

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

**Ломака Олена Володимирівна**



УДК [664-021.632:547.458]:613.292

**РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЇ АРАБІНОГАЛАКТАНОВМІСНИХ  
ФУНКЦІОНАЛЬНИХ ХАРЧОВИХ ІНГРЕДІЄНТІВ**

Спеціальність 03.00.20 – біотехнологія

**АВТОРЕФЕРАТ**

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата технічних наук

Одеса – 2014

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 харчової хімії, завідувач кафедри.

**Офіційні опоненти:** – доктор біологічних наук, професор,  
**Дуган Олексій Мартем'янович**,  
Національний технічний університет України  
“Київський політехнічний інститут”, кафедра  
промислової біотехнології, завідувач кафедри.

– кандидат технічних наук, доцент,  
**Ямборко Ганна Валентинівна**,  
Одеський національний університет  
імені І.І. Мечникова, кафедра мікробіології,  
вірусології та біотехнології, доцент кафедри

Захист відбудеться *14 березня 2014 року о 10<sup>30</sup>* 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 *13 лютого 2014 року*.

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



Г. М. Станкевич

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

У ХХІ столітті людство усвідомило видатну роль полісахаридів як компонентів їжі й корму. Некрохмальні полісахариди – пектинові речовини, різноманітні маннани, галактани, ксилани, глюкани, галактани, які раніше вважалися баластом в їжі, сьогодні відносять до біологічно активних речовин – есенціальних чинників харчування. Саме тому ХХІ століття називають “епохою полісахаридів”.

Найважливішими областями використання полісахаридів є харчова промисловість й охорона здоров'я. Застосування полісахаридів у цих напрямках зумовлено широким спектром їх функціональних властивостей, до яких, зокрема, належать ентеросорбційні, пребіотичні, мембранотропні, здатність до драглеутворення та інші.

В останні роки інтенсифікувалися дослідження щодо іммобілізації на полісахаридних матрицях біологічно активних речовин. Іммобілізація дозволяє удосконалювати їх властивості – збільшувати активність, пролонгувати дію, знижувати токсичність і побічні ефекти, збільшувати вибірковість дії, а також покращувати стабільність при зберіганні. У якості носіїв використовують декстран, крохмаль, карбоксиметилцелюлозу, водоростеві полісахариди. На таких підходах ґрунтується розробка функціональних харчових інгредієнтів нового покоління – так званих “смарт-добавок” (розумних добавок).

Отже, полісахариди – значний сировинний ресурс, а їхній потенціал як компонента їжі величезний.

**Актуальність теми.** Серед полісахаридів особливе місце належить арабіногалактану, який характеризується широким спектром перспективних властивостей. Поліфункціональність і водорозчинність арабіногалактану дозволяють використовувати його в різних сферах. Арабіногалактан володіє високою фізіологічною активністю. Він є ефективним пребіотиком і ентеросорбентом, виявляє гастропротекторну та антимікробну дію, уповільнює процеси пероксидного окиснення ліпідів. Головною особливістю цього полісахариду є висока мембранотропність, що зумовлює можливість його використання як транспортного засобу для біологічно активних речовин.

Важливим сировинним джерелом арабіногалактану є деревина. Його виробництво налагоджене в США, де цей полісахарид широко використовують у різних сферах, зокрема, у харчовій промисловості й медицині. В Україні арабіногалактан не виробляють, а його технології відсутні.

Сукупність вищевикладеного визначає актуальність теми дисертаційної роботи, присвяченої виділенню, характеристиці арабіногалактану з вітчизняної сировини та створенню на його основі поліфункціональних харчових інгредієнтів.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Робота відповідає держбюджетній тематиці кафедри харчової хімії Одеської національної академії харчових технологій в 2011 р. – «Полісахариди і комплекси на їх основі як компоненти наносистем», держбюджетній тематиці кафедри харчової хімії в

2012-2013 р. – «Отримання і характеристика арабіногалактану з деревини сосни і комплексів на його основі».

**Мета та завдання дослідження.** Метою роботи є отримання арабіногалактану з вітчизняної сировини, створення на його основі комплексів із бромелайном та бетаніном, розробка їх технологій.

Для досягнення поставленої мети визначено основні завдання досліджень:

- обґрунтування вибору сировини – джерела арабіногалактану;
- удосконалення методу вилучення арабіногалактану;
- характеристика отриманого продукту;
- створення арабіногалактановмісних функціональних харчових інгредієнтів комплексів арабіногалактану з бромелайном та бетаніном, обґрунтування їх складу та характеристика;
- проведення медико-біологічних та мікробіологічних досліджень бромелайн-арабіногалактанового комплексу;
- оптимізація ключових параметрів екстракції арабіногалактану та іммобілізації бромелайну на арабіногалактановій матриці;
- розробка технології комплексів;
- проведення промислової апробації технології арабіногалактану, бромелайн-арабіногалактанового та бетанін-арабіногалактанового комплексів та розробка нормативної документації на виробництво арабіногалактану та бромелайн-арабіногалактанового комплексу.

*Об'єкт дослідження:* технології полісахариду та функціональних харчових інгредієнтів.

*Предмет дослідження* – тирса сосни *Pinus silvestris*, арабіногалактан, комплекси арабіногалактану, біологічно активні речовини.

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

**Наукова новизна отриманих результатів.** Наукова новизна полягає в тому, що вперше:

- розроблено спосіб одержання арабіногалактану з вітчизняної сосни *Pinus silvestris* та надано його всебічну характеристику;
- обґрунтовано можливість стабілізації бетаніну та бромелайну шляхом комплексоутворення із арабіногалактаном;
- розроблено умови комплексоутворення арабіногалактану з бромелайном та бетаніном;
- надано фізико-хімічну характеристику отриманих комплексів;
- проведено медико-біологічні дослідження бромелайн-арабіногалактанового комплексу.

Наукову новизну підтверджено 3 патентами України на корисну модель: № 73047 “Спосіб одержання арабіногалактану”; № 83596 “Комплекс бромелайну з арабіногалактаном, який має антитромбну активність”; № 83942 “Спосіб одержання комплексу бромелайну з арабіногалактаном”.

**Практичне значення отриманих результатів.** На основі отриманих результатів розроблено технології одержання арабіногалактану, бромелайн-

арабіногалактанового та бетанін-арабіногалактанового комплексів. Оптимізовано основні показники процесу екстракції арабіногалактану та комплексоутворення бромелайну з арабіногалактаном. Доведено можливість реалізації розроблених технологій у промисловості.

**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 публікацій, організації промислової апробації розроблених технологій арабіногалактану, бромелайн-арабіногалактанового та бетанін-арабіногалактанового комплексів. Особистий внесок здобувача підтверджується представленими документами й науковими публікаціями.

**Апробація результатів дисертації.** Основні результати досліджень доповідалися й обговорювалися на 12 наукових конференціях, зокрема на VIII Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів “Техника и технология пищевых производств” (м. Могильов, Білорусь, 2012); VII Міжнародній науково-практичній конференції “Розвиток наукових досліджень 2011” (м. Полтава, 2011); VI Міжнародній науково-технічній конференції студентів, аспірантів та молодих учених “Химия и современные технологии” (м. Дніпропетровськ, 2013); V Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих учених і студентів “Проблеми формування здорового способу життя у молоді” (м. Одеса, 2012); Міжнародній науково-практичній конференції “Современные проблемы и пути их решения в науке, транспорте, производстве и образовании” (м. Одеса, 2012); 71, 72-ій наукових конференціях науково-викладацького складу ОНАХТ, (м. Одеса, 2011, 2012); Міжнародній науково-практичній конференції “Прогресивні техніка та технології харчових виробництв ресторанного господарства і торгівлі” (м. Харків, 2012); Міжнародній науково-практичній конференції “Хлібопродукти-2012” та “Хлібопродукти-2013” (м. Одеса, 2012, 2013); The second north and east european congress on food NEEFood-2013 (м. Київ, 2013).

