

в массе мелкоизмельченного ($\geq 0,5$ мм) топинамбура путем сочетания СВЧ- и термообработки в кислой среде. Мытые в подкисленной воде клубни топинамбура резали на крупные куски и замачивали в подкисленной воде в течение 15 минут, затем подвергали действию СВЧ облучения в течение 2 мин и тонко измельчали до размера частиц не более 0,5 мм. В полученную дисперсию вводили щавелевую кислоту в количестве 0,1 М/1000 г дисперсии и тщательно перемешивали. Разделив массу на две равные части, подвергали их термической обработке: а) в сушильном шкафу при температуре 80 ± 2 °С в течение 3 часов, б) в СВЧ установке 15 минут. После этого в обоих случаях отделяли гидролизат фильтрованием, промывали жмых горячей водой в количестве 20 % к массе исходной дисперсии и объединяли фильтрат с первой порцией гидролизата. Щавелевокислый гид-

ролизат нейтрализовали расчетным количеством гидроксида кальция, а затем удаляли избыток кальция, барботируя углекислый газ в образовавшуюся суспензию до pH=6-7. Осадок после созревания удаляли фильтрованием.

Жидкая фаза была трех-четырекратно концентрирована упариванием в вакууме при (65 ± 2) °С. Характеристики полупродуктов и продуктов приведены в табл. 5.

Выводы

Результаты работы показали принципиальную возможность существенного упрощения технологии получения растворов моноз из инулинсодержащего сырья и улучшения качества продукта за счет предупреждения окисления полифенолов и оптимизации процесса гидролиза олигосахаридов.

Поступила 11.2010

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гриненко И.Г. Физико-химические свойства инулина и получение его модифицированных производных. Канд. диссерт. Киев, 1993.
 2. Dubrunfaut P. Preparation du fructose //Ann. Chim. Phys. – 1847. – 21. – 169-174.
 3. Arsem W.C. Method of preparing fructose //Brevet US 1616172, 1927.
 4. Роминский И.Р. Исследование в области химии инулина и фруктозы и технологии их получения. Докт. диссертация. Киев, 1956.
 5. Мат. 1-ой Международной научно-практ. конф. "Растительные ресурсы для здоровья человека" 23-27.09.2002.– Москва – Сергиев-Посад. – С. 247, 269, 272, 293, 296, 306, 309, 310, 312-315, 323, 327, 330, 362, 372, 387-392.
 6. Бурюшкіна Т.М., Количев В.І., Ратушняк В.В. Спосіб виготовлення розчину вуглеводів з інулінвмісної сировини. Пат. України № 37973, 2008.
 7. Голубев В.Н., Куев В.Л., Гончаров Н.И. Биотехнологические аспекты переработки топинамбура //Пищевая промышленность. – 1991. – №9. – С. 52-53.
 8. Христюк В.Г. Влияние электромагнитного поля низкой частоты на выход и состав сока //Изв. вузов. – 2002. – № 2–3. – С. 73-74.
- УДК 664. 022.3:57.016:664.29:577.15

ЧЕРНО Н. К., д-р техн. наук, профессор, ОЗОЛИНА С. А., канд. хим. наук, доцент, КАПУСТЯН А.И., аспирант

Одесская национальная академия пищевых технологий

ИНТЕРПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫЙ КОМПЛЕКС ХИТОЗАН-ПЕКТИН КАК МАТРИЦА ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ ТРИПСИНА

Показано, что взаимодействие хитозана с пектином сопровождается образованием гелеобразного комплекса полиэлектролитного типа. Физико-химические характеристики интерполиэлектродного комплекса (ИПЭК) хитозан-пектин изучали с помощью методов спектрофотометрии, ИК-спектроскопии, определения спектра мутности. Установлена эффективность иммобилизации трипсина на интерполиэлектродной матрице.

Ключевые слова: интерполиэлектродные комплексы, хитозан, пектин, ферменты, иммобилизация.

