

**УДК 663.15**

<sup>1</sup>Є.О. Омельчук, <sup>1</sup>Ю.Ю.Лапська, <sup>1</sup>В.О. Красінько, <sup>2</sup>В.Л. Айзенберг, <sup>2</sup>В.І.Стойко

<sup>1</sup>Національний університет харчових технологій, м. Київ

<sup>2</sup>Інститут мікробіології і вірусології НАН України, м. Київ

**АНАЛІЗ СУПУТНИХ ФЕРМЕНТАТИВНИХ АКТИВНОСТЕЙ У  
ТЕРМОТОЛЕРАНТНИХ ШТАМІВ МІКРОМІЦЕТІВ – ПРОДУЦЕНТІВ  
ЦЕЛЮЛОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ**

*Здійснено аналіз супутніх ферментативних активностей (полігалактуроназної, пектинестеразної, інуліназної) серед термотолерантних мікроміцетів різних таксономічних груп, які мають високу ендолюкканазну активність. Визначено штами мікроміцетів, які можна використовувати як потенційні продуценти целюлолітичних ферментних препаратів комплексної та спрямованої дії.*

**Ключові слова:** *термотолерантні мікроміцети, целюлаза, полігалактуроназа, пектинестераза, інуліназа.*

Мікроскопічні гриби мають здатність до синтезу широкого спектру гідролітичних ферментів, значна частина яких знаходить своє призначення у різноманітних галузях промисловості, сільському господарстві, медицині. Більшість із них виділяють у культуральну рідину спектр гідролаз із різною активністю. Та є штами мікроміцетів, які за певних умов виділяють лише один визначений фермент (або групу ферментів, які діють на один і той же субстрат), активність інших ферментів при цьому мізерно мала або взагалі відсутня. Такі штами мікроміцетів одержали назву моноферментних.

Целюлолітичні ферменти мають перспективи широкого застосування у біотехнології, харчовій, переробній та ряді інших напрямків промисловості де використовується рослинна сировина або відходи при переробці рослин [1].

Ферменти целюлолітичного комплексу використовуються у сільському господарстві, де вони разом з іншими гідролітичними ферментами-деполімеразами входять до складу мультиензимних комплексів, які в свою чергу використовують з метою підвищення поживності комбінованих кормів для сільськогосподарських тварин [2].

Досить перспективним напрямком застосування целюлолітичних ферментів є виробництво пектину, а саме попередня обробка даними ферментами пектиновмісної сировини. При цьому руйнується пектин-целюлозний комплекс клітинної стінки рослин, не впливаючи на пектинову молекулу, що призводить до кращого зберігання структури пектинових речовин та збільшення виходу пектинових речовин під час екстрагування [3]. Важливою вимогою до таких ферментних препаратів має бути відсутність пектиназної активності, оскільки пектиназа (полігалактуроназа), здійснюючи деполімеризацію пектинової молекули позбавляє її корисних властивостей (комплексоутворювальної та гелеутворювальної здатностей). Наявність у ферментному препараті пектинестеразної активності призводить до утворення в результаті гідролізу низькоетерифікованого пектину, який володіє кращою комплексоутворювальною здатністю [4].

Іншим перспективним напрямком є використання целюлаз спільно із інуліназами для ферментативного гідролізу інуліновмісної рослинної сировини з метою її комплексної переробки. Використання комплексних ферментних препаратів, які мають високу целюлазну та інуліназну активність, можуть вирішити дану проблему [5].

Отже, володіючи даними щодо супутньої ферментативної активності у потенційних продуцентів целюлолітичних ферментів стає можливим створення ферментних препаратів, які здійснюють спрямований гідроліз целюлози, не впливаючи на інші полісахариди рослинної тканини, або ж мультиензимних комплексів, які здійснюють деполімеризацію усіх компонентів рослинної сировини.

Об'єктами дослідження було 9 відібраних в результаті скринінгу по ендоглюканазній активності термотолерантних колекційних штамів мікроскопічних грибів із Української колекції мікроміцетів відділу фізіології та систематики мікроміцетів Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, які належать до родів *Aspergillus*, *Corynascus* та *Thielavia* [6].

