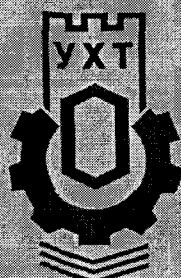


**УНИВЕРСИТЕТ ПО ХРАНИТЕЛНИ ТЕХНОЛОГИИ -
ПЛОВДИВ**

**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



БИОТЕХНОЛОГИЯ БАД АНТИДИАБЕТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ

Г. В. Крусир, Н. А. Кушнир

В статье описаны методы выделения, характеристика физико-химических свойств ингибитора панкреатической амилазы и разработка технологии биологически активной добавки (БАД) диабетического действия, предназначенной для самостоятельного употребления и введения в состав функциональных продуктов диабетического назначения.

BIOTECHNOLOGY OF BAA WITH ANTIDIABETIC ACTION

Krusir G., Kushnir N.

The methods of selection, description of physical and chemical properties of pancreatic amylase inhibitor and development of technology biologically active additives (BAA) with diabetic action, that intended for the independent use, and introduction in the complement of the diabetic setting functional products are described in the article.

Введение

Высокая распространенность сахарного диабета, ожирения и гиперлипидемии в развитых странах, в том числе и на Украине, тяжелые осложнения ставят их в ряд с заболеваниями цивилизации, которые требуют проведения лечебно-профилактических мероприятий. Для профилактики прогрессирования этих заболеваний наряду с медикаментозной терапией населению необходимо потреблять функциональные продукты питания и биологически активные добавки, обладающие способностью снижать или регулировать уровень глюкозы в крови [2,6].

Ингибиторы амилаз уменьшают уровень глюкозы в крови и нормализуют таким образом углеводный обмен, специфически замедляя разрыв гликозидных связей в таких субстратах как крахмал и крахмалоподобные полисахариды [1, 2]. Их использование в качестве компонентов БАД и ингредиентов функциональных продуктов питания откроет новые возможности в коррекции пищевого статуса населения Украины.

Целью работы является разработка технологии БАД, содержащей ингибитор панкреатической амилазы, белковой природы из мучки овса иммобилизованный на полисахаридной матрице, для лечебного и лечебно-профилактического питания.

Основная часть

Скрининг растительного сырья на содержание панкреатической амилазы показал, что максимальную ингибиторную активность по отношению к панкреатической амилазе проявляют экстракты зерна овса и вторичного продукта его переработки – мучки овса, что определяет их потенциальную перспективность в качестве сырьевых источников выделения ингибитора панкреатической амилазы.

Фракционирование белковой составляющей муки овса позволило определить, что наибольшая ингибиторная активность наблюдается для водорастворимой фракции. Ингибиторной активностью обладает также фракция, полученная с использованием 0,5 М раствора NaCl.

Влияние буферной системы на степень извлечения ингибитора α -амилазы из муки овса оценивали по максимальному значению удельной ингибиторной активности. Установлено что, при использовании в качестве экстрагирующего агента 0,15 М раствора NaCl в 0,1 М бикарбонатном буфере, pH 9 наблюдается наибольшая удельная активность (0,280 IO/мг белка), причем выход ингибитора при добавлении раствора NaCl увеличивается на 43 %.

Изучение влияния аминокислот на степень извлечения ингибитора из муки овса показало, что наибольшее влияние на полноту извлечения ингибитора из растительного сырья оказывает триптофан, аспарагиновая кислота и лейцин. Это позволяет прогнозировать, что эти аминокислоты могут принимать участие в образовании комплекса ингибитор–панкреатическая амилаза [3, 7, 8].

С целью характеристики нативного ингибитора и оценки его физико-химических свойств произвели его очистку. Стадии очистки ингибитора α -амилазы из муки овса включали: обезжиривание, экстракцию, фракционирование белковой составляющей экстракта сульфатом аммония с последующим диализом фракции между 40 %-ой и 75 %-ой степенью насыщения $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и аффинную хроматографию на биоспецифическом сорбенте α -амилаза–сефароза 4B [3, 8].

Показано, что при использовании сульфата аммония между 40 %-ой и 75 %-ой степенью насыщения удельная ингибиторная активность полученного осадка составляет 4,2 IE/мг белка, что в 15 раз превышает активность экстракта.

Эксперимент

Хроматографическая кривая выхода белка из колонки характеризуется тремя максимумами, при этом третий максимум сопровождается ингибиторной активностью.

