

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

**Омельчук Євген Олександрович**

**УДК 663.15:577.152.321+664.292**

**БІОТЕХНОЛОГІЯ ЦЕЛЮЛОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТНИХ ПРЕПАРАТІВ  
ТЕРМОТОЛЕРАНТНИХ МІКРОМІЦЕТІВ РОДІВ *ASPERGILLUS* І  
*CORYNASCUS***

*03.00.20 – біотехнологія*

**АВТОРЕФЕРАТ**  
**дисертації на здобуття наукового ступеня**  
**кандидата технічних наук**

**Київ – 2016**

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі біотехнології і мікробіології Національного університету харчових технологій Міністерства освіти і науки України та у відділі фізіології і систематики мікроміцетів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного Національної академії наук України.

**Науковий керівник:** кандидат технічних наук, доцент **Красінько Вікторія Олегівна**, Національний університет харчових технологій, доцент кафедри біотехнології і мікробіології

**Офіційні опоненти:** доктор технічних наук, доцент **Голуб Наталія Борисівна**, Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут», професор кафедри екобіотехнології та біоенергетики

доктор сільськогосподарських наук, професор **Мерзлов Сергій Віталійович**, Білоцерківський національний аграрний університет, завідувач кафедри харчових технологій та переробки продукції тваринництва

Захист відбудеться “19” травня 2016 р. об 11.00 год на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.058.03 Національного університету харчових технологій за адресою: м. Київ, 01601, вул. Володимирська, 68, аудиторія А-311.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національного університету харчових технологій за адресою: м. Київ, 01601, вул. Володимирська, 68.

Автореферат розісланий 8 квітня 2016 р.

Учений секретар  
спеціалізованої вченої ради

Н.О. Бублієнко

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Целюлолітичні ферменти мають перспективи широкого застосування у біотехнології, харчовій, переробній та ряді інших галузей промисловості, де використовується рослинна маса або відходи від переробки рослин. Целюлоза рослинної біомаси являє собою практично невичерпне джерело поновлюваної сировини, що може бути конвертована ферментативним шляхом у глюкозу. У свою чергу, глюкоза є незамінним компонентом поживних середовищ для мікробіологічних процесів одержання рідких і газоподібних видів палива (етанолу, бутанолу, етилену тощо), органічних і амінокислот, кормового білку й багатьох інших корисних продуктів мікробіологічного синтезу. На відміну від викопних видів палива, біоетанол та інші види палива з поновлюваної рослинної сировини не призводять до накопичення вуглекислого газу в атмосфері, тобто є CO<sub>2</sub>-нейтральними, що є надзвичайно важливим з огляду на запобігання виникненню глобального парникового ефекту. Останнім часом велику популярність набуває використання целюлолітичних ферментів саме у технологіях одержання альтернативних джерел енергії (біоетанолу, біогазу тощо) з целюлозовмісної сировини [Dunnet, 2008; Louime, 2008].

Мультиферментні комплекси, які містять целюлолітичні, амілолітичні та ряд інших ферментів, що каталізують лізис клітинної стінки рослин, можуть застосовуватися для біодеградації целюлозо- і геміцелюлозовмісних субстратів, у тому числі відходів промисловості й сільського господарства, а також у харчовій і спиртовій промисловості, у пивоварінні, входять до складу комбінованих кормів для сільськогосподарських тварин [Enzymes..., 2010]. Тому відбір і всебічне вивчення промислово важливих продуцентів целюлолітичних ферментів є актуальним і значущим напрямом наукових досліджень.

Україна має необмежені запаси целюлозовмісної сировини, однак наявні в країні біотехнології одержання целюлаз не відповідають сучасним вимогам ринку й багато в чому не є конкурентоздатними порівняно із закордонними аналогами. У зв'язку із цим існує необхідність створення нових ефективних вітчизняних технологій виробництва й використання недорогих, але ефективних целюлолітичних ферментів.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота включає дослідження, виконані згідно плану науково-дослідних робіт кафедри біотехнології і мікробіології Національного університету харчових технологій за темою «Розробка високоефективних ресурсозберігаючих біотехнологій з метою їх впровадження у мікробіологічну, фармацевтичну та харчову промисловість» (2006-2010, 2011-2015 р.р.) та напрямком науково-дослідної роботи Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного в рамках цільової комплексної програми наукових досліджень НАН України «Біомаса як паливна сировина» («Біопалива») за проектом «Мікроскопічні гриби як ефективні біодеструктори різноманітних рослинних субстратів» (2008-2009 р.р., № держреєстрації 0107 U 010053).

**Мета і задачі дослідження.** Метою роботи було розроблення технології одержання технічних целюлолітичних ферментних препаратів грибного

походження, вивчення їх фізико-хімічних властивостей та дослідження ефективності практичного застосування даних ферментних препаратів.

Згідно поставленої мети в процесі досліджень необхідно було виконати такі задачі:

- провести багатоступеневий скринінг серед мікроміцетів різних таксономічних груп з метою виявлення активних продуцентів ферментів целюлолітичного комплексу та дослідити здатність відібраних мікроміцетів до біосинтезу целюлолітичних ферментів за умови росту на природних целюлозовмісних субстратах, які класифікуються як відходи сільськогосподарського та промислового виробництва;
- дослідити здатність відібраних мікроміцетів до біосинтезу супутніх гідролітичних ферментів, здатних розкласти пектин;
- підібрати оптимальний склад поживного середовища та умови культивування для максимального біосинтезу целюлолітичних ферментів;
- одержати технічні целюлолітичні ферментні препарати;
- дослідити фізико-хімічні властивості ендоглюканази, які входять до складу целюлолітичних комплексів відібраних мікроміцетів;
- розробити технологію одержання рідкого та сухого целюлолітичних ферментних препаратів;
- підібрати оптимальні умови обробки одержаними ферментними препаратами пектиновмісної сировини з метою підвищення виходу пектину;
- розробити нормативно-технічну документацію для одержання пектину із застосуванням розроблених целюлолітичних ферментних препаратів;
- обґрунтувати економічну доцільність застосування целюлолітичних ферментних препаратів у технології одержання яблучного пектину.

Об'єктами дослідження були колекційні штами мікроскопічних грибів з Української колекції мікроміцетів, у тому числі відібрані в результаті ступеневого скринінгу продуценти ендоглюканази *Aspergillus* sp. 262 та *Corynascus* sp. 2006 327 н.

Предметом дослідження було вивчення умов біосинтезу целюлолітичних ферментів, підбір складу поживного середовища та умов культивування продуцентів для підвищення виходу позаклітинних ендо- та екзоглюканази, виділення та часткове очищення ферментів целюлолітичного комплексу, вивчення їх фізико-хімічних властивостей та сфери застосування.

**Методи дослідження.** Поставлені задачі були виконані з використанням біотехнологічних (культивування мікроорганізмів), мікробіологічних (визначення морфолого-культуральних та фізіолого-біохімічних ознак відібраних мікроміцетів), фізико-хімічних (висолювання білків та ультрафільтрація культуральної рідини, визначення виходу, молекулярної маси та ступеня етерифікації пектину), біохімічних (визначення спектру ферментативних активностей, температурного та рН-оптимуму і стабільності ендоглюканази) та математичних (статистична обробка результатів досліджень та підбір оптимального складу поживного середовища за допомогою плану Плакета-Бармана) методів дослідження.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Селекціоновано

термотолерантні продуценти целюлолітичних ферментів *Aspergillus* sp. 262 та *Corynascus* sp. 2006 327н і обґрунтована залежність впливу компонентного складу целюлозовмісних відходів сільського господарства та промисловості на рівень біосинтезу целюлаз.

Для промислового одержання термостабільних целюлолітичних ферментних препаратів вперше запропоновано спосіб дробного висолювання сульфатом амонію.

Теоретично обґрунтована та експериментально доведена ефективність обробки яблучних вичавок термостабільними целюлолітичними ферментними препаратами на стадії гідратації пектиновмісної сировини з метою підвищення виходу яблучного пектину.

**Практичне значення одержаних результатів.** Розроблена науково-обґрунтована технологія одержання рідкого та сухого целюлолітичних ферментних препаратів з *Corynascus* sp. 2006 327н.

Розроблена тимчасова технологічна інструкція на виробництво пектину з сировини, обробленої термостабільними целюлолітичними ферментними препаратами. Встановлені технологічні умови одержання пектину дозволять підвищити вихід пектину з яблучних вичавок до 13...14%, замість можливих раніше 8%.

Запропонована технологія одержання яблучного пектину була апробована в напіввиробничих умовах у ТОВ «Продсервіс-ІР» (Київська обл., с. Михайлівка-Рубежівка). Вихід пектину становив 142 кг з однієї тони яблучних вичавок, що на 47 % перевищує вихід пектину за традиційною технологією одержання.

Впровадження запропонованих технологічних режимів дозволить знизити собівартість пектину на 21,2%.

**Особистий внесок здобувача.** Робота виконана автором особисто на кафедрі біотехнології і мікробіології Національного університету харчових технологій, а також у відділі фізіології та систематики мікроміцетів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України; у плануванні експерименту брали участь ст.н.с., к.б.н. Айзенберг В.Л. та ст.н.сп., к.б.н. Сирчин С.О., які є співавторами наукових публікацій.

