

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ, МОЛОДІ ТА СПОРТУ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Капустян Антоніна Іванівна



УДК 613.292 – 021.632:[577.17:577.144.4]

**ТЕХНОЛОГІЯ ПРОТЕАЗ, ІММОБІЛІЗОВАНИХ
В ХІТОЗАН-ПЕКТИНОВИЙ КОМПЛЕКС**

Спеціальність 03.00.20 – біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата технічних наук

Одеса – 2012

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Одеській національній академії харчових технологій
Міністерства освіти і науки України.

Науковий керівник – доктор технічних наук, професор,
заслужений діяч науки і техніки України
Черно Наталія Кирилівна,
Одеська національна академія харчових технологій,
кафедра харчової хімії,
завідувач кафедри.

Офіційні опоненти: – доктор біологічних наук, професор,
Юкало Володимир Глібович,
Тернопільський державний технічний університет
ім. І. Пулюя,
кафедра харчової біотехнології і хімії,
завідувач кафедри, декан факультету переробних і
харчових виробництв;

– доктор технічних наук, професор,
Безусов Анатолій Тимофійович,
Одеська національна академія харчових технологій,
кафедра біотехнології, консервованих продуктів і
напоїв, завідувач кафедри.

Захист відбудеться *4 квітня о 10³⁰* на засіданні спеціалізованої вченої ради
Д 41.088.02 в Одеській національній академії харчових технологій за
адресою: 65039, м. Одеса, вул. Канатна, 112 в ауд. А-234.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Одеської національної
академії харчових технологій за адресою: 65039, м. Одеса, вул. Канатна, 112.

Автореферат розісланий *28 лютого 2012 р.*

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
д.т.н., професор



Г.М. Станкевич

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Ритм життя, структура харчування, стресові екологічні навантаження, характерні для населення України ХХІ століття, визначають різке збільшення частоти проявів алергічних реакцій, зниження активності імунної системи, порушення метаболічних процесів організму.

В останні роки статус епідеміологічних отримали захворювання серцево-судинної системи, діабет, патології шлунково-кишкового тракту та ін. Так, наприклад, розповсюдженість хвороб травного тракту за останні 10 років зросла майже вдвічі. Більшість патологій шлунково-кишкового тракту супроводжуються «травною недостатністю» (переважно панкреатичною) – невідповідністю функціональних можливостей травної системи до пропонованих продуктів харчування; прояви недостатності травлення виявляють у 25 – 41 % населення. Це визначає необхідність компенсації нестачі травних ферментів, зокрема протеаз, шляхом їх додаткового перорального введення.

Актуальність теми. Ефективність застосування інтактних протеаз, як і інших ферментів, обмежена у зв'язку з їх рН- і термолабільністю, швидкою інактивацією, нестабільністю при зберіганні, автолізом, дією інгібіторів та ін. Фіксація (іммобілізація) ферментів на носіях дозволяє отримувати їх стабільні форми.

В даний час до перспективних форм іммобілізації різних біорегуляторів відносять полімерні системи, отримані за принципом поліелектролітного комплексоутворення, а також поліелектролітні мікрокапсули.

Використання природних полімерів при отриманні ферментовмісних поліелектролітних надмолекулярних систем дозволяє проводити іммобілізацію в м'яких умовах, забезпечує біосумісність з активною складовою, нетоксичність та біодеградованість.

Вищевикладене визначає актуальність досліджень, присвячених розробці технології виробництва дієтичних добавок – протеаз, іммобілізованих в інтерполіелектролітний комплекс (ШПЕК) хітозан-пектин і поліелектролітні мікрокапсули, які поєднують функціонально-фізіологічні властивості природних ентеросорбентів і протеолітичних ферментів пролонгованої дії.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота відповідає тематиці досліджень проблемної лабораторії Одеської національної академії харчових технологій 1/06-П «Розробка біотехнологічних процесів цільового спрямованого регулювання, функціональних, фізіологічних і технологічних властивостей харчових продуктів і БАД»; наказ Міністерства освіти й науки України № 654 від 16.11.2005р.; 1/09-П «Біополімери рослин як об'єкти хімічної і біологічної модифікації» (наказ Міністерства освіти і науки України № 1043 від 17.11.2008 р.; держбюджетній тематиці кафедри харчової хімії 2009-2010 рр. «Отримання й характеристика фітокомплексів біологічно активних речовин» і в 2011 р. – «Полісахариди і комплекси на їх основі як компоненти наносистем».

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було отримання та характеристика протеаз, іммобілізованих в інтерполіелектролітний комплекс

хітозан-пектин і поліелектролітні мікрокапсули, обґрунтування і розробка технології їх виробництва.

Для досягнення поставленої мети було визначено основні завдання дослідження:

- розробити умови отримання інтерполіелектролітного комплексу хітозан-пектин та надати його характеристики;
- вивчити ентеросорбційні властивості ІПЕК;
- обґрунтувати параметри іммобілізації протеаз в ІПЕК хітозан-пектин, надати характеристику фізико-хімічних властивостей іммобілізованих ферментів;
- визначити параметри процесу гідролізу казеїну іммобілізованим трипсином і хімотрипсином, дати характеристику їх поведінки при моделюванні умов шлунково-кишкового тракту;
- дослідити кінетику гідролізу казеїну іммобілізованим трипсином;
- провести іммобілізацію протеаз в поліелектролітні мікрокапсули та надати характеристику їх фізико-хімічних властивостей;
- обґрунтувати технологічні схеми виробництва протеаз, іммобілізованих в хітозан-пектиновий комплекс та поліелектролітні мікрокапсули;
- оптимізувати ключові параметри процесу іммобілізації протеаз в ІПЕК хітозан-пектин;
- провести промислову апробацію розробленої технології виробництва протеаз, іммобілізованих в ІПЕК;
- здійснити медико-біологічні та мікробіологічні дослідження іммобілізованих протеаз;
- розробити нормативну документацію на виробництво дієтичних добавок – протеаз, іммобілізованих в ІПЕК.

Об'єкт дослідження: технології іммобілізованих протеаз, дієтичні добавки з ферментативною активністю.

Предмет дослідження: інтерполіелектролітний комплекс хітозан-пектин; поліелектролітні мікрокапсули; іммобілізація ферментів; фізико-хімічні властивості іммобілізованих протеаз.

Методи дослідження: комплекс традиційних і сучасних біохімічних, фізико-хімічних, мікробіологічних та технологічних методів дослідження.

Наукова новизна отриманих результатів.

Обґрунтовано доцільність використання інтерполіелектролітного комплексу хітозан-пектин як матриці для іммобілізації протеаз.

Вперше отримано потрійні інтерполіелектролітні комплекси з протеолітичною активністю пектин-трипсин-хітозан та пектин-хімотрипсин-хітозан, визначено оптимальні параметри іммобілізації протеаз. Надано характеристику їх фізико-хімічних властивостей і медико-біологічну оцінку.

Розроблено спосіб іммобілізації протеаз шляхом включення до поліелектролітних мікрокапсул, отриманих шляхом почергової адсорбції хітозану і пектину на неорганічній матриці. Визначено умови іммобілізації трипсину і хімотрипсину в мікрокапсули. Розроблено технологію дієтичних добавок – протеаз, іммобілізованих в ІПЕК хітозан-пектин. Наукова новизна підтверджена трьома патентами України на корисну модель.

Практичне значення отриманих результатів. На підставі отриманих результатів розроблено технологічні схеми виробництва дієтичних добавок – протеаз, іммобілізованих в ПЕК хітозан-пектин і поліелектролітні мікрокапсули. Розроблено технічні умови на дієтичну добавку «Протеази, іммобілізовані в ПЕК» та технологічну інструкцію на її виробництво; технологія апробована на науково-виробничому підприємстві «Аріадна», м. Одеса.

Особистий внесок здобувача полягає в забезпеченні методичного оформлення роботи, виконанні аналітичної та експериментальної роботи, аналізі та узагальненні отриманих даних у вигляді формування висновків і рекомендацій, підготовці матеріалів досліджень до публікацій, розробці нормативної документації, промислової апробації розробленої технології

Апробація результатів дисертації. Основні результати досліджень доповідались та обговорювались на восьми наукових конференціях, зокрема: Міжвузівській науково-практичній конференції «Проблеми техніки і технології харчових виробництв», (Полтава, 2007 р., 2010 р.); II Міжнародній науково-практичній конференції «Харчові технології – 2006», (Одеса, 2006 р.); Міжнародній науковій конференції «Food science, engineering and technologies 2011», (Пловдів, 2011); Науковій конференції професорсько-викладацького складу ОНАХТ, (Одеса, 2011г.); Міжнародній науково-практичній конференції «Харчові технології – 2011», (Одеса, 2011г.); Міжнародній науково-практичній конференції «Прогресивна техніка та технології харчових виробництв, готельного, ресторанного господарств і торгівлі. Економічна стратегія і перспективи розвитку сфери торгівлі та послуг», ХДУХТ 2011 р; Всеросійській науково-практичній конференції «Актуальные проблемы потребительского рынка товаров и услуг», м. Кіров, 2011 р.

