

Биолог. журн. Армении, 3 (55), 2003

УДК 579.222:577.152.32

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ ЛАКТОСАХАРОЗЫ

В.А. АБЕЛЯН, А.М. БАЛАЯН

Институт микробиологии НАН Армении, 378510, г.Абовян

Изучен процесс получения лактосахарозы (О-β-D-галактопиранозил-(1,4)-О-α-D-галактопиранозил-(1,2)-β-D-фруктофуранозид) из сахарозы и лактозы с помощью трансгликозилирования β-фруктофуранозидазой *Penicillium palitans* T1 и инвертазы *Kluyveromyces marxianus* IGC-3884. Оптимальные рН и температура находились в пределах рН 5,5-6,0 и 50-55° соответственно. Оптимальное соотношение лактозы и сахарозы и концентрация общих сахаров для эффективного получения лактосахарозы были 1:1 и 30-40% соответственно. Выход конечного продукта составлял 71% от сахарозы.

Առումնասիրվել է լակտոսախարոզի ստացման պրոցեսը (O-β-D-գալակտոպիրանոզիլ-(1,4)-O-α-D-գալակտոպիրանոզիլ-(1,2)-β-D-ֆրուկտոֆուրանոզիդ) սախարոզի և լակտոզի խառնուրդից *Penicillium palitans* T1-ի կողմից արտադրվող β-ֆրուկտոֆուրանոզիդազի և *Kluyveromyces marxianus* IGC-3884-ի ինվերտազի օգնությամբ: Պրոցեսի լավագույն рН-ը և ջերմաստիճանը համապատասխանաբար գտնվում են рН 5,5-6,0 և 50-55°-ի սահմաններում: Լակտոսախարոզի արդյունավետ ստացման համար լակտոզի և սախարոզի օպտիմալ հարաբերակցությունը և ընդհանուր շաքարների խտությունը համապատասխանաբար կազմում են 1:1 և 30-40%: Վերջնանյութի ելքը կազմում է 71% հաշված սախարոզից:

The lactosucrose (O-β-D-galactopyranosyl-(1,4)-O-α-D-glucopyranosyl-(1,2)-β-D-fructofuranoside) synthesis from the mixture of sucrose and lactose by transfructosylation action of β-fructofuranosidase of *Penicillium palitans* T1 and invertase of *Kluyveromyces marxianus* IGC-3884 has been studied. The optimum pH and temperature were in the range of pH 5.5-6.0 and 50-55°, respectively. The optimum ratio of lactose to sucrose and total sugar concentration for lactosucrose synthesis were 1:1 and 30-40%, respectively. The yield of the final product was 71% from sucrose.

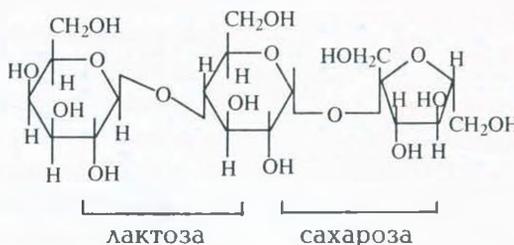
β-Фруктофуранозидаза – инвертаза – лактоза – сахароза – лактосахароза

Сахар является основным подслащивающим веществом, состоящим только из сахарозы. Однако чрезмерное потребление его приводит к возникновению различных заболеваний, а также к избыточной массе. Поэтому поиск новых, безвредных для человека сладких веществ, не являющихся источником энергии, является актуальной задачей.

В настоящее время наиболее широкое распространение получили такие синтетические заменители сахара, как сахарин, цикламат натрия, ацесульфам К и аспартам. Однако все они имеют побочные эффекты и небезопасны для организма человека при употреблении их в больших дозах. В этом отношении более перспективными являются подсластители природного происхождения – стевииозид, тауматин, глицирризин, глюкозо-фруктозный сироп и т.д.

Ранее нами сообщалось о получении сиропа фруктозо-концевых олигосахаридов из смеси крахмала и сахарозы с помощью циклодекстрин глюканотрансферазы [1], а также глюкозо-фруктозного сиропа с высоким содержанием фруктозы из инулинсодержащего сырья с применением свободной и иммобилизованной инулиназы [2].

