

## ИССЛЕДОВАНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ПРОДУКТОВ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА СОЕВОЙ МУКИ

Е.В. Милорадова, доцент, С.Е. Траубенберг, профессор,

Е.А. Бадичко, аспирант, П.А. Иванушкин, аспирант

Московский государственный университет пищевых производств

кафедра Аналитической химии

e-mail: lena\_badichko@mail.ru

**В** работе представлены результаты исследований фракционного состава и дана характеристика аминокислотного состава продуктов гидролиза соевой муки ферментными препаратами Бирзим П7 и Бирзим Чилл.

**Ключевые слова:** соевая мука, фракционный белковый состав, аминокислотный состав, гидролиз ферментными препаратами.

### ВВЕДЕНИЕ

Соевая обезжиренная и полуобезжиренная мука является наиболее дешевым белок-содержащим вторичным продуктом переработки сои на масло, содержащим, в соответствии с литературными данными, 38–54% ценного белка [1]. Вследствие этого соевая мука является ценным сырьем, модификация которого, в том числе ферментативная, позволяет получать на ее основе продукты, содержащие 30–90% белка и отличающиеся по функциональным свойствам, что, несомненно, расширяет области ее использования в пищевой промышленности.

Для ферментативной модификации соевой муки наиболее часто используют протеолитические ферменты растительного, микробного и животного происхождения [2, 3]. Эти ферменты различаются по субстратной специфичности, избирательности гидролиза пептидных связей в зависимости от вида аминокислот, образующих пептидную связь, а также оптимальными условиями, обеспечивающими высокую скорость реакции. В результате модификации компонентов соевой обезжиренной муки ферментными препаратами могут быть получены гидролизаты с определенным профилем пептидов и набором аминокислот и обладающие уникальными свойствами, такими как высокая растворимость, низкая вязкость, термостабильность и др., что позволяет их рассматривать как универсальную добавку при производстве широкого ассортимента продуктов питания [3].

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для проведения исследований нами были выбраны ферментные препараты Бирзим Чилл и Бирзим П7. Бирзим Чилл является препаратом растительного происхождения и получен из латекса фрукта Карика папайя, а

Бирзим П7 – микробный препарат, полученный из специально отобранного штамма *Bacillus subtilis*.

В работах [3–5] приведены данные по выбору оптимальных условий действия ферментных препаратов для гидролиза белков соевой муки, которые были использованы в данной работе (см. Экспериментальную часть).

Установлено, что при оптимальных концентрациях веществ в реакции ферментативного гидролиза и оптимальных условиях их взаимодействия максимальное накопление аминного азота – 700–1000 мг% – в гидролизатах достигается за первые 8 ч гидролиза (за количество продуктов реакции принимали разность  $N_i - N_0$  между количеством аминного азота в опытной пробе  $N_i$  и количеством аминного азота в муке  $N_0$ ) (рис. 1).

Изучено совместное действие ферментных препаратов Бирзим Чилл и Бирзим П7 на соевую полуобезжиренную муку [4].

Показано, что создание мультэнзимной композиции (МЭК), состоящей из Бирзим Чилл с концентрацией 0.015 ед. ПС\*/г муки и Бирзим П7 с концентрацией 0.25 ед. ПС/г муки, позволяет интенсифицировать процесс гидролиза и повысить степень биоконверсии растительного белка, по сравнению с использованием каждого препарата в отдельности, на 10–50% (рис. 1).

Принимая во внимание тот факт, что выбранные нами ферментные препараты являются эндопептидазами, действующими на глубокие пептидные связи, расщепляя белковые молекулы на более мелкие фрагменты, то для оценки степени протеолиза белков и характеристики фракционного состава использовали метод гель-хроматографии.

