

**ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОЦЕСУ ВИДІЛЕННЯ ФЕРМЕНТІВ
ЦЕЛЮЛОЛІТИЧНОГО КОМПЛЕКСУ З КУЛЬТУРАЛЬНОЇ РІДИНИ
МІКРОМІЦЕТА *ASPERGILLUS SP. 262***

Є.О.Омельчук, Ю.Ю. Лапська

***Анотація:** проведені експериментальні дослідження одержання комплексного ферментного препарату целюлолітичної дії з культуральної рідини міцеліального гриба *Aspergillus sp. 262*. Встановлено, що ефективним способом виділення та часткової очистки целюлолітичних ферментних препаратів є дробне осадження сульфатом амонію.*

***Ключові слова:** целюлолітичні ферменти, *Aspergillus sp. 262*, дробне осадження*

Вступ. Відомо, що до ферментів целюлолітичного комплексу належать ферменти класу гідролаз – целюлази. Вони здійснюють гідроліз 1,4-глікозидних зв'язків в молекулі целюлози, таким чином призводячи до утворення глюкози або целобіози. Глибокий гідроліз високоупорядкованої форми целюлози здійснюється в результаті узгодженої дії поліферментної системи (целюлолітичного комплексу). Дія цього комплексу ферментів здійснюється в два етапи. На першому етапі відбувається руйнування надмолекулярної структури полісахариду, що здійснюється складними фізико-хімічними взаємодіями, важлива роль в яких відводиться адсорбції ферментів на целюлозі. Другий етап включає стадії хімічних перетворень частково розщепленої целюлози, що забезпечують її розклад до низькомолекулярних продуктів [2]. Згідно з Номенклатурою ферментів до целюлаз – ферментів целюлолітичного комплексу належать такі:

1. Ендоглюканаза – (1,4- β -D-глюкан-4-глюканогідролаза (КФ 3.2.1.4)). Даний фермент здатний невпорядковано гідролізувати у целюлозі β -1,4 зв'язки.
2. Екзоглюканаза – (1,4- β -D-глюкан-4-глюканогідролаза (КФ 3.2.1.74)) гідролізує 1,4-зв'язки в 1,4- β -D-глюканах. Послідовно відщеплюючи глюкозні залишки.
3. Целобіогідролаза (1,4- β -D-глюканцелобіо гідролаза (КФ 3.2.1.91)) відщеплює целобіозу з нередукуючого кінця целоолігосахаридів.
4. β -глюкозидаза (целобіаза, β -D-глюкозидглюко гідролаза (КФ 3.2.1.91)). Даний фермент здатний відщеплювати кінцеві не редукуючі залишки β -D-глюкози звільняючи при цьому молекули глюкози. Фермент може гідролізувати β -D-глюкозиди та целобіозу [2].

Мікроскопічні гриби продукують широкий спектр гідролітичних ферментів, до яких відносяться целюлази. Перспектива промислового використання базується на властивостях даного комплексу ферментів здійснювати гідроліз целюлози з утворенням глюкози. На сьогодні целюлолітичні ферментні препарати широко використовуються у тваринництві та птахівництві в якості добавок до кормів для підвищення їх поживної

цінності, а також для збереження продуктивності тварин. Рациональне використання ферментних препаратів призводить до прискореного накопичення низькомолекулярних продуктів в ШКТ тварин, що сприяє розвитку мікрофлори, інтенсифікації процесів мікробної ферментації кормів, і їх прискореному росту і розвитку. Технології по застосуванню целюлолітичних ферментів в текстильній промисловості базуються на розкладанні первинної стінки волокон і видалення з них різних видів забруднень. Широке застосування целюлази знайшли в технології відділення джинсових текстильних виробів. В результаті цього досягається ефект пом'якшення, збільшується інтенсивність зафарбовування. Тому, пошук нових продуцентів ферментів целюлаз і вивчення їх властивостей, які є важливими для технологічного використання, нині є досить актуальним [1, 3].

Методи досліджень. Застосовано методи мікробіологічного, фізико-хімічного та біохімічного аналізу.

