

На правах рукописи



**Третьякова Ирина Николаевна**

**ИНТЕНСИФИКАЦИЯ ГИДРОЛИЗА  
РАСТИТЕЛЬНЫХ И ЖИВОТНЫХ БЕЛКОВ  
ПУТЕМ ПОВЫШЕНИЯ АКТИВНОСТИ И СТАБИЛЬНОСТИ  
ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ**

Специальность 05.18.07 –  
Биотехнология пищевых продуктов и биологически активных веществ

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата технических наук

Екатеринбург – 2021

Диссертационная работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Южно-Уральский государственный аграрный университет»

**Научный руководитель:** доктор технических наук, профессор  
**Тихонов Сергей Леонидович** (Россия)

**Официальные оппоненты:** член-корреспондент РАН,  
доктор биологических наук, доцент  
**Серба Елена Михайловна** (Россия),  
заместитель директора по научной работе  
Всероссийского научно-исследовательского  
института пищевой биотехнологии – филиала  
ФГБУН Федеральный исследовательский центр  
питания, биотехнологии и безопасности пищи

доктор технических наук, доцент  
**Бабич Ольга Олеговна** (Россия),  
директор Института живых систем ФГАОУ ВО  
«Балтийский федеральный университет имени  
Иммануила Канта»

**Ведущая организация:** Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования  
«Дальневосточный федеральный университет»

Защита диссертации состоится 25 сентября 2021 г. в 10:00 на заседании диссертационного совета Д 212.287.05, созданного на базе ФГБОУ ВО «Уральский государственный экономический университет», по адресу: 620144, г. Екатеринбург, ул. 8 Марта/Народной Воли, 62/45, ФГБОУ ВО «Уральский государственный экономический университет», зал диссертационных советов (ауд. 150).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО «Уральский государственный экономический университет». Автореферат размещен на официальном сайте ВАК при Минобрнауки России: <https://vak.minobrnauki.gov.ru> и на сайте ФГБОУ ВО «Уральский государственный экономический университет»: <http://science.usue.ru>.

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2021 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат технических наук, доцент

О. В. Феофилактова

## Общая характеристика работы

**Актуальность темы исследования.** В соответствии с распоряжением Правительства РФ от 31 декабря 2020 г. № 3694-р Программа фундаментальных научных исследований Российской Федерации на 2021–2030 гг. включает направление «Биотехнология», к ожидаемым прорывным достижениям которого относятся результаты исследований, направленных на совершенствование технологий ферментативного гидролиза, позволяющих трансформировать белки и получать пищевые продукты с использованием нетрадиционных источников растительного белка отечественного происхождения, улучшать функционально-технологические, структурно-механические свойства животного сырья, биологическую ценность готовых мясопродуктов.

Важным аспектом в технологии мясопродуктов является частичная замена основного сырья растительными белковыми препаратами, что позволяет снизить себестоимость готового продукта и обеспечить его высокую биологическую ценность. Поэтому актуальными остаются проблемы производства растительных белковых препаратов из отечественного сырья, в частности, из семян люпина.

В связи с этим представляются своевременными исследования по интенсификации технологий ферментативного гидролиза сырья растительного и животного происхождения путем совершенствования способов увеличения активности и повышения стабильности протеолитических ферментов.

**Степень разработанности темы исследования.** Существенный вклад в развитие теории и практики применения ферментов в пищевой промышленности и при ферментативной обработке мяса внесли академики РАН А. Б. Лисицын, Л. В. Римарева, И. М. Чернуха, члены-корреспонденты РАН А. Ю. Просеков, Е. М. Серба, профессора Л. В. Антипова, О. О. Бабич, Т. М. Гиро, Г. О. Ежкова, Т. К. Каленик, Н. Н. Крылова, Л. С. Кудряшов, О. Я. Мезенова, О. В. Кригер, зарубежные ученые R. Hamm, K. Honikel, S. Ishiura, S. See, R. Slizyte и др.

**Цель и задачи работы.** *Цель работы* – экспериментально обосновать использование активированного трипсина при гидролизе растительного белка, дать оценку стабильности поликомпонентного микрокапсулированного ферментного препарата при хранении и его эффективности при тендеризации ветчинных изделий.

*Задачи:*

- определить оптимальные параметры и разработать технологию повышения протеолитической активности трипсина, используемого в производстве растительного белкового препарата;
- научно обосновать и подтвердить в эксперименте технологические этапы и режимы производства белкового препарата из семян люпина, полученного с помощью ферментативного гидролиза;

– провести оценку качества и функционально-технологических свойств растительного белкового препарата, полученного с помощью ферментативного гидролиза;

– определить технологический этап внесения растительного белкового препарата в фарш и экспериментально обосновать его использование в технологии вареных колбас;

– разработать поликомпонентный микрокапсулированный ферментный препарат из пепсина и папаина, определить его стабильность при хранении и эффективность при тендеризации ветчинных изделий.

**Научная новизна.** Диссертационная работа содержит элементы научной новизны, соответствующие п. 4, 5 и 15 Паспорта специальности ВАК РФ 05.18.07.

Усовершенствована экспресс-методика визуального определения протеолитической активности фермента за счет сокращения времени учета реакции путем модернизации химического состава и технологии тест-пластинки, стабильной к термообратимости при температурном оптимуме активности протеазы (*п. 15 Паспорта специальности ВАК РФ 05.18.07*).

Показана возможность и обоснован механизм повышения протеолитической активности трипсина путем облучения раствора фермента светом синего спектра (*п. 4 Паспорта специальности ВАК РФ 05.18.07*).

Установлены рациональные параметры гидролиза белка из семян люпина трипсином (*п. 4 Паспорта специальности ВАК РФ 05.18.07*).

Научно обоснован технологический этап внесения гидратированного белкового препарата из семян люпина в основное сырье при производстве вареных колбас (*п. 4, 5 Паспорта специальности ВАК РФ 05.18.07*).

Предложена технология поликомпонентного ферментного препарата, состоящего из пепсина и папаина, последовательно микрокапсулированных в псевдокипящем слое из мальтодекстрина. На основании исследований функционально-технологических свойств, микроструктуры, структурно-механических характеристик мясного сырья, обработанного микрокапсулированным поликомпонентным ферментным препаратом, доказана его стабильность при хранении и эффективность в производстве мясопродуктов (*п. 4 Паспорта специальности ВАК РФ 05.18.07*).

**Теоретическая и практическая значимость работы.** *Теоретическая значимость* работы заключается в расширении научных знаний в области технологий ферментативного гидролиза белка при получении белковых растительных препаратов и микрокапсулировании протеолитических ферментов для повышения качества мясного сырья. Теоретическое обоснование и выводы, полученные на основе экспериментальных исследований, не противоречат знаниям, которые легли в основу технологий производства белковых препаратов и микрокапсулирования ферментов.

*Практическая значимость* работы заключается в:

– разработке технологии активации протеолитической активности трипсина путем экспозиции раствора фермента светом синего спектра;

- установлении рациональной концентрации трипсина и биотехнологических режимов гидролиза белка из семян люпина;
- разработке устройства для получения поликомпонентного ферментного препарата в псевдокипящем слое, конструкция которого позволяет создавать защитное покрытие на поверхности ферментов, что обеспечивает сохранение их протеолитической активности на протяжении более 6 мес. хранения;
- определении оптимальных режимов иммобилизации ферментов в псевдокипящем слое.

