

и промывании препарата дистиллированной водой после каждого употребления. Бета-фруктофуранозидаза оказалась достаточно стабильной и практически не утрачивала активности при многократном использовании.

Таким образом, на основании приведенных данных можно заключить, что иммобилизация внеклеточной бета-фруктофуранозидазы *A. pullulans* на силихроме С-80 не приводит к существенным изменениям свойств фермента. Иммобилизованный ферментный препарат можно использовать не только для гидролиза чистых высококонцентрированных растворов сахарозы, но и отходов сахарного производства, содержащих сахарозу, — мелассы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Алексанян Е. Р., Маркосян Л. С. Биолог. ж. Армении, 35, 10, 809—811, 1982.
2. Бренман С. А., Марьянич В. Л., Иволго Н. С., Ковальчук В. С. Производство и использование жидкого сахара. М., 1984.
3. Глемжа А. А. Микробные ферменты в народном хозяйстве. Вильнюс, 1985.
4. Клесов А. А. Тез. IV Всесоюзн. симп. «Инженерная энзимология», 1, 25—27, Киев, 1983.
5. Клесов А. А. В кн.: Биотехнология. 103—112, М., 1984.
6. Нахлетян Л. А. Тез. IV Всесоюзн. симп. «Инженерная энзимология», 1, 41, Киев, 1983.
7. Щустрова Н. И., Стальная Н. Д., Самошина Н. М., Нахлетян Л. А. Прикл. биохим. и микробиол., 16, 5, 780—783, 1980.
8. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 193, 1, 265—275, 1951.
9. Nelson N. J. J. Biol. Chem., 153, 1, 375—380, 1941.
10. Somogyi M. J. Biol. Chem., 195, 1, 19—23, 1952.

Поступило 15.XII 1987 г.

Биолог. ж. Армении, т. 41, № 2, 1988

УДК 577.15.08.154

### ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ КРАХМАЛА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕРМОФИЛЬНОЙ БАЦИЛЛЫ

А. М. БАЛЯН, В. А. АБЕЛЯН, Л. С. МАРКОСЯН

Институт микробиологии АН АрмССР, г. Абовян

Изучена возможность биоконверсии крахмала в сахаристые продукты с помощью термофильного штамма *Bacillus sp.*

Показано, что нативные и стабилизированные клетки обладают пуллулазазной и амнолитической активностью; при гидролизе крахмала указанным штаммом в зависимости от продолжительности процесса образуются мальтоза и глюкоза.

Առավանաիրգել է օւշաշի ֆարսկերպուսը շարտրանջութերի *Bacillus sp.* թւրմոֆիլ շտամի միջոցով: Պարզվել է, որ էշված միկրոօրգանիզմն օժտված է պուլլուլանազային և ամոլիտիկ ակտիվությամբ: Կախված հիդրոլիզի տևողությունից օւլան առաջուծվում է մինչև մալտոզայի և գլյուկոզայի:

The possibility of starch hydrolysis into sugar products by means of native and stabilized cells of the thermophillic strain *Bacillus sp.* is studied.

Bacterial cells possess pullulanase and amylolytic activity. During the starch hydrolysis by the given strain maltose and glucose are formed, which depends on the duration of the process.

*Термофильный штамм Bacillus sp.—пуллулаза— $\alpha$ -амилаза—конверсия крахмала—стабилизация клеток.*

Основным сырьем для получения сахаристых продуктов является крахмал, который подвергается гидролизу комплексом амилитических ферментов. Однако известно, что наряду с  $\alpha$ -1-4-глюкозидными связями в амилопектине имеются  $\alpha$ -1-6-связи (4—5%), не расщепляющиеся указанными ферментами [4, 12]. Это приводит к заметным потерям сырья при производстве сахаристых продуктов.

Данные литературы показывают, что при совместном применении глюкоамилазы, изоамилазы,  $\alpha$ -амилазы с пуллулазой происходит сравнительно полный гидролиз крахмала с образованием глюкозы и мальтозы [3, 5, 7, 8, 11]. Это свидетельствует о большой практической значимости одноэтапного гидролиза крахмала с помощью штамма микроорганизма, обладающего комплексом амилитических ферментов и одновременно с ферментом, расщепляющим  $\alpha$ -1-6-глюкозидные связи.

