

ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

ПЕТРОСЬЯНЦ АРСЕН ПЕДРОСОВИЧ

УДК 577.152.3

**РОЗРОБКА БІОТЕХНОЛОГІЇ
ОТРИМАННЯ ГІДРОЛІТИЧНОГО ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТУ
З α -ГАЛАКТОЗИДАЗНОЮ АКТИВНІСТЮ**

Спеціальність 03.00.20 – біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата технічних наук

Одеса – 2003

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Одеській національній академії харчових технологій,
Міністерство освіти і науки України

Науковий керівник: доктор технічних наук, професор,
лауреат Державної премії України
Капрельянц Леонід Вікторович,
Одеська національна академія харчових технологій,
завідувач кафедри біохімії та мікробіології

Офіційні опоненти: доктор технічних наук, професор
Безусов Анатолій Тимофійович,
Одеська національна академія харчових технологій,
завідувач кафедри технології консервування;

кандидат технічних наук
Ямборко Ганна Валентинівна,
Одеській національний університет ім. І.І. Мечникова,
доцент кафедри мікробіології і вірусології

Провідна установа: Національний університет харчових технологій, кафедра технології
функціональних харчових продуктів (м. Київ), Міністерство освіти і
науки України

Захист відбудеться 17.12 2003 року о 12 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради
Д 41.088.02 Одеської національної академії харчових технологій (65039, м. Одеса, вул. Канатна,
112).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Одеської національної академії
харчових технологій (м. Одеса, вул. Канатна, 112).

Автореферат розісланий 14.11. 2003 року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

Станкевич Г.М.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

В даний час в Україні, як і за кордоном, проводяться дослідження, які направлені на розширення асортименту харчових продуктів функціонального призначення. Удосконалення асортименту та формування якісних показників функціональних продуктів харчування може бути досягнуто широким використанням соєпродуктів.

Завдяки різноманітності біологічно активних інгредієнтів сої (білки, ліпіди, вуглеводи, вітаміни, мінеральні речовини, фітокомпоненти), вона є ідеальним функціональним продуктом, який використовується в дієтичному, лікувально-профілактичному та раціональному харчуванні. Соєпродукти є також одним з основних джерел різноманітних біологічно активних добавок, що використовуються як лікувально-профілактичні засоби при багатьох захворюваннях.

Сьогодні існує багато різноманітних технологій переробки соєвих бобів в продукти і інгредієнти харчування. У створенні сучасних технологій значне місце належить харчовій біотехнології, яка дозволяє створювати нові покоління вітчизняних продуктів, що відповідають вимогам так званих "здорових продуктів".

Актуальність теми. У сучасній інженерній ензимології особливо актуальними є питання активності і специфічності ферментів, дослідження біосинтезу їх різними продуцентами, фізико-хімічних властивостей, механізму дії ферментів. Розв'язання цих питань має не тільки фундаментальне значення, але й практичне з точки зору раціонального використання ферментних препаратів та інтенсифікації технологічних процесів, направленої модифікації компонентів сировини при виробництві харчових продуктів та інгредієнтів.

Серед гідролітичних ферментів, що знайшли своє застосування при переробці рослинної сировини, важливе місце посідає α -галактозидаза.

Питанням дослідження властивостей цього ферменту та його використання присвячені праці багатьох закордонних учених. У нашій країні ведуться окремі розвідувальні роботи. Субстратом для α -галактозидази є α -галактозиди, включаючи рафінозу, стахіозу та інші, які є основними олігосахаридами сої. Препарати α -галактозидази насамперед знаходять широке застосування при переробці сої. Галактоолігосахариди (переважно рафіноза) викликають у деяких людей небажані дисфункції шлунково-кишкового тракту. З іншого боку, існують докази, що ці олігосахариди мають пребіотичні властивості, збільшуючи число біфідобактерій у товстому кишечнику.

Якщо за допомогою α -галактозидази розщепити соєві галактоолігосахариди до галактози та інших низькомолекулярних вуглеводів, то ця суміш матиме солодкий смак. Обробка соєпродуктів, що широко застосовуються сьогодні в раціонах харчування, α -галактозидазою

робить перспективною розробку нових дієтичних соєпродуктів, а також утилізацію різних побічних продуктів їх виробництва. У зв'язку з вищевказаним актуальною є розробка отримання ферментного препарату з α -галактозидазної активністю.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота відповідає тематиці міжвузівської програми науково-дослідної роботи № 31 “Будова, склад, властивості і перетворення компонентів рослинної сировини як основи створення поліфункціональних добавок, збагачувачів і модулів при одержанні продуктів з новими властивостями, які забезпечують продовольчу безпеку населення України”, затвердженої наказом Міністерства освіти України № 271 від 15.08.96, зокрема темі досліджень проблемної лабораторії Одеської національної академії харчових технологій 1/2000-П “Фізико-хімічні та біотехнологічні основи одержання фітоферментних комплексів, симбіотиків, каротиноїдів та поліфенолів як компонентів біологічно активних добавок” (№ держреєстрації 0100U004565), зокрема підтемі № 2 “Створення консорціумів симбіотиків бактеріальних культур пробіотичної дії та розробка адаптаційних продуктів харчування з їх участю”.

Мета і задачі дослідження. Метою роботи є розробка біотехнології отримання гідролітичного ферментного препарату з α -галактозидазною активністю і його використання при переробці соєпродуктів.

Для досягнення зазначеної мети були поставлені такі задачі:

- провести дослідження комплексу фізико-біохімічних і технологічних ознак штамів-продуцентів α -галактозидази і здійснити добір перспективних штамів;
- розробити живильне середовище, яке забезпечить максимальне накопичення біомаси клітин, і розробити умови культивування, що сприятимуть підвищенню врожайності біомаси;
- розробити методи виділення й очищення α -галактозидази;
- визначити властивості ферменту і механізм його дії в реакціях гідролізу олігосахаридів у межах загальної концепції каталітичної дії карбогідраз;
- визначити робочі режими експлуатації ультрафільтраційної мембрани для концентрування ферменту;
- розробити технологічну та апаратурну схеми виробництва ферментного препарату Галактолонгін Г10х;
- вивчити умови ферментативного гідролізу соєпродуктів із застосуванням препарату Галактолон-гін Г10х, провести промислову апробацію, розробити нормативну документацію.

Об'єктами досліджень були: культури лакто- і біфідобактерій, живильні середовища, соєве молоко.

