2. Бибикова, М. В. Поиск фармакологически активных соединений среди ингибиторов ферментов микробного происхождения [Текст] / М. В. Бибикова, Л. П. Иваницкая // Антибиотики и химиотерапия. – 1991. – Т. 36, № 5. – С. 48–51.

3. Wu, C. Purification and partial characterization of four trypsin/chymotryrsin inhibitors from red kidney beans (Phaseolus vulgaris, var.linden) [Text] / C. Wu, J. R. Whitaker // J. Agr. And Food Chem. – 1990. – Vol. 38, № 7. – P. 1523–1529.

4. Purification and partial characterization of a Schizolobium parahyba chymotrypsin inhibitor [Text] / M. T. Souza [et al.]. // Phytochemistry. – 1995. – Vol. 39, № 3. – P. 521–525.

5. Property and amino acid sequence of a subtilisin inhibitor from seeds of beach Canavalia lineate [Text] / K. Hideki [at al.] // Biosci., Biotechnol. And Biochem. – 1994. – Vol. 58, № 11. – P. 2004–2008.

6. Выделение и характеристика нового ингибитора трипсина и химотрипсина из клубней картофеля [Текст] / Т. А. Ревина [и др.] // Биохимия. – 1995. – Т. 60, вып. 11. – С. 1844–1851.

7. Сучасний стан застосування інгібіторів протеолітичних ферментів у медицині [Текст] / Н. Ф. Маслова [и др.] // Ліки. – 2003. – № 1–2. – С. 22–26.

Отримано 15.03.2009. ХДУХТ, Харків.
© Н.К. Черно, Г.В. Крусір, Я.П. Русєва, 2009.

УДК [664.022.39 : 547.995] : 639.28

Н.К. Черно, д-р техн. наук *(ОНАХТ, Одеса)*
С.О. Озоліна, канд. хім. наук *(ОНАХТ, Одеса)*
Л.С. Гураль, канд. техн. наук *(ОНАХТ, Одеса)*

ГІДРОЛІЗ ХІТИНУ ПРЕПАРАТАМИ ДЕЯКИХ ГІДРОЛАЗ

Показано, що під дією гідролаз із неспецифічною хітинолітичною активністю (целовіридину, пепсину, панкреатину, лізоциму) на модифіковані хітин і хітин-протеїновий комплекс можна отримати водорозчинні низькомолекулярні вуглеводи. Під час одержання сполук, середній ступінь полімеризації яких наближається до двох, доцільно використовувати як гідролізуючий агент лізоцим, хітоолігомерів з більш високою молекулярною масою – панкреатин і целовіридин.

Показано, что под воздействием гидролаз с неспецифической активностью (целловиридина, пепсина, панкреатина, лизоцима) на модифицированные хитин и хитин-протеиновый комплекс можно получить водорастворимые низкомолекулярные углеводы. При получении соединений, средняя степень полимеризации которых приближается к двум, целесообразно использовать в

качестве гидролизующего агента лизоцим, хитоолигомеров с более высокой молекулярной массой – панкреатин и целловиридин.

It is shown that by influence of hydrolytic enzymes with unspecific activity (cellovyrydyn, pepsin, pancreatine, lysozym) on the modified chitin and chitin-protein complex it is possible to get water-soluble low molecular weight carbohydrates. To obtain substances with the middle degree of polymerization equal two, it is necessary to use lysozym as a hydrolytic agent, chitooligomers with higher molecular mass – pancreatine and cellovyrydyn.

Постановка проблеми у загальному вигляді. Інтерес до амінополісахаридів: хітину і його дезацетильованої форми – хітозану зростає в усьому світі. Це обумовлено широким спектром їх використання, який включає як технічні галузі, так і харчову промисловість, біотехнологію [1-3]. Поряд з цим привертають до себе все більшу увагу низькомолекулярні продукти деградації цих полімерів – аміноцукри і відповідні олігомерні сполуки, які, на відміну від полісахаридів, здатні потрапляти до кровотоку. Вони пригнічують ріст декотрих мікроорганізмів, вірусів; стимулюють синтез хрящової тканини; є пребіотиками, імуномодуляторами; їм притаманна протипухлинна, антиатеросклеротична, гіполіпідемічна, гіпохолестеринемічна активності [2; 4-6]. Визначено кореляцію між молекулярною масою і ступенем ацетилування таких вуглеводів та їх фізіологічною дією [5; 6]. Найбільш перспективним напрямком використання продуктів гідролізу хітину і хітозану є введення до складу БАД.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Отримання низькомолекулярних продуктів розщеплення амінополісахаридів зі стабільними характеристиками, як правило, здійснюється ферментативним гідролізом полімерів. Більшою мірою розроблено способи одержання олігомерів дією хітиназ та хітозаназ на хітозан [2; 5; 7]. Хоча відомо, що препарати декотрих інших гідролаз також здатні розщеплювати хітозан з утворенням суміші водорозчинних моно-, олігосахаридів та нерозчинного низькомолекулярного полісахариду [2; 5; 6: 8; 9]. Але продукти реакції характеризуються низьким ступенем ацетилування, що звужує спектр їх фізіологічної дії і, відповідно, обмежує перспективи подальшого використання як компонентів БАД.

