

И.А. ДЕРЕВЕНЬКОВ, С.В. МАКАРОВ

**БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ
ПИЩЕВЫХ ПРОИЗВОДСТВ**

Лабораторный практикум



**ИВАНОВО
2017**

Министерство образования и науки Российской Федерации

Ивановский государственный химико-технологический университет

И.А. Деревеньков, С.В. Макаров

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПИЩЕВЫХ ПРОИЗВОДСТВ

Лабораторный практикум

Иваново 2017

УДК 664

Деревеньков, И.А.

Биотехнологические основы пищевых производств: лаб. практикум / И.А. Деревеньков, С.В. Макаров; Иван. гос. хим.-технол. ун-т. – Иваново, 2017. – 84 с.

Практикум является руководством к выполнению лабораторных занятий по дисциплине «Биотехнологические основы пищевых производств», относящейся к вариативным обязательным дисциплинам направления «Продукты питания из растительного сырья».

Практикум содержит методические указания по выполнению лабораторных работ, связанных с использованием ферментных препаратов и процессов брожения в пищевой промышленности. Описание каждой работы сопровождается подробным теоретическим введением и контрольными вопросами для закрепления материала.

Предназначен для подготовки студентов очной формы обучения направления «Продукты питания из растительного сырья».

Табл. 14. Рис. 6. Схем 25. Библиогр.: 18 назв.

Печатается по решению редакционно-издательского совета Ивановского государственного химико-технологического университета.

Рецензенты:

кафедра химии Ивановской государственной медицинской академии и
кандидат химических наук В.Б. Шейнин
(Институт химии растворов им. Г.А. Крестова РАН)

© Деревеньков И.А., Макаров С.В., 2017

© ФГБОУ ВО «Ивановский государственный химико-технологический университет», 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1. Ферменты и ферментные препараты.....	6
1.1. Ферменты: общие сведения.....	6
1.2. Ферментные препараты: общие сведения.....	8
2. Амилолитические ферменты в пищевой промышленности.....	12
2.1. Амилолитические ферменты: общие сведения, классификация..	12
Лабораторная работа №1. Определение активности амилолитических ферментов.....	15
2.2. Использование процесса гидролиза крахмала в крахмалопаточной промышленности.....	24
Лабораторная работа № 2. Гидролиз крахмала амилолитическими фермента. Определение декстрозного эквивалента.....	27
2.3. Использование амилолитических ферментных препаратов в хлебопечении.....	32
Лабораторная работа № 3. Изучение влияния добавок амилаз на свойства хлеба.....	34
3. Ферментативная модификация белков в пищевой промышленности.....	41
3.1. Протеазы: общие сведения.....	41
Лабораторная работа № 4. Определение активности протеаз.....	47
3.2. Контроль протеолитической реакции. Степень гидролиза белка.	53
Лабораторная работа № 5. Определение степени гидролиза белка....	55
3.3. Ферменты, участвующие в формировании связей между белковыми молекулами.....	57
Лабораторная работа № 6. Влияние добавок протеаз, оксидоредуктаз и трансглутаминазы на свойства теста и хлеба.....	61
4. Липазы в пищевой промышленности.....	63
4.1. Общая характеристика липаз.....	63
Лабораторная работа № 7. Определение активности липаз.....	65
4.2. Использование препаратов липаз в пищевой промышленности..	68
Лабораторная работа № 8. Изучение кинетики ферментативного гидролиза триглицеридов.....	69
5. Биотехнологические основы процессов брожения.....	71
5.1. Общая характеристика процессов брожения.....	71
5.2. Спиртовое брожение.....	72
5.3. Образование органических кислот в ходе процессов брожения..	73
Лабораторная работа № 9. Влияние состава среды на процесс спиртового брожения.....	76
Порядок прохождения лабораторного практикума.....	81
Библиографический список.....	83

ВВЕДЕНИЕ

Биотехнология – это целенаправленное получение продуктов с использованием деятельности микроорганизмов, отдельных клеток и их компонентов. Микроорганизмы и их компоненты используются людьми для производства продуктов питания в течение длительного времени. Изначально люди подходили к использованию трансформации компонентов пищевых продуктов с помощью микроорганизмов или ферментов неосознанно: например, классическими примерами биотехнологии являются производство хлеба, вина, пива, сыра, кисломолочных продуктов. Становление же современной биотехнологии произошло в результате ряда научных открытий XX века.

В развитии биотехнологии можно выделить следующие этапы:

1. Допастеровская эра (до 1865 г.). Включает получение различных традиционных продуктов питания с неосознанным использованием микроорганизмов и ферментов.

2. Пастеровская эра (1865 – 1940 гг.). Включает производство этанола, ацетона, лимонной кислоты и других продуктов с осознанным использованием микроорганизмов.

3. Эра антибиотиков (1940 – 1960 гг.). В этот период открыты антибиотики, разработаны технологии получения вирусных вакцин, культивирования клеток животных.

4. Постантибиотическая эра (1960 – 1975 гг.). Разработаны технологии микробиологического получения аминокислот, витаминов, полисахаридов, иммобилизация ферментов, производство биогаза из твердых отходов.

5. Эра новой биотехнологии (с 1975 г.). Разработана генная инженерия и направления использования трансгенных объектов.

Биотехнология нашла применение в различных сферах человеческой деятельности: в пищевой промышленности, медицине, сельском хозяйстве, энергетике, экологии, химической промышленности и т. д.

Важную роль биотехнология играет в пищевой промышленности. Обширная научная база о составе пищевых продуктов, свойствах нутриентов, способах модификации микроорганизмов и их ключевых метаболитов – ферментов позволяет целенаправленно придавать продукту необходимые свойства, сократить количество стадий процесса и проводить их в более мягких условиях, увеличить выход готового продукта, уменьшить образование побочных веществ.

Одними из наиболее важных объектов современной пищевой биотехнологии являются ферментные препараты. Ежегодно на рынке ферментных препаратов появляются новые продукты, позволяющие решать различные технологические задачи. Например, одной из тенденций в производстве продуктов для здорового питания является сокращение содержания в них акриламида, обладающего канцерогенными свойствами. Эту задачу возможно решить с помощью ферментов-аспарагиназ (например, препарата AsyLaway® фирмы Novozymes). Некоторые препараты имеют

состав, очень близкий к «классическим» источникам ферментов для пищевой промышленности: существуют препараты-аналоги солода (например, препарат Ondea®Pro фирмы Novozymes), позволяющие обойтись без его использования в пивоварении и получать пиво, не отличающееся по качеству от продукта, произведенного традиционным способом.

Использование микроорганизмов и ферментных препаратов в пищевой промышленности предъявляет к специалисту ряд требований, касающихся его теоретической и практической подготовки. Цель курса «Биотехнологические основы пищевых производств» - приобретение основных практических умений и навыков использования ферментных препаратов и микроорганизмов в пищевых производствах.

В данном лабораторном практикуме приводятся работы, посвященные основным ферментным препаратам, позволяющим модифицировать белковые, углеводные и липидные компоненты сырья и полуфабрикатов и тем самым влиять на свойства готового продукта, а также использованию микроорганизмов в процессах брожения. К каждой лабораторной работе приведено подробное теоретическое введение и список вопросов для самоподготовки. Пособие предназначено для студентов, обучающихся по программе бакалавриата направления 19.03.02 «Продукты питания из растительного сырья».

1. Ферменты и ферментные препараты

1.1. Ферменты: общие сведения

Ферментами называются белки, проявляющие свойства катализаторов - веществ, ускоряющих химические реакции. Ферменты представляют собой в основном глобулярные белки, состоящие из 60...2500 аминокислот, с молекулярной массой от 6000 до 250 000 Да. Вещество, превращение которого катализируется ферментом, носит название субстрата [1,2].

Ферменты широко распространены в природе. Для протекания многих биохимических процессов необходимо присутствие ферментов, т.к. они делают возможными многие химические реакции в живых организмах, скорости которых в отсутствие ферментов очень малы.

Функции ферментов в природе очень разнообразны. Например, существует группа ферментов, позволяющих отщеплять фосфатные остатки от аденозинтрифосфата (АТФ), тем самым освобождая энергию, которая может быть использована для осуществления различных процессов. Так, фибриллярный белок миозин способен за счет этой реакции преобразовывать энергию химических связей в механическую энергию мышечного сокращения.

Важную роль ферменты играют в пищеварении животных и человека. Например, амилазы и протеазы расщепляют крупные молекулы крахмала белков соответственно до более простых фрагментов, которые легко метаболизируются.

Без ферментов невозможен процесс окисления глюкозы. Она может непосредственно фосфорилироваться аденозинтрифосфатом, однако без ферментов эта реакция протекает очень медленно. В присутствии же гексокиназы фосфорилирование глюкозы до глюкозо-6-фосфата протекает с очень высокой скоростью [1].

Названия ферментов обычно образуются путем добавления к названию субстрата и/или типу катализируемой реакции суффикса «аза». Например, липоксигеназа – фермент, катализирующий окисление липидов, или глюкозоизомераза – фермент, осуществляющий изомеризацию глюкозы в фруктозу. Используются и тривиальные названия ферментов: пепсин, химозин, трипсин, химотрипсин, папаин и др. [3,4].

Выделяют шесть классов ферментов в зависимости от типа катализируемой ими реакции [2]:

1. Оксидоредуктазы – катализирующие реакции окисления или восстановления субстратов (примеры – глюкозооксидаза, липоксигеназа, лактопероксидаза и др.).
2. Трансферазы – катализирующие перенос группы с одного субстрата на другой (примеры – трансфосфорилаза, трансгликозидаза, трансглутаминаза и др.).
3. Гидролазы – катализирующие реакции гидролиза (примеры – амилазы, протеазы, липазы и др.).

4. Лиазы – катализирующие расщепление связей негидролитическим способом, что часто приводит к образованию двойных связей (пример – пектинлиаза).

5. Изомеразы – катализирующие процессы изомеризации, т.е. изменения структуры и/или геометрии молекулы (пример – глюкозоизомераза).

6. Лигаза – катализируют образование связей между молекулами, в частности, C–C, C–O, C–N или C–S связей (пример – ДНК-лигазы).

Часто после названия фермента указывается код, включающий четыре числа, разделенных точками (ЕС код). Первое число соответствует классу фермента (см. указанную выше классификацию). Второе число указывает на подкласс фермента, который отвечает группе субстрата, участвующего в превращении. Третье число указывает под-подкласс фермента, который соответствует более частной группе субстрата. Четвертое число в коде является порядковым номером фермента.

Например, код 3.4.11.4 расшифровывается следующим образом: фермент относится к классу гидролаз (3), расщепляет пептидные связи (3.4), является экзо-гидролазой (действует по концам молекулы субстрата) (3.4.11), удаляет аминокислотные остатки с NH₂-конца молекулы субстрата (3.4.11.4) [1].

Одной из наиболее простых схем ферментативных реакций является модель Михаэлиса-Ментен, которая предполагает обратимое взаимодействие фермента (E) с субстратом (S), приводящее к образованию фермент-субстратного комплекса (ES). Распад последнего приводит к регенерации исходного фермента и образованию продукта (P) [1].



Активность ферментов зависит от следующих факторов [1]:

- свойств фермента. Выделяют специфичность и селективность ферментов. Селективность подразумевает предпочтительность действия фермента по отношению к определенному субстрату, а специфичность – скорость, с которой происходит превращение субстрата в продукты;

- концентрации фермента. При увеличении концентрации фермента в системе наблюдается увеличение скорости каталитической реакции;

- концентрации субстрата. При увеличении концентрации субстрата сначала наблюдается увеличение скорости реакции, а затем скорость достигает своего максимального значения;

- температура, pH. Для каждого фермента имеются определенные диапазоны температуры и pH, в которых наблюдается максимальная скорость реакции, которые называются pH- и температурными оптимумами. За пределами данных диапазонов происходит обратимое или необратимое снижение активности фермента (вплоть до нулевого уровня);

- присутствие активаторов. Многие ферменты по своей структуре являются сложными белками и помимо белковой части (апофермента) содержат небелковый фрагмент. Например, в состав глюкозооксидазы входит

флавинадениндинуклеотид (ФАД), лактопероксидазы – гем, глюкозоизомеразы – ион Mg^{2+} , α -амилазы – ион Ca^{2+} .

Часто небелковые фрагменты подразделяют на кофакторы и коферменты: к кофакторам относят неорганические соединения, включающие ион металла (например, K^+ , $Fe^{2+/3+}$, $Cu^{+/2+}$, Co^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} и др.), а к коферментам – органические соединения (кофермент А, никотинамидадениндинуклеотид, пиридоксальфосфат и др.).

В ряде случаев в ходе ферментативной реакции происходит удаление небелкового фрагмента из молекулы фермента в реакционную среду, в результате чего происходит снижение скорости процесса. Для сохранения активности некоторых ферментов в реакционную смесь вносят активаторы: например, для поддержания активности мезофильных α -амилаз используют соли Ca^{2+} , глюкозоизомеразы – соли Mg^{2+} .

- присутствие ингибиторов. Ингибиторами называют вещества, замедляющие или полностью прекращающие ферментативные реакции. Выделяют три типа обратимого ингибирования:

- конкурентное. В данном случае ингибитор обратимо связывается с активным центром фермента. Это приводит к уменьшению количества фермент-субстратного комплекса. При этом достижение максимальной скорости реакции происходит при более высоких концентрациях субстрата, чем в отсутствие ингибитора.
- неконкурентное. Неконкурентный ингибитор способен связываться как с самим ферментом, так и с фермент-субстратным комплексом и при этом он не мешает связыванию субстрата, а уменьшает скорость реакции за счет структурных изменений фермента. В данном случае достижение максимальной скорости реакции за счет добавления более высоких количеств субстрата невозможно.
- бесконкурентное. В данном случае ингибитор связывается с фермент-субстратным комплексом, но не с исходным ферментом.

Помимо этого выделяют необратимое ингибирование, в ходе которого происходит образование прочных связей между ингибитором и ферментом (как правило, активным центром фермента).

Примерами ингибиторов ферментов, используемых в пищевой промышленности, являются ионы Ca^{2+} – для глюкозоизомеразы, ионы тяжелых металлов – для тиольных протеаз, тиолы – для металлопротеаз [1-4].

1.2. Ферментные препараты: общие сведения

Понятие «ферментный препарат» относится, прежде всего, к той форме, в которой ферменты используются в практических целях (в пищевой промышленности, медицине и т.д.). Ферментные препараты могут состоять из одного или нескольких ферментов, иметь различную степень очистки, выпускаться в виде порошка, жидкости либо закрепленными на носителе (иммобилизованные ферменты) [3].

Поскольку ферментные препараты могут иметь различную степень чистоты, использование массы как меры их количества для практических целей не всегда удобно. В качестве количественной характеристики ферментных препаратов удобно использовать активность. Стандартная единица активности (Е или U) – это количество мкмоль субстрата, которое превращается ферментом за минуту в оптимальных условиях. Под оптимальными условиями принято считать: температуру 30 °С, значение рН, соответствующее оптимуму данного фермента, концентрацию субстрата, значительно превышающую концентрацию фермента и переводящую его в форму фермент-субстратного комплекса. Активность фермента принято относить к 1 г (для сухих образцов) или 1 мл (для жидких образцов) препарата [3]. В системе СИ единицей измерения активности ферментов является катал (кат) – активность фермента равна одному каталу, если присутствие катализатора увеличивает скорость реакции до 1 моль в секунду; 1 кат = 6·10⁷ Е.

Ферментные препараты получают из растительных, животных и микробных источников. Некоторые примеры ферментных препаратов, выделяемых из растительных и животных источников, приведены в табл. 1.1.

Таблица 1.1. Основные ферментные препараты, получаемые из растительных и животных источников

Ферментный препарат	Источник
α-Амилаза	Зерна злаков (например, пшеницы, ячменя)
β-Амилаза	Сладкий картофель, солод
Папаин	Млечный сок (латекс) папайи
Фицин	Млечный сок инжира
Бромелаин	Сок и стебель ананаса
Трипсин	Бычья/свиная поджелудочная железа
Пепсин	Бычий желудок
Сычужный фермент	Желудок (сычуг) телят, ягнят, козлят
Липаза	Сычуг телят, пищевод козлят, ягнят, свиная поджелудочная железа
Липоксигеназа	Бобовые растения
Лизоцим	Куриный яичный белок
Лактопероксидаза	Подсырная сыворотка, коровье молозиво

В настоящее время основным продуцентом ферментных препаратов для пищевой промышленности являются микроорганизмы (особенно генномодифицированные). Использование генномодифицированных микроорганизмов позволяет:

- достигать более высокого уровня экспрессии;
- получать высокочистые препараты;
- снижать стоимость препаратов;

- получать ферменты от организмов с низкими уровнями экспрессии и от патогенных микроорганизмов.

Можно выделить следующие основные этапы в истории использования ферментных препаратов в приготовлении пищи:

2000 до н.э. – египтяне и шумеры начали использовать ферментацию в пивоварении, хлебопечении и сыроделии.

800 до н.э. – в сыроделии начали применяться желудки телят и фермент химозин.

1878 г. – обнаружены вызывающие брожение компоненты клеток дрожжей, названные «энзимами» (от греч. «в дрожжах»).

1926 г. – доказана белковая природа ферментов.

1930 г. – в кристаллической форме получен фермент пепсин. Спустя несколько лет из *Bacillus licheniformis* выделена протеаза, что послужило отправной точкой для промышленного получения ферментных препаратов.

1969 г. – впервые проведен химический синтез фермента.

80 гг. XX века – разработаны технологии производства ферментов с целью улучшения усвояемости кормов для животных.

1982 г. – началось использование генноинженерной α -амилазы в производстве пищевых продуктов.

1988 г. – использование химозина из генномодифицированных микроорганизмов для производства пищевых продуктов было разрешено в Швейцарии. После этого ферментные препараты из генномодифицированных источников стали широко использоваться в пищевой промышленности (см. табл. 1.2). На российском рынке ферментов сегодня преобладают импортные препараты. Для них не существует регулярной номенклатуры, т.е. название препарата может не говорить об основном ферменте, производителе и степени очистки. Примерами названий импортных препаратов являются “Sweetzyme” (глюкозоизомераза), “Fructozyme” (инулиназа), “Alcalase” (протеаза).

Названия препаратов российского производства отражают основной фермент, производитель и степень очистки. Наименование каждого препарата включает сокращенное название основного фермента, к которому добавляется видовое название производителя; заканчивается название препарата суффиксом "ин". Например, амилазы, выделяемые из *Bacillus subtilis*, называются амилосубтилин. Далее ставится индекс, в котором обозначены способ производства и степень очистки фермента от балластных веществ. При глубинном способе культивирования после названия ставится буква Г, а при поверхностном – П. После букв Г или П может стоять цифра, обозначающая степень чистоты препарата. Индекс 2х обозначает жидкий неочищенный концентрат исходной культуры; 3х – сухой ферментный препарат, полученный высушиванием распылением неочищенного раствора фермента (экстракта из поверхностной культуры или культуральной жидкости). Индексом 10х обозначают сухие препараты, полученные осаждением ферментов органическими растворителями или методом высаливания; индексами 15х, 18х, 20х обозначают препараты, частично

освобожденные не только от балластных веществ, но и от сопутствующих ферментов; индексами выше 20х – высокоочищенные и гомогенные ферментные препараты [3].

Таблица 1.2. Основные области применения ферментных препаратов в пищевой промышленности

Ферментный препарат	Применение в пищевой промышленности
α -Амилаза	- Гидролиз крахмала в производстве патоки; - сахарообразование в производстве теста; - увеличение глубины сбраживания пивного сусла.
α -Ацетолактат-декарбоксилаза	- Ускорение созревания пива за счет быстрого превращения α -ацетолактата в ацетон.
β -Амилаза	- Производство мальтозной патоки; - продление сроков хранения хлеба за счет ограниченного гидролиза крахмала в тестоведении.
Гемицеллюлазы	- Улучшение структуры мякиша хлеба.
Глюкоамилаза	- Сахарообразование при получении теста; - производство высокосахаренной патоки; - ускорение брожения пива.
Глюкозооксидаза	- Укрепление клейковинного каркаса теста; - удаление кислорода из продуктов.
Глюкозоизомераза	- Производство глюкозо-фруктозных сиропов.
β -Глюканаза	- Улучшение фильтрования затора; - устранение помутнения пива.
Липазы	- Модификация вкуса и аромата; - переэтерификация жиров; - синтез эфиров жирных кислот.
Пектиназы	- Дспектинизация и осветление соков.
Пуллуланаза	- Производство высокосахаренной и мальтозной патоки.
Протеазы	- Производство белковых гидролизатов; - коагуляция казеина; - снижение аллергенности; - ослабление клейковинного каркаса теста.

Контрольные вопросы

1. Чем отличаются ферменты и ферментные препараты?
2. Назовите группы ферментов; какие реакции они катализируют?
3. Что такое кофактор? Приведите примеры кофакторов ферментов.
4. Что такое активность ферментного препарата?
5. Расшифруйте названия: Цитороземин П10х, Целловиридин Г20х, Пектофоедин П10х, Глюкаваморин Г3х, Протосубтилин Г15х.

2. Амилолитические ферменты в пищевой промышленности

2.1. Амилолитические ферменты: общие сведения, классификация

Гидролиз крахмала осуществляется в промышленности в присутствии α -амилаз, β -амилаз (мальтогенных амилаз), γ -амилаз (глюкоамилаз, амилоглюкозидаз) и пуллулаз. Эти ферменты различаются по строению, специфичности к различным фракциям крахмала и механизмам каталитического действия [1,4].

α -Амилазы (эндо-1,4- α -D-глюкан-глюканогидролазы, ЕС 3.2.1.1) разрушают α -1,4-гликозидные связи *внутри* молекулы субстрата, т.е. они являются эндо-действующими ферментами. α -Амилазы способны катализировать гидролиз амилозы, амилопектина (рис. 2.1), гликогена и других α -1,4-глюканов до смеси линейных и разветвленных олигосахаридов.

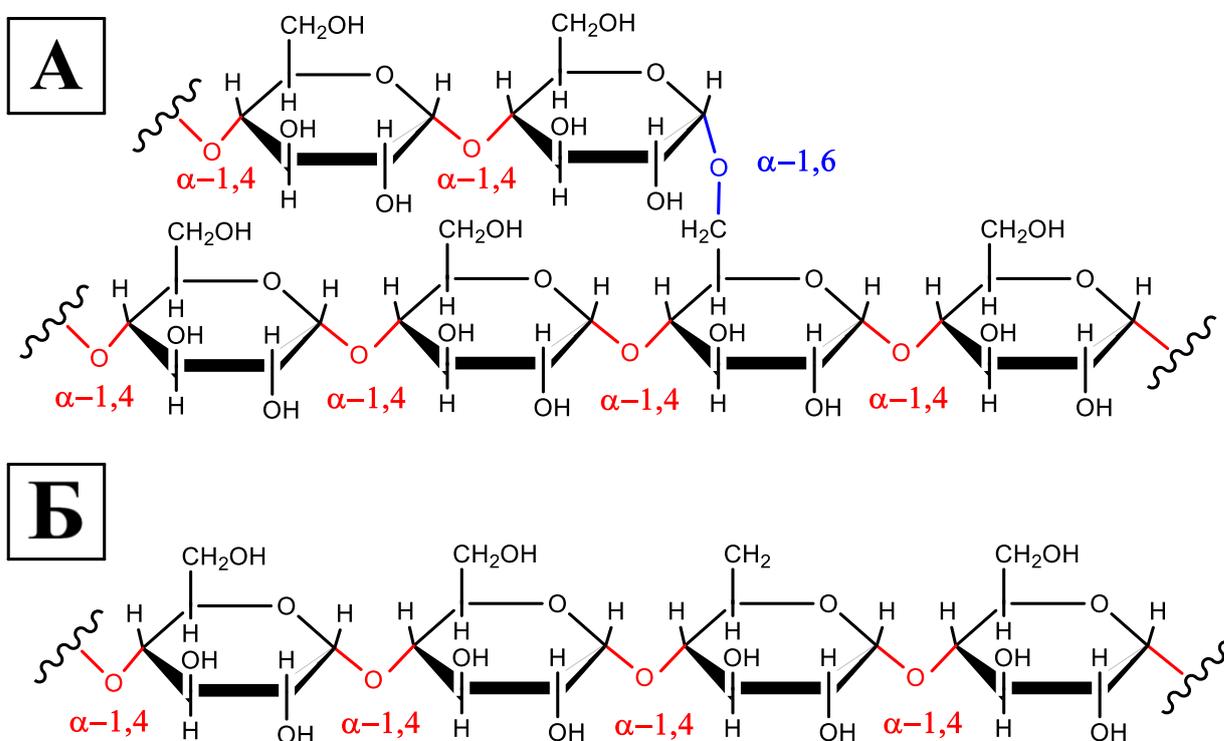


Рис. 2.1. Структура молекул амилопектина (А) и амилозы (Б)

Оптимальные условия действия α -амилаз различны и зависят от источников их получения. Ферменты, выделенные из *Bacillus subtilis*, относятся к группе мезофильных амилаз и имеют оптимум активности при 60 ... 85 °С и рН 5,5...6,5. Обязательным условием их действия является присутствие активаторов - ионов Ca^{2+} . α -Амилазы, выделенные из грибов *Aspergillus oryzae*, имеют более низкие температурный (35...55 °С) и рН-оптимумы (4,0...5,5). Мезофильные α -амилазы незначительно воздействуют на нативный крахмал из-за его плотной упаковки в гранулах. Однако после клейстеризации (желатинизации) крахмала (рис. 2.2) скорость его

ферментативного гидролиза значительно возрастает, поскольку упаковка молекулы становится менее плотной, и появляется большое количество гликозидных связей, доступных для атаки амилаз [2,5]. Температура клейстеризации крахмала зависит от источника его получения: она составляет 65...75 °С для кукурузного, 52...64 °С для пшеничного, 59...64 °С для картофельного, 60...80 °С для ячменного, 50...55 °С для ржаного крахмалов. Отметим, что α -амилазы, полученные из грибов *Aspergillus*, активны при более низких температурах, чем температура клейстеризации крахмала. Кроме того, они быстро инактивируются при температурах, превышающих оптимальные. В связи с этим α -амилазы, полученные из плесневых грибов, редко используются для разжижения крахмала.

