



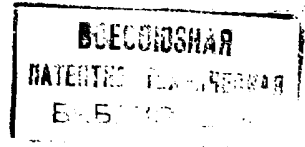
СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

(19) **SU** (11) **1512489** **A3**

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ
ПРИ ГКНТ СССР

(51) 4 C 12 P 19/12 // (C 12 P 19/12,
C 12 R 1:425, 1:01)

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ



- 1
- (21) 3335150/28-13
(22) 10.09.81
(31) P 3038219.5
(32) 09.10.80
(33) DE
(46) 30.09.89. Бюл. № 36
(71) Зюддойче Цукер-Акциенгезельшафт (DE)
(72) Мохаммад Мунир (PK)
(53) 577.15 (088.8)
(56) Патент ФРГ № 2217628, кл. C 12 P 19/12, опублик. 1972.
Выложенная заявка ФРГ № 2806216, кл. C 12 P 19/12, опублик. 1980.
Патент СССР № 1022663, кл. C 12 P 19/12, 1978.
(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ИЗОМАЛЬТУЛОЗЫ
(57) Изобретение относится к биотехнологии, касается непрерывного преоб-

2

разования сахарозы в изомальтулозу и найдет применение в пищевой промышленности в качестве сахарозаменителя. Цель изобретения - повышение выхода и чистоты целевого продукта. Способ предусматривает ферментативную изомеризацию 45-75%-ного раствора сахарозы путем пропускания его через реактор с симбиотизованными клетками *Protamino bacter rubrum* CBS 57477 или *Serratia plymuthica* ATCC 15928 или *S. marcescens* NCIB 8285 при 40-65°C. Для иммобилизации клеток в основном пригодны все методы приведения в неподвижность клеток. Благодаря двухступенчатой кристаллизации получают в кристаллической форме до 91,5% имеющейся в растворе изомальтулозы. 7 з.п. ф-лы.

Изобретение относится к биотехнологии и касается непрерывного преобразования сахарозы в изомальтулозу (палатинозу, 6;0- α -D-глюкопиранозид-D-фруктозу) при помощи неподвижных клеток бактерий.

Изомальтулоза является промежуточным продуктом для получения глюкопиранозид-1,6-манита и глюкопиранозид-1,6-сорбита (изомальтита), которые являются заменителями сахара.

Цель изобретения - повышение выхода и чистоты целевого продукта.

Для реализации способа с целью получения иммобилизованных клеток осуществляют оптимальное размножение клеток в питательной среде, содержащей только 5 мас.% сухих веществ.

Питательная среда содержит густой сироп (промежуточный продукт сахарной промышленности, маисовую воду для набухания и $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Однако предпочтительным является использование более дешевого питательного субстрата, который состоит только из мелассы кормовой свеклы и $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

Для приготовления такого питательного раствора мелассу разбавляют дистиллированной водой до 5%-ного содержания сухого вещества. В качестве дополнительного источника азота и фосфата на 100 кг такого раствора добавляют 0,1 кг $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Значение pH устанавливают равным 7,2 при помощи натрового щелока, раствора едкого калия или соляной кислоты.

(19) **SU** (11) **1512489** **A3**

Вакцинация микроорганизма, например *Protaminobacter rubrum* CBS 574.77, образующего изомальтулозу, происходит при промывке 10 мл стерильного питательного раствора указанного состава, а ферментацию осуществляют в качалочных колбах, заполненных 200 мл этой питательной среды, при 29°C. Когда количество микроорганизмов в загруженной культуре достигает 5×10^9 микроорганизмов/мл, культуру переносят в небольшой ферментер с питательной средой указанного состава и далее культивируют при возможно более высокой степени аэрирования и скорости перемешивания при 29°C. Контроль за размножением осуществляют так же, как и контроль за размножением в качалочных колбах, путем определения числа микроорганизмов. Как только количество микроорганизмов достигнет значения 5×10^9 микроорганизмов/мл, ферментер освобождают.

Для получения иммобилизованных клеток в основном пригодны все методы иммобилизации клеток I. CUIBATA (Immobilized Enzymes, John Wiley and sons, New York, London, 1978).

В качестве предпочтительных признаны следующие методы.