С другой стороны, в качестве подсластителя особый интерес представляет лактозилфруктоза (О-β-D-галактопиранозил-(1,4)-О-α-D-галактопиранозил-(1,2)-β-D-фруктофуранозид, лактосахароза, ЛС), которая представляет собой трисахарид, состоящий из галактозы, глюкозы и фруктозы в эквимольных соотношениях:



Данный олигосахарид отличается отсутствием калорийности и кариогенности, не усваивается в верхнем желудочно-кишечном тракте, однако является фактором роста для бифидофлоры кишечника, улучшает уровень липидов, а также оказывает положительное влияние при запорах и гнойных процессах [6].

Настоящая работа посвящена изучению процесса получения ЛС с использованием трансферазной активности β-фруктофуранозидазы *Penicillium palitans* и инвертазы *Kluyveromyces marxianus*.

Материал и методика. Выращивание *P. palitans* шт. Т1 (ИНМИА 10745) из коллекции культур микроорганизмов Института микробиологии НАН Армении осуществляли в течение 7 сут при 30° на среде следующего состава (г/л): инулин -2,5; сахароза -2,5; NaNO₃ -2,0; KH₂PO₄ - 1,0; MgSO₄·7H₂O - 0,5; KCl - 0,5; FeSO₄ - 0,1 (рН 7,0). Культивирование *K. marxianus* шт. IGC-3884 (ИНМИА 10085) проводили согласно известной методике [2].

Биомассу отделяли фильтрованием или центрифугированием, а культуральную жидкость, содержащую β-фруктофуранозидазу, концентрировали в 10 раз на ультрафильтрационных мембранах типа AP-0.2 и диализовали против водопроводной воды в течение 24 ч.

β-Фруктофуранозидазную активность определяли по [4]. За единицу активности принимали количество фермента, необходимое для переноса 1 мкм фруктозы за 1 мин в условиях эксперимента.

Количество трансферных продуктов (А) определяли по формуле:

$$A\% = (\text{Glc-Fru})/\text{Glc} \times 100$$

где Glc – количество свободной глюкозы, а Fru – количество свободной фруктозы.

Количество синтезированной ЛС (В) оценивали по соотношению продукта к исходной сахарозе:

$$B\% = \text{ЛС}/\text{сахароза} \times 100$$

Количества глюкозы, фруктозы, сахарозы и лактозы определяли с помощью ферментных китов и инструкции "Boehringer Mannheim" (Германия).

Редуцирующие вещества идентифицировали методом Сомоджи-Нельсона [7], а общие сахара – по [5]. Определение типов связей в олигосахаридах проводили методом

метилирования и метанолиза [3].

Выделение и очистку ЛС осуществляли колоночной хроматографией на активированном угле, с последующей рехроматографией на Bio-Gel P-2 [6].

ТСХ проводили в системе растворителей н.бутанол-этанол-вода (4:3:3), БХ – н.бутанол-пиридин-вода (6:4:3), а ВЭЖХ – по ранее описанному методу [1].

В работе использовали глюкозу, фруктозу, сахарозу и лактозу производства "Sigma" (США) и реактивы марки х.ч. и осч.

Результаты и обсуждение. Влияние pH и температуры. Для выявления оптимальных значений pH и температуры процесса по 0,2г сахарозы и лактозы растворяли в 1мл буферного раствора с соответствующим pH, добавляли 0,3мл ферментного раствора (10ед/г сахарозы) и проводили наблюдения в течение 24 ч.

