

УДК 547

ПРИМЕНЕНИЕ АКТИВНЫХ УГЛЕЙ В ПРОЦЕССАХ ОЧИСТКИ ПЕКТОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

Джакашева М.А.

Министерство Образования и Науки Республики Казахстан «Южно-Казахстанский государственный университет им. М.Ауэзова», г. Шымкент, e-mail: dzhakasheva_m@mail.ru

Технологически проработан и апробирован сорбционный метод очистки и выделения пектолитического ферментного препарата из культуральной жидкости штамма *Aspergillus awamori* 56-2-53-85-375, полученного в результате многоступенчатой селекции. Адсорбционная очистка с помощью микропористого активированного угля марки КАД-Г позволяет проводить очистку и выделение пектиназ при минимальном снижении общей активности ферментных растворов. Активный уголь имеет сильно развитую пористую структуру, образованную главным образом мезопорами от 0,8-0,2 мл/г в диаметре. При дозировке сорбента 10 г/л достигается степень очистки по цветности 63%, удельная активность пектиназы увеличивается до 97,5% при потере активности 4,8%. Обесцвечивание пектолитических ферментных растворов и удаление низкомолекулярных неактивных примесей делает возможным его использование на начальном этапе очистки.

Ключевые слова: пектиназа, *Aspergillus awamori*, очистка, выделение, активированный уголь, культуральная жидкость

THE USE OF ACTIVE CARBONS IN THE PROCESS OF PURIFICATION PECTOLYTIC ENZYMES

Dzhakasheva M.A.

The Ministry of Education and Science of the Republic Kazakhstan "M. Auezov South-Kazakhstan state university", Shymkent, e-mail: dzhakasheva_m@mail.ru

As a consequence of development of method of purification and extraction of pectolytic enzyme from culture liquid of *Aspergillus awamori* 56-2-53-85-375, the resulting of the gradation screening. Using adsorptive purification by microporous charcoal enzyme solutions of pectinase were extracted with minimum decrease in total activity. The application of porous coal with the aim of discoloration of enzyme solutions and purification of culture liquids from pectic substances is efficient at the first stage. Active carbon has a highly developed porous structure formed mainly of mesopores between 0.8-0.2 ml/g in diameter. At 10 g/l of sorbent, the purification degree in terms of color index is 63%, and the specific activity of pectinase increases to 97.5% at the activity loss of 4.8%.

Keywords: pectinase, *Aspergillus awamori*, purification, extraction, activated coal, culture fluid

Пектиназы – это ферменты, катализирующие реакции расщепления пектиновых веществ, которые имеют большое промышленное значение в плодopерерабатывающей промышленности [6]. Это обусловлено тем, что пектиназа – это не один фермент, а комплекс, состоящий из нескольких пектин-расщепляющих веществ: пектинэстеразы, полигалактуроназы, пектинлиазы и пектатлиазы. Кроме того, промышленные пектиназы не являются чистыми ферментными препаратами и обычно обладают побочной активностью, которая проявляется в том, что пектиназы могут выполнять функции целлюлазы, гемицеллюлазы, β-глюканазы, β-глюкозидазы и протеазы [3,7].

Культуральные жидкости, полученные после ферментации микроорганизмов – продуцентов пектолитических ферментов, содержат значительное количество нерастворимых примесей. Существует множество способов выделения и очистки ферментов из культуральной жидкости и растворов технических ферментных препаратов, сущностью которых является разделение многокомпонентных смесей ор-

ганических веществ и минеральных солей для удаления основной массы неактивных белков и примесей небелковой природы. Наличие в ферментном препарате примесей углеводов и пектиновых веществ может существенно образом исказить результаты анализа состава продуктов ферментализации пектиновых полисахаридов и затруднить выделение физиологически активных фрагментов [1]. Поэтому разработка способов получения очищенных и активных пектолитических ферментов является весьма актуальной.

Материалы и методы исследований

Культура мицелиального гриба *A. awamori* 56-2-53-85-375 получена в результате многоступенчатой селекции и мутагенеза на кафедре биотехнологии Южно-Казахстанского государственного университета им. М. Ауэзова, она поддерживается на скошенном сусло-агаре при 40С [4].

Активность пектолитического комплекса ферментов определяли по методике действующего ГОСТ Р 55298-2012. Мицелий,

полученный в процессе культивирования *A. awamori* 56-2-53-85-375, отделяли от культуральной жидкости на фильтре и затем подвергали водной экстракции.

Потери активности ферментных растворов рассчитывали по отношению разности между исходной и конечной активностью пектиназы к исходной ее величине и выражали в процентах. Содержание белка определяли по методу Лоури [5].

Пектиназы выделяли и очищали из культуральной жидкости, полученной после культивирования штамма *A. awamori* 56-2-53-85-375 в конусообразных колбах Эрленмейера объемом 250 мл на термостатированной качалке (220 об/мин) при температуре 30° С с рН 3,2 в течение 84 ч на жидкой питательной среде следующего состава, масс. %: свекловичный жом : виноградные выжимки : хлопковые створки (1:1:1) - 3, лактоза - 0,125, солодовые

ростки : экстракт из мицелия (1:1) - 1%, (NH₄)₂SO₄ - 0,5, KH₂PO₄ - 0,2, MgSO₄ - 0,1 [2].

