

ДК 602.4

КАПРЕЛЬЯНЦ Л.В., д-р техн. наук, професор, ШПИРКО Т.В., канд. техн. наук, доцент,
ЗИНОВ'ЄВ А.А., асистент, ШАЛИГІН О.В., асистент
Одеська національна академія харчових технологій

СТРУКТУРОУТВОРЕННЯ У РОЗЧИНАХ ЖЕЛАТИНУ ПІД ДІЄЮ ФЕРМЕНТУ ТРАНСГЛУТАМІНАЗИ

Вивчено вплив трансглютамінази на швидкість формування структури розчину желатину. Отримані математичні моделі, які описують зміну в'язкості в часі. Наведена математична модель та процес формування структури при різних співвідношеннях фермент-субстрат.

Ключові слова: желатин, трансглютаміназа, структуроутворення.

The influence of transglutaminase on velocity of structure formation of gelatin solution was researched. The mathematical models of viscose changing and of structural formation by different enzyme substrate relation were determinated.

Keywords: gelatin, transglutaminaza, struktu routvorenniya.

Першорядним завданням у забезпеченні населення України продовольством є розробка шляхів залучення у харчовий раціон нових ресурсів, особливо важливо збільшення джерел повноцінного білку, які можуть бути перероблені в традиційні високоякісні продукти. Використання додаткових нетрадиційних джерел білка не вирішує проблему, оскільки нові білки не завжди мають потрібні властивості.

Додатковим джерелом білка могли б стати природні білки, які не використовувалися раніше у зв'язку з важкістю їх виділення, після модифікації в форму доступну для використання. Однак при переробці сировини, яка містить білок, якість одержуваних продуктів залежить від функціонально-технологічних властивостей білків. Ці властивості в першу чергу визначаються структурними особливостями білкових молекул. Таким чином, проблема, надання білковим харчовим продуктам необхідних функціонально-технологічних властивостей пов'язана з пошуком шляхів регулювання структурно-хімічних властивостей білкових молекул [1 – 3].

Актуальним є використання біотехнологічних прийомів для одержання продуктів, які містять білок, із заданими функціонально-технологічними властивостями. Для цього використовують різні методи модифікації білків, найбільш ефективним методом є ферментативна модифікація, яка дозволяє проводити зміни властивостей білків і впливати на такі характеристики, як гелеутворення та структурно-механічні властивості гелів. Модифікація харчових білків трансглютаміназою призводить до одержання текстурованих продуктів, змінює розчинність і функціонально-технологічні властивості, дозволяє одержувати білки з високою харчовою і біологічною цінністю.

Мета роботи – вивчити вплив трансглютамінази на швидкість формування структури розчину желатину.

Об'єктом дослідження є ферментно-субстратна система – желатин з ферментним препаратом з трансглютаміназою активністю. В якості предмета дослідження застосовували комплексний підхід, який базується на фундаментальних біохімічних, фізико-хімічних уявленнях про структуроутворення в розчинах високомолекулярних біополімерів з використанням апарату математичної статистики. Методи дослідження передбачають визначення структурно механі-

чних властивостей фермент-субстратної системи (визначення в'язкості віскозиметричним методом) та обробку експериментальних даних на підставі кореляційного аналізу з використанням теорії повнофакторних експериментів.

Матеріали і методи дослідження

Розчини желатину у воді різної масової концентрації (1, 2,5, 3, 5, 10 %) рН = 6,52 приготували з желатину фірми «Мрія» з вмістом білку 87,5 %, вуглеводів 0,7 %, жирів 0,4 %. Препарат ферменту (0,1 мг/мл) вносили в розчин желатину безпосередньо після нагрівання його до оптимальної температури. Суміш активували при температурі 36 °С. Фермент інактивується при температурі кипіння. Співвідношення желатину та препарату були такими, щоб відповідали характеристичним точкам ортогонального центрального композитного плану другого порядку для двофакторних експериментів [4 – 7]. В якості параметрів розглядали час виходу значення структурно-механічної характеристики на лінію апроксимації та максимальне значення в'язкості гелю. Для віскозиметричних досліджень використовували віскозиметр Оствальда (діаметром 1,1 мм).

