

Автореф  
Т44

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

**Тірон-Воробйова Наталія Борисівна**



УДК 613.292-021.632:[577.15:635.162]

**ТЕХНОЛОГІЯ ЛІЗОЦИМОВМІСНИХ БІОПОЛІМЕРНИХ  
КОМПЛЕКСІВ РОСЛИННОГО ПОХОДЖЕННЯ**

Спеціальність 03.00.20 – біотехнологія (технічні науки)

**АВТОРЕФЕРАТ**

дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата технічних наук

Одеса – 2012

СВ

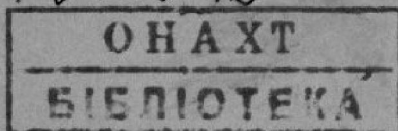
Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Одеській національній академії харчових технологій  
Міністерства освіти і науки, молоді та спорту України.

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

**Офіційні опоненти:** – доктор технічних наук, професор,  
**Безусов Анатолій Тимофійович**,  
Одеська національна академія харчових технологій,  
кафедра біотехнології, консервованих продуктів і  
напоїв, завідувач кафедри;  
– доктор технічних наук, професор,  
**Гержикова Вікторія Григорівна**,  
Національний інститут винограду і вина «Магарач»,  
НААН, м. Ялта, відділ хімії та біохімії вина,  
головний науковий співробітник.

v018049



Захист відбудеться «4» квітня 2012 року о 10<sup>30</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 41.088.02 в Одеській національній академії харчових технологій за адресою: 65039, м. Одеса, вул. Канатна, 112 в ауд. А-234.

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

Автореферат розісланий «28» лютого 2012 року.

24.04.12

Технологія лізоцимов



v018049

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

Г.М. Станкевич

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

У зв'язку з погіршенням структури харчування населення відмічається дефіцит в організмі життєво необхідних біологічно активних речовин (БАР), що супроводжується, зокрема, зниженням імунітету, життєвого тону, фізичної і розумової працездатності. Харчові раціони сучасної людини багаті неприродними стереоізомерами, рацематами, які не беруть участь у метаболізмі, блокують метаболічні шляхи, формують дефектні структури, викликаючи алергізацію організму і ряд різних захворювань.

У зв'язку з цим, в останні роки інтенсифікується створення нових функціональних продуктів, дієтичних добавок на основі природних БАР рослинної сировини. Дія БАР рослин не вичерпується тільки впливом на імунологічні процеси, багато з них служать природними антибіотиками, зокрема лізоцим – фермент, дія якого спрямована на зменшення патогенної флори.

Препарати лізоциму, отримані на основі рослинної сировини, поряд із основним компонентом містять і інші БАР, що сприяють розширенню спектра позитивних фізіологічних ефектів. Дієтичні добавки, до складу яких входять БАР рослинного походження, підтримують захисні сили організму в сезон вірусних інфекцій, не дають загостритися хронічним захворюванням, співвіднесення їх до препаратів мікробного і синтетичного походження має ряд переваг: не викликають токсичних, алергічних реакцій і звикання.

**Актуальність теми.** Відомо, що лізоцим є неспецифічним потужним імуностимулятором, який оберігає організм людини від розростання патогенної флори.

Цей фермент виконує одночасно кілька захисних дій: знешкодження чужорідного агента в організмі, стимулює фактори захисту, зокрема, фагоцитоз, запобігає процесам старіння, відновлює кишкову мікрофлору; застосовується при хронічних гастритах, колітах, захворюваннях жовчовивідних шляхів. Лізоцим запобігає зростанню бактерій з антибіотикостійкими властивостями.

В останні роки визначилася актуальність використання ферменту у складі харчових продуктів, дієтичних добавок та лікарських препаратів. Як правило, з цією метою застосовується лізоцим тваринного походження – з білка курячих яєць, перш за все як антибактеріальний агент.

Відомо, що рослинні лізоцими вигідно відрізняються від лізоциму білка курячих яєць відсутністю алергізуючого потенціалу.

Сукупність вищевикладеного визначає актуальність теми дисертаційної роботи, присвяченої виділенню і характеристиці лізоцимів рослинного походження, розробленню технології лізоцимовмісних біополімерних комплексів.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Робота відповідає тематиці досліджень проблемної лабораторії Одеської національної академії харчових технологій «Біополімери рослин як об'єкти хімічної та біотехнологічної модифікації» (2009-2011 рр., № держ. реєстрації 0109U000397, наказ Міністерства освіти і науки України № 1043 від 17.11.2008 р.).

### Мета та завдання дослідження.

Метою роботи є отримання, характеристика і розроблення технології виробництва лізоцимовмісних біополімерних комплексів рослинного походження.

Для досягнення поставленої мети визначено основні завдання дослідження:

- обґрунтування вибору сировини – джерел вилучення лізоциму;
- виділення та очищення лізоциму із сокової частини коренеплодів *Armoracia rusticana* (хрону звичайного);
- характеристика лізоциму *Armoracia rusticana* та дослідження кінетики гідролізу ним клітинних стінок Гр<sup>+</sup> бактерії *Micrococcus lysodeikticus*;
- обґрунтування вибору полісахариду-«комплексоутворювача»;
- характеристика лізоцимовмісних біополімерних комплексів з *Armoracia rusticana* і *Brassica oleracea* (капусти білокачанної);
- характеристика зв'язків фермент-матриця та електрофоретичні дослідження лізоцимовмісних біополімерних комплексів;
- оптимізація режимів процесу екстракції лізоциму *Armoracia rusticana* та іммобілізації лізоцимів *Armoracia rusticana* і *Brassica oleracea*;
- медико-біологічні та мікробіологічні дослідження;
- розроблення технологій комплексної переробки лізоцимовмісної рослинної сировини із отриманням біополімерних комплексів, промислова апробація розроблених технологій.

*Об'єкт дослідження:* технологія біологічно активних речовин та дієтичних добавок антибактеріальної спрямованості, лізоцим і лізоцимовмісні препарати.

*Предмет дослідження* – рослини сімейства капустяних (*Brassicaceae*) з лізоцимною активністю, лізоцимовмісні біополімерні комплекси.

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

**Наукова новизна отриманих результатів.** Надано всебічну характеристику лізоциму сокової частини коренеплодів *Armoracia rusticana*, визначено його амінокислотний склад, молекулярну масу, надано оцінку кінетичних закономірностей гідролізу лізоцимом *Armoracia rusticana* специфічного субстрату *M. lysodeikticus*. Вивчено фізико-хімічні властивості лізоцимів *Armoracia rusticana* і *Brassica oleracea* та їх іммобілізованих форм.

Розроблено спосіб виділення лізоцимів у вигляді комплексів з полісахаридами. Надано характеристику їх функціонально-фізіологічних властивостей та медико-біологічну оцінку лізоцимовмісних біополімерних комплексів із *Armoracia rusticana* і *Brassica oleracea*.

Наукову новизну підтверджено 2 патентами України на корисну модель: № 62988, Дієтична добавка з антибактеріальною дією; № 64406, Ферментний препарат.

**Практичне значення отриманих результатів.** Розроблено технології лізоцимовмісних комплексів із *Armoracia rusticana* та *Brassica oleracea*. Оптимізовано основні режими процесу екстракції лізоциму *Armoracia rusticana* і іммобілізації лізоцимів *Armoracia rusticana* та *Brassica oleracea* комплексоутворенням з полісахаридами. Розроблені технології реалізовано на науково-виробничому підприємстві ТОВ «Аріадна», м. Одеса.

**Особистий внесок здобувача** полягає в забезпеченні методичного оформлення роботи, виконанні аналітичних та експериментальних досліджень, проведенні аналізу та узагальненні отриманих даних у вигляді висновків і рекомендацій, підготовці матеріалів досліджень до публікації, організації промислової апробації розроблених технологій лізоцимовмісних біополімерних комплексів. Особистий внесок здобувача підтверджується представленими документами та науковими публікаціями.

**Апробація результатів дисертації.** Основні результати досліджень доповідалися й обговорювалися на 17 наукових конференціях, зокрема на Всеукраїнській науковій конференції студентів, присвяченій 40-річчю Харківського державного університету харчування та торгівлі «Актуальні проблеми розвитку харчових виробництв, ресторанного господарства і торгівлі» (м. Харків, 2007); Шостій міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Техника и технология пищевых производств» (м. Могилів, 2008); 73 науковій конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI ст.» (м. Київ, 2007); Науковій конференції молодих вчених і студентів «Modern problems of microbiology and biotechnology» (м. Одеса, 2007); Другій міжнародній науково-практичній конференції «Харчові технології – 2006» (м. Одеса, 2006); Міжнародній науково-практичній конференції «Новітні технології, обладнання, безпека та якість харчових продуктів: сьогодення та перспективи» (м. Київ, 2010); Міжнародній науково-практичній конференції «Новітні технології оздоровчих продуктів харчування XXI ст.» (м. Харків, 2010); Другій всеукраїнській науково-практичній конференції з хімії та хімічної технології студентів, аспірантів та молодих вчених (м. Київ, 2007); Шостій міжнародній науково-практичній конференції «Наукові дослідження – теорія та експеримент» (м. Полтава, 2010); Всеукраїнській науковій конференції студентів і молодих вчених «Актуальні проблеми розвитку харчових виробництв, ресторанного господарства і торгівлі» (м. Харків, 2010); Шостій міжнародній науково-практичній конференції «Розвиток наукових досліджень 2010» (м. Полтава, 2010); Сьомій міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Техника и технология пищевых производств» (м. Могилів, 2010); Всеросійській науково-практичній конференції з міжнародною участю, яка присвячена 10-річчю факультету експертизи і товарознавства 18 лютого 2011 г. «Актуальные проблемы потребительского рынка товаров и услуг» (м. Кіров, 2011); Сьомій міжнародній науково-практичній конференції «Наука і інновація – 2011» (м. Польща, 2011); Міжнародній науково-практичній конференції «Прогресивна техніка та технології харчових виробництв, готельного, ресторанного господарств і торгівлі. Економічна стратегія і перспективи розвитку сфери торгівлі та послуг» (м. Харків, 2011); Сьомій міжнародній науково-практичній конференції «Харчові технології – 2011» (м. Одеса, 2011); Другій міжнародній науково-практичній конференції «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине» (м. Санкт-Петербург, 2011).

