

УДК 57.083.132

ВЛИЯНИЕ ИСТОЧНИКОВ УГЛЕРОДА НА НАКОПЛЕНИЕ ПЕКТИНАЗ КУЛЬТУРОЙ *ASPERGILLUS AWAMORI* 56-2-53-85-375

Джакашева М.А., Кедельбаев Б.Ш., Есимова А.М., Балхибеков Р.М.

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

Изучены особенности образования пектиназы культурой *Aspergillus awamori* 56-2-53-85-375, полученной в результате многоступенчатой селекции и мутагенеза на кафедре биотехнологии Южно-Казахстанского государственного университета им. М. Ауэзова на различных источниках углеродного питания, поскольку пектиновые вещества играют роль индукторов в процессе синтеза пектиназ. Исследование некоторых физиолого-биохимические свойства данного штамма показало, что культура утилизирует широкий спектр углеродсодержащих субстратов и выявило, что увеличение внеклеточной активности пектиназы отмечено при использовании сред со смешанными источниками углеродного питания. Наиболее активными индукторами пектиназ являются свежесквашенный жом, виноградные выжимки и хлопковые створки в равных соотношениях в концентрации 1%, а также лактоза в концентрации 0,125%. Менее пригодные источники углерода арбузные выжимки, цитрусовый пектин, фруктоза и глюкоза.

Ключевые слова: пектиназа, питательная среда, культивирование, биосинтез, ферменты

INFLUENCE OF CARBON SOURCES ON THE ACCUMULATION OF PECTINASE BY CULTURE *ASPERGILLUS AWAMORI* 56-2-53-85-375

Dzhakasheva M.A., Kedelbayev B.Sh., Essimova A.M., Balhibekov R.M.

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

Were investigated the peculiarities of the formation of pectinases by culture *Aspergillus awamori* 56-2-53-85-375 resulting multistage breeding and mutagenesis at the Department of biotechnology, South Kazakhstan state University after M. Auezov on different sources of carbon nutrition. Because pectic substances play the role of inductors in the synthesis process of pectinase. Study of some physiological and biochemical properties of this strain showed that the culture utilizes a wide range of carbonaceous substrates and revealed that the increase in extracellular activity of pectinases was observed when using media with mixed carbon sources of power. The most active inductors of pectins are beet pulp, grape pomace and cotton sash in equal proportions at a concentration of 1%, and lactose at a concentration of 0.125%. Less suitable carbon sources watermelon pomace, citrus pectin, fructose and glucose.

Keywords: pectinase, nutrient medium, cultivation, biosynthesis, enzymes

Разработка основ биотехнологии любого ферментного препарата, помимо выбора наиболее высокопродуктивного штамма, включает изучение условий его биосинтеза, т.к. наличие гена, контролирующего образование фермента, еще не служит гарантией того, что данный фермент будет образовываться в значительном количестве [3]. В настоящее время исследователями проведен ряд экспериментов, подтверждающих влияние на биосинтез ферментов индукторов (специфических субстратов) и репрессоров (продуктов жизнедеятельности микроорганизма). Они воздействуют на участки молекул ДНК микроорганизмов, в которых заложены матрицы для биосинтеза ферментов. Присутствие индуктора биосинтеза пектиназ в качестве источника углерода в среде необходимо, в то время как репрессор по возможности должен быть удален [6]. Микроорганизмы способны утилизировать самые разнообразные углеродсодержащие соединения. Источниками углерода могут быть такие пектиновые вещества, как све-

жесквашенный жом, виноградные выжимки [3], стебли хлопчатника [5], тростниковая меласса, кофейный шрот и другие отходы переработки сельскохозяйственных продуктов [4].

Данная работа посвящена изучению продуцирования пектиназ культурой *A. awamori* 56-2-53-85-375 на различных источниках углеродного питания.

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 [7].

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 куль-

туральной жидкости на фильтре и затем подвергали водной экстракции.

Культивирование проводили в конусообразных колбах Эрленмейера объемом 250 мл на термостатированной качалке (220 об/мин) при температуре 30о С с рН 3,2 в течение 84 ч на жидкой питательной среде следующего состава, масс. %: свекловичный жом – 3, солодовые ростки – 1, (NH4)2SO4 – 0,1, KH2PO4 – 0,1, MgSO4–0,1.

Результаты и их обсуждение

Биосинтез пектолитических ферментов индуцируется пектиновыми веществами. Для определения зависимости биосинтеза пектиназ от различных источников углерода культурой *A. awamori* 56-2-53-85-375 определяли количество биомассы и пектолитическую активность через 5 суток роста, заменяя в ней источник углерода в концентрации 3% (табл. 1). В качестве источников углерода использовали среды, содержащие в основе молекулы полигалактуроновою кислоту (гидролизат свекловичного жома, цитрусовый пектин, хлопковые створки, арбузные и виноградные выжимки) и легко метаболизируемые сахара (лактоза, фруктоза, глюкоза).

Как видно из данных табл. 1, биосинтез пектолитических ферментов с наибольшей активностью (1,77 ед/мл) происходит на среде, содержащей свекловичный жом, прошедший глубокий ферментативный гидролиз. Это обусловлено тем, что с прогидролизованым сырьем в ферментационную среду вносятся легко усвояемые низкомолекулярные вещества углеводной природы. Несмотря на высокие показатели общей пектолитической активности на среде, содержащей гидролизат свекловичного жома,

использование данного источника углерода является нерентабельным из-за его дороговизны. Хорошая активность наблюдается на виноградных выжимках (1,74 ед/мл) и на хлопковых створках (1,73 ед/мл), т.к. синтез пектолитических ферментов эффективно индуцируется молекулами полигалактуроновою кислоты, которые в них содержатся. Хлопковые створки и виноградные выжимки представляют собой вторичное сырье перерабатывающих отраслей пищевой промышленности, которые ежегодно образуются десятками тысяч тонн в Южно-Казахстанской области.

