

030708

На правах рукописи

Соколова

СОКОЛОВА ЕЛЕНА НИКОЛАЕВНА

**РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТА
ПЕКТИНАЗ НА ОСНОВЕ СЕЛЕКЦИОНИРОВАННОГО ШТАММА
ASPERGILLUS FOETIDUS 379-K**

Специальность 03.00.23– Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Щелково – 2008

Работа выполнена в ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии Россельхозакадемии (ГНУ ВНИИПБТ Россельхозакадемии)

Научный руководитель: Доктор технических наук, профессор
Римарева Любовь Вячеславовна

Официальные оппоненты: Доктор биологических наук, профессор
Воробьева Галина Ивановна
Доктор технических наук, профессор
Кривова Анна Юрьевна

Ведущая организация: Московский государственный университет прикладной биотехнологии (МГУПБ)

Защита состоится «20» июня 2008г. в 10⁰⁰ час. на заседании диссертационного совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата биологических наук Д 006.069.01 во Всероссийском научно-исследовательском институте биологической промышленности Россельхозакадемии по адресу: 141142, Московская область, Щелковский район, п/о Кашинцево, пос.Биокомбината, ВНИТИБП

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ВНИТИБП Россельхозакадемии.

Автореферат разослан «20» мая 2008г.



Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Фролов Ю.Д.

1 Общая характеристика работы

Актуальность темы. В настоящее время большое внимание уделяется пектиновым веществам, деполимеризация которых осуществляется ферментами, входящими в пектолитический комплекс: пектингидролазами и пектинлиазами. Пектолитические ферменты имеют большое промышленное значение в различных отраслях биотехнологии: при получении пектинов; для интенсификации производства соков из плодово-ягодного сырья и осветления вин; для получения пищевых красителей и танинов; при обработке текстильных волокон. Потребность в этих ферментах стабильно растет.

Эффективность расщепления пектинсодержащих веществ зависит не только от применения биопрепаратов-источников активных пектолитических ферментов, но и от соотношения пектиназ различной специфичности и механизма действия в составе пектолитического комплекса, что обусловлено физиологическими и культуральными особенностями штамма-продуцента. Одним из основных источников получения пектолитических ферментов являются микроорганизмы, которые обладают характерной особенностью синтезировать широкий спектр внеклеточных пектиназ.

Работы многих исследователей посвящены созданию активных штаммов-продуцентов пектиназ и технологиям производства и применения ФП пектолитического действия (Бравова Г.Б., 1981; Михайлова Р.В., 1992; Сапунова Л.И., 1992; Barras F., 1994; Cavalito S.F., 1996; Семенова М.В., 2003; Синицын А.П., 2003; Римарева Л.В., 2004; Бутова С.Н., 2004; Курбатова Е.И., 2004 и др.).

Ранее широкое применение в сокоморсовой промышленности и виноделии имел ФП отечественного производства Пектофостидин П10Х. В биотехнологии Пектофостидина использовали гриб *Aspergillus foetidus*, культивируемый твердофазным методом. Однако в настоящее время предприятия, основанные на поверхностном культивировании продуцентов-ферментов, отсутствуют.

На современном этапе перспективным направлением науки является создание с использованием генетических и селекционных методов нового высокоэффективного штамма-продуцента пектолитических ферментов для глубинного культивирования, с целью разработки научных основ ферментных технологий для перерабатывающих отраслей АПК. Применение отечественных биокатализаторов позволит не только интенсифицировать существующие биотехнологические процессы в пищевой

промышленности и создать конкурентоспособную продукцию нового поколения с заданными свойствами, но и произвести импортозамещение, так как высокая цена биопрепаратов ограничивает их широкое применение в России.

Цель и задачи исследования. Основная цель диссертационной работы заключалась в скрининге активного штамма – продуцента внеклеточных пектиназ, подборе оптимальных условий его глубинного культивирования для получения комплексного ферментного препарата пектолитического действия.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

- скрининг и селекция штаммов– продуцентов внеклеточных пектиназ;
- мутагенез селекционированного штамма для повышения его биосинтетической способности;
- изучение физиолого-морфологических и биохимических особенностей отобранного продуцента;
- подбор оптимальных условий для получения ферментного препарата и исследование его биохимической характеристики;
- оценка эффективности применения препаратов для биокатализа полисахаридов растительного сырья.

Научная новизна работы. Впервые методами селекции и мутагенеза осуществлен скрининг нового штамма *Aspergillus foetidus* 379-К – продуцента комплекса пектолитических ферментов и исследованы его культуральные и морфолого-биохимические признаки. На основе установленных физиологических особенностей селекционированного штамма подобраны условия глубинного культивирования, позволяющие продуцировать ферментативный комплекс с доминирующими ферментами пектолитического действия и сопутствующими – ксиланазой, целлюлазой, β -глюкоаназой, хитиназой, маннаназой. Разработан новый экспресс-метод отбора активных вариантов при селекции микромицетов-продуцентов пектиназ. Получены новые экспериментальные данные по составу ферментного комплекса, продуцируемого *A.foetidus* 379-К. Показана возможность регуляции биосинтеза отдельных ферментов комплекса штаммом *A.foetidus* 379-К путем изменения условий культивирования (рН, температура, время культивирования). Получен новый ферментный препарат Пектофоетидин методом глубинного культивирования и исследована его биохимическая характеристика.

Практическая значимость работы. В результате изучения свойств селекционированного штамма разработана и экспериментально обоснована новая технология ФП Пектофостидин. Штамм депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов под номером F-962. Разработаны паспорт на штамм *Aspergillus foetidus* 379-K, методика по ведению и хранению продуцента пектолитических ферментов, ТУ на ферментный препарат Пектофостидин Г10Х и ТИ по получению ФП Пектофостидин Г10Х.

Проведены производственные испытания по получению нового ФП во ВНИТИБП – ЗАО «Биопрогресс» и по применению на ОАО «Уржумский спиртоводочный завод» в технологии получения спиртованных соков с применением ферментативной обработки плодово-ягодного сырья.

