

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ «ЗАПОРІЗЬКА  
ПОЛІТЕХНІКА»

Ленерт С.О., Дубініна А.А., Зайцева В.М.,  
Кукліна Т.С., Прусс В.Л.

**ОПТИМІЗАЦІЯ ПАРАМЕТРІВ  
РЕАКЦІЇ ФЕРМЕНТАТИВНОГО  
ГІДРОЛІЗУ  
γ-ОРИЗАНОЛУ**

МОНОГРАФІЯ

ЗАПОРІЖЖЯ

2025

УДК 664.663  
О-62

*Рекомендовано до друку Вченою радою НУ «Запорізька політехніка»,  
протокол № \_\_\_ від \_\_\_\_\_ 2025 р*

**Рецензенти:**

**Марценюк Л.В.** – д.е.н., професор, професор економіки та менеджменту Українського державного університету науки і технологій.

**Фоцан А.Л.** – д.т.н., професор, професор кафедри харчових технологій в ресторанній індустрії, Державного біотехнологічного університету.

**О-62 Ленерт С.О., Дубініна А.А., Зайцева В.М., Кукліна Т.С., Прусс В.Л.**

Оптимізація параметрів реакції ферментативного гідролізу  $\gamma$ -оризанолу: Монографія. – Запоріжжя : НУ «Запорізька політехніка», 2025. – 180 с.: іл.

ISBN 978-617-529-486-4

В монографії розглянуто гідролітичну активність щодо  $\gamma$ -оризанолу ліпази *Candida rugosa* типу VII та ферментного препарату Pentopan BG 500. На модельних системах досліджено та визначено закономірності впливу на ферментативне розщеплення  $\gamma$ -оризанолу параметрів проведення реакції. Розроблено режим проведення гідролізу  $\gamma$ -оризанолу. За допомогою математичного моделювання розроблено математичні моделі ферментативного гідролізу  $\gamma$ -оризанолу, які дають можливість керувати процесом та забезпечити гарантований вихід продуктів конверсії. Науково обґрунтовано технології виробництва бездріжжового хліба з використанням продуктів переробки гречки та проса та ферментативного препарату Pentopan BG500.

**УДК 664.663**

ISBN 978-617-529-486-4

© Ленерт С.О., Дубініна А.А., Зайцева В.М.,  
Кукліна Т.С., Прусс В.Л., 2025  
© Національний університет «Запорізька  
політехніка», 2025

## ЗМІСТ

	Стор.
Вступ	8
РОЗДІЛ 1.АНАЛІТИЧНИЙ ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	9
1.1. Властивості, фізіологічні ефекти рослинних стеролів та можливості використання в харчових продуктах	9
1.2. Характеристика ферментних препаратів, що використовуються для проведення гідролізу $\gamma$ -оризанолу	23
1.3. Використання гречки та проса у продуктах спеціального призначення	35
Висновки за розділом	51
РОЗДІЛ 2.ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ	53
2.1. Характеристика об'єктів дослідження	53
2.2. Методи дослідження	53
2.3. Методи математичного моделювання	59
2.3.1. Моделювання оптимальних режимів проведення гідролізу $\gamma$ -оризанолу ферментними препаратами	59
2.3.2 Моделювання рецептурного складу нових видів хліба	63
Висновки за розділом	65
РОЗДІЛ 3. ТЕОРЕТИЧНЕ ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ПАРАМЕТРІВ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГІДРОЛІЗУ $\gamma$ -ОРИЗАНОЛУ	66
3.1. Аналіз продуктів гідролізу $\gamma$ -оризанолу	66
3.2. Ферментативний гідроліз $\gamma$ -оризанолу порошком підшлункової залози бика	68
3.2.1. Визначення гідролітичної активності порошку підшлункової залози бика.	68
3.2.2. Вплив температури на гідроліз $\gamma$ -оризанолу.	70
3.2.3. Гідролітична активність порошку підшлункової залози в присутності таурохолату натрію.	72
3.2.4. Визначення оптимального співвідношення фермент/субстрат/буфер для проведення раціонального ферментативного гідролізу $\gamma$ -оризанолу.	76
3.2.5. Механічний вплив на конверсію гідролізу $\gamma$ -оризанолу з порошком підшлункової залози бика.	83

3.2.6. Визначення періоду інкубації для оптимального і повного гідролізу $\gamma$ -оризанолу.	85
3.3. Вивчення іммобілізації порошку підшлункової залози бика	87
3.4. Використання інших препаратів для гідролізу $\gamma$ -оризанолу	94
3.4.1. Визначення гідролітичної активності ліпази та ферулоїлестерази у ферментних препаратах ліпази і ксилонази.	95
3.4.2. Ферментативний гідроліз $\gamma$ -оризанолу ліпазами.	100
3.4.3. Ферментативний гідроліз $\gamma$ -оризанолу комерційним препаратом Pentopan BG500.	106
3.5. Розробка рецептур та технологій виробництва хлібних виробів на основі продуктів переробки гречки та проса	115
Висновки за розділом	136
<b>ВИСНОВКИ</b>	139
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ</b>	141
Додатки	165
ДОДАТОК А. Розчини для гідролізу $\gamma$ -оризанолу ферментними препаратами й використовувані при цьому прилади, допоміжні засоби і матеріали	165
ДОДАТОК Б. Опис умов хроматографування та спектроскопіювання	169
ДОДАТОК В. Модельовання рецептур нових видів хліба	172

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ВООЗ (WHO) – Всесвітня організація охорони здоров'я (World Health Organization)

ГДК – гранично допустима концентрація

ДДТ – трихлорметилди(п-хлорфеніл)метан

ДХ – домінуюча характеристика

ІАА – інтегральну антиоксидантну активність

ІОБ НААН – Інститут овочівництва і баштанництва Національної академії аграрних наук України

КЧ – кислотне число

МКО – Міжнародна комісія з освітлення

МНЖК – мононенасичені жирні кислоти

НЖК – насичені жирні кислоти

ПАТТЕРН – Planning Assistance Through Technical Evaluation of Relevance Numbers

ПНЖК – поліненасичені жирні кислоти

ПЧ – перекисне число

РХ – рецесивна характеристика

ФАО (FAO) – Продовольча та сільськогосподарська організація

ООН ( Food and Agriculture Organization)

АСАТ – Ацил-коа:холестерин-ацилтрансфераза

Ala – аланін

Asp – аспаригінова кислота

CAL-A – *Candida antarctica* липаза Тип А

CAL-B – *Candida antarctica* липаза Тур В  
EC – номер – номер комісії по ферментам  
FID – полум’яно-іонізаційний детектор  
FRAP – Ferric Reducing / Antioxidant Power  
GC – газовий хроматограф, газова хроматографія  
Gln – Glutamin  
Glu – Glutamat  
Gly – Glycin  
His – Histidin  
TAC – Total Antioxidant Capacity  
SMT – стеролметилтрансфераза

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Створення продуктів оздоровчого сегмента – це найбільш актуальний напрям інноваційних розробок харчової індустрії сучасного світу. Одним із поширених методів отримання таких продуктів є використання фізіологічно-функціональних інгредієнтів. Використання харчових волокон, макро- та мікроелементів, вітамінів, фенольних речовин, поліненасичених жирних кислот та інших функціональних речовин у складі рецептурних інгредієнтів дозволило вченим створити окремий напрям у класифікаційному просторі харчових продуктів.

Проте ще багато корисних функціональних речовин залишаються незатребуваними належною мірою. Це відноситься до таких сполук, як фітостероли, які мають антиоксидантні, антиканцерогенні, протизапальні, антибактеріальні, протиатерогенні властивості, а головне – вони здатні знижувати рівень холестерину в крові, що сприяє зменшенню ризику виникнення коронарної хвороби серця.

Україна належить до країн, у яких понад 50% населення помирають від серцево-судинних захворювань, однією з причин виникнення яких є підвищений рівень холестерину у крові. Поширеність захворювань системи кровообігу, пов'язаних зі способом життя та нераціональним харчуванням, залишається актуальною проблемою охорони здоров'я населення України [1].

Використання рослинної сировини у вигляді натуральних овочевих, плодово-ягідних і злакових наповнювачів, рослинних жирів сприяє ефективному поліпшенню асортименту продуктів харчування нового покоління, збагачених біологічно активними сполуками, у тому числі фітостеролами, які мають функціональні властивості [2].

# РОЗДІЛ 1.

## АНАЛІТИЧНИЙ ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Властивості, фізіологічні ефекти рослинних стеролів та можливості використання в харчових продуктах

Стероли дуже поширені в природі й залежно від походження поділяються на зоостероли (холестерин) і рослинні стероли – фітостероли і фітостаноли.

Рослинні стероли є структурними компонентами рослинних клітин і виконують у їх мембранах ті самі функції, що і холестерин у клітинах тварин. У рослинах вони містяться у вільній формі у вигляді ефірів із жирними чи фенольними кислотами (наприклад, феруловою), зв'язаними з моносахаридами, або ацитильованих глікозидів фітостеролів. У рослинах ідентифіковано більше ніж 250 фітостеролів, але найбільш розповсюдженими є  $\beta$ -ситостерин, кампестерин, сигмастерин, брассікастерин. Менш поширеними є фітостаноли, які відрізняються від фітостеролів тим, що в структурі їх стероїдних кілець відсутні подвійні зв'язки. Станоли є повністю насиченими формами стеринів [3–6]. Фітостероли, як і холестерин, синтезуються зі скваленів, які належать до групи тритерпенових [6; 7], тому за хімічною структурою є його аналогами.

Під час біосинтезу рослинних стеролів відбуваються більш ніж 30 ферментативно каталізованих реакцій. Фітостероли – це продукти ізопропеноїдного біосинтезу. Вони утворюються у цитоплазмі та мітохондріях у результаті перетворення мевалонової кислоти (рис. 1.1).

Фітостероли створені з шести молекул ізопентилпірофосфату. Активний ізопрен ізомеризується до диметилалілпірофосфату, який є праймером для подальшого перетворення до фарнезилпірофосфату за допомогою пренілтрансферази.

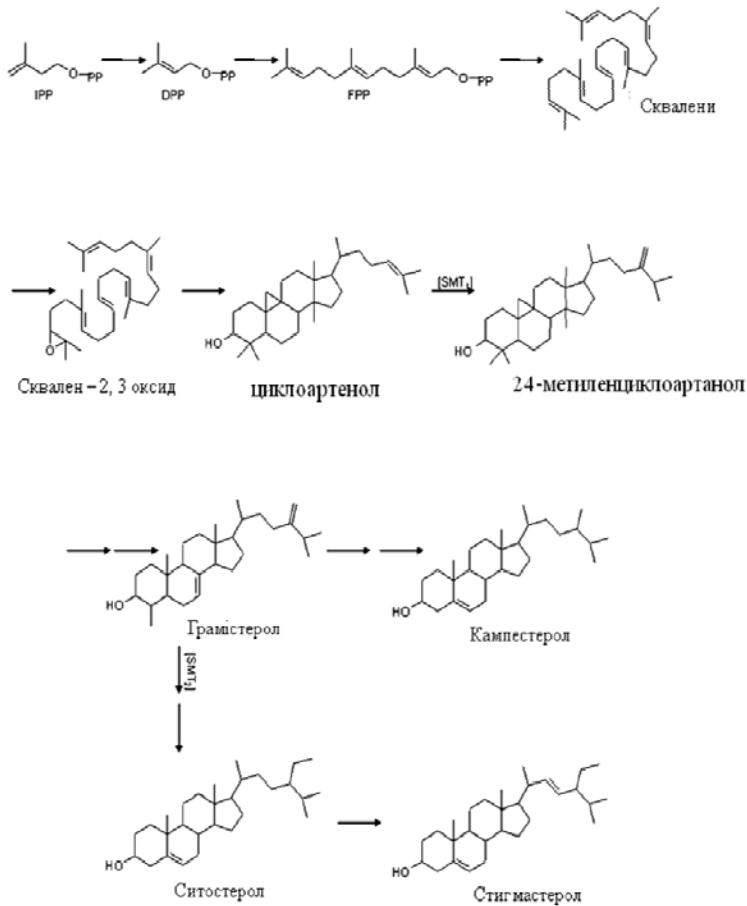
Метаболіт фарнезилпірофосфат являє собою розгалужений ступінь синтезу сесквітерпенів або синтезу тритерпенів (стеролів). Конденсація двох молекул фарнезилпірофосфату веде до створення скваленів. Після оксидації скваленів створюється попередник стеролів – сквален 2,3-оксид. Він перетворюється на циклоартенол, із якого можуть бути утворені всі фітостероли. Після диметилування одного вуглеводу C4 циклоартенолу утворюються 4 $\alpha$ -монометилстероли, а після диметилування наступних вуглеводів – 4-дезметилстероли. Метилування сторонніх ланцюгів здійснюється за допомогою каталізації двох різних стерилметилтрансфераз (SMT1 та SMT2) [8–10].

Останнім часом ученими світу широко досліджуються фізіологічні властивості фітостеролів. Установлено, що вони мають антиканцерогенну, противоракову дію [11–12]. Порівняно з холестерином  $\beta$ -ситостерин на 24% знижує зростання пухлинних клітин і в чотири рази підвищує апоптоз (знищення клітин).

Розмір пухлин у мишей, яким давали фітостероли, виявився на 33% меншим; вони мали на 22% менше метастазів у лімфатичних вузлах і легенях, ніж миші, яким давали холестерин. Результати цих досліджень свідчать про те, що фітостероли можуть уповільнювати ріст клітин раку грудей. Крім того, є свідчення про те, що фітостероли впливають на розвиток раку простати. Було також встановлено, що фітостероли мають профілактичну дію відносно раку легенів. Загальна кількість фітостеролів у їжі мала обернено пропорційний зв'язок зі ступенем захворювання на рак грудей, шлунка, стравоходу, матки, яєчників [13].

Фізіологічний вплив фітостеролів на організм людини зумовлений також протизапальною дією. Механізм цього процесу включає пригнічення секреції запальних медіаторів, таких як інтерлевкін-6 і онкогенний некроз фактор- $\alpha$ , моноцитами. Учені визначили можливу роль фітостеролів в етіології, а саме їх профілактичні властивості відносно проліферативних реакцій лімфоцитів, туберкульозу легенів, ВІЛ, зниження імунітету під впливом стресу, ревматоїдного артриту, алергічного риніту/синуситу [14].

Установлена також антиоксидантна дія фітостеролів. Ученими доведено, що  $\beta$ -ситостерин знижує ліпідне перекиснення мембран тромбоцитів у присутності заліза, а доза станолювого ефіру у 2–3 г знижує рівень окисненого НПЛ-холестерину [13; 15].



**Рис. 1.1.** Схематичне зображення біосинтезу стеролу в рослинах: SMT – стеролметилтрансфераза [14]

Фітостероли та фітостеринові ефіри мають також антибактеріальну та противиражкову дію. Вони продемонстрували свої профілактичні властивості проти пилоричної мегатурної форми виразки і гострих форм виразок, спричинених етанолом і цистеаміном. Наявність фітостеролів у базових місцевих дієтах (Індія та інші країни), можливо, є причиною того, що виразка дванадцятипалої кишки зустрічається там досить рідко, незважаючи на часті випадки інфекції *Helicobacter pylori* [13; 16].

Доведено, що фітостероли ефективні для запобігання розростанню клітин гладких м'язів судин, які відіграють важливу роль у розвитку атеросклерозу. У разі годування фітостеролами мишей із дефіцитом (аро-Е) в них зменшувалися кількість тромбоцитів, схильність кров'яних клітин до гемолізу (руйнування еритроцитів), схильність до атеросклеротичних патологічних змін [13]. Це свідчить про протиатерогенні властивості фітостеролів. Епідеміологічні дослідження вказують на те, що фітостероли можуть бути використані для профілактики та лікування хвороб серця та судин [13; 17].

Проте головна функція фітостеролів і причина зростаючого інтересу до них – це їх здатність знижувати рівень холестерину у крові, що сприяє зменшенню ризику виникнення коронарної хвороби серця, гіперхолестеринемії та інших патологічних станів, пов'язаних із порушенням обміну ліпідів у організмі [18–20]. При цьому встановлено, що холестеринознижувальний ефект у більшій мірі мають 4-дезметилфітостероли [21].

Сам механізм холестеринознижувального ефекту фітостеролів ще не досить повно досліджений. Доведено, що фітостероли знижують усмоктуваність холестерину в кишечнику на 30–50%. При утворенні міцел із жовчними кислотами фітостероли конкурують із холестерином. Саме тому ресорбція в кишковому епітелії міцел холестерину значно зменшується [3].

Завдяки своїй схожості зі структурою холестерину, фітостероли легко включаються в біомембрани ентероцитів і блокують рецептори холестерину, знижуючи абсорбцію холестерину й поліпшуючи його виведення з організму [22; 23].

Інші дослідження свідчать, що фітостероли здатні інгібувати активність таких ферментів, як ліпаза, естераза та ацил-коа (холестерин-ацилтрансфераза). Саме це приводить до утворення нових ефірів ресорбованого холестерину всередині клітини та зниження абсорбції холестерину [24].

Доведено також, що фітостероли поліпшують зворотне транспортування холестерину, знижуючи потребу організму в екзогенному холестерині; підвищують експресію мембранних білків-транспортерів фітостеролів, які контролюють транспортування холестерину і його відтік, та підсилюють синтез клітинних рецепторів ліпопротеїнів низької щільності [25].

Безпечність фітостеролів розглянуто вченими і в ході короткострокових досліджень, і протягом тривалого вивчення (до року). Доведено, що вони безпечні. У США рішенням Food and Drug Administration (FDA) 2000 року фітостеролам було присуджено статус абсолютно безпечних речовин (GRAS-статус) і надано дозвіл на внесення в маркування інформації про зниження ризику коронарної хвороби серця для продуктів, які містять ці речовини [13]. У Данії та Фінляндії збагачення фітостеролами харчових продуктів передбачено національними програмами.

Уживання фітостеролів становить 160...400 мг (із них 25 мг станолів) на добу для різних груп населення. Але на ранніх стадіях еволюції людини прийом фітостеролів був значно вищим – до 1 г на добу [13]. Уживання їх у такій кількості приводить до зниження рівня ліпопротеїдів низької щільності (ЛПНЩ) – холестерину на 5% [26; 27], а добова доза в 1,5–3,0 г зменшує вміст холестерину на 10–16% [28; 29]. Згідно з вимогами Комітету харчових продуктів SCF (Scientific Committee on Food) максимальна рекомендована добова доза фітостеролів становить 3 г [30; 3]. Більшість учених рекомендують уживати фітостероли у 2–3 прийоми на день. Це стосується будь-якої дози – профілактичної або лікувальної. При цьому науковці наводять той факт, що мінімальна ефективна доза прийому фітостеролів становить 800 мг на добу [13].

Більшість клінічних досліджень проведено з використанням фітостеролів і фітостанолів, які були додані в бутербродні пасти. Поки фітостероли споживаються з їжею для стимулювання

виділення жовчі, вони можуть ефективно знижувати рівень НПЛ-холестерину на фоні дієт і продуктів-носіїв різноманітних типів. Установлено, що фіто стероли є дієвими в разі споживання в рослинній олії, водній емульсії – у воді як лецитинових міцелах, йогурті, молоці часткового наповнення з низьким вмістом жиру, шоколаді, злакових, батончиках, хлібі, напоях, яловичині/гамбургерах [13].

Результати зниження рівня НПЛ-холестерину за умови використання розроблених ученими продуктів, збагачених вільними фітостеролами, фітостанолами та їх етерифікованими формами, наведено в табл. 1.1 [13].

Можна додати, що вільні фітостероли, фітостаноли та етерифіковані форми рівною мірою інгібують усмоктування з кишечника холестерину. Слід зазначити, що останнім часом фітостаноли все рідше використовуються для збагачення харчових продуктів через те, що вони дорожче фітостеролів (через додаткову стадію гідрогенізації під час їх отримання).

Уживання в їжу більше 3 г фітостеролів на добу призводить до небажаного ефекту – поганої абсорбції жиророзчинних вітамінів та каротиноїдів. Так, рівень  $\alpha$ -каротину знижується на 10%,  $\beta$ -каротину – на 12,1–25,0% та вітаміну Е – на 8% [28; 31].

Слід відзначити, що фітостероли є нетоксичними для організму людини [32; 33]. Негативну дію фітостеролів можна легко регулювати, збільшуючи споживання жиророзчинних вітамінів та каротиноїдів.

Дослідження багатьох учених свідчать про те, що профілактика та лікування різноманітних хронічних захворювань за допомогою фітостеролів є вкрай необхідними. Крім того, слід пропагувати споживання фітостеролів у харчових продуктах натурального походження. Харчовими джерелами цих речовин є: олія – від 91 мг/100 г (кокосова) до 1390 мг/100 г (кукурудзяна); зернові продукти – від 58 мг/100 г (вівсяне зерно) до 1325 мг/100 г (рисові висівки); горіхи – від 54 мг/100 г (лісові) до 297 мг/100 г (фісташки); насіння – 22–714 мг/100 г; фрукти та ягоди – 2–75 мг/100 г, овочі – 5–40 мг/100 г [34–43].

**Таблиця 1.1**  
**Вплив вільних та етерифікованих стеринів і станолів на рівень НПЛ-холестерину**

Продукт	Носій	Денна доза (еквівалент вільного стерину/станолу), г	Плацебо- корегувальне зниження рівня НПЛ- холестерину, %
A2	Бутербродна паста	0,7	LDL 6,1
B2	Олія соняшникова	1,3	LDL 14,4
A1	Майонез	1,0	LDL 6,2
B1		1,0	LDL 5,1
D1		1,2	LDL 7,7
A2	Оливкова олія	0,4	LDL 2,8
A1	Жир вершкового масла	1,8	LDL 13,3
B1		1,8	LDL 13,4
A1:B1(1:1)		1,8	LDL 16,0
A2	Рослинна олія в молоці	1,2	LDL 7,1
		1,6	LDL 9,6
D1	Майонез	0,8	LDL 7,7
		2,0	LDL 15,0
D1	Бутербродна паста (насіння ріпаку)	1,8	LDL 10,2
		2,6	LDL 10,2
D2 D1-2	Бутербродна паста (дієта з низьким вмістом жирів)	2,2	LDL 13,7
		2,3	LDL 8,6
C2	Бутербродна паста	0,8	LDL 6,2
		1,6	LDL 9,2
		3,2	LDL 9,8
C2	Бутербродна	2,0	LDL 10,4
D1	паста	2,0	LDL 12,7
C2	Яловичина	2,4	LDL 15,0
B	Йогурт	3,0	LDL 14,0

Примітка: LDL – НПЛ-холестерин, А – вільний фітостерол, В – вільний фітостанол; С – фітостериновий ефір, D – фітостаноловий ефір, 1 – таловий стерин, 2 – соєвий стерин.

Kaloustian J., Tabee E. та співавтори виявили, що після термічної обробки загальна кількість фітостеролів збільшується внаслідок того, що під дією високої температури розриваються ефірні та глікозидні зв'язки й утворюються вільні фіто стероли, їх біологічна активність у продукті збільшується [44; 45].

Фітостероли як функціональні мікронутрієнти почали використовуватись одразу після того, як у 50-х роках ХХ століття було встановлено їх вплив на рівень холестерину в крові людини. Тоді ж почали випускати біологічно активну добавку під торговою маркою Syttelin (фірми EliLilly), яка являла собою  $\beta$ -ситостерин. Використання цієї добавки та фітостеролів загалом було обмежене через їх погану розчинність і низьку біодоступність. І тільки в 1999 році на ринку з'явився маргарин фірми Raisio Venesol, збагачений фітостеролами та фітостанолами.

Сьогодні фітостероли активно використовують у виробництві харчових добавок («Уртирон», «Трианол» та ін.) або додаючи багату на фітостероли сировину як рецептурний компонент [31].

Фітостеролами збагачують батончики (Logicol, Австралія; Venesol, Великобританія), олію (Ekona, Японія; Nutra Lease Canola Active, Ізраїль), апельсиновий сік (Minute Maid Heart Wise), майонез (Австралія), молоко (Venesol, Великобританія; Logicol, Австралія; Sere Coi, Аргентина), йогурт (Logicol, Австралія; Venesol, Великобританія), йогуртові напої (Venesol, Великобританія), соєве молоко (Pacific Foods), м'ясо і супи (Raisio, Фінляндія), зелений чай (Cholzero, Корея), сир (Westland), хлібобулочні вироби (хліб із гарбузовим насінням від фірми Rampffmeuer та житній хліб), пряні соуси, маргарин (Venesol, Unilever), масло, фруктові напої на основі молочної сировини, соки та нектари, соєві та рисові напої (Diminicol фірми Teriaka) [3; 13; 46].

Фітостероли також продаються в сумішах з іншими функціональними інгредієнтами, такими як волокно (Unilever Fruit D'or, Франція), масла Beneol Olive Spread – Великобританія); неабсорбуючий діацилгліцерин (Као-ADM Ekona Heathy Cooking Oil, Enzymotec Multi Oil Platform, Arteri Careproducts, Ізраїль);

протеїн мигдалю, сої та в'язкі волокна. Цікаве також поєднання фітостеринів з антиокиснювачами, такими як флавоноїди, кверцетини, катехіни; розроблена суміш спецій Selako, відома на ринку Скандинавії під назвою Flavomare [13].

Виробники продають фітостероли також у формі добавок. Є зацікавленість у розробці фітостеролових лікарських препаратів (наприклад, Forbe's FM-VP4). Фітостероли можуть інтегруватися в інші холестеринознижувальні лікарські препарати з різними механізмами дії, включаючи статин (statin) та езетиміб (ezetimibe) [47].

Загальна вартість європейського ринку такої продукції оцінюється в 312,5 млн євро, і прогнозується подальше його зростання.

На жаль, в Україні виробництво продуктів із холестеринознижувальною дією поки ще не налагоджене, ринок продукції оздоровчого спрямування загалом розвивається дуже повільно. Вітчизняним споживачам доводиться купувати імпорتنі продукти, які є досить дорогими. Тому створення такої продукції вітчизняного виробництва є особливо актуальним.

Однак створення продукції з холестеринознижувальними властивостями шляхом збагачення фітостеролами та фітостанолами є достатньо трудомістким та дорогим процесом. Їх джерелом є масляні продукти, отримані під час переробки деревини сосни та інших дерев. Процес складається з очищення фітостеролів та фітостанолів із подальшою гідрогенізацією до станолів і етерифікації харчовими жирними кислотами. Аналогічним чином ефіри станолів можна отримати з побічних продуктів масляно-жирового виробництва. Використовуючи отримані стероли, слід брати до уваги їх погану розчинність через кристалічну структуру та характерний присмак, який вони вносять до харчових продуктів.

У зв'язку з цим другий спосіб отримання продукції з холестеринознижувальними властивостями, а саме пошук та використання рослинної сировини, багатой на рослинні стероли, є також важливим. Але аналіз літературних джерел свідчить про те, що використання цієї сировини для створення продукції оздоровчого призначення досить обмежене.

Відомо, що найбільш багаті на фітостаноли та фітостероли зернобобові культури, а саме рис, пшениця, кукурудза, гречка, просо, ячмінь, квасоля, горох, боби, сочевиця, арахіс. Тому дослідження якості рослинної сировини перспективних сортів, адаптованих до вирощування в Україні, є актуальним. Високий вміст у гречці, просі й арахісі ненасичених жирних кислот робить цю сировину важливою в боротьбі з атеросклерозом, серцево-судинними захворюваннями, накопиченням зайвого холестерину у крові.

Таким чином, актуальною залишається розробка технологій продуктів, які дозволили б максимально використовувати закладений у рослині потенціал і перетворювати його в оптимальні комплекси речовин, необхідних для забезпечення щоденних енергетичних та біологічних потреб організму.

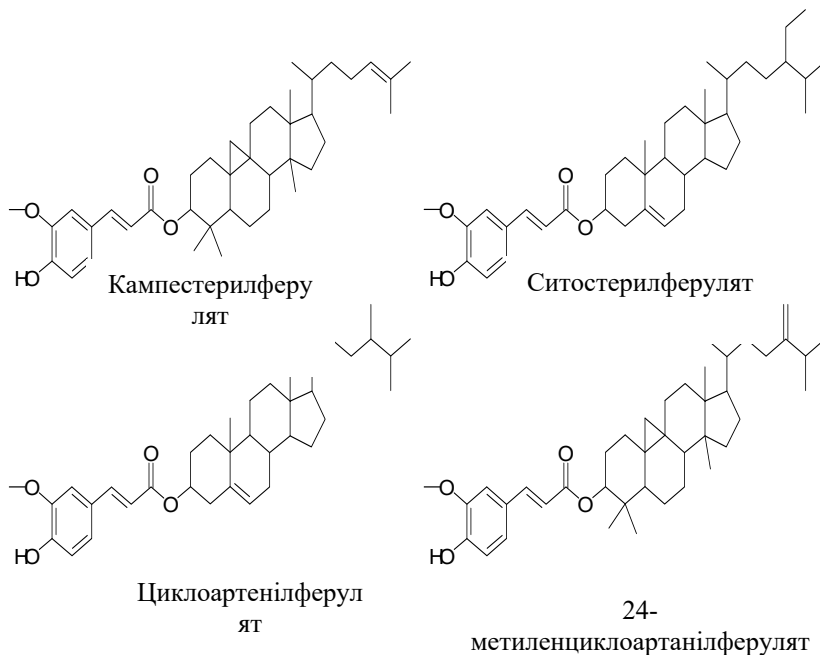
Аналіз літературних джерел свідчить, що в рослинній сировині містяться також інші речовини, які мають холестеринознижувальні властивості, а саме  $\gamma$ -оризанол, фітостерил, феруляти та ферулова кислота [48–52].

$\gamma$ -Оризанол – речовина, яку отримують із олії рисових висівок. Він складається із циклоартенолу, циклоартенілферулату, бета-ситостеролу, 24-метиленициклоартанолу і кампестерину. Ученими встановлено, що  $\gamma$ -оризанол має ті самі функціональні властивості, що й фітостероли. Ферментативний гідроліз приводить до утворення фітостерилферулатів і фітостеролів [53–55].

Фітостерилферуляти – це етери ферулової кислоти та фітостеролів.

На рис. 1.2 наведено структурні формули 4-дезметилстерилферулатів: кампестерилферуляту та ситостерилферуляту, а також 4,4'-диметилстерил-ферулатів: циклоартенілферуляту та 24-метиленициклоартанілферуляту. Стерилферуляти можна виявити в багатьох клітинних стінках зерен зернових (кукурудзи, пшениці, жита, рису, ячменю, тритикале). 4-Дезметилстерилферуляти є основними складовими речовини клітинних стінок, водночас 4,4'-диметилстерилферуляти є мінорними компонентами.

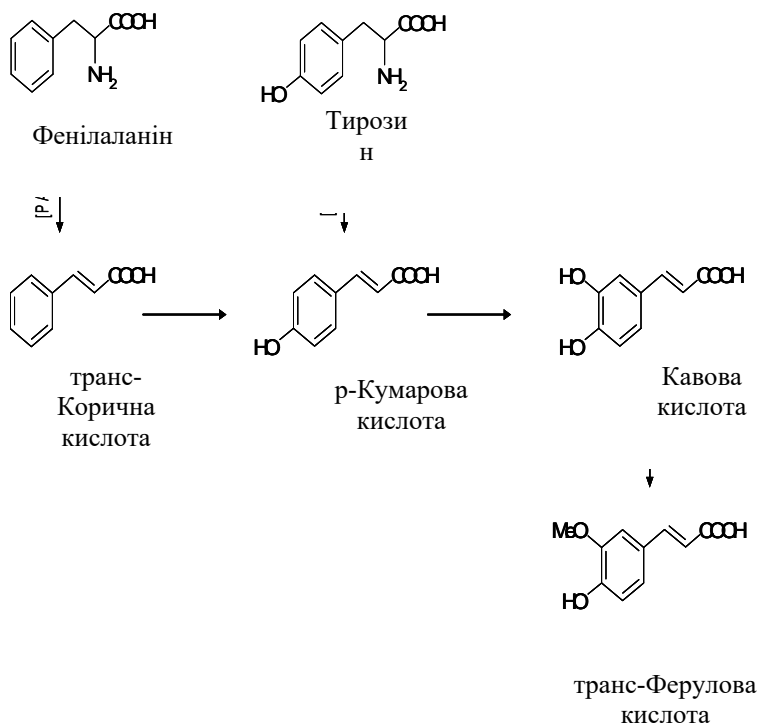
У кукурудзі, житі, пшениці містяться етери ферулової кислоти та насичених стеролів: ситостанолу та кампестанолу [53]. У кукурудзі також містяться етери кумаринової кислоти та станолу. Ферулова кислота утворюється з фенілаланіну та тирозину, які є продуктами шикіматного шляху (відбувається у пластидах мітохондрій та рослин) [56].



**Рис. 1.2. Структурні формули фітостерилферулятів**

З ароматичної амінокислоти фенілаланіну під дією каталізатора феніламоніумліази утворюються транс-коричні кислоти. У результаті гідроксилювання транс-коричних кислот утворюється *p*-кумаринова кислота. Вона також може утворитися прямо від тирозину завдяки відщепленню від нього аміаку під каталізацією тирозинамоніумліазою. Після гідроксилювання *p*-

кумаринової кислоти до кавової кислоти та кінцевого метилювання створюється транс-ферулова кислота (рис. 1.3) [57].

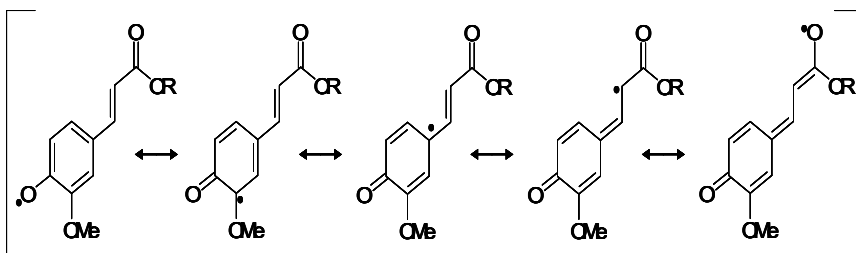


**Рис. 1.3. Біосинтез ферулової кислоти з амінокислоти тирозину: PAL – феніламоніумліаза, TAL – тирозинамоніумліаза**

Результати досліджень *in vitro* вказують на антиоксидативні властивості стерилферулатів та ферулової кислоти [48; 58; 59].

Антиоксидативна дія ферулової кислоти пояснюється наявністю в неї фенольних груп: реактивні радикали внаслідок відщеплення водневого радикала можуть бути зв'язані гідроксильними групами. Створений феноксі-радикал резонансно стабільний (рис. 1.4), тому менш реактивний, ніж зв'язаний радикал. Отож ланцюгова реакція радикалів таким чином призупинена.

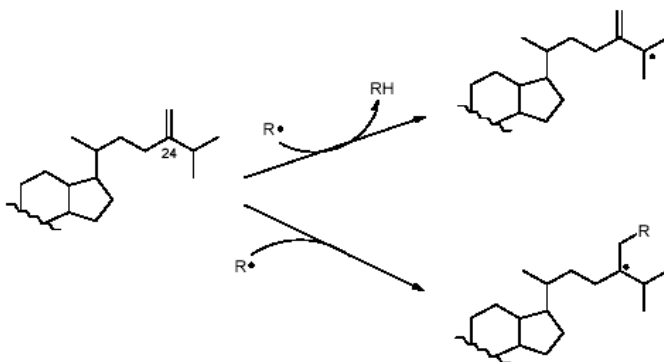
Антиоксидативна властивість стерилферулятів може змінюватися залежно від наявності кінців стеролів, оскільки вони також чинять антиоксидативну дію. Антиоксидативну дію 24-метиленициклоартенілферулату можна пояснити таким чином: радикали можуть бути зв'язані завдяки приєднанню до метиленових груп або відщепленню водневого радикала від C25. В обох випадках утворюється досить стабільний тетраїдний радикал (рис. 1.5) [60]. Як натуральні антиоксиданти стерилферулати можуть бути використані для стабілізації жирів та олій.



**Рис. 1.4. Резонансно стабілізований радикал на прикладі ферулової кислоти**

Як уже було відзначено,  $\gamma$ -оризанол та фітостерилферуляти мають холестеринознижувальні властивості.

У ході досліджень на тваринах та людях було досягнуто зменшення загального вмісту ліпопротеїдів низької щільності завдяки споживанню ними олій з рисових висівок та  $\gamma$ -оризанолу. Результати досліджень фітостеролів олій з рисових висівок свідчать про те, що холестеринознижувальний ефект обумовлено 4-дезметилстеролами. Водночас 4,4'-диметилстероли не мали цих властивостей.



**Рис. 1.5. Антиоксидативний вплив 24-метиленициклоартенілферулату: реакція з радикалами приводить до створення тетраїдного радикала**

За результатами медико-біологічних досліджень над хом'яками та кролями доведено, що концентрація ферулової кислоти у плазмі позитивно корелюється з наданою дозою  $\gamma$ -оризанолу [50]. Стерилферуляти гідролізуються в організмі, принаймі частково. У наступному дослідженні радіоактивно помічений  $\gamma$ -оризанол давали щурам. У результаті цього через 48 год із фекаліями було виведено з організму щура лише 84% радіоактивно поміченого  $\gamma$ -оризанолу. У ході експериментів *in situ* встановлено, що лише незначна частка доданого  $\gamma$ -оризанолу гідролізується в кишечнику. Абсорбований  $\gamma$ -оризанол на 80% засвоюється у формі етеру, 9,8% радіоактивно поміченого  $\gamma$ -оризанолу було виявлено до 72% у сечі. Разом із феруловою кислотою були ідентифіковані й інші метаболіти, зокрема гіпурова кислота. Стерилферулятив, що вживалися, у сечі не виявлено [51]. У яких конкретно органах були гідролізовані етери, ще не зрозуміло.

Під час досліджень *in vitro* встановлено гідроліз 4-дезметилстеролферулатів, які були ізольовані з рису, жита й пшениці, а також синтезованого ситостанілферуляту

холестеролестеразою панкреасу [53; 54]. 4,4'-Диметилстерилетер  $\gamma$ -оризанолу при цьому не був гідролізований [54].

За дослідженнями *in vitro* 4-дезметилстерилферулати здебільшого гідролізуються холестеролестеразою, на відміну від станілферулатів [53]. Така тенденція спостерігається й під час ферментативного виділення стеролів та станолів холестеролестеразою панкреасу з естерів кумаринової кислоти [61; 62].

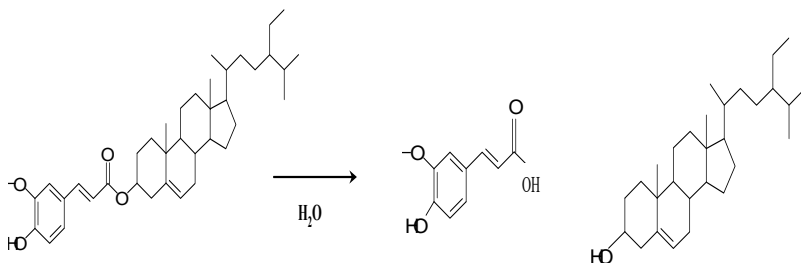
Таким чином, кількість вільних біологічно активних форм фітостеролів у продуктах може бути збільшена при ферментативному гідролізі  $\gamma$ -оризанолу. Оскільки фітостероли мають широкий спектр позитивних для здоров'я людини властивостей, дослідження активації ферментативного гідролізу  $\gamma$ -оризанолу є дуже важливим.

Аналіз літературних джерел вказує на те, що багато зарубіжних учених досліджують можливості цього процесу та здійснюють пошук способів його активації для збільшення виходу продуктів гідролізу [63; 64]. Головним чинником впливу на процес гідролізу  $\gamma$ -оризанолу та фітостерилферулатів є підбір ферментативних препаратів і раціональних параметрів його проведення.

## **1.2. Характеристика ферментних препаратів, що використовуються для проведення гідролізу $\gamma$ -оризанолу**

Аналіз літературних джерел свідчить про те, що найчастіше для проведення ферментативного гідролізу  $\gamma$ -оризанолу використовують ферментні препарати карбоксилетергідролази та глюкозидази [65]. Вагомий внесок у вирішення цих питань зробили зарубіжні вчені: A. Berger, R. Morcam, K.-M. Engel, A. Miller, A. Gerspach, R. Ostlund, L. Sarda, P. Desnuelle, D. Dressler, H. Potter. та ін.

Під час ферментативного гідролізу  $\gamma$ -оризанолу вивільнюються стерилферулати, ферулова кислота і відповідні стерини (рис. 1.6).



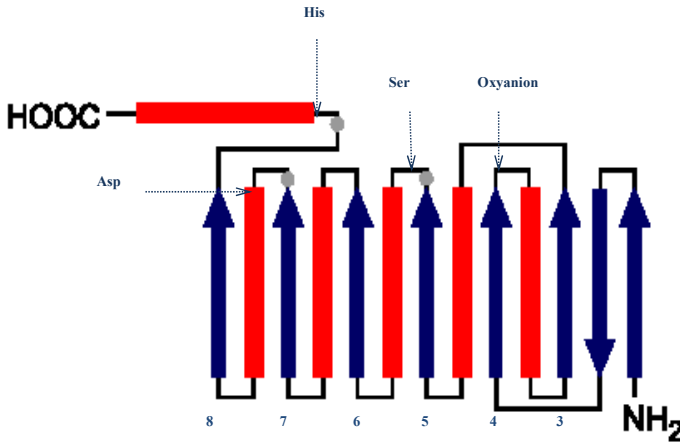
**Рис. 1.6. Процес ферментативного гідролізу  $\gamma$ -оризанолу**

Для більш глибокого розуміння цього процесу за участю різних ферментних препаратів необхідно навести їх характеристику.

*1.2.1. Карбоксилетергідролази.* Карбоксилетергідролази належать до ферментативного класу ЕС 3.1. «Ферменти, що гідролізують етерзв'язки», до яких належать естерази (ЕС № 3.1.1.1) та ліпази (ЕС № 3.1.1.3).

Естерази та ліпази каталізують розщеплення тригліцеридів до жирних кислот і значаться як «ліполітично активні ферменти». Естерази та ліпази мають таку саму третинну структуру, яка складається з  $\alpha/\beta$ -складок гідролази (рис. 1.7). Завдяки такій схожій структурі естерази та ліпази здатні каталізувати однаковий тип реакції.

Така специфічна структура  $\alpha/\beta$ -складки гідролази складається з восьми  $\beta$ -складних пластин, кожна друга пластин розташовується антипаралельно. Навколо  $\beta$ -складних пластин розташовуються  $\alpha$ -завитки, вони переплетені один з одним таким чином, що ззовні розташовані колони складають одна з одною кут  $90^\circ$ .



**Рис. 1.7.** Схематичне зображення  $\alpha/\beta$ -складок гідролази: червоні прямокутники зображують  $\alpha$ -завиток, сині стрілки зображують  $\beta$ -складні пластини; топологічні позиції каталітичних амінокислот позначені сірими точками: гістидин (His), серин (Ser), аспарат (Asp).

Гідролітичні ферменти структурного типу згортання  $\alpha/\beta$ -гідролази містять три каталітично незамінні амінокислоти. Вони відомі як каталітична

тріада і з'являються в такому порядку та послідовності: нуклеофільна амінокислота (серин, цистеїн), кисла амінокислота (аспарат або глутамат) і каталітично активний гістидин. Ліпази є сери новими гідролазами, тобто каталітична тріада складається із серину, кислій амінокислоти і гістидину. Нуклеофільний серин вбудований у висококонсервативний пентапептид Gly-X-Ser-X-Gly, який знаходиться між ланцюгом  $\beta 5$  і подальшою спіраллю  $\alpha C$ , і утворює «нуклеофільний вигин» на  $\gamma$ -подібній кривій [65]. Каталітичний механізм відбувається відповідно до таких етапів (рис. 1.8).

Серин активується шляхом перенесення водню з гідроксильної групи серину на бічний ланцюг гістидину (A). Після цього відбувається нуклеофільна атака кисню бічного ланцюга серину по карбонільному атому вуглецю субстрату (a).

