

УДК 663.15.:577.15

ВИДІЛЕННЯ ІНУЛІНАЗИ З КУЛЬТУРАЛЬНОЇ РІДИНИ *Penicillium* sp. 225 ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ЇЇ ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ

В. І. Стойко¹Н. М. Жданова¹В. Л. Айзенберг¹Г. П. Капічон¹В. В. Коновалова²А. Ф. Бурбан²¹Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного
НАН України, Київ²Національний університет «Києво-Могилянська академія»,
Центр мембранних досліджень, Київ

E-mail: v_stoiko@mail.ru

Інуліназа каталізує реакцію гідролізу інуліну з переважним утворенням фруктози. Цей ензим має значні перспективи для використання: попередня обробка доступної сільськогосподарської сировини, зокрема такої, як топінамбур і цикорій, одержання фруктозних сиропів. Інтерес до процесів ензиматичного гідролізу інуліну рослинного походження пов'язаний також із перспективою отримання цукристих речовин, етанолу та молочної кислоти. Вивчено два різних способи виділення інулінази з культуральної рідини *Penicillium* sp. 225. У разі осадження органічними розчинниками (етанолом, ізопропанолом, ацетоном) найкращим осаджувачем виявився етанол. Для концентрування інулінази використовували метод ультрафільтрації. За допомогою підібраної полісульфонової мембрани УН-030Р ступінь очищення одержаного з концентрату препарату становив 2,2 раза. При осадженні інулінази досягнуто ступеня очищення препарату 1,55 раза. Встановлено оптимальні умови дії ензиму: рН 5,0, температура 65 °С. Отриманий препарат інулінази характеризується рН- та термостабільністю.

Ключові слова: мікроскопічні гриби, інуліназна активність, виділення, ультрафільтрація, оптимальні умови дії.

Інуліназа (2,1-в-D-фруктозанфруктаногідролаза, КФ 3.2.1.7) каталізує реакцію гідролізу інуліну до фруктози та незначної кількості глюкози. Велика увага до цього ензиму зумовлена можливістю його використання в харчовій та мікробіологічній промисловості, а саме: для отримання фруктозних сиропів, промислового одержання фруктози, як реактиву для діагностики вмісту фруктози в продуктах споживання, у виробництві молочної кислоти та етилового спирту тощо [1–6]. Інуліназа має високу термічну стійкість, що становить значний інтерес у зв'язку з перспективою проведення ензиматичного гідролізу інулінвмісної сировини, включаючи відходи, за високих значень температури [7].

Здатність до біосинтезу інулінази притаманна мікроскопічним грибам, дріжджам та бактеріям [6–10]. Перші здебільшого продукують позаклітинну екзоінуліназу, що є технологічно більш вигідним. Бактерії та дріжджі частіше утворюють ендоінуліназу, виробництво якої має низку недоліків. Передусім це труднощі під час виділення ензи-

му — руйнування клітинної структури, втрата активності на стадії виділення, складність виробничого контролю ензиматичної активності на стадії отримання цільового продукту під час культивування мікроорганізму.

У результаті проведеного нами скринінгу щодо здатності до синтезу інулінази серед 301 колекційної культури 106 видів 39 родів мікроміцетів було селекціоновано новий ефективний штам *Penicillium* sp. 225 (мезофільна культура) [11]. Розроблено склад живильного середовища для вирощування продукента і проведено оптимізацію умов його культивування для досягнення максимального біосинтезу інулінази.

Метою цієї роботи було отримання та вивчення властивостей технічного ензимного препарату інулінази з *Penicillium* sp. 225.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження був штам гриба *Penicillium* sp. 225, який відібрано з колекції культур відділу фізіології та систематики

мікроміцетів Інституту мікробіології і вірусології НАН України.

Культивування досліджуваного мікроскопічного гриба проводили на живильному середовищі такого складу (г/л): нітрат калію — 2; дигідрофосфат калію — 1; сульфат магнію — 0,5; хлорид калію — 0,5; сульфат заліза — 0,01; жмих топінамбура — 20.

