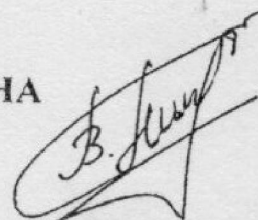


Автореф  
Я 96

ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

ЯШКІНА ВЕРОНІКА ВОЛОДИМИРІВНА



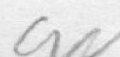
УДК [633.853.494:577.15]:613.292

**ТЕХНОЛОГІЯ ФУНКЦІОНАЛЬНИХ ХАРЧОВИХ  
ІНГРЕДІЄНТІВ З АНТИЛІПОЛІТИЧНОЮ АКТИВНІСТЮ  
НА ОСНОВІ НАСІННЯ РІПАКУ (*CANOLA*)**

Спеціальність 03.00.20 – біотехнологія

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

Одеса – 2009





v017797

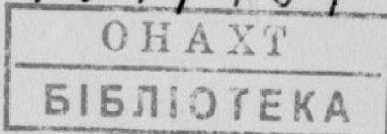
Дисертацією є рукопис  
Робота виконана в Одеській національній академії харчових технологій  
Міністерства освіти і науки України

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

**Офіційні опоненти:** – 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),  
завідувач відділом хімії та біотехнології вина.

v017797



Захист відбувся 11 березня 2009 р. о 12<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої  
Одеської національної академії харчових технологій за  
ауд. А-234.

Одеської національної академії харчових технологій, 112.

Г.М. Станкевич

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність роботи.** Практично всі патологічні стани людини пов'язані з деформованим функціонуванням певних ферментних систем, порушенням вуглеводного і ліпідного обмінів. Одним з шляхів вирішення цих проблем є використання інгібіторів ферментів рослинного походження, які порівняно з мікробними і синтетичними аналогами характеризуються низькими алергізуючим потенціалом і токсичністю, відсутністю ефекту звикання і не пригнічують синтез власних ферментних сполук в організмі. Різноманіття фізіологічних ефектів, що проявляють інгібітори, обумовлює їх значущість в профілактиці і лікуванні низки важких захворювань.

Серед речовин, здатних пригнічувати активність травних ферментів, найменше вивчені інгібітори ліпази. В той же час потреба в них як компонентах їжі надзвичайно висока, оскільки їх споживання дозволяє зменшувати всмоктуваність жирів і тим самим знижувати калорійність раціонів харчування. Відоме, наприклад, застосування для цих цілей дорогого імпортного лікарського засобу "Ксеникал", яким, практично, і обмежується спектр комерційних препаратів інгібіторів ліпази.

Сукупність вищевикладеного визначає актуальність дисертаційної роботи, присвяченої вилученню, характеристиці і розробці технології рослинного інгібітору ліпази – першого вітчизняного антиліполітичного препарату, призначеного для введення до складу біологічно активних добавок (БАД) і функціональних продуктів харчування ліпазотропної дії.

**Зв'язок з науковими програмами, планами, темами.** Робота відповідає темам досліджень науково-дослідної проблемної лабораторії Одеської національної академії харчових технологій: 1/06-П "Розробка біотехнологічних процесів цільового направленою регулювання функціональних, фізіологічних і технологічних властивостей харчових продуктів і БАД" (наказ Міністерства освіти і науки України № 654 від 16.11.2005г., № держреєстрації 0106 U 001445); 1/09-П "Біополімери рослин як об'єкти хімічної та біотехнологічної модифікації" (наказ Міністерства освіти і науки України № 1043 від 17.11.2008г., № держреєстрації 0109 U 000397).

**Мета і завдання дослідження.** Метою даної роботи є виділення і характеристика інгібіторів ліпази на основі насіння ріпаку і розробка технології БАД з антиліполітичною активністю.

Для досягнення поставленої мети вирішувалися наступні завдання:

- дослідити антиліполітичну активність окремих компонентів насіння ріпаку;
- визначити фракційний склад ліпідного комплексу сировини і дати оцінку антиліполітичної активності (АЛІА) його складових;
- надати характеристику складу фенольного комплексу та антиліполітичної активності його компонентів;
- вивчити фізико-хімічні властивості інгібіторів ліпідної і фенольної природи;
- дослідити кінетику інгібування панкреатичної ліпази фосфоліпідами і фенольними сполуками насіння ріпаку;
- провести іммобілізацію фенольних сполук ріпаку на біополімерній матриці, надати оцінку фізико-хімічних властивостей отриманого препарату і дослідити кінетику інгібування ним панкреатичної ліпази;

- обґрунтувати склад поліфункціональних БАД з інгібіторною активністю і здійснити характеристику їх функціональних властивостей;
- розробити принципову технологічну схему отримання БАД з антиліполітичною активністю;
- оптимізувати ключові параметри процесів екстракції та іммобілізації фенольних сполук;
- провести промислову апробацію розробленої технології;
- дослідити показники якості БАД в процесі зберігання;
- у дослідах на лабораторних тваринах оцінити ефективність застосування розроблених БАД як засобів зниження засвоєваності жирів;
- розробити проєкти ТУ на БАД і ТІ на її виробництво.

*Об'єкт дослідження:* біологічно активні добавки до їжі, інгібітори травних ферментів.

*Предмет дослідження:* інгібітори травних ліпаз на основі насіння ріпаку.

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

**Наукова новизна отриманих результатів** визначається тим, що в дисертаційній роботі вперше:

- надано характеристику антиліполітичної активності окремих компонентів ліпідного і фенольного комплексів насіння ріпаку;
- вивчено фізико-хімічні властивості отриманих інгібіторів;
- проведено кінетичні дослідження і встановлено тип інгібування панкреатичної ліпази інгібіторами фенольної і фосфоліпідної природи;
- розроблено умови іммобілізації фенольних сполук на біополімерній матриці і надано оцінку властивостей отриманого препарату;
- розроблено технологію БАД з антиліполітичною активністю на основі фенольних сполук насіння ріпаку.

Наукову новизну підтверджено трьома патентами на корисну модель: № 26164 Україна “Спосіб отримання інгібітору ліпази” № 26209 Україна “Спосіб отримання інгібітору ліпази” і № 35846 Україна “Біологічно активна добавка на основі рослинної сировини”.

**Практичне значення отриманих результатів.** На основі результатів досліджень розроблено принципову технологічну схему отримання інгібітору ліпази і БАД з антиліполітичною активністю на основі насіння ріпаку, а також проєкт нормативної документації на її виробництво (ТУ і ТІ). Розроблену технологію реалізовано в промислових умовах на НВО “Аріадна”, м. Одеса.

Показано можливість отримання функціональних продуктів харчування з включенням інгібітору ліпази.

