



УКРАЇНА

(19) UA (11) 21454 (13) U

(51) МПК (2006)

A23L 1/03

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ СПОСІБ ОТРИМАННЯ ХАРЧОВИХ ДОБАВОК ІЗ ПАНЦЕРОВІСНОЇ СИРОВИНИ

1

2

(21) u200610443

(22) 02.10.2006

(24) 15.03.2007

(46) 15.03.2007, Бюл. № 3, 2007 р.

(72) Черно Наталія Кирилівна, Озоліна Софія Олександрівна, Шум Лариса Сергіївна

(73) ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

(57) Спосіб отримання харчових добавок із панцеровмісної сировини шляхом ферментного гідролізу

білків протеолітичними ферментами, який передбачає обробку білка ферментними препаратами комплексної дії і гідроліз білка, який **відрізняється** тим, що ферментативний гідроліз білка проводять промисловими комплексними ферментними препаратами: панкреатином, протосубтиліном та лужною протеазою.

Корисна модель відноситься до галузі харчової промисловості, а саме - отримання біологічно активних добавок з використанням біотехнологічних методів і може бути використана для отримання біологічно активних гідролізатів білка, вилученого із панцеровмісної сировини, методом модифікації обмеженого ферментативного гідролізу промисловими ферментними препаратами, а саме - панкреатином, протосубтиліном, лужною протеазою, що покращують функціональні властивості білка.

Промислова переробка панцеровмісної сировини в основному направлена на отримання цільового продукту хітину з видаленням при цьому супутніх йому білкових та мінеральних речовин. Такі методи обробки називають, відповідно, депротейнуванням і демінералізацією. Відомим в промисловості є спосіб депротейнування панцеровмісної сировини розчинами гідроксиду натрію і подальша нейтралізація отриманого ізоляту розчином хлороводневої кислоти, отриманим на стадії демінералізації панцеровмісної сировини. Найбільш розповсюдженим варіантом утилізації такого білка є використання його в кормовій промисловості. Але існують технології депротейнування, які не передбачають утилізації білка. Прикладом таких способів можуть бути методи екстрагування білкових речовин лужними розчинами в присутності поверхнево-активної речовини аніонного типу (додецилсульфату, натрієвої солі лауринової кислоти), яка дозволяє знизити концентрацію луку в

розчині і забезпечити більш ефективне екстрагування білка.

Недоліками лужних методів депротейнування є жорсткі умови обробки панцеровмісної сировини, які включають використання досить концентрованих розчинів хімічних реагентів, тривалий контакт лужних розчинників із білковими речовинами при високій температурі, що призводить до погіршення якості білкових складових, що денатурують, внаслідок чого змінюється розчинність, відбувається рацемізація амінокислот, деградація молекул білка. Окрім того, продукт має значний вміст солі NaCl, а іноді і поверхнево-активні речовини в вигляді детергентів, що обумовлює зниження його харчової цінності та обмежує область його використання.

Враховуючи проблеми, які виникають при виділенні білка із панцеровмісної сировини, ми екстрагування білка вели при м'яких умовах, що дозволить використовувати його в харчових цілях.

Екстрагування білка із панцерів та демінералізованих панцерів, попередньо підданих і попередньо не підданих термічній обробці, здійснюють в однакових умовах. Наявність попередньої термічної обробки сприяє денатурації білка і разом з тим зменшує вихід останнього в розчин в результаті екстракції. Вміст білка в панцерах складає 11,5%, а в демінералізованих панцерах – 27,5%. Показники екстрагування білка із панцеровмісної сировини дещо нижчі ніж показники екстракції білка із демінералізованої панцеровмісної сировини. Тому, в зв'язку з перерахунком вище, виділення білкових речовин здійснюється з попередньо демінералізо-

(13) U

(11) 21454

(19) UA

ваних панцерів, які не піддавались термічній обробці.