Культуру вирощували в глибинних умовах у колбах Ерленмеєра об'ємом 750 мл за температури 20–25 °С.

Ензимний препарат осаджували органічними розчинниками з культуральної рідини за температури 4 °С. При цьому використовували етанол (ректифікат), ізопропанол (х. ч.) та ацетон (х. ч.) у кількісному співвідношенні ензимний розчин — осаджувач 1:1; 1:2; 1:2,5; 1:3; 1:3,5; 1:4.

Ультрафільтрацію проводили в установці непроточного типу Amicon 8200 (Millipore, США) за робочого тиску 200 кПа. У роботі застосовували целюлозні (UC-010T, C-030FM — з відсікальною здатністю за молекулярною масою cut off 10 та 30 кДа) та полісульфононі (P-010F, УН-030P, УН-050P, cut off 10, 30 та 50 кДа відповідно) мембрани (виробництво Microdyn Nadir, Німеччина), сформовані на пористій поліпропіленовій підкладці. Ефективність роботи мембран оцінювали за їхньою продуктивністю, яку розраховували за формулою:

$$P = \frac{V}{St}, \text{ л/м}^2 \cdot \text{год},$$

де V — об'єм фільтрату, який відібрано за час t ($V = 5$ мл); S — поверхня фільтрації, м² ($S = 13,4$ см²); t — тривалість відбору 5 мл фільтрату, год, а також за селективністю (коефіцієнтом затримування), яку визначали за формулою:

$$R = \frac{A_1 - A_2}{A_1} 100\%,$$

де A_1 — активність ензиму у вихідному розчині (од.), A_2 — активність ензиму в перміаті (фільтраті), од.

Ступінь концентрування препарату оцінювали за ступенем відбору, що його розраховували за формулою:

$$\alpha = \frac{V_1}{V_0} 100\%,$$

де V_1 — об'єм фільтрату, мл; V_0 — початковий об'єм рідини, що фільтрується, мл [12].

За одиницю інуліназної активності приймали таку кількість ензиму, що каталізує утворення 1 мкМ фруктози з інуліну за 1 хв у стандартних умовах ($t = 50$ °С, рН 4,6).

Інуліназну активність (A_I) рідких форм ензиму визначали за формулою [13]:

$$A_I = \frac{K}{180TV} R, \text{ од/мл},$$

де K — кількість моноцукрів, які утворилися при ензиматичному гідролізі (за калібрувальною кривою), мкг; T — час реакції, хв; V — об'єм проби ензиму, взятого для проведення реакції (у даній роботі $V = const = 0,02$ мл); R — розведення проби ензиму; 180 — маса 1 мкМ фруктози, мкг; $K/180$ — кількість мкМ фруктози, яка утворилася в результаті ензиматичного гідролізу інуліну.

Протеїн визначали за методом Лоурі [14].

Для встановлення деяких фізико-хімічних властивостей (рН- та температурного оптимуму, рН- та термостабільності) інулінази використовували концентрат препарату, отриманий ультрафільтрацією.

Дослідження впливу рН проводили в діапазоні значень рН 3,0 — 9,0 з інтервалом 1,0. Температурний оптимум інулінази *Penicillium* sp. 225 визначали в діапазоні температур 20 — 80 °С з інтервалом 5–10 °С, рН- та термостабільність інулінази — інкубуванням ензимного розчину протягом 10, 30, 60, 120, 180, 240 хв з наступним оцінюванням активності в стандартних умовах.

Усі експерименти повторювали тричі. У таблицях наведено середні арифметичні величини, відхилення від середнього значення не перевищувало 5%.

Результати та обговорення

Ензимні препарати можуть бути отримані у вигляді порошків або рідких концентратів. Найпоширенішим і загальноприйнятим методом одержання ензимних препаратів у вигляді порошків є осадження ензимів з водних розчинів органічними розчинниками [2]. Виходячи з цього як осаджувачі використовували етанол, ізопропанол та ацетон. Характерно, що всі досліджені розчинники осаджували інуліназу *Penicillium* sp. 225. Вибір осаджувача здійснювали не тільки за максимальною інуліназною активністю одержаного препарату, а й за такими показниками, як питома активність, ступінь очищення та вихід ензиму (табл. 1).

