

ТЕХНОЛОГИЯ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

УДК 557.15:637.3

Поступила в редакцию 10 декабря 2024 года

Л.Л. Богданова, к.т.н., В.В. Ковалева, А.Д. Белокобылова, Е.В. Беспалова, к.т.н.
Институт мясо-молочной промышленности, Минск, Республика Беларусь

АНАЛИЗ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ И ПОДХОДОВ К ОПРЕДЕЛЕНИЮ АКТИВНОСТИ ЛИЗОЦИМА В ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ СРЕДСТВАХ ДЛЯ СЫРОДЕЛИЯ

L. Bahdanava, V. Kovaleva, A. Belokobylova, E. Bepalova
Institute for Meat and Dairy Industry, Minsk, Republic of Belarus

ANALYSIS OF PATTERNS AND APPROACHES FOR DETERMINING LYSOZYME ACTIVITY IN TECHNOLOGICAL AIDS FOR CHEESE MAKING

e-mail: bogdanova_ll@tut.by, viktoriakovaleva000@gmail.com,
nastya.belokobylova@mail.ru, bepalova-kat@mail.ru

В статье представлен анализ научно-технической литературы определения активности лизоцима, результаты отработки режимных параметров определения активности лизоцима. Установлены основные.

The article presents the analysis of scientific and technical literature of lysozyme activity determination, the results of reflection of mode parameters of lysozyme activity determination. The main metrological characteristics of the measurement technique are established.

Ключевые слова: спектрофотометр; антимикробные препараты; методика; лизоцим, лизис клеток.

Keywords: spectrophotometer; antimicrobial drugs, methodology; lysozyme; cell lysis.

Введение. Соблюдение гигиенических стандартов на всех этапах производства сыра важно для предотвращения микробиологического загрязнения сырья, и впоследствии сохранения качества готового продукта. В процессе получения и хранения молока важно строгое соблюдение технологических режимов, особенно в периоды кормления животных силосом, когда увеличивается вероятность постсекреторной контаминации молока-сырья маслянокислыми бактериями, и как следствие – маслянокислого брожения в готовом продукте [1–7].

В процессе созревания сыр становится благоприятной средой для роста и размножения маслянокислых бактерий (кlostридий). В сыре достаточно питательных компонентов и созданы анаэробные условия для их жизнедеятельности. Ни кислотность сыра, ни пониженная температура созревания не является препятствием для роста и развития кlostридий: они растут при pH=4,8 и температуре 8°C. Особенно проблемным для сыродела свойством кlostридий является способность к образованию спор, которые достаточно устойчивы к температурному воздействию в условиях пастеризации, и, как следствие, в условиях созревания сыра, эти споры могут перейти в вегетативную форму. Кlostридии продуцируют масляную кислоту и большое количество газов – углекислого газа и водорода. Это может привести к позднему вспучиванию сыров и к образованию «сплитов» – тонких щелевидных разрывов внутри головки, к разрыву головок на части и возникновению прогорклого вкуса [2]. Для подавления роста посторонней микрофлоры в сыроделии

практически на всех молокоперерабатывающих предприятиях республики используют лизоцим [1, 8].

Результаты и их обсуждение. Для производства пищевой продукции в качестве технологического вспомогательного средства допускается использовать пищевые добавки, которые разрешены для применения в пищевой промышленности в соответствии с Едиными требованиями безопасности пищевых добавок и ароматизаторов (глава II, раздел 22).

В технологии производства продуктов питания допускается использовать ферментные препараты. Для получения ферментных препаратов в качестве источников и продуцентов используют органы и ткани здоровых сельскохозяйственных животных, культурных растений, а также непатогенные и нетоксигенные специальные штаммы микроорганизмов бактерий и низших грибов в соответствии с требованиями, установленными Приложением №6 Единых санитарно-эпидемиологических и гигиенических требований безопасности технологических вспомогательных средств, ТР ТС 029. В настоящее время в пищевой промышленности разрешено использование лизоцима, полученного только из яичного белка.

