



003447393

На правах рукописи

Божко Ольга Юрьевна

**БИОСИНТЕЗ, ПРЕПАРАТИВНОЕ ПОЛУЧЕНИЕ, ФИЗИКО-
ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИЗОМАЛЬТУЛОЗОСИНТАЗЫ
ERWINIA RHAPONTICI И ЕЁ ПРИМЕНЕНИЕ В
БИОТЕХНОЛОГИИ**

Специальность 03.00.04 - Биохимия
03.00.23 - Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

0 2 ОКТ 2008

Воронеж 2008

Работа выполнена в Воронежской государственной
технологической академии

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Корнеева Ольга Сергеевна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Епринцев Александр Трофимович

доктор технических наук, профессор
Бирюков Валентин Васильевич

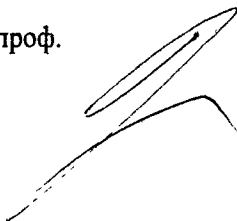
Ведущая организация: Открытое акционерное общество «Государственный научно-исследовательский институт биосинтеза белковых веществ» (ОАО «ГосНИИсинтезбелок»), г. Москва

Защита состоится «17» октября 2008 года в 14⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 212.038.03 при Воронежском государственном университете (394006, г. Воронеж, Университетская площадь, 1, конференц-зал).

С диссертацией можно ознакомиться в зональной научной библиотеке Воронежского государственного университета.

Автореферат разослан «16» сентября 2008 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета, д.б.н., проф.



Грабович М. Ю.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Проблема получения безвредных натуральных сахарозаменителей с пребиотическими свойствами с целью создания функциональных продуктов питания является одной из важнейших медико-социальных проблем профилактики и лечения сахарного диабета, ожирения, метаболического синдрома и дисбактериоза. Применение натуральных сахарозаменителей в рационе питания полезно также при занятиях фитнесом, спортсменам, для предотвращения кариеса зубов; они применяются в фармацевтической промышленности.

Среди известных технологий производства натуральных сахарозаменителей технологии на основе биокатализа являются наиболее перспективными и конкурентоспособными.

Одним из природных сахарозаменителей является изомальтулоза (6-О- α -D-глюкопиранозид-D-фруктоза) - редуцирующий дисахарид, молекулярная масса, вкус и внешний вид которой схожи с сахарозой. Сладость изомальтулозы составляет 40-60 % сладости сахарозы, калорийность около 2 ккал/г. Основными факторами, определяющими растущий интерес к изомальтулозе, являются: низкий гликемический индекс, низкая калорийность, безвредность для организма, отсутствие постороннего или горького привкуса, натуральное происхождение.

Изомальтулозу получают из сахарозы путем биокатализа под действием фермента изомальтулозосинтазы (ИС, КФ 5.4.99.11), также известного как сахарозоизомеразы, α -гликозилтрансферазы, продуцируемого некоторыми микроорганизмами. Поиску активных продуцентов фермента, а также вопросам получения изомальтулозы посвящены работы австралийских ученых L.Wu, R.Birch (2004), немецких исследователей M.McAllister, C.T.Kelly (1990), A.Krastanov, D.Blazheva (2006), H.Kawaguti (2007), D.Zhang, X.Li (2002) и других зарубежных авторов. Однако в России исследования по ферментативной трансформации сахарозы не проводятся. Отечественное производство изомальтулозы отсутствует.

К недостаткам существующих зарубежных технологий производства изомальтулозы следует отнести сравнительно низкую каталитическую активность фермента и недостаточно высокий выход целевого продукта (60-70 %). Кроме того, основным субстратом в реакции, катализируемой ИС, является сахароза. Отсутствуют конкретные данные о способности бифидобактерий развиваться на среде с изомальтулозой, пребиотические свойства углевода изучены недостаточно.

В связи с этим поиск высокоактивных продуцентов ИС, оптимизация процесса биосинтеза фермента, исследование его физико-химических характеристик с целью интенсификации процесса трансформации сахарозы являются актуальной задачей и имеют важное теоретическое и практическое значение.

Цель и задачи исследования. Целью диссертационной работы явилось получение высокоактивной изомальтулозосинтазы микробного происхождения, исследование ее физико-химических характеристик с целью разработки биотехнологии натурального бифидогенного сахарозаменителя изомальтулозы.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

- выбор активного продуцента ИС;
- оптимизация условий биосинтеза целевого фермента;
- получение очищенного ферментного препарата ИС и изучение его физико-химических свойств и кинетических характеристик;
- определение рациональных условий биотрансформации сахарозы;
- исследование пребиотических свойств полученной изомальтулозы;
- разработка биотехнологии изомальтулозы из возобновляемых источников растительного сырья.

Научная новизна заключается в следующем: подобран высокоактивный продуцент изомальтулозосинтазы *Erwinia rhapontici* B-9292, способный трансформировать сахарозу в изомальтулозу. Полученные данные позволяют расширить представления о биохимических и каталитических характеристиках изомальтулозосинтазы. Исследованы физико-химические свойства очищенного ферментного препарата, установлена высокая специфичность, дана термодинамическая характеристика процессов его кислотной и термической инактивации. Изучен процесс биотрансформации сахарозы. Представлен гипотетический механизм метаболического пути изомальтулозы в организме человека и бифидогенности полученного углевода.

Практическая значимость работы. Разработана биотехнология натурального сахарозаменителя изомальтулозы с применением высокоактивной изомальтулозосинтазы бактериального происхождения. Установлены рациональные режимы биотрансформации сахарозы в изомальтулозу, позволяющие увеличить выход конечного продукта до 92-95 %. Показана целесообразность получения изомальтулозы из тростникового

сахара-сырца, что удешевит стоимость целевого продукта. По результатам оформлено две заявки на изобретение: № 2006139255/13(042801), получено решение о выдаче патента от 27.08.2008 г., № 2007128643/13 (031195) приоритет от 25.07.2007 г. Установлены пребиотические свойства полученной изомальтулозы, что позволяет применять данный углевод в качестве компонента питательной среды в биотехнологиях пробиотиков, а также для профилактики и лечения дисбактериозов.

