

УДК 663.577

О.В. Пецюх, О.З. Комаровська-Порохнявець,
 О.В. Лужецька-Швед, В.П. Новіков, М.М. Вус,
 Г.З. Гайда, М.В. Наконечний, Ю.І. Козуб, Ю.І. Федоришин
 Національний університет “Львівська політехніка”,
 кафедра технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології

ДОСЛІДЖЕННЯ РЕЖИМУ БІОСИНТЕЗУ ГЛЮКОЗООКСИДАЗИ PENICILLIUM VITALE

© Пецюх О.В., Комаровська-Порохнявець О.З., Лужецька-Швед О.В., Новіков В.П.,
 Вус М.М., Гайда Г.З., Наконечний М.В., Козуб Ю.І., Федоришин Ю.І., 2002

З метою інтенсифікації біотехнологічних параметрів біосинтезу глюкозооксидази промислового штаму *Penicillium vitale* досліджено вплив температури (оптимально $(27,5 \pm 5)^\circ\text{C}$), концентрації джерел С (оптимально концентрація сахарози 7,5 %) та іонів Mg^{+2} (в концентрації 0,05 % підвищує активність культуральної рідини, суттєво не впливаючи на флавогенез) на активність ферменту та його виділення за допомогою ефективних адсорбентів із застосуванням методу тонкошарової та колонкової хроматографії, титрометрії, фотометрії, електрофорезу на поліакриламідному гелі. Ефективнішим сорбентом при паралельних дослідженнях каоліну, глауконіту та трепелу визначено трепел.

In order to intensify biotechnological parameters of glucose oxidase biosynthesis of industrial strain *Penicillium vitale* the influence of temperature ($(27,5 \pm 5)^\circ\text{C}$ is optimal one), concentration of C resource (7,5% is optimal saccharose concentration) and Mg^{+2} ions (in case of concentration 0,05 % it increases cultural liquid activity and has no impact on flavogenez) on enzyme activity and extraction with the help of effective sorbents using thinlayer and column chromatography method, titrometry, colorimetry, electrophoresis based on polyacrylic gel has been investigated. Trepel has been determined as the most effective sorbent.

Широке використання в народному господарстві та медицині ферментів пов'язане з їх біокаталітичною активністю при проходженні біохімічних процесів в м'яких умовах. Фермент глюкозооксидаза застосовується в медицині як терапевтичний протизапальний засіб у вигляді культуральної рідини для лікування опікових ран, у чистому вигляді – є складовою частиною діагностичних препаратів, іммобілізована глюкозооксидаза – є окисним компонентом набору для очищення крові, аналітичним реагентом біопрепаратів, індикатором біодавачів; у харчовій промисловості в інтактному вигляді застосовується як поліпшувач борошна, в комплексі з каталазою подовжує термін зберігання харчових продуктів, а також – при виробництві глюконової кислоти.

Глюкозооксидаза містить 12 % вуглеводів (манози) і дві одиниці флавінаденіндинуклеотиду (ФАД) та належить до класу оксидоредуктаз, продуцентами якої є *Aspergillus niger*, *Penicillium notatum*, *Pen. glaucum*, *Pen. amagasakiense*, *Pen. purpurgentum*, *Pen. vitale* [1]. Важливим моментом виділення глюкозооксидази з культуральної рідини є сорбція та осадження, яке ведуть альтернативним до висолювання мінеральними солями осадженням

органічними розчинниками, власне 88 % етиловим спиртом при температурі нижче ніж 10 °С з подальшим сушінням при $t = 35$ °С. Проблемою біосинтезу даного ферменту поверхневим методом є значна тривалість процесу, складність виділення його з культуральної рідини, зниження активності при втраті під час адсорбції та елюції, і, особливо, порушення індукції ФАД, втрата якого веде до інактивації ферменту, але додавання відновлює активність глюкозооксидази.

Для задоволення потреб промисловості у глюкозооксидазі одним з виробників ферменту є ДП “Львівдіалік”, яке випускає нативний розчин “Мікроцид” та порошкоподібний препарат “Глюкозооксидаза” шляхом поверхневого культивування *Penicillium vitale* на живильному середовищі Білай [2].