В целях оптимизации технологического процесса и эффективного использования лизоцима, важным параметром является активность ферментного препарата. Существует ряд методов определения активности лизоцима [8].

Анализ литературы, по определению лизоцимной активности, показал отсутствие диверсификации методик, многие из них имеют полуколичественный характер, а поэтому не дают точной оценки уровня лизоцимной активности. Рассмотрим некоторые из них.

Турбидиметрический метод определения активности лизоцима [9, 10]. Метод основан на способности лизоцима, добавленного к ацетоновому порошку тест-бактерий *Micrococcus lysodeicticus* штамм №2665 ГИСК им. Л.А. Тарасевича, лизировать последние в одном и том же временном интервале. Для регистрации изменений оптической плотности суспензии используют пробирочный электрофотокolorиметр с рабочей длиной волны 570 нм.

Тест-культуру выращивают в течении 48 часов при 37°C на агаре Хоттингера, суспендируют в 0,85%-ном растворе хлорида натрия, трижды отмывают дистиллированной водой, четырежды – ацетоном на холоду и высушивают при комнатной температуре.

Таблица 1 – Пример использования ацетонового порошка тест-культуры *M. lysodeikticus* для определения активности яичного лизоцима [9].

Ацетоновый порошок тест-культуры <i>M. lysodeicticus</i> штамм №2665 ГИСК им. Л.А.Тарасевича	Яичный лизоцим		Контроль	
	1 серия	2 серия	1 серия	2 серия
D _{нач}	0,780	0,545	0,663	0,641
D _{конеч}	0,571	0,366	0,640	0,620
ΔD (30 мин)	0,209	0,179	0,023	0,021
ед.а.	6,97	5,97	-	-

Источник данных: собственная разработка.

Полученный порошок можно длительно хранить при 4–6°C.

Недостатком использования ацетонового порошка тест-культуры *M. lysodeicticus* штамм №2665 ГИСК им. Л.А. Тарасевича является высокая агрегированность бактериальных клеток, а, следовательно, достаточно низкая степень дисперсности суспензии клеток (ее неоднородность) и снижение чувствительности клеток к бактериолитическому действию лизоцима.

Все это ведет к снижению точности и эффективности количественного определения уровня лизоцимной активности [9]. Как видно из таблицы 1, уже на первом этапе определения начальной оптической плотности одна и та же суспензия клеток тест-культуры, приготовленная с использованием ацетонового порошка микрококка, дала разные результаты (0,780 – 1 серия; 0,545 – 2 серия). В качестве объекта исследования авторами был взят коммерческий препарат яичного лизоцима фирмы «Ферейн». И, как результат, в двух сериях опыта, параллельно проведенных с использованием одной и той же ацетонированной тест-культуры *M. lysodeicticus* штамм №2665, получены разные данные об уровне активности фермента: 6,97 ед.а. и 5,97 ед.а., что наглядно подтверждает невысокую точность и достоверность данного способа.

Другим серьезным недостатком данного метода является его трудоемкость и длительность выполнения, что обусловлено необходимостью построения калибровочной кривой для количественной характеристики активности лизоцима в растворах, а также тем, что калибровочную кривую необходимо строить перед проведением каждой серии исследований. Данный процесс является длительным по времени, достаточно трудоемким и его результат во многом зависит от квалификации исследователя.

Известен «Способ выделения комплекса литических ферментов», в котором используется суспензия лиофилизированных клеток *M. lysodeicticus* штамм №2665 ГИСК им. Л.А. Тарасевича для определения бактериологической активности в выделенном комплексе ферментов. С этой целью используют 2 см³ лиофилизированных клеток *M. lysodeicticus* штамм №2665 в 0,01 М Трис-буфере рН 8,4–8,5 с концентрацией 0,5–0,6 ед оптической плотности (ФЭК – 56М, δ_{кюв} 3 мм, с/ф №6), прогретой в течении 10 мин, при 37°С, добавляют 0,1 см³ пробы, смесь инкубируют 5 мин, при 37°С.