Апробация работы. Основные положения и результаты диссертационной работы были представлены на отчетных научных конференциях ВГТА (2004-2006 гг.), межрегиональных конференциях, посвящённых памяти А.А. Землянухина «Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов» (Воронеж, 2006, 2007); 10-ой Пушкинской школы-конференции молодых ученых «Биология-наука XXI века» (Пушино, 2006); V-й Международной научно-технической конференции «Техника и технология пищевых производств» (Могилев, 2006); Московском Международном форуме «Биотехнология и современность» (Санкт-Петербург, 2006); Всероссийской научной молодежной конференции «Основные направления функционального питания и безопасность пищевых продуктов» (Улан-Удэ, 2006); Общероссийской конференции молодых ученых «Пищевые технологии» (Казань, 2006-2007); четвертом Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2007), 2-ом международном форуме «Актуальные проблемы современной науки» (Самара, 2006); V Всероссийской научно-практической конференции «Роль социальных, медико-биологических и гигиенических факторов в формировании здоровья населения» (Пенза, 2007), международной научно-практической конференции «Биотехнология. Вода и пищевые продукты» (Москва, 2008).

Данная работа была представлена на конкурс инновационных проектов в рамках Воронежского Промышленного Форума (2008 г.), отмечена дипломом, а также на конкурс молодых ученых, проходивший в рамках международной научно-практической конференции «Биотехнология. Вода и пищевые продукты» (2008 г.), награждена дипломом и медалью

Публикации. По результатам проведенных исследований опубликовано 26 работ.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов, выводов, списка использованной литературы и представлена

на 151 странице машинописного текста. Иллюстративный материал включает 36 рисунков и 24 таблицы. Библиография включает 182 наименований, в т. ч. 104 иностранных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы, определены цели и задачи исследований.

ГЛАВА 1. Обзор литературы. Представлена классификация и общая характеристика подслащивающих веществ. Приведена сравнительная оценка различных микроорганизмов - продуцентов ИС. Рассмотрены современные представления о локализации фермента в бактериальной клетке, а также способы получения ферментных препаратов ИС. Проведен сравнительный анализ физико-химических и каталитических свойств фермента различного происхождения.

Представлены данные зарубежных ученых и отмечена перспективность применения изомальтулозы, полученной в результате трансформации сахарозы, в производстве диетических, диабетических продуктов, а также в продуктах питания функционального назначения.

ГЛАВА 2. Объекты и методы исследования.

Основным объектом исследования служила чистая культура бактерий *Erwinia rhapontici* штамм В-9292, полученная из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ, г. Москва). Глубинное культивирование бактерий *E. rhapontici* В-9292 проводили в колбах емкостью 1000 мл в термостате, содержащих по 400 мл питательной среды исследуемого состава, в течение 48-54 ч при температуре 28-30°C.

Определение активности ИС осуществляли по количеству образующихся редуцирующих сахаров в процессе трансформации сахарозы, согласно методу Сомоджи-Нельсона. За единицу ферментативной активности принимали такое количество фермента, которое катализирует образование 1 мкМ изомальтулозы за 1 мин в стандартных условиях. Идентификацию продуктов ферментативной реакции проводили с помощью тонкослойной и газо-жидкостной хроматографии.

Математическое планирование эксперимента. Для построения математической модели в виде полинома второго порядка при подборе оптимальных условий трансформации сахарозы в изомальтулозу ферментом ИС выбрано центральное композиционное ротатабельное планирование.

Выделение и очистка фермента. Для получения высокоочищенного препарата ИС была использована схема очистки, включающая следующие стадии: получение экстракта фермента, гель-фильтрацию на колонке с сефадексом G-25, ионообменную хроматографию на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой, гель-хроматографию на колонке с сефадексом G-150. Контроль гомогенности ИС проводили путем электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) по методу Дэвиса. Окрашивание белковых полос осуществляли, используя нитрат серебра.

Определение молекулярной массы нативного фермента проводили методом гель-хроматографии на колонке с сефадексом G-150, а также электрофорезом в 10 %-ном ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН).

Определение константы Михаэлиса осуществляли по Диксону и Узббу.

Пребиотические свойства изомальтулозы оценивали по росту и развитию пробиотической культуры бифидобактерий *Bifidobacterium bifidum in vitro*. Культивирование бактерий проводили на среде Блаурокка в модификации Г.И. Гончаровой. Состав среды (г/л): пептон - 10; NaCl - 5; агар-агар - 0,75; лактоза - 10; L-цистеин или цистеин солянокислый - 0,1; печеночный отвар.

Статистическая обработка результатов. Опыты проводили в 3-4 - кратной повторности. Для определения достоверности результатов применяли метод вариационной статистики. В таблицах и на рисунках приведены данные типичных опытов, где каждое значение есть среднее арифметическое. При математической обработке использовали статистический критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 3. Биосинтез ИС и исследование физико-химических свойств фермента

Выбор активного продуцента ИС. В результате поиска микроорганизмов был выбран продуцент ИС - бактерии *E. rhapsodici* В-9292 (табл. 1). Активность фермента в 20-30 раз превышала значение таковой среди известных микроорганизмов – продуцентов фермента.

Изучены некоторые культуральные и морфологические признаки бактерий *E. rhapsodici* В-9292. Исследована локализация фермента ИС в бактериальной клетке. Установлено отсутствие активности фермента в фильтрате культуральной жидкости. Ультразвуковое разрушение бактериальных клеток не приводило к увеличению количества растворенного

фермента. Показано, что максимальная активность ИС сконцентрирована в биомассе бактериальных клеток.

