

## ИССЛЕДОВАНИЕ РЕЖИМОВ РАБОТЫ ГЕТЕРОГЕННОГО БИОКАТАЛИЗАТОРА НА ОСНОВЕ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ИНУЛИНАЗЫ В РЕАКТОРЕ НЕПРЕРЫВНОГО ДЕЙСТВИЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ФРУКТОЗЫ ИЗ ЭКСТРАКТОВ ИНУЛИНСОДЕРЖАЩИХ РАСТЕНИЙ

М. Г. Холявка, Т. А. Ковалева, С. А. Волкова, В. Г. Артюхов

ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию: 01.09.2014

**Аннотация.** Разработан высокостабильный гетерогенный препарат инулиназы, иммобилизованной на ионообменной смоле КУ-2, эффективно расщепляющий химически чистый и содержащийся в растительных экстрактах инулин, пригодный для использования не менее, чем в 10-циклах гидролиза подряд. При применении биокатализатора в реакторе непрерывного действия оптимальным является перемещение субстрата сверху вниз со скоростью 3 мл/мин (инулин), 7 мл/мин (экстракт топинамбура) или снизу вверх со скоростью 5 мл/мин.

**Ключевые слова:** инулиназа, иммобилизация гетерогенный биокатализатор, инулин, экстракт топинамбура, ионообменная смола КУ-2, реактор непрерывного действия.

**Abstract.** The highly stable heterogeneous preparation of inulinase, immobilized on the ion-exchange KU-2 resins, is developed. It effectively split chemically pure and containing in plant extracts inulin. It is suitable for use not less, than in 10 cycles of hydrolysis in a row. Substrate movement from top to bottom with a speed of 3 ml/min (inulin) and 7 ml/min. (plants extract) or from bottom to top with a speed of 5 ml/min is optimum at using of the biocatalyst in the reactor of continuous action.

**Keywords:** inulinase, immobilization of heterogeneous biocatalyst, inulin, extract of *Helianthus tuberosus*, ion-exchange KU-2 resin, reactor of continuous action.

В настоящее время разработка технологии получения пищевых продуктов диабетического и профилактического назначения приобретает все большее значение. В связи с этим возрос интерес к фруктозе. Фруктоза в 1.5–2 раза слаще сахарозы, она может быть использована в диетическом питании больных сахарным диабетом. Фруктозу, как правило, получают из крахмала путем многостадийного процесса, включающего расщепление до глюкозы с последующей обработкой глюкозы глюкозоизомеразой и хроматографическим разделением фруктозы и глюкозы [1]. Перспективным направлением является получение фруктозы из растительного инулинсодержащего сырья, в особенности топинамбура. Биотехнологические аспекты переработки топинамбура приводятся в работах [2, 3]. В клубнях топинамбура содержа-

ние инулина достигает 20–25 %, а сироп при этом включает не менее 70 % фруктозы [4, 5].

Инулиназа (инулаза; 2,1-β-D-фруктан-фруктаногидролаза, КФ 3.2.1.7), как фермент, расщепляющий инулин и другие фруктозосодержащие полимеры до фруктозы, широко распространена среди высших растений и микроорганизмов и может применяться для получения фруктозы из растительного сырья.

Исследование физико-химических свойств гидролитических ферментов позволило применять их в пищевой, текстильной, бумажной, парфюмерной промышленности, при производстве моющих средств, очистке стоков, в сельском хозяйстве, в медицине, что помогло существенно усовершенствовать многие известные способы производства продуктов питания и лекарственных препаратов, а также разработать новые безотходные технологические линии.

Возможности применения ферментов ограничены, по крайней мере, двумя причинами. Во-первых, они неустойчивы при хранении, а также при различных воздействиях, особенно тепловых. Во-вторых, многократное использование энзимов затруднено из-за сложности их отделения от реагентов и продуктов реакции. Принципиально новые перспективы открылись перед исследователями в результате создания гетерогенных ферментных препаратов.

В нашей лаборатории были разработаны и широко апробированы адсорбционный и ковалентный способы иммобилизации инулиназы на ряде синтетических катионитов и анионитов, позволяющие сохранить до 80–85 % активности нативного фермента [6-9].

Целью данного исследования было изучить режимы работы гетерогенного биокатализатора на основе иммобилизованной инулиназы в реакторе непрерывного действия и проанализировать экстракт топинамбура как субстрат для получения фруктозы.

## ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования были фракции белка, выделенные из клубней *Helianthus tuberosus*, проявляющие инулиназную активность, иммобилизованные на ионообменных смолах и волокнах. Подробно методики очистки препарата и его иммобилизации изложены в работах [9, 10].

