



Биол. журн. Армении, 2 (67), 2015

ПОЛУЧЕНИЕ ФРУКТООЛИГОСАХАРИДОВ ИЗ КРАХМАЛА И ИНУЛИНА С ПРИМЕНЕНИЕМ ЦИКЛОДЕКСТРИНГЛЮКОЗИЛТРАНСФЕРАЗЫ И ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ИНУЛИНАЗЫ

А.М. БАЛАЯН¹, Л.С. МАНУКЯН¹, В.Т. КОЧИКЯН¹, К.Б. АФЯН¹,
Н.А. АНДРЕАСЯН¹, В.А. АБЕЛЯН², Э.Г. АФРИКЯН¹

¹НПЦ „Армбиотехнология“, НАН РА
balayan49@yandex.com

²PureCircle Ltd, Negeri Sembilan, Malaysia
microbio@sci.am

Изучены некоторые свойства иммобилизованной инулиназы в условиях высокой концентрации субстрата с целью получения фруктоолигосахаридов из крахмала и инулина. С использованием циклодекстринглюкозилтрансферазы (ЦГТаза, ЕС 2.4.1.19) и иммобилизованной инулиназы (2,1-β-D-фруктан-фруктаногидролаза, ЕС 3.2.1.7) получена смесь фруктоолигосахаридов с конечным СВ=76%. С помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и тонкослойной хроматографии (ТХ) определен состав полученных олигосахаридов.

Иммобилизованные ферменты – крахмал – инулин – фруктоолигосахариды

Ուսումնասիրվել են իմոբիլիզացված ինուլինազի որոշ հատկություններ սուբստրատի բարձր կոնցենտրացիայի պայմաններում՝ օսլայից և ինուլինից ֆրոկտոոլիգոզաքարների ստացման նպատակով: Ֆիկլոդեքստրինգլյուկոզիլտրանսֆերազի (ՅԳՏազ, ЕС 2.4.1.19) և իմոբիլիզացված ինուլինազի (2,1-β-D-ֆրոկտան-ֆրոկտանոհիդրոլազ, ЕС 3.2.1.7) կիրառմամբ ստացվել է ֆրոկտոոլիգոզաքարների խառնուրդ, որի չոր նյութերի վերջնական քանակը 76% է: Ստացված օլիգոզաքարների կազմը որոշվել է բարձր արդյունավետության հեղուկ բրոմատոգրաֆիայի (ԲՄՅԲ) և նրբաշերտ բրոմատոգրաֆիայի (ՆԶ) միջոցով:

Իմոբիլիզացված ֆերմենտներ – օսլա – ինուլին – ֆրոկտոոլիգոզաքարներ

Some properties of immobilized inulinase in high concentrations of the substrate for obtaining of fructooligosaccharides from starch and inulin have been studied. With application of highly active Cyclodextrinylglucosyltransferase (CGTase, EC 2.4.1.19) and immobilized inulinase (2,1-β-D-fructan-fructanhydrolase, EC 3.2.1.7) a mixture of fructooligosaccharides with final DM equal to 76% has been obtained. The composition of obtained oligosaccharides has been revealed by use of high performance liquid chromatography (HPLC) and thin layer chromatography (TLC).

Immobilized enzymes – starch – inulin – fructooligosaccharides

В настоящее время в связи с заметной недостаточностью различных сахаристых продуктов возникла необходимость поиска качественно новых источников и методов их получения. Особый интерес представляют крахмал и инулин [3, 4, 7, 9]. Из них по отдельности и совместно можно получить такие подсластители как фруктозоконцевые олигосахариды (ФКО), фруктоолигосахариды (ФОС), инулоолигосахариды (ИОС) и их производные [1, 2, 5, 6, 10, 16]. Производство вышеуказанных подсластителей даст возможность частично удовлетворить потребность в сахаре, а также использовать их в качестве сахарозаменителей для диабетиков.

Целью нашей работы являлось изучение процесса синтеза фруктоолигосахаридов из крахмала и инулина с помощью ЦГТазы *Bacillus stearothermophilus* и иммобилизованной инулиназы *Aspergillus flavus*.

Материал и методика. В работе использовали грибную культуру *A. flavus* из коллекции культур Центра депонирования микроорганизмов НПЦ „Армбиотехнология“, НАН РА. Культуру выращивали в глубинных условиях на качалке со скоростью вращения 200-220 об/мин при температуре 32°C на модифицированной среде Чапека следующего состава: инулин – 2 %; NaNO₃-0,2 %; KН₂PO₄ – 0,1 %; MgSO₄ x 7 H₂O – 0,05 %; KCl – 0,05 %; FeSO₄— 0,001 % (pH 5,0).