Апробация работы. Основные положения представлены на следующих симпозиумах и конференциях: Международных симпозиумах «Микробные биокатализаторы и перспективы развития ферментных технологий в перерабатывающих отраслях АПК» (Москва, 2004); «Микробные биокатализаторы для перерабатывающих отраслей АПК» (Москва, 2006); Всероссийской научно-практической конференции «Проблемы создания продуктов здорового питания. Наука и технологии» (Углич, 2006); 4-м Международном научно-практическом симпозиуме «Микробные биокатализаторы и их роль в нано- и биотехнологиях», Москва, 2008.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 9 печатных работ, из них статей – 7.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, выводов, списка литературы, включающего 21 источника, из них 11 отечественных, 10 иностранных. Работа изложена в 110 страницах машинописного текста, включает 16 таблиц и 12 рисунков.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Селекционированный штамм *Aspergillus foetidus* 379-K – продуцент комплекса пектолитических ферментов;
2. Разработанный новый экспресс-метод отбора активных вариантов при селекции микромицетов-продуцентов пектиназ с применением индикатора;
3. Условия регулирования биосинтеза отдельных ферментов пектолитического комплекса при изменении условий выращивания в процессе роста культуры;

4. Разработанные условия глубинного культивирования *Aspergillus foetidus* 379-К, включающие подбор оптимальной питательной среды, длительность выращивания, температурный режим;

5. Разработанная нормативно-техническая документация на производство ферментного препарата Пектофоетидин Г10Х и Технические условия на ферментный препарат Пектофоетидин Г10 Х.

2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы исследований

Исследования проводили в лабораторных условиях на базе отдела биотехнологии ферментных препаратов ГНУ ВНИИПБТ, кафедры химической энзимологии МГУ им.Ломоносова. в опытно-промышленных условиях ЗАО «Биопрогресс» ВНИТИБП г.Щелково и ОАО «Уржумский спирто-водочный завод».

Объектами исследований служили штаммы микромицетов из коллекции микроорганизмов ГНУ ВНИИПБТ, Института микробиологии РАН, ОАО «ГосНИИсинтезбелок» и МГУ им.Ломоносова. В работе использовали общепринятые микробиологические и биохимические методы исследований, а также хроматографические методы разделения ферментного препарата по фракциям.

Определение общей пектолитической, эндополигалактуроназной и пектинэстеразной активности проводили по ГОСТ 20264.3-84. За единицу пектолитической активности принимали такое количество фермента, которое катализирует гидролиз 1г пектина до продуктов, не осаждаемых серноокислым цинком, при проведении гидролиза в течение 1ч при температуре 30⁰С, величине рН реакционной среды 4,0.

За единицу эндополигалактуроназной активности принимали такое количество фермента, которое катализирует гидролиз 1 г пектина со снижением вязкости раствора на 30% за 1 мин. при 30⁰С.

За единицу активности пектинэстеразы принимали такое количество фермента, которое катализирует гидролиз 1 мкэв сложноэфирных связей в молекуле пектина за 1 мин при 30⁰С. Определяемая величина пектинэстеразной активности находится в непосредственной зависимости от степени этерификации пектина.

Содержание растворимого белка определяли методом Лоури.

Статистическую обработку результатов проводили по программе Excel.

2.2 Результаты исследований и их обсуждение

2.2.1 Изучение биохимической характеристики микромицетов – продуцентов пектолитических ферментов. Отбор наиболее активного штамма

Проведена сравнительная характеристика 14 штаммов– продуцентов пектолитических ферментов рода: *Aspergillus* (A.), *Rhizopus* (R.), *Penicillium* (P.). Наибольшая пектолитическая активность ферментов отмечена при культивировании штамма *Aspergillus foetidus* 37 (табл.1).

Таблица 1 – Сравнительные исследования микромицетов – продуцентов пектолитических ферментов при глубинных условиях выращивания

Штаммы – продуценты	Активность ПкС, ед/см ³
<i>A.usami</i> 3758-248	0,03
<i>A.usami</i> 45-332	0
<i>A.niger</i> П-310	0,04
<i>A.fumigatus</i> 349	0
<i>A.oryzae</i> 387	0
<i>A.foetidus</i> 37	0,40
<i>A.foetidus</i> 51	0,10
<i>A.awamori</i> ВУДТ-2	0,002
<i>A.foetidus</i> 29	0,034
<i>A.foetidus</i> 17	0,15
<i>A.foetidus</i> 491 М	0,05
<i>Rhizopus delemar</i> 385	0,02
<i>Rhizopus tonkinensis</i> 27	0,015
<i>Penicillium citro-viride</i> 367	0,001

2.2.2 Селекция штамма *A.foetidus* 37 с целью повышения его биосинтетической способности

На I этапе провели селекцию отобранного штамма и скрининг наиболее активного варианта, синтезирующего комплекс пектолитических ферментов. В качестве исходного штамма использовали *Aspergillus foetidus* 37.

Для получения более стабильного и высокопродуктивного штамма была проведена многоступенчатая селекция с применением методов эффективных методов мутагенеза.

В селекционных исследованиях применен разработанный нами ускоренный микробиологический метод скрининга, позволяющий по окрашенным зонам гидролиза субстрата, образующимся вокруг гигантских колоний, отбирать активные варианты.

В результате селекции было выделено более 500 популяций культуры *Aspergillus foetidus* 37. Из них отобрано 8 активных клонов.

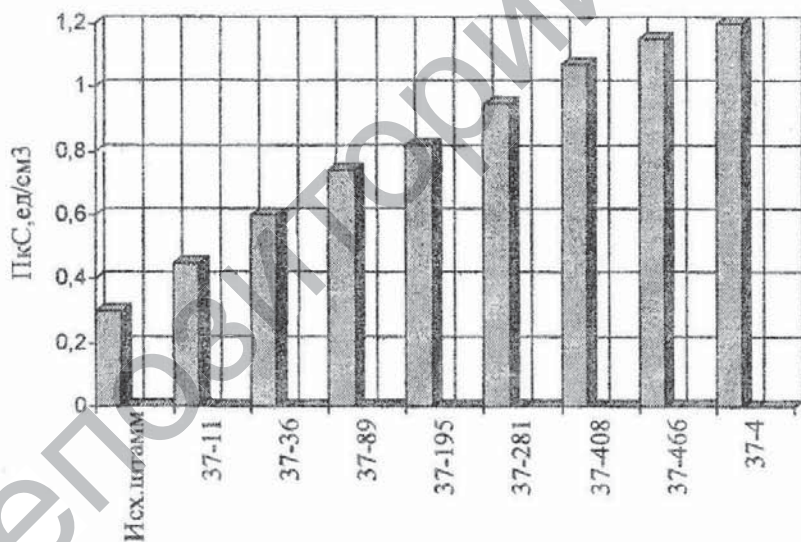


Рисунок 1 - Отбор активного варианта-продуцента пектиназ

Наибольшей способностью к синтезу пектиназ обладал штамм *Aspergillus foetidus* – 37-4, который секретировал внеклеточную пектиназу с активностью 1,0-1,2 ед/см³ (рис. 1).