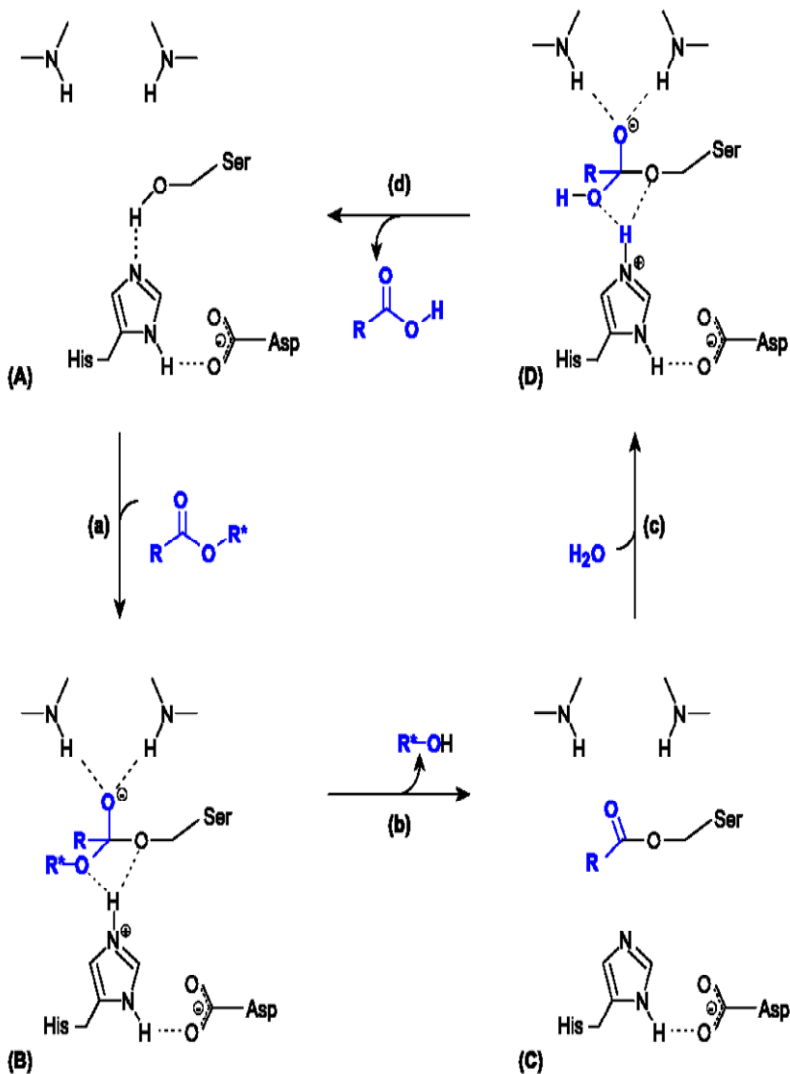


Рис. 1.8. Гідроліз складного ефіру, який каталізує ліпаза, з каталітичною тріадою амінокислот серину (Ser), аспартату (Asp) та гістидину (His) [63].

Це створює першу тетраедричну проміжну сполуку – оксіаніон (B).

Молекула фіксується в порожнині оксіаніона принаймні двома амідними групами на основі білка. Каталітичний гістидин передає протон на гідроксильну функцію, яка відщеплюється від субстрату (b). Кислотна функція етерифікується в останньому ацильному ферменті через атом кисню бічного ланцюга активного серину. Другий оксіаніон утворюється в результаті атаки активованої молекули води карбонільного атома вуглецю ацильного ферменту (c). Цей тетраедричний проміжний продукт (D) стабілізується аналогічно (B), (d). Каталітичний гістидин переносить протон до кисню бічного ланцюга серину, і складноферійний зв'язок між серином і залишком кислоти розривається [64].

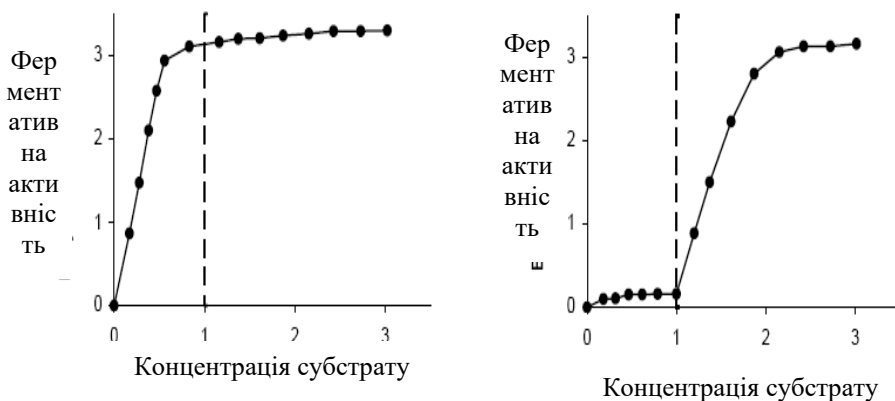
Відмінності в біохімічній поведінці естераз і ліпаз можуть бути з'ясовані за концентрацією субстрату і спектра субстрату. Під час гідролізу триацетину було виявлено, що естерази (естераза печінки коня) виявляють високу активність навіть за низьких концентрацій субстрату, а ферментативна активність ліпаз (ліпаза підшлункової залози свині) різко зростає тільки вище критичної міцелярної концентрації субстрату (рис. 1.9) [96]. Це явище, характерне для ліпаз, називається активацією інтерфейсу. Активація інтерфейсу заснована на сегменті амфифільного пептиду, кришці, яка в неактивній формі покриває каталітичний центр ліпаз. У разі інтерфейсного контакту відкривається доступ до активного центру. Розрізняють відкриту (активну) і закриту (неактивну) форми ліпази.

Тривалий час активація межі поділу і структура кришки використовувалися як критерії для розрізнення естераз і ліпаз.

Однак потік біохімічних даних і тривимірних структур, що з'явилися в 1990-х роках, також продукував ліпази, які не виявляли жодної активації інтерфейсу або не мали кришки. Сьогодні найбільш безпечною ознакою класифікації цих ліполітичних ферментів є переваги складних ефірів гліцерину з коротким ланцюгом для естераз і складних ефірів гліцерину з довгим ланцюгом для ліпаз.

Із підшлункової залози великої рогатої худоби отримують порошок. Метод заснований на швидкому видаленні води, щоб уникнути денатурації білка. Тонкоподрібнена тканина підшлункової залози екстрагується з розчину фосфатного буфера ацетоном при  $-15^{\circ}\text{C}$ . Потім суміш вода-ацетон видаляють в атмосфері азоту або вакуумною фільтрацією. Сирий препарат являє собою суміш різних травних ферментів, до складу якої входять, зокрема, гідролази, ліпаза підшлункової залози, холестеринестераза підшлункової залози, трипсин, хімотрипсин і амінопептидаза [65].

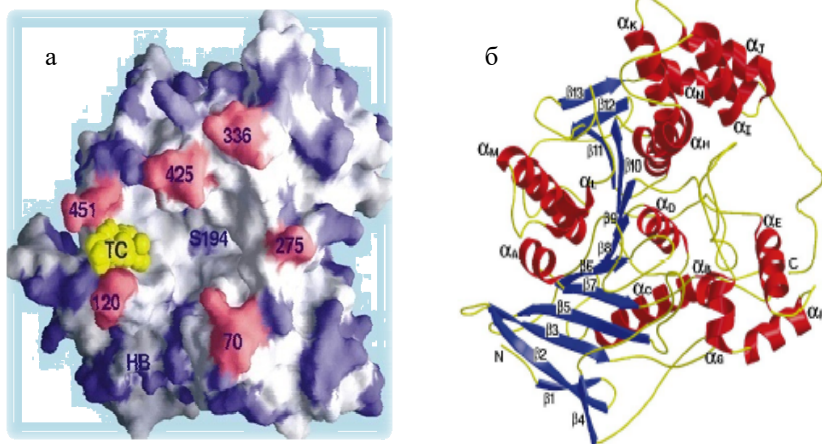
Активність порошку бичачої підшлункової залози подано відносно холестеринестерази (№ ЄС 3.1.1.13). Холестеринестераза підшлункової залози (також відома як ліпаза), активована солями жовчних кислот, має ліпазну й естеразну активність. Вона каталізує переестерифікацію вільних жирних кислот холестерином і гідроліз холестеринових ефірів, триацилгліцеринів і фосфоліпідів [65].



**Рис. 1.9. Порівняння кінетики Michaelis–Menten естераз і ліпаз [40] (пунктирні лінії на діаграмах позначають критичну міцелярну концентрацію субстрату)**

Глобулярний білок із молекулярною масою 69 кДа утворений послідовно з 547 амінокислот і належить до ряду білків, згорнутих до  $\alpha/\beta$ -гідролаз. Каталітична тріада з нуклеофільними Ser 194, Asp 320 і His 435 знаходиться приблизно в центрі молекули. Зв'язана кишенька являє собою глибоку тунельну гідрофобну область, яка пояснює здатність зв'язувати більші гідрофобні субстрати. Оксіаніон стабілізується амідними групами основного ланцюга білка Glu 107 і Ala 108. Холестеринестераза великої рогатої худоби є апоферментом.

Крім активного центру фермент має два сайти зв'язування кофактора таурохолат (рис. 1.10).



**Рис. 1.10:** а – зображення поверхні ліпази, активованої солями жовчних кислот, із підшлункової залози великої рогатої худоби: молекула таурохолат (ТС): заряджені й полярні амінокислотні залишки (фіолетовий), гідрофобні амінокислотні залишки (білий). Нуклеофільний серин (S194) [66]. б – тривимірна структура ліпази, активованої солями жовчних кислот, із підшлункової залози великої рогатої худоби ( $\alpha$ -спіралі червоні,  $\beta$ -листи сині) [66]

Активний центр і місця зв'язування кофактора покриті двома короткими гнучкими петлями. Активація інтерфейсу відкриває петлю для зв'язування кофактора. Це також стабілізує другу петлю, що закриває активний центр, у відкритому вигляді. Запущені конформаційні зміни забезпечують доступ субстрату до активного сайту [65].

Ліпази (№ ЄС 3.1.1.3) відіграють важливу роль у метаболізмі жирів і зустрічаються в рослин, тварин і мікроорганізмів. Найчастіше використовуються комерційно доступні ліпази, отримані з грибів. Із мезофільного гриба *Candida antarctica* можна отримати два типи ліпаз: ліпаза *Candida antarctica* типу А (CAL-A) і типу В (CAL-B).

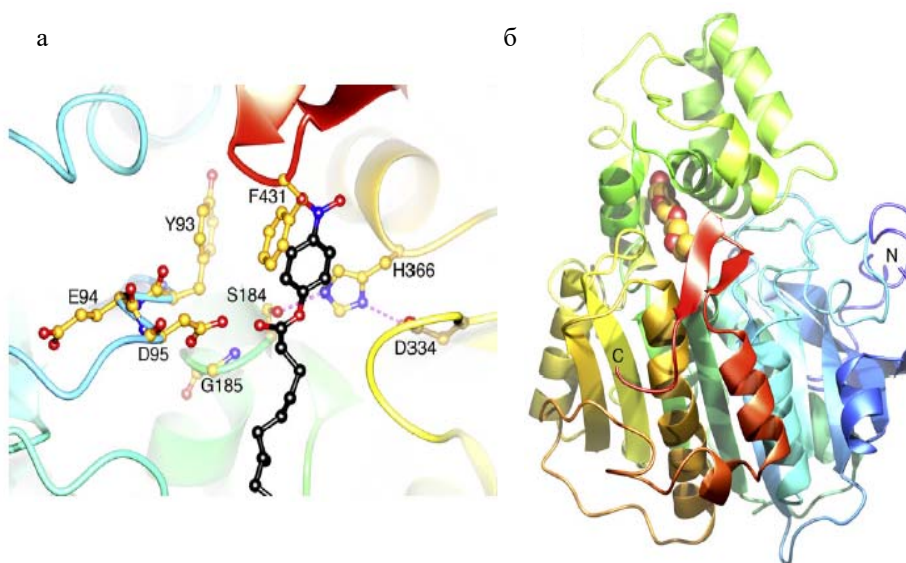
CAL-A – це термостабільний фермент, який може приймати дуже великі молекули субстрату. Він використовувався, наприклад, в енантіоселективних реакціях вторинних спиртів і синтезах складних ефірів (наприклад, стеролу карбонової кислоти, складних ефірів станолу).

CAL-A складається з послідовно розташованої 441 амінокислоти і має молекулярну масу 45 кДа. Її тривимірна структура відповідає укладанню  $\alpha/\beta$ -гідролази. Активний центр утворено Ser 184, Asp 334 і His 366 (рис. 1.11).

Сайт зв'язування оксіаніона стабілізується Gly 185 і Asp 95. Зв'язуючу кишеню ліпази А можна представити як тунель, що складається з полярних і неполярних послідовностей. Активний центр закритий «кришкою» і може бути відкритий поверхневою активацією [67; 68]. CAL-A – кальційзалежна ліпаза. Активація  $\text{Ca}^{2+}$  не завжди буває успішною [67; 69]. Ліпаза *Candida antarctica* типу А проявляє максимальну активність при 70°C і значенні рН 6,5.

CAL-B – рекомбінантний білок, отриманий із гриба *Aspergillus oryzae* [70]. Він використовується для складноефірного синтезу фенольних кислот із довголанцюговими спиртами та жирними кислотами [71; 72] і для енантіоселективної етерифікації вторинних спиртів [73]. CAL-B із молекулярною масою 30–35 кДа належить до  $\alpha/\beta$ -гідролазно-згорнутих білків і складається з послідовно розташованих 317 амінокислот. Каталітичну тріаду утворено амінокислотами Ser

105, Asp 187 і His 224 (рис. 1.12). Зв'язуюча кишеня відносно вузька і плоска, розташована в заглибленні вздовж поверхні ліпази. Оксіаніон стабілізований амідними групами Thr 40 і Gln 106 [74].

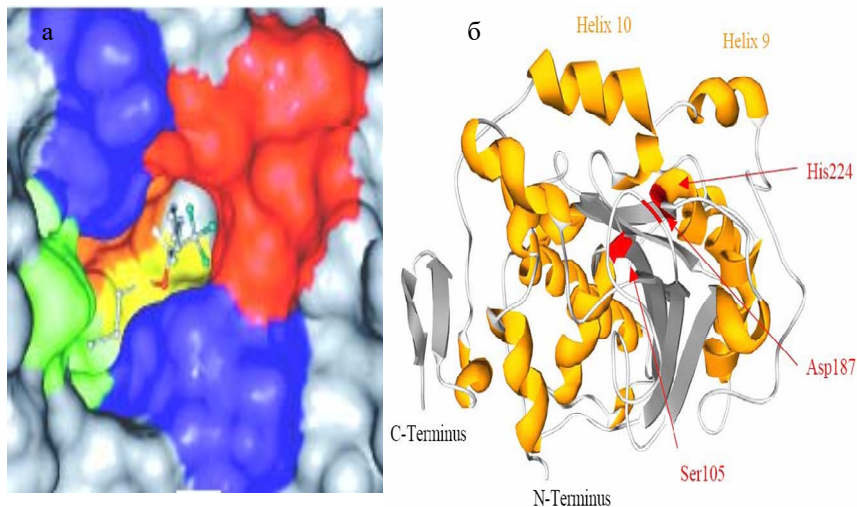


**Рис. 1.11:** а – зображення зв'язування *p*-нітрофенілового ефіру (чорний ланцюг) з активною стороною ліпази *Candida antarctica* типу А [67].

б – тривимірна структура ліпази *C. antarctica* типу А [67]

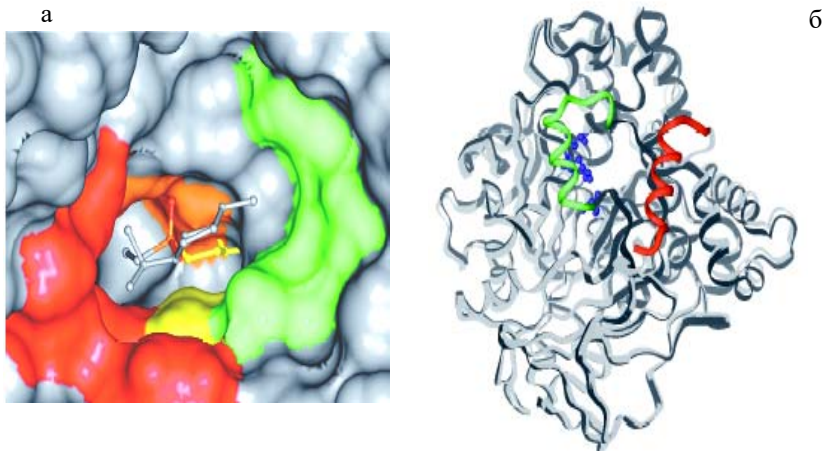
Відповідно до класифікації CAL-B є ліпазою, оскільки може гідролізувати тригліцериди довгих карбонових кислот. Однак ліпаза В набагато швидше каталізує гідроліз коротколанцюгових тригліцеридів, що характерно для естераз. Ліпаза *C. antarctica* типу В має структуру кришки, але не активує інтерфейсу. CAL-B є проміжною ланкою між ліпазою й естеразою. Вона показує максимальну активність у діапазоні рН 5,0–7,0 і приблизно при 60°C [70]. У роботі використовували іммобілізований препарат

ліпази В. В результаті іммобілізації умови і специфічність субстрату можуть змінюватися.



**Рис. 1.12: а – зображення сайту зв’язування CAL-B: каталітичний серин і гістидин (жовтий), оксіаніонова порожнина (помаранчева) [63]. б – тривимірна структура ліпази *C. antarctica* типу В [70]**

Ліпазу *Candida rugosa* використовували для органічного синтезу, зокрема складних ефірів жирних кислот, або для енантіоселективної етерифікації вторинних спиртів [75]. Ліпаза *C. rugosa* з молекулярною масою 60–65 кДа складається з послідовно розташованих 534 амінокислот. Вигляд складання відповідає укладанню  $\alpha/\beta$ -гідролази. Каталітичну тріаду утворено бічними ланцюгами амінокислот Ser 209, Glu 41 і His 449 (рис. 1.13).



**Рис. 1.13:** а – зображення поверхні сайту зв’язування ліпази *C. rugosa*. Каталітичний гістидин і серин (жовтий); оксианіонна печера (помаранчева) [63]. б – тривимірна структура двох накладених одна на одну кристалічних структур: *C. rugosa* у відкритій (червона кришка) і в закритій (жовта кришка) конформації (А – спіралі темно-зелені, β – листи сині)

Зв’язуюча кишенька являє собою гідрофобний тунель, який простягається глибоко всередину ліпази. Це досить глибоко, щоб вмістити жирну кислоту довжиною до 18 атомів вуглецю. Ліпаза *C. rugosa* має структуру кришки, описану перед активним центром. Оксианіонову печеру утворено амідними групами амінокислот Gly 124 і Ala 210. Ліпаза *C. rugosa* проявляє найвищу активність при нейтральному рН і температурі 37–40°C [76; 77].

*1.2.2. Глікозидази.* Глікозидази – кофакторзалежні ферменти, що каталізують гідроліз глікозидних зв’язків.

Ендо-1,4-β-ксилаза (ЕС 3.2.1.8) належить до глікозидаз. Фермент може бути отриманий із грибів, бактерій, дріжджів або морських водоростей. Гриби переважно використовуються в комерційних цілях [78]. Ендо-β-1,4-ксилаза використовується,

зокрема для вивільнення цукрів і отримання ферулової кислоти зі стінок рослинних клітин, для виробництва ферулоїлолігосахаридів і для отримання складних ефірів фітостеролових жирних кислот [79; 80].

Гідроліз ксиланазами заснований на загальному кислотно-основному каталізі з водою як нуклеофілом. Гідроліз має дві стадії, які проходять через проміжну стадію глікозил-ферменту (рис. 1.14). Спочатку протонується містковий атом кисню глікозидного зв'язку (1). Карбоксилат, протилежний каталітичній діаді, атакує нуклеофільність.

Після того як вихідна група була відщеплена, наявний проміжний глікозил-фермент. На наступному етапі атакуюча нуклеофільна вода (2) відновлює кислотно-основні властивості каталітичної діади [65]. Розрізняють два ряди через неоднакові тривимірні структури і молекулярні маси. Ксиланози ряду 10 являють собою білки з більшою молекулярною масою (>30 кДа) і мають 8-кратну структуру згортання ( $\alpha/\beta$ ). Ендо-1,4- $\beta$ -ксиланоза з молекулярною масою 24,7 кДа належить до 11 сімейства-ксиланаз, білки яких мають меншу молекулярну масу (<30 кДа) [81].

11 сімейство-ксиланаз має відкриту «праву» структуру (рис. 1.15). На додачу до 14 ділянок  $\beta$ -листів, які проходять антипаралельно один до одного в трьох областях (I–III), утворюється тільки одна  $\alpha$ -спіраль.

Два консервативні бічні ланцюги глутамату утворюють каталітичну діаду. Активний центр ферменту покритий двома гнучкими петлями «область великого пальця» і «нитка» [82].

Pentopan BG500 – комерційно доступний ферментний препарат ендо-1,4- $\beta$ -ксиланози з *Thermomyces lanuginosus* (раніше – *Humicola lanuginosa*) [83]. Каталітична діада ендо-1,4- $\beta$ -ксиланози з *Thermomyces lanuginosus* складається з протонованого Glu 178 і непротонованого Glu 86 (рис. 1.16).

Дисульфідні містки між амінокислотами області III  $\beta$ -листа і  $\alpha$ -спіралі, а також області великого пальця стабілізують фермент і пояснюють його термостабільність. Фермент стабільний при 60°C і активний при рН 6,0–6,5 [84; 85].

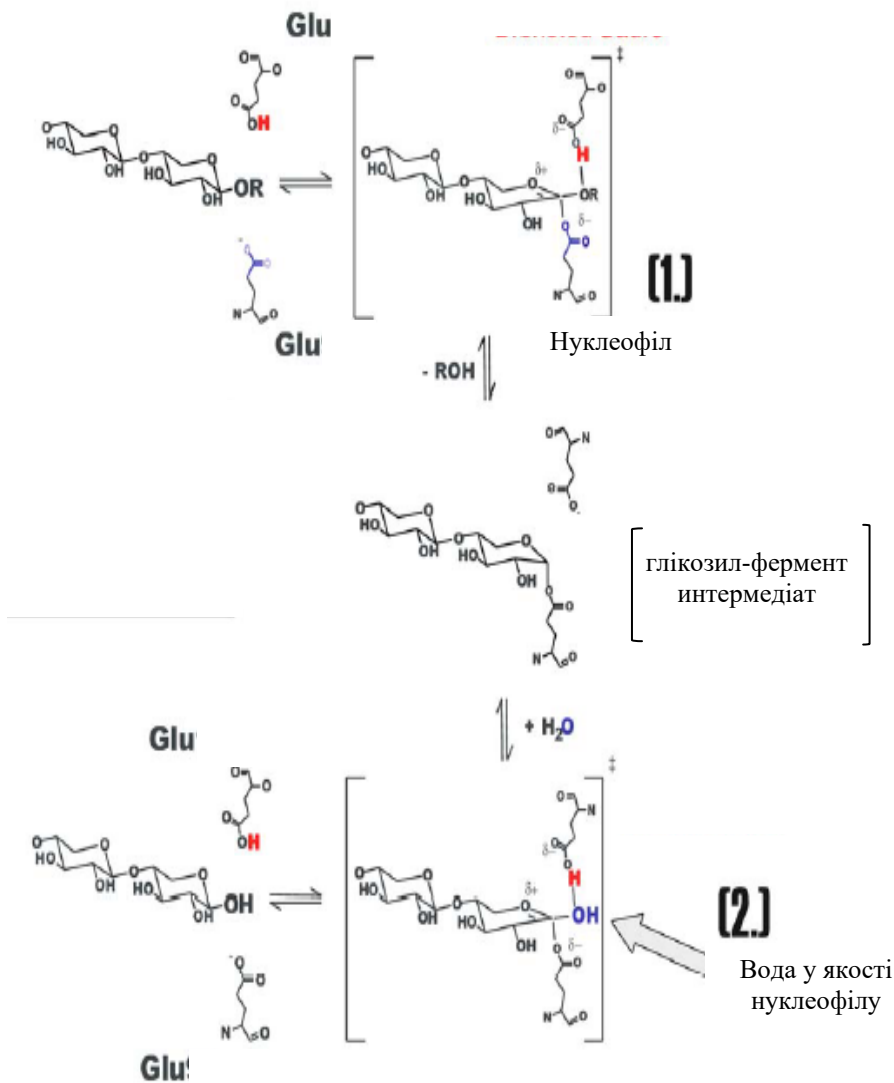
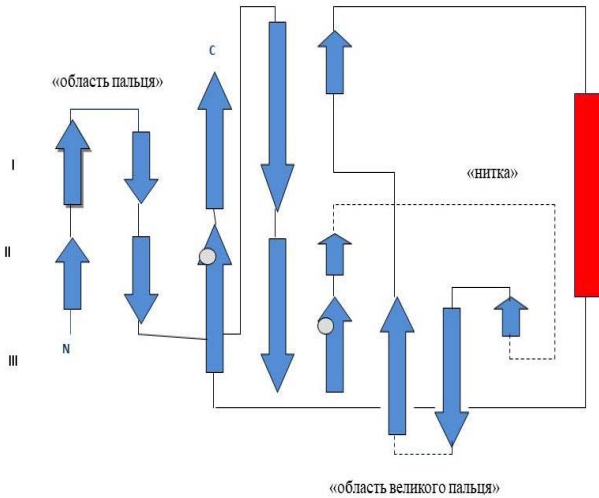
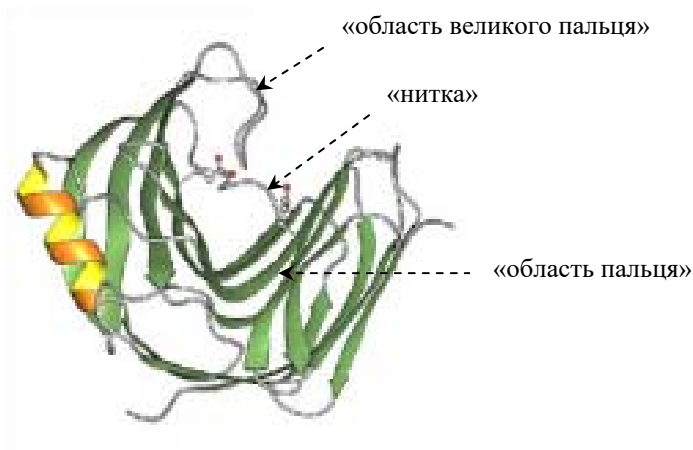


Рис. 1.14. Схематичне зображення механізму гідролізу глікозидазами [81]



**Рис. 1.15.** Схематичне зображення структури ксиланаз 11 сімейства;  $\alpha$ -спіралі (червоні),  $\beta$ -листи (сині), каталітичні амінокислоти (сірі круги) [82]



**Рис. 1.16.** Тривимірна структура ксиланаз з *Thermomyces lanuginosus* [81]

Разом із ксиланазною активністю препарат ксиланазу Pentopan 500 BG має амілазну і пектиназну активність, а також активність ферулоїл- і кофеїлестерази [86]. Завдяки своїй ферулоїлестеразній активності Pentopan 500 BG був використаний для переестерифікації вторинних спиртів, естерифікації ферулової кислоти глікозидами і виробництва ферулової кислоти із пшеничних висівок для виробництва ваніліну [83; 86; 87].

### **1.3. Використання гречки та проса у продуктах спеціального призначення**

Найпоширенішими видами гречки є культурна, або звичайна (*F. esculentum*. Moench.), і татарська (*F. tataricum* L.). Вирощують гречку, головним чином, для одержання зерна, а переробляючи його, одержують крупу та борошно. Гречка – одна з найцінніших круп'яних і медоносних культур, які вирощують в Україні [88; 89].

Серед основних круп'яних культур України є також просо (лат. *Panicum*). Виробниче значення мають два його види: просо звичайне посівне, волотисте *Panicum moniliaceum* L. та головчасте, або щетинисте *Setaria italica* L. Цінність проса визначається майже безвідходним використанням продуктів його переробки в харчовій, кормовій, фармацевтичній, мікробіологічній і промисловій галузях виробництва [90].

Вуглеводи є основною складовою гречаної крупки, загальна їх кількість становить 57,10–64,65%. Вони представлені здебільшого крохмалем, моно- та дисахаридами, харчовими волокнами. Гречаний крохмаль містить велику частку резистентного крохмалю, який поєднує функціональні властивості харчових волокон і пребіотиків. У ході мікроскопічних досліджень установлено, що гранули гречаного крохмалю здебільшого полігональні, рідше – сферичні чи овальні, поверхня частинок – шорстка, що дозволяє використовувати його як харчовий стабілізатор та загусник [91–93].

Крохмаль гречки має багато унікальних фізичних і хімічних характеристик: високу водопоглинальну здатність і набухливість, утворює колоїдні розчини. Із фізіологічної точки зору він вважається одним із найкращих серед крохмалів зернових культур [94; 95].

За вмістом харчових волокон (5–11%) крупа із гречки належить до групи продуктів із помірним їх вмістом, але серед інших круп займає лідируючу позицію разом із вівсяною та ячною [96].

Гречана крупа – багате джерело легкозасвоюваних білків, що забезпечують пластичні й енергетичні потреби організму. За вмістом білка (до 18%) крупа із гречки займає лідируючу позицію серед інших круп. Цінність білка зумовлена вмістом різноманітних амінокислот і збалансованістю їх складу, сприятливим співвідношенням трьох незамінних амінокислот – триптофану, лізину та метіоніну, наявністю треоніну та лізину, яких бракує в інших зернопродуктах, вмістом гістидину, що стимулює ріст дітей, великою кількістю цистеїну, що робить гречку стійкою до радіоактивного опромінювання [95].

Основну масу білкових речовин (до 80%) становлять білки, розчинні в сольових розчинах і воді (глобуліни й альбумін), у значно меншій кількості наявні білки, розчинні в спирті й лугах [97]. Відомо, що альбуміни і глобуліни мають високу водоутримуючу здатність, здатність до емульгування, піноутворення і придатність до переробки. Ці характеристики можуть бути використані для зміни харчової структури і підвищення поживної цінності харчових продуктів. Отже, білок гречки є безпечним і надійним інгредієнтом функціональних продуктів харчування. Крім того, гречка містить деякі специфічні білки, такі як інгібітори протеази, алергени. Завдяки їх високій біологічній активності й легкості адсорбування, останнім часом увага багатьох дослідників сконцентрувалася на поліпептидах гречки як на потенційному функціональному харчовому матеріалі [98].

Гречана крупа характеризується підвищеним вмістом жиру (до 3–5%), який має високу стійкість до окиснення, містить велику кількість лінолевої кислоти і належить до невисихаючих

видів олії, завдяки чому гречану крупу можна зберігати протягом тривалого часу без погіршення її поживних і смакових властивостей [95].

Завдяки тому, що основна частина зародка гречки перебуває всередині ендосперму і не видаляється під час лущення, у крупі залишається багато вітамінів і мінеральних речовин.

За вмістом мінералів (2,0–2,5%) гречана крупа займає лідируючу позицію серед інших круп. До складу гречки входять Калій, Фосфор, Магній, Натрій, Кальцій, Ферум, Мідь, Йод, Цинк, Бор, Кобальт [99].

Крупа з гречки є джерелом вітамінів групи В та вітаміну Е, вміст яких у 5–7 разів більше, ніж в інших крупах [94]. Вона містить значну кількість рибофлавіну. Гречка містить нікотинової кислоти майже в чотири рази більше, ніж вівсянка. Ніацин – це єдиний вітамін, який традиційна медицина вважає засобом, що нормалізує вміст холестерину в крові. Завдяки значному вмісту жиру порівняно з іншими крупами гречана крупа відрізняється підвищеним вмістом жиророзчинного вітаміну Е – головного представника групи антиоксидантів. Саме вміст токоферолу сприяє гарному збереженню гречаної крупы і збільшує її термін придатності [100].

Гречку визнано як харчовий і дієтичний продукт у багатьох країнах світу, оскільки вона містить значну кількість флавоноїдів: рутину, кверцетину, катехіну, орієнтину, вітексину, ізовітексину, ізоорієнтину [101].

Флавоноїди відомі своєю ефективністю в зниженні рівня холестерину в крові, збереженні міцності капілярів і артерій; вони запобігають високому кров'яному тиску, мають антибактеріальну, протигрибкову, протизапальну дію, беруть участь у багатьох фізіологічних реакціях в організмі [102; 103].

Перспективним класом біологічно активних міnorних компонентів їжі є фітостероли, які належать до групи сполук, що називаються тритерпенами. На сьогодні виділено понад 4000 різних тритерпенів, 250 з яких можуть бути віднесені до фітостеролів. Гречана крупа є важливим і доступним джерелом рослинних стеринів, за вмістом яких вона перевершує багато

інших круп. Основним компонентом фітостеролів гречаної крупи є  $\beta$ -ситостерин, масова частка якого становить 77,9–85,3% [104].

Таким чином, наведені вище чинники свідчать про важливе господарське значення гречки як цінної харчової та лікарської культури, що вказує на перспективність подальшого вивчення гречки та продуктів її переробки з метою комплексного використання сировини для створення продуктів спеціального призначення.

Не менш цінною за хімічним складом культурою є просо, крупа з якого є джерелом ненасичених жирних кислот, рослинного білка, вітамінів групи В, токоферолу, каротиноїдів, фітостеролів та інших біологічно активних речовин [105; 106].

В Україні основним круп'яним продуктом, що містить велику кількість білка, є пшоно. За вмістом білка (12%) пшоно займає одне з провідних місць серед інших круп, випереджаючи перлову, ячну, рисову і кукурудзяну. Пшоно багате рослинними білками з підвищеним вмістом амінокислот лейцину і глютамінової кислоти, проте його білки бідні на лізин, триптофан і гістидин: вміст лізину менше, ніж у рисовій крупі, у 2 рази, гречаній – у 3–4 рази [107].

Білки пшона представлені двома групами: протоплазматичними й запасними. Протоплазматичні білки, частка яких становить лише 10–15%, багаті всіма незамінними амінокислотами, збалансовані та сконцентровані в зародку. Це здебільшого альбуміни і глобуліни. Запасних білків у зерні 65–75%, це переважно глобуліни, проламіни і глютеліни. Білкові речовини пшона слабо набрякають, не здатні утворювати еластичну масу, як білок пшениці, тому пшоняне борошно майже не використовують для виготовлення хлібобулочних і кондитерських виробів.

Основною складовою частиною пшона є крохмаль, що складається із дрібних зерен (не більше 10–12 мкм). Температура клейстеризації крохмалю становить 65–68°C. У складі крохмальної речовини близько 20% припадає на амілозу, решта – на амілопектин. Крохмаль у звичайних умовах мало гідрофільний, але в разі нагрівання з водою сильно набрякає, чим зумовлює значне збільшення об'єму крупи під час варіння.

Крохмаль легко гідролізується амілазами, що може призвести до накопичення декстринів, які впливають на в'язкість каші. Однак у процесі шліфування пшона  $\alpha$ -амілаза, що знаходиться в зародку, видаляється, унаслідок чого каші набувають більш розсипчастої консистенції. Незначна гігроскопічність і розчинність, підвищена температура клейстеризації вказують на щільну упаковку макромолекул у крохмальних гранулах пшона [104].

Пшоно відрізняється від інших круп підвищеним вмістом жиру (до 3,9%), це пояснюється тим, що зародок у пшоні клиноподібно входить у ендосперм і після шліфування частина його залишається. Унаслідок цього в крупі зберігається значна кількість ліпідів, що мають ненасичений характер, завдяки чому пшоно погано зберігається, його жир швидко окиснюється, надаючи крупі гіркого присмаку.

Пшоно є джерелом багатьох макро- та мікроелементів, що надає йому певної цінності в аспекті харчових і лікарських властивостей. За вмістом мінеральних речовин воно займає центральну позицію серед інших видів круп. У пшоні міститься багато Фосфору (у 1,5–1,8 разу більше, ніж у м'ясних продуктах), Кремнію, але мало Кальцію і таких мікроелементів, як Ферум, Цинк та Мідь [108].

Пшоно відрізняється від інших круп високим вмістом вітамінів групи В, РР, Е, каротиноїдів, які відіграють важливу роль у процесах обміну в організмі людини та тварин.

Дослідження вмісту поліфенольних антиоксидантів і фітостеролів у пшоняній крупі майже відсутні й мають поверхневий характер. Проте японськими дослідниками було запропоновано замінити пацієнтам із різними алергічними захворюваннями рис і пшеницю на пшоно. Результати лікування є позитивними в аспекті запобігання зазначеним захворюванням, що підтверджує той факт, що пшоно можна розглядати як джерело поліфенольних антиоксидантів, хоча їх кількість значно менша, ніж у гречаній крупі [104].

Про лікувальні властивості пшоняної каші відомо здавна. Вона сприяє виведенню токсинів і важких металів з організму, зниженню рівня холестерину в крові, очищенню судин, є гарним

профілактичним засобом проти утворення пухлин. Регулярне споживання пшона рекомендують кардіологи, оскільки воно має здатність нормалізувати кров'яний тиск, зміцнювати серцевий м'яз, знижувати ризик захворювання атеросклерозом і багатьма іншими серцевими захворюваннями [109].

Як свідчить аналіз літературних джерел, гречана крупа та пшоно багаті на біологічно активні речовини, що дозволяє рекомендувати їх для виробництва продуктів спеціального призначення. Установлено, що ці крупи мають багатий хімічний склад, який добре вивчений вітчизняними та зарубіжними дослідниками. Проте недостатньо інформації про вміст окремих біологічно активних речовин, зокрема фітостеролів і антиоксидантів. Майже відсутні дані щодо хімічного складу залежно від сорту гречки та проса, з якого виготовлено крупу. Саме тому доцільними є подальші дослідження хімічного складу й ідентифікація біологічно активних речовин гречаної крупы та пшона з різних селекційних сортів гречки і проса, найбільш адаптованих для вирощування в Україні.

Під час створення продуктів харчування спеціального призначення важливим завданням є дослідження здатності сільськогосподарських культур до накопичення токсичних речовин, що надходять із навколишнього середовища внаслідок порушення технології вирощування, виробництва та зберігання продукції.

Крім корисних речовин гречана крупа і пшоно можуть містити у своєму складі й шкідливі, здатні проявляти токсичну дію.

Багато вчених проводили дослідження [110–114] щодо визначення вмісту важких металів у різних частинах гречки та проса. Установлено значні розбіжності цього показника залежно від морфологічної будови рослин, проте найнижчі концентрації токсичних елементів виявлено в насінні, що дозволяє вважати гречану крупу та пшоно продуктами із помірною кількістю солей важких металів.

Одним із чинників, що впливають на здатність до накопичення солей важких металів, є селекційний сорт рослини.

Тому для забезпечення харчової нешкідливості круп'яної сировини необхідним і доцільним є дослідження особливостей накопичення цих контамінантів у гречаній крупі та пшоні залежно від сортової приналежності круп'яної культури.

У крупах допустимий рівень вмісту  $^{137}\text{Cs}$  становить 30 Бк/кг,  $^{90}\text{Sr}$  – 10 Бк/кг [115]. Із метою зменшення надходження радіонуклідів у продукти рослинного походження необхідно ретельно підбирати культури і сорти, здатні до мінімального накопичення радіоактивних речовин. Основними джерелами надходження нітратів і нітритів у організм людини є продукти рослинного походження (до 70%). Згідно з даними ФАО/ВООЗ допустима норма нітратів становить 5 мг  $\text{NaNO}_3$  на добу на 1 кг маси тіла. Аналіз літературних джерел показав, що є дуже мало інформації щодо вмісту нітратів у гречаній крупі та пшоні залежно від сорту культури. Як і інші зернові культури, гречка та просо мають здатність до накопичення мікотоксинів за певних умов навколишнього середовища. Про токсикоз цвілью, пов'язаний зі споживанням проса і гречки, повідомлялося в Японії, Індії, США, Уганді та інших країнах [116].

Крім шкідливих речовин, що потрапляють у гречану крупу і пшоно ззовні, вони містять природні компоненти, які виявляють небезпечну дію. До природних токсикантів належить щавлева кислота. Людина без шкоди для здоров'я може щодня вживати 600–700 мг щавлевої кислоти, але за умови достатнього забезпечення Кальцієм і вітаміном D [117; 118]. Через здатність щавлевої кислоти зв'язувати катіони Кальцію вона характеризується антипоживною дією, для визначення якої введено поняття «оксалатний індекс» (співвідношення оксалат/Кальцій у продукті). Якщо він більше одиниці, оксалати здатні виявляти антипоживну дію [119].

Гречка вважається харчовим джерелом оксалатів, вміст яких становить приблизно 79 мг/100 г (за даними Гарварда), пшоно містить значно меншу кількість щавлевої кислоти (21–29 мг/100 г) [120]. На сьогодні в науковій літературі не знайдено даних про вміст токсичних речовин у крупі з гречки та проса, які вирощуються в Україні. Тому доцільним є дослідження цього

питання для виявлення сортів, здатних до мінімальної їх акумуляції.

Сьогодні інтенсивно розробляються і запроваджуються нові технології, розширюється асортимент збагачених продуктів спеціального призначення на основі зернових культур. Розроблено рецептури широкого асортименту зернових продуктів харчування, до складу яких включено різні за походженням білки, харчові волокна, вітамінні добавки тощо [121–130].

Із метою розширення асортименту й одержання нових виробів широко використовують гречану крупу та пшоно у вигляді зернових хлібців із різними збагачувачами, екструдованих сухих сніданків, збагачених каш швидкого приготування, хлібобулочних та кондитерських виробів [104].

Гречку та просо використовують за двома напрямками: традиційна технологія та глибока переробка. Традиційна обробка не покращує функціонального складу, не надає своєрідного, особливо приємного смаку продуктам із гречки та пшона і застосовується для переробки зерна в крупу та борошно. Останнім часом в усьому світі набуває широкого розповсюдження використання глибокої переробки круп [131; 132].

Найважливішим способом глибокої переробки зерна є ферментація – процес, який дозволяє перетворити складні компоненти в прості речовини з активними мікроорганізмами, які значно покращують поглинання поживних речовин і смакові властивості продуктів, а також розширюють способи промислового виробництва продуктів харчування [133].

У Китаї гречане борошно використовують для приготування шоколаду. У деяких регіонах Італії підсушені зерна гречаної крупи вживають як насіння. У Японії гречана локшина застосовується нарівні з рисовою. Вважається, що завдяки цьому продукту японці до старості зберігають рухову активність, багато займаються спортом, як наслідок – майже не мають проблем із зайвою вагою [100].

Гречані хлібці також є одним із найбільш популярних продуктів. Вони позитивно впливають на організм людини, стимулюють секрецію, беруть участь у травленні жовчних

кислот, допомагаючи в процесі перетравлювання і засвоєння їжі. Користь гречаних хлібців полягає також у здатності впливати на рівень холестерину в крові людини. Дослідники відзначають позитивну динаміку в лікуванні та профілактиці деяких видів захворювань шлунково-кишкового тракту в разі регулярного вживання в їжу цих виробів. Вони можуть використовуватися без термічної обробки, мають високі поживні властивості, добре засвоюються організмом [134; 135].

Підприємством «Хліб України» був розроблений спосіб виробництва овочево-гречаних мюслів, особливістю яких є високий вміст Феруму та вітамінів. Білки в гречаних пластівцях містять значну кількість водо- і солерозчинних фракцій, що допомагає організму людини повністю засвоїти продукт. Усе це робить гречані пластівці продуктом здорового харчування, що має високу поживну цінність і розглядається лікарями як дієтичний продукт, що рекомендується навіть дітям і вагітним жінкам [136].

Розроблено печиво діабетичне «Корисне», яке містить разом з іншими видами борошна гречане та інші рецептурні компоненти, що дозволяє отримати кондитерський виріб підвищеної харчової цінності з лікувально-профілактичними властивостями [137]. Розроблено кисломолочну пасту з композиціями прянощів, що містить кисломолочну основу, молочну сироватку та крупу гречану несмажену зелену як структуроутворювач, що значно підвищує харчову цінність продукту [138].

Із метою підвищення біологічної цінності та засвоюваності крупи піддають замочуванню та ферментації, унаслідок чого вони збагачуються більшою кількістю вітамінів, мінералів і ферментів, руйнуються глютен (частково), фітинова кислота та інші антинутрієнти [139].

Продукти переробки гречки, отримані шляхом її ферментації, легко засвоюються, при цьому виробляється певна кількість активних речовин, які потребують подальших досліджень. Умови проведення ферментації мають знаходитися під суворим контролем, що вимагає високого рівня технічного

забезпечення та складного сучасного устаткування. Цей факт значно ускладнює виробництво таких продуктів.

Серед сучасних ферментованих продуктів із гречки можна назвати гречаний оцет, вино з гречки, гречаний йогурт.

Особливо популярним у Китаї є гречаний оцет, що допомагає травленню, покращує метаболізм, знижує рівень цукру і холестерину, підвищує імунітет, має високу антиоксидантну активність. Оцет окиснюється більше шести місяців, тому його смак кисліший за звичайний. Останнім часом якість гречаного оцту покращилася завдяки поєднанню традиційного процесу бродіння і сучасної технології мікробіологічної ферментації [93].

