

© Ю. П. Загнитко

**МАСШТАБИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА ПОЛУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА
ЭКЗОПОЛИГАЛАКТУРОНАЗЫ КУЛЬТУРЫ
ГРИБА *LENTINUS EDODES* (BERK.) SINGER 480***ФГБОУ ВО «Донецкий государственный университет», г. Донецк, РФ
Россия, 283050, ДНР, г. Донецк, ул. Щорса, 46*

Загнитко Ю. П. Масштабирование процесса получения ферментного препарата экзополигалактуроназы культуры гриба *Lentinus edodes* (Berk.) Singer 480. – Изучен процесс масштабирования при получении ферментного препарата экзополигалактуроназы (Экзо-ПгС) из культуры *Lentinus edodes* (Berk.) Singer 480. Максимальные показатели Экзо-ПгС отмечены на 10-е сутки культивирования как на малых, так и на больших объемах питательной среды с достоверным максимумом на среде объемом 1 000 мл. Ферментный препарат Экзо-ПгС из культуры гриба *L. edodes* 480 термически нестабилен, но кратковременное прогревание (15 мин.) раствора ферментного препарата вызывает некоторую стабилизацию белковых молекул ферментов Экзо-ПгС. В исследованный ферментный препарат экзополигалактуроназного действия входят кислые и нейтральные экзопектиназы направленного действия, которые имеют оптимум рН активности 4,4–4,8 и 6,8–7,2.

Ключевые слова: экзополигалактуроназа, ферментный препарат, температура, кислотность.

Введение

Открытия ученых в области современной энзимобиотехнологии сделали ферментные препараты ключевым участником многих пищевых производств. Использование ферментов позволяет повышать скорость технологических процессов, увеличивать выход готовой продукции, улучшать ее качество, экономить ценное сырье и снижать количество отходов.

Пектиназы используются в пищевой промышленности (для экстракции и осветления фруктовых соков, производства алкогольных напитков и др.), медицине (в фармацевтической промышленности) и сельском хозяйстве (кормопроизводство). Для удовлетворения высокого спроса на ферментные препараты пектолитического действия важно производить пектиндеполимеризующие ферменты в больших объемах с минимальными затратами. Известные способы получения ферментов преследуют цель оптимизации питательной среды для их продуцентов и предусматривают культивирование продуцирующих целевой экзофермент культур грибов или микроорганизмов на питательной среде, содержащей источники углерода, азота, минеральные соли и стимуляторы биосинтеза ферментов, с последующим выделением ферментов. Методы очистки и выделения пектиназ зависят от условий процесса и целей. Это связано с тем, что пектиназа – не один фермент, а комплекс из нескольких пектинрасщепляющих веществ: пектин-эстеразы, полигалактуроназы, пектинлиазы и пектатлиазы. Кроме того, промышленные пектиназы не являются чистыми ферментными препаратами и обычно обладают побочной активностью. Наличие в ферментном препарате примесей углеводов и пектиновых веществ может исказить результаты анализа состава продуктов ферментолиза пектиновых полисахаридов и затруднить выделение физиологически активных фрагментов [8]. Поэтому разработка способов получения высокоочищенных и высокоактивных пектолитических ферментов является весьма актуальной.

Пектиназы, представленные на современном рынке, получают из микроорганизмов (35 %) [11, 12, 18], низших грибов (50 %) [1, 4–7, 14–17] и различных растений

(15 %) [19, 20]. Эта группа ферментов высших базидиальных грибов наиболее слабо исследована [2, 9, 10].

Цель работы – разработка способа и оптимальных параметров процесса лабораторного масштабирования культуры гриба *Lentinus edodes* (Berk.) Singer 480 с целью получения ферментного препарата экзополигалактуроназной активности (Экзо-ПгС).

Материал и методы исследования

Объектом исследования была культура гриба *L. edodes* 480 из коллекции мицелиальных культур базидиальных ксилотрофов кафедры физиологии растений Донецкого государственного университета, продуцент экзопектиназ.