Таблица 1

Сравнительная характеристика микроорганизмов – продуцентов ИС

Продуцент	Активность, Е/г	Выход изомальтулозы, %	Патогенность для человека
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	12±0,12	12±0,2	-
<i>Klebsiella sp. LX 3</i>	30±0,5	90±1,5	+
<i>Erwinia rhapontici</i>	1850±26,3	75±1,2	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	80±1,2	20±0,2	-
<i>Pantoea dispersa</i>	75±1,3	80±1,3	-
<i>Protaminobacter rubrum</i>	30±0,4	85±1,4	-
<i>Pseudomonas mesoacidophila</i>	400±5,3	10±0,12	-
<i>Serratia plymuthica</i>	300±5,1	72±1,2	+

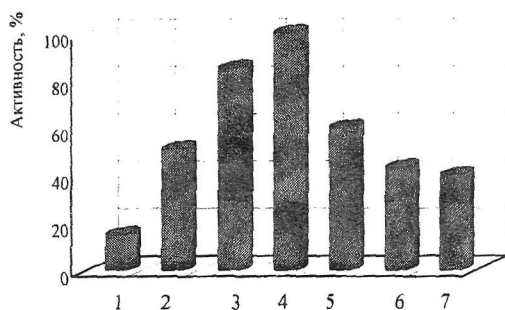


Рис. 1. Влияние источников углерода на активность ИС при культивировании *E. rhapontici*. 1 - без углевода, 2 - глюкоза, 3 - фруктоза, 4 - сахароза, 5 - мальтоза, 6 - изомальтулоза, 7 - лактоза

Влияние различных источников углерода и азота на биосинтез ИС. Установлен индуцибельный характер биосинтеза фермента при культивировании *E. rhapontici* В-9292 на средах с различными углеводами (4 %). Так, уровень активности ИС на среде, содержащей в качестве источника углерода глюкозу, лактозу, изомальтулозу, мальтозу был наименьшим (рис. 1). Культивирование бактерий на средах с фруктозой при-

водило к увеличению активности фермента до 1490 Е/г.

Максимальная активность ИС 1850 Е/г была обнаружена при введении в состав питательной среды сахарозы.

Показано, что наиболее активный синтез фермента обеспечивало содержание сахарозы в среде в концентрации 10 %.

Известно, что источником сахарозы, кроме сахарной свеклы, может служить сахарный тростник. Кроме того, используемый с целью получения сахарозы тростниковый сахар-сырец в 1,7 раза дешевле сахарозы свекловичного происхождения. В связи с этим нами была предпринята попытка удешевления питательной среды для культивирования *E. rhapsodici* В-9292 путем замены чистой сахарозы как источника углерода на тростниковый сахар-сырец. Как показали результаты исследований (рис. 2), активность ИС *E. rhapsodici* В-9292 при культивировании на среде, содержащей в качестве источника углерода сахарозу свекловичного происхождения, практически не отличалась от активности фермента, синтезированного на среде, содержащей тростниковый сахар-сырец.

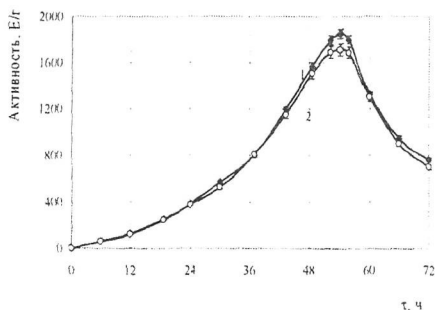


Рис. 2. Исследование процесса биосинтеза ИС на среде с содержанием тростникового сахара-сырца. 1 - свекловичный сахар, 2 - тростниковый сахар-сырец

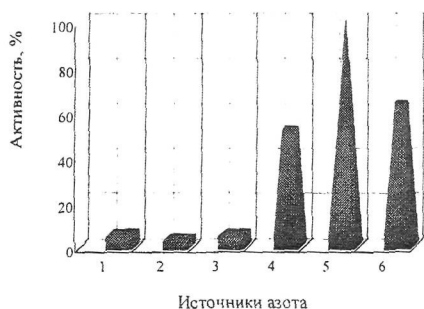


Рис. 3. Влияние источников азота на биосинтез ИС *E. rhapsodici*. 1- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2- KNO_3 , 3- NH_4Cl , 4- гидролизат казеина, 5- пептон, 6- кукурузный экстракт

При изучении влияния источников азота на биосинтез ИС использовали минеральные соли: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KNO_3 , NH_4Cl и источники органического азота: гидролизат казеина, пептон, кукурузный экстракт (рис. 3). Установлено, что наилучшая биосинтетическая способность бактерий наблюдалась при внесении в питательную среду источников органического азота, а именно пептона. Внесение минеральных солей по-

давляло синтез фермента на 80-90 %. Концентрация пептона 3 % обеспечивала максимальный биосинтез ИС.

Факторы, влияющие на биосинтез ИС *E. rharontici* В-9292. Интенсивному образованию ферментов способствует ряд условий, среди которых величина рН, температура культивирования и аэрация процесса занимают важное место. Было установлено, что максимальный биосинтез фермента наблюдался при рН 7,5 и температуре 30 °С к 54 ч культивирования бактерий. Наибольшее значение изомальтулозосинтазной активности было получено при соотношении объема среды к объему кислорода 1:2,5.

Получение очищенного ферментного препарата ИС и исследование его свойств. Для изучения физико-химических свойств ИС бактерий *E. rharontici* В-9292, культивируемых органогетеротрофно, была проведена очистка фермента. Результаты очистки представлены в таблице 2.

Таблица 2

Очистка ИС *E. rharontici* В-9292

Стадия очистки	Общий объем, мл	Белок		Активность			Степень очистки	Выход, %
		мг/мл	Общий, мг	Е/мл	Общая, Е	Удельная, ФЕ/мг белка		
Гомогенат	4,0	32,8±0,8	131,2±2,3	2563,0±62,3	10252,0±170,2	78,14±2,6	1	100
Гель-фильтрация на G-25	3,5	14,9±0,2	52,0±1,3	1971,3±45,6	6899,6±112,4	132,7±2,2	1,7	67,3
Ионообменная хроматография на ДЭАЭ - целлюлозе	3,2	0,85±0,01	2,73±0,11	1121,3±25,3	3588,2±52,1	1314,4±20,3	16,8	35,0
Гель-хроматография на G-150	1,2	0,3±0,003	0,36±0,009	1068,0±17,8	1281,5±18,4	3560,0±80,3	45,6	12,5

В результате был получен ферментный препарат с удельной активностью 3560 Е/мг белка, степень очистки составила 45,6 раза.

Проведенный электрофоретический анализ очищенного препарата показал, что в полиакриламидном геле с помощью нитрата серебра проявлялась одна белковая полоса с R_f 0,45 (рис. 4), что свидетельствует о гомогенности ферментного препарата. Определенная гель-

хроматографией на сефадексе G-150 молекулярная масса нативного фермента ИС составила $73,0 \pm 1,2$ кДа. С помощью ДДС-Na-ПААГ-электрофореза установлено, что фермент является мономером (рис.4).

