

Некоторые аспекты применения декстраназы в сахарных растворах

К. АБРАХАМ (e-mail: karin.abraham@campus.tu-berlin.de)^{1,2}

С. ХАГЕН¹

К. ШЛЮМБАХ¹

А. РОДЕ (e-mail: arohde@sternenzym.de)²

Е. ФЛЮТЕР¹

¹ Technische Universität Berlin, Seestr. 13, 13353 Berlin, Germany

² Sternenzym, Kurt-Fischer-Str. 55, 22926 Ahrensburg, Germany

ВВЕДЕНИЕ

Декстраны представляют собой полисахариды, которые продуцируются микроорганизмами и являются нежелательными в производстве сахара. Они могут присутствовать в сахарной свёкле и сахарном тростнике. В частности, в сахарной свёкле они образуются под воздействием неблагоприятных погодных условий, которые способствуют росту мезофильных бактерий. Резкая смена погоды, когда заморозки сменяются оттепелью, приводит к повышенному содержанию декстранов в сахарной свёкле.

Основным фактором образования декстранов являются молочнокислые бактерии вида *Leuconostoc mesenteroides*. Структура декстрана может варьироваться в зависимости от штамма микроорганизмов. Декстран состоит из остатков глюкозы, соединённых друг с другом α -(1-6)-гликозидными связями. Кроме того, в точках ветвления имеются α -(1-2)-, α -(1-3)-, α -(1-4)-гликозидные связи (Promraksa, 2008). Декстраны, образуемые бактериями штамма *L. mesenteroides*, содержат приблизительно 95% α -(1-6)-связей и 5% связей других типов (Khalikova и др., 2005).

Бактерии штамма *L. mesenteroides*, продуцирующие декстран, обладают ферментативной активностью. Под воздействием фермента

декстрансахарозы происходит расщепление молекул сахарозы до мономеров — фруктозы и глюкозы. Затем в результате полимеризации глюкозы образуются полисахариды. Эти полимеры извлекаются из измельчённого сырья вместе с соком. Наличие декстранов в соке или сиропе оказывает негативное влияние как на технологический процесс производства сахара, так и на качество конечной продукции. Декстраны, в зависимости от молекулярной массы и концентрации, приводят к увеличению вязкости раствора сахарозы, затрудняют фильтрование, очистку и выпаривание, а также снижают скорость кристаллизации. Кроме того, считается, что декстраны влияют на морфологию кристаллов, в частности, ведут к образованию кристаллов вытянутой вдоль оси *c* формы (Promraksa, 2008). Однако точное влияние различных фракций декстрана на кристаллизацию изучено ещё недостаточно.

Гидролиз декстрана с помощью ферментов является перспективным и широко применяемым методом для минимизации вышеуказанных проблем в сахарном производстве. Ферменты, расщепляющие декстран, синтезируются различными микроорганизмами (Khalikova и др., 2005). Гидролиз декстрана приводит к постепенному уменьшению средней молеку-

лярной массы. Таким образом, декстраны с изначально высокой молекулярной массой постепенно гидролизуются до низкомолекулярных декстранов, которые, в свою очередь, гидролизуются до олигосахаридов, изомальтотриозы и изомальтозы (Eggleston и др., 2009).

Согласно литературным источникам критическое значение декстрана составляет 500 мг/кг сахарозы. Считается, что высокомолекулярные декстраны являются основным фактором увеличения вязкости, а декстраны с низкой молекулярной массой — причиной образования кристаллов неправильной формы (Abdel-Rahman, 2007). Относительно низкий уровень и широкий диапазон молекулярных масс затрудняет точное определение фракций декстрана в соке (Day & Sarkar, 1986).

Для лучшего понимания технологических проблем, вызываемых декстраном, необходимо детальное определение декстранов и их свойств. Однако это по-прежнему представляет собой сложную задачу. Данная работа посвящена исследованию гидролиза высокомолекулярных декстранов ферментом декстраназой, полученной из штамма *Chaetomium gracile* (Sugazym DX L).

В первой части работы рассматриваются методы определения содержания декстрана и продук-

тов его распада для лучшего понимания кинетики и механизма процесса гидролиза.

Для оценки преимуществ обработки декстраназой необходимо рассмотреть специфику влияния разных фракций декстрана на процесс производства сахара. Поэтому вторая часть работы посвящена изучению влияния декстранов различной молекулярной массы и концентрации, а также ферментативной обработки высокомолекулярных декстранов на процесс кристаллизации, включая морфологию кристаллов и гранулометрический состав.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

В исследовании был использован ферментный препарат Sugazym DX L (производства компании SternEnzym) для гидролиза декстранов с высокой молекулярной массой от 1.500.000 до 2.800.000 Да (Sigma-Aldrich, T2000), а кроме этого – декстраны с низкой молекулярной массой 500 кДа (Carl Roth, T500) и 40 кДа (Carl Roth, T40).

Обработка ферментным препаратом

Для проведения опыта готовили сахарные растворы с массовой долей сахара 15% и разной концентрацией декстрана, а именно 2 000 и 5 000 мг высокомолекулярного декстрана на 1 кг сахарозы, рН установили на уровне 5,5. Внесли точно дозированное количество жидкого ферментного препарата и выдержали пробы на водяной бане при температуре 65 °С в течение 10 минут. Обработку прекращали инактивацией фермента путём нагревания до 80 °С и выдержки при этой температуре в течение 20 минут.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДЕКСТРАНА

Метод определения по мутности

После удаления крахмала (обработкой амилазами) и белка (осаждением трихлоруксусной кислотой) с последующей фильтрацией добавляли этиловый спирт для

осаждения декстрана и определяли мутность с помощью спектрофотометра (при длине волны 720 нм) (ICUMSA, 2011).