Разработаны технические условия и технологическая инструкция (ТУ и ТИ) 914616-087-02069214-2021 «Белковый препарат». Результаты исследований внедрены на мясоперерабатывающем предприятии ЗАО «Комбинат пищевой «Хороший вкус» (г. Екатеринбург).

Результаты проведенных экспериментальных исследований используются в учебном процессе на кафедре пищевой инженерии ФГБОУ ВО «Уральский государственный экономический университет» и в ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный аграрный университет» при подготовке бакалавров по направлению 19.03.01 «Биотехнология», профиль «Пищевая биотехнология».

**Методология и методы исследования.** Методология выполнения работы основана на анализе научно-технической литературы по теме диссертационного исследования, комплексном использовании разных методологических подходов для достижения поставленной цели и задач, обосновании выбора объектов исследований и технологий. При выполнении диссертационной работы использовались общепринятые и специальные методы, в том числе электронной микроскопии.

**Положения, выносимые на защиту:**

- способ активации протеолитических свойств фермента трипсина;
- экспресс-методика определения активности протеолитического фермента;
- обоснование технологии и параметров производства растительного белкового препарата, полученного методом ферментативного гидролиза;
- доказательства эффективности технологии получения поликомпонентного ферментного препарата путем последовательного микрокапсулирования ферментов пепсина и папаина в псевдокипящем слое из мальтодекстрина.

**Степень достоверности и апробация работы.** Результаты получены с использованием поверенных измерительных приборов в аккредитованной лаборатории промышленного пищевого предприятия. Обработка полученных цифровых данных проведена с использованием программных средств и приложений для инженерных вычислений.

**Апробация результатов работы.** Основные положения и результаты работы докладывались и обсуждались на международных и всероссийских

(национальных) научно-практических мероприятиях: Всероссийская (национальная) научно-практическая конференция «Научно-инновационные технологии как фактор устойчивого развития агропромышленного комплекса» (г. Курган, 2020); Всероссийская (национальная) научно-практическая конференция «Биотехнологические аспекты управления технологиями пищевых продуктов в условиях международной конкуренции» (г. Курган, 2020); X Международная научно-практическая конференция «Потребительский рынок: качество и безопасность товаров и услуг» (г. Орел, 2020); Всероссийская научно-практическая конференция «Научное сопровождение деятельности учреждений Роспотребнадзора» (г. Екатеринбург, 2020); II Всероссийская (национальная) научно-практическая конференция «Достижения и перспективы научно-инновационного развития АПК» (г. Курган, 2021), XVII Всероссийская конференция молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием «Пищевые технологии и биотехнологии» (г. Казань, 2021).

**Публикации.** По результатам исследований опубликовано 14 научных работ, из них 6 статей в научных изданиях, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук; 2 статьи в журналах, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа включает введение, четыре главы (анализ научно-технической литературы, объекты и методы исследований, результаты исследований, разработка технологии получения микрокапсулированного поликомпонентного ферментного препарата из пепсина и папаина и оценка его активности и стабильности при хранении), заключение, список литературы и приложения. Основное содержание работы изложено на 137 страницах машинописного текста, включает 30 рисунков и 29 таблиц, 194 источника литературы, из них 86 на иностранном языке.

## Основное содержание работы

Во **введении** обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна и практическая значимость работы.

На **первом этапе** проанализирована отечественная и зарубежная научно-техническая литература, посвященная характеристике, классификации ферментов, ферментных препаратов микробного, животного и растительного происхождения, исследованию биокаталитических технологий пищевых продуктов с использованием ферментов, способам микро- и микрокапсулирования ферментов, технологиям белковых препаратов ферментативного гидролиза и применению ферментов в производстве мясопродуктов.

На **втором этапе** усовершенствована технология растительного белкового препарата, полученного с использованием активированного протео-

литического фермента трипсина. На данном этапе исследований определен оптимум активности фермента в зависимости от pH и температуры среды, изучено влияние видимого света на активность фермента, представлена экспресс-методика определения биокаталитической активности фермента с помощью тест-пластинки, предложены технологические этапы производства белкового препарата из семян люпина. Определены органолептические показатели, химический состав, функционально-технологические свойства, микробиологические показатели, микроструктура полученного белкового препарата.

**Третий этап** посвящен практическому применению белкового препарата ферментативного гидролиза в технологии вареных колбас. На основании функционально-технологических свойств и микроструктуры фарша определен технологический этап внесения белкового препарата. Исследованы показатели качества вареной колбасы с использованием белкового препарата.

На **четвертом этапе** разработана технология получения поликомпонентного ферментного препарата из пепсина и папаина, отделенных защитным покрытием из мальтодекстрина. На пепсин в псевдокипящем слое было нанесено защитное покрытие из мальтодекстрина, затем на мальтодекстрин нанесли папаин с последующим его микрокапсулированием в мальтодекстрин. С помощью электронной микроскопии определена зависимость толщины защитного покрытия из мальтодекстрина на ферменте от продолжительности микрокапсулирования. Изучено влияние толщины защитных покрытий, pH среды, продолжительности хранения на протеолитическую активность полученного поликомпонентного ферментного препарата, состоящего из микрокапсулированных пепсина и папаина.

На **пятом этапе** проведена оценка эффективности технологии получения поликомпонентного ферментного препарата из пепсина и папаина на основании изменения влагосвязывающей способности (ВСС), влагоудерживающей способности (ВУС), pH, микроструктуры и растворимости белков мясного сырья в зависимости от продолжительности ферментирования микрокапсулированным поликомпонентным ферментным препаратом. На основании исследований структурно-механических свойств ветчинных изделий доказана эффективность применения микрокапсулированного поликомпонентного ферментного препарата, состоящего из пепсина и папаина, хранившегося более 6 мес.

Общая схема исследований представлена на рисунке 1.