**Публікації.** Результати дисертації опубліковано у 27 друкованих працях, з яких 6 статей у фахових виданнях, 2 патенти України на корисну модель № 62988,

№ 64406, 2 статті в наукових журналах, тези 17 доповідей на наукових та науково-практичних конференціях.

**Структура й обсяг роботи.** Дисертація складається зі вступу, 5 розділів, висновків, списку використаних літературних джерел та додатків. Дисертаційну роботу викладено на 116 сторінках основного тексту, вона містить 47 рисунків (25 сторінок), 24 таблиці (38 сторінок), 9 додатків (64 сторінки), список літературних джерел з 320 найменувань (34 сторінки).

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**У вступі** викладено актуальність теми дисертаційної роботи, зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, сформульовано мету і завдання дослідження, висвітлено наукову новизну і практичне значення отриманих результатів, їх апробацію, визначено особистий внесок здобувача у проведенні дослідження та публікаціях за темою дисертаційної роботи.

**У першому розділі** «Лізоцим як антибактеріальний агент» розглянуто розповсюдженість, основні типи, функціональну роль лізоцимів, висвітлено їх будову, функції, активності, механізм дії, фізико-хімічні властивості, методи виділення та визначення лізоцимної активності, напрями використання лізоцимів.

**У другому розділі** «Матеріали і методи досліджень» наведено схему досліджень (рис. 1). Основну частину досліджень проведено в лабораторіях кафедри харчової хімії ОНАХТ, в лабораторіях біохімії Одеського селекційно-генетичного інституту Національного центру насіннезнавства і сортовивчення УААН. Надано характеристику методів досліджень, як загальнонаукових, так і специфічних (хімічних та біохімічних). Наведено метод визначення лізоцимної активності, основні етапи вилучення та очищення лізоциму *Armoracia rusticana* з використанням фермент-субстратної хроматографії. Описано визначення молекулярної маси і гомогенності (електрофорез у поліакриламідному гелі (ПААГ)), амінокислотного складу, кінетики гідролізу *M. lysodeikticus* лізоцимом *Armoracia rusticana*, іммобілізацію лізоцимів *Armoracia rusticana* і *Brassica oleracea* шляхом комплексоутворення з іоногенними полісахаридами.

**У третьому розділі** «Виділення і характеристика лізоциму *Armoracia rusticana*» наведено результати досліджень щодо отримання очищеного препарату лізоциму з сокової частини коренеплодів *Armoracia rusticana*. Сік хроматографували з використанням біоспецифічного сорбенту глюкохітину.

Вихідна крива елюції лізоциму *Armoracia rusticana* з глюкохітину (рис. 2) характеризується двома білковими максимумами, один з яких володіє лізоцимною активністю.

Питома лізоцимна активність фракції 2 у порівнянні з соком зростає у 13,1 рази, а концентрація білка знизилась у 6,0 разів. Таким чином, ступінь очищення ферменту – 13,0, а його вихід 36,8 %. В узагальненому вигляді стадії очищення лізоциму наведено у табл. 1.

Результати електрофоретичних досліджень у 15 % ПААГ у присутності натрій додецилсульфату свідчать, що лізоцим є гомогенним білком з молекулярною масою 12,0 кДа; встановлено наявність в ньому двох ізоформ.

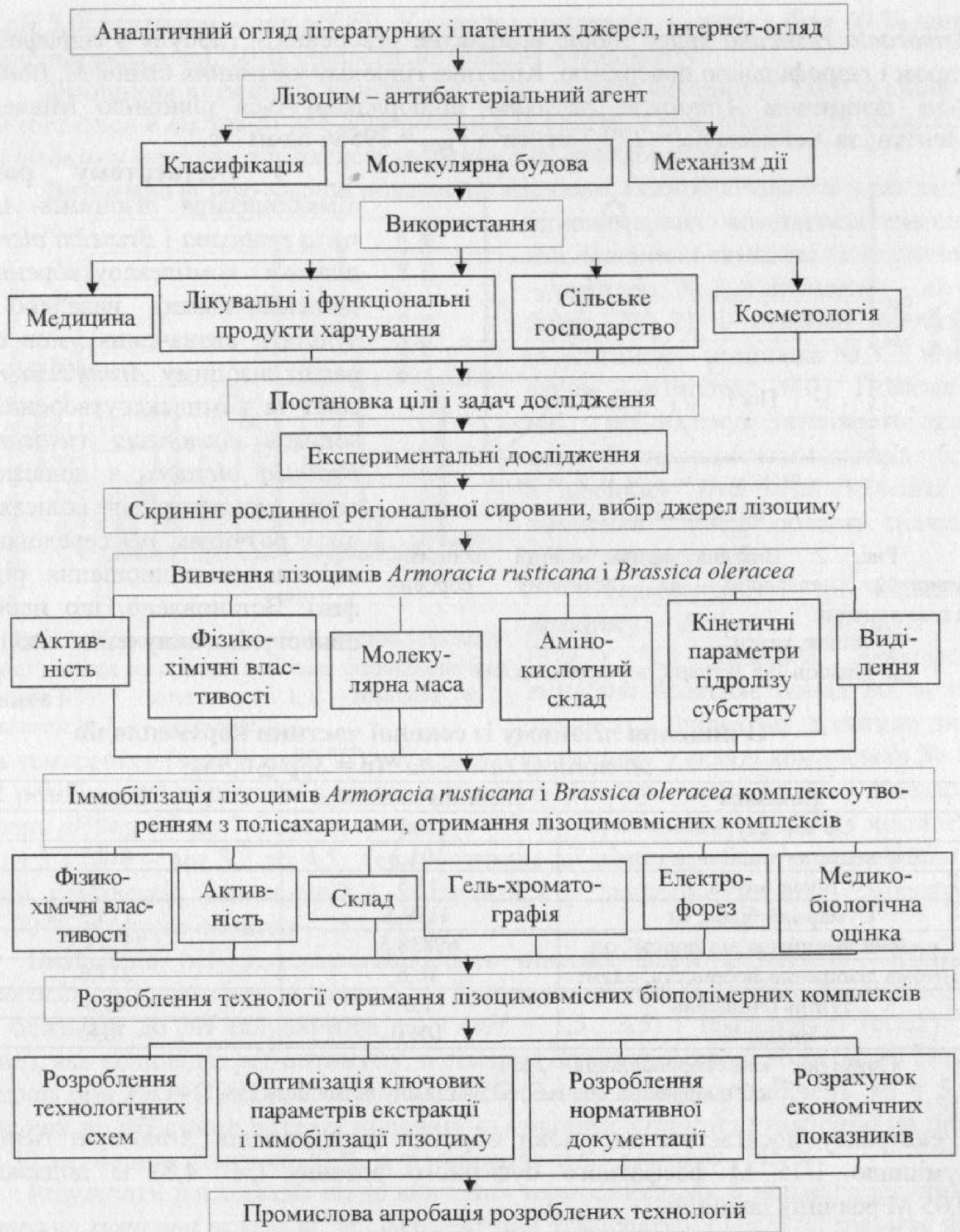


Рис. 1. Програма досліджень.

Встановлено, що лізоцим *Armoracia rusticana* за амінокислотним складом близький до такого лізоцимів рослинного походження і містить кількість залишків цистину, необхідну для прояву ним ферментативної активності і підвищеної стабільності. За ступенем гідрофобності білкової молекули розраховано розмір та форму її глобули. Встановлено (методом Фішера), що макромолекула лізоциму

*Armoracia rusticana* являє собою компактне утворення – глобулу з гідрофобним ядром і гідрофільною поверхнею. Кінетика гідролізу клітинних стінок *M. lysodeikticus* лізоцимом *Armoracia rusticana* підпорядковується рівнянню Міхаеліса-Ментен; за Хейнсом  $K_m = 229,7 \text{ мг/дм}^3$  і  $V_{max} = 19586 \text{ од} \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ .

