

Р.К. БЛИЕВА, Ж.Қ. РАХМЕТОВА, Ж.Б. СУЛЕЙМЕНОВА, А.Е. НУРЛЫБАЕВА,
Ж.Қ. САДУЕВА

***Aspergillus awamori* 1-8-ДЫҢ ПЕКТИНЫДЫРАТУШЫ ФЕРМЕНТТЕРДІ
БИОСИНТЕЗДЕУІНЕ КӨМІРТЕГІ МЕН АЗОТ КӨЗДЕРІНІҢ ӘСЕРІ**

ҚР БҒМ ҒК РМК «Микробиология және вирусология институты», Алматы қ.

Түйін

Бұл мақалада *Aspergillus awamori* 1-8 культурасының биосинтездік белсенділігін арттыру мақсатында әртүрлі көміртегі мен азот көздерінің әсері зерттелінді. Пектиныдыратушы ферменттердің түзілуі үшін ең жақсы көміртегі көзі пектин қосылған глюкоза, ал азот көзі- күкіртқышқылды аммоний болып табылады. *Aspergillus awamori* 1-8 культурасына пектиныдыратушы ферменттерді түзудің индуцирленген сипаты тән екендігі анықталды. Оңтайлы қоректік орта таңдалынып алынып, соның нәтижесінде пектин ыдыратушы ферменттердің (ПМГ және ПГ) белсенділігі осы кезеңде 3 есеге артты.

Жеміс-жидектерде болатын пектиндік заттардың шырынның тұтқырлығына, оның шығымы мен мөлдірлігіне әсер етуінің салдарынан, қазіргі уақытта тонналаған шикізаттан шырын мен шарап өнімдерінің шығымының аз мөлшерде бөлінуі күрделі мәселе болып отыр [1]. Пектиндік заттар өсімдік массасының шамамен 0,5 – 4% -н құрайды. Бұл мәселені шешудің бір жолы шырын жасау алдында жеміс пен көкөніс езбесіне пектинолитикалық ферменттік препараттарды қосу. Пектиназаларды қосқаннан соң өсімдік ұлпасы мен пектиндік заттардың құрылысы бұзылып, жеміс шырынының тұтқырлығы төмендейді, соның салдарынан жеміс езбесінен шырын көп мөлшерде оңай бөлініп шығады [2,3]. Сонымен қатар, коммерциялық ферменттік препараттарды шырын және шарап өндірісінде қолдану шараптың пісуі, оның экстракциясы, түссіздендірілуі және фильтрациялануы көрсеткіштеріне оң әсер етеді [4].

Қазіргі кезге дейін шырын және шарап өндірісінің барлығында пайдалануға сәйкес келетін пектиныдыратушы ферменттердің мөлшері шектеулі. Осыған орай, белгілі- бір қасиетке ие пектиныдыратушы ферменттердің белсенділігі жоғары продуцентіне скрининг жасау үлкен қызығушылық тудырады. Бұл продуцентті ферменттердің каталитикалық қызметі мен тұрақтылығын оңтайландыру мақсатында көп мөлшерде өндіретіндігі де үлкен зерттеулік қызығушылық байқатады.

Ферменттердің өнеркәсіптік өндірісі өнімділігі жоғары микроорганизм штамдарын талап етеді [5,6]. Алайда өнеркәсіптік ферменттерді өндіру деңгейі төмен болып қалуда. Пектиныдыратушы ферменттердің өнімділігіне ферменттердің продуцент- штамдарының

қоректену физиологиясы үлкен әсер етеді. Бұл жұмыста микроорганизм штамдарының өнімділігіне көміртегі мен азот көздерінің тигізетін әсері жайлы мәліметтер берілген.

Материалдар мен әдістер

Зерттеу объектісі ҚР БҒМ ҒК Микробиология және вирусология институтының микроорганизмдердің физиологиясы мен биохимиясы зертханасының коллекциясынан алынған микромицеттердің штамдары болды. Жұмыста жалпы микробиологиялық және биохимиялық зерттеу әдістері қолданылды.

