

Ksilanazių savybių ir jų imobilizavimo natrio alginatė galimybės

Dalia Čižeikienė¹,

Laura Prakopavičiūtė¹,

Algimantas Paškevičius²,

Vita Raudonienė²

¹ Kauno technologijos universitetas,
Radvilėnų pl. 19,
50254 Kaunas, Lietuva
El. paštas dalia.cizeikiene@ktu.lt

² Gamtos tyrimų centras,
Biodestruktorių tyrimo laboratorija,
Akademijos g. 2,
08412 Vilnius, Lietuva

Pastaruoju metu atkreiptas dėmesys į šalutinių maisto perdirbimo produktų bei žemės ir miško ūkio produktų perdirbimą į vertingus komponentus. Imobilizuotų fermentų panaudojimas šiam procesui sulaukia vis daugiau susidomėjimo dėl galimybės padidinti jų stabilumą ir ekonominės naudos. Šio darbo tikslas buvo atrinkti ksilanazes produkuojančius mikroskopinius grybus ir nustatyti temperatūros bei terpės pH įtaką ksilanazių aktyvumui, įvertinti mikroskopinių grybų gaminamų ksilanazių imobilizavimo galimybes: (I) kovalentiniu būdu ant kieto nešiklio susiuvant ir (II) patalpinant kapsulėje su alginato geliu. Iš dešimties skirtingų mikroskopinių grybų atrinktas didžiausiu ksilanaziniu aktyvumu pasižymėjęs *Penicillium* genties mikroskopinis grybas. Nustatyta *Penicillium* sp. gaminamų ksilanazių optimali veikimo temperatūra buvo 70–100 °C, o pH vertė 6. Fermentai imobilizuoti kovalentiniu būdu ir natrio alginato gelyje. Nustatyta kovalentinio imobilizavimo efektyvumo priklausomybė nuo glutaro aldehido koncentracijos, ksilanazių tirpalo koncentracijos ir kapsulių išlaikymo ksilanazių tirpale trukmės. Imobilizuojant fermentus kovalentiniu būdu ksilanazių imobilizacijos efektyvumas siekė 91 %, o fiksuojant ksilanazes alginato gelyje – 65 %.

Raktažodžiai: *Penicillium* sp., ksilanazės, imobilizacija, natrio alginatas, imobilizacijos efektyvumas

ĮVADAS

Didėjant bioproduktų poreikiui vis daugiau dėmesio skiriama atsinaujinančios lignoceliuliozės žaliavos perdirbimui ir jos panaudojimui bioproduktų gamyboje. Lignoceliuliozę sudaro celiuliozė, hemiceliuliozė ir ligninas. Tai cheminiu požiūriu labai didelę energetinę vertę turinčios struktūros (Volynets et al., 2017). Nors lignoceliuliozės žaliavos panaudojimas biotechnologijos pramonėje yra perspektyvus, tačiau ši žaliava labai sudėtingos struktūros, jai apdirbti taikomi sudėtingi metodai. Lignoceliuliozės žaliavai perdirbti buvo naudojami cheminiai metodai, tačiau nuodingi reagentai, cheminiai katalizatoriai ilgainiui buvo pakeisti pranašesniais biokatalizatoriais

(Bajpai, 2004). Antras pagal paplitimą polisacharidas medienoje yra ksilanas, randamas hemiceliuliozės struktūrose (Joseleau et al., 1992). Norint gauti apčiuopiamos naudos, ksilano struktūros skaidomos fermentais – ksilanazėmis iki monosacharido ir ksilozės. Ksilanazės – tai ksilanolitinių fermentų kompleksas, katalizuojantis ksilano hidrolizę (Bajpai, 1997). Ksilanazės plačiai naudojamos popieriaus, maisto, tekstilės ir chemijos pramonėje (Paice et al., 1992; Polizeli et al., 2005; Manji, 2006). Kadangi fermentai vykstant reakcijai nekinta, būtų tikslinga juos naudoti daugiau nei vieną kartą. Todėl ieškoma būdų, kaip naudoti fermentus nepertraukiamoje gamyboje. Ši problema gali būti išspręsta perėinant prie imobilizuotų fermentų, nes fiksuoti

fermentai ne tik yra tinkami naudoti pakartotinai, tačiau yra atsparesni denatūruojančių agentų poveikiui, po reakcijos gaunamas grynas produktas, kurį paprasta išskirti iš reakcijos mišinio. Yra trys pagrindiniai imobilizavimo būdai:

1. Imobilizavimas ant kieto nešiklio.
2. Imobilizavimas susiuvant (bifunkciniais reagentais).
3. Imobilizacija įjungiant fermentą į erdvines struktūras, nesudarant cheminių ryšių (geliuose).

Adsorbcijos procesas itin paprastas, tačiau nešiklį ir fermentą rišančios silpnos jėgos (Van der Valso, hidrofobinės) gali sukelti desorbcijos procesą, ir reakcija neįvyks. Kovalentinei imobilizacijai svarbu parinkti tinkamą nešiklį, nes kitaip gali sumažėti fermento aktyvumas. Imobilizacija susiuvant nereikalauja polimerinio nešiklio, tačiau sunku parinkti tinkamas ir stabilias biokatalizatoriaus gavimo sąlygas. Fermentas izoliuotas gelyje neišplaunamas, lieka stabilus, tačiau didelės makromolekulės substratas sunkiai prasiskverbia pro gelio struktūras, o tai lėtina fermentinę reakciją (Mohamad et al., 2015).

