

ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

**Русєва Яна Петрівна**



УДК 577.114.7:544.475

**ТЕХНОЛОГІЯ БІЛКОВО-ПОЛІСАХАРИДНИХ КОМПЛЕКСІВ  
З АНТИПРОТЕОЛІТИЧНОЮ АКТИВНІСТЮ**

Спеціальність 03.00.20 – біотехнологія (технічні науки)

**АВТОРЕФЕРАТ**

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата технічних наук

Одеса – 2010

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,  
**Юкало Володимир Глібович**,  
Тернопільський державний технічний університет ім. І.  
Пулюя,  
кафедра харчової біотехнології і хімії,  
завідувач кафедри,

– декан факультету переробних і харчових виробництв  
– доктор технічних наук, професор,  
**Безусов Анатолій Тимофійович**,  
Одеська національна академія харчових технологій, кафедра  
технології консервування,  
завідувач кафедри.

Захист відбудеться *9 грудня 2010 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 *8 листопада 2010 року*.

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



Г.М. Станкевич

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Стрімкий розвиток та прогресування багатьох важких захворювань людства за останні десятиріччя визначають доцільність введення у раціон харчування функціональних продуктів, які володіють профілактичними властивостями. Метою застосування харчових засобів функціонального призначення є регуляція та нормалізація різних функцій організму при захворюваннях та для їх профілактики. Багато функціональних продуктів містять речовини адаптогенної та тонізуючої дії, які стимулюють захисні сили організму, підвищують загальну стійкість та життєвий тонус, фізичну та розумову працездатність, знижують негативну дію навколишнього середовища та стресів.

В даний час усе більше поширення набуває використання інгібіторів ферментів рослинного походження як лікувально-профілактичних засобів, які в порівнянні з мікробними та синтетичними аналогами не викликають токсичні, алергічні реакції та звикання; не пригнічують синтез власних ферментів організму. Різноманіття фізіологічних ефектів інгібіторів обумовлює їх важливість в профілактиці та лікуванні ряду важких захворювань.

**Актуальність теми.** Хвороби, які на даний час набувають статусу епідеміологічних, в значній мірі пов'язані з порушеннями білкового обміну, в нормалізації якого відіграють важливу роль інгібітори протеолітичних ферментів. Вони приймають участь у регулюванні функцій протеаз шлунково-кишкового тракту, кровоносної системи, клітин шкіри та інших органів. Відомо, що гіперфункція секреції протеаз є основною ланкою в патогенезі панкреатитів різної етіології, захворювань системи згортання крові, шоківих та алергічних станів та ін.

Інгібітори протеаз застосовують для регуляції білкового обміну та при різних запалювальних процесах, вони виявляють антивірусну, антимікробну активність, мають антикоагуляційну та антиканцерогенну дію навіть у дуже малих кількостях. Ефективним є застосування їх за умов стресового та алергічного стану.

Сукупність вищевикладеного визначає актуальність теми дисертаційної роботи, присвяченої виділенню, характеристиці і розробці технології рослинного інгібітору трипсину – біокоректору з антипротеолітичною дією.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Робота відповідає тематиці досліджень проблемної лабораторії Одеської національної академії харчових технологій 1/06-П «Розробка біотехнологічних процесів цільового спрямованого регулювання функціональних, фізіологічних і технологічних властивостей харчових продуктів і БАД» (наказ Міністерства освіти й науки України № 654 від 16.11.2005 р.); 1/09-П «Біополімери рослин як

об'єкти хімічної і біологічної модифікації» (наказ Міністерства освіти й науки України № 1043 від 17.11.2008 р.).

**Мета та завдання дослідження.**

Метою роботи є отримання та характеристика білково-полісахаридного комплексу (БПК) з антипротеолітичною активністю та розробка технології його виробництва.

Для досягнення поставленої мети визначено основні завдання дослідження:

- обґрунтування вибору сировини – джерела вилучення інгібітору протеаз;
- виділення та очищення інгібітору трипсину насіння люцерни;
- характеристика інгібітору та дослідження кінетики гідролізу казеїну трипсином в його присутності;
- обґрунтування вибору полісахариду-комплексоутворювача, характеристика БПК з включенням інгібітору трипсину насіння люцерни, здійснення його кінетичних досліджень та отримання БПК з антипротеолітичною активністю з бобів сої;
- характеристика зв'язків інгібітор-матриця та молекулярно-масового складу БПК з антипротеолітичною активністю;
- оптимізація ключових параметрів екстракції та іммобілізації інгібітору трипсину насіння люцерни;
- медико-біологічні та мікробіологічні дослідження БПК, що містить інгібітор трипсину насіння люцерни;
- розробка векторної схеми технологічного процесу виробництва БПК з антипротеолітичною активністю, промислова апробація розробленої технології та оцінка можливості одержання функціональних продуктів харчування з включенням БПК.

*Об'єкти дослідження:* технологія біологічно активних речовин та біологічно активних добавок до їжі.

*Предмет дослідження* – насіння люцерни та бобів сої з антипротеолітичною активністю, білково-полісахаридні комплекси, харчові продукти функціонального призначення.

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

**Наукова новизна отриманих результатів.** Надано всебічну характеристику інгібітору трипсину з насіння люцерни, досліджено його амінокислотний склад, молекулярну масу, вивчено функціонально-фізіологічні властивості.

Розроблено спосіб виділення з екстракту насіння люцерни інгібітору трипсину методом комплексоутворення з полісахаридами та надано характеристику БПК. Показано можливість застосування методу комплексоутворення для вибіркового вилучення з екстрактів бобів сої інгібіторів Кунітца та Баумана-Бірк.