а) Содержимое для ферментации добавляют либо в сам ферментер, либо в другой сосуд с 1%-ным раствором катионоактивного коагулянта. Требуемое количество коагулянта должно быть определено в предварительном опыте. Клеточную массу, подвергнутую коагуляции, отстаивают, освобождают от лишней воды и далее осадок дважды промывают фосфатным буфером 0,1 М, pH 7,0. После этого клеточную массу обезвоживают до получения пастообразного вида, прессуют в полости, сушат, размалывают и просеивают.

б) К 10 л ферментативного бульона при медленном помешивании добавляют 0,5-2 л 0,2%-ного раствора хитозана. (коагулированную клеточную массу промывают фосфатным буфером 0,1 М, pH 7,0, обезвоживают в центрифуге, например с химическим принципом действия или в отстойной, прессуют в полосы, сушат, размалывают и просеивают.

с) В центрифуге клеточную массу отделяют от ферментационного бульона. 5-20 г этой клеточной суспензии (содержание сухого вещества 10%) суспен-

дируют в 45-60 мл раствора альгината (8 г в 100 мл) и при помощи шприца (диаметр иглы 0,55 мм) каплями вводят в 2%-ный раствор CaCl_2 . Появляющиеся гранулы примерно 15 мин перемешивают в растворе CaCl_2 и после этого промывают водой. Приблизительно в течение 20 ч гранулы сушат при комнатной температуре.

д) В центрифуге клеточную массу отделяют от ферментационного бульона, промывают фосфатным буфером (0,1 М, pH 7,0) и подвергают сублимационной сушке.

При 90°C под флегмой 15 г ацетата целлюлозы растворяют в 100 мл смеси диметилсульфоксида и ацетона (6:4). После охлаждения до 30°C добавляют 3-30 г сублимированных клеток. Эта суспензию при помощи инъекционного шприца (игла 0,8 мм) в виде капель вводят в воду. Образующиеся гранулы высушивают.

е) В центрифуге клеточную массу отделяют от ферментационного бульона. 5 г такой клеточной массы суспендируют в 5 мл физиологического раствора поваренной соли при 45-50°C. 1,7 г К-каррагинана (растворимый полисахаридный эфир серной кислоты) растворяют в 34 мл физиологического раствора поваренной соли при 45-60°C. Оба раствора смешивают и в течение 30 мин эту смесь выдерживают при 10°C. Появляющийся гель фиксируют в холодном 0,3 М растворе KCl и потом раскалывают на куски величиной примерно 3 мм.

ф) Ферментационный бульон смешивают сначала с 1%-ным раствором катионоактивного коагулянта, а потом с 1%-ным раствором анионоактивного коагулянта либо в самом ферментере, либо в другом сосуде. Требуемое количество коагулянтов должно быть определено в предварительном опыте. Скоагулированную клеточную массу отстаивают, промывают фосфатным буфером 0,1 М, pH 7,0, прессуют в полосы, сушат, размалывают и просеивают.

Клетки микроорганизмов, полученные по описанным методам, подвергают иммобилизации сшивкой. Для сшивки применяют бифункциональные препараты, например глутаровый альдегид. Обычная концентрация глутарового альдегида 2,5-5,0% при длительности контакта 30-45 мин в случае использования микроорганизмов, образующих изо-

мальтулозу, может не соблюдаться. Было обнаружено, что все неподвижные препараты при этих условиях полностью иммобилизованы. В качестве оптимальных условий для образования поперечных связей согласно предлагаемому способу концентрацию глутарового альдегида принимают равной 0,1% при длительности обработки 10 мин.

Неподвижные клетки с поперечными связями, полученные по указанным способам, подают в колонну реактора. В этом реакторе поддерживают равномерную температуру, а отношение диаметра и высоты составляет 1:1 - 1:20, преимущественно 1:1 - 1:10, предпочтительно 1:1,5-1:5. Чистый раствор сахарозы (концентрация 45-75%) при 40-65°C нагревают через колонну либо сверху вниз, либо снизу вверх. При этом скорость потока устанавливают такой, чтобы время контакта составило 1 - 10 ч, преимущественно 4-7 ч (это соответствует 0,2-0,8 г сахарозы, преимущественно 0,4-0,6 г, на 1 г неподвижных (сухих) клеток в 1 ч). При этом преобразуется полностью вся введенная сахароза, причем получают 1% глюкозы, 4% фруктозы, 82% изомальтулозы и 13% 1-0- α -D-глюкопиранозид-D-фруктозы.

