

УДК 637.345

О.А. Глазунова, В.Ф. Долганюк, Л.А. Астахова, Т.М. Дроздова

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПРОДУЦЕНТА ГЛЮКОЗОИЗОМЕРАЗЫ

В процессе исследования путем анализа литературных источников были выбраны продуценты глюкозоизомеразы, такие как *Lactobacillus brevis* Б-3, *Streptomyces griseofuscus* АС 1318 и *Streptomyces wedmorensis* АС 980. Для подбора подходящего штамма определяли глюкозоизомеразную активность, скорость роста биомассы, содержание сухих веществ в культуральной жидкости, титруемую кислотность. На основании результатов опытов был выбран штамм *Streptomyces griseofuscus*, отличающийся от аналогов наиболее оптимальными показателями. Дальнейшее исследование заключалось в подборе параметров культивирования. Проанализировано влияние температуры культивирования, активной кислотности среды на скорость роста биомассы *Streptomyces griseofuscus* АС 1318. Определены оптимальные соотношения источников углерода и концентрация ионов Mg^{2+} и Co^{2+} для данного продуцента глюкозоизомеразы.

Лактоза, лактулоза, глюкозоизомераза, биотрансформация.

Введение

Бифидофлора является важнейшим защитным барьером организма от многих заболеваний. Проблема ее стимулирования становится одной из главных проблем современной науки о питании и здоровье человека. Перспективный путь решения – получение пищевых добавок с бифидогенными свойствами из молочного сырья, при этом роль бифидогенного фактора принадлежит главным образом производному лактозы – лактулозе [5].

Лактулоза относится к классу олигосахаридов, подклассу дисахаридов, состоит из одной молекулы галактозы и одной молекулы фруктозы, соединенных β -гликозидной связью (рис. 1), что ставит ее вне конкуренции перед другими пребиотиками (галакто- и фруктосахаридами, инулином, хитозаном и другими), являющимися, как правило, высокомолекулярными полимерами. Лактулоза является неперевариваемым углеводом, избирательно стимулирует рост и активность молочнокислой микрофлоры кишечника [1, 5].

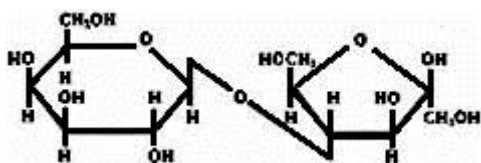


Рис. 1. Структурная формула лактулозы – 4-О-бета-D-галактопиранозил-D-фруктоза

Скорость бактериальной ферментации дисахарида лактулозы, то есть ее усваиваемость молочнокислыми бактериями и минимальная энергозатратность этой реакции, обеспечивает быстрый рост нормальной микрофлоры кишечника и, следовательно, высокую терапевтическую и профилактическую эффективность продуктов, обогащенных минимальным количеством лактулозы. Подсчитано, что 1 г лактулозы обеспечивает тот же бифидогенный эффект, что

и 7–10 г прочих олигосахаридов (диетических волокон), обладающих пребиотическим эффектом. Лактулоза не уменьшает абсорбцию витаминов и не вызывает привыкания. Ни в одном исследовании за все время применения лактулозы не было получено никаких прямых или косвенных доказательств наличия у нее мутагенных, генотоксических или тератогенных эффектов [1, 4].

Многочисленные исследования лактулозы доказали ее лечебные и профилактические свойства, что стимулировало внедрение лактулозы как в фармацевтическую (сегодня известно более 50 препаратов лактулозы, производимых различными фармацевтическими компаниями), так и в пищевую промышленность.

Лактулоза за более чем 40-летнюю историю использования в медицине широко применяется для лечения хронического запора (распространенность запоров составляет от 3 до 12 % среди взрослого населения, а в ряде индустриально развитых стран частота их встречаемости доходит до 40–60 %), дисбактериоза кишечника (практически 90 % населения страдает дисбактериозами кишечника различной степени проявления), а также печеночной энцефалопатии (наблюдается у 30–70 % пациентов с циррозом печени, согласно статистике от этой болезни погибает около 80 % больных), геморроя (по разным данным количество больных геморроем составляет от 40 до 80 % (8 из 10 человек), острой и хронической печеночной недостаточности (смертность от молниеносной печеночной недостаточности составляет 50–80 %), алкогольной болезни печени (в 5–15 % случаев алкогольная болезнь печени завершается развитием гепатоцеллюлярного рака) [1, 5, 7].

