

- В.В., Чирва В.Я., Мулик Е.Л., Кузовлев Ф.Н., Калюжин О.В., Киселевский М.В. // Биоорган. химия. – 2008. – Т. 34, № 1. – С. 114-120.
5. Кленов Р.О. Спектры пептидных соединений в эритроцитах разного возраста в условиях действия экзогенного АТФ. / Р.О. Кленов, Е.В. Чернова, Н.А. Кленова // Вестник СамГУ – Естественнонаучная серия. – 2009. – № 2 (68). – С. 155-160.
 6. Телишевская Л.Я. Белковые гидролизаты. Получение, состав, применение / Л.Я. Телишевская // Аграрная наука, Москва. – 2000.
 7. Гаврилин В.М. Выбор оптимальных условий получения гидролизатов молочнокислых бактерий термостойким способом / М.В. Гаврилин, Г.В. Сенчукова, С.П. Сенченко, В.А. Самойлов, Н.А. Гостишева // Химико-фармацевтический журнал. – Т. 41, – №2. – 2007. – С. 54-56.
 8. Самойлов В.А. Изучение состава препарата, полученного на основе гидролизатов молочнокислых бактерий / В.А. Самойлов, Н.А. Гостишева Г.В. Сенчукова, М.В.Гаврилин, С.П. Сенченко // Хим.-фармац. журн. – Т.39, – № 3. – 2005. – С. 51-53.
 9. Гараян Г.С. Химическое обоснование и биологическое исследование гидролизата на основе культур молочнокислых бактерий / Г.С. Гараян, Р.А. Ханферян, Э.Т. Оганесян // Хим.-фармац. журн. – Т. 44, – № 8. – 2010. – С. 46-49.

УДК [577.114.4+577.15]:66.096.4:001.891

ДОСЛІДЖЕННЯ КОМПЛЕКСОУТВОРЕННЯ БРОМЕЛАЙНУ З АРАБІНОГАЛАКТАНОМ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНИМИ МЕТОДАМИ

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

*Методами ізомольярних серій, мольярних співвідношень досліджено комплексоутворення бромелайну та арабіногалактану сосни *Pinus sylvestris* L. Визначено, що фермент та полісахарид взаємодіють при мольярному співвідношенні 2 : 1, що відповідає однаковим об'ємним співвідношенням 0,5 % розчинів обох складових. Розраховано константу стійкості комплексу бромелайн-арабіногалактан. Установлено, що бромелайн при комплексоутворенні з арабіногалактаном зберігає високу протеолітичну активність (80,8 %).*

*The complexation of bromelain and arabinogalactan of pine *Pinus sylvestris* L. has been studied by the methods of isomolar series and molar ratios. It has been determined that enzyme and polysaccharide interact at a molar ratio 2 : 1, that corresponds to the same volume ratio of 0.5% solutions of the both components. The stability constant of the complex bromelain-arabinogalactan has been calculated. It has been found that bromelain at the complexation with arabinogalactan preserves high proteolytic activity (80.8 %).*

Ключові слова: арабіногалактан, бромелайн, комплексоутворення, метод ізомольярних серій, метод мольярних співвідношень, константи нестійкості та стійкості комплексів.

Стрімко розвиваються дослідження в напрямі створення комплексів на основі біополімерів із включенням широкого спектру біологічно активних речовин. Одним із перспективних полісахаридів, який може бути використаний з цією метою, є арабіногалактан (АГ). Високомолекулярна природа, водорозчинність, мембранотропні та функціонально-технологічні властивості дозволяють використовувати його як у харчовій промисловості, так і в медицині [1, 2].

Арабіногалактан найчастіше отримують із модрина [3], застосовують як матрицю для іммобілізації багатьох сполук, яким притаманна біологічна активність, з метою їхньої стабілізації та підвищення біодоступності.

Раніше нами було показано доцільність отримання комплексу арабіногалактану з протеолітичним ферментом бромелайном [4, 5].

Метою даної роботи є обґрунтування стехіометричного співвідношення складових комплексу бромелайн-арабіногалактан спектrophотометричними методами.