**Публікації.** Результати дисертації опубліковано в 16 друкованих працях: 5 у наукових виданнях, зокрема 4 статті у фахових виданнях (МОН України), 1 – у виданні, включеному в міжнародну базу наукового цитування Agris; 1 стаття у виданні, що зареєстровано в наукометричній базі РИНЦ; 3 патенти України на корисну модель; тези 7 доповідей на наукових та науково-практичних конференціях.

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

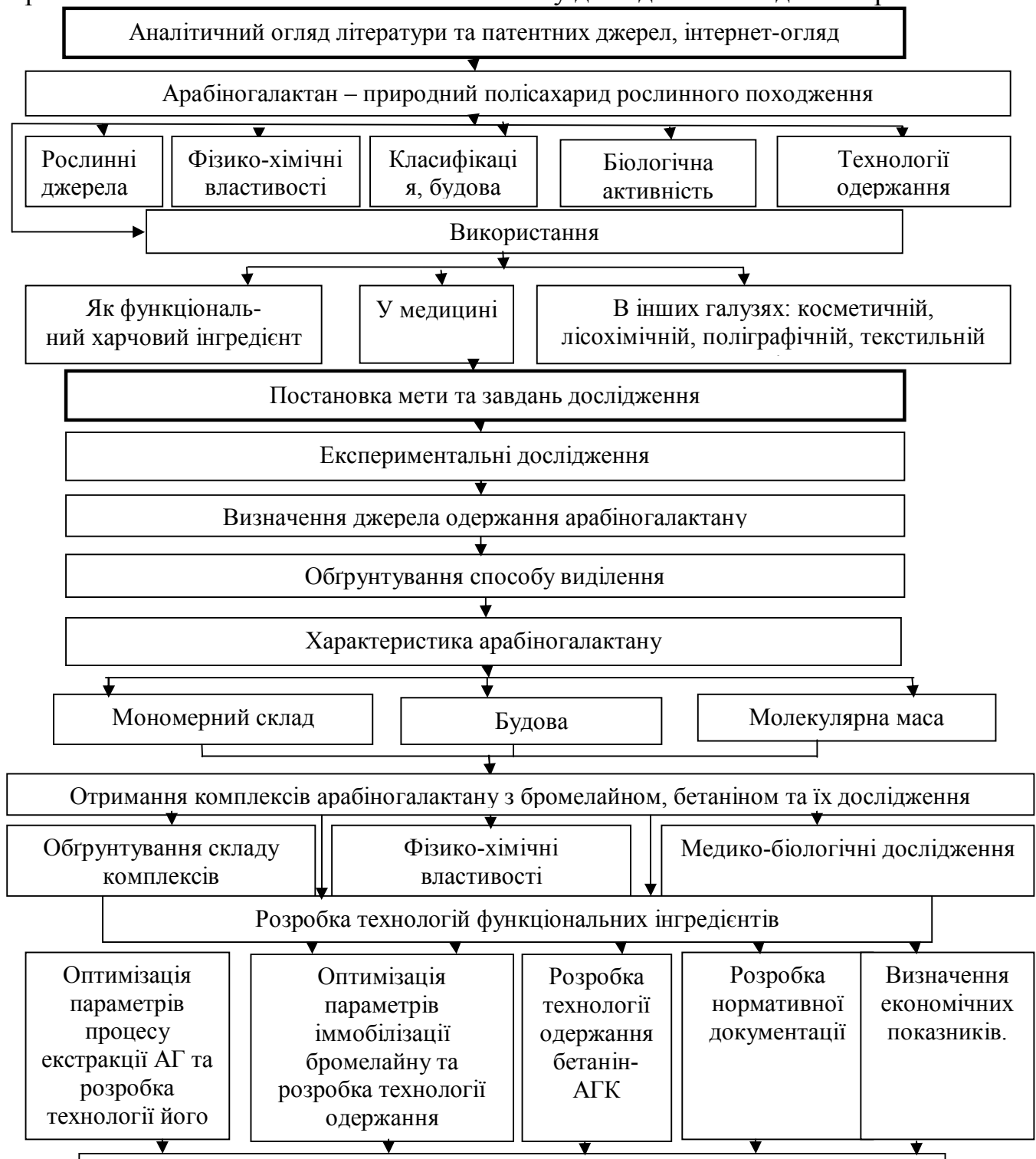
Дисертаційну роботу викладено на 153 сторінках основного тексту, вона містить 58 рисунків (19 стор.), 38 таблиць (26 стор.), 14 додатків (120 стор.), список літературних джерел з 243 найменувань (31 стор.).

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У вступі викладено актуальність теми дисертаційної роботи, сформульовано мету й завдання дослідження, висвітлено наукову новизну й практичне значення отриманих результатів, їх апробацію, визначено особистий внесок здобувача у проведених дослідженнях та публікаціях за темою дисертаційної роботи.

У першому розділі «Арабіногалактан – природний водорозчинний полісахарид рослинного походження» розглянуто будову, фізико-хімічні властивості арабіногалактану (АГ), похідні та супрамолекулярні комплекси на його основі, наведено його фізіологічні властивості, напрями використання, а також представлені способи одержання полісахариду.

У другому розділі «Матеріали й методи досліджень» викладено відомості про об'єкти й методи досліджень та етапи одержання арабіногалактану з отриманням на його основі комплексів. Схему досліджень наведено на рис. 1.





1	Сосна <i>Pinus silvestris</i>	Волинської обл.	97,4	0,21	1,7	1,0	відсутня	0,06
2		Сумської обл.	97,1	0,19	1,7	0,8	відсутня	0,02
3		Херсонської обл.	97,0	0,27	1,7	0,6	0,1	0,03
4		Одеської обл.	97,1	0,15	1,7	0,25	0,1	0,02
5	Ялина <i>Picea excelsa</i> *		95,1	0,19	1,0	0,8	відсутня	0,08
6	Ялиця <i>Abies sibirica</i> *		96,2	0,30	0,8	1,5	відсутня	0,07
7	Модрина <i>Larix sibirica</i> *		98,1... 99,5	0,15... 1,50	2,3... 6,9	1,0	відсутня	0,04

\* П р и м і т к а - літературні дані.

Присутність незначної кількості фенольних сполук незначна – не перевищує 0,3 %, що характерно для препаратів інших арабіногалактанів. Мономерний склад отриманих зразків полісахаридів майже ідентичний і містить у переважній більшості залишки галактози, кількість залишків арабінози значно менша, а їх співвідношення коливається в межах 1,0:0,25...1,0:0,70. У гідролізатах полісахаридів наявна глюкуронова кислота, що притаманно для арабіногалактанів хвойних видів деревини.

У подальших експериментах в якості джерела одержання АГ використовували деревину сосни *Pinus silvestris*, що росте в лісах Волині.

Ураховуючи локалізацію АГ в клітинній стінці рослин розглянуто можливість застосування таких ферментних препаратів (целовіридин, целокандин, целолігнорин, целококонінгін), які забезпечать мацерацію рослинної тканини з руйнуванням зв'язків між полісахаридами, гідроліз лігнінвуглеводних зв'язків, а також деструкцію окремих полісахаридів (целюлози, арабіноксиланів), із якими АГ зв'язаний у клітинній стінці деревини.

Ферментативний метод вилучення арабіногалактану включає наступні стадії: однократну обробку тирси сосни розчином ферментного препарату, згущення екстракту під вакуумом та осадження АГ етанолом. Використання ферментних препаратів у процесі вилучення сприяло підвищенню виходу цільового продукту на 20...30 %. Усі отримані зразки представлені полісахаридною складовою, у якій містяться переважно залишки галактози й арабінози та глюкуронової кислоти у мінорній кількості. Присутня незначна кількість фенольних сполук (табл. 2).