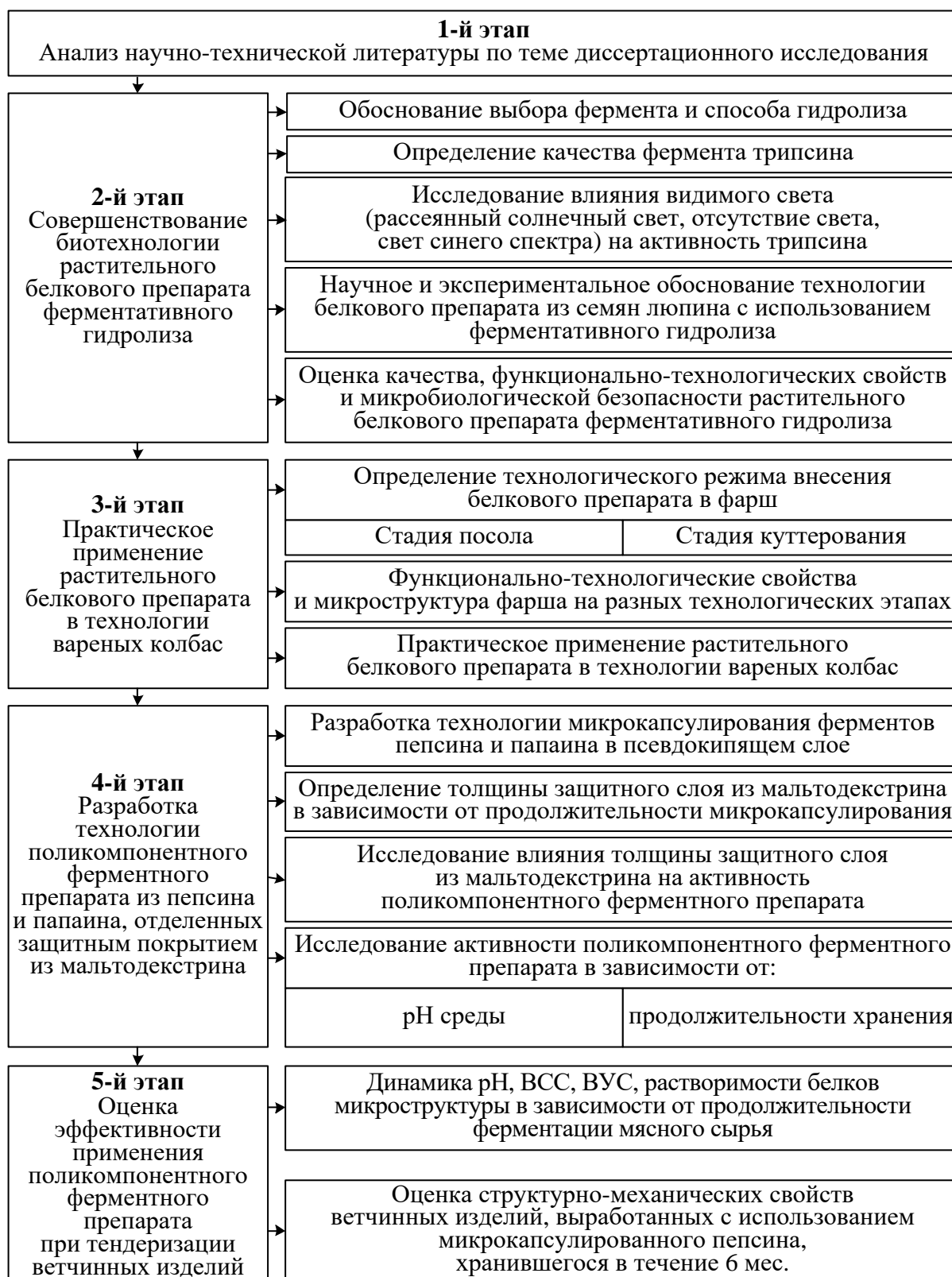


Рисунок 1 – Схема исследований

*Совершенствование технологии производства растительного белкового препарата с помощью ферментативного гидролиза. Установлено, что оптимум активности трипсина отмечается при pH 8,0 и температуре 40 °С. Проведен эксперимент по определению активности фермента трипсина,*



облученного светом синего спектра. Для опыта подготовили 0,3 %-й раствор трипсина на фосфатном буферном растворе с рН 8,0. Сделали разведения раствора фермента в дистиллированной воде при соотношениях раствора фермента и дистиллированной воды 1:2, 1:4, 1:6, 1:8 и т. д. до 1:256. Опытные образцы раствора трипсина облучали биолампой «Аверс-сан» в течение 8 ч, наносили по 2–3 капли на разработанную тест-пластинку при температуре 37 °С и учитывали реакцию через 10–15 мин. Активность фермента определяли по экспресс-методике, согласно которой желатиновую тест-пластинку после нанесения фермента необходимо поместить в термостат при температуре 37 °С и выдержать 20–30 мин.

Следует отметить, что рекомендуемая температура 37 °С при исследовании активности фермента приводит к размягчению желатиновой пластинки, что не позволяет правильно визуально оценить активность фермента, что связано с термообратимостью геля.

Предложено модернизировать состав желатиновой тест-пластинки путем смешивания агар-агара с желатином. Технология тест-пластинок следующая: берут агар-агар и желатин в соотношении 1:10, перемешивают с помощью магнитной мешалки при 1 200 об/мин в течение 3–5 мин, помещают в емкость, заливают десятикратным количеством дистиллированной воды и выдерживают в течение 30–40 мин до набухания агара и желатина, затем набухший раствор помещают на водяную баню при температуре 70–75 °С до образования геля. Жидким гелем заполняют на 2/3 чашки Петри и охлаждают. Исследованиями установлено, что полученные тест-пластинки стабильны к термообратимости при температурном оптимуме активности фермента.

Учет реакции проводили на основе визуального выявления на пластинке ямок различного радиуса, образованных в результате гидролиза коллагенсодержащего белка желатина. При этом активность фермента выражали в единицах. Например, при образовании ямки на желатиновой пластинке на месте нанесения капель раствора фермента в соотношении 1:32 активность фермента составляет 32 ед. Активность трипсина, облученного синим светом, значительно выше в сравнении с контрольными образцами, о чем свидетельствует диаметр и глубина ямок на желатиновой пластинке после нанесения ферментов. Так, диаметр ямок на желатиновой пластинке с ферментом, облученным синим светом, составляет от 28 до 36 мм, в то время как у контрольных образцов – 10–14 мм. Установлено, что активность контрольных образцов фермента составляет 32 ед. при разведении фермента 1:32, в то время как активность образцов фермента опытной группы находится на уровне 128 ед. Следовательно, облучение раствора трипсина светом синего спектра с длиной волны 435–470 нм позволяет увеличить его активность в четыре раза.

Разработана технология производства растительного белкового препарата из семян люпина (рисунок 2).