Дослідження по використанню ферментних препаратів у виробництві пектину були проведені у лабораторії дослідження фізико-хімічних властивостей пектину НУХТ.

Автор особисто брав участь у плануванні експериментів, провів скринінг серед мезофільних та термотолерантних мікроміцетів на предмет синтезу целюлолітичних ферментів та дослідив вплив різних целюлозовмісних субстратів на біосинтез целюлаз і супутніх ферментів відібраними мікроміцетами. Автором особисто досліджено культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні ознаки відібраних культур, підібрано для них оптимальні умови культивування для максимального синтезу целюлолітичних ферментів, досліджено способи одержання технічних ферментних препаратів та фізико-хімічні властивості ендоглюканаз, які входять до їх складу. Планування напрямів роботи, обговорення результатів роботи та їх підготовка їх до

опублікування здійснювалось за безпосередньої участі наукового керівника к.т.н., доц. Красінько В.О.

**Апробація результатів дисертації.** Результати досліджень доповідались та обговорювались на Міждисциплінарному мікологічному форумі (Москва 2009, 2010), Науково-практичній конференції «Біологічно активні речовини: фундаментальні та прикладні питання отримання та застосування» (Новий Світ 2009, 2011), Всеукраїнській конференції студентів та молодих науковців «Біологічні дослідження молодих учених в Україні» (Київ 2009), Міжнародній молодіжній науковій конференції «Планета – наш дом» (Алчевськ 2011), Всеросійському симпозіумі «Биологически активные вещества микроорганизмов: прошлое, настоящее, будущее» (Москва, 2011), Міжнародній науковій конференції «Микробиологическая биотехнология – наукоемкое направление современных знаний» (Кишинів, 2011), школі-конференції молодих вчених «Біосистема: від теорії до практики» (Пушино, 2012, 2013), Міжнародній науково-практичній конференції «Перспективные разработки науки и техники» (Перемишль, 2012), конференції молодих вчених «Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів» (Київ 2012), Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія XXI століття» (Київ 2012), VIII міжнародній конференції «DaRostim 2012. Мікробні біотехнології: актуальність і майбутнє» (Київ, 2012), III Всеукраїнській науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених "Техногенно-екологічна безпека України: стан та перспективи розвитку" (Ірпінь, 2013), Всеросійській науково-практичній конференції з міжнародною участю, присвяченій 85-річчю проф. Е.Н. Дормідонтова «Актуальные вопросы медицинской науки» (Ярославль, 2013), Міжнародному науковому форумі «Пищевые инновации и биотехнологии» (Кемерово, 2013), XIII з'їзді Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського (Ялта, 2013), Другому північному та східно-європейському конгресі з харчової науки «NEEFood-2013» (Київ, 2013).

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 35 наукових робіт, з них 7 статей (з них 5 - у фахових виданнях, 1 - у закордонному науковому виданні) та 28 тез доповідей.

**Структура та обсяг роботи.** Дисертаційна робота викладена на 169 сторінках друкованого тексту і складається з таких структурних частин: «Вступ», «Огляд літератури» (1 розділ), «Експериментальна частина» (5 розділів), «Висновки», «Список використаної літератури», який містить 269 посилань (з них 210 іноземних авторів). Робота містить 14 таблиць, 55 рисунків та 3 додатки.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

### Розділ 1 Огляд літератури

Огляд літератури складається з 5 підрозділів. В огляді висвітлено основні відомості щодо будови та хімічного складу рослинної клітинної стінки, класифікації, основних фізико-хімічних властивостей, особливостей будови та механізму дії целюлолітичних ферментів, технологій одержання та основних галузей застосування ферментів целюлолітичного комплексу.

### Розділ 2 Матеріали і методи досліджень

**Матеріали досліджень.** Відібрані в результаті ступеневого скринінгу штами термотолерантних мікроміцетів *Aspergillus* sp. 262 та *Corynascus* sp. 2006 327н.

**Культивування досліджуваних мікроміцетів.** В процесі ступінчатого скринінгу активних продуцентів целюлолітичних ферментів культивування здійснювали в умовах лімітації джерела вуглецю на мінеральному поживному середовищі Чапека за Підоплічко (г/дм<sup>3</sup>): нітрат натрію – 2, дигідрофосфат калію – 1, сульфат магнію – 0,5, хлорид калію – 0,5, сульфат заліза – 0,01.

На першому етапі скринінгу як джерело вуглецю використовували смужку фільтрувального паперу, розміром 10×80 мм. Культивування проводили протягом 21 доби в стаціонарних умовах, оцінку росту проводили візуально, згідно стандартної методики [Білай, 1982].

На другому етапі скринінгу культивування здійснювали в пробірках (d = 20 мм) на качалках (частота обертання – 220 об/хв) за температури 28°C (мезофільні мікроміцети) чи 42°C (термотолерантні мікроміцети) впродовж 4 та 6 діб на аналогічному мінеральному поживному середовищі та подрібненому на млині фільтрувальному папері, як єдиному джерелі енергії, вуглецю та індукторі целюлаз.

На третьому етапі скринінгу відібрані мікроміцети культивували на таких природних і модифікованих целюлозовмісних субстратах: мікрокристалічна целюлоза Авіцел, Na-КМЦ, вівсяна солома, листя та стебло соняшника, листя та стебло кукурудзи, стрижні початків кукурудзи, лушпиння соняшника, буряковий жом, опале листя, деревна тирса.

Середовище Чапека-Підоплічко з додаванням подрібненого фільтрувального паперу використовували як базове для підбору поживних середовищ. Склад середовищ розробляли для кожного штаму окремо, варіюючи за джерела вуглецевого, азотного та фосфорного живлення; досліджували вплив кожного з компонентів та оптимізували склад поживного середовища, використовуючи метод планування за Плакетом-Барманом.

Для встановлення оптимальних умов біосинтезу целюлолітичних ферментів селекціоновані штами *Aspergillus* sp. 262 та *Corynascus* sp. 2006 327н вирощували у колбах Ерленмейера об'ємом 750 мл при температурі 25, 30 та 42°C, об'ємі поживного середовища 100, 150 та 200 мл, швидкості обертання качалки 160 і 220 об/хв. Для засіву ферментаційного середовища як посівний матеріал використовували двохтижєву культуру мікроміцетів, вирощену на сусло-агарі з наступним пересіванням на підібрані поживні середовища через 1, 2, 3, 4 та 5 діб культивування інокуляту. Посівний матеріал вносили з

розрахунку 5, 10 і 15% до об'єму поживного середовища.

Культуральну рідину відокремлювали від міцелію фільтруванням, а на стадіях одержання ферментного препарату – центрифугуванням на лабораторній центрифугі LU-418 протягом 15 хв та частоті обертання ротора 3000 об/хв.

**Визначення активності ферментів целюлолітичного комплексу.**

Ендоглюканазну активність визначали віскозиметричним способом за здатністю ферменту знижувати в'язкість 0,3%-го розчину натрієвої солі карбоксиметилцелюлози (Na-КМЦ з ступенем заміщення 65,3 і ступенем полімеризації 347). Екзоглюканазну активність визначали спектрофотометрично за методом Мендельса-Вебера. За одиницю екзоглюканазної активності у даному методі приймали таку кількість ферменту, котра каталізувала гідроліз хроматографічного паперу за температури 50°C, значенні рН 4,7, протягом 1 год, з утворенням 1 мкмоль редуруючих цукрів у перерахунку на глюкозу.

**Визначення супутніх ферментативних активностей.** Ендополігалактураназну активність визначали віскозиметрично у віскозиметрі Освальда ( $d=0,73$  мм) [Польгалина, 2003]. Пектинестеразну активність визначали титриметрично [Польгалина, 2003].

**Виділення та очищення целюлолітичних ферментів** здійснювали шляхом фракційного осадження фугату культуральної рідини сульфатом амонію та ультрафільтрацією. Білки із фугату культуральної рідини фракціонували сульфатом амонію за ступенів насичення від 30 до 80% із кроком у 10%. На другому етапі відбір фракцій білків здійснювали за ступенів насичення  $\pm 5\%$ , від ступеня насичення фракцій, де була виявлена висока ферментативна активність на першому етапі.

Ультрафільтрацію проводили в установці непроточного типу Amicon 8200 (Millipore, США) при робочому тиску 300 кПа. У роботі використовували полісульфонові мембрани з cut off 10, 30, 50 та 100 кДа виробництва Microdun Nadir (Німеччина).

**Вплив температури та рН на активність та стабільність ендоглюканаз.** Оптимальні температурні умови активності ендоглюканаз з *Aspergillus sp.262* та *Corynascus sp. 2006* визначали за стандартних умов проведення реакції в діапазоні температур 40...90°C з інтервалом 10°C. Дослідження впливу рН на активність ендоглюканаз здійснювали в межах рН 4,0-8,0 з інтервалом 1,0. Термостабільність визначали інкубуванням ферментного розчину протягом 30, 60, 90, 120, 150 та 180 хв у діапазоні температур 40...90°C з інтервалом 10°C з наступним визначенням ендоглюканазної активності в стандартних умовах. рН-стабільність визначали інкубуванням ферментного розчину при 40°C, протягом 30, 60, 90, 120, 150 та 180 хв та значеннях рН 4,0...8,0 з інтервалом 1,0 з наступним визначенням ендоглюканазної активності в стандартних умовах.