Путем простого охлаждения раствора изомальтулозу частично кристаллизуют. При выпаривании и охлаждении из маточного раствора выкристаллизовывается дополнительное количество изомальтулозы, таким образом, в целом из полученной изомальтулозы может откис-таллизовываться 91,5%.

В предпочтительном варианте исполнения способа раствор сахарозы пропускают через колонну более быстро для того, чтобы преобразовалось только 75-80% сахарозы. Часть изомальтулозы может быть получена в кристаллической форме путем охлаждения потока продуктов, а остаток после добавления свежего раствора сахарозы еще раз пропускают через колонну. Преимущество такого варианта проведения процесса состоит в том, что образование 1-0- α -D-глюкопиранозид-D-фруктозы по-дается благодаря более короткому времени контактирования и в итоге может быть достигнут больший выход изомальтулозы.

Пример 1. От заражения штамма *Protaminobacter rubrum* CBS 574.77

клетки промывают 10 мл питательного стерильного субстрата, состоящего из 8 кг сахарного сиропа, густого, концентрации 65%, 2 кг маисовой воды для набухания, 0,1 кг $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ и 89,9 кг дистиллированной воды (при необходимости значение pH устанавливают равным 7,2). Эта суспензия служит в качестве затравочного вещества для предкультуры в колбе объемом 1 л с 200 мл питательного раствора указанного состава, находящейся во встряхивающем механизме.

После 30-часового инкубирования при 29°C 16 л питательного раствора указанного состава, разливают по 20 колбам (4 л), рассеивают в небольшом 30-литровом ферментере и ферментируют при 29°C при аэрации 20 л в 1 мин и скорости перемешивания 350 об/мин. Увеличивающееся количество клеток определяют микроскопическим методом. После того, как число клеток достигнет 5×10^9 клеток/мл, содержимое ферментера переводят в другой сосуд, в котором его смешивают с катионоактивным коагулянт (например, PRIMAFLUC C7V фирмы Rohm & Haas, Филадельфия, США). Скоагулированные клетки отстаивают, округляют, промывают фосфатным буфером (0,1 М, pH 7,0) и обезвоживают на центрифуге. Далее массу экструдируют в полоски, сушат на воздухе и размалывают.

Просеянную фракцию 0,3-0,8 мм из полученного препарата в течение 10 мин перемешивают в 0,1%-ном растворе глутарового альдегида, промывают фосфатным буфером (0,1 М, pH 7,0) и освобождают от надосадочной жидкости путем декантации. Определение ферментативной активности иммобилизованных клеток дает удельную активность 60 ед/г сухого вещества. В термоста-тируемую колонну вводят столько иммобилизованных клеток, чтобы объем слоя клеточной массы составлял 160 см³. Это количество соответствует 60 г сухого вещества. Колонну затем нагревают до 50°C и через нее непрерывно пропускают 70%-ный раствор сахарозы со скоростью протекания 20 см³/ч. Выходящий из колонны поток продукта имеет следующий состав, г/100 г сухого вещества:

Глюкоза	1
Фруктоза	4
Сахароза	0

Изомальтулоза 82

1-0- α -D-глюкопира-
ноизид-D-фруктоза 13

Полученный раствор изомальтулозы подают в кристаллизатор для охлаждения до 20°C и выкристаллизовавшуюся изомальтулозу отделяют от маточного раствора путем центрифугирования на решетчатом барабане. Маточный раствор при 70°C выпаривают до содержания сухого вещества 80% и снова охлаждают до 20°C в кристаллизаторе для охлаждения. Выкристаллизовавшуюся изомальтулозу отделяют от второго маточного раствора (мелассы) на центрифуге с решетчатым барабаном. Благодаря этой двухстадийной кристаллизации получают 91,5% кристаллической имеющейся в растворе изомальтулозы.