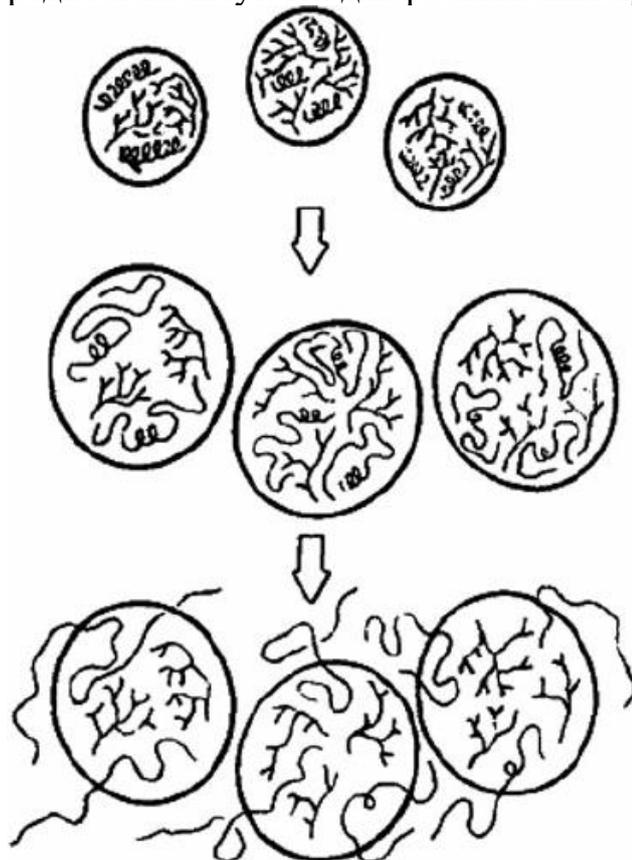


Рис. 2.2. Схематическое представление процесса клейстеризации крахмала

Широкое распространение в пищевой промышленности нашли термофильные α -амилазы, продуцируемые бактериями *B. stearothermophilus*. Препараты термофильных α -амилаз позволяют проводить разжижение крахмального клейстера с высокой скоростью. Кроме того, они активны не только по отношению к набухшему, но и к нативному крахмалу. Главным отличием термофильных ферментов от мезофильных является более высокий температурный оптимум первых (95...110 °С). Активность термофильных α -амилаз слабо зависит от присутствия в реакционной смеси ионов Ca^{2+} .

β -Амилазы (экзо-1,4- α -D-глюкан-мальтогидролазы, ЕС 3.2.1.2) отщепляют по две молекулы глюкозы от невосстанавливающего (не имеющего свободной аномерной ОН группы) конца (т.е. являются экзо-

действующими ферментами) полимера и способны разрушать только α -1,4-связи. В случае гидролиза линейных фрагментов амилозы продуктом реакции является мальтоза. Однако гидролиз амилопектина заканчивается за три звена до точки разветвления полигликозидной цепи (α -1,6-связи), т.е. продуктом реакции является смесь мальтозы и разветвленных декстринов (рис. 2.3). Препараты β -амилазы получают, как правило, из генномодифицированных штаммов *B. subtilis* либо из растительных источников (например, солода). β -Амилазы являются тиольными ферментами (т.е. их активный центр включает SH-группы). Их активность сильно снижается в присутствии окислителей, ионов тяжелых металлов. Активация ферментов заключается в восстановлении дисульфидных связей (S–S) до тиольных, что обычно осуществляется добавками L-цистеина. Оптимумы большинства препаратов β -амилаз - 50...70 °С, pH 6,0...7,0.

γ -Амилазы (глюкоамилазы, амилоглюкозидазы, экзо-1,4- α -D-глюкан-глюкогидролазы, ЕС 3.2.1.3) являются экзо-действующими ферментами, отщепляющими фрагменты глюкозы от невосстанавливающего конца полимера. Они способны катализировать гидролиз как α -1,4, так и α -1,6-связей, однако в последнем случае реакция протекает более медленно. Действие γ -амилаз на крахмал в итоге приводит к его полному гидролизу до глюкозы. Обычно препараты γ -амилаз выделяют из грибов *Asp. awamori*, *Asp. niger*, *Asp. oryzae*. Оптимум их активности - 50...65 °С, pH 3,5...5,0.

Пуллуланызы (эндо-1,6- α -D-глюкан-глюканогидролаза, ЕС 3.2.1.41) гидролизуют α -1,6-связи в разветвленных полиглюканах – амилопектине (рис. 2.3), гликогене, пуллулане и др. Их действие на амилопектиновую фракцию крахмала приводит к образованию смеси линейных декстринов. Продуцентом пуллуланызы являются бактерии *B. acidopullulyticus*. Оптимум активности пуллуланыз - 50...65 °С, pH 3,5...5,0. Их активность не зависит от присутствия в реакционной смеси ионов Ca^{2+} .

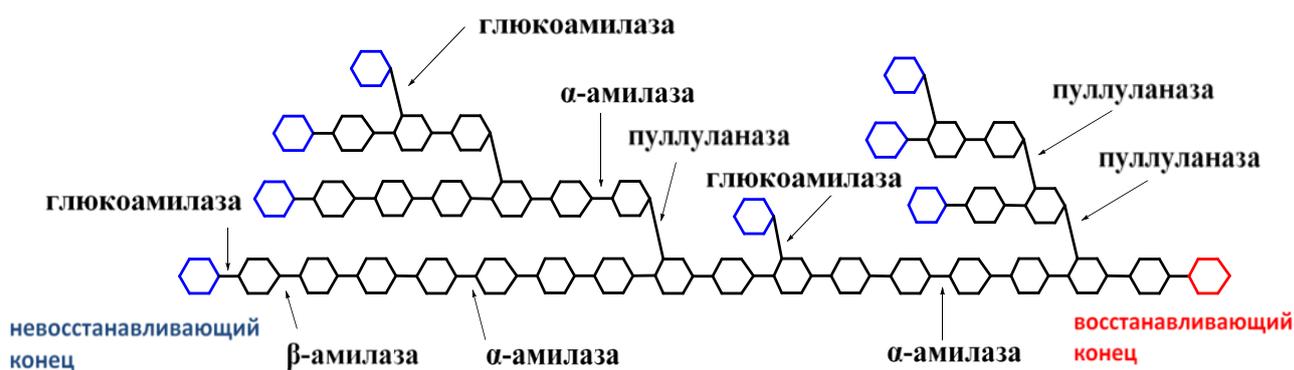


Рис. 2.3. Действие амилолитических ферментов на связи в амилопектине

Лабораторная работа №1. Определение активности амилолитических ферментов. Влияние pH на их активность

Активность препаратов мезофильных и термофильных α -амилаз и глюкоамилаз определяется согласно ГОСТ Р 54330-2011 [6].

1.1. Определение активности α -амилаз

Методика определения активности α -амилиз основана на определении количества гидролизованного крахмала в присутствии фермента. Стандартные условия для проведения анализа, определенные ГОСТ Р 54330-2011 [6], составляют: температура 30 °С, значение pH 6,0 – для бактериальных и 4,7 – для грибных α -амилаз. В работе предлагается провести анализ в широком диапазоне pH с целью определения влияния кислотности среды на свойства ферментного препарата.

За единицу амилолитической активности (E_{AM}) принято такое количество фермента, которое при стандартных условиях за 1 ч катализирует гидролиз 1 г крахмала до декстринов различной молекулярной массы, количество которых составляет 30 % от массы крахмала, введенного в реакцию. Активность относят к 1 г (для порошкообразных) или 1 мл (для жидких) анализируемого образца ферментного препарата.

Реактивы и материалы

Раствор крахмала

1,25 г крахмала помещают в мерную колбу объемом 100 мл, добавляют 50 мл дистиллированной воды, перемешивают, а затем помещают колбу в кипящую водяную баню не менее чем на 15...20 мин, непрерывно перемешивая содержимое до полного растворения крахмала. После этого содержимое колбы охлаждают, объем жидкости доводят до метки дистиллированной водой при температуре 20 °С и содержимое колбы перемешивают.

Ацетатный (pH 4,7), фосфатные (pH 2,2 и 6,0) и боратный (pH 9,2) буферные растворы

Приготовление ацетатного буферного раствора. В первую мерную колбу объемом 1 л помещают 82,0 г (или 136,0 г $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) безводного ацетата натрия и растворяют приблизительно в 300 мл дистиллированной воды. Затем доводят до метки дистиллированной водой при температуре 20 °С и перемешивают. Во вторую мерную колбу объемом 1 л вносят 58 мл ледяной уксусной кислоты, приливают около 300 мл дистиллированной воды, доводят до метки дистиллированной водой при температуре 20 °С и снова перемешивают. Для приготовления ацетатного буферного раствора в колбе смешивают равные объемы растворов ацетата

натрия и уксусной кислоты, создавая значение рН смеси, равное 4,7. При необходимости доводят рН раствора до 4,7 одним из исходных растворов.

Приготовление фосфатных буферных растворов. В первую мерную колбу объемом 1 л помещают 23,9 г гидрофосфата натрия ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), растворяют в 300 мл дистиллированной воды и доводят объем до метки дистиллированной водой при температуре 20 °С. Во вторую мерную колбу объемом 1 л помещают 9,1 г дигидрофосфата калия (KH_2PO_4), растворяют в 300 мл дистиллированной воды и доводят объем до метки дистиллированной водой при температуре 20 °С. В третьей мерной колбе объемом 1 л готовят раствор ортофосфорной кислоты с концентрацией 0,07 моль/л путем разбавления концентрированного раствора кислоты.

Для приготовления фосфатного буферного раствора с рН 6,0 первый и второй растворы смешивают в соотношении 1:9. Раствор с рН 2,2 готовят смешиванием равных количеств второго и третьего растворов. Величину рН проверяют на рН-метре. В случае отклонения рН фосфатного буферного раствора от 6,0 (или 2,2) его доводят до нужного значения соответствующим раствором.

Приготовление боратного буферного раствора. В мерную колбу объемом 1 л помещают 11,4 г тетрабората натрия ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), добавляют около 0,8 л дистиллированной воды и смесь перемешивают до полного растворения осадка. Для ускорения растворения осадка допускается нагреть смесь до кипения и затем охладить до комнатной температуры. После этого раствор доводят дистиллированной водой до метки, перемешивают и контролируют значение рН с помощью рН-метра.

Раствор йода

Приготовление основного раствора йода. 0,5 г йода и 5,0 г йодида калия растворяют в стаканчике для взвешивания с притертой пробкой в небольшом количестве воды. Содержимое перемешивают на магнитной мешалке при плотно закрытой крышке бюкса. Раствор после полного растворения йода количественно переносят в мерную колбу с притертой крышкой объемом 200 мл и объем доводят дистиллированной водой до метки при температуре 20 °С.

Приготовление рабочего раствора йода. 20 мл основного раствора йода разводят раствором соляной кислоты (0,2 моль/л) в мерной колбе объемом 1 л. Перед использованием рабочего раствора проверяют его поглощение на фотоэлектроколориметре или спектрофотометре в диапазоне длин волн 440...450 нм в кюветах с длиной оптического пути 1 см. Поглощение рабочего раствора йода, измеренное относительно дистиллированной воды, должно иметь значение $(0,22 \pm 0,01)$. В случае отклонения от этого значения добавляют раствор соляной кислоты или основной раствор йода до достижения нужной величины поглощения.

Основной и рабочий растворы ферментного препарата

Для приготовления *основного раствора* анализируемой пробы в стаканчик для взвешивания помещают 0,100 г порошкообразного ферментного препарата или 1,00 г жидкого ферментного препарата и суспендируют в небольшом количестве дистиллированной воды. Суспензию количественно переносят в мерную колбу объемом 100 мл, доводят объем до метки дистиллированной водой при температуре 20 °С и тщательно перемешивают.

Рабочий раствор анализируемого ферментного препарата готовят из основного раствора путем дальнейшего разведения его в дистиллированной воде таким образом, чтобы при определении активности коэффициент C (см. ниже), характеризующий степень гидролиза крахмала, находился в пределах 0,02...0,07.

Проведение анализа

В две пробирки вносят по 8 мл раствора крахмала и по 2 мл раствора буфера (согласно заданию). Содержимое пробирок прогревают в термостате при температуре (30 ± 1) °С в течение 5 мин.

В пробирки с крахмалом добавляют по 5,0 мл рабочего раствора анализируемой пробы ферментного препарата, предварительно прогретого при температуре 30 °С, тщательно перемешивают и включают секундомер, отмечая начало ферментативной реакции. Реакционную смесь выдерживают при температуре (30 ± 1) °С в течение 10 мин.

По окончании реакции отбирают 0,5 мл смеси и вносят в колбу с 50 мл рабочего раствора йода. Содержимое колбы перемешивают и измеряют поглощение на фотоэлектроколориметре или спектрофотометре при длине волны 670 нм в кюветах с длиной оптического пути 1 см относительно дистиллированной воды, получая значение поглощения A_2 .

В качестве контроля используют раствор, включающий 8 мл раствора крахмала и 2 мл буфера (согласно заданию), в который вместо раствора анализируемого фермента добавляют 5,0 мл дистиллированной воды. Полученную смесь прогревают при температуре 30 °С в течение 10 мин. Затем все дальнейшие действия проводят аналогично вышеописанной методике, получая значение поглощения A_1 .

После добавления к рабочему раствору йода смеси крахмала и продуктов его гидролиза раствор приобретает фиолетовую окраску различной интенсивности в зависимости от количества негидролизованного крахмала; цвет контрольного раствора – синий.

Обработка результатов

Количество гидролизованного крахмала (C) определяют на основании разности поглощения контрольного и анализируемого растворов по формуле (2.1).

$$C = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \cdot 0,1, \quad (2.1)$$

где A_1 – поглощение контрольного раствора;
 A_2 – поглощение анализируемого раствора;
0,1 – масса крахмала, взятого на анализ, г.

Если коэффициент C меньше 0,02 или больше 0,07, то анализ повторяют, подбирая другое разведение анализируемой пробы так, чтобы раствор содержал большее или меньшее количество фермента соответственно.

Амилолитическую активность препаратов бактериальной мезофильной α -амилазы ($E_{AM(6M)}$ в ед./г (для порошкообразного препарата) или ед./мл (для жидкого препарата)) рассчитывают по формуле (2.2).

$$E_{AM(6M)} = \frac{5,885C + 0,0017}{n} d, \quad (2.2)$$

где 5,885; 0,0017 – эмпирические коэффициенты уравнения, полученные при математической обработке экспериментальных данных зависимости массы гидролизованного крахмала от массы фермента, взятого для анализа, в пересчете на 1 ч действия фермента;

n – масса ферментного препарата с учетом разведения, взятая для испытания, г;

d – плотность раствора ферментного препарата (для жидкого препарата), г/мл.

Амилолитическую активность препаратов бактериальной термофильной α -амилазы ($E_{AM(6T)}$ в ед./г (для порошкообразного препарата) или ед./мл (для жидкого препарата)), рассчитывают по формуле (2.3).

$$E_{AM(6T)} = \frac{6,6138C - 0,0192}{n} d, \quad (2.3)$$

где 6,6138; 0,0192 – эмпирические коэффициенты уравнения, полученные при математической обработке экспериментальных данных зависимости массы гидролизованного крахмала от массы фермента, взятого для анализа, в пересчете на 1 ч действия фермента.

Амилолитическую активность для препаратов грибной α -амилазы ($E_{AM(Г)}$ в ед./г (для порошкообразного препарата) или ед./мл (для жидкого препарата)) рассчитывают по формуле (2.4).

$$E_{AM(r)} = \frac{7,264C - 0,0377}{n} d, \quad (2.4)$$

где 7,264; 0,0377 – эмпирические коэффициенты уравнения, полученные при математической обработке экспериментальных данных зависимости массы гидролизованного крахмала от массы фермента, взятого для анализа, в пересчете на 1 ч действия фермента.

При значении амилолитической активности менее 100 ед./г(мл) вычисления проводят до первого десятичного знака. При значении амилолитической активности не менее 100 ед./г(мл) вычисления проводят до целых чисел.

После определения активности при разных значениях рН следует сделать вывод о влиянии кислотности среды на свойства препарата.

1.2. Определение активности γ -амилаз

Метод основан на количественном определении глюкозы, образующейся при гидролизе крахмала γ -амилазой (глюкоамилазой, амилоглюкозидазой). Стандартные условия анализа, определенные ГОСТ Р 54330-2011 [6], составляют: температура 30 °С, рН 4,7. В данной работе предлагается провести анализ в широком диапазоне рН с целью определения влияния кислотности среды на свойства препарата.

Глюкоамилазная активность ($E_{ГА}$) характеризует способность ферментного препарата катализировать расщепление крахмала до глюкозы и выражается числом единиц активности в 1 г (1 мл) препарата. За единицу глюкоамилазной активности принято такое количество фермента, которое способно катализировать гидролиз растворимого крахмала при температуре 30 °С и значении рН 4,7, выделяя за 1 мин 1 мкмоль глюкозы. Активность выражается в ед./г (для порошкообразного) или ед./мл (для жидкого) анализируемого ферментного препарата.

Количество глюкозы, образующейся в результате ферментативного гидролиза крахмала, определяют глюкозооксидазным методом, основанным на действии ферментов глюкозооксидазы и пероксидазы. Фермент глюкозооксидаза катализирует окисление β -D-глюкозы кислородом воздуха до глюконо-1,5-лактона, гидролизующегося до глюконовой кислоты, с образованием перекиси водорода (схема 2.1). Оба конечных продукта образуются в количествах, эквимолярных окисленной глюкозе. Пероксид водорода под действием фермента пероксидазы окисляет гексацианоферрат(II) калия ($K_4[Fe(CN)_6]$), который переходит в гексацианоферрат(III) калия ($K_3[Fe(CN)_6]$) (схема 2.2), окрашенный в лимонно-желтый цвет, интенсивность окраски которого пропорциональна количеству глюкозы.

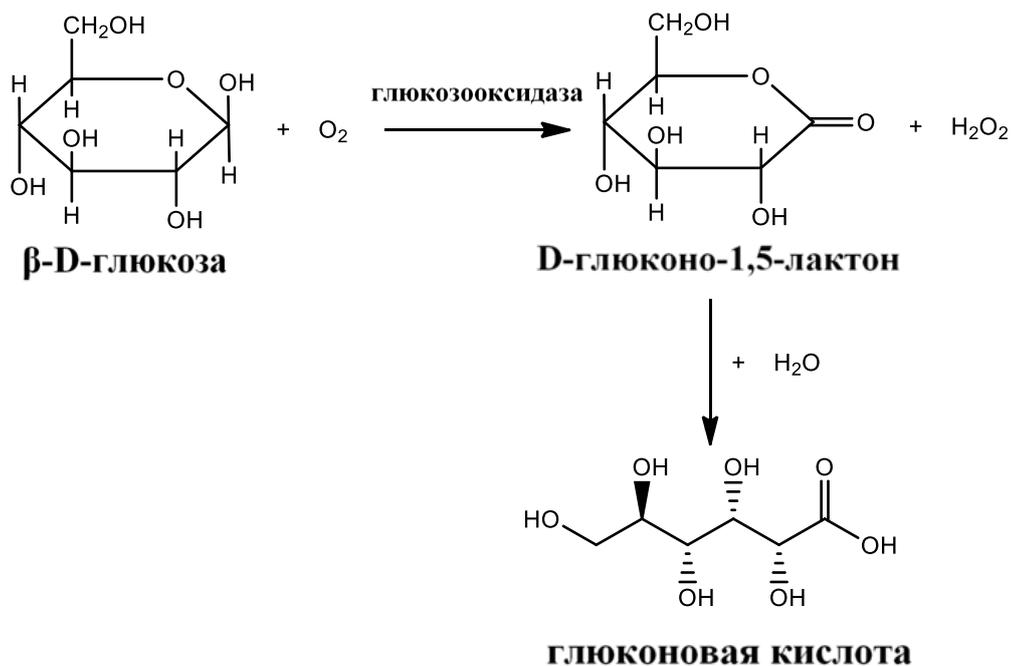


Схема 2.1. Окисление β -D-глюкозы кислородом в присутствии глюкозооксидазы

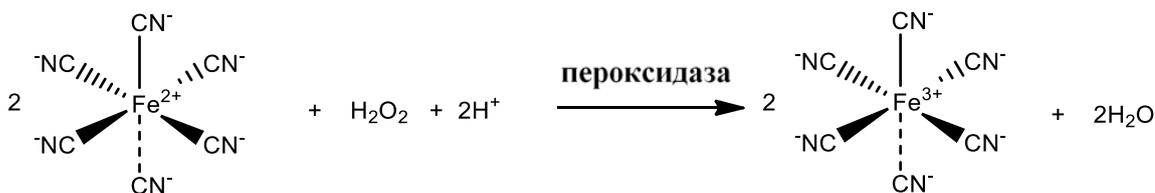


Схема 2.2. Окисление гексацианоферрата(II) до гексацианоферрата(III) пероксидом водорода в присутствии пероксидазы

Реактивы

Ацетатный (pH 4,7), фосфатные (pH 6,0 и 7,5) и боратный (pH 9,2) буферные растворы, раствор крахмала готовят аналогично методике, описанной в п. 1.1.

Глюкозооксидазный реактив

Глюкозооксидазный реактив готовят, используя раствор гексацианоферрата(II) калия (0,1 %) и раствор глюкозооксидазы.

Для приготовления раствора гексацианоферрата(II) калия (0,1 %) (раствор А) 0,05 г $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ количественно переносят в мерную колбу объемом 50 мл и растворяют в дистиллированной воде. Объем раствора доводят до метки дистиллированной водой при температуре 20 °С и

перемешивают. Раствор готовят непосредственно перед проведением анализа.

Для приготовления раствора *глюкозооксидазы* (раствор Б) 5,0...6,0 мг глюкозооксидазы растворяют фосфатным буферным раствором с рН 7,5 в мерной колбе объемом 50 мл и затем добавляют 2,0 мг пероксидазы. Объем доводят до метки фосфатным буферным раствором. Количество ферментных препаратов берут с учетом их активности из такого расчета, чтобы в 50 мл содержалось 500...600 ед. активности глюкозооксидазы, а пероксидазы – 600 ед. активности. Срок хранения полученного раствора в посуде из темного стекла в холодильнике – не более 3 суток.

Рабочий раствор С готовят смешиванием равных объемов растворов А и Б. Срок хранения полученного раствора в посуде из темного стекла в холодильнике составляет не более 3 суток.

Приготовление градуировочных растворов глюкозы

Для приготовления основного градуировочного раствора глюкозы с массовой концентрацией 1 мг/мл в мерную колбу объемом 100 мл помещают 0,1 г глюкозы, растворяют в дистиллированной воде, тщательно перемешивают и доводят объем до метки дистиллированной водой. Для приготовления рабочих градуировочных растворов глюкозы из основного ее раствора отбирают поочередно по 5, 10 и 15 мл в мерные колбы вместимостью 100 мл каждая и доводят объем до метки дистиллированной водой при температуре 20 °С. В 1 мл полученных растворов содержится 50, 100 и 150 мкг глюкозы. Эти растворы используют для построения градуировочного графика.