Публікації. Результати дисертації опубліковано в 16 друкованих роботах, з яких 6 статей у спеціалізованих виданнях, 3 патента України на корисну модель, 1 стаття в науковому журналі, тези 6 доповідей в матеріалах наукових та науково-практичних конференцій.

Сруктур і обсяг роботи. Дисертація складається зі вступу, 5 розділів, висновків, списку використаних літературних джерел та додатків. Дисертаційну роботу викладено на 118 сторінках основного тексту, вона містить 54 малюнка (20 сторінок), 21 таблицю (12 сторінок), 9 додатків(94 сторінки), список літературних джерел з 230 найменувань (20 сторінки).

У вступі викладено актуальність дисертаційної роботи, зв'язок роботи з науковими програмами, сформульовано мету і завдання досліджень, висвітлено наукову новизну і практичне значення результатів, їх апробацію. Визначено особистий внесок здобувача в проведених дослідженнях і публікаціях на тему роботи.

У першому розділі «Перспективи іммобілізації травних протеаз в поліелектролітні комплекси» розглянуто традиційні та сучасні методи іммобілізації біологічно активних речовин, відзначено пріоритетні методи та носії для іммобілізації травних протеаз. Зроблено висновок щодо перспективності використання поліелектролітних систем мембранного типу, як носіїв для іммобілізації ферментів.

У другому розділі «Матеріали і методи досліджень» викладено інформацію про матеріали і методи досліджень, розглянуто етапи отримання іммобілізованих протеаз. Схему досліджень наведено на рис. 1.

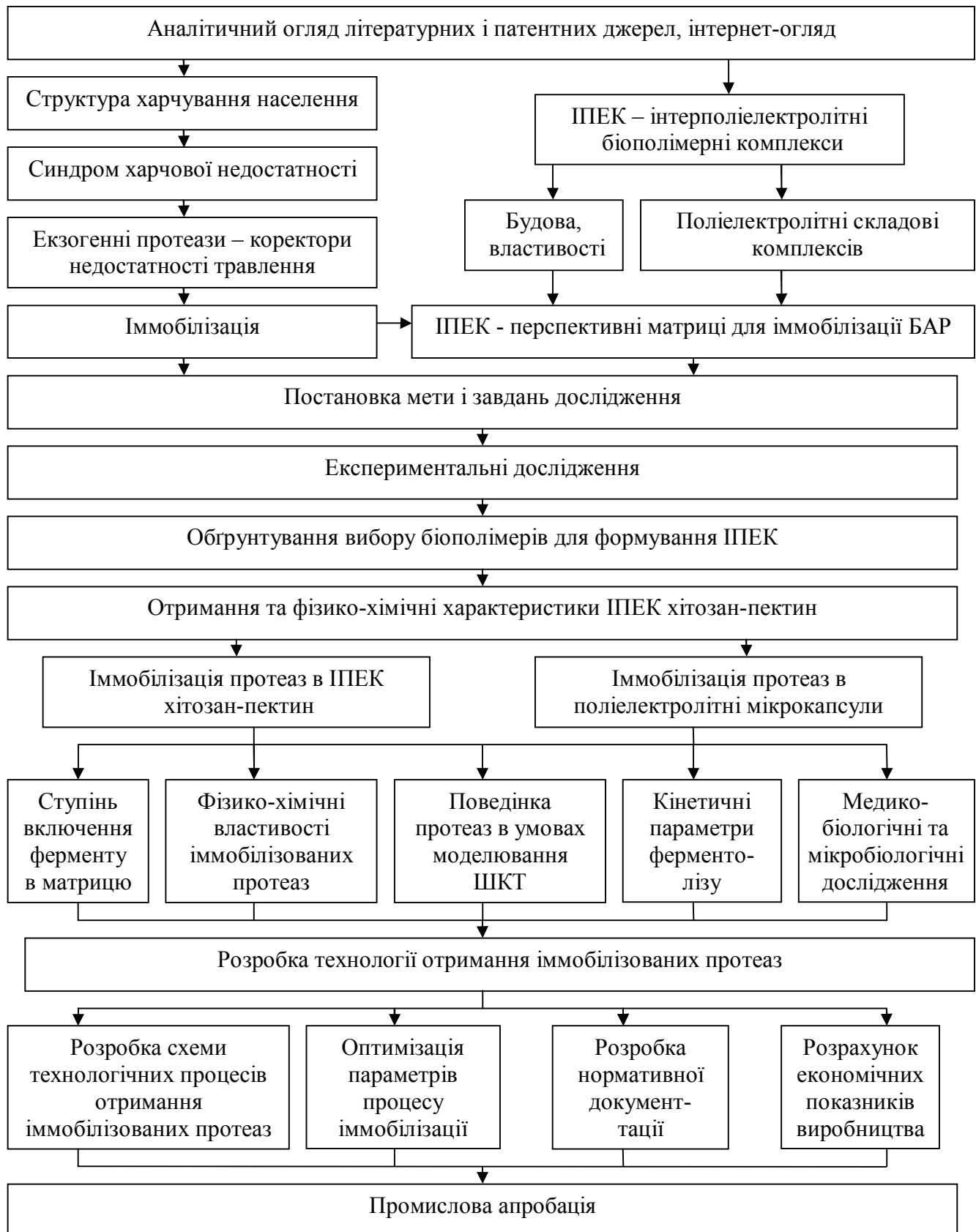


Рис. 1. Програма досліджень

Основну частину досліджень проведено в лабораторіях кафедри харчової хімії ОНАХТ, окремі дослідження виконувалися в лабораторії біохімії Одеського селекційно-генетичного інституту Національного центру насіннєзнавства УААН, в Українському науково-дослідному інституті медицини транспорту.

Наведено методи досліджень як загальнонаукові, так і специфічні (хімічні, біохімічні). Описано методи отримання поліелектролітних комплексів хітозан-трипсин (хімотрипсин)-пектин і поліелектролітних мікрокапсул, утворених пошаровою адсорбцією хітозану і пектину на CaCO_3 -частинках з іммобілізованим ферментом.

У третьому розділі «Отримання і характеристика інтерполіелектролітних комплексів хітозан-пектин» розглянуто можливість отримання ІПЕК на основі біополімерів, резистентних до дії травних ферментів, а саме хітозану (полікатион) з полісахаридами аніонної природи (карагінан, агар, пектин яблучний, пектин цитрусовий).

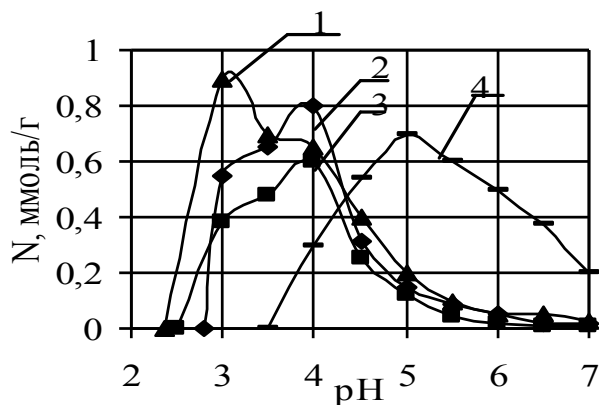


Рис.2. Залежність заряду полісахаридів від pH середовища: 1 - агар, 2 - пектин яблучний, 3 - пектин цитрусовий, 4 – карагінан.

значенні $\text{pH} = 4$, яке відповідає величині pH розчину хітозану в оцтовій кислоті.

Інтерполіелектролітні комплекси (ІПЕК) хітозану з пектином отримували шляхом поєднання їх водних розчинів. Варіювали концентрації біополімерів в розчині в інтервалі 0,25...2,0 %, і співвідношення хітозан : пектин від 1 : 4 до 4 : 1. Взаємодія хітозану з пектином супроводжувалась утворенням гетерогенної системи, в якій поєднувались рідка фаза і включення клубків гелеподібної структури.