В настоящей работе обобщены результаты изучения биоконверсии крахмала в сахаристые продукты с помощью термофильного штамма *Bacillus sp.*

*Материал и методика.* Термофильную культуру *Bacillus sp.* выделенную в ИММЦА Армянской ССР, выращивали в ферментере «АНКУМ-2» в пробных условиях в течение 9 ч при 56° и pH 7,5 в среде, содержащей (г/л): кукурузный экстракт 5,0; пептон—5,0; крахмал—5,0; NaCl—5,0; CaCO<sub>3</sub>—5,0. Биомассу отделяли центрифугированием при 6000 g в течение 15 мин.

Клетки *Bacillus sp.*, полученные после центрифугирования, стабилизировали обработкой их биофункциональными агентами, в результате чего получали жесткие гранулы сухих клеток с исключительной размерной стабильностью, которые с успехом можно использовать как в стационарных, так и в проточных условиях.

Пуллулазную активность определяли по образованию редуцирующего вещества после инкубации в реакционной смеси, состоящей из 1,0 мл 1% пуллулана, 0,5 мл 0,15 М фосфатно-цитратного буфера (pH 6,0) и 1,0 мл суспензии клеток (100 мг сырой или стабилизированной биомассы в 1,0 мл фосфатно-цитратного буфера). Инкубировали при 50° в течение 60 мин. Редуцирующие вещества определяли методом Сомоджи-Нельсона [6, 10].

За единицу пуллулазной активности принимали то количество фермента, которое высвобождало 1 мкмоль редуцирующего сахара при 50° в течение одного часа [7, 9].

Количество прогидролизованного крахмала определили коллоидно-крахмальным методом [2]. К смеси, содержащей 5,0 мл 1% крахмала, добавляли 1,0 мл 0,15 М фосфатно-цитратного буфера (pH 6,0) и 1,0 мл суспензии (100 мг сырой биомассы в 1,0 мл буфера) нативной или стабилизированной биомассы (2,0 ед) и инкубировали при 50°. По истечении определенного времени определяли количество прогидролизованного крахмала.

Состав продуктов гидролиза крахмала определяли методом тонкослойной и бумажной хроматографии в системе растворителей н-бутанол—пиридин—вода (6:4:2,5 об/об). Сахары проявляли раствором AgNO<sub>3</sub> в аммиаке [1]. Продукты гидролиза определяли также на высокоэффективном жидкостном хроматографе марки «Ortobal 5931» (Швеция) с колонкой размером 4,6 мм×25 см со скоростью потока 1 мл/мин.

В работе использовали: пуллулан фирмы «Serga» (ФРГ), растворимый крахмал—«Kaizo Chemicals Co.» (Япония), мальтоотриозу—«Sigma» (США) и реактивы отечественного производства марки х. ч.

**Результаты и обсуждение.** В предварительных опытах было установлено, что культура *Bacillus sp.* обладает как пуллулазной, так и амилитической активностью. С целью биоконверсии крахмала нативными и стабилизированными клетками *Bacillus sp.* мы провели исследования по оптимизации условий гидролиза  $\alpha$ -1-4- и  $\alpha$ -1-6-глюкозидных связей. Полученные результаты показали, что пуллулазная активность как нативных, так и стабилизированных клеток достигает максимума при pH 6,0 (табл. 1). Выяснилось также, что стабилизированные клетки несколько более устойчивы к pH, чем нативные (табл. 2).

Таблица 1. Влияние pH на пуллулазную и  $\alpha$ -амилазную активность нативных и стабилизированных клеток *Bacillus sp.*

pH	Относительная активность, %			
	пуллулаза		$\alpha$ -амилаза	
	нативные клетки	стабилизированные клетки	нативные клетки	стабилизированные клетки
3	18	27	—	—
4	50	60	30	25
5	75	85	75	80
6	100	100	100	100
7	90	80	80	90
8	60	40	40	55
9	20	25	—	—
10	5	10	—	—

Таблица 2. pH-стабильность пуллулазы нативных и стабилизированных клеток *Bacillus sp.*

pH	Относительная активность, %	
	нативные клетки	стабилизированные клетки
3	0	0
4	10	20
5	45	70
5.5	70	100
6	100	100
7	100	100
8	100	100
9	90	100
9.5	20	100
10	0	30
11	0	0

Наивысшая пуллулазная активность обеих форм достигается при 50—55° (табл. 3). Однако стабилизированные клетки, по сравнению с нативными, более устойчивы к действию высоких температур. Так, при выдерживании нативных клеток при 60° в течение двух часов утрачивается примерно 50% пуллулазной активности, в то время как стабилизированные клетки теряют лишь 10% ее (табл. 4). При изучении влияния pH среды и температуры на  $\alpha$ -амилазную активность нативных и стабилизированных клеток *Bacillus sp.* наиболее высокие показатели отмечаются при pH 6,0 и температуре 50°. Дальнейшее измене-

