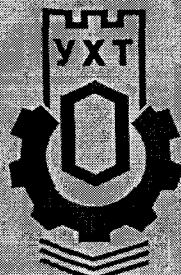


**УНИВЕРСИТЕТ ПО ХРАНИТЕЛНИ ТЕХНОЛОГИИ -
ПЛОВДИВ**

**UNIVERSITY OF FOOD TECHNOLOGIES -
PLOVDIV**



**SCIENTIFIC WORKS
Volume LVI, Issue 1
Plovdiv, October 23-24, 2009**

НАУЧНА КОНФЕРЕНЦИЯ С МЕЖДУНАРОДНО УЧАСТИЕ

**“ХРАНИТЕЛНА НАУКА, ТЕХНИКА И
ТЕХНОЛОГИИ 2009”**

**‘FOOD SCIENCE, ENGINEERING AND
TECHNOLOGIES 2009’**

НАУЧНИ ТРУДОВЕ

Том LVI, Свиськ 1

Пловдив, 23 - 24 октомври 2009



БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНАЯ ДОБАВКА – ИНГИБИТОР ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ ЛИПАЗЫ

Вероника Яшкина, Галина Крусир

Описаны выделение, характеристика и разработка технологии растительного ингибитора липазы – первого отечественного антилиполитического препарата, предназначенного для введения в состав БАД и функциональных продуктов липазотропного действия.

BIOLOGICALLY ACTIVE ADDITIVE – INHIBITOR OF PANCREATIC LIPASE

Veronika Yashkina, Galina Krusir

Selection, description and development of technology of plant lipase inhibitor are described. It is the first Ukrainian antilipolitic compound intended for inclusion in food supplements and functional products of the lipasotropic action.

Среди веществ, способных подавлять активность пищеварительных ферментов, важную роль играют ингибиторы липазы. Их потребление позволяет уменьшать всасываемость жиров и тем самым снижать калорийность рационов.

В связи с этим работа, посвященная выделению, характеристике и разработке технологии растительного ингибитора липазы – антилиполитического препарата, предназначенного для введения в состав БАД и функциональных продуктов липазотропного действия, является актуальной.

Целью данной работы является разработка технологии БАД с антилиполитической активностью.

Ранее нами было показано, что фенольная составляющая семян рапса проявляет значительную антилиполитическую активность [6-8]. Поскольку фенольные соединения характеризуются низкой рН- и термостабильностью целесообразна их стабилизация. Наиболее эффективным методом стабилизации биологически активных веществ является их иммобилизация на растительных биополимерах и их комплексах. В качестве матриц для иммобилизации рассмотрены наиболее часто упоминаемые в литературных источниках структурные полисахариды, биополимерные комплексы и растительное сырье (табл.1).

Результаты исследований показали, что максимальная ингибиторная активность наблюдается при использовании в качестве матрицы пшеничных отрубей (ПО) и пищевых волокон пшеничных отрубей (ПВПО) при массовом соотношении ингибитор–носитель 1:9. Учитывая ряд преимуществ ПВПО перед ПО, в дальнейшем для иммобилизации использовались ПВПО.

Эта матрица обеспечивает наибольшее сохранение ингибиторной активности, pH- и термостабильность, стабильность ингибиторов в модельных условиях желудочно-кишечного тракта.

Таблица 1 – Влияние природы носителя и массового соотношения ингибитор-носитель на антилиполитическую активность фенольного комплекса (n=3; p≥0,95)

Носитель	Массовое соотношение ингибитор-носитель	АЛА, ИЕ/г БАД
МКЦ	1 : 7	85,1
	1 : 8	89,6
	1 : 9	93,4
	1 : 10	90,0
Хитин	1 : 7	22,7
	1 : 8	25,3
	1 : 9	29,8
	1 : 10	26,5
Шрот рапса	1 : 7	29,4
	1 : 8	31,8
	1 : 9	35,1
	1 : 10	31,2
<u>ПВПО</u>	1 : 7	140,7
	1 : 8	157,0
	1 : 9	170,5
	1 : 10	159,1
<u>ПО</u>	1 : 7	171,2
	1 : 8	180,4
	1 : 9	188,5
	1 : 10	182,3
Лузга овса	1 : 7	33,7
	1 : 8	41,1
	1 : 9	47,5
	1 : 10	43,2

Для получения информации о природе взаимодействия ингибитор-носитель использовали калориметрию и ИК-спектроскопию.

Значение теплоты гидратации механической смеси значительно превышает теплоту гидратации иммобилизованного препарата (табл.2). Это свидетельствует о том, что взаимодействие ингибитора с носителем в условиях иммобилизации сопровождается возникновением связей между ними.

