

## ПЕРЕТВОРЕННЯ ПЕКТИНОВИХ РЕЧОВИН ПІД ВПЛИВОМ ПЕКТИНАЗ

*Наведено результати досліджень щодо виробництва низькомолекулярних олігосахаридів із пектиновмісної сировини, а саме з яблучних вичавок. Доведено, що отримані речовини володіють антиагезивними властивостями та здатні діяти як пребіотик.*

**Вступ.** Природні біополімери викликають великий інтерес у зв'язку з широким спектром їх біологічної дії та можливістю практичного застосування в різних сферах. Серед полісахаридів рослинної сировини одне з провідних місць займають пектинові речовини.

Розпад пектинових речовин в організмі людини проходить у нижчому відділі кишечника під дією ферментів мікрофлори, ступінь розщеплення пектину знаходиться у межах від 0-100 %. У природних біоценозах розщеплення пектинів спричиняють мікроорганізми та вищі базидальні гриби за участю пектингідролаз та пектинліаз. Перетворення пектинових речовин обумовлено дією різноманітних пектиназ, таких як полігалактуранази (ПГ), рамногалактуранази (РГ), пектинметилгалактуранази (ПМГ), пектинметилестерази (ПМЕ), пекат- і пектинліази. Відомо, що пектолітичні ферменти мікроорганізмів займають важливе місце у патогенезі рослин, вони також є перспективними для отримання вуглеводвмісних з'єднань, що володіють імуномодулюючою активністю, для отримання протопластів у клітинній інженерії, у селекції рослин, а також для освітлення соків і вин [1].

**Постановка проблеми.** Сьогодні процеси біотрансформації компонентів рослинної сировини є найбільш перспективним напрямом прогресу в переробних галузях, заснованому на дії ферментів, що дозволяють ефективніше і економніше використовувати сировину, впроваджувати нові технології, досягати високої екологічності технологій і високої якості продуктів.

**Мета дослідження.** Мета досліджень полягає у встановленні механізму, умов та параметрів проходження ферментативного гідролізу рослинних полісахаридів для отримання низькомолекулярних олігосахаридів галактуранової кислоти з пектину яблучних вичавок.

**Результати дослідження.** У хімічному відношенні пектинові речовини, що містяться в яблуках, – це кислий полісахарид. Основою пектинових речовин є молекулярний ланцюг, що складається із залишків  $\alpha$ -D-галактуранової кислоти, з'єднаних між собою O-(1,4)-глікозидними зв'язками, рис. 1. У малих кількостях, зазвичай, наявні фрагменти L-арабінози і D-галактози, рідше – L-рамнози, D-ксилози, L-фукози [2].

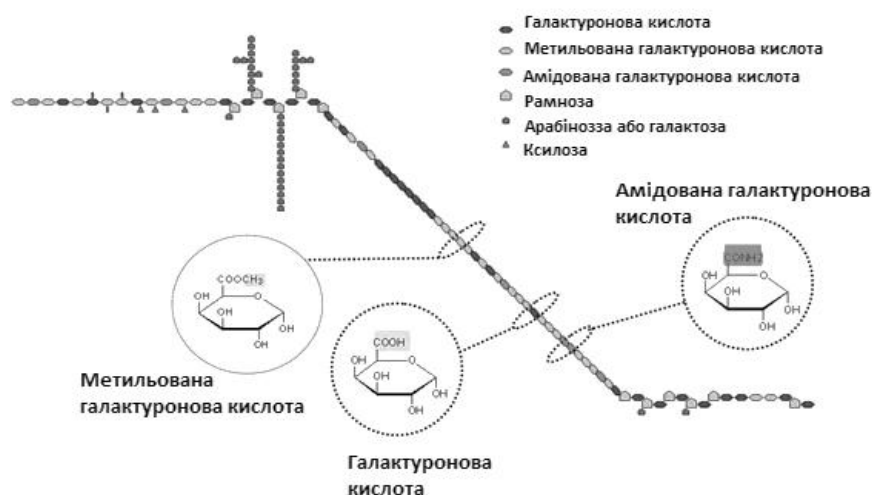


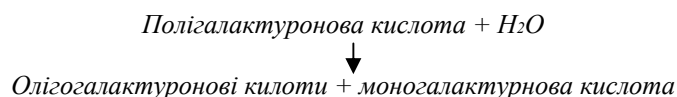
Рис. 1. Фрагмент хімічної формули пектину