Молекулярную массу (Mr) полученного белка-ингибитора определяли с помощью электрофореза в 15 % полиакриламидном геле (ПААГ). При использовании описанного метода очистки ингибитора панкреатической амилазы получен белок с молекулярной массой 25,11 кДа, которая была рассчитана с помощью калибровочной кривой [3, 4].

Расчеты позволили определить, что степень очистки ингибитора составляет 92,7. Из 100 г муки овса можно получить 1,85 мг ингибитора панкреатической α -амилазы, активность которого составляет 26 IE/мг белка.

Обязательным элементом ингибиторного анализа является определение его кинетических параметров. Результаты кинетических исследований проанализированы методами линеаризации уравнения Михаэлиса–Ментен по Лайнуиверу–Берку и Хейнсу. Значение константы ингибирования (K_i) вычисляли методами Диксона и Узбба.

Результаты кинетических исследований по ингибированию панкреатической амилазы ингибитором белковой природы из муки овса характеризуется уменьшением $V_{\max}$ по мере увеличения концентрации ингибитора без существенного изменения K_m по сравнению с интактным ферментом в отсутствии ингибитора, что позволяет утверждать о линейном неконкурентном ингибировании фермента.

Одной из основных характеристик природных ингибиторов является специфичность их действия. Изучена сравнительная специфичность действия

ингибитора панкреатической амилазы из муки овса и бифункционального ингибитора из зерна пшеницы (препарат «Ремоглюкол»). Показано, что ингибиторная активность препарата несколько превышает ингибиторную активность препарата «Ремоглюкол» и составляет 38 %. Ингибитор не является бифункциональным, т. к. не влияет на активность протеолитических ферментов [4].

Таблица 1

Сравнительная активность ингибитора из муки овса и препарата «Ремоглюкол»
(массовое соотношение ингибитор:фермент – 1:1)

Фермент	Ингибиторная активность (ИА), %	
	Ингибитор α-амилазы из муки овса	Ингибитор препарата «Ремоглюкол»
Панкреатическая α-амилаза	38	30
α-амилаза слюны человека	15	13
α-амилаза (<i>Bacillus subtilis</i>)	Не действует	Не действует
Трипсин	Не действует	25
Химотрипсин	Не действует	Не действует
Пепсин	Не действует	Не действует

Физико-химические показатели ингибитора панкреатической амилазы из муки овса (рН- и термооптимум, рН- и термостабильность) свидетельствуют о том, что он характеризуется незначительной рН- и термостабильностью, что обосновывает необходимость его стабилизации.

Применение аффинной хроматографии для выделения белковых биологически активных веществ (БАВ) с целью получения БАД экономически и технологически нецелесообразно. В настоящее время особое внимание привлекают методы получения БАД, которые содержат ценные БАВ совместно с другими компонентами растительного источника, которые стабилизируют основные БАВ и обладают биологической активностью.

Синтетические и естественные полиэлектролиты способны выделять (концентрировать) белки из разбавленных водных систем в виде нерастворимых белок-полиэлектролитных комплексов разной природы. Процессы концентрации белка с помощью полисахаридов не вызывают денатурацию белка и потерю его растворимости, что позволяет рассматривать перспективы их использования с целью получения БАД, которые содержат биологически активные вещества белковой природы [5].

Из экспериментальных данных исследования видно (рис. 1), что наиболее эффективное осаждение ингибитора наблюдается при использовании агара, которое происходит при рН 5,0, что соответствует изоэлектрической точке ингибитора. Наиболее значительное осаждение ингибитора агаром может объясняться тем, что при рН 5,0 агар характеризуется максимальным значением заряда ($N = 0,93$ ммоль/г).

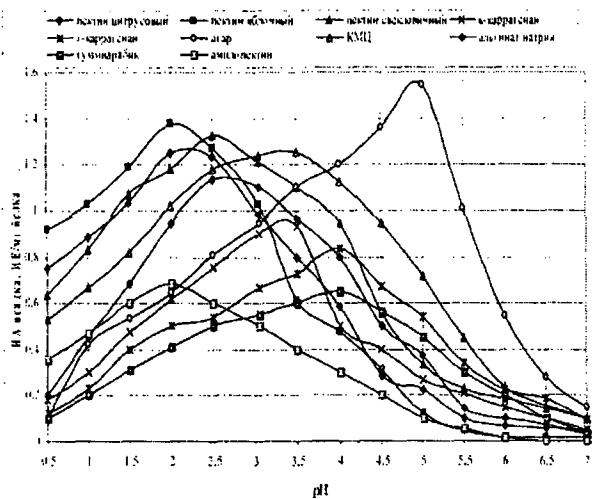


Рис. 1. Влияние pH растворов полисахаридов на ингибиторную активность комплекса

ингибитора из его водного раствора, что может, объясняться большей концентрацией суммарного белка в экстракте, который способствует облегчению межмолекулярных контактов между белком и полиэлектролитом, а также возможным соосаждением ингибитора с другими белками экстракта. Содержание ингибитора (выход) в комплексе в 43 раза превосходит его концентрацию в экстракте, иначе говоря, степень концентрации ингибитора из экстракта составляет 43.