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

**Апробація результатів дисертації.** Результати досліджень доповідались та обговорювались на Міжвузовській науково-практичній конференції “Проблеми техніки і технології харчових виробництв” (Полтава, 2004г); 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, 2005г); Scientific Conf. with International Participation “Food Science, Engineering and Technologies”, (Plovdiv, 2007, 2008); Міжнар. наук.-практ. конф. “Новые технологии консервирования пищевых продуктов” (м. Мінськ, Біларусь); Міжнар. наук.-практ. конф. “Техника и технология пищевых производств”, (м. Могильов, Біларусь); V Міжнародній науково-практичній конференції «Хлебопродукты-2005» (Одеса, 2005г); 63-й, 64-й, 65-й, 66-й, 67-й, 68-й, 69-й наукових конференціях професорсько-викладацького складу ОНПХТ (Одеса, 2004-2009г); II науковому симпозиумі “Растительные полифенолы и неспецифическая резистентность организма человека” 2-3 жовтня 2008, Одеса.

**Публікації.** Результати дисертації відображено в 19 опублікованих роботах, в тому числі в 10 статтях, з них 7 у фахових виданнях, трьох Патентах України на корисну модель, 3 у наукових журналах; тезах 6 доповідей в матеріалах наукових і науково-практичних конференцій.

**Структура і обсяг роботи.** Дисертація складається зі вступу, 5 розділів, висновків, списку використаних літературних джерел та додатків.

Дисертаційна робота викладена на 150 сторінках основного тексту, містить 25 рисунків (12 сторінок), 42 таблиці (15 сторінок), 14 додатків (173 сторінок), список літературних джерел з 223 найменувань (23 сторінок).

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У вступі обґрунтовано актуальність роботи, сформульовано мету і завдання дослідження, показано наукову новизну і практичне значення отриманих результатів, та наведено дані щодо їх апробації, визначено особистий внесок здобувача в проведених дослідженнях та публікаціях за темою дисертаційної роботи.

У першому розділі “Інгібітори панкреатичної ліпази – регулятори функціонування системи травлення в організмі людини” надано загальну характеристику інгібіторів ліпази. Використання інгібіторів ліпаз у складі парафармацевтиків для корекції ліпідного метаболізму і патологічних станів, обумовлених порушенням активності ліпази, є перспективним. Розглянуто інгібітори ліпази рослинного походження фенольної, білкової, ліпідної, вуглеводної та терпеноїдної природи. Показано, що серед фенольних сполук існує ряд активаторів та інгібіторів панкреатичної ліпази і вони є перспективними для подальшого вивчення. Наведено огляд синтетичних інгібіторів ліпази; визначено, що єдиним фармакопейним препаратом з антиліполітичними властивостями є Ксенікал. Інгібітори ліпаз рослинного походження, в порівнянні з синтетичними, мають меншу токсичність, володіють широким спектром дії, їх вживання має незначний ризик розвитку побічних ефектів. Розглянуто каталітичні і регуляторні властивості ліпази. Показано, що потенційним джерелом інгібіторів ліпаз є насіння представників родин бобових, хрестоцвітних, селерових, макових та

iii. Обґрунтовано використання у якості джерела інгібітору ліпази насіння ріпаку сорту "Галицький".

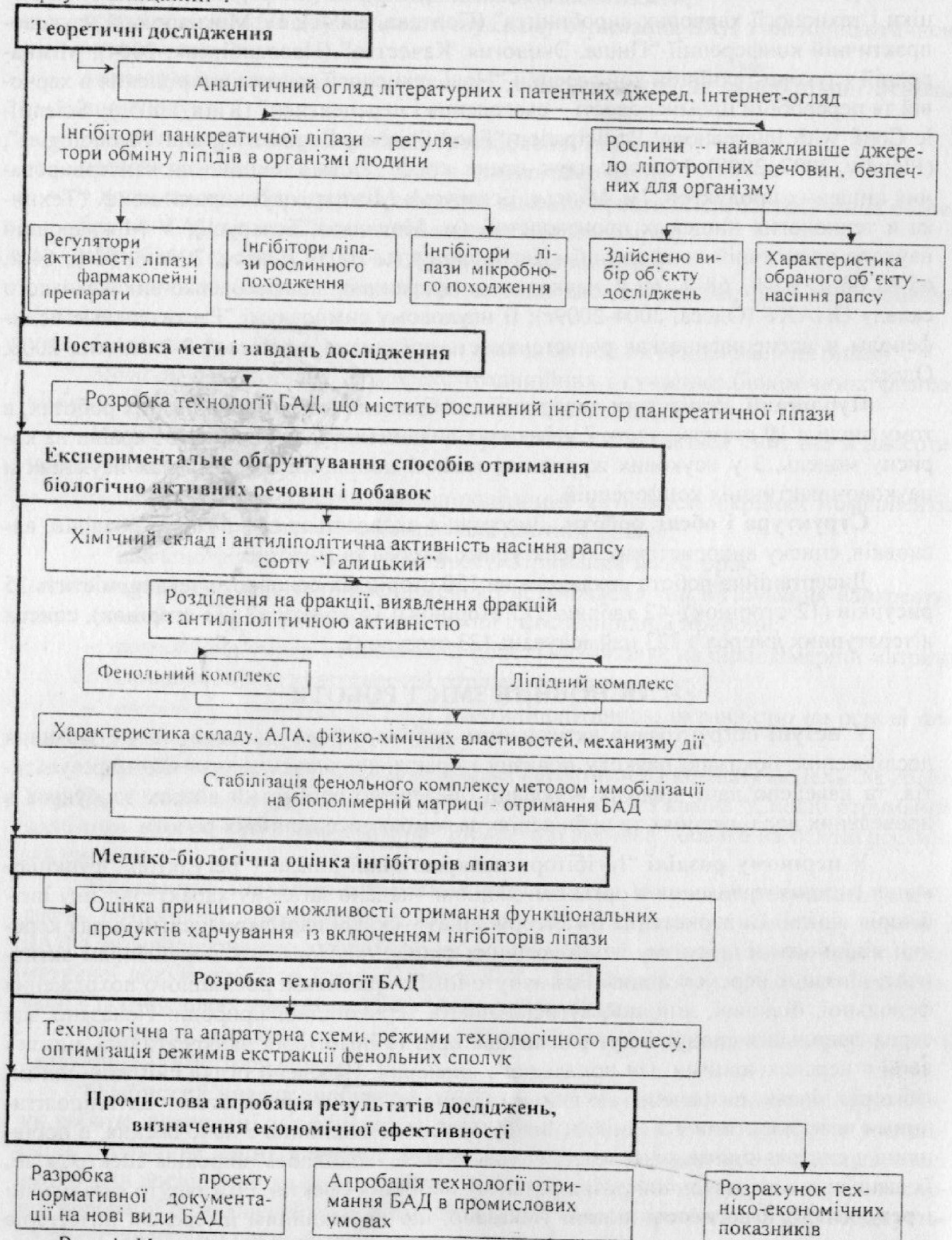


Рис. 1. Програма досліджень.

У другому розділі “Об’єкти та методи досліджень” наведено характеристику об’єкта досліджень, методів досліджень як загальнонаукових, так і спеціальних хімічних, фізико-хімічних та мікробіологічних, викладено методологічні основи проведених досліджень, показано послідовність їх вирішення і взаємодію етапів дослідження (рис. 1).