\* ПС – протеолитическая активность

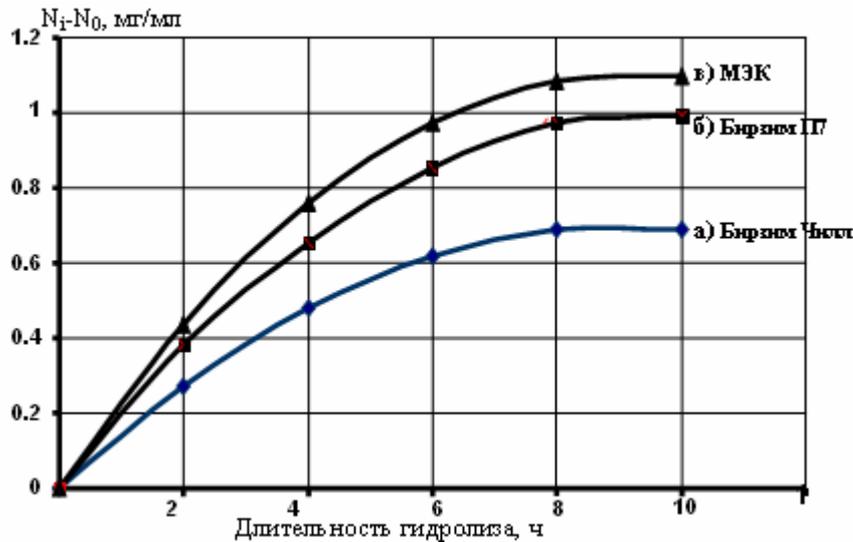


Рис. 1. Динамика накопления аминного азота при использовании ферментных препаратов: а) Бирзим Чилл; б) Бирзим П7; в) МЭК (Бирзим Чилл + Бирзим П7).

Модификацию белков полуобезжиренной соевой муки проводили ферментными препаратами Бирзим Чилл, Бирзим П7 и их МЭК при ранее выбранных оптимальных условиях [4].

В качестве контроля использовали водный экстракт из полуобезжиренной соевой муки, полученный при соотношении мука – вода 1 : 10. Гель-хроматографию осуществляли на колонке с TSK-gel Toyopearl HW-55F, элюцию проводили водой со скоростью 30 мл/ч, отбор проб осуществляли по 4 мл. Для определения молекулярной массы белковых фракций колонку калибровали стандартными метчиками – белками с известной молекулярной массой. Профили элюции белков полуобезжиренной соевой муки представлены на рис. 2.

В результате гель-хроматографии белки исследуемого образца соевой муки разделя-

ются на три основные фракции. Анализ распределения водорастворимых белков соевой муки по фракциям показывает, что значительную часть анализируемых белков составляют агрегаты белков с молекулярной массой 700000 Да и более (I пик), и, вероятно, этот пик соответствует белкам 15S- и  $\alpha$ -конглицинину. На долю этих белков приходится 30.77% от общего количества. Фракция, соответствующая пику II, с молекулярной массой 55000–8000 Да, выходящая с объемом элюции 84–108 мл, скорее всего представлена  $\beta$ -конглицинином и глицинином, а также в нее входят пептиды, включающие в среднем до 40-50 аминокислотных остатков. На ее долю приходится 47.25%. Доля низкомолекулярной фракции, выходящей с общим объемом колонки, составляет 21.98% (табл. 1, рис. 2).

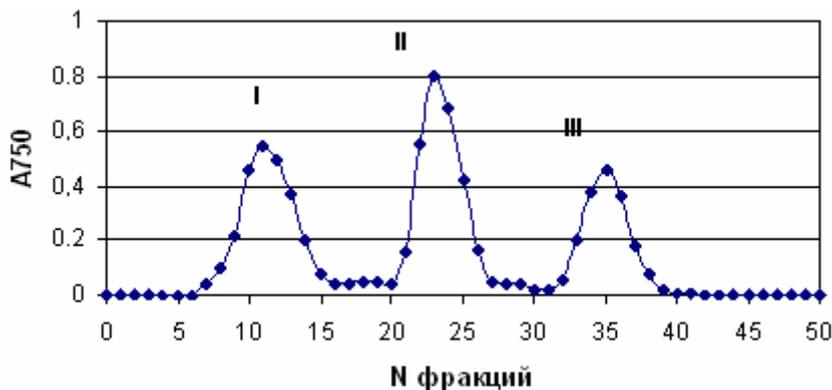


Рис. 2. Гель-хроматограмма белков полуобезжиренной соевой муки.

Таблица 1. Молекулярная масса белков полуобезжиренной соевой муки.