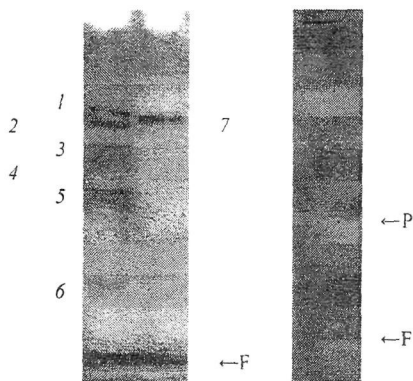


Рис. 4. Электрофореграмма очищенной ИС *E. rhapontici* B-9292

- 1 – целлюлаза (94,6 кДа);
- 2 – бычий сывороточный белок (66,2 кДа);
- 3 – яичный альбумин (45 кДа);
- 4 – карбоангидраза (31 кДа);
- 5 – ингибитор трипсина (21,5 кДа);
- 6 – лизоцим (14,4 кДа);
- 7 – ИС

P – белковая полоса
F – фронт красителя

Исследование влияния pH и температуры на активность ферментного препарата ИС. Для определения pH-оптимума действия фермента проводили трансформацию сахарозы в интервале pH 4,0-8,0. Результаты исследования показали, что оптимум pH лежит в пределах 5,5-6,5. Максимальная активность ИС наблюдалась при температуре 30 °C.

Исследование кинетики кислотной и термической инактивации ИС. Нами была изучена кинетика кислотной и термической инактивации очищенной ИС. Инактивацию фермента *E. rhapontici* B-9292 проводили в интервале pH 4,0-8,0 в 0,1 М ацетатном (в кислой зоне pH) и в фосфатном (в щелочной зоне pH) буфере.

Раствор фермента инкубировали при температуре 20-60 °C. В процессе инактивации контролировали изменение изомальтулозосинтазной активности. По истечении определенных промежутков времени отбирали пробы из инкубационной среды и определяли активность. Наибольшую стабильность фермент проявлял в зоне pH 6,0-7,0. Изменение pH как в кислую, так и в щелочную область приводило к увеличению константы скорости инактивации в 3-5 раз. При температуре 20-30 °C (табл. 3) скорость инактивации была незначительной. В интервале температуры 40-50 °C константа инактивации увеличивалась в 10-12 раз. Следовательно, температура является наиболее значимым фактором инактивации ИС.

**Влияние температуры и pH на константу скорости
инактивации ИС *E. rhapsontici* В-9292**

Температура, °C	K (ч ⁻¹) при pH				
	4,0±0,1	5,0±0,1	6,0±0,1	7,0±0,1	8,0±0,1
20±0,3	0,0813± 0,002	0,0101± 0,0002	0,0049± 0,0001	0,0134± 0,0002	0,0283± 0,0004
30±0,3	0,704± 0,017	0,3567± 0,0041	0,1393± 0,0021	0,1054± 0,0017	0,6932± 0,0112
40±0,6	1,2711± 0,031	0,5706± 0,0081	0,3020± 0,0072	0,4468± 0,0065	1,5854± 0,0213
50±0,8	5,0799± 0,125	2,3019± 0,0031	1,7855± 0,0441	3,4469± 0,0541	5,8728± 0,0082

Специфичность действия ИС. Исследование субстратной специфичности ферментного препарата ИС *E. rhapsontici* В-9292 имеет важное значение для биотехнологии изомальтулозы, полученной в результате трансформации сахарозосодержащих источников растительного сырья. В связи с этим нами была исследована активность очищенного ферментного препарата по отношению к различным сахарам. В качестве субстратов были испытаны следующие: трегалоза, лактоза, раффиноза, стахиоза, инулин, леван. Активность фермента определяли по начальной скорости

трансформации субстрата при 30 °C и pH 6,0.

Определение кинетических характеристик ИС при трансформации различных субстратов показало, что фермент является высокоспецифичным по отношению к сахарозе, $K_m = 62,5 \pm 1,02$ мМ (рис. 5). Такие сахара как раффиноза, стахиоза, инулин и леван оказались полностью нереакцион-

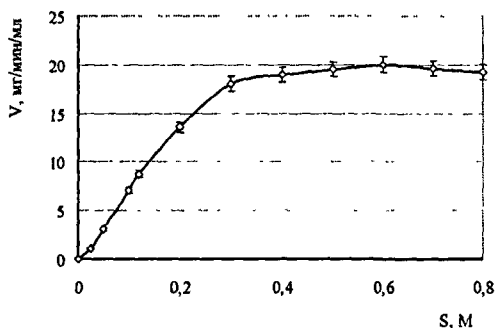


Рис. 5. Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации сахарозы

носпособными при действии фермента ($V_{\max} = 0$).

Влияние углеводов на активность ИС. Учитывая перспективу использования фермента ИС *E. rhapsodicus* В-9292 в проведении процесса трансформации сахарозосодержащих субстратов растительного происхождения, а также промежуточных продуктов в процессе промышленного получения сахара-песка, нами было изучено влияние возможных сопутствующих веществ на активность фермента. Наибольшее значение среди таковых имеют углеводы, такие как глюкоза, фруктоза, трегалоза, мальтоза, раффиноза, изомальтулоза, а также ионы некоторых металлов. Для этого процессу трансформации подвергался 4 %-ный раствор сахарозы, который служил контролем.

Таблица 4
Влияние углеводов на активность ИС

Углеводы	Относительная активность ИС, % при концентрации сахаров:	
	1 %	5 %
контроль (сахароза 4 %)	100±1,6	100±1,6
глюкоза	90,5±1,2	6,25±0,1
фруктоза	96,2±1,6	92,1±0,6
изомальтулоза	98,4±1,3	96,1±1,3
трегалоза	98,8±1,2	94,1±1,4
мальтоза	100±1,6	100±1,6
раффиноза	99,3±1,1	98,3±1,3

Углеводы попеременно вносили в реакционную смесь. Как видно из таблицы 4, присутствие таких сахаров, как фруктоза, изомальтулоза, трегалоза, мальтоза, раффиноза практически не оказывало влияния на активность фермента. Однако присутствие глюкозы в смеси снижало актив-

ность ИС на 9,5 % при концентрации глюкозы 1 % и на 93,8 % при концентрации 5 %. Установлено, что присутствие глюкозы в реакционной смеси оказывало ингибиторное воздействие на фермент ИС.

