

Надія ДЗЮБА

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ІЧ-СПЕКТРОСКОПІЄЮ КОМПЛЕКСОУТВОРЕННЯ АМІЛАЗА – ГЛЮТИН

Показано можливість використання ІЧ-спектроскопії для аналізу зв'язків при виробництві іммобілізованих форм ферментів. Розглянуто ІЧ-спектри глютину, нативної та іммобілізованої на глютині амілази. Проведено аналіз зв'язків у молекулах глютину та всіх форм іммобілізованого ферменту. Визначено функціональні зв'язки, за допомогою яких відбувається іммобілізація амілази на глютині. Доведено, що найбільшу роль в утворенні комплексу амілаза – глютин відіграють $-OH$, $-C=O$, $-NH$.

Ключові слова: глютин, іммобілізація ферментів, ІЧ-спектроскопія.

Дзюба Н. Идентификация ИК-спектроскопией комплексообразования амилаза – глютин. Показана возможность использования ИК-спектроскопии для анализа связей при производстве иммобилизованных форм ферментов. Рассмотрены ИК-спектры глютина, нативной и иммобилизованной амилазы. Проведен анализ связей в молекулах глютина и всех форм фермента. Определены функциональные связи с помощью которых происходит иммобилизация амилазы в глютин. Доказано, что наибольшую роль в образовании комплекса амилаза-глютин играют $-OH$, $-C=O$, $-NH$.

Ключевые слова: глютин, иммобилизация ферментов, ИК-спектроскопия.

Постановка проблеми. У наш час взаємовідносини людини й природи значно погіршились за рахунок науково-технічного прогресу, який дає змогу людині впливати на хід природних процесів. Людина опанувала всі доступні природні ресурси, що призвело до руйнування та забруднення довкілля. Коли забруднення навколишнього середовища відходами, викидами, стічними водами промислового виробництва та комунального господарства привело людство на грань екологічної катастрофи, питання здорового харчування виходить на одне із перших місць.

Потрапляння в ґрунт і воду сторонніх речовин, що призводять до хронічного чи гострого отруєння організму, змушують вчених замислитись над вирішенням цих проблем не лише за рахунок зменшення викидів шкідливих речовин в атмосферу, а й за рахунок харчування знизити вплив ксенобіотиків на організм людини. Захворювання шлунково-кишкового тракту (ШКТ) на сьогодні входять до переліку найбільш поширених, оскільки взнаки дається, крім екології, спосіб життя людини, їжа, яку вона споживає, та спадковість [1, с. 306–311].

В останні роки в Україні інтенсивно розвивається ринок функціональних продуктів і біологічно активних добавок (БАД), які уможливають формувати раціони харчування відповідно до індивідуальних особливостей організму людини. Асортимент функціональних продуктів в значній мірі визначається набором функціональних інгредієнтів або біологічно активних добавок, для більшості з яких ідентифікована їх основна потенційна користь для здоров'я. Однак є категорії речовин, які ще недостатньо вивчені і є вельми перспективними для використання як інгредієнтів функціональних продуктів. До них належать білки та пептиди, серед яких значний інтерес викликають травні ферменти, що відіграють важливу роль у регулюванні процесів травлення. Проте ферменти не є стабільними при високих температурах і в широкому діапазоні рН, що не дає змоги їх широко використовувати в харчовій промисловості.

Суттєві недоліки прямого введення біологічно активних речовин до організму людини обмежують їхнє використання: алергічні реакції, неспецифічна токсичність і пірогенність, чутливість до дії тепла, зміни рН та іонної сили, інактивація під дією ендогенних ферментів та інгібіторів тощо. Перераховані труднощі значною мірою можуть бути усунені шляхом використання іммобілізованих (зв'язаних з носієм) БАД, що уможливує скоротити загальну дозу препарату, який вживається, подовжити час перебування його в організмі (продлонгація дії), одночасно зменшуючи небажані побічні ефекти.

Основні методи іммобілізації біологічно активних речовин для одержання БАД та інгредієнтів функціональних продуктів – фізичні: сорбція на матрицях природного походження; мікрокапсулювання; комплексоутворення за рахунок електростатичної взаємодії (білків і полісахаридів) або проста коацервація.

