

ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

**КРУСІР Галина Всеволодівна**

УДК [633.853.494:577.15]:613.292

**НАУКОВІ ОСНОВИ ТЕХНОЛОГІЙ  
БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ ДОБАВОК –  
КОРЕКТОРІВ ПРОЦЕСІВ ТРАВЛЕННЯ**

Спеціальність 03.00.20 – біотехнологія

**АВТОРЕФЕРАТ**  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
доктора технічних наук

Одеса – 2009

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Одеській національній академії харчових технологій

Міністерства освіти і науки України

**Науковий консультант:** доктор технічних наук, професор,  
заслужений діяч науки і техніки України,  
лауреат державної премії України в  
області науки і техніки

**Черно Наталія Кирилівна,**

Одеська національна академія харчових технологій,  
кафедра харчової хімії, завідувач кафедри  
доктор технічних наук, професор,  
лауреат державної премії України  
в області науки і техніки

**Офіційні опоненти:**

**Сімахіна Галина Олександрівна,**

Національний університет харчових технологій,  
кафедра технології функціональних  
продуктів харчування, завідувач кафедри  
доктор технічних наук, професор

**Безусов Анатолій Тимофійович,**

Одеська національна академія харчових технологій,  
кафедра технології консервування, завідувач кафедри  
доктор технічних наук, професор

**Гержикова Вікторія Григорівна,**

Інститут винограду і вина "Магарач" УААН (м. Ялта),  
відділ хімії та біотехнології вина, завідувач відділу

Захист відбудеться **25 грудня** 2009 р о **10<sup>30</sup>** годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 41.088.02 в Одеській національній академії харчових технологій за адресою: вул. Канатна, 112, м. Одеса, 65039.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Одеської національної академії харчових технологій за адресою: вул. Канатна, 112, м. Одеса, 65039, ауд. 234.

Автореферат розісланий 22 листопада 2009 р.

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

Станкевич Г.М.

### ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Одним з актуальних і перспективних напрямів біотехнології є розробка біологічно активних добавок (БАД) до їжі, що чинять направлений вплив на ферментативні процеси в організмі. Враховуючи дефіцит на ринку України БАД, корегуючих ферментативну активність в організмі людини, очевидна необхідність розробки вітчизняних БАД, які містять рослинні ферменти та інгібітори травних ферментів.

Травні ферменти і їх інгібітори є ефективними коректорами процесів травлення, порушення яких призводить до різних захворювань (діабет, гіперліпідемія, серцево-судинні захворювання, новоутворення та інші). У багатьох розвинених країнах проблема порушення функціонування травної системи, що розцінюється як епідеміологічна, вирішується за допомогою медикаментозних засобів, які є препаратами ферментів і інгібіторів травних ферментів переважно тваринного або мікробного походження. Рослинні біокоректори за багатьма показникам їх перевершують, оскільки не приводять до пригнічення продукування власних травних ферментів організму (не викликають ефекту «звикання»), характеризуються низьким алергенним потенціалом, незначною токсичністю і містять корисні супутні біологічно активні речовини рослинного джерела. Тому своєчасною є розробка наукових основ створення БАД, що містять ферменти і інгібітори рослинного походження, та функціональних продуктів на їх основі. Проте системних досліджень, які б ставили за мету створення асортименту рослинних БАД, корегуючих процеси травлення людини, нами в літературі не виявлено.

Питання вибору рослинних джерел ферментів і інгібіторів травних ферментів, максимального збереження їх активності при вилученні, обґрунтування методів концентрування та стабілізації цих біокоректорів займають ключові позиції в розробці технологій нових БАД з корегуючими властивостями до процесів травлення.

Отже, виходячи з високої розповсюдженості функціональних порушень системи травлення, які кореспондуються з дефектами структури харчування населення України, можливістю її ефективної корекції шляхом включення в харчові раціони біологічно активних добавок цілеспрямованої дії, дослідження, спрямовані на створення наукових основ і технологій вітчизняних БАД, призначених для корекції ферментативних процесів системи травлення, є актуальними.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Апробація результатів дисертації.** Робота відповідає тематиці міжвузівської програми науково-дослідної роботи № 31 «Будова, склад, властивості і перетворення компонентів рослинної сировини як основи створення поліфункціональних добавок, збагачувачів і модулів для отримання продуктів з новими властивостями, які забезпечують продовольчу безпеку населення України», яка затверджена наказом Міністерства освіти і науки України № 271 від 15.08.96, зокрема, темі

досліджень проблемної науково-дослідної лабораторії Одеської національної академії харчових технологій 1/97-П «Отримання біологічно активних добавок адаптогенної і лікувальної дії на основі харчових волокон» (№ держреєстрації 0197016053), 1/03-П «Біотехнологічні основи створення біологічно активних добавок і продуктів з регульованими властивостями» (наказ Міністерства освіти і науки України № 633 від 05.11.2002 р.), 1/06-П «Розробка біотехнологічних процесів цільового направлено регулювання функціональних, фізіологічних і технологічних властивостей харчових продуктів і БАД» (наказ Міністерства освіти і науки України № 654 від 16.11.2005 р.), програмі «Розробка технологій поліфункціональних добавок і харчових продуктів загального лікувально-профілактичного напрямку (№ держреєстрації 0197 U 016055) та ін.

**Мета і завдання дослідження.** Мета дослідження – теоретичне і експериментальне обґрунтування технологій БАД – біокоректорів процесів травлення.

Для досягнення поставленої мети було визначено основні завдання дослідження:

- встановити природу активних компонентів рослинної сировини, які відповідають за корегуючу активність щодо процесів травлення;
- обґрунтувати методи вилучення та очищення біокоректорів процесів травлення;
- дослідити склад і фізико-хімічні властивості біокоректорів (вплив рН середовища і температури на активність і стабільність досліджуваних об'єктів, визначення активності ферментів під дією інгібіторів і активаторів, специфічності дії інгібіторів);
- дослідити кінетичні закономірності каталізу та інгібування нативними біокоректорами та їх стабілізованими формами;
- на основі узагальнення даних з аналізу фізико-хімічних властивостей, складу і кінетичних параметрів каталізу та інгібування обґрунтувати методи концентрування та стабілізації біокоректорів;
- дослідити склад та фізико-хімічні властивості стабілізованих біокоректорів;
- дати оцінку природи взаємодії носій-біокоректор;
- обґрунтувати склад та способи одержання БАД, що містять біокоректори і дати їх характеристики;
- розробити схему виробництва БАД – коректорів процесів травлення;
- оптимізувати ключові параметри технологій отримання БАД;
- здійснити промислову апробацію розроблених технологій і дати оцінку їх економічної ефективності;
- розробити та зареєструвати в Держспоживстандарті нормативну документацію на виробництво БАД, що містять біокоректори процесів травлення;
- здійснити фармакологічні дослідження БАД;

– оцінити можливість одержання функціональних продуктів харчування з включенням отриманої БАД.

*Об'єкти дослідження* – технології отримання БАД, що містять рослинні біокоректори процесів травлення.

*Предмет дослідження* – біорегулятори рослинного походження: протеаза насіння томатів, протеаза соку люцерни, ліпаза пророщеного насіння ріпаку, інгібітор панкреатичної амілази борошенець вівса, інгібітор панкреатичної ліпази фенольної природи з насіння ріпаку, інгібітор трипсину з зерна амаранту; насіння томатів, сік люцерни, насіння ріпаку, зерно амаранту, борошнecя вівса, БАД, які містять біокоректори процесів травлення.

*Методи дослідження* – комплекс традиційних і сучасних біохімічних, фізико-хімічних, мікробіологічних і технологічних методів дослідження, планування експерименту та математичної обробки експериментальних даних.

#### **Наукова новизна отриманих результатів:**

– на основі сучасних уявлень про оптимальне харчування, теоретичних і експериментальних досліджень сформульовано наукову концепцію щодо доцільності розробки технологій БАД, які містять рослинні біокоректори процесів травлення людини;

– вперше надано всебічну характеристику складу та фізико-хімічних властивостей біокоректорів процесів травлення рослинного походження;

– розглянуто теоретичні основи і перспективи використання методів іммобілізації біокоректорів білкової природи, які базуються на явищах їх комплексоутворення з полісахаридами, фізичної сорбції, безмембранного осмосу. Дано оцінку взаємозв'язку між структурними особливостями цих біополімерів (молекулярною масою біокоректорів, зарядом полісахаридів), а також основними фізико-хімічними параметрами системи (рН, іонна сила, концентрація фаз);

– встановлено природу взаємодії носій-біокоректор (іонна, гідрофобна, водневі зв'язки);

– визначено кінетичні закономірності каталізу та інгібування рослинними біокоректорами процесів травлення та їх стабілізованими формами;

– проведено комплекс медико-біологічних досліджень, які довели ефективність та доцільність використання біокоректорів в складі БАД, що регулюють ферментативну активність шлунково-кишкового тракту.

Наукову новизну підтверджено 7 патентами України на корисну модель № 26164 Україна “Спосіб одержання інгібітора ліпази”, № 26209 Україна “Спосіб одержання інгібітора ліпази”, № 35846 Україна “Біологічно активна добавка на основі рослинної сировини”, «Біологічно активна добавка» (№ 35892), «Спосіб одержання інгібітора амілази» (№ 35845), «Спосіб виробництва йогурту» (№ 39690), «Спосіб отримання лікувально-профілактичного

кисломолочного напою “Наріне”» (№ 39717).

### **Практичне значення отриманих результатів**

- на підставі теоретичних та експериментальних досліджень розроблено технології БАД, що містять біокоректори процесів травлення;
- вперше отримано вітчизняні БАД – біокоректори процесів травлення рослинного походження, що містять ліпазу пророщеного насіння ріпаку, інгібітор панкреатичної амілази з борошенців вівса, інгібітор панкреатичної ліпази фенольної природи з насіння ріпаку, інгібітор трипсину з зерна амаранту;
- розроблено та зареєстровано в Держспоживстандарті України нормативну документацію на БАД «Аміл-інг», що містить інгібітор панкреатичної амілази (ТУ, ТІ); розроблено нормативну документацію на БАД з включенням інгібітору панкреатичної ліпази з насіння ріпаку фенольної природи; на БАД – ліпаза пророщеного насіння ріпаку та на БАД – інгібітор трипсину з зерна амаранту.
- розроблені технології реалізовано у виробництві на науково-виробничому підприємстві «Аріадна»;
- доведено можливість одержання функціональних продуктів харчування діабетичного призначення та антиліполітичної дії і їх промислового виробництва (м. Володимирець Вінницької області, ВТО «Агроком», м. Одеса);
- медико-біологічними дослідженнями обґрунтовано корегуючу дію БАД (Державний науковий центр лікарських засобів (м. Харків));

**Особистий вклад здобувача** полягає у виборі та обґрунтуванні теми, розробці основної концепції роботи, проведенні аналітичних і експериментальних досліджень в лабораторних і виробничих умовах, розробці нормативної документації на нові види продукції. В опублікованих роботах авторів належать наукові обґрунтування теоретичних положень, постановка експериментів і науковий аналіз результатів досліджень, складання описів і формул винаходів. У матеріалах, опублікованих в співавторстві і використаних в дисертаційній роботі, всі теоретичні розробки належать дисертантові. Особистий внесок здобувача підтверджується представленими документами і науковими публікаціями.