The interaction of chitosan with pectin is accompanied by the formation of polyelectrolyte complex gel-like type. Physico-chemical characteristics of interpolyelectrolyte complex (IPEC), chitosan-pectin were studied using the methods IR-spectroscopy, determination of turbidity spectrum. The efficiency of immobilization of trypsin on the interpolyelectrolyte matrix was determined.

Keywords: interpolielektrolitnye complexes, chitosan, pectin, enzymes, immobilization.

В последние годы в результате интенсивного развития биотехнологии и геной инженерии использование ферментов находит все более широкое применение в различных областях науки. В настоящее время существует множество биологически активных добавок (БАД) и лекарственных средств на их основе. Однако при пероральном применении таких средств возникает проблема их ферментативной и кислотной деградации в желудочно-кишечном тракте. Ее решение достигается иммобилизацией ферментов различными способами [1].

Материалы, используемые в качестве носителей при иммобилизации биологически активных веществ (БАВ), чрезвычайно разнообразны. Это могут быть

частицы на основе силикагеля, гидроксида титана, циркония, железа, полимерные синтетические и природные материалы. Для синтеза оболочек при инкапсулировании биокатализаторов часто используют полиэлектродиты и полиэлектродитные пары поликатион-полианион. Химическая природа, молекулярная масса и структура полиэлектродитов, формирующих состав оболочки иммобилизуемого вещества, определяют структуру, размер, проницаемость и прочность получаемых капсул [2].

Синтетические полимеры имеют ряд преимуществ в качестве матрицы для иммобилизации перед природными биополимерами. Они обладают четко контролируемой структурой, высокой стабильностью, химической инертностью. Однако, при получении ферментсодержащих надмолекулярных систем, предназначенных для применения в биотехнологии и медицине, в качестве носителей целесообразно использование природных материалов, так как они биосовместимы, нетоксичны и биodeградируемы в физиологических условиях [2]. В качестве природных носителей используют полиэлектродиты или полиэлектродитные пары полисахаридов, белки, которые в силу своих амфотерных свойств в зависимости от pH среды могут являться как поликатионами, так и полианионами. Для создания функциональных систем на основе липосом применяются природные липиды – компоненты мембран.

При использовании природных полимеров, благодаря их собственной физиологической активности, может быть реализован синергический эффект – усиление активности иммобилизуемого вещества [1].

Среди основных требований, предъявляемых к носителям, предназначенным для применения в биотехнологии и медицине, следующие: создание целевых систем в мягких условиях; возможность контроля строения, размера, гидродинамических характеристик, прочности, стабильности, а также биосовместимости и биodeградируемости материалов.

При разработке полимерных лекарственных и биологически активных препаратов используют следующие методы иммобилизации: насыщение полимерного материала БАВ на основе сорбционных процессов; ковалентное связывание БАВ с полимерной основой; комплексообразование полимера с биокатализатором высокомолекулярной природы (двойные и тройные комплексы) [3].

Одной из важнейших проблем, определяющих эффективность лечебного действия полимерных материалов, является пролонгирование скорости перехода БАВ в окружающую среду. Регулирование скорости выделения БАВ может быть достигнуто при использовании интерполиэлектродитных комплексов (ИПЭК), пролонгированное высвобождение БАВ в отсутствие ковалентной связи из ИПЭК происходит за счет диффузии его в окружающую среду из набухшей полимерной системы [3].

ИПЭК представляют особый класс полимерных веществ, образующихся в результате кооперативных обратимых реакций соединения противоположно заряженных ионов. Кооперативный характер связей между полиионами придает ИПЭК высокую стабильность в широком интервале значений рН среды. Анионо- и катионогенные макромолекулы электростатически комплементарны друг другу, поэтому взаимодействие между ними в термодинамическом аспекте вполне аналогично взаимодействию между комплементарными биополимерами, ответственному за самосборку большинства биологических структур. Простейший способ получения ИПЭК – совмещение водных растворов, один из которых содержит полианионный, а другой – поликатионный компонент [4].