Експериментальну частину роботи виконували на кафедрі харчової хімії ОНАХТ, окремі дослідження виконувались у Фізико-хімічному інституті ім. О.В. Богатського НАН України. Медико-біологічні дослідження БАД з антиліполітичною активністю проведено у лабораторії біохімічної фармакології ДП “ДПЦЛЗ”, м. Харків.

Описано методи виділення ліпідного і фенольного комплексів насіння ріпаку, розділення їх на фракції та вивчення антиліполітичної активності; визначення фізико-хімічних властивостей отриманих інгібіторів та іммобілізованих препаратів. Дослідження ліпідного і фенольного комплексів проводилось за допомогою методів колонкової та тонкошарової хроматографії. Антиліполітичну активність визначали за здатністю інгібітору знижувати активність панкреатичної ліпази. Механізм взаємодії інгібітору та панкреатичної ліпази вивчали з допомогою кінетичних методів досліджень. Деякі аспекти взаємодії інгібітору з ферментом досліджували з допомогою методу ІЧ-спектроскопії. Взаємодію інгібітору з біополімерною матрицею вивчали з допомогою методів калориметрії та ІЧ-спектроскопії.

У третьому розділі “Виділення і характеристика інгібіторів ліпази з насіння ріпаку” показано, що інгібуючу активність по відношенню до панкреатичної ліпази мають фенольні сполуки і речовини ліпідної природи. Наведено результати фракціонування ліпідів та фенольних сполук з метою визначення компонентів, відповідальних за інгібуючу активність.

Фракціонування і аналіз інгібуючої активності компонентів ліпідних фракцій показали, що інгібують ліпазу фосфоліпіди, їх антиліполітична активність досягає 88 ІО/г. Встановлено, що фосфоліпідна складова насіння рапсу представлена трьома основними компонентами: фосфатидилінозитолом, фосфатидилетаноламіном і фосфатидилхоліном. Останній виявлено в переважаючій кількості. Вміст лізоформ незначний і складає 6,4 % від загальної кількості фосфоліпідів; фосфатидної кислоти – менше 3 % (табл.1).

Найбільш значну інактивуєчу дію має фосфатидилхолін, що в сукупності з його домінуючою присутністю, найімовірніше, є основним чинником, який визначає інгібуючу активність фосфоліпідного комплексу в цілому.

Встановлено, що значною здатністю гальмувати дію панкреатичної ліпази володіють як низькомолекулярні, так і високомолекулярні фенольні сполуки насіння ріпаку (табл. 2). Серед фенольних сполук насіння ріпаку найбільшою антиліполітичною активністю володіють синапін і гідролізуємі тапіни. Внесок синапіну в інгібуючу активність є переважаючим. Слід зазначити, що фенольний комплекс насіння ріпаку в цілому володіє значною інгібуючою дією (8875 ІО/г) на панкреатичну ліпазу, близькою до такої фармакопейного препарату “Ксеникал” (9700 ІО/г), і за своєю активністю він значно перевищує фосфоліпіди.

Таблиця 1  
Склад і антиліполітична активність фосфоліпідів (n=3; p≥0,95)

Фракція	% співвідношення	Антиліполітична активність, ІО/г
Фосфатидилхолін	40,4	105
Фосфатидилетаноламін	24,7	53
Фосфатидилінозитол	25,8	42
Лізофосфатидилхолін	4,2	33
Лізофосфатидилетаноламін	2,2	12
Фосфатидна кислота	2,7	–

Таблиця 2  
Вплив фенольних сполук насіння ріпаку на активність панкреатичної ліпази  
(n=3; p≥0,95)

Зразок	Вміст		Інгібіторна активність, ІО/г фенольних сполук
	г/г насіння ріпаку	мг ЕСК/г насіння ріпаку	
Сума фенольних сполук	0,0112	11,20	8875,0
Низькомолекулярні фенольні сполуки			
у т.ч. синапін	0,00505	5,05	18811,9
синапова кислота	0,00045	0,45	9777,8
глікопіранозилсинапат	0,00005	0,50	–
Поліфенольні сполуки (таніни), в т.ч.	0,0045	4,50	13333,3
таніни, що гідролізуються	0,0021	2,10	18541,4
конденсовані таніни	0,0024	2,40	8750,0

\* ЕСК – еквівалент синапової кислоти.

Досліджено фізико-хімічні властивості інгібіторів. Показано, що обидва інгібітори ліпази найбільш стабільні при температурі 37°C – протягом 2-х годин інкубації їх активність практично не знижується. Фенольні сполуки зберігають активність при температурі не вище 40 °C, фосфоліпіди – 55 °C. При підвищенні температури їх антиліполітична активність помітно знижується, що накладає обмеження на температурні режими, які закладаються в технологію отримання інгібіторів і виробництва БАД на їх основі.

Найбільш сприятливим для функціонування інгібіторів є значення рН, що дорівнює 7,5, при якому інгібітор фосфоліпідної природи зберігає 80 %, а фенольної – 75 % початкової активності після 6 годин функціонування в даних умовах (рис. 2, 3).

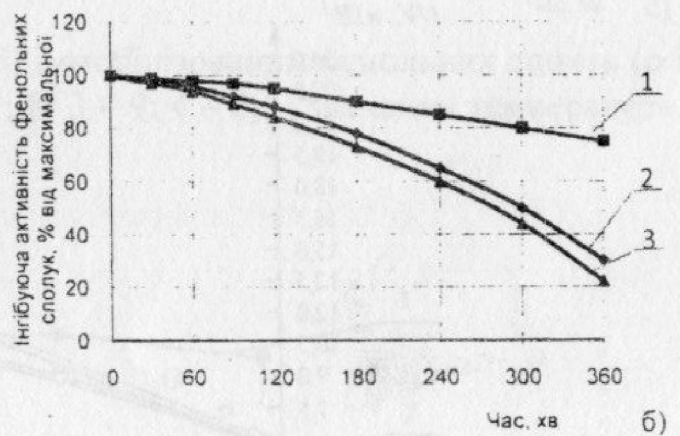
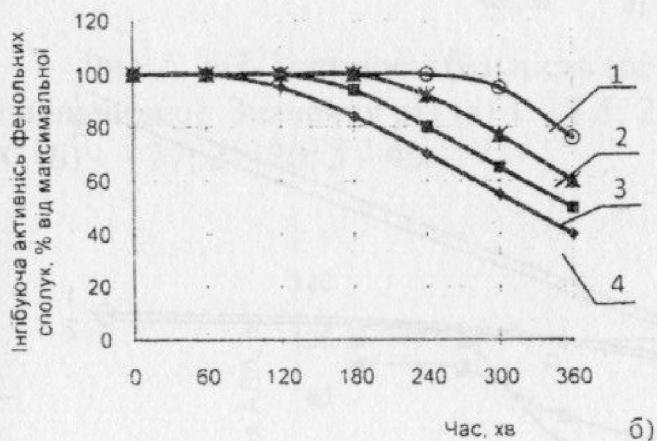
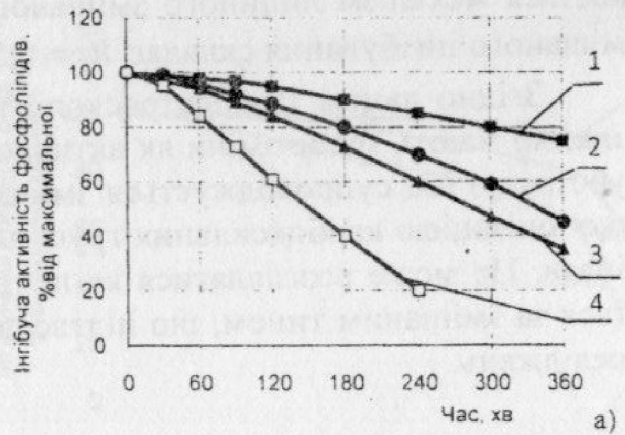
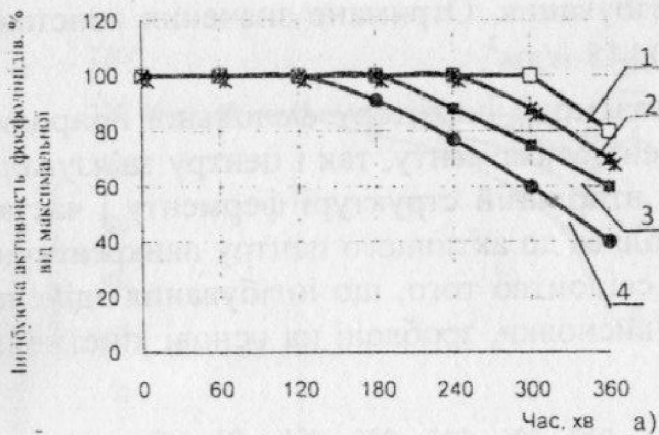