Розроблено технологію БПК з антипротеолітичною активністю на основі інгібітору трипсину насіння люцерни та надано його медико-біологічну оцінку.

Наукову новизну підтверджено 4 патентами України на корисну модель: № 42847, Спосіб одержання інгібітору трипсину; № 42548, Біологічно активна добавка; № 52020, Комплексна біологічно активна добавка; № 48106, Біологічно активна добавка.

**Практичне значення отриманих результатів.** Розроблено технологію переробки насіння люцерни з одержанням БПК, що містить інгібітор трипсину. Оптимізовано основні показники процесу екстракції інгібітору трипсину насіння люцерни та технології БПК з його включенням. Доведено можливість його промислового виробництва; технологію апробовано на науково-виробничому підприємстві «Аріадна», м. Одеса.

Показано можливість одержання функціональних продуктів харчування з включенням БПК, що містить інгібітор трипсину.

**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 розробленої технології БПК. Особистий внесок здобувача підтверджується представленими документами й науковими публікаціями.

**Апробація результатів дисертації.** Основні результати досліджень доповідалися й обговорювалися на 6 наукових конференціях, зокрема на Шостій міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Техника и технология пищевых производств» (м. Могилів, 2008); Четвертій міжнародній науково-практичній конференції «Розвиток наукових досліджень 2008» (м. Полтава, 2008); Всеукраїнській науково-практичній конференції «Сучасні наукові досягнення – 2008» (м. Миколаїв, 2008); I Всеукраїнській науково-практичній конференції «Питання технології та гігієни харчування» (м. Донецьк, 2009); 75-ій науковій конференції молодих вчених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI ст.» (м. Київ, 2009); Всеукраїнській науково-практичній конференції «Сучасні наукові досягнення – 2009» (м. Миколаїв, 2009).

**Публікації.** Результати дисертації опубліковано в 20 друкованих працях, з яких 6 статей у фахових виданнях, 4 патента України на корисну модель № 42847, № 42548, № 52020, № 48106, 5 статей в наукових журналах, тези 5 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 138 сторінках основного тексту, вона містить 36 рисунків (35 сторінки), 36 таблиць (41 сторінки), 10 додатків (95 сторінок), список літературних джерел з 203 найменувань (25 сторінок).

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

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

**У першому розділі** «Інгібітори протеаз та перспективи їх використання в оздоровчому харчуванні» розглянуто рослинні джерела інгібіторів протеаз, висвітлено їх основні джерела, класифікацію, механізм дії та методи вилучення із сировини, а також напрями їх використання.

**У другому розділі** «Матеріали і методи досліджень» викладено відомості про об'єкти і методи досліджень та етапи переробки насіння люцерни з отриманням білково-полісахаридного комплексу. Схему досліджень наведено на рис. 1.

Основну частину досліджень проведено в лабораторіях кафедри харчової хімії ОНАХТ, в лабораторіях біохімії Одеського селекційно-генетичного інституту Національного центру насіннєзнавства і сортовивчення УААН, в лабораторії біохімічної фармакології ДП «Державного національного центру лікарських засобів».

Надано характеристику методів досліджень, як загальнонаукових, так і специфічних (хімічних та біохімічних). Описано методи виділення інгібітору трипсину насіння люцерни з використанням афінної хроматографії, характеристики фізико-хімічних властивостей, кінетики гідролізу казеїну трипсином в присутності інгібітору насіння люцерни.

**У третьому розділі** «Виділення і характеристика інгібітору трипсину» наведено результати досліджень зі скринінгу рослинної сировини на вміст інгібітору трипсину, які показали, що максимальною антипротеолітичною активністю володіє екстракт насіння люцерни сорту Єва в (0,5 М NaCl в 0,1 М ацетатному буфері, рН 7,4). Встановлено, що найбільшою антипротеолітичною активністю володіє альбумінова складова білкової компоненти насіння.

Стадії очищення інгібітору трипсину включали екстракцію, фракціонування білкової складової екстракту амоній сульфатом і афінну хроматографію на біоспецифічному сорбенті трипсин-сефароза 4В.

Встановлено, що найбільшою інгібіторною активністю володіє білкова фракція, що осаджується при ступені насиченості 40...75 %, тобто альбумінова. Її подальше

хроматографування на трипсин-сефарозі (рис.2) дозволило досягти високого ступеню очищення білка-інгібітору від супутніх білків – 95,3.

Це підтверджено результатами електрофоретичних досліджень, які свідчать, що отриманий інгібітор є гомогенним білком з молекулярною масою 20,24 кДа.

В узагальненому вигляді стадії очищення інгібітору наведено в табл. 1.

Одержаний внаслідок очищення інгібітор знижує активність трипсину на 63,05 %. Розрахунки свідчать, що зі 100 г насіння люцерни можна одержати 48,09 мг інгібітору трипсину з активністю 27,6 ІО/мг білка.

Визначено амінокислотний склад інгібітору трипсину та порівняно його з такими соєвих інгібіторів Кунітца та Баумана-Бірк. Встановлено, що на відміну від інгібітору Баумана-Бірк, досліджуваний містить більше залишків проліну, гліцину, валіну, серину, лізину, лейцину, ізолейцину, аспаргінової та глутамінової кислот та менше – цистеїну. За амінокислотним складом інгібітор трипсину насіння люцерни наближується до інгібітору Кунітца. За ступенем гідрофобності білкових молекул розраховано розмір та форму їх глобул. За вмістом гідрофільних груп в ядрах інгібітори трипсину насіння люцерни та Кунітца сої значно відрізняються від інгібітору Баумана-Бірк. Радіуси ядер глобул інгібіторів Кунітца та насіння люцерни практично співпадають та є вдвічі більшими за радіус ядра молекули інгібітору Баумана-Бірк, а показник заповнення його ядра гідрофільними залишками вдвічі більший за такий вищевказаних інгібіторів. На основі отриманих даних інгібітор трипсину насіння люцерни доцільно віднести до родини інгібітору Кунітца.