Šio darbo tikslas buvo atrinkti ksilanazes produkuojančius mikroskopinius grybus, išskirtus iš augalinės kilmės substratų ir patalpų oro, nustatyti temperatūros ir terpės pH įtaką ksilanazių aktyvumui, taip pat įvertinti mikroskopinių grybų gaminamų ksilanazių imobilizavimo galimybes: (I) kovalentiniu būdu ant kieto nešiklio susiuvant ir (II) patalpinant kapsulėje su alginato geliu.

METODAI IR SĄLYGOS

Mikroskopiniai grybai (*Cladosporium* sp., *Cladosporium cladosporioides*, *Aureobasidium pullulans*, *Talaromyces luteus*, *Cladosporium lignicola*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium* sp., *Myrothecium verrucaria*) ksilanazių aktyvumo tyrimui buvo gauti iš Gamtos tyrimų centro, Biodestruktorių tyrimo laboratorijos (Vilnius). Mikroskopiniai grybai auginti skystoje terpėje (g l^{-1}): 1,4 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 g KH_2PO_4 , 0,3 g CaCl_2 , 0,3 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g CoCl_2 , 1 ml mikroelementų tirpalo, kuris ruoštas ištirpinus 1,56 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 5 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,4 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ir 0,4 g ksilano. Terpė sterilizuota 121 °C temperatūroje 15 min. Į atvėsusią terpę sterilia metaline kilpele pasėtos mikroskopinio

grybo sporos ($\sim 10^6$ sporų ml^{-1}) (Ja'afaru, 2013). Mikroskopiniai grybai auginti termostate esant 25 °C temperatūrai 7 paras.

Nustatytas ksilanazių aktyvumas naudojant beržo ksilaną kaip substratą. Tam reakcijos mišinys sudarytas iš 0,1 ml fermento tirpalo, 0,1 ml ksilano tirpalo (5 mg ml^{-1}) ir 0,8 ml 0,05 M acetatinio buferio (pH 4,8). Kontrolei naudotas reakcijos mišinys, į kurį buvo pilamas ne fermento tirpalas, o acetatinis buferis. Fermentinė hidrolizė vykdyta 70 °C temperatūroje 30 min. Po fermentinės hidrolizės įpilta 1 ml DNS reagento (1 g 3,5-dinitrosalicilo rūgšties ir 30 g natrio-kalio tartrato ištirpinta 100 ml 0,4 M NaOH tirpale) ir mėgintuvėliai kaitinti 5 min. 100 °C temperatūroje. Atvėsinius išmatuota 540 nm bangos ilgio spindulio sugertis tiriamuoju tirpalu. Veikiant fermentui vyksta ksilano hidrolizė iki ksilozės (redukuojantis sacharidas), kuri su 3,5-dinitrosalicilo rūgštimi (DNS reagentas) stipriai šarminėje terpėje sudaro spalvotus junginius. Vienas fermento aktyvumo vienetas gali išskirti 1 μmol ksilozės ekvivalento iš ksilano (70 °C, pH 4,8) per 1 min. Ksilanazių aktyvumas skaičiuotas pagal 1 formulę:

$$\text{AV/ml} = \frac{\text{KEV} \times \text{PF} \times 1}{30 \times 0,1 \times 1_{\text{KM}}}, \quad (1)$$

KEV – ksilozės ekvivalentas iš standartinės ksilozės tiesės; PF – praskiedimo faktorius; 1 – reakcijos mišinio tūris; 30 – fermentinės hidrolizės trukmė min.; 0,1 – fermento kiekis reakcijos mišinyje ml; ir 1_{KM} – tūris, naudotas spalvinei reakcijai.

Nustatyta *Penicillium* sp. mikroskopinių grybų gaminamų ksilanazių aktyvumo priklausomybė nuo fermentinės hidrolizės temperatūros bei pH vertės.

Penicillium sp. augintas šiaudų terpėje kietafazės fermentacijos sąlygomis 25 °C temperatūroje 6 dienas. Mitybinėje terpėje papildomai kaip azoto šaltinis buvo naudotas mielių ekstraktas ($0,75 \text{ g l}^{-1}$). *Penicillium* sp. į terpę išskirtos ksilanazės imobilizuotos dviem būdais: (I) kovalentiniu būdu ant kieto nešiklio susiuvant ir (II) įterpiant kapsulėje su alginato geliu.

Imobilizavimas kovalentiniu būdu buvo atliktas pagal A. Palo ir kt. (2011) bei Mishra ir kt. rekomendacijas (2017). Alginato kapsulės buvo

gautos lašinant švirkštu 4 % natrio alginato gelį į 0,2 M CaCl₂ tirpalą. Sutvirtėjusios kapsulės buvo aktyvuotos glutaro aldehido tirpale (6, 9 ir 12 %) išlaikant jas 3 valandas. Reikiamos koncentracijos glutaro aldehidas ruoštas 0,05 M citratiniame buferyje (pH 5). Ksilanazės kovalentiškai prijungtos išlaikant aktyvuotas alginato kapsules ksilanazių tirpale 30 min., 60 min., 90 min. ir 120 min. nuolat maišant kambario temperatūroje. Granulės plautos distiliuotu vandeniu ir naudotos ksilanazių aktyvumui nustatyti. Vertinti keturi parametrai, darantys įtaką imobilizacijos efektyvumui: (1) glutaro aldehido koncentracija (6, 9 ir 12 %); (2) ksilanazių tirpalo koncentracija; (3) kapsulių išlaikymo trukmė ksilanazių tirpale (30, 60, 90 ir 120 min.) ir (4) imobilizuotų fermentų panaudojimas keletą kartų. Imobilizacijos efektyvumas apskaičiuotas pagal 2 formulę:

$$IY_{\text{kov.}} (\%) = (Y/X) \times 100, \quad (2)$$

Y – imobilizuotų fermentų aktyvumas, AV; X – imobilizavimui naudotų fermentų aktyvumas, AV.

