

АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О. В. ПАЛЛАДИНА

На правах рукопису

ГРОХОЛЬСЬКА МАРИНА АНАТОЛІЇВНА

ДІЯ ЕКЗОГЕННИХ ГІДРОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТАТИВНИХ КОМПЛЕКСІВ
НА СОЄВИЙ ШРОТ

03.00.04 - біохімія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

КИЇВ - 1994

AB 29.246

Робота виконана на кафедрі біохімії Чернівецького державного університету ім. Ю.Федьковича.

Науковий керівник - доктор біологічних наук, професор С.С.Костишин

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор О.Г.Судьїна

доктор біологічних наук
В.А.Тугай

Провідна установа - Київський університет ім. Тараса Шевченка

Захист відбудеться "28" *березня* 1994 року о 14⁰⁰ год. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 010.07.01 в Інституті біохімії ім. О.В.Палладіна АН України (252601, МСП, м. Київ-30, вул. Леонтовича, 9).

Автореферат розісланий "24" *лютого* 1994 року

Вчений секретар спеціалізованої вченої ради кандидат біологічних наук

О.В.Кирсенко

ЛНБ України ім.В.Стефаніка



00801454 (M)

ЛНБ ім. В. Стефаніка
АН України

AB - 29. 270

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. З'ясування механізмів протікання та регуляції ферментативних реакцій є одним з найбільш актуальних напрямків сучасної ензимології. Традиційним підходом вивчення особливостей дії ферментних препаратів є використання гомогенних субстратів. Це дало можливість сформулювати сучасні уявлення про природу та механізм дії багатьох індивідуальних ферментів.

Однак, переважна кількість ферментативних процесів протікає в біогетерогенних полімерних системах. Глибока деструкція біополімерів відбувається, як правило, під дією не окремих ферментів, а поліферментних систем. Прикладом є целюлази, амілази, ксиланази, хітинази, протеїнази та інші [Wood, 1985, 1989; Клесов, 1987; Родионова, 1989]. Характер взаємовідносин та регуляторні стосунки між компонентами субстрату та ферментного комплексу в складних гетерогенних системах значно відрізняються від існуючого в гомогенних системах. В той же час, уявлення про механізм дії поліферментних систем на гетерогенні субстрати носять фрагментарний характер. Це стосується перш за все реакцій із складними концентраційними взаємовідносинами між вихідним субстратом, проміжними метаболітами та кінцевими продуктами реакції. Важливим залишається питання про роль структурних перебудов макромолекул при протіканні ферментативних процесів в гетерогенних системах. Тому останнім часом особливого значення набуває вивчення ферментативних реакцій в мицеллярних системах поверхнево-активних речовин, в першу чергу при моделюванні ферментативного каталізу [Березин, 1977; Мартинек, 1984; Левашов, 1987]. Проте, в літературі практично відсутні дані про використання поверхнево-активних речовин при з'ясуванні механізмів ферментативного гідролізу в складних багатокомпонентних системах.

У зв'язку з зазначеним вище, дослідження ферментативних перетворень в гетерогенних системах відкриває широкі можливості для поглиблення уявлень про механізми ферментативних реакцій складних біополімерних субстратів та при розробці теоре-

тичних аспектів дії поліферментних систем.

Інтерес до реакцій ферментативного перетворення білків, полісахаридів, лігніну та інших природних матеріалів зумовлений як саме науковими, так і прикладними завданнями. Такі дослідження дають можливість створення нових розробок при отриманні модифікованих харчових продуктів (білків, вуглеводів), а також при застосуванні сучасних підходів до біоконверсії. Відомі на теперешній час засоби використання гідролітичних ферментів при отриманні білкових ізолятів потребують подальшого удосконалення. Це пов'язано з тим, що вони не забезпечують високої якості білкового продукту і потребують значних витрат при здійсненні технологічного регламенту процесу ферментації (А.с.СРСР N 713995, 1980; patent of USA N 4478856, 1984).

Мета і завдання дослідження. Метою даної роботи було вивчення взаємовідносин компонентів екзогенного ферментативного комплексу, що відрізняються за субстратною специфічністю, адсорбційною здатністю та іншими фізико-хімічними показниками у загальному процесі деградації складного біополімерного субстрату, прикладом якого є багатоконпонентна система шроту сої. Відповідно до мети ставились завдання:

1. Вивчити роль окремих компонентів екзогенних гідролітичних ферментних комплексів на вуглеводні та білкові компоненти соєвого шроту.

2. Вивчити вплив поверхнево-активних речовин (ПАР) різної природи на активність гідролаз і ефективність гідролізу соєвого шроту.

3. Дослідити вплив ПАР на кількісний і якісний склад білкових ізолятів, що отримані при ферментативному гідролізі соєвого шроту.

Наукова новизна і практичне значення роботи. В роботі вивчено закономірності протікання ферментативних реакцій, що відбуваються в гетерогенній системі, яка являє собою як полісубстратну, так і поліферментну. На основі кореляційного аналізу залежності операційної активності від індивідуальних (пектиназних, целюлазних, ксиланазних) активностей ферментного комплексу зроблені висновки про самостійний внесок ферментів комплексів в сумарний процес гідролізу соєвого шроту. Зокрема встановлено, що ефективність ферментативного розщеплення висо-

комолекулярних вуглеводів соєвого шроту, як складного біополімерного субстрату, визначається дією пектолітичних ферментів, які слабо сорбуються на матриці нерозчинного субстрату.

Новизною роботи є також дослідження впливу різних груп поверхнево-активних речовин на ферментативну активність, стабільність і адсорбційну здатність ферментативного комплексу Целовіридин ГЗХ, а не на окремі високоочищені індивідуальні ферменти. В результаті проведених експериментів встановлено, що наявність в реакційній суміші ПАР приводить до зміни індивідуальних активностей і адсорбційних характеристик ферментів. Виявлено, що під дією відносно незначних концентрацій (до 0,15 %) ПАР неіоногенної (Твін 80, ОС 20) та катіонної (етоній) природи підвищується активність протеолітичних, пектолітичних, целюлолітичних ферментів і змінюється адсорбційний баланс целюлаз з напрямку слабо адсорбованої фракції. Встановлено, що зниження адсорбційної здатності целюлазних ферментів підвищує ефективність їх дії на вуглеводні компоненти шроту сої. Проведені дослідження вказують, що неіонні та катіонні ПАР сприяють підвищенню стабільності гідролітичних ферментів при досить тривалому часі проведення процесу ферментації.

