

6. Грачёва И.М. Технология ферментных препаратов/ И.М. Грачёва, А.Ю. Кривова// Учебник для студентов ВУЗов/ гриф УМО/. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Элевар, 2000. – 512 с.
7. Щербаком В.Г., Лобанов В.Г. Биохимия и товароведение масличного сырья. – М.: Колос, 2003. – 360 с.

УДК [577.15:664.785.8]:602.4

ІММОБІЛІЗАЦІЯ БІОРЕГУЛЯТОРІВ СИСТЕМИ ТРАВЛЕННЯ ЯК МЕТОД ЇХ КОНЦЕНТРУВАННЯ ТА ОДЕРЖАННЯ БАД

Крусір Г.В., канд. техн. наук, доцент, Кушнір Н.А., асистент, Руссва Я.П., аспірант
Одеська національна академія харчових технологій

У статті показано можливість концентрування та одержання БАД з включенням біорегуляторів системи травлення білкової природи з використанням фізичних методів іммобілізації.

The possibility of concentration and BAA reception with including of digestion system bioregulators of albuminous nature with the use of physical methods of immobilization is shown in the article.

Ключові слова: біорегулятори, гідролітичні ферменти, інгібітори панкреатичних ферментів.

Останнім часом ферменти знаходять широке застосування в нутриціології та у медицині при розладах травлення, пов'язаних із захворюваннями печінки й підшлункової залози, у людей літнього і похилого віку. Джерелом одержання ферментних лікарських засобів, в основному, служать тканини тваринного походження й мікроорганізми. Однак, тривалий прийом таких ферментних препаратів призводить до феномену «звикання»: до припинення секреції власних ферментів організмом. Рослинні ферменти позбавлені такого недоліку, володіють м'яким «природним» впливом на організм. Кінець ХХ і початок ХХІ сторіч ознаменувалися широким використанням ферментних рослинних біологічно активних добавок (БАД), що містять гідролітичні ферменти і рекомендовані для корекції розладів травлення. Розробка технологій таких БАД і пошук нових перспективних джерел рослинних біорегуляторів є актуальними [1].

В останні роки рослинні ферменти розглядають як альтернативу ферментам тваринного і мікробного походження при їх використанні в терапії вад шлунково-кишкового тракту (ШКТ), а також у складі біологічно активних добавок, які сприяють перетравленню їжі. Це обумовлено низкою суттєвих переваг рослинних ферментів, серед яких найбільш вагомим є те, що вони не викликають припинення виробництва власних ферментів організму людини. Крім того вони здатні функціювати не тільки в кишечнику, а й в кислому середовищі шлунку.

Функціональні порушення травлення за частотою виникнення займають друге місце після серцево-судинних захворювань, тому дослідження нових профілактичних БАД з фітоферментною складовою для нормалізації функціонування системи травлення особливо актуальне.

Основними методами іммобілізації біологічно активних речовин з метою одержання БАД та інгредієнтів функціональних продуктів є різноманітні фізичні методи:

- методи фізичної сорбції на матрицях природного походження;
- фізичні методи мікрокапсулювання: комплексоутворення за рахунок електростатичної взаємодії (білків та полісахаридів) або проста коацервація; безмембранний осмос або складна коацервація;
- для біологічно активних речовин (БАР) білкової природи можна використовувати також метод осадження в ізоелектричній точці, але недоліком цього методу є значне зменшення або повна втрата біологічної активності БАР.

При іммобілізації біорегуляторів білкової природи використовували перераховані методи для концентрування, стабілізації та одержання БАД, які містять гідролітичні ферменти рослинного походження та рослинні інгібітори ферментів ШКТ людини.

Метою дослідження є розробка ефективного методу стабілізації гідролітичних ферментів та інгібіторів травних ферментів з метою одержання БАД.

Одним з традиційних методів стабілізації біорегуляторів білкової природи з метою одержання БАД є їх адсорбція на біополімерних матрицях. Як матриці для іммобілізації рослинних ферментів були вибрані харчові волокна пшеничних висівок – складний комплекс біополімерів (полісахаридів і лігніну) лінійної і розгалуженої структури, пшеничні висівки (ПВ), водоростеві полісахариди (караганан, агар) та інші біополімерні матриці, які найбільш широко використовуються в якості носіїв БАР [1].

В ході досліджень були підібрані оптимальні умови сорбційної іммобілізації протеази насіння томатів, протеази люцерни та ліпази пророщеного насіння ріпаку: носій просочували водним розчином ферменту (екстрактом), використовуючи гідромодуль 3, при 20 °С і висушували препарат при температурі 40 °С. Вибір носія для іммобілізації ферментів здійснювався за максимальним збереженням вихідної ферментативної активності.

