

**УНИВЕРСИТЕТ ПО ХРАНИТЕЛНИ ТЕХНОЛОГИИ -
ПЛОВДИВ**

**UNIVERSITY OF FOOD TECHNOLOGIES -
PLOVDIV**



**SCIENTIFIC WORKS
Volume LVII, Issue 1
Plovdiv, October 15-16, 2010**

НАУЧНА КОНФЕРЕНЦИЯ С МЕЖДУНАРОДНО УЧАСТИЕ

**“ХРАНИТЕЛНА НАУКА, ТЕХНИКА И
ТЕХНОЛОГИИ 2010”**

**‘FOOD SCIENCE, ENGINEERING AND
TECHNOLOGIES 2010’**

НАУЧНИ ТРУДОВЕ

Том LVII, Свиськ 1

Пловдив, 15 - 16 октомври 2010



БИОТЕХНОЛОГИЯ БАД С ВКЛЮЧЕНИЕМ КОРРЕКТОРОВ ПРОЦЕССОВ ПИЩЕВАРЕНИЯ

Галина Крусир, Елена Севастьянова, Вероника Яшкина

Обоснована целесообразность разработки технологий биологически активных добавок с включением биокорректоров процессов пищеварения. Обоснованы методы стабилизации биокорректоров в составе биологически активных добавок.

BIOTECHNOLOGY of BIOACTIVE ADDITION with INCLUSION of CORRECTORS of DIGESTION

Galina Krusir, Elena Sevastianova, Veronika Iashkina

Expedience of development of technologies of bioactive additions is grounded with including of bioproof-readers of digestion. The methods of stabilizing of bioproof-readers are grounded in composition of bioactive additions.

Одним из актуальных и перспективных направлений биотехнологии является разработка биологически активных добавок (БАД) к пище, оказывающих направленное влияние на ферментативные процессы в организме. Пищеварительные ферменты и их ингибиторы являются эффективными корректорами процессов пищеварения, нарушение которых приводит к различным заболеваниям (диабет, гиперлипидемия, сердечно-сосудистые заболевания, новообразования и другие). Во многих развитых странах проблема нарушения функционирования пищеварительной системы, которая расценивается как эпидемиологическая, решается с помощью медикаментозных средств, являющихся препаратами ферментов и ингибиторов пищеварительных ферментов преимущественно животного или микробного происхождения. Растительные биокорректоры по многим показателям их превосходят, поскольку не приводят к угнетению выработки собственных пищеварительных ферментов организма (не вызывают эффекта «привыкания»), характеризуются низким аллергенным потенциалом, незначительной токсичностью и содержат полезные сопутствующие биологически активные вещества растительного источника.

Цель исследования - теоретическое и экспериментальное обоснование технологий БАД - биокорректоров процессов пищеварения.

Установлена природа активных компонентов: за ингибиторную активность в отношении панкреатической амилазы и трипсина отвечают вещества белковой природы, относительно панкреатической липазы - фенольные соединения. Ингибитор липазы - фенольные соединения из семян рапса выделяли 95 %-м этанолом и дальше фракционировали. Стадии очистки ингибитора трипсина из зерна амаранта включали экстракцию 0,05 М боратным буфером, pH 7,6, фракционирование белковой составляющей экстракта сульфатом аммония с последующим диализом фракции между 75%-ной и 100%-ной степенью насыщения

(NH₄)₂SO₄ и аффинной хроматографии на биоспецифичном сорбенте трипсин - сефароза 4В (табл. 1).

Таблица 1 – Стадии очистки ингибитора трипсина зерна амаранта

Стадии очистки	1 стадия (экстракция)	2 стадия (фракционирование и диализ)	3 стадия (аффинная хроматография)
Объем, см ³	90	120	70
Ингибиторная активность, ИЕ/ см ³	0,36	0,18	0,22
Белок, мг/ см ³	3,0	0,08	0,02
Общий белок, мг	270	9,6	1,4
Общая ингибиторная активность, ед	32,4	21,6	15,4
Удельная ингибиторная активность, ИЕ/мг	0,12	2,25	11,0
Степень очистки	1,0	18,8	91,7
Выход, %	100	66,7	47,5

Приведенные в табл. 1 данные свидетельствуют, что экстракт с содержанием белка 3,0 мг/см³ и ингибиторной активностью 0,36 ИЕ/см³ очищен до содержания белка в активной фракции элюата после аффинной хроматографии 0,02 мг/см³, обладающего ингибиторной активностью 0,22 ИЕ / см³. Степень очистки ингибитора составляет 91,7. Таким образом, расчеты свидетельствуют, что из 100 г зерна амаранта можно получить 4,7 мг ингибитора трипсина, ингибиторная активность которого составляет 11,0 ИЕ / мг белка. Ингибитор трипсина представлен двумя изоформами с молекулярными массами (18 ± 1) кДа и (20 ± 1) кДа, которые не образуют ассоциаций между собой. Он характеризуется рядом свойств, общих для ингибиторов семейства STI. Его молекула содержит значительное количество остатков кислых аминокислот, а также глицина и аминокислот с неполярными боковыми цепями (Pro, Val, Leu, Ile). Доля неполярных боковых цепей (NPS), составляет 0,39 (для ингибитора Кунитца - 0,29). Таким образом, исследуемый ингибитор относится к белкам с высокой степенью гидрофобности. Подобно ингибитору Кунитца (STI), белок из зерна амаранта является слабым нестехиометрическим ингибитором химотрипсина.