Об'єктом дослідження був міцеліальний гриб штаму *Aspergillus* sp. 262 з колекції культур відділу фізіології та систематики мікроміцетів Інституту мікробіології і вірусології НАН України.

Для культивування *Aspergillus* sp. 262 використовували оптимізоване для одержання целюлаз середовище. Як джерело вуглецю використовували відходи сільського господарства – буряковий жом. Культивування здійснювали у колбах Ерленмейера об'ємом 750 мл за температури 40–42°C на качалках (частота обертання 220 об/хв).

Одержання посівної культури проходило в декілька етапів. Як посівний матеріал використовували суспензію конідій 2-тижневих культур продуцентів, вирощених на скошеному сусло-агарі. Густина посіву – 2×10^6 конідій в 1 мл. Відокремлення міцелію від культуральної рідини здійснювали центрифугуванням (центрифуга LU418 протягом 15 хв, частота обертання ротора – 3000 об/хв.). Ендоглюканазну активність визначали за допомогою віскозиметра Освальда ($d_{\text{капіляра}} = 0,99$ мм) за зниженням в'язкості 0,3%-вого розчину Na-КМЦ [5]. За одиницю ендоглюканазної активності у даному методі приймають таку кількість ферменту, котра у прийнятих умовах дослідження призводить до збільшення текучості (величини, оберненої до відносної в'язкості), що рівна 1 хв^{-1} . Екзоглюканазну активність визначали за адаптованою методикою Мандельса і Вебера, щодо мікроміцетів як об'єктів дослідження, засновану на принципі відновлення редукуючих цукрів (РЦ), з використанням розчину гексоціаноферату калію. Метод визначення екзоглюканазної активності є модифікацією метода Мандельса і Вебера [5], який заснований на визначенні швидкості ферментативної реакції гідролізу хроматографічного паперу за кількістю утворених редукуючих цукрів. За одиницю екзоглюканазної активності у даному методі пропонується приймати таку кількість ферменту, котра каталізує гідроліз хроматографічного паперу при 50°C, значенні рН 4,7, протягом 1 год, з утворенням 1 мкг редукуючих цукрів (РЦ) у перерахунку на глюкозу.

Фракціонування целюлолітичних ферментів шляхом осадження сульфатом амонію здійснювали наступним чином: 250 мл відцентрифугованої та

попередньо охолодженої до 0°C культуральної рідини ставили на магнітну мішалку та помалу додавали розрахований об'єм розчину сульфату амонію. Ступінь насичення одержаної суміші складає 30%. Одержану суміш на 30 хв вміщували у морозильну камеру, потім центрифугували на лабораторній центрифугі. Центрифугат зливали, охолоджували до 0°C і знову додавали розчин сульфату амонію, досягаючи ступеня насичення. Осад на дні центрифужного стаканчика розчиняли в 20 мл охолодженого 70%-го етилового спирту, охолоджували, центрифугували, фугат зливали, осад підсушували протягом 1 год, а потім розводили в 10 мл ацетатного буферу із рН 5,0. У ході роботи кількість сульфату амонію була виражена у відсотках насиченості. Білки із культуральної рідини фракціонували при ступенях насичення від 30 до 70% сульфату амонію в суміші, із кроком у 10%. У вихідній культуральній рідині та розчинах, що були отримані після осадження ферменту визначали кількість білку, ендо- та екзоглюканазну активність і вираховували ступені очистки ферменту.

Результати і обговорення. В результаті проведення дробного осадження культуральної рідини досліджуваного штаму *Aspergillus* sp. 262 були отримані фракції осадженого білку і визначено питому ендо- і екзоглюканазну активність в них (табл. 1).