Для цього панцеровмісну сировину сушать при температурі 40°C, після чого подрібнюють на лабораторному млині. Подрібнену панцеровмісну сировину з діаметром часток $d \leq 1 \text{ мм}$ піддають демінералізації 2,0М розчином хлороводневої кислоти для видалення мінеральних речовин при температурі 0°C в співвідношенні твердого матеріалу і рідини 1:10 протягом 24 годин, періодично при цьому перемішуючи. Далі проводять фільтрацію через нейлонову тканину. Твердий залишок промивають дистильованою водою до встановлення нейтрального рН середовища. Демінералізовану панцеровмісну сировину сушать при температурі 40°C. Екстрагування білка здійснюють 2,0% розчином гідроксиду натрію при мінімальному співвідношенні твердої речовини і рідини 1:4 протягом 6 годин при температурі 18-20°C. Для підвищення

ефективності виходу білка в розчин використовують як поверхнево-активну речовину лецитин з концентрацією 0,2% в лужному розчині. По закінченні процесу екстрагування для нейтралізації лужного середовища додають 2М розчин хлороводневої кислоти. В ізоляті визначають загальну кількість білка методом Лоурі при довжині хвилі 750нм по кривій, побудованій для модельного білка альбуміну. Вилучений білок характеризують додатково за його амінокислотним складом, перетравлюваністю і визначають його функціональні властивості (піноутворюючу здатність, стійкість піни, жироемульгуючу здатність, стійкість емульсії).

Величина виходу білка в розчин, характеристики його амінокислотного складу, перетравлюваність і функціональні властивості отриманого ізоляту представлені в таблицях 1, 2.

Таблиця 1

Вихід білка в розчин при екстрагуванні його із демінералізованої панцеровмісної сировини, його перетравлюваність та функціональні властивості

Показники	Демінералізована панцеровмісна сировина (екстрагування чистим лужним розчином)	Демінералізована панцеровмісна сировина (екстрагування лужним розчином в присутності лецитину)
Кількість екстрагованого білка, %	58,0	55,0
Мг тирозину/ г білка	55	55
Перетравлюваність, %	83,4	84,2
Піноутворююча здатність, %	40	12
Стійкість піни, %	62	58
Жироемульгуюча здатність, %	20	33
Стійкість емульсії, %	17	22

Таблиця 2

Амінокислотний склад білка, вилученого із демінералізованої панцеровмісної сировини, %

Амінокислота	Масова частка амінокислоти від маси білка, %
Лізин	4,10-5,05
Гістидин	3,50-3,20
Аргінін	7,50-6,15
Аспарагінова кислота	9,15-8,30
Треонін	4,30-4,90
Серин	4,90-5,50
Глутамінова кислота	16,50-16,75
Пролін	1,90-2,50
Гліцин	8,25-10,25
Аланін	7,45-7,90
Валін	7,30-4,70
Ізолейцин	3,90-4,70
Лейцин	6,75-7,60
Тирозин	2,75-3,80
Фенілаланін	4,00-4,60
Цистин	сл.
Метионін	0,70-1,00

В більшості випадків білкові ізоляти, отримані із вторинних сировинних джерел, мають незначні функціональні властивості. Поліпшення функціональних властивостей білка може значно розширити спектр їх використання у складі харчових продуктів. В практиці для покращення функціональних властивостей малорозчинних або нерозчинних в воді білків застосовують різноманітні методи модифікації. Одним із виправданих методів модифікації білкових речовин є ферментативний гідроліз в умовах обмеженого часу.

Відомий спосіб ферментативної обробки соєвого білка ферментними препаратами пепсином і трипсином протягом 3 години при рН 1,2 і 8,0, відповідно. Також ефективним способом модифікації білка є його комплексоутворення з високомолекулярними полісахаридами, наприклад, метоксильованим пектином, і подальший ферментативний гідроліз трипсином протягом 3 годин [Дьяконова А.К. Научные основы технологий консервированных продуктов с использованием структурообразователей: Дис. док. техн. наук /ОНАПТ.— Одесса, 2006.—385с.].

Недоліки даних методів полягають в тому, що тривалий ферментативний гідроліз білка більше 3 годин призводить до накопичення гірких пептидів, та й існують певні ускладнення відносно використання ферментних препаратів, які відрізняються специфічністю дії щодо білкового субстрату.

Найбільш близьким до заявленого є метод обмеженого ферментного гідролізу нерозчинних в воді білків протеолітичними ферментами тваринного походження, зокрема протосубтиліном Г 3Х. Гідроліз білка (денатурованого альбуміну курячого яйця) проводять в термостаті з магнітною мішалкою при температурі процесу 30-50°C, куди вносять в рівних об'ємах білок 0-50мг/см³ і фермент 0-40мг/см³ при величині рН середовища 6,5-8,5. Гідроліз в відібраних пробах зупиняють додаванням до аліквот 10-кратного об'єму 10%-ного розчину трихлороцтової кислоти [Бабаян Т.Л. Способ оценки протеиназной активности комплексного ферментного препарата по данным кинетики протеолиза модельного белкового субстрата /Т.Л. Бабаян, В.К. Латов //Биотехнология. —2003.—№6.—с.47-51.].