Метод Робертса с использованием щелочного раствора сульфата меди

Определение концентрации декстрана проводили по методу Робертса (Roberts и др., 1983) и Калейфа (Khaleifah, 2001). Все полисахариды осаждали этиловым спиртом, затем декстран селективно осаждали щелочным раствором сульфата меди, проводили цветную реакцию с фенолом и серной кислотой и определяли декстран колориметрическим методом на спектрофотометре (при длине волны 485 нм).

Содержание декстрана рассчитывали по формуле

$$m_{Dextran} = \frac{1}{A} \cdot \frac{1}{B} \cdot \frac{C}{D} \cdot E \cdot F \cdot 10^5,$$

где A – содержание сухих веществ на 100 мл раствора;

B – аликвота пробы, взятой для осаждения спиртом, мл;

C – объём раствора, полученного после осаждения спиртом, мл;

D – аликвота пробы, взятой для осаждения щелочным раствором сульфата меди, мл;

E – объём полученного раствора комплекса декстрана и меди, мл;

F – количество декстрана, определённого по калибровочной кривой, мг/мл.

Хроматография

Реальное содержание декстрана находилось ниже предела обнаружения методом гель-проникающей хроматографии (ГПХ) и высокоэффективной жидкостной хрома-

тографии (ВЭЖХ). Поэтому для проведения детального анализа использовали концентрированный раствор, увеличив содержание фермента и субстрата с применением коэффициента 40.

ЭКСПЕРИМЕНТЫ

ПО КРИСТАЛЛИЗАЦИИ

Проведение кристаллизации

Кристаллизацию в лабораторных условиях проводили способом, описанным в работе Шлюмбаха (Schlumbach и др., 2015). Для кристаллизации выпариванием использовали кристаллизатор вместимостью 5 л. В процессе выпаривания вёлся контроль за постоянным пересыщением до 50% кристаллических веществ. Чтобы обеспечить приемлемость результатов, проводили очистку/аффинацию и сушку. Для сушки сахара использовали псевдоожижение.

Исходные растворы готовили в виде 65%-ного раствора сахарозы с добавлением декстрана в соответствии с табл. 1. Для проведения кристаллизации сахарного раствора, обработанного ферментным препаратом, требовалось предварительное выпаривание 15%-ного сахарного раствора до получения 65–67%-ного раствора.

Анализ кристаллов сахара

Определение гранулометрического состава проводили методом рассева в соответствии с положениями метода GS2/9-37 Международной комиссии по унифицированным методам анализа сахара (ICUMSA, 2011). Кроме этого, с помощью микроскопа

Таблица 1. Концентрация декстрана и фермента при проведении экспериментов по кристаллизации

Средняя молекулярная масса декстрана, кДа	–	40	40	40	500	2 000	2 000	2 000	2 000	2 000
Концентрация декстрана, мг/кг сахарозы	0	5 000	2 000	500	2 000	5 000	2 000	500	5 000	5 000
Концентрация фермента, мг/кг сока	–	–	–	–	–	–	–	–	4	60

Axio Scope A1 производства Zeiss сделали снимки и проанализировали их с использованием программы ImageJ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ АНАЛИЗ

Определение декстранов и их свойств в растворах сахарозы после обработки ферментным препаратом. Метод определения по мутности и метод Робертса с использованием сульфата меди

Применяемые методы имеют разные пределы обнаружения. Метод определения по мутности широко применяется в промышленности как наиболее быстрый и простой метод определения декстрана. Однако у него есть свои ограничения. Основной недостаток — выявление лишь высокомолекулярных декстранов (Rauh и др., 1999). Он не выявляет декстраны с низкой молекулярной массой, а именно ниже 40 кДа (Abdel-Rahman, 2007).

Метод Робертса с использованием щелочного раствора сульфата меди является более сложным и трудоёмким. Он позволяет определять интегральную концентрацию декстранов с молекулярной массой выше, чем у трисахаридов, однако не выявляет различий между разными фракциями декстрана (Roberts и др., 1983).

В связи с этим ни метод определения по мутности, ни метод Робертса с использованием щелочного раствора сульфата меди не способны определить продукты распада. Тем не менее их комбинированное применение даёт возможность определять содержание декстранов с высокой и низкой молекулярной массой путём простого расчёта, основанного на знании различных пределов определения.

На рис. 1 представлено содержание декстрана в образцах до и после обработки ферментным препаратом, которое определяли фотометрически по мутности и методом Робертса с использованием щелочного раствора сульфата

меди, при исходном содержании декстрана 2 000 мг/кг сахарозы. Исследовали влияние изменения концентрации фермента. Критическое значение содержания декстрана 500 мг/кг сахарозы приняты на основании результатов других исследований (Abdel-Rahman, 2007).

Вторая пара столбцов слева отображает содержание декстрана после обработки ферментным препаратом при исходной концентрации фермента 2 и 4 мг/кг сока. Метод определения по мутности показывает почти полный распад декстрана до значений ниже 300 мг/кг сахарозы.

Метод Робертса показывает более высокие значения декстрана. При концентрации фермента 2 и 4 мг/кг сока получены следующие значения содержания декстрана: 1 558 и 1 003 мг/кг сахарозы. Очевидно наличие большой разницы в полученных результатах. Метод определения по мутности показывает почти полное расщепление декстрана при относительно низком содержании декстраназы. Это свидетельствует о том, что удаление высокомолекулярных декстранов, возможно, решает проблему вязкости. С другой стороны, метод Робертса показывает высокое содержание декстрана, так как он охватывает большой диапазон молекулярных масс, что может давать завышенные результаты.

Первая пара столбцов слева отображает содержание декстрана без обработки ферментным препаратом. Здесь также есть небольшое расхождение между результатами двух методов. Метод Робертса показывает более высокие значения, а метод определения по мутности — более низкие, чем ожидалось. Это указывает на то, что метод Робертса даёт несколько завышенные результаты по содержанию декстрана, и не только вследствие того, что он охватывает большой диапазон молекулярных масс. В случае применения метода опре-

деления по мутности ситуация противоположная. И эта погрешность анализа немного увеличивает большое расхождение результатов.