Для отримання комплексу застосували арабіногалактан, виділений із сосни звичайної *Pinus sylvestris* L. з молекулярною масою 65 kDa [6] та ферментний препарат бромелайн фірми Merck (Німеччина) з молекулярною масою 30 kDa.

Комплексоутворення полісахариду та ферменту досліджували методами ізомолярних серій і молярних співвідношень (метод насичення) та знаходили константу стійкості світлопоглинальних комплексних сполук [7, 8]. Протеолітичну активність бромелайну у складі комплексу визначали модифікованим методом Ансона [9].

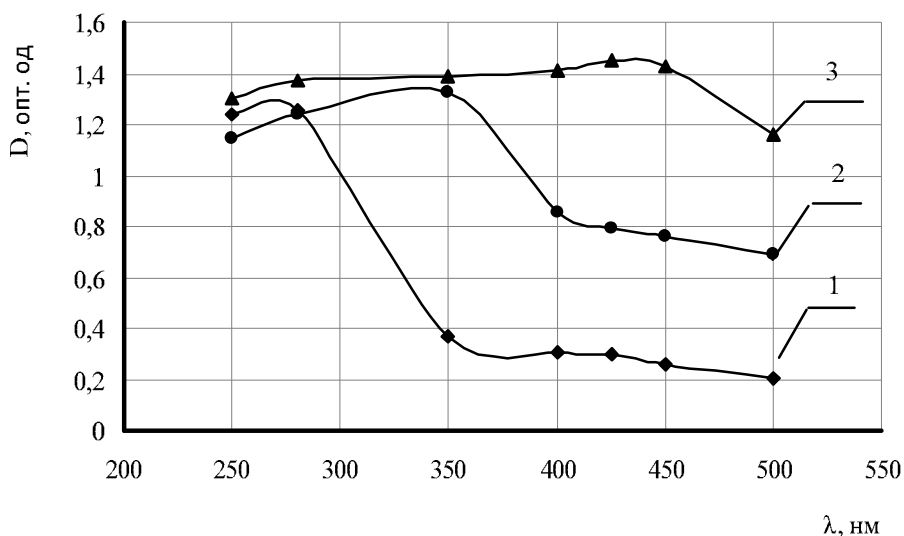
З метою визначення максимуму світлопоглинання водних розчинів арабіногалактану, бромелайну та суміші цих сполук на спектрофотометрі реєстрували оптичні густини їхніх 0,5 % розчинів у діапазоні 250-500 нм у кварцових кюветках товщиною 1 см проти дистильованої води.

Згідно з методом ізомолярних серій, який ґрунтується на визначенні ізомолярних концентрацій речовин, що реагують, які відповідають максимальному виходу комплексу, використовували ряд водних розчинів бромелайну (Бр) та арабіногалактану (АГ) з постійною сумою молярних концентрацій цих компонентів ($C_{\text{Бр}} + C_{\text{АГ}} = \text{const}$) у розчині, але з різними антибатними співвідношеннями $C_{\text{Бр}} / C_{\text{АГ}}$ (від 0,1:1,9 до 1,9:0,1), зберігаючи незмінним загальний об'єм розчину. Сумарна молярна концентрація кожної окремої серії була однаковою та складала $3,0 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³. Оптичну густину розчинів, отриманих поєднанням водних розчинів ферменту та полісахариду, вимірювали на спектрофотометрі у кварцових кюветках товщиною 1 см при довжині хвилі 425 нм, яка відповідає максимуму комплексу (БрмАГн). Виходячи з отриманих даних, визначали константи стійкості методом Бенеші-Гільдебранда [7]. Для

цього аналізували криву залежності $\frac{C_{\text{Бр}} \cdot l}{D_{425}} = f\left(\frac{1}{C_{\text{АГ}}}\right)$.

Згідно з методом молярних співвідношень (метод насичення) готували серію водних розчинів із постійною концентрацією Бр ($2,0 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³) та перемінною концентрацією АГ (від $0,15 \cdot 10^{-4}$ до $3,0 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³). Аналогічно готували серію розчинів з постійною концентрацією АГ ($2,0 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³) та перемінною концентрацією Бр (від $0,15 \cdot 10^{-4}$ до $3,0 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³), а далі знаходили аналітичним шляхом константи нестійкості отриманих комплексів.

