

У розроблених соусах покращився жирно-кислотний склад: збільшився вміст поліненасичених жирних кислот сімейства ω -3 (соус «Пікантний» на 27,5 %, «Студентський» 18,7 %, «Гранд» на 12,5 %) порівняно з контролем.

Важливим показником якості традиційних та розроблених соусів на основі олій є стійкість до зберігання.

Визначені показники безпечності розробленої соусної продукції на основі композиційних сумішей олій за такими показниками: вміст важких металів, мікотоксинів, пестицидів, радіонуклідів та мікробіологічними показниками. Досліджено вміст токсичних елементів у соусах.

Результати експериментальних даних досліджень свідчать, що вміст свинцю, міді, цинку не перевищує граничнодопустимі рівні (ГДР). Свинець (0,05), мідь (0,12), цинк (0,08), патулін (0,05), у контрольному зразку (соус майонез) та дослідних зразках не виявлено (табл.3.).

Для дослідження мікробіологічних показників безпеки емульсійних соусів визначали загальну кількість мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів (МАФAM) в 1г готової продукції у свіжовиготовлених зразках та під час зберігання протягом 12, 24, 48 год. (табл. 3).

Таблиця 3 – Мікробіологічні показники та вміст важких металів у соусах емульсійного типу

Показник	Соус	Норма	Фактичний вміст МАФAM в соусах ($\times 10^2$) протягом зберігання, год.				Вміст важких металів, мг/кг		
			0	12	24	48	Pb	Cu	Zn
Кількість МАФAM, КУО в 1 г	«Майонез» (контроль)	$1 \cdot 10^4$	1,40	2,23	3,61	5,41	0,02	0,1	0,06
	«Пікантний» (дослід)		1,31	2,04	3,42	5,03	0,02	0,05	0,06
	«Студентський» (дослід)		1,37	2,15	2,96	5,47	0,03	0,11	0,05
	«Гранд» (дослід)		1,32	2,06	2,62	5,31	0,03	0,12	0,05

Наявність бактерій групи кишкової палички (БГКП), патогенних мікроорганізмів, у т.ч. *Salmonella*, *Staphylococcus Aureus*, *Proteus* в соусах не виявлено. В контрольних та дослідних зразках протягом 48 годин зберігання не виявлено пліснявих грибів (КУО в 1г), дріжджів (КУО в 1г), а кількість мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів у дослідних зразках знаходяться на рівні контролю.

На підставі проведених досліджень можна зробити висновок, що впровадження розроблених емульсійних соусів на основі композицій олій: лляної, гарбузової, кунжутної, соняшникової є доцільним. Технологія соусів з використанням композицій олій дає змогу оптимізувати жирнокислотний склад емульсійних соусів, та розширити асортимент продукції ресторанного господарства.

Література

1. Скурихин И.М. Химический состав пищевых продуктов. Кн. 2: Справочные таблицы: 2-е изд., перераб. и доп. / И.М. Скурихин, М.Н. Волгарев. – М.: Агропромиздат, 1987. – 360 с.
2. Моїсеєва М. Світовий ринок олійних культур / М. Моїсеєва // Пропозиція. 2009. – № 10. – С.46-49.
3. Здобнов А.И. Сборник рецептов блюд и кулинарных изделий для предприятий общественного питания / А.И. Здобнов, В.А. Цыганенко, М.И. Пересичный. – К.: А.С.К., 1998. – 656 с.

УДК 613.2 – 021.632:[577.15:544.723]

ТЕХНОЛОГИЯ ДИЕТИЧЕСКОЙ ДОБАВКИ С ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ И СОРБЦИОННОЙ АКТИВНОСТЯМИ

Севастьянова Е.В., канд. хим. наук, доцент, Капустян А.И., канд. техн. наук
Одесская национальная академия пищевых технологий, г. Одесса

Предложена технологическая схема получения диетической добавки с протеолитической и сорбционной активностями путем иммобилизации трипсина в интерполиэлектролитный комплекс хитозан-пектин. Разработаны оптимальные условия иммобилизации трипсина. Эффективность иммобилизации доказана экспериментальными и медико-биологическими исследованиями.