Рідку фазу характеризували використовуючи методи віскозиметрії, нефелометрії, турбодиметрії. В'язкість досліджуваної рідкої фази (рис. 3а) більш ніж на 40 % перевищувала в'язкість розчинів вихідних полісахаридів, при цьому спостерігалось різке зменшення (на 50 %) показника світлопропускання (рис. 3б).

Радіус частинок рідкої фази комплексу становить $1023 \cdot 10^{-7} \text{ см}$ ($\text{pH} = 4,5$), а його складових хітозану і пектину – $321 \cdot 10^{-7} \text{ см}$ і $143,8 \cdot 10^{-7} \text{ см}$ відповідно. Це свідчить, що при взаємодії хітозану і пектину утворюються надмолекулярні системи – розчинні ІПЕК, які відрізняються за об'єктивними параметрами від вихідних компонентів.

Для прогнозування ефективності комплексоутворення хітозану зі вказаними аніонними полісахаридами, визначено їх заряди методом потенціометричного титрування (рис 2). На підставі даних експерименту зроблено висновок, що найбільш ефективною аніонною складовою комплексу по відношенню до хітозану є яблучний пектин, який має максимальний заряд ($N = 0,92 \text{ ммоль NaOH / г}$) при

Максимальний вихід нерозчинної складової комплексу має місце при поєднанні 0,5-відсоткових розчинів поліелектролітів та еквімолярному співвідношенні (1 : 1) функціональних груп в молекулах пектину і хітозану, що відповідає утворенню стехіометричного нерозчинного ІПЕК.

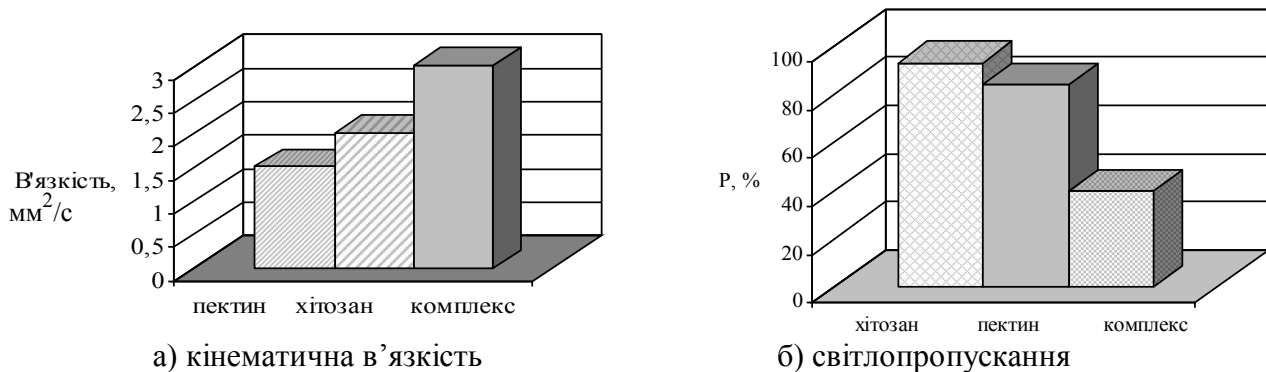


Рис. 3. Характеристика рідкої фази ІПЕК у порівнянні з розчинами пектину та хітозану

Отримані стехіометричні комплекси не розчиняються у воді навіть при сильному розведенні. При збільшенні іонної сили розчину до 4 система залишається гетерофазною.



Рис.4. Мікрофотографія нерозчинного ІПЕК хітозан-пектин

На рис. 4 зображено мікрофотографію нерозчинного ІПЕК хітозан-пектин, на якій спостерігаються ниткоподібні структури, не характерні для хітозану, пектину і розчинних комплексів. Нерозчинний ІПЕК характеризували використовуючи дериватографію, ІЧ-спектроскопію, оцінюючи внесок різних видів міжмолекулярних взаємодій в його утворенні.

На дериватограмах ІПЕК хітозан-пектин у порівнянні з механічною сумішшю полісахаридів (рис. 5) присутній додатковий екзоефект, який обумовлено руйнуванням зв'язків, що сформувалися при взаємодії полісахаридних складових.

Аналіз даних диференціальної ІЧ-спектроскопії показав, що спектр ІПЕК, порівняно зі спектрами вихідних полісахаридів, характеризується зниженням інтенсивності смуг (аміногрупи) і 1700 см⁻¹ (карбоксильні групи) і збільшенням при 2850 см⁻¹ (протоновані аміногрупи) і 1750 см⁻¹ (карбоксилат-аніони), що вказує на наявність електростатичної складової в

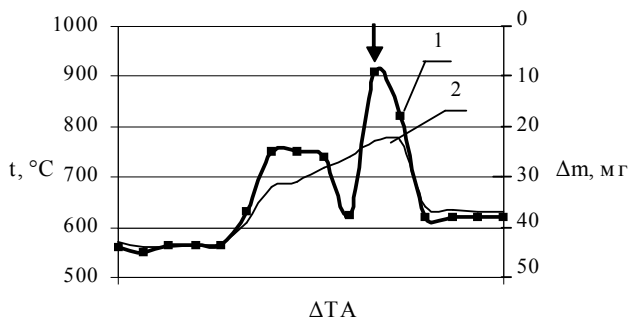


Рис. 5. Дериватограми:

1 – ІПЕК хітозан-пектин,

2 – механічна суміш хітозану з пектином

поглинання при 1620 см⁻¹ (аміногрупи) і збільшенням при 2850 см⁻¹ (протоновані аміногрупи) і 1750 см⁻¹ (карбоксилат-аніони), що вказує на наявність електростатичної складової в

стабілізації ІПЕК. Зменшення інтенсивності поглинання комплексу в області 3100 – 3400 см^{-1} , яка відповідає валентним коливанням вільних ОН-груп, свідчить про участь гідроксилів в системі водневих зв'язків.

Для кількісної оцінки внеску нековалентних міжмолекулярних взаємодій досліджували розчинність ІПЕК в системах, дію яких спрямовано на руйнування сил взаємодії різної природи. Встановлено, що у формуванні нерозчинних ІПЕК беруть участь електростатичні, водневі, гідрофобні взаємодії, доля яких становить 86 %, 8 % і 6 % відповідно.

Встановлено, що ІПЕК хітозан-пектин проявляє функціонально-фізіологічні властивості, притаманні природним ентеросорбентам (сорбція іонів свинцю – 33,5 мг/г, холевих кислот – 6,5 мг/г, ВУЗ – 6,2 г/г, ЖУЗ – 3,1 г/г), що свідчить про правомірність віднесення їх до категорії харчових волокон.

У четвертому розділі «Імобілізація протеаз в інтерполіелектролітні комплекси та мікрокапсули» наведено результати досліджень імобілізації трипсину і хімотрипсину в ІПЕК хітозан-пектин і поліелектролітні мікрокапсули, отримані почерговою адсорбцією біополімерів на неорганічній матриці (CaCO_3).

Встановлено, що закономірності імобілізації трипсину і хімотрипсину ідентичні, що обумовлено подібністю конформації їх макромолекул.

Комплекси, що володіють протеолітичною активністю, отримували послідовним поєднанням розчинів пектину, трипсину і хітозану, або пектину, хімотрипсину і хітозану. Концентрацію полісахаридів варіювали в інтервалі 0,5...2 %, ферментів – 0,25...1 %. Максимальне включення ферменту в ІПЕК мало місце при поєднанні 0,5-відсоткових розчинів полісахаридів і співвідношенні пектин : фермент : хітозан – 2 : 1 : 2. Встановлено, що імобілізація протеаз в ІПЕК сприяє значному збереженню їх активності (табл. 1).

Таблиця 1

**Активність імобілізованого трипсину в залежності від концентрацій компонентів комплексу у вихідних розчинах
(n = 3, p ≥ 0,95)**

Концентрація полісахаридів*, %	Концентрація трипсину, %	ПА, % від макс.
0,25	1,00	92,14
0,50	1,00	89,36
1,00	1,00	68,45
1,50	1,00	51,85
2,00	1,00	32,11
0,25	0,50	94,08
0,50	0,50	88,27
1,00	0,50	63,56
1,50	0,50	48,34
2,00	0,50	37,12
0,25	0,25	86,25
0,50	0,25	69,80
1,00	0,25	41,58

1,50	0,25	34,22
2,00	0,25	26,75

* – концентрація кожного з полісахаридів-комплексоутворювачів

Максимальне збереження активності (понад 90 %) має місце при використанні 0,25 і 0,50-відсоткових розчинів комплексоутворювачів, подальше збільшення концентрації полісахаридів призводить до зниження активності іммобілізованого трипсину. Аналогічна тенденція має місце при іммобілізації хімотрипсину. Деяке зменшення активності іммобілізованого трипсину обумовлено інгібуючою дією комплексу хітозан-пектин.