Однако в данном способе нет указаний о том, в какой фазе роста взяты клетки микроорганизма *M. lysodeicticus* штамм №2665 для приготовления суспензии, а также не указаны оптимальные условия выращивания культуры.

Вследствие чего, результаты нескольких серий опытов могут значительно отличаться между собой и не дают точных результатов. Кроме того, условия выполнения измерений адаптированы для определения активности лизоцима в биологическом материале человека и существенно отличаются от условий, применяемых для определения активности лизоцима в технологических вспомогательных средствах.

Один из методов определения активности лизоцима, часто применяемый в медицинских целях – чашечный метод, основан на способности диффузии лизоцима в агаровом геле. Недостатком данного метода является громоздкость, так как для отработки режимных параметров определения активности лизоцима и установления основных метрологических характеристик методики понадобится большое количество чашек Петри.

Существует микробиологический способ определения лизоцимной активности, который основан на изменении светопропускания *M. lysodeikticus*. Данный способ является трудоемким из-за необходимости многократного количества измерений, что может повлиять на величину погрешности при внесении небольших объемов испытуемых образцов при постановке способа.

Анализ данных методов [9–14] показывает, что основой определения активности лизоцима является оценка влияния исследуемого ферментного препарата на тест-культуру (бактериальную суспензию). Для определения влияния лизоцима животного или микробного происхождения необходимо определять скорость снижения абсорбции, которая обусловлена лизисом клеток *M. lysodeikticus*. Для этого необходимо спектрофотометрическое определение изменения оптической плотности

бактериальной суспензии с максимумом поглощения при определённой длине волны. В данном случае целесообразно взять за основу микробиологический способ. Для снижения величины погрешности при внесении небольших объемов испытуемых образцов необходимо использовать разведения используемых растворов. Для проведения скрининговых исследований рекомендуется проводить все измерения, соблюдая одинаковые условия (пробоподготовка, температура, вносимые дозировки, оборудование, длина волны).

Методика анализа активности лизоцима включает в себя: приготовление буферных растворов, приготовление раствора субстрата, приготовление стандартного раствора, подготовка пробы, проведение измерений, многократное измерение оптической плотности.

В качестве стандартного раствора используется разведение в буферном растворе коммерческого образца препарата лизоцима определенной активности (заявленной активности).

Проведение испытаний подразумевает определение скорости снижения абсорбции, которая обусловлена лизисом клеток тест-культуры *M. lysodeikticus* исследуемым образцом лизоцима. За промежуток времени на определенных интервалах при установленной длине волны и температуре проводится многократное измерение оптической плотности. Анализ динамики полученных данных позволит рассчитать активность лизоцима.

В данной методике в качестве буферного раствора используется раствор солей фосфата натрия или раствор солей фосфата калия, pH буферного раствора составляет $(6,2 \pm 0,1)$ ед. pH и устанавливается с помощью компонентов буфера.

Данный pH буферного раствора зависит в первую очередь от ферментного препарата, а именно оптимума pH его активности. Оптимум действия лизоцима – от 5 до 7. Также учитывается, что действие лизоцима не должно оказывать ингибирующего воздействия на заквасочную микрофлору на всех стадиях технологического процесса. К основным микроорганизмам, входящим в состав заквасок для сыроделия, относятся: *Lactobacillus plantarum* – оптимум pH 6,3; *Lactococcus lactis subsp. lactis* – оптимум pH 6,5; *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, *Lactococcus lactis subsp. diacetylactis*, *Streptococcus thermophiles* – оптимум pH 6,3–6,8. Таким образом выявлено, что оптимальный диапазон pH буфера составляет 6,3–6,8 ед. pH.

В рамках инициированных институтом исследований проведена оценка пробоподготовки – субстрата. Раствор субстрата представляет собой разведение тест-культуры (*M. lysodeikticus*) в буферном растворе.

Для определения стабильности исследуемого раствора провели сравнительный анализ подготовки двух типов образцов: без инкубации (1 образец) и с инкубацией (2 образец). Результаты исследования приведены в таблице 2 на примере одного измерения.