Patalpinant kapsulėje su geliu ksilanazių tirpalas sumaišytas su 4 % natrio alginato geliu lygiomis dalimis. Kapsulės gautos turinį lašinant į 0,25 M CaCl₂ tirpalą, kuris lėtai maišytas magnetine maišykle. Baigus lašinti granulės CaCl₂ tirpale išlaikytos dar 30 min., kad sutvirtėtų. Gauti kapsulėje patalpinti fermentai kalcio alginato gelyje plauti distiliuotu vandeniu ir nusausti filtruojant pro filtro popierių. Nustatytas imobilizacijos efektyvumas.

Eksperimentai buvo kartoti 3 kartus, iš gautų rezultatų išvesti vidurkiai ir apskaičiuoti standartiniai nuokrypiai naudojant Excel programinę įrangą, be to, esminiai skirtumai įvertinti statistiniais metodais pagal Dunkano kriterijų ($p \leq 0,05$), naudojant STATISTICA 11 kompiuterinę programinę įrangą.

REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Tirti mikroskopiniai grybai gamino ksilanazes, tačiau didžiausiu aktyvumu pasižymėjo *Penicillium* sp. A1 (1 lentelė). Nustatyta, kad *Penicillium* sp. A1 ksilanazių aktyvumas buvo 2,17 AV/ml.

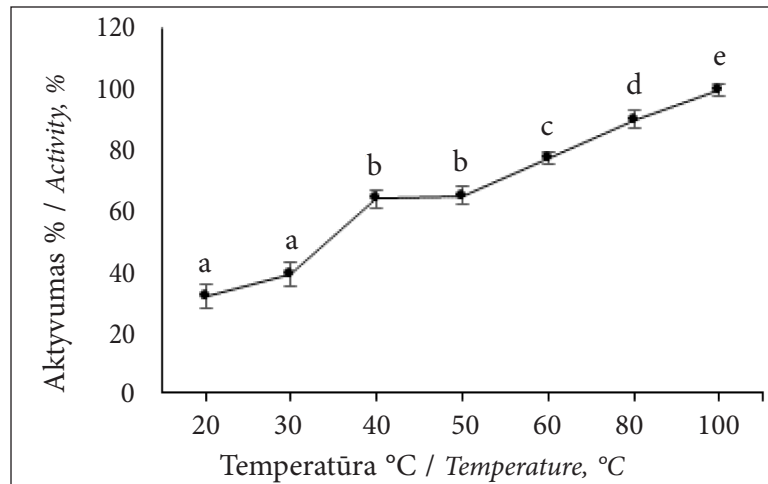
Mokslininkai pateikia ilgą sąrašą mikroorganizmų, gaminančių ksilanolitinius fermentus, bet labiausiai išskiria: *Acrophialophora nainiana*, *Aspergillus niger*, kitos *Aspergillus* genties rūšys, *Cephalosporium* spp., *Paecilomyces variotii*, *Thermomyces lanuginosus*, *Trichoderma* spp. (Subramanian, Prema, 2002; Bajpai, 2014). Nemažai tyrimų atlikta ir su *Penicillium* spp. mikroskopiniais grybais, tačiau jų aktyvumas, literatūros duomenimis, ne toks aukštas. Ksilanazes gamina *Penicillium lagena*, *Penicillium capsulatum*, *Penicillium canescens* mikroskopiniai grybai (Bakri et al., 2003; Khandeparkar, Bhosle, 2006; Ghotara et al., 2006).

Penicillium sp. A1 gaminamos ksilanazės yra termostabilios, kadangi didžiausias jų aktyvumas buvo 80–100 °C temperatūroje (1 pav.). Q. Chenas ir kt. (2016) nustatė, kad *Trichoderma* genties mikroskopinių grybų gaminamos ksilanazės

1 lentelė. Mikroskopinių grybų gaminamų ksilanazių aktyvumas

Table 1. The activity of xylanases produced by fungi

Mikroskopinis grybas / Fungus	Aktyvumas AV ml ⁻¹ Activity, AU ml ⁻¹
<i>Cladosporium</i> sp. X1	0,17
<i>Cladosporium cladosporioides</i> X2	0,92
<i>Aureobasidium pullulans</i> X3	0,50
Neidentifikuotas mikroskopinis grybas NB 6a / <i>Unidentified fungus</i> NB 6a	1,00
Neidentifikuotas mikroskopinis grybas NB 7a / <i>Unidentified fungus</i> NB 7a	0,42
<i>Talaromyces luteus</i> X4	1,50
<i>Cladosporium lignicola</i> X5	0,67
<i>Penicillium brevicompactum</i> X6	0,08
<i>Penicillium</i> sp. A1	2,17
<i>Myrothecium verrucaria</i> X7	0,16



Pastaba / Note: vidutinių verčių reikšmės pažymėtos skirtingomis raidėmis: a–e parodo, kad yra esminių skirtumų, įvertintų pagal Dunkano kriterijų ($p \leq 0,05$). / The average values marked with different letters, a–e, indicate significant differences between the tested samples assessed according to the Duncan criteria ($p \leq 0.05$).

