

**УНИВЕРСИТЕТ ПО ХРАНИТЕЛНИ ТЕХНОЛОГИИ -
ПЛОВДИВ**

**UNIVERSITY OF FOOD TECHNOLOGIES -
PLOVDIV**



**SCIENTIFIC WORKS
Volume LVII, Issue 1
Plovdiv, October 15-16, 2010**

НАУЧНА КОНФЕРЕНЦИЯ С МЕЖДУНАРОДНО УЧАСТИЕ

**“ХРАНИТЕЛНА НАУКА, ТЕХНИКА И
ТЕХНОЛОГИИ 2010”**

**‘FOOD SCIENCE, ENGINEERING AND
TECHNOLOGIES 2010’**

НАУЧНИ ТРУДОВЕ

Том LVII, Свиськ 1

Пловдив, 15 - 16 октомври 2010



АКТИВИРОВАНИЕ ХИТИНА КАК МЕТОД ПОВЫШЕНИЯ БИОДОСТУПНОСТИ

Наталия Черно, София Озолина, Лариса Гураль

Дана сравнительная характеристика продуктов, образующихся при действии ряда гидролаз на хитин, предварительно подвергнутый кислотной или щелочной обработке. Показано, что при действии панкреатина на активированный хитин возможно получение многокомпонентных смесей, содержащих водорастворимые хитоолигомеры и мономеры, а также нерастворимый низкомолекулярный хитин. Полученные продукты представляют собой полифункциональные биологически активные добавки с расширенным спектром физиологической активности.

CHITIN ACTIVATION AS THE METHOD OF INCREASE OF BIODEGRADATION

Natalia Chernov, Sofia Ozolina, Larisa Gural

The comparative characteristic of the products formed at action of the some hydrolases on chitin, preliminary subjected to acid or alkaline processing is given. It is shown, that at action pancreatin on the activated chitin it is possible to obtain the multicomponent mixes containing water-soluble chitooligomers and monomers, and also insoluble low-molecular chitin. The received products represent multifunctional biologically active additives with the expanded spectrum of physiological activity.

Хитин и его дезацетилированное производное – хитозан широко используются в самых различных отраслях, но наиболее перспективно их применение в медицине, производстве биологически активных добавок (БАД), пищевой промышленности [6, 14, 15]. Однако в последние годы все большее внимание медиков и нутрициологов привлекают низкомолекулярные водорастворимые продукты деградации этих аминополисахаридов. В сравнении с хитином и хитозаном хитоолигомеры обладают расширенным спектром терапевтической активности: подавляют рост ряда микроорганизмов (олигомеры со степенью полимеризации свыше 40), имеют антиатеросклеротическую, гиполипидемическую и гипохолестеринемическую активности (степень полимеризации более 22), стимулируют синтез хрящевой ткани, являются мощными антиоксидантами (преимущественно мономерные соединения), относятся к пребиотикам и онкопротекторам (степень полимеризации более 6) [9-12].

Хитоолигосахариды получают как химическими, так и биотехнологическим методами [6, 10-12]. Ферментативный гидролиз по сравнению с традиционным кислотным обладает рядом преимуществ, среди которых главным является возможность получать продукты с воспроизводимыми характеристиками, что очень важно, поскольку специфическая биологическая активность отдельных групп олигосахаридов коррелирует со степенью их полимеризации.

Поскольку хитиназы и хитозаназы – гидролазы со специфической активностью в отношении хитина и хитозана – дорогостоящи, в литературе обсуждается вопрос об использовании альтернативных ферментных препаратов с неспецифической активностью. К таковым относятся лизоцим, целлюлазы, протеазы, липазы,

пектиназы [2, 5, 6, 11-13]. Однако информация о гидролизе ими хитина в литературе весьма ограничена [5, 6, 13]. Таким образом, исследование процессов биodeградации хитина с использованием гидролаз с неспецифической активностью является актуальным.

Известно, что непосредственное воздействие на хитин ряда гидролаз позволяет расщепить лишь незначительную часть полисахарида. Образующиеся при этом водорастворимые продукты представлены преимущественно моносахаридами и дисахаридами [5, 7].

В связи с этим целью исследования явилось получение хитоолигомеров. Поставленная задача реализована путем выбора метода активации субстрата, а также подбора ферментов с неспецифической гидролитической активностью по отношению к хитину как факторов, определяющих характеристики продуктов биodeградации полисахарида.