Максимальний вихід ензиму (86,9%) спостерігали в разі використання ацетону в об'ємному співвідношенні культуральна рідина–ацетон 1:3. Якщо застосовували етанол та ізопропанол в об'ємному співвідношенні культуральна рідина–розчинник 1:3,5, вихід був менший — 79,3% та 73,7% відповідно.

Таблиця 1. Виділення препарату інулінази *Penicillium* sp. 225 з культуральної рідини з використанням органічних розчинників

Об'єм розчинника на 1 об'єм культуральної рідини	Інуліназна активність, од/мл	Концентрація протеїну, мг/мл	Питома активність, од/мг протеїну	Вихід, %	Ступінь очищення
<i>Вихідний розчин (культуральна рідина)</i>					
	20,9 ± 0,02	7,50 ± 0,11	2,79	100	1
<i>Розчинники</i>					
Етанол					
1	6,69 ± 0,02	2,28 ± 0,06	2,93	32,0	1,05
2	9,39 ± 0,07	2,80 ± 0,08	3,35	44,9	1,20
2,5	11,58 ± 0,03	3,03 ± 0,05	3,83	55,4	1,37
3	14,34 ± 0,05	3,05 ± 0,02	4,70	68,6	1,69
3,5	16,58 ± 0,04	3,84 ± 0,06	4,32	79,3	1,55
4	12,36 ± 0,02	3,38 ± 0,09	3,66	59,1	1,31
Ізопропанол					
1	5,73 ± 0,02	1,95 ± 0,06	2,94	27,4	1,05
2	7,35 ± 0,03	2,48 ± 0,04	2,97	35,2	1,07
2,5	10,56 ± 0,05	3,30 ± 0,07	3,20	50,5	1,15
3	14,09 ± 0,02	4,05 ± 0,06	3,48	67,4	1,25
3,5	15,41 ± 0,07	4,05 ± 0,09	3,80	73,7	1,37
4	12,50 ± 0,02	3,03 ± 0,06	4,13	59,8	1,48
Ацетон					
1	6,03 ± 0,03	2,11 ± 0,03	2,86	28,9	1,03
2	12,42 ± 0,04	4,15 ± 0,06	2,99	59,4	1,07
2,5	15,34 ± 0,02	5,10 ± 0,07	3,01	73,4	1,08
3	18,17 ± 0,09	5,88 ± 0,06	3,09	86,9	1,11
3,5	15,62 ± 0,07	4,97 ± 0,09	3,14	74,7	1,13
4	10,38 ± 0,05	3,53 ± 0,04	2,94	49,7	1,06

Щодо максимального ступеня очищення інулінази, то з використанням ацетону він був найменшим — 1,12. Найвище значення ступеня очищення ензиму спостерігалось у разі застосування етанолу — 1,69.

Оптимальним варіантом для виділення та очищення інулінази було використання етанолу як органічного розчинника в об'ємному співвідношенні культуральна рідина–розчинник 1:3,5. За таких умов досягали досить високого виходу препарату — 79,3% та високого ступеня очищення 1,55.

Таким чином, для отримання технічного препарату інулінази можна використовувати будь-який із зазначених розчинників у оптимальних концентраціях.

Рентабельність технології одержання ензимного препарату значною мірою зумовлюють застосовувані методи виділення та очищення ензиму. У виробництві рідких форм ензимних препаратів дедалі більшого значення набуває ультрафільтраційний метод виділення. Ультрафільтрація дає змогу одночасно концентрувати та фракціонувати ензимні розчини. Ефективність методу залежить

від фізико-хімічних властивостей мембран, властивостей розчину, що концентрується, а також умов проведення процесу.

У результаті здійснення ультрафільтрації культуральної рідини гриба *Penicillium* sp. 225 через усі досліджені мембрани отримано дані щодо продуктивності кожної з мембран, за якими побудовано залежність проникної здатності мембран від ступеня відбору (рис. 1).