Шляхом традиційного зброджування внаслідок твердої ферментації отримують вино з гречки, яке має приємний солодкий смак і корисні дієтичні властивості [93].

Гречаний йогурт – це напій, збагачений корисними лактобактеріями *Bulgaria Lactobacillus* та *Thermophilus Streptococcus*, що має смак гречки і є дуже корисним для організму людини [93].

Серед нових продуктів із гречки слід відзначити гречані паростки, які останнім часом набули широкого розповсюдження. Дослідження показали, що під час проростання гречки зменшується загальний вміст протеїнів, збільшується кількість амінокислот і флавоноїдів, посилюється дія антиоксидантів. Тому пророслені зерна гречки використовують для виробництва хліба і як солод для виробництва пива. Із паростків гречки можна отримати корисний сік. Висушені паростки використовують як харчову добавку до багатьох страв і напоїв. Розмелені в порошок, вони надають особливого кольору деяким продуктам харчування, зокрема хлібу, тістечкам, морозиву [131]. Гречані харчові волокна застосовуються як добавки в печиво і хліб, що покращує в'язкість тіста і збільшує поживні властивості продуктів [93].

На 12-му міжнародному Симпозіумі дослідників гречки (м. Любляна, Словенія) широко обговорювалися питання виробництва і розробки стратегій щодо продуктів із гречки. Освітнім центром «Піраміда» (м. Марибор, Словенія) розроблено більше 30 видів продукції з гречки, включаючи пасту, печиво, тістечка, торти, морозиво [140].

Пшоно також використовують для виробництва продуктів спеціального призначення.

Із додаванням пшона виробляють кисломолочний продукт «Коже Тенгрі», спосіб виробництва якого включає введення в молоко круп'яної основи з попередньо пророщених, запарених та зварених пшоняної, кукурудзяної та перлової круп, внесення бактеріальної закваски, заквашування і додавання готових м'ясних продуктів. Цей продукт має багато корисних властивостей і дозволяє розширити асортимент продукції спеціального призначення [141].

На основі пшона виготовлено новий екструдований картоплепродукт, до складу якого також входять сухе картопляне пюре, сухе молоко, морквяний порошок. Завдяки поєднанню цих інгредієнтів він має високу харчову цінність і відмінні органолептичні властивості [142]. Розроблено новий продукт на основі пшона – талкан (перемелені в борошно пророслі зерна проса), здатний очищати організм від шлаків, особливо кишечник. Талкан легко засвоюється, швидко насичує організм, при цьому він є некалорійним. Із талкану готують каші, супи, напої [143].

Борошно із пшона використовується в кондитерській галузі. Його додавання під час виробництва пісочних напівфабрикатів сприяє отриманню виробів із розсипчастою структурою [144].

Розроблено фарш рибний із кашею із цілих зерен пшениці, гречки, пшона і рису, оброблених ІЧ-випромінюванням. Унаслідок поєднання спеціальних способів обробки зерен із корисними інгредієнтами отримано продукт підвищеної харчової цінності [145].

Запропоновано новий продукт – крупеник із соєвою клітковиною, що містить мікронізовану крупу (гречку або кукурудзу, овес, пшоно) [146].

Розроблено спосіб отримання напою підвищеної харчової цінності з покращеними органолептичними показниками на основі рослинної сировини, а саме пшона, помеленого до порошкоподібного стану, причому попередньо насиченого буряковим або морквяним соком, обробленого до готовності водяною парою і висушеного. Цей спосіб забезпечує отримання

напою світло-коричневого або світло-фіолетового кольору, збагаченого білками й цукром, який містить каротин, вітамін С, солі Калію, Натрію і Фосфору, характеризується відсутністю гіркуватого присмаку [147].

В Орловському державному технічному університеті розроблено способи отримання кисломолочного продукту та сирної пасти. Виготовлення кисломолочного продукту передбачає використання молочної сировини, в яку перед гомогенізацією вводять рослинну основу з пророщеного насіння сої, гречки або проса [148]. Отримання сирної пасти передбачає введення гомогенізованої пшоняної каші, що дозволяє поліпшити її консистенцію, органолептичні показники і профілактичні властивості, підвищити біологічну цінність і водночас знизити собівартість готового продукту [149].

Ученими цього ж університету запропоновано виготовляти сирний продукт, який містить кисломолочний сир та рослинний екстракт із пророщених зерен гречки або проса. Винахід дозволяє створити продукт із поліпшеними органолептичними показниками, високою біологічною цінністю, дієтичними властивостями та низькою собівартістю [150].

Науковцями О.М. Сафоновою і А.Т. Теймуровою запропоновано спосіб одержання борошняних формових виробів підвищеної харчової цінності. У суху рецептурну суміш входять пшоно, пшениця, рис, квасоля, горох у певних співвідношеннях. Продукти характеризуються збалансованістю амінокислотного складу, поліпшенням значення коефіцієнта утилітарності білка, зниженням крихкості виробів та покращенням їх органолептичних властивостей [151].

Прикладом нового продукту підвищеної харчової цінності є екструзійний картоплепродукт «Повітряна картопля пшоняно-молочно-морквяна», що являє собою сухе картопляне пюре з додаванням пшона, сухого молока, морквяного порошку [152].

Аналіз попиту на зернові продукти спеціального призначення показує, що споживачі найчастіше купують сухі сніданки, хлібобулочні та кондитерські вироби. Асортимент хлібобулочних виробів, що випускаються в Україні, досить широкий, однак частка виробів дієтичного, лікувально-

профілактичного та спеціального призначення для різних груп населення в загальному об'ємі виробництва не перевищує 1–2% [153].

Науковий та практичний досвід свідчить, що з метою формування асортименту виробів, збагачених фізіологічно-функціональними інгредієнтами, доцільно включати до рецептур хліба продукти переробки зернових культур, які є природними біокоректорами з високим вмістом біологічно цінних білків, неперетравлюваних поліцукридів, вітамінів, мінеральних сполук та інших корисних для організму людини речовин [154; 155].

Останнім часом проводиться активна робота з виготовлення хлібобулочних виробів підвищеної харчової цінності з використанням нетрадиційної сировини. Це дає можливість заощадити частину пшеничного борошна, цукру, вершкового масла та інших видів сировини, поліпшити споживні властивості виробів за умови використання борошна з невисокими хлібопекарськими властивостями, а також створити нові вироби спеціального призначення [156].

Перспективним напрямом у виробництві хлібобулочних виробів вважається застосування композитних сумішей різних видів борошна. Як джерело біологічно активних речовин для підвищення харчової цінності хліба використовують висівки, дроблене зерно, ферментовані зернові продукти, солодові екстракти, зародки пшениці, кукурудзи, сої, амаранту, плющене зерно, топінамбур, морські водорості, екстракти лікарських рослин та багато інших видів сировини [157–159].

Одним із видів нетрадиційної сировини для виробництва хліба є продукти переробки гречки та проса – поживні й дієтичні продукти, що повністю відповідають вимогам здорового харчування. Аналіз науково-технічної літератури і патентний пошук свідчать про недостатнє застосування цих продуктів у хлібопеченні. Зазвичай крупу і борошно з гречки та проса використовують у суміші з іншими видами борошна в різних співвідношеннях і дозуваннях у кількості не більше 5–15% [160; 161].

Гречану крупу в технології хліба застосовують у кількості 5–30% від маси пшеничного борошна [162; 163], а в технології здобних виробів – до 10% [164].

Пшоно доцільно вносити в тісто для хліба в кількості 5–15% від маси борошна [165], а для булочних виробів – до 10%. Для покращення якості такого хліба рекомендовано проводити мікрохвильову обробку пшона в розмеленому вигляді разом із плівками [166].

Товариством «УкрЕко-Хліб» запропоновано спосіб виробництва харчового продукту лікувально-профілактичної дії на основі пророслого зерна гречки, проса та інших злаків. Зернову суміш отримують із щонайменше двох видів пророщених зернових, склад і пропорції яких обирають залежно від того, для лікування/профілактики якого захворювання буде використовуватися продукт [167].

Для одержання хлібобулочних виробів високої якості з гречаного борошна пропонується використовувати гідротермічно оброблене зерно [499], а також опарний спосіб тістovedення із заварюванням і подальшим заквашуванням гречаного борошна [168].

Ученими Луцького національного технічного університету запропоновано технологію хліба пшеничного з додаванням 5–10% відвареного до напівготовності пшона на заміну пшеничного борошна [169].

Науковцями Національного університету харчових технологій була розроблена технологія приготування білково-гречаного хліба з додаванням гречаного борошна. Цей хліб містить удвічі більше білків, ніж традиційні хлібобулочні вироби, характеризується підвищеним вмістом вітамінів, мінеральних речовин, низьким вмістом вуглеводів, має високі споживні властивості, розвинуту тонкостінну пористість та довго зберігає свіжість [170].

Новий спосіб виробництва хліба за покращеною рецептурою запропонували вчені О.І. Козлов та М.К. Садигова. Внесення суміші пшоняного та гарбузового борошна дає можливість поліпшити органолептичні та фізико-хімічні показники хліба,

використовувати його в раціонах харчування дітей шкільного та дошкільного віку [171].

Науковці Алтайського державного технічного університету ім. І.І. Ползунова плідно працюють над розробкою нових видів хліба підвищеної харчової цінності. Так, запропоновано спосіб виробництва хліба із пшеничного борошна з додаванням шліфованого пшона, що дозволяє поліпшити якість і споживні властивості хліба шляхом підвищення його харчової цінності, а також підвищити економічність виробництва [172].

Запропоновано також технологію хліба з додаванням суміші круп – пшона шліфованого, проділу гречаного і крупи рисової, які попередньо заливають окропом та витримують до охолодження. Винахід дозволяє поліпшити якість і споживні властивості хліба, інтенсифікувати процес його виробництва [173]. Цими ж ученими розроблено спосіб виробництва хліба з використанням попередньо відвареного гречаного проділу в кількості 5–10% від загальної маси пшеничного борошна. Це дозволяє знизити трудомісткість виробництва, поліпшити якість і споживні властивості хліба шляхом підвищення його засвоюваності [174].

Науковці Воронежського державного університету інженерних технологій розробили спосіб виробництва хліба на заквасках із борошна пшеничного першого гатунку з додаванням борошна з цільозмолотого зерна пшениці (або гречки, пшона, вівса, рису), що дозволяє отримати виріб підвищеної харчової та біологічної цінності [175].

Новий хлібобулочний виріб функціонального призначення із пшеничного борошна з додаванням пшоняного та гарбузового розроблено науковцями Саратовського державного аграрного університету ім. М.І. Вавилова. Винахід дозволяє збільшити вміст клітковини в готовій продукції, поліпшити органолептичні й фізико-хімічні показники хліба, розширити асортимент хлібобулочних виробів для харчування дітей шкільного та дошкільного віку, збільшити харчову та біологічну цінність виробу [176].

У Пензенській державній технологічній академії розроблено спосіб виробництва хліба пшеничного з додаванням продукту

екструзійної обробки гречки, що дозволяє поліпшити якість хліба внаслідок підвищення його біологічної цінності, органолептичних та фізико-хімічних показників, а також знизити витрати на його виробництво [177].

Спосіб виробництва зернового хліба з високим вмістом біологічно активних речовин розроблено П.І. Ісаєвим. Запропоновано використовувати зерно пшениці та/або жита (вівса, ячменю, гречки, проса, кукурудзи), зернову сировину попередньо замочують у талій воді та подрібнюють [178].

Набули поширення способи виготовлення хліба, хлібобулочних і кондитерських виробів з екструдованих зернопродуктів (пшениці, жита, ячменю, гречаної, манної крупи, гороху, рису, сої) [179].

Таким чином, проведений аналітичний огляд наукової літератури засвідчив, що гречана крупа та пшоно широко використовуються в усьому світі в різних галузях харчової промисловості. Проте використання цих круп для створення виробів спеціального призначення досить обмежене, особливо це стосується вітчизняної харчової промисловості. На жаль, в Україні процеси переробки й використання гречки та проса перебувають ще на початковому етапі. Основними продуктами з них є гречана крупа, пшоно та борошно на їх основі. Складніші способи переробки цих круп'яних культур майже не застосовуються. З огляду на це особливе значення надається максимальному використанню ресурсів гречки та проса для отримання низки продуктів здорового харчування.

## **Висновки за розділом**

1. Теоретично обґрунтовано використання фітостеролів як цінних мікронутрієнтів для створення продуктів харчування спеціального призначення. Доведено, що ці речовини мають антиоксидантну, протизапальну, протиатерогенну, антибактеріальну та протиракову дію. Головна їх цінність полягає в протидії абсорбції харчового холестерину. Розчинені фітостероли і фітостаноли у вільній чи етеризованій формах в

оптимальних дозах (0,8–0,1 г еквівалентів на день) і в різних харчових продуктах-носіях є важливими компонентами для підтримки здоров'я серцево-судинної системи.

2. Установлено, що багато відомих світових компаній, таких як Unilever (Нідерланди – Великобританія), Raisio Plc (Фінляндія), Cargill Inc (США), Cognis (Німеччина), DRT (Франція), Lipofoods (Іспанія), Enzymotech Ltd (Ізраїль), активно використовують фітостероли як функціональні мікронутрієнти під час виробництва харчових продуктів спеціального призначення. Але створення продукції з холестеринознижувальними властивостями шляхом збагачення продуктів-носіїв вільними фітостеролами та фітостанолами – дорогий та працемісткий процес. Інший спосіб отримання продуктів із холестеринознижувальними властивостями – пошук та використання рослинної сировини, багатої на рослинні стероли.

3. Аналіз літературних джерел дозволив установити, що в рослинній сировині містяться також інші речовини, які мають холестеринознижувальні властивості, а саме  $\gamma$ -оризанол, фітостерилферулати та ферулова кислота. Ферментативний гідроліз  $\gamma$ -оризанолу приводить до утворення фітостерилферулатів і фітостеролів, що збільшує біологічну активність продукції. Найчастіше для проведення ферментативного гідролізу  $\gamma$ -оризанолу використовують ферментні препарати карбоксилетергідролази та ксиланази. Для підвищення активності цього процесу важливим є підбір ферментного препарату та параметрів його проведення.

4. Установлено, що крупи з гречки та проса мають багатий хімічний склад, характеризуються цінними функціональними властивостями, є лідерами серед інших видів круп за вмістом білка, жиру, фітостеролів та інших біологічно активних речовин. Визначено відсутність інформації про хімічний склад, біологічну цінність та безпечність місцевих сортів гречки та проса. Розкрито проблеми обмеженості асортименту спеціальної продукції з використанням продукції переробки гречки і проса. Усе це дозволило обґрунтувати перспективність і актуальність

комплексних досліджень споживної цінності круп із гречки та проса місцевих селекційних сортів та продуктів їх використання.

## РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 2.1. Характеристика об'єктів дослідження

Об'єктами дослідження в ході експериментальних робіт були модельні системи для проведення ферментативного гідролізу  $\gamma$ -оризанолу, визначення ферментативної активності відібраних ферментних препаратів, відпрацювання раціональних параметрів реакції ферментативного гідролізу  $\gamma$ -оризанолу. Для створення цих систем обрано:  $\gamma$ -оризанол (Henry Lamote GmbH, м. Бремен), ферментний препарат – сирець-порошок бичачої підшлункової залози (Sigma, Taufrivchen), препарати ліпази – ліпаза В *Candida antarctica*, ліпаза А *Candida antarctica*, ліпаза С. *rugosa* тип VII (Sigma – Aldrich, Taufrivchen), препарат ксилонази – Pentopan BG500 (Novozymes, Badsvaerd, Данія), таурохолат натрію (Sigma, Taufrivchen), фосфат натрію хлористий натрій, п-кумаринові кислоти, етилферулат, п-нітрофенілпальмітат, п-нітрофенол. Приготування розчину для гідролізу  $\gamma$ -оризанолу ферментними препаратами й використовувані при цьому прилади, допоміжні засоби і матеріали наведено в додатку А.

Для виробництва нових продуктів на основі гречки та проса використовували таку сировину й матеріали: борошно пшеничне 1-го гатунку; борошно житнє хлібопекарське обдирне; сіль кухонну кам'яну; воду питну; сухі закваски O-tentic Durum, Sapore Rigoletto (фірма «Puratos», Бельгія); ферментний препарат Пентопан BG500 (фірма «Novozymes», Данія); крупу та борошно з гречки і проса дослідних сортів.

## 2.2. Методи дослідження

У роботі були використані такі стандартні та спеціальні методи дослідження: фізичні, хімічні, біохімічні, фізико-хімічні, мікробіологічні, органолептичні, соціологічні, експертні, математичне моделювання з використанням сучасних комп'ютерних програм (Microsoft Word, Microsoft Excel та Mathcad).

*Визначення активності ферментних препаратів методом капілярної газової хроматографії з використанням етилферуляту [54]*

У ході експерименту 50 мкл 4,9 мМ розчину етилферуляту суспендували в 450 мкл ферментного буфера рН 6,0 у флаконі на 1,5 мл і гомогенізували протягом 10 хв в ультразвуковій бані. Для отримання двофазної системи до гомогенізованого розчину додавали 200 мкл *n*-гексану. Потім додавали по 5 мг ферментного препарату в кожному випадку. Партії інкубували на водяній бані протягом 15 хв, постійно струшуючи (200 об/хв), при 45°C, партії з ліпазою VII *C. rugosa* при 37°C. Інкубацію припиняли, поміщаючи партії в силіконову баню при 100°C на 5 хв. Потім додавали 50 мкл розчину внутрішнього стандарту (2) і гомогенізували протягом 10 хв в ультразвуковій бані. Партії екстрагували тричі по 400 мкл МТБЕ щоразу. Екстракт МТБЕ сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (безводним), потім продували азотом. Залишок силілували, потім аналізували за допомогою капілярної газової хроматографії. Крім того, були приготовлені партії без додавання ферментів, щоб перевірити стабільність відповідного субстрату проти неферментативного гідролізу.

*Фотометричне визначення активності ферментних препаратів із використанням *n*-нітрофенілпальмітату [54]*

Фотометричне визначення активності ліпази проводили на фотометрі UVICON 420. Для цього 100 мкл 10 мМ розчину *n*-нітрофенілпальмітату переносили у флакон на 1,5 мл. Після видалення розчинника азотом додавали 900 мкл 100 мМ буфера фосфату натрію-NaCl рН 7,0 і 5 мг ферменту. Потім партії інкубували на водяній бані протягом 2 год, постійно струшуючи

(200 об/хв), при 45°C (Pentopan BG500, ліпаза *C. antarctica* типу А і типу В) або 37°C (ліпаза *C. rugosa*). Після цього партії фільтрували крізь мембрану. Потім 600 мкл відфільтрованого розчину розбавляли 1900 мкл води Millipore кімнатної температури при 400 нм порівняно з контрольним значенням. Холосте значення визначали шляхом приготування партії без додавання ферменту.

Для кількісної оцінки виходу *p*-нітрофенілпальмітату фотометр калібрували за допомогою *n*-нітрофенолу. Для цього були приготовані партії з 50,0 мкл, 10,0 мкл, 1,0 мкл або 0,1 мкл калібрувального розчину *n*-нітрофенолу замість розчину *p*-нітрофенілпальмітату, оброблені й виміряні, але без додавання ферментів й інкубації. Концентрації калібрувальних розчинів були обрані таким чином, щоб кількість доданого *n*-нітрофенолу відповідала конверсії *n*-нітрофенілпальмітату 50,0%, 10,0%, 1,0% і 0,1% відповідно. Конверсію гідролізу *n*-нітрофенолу пальмітату після ферментативної реакції визначали з використанням калібрувальної кривої (абсорбція як функція концентрації *p*-нітрофенолу).

*Проведення гідролізу  $\gamma$ -оризанолу з порошком підшлункової залози бика [54]*

Спочатку 300 мкл 100 мМ буфера фосфату натрію-NaCl pH 7,0 і 500 мкл 12 мМ або 48 мМ розчину таурохолату натрію переносили в пробірку на 1,5 мл. Потім додавали 50 мкл 16,1 мМ розчину  $\gamma$ -оризанолу, суміш гомогенізували протягом 10 хв в ультразвуковій бані. Після цього додавали 5 мг порошку бичачої підшлункової залози і 200 мкл ферментного буфера pH 6,0 й інкубували протягом 12 год або 24 год при 37°C на водяній бані, постійно струшуючи (200 об/хв) або перемішуючи. Інкубацію суміші завершували в тепловій силіконовій бані при 100°C протягом 5 хв. Після охолодження до кімнатної температури додавали 50 мкл розчину внутрішнього стандарту (1) і перемішували протягом 10 хв в ультразвуковій бані. Партію екстрагували тричі по 400 мкл МТБЕ щоразу. Розчинник об'єднаних екстрактів МТБЕ видаляли в атмосфері азоту, залишок силілували. Силіловані зразки аналізували з використанням

ГХ/ПД. Стійкість  $\gamma$ -оризанолу до неферментативного гідролізу перевіряли з використанням контрольного значення без додавання ферменту.

#### *Проведення гідролізу $\gamma$ -оризанолу ліпазами і Pentoran BG500*

По 50 мкл розчину  $\gamma$ -оризанолу суспендували в 450 мкл ферментного буфера (рН 6). Партії гомогенізували протягом 10 хв в ультразвуковій бані. Потім додавали 5 мг або 100 мг ферментного препарату й інкубували на водяній бані протягом 24 год, постійно струшуючи (400 об/хв), при 45°C або 37°C (ліпаза *C. rugosa*). Інкубацію партії завершували в силіконовій бані при 100°C протягом 5 хв. Після охолодження до кімнатної температури додавали

50 мкл розчину внутрішнього стандарту (1) і перемішували протягом 10 хв в ультразвуковій бані. Партію екстрагували тричі по 400 мкл МТБЕ щоразу. Розчинник об'єднаних екстрактів МТБЕ видаляли в атмосфері азоту, залишок силілували. Силіловані зразки аналізували з використанням ГХ/ПД. Подальші партії гідролізу інкубували в таких реакційних середовищах:

1) 200 мкл ферментного буфера рН 6 + 250 мкл 48 мМ розчину таурохолату натрію;

2) двофазна система: 200 мкл ферментного буфера рН 6 + 250 мкл 48 мМ розчину таурохолату натрію + 200 мкл *n*-гексану.

Стабільність  $\gamma$ -оризанолу до неферментативного гідролізу перевіряли за допомогою холостого значення.

#### *Імобілізація порошком підшлункової залози бика*

• Адсорбція. На основі методу Patel та ін. (1991): 50 мг порошку підшлункової залози бика розчиняли в 1 мл дистильованої води і центрифугували при 4°C. 500 мкл супернатанту додавали до 20 мг макропористого поліпропіленового порошку Accurel MP1000, який попередньо тричі промивали 500 мкл метанолу і сушили на роторному випарнику (Т = 40°C, р = 300 мбар). Потім суміш струшували за кімнатної температури протягом 24 год при 200 об/хв. Після

цього порошок промивали 1 мл бідистильованої води і сушили на роторному випарнику ( $T = 40^{\circ}\text{C}$ ,  $p = 300$  мбар,  $t = 36$  год).

Отриманий ферментний препарат тестували на активність за гідролізом стерилферуляту в тестових партіях з  $\gamma$ -оризанолом.

- Адсорбція і зшивання (з глутаровим альдегідом). Імобілізація проводилася методом Osborne та ін. (2006): 500 мкл 5 мМ буфера фосфату натрію-NaCl ( $\text{pH } 7,0$ ) додавали до 50 мг порошку підшлункової залози великої рогатої худоби. Після стадії центрифугування 400 мкл розчину ферменту і 400 мкл бідистильованої води струшували з 100 мг попередньо обробленого макропористого поліпропіленового порошку Accurel MP1000 протягом 4 год при  $3^{\circ}\text{C}$  при 300 об/хв. Потім воду випарювали ( $T = 7^{\circ}\text{C}$ ,  $p = 10$  мбар,  $t = 1,3$  год). Після додавання 1,5 мл ацетону суміш струшували (300 об/хв) протягом 1 год. Потім додавали 5 мкл глутарового альдегіду і струшували (30 об / хв) за кімнатної температури протягом 21 год. Розчинник випарювали на роторному випарнику ( $T = 30^{\circ}\text{C}$ ,  $p = 300$  мбар,  $t = 1,3$  год).

Отриманий ферментний препарат тестували на активність за гідролізом стерилферуляту в тестових партіях з  $\gamma$ -оризанолом.

### *Переетерифікація*

Спочатку 50 мкл 16,1 мМ розчину  $\gamma$ -оризанолу поміщали в пробірку на 1,5 мл і розчиняли в 250 мкл МТВЕ і 500 мкл 5,4 М розчину метилат натрію. Розчин нагрівали до кипіння в закритій посудині на FID газового хроматографа, потім залишали в темряві на 30 хв. Після цього розчин знову нагрівали до кипіння і після охолодження переносили в пробірку на 10 мл. Потім додавали 50 мкл відповідного розчину внутрішнього стандарту (2). Після додавання 1 мл дихлорметану і 4 мл 0,7 М соляної кислоти розчин енергійно струшували. Фазу дихлорметану переносили в пробірку на 1,5 мл піпеткою Пастера і сушили, використовуючи  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (безводний). Осушену дихлорметанову фазу продували азотом, залишок силілували й аналізували методом капілярної газової хроматографії.

### *Силілування*

Дослідний зразок змішували з 10 мкл піридину, 50 мкл BSTFA + 1% TMCS в атмосфері аргону. Потім зразок нагрівали до 80°C протягом 20 хв у силіконовій бані. Після охолодження силілованого зразка його розбавляли 90 мкл гексану й аналізували методом капілярної газової хроматографії. Силізовані зразки зберігали при 5...8°C в холодильнику.

*Визначення продуктів ферментативного гідролізу  $\gamma$ -оризанолу*

Ферментативне гідролізне перетворення  $\gamma$ -оризанолу визначали методом капілярної газової хроматографії на GC 8000 і на HRGC 3000, були оснащених інжектором на колонці й полум'яно-іонізаційним детектором (FID). Детальний опис умов хроматографування наведено в додатку Б.

Конверсія гідролізу розраховувалася за наступним рівнянням:

$$\text{Конверсія гідролізу (\%)} = \frac{A_{\text{стерол (e)}} \times A_{IS(U)}}{A_{\text{стерол (U)}} \times A_{IS(e)}} \times 100$$

де  $A_{\text{стерол (e)}}$ : площа піка стеролу після ферментативного гідролізу;

$A_{IS(e)}$ : Площа піка внутрішнього стандарту після ферментативного гідролізу;

$A_{\text{стерол (U)}}$ : площа піка стеролу після хімічної переестерифікації;

$A_{S(U)}$ : Площа піка внутрішнього стандарту після хімічної переестерифікації.

*Ідентифікація продуктів гідролізу за допомогою мас-спектроскопії [54].*

Мас-спектрометричні дослідження проводили на Trace GC ultra з мас-спектрометром Trace DSQ від Thermo Finnigan, м. Остін, Техас. Програмне забезпечення Xcalibur 1.4 SR1 (Thermo Finnigan, м. Остін, Техас) використовували для аналізу ГХ-МС. Детальний опис умов мас-спектроскопіювання наведено в додатку Б.

## 2.3. Методи математичного моделювання

### 2.3.1. Моделювання оптимальних режимів проведення гідролізу $\gamma$ -оризанолу ферментними препаратами

Моделювання оптимальних режимів проведення гідролізу  $\gamma$ -оризанолу ферментними препаратами [180]. На першому етапі математичного моделювання гідролізу  $\gamma$ -оризанолу порошком підшлункової залози бика ставилося завдання пошуку оптимального співвідношення компонентів фермент–субстрат–буфер. Відповідні дані наведено в табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Конверсія гідролізу  $\gamma$ -оризанолу порошком підшлункової залози бика залежно від варіацій співвідношення компонентів при  $t = 37^\circ\text{C}$

№ п/п	Співвідношення компонентів			Вихід продуктів гідролізу, %	
	Фермент	Субстрат	Буфер	Кампестерил-ферулят	Ситостерилферулят
1	1	1	1	$36,6 \pm 0,4$	$31,6 \pm 0,9$
2	1	1	5	$50,3 \pm 0,5$	$41,2 \pm 0,8$
3	1	1	10	$41,3 \pm 1,2$	$41,5 \pm 0,4$
4	1	5	1	$11,3 \pm 0,1$	$11,1 \pm 0,5$
5	1	5	5	$38,4 \pm 0,5$	$31,8 \pm 0,5$
6	1	5	10	$32,2 \pm 4,8$	$31,9 \pm 4,6$
7	1	10	1	$0,30 \pm 0,04$	$2,1 \pm 0,03$
8	1	10	5	$16,7 \pm 0,3$	$14,4 \pm 0,2$
9	1	10	10	$23,5 \pm 0,6$	$21,8 \pm 0,5$

Унаслідок регресійного аналізу цих даних запропоновано таку математичну модель:

$$y_1 = 27,7 \times x_1 - 4,59 \times x_2 + 8,32 \times x_3 + 0,122 \times x_2^2 - 0,592 \times x_3^2, \quad (2.2)$$

де  $y_1$  – вихід кампестерилферуляту, %;

$$y_2 = 26,3 \times x_1 - 3,86 \times x_2 + 5,57 \times x_3 + 0,095 \times x_2^2 - 0,337 \times x_3^2, \quad (2.3)$$

де  $y_2$  – вихід ситостерилферуляту, %;

$x_1$  – масова частка ферменту;

$x_2$  – масова частка субстрату;

$x_3$  – масова частка буфера.

Відносна похибка апроксимації експериментальних даних за рівнянням (2.2) – 18%, рівнянням (2.3) – 11% у межах варіювання компонентів згідно з таблицею (2.1). На підставі цих математичних моделей проведено пошук оптимального співвідношення компонентів, які забезпечують максимум виходу продуктів гідролізу – кампестерилферуляту та ситостерилферуляту. Розв'язання оптимізаційної задачі проводилось у середовищі пакета Mathcad-15 за стандартною процедурою нелінійної оптимізації. Оптимальні співвідношення компонентів фермент–субстрат–буфер за максимальним виходом продуктів гідролізу за рівняннями (2.2) та (2.3) становили: 1:5:5.

Наступним етапом моделювання було визначення оптимальних режимів гідролізу  $\gamma$ -оризанолу порошком підшлункової залози бика, а саме вплив механічної дії, періоду інкубації, та концентрації таурхолату натрію. Наступна серія експериментів проводилася за оптимального співвідношення компонентів фермент–субстрат–буфер як 1:5:5. Відповідні дані наведено в табл. 2.2.

Унаслідок регресійного аналізу даних таблиці 2.2 запропоновано таку математичну модель:

$$y_1 = 22,4 - 1,76 \times x_1 + 21,9 \times x_2 + 1,40 \times x_3 + 0,211 \times x_4, \quad (2.4)$$

де  $y_1$  – вихід кампестерилферуляту, %;

$$y_2 = 25,9 - 10,8 \times x_1 + 18,5 \times x_2 + 1,36 \times x_3 - 0,056 \times x_4, \quad (2.5)$$

де  $y_2$  – вихід ситостерилферуляту, %;

$x_1$  – наявність струшування (1 або 0);

$x_2$  – наявність перемішування (1 або 0);

$x_3$  – період інкубації,  $\times 60^{-2}$  (с);

$x_4$  – концентрація таурхолату натрію, мМ.

**Таблиця 2.2**

**Конверсія гідролізу  $\gamma$ -оризанолу порошком підшлункової залози бика залежно від варіацій деяких чинників процесу при  $t = 37^{\circ}\text{C}$  та співвідношенні компонентів фермент–субстрат–буфер як 1:5:5**

№ з/п	Механічний вплив		Період інкубації, $\tau \times 60^{-2}$ (с)	Концентрація таурхолату натрію, мМ	Вихід продуктів гідролізу, %	
	Струшування*	Перемішування*			Кампестерил-феруляту	Ситостерил-феруляту
1	0	0	6	12	34,5	30,5
2	0	0	6	48	40,7	32,1
3	1	0	6	0	29,1	23,3
4	0	1	6	0	52,8	52,6
5	0	0	6	0	25,1	29,0
6	0	0	12	0	45,0	51,0
7	0	0	18	0	51,1	54,5
8	0	0	24	0	52,0	52,8

\*Цифра 1 означає наявність механічного впливу, цифра 0 означає відсутність механічного впливу.

Відносна похибка апроксимації експериментальних даних за рівнянням (2.4) – 7%, рівнянням (2.5) – 8% у межах варіювання значущих чинників згідно з таблицею 2.2. На підставі цих математичних моделей був проведений пошук оптимального співвідношення компонентів, які забезпечують максимум виходу продуктів гідролізу – кампестерилферуляту та ситостерилферуляту. Розв’язання оптимізаційної задачі проводилось у середовищі пакета Mathcad-15 за стандартною процедурою нелінійної оптимізації. Знайдені оптимальні режими гідролізу  $\gamma$ -оризанолу порошком підшлункової залози за максимальним виходом продуктів гідролізу кампестерилферуляту та ситостерилферуляту такі: наявність механічного впливу струшування = 1, перемішування = 1, період інкубації  $\tau = 48 \times 60^2$  с, концентрація таурхолату натрію = 24 мМ.

Наступний етап моделювання присвячено процесу гідролізу  $\gamma$ -оризанолу ферментним препаратом Pentopan BG500. У табл. 2.3 наведено відповідні експериментальні дані. Співвідношення

компонентів фермент–субстрат–буфер у цих експериментах було сталим; досліджувався вплив механічної дії, тривалості періоду інкубації та концентрації таурхолату натрію.

**Таблиця 2.3**

**Конверсія гідролізу  $\gamma$ -оризанолу ферментним препаратом Pentoran BG500 залежно від варіацій деяких чинників процесу при  $t = 45^{\circ}\text{C}$**

№ з/п	Співвідношення компонентів			Механічний вплив		Період інкубації, $\tau \times 60^{-2}$ , с	Концен-трація таурхо-лату натрію, мМ	Вихід продуктів гідролізу, %	
	Фермент	Субстрат	Буфер	Струшу-вання*	Перемішу-вання*			Кампестерил-феруляг	Ситостерил-феруляг
1	20	1	1	0	0	12	0	8	27
2	20	1	1	0	0	12	0	4	22
3	20	1	1	0	0	24	0	5	29,5
4	20	1	1	0	0	36	0	6	21,3
5	20	1	1	0	0	24	48	28,44	44,43
6	20	1	1	0	1	24	48	18,35	35,81
7	20	1	1	1	0	24	48	28,45	44,51

\*Цифра 1 означає наявність механічного впливу, цифра 0 означає відсутність механічного впливу.

Унаслідок регресійного аналізу даних табл. 2.3 знайдено таку математичну модель:

$$y_1 = 3,0 + 0,01 \times x_1 - 10,1 \times x_2 + 0,083 \times x_3 + 0,488 \times x_4, \quad (2.6)$$

де  $y_1$  – вихід кампестерилферуляту, %;

$$y_2 = 24,9 + 0,08 \times x_1 - 8,62 \times x_2 - 0,029 \times x_3 + 0,42 \times x_4, \quad (2.7)$$

де  $y_2$  – вихід ситостерилферуляту, %;

$x_1$  – наявність струшування (1 або 0);

$x_2$  – наявність перемішування (1 або 0);

$x_3$  – період інкубації,  $\times 60^{-2}$ , с;

$x_4$  – концентрація таурхолату натрію, мМ.

Відносна похибка апроксимації експериментальних даних за рівнянням (2.6) – 7%, рівнянням (2.7) – 8% у межах варіювання значущих чинників згідно з таблицею (2.6). На підставі цих математичних моделей проведено пошук оптимального співвідношення компонентів, які забезпечують максимум виходу продуктів гідролізу – кампестерилферуляту та ситостерилферуляту. Розв'язання оптимізаційної задачі проводилось у середовищі пакета Mathcad-15 за стандартною процедурою нелінійної оптимізації. Знайдені оптимальні режими гідролізу  $\gamma$ -оризанолу порошком підшлункової залози за максимальним виходом продуктів гідролізу – кампестерилферуляту та ситостерилферуляту такі: наявність механічного впливу струшування = 1, перемішування = 1, період інкубації  $\tau = 48 \times 60^2$  с, концентрація таурхолату натрію = 24 мМ.

### **2.3.2. Моделювання рецептурного складу нових видів хліба**

Загальне вирішення цієї проблеми складається з трьох етапів. На першому етапі шляхом проведення цілеспрямованих експериментів знаходять об'єктивні залежності між компонентами рецептури готового продукту і тими значеннями, що являють собою показники якості. Визначення цих залежностей дає можливість отримати математичну модель процесу. На другому етапі досліджень, використовуючи методи оптимізації, на основі здобутої математичної моделі знаходять значення рецептури, що забезпечує максимальне значення обраного показника якості готового виробу (Додаток В). На останньому етапі остаточно перевіряють знайдені параметри розробленої рецептури на відповідність установленим показникам якості й у разі необхідності проводять корегування.

Для побудови математичної моделі за критерій оптимізації взято показник питомого об'єму готових виробів ( $Y$ , см<sup>3</sup>/г). Саме цей показник найкраще характеризує якість кожного зразка хліба. Математичну модель побудовано для визначення питомого об'єму хліба з гречаним борошном ( $Y_1$ ) та хліба із пшоном ( $Y_2$ ). Після ретельного аналізу компонентів, що входять до рецептури

продукту, та технологічних параметрів, що впливають на якість хліба, було обрано вхідні змінні:  $x_1$  – дозування ферментного препарату Пентопан BG500 (кг),  $x_2$  – вологість тіста (%).

Для опису залежностей між вихідними змінними і вхідним параметром використано квадратичну модель вигляду:

$$Y_i(x_1, x_2) = a_{1,i} + a_{2,i}x_1 + a_{3,i}x_2 + a_{4,i}x_1^2 + a_{5,i}x_2^2 + a_{6,i}x_1x_2. \quad (2.8)$$

де  $a_{1,i} \dots a_{6,i}$  – коефіцієнти математичної моделі, причому  $i = 1 \dots 2$  та означає відношення до різних видів готового продукту;

$Y_i$  – показник якості готової продукції.

Використання цієї моделі дає можливість знайти найкращі сполучення показників рецептури відносно показника якості.

Згідно із загальною теорією проведення експериментальних досліджень для визначення коефіцієнтів моделі шляхом проведення повного факторного експерименту необхідно побудувати таблицю, яка складається з дев'яти дослідів. У таблиці відтворюються всі можливі сполучення між вхідними змінними, також можуть додаватися й інші точки, які викликають певний науковий інтерес. Такий план експерименту (табл. 2.4) має назву D-оптимального [180].

**Таблиця 2.4**

**Таблиця плану експерименту**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
$X_1$	-1	-1	1	1	0	0	-1	1	0
$X_2$	-1	+1	-1	1	-1	+1	0	0	0

Як вхідні змінні в табл. 2.4 використано кодовані значення, які розраховуються за формулою:

$$Xi = \frac{x_i - \frac{x_{i \max} + x_{i \min}}{2}}{\frac{x_{i \max} - x_{i \min}}{2}}, \quad (2.9)$$

де  $i = 1$  – означає кількість ферментного препарату;

$i = 2$  – вологість тіста.

За допомогою перетворення моделі (2.8) діапазон вхідних змінних дорівнює  $(-1...1)$  і дає можливість швидко попередньо оцінити коефіцієнти математичної моделі.

Після побудови таблиці експерименту на її основі створюється матриця експерименту  $F$ , яка враховує обраний вид математичної моделі. У кожній точці експерименту проводилося не менше двох вимірювань із метою зменшення впливу похибок вимірювання, для подальшого обчислення коефіцієнтів моделі брали середнє значення проведених вимірювань.

Коефіцієнти моделі визначали за формулою:

$$a = (F^T F)^{-1} F^T Y, \quad (2.10)$$

де  $Y$  – матриця даних експерименту.

Для обчислення коефіцієнтів моделі використано пакет Mathcad. Перевірка математичної моделі на адекватність була проведена стандартними методами також із використанням пакета Mathcad [180].

## Висновки за розділом

1. Визначено об'єкти дослідження: модельні системи для проведення ферментативного гідролізу  $\gamma$ -оризанолу, визначення ферментативної активності відібраних ферментних препаратів, відпрацювання раціональних параметрів реакції ферментативного гідролізу  $\gamma$ -оризанолу; нові види хліба («Гречана сила» та «Пшоняний») та їх аналоги.

2. Обрано методи дослідження, а також методи математичного моделювання з використанням сучасних комп'ютерних програм.

### РОЗДІЛ 3. ТЕОРЕТИЧНЕ ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ПАРАМЕТРІВ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГІДРОЛІЗУ $\gamma$ -ОРИЗАНОЛУ

#### 3.1. Аналіз продуктів гідролізу $\gamma$ -оризанолу

Для визначення продуктів гідролізу відповідного стерилферуляту як індикатор було обрано утворення стеролу, який швидко і легко виявити за допомогою капілярної газової хроматографії.

Передумовою для визначення конверсії гідролізу є знання конвертованої кількості використаних компонентів. Відповідну кількість стеролу при 100% гідролізі визначали шляхом хімічної переестерифікації метилатом натрію (рис. 3.1).

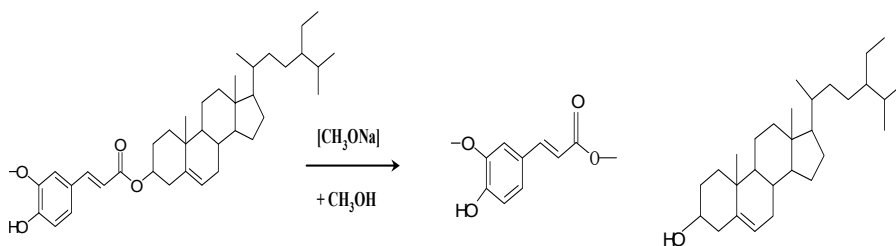


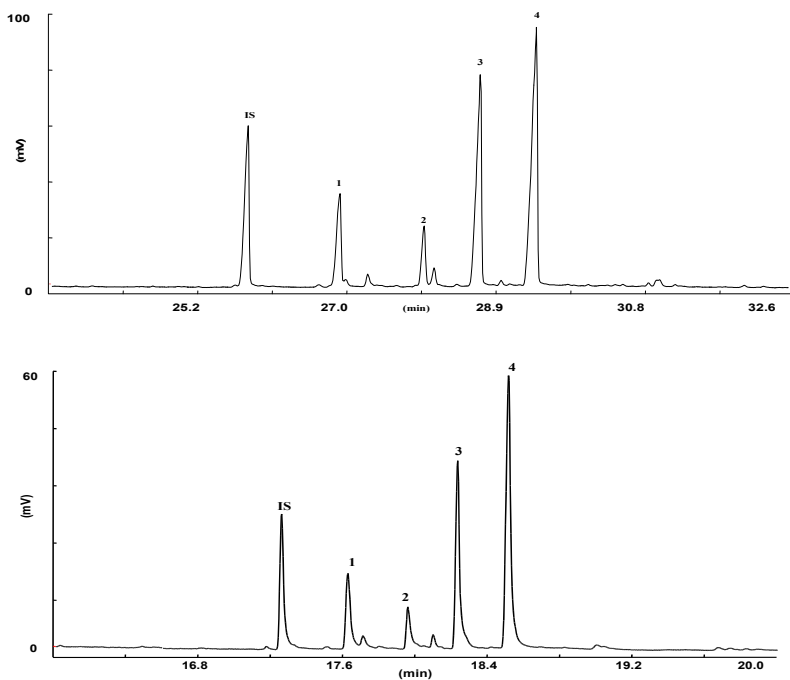
Рис. 3.1. Переестерифікація  $\beta$ -ситостерилферуляту

Як внутрішній стандарт використовували  $5\alpha$ -холестан- $3\beta$ -ол. Партії гідролізу екстрагували МТВЕ, після силілування екстракт досліджували на похідні ТМС стеринів за допомогою газової хроматографії з полум'яно-іонізаційним детектором.

Вивільнені стерини спочатку аналізували на термостабільній, відносно неполярній нерухомій фазі (DB-5ht).

Міллером уже використовувалася 5% дифенілдиметилполісилоксанова фаза (DB-5) для кількісного визначення вільних стеринів під час гідролізу  $\gamma$ -оризанолу *in vitro* [60]. У разі використання таурохолату натрію на хроматограмах з'явився невідомий пік, коелюйований із ТМС-ситостерином. Ці піки були розділені на стаціонарній трифторо-пропілметилполісилоксановій фазі із середньою полярністю (Rtx-200MS).

На рис. 3.2 показано капілярний газохроматографічний поділ стеринів, отриманих після переестерифікації  $\gamma$ -оризанолу на відносно неполярній (DB-5ht) і середньополярній стаціонарній фазі (Rtx-200MS).