Таблиця 1

**Стадії очищення інгібітору трипсину з насіння люцерни \***  
(n = 3, p ≥ 0,95)

| Стадії очищення           | 1 стадія<br>(екстракція) | 2 стадія<br>(фракціонування та<br>діаліз) | 3 стадія<br>(афінна<br>хроматографія) |
|---------------------------|--------------------------|---|---------------------------------------|
| Об'єм, см <sup>3</sup>    | 20                       | 130                                       | 67                                    |
| ІА, ІО/см <sup>3</sup>    | 0,14                     | 0,02                                      | 0,19                                  |
| Білок, мг/см <sup>3</sup> | 0,988                    | 0,057                                     | 0,007                                 |
| Загальний білок, мг       | 19,76                    | 7,43                                      | 0,47                                  |
| Сумарна ІА, од            | 2,80                     | 3,03                                      | 13,00                                 |
| Питома ІА, ІО/мг          | 0,142                    | 3,500                                     | 27,600                                |
| Ступінь очищення          | 1,0                      | 12,1                                      | 95,3                                  |
| Вихід, %                  | 100,0                    | 96,0                                      | 68,7                                  |

Примітка: \* Маса вихідної сировини 1 г.

Максимальну активність при фізіологічних значеннях температури (37±1 °С) інгібітор проявляє в діапазоні показників рН 6,8...7,6 (практично 100-відсоткову

активність). У відповідних умовах експерименту рН-оптимум дії трипсину складає 6,0 од. рН, при якому активність інгібітору перевищує 95 % від максимальної.

Як інгібітор, так і трипсин проявляють максимальну, майже 100-відсоткову, активність в діапазоні температури від 0 до 40 °С. При подальшому підвищенні температури активність обох речовин поступово зменшується. Причому трипсин втрачає активність у значно більшій мірі, ніж інгібітор. Так, при 100 °С активність трипсину зменшується майже на 85 %, а інгібітору – тільки на 25 %. Це, з одного боку, свідчить про можливість використання відповідної температури в технології отримання інгібітору, а з іншого є ще одним чинником, який дозволяє прогнозувати активне функціонування інгібітору в умовах реального травлення.

Аналіз даних кінетичних досліджень гідролізу казеїну трипсином в присутності інгібітору з насіння люцерни за Лайнуївером-Берком та Хейнсом показав зростання  $K_M$  зі зростанням концентрації інгібітору при низьких значеннях  $V_{max}$  та високому рівні лінійної залежності, тому спостерігається випадок лінійного конкурентного інгібування (або асоціативне інгібування). Результати подальших розрахунків за графіком Уебба (з урахуванням коефіцієнту лінійної кореляції) дозволяють стверджувати, що інгібування є нелінійним та неповним.

У четвертому розділі «Імобілізація інгібітору трипсину шляхом комплексоутворення» наведено результати вивчення умов комплексоутворення інгібітору з полісахаридом, фізико-хімічні властивості отриманого комплексу, кінетичні параметри його дії, дана порівняльна характеристика білкової компоненти екстракту насіння люцерни та іммобілізованого препарату за молекулярно-масовим складом, а також характеристика його кінетичних параметрів інгібування. Надано оцінку можливості використання даного методу іммобілізації для вилучення, концентрування та стабілізації соєвих інгібіторів Кунітца та Баумана-Бірк без їх попереднього фракціонування.

Встановлено (рис. 3), що найбільш ефективними комплексоутворювачами для інгібітору з екстракту люцерни є пектини, що характеризуються максимальними зарядами (буряковий –  $N = 0,92$  ммоль NaOH/г; цитрусовий –  $N = 0,87$  ммоль NaOH/г; яблучний –  $N = 0,76$  ммоль NaOH/г) в ІЕТ інгібітору, яку було визначено нефелометричним методом (рН 4,0).

Ступінь концентрування інгібітору також залежить від концентрації полісахариду: при концентрації пектину 0,2 % вихід інгібітору становить 85 %. Використання цитрусового пектину як комплексоутворювача дозволяє досягти значного ступеню очищення інгібітору від інших білків (у 47 разів). Отже метод комплексоутворення за ефективністю концентрування білка можна порівнювати з іонообмінною хроматографією та хроматофокусуванням.

Визначено рН- та термооптимум, а також рН- (рис. 4) та термостабільність іммобілізованого інгібітору (рис. 5) та порівняно їх з відповідними характеристиками вільного

інгібітору (очищеного афінною хроматографією). рН-Оптимум іммобілізованого інгібітору дещо розширений порівняно з таким вільного інгібітору та знаходиться в діапазоні значень рН від 6,0 до 7,6 при фізіологічній температурі ( $37\pm 1$ ) °С. Оптимальна температура його дії становить ( $37\pm 2$ ) °С.

