

АКТИВНОСТЬ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ИНУЛИНАЗЫ ПРИ НЕПРЕРЫВНОМ ГИДРОЛИЗЕ ЭКСТРАКТА ТОПИНАМБУРА (HELIANTHUS TUBEROSUS)

Т. А. Ковалева, М. Г. Холявка

Воронежский государственный университет

Поступила в редакцию 15.10.2008 г.

Аннотация. Получен иммобилизованный на ВИОН КН-1 препарат инулиназы, сохраняющий 27,5 % активности свободного фермента. Показано, что оптимальным для гидролиза экстракта топинамбура является использование реактора непрерывного действия при пропускании вытяжки данного растения сверху вниз со скоростью 3 мл/мин или снизу вверх со скоростью 5 мл/мин. Активность препарата в реакторе колоночного типа в первом случае на 82 %, а во втором случае на 117,5 % превысила его каталитическую способность в ферментере периодического действия.

Ключевые слова: инулиназа, иммобилизация, фруктоза, *Helianthus tuberosus*, реактор непрерывного действия.

Abstract. The immobilized on ВИОН КН-1 inulinase preparation, keeping 27,5 % of a free enzyme activity is received. It is shown, that for hydrolysis of the topinambour extract the using of an continual action reactor is optimum at an transmission of plant extracts from top to down with speed of 3 ml/min or from below upwards with a speed of 5 ml/min. Activity of a preparation in a column type reactor in the first case on 82 %, and in the second case on 117,5 % has exceeded it catalytic ability in a periodic action fermenter.

Keywords: inulinase, immobilization, fructose, *Helianthus tuberosus*, continual action reactor.

ВВЕДЕНИЕ

Инулиназа (2,1-β-D-фруктан-фруктаногидролаза, КФ 3.2.1.7) широко распространена среди высших растений и микроорганизмов. Возможно, данный фермент играет ключевую роль в превращении резервных полифруктозидов типа инулина или левана в мобильную фруктозу, которая является источником углерода и энергии для растений и микроорганизмов [1, 2]. Известно более 36 000 видов растений, содержащих инулин [3], поэтому данный энзим может использоваться для получения фруктозы из растительного сырья, в особенности из топинамбура [4, 5], цикория [6], якона [7]. Другое применение инулиназы — прямая ферментация инулина в этанол [8] путем сбраживания сока топинамбура с помощью *Zygomonas mobilis* [9, 10] или сока георгина с помощью *Clostridium pasteurianum* [11]. Перспективным является использование этого фермента для синтеза олигосахаридов, которые являются пребиотическими компонентами [12].

Различные растительные материалы, в частности, топинамбур, георгин, цикорий, сауссурия и спаржа уже описывались как эффективное сырье для производства сиропа с высоким содержанием

фруктозы. В ряде работ показано, что накопление редуцирующих сахаров идет интенсивнее при ферментативном гидролизе экстрактов топинамбура и спаржи, чем при расщеплении чистого инулина. Это явление связано с тем фактом, что в растениях вместе с инулином всегда встречаются родственные углеводы: псевдоинулин, инуленин, леулин, гелиантенин, синистрин, иризин, которые, очевидно, гидролизуются инулиназой с большей скоростью [13, 14].

Существуют исследования активности растворимого препарата инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* YS-1 при гидролизе чистого инулина и экстракта *Aparagus racemosus* в реакторе периодического действия [14], однако, неотъемлемой частью современной фармацевтической и пищевой индустрии является получение гетерогенных биологических препаратов на основе иммобилизованных белков. Связывание с нерастворимым носителем переводит фермент из разряда гомогенных катализаторов в разряд гетерогенных со всеми вытекающими отсюда технологическими преимуществами. Особое внимание исследователи уделяют проблемам подбора и модификации носителей, разработке методов иммобилизации, а также вопросам оптимизации использования в промышленных масштабах гетерогенных биопрепаратов. В

связи с этим целью работы был поиск путей повышения активности иммобилизованной инулиназы в условиях ферментативного гидролиза экстракта топинамбура в реакторе непрерывного действия.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектом исследований является фермент инулиназа, выделенная из дрожжей *Kluyveromyces marxianus* Y-303, чистая культура которых была получена из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ, Москва). Особенности культивирования продуцента, методики выделения и очистки фермента, определения активности и содержания белка, подготовки носителей и иммобилизации энзима, а также способ статистической обработки полученных результатов подробно описаны в [15].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Научно-технические технологии, которые предполагаются использовать в комплексной переработке клубней *Helianthus tuberosus*, могут дать мощный импульс развитию различных областей биотехнологии, поэтому мы проанализировали различные методики получения инулина из клубней топинамбура [16—18]. Экстракцию инулина проводили в интервале температур от 50 до 100°C в периодиче-