Таблиця 2

### Характеристика зразків арабіногалактану, одержаних ферментативним методом

n=3, p≥0,95

Умови отримання		Вміст полісахариду в зразку, %	Фенольних сполук, %	Мономерний склад, молярні співвідношення		
				Gal	Ara	Glc A
Обробка розчином ферментного препарату	целовіридин	97,8	0,21	3,0	1,0	0,06
	целокандин	97,5	0,21	1,8	0,8	0,05
	целолігнорин	97,4	0,21	1,8	0,7	0,06
	целококонінгін	97,6	0,21	2,3	0,7	0,04

Установлено, що найбільш ефективним ферментним препаратом є целовіридин: раціональними умовами процесу екстракції є: масова частка ферментного препарату в розчині 0,5 %,  $pH$  4,7, гідромодуль – 7, температура 50 °С та тривалість обробки – 4...6 год. У порівнянні з методом традиційної водної екстракції застосування ферментного препарату дозволило значно інтенсифікувати процес вилучення полісахариду із деревини (зменшити температуру з 90 °С до 50 °С, тривалість екстракції від 6 год до 4 год, скоротити об'єми витратних реагентів у 4 рази).

Отриманий АГ характеризували методами УФ-, ІЧ-, ЯМР  $^{13}C$  спектроскопії та гель-хроматографії.

УФ-спектр водного розчину отриманого препарату ідентичний такому АГ модрина (рис. 2). Смуги поглинання в області 285...290 нм свідчать про наявність у АГ речовин ароматичної природи (дигідрокверцетин, дигідрокемферол і еріодиктіол). В ІЧ-спектрі (рис. 3) ідентифіковані всі смуги поглинання, характерні для арабіногалактану. За даними гель-хроматографії (рис. 4 а, б), установлено, що середня молекулярна маса досліджуваного арабіногалактану складає 60...65 кДа.

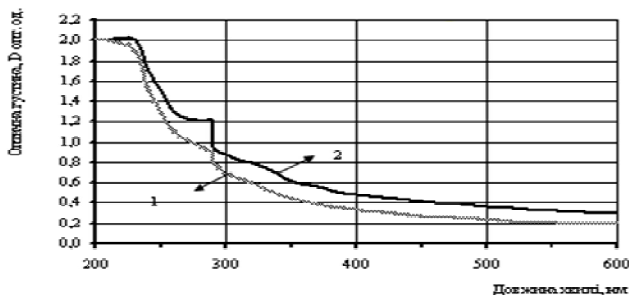


Рис. 2. УФ-спектри 0,1 % водних розчинів АГ із деревини модрина (1) та сосни (2).

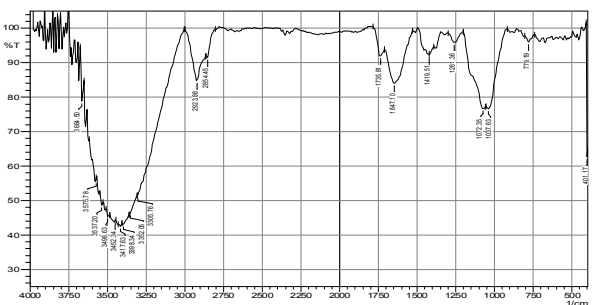
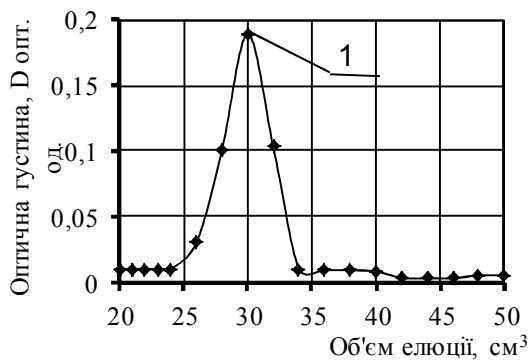
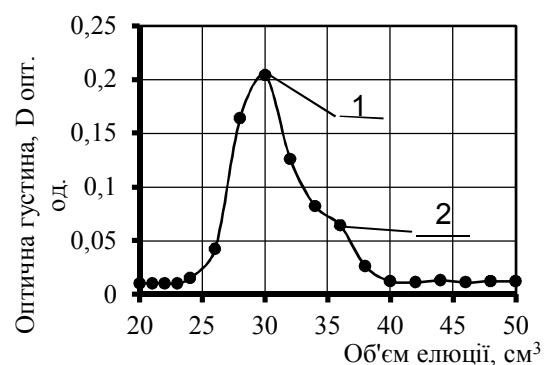


Рис. 3. ІЧ-спектр арабіногалактану деревини.



а)



б)

Рис. 4. Вихідні криві гель-хроматограми арабіногалактанів сосни звичайної на сефадексі G-75 (1- 65 кДа, 2- 60 кДа): а- арабіногалактан, отриманий стандартним методом; б – арабіногалактан, отриманий ферментативним методом.

Будову АГ досліджували методом спектроскопії ЯМР  $^{13}C$  (рис. 5). Згідно з отриманими даними, до складу його макромолекули входять залишки галактози й арабінози у співвідношенні 3:1.

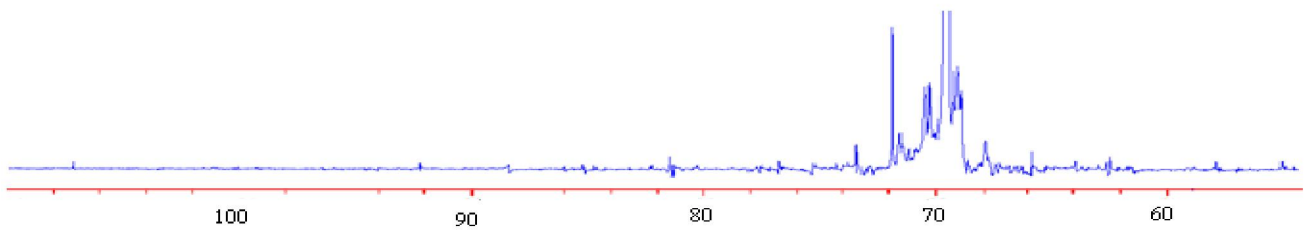


Рис. 5. ЯМР-спектр арабіногалактану деревини сосни *Pinus silvestris*.

Галактозні залишки представлено наступними структурами: [ $\rightarrow$ 3,6)-галактопіраноза-(1 $\rightarrow$ ), [галактопіраноза-(1 $\rightarrow$ ] у відсотковому співвідношенні 55 : 22. Бічні ланцюги складаються з [ $\rightarrow$ 6)-галактопіранози-(1 $\rightarrow$ ] (23 % від сумарної кількості залишків галактози). Інтенсивність сигналу арабінопіранозних залишків порівняно з іншими сигналами становить близько 1 % ( $\delta=63,8$  ppm, 64,5 ppm, чи 64,4 ppm, 64,1 ppm). Про  $\beta$ -конфігурацію залишків L-арабінопіранози в полісахариді вказують положення сигналу C-5 при 64,5 ppm і відповідного йому сигналу C-1 в районі 101 ppm. Про наявність залишків глюкуронової кислоти свідчать сигнали, характерні для групи  $>C=O$  ( $\delta=173,6$ -175,1 ppm).

Таким чином, встановлено, що АГ сосни *Pinus silvestris* (Волинської обл.) характеризується високорозгалуженою структурою. Головний ланцюг його макромолекули побудовано з залишків D-галактопіранози, з'єднаних між собою  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-глікозидними зв'язками. Бічні ланцюги побудовано із залишків L – арабінози, які знаходяться як у фуранозній, так і піранозних формах.

Отже, отримано АГ, який характеризується високим ступенем чистоти, добре розчиняється у воді, має типові для аналогічних полісахаридів мономерний склад, молекулярну масу, високорозгалужену структуру.