Содержание белка определяли методом Лоури, активность инулиназы измеряли спектрофотометрически резорциновым методом на фотоэлектроколориметре КФК-3 (Россия) [11]. За единицу каталитической активности принимали такое количество фермента, которое катализирует образование 1 мкМ фруктозы за 1 мин.

Статистическую обработку полученных результатов проводили при уровне значимости 5 % с использованием t-критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В первой серии экспериментов мы исследовали стабильность иммобилизованной инулиназы в ходе эксплуатации в модельном реакторе периодического действия. Реакцию гидролиза инулина осуществляли при оптимальных условиях в течение 20 минут при постоянном перемешивании с последующим анализом гидролизата на содержание фруктозы. Было показано, что при 10-кратном использовании гетерогенных образцов на основе КУ-2, КУ-2-8чС и АВ-17-2П их активность не

изменялась. По критерию стабильности полученные нами гетерогенные биокатализаторы оказались перспективными для промышленного применения.

Хотелось бы отметить, что ранее в нашей лаборатории была изучена стабильность адсорбированной на ионообменных материалах ВИОН-КН-1, АВ-16ГС, АМ-21А инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и показано, что при многократном использовании иммобилизованного препарата в реакторе периодического действия его активность практически не изменялась [12].

Устойчивость гетерогенных ферментных препаратов в процессе хранения также является важнейшей технологической характеристикой для биокатализаторов промышленного назначения, поэтому целью второго этапа работы был анализ каталитических характеристик инулиназы из клубней *Helianthus tuberosus*, иммобилизованной на синтетических катионитах КУ-2, КУ-2-8чС, PUROLITE и анионитах АВ-17-2П, АН-12П, ЭДЭ-10П, ИМАС-НР, после 1 года хранения в холодильнике. Удельная каталитическая активность гетерогенных биокатализаторов не претерпевала статистически значимых изменений, наблюдалась лишь тенденция к ее снижению для инулиназы, иммобилизованной на ионитах КУ-2, КУ-2-8чС, АВ-17-2П, АН-12П, ЭДЭ-10П (рис. 1).

Ранее нами было изучено влияние условий хранения на активность иммобилизованной на ВИОН КН-1 инулиназы из *Kluyveromyces marx-*

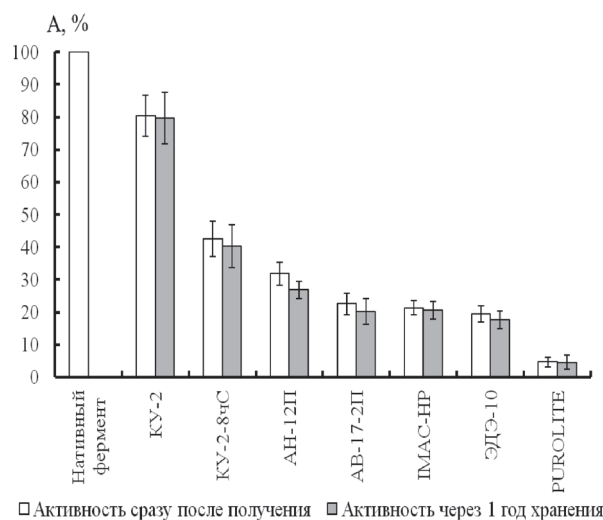


Рис. 1. Процент сохранения каталитической активности (А) иммобилизованной инулиназы из *Helianthus tuberosus* сразу после получения и после 1 года хранения ферментного препарата в лабораторных условиях

*ianus*. Выявлено, что каталитическая способность фермента в иммобилизованном препарате, который находился в стадии хранения в сухом виде, не изменялась на протяжении 2 лет [12].

В наших работах уже было продемонстрировано, что иммобилизованный на КУ-2 препарат инулиназы проявляет максимальную каталитическую способность при гидролизе экстрактов клубней топинамбура, корней цикория и девясила, которые по этой причине, на наш взгляд, являются перспективными для промышленного использования с целью получения фруктозы ферментативным путем. Интересно, что активность гетерогенного биокатализатора по отношению к экстрактам из клубней топинамбура и корней девясила и цикория была примерно в 2 раза выше, чем в реакции с чистым инулином [9].

Растительные материалы, в частности, топинамбур, георгин, цикорий, сауссурия и спаржа уже описывались в литературе как перспективное 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, левулин, гелиантенин, синистрин, иризин, которые, очевидно, гидролизуются инулиназой с большей скоростью [13].