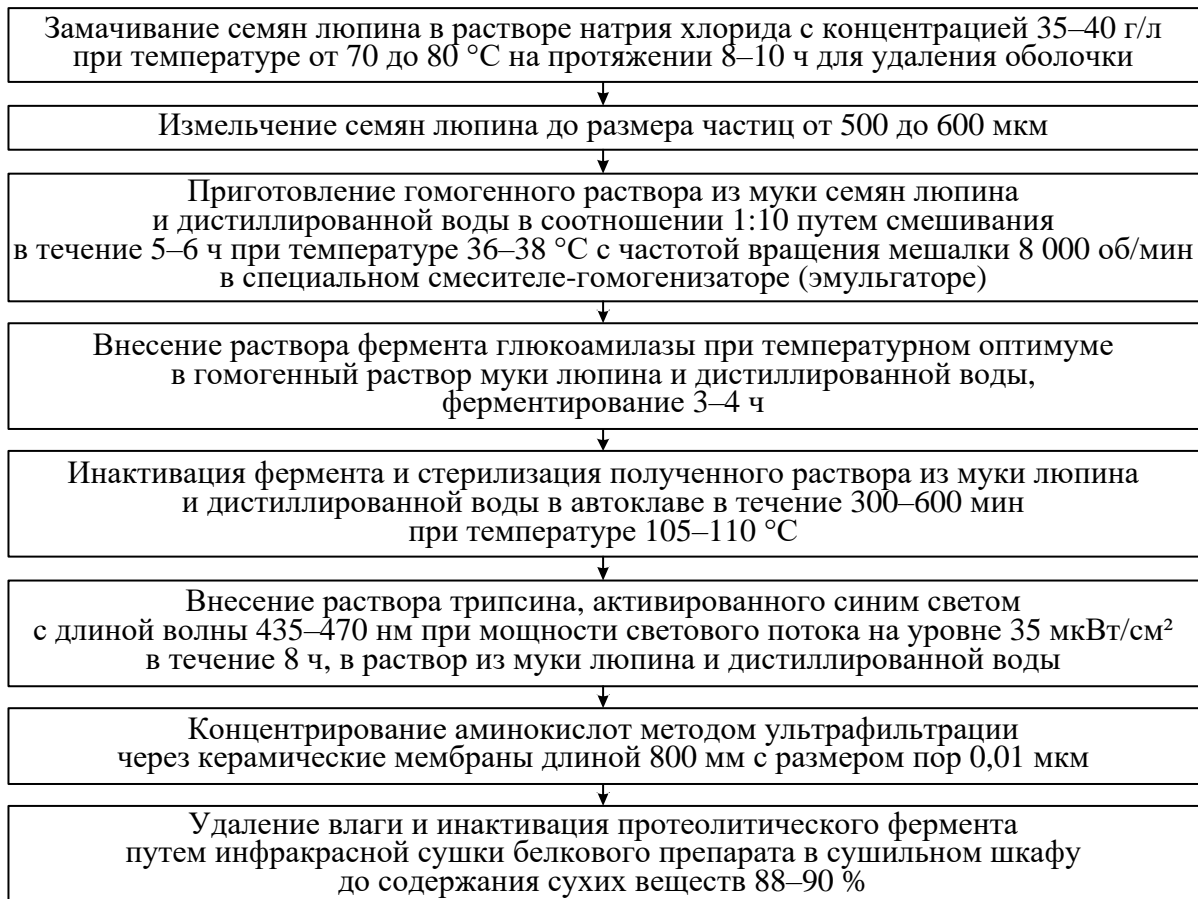


Рисунок 2 – Технологическая схема производства белкового препарата из семян люпина

Проведено исследование степени гидролиза белка по соотношению аминного азота и общего азота в белковом препарате. Значительное образование аминного азота отмечается в первые часы гидролиза. Так, после первого часа гидролиза содержание аминного азота составляет 3,2 г/л, после второго – 5 г/л. При дальнейшем увеличении времени гидролиза его скорость снижается. Так, после 4; 5; 6; 7 и 8 ч количество аминного азота составляет 5,8; 6,1; 6,3; 6,4; и 6,5 г/л соответственно. Максимальная степень гидролиза белка в гидролизате семян люпина отмечается через 6 часов гидролиза. Так, при времени гидролиза 1 ч степень гидролиза белка составляет 12,4 %, 2 ч – 21,8 %, 3 ч – 23,2 %, что согласуется со скоростью гидролиза, которая максимальна до 3 ч, а затем постепенно снижается. Установлено, что с увеличением концентрации фермента трипсина степень гидролиза возрастает и становится максимальной при количестве фермента 2 кг/100 кг раствора гидролизата, что позволяет сократить время гидролиза с 4 ч при концентрации фермента 1 кг/100 кг до 2 ч при концентрации фермента 2 кг/100 кг для достижения степени гидролиза 25 %. С увеличением pH с 3 до 8 степень гидролиза белка увеличивается и при pH 4 составляет 3,7 %, а при pH 8 – 32,7 % при концентрации фермента 2,0 кг/100 кг гидролизата.

Установлено, что оптимальный биотехнологический режим гидролиза белка в 25 % при концентрации трипсина 2 г/100 кг гидролизата и температурном оптимуме активности фермента следующий: рН от 7,25 до 8,25, время гидролиза 4–6 ч.

Полученный белковый препарат представляет собой мелкодисперсный порошок, имеет светло-желтый цвет; вкус и запах не выражены.

Проведены исследования химического состава и стабильности эмульсии растительного белкового препарата (таблицы 1, 2).

Таблица 1 – Химический состав растительного белкового препарата, % ( $n = 5$ )

Показатель	Значение, %
Массовая доля белка	74,1 ± 2,8
Массовая доля жира	7,9 ± 0,3
Массовая доля влаги	4,1 ± 0,3
Массовая доля золы	13,9 ± 0,5

Таблица 2 – Стабильность эмульсии растительного белкового концентрата

Процентное соотношение эмульсии после нагревания, %			Стабильность эмульсии, %
Вода	Масло	Эмульсия	
33,8 ± 1,2	2,4 ± 0,5	63,8 ± 3,9	63,8

Растительный белковый препарат отличается высокими функционально-технологическими свойствами. Так, влагоудерживающая способность составляет 517 %, жирудерживающая – 208 % и эмульгирующая способность – 98 %, стабильность эмульсии после нагревания составляет 63,8 %.

Полученные данные о химическом составе и функционально-технологических свойствах растительного белкового препарата свидетельствуют о перспективах его использования в технологии пищевых продуктов, в частности мясопродуктов.

*Практическое применение растительного белкового концентрата ферментативного гидролиза в технологии мясных систем.* Проведены исследования по влиянию гидратированного растительного белкового препарата на функционально-технологические свойства фарша для научного обоснования количества вводимого концентрата в состав вареных колбасных изделий и определения технологического этапа введения. Введение гидратированного белкового препарата в фарш позволяет увеличить содержание в нем белка на 10,4 %; 19,4 % и 26,6 % при замене мясного фарша на белковый концентрат в количестве 10 %; 20 % и 30 % соответственно. Количество жира в опытных образцах фарша снизилось на 6,7 %; 16,6 % и 21,9 % (таблица 3).

Таблица 3 – Химический состав контрольных и опытных образцов фарша из нежирной свинины ( $n = 5$ )

Показатель	Значение, %			
	1-я группа (контроль, фарш из нежирной свинины)	2-я группа (опыт, 10 % белкового препарата)	3-я группа (опыт, 20 % белкового препарата)	4-я группа (опыт, 30 % белкового препарата)
Массовая доля белка	12,4 ± 0,4	13,7 ± 0,2	14,8 ± 0,4*	15,7 ± 0,6*
Массовая доля жира	27,1 ± 1,8	25,3 ± 0,9	22,6 ± 1,2*	21,2 ± 1,0*
Массовая доля влаги	60,5 ± 0,3	61,0 ± 0,8	62,6 ± 1,4	63,1 ± 0,3*
Примечание – * Различия достоверны в сравнении с контрольной группой при $p \leq 0,05$ .				

Проведены исследования функционально-технологических свойств фарша после термической обработки при температуре 80–85 °С в течение 90–100 мин (таблица 4).

Таблица 4 – Функционально-технологические свойства образцов фарша из нежирной свинины с внесением белкового концентрата на стадии куттерования ( $n = 5$ )

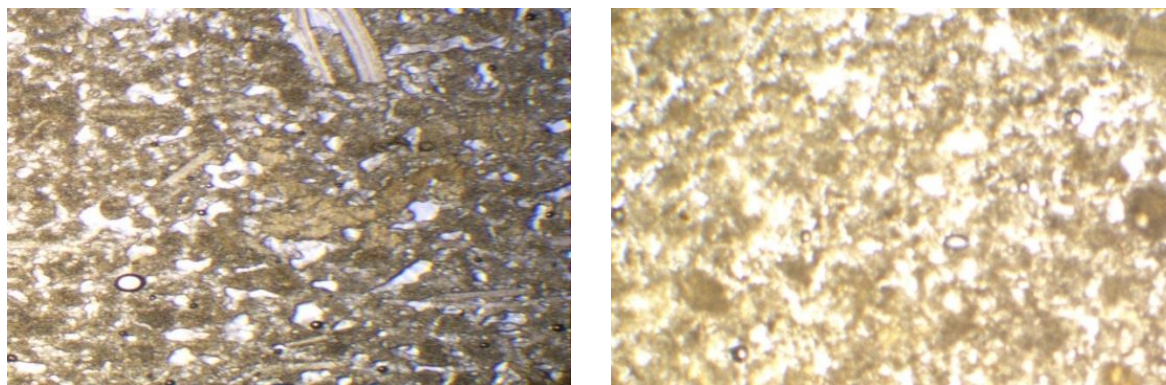
Показатель	Значение, %			
	1-я группа (контроль, фарш из нежирной свинины)	2-я группа (опыт, 10 % белкового препарат)	3-я группа (опыт, 20 % белкового препарата)	4-я группа (опыт, 30 % белкового препарата)
Влагоудерживающая способность	209 ± 6	248 ± 5*	289 ± 5*	326 ± 7**
Жироудерживающая способность	153 ± 4	174 ± 6*	195 ± 5*	207 ± 6**
Примечание – Различия достоверны при * $p \leq 0,05$ ; ** $p \leq 0,01$ .				