Крім того, доведено, що застосування ПАР при екзогенній ферментації дозволяє підвищити вихід білкового продукту з соєвого шроту на 45-56% та поліпшити його якісні характеристики: розчинність (за рахунок збільшення кількості альбумінів і легкорозчинних глобулінів) та чистоту (до 97%) білкового ізоляту. Отримані результати можуть бути використані при розробці високоефективних технологічних схем отримання білкового ізоляту і створенні замкнутих безвідходних виробництв переробки соєвого насіння.

Апробація роботи. Результати роботи були викладені на Міжнародній науковій конференції "Достиження біотехнології - агропромисловому комплексу" (Чернівці, 1991), VI Українському біохімічному з'їзді (Київ, 1992), Міжнародній конференції по екології (Чернівці, 1993), на теоретичних семінарах кафедри біохімії Чернівецького держуніверситету.

Публікації. По темі дисертації опубліковано 8 робіт.

Об'єм і структура дисертації. Дисертаційна робота складається з вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів роботи та їх обговорення, заключення, висновків, списку літератури, що складається з 209 робіт. Дисертація викладена на 121 сторінках, має у своєму складі 23 малюнки та 14 таблиць.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

За субстрат для дії гідролітичних ферментних комплексів використовували обезжирене насіння сої (*Glicine soja* L.) (шрот), отримане на Чернівецькому експериментальному заводі по виробництву харчового білка.

В дослідженнях використовували: технічні ферментні препарати: Пектофоетидин ГЗХ (*Asp. foetidus*) і Целовіридин ГЗХ (*Tr. viride*), Пектиназа 500 (*Asp. foetidus*), Пектофоетидин Г20Х (*Asp. foetidus*), Пектиназа (*Asp. niger*). В роботі застосовували наступні поверхнево-активні речовини (ПАР): катіонну - етоній, аніонну - сульфанола, неіоногенні - Твін 80, ОС 20.

Загальну целюлазну (ФБазну) активність визначали за методом (Mandels, 1976). Індивідуальні активності целюлаз вимірювали: ендоглюкозидазну - віскозиметричним методом (Нулве, 1971; Рабінович, 1977), целобіазну - по швидкості гідролізу целобіози (Клесов, 1980), екзоглюкозидазну - глюкозо-пероксидазним методом (Клесов, 1980), целлобіогідролазну - за методом (Клесов, 1980). Операційну активність щодо вуглеводів соєвого шроту визначали за допомогою модифікованого метода Шомоді-Нельсона (Somogyi, 1952; Nelson, 1944; Клесов, 1980). Визначення індивідуальних активностей пектолітичних ферментів (пектолітичної, екзополігалактуроноазної, пектинестеразної, ендополігалактуроноазної) проводили за методиками ГОСТу 20264.2-74. Геміцелюлазну активність вимірювали за методом (1987). Визначення протеолітичної активності проводили за модифікованим методом Ансона (ГОСТ 20264.2-74) та за методом (Дудка, 1982). Активність ферментних препаратів визначали в од/г. Величини оптичного поглинання вимірювали на спектрофотометрі "Specord".

Для визначення відносного вкладу компонентів ферментного

комплексу в сумарний процес гідролізу соєвого шроту проводився кореляційний аналіз залежності значень операційних активностей від відповідних величин активностей компонентів комплексу. Адсорбційну здатність целюлолітичних і пектолітичних ферментів визначали за зміною відповідних активностей до і після їх інкубування разом з соєвим шротом на протязі 30 хвилин.

Ферментативний гідроліз і екстракцію білка із шроту проводили за методом Коом, запропонованою в авторському свідоцтві СРСР, № 185252/13 (1988). Кількісне визначення білка в екстрактах здійснювали за методом Лоурі (Lowry, 1951) та ваговим методом після його осаджування з екстракту та промивки. Чистоту білкового продукту визначали по кількісному вмісту білка (в %) в білковому ізоляті. Визначення загального, білкового і небілкового азоту в білкових ізолятах проводили за методом Кельдаля. Виділення білкових фракцій з отриманих зразків білка проводили послідовною екстракцією водою (альбуміни), нейтральним (рН 7,0) (легкорозчинні глобуліни) і лужним (рН 10,0) (важкорозчинні глобуліни) розчинами і М NaCl, забуферених 0,1 М фосфатним буфером, 0,05 М NaOH (глютеліни).

Електрофоретичний аналіз білкових ізолятів сої проводили в 10% розділяючому поліакриламідному гелі, в трис-гліциновому буфері (рН 8,3) за методом Лемлі (Laemmli, 1970). Забарвлені та відмиті гелі денситометривали на приладі "Multiphor II LKB" (Швеція).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

1. Особливості дії гідролітичних ферментних комплексів на вуглеводні компоненти соєвого шроту.

Ефективність ферментативного гідролізу природних полісубстратів залежить як від компонентного складу ферментних комплексів і співвідношення їх активностей [Клесов, 1987; Рязанова, 1993], так і конформаційної відповідності їх до структури субстрату [Измайлова, 1974, 1988]. Проведений нами скринінг досліджуваних ферментних комплексів і на його основі кореляційний аналіз залежності значень операційної активності від відповідних значень активностей компонентів комплексу вказує

на значний вклад пектолітичних та ксиланолітичних ферментів в процес ферментативного розщеплення соєвого шроту (табл.1).

Таблиця 1.