Спектри поглинання досліджуваних водних розчинів арабіногалактану, бромелайну та суміші цих сполук представлені на рис. 1.



1 – арабіногалактан, 2 – бромелайн, 3 – сполучені розчини ферменту та полісахариду

Рис. 1 – УФ-спектри поглинання водних розчинів

Спектральні криві арабіногалактану та бромелайну характеризуються наявністю індивідуальних максимумів поглинання. У результаті взаємодії ферментної та полісахаридної складових на кривій світлопоглинання з'являється новий максимум, зміщений у сторону більших значень довжини хвилі – $\lambda_{\text{max}} = 425$ нм, притаманний комплексу, що утворився.

На основі отриманих значень оптичних густин серії ізомолярних розчинів бромелайну та арабіногалактану побудовано графічну залежність оптичної густини від $C_{\text{Бр}} / C_{\text{АГ}}$ (рис. 2).

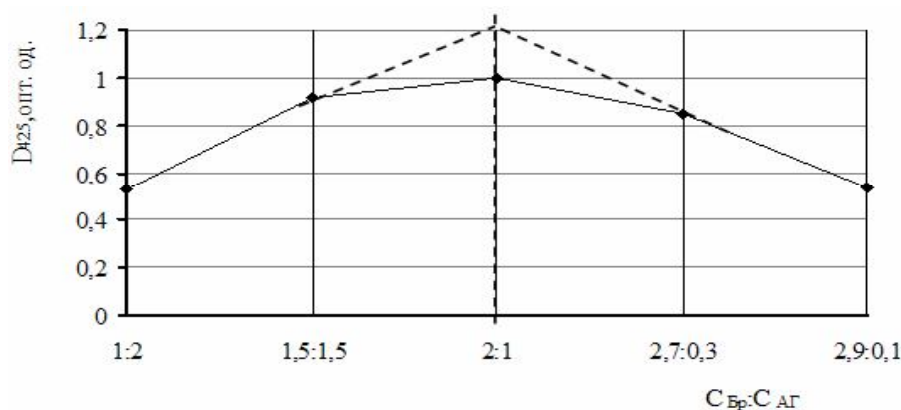
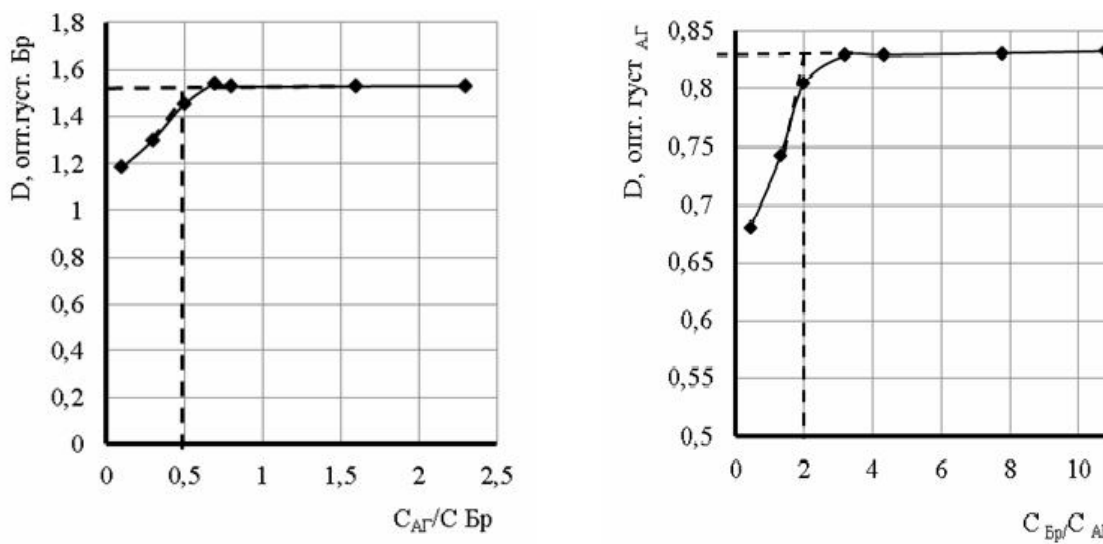


