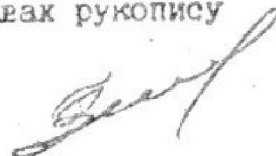


Автореф.

к 84

ОДЕСЬКИЙ ТЕХНОЛОГІЧНИЙ ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ ПРОМИСЛОВОСТІ
ім. М. В. ЛОМОНОСОВА

На прагах рукопису



КРУСІР Галина Всеволодівна

БІОТЕХНОЛОГІЯ ОДЕРЖАННЯ ХАРЧОВИХ ВОЛОКОН ЗЕРНОВИХ,
ЯКІ МІСТЯТЬ ФЕРМЕНТИ

Спеціальність - 03.00.23 - біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового
ступеня кандидата технічних наук

Одеса - 1993

АВТОРЕФ.
К

ОНАХТ 30.01.13
Біотехнологія одержа



v017058

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Одеському технологічному інституті харчової промисловості ім.М.В.Ломоносова

Науковий керівник: доктор технічних наук,
член-кореспондент АН України,
професор Черно Наталія Кирилівна
Науковий консультант: доктор хімічних наук,
професор Давиденко Тетяна Іванівна

Офіційні опоненти:

1. доктор біологічних наук, член-кореспондент УААН,
професор Левицький Анатолій Павлович
2. доктор технічних наук,
доцент Швець Віктор Миколайович

Провідна організація: науково-дослідний інститут гігієни харчування наукового гігієнічного центру Міністерства охорони здоров'я України, (м. Київ)

Захист відбудеться "26" листопада 1993 р.

в _____ годин на засіданні спеціалізованої вченої Ради Д 068.35.03 в Одеському технологічному інституті харчової промисловості ім.М.В.Ломоносова (270039, м.Одеса, вул.Свердлова, 112)

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Одеського технологічного інституту харчової промисловості

ім.М.В.Ломоносова (270039, м.Одеса, вул.Свердлова, 112)

Автореферат розісланий "26" листопада 1993 р.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої Ради,

К.Т.М., О.П.О.

П.В.Сев

Валичко Т.О.

v017058

Одесский технологический институт пищевой промышленности им. М. В. Ломоносова

Актуальність. Удосконалення структури харчування та профілактика захворювань, які пов'язані з її порушенням, приймає на сьогоднішній час першорядно значення. Це одна з десяти принципових, найбільш важливих проблем ООН. Світовий прогрес в галузі підвищення якості харчування охоплює широке коло питань. З них найважливішим є конструювання харчових продуктів, збагачувальників, добавок з наперед заданими властивостями. Їх введення в їжу забезпечує підтримку адекватного гомеостазу, дозволяє проводити диференційний підхід до формування раціонів харчування. Розробка цих компонентів базується на пріоритетних напрямках науки і техніки – біотехнології, хімії їжі, харчовій технології та гігієні харчування. Структура харчування, що склалась на Україні, не відповідає сучасним уявленням нутріціології. Наслідком цього є широке розповсюдження захворювань, в генезі яких – порушення травлення їжі.

В комплексі невідкладних мір по оптимізації харчування важливе місце займає робота та введення в його сферу харчових речовин та продуктів спрямованої дії, які дозволяють коректувати раціони відповідно до індивідуальних особливостей організму, враховувати і пом'якшувати вплив на організм людини антропогенних факторів. Це різноманітні радіопротектори, антиоксиданти, рослинні білкові збагачувальники, а також харчові волокна (ХВ). Концентрати ХВ вперше в СНД одержані в Одеському технологічному інституті харчової промисловості ім.М.В.Ломоносова. Вони є ефективним засобом поповнення дефіциту баластних речовин в раціонах, завдяки чому знижують ризик розвитку багаточислених захворювань нинішнього століття, в тому числі цукрового діабету, холециститу, коліту, ревматизму, кариєсу та ін. До цього часу високі адсорбційні характеристики ХВ, їх розвинута поверхність в поєднанні з достатнім проникненням для ферментів та субстратів, а також біологічна інертність не знайшли розгляду ні в теоретичному, ні в практичному аспекті в інженерній ензимології. В той же час дані властивості концентратів ХВ дозволяють розглядати перспективи використання останніх як носіїв для іммобілізації ферментів замісної терапії порушення травлення їжі, що знайшли широке застосування в медичній практиці.

Розроблені з використанням методів іммобілізації, композиції призначені для вклицення їх в дієти при різноманітних порушеннях травлення, які супроводжуються ензимною недостатністю. Актуальність роботи визначається необхідністю отримання засобів для корекції харчового статусу осіб, що страждають такими захворюваннями, число

13

яких на Україні за останні 10 років зросло більш, як в 3 рази і сьогодні перевищує 4 млн чоловік. Композиції даного виду є новими фізіологічно активними препаратами ХВ другого покоління.