1 pav. Temperatūros įtaka *Penicillium* sp. A1 ksilanazių aktyvumui
Fig. 1. Temperature influence on *Penicillium* sp. A1 xylanase activity

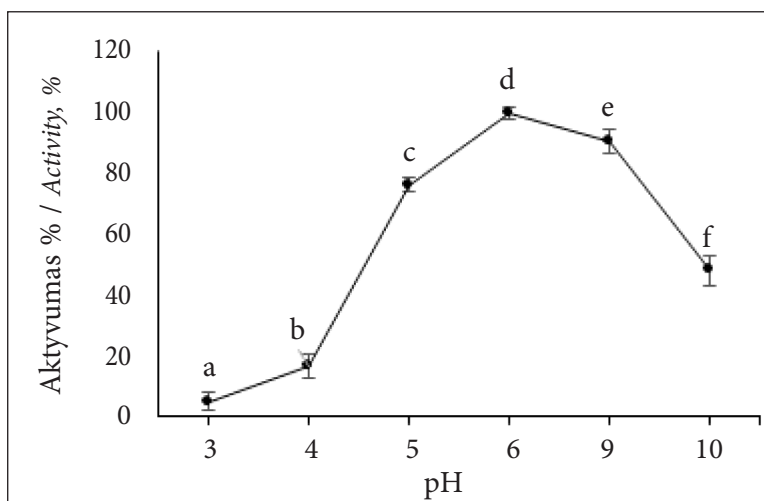
buvo aktyviausios esant 70 °C, tačiau nebuvo termostabilios 100 °C temperatūroje. A. Knobas ir kt. (2013) tyrė *Penicillium glabrum* mikroskopinių grybų produkuojamų ksilanazių savybes ir nustatė, kad optimali temperatūra ksilanazių aktyvumui yra 60 °C. Kai kurie mikroskopiniai grybai gali gaminti termostabilias ksilanazes, pavyzdžiui, *Aspergillus awamori* ir *Bispora* genties rūšys tai atlieka esant 80 °C temperatūrai (Yeoman et al., 2010).

Penicillium sp. A1 mikroskopinio grybo gaminiams ksilanazėms optimali terpės pH buvo 6, o rūgštinėje terpėje (pH 3 ir 4) ksilanazių aktyvumas sudarė tik 20 % (2 pav.). Fermentų savybės labai priklauso nuo jų šaltinio. Q. Chenas ir kt. (2016) bei C. S. Farinas ir kt. (2010) nustatė, kad ksilanazėms optimali pH vertė yra taip pat nuo 5 iki 6, o A. Knobo ir kt. (2013) gauti rezultatai atskleidė, kad *Penicillium glabrum* ksilanazių gamybai optimali pH vertė buvo 3. G. Q. Guano ir kt. (2016) įsitikinimu, *Cladosporium oxysporum* gamina ksilanazes šarminėje terpėje (pH 8). Optimali terpės pH vertė ksilanazių aktyvumui priklauso nuo fermentą produkuojančių mikroorganizmų.

Be glutaro aldehido imobilizavimo efektyvumas sudarė tik 33 %, o susiuvant ksilanazes 12 % glutaro aldehidu ksilanazių imobilizavimo efek-

tyvumas padidėjo iki 75 % (3 pav.). Nenaudojant glutaro aldehido nustatytas nežymus ksilanazinis aktyvumas, tačiau tai galima vertinti kaip fermento adsorbcijos proceso padarinį. Glutaro aldehidas aktyvuoja alginato granules, sudarydamas lengvai prieinamus tvirtinimo taškus fermentui bei suteikia vietos ksilanazių konformaciniam lankstumui. Gauti rezultatai patvirtina A. Palo ir kt. (2011) straipsnyje pateiktas tendencijas – didinant glutaro aldehido koncentraciją kartu didėja imobilizavimo efektyvumas.

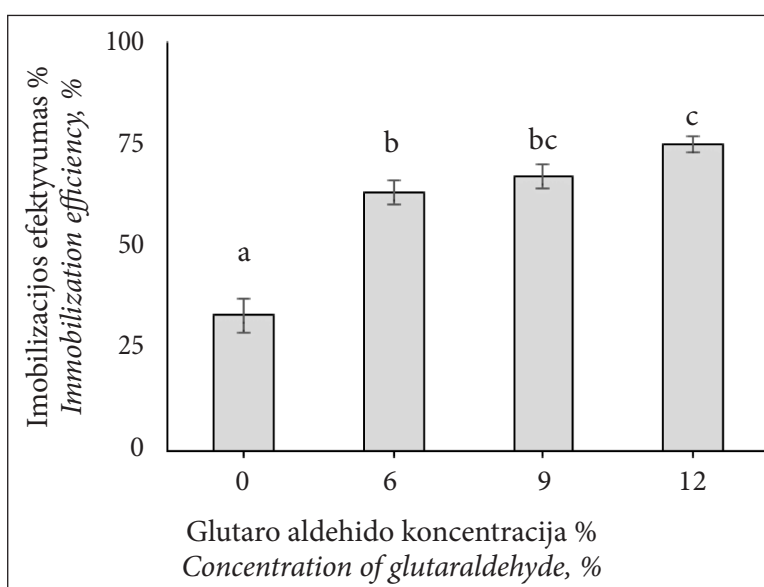
Nustatyta, kad mažėjant fermento koncentracijai tirpale, kuriame buvo panaudintos alginato kapsulės, ksilanazių imobilizavimo efektyvumas didėjo. Penkis kartus praskiedus ksilanazes ($2,2 \text{ AV ml}^{-1}$) pasiektas 67 % imobilizavimo efektyvumas, o naudojant $0,5 \text{ AV ml}^{-1}$ fermento tirpalą imobilizavosi 88 % ksilanazių (4 pav.). Taip yra galimai dėl riboto tvirtinimo taškų skaičiaus ant aktyvuotų alginato granuliu, todėl kovalentiškai neprijungtos ksilanazės po imobilizacijos tiesiog išplaukamos vandeniui. A. Palas ir kt. (2011) patvirtino, kad ksilanazių stipriai koncentruoti tirpalai turi neigiamą įtaką imobilizacijos efektyvumui. Nurodyta, kad imobilizacijos efektyvumas padidėja net 40 % praskiedus fermento tirpalą nuo 550 AV ml^{-1} iki 150 AV ml^{-1} .