Діапазон максимальної стабільності інгібітору в результаті іммобілізації не змінюється і складає рН 6,8...7,6, однак іммобілізований інгібітор залишається більш стабільним, ніж вільний, протягом всього терміну інкубації при низьких значеннях рН. Після 20 хвилин інкубації при рН 2,5 активність іммобілізованого препарату зменшується тільки на 1,5 %, а через 120 хвилин – на 12 %, тоді як така вільного інгібітору знижується до 97,95 та 86,54 % від максимальної, відповідно. Таким чином, на відміну від вільного інгібітору, іммобілізований має більшу рН-стабільність.

Іммобілізований препарат є більш термостабільним порівняно з вільним інгібітором (рис. 5). Його активність протягом 120 хвилин знижується до 46 %. Це дозволяє прогнозувати можливість використання відповідних температурних режимів (до 80 °С) в технології виробництва іммобілізованого інгібітору та функціональних продуктів з його включенням.

Характеристику молекулярно-масового складу білкових компонент екстракту насіння люцерни та БПК здійснювали, використовуючи електрофорез у 15 % поліакриламідному гелі (ПААГ) у присутності натрій додецилсульфату (НДС) (рис. 6) та гель-хроматографію на сорбенті Sephacryl S-200 Superfine (рис. 7 та 8).

Встановлено (табл. 2), що за молекулярно-масовим складом білкові компоненти екстракту та білково-полісахаридного комплексу суттєво відрізняються.

Якщо білок екстракту містить 33,22 % фракцій, що не розділяються за допомогою електрофорезу (тобто з молекулярними масами більшими за 92 кДа), то внаслідок комплексоутворення їх вміст значно (на 28,97 %) зменшується.

Отже, іммобілізація сприяє концентруванню переважно низькомолекулярних білків, в тому числі і інгібітору. Таким чином, вміст інгібітору в комплексі значно (в 47 разів) перевищує його кількість в білковій складовій екстракту.

Результати обробки даних експерименту з визначення кінетичних параметрів інгібування трипсину іммобілізованим інгібітором показали, що включення інгібітору до складу комплексу істотно не змінює його кінетичних властивостей у порівнянні з вільним. Єдиним виключенням є те, що при високій ( $0,256 \text{ г/дм}^3$ ) концентрації інгібітору його взаємодія з ферментом описується вже не степенною, а показовою залежністю. Це може вказувати на зміну стехіометрії зв'язування інгібітору з ферментом. Таким чином, встановлено, що іммобілізація на полісахаридній матриці не впливає на тип інгібування.

Утворення комплексу інгібітору трипсину насіння люцерни з цитрусовим пектином є результатом слабких неспецифічних взаємодій між білком та полісахаридом. В їх числі домінують електростатичні (більше 90,0 %), вклад водневих зв'язків в стабілізацію комплексу сягає 7,0 %, а ступінь гідрофобних взаємодій є мінімальним (біля 0,6 %).

Таблиця 2

**Молекулярно-масовий склад білкових фракцій екстракту та  
білково-полісахаридного комплексу**

| Середня молекулярна маса<br>білкової фракції, кДа | Вміст фракції в білковій<br>складовій екстракту, % | Вміст фракції в білковій<br>складовій комплексу, % |
|---|--|--|
| 8,0   | 0,05   | 10,45  |
| 12,0  | 0,02   | 6,01   |
| 18,2  | 26,12  | 21,68  |
| 20,5  | 0,74   | 35,00  |
| 32,0  | 20,05  | 19,75  |
| 50,0  | 0,13   | 2,08   |
| 61,7  | 19,47  | 0,48   |
| 100,0   | 15,12  | 1,55   |
| 110,0   | 6,26   | 0,92   |
| 200,0   | 2,54   | 0,79   |
| 600,0   | 9,30   | 0,99   |

Показано можливість застосування методу комплексоутворення для вилучення інгібіторів Кунітца та Баумана-Бірк з екстрактів соєвих бобів. Внаслідок використання в якості комплексоутворювача цитрусового пектину отримано комплекс з інгібітором Баумана-Бірк з виходом біля 90,0 % від його вмісту в екстракті. Наступна обробка рідкої фази після відокремлення комплексу пектин-інгібітор Баумана-Бірк розчином агару привела до осадження 82,5 % інгібітору Кунітца у вигляді комплексу білок-полісахарид. Це дає можливість вибіркового вилучення кожного з соєвих інгібіторів з однієї порції екстракту, що значно спрощує технологію їх виробництва.

У п'ятому розділі «Розробка технології білково-полісахаридного комплексу з антипротеолітичною активністю» наведено векторну схему технологічного процесу виробництва БПК; обґрунтовано раціональні параметри ключових технологічних операцій, технологічні та апаратурні схеми.

Встановлено залежність антипротеолітичної активності ( $IA_p$ ) білка-інгібітору від температури екстракції ( $t$ ), гідромодуля ( $ГМ$ ) та тривалості процесу ( $\tau$ ). Отримано рівняння регресії, що описує залежність інгібіторної активності екстракту ( $IA_p$ ) від досліджуваних факторів:

$$IA_p = 0,22375 + 0,04425 \cdot GM - 0,011 \cdot GM \cdot \tau + 0,01425 \cdot \tau \cdot t. \quad (1)$$

Отримані оптимальні значення, що відповідають максимуму інгібіторної активності (0,290 ІО/мг білка):  $\tau = 10$  хв.;  $t = 0$  °С;  $GM = 100$ .

Однак, з точки зору технологічності процесу екстракції та зменшення необхідної кількості води, процес екстракції доцільно проводити при мінімально можливому гідромодулі, який становить 20. Тоді інгібіторна активність за цих раціональних умов ( $\tau = 10$  хв.;  $t = 0$  °С;  $GM = 20$ ) складає 0,183 ІО/мг білка.