**Апробація результатів дисертації.** Основні результати дисертаційної роботи докладалися на 5 наукових і науково-практичних конференціях різного рівня 2003-2009 рр. Результати досліджень доповідались та обговорювались на Міжвузівській науково-практичній конференції “Проблеми техніки і технології харчових виробництв” (Полтава, 2004); IV Міжнародній науково-практичній конференції “Пища. Экология. Качество” (Новосибірськ, 2004); Міжнародній науково-технічній конференції “Нові технології та технічні рішення в харчовій та переробній промисловості – сьогодення і перспективи” (Київ, 2005); Scientific Conf.

with International Participation “Food Science, Engineering and Technologies”, (Plovdiv, 2004, 2007-2009); V Міжнародній науково-практичній конференції «Хлебопродукты – 2005» (Одеса, 2005); 62-69 наукових конференціях професорсько-викладацького складу ОНАХТ (Одеса, 2002-2009); II науковому симпозиумі «Растительные полифенолы и неспецифическая резистентность организма человека» 2-3 жовтня 2008, Одеса.

**Публікації.** Всього за темою дисертації опубліковано 48 робіт, у тому числі 25 статей в фахових журналах, 7 патентів на корисну модель, 3 статті в наукових журналах, тези 5 доповідей на наукових конференціях різного рівня.

**Структура дисертації.** Перша частина дисертаційної роботи складається із вступу, 6 основних розділів, загальних висновків, списку літературних джерел з 815 найменувань (75 стор.). Роботу викладено на 327 сторінках, вона містить 65 таблиць (42 стор.), 103 рисунки (56 стор.). Друга частина дисертаційної роботи містить 10 додатків.

## **ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ**

У **вступі** обґрунтовано актуальність вибраної теми, наведено загальну характеристику роботи, сформульовано мету і завдання досліджень, показано наукову новизну та практичне значення одержаних результатів.

У **першому розділі** «Наукова проблема створення і виробництва природних біокоректорів процесів травлення» розглянуто питання, пов'язані з сучасними проблемами харчування, станом і тенденцією розвитку виробництва БАД, що містять біокоректори процесів травлення, перспективами удосконалення технологій одержання БАД з їх включенням.

На основі проведеного аналізу публікацій за темою дисертації, узагальнення фундаментальних робіт встановлено, що перспективним напрямком концентрування та стабілізації рослинних біокоректорів процесів травлення є їх іммобілізація на біополімерних матрицях.

Проаналізовано літературні дані, присвячені проблемі створення БАД і функціональних продуктів, що містять рослинні біокоректори процесів травлення. Визнано доцільною необхідність розробки методів одержання та стабілізації останніх. Зроблено висновок про необхідність поглиблення та розширення досліджень, пов'язаних з розробкою наукових основ технологій БАД і функціональних продуктів, що містять біокоректори процесів травлення, визначенням умов і механізмів процесів іммобілізації на біополімерних матрицях, розробкою технологій одержання БАД і функціональних продуктів з включенням біокоректорів процесів травлення.

У **другому розділі** «Організація експериментальних досліджень» наведено загальну

методику проведення теоретичних та експериментальних досліджень за темою роботи, програму їх реалізації і практичного застосування результатів досліджень у конкретних технологіях (рис. 1).

Для характеристики біокоректорів, БАД та функціональних продуктів з їх включенням використано стандартні уніфіковані та оригінальні методики фізичних, фізико-хімічних і біохімічних методів дослідження. Оптимізацію процесів вилучення біокоректорів та їх іммобілізації на біополімерних матрицях проведено за допомогою методу планування багатofакторного експерименту з обробкою результатів на ЕОМ. Одержані результати застосовано для побудови математичних моделей, за допомогою яких проведено корегування головних параметрів технологічних процесів.

У **третьому розділі** «Виділення і характеристика біокоректорів» обґрунтовано вибір джерел біокоректорів, методів їх виділення та очищення, дано оцінку складу та фізико-хімічних властивостей, обґрунтовано необхідність їх стабілізації. Вибір джерел біокоректорів здійснювався, виходячи з літературних джерел та результатів власних досліджень. Критерій вибору – їх максимальна ферментативна або інгібіторна активність. Найбільша протеолітична активність властива насінню томатів та соку люцерна, ліполітична – пророщеному насінню ріпаку; максимальну інгібіторну активність відносно панкреатичної амілази проявляють екстракти вівса і вторинного продукту його переробки – борошенців, відносно панкреатичної ліпази – насіння ріпаку. Найбільшим вмістом інгібіторів амілаз володіють зернові, інгібіторів протеаз – бобові культури.

**Встановлено природу активних компонентів:** за інгібіторну активність відносно панкреатичної амілази та трипсину відповідають речовини білкової природи, відносно панкреатичної ліпази – фенольні сполуки.

**Виділення та очищення біокоректорів.** Інгібітор ліпази – фенольні сполуки з насіння ріпаку вилучали 95 % етанолом і далі фракціювали (рис. 2).

Схема фракціювання розроблена на основі літературних джерел та включає наступні основні етапи:

- фракціювання виділеного комплексу фенольних сполук на сефадексі з наступним розділенням одержаних фракцій з допомогою тонкошарової хроматографії та ідентифікацією окремих низькомолекулярних фенольних сполук;
- виділення полі фенольних сполук і їх наступне розділення на гідролізуємі та конденсовані.

Встановлено, що значну здатність гальмувати дію панкреатичної ліпази мають як низькомолекулярні, так і високомолекулярні фенольні сполуки (рис. 2).

Найбільшою антиліполітичною активністю володіють синапін і таніни, що



гідролізуються. Внесок синапіну в інгібіторну активність є переважаючим. В цілому фенольний комплекс насіння ріпаку володіє значною інгібіторною дією на панкреатичну ліпазу, близькою до такої фармакопейного препарату “Ксенікал” (9700 ІО/г).

*Інгібітор трипсину* вилучали з насіння амаранту 0,05 М боратним буфером, рН 7,6, *протеазу томатів* – 0,2 М розчином NaCl, *протеазу люцерни* – 0,1 М Na-фосфатним буфером, рН 7,6, ліпазу – 0,1 М амоніачним буфером, рН 9,0.

*Інгібітор панкреатичної амілази* з борошенець вівса має найвищу ступінь вилучення за умов екстракції 0,15 М NaCl в 0,1 М гідрокарбонатному буфері, рН 9,2 (питома активність складає 0,196 ІО/мг білка). Білкову складову екстракту фракціювали сульфатом амоніаку з подальшим діалізом фракцій і їх афінною хроматографією на біоспецифічному сорбенті сефароза-панкреатична амілаза.

При використанні сульфату амоніаку із ступенем насиченості між 40 і 75 % активність отриманого осаду має максимальне значення і складає 4,2 ІО/мг білка, що в 15 разів перевищує питому інгібіторну активність екстракту.

Протеазу томатів очищено за допомогою фракціювання екстракту на колонці з ДЕАЕ-целюлозою, протеазу люцерни – гель-хроматографією на колонці з Тоурpearl 50 F. Очищення ліпази здійснювали подвійним хроматографуванням на сефадексі G-250, інгібітору трипсину зерна амаранту – афінною хроматографією на трипсин-сефарозі 4В (рис. 3).

Стадії очищення *інгібітору трипсину* з зерна амаранту включали екстракцію 0,05 М боратним буфером, рН 7,6, фракціювання білкової складової екстракту сульфатом амонію з подальшим діалізом фракції між 75 %-вим та 100 %-вим ступенем насиченості  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  та афінну хроматографію на біоспецифічному сорбенті трипсин – сефароза 4В (табл. 1).

Таблиця 1

**Стадії очищення інгібітору трипсину з зерна амаранту  
сорту «Сонячний» (10 г борошна зерна амаранту, ГМ 10)**

Стадії очищення	1 стадія (екстракція)	2 стадія (фракціювання та діаліз)	3 стадія (афінна хроматографія)
Об'єм, см <sup>3</sup>	90	120	70
ІА, ІО/ см <sup>3</sup>	0,36	0,18	0,22
Білок, мг/ см <sup>3</sup>	3,0	0,08	0,02
Загальний білок, мг	270	9,6	1,4
Сумарна ІА, од	32,4	21,6	15,4
Питома ІА, ІО/мг	0,12	2,25	11,0
Ступінь очищення	1,0	18,8	91,7
Вихід, %	100	66,7	47,5

Наведені в табл. 1 дані свідчать, що екстракт із вмістом білка 3,0 мг/см<sup>3</sup> та інгібіторною активністю 0,36 ІО/см<sup>3</sup> очищено до вмісту білка в активній фракції елюату після афінної

хроматографії 0,02 мг/см<sup>3</sup>, що володіє інгібіторною активністю 0,22 ІО/см<sup>3</sup>. Ступінь очищення інгібітору складає 91,7. Таким чином, розрахунки свідчать, що із 100 г зерна амаранту можна одержати 4,7 мг інгібітору трипсину, інгібіторна активність якого складає 11,0 ІО/мг білка.

**Характеристика біокоректорів.** Протеази томатів та люцерни не відносяться до групи тіолових, оскільки вплив 2-меркаптоетанолу і *n*-хлормеркурібензоату, які, відповідно, є активатором і інгібітором тіолових протеаз (типу папаїназ), при концентрації 5 ммоль/дм<sup>3</sup>, не призводить до достовірних відмінностей ферментативної активності ферментних препаратів в присутності і при відсутності зазначених сполук.

Інгібітор борошенець вівса за якісним складом амінокислотних залишків подібний до інгібітору з зерна пшениці; за переважаючим вмістом в амінокислотному складі гліцину та аланіну – до інгібітору з зерна проса та ячменю. Інгібітор характеризує перевага в-конформацій у вторинній структурі. Це узгоджується з відомими даними щодо низького вмісту (або повної відсутності)  $\alpha$ -спіральных ділянок в інгібіторах амілаз рослинного походження.

Інгібітор трипсину представлено двома ізоформами з молекулярними масами (18 $\pm$ 1) кДа та (20 $\pm$ 1) кДа, які не утворюють асоціацій між собою. Він характеризується низкою рис, загальних для інгібіторів сімейства STI. Його молекула містить значну кількість залишків кислих амінокислот, а також гліцину та амінокислот з неполярними боковими ланцюгами (Pro, Val, Leu, Ile). Частка неполярних бокових ланцюгів (NPS), складає 0,39 (для інгібітору Кунітца – 0,29). Таким чином, досліджуваний інгібітор відноситься до білків з високим ступенем гідрофобності. Подібно до інгібітору Кунітца (STI), білок з зерна амаранту є слабким нестехіометричним інгібітором хімотрипсину.

Значення молекулярних мас для всіх біокоректорів, що досліджували, визначали електрофоретичним методом (рис. 4). Вони, за виключенням високомолекулярної (300 кДа) ліпази пророщеного насіння ріпаку, знаходяться в діапазоні 17...25 кДа, що дозволяє віднести їх до низькомолекулярних біокоректорів.