Збільшення K_m з одночасним зменшенням $V_{\max}$ при зростанні масової частки ІПЕК відносно ферменту (табл. 2) вказує на інгібування, яке проходить за змішаним типом. Значний вклад в інгібування вносить конкурентна складова змішаного інгібування. Таким чином для іммобілізації доцільно використання поліелектролітних матриць з масовою часткою по відношенню до ферменту – 65...75 %, яке забезпечує протікання реакцій гідролізу казеїну зі значеннями $V_{\max}$, близькими для значень каталізу вільним трипсином.

Таблиця 2

**Кінетичні параметри гідролізу казеїну іммобілізованим трипсином
(n = 3, p ≥ 0,95)**

Трипсин	Метод обробки даних експерименту				Значення складових константи змішаного інгібування		
	Лайнуівера – Берка		Хейнса		Конкурентна	Неконкурентна	Повна константа змішаного інгібування
	K_m , г/дм ³	$V_{\max}$, од/мг білка хв	K_m , г/дм ³	$V_{\max}$, од/мг білка хв			
Вільний	0,995	9,473	0,902	9,222	–	–	–
Трипсин іммобілізований в ІПЕК							
* $\omega_{\text{ІПЕК}}$ 66,6 %	1,619	9,158	1,682	9,521	6,66	56,54	6,67
$\omega_{\text{ІПЕК}}$ 74,5 %	1,765	9,275	1,587	8,721			
$\omega_{\text{ІПЕК}}$ 85,7 %	1,668	8,023	1,717	8,142			
$\omega_{\text{ІПЕК}}$ 88,6 %	1,595	7,541	1,574	7,461			
$\omega_{\text{ІПЕК}}$ 92,3 %	0,823	3,231	0,842	3,264		10,22	4,82
$\omega_{\text{ІПЕК}}$ 94,1 %	1,331	3,203	1,170	2,985			
$\omega_{\text{ІПЕК}}$ 95,2 %	2,984	3,470	1,791	2,839			

* - масова частка полісахаридної матриці у комплексі з ферментом

Показано, що іммобілізація протеаз в ІПЕК сприяє розширенню рН і термооптимумів їх дії: 80 % активності зберігається в діапазоні значень середовища рН = 6,0...8,4. Термооптими дії іммобілізованих ферментів відповідають фізіологічним значенням температур (36...37 °С).

Іммобілізація травних протеаз в ІПЕК значно підвищує їх стабільність, що проілюстровано нижче на прикладі трипсину (рис. 6, 7).

Наведені дані показують, що при експозиції вільного трипсину протягом 120 хв при рН = 2 зберігається лише 32 % його вихідної активності,

імобілізованого – 75 %; активність вільного трипсину при 80 °С протягом 120 хв знижується в 5,5 раз, імобілізованого – в 2,8. В аналогічних умовах (120 хв, pH = 2) збереження активності імобілізованого хімотрипсину становить 71 %, а при інкубації протягом 120 хв при 80°C його активність знижується в 3 рази.

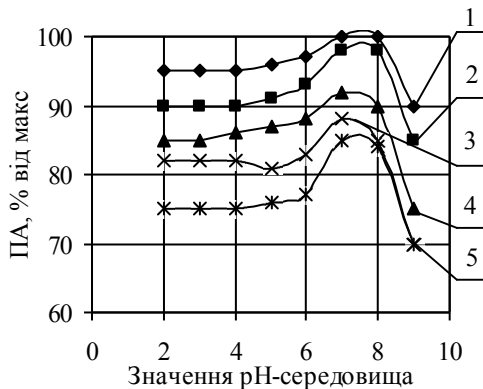


Рис. 6. pH-стабільність імобілізованого трипсину: 1 – 20 хв; 2 – 40 хв; 3 – 60 хв; 4 – 90 хв; 5 – 120 хв.

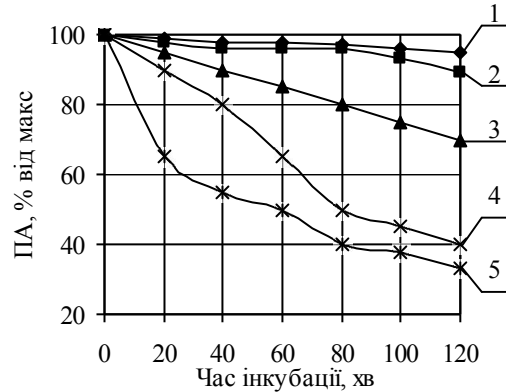


Рис. 7. Термостабільність імобілізованого трипсину: 1 – (20±2) °C; 2 – (37±2) °C; 3 – (50±2) °C; 4 – (65±2) °C; 5 – (80±2) °C.

Встановлено, що масова частка полісахаридів в комплексі впливає на динаміку накопичення низькомолекулярних продуктів гідролізу білка імобілізованими ферментами.

Для імобілізованих трипсину і хімотрипсину величини, що характеризують динаміку накопичення продуктів гідролізу казеїну дуже близькі. Для прикладу на рис. 8 показано динаміку накопичення продуктів гідролізу білка вільним трипсином і імобілізованим в ІПЕК з масовою часткою полісахаридів 50...90 %.

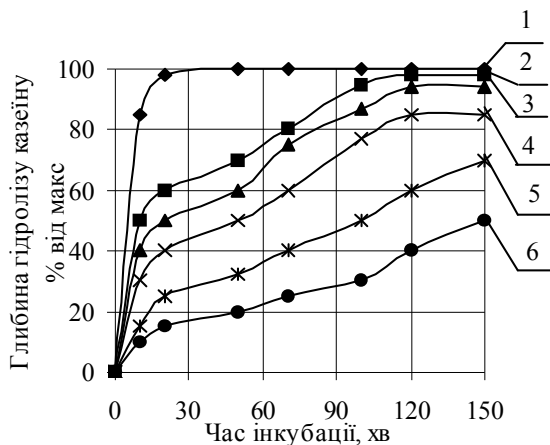


Рис. 8. Динаміка накопичення продуктів гідролізу казеїну: 1 - вільний трипсин, 2-6 - імобілізований трипсин (масова частка полісахаридів в комплексі 2 - ω = 50 %, 3 - ω = 66 %, 4 - ω = 80 %; 5 - ω = 90 %).

гідролізує субстрат на 94 % протягом 150 хв, у присутності 90 % полісахаридів – на 49 %. Хімотрипсин у присутності 66 % полісахаридів за цей же термін розщеплює субстрат на 95 %, в присутності 90 % полісахаридів – на 48 %.

Так, вільний трипсин практично повністю гідролізує субстрат за 20 хв, імобілізований у присутності 50 % полісахаридів на цю ж глибину розщеплює казеїн через 120 хв від початку інкубації. Імобілізований хімотрипсин в цих же умовах повністю гідролізує казеїн за 100 хв.

Встановлено, що зі збільшенням масової частки полісахаридів у комплексі, швидкість гідролізу субстрату імобілізованим ферментом зменшується. Трипсин, імобілізований в ІПЕК в присутності 66 % полісахаридів,

Показано, що нативні протеази в умовах, які імітують рідкі середовища травного тракту, піддаються денатурації і практично повністю втрачають здатність гідролізувати субстрат. Імобілізовані ферменти в цих умовах зберігають здатність розщеплювати субстрат: трипсин на 47 %, хімотрипсин на 51 %, що обумовлено захисним впливом полісахаридної матриці.

При дослідженні залежності виходу трипсину і хімотрипсину з ШЕК в зовнішній розчин при різних значеннях рН середовища (2; 4,5; 8) від терміну інкубації встановлено, що при кислих значеннях рН накопичення протеаз у зовнішньому розчині за 150 хв становить близько 27 % від їх вмісту в ШЕК. При лужних значеннях рН накопичення протеаз в розчині відбувається значно інтенсивніше. Так, за 150 хв від початку контакту ШЕК з рідкою фазою в розчин переходить до 90 % зв'язаного ферменту. Виходячи з цього можна вважати, що при контакті з середовищем шлункового соку ($\text{pH} \approx 1,2 \dots 2,5$) основна частина ферменту залишиться в матриці, а при лужних значеннях рН, відповідних середовищу кишкового соку, забезпечується його пролонговане вивільнення.