Pastaba / Note: vidutinių verčių reikšmės pažymėtos skirtingomis raidėmis: a–f parodo, kad yra esminių skirtumų, įvertintų pagal Dunkano kriterijų ($p \leq 0,05$). / The average values marked with different letters, a–f, indicate significant differences between the tested samples assessed according to the Duncan criteria ($p \leq 0.05$).

2 pav. pH vertės įtaka ksilanazių aktyvumui

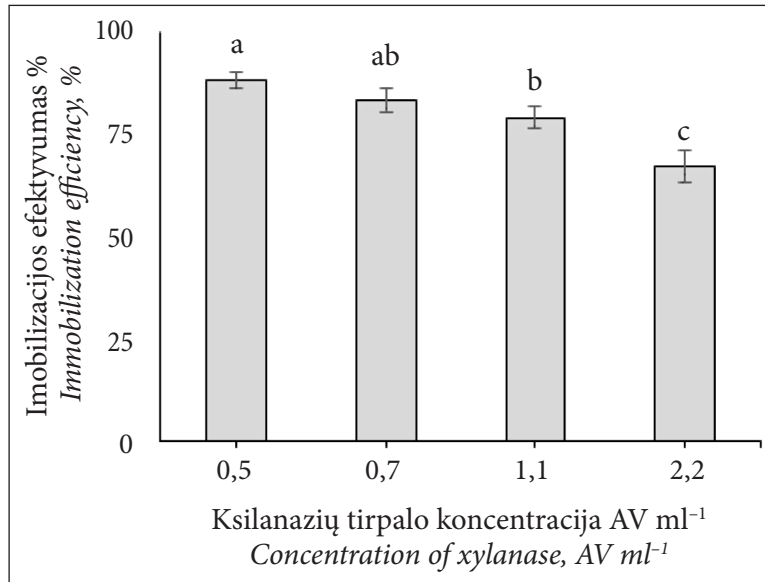
Fig. 2. Influence of pH on xylanase activity



Pastaba / Note: vidutinių verčių reikšmės pažymėtos skirtingomis raidėmis: a–c parodo, kad yra esminių skirtumų, įvertintų pagal Dunkano kriterijų ($p \leq 0,05$). / The average values marked with different letters, a–c, indicate significant differences between the tested samples assessed according to the Duncan criteria ($p \leq 0.05$).

3 pav. Glutaraldehydo koncentracijos įtaka kovalentinei ksilanazių imobilizacijai

Fig. 3. Influence of glutaraldehyde concentration on covalent xylanase immobilization



Pastaba / Note: vidutinių verčių reikšmės pažymėtos skirtingomis raidėmis: a–c parodo, kad yra esminių skirtumų, įvertintų pagal Dunkano kriterijų ($p \leq 0,05$). / The average values marked with different letters, a–c, indicate significant differences between the tested samples assessed according to the Duncan criteria ($p \leq 0.05$).

4 pav. Ksilanazių tirpalo koncentracijos įtaka imobilizacijos efektyvumui

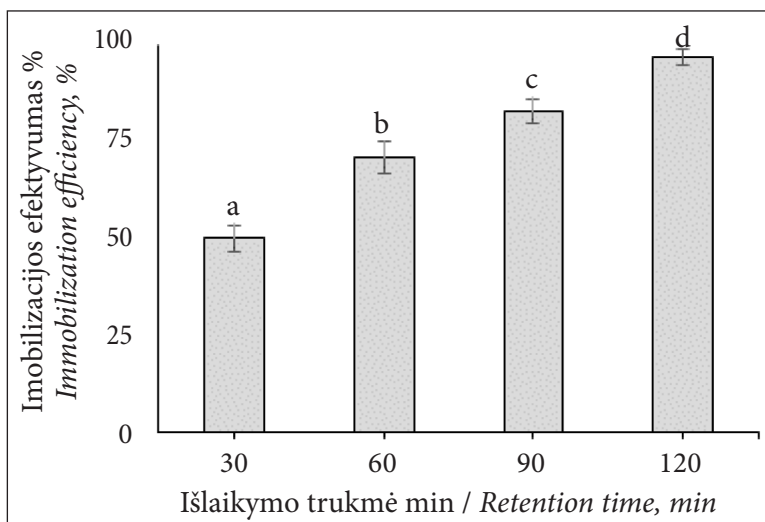
Fig. 4. Influence of xylanase solution concentration on immobilization efficiency

Ilgėjant kapsulių išlaikymo fermento tirpale trukmei imobilizacijos efektyvumas padidėjo iki 91 %. Lyginant 30 min. ir 120 min. kapsulių išlaikymo trukmę imobilizacijos efektyvumas padidėjo net 41 % (5 pav.). A. Palo ir kt. (2011) straipsnyje pateikti rezultatai taip pat patvirtina imobilizacijos efektyvumo priklausomybę nuo kapsulių išlaikymo fermento tirpale trukmės.