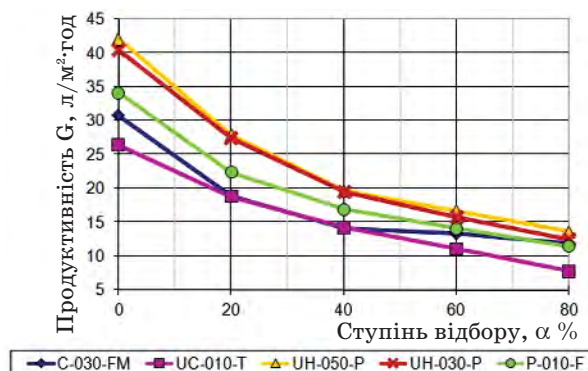


Рис. 1. Залежність продуктивності мембран від ступеня відбору

Найвищою середньою продуктивністю — 24,01 л/м²·год — характеризується полісульфонона мембрана з cut off 50 кДа, однак селективність її за інуліназою найнижча і становить 80,9%. Зі зменшенням cut off до 30 кДа як для целюлозної, так і для полісульфонової мембран селективність за ензимом підвищується до 87,3% та 82% відповідно. Найкращими селективними властивостями (понад 92%) характеризуються мембрани з cut off 10 кДа, але значення їхньої продуктивності набагато нижчі й продовжують знижуватись у процесі ультрафільтрації, що спричинено утворенням гелевого шару на їхній поверхні (вторинна мембрана) (табл. 2).

Таким чином, експериментально доведено можливість використання ультрафільтрації для концентрування та часткового очищення культуральної рідини гриба *Penicillium* sp. 225. Для цього процесу можна рекомендувати полісульфононі мембрани. Оптимальним варіантом виявилась полісульфонона мембрана УН-030Р з високою середньою продуктивністю 23,16 л/м²·год та коефіцієнтом затримки 82,0%, унаслідок чого вдалося досягнути концентрування в 3,5–4 рази. Показник інуліназної активності препарату з концентрату становив 72,2 од/мл (питома активність 6,07 од/мг); ступінь очищення — 2,2. Втрати активності ензиму при ультрафільтрації становлять 12%.

Найважливішими характеристиками у разі застосування ензимного препарату є рН- та температурний оптимум дії. Відомо, що оптимальним за дії інуліназ є значення

рН 4–5,5 [7]. Ця величина рН є більш сприятливою для виробничого процесу отримання фруктози з інулінвмісної сировини. Оптимальною температурою дії для більшості інуліназ є 45–55 °С. Також відомі й термостабільні форми ензиму з температурним оптимумом дії 60–65 °С [6, 7, 15, 16].

Встановлення рН-оптимуму ензиму проводили в діапазоні рН 3,0–9,0 (рис. 2). Як і для більшості інуліназ, рН-оптимум екзоінулінази *Penicillium* sp. 225 становить 5,0. За значень рН 5,0–6,0 ензим є досить стабільним: упродовж 3 год зберігається до 80% його активності (рис. 3).

Вивчення впливу температури на дію ензиму показало, що її оптимальне значення становить 65 °С (рис. 4). При температурі 60 та 70 °С активність інулінази склала, відповідно, 80 та 94% від максимальної. Ензим зберігав близько 80% активності під час інкубації його при температурах 50 та 60 °С

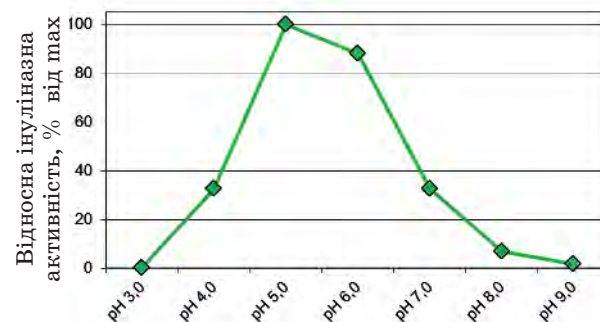


Рис. 2. рН-оптимум дії інулінази *Penicillium* sp. 225

Таблиця 2. Порівняльна характеристика ультрафільтраційних мембран при концентруванні інулінази