ском и непрерывном режиме модельного технологического процесса. При температуре 90°C и выше происходил температурный гидролиз инулина, что в наших исследованиях было нежелательно. Использование противоточного метода оказалось слишком трудоемким и нецелесообразным, так как к заметному повышению активности иммобилизованной инулиназы это не приводило. Рассмотрев данные других авторов и учитывая результаты, полученные в нашей лаборатории, мы выбрали для работы следующую методику.

Клубни топинамбура тщательно промывали, очищали от кожуры и измельчали, затем добавляли дистиллированную воду в соотношении 1 часть растительной биомассы и 3 части воды, pH полученной смеси доводили до значения 4,5 путем добавления уксусной кислоты. Далее препарат нагревали до 80—85°C и выдерживали при данной температуре 40—45 мин, затем его центрифугировали при 250 g в течение 15—20 минут для удаления денатурированных белков и других балластных веществ. Экстракт, выделенный из топинамбура, пропускали через биореактор (колонку размером 1,5×40 см), заполненный 2 г иммобилизованного на ВИОН КН-1 препарата инулиназы, по нисходящему и восходящему току с разной скоростью. Содержание фермента в реакторе — 19,8 мг, ката-

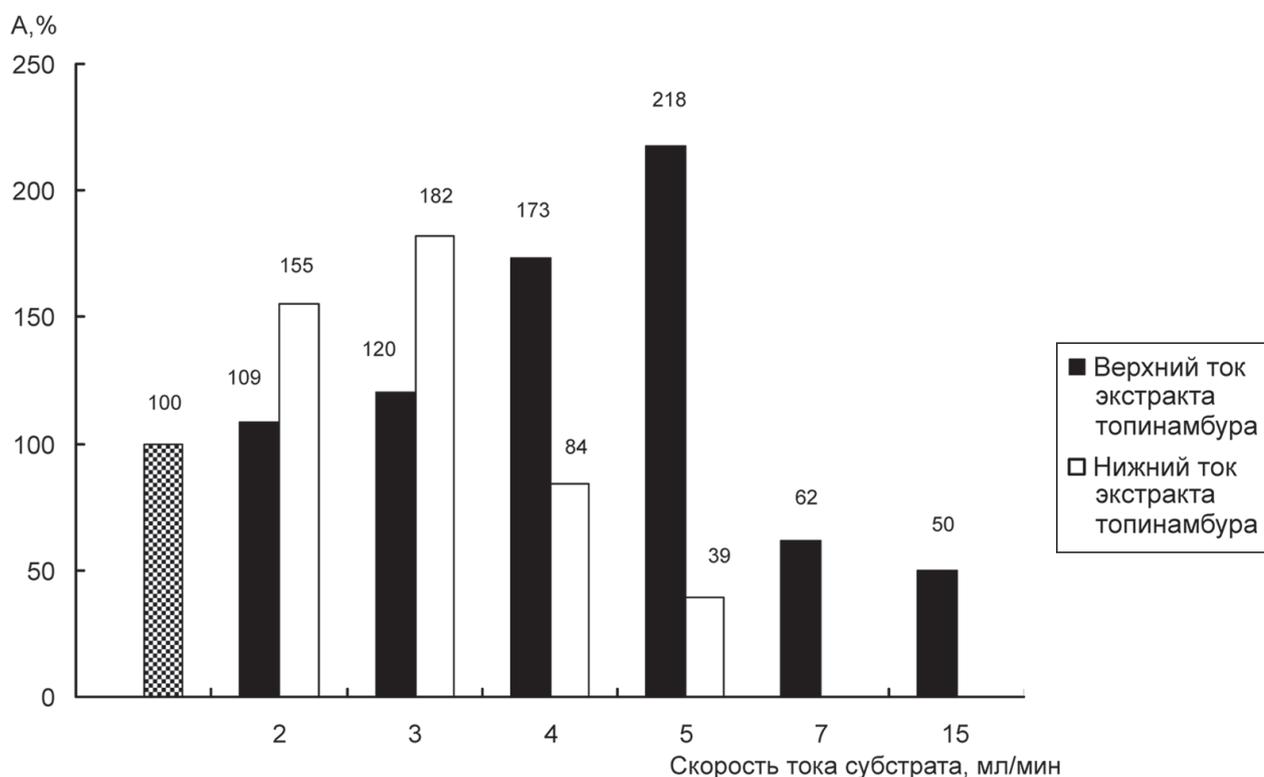


Рис. 1. Каталитическая активность иммобилизованной на ВИОН КН-1 инулиназы при использовании гетерогенного биокатализатора в реакторе непрерывного действия

