

Автореферат

А 13 ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ



АБДУЛАЗІЗ АБДУ ЯХЬЯ АББАС

УДК 664.2:664.7.002.35

**ОТРИМАННЯ ТА ВИКОРИСТАННЯ
ГЛЮКОЗООКСИДАЗИ В ТЕХНОЛОГІЇ
ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ**

Спеціальність 03.00.20 – біотехнологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата технічних наук

Одеса – 2007

Дисертацією є рукопис.
Робота виконана в Одеській національній академії харчових технологій
Міністерство освіти і науки України

Науковий керівник: доктор технічних наук, професор
Безусов Анатолій Тимофійович,
Одеська національна академія харчових технологій
завідувач кафедри технології консервування

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Крестінков Іван Спиридонович,
Одеська національна академія харчових технологій
завідувач кафедри екології харчових виробництв

кандидат технічних наук, доцент
Ямборко Ганна Валентинівна
Одеський національний університет
Кафедра мікробіології і вірусології

Провідна установа: Національний університет харчових технологій,
м. Київ

30 годині на засіданні спеціалізованої академії харчових технологій

Одеської національної академії харчових технологій (№ 112).

ОНАХТ 04.09.07
Отримання та викорис



v017651

с. В. 14651 v017651

ОНАХТ
БІБЛІОТЕКА

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Серед ферментів, які продукуються міцеліальними грибами, важливе місце займає глюкозооксидаза (β -D-глюкоза: O_2 – оксидоредуктаза) (ГО), що каталізує окиснення β -D-глюкози до глюконової кислоти. Цей фермент використовується в харчовій промисловості для вилучення кисню і глюкози з харчових продуктів, при приготуванні яечного порошку і м'ясних виробів у висушеному стані відбувається потемніння готового продукту у зв'язку з утворенням меланоїдинів. Глюкозооксидазу використовують у консервній, виноробній промисловостях для вилучення кисню, що сприяє підвищенню стійкості продуктів тривалого зберігання і збереженню кольору. З застосуванням окремих прийомів за допомогою глюкозооксидази можна зберігати сир, свіжі м'ясо і рибу, борошно, крупи. Ефективним є використання глюкозооксидази для промислового одержання глюконової кислоти. Глюконова кислота (E 574) використовується у світовій харчовій промисловості як регулятор кислотності і розпушувач, засіб, інгібуючий мікроорганізми, як зв'язувальна речовина для іонів металів.

В останні роки широко застосовується ГО як аналітичний реагент у клінічній діагностиці і біосенсорних технологіях для визначення глюкози у біологічних рідинах, їжі і технологічних процесах.

Перспективним напрямком використання ГО є розробка технологій фруктоовочевих нектарів лікувально-профілактичного призначення для людей з порушеним вуглеводним обміном – цукровий діабет другого типу. В основі лікування такого типу діабету покладена дієтотерапія, заснована на зниженні у раціоні харчування легкозасвоюваних вуглеводів. Найбільш прийнятним вуглеводом є фруктоза, що метаболізується у організмі людини без участі інсуліну. Розробка технології виробництва ферментного препарату глюкозооксидази та її використання при виробництві фруктоовочевих нектарів з низьким вмістом сахарози і глюкози є актуальним.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалась в напрямку науково-дослідних робіт проблемної науково-дослідної лабораторії Одеської національної академії харчових технологій за темою "Розробка біотехнологічних процесів цільового спрямованого регулювання функціональних, фізіологічних та технологічних властивостей продуктів та БАД: (тема 1/06-П № 654 від 16.11.2005 р; № державної реєстрації 0106U001445, код КПКВ-2201920) і відповідно до теми держбюджетної науково-дослідної роботи кафедри технології консервування ОНАХТ "Розробка біотехнологічних процесів виробництва харчових продуктів профілактичного та дієтичного призначення".

Мета і задачі досліджень. Метою роботи є одержання високоактивного ферментного препарату з переважною активністю глюкозооксидази, розробка технології його виробництва і використання.

Відповідно до поставленої мети необхідно було вирішити наступні задачі:

- провести скрінінг мікроорганізмів, продукуючих глюкозооксидазу;

- вивчити особливості культивування гриба *Asp. niger* ATCC 166808 на різних живильних середовищах;
- розробити режим екстракції внутрішньоклітинної глюкозооксидази та її концентрування й очищення;
- розробити спосіб іммобілізації глюкозооксидази в поліакриламідний гель;
- визначити глюкозооксидазну активність препарату глюкозооксидази та її іммобілізованої форми;
- дати характеристику фізико-хімічних властивостей ферментних препаратів глюкозооксидази;
- дослідити і визначити оптимальні параметри ферментативного гідролізу сахарози β-фруктофуранозідазою;
- дослідити процес окиснення водних розчинів глюкози та інвертного сиропу глюкозооксидазою;
- розробити технологічну схему одержання фруктозо-глюконових сиропів;
- розробити технологію одержання фруктоовочевих нектарів;
- розробити нормативну документацію на нові види нектарів.

Об'єкт досліджень – технологія ферментного препарату глюкозооксидази і її використання для виробництва діабетичних сиропів, фруктоовочевих нектарів.

Предмет досліджень – глюкозооксидаза зі штаму гриба *Asp. niger*, фруктозо-глюконовий сироп, діабетичні фруктоовочеві нектари.

Методи досліджень – загальноприйняті і спеціальні фізико-хімічні, хімічні, біохімічні методи.

Наукова новизна отриманих результатів.

Обґрунтовано вибір штаму гриба *Asp. niger* ATCC 166808 як продуцента внутрішньоклітинної глюкозооксидази; вивчено умови його культивування на різних поживних середовищах; розроблено параметри ГО екстракції з біомаси, концентрування й очищення; встановлено високу збереженість її активності при іммобілізації в поліакриламідний гель.

Розроблено технологічну схему одержання внутрішньоклітинної глюкозооксидази і досліджено її властивості.

Визначено оптимальні параметри процесу окиснення глюкози в глюконову кислоту.

Показано можливість використання глюкозооксидази для одержання фруктозних сиропів на основі продуктів інверсії сахарози.

Науково обґрунтовано технологію виробництва діабетичних напоїв (нектарів) на основі морквяного і мангового пюре. Новизна технологічних рішень підтверджена видачею двох патентів "на корисну модель".

Практичне значення отриманих результатів. У результаті проведення комплексних аналітичних і експериментальних досліджень розроблено технологію культивування штаму гриба *Asp. niger* ATCC 166808, виділення внутрішньоклітинного ферменту глюкозооксидази, і його застосування для

одержання діабетичних фруктоовочевих нектарів. Новизна технічних рішень захищена двома патентами на "корисну модель".

Особистий внесок здобувача. Полягає в проведенні теоретичного обґрунтування й експериментальних досліджень процесів культивування *Asp. niger*, розробки способу вилучення ферменту з біомаси гриба, його очищення і застосування у виробництві фруктоовочевих напоїв; участь в обговоренні запропонованих рішень, виступ з доповідями на конференціях, публікації отриманих результатів.