При іммобілізації біорегуляторів білкової природи (ферментів) використано перераховані методи для концентрування, стабілізації та одержання БАД, яка містить гідролітичний фермент α -амілазу. При цьому фермент стає стабільним, що особливо важливо, коли мова йде про нутрицевтики, які здійснюють амілолітичну функцію в умовах середовища ШКТ. Іммобілізація білків приводить, як правило, до зростання їх стійкості проти теплової денатурації. Це не менш важлива властивість, яка є суттєвою для технології їх виробництва [2, с. 16–19].

Розробка та конструювання поліфункціональних БАД для людей з порушеною ферментативною активністю є актуальним завданням, яке уможливить розширити асортимент сучасних БАД і кулінарних виробів профілактичного харчування, підвищити їхню харчову та біологічну цінність, раціонально використовувати нативні компоненти сировини.

Білкова природа ферментів зумовлює їхню нестійкість при зберіганні та чутливість до підвищеної температури. Ферменти не

можуть використовуватися багаторазово через труднощі у відділенні їх від реагентів і продуктів реакції. Вирішити ці проблеми допомагає створення іммобілізованих ферментів.

Для іммобілізації ферментів використовують матриці різної природи: білкові, вуглеводні [3, с. 320–325; 4, с. 98–99]. Однак перевагу потрібно віддати білковим, оскільки вони більш здатні до засвоєння. Білки як носії мають переваги: вони місткі, здатні до біодеградації, можуть застосовуватися як тонка (товщиною 80 мкм) мембрана. Іммобілізацію ферментів на білкових носіях можна проводити як у відсутності, так і в присутності зшиваючих агентів. До недоліків білків, які можуть бути носіями, відносять їх високу імуногенність (за винятком колагену та фібрину). Частіше для іммобілізації використовують структурні (кератин, фібрин, колаген, глютин), рухові (міозин) і транспортні (альбумін) білки [5, с. 115–153; 6, с. 809–812]. При іммобілізації ферменти, як правило, втрачають частину ферментативної активності, оскільки зв'язування з носієм послаблює контакт із субстратом. Іммобілізовані ферменти мають і деякі переваги перед звичайними – можуть легко видалятися із реакційної зони та використовуватися декілька разів, а також володіють пролонгованою дією.

Ступінь гідrataції та набухання колагену залежить від рН і температури. У кислому або лужному середовищі колаген набухає більше, ніж у чистій воді. Його обводненню (набуханню) сприяє розташування та частковий розрив зв'язків між головними ланцюгами в структурі. Цей процес, при якому збільшується число активних центрів, прийнято називати пептизацією. Він сприяє переходу колагену в глютин і використовується у виробництві желатину й клею із колагену кісток і сполучних тканин. Завдяки додатковому обводненню колагену в кислому або лужному середовищі він набуває кислотних або лужних властивостей [7, с. 140–141; 8].

Відомо, що колаген і продукти його гідролізу (зокрема, глютин) відіграють важливу роль в організмі людини та входять до складу сполучних тканин, забезпечуючи їх міцність та еластичність. Завдяки повноцінному комплексу фізико-хімічних властивостей вони можуть використовуватися як універсальні функціональні компоненти при виробництві харчової, фармацевтичної та медичної продукції. Внаслідок здатності утворювати гелі можуть застосовуватися як захисна оболонка для різних біокоректорів (ферментів і їх інгібіторів білкової природи).

Саме тому актуальним є питання розробки ефективних матриць для іммобілізації біокоректорів та їх використання в харчовій промисловості, що дасть змогу розширити асортимент страв і кулінарних виробів у закладах ресторанного господарства, підвищити їх харчову та біологічну цінність, раціонально використовувати нативні компоненти сировини, здійснювати безвідходні та ресурсозберігаючі технології в рибопереробній та інших галузях промисловості [3, с. 320–325].

Невирішеним залишається питання щодо можливості іммобілізації амілази на глютині, отриманому шляхом лужного гідролізу колагену вторинної рибної сировини.

Мета статті – дослідження можливості утворення комплексу α -амілаза – глютин ІЧ-спектроскопічним методом.