**Фізико-хімічні властивості вільних біокоректорів.** Результати експериментів свідчать про низьку рН- та термостабільність отриманих біокоректорів. Так, навіть за оптимальних умов, біокоректори білкової природи повністю втрачають вихідну активність вже через 1,5-2 години інкубації.

За кислого значення рН середовища активність протеази люцерни швидко втрачається протягом 20 хвилин; а за лужних значень повна втрата активності відбувається через 2 години.

Протеаза томатів за кислого значення рН середовища втрачає активність впродовж 20 хвилин. За лужних значень рН спостерігається більш повільніша інактивація – повна втрата активності відбувається через 1,5 години інкубації ферменту. За оптимальних умов функціонування ферменту активність стабільна протягом перших 50 хвилин, а потім різко

знижується і повністю втрачається через 2,5 години.

*Ліпаза пророщеного насіння ріпаку*, як і досліджувані протеази, має невисокі рН і термостабільність (рис. 5, 6).

Активність інгібітору трипсину з амаранту після 24 год інкубації при температурі  $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$  і  $(40 \pm 2)^\circ\text{C}$  залишається практично на вихідному рівні. Це дозволяє прогнозувати зберігання його активності в умовах організму людини. При температурі  $(60 \pm 2)^\circ\text{C}$  інгібітор втрачає лише 10 % вихідної активності. При температурі  $(80 \pm 2)^\circ\text{C}$  за 20 хв. втрата активності складає 15 %, і далі продовжує повільно знижуватися. Отримано також результати, які свідчать і про високу рН-стабільність інгібітору.

Інгібітор з борошенців вівса найбільш стабільний при рН 5,0. При рН інкубаційного середовища 2,0 ІА інгібітору різко знижується за умов інкубації при рН 7,0 інгібітор втрачає свою активність до 48 % через 6 годин інкубації.

Інгібітор ліпази фенольної природи найбільш стабільний при температурі  $37^\circ\text{C}$  – протягом 2-х годин інкубації активність практично не зменшується. Фенольні сполуки зберігають активність при температурі не вище  $40^\circ\text{C}$ . При підвищенні температури їх антиліполітична активність помітно втрачається, що накладає обмеження на температурні режими, які закладаються в технологію отримання інгібітору.

Таким чином, доцільний пошук і визначення шляхів підвищення стабільності рослинних біокоректорів.

У **четвертому розділі** «Теоретичні основи технологій одержання БАД – коректорів процесів травлення» обґрунтовано методи концентрування, стабілізації та створення БАД з включенням біокоректорів, дано характеристику складу та фізико-хімічних властивостей їх стабілізованих форм.

Для іммобілізації біокоректорів використовували наступні методи концентрування і стабілізації: фізичну сорбцію на матрицях природного походження; комплексоутворення з поліелектролітними матрицями; безмембранний осмос.

Результати експериментів дозволили зробити висновок, що для біокоректорів-ферментів найбільш ефективним методом стабілізації є фізична сорбція на біополімерних матрицях (табл. 2).

Таблиця 2

#### Іммобілізація білкових біокоректорів методом фізичної сорбції

Біокоректор	Носій*	Вагове співвідношення носій:біокоректор	Активність, % збереження від вихідної
Протеаза насіння томатів	ХВПВ:ХВШТ=1:1	1:0,20	55,0

Протеаза люцерни	ПВ	1:0,15	88,4
Ліпаза ріпаку	ХВПВ	1:0,30	72,4
Інгібітор панкреатичної амілази борошенець вівса	ХВПВ	1:0,30	33,0
Інгібітор трипсину амаранту	ХВПВ	1:0,30	34,0

Примітка. \*ХВПВ – харчові волокна пшеничних висівок, ХВШТ – харчові волокна шкірки томатів, ПВ – пшеничні висівки

І, навпаки, її використання для іммобілізації інгібіторів білкової природи не доцільно, оскільки ступінь збереження їх активності відносно низький і не перевищує 34 %. Ймовірними причинами меншого збереження вихідної активності інгібіторів при адсорбції на біополімерних матрицях є просторові та дифузійні утруднення виходу інгібітору в реакційне середовище, обмеження рухомості іммобілізованого інгібітору та екранування активного центру ферменту матрицею.

Результати визначення активності інгібіторів білкової природи, стабілізованих методом комплексоутворення (табл. 3), доводять, що він теж є ефективним для їх концентрування. Використання полісахаридів як комплексоутворювачів дозволяє досягти значного (25...40-кратного) ступеню очищення.

Таблиця 3

#### Іммобілізація білкових біокоректорів методом комплексоутворення

Біорегулятор	Ізоелектрич на точка (ІЕТ), рН	Молекуляр на маса, кДа	Максимальне осадження полісахаридом в ІЕТ біокоректора	Масова частка біокоректора в комплексному осаді
Протеаза насіння томатів	8,0	17...20	Гуміарабік	62
Протеаза люцерни	3,0	24	Альгінат натрію	65
Ліпаза насіння ріпаку	4,5	300	Агар	48
Інгібітор амілази з борошенців вівса	4,5	25,11	Агар	73
Інгібітор трипсину з зерна амаранту	3,0	20	Альгінат натрію	80

Порівняння основних параметрів цього процесу з відомими методами очищення білків

дозволяє віднести його за ефективністю до іонообмінної хроматографії та хроматофокусування. Ефективність осадження біокоректорів білкової природи з їх екстрактів залежить від молекулярної маси біокоректору: зі зменшенням молекулярної маси зростає ефективність осадження, тобто збільшується маса біокоректору, що перейшов з екстракту в комплексний осад. Так, при концентруванні протеаз з незначними молекулярними масами (менше, ніж 25 кДа), в осад переходить 62...65 % загальної кількості ферментів, а при іммобілізації ліпази насіння ріпаку в комплексний осад переходить лише 48 % загальної кількості ферменту.

Здатність біокоректору до комплексоутворення залежить від характеру його біологічної активності: білки-інгібітори мають більшу спорідненість до полісахаридів, ніж білки-ферменти. Це, ймовірно, пояснюється більшою стабільністю інгібіторів щодо конформаційних змін, які відбуваються при комплексоутворенні. Максимальне осадження біокоректорів відбувається близько ізоелектричної точки білка полісахаридом, який за даного значення рН має максимальний заряд.

Процес комплексоутворення біокоректорів і полісахаридів здійснюється за рахунок електростатичних взаємодій між зарядженими групами полімерів (приблизно на 80 %). Це не єдиний можливий тип зв'язків між складовими комплексу – вірогідними є гідрофобні взаємодії та водневі зв'язки, утворення яких доведено за допомогою ІЧ-спектроскопії.

Доцільність використання безмембранного осмосу для концентрування біокоректорів вивчали на прикладі ферменту – ліпази з насіння ріпаку, яка є складовою альбумінів і має сприятливу для використання цього методу високу молекулярну масу, значно вищу за аналогічні показники інших біокоректорів. Відомо, що нейтральний полісахарид – камедь бобів ріжкового дерева несумісний з усіма альбумінами і глобулінами при різних значеннях рН середовища та іонної сили. При концентруванні ліпази розчином полісахариду з використанням безмембранного осмосу 87 % її вихідної кількості концентрується в об'ємі, що в 6 раз менший, ніж вихідний об'єм екстракту (табл. 4). Отже, показано принципову можливість використання безмембранного осмосу для концентрування високомолекулярних біокоректорів.

Таблиця 4

**Фазове розшарування при концентруванні білкової складової  
екстракту знежиреного пророщеного насіння ріпаку  
розчином полісахариду (безмембранний осмос, вихідний склад фаз:  
11,9 % розчин білка, 0,4 % розчин полісахариду)**

Склад фаз після розшарування	Вміст білка, %	Вміст полісахариду , %	Ліполітична активність, % від загальної	Об'єм фази, мл
---------------------------------	-------------------	------------------------------	-----------------------------------------------	-------------------

Склад фази, збагаченої полісахаридом	3,9	0,24	13	25
Склад фази, збагаченої білком	53,5	1,20	87	5

Враховуючи вищенаведене, концентрування біокоректорів-ферментів здійснювали шляхом фізичної сорбції з використанням біополімерних матриць (табл. 3), інгібіторів білкового походження – комплексоутворенням з полісахаридами (табл. 4).

Для стабілізації *біокоректорів фенольної природи* доцільно використання сорбційних методів іммобілізації. Розглянуто низку носіїв в якості матриць. Максимальне збереження антиліполітичної активності має місце при використанні пшеничних висівок і харчових волокон пшеничних висівок. Іммобілізація на біополімерній матриці забезпечує високе збереження активності – 1534,5 ІО/г іммобілізованого препарату (понад 80 % від початкової антиліполітичної активності інгібітору); значне збільшення його рН- і термостабільності (рис. 7, 8).

Іммобілізований препарат інгібітору порівняно з вільним менш схильний до інактивуючої дії шлункового соку і холевих кислот, що дозволяє прогнозувати його ефективне функціонування в умовах реального травлення, а також можливість використання більш жорстких технологічних параметрів виробництва. Після послідовної інкубації в середовищі шлункового соку і жовчі інгібітор зберігає понад 40 % антиліполітичної активності (рис. 9), тоді як у Ксенікала (фармакопейний препарат антиліполітичної дії, Швейцарія) вона знижується до 26 % (рис. 10).

Вміст *інгібітору панкреатичної амілази* в комплексі білок-агар складає біля 1 % (рис. 11). Інгібіторна активність комплексу сягає 249 ІО/г (табл. 5) і порівняна з такою комерційного препарату панкреатичної амілази «Ремоглюкол» (Німеччина). В складі іммобілізованого препарату інгібітору, за даними електрофорезу та гель-хроматографії, переважають білки з низькими молекулярними масами (від 6 до 46 кДа) (рис. 12). Вміст високомолекулярних білків складає лише 7 %. На відміну від цього, у вихідному екстракті переважають білкові фракції з високими молекулярними масами (понад 70 %) (рис. 12). Таким чином, комплексоутворення біокоректорів з поліелектролітними матрицями супроводжується перерозподілом молекулярно-масового складу білкової компоненти екстракту.

Таблиця 5

**Порівняльна характеристика  
активності інгібітору амілази на окремих стадіях очищення**

Зразки	Інгібіторна активність	
	ІО/г зразка	% від максимальної
Борошечня вівса	1,2	0,0046

Очищений інгібітор	26000	100
Комплексний осад інгібітор-агар (БАД)	249	0,96
Ремоглюкол (препарат інгібітору з пшениці)	210	

**Фізико-хімічні властивості біокоректорів, стабілізованих іммобілізацією на біополімерних матрицях.** Іммобілізовані біокоректори характеризуються розширенням їх рН- та термооптимумів, значним збільшенням рН- та термостабільності, а також стійкістю при функціонуванні в модельних умовах реального травлення.

Іммобілізований інгібітор панкреатичної амілази більш стійкий до впливу рН середовища і температури, ніж його вільна форма (рис. 13, 14), що дозволяє прогнозувати його пролонговану дію в організмі та можливість виробництва з використанням температурних режимів в більш широкому діапазоні.

Результати модельних експериментів щодо впливу шлункового соку та натуральної жовчі на активність вільного інгібітору та його іммобілізованої форми у вигляді комплексу з агаром, які вказують на практично повну втрату активності першим вже після 30 хвилин інкубації в шлунковому соку і її високе (біля 80 %) збереження останнім (рис. 15), наочно демонструють високу стабільність отриманої БАД.

