

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПАРАМЕТРОВ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ БЕЛКОВО-ЖИРОВОЙ ОСНОВЫ ДЛЯ ПИТАНИЯ СПОРТСМЕНОВ НА АКТИВНОСТЬ ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕИНАЗ

Бочкарев С. В., Кричковская Л. В., Петрова И. А., Петров С. А.,
Варанкина А. А., Белинская А. П.

1. Введение

Ингибиторы протеиназ присутствуют у представителей многих групп растений, в том числе у масличных культур. Их характерной особенностью является то, что с протеолитическими ферментами они образуют устойчивые соединения, лишенные ферментативной активности. По химическому строению, локализации в растении, уровню активности, субстратной специфичности ингибиторы протеаз объединены в три группы: ингибиторы трипсина Кунитца, ингибиторы трипсина и химотрипсина Баумана-Бирк, ингибиторы сериновых протеиназ микроорганизмов, не действующие на трипсин и химотрипсин [1].

Ингибиторы протеаз являются протекторным фактором растений от неблагоприятных экологических факторов, включая воздействие насекомых, вирусов, бактерий и т. п. Они содержатся в семенах зерновых, бобовых, масличных и других культур: в кукурузе, арахисе, картофеле и др. В бобах сои содержатся пять и более ингибиторов трипсина в количестве 5–10 % общего содержания белка [2].

Ингибиторная активность данных соединений прекращается в том случае, когда удается разрушить дисульфидные связи молекулы. Но из-за чрезвычайной прочности дисульфидной связи для ее разрыва нужна значительная энергия – от 20 до 20 000 ккал (для разрыва водородной связи достаточно 1,5 ккал) [1]. Например, обработка соевых семян даже при температуре 232 С в течение 8 минут не позволяет полностью разрушить ингибиторы протеаз [3].

Поступая в организм человека с пищевыми продуктами, ингибирующие протеазы соединения препятствуют усвоению белков, подавляя активность пищеварительных ферментов. Предельно допустимое количество ингибиторов трипсина в пищевых продуктах согласно [4] не должно превышать 0,5 %.

В условиях дефицита пищевого белка в мире особенное значение приобретает вопрос повышения биологической ценности растительного белка, в частности, белка масличных культур. В исследованиях [5, 6] разработана белково-жировая основа, обогащенная незаменимыми аминокислотами и полиненасыщенными жирными кислотами ω -3 группы, в соответствии с физиологическими потребностями спортсменов, работников тяжелого физического труда, военнослужащих. Данная белково-жировая основа содержит следующие компоненты: подсушенные измельченные семена подсолнечника, кунжута и льна в обоснованных соотношениях. Присутствие в ее составе ингибиторов протеаз, снижающих усвоение белка организмом, существенно ограничивает ее применения в пищевой промышленности.

Ингибиторы протеиназ семян подсолнечника, кунжута и льна исследованы недостаточно, равно как и их влияние на протеиназы и белковый комплекс белково-жировой основы. Таким образом, изучение и обоснование способов регулирования их активности являются актуальными и имеют важное теоретическое и прикладное значение для повышения эффективности переработки масличных семян.

2. Объект исследования и его технологический аудит

Объектом данного исследования является биологическая ценность белково-жировой основы в зависимости от условий ее предварительной технологической обработки. Для выявления особенностей этой зависимости проводился технологический аудит, целью которого было определение изменения содержания аминокислот в образцах белково-жировой основы, прошедшей различную технологическую обработку, после ферментативного гидролиза.

Принципиальная возможность расщепления белка существенно зависит от времени предварительной обработки сверхвысокочастотным излучением, а также от исходной влажности сырья. Поэтому основным направлением усовершенствования технологической обработки белково-жировой основы является определение оптимальных параметров процесса. Это позволит повысить биологическую ценность белково-жировой основы.

3. Цель и задачи исследования

Цель исследования – совершенствование технологической обработки белково-жировой основы для питания спортсменов на основе моделирования и оптимизации физико-химических процессов денатурации ингибиторов ферментов. Это позволит повысить биологическую ценность белково-жировой основы, т. е. степень расщепления и усвояемости белков в желудочно-кишечном тракте.

