



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 54315

(13) A

(51) 7 C 12 N 9 / 00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ α -ГАЛАКТОЗИДАЗИ

1

2

(21) 2002076001

(22) 19 07 2002

(24) 17 02 2003

(72) Капрельянець Леонід Вікторович, Петросьянц
Арсен Педросович(73) Капрельянець Леонід Вікторович, Петросьянц
Арсен Педросович(57) Спосіб одержання α -галактозидази шля-
хом культивування мікроорганізму, що продукує

фермент, на живильному середовищі, що містить індуктори біосинтезу α -галактозидази - галактоолігосахариди, який відрізняється тим, що як мікроорганізм-продуцент використовують *Bifidobacterium longum*, який культивують на середовищі MRS, а як джерело галактоолігосахаридів - ферментоване дріжджами *Saccharomyces cerevisiae* соєве молоко, яке додають в кількості 5 % від об'єму живильного середовища

Винахід відноситься до мікробіологічної промисловості, а саме до способів одержання ферменту α -галактозидази

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб одержання α -галактозидази з використанням в якості продуцента ферменту мікроміцета *Cladosporium cladosporioides*, який культивують на живильному середовищі, що містить як джерело індукторів біосинтезу α -галактозидази соєву муку в кількості 20 - 40 г/л [Патент 10512 А Україна Спосіб одержання α -галактозидази МПК⁸ С 12 N 9/00 Надр 25 12 96 - Бюл. № 4]

Загальною суттєвою ознакою цього способу і способу, що заявляється, є використання, як індукторів біосинтезу α -галактозидази соєвих галактоолігосахаридів

Але галактоолігосахариди соєвого борошна у порівнянні з галактоолігосахаридами, які використовуються за способом, що заявляється, є більш слабкими індукторами біосинтезу α -галактозидази, крім того, *Cladosporium cladosporioides* є менш активним продуцентом ферменту, ніж бактерії, які використовуються за способом, що заявляється. Тому α -галактозидаза, що отримується за способом-прототипом, має нищу активність порівняно з α -галактозидазою, яка одержується за способом, що заявляється

В основу винаходу, що заявляється, поставлено задачу у способі одержання α -галактозидази шляхом використання більш активних продуцента ферменту та індукторів його біосинтезу отримати фермент з підвищеною ак-

тивністю

Додатковий технічний результат полягає в скороченні технологічного циклу одержання ферменту

Поставлена задача вирішується в способі одержання α -галактозидази шляхом культивування бактерій *Bifidobacterium longum* протягом 24 годин при температурі 38°C на середовищі MRS, до якого додають у кількості 5% від об'єму живильного середовища ферментоване дріжджами *Saccharomyces cerevisiae* соєве молоко, з наступними центрифугуванням живильного середовища, яке містить бактерії, при 6000 об/хв протягом 30 хвилин, суспендуванням бактеріальних клітин у нитратному буфері з pH 5,8, дезінтеграцією бактеріальних клітин при 9 Гц протягом 10 хвилин, розфасовуванням одержаного ферментного препарату та його висушуванням

Середовище MRS містить наступні компоненти (г/л): м'ясний екстракт - 10, пептон - 10, дріжджовий екстракт - 5, α -глюкозу - 20, ацетат натрію - 5, цитрат амонію - 2, двузамінний фосфат калію - 2, сульфат магнію - 0,2, сульфат марганцю - 0,05, агар - 12

Ферментоване соєве молоко використовують як джерело індукторів біосинтезу α -галактозидази - модифікованих галактоолігосахаридів. Його одержують шляхом розведення водою сухого соєвого молока у співвідношенні 1 : 10, внесення до соєвого молока дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* у кількості 5×10^6 КУО/мл, культивуванні протягом 10 годин при температурі 37°C з наступним центрифугуванням при 6000 об/хв протягом 40

(13) A

(11) 54315

(19) UA

хвилин та стерилізацією фільтрату при 98°C протягом 30 - 40 хвилин. Одержаний препарат містить 0,4 - 0,5% модифікованих олигосахаридів - мелібіози, галактобіози, маннінотріози.