Значения молекулярных масс для всех исследуемых биокорректоров определяли электрофоретическим методом. Они, за исключением высокомолекулярной (300 кДа) липазы пророщенных семян рапса, находятся в диапазоне 17 ... 25 кДа, что позволяет отнести их к низкомолекулярным биокорректорам. Результаты экспериментов свидетельствуют о низкой pH- и термостабильности полученных биокорректоров. Так, даже при оптимальных условиях, биокорректоры белковой природы полностью теряют исходную активность уже через 1,5-2 часа инкубации.

При кислых значениях pH среды активность протеазы люцерны быстро теряется в течение 20 минут, а при щелочных значений полная потеря активности происходит

через 2 часа. Протеаза томатов при кислых значениях pH среды теряет активность в течение 20 минут. При щелочных значениях pH наблюдается медленная инаktivация - полная потеря активности происходит через 1,5 часа инкубации фермента. При оптимальных условиях функционирования фермента активность стабильна в течение первых 50 минут, а затем резко снижается и полностью теряется через 2,5 часа. Липаза пророщенных семян рапса, как и исследуемые протеазы, характеризуются низкой pH и термостабильностью.

Активность ингибитора трипсина из амаранта после 24 ч инкубации при температуре $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$ и $(40 \pm 2)^\circ\text{C}$ остается практически на исходном уровне. Это позволяет прогнозировать сохранение его активности в условиях организма человека. При температуре $(60 \pm 2)^\circ\text{C}$ ингибитор теряет только 10% исходной активности. При температуре $(80 \pm 2)^\circ\text{C}$ за 20 мин потеря активности составляет 15%. Ингибитор из мучки овса наиболее стабилен при pH 5,0. При pH инкубационной среды 2,0 ингибиторная активность резко снижается, в условиях инкубации при pH 7,0 ингибитор теряет до 48% своей активности через 6 часов инкубации. Ингибитор липазы фенольной природы наиболее стабилен при температуре 37°C - в течение 2-х часов инкубации активность практически не уменьшается. Фенольные соединения сохраняют активность при температуре не выше 40°C . При повышении температуры их антилиполитическая активность заметно снижается, что накладывает ограничения на температурные режимы, закладываемые в технологию получения ингибитора. Таким образом, целесообразен поиск и определение путей повышения стабильности растительных биокорректоров.

Известно, что иммобилизация является эффективным методом стабилизации биологически активных веществ. При иммобилизации биокорректоров использовали следующие методы концентрирования и стабилизации: физическую сорбцию на матрицах природного происхождения; комплексообразования с полиэлектролитных матрицами; безмембранный осмос. Результаты экспериментов позволили сделать вывод, что для биокорректоров-ферментов наиболее эффективным методом стабилизации является их физическая сорбция на биополимерных матрицах (табл. 2).

Таблица 2 – Иммобилизация белковых биокорректоров методом физической сорбции

Биокорректор	Носитель*	Весовое соотношение носитель : биокорректор	Активность, % сохр. от исх.
Протеаза семян томатов	ПВПО:ПВКТ=1:1	1:0,20	55,0
Протеаза люцерны	ПО	1:0,15	88,4
Липаза рапса	ПВПО	1:0,30	72,4
Ингибитор панкреатической амилазы мучки овса	ПВПО	1:0,30	33,0
Ингибитор трипсина амаранта	ПВПО	1:0,30	34,0

Обозначения: * - ПВПО - пищевые волокна пшеничных отрубей, ПВКТ - пищевые волокна кожуры томатов, ПО - пшеничные отруби

И, наоборот, ее использование для иммобилизации ингибиторов белковой природы не целесообразно, поскольку степень сохранения их активности незначительна и не превышает 34%. Вероятными причинами низкого сохранения исходной активности ингибиторов при адсорбции на биополимерных матрицах являются пространственные и диффузионные затруднения выхода ингибитора в реакционную среду, ограничение подвижности иммобилизованных ингибиторов и экранирование активного центра ингибитора матрицей. Результаты определения активности ингибиторов белковой природы, стабилизированных методом комплексообразования (табл. 3), показывают, что этот метод является эффективным также для их концентрирования. Использование полисахаридов в качестве комплексообразователей позволяет добиться значительной (25 ... 40-кратной) степени очистки биокорректоров.