Ksilanazių imobilizacija alginato gelyje arba kovalentinis prijungimas prie alginato kapsulių yra nesudėtingi ir pigūs būdai. Tačiau imobilizuojant ksilanazes prarandama dalis fermento. Tiriant skirtingų veiksnių įtaką kovalentinei imobilizacijai nustatytos sąlygos, kurios padėjo pasiekti didžiausią *Penicillium* sp. A1 imobilizacijos išeią (91 %), o imobilizuojant alginato gelyje imobilizavimo efektyvumas siekė 65 %. Nustatyta, kad ksilanazių, išskirtų iš *Penicillium* sp. A1, kovalentinis imobilizavimas yra efektyvesnis nei ksilanazių įterpimas į erdvinę struktūrą ($IY_{kov.} = 91 \% > IY_{gelyje} = 65 \%$). Viena pagrindinių priežasčių, kodėl prarandamas ksilanazių aktyvumas

fiksuojant gelyje, yra sudėtingas ksilano kaip substrato molekūlės prasiskverbimas per alginato granulės sienelės iki ksilanazių. Kita priežastis gali būti per trumpas imobilizacijos laikas. Imobilizuotų ir laisvų ksilanazių aktyvumo palyginimas pateiktas 6 paveiksle.

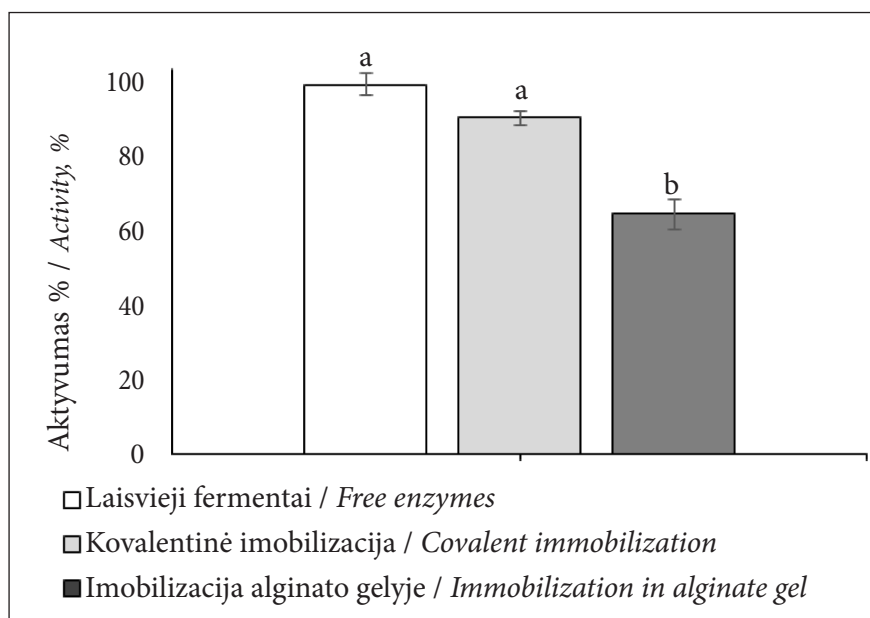
Laisvųjų fermentų panaudojimas yra jų švaistymas, nes po reakcijos fermentas negali būti pakartotinai naudojamas dėl sudėtingo jo išgryninimo iš reakcijos mišinio. Pritvirtinti prie kietų paviršių (ar imobilizuoti juose) fermentai gali būti panaudoti keletą kartų. Kovalentiškai imobilizuotų ksilanazių aktyvumas jau po antro naudojimo sumažėjo 40 %, tačiau po 3, 4, 5, 6 kartų naudojimo ksilanazės išliko stabilesnės, o aktyvumas mažėjo lėčiau (7 pav.). Gelyje imobilizuotos ksilanazės yra daug stabilesnės – po antro pakartotinio naudojimo fermento aktyvumas sumažėjo tik 3 %, o po 3, 4, 5, 6 kartų naudojimo fermento aktyvumas mažėjo nuo 92 % iki 63 %. Kovalentiškai imobilizuotų ksilanazių aktyvumas mažėjo greičiau nei imobilizuotų gelyje galbūt dėl to, kad imobilizacija erdvinėse struktūrose



Pastaba / Note: vidutinių verčių reikšmės pažymėtos skirtingomis raidėmis: a–d parodo, kad yra esminių skirtumų, įvertintų pagal Dunkano kriterijų ($p \leq 0,05$). / The average values marked with different letters, a–d, indicate significant differences between the tested samples assessed according to the Duncan criteria ($p \leq 0.05$).