Конформація пектинових речовин змінюється у залежності від температури, тривалості процесу гідролізу, рН середовища. Надзвичайно різні по молекулярній масі пектинові речовини розрізняються за будовою ланцюгів і характером надмолекулярних структур. Пектинові молекули мають переважно волокнисту структуру і відносяться до лінійних колоїдів з довжиною молекули близько 0,00001 см. У водних розчинах пектинова молекула набуває форми спіралі. Цю конформацію, звичайно, набувають макромолекули, у яких дальній конформаційний порядок у вигляді спіралі іммобілізований, наприклад,

водневими зв'язками. У водних розчинах пектин являє собою напівгнучку макромолекулу, що має конформацію спіралі з постійним поперечним розтиним, карбоксильні групи якої розташовані одна під одною.

Ферменти, що діють на пектинові речовини, поділяють на дві групи: деестерифікуючі та деполімеризуючі. Деполімеризуючі ферменти відносять до наступних класів: гідролази та транселіменози (ліази). Саме їх використовують для проведення регулюючого ферментативного гідролізу пектинових речовин рослинних полісахаридів.

Активність деполімеризуючих ферментів вимірюють за зниженням в'язкості, що дозволяє враховувати активність ендоферментів. Гідроліз ендо-ПГ проходить неупорядкованим шляхом, здебільшого розщеплюються внутрішні зв'язки полімеру [1]:



При гідролізі 1-10 % зв'язків, в'язкість розчинів галактуронанів знижується не менше, ніж на 50 %. Основним кінцевим продуктом гідролізу пектинів, в залежності від джерела ферменту, можуть бути моно-, ди-, три- або тетрагалактуронова кислота. Більшість ендо-ПГ – ферменти молекулярної маси 3-80 кДа, оптимум дії при рН від 3,5 до 6,5, температура 50 °С. Екзо-ПГ каталізує розщеплення кінцевих  $\alpha$ -1,4-глікозидних зв'язків між залишками неестерифікованої галактуронової кислоти в різних пектинових полісахаридах (полігалактуронова кислота, пектати, пектини) з утворенням моногалактуронової кислоти. Гідроліз супроводжується незначним зниженням в'язкості розчинів субстратів. Фермент розщеплює пектати не повністю, приблизно на 50 %. Екзо-ПГ мають оптимум дії при рН від 3,4 до 6,0 і температурі 30-50 °С. Частково деградовані субстрати, як правило, гідролізуються екзо-ПГ швидше високополімерних.

Пектинметилестерази (ПМЕ) каталізують відщеплення металних груп від поліметил-галактуронової кислоти з утворенням метанолу і частково деметоксильованої галактуронової кислоти. ПМЕ деестерифікує пектин на 60-70 %. По мірі зниження ступеня естерифікації субстратів знижується спорідненість ферменту до них, і процес гідролізу проходить не до кінця. ПМЕ в основному діє на крупні молекули, метоксильовані олігоуроніди розщеплюються повільніше. ПМЕ проявляють максимальну активність в інтервалі рН 4,4-8, оптимальна температура 30-40 °С [1].

При сумісній дії ПГ і ПМЕ на високометоксильований пектин, перша стадія гідролізу проходить під дією ПМЕ. Після часткового деметоксильовання субстрату починається гідроліз полігалактуронової кислоти. Зниження молекулярної маси пектину призводить до зниження реакції деметоксильовання. Основні перетворення пектину при гідролізі комплексом ендо-ПГ, екзо-ПГ і ПМЕ можуть бути представлені наступним чином:



Для деградації пектинових речовин поряд з пектингідролазами використовують ферменти, що відносяться до класу ліаз – пектинтранселіменози (ПТЕ). Ці ферменти викликають розривання глікозидного 1-4 зв'язку шляхом транселімінації. Розрив між напівацетальним киснем та 4-им вуглеводом супроводжується видаленням кисню, що знаходиться в транспозиції на 5-ому вуглеводі, в результаті чого виникає подвійний зв'язок між цими двома вуглеводами [1,3]:



Рис. 2. Механізм дії пектинтранселіменози на молекулу пектинових речовин

Отже, для досягнення поставленої мети, слід проводити регулюючий ферментативний гідроліз комплексом ферментів, який складається з ферменту ендопектолітичної дії (ендо-ПГ) та транселіменазою (ендо-ПТЕ). Відомо, що такі олігосахариди складаються із залишків галактуронової кислоти і мають у кінці молекули між С4-С5 атомами вуглецю подвійний зв'язок, володіють

антиадгезивними властивостями. Саме така властивість дозволяє олігосахаридам блокувати зв'язок ліганд-рецепторів з патогенними речовинами (під патогенними у цьому випадку розуміють бактерії, віруси, гриби, катіони важких металів) та проявляти себе як пребіотики [4].

Попередньо у лабораторних умовах нами були встановлені оптимальні умови та параметри проведення ферментативного гідролізу рослинних полісахаридів, безпосередньо з яблучних вичавок, ферментом ендопектолітичної дії [5]. Другий етап досліджень полягав у встановленні оптимальних умов та параметрів проведення ферментативного гідролізу ферментом транселіменазної дії.

Ліази найкраще проявляють свої властивості при рН в діапазоні 6-8,5 та температурі 35-60 °С. У якості попередньої обробки яблучних вичавок запропоновано проводити гідроліз активованою водою (рН=7,5), з додаванням поверхнево-активних речовин. За одиницю ПТЕ активності приймали таку кількість ферменту, яка за 1 год гідролізу при температурі 40 °С утворює ненасичені продукти розщеплення молекули пектину, збільшує оптичну густину реакційної суміші на 0,1 при довжині хвилі 235 нм. Концентрацію олігосахаридів галактуронової кислоти визначали карбазольним методом.

