

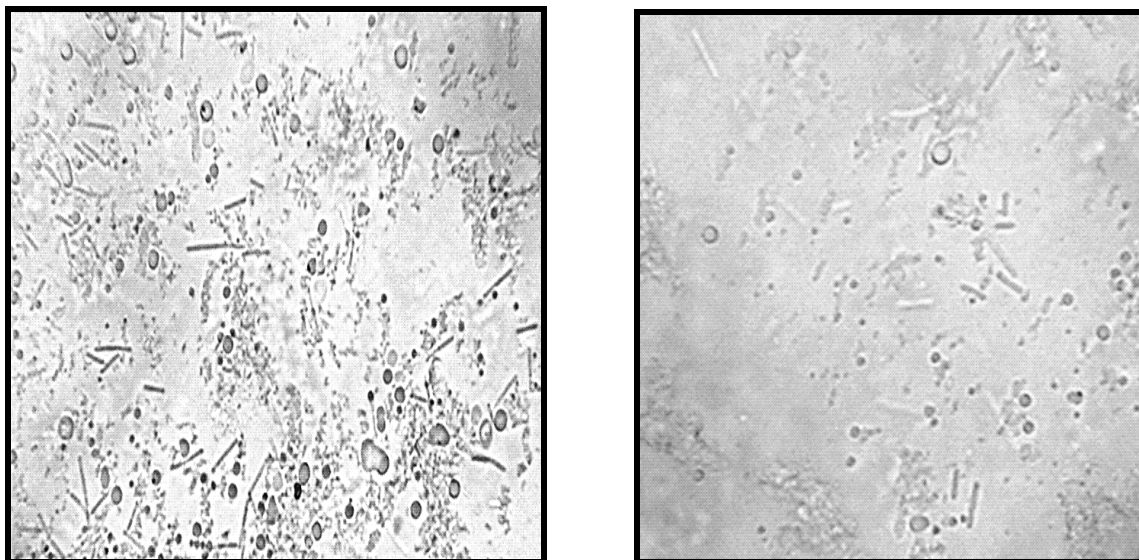


Рис. 3 – Микрофотографии пектиновых капсул, содержащие лактобактерии

Выводы. Полученные данные показали, что использования полисахарида в качестве защитной матрицы позволяет увеличить стрессоустойчивость клеток к неблагоприятным условиям и тем самым обеспечивает высокую степень выживаемости пробиотических культур.

Перспективным является использование капсулированных форм пробиотиков для создания новых продуктов лечебно-профилактического направления.

Литература

1. Капрельянц Л.В. Функціональні продукти [Текст] / Капрельянц Л.В., Іоргачова К.Г. – Одеса: Друк, 2003. – 312 с. - ISBN 966-8099-83-4.
2. Конев Ю. В. Дисбиозы и их коррекция // Consilium medicum. — 2005. — Т. 7, № 6. — С. 432—437.
3. Н.В. Ананьева, В.И. Ганина, Н.В. Нефедова, Г.Р. Габрильян. Применение иммобилизованных форм пробиотических бактерий в производстве молочных продуктов // Молочная промышленность – 2006.– №11 – с. 46 –47.
4. Промышленная микробиология: Учеб. пособие для вузов по спец. «Микробиология» и «Биология» / З.А. Аркадьева, А.М. Безбородов, И.Н. Блохина и др.; Под ред. Н.С. Егорова. – М.: Высш. шк., 1989. – 688 с.

УДК 613.292 – 021.632 : 577.114.7 : 577.152.34

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ТРИПСИНА В ИНТЕРПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫЙ КОМПЛЕКС ХИТОЗАН-ПЕКТИН

**Черно Н.К., д-р техн. наук, профессор, Капустян А.И., аспирант
Одесская национальная академия пищевых технологий, г. Одесса**

Дана характеристика иммобилизованного трипсина в состав интерполиэлектrolитного комплекса хитозан-пектин. Показано, что полученный препарат обладает высокой протеолитической активностью. Применение комплекса хитозан-пектин в качестве матрицы для иммобилизации обеспечивает пролонгированное действие трипсина.

The characteristics of immobilized trypsin in the interpolyelectrolyte complex chitosan-pectin is given. It is shown that the resulting product has a high proteolytic activity. The use of complex chitosan-pectin as a matrix provides prolonged action of trypsin.

Ключевые слова: трипсин, хитозан, пектин, иммобилизация, интерполиэлектrolитный комплекс.

