

## БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ СПОСІБ ВИЛУЧЕННЯ АРАБІНОГАЛАКТАНУ ІЗ ДЕРЕВИНИ СОСНИ

Черно Н.К., д-р техн. наук, професор, Гураль Л.С., канд. техн. наук, доцент, Ломака О.В., асп.  
Одеська національна академія харчових технологій, м. Одеса

Обґрунтовано доцільність застосування біотехнологічних прийомів при вилученні арабіногалактану із деревини сосни *Pinus silvestris*. Використання ферментних препаратів із целюлазною і геміцелюлазною активностями (целовіридин, целокандин, целолігнорин, целоконінгін) інтенсифікує процес екстракції та збільшує вихід арабіногалактану в порівнянні з традиційним способом його вилучення. Отримані зразки містять до 97,3-97,8 % полісахаридної компоненти, у складі якої наявні залишки галактози, арабінози і слідові кількості – глюкуронової кислоти. Арабіногалактан містить фракції з молекулярними масами в діапазоні 15-65 кДа, домінує фракція з середньою молекулярною масою 65 кДа.

*The expediency of application of biotechnological techniques taking the arabinogalactan from Pinus silvestris wood is proved. The use of the ferment preparations with cellulase and hemicellulase activities (celloviridin, cellocandin, celloignorin, cellokonin) intensifies the extraction process and increases the outlet of arabinogalactan in comparison with the traditional method of extraction. The received samples contain up to 97,3-97,8% of the polysaccharide component which includes the remnants of galactose, arabinose and a trace amount - glucuronic acid. Arabinogalactan contains fractions with molecular weights in the range of 15-65 kDa, the fraction with the average molecular mass of 65 kDa dominates.*

Ключові слова: деревина сосни, арабіногалактан, целюлолітичні ферментні препарати, біотехнологічний процес вилучення полісахариду.

Дослідженню арабіногалактану (АГ) хвойної деревини, зокрема – деревини модрина, як промислово значущого джерела, присвячено роботи авторитетних наукових шкіл Росії і США. Значний вклад у його вивчення внесено вченими Іркутського інституту хімії ім. Фаворського СО РАН, які детально охарактеризували будову й властивості АГ модрина видів *Larix sibirica* і *Larix gmelinii* залежно від способу його очистки й виділення [1]. У США в промисловому масштабі АГ отримують із деревини модрина західної *Larix occidentalis*, що зростає у північно-західному регіоні Північної Америки [2].

Макромолекула АГ модрина високо розгалужена. Її кор побудовано із залишків *D*-галактопіраноз, сполучених  $\beta$ -(1-3)-глікозидними зв'язками [1]. Молекулярна маса полісахариду коливається у межах від 3000 до 120 кДа.

Величина молекулярної маси АГ впливає на його біологічну активність. Так, згідно з дослідженнями D'Adamo, арабіногалактанам із низькою молекулярною масою, близькою до 20 кДа, притаманні проти-запальний, протикомплементарний і протиалергійний ефекти [3]. Навпаки, арабіногалактани з більш високою молекулярною масою сприяють стимуляції природних гранулярних лімфоцитів НК-клітин, які, у свою чергу, відіграють важливу роль у захисті організму від вірусних інфекцій та є невід'ємною складовою протиухлиного імунітету [3,4,5]. У дослідженнях *in vitro* було показано, що АГ є сильнодіючим імуносупресивним агентом [5].

Виходячи з аналізу літературних джерел щодо вмісту АГ у вітчизняній сировині, в Україні промисловим джерелом цього полісахариду може бути хвойна деревина. Раніше нами було показано, що найперспективнішим об'єктом його вилучення є відходи переробки сосни звичайної [6].