Помимо медицинской промышленности лактулоза находит широкое применение в молочной, мясной, кондитерской, ликероводочной промышленности, хлебобулочной и макаронной продукции, при производстве детского питания, безалкогольных напитков, а также в ветеринарии и косметологии.

Общий объем производства лактулозы в мире составляет около 50 000 т/год. Это больше, чем производство любого другого из известных в настоящее

время 12 бифидогенных олигосахаридов. На мировом рынке можно выделить пять основных производителей лактулозы: Solvay Group, Morinaga Milk Industry, Illovo Sugar, Fresenius Kabi и Biofac group. На российском рынке лактулозы существует два крупных предприятия: ООО «Фелицата Холдинг» и ООО «Шехонь-лактоза» (внедренческое подразделение Ярославского научно-исследовательской лаборатории молочного сыра) [1, 6].

В настоящее время лактозу получают при помощи химических методов с использованием различных катализаторов. На процесс изомеризации лактозы в лактулозу существенное влияние оказывают вид и доза катализатора, температура и продолжительность термостатирования. Имеются три группы катализаторов, применяемых в настоящее время. К недостаткам гидроксидов щелочных и щелочноземельных металлов следует отнести высокую скорость образования побочных продуктов реакции, снижающих качество готовой продукции и необходимость дорогостоящих стадий разделения и очистки. Сульфиты или фосфиты щелочных металлов, карбонат гуанидина и другие слабощелочные реагенты обуславливают невысокий выход лактулозы. Процесс с использованием алюминатов и боратов характеризуется высоким выходом, однако сложность удаления катализаторов, особенно боратов, существенно увеличивает стоимость готового продукта. Помимо перечисленных минусов каждой из группы реагентов следует упомянуть, что данные катализаторы вносятся в реакционную среду при температуре свыше 70 °С.

Перечисленные недостатки химических методов получения лактулозы доказывают актуальность разработки биокаталитического метода ее получения. К достоинствам такого метода относятся: температурный режим реакции до 60 °С, нейтральная рН реакционной среды, экологическая безопасность производства, простая инактивация фермента, высокий уровень выхода целевого продукта. В настоящее время биотрансформацию лактулозы в лабораторных условиях осуществляют с использованием таких ферментов, как β -галактозидаза и глюкозоизомераза [6, 9, 10].

Глюкозоизомераза относится к классу изомераз – это класс ферментов, катализирующих реакции изомеризации, подклассу внутримолекулярных оксидоредуктаз, которые катализируют окисление одной части молекулы с одновременным восстановлением другой части, поскольку в результате реакции не образуются окисленные продукты, эти ферменты не причисляются к классу оксидоредуктаз. Ферментативная изомеризация глюкозы во фруктозу идет по строго внутримолекулярному механизму, который осуществляется через промежуточный эндиол [2].

Глюкозоизомеразы являются термостабильными ферментами, оптимум действия которых лежит в интервале температур от 60 до 80 °С. Но есть и такие, которые имеют оптимум при 90 °С. Глюкозоизомеразы проявляют стабильность в широком диапазоне рН – от 4,5 до 11, оптимум действия находится либо в нейтральной зоне, либо в щелочной, обычно в интервале от 7 до 9. Глюкозоизомеразу образуют многие микро-

организмы, в литературе приведено свыше двухсот штаммов – продуцентов глюкозоизомераз, относящихся более чем к 80 видам. Наиболее часто в качестве источника глюкозоизомераз используют актиномицеты. Среди них следует назвать *Streptomyces olivocinereus*, *S. albus*, *S. albogriseolus*, *S. olivaceus*, *S. phaeochromogenes*, *S. venezuelae*, *S. griseus*, *S. wedmorensis*, *S. flavovirens*, *S. achromogenes*, *S. echinatus*, а также некоторые представители родов *Nocardia*, *Micromonospora*, *Microellobospora*, *Microbiospora*, *Actinoplanes*, *Thermactinomyces*, *Thermopolyspora*, *Pseudonocardia*.

Глюкозоизомеразу образуют также бактерии, относящиеся к родам *Aerobacter*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Flavobacterium*, *Curvobacterium*, и другие. Глюкозоизомеразы обнаружены у некоторых видов дрожжей рода *Candida*, а также в прорастающем зерне ряда злаковых культур.

Несмотря на достаточно большой перечень возможных продуцентов глюкозоизомеразы, в промышленности преимущественно используются микроорганизмы, относящиеся, прежде всего, к роду *Streptomyces*, а также к родам *Aerobacter* и *Lactobacillus* [2, 3, 8].