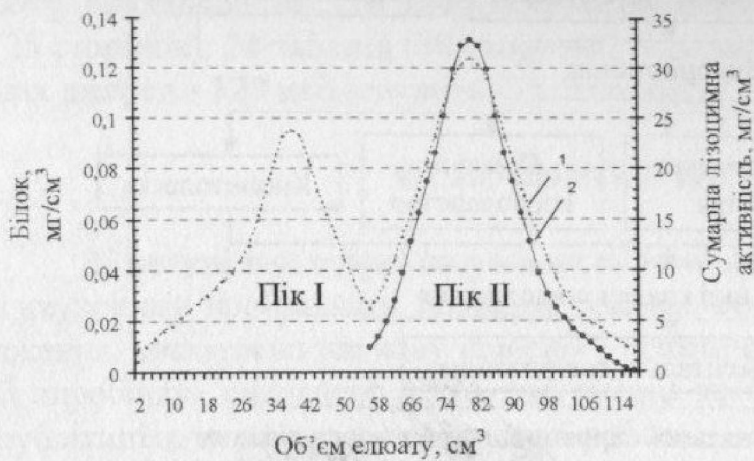


Рис. 2. Вихідна крива елюції лізоциму *Armoracia rusticana* на афінному сорбенті глюкохітині:

- 1 – білок, мг/см<sup>3</sup>;  
2 – лізоцимна активність у пробі, од./см<sup>3</sup>.

У четвертому розділі «Імобілізація лізоцимів *Armoracia rusticana* і *Brassica oleracea* шляхом комплексоутворення з полісахаридами» наведено результати визначення умов екстракції лізоциму *Armoracia rusticana* та комплексоутворення лізоцимів *Armoracia rusticana* і *Brassica oleracea* з полісахаридами (концентрація полісахаридів у розчинах, pH середовища і об'ємне співвідношення рідких фаз). Встановлено, що найбільший ступінь вилучення лізоциму

Таблиця 1

### Очищення лізоциму із сокової частини коренеплодів *Armoracia rusticana* \*(n = 3, p ≥ 0,95)

Показник	Значення показника	Елюат**
Об'єм соку, см <sup>3</sup>	365	62
Лізоцимна активність, од./см <sup>3</sup>	191,3	415,3
Білок, мг/см <sup>3</sup>	11,5	1,9
Сумарний білок, мг	4189,5	118,3
Сумарна лізоцимна активність, од.	69838,5	25748,3
Питома лізоцимна активність, од./мг	16,6	217,6
Ступінь очищення	1,0	13,0
Вихід, %	100,0	36,8

Примітка: \* маса коренеплодів – 2 кг;

\*\* об'єм фракцій, що мають лізоцимну активність (58-114 см<sup>3</sup>).

з екстракту досягається за умови обробки коренеплодів *Armoracia rusticana* сумішшю 1/15 М фосфатного буферного розчину (pH 4,8) із додаванням 0,05 М розчину лейцину.

У якості полісахаридної складової при концентруванні лізоцимів *Armoracia rusticana* і *Brassica oleracea* доцільно використовувати 1 % розчин яблучного пектину або 0,5 % – хітозану (об'ємне співвідношення лізоцимовмісна рідка фаза: розчин полісахариду становить 6:1).

Результати досліджень щодо впливу pH середовища на ступінь зв'язування лізоцимів наведено на рис. 3. Встановлено, що найбільше концентрування лізоциму *Armoracia rusticana* з екстракту хітозаном має місце при pH 6,0, пектином – при pH 6,0. Лізоцим *Brassica oleracea* ефективно осаджується із соку хітозаном

при  $pH$  5,0, пектином – при  $pH$  6,0. У складі комплексів міститься біля 40 % полісахаридної складової, 60 % припадає на білкову компоненту.

Лізоцимна активність комплексів у 3,6...4 рази перевищує таку лізоциму, який міститься в екстракті або соці рослин. Це свідчить про доцільність іммобілізації лізоциму методом комплексоутворення з полісахаридами.

Визначено фізико-хімічні показники інтактних і іммобілізованих у вигляді

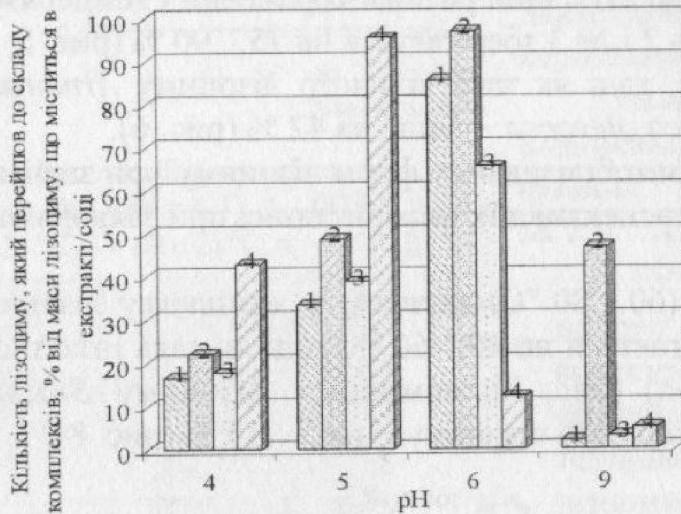


Рис. 3. Вплив величини  $pH$  на ступінь переходу лізоциму у склад комплексів (об'ємне співвідношення рідких фаз 6:1): 1 – комплекс № 1, 2 – комплекс № 2, 3 – комплекс № 3, 4 – комплекс № 4.

біополімерних комплексів лізоцимів *Armoracia rusticana* (з пектином – комплекс № 1, з хітозаном – комплекс № 2) і *Brassica oleracea* (з пектином – комплекс № 3, з хітозаном – комплекс № 4). Показано, що  $pH$ -оптимум інтактного лізоциму *Brassica oleracea* складає 6,5, а лізоциму *Armoracia rusticana* – зміщений у кислу область значень  $pH$  і становить 3,5.

Термооптимум дії вільного лізоциму *Brassica oleracea* –  $(37 \pm 2)$  °С. Лізоцим *Armoracia rusticana* проявляє понад 80 % активності у широкому діапазоні значень температур (від 40 до 80 °С);  $pH$ -оптимум лізоциму у складі комплексів № 1 і № 2 розширений порівняно з таким вільного ферменту і знаходиться у діапазоні значень  $pH$  від 6,0 до 7,6 при температурі  $(37 \pm 1)$  °С, а лізоциму у складі комплексів № 3 і № 4 – від 3,2 до 4,5. Термооптимум дії лізоциму *Armoracia rusticana* у складі комплексів розширений і знаходиться у діапазоні значень температур 40...70 °С, *Brassica oleracea* – 35...50 °С.

Визначено  $pH$ - і термостабільність вільних форм ферментів. Лізоцим *Armoracia rusticana* зберігає лише 5...8 % активності при значеннях  $pH$  середовища, близьких до  $pH$  шлункового соку ( $pH = 1,5...3,5$ ) і температурі  $(60 \pm 2)$  °С (3 год), яка відповідає  $pH$ -оптимуму, а лізоцим *Brassica oleracea* зберігає 20 % активності при  $pH = 2$  і температурі  $(37 \pm 2)$  °С (2 год). В області значень  $pH = 5,5$ , близьких до  $pH$  слини ротової порожнини, лізоцим *Armoracia rusticana* на проязі 30 хв зберігає близько 70 %, а лізоцим *Brassica oleracea* – 45 %.

Результати досліджень щодо вивчення термостабільності вільного лізоциму *Armoracia rusticana* показали, що фермент при температурі  $(37 \pm 2)$  °С зберігає лише 20 % активності, при підвищенні температури його активність знижується і складає 5...15 % від вихідної (3 год). При температурі  $(37 \pm 2)$  °С активність інтактного лізоциму *Brassica oleracea* складає близько 80 % вихідної (1 год), а через 2 год – 75 %. Підвищення температури до 60 °С супроводжується втратою активності лізоциму (понад 80 %) *Brassica oleracea* через 1 год.

Встановлено, що у результаті комплексоутворення лізоцимів із полісахаридами підвищується їх  $pH$ - і термостабільність. Відмічено значне підвищення  $pH$ -стабільності лізоцимів при значеннях  $pH$  середовища, близьких до таких

шлункового соку (рис. 4, 5). Так, при значеннях  $pH = 2,5$  і  $3,5$  лізоцим у комплексі № 2 залишається стабільним, його активність зберігається на 45...65 %, тоді як така інтактного лізоциму – лише на 5...8 % (3 год) (рис. 4). Це є одним з чинників, який дозволяє прогнозувати доцільність їх використання для профілактики ряду захворювань шлунку.

При значенні  $pH 5,5$ , близькому до  $pH$  слини ротової порожнини і температурі  $37^\circ C$  активність у комплексах № 1, № 2 і № 3 зберігається на 75...90 % (рис. 5, 6), а комплексу № 4 – на 95 % (30 хв), тоді як така вільного лізоциму *Armoracia rusticana* – на 70 %, а лізоциму *Brassica oleracea* – лише на 42 % (рис. 6).

Значне збереження активності іммобілізованих форм лізоциму при значенні  $pH 5,5$  дозволяє позитивно оцінити перспективи їх використання при захворюваннях ротової порожнини (рис. 5, 6).

