

IMMOBILIZATION OF AN EXOENZYME COMPLEX TO A POLYVINYL ALCOHOL CRYOGEL

Dzhakasheva M.A.¹, Lieberzeit P.A.²

¹Ministry of education and science Republic of Kazakhstan,
M. Auezov South-Kazakhstan state university, Taukekhana avenue, 5, Shymkent, 160000,
Kazakhstan

Dzhakasheva_m@mail.ru

²University of Vienna,
Univeristatsring 1, 1010 Vienna, Austria
Peter.Lieberzeit@univie.ac.at

ABSTRACT

We studied an immobilized biocatalyst process based on a multi-enzymic complex consisting of pectinase, cellulase, hemicellulase and β -glucanase, in which a polyvinyl alcohol cryogel was used as a carrier. The polyvinyl alcohol cryogel is a viscoelastic nonshattering material, which is unabraded, has favorable operational properties for a long duration, is able to take any granule shape, and is appropriate for different reactors with different operating modes. To form cross-linked enzymatic aggregates, a multi-enzymic complex was precipitated by isopropyl alcohol with the simultaneous addition of a glutaric aldehyde solution as the linking agent and reduced cured grape polyuria as the water-retaining agent and filler. The process was studied to include a multi-enzymic complex to the polyvinyl alcohol cryogel matrix. The reduced grape polyuria stabilized the catalytic exoenzyme activity retention at their cross-linking by glutaric aldehyde and negatively influenced enzymes activity in the complex cross-linked enzymatic aggregates content. The gained high-active biocatalyst immobilized to the polyvinyl alcohol cryogel displayed pH stability and high catalytic stability for a long time without any disturbance of the operating regime, and the process has multiple potential applications in winemaking. Due to a porous structure, the matrix of this carrier did not modify reactions catalyzed by the enzyme and resulted in a quality finished product (ruddy wine).

Keywords: Enzyme immobilization, cross-linked aggregates, pectolytic enzymes, multi-enzymic complex, polyvinyl alcohol

УДК 663.15

ИММОБИЛИЗАЦИЯ КОМПЛЕКСА ЭКЗОФЕРМЕНТОВ В КРИОГЕЛЬ ПОЛИВИНИЛОВОГО СПИРТА

Джакашева М.А.¹, Либерцайт П.А.²

¹Южно-Казахстанский государственный университет им. М.Ауэзова, МОН РК,
пр. Тауке-хана, 5, Шымкент, 160000, Казахстан

Dzhakasheva_m@mail.ru

²Университет Вены, Университатринг 1, 1010 Вена, Австрия
Peter.Lieberzeit@univie.ac.at

АБСТРАКТ

Технологически проработан и апробирован метод получения иммобилизованного биокатализатора на основе мультиэнзимного комплекса, состоящего из пектиназы, целлюлазы, гемицеллюлазы и β -глюконазы, где в качестве носителя использовали криогель поливинилового спирта. Криогель поливинилового спирта является вязкоупругим нехрупким материалом, который практически не подвергается абразивному износу, обладает хорошими эксплуатационными характеристиками в течение длительного времени и способен принять любую форму гранул, подходящую для различных реакторов с разными

режимами работы. Для включения мультиэнзимного комплекса в матрицу криогеля поливинилового спирта изучен процесс формирования поперечно-сшитых ферментных агрегатов, в котором мультиэнзимный комплекс осаждали изопропиловым спиртом при одновременном добавлении раствора глутарового альдегида в качестве сшивающего агента и измельченных подсушенных виноградных выжимок в качестве влагоудерживающего агента и наполнителя. Отмечено значительное стабилизирующее влияние измельченных виноградных выжимок на сохранение каталитической активности экзоферментов при сшивании их глутаровым альдегидом, неблагоприятно влияющим на активность ферментов в составе комплексных поперечно-сшитых ферментных агрегатов. Полученный высокоактивный биокатализатор, иммобилизованный в криогель поливинилового спирта, обладает рН стабильностью и высокой каталитической стабильностью в течение длительного времени без нарушения технологического режима для многократного использования в виноделии. Матрица данного носителя, благодаря пористой структуре, не создаёт серьёзных препятствий для протекания катализируемых ферментом реакций и обеспечивает высокое качество готового продукта (красного вина).

Ключевые слова: иммобилизация ферментов, поперечно-сшитые ферментные агрегаты, пектолитические ферменты, мультиэнзимный комплекс, поливиниловый спирт.

ВВЕДЕНИЕ

Применение специфичных комплексных ферментных препаратов (ФП) или мультиэнзимных комплексов (МЭК) позволяет осуществить принципиально новые технологии глубокой и комплексной переработки основного и вторичного сырья, а также непищевых отходов. Необходимость применения МЭК обусловлена тем, что технические ФП, выпускаемые промышленностью, сбалансированы по составу ферментных комплексов относительно узкого круга субстратов [1]. Поэтому глубокий гидролиз многокомпонентного растительного сырья возможен лишь при использовании комбинированных препаратов, содержащих ферменты с разной субстратной специфичностью. В свою очередь, иммобилизация ферментов обеспечивает возможность создания биотехнологических процессов длительного пользования с высоким выходом целевых продуктов, при этом техническое решение таких процессов существенно упрощено по сравнению с процессами на основе свободных ферментов.