В 100 кг выходящего из реактора раствора изомальтулозы содержится 30 кг воды и 70 кг сухого вещества, из которых 57,4 кг (82%) составляют изомальтулозу. На первой стадии кристаллизации отделяют 32,4 кг изомальтулозы и примерно 1 кг промывочной воды добавляют при центрифугировании. Получают 68,6 кг маточного раствора с 37,6 кг сухого вещества и 31 кг воды. Чтобы этот маточный раствор концентрировать от содержания 54,8% сухого вещества до содержания 80% сухого вещества до второй стадии кристаллизации, нужно испарить 21,6 кг воды, причем количество снижается на 47,0 кг.

На второй стадии кристаллизации получают 20,1 кг изомальтулозы, таким образом, общий выход составляет 52,5 кг или 91,5% находящейся в эфлюате из реактора изомальтулозы (соответствует 75% используемой сахарозы). Изомальтулоза с первой стадии кристаллизации имеет чистоту более 99,5% и может непосредственно использоваться далее. Изомальтулоза с второй степени кристаллизации (20,1 кг) имеет чистоту более 96,0% и ее нужно перекристаллизовывать. Для этого ее сначала растворяют в 13,4 кг воды и затем путем испарения и охлаждения выкристаллизовывают.

Испаряющееся количество воды составляет 21,6+13,4=35 кг для получения 52,5 кг изомальтулозы или 0,67 кг/кг изомальтулозы.

Пример 2. а) От заражения штамма *Protaminobacter rubrum* CBS 574.77 клетки промывают 10 мл сте-

рильного питательного раствора, состоящего из 6,25 кг свекольной мелассы концентрации 80%, 0,1 кг $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ и 93,65 кг дистиллированной воды (при необходимости значение pH устанавливают равным 7,2 при помощи HCl). Эта суспензия служит в качестве затравочного вещества для предкультуры в колбе объемом 1 л с 200 мл питательного раствора указанного состава, находящейся во встряхивающем механизме. После 30-часового инкубирования при 29°C 16 л питательного раствора указанного состава, разлитого по 20 колбам (4 л), его рассеивают в 30-литровом ферментере и подвергают ферментации при 29°C при аэрации 20 л/мин и скорости перемешивания 350 об/мин.

Далее процесс проводят аналогично примеру 1.

Пример 3. Из субкультуры штамма *Protaminobacter rubrum* CBS 574.77 клетки смывают 10 мл стерильной смеси 1 ч. сиропа концентрации 65% и 2 ч. водопроводной воды, содержащей 0,5 г/л $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Эта суспензия служит в качестве прививочного материала для предкультуры в колбах емкостью 1 л с 200 мл питательного раствора указанного состава, стерилизованного 20 мин при 121°C, находящихся в вибрационных машинах. После культивирования в течение 30 ч при 30°C предварительное культивирование заканчивают. 16 л питательного раствора указанного состава, разлитого по 20 колбам (общий объем 4 л), рассеивают в ферментере емкостью 30 л. Ферментируют при 30°C с аэрацией 12 л/мин и при скорости перемешивания 350 об/мин.

Выращенные в ферментере 20 л питательного раствора служат в качестве прививочного материала для ферментера емкостью 300 л со 180 л питательного раствора (смесь сиропа с сахарозой и водой с содержанием сухого вещества 25%, чистотой 96% в расчете на сухое вещество). Ферментер работает со скоростью аэрации 200 л воздуха/мин при 30°C и скорости вращения 200 об/мин.

После 7-часовой фазы роста добавляют непрерывно со скоростью разбавления 0,2 ч⁻¹ питательный раствор и равное количество превращенного питательного раствора с клетками непрерывно удаляют из ферментера.

500 л этого превращенного раствора содержат 2 л клеток (влажные), которые отделяют путем центрифугирования. Концентрация остающегося раствора составляет 23,8% по сравнению с 25% в исходном растворе (потери за счет выдувания части сухого вещества). Количество раствора составляет $498 \times 1,1001 = 547,8$ кг с содержанием сухого вещества 130,4 кг со 101,7 кг изомальтулозы. После выпаривания до содержания сухого вещества 80% при 70°C раствор охлаждают до 20°C в кристаллизаторе для охлаждения. Выкристаллизовывающуюся при этом изомальтулозу отделяют центрифугированием от маточного раствора.