литическая активность колонки — 80,84 ед. Полученный нами гетерогенный биокатализатор сохранял 27,5 % активности свободного ферментного препарата.

Было показано, что при пропускании раствора инулина сверху вниз через колонку, заполненную иммобилизованным препаратом инулиназы, со скоростью 3 мл/мин создаются наиболее благоприятные условия гидролиза (рис. 1). За 100 % принималось максимальное значение каталитической активности при использовании гетерогенного ферментного препарата в реакторе периодического действия при оптимальных условиях (70 °С, pH 4,5). Активность препарата в реакторе колоночного типа на 82 % превысила его активность при периодическом способе гидролиза экстракта топинамбура.

На следующем этапе была изучена активность иммобилизованной на ВИОН КН-1 инулиназы при пропускании раствора субстрата через реактор колоночного типа по восходящему току. Показано, что при пропускании раствора инулина снизу вверх через колонку, заполненную иммобилизованным препаратом инулиназы, со скоростью 5 мл/мин создаются оптимальные условия гидролиза инулина. Активность препарата в реакторе колоночного типа в этом случае на 117,5 % превысила его активность в ферментере и на 19,5 % оказалась выше, чем максимальная активность, наблюдаемая при нисходящем токе экстракта топинамбура.

Исследования показали, что с увеличением скорости протока растет каталитическая активность иммобилизованной инулиназы. Усиление массопереноса приводит к ослаблению диффузионных ограничений доступа молекул субстрата к активному центру фермента, что сопровождается повышением каталитической способности гетерогенного биокатализатора. Увеличение скорости тока экстракта топинамбура приводит к повышению каталитической активности иммобилизованной инулиназы только до определенного предела: 3 мл/мин при нижнем токе и 5 мл/мин при верхнем токе раствора. При скоростях протока субстрата, значительно превышающих вышеуказанные параметры, очевидно, уменьшается время контакта молекул инулина с активным центром инулиназы, и, следовательно, образуется меньшее количество фруктозы. К тому же, высокие скорости тока и перемешивания экстракта топинамбура могут вызвать частичную или полную денатурацию фермента.

Таким образом, показано, что инулиназа, иммобилизованная на ВИОН КН-1, эффективно расщепляет содержащийся в экстракте топинамбура

