

С. В. Ельчиц, В. А. Домарецкий, Б. И. Хиврич, В. А. Чугуй, Л. А. Мельниченко. **Киевский технологический институт пищевой промышленности (КТИПП)**

Глюкозо-фруктозные сиропы (ГФС), получаемые из крахмала, являются не только полноценными заменителями сахарозы, но и имеют перед ними ряд преимуществ—более низкую (**на 10— 40 %**) стоимость, быстрее усваиваются организмом, их применение позволяет на 1/3 снизить калорийность разнообразных пищевых продуктов и напитков. Производство ГФС в промышленно развитых странах достигает огромных размеров; например, в США. в 1990 г. их выпуск предполагалось довести до 67 % общего производства сахаристых веществ [1].

В СССР производство ГФС сдерживается из-за отсутствия промышленной технологии получения иммобилизованных препаратов глюкозоизомеразы, необходимых для выпуска сиропов.

Из арсенала методов иммобилизации ферментов и клеток микроорганизмов промышленное применение во всем мире нашли иммобилизованные препараты глюкозоизомеразы.

Простейшим методом иммобилизации ферментов и клеток микроорганизмов, наименее токсичным для последних, является адсорбционная иммобилизация, одним из вариантов которой можно считать метод культивирования продуцентов ферментов на питательных средах, содержащих носитель. Ранее [2] нами было показано, что культивирование на среде с носителем обеспечивает более эффективную иммобилизацию клеток, чем адсорбция предварительно выращенных клеток микроорганизмов.

Основным фактором, определяющим эффективность адсорбционной иммобилизации, является выбор носителя. В последние годы ведется поиск дешевых природных носителей, например, предложено использовать измельченные стебли кукурузы, отходы зерна [3]. Помимо доступности и дешевизны таких носителей они обладают достаточно высокой

адсорбционной емкостью и безпорной совместимостью с пищевыми продуктами.

Мы изучили возможность использования в качестве носителей для иммобилизации клеток продуцента глюкозоизомеразы отходов зернового производства — рисовой и овсяной шелухи и дробини — отхода пивоваренного производства. Исследовали также промышленную реализацию такой технологии.

Культивирование продуцента глюкозоизомеразы Str. Robeus S-606 в колбах на качалке в ферментах осуществляли на питательной среде, содержащей (в %): ксилозу—1,0; кукурузный экстракт — 2,0 (по сухому веществу);  $MgSO_4$ — 0,1;  $CoCl_2$ — 0,024, pH 7,0.

Посевным материалом для инокулята служила суспензия спор семисуточной культуры, выращенной на ксилозокрахмальном агаре. Инокулят выращивали в течение 48 ч при 30 °C и использовали для засева ферментационной среды в количестве 10 %. В ферментационную среду добавляли простерилизованный носитель. Шелуху злаковых и дробину перед использованием кипятили в воде в течение 30 мин, промывали и сушили на воздухе. Затем измельчали на лабораторной мельнице и с помощью сит разделяли на фракции частиц 0,1 — 0,5 мм; 0,5—1,0 мм и 1,5—2,0 мм.

После культивирования продуцента на среде с носителем в течение 36—48 ч клетки с носителем отделяли центрифугированием, суспендировали в 0,05 М фосфатном буфере с pH 7,0 и проводили термообработку при 60° C в течение 10 мин для фиксации глюкозоизомеразы в клетке.

Отделенную центрифугированием биомассу с носителем (иммобилизованный препарат) сушили при комнатной температуре в тонком слое на стекле до влажности 10—12 %. В полученном препарате определяли глюкозоизомеразную активность цистеинкарбазольным методом Дише [4], накопление биомассы оценивали весовым методом за вычетом массы носителя.

Известно, что концентрация носителя в питательной среде и размеры его частиц, определяющие адсорбционную поверхность, могут существенно влиять на метаболическую активность микроорганизмов [5].

Было установлено, что для всех изучаемых носителей оптимальная концентрация в питательной среде находится в пределах 0,4—0,6 % (масса, объем), в связи с чем во всех дальнейших исследованиях использовали концентрацию носителя 0,5 %.

Данные о влиянии размера частиц носителей на глюкозоизомеразную активность получаемого иммобилизованного препарата показаны в табл. 1.

Из данных таблицы видно, что при использовании фракции с размерами частиц 0,1—0,5 и 0,5—1,0 ферментативная активность препарата находится на одном уровне. Увеличение размеров частиц выше 1,0 мм приводит к значительному снижению активности препарата.

Влияние природных носителей на биосинтез глюкозоизомеразы и накопление биомассы штаммом *Str. Robeus* S-606 сравнивали с теми же показателями для свободных клеток (культивируемых на среде без носителя), а также клеток, культивируемых в присутствии базальтового супертонкого волокна — носителя, успешно использованного для иммобилизации клеток дрожжей [6]. Показатели сравнительной эффективности различных носителей при культивировании *Str. Robeus* S-606 приведены в табл. 2.