Инулиназную и инвертазную активность определяли согласно описанным ранее методам [12,14]. Фруктозилтрансферазную активность определяли по методу, предложенному Зинченко [4], белок – по методу Лоури [15], инулин – по методу Ермакова [8]. Количество гидролизованного инулина определяли с использованием тиобарбитуровой кислоты (ТБК), редуцирующие вещества – методом Шомоджи-Нельсона [17, 18], глюкозу и фруктозу – по Бергмайеру [11]. Экстракцию низкомолекулярных углеводов проводили 82 %-ным этанолом при 45°C в течение 15 мин. Иммобилизацию инулиназы осуществляли методом, предложенным Абеляном [1]. Для анализа компонентного состава моно- и олигосахаридов использовали метод ВЭЖХ. Анализ углеводных экстрактов проводили на жидкостном хроматографе фирмы “Laboratorni přístroje Praha”, работающем в изократическом режиме на колонке, заполненной сорбентом “Separon SGX NH₂”. В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрил – вода, взятые в объемных соотношениях 75 : 25. Идентичность отдельных углеводов подтверждали посредством сравнения хроматографических характеристик (времени удерживания) стандартных образцов с исследуемыми и введением стандартных растворов в исследуемую смесь. Количественное определение проводили методом внутренней нормализации, т.е. на основе площади отдельных пиков хроматограмм, а также был использован метод ТХ.

Результаты и обсуждение. В последние годы одним из важнейших достижений в биотехнологии является получение органических соединений с применением ферментного катализа и биотрансформации. В основе этих разработок лежат специфические свойства ферментов, которые дают возможность в десятки и сотни раз ускорить различные взаимодействия, что заметно упрощает и удешевляет технологические процессы. Кроме того, специфичность ферментного катализа обеспечивает высокий выход целевого продукта и дает возможность организовать безотходное и экологически чистое производство. Однако применение интактных клеток и ферментов ограничено их низкой биостабильностью. Этот недостаток был устранен с применением иммобилизованных форм фермента и клеток его продуцентов.

Принимая во внимание это обстоятельство и проведенные нами исследования, иммобилизацию инулиназы осуществляли методом ковалентного связывания, используя при этом в качестве носителя крахмал + β- циклодекстрин.

Изучено влияние pH и температуры на активность иммобилизованной инулиназы. Выявлено, что в присутствии 45 %-ого субстрата биокатализатор может работать в пределах температур 60-65°C и pH 4,5-5,5 (рис.1, 2).

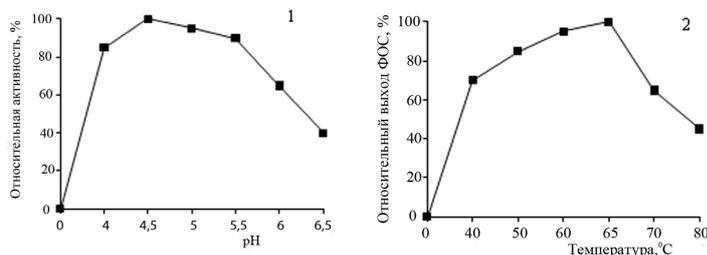


Рис. 1, 2. Влияние pH (1) и температуры (2) на активность иммобилизованной инулиназы

С целью изучения процесса синтеза фруктоолигосахаридов из крахмала и инулина к 20 г крахмала добавляли 20 мл дистиллированной воды (pH 6,5), 25 ед фермента ЦГТаза. Реакцию проводили при температуре 70⁰С в течение 24 ч с постоянным перемешиванием. Затем фермент инактивировали нагреванием реакционной смеси до температуры 80-85⁰С и обрабатывали активированным углем в течение 30 мин. Реакционную смесь фильтровали под вакуумом, полученный раствор охлаждали до температуры 60⁰С (pH 4,5), затем добавляли 10 г инулина и 10 ед иммобилизованной инулиназы.

Для выявления оптимальных pH и температуры трансгликозирования реакцию проводили в различных условиях в течение 24 ч с непрерывным перемешиванием. На рис. 3 и 4 показано влияние pH и температуры на синтез фруктоолигосахаридов.

