

На правах рукописи

Горбунков Михаил Владимирович

**Физико-химические свойства протеолитического комплекса и
применение ферментного препарата «Протепсин» для обработки
сырья животного происхождения**

05.18.07 – Биотехнология пищевых продуктов
и биологических активных веществ

05.18.04 – Технология мясных, молочных и рыбных
продуктов и холодильных производств

Автореферат
диссертации на соискание ученой
степени кандидата технических наук

Воронеж
2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном
образовательном учреждении высшего образования
«Воронежский государственный университет инженерных технологий»

Научный руководитель: доктор технических наук, профессор,
Заслуженный деятель науки РФ
Антипова Людмила Васильевна (ФГБОУ ВО
«Воронежский государственный университет
инженерных технологий»)

Официальные оппоненты: Глотова Ирина Анатольевна,
доктор технических наук, профессор,
ФГБОУ ВО «Воронежский государственный аграрный
университет им. императора Петра I», кафедра
«Технологии переработки животноводческой
продукции», заведующий кафедрой

Оботурова Наталья Павловна,
кандидат технических наук, доцент,
ФГАОУ ВПО «Северо-Кавказский федеральный
университет», кафедра «Технологии мяса и
консервирования», заведующий кафедрой

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Орловский государственный
аграрный университет», г. Орел

Защита состоится 5 июля 2016 года в 13.00 часов на заседании совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 212.035.04 при ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий» (ФГБОУ ВО «ВГУИТ») по адресу: 394036, г. Воронеж, пр-т Революции, 19, конференц-зал.

Отзывы на автореферат (в двух экземплярах), заверенные гербовой печатью учреждения, просим направлять ученому секретарю совета Д 212.035.04.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО «ВГУИТ». Полный текст диссертации размещен в сети «Интернет» на официальном сайте ФГБОУ ВО «ВГУИТ» www.vsuet.ru «25» февраля 2016 г.

Автореферат размещен в сети «Интернет» на официальном сайте Министерства образования и науки РФ по адресу: vak3.ed.gov.ru и на официальном сайте ФГБОУ ВО «ВГУИТ» www.vsuet.ru «5» мая 2016 г.

Автореферат разослан 18 мая 2016 г.

Ученый секретарь по защите диссертаций
на соискание ученой степени кандидата наук,
на соискание доктора наук



М.Е. Успенская

Общая характеристика работы

Актуальность темы диссертационного исследования. Современные тенденции развития пищевых и перерабатывающих отраслей АПК связаны с биотехнологией в соответствии с принятой в 2013 году программой мероприятий, намеченных к выполнению в государственном масштабе до 2020 года.

Отставание России по производству продуктов биотехнологии побудило ученых и специалистов к разработке отечественных объектов и технологий, конкурентоспособных на внешнем и внутреннем рынках. Ферментные технологии играют весьма значительную роль в разработке инновационных технических решений, позволяющих поднять уровень производства, создать стабильную ресурсную базу для производства высококачественного сырья и продуктов перерабатывающих отраслей АПК, увеличить объемы необходимых продуктов в структуре питания человека, разнообразить их ассортимент, рекомендовать современные и новые источники и формы полноценной пищи, интенсифицировать технологические процессы, снизить экологическую напряженность окружающей среды.

Производство сырья и продуктов животного происхождения имеет первостепенное значение в виду их необходимости использования в рационах человека для поддержания здоровья и воспроизводства, умственной и метаболической активности, пластических функций организма. Высокая рентабельность и значение в структуре питания выделяют эту группу продовольствия как наиболее важную, экономическое и социальное значение которой трудно переоценить.

Однако, известный дефицит этого сырья и продуктов привел Россию к импортозависимости, а слабое внедрение биотехнологий ограничивает возможность развития собственных резервов для поступательного развития соответствующих отраслей.

Степень разработанности темы. Отечественными и зарубежными учеными и специалистами (Антипова Л.В., Глотова И.А., Кудряшов Л.С., Боресков В.Г., Алексахина В.А., Забашта А.Г., Рогов И.А., Лисицын А.Б., Крылова В.Б., Битцева Э.Б., Абдулов А.И., Shahidi F., Whitehurst R., Fallah M., Amos J., Sivakumar V. и др.) показаны широкие и реальные возможности ферментных технологий для увеличения сырьевого потенциала, экономного расходования сырья, разработки новых ассортиментных линеек оригинальных и нетрадиционных продуктов питания, обеспечивающих физиологические потребности человека. Однако реальное использование сопряжено с необходимостью исследования свойств ферментов и их комплексов.

На отечественном рынке ферментных препаратов появился препарат «Протепсин», производимый на базе ЗАО «Завод эндокринных ферментов» (п. Ржавки, Московской области), который рекомендуется фирмой-производителем и поставщиками для обработки мясного сырья. Для

устойчивого коммерческого интереса со стороны предприятий-потребителей и расширения областей применения требуется углубленное изучение физико-химических, биокаталитических и структурных особенностей ферментов препарата с обоснованием инновационных конкурентоспособных технологий возможного применения.

Цель диссертационного исследования состоит в развитии ферментных технологий обработки низкосортного и маловостребованного сырья животного происхождения для увеличения ресурсного потенциала пищевых продуктов и интенсификации технологических процессов.

В рамках поставленной цели решались подчиненные ей задачи:

- идентифицировать протеолитические ферменты в составе комплекса препарата «Протепсин»;

- исследовать области активности и стабильности протеолитических ферментов;

- определить молекулярную массу, аминокислотный состав и функциональные особенности протеолитических фракций комплекса;

- установить функциональные группы каталитического центра и специфичность действия при гидролизе белков и пептидов;

- проанализировать действие препарата «Протепсин» на мясные системы;

- исследовать действие препарата «Протепсин» на белки молока;

- обосновать направления применения препарата и условия ферментных технологий обработки мясных ресурсов;

- исследовать возможность использования ферментного препарата «Протепсин» при обработке молочного сырья;

- провести опытную и производственную апробацию ферментных технологий, разработать техническую документацию и оценить и оценить экономическую целесообразность технических решений.