Суттєвими ознаками способу, що заявляється, є використання як продуцента ферменту *Bifidobacterium longum* та ферментованого дріжджами *Saccharomyces cerevisiae* соєвого молока як джерела індукторів біосинтезу α -галактозидази.

Причинно-наслідковий зв'язок між цими ознаками та технічним результатом, що досягається, обумовлений наступним.

Бактерії роду *Bifidobacterium* - постійні представники кишкової мікрофлори організму людини. Вони є одними з основних пробіотичних культур, які використовуються в препаратах та продуктах функціонального призначення. Експериментальні дослідження свідчать про те, що ці бактерії здатні продукувати фермент галактозидазу [Roy D, Blanchette L, Savoie L and Ward P. α -at β -Galactosidase properties of *Bifidobacterium infantis* // Milk wissenschaft-1992-Vol 47 -P 18-21, Marisa S Garro, Graciela S de Giori, Graciela F de Valdez and G Oliver α -D-Galactosidase from *Bifidobacterium longum* // Letters in Appl Microbiol - 1994 - Vol 19 -16-19].

Галактозидаза є індукцибельним ферментом, синтез якого здійснюється мікроорганізмами при наявності в поживному середовищі відповідного субстрату, а саме - галактоолігосахаридів. Інтенсивність пдропічних процесів розщеплення галактоолігосахаридів α -галактозидазами обумовлена природою субстрату. Галактоолігосахариди збудовані з залишків галактози. На редуруючому кінці їх молекул знаходиться фруктоза, яка лімітує глибину та швидкість розщеплення галактоолігосахаридів α -галактозидазами, які не здатні розщеплювати α -(1,2)-глікозидний зв'язок між галактозою і фруктозою.

Соєве борошно містить 4,5%, а сухе соєве молоко 8,5% галактоолігосахаридів [Силенко Г П, Капрельянци Л В, Ахметов А С, Павленкова П П, Шерстобитов В В. Лечебные и питательные свойства соевых продуктов-Москва. СигналЪ, 2000 -С 28]. При ферментації соєвого молока дріжджами відбувається пдропіз α -(1,2)-глікозидного зв'язку між галактозою і фруктозою фруктофуранозидазою (інвертазою), яка міститься в дріжджах. Внаслідок цього такі галактоолігосахариди як рафіноза, стахіоза та інші перетворюються на мелібіозу, галактобіозу, маннінотріозу та інші галактоолігосахариди, які побудовані тільки з залишків α -D-галактопіраноз, що зв'язані α -(1,6)-глікозидними зв'язками, доступними для α -галактозидази.

Це підтверджує експеримент, в якому α -галактозидазу одержували шляхом культивування *Bifidobacterium longum* на середовищі MRS без додавання до живильного середовища індукторів біосинтезу ферменту (варіант 1), з використанням як джерела індукторів соєвого борошна, яке додавали в кількості 10% від маси живильного середовища (варіант 2), з використанням як джерела індукторів соєвого молока, яке додавали в кількості 5% від маси живильного середовища

(варіант 3), з використанням як джерела індукторів ферментованого дріжджами соєвого молока, яке додавали в кількості 5% від маси живильного середовища (варіант 4).

В експерименті був використаний штам *Bifidobacterium longum* ЛМ-6 з колекції мікроорганізмів кафедри біохімії та мікробіології Одеської державної академії харчових технологій.

Культивування *B. longum* проводили у пробірках, що містили 6мл живильного середовища, протягом 24 годин при температурі 38°C. До кожної пробірки вносили культуру *B. longum*, яка містила $7,2 \times 10^8$ колонійутворюючих одиниць (КЮО), в кількості 3% від об'єму середовища. Одержану біомасу центрифугували при 6000об/хв протягом 30 хвилин, суспендували бактеріальні клітини у цитратному буфері з рН 5,8 та проводили дезинтеграцію бактеріальних клітин при 9Гц протягом 10 хвилин. Супернатант досліджувався на присутність α -галактозидазної активності.