Принцип иммобилизации заключается в стабилизации каталитической активности ферментов, принципиальном увеличении объемной продуктивности, расширении значений рН и температурных оптимумов, удлинении срока действия ферментов, связанных с многократным использованием иммобилизованного ФП [2,3]. В качестве носителей для иммобилизации ферментов широко используют как органические полимеры, так и неорганические материалы. К носителям предъявляются определённые требования: они должны быть нерастворимы в реакционной среде, обладать химической, биологической стойкостью, механической прочностью, не вызывать неспецифической адсорбции и сильных конформационных изменений молекулы белка, легко гранулироваться и активироваться [4]. Использование нерастворимых носителей для иммобилизации ферментов позволяет получать незагрязненный продукт при возможности многократного применения и технически несложного отделения системы отреагентов [5]. Еще одним немаловажным критерием выбора носителя является его стоимость, которая, в совокупности с ценностью и возможностью повторного использования сопродуктов, приводит к все расширяющемуся поиску дешевых и потенциально доступных носителей [3].

Одним из наиболее перспективных методов иммобилизации ферментов является включение в криогель поливинилового спирта (ПВС), который благодаря своей высокой прочности, выраженной пористости, биосовместимости и стабильности в биологических средах нашел широкое применение в различных областях биотехнологии [6]. Кроме того, криогели характеризуются высокой гидрофильностью, что позволяет им удерживать воду внутри полимерной подложки, даже находясь в безводной среде полярных органических растворителей [5].

Целью наших исследований является получение высокопродуктивного иммобилизованного биокатализатора на основе комплекса экзоферментов, состоящих из пектиназы, целлюлазы, гемицеллюлазы и β -глюконазы для многократного использования в виноделии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Высокоочищенный пектолитический ФП получен в результате разработки комбинированного способа выделения и очистки из культуральной жидкости штамма *A. awamori* 56-2-53-85-375, полученного в результате многоступенчатой селекции и мутагенеза на кафедре биотехнологии ЮКГУ им. М. Ауэзова [7,8]. Активность пектолитического комплекса ферментов определяли по

методике действующего ГОСТа Р55298-2012. МЭК получен путем смешения ферментных препаратов, содержащих пектиназу, целлюлазу, гемицеллюлазу, эндо- и экзо- β -1,4-глюканазу, которые были взяты в оптимальных количествах, определенных экспериментально. Ферментные препараты смешивали в шаровой мельнице РМ 100 («Retsch», Германия) в течение 10 мин. при температуре 35-37°C.

Для получения иммобилизованного МЭК в криогель ПВС ФП, входящие в состав МЭК, унифицировали путем измельчения до частиц размером 5-20 мкм и растворяли в 0,1 М KH_2PO_4 (рН7), охлажденном до 2°C. Для получения поперечно-сшитых ферментных агрегатов (ПСФА) МЭК осаждали изопропиловым спиртом в концентрации 35% при температуре 0°C в течение 5-80 сек. при одновременном прибавлении к водному раствору МЭК раствора глутарового альдегида (ГА) в концентрации 1,2% при рН 6-8 и измельченных (размер частиц около 0,5-1мм) подсушенных (до влажности 40-50%) виноградных выжимок в качестве биосовместимого влагоудерживающего агента в концентрации 12%. Полученный таким образом ПСФА в виде геля в концентрации 300 г/л и водный раствор ПВС в концентрации 80 г/л тщательно перемешивали до получения однородной массы и на криогрануляционной установке получали замороженные сферические гранулы диаметром 1,0-1,5 мкм по методике [9].

Определение массовой доли взвесей в сусле осуществляли гравиметрически, относительной вязкости – с помощью вискозиметра через определение времени истечения, массовую концентрацию суммы фенольных веществ – по методу Фолина-Чекольтеу и антоцианов – колориметрическим методом [10]. Для получения значения показателя интенсивности (И) и оттенка (Т) виноматериала выполняли в кварцевых кюветах с расстоянием между рабочими гранями 10 мм. Контролем служила дистиллированная вода. Показатель интенсивности (И) определяли как сумму значений оптических плотностей при длинах волн 420 и 520 нм: $(И_{520}=A_{420}+A_{520})$. Показатель оттенка (Т) рассчитывали как частное от деления A_{420} и A_{520} : $(Т=A_{420}/A_{520})$.

Все опыты были выполнены в трехкратной повторности. Оценку статистической достоверности результатов осуществляли с использованием прикладных программ «MathCAD» и «Statistica».

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТА

Полученный ранее МЭК является высокомолекулярным субстратом, т.к. состоит из различных композиций ФП (Пектинола 56-2-53-85-375, Целловиридина Г20Х, ТренолинОпти и Рапидаза Пресс). Для ковалентного присоединения МЭК к носителю необходимы крупнопористые матрицы криогеля ПВС, что, в свою очередь, приводит к тому, что существенная часть объема матриц приходится на поры, а количество реакционноспособных биокатализаторов, расположенных в стенках этих макропор, относительно невелико. Поэтому для повышения содержания ферментов в иммобилизованном биокатализаторе ФП нужно ввести в матрицу носителя в виде дисперсных частиц ферментосодержащие наполнители, которые будут распределены по всему объему носителя. В литературе имеется разработка [5], позволяющая осуществить такое распределение, однако использование хитозана в качестве биосовместимого влагоудерживающего биополимера не дало ожидаемых результатов и нами проведен анализ возможности использования других влагоудерживающих агентов. В результате найдено экономически обоснованное, простое и эффективное решение: применение измельченных и подсушенных виноградных выжимок позволило получить хорошую дисперсность ферментосодержащих наполнителей, наиболее высокую пектолитическую активность и стабильность иммобилизованного МЭК (ИммЭК).