5 pav. Kapsulių išlaikymo ksilanazių tirpale trukmės įtaka imobilizacijos efektyvumui

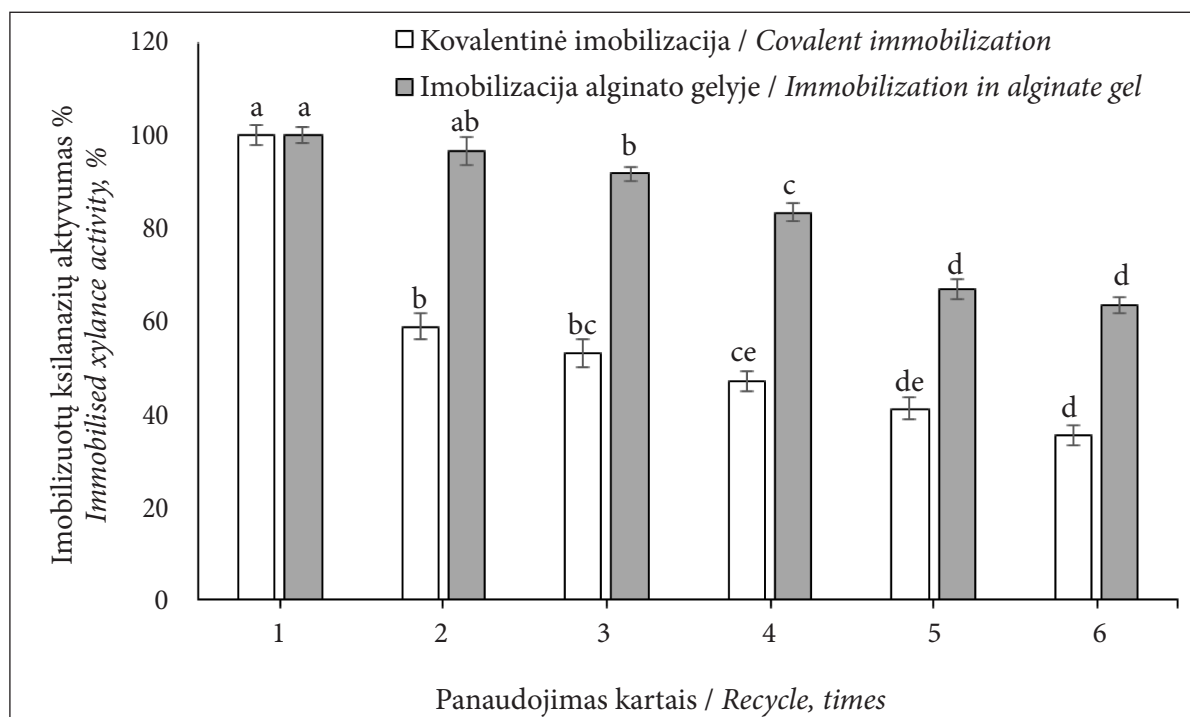
Fig. 5. Influence of the duration of capsules storage in xylanase solution on immobilization efficiency



Pastaba / Note: vidutinių verčių reikšmės pažymėtos skirtingomis raidėmis: a ir b parodo, kad yra esminių skirtumų, įvertintų pagal Dunkano kriterijų ($p \leq 0,05$). / The average values marked with different letters, a and b, indicate significant differences between the tested samples assessed according to the Duncan criteria ($p \leq 0.05$).

6 pav. Imobilizuotų ir neimobilizuotų ksilanazių aktyvumo palyginimas

Fig. 6. Comparison of the activity of immobilized and non-immobilized xylanases



Pastaba / Note: vidutinių verčių reikšmės, lyginant tos pačios spalvos stulpelius tarpusavyje, pažymėtos skirtingomis raidėmis: a–e parodo, kad yra esminių skirtumų, įvertintų pagal Dunkano kriterijų ($p \leq 0,05$). / The average values (by comparing the columns of the same colour with each other) marked with different letters, a–e, indicate significant differences between the tested samples assessed according to the Duncan criteria ($p \leq 0.05$).

7 pav. Imobilizuotų fermentų pakartotinio naudojimo įtaka jų aktyvumui
Fig. 7. Influence of re-use of immobilized enzymes on their activity

yra stabilesnė, o ksilanazės sunkiau išplaunamos iš kapsulių nei kovalentiškai prijungtos.

IŠVADOS

1. Iš dešimties mikroskopinių grybų didžiausiu ksilanaziniu aktyvumu pasižymėjo *Penicillium* sp. A1.

2. *Penicillium* sp. A1 gamina termostabilias ksilanazes, kurių didžiausias aktyvumas yra 70–100 °C temperatūroje, o optimali terpės pH vertė 6.

3. Kovalentiškai imobilizuojant ksilanazes su 12 % glutaro aldehidu, ksilanazių imobilizavimo efektyvumas padidėja iki 75 %, o glutaro aldehidu aktyvuotų kapsulių išlaikymo trukmė ksilanazių tirpale rekomenduojama 120 min. arba didesnė.

4. Imobilizuojant kovalentiniu būdu imobilizavimo efektyvumas yra 91 %, o fiksuojant ksilanazes alginato gelyje imobilizavimo efektyvumas siekia 65 %.

LITERATŪRA

1. Bajpai P. 2014. *Xylanolytic Enzymes*: book. USA: Academic Press. 112 p.
2. Bajpai P. 2004. Biological bleaching of chemical pulps. *Critical Reviews in Biotechnology*. Vol. 24. No. 11. P. 1–58.
3. Bajpai P. 1997. Microbial xylanolytic enzyme system: Properties and applications. *Advances in Applied Microbiology*. Vol. 43. P. 141–194.
4. Bakri Y., Jacques P., Thonart P. 2003. Xylanase production by *Penicillium canescens* 10–10c in solid-state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Vol. 108. P. 737–748.
5. Chen Q., Li M., Wang X. 2016. Enzymology properties of two different xylanases and their impacts on growth performance and intestinal microflora of weaned piglets. *Animal Nutrition*. Vol. 2. P. 18–23.
6. Farinas C. S., Loyo M. M., Baraldo A., Tardioli P. W., Neto V. B., Couri S. 2010. Finding stable cellulase and xylanase: evaluation of the synergistic effect of pH and temperature. *New Biotechnology*. Vol. 27. No. 6. P. 810–815.

