

# Биотехнология, бионанотехнология и технология сахаристых продуктов

---

УДК 573.6.086.835

Профессор О.С. Корнеева, доцент О.Ю. Гойкалова  
(Воронеж. гос. ун-т инж. технол.) кафедра биохимии и биотехнологии.  
тел. (473) 255-55-57  
E-mail: olga\_bojko2005@mail.ru

Professor O.S. Korneeva, associate Professor O.Iu. Goykalova  
(Voronezh state university of engineering technologies) Department of biochemistry and biotechnology. phone (473) 255-55-57  
E-mail: olga\_bojko2005@mail.ru

## Исследование процесса биотрансформации сахарозосодержащего сырья с целью получения изомальтулозы

## Research of biotransformation process of containing sugar raw for isomaltulose receiving

Реферат. Изучен процесс биотрансформации сахарозосодержащего сырья изомальтулозосинтазой бактерий рода *Erwinia* с целью получения изомальтулозы – натурального сахарозаменителя. Для получения изомальтулозы использовали тростниковый сахар-сырец, свекловичную мелассу и сироп сахарного сорго. Установлено, что тростниковый сахар-сырец может выступать в качестве субстрата в ферментативной реакции биотрансформации наряду с чистой сахарозой. Выход изомальтулозы при трансформации сахара-сырца был сопоставим с контролем и составил 97 % за 3,5 ч при оптимальных условиях изомеризации (рН 6,0, 30 °С, дозировка фермента 5 Е/мг сахарозы). Научно обоснованы причины снижения степени трансформации мелассы, сиропа сахарного сорго. Исследовано влияние несхаров, сопровождающих основные сахарозосодержащие субстраты – тростниковый сахар-сырец, мелассу, сироп сахарного сорго, при их биокаталитическом превращении. Доказано ингибирующее воздействие ионов металлов (алюминий, железо), анионов неорганических кислот (нитратов, хлоридов, фосфатов), аминокислот (серин, аспарагиновая кислота), органических кислот (лимонная, уксусная кислоты) на процесс биотрансформации чистой сахарозы. Снижение степени изомеризации сахарозы в присутствии исследуемых несхаров наблюдалось в пределах от 50 до 65 % по сравнению с контролем. Активирующее воздействие на изомальтулозосинтазу и, как следствие, выход изомальтулозы установлено для солей кальция и марганца в виде их сульфатов. Введение данных компонентов в раствор чистой сахарозы приводило к увеличению выхода изомальтулозы на 30,5 и 13,2 % соответственно. Полученные данные будут положены в основу исследований по оптимизации процесса биотрансформации различных источников растительного сырья, богатых сахарозой, с целью получения изомальтулозы.

Summary. The process of biotransformation containing sugar raw isomaltulosesynthase bacteria of the genus *Erwinia* to produce isomaltulose - natural sugars substitute. Raw cane sugar, beet molasses and sweet sorghum syrup used for isomaltulose. It was established that cane sugar may serve as a substrate for the enzymatic reaction together with biotransformation of pure sucrose. Yield of isomaltulose in the transformation of raw sugar was comparable to the control and was 97% for 3,5 hours at the optimal isomerization conditions (pH 6,0, 30 °C, the enzyme dosage of 5 U / mg of sucrose). Scientifically substantiated reasons for reducing the degree of transformation of molasses, sugar syrup strength sorghum. The influence of non-sugars accompanying basic substrates - raw cane sugar, molasses, sweet sorghum syrup, when biocatalytic transformation. Proved inhibitory effect of metal ion (aluminum , iron) , anions of inorganic acids ( nitrate , chloride , phosphate ) , amino acids (serine , aspartic acid -hand ) , organic acids ( citric acid, acetic acid), the process of biotransformation , the formation of sucrose. Reducing the degree of isomerization in the presence of sucrose was observed in the study of non-sugars from 50 to 65 % compared with the control. Isomaltulosesynthase activating effect on , and consequently , the yield of isomaltulose to set calcium and manganese in the form of their sulfates. The introduction of these components into a solution of pure sucrose increases the yield of isomaltulose by 30.5 and 13.2 % respectively. The data obtained will be the basis of studies to optimize the process of biotransformation of various sources of vegetable raw materials rich in sucrose to produce isomaltulose.