Приготовление растворов γ -амилазы

Для приготовления *основного раствора* анализируемой пробы ферментного препарата в стаканчик для взвешивания помещают 0,1 г порошкообразного или 100 г жидкого ферментного препарата и суспендируют в небольшом количестве дистиллированной воды. Суспензию количественно переносят в мерную колбу объемом 100 мл, доводят объем до метки дистиллированной водой при температуре 20 °С и тщательно перемешивают.

Рабочий раствор анализируемого ферментного препарата готовят из основного раствора путем разведения его дистиллированной водой в зависимости от предполагаемой активности таким образом, чтобы при ее определении плотность раствора после проведения реакции с глюкозооксидазным реактивом находилась в пределах градуировочной кривой. Растворы готовят в день определения.

Рабочие градуировочные растворы глюкозы готовят в день построения градуировочного графика, при этом берут по три параллельных разведения для приготовления раствора глюкозы каждой концентрации.

Проведение анализа

Построение градуировочного графика. В три пробирки вносят по 1,0 мл рабочего градуировочного раствора глюкозы различных массовых концентраций, добавляют по 3 мл рабочего раствора С. В контрольную пробу вместо раствора глюкозы вносят 1 мл дистиллированной воды. Оставляют пробирки на 45 мин при температуре 20 °С для развития окраски. Поглощение растворов глюкозы измеряют на фотоэлектроколориметре или спектрофотометре при длине волны 400 нм в кюветах с длиной светового пути 1 см относительно контрольной пробы на реактив С.

Рабочая зона градуировочного графика должна находиться в области содержания глюкозы 50...150 мкг в используемых растворах. Поглощение раствора должно быть близким к значениям (0,10 + 0,01); (0,20 + 0,01); (0,30 + 0,01).

По полученным значениям строят градуировочный график зависимости поглощения от содержания глюкозы в используемых растворах (мкг). На оси абсцисс (X) откладывают содержание глюкозы в рабочих растворах (m) в мкг; на оси ординат (Y) – соответствующие значения поглощения (A) при 400 нм.

Проведение анализа. В две пробирки вносят по 1,6 мл раствора крахмала и 0,4 мл буферного раствора (согласно заданию). Содержимое пробирок прогревают в термостате при температуре (30,0 + 1,0) °С в течение 5 мин.

В пробирки с субстратом добавляют по 1,0 мл рабочего раствора анализируемой пробы ферментного препарата, предварительно прогретого при температуре 30 °С, тщательно перемешивают и включают секундомер, отмечая начало ферментативной реакции. Реакционную смесь выдерживают при температуре (30 + 1) °С в течение 10 мин, отмечая время точно по секундомеру от начала ферментативной реакции.

По окончании реакции 1 мл смеси переносят в другую сухую пробирку, помещают в кипящую водяную баню, выдерживают в течение 3 мин (для инактивации фермента) по секундомеру, после чего содержимое пробирки охлаждают водой. Затем к смеси добавляют 3 мл раствора С, перемешивают и выдерживают 45 мин при комнатной температуре для развития окраски.

Поглощение раствора соединения желтой окраски, образующегося в результате действия глюкозооксидазного реактива, измеряют на фотоэлектроколориметре или спектрофотометре при длине волны 400 нм в кюветах с длиной светового пути 1 см относительно контрольной пробы на фермент. Значение поглощения должно лежать в пределах, соответствующих массе глюкозы в промеряемом растворе от 25 до 125 мкг.

Если при измерении интенсивности окраски анализируемой пробы полученные значения не соответствуют указанному диапазону, то опыт повторяют с меньшим или большим количеством основного раствора ферментного препарата, используемого для приготовления рабочего раствора.

Контрольная проба на фермент. Около 2 мл рабочего раствора ферментного препарата выдерживают в кипящей водяной бане в течение 10 мин (для инактивации фермента). К 1,6 мл раствора крахмала добавляют 0,4 мл буферного раствора и 1 мл рабочего раствора анализируемой пробы ферментного препарата, охлажденного после инактивации, и выдерживают в термостате в течение 10 мин. Затем в сухую пробирку отбирают 1 мл содержимого контрольной пробирки и проводят определение поглощения согласно вышеописанной методике.

Обработка результатов

Глюкоамилазную активность ($E_{ГА}$ в ед./г (для порошкообразного препарата) или ед./мл (для жидкого препарата)), вычисляют по формуле (2.5).

$$E_{ГА} = \frac{m \cdot 3}{m_1 \cdot 10 \cdot 180} d, \quad (2.5)$$

где m – массовая доля глюкозы, образовавшейся в реакционной смеси за счет действия фермента, найденная по градуировочному графику, мкг;

3 – коэффициент, учитывающий трехкратное разбавление рабочего раствора ферментного препарата непосредственно в реакционной смеси;

m_1 – масса ферментного препарата с учетом разбавления, взятая для анализа, г;

180 – молекулярная масса глюкозы, мкг/мкмоль;

10 – время гидролиза, мин;

d – плотность раствора ферментного препарата (для жидкого препарата), г/мл.

При значении глюкоамилазной активности не более 100 ед./г(мл) вычисления проводят до первого десятичного знака. При значении глюкоамилазной активности не менее 100 ед./г(мл) вычисления проводят до целых чисел.

После определения активности при разных значениях рН следует сделать вывод о влиянии кислотности среды на свойства препарата.

Контрольные вопросы

1. Дайте определение активности амилазных ферментных препаратов. При каких условиях проводится ее определение?
2. Почему необходимо придерживаться определенных условий при определении активности ферментных препаратов?
3. Перечислите гидролазы α -1,4 и α -1,6-гликозидных связей крахмала.
4. Что такое восстанавливающий и невосстанавливающий концы молекулы крахмала?

5. В чем заключается различие между термофильными и мезофильными α -амилазами?
6. С какой целью используется раствор йода при определении активности α -амилаз?
7. С какой целью используются глюкозооксидаза и пероксидаза при определении активности препаратов глюкоамилаз?
8. Можно ли определять активность глюкоамилаз с использованием раствора йода и почему?

2.2. Использование процесса гидролиза крахмала в крахмалопаточной промышленности

Промышленная переработка крахмала с использованием ферментных препаратов или без них в патоку включает следующие стадии:

- клейстеризацию;
- разжижение;
- декстринизацию;
- осахаривание;
- очистку сиропа.

В ГОСТ 32902-2014 [7] приводятся определения стадий гидролиза крахмала:

- клейстеризация – это набухание и разрушение крахмальных зёрен при нагревании в воде или при действии щелочных растворов;
- разжижение – это начальная стадия гидролиза крахмала, включающая его клейстеризацию и характеризующаяся снижением вязкости крахмального клейстера;
- декстринизация – это деструкция крахмала в присутствии катализатора или без него;
- осахаривание – это заключительная стадия гидролиза крахмала с получением гидролизата заданного углеводного состава.

Важной характеристикой гидролизатов крахмала, определяющей их состав и свойства, является декстрозный эквивалент. Декстрозный (глюкозный) эквивалент (*DE*) – это содержание восстанавливающих сахаров, равное числу граммов безводной D-глюкозы в 100 г сухого вещества образца. Согласно ГОСТ 52060-2003 [8] и ГОСТ 32902-2014 [9], декстрозный эквивалент каждого вида патоки должен находиться в определенных границах:

- для низкоосахаренной $DE = 26...35$;
- для карамельной $DE = 36...44$;
- для мальтозной $DE \geq 38$;
- для высокоосахаренной $DE \geq 45$.

Главным отличием мальтозной патоки от патоки других видов является углеводный состав: массовая доля мальтозы в ней должна составлять 35...65 %, а для высокомальтозной патоки ≥ 65 %.

Последовательность стадий ферментативного гидролиза крахмала представлена на схеме 2.3.

Природный крахмал незначительно гидролизуется α -амилазами [2,5]; для повышения эффективности гидролиза требуется клейстеризация крахмальной суспензии. В ходе клейстеризации происходит проникновение воды внутрь крахмального зерна, разрушение его компактной структуры, в результате чего появляется больше доступных для атаки ферментами гликозидных связей, чем было в исходной плотной упаковке.

Для разжижения к клейстеру добавляется препарат α -амилазы. В крахмалопаточной промышленности проведение стадий клейстеризации, разжижения и декстринизации значительно упрощается при использовании термофильной α -амилазы (препарат «Termamyl»). После установления необходимой величины pH раствора препарат «Termamyl» дозируется в крахмальную суспензию, затем смесь нагревается паром до 105 °С, и при данной температуре смесь выдерживают в течение пяти минут для проведения клейстеризации и разжижения крахмала. Затем при более низкой температуре (95...100 °С) в течение 1...2 часов протекает декстринизация крахмала до достижения необходимого значения декстрозного эквивалента. Дозировка ферментного препарата «Termamyl» составляет обычно 0,3...0,6 кг на тонну крахмала [1].

Процесс гидролиза крахмала желательно проводить при pH 4,5...5,0; при этих условиях образуется сравнительно немного побочных продуктов, некоторые из которых имеют темную окраску, и сокращается число технологических операций. Следует избегать pH > 6,5 из-за образования побочных продуктов, например, мальтулозы – 1- α -D-глюкопиранозил-4-D-фруктофуранозы, устойчивой к действию амилолитических ферментов, рис. 2.4. Образование мальтулозы усиливается при высоких температурах, длительной выдержке и становится очень выраженным по мере роста декстрозного эквивалента. Главным достоинством термостабильных α -амилаз является то, что стадия разжижения проводится при сравнительно низкой температуре (около 105 °С). В процессе кислотного гидролиза с использованием минеральных кислот для достижения необходимого значения декстрозного эквивалента требуются более высокие температуры (около 140 °С) [1].

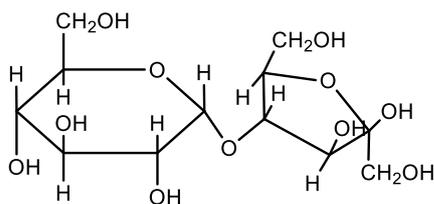


Рис. 2.4. Структура мальтулозы

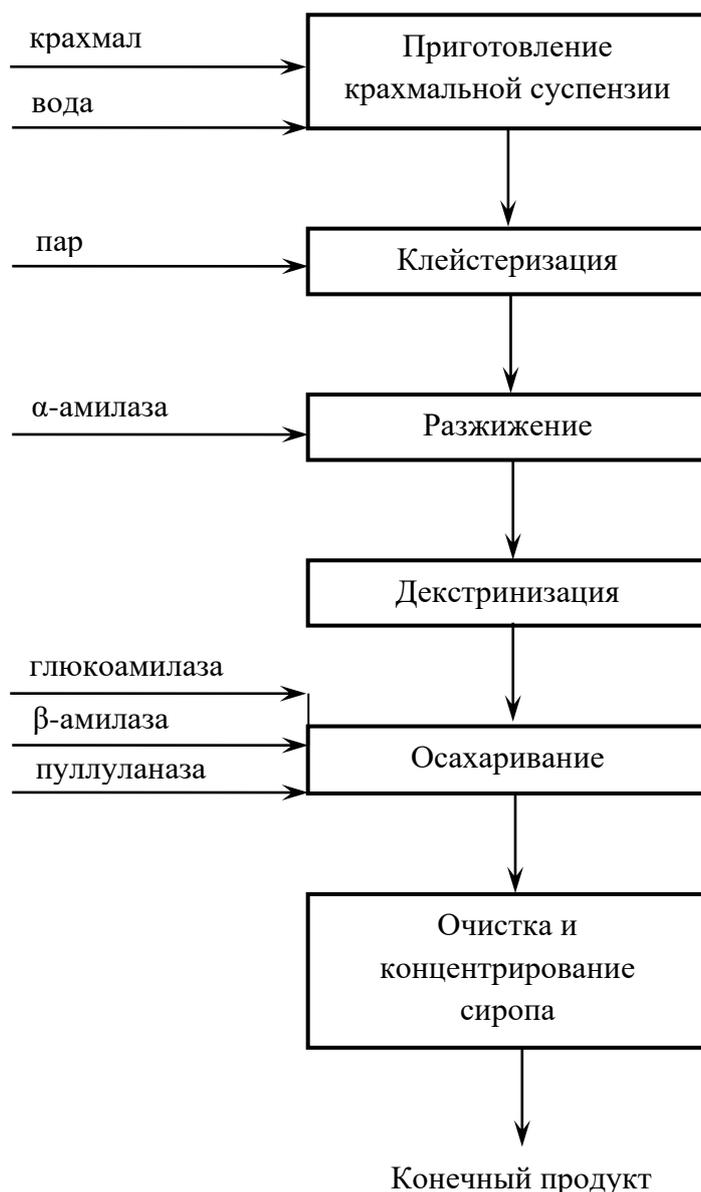


Схема 2.3. Стадии ферментативного гидролиза крахмала

После стадий разжижения и декстринизации можно достичь высоких значений декстрозного эквивалента (до 40). Часто, однако, *DE* не превышает 15...25, т.е. основными продуктами преобразования крахмала являются мальтодекстрины. В ходе дальнейшего гидролиза с использованием глюкоамилазы, β -амилазы и пуллуланазы могут быть достигнуты более высокие значения *DE*.

Мальтозную патоку получают осахариванием разжиженного крахмала β -амилазой. Процесс проводят при 55...65 °С, рН 4,8...5,5, содержании сухих веществ 30...40 %. Дозировка ферментных препаратов составляет 0,3...3,0 кг на тонну крахмала, время реакции - 20...40 ч. Для повышения содержания мальтозы в патоке в смесь вводят пуллуланазу, селективно гидролизующую α -1,6-связи.

Сиропы, содержащие до 95...97% глюкозы, можно получить из крахмала различного происхождения (кукурузного, пшеничного, картофельного, ячменного, рисового). Для этого используется глюкоамилаза

либо смесь глюкоамилазы с грибной α -амилазой. Глюкоамилаза достаточно медленно катализирует расщепление α -1,6-связей. Использование смеси глюкоамилазы и пуллулазы приводит к ускорению процесса. Его проводят в течение 24...72 ч при 55...65 °С, pH 4,0...4,5.

Лабораторная работа № 2. Гидролиз крахмала амилолитическими ферментами. Определение декстрозного эквивалента

Общепринятый метод определения декстрозного эквивалента основан на взаимодействии восстанавливающих остатков декстринов с солями двухвалентной меди. При этом происходит восстановление двухвалентной меди до одновалентной, выпадающей в осадок в виде оксида Cu_2O (схема 2.4). В данной работе в качестве соединения двухвалентной меди используется ее тартратный комплекс, образующийся в ходе приготовления реактива Фелинга.

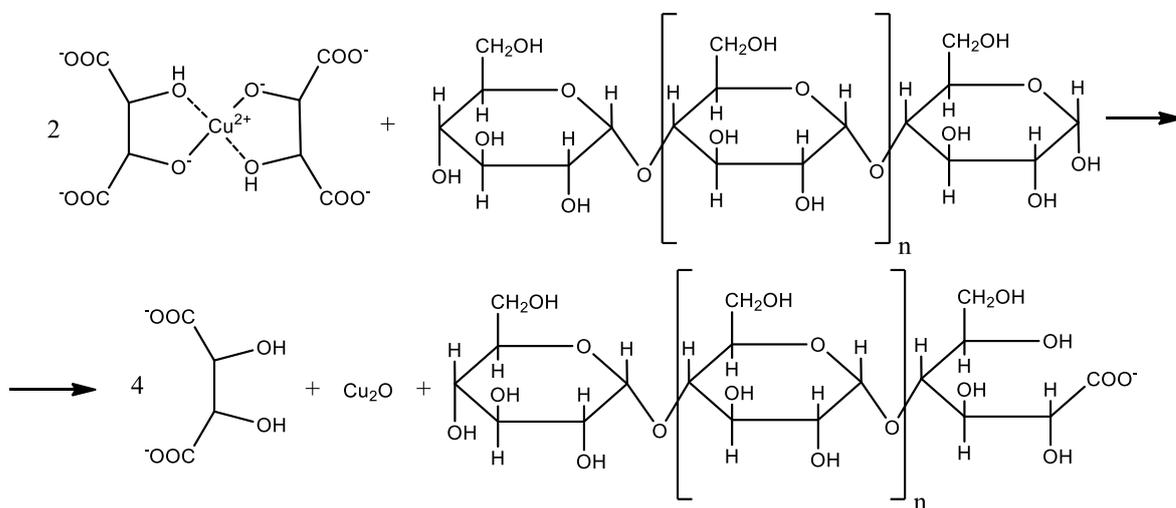


Схема 2.4. Взаимодействие тартратного комплекса меди(II) с восстанавливающими углеводами

Контроль за протеканием реакции осуществляется с помощью индикатора метиленового синего. Метиленовый синий обладает сильными окислительными свойствами и способен взаимодействовать с восстанавливающими углеводами (схема 2.5), при этом происходит обесцвечивание индикатора.

Определить декстрозный эквивалент можно также с использованием гексацианоферрата(III) калия. В ходе его восстановления происходит переход окрашенного в желтый цвет гексацианоферрата(III) калия в бесцветный гексацианоферрат(II) калия (схема 2.6). Определение количества восстанавливающих углеводов проводится спектрофотометрическим методом при длине волны 440 нм.

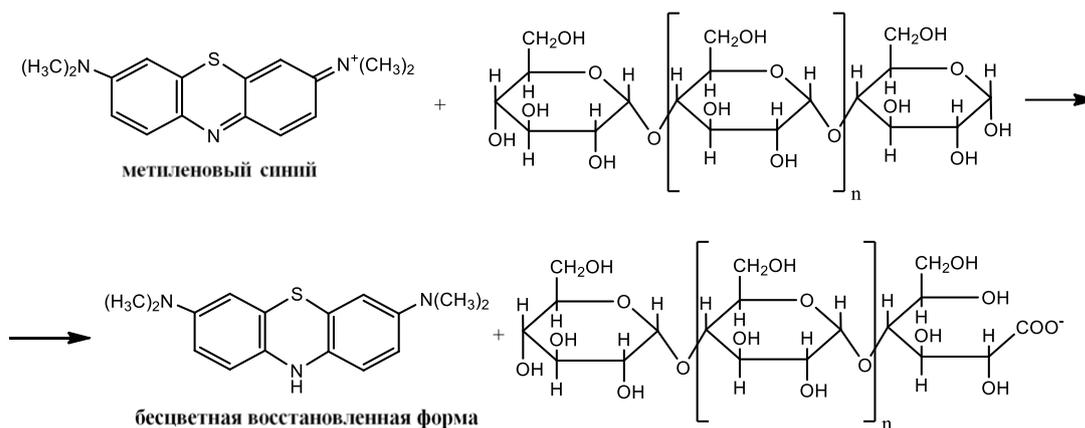


Схема 2.5. Взаимодействие метиленового синего с восстанавливающими углеводами

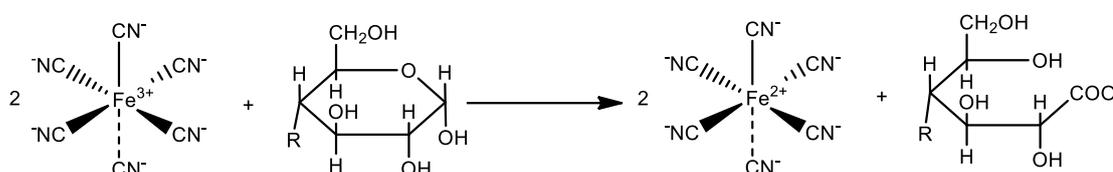


Схема 2.6. Взаимодействие гексацианоферрата(III) с восстанавливающими углеводами

Реактивы

Реактив Фелинга

Для приготовления раствора сульфата меди (раствор А) в сухом стакане взвешивают 69,3 г пентагидрата сульфата меди ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) и переносят без потерь в мерную колбу вместимостью 1000 мл. Добиваются полного растворения осадка, раствор доводят дистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают.

Для приготовления раствора тартрата натрия калия (раствор Б) взвешивают 346,0 г $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ и 100,0 г NaOH . Сухие компоненты переносят в мерную колбу на 1000 мл, полностью растворяют реагенты и раствор доводят дистиллированной водой до метки.

Растворы А и Б должны быть чистыми от осадка. В случае образования осадка раствор над осадком осторожно декантируют.

Раствор Фелинга (раствор С) готовят смешиванием равных количеств растворов А и Б. Для этого в сухую коническую колбу переносят 100 мл раствора А и 100 мл раствора Б, после чего смесь тщательно перемешивают.

Раствор гексацианоферрата(III) калия

Навеску гексацианоферрата(III) калия ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) массой 10,0 г растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе объемом 1000 мл. Объем раствора в колбе доводят до метки дистиллированной водой, перемешивают.

Стандартный раствор глюкозы

В случае проведения *анализа по методу Эйна* стандартный раствор глюкозы готовят следующим образом. В сухом стакане на аналитических весах взвешивают 0,6 г безводной глюкозы. Ее растворяют в воде и по частям переносят в мерную колбу объемом 100 мл. Раствор доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают. Раствор готовят в день использования.

Для проведения *анализа с использованием гексацианоферрата(III) калия* раствор глюкозы готовят следующим образом. В стакане вместимостью 100 мл взвешивают навеску безводной глюкозы массой 0,4 г. К навеске приливают 20...30 мл дистиллированной воды, тщательно перемешивают стеклянной палочкой и переносят жидкость в мерную колбу вместимостью 200 мл. Обработку пробы повторяют два-три раза до полного растворения навески. Стакан обмывают небольшой порцией дистиллированной воды, сливают в ту же мерную колбу. Раствор в колбе доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают.

Раствор метиленового синего

На аналитических весах взвешивают 0,05 г дигидрата метиленового синего ($C_{16}H_{18}ClN_3S \cdot 2H_2O$). Навеску растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды, переносят в мерную колбу на 50 мл, доводят дистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают.

Анализ

Гидролиз крахмала амилолитическими ферментами. На технических весах взвешивают 10 г крахмала, навеску помещают в стакан на 250 мл и к ней добавляют 100 мл дистиллированной воды. Смесь тщательно перемешивают, после чего измеряют рН раствора, который должен находиться в рамках оптимума для данного ферментного препарата. Тип амилолитического фермента и его количество выбирает преподаватель (табл. 2.1). В случае несоответствия величины рН смеси оптимуму ферментного препарата в суспензию добавляют необходимое количество раствора HCl или NaOH с концентрацией 0,01 моль/л.

Таблица 2.1. Варианты комбинаций ферментных препаратов, рекомендуемые для проведения гидролиза крахмала

Ферментный препарат	Вариант 1	Вариант 2	Вариант 3	Вариант 4	Вариант 5
Терманул	●	●	●		
Амилосубтилин	●	●		●	
Глюкаваморин	●		●		●

После определения рН смесь помещают на предварительно нагретую до необходимой температуры водяную баню. Температура водяной бани должна составлять: для термофильных α -амилаз – 95...105 °С (допускается осуществлять нагрев на электроплитке без использования водяной бани), для мезофильных α -амилаз – 75...85 °С, для глюкоамилаз – 50...60 °С. После прогрева крахмальной суспензии в нее добавляют необходимое количество ферментного препарата и смесь тщательно перемешивают. В случае использования для гидролиза нескольких ферментных препаратов гидролиз проводят постадийно и начинают со стадии с участием наиболее термостабильного фермента. Для перехода к стадии с меньшей температурой сначала проводят понижение температуры водяной бани, после этого прогревают реакционную смесь, а затем вносят навеску следующего ферментного препарата. Продолжительность каждой стадии гидролиза указывается преподавателем.

С периодичностью один раз в 30 минут проводят определение декстрозного эквивалента либо методом Эйна (ГОСТ Р 50549-93 [10]) либо с использованием гексацианоферрата(III) калия. Данные, полученные с использованием различных ферментных препаратов, вносят в итоговую таблицу.

Определение декстрозного эквивалента методом Эйна. Контрольный эксперимент. 25 мл реактива Фелинга помещают в чистую коническую колбу. В нее добавляют из бюретки 18 мл стандартного раствора глюкозы. После этого содержимое колбы доводят до кипения и кипятят ровно две минуты (время фиксируется точно по секундомеру). После этого к раствору добавляют пипеткой 1 мл раствора метиленового синего. Затем продолжают титрование раствором глюкозы до исчезновения синей окраски. Во время титрования раствор должен кипеть, глюкозу к раствору нужно добавлять порциями по 0,2 мл.