В результате исследований установлено, что внесение белкового препарата в фарш из нежирной свинины в количестве 10 %; 20 % и 30 % повышает ВУС на 18 %; 38,3 % и 60 % соответственно. Аналогичные изменения отмечены при исследовании жироудерживающей способности (ЖУС). Так, ЖУС во второй, третьей и четвертой опытных группах выше на 13,7 %; 27,5 % и 35,3 % по сравнению с контрольной.

Лучшие функционально-технологические свойства фарша отмечены при внесении белкового концентрата на стадии куттерования. Так, при внесении белкового концентрата на стадии куттерования ВУС и ЖУС составляют 248 % и 174 %.

Проведены исследования микроструктуры первой и второй групп образцов фарша.

На рисунке 3 представлена микроструктура образцов фарша при внесении растительного белкового концентрата (10 %) на стадии посола (*a*) на стадии куттерования (*b*).



*a* – на стадии посола

*б* – на стадии куттерования

Рисунок 3 – Микроструктура образцов фарша при внесении растительного белкового концентрата (увеличение  $\times 100$ )

Из рисунка 3 следует, что фарш представляет собой гомогенную массу, имеет включения белкового вещества и липидных капель. Следует отметить, что при внесении белкового препарата на стадии куттерования образцы фарша отличаются большей однородностью.

Применение растительного белкового концентрата в количестве 2 кг/100 кг основного сырья в рецептуре вареных колбас позволяет обеспечить высокие качественные характеристики и микробиологическую безопасность продукта после выработки и хранения.

*Разработка технологии получения микрокапсулированного поликомпонентного ферментного препарата из пепсина и папаина и оценка его активности и стабильности при хранении.* Для получения поликомпонентного ферментного препарата были выбраны пепсин и папаин, в качестве защитного слоя использовали 10 %-й водный раствор мальтодекстрина. Соотношение твердого вещества к жидкому (Т/Ж) выдерживали в пределах от 10:1 до 11,5:1. Ожижающим агентом, в том числе в режиме сушки, был воздух комнатной температуры, прокачиваемый через аппарат. В качестве контроля был взят чистый некапсулированный пепсин (свободный пепсин). Опытным путем была получена линейная зависимость ( $p \leq 0,05$ ) средней толщины нанесения раствора мальтодекстрина на гранулу пепсина в зависимости от продолжительности нанесения (рисунок 4).

Через 2 мин обработки раствором мальтодекстрина на грануле пепсина образуется защитный поверхностный слой толщиной 2 мкм от его среднего значения в конце процесса обработки, а после 6 мин обработки – 6 мкм, после 8 мин – 9 мкм. При этом расчетная скорость воздушного потока с раствором мальтодекстрина в узком сечении конуса рабочей камеры равнялась критической скорости витания крупных частиц пепсина и составила 0,17 м/с.

На рисунке 5 представлено фото фермента после капсулирования при толщине защитного покрытия 6 мкм. При этом активность пепсина наиболее стабильна при толщине слоя 6 мкм.

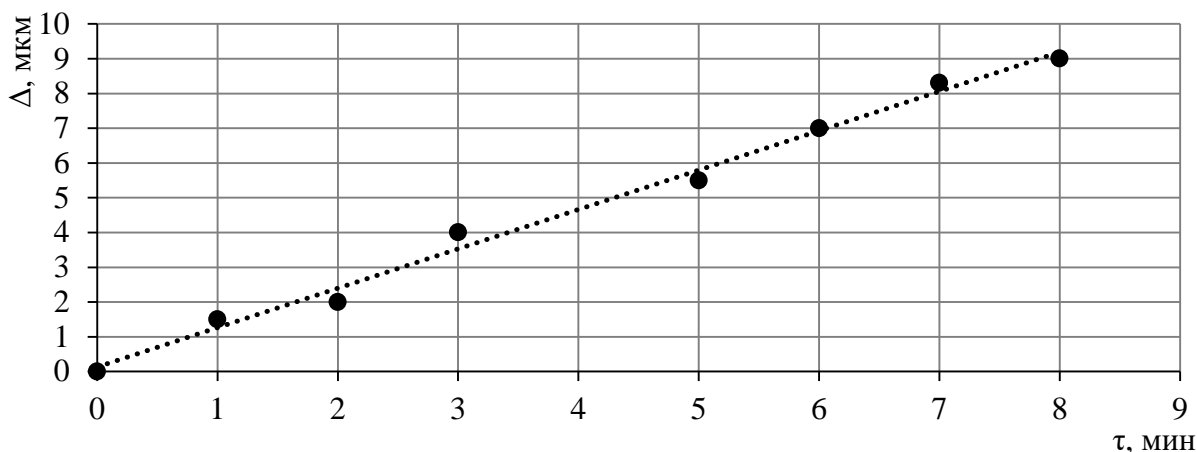


Рисунок 4 – Зависимость толщины слоя мальтодекстрина от продолжительности нанесения на пепсин

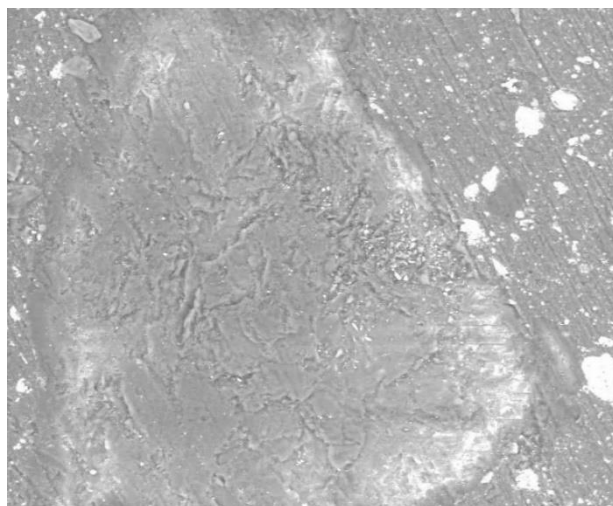


Рисунок 5 – Фермент пепсин после микрокапсулирования при толщине защитного покрытия 6 мкм (увеличение  $\times 1500$ )

Как показали опыты, толщина покрытия ферментом мальтодекстрином влияет на активность пепсина. Из результатов исследования видно, что чем толще слой мальтодекстрина, тем дольше сохраняется его первоначальная активность (рисунок 6).

Максимальная активность пепсина, иммобилизованного в растворе мальтодекстрина, сдвигается примерно на 2 ед. рН в щелочную сторону по сравнению со свободным ферментом, что, по всей вероятности, может быть обусловлено ограничением диффузии субстрата, когда отсутствует распределение протонов и ограничена их диффузия.

Разработана технология получения поликомпонентного ферментного препарата из пепсина и папаина, которая включает нанесение защитного покрытия (4 мкм) из мальтодекстрина на пепсин, нанесение папаина с последующим нанесением слоя мальтодекстрина (4 мкм) при скорости воздушного потока в узком сечении конуса рабочей камеры 0,17 м/с.

