

ОПТИМИЗАЦИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ПОЛУЧЕНИЯ КОМПОЗИЦИЙ НА ОСНОВЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ

И.С. Гайворонская¹, В.В. Колпакова¹, Л.В. Чумикина²

¹ *Всероссийский научно-исследовательский институт крахмалопродуктов, Россия*

² *Институт биохимии им. А.Н. Баха, Москва, Россия*

ВВЕДЕНИЕ

Увеличение численности населения планеты позволяет экспертам уже сегодня спрогнозировать прогрессирующий дефицит белковой пищи. Дефицит белка на планете оценивается в 10–25 млн. т в год. Приблизительно половина населения планеты страдает от недостатка белка. Нехватка пищевого белка является не только экономической, но и социальной проблемой современного мира [1]. Биотехнологические процессы с использованием микроорганизмов пока не имели успехов в получении новых, альтернативных источников обязательного и ценного компонента пищи. Это резко повышает роль природных белков, усиливает значимость наукоемких технологических процессов в их получении и использовании в виде новых форм. Растительный рацион, содержащий полноценный белок в необходимом количестве, может быть создан на основе использования белковых препаратов, полученных из белоксодержащих источников различного химического состава и биологической ценности. Большинство злаковых культур дефицитны по лизину, одной из важнейшей из незаменимых аминокислот в питании человека, в то время как бобовые содержат эту аминокислоту в достаточном количестве. С другой стороны, белки злаковых культур способны дополнять белки бобовых и пасленовых дефицитной аминокислотой метионином [2]. Наряду с соевыми белками, при соответствующих функциональных свойствах, гороховые рисовые и овсяные белки так же можно успешно использовать для обогащения и повышения биологической ценности пищевых продуктов [3]. При использовании ферментного препарата транскляминазы для биосинтеза композитных белковых продуктов повышенной биологической ценности с технологической точки зрения важным может быть и различное содержание свободных аминокислот в использованных растительных препаратах. Добавление белков с высоким содержанием свободных аминокислот, в частности лизиновых, к белкам с низким их количеством будет увеличивать реактивность последних [4] и формировать модули с заданным составом и функциональными свойствами.

Цель работы – оптимизация параметров биосинтеза мульти-белковых полимеров на основе горохового белка с подбором состава композиций на основе данных аминокислотного состава для поступления полноценного белка в организм человека и расширения использования данного белкового продукта в производстве пищевых изделий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве основных материалов использовали белковые концентраты: гороховый (Roquette, Франция), рисовый (Veneo, Бельгия), а так же овсяный (Tate&Lyle, Швеция). Химический состав белковых препаратов представлен в таблице 1. В качестве энзима использовали ферментный препарат (ФП) транскляминазу «классическую» (ТГ) (Novozymes, Дания).

О протекании реакции с ферментом транскляминазой между белками различной химической природы делали вывод по количеству выделившегося аминного азота. Аминный азот определяли методом формольного титрования. Для этого к 10 г. ферментированной смеси белковых концентратов, взятыми при определенных соотношениях, добавляли 50 см³ дистиллированной воды, затем смесь диспергировали 4–5 минут при 500 мин⁻¹. Смесь центрифугировали при 5500 мин⁻¹ в течение 20 минут.

Надосадочную жидкость сливали, отбирали из нее 5 см³ и переносили в стеклянный стакан для измерения рН с 20 см³ дистиллированной воды. Электроды рН-метра погружали в исследуемую суспензию. Нейтрализацию свободных карбоксильных групп проводили 0,05н раствором NaOH. Щелочь добавляли при помешивании, следя за показаниями потенциометра. Когда рН раствора достигало 7, к нему добавляли 0.5 см³ формольной смеси с фенолфталеином (50 см³ 40 %-ного формалина + 2 см³ 1 %-ного спиртового раствора фенолфталеина). Смесь титровали 0.05н раствором NaOH до рН 9.1–9.5, что соответствовало ярко-красному окрашиванию пробы. Все реактивы были химически чистые.