Отримано рівняння регресії, що описує залежність активності іммобілізованого на цитрусовому пектині інгібітору трипсину ( $IA_p$ ) від досліджуваних факторів:

$$IA_p = 0,562 - 0,0315 \cdot t - 0,0165 \cdot t \cdot \tau + 0,01525 \cdot t \cdot C + 0,01525 \cdot \tau \cdot C. \quad (2)$$

Отримані оптимальні значення, що відповідають максимуму інгібіторної активності становлять:  $\tau = 180$  хв.;  $t = 0$  °С;  $C = 0,1$  %. При цьому активність інгібітору дорівнює 0,610 ІО/г осаду.

Розроблено векторну схему технологічного процесу виробництва білково-полісахаридного комплексу (рис. 9).

Для визначення оптимальних параметрів процесу іммобілізації досліджували вплив температури процесу комплексоутворення ( $t$ ), концентрації цитрусового пектину ( $C$ ) та тривалості процесу ( $\tau$ ) на інгібіторну активність БПК.

Технологію виробництва БПК апробовано на науково-виробничому підприємстві «Аріадна», м. Одеса. Отриманий в промислових умовах комплекс відповідає необхідним санітарно-гігієнічним, токсикологічним, мікробіологічним, фізико-хімічним та органолептичним нормам.

Сукупність даних мікробіологічних досліджень та вивчення динаміки зміни інгібіторної активності БПК дозволяє рекомендувати його зберігання впродовж 12 місяців за температури  $(4 \pm 2)$  °С.

За даними медико-біологічних досліджень профілактичне введення БПК в дозі 0,225 г/кг виявляє позитивний вплив на показники систем згортання та фібринолізу крові тварин при експериментальному фібринолізі, що проявляється в тенденції зниження підвищених при патології показників згортання та фібринолітичної активності, та у збільшенні зниженої концентрації фібриногену. Добова доза для людини складає 2,5 г.

Собівартість місячного курсу БПК для перорального застосування складає 117,76 грн.

## ВИСНОВКИ

1. На основі результатів теоретичних та експериментальних досліджень розроблено технологію білково-полісахаридного комплексу. Отримано рослинний білково-полісахаридний комплекс з антипротеолітичною активністю та надано його характеристику.

2. Показано, що перспективним джерелом інгібітору протеаз є насіння люцерни, антипротеолітична активність якого складає 0,142 ІО/мг білка. Обґрунтовано умови вилучення інгібітору з сировини – екстракція NaCl концентрацією 0,5 М в 0,1 М ацетатному буфері, рН 7,4, гідромодуль 20.

3. Розроблено схему очищення інгібітору, яка включає етапи фракціонування білкової компоненти насіння люцерни амоній сульфатом та афінну хроматографію на трипсин-сефарозі 4В; ступінь очищення – 95,3, питома інгібіторна активність – 27,6 ІО/мг білка.

4. Визначено фізико-хімічні властивості інгібітору: рН оптимум – 7,4...7,6 при температурі  $(37\pm 2)$  °С, термооптимум –  $(37\pm 2)$  °С. Інгібітор є мономерним, його молекулярна маса – 20,24 кДа, ізоелектрична точка – 4,0. За амінокислотним складом інгібітор відповідає родині Кунітца і містить залишки лізину, серину, аспарагінової та глутамінової кислот в кількості, необхідній для проявлення антипротеолітичної активності. Інгібування трипсину інгібітором з насіння люцерни здійснюється за нелінійним неповним конкурентним типом (асоціативне інгібування).

5. Розроблено умови іммобілізації інгібітору трипсину методом комплексоутворення з полісахаридами: комплексоутворювач – цитрусовий пектин, максимальний заряд якого в кислій області значень рН відповідає ізоелектричній точці білка-інгібітору, а його концентрація в рідкій фазі – 0,2 %. Іммобілізація сприяє розширенню рН- і термооптимуму інгібітору, підвищенню його термостабільності; максимальна активність проявляється за фізіологічних значень температури  $((37\pm 2)$  °С). Іммобілізація не призводить до зміни типу інгібування. Обґрунтовано можливість використання комплексоутворення для іммобілізації соєвих інгібіторів Кунітца та Баумана-Бірк.

6. Показано, що іммобілізація здійснюється за рахунок утворення водневих зв'язків між інгібітором та пектином, електростатичних та гідрофобних взаємодій; у складі іммобілізованого інгібітору переважають низькомолекулярні білки (біля 93 %) молекулярною масою 8,0 – 20,5 кДа.

7. Обґрунтовано раціональні режими процесів екстракції (температура – 0 °С, тривалість – 10 хв., гідромодуль – 20) та іммобілізації інгібітору (температура – 0 °С, тривалість – 180 хв., концентрація пектину – 0,2 %).

8. Здійснено медико-біологічні та мікробіологічні дослідження білково-полісахаридного комплексу, встановлено добову дозу його прийому (2,5 г) та термін зберігання (12 місяців).

9. Обґрунтовано технологію білково-полісахаридного комплексу, яка включає екстракцію інгібітору, іммобілізацію, сушіння. Розроблену технологію реалізовано у виробництві на ТОВ НВП „Аріадна” (м. Одеса). Розроблено нормативну та технологічну документацію на виробництво білково-полісахаридного комплексу. Показано можливість його використання як харчового функціонального інгредієнту.