Предмети досліджень – процеси виділення, очищення, концентрування і сушіння ферментного препарату, вплив різних фізико-хімічних чинників на активність ферментного

препарату, ідентифікація функціонально каталітичних груп активного центру ферментного препарату, механізм дії ферментного препарату, процес гідролізу соєпродуктів за допомогою одержаного ферментного препарату.

Методи досліджень – фізико-хімічних характеристик ферментного препарату, активності досліджуваного штаму біфідобактерій були традиційні і сучасні мікробіологічні, технологічні і біохімічні методи.

Наукова новизна одержаних результатів. Вивчено динаміку росту культури *Bifidobacterium longum* на різних живильних середовищах і обрано оптимальне живильне для середовище подальшого культивування даної культури. Обрано оптимальні параметри дезінтеграції клітинної стінки культури *B.longum*. Проведено очищення ферменту за допомогою різних методів. Експериментально доведено можливість застосування ультрафільтрації для концентрування й очищення культуральної рідини, яка містить культуру *B.longum*. Вивчено вплив різних фізико-хімічних чинників на активність α -галактозидази. Проведено ідентифікацію каталітично функціональних груп активного центру α -галактозидази. Запропоновано механізм розриву α -1,6-глікозидного зв'язку в галактоолігосахариді рафінозі. Досліджено умови гідролізу соєвих галактоолігосахаридів. Розроблено науково обґрунтовану принципову технологічну схему одержання гідролітичного ферментного препарату Галактолонгін Г10х.

Експериментально доведено можливість промислового виробництва гідролітичного ферментного препарату Галактолонгін Г10х. Наукова новизна роботи підтверджена патентом.

Практичне значення одержаних результатів. Розроблено науково обґрунтовані принципову і апаратурну технологічні схеми одержання гідролітичного ферментного препарату Галактолонгін Г10х. На підставі одержаних даних розроблено нормативну документацію на виробництво гідролітичного ферментного препарату Галактолонгін Г10х. Розроблену технологію апробовано на підприємстві, що виробляє поліпшувачі борошна на основі ферментних композицій СП “ПП Карат”.

Особистий внесок здобувача. Особистий внесок полягає у забезпеченні методичного оформлення роботи, виконанні аналітичної і експериментальної роботи, аналізі та узагальненні одержаних даних у вигляді формування висновків і рекомендацій, підготовці матеріалів досліджень до публікації, розробці нормативно-технічної документації, промислової апробації розробленої технології. Особистий внесок здобувача підтверджується поданими документами і науковими публікаціями.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень повідомлені на Міжнародній конференції “Функціональні продукти харчування” (Кубань, 2001 р.); четвертій Міжнародній науково-технічній конференції “Їжа. Екологія. Людина” (Москва, 2001 р.); першому

Міжнародному конгресі “Біотехнологія – стан і перспективи розвитку” (Москва, 2002 р.); четвертому Українському біохімічному з’їзді (Чернівці, 2002 р.); 69-й науковій конференції молодих учених, аспірантів і студентів “Розроблення, дослідження і створення продуктів функціонального харчування, обладнання та нових технологій для харчової і переробної промисловості” (Київ, 2003 р.); 63-й науковій конференції Одеської національної академії харчових технологій (Одеса, 2003 р.).

Публікації. Результати дисертації опубліковані у 12 друкованих працях, включаючи 6 статей, один патент, 5 тез.

Структура та обсяг роботи. Дисертація складається зі вступу, чотирьох розділів, висновків, списку літератури і додатків. Зміст роботи викладено на 142 сторінках, включаючи 14 таблиць (на 4 стор.), 31 рисунок (на 4 стор.), 3 додатка (на 17 стор.). Список використаних бібліографічних джерел містить 138 найменувань (на 10 стор.).

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У вступі обґрунтовано актуальність теми досліджень, визначено наукову новизну та практичну цінність, сформульовано загальну мету та спрямованість роботи.

У першому розділі на базі аналізу літературних джерел розглянуто питання хімічного складу соєпродуктів та їх значення в харчуванні і профілактиці захворювань.

Розглянуто біотехнологічні засади використання ферментів при переробці рослинної сировини і застосування ферментних препаратів у харчовій промисловості. При переробці рослинної сировини в харчові продукти, корми, енергоносії широко використовується ферментативний гідроліз. При цьому виникають завдання різного ступеня складності, що визначається видом і числом гідролізованих субстратів, їх локалізацією в сировину, агрегатним станом у гідролітичній системі, заданим ступенем розщеплення і складом продуктів гідролізу. Найбільш простими є процеси гідролітичного розщеплення індивідуальних водорозчинних субстратів. З процесів цього типу в технології використовують інверсію сахарози, гідроліз лактози, інших олігосахаридів, глікозидів.

Представлено загальну характеристику ферментів класу гідролаз і характеристику методів виділення ферментів, також представлено характеристику і властивості ферменту α -галактозидази, що гідролізує галактоолігосахариди соєпродуктів.

У біотехнологічних прийомах переробки сої в харчові продукти представлені продукти харчування із сої, що виробляються провідними країнами-виробниками.