Таблица 1. Химический состав белковых продуктов

Белковый продукт	Влага, %	Белок, %	Жир, %	Клетчатка, %	Углеводы, %
гороховый	10,0	84,0	5,0	1,0	0
рисовый	12,0	79,0	5,0	3,2	6,0
овсяный	6,0	56,0	3,0	2,0	18,0

Аминный азот (в мг/%) (N) рассчитывали по формуле: $N = A * 0.7 * 100 / V$, где: A – количество см³ 0.05н NaOH, пошедшее на титрование; V – количество раствора для титрования; 0.7-количество азота в г, соответствующее 1 см³ 0.05 н раствора NaOH.

Для приготовления двухкомпонентных ферментированных композиций навески белковых продуктов при их определенных соотношениях смешивали на мешалке со скоростью 500 мин⁻¹. Навески ФП транслглютаминазы помещали в микробиологическую пробирку с крышкой, добавляли количество дистиллированной воды, в соответствии с заданным гидромодулем, интенсивно перемешивали и добавляли 1 г смеси белковых продуктов. Пробирки помещали в термостат, встряхивали при 170 мин⁻¹ и температуре 50 °С и проводили реакцию взаимодействия белков при различном времени ее протекания и различной концентрации.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С помощью программы, разработанной нами на основе метода подсчета Монте-Карло были составлены композиции белков с улучшенным аминокислотным профилем. При расчете использованы данные аминокислотного состава белковых продуктов для предполагаемых смесей, данные для эталонного белка базируются на рекомендациях ФАО ВОЗ 2011 г. [5]. Для концентратов горохового и овсяного белка оптимальное соотношение белков в композиции составило 1:1 (таблица 2), для концентратов горохового и рисового белка – 1:0,6 (таблица 2). Данные соотношения обеспечивали оптимальный скор аминокислот и являлись экономически целесообразными.

Таблица 2. Аминокислотный скор белков композиций из белковых концентратов, %

Показатели	Белковый концентрат			Белковые композиции	
	ГОРОХ	ОВЕС	РИС	ГК/ОК	ГК/РК
Массовая доля белка, %	84.0	56,3	79.5	70.2	81.8
Аминокислоты	Скор, %				
Валин	125	65	137	132	157
Лейцин	134	62	124	135	158
Изолейцин	156	62	113	149	170
Треонин	152	56	176	142	196
Лизин	148	33	147	117	141
Триптофан	151	103	136	181	177
Метионин+ цистин	47	82	147	101	105
Фенилаланин+ тирозин	224	113	176	234	256

Примечание: ГК-гороховый концентрат, ОК-овсяный концентрат, РК-рисовый концентрат

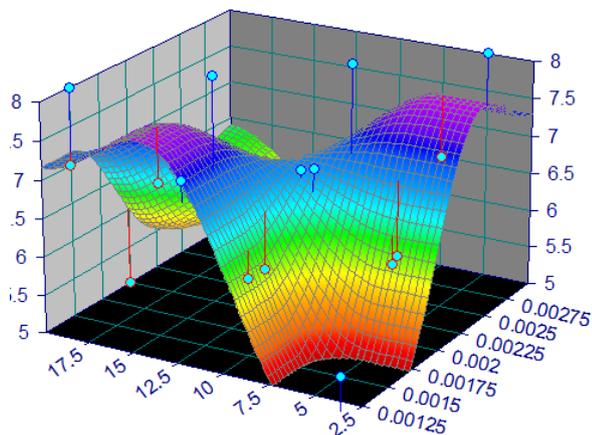
Данные показывают, что самые высокие значения аминокислотного сора всех кислот имел рисовый концентрат, самые низкие – овсяный, у горохового концентрата недостаточное количество серусодержащих аминокислот, что не противоречит литературным данным. Аминокислотный состав белковых композиций с гороховым белком, по сравнению с индивидуальными образцами, значительно улучшался за счет рисового и овсяного концентратов. Особенно ценно это увеличение у всех двухкомпонентных композитов для метионина и цистеина [6]. Наиболее сбалансированными явился композит состава ГК/РК, наименее – композит состава ГК/ОК.

Учитывая, что в реакциях с участием трансглютаминазы происходит перенос аминогрупп – NH₂ между молекулами с образованием новых ковалентных связей, то количество аминного азота в исследуемых системах уменьшается, поэтому по количеству непрореагировавших аминогрупп можно судить о протекании процесса синтеза между различными видами белков. Для получения результатов по влиянию различных факторов на содержание аминного азота для композиции гороховый белок – овсяный белок использованы методы математического планирования эксперимента. pH – 6.8–7.0 (const), температура 50 °С (const). Время экспозиции (X₃) изменяли в интервале 5÷20 мин, гидромодуль (X₁) – в диапазоне 1: до 1:8, концентрацию ФП (X₂) – от 0.0015 до 0.003 U/g белка.