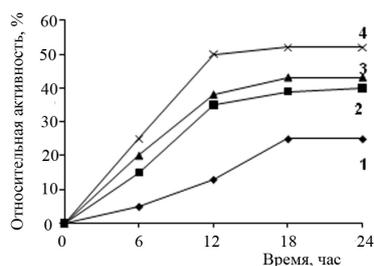


Рис. 3. Влияние pH на синтез фруктоолигосахаридов
1 – pH 4,0; 2 – pH 4,5; 3 – pH 5,0; 4 – pH 5,5

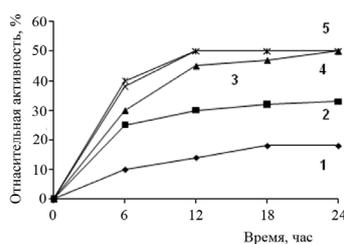


Рис. 4. Влияние температуры на синтез фруктоолигосахаридов
1 – 40⁰С; 2 – 50⁰С; 3 – 55⁰С; 4 – 60⁰С; 5 – 70⁰С

Проведенные исследования показали, что для трансгликозилирования важное значение имеют pH и температура реакционной среды. Наилучший выход олигосахаридов наблюдается в пределах pH 5,0-5,5 и температуре 70⁰С. При оптимальных значениях pH и температуры с повышением количества фермента значительно увеличивается скорость реакции. Так, если при 25 ед (на 1г инулина) реакция практически завершается в течение 4 ч, то при 20 ед необходимо 8 ч, а при меньшем количестве фермента степень трансгликозилирования значительно падает (рис.5).

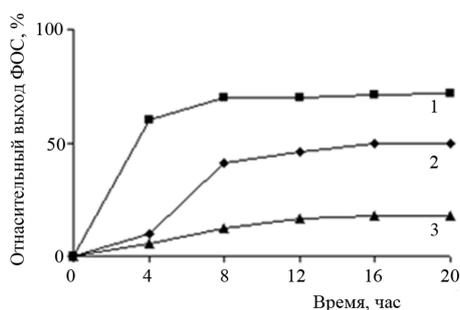


Рис. 5. Степень трансгликозилирования в зависимости от количества инулиназы 1- 25 ед; 2-20ед; 3-10ед:

С целью выделения и идентификации конечных продуктов к 100 г картофельного крахмала добавляли 100 мл дистиллированной воды (рН 6,5), 25 ед (на 1 г крахмала) ЦГТаза и реакцию проводили при температуре 70⁰С в течение 6 ч с постоянным перемешиванием. По истечении времени реакцию смесь охлаждали до температуры 60⁰С, рН доводили до 5,0-5,5, затем добавляли 50 г инулина, 25 ед иммобилизованной инулиназы (из расчета на 1г инулина) и реакцию продолжали в течение 5 ч. Затем ферменты инактивировали нагреванием реакционной смеси до температуры 80-85⁰С и обрабатывали активированным углем (в количестве 0,1% от объема) в течение 30мин, после чего отфильтровывали под вакуумом.

Очистка олигосахаридов была проведена с помощью специально переработанного активированного угля. Для этого 1 мл реакционной смеси вносили на заполненную активированным углем колонку (2,5-25 см) и последовательно элюировали дистиллированной водой (1 мл), затем 5%-ным (5 мл), 10%-ным (500 мл), 15,0 %-ным (500 мл) и 20 %-ным (200 мл) раствором этилового спирта. Соответствующие отдельные фракции были собраны, концентрированы до сиропообразного состояния и высушены под глубоким вакуумом при температуре 50-60⁰С.

По данным ВЭЖХ и тонкослойной хроматографии, водная фракция содержала только глюкозу и фруктозу (155 мг), раствор 5%-ного этилового спирта - только мальтозу, а остальные фракции содержали продукты трансформации, которые нумеровались как олигосахариды 1 (135 мг), 2 (130 мг) и 3 (60 мг).

Для выявления состава олигосахаридов применяли известные методы кислотного гидролиза, метилирования и метанолиза. По данным кислотного гидролиза, олигосахариды 1, 2 и 3 состояли из остатков глюкозы и фруктозы в молярном соотношении 1:2, 1:3 и 1:4, соответственно. Гликозиды, полученные в результате метанолиза, представляли собой метил-2.3.4.6-тетра-О-метил-D-глюкозид, метил-1.3.4.6-тетра-О-метил- и метил-3.4.6-три-О-метил-D-фруктозид в различном молярном соотношении.

Полученная смесь фруктоолигосахаридов состояла из глюкозы и фруктозы (до 30%), мальтозы (до 15%), 1 – кестозы (до 22%), нистозы (до 20%) и фруктозилнистозы (до 13%) и по своей структуре мало отличалась от подсластителя “Neosugar G”, который в производственном масштабе получают в Японии.