Обґрунтовано можливість іммобілізації протеаз шляхом їх включення в поліелектролітні мікрокапсули, сформовані почерговою адсорбцією хітозану і пектину на неорганічній матриці (CaCO_3). CaCO_3 -частинки отримували шляхом змішування еквімолярних розчинів хлориду кальцію і карбонату натрію. Включення трипсину і хімотрипсину в CaCO_3 -частинки проводили двома методами: сорбцією і співосадженням. У першому випадку включення ферменту відбувається в результаті фізичної сорбції в порах раніше сформованих CaCO_3 -матриць. У методі спів-осадження формування карбонатних мікрочастинок здійснюється за допомогою взаємодії хлориду кальцію і карбонату натрію з одночасним включенням до них ферментів.

Ефективність іммобілізації протеаз методом співосадження вище, ніж при сорбції. Включення трипсину в CaCO_3 -частинки методом сорбції становить 48 %, хімотрипсину – 53 %; методом співосадження – 81 і 85 %. Ймовірно, при формуванні мікрочастинок у присутності ферменту відбувається розподіл іммобілізованої речовини у всьому об'ємі карбонатної матриці, а при фізичній сорбції – переважно на її поверхні.

Для отримання мікрокапсул карбонатні ядра з іммобілізованим ферментом почерзі інкубували в розчинах хітозану і пектину, концентрацію полісахаридів варіювали в інтервалі 0,2...1,0 %. Якщо першим використовували хітозан (полікатіон), то на наступному етапі проводили адсорбцію пектину (поліаніон). Дану процедуру повторювали до утворення необхідної кількості шарів на поверхні неорганічної матриці. На наступному етапі карбонатну матрицю розчиняли шляхом додавання до отриманих мікрочастинок хелатуючого агента (ЕДТА).

На

рис.

9

зображено мікрофотографію отриманих мікрокапсул.

Проникність поліелектролітної мембрани мікрокапсул регулювали шляхом використання хітозанів з різними молекулярними масами (32 і 240 кДа), а також змінюючи кількість шарів хітозану і пектину від 2 до 8.

Показано, що протеази, іммобілізовані в мікрокапсули з двошаровою поліелектролітною мембраною, інактивуються під дією агресивного середовища

шлунка (кислі значення рН, пепсин), зберігаючи не більше 50 % активності (рис. 10).

Максимальне збереження активності (85 %) має місце, якщо оболонка мікрокапсул є чотирьохшаровою, а в її утворенні бере участь хітозан з М.м. 32 кДа. При подальшому збільшенні кількості шарів поліелектролітів від 5 до 8 глибина розщеплення казеїну іммобілізованими протеазами знижується.

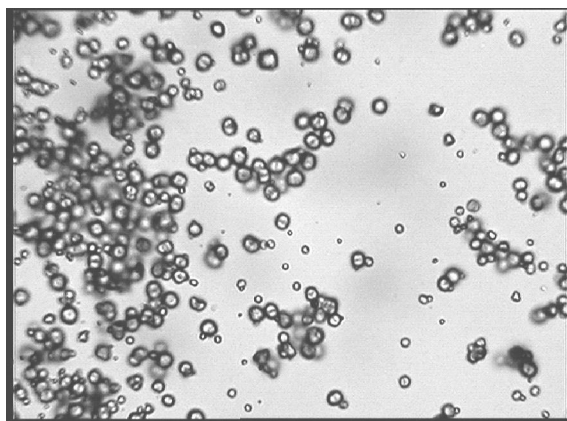


Рис. 9. Мікрофотографія поліелектролітних мікрокапсул

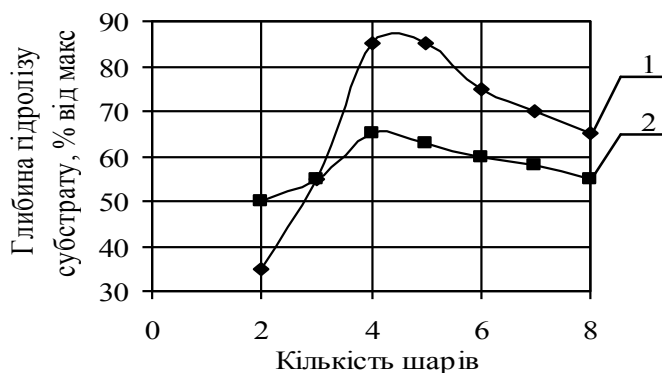


Рис. 10. Глибина гідролізу субстрату іммобілізованим трипсином в залежності від кількості шарів поліелектролітів: 1 - хітозан М.м. 32 кДа, 2 - хітозан М.м. 240 кДа)

У п'ятому розділі «Технологія поліфункціональних дієтичних добавок на основі ПЕК і протеаз» наведено дані щодо розробки технологій виробництва протеаз, іммобілізованих в ПЕК і поліелектролітні мікрокапсули.

Проведено оптимізацію параметрів іммобілізації трипсину в ПЕК хітозан-пектин за допомогою методів математичного моделювання. Отримано рівняння регресії, які описують залежність включення ферменту в ПЕК (ω_{ϕ}) і його активності (ПА) у складі полісахаридної матриці від досліджуваних факторів (концентрація хітозану і пектину (C , %) і масової частки хітозану в комплексі ($\omega_{\text{хит}}$)).

$$\omega_{\phi} = 84,95 + 6,32 \cdot C - 7,05 \omega_{\text{хит}} - 43,03 \cdot C^2$$

$$ПА = 37,22 + 4,16 \cdot C - 5,51 \cdot \omega_{\text{хит}} - 1,36 \cdot C \cdot \omega_{\text{хит}} - 21,81 \cdot C^2 + 2,07 \cdot \omega_{\text{хит}}^2$$

Отримано оптимальні значення, які відповідають максимальному включенню ферменту в комплекс при використанні 0,5-відсоткових розчинів полісахаридів і співвідношенні пектин : трипсин : хітозан – 2 : 1 : 2.

ПА іммобілізованих протеаз відповідає оптимальному значенню досліджуваних факторів для ω_{ϕ} . Тому оптимальними умовами іммобілізації протеаз в ПЕК є використання 0,5-відсоткових розчинів полісахаридів при співвідношенні пектин : трипсин : хітозан – 2 : 1 : 2.

Розроблено технологічні схеми виробництва дієтичних добавок – протеаз, іммобілізованих в ПЕК хітозан-пектин (рис.11) і в поліелектролітні мікрокапсули, отримані шляхом почергової адсорбції хітозану і пектину на неорганічній матриці з іммобілізованим ферментом (рис.12).

Обґрунтовано технологію поліфункціональних дієтичних добавок на основі ІПЕК і протеаз, проведено промислову апробацію розробленої технології на ВАТ НВП «Аріадна», м. Одеса. Розроблено нормативну документацію на виробництво поліфункціональних дієтичних добавок на основі протеаз і ІПЕК. Показана можливість зберігання дієтичних добавок протягом 12 місяців, під час якого показники якості іммобілізованих протеаз відповідають вимогам, викладеним у нормативній документації.

В умовах експерименту на тваринах встановлено пролонговану дію трипсину, іммобілізованого в ІПЕК хітозан-пектин. Показано, що його активність в тонкому кишечнику в 7,7 разів вище, ніж інтактного ферменту.

Розраховано собівартість дієтичних добавок на основі протеаз і ІПЕК, яка становить 47 грн за 1 флакон (60 капсул), 1 капсула містить трипсину (хімотрипсину) з мінімальною ферментативною активністю 380 МО FIP. Добова доза добавки складає 2...3 капсули.

