

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

Южно-Казахстанский
государственный университет
им. М. Ауезова, Казахстан, Шымкент

**Иммобилизация клеток
мицелиального гриба –
продуцента пектолитических
ферментов**

Одним из наиболее эффективных подходов к получению и стабилизации ферментов, а также повышению их экономической привлекательности является иммобилизация с использованием нерастворимых носителей. Для получения высокопродуктивного иммобилизованного биокатализатора на основе клеток мицелиального гриба *Aspergillus awamori* 56-2-53-85-375, способного в иммобилизованном состоянии секретировать внеклеточные пектиназы в течение длительного времени культивирования, технологически проработан и апробирован метод иммобилизации клеток в криогель поливинилового спирта. Данный носитель представляет собой макропористый вязкоупругий гелевый материал, полученный в результате криогенной обработки, т.е. после замораживания – выдерживания в замороженном состоянии – оттаивания водных растворов данного полимера. Приготовленный таким образом высокоактивный иммобилизованный биокатализатор на основе криогеля поливинилового спирта характеризуется длительным и стабильным биосинтезом комплекса пектолитических ферментов без нарушения технологического режима. Уровень суммарно накапливаемой пектолитической активности разработанного иммобилизованного биокатализатора превышал в 3,5 раза уровень штамма *A. awamori* 56-2-53-85-375, полученного в результате многоступенчатой селекции, используемого без иммобилизации. Таким образом, полученные пектолитические ферменты можно не подвергать очистке и активации, а в нативном виде использовать в виноделии.

Ключевые слова: Иммобилизованные клетки, мицелиальный гриб, биокатализатор, пектолитические ферменты, криогель поливинилового спирта.

Dzhakasheva M.A.,
Kedelbayev B.Sh., Esimova A.M.

M. Auezo, s South-Kazakhstan state
university, Kazakhstan, Shymkent

**Immobilization of cells of
filamentous fungi – producer
pectolytic enzymes**

One of the most effective approaches to the enzymes' preparation and stabilization, as well as increase in their economic attraction is immobilization using insoluble carriers. A method of the cell immobilization into a cryogel of polyvinyl alcohol has been technologically studied and approved to produce a high-productive immobilized biocatalyst on the basis of filamentous fungus cells *Aspergillus awamori* 56-2-53-85-375, able in the immobilized state to secrete extracellular pectinases during long culture period. This carrier is a macroporous visco-elastic gel material, obtained in a result of cryogenic treatment, i.e. after freezing – frozen conditioning – melting of the polymer's water solutions. Prepared in a such manner highly active immobilized biocatalyst on the basis of polyvinyl alcohol cryogel is characterized by long and stable biosynthesis of the pectolytic enzyme complex without loss of technological mode. Summarily accumulative pectolytic activity level of the developed immobilized biocatalyst exceeded in 3,5 times the level of *A. awamori* 56-2-53-85-375 strain, obtained in a result of many-staged selection used without immobilization. Thus, there is no need to clean and activate the obtained pectolytic enzymes, they can be used in a native view in the wine industry.

Key words: Immobilized cells, filamentous fungi, biocatalyst, pectolytic enzyme, polyvinyl alcohol cryogel.

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

М. Әуезов атындағы Оңтүстік
Қазақстан мемлекеттік университеті,
Қазақстан, Шымкент

**Пектолитикалық
ферменттердің мицелиалы
саңырауқұлақ продуценті
жасушасының
иммобилизациясы**

Перспективными продуцентами полиненасыщенных жирных кислот считаются микроорганизмы, в связи с их высокой скоростью роста на простых средах, возможностью накопления большого количества липидов и полиненасыщенных жирных кислот, а также возможностью манипулировать их метаболизмом. В работе было изучено содержание липидов и жирнокислотный состав мицелиальных грибов, дрожжей и бактерий, выделенных из воды и почв Казахстана. Было показано, что исследуемые микроорганизмы содержат от $4,3 \pm 0,4$ до $15,1 \pm 1,5\%$ липидов от сухой массы, а также содержат практически значимые полиненасыщенные жирные кислоты: линолевую, α - и γ -линоленовые, эйкозапентаеновую. В качестве перспективных продуцентов липидов и ценных полиненасыщенных жирных кислот были отобраны мицелиальные грибы *Petromyces alliaceus*, *Mucor circinelloides* и дрожжи *Auerobasidium commune*, *Yarrowia lipolytica*.

