

УДК 664.8.022.6

К.В. ЗУБКОВА

Херсонський національний технічний університет

## РЕГУЛЮВАННЯ АМІНОКИСЛОТНОГО ОБМІНУ ПЛОДІВ ТА ОВОЧІВ ЗА ДОПОМОГОЮ ПОПЕРЕДНЬОЇ ОБРОБКИ СИРОВИНИ

*Наведено результати досліджень параметрів ферментативного перетворення певних амінокислот, а саме глутамінової кислоти рослинної сировини на  $\gamma$ -аміноасляну кислоту (ГАМК) під дією пульсуючого тиску. За отриманими даними автором розроблено технологію овочевих соків і напоїв з підвищеним вмістом  $\gamma$ -аміноасляної кислоти.*

*Ключові слова:  $\gamma$ -аміноасляна кислота, глутамінова кислота, глутаматдекарбоксилаза, гарбуз, напої.*

K.V. ZUBKOVA

Kherson National Technical University

## REGULATION OF EXCHANGE AMINO ACID FRUITS AND VEGETABLES THROUGH TREATMENT OF RAW MATERIALS

### Abstract

*The results of studies of the parameters of enzymatic conversion of certain amino acids, namely glutamic acid to GABA raw materials under pulsating pressure. According to our data the author developed a technology for vegetable juices and drinks with high content of  $\gamma$ -aminobutyric acid.*

*Keywords: gamma aminobutyric acid, glutamic acid, glutamatedecarboxylase, pumpkin, beverages.*

### Постановка проблеми

При розробці технології харчових продуктів враховуються нові тенденції в харчуванні людини. Актуальним є створення нових продуктів з певним напрямом їх біологічної та фізіологічної дії, відомих під назвою «функціональні продукти», які відрізняються від традиційних регульованим вмістом фізіологічно-активних речовин. Серед асортименту функціональних продуктів найбільш прийнятними є продукти на основі фруктових та овочевих соків, тому що в них одночасно можуть функціонувати багато різних за класами функціональних нутрієнтів. Функціональною складовою таких продуктів можна вважати  $\gamma$ -аміноасляну кислоту (ГАМК), яка бере участь у багатьох метаболічних перетвореннях, із яких найбільше значення мають пов'язані з обміном дикарбонових амінокислот і глюкози, в регулюванні фізіологічного стану нервової системи, впливаючи на активність нейронів і синаптичну передачу в них, обумовлює гальмівний ефект, тобто відіграє роль нейромедіатора. У дозах 0,5...2 г на добу ГАМК допомагає покращувати мову і відновлювати втрачену пам'ять у людей, що пережили інсульт. Крім того, було виявлено, що в тих же кількостях вона зменшує вміст цукру у крові, а в дозах 3 г на добу здатна знижувати кров'яний тиск і підтримувати серцеву діяльність [1]. Для зниження тривожності і дратівливості, зазвичай, добре допомагають дози від 1 г до 2 г ГАМК на добу. У хворих шизофренією і хворобою Альцгеймера також виявляється дефіцит  $\gamma$ -аміноасляної кислоти.

Згідно досліджень, мелатонін підвищує вміст  $\gamma$ -аміноасляної кислоти і серотину в середньому мозку і гіпоталамусі [2]. Глутамін і ефірні олії валеріани також впливають на збільшення концентрації  $\gamma$ -аміноасляної кислоти [3].

Основним джерелом ГАМК може бути рослинна сировина, у якій дана амінокислота знаходиться у вільному стані. Збільшити її кількість у рослинних тканинах можна шляхом зміння обміну речовин в сировині. Таким чином, можна отримати продукти з підвищеним вмістом  $\gamma$ -аміноасляної кислоти, без внесення її ззовні.