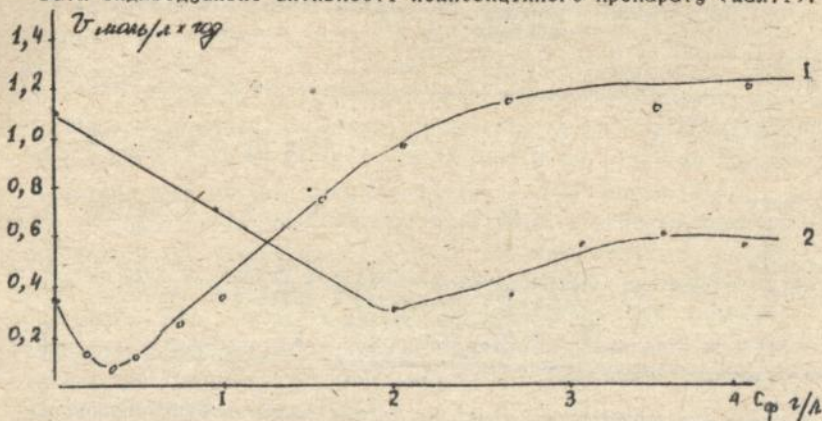
Значення коефіцієнту кореляції між операційною (по відновлюючим цукрам) активністю, глибиною гідролізу та індивідуальними активностями ферментних комплексів.

№ п/п	Індивідуальні активності	Коефіцієнт кореляції з	
		Операційною активністю	Глибиною гідролізу
1. Целюлазні активності:			
	Загальна целюлаза	0,72	0,86
	Ендоглюканаза (КФ 3.2.1.4)	0,91	0,92
	Екзоглюкозидаза (КФ 3.2.1.74)	0,96	0,86
	Целобіогідролаза (КФ 3.2.1.91)	0,93	0,91
	Целобіаза (КФ 3.2.1.21)	0,97	0,88
2. Пектиназні активності:			
	Загальна пектолітична	0,99	0,94
	Екзополігалактуроноаза (КФ 3.2.1.67)	0,93	0,93
	Пектинестераза (КФ 3.2.1.11)	0,75	0,85
	Ендополігалактуроноаза (КФ 3.2.1.15)	0,98	0,90
3. Загальна ксиланазна активність		0,98	0,64
4. Операційна активність		1,00	0,95

Максимальне значення коефіцієнту кореляції відповідало значенням пектолітичної, ендополігалактуроноазної та ксиланазної активностей комплексів (коефіцієнт кореляції 0,99, 0,98 та 0,98 відповідно). Така ж тенденція спостерігалась і при визначенні коефіцієнту кореляції між глибиною гідролізу і значеннями індивідуальних активностей компонентів комплексів.

Для з'ясування особливостей дії компонентів ферментних комплексів на вуглеводні складові соєвого шроту нами було проведено дослідження швидкості його гідролізу під дією компо-

зиційного ферментного препарату. Ця композиція складалась з двох ферментних препаратів, які мали однаковий ступінь очистки і відрізнялися за специфічністю дії на полімерний субстрат, а саме: целюлолітичний фермент Целовіридин ГЗХ та пектолітичний - Пектофоетидин ГЗХ. Зміна концентрації одного ферментного комплексу при постійній концентрації другого дозволяла регулювати індивідуальні активності композиційного препарату (мал.1).



Мал. 1. Залежність початкової швидкості накопичення редукувальних цукрів від концентрації ферментних комплексів при гідролізі соєвого шроту; 1 - Пектофоетидин ГЗХ при наявності Целовіридину ГЗХ (0,3 г/л); 2 - Целовіридин ГЗХ при наявності Пектофоетидину ГЗХ (2 г/л).

Отримана нами складна залежність початкової швидкості від співвідношення концентрацій може бути пов'язана як з відмінностями в індивідуальних активностях гідролаз, так і різною здатністю ферментів до адсорбції [Клесов, 1987; Wood, 1989; Березин, 1990; Головченко, 1992].

Подальшою нашою метою було вивчення адсорбційних характеристик композиційного препарату. Встановлено, що целюлолітичні ферменти, які входять до його складу представлені як міцно, так і слабо сорбованими фракціями, тоді як пектолітичні ферменти практично не адсорбуються на субстраті (табл.2). Крім того, фракція ферментів, яка слабо сорбується, приблизно в 5 разів

Таблиця 2.

Активності композиційного ферментного препарату (0,3 г/л Целовіридину ГЗХ та 1 г/л Пектофоетидину ГЗХ) та його фракцій з різною адсорбційною здатністю (од.акт/г)

Активність Фракції ферментного комплексу	Загальна целюлазна	Пектолітична	Операційна
Вихідний препарат до адсорбції на субстраті	2,70±0,10	11,10±0,60	0,60±0,10
Фракція, що слабо сорбується	1,50±0,30	11,40±0,30	0,50±0,05
Фракція, що міцно сорбується	Арифметична різниця дії композиційного препарату і фракції, що слабо сорбується 1,20±0,20		0,10±0,02
		0	

активніша, ніж фракція, що міцно адсорбується по відношенню до досліджуваного полісубстрату. Низька активність ферментів, що міцно сорбуються може бути обумовлена їхньою незначною дифузєю з матриці нерозчинного субстрату [Синицин, 1987]. На наш погляд, більшу ефективність дії ферментів, що слабо сорбуються можна пояснити досить широкою специфічністю пектолітичних ферментів та особливостями структури досліджуваного полісубстрату: наявністю аморфних ділянок целюлози і значної кількості пектину (до 5%) і геміцелюлози (до 10%), для ферментативного розщеплення яких необхідна присутність цієї фракції ферментів.

Результати дослідження адсорбційної здатності разом з кореляційним аналізом дозволяють припустити значно більший вклад пектолітичних ферментів порівняно з іншими карбогідразами в процес деградації соєвого шроту і пояснити отриману нами складну залежність при використанні композиційного препарату.

2. Вплив поверхнево-активних речовин (ПАР) різної природи на активність гідролаз і ефективність гідролізу соєвого шроту.