Материалы и методы исследования

Активацию хитина осуществляли щелочным и кислотным способами. Щелочную активацию осуществляли, обрабатывая полисахарид 18 %-м раствором NaOH в течение 120 мин. при массовом соотношении образец : реагент 1 : 8 и температуре 18–20 °C [7]. Активирование хитина концентрированной хлороводородной кислотой проводили при массовом соотношении образец : реагент 1 : 5 при температуре 18–20 °C в течение 90 мин. [4].

К активированному хитину прибавляли растворы ферментных препаратов: пепсина в цитратном буфере pH 3,2, панкреатина в фосфатном буфере pH 6,0; целловиридина Г20х в ацетатном буфере pH 5,2, лизоцима в 0,05 М ацетатном буфере pH 5,0. Массовая доля хитина в реакционной среде составляла 1,0 % [4-6, 12, 13], а Na_3N – 0,02 %. Гидролиз проводили при температуре 37 °C в течение 6 суток. Ферментоллиз останавливали кипячением. Накопление редуцирующих веществ в растворе контролировали по методу [1].

Смесь продуктов ферментативного гидролиза хитина разделяли центрифугированием. Жидкую и твердую фазы исследовали отдельно.

Жидкую фазу подщелачивали до pH 8,0-9,0. Выпавший осадок низкомолекулярных углеводов отделяли центрифугированием, затем растворяли в воде и очищали, пропуская через колонку с сефадексом G-15 [5, 12]. Водорастворимые продукты гидролиза хитина фракционировали на колонке с Biogel Р-4, откалиброванной с помощью декстранов, глюкозамина, целлобиозы. Степень полимеризации олигомеров устанавливали также по данным логарифмической зависимости этого показателя от объема элюции соответствующей фракции углеводов из колонки [3, 12].

Водонерастворимый продукт ферментативного гидролиза – деградированный хитин – характеризовали по степени полимеризации [14], степени упорядоченности и степени ацетилирования [8]. Его функционально-физиологические свойства оценивали по [8].

Результаты и их обсуждение

В качестве ферментов с неспецифической активностью по отношению к хитину были рассмотрены пепсин, целловиридин, лизоцим и панкреатин. Однако под их воздействием расщепляется не более 5,0 % полисахарида [7].

Предварительная активация полисахарида с использованием щелочных и кислотных агентов позволяет снизить степень его упорядоченности, о чем

свидетельствуют данные ИК-спектроскопических исследований [4, 7]. Такая обработка хитина интенсифицирует процесс его последующего ферментативного гидролиза: накопление редуцирующих веществ в составе жидкой фазы протекает значительно активнее, чем у исходного хитина, достигая максимальных значений на 5-6 сутки. Очевидно, это обусловлено активацией полисахарида в результате разрыхления его структуры, что приводит к увеличению числа аморфных участков, более доступных для действия гидролаз.

Сопоставляя действие различных гидролаз на субстрат (табл.1), необходимо выделить два фактора, определяющих дальнейший выбор фермента: выход целевого продукта – водорастворимых низкомолекулярных углеводов, образующихся при гидролизе хитина, и среднюю степень их полимеризации.

Таблица 1 – Сравнительная характеристика водорастворимых продуктов ферментативного гидролиза образцов активированного хитина

Фермент	Выход водорастворимых продуктов, %		Массовая доля редуцирующих веществ, %		Средняя степень полимеризации водорастворимых продуктов	
	модификация		модификация		модификация	
	щелочная	кислотная	щелочная	кислотная	щелочная	кислотная
Пепсин	22,6	26,2	5,4	6,4	4,2	4,1
Панкреатин	34,6	44,6	7,5	9,3	4,6	4,8
Лизоцим	38,4	47,2	18,3	20,5	2,1	2,3
Целловиридин	48,9	55,8	12,2	14,7	4,0	3,8

В случае использования пепсина выход водорастворимых продуктов гидролиза был минимальным, а при использовании целловиридина – максимальным. Однако по среднему значению степени полимеризации образовавшихся хитоолигомеров последний уступает панкреатину. При действии на субстрат лизоцима средняя степень полимеризации образующихся водорастворимых продуктов гидролиза свидетельствует о преобладании в их составе моно- и димерных соединений, которые как биологически активные вещества представляют меньший интерес по сравнению с другими низкомолекулярными углеводами, образующимися при биодегградации хитина.