Даний спосіб обрано найближчим аналогом.

Найближчий аналог і корисна модель, що за являється, мають такі спільні ознаки:

- обробка білка ферментним препаратом комплексної дії;
- гідроліз білка;
- протягом кожного часу ферментоліз зупиняють додаванням розчину трихлороцтової кислоти і контролюють глибину гідролізу білка за накопиченням азотовмісних сполук.

Але наведений спосіб має такі недоліки. Так, початкові концентрації ферменту не забезпечують необхідної глибини протеолізу нерозчинного в воді альбуміну і для її підвищення через 2 години після початку процесу додатково добавляють в еквімолярній кількості до субстрату фермент – це, в свою чергу, збільшує витрати ферментного препарату.

В основу корисної моделі поставлено задачу покращити функціональні властивості білкових ізолятів шляхом їх модифікації ферментативним гідролізом промисловими комплексними ферментними препаратами вітчизняного виробництва: панкреатином, протосубтиліном, лужною протеазою.

Поставлена задача вирішена в способі ферментного гідролізу білків протеолітичними ферментами, що передбачає обробку білка ферментними препаратами комплексної дії і гідроліз білка тим, що ферментативний гідроліз білка проводять промисловими комплексними ферментними препаратами: панкреатином, протосубтиліном та лужною протеазою.

Концентрацію ферментів підбирають таким чином, щоб забезпечити однакову їх активність відносно 2%-вого білкового субстрату. Ферментативний гідроліз ведуть протягом 1-6г при температурі 37°C для панкреатину, 40°C – для протосубтиліну, 45°C – для лужної протеази, при рН середовища 7,5 для панкреатину і протосубтиліну, а також при рН9,0 – для лужної протеази. Після ферментативного гідролізу після проходження кожного часу контролюють глибину гідролізу білка спектрофотометрично по накопиченню тирозину в робочій суміші при довжині хвилі 670нм і відразу вивчають їх функціональні властивості (піноутворюючу здатність, стійкість піни, жироемульгуючу здатність, стійкість емульсії). Важливими показниками отриманих білкових речовин є їх перетравлювання, яке визначають за ступенем деструкції білка під дією травних ферментів в умовах, близьких до фізіологічних процесів перетравності білка в шлунково-кишковому тракті.

Заявлений спосіб виконується наступним чином.

Приклад 1.

В отриманих білкових ізолятах при оптимальних умовах моделюють однакову концентрацію білка 2% в однаковому об'ємі розчину наступним чином: ізоляти центрифугують в лабораторній центрифугі при частоті обертів 5000об/хв. протягом 20хв., далі додають 0,05М фосфатний буфер (рН7,5 для панкреатину і протосубтиліну, рН9,0 для лужної протеази) з розрахунком, щоб кінцева концентрація білка в розчині становила 2мг/см³. До аліквот 2%-вого білкового ізоляту додають наважки ферментних препаратів, враховуючи при цьому активність кожного окремо. Таким чином, концентрація ферментів в робочому об'ємі розчину становить: панкреатину – 0,1%, протосубтиліну – 0,3%, лужної протеази – 0,5%, що забезпечують активність 28,3 протеолітичних одиниць/г білка, вилученого із панцеромісної сировини. Ферментативний гідроліз панкреатином, протосубтиліном, лужною протеазою ведуть протягом 6 годин при відповідній температурі для кожного препарату 37, 40 і 45°C. По закінченні ферментації гідролізати направляють для визначення функціональних властивостей. Одночасно гідроліз в відібраних пробах 1см³ зупиняють додаванням до аліквот в еквімолярній кількості 5%-вого розчину трихлороцтової кислоти і далі фільтрують через паперовий фільтр. Кількість розчинених в фільтраті низько-

молекулярних білків визначають спектрофотометричне за приростом тирозину, використовуючи метод Лоурі з реактивом Фоліна при довжині хвилі 670нм. Величину перетравлюваності протеїну травними ферментами визначають в модельній системі пепсин - трипсин. Для цього до розчину білка в кількості 15см³, які містять 150мг білка, вносили 2М розчин соляної кислоти і доводили рН середовища до 1,2-2,0. Далі експериментальні розчини поміщають в термостат до досягнення температури 37°C і вносять 15мг кристалічного пепсину. Ферментний гідроліз ведуть протягом 4 годин. Далі рідину нейтралізують 0,4см³ 8,0%-вого розчину гідроксиду натрію, після чого додають 15см³ 0,02N NaHCO₃ (рН8,2). В розчин вносять 15мг кристаліч-

ного трипсину і витримують у термостаті протягом 4 годин при температурі 37°C. Гідроліз в відрібраних аліквотах 1см³ зупиняють додаванням 1см³ 5%-вого розчину трихлороцтової кислоти.