У другому розділі викладено відомості про об’єкти і методи досліджень. Подано

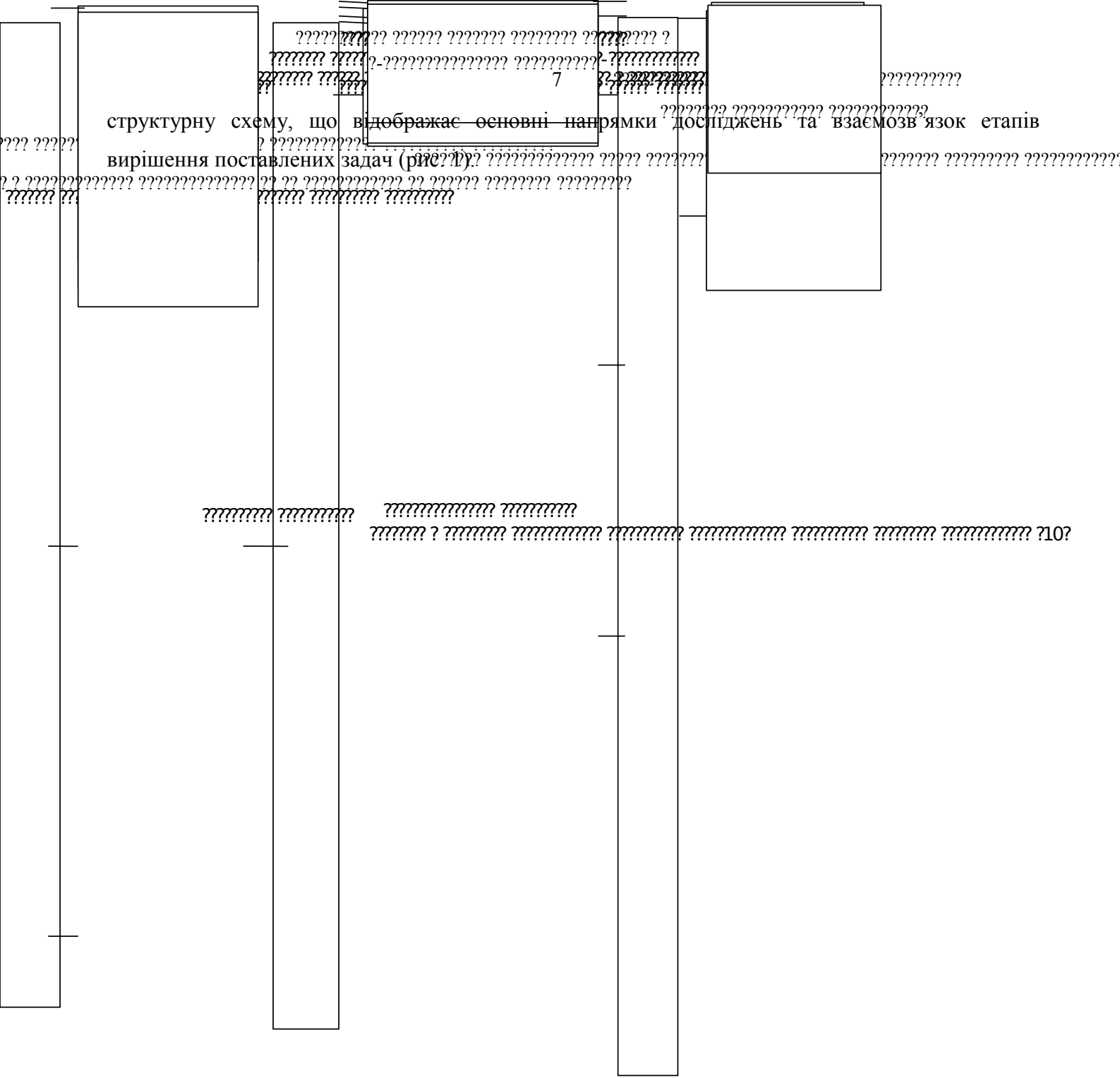


Рис.1. Основні напрямки проведення дослідження

Об'єктами досліджень у даній дисертаційній роботі були: культури біфідобактерій – *Bifidobacterium longum* ЛМ-6, *Bifidobacterium adolescentis* ЛМ-21, *Bifidobacterium bifidum* ЛМ-

19, *Saccharomyces cerevisiae* ДО-14; живильні середовища — соєва сироватка, кукурудзяно-лактозна, Блаурока, MRS; соєве молоко сухе (ТУ У 6170021.55-99), отримане на Ахтирському сиркомбінаті (Сумська область, Україна).

Основна частина досліджень була проведена в лабораторіях кафедри біохімії і мікробіології ОНАХТ, окремі дослідження виконувалися в лабораторії біохімії СГІ. У дослідженнях використовували як стандартні, так і оригінальні методи із застосуванням сучасних хроматографічних і спектральних методів дослідження.

У третьому розділі наведено результати експериментальних досліджень, пов'язаних з одержанням гідролітичного ферментного препарату з α -галактозидазною активністю, його очищенням, концентруванням, сушінням, впливом різних фізико-хімічних чинників на активність ферментного препарату. Представлено результати ідентифікації каталітично функціональних груп активного центру α -галактозидази, а також механізм дії ферментного препарату і результати гідролізу соєпродуктів з використанням одержаного ферментного препарату.

Як джерело активного ферменту, в роботі використовували чисті культури *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum* із колекції мікроорганізмів кафедри біохімії і мікробіології ОНАХТ.

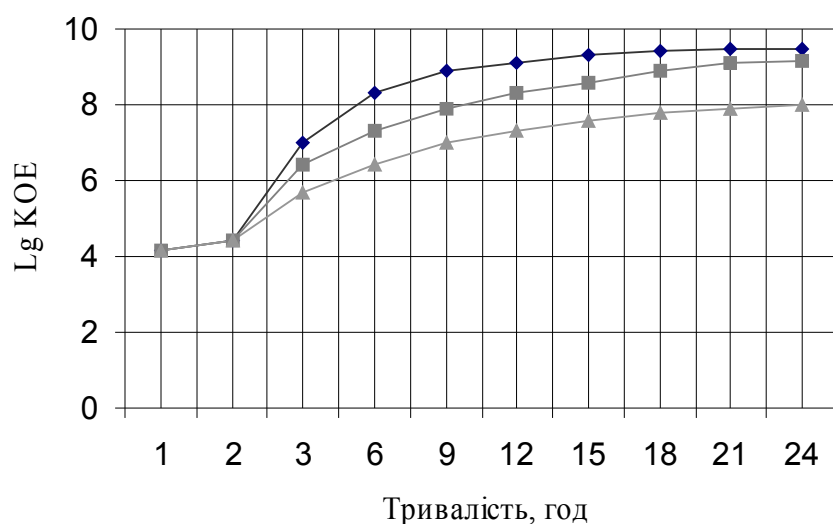


Рис. 2. Динаміка росту біфідобактерій на живильному середовищі MRS:

Культивування біфідобактерій на обраних середовищах показало практично однакову динаміку росту культур з незначним укороченням логарифмічної фази для середовища MRS і більш високі технологічні параметри *B. longum* на середовищі MRS і на соєвій сироватці. Тому у подальших дослідженнях для одержання α -D-галактозидази використовували культуру *B. longum*.

Аналіз літературних джерел показав, що α -галактозидаза є індукцибельним ферментом, синтез якого здійснюється мікроорганізмами за присутності в живильному середовищі відповідного субстрата-індуктора, а саме специфічних галактоолігосахаридів. Інтенсивність гідролітичних процесів розщеплення галактоолігосахаридів α -галактозидазами пояснюється природою субстрату. Галактоолігосахариди побудовані із залишків галактози. На редукуючому кінці їх молекул знаходиться фруктоза, яка лімітує глибину і швидкість розщеплення галактоолігосахаридів α -галактозидазами, які не можуть розщеплювати α -1,2-глікозидний зв'язок між галактозою і фруктозою.