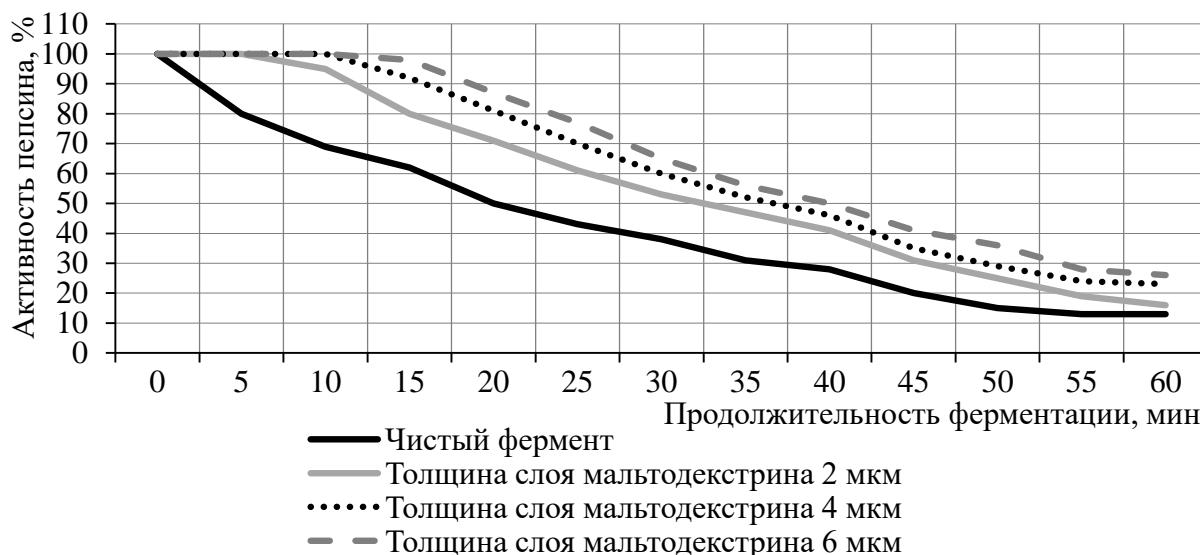


Рисунок 6 – Влияние толщины покрытия пепсина на его активность

Исследование протеолитической активности полученного ферментного препарата в зависимости от продолжительности хранения при температуре 0–2 °С показало (рисунок 7), что иммобилизация ферментов с использованием мальтодекстрина стабилизирует активность полученного ферментного препарата практически в течение 6 мес., в то время как у чистых (свободных) ферментов активность уменьшается уже через 3 мес.

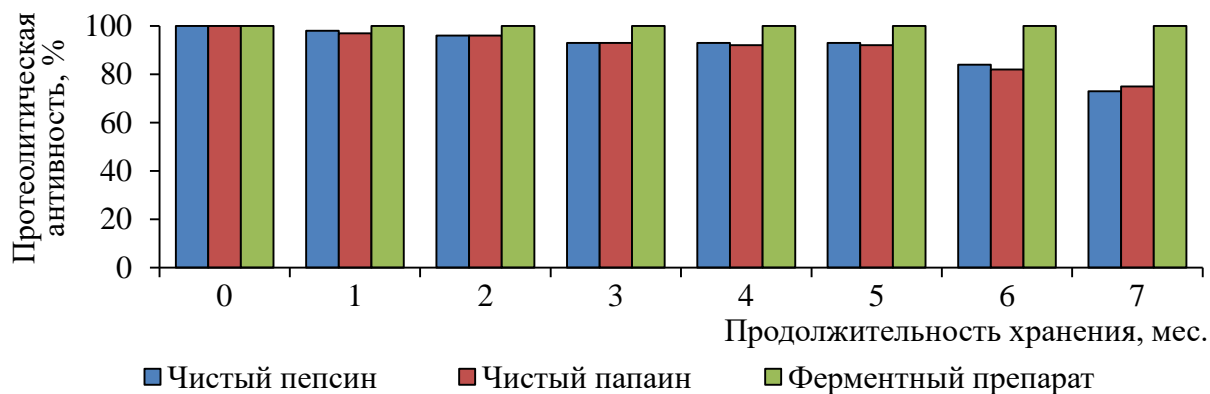


Рисунок 7 – Зависимость протеолитической активности чистых ферментов и микрокапсулированного поликомпонентного ферментного препарата от продолжительности хранения

Проведены исследования физико-химических свойств ветчинных изделий (задний окорок нежирной свинины без кости от охлажденных полутош): 1-я группа – контрольные образцы окорока (шприцевали рассолом с чистым пепсином); 2-я группа – опытные образцы окорока (шприцевали рассолом с чистым папаином); 3-я группа – опытные образцы окорока (шприцевали рассолом, содержащим микрокапсулированный поликомпонентный ферментный препарат). Ферменты и ферментный препарат хранились более 6 мес. Нашприцованное рассолом мясное сырье выдерживали

в посоле. Затем соленые образцы формовали, подпетливали и подвергали термической обработке в соответствии с действующей технологической инструкцией на производство ветчинных продуктов из свинины.

Под действием микрокапсулированного ферментного препарата рН окорока сдвигается в щелочную сторону, что связано с образованием оснований в результате гидролиза белка. У образцов ферментированного мяса третьей группы после 36 ч ферментации значение рН увеличилось на 7,4 %.

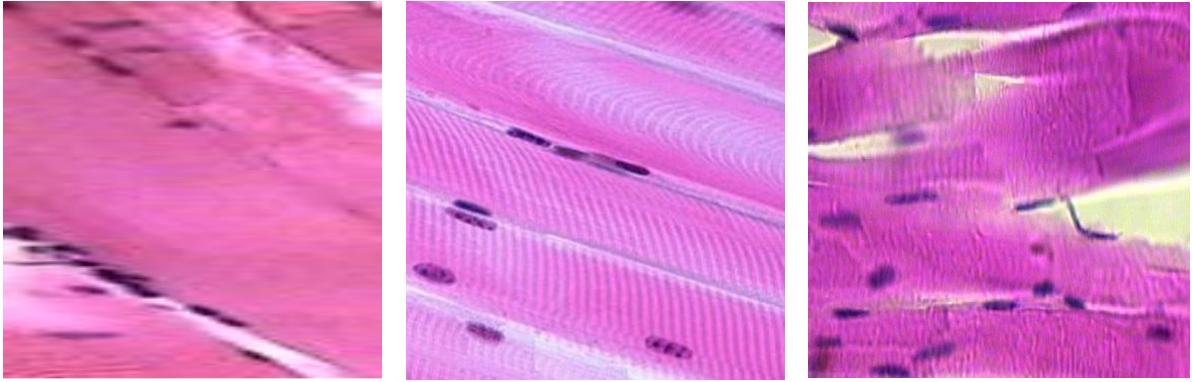
Установлено, что с увеличением продолжительности ферментации в третьей группе отмечается повышение ВСС. Так, в образцах мяса третьей группы ВСС до ферментации составляла 58,7 %, через 12; 24 и 36 ч – 63,4 %; 64,9 % и 67,2 %, в то время как в образцах мяса первой группы – 58,6 %; 59,8 %; 60,5 % и 61,3 %, во второй – 58,5 % 59,7 %; 60,4 % и 61,8 % соответственно. Аналогично значение ВУС в образцах свинины третьей группы увеличивается на фоне ферментации микрокапсулированным ферментным препаратом. Так, ВУС в третьей группе через 12; 24 и 36 ч составила 56,2 %; 57,8 % и 59,5 %, в то время как в первой – 54,3 %; 54,7 % и 55,1 %.