Таблица 2 – Параметры исследования стабильности субстрата

Оптическая плотность, D:			
1 образец		2 образец	
D_0 / D_5	$D_{исх} / D_{конец}$	D_0 / D_5	$D_{исх} / D_{конец}$
0,974	1,2552	0,929	0,974
0,931	1,2421	0,866	0,967

Источник данных: собственная разработка.

Все измерения проводились при длине волны 450 нм. По данным таблицы 2 видно, что оптическая плотность без выдержки превышает значение оптической

плотности субстрата после выдержки. Однако изменение стабильности субстрата ($\Delta = A_{5\text{мин}} - A_{0\text{мин}}$) в течении 5 мин исследования неодинаково, а именно для 1 образца составляет $\Delta=0,0131$, а для 2 образца $\Delta=0,007$ соответственно.

Аналогичные измерения проводились с трехкратной повторностью с соблюдением исходных условий. Сравнительный анализ двух образцов показал, что стабильность субстрата в 1,71–1,87 раз выше при инкубации в течении 30 мин при 37°C.

В таблице 3 приведены условия проведения измерений, а также полученная активность (Ед.акт/мг) исследуемых образцов.

Таблица 3 – Результаты исследования

Параметр	1 образец	2 образец
Температура среды, °С	22,7	
Температура субстрата, °С	22,8	37
Буферный раствор (соли)	K ₂ HPO ₄ : KH ₂ PO ₄ ; 1:2,82	
pH буферного раствора	6,21	
Оптическая плотность раствора <i>M. lysodeikticus</i> , D ₀	1,2552	0,974
Оптическая плотность раствора <i>M. lysodeikticus</i> , D ₅	1,2421	0,967
Ед.акт/мг (FIP)	1 730 000	3 179 000
R ²	0,976	0,991

Источник данных: собственная разработка.

По данным таблицы 3 можно сделать вывод, что при инкубации субстрата значение активности лизоцима в 1,65–1,84 раза выше, а также является наиболее достоверным значением, так как коэффициент R² составляет 0,9906. Анализ полученных данных проводился с использованием набора статистических инструментов стандартного программного пакета Microsoft Excel.

С учетом специфики использования спектрофотометрического метода анализа изменения скорости абсорбции, необходимо определить нулевую точку измерения: обнуление спектрофотометра. Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Результаты измерения оптической плотности исследуемых образцов

Оптическая плотность, D:					
1 опыт		2 опыт		3 опыт	
D ₀ / D ₅	D _{исх} / D _{конеч}	D ₀ / D ₅	D _{исх} / D _{конеч}	D ₀ / D ₅	D _{исх} / D _{конеч}
0,842	1,0751	0,896	0,9584	1,011	1,1705
0,787	1,0689	0,859	0,9497	0,969	1,1535

Источник данных: собственная разработка

- 1 опыт – обнуление против дистиллированной воды;
- 2 опыт – обнуление против буферного раствора;
- 3 опыт – обнуление против воздуха.

По данным таблицы 4 можно сделать вывод, что наибольшее значение оптической плотности достигается при измерении, используя обнуление спектрофотометра против воздуха. Однако, изменение стабильности субстрата в течении 5 мин исследования составляет: для 1 опыта $\Delta=0,0062$; для 2 опыта $\Delta=0,0087$; для 3 опыта $\Delta=0,017$. Аналогичные измерения проводились в трехкратной повторности с соблюдением исходных условий. Зависимость изменения стабильности субстрата в течении 5 мин. Установлено, что наибольшая стабильность измерения достигается при обнулении спектрофотометра против дистиллированной воды. В таблице 5 приведены результаты определения активности лизоцима:

Таблица 5 – Результаты исследования

Параметр	1 опыт	2 опыт	3 опыт
Буферный раствор (соли)	K ₂ HPO ₄ : KH ₂ PO ₄ ; 1:2,82		
pH буферного раствора	6,20		
Оптическая плотность, D _{0мин}	1,0751	0,9584	1,1705
Оптическая плотность, D _{5мин}	1,0689	0,9497	1,15335
Ед.акт/мг (FIP)	2 845 000	1 946 000	1 940 000
R ²	0,989	0,943	0,963

Источник данных: собственная разработка.