Түйін сөздер: Иммобилизденген жасушалар, мицелиалы саңырауқұлақ, биокатализатор, пектолитикалық фермент, поливинилді спирттің криогелі.

ИММОБИЛИЗАЦИЯ КЛЕТОК МИЦЕЛИАЛЬНОГО ГРИБА – ПРОДУЦЕНТА ПЕКТОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

Введение

Пектолитические ферменты составляют уникальную группу ферментов гидролитического действия, которые катализируют деградацию пектиновых полимеров [1]. Производство пектолитических ферментов составляет около 10% всего мирового производства ферментных препаратов [2].

Одним из определяющих направлений регуляции каталитической активности ферментов является иммобилизация фермента на различных органических и неорганических носителях, как природных, так и синтетических. Такой способ универсален, поскольку отличается простотой применяемых методик, обеспечивает равномерное распределение фермента в объеме носителя и получение стабильных, хорошо воспроизводимых по аналитическим характеристикам иммобилизованных препаратов. Кроме того, закрепление ферментов на твердых носителях позволяет значительно улучшить механические свойства ферментных препаратов [3]. Также биокаталитические системы на основе иммобилизованных клеток (ИМК) обладают повышенной устойчивостью к воздействию негативных факторов (рН, температуры, компонентов среды культивирования, и др.) и длительным сохранением метаболической активности при их многократном использовании в биотехнологических процессах при отсутствии заметного лизиса клеток [4]. Анализ литературных данных свидетельствует об изменении биохимического статуса разных ИМК в сравнении со свободными, выражающемся в увеличении уровня синтеза ферментов основного метаболизма в 2-3,5 раза. В основе изменения характеристик ИМК в сравнении со свободными клетками лежит именно создаваемая в интересах биотехнологических процессов их высокая концентрация в образцах гетерогенных биокатализаторов и в объемах реакторов [5].

В качестве носителей для иммобилизации ферментов широко используют как органические полимеры, так и неорганические материалы. К носителям предъявляются определённые требования: они должны быть нерастворимы в реакционной среде, обладать химической, биологической стойкостью, механической прочностью, не вызывать неспецифической адсорб-

ции и сильных конформационных изменений молекулы белка, легко гранулироваться и активироваться [6].

Перспективными носителями для иммобилизованных ферментов являются криогели поливинилового спирта – макропористые вязкоупругие полимерные гелевые материалы, получаемые в результате криогенной обработки, то есть после замораживания – выдерживания в замороженном состоянии – оттаивания водных растворов данного полимера. Поливиниловый спирт (ПВС) доступен, является продуктом крупнотоннажного синтеза, каждая его марка стандартизована. Благодаря высокой прочности, выраженной пористости, биосовместимости и стабильности в биологических средах криогели ПВС нашли широкое применение в различных областях биотехнологии [4].

Целью наших исследований является получение высокопродуктивного иммобилизованного биокатализатора на основе клеток мицелиальных грибов, способных в иммобилизованном состоянии секретировать внеклеточные пектиназы в течение длительного времени культивирования без нарушения технологического режима.

Материалы и методы исследований

Культура мицелиального гриба *Aspergillus awamori* 56-2-53-85-375 получена в результате многоступенчатой селекции и мутагенеза на кафедре биотехнологии ЮКГУ им. М. Ауэзова, она поддерживается на скошенном сусло-агаре при 4°C [7].

Активность пектолитического комплекса ферментов определяли по методике действующего ГОСТ 20264.3-81. 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 сернокислым цинком при проведении гидролиза в строго определенных условиях: $t=30^{\circ}\text{C}$, $\tau=1$ ч, pH 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 [8].