В ходе реакции происходит выделение большого количества коричневого осадка оксида меди(I), что затрудняет определение момента исчезновения окраски метиленового синего. Наиболее удобно контролировать исчезновение окраски в верхних слоях смеси. Наблюдение за цветом в ходе титрования облегчает установка белого экрана за колбой.

Определение декстрозного эквивалента исследуемого образца. 25 мл реактива Фелинга помещают в чистую коническую колбу. К нему добавляют 1 мл исследуемого образца. После этого содержимое колбы доводят до кипения и кипятят ровно две минуты. После этого к раствору добавляют пипеткой 1 мл раствора метиленового синего. Затем продолжают титрование раствором глюкозы до исчезновения синей окраски. Во время титрования раствор должен кипеть и глюкозу к раствору добавлять порциями по 0,2 мл!

Определение декстрозного эквивалента с использованием гексацианоферрата(III) калия. Построение градуировочного графика. В сухие конические колбы вместимостью 250 мл отмеряют пипетками 20 мл раствора гексацианоферрата(III) калия, 5 мл раствора гидроксида натрия или

калия с концентрацией 2,5 моль/л и 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 или 8,0 мл стандартного раствора глюкозы (что соответствует 12, 13, 14, 15 и 16 мг глюкозы в 35 мл раствора). В каждую колбу приливают из бюретки соответственно 4,0; 3,5; 3,0; 2,5 и 2,0 мл дистиллированной воды (объем жидкости в каждой колбе должен быть 35 мл). Содержимое колб нагревают до кипения и кипятят ровно 1 мин, охлаждают до комнатной температуры и измеряют поглощение растворов на фотоэлектроколориметре или спектрофотометре в кюветах с длиной оптического пути 1 см при длине волны 440 нм.

Определение декстрозного эквивалента исследуемого образца. В коническую колбу вместимостью 250 мл вносят 20 мл раствора гексацианоферрата(III) калия, 5 мл раствора гидроксида натрия или калия концентрацией 2,5 моль/л, 0,65 мл анализируемого раствора и 9,35 мл дистиллированной воды (до общего объема 35 мл). Смесь нагревают до кипения и кипятят ровно 1 мин, быстро охлаждают до комнатной температуры и делают не менее трех измерений поглощения на фотоколориметре при длине волны 440 нм. Поскольку градуировочный график строится в диапазоне значений оптической плотности от 0,587 до 0,728, то в случае получения значений поглощения, не попадающих в указанный интервал, определение повторяют, изменив объемы раствора пробы и дистиллированной воды.

Обработка результатов

В случае проведения анализа по *методу Эйнара* расчет декстрозного эквивалента (*DE*) проводят по формуле (2.6).

$$DE = \frac{(V_1 - V_2) \cdot 0,6 \cdot 100}{100 \cdot m}, \quad (2.6)$$

где V_1 – объем раствора глюкозы, пошедший на контрольное титрование, мл;
 V_2 – объем раствора глюкозы, пошедший на титрование исследуемого образца, мл;

0,6/100 – содержание глюкозы в 1 мл стандартного раствора, г/мл;

m – масса сухого вещества, соответствующая 5 мл исследуемого раствора, г;

100 – пересчет на 100 г сухого вещества.

При проведении анализа с использованием гексацианоферрата(III) калия расчет декстрозного эквивалента (*DE*) проводят по формуле (2.7).

$$DE = \frac{m_{\text{гл}} \cdot 100}{V_{\text{пр}} \cdot 10 \cdot 1000} \cdot 100, \quad (2.7)$$

где $m_{\text{гл}}$ – масса глюкозы в анализируемом образце, определенная из градуировочного графика, мг;

$V_{\text{пр}}$ – объем пробы, отобранной для анализа, мл;

10·1000/100 – масса крахмала, содержащаяся в 1 мл исходного раствора, мг;

100 – пересчет на 100 г сухого вещества.

Контрольные вопросы

1. Какие ферментативные стадии включает в себя процесс гидролиза крахмала?
2. Почему для эффективного действия α -амилаз на стадии разжижения крахмала необходимо провести его предварительную клейстеризацию?
3. Чем вызвана необходимость использования термофильных α -амилаз в крахмалопаточной промышленности?
4. Чем вызвана необходимость использования селективных гидролаз α -1,6-гликозидных связей крахмала в крахмалопаточной промышленности?
5. Что будет, если проводить стадию осахаривания в производстве мальтозной патоки только в присутствии β -амилаз (т.е. без использования пуллуланызы)?
6. Дайте определение декстрозного эквивалента. С какой целью он используется?
7. Какие реактивы используются для определения декстрозного эквивалента? На чем основано их действие?
8. Каковы оптимальные условия действия ферментных препаратов, используемых на стадии осахаривания?

2.3. Использование амилолитических ферментных препаратов в хлебопечении

Как известно, пшеничная мука содержит собственные (эндогенные) амилазы. Их содержание и активность различаются от одного вида пшеницы к другому. В муке из твердой непророщенной пшеницы содержание α -амилаз пренебрежимо мало. Больше ферментов присутствует в муке, произведенной из проросших зерен пшеницы, а также в ржаной муке.

Высокое содержание α -амилаз в муке нежелательно. Их излишне высокая активность приводит к переходу большого количества крахмала в декстрины со средней и низкой молекулярной массой. Декстрины обладают сильной гигроскопичностью, что негативно отражается на свойствах готового продукта: хлеб, произведенный из пшеничной муки с высокой α -амилолитической активностью, имеет липкий и сыропеклый мякиш.

В пшеничной муке нормального качества помимо α -амилаз присутствуют β -амилазы (мальтогенные амилазы). Действие последних положительно отражается на свойствах конечного продукта. β -Амилазы катализируют гидролиз крахмала до мальтозы и высокомолекулярных декстринов. Эти ферменты являются экзо-действующими и гидролизуют только α -1,4-связи, причем при гидролизе амилопектина процесс

расщепления полимерной цепи заканчивается за три звена до точки разветвления. Этим объясняется незначительный распад крахмала в присутствии данных ферментов. Образующаяся мальтоза усваивается дрожжами, что приводит к интенсификации процесса брожения теста.

Рассмотрим влияние добавок экзогенных амилаз на свойства хлеба. Амилазы как пищевые добавки - улучшители муки и хлеба имеют индекс E 1100. В хлебопечении используются α -амилазы грибного происхождения. Они действуют на поврежденные крахмальные зерна муки, содержание которых зависит от вида пшеницы и условий помола. Мука, полученная из твердых сортов пшеницы, содержит больше поврежденного крахмала, чем мука из мягких сортов пшеницы. Грибные α -амилазы катализируют гидролиз амилозы и амилопектина до декстринов промежуточного размера со степенью полимеризации (DP) 2...12. Эти ферменты образуют доступный для брожения сахар, который вызывает увеличение объема хлеба, улучшение цвета корки и улучшение аромата.

Правильно выбранная дозировка α -амилаз грибного происхождения приводит к необходимому ослаблению теста из-за гидролиза поврежденного крахмала. Однако превышение оптимальной дозировки приводит к более глубокому разрушению крахмала и образованию липкого теста. Оптимальной является такая дозировка фермента, при которой достигается максимальный объем теста без образования липкой консистенции.

Амилазы способны замедлять черствение хлеба. Этот эффект заключается в изменении структуры крахмала (особенно амилопектиновой составляющей) и его влагоудерживающей способности.

Несмотря на то, что грибные α -амилазы эффективно действуют на частично гидролизованный поврежденный крахмал, их действие на черствение хлеба проявляется очень слабо, что связано с их низкой температурной устойчивостью (эти амилазы инактивируются при 65 °C) (большая часть амилаз разрушается до начала клейстеризации крахмала, а крахмальный каркас хлеба остается практически нетронутым).

Бактериальная α -амилаза из *Bacillus subtilis* способна замедлять черствение за счет гидролиза гликозидных связей внутри молекул набухшего крахмала. Однако этот термоустойчивый фермент легко передозировать, т.е. после выпечки и охлаждения может остаться большое количество фермента, а, следовательно, образование растворимых декстринов будет продолжаться. Как результат, конечный продукт будет иметь клейкий и липкий мякиш.

β -Амилазы обладают большей температурной устойчивостью, чем грибные α -амилазы, но меньшей, чем бактериальные. Таким образом, они способны катализировать гидролиз гликозидных связей набухшего крахмала в ходе процесса выпечки, однако этот гидролиз ограничен за счет термической инактивации фермента.

Главным достоинством мальтогенных амилаз является их устойчивость к передозировке. Даже при использовании грибных амилаз может произойти образование липкой структуры мякиша или чрезмерно коричневой корки в

случае передозировки. Мальтогенная амилаза не влияет на реологические свойства теста при температуре ниже 35°C. Она активна лишь при температуре клейстеризации крахмала.

Добавление мальтогенной амилазы приводит к продлению срока хранения хлеба, по меньшей мере, на четыре дня.

В хлебопечении также используются глюкоамилазы, продуцируемые грибами *Asp. awamori*. В ходе брожения теста глюкоамилазы способствуют расщеплению крахмала до глюкозы. Образующаяся глюкоза быстро усваивается дрожжами, что способствует интенсификации тестоприготовления, увеличению объема теста и улучшению цвета корки. Важно отметить то, что активность глюкоамилаз при температуре брожения теста низка, что отражается на глубине гидролиза крахмала, т.е. действие фермента в тесте приводит к переходу части крахмала в глюкозу и высокомолекулярные декстрины. Образование высокомолекулярных декстринов, обладающих более высокой влагоудерживающей способностью по сравнению с крахмалом, приводит к увеличению сроков хранения хлеба.

В хлебопечении амилазы часто используются в смеси с другими ферментами. Применение таких смесей позволяет усилить эффекты отдельных составляющих, а иногда и минимизировать их негативное влияние на свойства теста и хлеба.

Синергический эффект проявляется в смесях грибной α -амилазы и ксиланазы. Ксиланазами называют ферменты, катализирующие гидролиз ксиланов – полисахаридов, входящих в группу гемицеллюлоз, состоящих из остатков ксилозы, соединенных β -1,4-связями. Раздельное применение ксиланазы и α -амилазы приводит к значительному увеличению объема хлеба, однако при таких дозировках тесто становится чрезмерно липким, что затрудняет его дальнейшую обработку. При использовании смеси меньшего количества ксиланазы с небольшой добавкой α -амилазы получают хлеб более высокого объема, липкость теста не увеличивается.

Мальтогенная амилаза используется в смеси с грибной α -амилазой, ксиланазой, липазой или другими ферментами. Применение смеси четырех указанных ферментов делает мякиш мягким на протяжении всего периода хранения хлеба (до девяти дней). Применение смеси α -амилазы, глюкозооксидазы и ксиланазы придает тесту упругость, конечный продукт имеет большой объем, а хрустящая корка - приятную окраску [1].

Лабораторная работа № 3. Изучение влияния добавок амилаз на свойства хлеба

Порядок выполнения работы

Безопарное тесто готовят по рецептуре, приведенной в табл. 2.2. На одну выпечку берут 150 г муки. Остальное количество сырья рассчитывают,

исходя из рецептуры с учетом варианта задания. Тип ферментного препарата и его количество выдаются преподавателем каждой подгруппе.

Таблица 2.2. Рецептура теста

Наименование компонентов	Содержание, г
Мука пшеничная	100
Дрожжи хлебопекарные	2,5
Соль	1,5
Вода	Рассчитывается
Ферментный препарат	В зависимости от варианта

Расчет массы воды для приготовления теста

Средневзвешенную влажность сырья W_C , %, рассчитывают по формуле (2.8) [11].

$$W_C = \frac{G_M W_M + G_{СЛ} W_{СЛ} + G_D W_D}{G_C}, \quad (2.8)$$

где G_M , $G_{СЛ}$, G_D – масса муки, соли, дрожжей, расходуемых на приготовление теста, г, соответственно;

W_M , $W_{СЛ}$, W_D – влажность муки, соли и дрожжей, соответственно ($W_M = 14,5\%$, $W_{СЛ} = 0,25\%$, $W_D = 75\%$).

Массу вносимой при замесе теста воды G_B , мл, определяют по формуле (2.9) [11].

$$G_B = \frac{G_C(W_T - W_C)}{100 - W_T}, \quad (2.9)$$

где G_C – суммарная масса сырья, расходуемого на приготовление теста (без воды), г;

W_T – влажность теста, % (из муки высшего сорта – 43,5 %; 1 сорта – 44,5 %; 2 сорта – 45,5 %);

W_C – средневзвешенная влажность сырья, %.

Температуру воды для замеса теста t_B , °С, рассчитывают по формуле (2.10) [11].

$$t_B = t_T + \frac{C_M \cdot G_M (t_T - t_M)}{C_B \cdot G_B} + K, \quad (2.10)$$

где t_T – заданная температура теста, °С;

C_M – теплоемкость муки ($C_M = 0,3$ кал/(г·град));

C_B – теплоемкость воды ($C_B = 1$ кал/(г·град));

G_M – количество муки, г;

t_M – температура муки, °С;

G_B – количество воды в тесте, г;

K – поправочный коэффициент (летом принимают равным 0...1, в весеннее и осеннее время – 2, зимнее – 3).

Проведение пробной лабораторной выпечки

В предварительно взвешенную емкость для брожения теста отмеривают нужное количество воды, имеющую рассчитанную по формуле (2.10) температуру, затем в эту емкость вносят соль, дрожжи и после их тщательного перемешивания – муку. Порошкообразный ферментный препарат вносится в рецептуру после предварительного смешивания с мукой, а жидкий – после смешивания с водой. Замес ведут вручную до получения теста однородной консистенции. Температура теста после замеса должна быть (31 ± 1) °С.

Замешанное тесто взвешивают с точностью до 1 г, измеряют температуру и помещают в емкость для брожения, которую устанавливают в термостат. Тесто сверху укрывают. В термостате в течение всего времени брожения теста поддерживают температуру 32 °С. Брожение теста длится 170 минут с двумя обминками теста вручную через каждые 60 минут после начала брожения. Температура и продолжительность брожения могут изменяться в зависимости от варианта задания. В конце брожения измеряют кислотность теста.

Через 150 минут брожения измеряют температуру теста и взвешивают его. Кусок теста проминают следующим образом: куску придают лепешкообразную форму, затем лепешку складывают пополам, тщательно проминают. Такую операцию повторяют несколько раз до удаления углекислого газа. Куску придают продолговатую форму и помещают его в форму для выпечки. Форму для расстойки помещают в термостат, в котором поддерживается температура 35 °С. Окончание расстойки определяют органолептически по состоянию и виду тестовой заготовки, а также по легкому нажатию пальцами на тестовую заготовку. Расстойку считают законченной, если следы от нажатия пальцев на заготовку выравниваются медленно. Расстойку прекращают, не допуская опадания теста. По окончании расстойки тесто помещают в печь.

Выпечку проб хлеба проводят в лабораторной электропечи при температуре 220...230 °С с увлажнением пекарной камеры в течение 30...35 минут. Конец выпечки определяют по температуре в центре мякиша, которая должна составлять 95...97 °С. По окончании выпечки верхнюю корку хлеба смачивают водой и взвешивают. После остывания хлеба проводят его органолептическую оценку.

Основные показатели, характеризующие процесс выпечки, записывают в табл. 2.3, а органолептические свойства хлеба в табл. 2.4.

Таблица 2.3. Протокол лабораторной выпечки [11]

Стадия процесса и показатель	Результаты измерений			
	1	2	3	4
<i>I. Приготовление теста</i>				
Количество муки, г				
Влажность муки, %				
Количество воды, г				
Температура воды, °С				
Количество соли, г				
Количество прессованных дрожжей, г				
Количество ферментного препарата, г				
Температура воздуха в термостате, °С				
Время начала брожения, ч:мин				
Время конца брожения, ч:мин				
Температура брожения, °С:				
– начальная				
– конечная				
Масса теста в начале брожения, г				
Масса теста в конце брожения, г				
Выход теста из 100 г муки, г				
<i>II. Разделка, расстойка, выпечка</i>				
Время начала разделки, ч:мин				
Характеристика теста				
Время начала расстойки, ч:мин				

Масса кусков теста для выпечки в форме, г				
Температура воздуха в расстойном шкафу, °С				
Время конца расстойки, ч:мин				
Продолжительность расстойки, мин				
Время начала выпечки, ч:мин				
Время конца выпечки, ч:мин				
Продолжительность выпечки, мин.				
Температура выпечки, °С				
– начальная				
– конечная				
Масса горячего хлеба, г				
Масса хлеба, г, через ____ ч. после выпечки				

Таблица 2.4. Органолептические показатели качества теста и хлеба

Показатель	Характеристика
Состояние теста после брожения: - липкость - мягкость	Отмечается в случае обнаружения Мягкое, жесткое
Внешний вид хлеба: - форма - поверхность корки	Правильная, неправильная Гладкая, неровная (бугристая или со вздутиями), с трещинами, с подрывами, рваная

Цвет корки	Бледная, светло-желтая, светло-коричневая, коричневая, темно-коричневая
Состояние мякиша: - цвет - равномерность окраски - эластичность - пористость: по крупности по равномерности по толщине стенок пор - липкость	Белый, серый, темный, темноватый (для муки высшего и первого сортов) Светлый, темный, темноватый (для муки второго сорта и обойной) Равномерная, неравномерная Хорошая, средняя, плохая, отмечается плотность мякиша, если при надавливании не происходит его деформации Мелкая, средняя, крупная Равномерная, неравномерная Тонкостенная, толстостенная Отмечается в случае обнаружения
Вкус	Нормальный, свойственный хлебу; отмечается наличие посторонних привкусов
Хруст	Наличие или отсутствие хруста
Комкуемость при разжевывании	Наличие или отсутствие комкуемости
Крошковатость	Крошащийся, некрошащийся

Контрольные вопросы

1. С какой целью используются амилолитические ферментные препараты в хлебопечении?

2. Чем вызвано положительное влияние добавок грибных α -амилаз на свойства хлеба? Почему данный эффект не достигается при использовании бактериальных α -амилаз?
3. За счет чего в присутствии некоторых амилаз интенсифицируется брожение теста?
4. Как достигается продление срока хранения хлеба за счет использования β -амилаз?
5. Почему использование β -амилаз с целью продления сроков хранения хлеба является более предпочтительным по сравнению с применением бактериальных α -амилаз?
6. Чем вызвано образование липкого и сиропеклого мякиша при выпечке хлеба с добавлением высокого количества бактериальных α -амилаз?
7. Объясните, чем вызвано усиление цвета корки хлеба при его выпечке с использованием некоторых видов амилаз?

3. Ферментативная модификация белков в пищевой промышленности

3.1. Протеазы: общие сведения

Протеазы – это гидролитические ферменты, катализирующие расщепление пептидной связи в белках.

Существует несколько классификаций протеаз [1,4]:

1. По *источнику выделения* различают протеазы животного (например, сычужный фермент, пепсин, панкреатин), растительного (например, папаин, фицин, бромелаин), микробиологического (например, протосубтилин) происхождения.
2. По *характеру расщепления полипептидной цепи* различают эндо- и экзопептидазы. Эндопептидазы разрушают пептидную связь изнутри молекулы (пепсин, трипсин), экзопептидазы отрывают аминокислотные фрагменты с краев белковой молекулы (аминопептидазы, дипептидазы, карбоксипептидазы).
3. По *структуре активного центра* выделяют четыре семейства протеаз¹: сериновые (в состав активного центра входит остаток серина; пример – трипсин, химотрипсин), тиольные или цистеиновые (в состав активного центра входит остаток цистеина; пример – папаин), аспартатные (активный центр включает два остатка аспарагиновой кислоты; пример – химозин) и металлопротеазы (активный центр включает ион металла – как правило, ион Zn^{2+} ; пример – некоторые аминопептидазы). Сериновые протеазы включают две подгруппы: подобные химотрипсину (или трипсину, т.е. протеазам животного происхождения), и подобные субтилину (протосубтилину, т.е. протеазам микробного происхождения).
4. По *оптимуму рН* выделяют кислые (оптимум рН находится в кислой среде; к ним относятся в основном аспартатные протеазы), нейтральные (оптимум рН находится около 7; примером являются металлопротеазы) и щелочные (оптимум рН находится в слабощелочной среде; к ним относятся в основном сериновые протеазы) протеазы.

Обычно препараты протеаз, используемые в пищевой промышленности, представляют собой смеси ферментов различных семейств с разным характером расщепления полипептидной цепи. Компоненты препаратов могут отличаться по оптимуму условий действия (рН, температура); в состав препаратов могут входить другие гидролазы и ферменты других классов. Примеры некоторых наиболее часто используемых в пищевой промышленности ферментных препаратов и оптимальные условия их действия приведены в табл. 3.1.

¹ Существуют также другие семейства протеаз, но они не нашли широкого промышленного применения.

Таблица 3.1. Протеазы, используемые в пищевой промышленности [1]

Название	Источник	Тип	Оптимум pH
Трипсин	Поджелудочная железа	Сериновая	7...9
Химотрипсин	Поджелудочная железа	Сериновая	7...9
Панкреатин	Поджелудочная железа	Сериновая	7...9
Сычужный фермент	Желудок телят, ягнят и т.д.	Аспартатная	3...6
Пепсин	Желудок свиней, крупного рогатого скота ит.д.	Аспартатная	1...4
Папаин	Папайя	Тиольная	5...9
Бромелаин	Ананас	Тиольная	5...8
Фицин	Инжир	Тиольная	5...8
Нейтраза (Neutrase)	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Металлопротеаза	6...8
Протосубтилин (субтилизин)	<i>B. subtilis</i>	Сериновая	6...10
Алкалаза (Alcalase)	<i>B. licheniformis</i>	Сериновая	6...10
Флейворзим (Flavourzyme)	<i>Aspergillus oryzae</i>	Амино- и карбоксипептидазы	5...8
Реннилаза (Rennilase)	<i>Rhizomucor miehei</i>	Аспартатная	3...5

Механизмы действия протеаз

Расщепление пептидной связи в молекуле белка протекает за счет активации молекулы воды под действием аминокислотных заместителей (например, остатков аспарагиновой кислоты) или иона металла, либо за счет непосредственного взаимодействия заместителей активного центра фермента (например, остатков цистеина или серина) с пептидной связью. Рассмотрим механизмы действия протеолитических ферментов более подробно.

1. Механизм действия сериновых протеаз

Активный центр сериновых протеаз представлен так называемой «каталитической триадой», включающей остатки серина (Ser), гистидина (His) и аспарагиновой кислоты (Asp) (Схема 3.1). Остаток серина играет роль

нуклеофила и атакует пептидную связь в форме алкоксида (Ser-O^-). Остаток гистидина на разных стадиях гидролиза играет роль основания (в депротонированной форме) и роль кислоты (в протонированной форме). Остаток аспарагиновой кислоты образует водородную связь с остатком гистидина и ориентирует его в правильном направлении по отношению к остатку серина.

Каталитический цикл сериновых протеаз включает две стадии (схема 3.1). На первой стадии происходит атака остатком серина карбонильного атома углерода пептидной связи, после которой образуется нестабильный интермедиат, распадающийся за счет реакции с протонированным остатком гистидина активного центра фермента. В результате этого распада выделяется соединение, содержащее аминогруппу, а серин остается в форме сложного эфира. Регенерация исходной формы серина происходит на второй стадии каталитического цикла фермента. Она включает взаимодействие молекулы воды с депротонированным остатком гистидина и атаку гидроксид-ионом карбонильного атома углерода сложноэфирной связи, в результате чего образуется нестабильный интермедиат, распадающийся до остатка серина и свободной карбоксильной группы пептидной связи.