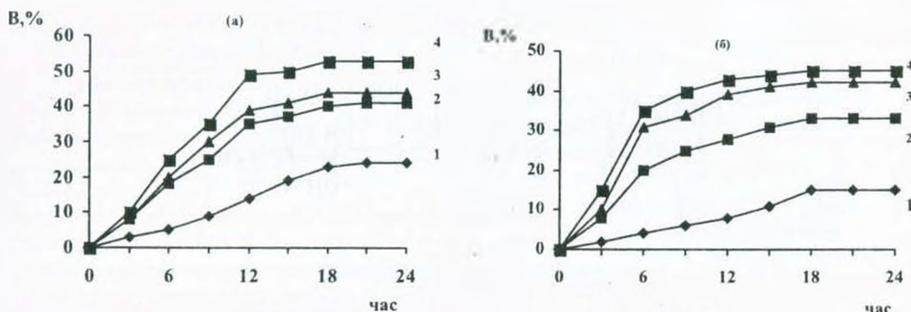


Рис. 1. Влияние pH на образование ЛС (V, %) β -фруктофуранозидазой *P. palitans* (а) и инвертазой *K. marxianus* (б). pH 4,0 и 5,0 – 20 мМ ацетатный буфер; pH 6,0 и 7,0 – 20мМ Na-фосфатный буфер. (1а,б), pH 4,0; (2а), pH 7,0; (3а, 2б), pH 5,0; (4а, 3б), pH 6,0; (4б), pH 5,5.

Образование ЛС β -фруктофуранозидазой *P. palitans* увеличивалось с повышением pH в рамках 4,0 – 5,5, несколько снижалось при pH 7,0 и достигало своего максимума при pH 6,0, что выше, чем для гидролитической активности и самотрансферазной реакции на сахарозе (pH5,0) (рис.1а). Аналогичная картина наблюдалась также для фермента, продуцируемого *K. marxianus*, который при гидролизе субстратов максимальную активность проявлял при pH 4,5 [2], в то время как наилучший синтез ЛС происходил при pH 5,5 (рис.1б). Следует отметить, что по продуктивности инвертаза *K. marxianus* несколько уступала грибному ферменту.

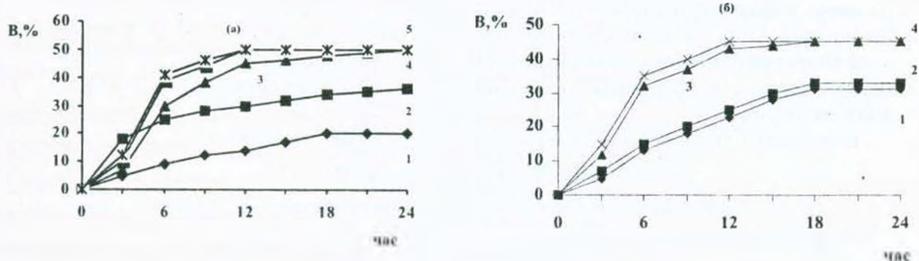


Рис.2. Влияние температуры на образование ЛС (V, %) β -фруктофуранозидазой *P. palitans* (а) и инвертазой *K. marxianus* (б). (1а,б), 40°; (2а), 70°; (3а, б), 50°; (4а, б), 55°; (5а, 1б), 60°.

Синтез ЛС практически не зависел от изменения температуры в интервале 50-60° в случае β -фруктофуранозидазы *P. palitans*, однако

эффективность процесса резко снижалась при более высоких или низких ее значениях (рис.2а).

Инвертаза имела оптимум в пределах температуры 50-55° (рис.2б).

Влияние количества фермента. Для выявления количества вносимого фермента на трансферазную реакцию готовили 30%-ные растворы с содержанием сахарозы и лактозы в соотношении 1:1, добавляли различные количества ферментов и реакцию осуществляли в течение 10ч при 50° и pH 5,5.

В случае обоих ферментов с увеличением количества биокатализатора повышалась степень трансферазной реакции. Однако для эффективного проведения реакции, β -фруктофуранозидазу *P.palitans* целесообразно использовать в количестве 7,5 ед на 1г сахарозы, в то время как инвертазу необходимо добавлять в два раза большем количестве (рис.3).



Рис.3. Степень трансгликозилирования (А, %) в зависимости от количества добавляемой β -фруктофуранозидазы *P.palitans* (1) и инвертазы *K.marxianus* (2).

Влияние соотношения и концентрации субстратов. На образование ЛС определенное влияние оказывает также соотношение лактозы и сахарозы в реакционной смеси. Для выявления оптимального варианта готовили 40%-ный раствор сахарозы и лактозы в различных соотношениях, добавляли 7,5 ед β -фруктофуранозидазы или 15 ед инвертазы на 1г сахарозы и реакцию осуществляли при 50° и оптимальных значениях pH в течение 10ч. Выявлено, что в данных условиях взаимопревращение достигает максимума при соотношении субстратов 1:1 в/в (рис.4).