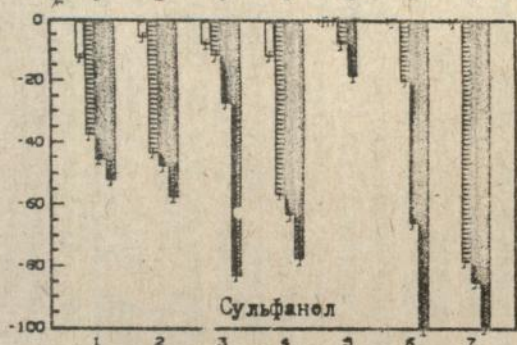
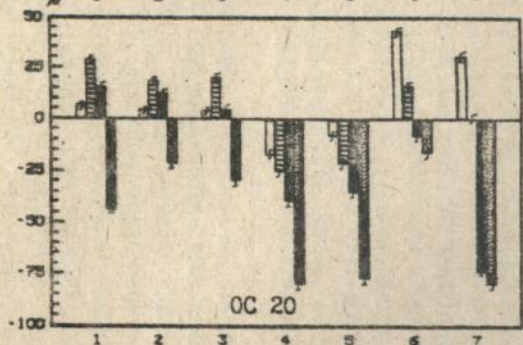
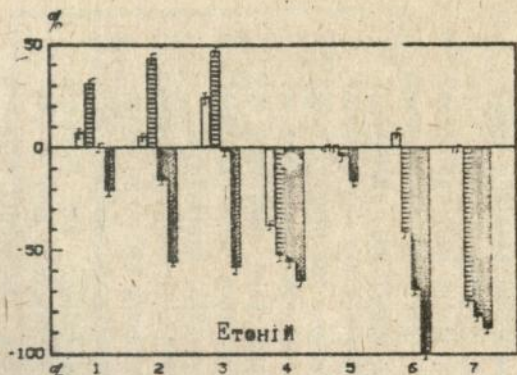
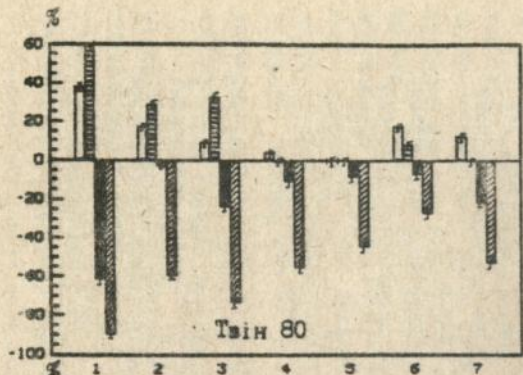
Ферментативна активність і адсорбційна здатність компонентів ферментних комплексів може значно змінюватися під дією поверхнево-активних речовин (ПАР). Відносно малі (до 0,15%) концентрації неіоногенних (Твін 80 і ОС 20) ПАР підвищували целюлазну, пектиназну, протеїназну та операційні активності гідролазного комплексу (мал.2 А,Б). Незначне збільшення ксиланазної активності спостерігалось тільки в присутності 0,05% Твін 80. Підвищення активностей можна пояснити збільшенням реакційної здатності субстрату внаслідок його часткової солубілізації [Измайлова,1974,1988] та зміною конформаційної структури ферменту під дією ПАР [Ooshima,1986; Hagen,1990].

Подальше збільшення концентрації ПАР в системі понижувало ферментативну активність гідролаз. Зниження КМЦ-азної активності спостерігалось на всьому інтервалі досліджуваних концентрацій ПАР. Ймовірно високі концентрації ПАР блокують субстрати і перешкоджають ефективному зв'язуванню його з ферментом. Не виключається також можливість інактивації ферменту високими концентраціями ПАР.

Аналогічна картина спостерігалась при дії катіонної ПАР - етонію. Малі концентрації підвищували, а високі значно понижували ферментативну активність гідролаз (мал.2 В).

У випадку з аніонногенною ПАР - цільфанолом - відбувалося зниження індивідуальних і операційних активностей незалежно від концентрації її в середовищі (мал.2 Г). Отриманий ефект може бути зумовлений специфічністю дії ПАР аніонногенної природи, що проявляється в дестабілізації і повній інактивації ферменту.

Результати кореляційного аналізу показують збільшення ролі целюлаз при ферментативному гідролізі соєвого шроту в присутності ПАР неіоногенної і катіонної природи (табл.3). Найбільший коефіцієнт кореляції між операційною та індивідуальними активностями гідролаз спостерігався для значень пектиназної ($r=0,96-0,99$) та целюлазної ($r=0,95-0,99$) активностей. Це може бути обумовлено зміною адсорбційних характеристик целюлаз в присутності ПАР. Проведені нами дослідження показали,



Мал. 2. Зміна ферментативної активності під дією PAR (%): 1 - операційна (по ВЦ), 2 - целюлазна, 3 - пектиназна, 4 - ксиланазна, 5 - КМЦ-азна, 6 - операційна протеїназна, 7 - протеїназна;

□ - 0,05%, ▨ - 0,15%, ■ - 0,3%, ▩ - 1% PAR.

Таблиця 3.

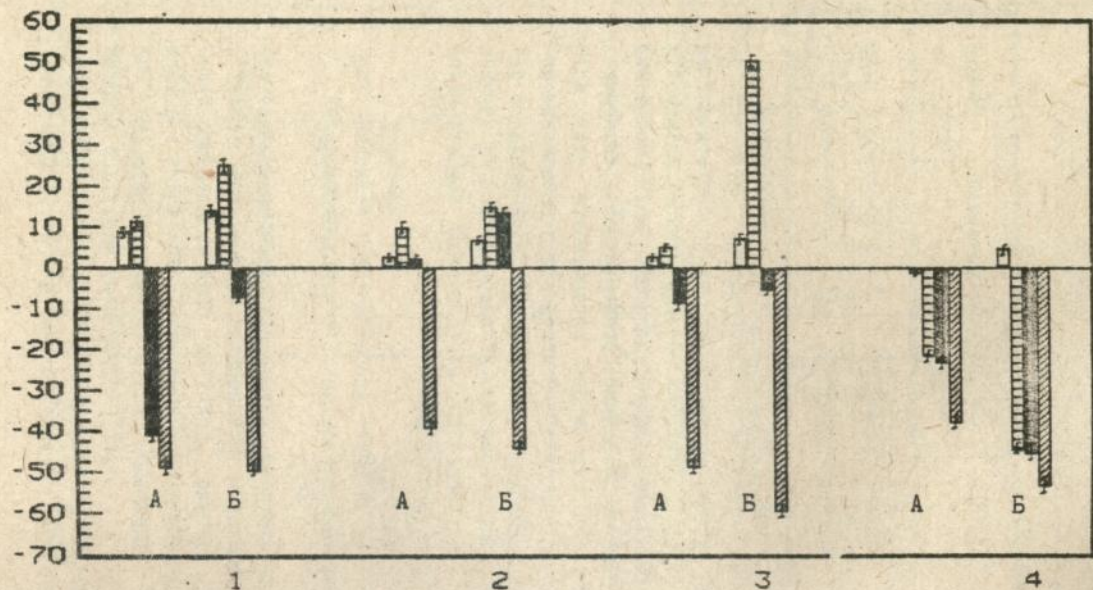
Значення коефіцієнту кореляції між операційними та індивідуальними активностями ферментного комплексу Целовіридин ГЗХ при дії ПАР різної природи.

