

Применение ферментативного гидролиза в технологии белковых концентратов из люпина

Д-р техн. наук **Л. А. ЗАБОДАЛОВА, Л. М. КУЗНЕЦОВА**

zabodalova@gmail.com

Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет ИТМО

Институт холода и биотехнологий

191002, Санкт-Петербург, ул. Ломоносова, 9

Канд. техн. наук **М. Л. ДОМОРОЩЕНКОВА,**

канд. техн. наук **Т. Ф. ДЕМЬЯНЕНКО**

Государственное научное учреждение Всероссийский научно-

исследовательский институт жиров Российской академии

сельскохозяйственных наук

Люпин – это бобовая культура, которая хорошо адаптирована к различным типам климата и почвы. В настоящее время эффективность продуктов из люпина как ингредиентов в питании человека находится в фокусе многих исследовательских групп. Непросеянная зерновая мука, цельносмолотая мука и белковые концентраты, полученные из различных сортов и культур, оцениваются специалистами. В данной работе исследован процесс получения белкового концентрата люпина в кислой среде из люпиновой муки, совмещенный с обработкой субстрата комплексом гидролитических ферментов, действующих на углеводную фракцию муки. Обработка гидролитическими ферментами позволяет получить целевой продукт с достаточно высоким содержанием белка.

Ключевые слова: люпин узколистый, концентраты белка люпина, некрахмалистые полисахариды, гидролитические ферменты.

The enzyme hydrolysis treatments in lupin protein concentrate technology

L. ZABODALOVA, L. KUZNETSOVA

National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics

Institute of Refrigeration and Biotechnologies

191002, St. Petersburg, Lomonosov str., 9

M. DOMOROCHSHENKOVA, T. DEMJANENKO

State scientific institution All-Russia Research Institute of fats,

Russian Academy of Agricultural Sciences

Lupin is a leguminous crop that is well adapted to a range of climatic and soil types. Nowadays the efficacy of lupins as an ingredient in human feeds has been the focus of number of research group. Whole seed meals, kernel meal and protein concentrate derived from a number of different species and cultivars have been evaluated. In this paper the process of receiving lupin protein concentrates in acid solution from lupin flour accompanied by a treatment of the substrate by complex enzyme systems hydrolyzing carbohydrate fraction of flour is studied. The treatment by hydrolytic enzymes allows to get final product with pretty high protein content.

Keywords: *Lupinus angustifolius*, lupin protein concentrates, non-starch polysaccharides, hydrolytic enzymes.

Для решения таких проблем, стоящих перед пищевой промышленностью сегодня, как нехватка качественного белка в питании, выпуск продуктов питания с функциональными свойствами, в частности обогащенных белком, белковые концентраты, изоляты и текстураты в основном импортируются. Хотя мы прекрасно понимаем, насколько актуален сейчас для России вопрос повышения конкурентоспособности продукции. В прогнозе развития научных и технологических направлений, имеющих значительный прикладной потенциал в долгосрочной перспективе, представленный институтами РАН, в области промышленной биотехнологии выделяются следующие целевые ориентиры: динамичное развитие конечного спроса на биотехнологическую продукцию при снижении импортозависимости внутреннего рынка и рационализации структуры экспорта и импорта; снижение затратности экономики производства.

Мука из семян низкоалкалоидного узколистного люпина как сырье для получения белковых концентратов отвечает требованиям, поставленным перед технологом современной пищевой промышленностью. Несомненная дешевизна сырья и его доступность привлекают все больше внимания к этой замечательной культуре.

Растение содержит до 42% протеина и является хорошим источником пополнения рационов животных сырым протеином, что особенно важно при дефиците качественных кормов и соевого шрота [1]. Как известно, в рационе современного человека также наблюдается дефицит белка. Эта проблема и определяет направление поиска новых источников комплементарного белка. Проблему его получения можно решить быстрее и более экономично за счет использования продукции растениеводства

В настоящей работе типичный способ проведения технологического процесса получения белковых концентратов методом кислотного осаждения дополняется биотехнологическими приемами, способствующими достижению большей степени очистки белка.

Готовый сухой концентрат белков люпина будет позиционироваться на рынке как компонент сухих смесей для получения специализированных продуктов питания и как функциональная пищевая добавка, существенно обогащающая белком исходное сырье.

Эксперимент проводился с целью подтверждения предположения о том, что применение ферментных препаратов целлюлолитического и ксилолитического действия позволяет увеличить степень извлечения белка из муки люпина. Вероятно, при гидролитическом расщеплении гемицеллюлоз и клетчатки, высвободившиеся молекулы белка также будут подвергаться кислотному осаждению в изоэлектрической точке.