Апробація результатів роботи. Основні результати дисертаційної роботи доповідалися та отримали позитивну оцінку на трьох наукових конференціях ОНАХТ (м. Одеса, 2005-2007 рр.), на Міжнародній науково-практичній конференції "Харчові технології-2005" (м. Одеса, 2005 р.) та "Харчові технології-2006" (м. Одеса, 2006 р.).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 7 наукових праць, у тому числі 3 статті у фахових виданнях, тези двох доповідей на наукових конференціях і 2 патенти на "корисну модель".

Структура й обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається з вступу, аналітичного огляду патентно-інформаційної літератури, експериментальної частини, висновків, списку використаних літературних джерел і додатків.

Основний текст роботи викладений на 149 сторінках комп'ютерного тексту, містить 20 таблиць (11 сторінок) і 31 рисунок (14 сторінок), список літературних джерел, що включає 198 найменувань та 4 додатка.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У вступі обґрунтовано актуальність роботи. Сформульовано мету і задачі досліджень, показано наукову новизну і практичну цінність роботи.

В першому розділі "Загальна характеристика мікроорганізмів, продукуючих органічні кислоти", наведено результати аналітичного огляду науково-технічної літератури. Визначено актуальність і перспективність використання мікроорганізмів, продукуючих глюкозооксидазу, як ферменту, що знайшов застосування в різних галузях харчової промисловості: для попередження окислення шляхом видалення кисню повітря з вершкового масла, яєчного порошку, для підвищення стійкості пива, вина, соків. Перетворення глюкози в глюконову кислоту перешкоджає потемнінню харчових продуктів внаслідок протікання сахароамінних реакцій (реакції Майяра).

За допомогою глюкозооксидази, у безкисневому середовищі можна зберігати тривалий час сир, сире м'ясо, борошно, крупу та інші продукти. Очищені препарати глюкозооксидази використовуються як засіб для обробки зовнішніх ран і опіків. Використання глюкозооксидази дозволить розширити асортимент функціональних продуктів, передусім для людей, хворих на цукровий діабет.

В другому розділі "Об'єкти і методи досліджень" наведена схема методологічної основи і взаємозв'язків етапів роботи з розробки технології одер-

жання глюкозооксидази та її застосування у виробництві діабетичних нектарів (рис. 1).

Об'єктом дослідження був штам *Asp. niger* ATCC 166808, який продукує внутрішньоклітинну глюкозооксидазу, та її використання при виробництві фруктоовочевих нектарів.

У роботі використовували сучасні і стандартні методи досліджень, що дозволили визначити хімічні, мікробіологічні показники вихідної сировини, напівфабрикатів і готових продуктів.

Основна частина експериментальних досліджень проведена на кафедрі технології консервування, в проблемній науково-дослідній лабораторії ОНАХТ. Вибір штаму гриба *Asp. niger* ATCC 166806, умови його культивування та режимів екстракції концентрування – в лабораторії кафедри харчових технологій і біотехнології університету Мосул (Ірак).

Для математичної обробки результатів використано метод найменших квадратів та стандартні програми пакета Microsoft Excel.

У третьому розділі "Виділення й очищення внутрішньоклітинної глюкозооксидази з *Asp. niger*" викладені результати експериментальних досліджень умов вирощування штамів грибів *Asp. niger* (ATCC 166808 і IMI 84305). Дана порівняльна характеристика обох штамів. Активність глюкозооксидази штаму *Asp. niger* ATCC 166808 склала 13090 од/дм³, тоді як для штаму *Asp. niger* IMI 84305 - 9785 од/дм³. У подальших дослідженнях використовували штам *Asp. niger* (ATCC 166808) (табл. 1).

Дослідження впливу природи субстрату на продукування глюкозооксидази штамом *Asp. niger* (ATCC 166808) показали, що наявність у живильному середовищі глюкози і сахарози дає кращі результати (рис. 2). Глюкоза, як легкозасвоюване джерело енергії, використовується грибом у першій фазі, а сахароза – у фазі інтенсивного росту. Так як утворення глюконової кислоти з глюкози залежить від величини рН (оптимум 5,5), при низьких концентраціях глюкози активна кислотність (рН) середовища знижується повільно, що сприяє синтезу грибом тільки глюконової кислоти.

Таблиця 1

Характеристика активності глюкозооксидази штамів грибів *Asp. niger* (ATCC 166808, IMI 84305)

Штам	Активність ферменту у фільтраті культури, од/см ³	Біомаса, г/дм ³	Повна активність ферменту, од/дм ³	Активність ферменту в клітинному екстракті, од/см ³	Об'єм клітинного екстракту, см ³
<i>Asp. niger</i> ATCC 166808	4,3	260	13090	119	110
<i>Asp. niger</i> IMI 84305	2,4	216	9785	103	95

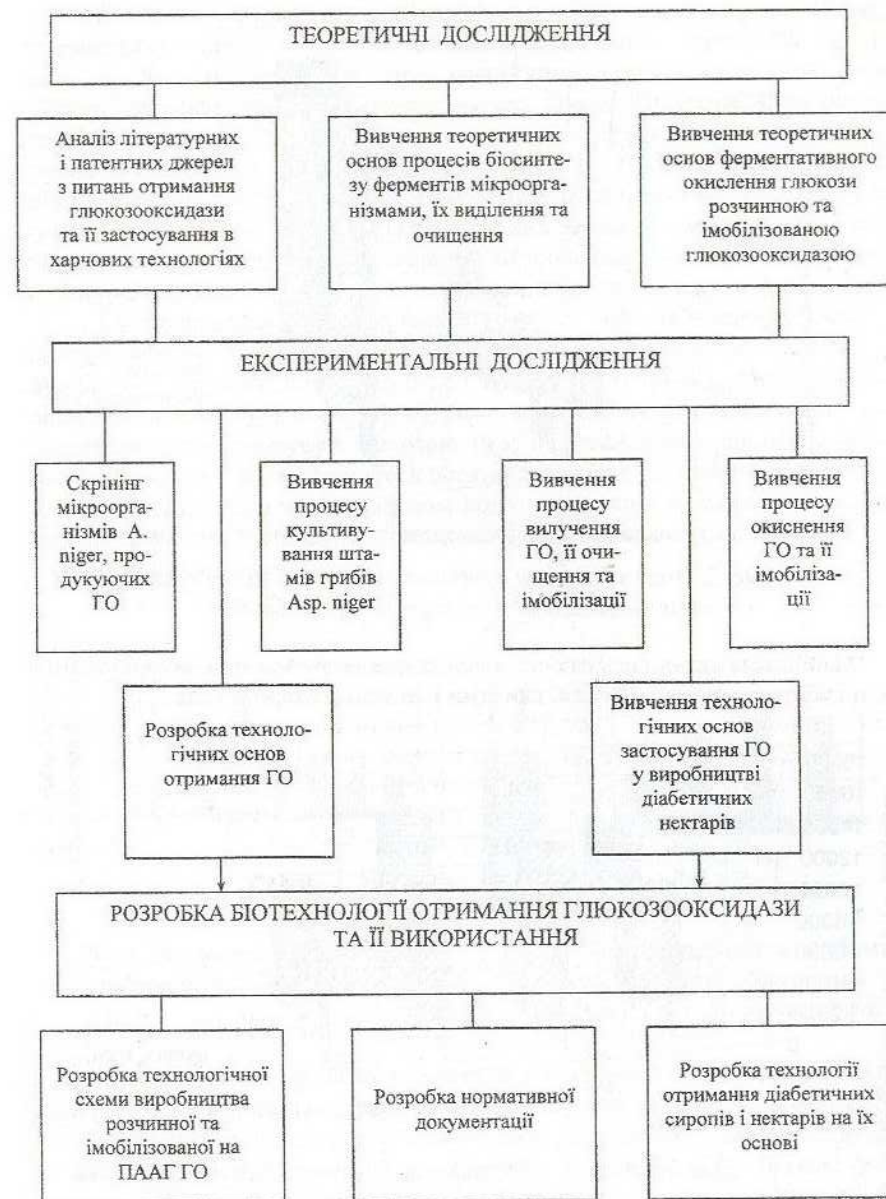


Рис. 1. Схема проведення експериментальних досліджень та взаємозв'язок етапів вирішення проблеми