Дослідження біосинтезу глюкозооксидази та флавогенезу нами проводилось при поверхневому культивуванні двомісячної культури, вирощеного на сусло-агарі та просі промислового штаму *Penicillium vitale* IV,V при $t = 27,5$ °С на стерилізованому середовищі Білай, очищеному від CaCO_3 , протягом $\tau = 8-10$ днів залежно від рівня рН середовища (від 4,5–5,0 до 3,4–3,5) і ферментативної активності ФА (120–150 од/мл). Ріст культури гриба спостерігався в трьох лініях по 10 пробірок зміною морфології та індукцією ФАД залежно від умов культивування (утворення жовтувато-золотистих плям на складчастій плівці) та вимірювали активність відфільтрованої від міцелію жовтуватої культуральної рідини. Визначення ферментативної активності глюкозооксидази в культуральній рідині визначали за формулою $\text{ФА} = knW$ (де W – кількість мл 0,01 н розчину натрію, який пішов на титрування 0,5 мл розведеного розчину; n – коефіцієнт розведення 10; k – коефіцієнт перерахунку на стандартні умови 2,3). Наявність ФАД в культуральній рідині визначали хроматографічно. Кількісний вміст глюкозооксидази при елюції з адсорбенту визначали фотоколориметрично та електрофоретично через залежність оптичної густини від концентрації фермента в розчині, що за методом Бредфорда [3].

Основні результати досліджень

Для визначення впливу температури на біосинтез глюкозооксидази *Rep.vit.* живильне середовище готували для трьох партій пробірок (по 10 штук), посівну культуру, попередньо вирощену в промислових умовах, перед пересівом витримували в термостаті 14 днів, пересівали на живильне середовище Білай та культивування проводили, відповідно, при температурі 26; 27,5; 29 °С. За результати вимірювань рН і ферментативної активності культуральної рідини на 10-й день культивування (табл. 1) нами визначено, що оптимальна температура культивування становить 27,5 °С.

Таблиця 1

Вплив температури на ферментативну активність глюкозооксидази *Penicillium vitale*

26 °С		27,5 °С		29 °С	
рН	ФА, од/мл	рН	ФА, од/мл	рН	ФА, од/мл
4,0	90	3,8	110	4,5	95

Для визначення впливу концентрації сахарози середовище готували для трьох партій пробірок (по 6 штук) і культивування проводили при температурі 27,5 °С протягом 10 днів. За результатами вимірювань рН та ферментативної активності культуральної рідини *Rep.vit.* на 10-й день культивування (табл. 2) нами визначено, що оптимальна концентрація цукру – 7,5 %.

Таблиця 2

Вплив концентрації сахарози на ферментативну активність глюкозооксидази *Pen.vitale*

Вміст сахарози, %	6,0	6,5	7,0	7,5	8,5	8,0
pH	4,0	3,8	3,5	3,3	3,7	3,9
ФА, од./мл	60	85	120	125	90	75

Для визначення впливу концентрації іонів Mg^{+2} вміст компонентів в живильному середовищі готували відповідно складу середовища Білай, крім кількості солі $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, яку змінювали від 0,03 до 0,055 % в трьох паралелях по 6 пробірок і культивування проводили при температурі 27,5 °C протягом 10 днів. За результатами вимірювань pH і ферментативної активності культуральної рідини *Pen.vit.* на 10-й день культивування (табл. 3) нами визначено, що максимальна ферментативна активність культуральної рідини спостерігалася при концентрації сульфату магнію 0,05 %, що є дещо більшою від регламентованого значення.

Таблиця 3

Вплив концентрації іонів Mg^{+2} на ферментативну активність глюкозооксидази *Pen.vitale*

Концентрація іонів Mg^{+2} , %	0,030	0,035	0,045	0,045	0,050	0,055
pH	4,0	3,8	3,7	3,5	3,8	3,8
ФА, од./мл	55	70	85	110	125	90

Активного біосинтезу ФАД (за даними ТШХ) не спостерігалася. Це можна пояснити генетичною нестабільністю культури *Pen.vit.* до біосинтезу ФАД, або невідповідністю умов культивування. При проведенні хроматографії були помічені сліди кофермента, але його кількість дуже незначна (5 мкг/мл). Збільшення ферментативної активності, очевидно, відбувалося за рахунок незначного підвищення синтезу кофермента при більшій концентрації іонів магнію.