Научная новизна. Впервые установлен фракционный состав протеолитического комплекса препарата «Протепсин», идентифицировано методами электрофореза и хроматографии два протеолитических фермента, отличающиеся физико-химическими и биохимическими свойствами. Кинетика термической и кислотной инактивации ферментов описывается уравнением реакции первого порядка и указывает на область стабильности ферментов в области кислых значений рН (3,0-5,5) и температурах 40-55°C. Электрофоретически и хроматографически доказано, что ферменты отличаются подвижностью в электрическом поле, величиной поверхностного заряда, молекулярной массой (71800-протеиназа I и 34500 – протеиназа II). Общая протеолитическая активность характерна для обоих ферментов, но молокосвертывающую активность проявляет лишь протеиназа II. Применение независимых критериев оценки (расчет теплот ионизации для «кислой» и «щелочной» ветви кривой $A=f(pH)$, фотоокисление, действие ионов металлов и т.д.) позволило выявить, что в активный центр ферментов входят несколько карбоксильных групп и, возможно, ароматический радикал

аминокислоты. Протеиназы проявляют субстратную специфичность при гидролизе белков и пептидов, преимущественно разрывая связи, образованные гидрофобными и ароматическими радикалами. Состав аминокислот в структуре белков-ферментов представлен значительной долей гидрофобных аминокислот (около 50 % всех остатков), преобладают количественно глутаминовая и аспарагиновая аминокислоты, что соответственно подчеркивает роль гидрофобных взаимодействий в стабилизации пространственной структуры и объясняет область биохимической активности в кислой зоне рН.

Препарат «Протепсин» универсален по действию на мясные и молочные белки, гидролизует мышечные и соединительнотканые белки. Проявляет широкую специфичность при гидролизе казеина молока.

Физико-химические и биокаталитические свойства протеолитических ферментов препарата обосновывают рациональные пути привлечения малоиспользуемого мясного и молочного сырья для увеличения ресурсного потенциала пищевых продуктов и интенсификации технологических процессов.

Теоретическая и практическая значимость. Теоретические положения и научные результаты значительно расширяют знания в области прикладной энзимологии, которые внедрены в практику научных исследований и образовательную деятельность при подготовке кадров соответствующего уровня (бакалавры, магистры) по направлению «Промышленная экология и биотехнологии».

Обоснованы, апробированы и рекомендованы ферментные технологии обработки сырья животного происхождения для увеличения ресурсного потенциала пищевых продуктов за счет вовлечения в рецептурные решения мясного сырья с высокой массовой долей соединительнотканых включений (10-100%). Сформированы подходы к выбору объектов для внедрения ферментных технологий, разработаны условия, параметры и режимы реализации частных технологий.

Практическая значимость состоит также в обосновании и внедрении новых технических решений по использованию ферментных технологий в мясной и молочной отраслях за счет имеющихся внутрипроизводственных резервов и их глубокой переработки.

Предлагаемые технические решения находятся в стадии НИОКР или внедрены в реальное производство на ряде предприятий мясной отрасли.

Новизна технических решений подтверждена заявками на патенты РФ (заявка №201514756/13(073256); №2015147566/13(073255)), и их значимость – результатами апробаций и внедрением в реальное производство с доказательством экономической целесообразности.

Методология и методы исследования. Методологической основой диссертационного исследования является обобщение информации и системный анализ опыта разработки и применения ферментных технологий в мясной и молочной отраслях АПК, составление схемы экспериментальных

исследований на принципах причинно-следственных связей и логики в развитии этапов с применением современных методов анализа, включая инструментальные и специальные: 1. Обоснование выбора основного объекта – ферментного препарата «Протепсин» отечественного производства протеолитического действия; 2. Идентификация ферментов протеолитического комплекса, исследование физико-химических и биокаталитических свойств, структурных особенностей; 3. Оценка действия ферментов препарата на белки мяса и молока на реальных субстратах; 4. Обоснование направлений и реальное использование ферментных технологий для увеличения ресурсного потенциала, расширения ассортимента и интенсификации производства продуктов на частных примерах.

Научные положения, выносимые на защиту:

- состав протеолитического комплекса препарата «Протепсин» и физико-химическая характеристика входящих ферментов;
- биокаталитические особенности и субстратная специфичность ферментов протеолитического комплекса при действии на белки и пептиды;
- ферментные технологии обработки мясного и молочного сырья;
- ассортиментные линейки пищевых продуктов с использованием маловостребованного мясного сырья при интенсификации технологических процессов.

Степень достоверности. Достоверность полученных в диссертации результатов подтверждается: 1) уровнем экспериментальных исследований с использованием современных методов исследований и приборно-измерительной техники; 2) использованием классических законов естественных наук и применением методов математической статистики при обработке экспериментальных данных; 3) воспроизводимостью и адекватностью теоретических и экспериментальных результатов; 4) широкой апробацией результатов в реальном производстве и научной общественности.

Апробация результатов: основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на международном, российском и региональном уровнях, в том числе на внутривузовских отчетных конференциях ВГУИТ в период 2013-2016 гг.: X Всероссийской конференции с международным участием «Актуальные проблемы химии, биологии и биотехнологии (2016)»; VIII Международном научно-практическом симпозиуме «Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов»; Международной научно-технической конференции «Инновационное развитие техники пищевых технологий» (Воронеж, ВГУИТ, 2015); конференции «Системный анализ и моделирование процессов управления качеством в инновационном развитии агропромышленного комплекса» (Воронеж, ВГУИТ, 2015); Международной научно-технической конференции «Продовольственная безопасность: научное, кадровое и информационное обеспечение» (Воронеж, ВГУИТ, 2015 г.) и выставочных центрах (Экспоцент, Международный конкурс в

номинации «Лучшие добавки и ингредиенты для агропромышленного комплекса», Агропродмаш, октябрь 2010, 2012, 2013 г.).

Результаты отмечены сертификатами участника, дипломами и медалями выставочных центров.

Соответствие диссертации паспортам научных специальностей:

Диссертационное исследование соответствует паспортам научных специальностей: 05.18.07 – Биотехнология пищевых продуктов и биологических активных веществ (п.1, 4, 5) и 05.18.04 – Технология мясных, молочных и рыбных продуктов и холодильных производств (п.1,4,6,7).

Публикации результатов работы:

По материалам выполненных исследований опубликовано 13 научных работ, в то числе 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, заявок на патенты РФ – 2.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, 5-ти основных глав, заключения, выводов, списка использованных источников литературы и приложений. Работа изложена на 168 страницах машинописного текста и иллюстрирована 12 таблицами, 34 рисунками и содержит 2 приложения. Список используемых источников включает 153 наименований, в том числе 38 зарубежных.

Основное содержание работы

Во введении освещена актуальность темы, степень ее разработанности сформулированы цель и задачи диссертационного исследования, научная новизна и перспективность избранного направления, ее значимость для развития отраслей экономики, положения выносимые на защиту, степень достоверности и апробации результатов.

Глава I. Литературный обзор. Глава посвящена обзору мясного рынка, опыту производства ферментов, созданию и распространению ферментных технологий, перспективам их применения в реальных секторах экономики, значению в увеличении ресурсного потенциала пищевых продуктов животного происхождения, интенсификации технологических процессов.