При различных соотношениях ионогенных групп исходных компонентов могут быть получены как нерастворимые, так и растворимые ИПЭК. Нерастворимые (стехиометричные) ИПЭК выделяются из раствора в виде сравнительно мало сольватированных осадков, соотношение между противоположно заряженными группами в них составляет 1:1.

Водорастворимые (нестехиометричные) ИПЭК могут быть получены из большинства пар противоположно заряженных полиэлектролитов, но при соблюдении определенных условий. Необходимые и достаточные условия образования растворимых ИПЭК не связаны прямым образом с химической природой полиэлектролитных комплексов. Если степень полимеризации полиэлектролита, введенного в избытке, превышает или, по крайней мере, не ниже степени полимеризации недостаточного компонента, образуются растворимые продукты [5].

Основные способы получения растворимых и

нерастворимых ИПЭК отличаются различной последовательностью смешивания водных растворов полиэлектролитов с различной концентрацией, молекулярной массой электролитов и ионной силой их водных растворов. Следует отметить, что при проведении реакций между полиэлектролитами может происходить одновременное образование как нерастворимых, так и растворимых ИПЭК, т.е. нерастворимый комплекс сосуществует с раствором комплекса. Нерастворимый ИПЭК может быть переведен в раствор в виде растворимого ИПЭК, если к нему добавить избыток высокомолекулярного компонента, который будет выполнять гидрофильную функцию [4].

Данная статья посвящена изучению некоторых физико-химических характеристик ИПЭК хитозан-пектин, а также исследованию процесса иммобилизации трипсина на полученной интерполиэлектродитной матрице.

Как известно, хитозан – широко используемый аминополисахарид. Он является растворимым, биосовместимым и биodeградируемым полимером. Одним из его важных свойств является способность образовывать прочные нековалентные комплексы с белками, анионными полисахаридами, а также хелатные комплексы с металлами, на чем основано его применение как материала для инкапсулирования и иммобилизации. В качестве анионного комплексообразователя использовали пектин, который представляет собой полимер α -D-галактуроновой кислоты, в котором часть карбоксильных групп находится в метоксилированном состоянии [9].

В работе использовали хитозан с молекулярной массой 245 кДа и степенью деацетилирования 67,2 %, яблочный пектин с молекулярной массой 12 кДа и степенью метоксилирования 66,4 %, трипсин с активностью 90 ед/мг. Молекулярную массу хитозана и пектина определяли на основе данных вискозиметрии [6]. ИПЭК хитозана с пектином получали путем совмещения их водных растворов и характеризовали, определяя спектр мутности, используя методы спектрофотометрии, оценивая вклад различных видов межмолекулярных взаимодействий.

Для спектрофотометрических исследований образцы готовили, прибавляя к 0,15 %-му раствору пектина различные объемы 0,001 %-го раствора хитозана. При этом был получен ряд систем, содержащих от 1 до 25 мкг полисахарида. Спектры их поглощения в интервале длин волн 230 – 450 нм представлены на рис. 1. Показано, что по мере увеличения количества добавляемого хитозана в спектре получаемых систем возрастает интенсивность поглощения при $\lambda=260$ нм и появляется поглощение в области 320 – 450 нм, где ни пектин, ни хитозан не поглощают (рис. 1). Такие изменения характера спектра отражают формирование дисперсной фазы хитозан-пектин, на частицах которой и происходит рассеяние УФ-излучения [6].

Таким образом, формирование ИПЭК подтверждено данными спектрофотометрических исследований. На основании полученных данных (рис. 1) построен график зависимости оптической плотности систем хитозан-пектин при длине волны $\lambda=340$ нм от количества вводимого в их состав хитозана (рис. 2) [6].