Интенсивное развитие исследований в области химии, биохимии и технологии интерполиэлектронных комплексов (ИПЭК) обусловлено не только тем, что они являются простейшими моделями процессов самосборки и самоорганизации в биологических системах, но и определившимися в последние годы перспективами их практического использования [1,2].

ИПЭК образуются в результате кооперативных обратимых реакций соединения противоположно заряженных ионов. Кооперативный характер связей между полиионами придает ИПЭК высокую стабильность в широком интервале pH среды. Частицы ИПЭК обладают коллоидными свойствами, аналогичными белковым структурам, наиболее характерными из которых являются заряд, гидрогелевая структура, контролируемая проницаемость по воде и растворам, включающим компоненты физиологических жидкостей [3].

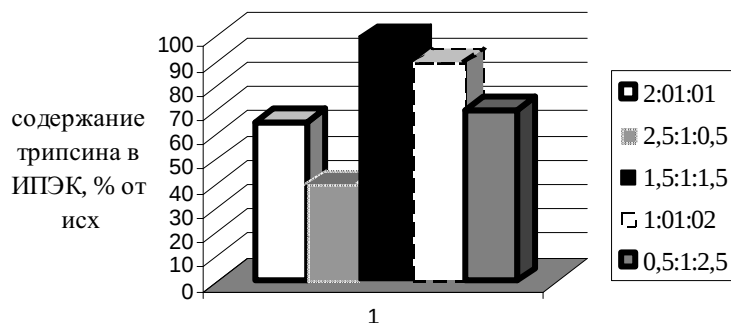
Особенности строения и свойств ИПЭК определяют возможности их широкого применения в различных областях практической деятельности, в том числе в медицине, биотехнологии и фармации. Перспективным является использование ИПЭК в качестве матриц для иммобилизации биокатализаторов, подвергающихся биодegradации и изменению структуры в условиях желудочно-кишечного тракта. При получении таких систем, в качестве носителей целесообразно использование природных материалов, так как они биосовместимы с активной компонентой, нетоксичны и биодegradируемы [3].

Цель настоящего исследования – получение и характеристика трипсина, иммобилизованного в ИПЭК.

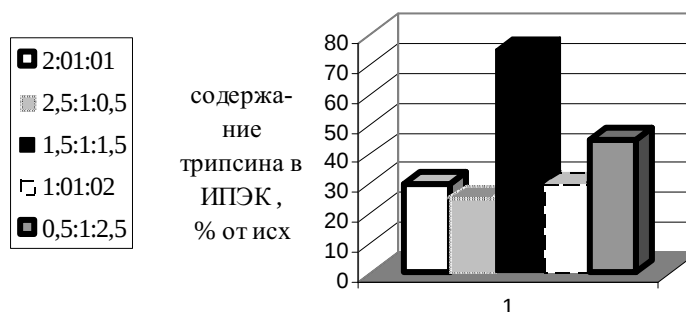
Его получали путем сочетания растворов биополимеров, резистентных к действию пищеварительных ферментов, а именно хитозана (поликатиона с молекулярной массой 245 кДа, степень деацетилования 67,2 %) с полисахаридами анионной природы.

Ранее нами были разработаны условия получения нерастворимого ИПЭК хитозан-пектин [4,5]. Установлено, что наиболее эффективным анионным комплексообразователем по отношению к хитозану является яблочный пектин (молекулярной массой 12 кДа, степень метоксилирования 33,4 %). Комплексообразование хитозана с пектином сопровождалось значительным повышением вязкости системы, а также образованием клубков гелеобразной структуры. При получении ИПЭК массовую долю биополимеров в растворе варьировали в интервале (0,5 – 2) %, массовое соотношение хитозан-пектин – от 1:3 до 3:1. Максимальный выход гелеобразной составляющей комплекса (94 %) имел место при использовании 0,5 % растворов полиэлектролитов при объемном соотношении 1:1, что соответствовало и эквимольному отношению (1:1) свободных карбоксильных групп в молекуле пектина и аминогрупп в молекуле хитозана.

На рис. 1 представлены данные, иллюстрирующие влияние соотношения и последовательности совмещения компонентов на содержание белка (трипсина) в составе трехкомпонентного ИПЭК хитозан-трипсин-пектин.