**Рис. 3.2.** Капілярний газохроматографічний поділ триметилсилільних похідних стеролу (похідних ТМС) після переестерифікації  $\gamma$ -оризанолу на нерухомих фазах DB-5ht (a) і Rtx-200MS (b): внутрішній стандарт (IS); кампестерин (1);  $\beta$ -ситостерин (2); циклоартенілферулят (3); 24-метиленициклоартенілферулят (4)

Елюювання силілованих стеринів із Rtx-200MS відбулося набагато раніше, та порядок елюювання був однаковим на обох колонках. Стериновий склад використовуваного  $\gamma$ -оризанолу наведено в табл. 3.1 [181].

**Таблиця 3.1**  
**Склад  $\gamma$ -оризанолу, використовуваного для гідролізу [54]**

Компоненти $\gamma$ -оризанолу	Mol, %	Маса, %
Кампестерилферулят	14,7 $\pm$ 0,10	14,0 $\pm$ 0,12
$\beta$ -ситостерилферулят	7,5 $\pm$ 0,12	7,3 $\pm$ 0,12
Циклоартенілферулят	33,9 $\pm$ 0,35	33,9 $\pm$ 0,32
24-Метиленциклоартанілферулят	44,8 $\pm$ 0,46	33,9 $\pm$ 0,32

## **3.2. Ферментативний гідроліз $\gamma$ -оризанолу порошком підшлункової залози бика**

### **3.2.1. Визначення гідролітичної активності порошку підшлункової залози бика**

Гідроліз  $\gamma$ -оризанолу порошком підшлункової залози бика вже описаний Miller, Majauskaitė, Gerspach [54; 181]. Щоб перевірити гідролітичну активність узятих для дослідження препаратів і порівняти її з відомими даними, були проведені випробування гідролізу на основі методу, описаного Gerspach [181].

Гідролітичну активність препарату порошку підшлункової залози бика перевіряли шляхом інкубації партій гідролізу з 5 мг вихідного препарату ферменту протягом 24 год при 37°C зі струшуванням у буферному розчині, з додаванням 12 мМ розчину таурохолату натрію. Досягнуті конверсії гідролізу показано в табл. 3.2.

Аналіз даних таблиці 3.2 показує, що не вдалося виявити продуктів гідролізу основних компонентів  $\gamma$ -оризанолу: циклоартенілферуляту і 24-метиленциклоартанілферуляту. Це

узгоджується з результатами Gerspach [181] і Miller [54], які також змогли продемонструвати тільки гідроліз 4-десметилстерилферулятів. Структурні формули 4,4-диметилстеринів циклоартенолу і 24-метиленциклоартанолу відрізняються від 4-десметилстеринів тим, що мають циклопропанове кільце на кільці В, а також двома метильними групами на С4 основного ланцюга стеролу.

**Таблиця 3.2**

**Результати гідролізу  $\gamma$ -оризанолу з порошком підшлункової залози бика**

Компоненти $\gamma$ -оризанолу	Стерол <sup>1</sup> [нмол/мг]	Маса, %
Кампестерилферулят	12,7 ± 0,0	34,4 ± 0,4
$\beta$ -ситостерилферулят	6,0 ± 0,0	30,9 ± 0,8
Циклоартенілферулят	н. з. <sup>2</sup>	н. з.
24-Метиленциклоартанілферулят	н. з.	н. з.
Загальний вихід 7 ± 0,6		

<sup>1</sup> нмол Стерол – мг порошка підшлункової залози бика.

<sup>2</sup> н. о. – не знайдено.

Очевидно, що принаймні одна з цих структурних особливостей запобігає гідролізу складних ефірів ферулової кислоти і 4,4-диметилстеринів холестеролестеразою.

Досягнуті ступені гідролізу нижче порівняноі з результатами, викладеними в дослідженнях Gerspach і Miller. Це може бути пов'язано з втратою активності ферменту під час зберігання.

Конверсії гідролізу за участю порошку підшлункової залози і чистих холестеролестераз можна було порівняти з результатами, отриманими Miller [54]. Через 24 год в середньому 63% кампестерилферуляту і 67%  $\beta$ -ситостерилферуляту були перетворені холестеролестеразою великої рогатої худоби, а порошком підшлункової залози – 68% і 70% відповідно.

Різні перетворення кампестерилферуляту і  $\beta$ -ситостерилферуляту можна пояснити кількістю подвійних зв'язків у кільці й довжиною бічних ланцюгів стеринів [181].

У контексті цієї роботи умови реакції гідролізу  $\gamma$ -оризанолу з порошком підшлункової залози бика мають бути змінені, а метод має бути поліпшений, щоб оптимізувати гідролітичний процес  $\gamma$ -оризанолу і збільшити конверсію гідролізу.

У подальших наших дослідженнях зроблено спробу збільшити конверсію гідролізу шляхом зміни параметрів проведення процесу, перш за все температури інкубації.

### 3.2.2. Вплив температури на гідроліз $\gamma$ -оризанолу

Відповідно до закону Вант-Гоффа, швидкість хімічних реакцій збільшується з підвищенням температури. Це також відноситься до реакції, що каталізується ферментами. Активність ферментів збільшується в 2–4 рази з підвищенням температури на кожні 10°C. Однак у разі підвищення температури вище критичної позначки стає помітним протилежний ефект у вигляді інактивації ферментів. Таким чином, температурний оптимум щодо активності ферменту є результатом накладення двох протилежних ефектів – активації й інактивації. У разі перевищення оптимальної температури відбувається денатурація білка. Температурна чутливість ферментів обумовлена відносно слабкими силами (іонні зв'язки, водневі зв'язки й гідрофобні взаємодії) для з'єднання білка. Унаслідок теплового руху запускаються незворотні ковалентні модифікації білка (наприклад, дисульфідні групи). Це може привести до утворення сильно розупорядкованої конформації й агрегатних утворень [182].

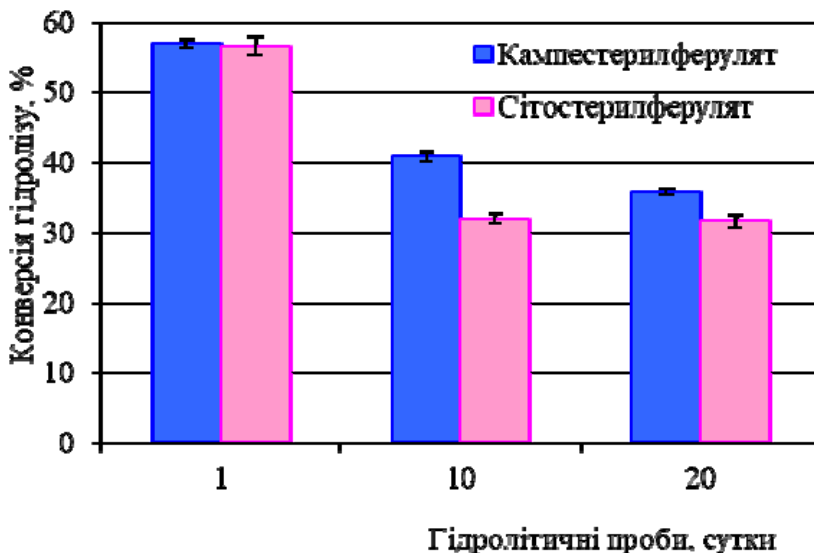
Mažauskaite і Gerspach провели експерименти з гідролізу  $\gamma$ -оризанолу з порошком підшлункової залози свиней і великої рогатої худоби за температури 37°C [54; 181].

Для визначення оптимальної температури проведено експерименти з гідролізу  $\gamma$ -оризанолу з порошком підшлункової залози бика за температур 37°C; 45°C; 50°C; 55°C. За температури вище 45°C фермент інактивується, а температура 37°C є оптимальною для порошку підшлункової залози.

Відомо, що термостабільність ферментів невелика за низьких температур. Втрата активності ферментів відбувається також під час зберігання або заморожування / відтавання. Під час заморожування утворюються кристали, що спричиняють денатурацію білків («холодна денатурація») [183]. Дегідратація пошкоджує гідрофобні зв'язки і сольватовані групи, що призводить до утворення агрегатів і неактивних мономерів як кінцевих продуктів [182].

Повільне заморожування спричиняє утворення великих кристалів, які можуть пошкодити білок або викликати конформаційні зміни. Але тільки деякі ферменти необоротно пошкоджуються під час заморожування [184].

Відповідність із теорією показують певні експериментальні дані (рис. 3.3).



**Рис. 3.3. Вплив повторюваних процесів заморожування/відтавання на гідролітичну активність порошку підшлункової залози під час ферментативного перетворення  $\gamma$ -оризанолу**

Згідно з даними експерименту спостерігається явне зниження активності ферменту. Імовірно, білок був пошкоджений утвореними під час повторюваного процесу заморожування/відтавання кристалами. Зниження активності порошку підшлункової залози під час зберігання призводить до зменшення утворення продуктів гідролізу  $\gamma$ -оризанолу. Припустимо, що це пов'язано зі структурним різноманіттям стерилферулятів. Відомо, що ефіри холестерину з коротким ланцюгом перетворюються швидше, ніж ефіри з довшим [61].

Конверсія гідролізу ситостерилферуляту залишається меншою, ніж кампестерилферуляту. Це можна пояснити довжиною бічних ланцюгів.

Під час роботи з ферментами неминучі процеси заморожування/відтавання. Щоб запобігти втраті активності ферменту, можна спробувати мінімізувати процеси відтавання/заморожування. Для цього доцільно порціонувати ферментні препарати, або використовувати крижану баню для зважування, або використовувати стабілізуючі поліспирти (наприклад, гліцерин).

Порошок підшлункової залози слід зберігати за температури нижче 0°C.

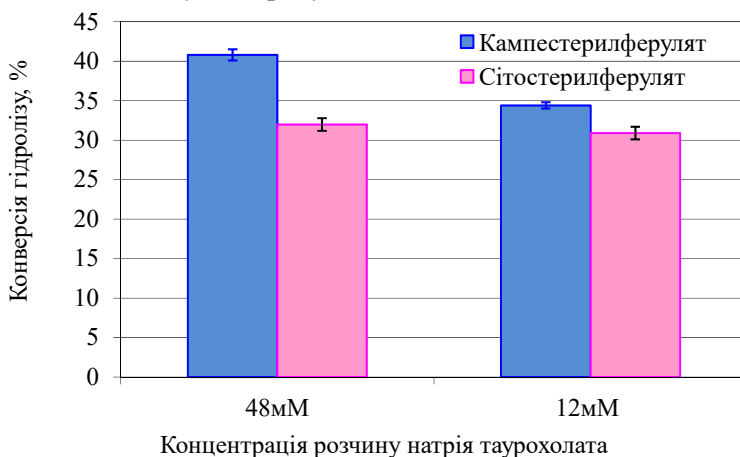
### **3.2.3. Гідролітична активність порошку підшлункової залози в присутності таурохолату натрію**

Багато авторів описують вплив жовчної кислоти або таурохолату натрію, який містить жовчні кислоти, на гідролітичну активність холестеролестерази підшлункової залози й ліпази [61]. Відомо, що зі збільшенням концентрації таурохолату до 10 мМ активність ліпази збільшується, а активність естерази зменшується. Присутність 10 мМ таурохолату натрію в буфері також може значно збільшити гідроліз холестеразиди підшлункової залози. Механізм посилення ферментативної активності ліпази підшлункової залози за допомогою жовчної кислоти і таурохолату відбувається за рахунок зміни конформації активного центру ферменту [61]. Таким чином, доведено, що холестеролестераза підшлункової

залози залежить від кофактора, тобто її активність може бути збільшена за рахунок більш високої концентрації кофактора.

На підставі викладеного можна припустити, що гідролітична активність препарату порошку підшлункової залози в присутності таурохолату натрію також буде більша.

На рис. 3.4 подано дані про вплив концентрації таурохолату натрію в буфері на гідролітичне перетворення  $\gamma$ -оризанолу з використанням порошку підшлункової залози бика. Оскільки в результаті реакції були перетворені тільки дезметилстерилферуляти, кампестерилферулят і ситостерилферулят, перетворення 4,4-диметилстерилферулятів не показані на наступних рисунках.



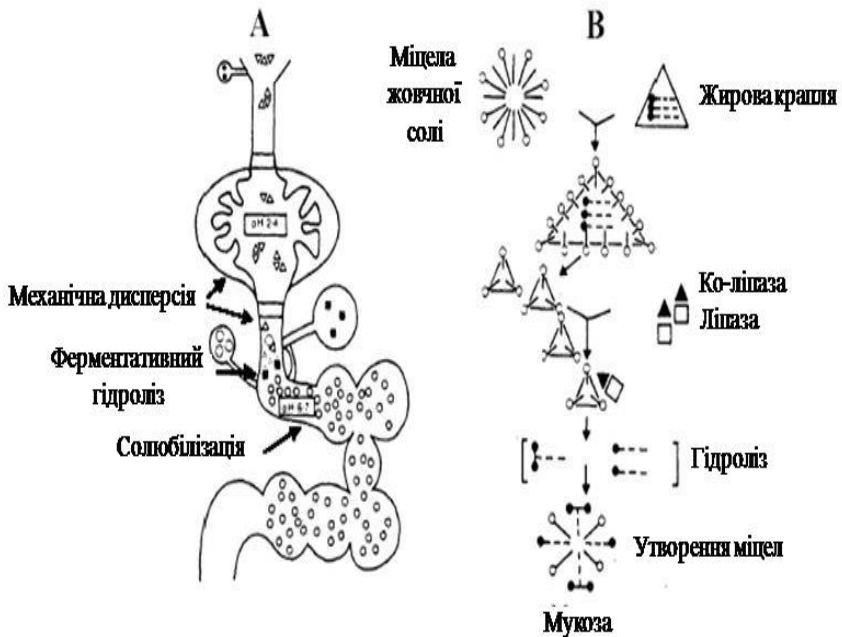
**Рис. 3.4. Ферментативне перетворення  $\gamma$ -оризанолу залежно від концентрації розчину таурохолату натрію (12 мМ або 48 мМ)**

Збільшення концентрації розчину таурохолату натрію від 12 мМ до 48 мМ призводило до збільшення швидкості гідролізу. Конверсія кампестерилферуляту може бути збільшена приблизно на 7%, ситостерилферуляту – до 11%.

Отримання емульсії особливо важливе для гідролізу водонерозчинних субстратів гідролазами [184]. Гідрофобний

субстрат в емульгованій або міцелярній формі краще контактує з активним центром ферменту, таким чином, перетворення субстрату може бути збільшене. Гідроліз гідрофобних субстратів у емульгованій формі *in vivo* є процесом перетравлення ліпідів ліпазою (рис. 3.5).

Механічне диспергування спричиняє проникнення тонкої емульсії з діаметром крапель близько 0,5 мкм у дванадцятипалу кишку, де вона змішується з рідинами підшлункової залози, жовчних шляхів і тонкого кишечника. Жовчні кислоти знаходяться у дванадцятипалій кишці у вигляді солей  $\text{Na}^+$  в концентрації 7–20 мМ. Солі жовчних кислот утворюють комплекс із коліпази й іонів  $\text{Ca}_2^+$ , який зв'язується з краплями емульсії й дозволяє ліпазі або холестеролестеразі атакувати субстрат. У процесі утворюються продукти гідролізу, зокрема жирні кислоти і 2-моноацилгліцериди або жирні кислоти.



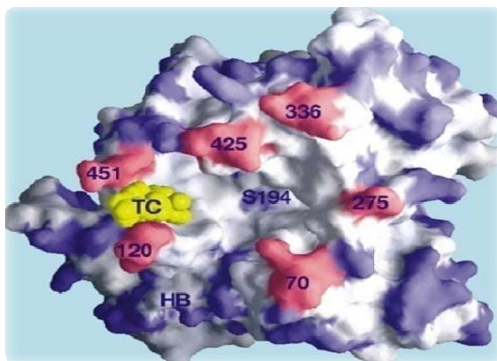
**Рис. 3.5.** Травні процеси в шлунково-кишковому тракті: диспергування, гідроліз і солюбілізація харчових жирів

Chen і Wang описали активацію холестеролестерази бика за допомогою утворення фермент-таурохолатного комплексу [66]. Холестеролестераза великої рогатої худоби є апоферментом, який, крім активного центра, має два сайти зв'язування для солей жовчних кислот, які служать кофакторами. Одна пляма знаходиться поруч із активним центром, який закривається петлею-шпилькою. Під час зв'язування таурохолату запускаються конформаційні зміни, і петля стабілізується у відкритій формі. Це відкриває доступ від підкладки до активного центра.

Другий сайт зв'язування таурохолату знаходиться далеко за активним центром. Біологічна функція цієї точки досі незрозуміла. Імовірно, зв'язування таурохолату із цими сайтами також допомагає у зміні конформації.

Якщо таурохолат натрію відсутній у буфері, молекули води зв'язуються із сайтами зв'язування кофакторів. Фермент проявляє меншу активність.

На рис. 3.6 показано утворений комплекс холестеролестерази бика з таурохолатом натрію. Молекула таурохолату показана жовтим кольором, відповідна оболонка заповнена. Димеризовані залишки рожеві. Пурпуровим кольором позначено заряджені й полярні залишки, білим – гідрофобні залишки. Нуклеофільна частина активного центра Ser194 розташована в гідрофобній області. НВ – сайт зв'язування гепарину.



**Рис. 3.6. Молекулярна поверхня комплексу холестеролестерази бика з таурохолатом натрію**

На підставі експериментальних даних рекомендовано використовувати 48 мМ розчин таурохолату натрію в подальших експериментах для збільшення швидкості гідролізу  $\gamma$ -оризанолу з порошком підшлункової залози бика.

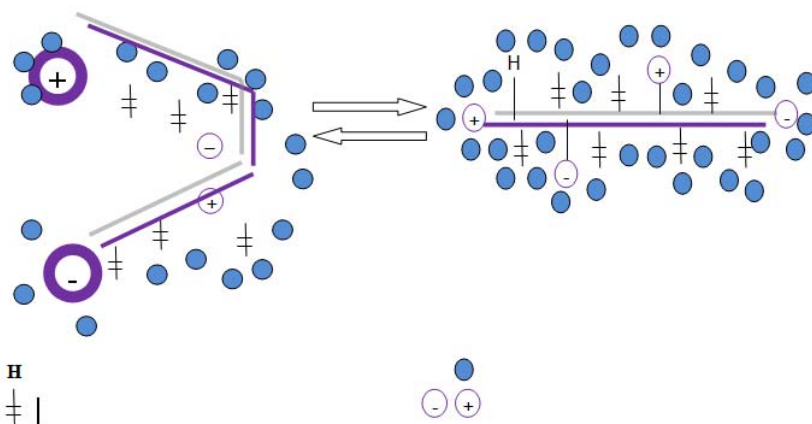
### **3.2.4. Визначення оптимального співвідношення фермент / субстрат / буфер для проведення раціонального ферментативного гідролізу $\gamma$ -оризанолу**

Для оптимальної активності ферменту важливо розробити середовище реакції. Концентрація компонентів середовища варіюється. Щоб створити оптимальне середовище для ферменту, важливо переконатися, що компоненти містяться в концентрації, яка ні занадто низька, ні занадто висока. Для вибору буфера важливо встановити значення рН. Воно впливає на стан заряду або дисоціації всієї білкової молекули, включаючи активний центр. Субстрат має знаходитися в розчині в насиченому стані, але не перевищувати певної межі, щоб уникнути пригнічення ферменту. Концентрація коферменту також має бути достатньою для активації ферменту [184].

Буфер впливає на розчинність і ступінь дисоціації ферменту. Ферменти розчинні у воді. Ступінь гідратації порошку підшлункової залози бика становить 20 г гидратної води / г білка. Розчинність ферменту також залежить від значення рН і наявних солей. Більш високі концентрації солей у буфері знижують розчинність білка [65]. Склад буфера використовували аналогічний із дослідженнями Gerspach як оптимальне середовище для порошку підшлункової залози бика та з оптимальним рН 7,0–7,5 [61].

Молекула природного білка стабілізується неполярними гідрофобними взаємодіями, водневими зв'язками, електростатичними силами, вандерваальсовими взаємодіями. У результаті гідратації вода витісняється зсередини білкової молекули. Вандерваальсові взаємодії послаблюються молекулами води, і водночас молекули білка і води, зливаються одна з одною відбуваються конформаційні зміни білка до тих пір, поки не буде досягнута рівновага (рис. 3.7).

Відмінності в тривимірній структурі білка, що спричинені умовами навколишнього середовища, важливі для спостереження його активності. Тому необхідно знайти відповідну кількість розчину для ферменту.



**Рис. 3.7. Схематичне зображення згорнутої молекули нативного білка в рівновазі з її розгорнутою денатурованою формою**

Miller гідролізував  $\gamma$ -оризанол порошком підшлункової залози великої рогатої худоби і свиней у 100 мМ натрійфосфатному буфері, рН 7,0, із 3М хлоридом натрію [54].

Досліджено, якою мірою співвідношення ферменту (Ф), субстрату (С) і буфера (Б) впливає на конверсію гідролізу  $\gamma$ -оризанолу порошком підшлункової залози бика. Кількість ферменту підтримували постійною, а кількість субстрату і буфера варіювали. Партії інкубували зі струшуванням при 37°C протягом 24 год.

Для стандартного досліду (дослід 1) використовували таку кількість компонентів: 5 мг порошку підшлункової залози, 50 мкл 16,1 мМ розчину  $\gamma$ -оризанолу і 1 мл буфера, що складається з 300 мкл 100 мМ фосфату натрію-NaCl, 500 мкл 48 мМ розчину

таурохолату натрію і 200 мкл ферментного буфера рН 6,0. Цю систему позначено таким чином: Ф:С:Б = 1:1:1.

У наступних дослідках співвідношення субстрату і буфера збільшували в 5 і 10 разів відносно кількості ферменту. Результати гідролітичних конверсій показано в табл. 3.3.

**Таблиця 3.3**

**Конверсії гідролізу  $\gamma$ -оризанолу порошком підшлункової залози бика залежно від кількості ферменту, субстрату і буфера**

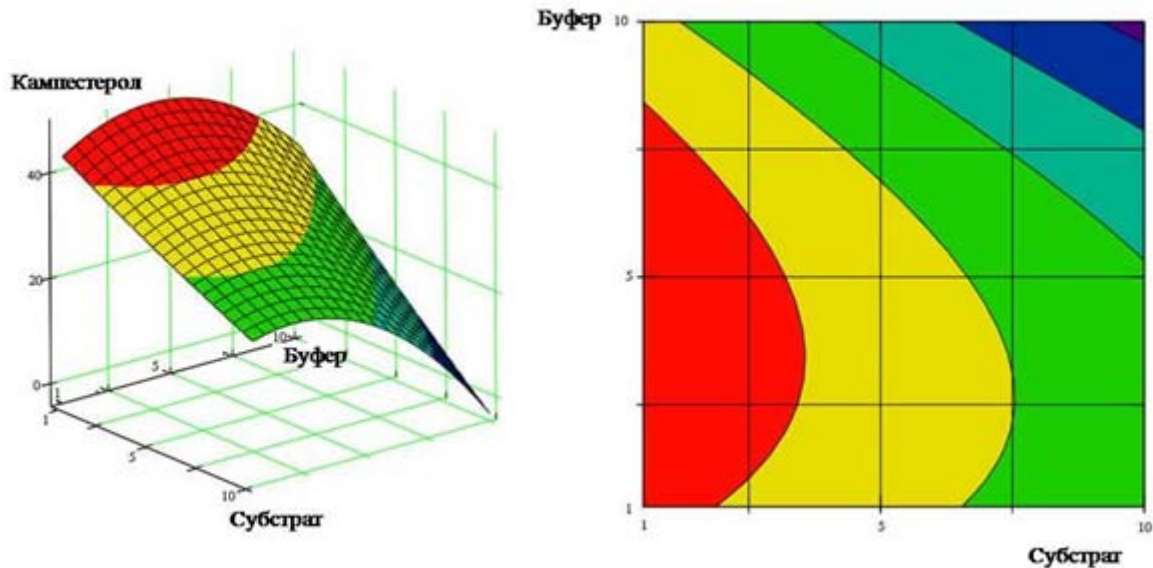
Досл ід №	Співвідношення компонентів			Кампестерилфер улят, %	Ситостерилфер улят, %
	Ферме нт	Субстр ат	Буф ер		
1	1	1	1	35,6±0,4	31,6±0,9
2	1	1	5	50,3±0,5	41,2±0,8
3	1	1	10	41,3±1,2	41,5±0,4
4	1	5	1	11,3±0,1	11,1±0,5
5	1	5	5	38,4±0,5	31,8±0,5
6	1	5	10	32,2±4,8	31,9±4,6
7	1	10	1	0,3±0,004	2,1±0,03
8	1	10	5	16,7±0,3	14,4±0,2
9	1	10	10	23,5±0,6	21,8±0,5

Конверсії гідролізу кампестерилферуляту і ситостерилферуляту показані у вигляді діаграм на рис. 3.8. і 3.9.

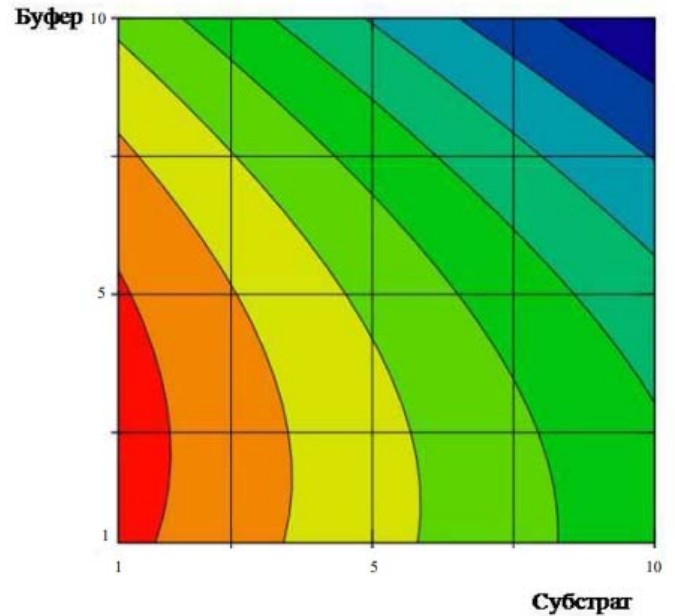
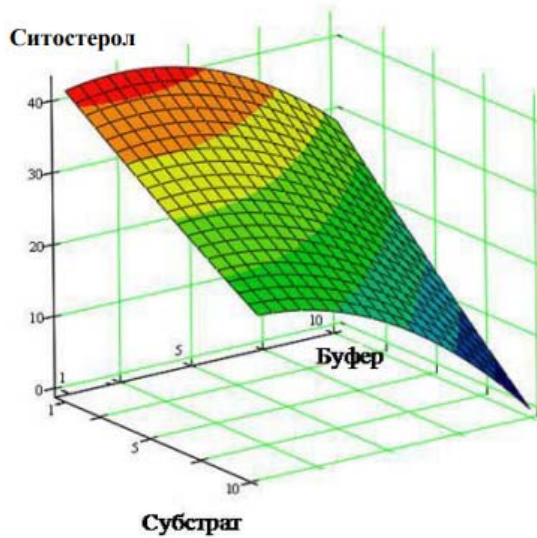
Вплив буфера можна спостерігати в дослідках, де кількість буфера збільшували від 1 до 10 разів за постійної концентрації субстрату і ферменту.

Порівняно з дослідом №1 у досліді №2 швидкості гідролізу кампестерилферуляту збільшуються приблизно на 41%, а ситостерилферуляту приблизно на 30%. Зі збільшенням буфера в 10 разів (дослід №3) конверсія гідролізу зменшується порівняно з дослідом №2, але все одно вище, ніж у досліді №1.

Зниження активності в досліді №3 можна пояснити конформаційними змінами ферменту, викликаними повною розчинністю ферменту в буфері або низькою концентрацією субстрату зі збільшенням вмісту буфера для цієї кількості ферменту.



**Рис. 3.8. Гідролітичне перетворення кампестерилферуляту порошком підшлунккової залози бика залежно від концентрації субстрату:буфера**



**Рис. 3.9. Гідролітичне перетворення ситостерилферуляту порошком підшлункової залози бика залежно від концентрації субстрату:буфера**

У дослідах із п'ятикратною кількістю субстрату (№4, №5, №6) найвища конверсія гідролізу була досягнута з п'ятикратною кількістю буфера (38,4% для кампестерилферуляту і 31,8% для ситостерилферулята). Але це було значно нижче, ніж у досліді №2 (50,3% і 41,2% відповідно). Таке зменшення виходу продуктів гідролізу можна пояснити обмеженням субстрату зі збільшенням вмісту буфера.

У разі дослідів із десятикратною кількістю субстрату конверсія гідролізу зростала зі збільшенням вмісту буфера. Однак вихід продукту становив максимум 23,5% для кампестерилферуляту і 21,8% для ситостерилферуляту (дослід №9), що значно нижче в порівнянні з дослідями з меншою часткою субстрату. Причиною цього, з одного боку, може бути пригнічення субстрату, з іншого – можливо, кількість ферменту недостатня для цієї кількості субстрату. Отже, можна припустити, що максимальна конверсія гідролізу в цих умовах ще не досягнута. Досліди з більшою часткою субстрату, можливо, доведеться інкубувати протягом тривалішого періоду часу.

Крім того, очевидно, що кількість буфера впливає на конверсію гідролізу: чим більша частка буфера, тим вище швидкість гідролізу. Система Ф:С:Б 1:1:5 (дослід №2) була охарактеризована як оптимальна. Конверсія під час гідролізу кампестерилферуляту становить до  $(50,3 \pm 0,5)\%$ , ситостерилферуляту до  $(41,2 \pm 0,8)\%$ .

Щоб перевірити вплив субстрату і вибрати оптимальну концентрацію, концентрацію субстрату збільшували від 1 до 10 разів за однакової кількості буфера і концентрації ферменту в системі.

За результатами дослідів (досліди №1, №4, №7) встановлено, що при п'ятикратній концентрації субстрату (дослід №4) конверсія нижче, ніж у досліді №1. Конверсія кампестерилферуляту знижується на 68%, а ситостерилферуляту на 62%. Якщо концентрацію субстрату збільшити до 10 разів, то конверсія кампестерилферуляту становить 99%, а ситостерилферуляту на 92% менше. Денатурація ферментів може відбуватися через більш високі концентрації органічного

розчинника – ацетону, який, можливо, залишився у препараті після виробництва [185]. Концентрація розчинника (ацетону) в досліді №1 становить 5%; у досліді №4 – 25%; у досліді №7 – 50%. Органічні розчинники знижують діелектричну проникність води, що запобігає розчинності білка й утворенню водневих зв'язків між водою і білком [184]. Це призводить до зниження активності ферменту.

За результатами дослідів №2, №5, №8 удалося виявити оптимальне співвідношення компонентів фермент:субстрат:буфер за умови найвищої конверсії гідролізу. У результаті збільшення концентрації субстрату зниження конверсії гідролізу спостерігається не так різко, як у системі Ф:С:Б – 1:1–10:1.

Якщо кількість субстрату збільшується до 5 разів (дослід №5), конверсія кампестерилферуляту знижується приблизно на 24%, ситостерилферуляту на 20% порівняно з дослідом №2. Зі збільшенням вмісту субстрату до 10 разів (дослід №8) конверсія гідролізу кампестерилферуляту знижується до 67%, а ситостерилферуляту до 65%.

Така сама тенденція існує і в системі Ф:С:Б 1:1–10:10 (досліди №3, №6, №9). Зі збільшенням концентрації субстрату конверсія гідролізу зменшується менше, ніж в інших системах, що пояснюється збільшенням кількості буфера в системі. Інгібування субстрату було відвернено, і концентрація ацетону в розчині була нижчою. Під час експерименту №9 конверсія кампестерилферулятів знижується на 43%, а ситостерилферулятів на 47,5%.

Таким чином, чим більша концентрація субстрату, тим менше вихід продукту. За підвищеної концентрації субстрату відбувається інгібування ферменту. У результаті зменшується вихід продукту. Ацетон, який, можливо, залишився у препараті після виробництва, також може знижувати активність ферменту. Цього можна уникнути, збільшивши кількість буфера. За результатами дослідження оптимальне співвідношення 1:1:5, але ж співвідношення 1:5:5 більш економічне, хоча конверсія кампестерилферуляту становить лише  $(38,4 \pm 0,5)\%$ , а ситостерилферуляту до  $(31,8 \pm 0,5)\%$ .

Важливо визначити оптимальну кількість ферменту для певної концентрації субстрату, щоб провести найбільш раціональну і дешеву ферментативну реакцію. У дослідях №1, №5, №9 за однакової концентрації субстрату в буфері вихід продукту різний. Конверсія в досліді №9 нижче, ніж у дослідях №1 і №5. Конверсія кампестерилферуляту становить всього (23,5±0,6)%, а ситостерилферуляту – (21,8±0,5)%, у досліді №1 ця конверсія становить для кампестерилферуляту (35,6±0,4)% і ситостерилферуляту (31,6±0,9)%. Імовірно, кількості ферменту недостатньо для досягнення такої самої конверсії за відведений час реакції. Система Ф:С:Б 1:5:5 була обрана як оптимальне співвідношення. Для встановлення статистично адекватної моделі оптимального співвідношення компонентів системи Ф:С:Б був проведений регресивний аналіз отриманих даних у наведених вище експериментах. На підставі проведеного регресійного аналізу було визначено вигляд математичних моделей:

$$y_1 = 27,7 \times x_1 - 4,59 \times x_2 + 8,32 \times x_3 + 0,122 \times x_2^2 - 0,592 \times x_3^2,$$

$$y_2 = 26,3 \times x_1 - 3,86 \times x_2 + 5,57 \times x_3 + 0,095 \times x_2^2 - 0,337 \times x_3^2.$$

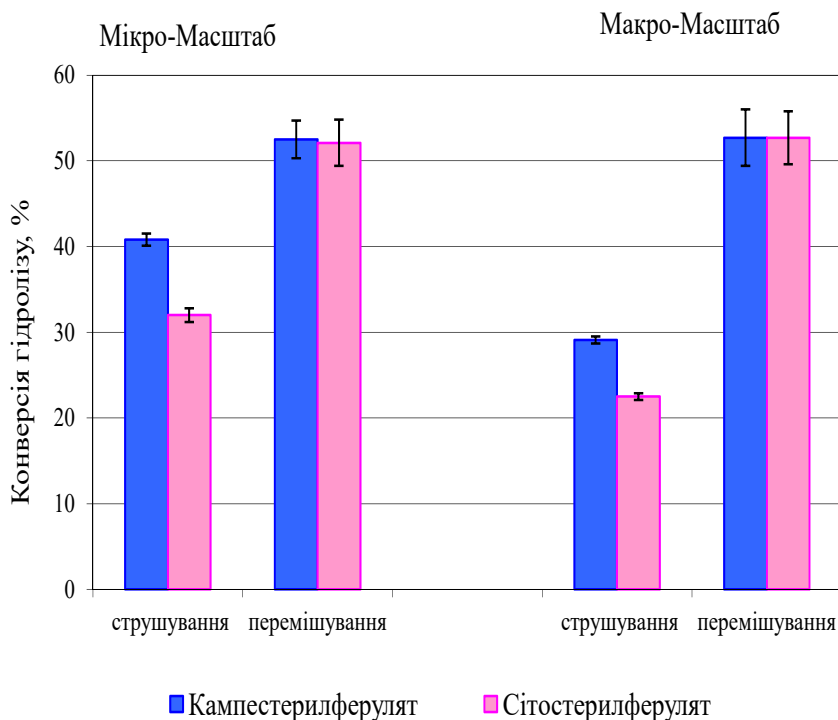
### **3.2.5. Механічний вплив на конверсію гідролізу $\gamma$ -оризанолу з порошком підшлункової залози бика**

Відомо, що добре перемішування реакційного середовища в біореакторах створює кращий контакт між субстратом і ферментом, як наслідок, конверсія гідролізу може бути збільшена. І навпаки, механічні сили можуть змінити структуру молекули ферменту так, що фермент буде інактивований [182].

Для гідролізу  $\gamma$ -оризанолу порошком підшлункової залози бика *Majauskaite* і *Gerspach* інкубували партії за умов струшування [54; 181].

Щоб вибрати оптимальні умови інкубації, експерименти з гідролізу  $\gamma$ -оризанолу порошком підшлункової залози бика були проведені в мікромасштабі і в п'ятикратно збільшеному масштабі за умови перемішування. Під час перемішування стає можливим краще масоперенесення субстрату до каталітичного центра

ферменту, і конверсія субстрату значно збільшується (рис. 3.10). Особливо це помітно в дослідях у макромасштабі. Конверсія кампестерилферуляту в мікромасштабі збільшується приблизно на 20%, ситостерилферуляту приблизно на 30%. Зі збільшенням масштабу конверсія кампестерилферуляту збільшується приблизно на 45%, ситостерилферуляту приблизно на 55%.



**Рис. 3.10. Механічний вплив на ферментативне перетворення  $\gamma$ -оризанолу порошком підшлункової залози в мікромасштабі й збільшеному масштабі**

У мікромасштабі й у збільшеному масштабі конверсія кампестерилферуляту і ситостерилферуляту однакова, але в разі струшування перетворюється більше кампестерилферуляту.

Втрата активності, яка спостерігалася під час зберігання ферментних препаратів, може бути компенсована перемішуванням. Таким чином, шляхом перемішування реакційного середовища для ферментативного перетворення речовин обмеження масоперенесення було відвернено, перетворення

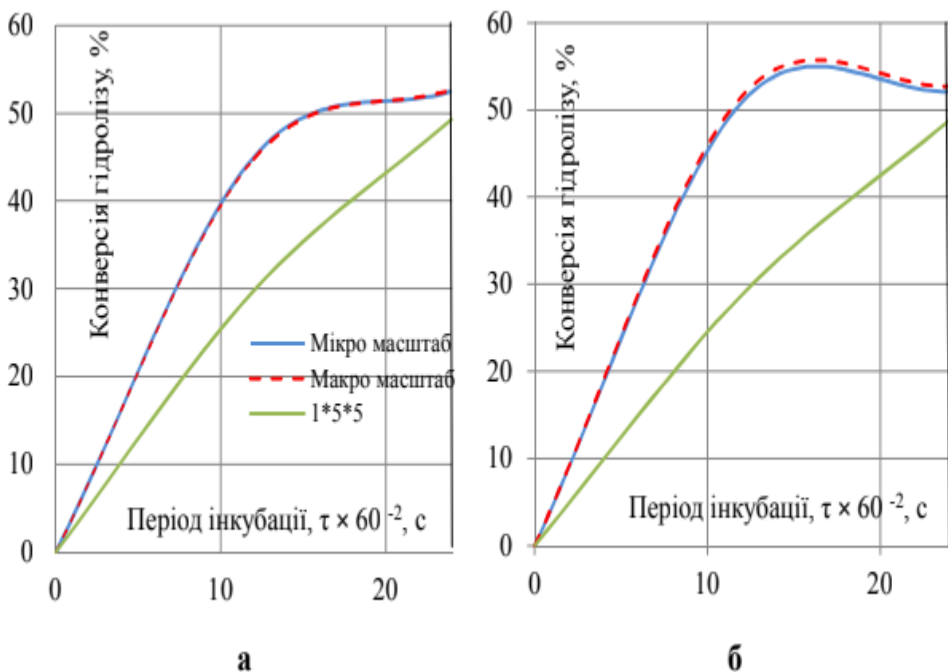
$\gamma$ -оризанолу порошком підшлункової залози бика в мікромасштабі й у збільшеному масштабі може бути збільшено. Установлені параметри реакції гідролізу  $\gamma$ -оризанолу можуть бути застосовані й для збільшених масштабів гідролітичних партій.

### **3.2.6. Визначення періоду інкубації для оптимального і повного гідролізу $\gamma$ -оризанолу**

Ферментативна кінетика досліджує тривалість реакції, що каталізується ферментами. У ході реакції концентрації реагуючих речовин безперервно змінюються, швидкість реакції також не є постійною. Зміна концентрації одного з реагентів, зокрема продукту, протягом певного періоду або перебіг реакції в часі представляються кривою перетворення часу [184].

Значення ферментно-кінетичної константи визначаються за кривою залежності часу, що дозволяє описувати ферментативно-каталізуючу реакцію відповідно до основних математичних моделей, які можуть бути сформульовані. Швидкість і порядок реакції можна визначити. Порядок реакції вказує на механізм реакції і показує, як швидкість реакції змінюється залежно від концентрації реагенту. У разі реакції нульового порядку швидкість постійна і не залежить від концентрації реагенту. Одна й та сама кількість речовини перетворюється за будь-який настільки ж великий проміжок часу. У реакції першого порядку швидкість зменшується зі збільшенням часу (зменшенням концентрації реагенту) [184].

Крива перетворення  $\gamma$ -оризанолу в часі була використана для визначення динаміки ферментативної реакції з порошком підшлункової залози бика. Для цього перетворення  $\gamma$ -оризанолу вимірювали після гідролізу в постійних умовах ( $\text{pH} = 7$ ;  $T = 37^\circ\text{C}$ , із перемішуванням) із порошком підшлункової залози бика після 12 год і 24 год інкубації. Криві перетворення  $\gamma$ -оризанолу в часі (рис. 3.11) були отримані для партій у мікромасштабі (1:1:1), у збільшеному масштабі (5:5:5) – у п'ять разів більше ферменту,



субстрату, буфера і система 1:5:5.

**Рис. 3.11. Криві перетворення  $\gamma$ -оризанолу порошком підшлункової залози бика в часі [кампестерилферулят (а) і ситостерилферулят (б)] за умов перемішування, з різними розмірами партій**

Вихід продукту швидко збільшується в мікроскопічному масштабі протягом 12 год. Після 12-годинного інкубаційного періоду конверсія гідролізу збільшується повільніше.

Вигляд кривих перетворення в часі для мікромасштабу ідентичний перебігу реакції в збільшеному масштабі. Це означає, що вибрані параметри реакції для мікромасштабу також підходять для макромасштабу.

З отриманих кривих видно, що час інкубації 24 год є оптимальним для гідролізу  $\gamma$ -оризанолу порошком підшлункової залози бика в системі Ф:С:Б 1:1:1. Для системи 1:5:5 реакція ще не завершена за 24 год. Підвищена кількість субстрату призводить до зниження активності ферменту й уповільнює швидкість реакції. Можливо, щоб збільшити вихід продукту в цій системі, партії необхідно інкубувати протягом тривалішого часу.

Криві перетворення в часі для  $\beta$ -ситостерилферуляту і кампестерилферуляту, показані на рис. 3.11, ілюструють типовий перебіг реакції першого порядку.

Фактично, гідроліз складних ефірів можна розглядати як реакцію першого порядку, оскільки концентрація реагентної води у водяному розчині майже не змінюється.

Для встановлення статистично адекватної моделі впливу різних факторів на вихід продуктів гідролізу  $\gamma$ -оризанолу порошком підшлункової залози бика був проведений регресійний аналіз отриманих даних у наведених вище експериментах. На підставі проведеного регресійного аналізу було визначено вигляд математичних моделей, які описують залежність виходу продуктів гідролізу від наявності механічного впливу, періоду інкубації, концентрації таурохолату натрія. математичні моделі мають вигляд:

$$y_1 = 22,4 - 1,76 \times x_1 + 21,9 \times x_2 + 1,40 \times x_3 + 0,211 \times x_4$$

$$y_2 = 25,9 - 10,8 \times x_1 + 18,5 \times x_2 + 1,36 \times x_3 - 0,056 \times x_4.$$

### **3.3. Вивчення іммобілізації порошку підшлункової залози бика**

Методи іммобілізації важливі для технічного використання ферментів. При цьому досягається краща стабільність ферменту,

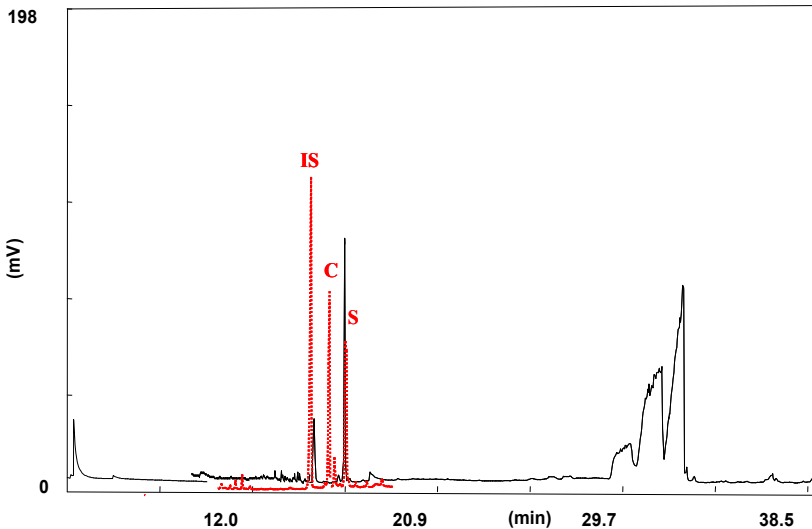
стають можливими поділ і повторне використання. Різні методи дозволяють іммобілізувати фермент на носії.