Глава II. Условия, объекты и методы экспериментальных исследований. В соответствии с целью и задачами диссертации в качестве основного объекта исследования избран ферментный препарат «Протеписин», производимый по ТУ 9219-005-427-89257 на базе ЗАО «Завод эндокринных ферментов» (Россия, Московская область, п. Ржавки). В ходе экспериментальных исследований также использовались: говядина по ГОСТ Р 54315 в охлажденном и замороженном состоянии, измельченное мясное сырье, шкурка свиная, субпродукты I и II категории, полуфабрикаты а также готовые к употреблению мясные продукты: целномышечные, вареные колбасы, полукопченые и варено-копченые колбасы, оригинальные продукты). Экспериментальные исследования выполнены по схеме, представленной на рис. 1.

Опыты проводились на базе НИЛ ВГУИТ, а также лабораторий промышленных предприятий и в реальных условиях производства. При выполнении экспериментов применяли современные методы анализа, позволяющие получить комплексную информацию о свойствах ферментного препарата, его действии на мясные и молочные системы, возможностях использования ферментных технологий для увеличения ресурсного потенциала мясного и молочного производства пищевых продуктов, в том числе: протеолитическую активность – методом Ансона, молокосвертывающую – методом ВНИИМС, пептидазную активность по методу Мура и Стейна, общий белок – фотометрически и методом Кьельдаля, фракционный состав продуктов гидролиза казеина – методом ступенчатого осаждения; аминокислотный состав белков – хроматографически на аминокислотном анализаторе ААА – 881, фракционный состав растворимых белков – последовательным осаждением растворами солей, щелочей и дистиллированной водой; фракционирование и идентификацию протеолитических ферментов – электрофорезом на ДЭАЭ – целлюлозе, фильтрацией на сефадексе G – 100; микроструктуру – по ГОСТ Р50372-92; перевариваемость *in vitro* – методом Покровского-Етранова; функционально-технологических свойств – по методам, описанным в книге Л.В. Антиповой (2004); цветовые характеристики – спектрофотометрически; показатели качества готовых изделий – в соответствии с действующей технической документацией; обработку результатов – статистическими методами.



Рис. 1 Схема экспериментальных исследований

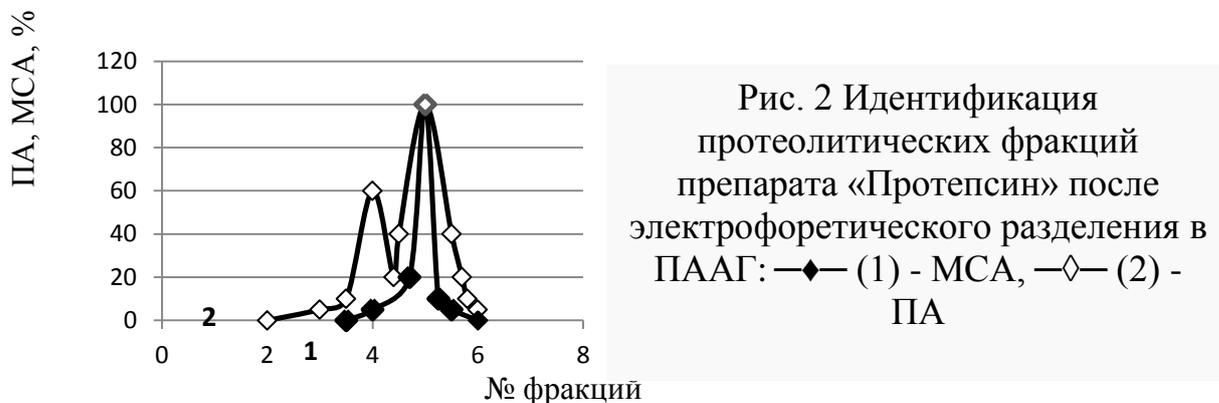
Основные результаты работы

Глава III. Физико-химические и биокаталитические свойства ферментного препарата «Протепсин». Препарат подвергли электрофоретическим и хроматографическим исследованиям для идентификации протеолитических фракций в составе комплекса ферментов, в том числе обладающих молокосвертывающей активностью.

Установлено, что белковый комплекс препарата представлен четырьмя белковыми фракциями, отличающимися подвижностью в среде ПААГ. Идентификация протеолитических ферментов в геле и экстрагированием из

геля показала, что в составе белков препарата имеется две протеолитические фракции.

В ходе экспериментальных исследований показано, что общая протеолитическая активность (ПА) сосредоточена в 2-х фракциях. На рисунке 2 видно, что молокозвертывающей активностью обладает лишь один фермент протеолитического комплекса.



Препарат подвергли фракционированию на ДЭАЭ – целлюлозе. Результаты приведены на рисунке 3. Которые также подтверждают, что в белковом составе препарата «Протепсин» проявляются две протеолитические фракции, одна из которых обладает МСА.

Разделение и сбор фракций с протеолитической активностью по молекулярной массе проводили с использованием сефадекса G – 100.

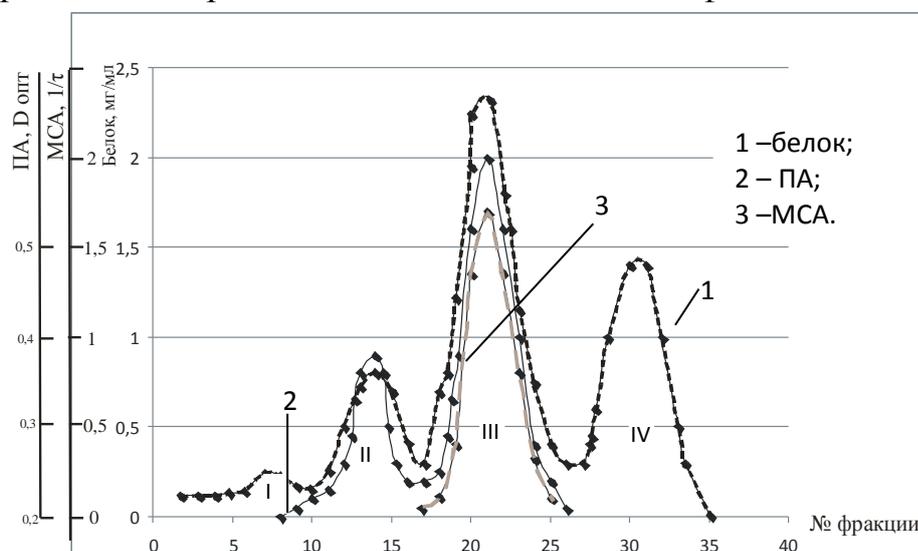


Рис. 3 Хроматография белков препарата «Протепсин» ДЭАЭ –целлюлозе

Фракции протеолитического комплекса объединяли, накапливали количественно и использовали в дальнейших исследованиях. Гомогенность протеолитических фракций доказана электрофоретически.