Рис. 2 – Залежність оптичної густини комплексів від складу ізомольарних розчинів бромелайну та арабіногалактану

Із метою уточнення положення максимуму на ізомольарній кривій застосували екстраполяційний прийом: через початкові точки обох гілок кривої провели прямі лінії, продовжуючи їх до взаємного перетину. Екстраполяційна точка перетину прямих відповідає екстремальній точці на ізомольарній кривій (проходить через максимум оптичної густини на осі ординат). Це свідчить, що у відповідному розчині вміст комплексу, що утворився за схемою $mBr + nAG \leftrightarrow Br_mAG_n$, є найбільшим, тобто екстремальна точка відповідає максимально можливій концентрації комплексу Br_mAG_n . Положення на осі абсцис, що відповідає екстремальній точці (перпендикуляр до осі абсцис від екстремальної точки за показником оптичної густини), зв'язане зі стехіометричними коефіцієнтами m і n , які відповідають стехіометричному молярному співвідношенню складових $Br : AG - 2:1$ або однаковим об'ємним співвідношенням 0,5 % розчинів обох компонентів. За цих умов у розчині утворюється одна найбільш стійка комплексна сполука.

Іншим методом визначення співвідношення компонентів при комплексоутворенні є метод молярних співвідношень (метод насичення), який ґрунтується на встановленні залежності оптичної густини від концентрації одного із компонентів при постійній концентрації іншого компонента і навпаки. За положенням точки перетину роблять висновок щодо молярних співвідношень компонентів, що реагують.

За отриманими даними оптичної густини для сполучених розчинів побудували графік залежності оптичної густини Br від C_{AG} / C_{Br} (рис. 3а). Аналогічно будували графічну залежність концентрації AG від C_{Br} / C_{AG} (рис. 3б).



а)

б)

- а – серія розчинів із постійною концентрацією ферменту ($2 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³) та змінною концентрацією полісахариду (від $0,15 \cdot 10^{-4}$ до $3,0 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³);
 б – серія розчинів із постійною концентрацією ферменту ($2 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³) та змінною концентрацією полісахариду (від $0,15 \cdot 10^{-4}$ до $3,0 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³)

Рис. 3 – Крива насичення для комплексу бромелайн-арабіногалактан

Співставляючи криві насичення (рис. 3,а,б), спостерігаємо, що точка заломлення відповідає співвідношенню стехіометричних коефіцієнтів, що дорівнюють співвідношенню концентрації розчинів компонентів, що реагують у точці *Xm.e.* – абсцисі точки еквівалентності. Точку заломлення на кривій насичення визначали екстраполяцією прямолінійних ділянок кривої до взаємного перетину. Установили молярні співвідношення, які становлять $m(\text{Br}) : n(\text{AG}) - 2:1$.

Константу стійкості цього комплексу (рівноважного комплексоутворення або константа рівноваги) комплексних сполук визначали за методом Бенеші-Гільдебранда [7]. Досліджували залежність $\frac{C_{\text{Br}} \cdot l}{D_{425}} = f\left(\frac{1}{C_{\text{AG}}}\right)$ (рис. 4, табл.1). Лінійний характер її підтверджує утворення асоціату при молярних співвідношеннях $\text{Br} : \text{AG} - 2:1$.

