

17. Русинов С.Ф. Изучение спонтанной и индуцированной изменчивости штаммов *Penicillium chrysogenum* - продуцентов пенициллина. // Прикладная биохимия и микробиология. 1995. Т.31. №2, с. 229-231.

18. Филиппова С.Н., Кузнецов В.Д., Бабаутдинов Д.В., Рысков А. П., Васильев В.А., Даниленко В.М. Изучение внутривидовых спонтанных морфологических вариантов *Streptomyces oligocarboxophilus* ISP 5589. // Микробиология. 1999. Том 68. №3. с. 379-386.

19. Фурсова П.В., Милько Е.С., Ильиных И.А., Максимов В.Н., Левич А.П. Определение потребностей диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* в углероде, азоте и фосфоре. // Микробиология 2004. Том 73, № 1, с. 45-50.

PROPRIETĂȚILE FIZICO-CHIMICE ALE PREPARATULUI ENZIMATIC PECTOLITIC OBȚINUT DIN LICHIDUL CULTURAL AL TULPINII *PENICILLIUM VIRIDE* CNMN FD 04 P

**Clapco Steliana, Ciloci Alexandra, Tiurina Janeta, Stratan Maria,
Labliuc Svetlana, Dvornina Elena**

Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei

Introducere

Numeroase investigații actuale sunt focusate asupra studierii și descrierii particularităților biochimice și fizico-chimice ale enzimelor, în vederea utilizării lor practice și teoretice. Proprietățile fizico-chimice ale enzimelor diferă în funcție de tulpina producătoare, fiind variate chiar și la reprezentanții aceleiași specii. Așa, poligalacturonazele sintetizate de tulpina *Aspergillus niger* E2 manifestă activitate maximă la pH 3,8, cele ale tulpinii *A. niger* – la valoarea de 5,0 [7]. Activitatea catalitică maximă a pectiniazelor produse de *Penicillium janthinellum* s-a stabilit la temperatura 35-40°C și pH-ul cuprins între 6,5-7,0, la cele produse de *P. adametzii* optimul manifestării activității s-a fixat la valori ale temperaturii și pH-ului considerabil mai ridicate – 55-60°C, pH – 8,0-8,5 [13]. Din lichidul cultural al unei forme mutante de *A. japonicus* au fost separate două endopoligalacturonaze, două pectinesteraze și o pectiniază – cu optimul de activitate la valori acide ale pH-ului [6].

Există informații ce indică faptul că pectinesterazele de origine fungică sunt active, în special, în medii acide pH 3,0-5,0, cele bacteriene – în medii neutre și slab alcaline pH 7,0-9,0, poligalacturonazele manifestă activitate maximă în medii acide (pH 3,5-6,0), la temperaturi cuprinse între 35-60°C; pectiniază au pH-ul optim de acțiune situat în domeniul bazic (pH 8,0-9,0), iar pectiniază – în mediul acid [2, 7, 8].

Scopul cercetărilor reflectate în lucrarea prezentă a constat în studiul parametrilor optimi de activitate a preparatului pectolitic obținut din lichidul cultural al micromicetei *Penicillium viride* CNMN FD 04 P în vederea determinării condițiilor de aplicare.

Materiale și metode

În studiu a fost inclus preparatul enzimatic pectolitic obținut din lichidul cultural al micromicetei *Penicillium viride* CNMN FD 04 P prin sedimentare cu alcool etilic în conformitate cu parametrii optimi de recuperare stabiliți anterior [1].

Valoarea optimă a pH-ului de acțiune s-a determinat prin dozarea activității pectolitice după incubarea soluției de preparat enzimatic cu substratul (pectina de sfeclă) la diverse valori de pH (2,8-9,0). S-au utilizat soluțiile tampon citrat-fosfat pH-2,0-7,0 și glicină – NaOH pH -8,0-10,0.

Temperatura optimă de acțiune a preparatelor enzimatic s-a determinat prin realizarea hidrolizei la 20°, 30°, 40°, 50°, 60°, 70° și 80°C cu dozarea ulterioară a activității respective.

Influența concentrației de substrat s-a urmărit variind concentrația pectinei de sfeclă între 0,5-5,0 %.

Pentru studiul termostabilității enzimelor pectolitice soluțiile de preparat (în lipsă de substrat) au fost menținute timp de 15, 30, 60 min. la diferite temperaturi (30, 40, 50 și 60°C). Ulterior în probele de preparat supuse tratării termice s-a dozat activitatea pectolitică prin metodele respective.