Дана робота виконувалась відповідно до програми 1/91-1-П за Н держреєстрації UA 01001930 Р "Розробити нові зразки харчових волокон та композицій на основі рослинних клітинних стінок та продуктів, збагачених ними, для лікувально-профілактичного харчування."

Мета та задачі дослідження. Мета дослідження - розробка технології одержання харчових композицій, що поєднують у своєму складі ферменти, системи та концентрати харчових волокон зернових, які використовуються як носії для іммобілізації ферментів.

В відповідності до поставленої мети були визначені такі основні задачі досліджень:

- оцінити і принципову можливість використання концентратів ХВ висівки пшениці та борошнця вієса як носіїв для іммобілізації ферментів;

- розробити методи іммобілізації ферментів на ХВ, які дозволяють отримати препарати з підвищеною стабільністю ензимної складової та з високими амілолітичною, протеолітичною, ліполітичною активностями;

- дослідити властивості іммобілізованих ферментних препаратів: рН- і температурний оптимум, рН- і термостабільність, кінетичні параметри, стійкість по відношенню до жовчаних кислот та іонів важких металів, при зберіганні та γ -стерилізації, можливість функціонування в колонному режимі т. статичних умовах;

- вивчити можливість використання модифікованих ферментами ХВ як ентеросорбентів;

- дослідити залежність активностей іммобілізованих форм ферментів від біополімерного складу та структурних характеристик ХВ;

- дати медично-біологічну та санітарно-гігієнічну оцінку отриманих препаратів;

- розробити технології одержання модифікованих ферментами ХВ і розглянути шляхи її реалізації в дослідно-промислових умовах.

Наукова новизна. Вперше одержано препарати ХВ другого покоління, що не мають аналогів, містять ферментні складові, характеризуються підвищеною стабільністю та високим зберіганням вихідних ферментативних активностей;

- науково обгрунтована можливість використання концентратів ХВ

як носіїв для іммобілізації ферментів;

- встановлено, що найбільш ефективним методом іммобілізації орази та пігарази на ХВ висівок пшениці та борошнця вієса, а також їх сумісної іммобілізації на ХВ є метод просочування ХВ ферментним розчином з використанням ПЕО з подальшою γ -стерилізацією, який дозволяє отримати препарати з комплексним зберіганням ферментативних активностей;

- показано, що при іммобілізації розширюється спектр фізико-хімічних властивостей ферментів (рН- і термо-оптимум, рН- і термо-стабільність), зростає стійкість по відношенню до рідин шлунково-кишкового тракту, при зберіганні та γ -стерилізації, встановлено пролонгований характер дії іммобілізованих на ХВ ферментів в досліді in vitro та in vivo.

- виявлена залежність зберігання вихідних активностей іммобілізованих препаратів в д біополімерного складу та структурних характеристик поверхні ХВ, яка дає можливість рекомендувати оптимальний склад ХВ з метою одержання ферментативних препаратів, що характеризуються максимальним зберіганням вихідних ферментативних активностей;

- визначено, що сорбційна здатність концентратів ХВ не змінюється при їх модифікації з допомогою ферментів, що дозволяє розглядати перспективи використання останніх як ентеросорбентів.

- визначенням кінетичних параметрів гідролізу субстратів іммобілізованими формами орази та пігарази, а також з допомогою комплексу фізико-хімічних методів дослідження (ІЧ-спектроскопія, термогравіметрія, калориметрія) встановлена взаємозалежна участь всіх компонентів при іммобілізації;

- науково обгрунтована технологія виробництва модифікованих ферментами концентратів ХВ.

Новизна технічних рішень розробленої технології підтверджується позитивними рішеннями Госпатента СРСР за заявками на винахід: N 4763069/13(441806) та N 4951-51/13/055197.

Практична цінність роботи. Проведення досліджень лягло в основу розробленої технології виробництва принципово нових препаратів ХВ, що вміщують ферментну складову і призначені для лікувального та профілактичного харчування, яка була апробована в виробничих умовах на Одеському виробничому хіміко-фармацевтичному об'єднанні "Віостимулятор". Запропоновані технологічні проєкти та їх режими дозволяють забезпечити потоковий характер виробництва, використовуючи для цієї мети технологічне обладнання, яке серійно випускається вітчиз-

няном машинобудівною промисловістю.

Проведені медично-біологічні дослідження підтвердили можливість та ефективність використання модифікованих ХВ в лікувально-му та профілактичному харчуванні. Міністерством охорони здоров'я України дано дозвіл на виробництво та використання останніх з цієї метою.

Розроблена та затверджена нормативно-технічна документація на виробництво модифікованих образів ХВ пшеничних висівок (ТУ та ТІ N 569/46.72-3-92).