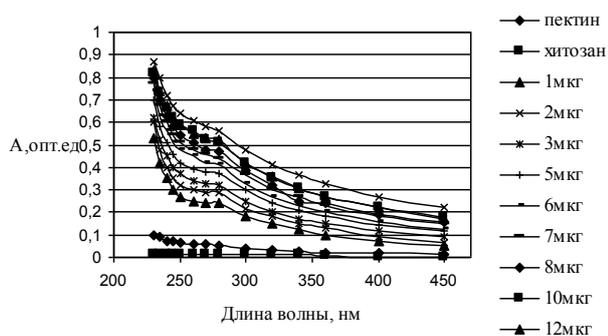


Рис. 1. Спектры поглощения пектина, хитозана и продуктов их взаимодействия

При увеличении количества хитозана, добавляемого к раствору пектина, от 1 до 22 мкг имеет место плавное возрастание оптической плотности системы, резкий скачок наблюдается при достижении массы хитозана – 23 мкг, что соответствует количеству хитозана, необходимого для образования дисперсий хитозан-пектин) [6].

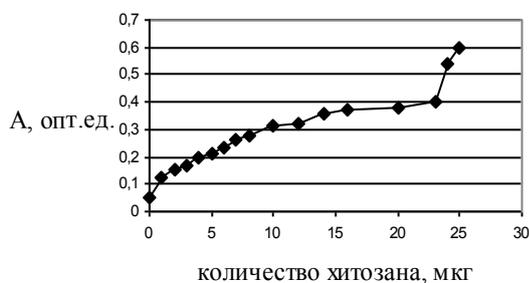


Рис. 2. Оптическая плотность систем хитозан-пектин

Определение спектра мутности является одним из основных методов, используемых для характеристики сложных дисперсных систем, которые формируются при взаимодействии растворов полимеров, надмолекулярных частиц в растворах полимеров [8]. Данный метод позволяет определить радиус частиц, мутность системы, количество частиц в единице объема, он был применен для исследования стехиометрических комплексов хитозан-пектин, полученных при различных значениях pH среды.

Практика применения метода спектра мутности при исследовании полимеров и дисперсных систем показала, что в большинстве случаев экспериментальные точки в двойном логарифмическом построении $\lg D - \lg \lambda$ достаточно хорошо ложатся на прямую в пределах $\Delta \lambda - 0,2 \dots 0,3$ микрона. В таких случаях n (волновой экспонент) определяется как тангенс угла наклона $\lg D / \lg \lambda$ с обратным знаком [9].

Пользуясь таблицами характеристических функций светорассеяния дисперсных систем [9] по значению n находили показатели, характеризующие исследуемые дисперсии: относительный показатель преломления - m , объемную долю полимера - \mathcal{G} , относительный размер частиц - α , удельную мутность системы - g и др. Прологарифмировав полученные величины оптической плотности ИПЭК и величины длин волн, при которых вели измерения, построили

графики зависимости $\lg D$ от $\lg \lambda$ при pH 2, 4,5 и 8, которые имели вид прямых линий, независимо от степени разведения, и наклон данных линий одинаков при данном значении pH среды (рис. 3). Рассчитав тангенс угла наклона полученной прямой графической зависимости $\lg D$ от $\lg \lambda$, определили величину волнового экспонента для ИПЭК с различным значением pH (табл. 1).

Полученные данные свидетельствуют о том, что характеристики ИПЭК хитозан-пектин зависят от pH среды. Радиус частиц в системе хитозан-пектин при pH=2 в 2 раза меньше, чем при pH=4,5 и в 3,5 раза меньше, чем при pH=8. Число частиц в единице объема системы соответственно максимально при pH=2. Размер частиц исходных полисахаридов остается без изменения в диапазоне значений pH среды от 2 до 4,5.

В ИК-спектре стехиометричного комплекса хитозан-пектин, в отличие от исходных спектров полимеров, в области $2600-3400 \text{ см}^{-1}$ наблюдается ряд уширенных полос, характерных для валентных колебаний протонированной аминогруппы, что подтверждает полиионную структуру комплекса. Это коррелирует с отсутствием в ИК-спектре ИПЭК полосы поглощения при 1622 см^{-1} , характерной для NH_2 -групп хитозана.