Егу материалы ретінде қоректік орта көлемінің 2%-ы мөлшерінде ендірілген конидиялардың сулы ерітіндісі қолданылды. Қоректік орта ретінде Чапек ортасы қолданылды: NaNO_3 - 0,7; сахароза – 2,0; KH_2PO_4 – 0,1; MgSO_4 – 0,05; KCl – 0,05; Fe SO_4 – 0,001. *Aspergillus awamori* 1-8 микромицетін өсіруді 3 күн аралығында орбиталды тербегіште 180 грм жылдамдықта, 26-28°C –де мерзімді дақылдау арқылы жүзеге асырдық.

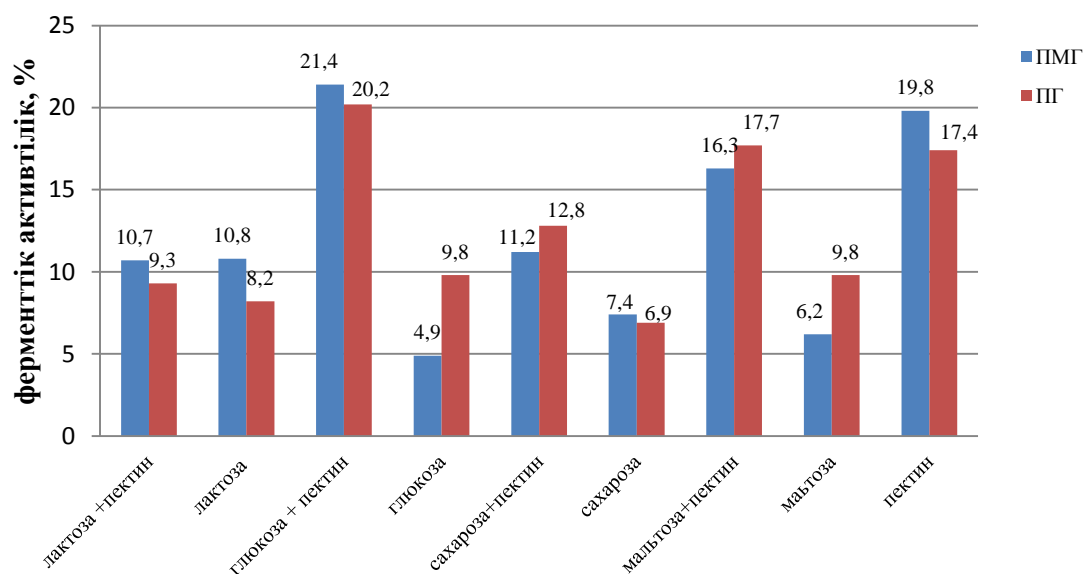
Қоректенуде көміртегі көзінің қажеттілігін зерттеген кезде моно-, ди-, және полисахаридтер 2%-қ концентрацияда, пектин 0,5% концентрацияда қолданылды. Пектиныдыратушы ферменттерді алу үшін көлемі 750 мл-к тербегіш колбадағы 100 мл қоректік ортаға 5 тәуліктік саңырауқұлақ культурасының мицелий суспензиясын 2 мл көлемде енгізіп, 26-28°C –де шейкерге (180 грм) қойдық.

Полигалактуроназа (ПГ) және полиметилгалактуроназа (ПМГ) ферменттерінің активтілігін анықтауды Витакер әдісі бойынша Оствальд вискозиметрінде жүргіздік [7]. Субстрат ретінде пектин қышқылы мен жоғары этерификацияланған алма пектині алынды. Жақсы жуылып, құрғатылған вискозиметрге 5 мл субстрат, 0,5 мл 0,1 М ацетатты буфер рН 4,6 және 0,5 мл культуралдық сұйықтық енгіздік. Тұтқырлықтың төмендеуін анықтауды су термостатында 40⁰ С температурада 1 мин аралығында жүргіздік.

Нәтижелер және оларды талқылау

Микромицеттердің ферменттерді биосинтездеуі культураның өсуі мен дамуына әсер ететін негізгі жағдайларға тығыз байланысты және ең алдымен пектиныдыратушы ферменттердің бағытты және үдемелі түрде биосинтездеуін қамтамасыз ететін қоректік ортаның құрамына тәуелді. Мерзімді дақылдау жағдайында *Aspergillus awamori* 1-8 тереңдік культурасы секрециялайтын ПГ және ПМГ ферменттерінің активтілігіне қоректік ортаның құрамдас бөлігі ретінде әртүрлі көміртегі және азот көздерінің әсері зерттелінді.