Цель работы – выбрать наиболее продуктивный штамм глюкозоизомеразы и оптимизировать параметры его культивирования.

Объекты и методы исследований

Исследования осуществляли в лаборатории научно-образовательного центра ФГБОУ ВПО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности».

На первом этапе проводили анализ отечественной и зарубежной литературы по теме работы.

На втором этапе на основе литературных данных в качестве объектов исследования выбрали следующие штаммы микроорганизмов – продуцентов глюкозоизомеразы: *Lactobacillus brevis* Б-3, *Streptomyces griseofuscus* АС 1318 и *Streptomyces wedmorensis* АС 980.

Для выбора штамма наиболее активного микроорганизма продуцента глюкозоизомеразы определяли: скорость роста биомассы, при этом использовали метод отделения мицелия от культуральной жидкости при помощи фильтрования с последующим высушиванием в сушильном шкафу с температурой 120 °С и измерением массы; глюкозоизомеразную активность, определение которой проводили спектрофотометрически (данный метод основан на изомеризации раствора D-глюкозы с определением образовавшегося количества D-фруктозы), за единицу активности глюкозоизомеразы принимается такое количество фермента, которое обеспечивает превращение 1 ммоль D-глюкозы в D-фруктозу за 1 ч при температуре 70 °С; содержание сухих веществ в культуральной жидкости с использованием рефрактометра; титруемую (путем титрования 0,1 М NaOH с добавлением фенолфталеина) и активную кислотность (используя потенциометр).

Третий этап связан с подбором питательной среды для наиболее активного микроорганизма продуцента глюкозоизомеразы. Для него выбирали оптимальные температуру и рН для процесса культиви-

рования, источник углерода и оптимальную концентрацию ионов Mg^{2+} и Co^{2+} в среде.

Результаты и их обсуждение

В ходе исследования установили глюкоизомеразную активность для трех выбранных штаммов микроорганизмов, которая составила для *Lactobacillus brevis* Б-3 – 73 Гл ИА ед/г а.с.в., *Streptomyces griseofuscus* AC 1318 – 84 Гл ИА ед/г а.с.в. и *Streptomyces wedmorensis* AC 980 – 78 Гл ИА ед/г а.с.в. Исходя из этих результатов очевидно, что из трех анализируемых продуцентов наибольшей глюкоизомеразной активностью обладает штамм *Streptomyces griseofuscus* AC 1318. Для этого микроорганизма далее подбирали оптимальные параметры температуры, pH, источника углерода, концентрацию ионов Mg^{2+} и Co^{2+} .

Для выбора оптимальных температуры и pH исследовали закономерность изменения скорости роста биомассы в процессе культивирования *Streptomyces griseofuscus* при различных значениях температуры и pH. Полученные результаты приведены в табл. 1 и 2.

Таблица 1

Изменение скорости роста биомассы в процессе культивирования штамма *Streptomyces griseofuscus* при различных значениях температуры

Температура, °С	Количество микроорганизмов, тыс. КОЕ/г		
	3-и сутки	5-е сутки	7-е сутки
24	0,83±0,04	2,1±0,1	4,2±0,2
28	0,94±0,04	3,2±0,1	5,2±0,2
32	0,9±0,04	2,9±0,1	4,8±0,2

Таблица 2

Изменение скорости роста биомассы в процессе культивирования штамма *Streptomyces griseofuscus* при различных значениях pH

pH	Количество микроорганизмов, тыс. КОЕ/г		
	3-и сутки	5-е сутки	7-е сутки
8,0	0,97±0,04	3,8±0,1	5,4±0,2
7,5	0,95±0,04	3,5±0,1	5,1±0,2
7,0	0,91±0,04	3,0±0,1	4,8±0,2

Из данных табл. 1 установили, что оптимальной температурой для штамма *Streptomyces griseofuscus* является 28 °С, при которой наблюдается наибольший прирост биомассы на 7-е сутки культивирования; при понижении температуры культивирования до 24 °С рост культуры замедляется. По результатам, приведенным в табл. 2, выбрали оптимальное значение pH для культивирования *Streptomyces griseofuscus* – 8,0, при таком значении pH количество микроорганизмов составляет 5,4 тыс. КОЕ/г.