Досліджуваній розчин	Тип мембрани	Продуктивність за водою, л/м ² ·год	Середнє значення продуктивності за розчином ензиму, л/м ² ·год	Об'єм, мл	Інуліназна активність, од/мл	Загальна кількість інулінази, од	Концентрація протеїну, мг/мл	Питома активність, од/мг протеїну	Селективність за інуліназою, %	Інактивація ензиму під час ультрафільтрації, %	Ступінь очищення
Вихідний розчин (КР)	–	–	–	50	20,90	1045,0	7,5	2,79	100,0	–	1,0
Концентрат	UC-010T	40	15,7	10	49,44	494,4	15,3	3,23	91,5	44,2	1,2
Фільтрат				40	2,22	88,8	2,5				
Концентрат	C-030FM	150	17,85	10	53,32	533,2	14,6	3,65	87,3	36,2	1,3
Фільтрат				40	3,33	133,2	3,5				
Концентрат	P-010F	50	19,84	10	50,52	505,2	13,1	3,86	96,3	47,9	1,4
Фільтрат				40	0,97	38,8	3,1				
Концентрат	УН-030Р	100	23,16	10	72,20	722,0	11,9	6,07	82,0	12,8	2,2
Фільтрат				40	4,72	188,8	4,3				
Концентрат	УН-050Р	250	24,01	10	51,64	516,4	11,7	4,41	80,9	31,4	1,6
Фільтрат				40	5,00	200,0	3,6				

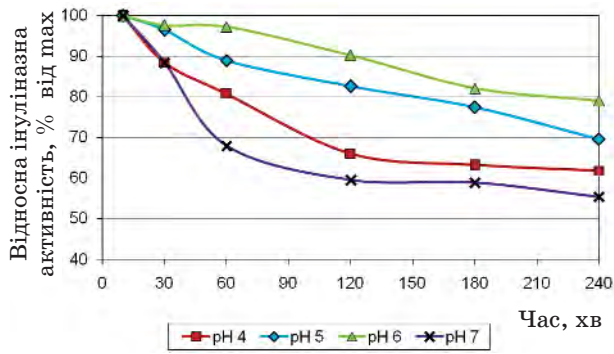


Рис. 3. pH-стабільність інулінази *Penicillium* sp. 225

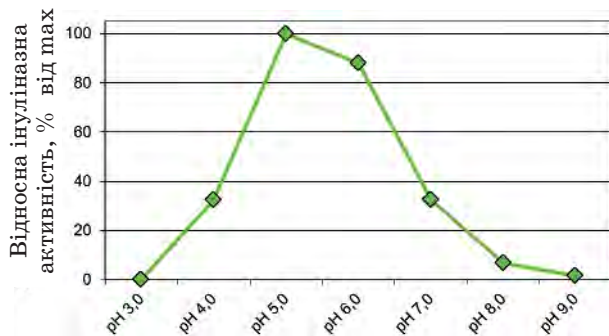


Рис. 4. Температурний оптимум дії інулінази *Penicillium* sp. 225

протягом 2 год; за температур 65 і 70 °C активність зберігалась упродовж 1,5 та 1 год відповідно (рис. 5).