При анализе ИК-спектров исходных образцов хитозана и пектина обнаружены полосы поглощения, характерные для данных полисахаридов: гидроксильных (3288 см^{-1} и 1170 см^{-1}), метильных ($2900-2800 \text{ см}^{-1}$), амидных (3460 см^{-1}), карбоксильных групп (1736 см^{-1} и 1712 см^{-1}) и аминогрупп (1622 см^{-1}).

Количественный дифференциальный анализ ИК-спектров комплекса относительно хитозана и пектина осуществляли по величине относительной оптической плотности (ВООП), используя метод базисной линии и внутреннего стандарта. После математической обработки полученных данных, построили дифференци-

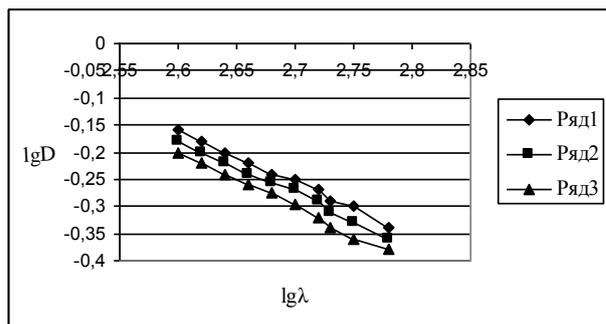


Рис. 3. Зависимость $\lg D$ от $\lg \lambda$ для систем хитозан-пектин при pH=2: ряд 1 - разведение 1:1, ряд 2 - 1:2, ряд 3 - 1:4

альные спектры в системе ВООП.

Дифференциальный ИК-спектр сравнения комплекса хитозан-пектин по отношению к пектину (рис. 4) характеризуется широкой полосой при 3400 см^{-1} , которая смещена в низкочастотную область в сравнении с частотой свободных OH-групп, что свидетельствует об участии гидроксидов в системе водородных связей.

Таким образом, данные ИК-спектроскопии подтверждают образование комплекса полиионной

Таблица 1

Характеристика дисперсных систем пектин-хитозан

Показатели	pH	ПЭК	хитозан	пектин
Волновой экспонент	2	2,143	1,971	2,300
Показатель преломления		1,288	1,300	1,273
Радиус частиц, см		$517,7 \cdot 10^{-7}$	$335,2 \cdot 10^{-7}$	$155,4 \cdot 10^{-7}$
Мутность системы, см ⁻¹		0,073	0,053	0,041
Количество частиц в единице объема, см ⁻³		$96114 \cdot 10^4$	$195318 \cdot 10^4$	$311165 \cdot 10^4$
Массовая концентрация, %		0,044	0,036	0,028
Волновой экспонент	4,5	2,358	2,435	2,300
Показатель преломления		1,353	1,337	1,273
Радиус частиц, см		$1023 \cdot 10^{-7}$	$321 \cdot 10^{-7}$	$143,8 \cdot 10^{-7}$
Мутность системы, см ⁻¹		0,071	0,062	0,041
Количество частиц в единице объема, см ⁻³		$1348 \cdot 10^4$	$246079 \cdot 10^4$	$311165 \cdot 10^4$
Массовая концентрация, %		0,078	0,024	0,028
Волновой экспонент	8	2,152	3,122	2,300
Показатель преломления		1,358	1,47	1,273
Радиус частиц, см		$1978 \cdot 10^{-7}$	$219 \cdot 10^{-7}$	$143,8 \cdot 10^{-7}$
Мутность системы, см ⁻¹		0,089	0,098	0,048
Количество частиц в единице объема, см ⁻³		$725 \cdot 10^4$	$314153 \cdot 10^4$	$311165 \cdot 10^4$
Массовая концентрация, %		0,083	0,019	0,0048

природы и участие водородных связей в образовании комплекса. Для количественной оценки вклада отдельных нековалентных межмолекулярных взаимодействий исследовали растворимость стехиометричного ИПЭК в системах, действие которых направлено на разрушение сил взаимодействия различной природы [7].