Для достижения поставленной цели необходимо:

1. Изучить закономерности влияния времени предварительной обработки белково-жировой основы сверхвысокочастотным излучением и ее исходной влажности на степень последующего ферментативного гидролиза белка.
2. Установить оптимальный диапазон величин выбранных факторов предварительной технологической обработки для максимально возможного увеличения биологической ценности белково-жировой основы.

4. Исследование существующих решений проблемы

Среди основных направлений снижения активности ингибиторов протеиназ в масличных семенах, выявленных в ресурсах мировой научной периодики, могут быть выделены следующие:

- «сухая» и «влажная» термоденатурации белков [7–11];
- проращивание семян [12];
- обработка в электромагнитном поле различной частоты [13–15];
- термообработка в присутствии химических денатурирующих агентов (этанола, уксусной кислоты, аммиака, соляной кислоты) [16];

В частности, в работах [7–9] приведены достоинства и недостатки «сухой» и «влажной» термоденатураций соевых ингибиторов протеиназ. Показано, что

термоденатурация молекул ингибиторов в увлажненном сырье проходит наиболее эффективно, но параллельно идут такие процессы, как необратимая денатурация растворимых фракций альбуминов и глобулинов, что влечет за собой потерю биологической ценности получаемого продукта. Схожий недостаток отмечен в работе [10]. В исследованиях показано, что соотношение водо-, соле- и щелочерастворимых белков в обезжиренных масличных семенах (на примере семян сои и хлопчатника) изменяется по мере увеличения интенсивности тепловой обработки – путем превращения водорастворимых белков в соле-, щелоче- и водонерастворимые белки. Известно, что обработка при относительно невысоких температурах влечет за собой денатурацию белков, что повышает пищевую ценность, так как происходит инактивация ингибиторов протеиназ и повышение доступности белков для гидролиза. Но параллельно проходят реакции редуцирующих сахаров растительного сырья с аминокислотами. Эти реакции вначале обратимы, так как образуются основания Шиффа, доступные для действия пищеварительных ферментов. Однако эти продукты быстро превращаются в соединения Амадори, которые практически не усваиваются [17].

Альтернативный вариант решения данного вопроса, изложен в [11, 12]. Определено, что во время прорастания семян активность протеиназ увеличивается, а активность их ингибиторов снижается. Слабая сторона такого подхода связана с изменением органолептических показателей готовой продукции (появление горького привкуса), а также со значительными временными затратами на обработку.

Исследованы тепловые, акустические и электромагнитные воздействия на активность ферментов в масличных семенах [13–15]. В частности, при дозревании семян подсолнечника доказанное влияние имеет обработка ультразвуком и электромагнитным полем различной частоты [13]. Представляют интерес результаты работ [14, 15], однако их объектом является активность не ингибиторов гидролитических ферментов, а собственно гидролаз, в частности, липаз.

Определенное решение данного вопроса показано в работе [16], но недостаток его заключается в том, что сырье с целью инактивации ингибиторов протеаз обрабатывается химическими реагентами, использование большинства из которых недопустимо в пищевых технологиях.

Как видно из обзора, наиболее углубленно исследованы ингибиторы протеиназ сои [7, 10, 11, 16]. В частности, показано, что их присутствие в животных кормах вызывает задержку роста, гипертрофию поджелудочной железы и аномально большой недостаток серосодержащих аминокислот.

Таким образом, результаты анализа позволяют сделать вывод о том, что единого мнения относительно возможности снижения активности ингибиторов протеаз в масличных семенах не существует. Выбор наиболее приемлемого технического решения для каждого отдельного объекта может базироваться на результатах, полученных в исследуемых модельных системах. Однако, перспективной с точки зрения биохимических, технологических и экономических аспектов является обработка в электромагнитном поле низкочастотного диапазона [12–14].