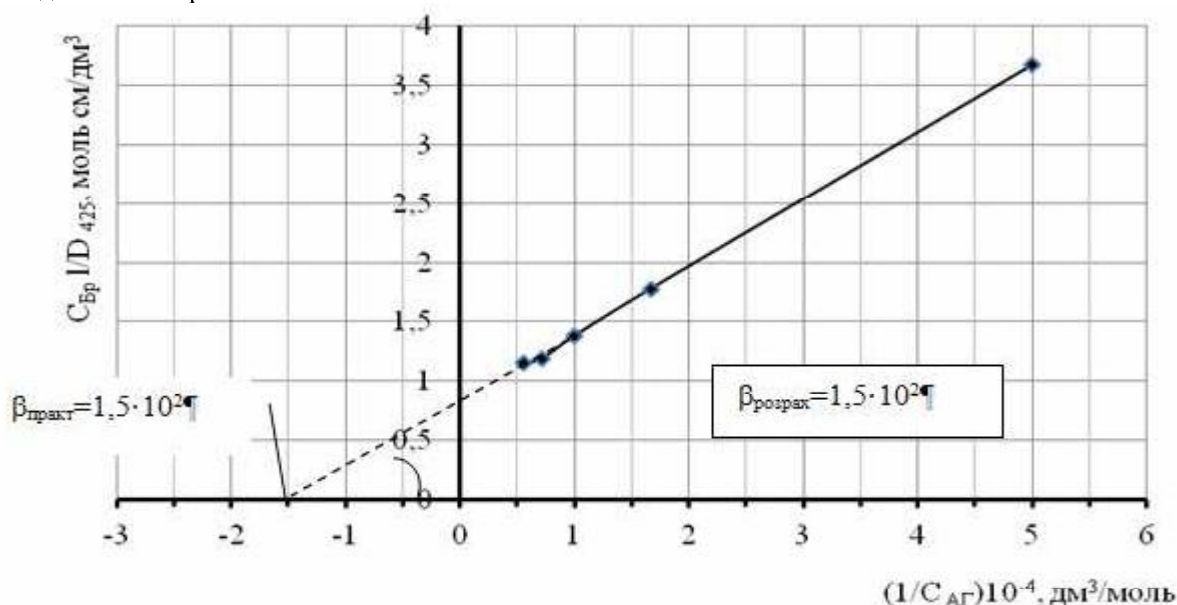


Рис. 4 – Залежність $\frac{C_{\text{Br}} \cdot l}{D_{425}} = f\left(\frac{1}{C_{\text{AG}}}\right)$ комплексу бромелайну з арабіногалактаном

Таблиця 1 – Дані для побудови залежності $\frac{C_{\text{Br}} \cdot l}{D_{425}} = f\left(\frac{1}{C_{\text{AG}}}\right)$ для комплексу бромелайн-арабіногалактан

Молярне співвідношення AG:Бромелайн	0,2:2,0	0,6:2,0	1,0:2,0	1,4:2,0	1,8:2,0
$\left(\frac{1}{C_{\text{AG}}}\right) \cdot 10^{-2}$, ДМ³/МОЛЬ	6,67	2,17	1,3	0,83	0,67
$\frac{C_{\text{Br}} \cdot l}{D_{425}} \cdot 10^4$, МОЛЬ СМ/ДМ³	3,08	1,48	1,15	1,0	0,96
D_{425} , ОПТ. ОД	0,543	1,124	1,452	1,670	1,740

Константу стійкості із графічної кривої визначали двома способами:

а) за точкою перетину з віссю абсцис – практичне значення константи стійкості – $\beta_{\text{пр}} = 1,5 \cdot 10^2$ ДМ³/МОЛЬ;

б) розрахунковим способом за значенням тангенса кута нахилу лінійної залежності $\text{tg} \alpha = \frac{1}{K_p \cdot \epsilon_{\text{Br-AG}}}$

до осі абсцис, де $\epsilon_{\text{Br-AG}}$ – коефіцієнт погашення комплексу при довжині хвилі λ_{425} та $\frac{1}{\epsilon_{\text{Br-AG}}}$ – відрізок,

який відсікається прямою на осі ординат; звідси розрахункове значення константи стійкості $\beta_{\text{розрах}} = 1,5 \cdot 10^2 \text{ дм}^3/\text{моль}$.

Відзначимо, що величина константи стійкості отриманого комплексу арабіногалактан:білок корелює з відповідними показниками комплексів з іншими нітрогеновмісними сполуками [10, 11].

Досліджено активність бромелайну у складі комплексів, отриманих за умов використання розчинів вихідних сполук у різних об'ємних (ізомольярних серій) та мольярних співвідношень. Установлено, що найбільшою протеолітичною активністю (80,8 % від активності вільного ферменту) володіє бромелайн, що входить до комплексу, склад якого відповідає теоретично розрахованому мольярному співвідношенню компонентів Бр:АГ = 2:1 [4, 5].