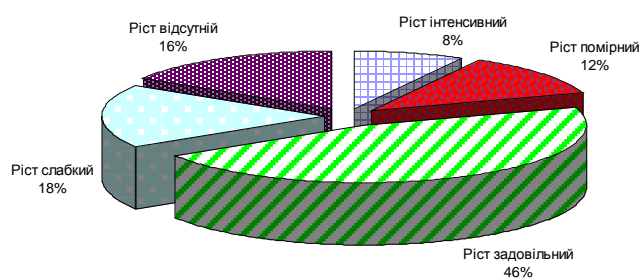
**Ферментативна обробка яблучної пектиновмісної сировини, виділення пектину та аналіз його фізико-хімічних показників.** Обробку яблучних вичавок на стадії гідратації здійснювали протягом 3 годин розчинами, які

містили 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 та 0,5 % ферментного препарату у перерахунку на масу пектиновмісної сировини. Гідроліз-екстрагування пектину здійснювали соляною кислотою за таких умов: рН 1,8...2,2, гідромодуль 1:3, температурі 75...80°C, протягом 90 хв, за періодичного перемішування. Пектин осаджували з екстракту за допомогою етилового спирту, промивали, висушували та визначали такі фізико-хімічні показники: вихід пектину, молекулярна маса та ступінь його етерифікації.

**Математичні методи досліджень.** Для визначення впливу компонентів поживного середовища на біосинтез целюлолітичних ферментів використовували семифакторний план Плакета-Бармана. Усі експерименти проводили у трьох повторностях, результати були статистично проаналізовані за допомогою програм Minitab 16 та Microsoft Office Excel. Достовірність результатів досліджень оцінювали згідно критерія Ст'юдента при 5%-му рівні значущості.

### Розділ 3 Ступеневий скринінг мікроміцетів – продуцентів целюлолітичних ферментів.

Відбір активних продуцентів целюлолітичних ферментів проводили серед колекційних штамів різних видів мікроскопічних грибів із Української колекції мікроміцетів відділу фізіології та систематики мікроміцетів Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, які були виділені із різноманітних субстратів природного та антропогенного походження. Загалом у дослідженні було використано 138 штамів 44 видів 23 родів мікроміцетів. В результаті першого етапу скринінгу було відібрано 11 штамів мезофільних та 17 штамів термотолерантних мікроміцетів, які належать до родів *Aspergillus* (3 штами), *Chaetomium* (1 штама), *Chrysosporium* (1 штама), *Coprinus* (1 штама), *Corynascus* (4 штами), *Emericella* (2 штами), *Fusarium* (10 штамів), *Humicola* (1 штама), *Melanocarpus* (1 штама) та *Thielavia* (4 штами) Відсотковий розподіл здатності мікроорганізмів до росту на фільтрувальному папері наведено на рисунку 1.



**Рисунок 1 - Здатність мікроміцетів різних таксономічних груп до росту на фільтрувальному папері**

Критерієм відбору штамів на другому етапі була ендоглюканазна активність культуральної рідини мікроміцетів понад 5 од/мл. В результаті було відібрано 9 штамів, які належать до родів *Aspergillus*, *Corynascus* та *Thielavia*. Крім ендоглюканазної (СМС), була виміряна і екзоглюканазна (FPA) активність відібраних мікроміцетів, а також проведена оцінка їх росту на фільтрувальному папері (табл. 1).

Відібрані мікроміцети культивували на целюлозовмісних субстратах природного походження, які розповсюджені на території України, частина з яких є відходами сільського господарства та переробної промисловості.

Залежно від походження лігноцелюлозні субстрати були розподілені на

такі групи: первинні відходи сільського господарства (вівсяна солома, стебло і листки кукурудзи та соняшника, стрижні качанів кукурудзи); відходи лісового господарства (деревна тирса, опале листя); вторинні відходи сільського господарства (буряковий жом, соняшникове лушпиння).

Спочатку перевіряли здатність досліджуваних целюлозовмісних субстратів до індукції ендоглюканази і в тому разі, якщо виявляли високу ендоглюканазну активність відібраних мікроміцетів, перевіряли також їх екзоглюканазну активність.

**Таблиця 1 – Відібрані мікроміцети – активні продуценти целюлолітичних ферментів**

Штам мікроміцету*	Ріст на ФП, бали	СМС, од/мл	ФРА, од/мл	Місце виділення
<i>Aspergillus</i> sp. 8ТХ	4	6,2	0,345	Грунт, м. Саки, АР Крим
<i>Aspergillus</i> sp. 262	5	9,7	0,325	Грунт, м. Саки, АР Крим
<i>Aspergillus</i> sp. 1957	4	8,1	0,195	Грунт, м. Лисичанськ, Луганська обл.
<i>Corynascus</i> sp. 2006 327н	5	9,3	0,28	Грунт, завод „Запоріжсталь”, м. Запоріжжя, Запорізька обл.
<i>Corynascus</i> sp. 8 ТСАХ	5	5,4	0,19	Корокомпост, целюлозно-паперовий комбінат, м. Чехов, Сахалінська обл.
<i>Corynascus</i> sp. 65068	5	5,1	0,275	Грунт, с. Прохорівка, Черкаська обл.
<i>Thielavia</i> sp. 52	5	5,3	0,19	Піщаний грунт, Ізраїль
<i>Thielavia</i> sp. 60	5	5,2	0,255	Піщаний грунт, Ізраїль
<i>Thielavia</i> sp. 62	5	5,5	0,225	Піщаний грунт, Ізраїль

Найвищі показники ендоглюканазної активності спостерігали на вівсяній соломі та буряковому жомові як джерелах вуглецю та індукторах целюлолітичних ферментів.

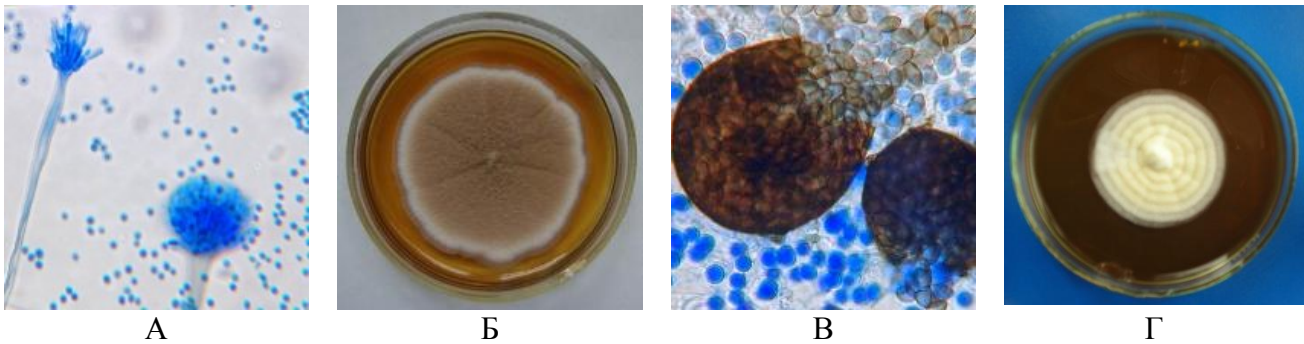
В результаті дослідження супутніх ферментативних активностей виявлено, що високою полігалактуроназною та пектинестеразною активністю володіють досліджувані штами роду *Aspergillus*, найбільш виражений комплексний склад ферментів спостерігали у штама *Aspergillus* sp. 262. Натомість серед представників роду *Corynascus* виявлено лише слідові кількості полігалактуроназної активності, але більш проявлену пектинестеразну, тому їх можна застосовувати як перспективних продуцентів целюлолітичних ферментних препаратів, які можна використовувати для попередньої обробки пектиновмісної сировини, що не будуть суттєво впливати на молекулярну масу одержаних пектинів.

На основі одержаних даних виявлено найбільш активні продуценти ферментів целюлолітичного комплексу. Це штами *Aspergillus* sp. 262 та *Corynascus* sp. 2006 327н.

#### **Розділ 4 Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні властивості продуцентів ферментів целюлолітичного комплексу**

Оптимальний склад поживного середовища та режим культивування є ключовими параметрами будь-якої біотехнології, тому на даному етапі досліджували морфолого-культуральні (рис.2) та фізіолого-біохімічні ознаки

мікроскопічних грибів-продуцентів ферментів целюлолітичного комплексу *Aspergillus* sp.262 та *Corynascus* sp. 2006 327н, здійснювали підбір оптимального складу поживного середовища та умов культивування для максимального біосинтезу ними целюлолітичних ферментів.