5. Методы исследований

Для проведения исследований использованы следующие материалы:

- семена подсолнечника согласно ДСТУ 7011: 2009;
- семена льна согласно ДСТУ 4967: 2008;
- семена кунжута согласно ДСТУ 7012: 2009;
- ферментный препарат *Distizym Protacid Extra* согласно с действующей нормативной документацией.

Белково-жировая основа представляет собой смесь подсушенных измельченных семян подсолнечника – 20 ± 5 % масс., льна – 50 ± 5 % масс. и кунжута – 30 ± 5 % масс. от массы смеси семян. Исходное содержание белка в основе определяли с помощью метода Кьельдаля.

Исходную влажность белково-жировой основы корректировали с помощью увлажнения и определяли термогравиметрически. Предварительную обработку сверхвысококачастотным излучением проводили с частотой 2450 мГц. После все образцы белково-жировой основы сушили до влажности 8 %.

Высушенные образцы подвергали ферментативному гидролизу. В качестве источника протеолитических ферментов был использован ферментный препарат *Distizym Protacid Extra* (производство *Erbsloeh Geisenheim AG*, ФРГ). Протеолитическая активность препарата обусловлена действием кислой грибной пептидазы, разрушающей белки до аминокислот. Препарат эффективен при температуре 50–58 °С, при рН 2,0–6,0. Активность *Distizym Protacid Extra* составляет 350 ед./мл.

Эффективность действия предварительной обработки белково-жировой основы сверхвысококачастотным излучением (т. е. повышение биологической ценности) оценивали по количеству α -аминного азота после ферментативного гидролиза. Аминный азот представляет собой азот свободных аминногрупп аминокислот и определяется методом формольного титрования (метод Серенсена).

Для планирования эксперимента и обработки данных применены математические методы с использованием программных пакетов *Microsoft Office Excel 2003 (USA)* и *Stat Soft Statistica v6.0 (USA)*. Для исследования зависимости содержания аминного азота в белково-жировой основе после ферментативного гидролиза от времени ее предварительной обработки сверхвысококачастотным излучением и ее исходной влажности использовали трехуровневый план для двухфакторной функции отклика. Исследования проводили в трикратном повторении. При заданной степени вероятности $P = 95$ %, относительная ошибка не превышала: при определении содержания аминного азота – 2 %; при определении влажности сырья – 2 %.

6. Результаты исследований

Данные по влиянию времени предварительной обработки белково-жировой основы сверхвысококачастотным излучением и ее исходной влажности на содержание аминного азота после ферментативного гидролиза белка приведены на рис. 1. Из рис. 1 видно, что происходит увеличение содержания аминного азота с 2,1 до 8,3 % после гидролиза белка при увеличении времени предварительной обработки сверхвысококачастотным излучением со 100 с до 280 с и исходной влажности сырья с 10 до 12 %. Это свидетельствует о процессе тер-

мической денатурации ингибиторов протеиназ увлажненных масличных семян при обработке сверхвысокочастотным излучением.

Обращает на себя внимание тот факт, что содержание аминного азота после ферментативного гидролиза белка с увеличением времени предварительной обработки сверхвысокочастотным излучением с 280 до 360 с и с увеличением исходной влажности основы с 12 до 15 % уменьшается от 8,3 до 4,0 %. Очевидно, это связано с тем, что при более жестких условиях обработки происходит необратимая денатурация белков, что понижает их доступность для протеиназ.