### Аналіз останніх досліджень і публікацій

Відомі способи отримання ГАМК мікробіологічним синтезом [4]. Після 90 год вирощування штамів *Bact. cadaveris* ATCC 9760 і *E. coli* ATCC 9637 в культивованій рідині накопичується до 4 г/л ГАМК. Продукт з відсепарованої при рН 2,0 культуральної рідини виділяють методом іонообмінної хроматографії на установці Diaion SKI (тип H+). Вихід кристалічного продукту з культуральної рідини складає 35 %. Недолік даного способу – низький вихід ГАМК і довготривалість процесу [5, 6, 7].

Відомі способи отримання ГАМК шляхом ензиматичного декарбоксилювання L-глутамінової кислоти, де в якості каталізатора реакції застосовують клітини мікроорганізмів, що містять L-глутаматдекарбоксилазу [8], а також іммобілізована GAD [9].

Недоліком цих способів є низька глутаматдекарбоксилазна активність клітин і додаткова процедура виділення і очищення GAD для іммобілізації.

Також існує спосіб отримання ГАМК декарбоксилюванням L-глутамінової кислоти клітинами бактерій *Arthrobacter simplex* [10]. Недоліком даного способу є невелике накопичення біомаси, довгий період росту і високі витрати біомаси на отримання ГАМК (0,43 г сухої біомаси на 1 г продукту) внаслідок низької глутаматдекарбоксилазної активності штаму, що використовується.

Задачею даних досліджень, виконаних автором, є розробка способу виробництва овочевих соків та напоїв, що містять більш високі концентрації ГАМК, ніж початкова сировина, за відносно простими технологічними схемами без використання зовнішніх добавок глутамінової кислоти [11].

#### **Формулювання мети дослідження**

Метою дослідження є встановлення механізму, умов та параметрів зміни метаболізму глутамінової кислоти, під дією глутаматдекарбоксилази, з утворенням ГАМК у рослинній сировині, під впливом зовнішніх факторів, і розробка технології соків та напоїв з підвищеним вмістом  $\gamma$ -аміномасляної кислоти.

#### **Викладання основного матеріалу дослідження**

В основі дихання лежить ряд закономірностей: перебіг реакції окиснення, відновлення, декарбоксилювання, дезамінування та інші. Кожна з цих реакцій каталізується специфічним ферментом. Існує генетичний зв'язок між аеробних і анаеробних типами дихання. Анаеробне дихання у фруктах та овочах може бути викликано нестачею кисню, надлишком вуглекислого газу, пошкодженням тканин і рядом інших причин. При цьому в різних умовах накопичуються різні проміжні продукти обміну речовин. Головною причиною виникнення анаеробного дихання є нестача кисню в тканинах. При витримці плодів в атмосфері з низьким вмістом кисню посилюється процес анаеробного дихання, в результаті у тканинах накопичується недоокиснені продукти – ацетальдегід і етиловий спирт.

В умовах обробки овочів пульсуючим тиском накопичення ацетальдегіду та етилового спирту спостерігалось у незначних кількостях. Вільні амінокислоти піддаються процесам дезамінування та декарбоксилювання. При декарбоксилюванні амінокислоти утворюють аміни і вуглекислий газ. Продукти, що утворюються при декарбоксилюванні амінокислот, часто мають фізіологічну дію, а у випадку з декарбоксилюванням дикарбонових кислот утворюються нові амінокислоти. Особливо інтенсивно процеси декарбоксилювання відбуваються у рослинній тканині. Так, з аспарагінової кислоти утворюється аланін, з глутамінової – ГАМК.

Захисні реакції рослин на несприятливий вплив набувають адаптивний характер при можливості координації їх за допомогою різних систем регулювання. При гіпоксії та аноксії ферментна регуляція контролюється комплементарною перебудовою обміну речовин, що необхідні для утворення достатньої для життєдіяльності кількості АТФ та інтермедіатів, генерування й окиснення відновлених кофакторів, детоксикації продуктів анаеробного метаболізму. Було встановлено, що активність ряду ферментів змінюється при дії на плоди факторів зовнішнього середовища, а саме, в умовах кисневого дефіциту. У залежності від часу гіпоксичної дії та складу газового середовища змінюються відповідні реакції рослинного організму. Під впливом відносно короткочасного впливу анаеробних умов у плодах спостерігаються значні порушення у вуглеводному обміні, що відображається на вмісті органічних кислот. Через нестачу енергії в анаеробних умовах знижується швидкість синтезу білка, і потреба в амінокислотах зменшується, що вважається головною причиною збільшення концентрації вільних амінокислот у клітинах.