инулин. При использовании данного биокатализатора в реакторе непрерывного действия оптимальным является пропускание вытяжки *Helianthus tuberosus* сверху вниз со скоростью 3 мл/мин или снизу вверх со скоростью 5 мл/мин. В обоих случаях каталитическая активность гетерогенного препарата значительно превышает его способность расщеплять инулин в реакторе периодического действия: на 82 % при нижнем токе субстрата и на 117,5 % при его верхнем токе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жеребцов Н.А. О механизме каталитического действия карбогидраз (обзор) / Н.А. Жеребцов, О.С. Корнеева, Т.Н. Тертычная // Прикладная биохимия и микробиология. — 1999. — Т.35, № 2. — С. 123—132.
2. Абелян В.А. Характеристика экзо-инулаз *Kluyveromyces marxianus* и *Bacillus licheniformis* / В.А. Абелян, Л.С. Манукян // Биохимия. — 1996. — Т. 61, № 6. — С. 1028—1036.
3. Carpita N. C. Linkage structure of fructans and fructan oligomers from *Triticum aestivum* and *Festuca arundinacea* leaves / N.C. Carpita, J. Kanabus, T.L. Housley // *J. Plant Physiol.*, 1989. — Vol. 134. — P. 162—168.
4. Голубев В.Н. Биотехнологические аспекты переработки топинамбура / В.Н. Голубев, В.П. Кулев // Пищевая промышленность. — 1991. — № 9. — С. 52—53.
5. Голубев В.Н. Топинамбур — пищевой биоэнергетический и экологосберегающий ресурс / В.Н. Голубев, Н.М. Пасько, И.В. Волкова // Хранение и переработка сельхозсырья. — 1994. — №5. — С. 41—46.
6. Enzymatic production of inulo-oligosaccharides from chicory juice / J.P. Park [et al.] // *Biotechnol. Lett.* — 1998. — V. 20. — № 4. — P. 385—388.
7. Корнеева О.С. Карбогидразы: препаративное получение, структура и механизм действия на олиго- и полисахариды / О.С. Корнеева. — Воронеж : Изд-во Воронеж. ун-та, 2001. — 184 с.
8. Использование дрожжевых инулаз для гидролиза растительного сырья / В.Л. Куев [и др.] // Достижения биотехнологии — агропромышленному комплексу: тез. докл. Всесоюз. конф., Черновцы, 1991. — Т. 1. — С. 141.
9. Allais J. Continuous production of ethanol with *Zymomonas mobilis* growing on *Jerusalem artichoke* juice / J. Allais, E. Torres // *Biotechnol. and Bioeng.* — 1987. — Vol. 29, № 6. — P. 778—782.
10. Kim C. Ethanol production *Jerusalem artichoke* by inulinase and *Zymomonas mobilis* / C. Kim, S. Rhee // *Appl. Biochem Biotechnol.* — 1990. — Vol. 23, № 2. — P. 171—180.
11. Oiwa H. Acetonebutanol production from *Dahlia inulin* by *Clostridium pasterianum* var Y-53 / H. Oiwa, M. Naganuma, S. Ohnima // *Agr. and Biol. Chem.* — 1987. — Vol. 51, № 10. — P. 2819—2820.
12. Production of inulo-oligosaccharides using endo-inulinase from a *Pseudomonas* sp. / D.H. Kim [et al.] // *Biotechnology Letters.* — 1997. — Vol. 19. — P. 369—371.

13. *Vajpai P.* Immobilization of *K. marxianus* cells containing activity in open pore gelatin matrix: application for high fructose syrup production / P. Vajpai, A. Margaritis // *Enz. Microbiol. Technol.* — 1985. — Vol. 7. — P. 459—461.

14. Partial purification and characterization of exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 for preparation of high-fructose syrup / R.S. Singh, D. Rajesh, P. Munish // *J. Microbiol. Biotechnol.* — 2007. — Vol. 17, № 5. — P. 733—738.

15. *Ковалева Т.А.* Разработка гетерогенного катализатора реакции гидролиза инулина на основе иммобилизованного препарата инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* / Т.А. Ковалева, М.Г. Холявка, А.С. Таха // *Биотехнология.* — 2007. — № 3. — С. 80—87.

6. *Абелян В.А.* Получение фруктозо-глюкозного сиропа из инулинсодержащего сырья с применением иммобилизованных клеток дрожжей / В.А. Абелян, Л.С. Манукян, Э.Г. Африкян // *Прикладная биохимия и микробиология.* — 1998. — Т. 34, № 5. — С. 544—548.

17. Применение ферментных препаратов с целью ускоренного гидролиза инулина при производстве этилового спирта / М.В. Вагабов [и др.] // *Биотехнология.* — 2005. — № 1. — С. 34—36.

18. *Чепурной И.П.* Проблемы создания инновационного производства по переработке клубней топинамбура для высокой выработки лечебно-профилактических препаратов и пищевых продуктов / И.П. Чепурной // *Нетрадиционные природные ресурсы, инновационные технологии и продукты: сб. науч. тр.* — Москва, Изд-во РАЕН-МААНОИ, 2001. — Вып. 5. — С. 88—93.

Ковалева Тамара Андреевна — профессор, доктор биологических наук, Воронежский государственный университет; тел.: (4732) 208-586, 208-578, факс: (4732) 208-308, e-mail: Tamara_Kovaleva@inbox.ru

Kovaleva Tamara A. — Professor, doctor of biological science, Voronezh State University; tel.: (4732) 208-586, 208-578, fax: (4732) 208-308, e-mail: Tamara_Kovaleva@inbox.ru

Холявка Марина Геннадьевна — аспирантка, Воронежский государственный университет, тел.: (4732) 208-308; e-mail: Holyavka@rambler.ru

Holyavka Marina G. — PhD student, Voronezh State University; tel.: (4732) 208-308; e-mail: Holyavka@rambler.ru