Процентное содержание азота саркоплазматических белков в образцах мяса возрастает, наибольшее количество отмечается в третьей группе. Так, после ферментации в течение 12; 24 и 36 ч количество азота саркоплазматических белков возросло на 4,6 %; 7,8 % и 10,0 %, в то время как в первой группе – на 1,2 %; 2,5 % и 4,4 %, во второй – 1,4 %; 2,7 % и 4,6 % соответственно. Содержание азота миофибриллярных белков к общему азоту достоверно увеличилось в исследуемых образцах мяса после ферментации. Так, через 12; 24 и 36 ч ферментации в третьей группе оно составило 17,7 %; 18,5 % и 20,8 %, в первой группе – 15,4 %; 16,3 % и 16,9 %, во второй группе – 15,6 %; 16,0 % и 17,1 %. При ферментации мяса микрокапсулированным поликомпонентным ферментным препаратом отмечается увеличение небелкового азота к общему белку. Процентное содержание небелкового азота к общему азоту увеличилось через 12; 24 и 36 ч ферментации на 2,2 %; 3,2 % и 4,8 %, в первой группе – на 0,4 %; 0,7 % и 1,1 %, во второй – на 0,6 %; 1 % и 1,4 % соответственно.

Проведено исследование микроструктуры мясного сырья. Все исследуемые протеолитические ферменты и ферментный препарат хранились в течение 9 мес. Из рисунков 8а и 8б следует, что в мышечных волокнах отсутствуют изменения микроструктуры, волокнистое, клеточное и аморфное строение сохранено, мышечная ткань имеет выраженную поперечнополосатую исчерченность. На рисунке 8в видно, что миофибриллы частично разрушены и отмечается выход ядер клеток в межклеточное пространство.

На рисунке 9 представлено влияние продолжительности хранения чистого пепсина, чистого папаина и микрокапсулированного поликомпонентного ферментного препарата на структурно-механические свойства ветчины.





*a* – рассол  
с чистым пепсином

*б* – рассол  
с чистым папаином

*в* – рассол  
с микрокапсулированным  
поликомпонентным  
ферментным препаратом

Рисунок 8 – Микроструктура мышечной ткани свинины (продольный срез) при толщине защитного покрытия 4 мкм, увеличение  $\times 100$

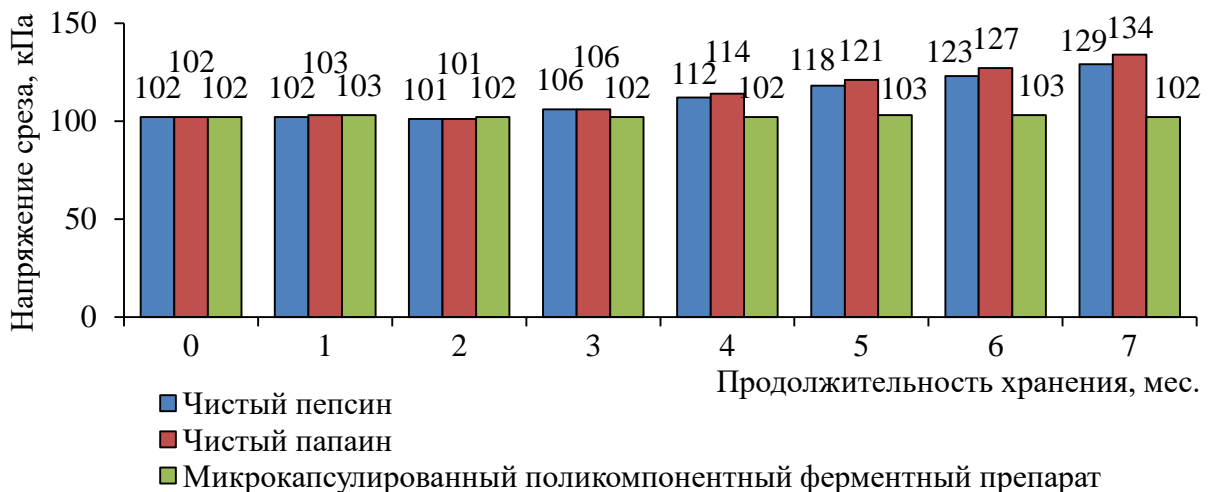


Рисунок 9 – Влияние продолжительности хранения чистого пепсина, чистого папаина и микрокапсулированного поликомпонентного ферментного препарата на структурно-механические свойства ветчины

Чистый пепсин и чистый папаин через 3 мес. хранения начали заметно терять свою активность, их протеолитическое действие на продукт существенно снижалось. В то же время микрокапсулированный поликомпонентный ферментный препарат не терял своей активности в течение 7 мес. хранения, что видно по величине напряжения среза ветчины.

С учетом полученных результатов можно рекомендовать осуществлять микрокапсулирование протеолитических ферментов пепсина и папаина с использованием мальтодекстрина при толщине покрытия от 4 до 6 мкм, что позволит расширить возможности использования иммобилизованных ферментов при производстве мясных продуктов.

## Заключение

В область научных интересов пищевой биотехнологии входят исследования по изучению протеолитической активности ферментов, совершенствованию технологий ферментативного гидролиза белка и направленного действия ферментов на пищевые системы. На основании проведенных исследований предложены способ активации протеолитической активности фермента и экспресс-методика ее определения, технология растительного белкового препарата с использованием активированного протеолитического фермента, технология получения поликомпонентного ферментного препарата, состоящего из последовательно микрокапсулированных пепсина и папаина в защитный слой из мальтодекстрина, проведена практическая апробация результатов исследований и сделаны следующие выводы.

1. Установлено, что оптимум активности трипсина отмечается при рН 8,0 и температуре 40 °С. Разработана технология активации протеолитических свойств фермента трипсина путем экспозиции 0,35 %-го раствора фермента на фосфатном буферном растворе светом синего спектра с длиной волны 435–470 нм и мощностью светового потока 35 мкВт/см<sup>2</sup> в течение 480 мин.

2. Усовершенствована экспресс-методика определения протеолитической активности фермента путем повышения температуры гидролиза тест-пластинки до температурного оптимума активности фермента, что позволяет снизить время учета реакции с 20–30 до 10–15 мин.

3. Научно обоснованы и экспериментально подтверждены технологические этапы производства белкового препарата из семян люпина с использованием ферментативного гидролиза, включающие: удаление оболочки и измельчение семян, гомогенизацию раствора из муки семян люпина, обработку ферментом глюкоамилазой с последующей инактивацией, протеолитический гидролиз белка активированным трипсином, ультрафильтрацию и сушку белкового препарата. Установлен оптимальный биотехнологический режим гидролиза белка из семян люпина в 25 % при концентрации трипсина 2 г/100 кг гидролизата: рН 7,25–8,25, время гидролиза – 4–6 ч.

4. Проведена оценка органолептических показателей, химического состава, функционально-технологических свойств и микроструктуры растительного белкового препарата ферментативного гидролиза. Установлено, что белковый препарат имеет однородную гомогенную структуру, содержание белка составляет 74,1 %, жира – 7,9 %, золы – 4,1 % и влаги – 13,9 %, влагоудерживающая – 517 %, жирудерживающая – 208 % и эмульгирующая способность – 98 %.