Апробування роботи. Основні результати досліджень доповідались на: Всесоюз. конф. "Хімія харчових речовин. Властивості та використання біополімерів в харчових продуктах" (Могилів, 1990 р), Всесоюз. конф. "Хімічні перетворення харчових полімерів" (Светлогорськ, 1991 р), Всесоюз. конф. "Хімія харчових добавок" (Чернівці, 1991 р), VII Всесоюз. симпозіумі "Інженерна ензимологія (одержання та використання біокатализаторів в народному господарстві та медицині)" (Москва, 1991 р), Всесоюз. конф. "Наукове забезпечення зберігання та переробки рослинної сировини в харчовій промисловості" (Москва, 1991 р), респ. науково-техн. конф. "Розробка високо-ефективних ресурсозберігаючих технологій, обладнання та нових видів харчових продуктів - в харчову та переробні галузі АПК" (Київ, 1991 р), Пленумі проблемної комісії Наукової ради з медичних проблем харчування при Президії АМН СРСР "Проблеми асиміляції їжі та фізіологічні обґрунтування нормів раціонального харчування" з питань "Харчові волокна - перспективи виробництва та використання в практиці" (Одеса, 1991 р), на наукових конференціях п. фесорськ-к-висладацького складу ОТХП ім. М.В.Ломоносова (1989 - 1993 рр).

З матеріалів дисертації опубліковано 12 друкованих робіт та отримано позитивні рішення Госпатента СРСР по 2 заявках на винахід.

Структура та обсяг роботи. Дисертація складається із введення, семи розділів, основних висновків, списку літератури, додатків. Робота викладена на 150 сторінках машинописного тексту, вміщує 31 малюнок та 50 таблиць. Список літератури вміщує 224 найменування вітчизняних та іноземних авторів.

На захист виносяться наукові положення:

- наукове обґрунтування можливості використання ХВ, як носіїв для іммобілізації ферментів;
- теоретичне обґрунтування та експериментальне підтвердження якісних та кількісних змін основних складових вихідної сировини при

іммобілізації;

-визначення можливості використання модифікованих ферментами ХВ зернових для лікувального та профілактичного харчування;

-наукове обґрунтування та розробка технології виробництва модифікованих ферментами ХВ;

ЗМІСТ РОБОТИ

У введенні обґрунтована актуальність роботи.

В першому розділі на основі аналізу сучасних знань про біохімічний склад, структурні характеристики поверхні, фізико-хімічні властивості, фізіологічні ефекти концентратів ХВ, а також розгляду використання компонентів ХВ та їх похідних як матриць для іммобілізації, показана принципова можливість застосування ХВ в практичному аспекті інженерної ензимології. Наявність фундаментальних розробок в галузі виділення та дослідження концентрованих препаратів ХВ (Дулкін М.С., Черно Н.К.) складає необхідні передумови для конструювання продуктів цільового призначення. Сформульована мета та визначені задачі досліджень.

В другому розділі "Матеріали та методи експериментів" описані об'єкти досліджень, такі як концентрати ХВ пшеничних висівок (ХВПВ), та борошених вівок (ХБВВ), а також ферментні субстанції вітчизняних лікувальних препаратів замісною терапією недостатності травлення: нігедаса - ліпаза рослинного походження, що одержана із насіння *Nigella damascena*, ораза - комплексний аміло- та протеолітичний ферментний препарат, який виділений з грибів *Aspergillus oryzae*.

Активність вільних та іммобілізованих форм препаратів визначала наступним чином: протеолітичну активність (ПА) - модифікованим методом Ансона через визначення оптичної густини при 670 нм; амілолітичну активність (АА) - колориметричним методом за кольором розчинів йоду, а також за вмістом редуруючих вуглеводнів; ліполітичну активність (ЛА) - титрометричним методом за вмістом вільних жирних кислот. Визначення рН- і термооптима, рН- і термостійкості ферментів, кінетичних параметрів процесів гідролізу субстратів проводили відповідно до основ ферментативної кінетики. Дослідження сорбційної здатності модифікованих ХВ по відношенню до жовчних кислот та іонів свинцю вели з допомогою колориметричних методів. Для вивчення впливу біополімерного складу та структурних характеристик ХВ на активність іммобілізованих ферментів одержували зразки ХВ, що мають різний хімічний склад та структуру поверхні, шляхом їх кислотної обробки. Оцінка структури композицій, що утворюється при іммобілізації, проведена з допомогою комплексної фіз-

ко-хімічних методів аналізу: диференційної ІЧ-спектроскопії, калориметрії, термогравиметрії. Результати досліджень зображувались методами математичної статистики та кореляційно-регресійного аналізу з використанням обчислювальної техніки.