По данным эксперимента с помощью программы TableCurve 3D построены поверхности отклика для аминного азота (рис. 1). Обработка данных в программах Matematika и Table Curve 3D

Для получения результатов по влиянию различных факторов на содержание аминного азота для композиции гороховый концентрат – рисовый концентрат использованы методы математического планирования эксперимента. С учетом данных, полученных в ходе эксперимента гороховый концентрат – рисовый концентрат выбраны наиболее эффективные параметры реакции: pH – 6.8–7.0 (const), температура 50 °С (const). Время экспозиции (X₃) изменяли в интервале 5÷20 мин, гидромодуль (X₁) – в диапазоне 1:5 до 1:8, концентрацию ФП (X₂) – от 0.0015 до 0.003 U/g белка.

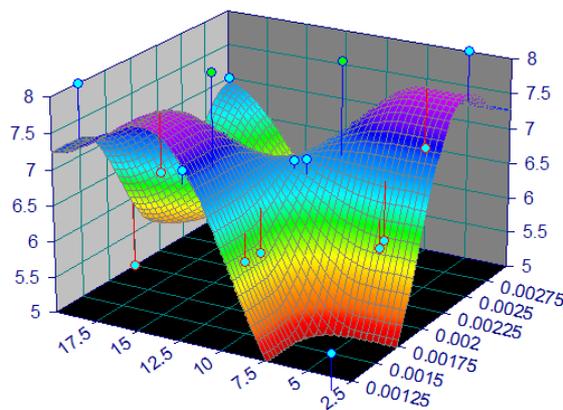
По данным эксперимента с помощью программы TableCurve 3D построены поверхности отклика для аминного азота (рис. 2). Обработка данных в программах Matematika и Table Curve 3D.



$$Y = 7.4865 + 149X_1 + 0.0335X_2 - 0.1145X_3$$

где x – концентрация ФП U/g белка; y – время экспозиции, мин; z – обратный гидромодуль

Рисунок 1 Зависимость количества аминного азота от параметров реакции для композиции гороховый концентрат-овсяный концентрат



$$Y = 7.5775 + 567X_1 + 0.0245X_2 - 0.2555X_3$$

Рисунок 2 Зависимость количества аминного азота от параметров реакции для композиции гороховый концентрат – рисовый концентрат

Для композиции горохового концентрата с овсяным белком закономерности изменения количества аминного азота в процессе реакции были аналогичны закономерностям, характерным для композиции гороховый концентрат-рисовый концентрат. Минимальное количество аминного азота после реакции с ТГ в композиции гороховый концентрат – овсяный белок наблюдалось в реакционной среде при концентрации 0.0015 г./г белка, времени экспозиции 15 минут и гидромодуле 1:7. Минимальное количество аминного азота после реакции с ТГ в композиции гороховый концентрат – рисовый концентрат наблюдалось в реакционной среде при концентрации 0.0015 г./г белка, времени экспозиции 20 минут и гидромодуле 1:8.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ТГ благодаря своим уникальным свойствам достаточно широко применяется в мясной и молочной промышленности для агрегации белковых молекул при производстве реструктурированных продуктов из сырья различного качества [7–9]. Фермент безопасный, производится недорогими источниками биосинтеза, что делает широким его применение.

Значительно меньше ТГ используется в производстве выпеченных изделий (хлеб, печенье) [4,10,11] и единичные исследования известны для получения композиций из растительных белков [12].