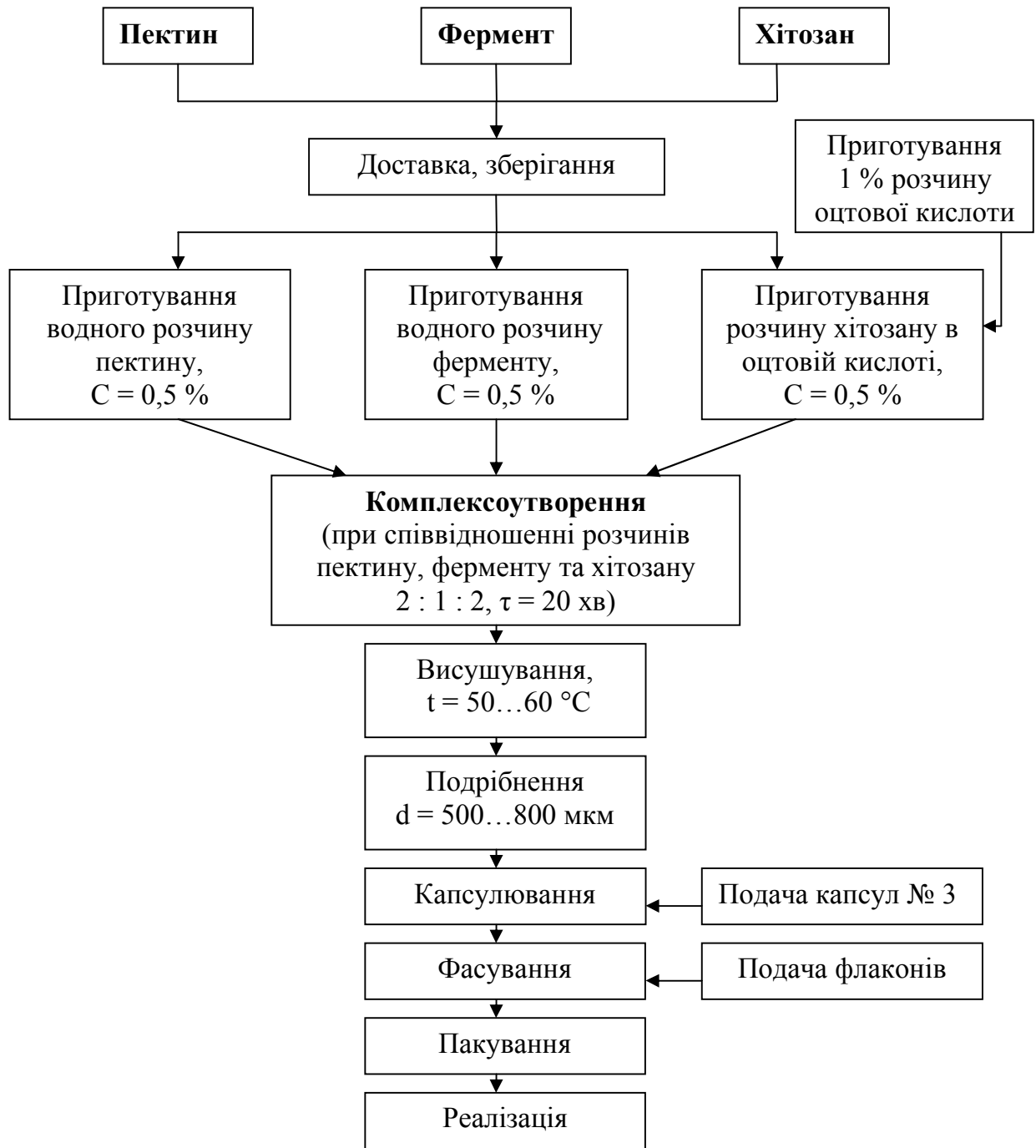


Рис.11. Технологічна схема виробництва поліфункціональних дієтичних добавок – протеаз, іммобілізованих в ПЕК хітозан-пектин

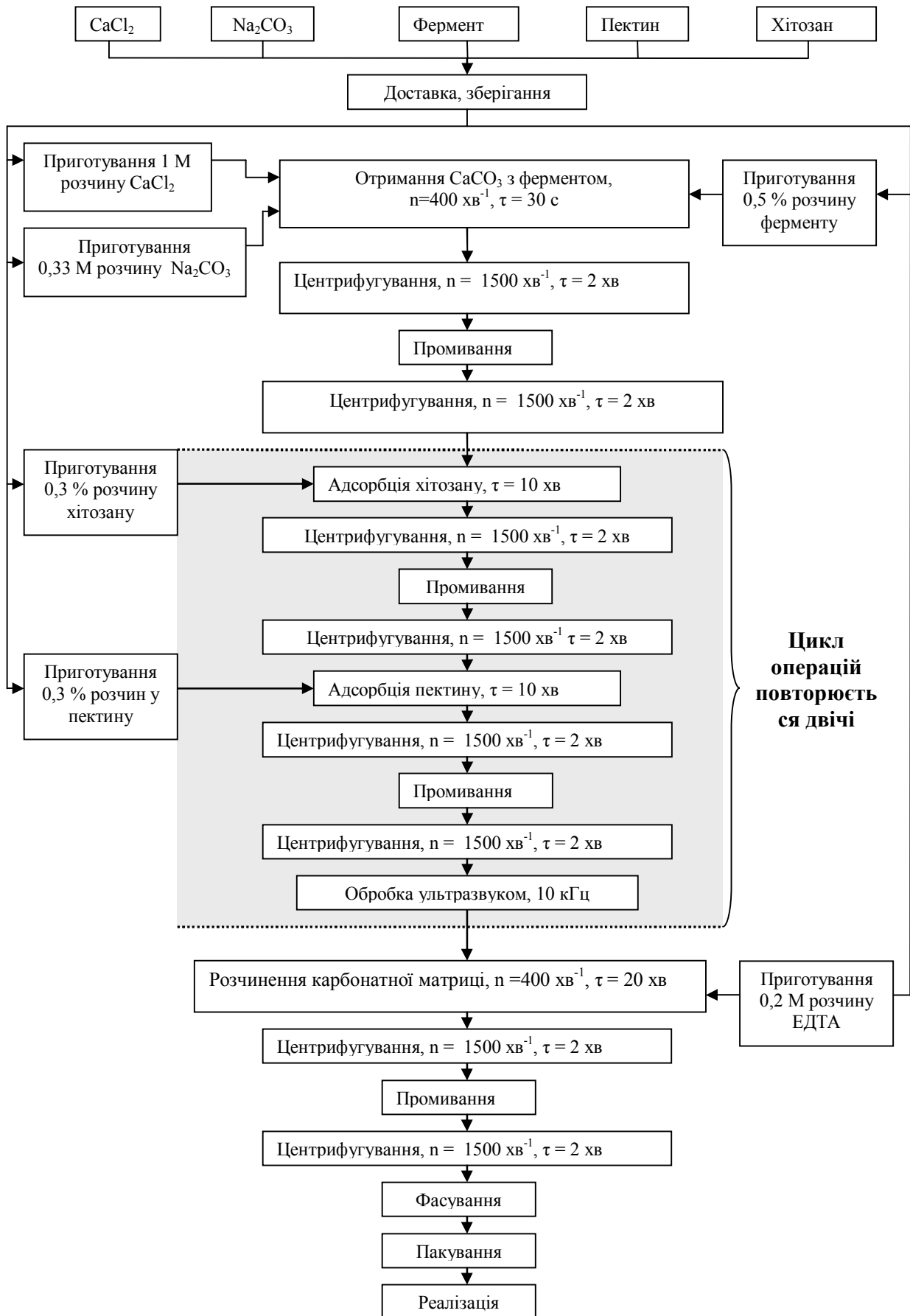


Рис.12. Технологічна схема виробництва поліфункціональних дієтичних добавок – протеаз, іммобілізованих в поліелектролітні мікрокапсули.

ВИСНОВКИ

1. Науково обґрунтовано та експериментально підтверджено технології протеаз, іммобілізованих в ІПЕК хітозан-пектин і поліелектролітні мікрокапсули.

2. Обґрунтовано доцільність отримання ІПЕК на основі хітозану (полікатион) і пектину (поліаніон).

3. Встановлено, що при взаємодії хітозану і пектину утворюється система, в якій співіснують розчинні і нерозчинні інтерполіелектролітні комплекси. Утворення поліелектролітних надмолекулярних систем доведено методами віскозиметрії, турбодиметрії, УФ та ІЧ-спектроскопії, дериватографії. Показано, що у формуванні нерозчинних ІПЕК хітозан-пектин беруть участь електростатичні, водневі, гідрофобні взаємодії, частка яких складає 86 %, 8 % і 6 % відповідно.

4. Проведено іммобілізацію протеаз в комплекс. Встановлено, що трипсин і хімотрипсин зберігають свою активність у складі комплексу: при варіюванні масової частки полісахаридів в комплексі з ферментом від 65 до 95 % – збереження активності становить 92,14...26,75 %.

5. Встановлено, що іммобілізація травних протеаз в ІПЕК значно підвищує їх стабільність: при експозиції інтактного трипсину протягом 120 хв при рН = 2 зберігається 32 % його вихідної активності, іммобілізованого – 75 %; активність інтактного трипсину при 80 °С протягом 120 хв знижується в 5,5 рази, іммобілізованого – в 2,8. Висока термостабільність ферментів, включених до ІПЕК, визначає можливість підвищення температурних режимів сушіння.