В третьому розділі "Імобілізація орази на ХВ" дано оцінку ХВ з погляду можливості використання їх як носіїв для імобілізації ферментів. При імобілізації орази з допомогою методу адсорбції вибір оптимальних умов вміщував визначення таких параметрів: вагового співвідношення ХВ: фермент, гідромодуль, часу інкубації ХВ та розчину ферменту, температури реакційного середовища. Максимальне зберігання комплексної ферментативної активності має місце при ваговому співвідношенні ХВПВ:ораз та ХВБВ:ораз 1:0,2, при цьому в першому випадку зберігання вихідних активностей: ПА - 20,4 %, АА - 22,8 %; в другому: ПА - 27,9 %, АА - 34,4 %. Значні зберігання вихідних активностей орази свідчать про можливість і перспективність використання ХВ як носіїв для імобілізації ферментів з метою терапії недостатності перетравлення їжі, але деякі втрати ферментативної активності при адсорбції визначають необхідність розробки більш ефективного та економічного способу імобілізації.

Далі була розглянута можливість використання ПЕО - полімерного матеріалу, який характеризується стабілізуючим впливом на білкові речовини, при імобілізації орази на ХВ. Порівняння активностей імобілізованої орази методом просочування в середовищі 20 %-го водного розчину ПЕО та в фосфатному буфері до та після γ -стерилізації дозою 26 кГр показало, що ефективність імобілізації в середовищі 0,1 М фосфатного буферу до γ -опромінення вища, ніж при використанні ПЕО, при цьому зберігання АА змінюється незначно, а зберігання вихідної ПА в умовах просочування в фосфатному буфері (86,0 %) перевищує цю величину при використанні ПЕО (75,2 %). Але тільки в присутності ПЕО для імобілізованих препаратів, що пройшли γ -стерилізацію визначається тенденція до комплексного зберігання ПА та АА, імобілізація в середовищі фосфатного буферу відзначається зниженням активності орази при γ -опроміненні. Вплив вагового співвідношення ХВ:фермент в умовах даного процесу незначний (табл. 1).

Таким чином, запропонований спосіб дозволяє отримати стійкий препарат з високим зберіганням як ПА, так і АА.

Враховуючи можливість практичного використання імобілізованих на ХВ ферментів дослідили такі їх властивості: стійкість при зберіганні; рН- і термо-оптимуми; рН- і термо-стабільність; кінетичні параметри гідролізу субстратів нативними та імобілізованими

тичні параметри гідролізу субстратів нативними та імобілізованими

Таблиця 1
Вплив умов імобілізації на зберігання вихідної активності орази, яка імобілізована на ХВБВ з використанням ПЕО

Умови імобілізації		ПА,	Зберіг.	АА,	Зберіг.
γ -стерилізація	вагове співвідношення ХВ:фермент	од/г ХВБ	ПА, %	од/г ХВБ	АА, %
до	1:0,05	0,60	69,7	1504,2	85,2
	1:0,1	1,10	64,1	3170,3	89,8
	1:0,2	2,56	73,4	5363,1	84,3
	1:0,3	3,30	65,5	9767,9	92,2
після	1:0,05	0,62	72,6	1696,6	96,1
	1:0,1	1,46	85,2	3369,0	95,4
	1:0,2	2,78	79,8	7017,1	99,2
	1:0,3	4,34	83,9	10456,5	98,7

формами орази; параметри функціонування в статичних умовах та в колонному режимі.

Імобілізовані форми орази стійкі при зберіганні, при витриманні останніх при 4 °C протягом 1 року зберігається біля 100 % їх активності.

Визначення рН-оптимуму АА та ПА препаратів імобілізованої на ХВПВ та ХВБВ орази проводили в діапазоні рН 1 - 9. рН-Оптимум імобілізованої з допомогою ПЕО з подальшим закріпленням γ -опроміненням орази значно розширений, імобілізована таким чином ораза стабільна в області рН 4,5 - 6,5 з зберіганням біля 100 % активності, що також доводить переваги цього методу. Суттєвою перевагою імобілізованих форм орази є зміщення рН-оптимумів активностей в кислій області значень рН, що зумовлює їх підвищену стійкість до впливу кислотоємного шлунку, і, як наслідок, більшу ефективність використання останніх з метою покращення травлення їжі. Нативна ораза цілком втрачає АА при рН 3,0 протягом 120 хвилин, імобілізований на ХВПВ препарат орази при інкубації його протягом 300 хвилин в буферному середовищі з рН 3,0 зберігає 31,5 % АА, що свідчить про те, що при імобілізації на ХВ також збільшується рН-стабільність орази.

Моделюючи поведінку імобілізованих препаратів в організмі, розглянули активності імобілізованих на ХВПВ форм орази в середовищі шлункового соку. При імобілізації орази з використанням ПЕО та γ -стерилізації зберігається 62,3 % АА і 49,8 % ПА протягом двох годин інкубації, для адсорбованої орази в тих самих умовах має

місце зберігання 25,2 % та 17,4 % АА та ПА відповідно, при цьому натільна ораза цілком втрачає свою активність протягом 10 хвилин (табл. 2).