ПАР / Активність	Твін 80	ОС 20	Сульфанол	Етоній
Целюлазна	0,96	0,95	0,99	0,99
Пектиназна	0,99	0,99	0,99	0,96
Ксиланазна	0,91	0,88	0,99	0,49

що під впливом ПАР відбувається збільшення активності як фракцій, які міцно сорбуються, так і тих, що сорбуються слабо (мал.3). Однак, ефект збільшення ферментативної активності значно більше виражений для фракції целюлаз, які сорбуються слабо. Нерівномірність в збільшенні ферментативної активності між фракціями, що слабо та міцно адсорбуються може бути пов'язана із зміною адсорбційного балансу між компонентами целюлазного комплексу. Отримані нами результати вказують на те, що вплив ПАР на ферментативний процес відбувається за рахунок зміни індивідуальних активностей і адсорбційних характеристик ферментів гідролазного комплексу.

3. Аналіз кількісних та якісних характеристик білкових Ізолятів, що отримані при ферментації та в присутності ПАР.

Гідролітичне розщеплення вуглеводів під дією досліджуваних ферментних препаратів підвищувало кількісний вихід і чистоту білкового Ізоляту. Найбільш ефективним було використання технічного ферментного препарату Целовіридин ГЗХ. При його застосуванні кількісний вихід білка зростав на 26% (мал.4). Вміст білка в Ізоляті, отриманому внаслідок ферментації Целовіридином ГЗХ збільшувався до 91%, тоді як без ферментації він досягав 80%. Збільшення виходу і чистоти білково-

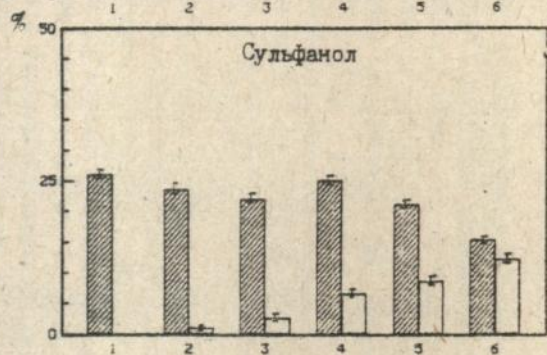
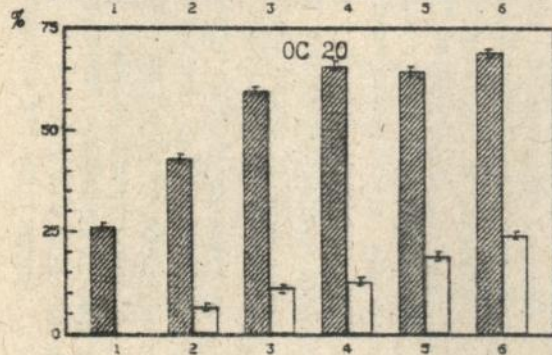
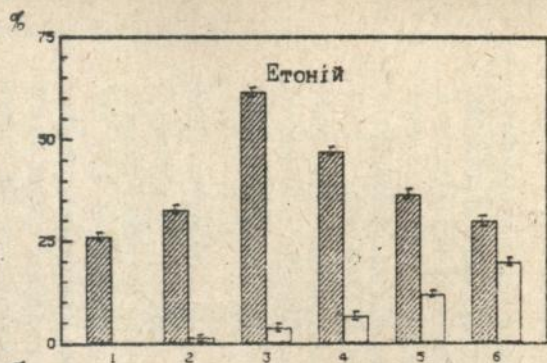
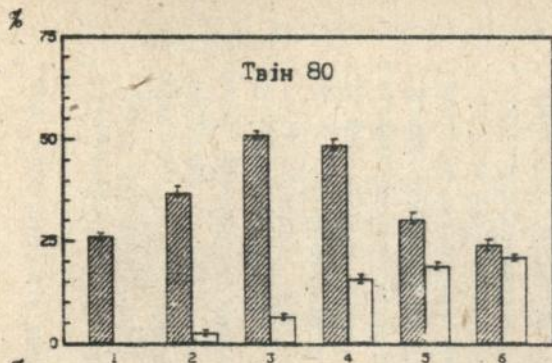


Мал. 3. Зміна ферментативної активності міцно та слабо адсорбованих фракцій целюлаз під дією ПАР (%):

A - фракція, що міцно адсорбується; Б - фракція, що слабо адсорбується;

1 - Твін 80, 2 - ОС 20, 3 - етоній, 4 - сульфаноїл;

□ - 0,05%, ▨ - 0,15%, ■ - 0,3%, ▩ - 1% ПАР.



Мал. 4. Вихід білка з м'яса при ферментативній обробці Целовіридином ГЗХ (%):
 1 - без ПАР, 2 - 0,05%, 3 - 0,15%, 4 - 0,3%, 5 - 0,5%, 6 - 1% ПАР,

▨ - при ферментативній обробці з ПАР,
 □ - без ферментативній обробці з ПАР.