**У четвертому розділі** «Дослідження комплексоутворення біологічно активних речовин із арабіногалактаном» обґрунтовано склад бромелайн-арабіногалактанового (бромелайн-АГК) та бетанін-арабіногалактанового (бетанін-АГК) комплексів та надано їх фізико-хімічну характеристику.

Комплекс бромелайну з АГ отримували шляхом суміщення їхніх водних розчинів з наступним сушінням. Установлено, що найбільш сприятливими умовами для взаємодії бромелайну з арабіногалактаном зі збереженням його максимальної ферментативної активності в кінцевому продукті, слід вважати використання 0,5 % розчинів ферментної та полісахаридної складових при їхніх об'ємних співвідношеннях 1 : 1 та тривалості процесу 30 хв.

Склад комплексу обґрунтовано за допомогою спектрофотометричних методів – ізомолярних серій і молярних співвідношень (метод насичення). Установлено стехіометричне молярне співвідношення бромелайн:АГ в комплексі складу 2:1, що відповідає 0,5 % водним розчинам бромелайну та арабіногалактану при поєднанні їхніх об'ємів 1:1. Дослідження протеолітичної активності (ПА) комплексів показало, що саме бромелайн, уключений до комплексу з теоретично розрахованим молярним співвідношенням компонентів (бромелайн:АГ 2:1), володіє найбільшою активністю. Розраховано константу стійкості бромелайн-АГК, що становить  $1,5 \cdot 10^2$  дм<sup>3</sup>/моль.

Комплексоутворення досліджували методами гелі-проникаючої хроматографії, дериватографії, віскозиметрії, ЯМР  $^{13}\text{C}$ -, ІЧ-спектроскопії.

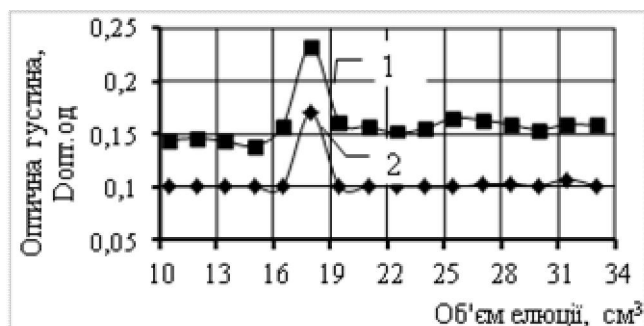


Рис. 6. Вихідна крива гелі-хроматографії комплексу арабіногалактану з бромелайном: 1– полісахаридна складова; 2–білкова складова.

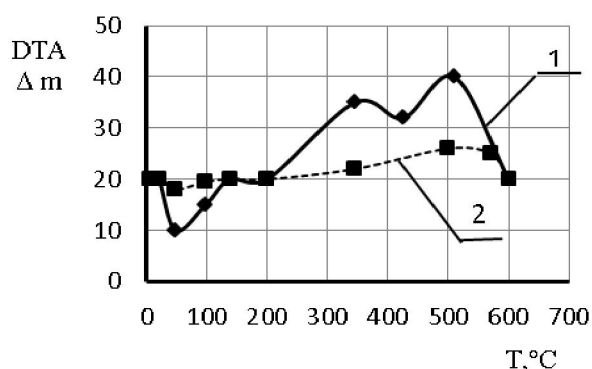


Рис. 7. Термограми зразків: 1-бромелайн-АГК, 2-суміш бромелайну з арабіногалактаном.

бромелайном та арабіногалактаном.

Утворення бромелайн-АГК підтверджено даними ЯМР  $^{13}\text{C}$  спектроскопії. Спектр комплексу характеризується утворенням нових сигналів ( $\delta = 59,56; 63,34; 61,27; 67,56; 88,73; 89,58; 89,67; 89,76; 89,89; 90,07; 90,91$  ppm), зміщеннями сигналів атомів у більш сильне поле, у порівнянні з вихідними сполуками: залишків арабінози на 0,4 та 2,09 ppm у сильне поле, залишків галактози – на 0,13...0,65 ppm.

Аналіз даних диференціальної ІЧ-спектроскопії показує, що спектр бромелайн-АГК, порівняно зі спектрами вихідних компонентів, характеризується зниженням інтенсивності смуг поглинання в області  $3400\text{ cm}^{-1}$ , яка відповідає валентним коливанням ОН-груп, що свідчить про участь гідроксилів у системі водневих зв'язків. Відсутність смуги поглинання при  $3650\text{ cm}^{-1}$  указує, що практично всі гідроксильні групи беруть участь у водневих зв'язках.

Визначено *pH*- та термооптимум (рис. 8), термостабільність іммобілізованого бромелайну (рис. 9, 10): *pH*-оптимум іммобілізованого бромелайну розширений у порівнянні з таким вільного та знаходиться в інтервалі значень *pH* від 6,0 до 8,0. Термооптимум становить 22...50 °С. При температурах 65...80 °С збереження активності іммобілізованого ферменту на 61...50 % вище за таку вільного.

На вихідних кривих гелі-хроматографії має місце повне співпадання піків полісахаридної та білкової складових (рис. 6), які відповідають значенню молекулярної маси голубого декстрану 90 кДа, що є адитивною величиною молекулярних мас АГ (65 кДа) та бромелайну (30 кДа).

На дериватограмах бромелайн-арабіногалактанового комплексу в порівнянні з механічною сумішшю бромелайну з арабіногалактаном присутній додатковий екзоефект, який обумовлено руйнуванням зв'язків, що сформувалися при взаємодії складових комплексу (рис. 7).

В'язкість розчину бромелайн-арабіногалактанового комплексу перевищує в'язкість розчинів АГ та бромелайну.

Сукупність отриманих даних є свідченням утворення комплексу між

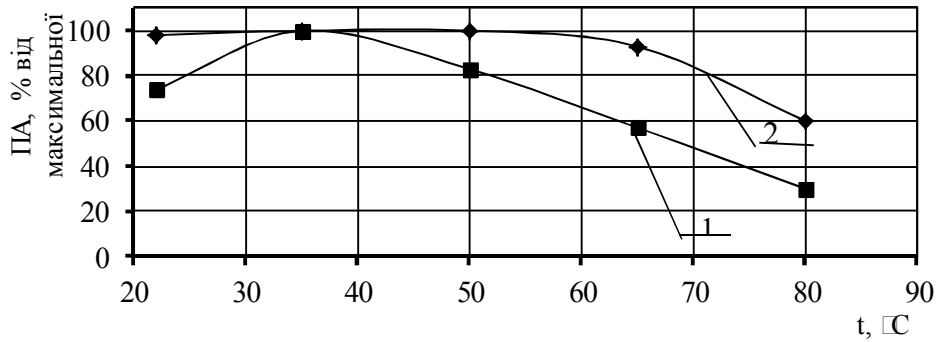


Рис. 8. Термооптимум бромелайну: 1 – вільний фермент; 2 – фермент у складі комплексу.

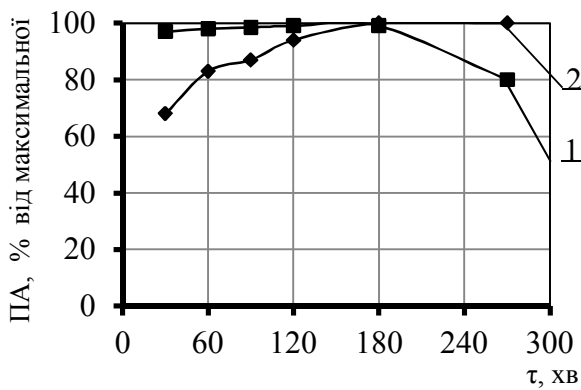


Рис. 9. Термостабільність бромелайну при 37 °С: 1–вільного; 2 – у складі комплексу.