Результати дослідження та їх обговорення

На попередньому етапі визначали час витікання розчину желатину різної концентрації без додавання ферментного препарату при температурі 45 °С крізь капіляр віскозиметра Оствальда [8]. На підставі одержаних даних було розраховано відносну, питому, приведену і характеристичну в'язкості для розчину желатину вказаної серії, вказаного виробника. З рис. 1 видно, що зростання масової частки желатину призводить до зростання кожної з вказаних видів в'язкості і одержані лінії можуть бути апроксимовані відповідними математичними залежностями.

$\eta_{Від}$, $\eta_{Пит}$, $\eta_{Пр}$, %

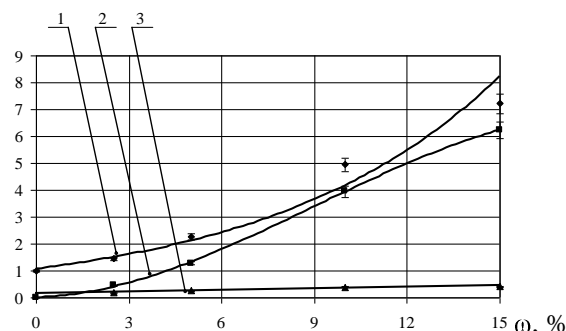


Рис. 1. Значення відносної (1), питомої (2), приведені (3) в'язкості розчину желатину у воді

Емпірично встановлені рівняння та коефіцієнти достовірності апроксимації мають такий вигляд:

$$\eta_{Від} = 1,073 \cdot e^{0,1358\omega} R^2 = 0,9788 \quad (1)$$

$$\eta_{Пит} = -0,0022\omega^3 + 0,0587\omega^2 + 0,0219\omega + 0,0136 R^2 = 0,9999 \quad (2)$$

$$\eta_{Пр} = 0,0194\omega + 0,1526 R^2 = 0,9042 \quad (3)$$

З рівняння (3) видно, що характеристична

в'язкість дорівнює 0,1526.

Далі оцінювали зміну в'язкості розчину желатину у воді при додаванні ферменту у кількості 1 од/г у часі. Вимір часу витікання розчину крізь капіляр здійснювали безпосередньо у термостаті при температурі 45 °С (рис.2).

η , мПа·с

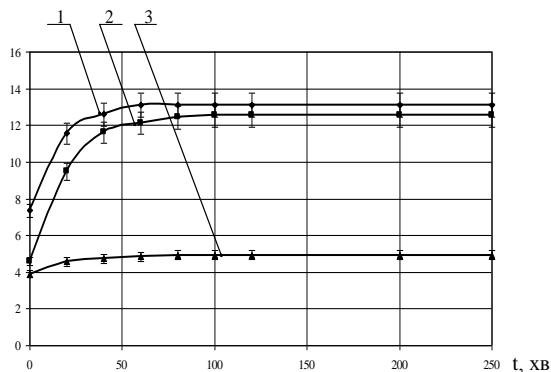


Рис. 2. Залежність динамічної в'язкості розчину желатину від часу протікання реакції з участю ферментного препарату 1 – 10 %; 2 – 5 %; 3 – 2,5 %

З рис. 2 видно, що для всіх розчинів залежності коефіцієнта динамічної в'язкості розчину желатину в присутності ферментного препарату мають апроксимаційний характер і в'язкість зростає на перших 100 хвиликах процесу ферментування.

Для кривої, яка описує зміну часу витікання розчину крізь капіляр при концентрації желатину 2,5 %, притаманний більш пологий характер і є підстави припускати, що біохімічний процес розвивається з більш постійною швидкістю. Значення в'язкості розчинів з відповідною кількістю желатину відповідають нульовому значенню часу (до реагування).