Фракции	Объем элюата, мл	Молекулярная масса, Да	% от общего количества
I пик	32–60	Больше 700000	30.77
II пик	84–108	55000–8000	47.25
III пик	128–156	Низкомолекулярные азотсодержащие соединения	21.98

При фракционировании белков соевой муки, подвергнутой модификации ферментным препаратом Бирзим Чилл, обнаруживается 6 фракций, ферментным препаратом Бирзим П7 – 7 фракций, а при использовании МЭК – 8 фракций. При этом во всех опытных образцах увеличивается не только общее количество водорастворимых белков по сравнению с соевой мукой, но и количество высоко-, средне- и низкомолекулярных фракций (рис.3–5; табл. 2–4).

Следует отметить, что рост общего содер-

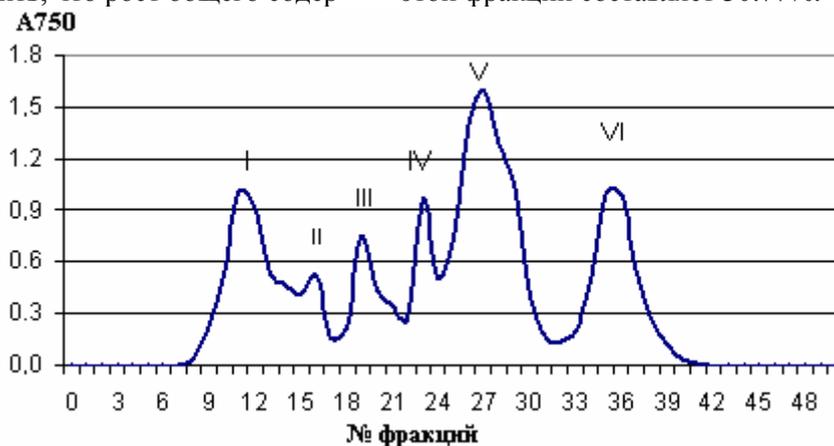


Рис. 3 . Гель-хроматограмма белков соевой муки после ее модификации ферментным препаратом Бирзим Чилл.

Таблица 2. Молекулярная масса белков соевой полуобезжиренной муки после ее модификации ферментным препаратом Бирзим Чилл.

Фракции	Объём элюата, мл	Молекулярная масса, Да	% от общего количества
I пик	32–56	Более 700000	19.96
II пик	60–68	260000–160000	5.87
III пик	72–88	90000–35000	10.86
IV пик	92–96	25000–10000	7.88
V пик	100–124	9000–1000	35.51
VI пик	132–160	Менее 1000	19.92

При фракционировании 3-х опытных образцов модифицированной соевой муки появляются фракции с молекулярной массой 260000–160000 Да (II пик) и 90000–35000 Да (III пик). На их долю приходится 16.73% белка в случае использования ферментного препарата Бирзим Чилл, 19.5% – Бирзим П7, и 14.41% – МЭК.

При этом во всех образцах гидролизованной муки доля низкомолекулярных азотсодержащих соединений (аминокислот и низкомолекулярных пептидов) возрастает в 2.5-3 раза (пики IV–VI, VII, VIII) по сравнению с аналогичной фракцией соевой муки (пик III на рис. 2). По мнению ряда исследователей, β-конглицинин сои хорошо поддается атаке протеолитических ферментных препаратов, а глицинин более устойчив к протеолиту [8, 9]. Основной полипептид глицинина гидролизуетс хуже, чем кислотный, и это связано

жания растворимого белка в опытных образцах свидетельствует о том, что в процессе гидролиза часть белков соевой муки переходит из нерастворимого в растворимое состояние, что согласуется с работами [6, 7]. Кроме того, установлено, что во всех опытных образцах доля высокомолекулярной фракции белков снижается и составляет 19.96% при действии ферментного препарата Бирзим Чилл, 17.22% – Бирзим П7 и 12.97% – МЭК, в то время как в контрольном образце доля этой фракции составляет 30.77%.

с его способностью образовывать нерастворимые высокомолекулярные комплексы [8].