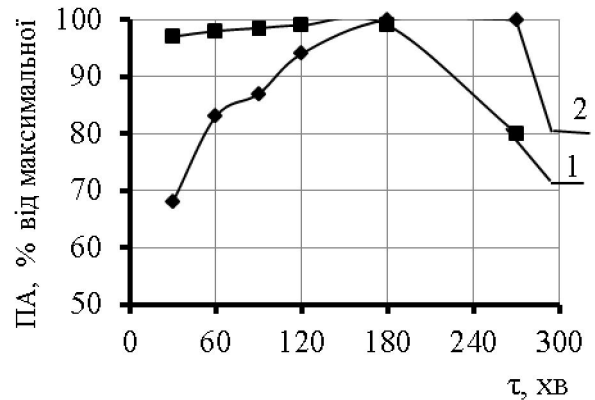


Рис. 10. Термостабільність бромелайну при 50 °С: 1–вільного; 2 – у складі комплексу.

Установлено, що бромелайн при фізіологічних значеннях температури (37 °С) та температурі 50 °С (можлива температура сушіння) (рис. 5, 6) має сталу активність, яка зберігається протягом тривалого часу. Зміни активностей вільного та іммобілізованого ферменту в залежності від часу мають схожий характер. Іммобілізація сприяє пролонгації дії ферменту. Так, якщо при температурах 37 °С та 50 °С активність вільного бромелайну залишається сталою протягом 180 хв, після чого починає знижуватися, то активність бромелайну у складі комплексу у цьому ж проміжку часу навпаки поступово зростає, а через 180 хв сягає свого максимального значення (100 %), і у подальшому зберігається такою протягом 90 хв.

Таким чином, розширення термостабільності дозволяє прогнозувати можливість використання відповідних температурних режимів (до 50 °С) у технології виробництва іммобілізованого бромелайну та функціональних харчових інгредієнтів із його включенням.

У результаті проведених медико-біологічних досліджень виявлено виражену антитромботичну активність бромелайн-АГК, що дозволяє розглядати перспективи його застосування як фізіологічно-функціонального інгредієнта харчових раціонів у хворих на серцево-судинні захворювання, особливо в тих, які знаходяться в групі ризику розвитку тромбозів.

Проведено експерименти щодо стабілізації бетаніну шляхом комплексоутворення з арабіногалактаном, для чого суміщали водні розчини бетаніну й АГ, комплекс осаджували етанолом і висушували.

На ступінь зв'язування бетаніну з АГ впливає  $pH$  середовище. Установлено, що найбільше включення бетаніну ( $pH$  розчину 4,0) в комплекс з арабіногалактаном ( $pH$  розчину 6,8) – 99,5 % досягається при використанні 0,1 % розчинів і їхніх об'ємних співвідношень 1:1 при 18...22 °С протягом 15 хвилин.

Обґрунтовано склад бетанін-арабіногалактанового комплексу (бетанін-АГК) спектрофотометричними методами. Установлено, що найбільше зв'язування (99,5 %) арабіногалактану з бетаніном відбувається при молярних співвідношеннях 2:0,2 моль/дм<sup>3</sup>, що відповідає 0,1 % розчинам при поєднанні їхніх об'ємів 1:1. Розраховано константу стійкості бетанін-АГК, що становить  $1,8 \cdot 10^2$  дм<sup>3</sup>/моль. Значення констант стійкості бетанін-АГК та бромелайн-АГК дозволяють зробити висновок про більшу стійкість бетанін-АГК.

Бетанін-АГК характеризували, використовуючи метод дериватографії.

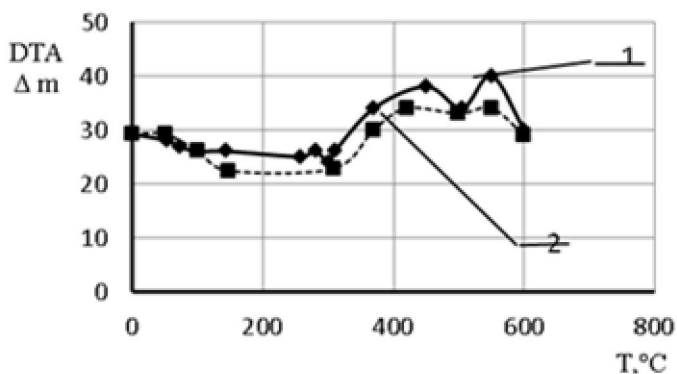


Рис. 11. Термограми зразків: 1-бетанін-АГК, 2-суміш бетаніну з арабіногалактаном.

На дериватограмах (рис. 11) бетанін-АГК в порівнянні з механічною сумішшю бетаніну з арабіногалактаном спостерігається додатковий екзоэффект, який може бути обумовлений руйнуванням зв'язків, що виникають при утворенні комплексу.

Таким чином, виходячи з різного характеру термодеструкції досліджуваних зразків, що вказує на відмінності в природі зв'язків,

отримані дані можна розглядати як підтвердження утворення комплексу між бетаніном та арабіногалактаном.

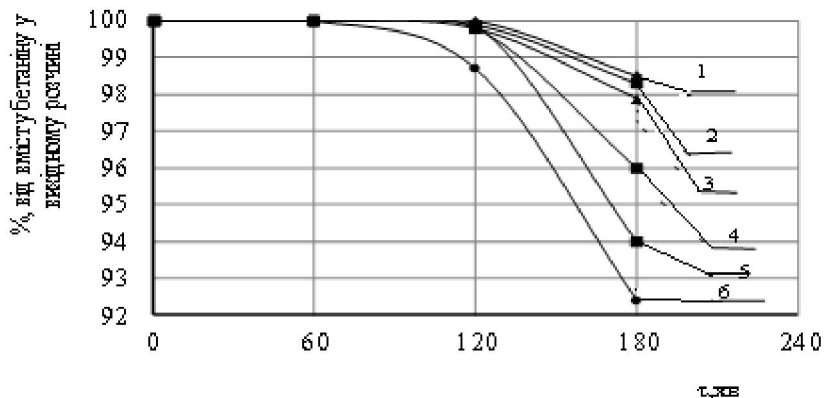


Рис. 12.  $pH$ -стабільність бетаніну в складі комплексу при  $t=(37 \pm 2)^\circ\text{C}$ : 1 -  $pH=3,0$ ; 2 -  $pH=4,0$ ; 3 -  $pH=6,0$ ; 4 -  $pH=7,0$ ; 5  $pH=7,5$ ; 6 -  $pH=8,0$ .

Показано, що в результаті комплексоутворення інтервал стабільності бетаніну розширюється до значень  $pH$  3...7 (вільний бетанін найбільш стійкий в інтервалі значень  $pH$  3,5...5,0).

Установлено, що діапазон максимальної стабільності бетаніну при ім-

мобілізації не змінюється протягом 120 хв. і складає 3,0...7,5 од.  $pH$ , лише при  $pH$  8,0 зменшується на 1,2 %. Через 180 хвилин інкубації при  $pH$  3,0...8,0 стабільність бетаніну в складі комплексу зменшилася лише на 1,1...8,5 % відповідно (рис. 12).

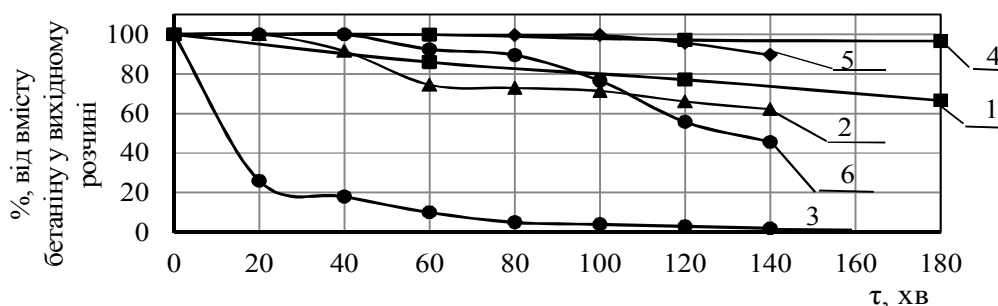


Рис. 13. Термостабільність бетаніну: вільного: 1 – 37 °C; 2—50 °C; 3 –100 °C; бетаніну в складі комплексу: 4 – 37 °C; 5– 50 °C; 6 –100 °C.