### Список робіт, опублікованих за матеріалами дисертації

1. Крусір, Г. В. Насіння люцерни як джерело інгібіторів протеолітичних ферментів [Текст] / Г.В. Крусір, В.В. Петков, Я.П. Русева // Прогресивні техніка та технології харчових виробництв ресторанного господарства і торгівлі: зб. наук. пр. ХДУХТ. – Х., 2008. – Вип. 1 (7). – С. 329–333.
2. Крусір, Г. В. Порівняльна характеристика антипротеолітичної активності насіння різних видів сімейства бобових [Текст] / Г. В. Крусір, Л. Л. Лобоцька, Я. П. Русева // Прогресивні техніка та технології харчових виробництв ресторанного господарства і торгівлі: зб. наук. пр. ХДУХТ. – Х., 2008. – Вип. 2 (7). – С. 528–532.
3. Розробка технології пшеничного хліба з підвищеною харчовою цінністю [Текст] / О. В. Мельніченко, Т. Є. Лебеденко, Г. В. Крусір, Я. П. Русева // Наук. пр.. ОНАХТ. – О., 2008. – Вип. 34, т. 1. – С. 193–199.
4. Черно, Н. К. Фізико-хімічні властивості інгібітору трипсину насіння люцерни [Текст] / Н. К. Черно, Г. В. Крусір, Я. П. Русева // Харчова наука і технологія. – 2008. – № 4. – С. 12–13.
5. Черно, Н. К. Виділення інгібітора трипсину насіння люцерни з використанням афінної хроматографії [Текст] / Н. К. Черно, Г. В. Крусір, Я. П. Русева // Харчова наука і технологія. – 2009. – № 1. – С. 44–48.
6. Черно, Н. К. Молекулярно-масовий склад білків екстракту насіння люцерни та БАД, що містить інгібітор трипсину [Текст] / Н. К. Черно, Г. В. Крусір, Я. П. Русева // Зернові продукти і комбікорми. – 2009. – № 1. – С. 19–22.
7. Виділення інгібітора трипсину насіння люцерни з використанням холодильної технології [Текст] / Н. К. Черно, Г. В. Крусір, О. В. Севастьянова, Я. П. Русева // Обладнання та технології харчових виробництв: темат. зб. наук. пр. ДонНУЕТ. – Донецьк, 2009. – Вип. 21. – С. 314–321.
8. Черно, Н. К. Порівняльна характеристика фізико-хімічних властивостей інгібітору трипсину насіння люцерни та БАД на його основі [Текст] / Н. К. Черно, Г. В. Крусір, Я. П. Русева // Прогресивні техніка та технології харчових виробництв ресторанного господарства і торгівлі: зб. наук. пр. ХДУХТ. – Х., 2009. – Вип. 1 (9). – С.547–552.

9. Черно, Н. К. Біологічно активні добавки на основі інгібітору трипсину насіння люцерни [Текст] / Н. К. Черно, Г. В. Крусір, Я. П. Русєва // Зернові продукти і комбікорми. – 2009. – № 3. – С. 22–25.
10. Крусір, Г. В. Імобілізація біорегуляторів системи травлення як метод їх концентрування та одержання БАД [Текст] / Г. В. Крусір, Я. П. Русєва, Н. А. Кушнір // Наук. пр. ОНАХТ. – О., 2009. – Вип. 36, т. 1. – С. 26–30.
11. Пат. на корисну модель 42847. Україна МПК (2009) А61К 38/00, А61К 36/00 Спосіб одержання інгібітора трипсину [Текст] / Черно Н. К., Крусір Г. В., Русєва Я. П.; власник Одес. нац. акад. харч. технологій. – № у 2009 01282; заявл. 16.02.2009; опубл. 27.07.2009, Бюл. № 14.
12. Пат. на корисну модель 42548. Україна МПК (2009) А23L 1/30; А23L 1/308. Біологічно активна добавка [Текст] / Черно Н. К., Крусір Г. В., Русєва Я. П.; власник Одес. нац. акад. харч. технологій. – № у 2009 01246; заявл. 16.02.2009; опубл. 10.07.2009, Бюл. № 13.
13. Пат. на корисну модель 45020. Україна МПК (2009) А23L 1/30; А23L 1/308. Комплексна біологічно активна добавка [Текст] / Черно Н. К., Крусір Г. В., Русєва Я. П.; власник Одес. нац. акад. харч. технологій. – № у 2009 04437; заявл. 5.05.2009; опубл. 26.10.2009, Бюл. № 20.
14. Пат. на корисну модель 48106. Україна МПК (2009) А23L 1/30; А23L 1/308. Біологічно активна добавка [Текст] / Черно Н. К., Крусір Г. В., Русєва Я. П.; власник Одес. нац. акад. харч. технологій. – № у 2009 08813; заявл. 25.08.2009; опубл. 10.03.2010, Бюл. № 5.
15. Черно, Н. К. Імобілізація соєвих інгібіторів комплексоутворенням з полісахаридами [Текст] / Н. К. Черно, Г. В. Крусір, Я. П. Русєва // Новітні тенденції у харчових технологіях та якість і безпечність продуктів : зб. ст. II Всеукр. наук.-практ. конф., Львів, 22 – 23 квіт. 2010 р. – Л., 2010. – С. 108–111.
16. Русєва, Я. П. Сравнительная характеристика антипротеолитической активности семян люцерны различных сортов [Текст] / Я. П. Русєва // Техника и технология пищевых производств: тез. докл. VI Междунар. науч. конф. студентов и аспирантов, Могилёв, 24-25 апр. 2008 г. / УО МГУП. – Могилёв, 2008. – С. 66–67.
17. Кушнір, Н. А. Белковые ингибиторы пищеварительных ферментов [Текст] / Н. А. Кушнір, Я. П. Русєва // Розвиток наукових досліджень 2008: тези доп. Четвертої міжнар. наук.-практ. конф., Полтава, 24-26 листопада 2008 р. – Полтава, 2008. – Т. 7. – С. 71–72.