Таким образом, осаждение ингибитора раствором агара приводит не только к концентрированию ингибитора, но и к получению иммобилизованной формы ингибитора.

Известно, что иммобилизация белковых веществ сопровождается увеличением pH- и термостабильности. Изучение физико-химических свойств иммобилизованного ингибитора показало, что pH- и термооптимум иммобилизованного ингибитора более расширен и находится в диапазоне значений pH от 5,0 до 6,8 при физиологической температуре (37 ± 1) °C. В отличие от очищенного ингибитора иммобилизованный ингибитор имеет более значительную pH-стабильность. Так, через 6 часов инкубации при pH 5,0 его активность уменьшилась только на 2 %.

Иммобилизованный ингибитор характеризуется более значительной термостабильностью по сравнению с очищенным ингибитором, что позволяет прогнозировать возможность его производства с использованием высоких температурных режимов. Так, за 6 часов инкубации при (20 ± 2) °C активность иммобилизованного ингибитора снизилась лишь на 0,45 %, при (37 ± 2) °C — на 2,59 %.

Результаты кинетических исследований по ингибированию панкреатической амилазы иммобилизованной формой ингибитора позволяют утверждать, что имеет место, как и для интактного ингибитора, линейное неконкурентное ингибирования фермента. Таким образом, можно констатировать, что при иммобилизации ингибитора тип ингибирования не изменяется.

Результаты исследований с использованием ИК-спектроскопии и калориметрии подтверждают образование комплекса ингибитора с агаром с участием различных

Для выяснения принципиальной возможности образования белок-полиэлектролитных комплексов изучали процесс осаждения ингибитора в модельных условиях. Результаты свидетельствуют, что осаждение ингибитора зависит от концентрации полииона: при концентрации агара 0,2 % выход ингибитора панкреатической амилазы составляет 51 %.

Исследования показали, что при осаждении ингибитора из экстракта раствором агара происходит более значительное осаждение ингибитора (выход ингибитора составляет 73 %) по сравнению с осаждением

связей, основными из которых являются водородные связи (80 %), гидрофобные взаимодействия (0,122 %) и ионные связи (6,3 %).

Сравнительное исследование молекулярно-массового состава белковых составляющих экстракта мучки овса и иммобилизованного препарата ингибитора изучали с помощью гель-хроматографии на сорбенте Sephacryl S-200 Superfine.

Белковая составляющая иммобилизованного ингибитора существенно отличается от таковой экстракта. В исходном экстракте преобладают белковые фракции с высокими молекулярными массами (70 % от общего количества белка). В составе иммобилизованного ингибитора преобладают белки с низкими молекулярными массами, от 6 до 46 кДа, что составляет 93 % от общего количества белка в препарате.

Таким образом, при получении иммобилизованного ингибитора наблюдается перераспределение молекулярно-массового состава белковой составляющей мучки овса с преобладанием низкомолекулярных фракций.

Используя метод наименьших квадратов и последовательный регрессионный анализ были оптимизированы ключевые параметры технологии получения БАД.

Для обоснования условий экстрагирования белка-ингибитора из растительного сырья как факторы оптимизации рассматривали: температуру экстракции (t), значения гидромодуля ($ГМ$) и длительность процесса (τ). Как параметр оптимизации выбраны выход белка в раствор u_6 , а также ингибиторная активность белка-ингибитора $u_{иА}$ %. Оптимальные значения процесса экстрагирования, которые отвечают максимуму ингибиторной активности составляют: $\tau = 30$ хв.; $t = 13,2$ °С; $ГМ = 7,2$. При этом активность ингибитора составляет 0,286 ИЕ/мг белка.

Для определения оптимальных параметров процесса комплексообразования при производстве БАД как факторы оптимизации рассматривали: влияние температуры процесса комплексообразования (t), концентрации агара (C) и длительности процесса (τ) на активность ингибитора в БАД $u_{иА}$. Оптимальные значения отвечающие максимуму ингибиторной активности составляют: $\tau = 30$ хв.; $t = 11,0$ °С; $ГМ = 6,34$. При этом активность ингибитора составляет 187 ИЕ/мг белка.