Pentru studierea pH-stabilității, soluțiile de preparat cu valori ale pH-ului în diapazon de 3,0-10,0 s-au menținut timp de 24 ore la temperatura de 20°C. După expirarea timpului pH-ul a fost ajustat până la valoarea optimă de acțiune a enzimelor (3,0) și s-a determinat activitatea pectolitică. În cercetările de stabilire a termo- și pH-stabilității rezultatele s-au exprimat procentual față de activitatea pectolitică inițială care s-a luat drept 100% [8, 13].

Momentul cheie în studiul pH și termostabilității a constat în tratarea termică, pH a preparatului enzimatic în lipsa substratului, care după cum este cunoscut, grație formării complexului enzimă-substrat, stabilizează structura secundară și terțiară a moleculei proteice, exercitând influență protectoare [11].

Activitatea pectolitică totală a fost determinată prin metoda interferometrică. În calitate de substrat a servit pectina de sfeclă cu gradul de esterificare 68%. Drept unitate de activitate enzimatică s-a considerat acea cantitate de enzimă care catalizează transformarea unui gram de pectină până la produse nesedimentate de sulfatul de zinc timp de o oră, la temperatura de 30°C [12].

Rezultate și discuții

Influența pH-ului asupra activității enzimatic s-a cercetat, incubând probele în medii cu valori ale pH-ului cuprinse între 2,8-9,0. Rezultatele sunt reflectate în figura 1.

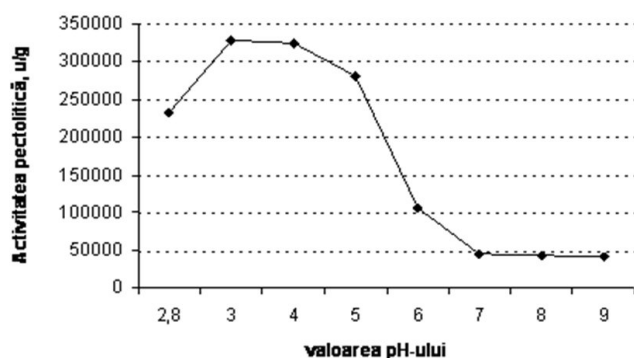


Fig. 1. Influența pH-ului asupra activității pectolitice

S-a constatat că preparatul enzimatic manifestă activitate enzimatică la cote superioare în intervalul de pH 2,8-5,0. Optimul pentru acțiunea pectinazelor s-a situat în domeniul puternic acid 3,0-4,0, activitatea maximă – 329080 u/g, fiind înregistrată la pH de 3,0. Creșterea pH-ului peste valoarea de 4,0 determină scăderea activității enzimatice, ce era mult mai evidentă în domeniul neutru și alcalin, activitatea fiind de 45190-40500 u/g, ceea ce constituie doar 10-15% din valoarea maximă fixată.

Datele obținute concordă cu cele publicate în literatura de specialitate, ce indică faptul că pectinazele fungice acționează preferențial în medii acide. Acțiunea pectinazelor biosintetizate de tulpina *P. viride* în mediul puternic acid constituie un avantaj indiscutabil pentru utilizarea lor practică, îndeosebi în procesele de clarificare a sucurilor de mere, struguri, sucuri cu pH foarte acid (3,0-4,0). Avantajul menționat se accentuează și prin faptul că majoritatea microorganismelor producătoare de pectinaze sintetizează enzime cu optim de acțiune la pH cuprins între 4,5-6,5 [2-5].

Dependența activității enzimatice a preparatului de temperatura de incubare s-a determinat prin realizarea hidrolizei substratului la diferite valori ale temperaturii – 20-80°C. Rezultatele sunt prezentate în figura 2.

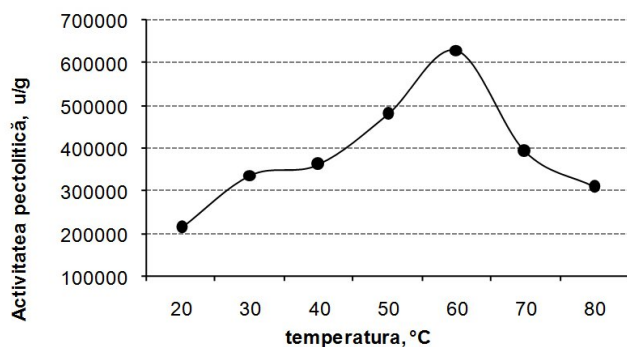


Fig. 2. Influența temperaturii asupra activității pectolitice.

