

Изобретение относится к микробиологической промышленности, в частности к производству ферментов, и представляет собой новый штамм гриба *Rhizopus cohnii* Berl. et de Toni var. MF № 1393 - продуцент экзоплазмы, способным к гидролизу молочного жира, который может быть использован в молочно-жировой промышленности при переработке молока для производства биологически ценных массовых продуктов питания; для получения разнообразных композиций жирных кислот и их производных на основе растительных масел и животных жиров, в технологии сыроделия; для разработки кормовых добавок; при утилизации молочножировых отходов.

В связи с плохой усвояемостью молочного жира существует необходимость в повышении переваримости липидов молока (триглицеридов, фосфоглицеридов, сфингозидов).

Не вызывает сомнения актуальность получения низкокалорийных полиненасыщенных жиров на основе модификаций молочного жира, производства биологически ценных продуктов, особенно для детского и диетического питания, с различным набором формирующих их органолептические свойства жирных кислот [1].

Проблема утилизации жиробелковых отходов пищевой промышленности, в частности молокоперерабатывающей, содержащих до 90% (по сухому весу) жиров, неразрывно связано с защитой окружающей среды от антропогенных воздействий. В природных условиях период биodeградации жировых отходов естественным биоценозом длится около 10 лет. Микробиологическая очистка таких стоков с использованием ферментов и специализированных культур микроорганизмов обеспечит возможность перехода к созданию безотходных технологий в пищевой промышленности [2].

Гидролитическое расщепление пищевых жиров, в том числе молочного жира, и масел может происходить в результате активности как экзо-, так и эндолипаз микробного происхождения [3].

Роль липолиза заключается в образовании вкусо- и ароматообразующих компонентов - жирных кислот и их производных.

Действие специфических и неспецифических липаз микроорганизмов обуславливает набор выделяющихся свободных жирных кислот, что определяет органолептические свойства и биологическую ценность пищевых продуктов [4].

Задача изобретения - получение нового штамма гриба - продуцента экзоплазмы, способной к гидролизу молочного жира.

Поставленная задача решается тем, что в качестве продуцента липазы используется штамм гриба *Rhizopus cohnii* Berl. et de Toni var. MF № 1393.

Культура *Rhizopus cohnii* Berl. et de Toni var. MF № 1393 получена двухступенчатой физиологической адаптацией к субстрату известного штамма *Rhizopus cohnii* Berl. et de Toni № 61252 [5] с липолитической активностью культуральной жидкости (к. ж.) 600^{тм} 700 ед. мл путем отбора колоний, выросших на агаризованной минеральной среде, содержащей в качестве единственного источника углерода молочный жир. Наиболее активные варианты многократно пересеивались на среды, содержащие в качестве источника азота казеин, а в качестве источника углерода - молочный жир и жиросодержащие отходы заводского цеха до производству плавленых сырков.

Полученный новый вариант гриба, адаптированный к жировой (содержащей около 25% олеиновой кислоты) и белковой (представленной мицеллами казеина) частям молока [1], дает высокие показатели липолитической активности на оптимизированной питательной среде с казеином и растительным маслом.

В процессе роста на среде, содержащей казеин, штамм гриба *R. cohnii* var. MF № 1393, по-видимому, под действием собственных внутриклеточных протеаз расщепляет казеин до олигопептидов и аминокислот.

Экспериментально подтверждено отсутствие необходимости дополнительного внесения солей кальция и фосфора в среду для культивирования селекционированного варианта гриба, ввиду высокого содержания кальция и фосфора в самом казеине. Учитывая полученные результаты, разработана новая малокомпонентная среда, содержащая казеин и подсолнечное масло.

Одним из достоинств штамма является способность к образованию при культивировании на среде с казеином мицелиальных шариков - пеллет, что значительно упрощает отделение культуральной жидкости от биомассы.

На средах с соевой мукой - богатейшим источником азотистых веществ, содержащих до 40% белка и до 22% жира [6], величина липолитической активности культуральной жидкости и предлагаемого штамма составляет около 2500 ед/мл.

Использование *Rhizopus cohnii* Berl. et de Toni var. MF № 1393 в сыроделии позволит получить новые сорта сыра, сократить продолжительность его созревания, разработать новые грибные закваски, расширить круг традиционно применяемых агентов созревания сыров. За рубежом для изготовления мягких сыров (камамбер) и голубых сыров (рокфор) применяются микроскопические грибы - *Penicillium camemberti*, *Geotrichum candidum* и *P. roqueforti* [1,3, 7].