Таблица 1

Влияние источников углерода на биосинтез пектолитических ферментов

Источник углерода	Биомасса, г/л	ПкС, ед/мл
Свекловичный жом (исходный вариант)	2,2	1,65
Гидролизат свекловичного жома	1,7	1,77
Лактоза	3,5	1,68
Фруктоза	5,1	1,48
Глюкоза	4,8	1,53
Арбузные выжимки	2,0	1,32
Хлопковые створки	1,6	1,73
Виноградные выжимки	2,5	1,74
Цитрусовый пектин	3,2	0,88

Т.к. среда для роста микроорганизмов должна не только обеспечивать физиологические потребности продуцента и максимальное образование ферментов, но и быть дешевой и доступной, то использование различных пищевых отходов, как компонентов питательной среды, позволяет улуч-

Таблица 2

Совместное влияние различных источников углерода на биосинтез пектолитических ферментов штаммом *A. awamori* 56-2-53-85-375

Компоненты питательной среды и их концентрация, %				ПкС, ед/мл	Биомасса, г/л	Цикл роста, сут
Свекловичный жом	Виноградные выжимки	Хлопковые створки	Лактоза			
3	-	-	-	1,65	2,2	5
2	1	-	-	1,69	2,8	5
1	2	-	-	1,60	2,1	6
1	-	1	-	1,68	2,4	5
1	-	2	-	1,66	2,2	5
2,5	-	-	0,50	1,58	2,7	6
2	1	-	0,10	1,76	3,1	5
2	-	1	0,10	1,75	2,9	5
1	1	1	0,10	1,77	3,3	4
1	1	1	0,05	1,71	3,0	5
1	1	1	0,15	1,79	3,5	4
1	1	1	0,20	1,70	2,6	5

шить технико-экономический показатель производства. Исходя из этого следует, что из всех испытанных источников углерода самыми оптимальными для биосинтеза пектиназ являются хлопковые створки и виноградные выжимки.

Лактоза также оказывает стимулирующее действие на синтез пектиназ штамма *A. awamori* 56-2-53-85-375. При использовании фруктозы отмечен наибольший рост культуры, но при этом наблюдается слабая общая пектолитическая активность.

С целью повышения пектолитической активности проверено совместное влияние различных источников углерода из числа описанных в таблице 1 на рост, развитие и ферментативную активность штамма *A. awamori* 56-2-53-85-375. Для этого производим частичную замену свекловичного жома на другие источники углерода – отходы сельскохозяйственного производства Республики Казахстан с низкой себестоимостью (табл. 2).

Наиболее активный синтез пектиназ (1,79 ед/мл) наблюдается на среде, содержащей свекловичный жом, виноградные выжимки и хлопковые створки в равных соотношениях в концентрации 1%, а также лактозу в концентрации 0,15%.

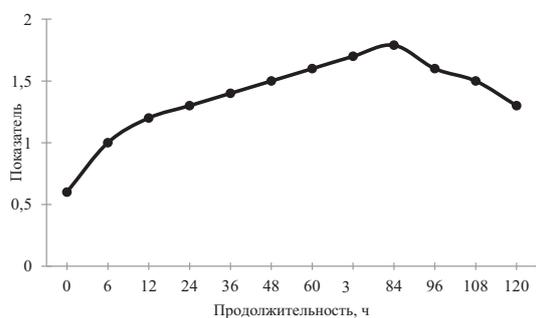


Рис. 1. Влияние длительности культивирования штамма *A. awamori* 56-2-53-85-375 на синтез пектиназ*

Синтез пектолитических ферментов зависит от стадии роста культуры: скорость

стадии возрастает в конце экспоненциального роста – начале стационарной фазы [3]. Максимальное образование пектиназы достигается через 60-70 часов и штамм сохраняет продуктивность в течение 100 часов культивирования (рис.1). При этом прирост биомассы происходит по логарифмическому закону и максимум приходится на 5 сутки. Таким образом, оптимальное время культивирования для получения ферментного препарата составляет 82-84 часа.

Заключение

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что пектолитическая активность штамма *A. awamori* 56-2-53-85-375 (1,79 ед/мл) увеличивается при использовании сред со смешанными источниками углеродного питания. Синтезируемые пектиназы являются индуцибельными ферментами, активный биосинтез которых осуществляется на средах с пектиновыми веществами. Наиболее эффективными индукторами являются свекловичный жом, виноградные выжимки и хлопковые створки в концентрации 1%, а также лактоза в концентрации 0,15%.

Список литературы

1. Бареева Н.Н., Донченко Л.В. Виноградные выжимки – перспективный промышленный источник пектиновых веществ // Научный журнал КубГАУ. -2008. - №9. - С. 152-158.
2. Голубятников Е.И. Обоснование рационального способа сушки свекловичного жома как пектинсодержащего сырья // Материалы 49 отчетной научной конф. за 2010 г. Воронежской государственной технологической академии. - Воронеж, 2011. - С. 71.
3. Грачева И.М., Кривова А.Ю. Технология ферментных препаратов. М.: Элевар, 2000. – С. 245-246.
4. Донченко Л.В., Калайциди Л.Ю. Физико-химические свойства пектинов из различных видов растительного сырья // Хранение и переработка сельхозсырья. - 1998. - № 1. - С. 34-35.
5. Муминов Н.Ш. Особенности получения пектина из хлопковой створки // Пищ. пром-сть. - 1997. - № 2. - С. 22.
6. Скурат Е.В. Пектинметилэстераза как фактор умалкания генов: дисс. канд. биол. наук. - М. 2006. - 122с.
7. 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.