Для продуцентов глюкоизомераз в качестве индуктора в среде обычно используется ксилоза или ксилобиоза, однако продуценты нуждаются и в других источниках углерода (глюкоза, сорбит, маннит, глицерин, арабиноза, крахмал, лактоза). В зависимости от продуцента соотношение индуктора (ксилозы) к другому источнику углерода меняется. Введение в

состав среды ксилозы экономически невыгодно, так как это дефицитный и дорогой моносахарид. Чаще в качестве источника ксилозы используют ксилозо- и ксилансодержащее сырье: солому, пшеничные и рисовые отруби, кукурузные кочерыжки, зерновую и хлопковую шелуху. Наилучшие результаты получаются при введении в состав среды гидролизатов ксилансодержащего сырья, которые содержат значительные количества пентоз [2, 3].

В проводимых исследованиях в качестве источника углерода использовали смеси гидролизата пшеничных отрубей с глюкозой, сорбитом, маннитом, глицерином, крахмалом, лактозой и арабинозой. Выбирали наиболее оптимальный состав смеси гидролизата пшеничных отрубей с различными источниками углерода, результаты исследования приведены в табл. 3.

Таблица 3

Прирост биомассы в процессе культивирования штамма *Streptomyces griseofuscus* на различных источниках углерода

Отношение гидролизата пшеничных отрубей с разными углеводами = 3,5:1,5 г	Общая скорость роста, г/ч	Максимальное количество биомассы, г/л
Глюкоза	0,0033±0,0001	0,55±0,02
Сорбит	0,0030±0,0001	0,50±0,02
Маннит	0,0035±0,0001	0,59±0,02
Глицерин	0,0026±0,0001	0,44±0,02
Крахмал	0,0031±0,0001	0,52±0,02
Лактоза	0,0032±0,0001	0,53±0,02
Арабиноза	0,0026±0,0001	0,43±0,02

Анализ результатов, представленных в табл. 3, показал, что наиболее оптимальным источником углерода является смесь гидролизата пшеничных отрубей с маннитом, так как при добавлении ее в состав питательной среды максимальное количество биомассы составляет 0,59 г/л. Высокая скорость роста наблюдается и при добавлении в среду глюкозы. В качестве источника углерода для штамма *Streptomyces griseofuscus* выбрали смесь гидролизата пшеничных отрубей с глюкозой, так как глюкоза является более дешевым сырьем, чем маннит, и максимальное количество биомассы при использовании глюкозы составляет 0,55 г/л, что меньше максимального количества биомассы при использовании маннита.

По данным многих авторов, для образования глюкоизомеразы в среде должны содержаться ионы магния в виде соли $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ и кобальта в виде соли $CoCl_2 \cdot 6H_2O$. Присутствие ионов Co^{2+} оказывает стабилизирующее действие на глюкоизомеразы. Концентрации этих солей определяются физиологическими особенностями продуцентов и варьируются для магния – от 0,025 до 0,05 % и для кобальта – от 0,005 до 0,024 %. В табл. 4 представлены данные по изменению количества биомассы в процессе культивирования *Streptomyces griseofuscus* при различных концентрациях ионов Mg^{2+} и Co^{2+} [2, 3].

Таблица 4

Накопление биомассы в процессе культивирования *Streptomyces griseofuscus* при различных концентрациях ионов Mg^{2+} и Co^{2+}

Концентрация вносимых солей, г			Биомасса, г/л		
$MgSO_4 \cdot 4H_2O$	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	3-и сутки	5-е сутки	7-е сутки
0,2	–	0,05	0,31±0,01	0,49±0,02	0,53±0,02
0,2	–	0,24	0,35±0,01	0,52±0,02	0,57±0,02
0,5	–	0,05	0,30±0,01	0,47±0,02	0,52±0,02
0,5	–	0,24	0,37±0,01	0,54±0,02	0,58±0,02
–	0,25	0,05	0,29±0,01	0,45±0,02	0,50±0,02
–	0,25	0,24	0,28±0,01	0,44±0,02	0,49±0,02
–	0,5	0,05	0,29±0,01	0,44±0,02	0,49±0,02
–	0,5	0,24	0,35±0,01	0,51±0,02	0,56±0,02

На основании проведенных исследований выбрали оптимальную концентрацию солей для культивирования штамма *Streptomyces griseofuscus*: $MgSO_4 \cdot 4H_2O$ 0,5 г и $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,24 г. Такая концентрация солей способствует росту биомассы и предположительно оказывает активирующее и стабилизирующее действие на фермент.

Таблица 5

Оптимальный состав среды для *Streptomyces griseofuscus* AC 1318

Ингредиенты	Количество, г/л
Солодовый экстракт	15,0
Дрожжевой экстракт	5,0
Крахмал	5,0
Карбонат кальция	3,0
Агар	20,0
Гидролизат пшеничных отрубей	3,5
Маннит	1,5
$MgSO_4 \cdot 4H_2O$	0,5
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,024

Оптимальный состав среды, подобранный на основании этих исследований, представлен в табл. 5.