Для формирования иммобилизованных биокатализаторов использовали разработанную нами методику, представленную на рисунке 1.



Рис. 1. Схема получения иммобилизованного мультиэнзимного комплекса в криогель поливинилового спирта

Fig. 1. Scheme of immobilized multi-enzymic complex process to the polyvinyl alcohol cryogel

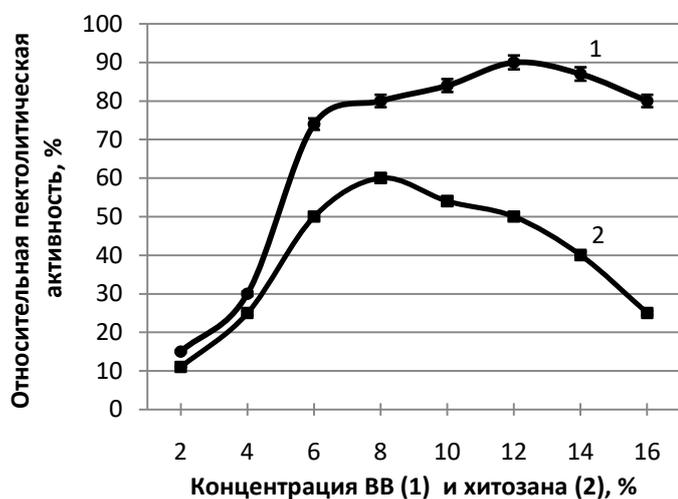
Для получения поперечно-сшитых ферментных агрегатов (ПСФА) МЭК осаждали изопропиловым спиртом при одновременном прибавлении к водному раствору МЭК раствора глутарового альдегида (ГА), который использовали в качестве сшивающего агента. Во избежание инактивации ФП вводили измельченные (размер частиц около 0,5-1 мм) и подсушенные (до влажности 40-50%) виноградные выжимки в качестве биосовместимого влагоудерживающего агента, который обеспечивает равномерное распределение МЭК по всему объему носителя. Одновременно с процессом сшивки ГА происходило осаждение готового ПСФА в виде геля.

На рисунке 2 приведены результаты осаждения ФП изопропанолом совместно с виноградными выжимками в различных концентрациях. Для оценки каталитической активности МЭК использовали относительную общую пектолитическую активность, т.е. определенную в сравнении с исходной активностью всех ФП, включенных в состав МЭК.

Полученные данные показывают, что осаждение двухкомпонентного коагулята изопропиловым спиртом в концентрации 35% наиболее оптимально для сохранения каталитической активности МЭК. Также установлено, что повышение концентрации виноградных выжимок вплоть до 12% приводит к увеличению пектолитической активности. Дальнейшее повышение количества виноградных выжимок в составе комплекса нецелесообразно, т.к. это приводит к снижению действующего каталитического начала фермента, поэтому использовали виноградные выжимки в концентрации 12%. Применение традиционно используемого хитозана оказалось менее эффективным (рис. 2В, кривая 2).



A)



B)

Условия: концентрация ГА – 0,5%; скорость прибавления изопропанола – 10 мл/с; время осаждения – 50 мин.; pH – 7

Рис. 2. Зависимость относительной пектолитической активности МЭК от концентрации изопропанола (А), хитозана и виноградных выжимок (В)

Conditions: concentration of glutaric aldehyde is 5%; the rate of addition of isopropyl alcohol is 10 ml/s; the deposition time is 50 min; the pH is 7

Fig. 2. Relative pectolytic activity of multi-enzymic complex is concentration isopropanol (A), chitosan and grape polyuria dependent (B)

Исследовано влияние режимов сшивки на выход ПСФА и их ФА. На рисунке 3 показано влияние концентрации ГА на скорость образования ПСФА.

