



УДК 557.112.083

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА  
ПЕКТИНАЗЫ ASPERGILLUS AWAMORI****М.А. Джакашева<sup>1</sup>, Б.Ш. Кедельбаев<sup>1</sup>, Питер Либерцайт<sup>2</sup>**<sup>1</sup>Южно-Казахстанский государственный университет им. М. Ауезова  
Министерства образования и науки Республики Казахстан

Шымкент, Казахстан

<sup>2</sup>Университет Вены, Вена, Австрия

**Аннотация.** Технологически проработан и апробирован сорбционный метод очистки и выделения пектолитического ферментного препарата из культуральной жидкости штамма *A. 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. 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.

**Введение.** Пектиназы — это ферменты, катализирующие реакции расщепления пектиновых веществ, которые имеют большое промышленное значение в плодоперерабатывающей промышленности [1]. Это обусловлено тем, что пектиназа — это не один фермент, а комплекс, состоящий из нескольких пектинрасщепляющих веществ: пектин-эстеразы, 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,  $\beta$ -глюканазы,  $\beta$ -глюкозидазы и протеазы [2; 3].

Существует множество способов выделения и очистки ферментов из КЖ и растворов техниче-

ских ФП, сущностью которых является разделение многокомпонентных смесей органических веществ и минеральных солей для удаления основной массы неактивных белков и примесей небелковой природы. Наличие в ферментном препарате примесей углеводов и пектиновых веществ может существенным образом исказить результаты анализа состава продуктов ферментализации пектиновых полисахаридов и затруднить выделение физиологически активных фрагментов [4]. 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 се-

лекции и мутагенеза на кафедре биотехнологии ЮКГУ им. М. Ауэзова, она поддерживается на скошенном сусло-агаре при 4 °С [5].

Активность пектолитического комплекса ферментов определяли, проводя гидролиз при 50 °С в течение 10 мин, останавливая реакцию добавлением реактива Шомоди и нагреванием проб до 100 °С. В качестве субстратов для определения этих активностей применялись: Avicel PH 105, карбометилцеллюлоза средней вязкости, полигалактуроновая кислота, ксилан березы (Sigma, USA). Определение удельной активности ферментов рассчитывали как отношение активности раствора (ед/мл) к общему содержанию белка (мг/мл). За единицу пектолитической активности принимали количество фермента, которое катализирует гидролиз 1 г пектина до продуктов, не осаждаемых серноокислым цинком при проведении гидролиза в строго определенных условиях:  $t$  30 °С,  $\tau$  = 1 ч, рН 4; соотношение фермент-субстрат в реакционной среде, обеспечивающее гидролиз 30%-ного пектина, взятого на реакцию. 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 [6].

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 4 °С добавляли микропористые угли, смесь тщательно перемешивали на магнитной мешалке в течение 30 мин, после чего сорбент отделяли фильтрова-

нием под вакуумом водокольцевого вакуумного насоса «Dolphin LC 0030 А» («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 фотоколориметре КФК-2 при длине волны 315 нм. Степень 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 КЖ *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.

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

Окончание таблицы

Марка угля	Условия обработки	Значение	Удельная активность, ед/мг белка	Степень очистки по цветности, %	Потери активности ПкС, %
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

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 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/дм<sup>3</sup> — < 460, прочность, % — > 70, объем пор суммарный, см<sup>3</sup>/г — > 0,7, объем микропор, см<sup>3</sup>/г — 0,23—0,26, адсорбционная способность, % — 60—62. Массовая доля золы, % — 10—12.

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%.

## ЛИТЕРАТУРА

1. 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. Pp. 1—15.
2. 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. Pp. 835—839.



3. Uhlig H. Industrial enzymes and their applications. A Wiley-Interscience Publication. John Wiley & Sons. Inc., 1998. P. 454.

4. Донцов А.Г., Шубаков А.А. Пектинолитические ферменты: очистка, активация, микробиологический синтез. Екатеринбург: Изд-во УрО РАН, 2010. С. 82—90.

5. 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). Pp. 593—597.

6. Lowry O.H., Roserbrough N.J., Fan A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. Vol. 193. Pp. 265—275.

## EXTRACTION AND PURIFICATION OF PECTINASE ASPERGILLUS AWAMORI

*M.A. Dzhakasheva<sup>1</sup>, B.Sh. Kedelbayev<sup>1</sup>, Peter Liebezeit<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>The Ministry of Education and Science of the Republic Kazakhstan, M. Auezov South-Kazakhstan state university, Shymkent, Republic of Kazakhstan

<sup>2</sup>University of Vienna, Vienna, Austria

**Annotation.** As a consequence of development of method of purification and extraction of pectolytic enzyme from culture liquid of *A. 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. 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%.

**Key words:** pectinase, *Aspergillus awamori*, purification, extraction, activated coal, culture fluid.

### REFERENCES

1. 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, no. 2, pp. 1—15.

2. 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, no. 18, pp. 835—839.

3. Uhlig H. Industrial enzymes and their applications. A Wiley-Interscience Publication. John Wiley & Sons. Inc., 1998. p. 454.

4. Doncov A.G., Shubacov A.A. Pectinolytic enzymes: cleaning, activating, microbiological synthesis. Yekaterinburg: Publishing Uro RAN, 2010. Pp. 82—90 (in Russian).

5. Dzhakasheva M.A., Kedelbayev B.S. Getting the active strain of *Aspergillus awamori* — pectinase producer. *International journal of applied and fundamental research*, 2014, no. 11(4), pp. 593—597.

6. Lowry O.H., Roserbrough N.J., Fan A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, vol. 193, pp. 265—275.