Влияние ионов металлов на активность ИС. Незначительное активирующее действие на фермент оказывали ионы Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} . Так, при введении в реакционную смесь сульфата магния или хлорида бария в концентрации 10 мМ активность фермента возрастала в 1,3 и 1,4 раза по сравнению с контролем. Ионы K^+ , Cu^{2+} , Ag^{3+} снижали активность ИС в 1,2-1,8 раза, причем с повышением их концентрации ингибирующий эффект усиливался. Сильным ингибитором фермента являются ионы Mn^{2+} и Fe^{3+} . Присутствие хлорида марганца или хлорида железа снижало активность ИС на 52,8-57,0 %. Введение в состав

реакционной смеси ЭДТА, как хелатора металлов, практически не влияло на активность ИС.

ГЛАВА 4. Биотехнология природного сахарозаменителя - изомальтулозы из возобновляемых источников растительного сырья

Влияние дозировки фермента на процесс трансформации сахарозы. Высокая активность ферментного препарата открывает большую перспективу его практического применения в биотехнологии. Нами исследовано влияние концентрации ИС *E. rhapsodicus* В-9292 на процесс трансформации 4 % раствора сахарозы при pH 6,0 и температуре 30 °С. Фермент вносили в количестве 1-15 Е/мг сахарозы с шагом 1 Е/мг (рис. 6).

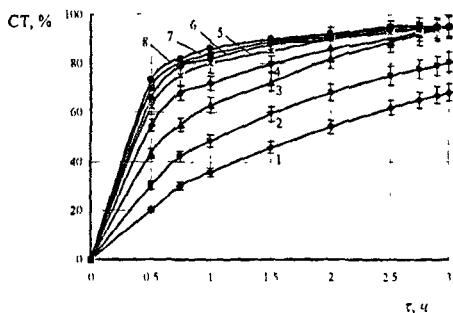


Рис. 6 Динамика трансформации сахарозы при различной дозировке фермента (Е/мг сахарозы) 1-1, 2-3, 3-5, 4-7, 5-9, 6-11, 7-13, 8-15 СТ - степень трансформации

дозировках. Однако к 3 ч процесса степень трансформации была максимальной и составляла 90-95 %. Из этого следует, что увеличение дозировки фермента выше 5 Е/мг субстрата не целесообразно.

Важным фактором, от которого зависит действие фермента, является концентрация субстрата. Нами исследовано влияние концентрации са-

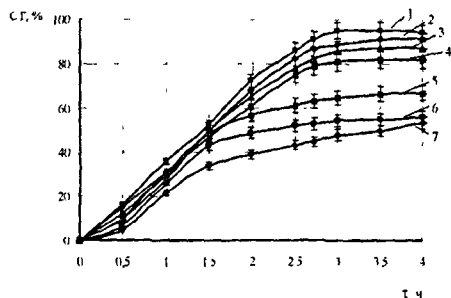


Рис. 7. Влияние концентрации сахарозы (%) на степень трансформации при дозировке ИС 5 Е/мг сахарозы 1-10, 2-5, 3-15, 4-20, 5-30, 6-40, 7-50 СТ - степень трансформации

Из рисунка видно, что при низкой дозировке фермента (1-3 Е/мг субстрата) степень трансформации сахарозы не превышала 80 % за весь исследованный период. При внесении фермента в большем количестве (5-15 Е/мг субстрата) отмечено увеличение скорости трансформации сахарозы в первые 2-2,5 ч при всех

сахарозы на процесс трансформации при pH 6,0 и температуре 30 °С. Сахарозу вносили в концентрациях 5-50 % с шагом 2 Е/мг при оптимальной концентрации фермента (5 Е/мг субстрата). Кинетику процесса изучали в

течение 3 ч (рис. 7). Установлено, что при увеличении концентрации сахарозы от 5 до 10 % степень трансформации повышалась. Если при концентрации сахарозы 5 % она составляла 88,6 % за 3 ч, то при концентрации 10 % была максимальной и достигала 95 %. Дальнейшее увеличение концентрации сахарозы от 15 до 50 % приводило к снижению выхода изомальтулозы за указанный промежуток времени, что возможно объясняется образованием промежуточного неактивного комплекса, т. е. субстратным ингибированием.

Таким образом, максимальный выход конечного продукта изомальтулозы (92-95 %) достигается при концентрации субстрата 10 %, дозировке фермента 5 Е/мг субстрата, продолжительности процесса 3-3,5 ч.

Подбор оптимальных условий процесса трансформации сахарозы. Для исследования взаимодействия факторов, влияющих на процесс трансформации сахарозы ИС *E. rhapsodic* В-9292, были применены математические методы планирования эксперимента.

Для построения математической модели в виде полинома второго порядка выбрано центральное композиционное ротатабельное планирование. В результате статистической обработки экспериментальных данных по известной методике получено уравнение регрессии, адекватно описывающее при 5-ти % уровне значимости зависимость степени трансформации от исследуемых факторов (в кодированном, безразмерном виде).

$$y = 64,4 - 11,92X_1 - 10,86X_2 + 6,0X_1X_2 - 7,1X_1^2 - 3,58X_2^2$$

Полученная математическая модель исследуемого процесса позволяет решить как прямую задачу, т. е. по известным значениям дозировки фермента и концентрации субстрата прогнозировать значение степени трансформации, так и обратную задачу - по заданному значению степени трансформации и одному из факторов определить другой неизвестный.

Ферментативная трансформация тростникового сахара-сырца. Известно, что основным источником получения изомальтулозы является сахароза, полученная из сахарной свеклы. Недостатком известного способа является высокая себестоимость продукта за счет использования дорогостоящего субстрата.

В связи с этим нами проводились исследования по изучению процесса трансформации сахарозосодержащего сырья растительного происхождения, а именно тростникового сахара-сырца (рис. 8).

Трансформацию 10 %-ного субстрата проводили с использованием биомассы бактериальных клеток *E. rharontici* В-9292 активностью 2800 Е/г. Установлены рациональные режимы процесса биотрансформации тростникового сахара-сырца: температура 30 °С; рН 6,0; дозировка фермента 5 Е/мг сахарозы и продолжительность процесса 3-3,5 ч.