Таблица 3 – Иммобилизация белковых биокорректоров методом комплексообразования

Биокорректор	Изоэлектрическая точка (ИЭТ), pH	Молекулярная масса, кДа	Максимальное осаждение полисахаридом в ИЭТ биокорректора	Массовая доля биокорректора в комплексном осадке
Протеаза семян томатов	8,0	17...20	Гуммиарабик	62
Протеаза люцерны	3,0	24	Альгинат натрия	65
Липаза семян рапса	4,5	300	Агар	48
Ингибитор амилазы мучки овса	4,5	25,11	Агар	73
Ингибитор трипсина зерна амаранта	3,0	20	Альгинат натрия	80

Способность биокорректоров к комплексообразованию зависит от характера их биологической активности: белки-ингибиторы имеют большее сродство к полисахаридам, чем белки-ферменты. Это, вероятно, объясняется большей стабильностью ингибиторов к конформационным изменениям, происходящим при комплексообразовании. Максимальное осаждение биокорректора происходит около изоэлектрической точки белка полисахаридом, который при данном значении pH имеет максимальный заряд. Процесс комплексообразования биокорректора и полисахарида осуществляется за счет электростатических взаимодействий между заряженными группами полимеров (примерно на 80%). Это не единственный возможный тип связей между составляющими комплекса - вероятны также гидрофобные взаимодействия и водородные связи, образование которых доказано с помощью ИК-спектроскопии.

Показана возможность получения биологически активных добавок, содержащих липазу семян рапса, ингибиторы амилазы, липазы и трипсина; приведены принципиальные схемы переработки растительного сырья с получением БАД; обоснованы рациональные параметры ключевых технологических операций,

технологические и аппаратные схемы. Технологии БАД – биокорректоров пищеварения включают следующие основные этапы: выделение биокорректора из сырья; иммобилизация биокорректора; сушка БАД. Полученные рациональные значения процесса физической сорбции экстракта липазы на пищевых волокнах, соответствующие максимальной липолитической активности, составляют: продолжительность – 20,0 мин; температура – 20 °С; ГМ – 3,0 (гидро модуль пропитки, соответствующий минимальным потерям ферментативной активности). При данных условиях активность иммобилизованной липазы составляет 2376 ЛЕ / г БАД.

По результатам исследований разработаны технологические схемы получения БАД, содержащих ингибитор амилазы мучки овса, ингибитор липазы семян рапса, липазу пророщенных семян рапса, ингибитор трипсина семян амаранта.

Список литературы

1. Черно Н.К. Біокоректори процесів травлення [Текст] / Н.К. Черно, Г.В. Крусір, О.В. Коваленко / Монографія. – Одеса. – 2009. – 236 с.
2. Черно Н.К. Фітоферментна добавка на основі томатів [Текст] / Н.К. Черно, О.В. Севастьянова, Г.В. Крусір // 36. наук. пр. "Обладнання та технології харчових виробництв". – Донецьк. – ДонДУЕТ. – 2003. – Вип. 9. – С. 172-178.
3. Крусір Г.В. Протеаза люцерни як компонент біологічно активної добавки [Текст] // Наук. пр. ОНАХТ/ Мін освіти і науки України. – Одеса: 2003. – Вип. 26. – С. 156-160.
4. Фосфолипиды рапса – ингибиторы липаз [Текст] / Н. К. Черно, Г. В. Крусір, Е. В. Севастьянова, В. В. Яшкина // Сб. науч. тр. МПА. – М., 2005. – Вып. 3. – С. 327-332.
5. Черно Н. К. Ліпідні насіння ріпаку – інгібітори панкреатичної ліпази [Текст] / Н. К. Черно, Г. В. Крусір, В. В. Мочуляк // Товари і ринки. – 2007. – № 1. – С. 152-156.
6. Черно Н. К. Інhibуючі властивості фенольних сполук насіння ріпаку [Текст] / Н. К. Черно, Г. В. Крусір, В. В. Мочуляк // Товари і ринки. – 2007. – № 2. – С. 155-161.
7. Дослідження механізму інhibування панкреатичної ліпази фенольними сполуками ріпаку [Текст] / Н. К. Черно, Е. В. Севастьянова, Г. В. Крусір, В. В. Яшкина // Харч. наука і технологія. – 2008. – № 2. – С. 23-25.
8. Крусір Г.В. Білкові інгібітори як регулятори гомеостазу організму людини [Текст] // Харч. наука і технологія. – 2008. – № 2. – С. 30-34.
9. Крусір Г.В. Технологія виробництва БАД «Аміл-інг» [Текст] / Г.В. Крусір, Н.А. Кушнір / Наук. пр. ОНАХТ – 2009. – Вип. 35. – Т. 1. – С. 11-14.

Сведения об авторах:

1. Галина Крусір, доцент, докт. техн. наук, каф. пищевой химии, Одесская национальная академия пищевых технологий, Тел. +380487124153
2. Елена Севастьянова, канд. хим. наук, каф. пищевой химии, Одесская национальная академия пищевых технологий, Тел. +380487124153
3. Вероника Яшкина, канд. техн. наук, ст. инспектор отдела международных связей, Одесская национальная академия пищевых технологий, Тел. +380487189708, E-mail: misato-san81@mail.ru