Technological schemes of receiving dietary supplementation with proteolytic and sorption activity by trypsin immobilization in the chitosan-pectin interpolyelectrolyte complex was proposed. Optimal conditions of trypsin immobilization was developed. The efficiency of trypsin immobilization proved by experimental and biomedical researches.

Ключевые слова: трипсин, иммобилизация, интерполиэлектролитные комплексы, пектин, хитозан.

Распространенность болезней пищеварительного тракта за последние 10 лет возросла почти в два раза. Большинство патологий желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) сопровождаются «пищеварительной недостаточностью», что определяет необходимость компенсации пищеварительных ферментов, в частности протеаз, путем их дополнительного перорального введения [1,2].

Эффективность применения интактных протеаз, как и других ферментов, ограничена в связи с их рН- и термоллабильностью, быстрой инактивацией, нестабильностью при хранении, автолизом, действием ингибиторов и других факторов. Стабильные формы ферментов получают посредством их фиксации на носителях – иммобилизации [3,4].

В настоящее время к перспективным формам иммобилизации ферментов относят полимерные системы, полученное по принципу полиэлектролитного комплексообразования [5]. Преимущество при выборе компонентов полиэлектролитных систем отдают природным полимерам, поскольку их использование обеспечивает биосовместимость с активной составляющей и биodeградацию.

Целью настоящего исследования явилось определение оптимальных условий иммобилизации трипсина в интерполиэлектролитный комплекс (ИПЭК) хитозан-пектин, разработка технологии диетической добавки с протеолитической и сорбционной активностями.

Ранее нами было показано, что наиболее эффективной полиэлектролитной матрицей для иммобилизации трипсина является комплекс полисахаридов, резистентных к действию пищеварительных ферментов, а именно – хитозана (поликатионит) с пектином (полианионит) [9,10].

Тройной ИПЭК хитозан-трипсин-пектин получали совмещением растворов компонентов комплекса, при этом факторами, влияющими на эффективность иммобилизации трипсина (включение фермента в комплекс и активность в его составе) явились: последовательность совмещения биополимеров, их концентрация и соотношение в комплексе.

В ходе исследований определена следующую закономерность – на показатели эффективности иммобилизации трипсина положительно влияет соблюдение порядка совмещения компонентов комплекса в последовательности пектин-трипсин-хитозан.

Для определения условий максимального включения трипсина в ИПЭК ($\omega_{тр}$, % от макс) и его активности в иммобилизованной форме (ПА, % от макс), необходимым явилось установить влияния концентрации полисахаридов (хитозана и пектина) ($C_{полисах}$, %), и массовой доли хитозана ($\omega_{хит}$, %) в полученном ИПЭК. Показатель $\omega_{тр}$ определяли по содержанию белка-фермента в комплексе (спектрофотометрически при $\lambda=280$ нм), ПА – по величине протеолитической активности иммобилизованного трипсина в условиях моделирования жидких сред ЖКТ.

С целью сокращения количества опытов и получения достоверных результатов о закономерностях процесса иммобилизации, целесообразным явилось использование методов математического планирования многофакторных экспериментов.

Уровни и интервалы варьирования факторов, влияющих на процесс иммобилизации трипсина в состав ИПЭК хитозан-пектин ($C_{полисах}$, % и $\omega_{хит}$, %) выбраны с учетом рациональных условий использования полисахаридов и фермента (табл. 1).

Таблица 1 – Уровни и интервалы варьирования факторов

Уровни и интервалы варьирования факторов	Факторы	
	$C_{полисах}$, %	$\omega_{хит}$, %
Нижний уровень	0,5	20
Верхний уровень	2,0	80

Учитывая то, что зависимость выходных параметров ($\omega_{тр}$, ПА), имеет нелинейный характер, для исследований выбрали D-оптимальный квадратичный план Бокса типа B_3 с дополнительным опытом в центре эксперимента, который позволил получить уравнения регрессии вида:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_{12} + b_{22}x_{22} + b_{12}x_1x_2, \quad (1)$$

где b_i – коэффициенты регрессии, которые определяются методом наименьших квадратов;

x_1, x_2 – кодированные значения факторов соответственно $C_{полисах}$ и $\omega_{хит}$.