Рис. 2. рН-стабільність фосфоліпідів (а) та фенольних сполук (б) ( $t=37^\circ\text{C}$ ).  
Значення рН: 1 – 7,5; 2 – 7; 8; 3 – 9; 4 – 2,5.

Рис. 3. Термостабільність фосфоліпідів (а) та фенольних сполук (б) (рН 7,5).  
Значення температури,  $^\circ\text{C}$ : 1 – 37; 2 – 20; 3а) – 55; 4а) – 65; 3б) – 40.

Визначено кінетичні параметри реакції інгибування панкреатичної ліпази фосфоліпідами і фенольними сполуками насіння ріпаку за допомогою розрахунків методами лінеаризації рівняння Міхаеліса–Ментен за Лайнуївером–Берком і Хейнсом. Значення константи інгибування ( $K_i$ ) обчислювали методами Діксона і Усбба.

Розглянуті залежності активності ферменту від концентрації субстрату свідчать про неповний лінійний конкурентний характер інгибування ліпази фосфоліпідами – кінетика Міхаеліса-Ментен найкращим чином зберігається в діапазоні концентрацій субстрату  $75 \dots 450 \text{ г/дм}^3$  та інгібітору  $0,1 \dots 6,4 \text{ г/дм}^3$  відповідно. Розрахунки свідчать – залишкова активність ферменту у присутності інгібітору знаходиться в межах  $40,8 \dots 56,2 \%$  від початкової.

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 Лайнуївера-Берка і Хейнса (рис. 4), тобто одночасному збільшенню  $K'_M$  і зменшенню  $V'_{\max}$  фенольні сполуки насіння рапсу інгібують панкреатичну ліпазу за змішаним (двопараметрично узгодженим) типом, тобто, здійс-

нюється механізм лінійного змішаного інгібування. Отримане значення константи змішаного інгібування складає  $\bar{K}_i = 0,58 \pm 0,145 \text{ г/дм}^3$ .

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.

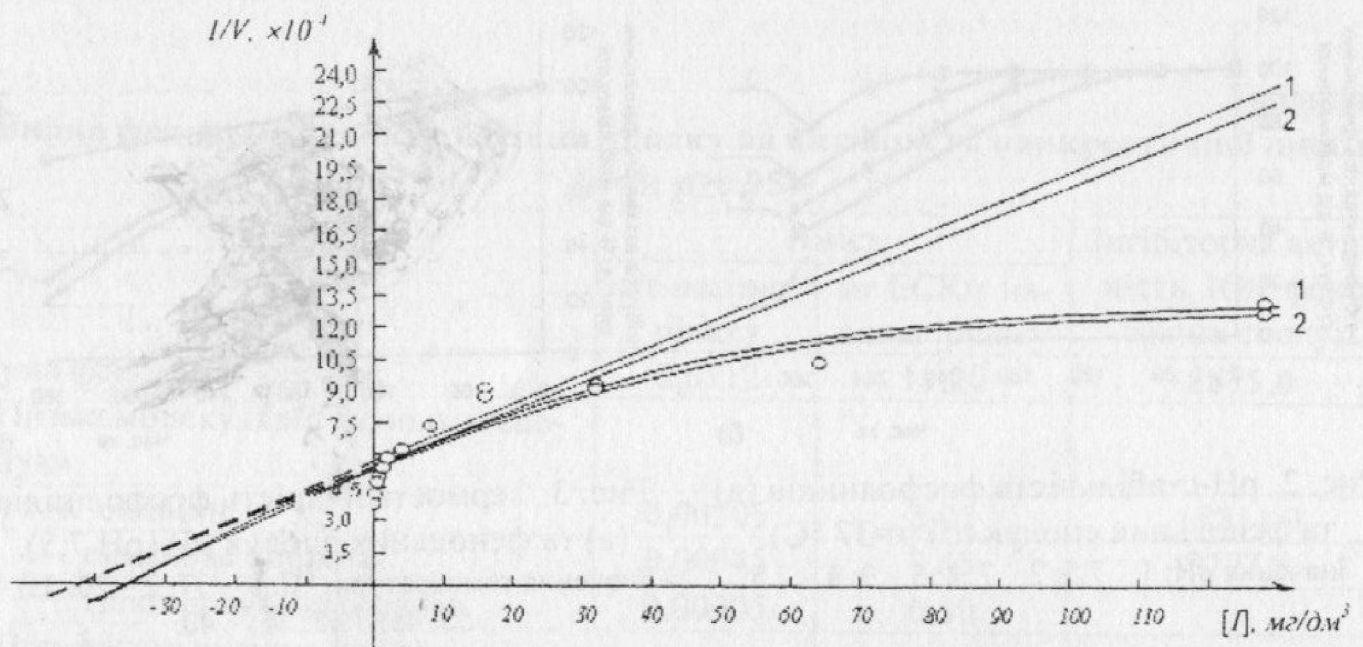


Рис. 4. Змішаний тип інгібування ліполізу фенольними сполуками ріпаку: 1 - за даними графіка Лайнуівера-Берка. 2 - за даними графіка Хейнса.

