

**ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

**ГУРАЛЬ ЛАРИСА СЕРГІЇВНА**

УДК [664.959:639.51]:602.4

**ТЕХНОЛОГІЯ ОТРИМАННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ  
РЕЧОВИН ІЗ РАКОПОДІБНИХ**

Спеціальність 03.00.20 – біотехнологія

**АВТОРЕФЕРАТ**

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата технічних наук

Одеса – 2008

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 і техніки України  
**Черно Наталія Кирилівна**  
Одеська національна академія харчових технологій,  
кафедра органічної хімії,  
завідувач кафедри

**Офіційні опоненти:** доктор технічних наук, професор  
**Безусов Анатолій Тимофійович**  
Одеська національна академія харчових технологій,  
кафедра технології консервування,  
завідувач кафедри

кандидат хімічних наук  
**Романовська Ірина Ігорівна**  
Одеський національний університет  
імені І.І. Мечникова,  
доцент кафедри фармацевтичної хімії,  
Фізико-хімічний інститут  
імені О.В. Богатського НАН України,  
зав. лабораторії фізико-хімічних  
основ біотехнології відділу медичної хімії

Захист відбудеться *30 травня* 2008 р. 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.

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

Автореферат розісланий *24 квітня* 2008 р.

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

Г.М. Станкевич

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** В останні роки в нутриціології все більша увага приділяється використанню хітиновмісних біологічно активних добавок (БАД). Це обумовлено унікальними функціонально-фізіологічними властивостями як самого хітину, так і його похідних. Сукупність ентеросорбційних і ліпотропних властивостей з бактеріостатичною дією і антитромбіновою активністю визначає доцільність їх використання в раціонах харчування людей з різноманітними патологіями; відкриваються серйозні перспективи у сфері застосування хітоолігосахаридів як онкопротекторних засобів і пребіотиків.

Існуючі технології отримання хітину та його похідних ґрунтуються на обробці панцировмісної сировини (ПВС) кислотами і лугами в жорстких умовах, що супроводжується деструкцією і втратою біологічної активності білка та складових з А-вітамінною активністю.

Вищезазначене визначає актуальність досліджень, присвячених розробці технології виробництва хітиновмісних біологічно активних речовин (БАР) – ентеросорбентів, хітоолігосахаридів, а також білкової харчової добавки і концентрату антиоксидантів, що базується на принципах комплексного використання регіональної ПВС і дозволяє в повній мірі реалізувати її потенціал як джерела БАР.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Робота виконана за тематикою міжвузівської програми науково-дослідної роботи № 31, затвердженої наказом Міністерства освіти і науки України № 271 від 15.08.96, зокрема, 1/03-П «Біотехнологічні основи створення біологічно активних добавок 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.) та ін.

**Мета і завдання дослідження.** Метою роботи є обґрунтування доцільності використання хітин-протеїнового комплексу як ентеросорбенту, альтернативного хітину, та технології його переробки з отриманням хітоолігосахаридів, низькомолекулярного хітину, комплексу біоантиоксидантів і модифікованого білка.

Для досягнення поставленої мети визначені основні завдання дослідження:

- вивчити хімічний склад регіональної хітиновмісної сировини;
- надати характеристику функціонально-фізіологічних властивостей хітин-протеїнового комплексу і визначити доцільність його використання як альтернативи хітину;
- розробити біотехнологічний спосіб отримання хітоолігосахаридів та надати їх характеристику;

- визначити вміст антиоксидантів у панцировмісній сировині та хітиновмісних продуктах, дослідити їх склад і антиоксидантну активність, обґрунтувати метод вилучення;
- отримати і дослідити білковий ізолят, розробити умови його біомодифікації, вивчити функціонально-технологічні властивості;
- розробити схему переробки панцировмісних відходів (побічних продуктів переробки ракоподібних) з отриманням біологічно активних речовин; здійснити промислову апробацію розробленої технології та надати оцінку її економічної ефективності;
- здійснити медико-біологічні дослідження хітин-протеїнового комплексу;
- розробити нормативну документацію на виробництво хітин-протеїнового комплексу;
- оцінити принципову можливість отримання функціональних продуктів харчування з включенням хітин-протеїнового комплексу.

*Об'єкти дослідження:* хітиновмісна сировина, хітин, біологічно активні речовини, біологічно активні добавки до їжі.

*Предмет дослідження* – технологія переробки панцировмісної сировини з отриманням біологічно активних речовин.

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

**Наукова новизна отриманих результатів.** Вперше надано всебічну характеристику проміжного продукту переробки панцировмісної сировини і хітин-протеїнового комплексу: досліджено склад формуючих його компонентів, надано оцінку надмолекулярної структури і структури поверхні, вивчено функціонально-фізіологічні властивості. Обґрунтовано доцільність використання хітин-протеїнового комплексу як ефективного ентеросорбенту, альтернативного хітину.

Вперше розроблено спосіб деструкції хітину, що поєднує попередню лужну модифікацію і наступний ферментативний гідроліз. Досліджено фракційний склад продуктів деструкції.

Показано доцільність модифікації білкової складової панцировмісної сировини за допомогою обмеженого ферментативного гідролізу з метою отримання харчової добавки. Визначено раціональні параметри її екстракції і ферментативної деструкції.

Наукову новизну підтверджено патентом України на корисну модель № 21454 та рішенням про видачу деклараційного патенту на корисну модель № u 2007 09841.