Показники функціональних властивостей і характеристика отриманих білкових гідролізатів приведені в табл. 3, 4, 5, 6, 7, 8.

Приклад 2 виконується аналогічно прикладу 1. У прикладі 1 брали максимальні заявлені значення. У прикладі 2 брали оптимальні значення заявлені у формулі корисної моделі: у випадку ферментативного гідролізу панкреатином час процесу становить 1 годину, при ферментації протосібітином – 2 години, лужною протеазою – 1 година.

Таблиця 3

Характеристика білкових гідролізатів, отриманих в результаті ферментативного гідролізу панкреатином, в порівнянні з найближчим аналогом та їх функціональні властивості

Показники	Найближчий аналог	Приклад 2	Приклад 1
Продукти гідролізу білка, мг тирозину/ г білка	80	92	144
Претравлюваність, %	89,7	88,7	99,4
Піноутворююча здатність, %	114	43	18
Стійкість піни, %	83	58	0
Жироемульгуюча здатність, %	67	32	37
Стійкість емульсії, %	70	43	20

Таблиця 4

Характеристика білкових гідролізатів, отриманих в результаті ферментативного гідролізу протосібітином, в порівнянні з найближчим аналогом та їх функціональні властивості

Показники	Найближчий аналог	Приклад 2	Приклад 1
Продукти гідролізу білка, мг тирозину/ г білка	99	94	126
Претравлюваність, %	91,1	89,4	95,3
Піноутворююча здатність, %	100	50	38
Стійкість піни, %	88	61	0
Жироемульгуюча здатність, %	71	25	11
Стійкість емульсії, %	77	24	19

Таблиця 5

Характеристика білкових гідролізатів, отриманих в результаті ферментативного гідролізу лужною протеазою, в порівнянні з найближчим аналогом та їх функціональні властивості

Показники	Найближчий аналог	Приклад 2	Приклад 1
Продукти гідролізу білка, мг тирозину/ г білка	85	87	135
Претравлюваність, %	90,8	87,2	97,0
Піноутворююча здатність, %	95	35	12
Стійкість піни, %	78	55	0
Жироемульгуюча здатність, %	59	22	0
Стійкість емульсії, %	75	18	0

Таблиця 6

Характеристика білкових гідролізатів з вмістом лецитину, отриманих в результаті ферментативного гідролізу панкреатином, в порівнянні з найближчим аналогом та їх функціональні властивості

Показники	Найближчий аналог	Приклад 2	Приклад 1
Продукти гідролізу білка, мг тирозину/ г білка	80	80	125
Претравлюваність, %	89,7	85,7	95,8
Піноутворююча здатність, %	114	0	0
Стійкість піни, %	83	0	0
Жироемульгуюча здатність, %	67	72	25
Стійкість емульсії, %	70	53	20

Таблиця 7

Характеристика білкових гідролізатів з вмістом лецитину, отриманих в результаті ферментативного гідролізу протосубтиліном, в порівнянні з найближчим аналогом та їх функціональні властивості

Показники	Найближчий аналог	Приклад 2	Приклад 1
Продукти гідролізу білка, мг тирозину/ г білка	99	74	113
Претравлюваність, %	91,1	84,1	92,0
Піноутворююча здатність, %	100	0	0
Стійкість піни, %	88	61	0
Жироемульгуюча здатність, %	71	49	20
Стійкість емульсії, %	77	52	20

Таблиця 8

Характеристика білкових гідролізатів з вмістом лецитину, отриманих в результаті ферментативного гідролізу лужною протеазою, в порівнянні з найближчим аналогом та їх функціональні властивості

Показники	Найближчий аналог	Приклад 2	Приклад 1
Продукти гідролізу білка, мг тирозину/ г білка	85	104	125
Претравлюваність, %	90,8	92,2	95,0
Піноутворююча здатність, %	95	10	0
Стійкість піни, %	78	60	0
Жироемульгуюча здатність, %	59	25	0
Стійкість емульсії, %	75	0	0