



УО «Полесский государственный университет»

**"Выделение, очистка и характеристика
молокосвертывающих протеиназ
из культуральной жидкости
Pleurotus ostreatus"**

Исполнители: Сакович В.В., Жерносеков Д.Д.

Докладчик: Сакович В.В., аспирант кафедры биотехнологии

АКТУАЛЬНОСТЬ

Протеолитические ферменты широко используются в сыроделии. Основным источником получения данных энзимов служат сычуги животных. Данный ресурс ограничен, что приводит к поиску альтернативных источников получения данных ферментов.

Pleurotus ostreatus содержит протеиназы, обладающие молокосвертывающей активностью. В литературе имеются данные, что экстракт плодовых тел *P. ostreatus* имеет сходство с препаратами, используемыми в сыроделии.

Выделение, очистка и изучение свойств этих энзимов является необходимым вектором не только для современной биотехнологии как науки, но является важным и для отечественной промышленности.

Схема исследований

Наращивание грибной культуры в достаточном для проведения исследований объеме

Осаждение белков методом высаливания

Проведение диализа

Ионообменная хроматография

Влияние pH

Влияние температуры

На каждом этапе проводится определение концентрации белка (метод Брэдфорда), определение молокосвертывающей активности (метод Пятницкого) и определение общей протеолитической активности (лизис желатина)

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ



Таблица 1. - Начальные этапы очистки молокосвертывающих ферментов *P. ostreatus*

Фракция	Объем, мл	Белок мг/мл	МСА во фракции, ед/мл	Общая МСА	Удельная МСА	Степень очистки
Культураль- ная жидкость	200	0,185	5	1000	27	1
Осаждение хлоридом натрия	50	0,22	5	250	22,7	0,84
Раствор лиофильного порошка	5	1,07	33	165	30,8	1,14

Таблица 2 – очистка ферментного препарата на КМ-сефарозе

Фракция	Объем , мл	Белок мг/мл	Активность во фракции, ед/мл	Общая активность	Удельная активность	Степень очистки
Р-р лиофильн. порошка	10	1,07	33	165	30,8	1,14
МСА: объединен. фракция	20	0,15	90	900	300	11
ПА: фракция 1	20	0,15	16,9	338	113	2,7
ПА: фракция 2	10	0,16	15,7	157	98	2,3
ПА: фракция 3	10	0,07	20	200	285,7	6,8