С помощью программы, разработанной на основе метода подсчета Монте-Карло составлены композиции белковых концентратов с улучшенным аминокислотным составом. С учетом массовой доли белка и аминокислотного состава концентратов определены их соотношения и аминокислотный скор для композитов состава белок-белок, полученных из различных видов растительного сырья (гороха, овса, риса). Композиты обогащены лизином, треонином, серосодержащими аминокислотами относительно зерновых и зернобобовых культур. С использованием биотехнологической реакции при участии фермента класса трансфераз (трансглутаминазы) получены биокомпозиты состава: гороховый концентрат – овсяный концентрат, гороховый концентрат – рисовый концентрат. Экспериментальным путем с применением метода формольного титрования по данным количества аминного азота, остающегося в реакционной среде, определены оптимальные параметры реакции: продолжительность ее протекания, гидромодуль, pH и концентрация ферментного препарата. Для композиции гороховый концентрат – овсяный концентрат минимальное количество аминного азота после реакции с ТГ наблюдалось в реакционной среде при концентрации 0.0015 г/г белка, времени экспозиции 15 минут и гидромодуле 1:7. Для композиции гороховый концентрат – рисовый концентрат минимальное количество аминного азота после реакции с ТГ в композиции гороховый концентрат – рисовый концентрат наблюдалось в реакционной среде при концентрации 0.0015 г/г белка, времени экспозиции 20 минут и гидромодуле 1:8. Эти данные указывали на большую интенсивность протекания реакции синтеза новых форм белков. Композиции концентратов с гороховым белком не содержали дефицитных незаменимых аминокислот, скор максимально приближался к эталонному белку, либо был выше. Используемые растительные белки не входят в список основных аллергенов, благодаря чему представляется возможным использование полученных композиций при разработке продуктов специального и диетического питания. Дальнейшие исследования покажут какими функционально-технологическими свойствами будут обладать созданные белковые композиты и в каких пищевых изделиях их можно будет использовать.

ЛИТЕРАТУРА

1. Донченко Л.В. Технология функциональных продуктов питания: учебное пособие для вузов – 2 изд, Москва, Юрайт, 2018 – стр. 101–102
2. Iqbal A, Khalil IA, Ateeq N and Khan MS, Nutritional quality of important food legumes. *Food Chem*, 97:331–335 (2006)
3. Tömösközi S, Lásztity R, Haraszi R and Baticz O, Isolation and study of the functional properties of pea proteins. *Nahrung/Food* 45:399–401 (2001).
4. Marco C, Rosell CM. Breadmaking performance of protein enriched, gluten-free breads. *Eur Food Res Technol*. 2008; 227:1205–1213. doi: 10.1007/s00217-008-0838-6.
5. Dietary protein quantity evaluation in human nutrition: Report of an FAO Expert Consultation. – Rome: FAO, 2013–66pp.
6. Koehler P., Wieser H. Chemistry of Cereal Grains. In: M. Gobbetti and M. Gunzle (eds.). *Handbook on Sourdough Biotechnology*, 11. 2013. Chapter 2, Springer Science+Business Media New York. DOI 10.1007/978-1-4614-5425-0_2
7. Kuraishi C., Sakamoto J., Yamazaki K., Susa Y., Kuhara C., Soeda T. Production of restructured meat using microbial transglutaminase without salt or cooking. *J. Food Sci.* 1997. V. 62. pp. 488–490. doi: 10.1111/j. 1365-2621.1997.tb04412.x
8. Ozer B., Kirmaci H.A., Oztekin S., Hayaloglu A., Atamer M. Incorporation of microbial transglutaminase into non-fat yogurt production. *Int. Dairy J.* 2007. V. 17. pp. 199–207. doi: 10.1016/j.idairyj.2006.02.007
9. Lorenzen P.C., Neve H., Mautner A., Schlimme E. Effect of enzymatic cross-linking of milk proteins on functional properties of set-style yoghurt. *Int. J. Dairy Technol.* 2002. V. 55. pp. 152–157. doi: 10.1046/j. 1471-0307.2002.00065.x
10. Lorenzen P.C., Neve H., Mautner A., Schlimme E. Effect of enzymatic cross-linking of milk proteins on functional properties of set-style yoghurt. *Int. J. Dairy Technol.* 2002. V. 55. pp. 152–157. doi: 10.1046/j. 1471-0307.2002.00065.x
11. Kuraishi C., Yamazaki K., Susa Y. Transglutaminase: its utilization in the food industry. *Food Rev. Int.* 2001. V. 17. pp. 221–246. doi: 10.1081/FRI-100001258
12. Колпакова В.В., Гайворонская И.С., Гулакова В.А., Сарджвеладзе А.С., Композиция на основе растительных белков с использованием трансглутаминазы. Международная мультидисциплинарная научная гео-конференция SGEM, Албена, Болгария. 2018: 119–126