В області високих температур ( $60...80^\circ C$ ) активність комплексу лізоциму *Armoracia rusticana* з хітозаном зберігається на 40...60 %, тоді як така інтактного лізоциму – лише на 5...15 % (3 год) (рис. 7); комплексу лізоциму *Brassica oleracea* з хітозаном – на 20...37 %, вільного лізоциму – на 5...15 % (рис. 8).

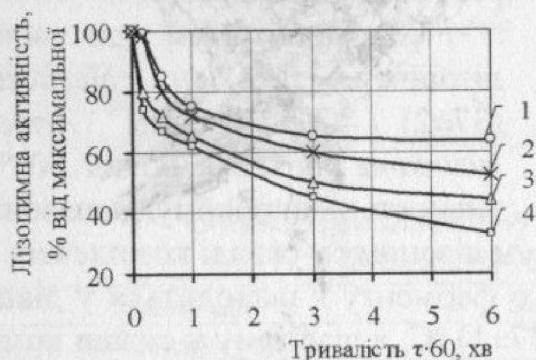


Рис. 4.  $pH$ -стабільність комплексів ( $t = (60 \pm 2)^\circ C$ ): 1 – комплекс № 2 ( $pH 2,5$ ); 2 – комплекс № 1 ( $pH 2,5$ ); 3 – комплекс № 2 ( $pH 3,5$ ); 4 – комплекс № 1 ( $pH 3,5$ ).

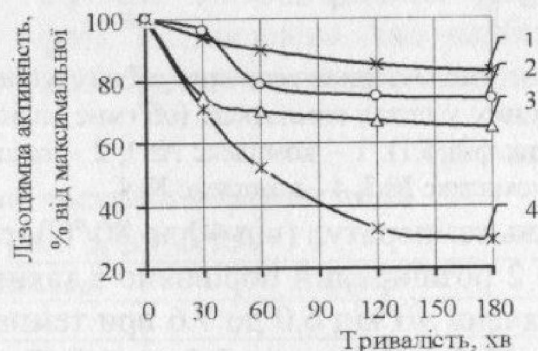


Рис. 5.  $pH$ -стабільність комплексів ( $t = (37 \pm 2)^\circ C$ ): 1 – комплекс № 4 ( $pH 5,5$ ); 2 – комплекс № 4 ( $pH 2,0$ ); 3 – комплекс № 3 ( $pH 5,5$ ); 4 – комплекс № 3 ( $pH 2,0$ ).

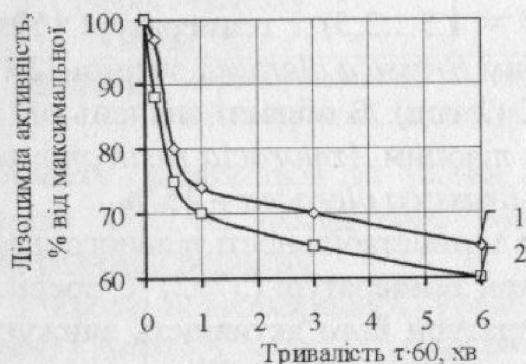


Рис. 6.  $pH$ -стабільність комплексів ( $t = (37 \pm 2)^\circ C$ ,  $pH = 5,5$ ): 1 – комплекс № 2; 2 – комплекс № 1.

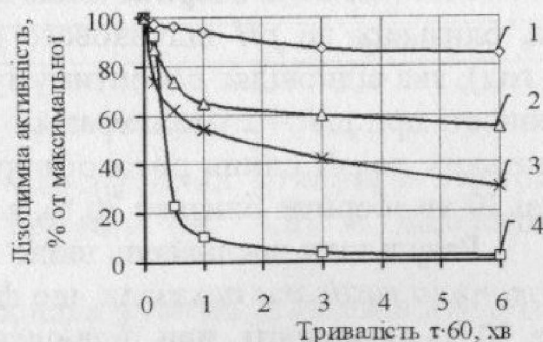


Рис. 7. Термостабільність комплексу № 2 ( $pH = 3,5$ ): 1 –  $(37 \pm 2)^\circ C$ ; 2 –  $(60 \pm 2)^\circ C$ ; 3 –  $(80 \pm 2)^\circ C$ ; 4 –  $(100 \pm 2)^\circ C$ .

Згідно результатів електрофоретичних досліджень білкові компоненти комплексів мають полідисперсний характер і містять чотири білкові фракції з молекулярними масами 29,0, 18,0, 17,0 і 12,0 кДа, остання переважає (рис. 9).

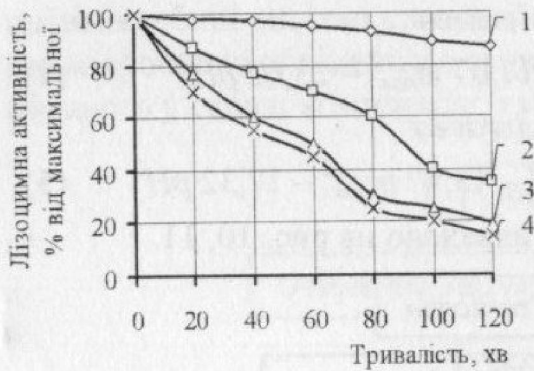


Рис. 8. Термостабільність комплексу № 4 ( $pH = 6,5$ ): 1 –  $(37 \pm 2)^\circ C$ ; 2 –  $(60 \pm 2)^\circ C$ ; 3 –  $(80 \pm 2)^\circ C$ ; 4 –  $(100 \pm 2)^\circ C$ .

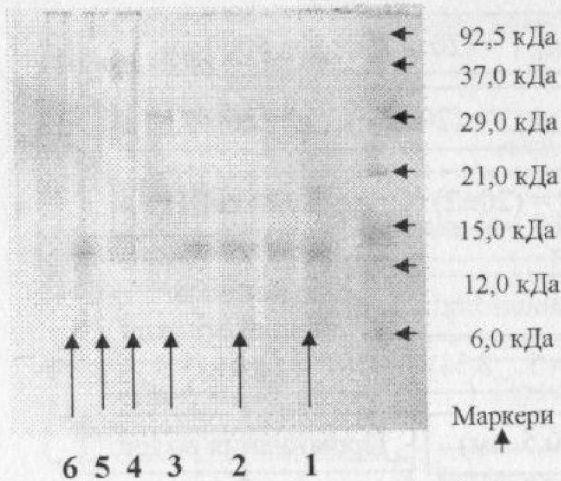


Рис. 9. Електрофореграма білкових складових екстракту *Armoracia rusticana* та соку *Brassica oleracea*, які містять лізоцим і лізоцимовмісних комплексів: 1 – комплекс № 1; 2 – комплекс № 2; 3 – екстракт *Armoracia rusticana*; 4 – комплекс № 3; 5 – комплекс № 4; 6 – сік *Brassica oleracea*.

Встановлено оптимальне значення, що відповідає максимальному переходу лізоциму в екстракт (88,86 %):  $ГМ = 3$ ,  $\tau = 3$  години.

Для визначення оптимальних параметрів процесу іммобілізації досліджували вплив маси полісахаридів  $m_{пол}$  і  $pH$  реакційного середовища на ступінь переходу лізоциму у склад комплексів (% від його маси в екстракті або соці).

Останній показник оцінювали, порівнюючи значення лізоцимної активності екстрактів і отриманих комплексів.

Наведено рівняння регресії, що описують експериментальні дані залежності концентрування лізоциму у складі комплексів з яблучним пектином і хітозаном від досліджуваних факторів  $m_{пол}$  і  $pH$ :

– для комплексу «лізоцим-пектин» *Armoracia rusticana*:

$$y_{вих} = 83,33 - 1,98 \cdot m_{пол} + 13,81 \cdot pH - 37,22 \cdot m_{пол}^2 - 18,69 \cdot pH^2 \quad (2)$$

– для комплексу «лізоцим-хітозан» *Armoracia rusticana*

$$y_{вих} = 94,81 + 10,08 \cdot m_{пол} + 6,09 \cdot pH - 18,23 \cdot m_{пол}^2 - 14,96 \cdot pH^2 \quad (3)$$

За допомогою гелі-хроматографії на сорбенті Sephacryl S 200 Superfine на прикладі комплексів № 1 і № 2 встановлено повне співпадіння піків вуглеводної і білкової складових. Комплексоутворення лізоцимів *Armoracia rusticana*, *Brassica oleracea* з полісахаридами здійснюється переважно за рахунок електростатичних взаємодій (понад 85,0 %).

Вклад водневих зв'язків у стабілізацію комплексів – більше 12,0 %, а ступінь гідрофобних взаємодій є мінімальним (біля 2,0...2,5 %).

У п'ятому розділі «Розроблення технології лізоцимовмісних біополімерних комплексів рослинного походження» обґрунтовано раціональні режими ключових технологічних операцій процесів екстракції лізоциму *Armoracia rusticana* та іммобілізації лізоцимів *Armoracia rusticana* і *Brassica oleracea* шляхом комплексоутворення з полісахаридами; наведено технологічні схеми отримання комплексів у таблетованій формі.