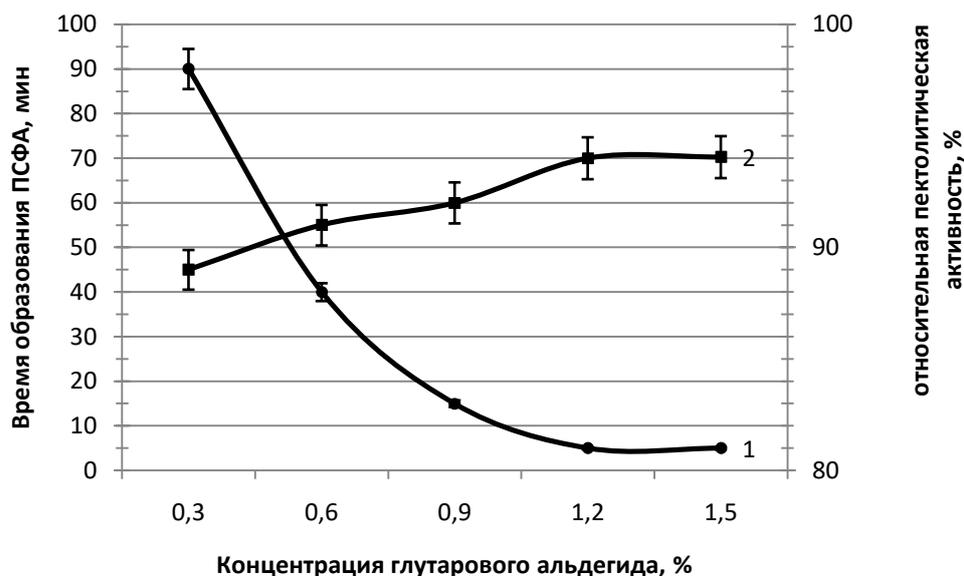
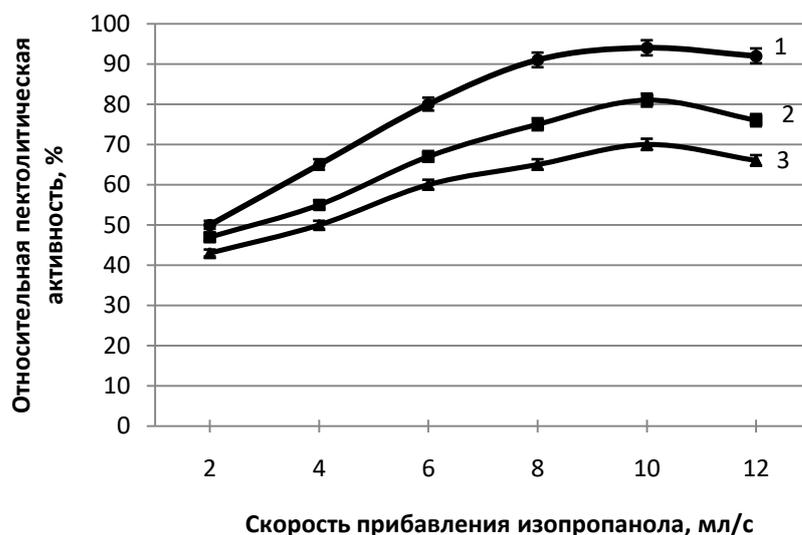


Рис. 3. Зависимость скорости образования поперечно-сшитых ферментных агрегатов (1) и их относительной пектолитической активности (2) от концентрации глутарового альдегида

Fig. 3. Cross-linked enzymatic aggregates' formation speed (1) and relative pectolytic activity (2) is concentration glutaric aldehyde dependent

Оптимальной концентрацией ГА в реакционной смеси для образования ПСФА в течение 5 мин. является концентрация 1,2%, сохранность пектолитической активности при этом составляет 92-94%.

При получении ПСФА необходимо учитывать скорость добавления и температуру осадителя, а также длительность процесса осаждения (рис. 4). Найдено, что количественный выход ПСФА увеличивается с повышением скорости разбавления раствора фермента раствором осадителя, что объясняется быстрой модификацией аминогрупп ФП, способных участвовать в реакциях межмолекулярной сшивки. Наибольшая ферментативная активность ПСФА происходит при температуре осадителя 0°C, т.к. при такой температуре происходит наиболее мягкое протекание реакции.



Обозначение кривых: температура осадителя, °C: 1–0; 2–5; 3–10

Рис. 4. Относительная пектолитическая активность ПСФА при осаждении изопропанолом

Designation of a curves: temperature of precipitant, °C: 1–0; 2–5; 3–10

Fig. 4. Relative pectolytic activity of cross-linked enzymatic aggregates at the precipitation isopropyl alcohol

Полученный таким образом ПСФА тщательно перемешивали с водным раствором ПВС до получения однородной массы и на криогрануляционной установке получали сферические гранулы диаметром 1,0-1,5 мкм. Для эффективной иммобилизации ПСФА в криогель ПВС были проведены исследования влияния концентрации гелеобразующего полимера и концентрации ПСФА на процесс формирования биокатализатора (табл. 1, 2). В результате экспериментов установлено, что наибольшая ферментативная активность иммобилизованного катализатора наблюдалась при концентрации ПВС 80 г/л и ПСФА 300 г/л.

Таблица 1. Характеристики формирования биокатализатора в зависимости от концентрации ПВС

Table 1. Features of formation of the biocatalyst in dependence on concentration of polyvinyl alcohol