Соєві боби містять 4,5 %, а сухе соєве молоко 8,5 % галактоолігосахаридів. При ферментації соєвого молока дріжджами відбувається гідроліз α -1,2-глікозидного зв'язку між галактозою і фруктозою β -фруктофуранозидазою (інвертазою), що міститься у дріжджах. Внаслідок цього такі галактоолігосахариди, як рафіноза, стахіоза та інші перетворюються на мелібіозу, галактобіозу, маніотріозу та інші галактоолігосахариди, побудовані тільки із залишків α -D-галактопіраноз, які зв'язані α -1,6-глікозидним зв'язком, доступним для α -галактозидази.

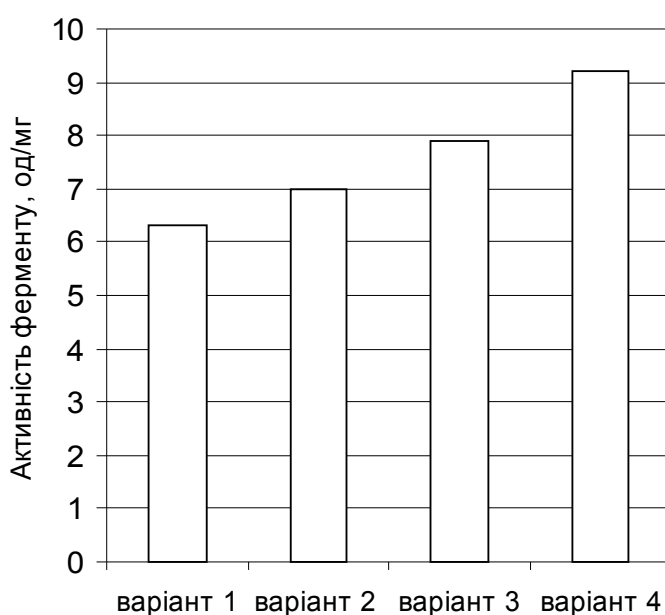


Рис. 3. Вплив індуктора біосинтезу α -галактозидази на активність ферменту

Одержані результати (рис. 3) показують, що при додаванні до живильного середовища MRS ферментованого дріжджами соєвого молока (варіант 4) активність α -галактозидази, синтезованої бактеріями, є найбільшою порівняно з іншими варіантами і контрольним зразком без вуглеводного речовин-індукторів.

Важливе теоретичне і практичне значення при вивченні ферментів мають питання

локалізації їх в мікробних клітинах, стабільності й активності ферментних препаратів, їх фізико-хімічної характеристики, можливості і шляхів одержання препаратів різного ступеня чистоти. Ці дослідження передують розробці прикладних аспектів, а також визначенню режимів одержання ферментних препаратів у виробництві.

Із наведених результатів (рис. 4) випливає, що фермент α -галактозидаза є внутрішньоклітинним ферментом, тому для одержання ферментного препарату біомасу, зібрану наприкінці логарифмічної фази росту, центрифугували при 6000 хв.^{-1} протягом 30 хв., промивали β -меркаптоетанолом, суспендували в цитратному буфері (рН 5,8) і руйнували клітини на дезінтеграторі УЗДН-А. Супернатант використовували як “сирий” ферментний препарат. Найбільш ефективним параметром руйнування клітинних структур, зв’язаних з α -D-галактозидазою, обрана тривалість дезінтеграції – 10 хвилин.

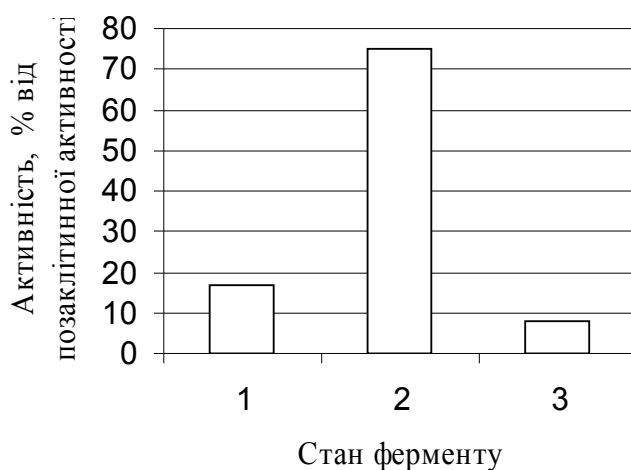


Рис. 4. Співвідношення поза-, внутрішньоклітинної і адсорбованої α -галактозидази

Вивчено вплив природи трьох органічних розчинників (ацетону, етанолу, ізопропанолу) та їх концентрації на процес виділення α -галактозидази з культуральної рідини. Визначено, що органічні розчинники при додаванні їх до 1 об'єму культуральної рідини 2-х об'ємів збільшують питому активність ферменту від 7,8 од/мг до 13,8 од/мг білка, досягаючи ступеня очищення в 1,3-2,3 рази.

Застосування розчинників (рис. 5) забезпечує збереження активності α -галактозидази на 80-85 %. Велике значення при осадженні ферментів має рН середовища. Найкращі умови для виділення α -галактозидази визначалися незалежно від характеру розчинника при рН 5,8-6,1. Це пов'язано з тим, що найбільш повно ферменти випадають у осад в ізоелектричній точці, коли складаються найбільш сприятливі умови для агрегації белкових молекул.

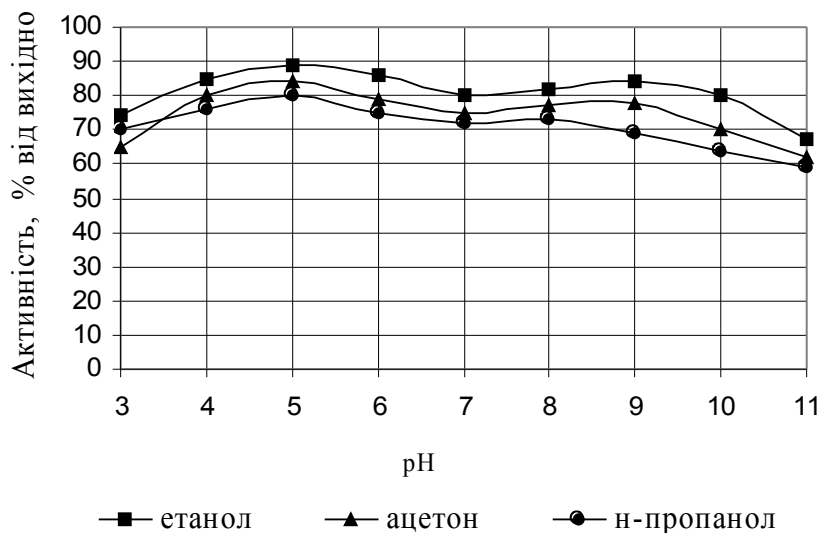


Рис. 5. Вплив рН культуральної рідини на осадження α -галактозидази органічними розчинниками

Одержані результати свідчать про те, що при осадженні ферменту етанолом при значенні рН 5,0 активність ферменту у відсотках від вихідної активності наближалася до 90 % порівняно з іншими органічними осаджувачами. Подальше збільшення значень рН не веде до збільшення активності ферменту.