*Ключевые слова:* биотрансформация, сахароза, *Erwinia rhapontici*, изомальтулоза, изомальтулозосинтаза, металлы, аминокислоты, органические кислоты.

*Keywords:* biotransformation, sucrose, *Erwinia rhapontici*, isomaltulose, isomaltulosesynthase, metals, amino acids, organic acids.

---

© Корнеева О.С., Гойкалова О.Ю., 2014

Как известно, углеводы являются активными участниками обмена веществ и источниками энергии в организме человека. Однако в последнее время наблюдается неуклонный рост числа заболеваний, связанных с нарушениями обмена веществ, сердечнососудистой системы, ожирением, при которых сахара должна быть исключена из рациона питания. В связи с этим получение безвредных натуральных сахарозаменителей с функциональными свойствами является одной из важнейших медико-социальных проблем профилактики и лечения ряда заболеваний.

Изомальтулоза (изомер сахарозы) является натуральным заменителем сахара, который присутствует в меде и соке сахарного тростника. По сравнению с другими сахарозаменителями изомальтулоза отличается низким гликемическим индексом (2 ед), низкой калорийностью (2 ккал/г), чистым сладким вкусом, некариогенностью, отсутствием тератогенного воздействия [1, 2].

На кафедре биохимии и биотехнологии ВГУИТ разработана биотехнология изомальтулозы из сахарозы с помощью высокоактивной изомальтулозосинтазы бактерий рода *Erwinia*. Однако использование в качестве субстрата чистой сахарозы значительно увеличивает стоимость изомальтулозы. В связи с этим цель работы состояла в изучении процесса биотрансформации сахарозосодержащего сырья (тростниковый сахар-сырец, свекловичная меласса, сироп сахарного сорго) для получения изомальтулозы.

Объектом исследования служили бактерии *E. rhapsodicus* штамм В-9292 (ВКПМ, г. Москва). Для поддержания и выращивания *E. rhapsodicus* использовали мясо-пептонный агар. Культивирование и осаждение бактерий проводили как описано в [3, 4]. Количество изомальтулозы определяли по методу Сомджи-Нельсона, а также с использованием тонкослойной хроматографии. Динамику трансформации сахарозосодержащего сырья изучали при температуре 30 °С, рН 6,0, дозировке фермента 5 Е/мг сахарозы и продолжительности процесса 3-3,5 ч.

Изучение процессов трансформации различных видов сахарозосодержащего сырья изомальтулозосинтазой показало, что для получения изомальтулозы оптимальным субстратом является тростниковый сахар-сырец, так как ход процесса биотрансформации практически не отличается от контроля (субстрат - чистая сахароза). Как видно из рисунка 1, степень трансформации сахарозы и сахара-сырца достигала максимума (97 %) за 3-3,5 ч. Тогда

как в опыте с мелассой и сиропом сахарного сорго к этому времени выход изомальтулозы составлял лишь 45 % и 65 % соответственно.

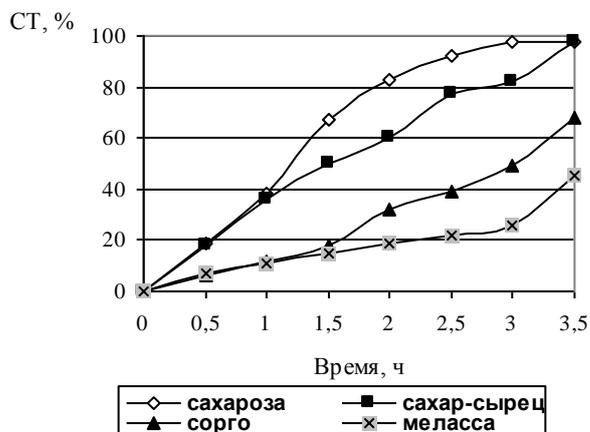


Рисунок 1. Динамика процесса трансформации сахарозосодержащих продуктов (СТ – степень трансформации)

Подобные результаты были получены в экспериментах с добавлением исследуемых субстратов в концентрации 0,5 масс. % к 5 % раствору чистой сахарозы. Ингибирование процесса биотрансформации также наблюдалось в опыте со свекловичной мелассой и сиропом сахарного сорго (степень трансформации к 3-му часу процесса снижалась на 14,5 и 18,7 % соответственно). Интенсивнее всего процесс наблюдался в пробе с содержанием тростникового сахара-сырца. Предположительно снижение степени трансформации сахарозы в составе мелассы и сиропа сахарного сорго провоцировали несахара, входящие в их состав.