Іммобілізація на харчових волокнах приводить до розширення термооптимуму активності, а також стабілізації ферментів в процесі тривалої інкубації при фізіологічній температурі та при більш високих температурах, які можливі при сушінні кінцевого продукту з їх вмістом.

**Природу взаємодії між біокоректорами і носіями** досліджено за допомогою калориметрії і ІЧ-спектроскопії.

Значення теплот гідратації механічних сумішей біокоректорів з носіями значно перевищує теплоти гідратації іммобілізованих препаратів.

Ентальпія утворення стабільних форм біокоректорів, отриманих при комплексоутворенні (2236,2 Дж/моль) перевищує значення ентальпії утворення іммобілізованих форм, отриманих шляхом фізичної сорбції (1797,0 Дж/моль), що свідчить про більшу міцність зв'язків, що утворились між біокоректором та матрицею при комплексоутворенні (табл. 6).

Таблиця 6

**Термохімічні характеристики біополімерних носіїв, вільних інгібіторів,  
їх механічних сумішей та іммобілізованих препаратів**

Зразок	Зміна температур	Теплота гідратації,	Теплота утворення	Теплота гідратації
--------	------------------	---------------------	-------------------	--------------------

	и, $\Delta t$ , °C	$\Delta H_{гидр}^{гидр}$ , Дж/моль	сполуки, $\Delta H_{имм}^{обр}$ , Дж/моль	(теор.) суміші, $\Delta H_{см}^{гидр}$ , Дж/моль
ХВПВ*	0,040	1597,3	—	—
Агар	0,057	2276,2	—	—
Фенольний комплекс	0,010	399,3	—	—
Інгібітор б-амілази	0,014	559,1	—	—
Механічна суміш ХВПВ + ф/с*	0,150	5989,9	—	1996,6
Механічна суміш Агар +інгібітор б-амілази	0,110	4392,6	—	2156,4
Імобілізовані на ХВПВ ф/с	0,105	4192,9	1797,0	—
Імобілізована форма інгібітору $\alpha$ -амілази	0,053	2116,4	2236,2	—

Примітка. \*ХВПВ – харчові волокна пшеничних висівок, ф/с – фенольні сполуки.

Порівняння ІЧ-спектрів харчових волокон і іммобілізованих на них інгібіторів фенольної і білкової природи свідчить, що іммобілізація сприяє зменшенню напівширини смуги поглинання, яка відповідає валентним коливанням ОН груп. Це вказує на збільшення кількості ОН-груп, що беруть участь в міцних водневих зв'язках. Отже, взаємодія інгібіторів з носіями в умовах іммобілізації супроводжується виникненням зв'язків між ними.

Як підсумок наукових досліджень, а також з урахуванням даних, наведених в літературних джерелах, запропоновано підходи до дефініції біокоректорів процесів травлення (рис. 16).

Виходячи з напрямку дії, їх поділяють на ферменти та інгібітори ферментів, із специфічності дії – на такі, що каталізують протеоліз, ліполіз, амілоліз, або, навпаки, уповільнюють ці процеси; з хімічної природи – на речовини білкової, фенольної або вуглеводної природи, за методом концентрування та стабілізації – на стабілізовані шляхом фізичної сорбції, комплексоутворення та безмбранного осмосу.

У п'ятому розділі «Біокоректори як каталізатори та інгібітори гідролізу субстратів – кінетичні дослідження» наведено результати кінетичних досліджень вільними та іммобілізованими формами біокоректорів. Кінетика гідролізу вільними та іммобілізованими протеазами з насіння томатів та люцерни підкоряється рівнянню Міхаеліса-Ментен, спостерігалися лінійні залежності в координатах Хейнса. Кінетичні параметри гідролізу гемоглобіну нативною і іммобілізованою протеазою томатів представлено на рис. 17; кінетичні параметри гідролізу казеїну нативною та іммобілізованою формою протеази люцерни – на рис. 18. При іммобілізації на харчових волокнах кінетичні параметри змінюються несуттєво.

Визначено кінетичні параметри реакції інгібування панкреатичної ліпази фенольними



сполуками насіння ріпаку за допомогою розрахунків методами лінеаризації рівняння Міхаеліса-Ментен за Лайнувером-Берком і Хейнсом. Значення константи інгібування ( $K_i$ ) обчислювали методами Діксона і Уебба. Вплив фенольних сполук на кінетику ліполізу є лінійним і підкоряється кінетиці Міхаеліса-Ментен. Підвищення концентрації фенольних сполук супроводжується підвищенням  $K_M$  і обидва способи лінеаризації утворюють системи прямих, що взаємно перетинаються, загальна точка перетину яких не лежить на координатних осях. За даними графіків Лайнувера-Берка і Хейнса (рис. 19), тобто одночасному збільшенню  $K'_M$  і зменшенню  $V'_{\max}$  фенольні сполуки насіння ріпаку інгібують панкреатичну ліпазу за змішаним (двопараметрично узгодженим) типом, здійснюється механізм лінійного змішаного інгібування. Отримане значення константи змішаного інгібування складає  $\bar{K}_I = 0,58 \pm 0,145$  г/дм<sup>3</sup>.

Згідно даним ІЧ-спектроскопії при взаємодії інгібітору фенольної природи з ліпазою мають місце зміни як активного центру ферменту, так і центру зв'язування субстрату, що супроводжується змінами у вторинній структурі ферменту і частковою іонізацією карбоксильних груп, які входять до активного центру панкреатичної ліпази. Це може розглядатися як непряме свідчення того, що інгібування здійснюється за змішаним типом, що підтверджує висновки, зроблені на основі кінетичних досліджень. Кінетичні константи іммобілізованого інгібітору ( $K_p$ ,  $K'_p$ ,  $\bar{K}_I$ ,  $K'_s$ ) зростають в 1,75...3,5 рази в порівнянні з такими для вільних фенольних сполук. Аналогічно з  $[I]_{50}$  для вільного інгібітору,  $[I]_{50}$  для іммобілізованого інгібітору є для  $[S] = 75...450$  г/дм<sup>3</sup> ( $0,25...1,5 K_M$ ) величиною, близькою до постійної, хоча і збільшеної в 2,77 рази (3,894 г/дм<sup>3</sup> проти 1,405 г/дм<sup>3</sup>).

Проведені розрахунки за Лайнувером-Берком та Хейнсом з використанням графіків Уебба і Діксона свідчать про лінійний тип експериментальної залежності, що підтверджується високими коефіцієнтами лінійної кореляції. В діапазоні концентрацій інгібітору 6,25...25 мг/дм<sup>3</sup> спостерігаються вищі значення швидкості реакції, ніж в його відсутності; значення  $K_M$  істотних змін не зазнають.

В діапазоні концентрацій інгібітору 50 мг/дм<sup>3</sup>...3,2 г/дм<sup>3</sup> спостерігається зниження  $V_{\max}$  за мірою зростання концентрації інгібітору без істотних змін значень  $K_M$  в порівнянні з інтактним ферментом (при відсутності інгібітору). Отримані дані показали, що розрахунки за  $K_M/V_{\max}$  дають менші абсолютні значення, ніж розрахунки за  $1/V_{\max}$ . Кінетичний аналіз реакції інгібування ліпази іммобілізованим препаратом інгібітору фенольної природи дозволив зробити висновок, що іммобілізація не змінює типу інгібування панкреатичної ліпази при використанні маслинової олії як субстрату, механізм відноситься до змішаного (двопараметрично узгодженого) типу.

Результати кінетичних досліджень інгібування панкреатичної амілази інгібітором з борошенців вівса показали, що у діапазоні концентрацій іммобілізованого інгібітору

50 мг/дм<sup>3</sup>...3,2 г/дм<sup>3</sup> спостерігається зниження  $V_{\max}$  за мірою зростання його концентрації без істотних змін значень  $K_M$  в порівнянні з інтактним ферментом (при відсутності інгібітору панкреатичної амілази). Значення  $K_M$  залишається приблизно постійним по всьому діапазону концентрацій іммобілізованого інгібітору, воно є приблизно в 1,5...1,6 раз меншим, ніж у випадках для інтактного ферменту. Порівняння отриманих результатів кінетичних досліджень інтактного та іммобілізованого інгібітору виявило зростання  $K_i$  для іммобілізованого інгібітору щодо інтактного. Відмінності між цими значеннями, обчисленими з використанням даних графіка Лайнуївера-Берка, є статистично недостовірними внаслідок великого розкиду даних. Для даних, отриманих за Хейнсом, вже спостерігається достовірність відмінностей (для 1990,1 – 424,4 = 1565,7 значення « $t$ » складає 3,487, що при  $n' = 8$  складає  $0,002 < p < 0,01$ ; для 678,4 – 445 = 233,3 отримали  $t = 3,391$ , що при  $n' = 11$  також складає  $0,002 < p < 0,01$ ); відмінності достовірні і при порівнянні даних, отриманих методом Уебба (для 1360,4 – 403,8 = 956,6 маємо  $t = 7,844$ , що при  $n' = 48$  складає  $p < 0,001$ ). Оскільки використання іммобілізованих препаратів інгібіторів відноситься до області гетерогенних процесів (інгібування), причинами зростання  $K_i$  можуть бути:

- дифузійні затруднення; з урахуванням того, що молекулярна маса інгібітору рівна 25,1 кДа, а агару – на декілька порядків більше, тому зв'язування білка з таким носієм повинно неминуче приводити до дифузійних ускладнень;

- стеричні (просторові) обмеження; за рахунок різкого збільшення молекулярної маси продукту взаємодії інгібітору з агаром, його зв'язування з амілазою може ускладнитися.

Крім того, слід враховувати і такі можливості:

- конформаційні зміни молекули інгібітору як результат її іммобілізації на агарі; вони цілком можуть позначатися на зв'язуванні інгібітору з ферментом;

- електростатичний ефект сульфогруп агаропектину;

- вплив цих же груп на рН в мікрооточенні інгібітору і ферменту, що змінює швидкість і міцність їх взаємодії.

Зменшення константи Міхаеліса розглядається як підвищення спорідненості ферменту до субстрату (стабілізація фермент-субстратного комплексу). Таким чином, результати обробки даних експерименту за інгібуванням панкреатичної амілази іммобілізованим інгібітором з використанням методів математичного аналізу кінетичних досліджень показали відсутність змін  $K_M$  при значеннях  $V_{\max}$ , які зменшуються, що дозволяє віднести інгібування до лінійного неконкурентного типу (каталітичне інгібування).

Розраховані кінетичні параметри гідролізу казеїна трипсином в присутності інгібітору з насіння амаранту свідчать про неповне конкурентне інгібування (графіки не мають точки

перетину з віссю ординат). Кінетичні параметри гідролізу казеїну трипсином в присутності стабілізованої форми інгібітору свідчать про здійснення неповного конкурентного інгібування. Імобілізована форма інгібітору трипсину при низьких концентраціях субстрату діє аналогічно вільній, а при високих концентраціях субстрату його активність дещо нижча, ніж в вільній формі.