Активність α -D-галактозидази визначали за методом, який передбачає визначення адсорбції п-нітрофенолу, який утворюється в наслідок дії ферменту на п-нітрофеніл- α -D-галактопіранозид. За одиницю активності ферменту приймали кількість ферменту, яка утворює за 1 хвилину 1,0ммоль п-нітрофенолу з п-нітрофеніл- α -D-галактопіранозиду [Mulimani V H, Ramalingam. Enzymic hydrolysis of raffinose and stachyose present soymilk by crude α -galactosidase from *Gibberella fujikuroi* // Biochem Mol Biol Int - 1995 - Vol 36 -P 897-905].

Отримані результати (фіг 1) свідчать, що при додаванні до живильного середовища MRS ферментованого дріжджами соєвого молока (варіант 4) активність α -галактозидази, що синтезується бактеріями, найвища порівняно з іншими варіантами та прототипом.

Було встановлено також, що максимальна активність ферменту - 9,2од/мл, досягається при додаванні до живильного середовища ферментованого дріжджами соєвого молока в кількості 5% від об'єму середовища. Подальше збільшення його кількості не приводить до підвищення активності ферменту (фіг 2).

Перелік фігур: фігура 1. Діаграма "Вплив джерела індукторів біосинтезу альфа-галактозидази, що використовується, на активність ферменту".

Фігура 2. Діаграма "Вплив вмісту ферментованого соєвого молока в живильному середовищі на активність альфа-галактозидази".

Спосіб, що заявляється здійснюється наступним чином.

Приклад 1. 6кг сухого соєвого молока розчиняють у 60л води. Додають дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* у кількості 5×10^6 КЮО/мл та культивують протягом 10 годин при температурі 37°C з наступним центрифугуванням при 6000об/хв протягом 40 хвилин та стерилізацією фільтрату при 98°C протягом 30 - 40 хвилин.

До ферментеру обсягом 2м³ додають 60л ферментованого соєвого молока (5% від загального обсягу живильного середовища), 1140л середовища MRS та 36л заквасочної культури, яка містить $7,2 \times 10^8$ КЮО *Bifidobacterium longum*. Проводять ферментацію протягом 24 годин при

температурі 38°C Одержану біомасу центрифугують при 6000об/хв протягом 30 хвилин, суспендують бактеріальні клітини у цитратному буфері з рН 5,8 та проводять дезінтеграцію бактеріальних клітин при 9Гц протягом 10 хвилин. Супернатант розфасовують та висушують. Активність одержаного ферменту становить 9,2од/мл.

Приклад 2 здійснюють аналогічно прикладу 1, при цьому ферментоване соєве молоко додають до живильного середовища в кількості 36л (3% від загального обсягу живильного середовища). Активність одержаного ферменту становить 8,7од/мл.

Приклад 3 здійснюють аналогічно прикладу 1, при цьому ферментоване соєве молоко додають до живильного середовища в кількості 72л (6% від загального обсягу живильного середовища). Активність одержаного ферменту становить 9,2од/мл.