Таким образом, анализ распределения водорастворимых белков полуобезжиренной соевой муки и муки, подвергнутой гидролизу ферментными препаратами Бирзим П7, Бирзим Чилл и их МЭК, по фракциям, показывает, что под действием ферментных препаратов протеолитического действия происходит глубокий гидролиз белков соевой муки. При этом фермент активно гидролизует как высокомолекулярные белки, переводя их из нерастворимого в растворимое состояние, так и средне- и низкомолекулярные белки, а также пептиды с накоплением значительного количества промежуточных продуктов гидролиза и низкомолекулярных азотсодержащих соединений. Это свидетельствует о том, что протеазы, содержащиеся в данных ферментных препаратах, обладают широкой специфичностью действия.

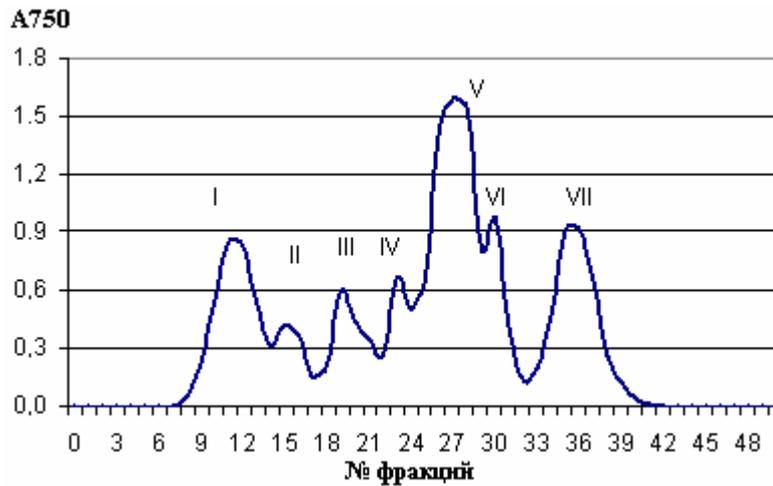


Рис. 4. Гель-хроматограмма белков соевой муки после ее модификации ферментным препаратом Бирзим П7.

Таблица 3. Молекулярная масса белков соевой полуобезжиренной муки после ее модификации ферментным препаратом Бирзим П7.

Фракции	Объём элюата, мл	Молекулярная масса, Да	% от общего количества
I пик	32–56	Более 700000	17.22
II пик	60–68	260000–160000	4.90
III пик	72–88	90000–35000	14.60
IV пик	92–96	25000–10000	6.05
V пик	100–116	9000–3000	31.13
VI пик	120–124	3000–1000	7.04
VII пик	128–160	Менее 1000	19.06

Для более полной характеристики белковой части продуктов гидролиза соевой муки под действием ферментных препаратов Бирзим П7, Бирзим Чилл и их МЭК

исследовали состав свободных аминокислот, содержащихся в гидролизатах, методом ВЭЖХ на хроматографе Agilent 1100 (США). Результаты исследований представлены в табл. 5.

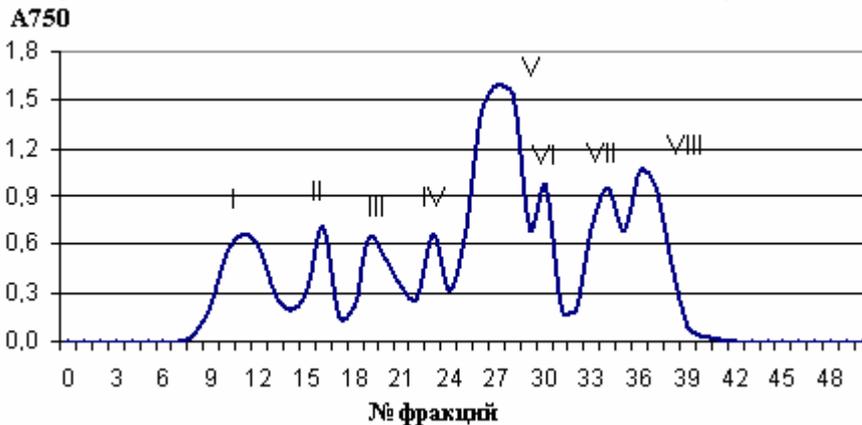


Рис. 5. Гель-хроматограмма белков соевой муки после её модификации с применением МЭК (Бирзим Чилл и Бирзим П7).