Исследования по созданию новых типов биореакторов, позволяющих существенно повысить производительность процессов, являются актуальными и современными. При разработке нового типа реактора наиболее важной задачей является решение проблемы уменьшения диффузионного торможения реакции, например, за счет интенсивного принудительного массопереноса субстрата к биокатализатору. Известно, что наиболее предпочтительными в промышленных условиях являются реакторы непрерывного действия, позволяющие автоматизировать технологический процесс. Поэтому мы изучили особенности реакции гидролиза инулина в реакторе колоночного типа.

При использовании реакторов непрерывного действия возрастает время контакта фермента с субстратом. При этом диффузионные затруднения доступа молекулы субстрата к молекуле иммобилизованного фермента преодолеваются более эффективно по сравнению с реакцией гидролиза в реакторе периодического действия. Создают-

ся благоприятные условия для образования фермент-субстратного комплекса [14].

Для гидролиза субстрата в непрерывном режиме мы использовали стеклянный реактор, который представляет собой термостатируемую колонку 1×20 см. При подготовке к опытам реактор промывали ацетатным буфером (рН 4.5), помещали в него 10 г инулиназы из *Helianthus tuberosus*, иммобилизованной на смоле КУ-2.

Было показано, что при миграции раствора инулина сверху вниз (нижний ток) через колонку, заполненную иммобилизованным препаратом инулиназы, со скоростью 3 мл/мин создаются оптимальные условия гидролиза. Активность катализатора в реакторе колоночного типа в этом случае на 20 % превысила его активность в ферментере при периодическом способе гидролиза субстрата. При увеличении скорости потока субстрата каталитическая активность иммобилизованной инулиназы снижалась. При скорости 5 мл/мин она на 10 % ниже, а при 10 мл/мин активность уменьшалась на 28 % по сравнению с реактором периодического действия (рис. 2). За контроль (100 %) принималось максимальное значение каталитической активности при использовании гетерогенного ферментного препарата в реакторе периодического действия (ферментере) при оптимальных условиях гидролиза (70 °С, рН 4.5).

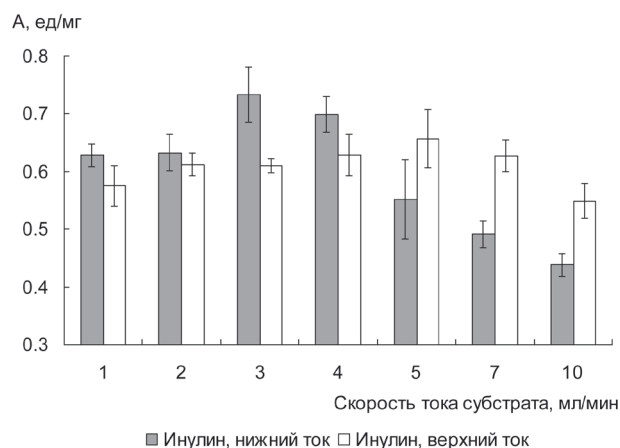


Рис. 2. Зависимость каталитической активности (А) иммобилизованной на КУ-2 инулиназы из *Helianthus tuberosus* от скорости тока субстрата (в качестве субстрата использовали инулин)

Известно, что для протекания реакции катализа в случае иммобилизованного фермента необходимо, чтобы его молекула подошла к поверхности матрицы носителя и протифундировала внутрь нее. При малых скоростях потока диффузионные

затруднения преодолеваются за счет увеличения времени взаимодействия фермента с субстратом и создаются благоприятные условия для возникновения фермент-субстратного комплекса. Соответственно при увеличении скорости потока субстрата уменьшается время контакта молекулы инулина с молекулой инулиназы, и, следовательно, образуется меньшее количество фруктозы. К тому же показано, что высокие скорости потока и перемешивания субстрата могут вызвать частичную или полную денатурацию фермента за счет «истирания» [15, 16].

Далее была изучена активность иммобилизованной на КУ-2 инулиназы при перемещении раствора субстрата через реактор колоночного типа по восходящему току. Показано, что при миграции раствора инулина снизу вверх (верхний ток) через колонку со скоростью 5 мл/мин создаются оптимальные условия гидролиза. Активность препарата в реакторе колоночного типа в этом случае на 10 % превысила его активность в ферментере. При увеличении скорости тока субстрата наблюдалось уменьшение активности гетерогенного биокатализатора: при значении 10 мл/мин каталитическая активность снижалась до 89 % от исходного уровня

Научные технологии, которые предполагается использовать в комплексной переработке клубней *Helianthus tuberosus*, могут дать мощный импульс развитию различных областей биотехнологии, поэтому в заключительной серии экспериментов в реакторах колоночного типа мы использовали экстракт топинамбура.