Рівняння, які описують залежності 2 та 3 мають вигляд:

$$\eta = -13,14 \cdot e^{-0,0565t} + 13,14 R^2 = 0,966 \quad (4)$$

$$\eta = -12,6 \cdot e^{-0,0449t} + 12,6 R^2 = 0,994, \quad (5)$$

$$\eta = -4,94 \cdot e^{-0,0447t} + 4,94 R^2 = 0,995, \quad (6),$$

де t – час протікання ферментативного процесу, хв.

На підставі залежностей (4), (5) та (6) можна прогнозувати, якою буде в'язкість при протіканні ферментативного процесу у часі.

На рис. 3 наведені графіки залежності динамічної в'язкості від часу протікання біохімічного процесу у випадку з різним співвідношенням ферментного

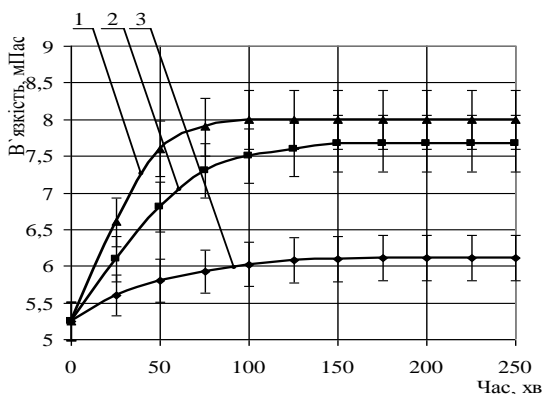


Рис. 3. Залежність коефіцієнту динамічної в'язкості у розчині желатину з масовою часткою 2,5 % від кількості ферментного препарату 1 – 9 Од/г; 2 – 5 Од/г; 3 – 1 Од/г

препарату та субстрату.

Три залежності носять апроксимаційний характер і наближаються до сталого значення в'язкості після відповідного часу протікання реакції. Для більшого співвідношення ферментний препарат – субстрат більш характерною є асимптотична апроксимація кривою при менших значеннях часу. Крива 1 виходить на більш-менш сталу ділянку після 100 хв протікання процесу, а крива 3 – після 200 хв.

На рисунку 4 наведено графік залежності першої похідної в'язкості за часом від значення в'язкості. Видно, що в подібних координатах графіки мають вигляд прямої лінії з загальним рівнянням виду:

$$d\eta/dt = k\eta + b \quad (7)$$

Для інтегрування рівняння (7) необхідно задати граничними умовами (достатньо початкових)

$$\eta_{t=0} = 5,25 \text{ мПа}\cdot\text{с}.$$

В табл. 1 наведені значення коефіцієнтів k і b

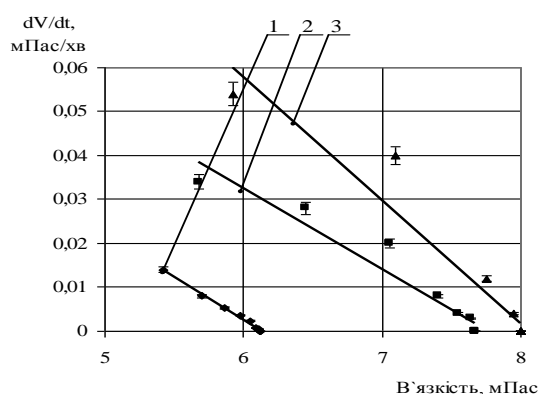


Рис. 4. Графік залежності першої похідної в'язкості за часом від значення в'язкості 1 – 1 Од/г; 2 – 5 Од/г; 3 – 9 Од/г.

для трьох випадків.