Таким чином, оптимальними умовами дії інулінази *Penicillium* sp. 225 слід вважати такі: pH 5,0, температура 65 °C. Отримані нами дані

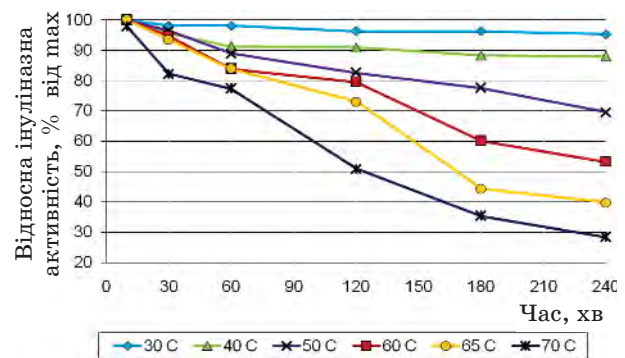


Рис. 5. Температурна стабільність інулінази *Penicillium* sp. 225

щодо фізико-хімічних властивостей ензимного препарату узгоджуються з даними інших дослідників [6, 7, 15, 16]. Характерною особливістю інулінази, виділеної з культуральної рідини *Penicillium* sp. 225, є її термостабільність.

Отже, для виділення та очищення інулінази *Penicillium* sp. 225, залежно від потреб застосування цього ензиму, можна рекомендувати як осадження органічними розчинниками (ступінь очищення ензиму 1,55), так і ультрафільтрацію. Однак у разі використання полісульфонової мембрани УН-030Р у процесі ультрафільтрації культуральної рідини гриба *Penicillium* sp. 225 препарат з концентрату характеризувався вищим ступенем очищення — 2,2.

Виділена термостабільна інуліназа має широкі перспективи застосування в біотехнологічній промисловості завдяки значній інтенсифікації виробничого процесу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Вагабов М. З., Керимова З. М., Мальцева Т. В., Корнеева О. С. Применение ферментных препаратов с целью ускоренного гидролиза инулина при производстве этилового спирта // Биотехнология. — 2005. — № 1. — С. 34–36.
2. Грачова И. М., Кривова А. Ю. Технология ферментных препаратов. — М.: Элевар, 2000. — 512 с.
3. Грушецкий Р. И. Разработка получения инулина из топинамбура. — К.: Вища школа, 1993. — 150 с.
4. Szambelan K., Nowak J. Acid and enzymatic hydrolysis of *Jerusalem artichoke* (*Helianthus tuberosus* L.) tubers for further ethanol production // EJPAU. — 2006. — V. 9, N 4. — <http://www.ejpau.media.pl/volume9/issue4/art-38.html>.
5. Zittan L. Enzymatic hydrolysis of inulin — an alternative way to fructose production // Starch. — 1981. — V. 33, N 11. — P. 373–377.
6. Cantor J. M. Progress in food engineering research and development. — New York: Nova Science Publishers, 2008. — 283 p.
7. Жеребцов Н. А., Абрамова И. Н., Шеламова С. А. Выделение экстрацеллюлярной бактериальной инулиназы и изучение ее физико-химических свойств // Биотехнология. — 2002. — № 3. — С. 13–20.
8. Pessoa A., Vitolo M. Inulinase from *Kluyveromyces marxianus*: culture medium composition and enzyme extraction // Braz. J. Chem. Eng. — 1999. — V. 16, N 3. — P. 291–297.
9. Kulminskaya A. A., Arand M., Eneyskaya E. V. et al. Biochemical characterization of *Aspergillus awamori* exoinulinase: substrate binding characteristics and regioselectivity of hydrolysis // Biochim. Biophys. Acta. — 2003. — V. 1650, N 1–2. — P. 22–29.
10. Gill P. K., Manhas R. K., Singh J., Singh P. Purification and characterization of an exoinulinase from *Aspergillus fumigatus* //

- Appl. Biochem. Biotechnol. — 2004. — V. 117, N 1. — P. 19–32.
11. Стойко В. И., Жданова Н. М., Айзенберг В. Л., Капичон Г. П. Скрининг микроміцетів — продуцентів інулінази // Біотехнологія. — 2010. — Т. 3, № 2. — 2010. — С. 48–55.
 12. Сова В. В., Кусайкин М. И. Методическое пособие к практическим занятиям по очистке белков. — Владивосток: Изд-во Дальневост. ун-та, 2006. — 42 с.
 13. Айзенберг В. Л., Стойко В. И., Демиденко Е. А. и др. Методика количественного определения активности грибной инулиназы с использованием реактива Самнера // Биотехнология. — 2007. — № 5. — С. 95–96.
 14. Lowry O. H., Rosebrough H. J., Faar A. L., Randal R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1963. — V. 193, N 1. — P. 675–677.
 15. Ettalibi M., Baratti J. C. Molecular and kinetic properties of *Aspergillus ficuum* inulinases // Agr. Biol. Chem. — 1990. — V. 54, N 1. — P. 61–68.
 16. Claessens G., Van-Laere A., Proft M. D. Purification and properties of an inulinase from chicory roots (*Cichorium intybus* L.) // J. Plant Physiol. — 1990. — V. 136, N 1. — P. 35–39.