Зазвичай АГ із деревини модрина виділяють водною екстракцією з подальшим осадженням його із рідкої фази аліфатичними спиртами, найчастіше етанолом, і ацетоном [1]. Інколи для очищення АГ від фенольних сполук застосовують іонообмінну хроматографію чи обробляють екстракт окисниками [1]. Ефективним способом очищення екстрактів АГ є суміщення коагуляції і флокуляції [7,8]. Концентрування й очищення розчинів АГ здійснюють методом ультрафільтрації [9]. Процес водної екстракції АГ у деяких випадках інтенсифікують, застосовуючи процеси механічної та механохімічної активації сировини, методи ультразвукової, СВЧ і ударно-акустичної дії [8].

Мета даної роботи – визначення можливостей застосування біотехнологічних підходів з метою збільшення виходу АГ із деревини сосни *Pinus silvestris* та характеристика вилученого полісахариду.

Відомо, що у клітинній стінці АГ відіграє роль ланки, яка сприяє стабілізації структури клітинної стінки. Цей водорозчинний полісахарид є своєрідним посередником між ксиллоглюканом і рамногалактуронідом: ксиллоглюкан, що сполучається з мікрофібрилами целюлози водневими зв'язками, у свою чергу,

з'єднаний глікозидним зв'язком із арабіногалактаном, а останній приєднаний глікозидним зв'язком до рамногалактуроніду [10].

Враховуючи локалізацію АГ у клітинній стінці рослин, для інтенсифікації процесу його вилучення необхідно застосування таких ферментних препаратів, які забезпечать глибокий ступінь мацерації рослинної тканини з руйнуванням зв'язків між полісахаридами, гідроліз лігнінвуглеводних зв'язків, а також деструкцію окремих полісахаридів (целюлози,  $\beta$ -глюканів, арабіноксиланів). До таких на вітчизняному ринку належать поліферментні препарати целюлолітичної і геміцелюлолітичної (ксиланазна,  $\beta$ -глюканазна) дії – целовіридин, целокандин, целолігнорин, целоконінгін тощо (табл. 1). Целюлолітичні ферменти широко застосовуються у тваринництві та птахівництві для підвищення поживної цінності кормів із високим вмістом целюлози та інших важкодоступних полісахаридів, у виробництві дієтичних харчових продуктів [11], технологіях світлих сортів пива, переробці солодких виноградних вичавок, у текстильній та целюлозно-паперовій промисловості тощо.

**Таблиця 1 – Характеристика целюлолітичних ферментних препаратів, од/г**

Ферментний препарат	Екзоглюканазна [12]	Целюлолітична [12]	$\beta$ -глюкозидазна [12]	$\beta$ -глюканазна [12]	Ксиланазна [12]	Загальна цитолітична
Целовіридин П10х ( <i>T. viride</i> )	–	2000	12,4	258	390	1072
Целокандин Г10х ( <i>G. Candidum</i> )	652	1200	18	120	110	1065
Целолігнорин П10х ( <i>T. lignorin</i> )	625	900	160	210	576	1071
Целоконінгін П10х ( <i>T. koningii</i> )	–	–	267	–	–	1063

АГ із тирси сосни з розміром часток (0,3-0,5) мм вилучали за класичним методом, який передбачає триразову екстракцію полісахариду водою при температурі 90 °С та гідромодулі 7 протягом 2 годин. Після охолодження реакційну суміш центрифугували, осад відокремлювали фільтруванням. Фільтрат згущували під вакуумом до 1/2 вихідного об'єму. Полісахарид осаджували етанолом (3-кратним об'ємом), відокремлювали від рідкої фази центрифугуванням, промивали 96 % етанолом, висушували при 40 °С.