Швидкість ферментативного процесу залежить від в'язкості розчину на етапі ініціації реакції ($\lim_{t \rightarrow 0}$)

Таблиця 1

Коефіцієнти регресії лінійної залежності похідної в'язкості за часом від в'язкості

Кількість ферменту	k ,	b ,	R^2
1 Од/г	-0,0196	0,1204	0,9927
5 Од/г	-0,0183	0,1426	0,9369
9 Од/г	-0,028	0,2262	0,9325

$d\eta/dt$). Зростання в'язкості призводить до зниження швидкості ферментативної реакції, що можна пояснити з позиції дифузійного обмеження процесу: у в'язких середовищах з високим вмістом субстрату виникають конформаційні перешкоди до утворення фермент-субстратних комплексів, як передумова ефективного протікання ферментативної реакції. В цих концентраційних умовах вирішальне значення для формування і регулювання структурно-механічних властивостей білкового розчину мають співвідношення ферменту і субстрату в певних умовах протікання ферментативної реакції.

Рівняння залежності в'язкості від часу можна представити у такому вигляді:

$$\eta = \frac{be^{kt} - b}{k} \quad (8)$$

Два рівняння (7, 8) та значення коефіцієнтів регресії (табл. 1) дозволяють оцінювати зміну швидкості реакції від часу за непрямими ознаками.

На підставі одержаних експериментальних даних було розроблено двофакторну математичну модель, яка здатна описати процес структуроутворення при заданому значенні масової частки субстрату та співвідношення ферментний препарат – субстрат.

Рівняння має такий вигляд:

$$\eta = 6,77 + 1,335\left(\frac{\omega-7}{5}\right) + 0,878\left(\frac{f-5}{4}\right) - 0,0925\left(\frac{\omega-7}{5}\right)\left(\frac{f-5}{4}\right), (9),$$

$$-0,777\left(\left(\frac{\omega-7}{5}\right)^2 - 0,667\right) + 0,497\left(\left(\frac{f-5}{4}\right)^2 - 0,667\right)$$

де ω – масова частка желатину у розчині, f – співвідношення одиниць активності до маси сухого желатину.

Рівняння (8) дозволяє прогнозувати: яким буде значення такого технологічного параметра, як в'язкість при заданому значенні масової частки сухого желатину та відповідному співвідношенні ферментного препарату до желатину.

На підставі одержаних експериментальних даних можна розробити математичну модель, яка описує залежність часу, за який в'язкість гелю набула максимального значення.

Рівняння має такий вигляд:

$$t = 158,33 - 23,33\left(\frac{\omega-7}{5}\right) - 60,83\left(\frac{f-5}{4}\right) + 2,5\left(\frac{\omega-7}{5}\right)\left(\frac{f-5}{4}\right), (10),$$

$$-0,238\left(\left(\frac{\omega-7}{5}\right)^2 - 0,667\right) + 12,26\left(\left(\frac{f-5}{4}\right)^2 - 0,667\right)$$

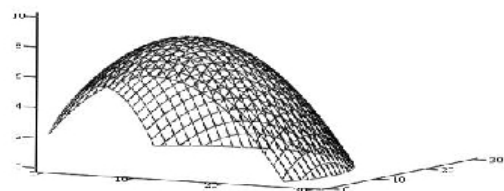
Середні значення відносної похибки для рівнянь (9) і (10) – 0,8 і 1,3 %.

На рис. 5 (а – для рівняння 9, б – для рівняння 10) наведені функції густини розподілу відносної похибки в характеристичних точках плану. Тобто, ймовірність зробити похибку при використанні рівнянь (9) та (10) найбільша при значеннях функції відгуку $\eta = 5,79$ Па·с, $t = 144,5$ хв.

Поверхні, які відображають функції відгуку при заданих асоціаціях факторів, наведені на рис. 5.