Условия экспериментов, усредненные экспериментальные y_{cp} и рассчитанные y_p за уравнением типа (1) значения массовой доли иммобилизованного трипсина в комплекс хитозан-пектин и его активность приведены в табл. 2.

Таблица 2 – Матрица плана экспериментов и результаты зависимости массовой доли иммобилизованного трипсина ($Y_{\omega_{mp}}$) и его активности в составе комплекса хитозан-пектин ($Y_{ПА}$) от различных значений концентрации полисахаридов (x_1) и массовой доли хитозана в комплексе (x_2).

N	Условия опытов		Массовая доля иммобилизованного трипсина, $Y_{\omega_{mp}}$, % от макс		Относительная ошибка, %	N	Условия опытов		Активность трипсина в составе комплекса, $Y_{ПА}$, % от макс		Относительная ошибка, %
	x_1	x_2	y_{cp}	y_p			x_1	x_2	y_{cp}	y_p	
1	0,5	20	42,94	42,65	0,68	1	0,5	20	16,45	59,5	6,52
2	2,0	20	29,13	28,54	2,04	2	2,0	20	28,19	86,4	1,37
3	0,5	80	54,93	55,30	0,69	3	0,5	80	9,56	18,9	3,59
4	2,0	80	42,07	41,19	2,09	4	2,0	80	15,85	45,8	6,51
5	0,5	50	92,91	92,01	0,97	5	0,5	50	12,03	56,5	6,07
6	2,0	50	47,75	48,25	1,05	6	2,0	50	18,98	83,4	3,40
7	1,25	20	34,71	35,59	2,55	7	1,25	20	46,33	86,8	3,15
8	1,25	80	77,24	77,90	0,85	8	1,25	80	32,46	46,2	4,23
9	1,25	50	84,70	84,95	0,29	9	1,25	50	37,20	83,8	6,07

Используя метод наименьших квадратов и последовательный регрессионный анализ [6-8], получили следующие уравнения регрессии, которые с достоверностью 95 % адекватно описывают экспериментальные данные зависимости условий иммобилизации трипсина на его выходные параметры.

$$Y_{\omega_{mp}} = 84,95 + 6,32x_1 - 7,05x_2 - 43,03x_1^2; \quad Y_{ПА} = 37,22 + 4,16x_1 - 5,51x_2 - 1,36x_1x_2 - 21,81x_1^2 + 2,07x_2^2$$

Для наглядного представления характера зависимости массовой доли иммобилизованного трипсина и его активности от исследуемых факторов по полученным уравнениям регрессии были построены соответствующие поверхности отклика, представленные на рис. 1, 2.

На основании уравнений регрессии определены значения $C_{полисах}$ (0,5 %) и $\omega_{хит}$ (50 %), при которых обеспечивается максимальная иммобилизация трипсина в комплекс и активность в его составе.

Таким образом, исходя из рациональных интервалов варьирования факторов, влияющих на эффективность иммобилизации трипсина в ИПЭК хитозан-пектин, определены оптимальные условия иммобилизации, которые обеспечивают максимальное включение фермента в комплекс (93 %) и его активность (47 % от макс).