У четвертому розділі "Імобілізація інгібітору фенольної природи на біополімерній матриці" обґрунтовано вибір матриці для іммобілізації інгібітору фенольної природи – харчових волокон пшеничних висівків (ХВІВ); визначено раціональні умови іммобілізації – масове співвідношення інгібітор-носій (1:9), ГМ 3 за температури 20 °С протягом 15 хв, розмір частинок носія 1,0...2,0 мм. Обрана біополімерна матриця забезпечує високе збереження інгібуючої активності – 1534,5 ІО/г інгібітору (понад 80 % від початкової антиліполітичної активності), а також рН- і термостабільність (рис. 5), збереження антиліполітичної активності в модельних умовах шлунково-кишкового тракту отриманих іммобілізованих препаратів інгібіторів. Після послідовної інкубації в середовищі шлункового соку і жовчі інгібітор зберігає понад 40 % антиліполітичної активності, тоді як у Кеєникала вона знижується до 26 % (рис. 6).

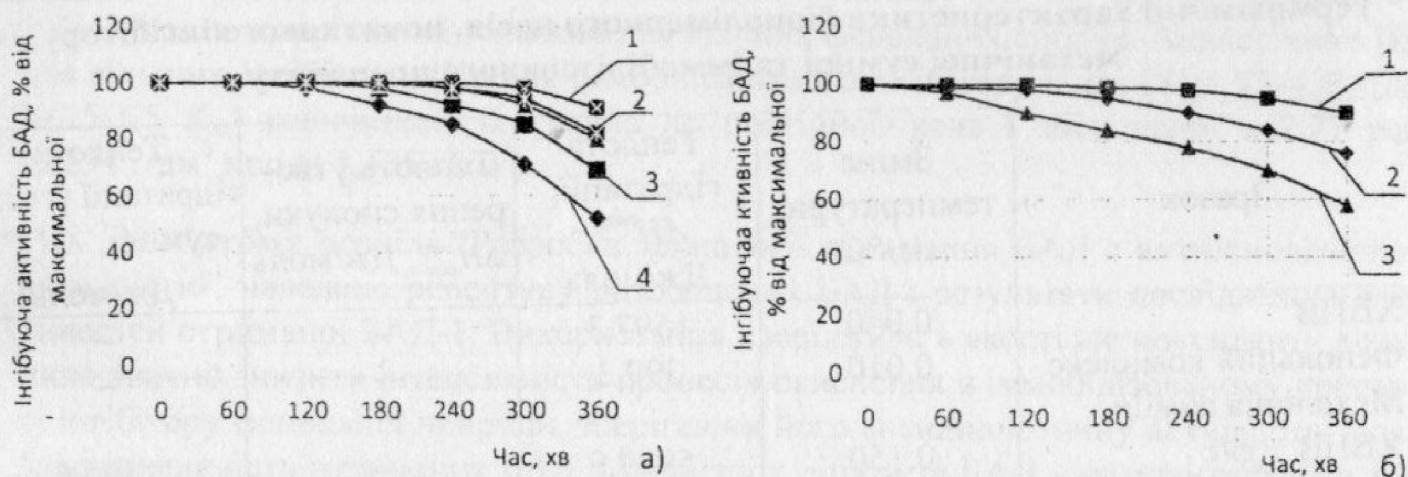


Рис. 5. рН- і термостабільність (рН 7,5) іммобілізованих фенольних сполук (а і б відповідно). Значення рН (а) 1 – 7,5; 2 – 7; 8; 3 – 9; 4 – 2,5. Значення температури, °С (б) 1 – 37; 2 – 20; 3 – 40.



Рис. 6. Динаміка зміни антиліполітичної активності іммобілізованих препаратів фенольних сполук (III) та Ксеникалу в умовах, що моделюють умови реального травлення:

1 – дія на ІП шлункового соку; 2 – дія на ІП жовчі; 3 – дія на Ксеникал жовчі.

Досліджено природу взаємодії між інгібітором і носієм за допомогою калориметрії і ІЧ-спектроскопії. Значення теплоти гідратації механічної суміші значно перевищує теплоту гідратації іммобілізованого препарату (табл. 3). Це свідчить про те, що взаємодія інгібітору з носієм в умовах іммобілізації супроводжується виникненням зв'язків між ними.

Порівняння ІЧ-спектрів ХВІВ і іммобілізованих на ХВПВ інгібіторів фенольної природи свідчить, що в останньому має місце зменшення напівширини смуги поглинання, що відповідає валентним коливанням ОН груп (табл. 4). Це вказує на збільшення кількості ОН-груп, що беруть участь в міцних водневих зв'язках.

Отримані результати свідчать про те, що при іммобілізації утворюються водневі зв'язки між інгібітором і матрицею.

Термохімічні характеристики біополімерного носія, початкового інгібітору, їх механічної суміші та іммобілізованого препарату

Зразок	Зміна температури, $\Delta t$ , °C	Теплота гідратації, $\Delta H^{гидр}$ , Дж/моль	Теплота утворення сполуки, $\Delta H_{спл}^{гидр}$ , Дж/моль	Теплота гідратації (теор.) суміші, $\Delta H_{сум}^{гидр}$ , Дж/моль
ХВІПВ	0,040	1597,3	—	—
Фенольний комплекс	0,010	399,3	—	—
Механічна суміш				
ХВІПВ + ф/с	0,150	5989,9	—	1996,6
Іммобілізовані на				
ХВІПВ ф/с	0,105	4192,9	1797,0	—

Характеристика водневих зв'язків ( $n=3$ ;  $\rho \geq 0,95$ )

Зразок	ВООП смуги $3400 \text{ см}^{-1}$	Напівширина смуги, $\text{см}^{-1}$
Іммобілізована форма інгібітору	1,53	670
Інгібітор	1,34	430
ХВІПВ	1,49	720

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 (рис. 7).