Көміртегі көзімен қоректену қажеттілігін зерттегенде моно-, ди- және полисахаридтер 2% концентрацияда пектинсіз және индуктор ретінде 0,5% пектин қосылған көміртегі көздері қолданылды. Әртүрлі көміртегі көздерінің әсері 1- суретте көрсетілген.



Көмірсу көздері

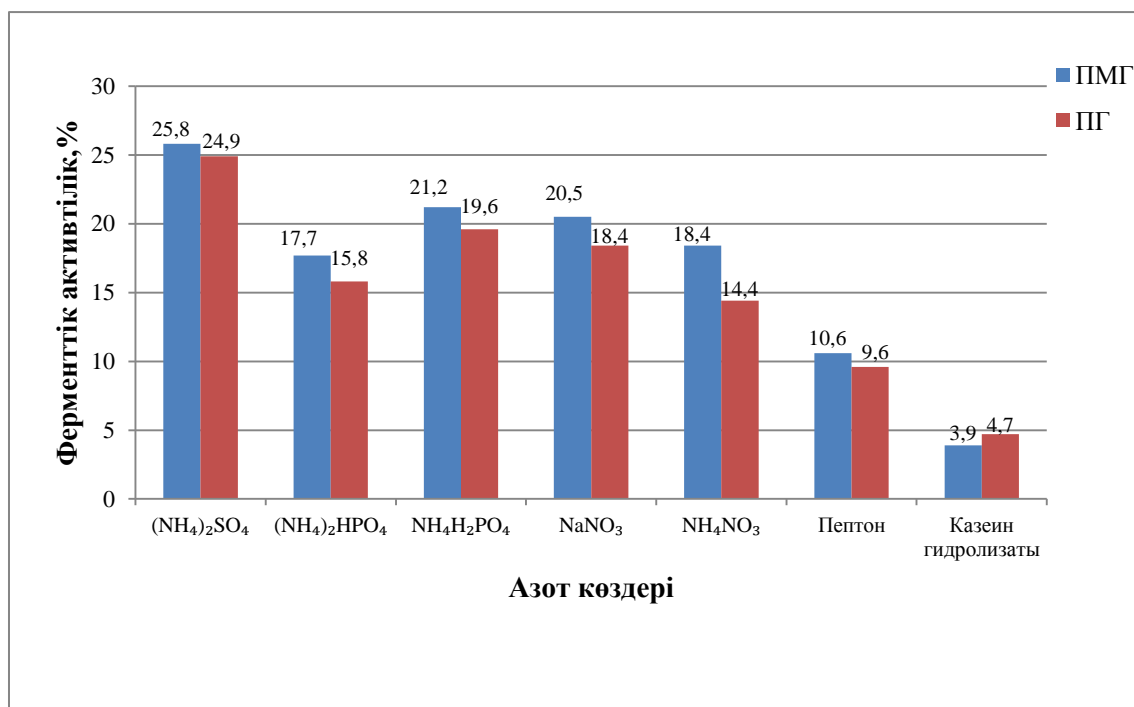
Сурет 1 - Өртүрлі көміртегі көздерінің пектиныдыратушы ферменттердің биосинтезделуіне әсері

1-ші суретте көрсетілген мәліметтерге қарағанда ПГ және ПМГ ферменттерінің активтілігі көміртегімен қоректену көздеріне байланысты өзгеріп отыратыны байқалды. Көміртегі көзі ретінде глюкоза, мальтоза және сахароза қосылған қоректік ортада өсірілген культура ең төмен ферментативтік активтілікті көрсетті, ал көміртегі көзі ретінде пектин қосылған глюкоза алынған қоректік ортада өсірілген варианттарда полигалактуроназа және полиметилгалактуроназа ферменттерінің активтілігі жоғары болды.