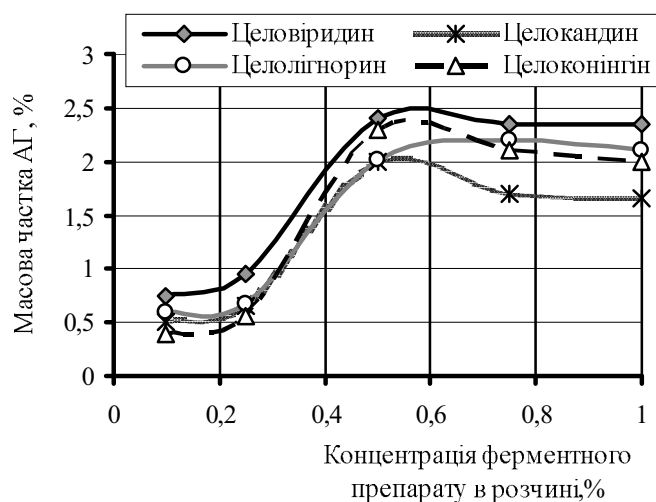
Паралельно АГ із деревини вилучали з використанням ферментних препаратів, для чого тирсу сосни обробляли їхніми розчинами в ацетатному буфері рН 4,7. В експериментах варіювали концентрацію ферментного препарату (0,1-1,0 %), гідромодуль – 1 : (5; 7; 10), тривалість обробки (1-8 год) і температуру (40-50 °С). Після завершення процесу екстракції, інкубаційну суміш кип'ятили з метою інактивації ферменту, охолоджували та центрифугували, осад відокремлювали фільтруванням, рідку фазу згущували, полісахарид осаджували етанолом і відокремлювали центрифугуванням, далі промивали етанолом та висушували.

Молекулярну масу встановлювали методом гель-проникаючої хроматографії на сефадексах G-75 та G-50; використовували колонку 38 см × 3 см, відкалібровану за блакитними декстранами. Як розчинник та елюент використовували 1 М розчин NaCl. Вміст полісахариду у фракціях визначали антроновим методом [13]. Моносахаридний склад гідролізатів отриманих зразків та молярне співвідношення моносахаридів встановлювали методом паперової хроматографії [14].

Аналіз експериментальних даних свідчить, що найбільший вихід водорозчинного полісахариду спостерігається при використанні в процесі екстракції 0,5 % розчинів ферментних препаратів целовіридину, целокандину, целоконінгину та 0,75 % розчину целолігнорину (рис. 1).

Відомо, що температурний оптимум дії целюлолітичних ферментів знаходиться у діапазоні температур (40-50) °С. Відповідно обробку деревини їхніми розчинами здійснювали у цьому температурному інтервалі. Встановлено, що підвищення температури екстракції до 50 °С сприяє збільшенню виходу АГ у розчин. Подальше підвищення температури призвело до поступового зменшення виходу полісахариду, що, вочевидь, обумовлено інактивацією ферментів.

Процес вилучення АГ із деревини модрина здійснюють зазвичай при співвідношенні сировина : екстрагент від 1 : 5 до 1 : 10. У випадку обробки тирси сосни розчинами ферментних препаратів при гідромодулі 5 відбувається лише змочування сировини рідиною, що в подальшому утруднює відділення рідкої фази та, як результат, вилучення цільового продукту. При збільшенні гідромодулю до 7-10 вихід продукту підвищується і становить майже однакові значення. Встановлено, що в присутності целовіридину, целокандину і целоконінгину максимальне накопичення полісахариду в рідкій фазі відбувається за 4 год., у присутності целолігнорину – за 6 год. Із подовженням тривалості ферментативної обробки тирси сосни спостерігалось незначне зменшення виходу АГ.



**Рис. 1 – Динаміка виходу водорозчинного полісахариду із деревини сосни (в розрахунку на сировину) залежно від масової частки ферментного препарату в розчині**

Встановлено, що біля 80 % АГ, який міститься у деревині сосни, вдається вилучити вичерпною 3-кратною водною екстракцією (табл. 2). Це відповідає сумарному гідромодулю сировина : дистильована вода – 1 : 21. Використання ферментних препаратів у процесі вилучення сприяло суттєвому підвищенню виходу цільового продукту при однократній обробці сировини та гідромодулі 1 : 7. Всі отримані зразки представлені полісахаридною складовою, у якій містяться переважно залишки галактози і арабінози, в слідових кількостях – залишки глюкуронових кислот (до 2 %).