Весьма существенно и то, что молочнокислые бактерии, используемые в пищевой технологии, как правило имеют низкий уровень липолитической активности и эффективнее воздействуют на жир, уже подвергшийся частичному гидролитическому расщеплению.

Предварительное внесение ферментного препарата липазы грибного происхождения позволит обеспечить направленное стимулирование липолиза под действием ферментных систем молочнокислых бактерий. Как теперь установлено [1], продукты расщепления казеина - пептиды и аминокислоты - выполняют роль факторов роста для молочнокислых бактерий, участвующих в процессах созревания такого биологически ценного и высокопереваримого продукта, каким является сыр.

Перспективна также разработка кормовых добавок для животноводства с использованием предлагаемого штамма.

Что касается перспектив применения предлагаемого штамма для утилизации отходов пищевой промышленности, то при его культивировании на водопроводной воде с добавлением 5-10 об. % жиробелковых отходов заводского цеха по производству плавленых сыров, потребление их составило 50-70

% с уровнем накопления биомассы 16-20 г/л.

Биомасса, образующаяся в процессе безотходного производства препарата липазы и являющаяся богатым источником белка, витаминов, аминокислот, ненасыщенных жирных кислот, может быть использована в качестве кормовой добавки в животноводстве и звероводстве. Добавка биомассы в состав комбикормов улучшит переваримость и качество корма, заменит белок животного происхождения.

Культурально-морфологические свойства штамма.

На агаризованных питательных средах - сусло-агаре, картофельно-дрожжевом агаре при 37°C растет быстро, дает хорошее спороношение, образует колонии рыхловатые до низкопушистых, вначале серые, затем дымчато-серые. В зависимости от условий культивирования для гриба характерны две формы роста: диффузная (гифальный рост) и пелленная (рост в виде мицелиальных шариков).

Ризоиды хорошо выраженные, простые или слабо разветвленные, светло-коричневые.

Спорангиеносцы неразветвленные, прямые или слабо изогнутые, образуются на столонках, отходят по 1-3 от шейки ризоида или столонovidных гиф, 83-520 и 5-13 мкм. Спорангии 45-90 мкм в диаметре. Спорангиспоры эллипсоидальные, округлые, 4-6 мкм в диаметре, гладкие бледно-голубоватые. Хламидоспоры цилиндрические, шаровидные 15,6-21,3 · 10,1-15,4 мкм.

Штамм подвергнут рассеву с выделением моноконидиальной культуры.

Физиолого-биохимические свойства штамма.

Аэроб, гетеротроф, растет в широком диапазоне pH 2-9. В погруженной культуре на разработанных средах отличается низкой спорообразующей способностью. Гриб термотолерантный с температурными границами роста от 17 до 52°C. Оптимальная температура роста 40-45°C, биосинтез липазы 38-40°C, pH 6-7.

В качестве источников углерода усваивает глицерин, ксилоту, галактозу, глюкозу, фруктозу, маннозу, сорбозу, мальтозу, лактозу, декстрозу, сахарозу, крахмал, инулин, сорбит, маннит; этанол и метанол - слабо. Использует соевое, подсолнечное, рапсовое, оливковое, косточковое, кукурузное, хлопковое масла, маргарин, молочный и кашалотовый жиры.

Усваивает нитратный, нитритный, аммонийный азот, предпочтительнее - органический. Ассимилирует аминокислоты, мочевины, пептон, кукурузный экстракт. Дезаминирует триптофан, метионин, фенилаланин, лейцин.

Развитие штамма стимулируют дрожжевые автолизат и экстракт.

С помощью присущих грибу ферментативных систем он активно участвует в процессах расщепления казеина, соевого белка.

На среде с соевой мукой характер роста гриба диффузный, на среде с казеином наблюдается рост в виде пеллет.

Признаки штамма устойчивы. Штамм атоксичный, не подвержен лизису, устойчив к антибактериальным веществам, не продуцирует в неклеточную протеазу.

Культура обладает стабилизированной устойчивостью по активности фермента липазы.