Активированные угли для очистки культуральной жидкости предварительно размалывали и фракционировали путем просеивания на ситах до получения гранул от 100 до 280 мкм. К культуральной жидкости объемом 1000 мл при 40°С добавляли микропористые угли, смесь тщательно перемешивали на магнитной мешалке в течение 30 мин, после чего сорбент отделяли фильтрованием под вакуумом водокольцевого вакуумного насоса «Dolphin LC 0030 A» («Busch», Германия). В фильтрате проверяли содержание белка и пектиназную активность. Оценку содержания пектиновых веществ в культуральных жидкостях осуществляли по цветности растворов путем измерения оптической плотности на фотокориметре КФК-2 при длине волны 315 нм. Степень

Таблица

Влияние условий обработки культуральной жидкости активированными углями

Марка угля	Условия обработки	Значение	Удельная активность, ед/мг белка	Степень очистки по цветности, %	Потери активности ПкС, %
СКТ	рН культуральной жидкости	3,0	77,0	63	0,5
		3,5	81,0	65	1,5
		4,0	80,8	64	2,8
		4,5	76,0	57	3,0
		5,0	71,3	50	4,5
		5,5	63,4	44	6,3
	Дозировка сорбента, г/л	5	65,0	48	4,0
		10	82,0	54	6,5
		15	81,4	61	22,0
		20	78,0	66	28,0
БАУ-Б	рН культуральной жидкости	3,0	91,2	70	1,0
		3,5	95,0	71	2,5
		4,0	91,8	68	4,4
		4,5	85,0	64	6,8
		5,0	77,0	52	9,0
		5,5	63,0	44	14,3
	Дозировка сорбента, г/л	5	73,0	50	20,0
		10	89,4	54	25,0
		15	85,5	59	37,0
		20	79,0	67	42,0
КАД-Г	рН культуральной жидкости	3,0	90,1	75	0,3
		3,5	94,0	75	0,8
		4,0	90,8	73	1,5
		4,5	88,0	70	1,8
		5,0	85,3	60	3,0
		5,5	81,0	50	5,6
	Дозировка сорбента, г/л	5	83,0	54	2
		10	97,5	63	4,8
		15	91,4	70	18
		20	95,0	77	25

очистки по цветности оценивали как отношение разности между исходной и конечной активностью пектиназы к исходной ее величине и выражали в процентах.

Оценку результатов и их статистической достоверности осуществляли с использованием прикладных программ «MathCAD» и «Statistica».

Результаты и обсуждение

Для удаления из культуральной жидкости *A. awamori* 56-2-53-85-375 низкомолекулярных примесей, таких как пектиновые вещества, использовали активированные микропористые угли марок СКТ, БАУ-Б и КАД-Г с размерами гранул от 100 до 280 мкм, который предварительно размалывали и фракционировали путем просеивания на ситах. Активированные угли представляют собой пористый углеродный адсорбент с развитой внутренней поверхностью, состоящей из открытых пор и капиллярных каналов объемом 0,23-0,26 мл/г. В таблице показаны зависимость степени очистки по цветности от значений рН среды при обработке культуральной жидкости, полученной после культивирования мицелиального гриба *A. awamori* 56-2-53-85-375 активированными углями марок СКТ, БАУ-Б и КАД-Г и их дозировок.

Из полученных данных видно, что в диапазоне рН среды 3,0-3,5 для всех выбранных марок активированных микропористых углей достигается наибольшая эффективность очистки ферментных растворов. Из данных таблицы 1 видно, что при оптимальном значении рН среды влияние дозировки сорбентов в культуральной жидкости на эффективность очистки является прямопропорциональным. Высокая эффективность при обесцвечивании и очистке растворов наблюдается при использовании угля марки КАД-Г с дозировкой 10 г/л.

Уголь активированный КАД-Г обычно применяют для очистки от органических

загрязнений сточных вод при производстве гальванических покрытий, а также для очистки оборотных и технологических вод. Его основные характеристики: размер зерен, мм - 1,0-2,8, насыпная плотность, г/дм³ - < 460, прочность, % - >70, объем пор суммарный, см³/г - >0,7, объем микропор, см³/г - 0,23-0,26, адсорбционная способность, % - 60-62. Массовая доля золы, % - 10-12.

Заключение

Таким образом, на основании полученных данных можно сделать вывод, что применение микропористого угля марки КАД-Г для обесцвечивания ферментных растворов и очистки культуральной жидкости от пектиновых веществ на первом этапе является эффективным. При дозировке сорбента 10 г/л достигается степень очистки по цветности 63%, удельная активность пектиназы увеличивается до 97,5% при потере активности 4,8%.

Список литературы

1. Донцов А.Г., Шубаков А.А. Пектинолитические ферменты: очистка, активация, микробиологический синтез. Екатеринбург: Изд-во УрО РАН, 2010. - С. 82-90.
2. Джакашева М.А., Кедельбаев Б.Ш., Есимова А.М. Культивирование штамма *Aspergillus awamori* 56-2-53-85-375 – продуцента пектиназы // Вестник ЕНУ им. Л.Н. Гумилева. – 2016. – №2. – С.77-84.
3. Ajayi A.A., Osunlalu E.O., Peter-Albert C.F., Adejuwon A.O. Studies on pectinolytic and proteolytic enzymes from deteriorated grapes (*Vitis vinifera*) // Covenant Journal of Physical and Life Sciences. - 2014. - Vol. 1. - № 2. - P. 1-15.
4. Dzhakasheva M.A., Kedelbayev B.S. Getting the active strain of *Aspergillus awamori* – pectinase producer // International journal of applied and fundamental research. - 2014. - № 11(4). - P.593-597.
5. Lowry O.H., Roserbrough N.J., Fan A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem., - 1951. - Vol. 193. - P. 265-275.
6. Sunnotel O., Nigam P. Pectinolytic activity of bacteria isolated from soil and two fungal strains during submerged fermentation // World Journal of microbiology and Biotechnology. - 2002. - №18. - P. 835-839.
7. Uhlig H. Industrial enzymes and their applications. A Wiley-Interscience Publication. John Wiley & Sons, Inc., 1998. - P. 139-141.