При заданому значенні одного з факторів можна одержати значення іншого за умов максимізації чи мінімізації функції відгуку. Обробку даних здійснювали в математичному редакторі Mathcad. В рамках вказаного пакету використовували регресуючі та інтерполюючі функції regress і interp. Ступінь апроксимуючого поліному дорівнювала 2 [6]. Одержані поверхні візуалізують математичні моделі (9) та (10). На рис. 5 (а) зображено однопорожнинний параболоїд. Подібна форма описується рівнянням (9) в трьохмір-

η , мПа·с

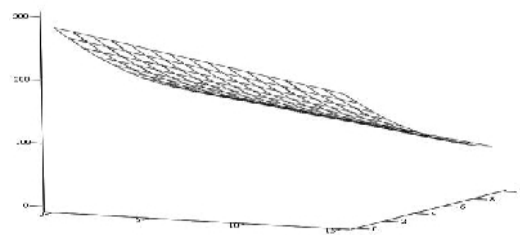


[E/S]

Вміст желатину, %

(а)

t , хв



[E/S]

Вміст желатину, %

(б)

Рис. 5. Поверхні функцій відклику в'язкості (а), часу (б)

ній системі. Подібний характер можна пояснити з позиції молекулярно кінетичної теорії конденсованих систем (Ейнштейна-Смолуховського), коефіцієнт дифузії та середньоквадратичний зсув молекул ферменту залежить від в'язкості. Екстремум (точка локального максимуму) відповідає співвідношенню факторів: вміст желатину – 11,5 %, $E/S = 8,5$.

Висновки.

Одержані результати дозволяють прогнозувати зміни структурно-механічних властивостей гелів желатину в присутності ферменту трансглютамінази. Одержані математичні рівняння описують процеси структуроутворення і дозволяють розраховувати коефіцієнт динамічної в'язкості – важливий технологічний показник. Двофакторні моделі дають можливість враховувати такі чинники, як масова частка структуроутворювача (желатину) та кількість ферментного препарату (каталізатора структуроутворення) в технологічних розрахунках. Поверхні, описані функціями відклику дають можливість оптимізувати співвідношення вказаних чинників.

Поступила 11.2010

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ruiz-Carrascal J., Regenstein J. Emulsion stability and water uptake ability of chicken breast muscle proteins as affected by microbial transglutaminase. J. Food Sci. 2002. 67. №2. с. 734-739.
2. Gerrard J.A., Fayle S.E., Brown P.A., Sutton K.H., Simmons L., Rasiah I. Effects of microbial transglutaminase on the wheat proteins of bread and croissant dough// J. Food Sci. 2001. 66. №6. с. 728-786.
3. Капрельянц Л.В., Зиновьев А.А. Использование фермента трансглютаминазы в пищевых технологиях, источники получения. Матеріали ІХ Українського біохімічного з'їзду 24-27 жовтня 2006 р., Том 2, Харків С 149-150.
4. Ахназарова С.Л. Методы оптимизации эксперимента в химической технологии: Учеб. Пособие для хим.-технол. Спец. Вузов/ С.Л. Ахназарова, В.В. Кафаров. – 2-е изд., перераб и доп. – М.: Высш. Шк., 1985. – 327 с.
5. Ферстер Э. Методы корреляционного и регрессионного анализа/ Э. Ферстер, Б. Рёнц, пер. с нем. В.М. Ивановой. – М.: Финансы и статистика, 1983. – 301 с.
6. Зажигаев Л.С. Методы планирования и обработки результатов физического эксперимента/ Л.С. Зажигаев, А.А. Кишьян, Ю.И. Романиков. – М.: Атомиздат, 1978. – 232 с.
7. Батунер Л.М. Математические методы в химической технике/ Л.М. Батунер, М.Е. Позин. – Л.: Госхимиздат, 1960. – 640 с.
8. Фролов Ю.Г. Лабораторные работы и задачи по коллоидной химии/ Ю.Г. Фролов, А.С.Гродский, В.В.Назаров. – М.: Химия, 1986. – 216 с.