а) при совмещении компонентов в последовательности пектин-трипсин-хитозан



б) при совмещении компонентов в последовательности хитозан-трипсин-пектин

Рис. 1 – Содержание трипсина в трехкомпонентном ИПЭК хитозан-трипсин-пектин

Практически полная иммобилизация трипсина в комплекс имела место при равном соотношении хитозан : пектин и при последовательности совмещения растворов пектин-трипсин-хитозан.

Связывание трипсина полиэлектролитным носителем не приводит к существенному снижению его активности, что часто наблюдается при получении иммобилизованных форм ферментов. Например, при иммобилизации липазы на пищевые волокна с использованием полиэтиленоксида и поливинилового спирта теряется (69 – 78) % исходной липолитической активности. Активность иммобилизованного трипсина в составе гелеобразного продукта из бурых морских водорослей «Ламидан» сохраняется всего лишь на 19,5 % [6]. Сохранение активности трипсина в составе трехкомпонентного комплекса составило 85,36 %.

pH-оптимум иммобилизованного трипсина в составе ИПЭК несколько расширен по сравнению с таковым нативного фермента, 90 % активности сохраняется в диапазоне значений pH от 6,4 до 8,0. Термооптимумы нативного и иммобилизованного трипсина соответствуют физиологическому значению температуры (37-38) °C.

При исследовании pH-стабильности интактного трипсина установлено, что он устойчив в кислой среде. После его экспозиции в течении 120 мин при pH = 2 сохраняется 82 % его активности. Такая тенденция характерна и для иммобилизованных образцов фермента.

Изучена зависимость выхода трипсина из ИПЭК во внешний раствор при различных значениях pH среды (2; 4,5; 8) от времени (рис. 2).

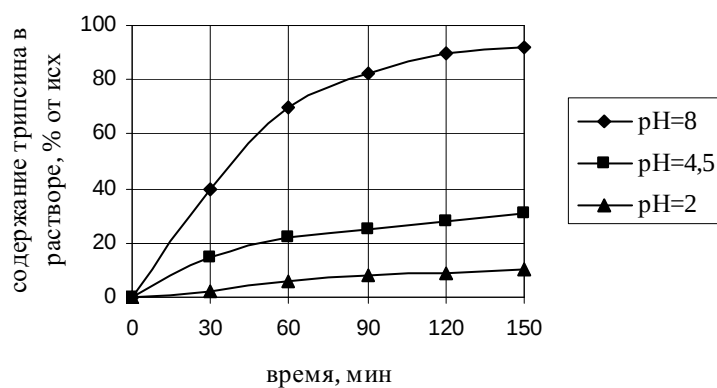


Рис. 2 – Динамика выхода трипсина из ИПЭК

Как следует из приведенных данных, при кислых значениях pH накопление фермента во внешнем растворе за первые 60 мин составляет около 20 % от исходного содержания трипсина в ИПЭК, а в последующие 90 мин увеличивается не более чем на 10 %. Исходя из этого можно полагать, что при контакте со средой желудочного сока (pH $\approx$ 1,2...2,5) основная часть фермента сохранится в матрице. При щелочных значениях pH, соответствующих среде кишечного содержимого желудочно-кишечного тракта человека, накопление трипсина в растворе происходит значительно интенсивнее. Так, за 60 мин от начала контакта ИПЭК с жидкой фазой в раствор переходит до 70 % связанного фермента, а его максимальный выход к концу эксперимента (150 мин) достигает 92 %.

Определена зависимость глубины гидролиза субстрата (казеина) от времени его инкубации с интактным и иммобилизованным трипсином (рис.3).

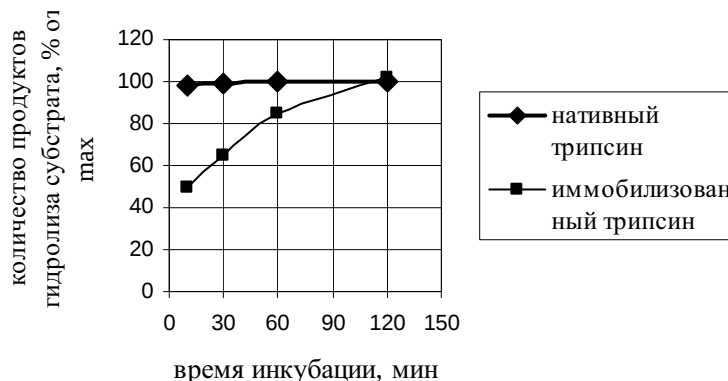


Рис. 3 – Глубина гидролиза субстрата

Приведенная зависимость показывает, что интактный трипсин за 10 мин гидролиза почти полностью (на 98 %) расщепляет субстрат, иммобилизованный за этот же промежуток времени гидролизует казеин на 45 %, полнота расщепления достигается только через 120 мин.