Культивирование продуцентов осуществляли в колбах Эрленмейера в течение 4-х суток при температуре 28-30⁰ С на подобранной нами питательной среде следующего состава (%): неосветленное свекловичное волокно-3,0, (NH₄)₂SO₄ – 0,3, КН₂РО₄ – 0,1, MgSO₄-0,1. В качестве посевного материала применяли культуру, выращенную в течение 10 суток на сусло-агаре.

Исследовали влияние различных источников азота в качестве компонентов питательной среды на активность внеклеточных пектиназ, секретируемых глубинной культурой отобранного варианта *A.foetidus* 37-4. При этом варьировали концентрацией аммонийных солей (табл.3).

Таблица 3 – Влияние концентрации аммонийных солей на биосинтез пектиназы *A.foetidus* 37-4

Источник неорганического азота	Концентрация, %	pH	Пектолитическая активность, %
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,3	3,1	100
	Контроль		
	0,5	3,3	125,0
	0,6	3,2	117,0
	0,7	3,5	125,0
(NH ₄)H ₂ PO ₄	0,8	3,3	108,0
	0,5	3,4	109,0
	0,6	3,5	111,0
	0,7	3,4	109,0
	0,8	3,2	102,0

Как видно из представленных в таблице 3 данных, наиболее высокая пектолитическая активность отмечена в вариантах, выращенных на среде, содержащей в качестве источника азота серноокислый аммоний. Оптимальной концентрацией для увеличения образования фермента является 0,5% (NH₄)₂SO₄.

Выявлено влияние различных источников азота на биохимическую активность отобранного продуцента (табл.3,4).

В качестве источников органического азота можно выделить пшеничные

отруби в концентрации 0,5%. Их использование позволило увеличить уровень активности фермента в к.ж. на 30,7% (табл.4).

Таблица 4 – Влияние органических источников азота на синтез внеклеточной пектиназы

№ п/п	Состав питательной среды	pH	% повышения активности
1.	Контроль (К)	2,7	-----
2.	К+ 0,5% глютена	3,5	11,7
3.	К+0,5% пшеничных отрубей	2,8	30,7
4.	К+0,5% солодовых ростков	3,2	14,4
5.	К+ 0,5% сухой барды	3,3	18,5
6.	К+ 0,5% кукурузного экстракта	3,9	5,8
7.	К+ 0,5% дрожжевого экстракта	3,6	-----

В результате проведенных исследований была подобрана питательная среда, содержащая: неосветленное свекловичное волокно – 3,0%, пшеничные отруби – 0,5%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,5%, KH_2PO_4 – 0,1%, MgSO_4 – 0,1%.

Использование эффективных методов селекции и оптимизация питательной среды позволила повысить активность внеклеточной пектиназы на I этапе с 0,4 до 1,6 ед/см³ к.ж.

2.2.3 Селекция и мутагенез продуцента пектиназ *Aspergillus foetidus* 37-4

Для повышения эффективности производства и применения пектолитических ферментов в различных отраслях АПК для гидролиза растительного сырья необходимо получение нового штамма, обладающего более высокой продуктивностью по отношению к пектиназам. В качестве родительского использовали штамм *A.foetidus* 37-4.

Мутагенез проводили по следующей схеме:

Родительский штамм → приготовление суспензии спор → облучение ультрафиолетом → рассев облученной суспензии на селективную агаризованную среду → отбор мутантов по окрашенным зонам гидролиза → пересев отобранных

вариантов на скошенный сусло-агар → проверка мутантов по пектолитической активности при глубинном культивировании.

В качестве мутагенной обработки использовали облучение спор ультрафиолетом с различной длительностью экспозиции. После выращивания колоний на агаризованных средах, содержащих солодовое сусло или цитрусовый пектин с различной степенью метоксилирования, осуществляли отбор мутантов по окрашенной зоне гидролиза субстрата среды, после чего отсеивали отобранные мутанты на скошенный сусло-агар и определяли активности пектолитических ферментов методом глубинного культивирования продуцентов на подобранной питательной среде для синтеза экзопектиназ.

В результате 1-ой ступени мутагенеза выделено 100 вариантов, из них наибольшая зона гидролиза наблюдалась у 6 клонов (рис.2).

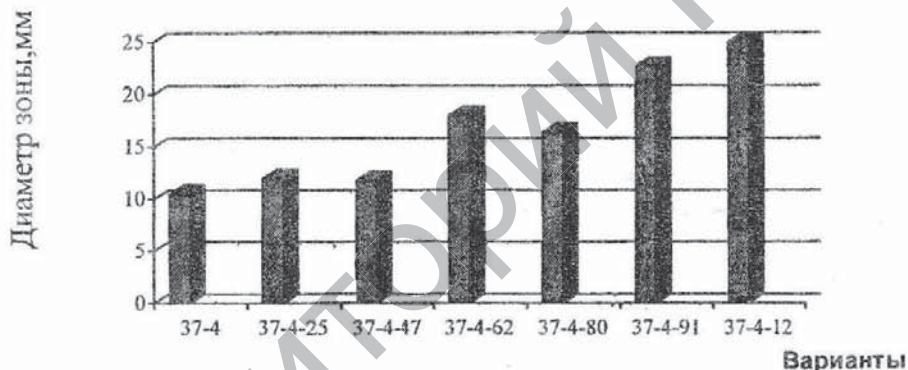


Рисунок 2 - Отбор активного варианта по зоне гидролиза субстрата

При сравнительных исследованиях биосинтетической способности отобранных 6 клонов был выявлен наиболее активный штамм *A. foetidus* 37-4-12, полученный при облучении в течение 7 минут. Уровень активности пектолитических ферментов селекционированного штамма превосходил активность родительского штамма *A. foetidus* 37-4. Особенно это наблюдалось при выращивании на среде, содержащей высокометоксилированный цитрусовый пектин:

- по общей пектолитической – на 10 %;
- по эндополигалактуроназной – на 88 %;
- по пектинэстеразной – на 93 %

Для дальнейшего повышения физиологической активности отобранного

штамма была проведена 2-ая ступень мутагенеза. Отсев мутантов проводили на агаризованные среды, содержащие солодовое сусло и высокометоксилированный цитрусовый пектин. Длительность облучения составила 6-8 минут. Уровень активности варианта, полученного после 2 ступени облучения превысила уровень активности варианта после 1 ступени:

- по общей пектолитической – на 4,5 %;
- по эндополигалактуроназной – на 8 %;
- по пектинэстеразной – на 17 % (табл.5).