При сравнении образцов ПВПО и иммобилизованных на ПВПО ингибиторов фенольной природы отмечается уменьшение полуширины полосы поглощения, соответствующей валентным колебаниям ОН-групп (табл. 3). Это указывает на увеличение количества ОН-групп, участвующих в прочных водородных связях.

Таким образом, результаты исследований природы взаимодействий между ингибитором и носителем свидетельствуют о том, что при иммобилизации образуются водородные связи между ингибитором и матрицей.

Таблица 2 – Термохимические характеристики биополимерного носителя, исходного ингибитора, их механической смеси и иммобилизованного препарата (n=3; p≥0,95)

Образец	Изменение температуры, Δt , °C	Теплота гидратации, $\Delta H_{гидр}$, Дж/моль	Теплота образования соединения, $\Delta H_{соед}$, Дж/моль	Теплота гидратации (теор.) смеси, $\Delta H_{см}$, Дж/моль
ПВПО	0,040	1597,3		
Фенольный комплекс	0,010	399,3		
Механическая смесь				
ПВПО+ф/с	0,150	5989,9		1996,6
Иммобилизованные на ПВПО ф/с	0,105	4192,9	1797,0	

Таблица 3 – Характеристика водородных связей

Образец	ВООП полосы 3400 см^{-1}	Полуширина полосы, см^{-1}
Иммобилизованная форма ингибитора	1,53	670
Ингибитор	1,34	430
ПВПО	1,49	720

С целью определения типа реакции ингибирования липазы, результаты реакции ингибирования липазы иммобилизованными на ПВПО фенольными соединениями рапса были проанализированы методами линеаризации уравнения Михаэлиса–Ментен по Лайнуиверу–Берку и Хейнсу. Ингибирование панкреатической липазы иммобилизованным препаратом фенольных соединений проходит по смешанному (двухпараметрически согласованному) типу ингибирования (рис. 1, табл. 4), который можно рассматривать как определенное сочетание конкурентного и неконкурентного ингибирования, то есть затрагивающего и центр связывания субстрата, и каталитический центр фермента. [1-5].

Таким образом, кинетический анализ реакции ингибирования липазы иммобилизованным препаратом ингибитора фенольной природы позволил заключить, что иммобилизация ингибитора фенольной природы не изменяет типа ингибирования панкреатической липазы при использовании оливкового масла в качестве субстрата, механизм относится к смешанному (двухпараметрически согласованному) типу. Кинетические константы иммобилизованной формы ингибитора (K_m , K'_m , $\overline{K}_I$, K'_S) возрастают в 1,75-3,5 раза по сравнению с таковыми для свободных фенольных соединений семян рапса.

Показана возможность получения полифункциональных БАД, обладающих ингибиторными и сорбционными свойствами. Медико-биологическими исследованиями показано, что эффективная доза БАД-1 составляет 1,5 г/сут. БАД-2 и БАД-3, учитывая их состав и дозы, можно рассматривать как энтеросорбенты, обладающие антилиполитической активностью (табл. 5).