Таблица 4. Молекулярная масса белков соевой муки после ее модификации МЭК.

Фракции	Объём элюата, мл	Молекулярная масса, Да	% от общего количества
I пик	32–56	Более 700000	12.97
II пик	60–68	260000–160000	5.83
III пик	72–88	90000–35000	8.58
IV пик	92–96	25000–10000	6.25
V пик	100–116	9000–3000	29.31
VI пик	120–124	3000–1000	5.74
VII–VIII пики	128–160	Менее 1000	31.32

Таблица 5. Содержание свободных аминокислот в соевой муке, подвергнутой ферментативному гидролизу.

Аминокислота	Содержание аминокислот в % к общему количеству свободных аминокислот в гидролизатах соевой муки, полученных под действием ферментных препаратов		
	Бирзим Чилл	Бирзим П7	МЭК
Аспарагиновая кислота	5.34	4.61	9.78
Глутаминовая кислота	6.43	7.36	6.60
Серин	2.59	2.23	5.37
Гистидин	0.63	0.92	2.03
Глицин	3.78	3.51	3.28
Треонин	0.74	0.81	1.44
Аланин	2.89	3.38	5.51
Аргинин	7.86	7.31	7.57
Тирозин	6.46	5.99	3.80
Цистин	31.76	29.26	14.94
Валин	3.93	3.56	4.01
Метионин	7.09	7.36	4.22
Фенилаланин	5.84	6.15	5.34
Триптофан	0.48	1.47	4.64
Изолейцин	4.48	5.89	9.69
Лейцин	4.61	5.45	7.29
Лизин	5.09	4.74	4.49
Сумма аминокислот	100	100	100

В результате проведенных исследований установлено, что все образцы муки, подвергнутые ферментативному воздействию, содержат одинаковый набор аминокислот, однако их распределение в образцах различно, что, вероятно, обусловлено действием ферментных препаратов на пептидные связи, образованные различными аминокислотными остатками

Наиболее интересными являются результаты по аминокислотному составу гидролизата муки, полученного при действии МЭК. Так, содержание гистидина, аланина, триптофана, изолейцина, серина, аспарагиновой кислоты в нем выше в 1.6-3.2 раза по сравнению с содержанием этих аминокислот в гидролизатах, полученных с использованием отдельных ферментных препаратов.

Содержание незаменимых аминокислот в полученных гидролизатах составляет 58.5–70%, что свидетельствует об их высокой пищевой ценности.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что ферментные препараты Бирзим Чилл и Бирзим П7 и их МЭК целесообразно использовать для модификации белков соевой муки, что способствует повышению ее пищевой ценности, изменению ее функциональных свойств и расширяет пути ее использования в различных отраслях пищевой промышленности.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали муку соевую дезодорированную полуобезжиренную (ГОСТ 3898-56), произведенную из генетически немодифицированной сои, предоставленную компанией «Техномол» (г. Москва); ферментные препараты Бирзим П7 и Бирзим Чилл фирмы «Erbsloeh» (Германия).

Гидролиз соевой муки ферментными препаратами проводили при следующих условиях: концентрация соевой муки в суспензии 100 мг/мл; Бирзим П7 – 0.5 ед. ПС/г муки, pH 6.3, температура 45°C, время гидролиза 8 ч; Бирзим Чилл – 0.03 ед. ПС/г муки, pH 8, температура 50°C, время гидролиза 8 ч; МЭК (Бирзим Чилл – 0.015 ед. ПС/г муки и Бирзим П7 – 0.25 ед. ПС/г муки), pH 8, температура 50°C, время гидролиза 10 ч.

Аминный азот определяли методом формольного титрования [10].