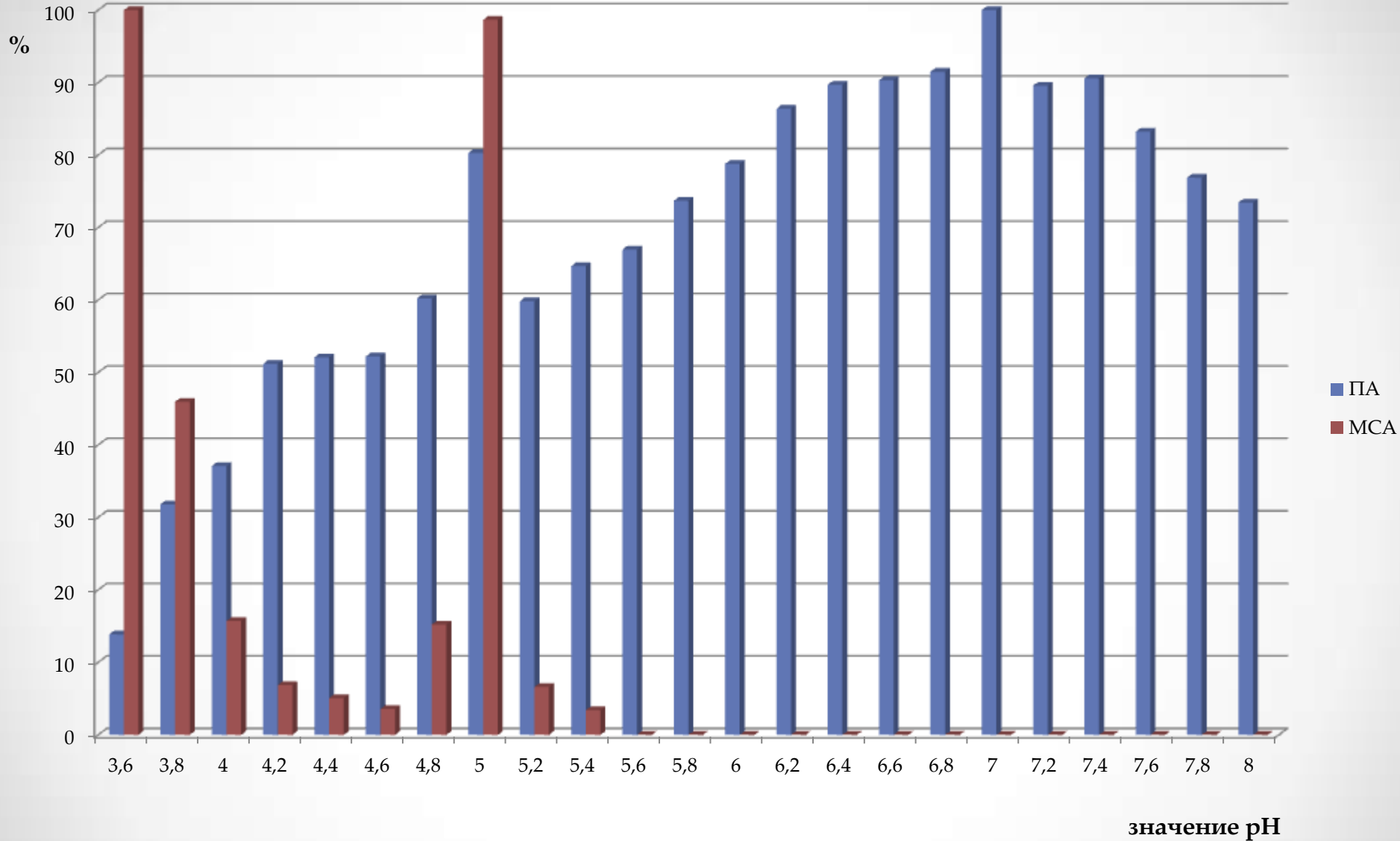
Таблица 3 – очистка ферментного препарата на DEAE-сефарозе

Фракция	Объем , мл	Белок мг/мл	Активность во фракции, ед/мл	Общая активность	Удельная активность	Степень очистки
Р-р лиофильн. порошка	5	1,07	33	165	30,8	1
МСА: объедин. фракция	8	0,13	92,5	740	698	22.7
ПА: объедине. фракция	8	0,13	24,31	194,5	183,5	5.2

Таблица 4 – Очистка ферментного препарата на DEAE-сефарозе с помощью бэтч-метода

Фракция	Объем, мл	Белок мг/мл	МСА во фракци и, ед/мл	МСА общая активность	Удельная активность	Степень очистки
Р-р лиофильн. порошка	5	1,07	33	165	30,8	1,14
Объедин. фракция	7	0,15	100	700	648	21