Адсорбційне зв'язування ферментів із нерозчинними у воді речовинами-носіями є найпростішим і давно відомим методом. Багато авторів успішно використовували цей метод. Із широкого спектра адсорбентів найбільш часто використовуються синтетичні макропористі полімери. Ці полімери добре підходять для іммобілізації, оскільки вони відповідають багатьом фізичним вимогам і дуже дешеві.

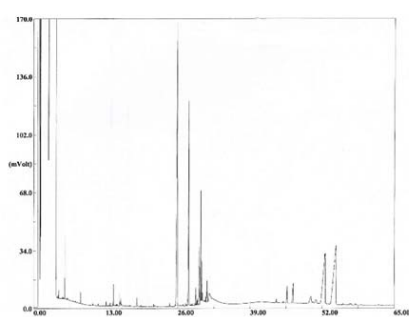
Gitlesen та ін. іммобілізували 12 різних ліпазних препаратів на поліпропіленовому порошку Accurel EP-100 (220 мг білка на 1 г носія). Питома активність ліпаз до і після адсорбції не змінилася, знизилася тільки у двох препаратів. Ліпази *Rhizopus oryzae* і *Rhizopus delemar* були іммобілізовані на Accurel MP1000 [186].

Грунтуючись на експериментальних результатах багатьох авторів, ми вибрали макропористий порошок Accurel MP1000 для іммобілізації порошку підшлункової залози бика. Було висловлено припущення, що порошок підшлункової залози бика також є гідрофобним ферментом і може ефективно адсорбуватися на гідрофобному порошку поліпропілену Accurel. Згідно з Chen Accurel MP1000 має такі фізичні характеристики: щільність 0,9 г/мл, розмір часток <1000 мкм, порожній обсяг 75%, розмір пор 0,05–0,50 мкм, площа внутрішньої поверхні 51 м<sup>2</sup>/г [66]. Іммобілізація порошку підшлункової залози бика була заснована на методі Пателля та ін. [187].

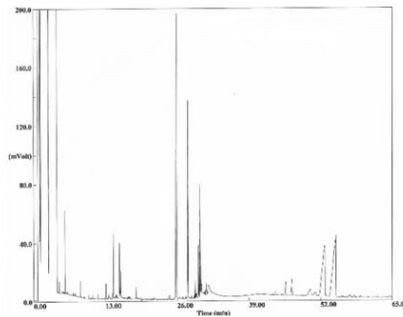
Активність іммобілізованого ферменту перевіряли під час гідролізу  $\gamma$ -оризанолу. Для цього партії інкубували з 5 мг та 20 мг іммобілізованого порошку підшлункової залози бика за температури 37°C зі струшуванням протягом 24 год. Гідролізні перетворення кампестерилферуляту і ситостерилферуляту з порошком підшлункової залози бика вибирали як контроль для визначення активності іммобілізованого ферменту. Хроматограми (рис. 3.12) показують, що іммобілізований порошок підшлункової залози бика не проявляє активності в гідролізі  $\gamma$ -оризанолу.



a



б



**Рис. 3.12. Газові хроматограми триметилсилілпохідних стеролу (похідних ТМС) після ферментативного перетворення  $\gamma$ -оризанолу з нативним (зазначено червоним) та іммобілізованим засобом адсорбції ферментним препаратом:**

**а – гідролітичне перетворення  $\gamma$ -оризанолу 5 мг іммобілізованого порошку підшлункової залози бика;**

**б – гідролітичне перетворення  $\gamma$ -оризанолу 20 мг іммобілізованого порошку підшлункової залози бика**

Відсутність гідролізного перетворення пов'язана з втратою активності ферментом або адсорбцією ферменту на носії. Щоб іммобілізувати фермент, адсорбція має бути повною й успішною. Адсорбція може бути порушена тільки носієм або ферментом. Адсорбція на гідрофобному носії відбувається за рахунок гідрофобних і неелектростатичних взаємодій між ферментом і функціональними групами на носії. Ці зв'язки є слабкими, мабуть, міцного зв'язування ферменту з носієм не відбулося.

Можливо, що носій містить речовини, які перешкоджають зв'язуванню білка, що також може впливати на взаємодії. Тому важлива повна і правильна попередня обробка носія (промивання деіоногенною водою або метанолом). Структура носія впливає на прикріплення ферменту до нього. Адсорбція може відбуватися тільки на поверхні, на це впливають пористість і розмір пор. Кількість точок прикріплення до поверхні носія може бути недостатньою для ферменту. Молекули ферменту мають бути менше пор носія, щоб забезпечити адсорбцію з макропористим носієм.

У результаті іммобілізації активність ферменту може змінитися від незначного зниження до повної втрати. Тут важливі стеричність (наприклад, зміна конформації) або дифузний ефект (масоперенесення).

Низька концентрація білка спричиняє зміну конформації й погане покриття поверхні носія. Це також може призвести до втрати активності. Білок, який міститься в більшій концентрації, забезпечує компактне покриття поверхні носія й іммобілізований у своїй нативній формі [188; 189]. Білок локалізується в порах носія. У результаті це може обмежити масоперенесення від субстрату до ферменту. Пояснення полягає в тому, що молекули субстрату знаходяться в емульгованій з водою формі, більшість із них набагато більші, ніж пори носія [189]. Неадекватний контакт субстрату з активним центром ферменту також може призвести до зниження активності.

З експериментальних даних видно, що адсорбція не привела до жодної іммобілізації порошку підшлункової залози бика. Були також зроблені спроби іммобілізації комбінованим методом, а саме адсорбції та шивання.

Комбінований метод є простим методом, який включає гідрофобні взаємодії й ковалентне зв'язування ферменту з носієм. Фермент адсорбується на носії, адсорбовані молекули ферменту також «зшиваються» біфункціональним реагентом (глутаровим альдегідом). Переваги цього методу полягають у тому, що молекули ферменту зв'язуються більш послідовно, ніж у разі просто адсорбційного зв'язування, дифузійні перешкоди для доступу до субстрату тут навряд чи виникнуть. Недоліком є те, що тільки відносно невелика кількість ферменту, а отже, невелика активність, пов'язується з носієм, глутаральдегід може викликати сильні конформаційні зміни в білку, а отже, втрату активності [190].

Вагі та ін. іммобілізували ліпазу підшлункової залози свиней на різних носіях (целітполіакриламід та ін.) за допомогою адсорбції та зшивання. Іммобілізація ліпази підшлункової залози свиней (0,5 г білка на 1 г носія) на поліакриламіді здійснюється зшиванням із глутаральдегідом. Активність ферменту знизилася на 15% у разі додавання 20 мМ глутаральдегіду [191].

Vafiadi та ін. також описали вплив глутаральдегіду на активність ферменту в разі зшивання комерційних ферментів із ферулоїлестеразною активністю. Підвищена концентрація глутаральдегіду призводить до зниження активності ферменту [192].

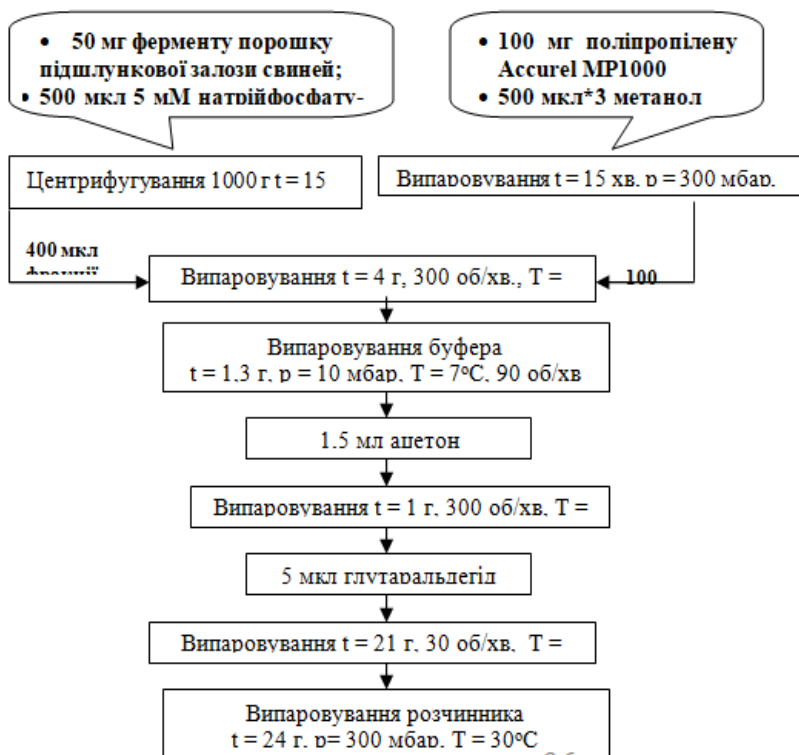
Іммобілізація ліпаз *C. rugosa*, *C. antarctica* (типів А і В) на носіях MANAE агарози шляхом перехресного зв'язування з глутаровим альдегідом у Fernandez-Lorente та ін. була успішною. Активність ферменту знизилася на 40%. Стабілізуючий реагент Triton-X рекомендовано для мінімізації втрати активності [193].

Метод Osborne та ін. був прийнятий для іммобілізації порошку підшлункової залози свиней. Іммобілізували холестеролестеразу (0,5 г білка на 1 г носія) на Acurel PP у збільшеному масштабі за допомогою комбінованого методу. Після іммобілізації активність ферменту не змінилася [194].

На основі методу Осборна були проведені такі етапи іммобілізації порошку підшлункової залози свиней (рис. 3.13). Для іммобілізації замість чистої холестеролестерази використовували дешевший порошок підшлункової залози

свиней, активність додатково перевіряли в експериментах з гідролізу  $\gamma$ -оризанолу.

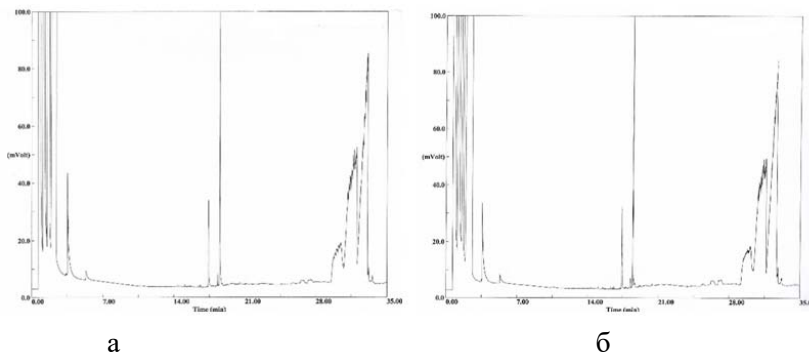
Щоб перевірити активність іммобілізованого ферменту, партії інкубували протягом 24 год з 15 мг іммобілізованого порошку підшлункової залози свиней за температури 37°C із перемішуванням. Гідроліз проводили в системі Ф:С:Б 1:5:5.



**Рис. 3.13.** Схематичне зображення іммобілізації порошку підшлункової залози свиней на макропористому носії Accurel MP1000 комбінованим способом

Порошок підшлункової залози свиней схожий на порошок підшлункової залози бика. Єдина відмінність між цими препаратами – швидкість гідролізу кампестерилферуляту і ситостерилферуляту. Згідно з Gerspach менші виходи кампестерилферуляту і ситостерилферуляту були досягнуті з порошком підшлункової залози свиней, ніж із порошком підшлункової залози бика. Тип використовуваного ферменту не мав значення для розробки методу іммобілізації.

Гідролізне перетворення кампестерилферуляту і ситостерилферуляту з використанням 5 г ферментного препарату порошку підшлункової залози свиней порівнювали з 20 г іммобілізованого порошку підшлункової залози свиней. На хроматограмах (рис. 3.14) видно, що іммобілізований фермент не проявляє активності в гідролізі  $\gamma$ -оризанолу.



**Рис. 3.14. Газові хроматограми триметилсилілопохідних стеролу (похідних ТМС) після ферментативного перетворення  $\gamma$ -оризанолу іммобілізованим комбінованим методом ферментним препаратом:**  
**а – 5 мг іммобілізованого порошку підшлункової залози свиней;**  
**б – 20 мг іммобілізованого порошку підшлункової залози свиней**

На втрату активності іммобілізованим ферментом може впливати біфункціональний реагент (глутаровий альдегід). Ковалентні зв'язки, які утворюються під час зшивання, водночас

можуть викликати серйозні зміни в конформації ферменту та призводити до втрати активності [191].

#### **3.4. Використання інших препаратів для гідролізу $\gamma$ -оризанолу**

До завдань наступного етапу дослідження входила необхідність перевірки ферментативної активності до ефірів ферулової кислоти препаратів ліпази і ксилонази в обраних рівнях випробувань. Субстрат має бути здатен перетворюватися дослідними ферментами. Крім того, реалізація має бути легко виявленою.

У різних дослідженнях *in vitro* для ферментативного розщеплення

$\gamma$ -оризанолу використовували ферменти ссавців. Moreau та ін. гідролізували

$\gamma$ -оризанол за допомогою холестеролестерази бика до 55% і не досягли гідролізу панкреатином. Nyström та ін. гідролізували  $\gamma$ -оризанол яловичою стерилестеразою і стерилестеразою свиней тільки на 10% [53]. Miller та ін. намагалися використовувати для розщеплення  $\gamma$ -оризанолу ферменти з ширшим спектром: холестеролестерази, ліпази різного походження, сирі ферментні препарати. Найвищий ступінь гідролізу (до 70%) досягнуто з препаратом сирого ферменту або порошком підшлункової залози бика, а з ліпазами конверсія  $\gamma$ -оризанолу не досягнута [54]. Із біотехнологічної точки зору важливо провести скринінг ферментних препаратів різного походження (грибкового, рослинного або ссавців), який був би можливий як альтернатива для ферментативного розщеплення  $\gamma$ -оризанолу.

Відомо, що естерази й ліпази можна використовувати для ферментативної етерифікації фенольних кислот як альтернативу хімічного синтезу. Антиоксиданти фенольного походження, такі як аліфатичні спирти, моносахариди, алкілглікозиди гідроксикоричних кислот із різними ліпазами і ферулоїлестеразами, можуть розщеплюватися і синтезуватися [195; 196]. Vafiadi та ін. використовували бактеріальну

ферулоїлестеразу для етерифікації фенольної кислоти з цукром [196]. Nyström установив, що ферментативний гідроліз пшеничних і рисових висівок, клітин тютюну ксиланазою може збільшити загальний вміст стеролів за рахунок розриву ефірних зв'язків [53].

Пентопан BG500 був використаний для виробництва ваніліну з пшеничних висівок шляхом ферментативного перетворення похідних ферулової кислоти [87]. На підставі структурної подібності стерилферулятов  $\gamma$ -оризанолу з похідними аліфатичних спиртів гідроксикоричних кислот можливий його гідроліз ферулоїлестеразами або ліпазами грибного походження. Для гідролізу  $\gamma$ -оризанолу було обрано такі ферментні препарати: комерційний препарат Pentopan BG500 (ксиланаз), ліпази *Candida antarctica* типів A і B та *Candida rugosa* типу VII.

### **3.4.1. Визначення гідролітичної активності ліпази та ферулоїлестерази у ферментних препаратах ліпази і ксилонази**

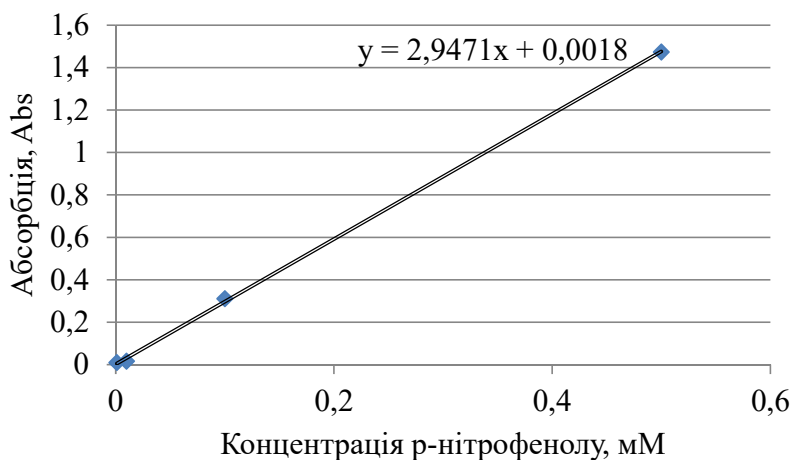
Для подальшого використання обраних ферментних препаратів у гідролітичних партіях  $\gamma$ -оризанолу необхідно було виявити та підтвердити їх здатність гідролізувати наданий субстрат. Саме тому необхідними стали виявлення ліпазної та ферулоїлестеразної активності обраних препаратів і вибір оптимальних умов реакції.

Питома гідролітична активність – це кількість субстрату, перетвореного за одиницю часу, і кількість ферменту за певних умов (оптимальна початкова концентрація субстрату, оптимальні рН і температура, активатори).

Комерційні препарати, виготовлені з *H. insolens* (Pentopan BG500), які мають активність ферулоїлестерази, можуть каталізувати реакції переетерифікації вторинних спиртів, хоча субстрат для ферулоїлестерази неспецифічний. Показано, що ферулоїлестераза не має значної ліпазної активності, а ліпаза не має ферулоїлестеразної активності [603]. Багатьма вченими доведено, що р-нітрофенілові ефіри можуть перетворюватися як ліпазами, так і естеразами [84; 198]. Ghatoga використовував р-нітрофеніловий ефір для визначення активності естерази [199].

Конверсію визначали за допомогою газової капілярної хроматографії й фотометрії.

Дотримуючись методу Мажаускайте [54], р-нітрофеніловий ефір гідролізували комерційним препаратом Pentoran 500BG та ліпазою *C. antarctica* типів А і В, протягом 2 год зі струшуванням, при 45°C. Суміші з ліпазою *C. rugosa* типу VII інкубували при 37°C протягом 2 год зі струшуванням. Після інкубації концентрацію р-нітрофенолу визначали фотометричним методом. Калібрувальну криву побудовано на основі визначеної абсорбції калібрувальних розчинів із певною концентрацією р-нітрофенолу (рис. 3.15). Концентрація р-нітрофенолу після ферментативного гідролізу може бути розрахована або графічно визначена шляхом інтерполяції за допомогою калібрувальної кривої за значенням абсорбції приготованого зразка.



**Рис. 3.15. Калібрувальна лінія для фотометричного кількісного визначення р-нітрофенолу**

Каталітичну (U) і питому каталітичну (U/г) активність розраховували з гідролізного перетворення р-нітрофенілпальмітату (%). Результати подано в табл. 3.4. За одну

одиницю ферментативної активності брали 1 нмоль р-нітрофенілпальмітату, який перетворюється за хвилину за обраних умов.

**Таблиця 3.4**  
**Визначення активності ліпази, ферментного препарату Pentopan BG500, іммобілізованої ліпази *C. antarctica* типу В, ліпази *C. antarctica* типу А, ліпази *C. rugosa* до р-нітрофенілпальмітату**

Ферментний препарат	мкмоль/хв	U/г	Вихід продуктів гідролізу р-нітрофенолу, %
Ліпаза <i>C. rugosa</i>	3,4±0,0	0,68±0,0	40,9±4,7
Іммобілізована ліпаза <i>C. antarctica</i> типу В	0,8±0,0	0,15±0,0	9,0±0,4
Pentopan BG500	0,4±0,0	0,07±0,0	4,5±0,3
Ліпаза <i>C. antarctica</i> типу А	0,1±0,0	0,02±0,0	0,9±0,4

За отриманими даними встановлено, що ліпаза *C. rugosa* показала найвищу ліпазну активність відносно р-нітрофенілпальмітату. Іммобілізована ліпаза *C. antarctica* типу В і комерційний препарат Pentopan BG500 в цих умовах мають меншу ліпазну активність. Для препарату Pentopan BG500 (ксиланаз) р-нітрофенілпальмітат як субстрат неспецифічний, але фермент проявляє ліпазну активність. Це відноситься до каталітичної послідовності ферменту, яка подібна до ліпази й естерази ферулової кислоти (ФАЕ) [197]. Ліпазна активність відносно р-нітрофенілпальмітату ферментного препарату ліпази *C. antarctica* типу А дуже низька. У зв'язку з тим, що препарат ліпаза *C. antarctica* типу А є термофільним, імовірно, слід змінити умови інкубації.

У зазначених умовах усі ферменти виявляли гідролітичну активність відносно р-нітрофенілпальмітату як позитивного

контролю. Максимальну ліпазну активність ( $3,4 \pm 0,0$ ) нмоль/хв показує ліпаза *C. rugosa*. Це свідчить про можливий гідроліз  $\gamma$ -оризанолу в зазначених умовах.

Естераза ферулової кислоти належить до підкласу естераз карбонових кислот (ЕС.3.1.1.1). Ці ферменти гідролізують складноефірні зв'язки між гідроксикоричними кислотами і цукром у стінках рослинних клітин [199–201], а також можуть бути використані для синтезу і переестерифікації похідних ферулової кислоти [63; 64]. Відомо, що ФАЕ може гідролізувати різні синтетичні складні ефіри метилгідрокоричної кислоти. Оптимальну активність ФАЕ має при значенні рН 4–8 і температурі 30...65°C [195].

Для визначення її активності використовували етилферулят [87; 192; 202]. Активність по гідролізу етилферуляту перевіряли в таких середовищах: ферментний буфер рН 6; двофазна система, що складається з ферментного буфера рН 6 і гексану.

Гідролізний розчин аналізували за допомогою капілярної газової хроматографії. Для виявлення гідролізу також можна простежити зменшення вмісту етилферуляту й утворення ферулової кислоти. Після обробки хроматограми обчислювали конверсію гідролізу. На підставі цього визначали каталітичну ( $U$ ) і питому каталітичну ( $U/g$ ) активність. Одна одиниця ферментативної активності відповідає конверсії 1 мкмоль етилферуляту на хвилину за вибраних умов.

У табл. 3.5 наведено ферулоїлестеразну активність дослідних ферментів. Із цього видно, що найвищу активність ферулоїлестерази проявляє препарат Pentoran BG500. Але у двофазній системі його активність у шість разів менша. Іммобілізована ліпаза *C. antarctica* типу В має дуже низьку активність відносно етилферуляту ( $0,01 \pm 0,0$ ). Ліпаза *C. antarctica* типу А, ліпаза *C. rugosa* типу VII не виявляють ферулоїлестеразної активності відносно етилферуляту в умовах реакції. Вважається, що для всіх використаних ферментів активність у двофазній системі значно знижується.

У ферментному буфері Pentoran BG500 показав найвищу активність естерази ферулової кислоти. Ліпази *C. antarctica* типу А і *C. rugosa* не виявляли активності ФАЕ в цих умовах реакції.

Однак іммобілізована ліпаза *C. antarctica* типу В показала активність ФАЕ. Активність ферулоїлестерази у препаратах ліпази була виявлена вперше. Іммобілізована ліпаза *C. antarctica* типу В використовувалася для синтезу ефірів ферулової кислоти і довголанцюгових спиртів.

**Таблиця 3.5**

**Визначення активності естерази ферулової кислоти у препаратах Pentoran BG500, іммобілізованої ліпази *C. antarctica* типу В, ліпази *C. antarctica* типу А, ліпази *C. rugosa* з етилферулятом**

Ферментний препарат	U (мкмоль/хв)	U/г	Вихід продуктів гідролізу етилферуляту (%)
Pentoran BG500	0,08±0,0	15,5±0,1	38,2±0,6
Іммобілізована ліпаза <i>C. antarctica</i> типу В	0,02±0,0	3,2±0,1	7,9±0,2
Ліпаза <i>C. antarctica</i> типу А	н. з.	н. з.	н. з.
Ліпаза <i>C. rugosa</i> типу VII	$0,6 \times 10^{-3} \pm 0,0$	0,1±0,0	0,09±0,0
двофазна система			
Pentoran BG500	0,01±0,0	2,6±0,1	6,3±0,2
Іммобілізована ліпаза <i>C. antarctica</i> типу В	0,01±0,0	1,6±0,1	3,8±0,3
Ліпаза <i>C. antarctica</i> типу А	$0,5 \times 10^{-3} \pm 0,0$	0,1±0,0	0,02±0,01
Ліпаза <i>C. rugosa</i> типу VII	$0,4 \times 10^{-3} \pm 0,0$	0,1±0,0	0,002±0,02

Примітка. Н. з. – не знайдено.

Активність ФАЕ препарату ксиланози Pentoran BG500 вже була описана. Вивільнення ферулової кислоти із пшеничних

висівок було використано Hatzakis [87] для визначення активності Pentopan BG500. Gioia [86] показав високу ФАЕ-активність цього препарату із субстратами метилферуляту.

У двофазній системі активність ФАЕ значно нижче, ніж в однофазній. Це в шість разів менше для Pentopan BG500 і у два рази менше для ліпази *C. antarctica* типу В. Нерівномірне зниження активності, ймовірно, пов'язане з різним розподілом ферменту і субстрату у двофазній системі.

Таким чином, показано, що умови реакції можуть сильно впливати на активність ферментів. Імовірно, активність ліпаз може бути збільшена, якщо субстрат перебуватиме в емульгованому стані, щоб забезпечити кращий контакт з активним центром ферменту [65].

Для ліпази *C. antarctica* типу А не вдалося досягти температурного оптимуму гідролітичної активності. Також необхідно враховувати субстратну специфічність. Для ліпаз може виявитися, що етилферулят не може бути прийнятий як субстрат. Оскільки активність ліпази може бути виявлена за допомогою р-нітрофенілпальмітату, були зроблені подальші спроби гідролізу  $\gamma$ -оризанолу за допомогою препаратів ліпази в цих умовах. Також передбачено гідроліз  $\gamma$ -оризанолу препаратом Pentopan BG500 у визначених умовах.

### 3.4.2. Ферментативний гідроліз $\gamma$ -оризанолу ліпазами

Ліпази можна використовувати для більш широкого спектра гідролітичних і синтетичних реакцій, таких як гідроліз ліпідів, ацидоліз (заміна етерифікованих жирних кислот вільними жирними кислотами), переетерифікація (обмін жирними кислотами між тригліцеридами) і синтез складних ефірів. Існують два типи ліпази *Candida antarctica*: А і В.

Ліпаза *Candida antarctica* використовувалася в різних дослідженнях *in vitro* для синтезу ферулятів, похідних жирних кислот. Ліпаза *C. antarctica* типу В часто використовується для синтезу гліколіпідів. Chao та ін. синтезували ефір жирної кислоти і фруктози під час ліпазного каталізу. Імобілізована ліпаза *Candida antarctica* типу В була використана для метанолізу трицинолеїну в органічних розчинниках, а також для отримання олеїлолеату

(рідкого ефіру воску). У роботі Borch та ін. повідомлялося, що тільки ліпаза *C. antarctica* типу А може бути використана для етерифікації стеринів карбоною кислотою [189].

У контексті цієї роботи викликає інтерес гідролітична активність  $\gamma$ -оризанолу ліпази *Candida antarctica* типів А і В.

Для вибору потрібної кількості ферменту, середовища й умов інкубації для гідролізу  $\gamma$ -оризанолу параметри реакції варіювали. Партії інкубували протягом 24 год за температури 45°C на бані-шейкері або із перемішуванням у таких середовищах:

- зі струшуванням: ферментний буфер рН 6,0 із 5 мг ферменту; двофазна система з 5 мг ферменту, що складається з ферментного буфера з рН 6,0 і гексану;

- зі перемішуванням: ферментний буфер рН 6,0, таурохолат натрію зі 100 мг ферменту, інкубація при перемішуванні; двофазна система зі 100 мг ферменту, що складається з ферментного буфера рН 6,0, таурохолату натрію і гексану.

Надалі, після ферментативного гідролізу, приготовані силіловані розчини досліджували за допомогою газової хроматографії. Піки порівнювали з еталонними хроматограмами, отриманими після хімічної переетерифікації  $\gamma$ -оризанолу. Для кількісної оцінки хроматограм площі піків були інтегровані й розраховані. Розрахункові конверсії гідролізу показано в табл. 3.6.

Під час ферментативного гідролізу  $\gamma$ -оризанол за допомогою ліпази *C. antarctica* типу А не виявлено продуктів гідролізу. Оскільки в контролі з р-нітрофенілпальмітатом конверсія також не була досягнута, можна припустити, що ферментний препарат неактивний у цих умовах. Але не можна повністю виключити гідролітичну активність ліпази *C. antarctica* типу А до  $\gamma$ -оризанолу, для цього необхідно провести дослідження з іншими режимами інкубації.

Гідролітичне перетворення  $\gamma$ -оризанолу ліпазою *C. antarctica* типу В було дуже низьким. Проте крім десметилстерилферулятів також були перетворені диметилстерилферуляти.

Конверсія не може бути значно збільшена під час перемішування, додавання таурохолату натрію і підвищеної кількості ферменту. Гідроліз у двофазній системі призводить до того самого перетворення  $\gamma$ -оризанолу, що і в буферній системі.

Таблиця 3.6

**Скринінг препаратів ліпази *Candida antarctica* типів А і В на вивільнення стеринів під час гідролізу  $\gamma$ -оризанолу**

Ферментні препарати Середовище	Конверсія гідролізу, %							
	Ліпаза <i>C. antarctica</i> типу В, іммобілізована на акриловій смолі				Ліпаза <i>C. antarctica</i> типу А			
Час інкубації	КФ	СФ	ЦАФ	МЦА	КФ	СФ	ЦАФ	МЦА
Однофазна система. Буфер рН 6,0 (фермент 5 мг)	0,22±0,001	0,24±0,004	0,13±0,01	0,15±0,002	н. з	н. з	н. з	н. з
Двофазна система (фермент 5 мг)	0,03±0,1	0,24±0,5	0,04±0,01	0,04±0,02	н. з	н. з	н. з	н. з
Однофазна система. Буфер рН 6,0 + таурохолат, із перемішуванням (фермент 100 мг)	0,66±0,46	5,92±8,3	0,15±0,13	0,24±0,16	н. з	н. з	н. з	н. з
Двофазна система. Буфер рН 6,0 + таурохолат, із перемішуванням (фермент 100 мг)	0,6±0,01	1,1±0,01	0,1±0,01	0,1±0,001	н. з	н. з	н. з	н. з

Примітка. КФ – кампестерилферулят; СФ – ситостерилферулят;  
ЦАФ – циклоартенілферулят; МЦА – 24-метиленциклоартаніл; н.в. – не знайдено

Перетворення  $\gamma$ -оризанолу ліпазою *C. antarctica* типу В перевіряли в часовому розрізі. Партії інкубували з 5 мг і 100 мг протягом 15 хв, 24 год і 96 год на бані-шейкері при 45°C. Тривалий час інкубації не може збільшити вихід. Час інкубації не впливає на активність гідролізу  $\gamma$ -оризанолу.

На підставі експериментальних даних можна зробити висновок, що ліпаза *C. antarctica* не може бути використана для гідролізу  $\gamma$ -оризанолу в обраних умовах реакції. Її гідролітична активність до  $\gamma$ -оризанолу занадто низька.

Ліпаза *Candida rugosa* типу VII була використана в харчовій технології для переестерифікації в маслі какао, кокосовому маслі. Weber та ін. повідомили, що ліпаза *Candida rugosa* може синтезувати ефіри станіл-, стерил- і стерин- жирних кислот [75]. Ben Ali та ін. визначили, що ліпаза *C. rugosa* має високу активність у гідролізі холестерилолеатів і оливкової олії [74]. Про гідроліз ефіру ферулової кислоти ліпазою *Candida rugosa* типу VII ще не повідомлялося.

Гідролітичну активність ліпази *Candida rugosa* до  $\gamma$ -оризанолу перевіряли в різних умовах інкубації. Партії інкубували протягом 24 год при 37°C, в одному разі, із 5 мг ферментного препарату зі струшуванням, в іншому разі, зі 100 мг ферментного препарату і 48 мМ таурохолату натрію з перемішуванням. Конверсії гідролізу показано в табл. 3.7.

Під час гідролізу  $\gamma$ -оризанолу ліпазою *Candida rugosa* типу VII стерини звільнялися як із десметилстерилферулятів, так і з 4,4-диметилстерилферулятів. Конверсія гідролізу десметилстерилферулятів була більшою, ніж 4,4-диметилстерилферулятів.

У дослідних партіях із 5 мг ферментного препарату без додавання таурохолату натрію конверсія гідролізу була дуже низькою. Досліди з 100 мг ферментного препарату і додаванням таурохолату натрію привели до підвищення гідролітичної конверсії.

Таблиця 3.7

**Конверсія гідролізу ефірів ферулової кислоти під час перетворення  $\gamma$ -оризанолу ліпазою *Candida rugosa* типу VII**

Компоненти $\gamma$ -оризанолу, %	5 мг ферменту без таурохолату натрію <sup>1</sup>		100 мг ферменту з таурохолатом натрію <sup>2</sup>	
	1 фаза	2 фаза	1 фаза	2 фаза
Кампестерилферулят	0,19±0,01	0,34±0,01	12,39±0,02	11,07±1,20
Ситостерилферулят	0,65±0,01	0,35±0,05	13,53±0,20	11,15±3,39
Циклоартенілферулят	0,08±0,01	0,03±0,06	0,39±0,06	0,15±0,15
24-Метиленициклоартаніл-ферулят	0,05±0,00	0,02±0,06	0,56±0,04	0,17±0,05
Загальний вихід	0,1±0,00	0,1±0,05	3,1±0,08	2,5±1,12

<sup>1</sup> Інкубація при струшуванні.

<sup>2</sup> Інкубація при перемішуванні.

Дезметилстерилферуляти були перетворені на 12,4–13,5%, а 4,4-диметилстерилферуляти тільки на 0,4–0,6%. Це відповідає загальному гідролітичному перетворенню  $\gamma$ -оризанолу 3,1%.

Значне збільшення гідролітичної конверсії  $\gamma$ -оризанолу в партіях зі 100 мг ферментного препарату пов'язане, серед іншого, зі збільшеною кількістю ферменту. Додавання таурохолату натрію в буфер може емульгувати стерилферуляти. Міцелярна форма може забезпечити ефект активації поверхні й ліпази, а отже, кращий доступ субстрату до активного центра. Однак активність ліпази *Candida rugosa* може змінюватися залежно від концентрації таурохолату [197]. Це пояснюється ефектом активації поверхні за рахунок утворення міцел і емульсій [182]. Однак механізм активації відрізняється через структурні відмінності між порошком підшлункової залози бика і ліпазою *C. rugosa*. У разі використання ліпази *C. rugosa* таурохолат натрію не виконує функції кофактора. Rogel та ін. повідомили про зміну

активності ліпази *C. rugosa* в разі додавання різних концентрацій натрію в буфер. За умови додавання 0,3 мМ і 0,9 мМ таурохолату у фосфатному буфері (рН 7) з оливковою олією як субстратом збільшується активність ліпази *C. rugosa*. Активність знижується при вмісті в розчині 0,6 мМ таурохолату натрію. Ці явища не отримали пояснення. Мінливість також може впливати на розчинники в субстраті [84]. Це ще раз підтверджує, що підбір складної системи для ферментативної реакції важливий. Salis та ін. повідомили про вплив електроліту в буфері на ферментативну активність ліпази *C. rugosa* і її розчинність у буфері [203]. Розчинність ферменту у фосфатному буфері, який містить 1 М  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , зрушує значення рН від 7,00 до 6,62. Це відбувається завдяки вмісту аніонів  $\text{SO}_4^{2-}$ , що викликає активацію ферменту. Розчинність ферменту в буфері  $\text{Tris} \times \text{HCl}$ , який містить 1М  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , зрушує значення рН від 7,00 до 7,38, що створює погані умови для ферменту. Hofmeister та ін. повідомили, що тільки аніони з нижчою полярністю (наприклад,  $\text{SO}_4^{2-}$ ) можуть активувати фермент. Нейтральні аніони ( $\text{Cl}^-$ ) мають менший активаційний ефект. При цьому надзвичайно поляризовані аніони ( $\text{SCN}^-$ ) призводять до інактивації ферменту [184]. Імовірно, коли в буфер додають таурохолат натрію, значення рН розчину також змінюється. Активність ферменту можна таким чином збільшити.

Очевидно, що одного тільки енергійного струшування партій недостатньо для забезпечення достатнього обміну речовинами між міцелами, утвореними з таурохолатом натрію, або між міцелами і рідиною, що їх оточує. Перемішування може поліпшити це. Ферментативна реакція зі 100 мг ліпази *C. rugosa* каталізується більш ефективно, ніж із 5 мг.

Конверсія гідролізу  $\gamma$ -оризанолу не може бути збільшена у двофазних системах у цих умовах; вона нижче, ніж в однофазній системі.

Для гідролізу  $\gamma$ -оризанолу ліпазою *C. rugosa* рекомендовані такі параметри реакції: буфер, що складається з ферментного буфера рН 6 і 48 мМ таурохолату натрію, розчиненого в 100 мМ буфері фосфату натрію- $\text{NaCl}$ , 100 мг ферменту і 50 мкл  $\gamma$ -оризанолу. Умови інкубації: 37°C, 24 год, із перемішуванням.

Ліпаза *C. rugosa* краще підходить для гідролізу  $\gamma$ -оризанолу, ніж *C. antarctica*. Різниця між активністю двох ліпаз обумовлена структурою ферменту. Сайти зв'язування різних ліпаз можна охарактеризувати з точки зору їх кишень зв'язування, які зв'язують певні речовини субстрату. Сайти зв'язування пов'язують ОН-функціональну область субстратів і можуть бути виявлені в заглибленні уздовж поверхні ліпази [199] (ліпаза *C. antarctica* типу В) або в тунелі (ліпаза *C. rugosa*), яке йде досить глибоко всередину ліпази [204]. Ліпаза *C. antarctica* типу В має відносно вузький і плоский сайт зв'язування. Великі й глибокі кишені ліпаз дозволяють зв'язувати субстрат за декількома атомами вуглецю, проте як для менших кишень це неможливо. Порошок підшлункової залози великої рогатої худоби показав значно більший високий відсоток конверсії гідролізу  $\gamma$ -оризанолу, ніж ліпаза *C. rugosa*. Хоча ліпазою *C. rugosa* можна гідролізувати не тільки десметилстерилферуляти, але й диметилферуляти.

### **3.4.3. Ферментативний гідроліз $\gamma$ -оризанолу комерційним препаратом Pentoran BG500**

Комерційний препарат ксиланази Pentoran BG500, як уже згадувалося вище, використовується для етерифікації похідних гідроксикоричних кислот довголанцюгових спиртів, моносахаридів і алкілглікозидів [84; 87; 205]. Про гідроліз стерилферулятів препаратами ксиланази (Pentoran BG500), ще не повідомлялося.

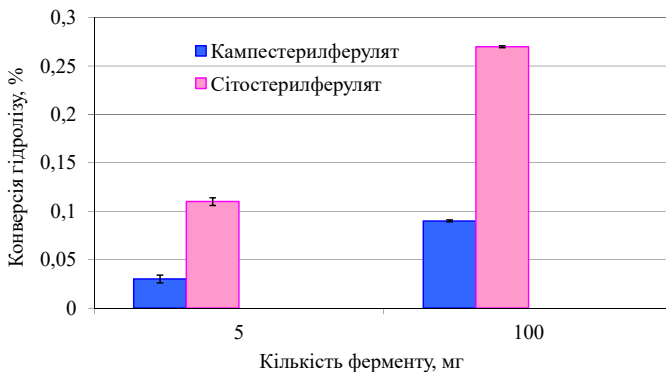
На підставі літературних даних і даних, отриманих нами експериментально, був доведений гідроліз ефірних зв'язків ефірів ферулової кислоти і стеролів за допомогою препарату Pentoran BG500 у відповідних умовах.

Для перевірки гідролітичної активності Pentoran 500BG до  $\gamma$ -оризанолу був проведений тест із 5 мг і 100 мг ферменту. Гідролітичне перетворення  $\gamma$ -оризанолу досягалося за таких умов: 50 мкл 16,1 мМ  $\gamma$ -оризанолу як субстрат розчиняли в 400 мкл ферментного буфера (рН 6) і додавали відповідну кількість

ферменту. Партії інкубували протягом 15 хв за температури 45°C на бані-шейкері (для струшування). Потім додавали 50 мкл внутрішнього стандарту (1), стерини екстрагували МТВЕ і залишок розчину силілували. Утворення стеринів як індикатора гідролізу  $\gamma$ -оризанолу аналізували за допомогою газової хроматографії (ГХ). Для газохроматографічного поділу вільних стеринів використовували неполярну і термостабільну нерухому фазу (Rtx-200MS). Отримані піки інтегрували і порівнювали з еталонною хроматограмою. Отримані після хімічного перетворення  $\gamma$ -оризанолу продукти гідролізу визначали за площами піків.

Для перевірки стабільності  $\gamma$ -оризанолу використовували партії без додавання ферменту (контрольні значення), інкубували, екстрагували, силілували й аналізували за допомогою газової хроматографії в тих самих умовах. Для визначення точного перетворення  $\gamma$ -оризанолу під час розрахунку конверсії гідролізу від площі піків, отриманих за результатом гідролізу віднімали площі піків, отриманих у результаті інкубації партій без додавання ферменту.

У результаті ферментативного гідролізу  $\gamma$ -оризанолу препаратом Pentoran BG500 утворюються вільні стерини й ферулова кислота. Конверсії гідролізу наведено на рис. 3.16.



**Рис. 3.16. Ступінь гідролізу  $\gamma$ -оризанолу препаратом Pentoran BG500 залежно від кількості ферменту**

Після 15 хв інкубації спостерігався гідроліз дезметилстерилферулятів. Ситостерилферуляту було гідролізовано більше, ніж кампестерилферуляту. За цих умов реакції продукти гідролізу 4,4-диметилферулятів: циклоартанілферуляту і 24-метиленициклоартанілферуляту – не були визначені.

Зч збільшенням кількості ферменту вихід продуктів гідролізу збільшився у 2,5–3,0 рази, але тенденція не змінилася. Гідроліз  $\gamma$ -оризанолу залежно від різних параметрів реакції досліджували в ході подальших експериментів. Для цього використовували 100 мг ферменту.

За результатом позитивного впливу таурохолату натрію на конверсію гідролізу  $\gamma$ -оризанолу з порошком підшлункової залози бика було зроблено припущення, що конверсія гідролізу за допомогою Pentoran BG500 також може бути збільшена завдяки утворенню емульсії або міцел гідрофобного субстрату ( $\gamma$ -оризанолу). Про підвищення активності ксиланаз таурохолатом натрію досі не повідомлялося.

Для вивчення впливу таурохолату натрію на конверсію гідролізу комерційним препаратом Pentoran 500BG, 100 мг ферменту інкубували у двох буферних системах: перша – 450 мкл ферментного буферного розчину (рН 6); друга складається з 200 мкл ферментного буфера (рН 6) і 250 мкл 48 мМ розчину таурохолату натрію. Як субстрат до цих розчинів додавали 50 мкл 16,1 мМ  $\gamma$ -оризанолу. Партії інкубували на бані-шейкері для струшування за температури 45°C. Перебіг реакції досліджували шляхом інкубації партій з і без використання таурохолату натрію протягом 0,25 год, 24 год та 96 год.