Для исследования фракционного состава растворимых белков использовали метод гель-фильтрации. Фракционирование осуществляли на колонке 2.2×35 мм, заполненной гелем Toyopearl gel HW-55F (Япония), позволяющем разделять белки с молекулярной массой от 1000 до 700000 Да. Элюцию проводили дист. водой со скоростью 30 мл/ч, отбор проб осуществляли по 4 мл. Каждую отобранную фракцию дополнительно исследовали на содержание в ней белка по методу

Лоури, затем рассчитывали процентное содержание каждой фракции по отношению к общему числу компонентов. Поглощение элюата определяли при длине волны 280 нм. Свободный объем определяли по выходу декстрана синего (молекулярная масса около 2 млн. Да). Общий объем определяли по выходу тирозина. Для определения молекулярной массы белковых фракций колонку маркировали стандартными метчиками – белками с известной молекулярной массой. Определение молекулярной массы вели по калибровочной кривой [11].

Определение свободных аминокислот в гидролизатах соевой муки проводили методом ВЭЖХ на хроматографе Agilent 1100 (США), оборудованном диодно-матричным спектрофотометрическим детектором и флуориметрическим детектором, а также системой

для сбора и обработки хроматографических данных Agilent.

Образцы гидролизатов без разведения фильтровали через бумажный фильтр «синяя лента», затем через тefлоновый фильтр с размером пор 0.45 мкм. Разделение проводили на колонке 200×2.1 мм (силикагель С18) Agilent Hypersil AA-ODS с размером частиц 5 мкм со скоростью потока 0.45 мл/мин при температуре 40°C. Подвижными фазами являлись: раствор, содержащий 0.36 г ацетата натрия, 90 мкл триэтиламина, 1.5 мл тетрагидрофурана и уксусную кислоту до 7.2% в 500 мл воды и смесь раствора 1.36 г ацетата натрия, уксусной кислоты до 7.2% в 100 мл воды, 200 мл метанола и 200 мл ацетонитрила. Обнаружение аминокислот проводили по поглощению в УФ-области при длине волны 338 и 262 нм.

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Бегулов, М. Ш. Основы переработки семян сои / М. Ш. Бегулов. – М. : ДеЛи принт, 2006. – 181 с.
2. Римарева, Л. В. Перспективы использования протеолитических ферментных препаратов / Л. В. Римарева // Пищевая промышленность. – 1996. – № 3. – С.44–45.
3. Милорадова, Е.В. Применение соевых ферментативных гидролизатов при производстве продуктов питания / Е. В. Милорадова // Индустрия продуктов питания – третье тысячелетие (человек, наука, технология, экономика). Ч. 1. – М., 1999. – С. 132–134.
4. Ферментативный гидролиз как инструмент для повышения пищевой ценности продуктов растениеводства / С. Е. Трауберберг, Е. В. Милорадова, Е. В. Алексеенко, Е. А. Бадичко // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2007. – № 5. – С. 62–65.
5. Кинетика гидролиза соевой обезжиренной муки ферментным препаратом Бирзим П7 / С. Е. Трауберберг, И. В. Вяльцева, Е. В. Милорадова, А. А. Козлова // Пищевая технология. Изв. вузов. – 2005. – № 2-3. – С.54–56.
6. Экстракция растворимых белков из продуктов переработки соевого зерна с применением ферментативного гидролиза / В. А. Шишков, Л. В. Римарева, В. Л. Кудряшов, В. А. Поляков // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2007. – № 1. – С.19–21.
7. Enzymatic extractability of soybean meal proteins and carbohydrates: heat and humidity effects / M. Fischer [et al.]// J. Agric. Food Chem. – 2001. – Vol. 49. – P. 4463–4469.
8. Voragen, A. G. J. Structural studies of plant cell-wall polysaccharides using enzymes / A. G. J. Voragen, H. A. Schols, H. Gruppen // In Plant polymeric carbohydrates / Ed. F. Meuser. – Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1993. – P. 3–15.
9. Positional effect on protein and oil content and composition of soybeans / J. O. Bennett [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2003. – Vol. 51. – P. 6882–6886.
10. Петров, К. П. Практикум по биохимии пищевого растительного сырья / К. П. Петров. – М. : Пищевая промышленность, 1965. – 330 с.
11. Методы биохимического исследования растений / А. И. Ермаков, В. В. Арасимович, Н. П. Ярош, Ю. В. Перуанский, Г. А. Луковников, М. И. Иконникова / под ред. А. И. Ермакова. – Л. : Агропромиздат, 1987. – 430 с.