Культивирование исследованного штамма *L. edodes* 480 проводили в течение 35 суток в качалочных колбах объемом 250 мл с 50 мл питательной среды и в лабораторном ферментере объемом 2 000 мл с 1 000 мл питательной среды при температуре 28 °С. Ферментационная среда имела следующий состав (г/л): K_2HPO_4 – 0,4; KH_2PO_4 – 0,6; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,5; $ZnSO_4 \times 7H_2O$ – 0,001; $CaCl_2$ – 0,05; яблочный жом – 30 % от общего объема питательной среды. В качестве посевного материала использовали мицелиальную суспензию, полученную при культивировании штамма-продуцента в качалочных колбах объемом 1 000 мл с 300 мл глюкозо-пептонной среды при температуре 28 °С в течение 10 суток. Посевной материал вносили в опытные колбы в количестве 10 % от общего объема ферментационной среды. Исследование динамики Экзо-ПгС культуральной жидкости культуры гриба *L. edodes* 480 проводили в течение 35-и суток со снятием результатов эксперимента каждые 5-е сутки.

Для выделения ферментного препарата экзополигалактуроназы использовали 10-суточную культуральную жидкость гриба-продуцента, предварительно отделенную от биомассы гриба фильтрованием через фильтровальную бумагу («ФС», Россия). Осаждение секретированных экзопектиназ из полученного культурального фильтрата проводили сульфатом аммония при степени насыщения 80 % в течение 24 ч при температуре 4 °С. Осадок отделяли от надосадочной жидкости на рефрижераторной центрифуге при 5 000 об/мин на протяжении 15 мин. Полученный осадок диализировали против чистой дистиллированной воды 2 суток в холодильнике. Диализат отделяли от нерастворившейся части центрифугированием. При исследовании термостабильности экзопектиназ использовали 1 %-ный раствор ферментного препарата в ацетатном буфере (рН 6,8), который прогревали в термостатах в температурном диапазоне от 25 до 80 °С в течение 15 и 60 мин. с последующим быстрым охлаждением. При определении рН оптимума Экзо-ПгС использовали 1 %-ный раствор ферментного препарата в ацетатном буфере в диапазоне рН от 3,2 до 8,4 с шагом 0,4. Реакционную смесь инкубировали 20 мин при 30 °С. Активность полученного ферментного препарата пектиназ определяли по ГОСТу Р 55298-2012 [4].

Все эксперименты проводили в трехкратной повторности. Результаты исследований обрабатывали статистически с использованием методов дисперсионного анализа, сравнение средних арифметических величин проводили методом Дункана [13].

Результаты и обсуждение

Результаты исследования культуральной жидкости гриба *L. edodes* 480 при росте на питательной среде как в небольших объемах, так и при масштабировании данного процесса показали (рис. 1), что характер проявления Экзо-ПгС культуральной жидкости совпадал. Так, на 10-е сутки эксперимента исследованная культура наиболее активно синтезировала ферменты экзополигалактуроназного действия в культуральную жидкость с максимальными показателями как на малых, так и на больших объемах питательной среды. При этом максимальная активность отмечена на питательной среде объемом 1 000 мл (0,017 ед./см³). В остальных случаях показатели Экзо-ПгС, полученные на среде с малым объемом питательной среды и при процессе масштабирования, не имели достоверных отличий между собой.