Бақылау ретінде көміртегі көзі ретінде сахароза алынған стандартты Чапек қоректік ортасы алынды; осы қоректік ортада өсірілген *Aspergillus awamori* 1-8 культурасының культуралдық сұйықтығындағы ПМГ және ПГ ферменттерінің активтілігі 7,4% және 6,9%, сәйкесінше (Сурет 1).

Aspergillus awamori 1-8 культурасына пектиныдыратушы ферменттерді түзудің индуцирленген сипаты тән екендігі анықталды, себебі қоректік ортаға субстратты (пектин) қосқанда ферменттердің биосинтезделу белсенділігі артты.

Қоректік орта құрамындағы азот көздері де культураның өнімділігі мен пектиныдыратушы ферменттердің синтезделуіне әсер етеді. 2- Суретте қоректік ортаның құрамдас бөлігі ретінде органикалық және бейорганикалық азот көздерін пайдаланудың *Aspergillus awamori* 1-8 вариантының полигалактуроназа активтілігіне әсері жайлы мәліметтер берілген. Көміртегі көзі ретінде пектин қосылған глюкоза пайдаланылды.



Сурет 2 - Органикалық және бейорганикалық азот көздерінің пектиныдыратушы ферменттердің биосинтезіне әсері

Суретте көрсетілген мәліметтерге қарағанда ең жоғары полигалактуроназа активтілігі қоректік орта құрамына күкіртқышқылды аммоний қосылып өсірілген ортадағы варианттарда анықталды (25,8% ПМГ және 24,9% ПГ, сәйкесінше). Ал органикалық азот көздерінің (пептон мен казеин гидролизаты) іріктелініп алынған продуценттің биохимиялық активтілігіне айтарлықтай әсері болған жоқ.

Зерттеу жұмыстары нәтижесінде оңтайлы қоректік орта құрамы таңдалынды: пектин – 0,5%, глюкоза – 2%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,15%,; KCl – 0,05%,; MgSO_4 – 0,05%,; K_2HPO_4 – 0,1%,; FeSO_4 – 0,001%, 24-26⁰С температурада. Қоректік ортаны оңтайландырудың нәтижесінде ПМГ және ПГ ферменттерінің активтіліктері осы кезеңде 7,4% және 6,9%-ден, 25,8% және 24,9%-ге дейін, сәйкесінше, арттыруға мүмкіндік берді. Сонымен, қоректік ортаны оңтайландыру нәтижесінде пектиныдыратушы ферменттердің активтілігі 3 есеге артты.

Қорытынды

Aspergillus awamori 1-8 культураны биосинтездейтін пектиныдыратушы ферменттердің активтілігіне әртүрлі көміртегі мен азот көздерінің әсері зерттелінді. Пектиныдыратушы ферменттердің түзілуі үшін ең жақсы көміртегі көзі 0,5% пектин қосылған 2% глюкоза (21,4% ПМГ и 20,2% ПГ, сәйкесінше). Басқа көміртегі көздері іріктелініп алынған продуценттің биохимиялық активтілігіне айтарлықтай әсер еткен жоқ.

Қоректік орта құрамындағы азот көздерінің де культураның өнімділігі мен пектиныдыратушы ферменттердің синтезделуіне әсер ететіндігі анықталды. Күкіртқышқылды аммоний қосылған қоректік ортада өсірілген варианттарда пектиназалық активтілігі жоғары болды (25,8% ПМГ үшін және 24,9% ПГ үшін, сәйкесінше). Ал органикалық азот көздерінің (пептон мен казеин гидролизаты) іріктелініп алынған продуценттің биохимиялық активтілігіне айтарлықтай әсері болған жоқ.

Aspergillus awamori 1-8 культурасына пектиныдыратушы ферменттерді түзудің индуцирленген сипаты тән екендігі анықталды.

Зерттеу нәтижесінде мынандай құрамдағы оңтайлы қоректік орта таңдалынып алынды: пектин – 0,5%; глюкоза – 2%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,7%; KCl – 0,05%; MgSO_4 – 0,05%; KH_2PO_4 – 0,1%; FeSO_4 – 0,001%. Қоректік ортаны оңтайландыру нәтижесінде ПМГ және ПГ ферменттерінің активтілігін осы кезеңде 3 есеге дейін арттыруға мүмкіндік берді.