Таблица 5 – Ферментативная активность отобранных вариантов *A. foetidus*

Варианты селективных агаризованных сред	Режим УФ, мин.	Разведение споровой суспензии	Активность ферментов пектолитического комплекса						
			ПкС		Эндо-ПгС		ПэС		
			ед/см ³	%	ед/см ³	%	ед/см ³	%	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	
1 ступень									
Солодовое сусло (род.штамм)	-	-	1,60	100,0	0,5	100,0	0,43	100,0	
Цитрусовый пектин высокометоксилированный	5'	10 ⁻⁴	0,91	76,0	0,62	124,0	0,23	53,4	
	7'	10 ⁻⁴	1,77	110,6	0,94	188,0	0,71	165,0	
Цитрусовый пектин низкометоксилированный	5'	10 ⁻⁴	1,46	91,3	0,58	116,0	0,83	193,0	
	7'	10 ⁻⁴	1,39	86,9	0,52	104,0	0,47	109,3	
Солодовое сусло	5'	10 ⁻⁴	1,53	95,6	0,74	148,0	0	0	
	7'	10 ⁻⁴	1,43	89,4	0,69	138,0	0,71	165,0	
2 ступень									
Солодовое сусло (род.штамм)	-	-	1,60	100,0	0,5	100,0	0,43	100,0	

1	2	3	4	5	6	7	8	9
	6'	10 ⁻⁵	1,85	104,5	1,02	108,5	0,83	116,9
	7'	10 ⁻⁵	1,79	101,1	0,98	104,2	0,75	105,6
	8'	10 ⁻⁵	1,74	98,3	0,96	102,2	0,69	97,0
Цитрусовый высокометоксилир ованный	6'	10 ⁻⁵	1,55	96,9	0,86	91,0	0,55	77,4
	7'	10 ⁻⁵	1,49	84,2	0,82	87,2	0,48	67,6
	8'	10 ⁻⁵	1,4	79,0	0,76	80,8	0,22	30,9
3 ступень								
Солодовое сусло (род.штамм)	-	-	1,85	100,0	1,02	100,0	0,83	100,0
Солодовое сусло	7'	10 ⁻⁵	1,67	90,2	0,72	70,5	0,77	92,7
	9'	10 ⁻⁵	1,48	80,0	0,81	79,4	0,52	62,6
Цитрусовый высокоме- токсилированный	7'	10 ⁻⁵	1,88	101,6	0,97	95,0	0,87	104,8
	9'	10 ⁻⁵	2,02	109,2	1,35	132,4	0,95	114,5

После 3-ой ступени облучения получили штамм, превосходящий по активности вариант, полученный после 2-ой ступени:

- по общей пектолитической - на 9%;
- эндополигалактуроназной - на 32%;
- пектинэстеразной - на 14% (табл.5).

Таким образом, в результате многоступенчатой селекции был получен штамм *A.foetidus* 379-К, который превышал уровень активности родительского штамма *A.foetidus* 37-4:

- по общей пектолитической - на 24%
- по эндополигалактуроназной - на 128%,
- по пектинэстеразной - на 124%.

2.2.4 Культурально - морфологическая характеристика отобранного штамма *Asp.foetidus* 379-К

Полученный вариант отличался от исходной культуры не только высокой биохимической активностью, но и некоторой морфологической гетерогенностью при

рассевах на твердых агаризованных питательных средах.

Размер 4-5-ти суточных гигантских колоний гриба *A.foetidus* 379 – К составил 3,0-4,5см в диаметре, а у родительского *A.foetidus* 37-4 – 2,8-3,5см. Цвет колоний темно-коричневый, почти черный у родительского штамма, а у мутантного – из-за обильного образования воздушного мицелия колонии имеют более серый оттенок. Колонии более выпуклые с небольшой возвышенностью в центре. Поверхность колонии более складчатая, чем у родительского штамма. Обратная сторона колонии светло-коричневая. Край колонии ровный, слегка складчатый. На агаризованной среде вокруг колонии наблюдается светлая зона – зона гидролиза субстрата ферментом. На среде, содержащей индикатор метилрот, она наиболее ярко выражена.

2.2.5 Исследование процессов биосинтеза экзопектиназ и состава ферментативного комплекса, продуцируемого грибом *A.foetidus* 379-К

Исследование регуляторных механизмов ферментообразования является необходимым условием целенаправленного использования биосинтетического аппарата микроорганизмов.

На следующем этапе работы исследовали процессы биосинтеза экзопектиназ, а также компонентный состав ферментного комплекса, синтезируемого мутантным штаммом *Aspergillus foetidus* 379-К.

В ходе проведения работы изучена динамика накопления пектолитических ферментов в процессе роста культуры *A.foetidus* 379-К (рис.3).

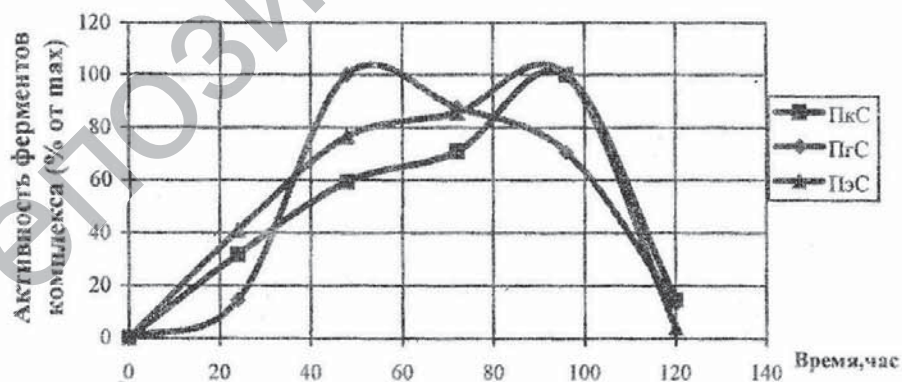


Рисунок 3– Динамика накопления пектолитических ферментов в процессе роста культуры *A.foetidus* 379-К

Полученные данные подтверждают взаимосвязь биосинтетических и физико-химических процессов, происходящих в период роста и развития микроорганизмов. Показано, что в начальный период в стационарной фазе роста культуры гриба *Aspergillus foetidus* 379-К происходят изменения pH культуральной жидкости в сторону более кислых значений, связанные, по-видимому, с накоплением органических кислот (рис.4). В это же период отмечена наибольшая скорость синтеза экзогидролаз (рис. 3). Так, на 24ч. роста гриба pH с 5,5 понижался до 4,0 и начинался синтез пектолитических ферментов. Через 48ч. выращивания pH среды снижался до 2,9 и активность эндополигалактуроназы достигала максимума $-1,37 \text{ед/см}^3$. После 72ч. роста pH среды повышался, а через 96ч. достигал значения 4,3.