Залежність ферментативної активності від часу культивування в присутності іонів магнію (табл. 4) в кількості 0,05% вказує на збільшення активності при зменшенні pH культуральної рідини *Pen.vit.* вже на четвертий день культивування.

Таблиця 4

Залежність ферментативної активності від часу культивування у присутності іонів Mg^{+2}

Конц. іонів Mg^{+2} , %	Час, дні	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	pH	5,1	5,1	5,0	4,8	4,6	4,4	3,8	3,6	3,6	3,5
0,05	ФА, од./мл	4,2	6,3	8,4	13,6	25,6	58,8	101,3	120,4	124,8	125,0
0,045	ФА, од./мл	4,2	6,3	8,4	11,3	21,6	52,4	94,1	107,2	109,2	110,0

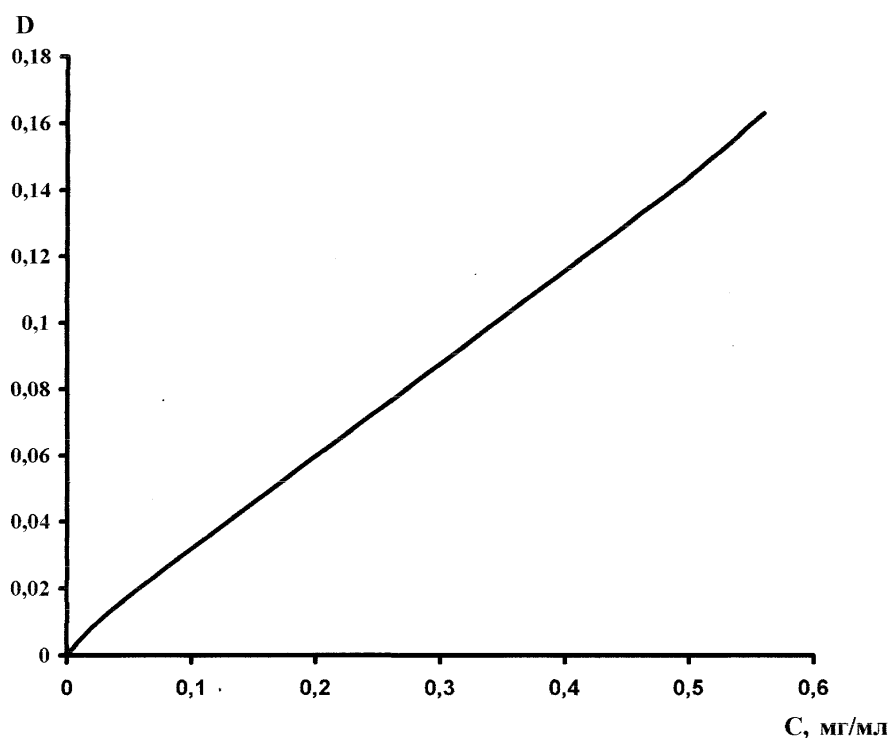
Для визначення ефективного сорбента та оптимальних умов виділення фермента адсорбцію модельних систем глюкозооксидази проводили паралельно на 4-х сорбентах: каоліні, трепелі, глауконіті (очищеному і неочищеному).

Перед проведенням адсорбції суху глюкозооксидазу попередньо розбавляли дистильованою водою до концентрації 10 % і розчин фермента діалізували. Ферментативна активність очищеного розчину глюкозооксидази – 180 од./мл.

Досліди проводилися в двох паралелях. На 10 мл ферментного розчину брали 0,5 г кожного сорбента. Сорбцію проводили протягом 5 годин, ферментативну активність над-

осадової рідини вимірювали з інтервалом 0,5 год. Елюцію проводили 0,25 та 0,15 М фосфатним і 0,1 і 0,2 М натрій-ацетатним буферами протягом 40 хвилин. Кількість буфера – 2 мл на 0,5 г сорбента. Вимірювання ферментативної активності надосадової рідини проводили з інтервалом 10 хвилин. Враховуючи низькі значення ферментативної активності при адсорбції і елюції з використанням глауконіту, в подальших дослідках застосовували лише каолін та трепел, значення якого більш оптимальні. Кількість трепелу для проведення адсорбції становила 0,33 г (що у 1,5 раза менше від маси каоліну) на 10 мл розчину глюкозооксидази. Кількість каоліну залишали незмінною (згідно з регламентом).