А - конідії *Aspergillus* sp. 262; Б- ріст *Aspergillus* sp. 262 на суслловому агарі;  
В - плодові тіла *Corynascus* sp. 2006 327н; Г - ріст *Corynascus* sp. 2006 327н на суслловому агарі

**Рисунок 2 - Морфолого-культуральні ознаки *Aspergillus* sp. 262 та *Corynascus* sp. 2006 327н**

Середовища підбирали окремо для кожного селекціонованого штаму за джерелами вуглецевого та азотного живлення. За допомогою методу математичного планування за Плакетом-Барманом визначали вплив концентрації кожного з компонентів на біосинтез целюлаз.

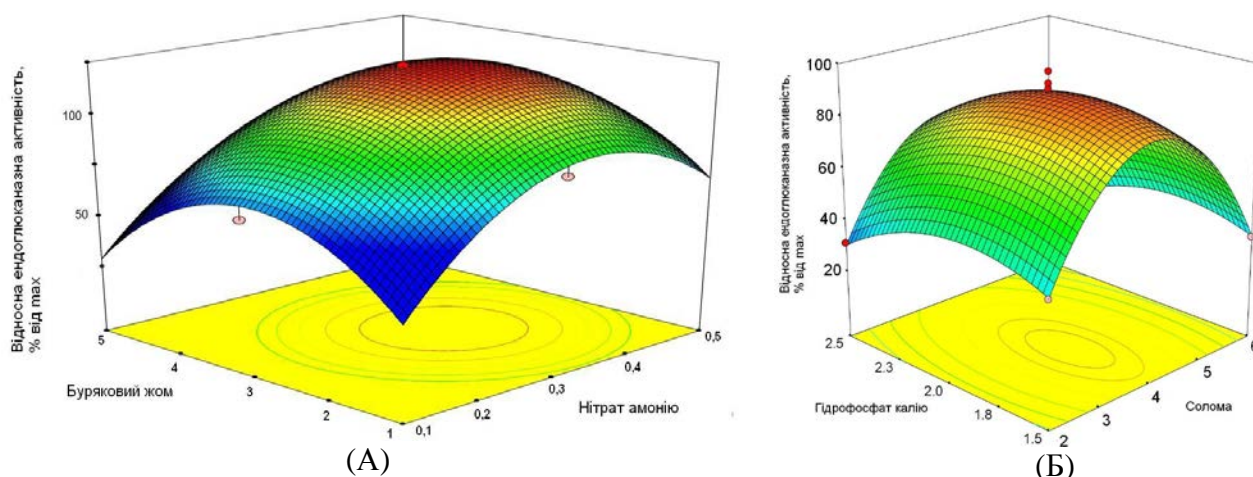
Як джерела вуглецю та можливі індуктори целюлолітичних ферментів досліджували моно-, ди- та полісахариди (арабінозу, глюкозу, рамнозу, ксилозу, сахарозу, мальтозу; лактозу, крохмаль) та багатоатомні спирти (гліцерин, інозит, сорбіт, маніт, дульцит). Як контроль використовували фільтрувальний папір та буряковий жом (для *Aspergillus* sp.262), а також вівсяну солому (для *Corynascus* sp. 2006 327н).

Целюлолітична активність та жодному з досліджуваних субстратів не перевищувала 20 % порівняно з контрольними целюлозовмісними субстратами, що свідчить про відсутність серед даних субстратів специфічних індукторів целюлаз.

Серед джерел азотного живлення на біосинтез целюлолітичних ферментів найбільш позитивно вплинув нітрат амонію, а також сечовина на *Aspergillus* sp.262, за умови росту на якій спостерігали максимальну екзоглюканазну активність.

Використовуючи метод математичного планування експерименту за Плакетом-Барманом, було визначено, що максимальний біосинтез ендоглюканази штамом *Aspergillus* sp.262 спостерігається за вмісту в поживному середовищі 3% бурякового жому та 0,3% нітрату амонію. У *Corynascus* sp. 2006 327н найбільший вплив на біосинтез целюлолітичних ферментів здійснюють джерело вуглецю (вівсяна солома) та фосфору (гідрофосфат калію). Максимальний біосинтез ендоглюканази спостерігали за вмісту в поживному середовищі 4% вівсяної соломи та 0,2% гідрофосфату

калію (рис. 3).



**Рисунок 3 – Оптимізація біосинтезу ендоглюканази *Aspergillus sp.262* (А) та *Corynascus sp. 2006 327n* (Б) за джерелами вуглецю та азоту**

Важливим етапом розроблення будь-якої біотехнології є підбір оптимальних технологічних параметрів культивування мікроорганізмів-продуцентів. Основними досліджуваними параметрами були тривалість вирощування та кількість внесеного посівного матеріалу, інтенсивність аерації та перемішування поживного середовища, температура культивування і тривалість основного культивування.

Найвищий рівень синтезу целюлолітичних ферментів, синтезованих *Aspergillus sp.262*, спостерігали за умови внесення 15% посівного матеріалу, але зменшення дози посівного матеріалу до 10% несуттєво вплинуло на ендо- та екзоглюканазну активність (зниження складало 2,3 і 4,1 % відповідно). Отже, з міркувань економічної доцільності, рекомендована кількість внесеного посівного матеріалу становить 10 %.

Максимальний синтез ендоглюканази у *Corynascus sp. 2006 327n* спостерігається при внесенні 10% інокуляту, екзоглюканази – 15%. Екзоглюканазна активність при внесенні 10% інокуляту була нижчою лише на 4,2%, ніж при внесенні 15% інокуляту. Отже, для культивування *Corynascus sp. 2006 327n* з метою слід використовувати 10% 3-х добового інокуляту. Максимальне накопичення целюлолітичних ферментів штамом *Aspergillus sp. 262* спостерігалось за температури 42°C, об'ємові поживного середовища 150 см<sup>3</sup> та частоті перемішування 220 об/хв. В *Corynascus sp. 2006 327n* максимум накопичення ендо- та екзоглюканази відбувалось за аналогічних умов.

Важливими факторами, які впливають на біосинтез ферментів є також тривалість проведення культивування та зміна рН в процесі ферментації. Тому визначали зміну активності целюлолітичних ферментів та рН у динаміці (рис.4).

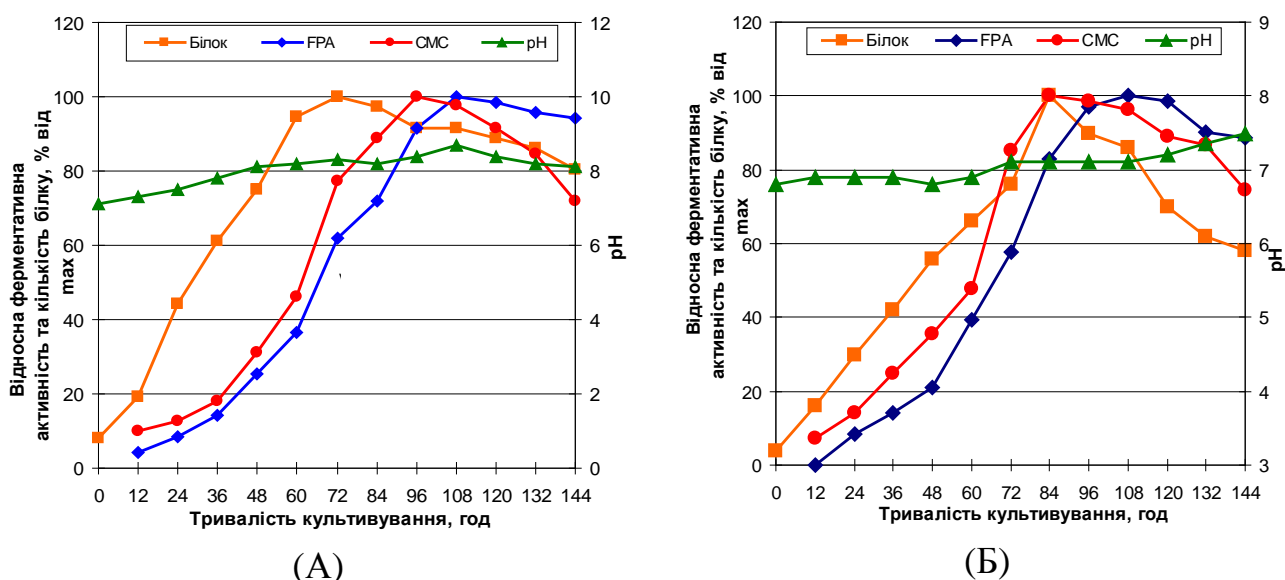


Рисунок 4 – Динаміка біосинтезу білку, целюлолітичних ферментів та зміни рН в процесі культивування *Aspergillus sp.262* (А) та *Corynascus sp. 2006 327н* (Б)

Оскільки першими в процес розкладання целюлози вступають ендоглюканази, то їх активність порівняно з екзоглюканазними ферментами, вища у лаг-фазі, експоненційній та на початку стаціонарної фази росту. Максимум накопичення ендоглюканаз спостерігали в кінці експоненційної, на початку стаціонарної фази розвитку культури і припадає на 96-ту годину в *Aspergillus sp.262* та на 84 годину в *Corynascus sp. 2006 327н*.