Таблиця 2
Зберігання ферментативної активності іммобілізованих препаратів орази (% від вих.) в шлунковому соці

Час інкубації, хвилин	Зберігання ферментативної активності, % від вих.			
	Протеолітичної		Амїлолітичної	
	адсорб. форма	іммоб. форма	адсорб. форма	іммоб. форма
30	52,2	88,7	60,2	90,8
60	30,8	69,0	48,4	76,4
120	17,4	49,8	25,2	62,3
180	8,8	24,2	10,7	45,4
240	-	10,2	5,9	23,1
300	-	5,7	-	8,2

Рівняння в стабільності адсорбованої і закріпленої з використанням ПЕО та γ -стерилізації орази проявляється і при температурному впливі. Можливо, в структурі зшитого γ -опроміненням ПЕО має місце додаткова фіксація ферменту. Внаслідок просторових перешкод, які вносяться сіткою полімера, поступовий та, можливо, обертальний рух білкових молекул значно затримується, тому в таких умовах утворення комплексу білок-матриця стає термодинамічно більш вигідним.

Вивчення термо-оптимумів АА і ПА натільної та іммобілізованих форм орази свідчать, що термо-оптимуми активностей іммобілізованих форм значно розширені в порівнянні з такими натільної орази. Зниження енергій активації іммобілізованих форм, аналіз температурних залежностей, а також оцінка термостабільності натільної та іммобілізованих форм орази по їх остатковій активності після інкубації останніх при температурі 50 °С протягом 5-ти годин в 0,1 М фосфатному буфері, підтверджує, що при іммобілізації на ХВ підвищується також термостабільність орази.

Лінеаризація рівняння Міхаеліса-Ментен в координатах зйноса дозволила визначити константи Міхаеліса (K_m) та максимальні швидкості гідролізу субстратів натільної та іммобілізованих форм орази. Збільшення K_m іммобілізованих форм орази при гідролізі крохмалю та казеїну, можливо, пояснюється зменшенням спорідненості ферменту до субстрату, що звичайно для іммобілізованих препаратів внаслідок дифузійних обмежень. Практично у всіх випадках для іммобілізованих препаратів має місце збільшення макимальної швидкості гідролізу крохмалю та казеїну.

Відомо, що ефективність використання іммобілізованих ферментів в різних галузях промисловості тісно зв'язана з стабільністю їх функціонування в статичних умовах і в колонному режимі. Показано, що час протікання процесу гідролізу білка в випадку використання іммобілізованої на ХВПВ з допомогою ПЕО орази зростає вдвоє в порівнянні з вільною оразою, що дозволяє констатувати про отримання препаратів з пролонгованим характером дії. Значна стабільність АА при роботі іммобілізованої орази в колонному режимі (напівперіод роботи колонни при гідролізі крохмалю складає 12 днів при цілодобовому функціонуванні біореактора) дозволяє розглядати можливість її використання в технологічних процесах харчових виробництв, які передбачають гідроліз крохмалю.

Розрахунки по оцінці взаємозв'язку величин АА та ПА іммобілізованої на ХВПВ орази з біополімерним складом та структурними характеристиками поверхні ХВПВ виконували з використанням кореляційно-регресійного аналізу на ЕОМ ЕС-1033, який показав, що найбільш точними є моделі, які зв'язують активності з показниками лігніну та білка. Результати такого аналізу дають можливість рекомендувати з метою одержання препаратів, що відрізняються підвищеним зберіганням вихідних активностей, використання ХВ з збільшенням вмісту білка та з мінімальною кількістю лігніну. Стабілізуючий вплив білка на зберігання вихідних ПА та АА іммобілізованої орази підтверджує тезис про позитивну дію субстратів ферментів на зберігання активностей при іммобілізації.

В четвертому розділі "Іммобілізація нігедаси на ХВ" розглянуто методи іммобілізації нігедаси на ХВ та дано характеристику фізико-хімічних властивостей вільної нігедаси і їх іммобілізованих зразків. Зберігання АА адсорбованої на ХВПВ та ХВБВ нігедаси залежить від вагової співвідношення ХВ:фермент і максимальна для співвідношення 1:0,1-0,15. При цьому зберігання вихідної АА іммобілізованої на ХВБВ нігедаси (18-20 %) значно перевищує таку при використанні ХВПВ (6 %), що, можливо, пояснюється особливостями поверхні ХВБВ. Їх більшою відповідністю ферменту. Кращі результати одержані при використанні методу просочування ХВ ферментним розчином з допомогою ПЕО та γ -стерилізації. Оптимальним при іммобілізації нігедаси на ХВПВ (зберігання АА 36,2 %) є вагове співвідношення 1:0,1 та 1:0,1-0,2 при використанні ХВБВ (зберігання АА 94-97 %).