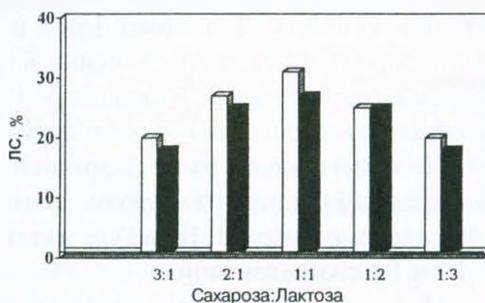


Рис.4. Образование ЛС в зависимости от соотношения лактозы к сахарозе. ■ - β -фруктофуранозидаза; □ - инвертаза.

Эффективность процесса практически не менялась при применении субстратов с общей концентрацией 30-40%, при которой реакция завершалась за 12-15ч. При этом синтез ЛС с участием β -фруктофуранозидазы *P.palitans* был менее зависим от изменения концентрации, чем при инвертазе *K.marxianus* (рис.5).

Очистка и идентификация продуктов. По 2г сахарозы и лактозы растворяли в 10мл 20 мМ Na-фосфатного буфера с pH 6,0 в случае β -фруктофуранозидазы и pH 5,5 (20мМ ацетатный буфер) для инвертазы и после добавления 7,5 ед β -фруктофуранозидазы или 15 ед инвертазы на 1 г сахарозы реакцию осуществляли в течение 15 ч при 55°. По истечении указанного

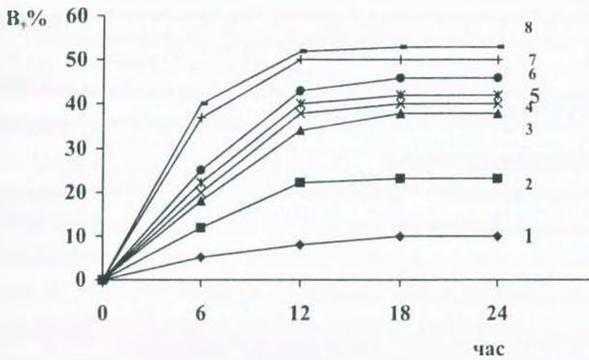


Рис. 5. Влияние концентрации общих сахаров на образование ЛС. (1, 2, 4, 5) - концентрация общих сахаров составляет 25, 50, 40 и 30% соответственно для инвертазы, (3, 6, 7, 8) - концентрация общих сахаров составляет 25, 50, 40 и 30% соответственно для β -фруктофуранозидазы.

времени реакцию оставляли выдерживанием реакционной смеси при 90° 30 мин и после фильтрации пропускали через колонку (1,0 x 30 см) с активированным углем. Колонку последовательно промывали дистиллированной водой (300 мл), а затем 10%-ным (610 мл), 15%-ным (850 мл) и 20%-ным этанолом (430 мл) со скоростью

100 мл/час.

Водная фракция содержала только глюкозу и фруктозу, 10%-ная этаноловая фракция - лактозу и сахарозу, 15%-ная - олигосахариды I и II, а 20%-ная - олигосахариды III и IV.

Дальнейшую очистку олигосахаридов проводили на колонке (1,5 x 100 см) с Bio-Gel P-2. Для этого 15%- и 20%-ную этаноловые фракции концентрировали до 2мл и наносили на колонку. Элюцию осуществляли дистиллированной водой со скоростью 10мл/ч. Очищенные таким образом олигосахариды были гомогенными по данным ТСХ, БХ и ВЭЖХ.

Полным кислотным гидролизом образцов установлено, что олигосахарид I состоит из глюкозы, галактозы и фруктозы в соотношении 1:1:1, а олигосахариды II, III и IV - из глюкозы и фруктозы в соотношении 1:2, 1:3 и 1:4 соответственно.