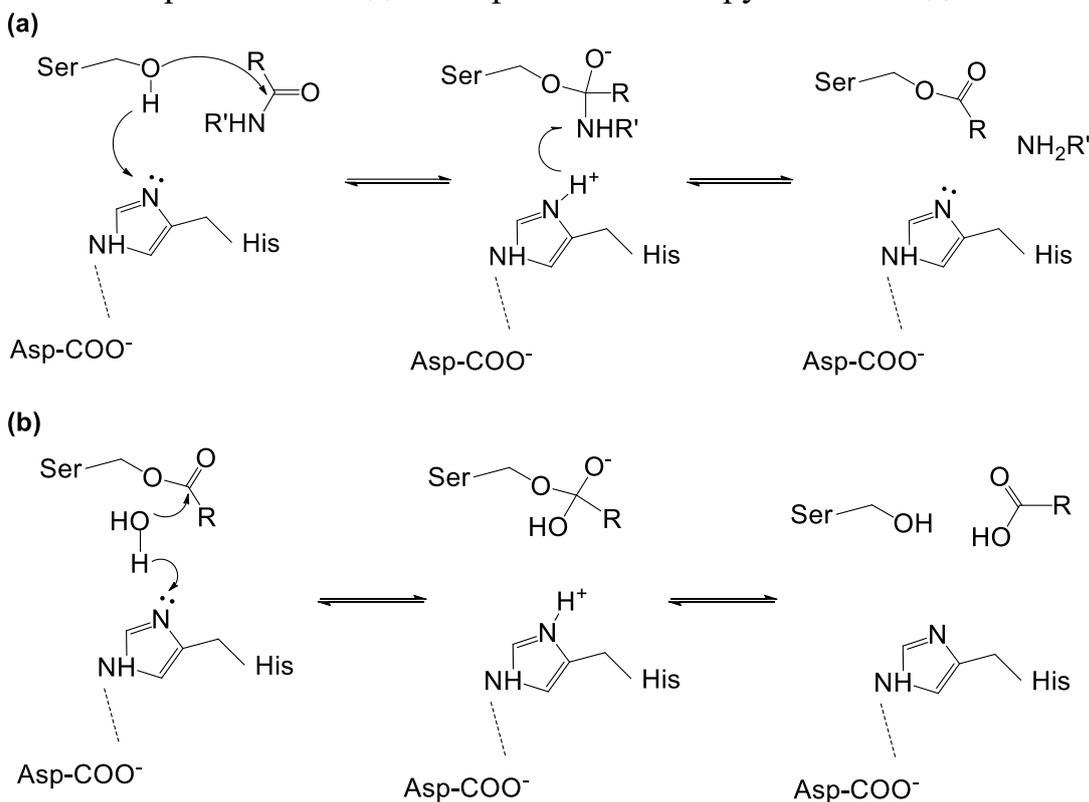
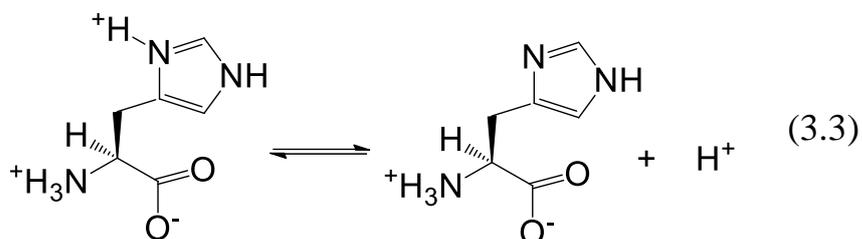
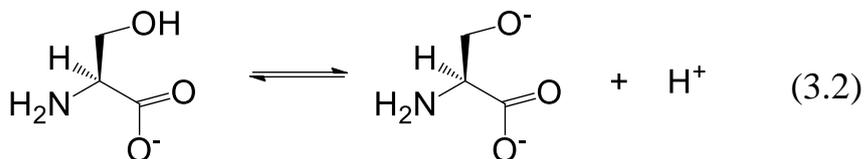


Схема 3.1. Первая (a) и вторая (b) стадии механизма гидролиза пептидной связи сериновыми протеазами

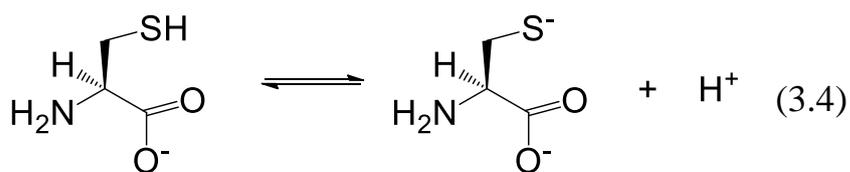
Важная роль в каталитическом цикле сериновых протеаз принадлежит остатку гистидина. В нейтральной среде концентрации алкоксид- и гидроксид-ионов пренебрежимо малы, что не способствует протеканию реакции гидролиза. Депротонированная молекула гистидина является

сильным нуклеофилом и способствует отрыву протона от молекул серина и воды. Протонированная форма гистидина служит донором протона, необходимым для распада интермедиатов, образующихся при взаимодействии серина и воды с пептидной и сложноэфирной связями, соответственно (процессы депротонирования воды, серина и гистидина описываются уравнениями 3.1, 3.2, 3.3).



2. Механизм действия тиольных протеаз

Активный центр тиольных протеаз похож на активный центр сериновых протеаз, только вместо серина в нем присутствует цистеин. Механизмы каталитического действия данных ферментов близки. Отличие заключается в большей кислотности тиольной группы по сравнению со спиртовой (процесс депротонирования цистеина описывается уравнением 3.4). В связи с этим тиольные протеазы способны гидролизовать пептидную связь в слабокислой среде (сериновые протеазы активны только в нейтральной и щелочной средах).



Тиольная группа более подвержена окислению, чем спиртовая (схема 3.2). Под действием слабых окислителей (йода, кислорода, дегидроаскорбиновой кислоты) тиольные группы переходят в дисульфидные, которые могут быть восстановлены добавлением цистеина, тиосульфата, сульфита, т.е. инактивация в данном случае протекает обратимо. Под действием сильных окислителей (кислородных соединений галогенов, перманганата калия) тиольные группы окисляются до сульфиновых и сульфоновых кислот. В этом случае происходит необратимая инактивация тиольных групп.

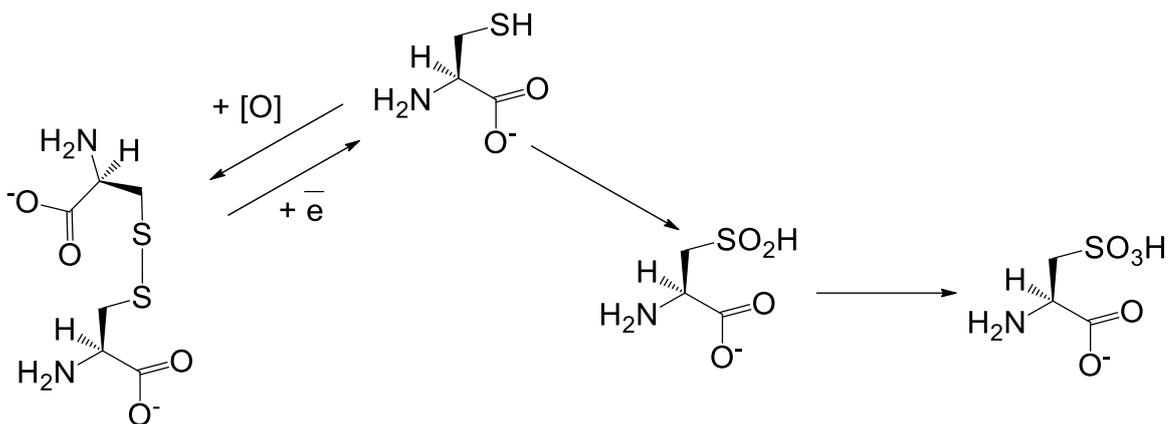


Схема 3.2. Окислительная инактивация тиольных протеаз

3. Механизм действия аспартатных протеаз

Активный центра аспартатных протеаз включает два остатка аспарагиновой кислоты (схема 3.3). Один из остатков находится в форме кислоты (-COOH), а второй в виде карбоксилат-аниона (-COO⁻). Роль -COO⁻ остатка заключается во взаимодействии с молекулой воды, приводящем к образованию гидроксид-иона (OH⁻) (в отсутствие остатка аспарагиновой кислоты концентрация OH⁻, образующегося в ходе диссоциации воды по реакции 3.1, пренебрежимо мала). Гидроксид-ион является сильным нуклеофилом и взаимодействует с карбонильным атомом углерода пептидной связи. Распад образующегося интермедиата протекает с участием -COOH остатка аспарагиновой кислоты, который служит донором протона для амидной группы.

4 Механизм действия металлопротеаз

В активном центре протеаз находится, как правило, ион Zn²⁺, связанный с двумя остатками гистидина и остатком глутаминовой кислоты (Glu) (схема 3.4). Ион Zn²⁺ способен обратимо связывать молекулу воды, а поскольку он является кислотой Льюиса, это взаимодействие приводит к депротонированию молекулы воды. Ион металла способен также обратимо связывать атом кислорода карбонильной группы пептидного фрагмента. Это приводит к сближению пептидной связи с гидроксид-ионом, что способствует их взаимодействию. Важная роль в каталитическом цикле принадлежит карбоксильной группе глутаминовой кислоты, являющейся донором иона H⁺ для промежуточного соединения гидроксид-иона с карбонильным атомом углерода пептидного фрагмента.

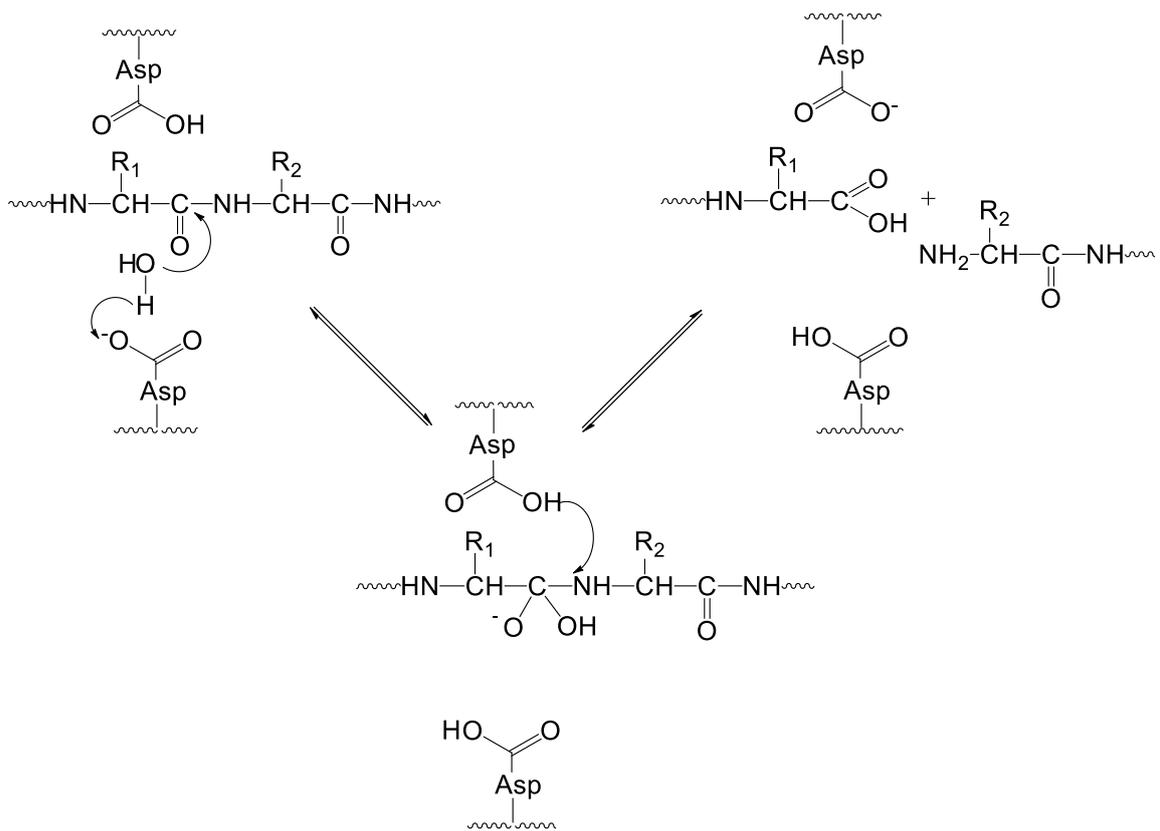


Схема 3.3. Механизм действия аспаратных протеаз

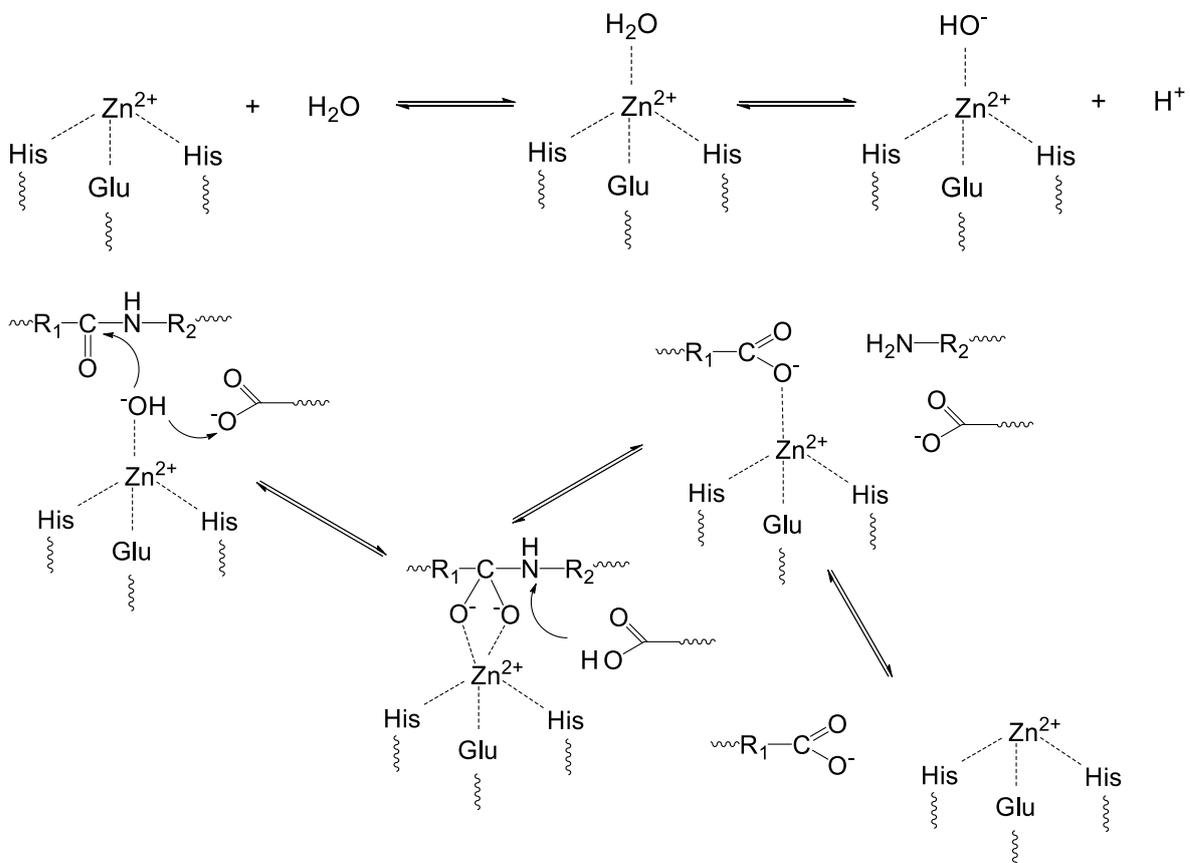


Схема 3.4. Механизм действия металлопротеаз

Лабораторная работа № 4. Определение активности протеаз

Активность протеаз определяется согласно ГОСТ Р 53974-2010 [12]: проводят гидролиз животного белка гемоглобина в кислой (рН 3,0), слабокислой (рН 5,3), нейтральной (рН 7,0) и щелочной (рН 9,0) средах до низкомолекулярных пептидов и свободных аминокислот с последующей инактивацией фермента осаждением негидролизованного белка трихлоруксусной кислотой (ТХУ) и определяют количество образовавшихся пептидов и свободных аминокислот.

За единицу общей протеолитической активности ($E_{\text{ПР}}$) принимают такое количество фермента, которое за 1 мин при 30 °С переводит гемоглобин в неосаждаемое трихлоруксусной кислотой состояние в количестве, соответствующем 1 мкмоль тирозина (1 мкмоль тирозина равен 0,181 мг); активность выражается в ед./г или ед./мл испытуемого препарата.

Количество белка, превращенного в низкомолекулярные пептиды и аминокислоты, определяют на спектрофотометре по поглощению при длине волны 275 нм, соответствующей поглощению фенольной группы.

Количество оставшегося в растворе тирозина можно найти, используя реакцию белка с реактивом Фолина (смесью вольфрамата (Na_2WO_4) и молибдата (Na_2MoO_4) натрия) и определяя поглощение продуктов восстановления вольфрамата и молибдата, имеющих голубую окраску, при длине волны 670 нм. Следует иметь в виду, однако, что реактив Фолина не селективен по отношению к тирозину и способен реагировать с другими аминокислотами (например, с цистеином).

Реактивы

Приготовление универсального буферного раствора (0,1 моль/л)

Для приготовления *раствора уксусной кислоты* ($[\text{CH}_3\text{COOH}] = 0,1$ моль/л; раствор А) 0,57 мл ледяной уксусной кислоты разбавляют дистиллированной водой при 20 °С в мерной колбе объемом 100 мл. Раствор уксусной кислоты хранят в закрытой стеклянной посуде при 20 °С в течение четырех недель.

Для приготовления *раствора фосфорной кислоты* ($[\text{H}_3\text{PO}_4] = 0,1$ моль/л; раствор В) 0,65 мл концентрированной ортофосфорной кислоты разбавляют дистиллированной водой при 20 °С в мерной колбе объемом 100 мл. Раствор ортофосфорной кислоты хранят в закрытой стеклянной посуде при 20 °С в течение четырех недель.

Для приготовления *раствора борной кислоты* ($[\text{H}_3\text{BO}_3] = 0,1$ моль/л; раствор С) ортоборную кислоту массой 0,62 г разбавляют дистиллированной водой при 20 °С в мерной колбе вместимостью 100 мл. Раствор ортоборной кислоты хранят в закрытой стеклянной посуде при 20 °С в течение четырех недель.

Для приготовления *раствора гидроксида натрия* ($[\text{NaOH}] = 1,0$ моль/л) навеску NaOH массой 4,0 г растворяют в дистиллированной воде при 20 °С в

мерной колбе вместимостью 100 мл. Раствор NaOH хранят в закрытой стеклянной посуде при 20 °С в течение двух недель.

Для приготовления *исходного универсального буферного раствора* (рН 2,0 ± 0,2) смешивают равные объемы растворов А, В и С, которые используют для приготовления раствора субстрата при определении ферментативной активности кислых протеаз. Для получения буферного раствора с рН 4,7, 7,0 и 9,3 к 100 мл исходного универсального буферного раствора добавляют 6, 10 и 14 мл раствора NaOH, соответственно. Эти растворы используют при определении активности слабокислых, нейтральных и щелочных протеаз. Буферные растворы хранят в закрытой стеклянной посуде при 4 °С в течение четырех недель.

Приготовление раствора гемоглобина с массовой долей 2,0 %

Небольшое количество гемоглобина предварительно растирают в фарфоровой ступке. Навеску растертого гемоглобина массой 1,0 г количественно переносят в стаканчик вместимостью 100 мл и растворяют в 25 мл буферного раствора с соответствующим значением рН (для этого навеску гемоглобина тщательно растирают в фарфоровой ступке в небольшом количестве необходимого буфера, затем добавляют остальное его количество). После этого для получения инкубационной смеси (ИС) к раствору гемоглобина добавляют 16,0 г мочевины, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем ИС тем же буфером до метки и выдерживают в течение 1 ч при 30 °С для денатурации белка. Так как мочевина сдвигает значение рН буфера, особенно в кислой и слабокислой средах, для создания необходимого рН инкубационной смеси раствор гемоглобина готовят в буфере с более низким значением рН в соответствии с табл. 3.2.

Раствор гемоглобина хранят в закрытой стеклянной посуде при 20 °С в течение трех дней.

Таблица 3.2. Зависимость рН инкубационной смеси от рН буфера, взятого для ее приготовления

рН буфера	рН инкубационной смеси
2,0	3,0
4,7	5,3
7,0	7,0
9,3	9,0

Раствор карбоната натрия ($[Na_2CO_3] = 0,5$ моль/л)

Навеску карбоната натрия массой 5,3 г растворяют в 50 мл дистиллированной воды в мерной колбе объемом 100 мл. Раствор доводят

до метки дистиллированной водой при 20 °С и перемешивают. Раствор хранят в закрытой стеклянной посуде при 20 °С в течение двух недель.

Раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ) (5 %)

Навеску ТХУ массой 5,0 г растворяют в 50 мл дистиллированной воды в мерной колбе объемом 100 мл. Раствор доводят до метки дистиллированной водой при 20 °С и перемешивают. Раствор ТХУ хранят в закрытой стеклянной посуде при 20 °С в течение четырех недель.

Реактив Фолина²

Для приготовления *основного раствора реактива Фолина* в круглодонную колбу с пришлифованным обратным холодильником вместимостью 100 мл наливают 60 мл дистиллированной воды, добавляют 10,0 г вольфрамата натрия и 2,5 г молибдата натрия. Затем приливают 5 мл ортофосфорной кислоты с массовой долей 85 % и 10 мл концентрированной соляной кислоты и осторожно перемешивают. Смесь кипятят на слабом огне на асбестовой сетке в течение 10 ч. Кипячение можно прерывать.

По окончании кипячения в охлажденную смесь добавляют 15,0 г сульфата или 11,5 г хлорида лития, 5 мл дистиллированной воды и каплю брома. Открытую колбу кипятят на слабом огне под тягой в течение 15...20 мин с целью удаления избытка брома. Раствор должен иметь желтую окраску. После охлаждения раствор доводят дистиллированной водой до 100 мл. Приготовленный основной раствор реактива Фолина хранят в посуде из темного стекла в холодильнике.

Концентрацию реактива Фолина проверяют титрованием его разбавленного в десять раз раствора раствором NaOH (0,1 моль/л) в присутствии фенолфталеина. Концентрация кислот в реактиве Фолина должна составлять 2,0 моль/л. Если кислотность реактива Фолина больше 2,0 моль/л, его разбавляют дистиллированной водой, если меньше – реактив непригоден для работы.

Рабочий раствор реактива Фолина готовят разведением основного раствора дистиллированной водой в соотношении 1:2. Рабочий раствор реактива Фолина хранят в закрытой стеклянной посуде при температуре 20 °С в течение одной недели.

Растворы тирозина

Для приготовления *основного градуировочного раствора тирозина* с концентрацией 10^{-3} моль/мл в мерную колбу объемом 100 мл помещают навеску чистого тирозина массой 0,0181 г и растворяют в растворе соляной кислоты (0,2 моль/л).

² готовится в случае проведения анализа на фотоэлектроколориметре или спектрофотометре при длине волны 670 нм.

Таблица 3.3. Объемы основного градуировочного раствора тирозина, необходимые для приготовления 50 мл рабочих градуировочных растворов соответствующих концентраций

Объем основного градуировочного раствора тирозина, мл	Концентрация тирозина в рабочем растворе, мкмоль/мл
1,0	0,02
2,0	0,04
4,0	0,08
5,0	0,10
7,5	0,15
10,0	0,20

Для приготовления *рабочих градуировочных растворов тирозина* в мерную колбу объемом 50 мл вносят различные количества основного раствора тирозина в соответствии с табл. 3.3 и доводят до метки раствором соляной кислоты (0,2 моль/л), получая различные концентрации тирозина в рабочих растворах.

Растворы ферментного препарата

Для приготовления *основного раствора анализируемого образца* ферментного препарата в стаканчик для взвешивания помещают сухой анализируемый образец ферментного препарата массой 0,1 г или жидкий ферментный препарат объемом 1,00 мл и суспендируют в небольшом количестве дистиллированной воды. Суспензию количественно переносят в мерную колбу объемом 100 мл, доводят объем до метки дистиллированной водой при температуре 20 °С и тщательно перемешивают.

Рабочий раствор анализируемого образца ферментного препарата готовят из основного раствора путем разведения его в дистиллированной воде. Количество фермента, взятого на анализ, должно быть рассчитано так, чтобы в реакционной смеси присутствовал избыток субстрата и чтобы измеряемые величины поглощения в кювете с длиной оптического пути 10 мм лежали в диапазоне значений 0,10...0,21. Раствор ферментного препарата готовят непосредственно перед определением.

Проведение анализа

Вычисление тирозинового эквивалента. Протеолитическую активность исследуемого образца вычисляют по тирозину. Для этого строят градуировочный график зависимости оптической плотности при длине волны

275 или 670 нм^{*3} от концентрации тирозина и по нему вычисляют тирозиновый эквивалент (ТЭ), т.е. поглощение, которое дает 1 мкмоль тирозина в 1 мл градуировочного раствора.