го препарату можна пояснити ліквідацією стеричних перешкод-
жень, створених високомолекулярними вуглеводами соєвого шроту
та гідролізом зв'язків між пектинподібними полісахаридами та
білками сої.

Крім того на кількісний і якісний склад білкових ізолятів
може впливати обов'язкова наявність в гідролітичних препаратах
протеазних компонентів. У випадку ферментації препаратами з
низькою активністю протеаз електрофореграми білків практично
не відрізняються. При застосуванні ферментних комплексів з
досить високою протеазною активністю (Пектиназа 500)
спостерігалось помітне зменшення кількості високомолекулярних
білків з масами від 45 до 80 кД. Після проведення повторного
гідролізу шроту знижувався вміст білків з молекулярними масами
до 30 кД.

Використання в процесі ферментації поверхнево-активних
сполук додатково збільшувало кількісний вихід і покращувало
якісні характеристики: чистоту і розчинність білкового ізоляту
сої. Отриманий ефект можна пояснити як сольбілізуючою дією ПАР
на субстрат, так і безпосередньою дією на фермент та фер-
мент-субстратну взаємодію. Збільшення кількісного виходу білка
було властиво для всіх груп ПАР і спостерігалось на всьому
інтервалі досліджуваних концентрацій (мал.4). Однак, проведені
нами контрольні експерименти по визначенню сольбілізуючої дії
ПАР на субстрат показали, що досить значне збільшення білково-
го виходу при високих концентраціях ПАР обумовлено ефектами
впливу ПАР на вуглеводні та білкові компоненти соєвого шроту.
При оптимальних для дії гідролітичних ферментних комплексів
концентраціях ПАР (0,15% для Твін 80 і етонію та 0,3% для ОС
20) вихід білкового продукту додатково збільшувався на 19, 30
та 27% для Твін 80, ОС 20 та етонію відповідно. Сумарне збіль-
шення білкового виходу при ферментації з ПАР неіоногенної та
катионної природи складало 45-56%. Подальше підвищення кон-
центрації ПАР в середовищі було неефективним для дії ферменту,
а вихід білка збільшувався за рахунок сольбілізуючої дії самих
ПАР на субстрат. Застосування аніонної ПАР (сульфанолу) в фер-
ментативному процесі понижувало білковий вихід порівняно з
контролем, де ПАР була відсутня.

Крім того, використання ПАР незалежно від іоногенної при-

Таблиця 4.
Вміст форм азоту та білка в соєвому білковому ізоляті
(в % на повітряно - суху речовину)

n=6

ПАР	№	Загальний азот	Небілковий азот	Білок
Т - 80	1	13,00 ± 0,12	1,05 ± 0,04	74,69 ± 0,35
	2	15,51 ± 0,04*	1,21 ± 0,17*	76,88 ± 0,34*
	3	15,73 ± 0,32*	1,23 ± 0,09*	89,39 ± 0,17*
	4	16,54 ± 0,15*	1,64 ± 0,07*	93,13 ± 0,21*
	5	15,86 ± 0,24	1,25 ± 0,14	91,30 ± 0,25
	6	17,08 ± 0,07**	1,61 ± 0,21	96,69 ± 0,29**
	7	17,27 ± 0,01**	1,72 ± 0,09**	97,19 ± 0,13**
	8	13,54 ± 0,23**	1,93 ± 0,17**	72,54 ± 0,22
ОС - 20	1	13,00 ± 0,09	1,05 ± 0,02	74,69 ± 0,19
	2	13,90 ± 0,07*	1,28 ± 0,11	79,92 ± 0,25*
	3	14,92 ± 0,13*	1,40 ± 0,09*	84,50 ± 0,21*
	4	15,57 ± 0,21*	1,40 ± 0,13*	86,19 ± 0,34*
	5	15,89 ± 0,05	1,25 ± 0,17	91,30 ± 0,29
	6	16,71 ± 0,18**	1,23 ± 0,23	96,73 ± 0,18
	7	16,46 ± 0,26	1,37 ± 0,07	94,31 ± 0,23**
	8	15,32 ± 0,31	1,42 ± 0,21	90,02 ± 0,20**
е т о н і й	1	13,00 ± 0,21	1,05 ± 0,09	74,69 ± 0,54
	2	13,95 ± 0,27	1,12 ± 0,03	80,19 ± 0,21*
	3	13,27 ± 0,06	0,96 ± 0,11	81,34 ± 0,43*
	4	12,18 ± 0,14	1,01 ± 0,01	81,80 ± 0,24*
	5	15,86 ± 0,32	1,25 ± 0,06	91,30 ± 0,37
	6	16,89 ± 0,28	1,31 ± 0,23	97,41 ± 0,27**
	7	15,62 ± 0,14	1,28 ± 0,09	89,63 ± 0,28**
	8	14,52 ± 0,17	1,16 ± 0,14	83,52 ± 0,23
с у л ь ф а н о л	1	13,00 ± 0,11	1,05 ± 0,07	74,69 ± 0,23
	2	12,69 ± 0,26	0,63 ± 0,03*	75,40 ± 0,31
	3	12,59 ± 0,09	0,81 ± 0,10	73,66 ± 0,22
	4	12,45 ± 0,12	0,61 ± 0,06	74,02 ± 0,28
	5	15,86 ± 0,07**	1,25 ± 0,13	91,30 ± 0,34
	6	13,86 ± 0,29**	1,25 ± 0,11	78,91 ± 0,23**
	7	12,98 ± 0,42**	0,85 ± 0,04**	75,83 ± 0,19**
	8	12,35 ± 0,21	0,88 ± 0,17	74,67 ± 0,20**

Примітка: Склад реакційної суміші: 1 - без фермента і ПАР (контроль 1); 2 - без фермента з 0,05% ПАР; 3 - без фермента з 0,15% ПАР; 4 - без фермента з 0,3% ПАР; 5 - з ферментом без ПАР (контроль 2); 6 - з ферментом і з 0,05% ПАР; 7 - з ферментом і з 0,15% ПАР; 8 - з ферментом і з 0,3% ПАР.
* - різниця між контролем 1 та дослідями 2, 3, 4;
** - різниця між контролем 2 та дослідями 6, 7, 8 достовірна (P<0,05).