Встановлено залежність переходу лізоциму з *Armoracia rusticana* в екстракт  $y_{вих}$  від гідромодулю  $ГМ$  та тривалості процесу  $\tau$ . Отримано рівняння регресії, що описує залежність  $y_{вих}$  від досліджуваних факторів:

$$y_{вих} = 75,91 + 6,9 \cdot \tau + 9,4 \cdot ГМ - 3,35 \cdot \tau \cdot ГМ \quad (1)$$

– для комплексу «лізоцим-пектин» *Brassica oleracea*

$$y_{\text{вих}} = 64,68 - 6,5 \cdot m_{\text{пол}} - 3,42 \cdot pH - 17,07 \cdot m_{\text{пол}}^2 - 23,62 \cdot pH^2 \quad (4)$$

– для комплексу «лізоцим-хітозан» *Brassica oleracea*

$$y_{\text{вих}} = 83,84 + 13,43 \cdot m_{\text{пол}} - 20,28 \cdot pH - 13,87 \cdot m_{\text{пол}}^2 - 17,32 \cdot pH^2 \quad (5)$$

Технологічні схеми виробництва комплексів наведено на рис. 10, 11.

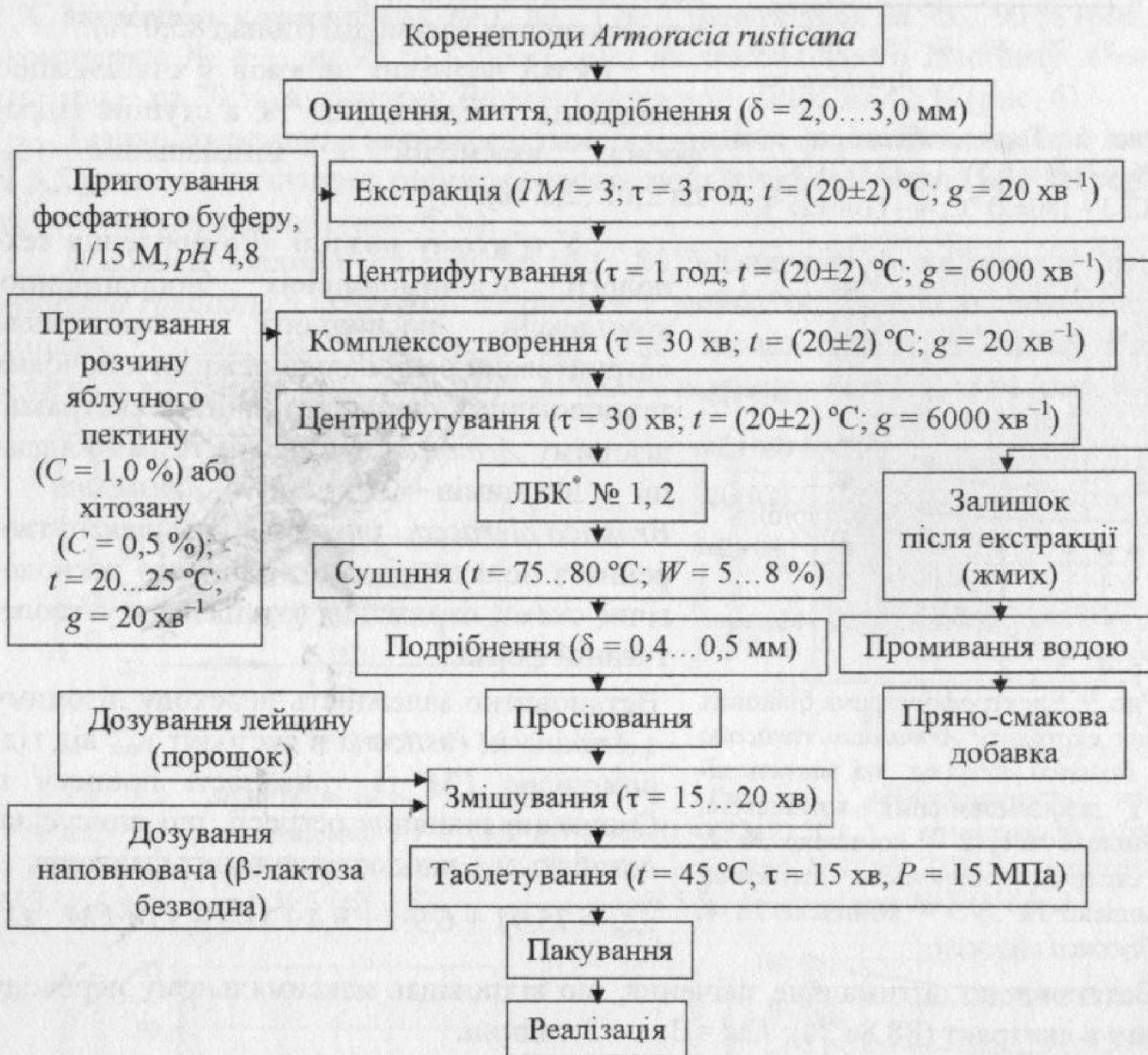


Рис. 10. Технологічна схема процесу виробництва лізоцимовмісних комплексів з коренеплодів *Armoracia rusticana* (\* ЛБК – лізоцимовмісний біополімерний комплекс).

Технології виробництва лізоцимовмісних комплексів апробовано на науково-виробничому підприємстві ТОВ «Аріадна», м. Одеса. Отримані в промислових умовах комплекси у таблетованій формі відповідають необхідним санітарно-гігієнічним, токсикологічним, мікробіологічним, фізико-хімічним та органолептичним нормам.

Сукупність даних мікробіологічних досліджень та вивчення динаміки зміни лізоцимної активності біополімерних комплексів дозволяють рекомендувати їх зберігання у таблетованій формі впродовж 1 року за температури  $(18 \pm 2)^\circ\text{C}$ .

За результатами медико-біологічних досліджень показано, що профілактичне використання лізоцимовмісних комплексів надає стимулюючу дію

антимікробній системі слизової оболонки ротової порожнини, що сприяє зниженню мікробного обсіменіння за рахунок введення екзогенного лізоциму, сконцентрованого у складі комплексів, і усунення явищ запалення, виявлених при дисбіозі.

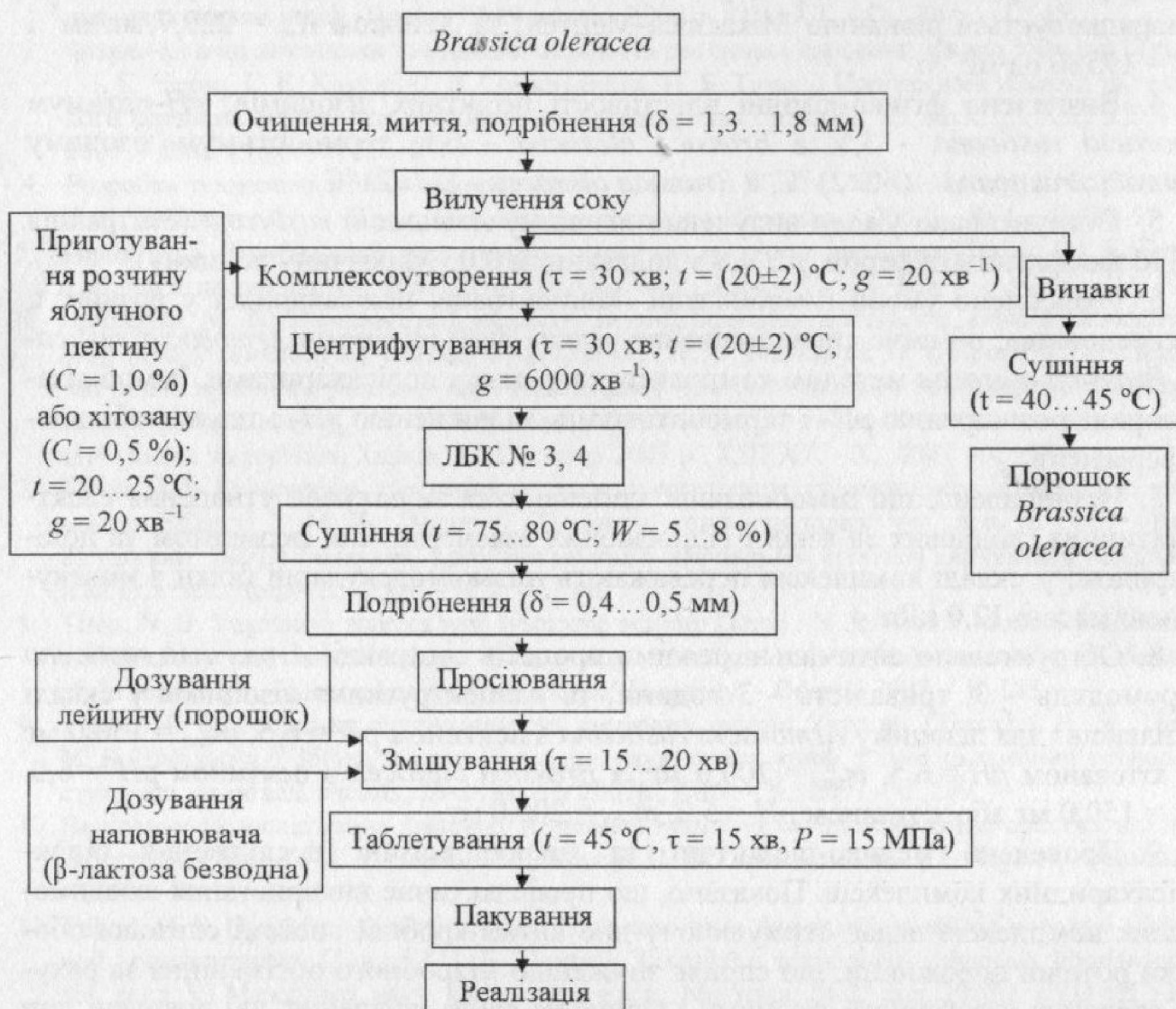


Рис. 11. Технологічна схема процесу виробництва лізоцимовмісних комплексів з *Brassica oleracea*.

