

УДК 577.15

В.С. ОМЕЛЬЧЕНКО, аспір., НТУ “ХПИ”

Л.В. КРИЧКОВСКАЯ, докт. биол. наук, проф., НТУ “ХПИ”

СОІММОБІЛІЗАЦІЯ АМІЛОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ – АМІЛАЗ ТА ГЛЮКОАМІЛАЗ НА КАТІОНАКТИВНИХ СМОЛАХ КУ-2-8 ДЛЯ ПОВНОГО ГІДРОЛІЗУ КРОХМАЛЮ ТА ДЕКСТРИНІВ

Проведено дослідження щодо іммобілізації та підвищення стабільності препаратів амілолітичних ферментів для декрохмалізації яблучного відновленого соку та ультра фільтрованого концентрату. Було досліджено параметри операційних умов роботи ферменту, іммобілізованого на носіях, котрі мають найбільше значення у промислових умовах.

Проведены исследования по иммобилизации та повешению стабильности препаратов амилаолитических ферментов для декрахмализации яблочного восстановленного сока и ультрафильтрованного концентрата. Были исследованы параметры операционных условий работы иммобилизованного на носителях фермента, которые имеют наибольшее значение в промышленных условиях.

The investigations of immobilization and increasing of amyloolytic ferments preparations stability for starch hydrolysis in apple renewed juice and ultrafiltrated concentrate. The parameters of operational conditions of ferment activity immobilized on the carriers that have got the most importance in industrial conditions.

Іммобілізація ферментів на водо-нерозчинних підкладках та носіях набуває дуже великого розповсюдження у сучасній харчовій промисловості завдяки значним перевагам, що отримуються під час обробки та виробництва кінцевого продукту. Застосування амілолітичних ферментів, амілаз та глюкоамілази, призначається для розщеплення високомолекулярних полімерів глюкози полісахаридів- крохмалю та олігосахаридів – декстринів з метою зменшення втрат моносахаридів, що складають ланцюги даних високомолекулярних сполук – глюкози, на ультрафільтраційних мембранах, сприяє зниженню ступіня забрудненості патронів фільтрів, дає змогу підвищити таким чином вміст «сухих» речовин, а також підвищити ступінь стабільності кінцевого продукту – відновленого соку, не даючи змоги утворенню осадів в наслідок зміни зовнішніх умов. Іммобілізація ферментів дасть змогу не допустити забруднення соку стороннім білком, зберегти дорогі ферментні препарати та також підвищити стабільність кінцевого продукту[1]. Об'єктом дослідження є ферментний препарат Назуме виробництва компанії DSM для декрохмалізації соків (розщеплення крохмалю). Іммобілізація виконується фізичною адсорбцією за рахунок електростатичних взаємодій шляхом іонного обміну.

Декрохмалізація соку є однією із основних стадій під час виробництва сокових продуктів. Застосування іммобілізованих ферментів дає змогу значно

скоротити витрати на ферментний матеріал, більш того, якщо такий є імпортованим. Додатково, іммобілізація може підвищити температурну стійкість та стабільність ферментного препарату завдяки закріпленню молекул білка на поверхні носія, що зміцнює та закріплює структуру активного центру [2]. Внаслідок іммобілізації може відбуватися перенесення величини рН та температури найбільш активного функціонування молекули фермента. Також іммобілізація розширює кордони проміжку роботи ферментного препарату, стабілізуючи його. В такому випадку ферменту вже стають нестрашними технологічні відхилення по температурі та рН, які у будь – якому разі є можливими в процесі роботи в промислових умовах. Причинами того можуть бути помилки персоналу обслуговування апаратури та технологів, порушення в процесі роботи обладнання або змінення режимів обробки продукту. Також, фізична адсорбція уможливорює легку заміну пошкодженого або відпрацьованого ферменту за рахунок десорбції або додаткового нанесення ферменту на підкладку.

Існує велика кількість різноманітних методів іммобілізації такі як, наприклад, фізичні: адсорбція, включення у гель, включення у шпари і т.д., хімічні – ковалентна іммобілізація за рахунок утворення хімічних зв'язків: або безпосередньо до носія, або ж за допомоги проміжної зшивки – спейсеру. Такими зшивками можуть бути різні речовини, наприклад найбільш широко використовується глутаровий альдегід, можуть бути використані також інші біфункційні зшивачі – активовані дикарбонові кислоти та їх естери і т.д.

Найчастіш іммобілізація відбувається за допомогою аміногруп або карбоксильних груп. Найбільш невдалим випадком іммобілізації є така, де приймають участь групи компонентів, що складають активний центр ферменту. Для запобігання такого використовують іммобілізацію із захистом активного центру субстратом.

В нашому випадку ми використали в якості носія гранули КУ-2-8. Це є катіонобінна смола, що є співполімером дивінілбензолу та сульфатованого стиролу. Іммобілізація відбувається за рахунок іонного обміну аміногруп та інших позитивно заряджених груп з сульфогрупами сульфостиролу. При даному способі іммобілізації фермент не зазнає жодних хімічних впливів на молекулу, що повинно мінімальним чином позначитися на рівні його залишкової активності. Відповідно до статистики, ферменти іммобілізовані фізичною адсорбцією як правило зберігають її на достатньо високому рівні. Також можливо для зміцнення зв'язування білку на носії застосовувати біфункціональні зшивки, одним з котрих є глутаровий альдегід, що набув широкого застосування у процесах іммобілізації.