Подальше очищення ферментного препарату здійснювали за допомогою гель-фільтрації на сефадексах.

З наведених результатів (табл. 1) випливає, що внаслідок застосування осадження етанолом і висолювання сульфатом амонію підвищується питома активність з 6,0 од/мг до 82,8 од/мг білка, а ступінь очищення дорівнює при цьому 13,8. Вихід α -галактозидази в цих умовах складає 40,1 %.

При застосуванні гель-хроматографічного поділу на колонках із сефадексами G-25 і G-100 питому активність удалося збільшити на першому етапі до 134 од/мг і на другому – до 422,9 %. Молекулярна маса α -галактозидази склала 112 кДа. Далі очищений препарат з α -галактозидазною активністю розділяли методом електрофорезу в поліакриламідному гелі, що дозволило отримати гомогенний фермент.

Експериментально доведено можливість застосування ультрафільтрації для концентрування і очищення культуральної рідини, що містить культуру *Bifidobacterium longum*. Для здійснення цього процесу можна рекомендувати напівволоконні мембрани ВПУ-1500 у складі розділових модулів AP або їм подібні. Робочі параметри ультрафільтрації рекомендуються наступні: P=1 атм, t=40 °C при максимально можливій для даної конструкції

апарата швидкості потоку рідини у міжмембранному каналі. Даним способом вдається досягти фактора концентрування 5-5,5.

Таблиця 1

Очищення α -галактозидази

Стадія очищення	Активність α -галактозидази, од.	Маса білка, мг	Питома активність, од/мг білка	Ступінь очищення	Вихід, %
Вихідний екстракт	3839	638	6,0	1,0	100
Осадження етанолом 1:2,5	2813	290	9,7	1,61	73,3
Висолювання сульфатом амонію при насиченні 55–56 %	1540	18,6	82,8	13,80	40,11
Гель-фільтрація на сефадексі G-25	737	5,5	134,0	22,33	19,20
Гель-фільтрація на сефадексі G-100	368	0,87	422,9	70,50	9,59

З метою одержання готової форми технічного препарату одержаний після дезінтеграції і центрифугування фільтрат культуральної рідини необхідно піддати концентруванню. Найчастіше для даної мети в технології ферментних препаратів використовують методи вакуум-випарювання. Його також використовують як один з етапів отримання сухих технічних або очищених ферментних препаратів. Даний процес здійснювали на роторному випарному апараті фірми “LUVA” при температурі, що дорівнює 32 °С.

Отриманий внаслідок осадження етанолом осад ферменту піддавали висушуванню. Метою сушіння було також одержати стабільний при зберіганні ферментний препарат із концентрату культуральної рідини. Для стабілізації активності ферменту при сушінні використовували $MnCl_2$ різної концентрації. Оптимальна концентрація стабілізатора становила 0,06 % і забезпечувала збереження при сушінні 94 % активності ферменту. Сушіння ферменту здійснювали у вакуум-сушильній шафі при таких параметрах: концентрація стабілізатора 0,06 %; $T=35^\circ C$; $P_{ост.}=125$ Па; $\tau=10$ год.

Досліджували вплив температури і рН та рН-стабільності на каталітичну активність α -D-галактозидази. α -D-галактозидаза, продукована *B.longum*, проявляла активність у діапазоні значень рН від 5,0 до 7,5, досягаючи максимуму при рН 6,0. Досліджували температурний інтервал для прояву максимальної α -галактозидазної активності і термічну стійкість ферментного препарату. Температурний інтервал для прояву максимальної α -D-галактозидазної активності ферменту досить широкий – від 33 до 48 °С, але при більш високій температурі настає його інактивація. Одержані експериментальні дані свідчать про досить високу термічну

стійкість α -галактозидази досліджуваного штаму біфідобактерій. Значна інактивація має місце лише при температурі 60 °С і вище.

Проводили ідентифікацію каталітично функціональних груп активного центра α -галактозидази. Визначили наявність карбоксильної та імідазольної груп в активному центрі α -галактозидази.

Для підтвердження участі карбоксильних та імідазольних груп, що беруть участь у розриві α -1,6-глікозидних зв'язків у рафінозі, розраховували теплоти іонізації цих груп (ΔH) за рівнянням Вант-Гоффа.

Обчислені значення величин pK та ΔH наведено у табл. 2.

Таблиця 2

Показники констант і теплот іонізації

Гілки кривої	pK		ΔpK	ΔH , кДж/моль
	10°	30°		
Висхідна	4,03	3,91	0,12	9,84
Спадна	8,00	7,49	0,51	41,82

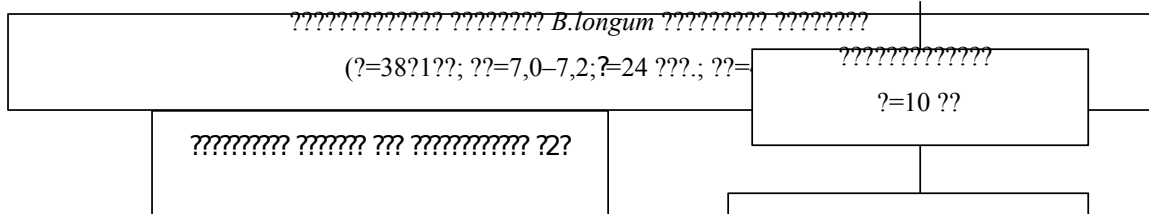
Як випливає із даних таблиці, значення ΔH відповідають карбоксильним та імідазольним групам, що є важливим критерієм ідентифікації функціональних груп активного центра ферменту. Наявність імідазольної групи в каталітичному центрі ферменту досліджували специфічною реакцією на цю групу – реакцією фотоокислювання у присутності фотосенсибілізатора метиленового синього. Експериментальні дані показали, що α -галактозидаза піддавалася інтенсивній інактивації при фотоокисненні з метиленовим синім, тоді як у контрольних дослідах її активність залишалася сталою.

У розумінні механізму розщеплення глікозидних зв'язків карбогідразами виходили з принципу орієнтованої сполученої атаки електрофільних та нуклеофільних груп на глікозидний зв'язок оліго- і полісахаридів.