Иммобилизацию клеток штамма *A. awamori* 56-2-53-85-375 проводили по методу [5], в котором в качестве носителя ИмК использовали криогель поливинилового спирта (ПВС). С этой целью использовали 2-х суточную культуру грибов, которую вводили при формировании криогеля ПВС после чего тщательно перемешивали до получения однородной массы и гранулировали по методу [6]. Данный носитель представляет собой макропористый вязкоупругий гелевый материал, полученный в результате криогенной обработки, т.е. после замораживания – выдерживания в замороженном состоянии – оттаивания водных растворов данного полимера. Замораживание осуществляли при температуре не ниже, чем несколько десятков градусов от точки замерзания чистого растворителя. Образующийся криогель имел макропористую (от 0,1 до 10 мкм) структуру с взаимосвязанными порами. После иммобилизации препарат культивировали в жидкой питательной среде для преимущественного биосинтеза комплекса пектолитических ферментов.

Процесс культивирования осуществляли глубинным способом в конусообразных колбах Эрленмейера объемом 250 мл на термостатированной качалке (220 об/мин) при температуре 30°C с pH 3,2 в течение 84 ч. Питательная среда имела следующий состав, %: свекловичный жом : виноградные выжимки: хлопковые створки (1:1:1) – 3, лактоза – 0,125, солодовые ростки : экстракт из мицелия (1:1) – 1%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,5, K_2HPO_4 – 0,2, MgSO_4 – 0,1

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили стандартными методами вариационной статистики. Статистическую оценку достоверности результатов проводили по общепринятым методам с использованием компьютерных прикладных программ «MathCAD» и «Statistica». Достоверность полученных результатов обеспечивается корректным набором экспериментально-измерительных средств и методов обработки экспериментальных результатов. Примененная в исследовании аппаратура откалибрована по эталонам.

Результаты и их обсуждение

Ранее в лаборатории кафедры «Биотехнология» ЮКГУ им. М. Ауэзова в результате многоступенчатой селекции был получен штамм-продуцент *A. awamori* 56-2-53-85-375, который синтезировал пектиназу с активностью 2,1 ед/мл [7].

Для иммобилизации клеток мицелиального гриба *A. awamori* 56-2-53-85-375 в криогель ПВС были проведены исследования влияния концентрации гелеобразующего полимера и концентрации клеток мицелиального гриба *A. awamori* 56-2-53-85-375 на процесс формирования биокатализатора (таблица 1, 2).

В результате экспериментов установлено, что при концентрации ПВС 60 г/л ухудшаются не только физико-механические свойства данного полимера, но и из-за увеличения среднего се-

чения пор (более 5,0 мкм) происходит прорастание гиф за пределы носителя, что приводит к частичному их отрыву при перемешивании частиц иммобилизованного биокатализатора и загрязнению культуральной среды. При концентрации ПВС более 120 г/л наблюдается угнетение развития биомассы из-за затрудненной диффузии субстратов и продуктов, вызванной маленьким сечением пор (меньше 0,5 мкм), что приводит к меньшему продуцированию пектиназ.

Таблица 1 – Характеристики формирования биокатализатора на основе иммобилизованного в криогель ПВС штамма *A. awamori* 56-2-53-85-375 в зависимости от концентрации ПВС

Концентрация ПВС, г/л	Основные характеристики			
	Удельная скорость роста мицелия, ч ⁻¹	Концентрация биомассы, г/л	Удельная активность, ед/мг им. биомассы	ПкС, ед/мл
60	0,36	8,1	385	6,2
80	0,37	8,1	411	6,6
100	0,38	8,2	465	6,9
120	0,36	8,0	430	6,8
140	0,14	4,4	277	5,0

Таблица 2 – Характеристики формирования биокатализатора на основе иммобилизованного в криогель ПВС штамма *A. awamori* 56-2-53-85-375 в зависимости от концентрации клеток