Ефективним адаптаційним механізмом служить перебудова амінокислотного обміну, що направлена у бік утворення так званих «стресових» амінокислот, однією з яких є ГАМК, що запасується тканинами рослин в несприятливих умовах у великих кількостях без пошкодження клітин і виступає як легко мобілізована форма сукцинату при відновленні нормального дихання завдяки блокуванню її утилізації через реакції циклу трикарбонових кислот.

Синтез ГАМК відбувається шляхом  $\alpha$ -декарбоксилювання глутамату, що каталізує кальцій/кальціймодулін-залежна глутаматдекарбоксилаза з достатньо низьким оптимумом рН (5,9). Глутаматдекарбоксилаза різної фруктово-овочевої сировини функціонує в різних кислотно-лужних умовах з рН отимумом від 3,0 до 6,0 (морква, гарбуз, томати, буряк тощо). Для з'ясування оптимального показника рН глутаматдекарбоксилази проводили її виділення з плодів, що мають різні показники рН соку. Місцем локалізації ГАМК може бути вакуоль, де знайдено значну кількість окремих амінокислот.

Проведені дослідження виділеного ферменту глутаматдекарбоксилази встановили, що рН у межах 5,4...6,0 сприяють виділенню ферменту з максимальною активністю (рис.1). Підвищення активності глутаматдекарбоксилази спостерігається і при показниках рН від 3,0 до 5,4.

Оскільки овочеві соки та напої мають активну кислотність 3,9...4,5, то дана активність глутаматдекарбоксилази є задовільною для того, щоб каталізувати перетворення глутамінової кислоти до ГАМК. Для вибору оптимальних умов, що сприяють підвищенню вмісту ГАМК в сировині при обробці пульсуючим тиском було досліджено вплив температури та часу витримки сировини (рис. 2, 3).

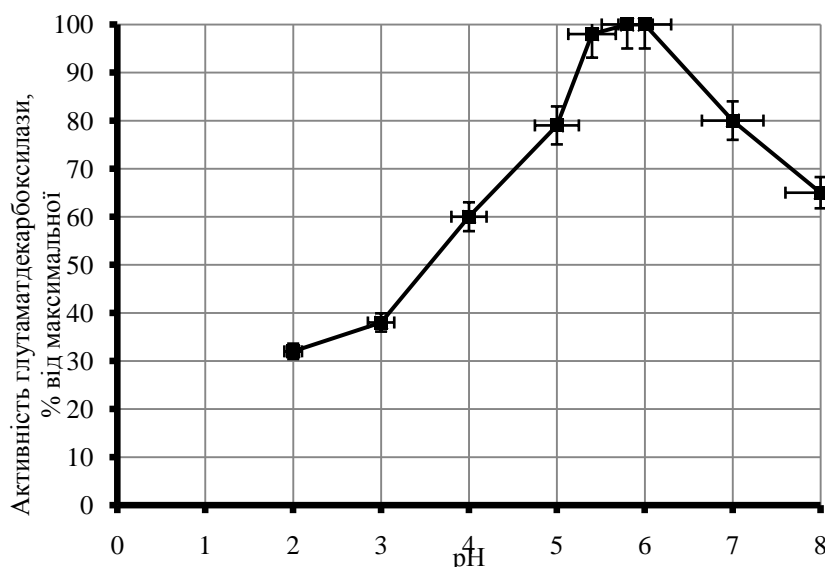


Рис. 1. Вплив рН середовища на активність глутаматдекарбоксилази гарбузового соку