Таким образом, на основании анализа литературных данных и проведенных экспериментов в качестве продуцента глюкозоизомеразы выбран штамм *Streptomyces griseofuscus* ATCC 1318. Оптимальными условиями культивирования для данного штамма являются следующие: температура культивирования – 28 °С; pH среды – 8,0; источник углерода – смесь гидролизата пшеничных отрубей с маннитом или глюкозой (в соотношении 3,5:1,5 соответственно); концентрация солей – $MgSO_4 \cdot 4H_2O$ 0,5 г и $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,24 г.

Список литературы

1. Бутова, Л.И. Возможности коррекции нарушения кишечного микробиоценоза лактулозой / Л.И. Бутова, А.В. Калинин // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2001. – № 1. – С. 79–83.
2. Грачева, И.М. Биотехнология биологически активных веществ / И.М. Грачева, Л.А. Иванова. – М.: Изд-во НПО «Элевар», 2006. – 453 с.
3. Грачева, И.М. Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов / И.М. Грачева. – М.: Изд-во «Легкая и пищевая промышленность», 1982. – 240 с.
4. Применение ферментативного гидролиза лактозы / Н.С. Донской, А.Д. Лодыгин, А.Г. Варданян и др. // Молочная промышленность. – 2008. – № 11. – С. 44–45.
5. Лактоза и ее производные / Б.М. Синельников, А.Г. Храмов, И.Е. Евдокимов и др. – СПб.: Изд-во «Профессия», 2007. – 767 с.
6. Храмов, А.Г. Биотрансформация лактозы в лактулозу / А.Г. Храмов, С.А. Рябцева, В.К. Топалов // Сборник научных трудов СевКавГТУ. – 2007. – № 3. – С. 19–21. Серия «Продовольствие».
7. Использование лактозы и ее производных / А.Г. Храмов, И.А. Евдокимова, С.А. Рябцева и др. // Молочная промышленность. – 2006. – № 6. – С. 50–52.
8. Bhosale, S.H. Molecular and industrial aspects of glucose isomerase / S.H. Bhosale, M.B. Rao, V.V. Deshpande // Microbiol. rev. – 1996. – Vol. 60, № 2. – P. 280–300.
9. Drazic, M. Isomerization of glucose to fructose using microbial enzymes / M. Drazic, Z. Golubic, S. Czimek // Period. biol. – 1980. – Vol. 82. – P. 481–484.
10. Mlichova, Z. Current trends of β -galactosidase application in food technology / Z. Mlichova, M. Rosensberg // Journal of Food and Nutrition Research. – 2006. – Vol. 45, № 2. – P. 47–54.
11. Lactose malabsorption and intolerance in the elderly / M. Di Stefano, G. Veneto, S. Malservisi et al. // Scand. J. Gastroenterol. – 2001. – № 36. – P. 1274–1278.

ФГБОУ ВПО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности»,
650056, Россия, г. Кемерово, б-р Строителей, 47.
Тел./факс: (3842) 73-40-40
e-mail: office@kemtipp.ru

SUMMARY

O.A. Glazunova, V.F. Dolganyuk, L.A. Astakhova, T.M. Drozdova

OPTIMIZATION OF CULTIVATION CONDITIONS
OF THE GLUCOSE ISOMERASE PRODUCER

The literature review allowed to select the glucose isomerase producers such as *Lactobacillus brevis* B-3, *Streptomyces griseofuscus* AS 1318 and *Streptomyces wedmorensis* AC 980. For the selection of a suitable strain glucose isomerase activity, growth rate, biomass, dry matter content in the culture liquid, titratable acidity were determined. Based on the results of the experiments, the strain of *Streptomyces griseofuscus* differing from the analogues in more optimal features, was selected. The task of further study was to select the cultivation parameters. The effects of cultivation temperature, medium active acidity on the growth rate of the biomass of *Streptomyces griseofuscus* AS 1318 was analyzed. The optimum ratios of carbon sources and concentrations of Mg^{2+} and Co^{2+} for the glucose isomerase producer were determined.

Lactose, lactulose, glucose isomerase, biotransformation.

Kemerovo Institute of Food Science and Technology
47, Boulevard Stroiteley, Kemerovo, 650056, Russia.
Phone/fax: +7(3842) 73-40-40
e-mail: office@kemtipp.ru