**ВЫДЕЛЕНИЕ ИНУЛИНАЗЫ
ИЗ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ
Penicillium sp. 225 И ХАРАКТЕРИСТИКА
ЕЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ**

В. И. Стойко¹, Н. Н. Жданова¹,
В. Л. Айзенберг¹, А. П. Капичон¹,
В. В. Коновалова², А. Ф. Бурбан²

¹Институт микробиологии и вирусологии
им. Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев
²Национальный университет «Киево-Могилян-
ская академия»,
Центр мембранных исследований, Киев

E-mail: v_stoiko@mail.ru

Инулиназа катализирует реакцию гидролиза инулина с преимущественным образованием фруктозы. Этот фермент имеет значительные перспективы для использования: предварительная обработка доступного сельскохозяйственного сырья, в частности топинамбура и цикория; получение фруктозных сиропов. Интерес к процессам ферментативного гидролиза инулина растительного происхождения связан также с перспективой получения сахаристых веществ, этанола и молочной кислоты.

Изучены два разных способа выделения инулиназы из культуральной жидкости *Penicillium* sp. 225. В случае осаждения органическими растворителями (этанол, изопропанол, ацетон) лучшим осадителем был этанол. Для концентрирования инулиназы использовали метод ультрафильтрации. С помощью подобранной полисульфоновой мембраны УН-030Р степень очистки полученного препарата из концентрата составила 2,2 раза. При осаждении инулиназы достигнута степень очистки препарата 1,55 раза.

Установлены оптимальные условия действия фермента: рН 5,0, температура 65 °С. Полученный препарат инулиназы характеризуется рН-стабильностью и термостабильностью.

Ключевые слова: микроскопические грибы, инулиназная активность, выделение, ультрафильтрация, оптимальные условия действия.

**INULINASE ISOLATION
FROM *Penicillium* sp. 225 AND
ITS PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES**

V. I. Stoiko¹, N. M. Zhdanova¹,
V. L. Aisenberg¹, G. P. Kapichon¹,
V. V. Konovalova², A. Ph. Burban²

¹Institute of Microbiology and Virology of
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
²National University of Kyiv Mohyla-Academy,
Membrane Research Center, Kyiv

E-mail: v_stoiko@mail.ru

Inulinase catalyzes the reaction of hydrolysis of inulin with the predominant formation of fructose. This enzyme has following great prospects for use: pretreatment of available agricultural raw materials, such as artichoke and chicory, for example, receiving fructose syrups. Interest in the processes of enzymatic hydrolysis of vegetable inulin is also associated with the prospect of obtaining of a sugary substance, ethanol and lactic acid.

Two different methods of inulinase purification from *Penicillium* sp. 225 culture liquid were studied. It was shown that in the case of organic solvent precipitation (ethanol, isopropanol, acetone), the best precipitant was ethanol. Method ultrafiltration was used for inulinase concentration. Polysulfone membrane УН-030Р was selected for inulinase concentration. The degree of purification of inulinase preparation obtained with the enzyme concentrate was 2.2. Degree of purification of the drug reached 1,55 times as a result of inulinase precipitation.

Determined optimal conditions of the enzyme was as follows: pH 5.0, temperature 65 °C. The partially purified inulinase preparation is characterized by pH- and thermal stability.

Key words: microscopic fungi, inulinase activity, isolation, ultrafiltration, optimal conditions of activity.