Специфічна активність щодо хітину притаманна препаратам хітиназ [2]; відомості щодо розщеплення його ферментами з неспецифічною активністю в літературі вельми обмежені [2; 10; 11].

Альтернативними біотехнологічним методам є хімічні. Але на сьогодні реальним є одержання хімічним шляхом лише глюкозаміну, на базі якого створюють препарати для регенерації функцій опорно-

рухового апарату, оскільки жорсткі умови проведення процесу деградації хітину виключають можливість утворення ацетильованих похідних низькомолекулярних вуглеводів.

Мета та завдання статті. Зважившись на відсутність вітчизняних хітиназ, високі цінові показники щодо відповідних імпортних препаратів, було поставлено задачу одержання низькомолекулярних продуктів розщеплення хітину з використанням ферментів з неспецифічною хітинолітичною активністю, а саме: целовіридину, пепсину, панкреатину, лізоциму.

При цьому порівнювали доцільність використання як субстрату хітину і хітин-протеїнового комплексу (ХПК) – проміжного продукту за умов промислового виробництва хітину з панцировмісної сировини [12].

Виклад основного матеріалу дослідження. У дослідах використовували хітин ракоподібних, в якому масова частка полісахариду становила 98,1%. Масова частка хітину у складі ХПК сягала 41,5%, білкової складової – 43,4%. Остання практично не розщеплювалась травними протеазами [13].

На першому етапі оцінювали власне вплив хітину і ХПК на активність перебігу реакції ферментативного гідролізу. Як приклад розглядали залежність глибини розщеплення казеїнового субстрату панкреатином за наявності зазначених добавок і без них. Результати експерименту наведено на рис.

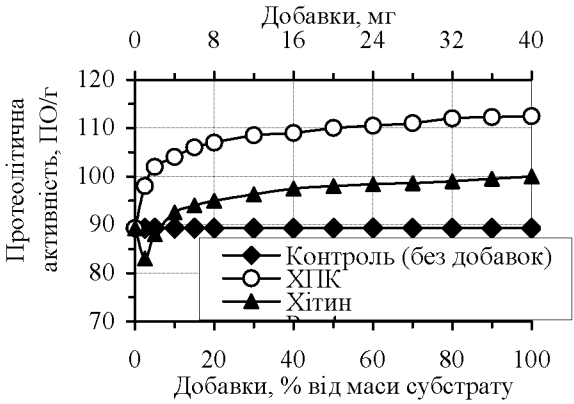

Рисунок 1 – Вплив хітину і ХПК на протеолітичну активність панкреатину: ♦ – контроль; ○ – ХПК; ▲ – хітин

Як видно з отриманих даних, за наявності хітину і ХПК глибина гідролізу білкового субстрату збільшується. Аналогічним чином зазначені субстанції впливають і на декстриногенну активність панкреатину [14]. Тобто за цих умов панкреатин не тільки не інгібується, але й певною мірою активується, при цьому ХПК є ефективнішим за хітин.

На наступному етапі роботи порівнювали ефективність процесу ферментативного гідролізу хітину досліджуваними ферментами. Контроль за ходом процесу здійснювали за двома показниками: накопиченням розчинних продуктів реакції, оскільки відомо, що моно- і олігомерні продукти розщеплення хітину водорозчинні, а також за вмістом у складі гідролізату редукуючих речовин.

Як видно з наведених даних (табл. 1), хітин, як у складі ХПК, так і ізольований, практично не атакується досліджуваними ферментними препаратами навіть з досить тривалим контактом ферменту з субстратом. Ймовірно, підвищена стійкість до гідролізу обумовлена високою кристалічністю полісахариду.