**Таблиця 2 – Характеристика зразків арабіногалактану**

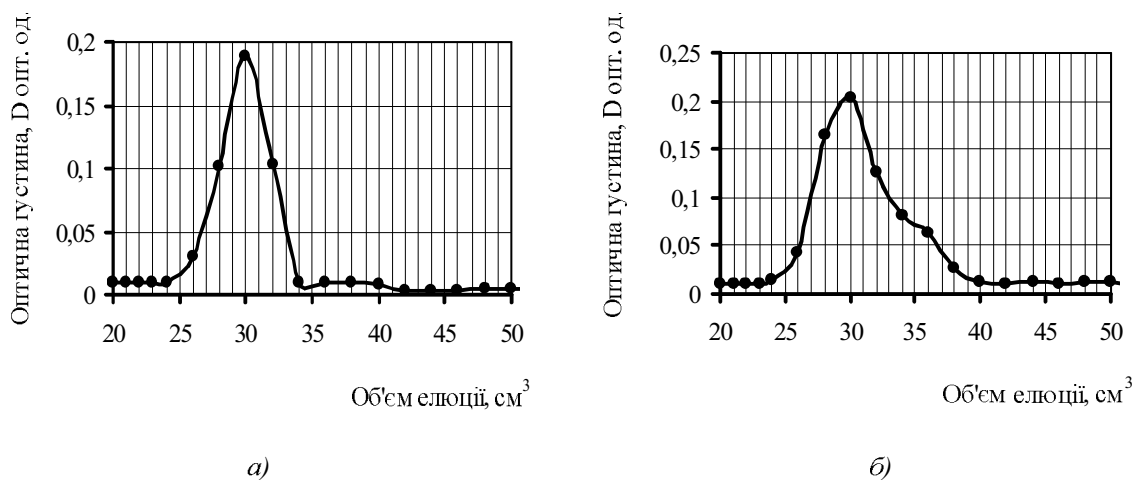
Умови отримання		Вихід, % на суху речовину	Вміст полісахариду у зразку	Співвідношення у полісахариді Gal : Ara
Водна екстракція	одноразова	0,3	97,3	1,0 : 0,7
	вичерпна	2,0	97,3	1,0 : 0,7
Обробка розчином ферментного препарату	целовіридин	2,4	97,8	1,4 : 0,7
	целокандин	2,0	97,5	1,3 : 0,7
	целолігнорин	2,2	97,4	1,3 : 0,7
	целоконінгін	2,3	97,6	1,4 : 0,7

Таким чином, раціональними умовами процесу екстракції АГ із деревини сосни є масова частка ферментного препарату в розчині 0,5 % (целовіридин, целокандин, целоконінгін) та 0,75 % (целолігнорин), рН = 4,7, гідромодуль – 7, температура 50°C та тривалість обробки – 4-6 год. У порівнянні з методом традиційної водної екстракції застосування біотехнологічних прийомів дозволило значно інтенсифікувати процес вилучення водорозчинного полісахариду із деревини, скоротити об'єми витратних реагентів та затрати електроенергії.

У гель-хроматографічних дослідженнях у якості елюенту використовували 1 М розчин NaCl, який пригнічує поліелектролітні ефекти і руйнує асоціати.

На вихідній кривій гель-фільтрації АГ, отриманого за допомогою водної екстракції, на сефадексі G-75 наявний пік, що відповідає середній молекулярній масі біополімеру 65 kDa (рис. 2).

