

ФЕРМЕНТНЫЙ ПРЕПАРАТ «АПИФИЛ» ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ИНВЕРТНЫХ САХАРНЫХ ПОДКОРМОК И ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ПЧЕЛОВОДСТВЕ

Л.И. Сапунова¹, И.О. Тамкович¹, А.Г. Лобанок¹, И.М. Лойко²

¹ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси», Минск, leonida@mbio.bas-net.by

²Гродненский государственный аграрный университет, inna.loko@mail.ru

В живых организмах катаболизм дисахарида сахарозы как источника энергии происходит только после ее ферментативного гидролиза, катализатором которого является β -фруктофуранозидаза (КФ 3.2.1.26) [1]. В обиходе фермент называют также β -фруктозидазой, сахаразой, сукразой и, наиболее часто, инвертазой. Конечным продуктом ферментативного гидролиза сахарозы является инвертный сахар – смесь равных количеств D-глюкозы и D-фруктозы [2]. Помимо свойства разрушать в молекуле сахарозы β -D-2,1-гликозидную связь между D-глюкозой и D-фруктозой инвертаза катализирует перенос остатка β -D-фруктофуранозида на акцепторный субстрат. Следовательно, инвертаза катализирует реакции гидролиза или трансфруктозилирования, в зависимости от концентрации сахарозы [3].

До недавнего времени трансферазная активность инвертазы, позволяющая получать фруктоолигосахариды пребиотического действия, была слабо востребована [2]. В то же время гидролитические свойства инвертазы определяют постоянно растущее ее использование в различных сферах практической деятельности – в технологиях производства косметических и лекарственных средств, молочной кислоты и биоэтанола, нутрицевтиков, биосенсоров для определения сахарозы, а также для повышения перевариваемости кормов, содержащих отходы переработки сахарозосодержащих субстратов. Однако востребован фермент преимущественно в пищевой промышленности, прежде всего для получения инвертного заменителя сахара, в составе кондитерских и хлебобулочных изделий, сгущенных молочных продуктов, алкогольных и безалкогольных напитков [3–5]. Лидерами на мировом рынке инвертазы для пищевой промышленности являются такие производители как Stern Enzym GmbH & Co. KG (Германия), Kerry Inc. (Ирландия), Creative Enzymes (США), Philip Harris (Великобритания), Novozymes (Дания), Centerchem (США) и др. В последние

годы на рынке этого сегмента ферментных препаратов усилилось влияние многочисленных биотехнологических компаний из Китая.

Инвертазу специально для получения инвертного сахарного сиропа для пчел производят Creative Enzymes (США), Philip Harris (Великобритания), Novozymes (Дания), Invertobee (Греция), «Энзим» (Украина), ООО НПП «Трис» (Россия) [6].

В Беларуси собственное производство инвертазы и получаемых с ее использованием инвертных сахарных подкормок для пчеловодства отсутствует при постоянно растущем спросе, что сопряжено с увеличением потребления аналогичной зарубежной продукции и расходования валютных средств на ее закупку. Это делает актуальными исследования по выделению новых и повышению продуктивности существующих продуцентов инвертазы, разработке современных ресурсосберегающих и экологически безопасных технологий производства биокатализаторов для получения инвертных сахарных подкормок.

Ранее нами из сбродившего варенья был выделен синтезирующий инвертазу изолят ИНВ-SP2 [7], который согласно MALDI масс-спектрометрического анализа профиля внутриклеточных белков идентифицирован как *Saccharomyces cerevisiae*, депонирован в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов под номером БИМ У-358 Д как перспективный продуцент фермента для получения инвертного сахарозаменителя.

Цель настоящей работы – изготовление экспериментального образца препарата инвертазы «Апифил», получение с его использованием инвертной сахарной подкормки и оценка эффективности их применения в рационе медоносных пчел.

В работе использовали дрожжевой гриб *Saccharomyces cerevisiae* ИНВ-SP2 (БИМ У-358 Д), который поддерживали на сусло-агаре методом периодических пересевов, хранили при температуре 6–8 °С.