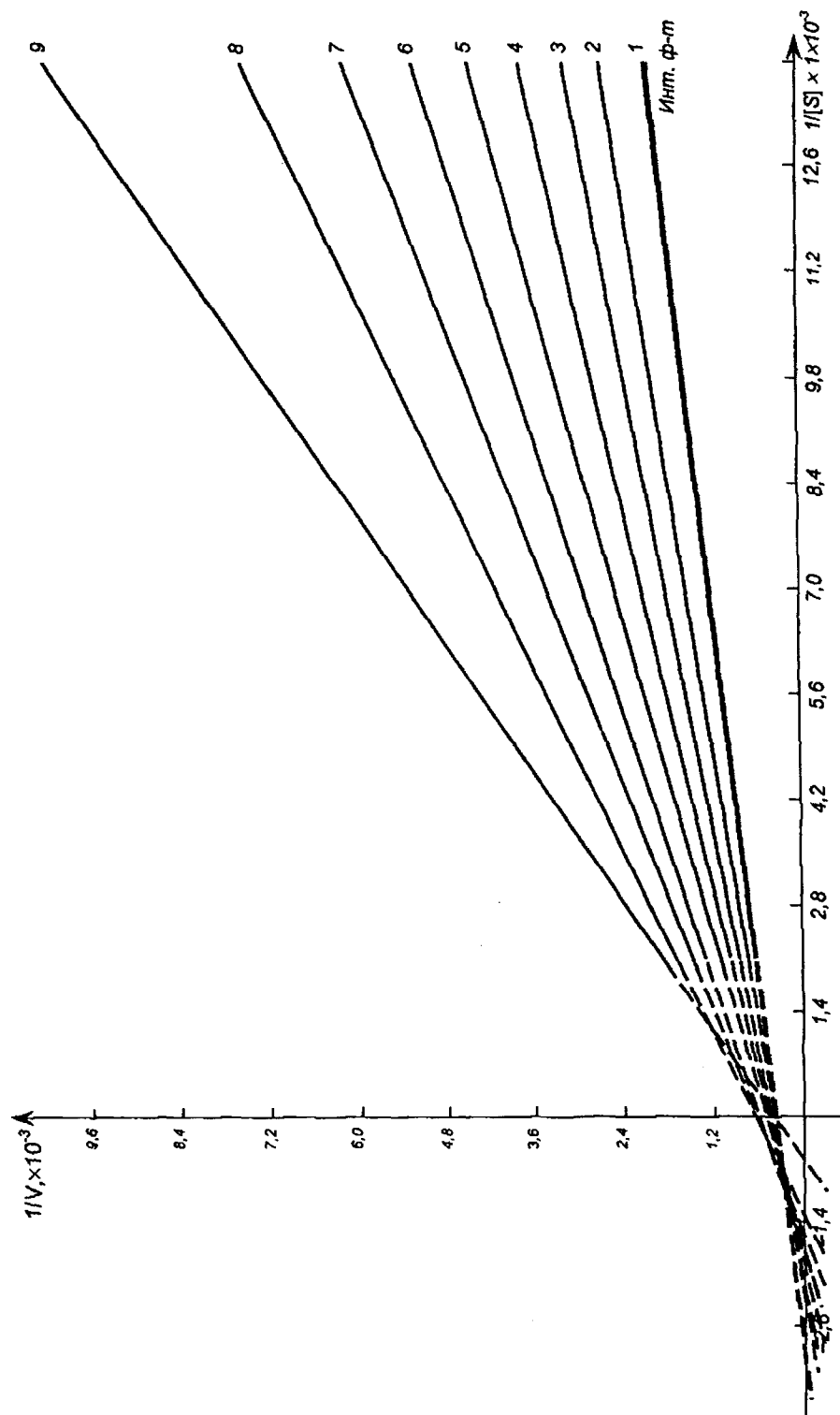


Рис. 1. Влияние БАД на основе фенольных соединений семян рапса на кинетику гидролиза оливкового масла панкреатической липазой. График Лайнуивера-Берка. Смешанный тип ингибирования. 1 – 0,05 г/дм³, $r = 0,9999$, $n = 9$; 2 – 0,1 г/дм³, $r = 0,9994$, $n = 9$; 3 – 0,2 г/дм³, $r = 0,9999$, $n = 9$; 4 – 0,4 г/дм³, $r = 0,9998$, $n = 9$; 5 – 0,8 г/дм³, $r = 0,9997$, $n = 9$; 6 – 1,6 г/дм³, $r = 0,9997$, $n = 9$; 7 – 3,2 г/дм³, $r = 0,9997$, $n = 9$; 8 – 6,4 г/дм³, $r = 0,9992$, $n = 9$; 9 – 12,8 г/дм³, $r = 0,9987$, $n = 9$.

Таблица 4 – Кинетические параметры смешанного типа ингибирования пикнореактивной лимонной кислоты из семян рапса (n=3; p≥0,95)

Кинетический параметр ³	Графический способ				Расчетный способ			
	Зависимость K'_{ij}/V_{max} от $[I]^b$		Зависимость $1/V_{max}$ от $[I]^b$ (график Диксона)		По Стюденту, $\bar{X}$		Непараметрически ^с	
По Лайнуверу-Берку	По Хейнсу	По Лайнуверу-Берку	По Хейнсу	По Лайнуверу-Берку $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	По Хейнсу $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	По Лайнуверу-Берку	По Хейнсу	
Конкурентная составляющая, K_i	6,449	5,532	3,403	3,108	1,175±0,303 0,002 < p < 0,01 n=9	1,464±0,491 0,01 < p < 0,02 n=9	Me=0,869 Q _H =0,345 Q _B =2,157	Me=0,883 Q _H =0,353 Q _B =2,363
Неконкурентная составляющая, K'_i	HO ^d	HO	HO	HO	4,292±1,316 0,02 < p < 0,05 n=6	7,036±2,572 0,02 < p < 0,05 n=9	Me=3,017 Q _H =2,136 Q _B =5,803	Me=2,975 Q _H =1,821 Q _B =11,397
Субстратная составляющая $K'_i = K'_H$ при $[I] = K'_i$	HO	HO	HO	HO	1459,0±84,5 p<0,001 n=5	1545,9±221,3 p<0,001 n=9	Me=1532,5 Q _H =1316,0 Q _B =1623,0	Me=1488,1 Q _H =1154,7 Q _B =2129,0
Интегральная константа смешанного ингибирования, K_i	HO	HO	HO	HO	2,467±0,540 0,001 < p < 0,002; n=8		Me=2,412 Q _H =1,159 Q _B =4,349	
$[I]_{50}$ при $[S] = 75$ г/дм ³	HO	HO	HO	HO	3,705±0,824 0,002 < p < 0,01; n=9		Me=3,485 Q _H =1,410 Q _B =5,860	
$[I]_{50}$ при $[S] = 300$ г/дм ³	HO	HO	HO	HO	3,922±0,715 p<0,001; n=8		Me=3,629 Q _H =2,014 Q _B =6,194	
$[I]_{50}$ при $[S] = 450$ г/дм ³	HO	HO	HO	HO	4,056±0,669 p<0,001; n=8		Me=3,752 Q _H =2,349 Q _B =6,346	
Усредненное значение $[I]_{50}$	HO	HO	HO	HO	3,894±0,409 p<0,001; n=24		p<0,05 Me=3,752 Q _H =2,082 Q _B =5,779	p<0,01 Q _H =2,014 Q _B =5,860