Таблиця 5.
Розподіл білкових фракцій в білковому ізоляті

(в % від загальної кількості).

n=6

ПАР	No	альбуміни	глобуліни		глітеліни
			важкорозчинні	легкорозчинні	
Т - 80	1	8,42±0,23	67,05±0,18	7,85±0,64	16,64±0,49
	2	9,79±0,37*	65,63±0,29*	7,95±0,24*	16,66±0,51
	3	11,02±0,41*	63,94±0,40*	9,63±0,41*	16,41±0,38
	4	13,28±0,48*	61,64±0,37*	9,60±0,38*	15,42±0,21*
	5	8,28±0,51	68,41±0,37	7,25±0,52	15,48±0,47
	6	12,85±0,28**	61,35±0,24**	9,25±0,61**	15,37±0,34
	7	12,66±0,34**	61,17±0,37**	9,98±0,27**	16,19±0,27
	8	11,03±0,48**	61,29±0,31**	10,34±0,38**	15,94±0,19
0С - 20	1	8,42±0,23	67,01±0,18	7,85±0,64	16,64±0,49
	2	8,54±0,27	66,88±0,34	8,61±0,61	15,97±0,24
	3	9,12±0,32	65,83±0,52	9,07±0,59	15,98±0,37
	4	10,71±0,37*	64,79±0,61*	10,47±0,47*	14,03±0,41*
	5	8,28±0,51	68,41±0,37	7,85±0,52	15,48±0,47
	6	10,21±0,11**	64,53±0,17**	8,98±0,23	16,28±0,31
	7	11,54±0,21**	64,97±0,36**	9,34±0,47	14,35±0,28
	8	12,41±0,14**	61,97±0,54**	10,21±0,64**	15,41±0,14
е т о н і й	1	8,42±0,23	67,05±0,18	7,85±0,64	16,64±0,49
	2	10,77±0,41*	65,82±0,26*	7,36±0,44	16,05±0,13
	3	12,14±0,37*	63,62±0,35*	8,11±0,18	16,13±0,41
	4	13,96±0,62*	63,36±0,68*	8,45±0,57	16,97±0,67
	5	8,28±0,51	68,41±0,37	7,85±0,52	15,48±0,47
	6	12,20±0,47**	63,40±0,25**	8,31±0,36	16,09±0,43
	7	13,34±0,34**	61,54±0,29**	9,99±0,21**	15,13±0,24
	8	13,99±0,37**	61,03±0,52**	9,98±0,46**	15,00±0,52
с у л ь Ф а н о л	1	8,42±0,23	67,05±0,18	7,85±0,64	16,64±0,49
	2	8,15±0,21	67,33±0,29	8,15±0,41	16,37±0,47
	3	8,50±0,34	67,60±0,11	7,98±0,37	15,92±0,32
	4	8,52±0,25	65,01±0,34*	9,84±0,52*	16,63±0,64
	5	8,28±0,51	68,41±0,37	7,85±0,52	15,48±0,47
	6	8,52±0,40	67,72±0,39	7,83±0,34	15,93±0,18
	7	8,43±0,31	67,53±0,42	9,13±0,51	15,19±0,32
	8	8,69±0,18	65,12±0,27**	9,74±0,37**	16,45±0,28

Примітка: Позначення такі ж, як в табл.4.

роди збільшувало кількісний вміст білка в білковому ізоляті, отриманому як ферментативним, так і неферментативним шляхом (табл.4). Однак при ферментації цей ефект був значно менш вираженим. Максимум спостерігався при 0,05% концентраціях ОС 20 і етонію та 0,15% Твін 80 і складав 96, 97 та 97% білка відповідно. Аніоногенна сполука сульфанола знижувала чистоту білкового ізоляту порівняно з контролем, де ферментація відбувалася у відсутності ПАР.

Аналіз якісних характеристик білкових ізолятів показує, що застосування ПАР сприяє підвищенню розчинності білку, яка значно погіршується за рахунок фізико-хімічної обробки насіння сої при переробці його на олію. При застосуванні неіоногенних та катіонних ПАР спостерігалось достовірне збільшення кількості альбумінів та легкорозчинних глобулінів, що ймовірно обумовлено відновленням структури та властивостей білків під дією ПАР (табл.5).

Таким чином, застосування ПАР неіоногенної (Твін 80, ОС 20) та катіонної (етоній) природи збільшує кількісний вихід і покращує якісний склад білкових ізолятів, отриманих ферментативним шляхом.

ЗАКЛЮЧЕННЯ

При ферментативному розщепленні в біогетерогенних системах визначається інтегруючий ефект величезної кількості процесів, взаємозв'язок яких обумовлює складні регуляторні стосунки між її компонентами. Дослідження в цьому напрямку сприяють формуванню нових поглядів на природу ферментативного каталізу, створенню теоретичних аспектів дії поліферментних систем. Важливим етапом подібних розробок є вивчення закономірностей ферментативної деградації відповідних біополімерів.

Проведені нами дослідження підтверджують уявлення про те, що ефективність ферментативного гідролізу природної целюлозовмісної сировини залежить від компонентного складу ферментного комплексу і його відповідності структурі субстрату. Значну роль відіграють також адсорбційні характеристики компонентів ферментних комплексів.

При застосуванні композиційного ферментного препарату, який дозволяв змінювати співвідношення його компонентів як за індивідуальними активностями, так і за адсорбційною здатністю, нами було показано, що визначальну роль в ферментативному розщепленні соєвого шроту відіграють пектолітичні ферменти, які практично не адсорбуються на субстраті. Однак при проведенні ферментативного процесу в присутності відносно низьких концентрацій неіоногенних та катіонних ПАР змінювався адсорбційний баланс між компонентами целюлазного комплексу, що приводило до збільшення їх ролі в ферментативному розщепленні досліджуваного полісубстрату. Таким чином, ефективність ферментативного розщеплення багатокомпонентних субстратів, елементи яких зв'язані між собою різними типами хімічного зв'язку визначається перш за все дією ферментів, що слабо сорбуються.