Культивирование продуцента инвертазы проводили глубинным способом в ферментере Biotechno П100.1 объемом 100 л в питательной среде оптимизированного состава при температуре 25–27 °С в течение 48 ч. Посевной материал – суспензия клеток дрожжевого гриба, выращенного в жидкой оптимизированного состава в течение 18 ч, в количестве 4 об. %.

По окончании культивирования биомассу дрожжевого гриба отделяли от культуральной жидкости центрифугированием (8000 g, 15 мин), отмывали дистиллированной водой и разрушали с использованием френч-пресса высокого давления «Panda Plus 2000» (Gea Niro Soavi, Italy). Суспензию разрушенных клеток центрифугировали, а супернатант после удаления балластных белков этиловым спиртом лиофильно высушивали. Полученный препарат инвертазы «Апифил» использовали для получения инвертного сахарного сиропа.

Определение активности инвертазы в препарате «Апифил» проводили спектрофотометрически по количеству восстанавливающих сахаров, образующихся в результате ферментативного гидролиза сахарозы и вступающих в реакцию с 3',5'-динитросалициловой кислотой (3',5'-ДНС) [8]. За единицу активности фермента принимали такое его количество, при действии которого на сахарозу в течение 1 мин при 30 °С и рН 4,7 образуется 1 мкмоль восстанавливающих сахаров в пересчете на глюкозу. Активность инвертазы выражали в условных единицах в 1 г препарата (ед/г).

Сахарный сироп готовили путем растворения сахарозы в горячей водопроводной воде в соотношении 2 : 1 (масс./об.), охлаждали до необходимой температуры, вносили растворенный в небольшом количестве воды препарат инвертазы «Апифил». Полученную смесь тщательно перемешивали и оставляли до достижения максимальной степени инверсии.

Эффективность гидролиза сахарозы рассчитывали согласно формуле: $ЭГС = РВ \times 0,95 / С \times 100$, где ЭГС – эффективность гидролиза сахарозы, %; РВ – редуцирующие вещества, мг/мл; С – концентрация сахарозы, мг/мл; 0,95 – коэффициент пересчета редуцирующих веществ на сахарозу; 100 – перевод данных в проценты [9].

Оценивали влияние ферментативно полученного инвертного сиропа на жизнеспособность и микрофлору кишечника пчел серой горной кавказской породы в садковом эксперименте. Для этого формировали 2 группы энтомофильных садков, по 3 садка с 50±3 насекомыми в каждом. Рабочим пчелам контрольной группы задавали 60 %-ный сахарный сироп, пчелам опытной группы – ферментативно полученный 60 %-ный инвертный сироп в количестве 5 мл ежедневно.

При исследовании жизнеспособности садки заселяли пчелами 1–3-дневного возраста. Ежедневно учитывали расход корма и воды, а также количество погибших особей, вплоть до их полной гибели.

При изучении микробиоты кишечника за пчелами опытной и контрольной групп вели наблюдение в течение 18 сут. Для этого у вышедших из ячеек пчел извлекали кишечник, и его содержи-

мое высевали на дифференциально-диагностические среды, приготовленные по общепринятым методикам.

Приведенные результаты представляют собой усредненные значения данных 2–3 опытов, выполненных в трехкратной повторности и статистически обработанных.

С целью оптимизации условий ферментативной инверсии сахарозы в научно-производственном центре биотехнологий Института микробиологии НАН Беларуси наработан экспериментальный образец инвертазы «Апифил». Согласно экспериментальным данным, полученным при оптимизации условий ферментативного гидролиза раствора сахарозы, длительность процесса получения инвертного сахарного сиропа со степенью гидролиза сахарозы, составляющей более 99 %, возрас- тала с 16 до 54 ч со снижением температуры процесса с 50 до 20 °С при прочих равных условиях.