Изучение продуктов метанолиза полностью метилированных олигосахаридов показало наличие метил-2,3,4,6-тетра-О-метил-галактозида, метил-2,3,4-три-О-метил-глюкозида и метил-1,3,4,6-тетра-О-метил-фруктозида в первом из них. Олигосахариды II, III и IV состояли из метил-2,3,4,6-тетра-О-метил-глюкозида, метил-1,3,4,6-тетра-О-метил- и метил-3,4,6-три-О-метил-фруктозидов в соотношениях, приведенных в табл. 1.

Полученные результаты однозначно показывают, что олигосахарид I представляет собой трисахарид, где галактозный остаток соединен с глюкозой посредством 1,4-связи, а фруктоза связана с глюкозой с помощью 1,2-связи, т.е. является лактосахарозой (О- β -D-галактопиранозил-(1,4)-О- α -D-галактопиранозил-(1,2)- β -D-фруктофуранозид). Олигосахариды II, III и IV идентифицированы как I^F (1- β -фруктофуранозилсахароза, 1-кестоза), I^G (1- β -фруктофуранозил) сахароза, нистоза и фруктофуранозилнистоза соответственно.

В условиях пилотной установки после однократной очистки на колонке с активированным углем получена ЛС с выходом 71% от сахарозы. Конечный

сиропообразный продукт содержал около 0,5% глюкозы и фруктозы, 0,6% лактозы, 0,2% сахарозы, 0,5% 1-кестозы и 0,1% других олигосахаридов.

Таблица 1. Анализ продуктов трансгликозилирования из смеси сахарозы и лактозы под действием инвертазы и β-фруктофуранозидазы

Продукт	Редуцирующие вещества	Метил-гликозиды	Соотношение метил-гликозидов	Степень полимеризации
Олигосахарид I	Нет	2,3,4,6-Гал 1,3,4,6-Фру 2,3,6-Глю	1,1 0,9 1,0	3
Олигосахарид II	Нет	2,3,4,6-Глю 1,3,4,6-Фру 3,4,6-Фру	1,0 1,0 1,0	3
Олигосахарид III	Нет	2,3,4,6-Глю 1,3,4,6-Фру 3,4,6-Фру	1,0 1,1 2,2	4
Олигосахарид IV	Нет	2,3,4,6-Глю 1,3,4,6-Фру 3,4,6-Фру	1,1 0,9 3,1	5
2,3,4,6-Глю 2,3,4,6-Гал 2,3,6-Глю 1,3,4,6-Фру 3,4,6-Фру	- метил-2,3,4,6-тетра-О-метил-глюкозид; - метил-2,3,4,6-тетра-О-метил-галактозид; - метил-2,3,6-три-О-метил-глюкозид; - метил-1,3,4,6-тетра-О-метил-фруктозид; - метил-3,4,6-три-О-метил-фруктозид.			

По своей продуктивности разработанный метод с применением фермента *P.palitans* практически не уступает, а в некоторых случаях превосходит известный процесс с использованием β-фруктофуранозида *Arthrobacter sp.* K-1, которая является производственным ферментом при промышленном производстве ЛС [6]. Характеристика конечного продукта соответствует качеству подсластителя LS-98 и с успехом может использоваться в качестве заменителя сахара.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абелян В.А., Балаян А.М., Авакян З.Г., Манукян Л.С., Узунян Л.В. Биохимия, 57, 3, 438-443, 1992.
2. Абелян В.А., Манукян Л.С. Прикл. биохим. и микробиол., 28, 3, 356-361, 1992.
3. Елинов Н.П., Абелян В.А., Кустова Н.В. Микология и фитопатология, 15, 5, 394-398, 1981.
4. Зинченко О.Н., Кривошеева О.В., Лобанок А.Г. Прикл. биохим. и микробиол., 31, 2, 186-189, 1995.
5. Dubois M., Gills R., Hamilton J.K. Anal. Chem. 28, 2, 350-354, 1959.
6. Fujita K., Osawa T., Mikuni K. Denpun Kagaku. 38, 1, 1-7, 1991.
7. Somogyi M.J. J. Biol. Chem., 195, 1, 19-22, 1952.

Поступила 26.VI.2002