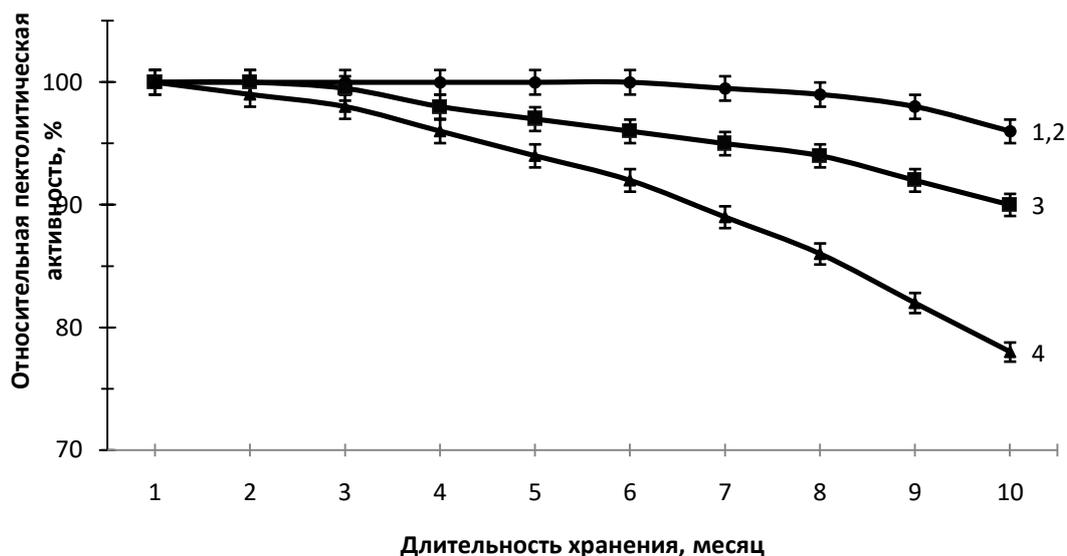
Концентрация ПВС, г/л Concentration of polyvinyl alcohol, g/l	Удельная активность, ед/г белка Specific activity, units/g protein	ПкС, ед/мл РТА, units/ml
60	490000	10,7
70	505000	11,0
80	551250	11,4
90	509500	11,1
100	495200	10,8
110	483100	10,2

Таблица 2. Характеристики формирования биокатализатора в зависимости от концентрации ПСФА

Table 2. Features of formation of the biocatalyst in dependence on concentration of polyvinyl cross-linked enzymatic aggregates

Концентрация ПСФА, г/л Concentration of cross-linked enzymatic aggregates, g/l	Удельная активность, ед/г белка Specific activity, units/g protein	ПкС, ед/мл РТА, units/ml
150	500250	10,9
200	502000	11,0
250	525300	11,1
300	550000	11,3
350	490100	10,5
400	470100	9,2

Изучение стабильности ИмМЭК в зависимости от условий хранения показало (рис. 5), что при температуре хранения 0-6°C в течение 6-ти месяцев сохраняется 100% каталитическая активность. После 6-ти месяцев хранения ИмМЭК ферментативная активность снижается.



Обозначение кривых: температура хранения, °С: 1 – 0; 2 – 6; 3 – 10; 4 – 25

Рис. 5. Влияние условий хранения ИмМЭК на относительную пектолитическую активность

Designation of a curves: temperature of storage, °С: 1 – 0; 2 – 6; 3 – 10; 4 – 25

Fig. 5. The influence of storage conditions of the immobilized multi-enzymic complex on the relative pectolytic activity

Исследованиями в наших ранних работах [11, 12] доказана эффективность применения некоторых новых ПФП при производстве красных столовых вин. Целью дальнейшей работы является исследование эффективности действия ИмМЭК при получении высококачественных столовых красных вин. Опыты проводились на винограде сорта Каберне Совиньон с одного участка, одного и того же года урожая, имевшем 20% сахаров и приблизительно одинаковое содержание красящих и дубильных веществ. В данном эксперименте при получении образцов мезгу сульфитировали из расчета 70 мг/л и подвергали ферментации в течение 12 ч. с использованием ИмМЭКв различных концентрациях, который применялся многократно и подавался в специальную перфорированную емкость, закрепленную на валу перемешивающего устройства в термовинификаторе. Мезгу, прошедшую ферментацию, прессовали и полученное сусло сбрасывали одной и той же расой дрожжей при 23-25°C. После полного прекращения брожения виноматериал снимали с дрожжей и определяли основные показатели, характеризующие эффективность применения ферментных препаратов (табл. 3). На основании полученных данных для производства красных столовых вин можно рекомендовать ИмМЭК в концентрации: 15 г/100 кг мезги.

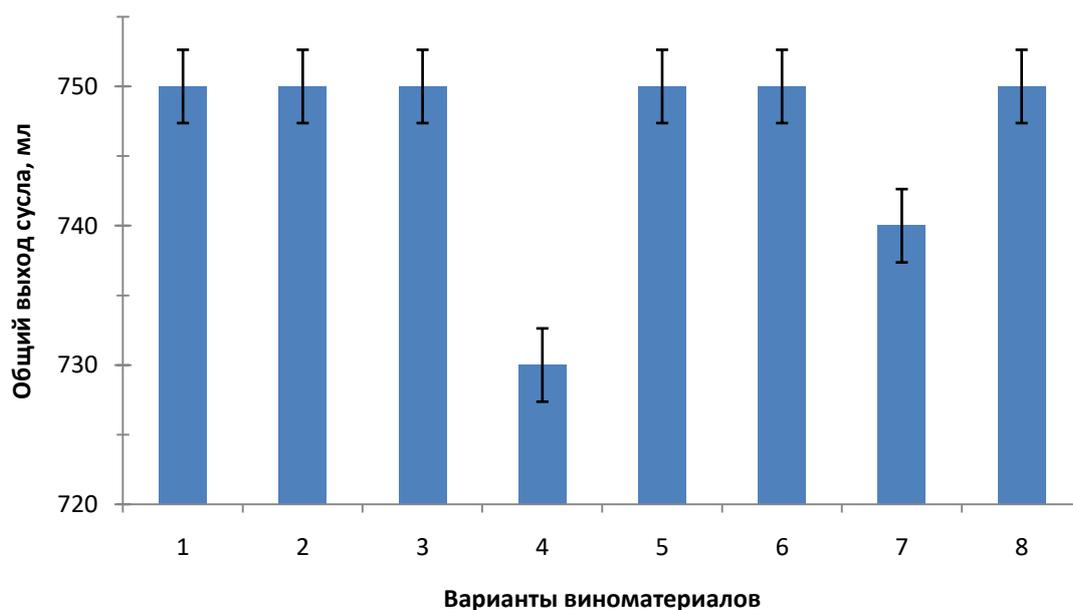
Таблица 3. Основные показатели, характеризующие эффективность применения ИмМЭК