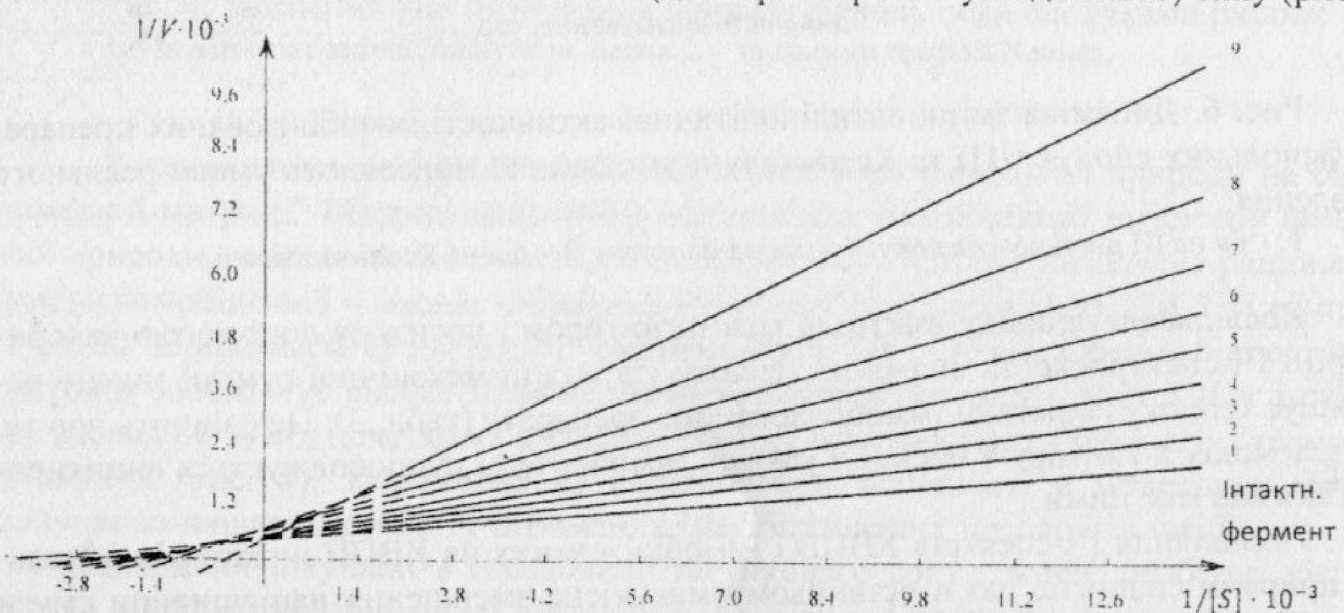


Рис. 7. Графік Лайнуівєра-Бєрка. Змішаний тип інгібування.

1 -  $0,05 \text{ г/дм}^3$ ,  $r = 0,9999$ ,  $n = 9$ ; 2 -  $0,1 \text{ г/дм}^3$ ,  $r = 0,9994$ ,  $n = 9$ ; 3 -  $0,2 \text{ г/дм}^3$ ,  $r = 0,9999$ ,  $n = 9$ ; 4 -  $0,4 \text{ г/дм}^3$ ,  $r = 0,9998$ ,  $n = 9$ ; 5 -  $0,8 \text{ г/дм}^3$ ,  $r = 0,9997$ ,  $n = 9$ ; 6 -  $1,6 \text{ г/дм}^3$ ,  $r = 0,9997$ ,  $n = 9$ ; 7 -  $3,2 \text{ г/дм}^3$ ,  $r = 0,9997$ ,  $n = 9$ ; 8 -  $6,4 \text{ г/дм}^3$ ,  $r = 0,9992$ ,  $n = 9$ ; 9 -  $12,8 \text{ г/дм}^3$ ,  $r = 0,9967$ ,  $n = 9$ .

Кінетичні константи іммобілізованого інгібітору ( $K$ ,  $K'_i$ ,  $\overline{K}_i$ ,  $K'_s$ ) 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  $[S] = 75-450 \text{ г/дм}^3$  (0,25-1,5  $K_M$ ) величиною, близькою до постійної, хоча і збільшеної в 2,77 рази (3,894  $\text{г/дм}^3$  проти 1,405  $\text{г/дм}^3$ ).

У п'ятому розділі "Розробка технології отримання БАД з антиліполітичною активністю" наведено рецептуру розроблених БАД і результати дослідження властивостей отриманої БАД-1. Використання кверцетина в якості антиоксиданту дозволило значно знизити інтенсивність процесів окиснення в іммобілізованому препараті інгібітору фенольної природи, зберігаючи його антиліполітичну активність. Показано можливість отримання БАД – інгібітору ліпази та БАД – ентеросорбентів з інгібуючими властивостями (табл. 5).

Таблиця 5

Компонентний склад розроблених БАД

БАД	Масова частка компоненту, %		
	ХВІВ	Фенольні сполуки	Антиоксидант
БАД-1	89,95	10	0,05
БАД-2	96,73	3,22	0,05
БАД-3	98,31	1,69	0,05

Антиліполітична активність БАД і добова доза кожної з врахуванням рекомендованих доз, становить 255 ІО АІА. Кількість харчових волокон в добовій дозі БАД 2 – 33 %, БАД 3 – 73 % від маси ХВІВ, що рекомендується для заповнення щодобового дефіциту цього компоненту в травленні. Це дозволяє віднести два останні препарати до категорії поліфункціональних, оскільки поряд з тим, що вони володіють антиліполітичною активністю, до їх складу також входить значна кількість харчових волокон, відповідальних за низку значущих функціонально-фізіологічних властивостей.

Використовуючи методи багатофакторного планування експериментів було встановлено раціональні режими екстракції:  $\tau = 10 \text{ хв}$ ,  $t = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ , ГМ 10.

За допомогою методу найменших квадратів і послідовного регресійного аналізу отримано рівняння регресії, яке описує залежність антиліполітичної активності іммобілізованих фенольних сполук від досліджуваних чинників — температури іммобілізації  $t$ , тривалість процесу  $\tau$  та співвідношення твердої і рідкої фаз (ГМ). На основі цього рівняння встановлено раціональні параметри процесу іммобілізації фенольних сполук на харчових волокнах пшеничних висівків:  $\tau = 15,5 \text{ хв}$ ;  $t = 16 \text{ }^\circ\text{C}$ ; ГМ = 3,49. За цих умов забезпечується максимум інгібіторної активності іммобілізованого препарату — 165,6 ІО/г.

Обґрунтовано умови сушіння БАД в киплячому шарі. Показано, що сушіння БАД-1 при температурі  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  і тривалості процесу 30 хв забезпечує збереження антиліполітичної активності.

Розроблено технологію БАД, що включає наступні основні етапи:

1. Виділення фенольного комплексу з сировини;
2. Імобілізацію фенольних сполук на біополімерну матрицю;
3. Сушіння БАД.

Послідовність технологічних операцій отримання БАД приведено нижче у векторному виконанні (рис. 10).