Даний носій може бути використаним у реакторах різного типу, наприклад колонних або ємкісних із подальшим відфільтруванням носія.

Методи та матеріали.

В даній роботі було використано комерційний ферментний препарат фірми DSM "Nuzyme", що є комплексом ферментів, котрий має амілолітичну активність та повинен проводити гідроліз крохмалю до моносахаридів, тобто глюкози. У якості носія була використана катіоноактивна смола КУ – 2-8, що є

вітчизняним продуктом виробництва “Азот”м.Черкаси.Середній діаметр частинок дорівнює 1-2 мм. У якості реакційного середовища було використано 0,2 М ацетатний буфер, субстратом слугував 2-% розчин крохмалю у дистильованій воді.

Процедура нанесення ферменту.

Визначену кількість г катионообмінної смоли КУ – 2-8, що не піддавалася попередньої активації урівноважили за допомогою 0,2 М ацетатного буферу при рН 3,8. 3 мл ферментного препарату амілолітичних ферментів інкубували у 50 мл ацетатного буферу разом із катионообмінною смолою за температури 15 С протягом 4 годин. Проміжки часу перемішування складали 45 хвилин , час вистоювання 15 хвилин. Процедура вистоювання потрібна для закріплення адсорбованого ферменту . Під час постійного перемішування може відбуватися часткове унесення ферменту. Потім після іммобілізації незв'язаний ферментний препарат відділяли за допомогою декантації та промивки ацетатним буфером із таким же самим рН.

Визначення оптимальної кількості смоли.

До 3 мл ферментного препарату , як це вказано вище додавали різні кількості смоли , починаючи від 0,5 г (далі 1; 1,5; 2 ; 2,5 ; 3).

Активність ферменту.

Активність закріпленого ферменту перевіряли шляхом інкубації носія із іммобілізованим ферментом разом із 2 % - ним розчином крохмалю у ацетатному буфері (50 мл) протягом 2 годин. Ступінь перетворення субстрату, тобто розщеплення крохмалю вимірювалася за допомоги йодометричного методу (зниження ступеню забарвленості комплексу йод – крохмаль) при довжині хвилі в 600 нм [3]. Контроль вели до того моменту , коли в реакційному розчині відбувався повний процес гідролізу крохмалю та декстринів.Допустимий час вистоювання для реакційної суміші повинен складати не більше 2 годин.

Визначення робочої ефективності.

Для визначення кількості повторних використань визначали залишкову активність іммобілізованого ензиму. Іммобілізовані препарати після проведення 2 годинного циклу гідролізу промивали чистим ацетатним буфером від залишків крохмалю, декстринів та глюкози .

Результати та обговорення.

Ферментні препарати амілаз, що добуті з грибів Аспергіллус нігер містять різні типи амілолітичних ферментів і є таким чином поліферментними системами. Препарати амілолітичного типу містять у собі амілази, що перетворюють крохмаль , гідролізуючи такі до декстринів. Далі ці декстрини розщеплюються до моносахаридів – глюкози за допомогою ферменту глюкоамілази.. Для вільного ферментного препарату характерними є такі показники роботи – оптимальні температури роботи 50 – 55 С, рН 3 – 4.

Сік, що добувається на початку сезону містить більшу кількість крохмалю та має більш низький рівень рН . Це обумовлюється тим , що яблука містять більшу кількість органічних кислот (яблучної) і є менш стиглими. Таким чином, для декрохмалізації соку у перший місяць сезону потрібна трохи більша кількість ферментного препарату амілаз порівняно із подальшими. Для обробки 1 тонни

соку необхідно витратити 13,5 мл ферментного препарату. Кількість білку, що міститься у 1 мл ферментного препарату може зменшуватися, тому що у препараті можуть міститися протеази у деякій кількості, що можуть гідролізувати та зменшувати існуючу кількість білка в 1 мл.

Повний гідроліз крохмалю за температури 15 С відбувався протягом 16 годин. Оптимальна температура роботи дорівнювала 40 С, що на 10 – 15 С є нижчим за оптимальну температуру для вільного ферменту. Під час роботи на багатотонажному виробництві температура соку, що виходить із першої ступені концентрування складає 50 С. Далі сік направляється у ємкості, що слугують для ферментаційної обробки. У даних ємкостях спостерігається поступове охолодження соку і таким чином активність ферментів із часом падає, у нашому випадку, до 40 С. Таке зниження температурного діапазону дії іммобілізованого ферменту не повинно позначитися його активності, і фермент наразі залишатиметься дієвим протягом процесу ферментації. Початкова активність ферменту після нанесення складала 75 % від нативного. Після 5 циклів гідролізу спостерігалось незначне зменшення активності ферменту.