Оптимальне за рівнем збереження протеолітичної активності співвідношення носій:фермент склало 1 г харчових волокон пшеничних висівок (ХВПВ) на 200 мг протеази з насіння томатів із збереженням 55 % від вихідної активності нативного ферменту.

Оптимальне за рівнем збереження протеолітичної активності протеази люцерни вагове співвідношення ХВПВ:фермент склало 1:0,2 із збереженням 70,5 % вихідної протеолітичної активності

Використання ХВПВ як носія для іммобілізації ліпази насіння ріпаку приводить до збільшення збереження вихідної ліполітичної активності, яка складає 72,4 % при ваговому співвідношенні носій:фермент = 1:0,3.

Відомо [2], що синтетичні і природні поліелектроліти здатні виділяти (концентрувати) білки з розбавлених водних систем у вигляді нерозчинних білок-поліелектролітних комплексів різної природи. Процеси концентрування білка за допомогою полісахаридів є одним з методів іммобілізації білкових біологічно активних речовин (мікрокапсулювання), які не викликають денатурацію білка і втрати його розчинності, а також ведуть до стабілізації білкової складової, що дозволяє розглядати перспективи їх використання з метою отримання БАД, які містять БАР білкової природи – гідролази і їх інгібітори. Білки і полісахариди утворюють комплекси за певних умов.

В роботі визначали вплив природи полісахариду та значення рН середовища на ферментативну активність комплексу фермент-полісахарид. Осадження білка в ІЕТ внаслідок різкого зниження його сумарного заряду є одним з найпростіших і економічніших прийомів в біотехнології.

З експериментальних даних видно, що найбільш ефективно осадження протеази з насіння томатів спостерігається при використанні гуміарабіку при рН 8,0 реакційного середовища (рис. 1).

ІЕТ протеази насіння томатів складає рН 8,0, тому можна зробити висновок, що максимальне осадження протеази відбувається в її ІЕТ і складає 62 % загальної маси протеази екстракту.

На основі експериментальних даних дослідження можна зробити висновок, що максимальне осадження протеази люцерни відбувається в присутності альгінату натрію при рН 3,0, що є ІЕТ протеази люцерни і складає 65 % загальної маси протеази екстракту люцерни.

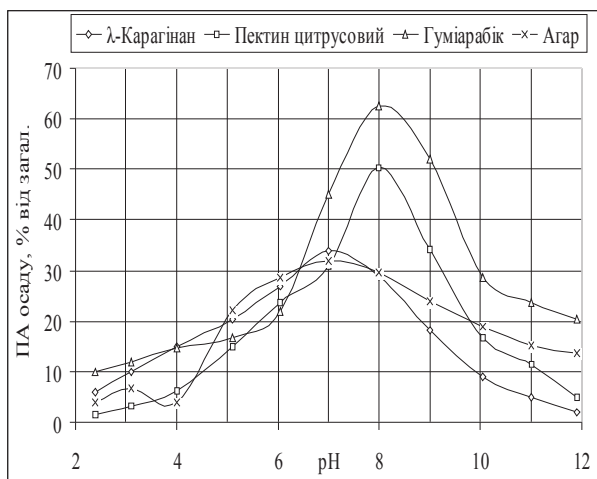


Рис. 1 – Залежність масової частки протеази насіння томатів, що перейшла в комплексний осад від загальної протеолітичної активності вихідного екстракту

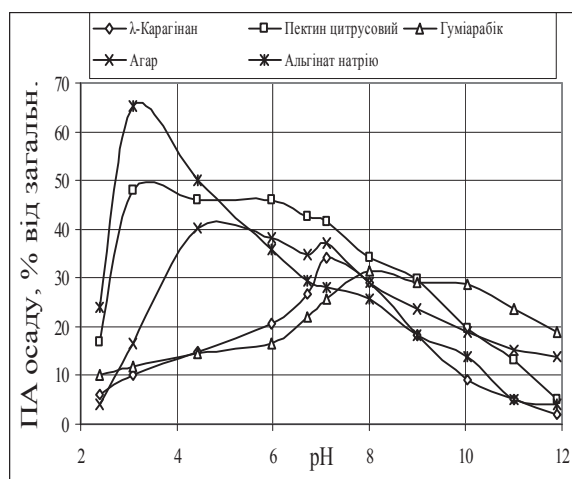


Рис. 2 – Залежність масової частки протеази люцерни, що перейшла в комплексний осад від загальної протеолітичної активності вихідного екстракту

Експериментальні дані досліджень свідчать про те, що максимальне осадження ліпази насіння ріпаку спостерігається при рН 4,5, що є ІЕТ ліпази, агаром і складає 48 % загальної ліполітичної активності екстракту.