а – Для диапазона концентраций ингибитора 0,2-12,8 г/дм³. При использовании данных графика Лайнуверу-Берка (n=7; r = 0,9829) и 0,4-6,4 г/дм³ по данным графика Хейнса (n=5; r=0,9850). б – Тот же диапазон $[I]$ при том же n . Значения γ составляют 0,9746 и 0,9813 при обработке данных графиков Лайнуверу-Берка и Хейнса, соответственно. с – Представлены значения медианы (Me), а также нижнего (Q_H) и верхнего (Q_B) квартилей в качестве доверительных границ Me при p=0,05. d – HO – не определяли.

Таблица 5 – Компонентный состав разработанных БАД (n=3; p≥0,95)

БАД	Массовая доля компонента, %		
	ПВПО	Фенольные соединения	Антиоксидант
БАД-1	89,95	10	0,05
БАД-2	96,73	3,22	0,05
БАД-3	98,31	1,69	0,05

На основании проведенных исследований разработана технология БАД, включающая следующие основные этапы:

1. Выделение фенольного комплекса из сырья;
2. Иммунизацию фенольных соединений на биополимерной матрице;
3. Сушку БАД.

Осуществлена выработка БАД-1 в производственных условиях на основании рекомендуемой технологической схемы и разработанных режимов отдельных стадий процесса на НПО "Ариадна" с использованием серийного оборудования.

Качество БАД-1, полученной в производственных условиях, соответствует требованиям разработанной нормативно-технической документации, что свидетельствует о возможности производства исследуемых продуктов на серийном оборудовании, а также об эффективности разработанной технологии.

Таким образом, на основании результатов теоретических и экспериментальных исследований разработана технология производства БАД, обладающей ингибиторной активностью в отношении панкреатической липазы.

Список литературы

1. *Atkins G.L., Nimmo I.A.* Current trends in the estimation of Michaelis-Menten parameters. Review. // *Analytical Biochemistry*, 1980, v.104, №1, P.1-9.
2. *Келети Т.* Основы ферментативной кинетики. М.: Мир, 1990, 348с.
3. *Корниш-Боуден Э.* Основы ферментативной кинетики. М.: Мир, 1979, 280с.
4. *Крупянюк В.И.* К коррекции координат расчета констант ингибирования и активации ферментов. // *Прикл. биохим. и микробиол.*, 1995, т.31, №5, С.480-493.
5. *Крупянюк В.И.* Система координат, удобная для анализа взаимосвязей между отдельными типами активации и ингибирования ферментов. // *Прикл. биохим. и микробиол.*, 1989, т.22, №3, С.440-446.
6. Пат. 26209 Украина, МПК А 61 К 36/00. Спосіб одержання інгібітору ліпази. / Н.К. Черно, Г.В. Крусир, В.В. Яшкіна – № у 2007 04508; заявл. 23.04.2007; опубл.10.09.2007. –4с.
7. *Черно Н.К.* Исследование антилиполитической активности фенольных соединений семян рапса / Черно Н.К., Крусир Г.В., Мочуляк (Яшкіна) В.В. // *Зернові продукти і комбікорми.* – № 4.- 2007.- С.14-16.
8. *Черно Н.К.* Перспективы использования некоторых видов растительного сырья, как ингибиторов липаз/ Черно Н.К., Крусир Г.В., Яшкіна В.В. // *Зернові продукти і комбікорми.* – № 3. – 2004. – С.15-17.
1. Вероника Яшкіна, мл. науч. сотр. проблемной научно-исследовательской лаборатории, Одесская национальная академия пищевых технологий, Тел. 80487124153
E-mail: misato-san81@mail.ru
2. Галина Крусир, доцент, канд. техн. наук, каф. пищевой химии, Одесская национальная академия пищевых технологий, Тел. 80487124153