Включення інгібітору трипсину із зерна амаранту до складу БАД не супроводжується зміною стехіометрії зв'язування інгібітору та ферменту при значній концентрації (256 мг/дм<sup>3</sup>) інгібітору, тип інгібування відноситься до неповного лінійного конкурентного (рис. 20).

Отже, на підставі отриманих результатів зроблено висновок щодо типів інгібування вільними та імобілізованими формами біокоректорів. Встановлено, що інгібування панкреатичної ліпази фенольними сполуками ріпаку здійснюється за змішаним (двопараметрично узгодженим) типом, панкреатичної амілази інгібітором з борошенець вівса – лінійним неконкурентним, трипсину інгібітором з насіння амаранту – неповним конкурентним. Для імобілізованих препаратів практично у всіх випадках спостерігалось зниження  $V_{\max}$ , зумовлене гетерогенністю каталізу високомолекулярного субстрату. Збільшення  $K_M$  при імобілізації означає, що для досягнення даної швидкості реакції потрібна більша концентрація субстрату, ніж для інтактного ферменту. Можливо, це пов'язано з конформаційною відмінністю імобілізованого препарату в порівнянні з інтактним. Імобілізація біокоректорів не приводить до зміни типу інгібування.

В шостому розділі «Розробка технології БАД-коректорів процесів травлення» доведено можливість отримання біологічно активних добавок, які містять ліпазу насіння ріпаку, інгібітори амілази, ліпази та трипсину; наведено принципові схеми переробки рослинної сировини з отриманням БАД; обґрунтовано раціональні параметри ключових технологічних операцій, технологічні та апаратурні схеми. Технології БАД – біокоректорів включають наступні основні етапи:

- вилучення біокоректору з сировини;
- імобілізацію біокоректору;
- сушіння біокоректору.

Для обґрунтування умов *вилучення біокоректорів* з рослинної сировини як фактори оптимізації розглядали: температуру екстракції ( $t$ ), значення гідромодуля ( $ГМ$ ) та тривалість процесу ( $\tau$ ). Як параметр оптимізації обрано активність біокоректору  $y_{IA}$ .

Отримано рівняння регресії, що описує залежність виходу *інгібітору амілази* в розчин (IA) від досліджуваних факторів:

$$IA=0,19378-0,00002t^2-0,000108\phi+0,02657ГМ-0,001923ГМ^2-0,000087tГМ+0,000003t\phi, (1)$$

Отримані оптимальні значення, що відповідають максимальній амілолітичній активності  $y_{IA}$  (0,286 ІО/мг білка), становлять:  $\tau = 30$  хв.;  $t = 13,4$  °C;  $ГМ = 7,2$ .

Для визначення оптимальних параметрів процесу *імобілізації* білкових біокоректорів методом *комплексоутворення* як фактори оптимізації розглядали: вплив температури процесу комплексоутворення ( $t$ ), концентрації полісахариду ( $C$ ) та тривалості процесу ( $\phi$ ) на інгібіторну активність БАД.

Отримано рівняння регресії, що описує залежність імобілізації інгібітору амілази на агарі ( $IA$ ) від досліджуваних факторів:

$$IA = 102,0435 - 0,0102t^2 - 0,5639\phi + 46,6663C - 55,106C^2 + 0,3014Ct + 0,4290\phi C, \quad (2)$$

Оптимальні значення, що відповідають максимальній інгібіторної активності (187 ІО/мг білка), становлять:  $\tau = 15$  хв.;  $t = 13,5$  °C;  $C = 0,3$  %.

Для обґрунтування умов вилучення *інгібітору ліпази* як фактори оптимізації розглядали: температуру *екстракції*, гідромодуль та тривалість процесу. Отримано рівняння регресії, яке описує залежність антиліполітичної активності фенольних сполук від досліджуваних факторів. Оптимальні значення, що відповідають максимальній антиліполітичній активності, становлять: тривалість процесу – 10 хв; температура – 20 °C; гідромодуль – 10. За цих умов забезпечується максимальна інгібіторна активність фенольних сполук – 8875 ІО/г.

За допомогою методу найменших квадратів і послідовного регресійного аналізу отримано рівняння регресії, яке описує залежність антиліполітичної активності імобілізованих фенольних сполук методом *фізичної сорбції* від досліджуваних чинників – температури імобілізації  $t$ , тривалості процесу  $\tau$  та співвідношення твердої і рідкої фаз ( $ГМ$ ).

$$IA = -9,81375 + 5,80736t - 0,1735t^2 + 4,88905\phi - 0,12476\phi^2 + 55,4537ГМ - 7,93519ГМ^2 - 0,10972t\phi + 0,00289t^2\phi \quad (3)$$

На основі цього рівняння встановлено раціональні параметри процесу імобілізації фенольних сполук на харчових волокнах пшеничних висівок:  $\tau = 15,5$  хв;  $t = 16$  °C;  $ГМ = 3,5$ . За цих умов забезпечується максимальна інгібіторна активність імобілізованого препарату – 165,6 ІО/г.

За раціональні параметри процесу екстракції ліпази, що відповідають максимальній ліполітичній активності прийняли: тривалість ( $\tau$ ) – 30 хв; температура ( $t$ ) – 20,0 °C; гідромодуль ( $ГМ$ ) – 3,5. За даних умов ліполітична активність екстракту складає 10,94 ІО/ мг білка.

Отримані раціональні значення процесу фізичної сорбції екстракту ліпази на харчових волокнах, що відповідають максимальній ліполітичній активності, становлять: тривалість –

20,0 хв.;  $t = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; ГМ – 3,0 (гідромодуль просочування, який відповідає мінімальним втратам ферментативної активності). За даних умов активність іммобілізованої ліпази складає 2376 ЛО/г БАД.

Наведено рецептуру розроблених БАД і результати дослідження властивостей отриманих БАД – коректорів процесів травлення. Використання кверцетина в якості антиоксиданту в складі БАД з включенням інгібітору ліпази фенольної природи дозволило значно знизити інтенсивність процесів окиснення в іммобілізованому препараті, зберігаючи його антиліполітичну активність. Показано можливість отримання БАД – інгібітору ліпази та БАД – ентеросорбентів з інгібіторними властивостями.

За результатами досліджень розроблено *технологічні схеми отримання БАД*, які містять інгібітор амілази борошенців вівса, інгібітор ліпази насіння ріпаку, ліпазу пророщеного насіння ріпаку, інгібітор трипсину з насіння амаранту.

Послідовність технологічних операцій отримання БАД з антиамілолітичною активністю наведено на рис. 21.

Схема виробництва антиліполітичної БАД включає наступні етапи: виділення фенольного комплексу з сировини; іммобілізація фенольних сполук на біополімерній матриці методом фізичної сорбції та сушіння БАД, які представлені на рис. 22. Технологічний процес, що рекомендується, забезпечується необхідною організацією вимірювально-інформаційної системи. Це дозволяє поетапно виконувати вимоги технології, які визначаються технохімічним і мікробіологічним контролем.

Технологія отримання БАД, що містить ліпазу пророщеного насіння ріпаку, включала наступні стадії: пророщування насіння, його знежирення, екстракцію з використанням 0,1 М амоніачного буферу, рН 9,0, концентрування та стабілізація біокоректору з допомогою іммобілізації методом фізичної сорбції на біополімерній матриці і сушіння одержаної БАД.

За результатами дослідження було розроблено технологічну схему отримання БАД з включенням ліпази пророщеного насіння ріпаку (рис. 23).

Реальність розроблених технологій БАД – коректорів процесів травлення підтверджено результатами промислових апробацій на науково-виробничому підприємстві «Аріадна», м. Одеса. Отримані БАД відповідають необхідним санітарно-гігієнічним, токсикологічним, мікробіологічним, фізико-хімічним та органолептичним нормам.

Сукупність даних мікробіологічних досліджень та вивчення динаміки зміни активностей БАД дозволяє рекомендувати зберігання БАД з включенням фенольних сполук впродовж 6 місяців, всіх інших – 12 місяців за температури  $(4\pm 2)\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Показано можливість отримання функціональних кисломолочних напоїв лікувально-профілактичної спрямованості з включенням БАД, що містять інгібітор панкреатичної амілази

та інгібітор панкреатичної ліпази.

Проведені дегустація і промислова апробація (ВАТ «Володимирецький молочний завод», м. Володимирець, Рівненської обл. та ТОВ «Агроком», Одеська обл.) показали можливість введення БАД з антиамілолітичною дією до складу кисломолочних напоїв (йогурт та «Наріне»). Використання розробленої БАД дозволяє зменшити час виробництва, покращити органолептичні та фізико-хімічні показники напоїв.

Обґрунтовано економічну ефективність та доцільність впровадження розроблених технологій біокоректорів процесів травлення у промислове виробництво.

Результати медико-біологічних досліджень антиамілолітичної БАД свідчать про її м'яку гіпоглікемічну дію. Вона нормалізує вуглеводний обмін, не викликає стимуляції секреції інсуліну та розвитку інсулінорезистентності, що характерно для протидіабетичних препаратів периферійної дії. Доведено доцільність її використання для зниження та регулювання рівня глюкози у крові людини. Рекомендована добова доза складає 2 г.

Медико-біологічні дослідження БАД з антиліполітичною активністю свідчать, що при її вживанні достовірно інгібується розщеплення жирів. БАД з активністю 170,5 ІО/г має пригнічуючу дію на приріст маси тіла щурів за рахунок інгібування розщеплення жирів в кишківнику, що підтверджується збільшенням кількості неперетравлених жирів. Ефективна добова доза БАД – 135 мг/кг, що в перерахунку на дозу для людини складає 1,5 г на добу.

Розроблено нормативну та технологічну документацію на БАД, що містить інгібітор панкреатичної ліпази; на БАД, що містить інгібітор трипсину з зерна амаранту та на БАД з включенням ліпази; розроблено та зареєстровано в Держспоживстандарті України нормативну та технологічну документацію на дієтичну добавку, що містить інгібітор панкреатичної амілази з борошенець вівса.

## **ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ**

1. Сформульовано та реалізовано концепцію про можливість і доцільність корегування процесів травлення біокоректорами рослинного походження, технології яких обґрунтовано в дисертаційній роботі.

2. Обґрунтовано способи вилучення та очищення біокоректорів: протеазу томатів доцільно вилучати 0,2 М розчином NaCl з подальшим хроматографуванням на ДЕАЕ-целюлозі; протеазу люцерни та ліпазу ріпаку – відповідно 0,1 % розчином натрію гідросульфату (рН 8,0) та 0,1 М амоніачним буфером (рН 9,0) і наступним фракціюванням на сефадексах; інгібітор амілази з борошенців вівса екстракцією 0,15 М NaCl в 0,1 М гідрокарбонатному буфері, рН 9,2; інгібітор протеази з зерна амаранту – 0,05 М боратним буфером, рН 7,6, інгібітор ліпази – 95 % етанолом з подальшим очищенням шляхом афінної хроматографії.

3. Встановлено природу та склад інгібіторів ферментів. Інгібітори амілази та трипсину –

білки. За амінокислотним складом та специфічністю дії інгібітор амілази аналогічний іншим зерновим інгібіторам; інгібітор протеази-інгібітору Кунітца (сімейство STI). Інгібітор ліпази – комплекс фенольних речовин, активність якого переважно обумовлено наявністю синапіну та гідролізуємих танінів.