Table 3. The main indicators characterizing the effectiveness of the immobilized multi-enzymic complex

Показатели Indicators	Контроль Control	ДозировкаФП, ггранул/100 кгмезги Dosage of enzyme preparation, g granules/100 kg of mash				
		3	6	9	15	20
Общий выход сусла и выход сусла-самотека, мл The total yield of the mash and the yield of the mash-drift, ml	560 (410)	728 (490)	734 (495)	737 (510)	760 (519)	748 (515)

Взвеси, г/100 мл The suspension, mg/ml	3,2	2,8	2,7	2,6	2,3	2,3
Относительная вязкость Relative viscosity	1,61	1,41	1,38	1,32	1,28	1,28
Фенольные соединения, мг/л Phenolic compounds, mg/l	1830	2462	2584	2615	2780	2777
Антоцианы, мг/л Anthocyanins, mg/l	520	618	654	682	724	720
Интенсивность окраски Color intensity	1,19	1,23	1,36	1,43	1,47	1,45
Оттенок окраски Tint color	1,09	0,92	0,82	0,77	0,63	0,64

На рис. 6 показано влияние качества ИмМЭК на эффективность протекания процесса мацерации, которое подтверждают вышеприведенные данные о высокой стабильности иммобилизованного комплекса.



1 – свежеприготовленный ИмМЭК однократного использования; 2 –ИмМЭК после 3-х месяцев хранения однократного использования; 3 –ИмМЭК после 6-ти месяцев хранения однократного использования; 4 – ИмМЭК после 8-ми месяцев хранения однократного использования; 5 – свежеприготовленный ИмМЭК 20-кратного использования; 6 – свежеприготовленный ИмМЭК 50-кратного использования; 7 – свежеприготовленный ИмМЭК после 60-кратного использования; 8 –ИмМЭКпосле 6-ти месяцев хранения 50-кратного использования

Рис. 6. Влияние качества ИмМЭК на эффективность процесса мацерации

1 – freshly prepared single-use the immobilized multi-enzymic complex; 2 – the immobilized multi-enzymic complex after 3 month of storage of a single use; 3 – the immobilized multi-enzymic complex after 6 month of storage of a single use; 4 – the immobilized multi-enzymic complex after 8 month of storage of a single use; 5 - freshly prepared 20 times use the immobilized multi-enzymic complex; 6– freshly prepared 50 times use the immobilized multi-enzymic complex; 7–freshly prepared 60 times use the immobilized multi-enzymic complex; 8 –the immobilized multi-enzymic complex after 6 month of storage 50 times use

Fig. 6. The influence of the quality of the immobilized multi-enzymic complex on the efficiency of the process of maceration

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследований позволили установить влияние режимов сшивки и осаждения экзоферментов на выход ПСФА и их ферментативную активность. Отмечено, что при первоначальном осаждении водного раствора МЭК изопропанолом с одновременным прибавлением раствора ГА и измельченных виноградных выжимок выход ПСФА значительно увеличивается, что связано с оптимально подобранными условиями разбавления раствора МЭК с раствором осадителя и сшивателя, а также со стабилизирующим влиянием виноградных выжимок на сохранение активности МЭК при его сшивании с помощью ГА, который неблагоприятно влияет на активность ферментов. Полученный высокоактивный иммобилизованный биокатализатор на основе криогеля ПВС обладает высокой каталитической стабильностью при температуре хранения 0-6°C в течение 6-ти месяцев. Матрица данного носителя благодаря пористой структуре не создаёт серьёзных препятствий для протекания катализируемых ферментом реакций и обеспечивает высокое качество готового продукта (красного вина). Использование ИМЭК при получении красных столовых вин экономически и технологически обосновано, т.к. несмотря на высокую стоимость разработанного иммобилизованного комплекса за счет многократного его применения (до 50 раз) фактический расход его в 10 раз меньше, чем для традиционных ФП.

Финансирование

Работа выполнена в рамках государственного образовательного заказа по подготовке доктора философии (PhD) специальности 6D070100 – Биотехнология на 2012-2017 гг. при финансовой поддержке Республиканского бюджета.