Обнуление спектрофотометра против дистиллированной воды (опыт 1) является наиболее достоверным значением, так как коэффициент R² составляет 0,9897. Одной из метрологической характеристик методики является: температура образца и окружающей среды при проведении измерений. В разных источниках указан оптимум измерения: 25°C и 37°C [8]. В таблице 6 приведены результаты исследования измерения оптической плотности образцов при разных температурных режимах.

Таблица 6 – Результаты измерения оптической плотности исследуемых образцов с разными температурными режимами

Оптическая плотность, D:							
1 опыт – 25°C		2 опыт – 29°C		3 опыт – 33°C		4 опыт – 37°C	
D ₀ /D ₅	D _{исх} /D _{конеч}	D ₀ /D ₅	D _{исх} /D _{конеч}	D ₀ /D ₅	D _{исх} /D _{конеч}	D ₀ /D ₅	D _{исх} /D _{конеч}
0,721	0,76284	1,055	1,1042	1,099	1,2241	0,580	0,91575
0,685	0,75204	1,005	1,0842	1,059	1,2176	0,442	0,90884

Источник данных: собственная разработка.

Изменение стабильности субстрата в течении 5 мин исследования составляет: для первого опыта Δ=0,0108; для второго Δ=0,02; для третьего Δ=0,0065; для четвертого Δ=0,0069. Измерения проводились в трехкратной повторности с соблюдением исходных условий. Установлено, что при температурах 33°C и 37°C зависимость изменения стабильности субстрата в течении 5 мин от температуры наиболее стабильна. Это доказывает, что при выдержке в течении 30 мин при температуре 37°C происходит активация тест-культуры *M. lysodeikticus*, тем самым повышается стабильность субстрата в период измерений. В таблице 7 приведены результаты определения активности лизоцима.

Таблица 7 – Результаты определения активности лизоцима

Параметр	1 опыт	2 опыт	3 опыт	4 опыт
Буферный раствор (соли)	K ₂ HPO ₄ : KH ₂ PO ₄ ; 1:2,82			
pH буферного раствора	6,20			
Оптическая плотность, D _{0мин}	0,76284	1,1042	1,2241	0,91575
Оптическая плотность, D _{5мин}	0,75204	1,0842	1,2176	0,90884
Ед.акт/мг (FIP)	3 299 000	5 043 000	4 013 000	8 239 000
R ²	0,956	0,846	0,949	0,977

Источник данных: собственная разработка.

Зависимость скорости снижения абсорбции от температуры, обусловленная лизисом клеток *M. lysodeikticus* исследуемыми образцами препаратов лизоцима, изображена на графиках зависимости оптической плотности от времени полученных

с использованием набора статистических инструментов стандартного программного пакета Microsoft Excel (Рисунок 1).