Таблица 3. Влияние температуры на пуллулазазную и  $\alpha$ -амилазную активность нативных и стабилизированных клеток *Bacillus sp.*

Температура, °С	Относительная активность, %			
	пуллулазаза		$\alpha$ -амилаза	
	нативные клетки	стабилизированные клетки	нативные клетки	стабилизированные клетки
30	10	50	—	—
40	70	80	80	75
50	100	95	100	100
55	95	100	95	100
60	85	95	80	100
70	10	40	0	50
80	0	0	0	0

Таблица 4. Термостабильность пуллулазазы нативных и стабилизированных клеток *Bacillus sp.*

Температура, °С	Относительная активность, %	
	нативные клетки	стабилизированные клетки
30	100	100
40	100	100
50	95	100
60	45	95
70	15	25
80	0	0

ние рН и повышение температуры приводит к заметной инактивации  $\alpha$ -амилазной активности обеих форм клеток (табл. 1, 2). Интересно отметить, что рН и температурный оптимум пуллулазазной и  $\alpha$ -амилазной активности клеток совпадают, что позволяет осуществлять одноэтапный гидролиз крахмала клетками *Bacillus sp.*

Данные литературы о влиянии ионов различных металлов свидетельствуют о том, что ионы  $\text{Ca}^{2+}$  в отличие от многих других ионов, оказывают положительное действие на активность пуллулазазы микроорганизмов [9, 11]. Результаты наших опытов с использованием ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в концентрации 0,03 М также выявили положительный эффект их как в отношении нативных, так и стабилизированных клеток (рис. 1). Кроме того, добавление этих ионов к раствору фермента повышает его термостабильность. Так, выдерживание его при 60° в течение пяти часов в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$  приводит к снижению пуллулазазной активности нативных клеток на 85%, а стабилизированных лишь на 20%.

Изучение продуктов гидролиза пуллулана и крахмала ферментным комплексом *Bacillus sp.* показало, что в зависимости от продолжительности гидролиза обоих субстратов образуются различные сахара. Так, при расщеплении крахмала вначале образуются олигосахариды и глюкоза, а затем лишь глюкоза (рис. 2, справа). В случае же гидролиза пуллулана клетками *Bacillus sp.* наряду с мальтотриозой вначале и ден-

тифинируется также и глюкоза, а при более длительном гидролизе единственным продуктом является глюкоза (рис. 2, слева).

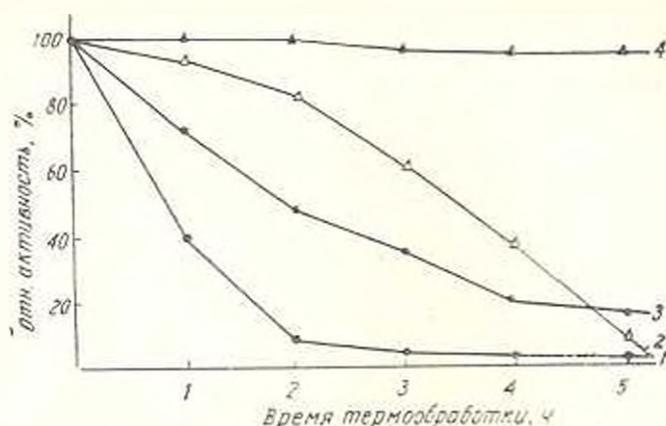


Рис. 1. Влияние ионов Ca<sup>2+</sup> на пуллулазную активность клеток в активном и стабилизированном состояниях. 1—без Ca<sup>2+</sup>, 2—с Ca<sup>2+</sup> активные клетки, 3—без Ca<sup>2+</sup>, 4—с Ca<sup>2+</sup> стабилизированные клетки.