Несмотря на это, данные методы можно применять в комбинации для получения общей картины молекулярно-массового распределения декстранов в соке после обработки ферментным препаратом. Большая разница при этих содержаниях ферментов указывает на относительно высокую долю молекул в диапазоне низкой молекулярной массы вплоть до трисахаридов. Как было указано выше, декстраны с низкой молекулярной массой тоже оказывают значительное влияние, и поэтому должны быть расщеплены. Для этого можно, например, увеличить дозировку фермента до 8–16 мг/кг сока (третья группа столбцов на рис. 1). Как известно, концентрация субстрата влияет на скорость ферментативных реакций (Michaelis-Menten). На рис. 2, как и на рис. 1, представлено содержание декстрана, определённое по мутности и методом Робертса с использованием щелочного раствора сульфата меди, в образцах сока после обработки ферментным препаратом в различной концентрации, при исходном содержании декстрана 5 000 мг/кг сахарозы. При рассмотрении рис. 2 прослеживается аналогия с рис. 1. Здесь также видна большая разница в значениях, что свидетельствует о высокой доле продуктов распада с низкой молекулярной массой вплоть до трисахаридов. И также требуется более высокая концентрация фермента (60 мг/кг сока), чтобы снизить содержание низкомолекулярных декстранов до уровня ниже критического значения 500 мг/кг сахарозы (третья группа столбцов слева на рис. 2).

Увеличение концентрации с 25 до 40 мг/кг сока (рис. 2) не приводит к дальнейшему снижению содержания декстрана. Вероятно, это связано с тем, что на данном этапе

молекулы декстрана уменьшаются в размере, но не расщепляются на мелкие фрагменты, такие как трисахариды. Другими словами, метод Робертса с использованием щелочного раствора сульфата меди не позволяет контролировать уменьшение размеров молекул декстрана, если при этом не образуются молекулы из трёх и менее единиц глюкозы (Roberts и др., 1983).

Это означает, что использование только одного из этих методов не подходит для детального анализа проблем, вызываемых наличием декстрана в сырье. Метод определения по мутности недостаточно точен, а метод Робертса с использованием щелочного раствора сульфата меди охватывает все молекулы, размер которых больше, чем у трисахаридов, и может давать завышенные результаты по декстрану. Комбинация результатов позволяет провести первоначальную оценку процесса расщепления декстрана с различием высокого и низкого уровня или полного расщепления. Декстраны с низкой и средней молекулярной массой объясняют значительные расхождения между результатами двух методов анализа.

Гель-проникающая хроматография (ГПХ)

Для более детального определения декстранов использовали

гель-проникающую хроматографию (ГПХ) и высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ). Широкий диапазон молекулярных масс и относительно низкий уровень содержания затрудняют точное определение декстранов (Day & Sarkar, 1986).

Об этом свидетельствуют полученные значения. С помощью ГПХ и ВЭЖХ не удаётся определить пики декстрана и других компонентов, кроме сахарозы. Необходимо предварительное концентрирование проб. В данном случае концентрацию фермента и субстрата увеличили с применением коэффициента 40.

Кривая красного цвета на рис. 3 а отображает 15%-ный сахарный раствор с содержанием декстрана 80,000 мг/кг сахарозы, это исходный высокомолекулярный декстран (Т2000-2000 кДа), который подвергается ферментативному гидролизу. При самом большом объёме элюирования (последнее элюирование) 15%-ная сахароза вызывает появление большого пика. В целом хроматограммы показывают, что образцы декстрана имеют достаточно широкое молекулярно-массовое распределение, при этом Т2000 хорошо различим (рис. 3, б). Кривая зелёного цвета показывает, что три фракции (Т2000, Т500, Т40) перекрываются. Как и ожидалось, крупные мо-

лекулы с большой молекулярной массой элюируются первыми.

Очевидно, что пик Т2000 зелёной кривой выше, чем у красной, несмотря на одинаковую концентрацию высокомолекулярного декстрана (Т2000). Возможной причиной этого пика является наличие декстрана Т500. Второй пик декстрана зелёной кривой соответствует декстранам Т500 и Т40. Несмотря на перекрывание, окончание низкомолекулярных декстранов (Т40) чётко идентифицируется, что хорошо видно на графике по тому, как кривая идёт вниз к базовой линии.

На рис. 3, в представлены хроматограммы образцов, обработанных ферментным препаратом, (за исключением пика сахарозы). Для анализа использовали образцы с увеличенной концентрацией декстрана (Т2000), а именно 80,000 и 200,000 мг/кг сахарозы до ферментативной обработки. Соответственно увеличили концентрацию фермента с применением коэффициента 40.

Действие декстраназы приводит к появлению пика, который слегка перекрывается с пиком Т40 и пиком сахарозы, что указывает на наличие компонентов с низкой молекулярной массой вплоть до олигосахаридов. Это согласуется с выводами, полученными при определении содержания декстрана по мутности

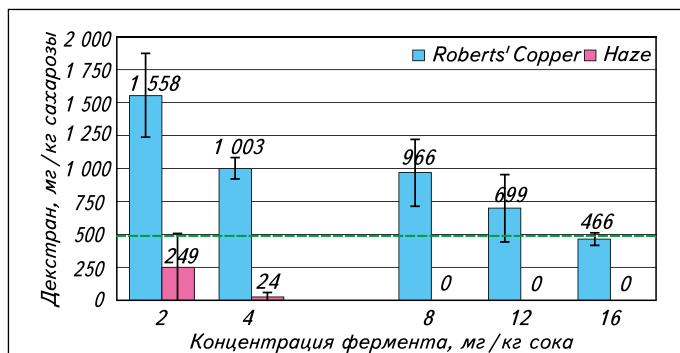


Рис. 1. Концентрация декстрана (мг/кг сахарозы) после обработки ферментным препаратом в 15%-ном растворе сахарозы с исходным содержанием декстрана 2 000 мг/кг сахарозы; изменение концентрации фермента (при 65 °С, 10 минут; рН: 5,5)