При повышении дозы используемого ферментного препарата с 0,2 до 0,5 г/кг сахара в условиях пониженной (20 °С) температуры длительность приготовления инвертного подсластителя сокращалась с 54 до 30 ч, не влияя на качество получаемого продукта. Это позволяет получать инвертную подкормку непосредственно на пасеках в условиях, не позволяющих поддерживать оптимальную, обычно более 50 °С, температуру процесса ферментативной инверсии сахарозы. Анализ данных литературы показывает, что препарат Инвертазы «Апифил» по эффективности действия не уступает известным препаратам «ПЧЕЛИТ» и «ПЧЕЛИТ-АКТИВ» (ООО НПП «Трис», Россия) и найдет применение для получения инвертных сахарных подкормок в пчеловодческих хозяйствах Республики Беларусь.

Проведенные в лабораторных условиях эксперименты показали, что замена в рационе рабочих пчел осенней генерации сахарного сиропа инвертной сахарной подкормкой, полученной с использованием инвертазы «Апифил», способствует увеличению в среднем на 18 % продолжительности жизни насекомых. При этом происходит нормализация состава их кишечной микробиоты за счет снижения количества условно-патогенной микрофлоры и повышения количества лактобактерий.

Результаты производственных испытаний инвертного сахарного сиропа, приготовленного с использованием инвертазы «Апифил», свидетельствуют об повышении сохранности пчелиных семей после зимовки; наращивании силы пчелиных семей к главному медосбору; увеличении количества и качества открытого и печатного расплода при увеличении яйценоскости пчелиных маток; повышении воско- и медопродуктивности пчелиных семей; повышении иммунного статуса пчел; более эффективным использовании кормовой базы пчеловодства.

Таким образом, разработка отечественной ресурсосберегающей технологии получения препарата инвертазы «Апифил» и освоение его производства позволят улучшить кормовую базу и повысить рентабельность производства пчеловодческой продукции, сократить зависимость внутреннего рынка от аналогичной импортируемой продукции и сэкономить валютные средства на ее закупку.

Список использованных источников

1. An overview of the recent developments on fructooligosaccharide production and applications / A. L. Dominguez [et al.] // *Food and Bioprocess Technology*. – 2014. – Vol. 7, № 2. – P. 324–337.
2. A review on invertase: Its potentials and applications / H. Manoochchri [et al.] // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. – 2020. – Vol. 25. – P. 793–797.
3. Fructosyltransferases and Invertases: Useful Enzymes in the Food and Feed Industries / L. E. Toledo [et al.] // *Enzymes in Food Biotechnology*. – Elsevier Inc., 2019. – Chapter 26. – P. 451–469.
4. Microbial invertases: a review on kinetics, thermodynamics, physiochemical properties / H. Nadeem [et al.] // *Process Biochemistry*. – 2015. – Vol. 50, № 8. – P. 1202–1210.
5. Pang, W. C. Structural properties, production, and commercialisation of invertase / W. C. Pang, A. N. M. Ramli, N. D. Johari // *Sains Malaysiana*. – 2019. – Vol. 48, № 3. – P. 523–531.
6. Инвертные сахарные сиропы: получение, свойства и применение в пчеловодстве / Л. И. Сапунова [и др.] // *Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: сб. науч. тр. / Ин-т микробиологии НАН Беларуси; редкол.: Э. И. Коломиец [и др.]*. – Минск: Беларуская навука, 2022. – Т. 14. – С. 229–242.
7. Отбор дрожжей, синтезирующих инвертазу / Л.И. Сапунова [и др.] // *Современные технологии сельскохозяйственного производства: сб. науч. ст. по матер. XXV Междунар. науч.-практ. конф., Гродно, 27 мая 2022 г. / Мин-во сельского хоз-ва и прод-вия РБ, УО «Гродненский гос. агр. ун-т»; отв. за выпуск О.В. Вертинская*. – Гродно: ГГАУ, 2022. – С. 169–171.
8. Miller, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar / G. L. Miller // *J. Anal. Chem.* – 1959. – Vol. 31. – P. 426–428.

9. Исследование механизма кислотного гидролиза сахарозы / Н. А. Жеребцов [и др.] // Известия ВУЗов. Пищевая технология. – 1997. – № 2–3. – С. 36–38.