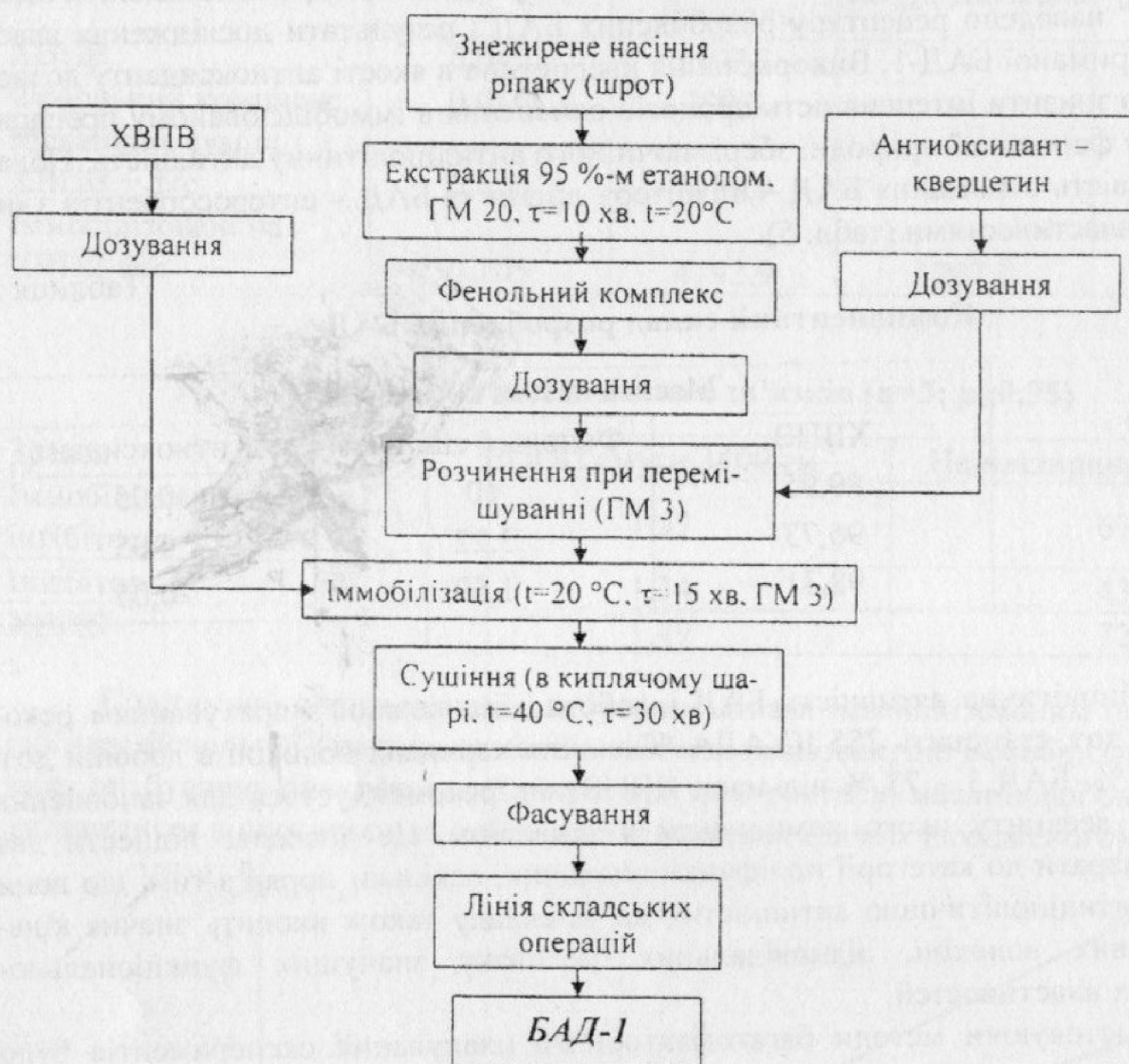


Рис. 10. Функціональна схема отримання БАД

## ВИСНОВКИ

1. На підставі результатів теоретичних і експериментальних досліджень розроблено технологію виробництва БАД, що володіє інгібуючою активністю відносно панкреатичної ліпази.

2. Показано, що компонентами насіння ріпаку, відповідальними за антиліполітичну активність, є ліпіди (ІА = 65 ІО/г) і фенольні сполуки (ІА = 1885 ІО/г). Інгібуюча активність ліпідної компоненти визначається присутністю фосfolіпідів (АЛА 88 ІО/г). Фенольний комплекс за величиною антиліполітичної активності (8875 ІО/г).

порівняний з фармакопейним препаратом "Ксеникал" (9700 ІО/г). Основними компонентами фенольного комплексу, що обумовлюють його інгібуючу дію, є синапін (18811,9 ІО/г), синапова кислота (9777,8 ІО/г), гідролізуємі таніни (18541,4 ІО/г).

3. Визначено, що інгібування панкреатичної ліпази фосфоліпідами ріпаку здійснюється за лінійним конкурентним типом, фенольними сполуками – за лінійним змішаним типом. При взаємодії інгібітору фенольної природи з ліпазою мають місце зміни як активного центру ферменту, так і центру зв'язування субстрату, що супроводжується частковою іонізацією карбоксильних груп, що входять до активного центру панкреатичної ліпази.

4. Встановлено, що інгібітори найбільш стабільні при значеннях рН в інтервалі 7,0...8,0 і температурі  $(37 \pm 2)$  °С. Активність досліджуваних інгібіторів значно знижується в кислому середовищі, а також при температурі вищій 40°С; рН-оптимум дії інгібіторів знаходиться в інтервалі 7,0...8,0 одиниць рН; термооптимум –  $(37 \pm 2)$  °С.

5. Доказано, що стабілізація інгібітору фенольної природи можлива за допомогою його іммобілізації на біополімерній матриці, внаслідок якої між носієм і інгібітором виникають водневі зв'язки, що стабілізують комплекс інгібітор-носій. Іммобілізація супроводжується збільшенням рН- і термостабільності інгібітору більш ніж на 20 % і зростанням його стійкості до інактивуючої дії шлункового соку і компонентів жовчі.

6. Вивчено, що інгібування панкреатичної ліпази іммобілізованим препаратом фенольних сполук відбувається за змішаним (двопараметрично узгодженим) типом.

7. Визначено, що раціональними параметрами екстракції фенольних сполук є: температура 20 °С, тривалість 10 хв, гідромодуль – 20; раціональними параметрами іммобілізації фенольних сполук на ХВПВ є: температура 16 °С, тривалість 15,5 хв, гідромодуль – 3,49.

8. Експериментально встановлено, що до складу БАД разом з фенольною компонентою і біополімерною матрицею доцільне включення антиоксиданту – кверцетину з масовою часткою 0,05%. Показана можливість отримання БАД з різним масовим співвідношенням інгібітор-носій: (1 : 9), (1 : 30), (1 : 60). Протягом 6 місяців зберігання показники якості БАД не знижуються.

9. Розроблено принципову технологічну схему отримання БАД, що включає етапи виділення інгібітору, його іммобілізацію і сушку. Апробацію у виробничих умовах проведено на НВО "Аріадна"; показники якості отриманої продукції відповідають вимогам, викладеним в ТУ.

10. Медико-біологічні дослідження на лабораторних тваринах показали, що БАД-1 достовірно інгібує розщеплення жирів. Добова доза БАД-1 для людини складе 1,5 г.