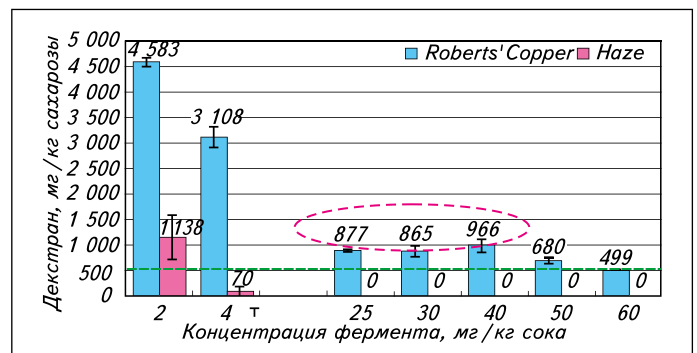


Рис. 2. Концентрация декстрана (мг/кг сахарозы) после обработки ферментным препаратом в 15%-ном растворе сахарозы с исходным содержанием декстрана 5 000 мг/кг сахарозы; изменение концентрации фермента (при 65 °С, 10 минут; рН: 5,5)

и по методу Робертса с использованием сульфата меди, по соотношению фермента и субстрата. Более высокая концентрация субстрата, а также более высокая концентрация фермента ведёт к усилению взаимодействия фермента и субстрата, что увеличивает скорость ферментативной реакции (Michaelis-Menten). Очевидно, что более высокая концентрация субстрата приводит к образованию большего количества продуктов распада без изменения их размера, как видно при сравнении фиолетовой и чёрной кривых. Несмотря на то что концентрация фермента у них одинакова, более высокая концентрация продуктов распада наблюдается при более высокой

концентрации субстрата. Пики экспериментальных кривых находятся на одной вертикальной линии (пунктирная линия на рис. 3, в), что указывает на один и тот же диапазон размеров частиц. Это свидетельствует о том, что при данном соотношении фермента и субстрата фермент не насыщен, что не было установлено по результатам, полученным методом определения по мутности и методом Робертса с использованием сульфата меди. Это объясняется изменением ферментативной кинетики вследствие многократного увеличения концентрации субстрата и фермента, которое привело к усилению взаимодействия фермента и субстрата.

Кривая элюирования для более высокого уровня фермента появляется чуть позже, и пик на кривой поменьше. Следовательно, увеличение концентрации фермента ведёт к меньшему количеству продуктов распада малых размеров, что свидетельствует о более полном расщеплении декстрана (показано горизонтальной стрелкой на рис. 3, в).

Установлено, что у этих четырёх образцов сока, приготовленных с увеличенной концентрацией декстрана и обработанных декстраназой, в результате расщепления декстрана образуются относительно небольшие фрагменты. Их низкий молекулярный вес, ниже 40 кДа, указывает на наличие зна-