6. Показано, що сумарний вміст полісахаридів в потрійному комплексі пектин-фермент-хітозан взаємопов'язане зі швидкістю протеолізу субстрату, що дозволяє регулювати ступінь пролонгації дії ферменту варіюванням масових співвідношень компонентів комплексу.

7. Доведено, що інтактні протеази в умовах, які імітують середовища травного тракту, піддаються денатурації і практично повністю втрачають здатність гідролізувати субстрат. Іммобілізовані ферменти в цих умовах зберігають здатність розщеплювати субстрат (глибина гідролізу казеїну складає 47 %), що обумовлено захисним впливом полісахаридної матриці. Медико-біологічні дослідження на експериментальних тваринах показали, що активність трипсину, включеного в ІПЕК, в тонкому кишечнику в 7,7 разів вище, ніж інтактного ферменту, а його накопичення має пролонгований характер.

8. Розроблено спосіб отримання іммобілізованих протеаз методом включення в поліелектролітні мікрокапсули, утворені шляхом пошарової адсорбції хітозану і пектину на CaCO_3 -частинках з трипсином або хімотрипсином. Встановлено оптимальні параметри іммобілізації протеаз, які забезпечують ефективне функціонування ферментів в умовах травного тракту (кількість шарів поліелектролітної мембрани – 4...6; концентрація полісахаридів – 0,3 %).

9. Обґрунтовано оптимальні параметри іммобілізації протеаз в ІПЕК хітозан-пектин (концентрація хітозану, трипсину і пектину становить 0,5 %; співвідношення компонентів у комплексі 2:1:2; послідовність поєднання – пектин-трипсин-хітозан).

10. Показано що ПЕК і ПЕМК є дієтичними добавками, які поєднують фізіологічно-функціональні властивості ферментів замісної терапії та природних харчових ентеросорбентів (сорбція іонів свинцю – 33,5 мг/г, холевих кислот – 6,5 мг/г, ВУЗ – 6,2 г/г, ЖУЗ – 3,1 г/г).

11. Обґрунтовано технології поліфункціональних дієтичних добавок, одержуваних включенням протеаз в ПЕК і поліелектролітні мікрокапсули, здійснено промислову апробацію технології протеаз іммобілізованих в ПЕК, на ВАТ НВП «Аріадна», м. Одеса. Розроблено нормативну документацію на виробництво дієтичних добавок – протеаз, іммобілізованих в ПЕК хітозан-пектин.

12. Розраховано собівартість дієтичних добавок на основі протеаз і ПЕК, яка становить 47 грн за 1 флакон (60 капсул), 1 капсула містить трипсину (хімотрипсину) з мінімальною ферментативною активністю 380 МО FIP. Добова доза добавки складає 2...3 капсули.

Список робіт, опублікованих за матеріалами дисертації

1. Черно, Н.К. Характеристика продуктів взаємодії хітозану з пектином [Текст]/ Н.К. Черно, С.О. Озоліна, А.І. Капустян // Прогресивні техніка та технології харчових виробництв, ресторанного господарства і торгівлі: Зб. наук.праць ХДУХТ.– 2006. Вип. 2(4).– С. 400-405.
2. Антипина, Е.А. Использование природных полисахаридов в низкокалорийных майонезах [Текст] / Е.А. Антипина, А. И. Капустян // Міжнар. наук.-техн. конф. «Актуальні проблеми і новітні технології харчової та переробної галузі» Матер.конф. 23-24 квітня 2008 р., Луганський аграрний нац. ун-т, Луганськ, 2008.– С. 116–119.
3. Черно, Н.К. Интерполиэлектролитный комплекс хітозан-пектин як матриця для іммобілізації трипсину [Текст]/ Н.К. Черно, С.О. Озоліна, А.І. Капустян // Харчова наука і технологія.- 2010. - № 4 (13).– С. 40–43.
4. Черно, Н.К. Иммобилизация трипсина в интерполиэлектролитный комплекс хитозан-пектин [Текст] / Н.К. Черно, А.І. Капустян // Наукові праці ОНАХТ, 2011. Вип. 40, том 2.– С. 154–158.
5. Черно, Н.К. Деякі фізико-хімічні характеристики іммобілізованих форм трипсину [Текст] / Н.К. Черно, А.І Капустян // Обладнання та технології харчових виробництв: темат. зб. наук. пр. / ДоНУЕТ. – 2011. – Вип. 27. – С. 35–41.
6. Черно, Н.К. Фізико-хімічні характеристики комплексів хітозану з анаіонними полісахаридами [Текст] / Н.К. Черно, С.О. Озоліна, А.І. Капустян // Прогресивна техніка та технології харчових виробництв, ресторанного господарств і торгівлі: зб. наук. пр. ХДУХТ. – Харків, 2011. – Вип. 1 (13).– С. 64–70.
7. Пат. на корисну модель 66757. Україна МПК (2011.01) C12N 11/00, Спосіб іммобілізації ферменту в поліелектролітну мікрокапсулу [Текст] / Черно Н. К., Озоліна С.О., Капустян А.І.; власник Одес. нац. акад. харч. технологій. – № u 2011 11777; заявл. 20.09.2011; опубл. 10.01.2012, Бюл. № 1, 2012.
8. Пат. на корисну модель 66429. Україна МПК (2011.01) C12N 11/00, Спосіб іммобілізації трипсину [Текст] / Черно Н. К., Озоліна С.О., Капустян А.І.; власник Одес. нац. акад. харч. технологій. – № u 2011 02160; заявл. 24.02.2011; опубл. 10.01.2012, Бюл. № 1, 2012.
9. Пат. на корисну модель 66014. Україна МПК (2011.01) C12N 11/00, Спосіб іммобілізації трипсину [Текст] / Черно Н. К., Озоліна С.О., Капустян А.І.; власник Одес. нац. акад. харч. технологій. – № u 2011 02160; заявл. 26.04.2011; опубл. 26.12.2011, Бюл. № 24.
10. Черно, Н.К. Иммобилизация трипсина на интерполиэлектролитной матрице [Текст] / Н.К.Черно, С.О. Озоліна, А.І. Капустян // Научно конференция с международно

участие «Хранительная наука, техника и технологии 2011 15-16 октября 2011 г., том LVIII, Свиток 2 Пловдив. С. 295–300.

11. Черно, Н.К. Отримання поліелектролітних комплексів хітозан-пектинові сполуки [Текст] / Н.К. Черно, С.О. Озоліна, А.І. Капустян // Харчові технології-2006 Тези доп. II міжн. наук.-практ. конф. – Одеса: ОНАХТ. – 2006. – С.40.

12. Капустян, А.І. Вплив умов деметоксилування пектину на утворення комплексу пектин-хітозан [Текст] / А.І. Капустян // Наукові дослідження – теорія та експеримент '2007': Матеріали третьої міжнар. наук.-практ. конф., м. Полтава, 14-16 травня 2007 р.: Полтава: "Інтерграфіка", 2007. – Т. 6. – С. 38-40.

13. Капустян, А.І. Дослідження поліелектролітних комплексів пектину з хітозаном та казеїном [Текст] / А.І. Капустян // Збірник навч. праць молодих учених, аспірантів та студентів / МОН України. – Одеса, ОНАХТ : 2010. – Т. 2. – С. 115.

14. Черно, Н.К. Характеристика продукта взаимодействия хитозана с пектином / Н.К. Черно, С.О. Озоліна, А.І. Капустян // Матеріали шостої міжнародної конференції «Розвиток наукових досліджень '2010» 22-24 листопада 2010 р. – Т.5. – С.122–123.

15. Черно, Н.К. Спосіб іммобілізації трипсину [Текст] / Н.К. Черно, С.О. Озоліна, А.І. Капустян // «Прогресивна техніка та технології харчових виробництв, готельного, ресторанного господарств і торгівлі. Економічна стратегія і перспективи розвитку сфери торгівлі та послуг»: Міжнар. наук.-практ. конф., 19 травня 2011р.: [тези у 4 ч.]: Харк. держ. ун-т харчування та торг. – Харків: ХДУХТ, 2011. – Ч. 1. – С. 79–80.

16. Черно, Н.К. Получение полиэлектролитного комплекса хитозан-пектин и характеристика его физико-химических свойств [Текст] / Н.К. Черно, С.О. Озоліна, А.І. Капустян // Всероссийская науч.-практ. конф. «Актуальные проблемы потребительского рынка товаров и услуг» 18 февраля 2011, г. Киров. – С. 290–291.

Особистий внесок:

1. Аналіз даних літератури, проведення експериментальних досліджень щодо отримання та характеристики інтерполіелектролітних комплексів хітозан-пектин, обробка та узагальнення отриманих результатів, підготовка до друку (1-3, 15, 16, 12,13).