Основными факторами управления биохимическими процессами в пищевом сырье и продуктах выступают рН и температура. При определении диапазонов рН и температуры действия ферментов нами введены условные обозначения: фракция №2 на электрофореграмме (рис. 3) названа нами

протеиназа I, а №3 – протеиназа II. Частные значения рН стандартного субстрата поддерживали с помощью 0,1 М универсального буфера К 2 мл 2%-ного раствора субстрата добавляли по 2 мл растворов гомогенных фракций протеолитического комплекса с содержанием белка 600 мкг/мл. Гидролиз вели при температуре 35°C в течение 30 мин. Результаты определения активности в каждой пробе представлены в виде графической зависимости $A=f(pH)$ (рис. 4).

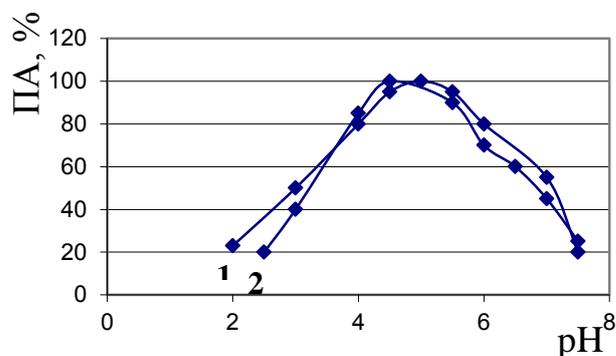


Рис. 4 Влияние рН на активность ферментов протеолитического комплекса препарата «Протепсин»: 1 – ПА II, 2 – ПА I

Ферменты достоверно различаются рН – оптимумами, при этом протеиназа I имеет максимальное значение активности при рН 4,0-4,5, а протеиназа II – при рН 4,5-5,0.

Аналогичные исследования проводили при воздействии температуры. Температуру поддерживали с помощью водяного термостата в диапазоне 20-70°C. Результаты определения ПА в каждом опыте представлены на рис. 5

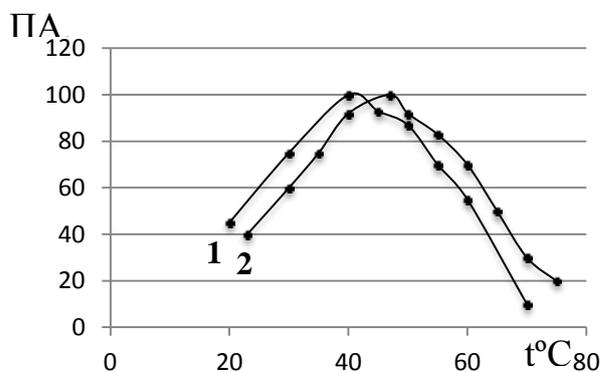


Рис. 5 Влияние температуры на активность протеолитических ферментов препарата «Протепсин»: 1 – ПА II, 2 – ПА I

Как видно на рисунке 5, оба фермента имеют температурный оптимум действия, характерный для ферментов животного происхождения, при этом протеиназа I наиболее активна при температуре 45°C, а протеиназа II – при 40°C. Для ферментных препаратов, работающих в пищевых системах, весьма важна информация о пределах активности и кинетике инактивации под воздействием рН и температуры, так как активные протеолитические ферменты в процессе пищеварения могут вызывать нарушения целостности тканей и соответственные заболевания.

Кислотную инактивацию ферментов препарата «Протепсин» изучали в интервале рН 2,0-7,0 в фосфатно-цитратном буфере с ионной силой 0,05. Во всех случаях использовали одну и ту же концентрацию ферментов: 600 мкг/мл для ПА и 3 мкг/мл – для МСА. Среда инкубировали при температуре

30°C и через определенные промежутки времени (20-30 минут) определяли ПА и МСА в каждой пробе.

Установлено, что наибольшая стабильность отмечалась при рН 4,5-5,0 для протеиназы II и при рН 4,0-4,5 – протеиназы I. Ферменты значительно теряли активность в слабокислой и около нейтральной средах. Инактивация по ПА и МСА практически совпадает, что доказывает, что это один и тот же фермент.

Влияние температуры на скорость химических реакций описывается уравнением Аррениуса, его применение к ферментам препарата «Протепсин» показало, что график инактивации (зависимость Аррениуса) $lgK = f \frac{1}{T}$ отклоняется от прямой с наклоном, имеет характерный излом, образованный двумя пересекающимися прямыми, одна соответствует температурам 30-45°C, а другая 45-70°C, что указывает температуру начала денатурации ферментов. Экспериментально установлено, что при температуре 72°C ферменты полностью теряют активность за 5-6 минут, а при 70°C - за 12 минут. Полученные результаты имеют практическое значение, так как указывают на условия полной инактивации, необходимой при производстве пищевых продуктов.

Применение нескольких независимых методов электрофоретического определения молекулярной массы позволили установить значения для ферментов протеолитического комплекса препарата: протеиназа I (ПА) – 71800; протеиназа II (ПА+МСА) – 34500. Полученные результаты вполне согласуются с литературными данными. При этом молокосвертывающая протеиназа особенно близка к пепсину животных.

Анализ состава аминокислот показал, что белки-ферменты содержат в своем составе около 50% гидрофобных аминокислот и преобладающую долю остатков глутаминовой и аспарагиновой аминокислот, что соответственно указывает на значительную роль гидрофобных взаимодействий в стабилизации пространственной структуры и объясняет активность ферментов в кислой зоне рН.

Для идентификации функциональных групп в активном центре ферментов необходимо совпадение нескольких независимых экспериментальных критериев. Широко для этой цели используется исследование кривых рН – активность и расчет теплот ионизации.

Результаты графо-аналитических расчетов представлены в таблице 1

Таблица 1 – Величины рК и ΔH функциональных групп протеиназы II, участвующих в акте катализа

Ветви кривой	рК при температуре, °С		ΔH , кДж моль ⁻¹
	20	45	
“Кислая”	1,68	1,82	9,7
“Щелочная”	3,96	3,76	12,1

Малые величины ΔH свидетельствуют о присутствии в активном центре карбоксильной группы, теплота ионизации которой наименьшая из всех теплот ионизации ионогенных групп, входящих в белки. Она равна $6,3 \text{ кДж моль}^{-1}$.

Близкие значения теплот ионизации для обеих ветвей кривой рН-активность говорят о возможном наличии в каталитическом центре фермента не одной карбоксильной группы, а нескольких. Нами проведены исследования функциональных групп каталитического центра и другими методами. Опыты по фотоокислению, блокировка функциональных групп каталитического центра специфическими химическими реагентами (ЭДТА, 8-оксихинолин монойодуксусная кислота, п-хлормеркурий-бензоат, глутатион, цистеин, семикарбозит, тиодипропиновая кислота, тиосульфатнатрия, металлический йод, перманганат калия) показали, что молокосвертывающая протеиназа не содержит в активном центре SH-групп, не относится к сериновым или маллоферментам. Резкое снижение активности в среде йода и перманганата калия указывает на существенную роль тирозина или триптофана в акте катализе. Двухвалентные металлы (Ba, Zn, Cd, Hg, Mg, Pb, Mn, Cu, Co, Ni, Ca) не оказывали никакого влияния на уровень активации фермента, лишь ионы Fe^{3+} оказывали ингибирующий эффект (более 60%), что дополнительно указывает на наличие нескольких карбоксильных групп в активном центре фермента.