Концентрация клеток, мл/л	Основные характеристики			
	Удельная скорость роста мицелия, ч ⁻¹	Концентрация биомассы, г/л	Удельная активность, ед/мг им. биомассы	ПкС, ед/мл
0,2	0,36	8,1	385	3,2
0,4	0,37	8,1	411	5,3
0,6	0,38	8,2	465	7,0
0,8	0,36	8,1	430	7,4
1,0	0,35	7,9	277	7,3

Кроме того было установлено равномерное прорастание мицелия по всему объему гранул криогеля ПВС и за счет увеличения плотности упаковки мицелия внутри гранул снижена их влажность с 90% до 80%. Также отмечено увеличение размеров и массы гранул ГБК благодаря высокой скорости роста мицелия. При концентрации клеток мицелиального гриба *A. awamori* 56-2-53-85-375 меньше 0,5 мл/л биокатализатор обладает заметно меньшей пектолитической активностью, а при концентрации более 0,8 ед/мл наблюдается неполное включение всех клеток, введенных в крио-

гель ПВС при формировании биокатализатора, что приводит к частичному их вымыванию при помещении полученных гранул в культуральной жидкости (КЖ). Наибольший синтез пектиназ (7,4 ед/мл) отмечен при концентрации клеток мицелиального гриба 0,8 ед/мл.

На рисунке 1 и 2 показаны влияние концентрации гранул биокатализатора и длительность процесса на максимальный биосинтез внеклеточных пектиназ ИмК штамма *A. awamori* 56-2-53-85-375 при культивировании в жидкой питательной среде. Установлено, что при ис-

пользовании биокатализатора максимальная средняя продуктивность процесса по пектолитической активности составила $1,50 \text{ Ед. мл}^{-1} \text{ ч}^{-1}$,

а максимальная пектолитическая активность, суммарно накапливающаяся в среде за все время ферментации (600 ч), достигла $7,35 \text{ ед/ мл}$.

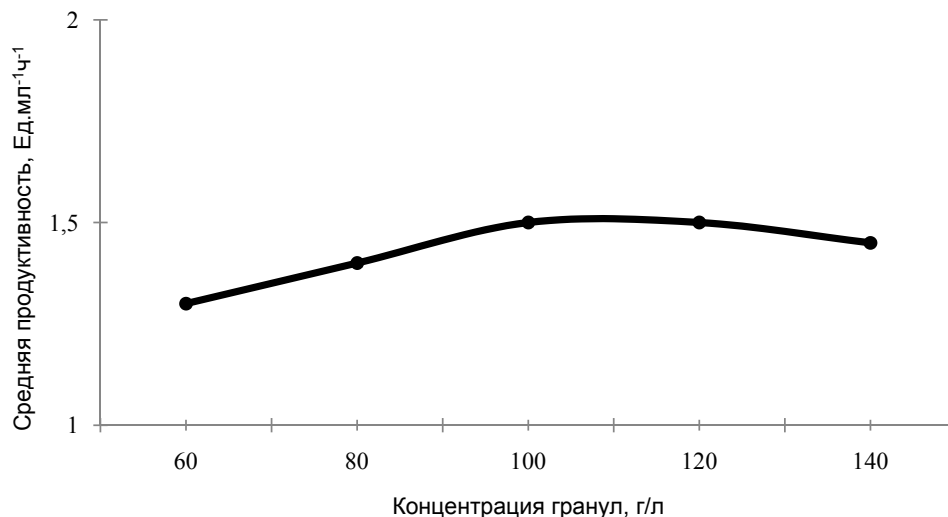


Рисунок 1 – Влияние концентрации гранул биокатализатора на рост и синтез пектиназ иммобилизованного в криогель ПВС штамма *A. awamori* 56-2-53-85-375

Из данных рис. 1 видно, что максимальная средняя продуктивность процесса по пектолитической активности составляет $1,5 \text{ Ед. мл}^{-1} \text{ ч}^{-1}$ при концентрации гранул 100-120 г/л, и пос-

кольку дальнейшее повышение содержания гранул в объеме КЖ не приводит к повышению продуктивности, то в качестве оптимальной концентрации мы выбрали 100 г/л.