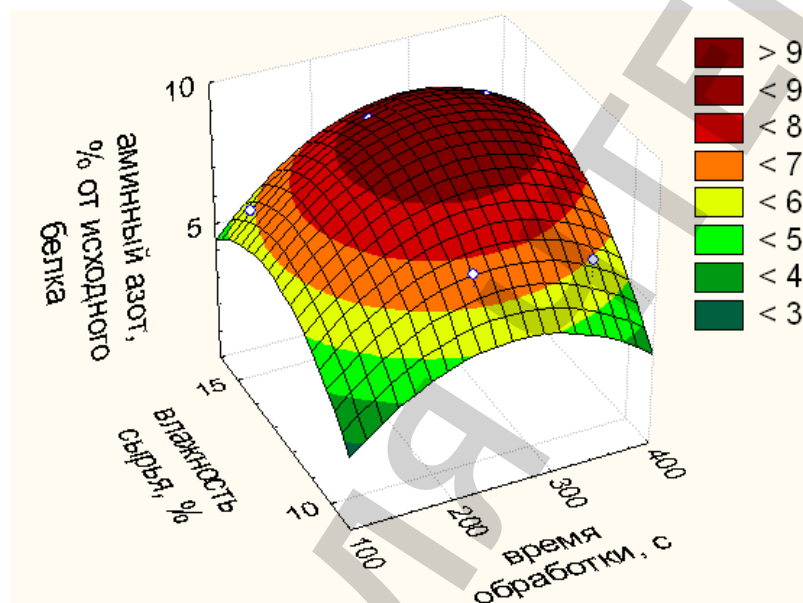


Рис. 1. Зависимость содержания аминного азота после ферментативного гидролиза белка в белково-жировой основе от времени предварительной обработки сверхвысокочастотным излучением и исходной влажности сырья

Уравнения регрессии, представляющее зависимость содержания аминного азота после гидролиза белка в основе от времени предварительной обработки сверхвысокочастотным излучением и исходной влажности сырья, имеет вид:

$$AN = -30,7821 + 0,0787 \cdot \tau + 4,4993 \cdot \omega - 0,0001 \cdot \tau^2 - 0,002 \cdot \tau \cdot \omega - 0,1538 \cdot \omega^2, \quad (1)$$

где AN – содержание аминного азота (*amine nitrogen*), % от содержания исходного белка в основе;

τ – время обработки сырья сверхвысокочастотным излучением, с;

ω – исходная влажность сырья, %.

Проверка значимости коэффициентов, которую проводили по критерию Стьюдента, показала значимость представленных в полиноме (1) коэффициентов. На основе проведенных экспериментов уравнение регрессии проверено на адекватность по критерию Фишера (при заданной степени вероятности $P=95\%$).

На основе анализа уравнения (1) и графической зависимости установлены оптимальные условия предварительной обработки белково-жировой основы: время обработки сверхвысокочастотным излучением 250–350 с и ее увлажне-

ние до содержания влаги 12–14 %. Это позволит повысить биологическую ценность белково-жировой основы, а именно увеличить степень расщепления и усвояемости белков в желудочно-кишечном тракте.

7. SWOT-анализ результатов исследований

Strengths. Среди сильных сторон данного исследования надо отметить полученные результаты по оптимальным диапазонам технологических параметров обработки белково-жировой основы – времени предварительной обработки сверхвысокочастотным излучением и задаваемой исходной влажности. По результатам анализа современной научной литературы на сегодняшний день такие результаты отсутствуют. Именно по этой причине в технологии переработки масличных семян трудно выбрать приоритетный метод снижения активности ингибиторов протеиназ. Использование полученных данных позволяет решить задачу выбора способа предварительной обработки белково-жировой основы с целью повышения биологической ценности. Стоит отметить экономическую привлекательность выбранного способа предварительной обработки для пищевой технологии.

Weaknesses. Слабая сторона данного исследования связана с тем, что выбор оптимальных параметров предварительной технологической обработки белково-жировой основы зависит от ряда характеристик исходного сырья (например, сорта масличных семян, степени их зрелости) и, соответственно, будет варьироваться при изменении данных характеристик. Поэтому для предотвращения указанного недостатка следует особое внимание уделять качеству сырья, что накладывает особые обязательства на производителя.

Opportunities. Исследования предварительной обработки масличных семян в электромагнитном поле низкочастотного диапазона могут получить свое развитие в таких отраслях пищевой промышленности как кондитерская, а также при переработке растительного сырья в белковые продукты (изоляты, концентраты, обезжиренную муку, текстурированные белки). Именно таким образом может быть решена задача повышения биологической ценности растительных белковых продуктов.