При определении субстратной специфичности использовали графоаналитический метод Лайнцивера-Бэрка для определения численного значения константы Михаэлиса-Ментен. При гидролизе белков установлено, что протеиназа II препарата «Протепсин» проявляет активность в ряду: солерастворимая фракция белков мяса \leq водорастворимая фракция белков мяса $<$ казеинат натрия $<$ коллаген, что обосновывает пути рационального использования препарата, включая обработку коллагенсодержащего сырья.

Лучшими субстратами были альбумин, гемоглобин, казеин. Максимальная степень гидролиза гемоглобина – 65-68%. Близкие результаты дал гидролиз альбумина. Степень гидролиза была на 5-8% больше по сравнению с гидролизом гемоглобина. Казеин занимал среднее положение между гемоглобином и желатиной. Степень его гидролиза была равна 50-55%.

Анализ специфичности протеиназы II при действии на белки показал, что они неравноценны с точки зрения разрыва пептидных связей. Однако проверка субстратной специфичности на белках затрудняет решение вопроса о разрыве каких-либо определенных связей. С этой точки зрения более приемлемыми субстратами являются синтетические пептиды.

В опытах использовали синтетические субстраты: DL – α – аланин – DL – аспарагин, DL – аланил-метионин. DL – α – аланил-триптофан, аланил-глицил-глицин, глицил – DL – β – финилаланил, бензоил – β – аланин (рис.6).

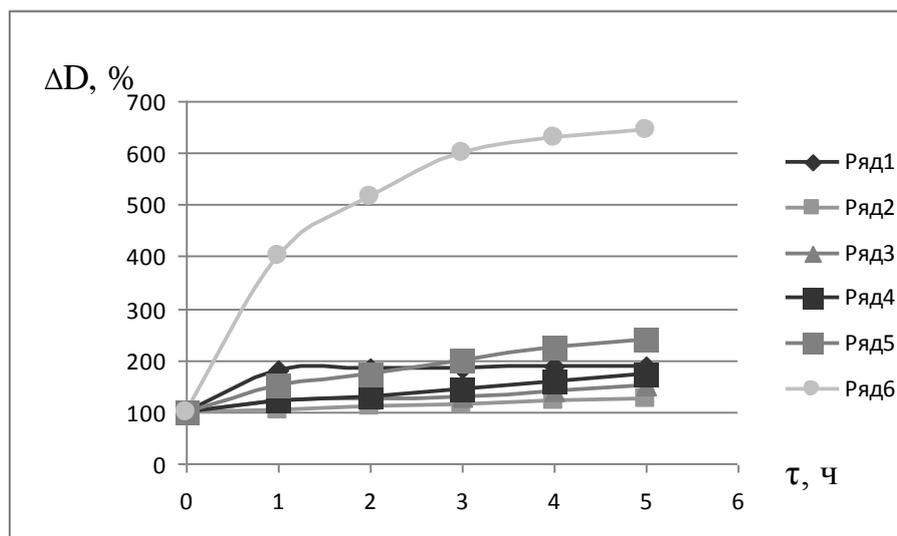


Рисунок 6 – Гидролиз синтетических пептидов протеиназой II препарата «Протепсин»: 1 – ала-асп; 2 – ала-мет; 3 – гли-фе; 4 – ала-три; 5 – ала-гли-гли; 6 – бенз-ала; ось ординат – изменение оптической плотности в % к контрольной

Такая специфичность действия исследуемого фермента была сходна с пепсиновой группой известных карбоксильных протеолитических ферментов.

Глава IV. Влияние препарата «Протепсин» на свойства мясного и молочного сырья. Углубленное изучение физико-химических и биокаталитических свойств препарата «Протепсин» указывает на перспективность при обработке белковых субстратов животного происхождения. Однако, учитывая гетерогенность и сложность строения животных белков, на следующем этапе исследовали действия ферментного препарата на реальные мясные субстраты, включая с высокой долей соединительнотканых белков, а также молочные среды.

В качестве сырья использовали говядину I, II сортов, свиную шкуру, субпродукты, мясные фарши.

Методами микроструктурного анализа подтверждено действие препарата на морфологические структуры ткани, в том числе на соединительнотканые. Установлено, что ферментный препарат «Протепсин» усиливает действие лизосомных ферментов, что позволяет закончить посол и созревание за 6-8 часов, что в 1,8-2,5 раза быстрее, чем при традиционном посоле.

В опытах на цельномышечных и фаршевых мясных системах показана одинаковая тенденция к увеличению функционально-технологических свойств, независимо от доли соединительных включений.

Обобщение имеющихся и собственных результатов исследования позволяет логично заключить, что препарат весьма перспективен для обработки мясного сырья, так как он синергичен катепсином лизосом, физиологичен для человека, полностью инактивируется в диапазонах рН и

температуры при обработке мясного сырья в технологиях вареных, полукопченых и варено-копченых колбас, сосисок, сарделек, консервов, ливерных колбас и зельцев. С его применением может быть связано как ускорение процессов созревания и посола, а также смягчение, расширяющее области использования коллагенсодержащего сырья, включая получение эмульсий, пригодных для рецептурно-компонентных решений широкого ассортимента продуктов.

В ходе экспериментальных исследований, представленных в главе III, показано, что ферменты препарата «Протепсин» действуют непосредственно на белки, а затем проявляют и пептидазную активность и образуют аминокислоты - наиболее усвояемую форму человеком и микроорганизмами. В связи с этим представляло интерес оценить микробиологические характеристики в ходе созревания и посола. Актуальность исследований в этом направлении тесно связано с уровнем биобезопасности сырья, влияющего непосредственно на свойства готовых продуктов. Результаты проведенных экспериментов показали (рис.7), что ферментная обработка мясного сырья стимулирует рост числа микробных клеток, однако численные значения не выходят за рамки установленных требований, а после термической обработки в опытных образцах число вегетативных клеток оказалось ниже в 10 раз. Бактерии группы кишечной палочки в глубине продуктов не обнаружены. Полученные результаты свидетельствуют о безопасности принятых технологических режимов в получении благополучных по качеству мясных продуктов.