З метою отримання комплексного препарату розвели суміш іммобілізації орази та нігедаси на ХВ. Показано, що в розчині фер-

ментів присутність орази негативно впливає на проявлення активності нігедизи. При сумісній іммобілізації орази та нігедизи на ХВНВ такий вплив зникає, сумісно іммобілізовані препарати відрізняються зберіганням 47,2 % ПА, 94,8 % АА та 98,7 % ЛА, після γ -стерилізації має місце комплексне зберігання ПА (47,1 %), АА (99,8 %) та ЛА (93,6 %).

В п'ятому розділі "Фізико-хімічні методи дослідження" представлені результати експериментальних досліджень по одержанню додаткової інформації про модифікацію носія та ферменту в процесі іммобілізації, яка дозволяє констатувати наявність додаткових зв'язків, утворення яких відбувається під впливом γ -опромінення. Як і активність іммобілізованих ферментів, їх стабільність також в значній мірі залежить не тільки від властивостей ферменту, але також від природи носія і типу зв'язку між ферментом та матрицею. Важко оцінити одночасно суть процесів, які протікають при іммобілізації, можливо визначити тільки деякі їх аспекти, що було зроблено в використанні комплексу фізико-хімічних методів аналізу: калориметрії, термогравиметрії, ІЧ-спектроскопії.

Значення ентальпій утворення іммобілізованих методом просочування ХВ при використанні ПЕО з подальшим γ -опроміненням ферментів приблизно в 2 рази перевищує гліко-адсорбованих на ХВ ферментних препаратів. Калориметричні дослідження на основі розрахунку ентальпій утворення підтверджують наявність нової модифікованої форми фермента.

Деякі залежності одержано в використанні методу термогравиметрії. Суттєво різниця в термічних картинах деструкції зразків до та після γ -стерилізації свідчать про утворення комплексу після γ -стерилізації.

Диференціальна крива порівняння величин відносних оптичних густин зразків до та після γ -опромінення характеризується значним зменшенням інтенсивності поглинання зразків після γ -опромінення в області 3400 см^{-1} , яка відповідає валентним коливанням ОН-груп. Також слід відмітити значне зміщення цієї смуги в область менших частот для опромінених зразків ($1730 - 1710\text{ см}^{-1}$), а також появу нових смуг, які були відсутніми в неопроміненіх зразках ($710, 770\text{ см}^{-1}$). Таким чином, сукупність одержаних результатів свідчить про утворення нових зв'язків, що відбувається під впливом γ -опромінення та одержання нової модифікованої форми ферменту. Причому це можуть бути і адсорбовані на ХВ міцелярні агрегати ПЕО з вбудованими в них молекулами ферментів, можливо також вшиття ПЕО при

γ -опроміненні на молекулярному рівні по кінцевим ОН-групам ПЕО та ОН- та NH-групам ферменту. Не виключено, що матриця ХВ також може приймати участь в подібному новоутворенні.

В шостому розділі представлені експериментальні дані по оцінці можливості використання модифікованих ферментами ХВ (ХВФ) як ентеро-сорбентів, розглянуті сорбційна здатність ХВФ по відношенню до жовчаних кислот та іонів свинцю, вивчені закономірності сорбції колових кислот ХВФ, а також досліджено вплив останніх на ферментативну активність нативних та іммобілізованих на ХВ форм ферментів.

Експериментальні дані свідчать, що іммобілізація орази та нігедизи на ХВ не впливає на сорбційну здатність ХВФ по відношенню до колових кислот та іонів свинцю. Так, величина сорбції колової кислоти модифікованими оразом ХВНВ складає 29,8 %, що менше, ніж на модифікованих оразом ХВБВ (40,5 %), можливо, завдяки різниці в їх хімічному складі, властивостях поверхні та ін. Величина сорбції колових кислот залежить також від їх природи. В порядку зростання сорбції на ХВФ кислоти розміщуються таким чином: таурохолева < глікохолева < дезоксикохолева < колева. Ізотерми адсорбції колової кислоти препаратами ХВФ належать до І-типу, що зумовлено мономолекулярним механізмом адсорбції. Вивчення кінетики сорбції колової кислоти ХВФ свідчить, що максимальні швидкості сорбції мають місце при використанні, як носіїв ферментів, ХВБВ. Порівняння сорбційної здатності ХВФ, виходячи із значень констант сорбційної здатності, дозволяє зробити висновок, що на поверхні модифікованих ХВБВ має місце більше кількості сорбційних центрів, які можуть взаємодіяти з коловою кислотою, ніж на поверхні модифікованих ХВНВ. Модифіковані