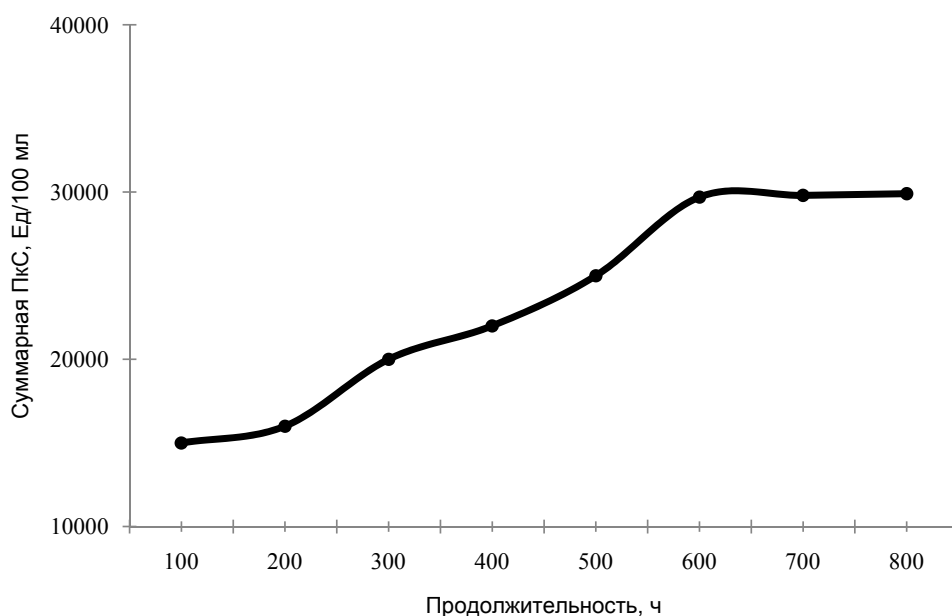
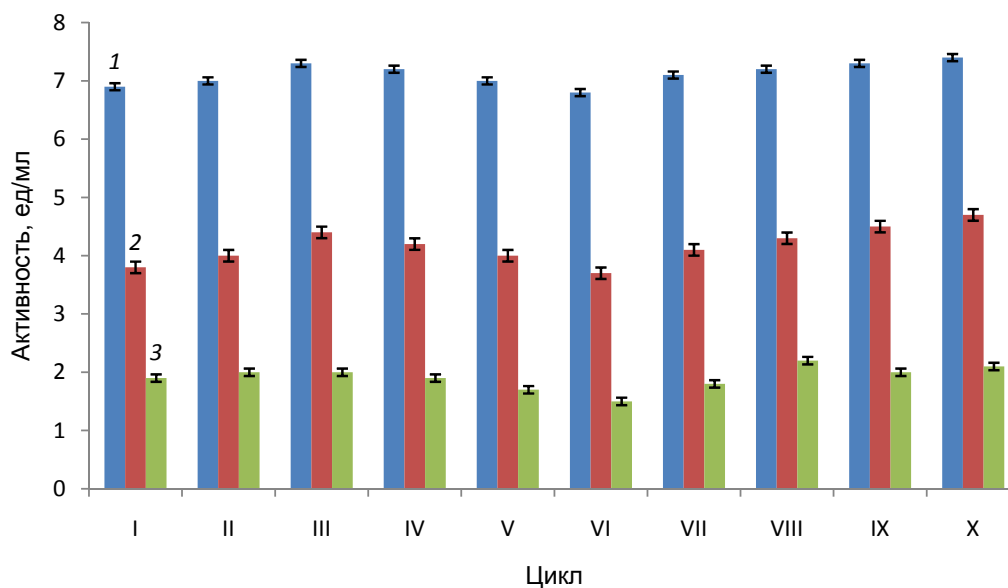


Рисунок 2 – Влияние длительности культивирования клеток штамма *A. awamori* 56-2-53-85-375 в иммобилизованном состоянии

Экспериментально установлено (рис.2), что максимальная пектолитическая активность, суммарно накапливающаяся в среде за все время ферментации (600 ч), достигает 7,35 ед/мл.