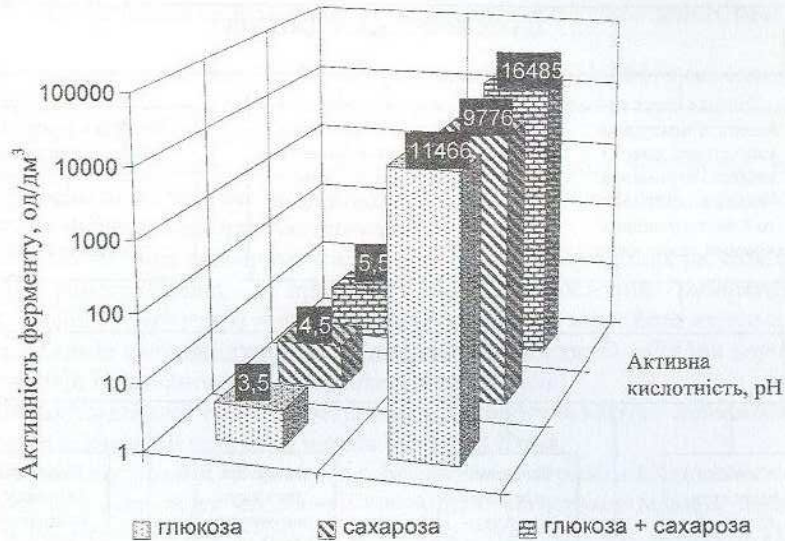


Рис. 2. Вплив природи цукрів на активність продукування глюкозооксидази *Asp. niger* ATCC 166808

Найбільша активність глюкозооксидази досягається при використанні у якості субстрату суміші 20 г/дм³ глюкози і 20 г/дм³ сахарози (рис. 3).

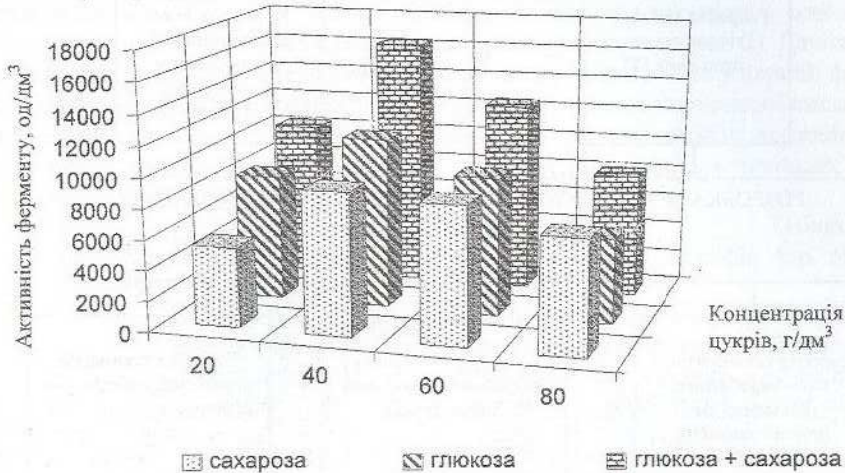


Рис. 3. Вплив концентрації цукрів у субстраті на активність продукування *Asp. niger* глюкозооксидази при рН = 5,5

Досліджено термін інкубації гриба *Asp. niger* при встановлених раніше параметрах: температура 30 °С, живильне середовище – суміш 20 г/дм³ глюкози + 20 г/дм³ сахарози, при постійному перемішуванні на качалці 125 хв⁻¹, що забезпечує необхідну кількість кисню. В перший день інкубації гриба активність ГО відсутня чи незначна. На другий день внутрішньоклітинна активність складала 102 од/см³, на третій – 159 од/см³. Через зниження рН з 5,5 до 3,5, продукування грибом фермента глюкозооксидази знижується (рис. 4). Внаслідок ушкодження клітинних мембран пероксидом водню і зниження рН, внутрішньоклітинна глюкозооксидаза починає переходити в культуральну рідину, особливо в значних кількостях на 6 і 7 добу інкубації.

Глюкозооксидаза з гриба *Asp. niger* ATCC 186808 є внутрішньоклітинним ферментом. Для руйнування клітин гриба використовували ультразвукову обробку. Після відділення культуральної рідини біомасу клітин заморожували при температурі мінус 15 °С, а при наступному розморожуванні у воді піддавали дії ультразвуку з частотою 10 кГц. Встановлено, що максимальний вихід ферменту і його активність досягається після 15 хвилин обробки (рис. 5). Фермент концентрували шляхом його осадження з екстракту охолодженим до мінус 5 °С ацетоном. Вплив співвідношення екстракт-ацетон на осадження білків наведено на рис. 6.



Рис. 4. Вплив терміну інкубації на продукування ферменту



Рис. 5. Вплив часу обробки біомаси *Asp. niger* ультразвуком на екстракцію глюкозооксидази

Осад, отриманий після осадження і промивання охолодженим ацетоном (-5 °С), сушили на повітрі. Глюкозооксидазна активність порошку складала 2598 од/мг білка. При наступному фракціонуванні ферментного препарату на Сефадексі G-150 отримано три білкових фракції (рис. 7). Білкові фракції елюента 13...14, 41...55 не володіли глюкозооксидазною активністю. Найвища активність 8270 од/мг білка виявлено у фракціях 16...20.

Білкову фракцію 16...20 додатково піддавали фракціонуванню на колонці з ДЕАЕ-целлюлозою, елюент – 0,4 М розчин NaCl.