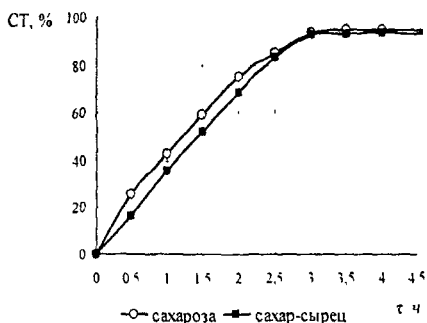


Рис. 8. Зависимость выхода изомальтулозы (%) от продолжительности процесса трансформации

ГЛАВА 5. Исследование пребиотических свойств изомальтулозы

Известно, что бифидобактерии являются наиболее значимыми представителями нормобиоценоза. Это анаэробные бактерии, морфологически представляющие собой крупные грамположительные неспорообразующие палочки с раздвоенными концами, способные к полиморфизму.

С целью определения пребиотических свойств полученной изомальтулозы осуществляли культивирование пробиотической культуры *Bifidobacterium bifidum in vitro* на среде с ее содержанием. Данные по динамике роста *B. bifidum* на различных источниках углерода (рис. 9) показали, что микроорганизмы способны к росту на всех испытанных средах.

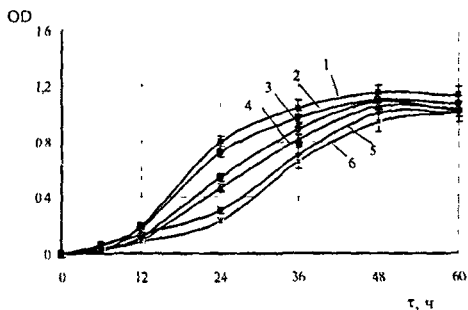


Рис. 9. Динамика накопления биомассы *B. bifidum* на средах с различными углеводами. 1-изомальтулоза, 2-лактоза, 3-трегалоза, 4-инулин, 5-фруктоза, 6-без углевода OD – показатель оптической плотности

Максимальное накопление биомассы наблюдалось к 48 ч процесса культивирования бактерий. Однако внесение того или иного источника углерода оказывало различное влияние на скорость и интенсивность роста бифидобактерий. Наилучшее влияние обеспечивали такие углеродные субстраты, как изомальтулоза и лактоза (рис. 10). Так, к 24 ч культивирования микроорганизмов количество биомассы на среде с изомальтулозой было в 1,4 раза больше по сравнению с инулином содержащей средой и в 3,5 раза больше по сравнению с биомассой в контроле, выращенной без источника углерода. Это согласуется с литературными данными о том, что бифидобактерии потребляют глюкозу, галактозу, большое число олигосахаридов, в том числе фруктоолигосахариды, а из полисахаридов - только инулин.

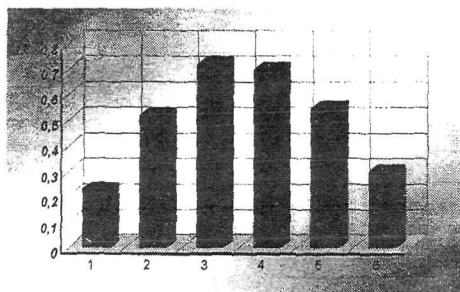


Рис. 10. Нефелометрическое определение биомассы *B. bifidum* на различных углеводных средах (24 ч). 1 - без углевода, 2 - инулин, 3 - изомальтулоза, 4 - лактоза, 5 - трегалоза, 6 - фруктоза.

Интенсивность метаболических процессов у бифидобактерий контролировали по изменению рН среды, что служит показателем трансформации сахаров в органические кислоты как конечные продукты метаболизма. Из рис. 11 следует, что изменение величины рН коррелирует с ростом и развитием культуры бактерий на среде с изомальтулозой.

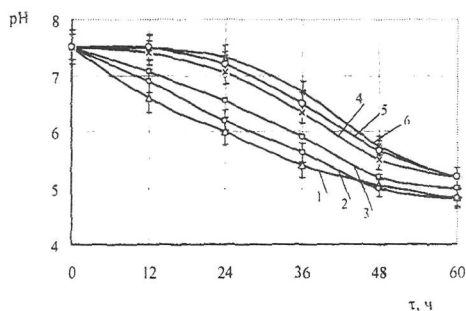


Рис. 11. Динамика изменения рН среды культивирования *B. bifidum* на средах с различными углеводами: 1-изомальтулоза, 2-лактоза, 3-трегалоза, 4-инулин, 5-фруктоза, 6-без углевода

Также определяли биохимическую активность бифидобактерий по нарастанию титруемой кислотности через каждые 12 часов культивирования. Результа-

ты исследований представлены в таблице 5.

Таблица 5

Кислотообразующая способность *B. bifidum* на средах с различными углеводами

τ, ч	Титруемая кислотность, °Т		
	без углевода	лактоза	изомальтулоза
0	19±0,25	21±0,35	21±0,35
12	31±0,51	40±0,66	42±0,67
24	52±0,82	68±1,12	68±1,13
36	65±1,04	76±1,27	79±1,32
48	87±1,43	108±1,8	112±1,6

Высокая активность роста, уровень накопления биомассы, продукции органических кислот при культивировании бифидобактерий на среде с содержанием изомальтулозы свидетельствуют о том, что данный заменитель сахара обладает пребиотическими свойствами. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что изомальтулоза может применяться как компонент среды в биотехнологиях пробиотиков, поскольку среда с содержанием изомальтулозы в качестве углеводного компонента пригодна для роста бифидобактерий.

Способность изомальтулозы увеличивать скорость и интенсивность роста бифидобактерий *in vitro* свидетельствует о возможности включения данного сахарозаменителя в рацион питания людей для профилактики диареи, колитов и других заболеваний желудочно-кишечного тракта человека, а также с целью поддержания нормобиоценоза кишечника.

Технология получения изомальтулозы. Установленные рациональные параметры процесса культивирования микроорганизмов *E. rhapsodicus* В-9292 и трансформации сахарозы из различных источников растительного сырья послужили основой для разработки технологии получения изомальтулозы. Блок-схема получения изомальтулозы представлена на рис. 12.