Результати експерименту, що представлені на рис. 13, указують, що протягом 180 хвилин при температурі 37 °C, на відміну від вільного бетаніну, який руйнується за цей час на 26,7 %, вміст пігменту в складі комплексу практично не змінюється. При підвищенні температури до 50 °C вільний бетанін руйнується уже через 20 хвилин, тоді як зв'язаний залишається стабільним протягом 100 хвилин. При температурі 100 °C на 10 хвилині починає відбуватися руйнування бетаніну, а у складі комплексу він термічно стабільний протягом 40 хвилин.

Таким чином, обґрунтовано можливість отримання комплексу бетаніну з арабіногалактаном сосни *Pinus silvestris*. Найбільша кількість пігменту зв'язується з полісахаридною матрицею при суміщенні розчинів арабіногалактану й бетаніну при  $pH$  5,8 та об'ємному співвідношенні 1:1 при 18...22 °C протягом 15 хвилин.

Комплексоутворення приводить до підвищення  $pH$  і термостійкості бетаніну, що визначає можливість використання бетанін-АГК як стабільного харчового барвника, обумовлює його пролонговану дію як БАР в умовах шлунково-кишкового тракту. Поєднання в складі комплексу двох фізіологічно-функціональних речовин дозволяє розглядати його як поліфункціональний інгредієнт харчових продуктів та дієтичних добавок.

**У п'ятому розділі** «Розробка технології арабіногалактановмісних функціональних харчових інгредієнтів» наведено технологічні та апаратурні схеми виробництва арабіногалактану, бромелайн-АГК, бетанін-АГК; обґрунтовано раціональні параметри ключових технологічних операцій екстракції арабіногалактану та іммобілізації бромелайну на арабіногалактановій матриці.

Проведено оптимізацію параметрів процесу одержання арабіногалактану за допомогою ферментного препарату методом найменших квадратів із застосуванням послідовного регресійного аналізу. Отримано рівняння регресії, яке адекватно описує залежність виходу арабіногалактану від прийнятих до розгляду факторів  $GM$ ,  $\tau$  та  $C_F$ :

$$y = 0,3146 \cdot GM + 0,4067 \cdot \tau + 2,8507 \cdot C_F - 0,0219 \cdot GM^2 - 0,0504 \cdot \tau^2 - 2,8999 \cdot C_F.$$

Отримані оптимальні значення, що відповідають максимальному виходу арабіногалактану  $y = 2,65\%$ :  $ГМ = 1:7$ ,  $\tau = 4,03$  год,  $C_F = 0,49\%$ .

Проведено оптимізацію параметрів процесу комплексоутворення бромелайну з арабіногалактаном за допомогою методів найменших квадратів і послідовного регресійного аналізу. Отримано наступне рівняння регресії в натуральних змінних, що описує залежність активності ферменту у бромелайн-АГК  $u_{ПА}$  від концентрації арабіногалактану  $C_{AG}$  та бромелайну  $C_{Br}$ :

$$u_{ПА} = 45,35 + 108,82 \cdot C_{AG} + 26,66 C_{Br} - 100,17 C_{AG}^2 - 27,21 C_{Br}^2$$

Отримано оптимальні значення, які відповідають максимальному включенню ферменту в комплекс при використанні 0,5 % розчинів ферментної та полісахаридної складових. При цьому активність бромелайну складає близько 80 %.

На рис.10 представлено технологічну схему виробництва бромелайн-АГК.

Технологію виробництва арабіногалактану, бромелайн-АГК та бетанін-АГК апробовано на науково-виробничому підприємстві «Аріадна» (м. Одеса). Отримані у промислових умовах продукти відповідають необхідним санітарно-гігієнічним, токсикологічним, мікробіологічним, фізико-хімічним та органолептичним нормам.



Рис. 10. Технологічна схема виробництва бромелайн-АГК.

Сукупність даних мікробіологічних досліджень та вивчення динаміки зміни протеолітичної активності бромелайну в складі комплексу дозволяє рекомендувати його зберігання впродовж 12 місяців за температури  $(4\pm 2)^\circ\text{C}$ .

Собівартість харчового інгредієнта (бромелайн-АГК), становить 110,0 грн за 1 упаковку (90 капсул по 300 мг).

## ВИСНОВКИ

На основі результатів теоретичних та експериментальних досліджень удосконалено технологію одержання арабіногалактану, розроблено технології бромелайн-арабіногалактанового та бетанін-арабіногалактанового комплексів.

1. Установлено, що перспективним джерелом одержання арабіногалактану є сосна *Pinus silvestris* L. Проведено порівняльний аналіз хімічного складу деревини сосни з різних регіонів України. Показано, що найбільший вміст арабіногалактану притаманний сосні, що росте у Волинській області.

2. Обґрунтовано умови одержання арабіногалактану із застосуванням попередньої обробки сировини розчином ферментного препарату – целовіридину: масова частка ферментного препарату у розчині – 0,5 %, гідромодуль 7, тривалість обробки 4 год, температура  $50^\circ\text{C}$ .

3. Показано, що арабіногалактан сосни *Pinus silvestris* L. має високорозгалужену структуру; до складу його макромолекули входять залишки галактози й арабінози у співвідношенні 3:1 та в мінорній кількості – глюкуронової кислоти; молекулярна маса арабіногалактану 60...65 кДа.

4. Доведено доцільність іммобілізації на арабіногалактановій матриці протеолітичного ферменту бромелайну шляхом комплексоутворення; установлено умови комплексоутворення: суміщення 0,5 % розчинів ферментної та полісахаридної складових в об'ємних співвідношеннях 1:1 протягом 30 хв. Обґрунтовано склад комплексу. Установлено, що іммобілізація сприяє розширенню *pH*-оптимуму бромелайну: з 6 од. *pH* до 6...8 од. *pH*; і термооптимуму: з  $35^\circ\text{C}$  до 22... $50^\circ\text{C}$ ; підвищенню його термостабільності.

5. Розроблено умови стабілізації бетаніну шляхом комплексоутворення з арабіногалактаном: суміщення 0,1 % розчинів арабіногалактану й бетаніну протягом 15 хвилин при *pH* 5,8 та об'ємному співвідношенні 1:1 при 18... $22^\circ\text{C}$ . Обґрунтовано склад комплексу. Комплексоутворення приводить до підвищення *pH*-стабільності бетаніну. При температурі  $37^\circ\text{C}$  іммобілізований бетанін стабільний протягом 180 хв, при  $50^\circ\text{C}$  – 100 хв, при  $100^\circ\text{C}$  – 40 хв.

6. Здійснено медико-біологічні та мікробіологічні дослідження бромелайн-арабіногалактанового комплексу. Показано виражену антитромботичну активність бромелайн-арабіногалактанового комплексу. Установлено термін зберігання бромелайн-арабіногалактанового комплексу – 12 місяців.

7. Оптимізовано ключові параметри екстракції арабіногалактану: *ГМ* 1:7,  $\tau = 4$  год,  $C_F = 0,5\%$ ; іммобілізації бромелайну на арабіногалактановій матриці:  $C_F = 0,5\%$ ,  $C_{AG} = 0,5\%$ .

8. Обґрунтовано технології арабіногалактану, бромелайн-АГК, бетанін-АГК. Розроблені технології реалізовано у виробництві на ТОВ НВП „Аріадна” (м. Одеса). Розроблено нормативну документацію на виробництво арабіногалактану, бромелайн-арабіногалактанового комплексу.