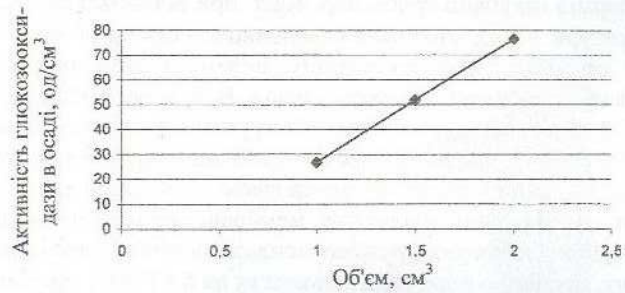


Рис. 6. Активність препаратів глюкозооксидази, отриманих при використанні різних співвідношень об'ємів ацетон-екстракту

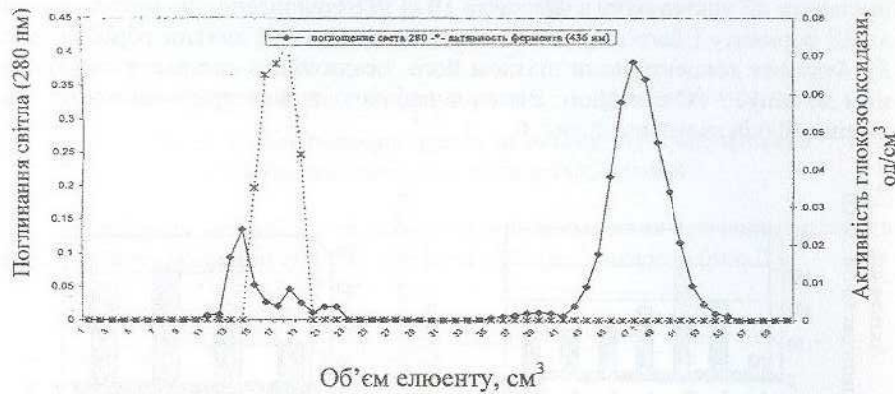


Рис. 7. Профілі елюції препарату глюкозооксидази на Сефадексі G-150 (буфер рН 6, швидкість витікання 12 см³/год.)

Порівнюючи глюкозооксидазні активності фракцій 16 ...20, отриманих на Сефадексі G-150 і фракцій 32...41, що отримані на ДЕАЕ-целлюлозі (рис. 8), можна стверджувати про її індивідуальність.

Таким чином, осадження екстракту біомаси гриба *Asp. niger* ATCC 166808 ацетоном у співвідношенні 1:2 приводить до очищення ферментного препарату у 18,2 рази (табл. 2), при цьому глюкозооксидазна активність збільшується з 160 од/мг білка до 2958 од/мг білка. Наступне очищення препарату на Сефадексі G-150 і хроматографією на ДЕАЕ-целлюлозі збільшує його активність відповідно у 51,6 і 53,2 разів, а глюкозооксидазна активність препаратів становила 8270,8 і 8528 од/мг білку відповідно. Технологічну схему отримання глюкозооксидази з *Asp. niger* наведено на рис. 9.

З метою багаторазового використання глюкозооксидази в реакціях окислення розчинів глюкози, виділений ферментний препарат іммобілізували в

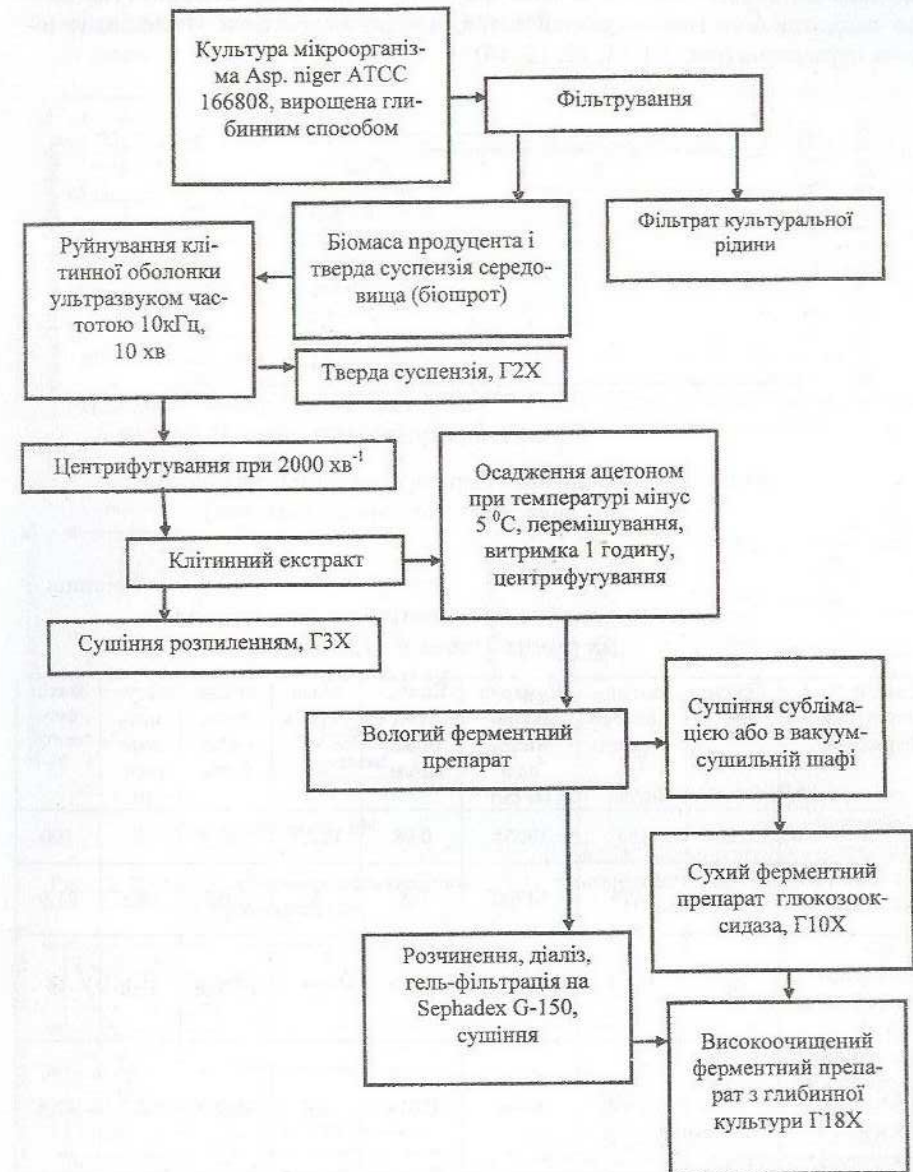


Рис. 9. Технологічна схема отримання глюкозооксидази *Asp. niger* штаму ATCC 166808 глибинним способом

поліакриламідний гелі. Включення ферменту у поліакриламідний гелі веде до зміщення його ізоелектричної точки, значення константи Міхаеліса та інших параметрів (рис. 10, 11, 12, 13, 14).