Культивування мікроміцетів здійснювали на мінеральному поживному середовищі Чапека за Підоплічко ( $\text{NaNO}_3$  - 2 г/л,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 1 г/л,  $\text{MgSO}_4$  - 0,5 г/л,  $\text{KCl}$  - 0,5 г/л,  $\text{FeSO}_4$  - 0,01 г/л). Як індуктор та джерело вуглецю для дослідження полігалактурназної та пектинестеразної активності використовували буряковий жом, інуліназної – вичавки з топінамбура.

Культивування проводили в колбах на качалках (220 об/хв) за температури 42°C протягом 4 та 6 діб.

Ендополігалактуроназну активність (ПГА) визначали віскозиметричним методом, заснованим на гідролізі пектину досліджуваним ферментним препаратом із наступним контролем ступеня розщеплення за зниженням в'язкості субстрату за допомогою капілярного віскозиметра Освальда (діаметр капіляру 0,99 мм). За одиницю активності приймали таку кількість ферменту, який каталізує гідроліз 1 г пектину зі зниженням в'язкості розчину на 30 % за 1 хв при 30°C [7].

Пектинестеразну активність (ПЕА) визначали титриметричним методом, який заснований на визначенні вільних гідроксильних груп в 1%-му розчині високометоксильованого пектину до і після дії ферментного препарату. За одиницю активності пектинестерази приймали таку кількість ферменту, яка каталізує гідроліз 1 мікроеквівалента складноефірного зв'язку в молекулі пектину за 1 хв при температурі 30°C [7].

Інуліназну активність визначали за модифікованим методом Самнера, який заснований на принципі відновлення редуруючих цукрів динітросаліциловою кислотою з подальшим спектрофотометричним визначенням зміни інтенсивності забарвлення реакційної суміші. За одиницю інуліназної активності приймали

кількість ферменту, яка каталізує утворення 1 мкМ фруктози з інуліну за 1 хв у стандартних умовах проведення реакції ( $t=50^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH } 4,6$ ) [8].

Визначення кількості білка у фільтраті культуральної рідини здійснювали за методом Лоурі. Супутню ферментативну активність досліджуваних мікроміцетів перераховували як питому, в од/мг білку.

Результати визначення питомої полігалактуринознаї активності досліджуваних мікроміцетів наведена на діаграмі (рис.1)