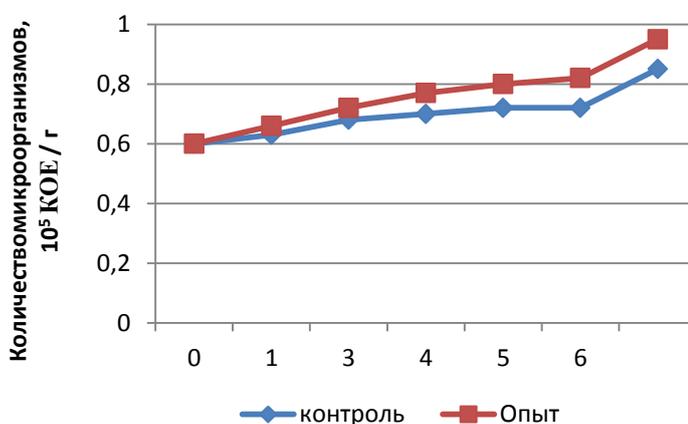


Рисунок 7 – Динамика общего числа микробных клеток

Для оценки цветности использовали спектрофотометрический метод, результаты определений показали (рис.8), что действие ферментов препарата минимально затрагивает структуру пигментов, а отклонения в цветности мясных систем находятся за пределами чувствительности глаза человека.

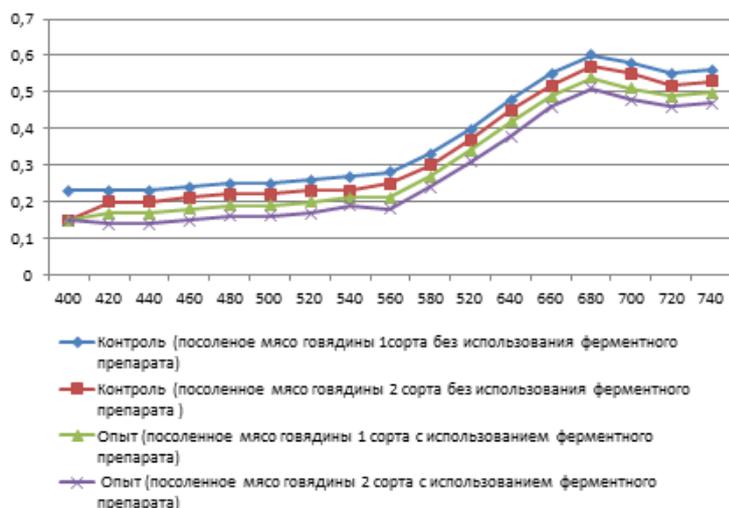


Рисунок 8 – Спектры отражения посоленного сыря

Коллаген-белок соединительной ткани, популярность которого возрастает с каждым годом из-за открытия новой его роли как пищевого волокна в питании. Однако нативный коллаген обладает низкой функциональностью в пищевых системах и требует предварительной обработки для увеличения объемов его использования. Поэтому управляемый гидролиз с получением продуктов заданного состава и уровня функционально-технологических свойств может увеличить его усвояемость с одновременным увеличением объемов его использования. Представляло интерес изучить изменение атакуемости гидролизованных белков мяса говядины I и II сорта под действием ферментных препаратов пищеварительного тракта в опытах *in vitro*. В ходе экспериментальных исследований установлено, что на первом этапе опытные образцы характеризовались высоким уровнем протеолиза под действием пепсина, на II этапе протеолиз был менее выражен количественно. В целом опытные образцы отличались лучшей перевариваемостью, а значит биологической ценностью.

Представляло интерес исследование действия препарата «Протепсин» на белки молока в сравнении с сычужным ферментом применительно к технологии сыров.

Как видно на рисунках 9, 10, 11 препараты практически идентично реагируют на внешние факторы при действии на молочные белки, что указывает на единую природу происхождения-животные организмы, условия нормального существования которых весьма близки, что поддерживается соответствующими ферментными системами. Препараты слабо проявляют коагулирующие свойства при pH, близких к нейтральному значению и весьма усиливаются при снижении pH (рис. 10). Температурные оптимумы связаны с физиологическими условиями существования животных организмов и находятся в интервале 40-50°C.

Учитывая чрезвычайно важную роль Ca^{2+} в механизме коагуляции белков молока, представляло интерес провести исследование влияния этих катионов на активность ферментов. При этом пользовались известной информацией Горбатовой К.К. о том, что в процессе свертывания казеина молока различают 3 стадии: первая (ферментативная) связана с протеолитическим воздействием ферментов на молекулу казеина; вторая представляет физико-химический процесс структурообразования, которая связана с возникновением кальциевых мостиков между мицеллами казеина; третья связана с медленным протеолизом компонентов казеина под действием протеаз. От содержания Ca^{2+} в молоке зависит скорость его свертывания и качество сгустка. Завершающая стадия определяет качество сгустка, хранимость и потребительские свойства продуктов.

Изменение общей протеолитической активности при pH 6,5 и МСА в зависимости от концентрации ионов Ca^{2+} , вносимых в молоко в виде CaCl_2 представлено на рисунке 11, на котором видно, что при концентрации ионов Ca^{2+} 0,1 г/л МСА обоих препаратов увеличивалась практически одинаково. Концентрация Ca^{2+} 0,2 г/л молока снижала МСА, однако в случае сычужного фермента это снижение происходило более плавно, дальнейшее увеличение в среде ионов кальция к изменению МСА не приводило в обоих случаях.

Иная картина отмечена при исследовании влияния ионов кальция на ПА обоих препаратов: активность с разной скоростью увеличивалась.

При исследовании влияния внешних факторов на уровень активности ПА и МСА соответственные субстраты нагревали до заданной температуры, а pH-с использованием HCl при контроле pH потенциометрически или приготовлением субстрата на фосфатном буфере соответствующего pH. Влияние температуры на МСА препарата «Протепсин» и сычужного фермента представлено на рисунке 10.

При оценке действия ферментов препарата на белки молока проводили сравнение с сычужным ферментом – известным молокосвертывающим ферментом в практике сыров и творога. Результаты исследования влияния pH, температуры и ионов Ca^{2+} показали, что ферменты препаратов практически идентично реагируют на внешние факторы, что указывает на единую природу их происхождения.

Несмотря на идентичность графиков, следует отметить более высокую чувствительность препарата сычужного фермента к ионам Ca^{2+} как в случае ПА, так и МСА.