С целью научного обоснования полученных результатов эксперимента нами исследовалось влияние некоторых несахаров, сопровождающих тростниковый сахар-сырец, мелассу, сироп сахарного сорго на процесс биотрансформации чистой сахарозы. Анализируя химический состав исследуемых видов сырья, установили, что наибольшим разнообразием несахаров отличается меласса, а именно, по зольному составу, по количеству некоторых аминокислот, а также углеводов и витаминов. В связи с этим нами было изучено влияние некоторых ионов металлов, анионов неорганических кислот, аминокислот и органических кислот на процесс биотрансформации сахарозы.

Из металлов для исследования были использованы алюминий, калий, марганец, кальций, железо и магний в виде сульфатов и хлоридов (1,5 масс. %). Среди анионов в реакционную смесь вводили  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{CaSO}_4$  (1 масс. %). Для исследования влияния аминокислот на процесс биотрансформации сахарозы использовали аспарагиновую кислоту,

серин, аланин и глицин, из органических кислот - лимонную, янтарную и уксусную (1 масс. %). Выбранное значение концентрации исследуемых компонентов реакционной смеси было экспериментально обосновано.

Анализируя полученные данные, установили, что явное стимулирующее действие на процесс трансформации сахарозы оказывали ионы кальция и марганца (в виде сульфатов), степень трансформации которых превышала контроль на 30,5 и 13,2 % соответственно. Результаты представлены на рисунке 2.

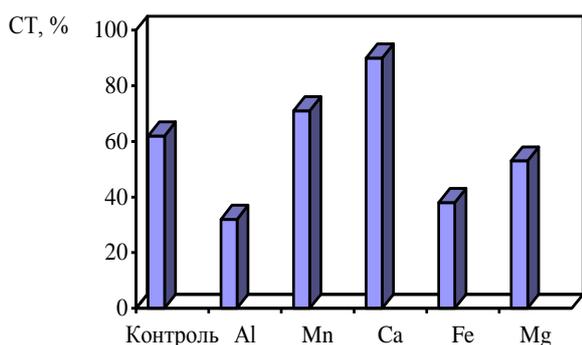


Рисунок 2. Влияние ионов металлов на процесс биотрансформации сахарозы (СТ – степень трансформации, продолжительность – 1 ч)

В то же время ионы алюминия и железа оказывали ингибирующее воздействие (степень трансформации снижалась на 46,9 и 40,9 % соответственно). Введение ионов магния в реакционную смесь приводило к незначительному ингибирующему эффекту.

Изучение динамики процесса трансформации сахарозы в присутствии хлоридов калия, железа и кальция (при продолжительности процесса 1 ч) также показало стимулирующее влияние ионов калия и кальция (степень трансформации увеличивалась на 29,7 и 25,8 %), что согласуется с результатами, представленными на рисунке 1. Как известно, ионы металлов часто выступают в качестве ингибиторов или активаторов ферментов. Механизм влияния металлов-активаторов может быть различным. Полученные нами данные гипотетически можно объяснить именно влиянием ионов кальция и магния на активный центр изомальтулозосинтазы. Известно, что металл может быть компонентом активного центра фермента, может действовать как связующий мостик между ферментом и субстратом, удерживая субстрат у активного центра фермента.

Присутствие анионов неорганических кислот оказывало меньшее ингибирующее воздействие по сравнению с амино- и органи-

ческими кислотами. Среди анионов можно отметить угнетающее воздействие нитратов, хлоридов и фосфатов на степень трансформации сахарозы, которая снижалась на 11,7, 17,6 и 22,3 % соответственно по сравнению с контролем. Причем наибольшее ингибирующее воздействие оказывали фосфаты.

Наиболее сильное снижение степени трансформации сахарозы вызвало присутствие таких аминокислот как серин и аспарагиновая кислота (рисунок 3).