Углеводная фракция люпиновой муки характеризуется небольшим содержанием крахмала. В составе зерна бобовых имеются такие углеводы как клетчатка, гемицеллюлозы, пектиновые вещества, пентозаны, которые входят в состав семенных оболочек, клеточных стенок или играют роль запасных веществ. Углеводный состав семян представлен в таблице 1 [4].

Состав углеводов семян люпина

Наименование показателя	Значение показателя
Содержание углеводов, %	20-30
Моносахаридов	0,27
Олигосахаридов	Сахароза - 3,34
Полисахаридов, не обладающих свойствами сахаров:	
Декстрины	2,43
Крахмал	3,97
Клетчатка	11-18
гемицеллюлозы + пектиновые вещества	10,19
Пентозаны	Около 4

Нерастворимую основу каркаса частицы люпиновой муки составляют вещества целлюлозного и гемицеллюлозного типа, в частности ксиланы. Частичное разрушение гемицеллюлозных цепочек или их переплетений позволяет упростить внутреннюю структуру частицы муки и способствует диффузионному перемещению молекул белка из глубины частицы к её поверхности.

Для исчерпывающего ферментативного гидролиза гемицеллюлоз требуется широкий набор ферментов, однако в большинстве технологических процессов, где применяется ферментативная деструкция гемицеллюлоз, достаточно действия ксиланаз и маннаназ.

Диапазон и эффективность действия ферментов как биокатализаторов определяются их специфическими особенностями. Средний диаметр макромолекул у ксиланаз 10–30 Å, их молекулярная масса находится в пределах от 10 до 85 кДа. Оптимум pH для ксиланаз находится в интервале 5–9,5 [5].

Монокомпонентные гемицеллюлазы способны гидролизовать незначительную часть гемицеллюлоз, при этом ксиланазы эффективнее маннаназ, при их действии может также частично удаляться маннан [3].

В качестве ксиланазы в эксперименте использовался ферментный препарат Pentopan Mono BG (ксиланазы эндо-1,4-), выделяемый из культуры грибов *A. oryzae*. Препарат предоставлен АО "Novozymes A/S" (Дания). Активность фермента 2500 ед КС/мл.

Действие целлюлолитических ферментов приводит к частичной деструкции целлюлозных цепей, в результате повышается доступность гемицеллюлоз для ксиланаз и маннаназ. В эксперименте был использован Celluclast BG - ферментный препарат целлюлазы, выделяемый из культуры грибов *T. reesei*. Препарат предоставлен АО "Novozymes A/S" (Дания). Активность фермента 3500 ед/г.

Содержание сырого протеина в конечном продукте и степень повышения этого показателя по сравнению с исходным сырьем и контрольной пробой и послужили критерием оценки результатов биоконверсии углеводной фракции люпиновой муки.

Ранее в ходе исследования были установлены оптимальные параметры совмещенного процесса кислотного осаждения белка в изоэлектрической точке и ферментативного расщепления балластных веществ люпиновой муки целлюлолитическим ферментом: температура 50°C и гидромодуль 1 : 15.

В оптимальных для целлюлаз условиях ведения процесса было изучено влияние ферментного препарата (далее ФП) Целлюкласт на экстрагируемость небелковых соединений из люпиновой муки. Контрольную пробу получали при тех же режимах без использования ферментного препарата. Результаты приведены в таблице 2.

Таблица 2

Физико-химические показатели продуктов экстракции небелковых соединений из муки люпина с ФП Целлюкласт в различных дозировках

Дозировка ФП, ед/г	Количество во пасты, г	Количество сыворотки, мл	Плотность сыворотки, кг/м ³	Содержание белка в пасте, % на а.с.в.	Влажность пасты, %	Сухие вещества сыворотки, %
-	278±20	1270±20	1003±1	50,40 ±1,30	75,22±1,06	1,30±0,36
0,54±0,02	245±15	1300±10	1005±1	52,74±1,10	78,67±0,32	1,89±0,11
1,08±0,02	250±05	1280±10	1005±1	55,97±1,07	80,56±1,50	1,78±0,13
2,16±0,02	255±15	1280±10	1004±1	52,30±1,06	74,63±0,65	2,00±0,50

В результате эксперимента была определена оптимальная дозировка ФП Целлюкласт, которая составила 1,08±0,02 ед/г.

Также было исследовано влияние совместного применения ферментных систем на экстрагируемость небелковых соединений из люпиновой муки.

Гетерофазные системы высокой степени дисперсности, в условиях постоянного перемешивания, исключаящего разделения фаз, в некоторых отношениях подобны гомогенным системам. В высокодисперсных системах все субстраты равнодоступны действию ферментов, архитектура сырья не определяет порядок введения ферментов в реакционную среду. Равная доступность субстратов позволяет осуществлять выборочный гидролиз одних, не затрагивая других, а при необходимости гидролиза нескольких субстратов, провести его в одну стадию, что сокращает энергозатраты и уменьшает риск развития инфекции. Раздельная (постадийная) обработка ферментами проводится в тех случаях, когда наблюдается ингибирование действия одного фермента продуктами реакции, катализируемой другим, или при существенных различиях оптимальных условий действия отдельных ферментов. Ингибирование продуктами реакции наблюдается, например, при одностадийном гидролизе зернового сырья целлюлазой или глюкоамилазой, поскольку целлюлаза ингибируется глюкозой.