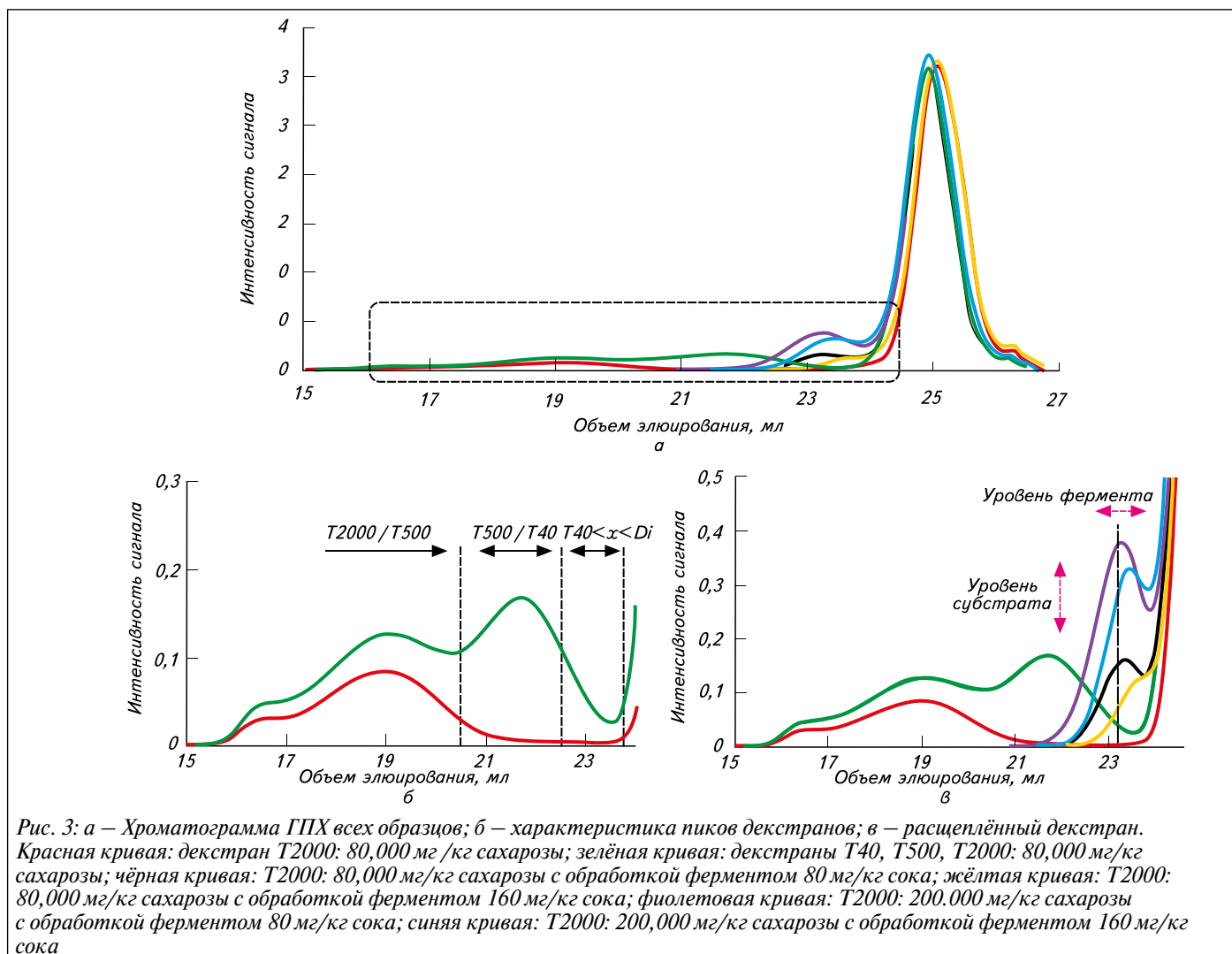


Рис. 3: а – Хроматограмма ГПХ всех образцов; б – характеристика пиков декстранов; в – расщеплённый декстран. Красная кривая: декстран T2000: 80,000 мг/кг сахарозы; зелёная кривая: декстраны T40, T500, T2000: 80,000 мг/кг сахарозы; чёрная кривая: T2000: 80,000 мг/кг сахарозы с обработкой ферментом 80 мг/кг сока; жёлтая кривая: T2000: 80,000 мг/кг сахарозы с обработкой ферментом 160 мг/кг сока; фиолетовая кривая: T2000: 200,000 мг/кг сахарозы с обработкой ферментом 80 мг/кг сока; синяя кривая: T2000: 200,000 мг/кг сахарозы с обработкой ферментом 160 мг/кг сока

чительного количества олигосахаридов.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

С использованием колонки ВЭЖХ удалось определить моно-, ди- и трисахариды. При низких концентрациях исходных образцов методом ВЭЖХ не смогли обнаружить ни один из этих компонентов. В результате использовали специально приготовленные образцы с увеличенной концентрацией фермента и субстрата. На хроматограммах видны пики в диапазоне моно-, ди-, трисахаридов. Пик с самым высоким объёмом элюирования (время удерживания RT 26 мин) является пиком сахарозы. Пик продукта распада появляется несколько позже (время удерживания RT 36 мин). Зная время удерживания, можно идентифицировать вещество. Данный пик соответствует преимущественно изомальтозе.

Дополнительно следует рассмотреть дисахариды, которые образуются в местах ветвления в структуре декстрана. Как упоминалось ранее, декстраны, продуцируемые бактериями штамма *L. Mesenteroides*, содержат около 95% α -1,6-гликозидных связей и 5% α -1,3-гликозидных связей. Следовательно, возможно нали-

чие дисахаридов, состоящих из двух единиц глюкозы, соединённых α -1,3-гликозидными связями (нигероза), которое могло способствовать появлению этого пика. Фермент оказывает специфическое воздействие на α -1,6-связи и не расщепляет α -1,3-связи. Однако есть сомнения, что концентрация достаточна для обнаружения с помощью ВЭЖХ.

И снова очевидно влияние концентрации фермента и субстрата, что хорошо видно на рис. 4, а. Более высокая концентрация субстрата, а также фермента приводит к увеличению высоты пика, которая прямо пропорциональна количеству продукта распада.

Продукты распада

Вышеприведённые результаты указывают на наличие продуктов распада, главным образом олигосахаридов, при относительно низком содержании фермента. Меньшая часть представлена малыми молекулами (в основном изомальтозой), которая растёт с увеличением содержания фермента. Это подтверждают результаты хроматографического анализа. Для оценки преимуществ обработки декстраназой необходимо выяснить, какое специфическое влияние оказывают различные фракции декстрана, а также продукты

распада на процесс производства сахара. Требуется уменьшить или полностью устранить возможное отрицательное влияние продуктов распада. Следующая часть работы посвящена изучению влияния декстранов на процесс кристаллизации и преимуществ обработки ферментным препаратом.

Эксперименты по кристаллизации.

Влияние на морфологию кристаллов.

Влияние декстранов в зависимости от молекулярной массы и концентрации

Изображения кристаллов, полученные с помощью светового микроскопа, исследовали с использованием программы ImageJ. Анализировали двумерные изображения кристаллов без третьей оси. Кристаллы лежат в плоскости (100) кристалла сахарозы; это означает, что программное обеспечение анализирует оси *c* и *b*. Изменяли два параметра – округлость и соотношение сторон, рассчитали частотность и построили кривую распределения.

Соотношение сторон – это отношение длин большой и малой оси эллипса, помещённого в кристалл сахара. При сильно вытянутой форме кристаллов соотношение сторон увеличивается. При недостаточно вытянутой