4. На основі досліджень фізико-хімічних властивостей біокоректорів (молекулярна маса, ізоелектрична точка, рН- і термооптимум, рН- і термостабільність) встановлено, що біокоректори характеризуються незначними молекулярними масами (20...25 кДа) за виключенням ліпази (300 кДа). Ізоелектричні точки біокоректорів-білків знаходяться в інтервалі значень рН 3...8. Термооптимуми дії всіх біокоректорів – 37 °С; рН-оптимум дії протеази томатів – 5,0; протеази люцерни – 7,0; ліпази ріпаку – 9,0; інгібітору амілази – 5,5. Біорегулятори фенольної та білкової природи, за виключенням інгібітору трипсину з зерна амаранту, характеризуються незначними рН- і термостабільностями.

5. На основі визначення специфічності дії та активності біокоректорів встановлено, що за характером взаємодії з активаторами та інгібіторами протеази томатів та люцерни відносяться до категорії нетіолових протеаз. Інгібітор трипсину є монофункціональним і двоголовим (1 молекула інгібітору зв'язує 2 молекули ферменту при утворенні комплексу). За активністю інгібітори трипсину (11,0 ІО/мг), амілази (26,0 ІО/мг) та ліпази (8875 ІО/г) наближаються до відповідних фармакопейних препаратів (Контрикал, Ремоглюкол, Ксенікал).

6. Встановлено закономірності перебігу реакцій ферментативного каталізу (інгібування) біокоректорами. Імобілізація інгібіторів не приводить до зміни типу інгібування, який визначено як лінійний неконкурентний для інгібітору амілази, змішаний – для інгібітору ліпази і конкурентний – для інгібітору трипсину.

7. Здійснено порівняльну характеристику ефективності використання методів концентрування та стабілізації біокоректорів. Встановлено доцільність використання фізичної сорбції для стабілізації інгібітору ліпази ріпаку (збереження активності 98 %); комплексоутворення – для біокоректорів білкової природи з незначними молекулярними масами (меншими, ніж 25 кДа), осадження яких відбувається близько ізоелектричної точки полісахаридом-комплексоутворювачем, що за даного значення рН має максимальний заряд (ступінь очищення 25...40); безмембранного осмосу – для високомолекулярних білкових біокоректорів (збереження активності більш, ніж 87 %).

8. Визначено склад і закономірності змін фізико-хімічних властивостей біокоректорів внаслідок імобілізації: встановлено значне підвищення їх рН- та термостабільності, розширення рН- та термооптимумів імобілізованих біокоректорів в порівненні з їх вільними формами. Максимальна активність біокоректорів відповідає фізіологічним значенням температури ((37±2) °С). У складі біокоректорів, імобілізованих методом

комплексоутворення переважають низькомолекулярні білки (93 %). Імобілізація інгібітору панкреатичної ліпази фенольної природи на біополімерній матриці забезпечує високе збереження активності (понад 80 % від початкової); значне збільшення його рН- і термостабільності. Імобілізовані препарати інгібіторів ліпази та амілази порівняно з нативними більш стійкі до інактивуючої дії шлункового соку і жовчаних кислот.

9. Встановлено природу взаємодії біокоректорів з полісахаридами або полісахарид-лігнінними матрицями. Зв'язок між агаром і інгібітором амілази обумовлено переважно іонними взаємодіями (80 %), імовірно також гідрофобні (6,18 %) взаємодії та водневі (13,7 %) зв'язки. Взаємодія між інгібітором ліпази і вуглевод-лігнінною матрицею забезпечується в основному водневими зв'язками.

10. Обґрунтовано компонентний склад та способи одержання БАД. Вміст біокоректорів в складі БАД варіює в діапазоні 1...10 %, доля матриці складає 52,7...96,7 %, інше – біологічно активні речовини рослинного джерела. Показано доцільність використання 0,05 % кверцетину як антиоксиданта в складі БАД з антиліполітичною дією.

11. Розроблено схеми отримання БАД з включенням рослинних біокоректорів: на основі ліпази з пророщеного насіння ріпаку, інгібітору панкреатичної ліпази з борошенців вівса, інгібітору трипсину з зерна амаранту, інгібітору панкреатичної ліпази насіння ріпаку. Схеми виробництва БАД включають наступні етапи: виділення біокоректорів з сировини; іммобілізацію їх на біополімерних матрицях; сушіння БАД зберігаються протягом 6-12 місяців, впродовж яких показники якості БАД відповідають вимогам, викладеним в нормативній документації.

12. Оптимізовано ключові режими процесів екстракції та іммобілізації інгібітору фенольної природи з насіння ріпаку на ХВРВ. Встановлено, що раціональними режимами екстракції є: температура 20 °С, тривалість екстракції 10 хв., гідромодуль – 10; раціональними режимами іммобілізації – температура 16 °С, тривалість 15,5 хв, гідромодуль – 3,5. Встановлено, що раціональними режимами екстракції інгібітору з зерна амаранту є: температура екстракції – 20 °С, тривалість екстракції – 30 хв, гідромодуль – 6,3; а процесу іммобілізації: температура – 20 °С, час комплексоутворення – 20 хв, концентрація полісахариду – 0,2 %. Раціональними режимами екстракції інгібітору амілази з борошенців вівса є: температура – 13,4 °С, тривалість – 30 хв, гідромодуль – 7,2; а процесу іммобілізації: температура – 13,5 °С, тривалість комплексоутворення – 15 хв, концентрація полісахариду – 0,3 %. Встановлено, що раціональними режимами екстракції ліпази пророщеного насіння ріпаку є: температура 20 °С, тривалість екстракції 30 хв., гідромодуль – 3,5; раціональними режимами іммобілізації – температура 20 °С, тривалість 20 хв, гідромодуль – 3.

13. Проведено промислову апробацію розроблених технологій БАД на ВАТ НПО



«Аріадна» (м. Одеса). Дано економічне обґрунтування ефективності виробництва БАД з включенням інгібітору ліпази: собівартість 10 капсул складає 1,0 грн, собівартість 50 г БАД з включенням інгібітору амілази – 22,34 грн.

14. Доведено лікувально-профілактичні властивості БАД з вмістом інгібіторів ліпази, амілази та трипсину. Встановлено, що споживання БАД з включенням інгібітору ліпази в межах фізіологічної норми (1,5 г на добу) сприяє значному збільшенню виведення жиру, зниженню активності ліполітичних ферментів та вмісту загальних ліпідів. Використання в раціонах харчування діабетиків БАД з включенням інгібітору амілази приводить до зменшення рівня глюкози в крові та значного зменшення гіперглікемії; встановлена ефективна доза складає біля 2 г на добу.

15. Розроблено нормативну документацію на БАД, що містить інгібітор панкреатичної ліпази фенольної природи насіння ріпаку, на БАД з включенням ліпази та на БАД, яка містить інгібітор трипсину. Розроблено та зареєстровано в Держспоживстандарті України нормативну документацію на дієтичну добавку, що містить інгібітор панкреатичної амілази з борошенців вівса.

16. Показано можливість отримання функціональних кисломолочних напоїв лікувально-профілактичної спрямованості з включенням БАД, що містять інгібітор панкреатичної амілази та інгібітор панкреатичної ліпази. Вивчено особливості росту мікроорганізмів, згортання молочної суміші, показники біологічної активності, вплив технологічних режимів і стадії внесення БАД з включенням інгібітору панкреатичної амілази на якість готових напоїв. Досліджено процес зберігання отриманих кисломолочних напоїв діабетичного призначення. Термін зберігання при температурі  $(4 \pm 2)$  °C складає 14 діб, впродовж яких зберігається висока концентрація пробіотиків в продукті без погіршення органолептичних і мікробіологічних показників.

#### **Перелік публікацій за темою дисертаційної роботи**

1. Черно Н.К. Биокорректоры процессов травления [Текст] /Н.К. Черно, Г.В. Крусир, О.В. Коваленко / Монография. – Одеса. – 2009. – 236 с.
2. Черно Н.К. Фитоферментная добавка на основе томатов [Текст]/ Н.К. Черно, О.В. Севастьянова, Г.В. Крусир // Зб. наук. пр. “Обладнання та технології харчових виробництв”. – Донецьк. – ДонДУЕТ. – 2003. – Вип. 9. – С. 172-178.
3. Крусир Г.В. Протеаза люцерни як компонент біологічно активної добавки [Текст] // Наук. пр. ОНАХТ/ Мін освіти і науки України. – Одеса: 2003. – Вип. 26. – С. 156-160.
4. Черно Н. К. Перспективы использования некоторых видов растительного сырья, как ингибиторов липаз [Текст] / Н. К. Черно, Г. В. Крусир, В. В. Яшкіна // Зернові

- продукти і комбікорми. – 2004. – № 3. – С. 15-17.
5. Фосфолипиды рапса – ингибиторы липаз [Текст] / Н. К. Черно, Г. В. Крусир, Е. В. Севастьянова, В. В. Яшкина // Сб. науч. тр. МПА. – М., 2005. – Вып. 3. – С. 327-332.
  6. Черно Н. К. Вивчення впливу біохімічного складу і структурних характеристик зразків насіння ріпаку на їх антиліполітичну активність з допомогою методів математичного моделювання [Текст] / Н. К. Черно, Г. В. Крусир, В. В. Яшкіна, Л. Л. Лобоцька // Обладн. та технології харч. вир-в: темат. зб. наук. пр. ДонНУЕТ.– Донецьк, 2005. – Вип. 13, т. 2 – С. 321-331.
  7. Черно Н. К. Исследование антилиполитической активности фенольных соединений семян рапса [Текст] / Н. К. Черно, Г. В. Крусир, В. В. Мочуляк // Зернові продукти і комбікорми. – 2007. – № 4. – С. 14-16.
  8. Черно Н. К. Ліпіди насіння ріпаку – інгібітори панкреатичної ліпази [Текст] / Н. К. Черно, Г. В. Крусир, В. В. Мочуляк // Товари і ринки. – 2007. – № 1. – С. 152-156.
  9. Черно Н. К. Інгібуючі властивості фенольних сполук насіння ріпаку [Текст] / Н. К. Черно, Г. В. Крусир, В. В. Мочуляк // Товари і ринки. – 2007. – № 2. – С. 155-161.
  10. Крусир Г.В. Вплив екстрагентів на одержання ліпази насіння рапсу [Текст] / Г.В. Крусир, О.В.Севастьянова // Зб. наук. пр. «Прогресивні техніка та технології харчових виробництв, ресторанного господарства і торгівлі», ХДУХТ. – Харків, 2007. – Вип. 1 (5). – С.198-203.
  11. Крусир Г.В. Насіння рапсу – джерело високоактивної ліпази [Текст]/ Г.В. Крусир, О.В. Севастьянова// Зб. наук. пр. «Прогресивні техніка та технології харчових виробництв, ресторанного господарства і торгівлі», ХДУХТ. – Харків, 2007. – Вип. 1 (5). – С.193-197.
  12. Крусир Г.В. Рослинна сировина як джерело інгібіторів амілолітичних ферментів [Текст]/ Г.В. Крусир, О.В. Севастьянова, Н.А.Кушнір // Зб. наук. пр. «Прогресивні техніка та технології харчових виробництв, ресторанного господарства і торгівлі», ХДУХТ. – Харків, 2007. – Вип. 1 (5). – С.203-207.
  13. Крусир Г.В. Вплив екстрагентів на одержання інгібіторів амілолітичних ферментів з борошенець вівса [Текст]/ Г.В. Крусир, О.В.Севастьянова, Н.А.Кушнір // Зб. наук. пр. «Прогресивні техніка та технології харчових виробництв, ресторанного господарства і торгівлі», ХДУХТ – Харків, 2007. – Вип. 2 (6). – С.34-39.
  14. Крусир Г. В. К вопросу об ингибировании панкреатической липазы фенольными соединениями и фосфолипидами рапса [Текст] / Г. В. Крусир, Е. В.Севастьянова, В. В. Яшкина // Інновац. енерго- й ресурсозберігаючі технології та облад. в хлібопекар., кондитер., макарон., харчоконцентрат. і зерноперероб. галузях харч. пром.-сті: темат.