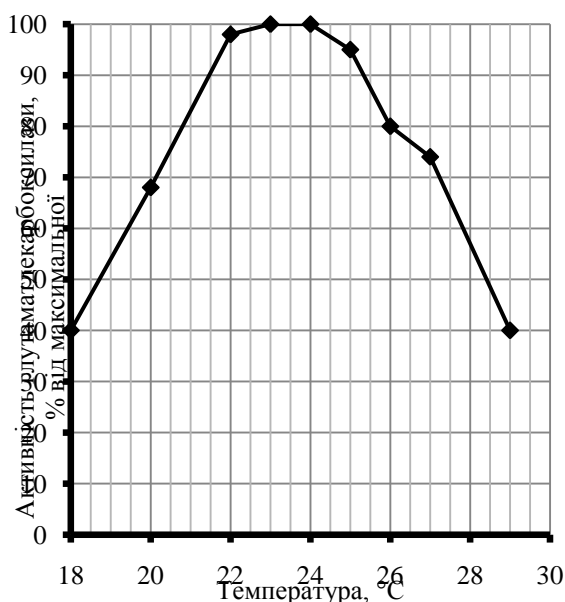


Рис. 2. Вплив температури витримки сировини на активність глутаматдекарбоксилази гарбузового соку, при дії пульсуючого тиску (24 цикли, 70 і 101,3 кПа)

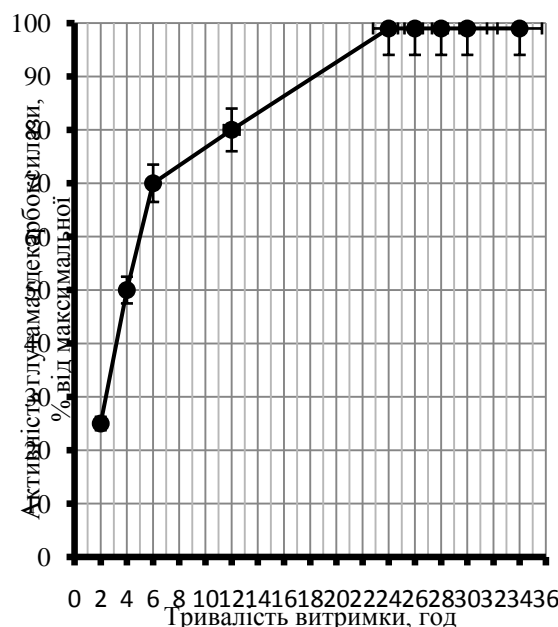


Рис. 3. Вплив тривалості витримки сировини на активність глутаматдекарбоксилази гарбузового соку, при дії пульсуючого тиску (70 і 101,3 кПа)

Оптимальна температура, що сприяє підвищенню активності глутаматдекарбоксилази – 23...24 °С. Найбільша активність глутаматдекарбоксилази спостерігалась при чергуванні аеробних і анаеробних умов витримки сировини протягом 24 годин.

Експериментально досліджено вплив відносної вологості повітря в камері попередньої обробки при вакуумуванні на технологічні показники отриманого соку. З підвищенням температури швидше накопичується вуглекислий газ, який краще розчиняється в соку, ніж кисень. Підвищення концентрації вуглекислого газу в овочах проявляє себе як регулятор обміну речовин, який впливає на окисно-відновні системи, у тому числі на окисні ферменти. Установлено, що газовий склад атмосфери овочів залежить від тривалості їх витримки в розрідженій атмосфері та температури, при якій проводять дослідження.

Згідно закону Генрі, граничне насичення тим чи іншим газом визначається величиною парціального тиску, і залежить від температури. Пониження тиску при вакуумуванні призводить до

порушення рівноважного стану, і розчинні гази виділяються у вигляді мікробульбашок. До цих процесів додається генерування парової фази, а інтенсивність утворення газової та парової фаз визначається глибиною входження рідкої фази в метастабільний стан. Таким чином, у процесі вакуумування з сировини видаляються не тільки гази, але й волога.

Щоб дослідити вплив відносної вологості повітря в камері попередньої обробки цілих плодів на вихід та характеристики соку визначали його основні технологічні показники. Для цього овочі витримували в розрідженій атмосфері (70 кПа) при відносній вологості в камері 71 %, 80 % та 95 % протягом 10, 20 та 60 хв.