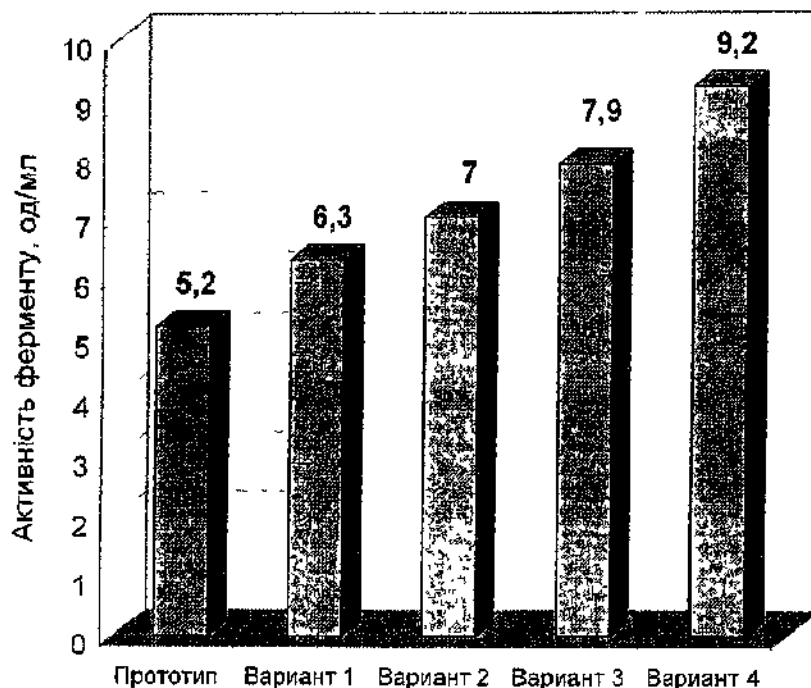
Наведені приклади свідчать про те, що використання ферментованого соєвого молока, в кі-

лькості меншій, ніж така, що заявляється, приводить до зниження активності ферменту. При використанні більшої кількості ферментованого соєвого молока відбувається зайва витрата джерел індукторів біосинтезу ферменту, оскільки підвищення активності α -галактозидази, що одержують, не відбувається.

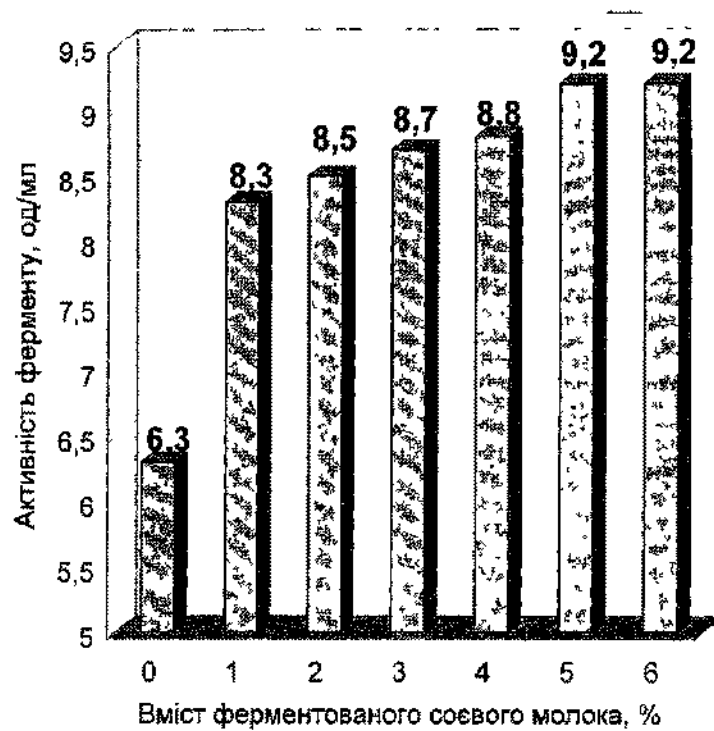
Активність α -галактозидази, отриманої за способом, що заявляється становить 9,2од/мл, що в 1,8 разів більше, ніж активність α -галактозидази, отриманої за способом-прототипом, яка становить 5,2од/мл при визначенні активності з використанням п-нітрофеніл- α -D-галактопіранозиду.

Загальна тривалість технологічного процесу за способом, що заявляється, складає 24 години, в той час, як за способом-прототипом - 144 години. Отже процес одержання ферменту скорочується в 6 разів.

Рисунок 1. Вплив джерела індукторів біосинтезу альфа-галактозидази, що використовується, на активність ферменту



Фіг. 1



Фіг. 2