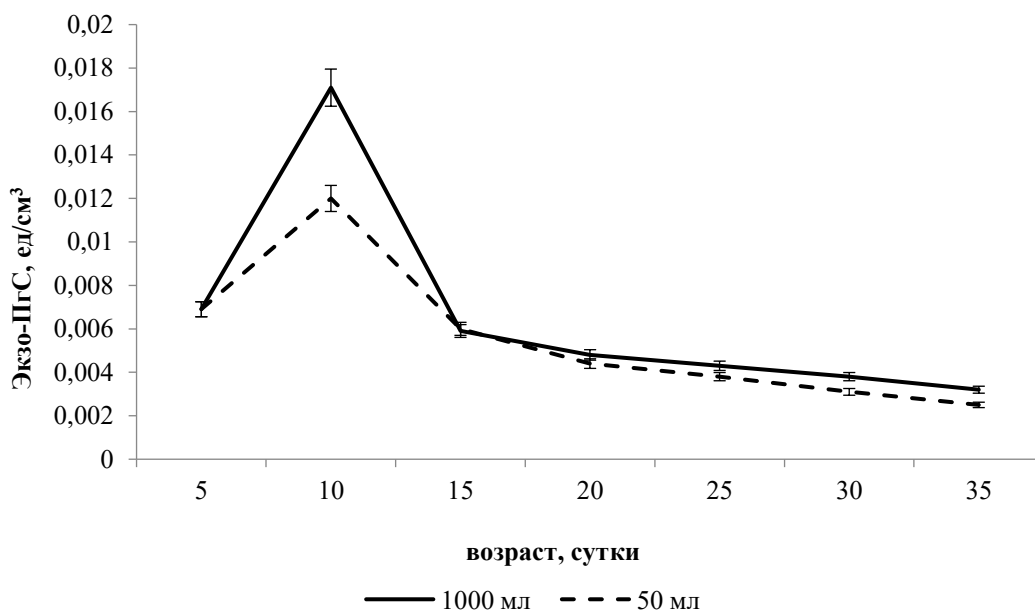


Рис. 1. Динамика экзополигалактуроназы (Экзо-ПгС) культуральной жидкости гриба *Lentinus edodes* (Berk.) Singer 480

При дальнейшем росте культуры (начиная с 15-х суток и до конца эксперимента) активность экзополигалактуроназы достоверно снижалась как на малых, так и на больших объемах питательной среды. Полученные в результате эксперимента данные свидетельствуют о нецелесообразности длительного культивирования исследуемой культуры гриба с целью получения ферментов Экзо-ПгС.

При использовании методов высаливания и диализа был получен грубый ферментный препарат с активностью Экзо-ПгС 0,8 ед./см³. Активность ферментного препарата определяли по ГОСТу [4], полученные значения пересчитывали в относительные единицы, принимая за 100 % показатель Экзо-ПгС нативного ферментного препарата.

Изучение термостабильности ферментного препарата Экзо-ПгС из культуры гриба *L. edodes* 480 (рис. 2) показало, что при прогревании раствора экзофермента на протяжении 60 мин. ферментный препарат фактически полностью сохранял свою активность при температуре 25–35 °С.

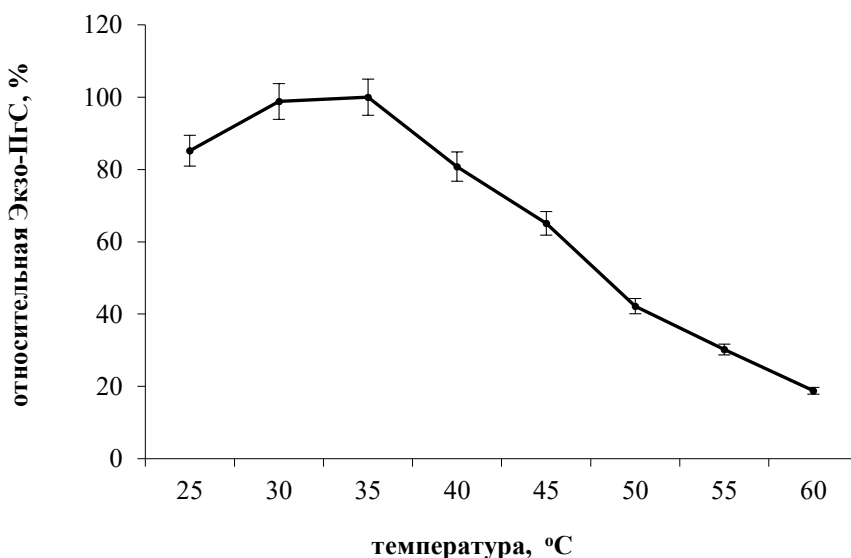


Рис. 2. Термостабильность ферментного препарата экзополигалактуроназы (Экзо-ПгС) из гриба *Lentinus edodes* (Berk.) Singer 480 (прогревание ферментного препарата 60 мин.)

При температуре 40 °С активность Экзо-ПгС снижалась почти на 20 %. При более высоких значениях температуры показатели активности энзима резко снижались и уже при температуре 55 °С сохранялось около 30 % активности.

При изучении термостабильности полученного ферментного препарата при кратковременном прогревании (15 мин.) максимальные показатели активности Экзо-ПгС установлены в интервале температур 35–45 °С (рис. 3). В диапазоне температур 50–70 °С отмечено постепенное достоверное снижение активности Экзо-ПгС на более, чем 80 %, а температура 75 °С вызвала полную инактивацию исследованного ферментного комплекса.