**Практичне значення отриманих результатів.** На основі отриманих результатів розроблено технологію комплексної переробки панцировмісної сировини з отриманням хітин-протеїнового комплексу, хітину, хітозану, продуктів деструкції хітину, модифікованого білка, комплексу антиоксидантів, а також проект нормативної документації на виробництво хітин-протеїнового комплексу (ТУ і ТП). Доведено можливість промислового виробництва розроблених біологічно активних речовин; технологію апробовано на науково-виробничому підприємстві «Аріадна», м. Одеса.

Показано можливість отримання функціональних продуктів харчування з включенням хітин-протеїнового комплексу.

**Особистий внесок здобувача.** Авторіві належить забезпечення методичного оформлення роботи, виконання аналітичних та експериментальних досліджень, проведення аналізу й узагальнення отриманих даних у вигляді висновків і рекомендацій, підготовка матеріалів досліджень до публікації, розроблення нормативної документації, організація промислової апробації розробленої технології. Особистий внесок здобувача підтверджується представленими документами і науковими публікаціями.

**Апробація результатів дисертації.** Основні результати досліджень доповідались та обговорювались на 16 наукових конференціях, зокрема на Міжнародній науковій конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Сучасні методи створення нових технологій та обладнання в харчовій промисловості» (Київ, 2002 р.); III-международной научно-технической конференции «Техника и технология пищевых производств» (Могилев, 2002 г.); V Українській конференції молодих вчених з високомолекулярних сполук (Київ, 2003 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Управлінські та технологічні аспекти розвитку підприємств харчування та торгівлі» (Харків, 2003 р.); IV международной научно-практической конференции «Пища, экология, качество» (Новосибирск, 2004 г.); Міжвузівській науково-практичній конференції «Проблеми техніки і технології харчових виробництв» (Полтава, 2004 р.); Міжнародній науково-технічній конференції «Актуальні проблеми харчування: технологія та обладнання, організація і економіка» (Донецьк, 2005 р.); II міжнародній науково-практичній конференції «Харчові технології – 2006» (Одеса, 2006 р.); 73-й науковій конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті» (Київ, 2007 р.); Восьмій всеукраїнській конференції студентів і аспірантів «Сучасні проблеми хімії» (Київ, 2007 р.); Другій всеукраїнській науково-практичній інтернет-конференції «Науковий потенціал України 2007» (Київ, 2007 р.); The young scientists' and students' International scientific conference «Modern problems of microbiology and biotechnology» (Odesa, 2007); 5-й міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні проблеми харчування: технологія і обладнання, організація і економіка» (Донецьк, 2007 р.); The

International Scientific Conference «Food science, engineering and technologies '2007» (Plovdiv, 2007); 63-й и 67-й наукових конференціях професорсько-викладацького складу ОНАХТ (Одеса, 2003 і 2007 рр.).

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 27 друкованих праць, з них 9 статей у фахових наукових виданнях, 2 статті у наукових журналах, 1 патент України на корисну модель № 21454 та рішення про видачу деклараційного патенту на корисну модель № u 2007 09841 і тези 14 доповідей в матеріалах наукових і науково-практичних конференцій.

**Структура й обсяг роботи.** Дисертація складається зі вступу, 6 розділів, висновків, списку використаних літературних джерел та додатків.

Дисертаційна робота викладена на 144 сторінках основного тексту, містить 42 рисунки (22 сторінки), 28 таблиць (17 сторінок), 15 додатків (123 сторінки), список літературних джерел з 378 найменувань (39 сторінок).

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

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

**У першому розділі** «Хітин і його похідні як функціональні інгредієнти раціонів харчування» розглянуто джерела хітиновмісної сировини, будову і хімічні властивості хітину, хімічні й біотехнологічні способи його вилучення із сировини; використання хітину і його похідних у складі біологічно активних добавок і продуктів харчування, застосування хітиновмісних препаратів у медицині.

**У другому розділі** «Об'єкти та методи досліджень» викладено відомості про об'єкти і методи досліджень та етапи переробки панцировмісної сировини з отриманням біологічно активних речовин і добавок. Схему напрямків досліджень наведено на рис. 1.

Надано характеристику методів досліджень як загальнонаукових, так і спеціальних хімічних, біохімічних.

Описано методи отримання хітин-протеїнових комплексів; модифікації хітину і фракціонування продуктів його ферментативного гідролізу та їх характеристики; вилучення білка із хітиновмісних продуктів і його біомодифікації.

**У третьому розділі** «Отримання і характеристика хітин-протеїнових комплексів» наведено дані щодо хімічного складу хітиновмісної сировини, визначено склад хітин-протеїнових комплексів (ХПК), їх структурні особливості і функціонально-фізіологічні

властивості.

Як хітиновмісну сировину розглянуто панцировмісні відходи переробки ракоподібних водоймищ України – річкових раків (*Pontastacus leptodactylus*) і креветок (*Palaemon adspersus* та *Palaemon elegans*). Запропоновано схему отримання ХПК.

Надано характеристику отриманих ХПК. У їх складі масова частка хітину варіює в межах 19,8...29,7 %, білка – 21,8...40,2 %. Ступінь кристалічності продуктів знаходиться в діапазоні від 0,82 до 16,60 % (рис. 2), розміри кристалітів – 3,0...6,3 нм; таким чином, хітин-протеїнові комплекси є нанокристалічними структурами.