Приготовленный таким образом высокоактивный иммобилизованный биокатализатор на основе криогеля ПВС в концентрации 120 г/л, содержащий клетки штамма *A. awamori* 56-2-53-85-375 в концентрации 0,8 ед/

мл характеризуется длительным и стабильным биосинтезом комплекса пектолитических ферментов (рис. 2, 3). Уровень суммарно накапливаемой пектолитической активности разработанного иммобилизованного биокатализатора превышал в 3,5 раза уровень штамма *A. awamori* 56-2-53-85-375, полученного в результате многоступенчатой селекции, используемого без иммобилизации.



Обозначения, активность ферментов, ед/мл: 1- ПкС; 2 – ПгС; 3 – ПэС

Рисунок 3 –Комплекс пектолитической активности, накапливающейся в среде при многократном использовании иммобилизованного штамма *A. awamori* 56-2-53-85-375 в криогеле ПВС

В таблице 3 представлена хроматограмма, полученная при фракционировании внеклеточных пектиназ. Сравнительный анализ ферментативных комплексов, проводимый путем хроматографического разделения белков с пек-

толитической активностью, при использовании растворов NaCl в градиенте 0-0,07 М NaCl, свидетельствует об изменении биохимического статуса разработанного иммобилизованного биокатализатора.

Таблица 3 – Фракционирование КЖ с пектолитической активностью свободных и иммобилизованных клеток штамма *A. awamori* 56-2-53-85-375

Фракция, М NaCl	ПкС, ед/мл		ПгС, ед/мл		ПэС, ед/мл		Белок, мг/мл	
	ИМК	СвК	ИМК	СвК	ИМК	СвК	ИМК	СвК
0,01	2,4	1,5	1,7	0,1	0,5	-	1,2	0,98
0,03	3,4	1,6	1,7	0,2	0,7	-	1,3	-
0,04	3,5	1,6	2,0	0,2	0,7	-	1,4	0,95
0,045	4,0	1,5	2,9	0,4	1,1	0,1	1,5	-

Фракция, М NaCl	ПкС, ед/мл		ПгС, ед/мл		ПэС, ед/мл		Белок, мг/мл	
	ИмК	СвК	ИмК	СвК	ИмК	СвК	ИмК	СвК
0,05	3,8	1,7	2,2	0,3	0,8	0,1	1,3	0,94
0,06	4,2	-	2,7	-	1,0	-	1,6	-
0,07	7,6	2,0	4,4	0,8	2,2	0,4	2,5	0,93

Иммобилизованные клетки штамма *A. awamori* 56-2-53-85-375 обладают более высокой общей пектиназной активностью и полигалактуроназной активностью, что благоприятно для технологии получения красных вин.

Заключение

Достоинства метода иммобилизации на основе криогеля ПВС заключаются в том, что ПВС не оказывает негативного влияния на биосинтез пектолитических ферментов иммобилизованных клеток, а напротив, повышает их жизнеспособность и ферментативную активность благодаря пористой структуре матрицы данного носителя (сечение пор 0,5-1.2 мкм), которая обеспечивает

легкую диффузию компонентов питательной среды и продуктов метаболизма. Кроме того, криогель ПВС является вязкоупругим нехрупким материалом, который практически не подвергается абразивному износу, обладает хорошими эксплуатационными характеристиками в течение длительного времени культивирования (до 600 ч) и способен принять любую форму гранул, подходящую для различных реакторов с разными режимами работы. Как результат, разработанный биокатализатор, обладающий существенно улучшенной средней продуктивностью процесса по пектолитической активности (7,35 ед/мл), поэтому полученные пектолитические ферменты можно не подвергать очистке и активации, а в нативном виде использовать в виноделии.