При відносній вологості повітря (71 % та 80 %) у процесі вакуумування має місце усушка, що призводить до підвищення масової частки сухих речовин у соку від 0,1 до 0,5 %, що складає 2,7...4,5 % від загального вмісту. Це повинно впливати на вихід соку.

Збільшення тривалості вакуумування овочів до 60 хв при відносній вологості 71 % не суттєво змінює вихід соку, що пояснюється адаптаційними процесами в цитоплазматичних мембранах та усушкою овочів у процесі обробки.

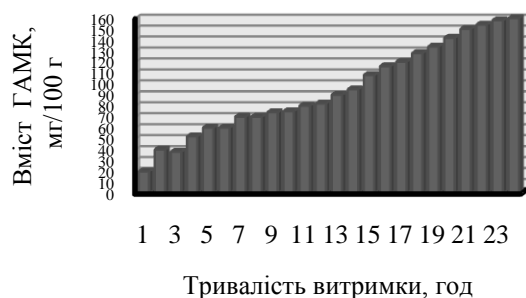
Масова частка сухих розчинних речовин при вакуумуванні протягом 10...60 хв при відносній вологості 95 % не змінювалась відносно контролю.

Такі дослідження дають підстави вважати, що витримка овочів у розрідженій атмосфері при високій відносній вологості не впливає на зміни сухих речовин. Цим підтверджується той факт, що за даних умов відсутній процес усушки.

Для вивчення впливу дії пульсуючого вакууму (вакуум, що порушується через рівні проміжки часу) на зміну метаболізму сировини досліджували зміну вмісту ГАМК в овочах залежно від числа порушень вакууму. Для цього підготовлені овочі розміщували в камері, де кожну годину змінювали тиск з 70 кПа на 101,3 кПа, температура протягом всього дослідження була сталою 24 °С (рис. 4).

Кількість порушень вакууму значно впливає на зміни вмісту ГАМК (рис. 5). Вісім перепадів тиску протягом 8 год збільшують вміст ГАМК у 4 рази, подальші перепади тиску до 24 годин з тією ж періодичністю призводять до збільшення вмісту ГАМК у 8 разів (на прикладі гарбузового соку).

Після витримки сировини у заданих умовах вміст ГАМК не змінюється, а отже збільшувати час витримки не раціонально.



**Рис. 4. Циклічна зміна тиску в залежності від тривалості витримки сировини**



**Рис. 5. Зміна вмісту ГАМК у гарбузовому соці в залежності від тривалості витримки при циклічній зміні тиску**

Запропонований спосіб витримки сировини при багатократній зміні циклів підвищення і пониження тиску дозволяє отримати готові продукти (соки, напої тощо) з підвищеним вмістом ГАМК, оскільки в сировині йдуть процеси перетворення вільних амінокислот, а саме глутамінова кислота, яка становить біля 40 % від загального вмісту вільних амінокислот в сировині, під дією ферменту глутаматдекарбоксілази утворює ГАМК та вуглекислий газ.

Доведено, що перепади тиску мають дієвіший вплив на збільшення вмісту ГАМК у сировині, ніж постійний знижений тиск, оскільки при витримці сировини при постійному зниженому тиску починається накопичення ацетальдегіду та етилового спирту.

Вміст ГАМК значно збільшився у тканинах плодів при дії дефіциту кисню. Оптимальний час обробки становить 24 години, оскільки саме за цей час накопичується максимальна кількість ГАМК та ще не починається спиртове бродіння. Таким чином, захисні реакції плодів на несприятливі умови набувають адаптивного характеру при можливості координації їх за допомогою різних систем регуляції дефіциту кисню.

Було встановлено, що активність глутаматдекарбоксілази збільшується при дії на овочі факторів зовнішнього середовища, а саме в умовах дефіциту кисню.