Совокупность полученных данных позволяет прогнозировать эффективное пролонгированное функционирование иммобилизованного в ИПЭК трипсина в реальных условиях желудочно-кишечного тракта.

Известно, что компоненты ИПЭК – хитозан и пектин, относят к категории энтеросорбентов. Установлено, что полученный их сочетанием ИПЭК обладает развитой поверхностью, превосходящей по своим характеристикам хитозан (табл. 1), а его способность к сорбции воды (рис.4), определенная с помощью весов Мак-Бена-Бакра [7], близка к таковой пектина. Как и другие представители пищевых волокон, ИПЭК обладает способностью к связыванию катионов тяжелых металлов (сорбция Pb^{2+} – 35,5 мг/г), холевых кислот (6,5мг/г), приближаясь к величине этих показателей к эталонным образцам [7].

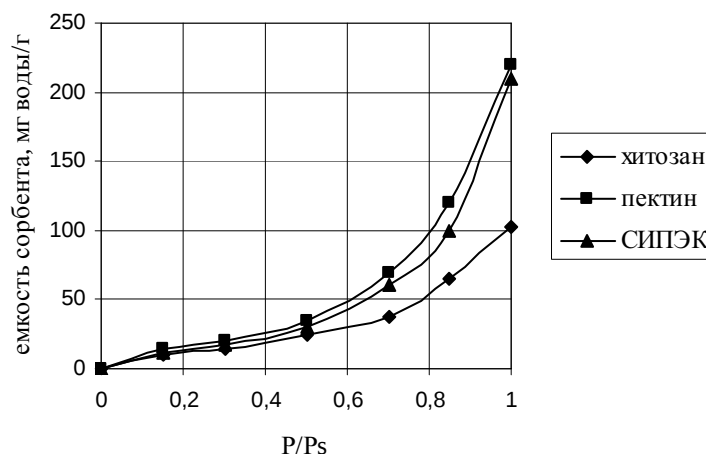


Рис. 4 – Изотермы сорбции паров воды ИПЭК и его компонентами

Таблица 1 – Характеристика структуры исследуемых образцов

Наименование образца	Емкость монослоя a_m , ммоль/г	Удельная поверхность $S_{уд.}$, м ² /г	Предельно сорбируемый объем $V_{max} \cdot 10^{-6}$, м ³ /г	Средний эффективный радиус пор $r \cdot 10^{-10}$, м
Хитозан	5,12	256,35	0,386	22,31
Пектин	5,84	301,42	0,582	18,63
ИПЭК	5,78	293,22	0,534	19,44

Выводы

Таким образом показано, что включение трипсина в ИПЭК хитозан-пектин пролонгирует действие фермента; полученный препарат, наряду с протеолитической активностью, обладает функционально-физиологическими свойствами, присущими энтеросорбентам.

Литература

1. Кабанов В.А., Физико-химические основы и перспективы применения растворимых интерполиэлектролитных комплексов (обзор)// Высокомолекулярные соединения, 1994. Т. 36.№2. С.183-197.
2. Зезин А.Б., Кабанов В.А. Новый класс комплексных водорастворимых полиэлектролитов. - Успехи химии, 1982, т. 51, №9, с. 1447-1483.
3. Ильина А.В., Варламов В.П // Прикладная биохимия и микробиология, 2004. – Т. 40. №3. С. 354 – 358.
4. Черно, Н.К. Характеристика продукта взаимодействия хитозана с пектином/ Н. К. Черно, С. О.Озолина, А. И. Капустян // «Розвиток наукових досліджень 2010»: Мат. шост. Міжн. наук.-практ. конф 22-24 жовтня 2010 р., Полтава 2010. – С.122-123.
5. Черно, Н.К. Получение полиэлектролитного комплекса хитозан-пектин и характеристика его физико-химических свойств/ Н. К. Черно, С. О. Озолина, А. И. Капустян // Актуальные проблемы потребительского рынка товаров и услуг: Мат. Всерос. научн.-практ. Конф. с междунар. участием 18 февраля 2011 г., г. Киров. – С. 290.