2. Проведення дослідження щодо іммобілізації протеаз в системі мембранного типу, а саме поліелектролітні комплекси та поліелектролітні мікрокапсули (4,5,11).

3. Вивчення фізико-хімічних властивостей іммобілізованих протеаз (1-3, 10).

4. Проведення патентного пошуку та оформлення патентів на корисну модель(7-9).

АНОТАЦІЯ

Капустян А.І. Технологія протеаз, іммобілізованих в хітозан-пектиновий комплекс. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата технічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія (технічні науки). – Одеська національна академія харчових технологій Міністерство освіти, молоді та спорту України, Одеса, 2012.

Дисертаційна робота присвячена розробці технології протеаз, іммобілізованих в інтерполіелектролітний комплекс (ІПЕК) хітозан-пектин та поліелектролітні мікрокапсули.

Обґрунтовано доцільність отримання ІПЕК на основі хітозану і пектину та їх використання як ефективних матриць для іммобілізації протеаз. Встановлено, що іммобілізація трипсину і хімотрипсину в ІПЕК хітозан-пектин сприяє збереженню їх активності і значно підвищує стабільність до денатуруючих

факторів (кислі значення рН середовища, високі температури, дія середовищ ШКТ). В умовах експерименту на тваринах встановлено, що активність іммобілізованого трипсину в тонкому кишечнику в 7,7 разів вища, ніж інтактного ферменту.

Обґрунтовано можливість іммобілізації протеаз шляхом їх включення в поліелектролітні мікрокапсули, сформовані пошаровою адсорбцією хітозану і пектину на неорганічній матриці (CaCO_3).

Визначено оптимальні параметри процесу іммобілізації протеаз в ІПЕК. Розроблено та економічно обґрунтовано технологію одержання поліфункціональних дієтичних добавок – протеаз, іммобілізованих в ІПЕК, проведено промислову апробацію розробленої технології.

Собівартість дієтичних добавок – протеаз, іммобілізованих в ІПЕК хітозан-пектин, складає 47 грн за 1 флакон (60 капсул), 1 капсула містить трипсину (хімоліпсину) з ферментативною активністю 380 МО FIP.

Ключові слова: трипсин, хімоліпсин, іммобілізація, хітозан, пектин, інтерполіелектролітний комплекс, поліелектролітні мікрокапсули.

АННОТАЦИЯ

Капустян А.И. Технология протеаз, иммобилизованных на хитозан-пектиновых комплексах. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология (технические науки). – Одесская национальная академия пищевых технологий Министерство образования, молодежи и спорта, Одесса, 2012.

Диссертация посвящена разработке технологии протеаз, иммобилизованных в интерполиэлектrolитный комплекс хитозан-пектин и полиэлектролитные микрокапсулы.

Обоснована целесообразность получения ИПЭК на основе хитозана (поликатионит) и пектина (полианионит).

Доказано, что в результате взаимодействия хитозана с пектином образуется система, в которой сосуществуют растворимые и нерастворимые интерполиэлектrolитные комплексы. Образование полиэлектролитных надмолекулярных систем доказано методами вискозиметрии, турбидиметрии, УФ и ИК-спектроскопии, термогравиметрии. Определен вклад отдельных межмолекулярных взаимодействий в комплексе: в формировании нерастворимого ИПЭК участвуют электростатические, водородные, гидрофобные взаимодействия, доля которых составляет 86 %, 8 % и 6 % соответственно.

Проведена иммобилизация трипсина и химоліпсина в ИПЭК хитозан-пектин и полиэлектролитные микрокапсулы. Установлено, что трипсин и химоліпсин сохраняют свою активность в составе ИПЭК: при варьировании массовой доли полисахаридов в комплексе с ферментом от 50 до 90 % сохранение активности составляет 92,14...26,75 %.

Показано, что иммобилизация пищеварительных протеаз в ИПЭК значительно повышает их стабильность: при экспозиции интактного трипсина в

течение 120 мин при $pH=2$ сохраняется 32 % его исходной активности, иммобилизованного – 75 %; активность интактного трипсина при $(80 \pm 2)^\circ C$ в течение 120 мин снижается в 5,5 раза, иммобилизованного – в 2,8. Высокая термостабильность ферментов, включенных в ИПЭК, определяет возможность повышения температурных режимов сушки.

Показано, что суммарное содержание полисахаридов в тройном комплексе пектин-фермент-хитозан взаимосвязано со скоростью протеолиза субстрата, что позволяет регулировать степень пролонгации действия фермента варьированием массовых соотношений компонентов комплекса.

Доказано, что интактные протеазы в условиях, имитирующих среды пищеварительного тракта, подвергаются денатурации и практически полностью теряют способность гидролизовать субстрат. Иммобилизованные в ИПЭК ферменты в этих условиях сохраняют способность расщеплять субстрат (глубина гидролиза казеина составляет 47 %), что обусловлено защитным влиянием полисахаридной матрицы.

В условиях эксперимента на животных установлено пролонгированное действие трипсина, иммобилизованного в ИПЭК. Показано, что его активность в тонком кишечнике в 7,7 раз выше, чем интактного фермента.

Обоснована возможность иммобилизации протеаз посредством их включения в полиэлектролитные микрокапсулы, сформированные послойной адсорбцией хитозана и пектина на неорганической матрице ($CaCO_3$). Установлены оптимальные параметры иммобилизации протеаз обеспечивающие эффективное функционирование ферментов в условиях пищеварительного тракта (количество слоев полиэлектролитной мембраны – 4...6; концентрация полисахаридов – 0,3 %).

Обоснованы оптимальные параметры процесса иммобилизации трипсина и химотрипсина в ИПЭК. Показано, что ИПЭК и ПЭМК представляют собой диетические добавки, сочетающие физиологическо-функциональные свойства ферментов заместительной терапии и природных пищевых энтеросорбентов (сорбция ионов свинца – 33,5 мг/г, холевых кислот – 6,5 мг/г, ВУС – 6,2 г/г, ЖУС – 3,1 г/г).

Разработана и экономически обоснована технология получения полифункциональных диетических добавок – протеаз, иммобилизованных в ИПЭК, проведена промышленная апробация разработанной технологии на ОАО НПП «Ариадна», г. Одесса, разработана нормативная документация.

Себестоимость диетических обавок – протеаз, иммобилизованных в ИПЭК хитозан-пектин составляет 47 грн за 1 флакон (60 капсул), 1 капсула содержит трипсина (химотрипсина) с ферментативной активностью 380 ME F.I.P.

Ключевые слова: трипсин, химотрипсин иммобилизация, хитозан, пектин, интерполиэлектролитный комплекс, полиэлектролитные микрокапсулы.

ABSTRACT

Kapustian A. The technology of proteases immobilized in chitosan-pectin complex. –Manuscript.

The thesis for an academic degree of technical sciences candidate, special 03.00.20 - biotechnology (engineering sciences). – Odessa National Academy of Food Technologies the Ministry of Education and Science Youth and Sports of Ukraine, Odessa, 2011.

The thesis is devoted to development protease technologies immobilized in interpolyelectrolyte complex (IPEC) chitosan-pectin and polyelectrolyte microcapsules.

The usefulness of obtaining IPEC on the base of chitosan and pectin, and their use as effective matrices for proteases immobilization was grounded. It was established that immobilization of trypsin and chymotrypsin in IPEC chitosan-pectin promoted keeping their activity and considerably increased resistance to denaturing factors frames (acidic pH environment, the temple temperature, the effect of media gastrointestinal tract). The results of experiments on animal shown that activity of immobilized trypsin was 7.7 times higher than the intact enzyme.

The possibility of proteases immobilization by inserting them into polyelectrolyte microcapsules formed by layer-adsorption of chitozan and pectin on the inorganic matrix (CaCO_3) was grounded.

The rational parameters of the of the proteases immobilization process in IPEC was determined. The technology of polyfunctional dietary supplements – proteases immobilization in IPEC was developed and economically grounded. The test of developed technology was been made in industry.

Cost price of dietary supplements – protease immobilized in IPEC chitosan-pectin is 47 UAH for 1 bottle (60 pcs of capsules) 1 capsule contains trypsin (chymotrypsin) with the enzymatic activity 380 FIP

Keywords: trypsin, chymotrypsin, immobilization, chitosan, pectin, interpolyelectrolyte complex, polyelectrolyte microcapsules.

Одеська національна академія харчових технологій
65039, Україна, м. Одеса, вул. Канатна