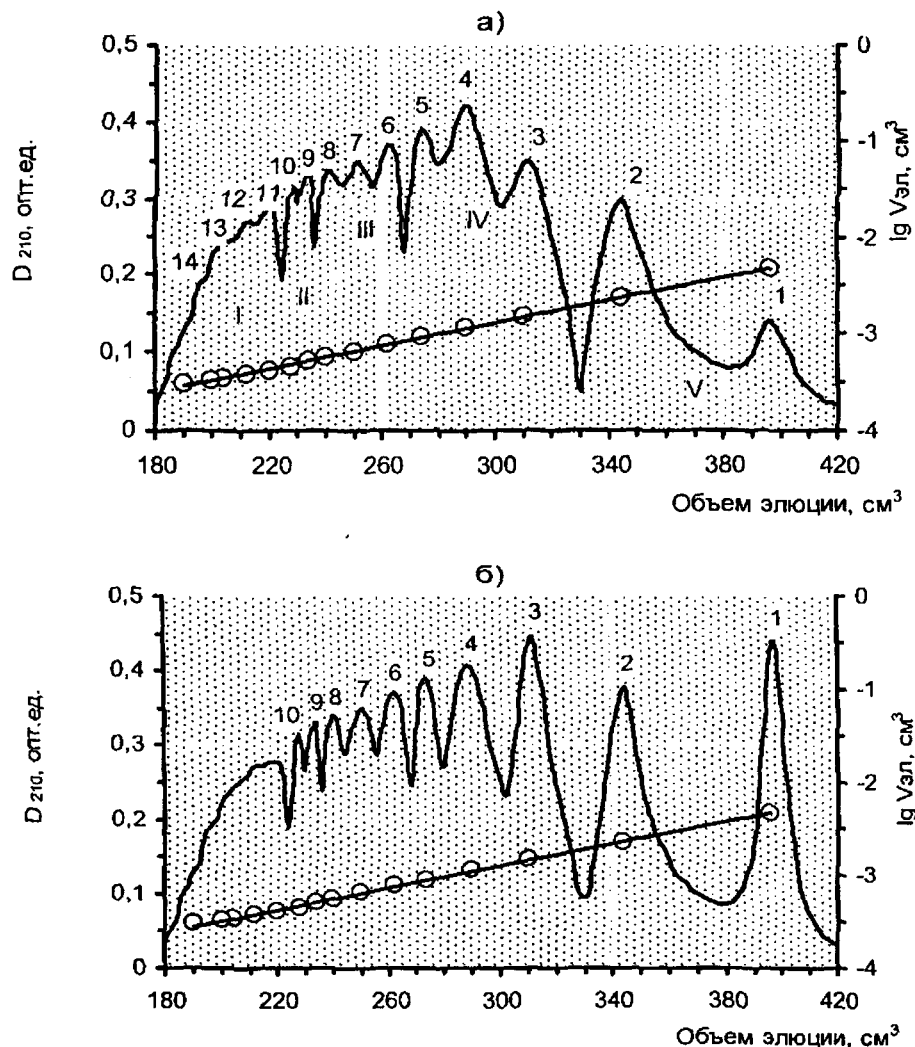
Следует отметить, что указанные зависимости наблюдались при действии гидролаз на оба исследуемых субстрата – как активированного предварительной кислотной, так и предварительной щелочной обработками хитина.

Учитывая вышеизложенное, наиболее целесообразным следует считать использование в качестве гидролизующего агента панкреатина.

На следующем этапе более подробно были охарактеризованы продукты биодегградации модифицированных образцов хитина панкреатином. Они представляли собой смесь водорастворимых и не растворимых в воде углеводов, которые разделяли и далее исследовали отдельно.

Выходные кривые гель-филтрации водорастворимых углеводов на акрилексе Р-4 в совокупности с расчетами степени их полимеризации, проведенных с учетом объемов их элюции из колонки, свидетельствуют о наличии в составе гидролизатов соединений с широким диапазоном распределения по степени полимеризации.

При этом количество олигомеров со степенью полимеризации более двух превосходило суммарное содержание мономерных и димерных соединений в 5,5 раза при щелочной (рис. 1а) и 4,2 раза при кислотной активации (рис. 1б).



а) хитин, активированный щелочной обработкой,
б) хитин, активированный кислотной обработкой.

Рис. 1 – Гель-хроматография водорастворимых продуктов гидролиза модифицированного хитина панкреатином на Biogel P-4

Водонерастворимый продукт ферментативного гидролиза – деградированный хитин – характеризовали по степени полимеризации, степени упорядоченности и степени ацетилирования. Результаты ИК-спектроскопического исследования обоих образцов низкомолекулярного хитина свидетельствуют о заметном снижении упорядоченности его структуры и степени ацетилирования как результат активации и последующего ферментализа [4, 7].