Экстракт, выделенный из клубней *Helianthus tuberosus*, пропускали через биореактор, заполненный 10 г иммобилизованного на КУ-2 препарата инулиназы, по нисходящему и восходящему току с разной скоростью. Было показано, что при перемещении раствора сверху вниз через колонку, заполненную иммобилизованным препаратом инулиназы, со скоростью 7 мл/мин создаются наиболее благоприятные условия гидролиза (рис. 3). Активность препарата в реакторе колоночного типа на 48 % превысила его активность при периодическом способе гидролиза экстракта топинамбура.

На следующем этапе была изучена активность иммобилизованной на КУ-2 инулиназы при пропускании растительного экстракта через реактор колоночного типа по восходящему току. Установлено, что при перемещении экстракта топинамбура снизу вверх через колонку со скоростью 4 и 5

мл/мин создаются оптимальные условия гидролиза инулина. Активность препарата в реакторе колоночного типа в этом случае на 34 % превысила его активность в ферментере периодического действия.

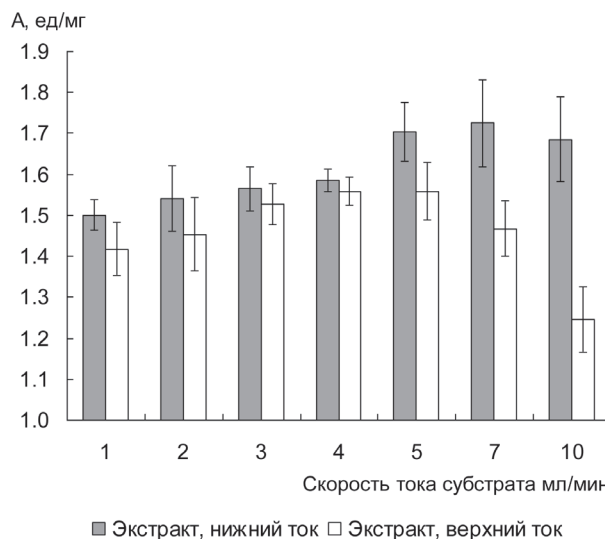


Рис. 3. Зависимость каталитической активности (А) иммобилизованной на КУ-2 инулиназы из *Helianthus tuberosus* от скорости тока субстрата (в качестве субстрата использовали экстракт топинамбура)

Исследования показали, что с увеличением скорости потока субстрата (химически чистого инулина и экстракта топинамбура) увеличивается ферментативная активность иммобилизованной инулиназы. Усиление массопереноса приводит к ослаблению диффузионных ограничений доступа гидролизуемых молекул к активному центру энзима, что сопровождается повышением каталитической способности гетерогенного биокатализатора. Увеличение скорости тока приводит к повышению каталитической активности иммобилизованной инулиназы только до определенного предела.

Показано, что инулиназа, иммобилизованная на КУ-2, эффективно расщепляет химически чистый и содержащийся в экстракте топинамбура инулин. При использовании данного биокатализатора в реакторе непрерывного действия оптимальным является перемещение субстрата сверху вниз со скоростью 3 мл/мин (инулин), 7 мл/мин (экстракт топинамбура) или снизу вверх со скоростью 5 мл/мин. В обоих случаях ферментативная активность гетерогенного биопрепарата превысила его каталитическую способность в реакторе



периодического действия: на 20 % (при нижнем токе) и 10 % (при верхнем токе) при пропускании химически чистого инулина и на 48 % (при нижнем токе) и 34 % (при верхнем токе) при использовании в качестве субстрата экстракта *Helianthus tuberosus*.

## ВЫВОДЫ

Установлено, что при 10-кратном использовании гетерогенных препаратов на основе инулиназы, иммобилизованной на КУ-2, КУ-2-8чС и АВ-17-2П, их активность поддерживалась практически на одном и том же уровне. После 1 года хранения в лабораторных условиях удельная каталитическая активность биокатализаторов не претерпела статистически значимых изменений.

Разработанный в нашей лаборатории гетерогенный препарат инулиназы эффективно расщепляет химически чистый и содержащийся в экстракте клубней *Helianthus tuberosus* инулин при использовании данного биокатализатора в реакторе непрерывного действия, что позволяет рекомендовать его для применения в промышленных масштабах.