Выход: 55,9 кг изомальтулозы с чистотой примерно 99,0%.

Испарение воды на второй стадии кристаллизации 20,4 кг. Всю изомальтулозу (88,3 кг) перекристаллизовывают, чтобы повысить чистоту до величины свыше 99,5%. Для этой цели ее растворяют в 58,9 кг воды. При кристаллизации затем эту воду нужно снова выпарить.

Выход: 85,5 кг изомальтулозы с чистотой более 99,5%.

Испаряемое количество воды: $385 + 20,4 + 58,9 = 464,3$ кг = 5,43 кг на 1 кг изомальтулозы.

В 500 л исходного раствора содержится 138,2 кг сухого вещества (соответствует 132,7 кг сахарозы). Таким образом, выход изомальтулозы составляет 64,4% используемой сахарозы.

Пример 4. Фракцию просева 0,3 - 0,8 мм из полученного по примеру 1 препарата размешивают в 0,1%-ном растворе глутарового альдегида в течение 10 мин, промывают фосфатным буфером 0,1 М, pH 7,0, и путем декантации освобождают от жидкости. Определение ферментативной активности обработанных иммобилизованных клеток показывает удельную активность 60 ед/г сухого вещества. Термостатируемую колонну заполняют иммобилизованными клетками, так, чтобы объем клеточной массы составил 16 л. Это количество соответствует 6 кг сухого вещества. Затем колонну нагревают до 50°C и через нее непрерывно пропускают 50%-ный раствор сахарозы с нормой расхода 10 л/ч. Выходящий из колонны продукт имеет следующий состав, г/100 г сухого вещества:

Глюкоза 1,4

Фруктоза 4,5
Сахароза 0
Изомальтулоза 81,1
1-0- α -D-глюкопиранозид-D-фруктоза 13,0

Полученный раствор изомальтулозы при 70°C упаривают до концентрации 80%, подводят в охлаждающий кристаллизатор, охлаждают до 20°C и выкристаллизовывают изомальтулозу на фильтрующей корзиночной центрифуге и отделяют от маточника. Маточник при 70°C упаривают до концентрации 80% и в охлажденном кристаллизаторе вновь охлаждают до 20°C. Выкристаллизовавшуюся изомальтулозу на аналогичной центрифуге отделяют от вторичного маточника (мелассы).

В 100 кг выходящего из реактора раствора изомальтулозы содержится 50 кг сухого вещества, из которых 40,55 кг (81,1%) составляют изомальтулозу. Упаривают 37,5 кг воды, чтобы повысить концентрацию до 80%. На 1-й ступени кристаллизации осаждается 22,9 кг изомальтулозы и примерно 0,5 кг промывной воды добавляют при центрифугировании. Получают в результате 40,1 кг маточника с 27,1 кг сухого вещества и 13 кг воды. Чтобы перед 2-й кристаллизацией повысить концентрацию маточника от 67,6 до 80%, нужно испарить 6,2 кг воды.

На 2-й ступени кристаллизации получают 14 кг изомальтулозы, так что общий выход составляет 36,9 кг или 91% находящейся в реакторе изомальтулозы (соответствует 73,8% использованной сахарозы). Изомальтулоза с 1-й ступени кристаллизации имеет чистоту более 99,5%, и ее можно непосредственно применять дальше. Изомальтулоза с 2-й ступени кристаллизации (14 кг) имеет чистоту более 96%, и ее еще требуется перекристаллизовать. Для этого ее сначала растворяют в 9,5 кг воды и затем путем упаривания и охлаждения выкристаллизовывают.

Соответственно этому подлежащее упариванию количество воды составляет $37,5 + 6,2 + 9,5 = 53,2$ кг для получения 36,9 кг изомальтулозы или 1,44 кг/кг изомальтулозы.