18. Кушнір, Н. А. Фізико-хімічні властивості рослинних інгібіторів гідролітичних ферментів [Текст] / Н. А. Кушнір, Я. П. Русєва // Сучасні наукові досягнення–2008: зб. матер. всеукр. наук.-практ. конф., Миколаїв: в 3-х т., Т. II. –Миколаїв, 2008. – С. 292–294.
19. Русєва, Я. П. Вивчення молекулярно-масового складу білкової компоненти екстракту насіння люцерни та БАД, що містить інгібітор трипсину [Текст] / Я. П. Русєва // Питання технології та гігієни харчування: матер. I Всеукр. наук.-практ. конф., Донецьк, 8 – 9 квіт. 2009 р. – Донецьк, 2009. – С. 64.
20. Русєва, Я. П. Фізико-хімічні властивості інгібітору трипсину як важливі фактори створення БАД на його основі [Текст] / Я. П. Русєва, Ю. О. Рибальченко // 75 наук. конф. молодих учених, асп. і студ., Київ, 13 – 14 квіт. 2009 р. «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI ст.»: тез. доп. – К., 2009. – Ч. 3. – С. 301.

*Особистий внесок:*

1. Аналіз даних літератури, проведення експериментальних досліджень щодо всебічної характеристики інгібітору трипсину, виділеного з рослинної сировини, обробка та узагальнення отриманих результатів, підготовка до друку (поз. 1 – 10, 15 – 21).

2. Вивчення фізико-хімічних властивостей вільного інгібітору та його іммобілізованої форми, обробка отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку (поз. 4, 8, 18, 21).

3. Проведення дослідження щодо іммобілізації інгібітору трипсину на полісахаридних матрицях, обробка отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку (поз. 9, 10, 15, 16).

4. Проведення експериментальних досліджень, узагальнення отриманих результатів, проведення патентного пошуку та оформлення патентів на корисну модель (поз. 11 – 14).

## АНОТАЦІЯ

Русєва Я.П. Технологія білково-полісахаридних комплексів з антипротеолітичною активністю. – 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 України, Одеса, 2010.

Дисертація присвячена розробці технології отримання білково-полісахаридного комплексу з антипротеолітичною активністю.

Значна увага в роботі приділяється всебічній характеристиці інгібітору трипсину, виділеного з насіння люцерни: характеристика складу та фізико-хімічних властивостей, визначення кінетичних параметрів гідролізу казеїну трипсином в присутності інгібітору з

насіння люцерни; а також дослідженню умов його іммобілізації та характеристикі отриманого білково-полісахаридного комплексу.

Доведено доцільність використання білкової складової насіння люцерни як ефективного інгібітору трипсину в складі білково-полісахаридного комплексу. Інгібітор виділено зі знежиреного насіння люцерни екстракцією NaCl концентрацією 0,5 М в 0,1 М ацетатному буфері, рН 7,4. Визначено, що активною по відношенню до трипсину є альбумінова фракція насіння люцерни.

Встановлено, що за фізико-хімічними показниками білок-інгібітор є стійким до дії рН та температури середовища. Охарактеризовано його амінокислотний склад та форму білкової молекули. За специфічністю дії інгібітор є монофункціональним.

Здійснено іммобілізацію інгібітору трипсину насіння люцерни методом комплексоутворення з полісахаридом.

Надано характеристику складу отриманого комплексу, встановлено, що шляхом іммобілізації можна досягти значного концентрування інгібітору. Іммобілізація не призводить до зміни механізму інгібування дії трипсину.

Розроблено та економічно обґрунтовано технологію отримання білково-полісахаридного комплексу з антипротеолітичною активністю. Технологія отримання комплексу включає такі основні етапи: екстракція інгібітору, його іммобілізація комплексоутворенням з полісахаридом, сушіння отриманого комплексу. Розроблено технічні умови та технологічну інструкцію на виробництво білково-полісахаридного комплексу. Реальність технології підтверджено результатами промислової апробації на біотехнологічному підприємстві. Показано можливість використання білково-полісахаридного комплексу у складі функціональних продуктів харчування.

**Ключові слова:** інгібітор трипсину, комплексоутворення, полісахарид, іммобілізація.

## АННОТАЦІЯ

Русева Я.П. Технология белково-полисахаридных комплексов с антипротеолитической активностью. – 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 Украины, Одесса, 2010.

Диссертация посвящена разработке технологии получения белково-полисахаридного комплекса с антипротеолитической активностью.

Значительное внимание в работе уделяется всесторонней характеристике ингибитора трипсина, выделенного из семян люцерны: изучению его состава и физико-химических свойств, определению кинетических параметров гидролиза казеина трипсином в присутствии полученного ингибитора; разработке условий его иммобилизации и характеристике полученного белково-полисахаридного комплекса.

Установлено, что ингибитор трипсина семян люцерны имеет белковую природу.

Белковую компоненту с антипротеолитической активностью выделяли из обезжиренных семян люцерны экстракцией NaCl концентрацией 0,5 М в 0,1 М ацетатном буфере, рН 7,4, гидромодуль 20. Ее фракционирование с помощью аммоний сульфата с последующей аффинной хроматографией на биоспецифическом сорбенте трипсин-сефароза 4В и дальнейшая характеристика ингибиторной активности полученных фракций позволили установить, что активной по отношению к трипсину является альбуминовая фракция.