Досліджено умови гідролізу соєвих галактоолігосахаридів. Показано, що повний їх гідроліз α -галактозидазою *B.longum* досягається за 30–40 хв. ферментолізу при активності 9–10 од/мг, при рН 6,0 і температурі 45 °С.

У четвертому розділі наведено принципову технологічну схему виробництва гідролітичного ферментного препарату Галактолонгін Г10х, опис технологічних процесів, дані щодо виробничої апробації.

З використанням експериментальних даних розроблено принципову технологічну схему виробництва гідролітичного ферментного препарату Галактолонгін Г10х.



Ошибка: источник перекрестной ссылки не найден

Рис. 6. Принципова технологічна схема одержання гідролітичного ферментного препарату Галактолонгін Г10х.

Органолептичні і фізико-хімічні показники ферментного препарату Галактолонгін Г10х з використанням розробленої принципової технологічної схеми представлена у таблиці 4.

З метою оптимізації окремих технологічних параметрів процесу гідролізу соєпродуктів ферментом α -галактозидаза, були використані методи математичного моделювання експерименту, одержано рівняння регресії, що адекватно описує процес гідролізу галактоолігосахаридів сої

Таблиця 4
Органолептичні і фізико-хімічні показники ферментного препарату Галактолонгін Г10х

Найменування показника	Характеристика ферментного препарату
Зовнішній вигляд	Однорідний порошок з максимальним ребром часток не більш 2 мм
Смак і запах	Натуральним, властиві ферментним препаратам, без гіркоти та інших сторонніх присмаків
Колір	Кремовий
Сторонні домішки	Не допускаються
Вологість, %	8,67±0,34
Питома α -галактозидазна активність	53,62±1,74

Оптимальними технологічними параметрами були: активність ферментного препарату 7,5–8,6 од/мг, час обробки у межах 40-50 хв. Методами ТСХ и ВЕЖХ показано, що в гідролізаті соєвого молока накопичена галактоза і практично відсутні рафіноза і стахіоза. Глибина ферментолізу складає 95-96 %.

Проведено промислову апробацію на підприємстві, що виробляє борошно на основі ферментних композицій (СП “Українсько-турецьке “ПП Карат”). Показано можливість використання серійного обладнання для виробництва гідролітичного ферментного препарату Галактолонгін Г10х. Показники ферментного препарату з дослідних партій відповідають

нормативно-технічній документації.

ВИСНОВКИ

1. Дисертаційну роботу присвячено розробці біотехнології виробництва гідролітичного ферментного препарату з α -галактозидазною активністю. Результатом роботи є розробка нормативної документації і впровадження технології виробництва ферментного препарату Галактолонгін Г10х.

2. Вивчено динаміку росту культури *Bifidobacterium longum* на різних живильних середовищах і обрано оптимальне живильне середовище для подальшого культивування даної культури. Було виявлено, що оптимальними за накопиченням біомаси є середовище MRS. Показана можливість використання в поживному середовищі соєвої сироватки.

Обрано оптимальні параметри дезінтеграції клітинної стінки культури *B.longum*: тривалість 10 хв.; синхронізація і чутливість 9 од.

3. Проведено очищення ферменту за допомогою різних методів: осадження етанолом, гельфільтрацією, електрофорезом. Обрано робочі параметри ультрафільтрації: $P = 1$ атм, $t = 40$ °С. Експериментально доведено можливість застосування ультрафільтрації для концентрування та очищення культуральної рідини, що містить культуру *B.longum*. Для здійснення цього процесу можна рекомендувати напівволоконні мембрани ВПУ-1500 у складі розділових модулів АР або їм подібні.

4. Вивчено вплив різних фізико-хімічних чинників на активність α -галактозидази. α -галактозидаза з *B.longum* проявляє максимальну активність при $T = 33-48$ °С та рН 6,0. Фермент є стабільним у діапазоні рН 6,0.

5. Проведено ідентифікацію каталітично функціональних груп активного центра α -галактозидази. Показано, що в каталітичному центрі α -галактозидази наявні дві функціональні групи – карбоксильна й імідазольна, що утворюють систему карбоксилат-імідазолій, яка функціонує за типом кислотно-основного каталізу. Запропоновано механізм розриву α -1,6-глікозидного зв'язку в галактоолігосахариді рафінозі.

6. Досліджено умови гідролізу соєвих галактоолігосахаридів. Показано, що повного їх гідролізу α -галактозидазою *B.longum* можна досягти за 30–40 хв. ферментолізу при активності 9–10 од/мг, при рН 6,0 і температурі 45 °С.

7. Досліджено і обґрунтовано за допомогою методів математичного моделювання оптимальні технологічні параметри процесу ферментування соєпродуктів, що становлять: активність ферменту 8,5 од/мг білка, тривалість – 40-50 хв. Кінетичні параметри ферментативного гідролізу для різних субстратів показали високу субстратну специфічність до

стахіози $K_M=26,70$ мМ, $V_M=47600$ мМ/хв і рафінози $K_M=34,92$ мМ, $V_M=42300$ мМ/хв.

Методами ТСХ и ВЕЖХ показано, що кінцевим продуктом гідролізу галактоолігосахаридів є галактоза.

8. Розроблено принципову технологічну схему виробництва гідролітичного ферментного препарату Галактолонгін Г10х, яку апробовано на підприємстві з виробництва поліпшувачів борошна на основі ферментних композицій СП “ПП Карат”. На ферментний препарат розроблено нормативно-технічну документацію. Наукову новизну дослідження захищено патентом.

Розрахована собівартість отриманого ферментного препарату складає 83,36 грн/кг у цінах 2003 року.

Основний зміст роботи викладено у публікаціях

1. Капрельянц Л.В., Петросьянц А.П., Паулина Я.Б. Характеристика α -галактозидазы бифидобактерий. // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2002, № 11. – С. 44-46.

Вивчено динаміку росту культури *Bifidobacterium longum* на різних живильних середовищах і обрано оптимальне живильне середовище для подальшого культивування даної культури. Обрано оптимальні параметри дезінтеграції клітинної стінки культури *B.longum*. Вивчено вплив різних фізико-хімічних чинників на активність α -галактозидази.

2. Павленкова П.П., Капрельянц Л.В., Петросьянц А.П. Использование соевого обогатителя “Самсон” в производстве мясных рубленых изделий. // Наукові праці Одеської державної академії харчових технологій. – Одеса: ОДАХТ, 2002. – Вип. 23. – С. 137-142.