- зб. наук. пр. НУХТ. – Київ, 2008. – № 25, ч. 2. – С. 21-23.
15. Дослідження механізму інгібування панкреатичної ліпази фенольними сполуками ріпаку [Текст] / Н. К. Черно, Е. В. Севастьянова, Г. В. Крусир, В. В. Яшкіна // Харч. наука і технологія. – 2008. – № 2. – С. 23-25.
  16. Крусир Г.В. Білкові інгібітори як регулятори гомеостазу організму людини [Текст] // Харч. наука і технологія. – 2008. – № 2. – С. 30-34.
  17. Крусир Г.В. Біохімічна характеристика інгібітору б-амілаз з борошенець вівса [Текст]/ Г.В. Крусир, Н.А. Кушнір // Наук. пр. ОНАХТ. – 2008. – Вип. 34. – Т. 1. – С. 252-257.
  18. Крусир Г.В. Фізико-хімічні властивості рослинного інгібітору б-амілаз [Текст] / Г.В. Крусир, Н.А. Кушнір // Прогресивні техніка та технології харчових виробництв ресторанного господарства і торгівлі: Зб. наук. пр.ХДУХТ. – Харків, 2008. – Вип. 1 (7). – С. 427-433.
  19. Крусир Г.В. Біотехнологія отримання БАД, що містить інгібітора панкреатичної б-амілази з борошенець вівса [Текст] / Г.В. Крусир, Н.А. Кушнір // Наук. пр. НУХТ – Київ, 2008. – № 25, частина 2. – С. 32-34.
  20. Крусир Г.В. Применение ингибитора панкреатической амилазы в производстве йогурта [Текст]/ Г.В. Крусир, Н.А. Кушнир // Наук. пр. ОНАХТ – 2008. – Вип. 33. – С. 158-162.
  21. Крусир Г.В. Порівняльна характеристика фізико-хімічних властивостей рослинного інгібітору б-амілази та БАД на його основі [Текст]/ Г.В. Крусир, Н.А. Кушнір // Прогресивні техніка та технології харчових виробництв ресторанного господарства і торгівлі: Зб. наук. пр.ХДУХТ. – Харків, 2008. – Вип. 2 (8). – С. 521-527.
  22. Крусир Г.В. Ингибиторы амилаolitikеских ферментов из зерновых. Физико-химические свойства [Текст] / Г.В. Крусир, Н.А. Кушнир // Харчова наука і технологія. – 2008. – № 4(5)'. – С. 15-20.
  23. Крусир Г.В. Распространенность ингибиторов амилаз в зерновых культурах [Текст]/ Г.В. Крусир, Н.А. Кушнир // Зернові продукти і комбікорми. 2008. – № 4(32). – С. 28-32.
  24. Черно Н.К. Визначення раціональних параметрів екстракції інгібітору панкреатичної ліпази з насіння ріпаку та розробка технології БАД на його основі [Текст]/ Н.К. Черно, Г.В. Крусир, В.В. Яшкіна, Н.П. Худенко // Наук. пр. ОНАХТ. – 2009. – Вип.35. – том 1. – С. 30-33.
  25. Крусир Г.В. Использование БАД «Амил-инг» в производстве кисломолочных напитков функционального назначения [Текст]/ Г.В. Крусир, Н.А. Кушнир, Л.И. Слонь // Молочна промисловість. – 2009. – № 3 (52). – С. 42-46.

26. Крусір Г.В. Основи комплексоутворення інгібітор панкреатичної амілази-полісахарид [Текст]/ Г.В. Крусір, О.В.Севастьянова, Н.А.Кушнір // Зернові продукти і комбікорми. – 2009. – № 1(33)'. – С. 16-19.
27. Крусір Г.В. Дослідження складу білкової складової БАД «Аміл-інг» [Текст]/Г.В. Крусір, Н.А. Кушнір// Харчова наука і технологія. – 2009. – № 1 (6). – С. 42-44.
28. Крусір Г.В. Технологія виробництва БАД «Аміл-інг» [Текст]/ Г.В. Крусір, Н.А. Кушнір /Наук. пр. ОНАХТ – 2009. – Вип. 35. – Т. 1. – С. 11-14.
29. Крусір Г.В. Застосування математичних методів для визначення раціональних режимів комплексоуворення інгібітор панкреатичної амілази-агар [Текст]/ Г.В. Крусір, О.В. Севастьянова, О.Б. Василів, Н.А.Кушнір // Обладнання та технології харчових виробництв: Зб.наук.пр. ДонДУЕТ ім. М. Туган-Барановського. – 2009. – Вип. 22. – С. 247-253.
30. Черно Н.К. Растительные комплексы, ингибирующие действие панкреатической липазы, и их использование [Текст]/ Н.К. Черно, Г.В. Крусір, В.В.Яшкіна // Зернові продукти і комбікорми. – 2009. – № 2 (34). – С.13-17.
31. Крусір Г.В. Ингибиторы панкреатической амилазы: характеристика, свойства и технология получения БАД [Текст]/ Г.В. Крусір Г.В., О.В. Севастьянова, Н.А. Кушнір // Зернові продукти і комбікорми. – 2009. – № 3 (35). – С. 18-22.
32. Патент на корисну модель 26209 Україна, МПК А 61 К 36/00. Спосіб одержання інгібітору ліпази [Текст] / Н. К. Черно, Г. В. Крусір, В. В. Яшкіна; заявник і патентодавець Одес. нац. акад. харч. технологій. – № u 2007 04508; заявл. 23.04.2007; опубл. 10.09.2007, Бюл. № 14. – 4 с.
33. Патент на корисну модель 26164 Україна, МПК А 61 К 36/00. Спосіб одержання інгібітору ліпази [Текст] / Н. К.Черно, Г. В. Крусір, В. В. Яшкіна; заявник і патентодавець Одес. нац. акад. харч. технологій. – № u 2007 03683; заявл. 03.04.2007; опубл. 10.09.2007, Бюл. № 14. – 4 с.
34. Патент на корисну модель 35846 Україна, МПК А23L 1/052, А61Р 1/00, А61Р 43/00. Біологічно активна добавка на основі рослинної сировини [Текст] / Н. К. Черно, Г. В. Крусір, В. В. Яшкіна; заявник і патентодавець Одес. нац. акад. харч. технологій. – № u 2008 04748; заявл. 10.10.2008; опубл. 10.09.2007, Бюл. № 19. – 2 с.
35. Патент на корисну модель 35845. Україна МПК (2006) А61К 38/00, А61К 38/43 Спосіб одержання інгібітора амілази [Текст]/ Г.В. Крусір, Н.А. Кушнір. – № 35845; заявл. 14.04.2008; опубл. 10.10.2008, Бюл. № 19.
36. Патент на корисну модель 35892. Україна МПК (2006) А61К 38/00 Біологічно активна добавка [Текст]/ Г.В. Крусір, Н.А. Кушнір. – № 35892; заявл. 24.04.2008; опубл.

- 10.10.2008, Бюл. № 19.
37. Патент на корисну модель 39690. Україна МПК (2006) A23C 9/12 Спосіб виробництва йогурту [Текст]/ Г.В. Крусір, Н.А. Кушнір.- № 39690; заявл. 15.09.2008; опубл. 10.03.2009, Бюл. № 5.
  38. Патент на корисну модель 39717. Україна МПК (2006) A23C 9/123 Спосіб виробництва лікувально-профілактичного кисломолочного напою “Наріне”[Текст]/ Г.В. Крусір, Н.А. Кушнір. – № 39717; заявл. 30.09.2008; опубл. 10.03.2009, Бюл. № 5.
  39. Черно Н.К. Препараты пищевых волокон новой генерации, содержащие иммобилизованные ферменты [Текст]/ Н.К. Черно, Г.В. Крусир // Научна конференция с международно участие «Хранителна наука, техника и технологии 2004». – Научни трудове, том LI, Свиськ 3, Пловдив, 27-29 октомври 2004. – С. 195-198.
  40. Черно Н. К. Фенольные вещества семян рапса: состав и антилиполитическая активность [Текст] / Н. К. Черно, Г. В. Крусир, В. В. Мочуляк / Научна конференция с международно участие “Хранителна наука, техника и технологии 2007” Научни трудове, Пловдив 19-20 октомври 2007. – Т. LIV, свиськ 1. – Пловдив, 2007 г. – С. 264-268.
  41. Chern N. Lipids from rapeseed: composition and antilipolytic activity [Text] / N. Chern, G. Krusir, V. Yashkina // International Scientific Conference “Food Sciense, Engineering and Technologies – 2008”, Plovdiv, 24-25 okt. 2008. – Plovdiv, 2008. – P. 261-266.
  42. Chern N. Innovation in use of food fibres as components of biologically active additives [Text] / N. Chern, G. Krusir// International Scientific Conference “Food Sciense, Engineering and Technologies – 2008”, Plovdiv, 24-25 okt. 2008. – Plovdiv, 2008. – P.437-440.
  43. Черно Н.К.Пищевая ферментная добавка [Текст]/ Н.К. Черно, Г.В. Крусир, Е.В. Севастьянова / III Международная научно-техн. конф. «Техника и технология пищевых производств». – Могилев. – 2002. – С.77-78.
  44. Черно Н. К. Вивчення інгібіторної активності насіння арахісу і ріпаку [Текст] / Н. К. Черно, Г. В. Крусір, В. В. Яшкіна // Тез. доп. Міжвуз. наук.-практ. конф. “Пробл. техніки і технології харч. вир-в”, Полтава, 8-9 квіт. 2004 р. – Полтава, 2004. – С. 237-239.
  45. Черно Н.К.Разработка биологически активных добавок полифункционального действия [Текст]/ Н.К. Черно, Г.В. Крусир, В.В. Мочуляк // Тез. Докл. IV междунар. Науч.- практ. конф. “Пища. Экология. Качество”, Новосибирск. – 2004. – С. 305-308.
  46. Черно Н. К. Характеристика ингибиторов липаз из семян рапса, арахиса и горчицы [Текст]/ Н. К. Черно, Г. В. Крусір, В. В.Яшкіна//Тез.докл. IV Междунар.науч.-практ. конф. “Пища. Экология. Качество”, Новосибирск 2004 г. – Новосибирск, – 2004. – С.