Індекси упорядкованості і кристалічності, встановлені на основі ІЧ-спектрів, корелюють зі ступенем кристалічності, визначеним за даними рентгеноструктурного аналізу. Переважна кількість функціональних груп макромолекул полімерів бере участь в утворенні водневих зв'язків, що визначає високу міцність надмолекулярної структури, яка представлена б-модифікацією хітину.

За гідрофобізацію поверхні ХПК відповідає білкова компонента, що узгоджується з даними характеристики гідрофобності та конформації білка за Фішером. Вилучення ХПК супроводжується розвитком поверхні препаратів.

Досліджено функціональні властивості, які обумовлюють ентеросорбційні ефекти ХПК: водоутримуючу (ВУЗ) та жирозв'язуючу здатність (ЖЗЗ), сорбцію іонів двовалентних металів, екотоксикантів ароматичного ряду, холевої кислоти, метиленового синього (рис. 3).

Наведені дані свідчать, що за більшістю досліджуваних показників ХПК в порівнянні з багатьма відомими природними ентеросорбентами не поступається, а за величиною сорбції холевої кислоти значно випереджає навіть еталонний зразок – харчові волокна висівков пшениці (ХВВП). Виходячи з нездатності хітину до деградації під дією травних ферментів, а також визначеної в експериментах стійкості білкової складової до дії ферментів шлунково-кишкового тракту, правомірним є віднесення ХПК до категорії харчових волокон.

ХПК сповільнює швидкість дифузії глюкози через напівпроникаючу мембрану (рис. 4), що дозволяє прогнозувати ефективність його використання в раціонах харчування діабетиків.

До складу ПВС входять каротиноїди та фенольні сполуки (табл. 1), що володіють значною антиоксидантною дією (рис. 5). Їх наявність у в значній мірі обумовлено антиоксидантну активність ХПК.

<p>????????? ??????-??????????          ??????????</p>
--

Таблиця 1

**Вміст каротиноїдів і фенольних сполук в хітин-протеїнових комплексах, мг / 100 г**  
**(n=3; p≥0,95)**

Зразок	Каротиноїди	Фенольні сполуки
--------	-------------	------------------

Раки <i>Pontastacus leptodactylus</i>	ПВС	11,42±0,57	0,81±0,04
	ХПК	7,49±0,27	0,32±0,01
Креветки <i>Palaemon elegans</i>	ПВС	3,70±0,17	0,35±0,01
	ХПК	2,41±0,11	0,20±0,01
Креветки <i>Palaemon adspersus</i>	ПВС	6,24±0,30	0,37±0,01
	ХПК	4,23±0,19	0,23±0,01

Отже, отримані хітин-протеїнові комплекси можуть розглядатися як поліфункціональні БАР, яким притаманні виражені ентеросорбційні й антиоксидантні властивості.

У четвертому розділі «Отримання продуктів біодеградації хітину» наведено дані щодо обґрунтування умов деструкції хітину з метою одержання хітоолігосахаридів та результати дослідження їх складу.

Для попереднього активування хітину використовували розчин NaOH з масовою часткою 18,0 %. Розглянули можливість ферментативного гідролізу хітину рядом комерційних препаратів (рис. 6). Як гідролізуючий агент обраний панкреатин, при використанні якого отримано розчинні олігомерні продукти з найбільшим ступенем полімеризації. Встановлено, що внаслідок біотехнологічної модифікації активованого хітину утворюється суміш олігомерів, які мають ступінь полімеризації у межах значень 2...18 (табл. 2).

Нерозчинну компоненту представлено низькомолекулярним хітином (табл. 2), який за своїми функціонально-фізіологічними властивостями близький до вихідного хітину.

Таблиця 2

**Характеристика хітину і продуктів ферментативного гідролізу  
(n=3; p≥0,95)**

Препарат		Вихід, %	Ступінь полімеризації	Ступінь упорядкованості	Ступінь ацетилювання, %
Вихідний хітин		–	4240	1,24	82,8
Активований хітин		93,0	3450	0,97	64,5
Про дукт и дест рукц ії	низькомолекулярн ий хітин	70...74	790	1,07	52,1
	олігомери / мономери	15...18	1...18	–	77,3

У п'ятому розділі «Біомодифікація панцирного білка» доведено можливість отримання харчової добавки — панцирного білка з поліпшеними функціонально-технологічними властивостями, модифікованого обмеженим ферментативним гідролізом.

Для обґрунтування умов вилучення білка з хітиновмісної сировини як фактори оптимізації розглядали: концентрацію екстрагента – розчин NaOH ( $C_{NaOH}$ ), значення гідромодуля ( $ГМ$ ) та тривалість процесу ( $\phi$ ). Як параметр оптимізації обрано вихід білка у розчин  $y_{\phi}$ , а також витрати води на одиницю продукту  $y_{в.б.}$  або на одиницю продуктивності екстрактора  $y_{в.н.}$  (рівняння 1–3).

$$y_{\phi} = 26,38 + 16,35x_1 + 14,30x_2 + 3,73x_3 + 10,07x_1x_2 + 1,10x_2x_3, \quad (1)$$

$$y_{в.б.} = 106,1 - 116,3x_1 - 94,5x_2 + 34,3x_3 + 64,5x_1^2 + 43,2x_2^2 + 45,0x_1x_2 - 10,0x_2x_3, \quad (2)$$

$$y_{в.н.} = 443,2 - 54,8x_1 + 305,9x_2 + 145,2x_3 + 169,8x_1^2 + 85,4x_2^2 - 58,1x_2x_3. \quad (3)$$