Таким образом, полученный нами подсластитель имеет низкую калорийность, не кристаллизуется и может употребляться больными сахарным диабетом, при сохранении адекватного уровня потребления 2,0-5,0г в сутки, что подтверждает данные авторов [13].

ЛИТЕРАТУРА

1. *Абелян В.А., Манукян Л.С.* Иммуобилизация микробной инулиназы на различных носителях. Прикладная биохимия и микробиология. 28, 3, с. 356-361, 1992.
2. *Абелян В.А., Манукян Л.С., Африкян Э.Г.* Получение фруктозо-глюкозного сиропа из инулинсодержащего сырья с применением иммуобилизованных клеток дрожжей. Прикладная биохимия и микробиология. 34, 5, с. 544-548, 1998.
3. *Жеребцов Н.А., Шеламова С.А., Абрамова И.Н.* Биосинтез инулиназ бактериями рода *Vacillus*. Прикладная биохимия и микробиология. 38, 6, с. 634-638, 2002.
4. *Зинченко О.Н., Кривошеева О.В., Лобанок А.Г.* Трансгликозилазная активность 3-фруктофуранозидазы *Penicillium suaveum*. Прикл. биохим. и микробиол., 30, с. 330-555, 1994.
5. *Ковалева Т.А., Холявка М.Г.* Активность иммуобилизованной инулиназы при непрерывном гидролизе экстракта топинамбура (*Helianthus tuberosus*). Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация, 5, с. 104-107, 2008.
6. *Ковалева Т.А., Холявка М.Г., Таха А.С.* Исследование некоторых параметров иммуобилизованной инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* как перспективного катализатора реакции гидролиза инулина. Биотехнология, 2, с. 55-59, 2009.
7. *Манукян Л. С., Кочикян В.Т., Андреасян Н.А., Афян К.Б., Балаян А.М.* Выделение инулина из различного растительного сырья. Биолог. журн. Армении, 66, 4, 2014.
8. *Петров К.П.* Практикум по биохимии пищевого растительного сырья., М., Пищевая промышленность. с. 203-204, 1965.
9. *Шаззо Р.И., Екутеч Р.И., Кондратенко В.В., Купин Г.А.* Способ получения инулинсодержащего раствора из топинамбура. Патент РФ № 2493171, с. 4, 2012.
10. *Balayan A.M., Ghochikyan V.T., Manukyan L.S., Andreasyan N.A., Afyan K.B., Afrikian E.K.* Enzymatic and microbiological production of high – value products from inulin – containing raw materials. International Scientific Workshop Yerevan State University October 5-8, 2014, Yerevan, Armenia.
11. *Bergmeyer H.U., Bernt E., Schmidt F., Stork H.* D-Glucose: Determination with hexokinase and glucoses-phosphate dehydrogenase in Method of Enzymatic Analysis (2nd ed), edited by Bergmeyer H.U. New-York. Academic Press. 3, pp. 1196-1201, 1974.
12. *Guirand J. P., Viard-Gaundin Ch., and Galzy P.* Etude de L'inulinase de *Candida salmenticensis* Van Uden et Buckley. Agric. Biol. Chem. 44, 6, pp. 1245-1252, 1980.
13. *Caselato de Sousa V. M., Freitas dos Santos E., Sgarbieri V.C.* The Importance of Prebiotics in Functional Foods and Clinical Practice, Food and Nutrition Sciences, 2, 133-144, 2011.
14. *Koops, AJ; Jonker, HH.* Purification and characterization of the enzymes of fructan biosynthesis in tubers of *Helianthus tuberosus* Colombia. II. Purification of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase and reconstitution of fructan synthesis *in vitro* with purified sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase and fructan:fructan fructosyltransferase. Plant Physiol. 110, 1167-1175, 1996.
15. *Lowry D H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, pp. 265-275, 1951.
16. *Lüscher, M; Erdin, C; Sprenger, N; Hochstrasser, U; Boller, T; Wiemken, A.* Inulin synthesis by a combination of purified fructosyltransferases from tubers of *Helianthus tuberosus*. FEBS Lett., 385, pp. 39-42, 1996.
17. *Nelson N.* A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem. 153, 2, pp. 375-380, 1944.
18. *Somogyi M.* Notes on sugar determination. J. Biol. Chem., 195, 1, pp. 19-23, 1952.

Поступила 05.12.2014