ЛИТЕРАТУРА

1. Донцов А.Г., Шубаков А.А. Пектинолитические ферменты: очистка, активация, микробиологический синтез.–Екатеринбург: Изд-во УрО РАН, 2010. –С. 82-90.
2. Beshay U. β -glucanase productivity improvement via cell immobilization of recombinant *Escherichia coli* cells in different matrices / U. Beshay, H. El-Enshasy, I.M.K. Ismail, H. Moawad, S. ABD-El-Ghany // *Pol. J. Microbiol.* –2011. –Vol.60,№2. –P.133-138.
3. Крякунова Е.В. Применение иммобилизованных микроорганизмов и ферментов / Е.В. Крякунова, А.В.Канарский // *Вестник Казанского технологического университета.* – 2012. – Т.15,№22. –С.101-105.
4. Ефременко Е.Н. Влияние длительного хранения клеток микроорганизмов, иммобилизованных в криогель поливинилового спирта, на их выживаемость и биосинтез целевых метаболитов / Е.Н. Ефременко, Н.Ю. Татарина // *Микробиология.* –2007. – Т.76, №3.–С.383-389.
5. Шаскольский Б.Л. Композитные иммобилизованные биокатализаторы с частицами ферментного препарата, включенного в матрицу криогеля поливинилового спирта /Б.Л. Шаскольский, М.С. Фогораси, М.Д. Станеску, В.И. Лозинский // *Биотехнология.* – 2009. – №1. – С. 71-82.
6. Лозинский В.И. Физико–химические свойства криогелей поливинилового спирта и особенности их макропористой морфологии / В.И. Лозинский, Л.Г. Дамшкалин, Б.Л. Шаскольский, Т.А. Бабушкина, И.Н. Курочкин, И.И. Курочкин // *Коллоидный журнал.* – 2007. – Т. 69, №6. – С. 798-816.
7. Dzhakasheva M.A. Getting the active strain of *Aspergillus awamori* – pectinase producer /M.A. Dzhakasheva, B.Sh.Kedelbayev // *International journal of applied and fundamental research.* –2014. – Vol. 11, №4. –P.593-597.
8. Dzhakasheva M.A. Extraction and purification of pectolytic enzyme using combined method / M.A. Dzhakasheva, B.Sh. Kedelbayev, Zh.R. Elemanova, A.Y. Mamytova, U.K. Bissenov // *Biology and medicine.* – 2016. – Vol.8,iss. 1. (http://www.biolmedonline.com/Articles/Vol8_2_2016/BM-174-16_Extraction-and-Purification-of-Pectolytic-Enzyme-Using-Combined-Method.pdf).
9. Пат. 2104866 Российская Федерация, МПК В29В9/10, В01J2/02. Устройство для формирования гранул /Лозинский В.И., Зубов А.Л. – Заявл. 02.09.1996; опубл. 20.02.1998.
10. Методы теххимического контроля в виноделии /под ред. В.Г. Гержикова. – Симферополь: Таврида, 2002. – 260 с.

11. Джакашева М.А. Исследование влияния ферментного препарата Тренолин Руж ДФ на качество казахстанских красных столовых вин // Сб. науч. трудов аспирантов, магистрантов, стажеров-исследователей ЮКГУ им. М.Ауэзова. – Шымкент, 2009. – С. 187-191.
12. Джакашева М.А. Анализ влияния пектолитического фермента при производстве красных столовых вин / М.А. Джакашева, К.Б. Шоинбаева, Ш.К. Кнашова// Науч. труды ЮКГУ им. М.Ауэзова. – 2012. – №1(22). – С. 22-27.