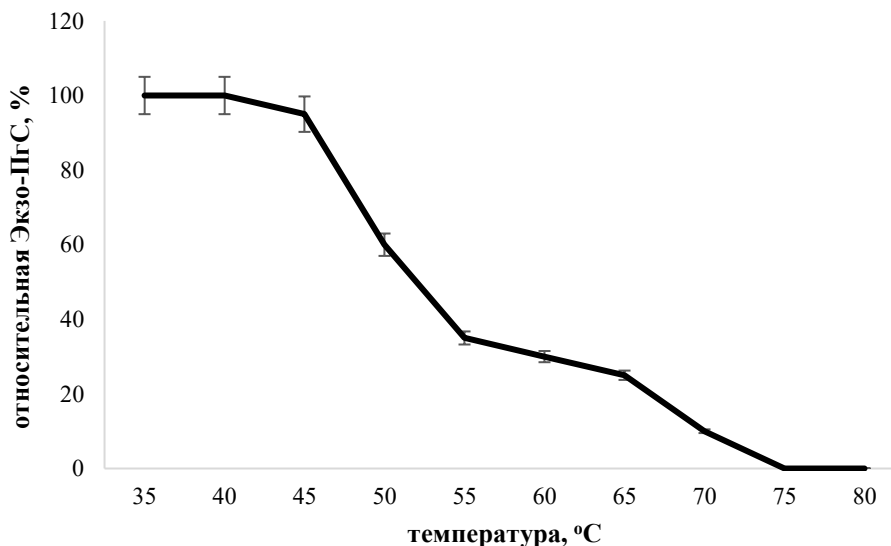


Рис. 3. Термостабильность ферментного препарата экзополигалактуроназы (Экзо-ПгС) из гриба *Lentinus edodes* (Berk.) Singer 480 (прогревание ферментного препарата 15 мин.)

Полученные экспериментальные данные показали, что ферментный препарат Экзо-ПгС из культуры гриба *L. edodes* 480 термически нестабилен и при длительном прогревании теряет около 60 % своей активности уже при 50 °С. Однако кратковременное прогревание (15 мин.) раствора ферментного препарата вызывает некоторую стабилизацию белковых молекул ферментов Экзо-ПгС.

Таким образом, экспериментальные данные показали, что полученный из культуральной жидкости культуры гриба *L. edodes* 480 ферментный препарат Экзо-ПгС проявляет термолабильность в диапазоне температур 35–45 °С.

Ферменты разнообразного назначения проявляют максимальную активность при разных значениях pH. При повышении или понижении уровня pH показатели активности могут снижаться. Так, pH оптимум стабильности ферментов может не совпадать с pH оптимумом активности [2]. Грибные пектиназы делят по их отношению к кислотности среды на кислые (pH 4,0–5,0), нейтральные или слабощелочные (pH 7,0–8,0) [10]. Наличие pH оптимума можно объяснить тем, что критический уровень кислотности среды может привести к инактивации энзимов, так как ионная сила раствора влияет на сродство фермента к субстрату и стабильность белковой молекулы.

Результаты изучения влияния кислотности реакционной среды на активность Экзо-ПгС из гриба *L. edodes* 480 (рис. 4) показали, что для полученного ферментного препарата характерны 2 пика активности. Так, максимальные показатели активности Экзо-ПгС отмечены в диапазоне pH 4,4–4,8 и 6,8–7,2 (около 100 %), причем значения ферментативной активности обоих пиков не имели достоверных отличий между собой. Это свидетельствует о том, что, возможно, в ферментный комплекс экзопектиназ культуры гриба *L. edodes* 480 входят кислые и нейтральные ферменты, обладающие экзополигалактуроназной активностью. Переходные значения pH от кислого к нейтральному вызывали достоверное снижение уровня активности Экзо-ПгС.