Threats. Сложности во внедрении полученных результатов исследования могут быть связаны с таким фактором как менеджмент предприятий пищевой промышленности. Вложение дополнительных средств, даже незначительных, в приобретение необходимого оборудования и отсутствие осязаемого результата оказывает влияние на позицию лиц, принимающих решение. Этот риск имеет под собой все основания, так как полученная математическая модель процесса, как было сказано выше, требует стандартизации ряда показателей масличного сырья.

Таким образом, SWOT-анализ результатов исследований позволяет обозначить основные направления для успешного достижения поставленной цели исследований. Среди них:

– разработка научно обоснованных рекомендаций к стандартизации показателей масличного сырья для производства белково-жировой основы в соответствии с физиологическими потребностями спортсменов, работников тяжелого физического труда, военнослужащих;

- провести оценку эффективности предварительной обработки масличных семян в электромагнитном поле низкочастотного диапазона в промышленных условиях;
- разработать технологические решения относительно получения белково-жировой основы повышенной биологической ценности.

8. Выводы

1. Изучены закономерности влияния времени предварительной обработки белково-жировой основы сверхвысокочастотным излучением и ее исходной влажности на степень последующего ферментативного гидролиза белка. Данная зависимость представляет собой квадратичную функцию, которая прогнозирует увеличение содержания аминного азота после гидролиза белка при увеличении времени предварительной обработки сверхвысокочастотным излучением и исходной влажности сырья до определенного предела (с 2,1 до 8,3 %). Затем содержание аминного азота с увеличением времени предварительной обработки сверхвысокочастотным излучением и с увеличением исходной влажности основы снова уменьшается (с 8,3 до 4,0 %).

2. Установлен оптимальный диапазон величин выбранных факторов предварительной технологической обработки для максимально возможного увеличения биологической ценности белково-жировой основы. Оптимальное время предварительной обработки сверхвысокочастотным излучением белково-жировой основы составляет 250–350 с, задаваемая исходная влажность сырья – 12–14 %. Получение более узких диапазонов не гарантировано в силу нестабильных показателей масличного сырья.

Литература

1. Mossor, G. Plant inhibitors of proteolytic enzymes [Text] / G. Mossor, J. Skupin, B. Romanowska // Food/Nahrung. – 1984. – Vol. 28, No. 1. – P. 93–112. doi:[10.1002/food.19840280122](https://doi.org/10.1002/food.19840280122)
2. Solomintsev, M. V. Determination of proteinase inhibitors activity in food products [Text] / M. V. Solomintsev, M. P. Mogilny // Izvestia vuzov. Pishhevaya tekhnologia. – 2009. – No. 1. – P. 13–16.
3. Mezhlum'yan, L. G. Functions of inhibitors of proteolytic enzymes in plants [Text] / L. G. Mezhlum'yan, E. F. Redina, P. K. Yuldashev // Chemistry of Natural Compounds. – 1997. – Vol. 33, No. 1. – P. 31–35. doi:[10.1007/bf02273917](https://doi.org/10.1007/bf02273917)
4. Pro zatverdzhennia metodychnykh vkazivok «Medyko-biologichna otsinka netradytsiinoi prodovolchoi syrovyny i novykh kharchovykh produktiv» [Electronic resource]: Order of the Ministry of Health of Ukraine No. 204 from 07.09.1997. – Available at: \www/URL: <http://mozdocs.kiev.ua/view.php?id=824>
5. Bochkarev, S. Development of the protein-fatty base of the sugar confectionery for nutrition of the sportsmen [Text] / S. Bochkarev, V. Papchenko, T. Matveeva, A. Belinska, V. Rudniev // Technology Audit And Production Reserves. – 2016. – Vol. 5, No. 3 (31). – P. 58–64. doi:[10.15587/2312-8372.2016.81142](https://doi.org/10.15587/2312-8372.2016.81142)
6. Bochkarev, S. Research of the oilseeds ratio on the oxidative stability of the protein-fat base for sportsmen [Text] / S. Bochkarev, T. Matveeva,

L. Krichkovska, I. Petrova, S. Petrov, A. Belinska // Technology Audit And Production Reserves. – 2017. – Vol. 2, No. 3 (34). – P. 8–12. doi:[10.15587/2312-8372.2017.96665](https://doi.org/10.15587/2312-8372.2017.96665)

7. Yasothai, R. Antinutritional factors in soybean meal and its deactivation [Text] / R. Yasothai // International Journal of Science, Environment and Technology. – 2016. – Vol. 5, No. 6. – P. 3793–3797.