Криві елюції на сефадексі G-75 арабіногалактанів, вилучених біотехнологічним способом, мають дещо розмитий вигляд. У цих препаратах також переважає фракція з молекулярною масою 65 kDa, у меншій кількості присутні фракції, середня молекулярна маса яких наближається до 60 kDa, а також встановлено наявність сполук із молекулярною масою, нижчою за 30 kDa. Хроматографуванням на G-50 з'ясовано, що таким в арабіногалактанах, отриманих із застосуванням целовіридину та целолігнорину, відповідають фракції полісахаридів, молекулярна маса яких коливається в діапазоні 15-21 kDa та 25-28 kDa відповідно.



а – водна екстракція; б – екстракція із застосуванням целовіридину.

**Рис. 2 – Молекулярно-масове розподілення арабіногалактанів сосни звичайної на сефадексі G-75**

### Висновки

Доведено доцільність використання ферментних препаратів целовіридину, целокандіну, целолігніну, целоконігніну для вилучення арабіногалактану сосни *Pinus silvestris*. Застосування біотехнологічних прийомів дозволяє інтенсифікувати процес його екстракції, скоротити об'єми витратних реагентів та затрати електроенергії. Отриманий арабіногалактан представлений переважно фракціями з молекулярними масами у діапазоні 60-65 kDa, що дозволяє прогнозувати можливість прояву ним низки фізіологічних ефектів, притаманних аналогічним полісахаридам модрини видів *Larix sibirica* і *Larix gmelinii*.

### Література

1. Влияние способа выделения и очистки арабиногалактана из древесины лиственницы сибирской на его строение и свойства. [Текст] / Е.Н. Медведева, Т.Е. Федорова, А.С. Ванина, и др. // Химия растительного сырья. (Уфа). – 2006. – №1 - С. 25-32.
2. D'Adamo, P. Larch arabinogalactan is a novel immunomodulator. [Text] / P. D'Adamo // J Naturopath Med. – 1996. – № 4. – P. 32 – 39.
3. D'Adamo, P. Larch arabinogalactan. [Text] / P. D'Adamo // J Naturopath Med. – 1996. – № 6. – P. 33 – 37.
4. Hauer, J. Mechanism of stimulation of human natural killer cytotoxicity by arabinogalactan from *Larix occidentalis*. [Text] / J Hauer, F.A. Anderer. // Cancer Immunol Immunother. – 1993. – Vol.36, № 4. – P. 237 – 44.
5. Kelly, G.S. Larch arabinogalactan: clinical relevance of a novel immune-enhancing polysaccharide. [Text] / G. S. Kelly // Altern. Med Rev. – 1999. – № 4. – P.96 - 103.
6. Черно, Н. К. Дослідження арабіногалактану деревини *Pinus silvestris*. [Текст] / Н.К Черно, Л.С. Гураль, О.В. Ломака // Харчова наука і технологія. – 2011. – № 4(17). – С. 22-26.
7. Бабкин, В.А. Промышленное производство медицинских препаратов и биологически активных добавок из древесины и коры лиственницы. [Текст] / В.А. Бабкин, Л.А. Остроухова, Ю.А. Малков // Фундаментальная наука в интересах развития химической и химико-фармацевтической промышленности. II Конференция. Пермь, 2004 г., 16-19 ноябр., г. Пермь. – 2004. – С. 93-97.
8. Кузнецова, С.А. Интенсификация процесса экстракции арабиногалактана из древесины лиственницы методами СВЧ и акустической обработки. [Текст] / С.А. Кузнецова, Г.П. Скворцова, А.Г. Михайлов // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: материалы докл. II Всерос. науч. конф., 2005., 25-27 окт., г. Барнаул. – 2005. – С. 105-112.
9. Разработка и внедрение способа промышленного производства арабиногалактана для медицины, пищевой промышленности и сельского хозяйства. [Текст] / В.А. Бабкин, Ю.А. Малков, Е.Н. Медведева и др. // Новые лекарственные средства: успехи и перспективы. (Уфа). – Гилем. – 2005. – № 5. – С. 232.
10. Гемипеллолозы. [Текст] / М.С. Дудкин, [и др.]. – Рига: Зинатне, 1991. – 488 с.
11. Рабинович, М.Л. Прогресс в изучении целлюлолитических ферментов и механизм биodeградации высокоупорядоченных форм целлюлозы. [Текст] / М.Л. Рабинович, М.С. Мельник. // Успехи