*Работа выполнена при поддержке Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы», (кратко - ФЦП ИР14-20) соглашение № 14.577.21.0035. SPIN 3521-2905*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Нахапетян Л.А. Получение глюкозо-фруктозного сиропов из крахмалсодержащего сырья / Л.А. Нахапетян, И.И. Меняйлова // Биотехнология. — 1988. — №5. — С. 564–574.
2. Голубев В.Н. Биотехнологические аспекты переработки топинамбура / В.Н. Голубев, В.П. Кулев // Пищевая промышленность. — 1991. — № 9. — С. 52–53.
3. 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.
4. Абелян В.А. Иммобилизация микробной инулиназы на различных носителях / В.А. Абелян, Л.С. Манукян // Прикладная биохимия и микробиология. — 1992. — Т. 28, № 3. — С. 356–361.
5. 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.
6. Kovaleva T.A. Study on a Few Characteristics on Immobilized Inulinase from *Kluyveromyces marxianus* as a Perspective Catalyst for Inulin Hydrolysis / Т.А. Kovaleva, М.Г. Kholyavka, А.С. Takha // Biotechnology in Russia. — 2009. — № 2. — С. 73–80.
7. Ковалева Т.А. Исследование иммобилизации инулиназы на ионогенных и неионогенных носителях / Т.А. Ковалева, М.Г. Холявка, А.С. Таха // Сорбционные и хроматографические процессы. — 2007. — Т. 7, вып. 5. — С. 804–810.
8. Kovaleva T.A. Inulinase Immobilization on Macroporous Anion-Exchange Resins by Different Methods / Т.А. Kovaleva, М.Г. Holyavka, S.S. Bogdanova // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. — 2009. — Vol. 148, № 1. — P. 39–41.
9. Холявка М.Г. Создание гетерогенного ферментного препарата на основе иммобилизованной инулиназы из *Helianthus tuberosus* / М.Г. Холявка [и др.] // Биотехнология. — 2012. — № 6. — С. 31–41.
10. Холявка М.Г. Разработка методики выделения и очистки инулиназы из клубней *Helianthus tuberosus* и анализ ее физико-химических и кинетических свойств / Холявка М.Г. [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. — 2013. — № 9. — С. 43–52.
11. Ермаков А.И. Методы биохимического исследования растений / А.И. Ермаков, В.В. Арасимович, Н.П. Ярош. — Л.: Агропромиздат, 1987. — 429 с.
12. Kovaleva T.A. Development of a Heterogenous Biocatalyst on the basis of Immobilized Inulinase Preparation from *Kluyveromyces marxianus* / Т.А. Kovaleva, М.Г. Kholyavka, А.С. Takha // Biotechnology in Russia. — 2007. — № 3. — P. 106–116.
13. Singh R.S. Production of high fructose syrup from *Asparagus inulin* using immobilized exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 / R.S. Singh, R. Dhaliwal, M. Puri // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. — 2007. — Vol. 34, № 10. — P. 649–655.
14. Диксон М. Ферменты: в 2 т. / М. Диксон, Э. Уэбб — М.: Мир, 1982. — Т. 1. — 389 с.
15. Васильев Н. Инулин и инулиназа / Н. Васильев // Природа (Бьлг). — 1993. — № 2. — С. 35–39.
16. Иммобилизованные ферменты: в 2 т. // под ред. И.В. Березина, В.К. Антонова, К. Мартинек. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1976. — Т. 1: Современное состояние и перспективы. — 296 с.

*Холявка Марина Геннадьевна* — старший научный сотрудник, Воронежский государственный университет; e-mail: [holyavka@rambler.ru](mailto:holyavka@rambler.ru)

*Ковалева Тамара Андреевна* — профессор кафедры биофизики и биотехнологии, доктор биологических наук, Воронежский государственный университет; e-mail: [tamara\\_kovaleva@inbox.ru](mailto:tamara_kovaleva@inbox.ru)

*Волкова Светлана Анатольевна* – Студентка, Воронежский государственный университет

*Артюхов Валерий Григорьевич* — Заведующий кафедрой биофизики и биотехнологии, профессор, доктор биологических наук. Воронежский государственный университет; e-mail: [artyukhov@bio.vsu.ru](mailto:artyukhov@bio.vsu.ru)

*Holyavka Marina G.* — Senior researcher, Cand.Biol.Sci., Voronezh State University; e-mail: [holyavka@rambler.ru](mailto:holyavka@rambler.ru)

*Kovaleva Tamara A.* — Professor of biophysics and biotechnology department, doctor of biological science; e-mail: [tamara\\_kovaleva@inbox.ru](mailto:tamara_kovaleva@inbox.ru)

*Volkova Svetlana A.* – Student, Voronezh State University

*Artyukhov Valeriy G.* — Manager of biophysics and biotechnology department, professor, doctor of biological science. Voronezh State University; e-mail: [artyukhov@bio.vsu.ru](mailto:artyukhov@bio.vsu.ru)