Preparatul pectolitic parțial purificat prezintă valori majore ale activității enzimatice în intervalul de temperatură cuprins între 40-70°C. S-a stabilit că odată cu creșterea temperaturii are loc o sporire pronunțată a activității pectolitice, maximul – 630530 u/g fiind marcat la temperatura de 60°C. Temperaturile superioare valorii optime cauzează reducerea activității pectolitice cu circa 40-50%, aceasta constituind 391080 u/g la temperatura de 70°C și 308640 u/g la 80°C.

La valori optime de pH – 3,0 și temperatură – 60°C s-a determinat activitatea pectolitică în condiții de creștere a concentrației substratului între 0,5-5,0% (fig. 3).

Analizând rezultatele obținute s-a observat o creștere a activității până la concentrația de 1,0% pectină când se atinge concentrația de saturație cu substrat. La concentrații peste valoarea optimă s-a determinat o slabă inhibiție prin substrat.

Importante caracteristici ale preparatelor enzimatice pentru utilizare în practică sunt pH- ul și termostabilitatea enzimelor.

pH-ul mediului în care sunt menținute enzimele afectează starea de ionizare a aminoacizilor constituenți, influențează structura primară și secundară a moleculelor proteice, controlând, astfel, activitatea catalitică. Există, deci, o corelație directă dintre valoarea pH-ului mediului și stabilitatea enzimelor.

S-a constatat că preparatul este stabil în domeniul acid, păstrându-și circa 70% din activitate la pH 3,0-4,0 și 50% la pH 5,0. Activitatea probelor menținute în domeniul neutru scade cu circa 80%, iar în mediul alcalin activitatea remanentă constituia doar 5-8%.

În scopul determinării termostabilității preparatului enzimatic pectolitic separat din lichidul cultural al tulpinii *P. viride* soluțiile de preparat au fost menținute timp de 15, 30, 60 min. la diferite temperaturi – 30, 40, 50 și 60°C (fig. 5). S-a determinat că activitatea pectolitică se menținea la cote superioare la temperatura de 30°C, diminuând nesemnificativ odată cu creșterea duratei de tratare termică, și la temperatura de 40°C în cazul menținerii timp de 15-30 min. La temperatura de 50°C pectinazele sunt inactivate cu circa 60-70%, iar incubarea la temperatura de 60°C timp de 15-60 min. conduce la scăderea activității cu 90-94%.

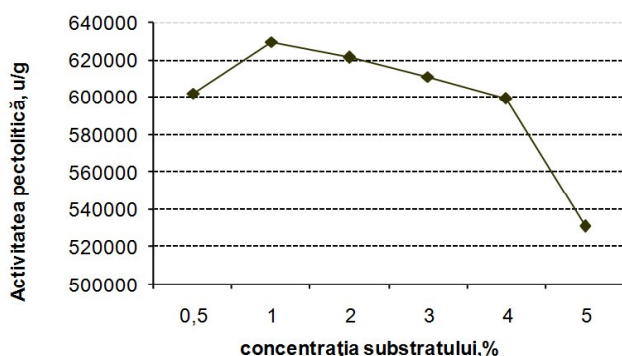


Fig. 3. Influența concentrației substratului asupra activității pectolitice.

Rezultatele privind pH-stabilitatea preparatului enzimatic pectolitic sunt prezentate în figura 4.

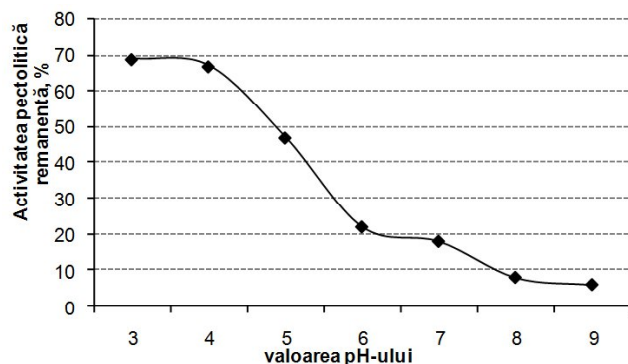


Fig. 4. Studiul pH-stabilității preparatului pectolitic.

Ca rezultat al investigațiilor efectuate s-a constatat că pectinazele sintetizate de tulpina fungică *P. viride* manifestă activitate catalitică maximă la temperatura de 60°C, pH 3,0. Cea mai înaltă valoare a activității pectolitice s-a înregistrat la concentrația substratului – 1,0%. Preparatul enzimatic se caracterizează prin stabilitate relativ înaltă la temperaturi de 30-40°C și la valori ale pH-ului – 3,0-4,5.