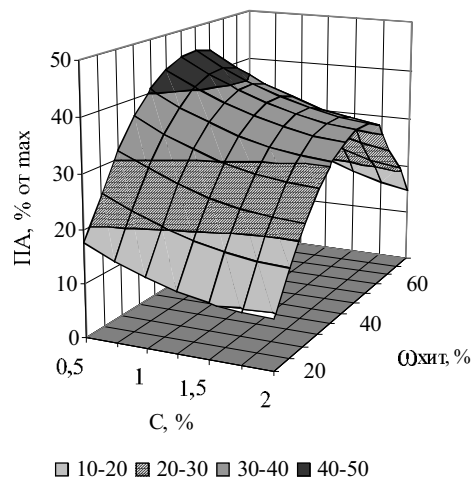
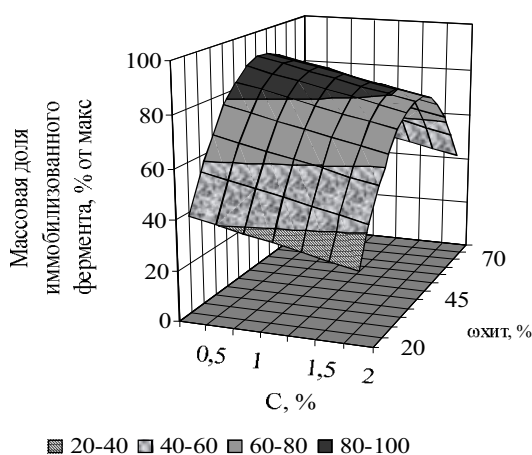


Рис. 1 – Зависимость массовой доли иммобилизованного трипсина от исследуемых факторов

Рис. 2 – Зависимость ПА иммобилизованного фермента от исследуемых факторов

На основании результатов математического моделирования процесса иммобилизации разработана технологическая схема производства диетической добавки, получаемой включением протеазы в ИПЭК хитозан-пектин (рис. 3).