6. Кравченко І.А. та ін Імобілізація ферментів замісної терапії на харчових волокнах. Доповіді НАН України, 1997, № 3, с.182-186.
7. Макаринская А.В. Разработка парафармацевтика с антибактериальной и ферментативной активностью: Дис...канд. техн. наук. – 1998. – 172 с.

УДК 664.002.35 : 573.6

НАУЧНЫЕ ОСНОВЫ БИОСИНТЕЗА ПОЛИФРУКТАНОВ ИЗ САХАРОЗЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА С ИНУЛИНСИНТЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Безусов А.Т., д-р техн. наук, профессор, Пилипенко И.В., канд. техн. наук, доц.,
Средницкая З.Ю., научный сотрудник
Одесская национальная академия пищевых технологий, г. Одесса

Разработка эффективного способа извлечения ферментного препарата из клубней Helianthus tuberosus L. позволяет индуцировать синтез специфических полифруктанов с целью увеличения их содержания в продуктах функционального и профилактического назначения.

The cells metabolism regulation of root Helianthus tuberosus L. by outer influence indicates the specific polyfructosans synthesis for their contents increasing, and searching ways for effective obtaining polyfructosans

Ключевые слова: топинамбур, полифруктозаны, инулинсинтетическая активность.

Биотрансформация и биосинтез являются наиболее перспективными направлениями современной биотехнологии. Процессы биокатализа обладают рядом преимуществ перед традиционным органическим синтезом, и находят применение в пищевой промышленности для направленного получения соединений, обладающих специфическими свойствами. При этом реакции биотрансформации обеспечивают избирательность катализируемых реакций, а также возможность проведения процесса с высоким выходом конечного продукта. Литературные данные свидетельствуют, что согласно модели, предложенной Эдельманом и Джеффордом [1], синтез инулина в клубнях *Helianthus tuberosus* L. происходит в два этапа. На первом – из двух молекул сахарозы (GF) образуются глюкоза (G) и трисахарид 1-кестоза (GF₂): GF + GF = GF₂ + G. Катализатором процесса является фермент сахароза-сахароза-фруктозилтрансфераза (SST). В данном случае сахароза является и донором и акцептором фруктозильных остатков.

Недавно было обнаружено, что под действием SST могут также синтезироваться олигосахариды со степенью полимеризации до 5 (GF₃ и GF₄) [1]. Следующим шагом биосинтеза фруктана является реакция между образовавшимся олигосахаридом GF_n менее 5, который выполняет функцию донора фруктозила и молекулой сахарозы или фруктана в роли акцептора: G(F)_n + G(F)_m → G(F)_{n-1} + GF_{m+1}. Реакция катализируется фруктан-фруктан-фруктозилтрансферазой (FFT), которая участвует в перераспределении фруктозильных остатков между GF_n менее 5 и сахарозой. В результате неоднократного трансфруктозилирования происходит образование высокомолекулярных фруктанов.

Хотя двухшаговая модель биосинтеза фруктанов была предложена еще в 1968 г., потребовалось 30 лет для ее экспериментального доказательства. В 1994 г. из клубней топинамбура была выделена и очищена фруктозилтрансфераза с относительной молекулярной массой около 70 кДа [2]. Этот фермент при инкубировании неочищенных экстрактов клубней с сахарозой катализировал реакцию полимеризации фруктанов путем перераспределения фруктозильных остатков от олигофруктанов к фруктанам с большей степенью полимеризации. Поскольку в качестве наименьшего донора фруктозила выделенный фермент использовал трисахарид (GF₂), то он был идентифицирован как FFT.

Доказательство существования фермента, катализирующего синтез трисахарида, было получено в 1996 г. Описаны [1] выделение и характеристика фруктозилтрансферазы из клубней *Helianthus tuberosus* L., имеющей профиль активности, отличный от активности FFT.

В противоположность FFT этот фермент при встречном синтезе мог использовать сахарозу как наименьший субстрат – донор фруктозила в реакциях полифруктозилирования, для которых синтез трисахарида являлся преобладающим. Поэтому фермент был обозначен как SST.

Таким образом, в результате исследования ферментативных свойств SST и FFT было показано, что FFT не способна катализировать начальный этап синтеза фруктанов, тогда как SST не способна катализировать формирование фруктановых полимеров со степенью полимеризации выше пяти. SST может распределять фруктозильные остатки между сахарозой также эффективно, как FFT между молекулами