Для построения градуировочного графика в шесть пробирок вносят по 1 мл рабочего раствора тирозина различной концентрации и добавляют при перемешивании по 5 мл раствора карбоната натрия концентрации 0,5 моль/л и по 1 мл рабочего раствора реактива Фолина (при проведении анализа при длине волны 630 нм) или по 1 мл воды (при проведении анализа при длине волны 275 нм). Контрольный опыт готовят так же, но вместо раствора тирозина используют 1 мл дистиллированной воды. Реакционную смесь выдерживают в течение 20 мин (в случае проведения анализа с использованием реактива Фолина). Поглощение измеряют на фотоэлектроколориметре или спектрофотометре при длине волны 275 или 670 нм в кюветах с длиной оптического пути 1 см.

Для построения каждой точки градуировочного графика вычисляют среднеарифметическое значение оптической плотности трех параллельных измерений. По полученным значениям строят градуировочный график зависимости оптической плотности от концентрации тирозина (мкмоль/мл).

На оси абсцисс (X) откладывают значения концентрации тирозина С в мкмоль/мл, на оси ординат (Y) – соответствующие им значения поглощения (A) при длине волны 275 или 670 нм. По градуировочному графику находят ТЭ, соответствующий поглощению 1 мкмоль тирозина в 1 мл раствора.

Проведение анализа. В две пробирки вносят по 1 мл субстрата, помещают их в термостат при температуре (30 ± 1) °С и выдерживают в течение 5 мин. Далее в пробирки с субстратом добавляют по 1 мл рабочего раствора анализируемого ферментного препарата, предварительно термостатированного при температуре (30 ± 1) °С в течение 3...4 мин. Затем пробирки встряхивают и проводят гидролиз при температуре (30 ± 1) °С в течение 10 мин. По окончании реакции в обе пробирки добавляют по 2 мл раствора ТХУ, чтобы прервать ферментативную реакцию и осадить негидролизированный белок, а также высокомолекулярные продукты гидролиза. Смесь перемешивают и для обеспечения полного осаждения белка выдерживают пробирки со смесью в течение 10 мин. Затем смесь фильтруют в сухие пробирки. Фильтрат должен быть полностью прозрачен.

В чистые пробирки вносят по 1 мл фильтрата, добавляют по 5 мл раствора карбоната натрия, перемешивают и приливают по 1 мл рабочего раствора реактива Фолина (при проведении анализа при длине волны 630 нм) или по 1 мл дистиллированной воды (при проведении анализа при длине волны 275 нм). В случае проведения анализа с использованием реактива Фолина реакцию смесь выдерживают 20 мин; растворы при этом приобретают голубую окраску. Поглощение растворов определяют на фотоэлектроколориметре или спектрофотометре при длине волны 275 или

³ длина волны 670 нм применяется в случае проведения анализа с использованием реактива Фолина.

670 нм в кюветах с длиной оптического пути 1 см относительно контрольного образца.

Контрольный образец готовят, прибавляя реактивы в обратной последовательности. Для этого в контрольную пробирку вносят 1 мл рабочего ферментного раствора того же разведения, как и в анализе, добавляют 2 мл ТХУ, вносят 1 мл субстрата и выдерживают в термостате при температуре 30 °С в течение 10 мин. Дальнейшие операции осуществляют аналогично описанной выше методике.

Обработка результатов

Протеолитическую активность, ед./г или ед./мл используемого препарата, рассчитывают по формуле (3.5).

$$E_{\text{ПР}} = \frac{A \cdot 4}{TЭ \cdot 10 \cdot m}, \quad (3.5)$$

где A – оптическая плотность исследуемого раствора;

4 – отношение объемов реакционной смеси и раствора фермента после добавления ТХУ;

$TЭ$ – тирозиновый эквивалент;

10 – время гидролиза субстрата, мин;

m – масса (объем) ферментного препарата, взятая для гидролиза (расчет ведется на 1 мл рабочего раствора анализируемого образца ферментного препарата), г (мл).

Окончательное значение $E_{\text{ПР}}$ рассчитывают как среднее арифметическое двух параллельных измерений (в случае соблюдения их повторяемости).

Контрольные вопросы

1. Дайте определение активности протеолитических ферментных препаратов.
2. С какой целью при определении активности протеаз используется трихлоруксусная кислота?
3. На чем основаны методы определения активности протеаз? Являются ли данные методы эквивалентными друг другу?
4. Какое строение может иметь активный центр протеаз?
5. Каковы оптимумы рН различных групп протеаз?
6. В чём заключается сходство и различие между сериновыми и тиольными протеазами?
7. Какие протеазы животного и растительного происхождения нашли применение в пищевой промышленности?

8. Каким образом может протекать ингибирование тиольных и цинковых протеаз?

9. Как проводится реактивация тиольных протеаз?

3.2. Контроль протеолитической реакции. Степень гидролиза белка

Расщепление пептидных связей протеазами представляет собой обратимую реакцию (схема 3.5). В водной среде это равновесие сильно смещено вправо.



Схема 3.5. Ферментативный разрыв пептидной связи

Наиболее важными факторами, определяющими протекание гидролитической реакции, являются: S (процент белка в реакционной смеси, %), E/S (соотношение фермент/субстрат, выраженное в единицах активности на кг белка), pH и температура. Эти параметры, наряду со специфичностью и свойствами самого фермента, существенно влияют на реакцию.

Количественной характеристикой протеолитической реакции является степень гидролиза (DH) – отношение количества пептидных связей, разрушенных в ходе реакции, (h) к общему числу пептидных связей в исходном белке ($h_{\text{общ.}}$), выраженным в процентах (уравнение 3.6).

$$DH = h/h_{\text{общ.}} \cdot 100\%. \quad (3.6)$$

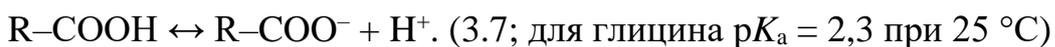
Общее число пептидных связей определяют на основе аминокислотного состава белка. Поскольку средняя молярная масса аминокислоты составляет 125 г/моль, обычно $h_{\text{общ.}} \sim 8$ моль/кг. Более точные значения $h_{\text{общ.}}$ для конкретных белков приводятся в литературе.

Степень гидролиза существенно влияет на свойства продукта. Так, в процессе гидролиза белка наблюдается увеличение его растворимости. Кроме того, при достижении гидролизатом определенных значений DH происходит увеличение его пено- и гелеобразующих свойств, а также эмульгирующей способности. Значительным изменениям в ходе протеолиза подвергается вкус белковых растворов. Известно, что белки обладают нейтральным вкусом, в отличие от продуктов их гидролиза (аминокислот и пептидов), имеющих выраженные вкусовые качества. Например, в ходе протеолиза может выделяться глутаминовая кислота, а глутамат – известный усилитель вкуса. Некоторые белковые гидролизаты имеют горький вкус, который связан с появлением в растворе пептидов, содержащих гидрофобные аминокислотные остатки. Решить эту проблему можно путем подбора оптимальных условий гидролиза, а также за счет использования

маскирующих агентов (например, органических кислот) или экзопептидаз. Контроль степени гидролиза важен при производстве низкоаллергенных продуктов для детского питания. Известно, что аллергический эффект вызывают определенные участки белковых молекул, называемые эпитопами, разрушив которые можно добиться снижения аллергенности белков. Эффективность разрушения эпитопов зависит от типа использованной протеазы и от достигнутой степени гидролиза.

Степень гидролиза может быть измерена непосредственно в ходе процесса. Для определения степени гидролиза продукта применяются относительно простые аналитические методы: рН-статическая (или рН-стат) методика, осмометрия, вискозиметрия и химическое определение свободных аминогрупп с использованием химических реагентов, например, тринитробензолсульфоновой кислоты, реакция с которой приводит к образованию окрашенного соединения. Для определения α -аминогрупп также используются *o*-фталальдегид и нингидрин. Наиболее простыми и быстрыми методиками из перечисленных являются рН-статическая и осмометрическая [1].

Наиболее часто для определения DH используется рН-статическая методика. Ее сущность заключается в следующем. В ходе присоединения молекулы воды к пептидной связи внутри белковой молекулы происходит выделение иона водорода. При рН 7...9 ион водорода не может присоединиться к карбоксильной группе (реакция 3.7), однако может обратимо связываться аминогруппой (реакция 3.8) (pK для реакции 3.8 значительно больше, чем для реакции 3.7), что приводит к снижению рН раствора. Зная объем щелочи, необходимый для восстановления исходного значения рН раствора белка, можно определить степень гидролиза белка (DH).



Достоинствами данной методики являются простота, отсутствие токсичных реактивов и быстрота, что позволяет проводить измерение DH в режиме «он-лайн». Недостатками являются невозможность проведения измерения при рН < 7 (при данных условиях ион водорода, выделяющийся из молекулы воды в ходе протеолиза, полностью связывается аминогруппой (реакция 3.8) и не оказывает влияния на кислотность среды) и низкая точность при достижении гидролизатом высоких значений рН. В ряде случаев результаты, полученные с использованием рН-статической методики, не согласуются с данными, полученными другими методами [13].

Более точными способами определения DH являются методики, основанные на химическом определении аминогруппы. Один из данных

⁴ значение pK_a для «средней» аминогруппы белка ниже данного значения.

методов основан на реакции тринитробензолсульфоновой кислоты (TNBS) с аминогруппами, приводящей к образованию окрашенного соединения (схема 3.6) [13]. Определив спектрофотометрическим методом количество образовавшегося окрашенного продукта, можно узнать количество выделившихся в ходе гидролиза аминогрупп и найти количество разрушенных пептидных связей. Данный метод позволяет проводить с высокой точностью определение *DH* для любых гидролизатов, однако его недостатками являются низкая скорость определения, высокая токсичность и взрывоопасность TNBS, что объясняет его низкую популярность.

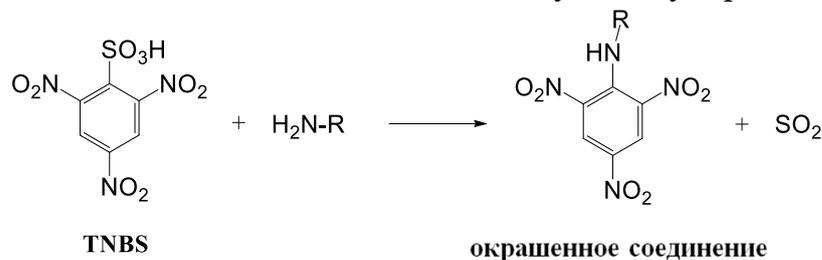


Схема 3.6. Взаимодействие тринитробензолсульфоновой кислоты с аминогруппами

Этих недостатков лишен метод, основанный на использовании *o*-фталальдегида (OPA) [14]. В этом случае в присутствии аминогрупп и тиолов (например, меркаптоэтанола и дитиотрейтола) OPA переходит в окрашенное соединение (схема 3.7), количество которого определяют спектрофотометрическим методом.

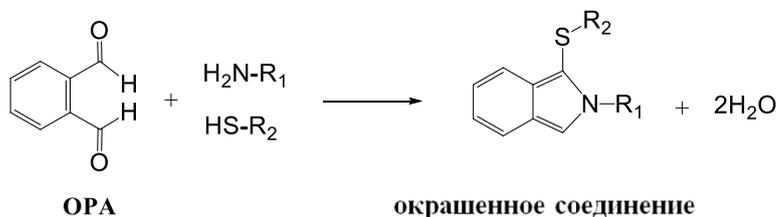


Схема 3.7. Взаимодействие *o*-фталальдегида с аминогруппами в присутствии тиолов

Лабораторная работа № 5. Определение степени гидролиза белка

Данная работа включает проведение гидролиза водорастворимых белков протеолитическими ферментами различных классов, определение изменения степени гидролиза во времени рН-статическим методом и сравнительный анализ полученных данных.

Анализ

В предварительно взвешенный стакан или коническую колбу помещают яичный белок и определяют его массу. Для проведения гидролиза может быть использован любой другой водорастворимый белок. Затем к

белку из мерного цилиндра добавляют 200 мл дистиллированной воды и смесь тщательно перемешивают. Для выбора оптимального индикатора и выполнения расчета степени гидролиза белка необходимо определить рН смеси до начала протеолитической реакции. В полученный раствор вносят ферментный препарат (тщательно измельченный или освобожденный от оболочки), смесь перемешивают, добиваясь полного растворения препарата.

Сразу же после растворения проводят титрование 40 мл смеси раствором гидроксида натрия (0,1 моль/л) в присутствии индикатора до появления соответствующей окраски (холостой эксперимент).

Смесь белка и фермента оставляют на водяной бане при температуре 50°C. Проводят повторное титрование 40 мл смеси раствором гидроксида натрия (0,1 моль/л) спустя 0,5, 1,0, 1,5 и 2,0 ч. Фиксируют объемы, пошедшие на титрование.

Степень гидролиза белка (DH , %) определяют по формуле (3.9). Необходимо учесть то, что данная формула применима только для определения степеней гидролиза менее 10.

$$DH = \frac{V(NaOH) \cdot C(NaOH) \cdot 100}{\alpha \cdot MP \cdot h_{\text{общ}}}, \quad (3.9)$$

где $V(NaOH)$ – объем гидроксида натрия, пошедший на титрование белка за вычетом объема, затраченного на холостой эксперимент, мл;⁵

$C(NaOH)$ – концентрация раствора NaOH, моль/л;

α – средняя степень диссоциации аминокруппы (определяют на основании рН исходного раствора белка и температуры раствора по табл. 3.4);

MP – масса белка, г;

$h_{\text{общ}}$ – суммарное количество пептидных связей в белке, ммоль/г (выбирают из табл. 3.5).

Таблица 3.4. Зависимость степени диссоциации аминокруппы от температуры и рН

рН	Температура, °С						
		40	50	60	70	75	80
	рK _a	7,3	7,1	6,9	6,7	6,6	6,5
6,5			0,20	0,29	0,39	0,44	0,50
7,0		0,33	0,44	0,55	0,67	0,71	0,76
7,5		0,61	0,71	0,80	0,86	0,89	0,91
8,0		0,83	0,89	0,93	0,95	0,96	0,97
8,5		0,94	0,96	0,97	0,98	0,99	0,99

⁵ данный объем можно определить на рН-метре как количество щелочи, пошедшее на восстановление исходного значения рН раствора белка.

Таблица 3.5. Общее количество пептидных связей ($h_{\text{общ.}}$) в различных белках

Белок	$h_{\text{общ.}}$, ммоль/г
Казеин	8,2
Сывороточные белки молока	8,8
Белки мяса	7,6
Белки рыбы	8,6
Яичный белок	8,0
Соевый белок	7,8
Гемоглобин	8,3
Пшеничный глютен	8,3
Желатин	11,1

Контрольные вопросы

1. Что такое степень гидролиза белка?
2. С какой целью проводится определение степени гидролиза белка в пищевой промышленности?
3. Перечислите существующие методики определения степени гидролиза белка.
4. В чём заключаются основные достоинства и недостатки рН-статической методики?
5. Как определяют степень гидролиза белка в диапазоне DH от 30 до 50?

3.3. Ферменты, участвующие в формировании связей между белковыми молекулами

Образование связей между белковыми молекулами является задачей, противоположной той, которая достигается за счет протеолиза. Можно выделить два основных способа образования связей между белковыми молекулами: «сшивка» редокс активных аминокислотных остатков (главным образом – цистеина) за счет участия оксидоредуктаз и формирование связей между остатками глутамина и лизина за счет действия трансглутаминазы [1].

Использование оксидоредуктаз с целью образования поперечных связей в белковых молекулах

Липоксигеназа – это негемовый железосодержащий фермент, найденный в большом числе растительных и животных тканей, который катализирует окисление кислородом полиненасыщенных жирных кислот до гидроперекисей жирных кислот (схема 3.8). Эти ферменты распространены в семенах бобовых растений (бобы, горох), в малых количествах встречаются в

пшеничной муке. Главным коммерческим источником липоксигеназы является соевая мука.

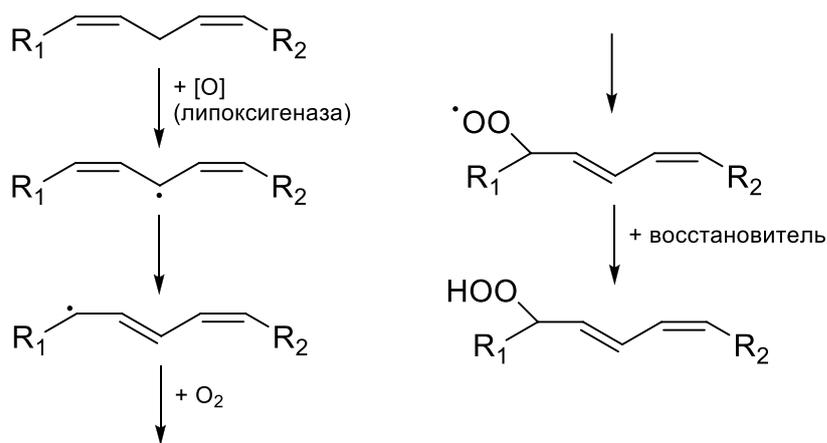


Схема 3.8. Механизм окисления полиненасыщенных жирных кислот липоксигеназой

Липоксигеназа пшеницы катализирует окисление полиненасыщенных жирных кислот в свободном виде либо в форме моноацилглицеринов, тогда как липоксигеназа сои окисляет их в форме триацилглицеринов. В ходе процесса окисления образуются свободные радикалы, являющиеся сильными окислителями: алкильные (R^\bullet), пероксильные (ROO^\bullet), оксильные (RO^\bullet), гидроксильные (HO^\bullet) и др. Взаимодействие этих частиц с тиольными или тирозиновыми фрагментами приводит к образованию поперечных связей между белковыми цепочками (схема 3.9).

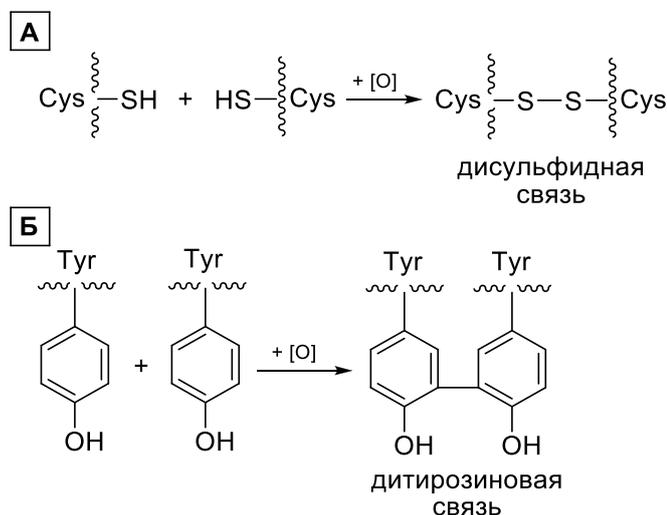


Схема 3.9. Образование дисульфидных (А) и дитирозиновых (Б) связей между белковыми цепочками

Липоксигеназа, как правило, применяется для улучшения реологических свойств теста. Её действие может вызвать появление неприятных запахов в хлебе, которые возникают из-за накопления продуктов разложения гидроперекисей – альдегидов и кетонов. По этой причине

предпочтительным является использование других оксидоредуктаз, не вызывающих изменение вкуса и аромата у готового продукта. Примером таких ферментов является *глюкозооксидаза*.

Глюкозооксидаза катализирует окисление глюкозы кислородом воздуха (схема 2.1). В ходе этой реакции образуется пероксид водорода, способный окислять тиольные группы (схема 3.10 (А)).

Использование трансглутаминаз в пищевой промышленности

Трансглутаминаза широко распространена в природе, она входит в состав различных тканей животных и растений. Наиболее известный пример трансглутаминаз – это фактор XIII свертывания крови человека.

Как правило, препараты глутаминазы выделяют из бактерий рода *Streptovercillium*. Препараты обладают активностью в широком диапазоне температур и в интервале рН 5...9. В отличие от трансглутаминаз млекопитающих, активность микробных ферментов практически не зависит от присутствия ионов кальция. Трансглутаминаза катализирует реакцию переноса ацильного фрагмента глутамина на молекулу первичного амина (схема 3.10 (А)). Обычно в белковой молекуле акцептором ацильной группы выступает аминогруппа боковой цепи лизина (схема 3.10 (Б)). В результате взаимодействия этих групп образуются поперечные связи между полипептидными цепями. При взаимодействии ацильной группы с молекулой воды происходит деаμίдирование глутамина (схема 3.10 (В)).

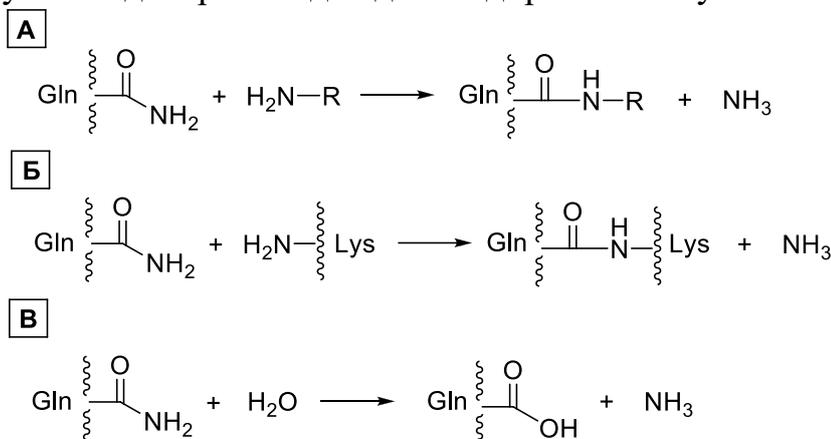


Схема 3.10. Реакции, катализируемые трансглутаминазой

Для пищевой промышленности важна реакция образования поперечных связей между остатками глутамина и лизина, поскольку это приводит к изменению физических свойств белковых компонентов, а, следовательно, и к изменению свойств пищевых продуктов.

Наиболее ярким примером использования трансглутаминаз в пищевой промышленности является «склеивание» фрагментов мяса небольшого размера в более крупный кусок (трансглутаминазу часто называют «мясной клей»). Образующийся продукт обладает высоким качеством, органолептические свойства мяса не изменяются, прочность «склейки» сохраняется на протяжении всего процесса приготовления пищи. Кроме того,

препараты транsgлутаминазы позволяют улучшать консистенцию кисломолочных продуктов, увеличивать выход сыра, улучшить качество хлеба и макаронных изделий.

Лабораторная работа № 6. Влияние добавок протеаз, оксидоредуктаз и транsgлутаминазы на свойства теста и хлеба

Протеазы эндо-типа нашли широкое применение в хлебопечении благодаря их способности ослаблять клейковинный каркас теста при получении теста из сильной муки. Кроме того, их добавки позволяют сократить продолжительность замеса, повысить газоудерживающую способность, улучшить раскатываемость тестовых заготовок.

В отличие от протеаз, оксидоредуктазы и транsgлутаминаза применяются для усиления клейковинного каркаса при получении теста из муки со слабой клейковиной. Так, добавки глюкозооксидазы позволяют повысить стабильность теста, уменьшить его липкость, повысить объем хлеба, а также улучшить структуру мякиша. Влияние транsgлутаминазы на свойства теста и хлеба похоже на действие оксидоредуктаз. Нежелательным эффектом использования транsgлутаминазы является уменьшение растяжимости теста, которое можно предотвратить при использовании транsgлутаминазы в смеси с протеазой.

В данной работе будет проведено сравнение влияния добавок протеаз, оксидоредуктаз и транsgлутаминазы на свойства пшеничного теста и хлеба.

Порядок выполнения работы

6.1. Влияние добавок препаратов протеаз, глюкозооксидазы и транsgлутаминазы на силу клейковины муки

Отмывание клейковины

На технических весах взвешивают 25 г пшеничной хлебопекарной муки, помещают ее в емкость для замеса, после чего к ней добавляют необходимое количество ферментного препарата, предварительно взвешенного на аналитических весах (количество ферментного препарата и способ его внесения указывается преподавателем). Смешивают муку с ферментным препаратом, добавляют к смеси 14 мл дистиллированной воды и проводят замес теста до достижения однородности. Тесто скатывают в шарик и помещают в термостат с температурой 30...32 °С на 30 минут. Для предотвращения высыхания поверхности шарика необходимо накрыть емкость с ним крышкой.

Отмывание клейковины проводят в ёмкости с большим количеством воды (не менее 2 л, температура (20 ± 2) °С), которую периодически меняют. Отмывание начинают осторожно, не допуская отрыва от образца кусочков теста, и добиваются удаления большей части крахмала, о чём можно судить по прозрачности промывных вод. После этого отмывание проводят более энергично между ладонями. Если при этом от образца отрываются кусочки

теста, их собирают и присоединяют к общей массе клейковины. Конец отмывания контролируют по йодной пробе: добавление 3-4 капель раствора йода к промывным водам не должно вызывать появления синей окраски.