Пример 5. Фракцию просева 0,3-0,8 мм из полученного по примеру 1 препарата перемешивают в 0,1%-ном растворе глутарового альдегида в те-

чение 10 мин, промывают фосфатным буфером 1,0 М, pH 7,0, и путем декантации освобождают от воды. Определение ферментативной активности у обработанных иммобилизованных клеток показывает удельную активность 60 ед/г сухого вещества. Термостатируемую колонну заполняют иммобилизованными клетками, так чтобы объем клеточной массы составлял 16 л. Это количество соответствует 6 кг сухого вещества. Затем колонну нагревают до 40°C и через нее непрерывно пропускают 50%-ный раствор сахарозы с нормой расхода 10 л/ч. Выходящий из колонны продукт имеет следующий состав, г/100 г сухого вещества:

Глюкоза	2,5
Фруктоза	4,5
Сахароза	0,6
Изомальтулоза	82,5

1-0- α -D-глюкопиранозид-D-фруктоза 9,9

Полученный раствор изомальтулозы кристаллизуют по описанной в примере 4 схеме.

Из 100 кг раствора изомальтулозы получают 37,4 кг изомальтулозы (соответствует выходу 74,8% в расчете на использованное количество сахарозы).

Подлежащее упариванию количество воды составляет 53,2 кг для получения 37,4 кг изомальтулозы или 1,42 кг/кг изомальтулозы.

П р и м е р 6. От перевивки штамма *Serratia plymuthica* ATCC 15928 смывают клетки с помощью 10 мл стерильной питательной среды, состоящей из 8 г сиропа с завода по производству сахара, концентрации 65%, 2 кг воды от набухания кукурузы, 0,1 кг (NH₄)₂HPO₄ и 89,9 кг дистиллированной воды (при необходимости pH устанавливают 7,2). Эта суспензия служит в качестве затравочного материала для предкультур в вибрационных колбах емкостью 1 л с 200 мл питательного раствора указанного состава.

После термостатирования в течение 30 ч при 29°C проводят инокуляцию с помощью 20 колб (4 л) 16 л питательной среды указанного состава в ферментере емкостью 30 л и ферментируют при 29°C с аэрацией 20 л воздуха/мин и при скорости перемешивания 350 об/мин. Возросшее количество микроорганизмов определяют микроскопи-

ческим методом. После достижения по меньшей мере 5×10^9 микроорганизмов/мл ферментацию заканчивают.

Содержимое ферментера переводят в другую емкость (сосуд), где смешивают с катионоактивным коагулянтом (как например, PRIMAFLOC® C7 фирмы Rohm and Haas, Филадельфия, США). Скоагулированные клетки удаляют путем декантации надосадочной жидкости, промывают с помощью 0,1 М фосфатного буфера с pH 7,0 и обезвреживают на центрифуге. Затем массу экстрадируют до получения прядей, высушивают на воздухе и размалывают.

60 г просеянной через сито размером 0,3-0,8 мм фракции из полученного препарата в течение 10 мин перемешивают в 0,1%-ном растворе глутарового альдегида, промывают фосфатным буфером 0,1 М, pH 7,0, и декантацией освобождают от надосадочной жидкости. Определение ферментной активности таким образом обработанных иммобилизованных клеток показывает удельную активность 40 ед/г сухого вещества. Иммобилизованные клетки вносят в термостатируемую при 45°C колонну. Объем слоя клеточной массы составляет примерно 160 см³. Через колонки непрерывно протекает 50%-ный раствор сахарозы со скоростью потока 70 см³/ч. Выходящий из колонки поток продукта имеет следующий состав, г/100 г сухого вещества:

Глюкоза	3,4
Фруктоза	5,7
Сахароза	1,3
Изомальтулоза	74,4
1-0- α -D-глюкопиранозид-D-фруктоза	15,2

Полученный раствор изомальтулозы кристаллизуют соответственно описанной в примере 4 схеме. Из 50 кг раствора изомальтулозы получают 17,3 кг изомальтулозы (соответствует выходу 69,2% в расчете на использованное количество сахарозы).