Әдебиет:

1. Бутова С.Н. Биотехнологическая деградация отходов растительного сырья // Москва: Россельхозакадемии. -2004. –С. 319
2. J. Yu and R. W. Lencki Effect of enzyme treatments on the fouling behavior of apple juice during microfiltration // Journal of Food Engineering, Vol. 63, Issue 4, 2004, P. 413-423.
3. Manuel Pinelo et al. Juice clarification by protease and pectinase treatments indicates new roles of pectin and protein in cherry juice turbidity // Food and Bioproducts Processing, Vol. 88, Issues 2-3, 2010, P. 259-265
4. Тананайко Т.М., Алексанян К.А., Ткачук Л.А. Использование новых ферментных препаратов в плодово-ягодном виноделии. // Сб. трудов «Микробные биокатализаторы для перерабатывающих отраслей АПК». -Москва. -2006. –С.229-234.
5. Морозова К.А., Римарева Л.В., Оверченко М.Б., Сеницын А.П.// Селекция штамма микромицета *Aspergillus oryzae* – продуцента комплекса экзогидролаз. // В сб. «Микробные биокатализаторы для перерабатывающих отраслей АПК».-Москва. – ВНИИПТБ. - 2006. С. 10-15
6. Diana Dinu Enzymes with new biochemical properties in the pectinolytic complex produced by *Aspergillus niger* MIUG 16 // Journal of Biotechnology, Vol. 131, Issue 2, 31 2007, P. 128-137.
7. Whitaker D.R., Hanson K.R., Datta P.K. // Canad.J.Biochem., 41, 1963, p. 671.

R.K. BLIEVA ,Zh.K. RAKHMETOVA, Zh. B. SULEIMENOVA, A.E.
NURLYBAYEVA,Zh.K. SADUYEVA

IMPACT OF CARBON AND NITROGEN SOURCES ON PECTINASE PRODUCTION BY *Aspergillus awamori* 1-8

“Institute of microbiology and virology”, Almaty

Summary

In this article effects of various nitrogen and carbon sources on the biosynthesis of pectolytic enzymes in *Aspergillus awamori* 1-8 strain were studied. Enzyme production was maximal when glucose plus pectin were used as a carbon and ammonium sulfate as a nitrogen sources. It was found that pectin induced pectinase activity by *Aspergillus awamori* 1-8. Optimal carbon and nitrogen sources allow increase pectin degrading enzymes activity in *Aspergillus awamori* 1-8 by 3 times.

There is a serious problem of low yield of fruit raw materials resulting from the presence of fruit and berry production of pectin substances that impede the processes of mash-impact, juice clarification and filtration [1]. The pectic substances account for about 0.5-4% of the weight of fresh material. One way to solve this important problem is addition of pectinolytic enzymes to fruit and vegetable mash. With the addition of pectinases the viscosity of the fruit juice drops, the press ability of the pulp improves, the jelly structure disintegrates and the fruit juice is easily obtained with higher yields [2,3]. Moreover commercially produced enzymes benefit a number of aspects of the wine industry, including maturation, extraction, clarification, and filtration [4].

Nevertheless, there are still limited sources of pectinases which suitable to be used in all juices and wine production. Thus, screening for ideal pectinolytic enzymes producer with more approving properties and engineering of pectinases in order to optimize their catalytic and stability features still are enduring research interest [4].

Industrial production of enzymes requires highly productive strains of microorganisms [5,6]. However, production levels of industrial enzymes are often disappointing low. Several factors like physical and nutritional factors affect on pectinase enzyme production. Hence, this study reveals the effect of carbon and nitrogen sources on pectinase enzyme production in microscopic fungi.

MATERIALS AND METHODS

In present study *Aspergillus awamori* 1-8 (Institute of microbiology and virology own collection of microscopic fungi) was used. This culture was maintained on Czapek medium. CZAPEK (%): NaNO₃ - 0,7; sucrose – 2,0; KH₂PO₄ – 0,1; MgSO₄ – 0,05; KCL – 0,05; Fe SO₄ – 0,001. Spore suspension in concentration of 2% was used as inoculum for fungal cultivation. Production of pectinase in periodic cultivation was made by growing *Aspergillus awamori* 1-8 in liquid CZAPEK medium on orbital shaker for 3 days (180 rpm) at 26-28°C.