Влияние рН

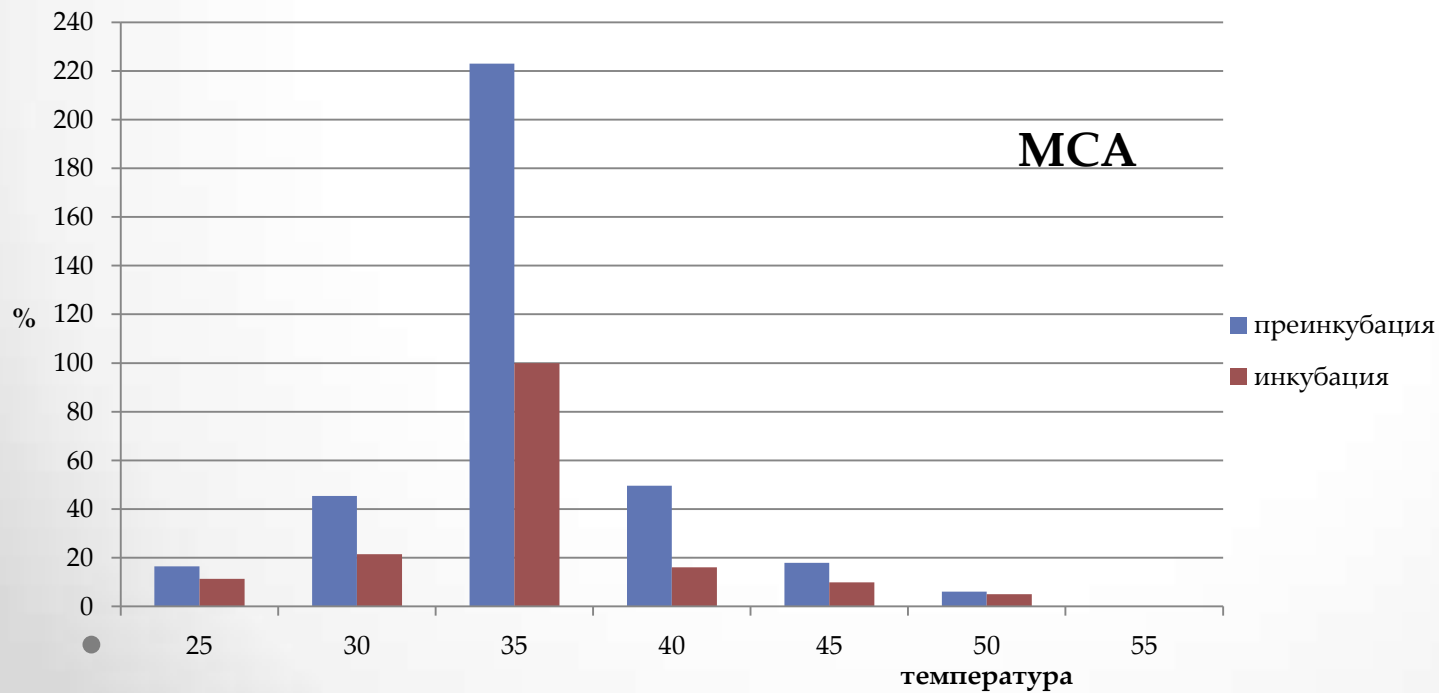
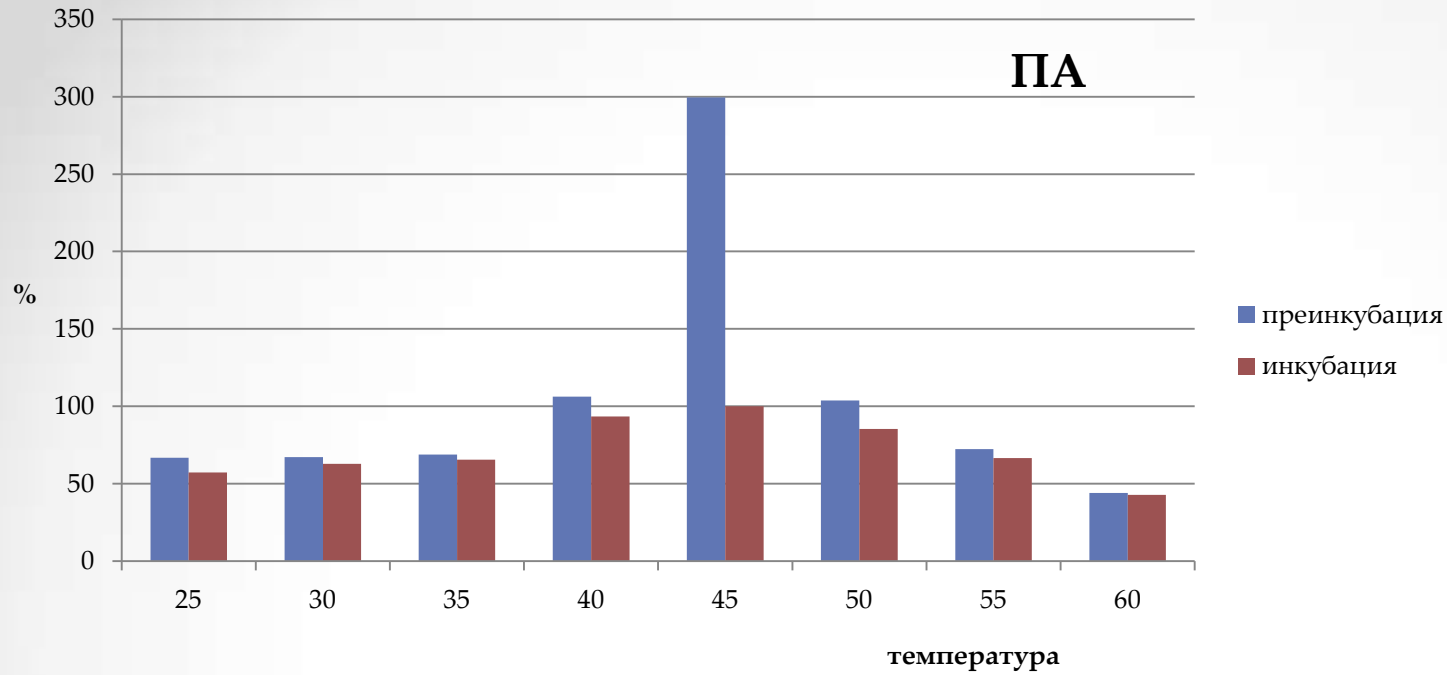