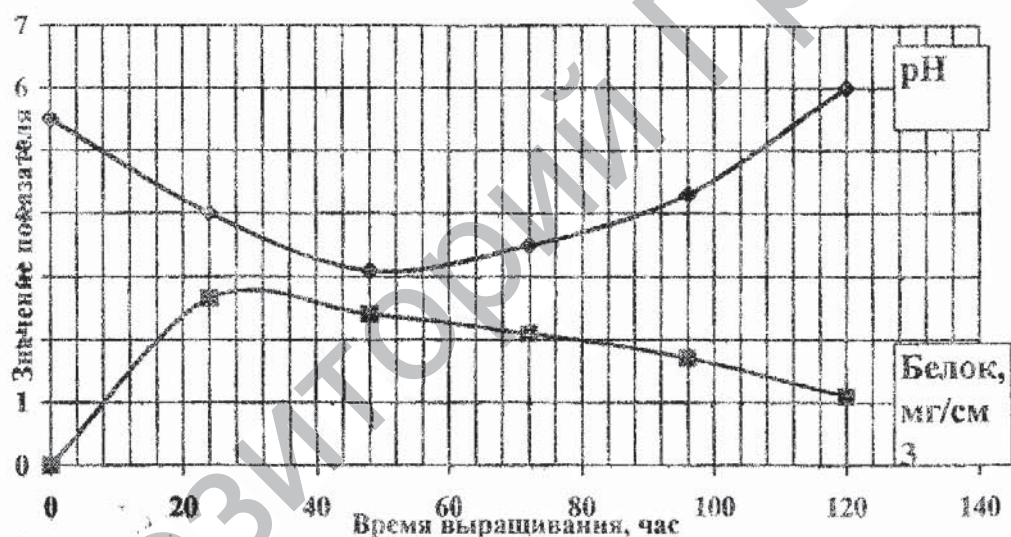


Рисунок 4— Динамика накопления белка и изменения pH в культуральной жидкости гриба *A. foetidus* 379-К

Можно предположить, что изменение концентрации ионов H^+ при культивировании гриба *Aspergillus foetidus* 379-К носит приспособительный характер. При этом микроорганизмы, развиваясь и ассимилируя питательные вещества, выделяют в среду продукты обмена, в т.ч. пектиназы, создавая условия для сохранения их активности на оптимальном уровне. В фазе затухания происходит

снижение потребности микроорганизма в питании и торможение синтеза пектолитических ферментов, а далее – их инактивация, связанная с автолизом клеток.

Таким образом, в результате многоступенчатой селекции и мутагенеза исходного штамма *A.foetidus* 37 был получен новый активный мутантный штамм *A.foetidus* 379-К, продуктивность которого по отношению к пектиназам была увеличена в 4 раза. На основе установленных закономерностей синтеза пектолитических ферментов и условий культивирования штамма уровень активности ферментов была увеличена еще на 30% (рис.5).

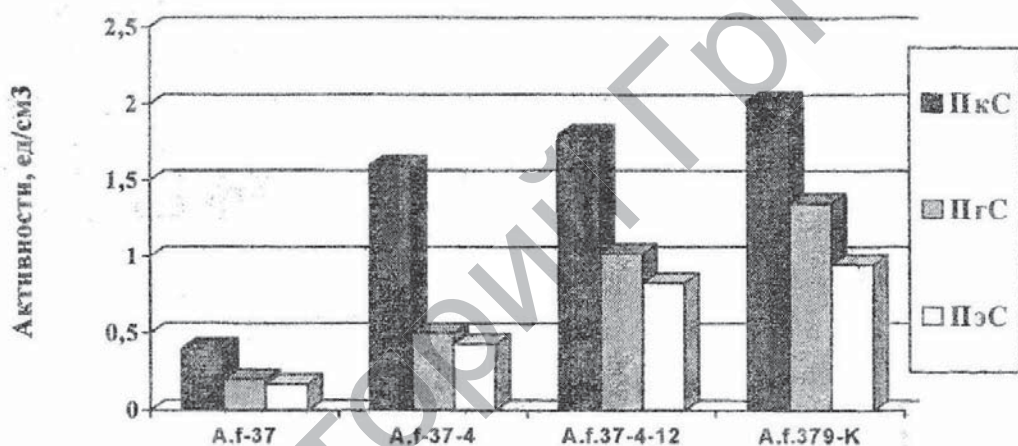


Рисунок 5- Результаты селекции и мутагенеза микромицета *A.foetidus* 379-К

2.2.6 Получение комплексного ФП Пектофоетидин Г10Х и Г18Х

2.2.6.1 Изучение условий получения ФП Пектофоетидин Г10Х и Г18Х и их биохимическая характеристика

С целью получения концентрированного ФП Пектофоетидин из глубинной культуры *Aspergillus foetidus* 379-К были проведены исследования по получению препарата методом осаждения активного белка этанолом из культуральной жидкости. При этом варьировали соотношением спирта и к.ж. (табл.6).

Таблица 6– Выход ФП Пектофестидин Г 10 X в различных вариациях количества к.ж. и спирта

Соотношение к.ж.: спирт	Активность пектолитического комплекса ферментов, %		
	ПкС	Эндо-ПгС	ПэС
1:2,5	84,2	63,6	81,3
1:3	100	100	100
1:3,5	71,7	45,2	76,2
1:4	17	31,9	47,5
1:4,5	14	17,4	52,9

В результате проведенных экспериментов были подобраны оптимальные условия получения ферментного препарата (соотношение к.ж.: этанол = 1:3).

Изучена биохимическая характеристика полученного пектолитического препарата Пектофестидин Г10Х, которая приведена в таблице 7. Концентрация белка в препарате 194 мг/г.