#### Список робіт, опублікованих за матеріалами дисертації

1. Черно, Н. К. Дослідження арабіногалактану деревини *Pinus silvestris* L. [Текст] / Н. К. Черно, Л. С. Гураль, О. В. Ломака // Харчова наука і технологія – 2011. – № 4 (17). – С. 22-26.
2. Черно, Н. К. Біотехнологічний спосіб вилучення арабіногалактану із деревини сосни [Текст] / Н. К. Черно, Л. С. Гураль, О. В. Ломака // Наукові праці Одеської національної академії харчових технологій. – 2012. – Вип. 42. – Том 2. – С. 157-161.
3. Черно, Н. К. Отримання білок-полісахаридного комплексу та його характеристика [Текст] / Н. К. Черно, Л. С. Гураль, О. В. Ломака // Прогресивні техніка та технології харчових виробництв ресторанного господарства і торгівлі. – Харків, 2012. – Вип. 2. (16). – С. 309-315.
4. Черно, Н. К. Дослідження комплексоутворення бромелайну з арабіногалактаном спектрофотометричними методами [Текст] / Н. К. Черно, Л. С. Гураль, О. В. Ломака // Наукові праці Одеської національної академії харчових технологій. – 2013. – Вип. 44. – Том 2. – С. 99-103.
5. Черно, Н. К. Стабілізація бетанина комплексоутворенням з арабіногалактаном [Текст] / Н. К. Черно, О. В. Ломака // Известия вузов. Пищевая технология – Краснодар. – 2013 г. – №. 4. – С. 32-34.
6. Пат. на корисну модель № 73047 Україна. МПК (2012.01) А61К 35.00 С08В 37.00. Спосіб одержання арабіногалактану [Текст] / Н. К. Черно, Л. С. Гураль, О. В. Ломака; власник Одеська національна академія харчових технологій.– и 2012 02030; заявл. 22. 09.12; опубл. 10.09.12, Бюл. № 17. – 4 с.
7. Пат. на корисну модель № 83942 Україна. МПК А61К31/00. Спосіб одержання комплексу бромелайну з арабіногалактаном [Текст] / Н. К. Черно, Л. С. Гураль, О. В. Ломака; власник Одеська національна академія харчових технологій. – и 2012 02680; заявл. 04. 03.13; опубл. 10.10.13, Бюл. № 19. – 5 с.
8. Пат. на корисну модель № 83596 Україна. МПК А61К31/00. Комплекс бромелайну з арабіногалактаном, який має антитромбну активність [Текст] / Н. К. Черно, Л. С. Гураль, О. В. Ломака; власник Одеська національна академія харчових технологій. – и 2012 02030; заявл. 22. 09.12; опубл. 25.09.13, Бюл. № 18. – 4 с.
9. Черно, Н. К. Імобілізація бромелайну шляхом комплексоутворення з арабіногалактаном *Pinus silvestris* [Текст] / Н. К. Черно, О. В. Ломака // Современные проблемы и пути их решения в науке, транспорте и образовании 2012. Сборник научных трудов SWorld: материалы Международной научно-практической конференции, Одесса, 18-27 декабря 2012 г.: изд-во Куприенко С.В. – Т. 45. – С. 114-116.
10. Ломака, О. В. Виділення і характеристика арабіногалактану з сосни *Pinus silvestris* [Текст] / О. В. Ломака, Л. С. Гураль // Збірник наукових праць молодих учених, аспірантів та студентів. – Одеса, 2011. – С. 191-192.
11. Гураль, Л. С. Вплив ферментативної обробки деревини сосни на вихід арабіногалактану [Текст] / Л. С. Гураль, О. В. Ломака // Развитие научных исследований 2-11: материалы Седьмой Международной научно-практической конференции, Полтава, 28-30 ноября 2011 г.: Полтава: изд-во “ІнтерГрафіка” – Т. 9. – С. 104-105.
12. Ломака, О. В. Порівняльна характеристика арабіногалактанів сосни *Pinus silvestris* L. Різних регіонів України [Текст] / О. В. Ломака, Л. С. Гураль // Хімія та сучасні технології: тези доповідей VI Міжнародної науково-технічної конференції студентів, аспірантів та молодих учених, Дніпропетровськ, 24-26 квітня 2013 року: ДВНЗ УДХТУС. – Т. IV. –С. 91.

13. Ломака, Е. В. Полисахариды и их комплексы как функциональные ингредиенты пищи [Текст] / Е. В. Ломака, А. В. Никитина, К. И. Шапкина // Техника и технология пищевых производств: тезисы докладов VIII Международной научной конференции студентов и аспирантов, Могилев, 26-27 апреля 2012 г. / Учреждение образования “Могилевский государственный университет продовольствия”; редкол.: А. В. Акулич (отв. ред.) [и др.]. – Могилев, 2012. – С. 214.

14. Ломака О. В. Супрамолекулярний комплекс арабіногалактану з бромелайном [Текст] / О. В. Ломака // Збірник наукових праць молодих учених, аспірантів та студентів. – Одеса, 2012. – Т. 2. – С. 30-31.

15. Гураль, Л. С. Бетаніновмісний комплекс на основі арабіногалактану сосни *Pinus silvestris* [Текст] / Л. С. Гураль, О. В. Ломака // Сучасний ринок товарів та проблеми здорового харчування: міжнародна науково-практична інтернет-конференція, секція 4, оздоровче харчування: проблеми та напрями розвитку. – Харків, 13-14 травня 2013 р./ Видавець та виготовлювач Харківський державний університет харчування та торгівлі – С. 121-122.

16. Chernon N., Functional food ingredients on the basis of polysaccharides [текст] // N. Chernon, Kr. Shapkina, A. Nikitina, E. Lomaka and S. Osolina // Матер. другого північного та східно-європейського конгресу з харчової Науки (NEEFood-2013). – Kyiv, 2013. – P. 213

#### Особистий внесок:

1. Аналіз даних літератури, проведення експериментальних досліджень щодо всебічної характеристики арабіногалактану, виділеного з рослинної сировини, обробка та узагальнення отриманих результатів, підготовка до друку (поз. 1, 2, 10-12).

2. Вивчення фізико-хімічних властивостей вільного бромелайну та його іммобілізованої форми, обробка отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку (поз. 3, 4, 9, 14).

3. Вивчення фізико-хімічних властивостей вільного бетаніну та у складі комплексу, обробка отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку (поз. 5, 15).

4. Проведення експериментальних досліджень, узагальнення отриманих результатів, проведення патентного пошуку та оформлення патентів на корисну модель (поз. 6, 7, 8).

5. Проведення досліджень фізико-хімічної характеристики отриманого бромелайн-арабіногалактанового комплексу, обробка, обґрунтування та узагальнення отриманих результатів.(13, 16)

## АНОТАЦІЯ

**Ломака О.В.** Розробка технології арабіногалактановмісних функціональних харчових інгредієнтів. – 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, 2014.

Дисертацію присвячено отриманню арабіногалактану з вітчизняної сировини, створенню на його основі комплексів із бромелайном та бетаніном, розробці їх технологій.

У роботі надано характеристику арабіногалактану, одержаного з вітчизняної сировини – деревини сосни *Pinus silvestris*. Показано, що він має високорозгалужену структуру; до складу його макромолекули входять залишки галактози й арабінози у співвідношенні 3:1 та в мінорній кількості – глюкуронової кислоти; молекулярна маса 60...65 кДа.

Здійснено іммобілізацію бромелайну шляхом комплексоутворення з арабіногалактаном. Надано характеристику складу отриманого комплексу. Установлено, що іммобілізація сприяє розширенню рН- і термооптимуму бромелайну, підвищенню його термостабільності.

Показано доцільність отримання бетанін-арабіногалактанового комплексу. Установлено, що комплексоутворення приводить до підвищення рН і термостабільності бетаніну.