7. Ghotara S. K., Chadha B. S., Badhan A. K., Saini H. S., Bhat M. K. 2006. Identification and characterization of diverse xylanases from thermophilic and thermotolerant fungi. *BioResources*. Vol. 1. P. 18–33.
8. Guan G. Q., Zhao P. X., Zhao J., Wang M. J., Huo S. H., Cui F. J., Jiang J. X. 2016. Production and partial characterization of an alkaline xylanase from a novel fungus *Cladosporium oxysporum*. *BioMed Research International*. Article ID 4575024. Prieiga per internetą: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/4575024>
9. Jaafaru M. I. 2013. Screening of fungi isolated from environmental samples for xylanase and cellulase production. *ISRN Microbiology*. Article ID 283423.
10. Joseleau J. P., Comtat J., Ruel K. 1992. Chemical structure of xylans and their interactions in the plant cell walls. *Progress in Biotechnology*. Vol. 7. No. 1. P. 1–15.
11. Khandeparkar R. D. S., Bhosle N. B. 2006. Isolation, purification and characterization of the xylanase produced by *Arthrobacter* sp. MTCC 5214 when grown in solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*. Vol. 39. P. 732–742.
12. Knob A., Beitel S. M., Fortkamp D., Terrasan C. R., de Almeida A. F. 2013. Production, purification, and characterization of a major *Penicillium glabrum* xylanase using brewer's spent grain as substrate. *BioMed Research International*. Article ID 728735. Prieiga per internetą: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/728735>
13. Manji A. H. 2006. Extended usage of xylanase enzyme to enhance the bleaching of softwood kraft pulp. *TAPPI Journal*. Vol. 5. No. 1. P. 23–26.
14. Mishra A., Mishra V., Akhter P., Kumar P., Kumar S. 2017. Industrial application of glutaraldehyde activated immobilized xylanase for clarification of tomato juice. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*. Vol. 4. No. 9. P. 71–82.
15. Mohamad N. R., Marzuki N. H. C., Buang N. A., Huyop F., Wahab R. A. 2015. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology, Biotechnological Equipment*. Vol. 29. No. 2. P. 205–220.
16. Paice M. G., Gurnagul N., Page D. H., Jurasek L. 1992. Mechanism of hemicellulose-directed prebleaching of kraft pulps. *Enzyme and Microbial Technology*. Vol. 14. P. 272–276.
17. Pal A., Khanum F. 2011. Covalent immobilization of xylanase on glutaraldehyde activated alginate beads using response surface methodology: Characterization of immobilized enzyme. *Process Biochemistry*. Vol. 46. P. 1315–1322.
18. Polizeli M. L., Rizzatti A. C., Monti R., Terenzi H. F., Jorge J. A., Amorim D. S. 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 67. P. 577–591.
19. Subramaniyan S., Prema P. 2002. Biotechnology of microbial xylanases: Enzymology, molecular biology and application. *Critical Reviews in Biotechnology*. Vol. 22. P. 33–46.
20. Yeoman C. J., Han Y., Dodd D., Schroeder C. M., Mackie R. I., Cann I. K. O. 2010. Thermostable enzymes as biocatalysts in the biofuel industry. *Advances in Applied Microbiology*. Vol. 70. P. 1–55.
21. Volynets B., Ein-Mozaffari F., Dahman Y. 2017. Biomass processing into ethanol: pretreatment, enzymatic hydrolysis, fermentation, rheology, and mixing. *Green Processing and Synthesis*. Vol. 6. No. 9. P. 1–22. Prieiga per internetą: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/283423>

Dalia Čižeikienė, Laura Prakopavičiūtė,
Algimantas Paškevičius, Vita Raudonienė

INVESTIGATION OF XYLANASE PROPERTIES AND POSSIBILITIES OF IMMOBILIZATION USING SODIUM ALGINATE

Summary

Recently, attention has been paid to the processing of by-products of agriculture into valuable components, and the use of immobilized enzymes for this purpose has become more and more interesting due to the possibility to increase their stability, as well as economic benefit. The aim of this work was to select xylanase producing fungi and to evaluate the influence of temperature and media pH on the activity of enzyme, as well as to evaluate the possibility of xylanase immobilization: (i) covalently on a solid carrier and (ii) encapsulating in alginate gel. In this study ten microscopic fungi were screened for xylanase activity and one belonging to *Penicillium* sp. genus was selected for further experiments as it produced the highest amount of xylanases. The optimum temperature for xylanases production by *Penicillium* sp. was 70–100°C and pH 6. Xylanases produced by *Penicillium* sp. were immobilised: (i) covalently on glutaraldehyde activated alginate beads and (ii) in sodium alginate gel beads. The covalent immobilization efficiency was optimized by changing the immobilization conditions: glutaraldehyde concentration, enzyme load and coupling time. The immobilization yield of covalent immobilization and the immobilization in sodium alginate beads were 91 and 65%, respectively.

Keywords: *Penicillium* sp., xylanase, immobilization, sodium alginate, immobilization efficiency