### Перелік публікацій за темою дисертаційної роботи

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Черно Н. К. Фенольні сполуки насіння ріпаку – інгібітори панкреатичної ліпази [Текст] / Н. К. Черно, Г. В. Крусир, В. В. Мочуляк // Товари і ринки. – 2007. – № 2. – С. 142-147.
6. Крусир Г. В. К вопросу об ингибировании панкреатической липазы фенольными соединениями и фосфолипидами рапса [Текст] / Г. В. Крусир, Е. В. Севастьянова, В. В. Яшкіна // Інновац. енерго- й ресурсозберігаючі технології та облад. в хлібопекар., кондитер., макарон., харчо концентрат, і зерно перероб. галузях харч. пром.-сті: темат. зб. наук. пр. НУХТ. Х., 2008. – № 25, ч. 2. – С. 21-23.
7. 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.
8. Пат. 26209 Україна, МПК А 61 К 36/00. Спосіб одержання інгібітору ліпази [Текст] / Н. К. Черно, Г. В. Крусир, В. В. Яшкіна; заявник і патентодавець Одес. нац. акад. харч. технологій. № у 2007 04508; заявл. 23.04.2007; опубл. 10.09.2007. Бюл. № 14. – 4 с.
9. Пат. 26164 Україна, МПК А 61 К 36/00. Спосіб одержання інгібітору ліпази [Текст] / Н. К. Черно, Г. В. Крусир, В. В. Яшкіна; заявник і патентодавець Одес. нац. акад. харч. технологій. № у 2007 03683; заявл. 03.04.2007; опубл. 10.09.2007. Бюл. № 14. – 4 с.
10. Пат. 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. Крусир, В. В. Яшкіна; заявник і патентодавець Одес. нац. акад. харч. технологій. № у 2008 04748; заявл. 10.10.2008; опубл. 10.09.2007. Бюл. № 19. – 2 с.
11. Фосфолипиды рапса – ингибиторы липаз [Текст] / Н. К. Черно, Г. В. Крусир, Е. В. Севастьянова, В. В. Яшкіна // Сб. науч. тр. МПА. – М., 2005. – Вып. 3. – С. 327-332.
12. Chernо N. Lipids from rapeseed: composition and antilipolytic activity [Text] / N. Chernо, G. Krusir, V. Yashkina // International Scientific Conference "Food Science, Engineering and Technologies 2008", Plovdiv, 24-25 okt. 2008. Plovdiv, 2008. P.261-266.
13. 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, свитьк I. – Пловдив, 2007г. – С. 264-268.
14. Черно Н. К. Вивчення інгібіторної активності насіння арахісу і ріпаку [Текст] / Н. К. Черно, Г. В. Крусир, 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.
15. 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.
16. Черно Н. К. Масличные культуры как источники ингибиторов пищеварительных ферментов [Текст] / Н. К. Черно, В. В. Яшкіна, О. А. Лось / Тез. доп. 9 Міжнар. наук.-техн. конф. „Но-

- ві технології та техн. рішення в харч. та перероб. пром.-сті. Сьогодення і перспективи", Київ 17-19 жовт. 2005 р. – К., 2005. – С. 10-11.
17. Липиды рапса – источник ингибиторов липаз [Текст] / Н. К. Черно, Г. В. Крусир, Е. В. Севастьянова, В. В. Яшкіна / Тез. доп. 5 Міжнар. наук.-практ. конф. „Хлібопродукти–2005”. Одеса. 14-16 верес. 2005 р. – О., 2005. – С. 37.
  18. Черно Н. К. Характеристика ліпідів нового сорту ріпаку "Галицький" [Текст] / Н. К. Черно, В. В. Яшкіна, К. С. Денисюк // Тез. доп. Всеукр. Наук. конф. студ. "Актуал. пробл. розв. харч. вир-в. ресторан. Госп-ва і торгівлі", Харків / ХДУХТ. 11-12 квіт. 2007 р. – Х., 2007. – С. 431.
  19. Черно Н. К. Характеристика ингибиторов липаз из семян рапса, арахиса и горчицы [Текст] / Н. К. Черно, Г. В. Крусир, В. В. Яшкіна // Тез. докл. IV Междунар. науч.-практ. конф. "Пища. Экология. Качество", Новосибирск 2004 г. – Новосибирск, – 2004. – С. 206-209.

#### Особистий внесок:

1. Аналіз даних літератури, проведення експериментальних досліджень щодо всебічної характеристики інгібіторів ліпази та їх джерел (вивчення інгібіторів ліпази рослинного і мікробного походження та синтетичних, аналіз рослинних джерел інгібіторів панкреатичної ліпази різної природи – фенольних сполук, білків, жирів, вуглеводів з ліпазінгібуючою активністю), обробка та узагальнення отриманих результатів, вибір об'єкту вивчення, підготовка до друку (поз. 1, 15, 17).

2. Вивчення антиліполітичної активності насіння ріпаку та його компонентів, обробка отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку (поз. 2-5, 8, 12-14, 16, 18, 19).

3. Вивчення кінетичних параметрів реакції інгібування ліпази фенольними сполуками і фосфоліпідами ріпаку, підготовка матеріалів до друку (поз. 6, 7).

4. Проведення експериментальних досліджень, узагальнення отриманих результатів, проведення патентного пошуку та оформлення заявок на корисну модель (поз. 9, 10, 11).

#### АНОТАЦІЯ

Яшкіна В.В. Технологія функціональних харчових інгредієнтів з антиліполітичною активністю на основі насіння ріпаку (*Canola*). – Рукопис.

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

Дисертація спрямована на розробку технології отримання біологічно активних добавок з антиліполітичною дією. Значна увага в роботі приділяється всебічній характеристиці інгібіторів ліпази з насіння ріпаку: визначення і отримання компонентів з інгібіторною активністю по відношенню до панкреатичної ліпази, визначення кінетичних параметрів реакції інгібування ліпази фенольними і фосфоліпідними сполуками, типу взаємодії ферменту з інгібітором фенольної природи та інгібітору з біополімерною матрицею в результаті іммобілізації.

Доведено доцільність використання фенольних сполук насіння ріпаку як ефективного інгібітору ліпази в складі БАД і функціональних продуктів харчування. Фе-

## SUMMARY

Yashkina V.V. Technology of functional food ingredients with antilipolytic activity on the basis of rape seed (*Canola*). – Manuscript.

Dissertation for obtaining the scientific degree of the Candidate of Technical Science on the specialty 03.00.20 – Biotechnology. – Odessa National Academy of Food Technologies, the Ministry of Education and Science of the Ukraine, Odessa, 2009.

Dissertation is directed for development of technology of biologically active additions receipt with an antilipolytic action. Considerable attention in work is directed on comprehensive description of lipase inhibitors from the rape seed: determination and receipt of components with inhibitory activity in relation to pancreatic lipase, determination of kinetic parameters of lipase inhibition reaction by phenolic components and phospholipids, type of enzyme co-operation with phenolic nature inhibitor and inhibitor with a biopolymeric matrix as a result of immobilization.

Expedience of the use of rape seed phenolic components is proved as effective lipase inhibitor in composition of biologically active additives and functional food stuffs. With the purpose of phenolic complex receipt it was extracted from the fat free rape seed by the extraction of 95 % an ethanol in soft terms. With the purpose of determination of inhibitor composition and separate components with antilipolytic activity fractionating of the phenolic complex is conducted by the column chromatography and the thin-layer chromatography. Certainly, that active in relation to pancreatic lipase is sinapic acid, sinapin and polyphenol components.

The developed technology for biologically active additives receipt is economically grounded and includes the followings main stages: extraction of phenol complex from raw material, immobilization of phenol components on a biopolymeric matrix, drying of biologically active additives. Reality of technology is confirmed by the results of industrial approbation on a biotechnological enterprise, a normative document is developed on BAD-1. Possibility of the use of BAD-1 is shown in composition functional food stuffs on the basis of milk products.

**Keywords:** pancreatic lipase inhibitors of plant origin, phenolic components, phospholipids, pancreatic lipase, inhibition, immobilization.