Литература

- 1 Донцов А.Г., Шубаков А.А. Пектинолитические ферменты: очистка, активация, микробиологический синтез. – Екатеринбург: УрО РАН, 2010, – 163 с.
- 2 Донцов А.Г., Попейко О.В., Артеева А.В. Получение пектинолитического ферментного препарата для структурно-химических исследований полисахаридов: Материалы всероссийского семинара. – Барнаул, 2002. – С. 162-165
- 3 Солдатова Л.С. Бабич О.О. Повышение каталитической активности и стабильности химотрипсина за счет ковалентной иммобилизации на магнитных наночастицах Fe₃O₄ // Техника и технология пищевых производств. 2010, – №1 (16), -С. 512-519.
- 4 Шаскольский Б.Л. Композитные иммобилизованные биокатализаторы с частицами ферментных препаратов, включенных в матрицу криогеля поливинилового спирта. – Москва: автореф. на соис. уч.ст. канд. хим. наук, 2009. – 22 с.
- 5 Ефременко Е.Н., Сенько О.В., Спиричева О.В., Варфоломеев С.Д., Шаскольский Б.Л., Лозинский В.И. Иммобилизованный биокатализатор для микробиологического получения пектиназ: Патент №2383618, Россия, МПК 2008127557/13. Заяв. 09.07.2008. Оpubл. 10.03.2010.
- 6 Лозинский В.И.; Зубов А.Л. Устройство для формирования гранул: Патент № 2104866, Россия, МПК В29В9/10, В01J2/02. Заяв. 02.09.1996. Оpubл. 20.02.1998.
- 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): 593-597.
- 8 Lowry O.H., Rosebrough N.J., Fan A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951. V. 193: 265-275.

References

- 1 Doncov A.G., Shubakov A.A. (2010) Pectolytic enzymes: cleaning, activating, microbiological synthesis. [Pectinolicheskiye fermenty: ochistka, aktivaciya, mikrobiologicheskyy sintez.] Ekaterinburg. UrORAN: 163. (In Russian)
- 2 Doncov A.G., Popeiko O.V., Artyeva A.V. (2002) Getting pectinolytic enzyme preparation for structural and chemical studies of polysaccharides: Proceedings of the seminar. [Polucheniye pectinolicheskogo fermentnogo preparata dlya strukturno-himicheskikh issledovaniy polisaharidov: materialy vserossyskogo seminaru.] Barnaul: 162-165. (In Russian)

- 3 Soldatova L.S. Babich O.O. (2010) Increased catalytic activity and stability of chymotrypsin by covalent immobilization on magnetic nanoparticles Fe₃O₄. Engineering and technology of food production. [Povysheniye kataliticheskoy aktivnosti i stabilnosti himotripsina za schet kovalentnoy immobilizatsii na magnitnykh nanochastichah Fe₃O₄. Tehnika i tehnologiya pichshevyykh proizvodstv.] №1 (16):512-519. (In Russian)
- 4 Shaskolsky B.L. (2009) Composite particles with immobilized biocatalysts enzyme preparations in cryogel matrix of polyvinyl alcohol. [Kompozitnie immobilizovannye biokatalizatory s chasticami fermentnykh preparatov, vkluchennykh v matricu kriogelya polivinilovogo spirta] Moscow: Avtoref. soisk. kond. ch.science, : 22. (In Russian)
- 5 Efremenko E.N., Senko O.V., Spiricheva O.V., Varfolomeev S.D., Shaskolsky B.L. Lozinsky V.I. Immobilized biocatalyst for producing microbial pectinases. [Immobilizovanny biokatalizator dlya microbiologicheskogo polucheniya pectinaz] Patent №2383618, Russia, IPC 2008127557/13. Claim. 09.07.2008. Publ. 10.03.2010. (In Russian)
- 6 Lozinsky V.I. Zubov A.L. An apparatus for forming granules. [Ustroystvo dlya formirovaniya granul] Patent number 2104866, Russia, IPC B29B9 / 10, B01J2 / 02. Claim. 02.09.1996. Publ. 20.02.1998. (In Russian)
- 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): 593-597.
- 8 Lowry O.H., Roserbrough N.J., Fan A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent . J. Biol. Chem. 1951. V. 193: 265-275.