Матеріали та методи. Використано чотири зразки, попередньо висушені при 50 °С протягом 24 год: *перший* зразок – 1 г амілази, *другий* зразок – 1 г глютину, *третій* зразок – 10 г глютину, перемішаного в бюксі з 0.01 г сухого ферменту амілази, *четвертий* зразок – до 10 см³ 0.1 % розчину амілази введено 10 г глютину, іммобілізація протягом 20 хв, висушування.

Інфрачервоний спектр поглинання зразків, попередньо висушених до постійної маси, отриманих в дисках із калію бромідом Р (2 мг субстанції в 200 мг калію бромід Р), проведено в області від 4000 до 400 см⁻¹ на інфрачервоному спектрофотометрі FTIR-8400S фірми *Shimadzu*.

Результати дослідження. Процес іммобілізації уможливило захистити фермент від негативних чинників зовнішнього середовища та зберегти його властивості під час додавання ферменту до продуктів харчування.

Іммобілізацію амілази проведено на глютині з метою одержання БАД, що має вищу рН- і термостабільність, ніж нативний фермент. Утворення зв'язків між носієм і ферментом змінює кінетичні характеристики ферментативної реакції, що дає змогу впливати на перебіг реакцій в шлунково-кишковому тракті. Іммобілізація амілази здійснюється фізичною адсорбцією на матриці шляхом їх включення до гелю глютину, а також ковалентним зв'язуванням ферменту з нерозчинним матеріалом із утворенням нерозчинних поліферментних комплексів.

Оскільки глютин має високу гідрофільну здатність, то фермент легко зв'язується з ним. Фермент і матриця є речовинами білкової природи, тому в результаті іммобілізації вони утворюють міцні електростатичні зв'язки та зв'язки, які можна визначити ІЧ-спектроскопією. Поглинання в ІЧ-області обумовлено переходами між рівнями коливання, що відповідають різним коливанням енергії функціональних груп. В ІЧ-спектроскопії використовують середню частину ІЧ-області, а саме – 4000–200 см⁻¹. При розшифровці ІЧ-спектрів використано довідкові матеріали [9].

Отримані графіки ІЧ-спектрів дали можливість провести порівняння зв'язків у нативному ферменті (*рис. 1*), глютині (*рис. 2*), іммобілізованому ферменті механічним способом (*рис. 3*) та способом включення ферменту в гель глютину (*рис. 4*).

При розшифровці отриманих спектрів в ІЧ-спектрах поліпептидів і білків виявляється декілька відносно сильних смуг поглинання, які, зазвичай, відносяться до коливань пептидної групи –CO–NH–, як загального структурного компоненту білкових молекул.