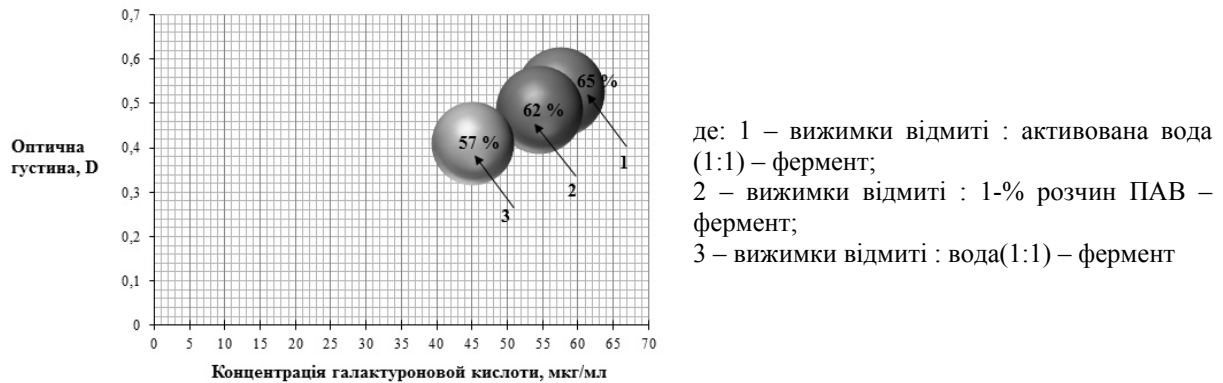


Рис. 3. Глибина гідролізу за 30 хв

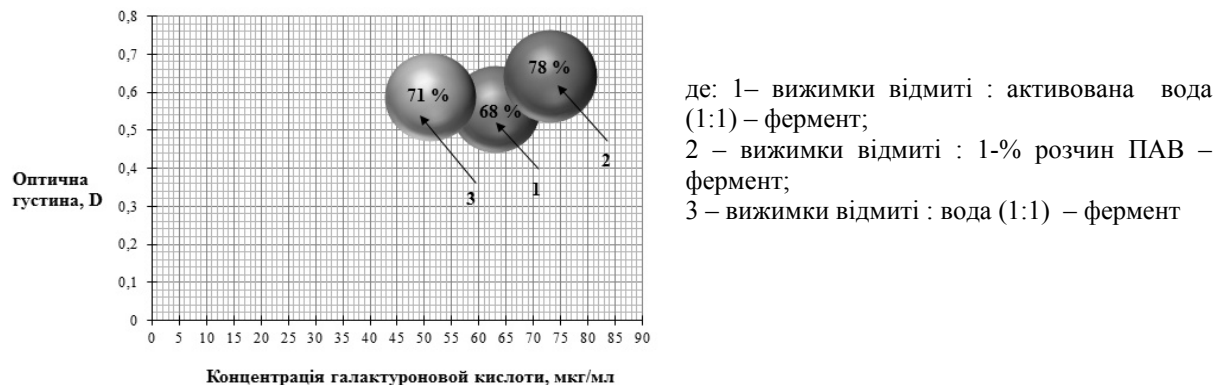


Рис. 4. Глибина гідролізу за 60 хв

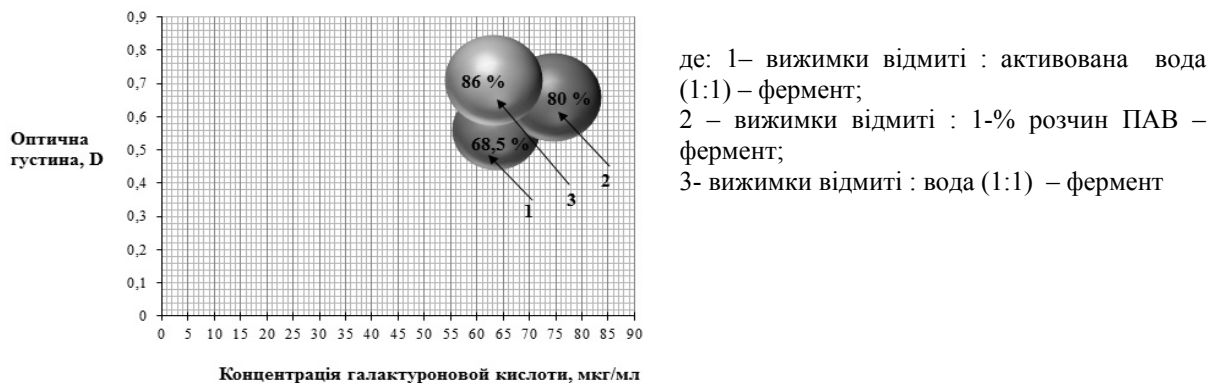


Рис. 5. Глибина гідролізу за 90 хв

Найкраща глибина гідролізу ферментом транселіменазної дії спостерігалась після 90 хв проведення реакції, при рН – 7,5 і температурі 40 °С. В результаті реакції отримано речовини молекулярною масою 3,5 кДа, частка ненасичених речовин складає 70 %.

**Висновок.** Проведені дослідження встановлюють параметри та умови ферментативного гідролізу пектинових речовин ферментом транселіменазної дії і дозволяють отримати низькомолекулярні галактуронові олігосахариди.

**ЛІТЕРАТУРА:**

1. Чешкова А.В. Ферменты и технологии для текстиля, моющих средств, кожи, меха: Учеб. Пособие для вузов. – И.: ГОУВПО ИГХТУ, 2007. – 282 с.
2. Рудиченко В.Ф. Природні харчові сорбенти як чинник здоров'я сучасної людини. К.: Вища школа, 1997. – 367 с.
3. Патент RU (11) 2267324 (13) С26 МПК А61Л 31/70 – Препарат для уменьшения и/или блокирования адгезии патогенных веществ и организмов, применение антиадгезивных углеводов.
4. Безусов А.Т., Малькова М.Г. Технологія виробництва галактуронових олігосахаридів із пектиновмісної сировини [Текст] / А.Т. Безусов, М.Г. Малькова // ОНАХТ, Харчова наука і технологія. – 2010. – №1 (10).

**БЕЗУСОВ** Анатолій Тимофійович – д.т.н, професор, завідувач кафедри біотехнології, консервованих продуктів і напоїв Одеської національної академії харчових технологій.

Наукові інтереси:

- наукові основи біотехнології консервованих продуктів з рослинної сировини і гідробіонтів;
- проблеми створення нових технологій харчових продуктів.

**ЛІГАНЕНКО** Маргарита Геннадіївна – аспірант II-го року навчання кафедри біотехнології, консервованих продуктів і напоїв Одеської національної академії харчових технологій.

Наукові інтереси:

- проблеми створення нових технологій харчових продуктів;
- технологія консервування плодів і овочів.