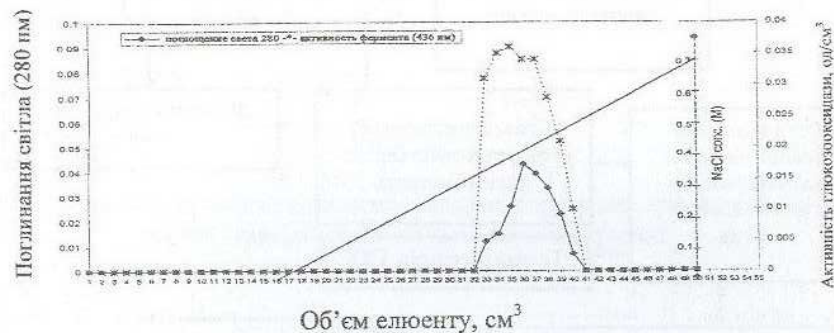


Рис. 8. Профілі елюції з *Asp. niger* на ДЕАЕ-целюлозі (буфер рН 6, швидкість витікання 25 см³/год)

Таблиця 2

Характеристика препаратів глюкозооксидази на різних етапах її отримання

Стадія очищення ферменту	Об'єм, см³	Активність ферменту, од/см³	Сумарна активність, од.в об'ємі	Концентрація білка, мг/см³	Маса білка в об'ємі, мг	Активність од/мг білка	Ступінь очищення	Вихід ферменту, %
Клітинний екстракт	115	157	18055	0,98	112,7	160,2	1	100
Осадження ацетоном	10	1479	14790	0,5	5	2958	18,5	81,9
Гель-фільтрація на Сефадексі Q-150	50	198,5	9925	0,024	1,2	8270,8	51,6	55
Іонообмінна хроматографія на ДЕАЕ-целюлозі	72	119,4	8596	0,014	1,0	8528,6	53,2	47,6

Константа Міхаеліса для вихідного і імобілізованого ферменту дорівнювала відповідно 34 і 43 ммоль/хв (рис. 15).

Кінетику окиснення глюкози імобілізованою внутрішньоклітинною глюкозооксидазою вивчали на модельних розчинах 0,5 моль/дм³ глюкози у фосфатному буфері рН 6 при температурі 25 °С. Встановлено, що чим більше

час контакту субстрату з імобілізованим ферментом, тим більше відсоток окиснення глюкози в глюконову кислоту (табл. 3).

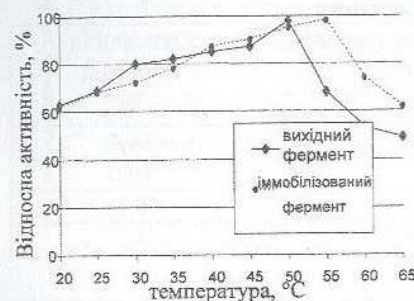


Рис. 9. Вплив температури на активність вихідної та імобілізованої ГО



Рис. 10. Вплив рН на активність вихідної та імобілізованої ГО

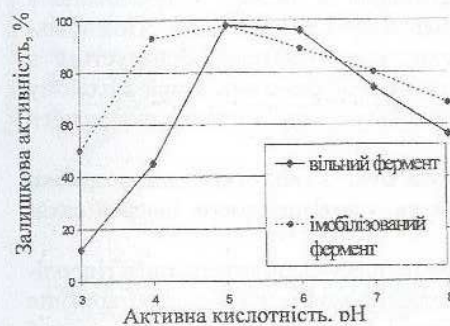


Рис. 12. Вплив рН на стабільність вихідної і імобілізованої ГО

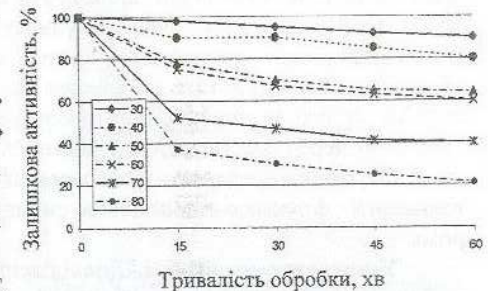


Рис. 13. Вплив температури і часу на активність імобілізованої ГО

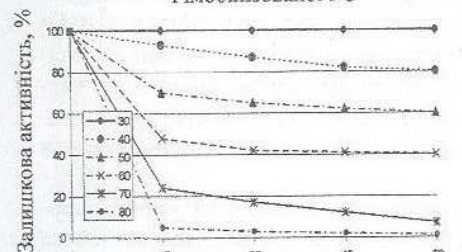


Рис. 14. Вплив температури і часу на активність вихідної ГО

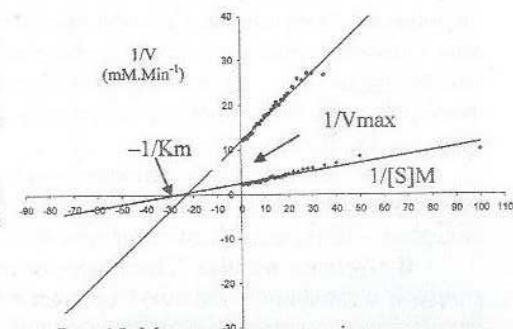


Рис. 15. Максимальна швидкість окиснення глюкози вихідною і імобілізованою ГО

Таблиця 3

Вплив тривалості контакту глюкози з іммобілізованою ГО
на ступінь її окиснення

Швидкість витікання розчину глюкози, см ³ /год	Термін контакту глюкози з ферментом, год	Окислення глюкози, %
5	2,4	18,4
15	0,77	10,0
30	0,39	8,1
60	0,20	4,3

Швидкість витікання розчину глюкози впливає на ступінь її окиснення і становить 18,4 %; 10,0 %; 8,1 %; 4,3 % при швидкості витікання 5; 15; 30; 60 см³/год відповідно.

Однак, розрахунок швидкості окислення більше при більш високій швидкості витікання. При швидкості витікання 5 см³/год, в порівнянні з 60 см³/год, час контакту субстрату з ферментом у 12 разів більше. При збільшенні швидкості витікання відсоток окиснення глюкози збільшується з 18,4 % до 51,6 %. Процес окиснення глюкози необхідно вести при високому ступені витікання шляхом багаторазового пропускання частково окисненого субстрату через іммобілізований фермент.

Отримані препарати глюкозооксидази були використані для розробки технології фруктозо-глюконових сиропів на основі продуктів інверсії сахарози.

У четвертому розділі "Дослідження процесу ферментативного гідролізу сахарози фруктофуранозидазою" наведено умови процесу перетворення сахарози у інвертний сироп, який складається з рівних кількостей глюкози і фруктози.

Для одержання діабетичних сиропів, які не містять глюкозу, використовували найбільш поширений вуглевод-сахарозу, яка складається з α -D-глюкози і β -D-фруктози. Гідроліз сахарози проводили ферментативним шляхом з використанням фруктофуранозидази. Досліджували вплив масової частки сахарози (рис. 16), концентрації ферменту (рис. 17), температури, величини рН, тривалості процесу на ступінь гідролізу водних розчинів сахарози (рис. 18, 19, 20, 21).

Отримані кінетичні закономірності дозволили визначити умови одержання інвертного сиропу: концентрація ферменту 50 мг/дм³, масова частка сахарози – 10 %, рН 4,5, температура 40°C, 5 годин (рис. 19, 20).

В п'ятому розділі "Дослідження процесу окиснення водних розчинів глюкози в глюконову кислоту" приведено результати досліджень впливу масової частки глюкози на швидкість і глибину її окиснення (рис. 22).

На глибину процесу окиснення впливає масова частка ферменту (рис. 23).