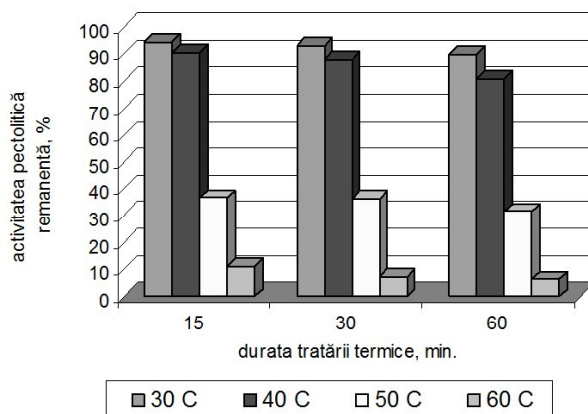


Fig. 5. Studiul termostabilității preparatului pectolitic.

În conformitate cu proprietățile sale fizico-chimice pectinazele separate din lichidul cultural al tulpinii *Penicillium viride* CNMN FD 04 sunt apropiate de pectinazele izolate din alte tulpini de micromicete și pot fi recomandate la fabricarea sucurilor și conservelor din fructe și legume pentru macerarea pulpelor, evitarea formării suspensiilor coloidale, prevenirea gelificării pectinei în siropurile concentrate, sporirea productivității preselor și filtrelor, limpezirea rapidă și stabilă a sucurilor.

Bibliografie

1. Clapco S., Ciloci A., Tiurin J., Labliuc S., Stratan M. Stabilirea parametrilor optimi de recuperare a complexului enzimatic pectolitic din lichidul cultural al tulpinii *Penicillium viride* CNMN FD 04 P. // Buletinul Academiei de Științe a Moldovei, șt. vieții, 2008, nr. 3, p. 138-145.
2. Dinu D. Enzimele pectolitice de origine microbiană, <http://www.unibuc.ro/eBooks/biologie/ProgreseVolumul1/capitolul6>
3. Kobayashi T., Sawoda K., Sumitoma N. Bifunctional pectolytic enzyme with separate pectat lyase and pectin methylesterase domains from an alcalophilic *Bacillus*. // World J. of Microb. and Biotech., 2003, vol. 19, no. 3, p. 269-277.
4. Nadaroglu H., Taşkin E., Adiguzel A. et al. Production of a Novel Pectin Lyase From *Bacillus pumilus* (P9), Characterisation and Fruit Juice Application. // Romanian Biotechnological Letters, 2010, Vol. 15, No.2, p. 5167-5176.
5. Rasheedha Banu A., Kalpana Devi M., Gnanaprabhal G. R., et al. Production and characterization of pectinase enzyme from *Penicillium chrysogenum*. // Indian Journal of Science and Technology Vol. 3, No. 4, 2010, p. 377-381.
6. Semenova M.V., Grishutin S.G., Gusakov A.V. et. al. Isolation and properties of pectinases from the fungus *Aspergillus japonicus*, Biochemistry, V. 68, N. 5, 2003, p. 559-569.
7. Vries R., Visser J. *Aspergillus* Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. // Microbiology and molecular biology reviews, V. 65, N. 4, 2001, p. 497-522.
8. Головнева Р.А., Астапович Н. И др. Выделение и некоторые свойства внеклеточной полигалактуроназы *Aspergillus carbonarium*. // Прикл. биохим. и микр., 1990, Т. 26, №4, с. 462-468.
9. Лобанок А., Астапович Н., Михайлова Р. Биотехнология микробных ферментов, Минск, 1989, с. 5-85.
10. Родионова Н.А., Безбородов А.М. О локализации систем ферментов,

катализирующих расщепление полисахаридов растительных клеточных стенок у высших растений. Пектиназы. // Прикл. биохим. и микр. 1997, Т. 33, №5, с. 467-487.

11. Рухлядева А.П. Методы определения активности гидролитических ферментов, М. 1981, с. 5-21.

12. Рухлядева А.П., Корчагина Г.Т. Определение пектолитической активности интерферометрическим методом. // Прикл. Биохим. и микр, 1973, №6, с. 922.

13. Сапунова Л.И., Михайлова Р.В., Лобанок А.Т. Изучение свойств пектинлиазных препаратов *Penicillium* // Прикл. биохим. и микр., 1995, Т. 31, №5, с. 510-514.