For enzyme production, 750-ml flasks containing 100 ml sterilized liquid Czapek medium were inoculated with 2 ml mycelium/spore suspension made from a 5-day-old culture. They were incubated at 26-28°C on orbital shaker (180 rpm) for 3 days.

Polygalacturonase (PG) and polymethylgalacturonase (PMG) activities were assayed by viscometric method as viscosity loss (%) within 1 minute [7]. The Ostwald's viscometer was thoroughly cleaned with distilled water and dried before use. 5ml of pectin (PMG) and pectic acid (PG) in 0,5ml of 0.1 M acetate buffer (pH 4.6) and 0,5ml of enzyme source were taken in viscometer and were thoroughly mixed and incubated at 35 - 40°C temperature. The efflux time of the mixture at 1 minute was recorded with the help of stop watch.

RESULTS AND DISCUSSION

Various carbon sources were supplemented in the production medium to study their effect on PG and PMG production in *A. awamori* 1-8 fungus via periodic cultivation. Basal medium containing sucrose served as the control. In order to study the effect of carbon sources on PG and PMG activities in *A. awamori* 1-8 fungus different carbon sources were supplemented individually (in concentration 2%) and combined with pectin (in concentration 0,5%) as inductor in the basal medium. All carbon sources belong to monosaccharide, disaccharides and polysaccharides. The effect of various carbon sources on PG and PMG production after 3 days is summarized in Figure 1.

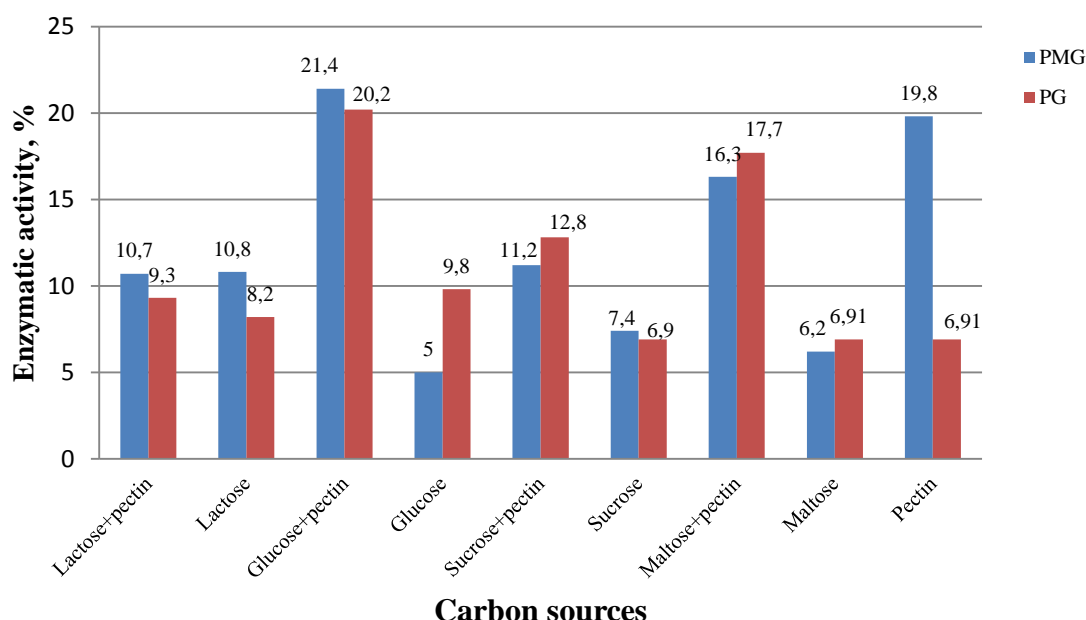


Fig. 1 - Effect of various carbon sources on PG and PMG activities in *A. awamori* 1-8

As can be concluded from the data presented in Fig. 1, the PG and PMG enzyme activities varied depending on the carbon sources. The lowest enzyme activity was on medium containing

glucose, maltose and sucrose as carbon sources, while the highest PG and PMG activities were in variant grown on medium containing glucose plus pectin as a carbon source.