Рис. 16. Вплив концентрації сахарози на глибину її гідролізу ($t = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2 год)



Рис. 17. Вплив концентрації фруктофуранозидази на глибину гідролізу сахарози ($t = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2 год)

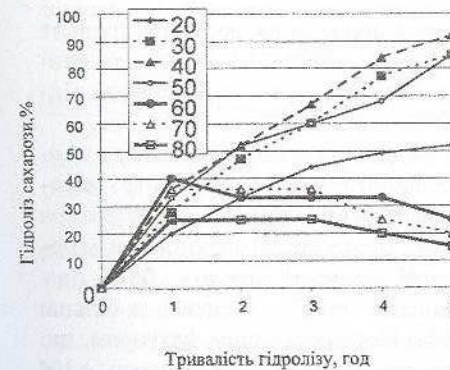


Рис. 18. Вплив температури на глибину гідролізу 10 %-го розчину сахарози



Рис. 19. Вплив рН середовища на глибину гідролізу сахарози фруктофуранозидазою

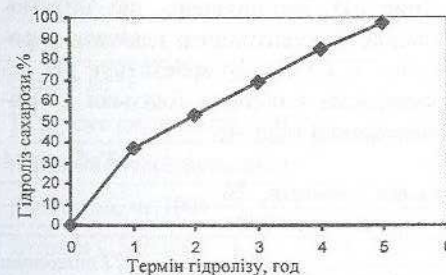


Рис. 20. Залежність ступеню гідролізу сахарози фруктофуранозидазою від тривалості процесу

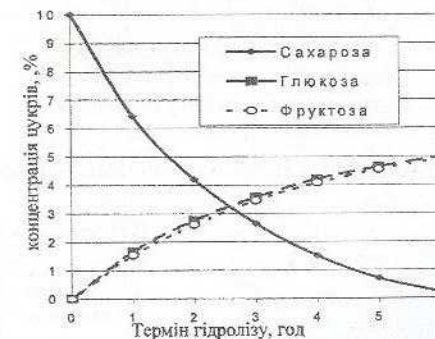


Рис. 21. Кінетика гідролізу 10 %-го розчину сахарози фруктофуранозидазою



Рис. 22. Вплив масової частки глюкози на глибину її окислення

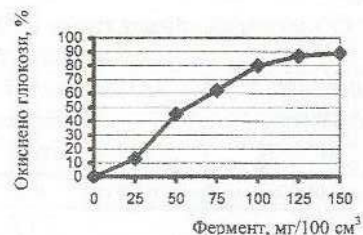


Рис. 23. Вплив концентрації ферменту на окислення 5%-го водного розчину глюкози

Встановлено, що при однакових умовах проведення дослідів, процент окиснення складає 85 % при масовій частці глюкози 2 %, 75...80 % при концентрації 4...5 %, підвищення концентрації глюкози до 8 і 10 % складає відповідно 40 % і 33 %.



Рис. 24. Зміна рН середовища в залежності від концентрації глюкози та тривалості процесу окиснення

Показано, що при обраних умовах проведення експерименту: масова частка глюкози 5 %, температура 30 °С, тривалість 10 годин при активності глюкозооксидази 36,2 од/г глюкози, ступінь окиснення більше 85 %. Найважливішим фактором, що впливає на окиснення глюкози, є рН середовища. Відхилення рН реакційного середовища від рН оптимального (5,5) у кислу сторону веде до зниження швидкості процесу окиснення (рис. 24). Встановлено, що оптимальною концентрацією глюкози в розчині є 4-6 %, що забезпечує рН середовища в області, близької до оптимального.

Вуглеводний склад сиропу наведено в табл. 4.

Таблиця 4

Продукт	Вуглеводний склад сиропів, %				
	Вміст, г/100 г				
	Сухі розчинні речовини	Сахароза	Глюкоза	Фруктоза	Глюконова кислота
10 %-ний цукровий сироп	10,0	9,98	0,0	0,0	0,0
Інвертний сироп	10,1	0,1	4,9	4,9	0,0
Фруктозо-глюконовий сироп	10,1	0,1	0,1	4,9	4,9

Методами високоефективної рідинної та тонкошарової хроматографії встановлено вуглеводний склад сиропу, отриманого шляхом окиснення суміші глюкози і фруктози (інвертний сироп) глюкозооксидазою. При масовій частці розчинних сухих речовин 10 % в сиропі вміст глюкози складає 0,1 %, сахарози – 0,1 %, фруктози 4,9 %, глюконової кислоти – 4,9 %.

У шостому розділі "Розробка технології фруктоовочевих нектарів" показано практичне застосування ферментного препарату з глюкозооксидазною активністю для одержання продуктів спеціального призначення. Наведено дві схеми одержання нектарів з плодів манго (рис. 25) із морквяного поре-напівфабрикату. Розроблено рецептури діабетичних нектарів з урахуванням вимог до продуктів спеціального призначення, у яких сумарний вміст сахарози і глюкози не перевищував 3 %.

Нектари, отримані за розробленою технологією, фасували в скляну тару типу III ємністю 1 дм³ і стерилізували за науково обґрунтованими режимами: нектар із манго – $\frac{20-35-30}{100^{\circ}\text{C}}$ Р, для морквяного нектару – $\frac{20-40-30}{100^{\circ}\text{C}}$ Р. Розшифровка летальності режимів (A_{80}^{15}) показала, що її значення відповідає умовам науково обґрунтованих режимів стерилізації для соків з м'якоттю.

Біохімічний склад діабетичних нектарів представлений в табл. 5. На підставі отриманих результатів розроблена нормативна документація на нектари з плодів манго і морквяного поре-напівфабрикату.

Таблиця 5

Хімічний склад діабетичних нектарів з поре манго та моркви

Показники	Пюре з моркви	Морквяний нектар	Пюре з манго	Манговий нектар
Розчинні сухі речовини, %	7,0	8,7	16,0	15,8
Глюкоза, %	0,9	1,4	0,7	0,35
Фруктоза, %	0,9	3,2	2,9	5,3
Сахароза, %	5,0	1,4	9,4	2,5
Титрусма кислотність, г/100г	0,15	2,57	0,7	2,3
Активна кислотність, рН	4,7	4,0	3,9	3,2
β-каротин, мг/100г	10,3	5,1	8,0	4,0
Вітамін С, мг/100г	6,0	3,0	26,0	13,0