REFERENCES

1. Doncov A.G., Shubakov A.A. *Pektinoliticheskie fermenty: oshistka, aktivacija, mikrobiologicheskij sintez* [Pectinolytic enzymes: cleaning, activating, microbiological synthesis]. Ekaterinburg: Publishing House of the Ural Branch of RAS, 2010. pp. 82-90.
2. Beshay U., El-Enshasy H., Ismail I.M.K., Moawad H., ABD-El-Ghany S. β -glucanase productivity improvement via cell immobilization of recombinant Escherichia coli cells in different matrices. *Pol. J. Microbiol*, 2011, vol.60, no. 2, pp.133-138.
3. Krjakunova E.V., Kanarskij A.V. *Primenenie immobilizovannykh mikroorganizmov i fermentov* [The use of immobilized enzymes and microorganisms]. *Bulletin of Kazan Technological University*, 2012, vol.15, no.22, pp.101-105.
4. Efremenko E.N., Tatarinova N.Ju. *Vlijaniye dlitel'nogo xranenija kletok mikroorganizmov, immobilizovannykh v kriogel' polivinilovogo spirita, na ih biosintez i tvorjenie metabolitov* [Effect of long-term storage of cells of microorganisms immobilized in polyvinyl alcohol cryogel for their survival and target metabolite biosynthesis]. *Microbiology*, 2007, vol.76, no. 3, pp.383-389.
5. Shaskol'skij B.L., Fogorasi M.S., Stanesku M.D., Lozinskij V.I. *Kompozitnyye immobilizovannyye biokatalizatory s chasticami fermentnogo preparata, vkljuchennogo v matricu kriogelja polivinilovogo spirita* [Immobilized biocatalysts with particles of enzyme preparation in a matrix of polyvinyl alcohol cryogel]. *Biotechnology*, 2009, no. 1, pp. 71-82.
6. Lozinskij V.I., Damshkaln L.G., Shaskol'skij B.L., Babushkina T.A., Kurochkin I.N., Kurochkin I.I. *Fiziko-himicheskie svoystva kriogelja polivinilovogo spirita i osobennosti ih makroporistoj morfolozii* [Physico-chemical properties of polyvinyl alcohol cryogel and features of their macroporous morphology]. *Colloid Journal*, 2007, vol.69, no. 6, pp. 798-816.
7. Dzhakasheva M.A., Kedelbayev B.Sh.. Getting the active strain of Aspergillus awamori – pectinase producer. *International journal of applied and fundamental research*, 2014, vol. 11, no. 4, pp.593-597.
8. Dzhakasheva M.A., Kedelbayev B.Sh., Elemanova Zh.R., Mamytova A.Y., Bissenov U.K. Extraction and purification of pectolytic enzyme using combined method. *Biology and medicine*, 2016, vol. 8, iss. 1. Available at: http://www.biolmedonline.com/Articles/Vol8_2_2016/BM-174-16_Extraction-and-Purification-of-Pectolytic-Enzyme-Using-Combined-Method.pdf.
9. Lozinskij V.I., Zubov A.L. *Ustrojstvo dlja formirovanija granul* [A device for forming granules]. Patent RF, no.2104866, 1998.
10. Gerzhikova V.G. *Metody tehnologicheskogo kontrolya v vinodelii* [Methods of technological and chemical control in wine making]. Simferopol: Tavrida, 2002, p. 260.
11. Dzhakasheva M.A. *Issledovanie vlijaniya fermentnogo preparata Trenolin Ruzh DF na kachestvo kazhstanskikh krasnykh stolovykh vin* [Study of the effect of the enzyme preparation Trenolin Ruzh DF on the quality of Kazakhstan red table wines]. *Collection of scientific works of graduate students, undergraduates, research fellows SKSU named after M. Auezov*, 2009, pp. 187-191.
12. Dzhakasheva M.A., Shoibaeva K.B., Knashova Sh.K. *Analiz vlijaniya pektoliticheskogo fermenta pri proizvodstve krasnykh stolovykh vin* [Analysis of the influence of the pectolytic enzyme in the production of red table wines]. *Scientific works SKSU named after M. Auezov*, 2012, no. 1 (22), pp. 22-27.

ПОЛИВИНИЛ СПИРТІНІҢ КРИОГЕЛЬДЕГІ ЭКЗОФЕРМЕНТІК КЕШЕНІНІҢ ИММОБИЛИЗАЦИЯСЫ

Джакашева М.А.¹, Либерцайт П.А.²

¹ҚР БҒМ, М.Әуезов атындағы Оңтүстік Қазақстан мемлекеттік университеті,
Тәуке хан д-лы, 5, Шымкентқ., 160000, Қазақстан
Dzhakasheva_m@mail.ru

ТҮЙІН

Иммобилизденген биокатализатор негізінде мультиэнзимді кешен алу тәсілінің технологиялық жолы мен апробациясы жасалынған, оның құрамы пектиназа, целлюлаза, гемицеллюлаза және β -глюконазназаларды, криогель тасымалдаушы есебінде поливинил спирті қолданылды. Криогель поливинил спирті аса төзімді мықты материал болып табылады, іс жүзінде тотығуға берілмейтін, тозбайтын, ұзақ уақыт бойы және кез келген түйіршік пішінді болып қабылдай алатын жақсы эксплуатациялық сипаттарға ие, және ол барлық реактормен әртүрлі жұмыс режимінде істей алады. Мультиэнзимді комплексті матрицаға криогель поливинил спиртің ендіру үшін көлденең – тігілген ферменттік агрегаттарды қалыптастыру процесі зерттелді, мұнда мультиэнзимді кешенді изопропил спиртінде бір уақытта глутар альдегид ертіндісін қоса отырып, тұндырады ал ол ылғалұстағыш және толтырғыш тігілген агент ретінде ұнтақталып, кептірілген жүзім сығындылары қолданылды. Тігілген агент ретінде ұнтақталып кептірілген жүзім сығындыларының глутарлы альдегидтік ферменттің әсері экзоферментті каталитикалық белсенділігіне көлденең – тігілген агрегаттардың кешенді құрамы кері әсер етеді. Алынған жоғары белсенді иммобилизденген биокатализатор криогель поливинил спирті рН тұрақтылыққа ие және ұзақ бойы технологиялық режимі бұзылмай бірнеше дүркін шарап жасау өндірісінде қолданыла алады. Берілген тасымалдағыштың матрицаның құрылымына байланысты кеуекті болғандықтан, каталитикалық ферменттердің реакциясының жүруі анағұрлым кедергілер туындатпайды және дайын өнімге (қызыл шарапқа) жоғары сапа беруге ықпал етеді.

Түйін сөздер: Иммобилизденген ферменттер, көлденең – тігілген ферменттік агрегаттар, пектолитикалық фермент, мультиэнзимді комплекс, поливинилді спирт