Аналіз отриманих результатів свідчить, що оптимальні умови вилучення білка такі: масова частка луґу в розчині 3,1...3,5 %, гідромодуль 4, тривалість процесу 5,5...6,0 годин. Розглянуто також можливість використання як екстрагента білкової складової розчин луґу, що містить поверхнево-активну речовину (рівняння 4). Це дозволило екстрагувати білок 0,8-відсотковим розчином NaOH з масовою часткою лецитину 0,2 % при гідромодулі 4 протягом 6 годин.

$$y_{б.лец.} = 37,6 + 7,8x_1 + 18,3x_2 - 5,0x_1^2 + 3,5x_2^2 + 5,5x_1x_2, \quad (4)$$

За своїм амінокислотним складом отриманий білок дефіцитний на сульфуровмісні амінокислоти та триптофан. Він може використовуватися для добалансування раціонів харчування лейцином, ізолейцином, фенілаланіном, тирозином, треоніном і валіном. Гідролізованість білка травними ферментами сягає 83,4 %. Він є гідрофобним за Фішером, має низькі функціонально-технологічні властивості.

Розглянуто можливість модифікації білка шляхом обмеженої ферментативної деструкції (рис. 7). Максимальний ступінь конверсії білка притаманний гідролізатам, отриманим із використанням панкреатину (табл. 3), для яких спостерігається найбільше поліпшення функціонально-технологічних властивостей: максимальне значення жироемульгуючої здатності

Таблиця 3

**Залежність складу гідролізатів білка від тривалості ферментолізу (n=3; p≥0,95)**

Показники	Панкреатин	Протосубтилін	Лужна протеаза
-----------	------------	---------------	----------------

	тривалість, хв								
	60	120	180	60	120	180	60	120	180
Високомолекулярний білок, %	79	60	41	58	49	33	43	31	20
Пептиди з молекулярною масою менше 4 kDa, %	13	34	40	37	47	57	55	60	68
Вільні амінокислоти, %	2	6	11	1	3	5	4	5	7
Ступінь конверсії, %	16	18	28	3	6	9	7	8	10

(29...40 %) досягається протягом перших двох годин ферментативного гідролізу; показник стійкості емульсії значно підвищується (на 30...33 %) в результаті ферментолізу через годину після його початку. Подовження процесу (3...6 годин) призводить до значної втрати властивостей за обома показниками.

Таким чином, модифікований білок може використовуватися як харчовий емульгатор.

**У шостому розділі** «Технологія переробки панцировмісної сировини» наведено принципову схему переробки ПВС з отриманням біологічно активних речовин (рис. 10); дані з обґрунтування раціональних параметрів ключових технологічних операцій, технологічні та апаратурні схеми отримання хітиновмісних ентеросорбентів, концентрату антиоксидантів, комплексу хітоолігосахаридів і низькомолекулярного хітину, модифікованого білка.

Випуск повного асортименту біологічно активних речовин або частини з них визначається потребами ринку і технічними можливостями підприємства-виробника. Можливий варіант скороченої схеми переробки ПВС з отриманням ХПК (I етап), який є енерго- і ресурсозберігаючим, екологічно безпечним. ХПК надалі може розглядатися як напівфабрикат для отримання гами біологічно активних речовин (II етап).

Реальність розробленої технології підтверджено результатами її промислової апробації на науково-виробничому підприємстві «Аріадна», м. Одеса. Отримані продукти відповідають необхідним органолептичним, фізико-хімічним, мікробіологічним, токсикологічним, санітарно-гігієнічним нормам. Розроблено нормативну документацію: ТУ на ХПК та ТІ на його виробництво. Сукупність даних мікробіологічних досліджень і вивчення динаміки зміни антиоксидантної активності продуктів дозволяє рекомендувати зберігання хітин-протеїнових комплексів, хітину, продуктів деструкції хітину, модифікованого білка, комплексу антиоксидантів протягом 6...12 місяців.

Результати медико-біологічних досліджень ХПК свідчать про можливість його використання як ефективної біологічно активної добавки, яка характеризується гіпохолестеринемічним, гіполіпідемічним і антиоксидантним ефектами.

Проведені дегустація і промислова апробація показали можливість введення ХПК до

рецептури вівсяного печива. Його використання дозволяє скоротити витрати пшеничного борошна на 54,31 кг при виробництві 1 т печива.

Отже, запропонована технологія дозволить значно підвищити ефективність використання ПВС як джерела БАР, знизити екологічну емність виробництва і в одному з варіантів реалізувати виробництво в рамках маловідходної технології.