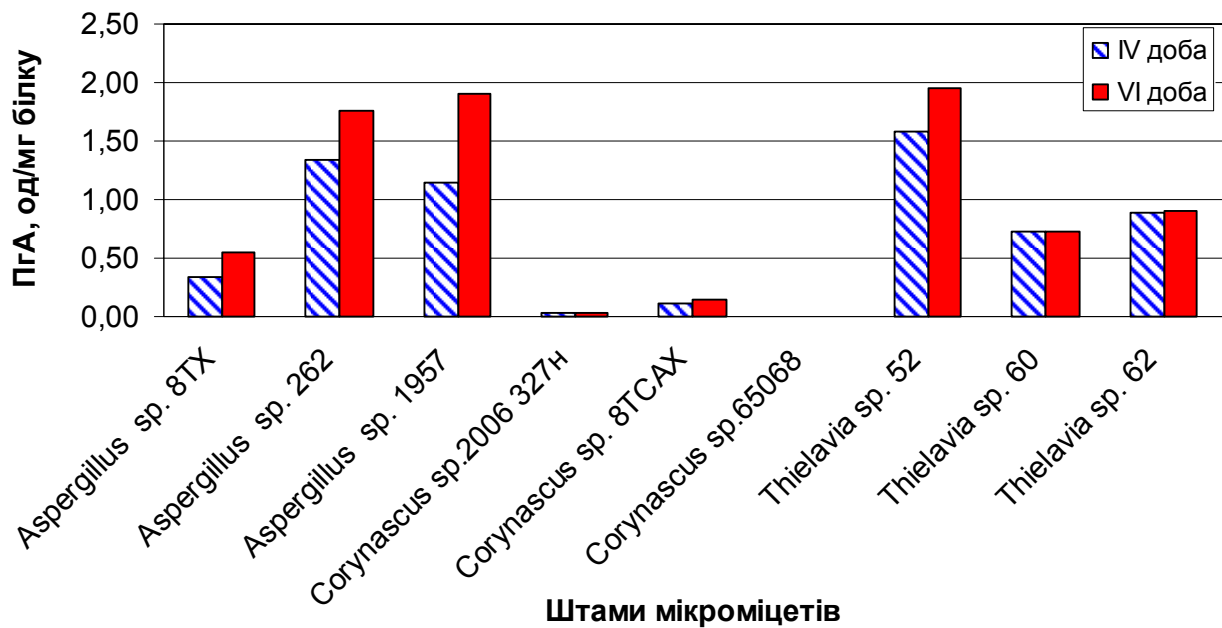


Рис. 1 Питома полігалактуринозна активність досліджуваних термотолерантних мікроміцетів

Найбільш активними продуцентами полігалактуринози виявились штами *Aspergillus sp. 262*, *Aspergillus sp. 1957* та *Thielavia sp. 52*. Незначна ферментативна активність спостерігалась і серед інших представників роду *Aspergillus* та *Thielavia*, натомість серед представників роду *Corynascus* полігалактуринозна активність була або повністю відсутньою, або мала слідові кількості.

Результати дослідження питомої пектинестеразної активності наведено на діаграмі (рис.2).

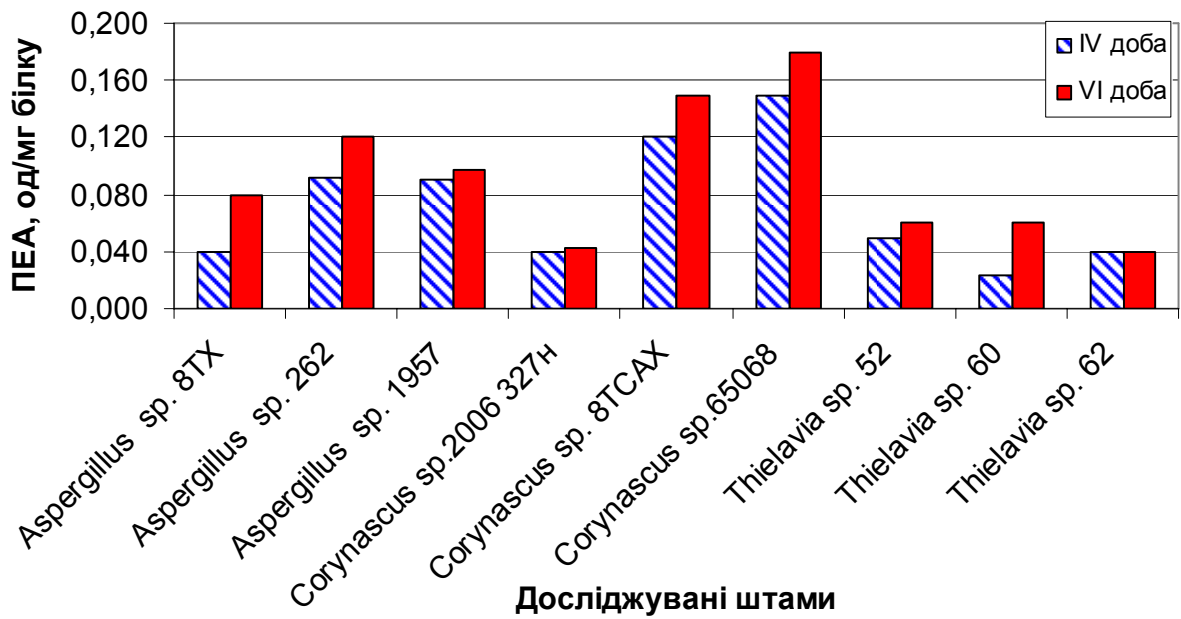


Рис. 2 Питома пектинестеразна активність досліджуваних термотолерантних мікроміцетів

Усі досліджувані мікроміцети певною мірою здатні до біосинтезу пектинестерази, але найбільш активними продуцентами є штами 8TCAH та 65068 роду *Corynascus*. Також значною питомою пектинестеразною активністю (понад 1 од/мг білку) володіє *Aspergillus* sp. 262.