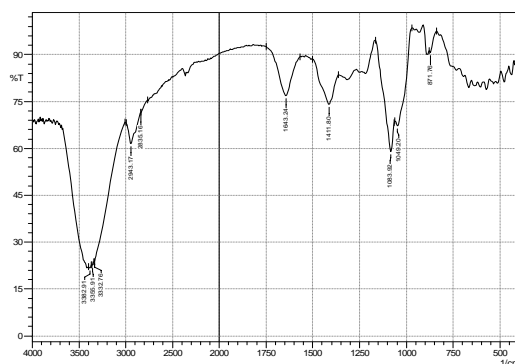


Рис. 1. ІЧ-спектр амілази

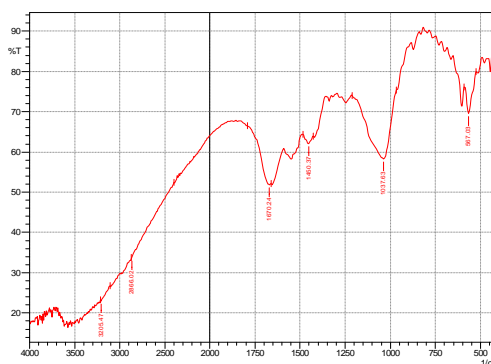


Рис. 2. ІЧ-спектр глютину

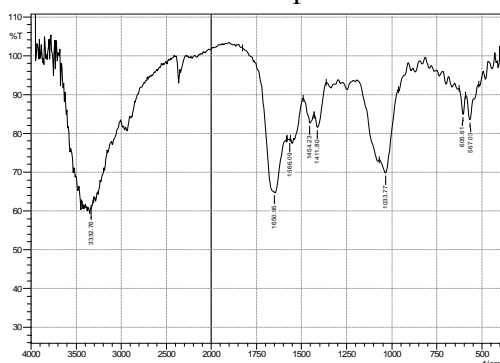


Рис. 3. ІЧ-спектр іммобілізованої амілази механічним способом на глютині

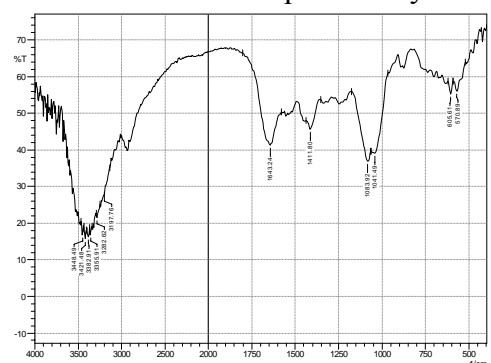


Рис. 4. ІЧ-спектр іммобілізованої амілази включеної в гель глютину

У спектрі амілази (див. *рис. 1*) спостерігається широка смуга з піком поглинання при 3382.91 cm^{-1} , що свідчить про наявність вільних аміногруп ($-\text{NH}$). Симетричні коливання метильних груп характеризує пік 2350 cm^{-1} , також спостерігаються коливання в діапазоні $2800\text{--}3000 \text{ cm}^{-1}$, що є характерним для валентних коливань C-H груп. Наявність піку при 1643.24 cm^{-1} характеризує амід 1, що дає змогу говорити про валентні коливання зв'язку $-\text{C}=\text{O}$ та β -конформацію молекули амілази. Коливання в смузі $1000\text{--}1100 \text{ cm}^{-1}$ характеризує скелет молекули.

Аналіз ІЧ-спектрів глютину (див. *рис. 2*) показав наявність амідів А (пік при 3500 cm^{-1} і свідчить про те, що глютин є продуктом гідролізу колагену), амідів I ($-\text{C}=\text{O}$ при 1670.24 cm^{-1}), амідів II (1550 cm^{-1}). При 1620 cm^{-1} спостерігаються валентні коливання $-\text{C}=\text{I}$ груп неіонізованих та іонізованих кислот, що може свідчити про їх неповне виділення при нейтралізації глютину в технологічному процесі. Як і в ІЧ-спектрах амілази (див. *рис. 1*), в спектрах глютину (див. *рис. 2*) також спостерігається пік при 1037.63 cm^{-1} та широка смуга поглинання $1000\text{--}1200 \text{ cm}^{-1}$, що свідчить про коливання скелету молекули глютину.

У спектрі іммобілізованої амілази механічним шляхом (див. *рис. 3*) спостерігається інтенсивна широка смуга з максимумом поглинання при 3400 cm^{-1} , яка зміщена в низькочастотну область порівняно з частотою вільних груп $-\text{OH}$, що характеризує валентні коливання зв'язаних $-\text{OH}$

груп та свідчить про участь гідроксилів у системі водневих зв'язків. Наявність невеликого піку поглинання при 3421.48 см^{-1} говорить про присутність вільних аміногруп. Невеликий пік амідів I, порівняно з амілазою (див. *рис. 1*) та глютином (див. *рис. 2*), при 1643.24 см^{-1} свідчить, що в процесі іммобілізації зв'язки $\text{C}=\text{O}$ ферменту взяли більшу участь, ніж зв'язки $\text{C}=\text{O}$ глютину.

При аналізі ІЧ-спектрів іммобілізованої амілази (див. *рис. 4*) включенням до гелю глютину видно, що практично всі OH групи включені у водневий зв'язок, про що свідчить відсутність смуги поглинання при 3650 см^{-1} . Широка смуга з піком при 3332.76 см^{-1} говорить про те, що в іммобілізації взяли участь аміногрупи глютину. Така широка смуга з'являється внаслідок коливань аміногруп, асоційованих водневими зв'язками (CO-NH).