Екзоглюканази накопичуються в культуральній рідині у середині експоненційної фази росту, або на 108 годину культивування як *Aspergillus sp.262*, так і *Corynascus sp. 2006 327н*.

Оптимальним часом закінчення процесу ферментації для *Aspergillus sp.262* та *Corynascus sp. 2006 327н* обрано 96-ту годину, оскільки на цей час припадає максимальне значення ендоглюканазної активності та висока (понад 90 % від максимального значення) екзоглюканазна активність.

Визначено, що в процесі культивування відбувається підвищення рівня рН культуральної рідини з 7,6 до 8,1 у *Aspergillus sp.262* та з 6,8 до 7,5 у *Corynascus sp. 2006 327н*, що в свою чергу супроводжується зниженням як ендоглюканазної, так і екзоглюканазної активності, тому в процесі культивування слід здійснювати підкислення поживного середовища до нейтрального або слабо кислого значень аби запобігти інактивації ферментів.

Експериментально підібрано оптимальний склад поживного середовища та умови культивування продуцентів целюлолітичних ферментів. Загалом вдалося підвищити ендоглюканазну активність у *Aspergillus sp.262* з 9,7 од/мл до 47,4 од/мл, у *Corynascus sp. 2006 327н* з 9,3 од/мл до 39,8 од/мл. Екзоглюканазну активність вдалось підвищити у 7,9 рази для *Aspergillus sp.262* та у 8,1 рази для *Corynascus sp. 2006 327н*.

## Розділ 5 Виділення целюлаз та визначення їх фізико-хімічних властивостей

Целюлолітичні ферментні препарати одержували шляхом дробного висолювання сульфатом амонію та ультрафільтрацією.

Найвища питома ендо- та екзоглюканазна активність штаму *Aspergillus* sp. 262 спостерігалась у фракціях, отриманих при осадженні білків за 61...80%-го насичення центрифугату культуральної рідини сульфатом амонію. Результати визначення активностей целюлолітичних ферментів (ендо- і екзоглюканази), осаджених за 0...40%-го насичення були значно гіршими. Тому висолювання целюлолітичних ферментів з центрифугату культуральної рідини *Aspergillus* sp. 262 слід проводити за 40...80%-го насичення.

При висолюванні білків з культуральної рідини з *Corynascus* sp. 2006 327н максимальна питома ендоглюканазна активність спостерігалась у фракціях, одержаних при 41...60%-му насиченні ферментного розчину. Максимальна екзоглюканазна активність спостерігалась у фракціях, одержаних за 41...50%-го та 71...80%-го насичення ферментного розчину, що свідчить про наявність мінімум двох різних за своїми біохімічними властивостями ферментів, які володіють екзоглюканазною активністю, отже висолювання целюлолітичних ферментів для *Corynascus* sp. 2006 327н слід проводити за 41...80%-го насичення сульфатом амонію.

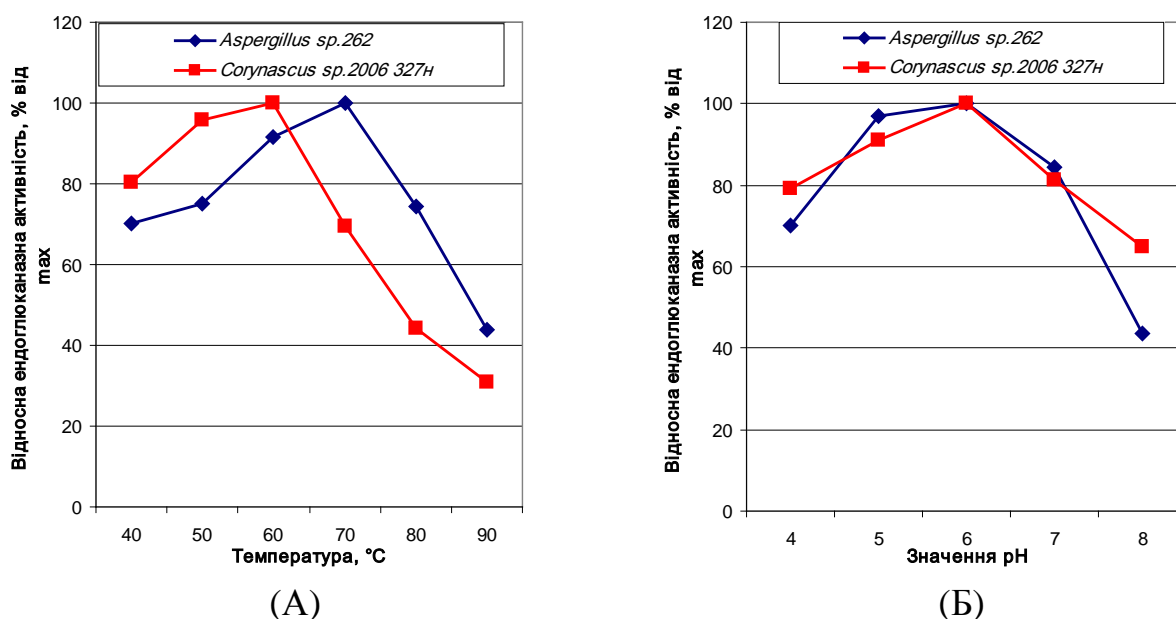
Основним питанням у дослідженні процесу ультрафільтрації ферментних розчинів є вибір мембрани. Визначальним фактором при цьому є компроміс між селективністю мембрани відносно цільового ферменту та її продуктивністю.

Дослідження процесу ультрафільтрації здійснювали на полісульфонових асиметричних мембранах із показниками cut off 10, 30, 50 та 100 кДа.

Найкращими селективними властивостями (понад 98% для ендоглюканази) характеризуються мембрани з cut off 10 кДа, хоч вона й володіє низькою проникаючою здатністю. Разом із тим зниження продуктивності даної мембрани упродовж процесу ультрафільтрації є незначним. Тому дана мембрана була обрана для концентрування культуральних рідин з *Aspergillus* sp. 262 та *Corynascus* sp. 2006 327н з метою одержання рідких целюлолітичних ферментних препаратів.

Найбільш важливими характеристиками при застосуванні ферментного препарату є рН- та температурний оптимум дії, а також його стабільність за підвищених температур та значеннях рН в межах оптимуму його дії.

Оптимум дії ендоглюканази з *Aspergillus* sp. 262 знаходиться при температурі 70°C, а з *Corynascus* sp. 2006 327н при 60°C (рис. 5а), що відповідає літературним даним щодо температурного оптимуму дії ендоглюканаз [Baldrian,2008; Dashtban,2009]. Встановлення рН-оптимуму ендоглюканаз проводили в діапазоні рН 4,0...8,0. Максимальна активність ендоглюканаз з *Aspergillus* sp. 262 та *Corynascus* sp. 2006 327н спостерігалась при рН 6,0 (рис.5б).



**Рисунок 5 – Температурний (А) та рН-оптимум (Б) дії ендоглюканаз з *Aspergillus sp. 262* та *Corynascus sp. 2006 327n***

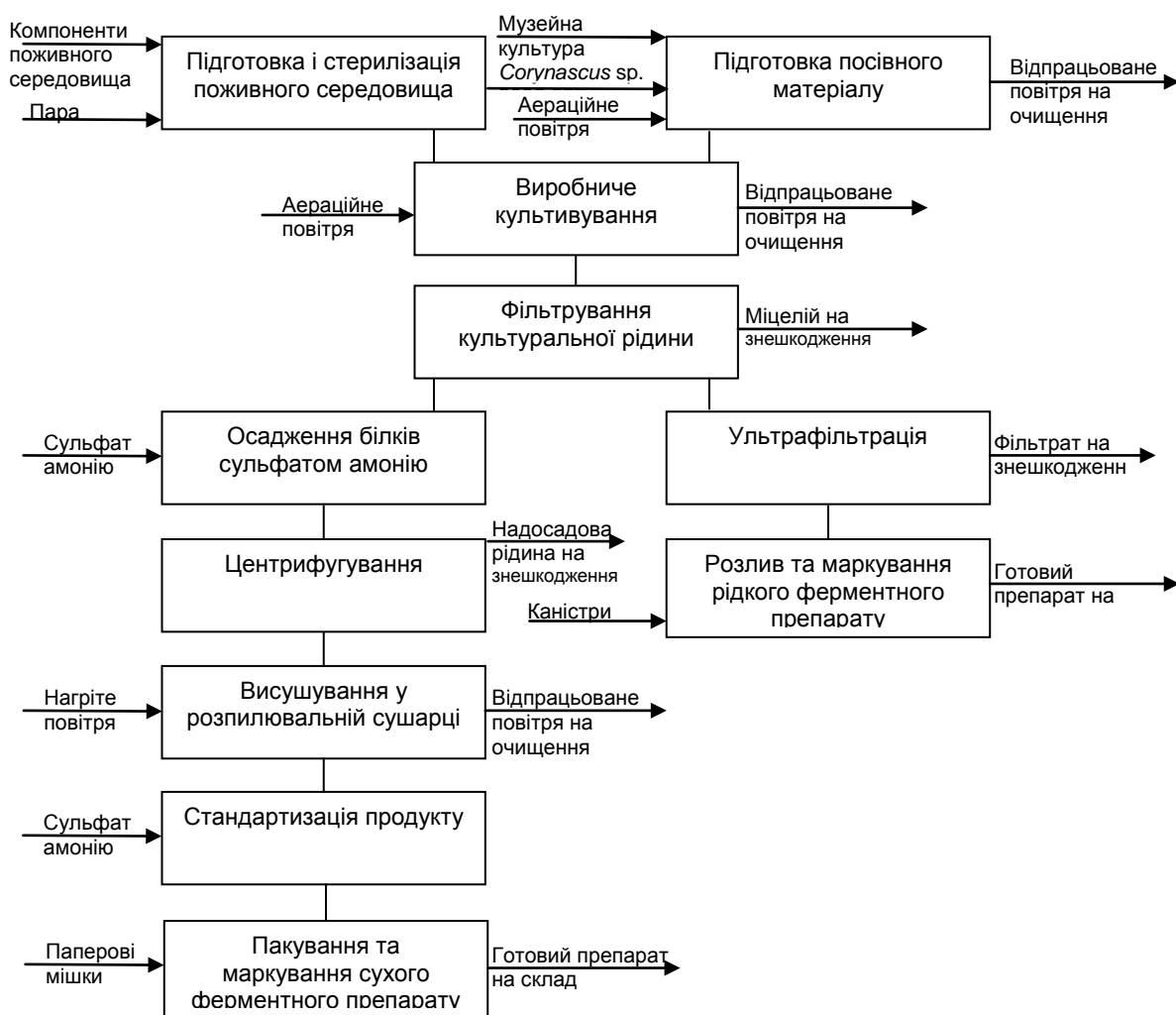
Період напіврозпаду ендоглюканаз *Aspergillus sp. 262* при 60 та 70°C складає відповідно 160 та 135 хв. За більш низьких температур фермент стабільний та швидко інактивується при 80...90°C. Ендоглюканаз *Corynascus sp. 2006 327n* при 60°C – після 3 годин інкубації вона зберігала відповідно 86, 67 та 50 % від початкової активності. При підвищенні температури до 70...90°C відбувається швидка інактивація ферменту.