Таблиця 1

Ендо- та екзоглюканазна активність у білкових фракціях, одержаних в результаті дробного висолювання культуральної рідини штаму *Aspergillus* sp. 262

Насичення культуральної рідини сульфатом амонію	Кількість білку у фракції, мг/мл	Ендоглюканазна активність		Екзоглюканазна активність	
		C _x A, од/мл	од/мг білку	Кількість РЦ, мкг/мл	од/мг білку
Вихідна культуральна рідина	1,754	0,26	0,148	38	0,022
0-30%	1,354	0,175	0,166	40	0,038
31-40%	0,304	0,108	0,355	39	0,128
41-50%	0,229	0,124	0,579	45	0,210
51-60%	0,054	0,305	5,259	21	0,362
61-70%	0,054	0,552	10,222	45	0,833
Повне насичення	1,754	0,11	1,618	17	0,250

Найвища питома ендо- та екзоглюканазна активність штаму *Aspergillus* sp. 262 спостерігалась у фракціях, отриманих при осадженні білків за 60%-го та 70%-го насичення культуральної рідини сульфатом амонію. Результати визначення активностей целюлолітичних ферментів (ендо- і екзоглюканази) осаджених за 30%-го, 40%-го та 50%-го насичення були значно гіршими, що, в цілому, корелює з літературними даними [2].

В процесі дробного осадження целюлолітичних ферментів із культуральної рідини було відокремлено 93,6% баластних білків із низькою ферментативною активністю, а на 6,4 % відібраних активних білків припадало 85% питомої ендоглюканазної та 65% питомої екзоглюканазної активності (рис. 1).

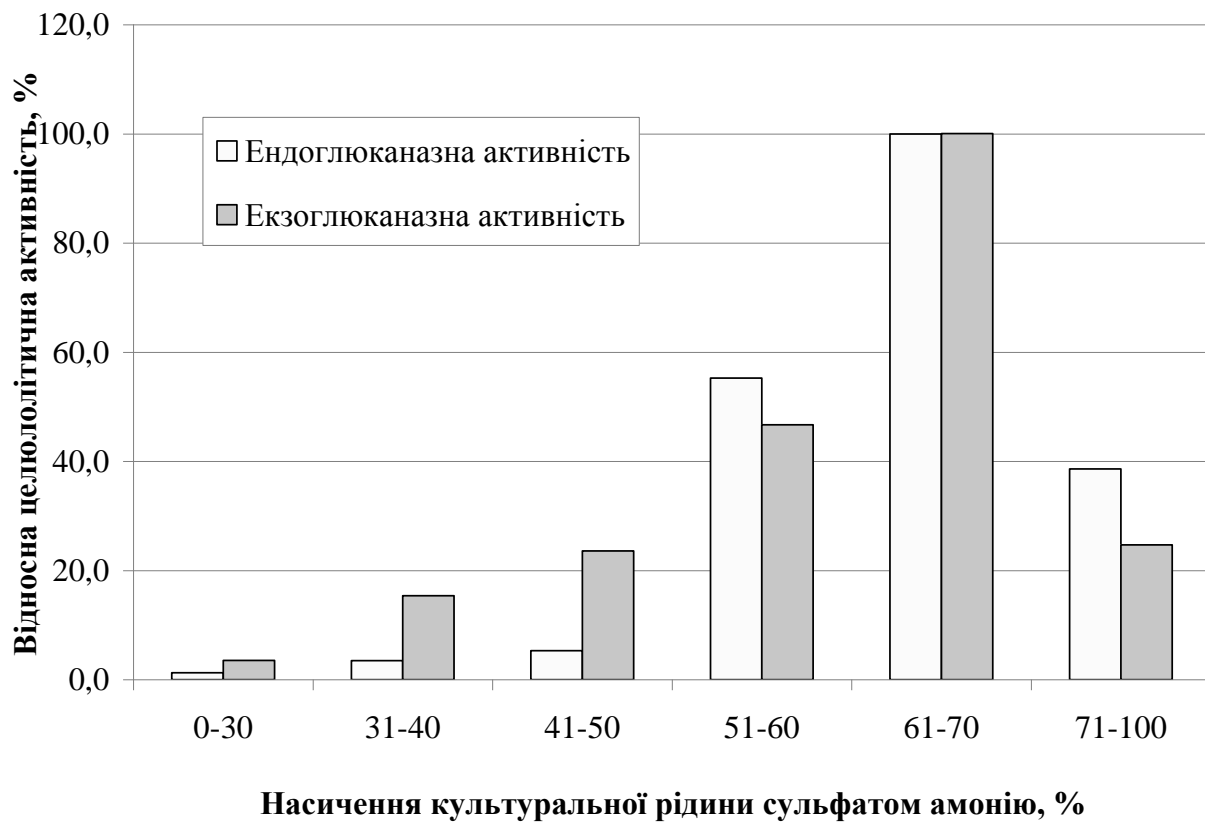


Рис. 1. Зміна показників ендо-та екзоглюканазної активності за дробного висолювання білків сульфатом амонію