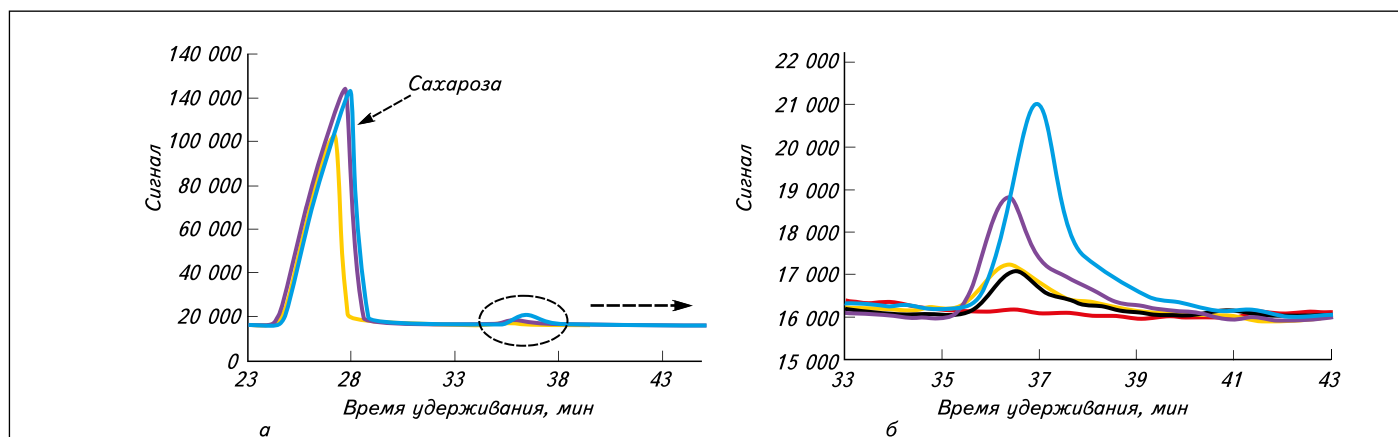


Рис. 4. Хроматограмма ВЭЖХ образцов, обработанных ферментным препаратом. Красная кривая: dextran T2000: 80,000 мг/кг сахарозы; чёрная кривая: декстран: 80,000 мг/кг сахарозы + фермент: 80 мг/кг сока; жёлтая кривая: декстран: 80,000 мг/кг сахарозы + фермент: 160 мг/кг сока; фиолетовая кривая: декстран: 200,000 мг/кг сахарозы + фермент: 80 мг/кг сока; синяя кривая: декстран: 200,000 мг/кг сахарозы + фермент: 160 мг/кг сока

форме кристаллов вдоль оси c соотношение сторон уменьшается вследствие сближения двух осей. На рис. 5, *a* показана частотность образцов с самой высокой концентрацией декстрана (5 000 мг/кг сахарозы), эталона и образца, обработанного ферментным препаратом. У образцов кристаллов, полученных из проб с наличием декстрана, наблюдается сдвиг кривой распределения в сторону уменьшения соотношения сторон. Преобладают кристаллы с более низким соотношением сторон по сравнению с эталоном, что указывает на большее количество кристаллов с недостаточно вытянутой формой вдоль оси c .

Другим важным параметром анализа изображений является округлость, идеальное значение которого равно 1,0. Уменьшение значения округлости указывает на вытянутость кристаллов, т.е. образование кристаллов игольчатой формы. Кристаллы недостаточно вытянутой формы с более низким значением соотношения сторон имеют более высокую округлость, приближаются к квадратной форме. Частотность значений указывает на преобладание кристаллов с низким значением округлости, как видно на рис. 5, *б*.

На рис. 6 представлены кристаллы, полученные из проб с наличием декстранов T2000 и T40 в количестве 5 000 мг/кг сахарозы. Как упоминалось ранее, это приводит

Таблица 2. Зависимость формы частиц от значения округлости и соотношения сторон

Форма частиц	Значение округлости	Соотношение сторон
Кристаллы вытянутой формы	Уменьшается	Увеличивается
Кристаллы недостаточно вытянутой формы	Увеличивается	Уменьшается
Агломераты	Уменьшается	В зависимости от формы

к образованию кристаллов сильно вытянутой формы, т.е. к увеличению соотношения сторон и уменьшению значения округлости, что хорошо видно по кристаллам (С) и (D). У кристалла (B) наблюдается приближение оси c к оси b и, соответственно, меньшее соотношение сторон и более высокое значение округлости. Кроме того, наличие декстранов способствует образованию агломератов. Агломераты кристаллов имеют низкое значение округлости, при этом соотношение сторон может быть выше, ниже или оставаться без изменений в зависимости от формы кристаллов.

В табл. 2 приведены обобщённые данные о влиянии округлости и соотношения сторон на форму кристаллов. С помощью анализа выделенных кристаллов, представленных на рис. 6, установлено, что образуются кристаллы такой формы. Два вида кристаллов показали меньшее значение округлости, что объясняет более низкое общее значение округлости. Аналогичные выводы применимы к соотношению сторон.

Рассматривая все показатели в совокупности, можно сделать вывод, что на основную часть кристаллов имеющийся декстран не оказал влияния. Возможные отклонения от нормальной формы кристаллов проявляются в виде редких сильно вытянутых кристаллов (С) и (D), недостаточно вытянутых кристаллов (B) и агломератов (E) и (F).

Влияние обработки ферментным препаратом

Рисунок 5, *б* показывает, что обработка ферментным препаратом в количестве 4 и 60 мг/кг сока даёт кривую, приближённую к эталонной кривой распределения по показателю округлости.

Частотность показателя соотношения сторон образца с низкой концентрацией фермента указывает на присутствие частиц с более низким соотношением сторон по сравнению с эталоном. С применением табл. 2 можно предположить уменьшение и даже полное устранение сильно вытянутых кристаллов, а также агломератов.