Результати визначення питомої інуліназної активності наведено на діаграмі (рис.3).

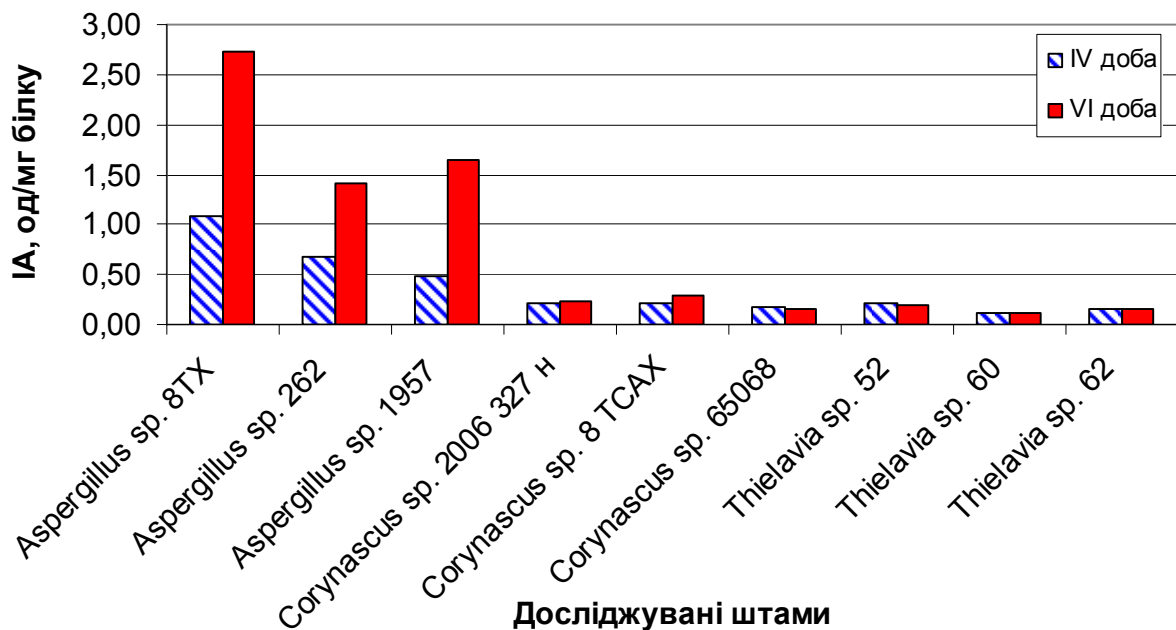


Рис. 3 Питома інуліназна активність досліджуваних термотолерантних мікроміцетів

Найбільш активними продуцентами інулінази серед досліджуваних термотолерантних мікроміцетів виявились усі представники роду *Aspergillus* (*Aspergillus sp.* 8TX, *Aspergillus sp.* 262 та *Aspergillus sp.* 1957), інші досліджувані штами мають незначну питому інуліназну активність, яка не перевищує 1 од/мг білку.

Високою полігалактуразнаю, пектинестеразнаю та інуліназнаю активністю володіють досліджувані штами роду *Aspergillus*, найбільш виражений комплексний склад ферментів спостерігали у штама *Aspergillus sp.* 262. Натомість серед представників роду *Corynascus* виявлено лише слідові кількості полігалактуразної та інуліназної активності, але більш проявлену пектинестеразну, тому їх можна застосовувати як перспективних продуцентів целюлолітичних ферментних препаратів спрямованої дії, які можна застосовувати для попередньої обробки пектиновмісної сировини.

### **Висновок**

Одержані результати дозволяють виявити серед досліджуваних мікроміцетів потенційних продуцентів целюлолітичних ферментних препаратів, які залежно від вмісту в них супутніх ферментативних активностей можна застосовувати для комплексного ферментативного гідролізу рослинної сировини у різних сферах переробної промисловості та сільського господарства та ферментативної передобробки пектиновмісної сировини з метою кращого виходу пектину під час гідролізу-екстрагування.