Таким чином, дробне фракціонування дозволило не тільки вибірково відокремити, але і сконцентрувати і частково очистити комплексний ферментний препарат целюлолітичної дії з культуральної рідини мікроміцета *Aspergillus* sp. 262.

Висновки.

1. Для виділення та часткової очистки целюлолітичних ферментних препаратів слід застосовувати дробне осадження білків із культуральної рідини *Aspergillus* sp. 262.

2. Найповніше виділення фракції білків, які мають целюлолітичну активність, досягається за 60–70% насичення культуральної рідини сульфатом амонію.

3. Використовуючи для одержання ферментних препаратів дробне висолювання, можна за однакових витрат сульфату амонію (порівняно із процесом повного осадження білків солями) досягти значної очистки ферментного препарату від баластних білків.

Автори висловлюють щире подяку науковим консультантам: к.т.н., доценту кафедри біотехнології і мікробіології НУХТ Красінько Вікторії

Олегівні, к.б.н., старшому науковому співробітнику відділу фізіології та систематики мікроміцетів Інституту мікробіології та вірусології НАНУ Сирчину Сергію Олександровичу, к.б.н., науковому співробітнику відділу фізіології та систематики мікроміцетів Інституту мікробіології та вірусології НАНУ Айзенберг Вікторії Леонідівні

Література:

1. *Билай В.И.* Методы экспериментальной микологии: Справочник. – К.: Наукова думка, 2003. – 550 с.
2. *Грачова И.М., Кривова А.Ю.* Технология ферментных препаратов. – М.: Элевар, 2000. – 512 с.
3. *Кислухина О.В.* Ферменты в производстве пищи и кормов / О.В.Кислухина – М: ДеЛи принт, 2002. – С.77–79.
4. *Омельчук Є.О., Красінько В.О., Іванов О.О. та ін.* Скринінг продуцентів целлюлолітичних ферментів серед мезофільних та термотолерантних мікроміцетів // Харчова промисловість. – 2010. – №9. – С. 46–49.
5. *Ghose T.K.* Measurement of cellulase activities // Pure & Appl. Chem. – 2006. – Vol. 59, №2. – P. 257 – 268.

RESEARCH OF SALTING-OUT PROCESS OF COMPLEX FROM THE MIKROMICETS ASPERGILLUS SP. 262 CULTURAL MEDIUM

Evgen Omelchuk, Julia Lapska

National University of food technologies, Kyiv, Ukraine

*The experimental researches of complex enzymic preparation with cellulolytic action receiving from the cultural medium of mycelial mushroom *Aspergillus sp. 262* was held. It is shown that the effective method of selection and partial cleaning of cellulolytic enzymic preparations is the fractional precipitation with ammonium sulfate*

Keywords: *cellulolytic enzymes, *Aspergillus sp. 262*, the fractional precipitation*

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА ВЫДЕЛЕНИЯ ФЕРМЕНТОВ ЦЕЛЛЮЛОЛИТИЧЕСКОГО КОМПЛЕКСА ИЗ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ МИКРОМИЦЕТА *ASPERGILLUS SP. 262*

Е.А.Омельчук, Ю.Ю. Лапская

Национальный университет пищевых технологий, Киев, Украина

*Проведены экспериментальные исследования получения комплексного ферментного препарата целлюлолитического действия из культуральной жидкости мицелиального гриба *Aspergillus sp. 262*. Установлено, что эффективным способом выделения и частичной очистки целлюлолитических ферментных препаратов является дробное осаждение сульфатом аммония.*

Ключевые слова: *целлюлолитические ферменты, *Aspergillus sp. 262*, дробное осаждение*