Групи CH_2 -амілази зовсім не брали участі в іммобілізації (див. *рис. 3, 4*), про що свідчить наявність смуги поглинання $2800\text{--}3000\text{ см}^{-1}$. Метильні групи амілази не взяли участь в утворенні комплексу (див. *рис. 4*), на відміну від іммобілізації механічним шляхом, про що говорить наявність піку при 2350 см^{-1} . В ІЧ-спектрах іммобілізованої включенням в гель амілази спостерігається наявність амідів I (зв'язок $\text{C}=\text{O}$ при 1650.95 см^{-1}) та амідів II (зв'язок NH при 1566.09 см^{-1}), що свідчить про наявність β та α конформацій молекул ферменту.

Отримані графіки показали, що амілаза, іммобілізована методом механічного включення (див. *рис. 3*), має незначні відхилення хвиль від ферменту в чистому вигляді, з чого можна зробити висновок, що міцні зв'язки не утворились, але процес іммобілізації відбувся.

Амілаза, іммобілізована включенням до гелю глютину, утворила стійкий комплекс, оскільки відхилення хвиль в ІЧ-спектрі є значними. Наявність амідів I та амідів II в амілазі, включеної до гелю глютину (див. *рис. 4*), дає змогу стверджувати, що в зразку є поліпептид або білок, а як зв'язуючий компонент могли виступити функціональні групи глютину.

Висновки. Дані аналізу отриманих ІЧ-спектрів свідчать про більш складну будову молекули при включенні амілази в гель, порівняно з механічною іммобілізацією, та служить підтвердженням гіпотези про те, що функціональні групи в складі глютину здатні до утворення зв'язків з ферментами. Це дає можливість рекомендувати глютин як матрицю для іммобілізації ферментів з метою створення БАД направленої дії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Тележенко Л. М. Моделювання раціонального харчування / Л. М. Тележенко, Н. А. Кушнір, М. М. Тодорова // Обладнання та технології харчових

- виробництв : темат. зб. наук. пр. ДонНУЕТ ім. М. Туган-Барановського / голов. ред. О. О. Шубін. — 2013. — Вип. 30. — С. 306—311.
2. Крусір Г. В. Основи комплексоутворення інгібітор панкреатичної амілази – полісахарид / Г. В. Крусір, О. В. Севастьянова, Н. А. Кушнір // Зернові продукти і комбікорми. — 2009. — № 1. — С. 16—19.
 3. Ключева М. В. Основные аспекты иммобилизации ферментов на примере липаз / М. В. Ключева // Молодой ученый. — 2014. — № 8. — С. 320—325.
 4. Кушнір Н. А. Іммобілізація як спосіб стабілізації біокоректорів / Н. А. Кушнір, Н. С. Назаренко, К. С. Болгова : матеріали міжнар. наук.-прак. інтернет-конф. ["Наукові пріоритети розвитку аграрної сфери в умовах глобальних змін"] ; (Тернопіль, 4–5 груд. 2014 р.). — Тернопіль : Крок, 2014. — С. 98—99.
 5. Ларионова Н. И. Принципы иммобилизации и новые подходы к использованию ферментов и других физиологически активных веществ в медицине. В кн. : Химическая энзимология / Н. И. Ларионова, В. П. Торчилин. — М. : Мир. — 1983. — С. 115—153.
 6. Weselake R. J. An endogenous α -amylase inhibitor in barley kernels / R. J. Weselake, A. W. MacGregor, R. D. Hill // Plant Physiol. — 1983. — Vol. 72. — P. 809—812.
 7. Ермоленко В. Д. Исследование формы связи влаги с пищевыми материалами методами физических характеристик / В. Д. Ермоленко // Изв. вузов. Пищевая технология. — 1961. — № 1. — С. 140—141.
 8. Иванова Л. А. Коллаген в технологии лекарственных форм : монография / Л. А. Иванова, И. А. Сычеников, Т. С. Кондратьева. — М. : Медицина, 1984. — С. 112.
 9. Тарасевич Б. Н. ИК-спектры основных классов органических соединений. Справочные материалы / Б. Н. Тарасевич. — М. : МГУ им. М. В. Ломоносова, 2012. — С. 55.

Стаття надійшла до редакції 17.11.2015.

Dzyuba N. Identification of complexforming amylase – gluten by infrared spectroscopy.