5. На основании исследований органолептических показателей, химического состава и функционально-технологических свойств доказана перспективность замены фарша из нежирной свинины на гидратированный

белковый концентрат при производстве вареных колбас. На основании исследований влагоудерживающей, жирудерживающей способности и микроструктуры фарша определен технологический этап внесения гидратированного белкового препарата – стадия куттерования. Установлено, что замена основного мясного сырья в количестве 2 % при производстве вареной колбасы на гидратированный растительный белковый препарат в соотношении 1:10 обеспечивает высокие качественные характеристики готового продукта.

6. Определены рациональные параметры иммобилизации пепсина для толщины защитного покрытия 6 мкм: скорость воздушного потока с 10 %-м раствором мальтодекстрина в узком сечении конуса рабочей камеры – 0,17 м/с, время – 6 мин. Предложена технология получения поликомпонентного ферментного препарата путем последовательного микрокапсулирования пепсина и папаина в псевдокипящем слое из мальтодекстрина. Показано, что создание защитного покрытия из мальтодекстрина с толщиной 4 и 6 мкм позволяет сохранить протеолитическую активность ферментов на протяжении более 6 мес. при температуре хранения 0–2 °С.

7. Экспериментальным путем доказана эффективность применения микрокапсулированного поликомпонентного ферментного препарата в технологии ветчинных изделий. Под действием микрокапсулированного поликомпонентного ферментного препарата, хранившегося более 6 мес., рН мяса после 36 ч ферментации увеличивается на 7,3 %, ВСС – на 8,5 %, ВУС – на 5,4 %, азот саркоплазматических белков к общему азоту – на 10,0 %, азот миофибриллярных белков к общему азоту – на 5,6 %, небелковый азот к общему азоту – на 4,8 %, полипептидный азот к общему азоту – на 3,3 %, изменяется микроструктура (миофибриллы частично разрушены, отмечается выход ядер клеток в межклеточное пространство), напряжение среза ветчинных изделий ниже на 31,4 %. Достоверных изменений показателей гидролиза белка под действием немикрокапсулированных ферментов, хранившихся более 6 мес., не отмечено.

## **Публикации по теме диссертации**

### **Статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендуемых ВАК**

1. **Третьякова, И. Н.** Влияние толщины защитного слоя микрокапсулированного фермента на его активность и стабильность / И. Н. Третьякова, С. Л. Тихонов, Н. В. Тихонова, Л. С. Кудряшов // Достижения науки и техники АПК. – 2019. – Т. 33, № 9. – С. 70–73.

2. **Третьякова, И. Н.** Разработка паштета функциональной направленности с добавлением растительного белкового препарата / И. Н. Третьякова, С. Л. Тихонов, Н. В. Тихонова // Достижения науки и техники АПК. – 2020. – Т. 34, № 3. – С. 79–82.

3. **Третьякова, И. Н.** Использование белкового препарата из семян люпина при производстве вареных колбас / И. Н. Третьякова, С. Л. Тихонов, Н. В. Тихонова, Л. С. Кудряшов // Мясная индустрия. – 2020. – № 5. – С. 20–25.

4. **Третьякова, И. Н.** Технология и оценка качества растительного белкового препарата, полученного ферментативным гидролизом / И. Н. Третьякова, С. Л. Тихонов, Н. В. Тихонова // Технология и товароведение инновационных пищевых продуктов. – 2020. – № 3 (62). – С. 96–101.

5. Тихонов, С. Л. Белковый препарат и перспективы его использования в технологии мясопродуктов / С. Л. Тихонов, **И. Н. Третьякова**, Н. В. Тихонова, В. А. Лазарев // Индустрия питания. – 2020. – Т. 5, № 2. – С. 53–60.

6. Брашко, И. С. Биотехнологический метод конверсии коллагенсодержащего сырья с использованием фермента микробного происхождения / И. С. Брашко, **И. Н. Третьякова**, С. Л. Тихонов, Н. В. Тихонова, О. К. Мотовилов // XXI век: итоги прошлого и проблемы настоящего. – 2021. – № 3 (53). – С. 146–150.

#### **Статьи в журналах, индексируемых в Web of Science и Scopus**

7. **Tretyakova, I.** Production of herbal protein isolates with the enzymatic hydrolysis technology / I. Tretyakova, S. Tikhonov, A. Diachkova // International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences. – 2020. – № 9 (3). – P. 10–15.

8. Miftakhutdinova, E. Technology optimization for the production of meat paste / E. Miftakhutdinova, S. Tikhonov, **I. Tretyakova**, A. Diachkova // International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences – 2021. – № 10 (1). – P. 100–108.

#### **Статьи в международных и всероссийских (национальных) научно-практических конференциях**

9. **Третьякова, И. Н.** Исследование сохранности микрокапсулированной аскорбиновой кислоты в колбасных изделиях / И. Н. Третьякова, С. Л. Тихонов // Биотехнологические аспекты управления технологиями пищевых продуктов в условиях международной конкуренции : материалы Всерос. (нац.) науч.-практ. конф. – Курган : Курганская ГСХА, 2019. – С. 350–352.

10. **Третьякова, И. Н.** Разработка технологии микрокапсулирования фермента пепсина / И. Н. Третьякова, С. Л. Тихонов, Н. В. Тихонова // Потребительский рынок: качество и безопасность товаров и услуг : материалы X Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 100-летию Орловского государственного университета им. И. С. Тургенева. – Орел : ОГУ им. И. С. Тургенева, 2019. – С. 363–367.

11. Брашко, И. С. Разработка способа микрокапсуляции биологически активных веществ и их использование для обогащения пищевой продукции / И. С. Брашко, **И. Н. Третьякова**, С. Л. Тихонов // Научное сопровождение деятельности учреждений Роспотребнадзора : материалы Всерос. науч.-практ. конф. – Екатеринбург : ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора, 2019. – С. 31–33.

12. **Третьякова, И. Н.** Активация протеолитического фермента видимым светом / И. Н. Третьякова, С. Л. Тихонов, Н. В. Тихонова // Научно-инновационные технологии как фактор устойчивого развития агропромышленного комплекса : материалы Всерос. (нац.) науч.-практ. конф. – Курган : Курганская ГСХА, 2020. – С. 213–216.

13. **Третьякова, И. Н.** Растительный белковый препарат, полученный ферментативным гидролизом / И. Н. Третьякова, С. Л. Тихонов, Н. В. Тихонова // Достижения и перспективы научно-инновационного развития : материалы II Всерос. (нац.) науч.-практ. конф. с междунар. участием. – Курган : Курганская ГСХА, 2021. – С. 961–963.

14. Брашко, И. С. Способ производства и биокаталитические свойства ферментного препарата / И. С. Брашко, **И. Н. Третьякова**, С. Л. Тихонов [и др.] // Пищевые технологии и биотехнологии : материалы XVII Всерос. конф. молодых ученых, аспирантов и студентов с междунар. участием. – Казань : КНИТУ, – 2021. – С. 275–279.

Подписано в печать 30.06.2021.  
Формат 60 × 84 <sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Гарнитура Таймс. Бумага офсетная. Печать плоская.  
Уч.-изд. л. 1,0. Тираж 100 экз. Заказ

Отпечатано с готового оригинал-макета в подразделении оперативной полиграфии  
Уральского государственного экономического университета  
620144, г. Екатеринбург, ул. 8 Марта/Народной Воли, 62/45