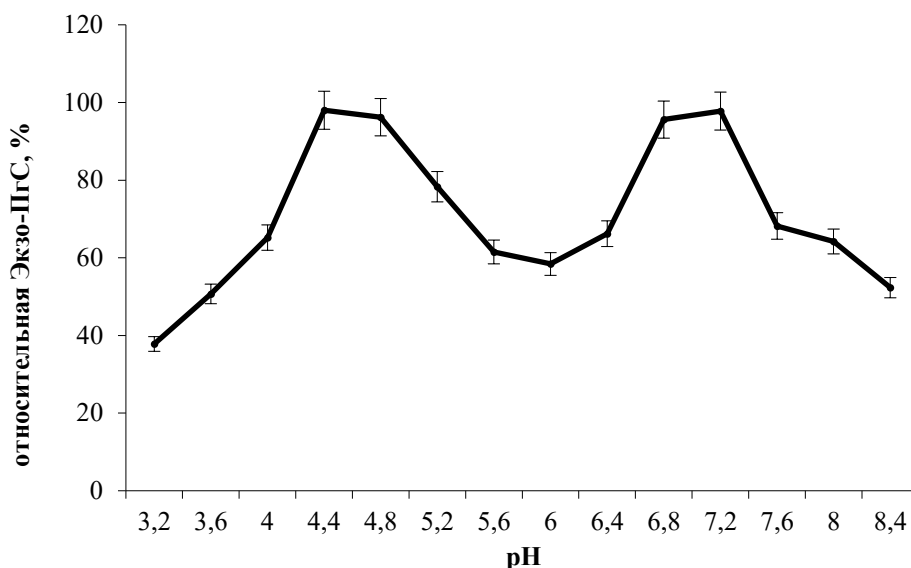


Рис. 4. Зависимость активности ферментного препарата экзополигалактуроназы (Экзо-ПгС) из гриба *Lentinus edodes* (Berk.) Singer 480 от pH реакционной среды

Выводы

Масштабирование процесса получения ферментного препарата Экзо-ПгС из культуры гриба *L. edodes* 480 показало, что результаты, полученные на лабораторном оборудовании, можно воспроизвести в промышленных условиях. Перенос технологии из лабораторных установок на промышленные объемы может помочь интенсифицировать синтез экзополигалактуроназы исследованным продуцентом.

Исследования проводились в рамках государственного задания (номер госрегистрации НИОКТР 124012400346-5).

Список литературы

1. Блжева Р. К. Изучение биосинтеза пектинрасщепляющих ферментов при глубинном культивировании плесневых грибов из рода *Aspergillus*: автореф. дис. ... канд. техн. наук. Алма-Ата, 1967. 25 с.
2. Бойко С. М., Малюга М. В. Зависимость пектолитической активности некоторых базидиальных грибов от качественного состава питательной среды // Проблемы экологии та охорони природи техногенного регіону. 2013. № 1 (13). С. 174–180.
3. Гореликова Г. А. Основы современной пищевой биотехнологии. Кемерово, 2004. 100 с.
4. ГОСТ Р 55298-2012. Ферментные препараты пищевой промышленности. Методы определения пектолитической активности. М.: Стандартиформ, 2014. 22 с.
5. Грачева И. М., Бутова С. Н., Туписева И. А., Эль-Рештан Г. И. Теоретические основы биотехнологии. Биохимические основы синтеза биологически активных веществ. М.: Изд-во «Элевар», 2003. 534 с.
6. Джакашева М. А., Кедельбаев Б. Ш., Либерцайт П. Новый отечественный ферментный препарат для виноделия // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2017. Т. 7, № 3. С. 46–53. DOI: 10.21285/2227-2925-2017-7-2-46-53.
7. Джакашева А. М. Технология получения пектолитического ферментного препарата, применяемого для улучшения органолептических показателей красных столовых вин: дис. ... уч. степени доктора философии: 6D070100. Республика Казахстан Алматы, 2017. 183 с.
8. Донцов А. Г., Шубаков А. А. Активация полигалактуроназ в процессе очистки: эффект использования кальцийсодержащих носителей // Естеств. и техн. науки. 2009. № 6. С. 196–198.