- биологической химии, 2000 - Т. 40. – С. 205 – 266.
12. Польшгалына, Г.В. Определение активности ферментов [Текст] / Г.В.Польшгалына, В. С.Черединченко, Л.В. Римарева – М.: ДеЛи принт, 2003. – 375 с.
  13. ГОСТ 26176-91 Методы определения растворимых и легкогидролизующих углеводов. [Текст]. – Введ. 1993-01-01. УДК 636.085.3:006.354 Группа С19. СССР
  14. Шарков, В.И. Химия гемипеллоидов. [Текст] / В.И. Шарков, Н.И. Куйбина – М.: Лесная промышленность, 1972. – 440 с.

УДК 664.788.002.67:633.34

## ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СОЕВЫХ БЕЛКОВ КАК ДОПОЛНИТЕЛЬНЫХ СЫРЬЕВЫХ РЕСУРСОВ

**Осадчук И.В., научный сотрудник ПНИЛ  
Одесская национальная академия пищевых технологий, г. Одесса**

*Проблема обогащения соевым белком пищевых продуктов и повышения эффективности использования соевого сырья является актуальной. Показана возможность применения окары для повышения пищевой ценности консервированных продуктов. Однако белковый комплекс побочного продукта производства соевого молока имеет невысокий уровень переваримости. Частичный ферментативный гидролиз улучшает функциональные свойства окары.*

*The problem of enriching soy protein foods and more efficient use of raw soybean is important. Possibility of using of okara for rise of food value of tinned products is described. But proteins of soy by-products are poor solubility. Partial fermentation improves functional properties of soy okara.*

Ключевые слова: соевый белок, окара, ферментативная модификация, пищевая ценность

В настоящее время задача обеспечения населения полноценными пищевыми веществами, такими как белки, жиры и углеводы сохраняет свою актуальность. Для решения задач обеспечения населения дешевым и качественным белком важное значение имеет рациональное использование сырья растительного происхождения и создание новых ресурсосберегающих технологий пищевых продуктов высокого качества с одновременным снижением их себестоимости. Сравнительный анализ мирового производства и использования белков основных видов сельскохозяйственных культур свидетельствует о том, что на сегодняшний день соевый белок является наиболее важным реально существующим резервом пищевого белка и одним из основных средств, с помощью которых можно улучшить белковое питание всего мирового населения.

Помимо доступности сырья высокий потенциал использования сои в качестве основного источника сырья для производства белковых продуктов обусловлен следующими факторами:

- уникальность аминокислотного состава белков сои;
- комплементарность белков сои с мышечными белками, что повышает общую биологическую ценность белкового состава готового продукта;
- нейтральность вкусоароматических характеристик соевых белков и их совместимость с различными видами сырья в рецептурах изделий;
- наличие высоких функционально-технологических характеристик – эмульгирование, удержание влаги и способность к гелеобразованию, стабилизирующие реологические характеристики эмульсионных систем;
- относительно низкая стоимость этих продуктов в гидратированной форме по сравнению с белками животного происхождения.

Технологии переработки цельных соевых бобов можно разделить на 4 группы. К первой относятся способы фракционирования, позволяющие получать масло и в качестве побочных продуктов жмых и шрот, которые используются в основном в кормопроизводстве и лишь 5 % которого подвергается дальнейшей переработке для получения обезжиренной пищевой соевой муки, концентратов и изолятов соевых белков. Во вторую группу входят технологии получения соевого молока и продуктов его переработки, а также ферментированной соевой продукции. Третья связана с производством цельножирной и полужирной соевой муки и ее модификаций. К четвертой относятся методы получения из цельных семян заменителей орехов, проростков и соевого соуса.