**Висновки**

1. На основі аналітичних та експериментальних досліджень розроблено технологію овочевих соків і напоїв з підвищеним вмістом  $\gamma$ -аміноасляної кислоти.
2. Досліджено кінетику ферментативного перетворення глутамінової кислоти до  $\gamma$ -аміноасляної кислоти під дією глутаматдекарбоксилази, виділеної з гарбуза, моркви, томатів і буряка.
3. Визначено оптимальні параметри витримки сировини в умовах пульсуючого тиску, що сприяють збільшенню вмісту  $\gamma$ -аміноасляної кислоти у готовому продукті.
4. Визначено фізико-хімічні та органолептичні показники якості овочевих соків і напоїв, виготовлених за розробленими технологіями при зберіганні.

**Список використаної літератури**

1. Ковалев, Г. В. Препараты ГАМК и ее аналогов в эксперименте и клинике [Текст] / Г.В. Ковалев // Фармакология и клиника  $\gamma$ -аминоасляной кислоты и ее аналогов: тр. ВГМИ. – Волгоград, 1979. – Т. XXXI. – С. 11-25.
2. Andersen P. Pathway of postsynaptic inhibition in the hippocampus [Text] / P.Andersen, J.C. Eccles, Y. Loyning // J. Neurophysiol. – 1964. – Vol.27. – P. 608-619.
3. Семейнов А.В. ГАМК-эргическое торможение в ЦНС: типы ГАМК-рецепторов и механизмы тонического ГАМК-опосредованного тормозного действия [Текст] / А.В. Семейнов // Нейрофизиология. – 2002. – №.1, Т.34 – С.82-92.
4. Глутаматдекарбоксилаза из *Escherichia coli*: экспрессия гена *gad A*, очистка и свойства GADa [Текст] / А.А. Шульга, Е.Л. Дарий, Ф.Т. Курбанов и др. // Молекуляр. биология. – 1999. – №4. – С.560-566.
5. Сухарева Б.С. Глутаматдекарбоксилаза: макромолекулярная структура и каталитические свойства [Текст] / Б.С.Сухарева // Физико-химические проблемы ферментативного катализа / ред. Ю.М. Торчинский. – М., 1984. – С. 185-210.
6. Христофоров Р.Р. Реакции декарбосилирования и побочного трансаминирования при взаимодействии глутаматдекарбоксилазы из *Escherichia coli* с аналогами субстрата, модифицированными по атомам С3 и С4 [Текст] / Р.Р. Христофоров, Б.С. Сухарева, Х.Б. Диксон // Биохимия. – 1996. – Т.61. – С.464-471.
7. Preparation of  $\gamma$ -aminobutyric acid using *E. coli* cells with high activity of glutamate decarboxylase [Text] / R.R Khristoforov, B.S. Sukhareva, H.B. Dixon et al. // Bioch. Molec.Biol. Intern. – 1995. – Vol. 36. – P. 77-85.
8. Губарев Е.М. Способ получения  $\gamma$ -аминоасляной кислоты [Текст] / Е.М. Губарев // Биохимия. – 1960. – Т. 25, № 2. – С. 261-263.
9. Chessler, S.D. Alternative splicing of GAD67 results in the synthesis of a third form of glutamic-acid decarboxylase in human islets and other non-neceral tissues [Text] / S. Chessler, A. Lernmark // J. Biol.Chem. – 2000. – Vol. 7. – P. 5188-5192.
10. Способ получения  $\gamma$ -аминоасляной кислоты [Текст] / Р.П. Янушевичуте, А.-А.Б. Паулюконис, Б.С. Сухарева; ВНИИ приклад. энзимологии, ин-т молекул.биологии АН СССР. – №2819151/23-04; заявл. 17.09.79; опубл. 30.09.82, Бюл. №12.
11. Зубкова К.В. Розробка технології овочевих соків і напоїв з підвищеним вмістом  $\gamma$ -аміноасляної кислоти [Текст]: автореф. дис. ...канд. техн. наук: 05.18.13 – технологія консервованих і охолоджених харчових продуктів / Зубкова Катерина Віталіївна; ОНАПТ. – Одеса, 2013. – 20 с.