Таким чином, спектрофотометричними методами – методами ізомольярних серій та мольярних співвідношень – установлено стехіометричне мольярне співвідношення Бр:АГ в комплексі складу 2:1, що відповідає 0,5 % водним розчинам бромелайну та арабіногалактану при поєднаних їхніх об'ємів 1:1. Визначено константу стійкості цього гетероасоціату ($\beta_{\text{тп}} = 1,5 \cdot 10^2 \text{ дм}^3/\text{моль}$ та $\beta_{\text{розрах}} = 1,5 \cdot 10^2 \text{ дм}^3/\text{моль}$). Установлено, що за цих умов комплексоутворення, бромелайн зберігає високу протеолітичну активність.

Література

1. D'Adamo, P. Larch arabinogalactan. [Text] / P. D'Adamo // J Naturopath Med. – 1996. – № 6. – Р. 33 – 37
2. Чемакина, А.Б. О функциональных свойствах арабиногалактана [Текст] / А.Б. Чемакина, Т.Б. Цыганова., О.А. Ильина // Хранение и переработка сельхозсырья. М. – 1998, – № 1.
3. Медведева, Е.Н. Арабиногалактан лиственницы – свойства и перспективы использования (обзор) [Текст] / Е.Н. Медведева, В.А. Бабкин, Л.А. Остроухова // Химия растительного сырья. – 2003, – № 1. – С. 27-37.
4. Черно, Н.К. Імобілізація бромелайну шляхом комплексоутворення з арабіногалактаном *Pinus silvestris* [Текст] / Н.К. Черно, О.В. Ломака // Сборник научных трудов SWorld. – 2012. – Том 45. – С. 114-116.
5. Черно, Н.К. Отримання білок-полісахаридного комплексу та його характеристика [Текст] / Н.К. Черно, Л.С. Гураль, О.В. Ломака // Збірник наукових праць “Прогресивні техніка та технології харчових виробництв ресторанного господарства і торгівлі”. – Харків. 2012. – С. 309-315.
6. Черно, Н.К. Біотехнологічний спосіб вилучення арабіногалактану із деревини [Текст] / Н.К. Черно, Л.С. Гураль, О.В. Ломака // Наукові праці ОНАХТ. – 2012. – випуск 42, Т2. – С. 157-161.
7. Спектрохимия. Многоатомная химия. [Текст] / С.Ф. Белявский. – 2006. – №1. – С. 25-32.
8. Булатов, И. П. Практическое руководство по фотометрическим методам анализа. [Текст] И. П. Булатов, М. И. Калинин. / Л.: Химия, 1986. – С. 241.
9. Польшалина, Г. В. Определение активности ферментов [Текст] / Г. В. Польшалина, В. С. Чередищенко, Л.В. Римарев: Справочник. – М.:Делли принт, 2003. – 375 с.
10. Бадькова, Л. А. Взаимодействие арабиногалактана сибирской лиственницы с 5-аминосалициловой кислотой, 4-аминосалициловой кислотой и гидразидом изоникотиновой кислоты: автореф. дис. канд. хим. наук [Текст] / Уфа, 2007.
11. Взаимодействие поли- и олигосахаридов на основе арабиногалактана с 5-аминосалициловой кислотой. [Текст] / Р.Х. Мударисова, Л. А. Бадькова, И. М. Борисов и др. // Журнал физической химии, 2008. – Том 82. – С.1566-1570.

УДК 664.661:613.2

ВИКОРИСТАННЯ КОМПЛЕКСУ ГІДРОЛАЗ ДРІЖДЖІВ *S. CEREVISIAE* ДЛЯ ОТРИМАННЯ ОЛІГОМЕРІВ, ЩО МАЮТЬ АНТИОКСИДАНТНІ ВЛАСТИВОСТІ

Данилова О.І., канд. хім. наук, ст. наук. співр., Решта С.П., канд. техн. наук, доц.,
Одеська національна академія харчових технологій, м. Одеса

*Здійснено оцінку антиоксидантних властивостей олігомерів рослинної сировини, отриманих за допомогою комплексу гідролаз *S. cerevisiae*. Відзначено, що склад олігомерів значною мірою впливає на біологічну активність ферментолізатів. З'ясовано, що препарати, отримані із вичавок кабаку і яблука, виявляють більші антиоксидантні властивості, а препарати із вичавок винограду і бурякового жому мають близькі значення біологічної активності.*