206-209.

47. Липиды рапса – источник ингибиторов липаз [Текст] / Н. К. Черно, Г. В. Крусир, Е. В. Севастьянова, В. В. Яшкина / Тез. доп. 5 Міжнар. наук.-практ. конф. „Хлібопродукти–2005”, Одесса, 14-16 верес. 2005 р. – О., 2005. – С. 37.
48. Черно Н. К. Фенольні сполуки насіння ріпаку – інгібітори панкреатичної ліпази [Текст] / Н. К. Черно, Г. В. Крусир, В. В. Яшкіна // Вестник стоматологии. – 2008. – № 4 (64) – С. 44.

*Особистий внесок:*

- 1) керівництво і участь в експериментальних дослідженнях, узагальнення результатів, підготовка матеріалів до публікації (поз. 8, 10, 28);
- 2) проведення літературного пошуку, узагальнення результатів, підготовка матеріалів до публікації (поз. 1-7, 11-18, 29-31);
- 3) організація і участь в експериментальних дослідженнях, узагальнення результатів, підготовка матеріалів до публікації (поз. 9, 24-27);
- 4) складання опису патентів, складання та редагування формул патентів, теоретичне обґрунтування запропонованих рішень (поз. 32-38);
- 5) розробка методології досліджень, обґрунтування і узагальнення результатів досліджень, підготовка матеріалів до публікації (поз. 19-23; 39-48).

## АНОТАЦІЯ

**Крусір Г.В. Наукові основи технології біологічно активних добавок – коректорів процесів травлення. – Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора технічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Одеська національна академія харчових технологій Міністерства освіти і науки України, Одеса, 2009.

Дисертація спрямована на розробку наукових основ технологій отримання біологічно активних добавок з корегуючою дією відносно процесів травлення. Значна увага в роботі приділяється всебічній характеристиці біокоректорів рослинного походження: визначення і отримання компонентів з ферментативними та інгібіторними активностями, визначення кінетичних параметрів реакцій гідролізу субстратів та реакцій інгібування травних ферментів біокоректорами рослинного походження, дослідження типу взаємодії ферментів з біокоректорами-інгібіторами та біокоректорів з біополімерною матрицею в результаті іммобілізації.

Здійснено порівняльну характеристику ефективності використання методів концентрування та стабілізації біокоректорів. Встановлено доцільність використання фізичної сорбції для стабілізації інгібітору ліпази ріпаку (збереження активності 98 %) та рослинних гідролітичних ферментів; комплексоутворення – для біокоректорів білкової природи з незначними молекулярними масами (меншими, ніж 25 кДа), осадження яких відбувається близько ізоелектричної точки полісахаридом-комплексоутворювачем, що за даного значення рН має максимальний заряд (ступінь очищення 25...40); безмембранного осмосу – для високомолекулярних білкових біокоректорів (збереження активності більш, ніж 87 %).

Розроблені технології БАД – коректорів процесів травлення економічно обґрунтовані і включають такі основні етапи: виділення біокоректорів із сировини, іммобілізацію їх на біополімерній матриці, сушіння БАД. Реальність технологій підтверджено результатами промислової апробації на біотехнологічному підприємстві, розроблено та зареєстровано в Держспоживстандарті України нормативну документацію на БАД «Аміл-інг», що містить інгібітор панкреатичної амілази, розроблено нормативну документацію на БАД з включенням інгібітору ліпази. Показано можливість використання БАД – біокоректорів у складі функціональних продуктів харчування на основі молочної сировини.

**Ключові слова:** біокоректори процесів травлення, гідролітичні ферменти рослинного походження, рослинні інгібітори трипсину та панкреатичних амілази і ліпази, фенольні сполуки, інгібування, іммобілізація.

## АННОТАЦИЯ

**Крусир Г.В. Научные основы технологий биологически активных добавок – корректоров процессов пищеварения. – Рукопись.**

Диссертация на соискание научной степени доктора технических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. – Одесская национальная академия пищевых технологий Министерства образования и науки Украины, Одесса, 2009.

Диссертация направлена на разработку технологии получения биологически активных добавок с регуляторным действием по отношению к процессам пищеварения.

В настоящее время проблема нарушения функционирования пищеварительной системы, расцениваемая как эпидемиологическая, решается с помощью медикаментозных средств, являющихся препаратами ферментов преимущественно животного или микробного происхождения и синтетических ингибиторов. Использование растительных аналогов, которые по многим показателям их превышают, рассматривается сегодня как альтернативный путь коррекции и регуляции процессов пищеварения.

Совокупность вышеизложенного определило актуальность работы, посвященной выделению, характеристике и разработке научных основ технологии растительных биокорректоров – первых отечественных препаратов, предназначенных для введения в состав БАД и функциональных продуктов, обладающих регуляторной активностью по отношению к процессам пищеварения.

Критерием выбора источников биокорректоров служила их максимальная ферментативная либо ингибиторная активность. Фракционирование сырья позволило установить природу активных компонентов: за ингибиторную активность по отношению к панкреатической амилазе и трипсину отвечают вещества белковой природы, по отношению к панкреатической липазе – фенольные соединения.

С целью стабилизации, а также концентрирования биокорректоров из их экстрактов, а также как метод получения БАД с их включением, обосновано использование следующих методов иммобилизации: метод физической сорбции на матрицах природного происхождения; комплексообразование за счет электростатического взаимодействия (белков и полисахаридов) или простая коацервация; безмембранный осмос или сложная коацервация.

Использование полисахаридов в качестве комплексообразователей позволяет достичь значительной 25-40-кратной степени очистки биокорректоров процессов пищеварения. Сравнение основных параметров данного процесса с известными методами очистки белковых БАВ позволяет поставить метод связывания биокорректоров в комплекс с полиэлектролитами по эффективности в один ряд с ионообменной хроматографией и хроматофокусированием.

Эффективность осаждения биокорректоров белковой природы из их экстрактов зависит



от молекулярной массы биокорректора: с уменьшением молекулярной массы биокорректора увеличивается его доля в комплексном осадке. Так, при концентрировании протеаз, которые характеризуются незначительными молекулярными массами, в осадок переходит 62...65 % общего количества ферментов, а при комплексообразовании липазы из семян рапса (молекулярная масса 300 кДа) - 48 % общего количества липазы. Показано, что осаждение биокорректоров зависит от их биологической активности: доля ингибиторов, перешедших в комплексный осадок превышает таковую ферментов, что, вероятно, может объясняться менее благоприятным влиянием матрицы на активный центр ферментов, а также на их нативную конформацию.

В качестве эффективного метода стабилизации биокорректоров фенольной природы обоснована целесообразность использования сорбционных методов иммобилизации на биополимерных матрицах. Иммобилизация на биополимерной матрице обеспечивает высокое сохранение активности; значительное увеличение рН- и термостабильности. Иммобилизованные препараты биокорректоров более устойчивы к инактивирующему воздействию желудочного сока и холевых кислот, что позволяет прогнозировать их эффективное функционирование в условиях реального пищеварения, а также возможность использования более жестких технологических параметров производства.

На основании проведенных исследований предложена классификация БАД – биокорректоров процессов пищеварения, в соответствии с методами их концентрирования из экстрактов, стабилизации и получения БАД: метод физической сорбции (ингибиторы фенольной природы и растительные ферменты); метод комплексообразования с полиэлектролитными матрицами: биокорректоры белковой природы с невысокими значениями молекулярных масс; метод безмембранного осмоса: высокомолекулярные биокорректоры белковой природы.

Фармакологическая оценка БАД – биокорректоров подтвердила эффективность их использования для коррекции процессов пищеварения.

Показана принципиальная возможность получения функциональных пищевых продуктов на молочной основе с введением биокорректоров. Предложенная технология позволяет получить новые высокорентабельные продукты с содержанием растительных биокорректоров процессов пищеварения в пределах малоотходного производства.

Разработанные технологии БАД – корректоров процессов пищеварения экономически обоснованы и включают следующие основные этапы: выделение биокорректоров из сырья, иммобилизацию их на биополимерной матрице, сушку БАД. Реальность технологий подтверждена результатами промышленной апробации на биотехнологическом предприятии, разработана, утверждена и зарегистрирована в Госпотребстандарте Украины нормативная документация на диетическую добавку «Амил-инг», содержащую ингибитор панкреатической амилазы, разработана нормативная документация на БАД с включением ингибитора

панкреатической липазы, ингибитора трипсина и растительной липазы. Показана возможность использования БАД–корректоров процессов пищеварения в составе функциональных продуктов на основе молочного сырья.

**Ключевые слова:** биокорректоры процессов пищеварения, гидролитические ферменты растительного происхождения, ингибиторы панкреатических амилазы, липазы, трипсина растительного происхождения, фенольные соединения, панкреатическая липаза, ингибирование, иммобилизация.

## ANNOTATION

**Krusir G.V. Scientific bases of technology of biologically active additives – correctors of digestion processes. - It is Manuscript.**

Dissertation on the receipt of scientific degree of doctor of engineering sciences by speciality 03.00.20 – biotechnology. – Odessa national academy of food technologies of Department of education and science of Ukraine, Odessa, 2009.

Dissertation is directed for technology scientific base development of reception of biologically active additives with a correcting action in relation to the digestion processes. Considerable attention in the work is spared to comprehensive phytoogenous biocorrector description: determination and receipt of components with enzymatic and inhibitory activities, determination of substrate hydrolysis reaction and phytoogenous biocorrector digestive enzymes inhibition reaction kinetic parameters, researches of enzyme co-operation type with correctors-inhibitors and biocorrectors with a biopolymeric matrix co-operation as a result of immobilization.

Efficiency comparative description of the concentration and biocorrector stabilization method use is carried out. Expedience of the physical sorption use is set for stabilization of rape lipase inhibitor (maintainance of activity 98 %); complex formation – for the albuminous nature biocorrectors with the insignificant molecular masses (less than 25 kDa) besieging of which takes place near the iso-electric point of polysaccharide-complex former, which at this value of pH has a maximal charge (cleaning degree 25,40); no-diaphragm osmose – for high molecular albuminous biocorrectors (maintainance of activity more than 87 %).

Developed technologies of BAA – the digestion process correctors are economicly grounded and include such basic stages: selection of biocorrectors from raw material, immobilization them on a biopolymeric matrix, drying of BAA. Reality of technologies is confirmed by the results of industrial approbation on a biotechnological enterprise, developed and incorporated normative document on BAA «Амил-инг», which contains the inhibitor of pancreatitis amylase, in State Consumer Standarte of Ukraine, a normative document is developed on BAA with including of inhibitor of lipase. Possibility of the BAA-biocorrector use is rotined in composition of functional food stuffs on the basis of

milk raw material.

**Keywords:** digestion process biocorrectors, phylogenous hydrolases, phylogenous inhibitors of trypsin and pancreatic amylase and lipase, phenic compounds, inhibition, immobilization.

Підписано до друку 18.11.2009 р. Формат 60Ч90/16. Об'єм 1,8 умов. друк. арк.  
Замовлення № 45. Тираж 100 прим.

---

ОНАХТ, 65039, м. Одеса – 39, вул. Канатна, 112