Первый этап адаптации штамма к усвоению белково-жирового комплекса молока заключался в многократном пассировании исходного штамма на среде, содержащей в качестве источника азота казеин (1%), а в качестве источника углерода - подсолнечное масло (1%). Инокулят выращивали на среде следующего состава (%): вытяжка из пшеничных отрубей - 10,0; сахароза - 1,0; K₂HPO₄ - 0,2; KCl - 0,05; CaCO₃ - 0,05; MgSO₄ - 0,05; NH₄NO₃ - 0,03. В процессе десятикратных пересевов на указанную среду селекционирован вариант, адаптированный к белковой части молока, накапливающий биомассу в количестве 12,0 г абсолютно сухого вещества (а. с. в.)/л с липолитической активностью к. ж. 1200 ед/мл. Полученные показатели превышают таковые в сравнении со значениями у исходного штамма соответственно в 1,7 и 2,0 раза (табл. 1).

На втором этапе адаптации использовалась среда состава: казеин - 1 %, молочный жир - 1 %, водопроводная вода - остальное. В результате 10-кратных пересевов варианта, полученного на первом этапе адаптации к белковой части молока, селекционирован вариант, адаптированный к жировой части молока, накапливающий биомассу на уровне 14,4 г а. с. в./л с липолитической активностью культуральной жидкости 410 ед/мл (табл. 2).

Изобретение поясняется следующими примерами.

Пример 1. Культивирование продуцента экзоплазмы *Rhizopus cohmii* Berl. et de Toni var. MF №1393 проводят на качалках с 220-240 об/мин при 38-40°C на новой малокомпонентной среде состава, (%): казеин - 1,0; подсолнечное масло - 1,0; (величина pH после стерилизации 6,7 ± 0,1) по 150 мл в колбах емкостью 750 мл. Посев 5-ю процентами односуточного инокулята, полученного на молочной сыворотке с pH 6,0-6,4; длительность ферментации 52-56 час. Липолитическая активность к. ж. составляет 800-1000 ед/мл.

Пример 2. Культивирование продуцента производилось на качалках на среде, аналогичной примеру 1. Выращивание инокулята проводили на среде следующего состава (%): вытяжка из пшеничных отрубей - 10,0; сахароза - 1,0; K₂HPO₄ - 0,2; KCl - 0,05; CaCO₃ - 0,05; MgSO₄ - 0,05; NH₄NO₃ - 0,03. Липолитическая активность к. ж. составляет 1100-1300 ед/мл.

Пример 3. Культивирование осуществляют в ферментере на среде по примеру 1 при 38-40°C, аэрации 1 м³/м³ /мин, при работе мешалки с 250 об/мин, величина pH в пределах 6,0-7,0. Инокулят выращивают по примеру 2. Липолитическая активность к. ж. составляет 1300-1500 ед/мл.

Липолитическую активность определяли титрометрическим методом, модифицированным Ota Jamada (8), основанном на количественном определении свободных жирных кислот, образующихся в результате ферментативного гидролиза липидов. Липолитическая активность характеризует способность ферментного препарата катализировать расщепление эмульсии оливкового масла с образованием олеиновой кислоты и выражается числом единиц липазы в 1 г препарата. При этом за единицу активности принято такое количество фермента, которое омыляет 1 микромоляр (МКМ) олеиновой кислоты от 40%-ной эмульсии оливкового масла в 2%-ном водном растворе поливинилового спирта (ПВС) в стандартных условиях: температура 37°C, pH 7,0, время гидролиза 1 час.

Приготовление раствора ферментного препарата.

0,1 г исследуемого препарата тщательно растирают в небольшом количестве дистиллированной воды, затем количественно переносят в мерную колбу емкостью 100 мл, доводят водой до метки, перемешивают. Из этого раствора готовят ряд разведений в зависимости от предполагаемой активности препарата.

При определении активности культуральной жидкости (к. ж.) ее разводят таким образом, чтобы при титровании разность между опытным и контрольным титрованием находилась в пределах от 0,7 до 1,5 мл. Аналогично и для препарата.

Приготовление субстрата эмульсии оливкового масла.

100 мл оливкового масла и 150 мл 2%-ного водного раствора поливинилового спирта (ПВС) перемешивают в течение 10 мин в смесителе с числом оборотов не менее 8 тыс. об./мин. Полученную эмульсию выдерживают на холоду в течение часа. Если замечено расслаивание эмульсии, то перемешивание повторяют.

Приготовление раствора ПВС.