При комплексоутворенні відбувається взаємодія між білком та полісахаридом за рахунок утворення водневих зв'язків, гідрофобних та електростатичних взаємодій. Існує область рН, в якій макромолекули

білка і полісахариду заряджені різнойменно. У цій області електростатична взаємодія між макрокатіоном білка і макроіоном полісахариду може приводити до утворення розчинних або нерозчинних комплексів.

Залежність заряду полісахариду (N) від рН середовища досліджували за допомогою потенціометричного титрування розчинів полісахаридів з різними значеннями рН (рис. 4).

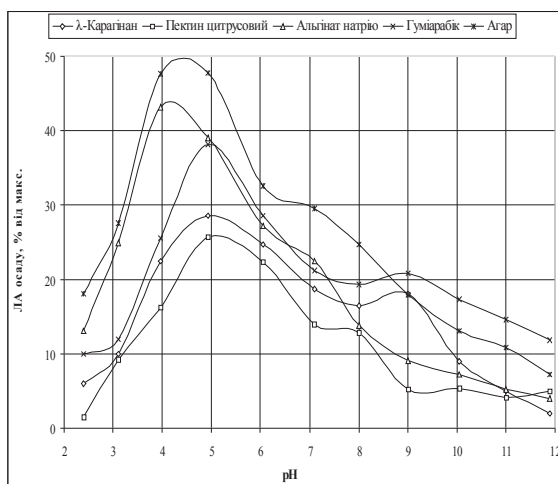


Рис. 3 – Залежність масової частки ліпази насіння ріпаку, що перейшла в комплексний осад від загальної лі поліфенольної активності вихідного екстракту

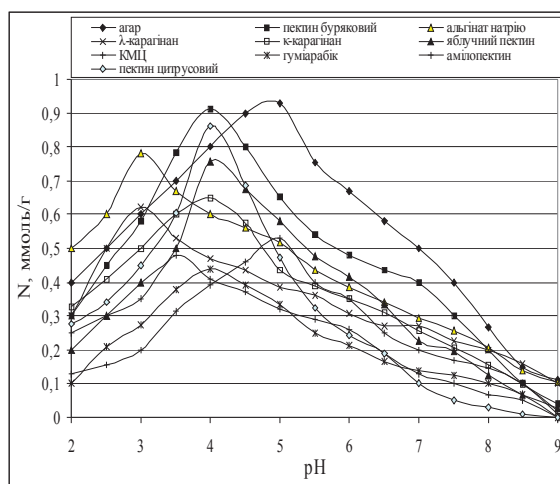


Рис. 4 – Залежність заряду (N) полісахариду від рН; де N, ммоль/г – різниця між максимально можливим і фактичним числом зв'язаних протонів 1г полісахариду

З отриманих даних, наведених на рис. 4, видно, що максимальний заряд полісахаридів знаходиться в кислому середовищі. В ізоелектричних точках (ІЕТ) білків-ферментів (рН 8,0; 3,0; 4,5 відповідно для протеази з насіння томатів, протеази люцерни та ліпази насіння ріпаку) найвищим зарядом володіють відповідно гуміарабік, альгінат натрію та агар (N = 0,4; 0,78; 0,93 ммоль/г).

Таким чином можна прогнозувати, що максимальне осадження ферментів відбувається близько ІЕТ білка-ферменту і саме тим полісахаридом, який за даного значення рН має максимальний заряд.

Результати вивчення процесів осадження полісахаридами рослинних біорегуляторів системи травлення наведені в табл. 1.

Таблиця 1 – Результати вивчення іммобілізації біорегуляторів білкової природи методом комплексоутворення (мікрокапсулювання)

Біорегулятор	ІЕТ	М. м., кДа	Максимальне осадження полісахаридом в ІЕТ біорегулятора	Масова частка біорегулятора в комплексному осаді
Протеаза насіння томатів	8,0	17...20	Гуміарабік	62
Протеаза люцерни	3,0	24	Альгінат натрію	65
Ліпаза насіння ріпаку	4,5	300	Агар	48
Інгібітор амілази з борошенець вівса	4,5	25,11	Агар	73
Інгібітор трипсину з зерна амаранту	3,0	20	Альгінат натрію	80
Інгібітор трипсину з насіння люцерни	4,2	20,2	Пектин цитрусовий	89,7

Дані експериментальних досліджень (табл. 1) свідчать, що осадження біорегуляторів з їх екстрактів залежить від молекулярної маси біорегулятора: при низьких молекулярних масах біорегуляторів ефективність осадження більша, ніж ефективність осадження біорегуляторів з більшими молекулярними масами. Так, при концентруванні протеаз, які характеризуються незначними молекулярними масами, в осад

переходить 62...65 % загальної кількості ферментів, а при іммобілізації ліпази з насіння ріпаку в комплексний осад переходить лише 48 % загальної кількості ліпази.