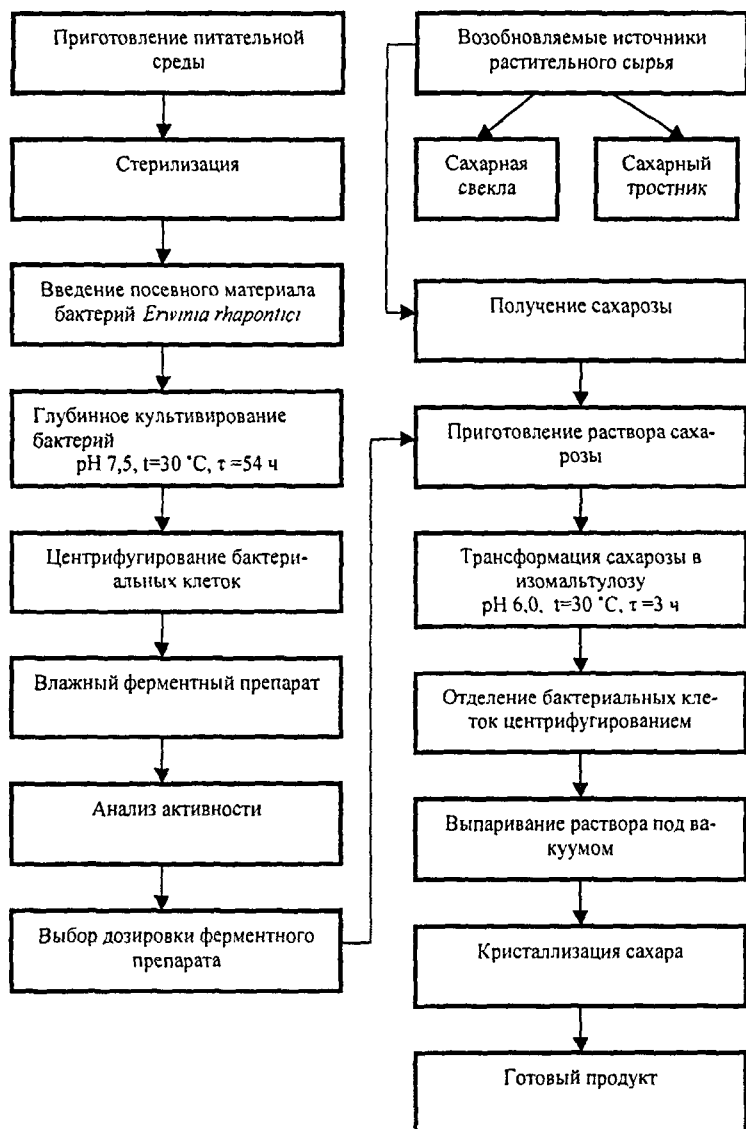


Рис. 12. Блок-схема получения изомальтулозы

ВЫВОДЫ

1. В результате скрининга микроорганизмов выбран высокоактивный продуцент изомальтулозосинтазы - бактерии *E. rhapsodici* В-9292, каталитическая активность фермента - 3000 Е/г, что в 20-30 раз превышает значение таковой среди известных продуцентов фермента.
2. Подобраны оптимальные условия для глубинного культивирования бактерий *E. rhapsodici* и биосинтеза ими изомальтулозосинтазы, что позволило увеличить исходный уровень активности фермента в 1,5-2 раза.
3. Разработана схема очистки изомальтулозосинтазы, при которой удельная активность фермента составляет 3560 Е/мг белка. Установлено, что фермент является мономером с молекулярной массой $73,0 \pm 1,2$ кДа.
4. Установлены оптимальные значения pH и температуры изомальтулозосинтазы, при которых фермент проявляет наибольшую стабильность. Оптимум pH и температурный оптимум составляют соответственно 6 и 30 °С.
5. Установлено, что фермент изомальтулозосинтаза проявляет высокое сродство к сахарозе ($K_m = 62,5 \pm 1,02$ мМ). Раффиноза, стахиоза, инулин, леван оказались полностью нереакционноспособными при действии фермента.
6. Разработаны рациональные условия процесса биотрансформации сахарозы свекловичного происхождения, а также тростникового сахара-сырца с использованием изомальтулозосинтазы, позволяющие увеличить выход изомальтулозы до 92 - 95 %.
7. Выявлено, что культивирование бифидобактерий *Bifidobacterium bifidum in vitro* на среде с содержанием изомальтулозы отличается высокой активностью их роста, уровнем накопления биомассы, продукцией органических кислот, что свидетельствует о пребиотических свойствах данного заменителя сахара.
8. Разработан гипотетический механизм бифидогенности изомальтулозы.
9. Получен натуральный заменитель сахара из источников растительного сырья, биотехнология которого может быть положена в основу его промышленного производства.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Корнеева О.С. Изомальтулоза – природный заменитель сахара / О.С. Корнеева, О.Ю. Божко // Фундаментальные исследования. - М. : «Академия естествознания», 2005. - № 10. - С. 34-35.
2. Корнеева О.С. Изомальтулоза – природный заменитель сахара / О.С. Корнеева, О.Ю. Божко // Материалы XLIII отчетной научной конференции за 2004 год. - Воронеж, 2005. - Ч. 1. - С. 91.
3. Корнеева О.С. Об активности изомальтулозосинтазы микробного происхождения / О.С. Корнеева, О.Ю. Божко // Материалы XLIV отчетной научной конференции за 2005 год. - Воронеж, 2006. - Ч. 1. - С. 67-70.
4. Корнеева О.С. Использование бактерий рода *Leuconostoc* с целью получения изомальтулозосинтазы / О.С. Корнеева, О.Ю. Божко // Материалы V-й Международной научно-технической конференции «Техника и технология пищевых производств». - Могилев, 2006. - С. 57.
5. Корнеева О.С. Изомальтулоза, изомальт в свете современных исследований / О.С. Корнеева, О.Ю. Божко // Сборник тезисов 10-ой Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». - Пущино, 2006. - С. 358.
6. Корнеева О.С. Биосинтез изомальтулозосинтазы *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* / О.С. Корнеева, О.Ю. Божко, М.М. Корнеева // Успехи современного естествознания. - М. : «Академия естествознания», 2006. - № 10. - С. 75.
7. Корнеева О.С. Ферменты микробного происхождения и их применение в пищевой промышленности / О.С. Корнеева, В.С. Капранчиков, О.Ю. Божко // Материалы VII международного форума «Биотехнология и современность». - СПб., 2006. - С. 43-44.
8. Божко О.Ю. Изомальтулоза – перспективный заменитель сахара / О.Ю. Божко, О.С. Корнеева // Материалы Всероссийской научной молодежной конференции с международным участием «Основные направления функционального питания и безопасность пищевых продуктов». - Улан-Удэ, 2006. - С. 10.
9. Корнеева О.С. Биосинтез изомальтулозосинтазы *Leuconostoc mesenteroides* / О.С. Корнеева, О.Ю. Божко // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов : межрегиональный сборник научных работ. - Воронеж, 2006. - Вып. 8. - С. 111-114.