20 г ПВС суспендируют в 800 мл дистиллированной воды. Суспензию выдерживают в течение 30 мин при комнатной температуре, затем к суспензии добавляют 0,5 мл 1 н HCl или 2,5 мл н HCl, затем непрерывно перемешивают при 80-90°C в течение часа. ПВС полностью растворяется. Раствор охлаждают, pH раствора доводят до 7,0 раствором едкого натра. Затем объем раствора доводят до 1 л дистиллированной водой и фильтруют.

Приготовление буфера Мак-Ильвейна.

Буфер готовится из двухзамещенного фосфата натрия - Na_2HPO_4 и лимонной кислоты. Для приготовления буфера (pH 7,0) сливают 3,53 мл раствора А (0,1 М раствор лимонной кислоты, навеска 19,2 г) и 16,47 мл раствора В (0,2 М раствор $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, навеска 28,4 г).

Приготовление индикатора.

1 г фенолфталеина растворяют в 100 мл 96%-ного этилового спирта

Техника определения липолитической активности.

2,5 мл эмульсии и 2,0 мл буфера (pH 7,0) помещают в 100 мл коническую колбу, закрывают пробкой и термостатируют при 37°C в течение 10 мин. Затем к смеси добавляют 0,5 мл раствора фермента, перемешивают и, закрыв пробкой, ставят в термостат при 37°C на 1 час. По истечении времени реакции добавляют 15 мл этилового спирта для прекращения реакции гидролиза, 0,1 мл 1 %-ного раствора фенолфталеина. Затем смесь титруют 0,05 н и раствором едкого натра (едкого кали) до розовой окраски.

Параллельно ставят контроль, состоящий из 2,5 мл субстрата и 2,0 мл буфера, выдержанный при 37°C в течение часа. К смеси сразу добавляют 15 мл этилового спирта, а затем 0,5 мл раствора фермента и индикатор. Смесь титруют. Разность в титрах соответствует количеству жирных кислот, образовавшихся под действием липазы при гидролизе субстрата. Активность липазы (Л. А.) рассчитывают по формуле:

$$\text{ЛА} = \frac{a \times F \times 100}{b} \text{ ед/мл или ед/г,}$$

где а - разница между количеством щелочи, пошедшей на титрования опытного и контрольного растворов;

б - концентрация (г/мл) образца в растворе фермента или объем к. ж.;

F - коэффициент для щелочи;

100 - коэффициент перевода в макромоль олеиновой кислоты. За окончательный результат принимают среднее арифметическое двух параллельных определений.

Сравнительная характеристика исходного и адаптированного к белково-жировому комплексу штаммов представлена в табл. 3.

Данные табл. 3 свидетельствуют об адаптации исходного штамма к белково-жировому комплексу молока, получению варианта с повышенной липолитической активностью, высоким выходом биомассы, селекции нового штамма гриба *Rhizopus cohnii* Berl. et de Toni var. MF № 1393, способного к гидролизу молочного жира. Испытание предлагаемого штамма при гидролизе молочно-жировых отходов заводского цеха по производству плавленых сыров, содержащих до 87% жира (по сухому весу), показало возможность применения штамма в процессах утилизации белково-жировых стоков.

Т а б л и ц а 1

Показатели	Количество пересевов					
	0	2	4	6	8	10
Биомасса, г а.с.в./л	7,0	7,5	9,0	10,3	11,6	12,9
Липолитическая активность к.ж. ед/мл	400	450	640	820	1100	1200

Таблица 2

Показатели	Количество пересевов					
	0	2	4	6	8	10
Биомасса, г а.с.в./л	12,1	14,2	13,1	13,9	13,7	14,4
Липолитическая активность к.ж. ед/мл	160	230	180	390	380	410

Таблица 3

Пока. атели	Штамм	
	Исходный	Предлагаемый
Биомасса, г а.с.в./г на среде с казеином и подсолнечным маслом	11,2	12,9
Липолитическая активность к.ж., ед/мл (инокулят по примеру 1)	650	1200
Биомасса, г а.с.в./л на среде с казеином и молочным жиром	13,3	14,4
Липолитическая активность к.ж., ед/мл (инокулят по примеру 2)	140	400
Биомасса, г а.с.в./л на среде с отходами от производства сыров	16,5	18,8
Липолитическая активность к.ж., ед/мл (инокулят по примеру 2)	160	480