Отмытую клейковину отжимают между сухими ладонями до тех пор, пока образец не начнет прилипать к рукам. Затем отбирают для последующего анализа 4 г клейковины. Образцу придают гладкую шарообразную форму и помещают его в ёмкость с водой на 15 минут (вода должна полностью покрывать поверхность шарика). Затем анализируют качество клейковины на приборе ИДК-1М (рис. 3.1).



Рис. 3.1. Внешний измерителя деформации клейковины ИДК-1М: 1 – кнопка «СЕТЬ»; 2 – кнопка «ПУСК»; 3 – индикатор «ОТСЧЕТ»; 4 – кнопка «ТОРМОЗ»; 5 – индикаторная стрелка; 6 – опорный столик; 7 – пуансон

Определение упругих свойств клейковины на приборе ИДК-1М

1. Подготовка прибора к работе

Перед началом работы прибор подключают к проводу заземления через соответствующую клемму, расположенную на задней части прибора. Стрелка индикатора должна быть расположена на отметке 60. Затем включают прибор в сеть с напряжением 220 В, нажимают на кнопку «СЕТЬ» и дают прогреться прибору 20...30 минут. После этого необходимо убедиться в правильности калибровки прибора. Для этого используются мерные плитки толщиной 10,55 и 2,15 мм, соответствующие отметкам 0 и 120 на шкале прибора.

2. Определение упругих свойств клейковины

Если пуансон прибора находится в нижнем положении, то необходимо нажать на кнопку «ТОРМОЗ» и поднять его в верхнее положение. После этого в центр опорного столика следует положить испытуемый образец клейковины, нажать и отпустить кнопку «ПУСК». После окончания выдержки, когда загорается лампочка «ОТСЧЕТ», производят отсчет по шкале индикатора. Затем следует нажать кнопку «ТОРМОЗ», поднять

пуансон в верхнее положение, убрать с опорного столика образец клейковины и протереть его мягкой тканью или бумагой.

В зависимости от показаний прибора образец клейковины хлебопекарной муки относят к соответствующей группе качества:

- 0...30 – неудовлетворительно крепкая (III группа качества);
- 35...50 (для муки высшего и первого сортов) и 40...50 (для муки второго сорта) – удовлетворительно крепкая (II группа качества);
- 55...75 – хорошая (I группа качества);
- 80...100 – удовлетворительно слабая (II группа качества);
- 105 и более – неудовлетворительно слабая (III группа качества).

После этого анализируют влияние добавок ферментных препаратов на упругие свойства клейковины муки и оценивают возможность их использования в хлебопечении.

6.2. Влияние добавок препаратов протеаз, глюкозооксидазы и трансглутаминазы на свойства теста и хлеба

Безопасное тесто готовят согласно методике, приведенной в лабораторной работе №3. Тип ферментного препарата и его количество указываются преподавателем. Оптимальной дозировкой ферментного препарата считается 0,1 % от массы муки, взятой на выпечку, однако в ряде случаев это количество необходимо скорректировать в зависимости от активности используемого ферментного препарата. Сухие ферментные препараты перед проведением замеса теста необходимо предварительно смешать с мукой, а жидкие – с водой, взятой для замеса.

В ходе выполнения работы заполняют протокол выпечки (аналогично табл. 2.3) и проводят органолептический анализ теста и готового изделия согласно табл. 2.4.

Контрольные вопросы

1. С какой целью проводится модификация белков клейковины муки в хлебопечении?
2. Какие поперечные связи и как образуются в клейковинном каркасе муки при действии ферментных препаратов?
3. Укажите достоинства и недостатки использования липоксигеназы в хлебопечении. В чём заключаются преимущества глюкозооксидазы перед липоксигеназой?
4. Запишите реакции, катализируемые трансглутаминазой. В чём заключается недостаток её использования в хлебопечении и как его можно устранить?
5. При анализе контрольного образца клейковины муки получены показания прибора ИДК-1М, равные 100. Предложите способы улучшения упругих свойств клейковины этой муки.

4. Липазы в пищевой промышленности

4.1. Общая характеристика липаз

Липазы являются растворимыми в воде ферментами, которые катализируют гидролиз триглицеридов до ди- и моноглицеридов, жирных кислот и глицерина (схема 4.1). Следует отличать их от эстераз, которые гидролизуют субстраты с ацильной цепью, включающей менее десяти атомов углерода. Кроме того, липазы действуют на границе раздела водной и неводной фаз, тогда как эстеразы – только в водной фазе⁶.

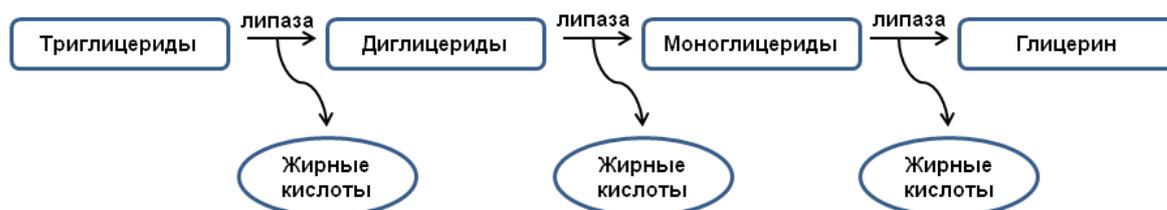


Схема 4.1. Гидролиз жиров в присутствии липазы

Активность липаз зависит от pH. Обычно липазы стабильны в слабокислых и нейтральных средах (pH 4,0...8,0). Большинство липаз проявляет максимальную активность при температуре 30...35 °С, термофильные липазы действуют при 40...60 °С [1,15,16].

Несмотря на то, что липазы не имеют кофакторов, ионы кальция способны повышать их активность. Ингибиторами липаз являются Co^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} , Sn^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} [1,15,16].

Липазы можно разделить на две группы в зависимости от региоселективности. Липазы первой группы не проявляют региоселективности к субстратам и гидролизуют все три сложноэфирные связи в триглицеридах. Липазы второй группы действуют на первую и третью связи в триглицеридах и приводят к образованию свободных жирных кислот и 1,2-(2,3)-диглицеридов и 2-моноглицеридов. Длительная выдержка 1,3-специфичных липаз с триглицеридами приводит к их переходу в смесь глицерина с жирными кислотами. Это связано с тем, что 2-моноглицериды и 1,2-диглицериды способны изомеризоваться в 1-моноглицериды и 1,3-диглицериды, соответственно [15]. Кроме того, известны липазы, способные по-разному действовать на глицериды, содержащие насыщенные и ненасыщенные жирнокислотные остатки.

Липазы способны катализировать обратную реакцию гидролиза – реакцию этерификации (4.1) и переэтерификации (4.2) при некоторых условиях (например, при недостатке воды). Липазы также катализируют реакции алкоголиза (4.3) и ацидолиза (4.4). Всё эти реакции нашли широкое применение в промышленности.

⁶ В литературе приводятся и другие отличия между липазами и эстеразами.



Основными источниками получения промышленных липаз являются бактерии и грибы, причем использование грибных источников является более предпочтительным, поскольку в этом случае липазы выделяются внешнеклеточно. Наиболее важными продуцентами липаз являются *Pseudomonas sp.*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium camembertii*, *Bacillus subtilis*. Свойства некоторых липаз микробного и животного происхождения приведены в табл. 4.1.

Таблица 4.1. Свойства липаз микробного и животного происхождения [1,15,16]

Продуцент	Оптимум pH	Температурный оптимум, °С	Специфичность
<i>Asp. niger</i>	5...7	30...40	1,3
<i>Asp. oryzae</i>	5,5...7,0	30...40	1,3
<i>B. subtilis</i>	8...10	30...40	1,3
<i>Candida cylindracea</i>	5...8	30...50	1,2,3
<i>Geotricum candidum</i>	5...8	40...50	1,2,3
<i>Penicillium cyclopium</i>	4,5...7,5	30...50	1,3
<i>Pseudomonas sp.</i>	5...7	45...60	1,2,3
<i>Rhizopus delemar</i>	5...7	30...45	1,3
Свиная поджелудочная липаза	7,3...9,0	35...45	1,3
Лингвальная липаза ягненка	5...6	30...45	1,3

Активный центр липаз имеет сходство с активным центром сериновых протеаз: в его структуру входит каталитическая триада, включающая остатки серина, гистидина и аспартата (или глутамата). Последовательность стадий каталитического цикла липаз показана на схеме 4.1 [17]. Первая стадия цикла включает отщепление иона водорода от спиртовой группы серина, для чего требуется участие остатков гистидина и аспартата. В результате потери иона водорода нуклеофильность спиртового остатка значительно увеличивается, что делает возможным его взаимодействие с карбонильным атомом углерода

сложноэфирной связи. После этого протекают последовательные стадии отщепления спиртового фрагмента от сложноэфирной связи и деацилирования серинового фрагмента с участием молекулы воды.

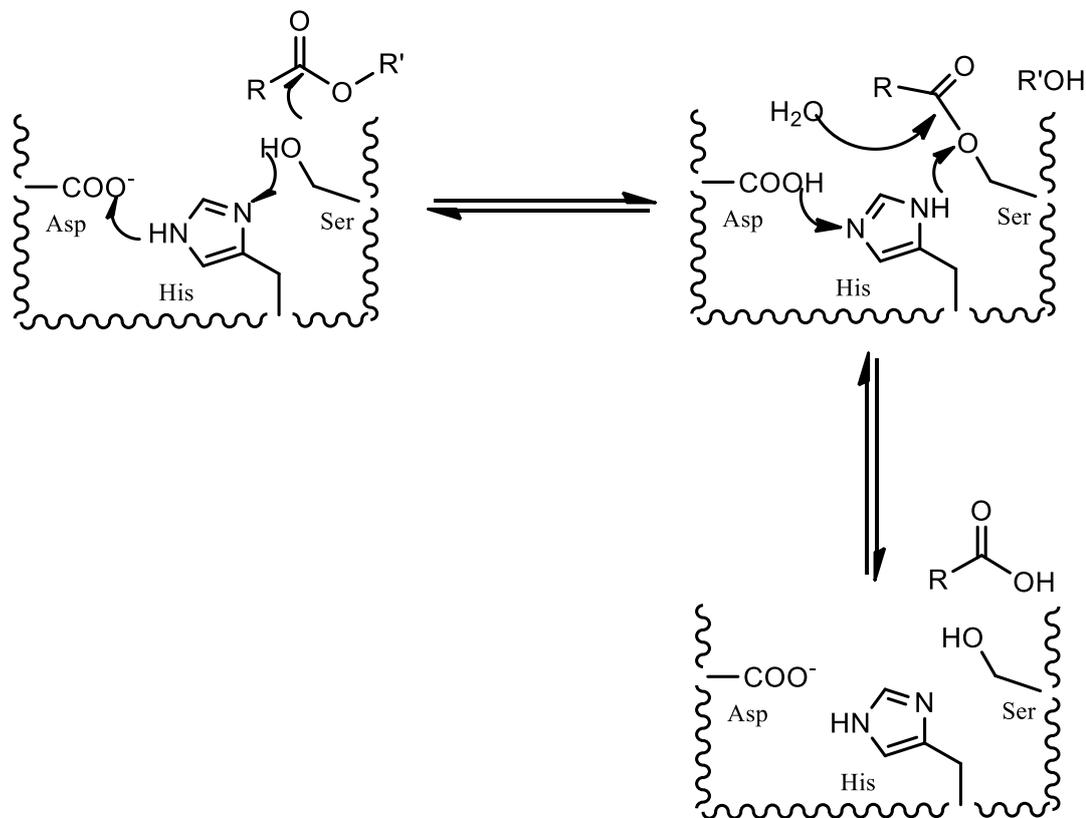


Схема 4.1. Механизм гидролиза сложноэфирных связей в присутствии липазы

Лабораторная работа № 7. Определение активности липаз

Активность препаратов липаз определяется согласно методике, приведенной в ГОСТ ISO 13082-2014 [17].

Международная единица активности липазы - это активность липазы, в результате действия которой выделяется масляная кислота из глицерилтрибутирата со скоростью 1,25 мкмоль/мин при заданных условиях.

Активность липазы выражают в международных единицах липазы Е на 1 г или на 1 мл продукта.

Метод определения активности липаз основан на нейтрализации раствором гидроксида натрия с помощью рН-стата свободных жирных кислот, например масляной кислоты, после гидролиза триглицеридов. Расчет активности липазы в единицах Е на 1 мл или IU на 1 г основан на учете количества гидроксида натрия, израсходованного за заданный период времени. При этом не учитывается ошибка, связанная с невозможностью титрования малых концентраций масляной кислоты (4 %), не подверженной диссоциации.

Реактивы и материалы

Раствор гидроксида натрия ($[NaOH] = 0,025$ моль/л)

При помощи пипетки добавляют 25 мл раствора гидроксида натрия молярной концентрации 1 моль/л с точно известным титром в колбу объемом 1000 мл, доводят водой до метки и тщательно перемешивают.

Раствор NaOH молярной концентрации 0,025 моль/л хранят в закрытой емкости при комнатной температуре не больше одного месяца.

При анализе проб малоактивных липаз и титровании используют раствор NaOH молярной концентрации 0,010 моль/л, который готовят непосредственно перед использованием.

Раствор лецитина ($w = 10\%$)

В емкость вместимостью 100 мл помещают 10,0 г лецитина и растворяют его в 95 мл жидкого парафина при перемешивании с помощью магнитной мешалки в течение 1...2 суток. Когда лецитин полностью растворится, доводят объем до метки жидким парафином. Раствор хранят в холодильнике в течение одного года.

Раствор субстрата

600 мг казеината натрия растворяют в 95 г воды. Добавляют 0,5 мл раствора лецитина и 1,0 мл глицерилтрибутирата, перемешивают в течение 60 с. Субстрат переносят в колбу или химический стакан и выдерживают при комнатной температуре при перемешивании магнитной мешалкой. Срок хранения субстрата – не более 4 ч.

Раствор липазы

Для приготовления *раствора жидкой пробы липазы* в мерную колбу вместимостью 100 мл отбирают пипеткой требуемое количество жидкой пробы липазы или контрольной пробы с целью получения 100 мл раствора липазы с концентрацией (4 ± 1) Е/мл. Доводят объем водой до метки. Допускается анализировать пробу без разбавления, если активность липазы 5 Е/мл или ниже.

Приготовление раствора порошкообразной пробы липазы проводится следующим образом. Сначала порошок липазы осторожно перемешивают до достижения однородности. Затем в химическом стакане взвешивают требуемое количество пробы для получения 100 мл раствора липазы концентрацией (4 ± 1) Е/мл.

Растворяют анализируемую пробу липазы или контрольную пробу в 90 мл воды при постоянном энергичном перемешивании. Проверяют значение pH и доводят его, при необходимости, до значения $8,50 \pm 0,10$ раствором гидроксида натрия (0,1 моль/л). После полного растворения в течение не менее 20 мин раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем водой до метки.

Раствор липазы переносят в сухой химический стакан и непрерывно перемешивают. Раствор анализируют не позднее чем через 2 ч после приготовления пробы липазы. Записывают коэффициент разбавления d (равный общему объему в мл на г или в мл на мл пробы).

Анализ

Водяную баню нагревают до 42 °С, заполняют бюретку раствором гидроксида натрия и добавляют 10 мл субстрата в реакционный сосуд. Затем добавляют пипеткой 1 мл анализируемого раствора липазы к субстрату при интенсивном перемешивании с помощью магнитной мешалки, фиксируя исходное значение рН. Анализ проводят в течение 15 мин. В течение первых пяти минут рН смеси должен достигнуть величины $\approx 6,2$. При уменьшении значения рН ниже этой величины его корректируют добавлением гидроксида натрия. Если в течение первых двух минут рН смеси остается выше значения 6,20, к смеси добавляют раствор HCl (0,1 моль/л) до достижения нужного значения. Объем израсходованного раствора NaOH фиксируется в течение последних 10 мин анализа. При необходимости анализ повторяют.

Обработка результатов

Активность липазы в анализируемой пробе ($E_{л}$) в международных единицах липазы Е на 1 г или 1 мл рассчитывают по формуле (4.5).

$$E_{л} = \frac{V \cdot c \cdot f_1 \cdot d}{t \cdot f_2}, \quad (4.5)$$

где V – объем израсходованного раствора гидроксида натрия, мл;

c – молярная концентрация раствора гидроксида натрия, взятого для титрования, моль/л;

f_1 – коэффициент пересчета миллиграммов масляной кислоты в микрограммы ($f_1 = 1000$);

f_2 – коэффициент пересчета активности на 1,25 мкмоль/мин в соответствии с определением ($f_2 = 1,25$);

d – коэффициент разбавления пробы;

t – время, в течение которого фиксировался расход раствора гидроксида натрия ($t = 10$ мин).

Контрольные вопросы

1. Какие реакции катализируют липазы?
2. Как классифицируются липазы?
3. На чём основан метод определения активности липаз?
4. С какой целью при определении активности липаз используется глицерилтрибутират?

5 Что произойдет, если исключить из методики определения активности использование эмульгатора?

4.2. Использование препаратов липаз в пищевой промышленности

В пищевой промышленности липазы используются в следующих целях:

- в молочной промышленности – для улучшения аромата, ускорения созревания сыра, модификации сливочного масла;
- в кондитерской, мясной и рыбной промышленности – для улучшения аромата;
- в масложировой промышленности – для получения переэтерифицированных жиров, в процессах гидролиза.

Одним из наиболее частых направлений использования липаз в пищевой промышленности является изменение вкуса и аромата пищевых продуктов за счет гидролиза их жировых компонентов. Изменение вкуса и аромата в данном случае достигается за счет образования жирных кислот с числом атомов углерода от четырех до десяти, обладающих выраженным вкусом и ароматом. Модифицировать вкус и аромат продуктов можно, непосредственно добавляя липазы в пищевые продукты либо получая ароматизаторы с использованием липаз. Например, из молочного жира можно получать ароматизаторы сыра. В результате гидролиза сливочного масла на 6...10 % происходит значительное увеличение содержания в нем свободных жирных кислот (в 100...200 раз) и усиление его вкуса и аромата. Такое масло можно вносить в сыр в количестве около 0,5 % для изменения его органолептических характеристик.

Важным свойством реакций, катализируемых липазой, является обратимость. В присутствии большого количества воды, однако, гидролиз жиров протекает необратимо. Обратимость проявляется при наличии в системе минимального количества воды.

Данное свойство липаз нашло ряд промышленных применений, важнейшим из которых является переэтерификация жиров. Переэтерификация является одним из способов, позволяющим изменять температуру плавления жиров за счет обмена жирнокислотными остатками между молекулами триглицеридов (либо других глицеридов). Традиционно переэтерификация проводится с использованием химических реагентов (метоксида (метилата) CH_3ONa или этоксида (этилата) натрия $\text{C}_2\text{H}_5\text{ONa}$) при нагревании. В присутствии этих реагентов происходит быстрый обмен жирнокислотными остатками, который затрагивает все три положения в глицеридах. Главным недостатком этой технологии является высокая токсичность и взрывоопасность реагентов. Высокая температура способствует протеканию ряда побочных реакций, в ходе которых в масле накапливаются продукты распада жиров и разрушаются токоферолы. Из-за накопления в жире побочных продуктов требуются дополнительные стадии очистки жиров, что снижает выход целевых продуктов.

растительного масла и начинают интенсивное перемешивание системы. После перемешивания компонентов в течение одной минуты необходимо провести контрольное титрование. Отбирают 5 мл водной вытяжки, пробу помещают в коническую колбу, к ней добавляют необходимое количество воды, две капли фенолфталеина и титруют раствором гидроксида натрия (0,1 моль/л) до появления розовой окраски. Затем проводят отбор проб с периодичностью один раз в 30 минут в течение двух часов и титруют их, как указано выше.

Итоговые данные представляют в виде зависимостей объема раствора NaOH (0,1 моль/л), пошедшего на титрование образцов, от времени, выраженного в минутах. Зависимости должны быть получены с использованием различных дозировок ферментных препаратов, различных видов липаз и в присутствии (или в отсутствие) эмульгатора.

Контрольные вопросы

1. Перечислите основные направления использования липаз в пищевой промышленности.
2. Чем обусловлено изменение вкуса и аромата пищевых продуктов после добавления в них липазы?
3. При каких условиях в присутствии липаз протекает гидролиз, а при каких переэтерификация жиров?
4. Какими достоинствами обладает переэтерификация, проводимая с использованием ферментных препаратов, по сравнению с процессом, осуществляемым традиционным способом?
5. Каким способом можно осуществлять контроль за ферментативным гидролизом жиров?

5. Биотехнологические основы процессов брожения

5.1. Общая характеристика процессов брожения

Брожение – это процесс преобразования питательных веществ (например, глюкозы) в этанол, органические кислоты и газообразные вещества. Этот процесс протекает в клетках бактерий, грибов, а также в некоторых клетках высших организмов в условиях недостатка кислорода (пример – образование молочной кислоты в мышечных клетках). Часто процесс брожения реализуется в том случае, когда в транспортной сети электронов отсутствует финальный акцептор, которым обычно является кислород, т.е. в анаэробных условиях. Отсутствие кислорода, однако, не всегда является обязательным условием протекания процессов брожения.

В зависимости от вида конечного продукта выделяют следующие виды брожения:

- спиртовое;
- молочнокислородное;
- уксуснокислородное;
- маслянокислородное;
- пропионовокислородное и др.

В большинстве случаев стартовой точкой процессов брожения является преобразование глюкозы в пируват (путь Эмбдена-Мейергофа-Парнаса, ЭМП, или процесс гликолиза; схема 5.1).

Гликолиз (схема 5.1) начинается с фосфорилирования глюкозы молекулой АТФ до глюкозо-6-фосфата. Следующей реакцией является обратимая изомеризация глюкозо-6-фосфата во фруктозо-6-фосфат, осуществляемая глюкозофосфатизомеразой. Фруктозо-6-фосфат также может образовываться из фруктозы, поступающей непосредственно из питательной среды. 6-фосфофруктокиназа, осуществляет образование фруктозо-1,6-дифосфата из фруктозо-6-фосфата и АТФ. Таким образом, на каждую молекулу глюкозы, вошедшую в цепь, расходуется две молекулы АТФ. Затем фруктозо-1,6-дифосфата альдолаза катализирует обратимое расщепление шестиуглеродной молекулы на две трехуглеродные – диоксиацетонфосфат и D-глицеральдегид-3-фосфат. Только последняя молекула подвергается дальнейшим превращениям по пути ЭМП, и равновесие между двумя триозофосфатами поддерживается триозофосфатизомеразой.

Глицеральдегид-3-фосфат расходуется далее на образование 1,3-дифосфоглицерата при участии фермента глицеральдегидфосфат дегидрогеназы. Для этой реакции требуется источник неорганического фосфата. Это первая реакция в гликолитической цепи, которая включает окисление субстрата. На следующей ступени происходит перенос энергии этой связи на АДФ так, что образуется АТФ и 3-фосфоглицерат; реакция катализируется фосфоглицераткиназой. На этом участке цепи из каждой вошедшей в нее молекулы глюкозы или фруктозы образуются две молекулы

АТФ и две молекулы НАДН (восстановленной формы никотинамидадениндинуклеотида).