Значення цього явища можливо полягає в збільшенні реакційної здатності нерозчинного субстрату внаслідок часткової фрагментації його компонентів і підвищенні доступності певних частків субстрату для дії ферментів, що міцно сорбуються.

В роботі також продемонстровано, що характер дії ПАР на хід ферментативного процесу визначається модифікацією як субстратів, так і самих ферментів. Внаслідок впливу ПАР відбувалася не тільки зміна адсорбційних характеристик ферментного комплексу, але і його стабільності та індивідуальних активностей.

Крім того, дослідження гідролітичних ферментних комплексів, які розщеплюють вуглеводи показало, що їх застосування може значно збільшувати кількісний вихід білкового продукту із соєвого шроту. Цей ефект підсилювався при використанні ферментів в сукупності з ПАР неіоногенної і катіонної природи. При цьому покращувались його якісні характеристики: підвищувалась розчинність і чистота білкового ізоляту. Цей факт вказує на можливість отримання модифікованих білкових ізолятів з підвищеним вмістом білка.

В И С Н О В К И

1. Визначальну роль в сумарному процесі гідролізу вуглеводних компонентів соєвого шроту відіграють ферменти, які слабо адсорбуються на матриці нерозчинного субстрату: пектолітичні та слабо адсорбована фракція целюлазних компонентів.

2. Вплив ПАР на ферментативний процес залежить від іоногенної природи і концентрації її в реакційній суміші. При протіканні ферментативних реакцій у водних розчинах ПАР відбувається зміна індивідуальних активностей гідролаз і адсорбційних характеристик целюлаз. Невисокі концентрації (до 0,15%) досліджуваних неіонних (Твін 80, ОС 20) та катіонних (етоні) ПАР підвищують активності пектолітичних, протеолітичних та целлюлолітичних ферментів, а також змінюють адсорбційний баланс целюлаз в напрямку фракцій, що слабо адсорбуються. Аніонні (сульфанол) та високі концентрації досліджуваних ПАР пригнічують дію гідролітичних ферментів.
3. Застосування гідролітичних ферментних комплексів підвищує кількісний вихід білкового ізоляту на 26%, при ферментації з оптимальними концентраціями неіоногенних (0,15% Твін 80, 0,3% ОС 20) та катіонних (0,3% етоні) ПАР - на 45, 56, 51% відповідно.
4. Використання ПАР при ферментації покращує якісні характеристики (чистоту та розчинність) білкового продукту. Вміст білка в ізоляті зростає на 11% при ферментації без ПАР та на 16-17% - з ПАР неіоногенної та катіонної природи.
5. Присутність протеїназ в гідролітичних ферментних комплексах, що розщеплюють вуглеводи змінює компонентний склад білкових ізолятів. При досить високій протеїназній активності карбогідраз спостерігається зменшення кількості високомолекулярних білків з молекулярними масами від 45 до 80 кД, а при значній тривалості процесу - з молекулярною масою до 30 кД, що погіршує їх осаджування.
6. Отримані результати можуть бути використані при розробці високоефективних технологічних схем отримання білкового ізоляту і створенні замкнутих безвідходних виробництв по переробці соєвого насіння.

СПИСОК РОБІТ, НАДРУКОВАНИХ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Костышин С.С., Мошкович Ф.С., Куцак (Грохольская) И.А. Гидролиз соевого шрота ферментными комплексами. 1. Особенности действия целлюлаз и пектиназ // Ферменты микроорганизмов. - М.:

Всес.научно-исслед.ин-т генетики и селекции микроорганизмов, 1989.- Ч.1.- С.100-109.

2. Мошкович Ф.С., Костишин С.С., Куцак (Грохольская) М.А., Копыльчук Г.П. Гидролиз соевого шрота ферментными комплексами, содержащими целлюлазы и пектиназы. П. Влияние протеолитических ферментов// Ферменты микроорганизмов и деградация биополимеров.- М.: Всес.научно-исслед.ин-т генетики и селекции микроорганизмов, 1990.- С. 69-76.

3. Мошкович Ф.С., Наумчук П.Л., Куцак (Грохольская) М.А., Свєрбєвус Я.А. О возможности применения ферментных препаратов для создания безотходной технологии производства пищевого белка// Пути повышения продуктивности, эффективности использования и охраны природных ресурсов украинских Карпат и Прикарпатья.- Киев: УМК ВО, 1989.- С.90-97.

4. Костишин С.С., Куцак (Грохольская) М.А., Мошкович Ф.С. Гидролиз соевого шрота ферментными комплексами, содержащими целлюлазы и пектиназы. 3. Влияние ПАВ на активность гидролаз// Биотехнология.- 1992.- N 5.- С. 97-99.

5. Куцак (Грохольская) М.А., Костишин С.С., Мошкович Ф.С., Прокопчук О.В. Влияние ПАВ на ферментативный гидролиз соевого шрота// Тез. докл. всесоюз. науч. конф. "Достижения биотехнологии - агропромышленному комплексу". - Черновцы, 1991.- Т.1., С.128.

6. Куцак (Грохольська) М.А., Костишин С.С., Мошкович Ф.С. Вплив ПАВ на гідролітичну активність ферментів і якісний склад білкових ізолятів// Тез. доп. VI Укр. біох. з'їзду.- Київ, 1992.- Ч.1. - С. 125.

7. Куцак (Грохольська) М.А., Костишин С.С. Використання ПАВ при ферментативному гідролізі целюлозовмісної сировини у безвідходному виробництві // Тез. доп. міжнародної конференції "Навколишнє середовище і здоров'я". - Чернівці, 1993. - С.285.

8. Авторское свидетельство СССР N 1571820, 1988.

А. Мошкович

Підписано до друку 15.02.94.
Формат 60x84/16. Папір друкарський №2.
Офсетний друк. Ум. друк. аркушів 0,93.
Обл.-вид. аркушів 1,0. Замовлення 037.
Тираж 100. Безплатно

Лабораторія копівально-розмножувального друку
Чернівецького державного університету

м. Чернівці, вул. Коцюбинського 2

AB 29.246