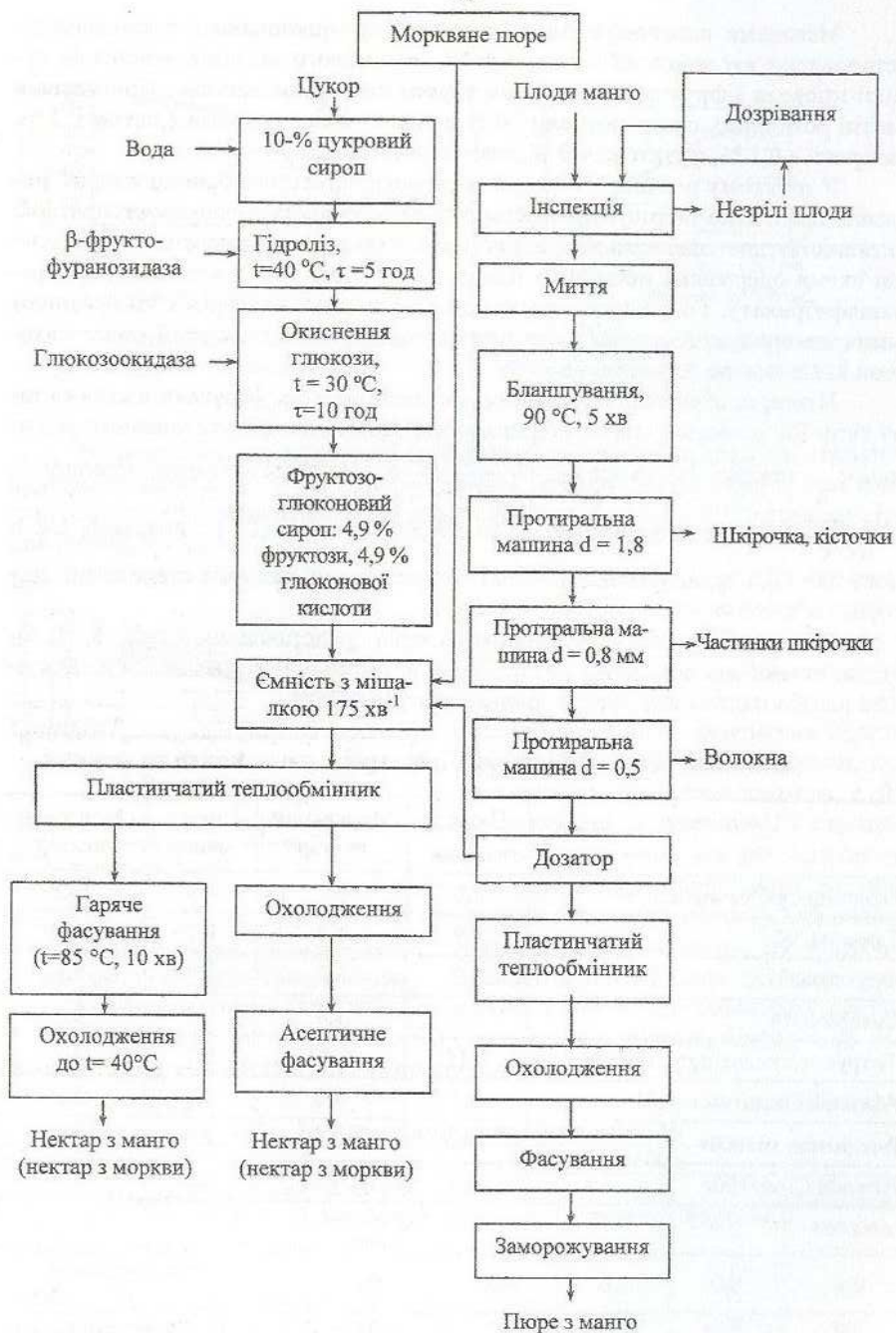


Рис. 25. Технологічна схема отримання нектарів

Висновки

1. На підставі узагальнених результатів експериментальних і аналітичних досліджень обґрунтована можливість використання штаму гриба *Asp. niger* ATCC 166808 для одержання внутрішньоклітинної глюкозооксидази.

2. Розроблено параметри культивування гриба *Asp. niger* на живильних середовищах цукрів із суміші глюкози і сахарози у концентраціях 20 г/дм³, що забезпечують максимальне продукування глюкозооксидази.

3. Розроблено параметри екстракції внутрішньоклітинної глюкозооксидази з біомаси гриба *Asp. niger*, підданій ультразвуковій обробці протягом 10 хв при 10 кГц. Ступінь очищення препарату при осадженні ацетоном підвищився в 18,5 разів, гель-фільтрації на Сефадексі G 150 – в 51,6 разів, на ДЕАЕ – в 53,2 рази. При цьому активність глюкозооксидази в препаратах склала відповідно 2958, 8270 і 8256 од/мг білка.

4. Розроблено спосіб іммобілізації розчинного препарату глюкозооксидази в поліакриламідному гелі. Встановлено характеристику фізико-хімічних властивостей розчинної та іммобілізованої форм ферменту.

5. Визначено закономірності впливу на ступінь інверсії сахарози температури, концентрації цукрів і ферменту, тривалості інверсії. Встановлено оптимальні параметри процесу гідролізу сахарози інвертазою (β -фруктофуранозидазою): концентрація сахарози 10 %, масова частка фруктофуранозидози 50 мг/100 г сахарози, температура 40 °С, тривалість 2 год.

6. Визначено закономірності впливу на процес окиснення концентрації глюкози і ферменту, тривалості процесу і рН середовища. Встановлено параметри окиснення розчинів з глюкозою глюкозооксидазою: концентрація глюкози в субстраті 5 %, глюкозооксидази 36,2 од/г глюкози, рН 5,0...5,5.

7. Розроблено технологію виробництва діабетичних фруктозо-глюконових сиропів на основі продуктів окислення інвертних цукрів і технологія фруктоовочевих нектарів спеціального призначення. Розроблено нормативну документацію на діабетичні нектари. Наукова новизна підтверджена патентами на "корисну модель" "Спосіб виробництва фруктозо-глюконового сиропу" і "Нектар діабетичного призначення".

ПЕРЕЛІК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Безусов А.Т. Розробка технології виділення глюкозооксидази з культуральної рідини *Asp. niger* / А.Т. Безусов, Аббас А.Я. Абдулазиз, І.Р. Біленька // Наукові праці Одеської національної академії харчових технологій. – Одеса: 2006. – Вип. 28. – Т. 1. – С. 60 – 63.

Автором проведені дослідження впливу різних факторів на продукування грибом *A. niger* глюкозооксидази. Встановлено параметри екстракції внутрішньоклітинної глюкозооксидази із біомас та розроблено принципову технологічну схему отримання ферменту.

2. Безусов А.Т. Иммобилизация глюкозооксидазы из *Asp. niger* ATCC 166808 / А.Т. Безусов, Аббас А.Я. Абдулазиз, И.Р. Беленькая // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2007. – № 5. – С. 24-29.

Автором встановлені оптимальні умови іммобілізації глюкозооксидази шляхом включення ферменту в поліакриламідний гель. Досліджено вплив різних факторів на активність іммобілізованого ферменту.

3. Безусов А.Т. Розробка технології нектарів спеціального призначення./ А.Т. Безусов, Біленька І.Р., Аббас А.Я. Абдулазиз // Харчова і переробна промисловість, квітень, 2007, –С. 23-25.

Автором проведені дослідження процесу гідролізу сахарози інвертазою, вплив різних факторів (температури, масової частки сахарози та ферменту, тривалість гідролізу) на ступінь її гідролізу. Встановлено оптимальні параметри окислення розчинів, які містять глюкозу. Розроблено принципову технологічну схему отримання діабетичних нектарів на основі фруктозо-глюконового сиропу та фруктоовочевих пюре.

4. Позитивне рішення України, МПК С 13 К II/00, С 13 F 3/00 "Спосіб виробництва фруктозо-глюконового сиропу"/ Безусов А.Т., Біленька І.Р., Абдулазиз А. Я. Аббас., № 200700988, Заяв. 31.01.2007.

Автором розроблені технологічні параметри виробництва фруктозо-глюконового сиропу.

5. Позитивне рішення України, МПК С 13 К II/00, С 13 F 3/00 "Нектар діабетичного призначення"/А.Т. Безусов, І.Р. Біленька, Аббас А. Я. Абдулазиз, № 200700990, Заяв. 31.01.2007.