8. Rackis, J. J. Protease Inhibitors in Plant Foods: Content and Inactivation [Text] / J. J. Rackis, W. J. Wolf, E. C. Baker // Nutritional and Toxicological Significance of Enzyme Inhibitors in Foods. – 1986. – P. 299–347. doi:[10.1007/978-1-4757-0022-0_19](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-0022-0_19)

9. Moyano Lopez, F. J. Inhibition of digestive proteases by vegetable meals in three fish species; seabream (*Sparus aurata*), tilapia (*Oreochromis niloticus*) and African sole (*Solea senegalensis*) [Text] / F. J. Moyano Lopez, I. Martinez Diaz, M. Diaz Lopez, F. J. Alarcon Lopez // Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. – 1999. – Vol. 122, No. 3. – P. 327–332. doi:[10.1016/s0305-0491\(99\)00024-3](https://doi.org/10.1016/s0305-0491(99)00024-3)

10. DiPietro, C. M. Heat inactivation of the Kunitz and Bowman-Birk soybean protease inhibitors [Text] / C. M. DiPietro, I. E. Liener // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 1989. – Vol. 37, No. 1. – P. 39–44. doi:[10.1021/jf00085a010](https://doi.org/10.1021/jf00085a010)

11. Andrade, J. C. The effect of thermal treatment of whole soybean flour on the conversion of isoflavones and inactivation of trypsin inhibitors [Text] / J. C. Andrade, J. M. G. Mandarino, L. E. Kurozawa, E. I. Ida // Food Chemistry. – 2016. – Vol. 194. – P. 1095–1101. doi:[10.1016/j.foodchem.2015.08.115](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.115)

12. Moskvich, I. A. Biohimicheskaia harakteristika ingibitorov proteinaz podsolnechnika v sviazi s neobhodimost'iu povysheniia biologicheskoi tsennosti podsolnechnogo belka [Text]: PhD thesis: 03.00.04 / I. A. Moskvich. – Krasnodar, 2003. – 109 p.

13. Dubovoi, D. A. Ispytaniia eksperimental'noi ustanovki dlia sushki semi-an maslichnyh kul'tur s ispol'zovaniem SVCh-nagreva [Text] / D. A. Dubovoi // Hranenie i pererabotka sel'hozsyr'ia. – 2001. – No. 5. – P. 62–63.

14. Mustafayev, S. K. The influence of microwave heating of freshly harvested sunflower seeds before convective drying on output and quality of oil [Text] / S. K. Mustafayev // Scientific Journal of KubSAU. – 2014. – No. 97. – P. 985–996.

15. Gubiev, Yu. K. Termoobrabotka zerna mikrovolnovym polem [Text] / Yu. K. Gubiev, S. P. Punkov, R. K. Erkinbaeva // Pishchevaia tehnologiia. – 1995. – No. 1–2. – P. 88–90.

16. Pustovoi, E. A. Vliianie fiziko-himicheskikh sposobov vozdeistviia na inaktivatsiiu antipitatel'nyh veshchestv, soderzhashchihsia v zernah soi [Text]: PhD thesis: 06.02.02 / E. A. Pustovoi. – Blagoveshchensk, 2000. – 131 p.

17. Kale, Sh. Rastitel'nyi belok [Text] / Sh. Kale, B. Zhudrie, B. Gordon; ed. by T. P. Mikulovich; Translated from French: V. G. Dolgoplov. – Moscow: Agropromizdat, 1991. – 684 p.