Вивчено функціональні характеристики та можливість використання соєвого білкового збагачувача “Самсон” у виробництві м’ясних рублених виробів.

3. Капрельянц Л.В., Петросьянц А.П. Ферментативный гидролиз соевых галактоолигосахаридов. // Наукові праці Одеської державної академії харчових технологій. – Одеса: ОДАХТ, 2002. – Вип. 24. – С. 122-125.

Досліджено умови гідролізу соєвих галактоолігосахаридів. Розроблено науково обґрунтовану принципову технологічну схему одержання гідролітичного ферментного препарату Галактолонгін Г10х.

4. Капрельянц Л.В., Петросьянц А.П. Отримування і використання ферментного препарату галактолонгін Г-10х при переробці соєпродуктов. // Зернові продукти і комбікорми. – 2003, № 1. – С. 23-26.

Проведено очищення ферменту за допомогою різних методів. Експериментально доведено можливість застосування ультрафільтрації для концентрування й очищення культуральної рідини, що містить культуру *B.longum*.

5. Капрельянц Л.В., Петросьянц А.П., Розанов А.Я. Ідентифікація функціональних груп каталітичного центру α -галактозидази *Bifidobacterium longum* ЛМ-6. // Наукові праці Одеської національної академії харчових технологій. – Одеса: ОНАХТ, 2003. – Вип. 25. – С. 118-122.

Проведено ідентифікацію каталітично функціональних груп активного центра α -галактозидази.

6. Пат. 54315 А Україна, МКП 12N9/00, Спосіб одержання б-галактозидази / Л.В. Капрельянц, А.П.Петросьянц; № 2002076001; Заявл. 10.07.2002; Опубл. 17.02.03. Бюл. № 2.

7. Капрельянц Л.В., Силенко Г.П., Шерстобитов В.В., Петросьянц А.П. Функциональные продукты питания из сои. // Международная конференция “Функциональные продукты питания”. – Тез. докл. – Кубань, 2001. – С. 109-110.

Проведено аналіз біохімічного складу основних сортів сої, районованих на півні України.

8. Капрельянц Л.В., Петросьянц А.П. Функциональные продукты питания из сои. // Материалы четвертой международной научно-технической конференции “Пища. Экология. Человек”. – Москва, 2001. – С. 56-57.

Досліджено властивості біотехнології при переробці соєвих бобів у функціональні продукти.

9. Капрельянц Л.В., Петросьянц А.П. Ферментативный гидролиз галактоолигосахаридов. // Материалы 1-го международного конгресса “Биотехнология – состояние и перспективы развития”. – Москва, 2002. – С. 380-381.

Експериментально доведено можливість застосування ферменту α -галактозидази для гідролізу соєпродуктів.

10. Капрельянц Л.В., Петросьянц А.П. α -галактозидаза бифидобактерий. // Материалы 3-ей международной научно-технической конференции “Техника и технология пищевых производств”. – Могилев, 2002. – С. 85-86.

Визначено, що культура *B.longum* являється джерелом активного ферменту α -галактозидази.

11. Капрельянц Л.В., Петросьянц А.П. Виділення, очищення і використання ферментного препарату з α -галактозидазною активністю. // Матеріали 69-ой наукової конференції молодих вчених, аспірантів і студентів “Розроблення, дослідження і створення продуктів функціонального харчування, обладнання та нових технологій для харчової і

переробної промисловості”. – Київ, 2003. – С. 70.

Експериментально доведено можливість застосування різних методів очищення ферменту α -галактозидази. Обрано робочі параметри ультрафільтрації.

Аннотация

Петросьянц А.П. Разработка биотехнологии производства гидролитического ферментного препарата с α -галактозидазной активностью.

Диссертация на соискание научной степени кандидата технических наук по специальности 03.00.20. – биотехнология. – Одесская национальная академия пищевых технологий, Одесса, 2003.

Диссертация посвящена разработке производства гидролитического ферментного препарата с α -галактозидазной активностью.

Основными задачами работы являлись: изучение различных методов выделения, очистки, концентрирования и сушки ферментного препарата; влияние различных физико-химических показателей на активность фермента; идентификация функционально каталитических групп активного центра фермента; механизм действия фермента, исследование процесса гидролиза соепродуктов с использованием полученного ферментного препарата; разработка принципиальной технологической схемы производства гидролитического ферментного препарата Галактолонгин Г10х и ее промышленная апробация.

Изучена динамика роста культуры *Bifidobacterium longum* на различных питательных средах и выбрана оптимальная питательная среда для дальнейшего культивирования данной культуры. Оптимальными по накоплению биомассы были выбраны среда MRS и соевая сыворотка. Выбран оптимальный параметр дезинтеграции клеточной стенки культуры *B. longum* длительность равная 10 мин.

Изучено влияние природы 3-х органических растворителей (аcetона, этанола, изопропанола) и их концентрации на процесс выделения α -галактозидазы из культуральной жидкости. Органические растворители при добавлении их к 1 объему культуральной жидкости 2-х объемов увеличивают удельную активность фермента от 7,8 ед./мг до 13,8 ед./мг белка, достигая степени очистки в 1,3-2,3 раза.

Экспериментально доказана возможность применения ультрафильтрации для концентрирования и очистки культуральной жидкости содержащей культуру *B. longum*. Для осуществления этого процесса можно рекомендовать полуволоконные мембраны ВПУ-1500 в составе разделительных модулей АР или им подобные. Выбраны рабочие параметры ультрафильтрации: Р=1атм, t=40°C.

Полученный в результате осаждения этанолом осадок фермента подвергался высушива-

нию. Целью сушки было получить стабильный при хранении ферментный препарат из концентрата культуральной жидкости. Для стабилизации активности фермента использовали $MnCl_2$. Оптимальная концентрация стабилизатора составляет 0,06 %, и обеспечивает сохранение при сушке 94 % активности фермента. Сушку фермента проводили в вакуум-сушильном шкафу при таких параметрах: концентрация стабилизатора 0,06 %; $T=35\text{ }^\circ\text{C}$; $P_{\text{ост.}}=125\text{ Па}$; $\tau=10\text{ ч}$.

Исследовали влияние температуры, pH и pH-стабильности на каталитическую активность α -D- галактозидазы. α -D- галактозидаза, продуцируемая *B.longum*, проявляла активность в диапазоне значений pH от 5,0 до 7,5 достигая максимума при pH, близком 6,0.

Температурный интервал для проявления максимальной α -D-галактозидазной активности фермента достаточно широк – от 33 до 48 $^\circ\text{C}$ однако, при более высокой температуре наступает его инактивация.