Ендоглюканаз *Aspergillus sp. 262* стабільна в діапазоні рН 5,0...7,0. Ендоглюканаз *Corynascus sp. 2006 327n* має стабільна в діапазоні рН 4,0...7,0.

### **Розділ 6 Технологія одержання та застосування целюлолітичних ферментних препаратів у виробництві пектину**

Отримані результати досліджень в попередніх розділах, дозволили перейти до розробки принципової схеми одержання целюлолітичних ферментних препаратів з досліджених штамів термотолерантних мікроміцетів. Технологія одержання целюлолітичного ферментного препарату розглянуто на прикладі, де продуцентом виступає штам *Corynascus sp. 2006 327n*. Залежно від сфери застосування запропоновано одержання двох форм цільового продукту: рідкого концентрату культуральної рідини (1) та сухого ферментного препарату після осадження сульфатом амонію (2). Лінія виробництва може бути виконана на існуючих біотехнологічних підприємствах з використанням стандартного виробничого обладнання.

Принципова технологічна схема наведена на рисунку 6.



**Рисунк 6 –Принципова технологічна схема виробництва рідкого та сухого целюлолітичного ферментного препарату з *Corynascus sp.* 2006 327n**

З метою збільшення виходу пектину з яблучних вичавок застосовували виділені з *Aspergillus sp.* 262 та *Corynascus sp.* 2006 327n целюлолітичні ферментні препарати (ЦФП) в процесі гідратації перед гідролізом та екстрагуванням із них пектину і досліджували їх вплив на вихід та фізико-хімічні показники пектину.

Обробка яблучних вичавок різними концентраціями ФП з *Aspergillus sp.* 262 призвела до збільшення виходу пектину на 5,13% при дозуванні ФП у 0,3% від маси сировини і 5,58% при 0,5%. Різниця між виходом пектину при 0,3, 0,4 та 0,5% вмісту ФП є незначною, тому більш доцільним для обробки яблучних вичавок в процесі їх гідратації є використання ЦФП у концентрації 0,3% від маси пектиновмісної сировини. Обробка яблучних вичавок ЦФП з *Corynascus sp.* 2006 327n у концентрації 0,4 % з призвела до збільшення виходу пектину на 5,28% і на 5,43% відповідно. В інших випадках збільшення виходу не перевищувало 4%.

У зразках пектину, одержаних після обробки яблучних вичавок ЦФП з *Aspergillus sp.* 262 у різних дозуваннях, відбувається значне зниження молекулярної маси пектину та ступеня його етерифікації. За максимальної концентрації ЦФП (0,5%) спостерігали зниження молекулярної маси пектину

майже на 67% (до 68 кДа) та ступеня етерифікації на 34% (до 48%). Це пояснюється достатньо високими супутніми полігалактуроною та пектинестеразною активністю ЦФП з *Aspergillus* sp. 262.

За умови обробки яблучних вичавок ЦФП з *Corynascus* sp. 2006 327н значних змін у молекулярній масі та ступені етерифікації одержаного пектину на спостерігали. За максимальної використаної концентрації ЦФП у 0,5% зміна молекулярної маси не перевищувала 5%, ступеня етерифікації – 9%.

Одержані ЦФП можна рекомендувати використовувати у технології одержання яблучного пектину. Після обробки сировини на стадії гідратації ЦФП з *Aspergillus* sp. 262 можна застосовувати як біологічну добавку, діючу або допоміжну речовину у фармацевтичній промисловості, оскільки даний пектин через низький ступінь етерифікації буде володіти високою сорбуючою та комплексоутворюючою здатністю. ЦФП з *Corynascus* sp. 2006 327н слід застосовувати у технології одержання яблучного пектину для харчової промисловості, оскільки через високу молекулярну масу він буде мати високу желеутворювальну здатність.

#### **Додатки.**

Технологія одержання целюлолітичних ферментних препаратів складається із допоміжних робіт (санітарна підготовка виробництва, підготовка стерильного технологічного повітря та поживного середовища), основного технологічного процесу (приготування посівного матеріалу *Corynascus* sp. 2006 327н, виробниче культивування, фільтрування культуральної рідини, ультрафільтрація фільтрату культуральної рідини, осадження фільтрату сульфатом амонію, стандартизація ферментного препарату), розлив, пакування і маркування готового препарату та знешкодження відходів.

До складу розробленої технологічної інструкції на одержання яблучного пектину з ферментативно обробленої сировини входять наступні розділи: характеристика готової продукції, характеристика сировини і матеріалів, технологічна схема та опис технологічного процесу.

Для оцінки економічної ефективності застосування целюлолітичних ферментних препаратів у технології одержання пектину порівнювали витрати сировини, допоміжних матеріалів та енергоносіїв у запропонованій технології з існуючою технологією. Очікуваний річний економічний ефект підприємства потужністю 100 кг пектину на добу при виробничому сезоні 180 діб на рік складе 2797016 грн. Зниження собівартості яблучного пектину після впровадження запропонованого способу буде становити 21,2 %.

## **ВИСНОВКИ**

В дисертаційній роботі наведено теоретичні узагальнення та практична реалізація важливого наукового завдання, яке полягає у розробленні науково обґрунтованої технології одержання целюлолітичних ферментних препаратів на основі термотолерантних мікроміцетів родів *Aspergillus* та *Corynascus* та їх застосування у технології одержання яблучного пектину.

1. В результаті ступеневого скринінгу селекціоновано два активні продуценти ферментів целюлолітичного комплексу – термотолерантні штами

мікроміцетів *Aspergillus* sp. 262 та *Corynascus* sp. 2006 327н. Найбільш активними індукторами целюлаз для даних штамів є буряковий жом та вівсяна солома відповідно.

2. Визначено, що мікроміцети роду *Aspergillus* активно синтезують широкий спектр супутніх пектолітичних ферментів, серед представників роду *Corynascus* біосинтез супутніх ферментів спостерігається лише у слідових кількостях.

3. Оптимізація складу поживного середовища за джерелами вуглецю, азоту, макро- та мікроелементами і умов культивування за віком і кількістю внесеного посівного матеріалу, температурою, аерацією, тривалістю культивування, для мікроміцетів *Aspergillus* sp. 262 та *Corynascus* sp. 2006 327н дозволила підвищити рівень ендоглюканазної активності у 4,9 та 4,3 рази, рівень екзоглюканазної активності – у 7,9 та 8,1 рази відповідно.

4. Встановлено, що при дробному осадженні білків сульфатом амонію із центрифугатів культуральних рідин відібраних мікроміцетів найбільш повне висолювання целюлолітичних ферментів *Aspergillus* sp. 262 відбувається при 46...75%-му насиченні, *Corynascus* sp. 2006 327н – при 46...80%-у насиченні.

З метою одержання рідкого концентрату целюлолітичних ферментів з *Aspergillus* sp. 262 та *Corynascus* sp. 2006 327н для процесу ультрафільтрації центрифугатів культуральних рідин підібрано полісульфонову мембрану Р-010F, селективність якої за целюлазами становить понад 98%.