## ВИСНОВКИ

1. На основі результатів теоретичних та експериментальних досліджень розроблено технології лізоцимовмісних біополімерних комплексів. Отримано рослинні білок-полісахаридні комплекси з лізоцимною активністю та надано їх характеристику.

2. Показано, що перспективними джерелами лізоциму є *Armoracia rusticana* і *Brassica oleracea*, лізоцимна активність яких знаходиться у межах 30,2 і 21,2 од./мг білка відповідно.

3. Розроблено схему отримання очищеного препарату лізоциму *Armoracia rusticana*. Фермент (ступінь очищення – 13,0; питома лізоцимна активність – 217,6 од./мг білка), отриманий з соку рослини за допомогою афінної хроматографії на глюкохітині, представлено двома ізоформами, його молекулярна маса – 12,0 кДа. Встановлено, що за амінокислотним складом лізоцим *Armoracia*

*rusticana* наближається до других однойменних препаратів рослинного походження (папайї – *Carica papaya* L. і фігового дерева – *Ficus carica* L.) і містить залишки цистину в кількості, необхідній для підвищеної стабільності і проявлення активності ферменту. Кінетика гідролізу лізоцимом *Armoracia rusticana* M. lysodeikticus підпорядковується рівнянню Міхаеліса-Ментен; за Хейнсом  $K_m = 229,7$  мг/дм<sup>3</sup> і  $V_{max} = 19586$  од·мг<sup>-1</sup>·с<sup>-1</sup>.

4. Визначено фізико-хімічні властивості інтактних лізоцимів: рН-оптимум *Armoracia rusticana* – 3,5, а *Brassica oleracea* – 6,5; термооптимум лізоциму *Armoracia rusticana* – (60±2) °С, а *Brassica oleracea* – (37±2) °С.

5. Обґрунтовано умови вилучення лізоциму *Armoracia rusticana* (екстракція 1/15 М фосфатним буфером, рН 4,8 з додаванням 0,05 М розчину лейцину).

6. Розроблено умови іммобілізації (концентрація полісахаридів у розчинах, рН середовища, об'ємне співвідношення рідких фаз) лізоцимів *Armoracia rusticana* і *Brassica oleracea* методом комплексоутворення з полісахаридами. Іммобілізація сприяє розширенню рН- і термооптимумів, підвищенню рН- і термостабільності ферментів.

7. Встановлено, що іммобілізація здійснюється за рахунок утворення електростатичних, водневих зв'язків і гідрофобних взаємодій між ферментом та полісахаридом; у складі комплексів переважають низькомолекулярні білки з молекулярною масою 12,0 кДа.

8. Обґрунтовано оптимальні режими процесів екстракції *Armoracia rusticana* (гідромодуль – 3, тривалість – 3 години) та концентрування лізоцимів у складі комплексів: для лізоциму *Armoracia rusticana* з пектином рН = 6,5,  $m_{пол} = 150,0$  мг або хітозаном рН = 6,5,  $m_{пол} = 200,0$  мг; а *Brassica oleracea* з пектином рН = 6,0,  $m_{пол} = 150,0$  мг або хітозаном рН = 5,0,  $m_{пол} = 200,0$  мг.

9. Проведено медико-біологічні та мікробіологічні дослідження білок-полісахаридних комплексів. Показано, що профілактичне використання лізоцимовмісних комплексів надає стимулюючу дію антимікробній системі слизової оболонки ротової порожнини, що сприяє зниженню мікробного обсіменіння за рахунок введення екзогенного лізоциму і усунення явищ запалення, які виявлені при дисбіозі. Встановлено гарантований термін зберігання лізоцимовмісних комплексів у таблетованій формі – 1 рік.

10. Обґрунтовано принципові схеми отримання лізоцимовмісних біополімерних комплексів, основними етапами яких є вилучення лізоцимів з екстракту *Armoracia rusticana* (або соку *Brassica oleracea*), комплексоутворення, отримання лізоцимовмісних комплексів, сушіння, подрібнення, просіювання, змішування з наповнювачем і лейцином, таблетування. Розроблені технології реалізовано на науково-виробничому підприємстві ТОВ «Аріадна» (м. Одеса). Розроблено нормативну документацію на лізоцимовмісні біополімерні комплекси.

#### Список робіт, опублікованих за матеріалами дисертації

1. Возможность использования растительных объектов, обладающих лизоцимной активностью [Текст] / Н. К. Черно, Севастьянова О. В., Крусир Г. В., Тирон Н. Б. // Сучасні напрямки технології та механізації процесів переробних і харчових виробництв:

- зб. наук. пр. Харківського національного технічного університету сільського господарства ім. Петра Василенка. – Х., 2006. – Вип. 45. – С. 292–298.
2. Растительные объекты с лизоцимной активностью [Текст] / Н. К. Черно, О. В. Севастьянова, Г. В. Крусир, Н. Б. Тирон // Харчові технології – 2006: тез. доп. II міжнар. наук.-практ. конф., Одеса, 17-19 жовтня 2006 р., ОНАХТ. – О., 2006. – С. 45.
  3. Фізико-хімічні показники лізоцимної складової рослинної сировини півдня України [Текст] / Н. К. Черно, Г. В. Крусир, О. В. Севастьянова, Н. Б. Тирон // Прогресивні техніка та технології харчових виробництв ресторанного господарства і торгівлі: зб. наук. пр. ХДУХТ. – Х., 2007. – Вип. 1 (5). – С. 212–217.
  4. Розробка технології хліба з використанням лізоциму [Текст] / Г. В. Крусир, В. В. Сікайло, Т. Є. Лебеденко, Н. Б. Тирон // Зернові продукти і комбікорми. – 2007. – № 4. – С. 36–39.
  5. Тирон, Н. Б. Региональное растительное сырье как источник лизоцима [Текст] / Н. Б. Тирон // Зб. наук. пр. молод. уч., асп. і студ. ОНАХТ. – О., 2007. – С. 121–123.
  6. Ніколаєва, М. В. Можливість одержання та використання лізоциму з *Armoracia rusticana* LAM (хрону звичайного) у складі БАД [Текст] / М. В. Ніколаєва, О. І. Проца, Н. Б. Тирон // Актуальні проблеми розвитку харчових виробництв, ресторанного господарства і торгівлі: тези доповідей всеукр. наук. конф. студ., присвяченої 40-річчю Харківського держ. ун-ту харчування та торгівлі, Харків, 11-12 квітня 2007 р., ХДУХТ. – Х., 2007. – С. 58.
  7. Тирон, Н. Б. Можливість створення рослинних комплексів, що володіють лізоцимною активністю [Текст] / Н. Б. Тирон // 73 наук. конф. молодих уч., асп. і студ., Київ, 23–24 квіт. 2007 р. «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI ст.»: тез. Доп. – К., 2007. – Ч. 2. – С. 90.
  8. Tiron, N. B. Vegetative sources with lysozyme activity [Text] / N. B. Tiron // Modern problems of microbiology and biotechnology: The young scientists and students scientific conference, 28-31 may 2007. – Mechnikov Odessa National University. – Odessa, 2007. – P. 145.
  9. Тирон, Н. Б. Рослинна лізоцимовмісна сировина півдня України [Текст] / Н. Б. Тирон, М. В. Ніколаєва // Збірка тез доп. II всеукр. наук.-практ. конф. з хімії та хімічної технології студ., асп. та молод. вчених, 26-28 квітня 2007р., Київ. – К.: 2007 – С. 239.
  10. Виділення та дослідження лізоциму *Armoracia rusticana* методом фермент-субстратної хроматографії [Текст] / Н. К. Черно, Г. В. Крусир, О. В. Севастьянова, Н. Б. Тирон // Фармаком. – 2008. – № 3. – С. 51–55.
  11. Тирон, Н. Б. Некоторые аспекты выделения лизоцима *Armoracia rusticana* методом аффинной хроматографии [Текст] / Н. Б. Тирон // Техника и технология пищевых производств: тез. докл. VI Междунар. науч. конф. студ. и асп., Могилёв, 24-25 апр. 2008 г. / УО МГУП. – Могилёв, 2008. – С. 40–41.
  12. Тирон-Воробьева, Н. Б. Получение лизоцима *Armoracia rusticana* [Текст] / Н. Б. Тирон-Воробьева // Зб. наук. пр. молод. уч., асп. і студ. ОНАХТ. – О., 2009. – С. 324–325.
  13. Лизоцим *Armoracia rusticana*: аминокислотный состав, форма макромолекулы [Текст] / Н. К. Черно, Г. В. Крусир, Е. В. Севастьянова, Н. Б. Тирон-Воробьева // Харчова наука і технологія. – 2010. – № 1. – С. 31–34.
  14. Черно, Н. К. Мультиферментні комплекси з лізоцимною активністю з деяких представників сімейства *Brassicaceae* [Текст] / Н. К. Черно, С. О. Озоліна, Н. Б. Тирон-Воробйова // Новітні технології, обладнання, безпека та якість харчових продуктів: сьогодення та перспективи: тези доп. міжнар. наук.-практ. конф., 27-28 вересня 2010 р. – К.: НУХТ, 2010. – Ч. 1 – С. 47.
  15. Черно, Н. К. Отримання лізоцимовмісної біологічно активної добавки на основі капусти білокачанної [Текст] / Н. К. Черно, С. О. Озоліна, Н. Б. Тирон-Воробйова // Новітні технології оздоровчих продуктів харчування XXI ст.: Міжнар. наук.-практ. конф., 21 жовтня 2010 р., ХДУХТ. – Х., 2010. – С. 263–264.
  16. Черно, Н. К. Вилучення ферментних комплексів з лізоцимною активністю з *Brassica var capitata* [Текст] / Н. К. Черно, С. О. Озоліна, Н. Б. Тирон-Воробйова // Наукові дослідження –