Разработана схема получения БАД на основе мучки овса, которая предусматривает получение БАД.

Таблица 2

Изменение микробиологических показателей БАД в процессе хранения ($n = 3$, $p \geq 95$)

Показатели	Период хранения, месяцы						
	0	2	4	6	8	10	12
МАиФАМ, КОЕ/г	0,2·10 ¹	0,31·10 ¹	0,46·10 ¹	0,53·10 ¹	0,67·10 ¹	0,86·10 ¹	0,94·10 ¹
Плесень, КОЕ/г	–	–	–	–	–	–	–
Патогенные микроорганизмы, КОЕ в 25 г	–	–	–	–	–	–	–
БГКП	–	–	–	–	–	–	–

Ингибиторная активность БАД в процессе хранения в течении 12 месяцев практически не изменяется и соответствует необходимым показателям качества (снижается до 99,6%). После 12 месяцев хранения наблюдается значительное снижение ингибиторной активности БАД.

Исследования изменения микробиологических показателей БАД в процессе хранения при температуре +4 °С представлены в табл. 2.

Проведенные фармакологические исследования показали, что БАД эффективно снижает уровень глюкозы в крови крыс за счет ингибирования расщепления полисахаридов в кишечнике. Установлено, что эффективная доза БАД составляет 180 мг/кг, что при пересчете на дозу для человека составляет 2 г в сутки.

Заключение

Совокупность данных микробиологических, органолептических и физико-химических исследований, а также изучения динамики изменения ингибиторной активности в течении хранения БАД позволяет рекомендовать ее хранение в течение 12 месяцев при температуре (4±2) °С. Таким образом, теоретически и экспериментально обоснована технология БАД, содержащий ингибитор панкреатической амилазы и способной уменьшать уровень глюкозы в крови для лечебно-профилактического питания.

Литература

1. Грачёва И. М. Технология ферментных препаратов. – М. Агропромиздат, 1987 – с. 335.
2. Кабачный П. И. Перспективы создания лекарственных средств гипогликемического действия на основе природных ингибиторов амилазных ферментов: Лекарственные средства. Экономика, технология и перспективы получения. Обзор. Информ. – М: ВНИИСЭНТИ Минмедпрома СССР, 1990. – Вып.1. – 23 с.
3. Крусір Г.В. Виділення амілолітичних ферментів методом афінної хроматографії / Крусір Г.В., Кушнір Н.А. // Наук. пр. ОНАХТ – Вип. – Т. – Одеса: ОНАХТ, 2008.- С.
4. Крусір Г.В. Фізико-хімічні властивості рослинного інгібітору α-амілаз / Крусір Г.В., Кушнір Н.А. // Прогресивні техніка та технології харчових виробництв ресторанного господарства і торгівлі: 36. наук. праць / Редкол.: О. І. Черевко (відпов. ред.) та ін.; Харк. держ. ун-т харчування та торгівлі.- Харків, 2008.- Вип. 1 (5).- с. 427-433.
5. Крусір Г.В. Біотехнологія отримання інгібітора панкреатичної α-амілази з борошенець вівса / Крусір Г.В., Кушнір Н.А. // Наукові праці Національного університету харчових технологій – Київ НУХТ, 2008. – № 25, частина 2. – с. 32-34.
6. Macoto Kotaru, Hideki Yoshikawa and et. An α-amylase inhibitor from Cranberry Bean (*Phaseolus vulgaris*): Its Specifity in inhibition of mammalian pancreatic α-amylases and formation of a complex with the porcine enzyme // J. Nutr. Sci. Vitaminol. – 1987. V. 33. – P. 359 – 367.
7. ПАТ. 35845. Україна МПК (2006) А61К 38/00, А61К 38/43 Спосіб одержання інгібітора амілази / Г.В. Крусір, Н.А. Кушнір. – № 35845; заявл. 14.04.2008; опубл. 10.10.2008, Бюл. № 19.
8. ПАТ. 35892. Україна МПК (2006) А61К 38/00 Біологічно активна добавка/ Г.В. Крусір, Н.А. Кушнір. – № 35892; заявл. 24.04.2008; опубл. 10.10.2008, Бюл. № 19.

Галина Всеволодовна Крусир: канд. техн. наук, доцент кафедры пищевой химии Одесской национальной академии пищевых технологий, тел.0038-0482-45-47-38, krussir_65@mail.ru
Надежда Анатольевна Кушнир: аспирант кафедры пищевой химии Одесской национальной академии пищевых технологий