Таблица 7– Характеристика спиртоосажденного препарата

Ферменты, входящие в комплекс	Активность ферментов, ед/г препарата	Удельная активность, ед/мг белка
Общая пектиназа	397	2,0
Эндополигалактуроназа	245,5	1,22
Пектинэстераза	125,5	0,62
В-Глюканаза	395,0	1,02
Ксиланаза	89,7	0,46
Целлюлаза	165,5	0,85
Хитиназа	2,53	0,013

При совместной работе с лабораторией мембранных технологий ГНУ ВНИИПБТ был получен ФП в виде ультраконцентрата на мембране УПМ-20. При этом к.ж. удалось сконцентрировать в 8 раз и получить препарат со следующими активностями ферментов:

- общая пектолитическая – 16,8 ед/см³;
- эндополигалактуроназная – 7,6 ед/см³;
- пектинэстеразная – 5,4 ед/см³

Концентрация белка в ультраконцентрате – 8,7 мг/см³

Проведенные хроматографические исследования биохимического состава ферментного препарата на кафедре энзимологии МГУ им. Ломоносова подтвердили многокомпонентность ферментативной системы ФП Пектофоетидин Г10Х (рис.6). Результаты анализа показали, что препарат проявил высокую активность к полигалактуроновой кислоте, что обеспечивается присутствием полигалактуроназы, и высокую общую пектиназную вискозиметрическую активность (совместное действие полигалактуроназы и пектинэстеразы). Уровень пектиллазной активности был достаточно низким, что способствует более эффективному действию пектолитического комплекса при получении и осветлении соков из плодово-ягодного сырья. Кроме того, препарат содержал ряд ферментов гемицеллюлазного комплекса, что соответствует наличию активностей к ксилану, β – глюкану, ксилоглюкану, арабинану, галактану, галактоманнану. Препарат обладал рядом гликозидазных активностей по отношению к пара-нитрофенильным производным сахаров, а также в препарате была обнаружена протеаза, активная в «кислой» области рН (табл.8).

Таким образом, исследуемый ферментный комплекс препарата на основе гриба *Asp.foetidus* 379-К является мультикомпонентным, с преимущественным содержанием пектиназ (в первую очередь, полигалактуроназ), а также с разнообразным составом гемицеллюлаз (ксилаза, β – глюканаза и т.д.).

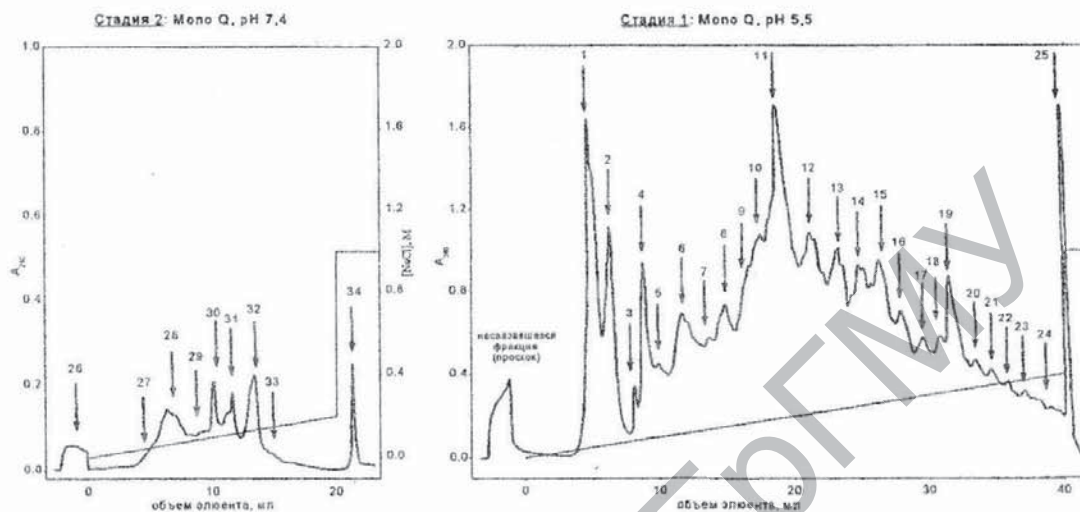


Рисунок 6 – Аналитическое фракционирование ферментного препарата Пектофоетидин Г20Х, полученного на основе *Aspergillus foetidus* 379-К

Таким образом, скрининг активного мутантного штамма и разработка условий культивирования и биосинтеза экзопектиназ позволили получить новый ФП Пектофоетидин Г10Х, отличающийся от ранее известного Пектофоетидин П10Х (табл.8).

Полученный по разработанной технологии новый препарат Пектофоетидин Г10Х на основе мутантного штамма *A.foetidus* 379-К, обладал более высокой эндополигалактуроназной активностью (в1,3раза) и более низкой пектинэстеразной.

Таблица 8– Сравнительная характеристика ФП Пектофоетидин Г10Х и П10Х

Активности ферментов	Пектофоетидин П10Х	Пектофоетидин Г10Х
1	2	3
Общая пектолитическая, ед ПкС/г	233,8	397,0
Эндополигалактуроназная, ед Эндо-ПкС/г	187,0	245,5
Пектинэстеразная, ед ПвС/г	238,2	125,5

1	2	3
В-Глюканазная, ед β -ГКС/г	618,1	395,0
Целлюлолитическая, ед ЦС/г	196,8	165,5
Ксиланазная, ед КС/г	146,8	89,7
Хитинаязная, ед ХС/г	2,83	4,53

Полученные данные указывают на возможность более эффективного использования нового препарата пектиназ в связи с его высокой активностью и сниженным содержанием пектинэстеразы, что позволяет интенсифицировать процесс гидролиза пектина и сократить при этом образование метанола.

2.2.6.2 Изучение pH- и термостабильности препарата пектиназ, полученных из *Aspergillus foetidus* 379-K

Для использования ферментного препарата пектиназ необходимо знание его физико-химических свойств.

В связи с этим были проведены эксперименты по изучению влияния pH и температуры на стабильность ферментного препарата.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что ферментный препарат стабилен в диапазоне pH от 4,0 до 5,0 (рис.10-13) и температуре до 50°C (рис.8,9).

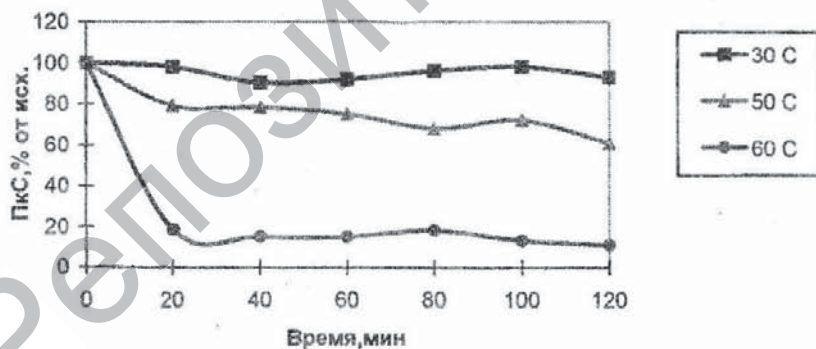


Рисунок 7 – Влияние температуры и времени инкубирования на стабильность общей пектиназы