As a control, basal Capek medium with sucrose as a carbon source was used. PG and PMG activities of *Aspergillus awamori* 1-8, were 7.37 and 6.91%, respectively (Fig 1).

It was found that *Aspergillus awamori* 1-8 characterized induced character of pectin degrading enzymes production since the addition of substrate (pectin) to the cultivation medium activated enzymes biosynthesis.

Various nitrogen sources also were supplemented in the production medium to study their effect on PG and PMG production in *A. awamori* 1-8 fungus via periodic cultivation. Inorganic and organic nitrogen sources were incorporated separately in the basal medium. Effect of various nitrogen sources on production in *A. awamori* 1-8 and is shown in Figure 2. As a carbon source glucose plus pectin was supplemented to media components.

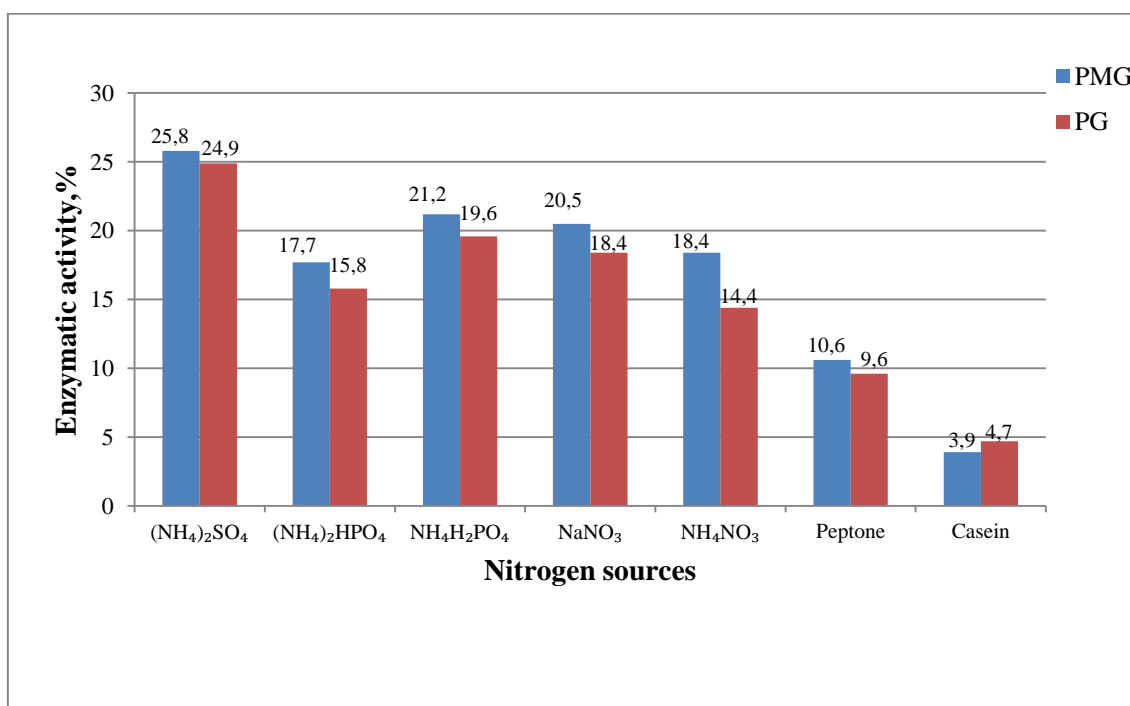


Figure 2 - Effect of various nitrogen sources on PG and PMG activities in *A. awamori* 1-8

It was found that ammonium sulfate supported moderate growth PMG and PG production in *A. awamori* 1-8 (25,8% in PMG and 24,9% in PG, respectively) whereas organic nitrogen sources like peptone and casein reduced fungal enzymatic activity.