Характер выходной кривой гель-фильтрации на сефадексе G-200 твердого остатка после щелочно-ферментативной обработки свидетельствует о повышении степени неоднородности полисахарида. На это указывает появление фракций с более низкими значениями молекулярных масс (рис. 2). При этом степень полимеризации полисахарида снижается в 4,5 и 5,4 раза по сравнению с таковой активированного хитина и исходного хитина соответственно. Аналогичные изменения отмечены для хитина, подвергнутого кислотно-ферментативной обработке [4].

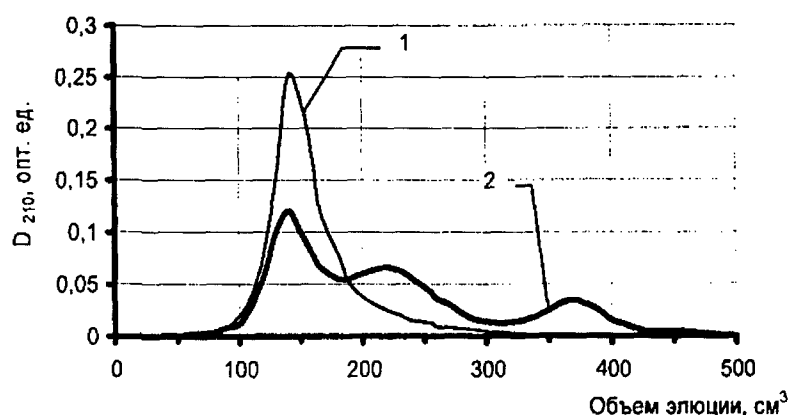


Рис. 2 – Гель-хроматография активированного щелочной обработкой (1) и деградированного хитина (2) на G-200

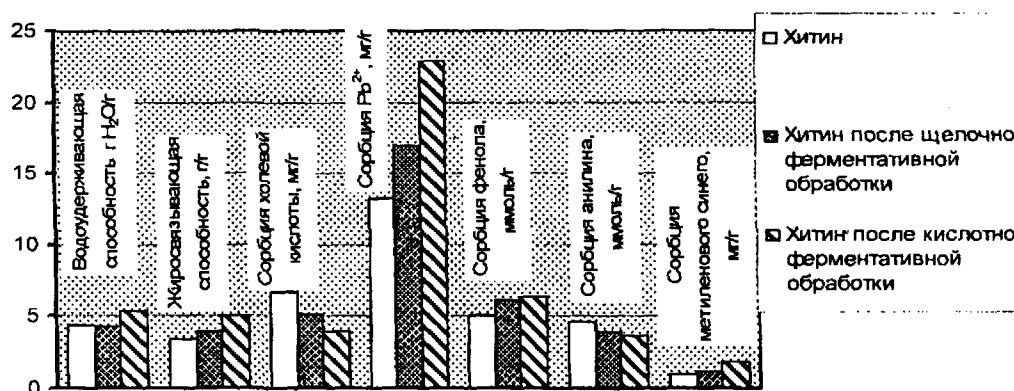


Рис. 3 – Функционально-физиологические свойства образцов хитина

Результаты исследования функционально-физиологических свойств образцов деградированного хитина указывают на то, что уменьшение степени упорядоченности и ацетилирования полисахарида в процессе двухступенчатой обработки (химической и последующей ферментативной) способствует увеличению водоудерживающей и жирсвязывающей способности, приводит к повышению сорбционной активности в отношении свинца и фенола (рис. 3). Последнее является

важной характеристикой энтеросорбентов, к категории которых принадлежит хитин. Величина сорбции метиленового синего находится в пределах 1,2-1,8 мг/г продукта, что в пересчете на клетки кишечной палочки составляет около 19,0-28,5 млн. бактерий *E.coli* / г препарата. Практически неизменной остается антиоксидантная активность препаратов, величина которой составляет 43,1-44,2 %.

Заключение

В результате щелочной и кислотной активации хитина с последующим ферментативным гидролизом панкреатином возможно получение многокомпонентных смесей – продуктов его биodeградации. Они представляют собой совокупность водорастворимых хитоолигомеров и мономеров и нерастворимого низкомолекулярного хитина. Каждый из указанных компонентов является носителем специфических свойств, что определяет возможность получения на основе хитина полифункциональной биологически активной добавки с расширенным спектром физиологической активности. При этом предпочтительным является применение щелочно-ферментного метода, поскольку этот продукт характеризуется более высоким содержанием хитоолигомеров со степенью полимеризации больше 2.