## ВИСНОВКИ

1. Науково обґрунтовано та експериментально підтверджено технологію переробки панцировмісної сировини з отриманням хітин-протеїнових комплексів (ентеросорбенти), хітоолігосахаридів, біоантиоксидантів та модифікованого білка.
2. Домінуючими компонентами панцировмісної сировини є хітин (19,8...29,7 %), білок (21,8...40,2%) та мінеральні сполуки (18,7...47,9%); їм супутня незначна кількість каротиноїдів та фенольних речовин.
3. Доцільне отримання на основі панцировмісної сировини хітин-протеїнових комплексів, склад та ступінь проявлення функціонально-фізіологічних властивостей яких визначають можливість їх віднесення до категорії ентросорбентів та використання як альтернативи хітину (сорбція холевої кислоти – 17,6...21,9 мг/г, фенолу – 4,7...6,1 ммоль/г, аніліну – 6,5...12,3 ммоль /г).
4. Отримані з регіональної панцировмісної сировини хітин, хітиновмісні продукти та хітозан – нанокристалічні структури (ступінь кристалічності – від 0,82 до 16,60 %, розміри кристалітів – 3,0...6,3 нм). Високу міцність їх надмолекулярної структури обумовлено участю більшості ОН і NH<sub>2</sub>-груп макромолекул у водневих зв'язках.
5. Фракціонуванням хітин-протеїнового комплексу можна отримати комплекс антиоксидантів, білковий ізолят, хітоолігомери та низькомолекулярний хітин (ентеросорбент).
6. Отримання хітоолігомерів зі ступенем полімеризації 2...18 можливе шляхом ферментної деструкції хітину, вилученого з хітин-протеїнового комплексу після екстракції антиоксидантів і білка, й активованого 18-відсотковим NaOH (вихід 15...18 %; співвідношення панкреатин : субстрат 1 : 30, гідромодуль 25, рН 6,0, температура процесу 38±1°C).
7. Отримання високоактивних антиоксидантів, які містять фенольні та каротиноїдні складові в співвідношенні 1 : 23, реалізується за рахунок їх екстракції з хітин-протеїнового комплексу етанолом та подальшого концентрування до 10-відсоткового

вмісту сухих речовин у розчині.

8. Білок доцільно вилучати із хітин-протеїнового комплексу 0,8-відсотковим розчином NaOH з масовою часткою лецитину 0,2 %, гідромодуль 4 протягом 6 годин при температурі 18...20 °С після попереднього видалення антиоксидантів. Його можна використовувати для добалансування харчових раціонів лейцином, ізолейцином, треоніном і валіном.
9. Підвищення функціонально-технологічних властивостей білка досягається його модифікацією шляхом обмеженої ферментативної деструкції панкреатином (співвідношення фермент : субстрат 1 : 70, температура 37±1 °С, рН 7,2); при формуванні структурованих харчових продуктів доцільне використання модифікованого білка як емульгатора.
10. Розроблена технологія переробки панцирвмісної сировини економічно обґрунтована і включає такі основні етапи: демінералізацію сировини, екстракцію антиоксидантів, вилучення білка та його біомодифікацію, вичерпне депротеїнування з отриманням хітину, активування хітину та його подальший ферментативний гідроліз; її реальність підтверджено результатами промислової апробації на науково-виробничому підприємстві «Аріадна», м. Одеса; розроблено нормативну документацію на хітин-протеїновий комплекс.
11. Отримана продукція (хітин-протеїнові комплекси, продукти деструкції хітину, модифікований білок, комплекс антиоксидантів) відповідає необхідним санітарно-гігієнічним показникам і може зберігатися 6...12 місяців без зниження показників якості.
12. Хітин-протеїновий комплекс є ефективною біологічно активною добавкою, яка характеризується гіпохолестеринемічним, гіполіпідемічним і антиоксидантним ефектами, доведеними результатами медико-біологічних досліджень.
13. Доцільне отримання продуктів спеціального призначення з включенням хітин-протеїнового комплексу.

#### **Список робіт, опублікованих за матеріалами дисертації**

1. Функціональные свойства модифицированных образцов хитина / Н.К. Черно, С.А. Озолина, Л.С. Шум, Е.А. Антипина // Наук. пр. ОДАХТ. – Вип. 23. – Одеса, 2002. – С.12-16.
2. Черно Н.К. Антиоксидантна активність хітиновмісних біологічно активних добавок / Н.К. Черно, С.О. Озолина, Л.С. Шум // Наук. пр. ОНАХТ. – Вип. 25. – Одеса, 2003. – С. 127-129.
3. Порівняльна характеристика хітинів із різних сировинних джерел / Н.К. Черно,

- С.О. Озоліна, С.П. Решта, Л.С. Шум // Наук. пр. ОНАХТ. – Вип. 26.– Одеса, 2003. – С. 130-134.
4. Обмежений ферментативний гідроліз як засіб модифікації білка із панцеровмісної сировини / Н.К. Черно, С.О. Озоліна, Л.С. Шум, Л.А. Тітомір // Наук. пр. ОНАХТ. – Вип. 27. – Одеса, 2004. – С. 125-128.
  5. Получение и характеристика модифицированных хитинсодержащих препаратов / Н.К. Черно, С.А. Озолина, Е.И. Данилова, Л.С. Шум, А.И. Ахмедова // Обладнання та технології харчових виробництв: Темат. зб. наук. пр. ДонДУЕТ. – Вип.13, т.1 – Донецьк, 2005. – С. 182-188.
  6. Дослідження хітину, його модифікованих форм і хітиновмісних субстанцій методом рентгеноструктурного аналізу / Н.К. Черно, С.О. Озоліна, Л.С. Шум, В.М. Баумер // Наук. пр. ОНАХТ. – Вип. 29, Т.1. – Одеса, 2006. – С. 36-40.
  7. Черно Н.К. Порівняльна характеристика хітин-протеїнових комплексів ракоподібних / Н.К. Черно, С.О. Озоліна, Л.С. Шум // Прогресивна техніка та технології харчових виробництв, ресторанного господарства і торгівлі: Зб. наук. пр. технологічного спрямування ХДУХТ. – Харків, 2007. – С. 207-212.
  8. Застосування математичних методів для визначення раціональних режимів екстракції білка із панцеровмісної сировини / Н.К. Черно, С.О. Озоліна, Л.С. Шум, Г.М. Станкевич // Обладнання та технології харчових виробництв: Темат. зб. наук. пр. – Вип. 17, т.2. – Донецьк: ДонНУЕТ, 2007. – С. 117–124.
  9. Комплексная переработка хитинсодержащего сырья с получением биологически активных добавок / Н.К. Черно, С.О. Озолина, Л.С. Шум, Е.А. Антипина, Т.З. Терлецкая // Наук. пр. ОНАХТ. – Вип. 31, т.1 – Одеса, 2007. – С. 15-19.
  10. Пат. 21454. Україна, МПК А23L 1/03. Біотехнологічний спосіб отримання харчових добавок із панцеровмісної сировини / Н.К. Черно, С.О. Озоліна, Л.С. Шум – № u 2006 10443; заявл. 02.10.2006; опубл.15.03.2007, Бюл. № 3.
  11. Рішення про видачу деклараційного патенту на корисну модель № u 2007 09841, Україна, МКП А23L 1/30, А23L 1/325, А23L 1/333. Спосіб отримання хітин-протеїнового комплексу / Н.К. Черно, С.О. Озоліна, Л.С. Гураль. – Заявл. 03.09.2007.
  12. Фізико-хімічні характеристики модифікованих хітинів і хітиновмісних препаратів / Н.К. Черно, С.О. Озоліна, О.І. Данилова, Л.С. Шум, А.І.Ахмедова // Наук. вісник ПУСКУ. Сер. «Технічні науки». – 2005. – № 3(16). – С. 58-60.
  13. Черно Н.К. Хитин-протеиновый комплекс – альтернатива известным