Таблиця 3

Впл в колових кислот на зберігання ферментативної активності орази

Стерилізація	Колова кислота	Зразок	Зберігання ПА, % від вихідної	Зберігання АА, % від вихідної
до	Холева кислота	ораз	26,1	19,
		ХВНВ-ораз	41,2	40,2
		ХВБВ-ораз	47,8	39,8
після		ХВНВ-ораз	56,7	58,4
		ХВБВ-ораз	60,4	63,7
	Гліко-холева кислота	ораз	28,3	22,4
		ХВНВ-ораз	66,3	68,4
		ХВБВ-ораз	70,0	71,5

ферментами ХВБВ утворюють також більш міцніші зв'язки з молекулами

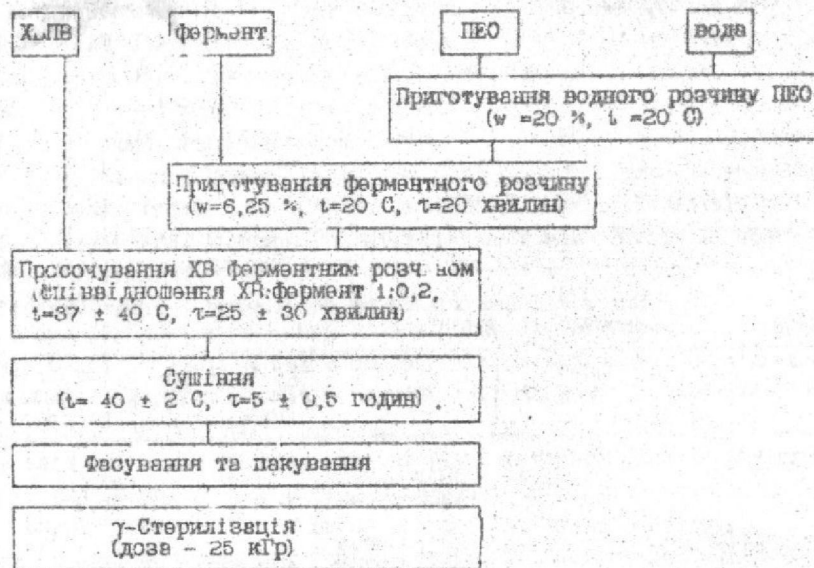
холової кислоти.

Значні зберігання ПА, АА та Л, іммобілізованих на ХВ орази та нігедези в порівнянні із зберіганням ферментативних активностей нативних препаратів можна пояснити захисним впливом матриці ХВ (табл.3)

Медично-біологічними дослідженнями, які проводились Інститутом гігієни харчування Міністерства охорони здоров'я України і представл.ні в Додатках, показана доцільність та ефективність використання ХВФ в харчуванні осіб з різними захворюваннями шлунково-кишкового тракту. Встановлено пролонгований характер дії ХВФ в дослідіах in vivo.

На основі проведених досліджень в цьому розділі "Технологія одержання ХВФ" приведено наукове обґрунтування режими технологічних процесів виробництва ХВФ, вимоги яким повинні задовольняти кінцеві продукти, а також свідчення про впровадження результатів досліджень.

Загальна технологічна схема виробництва ХВФ, яка покладена в основу розробленої та затвердженої нормативно-технічної документації (ТУ та ТІ N 569/46.72-3-92) технології, показана на малюнку 1



Мал. 1. Технологічна схема виробництва ХВФ.
Рекомендований технологічний процес забезпечується організацією вимірально-інформаційної системи, яка дозволяє повністю виконувати вимоги технології, які визначаються техніч.мічним контролем. Розроблена технологія виробництва, відповідні техно-

логічні режими на окремих операціях, виконання техніхімічного контролю виробництва апробовані в умовах виробництва на Одеському виробничому хіміко-фармацевтичному об'єднанні "Біосимулятор".

В И С Н О В К И

1. Науково обґрунтована можливість використання ХВ як носіїв для іммобілізації ферментів.

2. Розроблений спосіб іммобілізації з допомогою ПЕО та подальшої γ-стерилізації дозволяє отримати іммобілізовану на ХВ оразу з 60-70 %-ним зберіганням протектичної та 90-99 %-ним зберіганням ам'долітичної активностей.

3. Встановлено, що іммобілізація орази на ХВФ найбільш ефективна при таких технологічних режимах просочування ХВФ ферментним розчином: вагове співвідношення ХВ:орази 1:0,2, гідромодуль 3, температура 37-40 C, тривалість процесу 25-30 хвилин.

4. Вивчені властивості іммобілізованих на ХВ орази та нігедези. Виявлено, що рН-оптимуми активностей іммобілізованих на ХВ препаратів мають тенденцію до зміщення в кислу область значень рН, підвищені рН- та термо-стабільність іммобілізованих форм в порівнянні з нативними ферментами. Препарати стійкі при зберіганні та γ-стерилізації.

5. Модифіковані ферментами ХВ визначаються високою сорбційною здатністю по відношенню до жорстких кислот і іонів важких металів, яку можна порівняти з аналогічним показником концентратів ХВ. Природа ферменту та умови іммобілізації не впливають на сорбційну здатність модифікованих ферментами ХВ, яка залежить тільки від природи ХВ.