Контроль: буфер (с соответствующим рН + субстрат)

- Специфического гидролиза субстрата (ПА) и свертывания молока (МСА) не наблюдалось

Таблица 1 – соотношение МСА/ПА при различных значениях рН

Значение рН	Белок мг/мл	Общая МСА	Удельная МСА	Общая ПА	Удельная ПА	МСА/ПА
3,6	1,07	81,08	75,78	1,09	1,02	74:1
3,8	1,07	37,27	34,8	2,5	2,34	16:1
4,0	1,07	12,74	11,9	2,92	2,73	4:1
4,2	1,07	5,57	5,2	4,03	3,77	1,5:1
4,4	1,07	4,12	3,92	4,01	3,75	1,1:1
4,6	1,07	2,89	2,7	4,11	3,8	0,8:1
4,8	1,07	12,35	11,5	4,74	4,43	2,6:1
5,0	1,07	80	74,77	6,32	5,91	13:1
5,2	1,07	5,38	5,03	4,71	4,4	1,2:1
5,4	1,07	2,72	2,54	5,09	4,76	0,6:1



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

*Очистку ферментного препарата, обладающего МСА, с помощью хроматографии на ДЭАЭ-сефарозе предлагаем использовать в сыроделии на этапе образования сырного сгустка.

*Частично очищенный препарат охарактеризован для промышленного использования, в качестве молокосвертывающего фермента:

- Рекомендуемое значение рН 3,6
- Рекомендуемая температура 35 °С
- Для увеличения МСА мы рекомендуем проведение часовой преинкубации ферментного препарата

*Планируется дальнейшая очистка препарата, обладающего МСА и изучение субстратной специфичности ферментов, входящих во фракции, разделяемые хроматографией на ионообменных носителях.



БЛАГОДАРЮ ЗА ВНИМАНИЕ