- хитинсодержащим препаратам / Н.К. Черно, С.А. Озолина, Л.С. Шум // Food science, engineering and technologies '2007: Scientific works The International Scientific Conference, Vol. LIV, Issue 2 – Plovdiv, 2007. – P.119-124.
14. Шум Л.С. Характеристика хітину і хітин-протеїнового комплексу з панцирів ракоподібних водоймищ України // Сучасні методи створення нових технологій та обладнання в харчовій промисловості: Мат. міжн. наук. конф. молодих учених, аспірантів і студентів. – К.: НУХТ. – 2002. – С. 75-76.
  15. Черно Н.К. Физико-химические свойства ионогенных полисахаридов гидробионтов / Н.К. Черно, С.А. Озолина, Л.С. Шум // Техника и технология пищевых производств: Мат. III-Междун. науч.-техн. конф. – Могилев: МГТИ. – 2002. – С. 262.
  16. Черно Н.К. Побічні продукти переробки ракоподібних як сировина для отримання біологічно активних речовин / Н.К. Черно, С.О. Озолина, Л.С. Шум / Управлінські та технологічні аспекти розвитку підприємств харчування та торгівлі: Тези доп. міжн. наук.-практ. конф., присвяченої 65-річчю з дня народження доктора техн. наук, проф., члена-кореспондента ВАСГНІЛ Беляєва М.І. – Харків: ХДУХТ. – 2003. – С. 56-58.
  17. Шум Л.С. Характеристика модифікованих форм хітину // Тези доп. V Укр. конф. молодих вчених з високомол. сполук. – К.: НАН України. – 2003. – С.113.
  18. Черно Н.К. Ферментативная обработка как способ улучшения функциональных свойств белка из панцирей ракообразных / Н.К. Черно, С.А. Озолина, Л.С. Шум // Пища, экология, качество: Тр. IV междун. науч.-практ. конф. – Новосибирск. – 2004. – С. 284-286.
  19. Черно Н.К. Антиоксидантна активність компонентів панцирів ракоподібних / Н.К.Черно, С.О.Озолина, Л.С.Шум // Проблеми техніки і технології харчових виробництв: Мат. міжвузівської наук.-практ. конф. – Полтава: РВВ ПУСКУ. – 2004. – С. 231-234.
  20. Получение и характеристика модифицированных хитинсодержащих препаратов / Н.К. Черно, С.А. Озолина., Е.И Данилова, Л.С. Шум, А.И. Ахмедова // Актуальні проблеми харчування: технологія та обладнання, організація і економіка: Тези доп. міжн. наук.-техн. конф. – Донецьк: ДонДУЕТ. – 2005. – С. 42-44.
  21. Шум Л.С. Характеристика хитина из различных сырьевых источников / Л.С. Шум, Н.К. Черно, С.А. Озолина // Техника и технология пищевых производств:

- Тез. докл. V междун. науч. конф. студентов и аспирантов. – Могилев: МГУП. – 2006. – С. 168.
22. Хітин-протеїновий комплекс як сорбент екотоксикантів ароматичної природи / Н.К. Черно, С.О. Озоліна, Л.С. Шум, Г.С. Карацуба // Харчові технології –2006: Тези доп. II міжн. наук.-практ. конф. – Одеса: ОНАХТ. – 2006. – С.46.
  23. Шум Л.С. Перспективи використання хітин-протеїнового комплексу в БАД комплексної дії / Зб. наук. пр. молодих учених, аспірантів та студентів. – Одеса: ОНАХТ. – 2007. – С. 123-125.
  24. Шум Л.С. Дещо про можливості використання хітин-протеїнових комплексів із панцеровмісної сировини / Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті: Мат. 73-ї наук. конф. молодих учених, аспірантів і студентів. – К.: НУХТ. – 2007. – С.88.
  25. Шум Л.С. Дослідження азотовмісних полісахаридів панцеровмісної сировини фізичними методами // Сучасні проблеми хімії: Зб. тез доп. Восьмої всеукр. конф. студентів та аспірантів. – К.: КНУ ім. Т. Шевченка. – 2007. – С. 226.
  26. Черно Н.К. Ферментативний гідроліз як спосіб покращання функціональних властивостей білка із панцеровмісної сировини / Н.К. Черно; С.О. Озоліна; Л.С. Шум // Науковий потенціал України 2007: Мат. другої всеукр. наук.-практ. інтернет-конф. Ч.1. – К.: ІНП та КІЕГП. – 2007. – С. 2-3.
  27. Shum L. Obtaining of protein supplements from crustacean shell waste by the limited enzyme hydrolysis implementation // Modern problems of microbiology and biotechnology: Book of abstracts of The young scientists' and students' International scientific conference. – Odessa: MONU. – 2007. – P. 144.