Увеличение концентрации фермента до 60 мг/кг сока ведёт к по-

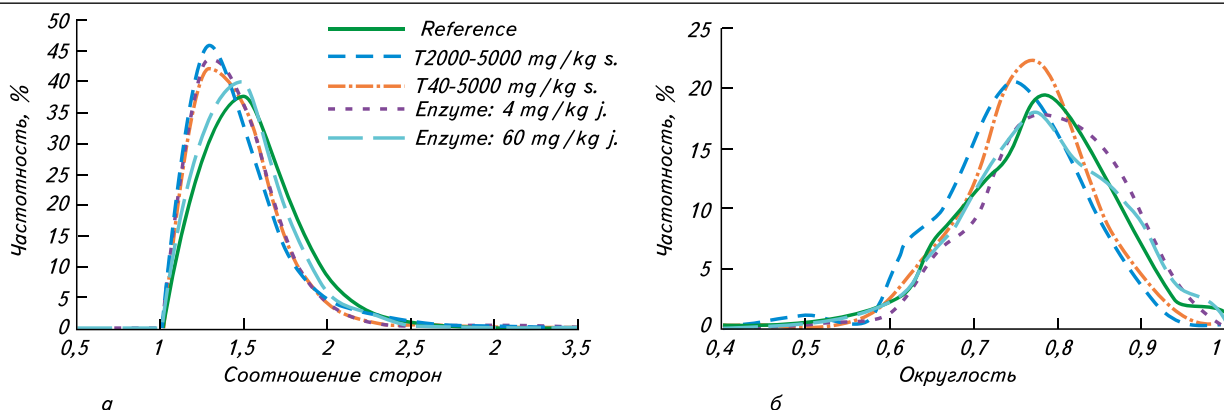


Рис. 5: *a* – частотность, соотношение сторон; *б* – округлость



которые преобладают при более высокой концентрации фермента, не оказывают влияния на форму кристаллов по всем определяемым параметрам.

Гранулометрический состав

Определение гранулометрического состава проводили методом рассева. Коэффициент неоднородности показан на рис. 7, а. Очевидно, что наличие декстрана существенно влияет на гранулометрический состав кристаллов. Декстраны с высокой, а также низкой молекулярной массой вызывают увеличение коэффициента неоднородности и уменьшение среднего размера кристаллов. Это указывает на более широкий гранулометрический состав и образование кристаллов малого размера. Вычисление массовой доли каждой фракции кристаллов, оставшихся на ситах, подтверждает это предположение (рис. 7, б). По всей видимости, имеется отклонение от нормального размера кристаллов в сторону уменьшения.

Наличие большого количества мелких кристаллов можно объяснить функцией декстрана в качестве затравки. Уменьшение межфазной энергии и критического радиуса из-за примесей ведёт к более высокой скорости зарождения центров кристаллизации. Таким образом, не исключено, что дек-

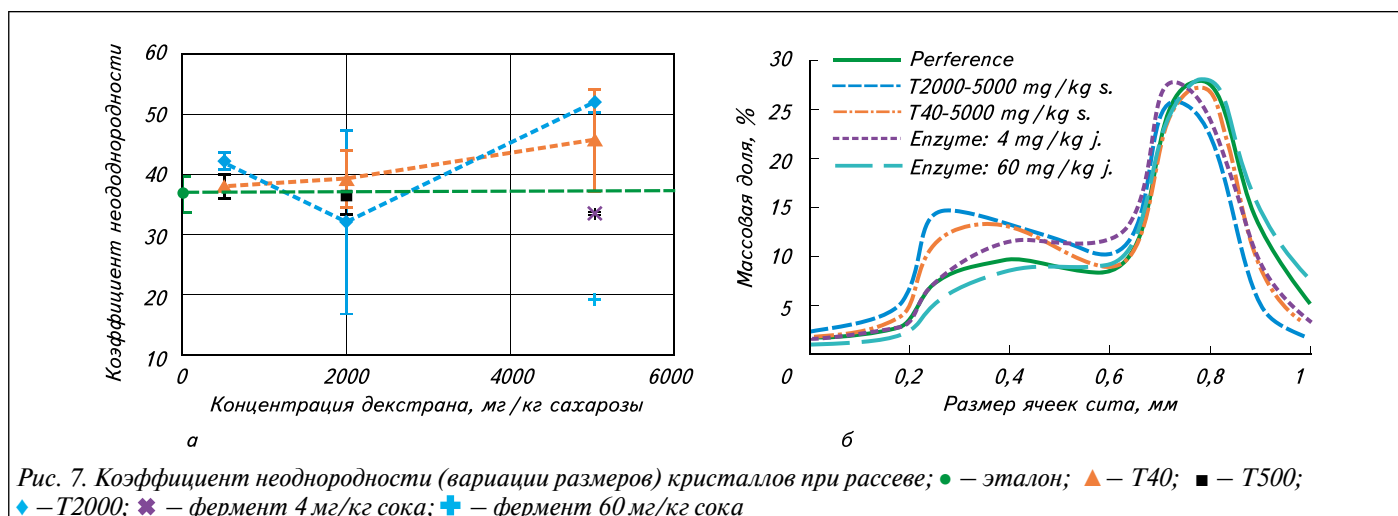
лучению кривой, приближённой к эталонной кривой распределения по показателю соотношения сторон, как и по показателю округлости.

Следовательно, более низкая концентрация фермента и, таким образом, расщепление молекул преимущественно в диапазоне от 40 кДа до трисахаридов приводит к улучшению морфологии кристаллов, однако полная элиминация не достигается.

Ферментативное расщепление при более высокой концентрации

фермента показывает значительное улучшение формы кристаллов и схожесть с эталоном (не только по показателю округлости, но и по соотношению сторон).

Следовательно, более крупные молекулы продуктов распада, образующиеся при более низкой концентрации ферментов, ещё оказывают небольшое влияние на морфологию, образование сильно вытянутых кристаллов и агломератов существенно уменьшается и даже полностью устраняется. Более мелкие продукты распада,



стран оказывает влияние на межфазную энергию.

Наибольший эффект наблюдался при наличии декстрана с высокой молекулярной массой. Все используемые для анализа декстраны получены из штамма *L. mesenteroides* и имеют схожие гликозидные связи. Следовательно, единственным обуславливающим фактором является размер молекул, который может увеличить вероятность адсорбирования на поверхности кристалла.