Таблиця 1 – **Характеристика продуктів ферментативного гідролізу препаратів (за 9 діб)**

Фермент	Субстрат	Водорозчинні продукти, % від маси субстрату	Редукуючі речовини, % від маси субстрату
Целовіридин	Хітин	2,5	2,0
	ХПК	4,7	4,2
Пепсин	Хітин	2,3	2,2
	ХПК	4,3	4,1
Панкреатин	Хітин	2,9	2,5
	ХПК	4,9	4,8
Лізоцим	Хітин	3,5	3,1
	ХПК	5,2	4,9

Знизити загальну упорядкованість і, відповідно, підвищити кількість аморфних, більш доступних для дії гідролаз ділянок у хітині можливо шляхом його модифікації. Відомо, що для аморфізації і деполімеризації структурних полісахаридів використовують концентровані розчини кислот [2; 15]. Модифікацію хітину і ХПК здійснювали обробкою концентрованою хлоридною кислотою при температурі 20° С протягом 1,5 год. За цих умов ступінь упорядкованості обох субстратів за даними ІЧ-спектроскопії знизився приблизно на чверть. Після нейт-

ралізації кислоти і створення відповідних значень pH середовища до реакційної суміші додавали гідролази (табл. 2).

Як довели результати досліджень, в процесі гідролізу модифікованих кислотою хітину і ХПК порівняно з вихідними зразками утворюється значно більше відновлюючих вуглеводів (табл. 1, 2). Протягом перших 4–6 діб накопичення редукуючих цукрів відбувається досить інтенсивно. Далі цей процес уповільнюється.

Таблиця 2 – **Характеристика процесу ферментативного гідролізу хітину**

Фермент	Субстрат	Утворення водорозчинних вуглеводів, % від маси субстрату	Максимальна концентрація редукуючих речовин, % від маси субстрату	Середній ступінь полімеризації	Час, протягом якого досягнуто максимальну глибину гідролізу, доб.
Целовіридин	Хітин	55,8	14,7	3,8	6
	ХПК	60,1	17,2	3,5	6
Пепсин	Хітин	26,2	6,4	4,1	6
	ХПК	31,5	7,9	4,0	6
Панкреатин	Хітин	44,6	9,3	4,8	5
	ХПК	49,8	12,8	3,9	5
Лізоцим	Хітин	47,2	20,5	2,3	5
	ХПК	52,0	26,0	2,0	5

Гідроліз субстратів лізоцимом характеризується утворенням найбільшої кількості редукуючих речовин. При цьому середній ступінь полімеризації низькомолекулярних вуглеводів, розрахований на основі даних про накопичення вуглеводів у рідкій фазі і вміст редукуючих речовин, наближається до двох. При використанні інших гідролізуючих агентів редукуюча здатність продуктів гідролізу значно менша.

Вихід розчинних продуктів гідролізу хітину найменший у разі використання пепсину, максимальний – целовіридину.

Висновки. Показано, що всім дослідженим ферментам притаманна хітинолітична активність. Вони здатні гідролізувати попередньо модифікований хітин до низькомолекулярних водорозчинних вуглеводів, вихід яких становить 26,2…55,8%. З метою отримання сполук, середній ступінь полімеризації яких наближається до двох, доцільно ви-

користовувати як гідролізуючий агент лізоцим, хітоолігомерів з більш високою молекулярною масою – панкреатин і целовіридин.

Як субстрат можна використовувати не тільки хітин, але й ХПК, що дозволить спростити технологічний ланцюг отримання цільових продуктів.

Список літератури

1. Muzzarelli, R. A. A. Chitin [Text] / R. A. A. Muzzarelli. – Oxford : Pergamon Press, 1977. – 309 p.

2. Хитин и хитозан: получение, свойства и применение [Текст] / под ред. К. Г. Скрябина, Г. А. Вихоревой, В. П. Варламова. – М. : Наука, 2002. – 364 с.

3. Shahidi, F. Food applications of chitin and chitosans [Text] / F. Shahidi, J. K. V. Arachchi, Y. J. Jeon // J. Food. Sci. Technol. – 1999. – № 10. – P. 37–51.

4. Shon, D. H. Chitosan oligosaccharides for functional foods and microbial enrichment of chitosan oligosaccharides in soypaste [Text] / D. H. Shon // Proceedings of the International Workshop on Bioactive Natural Products. – Tokyo, 2001. – P. 56–66.

5. Characterization of chito-oligosaccharides prepared by chitosanolysis with the aid of papain and pronase, and their bactericidal action against Bacillus cereus and Escherichia coli [Text] / Acharya B. Vishu Kumar, Mandyam C. Varadaraj, Lalitha R. Gowda, Rudrapatnam N. Tharanathan // Biochem. J. – 2005. – Vol. 391. – P. 167–175.