Для визначення кількісного вмісту глюкозооксидази користувалися графічною залежністю оптичної густини від концентрації фермента в розчині за методом Бредфорда електрофоретично. Оптичну густину досліджуваних ферментних розчинів визначали при $\lambda = 595$ нм за графічною залежністю $D = f(C)$ (див. рисунок)



C, мг/мл	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
D	0	0,035	0,060	0,089	0,118	0,142

Графічна залежність оптичної густини від концентрації фермента в розчині

Досліди для визначення ферментативної активності залежно від використаного сорбента проводили в двох паралелях (табл. 5), ферментативну активність визначали за формулою $\Phi A = 2,3 V / 0,034 a t$ (де a – кількість ферменту в пробі; V – кількість мл 0,01 н тіосульфату натрію, витраченого на титрування, мл; t – час інкубації, хв; 2,3 – коефіцієнт перерахунку на стандартні умови; 0,17 – перерахунок на 1 мл 0,01 н тіосульфату натрію в 100 мл води; 0,034 – кількість мл перексиду водню в 1 мкл).

Ферментативна активність розчинів глюкозооксидази при адсорбції та елюції

Сорбент	Час адсорбції, год				Час елюції 0,25 М фосфатним буфером, хв		
	0,5	2,5	4,0	5,0	0	30	40
Ферментативна активність, од./мл							
Каолін	70,0	2,1	1,5	1,4	1,4	167,8	167,8
Трепел	100,0	11,7	4,3	3,5	3,4	171,5	171,5
Глауконіт (н)	115,0	31,7	15,2	8,9	8,9	155,5	155,5
Глауконіт (о)	120,0	365,2	18,0	1,0	11,0	144,4	146,4

Як показали дані паралельних досліджень, методом колонкової хроматографії каоліну, глауконіту та трепелу ефективнішим сорбентом можна вважати трепел.

1. *Микробные ферменты и биотехнология / Под ред. В.М. Фогарти. – М., 1986. – С. 95–104.* 2. *Пецюх О.В., Комаровська О.З., Вус М.М., Гайда Г.З., Сай Т.Ф.Б., Луژهцька-Швед О.В. Дослідження режиму біосинтезу та виділення глюкозооксидази *Penicillium vitale* // XIX Укр. конф. з орг.хімії: Тез. доп. – Львів, 2001. – 78 с.* 3. *Bradford M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of mg quantites of protein... // Anal. Biochim. – 1976. – Vol. 72, N 1–2. – P. 248–254.*

УДК 663.534(088.8)

Ю.І. Сидоров, Т.А. Хан, В.П. Новіков, Р.Й. Влязло
 Національний університет “Львівська політехніка”,
 кафедра технології біологічно активних сполук, фармацевції та біотехнології

РОЗРОБКА МЕТОДУ ДОДАТКОВОГО ОЧИЩЕННЯ НЕСТАНДАРТНОЇ МЕЛЯСИ ТА РОЗРАХУНКОВА ЕФЕКТИВНІСТЬ ПРОЦЕСУ

© Сидоров Ю.І, Хан Т.А., Новіков В.П., Влязло Р.Й., 2002

Вивчали додаткове очищення нестандартної меляси зі збільшеним вмістом забарвлюючих речовин та колоїдних структур. Найкращий результат досягався при кислотній обробці з подальшою додатковою обробкою активованим вугіллям. Розрахунки показали, що застосування додаткового процесу очищення веде до різкого подорожчання процесу в цілому. З технологічного погляду прийнятним варіантом може бути додаткове тонке фільтрування.

Studied process of additional clearing non-standard production waste of sugar with the increased contents of colouring substances and colloid structure. The best result was reached for want of to acid processing with further additional processing activated coal. The accounts have shown, that the application of additional process of clearing conducts to sharp rise in price of process as a whole. From a technological point of view of acceptable variant can be additional filtering with application of fine-filters.

Для виробництва хлібопекарських дріжджів *Sac. cerevisiae* іноді застосовують нестандартну мелясу з високим вмістом забарвлюючих речовин і колоїдів. Шкідливість колоїдів