Слід зазначити, що ефективність переходу інгібіторів травних ферментів в комплексний осад значно вища, ніж ферментів, що може пояснюватись менш сприятливим впливом полісахариду на активний центр ферментів, а також на їх нативну конформацію. Інгібітори більш стабільні до конформаційних змін при комплексоутворенні з полісахаридами.

Таким чином, використання полісахаридів як комплексоутворювачів дозволяє досягти значного 25...40-кратного ступеня очищення біорегуляторів системи травлення. Порівняння основних параметрів даного процесу з відомими методиками очищення білкових БАР дозволяє поставити метод зв'язування ферментів у комплекс з поліелектролітами за ефективністю в один ряд з іонообмінною хроматографією і хроматофокусуванням.

Метод безмембранного осмосу пред'являє певні вимоги до структури біополімерів і до складу двофазних систем, що вибираються. Так, необхідно використовувати полісахариди, термодинамічно несумісні в розчині з концентрованим білком. Бажано також, щоб концентрація білкової фази значно перевищувала концентрацію полісахаридної фази, а розчинність полісахариду в білковій фазі була б мінімальною. Іншими словами, необхідно встановити умови несумісності білків і полісахаридів [2].

Основні умови несумісності розрізняються для систем, що містять неполярні полісахариди НПС, карбоксилвміщуючі аніонні полісахариди АПС (КАПС) і сульфатовані АПС (САПС), а також білки, розчинні і нерозчинні в ІЕТ. Білки (окрім альбумінів) і КАПС несумісні в області рН вище за ІЕТ білок за будь-яких значень μ , а при рН нижче ІЕТ – тільки за іонної сили вище 0,25. У разі САПС розшарування систем спостерігається при μ вище 0,5 незалежно від величини рН. Альбуміни несумісні з АПС – тільки при $\mu > 0,25$, незалежно від рН суміші. З НПС ці білки утворюють двофазні суміші при рН $>$ ІЕТ за будь-яких значень μ , а при рН $<$ ІЕТ – при $\mu > 0,25$.

Вельми істотною є та обставина, що фазовий стан не залежить від стану молекул білка (колоїдно-дисперсне або молекулярно-дисперсне) або, іншими словами, від ступеня його асоціації.

З іншого боку, сумісність полісахаридів з білками залежить від природи і молекулярної маси білка. Так, явище фазового розділення в сумішах, що містять полісахариди і альбуміни або прості глобулярні білки, має місце тільки при високих молекулярних масах білка (> 20 кДа), що вказує на певні обмеження, що накладаються на процес фазового розшарування.

Двофазні системи можуть бути одержані в умовах (рН, іонна сила), що виключають взаємодію різно-типових макромолекул. Іншими словами, несумісність виявляється при виключенні можливості утворення комплексів білок-полісахарид.

Процес концентрування біорегуляторів за допомогою безмембранного осмосу (табл. 2) вивчали виключно на прикладі ліпази з насіння ріпаку, тому що саме вона відповідає вимогам щодо молекулярної маси – її молекулярна маса складає 300 кДа. В літературних джерелах [2] також вказується, що нейтральний полісахарид – камедь бобів ріжкового дерева несумісний з усіма альбумінами і глобулінами при різних значеннях рН середовища та іонної сили. Саме цим зумовлений вибір полісахариду.

Таблиця 2 – Фазове розшарування при концентруванні білкової складової екстракту знежиреного пророщеного насіння ріпаку розчином полісахариду (вихідний склад фаз: 11,9 % розчин білку, 0,4 % розчин полісахариду)

Склад фаз після розшарування	Вміст білка, %	Вміст полісахариду, %	ЛА, % від загальної	Об'єм фази, мл
Склад фази, збагаченої полісахаридом	3,9	1,2	13	25
Склад фази, збагаченої білком	53,5	0,005	87	5

Одержані дані свідчать, що при концентруванні білкових речовин розчином полісахариду з використанням безмембранного осмосу 87 % вихідної ліпази концентрується в об'ємі, який в 5 раз менший, ніж вихідний об'єм екстракту.