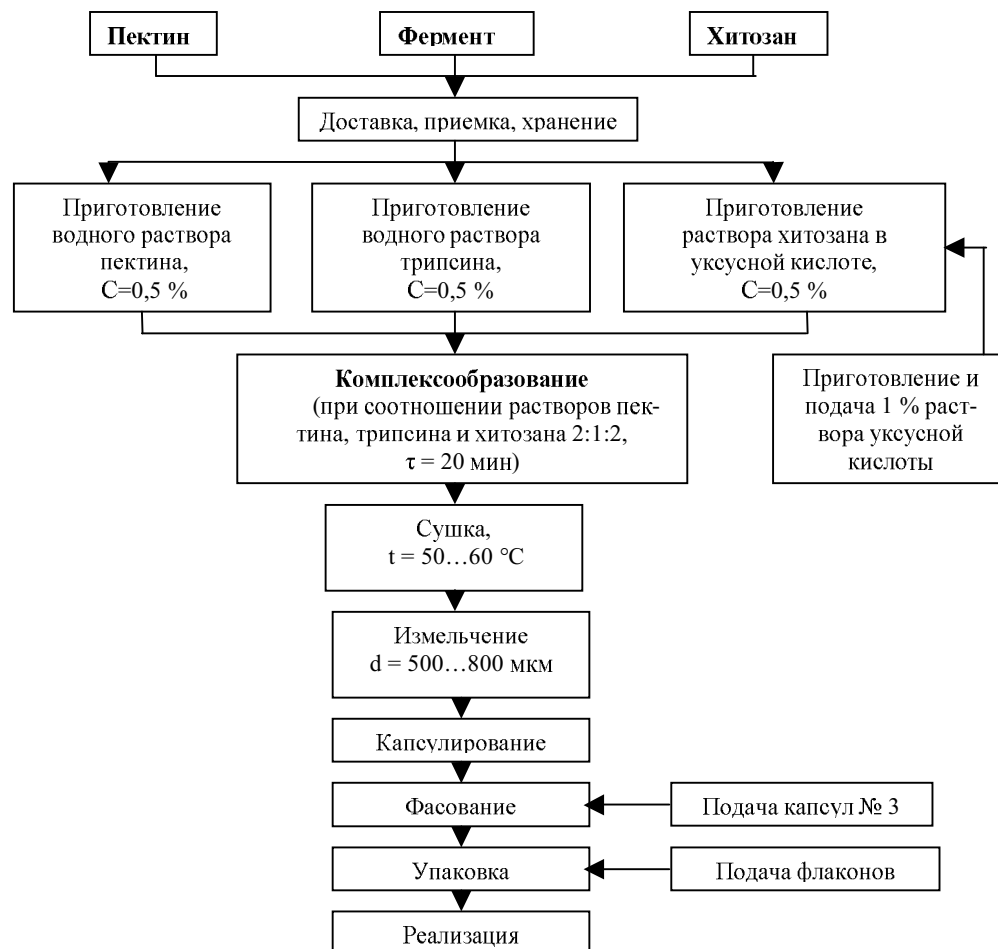


Рис. 3 – Технологическая схема производства диетической добавки, получаемой включением трипсина в ИПЭК хитозан-пектин

Растворы пектина, фермента и хитозана готовят отдельно в реакторах стальных эмалированных, снабженных рамочной мешалкой ($n=20\ldots 60 \text{ мин}^{-1}$), фильтрами, дозирующими устройствами для подачи жидкости. Взвешенное сырье загружают в реактор, далее заливают дистиллированной водой в случае приготовления раствора пектина и трипсина, или подготовленной 1 % уксусной кислотой в случае приготовления раствора хитозана. Растворение биополимеров проводится при перемешивании в течении 60 мин.

Приготовленные растворы компонентов комплекса перекачивают в следующий реактор, соблюдая последовательность и соотношение их совмещения. Оптимальным принято соотношение растворов пектина, фермента и хитозана 2:1:2 и последовательность совмещения пектин-фермент-хитозан при концентрации биополимеров 0,5 % [10].

Включая мешалку, сначала перекачивают необходимый объем раствора пектина, далее при перемешивании добавляют соответствующий объем раствора протеазы, время перемешивания 15 мин. В результате непрерывного перемешивания происходит равномерное распределение фермента по всему объему смеси. После этого перекачивают в реактор при перемешивании необходимый объем раствора хитозана, время перемешивания 15 мин. Для окончания процесса комплексообразования смесь выдерживают 20 мин.

Готовый комплекс подается в сушилку с кипящим слоем периодического действия (КСП) для материалов с ярко выраженными адгезионными свойствами. Температура сушки составляет $50\ldots 70 \text{ }^\circ\text{C}$, продолжительность сушки 15...17 ч. Конечная влажность продукта не должна превышать 12 %. После сушки продукт направляют на измельчение в шаровой мельнице; диаметр частиц должен быть не более $500\ldots 800 \text{ мкм}$.

Для дозирования полученный ферментный препарат фасуют в желатиновые капсулы № 3 для предотвращения не желательных процессов деградации фермента, которые могут возникнуть при таблетировании.

ровании иммобилизованного трипсина. Заполнение капсул производится на ручном капсуляторе. Наполненные капсулы фасуют во флаконы по 60 шт на полуавтоматической счетно-фасовочной машине. Флаконы упаковывают в картонные коробки по 100 шт. Продукция хранится при температуре 5...12 °С.

Изучение физико-химических характеристик трипсина в комплексе с ИПЭК показало, что иммобилизация повышает его стабильность: при экспозиции интактного трипсина в течение 120 мин при pH = 2 сохраняется 32 % его исходной активности, иммобилизованного – 75 %; активность интактного трипсина при 80 °С в течение 120 мин снижается в 5,5 раз, иммобилизованного – в 2,8 [11].

Доказано, что интактные протеазы, подвергаются денатурации и практически полностью теряют способность гидролизовать субстрат. Иммобилизованные в ИПЭК ферменты в условиях, имитирующих среды пищеварительного тракта сохраняют способность расщеплять субстрат – глубина гидролиза казеина составляет 47 %, что обусловлено защитным влиянием полисахаридной матрицы. Медико-биологические исследования на экспериментальных животных подтверждают эффективность иммобилизации протеазы: активность трипсина, включенного в ИПЭК, в тонком кишечнике в 7,7 раз выше, чем интактного фермента, а его накопление имеет пролонгированный характер.