5. Визначено, що оптимальні умови дії ендоглюканази з *Aspergillus* sp. 262 становлять: температура 70°C та рН 6,0; ендоглюканази з *Corynascus* sp. 2006 327н – температура 60°C та рН 6,0. Ферменти проявляють стабільність при температурах до 70°C (для *Aspergillus* sp. 262) та 60°C (для *Corynascus* sp. 2006 327н) та у діапазоні значень рН 4-7.

6. На основі отриманих даних розроблено науково-обґрунтовану біотехнологію рідкого концентрованого та сухого ЦФП з *Corynascus* sp. 2006 327н з активністю 200 од/мл та 2000 од/г відповідно.

7. Підібрано оптимальні дозування рідких концентрованих целюлолітичних ферментних препаратів (0,3% від маси сировини для ферментного препарату з *Aspergillus* sp. 262 та 0,4% для ферментного препарату з *Corynascus* sp. 2006 327н) з метою одержання яблучного пектину з різними фізико-хімічними показниками. Встановлено, що застосування целюлолітичних ферментних препаратів з *Aspergillus* sp. 262 та *Corynascus* sp. 2006 327н дозволяє підвищити вихід пектину більш, ніж на 5%.

8. Розроблено та затверджено у встановленому порядку технологічну інструкцію на виробництво яблучного пектину з використанням целюлолітичних ферментних препаратів, яку апробовано на базі ТОВ «Продсервіс-ІР».

9. Застосування запропонованого способу одержання яблучного пектину дозволить підвищити вихід пектину на 47%, що знизить собівартість яблучного пектину на 21,2 %.

## СПИСОК ОСНОВНИХ РОБІТ, ЩО ОПУБЛІКОВАНО ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Скринінг продуцентів целюлолітичних ферментів серед мезофільних та термотолерантних мікроміцетів / Є.О. Омельчук, В.О. Красінько, О.О. Іванов, І.О. Твердохліб, А.П. Капічон, В.Л. Айзенберг, В.І. Стойко // Харчова промисловість. – 2010. – №9. – С. 46 – 49.

*Особистий внесок дисертанта: провів скринінг серед різних таксономічних груп мікроскопічних грибів та підготував статтю до друку.*

2. Аналіз супутніх ферментативних активностей у термотолерантних штамів мікроміцетів – продуцентів целюлолітичних ферментів / Є.О.Омельчук, Ю.Ю. Лапська, В.О. Красінько, В.Л. Айзенберг, В.І. Стойко // Наукові праці НУХТ. – 2012. – №44. – С. 12 – 16.

*Особистий внесок дисертанта: перевіряв полігалактураназну активність у культуральних рідинах досліджуваних мікроміцетів, підготував статтю до друку.*

3. Омельчук Є.О. Підбір оптимального складу поживного середовища та умов культивування *Aspergillus* sp. 262 – продуцента ферментів целюлолітичного комплексу / Є.О.Омельчук, Ю.Ю. Лапська, Ю.М. Пенчук // Наукові праці НУХТ. – 2012. – №50. – С. 36 – 40.

*Особистий внесок дисертанта: брав участь у плануванні та підготовці експерименту, досліджував вплив різних джерел азоту та фосфору та біосинтез целюлолітичних ферментів.*

4. Використання целюлолітичних ферментних препаратів для отримання яблучного пектину / Є.О. Омельчук, В.О. Красінько, І.О. Крапивницька, С.О. Сирчин // Наукові праці НУХТ. – 2013. – №51. – С. 14 – 20.

*Особистий внесок дисертанта: одержував ферментний препарат для проведення гідролізу пектиновмісної сировини.*

5. Physical and chemical properties of endoglucanases from *Aspergillus* sp. 262 and *Corynascus* sp. 2006 327n / V.O. Krasinko, I.O. Kravynytska, S.M.Teterina, E.O. Omelchuk, S.O.Syrchin // Austrian Journal of Natural and Technical Sciences. – 2014. – I. 9 – 10. – P. 25 – 28. (Австрія).

*Особистий внесок дисертанта: досліджував вплив температури та рН на активність ендоглюканази з *Corynascus* sp. 2006 327n.*

6. Біосинтез ендоглюканази термотолерантними мікроміцетами при рості на штучних та природних целюлозовмісних субстратах / Є.О. Омельчук, В.О. Красінько, В.Л. Айзенберг, С.О. Сирчин // Наукові доповіді НУБіП України. – 2012. – Вип. № 7 (36). – 10 с. – Режим доступу до журн.: [http://nd.nubip.edu.ua/2012\\_7/12o eo.pdf](http://nd.nubip.edu.ua/2012_7/12o eo.pdf) - Назва з екрану.

*Особистий внесок дисертанта: дослідив ріст та біосинтез ендоглюканази на природних целюлозовмісних субстратах, підготував статтю до друку.*

7. Омельчук Є. Дослідження процесу виділення ферментів целюлолітичного комплексу з культуральної рідини мікроміцета *Aspergillus* sp.262 / Євген Омельчук, Юлія Лапська // Ukrainian Food Journal. – 2012. – №2. – С.27 – 30.

*Особистий внесок дисертанта: брав участь у плануванні та проведенні експерименту.*

8. Селекция микромицетов – продуцентов высокотехнологических гидролитических ферментов / В.Л. Айзенберг, В.И. Стойко, А.В. Борисенко, А.П. Капичон, И.А. Твердохлиб, Е.А. Омельчук, А.А. Иванов // Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения, 25-30 мая 2009 г.: тезисы доп. – Новый Свет, Крым, 2009. – С.7 – 8.

*Особистий внесок дисертанта: визначив ендоглюканазну активності відібраних мікромицетів – активних продуцентів целюлаз.*

9. Скринінг мезофільних та термотолерантних мікромицетів - продуцентів целюлолітичних ферментів / В.О. Красінько, О.О. Іванов, Є.О. Омельчук, В.Л.Айзенберг, А.П. Капичон, С.А. Старосила, І.В. Домбровська // Біологічні дослідження молодих учених в Україні: ІХ всеукр. наукова конф., 28-29 жовтня 2009 р.: тези доп. – К.: 2009. – С.146 – 147.

*Особистий внесок дисертанта: визначив ендо- та екзоглюканазну активність серед відібраних мікромицетів, підготував доповідь на конференцію.*

10. Микроскопические грибы – продуценты промышленно-ценных гидролаз для новейших биотехнологий / В. Айзенберг, В. Стойко, С. Сырчин, В.Страшный, Е. Омельчук, В. Красинько // Microbiologic biotechnology – the scientific intensive domain of modern knowledge: scient. int.conf.: 6 – 8 June 2011: abstracts. – Chisinau, 2011. – P. 126 – 127.

*Особистий внесок дисертанта: надав дані щодо ендо- та екзоглюканазної активності серед досліджуваних мікромицетів.*

11. Оптимізація умов культивування *Aspergillus* sp. 262 та *Corynascus* sp. 2006 - продуцентів комплексу целюлолітичних ферментів / Ю.Ю. Лапська, Є.О.Омельчук, В.О. Красінько, Б.В. Чернюк, С.О. Сирчин // Perspektywiczne opracowania sa nauka i technikami – 2012: VIII miedzynarodowa naukowo-praktyczna konf., 7 – 15 listopada 2012: materialy konf. – Przemysl, 2012. – С. 28 – 30.

*Особистий внесок дисертанта: брав участь у плануванні експерименту, визначав ендо- та екзоглюканазної активність досліджуваних штампів за різних умов культивування.*

12. Вплив температури та рН на активність ендоглюканази з *Aspergillus* sp. 262 / Ю.Ю. Лапська, Є.О.Омельчук, В.О. Красінько, С.О.Сирчин // Біотехнологія XXI століття: VII Всеукр. науково-практ. конф. 24 квітня 2013 р., тези доп. – К., 2013. – С. 48 – 49.

*Особистий внесок дисертанта: брав участь у плануванні експерименту, дослідженні впливу температури та рН на активність ендоглюканази.*

13. Подбор оптимальных условий культивирования *Aspergillus* sp. 262 – продуцента ферментов целлюлозолитического комплекса / Ю.Ю. Лапская, Е.А. Омельчук, В.О. Красинько, С.А. Сырчин // Актуальные вопросы медицинской науки: Всеросс. научно-практ. конф. с междунар. уч. 24 – 26 апр. 2013 г.: матер. конф. – Ярославль, 2013. – С. 76 – 77.

*Особистий внесок дисертанта: брав участь у плануванні та підготовці експерименту, досліджував вплив різних джерел азоту на біосинтез целюлолітичних ферментів.*

14. Изучение влияния рН и температуры на активность эндоглюканазы *Aspergillus* sp. 262 / Ю.Ю. Лапская, Е.А. Омельчук, В.О. Красинько, Б.В. Чернюк, С.А. Сырчин // Пищевые инновации и биотехнологии: Междунар. науч. форум 8-12 апр. 2013 г.: матер. конф.: – Кемерово, 2013. – С. 332 – 336.