- теорія та експеримент: Мат. шостої міжнар. наук.-практ. конф., Полтава, 17-19 травня 2010 р. – Полтава, 2010. – Т. 4. – С. 80–81.
17. Тирон-Воробйова, Н. Б. Вилучення ферментних комплексів з лізоцимною активністю з рослинної сировини [Текст] / Н. Б. Тирон-Воробйова, О. В. Біла // Актуальні проблеми розвитку харчових виробництв, ресторанного господарства і торгівлі: тези доп. всеукр. наук. конф. студ. і молод. вчених, Харків, 20 квітня 2010р., ХДУХТ – Х., 2010. – С. 6.
  18. Черно, Н. К. Фізико-хімічні властивості лізоцимної складової капусти білокачанної (*Brassica oleracea*) [Текст] / Н. К. Черно, С. О. Озолина, Н. Б. Тирон-Воробйова // Розвиток наукових досліджень 2010: тези доп. шостої міжнар. наук.-практ. конф., Полтава, 22-24 листопада 2010 р. – Полтава, 2010. – Т. 5. – С. 125–126.
  19. Тирон-Воробьева, Н. Б. Ферментативные активности некоторых представителей семейства крестоцветных [Текст] / Н. Б. Тирон-Воробьева, О. В. Белая // Техника и технология пищевых производств: тез. докл. VII междунар. науч. конф. студ. и асп., Могилёв, 22-23 апр. 2010 г. / УО МГУП. – Могилёв, 2010. – С. 89.
  20. Тирон-Воробйова, Н. Б. Лізоцимовмісна біологічно активна добавка на основі капусти білокачанної [Текст] / Н. Б. Тирон-Воробйова // Зб. наук. пр. молод. уч., асп. і студ. ОНАХТ. – О., 2010. – Т. 2. – С. 118.
  21. Озолина, С. А. Комплексная переработка растительного сырья с получением растительных лизоцимсодержащих биополимерных комплексов [Текст] / С. А. Озолина, Н. Б. Тирон-Воробьева // Наукові праці. ОНАХТ. – О., 2011. – Т. 2, вип. 40. – С. 173–177.
  22. Черно, Н. К. Растительные комплексы с лизоцимной активностью [Текст] / Н. К. Черно, С. А. Озолина, Н. Б. Тирон-Воробьева // Актуальные проблемы потребительского рынка товаров и услуг: мат. всерос. научн.-практ. конф. с междунар. участ., посв. 10-летию факта экспертизы и товаровед. 18 февраля 2011 г., под ред. И. В. Шешунова, С. А. Дворянского, Л. Н. Зоной, И. В. Горевой. – Киров: ГОУ ВПО Кировская гос. мед. акад. Минздравсоцразвития России, 2011. – С. 291–293.
  23. Ферментные композиции с лизоцимной активностью [Текст] / Н. К. Черно, С. А. Озолина, И. В. Страшнова, Н. Б. Тирон-Воробьева // Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии, фармакологии и медицине. Т. 1: Сб. ст. второй междунар. научн.-практ. конф. «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине», 26–28 октября 2011, Санкт-Петербург, Россия / под ред. А.П. Кудинова, Б.В. Крылова. – СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2011. – С. 246–249.
  24. Пат. № 62988 Україна, МПК А 23 К 1/17. Дієтична добавка з антибактеріальною дією [Текст] / Черно Н. К., Озолина С. О., Тирон-Воробйова Н. Б.; заявник і патентовласник ОНАХТ – № у 201101918; заявл. 18.02.2011; опубл. 26.09.2011, Бюл. № 18. – 6 с.
  25. Пат. № 64406 Україна, МПК А 61 К 31/455. Ферментний препарат [Текст] / Черно Н. К., Озолина С. О., Тирон-Воробйова Н. Б.; заявник і патентовласник ОНАХТ – № у 2011 03677; заявл. 28. 03. 2011; опубл. 10. 11. 2011, Бюл. № 21. – 6 с.
  26. Черно, Н. К. Диетические добавки с лизоцимной активностью на основе растительного сырья [Текст] / Н. К. Черно, С. А. Озолина, Н. Б. Тирон-Воробьева // Materialy VII Miedzynarodowej naukowo-praktycznej konferencji «Nauka i inowacja – 2011», volume 12. Medycyna. Nauk biologicznych. Fizyczna kultura i sport. Przemysl. Nauka I studia. – S. 74–76.
  27. Ферментні композиції на основі лізоциму [Текст] / Н. К. Черно, С. О. Озолина, І. В. Страшнова, Н. Б. Тирон-Воробйова // «Прогресивна техніка та технології харчових виробництв, готельного, ресторанного господарств і торгівлі. Економічна стратегія і перспективи розвитку сфери торгівлі та послуг»: Міжнар. наук.-практ. конф., 19 травня 2011 р.: [тези у 4 ч.]: Харк. держ. ун-т харчування та торг. – Харків: ХДУХТ, 2011. – Ч. 1. – С. 57–58.

#### Особистий внесок:

1. Аналіз даних літератури, проведення експериментальних досліджень щодо всебічної характеристики ферменту лізоциму, виділеного з рослинної сировини, обробка та узагальнення отриманих результатів, підготовка до друку (поз. 1, 3, 5–10).

2. Вивчення фізико-хімічних властивостей вільних лізоцимів та їх іммобілізованих форм, обробка отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку (поз. 2, 4, 11, 12, 15–17).

3. Проведення дослідження щодо іммобілізації лізоцимів на полісахаридних матрицях, обробка отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку (поз. 18–22).

4. Проведення експериментальних досліджень, узагальнення отриманих результатів, проведення патентного пошуку та оформлення патентів на корисну модель (поз. 23–27).

## АНОТАЦІЯ

Тірон-Воробйова Н. Б. Технологія лізоцимовмісних біополімерних комплексів рослинного походження. – Рукопис.

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

Дисертацію присвячено розробленню технології отримання білок-полісахаридних комплексів з лізоцимною активністю.

Визначено лізоцимну активність рослинної сировини. Перспективні джерела вилучення лізоциму – рослини сімейства *Brassicaceae* (капустяних): *Armoracia rusticana* (хрін звичайний) і *Brassica oleracea* (капуста білокачанна).

Методом афінної хроматографії на глюкохітині отримано лізоцим *Armoracia rusticana*. Визначено його питому лізоцимну активність, молекулярну масу, амінокислотний склад, форму білкової молекули; виявлено, що він існує у вигляді двох ізоформ.

Процес отримання лізоцимовмісних препаратів складався з двох стадій: вилучення ферменту з сировини і його подальшого концентрування у складі нерозчинних комплексів з полісахаридами. Методом гель-фільтрації у комплексах доведено повне співпадіння білкової і вуглеводної складових. З використанням ІЧ-спектроскопії встановлено, що в їх утворенні провідна роль належить електростатичним взаємодіям, менш значущим є вклад водневих зв'язків, а також гідрофобних взаємодій. Показано, що у складі лізоцимовмісних комплексів переважає білкова компонента, яка представлена низькомолекулярними білками з молекулярною масою 12,0 кДа.

Надано порівняльну характеристику фізико-хімічних показників інтактних лізоцимів і отриманих комплексів. За результатами медико-біологічних досліджень відмічено тенденцію підвищення лізоцимної активності слини ротової порожнини додатковим внесенням необхідної дози екзогенних лізоцимів у складі комплексів.