Установлено, что основную роль в нековалентном межмолекулярном взаимодействии хитозана и пектина играют ионные связи, доля которых составляет – 86%, вклад гидрофобных взаимодействий – 6% и водородных – 8%.

Тройной стехиометричный ИПЭК, обладающий протеолитической активностью, получали последовательным смешиванием растворов пектина, трипсина и хитозана при массовом соотношении компонентов 2:1:2. Концентрацию полисахаридов-комплекс-

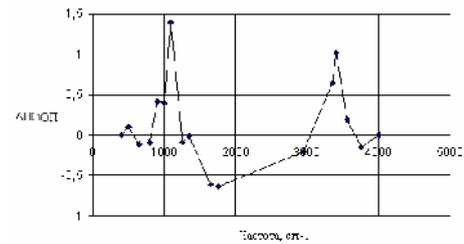


Рис. 4. Дифференциальный ИК спектр комплекса хитозан-пектин относительно пектина

образователей варьировали в интервале от 0,5 до 2 %, трипсина – от 0,2 до 1 %.

Процесс взаимодействия компонентов происходил мгновенно и сопровождался гелеобразованием, в то время как каждый из полисахаридов в отдельности при взаимодействии с трипсином в данных условиях не способен к образованию геля.

Эффективность иммобилизации белка фермента контролировали по изменению его концентрации в жидкой фазе в сравнении с исходным раствором методом спектрофотометрии при длине волны 280 нм [6]. Установлено, что наибольшей активностью обладает тройной стехиометричный ИПЭК, полученный с использованием 0,25 %-ых растворов пектина и хитозана и 1 %-го раствора трипсина. Показано, что скорость диффузии фермента из интерполиэлектролитной матрицы уменьшается с увеличением концентрации полисахаридов.

Таким образом показано, что взаимодействие хитозана с пектином сопровождается образованием интерполиэлектролитного комплекса, который является эффективной матрицей для иммобилизации трипсина. Возможно регулирование скорости диффузии фермента из ИПЭК путем изменения концентраций биополимеров, используемых при комплексобразовании.

Полученные интерполиэлектролитные матрицы могут представлять интерес как материал для микрокапсулирования и в качестве носителей для транспорта биологически активных веществ с пролонгированным действием.

Поступила 11.2010

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ильина А.В., Варламов В.П. Полиэлектролитные комплексы на основе хитозана (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология, 2005 – Т. 41. №1. С. 9 – 16.
- Хитин и хитозан: получение, свойства, применение / под ред. ак. РАСХН К.Г. Скрябина, Г.А. Вихоревой. – М.: Наука 2002. – 368с.
- Трехкомпонентные интерполимерные комплексы с низкомолекулярным посредником – некоторые особенности надмолекулярной структуры / О.В. Праздничная, И.Д. Юргенс, С.В. Кораблева и др. // Высокомолекулярные соединения, 1994. Сер. А. Т. 36, №8. С. 1316-1321
- Кабанов В.А., Физико-химические основы и перспективы применения растворимых интерполиэлектролитных комплексов (обзор) // Высокомолекулярные соединения, 1994. Т. 36. №2. С.183-197.
- Кабанов В. А. Полиэлектролитные комплексы в растворе и в конденсированной фазе // Успехи химии. 2005. Т. 74. №1. С. 5–23.
- Саянов В.И., Ильина А.В., Варламов В.П., Евдокимов Ю.М. // Молекулярная биология, 2002. – Т. 36. №4. С. 706-714.
- Крусир Г.В. ингибиторы панкреатической амилазы // Зернові продукти і комбікорми. – 2009. - №3(35). С. 18-22.
- Толстогузов В.Б. Применение турбидиметрии для исследования взаимодействия белков и кислых полисахаридов в водной среде // В.Б. Толстогузов, Е.С. Вайнерман // Die nahrung. - №5. – 5 с