Список литературы

1. Горячковский А.М. Клиническая биохимия. – 1998. – 608 с.
2. Деструкция хитозана ферментным комплексом из *Carica papaya* / Е.И. Черкасова, М.Ф. Алексеева, М.О. Пастухов и др. // Биотехнология. – 2005. – № 2. – С.73-81.
3. Максимов В.И. Метод измерения гексозаминов в хитиновых гидролизатах / В.И. Максимов, В.Е. Родоман, Е.В. Максимова // Прикл. биохимия и микробиология. – 1999. – № 2. – С. 227-230.
4. Отходы переработки ракообразных как источник получения полифункциональной биологически активной добавки / Н.К. Черно, С.А. Озолина, Л.С. Гураль, Т.З. Терлецкая // Инновационные технологии в производстве пищевых продуктов: Мат. VII Междунар. науч.-практ. конф. – Минск, 2008. – С. 126-133.
5. Ферментативный гидролиз α -хитина / А.В. Ильина, О.Ю. Зуева, С.А. Лопатин, В.П. Варламов // Прикл. биохимия и микробиология. – 2004. – Т. 40, № 1. – С. 42-45.
6. Хитин и хитозан: получение, свойства и применение / Под ред. К.Г. Скрыбина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. – М.: Наука, 2002. – 364 с.
7. Черно Н.К. Получение продуктов биodeградации хитина / Н.К. Черно, С.А. Озолина, Л.С. Гураль // Пищевая наука и технология. – 2008. – № 6. – С. 17-20.
8. Черно Н.К. Хитин-протеиновый комплекс – альтернатива известным хитинсодержащим препаратам / Н.К. Черно, С.А. Озолина, Л.С. Шум // Food science, engineering and technologies '2007: Scientific works The International Scientific Conference, Vol. LIV, Issue 2 – Plovdiv, 2007. – P.119-124.
9. Чилингарян Г.Г. Глюкозамингидрохлорид — новое противоартрозное отечественное средство / Г.Г. Чилингарян, В.Ю. Новиков // Фитотерапия, лазеротерапия, биологически активные вещества естественного происхождения в XXI веке: Мат. науч. конф. – Черноголовка, 2000. – С.177-180.
10. Bactericidal and antifungal activities of low molecular weight chitosan and its N-2/(3)-(dodec-2-enyl)succinoyl-derivatives / V.E. Tikhonov, E.A. Stepnova, V.G. Babak, eds. // Carbohydr. Polymers. – 2006. – V.64, № 1. – P. 66-72.
11. Hélène Barreteau, Production of Oligosaccharides as Promising New Food Additive Generation / Hélène Barreteau, Cédric Delattre, Philippe Michaud // Food Technol. Biotechnol. – 2006. – V.44, №3. – P.323-333.

12. Characterization of chito-oligosaccharides prepared by chitosanolytic with the aid of papain and pronase, and their bactericidal action against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli* / Acharya B. Vishu Kumar, Mandyam C. Varadaraj, Lalitha R. Gowda, Rudrapatnam N. Tharanathan // *Biochem. J.* – 2005. – V.391. – P.167-175.
13. Ipsita. Hydrolysis of chitin by PectinexTM / Ipsita Roy, Meryam Sardar, Munishwar N. Gupta // *Enzyme and Microbial Technol.* – 2003. – V. 32. – P. 582-588
14. Nellie Gagné. Production of chitin and chitosan from crustacean waste and their use as a food processing aid. – Montreal: McGill University, 1993. – 98 p.
15. Roberts G.F.A. Chitin Chemistry. – L.: Makmillan Press, 1992. – 352 p.

Сведения об авторах:

1. **Черно Наталия**, доктор технических наук, профессор; заведующий кафедрой пищевой химии Одесской национальной академии пищевых технологий.
Контактный телефон и адрес: ул. Канатная, 112, г. Одесса, 65039, Украина, +38 (048) 712 - 41 - 53.
2. **София Озолина**, кандидат химических наук, доцент кафедры пищевой химии Одесской национальной академии пищевых технологий.
Контактный телефон и адрес: ул. Канатная, 112, г. Одесса, 65039, Украина, +38 (048) 712 - 41 - 53.
3. **Лариса Гураль**, кандидат технических наук, ассистент кафедры пищевой химии Одесской национальной академии пищевых технологий.
Контактный телефон и адрес: ул. Канатная, 112, г. Одесса, 65039, Украина, +38 (048) 712 - 41 - 53.
e-mail: loris_shum@ukr.net