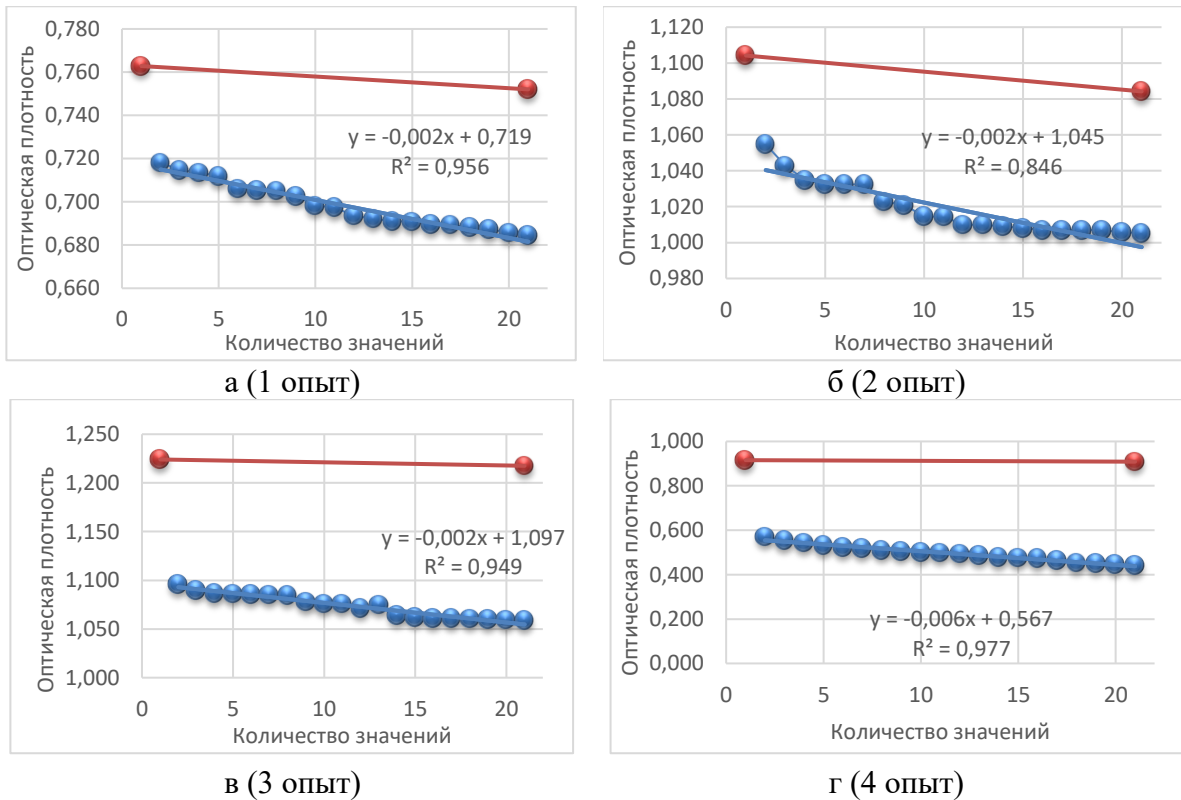


Рисунок 1 – Графики снижения абсорбции исследуемых образцов
 Источник данных: собственная разработка.

На рисунке 1 приведены результаты анализа полученных данных, где наиболее приближенные к действительности значения активности лизоцима получены при температуре 37°C, и составляют 0,977. Корректность полученных значений в 4 опыте отображается линейностью графика (Рисунок 1, г). Полученная активность в 4 опыте – 8 239 000 Ед.акт/мг (FIP) является наиболее приближенным значением заявленной активности стандартного препарата лизоцима – 9 000 000 Ед.акт/мг (FIP). Разница в значении обусловлена погрешностью измерения, сроком годности стандартного лизоцима, особенностями используемой тест-культуры *M. lysodeikticus*.

Закключение. В результате анализа методической и научно-технической литературы определения активности лизоцима установлено, что наиболее приемлемым является микробиологический метод, основой которого является определение скорости снижения абсорбции, которая обусловлена лизисом клеток *M. lysodeikticus* препаратами лизоцима. Для этого проводится спектрофотометрическое определение изменения оптической плотности бактериальной суспензии при определённой длине волны.

В результате отработки режимных параметров определения активности лизоцима исследовались следующие параметры методики: пробоподготовка раствора субстрата (тест-культуры *M. lysodeikticus*); нулевая точка измерения: обнуление спектрофотометра (дистиллированная вода, раствор буферных солей, воздух); температура образца и окружающей среды при проведении измерений.

В ходе исследования и отработки режимных параметров определения активности лизоцима, установили основные метрологические характеристики методики выполнения измерений.

Таким образом, для определения активности лизоцима необходимо соблюдать следующие режимные параметры методики: инкубация тест-культуры в течении 30 мин при 37°C, обнуление спектрофотометра против дистиллированной воды, измерение проводить при температуре образца 37°C.