П р и м е р 7. Ситовую фракцию 0,3-0,8 мм из полученного согласно примеру 1 препарата перемешивают в течение 30 мин в 0,2%-ном растворе цианурхлорида (2,4,6-трихлор-сим-триазин), промывают фосфатным буфером 0,1 М, pH 7,0 и путем декантации освобождают от надосадочной жидкости. Определение ферментной активности таким образом обработанных иммобилизо-

ванных клеток показывает удельную активность 55 ед/г сухого вещества. В термостатируемую при 40°C колонку вносят столько иммобилизованных клеток, чтобы объем слоя клеточной массы составил 160 см³. Это количество соответствует 60 г сухого вещества. Через колонку затем непрерывно пропускают 50%-ный раствор сахарозы со скоростью потока 30 см³/ч. Выходящий из колонки поток продукта имеет следующий состав, г/100 г сухого вещества:

Глюкоза	2,7
Фруктоза	3,9
Сахароза	0,7
Изомальтулоза	79,9
1-0- α -D-глюкопиранозид-D-фруктоза	12,8

Полученный таким образом раствор изомальтулозы кристаллизуют соответственно описанной в примере 4 схеме.

Из 50 г раствора изомальтулозы получают 17,8 кг изомальтулозы. Это соответствует выходу 71,2% в расчете на использованное количество сахарозы.

Пример 8. Из полученного согласно примеру 6 ферментного раствора получают клеточную массу с помощью центрифуги. Эту клеточную массу перемешивают в 8%-ном растворе альгината натрия в соотношении 1 ч. клеточной массы на 10 ч. раствора альгината. Полученную таким образом суспензию пропускают через фильтры диаметром 0,8 мм в медленно перемешиваемый 2%-ный раствор хлорида кальция. При этом образуются гранулы (шарики) альгината кальция, которые содержат включенные клетки бактерий. Измерение ферментной активности гранул (шариков) показывает удельную активность 87 ед/г сухого вещества. В термостатируемую при 40°C колонку вносят 160 см³ гранул (шариков). Это количество соответствует 45 г сухого вещества. Через колонку непрерывно пропускают 50%-ный раствор сахарозы со скоростью потока 50 см³/ч. Выходящий из колонки поток продукта имеет следующий состав, г/100 г сухого вещества:

Глюкоза	2,1
Фруктоза	4,3
Сахароза	2,0
Изомальтулоза	78,3
1-0- α -D-глюкопиранозид-D-фруктоза	13,3

Полученный раствор изомальтулозы кристаллизуют соответственно описанной в примере 4 схеме.

Из 50 кг раствора изомальтулозы получают 17,6 кг изомальтулозы. Это соответствует выходу 70,4% в расчете на использованное количество сахарозы.

Пример 9. Перевивку штамма *Protaminobacter rubrum* CBS 574.77 ферментируют аналогично примеру 6.

Содержимое ферментера смешивают с 2%-ным раствором хитозана. Скоагулированную при этом клеточную массу обезвоживают на центрифуге, экстрадируют до получения прядей и высушивают. Затем массу размалывают и просеивают. Ситовую фракцию 0,3-0,8 мм перемешивают в течение 30 мин в 0,2%-ном растворе цианурхлорида (2,4,6-трихлор-симм.-триазин) промывают фосфатным буфером 0,1 М, pH 7,0, и отделяют от надосадочной жидкости декантацией. Определение ферментной активности обработанных таким образом иммобилизованных клеток показывает удельную активность 65 ед/г сухого вещества. В термостатируемую при 40°C колонку вносят столько иммобилизованных клеток, чтобы объем слоя клеточной массы составил 160 см³. Это количество соответствует 50 г сухого вещества. Через колонку затем непрерывно пропускают 50%-ный раствор сахарозы со скоростью потока 60 см³/ч. Выходящий из колонки поток продукта имеет следующий состав, г/100 г сухого вещества:

Глюкоза	1,3
Фруктоза	3,2
Сахароза	1,2
Изомальтулоза	80,6
1-0- α -D-глюкопиранозид-D-фруктоза	13,7

Полученный раствор изомальтулозы кристаллизуют соответственно описанной в примере 4 схеме.

Из 50 г раствора изомальтулозы получают 18,1 кг изомальтулозы. Это соответствует выходу 72,4% в расчете на использованное количество сахарозы.

Пример 10. Перевивку штамма *Protaminobacter rubrum* CBS 574.77 ферментируют аналогично примеру 6.