Оптимальною кількістю є 1 г катіоноактивного носія на 3 мг ферментного препарату. Подальше збільшення кількості носія при інкубації із такою ж самою кількістю ферментного препарату не давав підвищення активності ферменту, і таким чином було зроблено висновок, що 1 г КУ-2-8 на 3 мл препарату є оптимальним. Дослідження вмісту білка на носії не проводили. Зменшення активності може відбуватися по причині десорбції декотрої кількості білку у реакційний розчин. Також може відбуватися десорбція внаслідок частих промивок. Після проведення кожної реакції гідролізу крохмалю проводили аналіз наявності залишкової каталітичної активності після відокремлення носія. Проби були негативними.

Оптимальний рівень рН для іммобілізованого ферменту практично не змінювався і залишався у тому ж самому діапазоні рН 3 – 4, що і для нативного ферменту. Такий же самий рН є зазвичай у нативного яблунового соку. Як правило, при збільшенні кількості крохмалю на виробництві або збільшують кількість ферменту, або ж час відстоювання. На жаль, термостабільність ферменту залишається на своєму рівні і вже за температури 65 градусів відбувалася повна втрата каталітичної активності.

Не менш значною проблемою є захист від дії мікроорганізмів[4]. Цьому у деякому сенсі сприяє дуже низький рівень рН, попередня термічна обробка соку, підвищений рівень вмісту цукрів, що частково запобігає розмноженню, а також підтримання загального рівню асептики на підприємстві. Зменшенню імовірності бактеріального забруднення препарату на носіях сприятиме регулярний контроль активності препарату та бактеріальної чистоти реактору шляхом щоденної перевірки носія.

Висновки.

Амілолітичний комплекс ферментів було іммобілізовано на катіонообмінних смолах КУ –2-8 шляхом адсорбції за рахунок міжіонних взаємодій. Робочі характеристики майже не відрізнялися від таких для неіммобілізованого препарату, що дозволить не вносити в існуючий технологічний процес суттєвих

змін. Ця технологія вважається найбільш бажаною для застосування у виробництві харчових продуктів, тому що є дуже легкою, не потребує застосування хімічних реагентів, що можуть бути токсичними, і у разі втрати активності ферменту дуже легко підготувати новий препарат. Це проводиться шляхом десорбції відпрацьованого ферменту та подальшим нанесенням нової порції активного біокатализатора. Такі технології повинні сприяти здешевленню проведення технологічних процесів вироблення харчових продуктів функціонального призначення, що буде відбиватися на їх коштовності та доступності для широких прошарків населення.

Список літератури: 1. *Тривен М.* Иммуобилизованные ферменты - М:Мир, 1983. 213 стр. 2. Иммуобилизованные ферменты//Современное состояние и перспективы/ Под ред. *И.В.Березина, В.К.Антонова и К. Мартиника.* – М:Изд – во МГУ, 1976. Т1,2 296с.; 358с. 3. *Fuwa H.*//J.Biochem.-1954-41.-P.583-603. 4. *Шкутина И.В., Стоянова О.Ф., Лунина В.В.* Влияние ионной формы полиамфолита АНКБ -2 на иммобилизацию ферментов .Сорбционные и хроматографические процессы 2009. Т.9. Вып.2С. 247 – 253.

Поступила в редколлегию 11.03.2011

УДК 661.77

С.А. ПЕТРОВ, асп., НТУ «ХПИ»

В.Б. ДИСТАНОВ, канд. хим. наук, доц. НТУ «ХПИ»

А.Г. БЕЛОБРОВ, канд. техн. наук, проф., НТУ «ХПИ»

КОМПЬЮТЕРНЫЙ ПРОГНОЗ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДНЫХ ОКСАЗОЛ-5-ОНА КАК ОСНОВА ДЛЯ ПОИСКА И ОПТИМИЗАЦИИ СТРУКТУР НОВЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

В статье рассмотрены основы компьютерного моделирования биологической активности. Предоставлены данные прогноза возможной биологической активности новосинтезированных люминофоров в ряду производных оксазол-5-она. Проанализирована зависимость между структурой и биологическими свойствами, которая дает возможность приблизиться к целенаправленному синтезу биологически активных веществ, представляющих потенциальный интерес для применения в медицине и биологии.

У статті розглянуті основи комп'ютерного моделювання біологічної активності. Надано дані прогнозу можливої біологічної активності новосинтезованих люмінофорів в ряду похідних оксазол-5-ону. Проаналізовано залежність між структурою і біологічними властивостями, яка дає можливість наблизитися до цілеспрямованого синтезу біологічно активних речовин, що представляють потенційний інтерес для застосування в медицині та біології.

In the article the bases of in silico modeling of biological activity are discussed. The data of prognosis for possible biological activity of in new synthesized luminophores from the range of oxazol-5-one derivatives has been represented. The dependency between the structure and biological properties that gives the possibility to become closer to aim – directed synthesis of biologically active substances are of the potential interest for application in biology and clinics has been analyzed.

Исследование биологической активности органических соединений является одним из наиболее актуальных направлений в современной