Автором розроблено технологічні параметри виробництва нектарів із плодів манго та моркви.

6. Безусов А.Т., Абдулазиз А. Я. Аббас., Біленька І.Р. Розробка технології виділення глюкозооксидази з культуральної рідини *A. niger*./Тези доповідей I міжнародної науково-практичної конференції "Харчові технології – 2005" 12 – 14 вересня, 2005 р. – Одеса, 2005, - С. 59.

Автором встановлено раціональні умови виділення внутрішньоклітинної глюкозооксидази із біомаси гриба *A. niger* та запропонована технологічна схема отримання ферменту.

7. Абдулазиз А. Я. Аббас. Розробка способу виробництва фруктозних сиропів для лікувально-профілактичних фруктоовочевих нектарів./ Тези доповідей II міжнародної науково-практичної конференції "Харчові технології – 2006" 17 – 19 жовтня, 2006 р. – Одеса, 2006. С. 216.

Автором встановлено параметри гідролізу розчину сахарози фруктозо фуранозідазою, та умови окислення глюкози інвертного сиропу. Запропонована технологічна схема отримання фруктозо-глюконових сиропів та нектарів на їх основі.

Анотація

Абдулазиз Абду Яхья Аббас. Отримання та використання глюкозооксидази в технології харчових продуктів. Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата технічних наук за фахом 03.00.20 – біотехнологія. – Одеська національна академія харчових технологій, Одеса, 2007.

Дисертаційна робота присвячена розробці технології отримання внутрішньоклітинної глюкозооксидази із штама гриба *Asp. niger* ATCC 166808 та його використання для виробництва діабетичних фруктоовочевих нектарів.

Встановлено параметри культивування гриба *Asp. niger* на живильних середовищах, які складаються з суміші глюкози і сахарози в концентраціях 20 г/дм³ та забезпечують максимальне продукування глюкозооксидази.

Розроблено параметри екстракції внутрішньоклітинної глюкозооксидази з біомаси гриба *Asp. niger*, її концентрування та очищення.

Розроблено метод іммобілізації препарату глюкозооксидази в поліакриламідний гель. Надано характеристику фізико-хімічних властивостей розчинної та іммобілізованої форм фермента.

Досліджено та встановлено параметри процесу гідролізу сахарози інвертазою, визначено закономірності впливу на ступінь інверсії масової частки цукру, фермента, температури.

Досліджено процес окислення водних розчинів глюкози, інвертного сиропу глюкозооксидазою. Встановлено оптимальні параметри: масова частка глюкози в розчині 5 г/100 г, глюкозооксидази 36,2 од/г глюкози, рН 5,0 – 5,5.

Розроблено технологію виробництва діабетичних фруктозо-глюконових сиропів та нектарів спеціального призначення з мангового та морквяного пюре. Досліджено біохімічний склад одержаних нектарів.

Ключові слова: гриб *Aspergillus niger*, глюкозооксидаза, іммобілізація, фруктозо-глюконовий сироп, діабетичні фруктоовочеві нектари, технологія.

Аннотация

Абдулазиз Абду Яхья Аббас. Получение и использование глюкозооксидазы в технологии пищевых продуктов. Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. – Одесская национальная академия пищевых технологий. – Одесса, 2007.

Диссертация посвящена разработке технологии получения внутриклеточной глюкозооксидазы из штамма гриба *Asp. niger* ATCC 166808 и ее использования при производстве диабетических фруктоовошных нектаров.

Разработаны параметры культивирования гриба *Asp. niger* на питательных средах, состоящих из смеси глюкозы и сахарозы в концентрациях 20 г/дм³, обеспечивающих максимальное продуцирование глюкозооксидазы.

Разработаны параметры экстракции внутриклеточной глюкозооксидазы из биомассы гриба *Asp. niger*, подвергнутой ультразвуковой обработке в течение 10 мин при 10 кГц, концентрирование и очистку.

Разработан способ иммобилизации растворимого препарата глюкозооксидазы на полиакриламидном геле. Дана характеристика физико-химических свойств растворимой и иммобилизованной форм фермента.

Установлены оптимальные параметры процесса гидролиза сахарозы инвертазой (β -фруктофуранозидазой) и определены закономерности влияния на степень инверсии сахарозы температуры, массовой доли субстрата и фермента, времени инверсии.

Установлены оптимальные параметры окисления растворов, содержащих глюкозу, глюкозооксидазой. Определены закономерности влияния на процесс окисления массовых долей глюкозы и фермента, времени и рН среды. Концентрация глюкозы в субстрате 5 %, глюкозооксидазы 36,2 од/г глюкозы, рН 5,0...5,5.

Разработана технология производства диабетических фруктозо-глюконовых сиропов на основе продуктов окисления инвертных сахаров и технология фруктоовошных нектаров специального назначения. Разработана нормативная документация на диабетические нектары. Научная новизна подтверждена патентами на

"полезную модель" "Спосіб виробництва фруктозо-глюконового сиропу" и "Нектар діабетичного призначення".

Ключевые слова: гриб *Aspergillus niger*, глюкозооксидаза, иммобилизация, фруктозо-глюконовый сироп, диабетические фруктовоовощные нектары, технология.

Summary

Abdulaziz Abdo Yahya Abbas. Glucose oxidase receiving and using in products food technology. – Manuscript.

The dissertation for a scientific degree of a candidate of technical science on speciality 03.00.20 – biotechnology. – Odessa National Academy of Food Technologies of Ministry of Education and Science of Ukraine, Odessa, 2007.

The dissertation is devoted to the technology of intracellular glucose oxidase elaboration from *Asp. niger* ATCC 166808 and its using in a diabetic fruity-vegetable nectars production.

Parameters of *Asp. niger* cultivation on nutrient medium, which consist of glucose and sucrose mixture in a 20 g\l concentration and causes maximum glucose oxidase production was elaborated.

Extraction parameters of intracellular glucose oxidase from *Asp. niger* biomass, which was undergo the ultra sound treatment in 15 min time by 10 kHz, concentration and purification was elaborated.

The way of glucose oxidase soluble preparation immobilization in a polyacrelamid gel was elaborated.

The characteristic of physical-chemical properties of soluble and immobilized enzyme forms was given.

The optimum parameters of sucrose hydrolysis by invertase and influence appropriateness of sucrose inversion degree by temperature, substrate and enzyme amount, inversion time was determined.

The optimum parameters of solution oxidation by GOX, which contain glucose was determined. The appropriateness of glucose and enzyme, time and pH influence on oxidation process was elaborated. The glucose concentration in substrate is 5 %, GOX – 36,2 unit\g glucose, pH 5,0...5,5.

The technology of diabetic fruity-vegetable syrup production on a base of inversion sacchared oxidation products and special application fruity-vegetable nectars technology.

Key words: *Aspergillus niger*, glucose oxidase, immobilization, fructose-gluconic syrup, diabetic fruity-vegetable nectars, technology.

Підписано до друку 18.05.2007 р. Формат 60×90/16
Об'єм 0,9 умов. друк. арк.. Замовлення № 20. Тираж 100 прим.