**Таблица 1**

| Носитель | Глюкозоизомеразная активность, МЕ/г препарата при размерах частиц носителя, мм |             |             |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------|-------------|-------------|
|          | 0,1—0,5                                                                        | 0,5—1,0     | 1,5—2,0     |
| Шелуха:  |                                                                                |             |             |
|          | 125,4 ± 2,6                                                                    | 124,8 ± 3,1 | 110,8 ± 1,5 |

|         |                 |                 |                 |
|---------|-----------------|-----------------|-----------------|
| овсяная | 95,8 $\pm$ 3,6  | 96,2 $\pm$ 4,1  | 80,5 $\pm$ 3,6  |
| рисовая |                 |                 |                 |
| Дробина | 154,0 $\pm$ 2,1 | 156,0 $\pm$ 1,7 | 138,6 $\pm$ 2,2 |

Полученные данные свидетельствуют о том, что наличие твердой фазы в питательной среде независимо от природы носителя стимулирует накопление биомассы продуцентом глюкозоизомеразы. Биосинтез глюкозоизомеразы наиболее эффективен в присутствии дробины; по сравнению со свободными клетками наблюдается увеличение активности на 52 % в расчете на 1 г биомассы.

Продуктивность культуры в присутствии всех носителей была значительно выше, чем свободных клеток, а в случае использования в качестве носителя дробины продуктивность штамма увеличивалась почти в 2 раза.

Отмечено также, что в присутствии природных носителей клетки продуцента глюкозоизомеразы менее чувствительны к изменению начальной концентрации водородных ионов в среде, особенно в щелочной области. Если для свободных клеток при повышении pH питательной среды выше 8,0 наблюдается резкое снижение глюкозоизомеразной активности клеток, то в присутствии носителей изменение pH до значения 9,5 не приводит к снижению активности. Это может быть следствием повышения буферности системы в случае наличия носителя и распределения ионов водорода на поверхности носителя.

Для проверки возможности промышленного использования технологии культивирования продуцента глюкозоизомеразы на среде с природными носителями были проведены испытания на Киевском заводе биохимпрепаратов. Культивирование осуществляли в ферментере объемом 140 л с коэффициентом заполнения 0,6, при перемешивании и аэрации путем барботирования стерильным воздухом. В качестве носителя использовали дробину (0,5 % масс/объем).

Максимальная глюкоизомеразная активность клеток наблюдалась на 42 ч культивирования, после чего происходило резкое снижение активности клеток. Максимальная активность клеток составила 21,8 МЕ/г влажной биомассы при влажности 92 %, что превышает уровень биосинтеза глюкозоизомеразы в лабораторных условиях.

Проведенные исследования и полупромышленные испытания показали перспективность технологии культивирования продуцента глюкозоизомеразы Str. Robeus S-606 на среде с природными носителями с целью получения иммобилизованного препарата глюкозоизомеразы.

Следует отметить, что применение природных носителей позволит создать безотходную технологию при получении ГФС, так как после использования иммобилизованные клетки с носителем могут быть утилизированы в качестве кормовых добавок.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Наханетян Л. А. Меняйлова И. И. Получение глюкозно-фруктозных сиропов из крахмалосодержащего сырья. // Биотехнология, 1988, № 5.
2. А. с. СССР № 1228490. Способ получения иммобилизованных микроорганизмов // Ельчиц С. В., Архипович Н. А., Белам М. Н. и др.
3. Monsan P., Combes D. Application of immobilized invertase to continuous hydrolysis of concentrated sucrose solutions // Biotechnology and Bioeng., 1984, 26, №4
4. Dische D., Barenfrsund E. A new spectrophotometric method for detection and determination of ketosudar and trioses // J. Biol. Chem., 1951, 192
5. Звягинцев Д. Г. Взаимодействие микроорганизмов с твердыми поверхностями. – М.: МГУ, 1973.
6. Ельчиц С. В., Выговская Е. Л., Крапивницкая И.А. Гидролиз растворов сахарозы  $\beta$ -фруктофуранозидазой иммобилизованных клеток дрожжей // Пищевая промышленность, 1989, №4.

#### Таблица 2

| Носитель                         | Биомасса<br>г/100мг | Активность        |                  | Продуктивность,<br><br>МЕ/100 мг |
|----------------------------------|---------------------|-------------------|------------------|----------------------------------|
|                                  |                     | МЕ/г<br>препарата | МЕ/г<br>биомассы |                                  |
| Дробина                          | 0,82±0,07           | 154,5 ±<br>2,2    | 256,6            | 210,4                            |
| Шелуха                           |                     |                   |                  |                                  |
| рисовая                          | 0,82 ±<br>0,09      | 134,4 ±<br>3,1    | 223,3            | 182,8                            |
| овсяная                          | 0,84<br>±0,06       | 132,4 ±<br>2,0    | 157,1            | 131,8                            |
| Базальтовое<br>волокно<br>(БСТВ) | 0,94 ±<br>0,06      | 101,6 ±<br>3,7    | 157,1            | 147,6                            |
| Свободные<br>клетки              | 0,64 ±<br>0,07      | 168,6 ±<br>4,7    | 168,6            | 107,5                            |