Розроблено та економічно обґрунтовано технології отримання комплексів з лізоцимною активністю. З використанням методів математичного планування багатофакторних експериментів визначено раціональні режими основних стадій процесів отримання лізоцимовмісних комплексів.

Реальність технологій підтверджено результатами їх промислової апробації на науково-виробничому підприємстві ТОВ «Аріадна» (м. Одеса). Розроблено нормативну документацію на лізоцимовмісні біополімерні комплекси.

**Ключові слова:** фермент лізоцим, рослини сімейства *Brassicaceae*, лізоцимна активність, комплексоутворення, полісахариди.

## АННОТАЦИЯ

Тирон-Воробьева Н. Б. Технология лизоцимсодержащих биополимерных комплексов растительного происхождения. – Рукопись.

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

Диссертация посвящена разработке технологии получения белок-полисахаридных комплексов с лизоцимной активностью.

Обоснован выбор сырьевых источников выделения лизоцима – растения семейства *Brassicaceae* (капустных): *Armoracia rusticana* (хрен обыкновенный) и *Brassica oleracea* (капуста белокочанная).

Из корнеплодов *Armoracia rusticana* методом фермент-субстратной хроматографии на глюкохитине выделен и очищен лизоцим соковой части корнеплодов *Armoracia rusticana*. Представлена его всесторонняя характеристика: удельная активность (217,6 ед./мг белка), молекулярная масса (12,0 кДа), аминокислотный состав, наличие двух изоформ. Дана оценка формы его белковой макромолекулы – сферическая глобула с гидрофобным ядром и гидрофильной поверхностью. Показатель заполнения ядра глобулы лизоцима *Carica papaya L.* гидрофильными остатками – 1,01, *Armoracia rusticana* и *Ficus carica L.* практически идентичны и составляют 0,98 и 0,93 соответственно. Определены кинетические параметры гидролиза *M. lysodeikticus* лизоцимом *Armoracia rusticana*. Расчеты по Лайнуиверу-Берку и Хейнсу свидетельствуют о линейном типе экспериментальной зависимости, что подтверждается высокими коэффициентами линейной корреляции. В диапазоне концентраций субстрата  $6,65 \cdot 10^{-2} - 1,14 \cdot 10^{-1}$  г/дм<sup>3</sup> наблюдаются более высокие значения скорости реакции вследствие значительного сродства фермента к субстрату. Согласно трем методам расчета кинетического эксперимента определены  $K_m$  и  $V_{max}$ . По Хейнсу –  $K_m = 229,7$  мг/дм<sup>3</sup>,  $V_{max} = 19586$  ед·мг<sup>-1</sup>·с<sup>-1</sup>.

Установлено, что наибольшая степень извлечения лизоцима из сырья достигается при обработке корнеплодов *Armoracia rusticana* 1/15 М фосфатным буфером, pH 4,8, содержащим лейцин. Показана возможность концентрирования лизоцимов растительного происхождения путем комплексообразования с полисахаридами. В качестве полисахаридной составляющей целесообразно использование 1 %-го раствора пектина и 0,5 %-го раствора хитозана. В составе комплексов преобладает белковая компонента, в основном представленная низкомолекулярными белками с молекулярной массой 12,0 кДа. На долю полисахаридной составляющей приходится менее 40 %. Комплексообразование осуществляется преимущественно за счет электростатических взаимодействий (84,0...87,5 %), на долю водородных связей приходится 12,5...13,2 %, вклад гидрофобных взаимодействий в стабилизацию комплексов минимален и составляет от 2,0 до 2,6 %.

Дана сравнительная характеристика физико-химических показателей интактных лизоцимов и полученных лизоцимсодержащих биополимерных комплексов; pH-оптимум лизоцима *Brassica oleracea* составляет 6,5, *Armoracia rusticana* – 3,5 ед. pH. Термооптимум действия лизоцима *Brassica oleracea* – (37±2) °С,

*Armoracia rusticana* –  $(60 \pm 2)^\circ\text{C}$ . Лизоцим *Brassica oleracea* наиболее стабилен при  $\text{pH}$  6,5 и температуре  $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$ , *Armoracia rusticana* сохраняет 30 % максимальной лизоцимной активности в течение 30 минут инкубирования ( $\text{pH}$  среды 1,5...3,5 ед.  $\text{pH}$ ) и температуре  $(60 \pm 2)^\circ\text{C}$ .

Иммобилизация способствует расширению  $\text{pH}$ - и термооптимумов лизоцимов в составе комплексов, повышению их  $\text{pH}$ - и термостабильности.

Стабильность комплексов при значениях  $\text{pH}$  среды, близких к таковым желудочного сока, позволяет считать целесообразным применение их для восстановления защитных факторов пищеварительных секретов (лизоцимной активности, уровня IgA).

С помощью методов математического моделирования оптимизированы ключевые режимы процессов экстракции и комплексообразования. Для процесса экстракции лизоцима из корнеплодов *Armoracia rusticana* таковыми являются: продолжительность – 3 часа, гидромодуль – 3, а образования комплексов: для лизоцима *Armoracia rusticana* с пектином  $\text{pH} = 6,5$ ,  $m_{\text{пол}} = 150,0$  мг или хитозаном  $\text{pH} = 6,5$ ,  $m_{\text{пол}} = 200,0$  мг; а *Brassica oleracea* с пектином  $\text{pH} = 6,0$ ,  $m_{\text{пол}} = 150,0$  мг или хитозаном  $\text{pH} = 5,0$ ,  $m_{\text{пол}} = 200,0$  мг.

Разработаны принципиальные схемы получения биополимерных комплексов на основе лизоцимов *Armoracia rusticana* и *Brassica oleracea*. Основными этапами явились: экстракция лизоцима *Armoracia rusticana* или отжим сока *Brassica oleracea*, комплексообразование с яблочным пектином или хитозаном, получение лизоцимсодержащих комплексов, высушивание, измельчение, смешивание с наполнителем и лейцином, таблетирование, упаковка, реализация.

Показана возможность получения лизоцимсодержащих биополимерных комплексов в таблетированной форме. Установлен гарантированный срок хранения лизоцимсодержащих биополимерных комплексов в таблетированной форме – один год, на протяжении которого показатели качества не превышают норм, изложенных в нормативной документации.

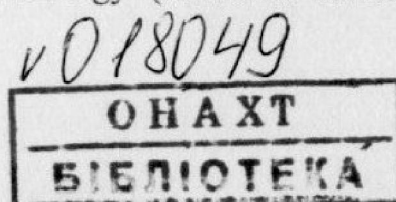
Результаты промышленной апробации разработанных технологий показали возможность их реализации в производственных условиях. Рассчитана себестоимость лизоцимсодержащих биополимерных комплексов в таблетированной форме (1 упаковка – 1 блистер, масса одной таблетки 1,2 г, блистера – 12 г): для комплексов лизоцима *Armoracia rusticana* с пектином – 97,44 грн. или хитозаном – 97,53 грн.; а *Brassica oleracea* с пектином – 16,32 грн. или хитозаном – 16,42 грн.

**Ключевые слова:** фермент лизоцим, растения семейства *Brassicaceae*, лизоцимная активность, комплексообразование, полисахариды.

## ANNOTATION

Tiron-Vorobyova N. B. Technology of biopolymer complexes with lysozyme activity of plant origin. – Manuscript.

Dissertation for obtaining the scientific degree of the Candidate of Technical Science on the specialty 03.00.20 – Biotechnology (technical sciences). – Odessa



National Academy of Food Technologies, the Ministry of Education and Science, Youth and Sports of the Ukraine, Odessa, 2012.

This thesis was devoted to the development of technology of protein-polysaccharide complexes with lysozyme activity. The primary sources of lysozyme were plants of the family *Brassicaceae*: *Armoracia rusticana* (horseradish) and *Brassica oleracea* (cabbage).

It was obtained purified lysozyme from roots *Armoracia rusticana* by method of enzyme-substrate chromatography on glucosylchitin. The comprehensive descriptions of its specific activity, molecular weight, amino acid composition were presented. It was identified the kinetic parameters of hydrolysis of *M. lysodeikticus* by *Armoracia rusticana* lysozyme.

The process of obtaining preparations complexes with lysozyme activity consisted of two stages: removing the enzyme from the raw materials in soluble form and further concentrating in the insoluble complexes with polysaccharides.

It was shown that protein component was predominant in the complexes, which mainly consisted of low molecular weight proteins with a molecular weight 12,0 kDa.

Characteristics of the physico-chemical properties of intact lysozyme and its complexes were comparative. According to the results of biomedical research complexes possess antibacterial activity and inhibit the growth of pathogenic microorganisms of saliva of the mouth.

Technology of biopolymer complexes was developed and economically feasible, which includes: extraction lysozyme from cabbage or roots horseradish, complex formation, drying, grinding, screening, mixing with the filler and leucine, tableting, packaging and sale. It was identified the main stages of rational modes or processes for complexes with lysozyme activity, using methods of mathematical planning of multi-factorial experiments.

The reality of technology was confirmed by the results of their industrial approbation on biotech venture. Normative documents of biopolymer complexes were developed.

**Keywords:** enzyme lysozyme, plants of the family *Brassicaceae*, the lysozyme activity, complexing, polysaccharides.