6. Ферментативный гидролиз α-хитина [Текст] / А. В. Ильина [и др.] // Прикл. биохимия и микробиология. – 2004. – Т. 40, № 1. – С. 42–45.

7. Деполимеризация хитозана хитинолитическим комплексом бактерий рода Bacillus sp. 739 [Текст] / А. В. Ильина [и др.] // Прикл. биохимия и микробиология. – 2001. – № 2. – С. 160–163.

8. Деструкция хитозана ферментным комплексом из Carica papaya [Текст] / Е. И. Черкасова [и др.] // Биотехнология. – 2005. – № 2. – С. 73–81.

9. Sei-ichi-Aiba. Studies on chitosan: 4. Lysozymic hydrolysis of partially N-acetylaed chitisans [Text] // Int. J. Biol. Macromol. – 1992. – Vol. 14. – P. 225–228.

10. Roy Ipsita. Hydrolysis of chitin by Pectinex^{T}M [Text] / Ipsita Roy, Meryam Sardar, Munishwar N. Gupta // Enzyme and Microbial Technol. – 2003. – Vol. 32. – P. 582–588.

11. Черно, Н. К. Получение продуктов биодеградации хитина [Текст] / Н. К. Черно, С. А. Озолина, Л. С. Гураль // Харчова наука і технологія. – 2008. – № 6. – С. 17–20.

12. Технология рыбы и рыбных продуктов [Текст] : учеб. для вузов / В. В. Баранова [и др.] – СПб. : ГИОРД, 2006. – 944 с.

13. Черно, Н. К. Хитин-протеиновый комплекс – альтернатива известным хитинсодержащим препаратам [Текст] / Н. К. Черно, С. А. Озолина, Л. С. Шум // Food science, engineering and technologies '2007: Sientific works The International Scientific Conference. – Plovdiv, 2007. – Vol. LIV, Issue 2. – P. 119–124.

14. Озоліна, С. О. Волокнисті кальцієвмісні добавки [Текст] / С. О. Озоліна, О. О. Антіпіна, Л. С. Шум // Наукові дослідження – теорія та експеримент'2007: Третя міжнар. наук.-практ. конф. : [мат.]. – Полтава, 2007. – С. 37–38.

15. Takahashi, Y. Effect of sonolysis on acid degradation of chitin to form oligosaccharides [Text] / Y. Takahashi, F. Miki, K. Nagase // Bull. Chem. Soc. Jpn. – 1995. – Vol. 68, № 7. – P. 1851–1857.

Отримано 15.03.2009. ХДУХТ, Харків.
© Н.К. Черно, С.О. Озоліна, Л.С. Гураль, 2009.

УДК 664,38.061.34:595.3

Г.В. Крусір, канд. техн. наук, доц. *(ОНАХТ, Одеса)*
О.Б. Василів, канд. техн. наук, доц. *(ОНАХТ, Одеса)*
Н.А. Кушнір, асп. *(ОНАХТ, Одеса)*

ЗАСТОСУВАННЯ МАТЕМАТИЧНИХ МЕТОДІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ РАЦІОНАЛЬНИХ РЕЖИМІВ ЕКСТРАКЦІЇ ІНГІБІТОРУ ПАНКРЕАТИЧНОЇ АМІЛАЗИ

Показано можливість отримання з борошенець вівса інгібітору панкреатичної амілази, придатного до застосування в складі біологічно активних добавок та в харчових продуктах. За допомогою математичних методів було розраховано раціональні параметри процесу вилучення інгібітору: тривалість – 30 хв, температура – 13,4° С, гідромодуль – 7,2.

Показана возможность получения из мучки овса ингибитора панкреатической амилазы, пригодного для использования в составе биологически активных добавок и в пищевых продуктах. С помощью математических методов были рассчитаны рациональные параметры процесса экстракции ингибитора: продолжительность – 30 мин., температура – 13,4° С, гідромодуль – 7,2.

Possibility of receipt from husk of oat of inhibitor of pancreatic amylase is shown in the article, for the use in composition biologically active additions and in food products. By mathematical methods the rational parameters of process of extraction of inhibitor were expected: duration – 30 min., temperature – 13,4° С, GM – 7,2.

Постановка проблеми у загальному вигляді. Біологічно активні добавки (БАД), що містять інгібітори панкреатичної амілази рослинного походження визнані ефективними засобами в профілактиці та лікуванні широкого спектра захворювань, що супроводжуються підвищеним рівнем глюкози в крові [1-4]. Тому є актуальним питання визначення оптимальних параметрів виділення інгібіторів панкреатичної