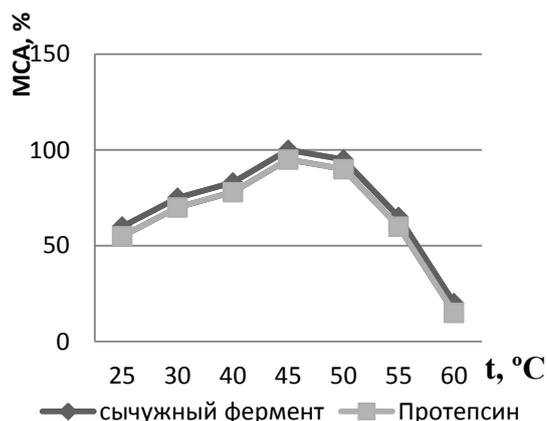


Рис. 9 Влияние температуры на МСА препаратов: сычужный фермент, «Протепсин»

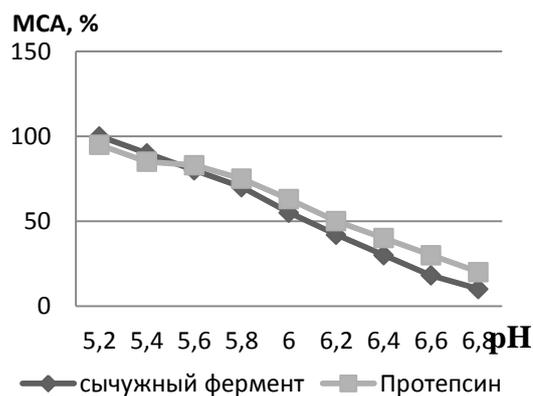


Рис. 10 Влияние pH на МСА препаратов: сычужный фермент, «Протепсин»

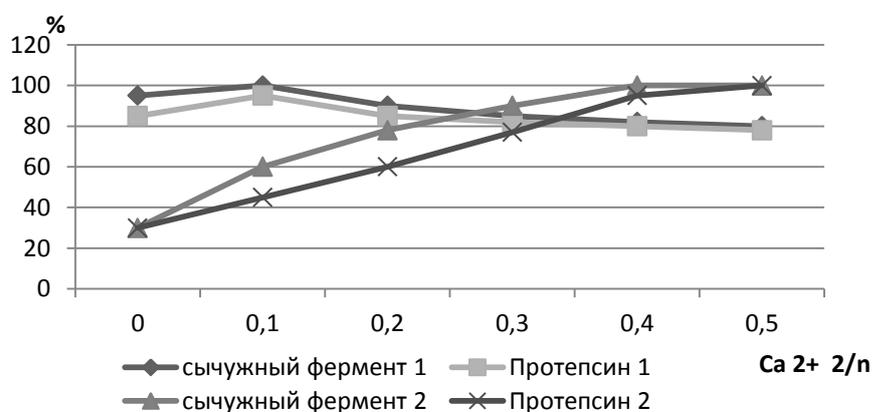


Рис. 11 Влияние Ca²⁺ на ПА и МСА ферментных препаратов

Расчет активных масс, обеспечивающих время свертывания молока за 10 минут при pH 5,5 и 6,5 и температуре 35°C показал, что «Протепсин» в 3,7 раза активнее разлагает казеин молока при pH 6,5 и в 4,1 раза при pH 5,5. Оценка суммарных продуктов гидролиза казеина свидетельствует о более широкой субстратной специфичности препарата «Протепсин», так как гидролизаты обогащены пептидами и аминокислотами. Следует отметить, что в гидролизатах обоих препаратов преобладают фенилаланин, валин, глютаминовая кислота, что указывает на некоторую их общность в механизме разрыва пептидных связей.

Глава V. Опыт и перспективы применения ферментного препарата «Протепсин» в технологиях мясных и молочных продуктов. Научные результаты, апробация, внедрение препарата в реальном производстве позволяет сформировать основные направления функциональных ферментных технологий (рис. 9).

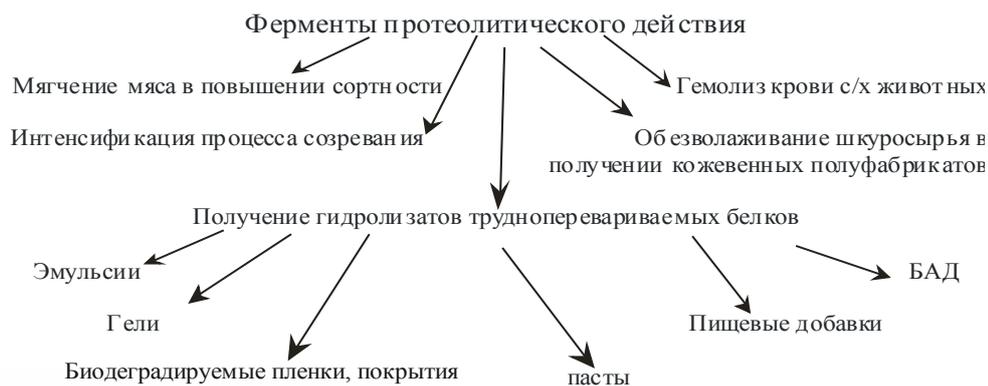


Рис. 9 Основные направления использования ферментов при обработке мясного сырья

Для молочной промышленности остается актуальной разработка молокосвертывающих ферментов при получении широкого спектра белковых препаратов, в том числе с использованием специальных заквасок, включающих бифидобактерии и другие полезные бактерии кишечника человека.

Обобщение имеющейся информации и апробация в реальном производстве позволили разработать подходы, дозировки, режимы обработки низкосортного сырья с высокой долей соединительнотканых белков и неиспользуемого коллагенсодержащего сырья с целью мягчения, ускорения созревания, деструктивных процессов при проектировании эмульсий. Полученные результаты легли в основу технической документации, внедренной в реальном производстве на ряде предприятий.

Исследование влияния пищевых добавок и специй, использование ступенчатого и медленного протеолиза при действии на различные анатомические участки и ткани, позволили рекомендовать ряд рецептурных и технологических решений, позволяющих увеличить ресурсную базу при производстве мясных продуктов, создать линейку продуктов здорового питания, сократить импортные поставки сырья, интенсифицировать технологические процессы. Частные технологии мясных продуктов приведены в диссертации и технологических инструкциях, утвержденных в установленном порядке.

В опытно-лабораторных условиях проведены выработки сыров типа голландского на базе традиционной технологии при полной или частичной замене сычужного фермента на препарат «Протепсин». Результаты указывают на перспективность данного направления и необходимость детализированных исследований в данном направлении в перспективе.

Проведенные диссертационные исследования позволили сделать следующие выводы.