Учитывая, что полиэлектролитные комплексы с иммобилизованным трипсином, сформированы с участием полисахаридов, относящихся к пищевым волокнам, дали оценку их свойств, определяющих физиологические эффекты веществ этой категории. Результаты исследований показали, что им присущи высокая водоудерживающая способность (6,2...7,1 г H₂O/г ИПЭК), способность к сорбции холевых кислот (6,5 мг холевой кислоты /г ИПЭК) и ионов тяжелых металлов (33,5 мг Pb²⁺/г ИПЭК).

Полученный ферментный препарат стабилен на протяжении 12 месяцев хранения (в конце указанного срока активность иммобилизованного трипсина составляет до 97,2...98,9 % от теоретической), микробиологические характеристики (КМАФАнМ и патогенные микроорганизмы) не превышают показателей установленных нормативной документацией.

Выводы

Определены оптимальные условия иммобилизации трипсина в интерполиэлектролитный комплекс хитозан-пектин, обеспечивающие максимальное включение фермента, его защиту и стабильность. По предложенным параметрам разработана технологическая схема производства диетической добавки – трипсина, иммобилизованного в ИПЭК. Использование природных полисахаридов при создании ферментсодержащих полиэлектролитных систем обеспечивает получение добавок, обладающих физиологическими эффектами, присущими природным энтеросорбентам.

Література

1. Веремеенко, К. Н., Протеолиз в норме и при патологии [Текст] / К. Н. Веремеенко, О. П. Голобородько, А. И. Кизим // – Киев: Здоровье, 1988. – 200 с.
2. Михальчук, В. Н., Трипсиноподобные протеиназы в физиологии и биологии человека [Текст] / В. Н. Михальчук // Актуальные проблемы транспортной медицины №4 (14), 2008г. – С. 132 – 139.
3. Вудворд, Дж. Иммобилизованные клетки и ферменты. Методы. [Текст] / (Ред. Дж. Вудворда) – М.: Мир, 1988. – 215 с.
4. Давиденко, Т.И. Иммобилизация ферментных препаратов [Текст] / Т.И.Давиденко // Вісник ОНУ. Серія хімія.– 2003. – Т. 8, № 4. — С. 135-147.Вирник, А. Д.
5. Интерполиэлектролитная реакция – метод получения ферментсодержащих волокнистых материалов с регулируемым составом и свойствами. [Текст] / А. Д. Вирник, И. Ф. Скокова, М. В. Иванова, Т. Н. Юданова // Текстильная химия. – 1994. – №1(5). – С. 5 – 2
6. Ахназарова, С. Л. Методы оптимизации эксперимента в химической технологии [Текст] / С. Л. Ахназарова, В. В. Кафаров – М.: Высш. шк., 1985. – 327 с.
7. Математическое моделирование процессов пищевых производств [Текст] / Н. В. Остапчук, В. Д. Каминский, Г. Н. Станкевич, В. П. Чучуй – К.: Вища школа. – 1992. – 175 с.
8. Остапчук, М. В. Математичне моделювання на ЕОМ: Підручник. [Текст] / М. В. Остапчук, Г. М. Станкевич – Одеса: Друк, 2006. – 313 с.
9. Черно, Н. К. Иммобилизация трипсина в интерполиэлектролитный комплекс хитозан-пектин [Текст] / Н.К. Черно, А. І. Капустян // Наукові праці ОНАХТ, 2011. Вип. 40, том 2.– С. 154–158.
10. Черно, Н. К. Деякі фізико-хімічні характеристики іммобілізованих форм трипсину [Текст] / Н. К. Черно, А. І Капустян // Обладнання та технології харчових виробництв: темат. зб. наук. пр. / ДоНУ-ЕТ. – 2011. – Вип. 27. – С. 35–41.
11. Пат. на корисну модель 66014. Україна МПК (2011.01) C12N 11/00, Спосіб іммобілізації трипсину [Текст] / Черно Н. К., Озоліна С.О., Капустян А.І.; власник Одес. нац. акад. харч. технологій. – № u 2011 02160; заявл. 26.04.2011; опубл. 26.12.2011, Бюл. № 24.