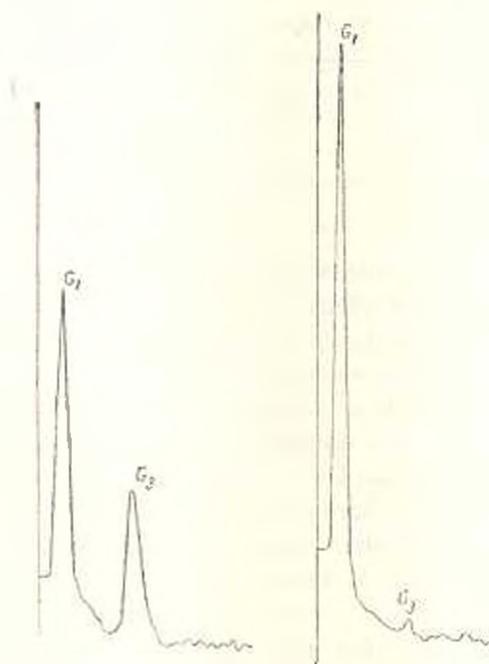


Рис. 2. Высокоэффективная жидкостная хроматография гидролиза: слева—пуллулана, справа—крахмала (G<sub>1</sub>—глюкоза, G<sub>2</sub>—мальтотриоза).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что термофильный штамм *Bacillus sp.* обладает не только α-амилазой и пуллулазной активностью, но и другими гидролазами, расщепляющими различные олигосахариды, и является персекутивным штаммом для одноступенчатой конверсии крахмала и пуллулана в сахаристые продукты.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Foster A. B. J. Chem. Soc., 982—987, 1953.
2. Hale W. S. and Rawlins L. C. Cereal. Chem., 28, 49—51, 1951.
3. Harada T., Misaki A., Aka H., Yokobayashi K. and Sugimoto K. Biochem. et Biophys. Acta, 268, 497—505, 1972.
4. Manners D. J. and Marthensson N. K. Carbohydr. Res., 91, 99—105, 1981.
5. Marthensson K. Biotech. and Bioeng., 16, 579—591, 1974.
6. Nelson N. U. Biol. Chem., 153, 375—380, 1941.
7. Norman B. E. J. Jpn. Soc. Starch Sci., 30, 2, 209—211, 1983.
8. Okba R., Chean H., Hayashi S. and Ueda S. Biotech. and Bioeng., 20, 661—676, 1978.
9. Okba R. and Ueda S. Biotech. and Bioeng., 22, 2137—2154, 1980.
10. Somogyi M. J. Biol. Chem., 160, 61—67, 1945.
11. Takasaki Y. Agr. Biol. Chem., 40, (8), 1523—1530, 1976.
12. Whelan W. J. Biochem. J., 122, 609—615, 1971.

Поступило 13 X 1987 г.

Биол. ж. Армения, т. 41, № 2, 1988

УДК 636.12/14 663.513

### ПОЛУЧЕНИЕ КОРМОВЫХ ДРОЖЖЕЙ НА ФИЛЬТРАТЕ ПРОИЗВОДСТВА ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ

Л. А. ЕРЗНИКЯН, Ф. Г. САРУХАНИЯН, А. Л. ЭЛИАЗЯН,  
А. Г. СЕВОЯН, М. Л. СТЕПАНИН

Институт микробиологии АН АрмССР, лаборатория бродильных  
микроорганизмов, г. Абовян

Установлена возможность использования фильтрата лимоннокислотного производства Спитакского сахарного завода в качестве питательной среды для получения высококачественной дрожжевой биомассы. Отобраны продуктивные штаммы кормовых дрожжей, эффективно усваивающие остаточные сахара фильтрата.

Հաստատվել է, որ Սպիտակի շաքարի գործարանի լիմոնաթթվի արտադրության ֆիլտրատը բարենպաստ սննդամիջավայր է շաքարանկալի բարձրորակ կենսա-գոյական ստանալու համար: Ընտրվել են կիրառելի շաքարանկերի աչելիսի շտամ-ներ, որոնք մեծ արդյունավետությամբ շտրագնում են ֆիլտրատի շաքարները և կու-տակում բարձր էրազ կենսագանգված:

The possibility of use of filtrate of citric acid production from Spitak sugar factory as a nutritious medium for the production of high qualitative yeast biomass has been established. Productive strains of fodder yeasts, effectively adopting remnant sugars of filtrate, have been selected.

*Дрожжи кормовые—производство лимонной кислоты—протеин—аминокислоты.*

Микробиологическое получение кормовых продуктов с использованием местных ресурсов является важным этапом в современных микробиологических исследованиях [1]. Использование промышленных отходов для получения кормовых дрожжей даст возможность рационально решать проблемы малозатходного производства и охраны окружающей среды. В настоящее время Спитакский сахарный завод выпускает в год свыше тысячи тонн кристаллической лимонной кислоты. Со сточ-