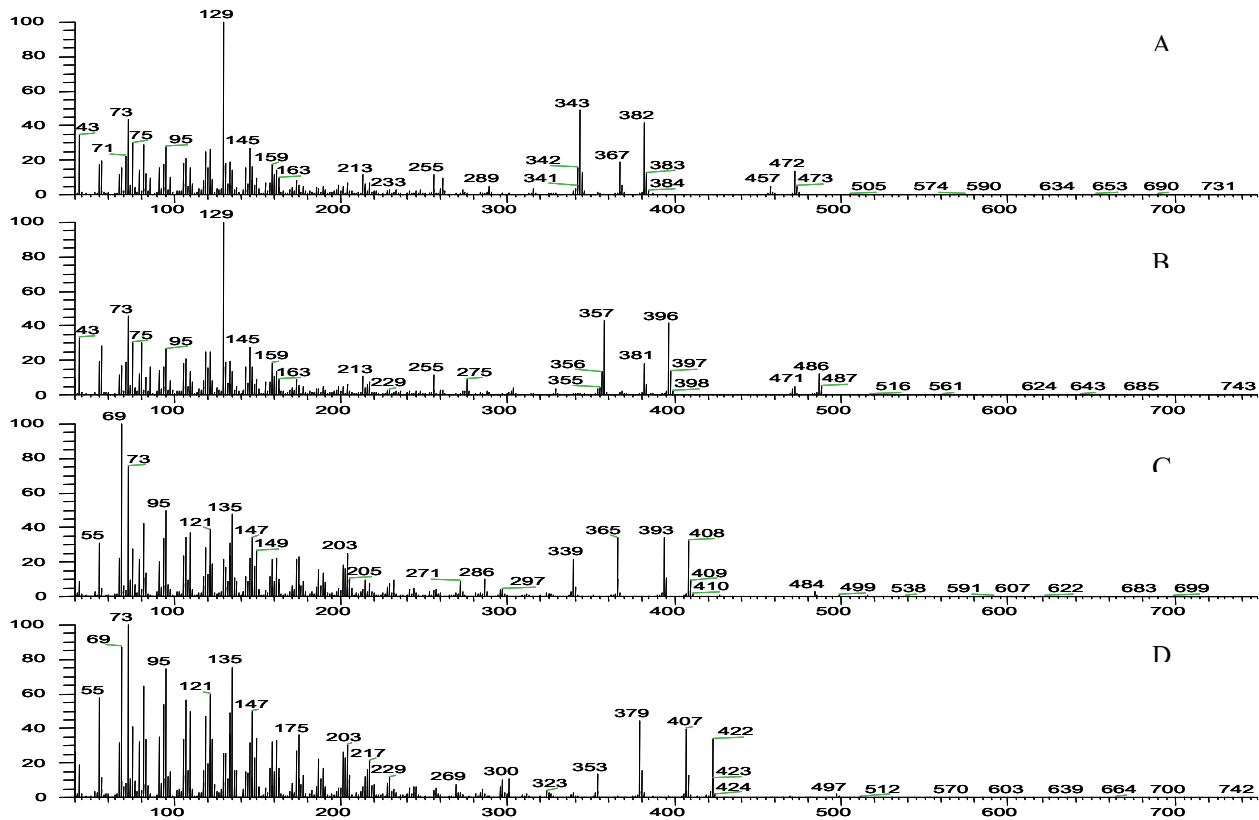
Отримані продукти реакції – стерини – ідентифікували за допомогою газової хроматографії / масової спектрометрії. На рис. 3.17 показані мас-спектри силілованих стеринів. Піки стеролів можна було визначити на хроматограмі шляхом порівняння з літературними даними.

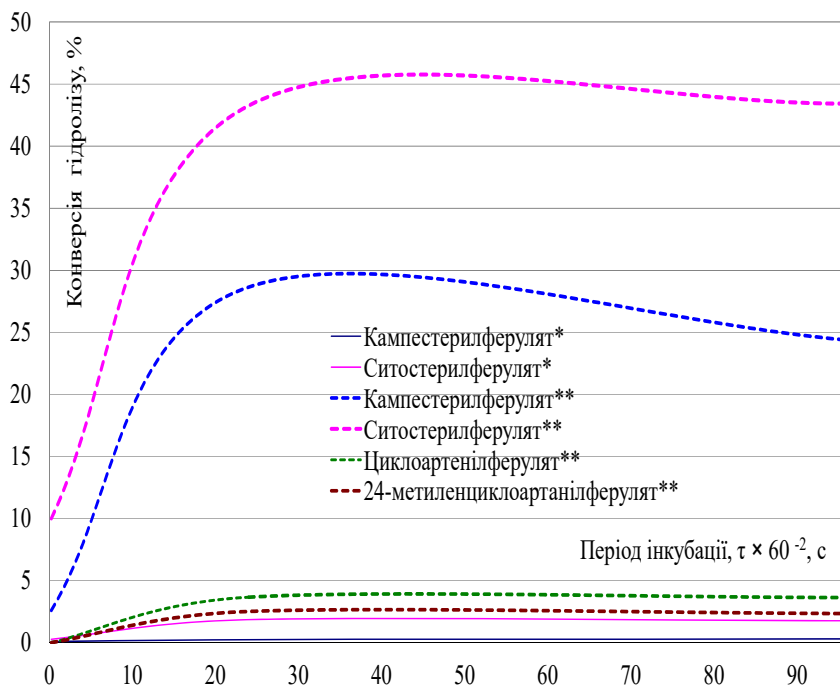
Розраховані конверсії гідролізу порівнювали з конверсіями, отриманими після інкубації без таурохолату натрію і з ним (рис. 3.18).

За динамікою ферментативної реакції, показаної на діаграмі, можна визначити, що з часом вихід продукту збільшується до максимального значення в обох середовищах, а потім зменшується. Конверсія через 0,25 год ще не завершена, і швидкість гідролізу невелика. Через 24 год конверсія  $\gamma$ -оризанолу досягла максимального значення. А чим більше час інкубації (96 год), тим нижче конверсія. Імовірно, це пов'язано з пригніченням ферменту утвореними продуктами та завершенням реакції.

Після інкубування протягом 24 год у ферментному буфері було отримано такий ступінь гідролізу: для кампестерилферуляту 0,3% і для ситостерилферуляту 1,8%. У результаті збільшення часу інкубації кількість продуктів гідролізу залишалася без змін. Продуктів гідролізу 4,4-диметилстерилферулятів у цих умовах не виявлено.

Рис. 3.17. Мас-спектри силілованих стеринів, холестерину (а), 5 $\alpha$ -холестан-3 $\beta$ -олу (б),





**Рис. 3.18. Ступінь гідролізу в разі ферментативного гідролізу  $\gamma$ -оризанолу препаратом Pentoran BG500 залежно від концентрації таурохолату натрію і часу інкубації**  
 \* Тільки ферментний буфер, без таурохолату натрію.  
 \*\* Із додаванням таурохолату натрію.

Перетворення  $\gamma$ -оризанолу значно збільшується за наявності в буфері таурохолату натрію. Конверсія кампестерилферуляту збільшується приблизно на 99%, а ситостерилферуляту приблизно на 95%.

Уже після 15 хв інкубації було виділено значно більшу кількість стеролів із дезметилферулятів, ніж через 24 год інкубації у ферментативному буфері. Ступінь гідролізу ситостерилферуляту через 24 год інкубації дорівнював 43%, кампестерилферуляту 29%. Гідроліз 4,4-диметилферулятів

Pentopan 500BG із додаванням таурохолату натрію можна було спостерігати після 24-годинної інкубації: циклоартенілферулят 3,6%, 24-метиленициклоартенілферулят 2,5%.

Можна пояснити збільшення виходу продуктів гідролізу  $\gamma$ -оризанолу за рахунок таурохолату натрію емульгувальним ефектом. Завдяки використанню таурохолату натрію гідрофобний субстрат знаходиться в емульгованій формі у водному середовищі й краще контактує з ферментом.

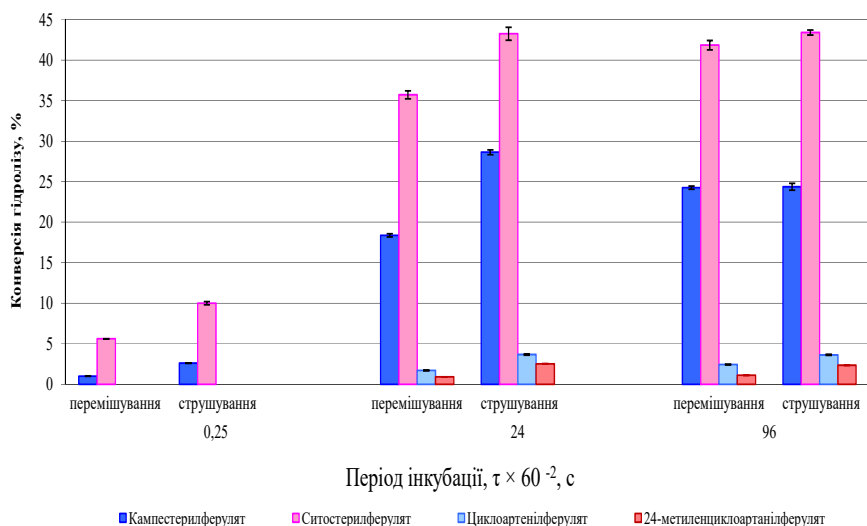
Подальше підвищення ступеня гідролізу за допомогою збільшення часу інкубації до 96 год не було досягнуто.

Оптимальний час інкубації становить 24 год, буферна система є оптимальним середовищем для проведення ферментативної реакції.

Механічні сили можуть мати як позитивний, так і негативний вплив на вихід продукту у ферментативних реакціях. Такі сили можуть змінити хімічну структуру молекули ферменту до такої міри, що фермент буде інактивований. Сили, які часто можуть викликати денатурацію білка: сили зсуву (можуть виникати в результаті перемішування), поверхневий натяг (виникає в результаті утворення піни під час інкубації), адсорбція на твердих поверхнях (наприклад, на стінках біореактора), струми деформації й кавітація (виникають за більш високої швидкості перемішування). Для ступеня інактивації важливо визначити поєднання інтенсивності й тривалості дії механічних сил [182].

Позитивний вплив перемішування на вихід продуктів гідролізу  $\gamma$ -оризанолу вже було продемонстровано за допомогою ферментного порошку підшлункової залози бика. Такий самий ефект очікується в разі гідролізу  $\gamma$ -оризанолу Pentopan BG500.

Щоб перевірити вплив механічних сил (струшування і перемішування), використовували партії, що складаються зі 100 мг ферменту, 50 мкл  $\gamma$ -оризанолу, 200 мкл ферментного буфера (рН 6), 250 мкл 48 мМ розчину таурохолату натрію. Підготовані розчини струшували при 45°C або перемішували, інкубували протягом 0,25 год, 24 год, 96 год. Певні конверсії гідролізу показано на рис. 3.19.



**Рис. 3.19. Механічний вплив на ферментативне перетворення  $\gamma$ -оризанолу препаратом Pentoran BG 500**

Дані діаграми вказують, що вихід продукту в разі струшування вже в перші 15 хв у 2 рази вище, ніж за умов перемішування. Після 24-годинного інкубаційного періоду можна спостерігати не тільки вихід дезметилстерилферулятів, але й диметилстерилферулятів (циклоартанолферуляту і 24-метиленициклоартанолферуляту). Вихід продукту в разі струшування все ж вище, ніж за умов перемішування. Через 24 год конверсія гідролізу все ще збільшується в разі перемішування, хоча конверсія істотно не знижується через 24 год за умов струшування суміші. Конверсія за 96 год майже така сама, як у разі перемішування і струшування. Тільки конверсія диметилстерилферулятів за умови перемішування майже вдвічі нижче, ніж у разі струшування.

З експериментально отриманих даних можна зробити висновок про меншу активність ферменту в разі перемішування.

Поясненням цього можуть бути конформаційні зміни ферменту. Рух середовища реакції може бути перешкодою для утворення комплексу субстрат–фермент. Також припустимо, що сили зсуву змінюють сольватовані групи білка, що призводить до утворення неактивних мономерів.

Для отримання високих конверсій гідролізу  $\gamma$ -оризанолу препаратом Pentoran BG500 рекомендується інкубація на банішейкері (зі струшуванням реакційної суміші).

Вихід продуктів гідролізу може бути збільшений за рахунок інкубації у двофазній системі. Причина цього – зменшення будь-якого пригнічення продукту, яке може існувати під час утворення продуктів гідролізу. Використання двофазної системи дозволяє одночасно екстрагувати продукт в органічну фазу, і фермент «сприймає» тільки низьку концентрацію продукту [182]. Щоб перевірити цей ефект, партії гідролізу інкубували зі 100 мг Pentoran BG500 в середовищі (1-, 2-фазна система з таурохолатом натрію і без нього) при 45°C, струшуванні/перемішуванні протягом 24 год.

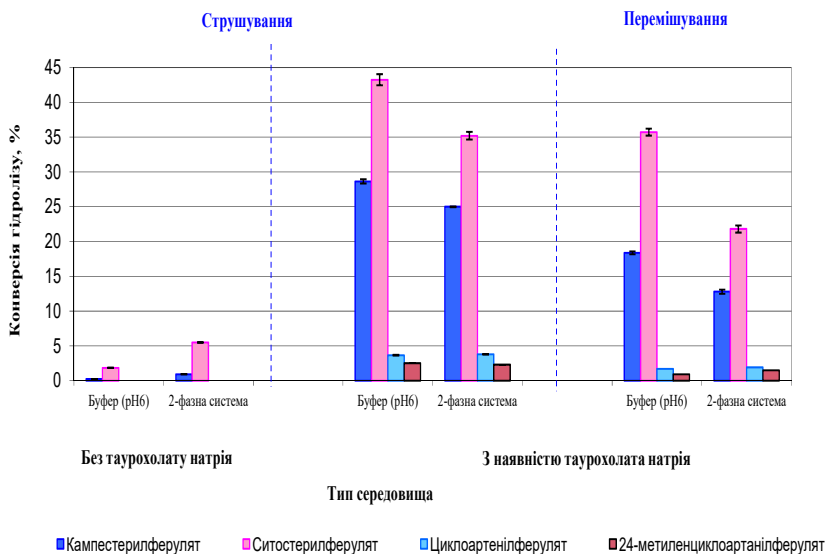
У першій серії дослідів використовували при струшуванні такі системи: однофазну з ферментним буфером (pH 6) і двофазну, що складається з ферментного буфера (pH 6) і гексану. У другій серії дослідів використовували такі системи при струшуванні: однофазну з ферментним буфером (pH 6) і двофазну, що складається з ферментного буфера (pH 6), таурохолату натрію і гексану. У третій серії дослідів при перемішуванні використовували такі системи: однофазну з ферментним буфером (pH 6) і двофазну, що складається з ферментного буфера (pH 6), таурохолату натрію і гексану.

Порівняння конверсій гідролізу зі зміною параметрів реакції показано на рис. 3.20.

У двофазній системі без використання таурохолату натрію конверсія

$\gamma$ -оризанолу збільшується. Фермент знаходиться у водній фазі, а продукти, що утворюються в результаті гідролізу, переходять у гексанову фазу. Вихід продукту у двофазній системі у два рази перевищує отриману конверсію стерилферуляту у ферментному

буфері рН 6. Однак конверсія стерильних ферулятів, яка досягає тільки 2,5–5,0%, дуже низька.



**Рис. 3.20. Порівняння ферментативного перетворення  $\gamma$ -оризанолу з Penton BG500 залежно від співвідношення компонентів у системі**

Наявність таурохолата натрію в реакційному середовищі значно збільшує гідролітичні конверсії  $\gamma$ -оризанолу. При цьому в однофазній системі вихід продуктів гідролізу більша, ніж у двофазній. Конверсія  $\gamma$ -оризанолу у двофазній системі знижується в разі додавання коферментів: кампестерилферуляту приблизно на 3% і ситостерилферуляту приблизно на 13%. Імовірно, у двофазній системі активність ферменту знижується через перехід субстрату в емульгований стан. Це можна пояснити розгортанням ферменту завдяки взаємодії поверхневих сил на межі поділу фаз або обмеженню дифузії продуктів гідролізу в

органічну фазу. Як було встановлено, перемішування знижує загальну конверсію  $\gamma$ -оризанолу.

У двофазній системі вихід продуктів гідролізу менше, ніж в однофазній. Зниження активності ферменту у двофазній системі в разі перемішування майже вдвічі більше, ніж у двофазній системі за умови струшування.

За результатами проведених досліджень можна зробити висновок, що оптимальним середовищем для гідролізу  $\gamma$ -оризанолу препаратом Pentopan BG500 є буферна система, що складається з ферментного буфера (рН 6) і таурохолату натрію.

Для встановлення статистично адекватної моделі впливу різних факторів на вихід продуктів ферментативного гідролізу  $\gamma$ -оризанолу був проведений регресійний аналіз отриманих даних у наведених вище експериментах. На підставі проведеного регресійного аналізу було визначено вигляд математичних моделей, які описують залежність виходу продуктів гідролізу від наявності механічного впливу, періоду інкубації, концентрації коферменту та співвідношення компонентів гідролізу. Математичні моделі мають вигляд:

$$y_1 = 3,0 + 0,01 \times x_1 - 10,1 \times x_2 + 0,083 \times x_3 + 0,488 \times x_4,$$

$$y_2 = 24,9 + 0,08 \times x_1 - 8,62 \times x_2 - 0,029 \times x_3 + 0,42 \times x_4.$$

### **3.5. Розробка рецептур та технологій виробництва хлібних виробів на основі продуктів переробки гречки та проса**

Для створення нових хлібних виробів спеціального призначення з додаванням продуктів переробки гречки та проса було вирішено розробити рецептури бездріжджового хліба на заквасках. Відомо, що бездріжджові закваски і хліб, приготований на їх основі, збагачують організм органічними кислотами, вітамінами, мінеральними речовинами, ферментами, клітковиною, пектинами, біостимуляторами тощо. Хліб, приготований таким методом, краще зберігається і не пліснявіє [206].

Ураховуючи складність виготовлення густих і рідких

заквасок, було прийнято рішення про використання сухих заквасок фірми «Пуратос», які характеризуються широким асортиментом і можуть бути застосовані за будь-якого типу виробничого процесу.

Для гречаного хліба як прототип обрано рецептуру житньо-пшеничного хліба зі співвідношенням борошна житнього обдирного та борошна пшеничного 1-го гатунку 60:40; для хліба із пшоном – рецептуру хліба із пшеничного борошна 1-го гатунку. Такий вибір аналогів хліба оснований на кольорових характеристиках продуктів переробки гречки і проса. Вибір саме цих гатунків борошна обумовлений тим, що для створення хлібопродуктів із додаванням нетрадиційної сировини не рекомендовано використовувати житнє та пшеничне борошно вищого гатунку.

Із метою визначення доцільності застосування крупи або борошна з гречки і проса проведено низку пробних випікань. Експериментально встановлено, що хліб із додаванням гречаного борошна має значно кращі показники якості порівняно з хлібом із додаванням попередньо відвареної гречаної крупи. Сьогодні гречане борошно є достатньо розповсюдженим продуктом харчування і знаходиться в тому самому ціновому сегменті, що і гречана крупа. Ураховуючи ці факти, нами було прийнято рішення про розробку нового виду хліба з додаванням гречаного борошна.

Інші умови спостерігалися в разі використання пшона. Хліб із додаванням просяного борошна та хліб із відвареним до напівготовності пшоном характеризуються майже однаковою якістю, але черствіння хліба з борошном із проса відбувається значно швидше, що призводить до погіршення якісних показників хліба вже через 24 год після випікання. До того ж просяне борошно виробляється в дуже незначних обсягах і за ціною значно дорожче за пшоняну крупу. Тому ми вважаємо, що розробка нового хлібного виробу з додаванням пшона, попередньо відвареного до напівготовності, є більш доцільною.

Для розробки нових видів хліба обрано сорти гречки і проса, які отримали найвищу оцінку за комплексним показником якості, а саме: гречку сорту Квітник та просо сорту Козацьке. Дослідну

партію круп та борошна вироблено на лабораторному устаткуванні Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр'єва.

Із літературних джерел [158–166] відомо, що в разі використання нетрадиційної сировини в хлібопеченні зазвичай кількість добавок становить не більше 10–20% від маси борошна. Метою наших експериментальних досліджень була розробка нових видів якісного хліба з максимально можливим вмістом гречаного борошна і пшона для отримання продуктів спеціального призначення. Для приготування гречаного хліба частину житнього борошна заміняли гречаним у кількості 10, 20, 30, 40 і 50% відповідно. Аналогічно для дослідних зразків пшоняного хліба частину пшеничного борошна заміняли пшоном, попередньо відвареним до напівготовності, у дозуванні від 10% до 50% із кроком 10% відповідно.

Експериментально встановлено, що заміна житнього борошна гречаним у кількості 10% і 20% не впливає суттєво на якість хліба, але й не підвищує значною мірою його харчову цінність. Додавання 30, 40 та 50% гречаного борошна вносить зміни в хімічний склад хліба, значно підвищуючи його цінність, проте водночас спостерігається погіршення окремих показників якості виробу. Під час пробних випікань пшоняного хліба виявлено, що погіршення структурно-механічних властивостей виробу спостерігається в разі додавання пшона в кількості 30% і 40%; у разі дозування 50% отримано зразок дуже низької якості, що дозволяє зробити висновок про недоцільність використання пшона в дозуванні більше ніж 40%.

Отже, для остаточного обґрунтування рецептурного складу нових видів хліба оздоровчого призначення вирішено проводити експериментальні дослідження із заміною житнього борошна на гречане в кількості 30, 40 та 50% та з дозуванням пшона 20%, 30% та 40% відповідно.

Оскільки гречка і просо не містять клейковини, то в разі додавання продуктів їх переробки в кількості більше 20% від загальної маси борошна спостерігається поступове погіршення структурно-механічних властивостей виробів. Для підвищення якості нових видів хліба нами запропоновано введення в тісто ферментних препаратів із геміцелюлолітичною активністю, які

діють на нерозчинні високомолекулярні пентозани борошна, збільшують частку низькомолекулярних пентозанів, сприяючи утворенню більш міцного каркаса клейковини. Внесення таких препаратів сприяє збільшенню частки зв'язаної вологи в тісті, що приводить до збільшення вологопоглинальної здатності напівфабрикатів, а отже, до поліпшення структурно-механічних властивостей тіста [207].

Після ретельного аналізу ферментних препаратів із геміцелюлолітичною активністю, представлених на українському ринку, нами обрано як покращувач ферментний препарат Pentopan BG500. Крім поліпшення структурно-механічних властивостей тіста, покращення пористості й еластичності м'якушки хліба, збільшення питомого об'єму готових виробів Pentopan BG500 має позитивний вплив на  $\gamma$ -оризанол – речовину, що міститься в усіх зернових і являє собою суміш антиоксидантних сполук, зокрема фітостеринів та ферулової кислоти. За результатами наших досліджень, наведеними в розділі 3, встановлено, що під дією Pentopan BG500  $\gamma$ -оризанол метаболізується з утворенням  $\beta$ -ситостерину, кампестерину та інших фітостеролів [208]. Результати дослідження, наведені в розділі 3 свідчать про те, що препарат Pentopan BG500 покращує гідроліз  $\gamma$ -оризанолу шляхом регулювання концентрації ферментного препарату, температурних умов і тривалості процесу. Можна припустити, що його внесення до тіста сприятиме підвищенню вмісту фітостеролів у нових хлібопродуктах, що дозволить вважати їх виробами з холестеринознижуючими властивостями.

Для оцінювання якості нових видів хліба з гречаним борошном і пшоном застосовували вимоги ДСТУ-П 4588:2006 «Вироби хлібобулочні для спеціального дієтичного споживання. Загальні технічні умови» [209].

Для створення нового гречаного хліба спеціального призначення використовували традиційну сировину: борошно пшеничне 1-го ґатунку, борошно житнє хлібопекарське обдирне, сіль кухонну кам'яну, воду питну. Для підвищення харчової цінності нового хліба частину житнього борошна заміняли на гречане, вміст пшеничного борошна не змінювали з метою збереження структурно-механічних властивостей тіста. На рис.

3.11 наведено технологічну схему виробництва хліба з гречаним борошном.

Хліб готували на сухій заквасці O-tentic Durum, яка використовується у виробництві житніх і житньо-пшеничних сортів хліба, дає можливість виготовляти продукцію стабільно високої якості з тривалим терміном зберігання. При цьому застосовували рекомендоване виробниками дозування закваски – 4,0% від маси борошна [210].

Контрольний зразок хліба готували із суміші житнього та пшеничного борошна у співвідношенні 60:40. Для приготування дослідних зразків частину житнього борошна заміняли на гречане в кількості 30, 40 та 50% із додаванням ферментного препарату Pentopan BG500 у кількості 5 г на 100 кг борошна (середнє дозування препарату за рекомендаціями з розділу 3 дисертації та виробника) [211]. Контрольний зразок тіста (вологістю 48%) та дослідні зразки виготовляли з однаковими параметрами технологічного процесу.

Із метою визначення вологості тіста контрольного і дослідних зразків проведено експериментальні дослідження з установлення водоутримувальної здатності різних видів борошна, що використовувались у роботі. Визначено, що цей показник для пшеничного борошна 1-го гатунку становить 70–75%, житнього обдирного 110–115%, гречаного 185–190%. Ураховуючи підвищену водоутримувальну здатність гречаного борошна, вологість тіста дослідних зразків підвищували на 1–2% відносно контрольного зразка.

Для обґрунтування рецептурного складу гречаного хліба проводили пробні випікання, використовуючи технологію, яка включає такі операції: підготовка компонентів, замішування тіста, його вистоювання, розподіл тіста на шматки, формування тістових заготовок та їх вистоювання, випікання виробів, охолодження і зберігання хліба (рис. 3.21). Рецептурний склад контрольного та дослідних зразків гречаного хліба наведено в табл. 3.8.

Результати визначення показників якості контрольного та дослідних зразків гречаного хліба подано в табл. 3.9. Результати оцінювання якості контрольного та дослідних зразків хліба показують, що заміна житнього борошна гречаним у різних кількостях майже не

впливає на форму виробів: усі вони характеризуються правильною формою відповідно до тієї, в якій проводили випікання, мають різного ступеня випуклості верхню скоринку, без бокових впливів.

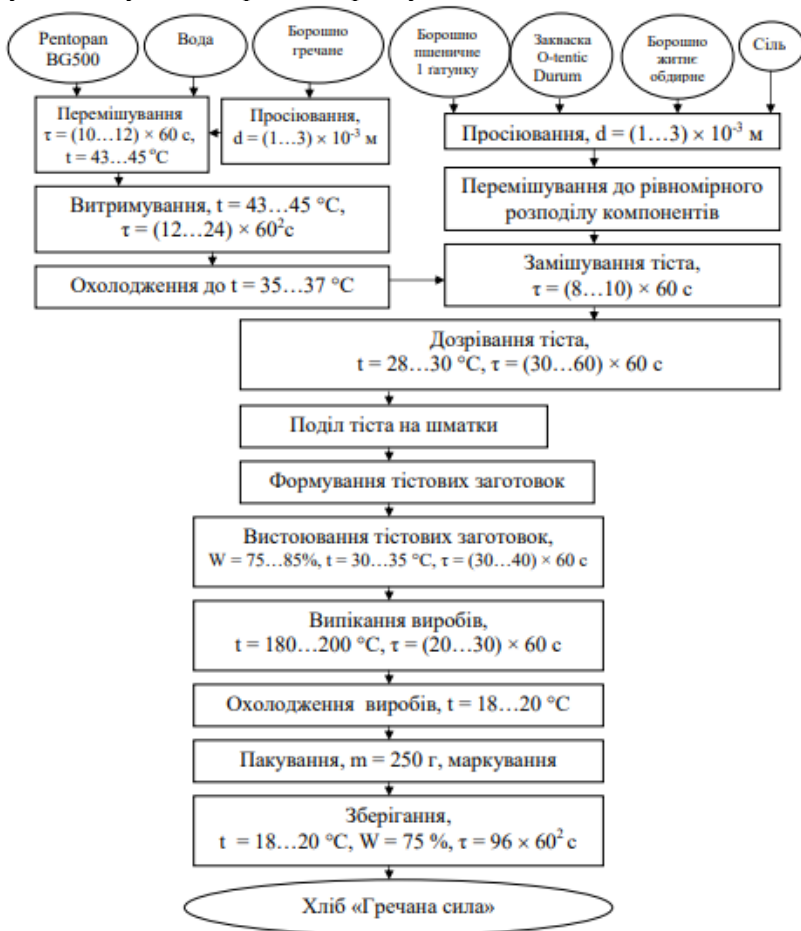


Рис. 3.21. Технологічна схема виробництва хліба на заквасках «Гречана сила»

Таблиця 3.8

## Рецептурний склад гречаного хліба

Сировина	Витрати сировини, кг			
	Хліб житньо-пшеничний (контроль)	Зразок №1	Зразок №2	Зразок №3
Борошно пшеничне 1-го ґатунку	40,0	40,0	40,0	40,0
Борошно житнє обдирне	60,0	30,0	20,0	10,0
Борошно гречане вищого ґатунку	–	30,0	40,0	50,0
Закваски O-tentic Durum	4,0	4,0	4,0	4,0
Ферментний препарат Pentopan BG500	–	0,005	0,005	0,005
Сіль кухонна кам'яна	1,5	1,5	1,5	1,5
Вода	За розрахунком			
Разом	105,500	105,505	105,505	105,505

Поверхня контрольного зразка є гладкою, без тріщин і великих підривів. Поверхня виробів із додаванням гречаного борошна трохи шорсткувата, нерівна, але без тріщин і великих підривів, без забруднення. Колір скоринки змінюється залежно від вмісту гречаного борошна від світло-коричневого (контрольний зразок) до коричневого (дослідні зразки).

М'якушка у всіх зразків м'яка, пропечена, без слідів непромісу, еластична, рівномірно забарвлена, з розвиненою пористістю. Але якщо в контрольного зразка та зразка з 30% гречаного борошна вона не волога на дотик, то в зразка з 40% добавки відчувається вже незначна липкість, у зразка з 50% добавки м'якушка волога, липка на дотик, що пов'язано з підвищеною водоутримувальною здатністю гречаного борошна та більшою вологістю тіста.

Колір м'якушки змінюється залежно від кількості доданого гречаного борошна: від сірого (контрольний зразок) до сіруватого

з ледь помітним коричневим відтінком (із 30% гречаного борошна), до сіруватого з добре вираженим коричневим відтінком (із 40% та 50%).

Таблиця 3.9

## Показники якості хліба з додаванням гречаного борошна

Показник	Характеристика показників якості хліба				
	Вимоги ДСТУ-П 4588:2006	Контрольний зразок (без добавки)	із заміною житнього борошна на гречане, %		
			30,0	40,0	50,0
1	2	3	4	5	6
<b>Органолептичні показники якості хліба</b>					
Зовнішній вигляд					
форма	Відповідає формі, в якій проводили випікання, без бокових впливів	Правильна, відповідає формі, в якій проводили випікання, з випуклою верхньою скоринкою, без бокових впливів	Правильна, відповідає формі, в якій проводили випікання, із дещо випуклою верхньою скоринкою, без бокових впливів		Правильна, відповідає формі, в якій проводили випікання, з недостатньо випуклою верхньою скоринкою
стан поверхні	Відповідає виду виробу, без забруднення	Гладка, без великих тріщин і великих підривів, без забруднення	Шорсткувата, нерівна, без великих тріщин і великих підривів, без забруднення		Шорстка, нерівна, без великих тріщин і великих підривів, без забруднення
колір скоринки	Від світло-жовтого до коричневого	Світло-коричневий, без підгорілості	Коричневий, без підгорілості		
Стан м'якушки	Пропечена, еластична, не волога на дотик, без слідів непромісу	М'яка, добре пропечена, без слідів непромісу, не волога на дотик, еластична	М'яка, пропечена, без слідів непромісу, еластична, з незначною липкістю	Достатньо м'яка, пропечена, без слідів непромісу, достатньо еластична, з незначною липкістю	Недостатньо м'яка, дещо ущільнена, пропечена, недостатньо еластична, липка на дотик

Продовження табл. 3.9

1	2	3	4	5	6
Пористість	Добре розвинена, рівномірна	Добре розвинена, рівномірна, пори дрібні та середні за розміром, тонкостінні	Добре розвинена, рівномірна, стінки пор середньої товщини, пори дрібні та середні за розміром	Розвинена, пори дрібні та середні за розміром, тонкостінні, рівномірно розподілені по товщині	Менш розвинена, недостатньо рівномірна, пори дуже дрібні, тонкостінні
Смак	Властивий цьому виду виробу, без стороннього присмаку	Добре виражений, приємний, властивий цьому виду хліба	Виражений, властивий цьому виду хліба, з ледь відчутним присмаком гречки	Добре виражений, властивий цьому виду хліба, із приємним присмаком гречки	Властивий цьому виду хліба, із сильно вираженим присмаком гречки
Запах	Властивий цьому виду виробу, без стороннього запаху	Властивий цьому виробу, приємний, без стороннього запаху	Властивий цьому виробу, з ледь відчутним запахом гречки	Властивий цьому виробу, приємний, з добре вираженим запахом гречки	Властивий цьому виробу, із сильно вираженим запахом гречки
Розжовуваність м'якушки	Добре розжовується	Добре розжовується			Трохи відчувається грудкуватість під час розжовування
Вологість м'якушки, %	Не більше ніж 41,0–53,0	47,0±1,2	47,5±1,2	48,0±1,2	48,5±1,2
Кислотність м'якушки, град.	Не більше ніж 5,0–12,0	5,0±0,2	4,9±0,2	4,9±0,2	4,9±0,2
Пористість м'якушки, %	Не менше ніж 46,0	63,8±1,0	59,2±1,0	57,7±1,0	54,0±1,0
Питомий об'єм, см <sup>3</sup> /г	–	2,7±0,1	2,5±0,1	2,4±0,1	2,2±0,1

Серед дослідних зразків лише зразок із 50% гречаного борошна має недостатньо розвинену, менш рівномірну пористість, відрізняється тонкостінними, дуже дрібними порами. Інші зразки характеризуються добре розвиненою, рівномірною пористістю з тонкостінними, дрібними та середніми за розміром порами.

Усі зразки характеризуються відсутністю крихкості й грудкуватості під час розжовування, окрім зразка з 50% гречаного борошна, в якому через підвищену липкість і вологість м'якушка недостатньо добре розжовується. Додавання гречаного борошна замість житнього приводить до появи гречаного присмаку та запаху, найбільш виражених і приємних у зразка із 40% гречаного борошна.

Показник вологості м'якушки хліба в дослідних зразках вище, ніж у контрольного, що пов'язано зі збільшенням вологості тіста в міру додавання гречаного борошна через його підвищену водоутримувальну здатність порівняно з пшеничним та житнім борошном. Кислотність виробів майже не змінюється і знаходиться в межах 4,9–5,0 град.

Пористість м'якушки дослідних зразків зменшується в міру додавання гречаного борошна, а саме на 7,2, 9,6 та 15,4% відповідно порівняно з контрольним зразком. Але якщо в зразків №2 та №3 цей показник незначно розрізняється, то в разі додавання 50% гречаного борошна пористість м'якушки значно знижується і становить усього 54%.

Аналогічна тенденція спостерігається і з показником питомого об'єму хліба. Зі збільшенням дозування гречаного борошна цей показник зменшується на 7,4, 11,1 та 18,5% відповідно.

Таким чином, проведені пробні випікання та отримані результати оцінювання якості нового хліба з різним дозуванням гречаного борошна дозволяють зробити висновок про доцільність заміни житнього борошна на гречане в кількості 30–40%. Такий хліб характеризується достатньо високими органолептичними та задовільними фізико-хімічними показниками. Додавання гречаного борошна в кількості 50% призводить до суттєвого зменшення пористості, питомого об'єму, погіршення стану м'якушки, смаку та запаху виробів.

Для створення нового хліба з пшоном використовували традиційну сировину: борошно пшеничне 1-го гатунку, сіль кухонну кам'яну, воду питну.

На рис. 3.22 наведено технологічну схему виробництва хліба з пшоном.

Для підвищення харчової цінності нового виробу частину пшеничного борошна заміняли на пшоно, попередньо відварене до напівготовності. Для отримання натурального хлібного виробу без дріжджів хліб готували на двох сухих заквасках: O-tentic Durum та Sapore Rigoletto. Вибір цих заквасок пов'язаний із їх різними функціями та призначенням.

Закваска O-tentic Durum рекомендується для виробництва пшеничного хліба за будь-якою тістоприготування, дозволяє досягти бажаної структури пористості м'якушки, сприяє утворенню хрусткої скоринки. Закваска Sapore Rigoletto використовується для поліпшення якості й аромату пшеничних сортів хліба, а саме: забезпечує значний об'єм, якісну структуру м'якушки, м'якість і свіжість виробів, надає готовій продукції насиченого смаку та унікального своєрідного аромату, властивого традиційному пшеничному хлібу, що особливо важливо для пшоняного хліба, оскільки пшоно майже не має характерного запаху.

Під час виробництва хліба з пшоном застосовували рекомендоване виробниками дозування заквасок: O-tentic Durum 4,0%; Sapore Rigoletto 1–3% від маси борошна [210, 211]. Із метою поліпшення структурно-механічних властивостей нового хліба та підвищення вмісту фітостеринів у рецептуру вводили ферментний препарат Pentopan BG500. Для обґрунтування рецептурного складу пшоняного хліба проводили пробні випікання. Контрольний зразок хліба готували із пшеничного борошна, сухих заквасок, солі кухонної та води питної (із розрахунку на 43% вологості тіста). Для приготування дослідних зразків частину пшеничного борошна заміняли на пшоно, відварене до напівготовності, у кількості 20, 30 та 40% із додаванням ферментного препарату Pentopan BG500 у кількості 5 г на 100 кг борошна. Рецептури контрольного та дослідних зразків хліба наведено в табл. 3.10.

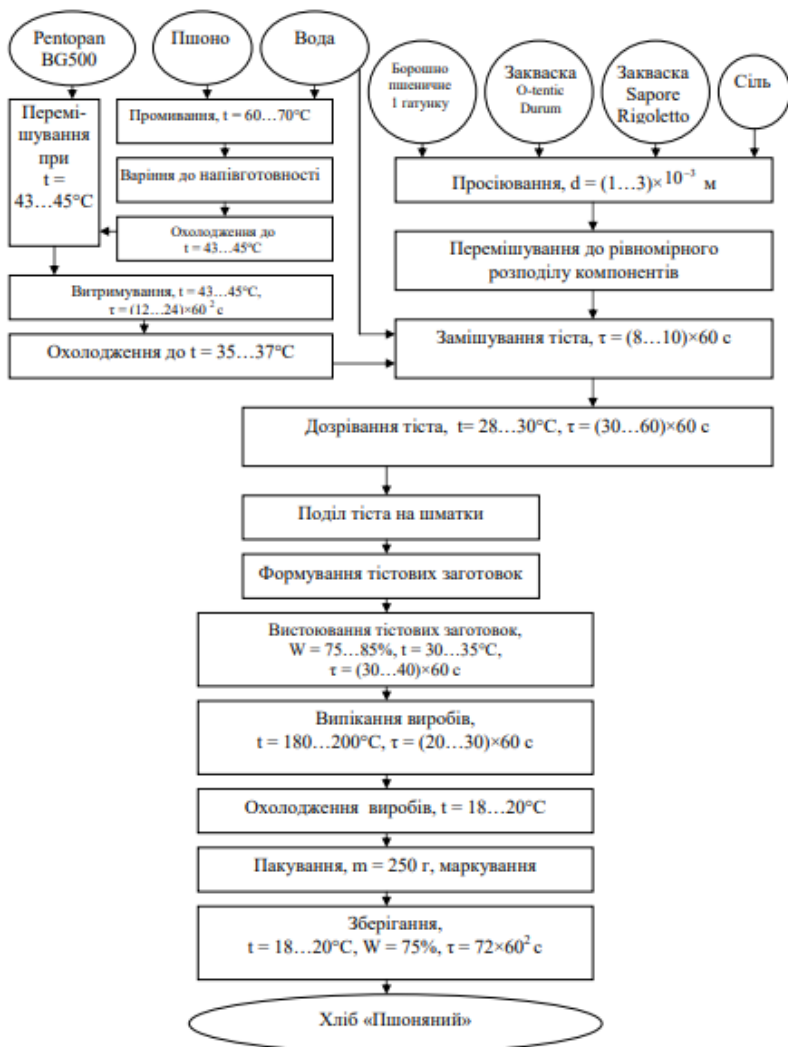


Рис. 3.22. Технологічна схема виробництва хліба на заквасках «Пшоняний»

Результати визначення показників якості контрольного та дослідних зразків хліба з пшоном подано в табл. 3.11. Отримані результати показують, що введення пшона в рецептуру хліба впливає на його зовнішній вигляд, а саме на форму верхньої скоринки.

У контрольного зразка вона має значно випуклішу форму. У міру додавання пшона вона змінюється: від добре випуклої форми (20% пшона) до майже плоскої (40% пшона).

Поверхня контрольного зразка є гладкою, без тріщин і великих підривів. Поверхня виробів із додаванням пшона шорсткувата, причому ступінь шорсткості зростає зі збільшенням вмісту пшона. Зразок із додаванням 40% пшона має шорстку, нерівну поверхню з невеликими тріщинами та підривами. Колір скоринки у всіх зразків є світло-коричневим, без підгорілості [212].

**Таблиця 3.10**

**Рецептурний склад хліба з пшоном**

Сировина	Витрати сировини, кг			
	Хліб пшеничний (контроль)	Зразок №1	Зразок №2	Зразок №3
Борошно пшеничне 1-го гатунку	100,0	80,0	70,0	60,0
Пшоно	–	20/50*	30/75*	40/100*
Закваска O-tentic Durum	4,0	4,0	4,0	4,0
Закваска Sapore Rigoletto	2,0	2,0	2,0	2,0
Ферментний препарат Пентопан BG500	–	0,005	0,005	0,005
Сіль кухонна кам'яна	1,5	1,5	1,5	1,5
Вода	За розрахунком			
Разом	107,500	137,505	152,505	167,505

\* Маса відвареного пшона.

Таблиця 3.11

## Показники якості хліба з додаванням пшона

Показник	Характеристика показників якості хліба				
	Вимоги ДСТУ-П 4588:2006	Контрольний зразок (без добавки)	із заміною пшеничного борошна на пшоно, %		
			20,0	30,0	40,0
1	2	3	4	5	6
<b>Органолептичні показники якості хліба</b>					
<b>Зовнішній вигляд</b>					
форма	Відповідає формі, в якій проводили випікання, без бокових впливів	Правильна, відповідає формі, в якій проводили випікання, із сильно випуклою верхньою скоринкою, без бокових впливів	Правильна, відповідає формі, в якій проводили випікання, з добре випуклою верхньою скоринкою, без бокових впливів	Правильна, відповідає формі, в якій проводили випікання, з дещо випуклою верхньою скоринкою, без бокових впливів	Правильна, відповідає формі, в якій проводили випікання, з плоскою верхньою скоринкою, без бокових впливів
стан поверхні	Відповідає виду виробу, без забруднення	Гладка, без тріщин і підривів, без забруднення	Шорсткувата, із помірною кількістю пшона на поверхні, без великих тріщин і підривів, без забруднення		Шорстка, нерівна, зі значною кількістю пшона на поверхні, з невеликими тріщинами та підрива
колір скоринки	Від світло-жовтого до коричневого	Світло-коричневий, без підгорілості			
Стан м'якушки	Пропечена, еластична, не волога на дотик, без слідів непромісу	М'яка, добре пропечена, еластична, без слідів непромісу, не волога на дотик	М'яка, добре пропечена, еластична, не волога на дотик, без слідів непромісу	М'яка, добре пропечена, еластична, не волога на дотик, без слідів непромісу	М'яка, але дещо уцільнена, пропечена, недостатньо еластична, дещо волога, липка на дотик

Продовження табл. 3.11

1	2	3	4	5	6
Пористість	Добре розвинена, рівномірна	Добре розвинена, рівномірна, пори середні за розміром, тонкостінні	Добре розвинена, рівномірна, стінки пор середньої товщини, дрібні та середні за розміром		Недостатньо розвинена, пори дрібні з середньою товщиною стінок, нерівномірно розподілені по товщині
Смак	Властивий цьому виду виробу, без стороннього присмаку	Добре виражений, властивий цьому виду хліба, без стороннього присмаку	Добре виражений, властивий цьому виду хліба, з незначним присмаком пшона	Добре виражений, властивий цьому виду хліба, із приємним присмаком пшона	Властивий цьому виду хліба, із сильно вираженим присмаком пшона
Запах	Властивий цьому виду виробу, без стороннього запаху	Приємний, з ароматом вершкового масла і пивними нотками, без стороннього запаху	Властивий цьому виду виробу, приємний, з ароматом вершкового масла і пивними нотками, з ледь відчутним запахом пшона		
Розжовуваність м'якушки	Добре розжовується	Добре розжовується			Трохи відчувається грудкуватість під час розжовування
<b>Фізико-хімічні показники якості хліба</b>					
Вологість м'якушки, %	Не більше ніж 39,0–48,0	41,5±1,2	42,0±1,2	42,8±1,2	44,9±1,2
Кислотність м'якушки, град.	Не більше ніж 2,5–5,0	3,0 ±0,1	2,9±0,1	2,9±0,1	2,9±0,1
Пористість м'якушки, %	Не менше ніж 63,0	77,1±1,0	71,5±1,0	68,3±1,0	61,5±1,0
Питомий об'єм, см <sup>3</sup> /г	–	3,6±0,1	3,4±0,1	3,2±0,1	2,9±0,1

М'якушка контрольного зразка і зразків із 20% та 30% пшона м'яка, добре пропечена, еластична, не волога на дотик, рівномірно забарвлена, з добре розвиненою пористістю. Зразок із 40% пшона характеризується м'якою, пропеченою, але недостатньо еластичною, трохи вологою на дотик, дещо ущільненою м'якушкою. Колір м'якушки в контрольного зразка білий із сіруватим відтінком, дослідні зразки мали такий самий колір і відрізнялися лише різною кількістю жовтих вкраплень пшона залежно від вмісту добавки.