*Особистий внесок:*

1. Аналіз даних літератури, проведення експериментальних досліджень щодо всебічної характеристики хітиновмісних продуктів (аналіз хімічного складу сировини і вилучених хітиновмісних продуктів, вивчення структури поверхні, надмолекулярної структури і функціонально-фізіологічних властивостей), обробка та узагальнення отриманих результатів, підготовка до друку (поз. 1, 3, 5, 7, 9, 12–17, 21–24).
2. Вивчення антиоксидантної активності хітиновмісних продуктів і екстрактивних речовин, обробка отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку (поз. 2, 19).
3. Опрацювання літературних джерел з рентгеноструктурних досліджень хітину і хітозану, підготовка матеріалів до друку (поз. 6, 25).

4. Проведення досліджень щодо впливу хітин-протеїнових комплексів, хітину і хітозану на процеси дифузії глюкози через напівпроникаючу мембрану (поз. 5, 20).
5. Проведення досліджень щодо вилучення і підбору умов біомодифікації панцирного білка, обробка та узагальнення отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку (поз. 4, 8, 10, 18, 26, 27).
6. Проведення експериментальних досліджень, узагальнення отриманих результатів, проведення патентного пошуку та оформлення заявок на винахід (поз. 10, 11).

## АНОТАЦІЯ

Гураль Л.С. Технологія отримання біологічно активних речовин із ракоподібних. – 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, 2008.

Дисертація спрямована на розробку маловідходної технології переробки панцировмісної сировини з отриманням біологічно активних і харчових добавок, яка дозволяє максимально реалізувати потенціал сировини як джерела біологічно активних речовин. Значна увага в роботі приділяється всебічній характеристиці хітин-протеїнових комплексів, отриманню і характеристиці продуктів ферментативної деструкції хітину, вилученню і біомодифікації панцирного білка, екстракції комплексу антиоксидантів.

Доведено доцільність використання хітин-протеїнових комплексів як ефективних ентеросорбентів, особливо холевої кислоти, та антиоксидантів. З метою отримання хітоолігосахаридів хітин необхідно активувати розчином гідроксиду натрію і далі гідролізувати панкреатином. Екстракцію панцирного білка доцільно проводити в м'яких умовах, а подальшу його біомодифікацію з метою поліпшення функціонально-технологічних властивостей необхідно проводити панкреатином. Екстракція етанолом хітин-протеїнового комплексу дозволяє отримати антиоксидантну біологічно активну речовину – фенол-каротиноїдний комплекс.

Розроблена технологія переробки панцировмісної сировини економічно обґрунтована і включає такі основні етапи: демінералізацію сировини, екстракцію антиоксидантів, вилучення білка та його біомодифікацію, вичерпне депротейнування з отриманням хітину, активування хітину та його подальший ферментативний гідроліз; її реальність підтверджено результатами промислової апробації на біотехнологічному підприємстві; розроблено нормативну документацію на хітин-протеїновий комплекс.

**Ключові слова:** хітин, панцировмісна сировина, хітин-протеїновий комплекс, продукти

ферментативного гідролізу хітину, хітоолігосахариди, модифікований панцирний білок, антиоксиданти, комплексна переробка панцировмісної сировини.

## АННОТАЦІЯ

Гураль Л.С. Технология получения биологически активных веществ из ракообразных. — Рукопись.

Диссертация на соискание научной степени кандидата технических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. — Одесская национальная академия пищевых технологий Министерства образования и науки Украины, Одесса, 2008.

Диссертация направлена на разработку малоотходной технологии переработки панцирьсодержащего сырья с получением биологически активных и пищевых добавок, которая позволяет максимально реализовать потенциал сырья как источника биологически активных веществ.

В качестве панцирьсодержащего сырья использовали побочные продукты переработки ракообразных (раков и креветок). Выделенные из сырья хитин-протеиновые комплексы включают макрокомпоненты — хитин и белок, а также сопутствующие им в минорных количествах каротиноиды и фенольные соединения. Белковые составляющие хитин-протеиновых комплексов характеризуются устойчивостью к действию протеолитических ферментов желудочно-кишечного тракта человека. Гидрофобность белка обуславливает значительную гидрофобность хитин-протеиновых комплексов. По данным рентгеноструктурного анализа хитин-протеиновые комплексы являются нанокристаллическими структурами, размеры кристаллитов составляют 3,0...6,3 нм, а степень их кристалличности пропорциональна размерам кристаллов. По данным ИК-спектроскопии преобладающее количество функциональных групп в составе хитинсодержащих препаратов участвует в образовании водородных связей. Хитин-протеиновые комплексы имеют развитую поверхность, определяющую их высокую сорбционную активность по отношению к холевым кислотам и ряду экотоксикантов; они замедляют скорость диффузии глюкозы через полупроницаемую мембрану. Совокупность результатов исследований позволяет отнести хитин-протеиновые комплексы к категории пищевых волокон и рассматривать как энтеросорбенты, альтернативные хитину.