*Особистий внесок дисертанта: планував експеримент, досліджував вплив температури та рН на активність ендоглюканази досліджуваного мікроміцета.*

## АНОТАЦІЯ

**Омельчук Є.О. Біотехнологія целюлолітичних ферментних препаратів термотолерантних мікроміцетів родів *Aspergillus* і *Corynascus*. – На правах рукопису.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата технічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Національний університет харчових технологій МОН України, Київ, 2016.

Дисертаційна робота присвячена розробленню технологій целюлолітичних ферментних препаратів на основі штамів термотолерантних мікроміцетів *Aspergillus* sp. 262, *Corynascus* sp. 2006 327н та практичного використання даних ферментних препаратів у технології одержання яблучного пектину.

Термотолерантні штами-продуценти целюлолітичних ферментів *Aspergillus* sp. 262 та *Corynascus* sp. 2006 327н були відібрані в результаті ступеневого скринінгу серед 138 штамів мезофільних і термотолерантних мікроміцетів. Було підбрано та оптимізовано склад поживного середовища та умови культивування для максимального синтезу ферментів целюлолітичного комплексу. Досліджено процеси концентрування, виділення та часткового очищення комплексу целюлолітичних ферментів за допомогою ультрафільтрації та дробного висолювання. Визначено вплив температури та рН на активність та стабільність ендоглюканаз відібраних мікроміцетів.

Використання целюлолітичних ферментних препаратів з *Aspergillus* sp. 262 та *Corynascus* sp. 2006 327н у технології яблучного пектину на стадії гідратації дозволяє підвищити вихід пектину після гідролізу-екстрагування й залежно від продуцента ферментного комплексу застосовувати одержаний пектин у фармацевтичній або харчовій промисловості.

**Ключові слова:** *Aspergillus* sp. 262, *Corynascus* sp. 2006 327н, ендоглюканаза, екзоглюканаза, целюлолітичний ферментний препарат, технологія пектину

## АННОТАЦИЯ

**Омельчук Е.А. Биотехнология целлюлолитических ферментных препаратов термотолерантных микромицетов родов *Aspergillus* и *Corynascus*. – На правах рукописи.**

Диссертация на соискание научной степени кандидата технических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. – Национальный университет пищевых технологий МОН Украины, Киев, 2016.

Диссертационная работа посвящена разработке технологии целлюлолитических ферментных препаратов на основе штаммов термотолерантных микромицетов *Aspergillus* sp. 262 и *Corynascus* sp. 2006 327н, а также практического использования данных ферментных препаратов в технологии получения яблочного пектина.

Термотолерантные штаммы-продуценты целлюлолитических ферментов *Aspergillus* sp. 262 и *Corynascus* sp. 2006 327н были отобраны в результате ступенчатого скрининга среди 138 штаммов мезофильных и термотолерантных микроскопических грибов Украинской коллекции микромицетов. Определено, что наилучшие индукторы целлюлолитических ферментов среди растительных отходов сельского хозяйства и перерабатывающей промышленности – это овсяная солома для *Corynascus* sp. 2006 327н и свекловичный жом для *Aspergillus* sp. 262. Определена активность сопутствующих пектолитических ферментов. Штамм *Aspergillus* sp. 262 проявил себя как перспективный продуцент пектолитических ферментов (удельная полигалактуроазная активность – 1,7 ед/мг белка, удельная пектинэстеразная активность – 0,12 ед/мг белка). Штамм *Corynascus* sp. 2006 327н продуцирует незначительное количество пектолитических ферментов.

Изучен ряд морфолого-культуральных и физиолого-биохимических свойств отобранных штаммов. Экспериментально подобран и математически уточнен с помощью планов Плакета-Бармана оптимальный состав питательной среды по источникам углерода и фосфора, а также условия культивирования продуцентов целлюлолитических ферментов (внесение 10% 3-х суточного инокулята, культивирование продуцентов 96 часов при температуре 42°C) позволили повысить эндоглюканазную активность почти в пять раз у *Aspergillus* sp. 262 и в 4 раза у *Corynascus* sp. 2006 327н. Экзоглюканазная активность культуральной жидкости *Aspergillus* sp. 262 возросла в 7,9 раза, а *Corynascus* sp. 2006 327н более, чем в восемь раз.

Установлено, что при дробном осаждении белков сульфатом аммония из центрифугатов культуральной жидкости отобранных микромицетов наиболее полное высаливание целлюлаз *Aspergillus* sp. 262 происходит при 46...75%-м насыщении раствора сульфатом аммония, целлюлаз *Corynascus* sp. 2006 327н – при 46...80%-м насыщении.

Показано, что при дробном высаливании белков из культуральной жидкости *Corynascus* sp. 2006 327н при 46...65%-м насыщении сульфатом аммония возможно практически полное осаждение эндоглюканазы.

Изучена возможность использования ультрафильтрации для концентрирования культурального центрифугата глубинных культур

*Aspergillus* sp. 262 и *Corynascus* sp. 2006 327н. Подобранный полисульфоновая мембрана P-010F характеризуется наилучшими селективными свойствами по отношению к целлюлазам отобранных штаммов, стабильной пропускной способностью при концентрировании культуральных центрифугатов в 4...5 раз, что позволяет с ее помощью получать жидкие технические ферментные препараты из культур *Aspergillus* sp. 262 и *Corynascus* sp. 2006 327н.

Изучено влияние температуры и pH на активность и стабильность полученных эндоглюканаз. Оптимальные условия действия эндоглюканазы *Aspergillus* sp. 262 – 70°C, pH 6,0; эндоглюканазы *Corynascus* sp. 2006 327н – 60°C и pH 6,0. Эндоглюканаза *Aspergillus* sp. 262 стабильна при температуре до 70°C и диапазоне pH 5,0...7,0. Эндоглюканаза *Corynascus* sp. 2006 327н стабильна при температуре до 60°C, но имеет более широкий диапазон pH-стабильности – 4,0...7,0. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о высокой стабильности исследуемых эндоглюканаз при высоких температурах и значительном диапазоне pH, что говорит о возможности их широкого использования в различных сферах промышленности и сельского хозяйства.

Использование целлюлолитического ферментного препарата из *Aspergillus* sp. 262 в количестве 0,3 % от массы сухих яблочных выжимок на стадии гидратации позволяет повысить выход пектина после гидролиза-экстрагирования на 5,13 %. Полученный пектин имеет молекулярную массу в среднем 95 кДа, степень этерификации 60 % и может использоваться в фармации как комплексообразователь.

При добавлении целлюлолитического ферментного препарата из *Corynascus* sp. 2006 327н в количестве 0,4 % от массы сухих яблочных выжимок на стадии гидратации выход пектина после гидролиза-экстрагирования повысился на 5,28 %, молекулярная масса пектина и степень его этерификации при этом существенно не изменились. Полученные образцы пектина, благодаря их физико-химическим свойствам, можно использовать в пищевой промышленности в качестве гелеобразователей.

**Ключевые слова:** *Aspergillus* sp. 262, *Corynascus* sp. 2006 327н, эндоглюканаза, экзоглюканаза, целлюлолитический ферментный препарат, технология пектина

## SUMMARY

**Omelchuk E. Cellulolytic enzymatic preparations biotechnology from thermotolerance micromycetes *Aspergillus* and *Corynascus*. – Manuscript.**

Dissertation for the degree of Ph.D., speciality 03.00.20 – biotechnology. – National University of Food Technologies Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2016.

Dissertation work is devoted to development of cellulolytic enzyme preparations based on strains of thermotolerant micromycetes *Aspergillus* sp. 262, *Corynascus* sp. 2006 327n and practical usage of these enzyme preparations in technology of apple pectin obtaining.

Thermotolerant strains-producers of cellulolytic enzyme *Aspergillus* sp. 262

and *Corynascus* sp. 2006 327n were reflected as a result of step-by-step screening of 138 strains of mesophilic and thermotolerant micromycetes. Selection and optimization of culture medium composition and cultivation conditions for micromycetes *Aspergillus* sp. 262 and *Corynascus* sp. 2006 327n gave us opportunity to increase endoglucanase activity level in 4.9 and 4.3 times, the level exoglucanase activity - at 7.9 and 8.1 times, respectively. The processes of concentration, separation and particular purification of cellulolytic enzyme complex by using ultrafiltration and fractional salting were researched.

It is determined that the optimum conditions of the endoglucanase from *Aspergillus* sp. 262 are: temperature 70 °C and pH 6.0; endoglucanase from *Corynascus* sp. 2006 327n - 60°C and pH 6.0. The enzymes are stable at temperatures up to 70°C and in the range of pH 5-7 (for *Aspergillus* sp. 262) and 60°C and pH 4.7 (for *Corynascus* sp. 2006 327n).

Using of cellulolytic enzyme preparation from *Aspergillus* sp. 262 and *Corynascus* sp. 2006 327n in apple pectin obtaining technology at the stage of hydration allows to increase pectin yield after hydrolysis-extraction and depending on the enzyme complex producer apply pectin in pharmaceutical or food industry needs.

**Keywords:** *Aspergillus* sp. 262, *Corynascus* sp. 2006 327n, endoglucanase, exoglucanase, cellulolytic enzymatic preparation, pectin technology.