Содержимое ферментера переводят в другой сосуд, смешивают с водным раствором коагулянта, состоящим из катионоактивного коагулянта PRIMAFLOC[®] C7 фирмы Rohm and Haas, Филадельфия,

США) и анионоактивного коагулянта PRIMAFLOC[®] A10 фирмы Rohm and Haas, Филадельфия США, Скоагулировавшие клетки осаждают, декантируют, промывают с помощью 0,1 М фосфатного буфера, pH 7,0, и обезвоживают на центрифуге. Массу затем экструдируют в жгуты, сушат при 30°C и размалывают.

100 г ситовой фракции 0,3-0,8 мм полученного препарата перемешивают в течение 10 мин в 0,1%-ном растворе глутарового альдегида, промывают фосфатным буфером (0,1 М, pH 7,0) и путем декантации освобождают от надосадочной жидкости. Обработанные клетки имеют удельную активность 65 ед./г сухого вещества.

Иммобилизованными клетками заполняют термостатируемый при 30°C колонный реактор. Объем слоя клеточной массы составляет примерно 300 см³. Через реактор непрерывно пропускают 50%-ный раствор сахарозы со скоростью протекания 180 см³/ч. Выходящий из реактора поток продукта имеет следующий состав, г/100 г сухого вещества:

Глюкоза	3,1
Фруктоза	4,9
Сахароза	0,8
Изомальтулоза	81,5
1-О- α -D-глюкопиранозидо-D-фруктоза	9,7

Полученный раствор изомальтулозы кристаллизуют соответственно описанной в примере 4 схеме.

Из 50 кг раствора изомальтулозы получают 18,3 кг изомальтулозы. Это соответствует выходу 73,2% в расчете на использованное количество сахарозы.

Изобретение обеспечивает следующие преимущества: раствор, содержащий изомальтулозу, можно подвергать кристаллизации без предварительного выпаривания, благодаря чему достигается значительная экономия энергии; применение иммобилизованных клеток повышает выход изомальтулозы, так как сахароза не расходуется для обмена веществ бактериальной массы; выход изомальтулозы еще более повышается вследствие того, что вводят чистые растворы сахарозы и поэтому избегают обширного образования мелассы; так как растворы сахарозы с концентрацией выше 65% микробиологически стабильны, то можно исключить стерилиза-

цию субстрата; более высокие концентрации субстрата можно вводить в меньшем объеме и, таким образом, можно использовать аппаратуру меньших размеров; увеличение бактериальной массы для получения неподвижных клеток происходит при оптимальных условиях развития; для приготовления бактериальной массы можно применять дешевый питательный субстрат, например разбавленный мелассовый раствор.

Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

1. Способ получения изомальтулозы, предусматривающий ферментативную изомеризацию раствора сахарозы с помощью клеток *Protaminobacter rubrum* CBS 574.77 или *Serratia plymuthica* с последующим выделением и кристаллизацией целевого продукта, отличающийся тем, что, с целью повышения выхода и чистоты целевого продукта, изомеризацию осуществляют с использованием иммобилизованных культур *Protaminobacter rubrum* CBS 574.77 или *Serratia plymuthica* ATCC 15928, или *S. marcescens* NCIB 8285 путем непрерывного пропуска 45-75%-ного раствора сахарозы через реактор с иммобилизованными клетками при 40-65°C.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что используют иммобилизованные клетки, полученные коагуляцией глутаровым альдегидом или хлористым циануром.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что используют иммобилизованные клетки, полученные коагуляцией катионоактивным коагулянтом.

4. Способ по пп.1 и 3, отличающийся тем, что в качестве коагулянта используют хитозан.

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что используют иммобилизованные клетки, включенные в матрицу из альгината кальция.

6. Способ по п.1, отличающийся тем, что используют иммобилизованные клетки, включенные в К-каррагинановый гель.

7. Способ по п.1, отличающийся тем, что используют иммобилизованные клетки, включенные в волокна диацетат или триацетат целлюлозы.

8. Способ по п.1, отличающийся тем, что используют иммо-

билизованные клетки, полученные коагуляцией анионоактивным или катионо-

активным коагулянтом или их комбинацией.

Редактор А.Огар

Составитель И.Привалова
Техред Л.Сердюкова

Корректор В.Кабаций

Заказ 5914/59

Тираж 501

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г.Ужгород, ул. Гагарина, 101.