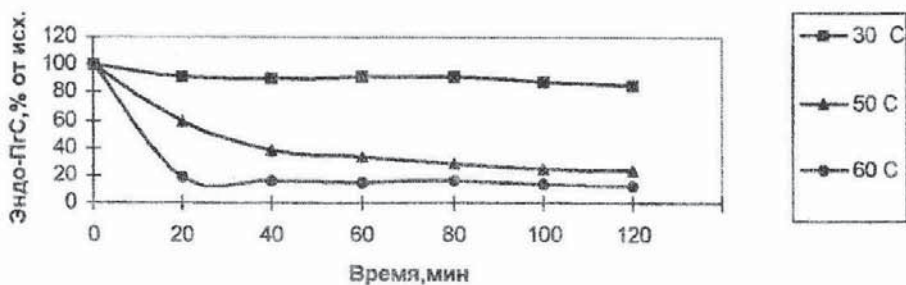


Рисунок 8 – Влияние температуры и времени инкубирования на стабильность эндополигалактуроназы

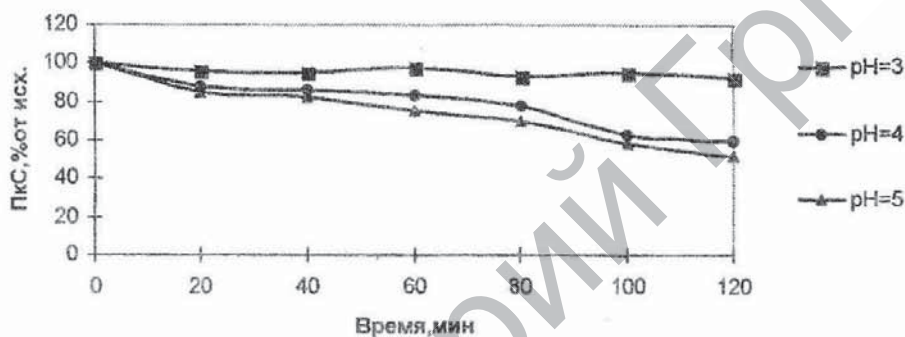


Рисунок 9 – Влияние pH и времени инкубирования на стабильность общей пектиназы при температуре 30°C

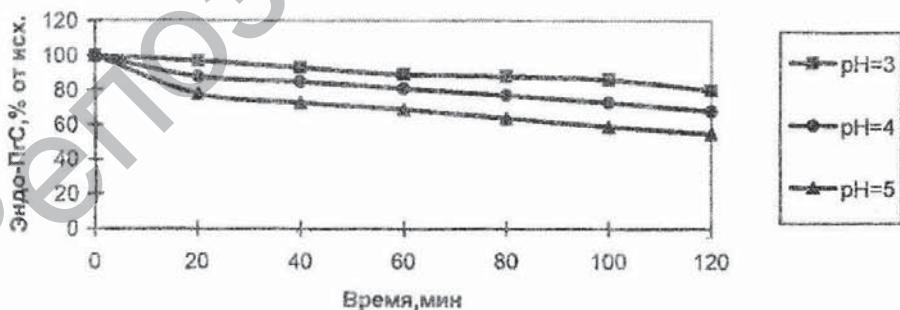


Рисунок 10 – Влияние pH и времени инкубирования на стабильность эндополигалактуроназы

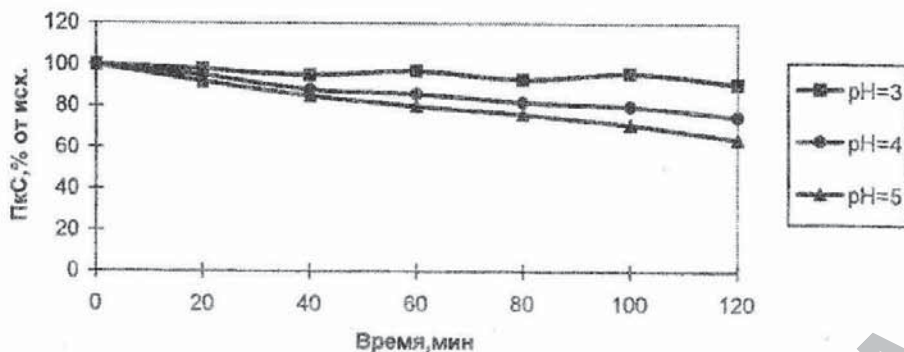


Рисунок 11 – Влияние pH и длительности инкубирования на стабильность общей пектиназы при 50°C

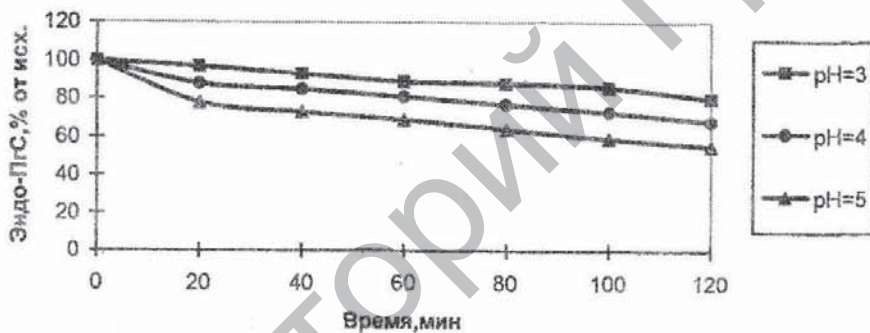


Рисунок 12 – Влияние pH и длительности инкубирования на стабильность эндополигалактуроназы

2.2.7 Исследование эффективности действия ФП пектиназ на деструкцию клюквенного сырья при получении соков.

На следующем этапе работы был проведен ряд экспериментов, направленных на изучение влияния полученных препаратов на биоконверсию плодово-ягодного сырья (клюквы).

Таблица 10 – Результаты гидролиза клюквы ультраконцентратом и спиртоосажденным препаратами, полученными из глубинной культуры *A.foetidus* 379-К

Показатель	Спиртоосажденный препарат	Ультраконцентрат	Контроль (без ФП)
	% от контроля		
Выход сока	120	110	100
Динамическая вязкость	49,5	49,8	100
Кислотность в пересчете на лимонную	105,0	108,8	100
Содержание общих фенольных веществ	62,9	100	100
СВ	7,9	8,0	7,6
РВ	100	103,7	100
Содержание пектиновых веществ	81,8	82,6	100

Эффективное использование исследуемых пектолитических ферментных препаратов позволило (табл.10):

- увеличить выход сока-самотека на 10-20%;
- снизить вязкость соков на 45-50%;
- увеличить содержание органических кислот на 5-8%;
- увеличить содержание сухих веществ на 4-5%;
- улучшить органолептические показатели соков.