Полученные экспериментальные данные о влиянии температур на активность фермента свидетельствуют о довольно высокой термической устойчивости α -галактозидазы исследуемого штамма бифидобактерий. Существенная инактивация отмечается лишь при температуре 60 $^\circ\text{C}$ и выше.

Проведена идентификация каталитически функциональных групп активного центра α -галактозидазы. Показано, что в каталитическом центре α -галактозидазы находятся две функциональные группы- карбоксильная и имидазольная, которые образуют систему карбоксилат-имидазоль, функционирующую по типу кислотно-основного катализа. Предложен механизм разрыва α -1,6-гликозидной связи в галактоолигосахариде раффинозе.

Исследованы условия гидролиза соевых галактоолигосахаридов. Показано, что полный их гидролиз α -галактозидазой *B.longum* достигается за 30-40 мин ферментализации при активности 9-10 ед/мг, при pH 6,0 и температуре 45 $^\circ\text{C}$.

Исследованы и обоснованы с помощью методов математического моделирования оптимальные технологические параметры процесса ферментирования соепродуктов. На основании полученных данных разработана и апробирована в производственных условиях принципиальная технологическая схема производства гидролитического ферментного препарата Галактолонгин Г10х.

Ключевые слова: продукт, культивирование, дезинтеграция, α -галактозидазная активность, бифидобактерии, соевые галактоолигосахариды, биотехнология.

Анотація

Петросьянц А.П. Розробка біотехнології виробництва гідролітичного ферментного препарату з α -галактозидажною активністю.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата технічних наук за спеціальністю

03.00.20. – біотехнологія. – Одеська національна академія харчових технологій, Одеса, 2003.

Дисертацію присвячено розробці виробництва гідролітичного ферментного препарату з α -галактозидазною активністю.

Основними задачами роботи було: вивчення різних методів виділення, очищення, концентрування і сушіння ферментного препарату; визначення впливу різних фізико-хімічних показників на активність ферменту; ідентифікація функціонально каталітичних груп активного центра ферменту; механізм дії ферменту, дослідження процесу гідролізу соєпродуктів із використанням отриманого ферментного препарату; розробка принципово технологічної схеми виробництва гідролітичного ферментного препарату Галактолонгін Г10х та її промислова апробація.

Вивчено динаміку росту культури *Bifidobacterium longum* на різних живильних середовищах та обрано оптимальне живильне середовище для подальшого культивування даної культури. Оптимальними за накопиченням біомаси були визнані середовище MRS і соєва сироватка.

Вивчено вплив природи трьох органічних розчинників (ацетону, етанолу, ізопропанолу) та їх концентрації на процес виділення α -галактозидази з культуральної рідини.

Експериментально доведено можливість застосування ультрафільтрації для концентрування й очищення культуральної рідини, що містить культуру *B.longum*.

Отриманий внаслідок осадження етанолом осад ферменту піддавали висушіванню. Для стабілізації активності ферменту використовували $MnCl_2$.

Досліджували вплив температури і рН та рН-стабільності на каталітичну активність α -D-галактозидази. α -D-галактозидаза, продукована *B.longum*, проявляла активність у діапазоні значень рН від 5,0 до 7,5, сягаючи максимуму при рН, близькому 6,0.

Температурний інтервал для прояву максимальної α -D-галактозидазної активності ферменту досить широкий – від 33 до 48 °С, але при більш високій температурі настає його інактивація.

Одержані експериментальні дані про вплив температур на активність ферменту свідчать про досить високу термічну стійкість α -галактозидази досліджуваного штаму біфідобактерій. Значна інактивація спостерігається лише при температурі 60 °С і вище.

Проведено ідентифікацію каталітично функціональних груп активного центра α -галактозидази. Показано, що в каталітичному центрі α -галактозидази наявні дві функціональні групи – карбоксильна та імідазольна, що утворюють систему карбоксилат-імідазолій, яка функціонує по типу кислотно-основного каталізу. Запропоновано механізм розриву α -1,6-глікозидного зв'язку в галактоолігосахариді рафінозі.

Досліджено умови гідролізу соєвих галактоолігосахаридів. Показано, що повний їх гідроліз α -галактозидазою *B.longum* можна досягти за 30-40 хв. ферментолізу при активності 9-10 од/мг, при рН 6,0 і температурі 45 °С.

Досліджено й обґрунтовано за допомогою методів математичного моделювання оптимальні технологічні параметри процесу ферментування соєпродуктів. На підставі отриманих даних розроблено й апробовано у виробничих умовах принципово технологічну схему виробництва гідролітичного ферментного препарату Галактолонгін Г10х.

Ключові слова: продукт, культивування, дезінтеграція, α -галактозидазна активність, біфідобактерії, соєві галактоолігосахариди, біотехнологія.

Summary

Petrosyants A.P. Elaboration to the development of the technology of hydrolysis enzyme with α -galactosidase activity.

The thesis for candidate's degree of technical sciences for specialty 03.00.20 – biotechnology. – The Odessa National Academy of Food Technologies, Odessa, 2003.

The thesis is devoted to the development of the technology of hydrolysis enzyme with α -galactosidase activity.

Determination of the characteristic of *Bifidobacterium longum* culture, which can be both a starter culture and the source of the enzyme was done. Cultivation was carried out in the medium of MRS broth.

As this enzyme is intracellular, the conditions of desintegration of the cells on the desintegrator UZDN-A were investigated. The optimum conditions are duration – 10 min.

The activity of our enzyme was measured by the method of Church. The maximum activity of α -D-galactosidase was 8,8-9,0 EA/mg of protein.

Influence of pH, temperature, thermal stability, storage stability of the enzyme, effect of metal ions, inhibitors and other substances on enzyme activity has been investigated. It has been shown, that the maximum activity of α -D-galactosidase is displayed under pH 6,0 and temperature 43-48 °С. Not very high thermal stability of enzyme obtained was marked.

The identification of functional catalytic groups of the enzyme active center was done.

The conditions of the fermentative hydrolysis of soybean products by the enzyme have been investigated. The optimum conditions of the hydrolysis which allow to carry out breaking up of soybean galactooligosaccharides by 98 % have been chosen.

Determine all these properties of our enzyme we understood that, this enzyme allows us to use it as a starter culture for a soybean product.

Besides, the strong stability of the enzyme at low temperatures would permit continuation of hydrolysis of the non- digestible galactooligosaccharides throughout the shelf- life of the fermented product.

Key words: product, cultivation, desintegration, α -galactosidase activity, bifidobacterium, soy galactooligosaccharides, biotechnology.