Конверсия целлюлозы в природных биоценозах сопряжена с деструкцией гемицеллюлозы и лигнина. При культивировании грибов на древесных субстратах в первую очередь разлагается гемицеллюлоза, после удаления ксилана увеличивается скорость гидролиза целлюлозы. Ксиланазы и целлюлазы проявляют синергизм, что объясняется последовательностью их действия при

гидролизе смешанного субстрата, где целлюлоза экранирована гемицеллюлозой [2].

Таким образом, целесообразно провести сравнение результатов одностадийной обработки люпиновой муки смесью ферментных систем и многостадийной обработки муки указанными ФП.

Для проведения одностадийной обработки муки были подготовлены мультиэнзимные композиции (далее МЭК), состав которых приведен в таблице 3. Соотношение препаратов в МЭК рассчитывалось исходя из заявленной активности, а количество композиции для гидролиза рассчитывалось по содержанию субстрата в сырье.

Таблица 3

Состав мультиэнзимных композиций, использованных для ферментативного гидролиза

Номер композиции	Состав композиции
1	1,08±0,02 ед/г ферментного препарата «Celluclast BG» и 5 ед/г «Pentopan Mono BG»
2	1,08±0,02 ед/г ферментного препарата «Celluclast BG» и 25 ед/г «Pentopan Mono BG»

Принимая во внимание свойства данных ферментных систем и их поведение в процессе кислотной экстракции небелковых соединений из муки люпина, были предложены следующие параметры биоконверсии балластных веществ исходного сырья в жидкую фазу: температура 50°C; pH 4,5; гидромодуль 1 : 15; продолжительность процесса 40 мин.

Для проведения многостадийной обработки на каждой стадии эксперимента создавались оптимальные условия для воздействия определенного ФП на субстрат. Обработка Целлюкластом проводилась при 40° С и pH 4,8 в течение 40 мин, затем суспензия была подвергнута постепенному нагреву до 70°С (такой температурный режим позволяет частично инактивировать целлюлазу и приблизиться к температурному оптимуму действия ФП Пентопан Моно). На второй стадии процесса при 70° С была внесена ксиланаза, обработка суспензии также длилась 40 мин. Полученные результаты приведены в табл. 4.

Таблица 4

Физико-химические показатели белковой пасты и сыворотки, полученные при проведении экстракции в одну или несколько стадий

Вариант обработки	Содержание сырого протеина в пасте, % на а.с.в.	Влажность белковой пасты, %	Сухие вещества сыворотки, %
МЭК 1	56,04±1,10	80,56±0,44	1,78±0,33
МЭК 2	51,88±1,30	74,69±0,46	1,88±0,06
Многостадийная обработка	54,59±1,09	79,96±0,53	1,95±1,10

На основании полученных в этой серии эксперимента данных сделать однозначный вывод не представляется возможным. Целесообразность проведения процесса в одну или несколько стадий будет исследована в дальнейшем. На данном этапе эксперимента наилучший результат получен при использовании МЭК №1. При этом содержание сырого протеина в целевом продукте возрастает примерно на 10 % по сравнению с исходной мукой и на 6 % по сравнению с контрольным продуктом.

На основании проведенной серии экспериментов были сделаны следующие выводы:

1. Разработана технология получения белкового концентрата люпина с использованием процесса экстракции небелковых соединений из люпиновой муки в кислой среде, совмещенного с обработкой углеводов субстрата комплексом гидролитических ферментов.

2. Установлено, что оптимальная дозировка ФП Целлюкласт при температуре 50°C и гидромодуле 1 :15 составляет $1,08 \pm 0,02$ ед/г.

Список литературы

1. Егоров И., Чеснокова Н., Андрианова Е., Анчиков Э. Комбикорма для бройлеров с люпином и фитазой. // Комбикорма, 2009 №1. – С. 67-68.

2. Кислухина О.В. Ферменты в производстве пищи и кормов. – М.: ДеЛи принт, 2002. – 336 с.

3. Новожилков Е.В., Пошина Д.Н. Биотехнологии в производстве целлюлозы для химической переработки (обзор). // Химия растительного сырья, 2011. №3. С. 15-32.

4. РУКОВОДСТВО по методам исследования, теххимическому контролю и учёту производства в масложировой промышленности. Том 5, Ленинград, 1965.

5. Jeffries T. Biochemistry and genetics of microbial xylanases // Journal of Biotechnology. 1996. V. 7. Pp. 337–342.