Выводы

1. Методами электрофореза и хроматографии (на ДЭАЭ – целлюлозе и сефадексе G-100) идентифицировано два фермента в составе протеолитического комплекса препарата «Протепсин» (протеиназа I и II), которые обладают общей протеолитической активностью, одна из которых (протеиназа II) – дополнительно молокосвертывающей; молекулярная масса протеиназы I – 71800, протеиназы II – 34500.
2. Протеиназы I и II активны и стабильны в кислой области pH при температурах, характерных для животных организмов, достоверно отличаются pH- и температурными оптимумами действия (соответственно 4,0 и 45°C, 4,5 и 40°C). Ферменты различаются числом остатков различных аминокислот в первичной структуре, где суммарно определяется около 50% гидрофобных аминокислот, количественно преобладают глутаминовая и аспарагиновая аминокислоты, что соответственно объясняет роль гидрофобных взаимодействий в стабилизации пространственной структуры и активность в области кислых значений pH.
3. Применение независимых методов идентификации и обобщение результатов позволяет констатировать, что в активный центр протеиназы II входят по меньшей мере 2 карбоксильные и какая-либо ароматическая группа аминокислот, фермент проявляет специфичность к гидролизу пептидных связей в белках и пептидах, образованных преимущественно гидрофобными и ароматическими радикалами.
4. Гистоморфологические исследования доказывают, что протеолитические ферменты, действуют на мясные субстраты с различным содержанием соединительной ткани, что приводит к стимулированию функционально-технологических свойств низкосортного сырья, продуктов разделки и обработки туш, увеличению атакуемости мясных белков ферментами желудочно-кишечного тракта, ускорению процессов созревания в 1,8-3,0 при сохранении цветности и удовлетворяют микробиологическим требованиям.
5. Препарат «Протепсин» обладает молокосвертывающей активностью и способен гидролизовать казеин молока и белки молочной сыворотки. Имеет сходства и отличия с сычужным ферментом при действии на субстраты.
6. Обоснованы, апробированы и внедрены ферментные технологии обработки мясного сырья с низкими функционально-технологическими свойствами, что позволяет увеличить ресурсный потенциал отрасли за счет целенаправленного формирования сырья с более высокой сортностью и получения эмульсий высокого качества при ускорении созревания в 1,8-3,0 раза. Разработана и внедрена техническая документация на производство, доказана экономическая целесообразность и новизна технических решений в частных технологиях мясопродуктов (снижение себестоимости составляет от 11 000 до 27 000 р в зависимости от вида сырья).
7. Результаты опытно-лабораторных апробаций ферментного препарата «Протепсин» при обработке молочного сырья предполагают перспективу

использования в качестве заменителя сычужного фермента в технологии сыров и получении гидролизатов молочной сыворотки, в том числе с гипоаллергенными свойствами.

Список публикаций в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ:

1. Антипова, Л. В. Свойства коммерческого ферментного препарата «Протепсин» [Текст]/ Л.В. Антипова, М.В. Горбунков // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. – 2013. - №4 (58). – С. 145-147 (0,3 п.л., в т.ч. лично соискателем 0,2 п.л.).

2. Антипова, Л. В. Новый молокосвертывающий препарат «Протепсин» для создания инновационных решений производства здоровых продуктов питания [Текст]:/ Л.В. Антипова, М.В. Горбунков // Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК – продукты здорового питания, 2016. - №1 (9). – С. 66-74 (0,56 п.л., в т.ч. лично соискателем 0,4 п.л.).

3. Антипова, Л. В. Физико-химические и биокаталитические свойства протеолитического комплекса препарата «Протепсин» [Текст]:/ Л.В. Антипова, М.В. Горбунков // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. – 2016. - № 1. – С. 89-93 (0,31 п.л., в т.ч. лично соискателем 0,2 п.л.).

Публикации в других изданиях

4. Антипова, Л. В. Опыт и перспективы отечественного производства ферментных препаратов для переработки животноводческого сырья [Текст]:/ Л.В. Антипова, М.В. Горбунков// Материалы конференции 7-й международный биотехнологический форум – выставка РосБиоТех: в 2-х ч. Ч. 2. – М., 2013. – С. 11-14 (0,25 п.л., в т.ч. лично соискателем 0,15 п.л.).

5. Антипова, Л. В. Биокаталитические технологии в рациональном использовании малоценных отходов переработки животных и птиц [Текст]:/ Л.В. Антипова, С.А. Сторублевцев, М.В. Горбунков, О.Г. Орехов// Материалы II отчетной научной конференции преподавателей и научных сотрудников ФГБОУ ВПО «ВГУИТ» за 2013 г. – 2014. – С. 52 (0,06 п.л., в т.ч. лично соискателем 0,03 п.л.).

6. Антипова, Л. В. Выбор ферментных препаратов для обработки рыбных шкур [Текст] / Л.В. Антипова, А.В. Соколов, М.Д. Горбунков, С.А. Сторублевцев// «Технологии пищевой и перерабатывающей

промышленности АПК – продукты здорового питания». ВГУИТ– 2014. - № 1 (1). – С. 48-53 (0,38 п.л., в т.ч. лично соискателем 0,2 п.л.).

7. Антипова, Л. В. Ферментный препарат для обработки мяса [Текст] / Л.В. Антипова, М.В. Горбунков // Мясной ряд. – 2014. - №2. – С. 72-73 (0,13 п.л., в т.ч. лично соискателем 0,1 п.л.).

8. Антипова, Л. В. Ферментные препараты для производства мясных продуктов [Текст] / Л.В. Антипова, М.В. Горбунков, О.Т. Ибрагимова // Материалы ЛП отчетной научной конференции преподавателей и научных сотрудников ФГБОУ ВПО «ВГУИТ» за 2013 г. – 2014. – С. 25 (0,06 п.л., в т.ч. лично соискателем 0,03 п.л.).

9. Antipova, L. V. The experience of enzyme preparations application in the processing of animal origin raw materials [Text] / L.V. Antipova, M.Y. Gorbunkov, S.A. Storublevtsev // European Journal of Natural History. - 2015. - № 2. - P. 42-43 (0,13 п.л., в т.ч. лично соискателем 0,1 п.л.).

10. Антипова, Л. В. Ферментные препараты в повышении эффективности переработки сырья животного происхождения [Текст] / Л.В. Антипова, М.Ю. Горбунков, С.А. Сторублевцев, М.В. Шопина, А.С. Шкирман // Материалы Международной научно-практической конференции «Системный анализ и моделирование процессов управления качеством в инновационном развитии агропромышленного комплекса», 8-9 апреля 2015 г, ун-т инж. технол. – Воронеж: ВГУИТ, 2015. – С. 307-311с(0,3 п.л., в т.ч. лично соискателем 0,2 п.л.) .

11. Антипова, Л. В. Инновационное применение ферментных препаратов для переработки животноводческого сырья [Текст] / Л.В. Антипова, М.В. Горбунков// Материалы международной научно-технической конференции «Инновационное развитие техники пищевых технологий», ВГУИТ. – 2015. – С. 55-61(0,44 п.л., в т.ч. лично соискателем 0,3 п.л.).

12. Горбунков, М. В. Ферментный препарат «Протепсин» в получении эмульсии из коллагенсодержащего сырья [Текст] / М.В. Горбунков, С.А. Сторублевцев// Материалы ЛП отчетной научной конференции преподавателей и научных сотрудников ВГУИТ за 2014 год, посвященной 85-летию ВГУИТ: в 3 ч. Ч. 1. / под ред. С.Т. Антипова; Воронеж. гос. ун-т инж. технол. – Воронеж: ВГУИТ, 2015. – С. 61 (0,06 п.л., в т.ч. лично соискателем 0,3 п.л.).

13. Технологическая инструкция по применению ферментного препарата «Протепсин» фирмы «Прайм плюс ингредиенты» для производства мясопродуктов. – Москва, 2014. – 18 с.