Таким чином, показано можливість концентрування та одержання БАД з включенням біорегуляторів системи травлення (ферментів та інгібіторів травних ферментів) білкової природи з використанням фізичних методів іммобілізації.

Література

1. Черно Н. К. Иммунизация ферментов заместительной терапии на пищевых волокнах [Текст] / Черно Н. К., Давиденко Т. И., Севастьянова Е. В., Кравченко И. А. // Доклады АН Украины, биохимия. 1994.– № 5.– С. 146-149.
2. Антонов Ю. А. Применение метода безмембранного осмоса для концентрирования белков из молекулярно-дисперсных и коллоидно-дисперсных растворов (обзор) [Текст] / Антонов Ю. А. // Прикладная биохимия и микробиология.– 2000.– Т. 36.– № 4.– С. 380-394.

УДК 633.31:66.097.8

ВИДІЛЕННЯ ІНГІБІТОРУ ТРИПСИНУ З ЗЕРНА АМАРАНТУ З ВИКОРИСТАННЯМ АФІННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

**Крусір Г.В., канд. техн. наук, доцент, Севастьянова О.В., канд. хім. наук, доцент
Одеська національна академія харчових технологій, м. Одеса**

Виділено та охарактеризовано білковий інгібітор трипсину зерна амаранту. Він має значну антипротеолітичну активність та є перспективним для створення харчових композицій, які призначені для корекції харчування за різних станів, що супроводжуються підвищеною активацією протеолітичних ферментів.

Albuminous trypsin inhibitor of amaranth corn is selected and described. He has considerable antiproteolytic activity and is perspective for food compositions creation, which are intended for correction of feed at different states which are accompanied by the promoted activation of proteolytic enzymes.

Ключові слова: зерно амаранту, екстракція, афінна хроматографія, інгібітор трипсину, амінокислота, молекулярна маса.

Одним з актуальних та перспективних напрямків біотехнології є розробка харчових композицій, які спрямовано впливають на ферментативні процеси в організмі.

Білкові інгібітори протеолітичних ферментів відіграють важливу роль у підтримці гомеостазу. Вони беруть участь у регулюванні функцій протеаз шлунково-кишкового тракту, кровоносної системи, клітин шкіри та інших органів. У наш час багаточисельними лабораторними та клінічними дослідженнями доведено, що активація протеаз є основною ланкою в патогенезі таких тяжких захворювань людини, як панкреатити різної етіології, захворювання системи згортання крові, шоківий та алергічний стани, різні запальні процеси [1].

Відомо, що секреція соку підшлункової залози регулюється «процесом травлення». Перетравлюваність їжі залежить від рівня трипсину та хімотрипсину в кишечнику. Коли рівень цих ферментів стає нижчим за критичний показник, підшлункова залоза починає виробляти більше ферментів. За умов зв'язування трипсину з інгібітором може відбуватися уповільнення травлення [2]. Фактором-посередником між трипсином та підшлунковою залозою слугує гормон холецистокінін, який вивільняється з секретом кишечника, коли вміст трипсину в ньому стає нижчим за найвищий показник. Таким чином, збільшення рівня інгібіторів трипсину в їжі викликає ланцюг реакцій, що відновлюють нормальний вміст трипсину в кишечнику та нормалізують травлення [3].

Вплив інгібітору трипсину на організм людини не обмежується функціями травлення. Деякі патологічні стани, такі як ревматоїдний артрит, бактеріальна пневмонія, перитоніт, характеризуються надлишковою активацією протеолізу. Введення в організм додаткових кількостей інгібіторів - один з методів лікування перерахованих захворювань.

Доведено антиоксидантну дію інгібіторів хімотрипсину з сої, квасолі та картоплі, яка залежить як від дози, так і від типу інгібітора. Прийнято вважати, що інгібітори захищають від окиснення перш за все клітини та молекули шлунково-кишкового тракту [4]. Механізм цього захисту поки що не з'ясовано, але вважається, що атоми сульфуру молекул інгібітору здатні зв'язувати радикали, що попереджує їх окиснення та утворення пероксиду водню.

Інгібітори виявляють також антивірусну, антимікробну активність, мають протизапальну, антикоагуляційну дію.

Метою роботи є виділення та характеристика білкового інгібітору трипсину зерна амаранту. Він رایонований на Україні, має значну антипротеолітичну активність [4] та перспективний як компонент хар-