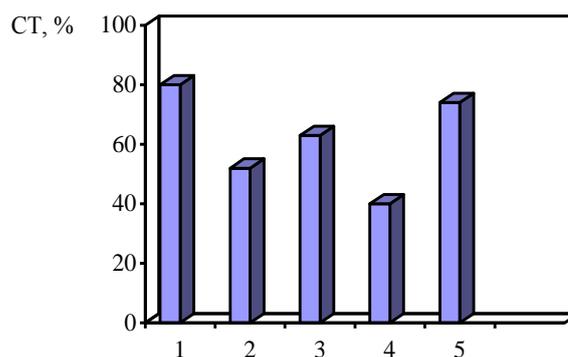


Рисунок 3. Влияние аминокислот на процесс биотрансформации сахарозы (СТ – степень трансформации, продолжительность – 1 ч, 1 - контроль, 2 – серин, 3 – аланин, 4 – аспарагиновая кислота, 5 - глицин)

Степень трансформации сахарозы к 1 ч процесса в этих пробах составляла всего 35,2 и 49,5 % соответственно. Однако к 2 ч процесса степень трансформации достигала 97 % во всех пробах, за исключением таковой с содержанием аспарагиновой кислоты (75,24 %).

Среди органических кислот процесса ингибирующее влияние оказывали лимонная и уксусная, так как степень трансформации снижалась на 38,9 и 42,8 % соответственно. К 3 ч степень трансформации достигла 97 % во всех пробах за исключением таковой с содержанием уксусной кислоты (87,46 %).

Полученные данные позволяют рекомендовать тростниковый сахар-сырец как альтернативную замену дорогостоящего субстрата (сахарозы) с целью получения изомальтулозы. Результаты исследования влияния несугаров на процесс изомеризации сахарозы свидетельствуют о причинах их ингибирующего воздействия при трансформации таких сахарозосодержащих субстратов как меласса, сироп сахарного сорго. В дальнейшем полученные экспериментальные данные будут положены в основу исследований по оптимизации состава реакционной смеси в процессе биотрансформации сахарозосодержащего растительного сырья для получения изомальтулозы – натурального сахарозаменителя.

ЛИТЕРАТУРА

1 Kawaguti H.Y., Manrich E., Sato H.H. Application of response surface methodology for glucosyltransferase production and conversion of sucrose into isomaltulose using free *Erwinia sp.* cells // Electronic J. Biotechnology. 2006. V. 9. № 5. P. 482 - 493.

2 Krastanov A., Blazheva D., Yanakieva I., Kratchanova M. Conversion of sucrose into palatinose in a batch and continuous processes by immobilized *Serratia plymutica* cells // Enzyme and Microbial Technology. 2006. V. 39. P. 1306 - 1312.

3 Корнеева О.С., Божко О.Ю., Шуваева Г.П. Биотехнология изомальтулозы - природного заменителя сахара с пребиотическими свойствами // Биотехнология. 2008. № 2. С. 46-50.

4 Корнеева О.С., Божко О.Ю. Применение изомальтулозосинтазы *Erwinia rhapontici* с целью трансформации сахарозы в изомальтулозу // Вестник ОГУ. 2009. № 4. С. 130-134.

REFERENCES

1 Kawaguti H.Y., Manrich E., Sato H.H. Application of response surface methodology for glucosyltransferase production and conversion of sucrose into isomaltulose using free *Erwinia sp.* cells [Electronic J. Biotechnology], 2006, vol. 9, no. 5, pp. 482 - 493.

2 Krastanov A., Blazheva D., Yanakieva I., Kratchanova M. Conversion of sucrose into palatinose in a batch and continuous processes by immobilized *Serratia plymutica* cells [Enzyme and Microbial Technology], 2006, vol. 39, pp. 1306 - 1312.

3 Korneeva O.S., Bozhko O.Iu., Shuvaeva G.P. Biotechnology isomaltulose - natural sweetener with prebiotic properties. *Biotekhnologiya*. [Biotechnology], 2008. no. 2, pp. 46-50. (In Russ.).

4 Korneeva O.S., Bozhko O.Iu. Application isomaltulosesynthase *Erwinia rhapontici* to transform sucrose to isomaltulose. *Vestnik OGU*. [Bulletin of OSU], 2009, no. 4, pp. 130-134. (In Russ.).