Изучены физико-химические свойства свободного ингибитора. Установлены рН- и термооптимумы его действия, при которых проявляется максимальная эффективность ингибирования. Доказано, что он является мономерным белком с изоэлектрической точкой в кислой области рН.

Сравнительная характеристика аминокислотного состава и формы белковых молекул ингибитора люцерны и соевых ингибиторов протеаз Кунитца и Баумана-Бирк показала его сходство с ингибитором Кунитца. По специфичности действия ингибитор является монофункциональным.

Установлено, что ингибирование действия трипсина ингибитором происходит по нелинейному неполному конкурентному механизму.

Проведена иммобилизация ингибитора трипсина методом комплексообразования с полисахаридом. Разработаны условия получения белково-полисахаридного комплекса с максимальным сохранением антипротеолитической активности.

Охарактеризован состав полученного комплекса и установлено, что с помощью иммобилизации можно достичь значительного концентрирования ингибитора из экстракта. Молекулярно-массовый состав белковой составляющей комплекса в сравнении с таковым экстракта показал эффективность концентрирования низкомолекулярного ингибитора его комплексообразованием с полисахаридом.

Исследование физико-химических свойств белково-полисахаридного комплекса свидетельствует о расширении рН- и термооптимума ингибитора и повышении его термостабильности.

Кинетические исследования гидролиза казеина трипсином в присутствии иммобилизованного ингибитора свидетельствуют о сохранении механизма ингибирования неизменным.

Установлено, что в образовании комплекса ингибитор-полисахарид принимают участие водородные и электростатические связи, гидрофобные взаимодействия.

Показана возможность применения метода комплексообразования для иммобилизации ингибиторов Кунитца и Баумана-Бирк соевых бобов. Установлено, что с помощью данного метода можно их эффективно концентрировать и разделить, что значительно упрощает технологию.

Обоснованы рациональные режимы процессов экстракции ингибитора трипсина семян люцерны и его иммобилизации комплексообразованием с полисахаридом.

Разработана и экономически обоснована технология получения белково-полисахаридного комплекса с антипротеолитической активностью, которая включает экстракцию ингибитора, его иммобилизацию комплексообразованием с полисахаридом, отделение комплекса от жидкой фазы, сушку и фасовку полученного белково-полисахаридного комплекса.

Реальность разработанной технологии подтверждена результатами ее промышленной апробации на биотехнологическом предприятии ООО НПО „Ариадна”. Результаты медико-биологических исследований показали, что введение белково-полисахаридного комплекса в пищевые рационы оказывает положительный эффект на показатели системы свертывания крови, способствует увеличению пониженной концентрации фибриногена. Рекомендованная суточная доза для человека составляет 2,5 г. Разработаны технические условия и технологическая инструкция на производство белково-полисахаридного комплекса. Показана возможность использования белково-полисахаридного комплекса в составе функциональных продуктов питания.

**Ключевые слова:** ингибитор трипсина, комплексообразование, полисахарид, иммобилизация.

## ABSTRACT

Ruseva Y. Technology of protein-polysaccharide complexes with antiproteolytic activity. – Manuscript.

Dissertation on the reception of PhD of Engineering Sciences scientific degree by specialty 03.00.20 – biotechnology (technical sciences). – Odessa national academy of food technologies of Department of education and science of Ukraine, Odessa, 2010.

Dissertation is devoted to reception technology development of protein-polysaccharide complex with antiproteolytic activity. Considerable attention is paid in full characterization of trypsin inhibitor isolated from the seeds of alfalfa: composition and physico-chemical property characteristic, de-

termination of casein hydrolysis kinetic parameters in the presence of trypsin inhibitor from alfalfa seed; study of the conditions of protein-polysaccharide complex immobilization and characterization.

Prove the feasibility of using the protein component of alfalfa seeds as an effective trypsin inhibitor in the BPC. The inhibitor was isolated from defatted alfalfa seed by NaCl (concentration 0,5 M) in 0,1 M acetate buffer (pH 7,4) extraction. In order to determine the inhibitor composition and anti-proteolytic activity of alfalfa seed individual protein components held protein component fractionation with ammonium sulfate. Determined that alfalfa seed albumin fraction had the antitrypsin activity.

It was established that the physicochemical characteristics of protein-inhibitor are resistant to pH and temperature environment. Its amino acid composition and form of the protein molecule were also characterized. The inhibitor is monofunctional by the specificity.

The immobilization of alfalfa seed trypsin inhibitor by the method of complexation with polysaccharides was carried out.

Composition of the complex was characterized and found that with the help of immobilization significant concentration of the inhibitor from the extract can be achieved. The mechanism of trypsin inhibition did not change as a result of immobilization.

The technology of protein-polysaccharide complex with antiproteolytic activity is developed and economically justified. The complex obtaining technology includes the following main stages: the protein inhibitor selection from the alfalfa seed extract and immobilization by complexforming with the polysaccharide, drying of obtained complex. The reality of technology is confirmed by the results of industrial testing at the biotechnological company, regulatory documentation is developed. The possibility of using protein-polysaccharide complex in the functional food is shown.

**Keywords:** trypsin inhibitor, complex, polysaccharide, immobilization.



Підписано до друку 4.11.2010. Формат 60×90/16. Ум.-друк. арк. 0,9.

Наклад 100 прим. Замовлення № \_\_\_\_

---

**Одеська національна академія харчових технологій**

65039, Україна, м. Одеса, вул. Канатна, 112.