Показана возможность получения комплекса антиоксидантов посредством их экстракции этанолом из хитин-протеинового комплекса. В их состав входят фенольные соединения и каротиноиды. По антиоксидантной активности они сопоставимы с кверцетином и  $\beta$ -каротином.

Разработан способ получения хитоолигосахаридов со степенью полимеризации более 2, высоковольтных как компонентов биологически активных добавок. Он включает активи-

рование хитина раствором NaOH и последующий гидролиз ферментными препаратами с неспецифической активностью. Наибольшая величина показателя средней степени полимеризации характерна для растворимых в воде продуктов, получаемых при использовании в качестве гидролизующего агента панкреатина. Выход олигомеров – продуктов гидролиза панкреатином активированного хитина составляет 15...18 %. Хитоолигомеры исследовали, применяя гель-хроматографию. Диапазон варьирования степени их полимеризации 2...18; в продуктах биотехнологической модификации хитина количество олигомеров со степенью полимеризации более двух в 5,5 раза превышает суммарное содержание мономерных и димерных соединений. Наряду с хитоолигомерами продуктом гидролиза является низкомолекулярный хитин со степенью полимеризации 790; его выход достигает 70...74 %; по функционально-технологическим свойствам он аналогичен хитину.

С использованием математических методов статистики установлены рациональные режимы щелочной экстракции белка хитин-протеинового комплекса. Исходя из анализа аминокислотного состава полученный белок можно использовать для добалансировки рационов питания рядом аминокислот; он гидрофобен и имеет неудовлетворительные функционально-технологические свойства. С целью их улучшения осуществляли модификацию белка посредством ограниченного ферментативного гидролиза с использованием ряда коммерческих протеаз. Специфичность действия ферментов значительно влияет на состав получаемых гидролизатов белка и на их функциональные свойства, в частности – эмульгирующие. Применение панкреатина наиболее эффективно для биомодификации. Гидролизат, полученный путем обработки белка панкреатином в течение 1 ч, содержит 2 % аминокислот, 13 % пептидов со средней молекулярной массой 2200 Da и 79 % высокомолекулярного белка; он имеет хорошие показатели жирозэмульгирующей способности и стойкости эмульсии, превышающие их значения белков растительного происхождения, и может использоваться в качестве эмульгаторов при формировании структурированных пищевых продуктов и низкокалорийных белковых рационов.

Таким образом, разработана технология переработки панцирьсодержащего сырья с получением хитин-протеиновых комплексов, хитоолигосахаридов, низкомолекулярного хитина, модифицированного белка и комплекса антиоксидантов. Реальность разработанной технологии подтверждена результатами производственной апробации на биотехнологическом предприятии. Полученные продукты отвечают необходимым санитарно-гигиеническим нормам. Проведенные медико-биологические исследования позволили рекомендовать применение хитин-протеинового комплекса в качестве биологически активной добавки гипохолестеринемической, гиполипидемической и антиоксидантной направленности. Показана возможность получения функциональных продуктов питания с включением хитин-протеинового комплекса.

**Ключевые слова:** хитин, панцирьсодержащее сырье, хитин-протеиновый комплекс,

продукты ферментативного гидролиза хитина, хитоолигосахариды, модифицированный панцирный белок, антиоксиданты, комплексная переработка панцирьсодержащего сырья.

## SUMMARY

Gural L.S. Technology of obtaining biological active supplements from crustaceans. – The 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, 2008.

The dissertation is dedicated to the development of a low-wasted technology for processing the shell containing raw material with the purpose of obtaining some biological active and food supplements. The technology makes it possible to utilize the raw material as biological active substances at most. Much attention is paid to the overall description of chitin-protein complexes, to obtaining of some chitin enzymatic hydrolysis products, their description, to extraction and biomodification of shell protein and also to extraction of complex of antioxidants.

It is proved in the work that using chitin-protein complexes as effective oral sorbents – especially using of cholic acid and antioxidants – is reasonably. In order to obtain chito oligosaccharides it is necessary to activate solution of hydroxide sodium and to hydrolyze it by means of pancreatine. The extraction of shell protein should be carried out under the soft conditions and its following biomodification, that improves its functional and technological properties, must be carried out by means of pancreatine. Extracting of chitin-protein complex by means of ethanol makes it possible to get antioxidant biological active substances, i.e. phenol-carotinoid complex.

The developed technology for processing shell containing raw material is economically grounded. It includes the following main stages: demineralization of shell containing raw material, extraction of antioxidants, extraction of protein and its biomodification, complete deproteinization and obtaining chitin, activation of chitin and its following enzymatic hydrolysis. Realizability of the technology is confirmed by the results of industrial approbation at the biotechnological enterprise; the normative documents for chitin-protein complex is worked up.

**Key words:** chitin, crustacean shell waste, chitin-protein complex, products of chitin enzymatic hydrolysis, modified shell protein, antioxidants, complex processing of crustacean shell waste.

Підписано до друку 18.04.2008. Формат 60Ч90/16. Ум.-друк. арк. 0,9.

Наклад 100 прим.

---

Віддруковано з готового оригінал-макету в ПП “Фенікс”

65009, Україна, м. Одеса, вул.. Зоопаркова, 25

Свідоцтво ДК № 1044 від 17.09.02