Контрольний зразок характеризується середніми та великими за розміром, тонкостінними, рівномірно розташованими порами. Дослідні зразки мають трохи дрібніші за розміром пори зі стінками середньої товщини. У зразках із 20% та 30% пшона вони розташовані рівномірно, зразок із 40% має нерівномірну пористість. Усі зразки характеризуються відсутністю крихкості й грудкуватості під час розжовування, крім зразка з 40% пшона, в якому через підвищену вологість м'якушки трохи відчувається грудкуватість під час розжовування. На смак контрольний і дослідні зразки відрізняються між собою. Внесення пшона замість пшеничного борошна приводить до появи пшоняного присмаку, ледь відчутного в зразка з 20% пшона і занадто сильно вираженого в зразка з 40%. Найбільш приемним присмаком пшона характеризується зразок із 30% добавки.

Оскільки пшоно майже не має характерного запаху, усі зразки хліба характеризуються майже однаковим приемним запахом з ароматом вершкового масла і легкими пивними нотками завдяки введенню в рецептуру закваски *Sapore Rigoletto*. У дослідних зразків наявний ледь відчутний запах пшона. Результати визначення фізико-хімічних показників показують, що вологість дослідних зразків вища за контрольний зразок (41,5%) і змінюється в межах від 42,0% до 44,9%, що відповідає встановленим вимогам. Кислотність м'якушки контрольного та дослідних зразків хліба (2,9–3,0 град) не має значних розбіжностей і знаходиться в межах установлених норм [212].

Погіршення якості дослідних зразків хліба порівняно з контрольним відзначається за показниками пористості м'якушки

та питомого об'єму хліба. У міру збільшення дозування пшона пористість зменшується на 7,2, 11,8 та 20,2% і становить відповідно 71,5, 68,0 та 61,5%. Таким чином, зразок хліба з 40% пшона не відповідає встановленим вимогам. Аналогічна тенденція спостерігається й із показником питомого об'єму хліба, який у контрольного зразка становить 3,6 см<sup>3</sup>/г; у міру заміни борошна пшеничного на пшоно він знижується на 5,5, 11,1 та 19,4% відповідно.

Отже, проведені пробні випікання та результати визначення показників якості пшеничного хліба з додаванням різної кількості пшона дозволяють зробити висновок про доцільність заміни борошна пшеничного на пшоно, попередньо відварене до напівготовності, у кількості 20–30%. Серед дослідних зразків саме цей хліб має органолептичні та фізико-хімічні показники, які повністю відповідають установленим вимогам стандарту. Внесення пшона в більшій кількості призводить до суттєвого зменшення пористості, питомого об'єму, погіршення стану м'якушки, верхньої скоринки, смакових властивостей хліба [212].

Таким чином, із метою забезпечення високої якості нових видів хліба з додаванням гречаного борошна і пшона необхідно провести математичне моделювання рецептурного складу та технологічних параметрів, що забезпечить поліпшення стану скоринки, м'якушки, смакових властивостей та сприятиме покращенню їх структурно-механічних характеристик.

Попередніми дослідженнями підтверджена доцільність уведення гречаного борошна замість житнього в кількості 30–40% (для хліба гречаного) та 20–30% пшона замість пшеничного борошна (для хліба пшоного). Виявлено погіршення окремих органолептичних і фізико-хімічних показників якості нових виробів. Із метою досягнення відповідного рівня якості нової продукції необхідно провести математичне моделювання рецептурного складу та технологічних параметрів.

Для поліпшення якості та харчової цінності нових видів хліба нами запропоновано введення в рецептурний склад ферментного препарату Pentopan BG500. Відомо, що якість хліба суттєво залежить від кількості внесеного ферменту: у разі недостатнього додавання ферменту не можливо отримати позитивний

технологічний ефект; передозування препарату призводить до погіршення якості хліба. Кількість внесених ферментів визначається способом тістоприготування, показниками якості клейковини, водопоглинальної здатністю борошна і багатьма іншими чинниками. Таким чином, кількість внесеного ферментного препарату вимагає ретельного обґрунтування й оптимального дозування для кожного конкретного виду виробу.

Важливим аспектом під час виробництва хлібобулочних виробів є також регулювання вологості тіста, оскільки це значною мірою впливає на вміст вільної вологи і, як наслідок, на структурно-механічні властивості тіста і якість готового виробу.

Для встановлення оптимальних дозувань препарату Pentopan BG500 та визначення необхідної вологості тіста для виробництва нових видів хліба використано математичний метод планування повного факторного експерименту. За критерій оптимізації обрано показник питомого об'єму готових виробів ( $Y$ , см<sup>3</sup>/г). На основі попередніх досліджень вибрані такі керівні чинники, що впливають на функцію відгуку: кількість ферментного препарату Pentopan BG500 ( $X_1$ ) та вологість тіста ( $X_2$ ). Рівні дозування ферменту визначено з урахуванням рекомендацій, викладених у розділі 3, та виробника, рівні вологості тіста – на основі проведених пробних випікань та вимог стандарту.

Показником якості для кожного виду хліба є максимальний питомий об'єм  $Y_{1,2}$  за умови:

$$Y_{1,2} \xrightarrow{x \in \Omega} \max \quad (3.1)$$

де  $Y_i$  – значення  $i$ -ї вихідної величини;

$\Omega$  – дозволений діапазон зміни вхідних величин  $x_i$ .

Для знаходження максимальних значень показника питомого об'єму хліба була використана стандартна функція Maximize пакета Mathcad.

За результатами розрахунків знайдено, що для хліба з гречаним борошном максимальне значення  $Y_1$  досягається при  $X_1=0,142$  та  $X_2=0,063$ . Максимальний питомий об'єм дорівнює  $Y_1=2,5$  ум. од.

Для хліба з пшоном максимальне значення  $Y_2$  досягається при  $X_1=0,176$  та  $X_2=-0,015$ . Максимальний питомий об'єм дорівнює  $Y_1=3,3$  ум. од.

Процедуру обчислення математичної моделі, знаходження оптимальних значень вхідних параметрів, графічні ілюстрації знаходження значень вхідних параметрів наведено в додатку В.

Обчислене значення математичної моделі має такий вигляд:

$$\begin{aligned} Y_1 &= a_{1,1} + a_{1,2}x_1 + a_{1,3}x_2 + a_{1,4}x_1^2 + a_{1,5}x_2^2 + a_{1,6}x_1x_2; \\ Y_2 &= a_{2,1} + a_{2,2}x_1 + a_{2,3}x_2 + a_{2,4}x_1^2 + a_{2,5}x_2^2 + a_{2,6}x_1x_2. \end{aligned} \quad (5.2)$$

Коефіцієнти моделі мають такі числові значення:

$$\begin{aligned} a_{1,i} &= |2,47; 0,04; 0,02; -0,148; -0,163; 5 \cdot 10^{-3}|, \\ a_{2,i} &= |3,03; 0,108; -10 \cdot 10^{-3}; -0,278; -0,453; -0,025|. \end{aligned}$$

Коефіцієнти  $a_{1,i}$  відносяться до гречаного хліба;  $a_{2,i}$  – до пшоняного. Коефіцієнти моделі розраховано для кодованих значень вхідних змінних.

У додатку В також наведено дані математичної моделі в природних значеннях. Остаточна математичні моделі мають такий вигляд:

$$Y_1e(x_1, x_2) := -422.673 + 126.333 x_1 + 16.636 x_2 - 16444.44 x_1^2 - 0.163 x_2^2 + 1.66 x_1 x_2$$

$$Y_2e(x_3, x_4) := -917.42 + 781.66 x_3 + 40.81 x_4 - 30888.88 x_3^2 - .453 \times x_4^2 - 8.33 x_3 x_4$$

Оптимальні значення кількості внесеного ферменту та значення вологості тіста є такими:

– для хліба з гречаним борошном:  $x_1=6,43 \times 10^{-3}$  кг;  $x_2=50,1\%$ ;

– для хліба з пшоном:  $x_3=6,0 \times 10^{-3}$  кг;  $x_4=45,0\%$ .

Дані були розраховані внаслідок математичного моделювання. Для їх перевірки та уточнення числових значень проведено додаткові досліді, які показали, що знайдені значення

дозування ферментного препарату та вологості тіста задовольняють технологічним вимогам до цих продуктів і не потребують додаткового корегування.

На основі комплексу експериментальних досліджень і результатів математичного моделювання розроблено рецептурний склад нових видів хліба оздоровчого призначення (табл. 3.12): «Гречана сила» – хліб із суміші пшеничного, житнього та гречаного борошна; «Пшоняний» – із пшеничного борошна з додаванням пшона, відвареного до напівготовності.

**Таблиця 3.12**

**Рецептурний склад хліба з гречаним борошном і пшоном**

Сировина	Витрати сировини, кг			
	Хліб житньо-пшеничний (контроль)	Хліб «Гречана сила»	Хліб пшеничний (контроль)	Хліб «Пшоняний»
Борошно пшеничне 1-го ґатунку	40,0	40,0	100,0	70,0
Борошно житнє обдирне	60,0	20,0	–	–
Борошно гречане	–	40,0	–	–
Пшоно шліфоване 1-го ґатунку	–	–	–	30,0/75,0*
Закваски O-tentic Slovia	4,0	–	–	–
Закваска O-tentic Durum	–	4,0	4,0	4,0
Закваска Sapore Rigoletto	–	–	2,0	2,0
Ферментний препарат Pentoran BG500	–	0,0064	–	0,006
Сіль кухонна кам'яна	1,5	1,5	1,5	1,5
РАЗОМ	105,500	105,506	107,500	152,506

\*Маса відвареного пшона.

Результати досліджень органолептичних і фізико-хімічних

показників якості нових видів хліба, виготовлених із використанням отриманих результатів оптимізації, підтвердили доцільність застосування обраних технологічних параметрів для підвищення якості хліба з додаванням гречаного борошна та пшона (табл. 3.13).

**Таблиця 3.13**

**Показники якості нових видів хліба з гречаним борошном та пшоном**

Показник	Хліб «Гречана сила»	Хліб «Пшоняний»
<b>Органолептичні показники якості хліба</b>		
Зовнішній вигляд		
форма	Правильна, відповідає формі, у якій проводили випікання, з дещо випуклою верхньою скоринкою, без бокових впливів	
поверхня	Шорсткувата, без великих тріщин і підривів, без забруднення	Шорсткувата, без великих тріщин і підривів, без забруднення, із помірною кількістю пшона на поверхні
колір скоринки	Коричневий, без підгорілості	Світло-коричневий, без підгорілості
Стан м'якушки	Пропечена, еластична, з розвиненою пористістю, без слідів непромісу	Пропечена, еластична, з розвиненою пористістю, із вкрапленнями пшона на розрізі
Смак	Добре виражений, властивий цьому виду хліба, із приємним присмаком гречки, без стороннього присмаку	Добре виражений, властивий цьому виду хліба, із приємним присмаком пшона, без стороннього присмаку
Запах	Властивий цьому виду хліба, приємний, з добре вираженим запахом гречки, без стороннього запаху	Властивий цьому виду хліба, приємний, з ароматом вершкового масла і пивними нотками, з ледь відчутним запахом пшона
<b>Фізико-хімічні показники якості хліба</b>		
Вологість м'якушки, %, не більше ніж	48,5±1,2	43,5±1,2
Кислотність м'якушки, град., не більше	4,9±0,2	2,9±0,1

ніж		
Пористість м'якушки, %, не менше ніж	60,0±1,0	69,0±1,0
Питомий об'єм, см <sup>3</sup> /г, не менше ніж	2,5±0,1	3,3±0,1

Розроблені вироби запропоновано виготовляти формовими масою 0,25 кг. Вихід нових видів хліба є таким: для хліба «Гречана сила» 143,0%, для хліба «Пшоняний» 151,0%, тоді як вихід контрольних виробів становить

139,0% та 138,0% відповідно. Отже, розроблені вироби характеризуються підвищеним показником виходу хліба – одного з найбільш важливих у хлібопекарському виробництві.

### Висновки за розділом

1. Визначено гідролітичну активність відносно до  $\gamma$ -оризанолу таких ферментних препаратів: порошку підшлункової залози бика, ліпази *Candida antarctica* типів А і В, ліпази *Candida rugosa* типу VII, препарату ксиланази Pentoran 500BG. Досягнуті конверсії гідролізу  $\gamma$ -оризанолу з порошком підшлункової залози бика відносяться тільки до 4-дезметилстерилферулятів, основних компонентів 4,4-диметилстерилферулятів виявити не вдалося. Ліпаза *Candida antarctica* типу А в обраних умовах не показала гідролітичної активності до  $\gamma$ -оризанолу, а з ліпазою *Candida antarctica* типу В вихід продуктів гідролізу був дуже низьким. Уперше доведено каталіз гідролітичного розщеплення  $\gamma$ -оризанолу ліпазою *Candida rugosa* типу VII. Ферментний препарат Pentoran BG500 продемонстрував гідролітичну активність відносно  $\gamma$ -оризанолу. При цьому спостерігалася конверсія гідролізу як дезметилстерилферулятів, так і диметилстерилферулятів. З обраних для дослідження ферментних

препаратів найбільших конверсій гідролізу  $\gamma$ -оризанолу вдалося досягти з препаратом Pentoran BG 500.

2. Комплексно досліджено та визначено закономірності (механізми) впливу на гідролітичне розщеплення  $\gamma$ -оризанолу параметрів проведення ферментативної реакції, а саме: температури, концентрації таурохолату натрію, співвідношення ферменту / субстрату / буферу, часу інкубації, іммобілізації, механічного впливу (струшування й перемішування). Установлено, що оптимальними температурами процесу гідролізу для ліпази та порошку підшлункової залози бика є 37°C, для препарату Pentoran BG 500 – 45°C. Склад системи важливий для отримання максимальної кількості продуктів гідролізу. Збільшення концентрації в розчині таурохолату натрію з 12 мМ до 48 мМ приводить до збільшення конверсії гідролізу  $\gamma$ -оризанолу. Установлено, що перетворення субстрату ( $\gamma$ -оризанолу) порошком підшлункової залози та ліпази *Candida rugosa* типу VII за умови перемішування краще, ніж у разі струшування системи, а препаратом Pentoran BG500 – навпаки.

Оптимальним часом інкубації партій є 24 год. Виявлено, що іммобілізовані ферментні препарати не проявляють активності в гідролізі  $\gamma$ -оризанолу.

3. Розроблено режим проведення гідролізу  $\gamma$ -оризанолу ферментними препаратами: порошком підшлункової залози бика і ліпазою *Candida rugosa* типу VII. Рекомендовано такі параметри реакції: буфер, що складається з ферментного буфера (pH) і таурохолату натрію, розчиненого в 100 мМ буфері фосфату натрію-NaCl; співвідношення компонентів у системі Ф:С:Б = 1:5:5; умови інкубації – температура 37°C протягом 24 год, із перемішуванням. Вихід продуктів гідролізу з порошком підшлункової залози бика становить для кампестерилферуляту 38,4%, для ситостерилферуляту – 31,8%. Вихід продуктів гідролізу з ліпазою *Candida rugosa* типу VII становить для кампестерилферуляту 12,39%, ситостерилферуляту – 13,53%, для циклоартенілферуляту – 0,39%, для 24-

метиленциклоартанілферуляту – 0,56%. Із препаратом Pentopan BG 500 гідроліз  $\gamma$ -оризанолу слід проводити за таких параметрів реакції: буфер, що складається з ферментного буфера (рН) із додаванням таурохолату натрію; умови інкубації – температура 45°C протягом 24 год, зі струшуванням. Вихід продуктів гідролізу становить для кампестерилферуляту 29,0%, ситостерилферуляту – 43,0%, циклоартенілферуляту – 3,6%, 24-метиленциклоартанілферуляту – 2,5%.

4. За допомогою математичного моделювання розроблено математичні моделі ферментативного гідролізу  $\gamma$ -оризанолу, які дають можливість керувати процесом та забезпечити гарантований вихід продуктів конверсії. Отримані результати можливо використовувати у технологіях харчових продуктів в залежності від виду сировини та наявності ферментного препарату.

5. Науково обґрунтовано технології виробництва бездріжджового хліба з використанням продуктів переробки гречки й проса та ферментативного препарату Pentopan BG500. Показано, що гідролітичне розщеплення стероїдного комплексу гречки та пшона активно відбувається за режимами, які були відпрацьовані на модельних системах і рекомендовані до використання. Встановлено раціональну кількість додавання до сировини ферментного препарату Pentopan BG500:  $6,43 \times 10^{-3}$  кг (для хліба з гречаним борошном) та  $6,0 \times 10^{-3}$  кг (для хліба з пшоном).

Проведені пробні випікання та результати визначення показників якості нових видів хліба дозволили встановити оптимальне дозування гречаного борошна в кількості 30–40% від загальної маси борошна та пшона, попередньо відвареного до напівготовності, у кількості 20–30%. На основі комплексу експериментальних досліджень та результатів математичного моделювання розроблено рецептурний склад нових видів хліба оздоровчого призначення – «Гречана сила» та «Пшоняний».

## ВИСНОВКИ

1. Аналіз вітчизняної та зарубіжної наукової літератури дозволив встановити, що в раціоні харчування сучасної людини є дефіцит фітостеролів, причинами якого є нераціональне харчування. З урахуванням наявності наукових розробок щодо створення продуктів із холестеринознижуючими властивостями основними проблемами їх виробництва є дороговизна та трудомісткість технологічних процесів, а також з-за поганої розчинності фітостеролів погіршення органолептичних показників продукції. Установлена можливість корекції дефіциту фітостеролів двома іншими шляхами: по-перше пошуком сировини, яка є джерелом фітостеролів, а по-друге розробкою таких технологій продуктів, які б дозволили максимально використовувати закладений у сировині потенціал. Перспективною сировиною для цього є арахіс, гречка та просо, а перспективними технологіями є технології з забезпеченням ферментативного гідролізу стероїдного комплексу сировини, зокрема  $\gamma$ -оризанолу, та отримання продуктів з високим вмістом біологічно активних форм стероїдів. Таким чином доведено необхідність розвитку науково-практичного напрямку зі створення холестеринознижуючої харчової продукції:

2. Вперше доведено гідролітичну активність щодо  $\gamma$ -оризанолу ліпази *Candida rugosa* типу VII та ферментного препарату Pentoran BG 500. Конверсія гідролізу відноситься як до 4-дезметілстерилферулатів, так і до 4,4' – диметілстерилферулатів. Найбільша гідролітична активність по відношенню до  $\gamma$ -оризанолу встановлена у Pentoran BG 500 та у порошку підшлункової залози бика. Ліпаза *Candida antarctica* типу A в обраних умовах не показала гідролітичної активності до  $\gamma$ -оризанолу, а з ліпазою *Candida antarctica* типу B та *Candida rugosa* типу VII вихід продуктів гідролізу був дуже низьким.

3. На модельних системах комплексно досліджено та визначено закономірності впливу на ферментативне розщеплення  $\gamma$ -оризанола параметрів проведення реакції, а саме: температури, концентрації таурохолату натрію, співвідношення компонентів

(фермент/субстрат/буфер), часу інкубації, іммобілізації, механічних впливів (струшування і перемішування). Розроблено режим проведення гідролізу  $\gamma$ -оризанолу порошком підшлункової залози бика, а саме: концентрація таурохолата натрія в буфері – 48 мМ, співвідношення компонентів системи - фермента: субстрата: буфера = 1:5:5, умови інкубації – температура 37 °С протягом 24 годин при перемішуванні. З препаратом Pentopan BG 500 гідроліз  $\gamma$ -оризанолу відрізняється тільки температурою інкубації, яка становить 45 °С. За допомогою математичного моделювання розроблено математичні моделі ферментативного гідролізу  $\gamma$ -оризанолу, які дають можливість керувати процесом та забезпечити гарантований вихід продуктів конверсії (фітостеролів). Отримані результати можливо використовувати у технологіях харчових продуктів в залежності від виду сировини та наявності ферментного препарату.

4. Науково обґрунтовано технології виробництва бездріжжового хліба з використанням продуктів переробки гречки та проса та ферментативного препарату Pentopan BG500. Показано, що гідролітичне розщеплення стероїдного комплексу гречки та пшона активно відбувається за режимами, які були відпрацьовані на модельних системах і рекомендовані до використання. Встановлено раціональну кількість додавання до сировини ферментного препарату Pentopan BG 500:  $6,43 \times 10^{-3}$  кг (для хліба з гречаним борошном) та  $6,0 \times 10^{-3}$  кг (для хліба з пшоном).

Проведені пробні випікання та результати визначення показників якості нових видів хліба дозволили визначити оптимальне дозування гречаного борошна в кількості 30...40 % від загальної маси борошна та пшона, попередньо відвареного до напівготовності, у кількості 20...30 %. На основі комплексу експериментальних досліджень та результатів математичного моделювання розроблено рецептурний склад нових видів хліба оздоровчого призначення – «Гречана сила» та «Пшоняний».

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Висновок до проекту Закону України від 28.02.2019 № 9015 (Одержаний ВР України) «Про Стратегію сталого розвитку України до 2030 року». URL: <https://ips.ligazakon.net/document/ХН6YF00A?an=3>
2. Капрельянци Л. В., Єгорова А. В. та ін. Функціональні продукти харчування: перспективи в Україні // Харчова наука і технологія. 2019. № 13(2). С. 15–22.
3. Ленерт С. О. Формування якості овочево-сиркових паст підвищеної біологічної цінності: дис. ... канд. техн. наук: 05.18.15. Харків, 2011. 276 с.
4. Moreau R., Whitaker B., Hicks K. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses // Prog. Lipid. Res. 2002. № 41. P. 457.
5. Gylling H., Miettinen T. A. LDL cholesterol lowering by bile acid malabsorption during inhibited synthesis and absorption of cholesterol in hypercholesterolemic coronary subjects // Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. 2002. № 12. P. 19–23.
6. Gylling H., Miettinen T. A. Plant sterols in nutrition – promise or threat for the future // Scand. J. Nutr. 2000. № 44. P. 104.
7. Flores-Sánchez Isvett J., Ortega-López Jaime, Montes-Horcasitas María del Carmen, Ramos-Valdivia Ana C. Biosynthesis of Sterols and Triterpenes in Cell Suspension Cultures of *Uncaria tomentosa* // Plant Cell Physiol. 2002. № 43(12). P. 1502–1509.
8. Schalle H. The role of sterols in plant growth and development // Progress in Lipid Research. 2003. № 42. P. 163–175.
9. Piironen V., Lindsay D. G., Miettinen T. A., Toivo J., Lampi A. M., Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition // J. Sci. Food Agric. 2000. № 80. P. 939–966.
10. Nes W. D., Enzyme mechanisms for sterol C-methylations // Phytochemistry (Elsevier). 2003. № 64(1). P. 75–95.

11. Imanaka H., Koide H., Shimizu K. et al. Chemoprevention of tumor metastasis by liposomal beta-sitosterol intake // *Biol. Pharm. Bull.* 2008. № 31. P. 400–404.

12. Conforti F., Ioele G., Statti G. A. et al. Antiproliferative activity against human tumor cell lines and toxicity test on Mediterranean dietary plants // *Food and Chemical Toxicology.* 2008. № 46. P. 3325–3332.

13. Бергер Э., Джоунс П., Абумус С. С. Растительные стеролы: факторы, влияющие на их эффективность и безопасность в качестве функциональных пищевых ингредиентов // *Липиды в здоровье и болезни.* 2004. Т. 1. С. 5. DOI: 10/1186/1476-511x-3-5

14. Bouic P. J. The role of phytosterols and phytosterolins in immune modulation: a review of the past 10 years // *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2001. № 4. P. 471–475.

15. Yoshida Y., Niki E. Antioxidant effects of phytosterol and its components // *J. of Nutritional Science and Vitaminology.* 2003. № 49(4). P. 277–280.

16. Beveridge T. H. J., Li T. S. C., Drover J. C. G. Phytosterol content in American ginseng seed oil // *J. Agric. Food Chem.* 2002. № 50. P. 744–750.

17. Ostlund R. E. Phytosterols in human nutrition // *Ann. Rev. Nutr.* 2002. № 22. P. 533–549.

18. Шубина О. Г., Карпухин Д. В., Кочеткова А. А. Фитостерины, их физиологические преимущества и возможности использования в пищевых продуктах // *Пищевые ингредиенты, сырье и добавки.* 2004. № 2. С. 26–29.

19. Thomas A. W., Robert J. N., Benjamin W., David K. Rice bran oil and oryzanol reduce plasma lipid and lipoprotein cholesterol concentrations and aortic cholesterol ester accumulation to a greater extent than ferulic acid in hypercholesterolemic hamsters // *The Journal of nutritional biochemistry.* 2007. № 18(2). P. 105–112.

20. Jain D., Ebine N., Jia X. et al. Corn fiber oil and sitostanol decrease cholesterol absorption independently of intestinal sterol transporters in hamsters // *The Journal of Nutritional Biochemistry.* 2008. № 19(4). P. 229–236.

21. Vissers M. N., Zock P. L., Meijer G. W. et al. Effect of plant sterols from rice bran oil and triterpene alcohols from sheanut oil on serum lipoprotein concentrations in humans // *Am. J. Clin. Nutr.* 2000. № 72. P. 1510–1515.

22. Moreau R. A., Whitaker B. D., Hicks K. B. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses // *Prog. Lipid. Res.* 2002. № 41. P. 457–500.

23. Berger A., Rein D., Schäfer A. et al. Similar cholesterol-lowering properties of rice bran oil, with varied  $\gamma$ -oryzanol, in mildly hypercholesterolemic men // *European Journal of Nutrition.* 2005. № 44(3). P. 163–173.

24. Trautwein E. A., Duchateau J. E., Guus S. M. et al. Proposed mechanisms of cholesterol-lowering action of plant sterols // *European Journal of Lipid Science and Technology.* 2003. № 105(3-4). P. 171–185.

25. Plat J., Nichols J. A., Mensink R. P. Plant sterols and stanols: Effects on mixed micellar composition and LXR (target gene) activation // *J. of Lipid Research.* 2005. № 46(11). P. 2468–2476.

26. Berger A., Jones P., Abumweis S. Plant sterols: factors affecting their efficacy and safety as functional food ingredients // *Lipids in Health and Disease.* 2004. № 3(1). P. 5.

27. Jenkins D. J., Kendall C. W., Marchie A. et al. The Garden of Eden--plant based diets, the genetic drive to conserve cholesterol and its implications for heart disease in the 21st century // *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2003. № 136. P. 141–151.

28. Katan M. B., Grundy S. M., Jones P. et al. Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels // *Mayo Clin. Proc.* 2003. № 78. P. 965–978.

29. Noakes M., Clifton P. M., Doornbos A. M. E., Trautwein E. A. Plant sterol ester enriched milk and yogurt effectively reduce serum cholesterol in modestly hypercholesterolemic subjects // *Eur. J. Nutr.* 2005. № 44(4). P. 214–22.

30. Weber N., Mukherjee K. D. Plant sterols and steryl esters in functional foods and nutraceuticals // *Nutraceutical Science and Technology.* 2006. Vol. 5: Nutraceutical and Specialty Lipids and Their Co-Products. P. 483–508.

31. Brufau G., Canela M. A., Rafecas M. Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties // Nutrition Research. New York: NY, United States. 2008. № 28(4). P. 217–225.

32. Kritchevsky D., Chen S. C. Phytosterols-health benefits and potential concerns: a review // Nutrition Research. New York: NY, United States. 2005. № 25(5). P. 413–428.

33. Plat J., Mensink R. P. Plant Stanol and Sterol Esters in the Control of Blood Cholesterol Levels: Mechanism and Safety Aspects // American Journal of Cardiology. 2005. № 96(1A). P. 15D–22D.

34. Sajfrtová Marie, Ličková Ivana, Wimmerová Martina.  $\beta$ -Sitosterol: Supercritical Carbon Dioxide Extraction from Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Seeds // Int. J. Mol. Sci. 2010. № 11. P. 1842–1850.

35. Ryan E., Galvin K., O'Connor T. P. et al. Phytosterol, squalene, tocopherol content and fatty acid profile of selected seeds, grains, and legumes // Plant Foods Hum Nutr. 2007. № 62. P. 85–91.

36. Szterk Arkadiusz, Roszko M., Sosińska E. et al. Chemical Composition and Oxidative Stability of Selected Plant Oils // J. Am. Oil Chem. Soc. 2010. № 87. P. 637–645.

37. Sriti Jazia, Wannes Wissem Aidi, Talou Thierry et al. Lipid Profiles of Tunisian Coriander (*Coriandrum sativum*) Seed // J Am Oil Chem Soc. 2010. № 87. P. 395–400.

38. Zlatanov M. D., Angelova-Romova M. J., Antova G. A. et al. Variations in Fatty Acids, Phospholipids and Sterols During the Seed Development of a High Oleic Sunflower Variety // J. Am. Oil Chem. Soc. 2009. № 86. P. 867–875.

39. Berger A., Rein D., Schäfer A. et al. Similar cholesterol-lowering properties of rice bran oil, with varied  $\gamma$ -oryzanol, in mildly hypercholesterolemic men // Eur. J. Nutr. 2005. № 44. P. 163–173.

40. Lampia Anna-Maija, Moreaub Robert A., Piironena Vieno, Hicks Kevin B. Pearling Barley and Rye to Produce Phytosterol-Rich Fractions // Lipids. 2004. Vol. 39, № 8. P. 783–787.

41. Jiménez-Escrig A., Santos-Hidalgo A. B., Saura-Calixto F. Common Sources and Estimated Intake of Plant Sterols in the Spanish Diet // J. Agric. Food Chem. 2006. № 54. P. 3462–3471.

42. Lagarda M. I., Garcia-Llatas G., Farre R. Analysis of phytosterols in foods // *I.Pharm. Biomed. Analysis*. 2006. № 41. P. 1486–1496.

43. Klingberg S., Andersson H., Mulligan A. et al. Food sources of plant sterols in the EPIC Norfolk population // *Eur. J. Clin. Nutr.* 2008. № 62(6). P. 695–703.

44. Kaloustian J., Alhanout K., Amiot-Carlin M.-J. et al. Technical collaboration Effect of water cooking on free phytosterol levels in beans and vegetables // *Food Chemistry*. 2008. № 107. P. 1379–1386.

45. Tabee E., Jägerstad M., C. Paresh Dutta Lipids and phytosterol oxidation products in commercial potato crisps commonly consumed in Sweden // *Eur. Food Res. Technol.* 2008. № 227. P. 745–755.

46. Lugasi A. Phytosterol-Enriched Foods: Role in Lowering Serum Cholesterol Level, Community Authorising and Conditions of Marketing // *Cemed*. 2009. Vol. 3, № 3. P. 381–401.

47. Мехтиев А. Р., Мишарин А. Ю. Биологическая активность фитостероидов и их производных // *Биомедицинская химия*. 2007. Т. 53, вып. 5. С. 497–521.

48. Nystrom L., Makinen M., Lampi A. M., Piironen V. Antioxidant Activity of Steryl Ferulate Extracts from Rye and Wheat Bran // *J. Agric. Food Chem.* 2005. № 53(7). P. 2503–2510.

49. Berger, A., Rein D., Schäfer A., Monnard I., Gremaud G., Lambelet P., Bertoli C. Similar cholesterol-lowering properties of rice bran oil, with varied  $\gamma$ -oryzanol, in mildly hypercholesterolemic men // *European Journal of Nutrition*. 2005. № 44(3). P. 163–173.

50. Thomas A. W., Robert J. N., Benjamin W., David K. Rice bran oil and oryzanol reduce plasma lipid and lipoprotein cholesterol concentrations and aortic cholesterol ester accumulation to a greater extent than ferulic acid in hypercholesterolemic hamsters // *The Journal of nutritional biochemistry*. 2007. № 18(2). P. 105–112.

51. Jain D., Ebine N., Jia X., Kassis A., Marinangeli C., Fortin M., Beech R., Hicks K. B., Moreau R. A., Kubow S., Jones P. J. H. Corn fiber oil and sitostanol decrease cholesterol absorption independently of intestinal sterol transporters in hamsters // *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2008. № 19(4). P. 229–236.

52. Gemma B., Miguel Angel C., Magda R. Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties. 2008. № 28(4). P. 217–225.

53. Nyström L., Moreau R., Lampi A.-M., Hicks K., Piironen V. Enzymatic hydrolysis of steryl ferulates and steryl glycosides // European Food Research and Technology. 2008. № 227(3). P. 727–733.

54. Miller A., Majauskaite L., Engel K.-H. Enzyme-catalyzed hydrolysis of  $\gamma$ -oryzanol // European Food Research and Technology. 2004. № 218(4). P. 349–354.

55. Narayan A. V., Barhate R. S., Raghavarao K. S. M. S. Extraction and purification of oryzanol from rice bran oil and rice bran oil soapstock // Journal of the American Oil Chemists' Society. 2006. № 83(8) P. 663–670.

56. Piironen V., Lindsay D. G., Miettinen T. A., Toivo J., Lampi A. M. Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition // J. Sci. Food Agric. 2000. № 80. P. 939–966.

57. Kyndt J. A., Meyer T. E., Cusanovich M. A., Van Beeumen J. J. Characterization of a bacterial tyrosine ammonia lyase, a biosynthetic enzyme for the photoactive yellow protein // FEBS Letters. 2002. № 512(1-3). P. 240–244.

58. Nagasaka R., Chotimarkorn C., Shafiqul I. M., Hori M., Ozaki H., Ushio H. Anti-inflammatory effects of hydroxycinnamic acid derivatives // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2007. № 358(2). P. 615–619.

59. Islam M. S., Murata T., Fujisawa M., Nagasaka R., Ushio H., Bari A. M., Hori M., Ozaki H. Anti-inflammatory effects of phytosteryl ferulates in colitis induced by dextran sulphate sodium in mice // Br. J. Pharmacol. 2008. № 154(4). P. 812–824.

60. Miller A. Analytik von Minorlipiden: Ferulasäureester von Phytosterolen ( $\gamma$ -Oryzanol) in Reis: Dissertation. Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München, 2004.

61. Ostlund R. E., Jr., McGill J. B., Zeng C. M., Covey D. F., Stearns J., Stenson W. F., Spilburg C. A. Gastrointestinal absorption and plasma kinetics of soy Delta (5)-phytosterols and phytostanols in

humans // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2002. № 282. P. E911–E916.

62. Ostlund Richard E. Jr. Phytosterols in human nutrition // Annu Rev. Nutr. FIELD Full Journal Title: Annual review of nutrition. 2002. № 22. P 533–49.

63. Schulz T. Molekulare Grundlagen der Stereoselektivität Lipase-katalysierter Umsetzungen: Dissertation. Fakultät Chemie der Universität Stuttgart, 2001.

64. Dressler D., Potter H. Katalysatoren des Lebens: Struktur und Wirkung von Enzymen. Spektrum Akad. Verlag, 1992. 258 p.

65. Bornscheuer U. T. Hydrolases in organic synthesis – Regio- and Stereoselective Biotransformations: Monographie. Second edition. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2005. 356 p.

66. Wang X., Wang C.-S., Tang J., Dyda F., Zhang X. C. The crystal structure of bovine bile salt activated lipase: insights into the bile salt activation mechanism // Structure. 1997. № 5(9). P. 1209–1218.

67. Ericsson D. J., Kasrayan A., Johansson P., Bergfors T., Sandstrom A. G., Backvall J.-E., Mowbray S. L., X-ray Structure of *Candida antarctica* Lipase A Shows a Novel Lid Structure and a Likely Mode of Interfacial Activation // Journal of Molecular Biology. 2008. № 376(1). P. 109–119.

68. Kasrayan A., Bocola M., Sandstroem A. G., Laven G., Baeckvall J.-E. Prediction of the *Candida antarctica* lipase A protein structure by comparative modeling and site-directed mutagenesis // Chem. BioChem. 2007. № 8(12). P 1409–1415.

69. Pfeffer J., Richter S., Nieveler J., Hansen C.-E., Rhlid R., Schmid R., Rusnak M. High yield expression of Lipase A from *Candida antarctica* in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and its purification and characterization // Applied Microbiology and Biotechnology. 2006. № 72(5). P. 931–938.

70. Rusnak M. Untersuchungen zur enzymatischen Enantiomerentrennung von Glykolethern und Etablierung neuer Methoden des synthetischen Shufflings: Dissertation. Der Fakultät Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart, 2004.

71. Weitkamp P., Vosmann K., Weber N. Highly Efficient Preparation of Lipophilic Hydroxycinnamates by Solvent-free Lipase-

Catalyzed Transesterification // *J. Agric. Food Chem.* 2006. № 54(19). P. 7062–7068.

72. Vosmann K., Weitkamp P., Weber N. Solvent-free Lipase-Catalyzed Preparation of Long-Chain Alkyl Phenylpropanoates and Phenylpropyl Alkanoates // *J. Agric. Food Chem.* 2006. № 54(8). P. 2969–2976.

73. Strohalm H., Doldt S., Pendzialek K., Weiher M., Engel K.-H. Lipase catalyzed kinetic resolution: Preparation of optically pure esters of secondary alcohols // *J. Agric. Food Chem.* 2010. № 58(10). P. 6328–6333.

74. Trodler P., Pleiss J. Modeling structure and flexibility of *Candida antarctica* lipase B in organic solvents // *BMC Structural Biology.* 2008. № 8(1). P. 9.

75. Weber N., Weitkamp P., Mukherjee K. D. Fatty Acid Steryl, Stanyl, and Steroid Esters by Esterification and Transesterification in Vacuo Using *Candida rugosa* Lipase as Catalyst // *J. Agric. Food Chem.* 2001. № 49(1). P. 67–71.

76. Pereira E., De Castro H., De Moraes F., Zanin G. Kinetic studies of lipase from *Candida rugosa* // *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 2001. № 91-93(1). P. 739–752.

77. Santos R., Limas E., Sousa M., da Conceicao Castilho M., Ramos F., da Silveira M. I. N. Optimization of analytical procedures for GC-MS determination of phytosterols and phytostanols in enriched milk and yoghurt // *Food Chemistry.* 2007. № 102(1). P. 113–117.

78. Polizeli M. L. T. M., Rizzatti A. C. S., Monti R., Terenzi H. F., Jorge J. A., Amorim D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications // *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2005. № 67(5). P. 577–591.

79. Moreau R., Johnston D., Powell M., Hicks K. A comparison of commercial enzymes for the aqueous enzymatic extraction of corn oil from corn germ // *Journal of the American Oil Chemists' Society.* 2004. № 81(11). P. 1071–1075.

80. Xiaoping Yuan, Jing Wang, Huiyuan Yao. Production of feruloyl oligosaccharides from wheat bran insoluble dietary fibre by xylanases from *Bacillus subtilis* // *Food Chemistry.* 2006. № 95. P. 484–492.

81. Betz M. NMR-spektroskopische Untersuchungen an der Xylanase aus *Bacillus agaradhaerens*: Dissertation. Johan Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, 2003.

82. Plesniak L. A., Wakarchuk W. W., McIntosh L. P. Secondary structure and NMR assignments of *Bacillus circulans* xylanase // *Protein science : a publication of the Protein Society*. 1996. № 5(6). P. 1118–1135.

83. Mastihubová M., Mastihuba V., Bilanicová D., Boreková M. Commercial enzyme preparations catalyse feruloylation of glycosides // *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2006. № 38(1). P. 54–57.

84. Singh S., Pillay B., Prior B. A. Thermal stability of [beta]-xylanases produced by different *Thermomyces lanuginosus* strains // *Enzyme and Microbial Technology*. 2000. № 26(7). P. 502–508.

85. Naveen K., Agrawal S. C., Jain P. C. Production and properties of thermostable xylanase by *Thermomyces lanuginosus* NK-2 grown on lignocelluloses // *Biotechnology*. 2006. № 5(2). P. 148–152.

86. Di Gioia D., Sciubba L., Setti L., Luziatelli F., Ruzzi M., Zanichelli D., Fava F. Production of biovanillin from wheat bran // *Enzyme and Microbial Technology*. 2007. № 41(4). P. 498–505.

87. Hatzakis N. S., Smonou I. Asymmetric transesterification of secondary alcohols catalyzed by feruloyl esterase from *Hemicola insolens* // *Bioorganic Chemistry*. 2005. № 33(4). P. 325–337.

88. Трегуб О. В. Джерела продуктивності та адаптивності гречки // *Генетичні ресурси рослин*. 2016. № 18. С. 77–87.

89. Тригуб О. В., Харченко Ю. В., Рябчун В. К., Григоращенко Л. В., Докукіна К. І. Широкий уніфікований класифікатор роду Гречки (*Fagopyrum* Mill.). Устимівка, 2013. 54 с.

90. Беленіхіна А., Костромітін В. Просо: забуті переваги // *Агробізнес сьогодні*. 2012. № 10. С. 42–45.

91. Хрунгу Н. К., Набенита Деватасан, Иван Крефт, Мария Лисен. Идентификация и молекулярная характеристика гранулированной-связанной синтазы крахмала, извлеченной из гречихи // *Вестник ОрелГАУ*. 2010. № 4(25). С. 70–76.

92. Juan Gu, Hong Yan, Gu Zhengbiao. Study on Physico-chemical Properties of Buckwheat Starch // Food and Fermentation Industries. 2009. Vol. 30(11). P. 104–108.

93. Инг Ванг, Чен Дзя, Фенг Ибаили. Состояние процесса производства и разработка стратегий в отношении продуктов из гречихи в Китае // Вестник ОрелГАУ. 2010. № 4(25). С. 9–14.

94. Зенкова А. Н., Панкратьева И. А., Политуха О. В. Гречневая крупа – продукт повышенной пищевой ценности // Хлебопродукты. 2013. № 1. С. 42–44.

95. Семенова А. Б. Удосконалення технології хлібобулочних виробів з використанням продуктів переробки круп'яних культур: дис. ... канд. техн. наук: 05.18.01. Київ, 2014. 144 с.

96. Yang Fulian, Yin Xia, Beilei Ren. Extract of dietary fiber from buckwheat shells by alkaline hydrolysis // Cereals and Oils. 2009. Vol. 7. P. 23–25.

97. Yuan Fu, Zhang Meili, Wen Houjuan. Preparation of Antioxidant Peptides from Buckwheat Albumin by Enzymatic Hydrolysis // Food Science. 2009. Vol. 30(15). P. 142–147.

98. Bonafaccia G., Gambelli L., Fabjan N., Kreft I. Trace elements in flour and bran from common and tartary buckwheat // Food Chem. 2003. Vol. 83, Is. 1. P. 1–5.

99. Грищенко Р. Є. та ін. Вміст основних елементів живлення в рослинах гречки залежно від системи удобрення // Землеробство: міжвідомчий темат. наук. зб. Київ, 2004. Вип. 76. С. 101–105.

100. Алексеева Е. С., Никитчук А. В. Гречиха татарская – разрушение стереотипов // Хранение и переработка зерна. 2000. № 6. С. 31–33.

101. Мягчилов А. В. Флавоноиды растений *Fagopyrum sagittatum* Gilib. (гречихи посевной) и серпухи венценосной (*Serratula coronata* L.) (методы выделения, идентификация веществ, перспективы использования): дис. ... канд. биол. наук: 03.02.14. Владивосток, 2014. 110 с.

102. Кривченкова М. В., Клышинская Е. В., Ильиных М. А., Бутова С. Н. Растительные флавоноиды как функциональные добавки в косметических и пищевых продуктах // Вестник Российской академии естественных наук. 2012. № 3. С. 47–51.

103. Matsunaga N., Chikaraishi Y., Shimazawa M. et al. *Vaccinium murtillus* (Bilberry) Extracts Reduce Angiogenesis In Vitro and In Vivo // *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2010. Vol. 7. № 1. P. 47–56.

104. Неборская Н. Г. Разработка технологии кулинарной продукции из микронизированных продуктов гречневой и пшеничной круп: дис. ... канд. техн. наук: 05.18.15. Новосибирск, 2009. 149 с.

105. Бірюкова О. В., Горбачова С. М. Характеристика сортів проса, занесених до Державного реєстру сортів рослин, при вирощуванні в умовах Східного Лісостепу України // *Селекція і насінництво.* 2012. Вип. 102. С. 195–201.

106. Григорашенко Л. В., Холод С. Г., Рудник О. І. та ін. Широкий уніфікований класифікатор проса (*Panicum miliaceum* L.). Харків, 2009. 63 с.

107. Беленіхіна А. В., Костромітін В. М. Просу – гідну увагу // *Агробізнес сьогодні.* 2012. № 21/22. С. 35–37.

108. Григоренко О. М. Розробка продуктів харчування, збагачених мікроелементами, як засіб вирішення проблеми гіпер-і гіпомікроелементозів // *Вісник ДонНУЕТ.* 2013. № 1(57). С. 33–41.