9. *Загнитко Ю. П., Кочнева В. С., Палагуца А. П.* Динамика активности экзополигалактуроназы, синтезируемой базидиальными ксилотрофами / Донецкие чтения 2021: образование, наука, инновации, культура и вызовы современности: Материалы VI Международ. науч. конф. (Донецк, 26–27 окт. 2021 г.). Т. 3. Биологические и медицинские науки, экология Донецк: Изд-во ДонНУ, 2021. С. 221–222.
10. *Загнитко Ю. П.* Физико-химические свойства препарата пектиназ грибного происхождения // Проблемы экологии и охраны природы техногенного региона. 2024. № 3. С. 66–70. DOI: 10.5281/zenodo.14532287.
11. *Калунянц К. А., Голгер Л. И.* Микробные ферментные препараты (технология и оборудование). М.: Пищевая промышленность, 1979. 304 с.
12. *Полторак О. М., Таулицкий В. Н., Атякиева Л. Ф.* рН-оптимум стабильности ферментов // Методы получения, анализа и применения ферментов. Тезисы докладов. Рига, 1990. С. 6.
13. *Приседський Ю. Г.* Статистична обробка результатів біологічних експериментів: навч. посібник. Донецьк: Кассиопея, 1999. 210 с.
14. *Семенова М. В.* Свойства внеклеточных пектиназ грибов рода *Aspergillus*: дис. ... канд. хим. наук: 02.00.15, 03.00.23. М., 2005. 167 с.
15. *Соколова Е. Н.* Разработка биотехнологии получения препарата пектиназ на основе селекционированного штамма *Aspergillus foetidus* 379-К: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.23. М., 2008. 28 с.
16. *Спичак В. В., Вратский А. М.* Современные направления использования и утилизации свекловичного жома // Сахар. 2011. № 9. С. 60–64.
17. *Сулейменова Ж. Б., Рахметова Ж. К., Нурлыбаева А. Е.* Биосинтез пектинрасщепляющих ферментов микромицетами рода *Aspergillus* // Биотехнология. Теория и практика. 2012. № 3. С. 72–76.
18. *Garg G., Singh A., Kaur A., Singh R., Kaur J., Mahajan R.* Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries: Biotech. 2016. № 6 (1). P. 47. DOI: 10.1007/s13205-016-0371-4.
19. *Kashyap D. R., Vohra P. K., Chopra S., Tewari R.* Applications of pectinases in the commercial sector: a review. Bioresource Technology. 2001. № 77 (3). P. 215–227. DOI: 10.1016/s0960-8524(00)00118-8.
20. *Sonali Satapathy, Jyoti Ranjan Rout, Rout George Kerry, Hrudayanath Thatoi, Santi Lata Sahoo* Biochemical Prospects of Various Microbial Pectinase and Pectin: An Approachable Concept in Pharmaceutical Bioprocessing. Frontiers in Nutrition. 2020. 7:117. DOI: 10.3389/fnut.2020.00117.

Поступила в редакцию 12.11.2025 г.

Zagnitko Yu. P. Scaling the process of obtaining an enzyme preparation of exopolygalacturonase from the culture of the fungus *Lentinus edodes* (Berk.) Singer 480. – The scaling process of obtaining an enzyme preparation of exopolygalacturonase (Exo-PgS) from the culture of *Lentinus edodes* (Berk.) Singer 480 has been studied. The maximum values of Exo-PgS were observed on the 10th day of cultivation, both on small and large volumes of the nutrient medium, with a significant maximum on a medium volume of 1 000 ml. The enzyme preparation Exo-PgS from the culture of the fungus *L. edodes* 480 is thermally unstable, but short-term heating (15 minutes) of the enzyme preparation solution causes some stabilization of the protein molecules of the Exo-PgS enzymes. The studied enzyme preparation of exopolygalacturonase action includes acidic and neutral exopectinases of directed action, which have an optimum pH of activity of 4.4–4.8 and 6.8–7.2.

Keywords: exopolygalacturonase, enzyme preparation, temperature, acidity.

Загнитко Юлия Петровна

старший преподаватель кафедры физиологии растений, научный сотрудник НИЧ ФГБОУ ВО «Донецкий государственный университет», г. Донецк, ДНР, РФ.

E-mail: upzagnitko@mail.ru

ORCID: 0009-0002-7487-0108

AuthorID: 1127933

Zagnitko Yuliya Petrovna

Senior Lecturer at the Department of Plant Physiology, Research Officer of the Research Department of Donetsk State University, Donetsk, DPR, Russian Federation.