Список использованных источников

1. Богданова Л. Л., Фролов И. Б. Изучение эффективности использования антимикробных и фунгицидных препаратов в сыроделии. Актуальные вопросы переработки мясного и молочного сырья. 2014;1(9). – С. 77–82.
1. Bogdanova L. L., Frolov I. B. Izuchenie effektivnosti ispol'zovaniya antimikrobnih i fungicidnyh preparatov v syrodellii. Aktual'nye voprosy pererabotki myasnogo i molochnogo syr'ya . [Study of the effectiveness of using antimicrobial and fungicidal preparations in cheese making. Current issues of processing meat and dairy raw materials] 2014;1(9). – S. 77–82.
2. Снеговая, Н. В. Качество продукции. Анаэробные бактерии – угроза в вакууме / Н. В. Снеговая // Пищевая индустрия. – №4. – 2018. – С. 36–37
2. Snegovaya, N. V. Kachestvo produktsii. Anaerobnye bakterii – ugroza v vakuume [Product Quality: Anaerobic Bacteria - A Threat in a Vacuum] / N. V. Snegovaya // Pishchевaya industriya. – №4. – 2018. – S. 36–37
3. Ying Zhu, Zetang Wu, Shang-Tian Yang. Butyric acid production from acid hydrolysate of corn fibre by *Clostridium tyrobutyricum* in a fibrous-bed bioreactor // Process Biochemistry. – 2002. – №38. – P. 657–666.
4. Zigova J. and Sturdõk E. Advances in biotechnological production of butyric acid // Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. – 2000. – №24. – P. 153–160.
5. Сушкова, В. И. Пути интенсификации процесса биосинтеза масляной кислоты / В. И. Сушкова [и др.]. // Химия растительного сырья. – №1. – 2012. – С. 171–180.
5. Sushkova, V. I. Puti intensivatsii processa biosinteza maslyanoj kisloty [Ways to intensify the process of butyric acid biosynthesis] / V. I. Sushkova [i dr.]. // Himiya rastitel'nogo syr'ya. – №1. – 2012. – S. 171–180.
6. Гудков, А. В. Сыроделие: технологические, биологические и физико-химические аспекты. – Москва, 2004. – С. 523–543.
6. Gudkov, A. V. Syrodellie: tekhnologicheskie, biologicheskie i fiziko-himicheskie aspekty [Cheese making: technological, biological and physicochemical aspects]. – Moskva, 2004. – S. 523–543.
7. Червоткина Д. Р., Борисова А. В. Антимикробные препараты природного происхождения: обзор свойств и перспективы применения // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2022. Т. 12. N 2. – С. 254–267.
7. Chervotkina D. R., Borisova A. V. Antimikrobnые preparaty prirodного proiskhozhdeniya: obzor svoystv i perspektivy primeneniya [Antimicrobial drugs of natural origin: review of properties and application prospects] // Izvestiya vuzov. Prikladnaya himiya i biotekhnologiya. 2022. T. 12. N 2. S. 254–267.
8. Богданова Л. Л., Ковалева В. В., Белокобылова А. Д. Исследование возможности использования лизоцима микробного происхождения при изготовлении сыров. Анализ современного рынка препаратов лизоцима // Актуальные вопросы переработки мясного и молочного сырья: сб. науч. тр. / РУП «Институт мясо-молочной промышленности»; редкол.: Г. В. Гусаков (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2023. – Вып. 17. – С. 220–225.
8. Bogdanova L. L., Kovaleva V. V., Belokobylova A. D. Issledovanie vozmozhnosti ispol'zovaniya lizocima mikrobnого proiskhozhdeniya pri izgotovlenii syrov. Analiz sovremennogo rynka preparatov lizocima [Study of the possibility of using lysozyme of microbial origin in cheese production. Analysis of the current market of lysozyme preparations] // Aktual'nye voprosy pererabotki myasnogo i molochnogo syr'ya: sb. nauch. tr. / RUP «Institut myaso-molochnoj promyshlennosti»; redkol.: G. V. Gusakov (gl. red.) [i dr.]. – Minsk, 2023. – Vyp. 17. – S. 220–225.
9. Пат. 2294373С2 Российская Федерация, МПК
9. Pat. 2294373С2 Rossijskaya Federaciya, MPK