Таким образом, показана возможность эффективного использования пектолитических ферментных препаратов, выделенных из глубинной культуры *A.foetidus* 379-К, для гидролиза клюквы, при этом не только повышался выход сока, но и его качество.

3 Выводы

1. Проведена сравнительная характеристика различных микроорганизмов – продуцентов пектолитических ферментов и отобран в качестве исходного -

- штамм *Aspergillus foetidus* –37. При селекции исходного штамма выделен активный штамм *Aspergillus foetidus* –37-4, биосинтетическая способность которого по отношению к экзопектиназам увеличена в 2 раза. Исследованы физиолого-биохимические и морфологические признаки отобранного штамма, подобрана питательная среда, обеспечивающая повышение активности селекционированного штамма на 30%.
2. Разработан новый экспресс-метод отбора активных вариантов при селекции микромицетов – продуцентов пектиназ.
 3. На основе многоступенчатой селекции и мутагенеза осуществлен скрининг нового мутантного штамма *Aspergillus foetidus* –379-К, биосинтетическая активность которого превышала исходный штамм на 200%. Разработаны условия культивирования микромицета, обеспечивающие максимальный синтез полигалактуроназ (48 ч роста), пектинэстераз (96 ч роста) при оптимальной температуре роста 32°C, исходном pH среды 5,5.
 4. Исследованы физико-химические свойства ФП Пектофоедин Г10Х и установлены оптимальные условия действия пектиназ (pH 4,0-5,0, температура 35-45°C) и условия обеспечивающие стабильность ферментных препаратов и сохранение уровня активности пектолитических ферментов в течение длительного времени (pH стабильность-3,0-5,5, термостабильность 30-50°C).
 5. Разработан способ и оптимальные параметры процесса получения концентрированных ферментных препаратов пектиназ: Пектофоедин Г10Х и Г18Х. Установлено, что общая пектолитическая и полигалактуроназная активности препарата пектиназ Пектофоедин Г10Х, полученного на основе нового мутантного штамма в 1,3 раза превосходят активности известного препарата Пектофоедин П10Х.
 6. Методом хроматографического фракционирования исследован ферментный комплекс, синтезируемый селекционированным микромицетом. Показана его многокомпонентность и состав основных (полигалактуроназа, пектинэстераза, β-глюканазы) и минорных ферментов (ксиланаза, целлюлаза, кислая протеаза, пектинлиаза, арабиназа, галактоманназа,).
 7. Проведены производственные испытания и показана эффективность полученного комплексного ферментного препарата пектиназ в производстве

соков и морсов.

8. Экономическая эффективность от производства 1т ферментного препарата пектиназ по предложенной технологии составит до 1млн.рублей в год.

4 Практические предложения

На основании полученных в результате исследований материалов разработаны Технологическая инструкция по производству ферментного препарата Пектофоетидин Г10Х, а также Технические условия на ферментный препарат Пектофоетидин Г10Х (ТУ №9291-092-00334586-2008).

5 Список публикаций

1. Римарева Л.В., Соколова Е.Н., Климачева Л.М., Двадцатова Е.А. Синтез пектиназы культурой *A. foetidus* МБ. // Сб.трудов научно-практической конференции «Наукоемкие и конкурентноспособные технологии продуктов питания со специальными свойствами». Углич: ВНИИМС, 2003г, с.389-390.

2. Римарева Л.В., Соколова Е.Н., Климачева Л.М., Двадцатова Е.А. Изучение условий биосинтеза внеклеточной пектиназы в глубинной культуре *A.foetidus*. // Хранение и переработка с/х сырья. – 2004г, №9, с.30-31.

3. Соколова Е.Н., Римарева Л.В. Изучение физиологии питания микромицета *A.foetidus* МБ, синтезирующего внеклеточную пектиназу. // Хранение и переработка с/х сырья. – 2005г, №5. – с.39-40

4. Соколова Е.Н., Климачева Л.М., Двадцатова Е.А., Римарева Л.В. Разработка ускоренного микробиологического способа определения внеклеточной пектиназы, образуемой микромицетом *A foetidus* МБ.. // Хранение и переработка с/х сырья. – 2005г, №9, с.35-36.

5. Соколова Е.Н., Римарева Л.В., Двадцатова Е.А., Климачева Л.М., Курбатова Е.И., Семенова М.В., Сеницын А.П. Изучение физиолого-морфологических и биохимических свойств *A foetidus* МБ-4 – продуцента пектолитических ферментов. // Сб. научных трудов под редакцией Полякова В.А., Римаревой Л.В. «Микробные биокатализаторы для перерабатывающих отраслей АПК» М.: ВНИИПБТ, 2006г, с.69-76.

6. Соколова Е.Н., Курбатова Е.И., Римарева Л.В. Исследование процесса биосинтеза пектолитических ферментов при глубинном культивировании *A foetidus* МБ-4. // Сб. материалов XII Всероссийской научно-практической конференции «Проблемы создания продуктов здорового питания. Наука и технологии», Углич: ВНИИМС, 2006г, с.241-242.

7. Соколова Е.Н., Римарева Л.В., Курбатова Е.И. Использование комплексного пектолитического ферментного препарата для деструкции плодово-ягодного сырья. // Сб. трудов Международной научно-практической конференции «Технологические и микробиологические проблемы консервирования и хранения плодов и овощей» к 100-летию В.И.Рогачева, ГНУ ВНИИКОП, 2007г, с.276-279.

8. Римарева Л.В., Курбатова Е.И., Юскина О.Н., Соколова Е.Н., Климачева Л.М. Мультиэнзимная система для гидролиза биополимеров клеточной стенки дрожжей с целью получения белковых изолятов для пищевой промышленности. // Сб. материалов научно-практической конференции «Интеграция фундаментальных и прикладных исследований – основа развития современных аграрно-пищевых технологий», Углич, 2007г, с.287-290.

9. Римарева Л.В., Соколова Е.Н., Климачева Л.М., Курбатова Е.И. Селекция штаммов-продуцентов пектолитических ферментов для биотрансформации растительного сырья. // Сб. «Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов». Материалы Международной научно-практической конференции 20-21.12.2007. Щелково-2007г,с.304-308

10. Римарева Л.В., Курбатова Е.И., Юскина О.Н., Соколова Е.Н., Климачева Л.М. Влияние различных ферментативных систем на процессы биокатализа полимеров клеточных стенок дрожжей с целью получения оптимального мультиэнзимного комплекса для деструкции полимеров клеточных стенок // Сб. научных трудов 4-го Международного научно-практического симпозиума «Микробные биокатализаторы и их роль в нано- и биотехнологиях», Москва, 2008г, с.115-121.