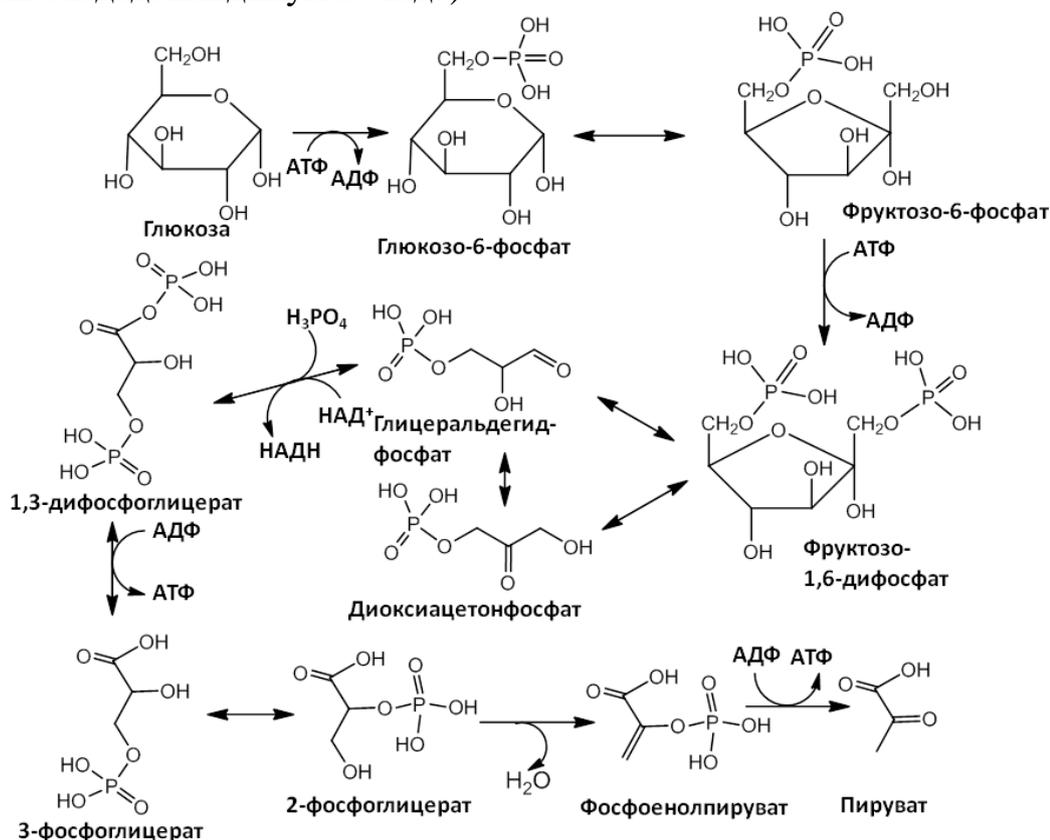
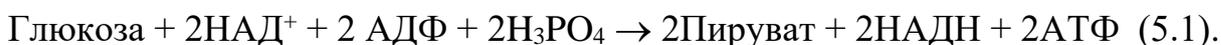


Схема 5.1. Механизм процесса гликолиза (соединения в данной и последующих схемах показаны в форме кислот)

В присутствии фосфоглицеромутазы 3-фосфоглицерат переходит в 2-фосфоглицерат. Энолаза способствует удалению воды из 2-фосфоглицерата, что приводит к образованию фосфоэнолпирувата. Богатая энергией связь в фосфоэнолпирувате используется затем для фосфорилирования АДФ, в результате чего образуются АТФ и пируват.

Процесс гликолиза можно представить следующим уравнением:



5.2. Спиртовое брожение

Спиртовое брожение протекает при получении спирта, пива, вина, хлеба, кефира и других продуктов.

Для осуществления процесса спиртового брожения используются в основном дрожжи семейства *Saccharomycetaceae*, рода *Saccharomyces*. Примерами промышленных дрожжей являются: спиртовые – *S. cerevisiae*; пивоваренные – *S. cerevisiae*, *S. carlsbergensis* и др.; винные – *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. beticus*, *S. fermentati* и др.; хлебопекарные – *S. cerevisiae*.

Гликолиз (схема 5.1) протекает на предварительном этапе спиртового брожения. Образовавшийся в ходе данной стадии пируват под действием

В ходе гомоферментативного маршрута происходит последовательное образование пирувата из глюкозы (схема 5.1) и восстановление пирувата до лактата ферментом – лактатдегидрогеназой (схема 5.3), в ходе которого происходит окисление молекулы НАДН до НАД⁺, который вновь включается в процесс гликолиза. Механизм гетероферментативного брожения значительно отличается от механизма гомоферментативного процесса и протекает по пентозофосфатному пути.

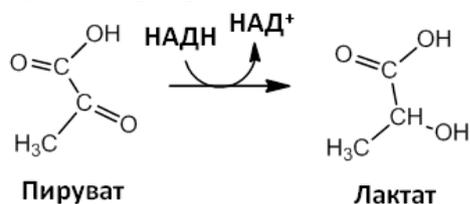


Схема 5.3. Преобразование пирувата в лактат

В общем виде процесс молочнокислого брожения может быть представлен уравнением (5.3).



Маслянокислое брожение

Другим примером брожения, нашедшим широкое применение в биотехнологии, является преобразование углеводов в масляную кислоту (бутират). Маслянокислое брожение протекает с участием бактерий рода *Clostridium*: *C. pasteurianum*, *C. butyricum*, *C. acetobutylicum*, *C. pectinovorum*. Важным продуцентом масляной кислоты является *C. butyricum*.

Развитие маслянокислых бактерий и образование масляной кислоты отрицательно влияет на свойства пищевых продуктов: эти бактерии способны вызывать вспучивание сыров, порчу консервов, прогоркание жировых продуктов.

Последовательность реакций, протекающих в ходе главного процесса образования масляной кислоты, показана на схеме 5.4. Исходным веществом является пируват, образующийся в результате гликолиза. Пируват подвергается декарбоксилированию и превращается в ацетил-КоА, что сопровождается выделением углекислого газа и восстановлением ферредоксина. При взаимодействии двух молекул ацетил-КоА образуется ацетоацетил-КоА, который в ходе серии реакций превращается в бутирил-КоА. Это соединение обладает большим количеством энергии для синтеза АТФ, поэтому остаток кофермента А в нем замещается на фосфатную группу, после чего эта группа используется для образования АТФ. Конечным продуктом этого маршрута является масляная кислота. В процессе маслянокислого брожения протекает ряд побочных процессов, приводящих к образованию бутанола, изопропанола, ацетона, этанола, уксусной кислоты (не показаны на схеме 5.4).

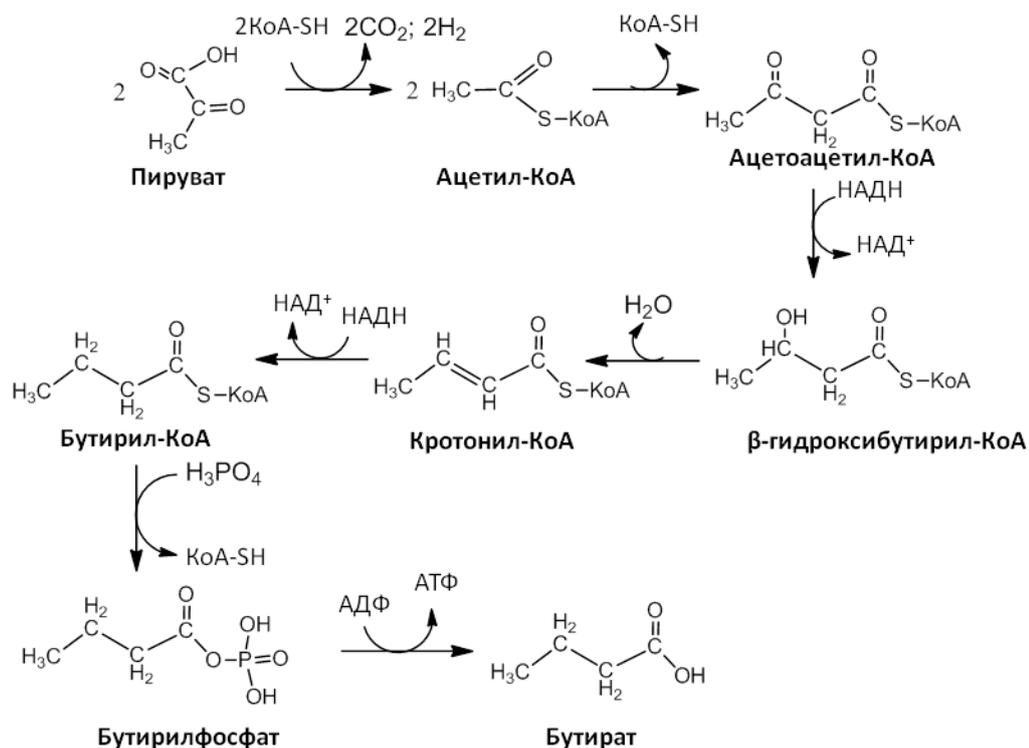


Схема 5.4. Преобразование пирувата в бутират

В общем виде процесс молочнокислого брожения может быть представлен уравнением (5.4).



Уксуснокислое брожение

Уксуснокислое брожение отличается от других процессов брожения. В данном случае образование уксусной кислоты протекает не из глюкозы или других сахаров, а из этанола. В промышленности производство уксусной кислоты осуществляется двумя группами уксуснокислых бактерий: *Gluconobacter*, которые окисляют этанол только до уксусной кислоты, и *Acetobacter* (*A. aceti*, *A. peroxidans*, *A. pasteurianus*), которые преобразуют этанол сначала в уксусную кислоту, а затем ее – в CO_2 и H_2O . Уксуснокислые бактерии широко распространены в природе. Их попадание в алкогольные напитки (например, в вино, пиво, сидр) приводит к постепенному скисанию продуктов.

Последовательность реакций, протекающих при уксуснокислом брожении, представлена на схеме 5.5. Сначала происходит окисление этанола до ацетальдегида с участием алкогольдегидрогеназы. Ацетальдегид далее переходит в гидратированную форму, являющуюся субстратом для альдегиддегидрогеназы, которая превращает ее в ацетат.

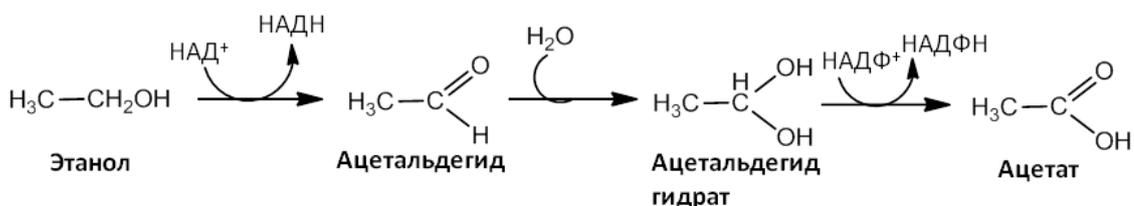


Схема 5.5. Преобразование этанола в ацетат



Уксуснокислые бактерии являются аэробами, поэтому производство уксусной кислоты протекает при постоянном обогащении среды кислородом воздуха.

Лабораторная работа № 9. Влияние состава среды на процесс спиртового брожения

В общем виде блок-схема данного производства приведена на схеме 5.6.

Сырьем для производства этанола служит крахмалсодержащее сырье (например, пшеница, картофель и т. д.). В качестве культуры микроорганизмов, осуществляющей преобразование углеводов, обычно используются *Saccharomyces cerevisiae*. Данные дрожжи способны сбраживать только низкомолекулярные углеводы: моносахариды – глюкозу, фруктозу, дисахариды – мальтозу, сахарозу, а также трисахарид – мальтотриозу. Существуют продуценты этанола, способные сбраживать другие углеводы: например, дрожжи *S. diastolicus* способны усваивать декстрины, а *Kluuveromyces lactis* и *K. fragilis* – лактозу.

Важной стадией производства спирта является преобразование крахмала в смесь усваиваемых дрожжами углеводов, что осуществляется в ходе стадий разваривания сырья и осахаривания. Это достигается путем использования ферментных препаратов.

В целом ферментативная составляющая процессов преобразования крахмалосодержащего сырья в смесь низкомолекулярных углеводов аналогична реакциям, протекающим при производстве патоки (см. п. 2.2). На стадии разваривания к сырью добавляют препараты термостабильной α -амилазы, позволяющей быстро гидролизовать крахмал до декстринов. Дальнейшее преобразование декстринов до сахаров осуществляется с использованием мезофильных бактериальных и грибных амилаз, глюкоамилаз и гидролаз α -1,6-гликозидных связей.

В меньшей степени нашли применение в производстве спирта гидролазы целлюлозы и других β -глюканов. Их использование может повысить не только содержание сбраживаемых углеводов, но и сделать крахмал более доступным ферментативному гидролизу. Использование цитолитических ферментов может повысить выход спирта на ~ 10 %.



Схема 5.6. Блок-схема производства этанола

Помимо наличия сбраживаемых углеводов, важным фактором, влияющим на метаболизм дрожжей, является присутствие в среде аминокислот. Дрожжи, выращенные в присутствии аминокислот, приобретают повышенную устойчивость к продуктам брожения. Обычно в качестве источника азота используются аммонийные соли. Содержание аминокислот в среде для брожения можно увеличить за счет использования протеолитических ферментов. С этой целью используют препараты, обладающие экзопептидазной активностью, либо смесь экзо- и эндопептидаз.

Анализ

В пластиковую бутылку объемом 1,5 л помещают смесь, состоящую из 2 г хлебопекарных дрожжей и 1 л раствора, состав которого указан в табл. 5.1. Смесь тщательно перемешивают, закрывают ватно-марлевой пробкой и оставляют в термостате на сутки при 30 °С.

Затем проводят перегонку реакционной смеси на вакуумном роторном испарителе. Перегонку начинают при 50 °С и отбрасывают первую «головную» фракцию. Постепенно проводят повышение температуры до 70 °С и отгоняют около 90% всего объема реакционной смеси.

Таблица 5.1. Варианты состава среды для спиртового брожения

Вариант	Состав среды
1	100 г сахарного песка растворяют дистиллированной водой в мерной колбе объемом 1 л
2	120 г пшеничной муки помещают в мерную колбу объемом 1 л. Колбу на 2/3 объема заполняют дистиллированной водой, смесь энергично перемешивают и добавляют оставшийся объем воды
3	120 г пшеничной муки помещают в мерную колбу объемом 1 л. Колбу на 2/3 объема заполняют дистиллированной водой, к смеси добавляют ферментный препарат амилаesubтилин (количество указывается преподавателем), смесь энергично перемешивают и добавляют оставшийся объем воды
4	120 г пшеничной муки помещают в мерную колбу объемом 1 л. Колбу на 2/3 объема заполняют дистиллированной водой, к смеси добавляют ферментный препарат термамил (количество указывается преподавателем), смесь энергично перемешивают и добавляют оставшийся объем воды
5	120 г пшеничной муки помещают в мерную колбу объемом 1 л. Колбу на 2/3 объема заполняют дистиллированной водой, к смеси добавляют ферментный препарат глюкозаморин (количество указывается преподавателем), смесь энергично перемешивают и добавляют оставшийся объем воды
6	120 г пшеничной муки помещают в мерную колбу объемом 1 л. Колбу на 2/3 объема заполняют дистиллированной водой, к смеси добавляют ферментные препараты термамил (или амилаesubтилин) и глюкозаморин (количество указывается преподавателем), смесь энергично перемешивают и добавляют оставшийся объем воды
7	120 г пшеничной муки помещают в мерную колбу объемом 1 л. Колбу на 2/3 объема заполняют дистиллированной водой, к смеси добавляют ферментные препараты термамил, глюкозаморин, протосубтилин и целлюлазу (количество указывается преподавателем), смесь энергично перемешивают и добавляют оставшийся объем воды

Затем определяют содержание этанола в перегнанной смеси по плотности, найденной с использованием ареометра (табл. 5.2). После этого

делают вывод о зависимости количества образующегося этанола от состава среды для брожения.

Таблица 5.2. Плотность водно-этанольных смесей при 20 °С

Плотность, г/мл	Массовая доля спирта, %	Молярная концентрация, М
0,9945	2	0,432
0,9910	4	0,860
0,9878	6	1,287
0,9848	8	1,710
0,9819	10	2,131
0,9791	12	2,550
0,9764	14	2,967
0,9739	16	3,382
0,9713	18	3,795
0,9686	20	4,205

Порядок работы на вакуумном роторном испарителе ИКА. Использование вакуума значительно облегчает процесс перегонки, поскольку позволяет проводить его при более низких температурах. Основными элементами вакуумного роторного испарителя (рис. 5.1) являются нагревательная баня (1), в которую с помощью специального механизма опускается перегонная колба (6); электродвигатель (5), осуществляющий вращение перегонной колбы; стеклянный отсек с расположенным внутри холодильником (8), необходимым для конденсации образующихся паров, который имеет сверху трубку (9) для откачки воздуха, в боковой части – кран (10) для сброса вакуума, а снизу – шлиф для соединения с приемной колбой.

Включение испарителя в сеть проводят с помощью двух клавиш, расположенных в нижней части правой торцевой поверхности. Перед началом работы наполняют емкость нагревательной бани дистиллированной водой и, вращая ручку (2), устанавливают необходимую температуру и фиксируют ее путем нажатия на ручку (2). На дисплее слева ручки (2) отображается фактическое значение температуры в бане (1).

Далее включают подачу воды в холодильник (8), присоединяют и фиксируют с помощью металлической клипсы приемную колбу (7). В круглодонную колбу со шлифом 29/32 помещают перегоняемую смесь, присоединяют ее пластиковой клипсой к шлифу испарителя, расположенному над нагревательной баней. С помощью клавиш (3) опускают колбу с перегоняемой смесью в нагревательную баню, устанавливают необходимую частоту вращения колбы с помощью ручки (4) и дают смеси нагреться в течение 5-10 минут.

Перед подачей вакуума следует убедиться в том, что кран сброса вакуума (10) находится в закрытом положении. После этого производят постепенную подачу вакуума до момента достижения слабого кипения

перегоняемой смеси. Чрезмерно интенсивная подача вакуума может вызвать интенсивное кипение смеси и ее выплескивание в приемную колбу.

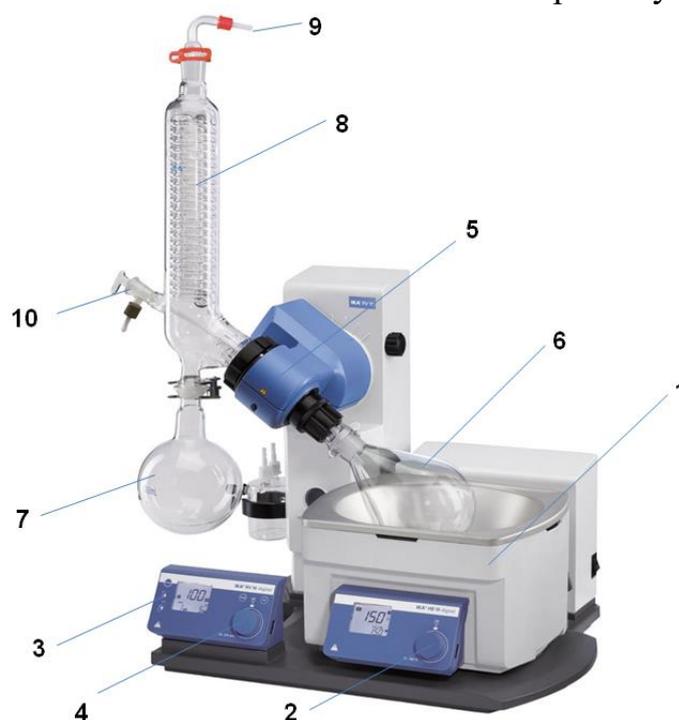


Рис. 5.1. Внешний вид вакуумного роторного испарителя ИКА RV10: 1 – нагревательная баня; 2 – ручка установки температуры; 3 – клавиши подъема/опускания испарителя; 4 – ручка установки частоты вращения колбы; 5 – электродвигатель; 6 – перегонная колба; 7 – приемная колба; 8 – холодильник; 9 – трубка для подключения вакуум-насоса; 10 – кран для сброса вакуума

После завершения перегонки останавливают вращение нажатием на ручку (4), поднимают колбу в верхнее положение с помощью клавиш (3) и сбрасывают вакуум краном (10). Затем можно отсоединять перегонную и приемные колбы.

Контрольные вопросы

1. Что общего в процессах спиртового, молочнокислого и уксуснокислого брожения?
2. В чем принципиальное различие между процессами спиртового и уксуснокислого брожения?
3. С какой целью используются ферментные препараты в производстве спирта из крахмалсодержащего сырья?
4. Какой минимальный набор ферментов необходим для производства спирта из крахмала?
5. Как можно получить спирт из лактозы с использованием дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*?

Порядок прохождения лабораторного практикума

Перед лабораторной работой студент должен ознакомиться с ее теоретическими основами, методикой эксперимента, зафиксировать в лабораторном журнале теоретическое введение и составить план. В начале занятия студент сдает теоретические основы лабораторной работы и порядок ее выполнения с целью выяснения уровня подготовки к ее выполнению.

В ходе лабораторной работы фиксируются все наблюдения и первичные данные. После завершения экспериментов проводится предварительная обработка данных измерений, и вычисленные результаты согласуются с преподавателем.

Лабораторные работы оформляются в лабораторном журнале, который обязательно должен включать титульный лист. Каждый отчет должен содержать:

- титульный лист, включающий название работы и дату ее выполнения;
- цель работы;
- теоретическое введение (минимальный объем – 2 с);
- порядок выполнения работы;
- схему экспериментальной установки и ее краткое описание;
- экспериментальные данные;
- обработку экспериментальных данных и их обсуждение;
- выводы;
- список использованных источников.

Библиографический список

1. Ферменты в пищевой промышленности / под ред. Р.Д. Уайтхерста, М. Оорта . – СПб.: Профессия, 2014 . – 405 с.
2. Химия пищевых продуктов / ред.-сост. Ш. Дамодаран, К.Л. Паркин, О.Р. Феннема. – СПб., Профессия, 2012. – 1040 с.
3. Неверова, О.А. Пищевая биотехнология продуктов из сырья растительного происхождения : учеб. для вузов / О.А. Неверова. – Новосибирск : Сибирское университетское издательство, 2007. – 415 с.
4. Рогов, И.А. Пищевая биотехнология. Книга 1 / И.А. Рогов, Л.В. Антипова, Г.П. Шуваева. – М.: КолосС, 2004. – 440 с.
5. Пищевая химия / под ред. А.П. Нечаева. – СПб.: ГИОРД, 2001. – 589 с.
6. ГОСТ Р 54330-2011 Ферментные препараты для пищевой промышленности. Методы определения амилолитической активности. – Введ. 2013–01–01. – М.: Стандартинформ, 2012. – 14 с.
7. ГОСТ 32902-2014 Крахмал и крахмалопродукты. Термины и определения. – Введ. 2015–06–01. – М.: Стандартинформ, 2015. – 12 с.
8. ГОСТ 52060-2003 Патока крахмальная. Общие технические условия. – Введ. 2004–01–01. – М.: Издательство стандартов, 2003. – 34 с.
9. ГОСТ 32902-2014 Крахмал и крахмалопродукты. Термины и определения. – Введ. 2015–06–01. – М.: Стандартинформ, 2015. – 12 с.
10. ГОСТ Р 50549-93 Продукты гидролиза крахмала. Определение восстанавливающей способности и эквивалента глюкозы. Метод постоянного титра Лейна и Эйнона. – Введ. 1994–01–01. – М.: Издательство стандартов, 1993. – 8 с.
11. Степычева, Н.В. Научные основы производства продуктов питания: лабораторный практикум / Н.В. Степычева; Иван. гос. хим.-технол. ун-т. – Иваново, 2014. – 64 с.
12. ГОСТ Р 53974-2010 Ферментные препараты для пищевой промышленности. Метод определения протеолитической активности. – Введ. 2012–01–01. – М.: Стандартинформ, 2011. – 10 с.
13. Cheison S.C., Zhang S.-B., Wang Z., Xu S.-Y. Comparison of a modified spectrophotometric and the pH-stat methods for determination of the degree of hydrolysis of whey proteins hydrolysed in a tangential-flow filter membrane reactor // Food Res. Int. 2009. V. 42 P. 91–97.
14. Nielsen P.M., Petersen D., Dambmann C. Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis // J. Food Sci. 2001. V. 66. P. 642–646.

15. Кислухина, О.В. Ферменты в производстве пищи и кормов / О.В. Кислухина. – М.: ДеЛи принт, 2002. – 335 с.
16. Gupta R., Gupta N., Rathi P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004. V. 64. P. 763–781.
17. Reis P., Holmberg K., Watzke H. et al. Lipases at interfaces: A review // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2009. V. 147–148. P. 237–250.
18. ГОСТ ISO 13082-2014 Молоко и молочная продукция. Определение активности липазы в препаратах преджелудочной липазы. – Введ. 2016–01–01. – М.: Стандартинформ, 2015. – 8 с.

Учебное издание

ДЕРЕВЕНЬКОВ Илья Александрович

МАКАРОВ Сергей Васильевич

БИТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПИЩЕВЫХ ПРОИЗВОДСТВ

Лабораторный практикум

Редактор В.Л. Родичева

Подписано в печать 30.11.2017. Формат 60×84 ¹/16. Бумага писчая.

Усл. печ. л. 5,12. Тираж 50 экз. Заказ

ФГБОУ ВО «Ивановский государственный
химико-технологический университет»

153000, г. Иваново, Шереметевский пр., 7