Влияние обработки ферментным препаратом на гранулометрический состав показано на рис. 7. Применение фермента в концентрации 4 мг/кг сока ведёт к улучшению коэффициента неоднородности, приближает к эталону, а также кривой гранулометрического состава. Дальнейшее увеличение концентрации фермента приводит к значительному улучшению коэффициента неоднородности (по сравнению с коэффициентом эталона) и улучшению кривой гранулометрического состава.

Выводы

В настоящем исследовании проанализировано ферментативное расщепление декстрана путём определения остаточного декстрана и возможных продуктов его распада и их свойств. В зависимости от концентрации фермента обнаружены продукты распада с молекулярной массой в диапазоне от 40 кДа до трисахаридов, а также ещё более мелкие молекулы. Присутствие высокомолекулярных и низкомолекулярных декстранов оказывает влияние на морфологию и гранулометрический состав кристаллов. Для более детального рассмотрения влияния декстрана на процесс кристаллизации необходимо провести дополнительные исследования. Установлено отрицательное влияние на кристаллизацию и свойства кристаллов, которое можно существенно уменьшить и даже полностью устранить

путём обработки ферментным препаратом.

Список литературы

1. *Abdel-Rahman, E.* (2007). Investigation on the influence of dextran during beet sugar production with special focus on crystal growth and morphology. PhD. Berlin.
2. *Day, D.F., & Sarkar, D.* (1986). Methods of analysis for dextran in sugar molasses and juice. Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol., 748–754.
3. *Eggleston, G., Monge, A., Montes, B., & Steward, D.* (2009). Application of dextranase in sugarcane factory: Overcoming practical problems. Sugar Tech, 11, 135–141.
4. ICUMSA (Ed.) (2011). ICUMSA Method Book. Berlin: Dr. Albert Bartens KG. Khalifah, M. (2001). Effect of dextran on sugarcane quality and raw sugar manufacture. PhD. Assiut.

5. *Khalikova, E., Susi, P., & Korpela, T.* (2005). Microbial dextran-hydrolyzing enzymes: fundamentals and applications. Microbiology and molecular biology reviews MMBR, 69, 306–325.

6. *Promraksa, A.* (2008). Reduction of Dextran in Raw Sugar Production. PhD. Suranaree.

7. *Rauh, J. S., Cuddihy J.A., & Opelka, M. J.* (1999). Analyzing dextran in the sugar industry: A review of dextran in the factory and a new analytical Technique. American Society of Sugar Beet Technologists, 30, 29–40.

8. *Roberts, E. J., Clarke, M. A., & Godshall, M. A.* (1983). The analysis of dextran in sugar production. Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol., 18, 1374–1382.

9. *Schlumbach, K., Pautov, A., Göckeritz, L., Bagherzadeh, A., & Flöter, E.* (2015). Controlled sucrose crystallization at pilot-plant scale. Sugar Industry, 140, 500–507.

Аннотация. Исследовано расщепление декстрана под действием декстраназы (ферментного препарата Sugazym DX L производства компании SternEnzym). В основе работы лежит детальный анализ декстрана и возможных продуктов его распада, проведённый различными методами (методом определения по мутности, методом Робертса с использованием сульфата меди, методом хроматографии). Комбинация этих методов позволила получить новые данные по ферментативному расщеплению декстрана. С помощью метода определения по мутности выявляются более крупные молекулы декстрана без их специфики. Целесообразность применения данного метода обусловлена тем, что более крупные молекулы декстрана приводят к технологическим проблемам при переработке сырья. Однако то, какие продукты распада образуются и как они влияют на процесс производства сахара, детально ещё не изучено. В настоящей работе предпринята попытка раскрыть эту проблематику. При промышленно значимом содержании фермента и декстрана в сахарном растворе образуются продукты распада с молекулярной массой в диапазоне от 40 кДа до трисахаридов. При увеличении дозировки фермента происходит расщепление на более мелкие сахараиды. Проведённые эксперименты по кристаллизации показали, что наличие декстрана оказывает существенное влияние (на кристаллизацию, гранулометрический состав, морфологию кристаллов). Установлено, что декстран приводит к более широкому диапазону гранулометрического состава. Изображения кристаллов, полученные с помощью светового микроскопа, показывают морфологические изменения, вызванные наличием декстрана. В результате проведённой работы установлено отрицательное влияние декстрана на кристаллизацию и свойства кристаллов, при этом обработка ферментным препаратом в определённой дозировке при соответствующем времени реакции уменьшает и даже полностью устраняет это негативное влияние.

Ключевые слова: декстран, декстраназа, продукты распада, кристаллизация.

Summary. This work is concerned with the decomposition of dextran by dextranase action (Sugazym DX L, SternEnzym). Detailed analysis of dextran and potential decomposition products is key to this work. Different analytical methods (Haze, Roberts' Cooper methods, chromatography) were used and new insights into the enzymatic degradation of dextrans could be derived from their combination. The Haze method rather non-specifically detects larger branched dextrans. This is practical because the larger branched dextrans are known to predominantly cause processing problems. However, what degradation products appear and how they influence the manufacturing processes is not understood in great detail. The work performed hence actually tries to elucidate this subject matter. Combination of industrially relevant enzyme and dextran levels yielded decomposition products in the range of 40 kDa to trisaccharides. At higher enzyme levels decomposition to smaller saccharides appeared. The crystallization experiments performed indicated that the presence of dextran has a significant influence (crystallization, particle size distribution, crystal morphology). It is found that dextran led to a wider particle size distribution. Light microscopy images illustrate morphological changes induced by the presence of dextran (distinctly elongated, slightly elongated and agglomerated crystals). The precise effect of different dextran fractions on the crystallization is still not fully mapped and certainly needs further investigation. Nevertheless, a negative effect on the crystallization and the crystal characteristics could be detected, while an enzyme treatment reduces or rather eliminates these negative effects taken appropriate enzyme dosages and exposure times are used.

Keywords: dextran, dextranase, decomposition products, crystallization