Background. Significant shortcomings of direct enzymes input in humans restrict their availability: temperature sensitivity, pH changes and ionic strength. It stipulates perspective of studying multifunctional additives obtained by enzyme immobilization on protein matrices. The enzyme and matrix are substances of protein nature. As a result of immobilization they form strong electrostatic bonds and bonds that can be determined by infrared spectroscopy.

The article *aim* is to explore the possibility of formation of α -amylase – gluten complex using infrared spectroscopy.

Material and methods. The infrared absorption spectrum of samples, which were previously dried to constant mass, obtained in the discs of potassium bromide R (2 mg of substance in 200 mg of potassium bromide R), conducted in 4000 cm^{-1} and 400 cm^{-1} on infrared spectrophotometer FTIR-8400S of Shimadzu company.

Results. The possibility of using infrared spectroscopy to analyze the bond in the production of immobilized enzyme forms was showed. IR-spectrums of gluten, native and gluten-immobilized amylase were considered. Analysis of bonds in gluten molecules and all forms of immobilized enzyme was made.

Functional bonds, which provide the amylase immobilization on gluten, were determined. It is shown, that –OH, –C=O, –NH play the most important role in the formation of amylase – gluten complex.

Conclusion. Data of analyzed IR-spectrums shows a more complex molecule structure when amylase is included in the gel compared to mechanical immobilization. It confirms the hypothesis that the functional groups of gluten can form bonds with enzymes. It provides recommendation of gluten using as a matrix for the immobilization of enzymes to develop dietary supplements with directive effect.

Keywords: gluten, immobilization of enzymes, infrared spectroscopy.

REFERENCES

1. *Telezhenko L. M.* Modeljuvannja racional'nogo harchuvannja / L. M. Telezhenko, N. A. Kushnir, M. M. Todorova // *Obladnannja ta tehnologii' harchovyh vyrobnyctv : temat. zb. nauk. pr. DonNUET im. M. Tugan-Baranovs'kogo / golov. red. O. O. Shubin.* — 2013. — Vyp. 30. — S. 306—311.
2. *Krusir G. V.* Osnovy kompleksoutvorennja ingibitor pankreatychnoi' amilazy – polisaharyd / G. V. Krusir, O. V. Sevast'janova, N. A. Kushnir // *Zernovi produkty i kombikormy.* — 2009. — № 1. — S. 16—19.
3. *Kljueva M. V.* Osnovnye aspekty immobilizacii fermentov na primere lipaz / M. V. Kljueva // *Molodoj uchenyj.* — 2014. — № 8. — S. 320—325.
4. *Kushnir N. A.* Immobilizacija jak sposib stabilizacii' biokorektoriv / N. A. Kushnir, N. S. Nazarenko, K. S. Bolgova : materialy mizhnar. nauk.-prak. internet-konf. ["Naukovi priorityty rozvytku agrarnoi' sfery v umovah global'nyh zmin"]; (Ternopil', 4–5 grud. 2014 r.). — Ternopil' : Krok, 2014. — S. 98—99.
5. *Larionova N. I.* Principy immobilizacii i novye podhody k ispol'zovaniju fermentov i drugih fiziologicheski aktivnyh veshhestv v medicine. V kn. : Himicheskaja jenzimologija / N. I. Larionova, V. P. Torchilin. — M. : Mir. — 1983. — S. 115—153.
6. *Weselake R. J.* An endogenous α -amylase inhibitor in barley kernels / R. J. Weselake, A. W. MacGregor, R. D. Hill // *Plant Physiol.* — 1983. — Vol. 72. — P. 809—812.
7. *Ermolenko V. D.* Issledovanie formy svjazi vlagi s pishhevymi materialami metodami fizicheskikh harakteristik / V. D. Ermolenko // *Izv. vuzov. Pishhevaja tehnologija.* — 1961. — № 1. — S. 140—141.
8. *Ivanova L. A.* Kollagen v tehnologii lekarstvennyh form : monografija / L. A. Ivanova, I. A. Sychenikov, T. S. Kondrat'eva. — M. : Medicina, 1984. — S. 112.
9. *Tarasevich B. N.* IK-spektry osnovnyh klassov organicheskikh soedinenij. Spravochnye materialy / B. N. Tarasevich. — M. : MGU im. M. V. Lomonosova, 2012. — S. 55.