10. Божко О.Ю. Биотехнология изомальтулозы / О.Ю. Божко, О.С. Корнеева // Материалы общероссийской конференции молодых ученых «Пищевые технологии». - Казань, 2006. - С. 106-107.
11. Корнеева О.С. Динамика биосинтеза изомальтулозосинтазы в процессе культивирования *Leuconostoc mesenteroides* / О.С. Корнеева, О.Ю. Божко // Материалы 2-го международного форума «Актуальные проблемы современной науки». - Самара, 2006. - С. 54.
12. Применение продуктов микробного синтеза в пищевой промышленности и биотехнологии / О.С. Корнеева, О.Ю. Божко, И.В. Черемушкина, Т.В. Свиридова, В.С. Капранчиков, Н.А. Чигирина, Е.А. Мотина, Т.И. Фурсова // Материалы Четвертого Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». - Москва, 2007. - Ч. 2. - С. 176-177.
13. Применение ионообменной хроматографии как основного этапа в процессе очистки изомальтулозосинтазы *Erwinia rhapontici* и липазы *Yarrowia lipolytica* / А.Н. Ивентьев, О.С. Корнеева, В.С. Капранчиков, Е.А. Мотина, О.Ю. Божко // VIII Всероссийская конференция молодых ученых с международным участием «Пищевые технологии». - Казань, 2007. - С. 197.
14. Божко, О. Ю. Биосинтез изомальтулозосинтазы *Erwinia rhapontici* / О. Ю. Божко, О. С. Корнеева // VIII Всероссийская конференция молодых ученых с международным участием «Пищевые технологии». - Казань, 2007. - С. 209.
15. Корнеева, О. С. Получение очищенного ферментного препарата изомальтулозосинтазы *Erwinia rhapontici* / О. С. Корнеева, А. Н. Ивентьев, О. Ю. Божко // Материалы XLV отчетной научной конференции за 2006 год. - Воронеж, 2007. - Ч. 1. - С. 103-104.
16. Корнеева О.С. Получение и свойства изомальтулозосинтазы бактерий *Erwinia rhapontici* / О.С. Корнеева, О.Ю. Божко, А.Н. Ивентьев // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов : межрегиональный сборник научных работ. - Вып. 9. - Воронеж, 2007.- С. 87-91.
17. Божко О.Ю. Изомальтулоза - заменитель сахара для продуктов питания функционального назначения // О.Ю. Божко, О.С. Корнеева / Роль социальных, медико-биологических и гигиенических факторов в формировании здоровья населения : сборник

18. Божко О.Ю. Ионнообменная хроматография как важнейший этап очистки изомальтулозосинтазы из бактерий *Erwinia rhapontici* // О.Ю. Божко, А.Н. Ивентьев, О.С. Корнеева / Сорбционные и хроматографические процессы. - 2007. - Т. 7. - Вып. 3. - С. 465-468.
19. Корнеева О.С. Биотехнология изомальтулозы – природного заменителя сахара // О.Ю. Божко, О.С. Корнеева / Вестник ВГТА. - 2007. № 12. - С. 34-39.
20. Корнеева О.С. Превращение сахарозы в изомальтулозу – природный заменитель сахара // О.С. Корнеева, О.Ю. Божко / Хранение и переработка сельхозсырья. - 2008. № 1. - С. 54-56.
21. Божко О.Ю. Разработка ферментативного способа получения изомальтулозы - натурального сахарозаменителя с функциональными свойствами // О.Ю. Божко, О.С. Корнеева / Материалы международной научно-практической конференции «Биотехнология. Вода и пищевые продукты». - Москва, 2008. - С. 246.
22. Корнеева О.С. Биотехнология изомальтулозы - природного заменителя сахара с пребиотическими свойствами // О.С. Корнеева, О.Ю. Божко, Г.П. Шуваева / Биотехнология. - 2008. - № 2. - С. 46-50.
23. Корнеева О.С. Оптимизация процесса трансформации сахарозы в изомальтулозу - природный заменитель сахара // О.С. Корнеева, О.Ю. Божко, А.Н. Ивентьев / Материалы XLVI отчетной научной конференции за 2007 год. – Воронеж, 2008. - Ч. 1. - С. 63-64.
24. Божко О.Ю. Исследование пребиотических свойств изомальтулозы - натурального сахарозаменителя / О.Ю.Божко, О.С.Корнеева, Г.П. Шуваева// Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов : межрегиональный сборник научных работ. - Воронеж, 2008.- Вып. 10. - С. 46-51.
25. Bozhko O.U. Working out of the biocatalytic technology the new natural sugar substitute with prebiotic properties / O.U. Bozhko, O.S. Korneyeva // Materials of the 2th International Conference “Biocatalysis in Non-Conventional Media”. - Moscow, 2008. - P. 36.
26. Корнеева О.С. Физиолого-биохимические свойства бактерий *Erwinia rhapontici* - продуцентов изомальтулозосинтазы // О.С. Корнеева, О.Ю. Божко, З.М. Мангуева / Прикладная биохимия и микробиология. - 2008. - Т. 44, № 6.- С. 626-631.

Работы № 18, 20, 22, 26 опубликованы в изданиях, рекомендованных Перечнем ВАК.

Подписано в печать *15.09.08*. Бумага для множительных аппаратов.
Печать офсетная. Усл. п.л. 1,0.
Тираж 100 экз. Заказ *4416*.

Отпечатано в типографии ФГУ «Воронежский ЦНТИ»
394730, г.Воронеж, пр.Революции, 30