Штам *Aspergillus sp.* 262 крім високої ендо- та екзоглюканазної активності володіє збалансованим комплексом позаклітинних гідролітичних ферментів, здатних до деструкції різних рослинних полісахаридів, тому його можна застосовувати для створення комплексних ферментних препаратів.

Представників роду *Corynascus* доцільно використовувати для створення ферментних препаратів спрямованої дії, які можна застосовувати у ферментативній технології одержання пектину.

## Література

1. *Грачева И.М.* Технология ферментных препаратов / И.М.Грачева, А.Ю.Кривова // 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Элевар, 2000. – 512 с.
2. *Кирилов М.П.* Использование многокомпонентных ферментных препаратов в комбикормах для сельскохозяйственных животных [Методические рекомендации] / М.П.Кирилов, В.А.Крохина, В.Н.Виноградов и др. – Дубровцы: ВНИИ Животноводства, 2003. – 22 с.
3. *Єжов В.М.* Біотехнологічні основи виробництва білка і пектину з відходів переробки плодів та винограду / В.М.Єжов, Г.Г.Валуйко, О.С.Луканін, І.Р.Клечак. – К.: Урожай, 1993. – 120 с.
4. *Донченко Л.В.* Пектин: основные свойства, производство и применение [монографія]/ Л.В. Донченко, Г.Г. Фирсов – М.: ДеЛи принт, 2007. – 276 с.
5. *Емелина Т.Н.* Комплексная переработка вегетативной части топинамбура с получением продуктов микробного синтеза: дис... кандидата техн. наук: 05.21.03 / Емелина Татьяна Николаевна. – Красноярск., 2003. – 121 с.
6. *Омельчук Є.О.* Скринінг продуцентів целюлолітичних ферментів серед мезофільних та термотолерантних мікроміцетів / Є.О.Омельчук, В.О.Красінько, О.О.Іванов та ін.// Харчова промисловість. – 2010. – №9. – С. 46–49.
7. *Полыгалина Г.В.* Определение активности ферментов [Справочник] / Г.В.Полыгалина, В.С.Чередниченко, Л.В.Римарева – М.: Делипринт, 2003. – 375 с.
8. *Айзенберг В.Л.* Методика количественного определения активности грибной инулиназы с использованием реактива Самнера / В.Л. Айзенберг, В.И. Стойко, Е.А. Демиденко и др. // Биотехнология. – 2007. – № 5. – С. 95–96.

**Е.А. Омельчук, Ю.Ю. Лапская, В.О. Красинько,**

**В.Л.Айзенберг, В.И. Стойко**

**АНАЛИЗ СОПУТСТВУЮЩИХ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ АКТИВНОСТЕЙ  
СРЕДИ ТЕРМОТОЛЕРАНТНЫХ ШТАМОВ МИКРОМИЦЕТОВ –  
ПРОДУЦЕНТОВ ЦЕЛЛЮЛОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ**

Был проведен анализ сопутствующих ферментативных активностей (полигалактуроназной, пектинэстеразной, иннулиназной) среди термотолерантных микромицетов разных таксономических групп, которые имеют высокую эндоглюканазную активность. Определены штаммы микромицетов, которые возможно использовать в качестве потенциальных продуцентов целлюлолитических ферментных препаратов комплексного и направленного действия.

*Ключевые слова:* термотолерантные микромицеты, целлюлаза, полигалактуроназа, пектинэстераза, иннулиназа.

**E.Omelchuk, J.Lapska, V.Krasinko,**

**V.Aisenberg, V.Stoiko**

**THE ANALYSIS OF THE RELATED ENZYMATIC ACTIVITIES AMONG  
TERMOTOLERANCE MICROMICETES STAINS - CELLULOSOLITIC  
ENZYMES PRODUCERS**

The analysis of the related enzymatic activities ( poligalacturonase, pectinesterase, inulinase) among termotolerance micromicetes of the different taxonomic groups that have high endoglucanase activity was carried out. Stains, that can be used as a potential of cellulolytic enzymes that have complex and directional activity were defined.

*Key words:* termotolerance micromicetes, cellulase, poligalacturonase, pectinesterase, inulinase.