From this experiment it can be concluded that enzyme production was maximum when concentration of salts and sugar was as follows: pectin – 0,5%, glucose – 2%, (NH₄)₂SO₄ – 0,15%,; KCl – 0,05%,; MgSO₄ – 0,05%,; KH₂PO₄ – 0,1%,; FeSO₄ – 0,001% , 24-26⁰C. Thus, optimal carbon and nitrogen sources allow increase PMG and PG activities from 7,37% and 6,91% to 25,8% and 24,9% respectively.

CONCLUSION

Effects of various nitrogen and carbon sources on the biosynthesis of pectolytic enzymes (PG and PMG) in *Aspergillus awamori* 1-8 strain were studied.

Enzyme production was maximal when glucose plus pectin were used as a carbon sources (21,36% in PMG and 20,23% in PG). All other carbon sources used had a little effect on PG and PMG activities. From inorganic and organic nitrogen sources ammonium sulfate supported moderate growth PMG and PG production in *A. awamori* 1-8 (25,8% in PMG and 24,9% in PG, respectively) whereas organic nitrogen sources like peptone and casein reduced fungal enzymatic activity.

It was found that addition of pectin to media components induced pectinase productivity of *Aspergillus awamori* 1-8. Enzyme production was maximum when concentration of salts and sugar was as follows: pectin – 0,5%, glucose – 2%, (NH₄)₂SO₄ – 0,15%,; KCl – 0,05%,; MgSO₄ – 0,05%,; KH₂PO₄ – 0,1%,; FeSO₄ – 0,001%. Optimal carbon and nitrogen sources allow increase PMG and PG activities by 3 times.

References:

1. Бутова С.Н. Биотехнологическая деградация отходов растительного сырья // Москва: Россельхозакадемии. -2004. –С. 319
2. J. Yu and R. W. Lencki Effect of enzyme treatments on the fouling behavior of apple juice during microfiltration // Journal of Food Engineering, Vol. 63, Issue 4, 2004, P. 413-423.
3. Manuel Pinelo et al. Juice clarification by protease and pectinase treatments indicates new roles of pectin and protein in cherry juice turbidity // Food and Bioproducts Processing, Vol. 88, Issues 2-3, 2010, P. 259-265
4. Тананайко Т.М., Алексанян К.А., Ткачук Л.А. Использование новых ферментных препаратов в плодово-ягодном виноделии. // Сб. трудов «Микробные биокатализаторы для перерабатывающих отраслей АПК». -Москва. -2006. –С.229-234.
5. Морозова К.А., Римарева Л.В., Оверченко М.Б., Сеницын А.П.// Селекция штамма микромицета *Aspergillus oryzae* – продуцента комплекса экзогидролаз. // «Микробные биокатализаторы для перерабатывающих отраслей АПК», -Москва. –ВНИИПТБ. - 2006. С. 10-15.
6. Diana Dinu Enzymes with new biochemical properties in the pectinolytic complex produced by *Aspergillus niger* MIUG 16 // Journal of Biotechnology, Vol. 131, Issue 2, 31 2007, P. 128-137.
7. Whitaker D.R., Hanson K.R., Datta P.K. // Canad.J.Biochem., 41, 1963, p. 671

Р.К. БЛИЕВА, Ж.Қ. РАХМЕТОВА, Ж.Б. СУЛЕЙМЕНОВА, А.Е.
НУРЛЫБАЕВА, Ж.Қ. САДУЕВА

ВЛИЯНИЕ ИСТОЧНИКОВ УГЛЕРОДНОГО И АЗОТНОГО ПИТАНИЯ НА БИОСИНТЕЗ ПЕКТИНРАСЩЕПЛЯЮЩИХ ФЕРМЕНТОВ *Aspergillus awamori* 1-8

Аннотация

Выявлены оптимальные источники углерода и азота с целью повышения биосинтетической активности *Aspergillus awamori* 1-8. Лучшим источником углерода для образования пектинрасщепляющих ферментов является глюкоза с пектином, а азота – сернокислый аммоний. Установлено, что для культуры *Aspergillus awamori* 1-8 характерен индуцированный

характер образования пектинрасщепляющих ферментов. Подобрана оптимальная питательная среда, которая позволила повысить биосинтетическую активность пектинрасщепляющих ферментов (ПМГ и ПГ) на данном этапе в 3 раза.