109. Холод С. Г. Господарсько-цінні властивості зразків проса, залучених до колекції Устимівської дослідної станції рослинництва // *Корми і кормовиробництво.* 2013. Вип. 77. С. 54–60.

110. Гармаш Т. П. Біоаккумуляція як процес накопичення токсикантів в організмі // *Вісник проблем біології і медицини.* 2010. № 2. С.20–22.

111. Huang Y., Peng L., Liu Y. et al. Evaluation of essential and toxic elements concentrations in different parts of buckwheat // *Czech J. Food Sci.* 2013. Vol. 31, № 3. P. 249–255.

112. Басов Ю. А., Басов А. Ю. Особенности аккумуляции тяжелых металлов гречихой в условиях техногенеза // *Вестник ОрелГАУ.* 2010. № 4(25). С. 39–43.

113. Horbowicz M., Dębski H., Wiczowski W. et al. The Impact of Short-Term Exposure to Pb and Cd on Flavonoid Composition and

Seedling Growth of Common Buckwheat Cultivars // Pol. J. Environ. Stud. 2013. Vol. 22. № 6. P. 1723–1730.

114. Suman K., Kalpan A. Effects of heavy metal stress on callus induction and regeneration of Finger millet (*Eleusine coracana*) (L.) Gaertn // Research Journal of Recent Sciences. 2013. Vol. 2. P. 24–28.

115. Допустимі рівні вмісту радіонуклідів  $^{137}\text{Cs}$  і  $^{90}\text{Sr}$  у продуктах харчування та питній воді. Державні гігієнічні нормативи: ГН 6.6.1.1-130-2006. Київ, 2006. 13 с.

116. Wild C. P., Gong Y. Y. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue // Carcinogenesis. 2010. Vol. 31. № 1. P. 71–82.

117. Curhan G. C., Taylor E. N. 24-h uric acid excretion and the risk of kidney stones // Kidney Int. 2008. Vol. 73. P. 489–496.

118. Taylor E. N., Curhan G. C. Oxalate Intake and the Risk for Nephrolithiasis // J. Am. Soc. Nephrol. 2007. Vol. 18. P. 2198–2204.

119. Дубініна А. А., Ольховська В. С., Колесник В. В., Круглова О. С. Дослідження вмісту оксалатів у ботанічних сортах томатів, районованих у Східній Україні // Прогресивна техніка та технологія харчових виробництв, ресторанного господарства і торгівлі: зб. наук. пр. Х., 2008. С. 334–338.

120. Ravindran G. Studies on millets: Proximate composition, mineral composition, and phytate and oxalate contents // Food Chemistry. 1999. Vol. 39. P. 99–107.

121. Danik M. Martirosyan. Introduction to Functional Food Science: Textbook. Second Edition // Create Space Independent Publishing Platform. 2014. Vol. 1. 624 p.

122. Mardar M., Tkachenko N., Znachek R., Leonardi C. Optimization of formulation composition of the crispbread with improved consumer properties // Технологічний аудит та резерви виробництва. 2017. № 2/3(34). С. 22–29

123. Mardar M., Ustenko I., Macari A., Znachek R. Application of HACCP principles for quality and safety in the development of grain products of wellness purpose // Annals. Food Science and Technology. 2017. Vol. 18. Issue 2. P. 138–144.

124. Жигунов Д. О., Мардар М. Р., Волошенко О. С., Брославцева І. В. Зерновий сніданок на основі вівсяних

пластівців // *Хранение и переработка зерна*. 2017. № 9(217). С. 26–28.

125. Mardar M., Yegorova A., Ustenko I., Stateva M., Cherevaty T. Modern technology of production and strategy of promotion of new cereal products on Ukrainian consumer market // *Харчова наука і технологія*. 2018. № 2. С. 89–99.

126. Mardar M., Krusir G., Znachek R., Agunova L. Bioassay in Safety Assessment of new Grain Products // *Journal of Agriculture and Plant Sciences, JAPS*. 2018. Vol 16. №. 1. P. 65–71.

127. Mardar M., Znachek R., Zhygunov D., Macari A., Ustenko I. Spelt crisp bread – health food products // *Modern technologies, in the food industry – 2018: Proceedings of the International Conference Technical / University of Moldova*. Ch.: Tehnica-Info, 2018. P. 187–193.

128. Жигунов Д. О., Мардар М. Р., Соц С. М., Барковська Ю. С., Жигунова Г. Д. Дослідження технологічних властивостей пшениці та спельти як сировини для виробництва борошна і крупи // *Наукові праці НУХТ*. 2018. Т. 24, № 5. С. 208–217.

129. Aprakhimov D., Mardar M., Evtushenko A., Smolnikova F., Prokhasko L., Rebezov M., Khayrullin M. Justification of the optimal ratio of components in macaroni products enriched with composite mixture // *International Journal of Engineering & Technology*. 2018. Vol. 7(4.38). P. 1327–1329.

130. Mardar M., Tkachenko N., Znachek L. Agunova Simulation of formulation composition of the enriched spelt cereal products // *Food Science and Applied Biotechnology*. 2019. Vol. 2(2). P. 110–120.

131. Крефт Иван, Икеда Кийоказу, Икеда Саёко. Разработка функционально новых продуктов питания на основе гречихи обыкновенной и татарской // *Вестник ОрелГАУ*. 2010. № 4(25). С. 15–17.

132. Дубініна А. А., Попова Т. М., Бондаренко В. Ф. Нові продукти функціонального призначення на основі зерна гречки // *Сучасний ринок товарів та проблеми здорового харчування: Міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., 13–14 травня 2013 р.: тези доп. Х.: ХДУХТ, 2013. С. 21–22.*

133. Романенко Г. А. 30 лет Международной ассоциации исследователей гречихи (IBRA) – вехи и тенденции // Вестник ОрелГАУ. 2010. № 4. С. 2–4.

134. Mardar M., Stateva M., Agunova L. Development of a new product of high nutrition value under the quality function development methodology // Journal of critical reviews. 2020. Vol. 7(9). P. 390–399.

135. Дубініна А. А., Попова Т. М. Застосування технології екструзії під час виробництва нових видів зернових продуктів // Інноваційні аспекти розвитку обладнання харчової і готельної індустрії в умовах сучасності: міжнар. наук.-практ. конф., 8–11 вересня 2015 р.: тези доп. Х.: ХДУХТ, 2015. С. 259–260.

136. Композиція інгредієнтів для виробництва мюслі «Овочево-гречані» преміум: пат. на корисну модель 28784. Україна: МПК (2006.01) A23L 1/164 / Щербина М. А. № u200708153; заявл. 18.07.2007; опубл. 25.12.2007, Бюл. № 21.

137. Печенье диабетическое «полезное»: пат. на изобретение 2011132833 Российская Федерация: МПК A21D13/00 (2006.01) / Полякова Е. Д., Заикина М. А., Иванова Т. Н., Дидковская Т. М.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Юго-Западный государственный университет» (ЮЗГУ). № 2011132833/14; заявл. 04.08.2011; опубл. 27.11.2013, Бюл. № 33.

138. Кисломолочна паста з композиціями прянощів: пат. на корисну модель 95375 Україна: МПК A23C 9/13 (2006.01) / Ющенко Н. М., Кузьмик У. Г., Іващук Х. С.; заявник та патентовласник Національний університет харчових технологій. № u201406523; заявл. 11.06.2014; опубл. 25.12.2014, Бюл. № 24.

139. Дубініна А. А., Попова Т. М., Іванніков П. В. Замочування та ферментація круп: шляхи підвищення їх біологічної цінності та засвоюваності // Розвиток харчових виробництв, ресторанного та готельного господарств і торгівлі: проблеми, перспективи, ефективність: Міжнар. наук.-практ. конф., 14 травня 2015 р.: тези доп. у 2 ч. Х.: ХДУХТ, 2015. Ч. 1. С. 193–194.

140. 12-й Международный Симпозиум по гречихе. URL: <http://www.vniizbk.ru/ru/international/152-12-.html>.

141. Способ производства молочного продукта «Коже Тенгри»: пат. на изобретение 26839 Республика Казахстан: KZ A4 A23C 19/03 / Алимарданова М. К. № 2012/0205.1; заявл. 22.02.12; опубл. 15.05.13, Бюл. № 5. 6 с.

142. Экструзийний картоплепродукт «Повітряна картопля пшонажно-молочно-морквяна»: пат. на корисну модель 55323 Україна: МПК 51A23L-1/214 / Шульга О. С., Ковбаса В. М., Шульга С. І. № 201006768; заявл. 01.06.2012; опубл. 10.12.2012, Бюл. № 23. 4 с.

143. Жаркеев М. К. Разработка технологии национального крупяного продукта: автореф. дис. ... канд. техн. наук: 05.18.01. М., 2011. 26 с.

144. Матвеева Т. В., Корячкина С. Я. Мучные кондитерские изделия функционального назначения. Научные основы, технологии, рецептуры: монография. Орел: ФГОУ ВПО «Госуниверситет – УНПК», 2011. 358 с.

145. Фарш рибний з кашею з цільних зерен есо: пат. на корисну модель 60030 Україна: МПК A23L 1/00 / Пересічний М. І.; Кравченко І. В.; заявник та патентовласник Київський національний торговельно-економічний університет. № u201013387; заявл. 10.11.2010; опубл. 10.06.2011, Бюл. № 11.

146. Крупеник з клітковиною: пат. на корисну модель 67123 Україна, МПК A23L 1/00 / Пересічна С. М.; Калашнік Ю. І.; заявник та патентовласник Київський національний торговельно-економічний університет. № u201103628; заявл. 28.03.2011; опубл. 10.02.2012, Бюл. № 3.

147. Способ получения напитка на основе растительного сырья: пат. на изобретение 2369272 Российская Федерация: МПК A23L 2/00 (2006.01) / Щепочкина Ю. А.; заявитель и патентообладатель Щепочкина Ю. А. № 2008133674/13; заявл. 15.08.2008; опубл. 10.10.2009, Бюл. № 28.

148. Способ производства кисломолочного продукта: пат. на изобретение 2006101252 Российская Федерация: МПК A23C 9/13 (2006.01) / Самофалова Л. А., Сафронова О. В.; заявитель и патентообладатель ГОУВПО «Орловский государственный

технічний університет» (ОрелГТУ). № 2006101252/13; заявл. 16.01.2006; опубл. 27.07.2007, Бюл. № 12.

149. Способ получения творожной пасты: пат. на изобретение RU0002243674C1 Российская Федерация / Лунова О. М., Иванова Т. М. № 2003131130/13; заявл. 22.10.2003; опубл. 10.01.2005. Бюл. № 10.

150. Творожный продукт: пат. на изобретение 2292724 Российская Федерация: МПК А23С 23/00 (2006.01) / Самофалова Л. А., Климова Е. В.; заявитель и патентообладатель ГОУВП «Орловский государственный технический университет» (ОрелГТУ). № 2005122777/13; заявл. 18.07.2005; опубл. 10.02.2007, Бюл. № 4.

151. Спосіб борошняних формованих виробів підвищеної харчової цінності: пат. на корисну модель 66013 Україна: МПК А23L 1/10 (2006.01) / Сафонова О. М., Дугіна К. В. № u201105215; заявл. 26.04.2011, опубл. 26.12.2011, Бюл. № 24.

152. Экструзийный картоплепродукт «Повітряна картопля пшоняно-молочно-морквяна»: пат. на корисну модель 55323 Україна: МПК А23L 1/214 / Шульга О. С., Ковбаса О. М. № u201006768; заявл. 01.06.2010, опубл. 10.12.2010, Бюл. № 23.

153. Ибраимова С. Е., Уажанова Р. У., Мардар М. Р. Маркетинговые исследования потребительских предпочтений при выборе хлебобулочных изделий // Механика и технологии. / Таразский гос. ун-т им. М. Х. Дулати (Казахстан). 2020. № 1(67). С. 129–133

154. Mardar M., Znachek R. Development of Wellness Grain Bread // IJAAES – International Journal of Anatolia Agricultural Engineering 2019. (Özel Sayı 1). P. 72–76.

155. Ibraimova S., Uazhanova R., Mardar M., Serikbaeva A., Tkachenko N., Zhygunov D. *Development of recipe composition of bread with the inclusion of juniper using mathematical modeling and assessment of its quality* // Eastern-European Journal of Enterrise Technologies. 2020. Vol 6, № 11(108). P. 6–16

156. Завертаний Д. В. Сучасний стан та перспективи розвитку хлібопекарської галузі України // Ринкова економіка: сучасна теорія і практика управління. 2015. Т. 14. Вип. 2(30). С. 194–201.

157. Корячкина С. Я., Ахмедова Д. К. Использование нетрадиционного сырья как способ повышения содержания пищевых волокон в хлебобулочных изделиях // Хлебопродукты. 2012. № 10. С. 56–57.

158. Смертина Е. С., Федянина Л. Н., Каленик Т. К. Перспективы применения нетрадиционного сырья растительного происхождения в хлебопечении // Хлебопечение. 2012. № 4. С. 12–14.

159. Назар М. І., Михайлюк Г. С., Сильчук Т. А. Впровадження виробництва хліба оздоровчого призначення // Оздоровчі харчові продукти та дієтичні добавки: технології, якість та безпека: матеріали міжнар. наук.-практ. конф., 12–13 травня 2016 р. К.: НУХТ, 2016. С. 37–38.

160. Захарова А. С., Козубаева Л. А., Корякина Н. А. Использование шлифованного пшена в производстве сдобных хлебобулочных изделий // Хлебопродукты. 2014. № 12. С. 42–43.

161. Козубаева Л., Захарова А. Хлеб с добавлением шлифованного пшена // Хлебопродукты. 2007. № 3. С. 37–38.

162. Темникова О. Е. Совершенствование хлебобулочных изделий с использованием продуктов переработки гречихи: дис. ... канд. техн. наук: 05.18.01. Самара, 2012. 113 с.

163. Козубаева Л. Хлеб с гречневый проделом // Хлебопекарное производство. 2007. № 12. С. 18–19.

164. Непомнящих А. В., Захарова А. С. Сдобные булочки с гречневой // Инновационные технологии в пищевой промышленности: тезисы докл. IX междунар. науч.-практ. конф., 7–8 окт. 2010 г. Минск, 2010. С. 45–47.

165. Калинова В. В., Щербатюк С. І., Гаєвська Н. В. Перспективи використання розмеленого зерна проса при виробництві пшеничного хліба // Збірник наук. праць молод. учених, аспірантів і студентів Одеської національної академії харчових технологій. 2014. С. 18–20.

166. Корячкина Н. А., Захарова А. С. Булочные изделия с пшеном шлифованным // Наука и молодежь – 2013: тезисы докл. X Всерос. науч.-техн. конф. студ., аспирантов и молод. ученых / АлтГТУ. Барнаул, 2013. С. 32.

167. Спосіб виробництва харчового продукту лікувально-профілактичної дії на основі пророслого зерна: пат. на корисну модель 54288 Україна: МПК А21D 13/02 (2006.01) / Голубев О. В.; заявник та патентовласник ТОВ «УКР ЕКО-ХЛІБ». № u201002575; заявл. 09.03.2010; опубл. 10.11.2010, Бюл. № 21

168. Исакова Г., Гаврюшенко Т., Усибалиев А. и др. Использование гречневой муки в производстве хлеба // Современное хлебопекарное производство: перспективы развития: тезисы докл. 15-й Всерос. науч.-практ. конф., 18 апр. 2014 г. / Урал. гос. кон. ун-т. Екатеринбург, 2014. С. 9–12.

169. Ярошевич Т. С., Ярошевич О. М. Використання пшона шліфованого у виробництві пшеничного хліба // Товарознавчий вісник. 2014. № 7. С. 199–204.

170. Білково-гречаний хліб: пат. на корисну модель 75423 Україна: МПК (2012.01), А21D 8/00, А21D 13/00 / Гордієнко Т. В., Семенова А. Б., Михонік Л. А., Дробот В. І.; заявник та патентовласник Національний університет харчових технологій. № u201207607; заявл. 20.06.2012; опубл. 26.11.2012, Бюл. № 22.

171. Способ производства хлеба: пат. на изобретение RU0006574369C1 Российская Федерация: МПК А23С23/00 / Козлов О. І., Садигова М. К. № 2010123000/13; заявл. 04.06.2010; опубл. 10.12.2011, Бюл. 9.

172. Способ производства хлеба: пат. на изобретение 2271104 Российская Федерация: МПК А21D 8/02 (2006.01) А21D 2/36 (2006.01) / Козубаева Л. А., Захарова А. С.; заявитель и патентообладатель ГОУВПО «Алтайский государственный технический университет им. И. И. Ползунова» (АлтГТУ). № 2004121393/13; заявл. 12.07.2004; опубл. 10.03.2006, Бюл. № 7.

173. Способ производства хлеба: пат. на изобретение 2376765 Российская Федерация: МПК А21D 8/02 (2006.01), А21D 2/36 (2006.01) / Козубаева Л. А., Захарова А. С.; заявитель и патентообладатель ГОУВПО «Алтайский государственный технический университет им. И. И. Ползунова: (АлтГТУ). № 2008105133/13; заявл. 11.02.2008; опубл. 27.12.2009, Бюл. № 36.

174. Способ производства хлеба: пат. на изобретение 2290812 Российская Федерация: МПК А21D 8/02 (2006.01), А21D 2/36 (2006.01) / Козубаева Л. А., Захарова А. С.; заявитель и

патентообладатель ГОУВПО «Алтайский государственный технический университет им. И. И. Ползунова» (АлтГТУ). № 2005111119/13; заявл. 15.04.2005; опубл. 10.01.2007, Бюл. № 1.

175. Способ производства хлеба: пат. на изобретение 2512159 Российская Федерация: МПК А21D 13/02 (2006.01) / Пономарева Е. И., Шторх Л. В., Застрогина Н. М.; заявитель и патентообладатель ФГОУ ВПО «Воронежский государственный университет инженерных технологий» (ФГБОУ ВПО «ВГУИТ»). № 2013100451/13; заявл. 10.01.2013; опубл. 10.04.2014, Бюл. № 10.

176. Способ производства хлеба: пат. на изобретение 2435404 Российская Федерация: МПК А21D 8/02 (2006.01) А21D 2/36 (2006.01) / Козлов О. И., Садыгова М. К.; заявитель и патентообладатель ФГОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н. И. Вавилова». № 2010123000/13; заявл. 04.06.2010; опубл. 10.12.2011, Бюл. № 34.

177. Способ производства хлеба: пат. на изобретение 2460302 Российская Федерация, МПК А21D 8/02 (2006.01), А21D 2/36 (2006.01), А23L 1/18 (2006.01) / Шабурова Г. В., Курочкин А. А., Авроров Г. В., Сударикова В. В., Мурашкина О. А.; заявитель и патентообладатель ГОУ ВПО «Пензенская государственная технологическая академия». № 2011113563/13; заявл. 07.04.2011; опубл. 10.09.2012, Бюл. № 25.

178. Способ производства хлеба: пат. на изобретение 2154945 Российская Федерация: МПК А21D 13/02 (2000.01) / Исаев П. И. № 99119989/13; заявл. 22.09.1999; опубл. 27.08.2000, Бюл. № 24.

179. Спосіб виготовлення хліба, хлібобулочних та кондитерських виробів з екструдованих продуктів: пат. на корисну модель 26500 Україна: МПК А21D 8/00 / Олешко О. М., Олешко О. М. № u200705219; заявл. 14.05.2007; опубл. 25.09.2007, Бюл. № 15.

180. Льяконов В. П. Mathcad 11/12/13 в математике. Справочник. М.: Горячая линия – Телеком, 2007. 928 с.

181. Gerspach A. C. Enzymatische Hydrolyse von Hydroxyzimtsäuresteryl- stanylestern. Bachelor's Thesis, 2007.

182. Gitlesen T., Bauer M., Adlercreutz P. Adsorption of lipase

on polypropylene powder // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Lipids and Lipid Metabolism*. 1997. № 1345(2). P. 188–196.

183. Suelter C. H. *Experementelle Enzymologie. Grundlagen für die Laborpraxis*. Gustav Fischer Verlag. 1990. 267 p.

184. Kessler H. G., *Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik, Molkereitechnologie*. 1996. Vol. Auflage.

185. Chmiel H. *Bioprozesstechnik*. Spektrum Akad. Verlag. 2007.

Vol. Auflage. 420 p.

186. Al-Duri B., Yong Y. P. Lipase immobilisation: an equilibrium study of lipases immobilised on hydrophobic and hydrophilic/hydrophobic supports // *Biochemical Engineering Journal*. 2000. № 4(3). P. 207–215.

187. Hartmeier W. *Immobilisierte Biokatalysatoren*. Springer-Verlag. 1986. 205 p.

188. Salis A., Sanjust E., Solinas V., Monduzzi M. Characterisation of Accurel MP1004 polypropylene powder and its use as a support for lipase immobilization // *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2003. № 24–25. P. 75–82.

189. Borch K., Christensen M. W. Process for preparing esters. 2001 - DK39 2001053511, 20010119., 2001.

190. Osborne A. P., Brick D., Rucroft G., Taylor I. N. Immobilization of Cholesterol Esterase for Use in Multiple Batch Biotransformations to Prepare (-)- FTC (Emtricitabine) // *Org. Process Res. Dev.* 2006. № 10(3). P. 670–672.

191. Fernandez-Lorente G., Palomo J. M., Mateo C., Munilla R., Ortiz C., Cabrera Z., Guisan J. M., Fernandez-Lafuente R. Glutaraldehyde Cross-Linking of Lipases Adsorbed on Aminated Supports in the Presence of Detergents Leads to Improved Performance // *Biomacromolecules*. 2006. № 7(9). P. 2610–2615.

192. Ralet M.-C., Faulds C. B., Williamson G., Thibault J.-F. Degradation of feruloylated oligosaccharides from sugar-beet pulp and wheat bran by ferulic acid esterases from *Aspergillus niger* // *Carbohydrate Research*. 1994. № 263(2). P. 257–269.

193. Bendicho S., Trigueros M. C., Hernaández T., Martí'n O. Validation and Comparison of Analytical Methods Based on the Release of p-Nitrophenol to Determine Lipase Activity in Milk // *J.*

Dairy Sci. 2001. № 84 (7). P. 1590–1596.

194. Bagi K., Simon L. M., Szajani B. Immobilization and characterization of porcine pancreas lipase // *Enzyme and Microbial Technology*. 1997. № 20(7). P. 531–535.

195. Topakas E., Vafiadi C., Stamatis H., Christakopoulos P. *Sporotrichum thermophile* type C feruloyl esterase (StFaeC): purification, characterization, and its use for phenolic acid (sugar) ester synthesis // *Enzyme and Microbial Technology*. 2005. № 36(5-6). P. 729–736.

196. Vafiadi C., Topakas E., Alderwick L., Besra G., Christakopoulos P. Chemoenzymatic synthesis of feruloyl d-arabinose as a potential anti-mycobacterial agent // *Biotechnology Letters*. 2007. № 29(11). P. 1771–1774.

197. Rogel A., Stone W., Adebajo F. A novel spectrophotometric assay for lipase activity utilizing cis -parinaric acid // *Lipids*. 1989. № 24(6). P. 518–525.

198. Ghatora S. K., Chadha B. S., Saini H. S., Bhat M. K., Faulds C. B. Diversity of plant cell wall esterases in thermophilic and thermotolerant fungi // *Journal of Biotechnology*. 2006. № 125(3). P. 434–445.

199. Crepin V. F., Faulds C. B., Connerton I. F. Functional classification of the microbial feruloyl esterases // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004. № 63(6). P. 647–652.

200. Grabber J. H., Hatfield R. D., Lu F., Ralph J. Coniferyl Ferulate Incorporation into Lignin Enhances the Alkaline Delignification and Enzymatic Degradation of Cell Walls // *Biomacromolecules*. 2008. № 9(9). P. 2510–2516.

201. Topakas E., Vafiadi C., Christakopoulos P. Microbial production, characterization and applications of feruloyl esterases // *Process Biochemistry*. 2007. № 42(4). P. 497–509.

202. Kroon, P. A.; Faulds, C. B.; Brezillon, C.; Williamson, G., Methyl phenylalkanoates as substrates to probe the active sites of esterases // *European Journal of Biochemistry*. 1997. № 248(1). P. 245–251.

203. Patel R. N., Howell J. M., Banerjee A., Fortney K. F., Szarka L. J. Stereoselective enzymatic esterification of 3-benzoylthio-2-methylpropanoic acid // *Applied Microbiology and Biotechnology*.

1991. № 36(1). P. 29–34.

204. Howles P. N., Carter C. P., Hui D. Y. Dietary Free and Esterified Cholesterol Absorption in Cholesterol Esterase (Bile Salt-stimulated Lipase) Gene-targeted Mice // *J. Biol. Chem.* 1996. № 271(12). P. 7196–7202.

205. Ruttloff H. *Industrielle Enzyme*. Hamburg Behr's Verlag. 1994.

Vol. Auflage. 1038 p.

206. Козаков С. Хліб на заквасці – або «бездріжджовий хліб» // Харчовик (Пекарня та кондитерська). 2016. № 3/4. С. 16.

207. Улучшители качества хлеба: ферментные препараты с гемицеллюлазной активностью. URL: <http://www.russbread.ru/karta-saita.html>

208. Тесля О. Д., Дробот В. І., Бондаренко Ю. В. Перетравлюваність білків і вуглеводів хлібобулочних виробів за удосконаленого безопарного способу приготування тіста // *Хранение и переработка зерна*. 2010. № 9(135). С. 57–58.

209. Вироби хлібобулочні для спеціального дієтичного споживання. Загальні технічні умови: ДСТУ-П 4588:2006. К., 2006. 24 с.

210. Офіційний сайт фірми «Пуратос Україна». URL: <http://www.puratos.com.ua/uk/>

211. Офіційний сайт компанії «Новоконтакт». URL: <http://novocontact.com.ua/about>

212. Дубініна А. А., Ленерт С. О., Попова Т. М. Використання пшона у виробництві хліба оздоровчого призначення // *Харчова наука і технологія*. 2016. Т. 10. Вип. 4. С. 18–24.

## **ДОДАТОК А**

**Розчини для гідролізу  $\gamma$ -оризанолу ферментними  
препаратами й використовувані при цьому прилади,  
допоміжні засоби і матеріали**

- Аналітичні ваги Sartorius research R300S (Sartorius, Göttingen)
- Разові кювети 2,5 мл (Brand, Wertheim)
- Льодяна Машина (AF 80) (Scotsman, Mailand, Italien)
- Дистилятор (Millipore, Molsheim Frankreich)
- рН-метр CG 820 (Schott Geräte, Mainz)
- Фотометр UVICON 420 (Bio-Tek, Neufahrn)
- Роторний випаровувач (Laborota 4000 Serie) (Heidolph Instruments, Schwabach)
- Струшувач (GFL 3018) (GFL, Burgwedel)
- Водяна баня з нагрівачем із струшувачем (Heto Master Shake, HITACHI, Tokyo Japan)
- Силіконова баня, яка складається
  - Нагрівачий магнітний перемішувач (RH basic ) (IKA Labortechnik, Staufen)
  - Термометри, ETS-D4 fuzzy (IKA Labortechnik, Staufen)
  - (10 bis +150 °C; ±1 °C)
  - Стакан (250 мл) VWR International, Darmstadt
  - Тримач стакану з пробією, каркас із алюмінію
  - Палочка магнітного мішувача (l = 15 мм) VWR International, Darmstadt
- Ультрозвукова баня Sonorex RK 100 H (Bandelin Electronic, Berlin)
- Центрифуга Z 233 MK2 (Hermle, Gosheim)
- Палочка магнітного мішувача (l = 30 мм) (VWR International, Darmstadt)
- Мембрановий фільтр Spartan 13/0.45 RC (Schleicher & Schuell, Dassel)
- Мікро- Палочка магнітного мішувача (l = 5 мм) (VWR International, Darmstadt)

- Бумага для взвешивания, (NeoLab, Heidelberg)  
Kjeldal

(Schleicher & Schuell  
Microscience GmbH,  
Dassel)

## 1. Прибори та допоміжні засоби

## 2. Розчини для гідроліза $\gamma$ -оризанола порошком підшлункової залози бика

### • Буфер 100 мМ фосфат натрія-NaCl pH 7,0

Розчин 1: 1,56 г  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  и 0,58 г NaCl взвжують у мірну колбу на 100 мл та заповнюють дистильованою водою.

Розчин 2: 1,78 г  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  и 0,58 г NaCl взвжують у мірну колбу на 100 мл та заповнюють дистильованою водою.

pH розчину 1 доводили до 7,0, додаючи розчин 2.

### • 12 мМ розчин таурохолату натрія

64,5 мг таурохолату натрію взвжують у мірну колбу на 10 мл та заповнюють 100 мМ буфером фосфата натрію-NaCl, pH 7,0.

### • 48 мМ розчин таурохолату натрія

258 мг таурохолату натрію взвжують у мірну колбу на 10 мл та заповнюють 100 мМ буфером фосфату натрію-NaCl, pH 7,0.

### • Ферментний буфер pH 6,0

Розчин 1: 1,56 г  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  и 17,4 г NaCl взвжують у мірну колбу на 100 мл та заповнюють дистильованою водою.

Розчин 2: 1,78 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  и 17,4 г NaCl взвжують у мірну колбу на 100 мл та заповнюють дистильованою водою.

pH розчину 1 доводили до 6,0, додаючи розчин 2.

### • 16,1 мМ розчин $\gamma$ -оризанолу

50 мг  $\gamma$ -оризанолу взвжують у мірну колбу на 5 мл та заповнюють ацетоном.

### • Внутрішній стандарт 2,6 мМ (1)

5 мг  $5\alpha$ -холестан- $3\beta$ -ола взвжують у мірну колбу на 5 мл та заповнюють ацетоном.

3. **Розчини для гідроліза  $\gamma$ -оризанола зPentopanBG500 та липазами**

- Ферментний буфер рН 6,0 3.2.1.2
- 16,1 мМ розчин  $\gamma$ -оризанолу 3.2.1.1
- Внутрішній стандарт 2,6 мМ (1) 3.2.1.1
- 48 мМ розчину таурохолату натрію 3.2.1.1

• **Внутрішній стандарт 60,9 мМ (2)**

10 мг р-кумарової кислотивзважають у мірну колбу на1 мл та заповнюють ацетоном.

- 4,9 мМ розчину етилферулята

10 мг етилферулята взважають у мірну колбу на 1 мл та заповнюють ацетоном.

• **10 мМ розчинр-нітрофенілпальмітата**

37,8 мг п-нітрофенілпальмітата взважають у мірну колбу на10 мл та заповнюють ацетоном.

• **Калібрувальнийрозчинр-нітрофенола «100%».**

34,8 мг р-нітрофенола взважають у мірну колбу на 25 мл та заповнюють ацетоном.

**ДОДАТОК Б**  
**Опис умов хроматографування та спектроскопіювання**

## 1. Опис умов хроматографування

Газовий хроматограф: GC 8000 Series (Fisons Instruments, Mailand, Italien)  
Газ носій: Водень, 70 кПа  
Об'єм ін'єкції: 0,5 мкл  
Інжектор: On-Column  
Детектор: FID (360 °C)  
Колонка: 0,90 м х 0,32 мм попередня колонка, деактивована 1,3-дифеніл-1,1,3,3-тетраметилдисилазаном, яка з'єднана з DB-5ht за допомогою преса для скла (27 м х 0,25 мм, товщина плівки 0,1 мкм)  
Програма температур: 40°C / 3 min / 15°/min / 220°C / 5°/min / 340°C / 30 min  
Запис даних: Chrom-Card-Software Version 1.2 (ThermoFinnigan, Egelsbach)

Газовий хроматограф: GC 3000 Series Dualchrom (Fisons Instruments, Mailand, Italien)  
Газ носитель: Водень 75 кПа  
Объем инъекции: 5 мкл - 1мкл  
Інжектор: On-Column  
Детектор: FID (360 °C)  
Колонка: 0,90 м х 0,32 мм попередня колонка, деактивована 1,3-дифеніл-1,1,3,3-тетраметилдисилазаном, яка з'єднана з DB-5ht за допомогою преса для скла (27 м х 0,25 мм, товщина плівки 0,1 мкм)  
Програма температур: 40°C / 3 min / 15°/min / 310°C/2min / 5°/min / 340°C / 3 min  
Запис даних: Chrom-Card-Software Version 1.2 (ThermoFinnigan, Egelsbach)

## 2. Опис умов мас-спектроскопіювання

Інжектор:	Split ін'єктор
Потік розподілу	14 мл/хв
Відносини розподілу	1:10
Температура інжектора	300°C
Об'єм ін'єкції:	1 мкл
Колонка:	Rtx-200MS 27 м × 0,25 мм I.D., товщина плівки 0,1 мкм (Restek GmbH, Bad Soden)
Газ носій:	Гелій
Потік:	постійний: 1,4 мл/хв
Програма температур:	140°C / 15°C/min / 310 / 1,5°C/min / 340°C (3 min)
МС-Вимоги:	
Температура інтерфейсу:	320°C
Іонізація:	EI+ (70 eV)
Температура джерела:	250 °C
Масова область:	40 - 750 Da (Full Scan Mode)
Час сканування:	0,4 с
Початок запису:	після 6 хв

Програмне забезпечення: Xcalibur 1.4 SR1 (Thermo Finnigan, Остин, Техас)

## **ДОДАТОК В**

### **Моделювання рецептур нових видів хліба**

## Оптимізація рецептурного складу та вологості нових видів хліба з гречаним борошном та з пшоном

Дослідження проводилось для двох видів хліба: хліба з додаванням гречаного борошна та хліба з додаванням пшона.

Параметр оптимізації - питомий об'єм хліба.

Кодовані значення вводились за наступними співвідношеннями:  $x_1$  - кількість ферменту для хліба з гречаним борошном;  $x_2$  - вологість тіста для хліба з гречаним борошном;  $x_3$  - кількість ферменту для хліба з пшоном;  $x_4$  - вологість тіста для хліба з пшоном;  $Y_1$  - показник питомого об'єму для хліба з гречаним борошном;  $Y_2$  - показник питомого об'єму для хліба з пшоном.

Межі зміни вхідних параметрів:

$0,003 < x_1 < 0,009$ ;  $49 < x_2 < 51$  (гречаний хліб);  $0,003 < x_3 < 0,009$ ;  $44 < x_4 < 46$  (хліб з пшоном);

Введення кодованих значень здійснюється за формулами:

$$X1(x_1) := \frac{x_1 - \frac{0.009 + 0.003}{2}}{\frac{0.009 - 0.003}{2}}$$

$$X2(x_2) := \frac{x_2 - \frac{51 + 49}{2}}{\frac{51 - 49}{2}}$$

$$X3(x_3) := \frac{x_3 - \frac{0.009 + 0.003}{2}}{\frac{0.009 - 0.003}{2}}$$

$$X4(x_4) := \frac{x_4 - \frac{46 + 44}{2}}{\frac{46 - 44}{2}}$$

ORIGIN:= 1

Результати експерименту по гречаному та пшоному хлібу (кодовані значення)

Матриця планування

$$F := \begin{pmatrix} 1 & -1 & -1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & -1 & 1 & 1 & 1 & -1 \\ 1 & 1 & -1 & 1 & 1 & -1 \\ 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & 0 & -1 & 0 & 1 & 0 \\ 1 & 0 & 1 & 0 & 1 & 0 \\ 1 & -1 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \quad Y1k := \begin{pmatrix} 2.1 \\ 2.15 \\ 2.18 \\ 2.25 \\ 2.3 \\ 2.3 \\ 2.28 \\ 2.35 \\ 2.5 \end{pmatrix} \quad Y2k := \begin{pmatrix} 2.2 \\ 2.25 \\ 2.5 \\ 2.45 \\ 2.51 \\ 2.45 \\ 2.58 \\ 2.73 \\ 3.32 \end{pmatrix}$$

Коефіцієнти математичної моделі технологічного процесу при використанні домішок у кодованих значеннях визначалися за формулою:

$$a1 := (F^T \cdot F)^{-1} \cdot F^T \cdot Y1k \quad a2 := (F^T \cdot F)^{-1} \cdot F^T \cdot Y2k$$

$$a1^T = (2.476 \quad 0.042 \quad 0.02 \quad -0.148 \quad -0.163 \quad 5 \times 10^{-3})$$

$$a2^T = (3.082 \quad 0.108 \quad -10 \times 10^{-3} \quad -0.308 \quad -0.483 \quad -0.025)$$

Рівняння моделі Y1-гречаний хліб, Y2-пшоняний хліб

$$Y1(X1, X2) := a1_1 + a1_2 \cdot X1 + a1_3 \cdot X2 + a1_4 \cdot X1^2 + a1_5 \cdot X2^2 + a1_6 \cdot X1 \cdot X2$$

$$Y2(X3, X4) := a2_1 + a2_2 \cdot X3 + a2_3 \cdot X4 + a2_4 \cdot X3^2 + a2_5 \cdot X4^2 + a2_6 \cdot X3 \cdot X4$$

Попередня перевірка математичної моделі

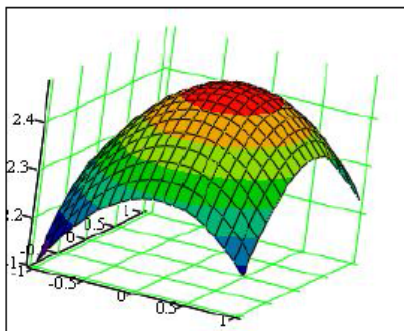
$$F \cdot a1 = \begin{pmatrix} 2.107 \\ 2.137 \\ 2.181 \\ 2.231 \\ 2.292 \\ 2.332 \\ 2.286 \\ 2.369 \\ 2.476 \end{pmatrix} \quad (F \cdot a2) = \begin{pmatrix} 2.167 \\ 2.197 \\ 2.434 \\ 2.364 \\ 2.609 \\ 2.589 \\ 2.666 \\ 2.882 \\ 3.082 \end{pmatrix}$$

Знаходження значення X1, X2 для здобуття максимального значення питомого об'єму хліба з гречаним борошном

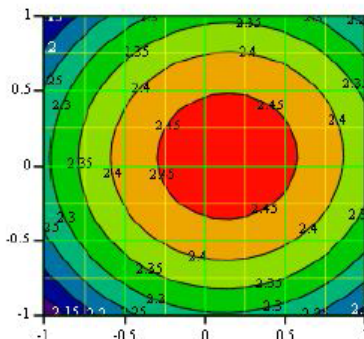
$$\begin{array}{llll} \text{Given} & X1 := 0 & X2 := 0 & \\ X1 \geq -1 & X1 \leq 1 & X2 \geq -1 & X2 \leq 1 \\ P1 := \text{Maximize}(Y1, X1, X2) & P1 = \begin{pmatrix} 0.142 \\ 0.063 \end{pmatrix} & Y1(P1_1, P1_2) = 2.479 & \end{array}$$

Побудова поверхні відгуку математичної моделі питомого об'єму хліба з гречаним борошном

F1 := CreateMesh (Y1, -1, 1, -1, 1, 20)



F1



F1

Знаходження значення X3, X4 для здобуття максимального значення питомого об'єму хліба з пшоном

$$X3 := 0 \quad X4 := 0$$

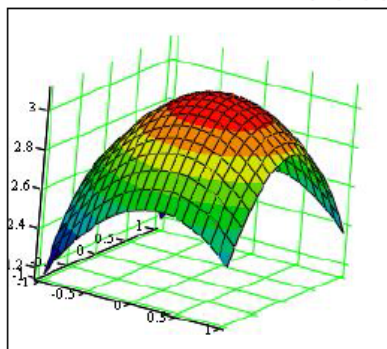
Given

$$X3 \geq -1 \quad X3 \leq 1 \quad X4 \geq -1 \quad X4 \leq 1$$

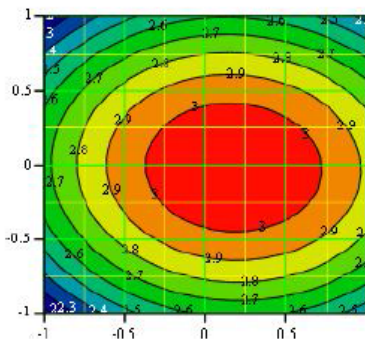
$$P2 := \text{Maximize}(Y2, X3, X4) \quad P2 = \begin{pmatrix} 0.176 \\ -0.015 \end{pmatrix} \quad Y2(P2_1, P2_1) = 3.074$$

Побудова поверхні відгуку математичної моделі питомого об'єму хліба з пшоном

F2 := CreateMesh (Y2, -1, 1, -1, 1, 20)



F2



F2

Перехід до природних значень коефіцієнтів вхідних змінних математичної моделі здійснюється шляхом підстановки природних значень у формулу переходу до кодованих значень

$$2.476 + 0.042 \left( \frac{x_1 - \frac{0.009 + 0.003}{2}}{\frac{0.009 - 0.003}{2}} \right) + 0.02 \left( \frac{x_2 - \frac{51 + 49}{2}}{\frac{51 - 49}{2}} \right) - 0.148 \left( \frac{x_1 - \frac{0.009 + 0.003}{2}}{\frac{0.009 - 0.003}{2}} \right)^2 \dots$$

$$+ \left( \frac{x_2 - \frac{51 + 49}{2}}{\frac{51 - 49}{2}} \right)^2 + 5 \cdot 10^{-3} \cdot \left( \frac{x_1 - \frac{0.009 + 0.003}{2}}{\frac{0.009 - 0.003}{2}} \right) \cdot \left( \frac{x_2 - \frac{51 + 49}{2}}{\frac{51 - 49}{2}} \right)$$

$$-422.673 + 126.33x_1 + 16.636x_2 - 16444.44x_1^2 - 1630x_2^2 + 1.66x_1 \cdot x_2$$

Остаточний вигляд математичної моделі для Y1 у природних значеннях

$$Y1(x_1, x_2) := -422.673 + 126.333x_1 + 16.636x_2 - 16444.44x_1^2 - 0.163x_2^2 + 1.66x_1 \cdot x_2$$

$$3.032 + 0.108 \left( \frac{x_3 - \frac{0.009 + 0.003}{2}}{\frac{0.009 - 0.003}{2}} \right) - 10 \cdot 10^{-3} \cdot \left( \frac{x_4 - \frac{46 + 44}{2}}{\frac{46 - 44}{2}} \right) - 0.278 \left( \frac{x_3 - \frac{0.009 + 0.003}{2}}{\frac{0.009 - 0.003}{2}} \right)^2 \dots$$

$$+ 0.453 \left( \frac{x_4 - \frac{46 + 44}{2}}{\frac{46 - 44}{2}} \right)^2 - 0.025 \left( \frac{x_3 - \frac{0.009 + 0.003}{2}}{\frac{0.009 - 0.003}{2}} \right) \cdot \left( \frac{x_4 - \frac{46 + 44}{2}}{\frac{46 - 44}{2}} \right)$$

Остаточний вигляд математичної моделі для Y2 у природних значеннях

$$Y2(x_3, x_4) := -917.42 + 781.66x_3 + 40.81x_4 - 30888.88x_3^2 - 453x_4^2 - 8.33x_3 \cdot x_4$$

Оптимальні значення для хліба з гречаним борошном, що визначені за моделлю:

кількість ферменту  $6.426 \times 10^{-3}$

вологість тіста 50.06%

Оптимальні значення для хліба з пшоном, що визначені за моделлю:

кількість ферменту  $6.0 \times 10^{-3}$

вологість тіста 44.98%

Формули для обчислення природних значень за кодованими:

$$x1(X1) := \frac{X1 + 2}{333.33} \qquad x2(X2) := X2 + 50$$

$$x3(X3) := \frac{X3 + 2}{333.33} \qquad x4(X4) := X4 + 45$$

Для нотаток

Для нотаток

Наукове видання

ЛЕНЕРТ Світлана Олександрівна  
ДУБІНІНА Антоніна Анатоліївна  
ЗАЙЦЕВА Валентина Миколаївна  
КУКЛІНА Тетяна Сергіївна  
ПРУСС Вікторія Леонідівна

**ОПТИМІЗАЦІЯ ПАРАМЕТРІВ РЕАКЦІЇ  
ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГІДРОЛІЗУ  $\gamma$  -  
ОРИЗАНОЛУ**

*Монографія*

Комп'ютерний набір *Кукліна Т.С.*  
Верстання *Кукліна Т.С.*

Підписано до друку 02.02.2024. Формат 60×84/16. Ум. друк. арк. 10,45.  
Тираж 100 прим. Зам. № 70.

Національний університет «Запорізька політехніка» Україна, 69063, м.  
Запоріжжя, вул. Університетська, 64  
Тел.: (061) 769–82–96, 220–12–14

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 6952 від 22.10.2019.