C12Q 1/02, G01N 33/48. Способ определения лизоцимной активности биологических объектов / заявитель(и) Соловых Г.Н. [и др.]; патентообладатель(и) ГОУ высш. проф. обр. «Оренбургская госуд. мед. акад.» МЗРФ. – № 2005103265/13; заяв. 08.02.2005; опубл. 27.02.2007, Бюл. №6. – 9 с.

10. Марьянская И. В. Автоматизированный микрометод определения лизоцимной активности. Клиническая лабораторная диагностика. 1995; 4: 31-33.

11. Матолыгина, Д. А. Определение активности и измерение сорбции бактериолитического фермента в системе живых клеток *Lactobacillus plantarum* / Д.А. Матолыгина, Е.Э. Осипова, С.А. Смирнов [и др.] // ВЕСТН. МОСК. УН-ТА. СЕР. 2. ХИМИЯ. – 2015. – № 6. – С. 365–371.

12. Овсянников В. Г., Торопкина Ю. Е., Краскевич В. В., Алексеев В. В., Бойченко А. Е., Алексеева Н. С., Краскевич Д. А. Лизоцим – грани возможного // Современные проблемы науки и образования. – 2020. – №3.

13. Подборонов В. М., Щелканов М. Ю., Смирнова И. П., Буренкова Л. А., Новикова В. П., Аристова В. А., Новикова Е. Л., Москвитина Г. Г., Иоффе А. М. Бактерицидное действие лизоцима. Антибиотики и Химиотерапия. – 2013. – С. 22–24.

14. Иммунология, Аллергология, Инфектология. – 2018. – №1. – С. 34–41.

C12Q 1/02, G01N 33/48. Sposob opredeleniya lizocimnoj aktivnosti biologicheskikh ob"ektov [Method for determining lysozyme activity of biological objects] / zayavitel'(i) Solovyh G.N. [i dr.]; patentoobladatel'(i) GOU vyssh. prof. obr. «Orenburgskaya gosud. med. akad.» MZRF. - № 2005103265/13; zayav. 08.02.2005; opubl. 27.02.2007, Byul. №6. – 9 s.

10. Mar'yanskaya I. V. Avtomatizirovannyj mikrometod opredeleniya lizocimnoj aktivnosti [Automated micromethod for determination of lysozyme activity]. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.

11. Matolygina, D. A. Opredelenie aktivnosti i izmerenie sorbcii bakterioliticheskogo fermenta v sisteme zhivykh kletok *Lactobacillus plantarum* [Determination of activity and measurement of sorption of bacteriolytic enzyme in the living cell system of *Lactobacillus plantarum*] / D.A. Matolygina, E.E. Osipova, S.A. Smirnov [i dr.] // VESTN. MOSK. UN-TA. SER. 2. HIMIYA. – 2015. – № 6. – S. 365–371.

12. Ovsyannikov V. G., Toropkina Yu. E., Kraskevich V. V., Alekseev V. V., Bojchenko A. E., Alekseeva N. S., Kraskevich D. A. Lizocim – grani vozmozhnogo [Lysozyme - the limits of the possible] // Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya. – 2020. – №3.

13. Podboronov V. M., Shchelkanov M. Yu., Smirnova I. P., Burenkova L. A., Novikova V. P., Aristova V. A., Novikova E. L., Moskvitina G. G., Ioffe A. M. Baktericidnoe dejstvie lizocima. Antibiotiki i Himioterapiya [Bactericidal action of lysozyme. Antibiotics and Chemotherapy]. – 2013. – S. 22–24.

14. Immunologiya, Allergologiya, Infektologiya [Immunology, Allergology, Infectology]. – 2018. – №1. – S. 34–41.