6. Показано значні зберігання вихідних ферментативних активностей іммобілізованих на ХВ зернових орази і нігедези при впливі на них жовтчих кислот та іонів свинцю яке, як можна припустити, пов'язано з захисним впливом матриці ХВ.

7. Показана можливість використання іммобілізованої на ХВФ орази в технологічних схемах харчових виробництв, які передбачають гідроліз крх. малю. Встановлено, що напівперіод роботи колонії при гідролізі крохмалю складає 12 днів при цілодобовому функціонуванні біореактору.

8. В дослідіах in vitro та in vivo спостерігається пролонгування дії іммобілізованих форм орази та нігедези в порівнянні з нативними препаратами. Тривалість процесу гідролізу білка в випадку використання іммобілізованої на ХВФ орази збільшується вдвоє в порівнянні з вільним ферментом.

9. Розроблені наукові основи технології виробництва модифікованих ферментами ХВ. Технологічні процеси та їх режими дозволяють забезпечити поточний характер виробництва. Технологія апробована в виробничих умовах на Одеському виробничому хіміко-фармацевтичному об'єднанні "Віостим-лятор". Розроблена та затверджена нормативно-технічна документація на виробництво та використання модифікованих образів харчових волокон пшеничних висівків.

Основний зміст дисертації опубліковано в таких наукових роботах:

1. Черно Н.К., Крусир Г.В. Исследование свойств модифицированных препаратов пищевых волокон / Тез. докл. Всесоюз. конф. "Химия пищевых веществ. Свойства и использование биополимеров в пищевых продуктах" - Могилев. - 1990. - С.150.

2. Имобилизация ферментов на пищевых волокнах / Крусир Г.В., Черно Н.К., Севастьянова Е.В., Давиденко Т.И. / Тез. докл. Всесоюз. конф. "Химические превращения пищевых полимеров" - Светлогорск. - 1991. - С.57.

3. Черно Н.К., Адамовская К.Д., Крусир Г.В. Физико-химические свойства комбинированных препаратов пищевых волокон / Тез. докл. расп. научно-техн. конф. "Разработка высокоэффективных ресурсосберегающих технологий, оборудования и новых видов пищевых продуктов - в пищевую и перерабатывающие отрасли АПК" - Киев. - 1991. - С.35.

4. Побочные продукты крупяных производств как источники пищевых волокон / Черно Н.К., Капрельяни Л.В., Крусир Г.В., Воеводская С.В. / Тез. докл. Всесоюз. конф. "Достижения биотехнологии - Агропромышленному комплексу" - Черновицы. - 1991. - С.88.

5. Ферментативный гидролиз крахмала и казеина с использованием биокатализатора на основе пищевых волокон / Крусир Г.В., Черно Н.К., Севастьянова Е.В., Давиденко Т.И. / Тез. докл. VII Всесоюз. симпозиума "Инженерная энзимология (получение и применение биокатализаторов в народном хозяйстве и медицине)" - Москва. - 1991. - С.156.

6. Черно Н.К., Крусир Г.В. Пищевые волокна как матрица для иммобилизации ферментов / Тез. докл. научной конф., посвященной 90-летию ОТИП им. М.В.Ломоносова - Одесса. - 1991. - С.209.

7. Крусир Г.В. Харчові волокна лікують // Харчова і переробна промисловість. - 1992. - № 8. - С.32.

8. Enzymatic hydrolysis of starch and casein using biocatalyst on the basis of food fibers / Krusir G.V., Chernov N.K., Sevastyanova E.V., Davidenko T.I. // Russian Biochemistry and Biotechnology. - 1991. - V.1. - N 2/3. - P.95.

9. Черно Н.К., Адамовская К.Д., Крусир Г.В. Растительные клеточные стенки как компоненты пищевых композиций целевого назначения / Тез. докл. науч. конф., посвященной 60-летию ОТИП "Научное обеспечение хранения и переработки растительного сырья в пищевой промышленности" - Москва. - 1991. - С.137.

10. Крусир Г.В., Черно Н.К., Севастьянова Е.В. О структуре пищевой ферментной добавки / Тез. докл. научной конф. ОТИП им. М.В.Ломоносова - Одесса. - 1993. - С.232.

11. Крусир Г.В., Черно Н.К., Воеводская С.В. Исследование pH и термостойкости пищевой ферментной добавки / Тез. докл. научной конф. ОТИП им. М.В.Ломоносова - Одесса. - 1993. - С.245.

12. Черно Н.К., Крусир Г.В. Кислотно-основные и ионообменные свойства пищевых волокон // Прикладная биохимия и микробиология. - 1992. - № 3 - С.297-300.

110.17058

Одесский институт пищевой промышленности

Институт пищевой промышленности