Обґрунтовано технології отримання арабіногалактану та його комплексів з бромелайном та бетаніном. Розроблено технічні умови та технологічну інструкцію на виробництво арабіногалактану та бромелайн-арабіногалактанового комплексу. Реальність технологій підтверджено результатами їх промислової апробації на біотехнологічному підприємстві ТОВ НВП „Аріадна” (м. Одеса). Здійснено медико-біологічні та мікробіологічні дослідження бромелайн-арабіногалактанового комплексу. Показано його виражену антитромботичну активність.

**Ключові слова:** арабіногалактан, комплексоутворення, полісахарид, пігмент, іммобілізація.

## АННОТАЦІЯ

**Ломака Е.В.** Разработка технологии арабиногалактансодержащих функциональных пищевых ингредиентов. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология.– Одесская национальная академия пищевых технологий Министерства образования и науки Украины, Одесса, 2014.

Диссертация посвящена получению арабиногалактана из отечественного сырья, созданию на его основе комплексов с бромелайном и бетанином, разработке их технологий.

Обоснована целесообразность применения биотехнологических приемов при выделении арабиногалактана древесины сосны *Pinus silvestris*. Использование ферментного препарата целловиридина способствует интенсификации процесса экстракции арабиногалактана и увеличению его выхода.

Получен препарат полисахарида высокой степени чистоты. Полученный арабиногалактан сосны *Pinus silvestris* исследовали с помощью методов ЯМР <sup>13</sup>С, ИК-, УФ- спектроскопии, хроматографии.

Показано, что арабиногалактан сосны *Pinus silvestris* L. имеет высокоразветвленную структуру; в состав его макромолекулы входят остатки галактозы и арабинозы в соотношении 3:1 и в минорном количестве – глюкуроновой кислоты; молекулярная масса арабиногалактана 60...65 кДа.

Получен комплекс арабиногалактана с протеолитическим ферментом бромелайном. Образование комплекса доказано результатами исследований методами гель-проникающей хроматографии, ЯМР <sup>13</sup>С, ИК-спектроскопии, дериватографии, вискозиметрии.

Установлено, что молекулярная масса бромелайн-арабиногалактанового комплекса соответствует значению молекулярной массы голубого декстрана

90 кДа, что является аддитивной величиной молекулярных масс арабиногалактана (65 кДа) и бромелайна (30 кДа).

Образование бромелайн-арабиногалактанового комплекса подтверждено данными ЯМР  $^{13}\text{C}$  спектроскопии. Спектр комплекса характеризуется образованием новых сигналов ( $\delta = 59,56; 63,34; 61,27; 67,56; 88,73; 89,58; 89,67; 89,76; 89,89; 90,07; 90, 91$  ppm), смещениями сигналов атомов в более сильное поле, по сравнению с исходными соединениями: остатков арабинозы на 0,4 и 2,09 ppm в сильное поле, остатков галактозы - на 0,13...0,65 ppm.

На дериватограммах бромелайн-арабиногалактанового комплекса по сравнению с механической смесью бромелайна с арабиногалактаном присутствует дополнительный экзоефект, обусловленный разрушением связей, сформировавшихся при взаимодействии составляющих комплекса.

Вязкость раствора бромелайн-арабиногалактанового комплекса превышает вязкость растворов арабиногалактана и бромелайна.

Определены условия комплексообразования, при которых имеет место максимальное сохранение активности фермента (совмещение 0,5 % водных растворов бромелайна и арабиногалактана в объемном соотношении 1 : 1 в течение 30 минут). Дана характеристика физико-химических свойств иммобилизованного фермента.

Установлено, что иммобилизация приводит к расширению  $pH$ -оптимума бромелайна: с 6 ед.  $pH$  до 6...8 ед.  $pH$  и термооптимума: с 35 °С до 22...50 °С; повышению его термостабильности.

Показана возможность стабилизации бетанина посредством образования комплекса с арабиногалактаном сосны *Pinus silvestris*. Установлены концентрации растворов бетанина и арабиногалактана, их объемные соотношения, температура и продолжительность комплексообразования, значения  $pH$ , позволяющие практически полностью включить бетанин в состав комплекса.

Показано, что наибольшее количество бетанина связывается с полисахаридной матрицей при совмещении 0,1 % растворов арабиногалактана и бетанина при  $pH$  5,8, объемном соотношении 1:1 при 18...22 °С в течение 15 мин.

Комплексообразование приводит к повышению  $pH$ - и термостабильности бетанина, что расширяет возможности его использования в пищевых системах и обуславливает пролонгированное действие в пищеварительном тракте человека.

Показано, что свободный бетанин наиболее устойчив в интервале значений  $pH$  3,5...5,0. В результате комплексообразования интервал стабильности бетанина расширяется до значений  $pH$  3...7.

Показано, что в течение 180 мин при температуре 37 °С, в отличие от свободного бетанина, количество которого снижается за этот период времени на 26,7 %, содержание пигмента в составе комплекса практически не изменяется. При повышении температуры до 50 °С свободный бетанин начинает разрушаться уже через 20 мин, тогда как связанный остается стабильным в течение 100 мин. При температуре 100 °С содержание свободного бетанина в течение 10 мин снижается, а пигмент в составе комплекса термически стабилен на протяжении 40 мин.

Обоснованы рациональные режимы процессов экстракции арабиногалактана  $ГМ 1 : 7$ ,  $\tau = 4$  ч,  $C_F = 0,5$  %; иммобилизации бромелайна на арабиногалактановой матрице:  $C_F = 0,5$  %,  $C_{AG} = 0,5$  %.

Разработаны технологии получения арабиногалактана, комплексов арабиногалактана с бромелайном и бетанином.

Реальность разработанных технологий подтверждена результатами промышленной апробации на биотехнологическом предприятии ООО НПО „Ариадна”.

Результаты медико-биологических исследований показали выраженную антитромботическую активность бромелайн-арабиногалактанового комплекса.

Установлен срок хранения бромелайн-арабиногалактанового комплекса – 12 месяцев.

Разработаны технические условия и технологическая инструкция на производство арабиногалактана, бромелайн-арабиногалактанового комплекса.

**Ключевые слова:** арабиногалактан, комплексообразование, фермент, пигмент, иммобилизация.

**ABSTRACT**

**Lomaka E.** The development of the technology of functional food ingredients that contain arabinogalactan. – Manuscript.

The thesis for an academic degree of candidate of technical sciences, speciality 03.00.20 - biotechnology. - Odessa National Academy of Food Technologies, the Ministry of Education and Science of Ukraine, Odessa, 2014.

The thesis describes the obtaining of arabinogalactan from domestic raw material, creation of complexes with bromelain and betanin on its basis, the development of their technologies.

The characteristic of arabinogalactan obtained from domestic raw material pine *Pinus silvestris* is given and the conditions for the creation of complexes with bromelain and betanin on its basis have been studied in this paper.

The immobilization of bromelain by complexation with arabinogalactan has been done. The composition characteristic of obtained complex is given. It has been established that immobilization helps to enlarge pH- and thermal optimum of bromelain, increase its thermal stability.

The expediency of obtaining of betanin-arabinogalactan complex has been founded. It has been established that complexation leads to increase of *pH* and thermostability of betanin.

The technology of obtaining of bromelain-arabinogalactan complex with proteolytic activity has been developed and economically grounded. The technology of complex obtaining includes the following stages: immobilization by complexation of bromelain with polysaccharide, drying the obtained complex, capsulation. The technical conditions and technological instructions for the production of bromelain-arabinogalactan complex has been developed. The reality of technology has been confirmed by the results of industrial approbation at the biotechnological factory.

**Keywords:** arabinogalactan, pine *Pinus silvestris* L., complexation, bromelain, betanin, immobilization.



Підписано до друку 4.02.2014. Формат 60×90/16. Ум.-друк. арк. 0,9.  
Наклад 100 прим. Замовлення № 14

---

Віддруковано з готового оригінал-макету в копіцентрі “Європринт”  
65039, Україна, м. Одеса, вул. Канатна, 101/2, тел. (048) 717-85-08,  
kopicentr@ukr.net

