

**ВИННОВ А.С., канд. техн. наук, доцент**

Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины

**МАНОЛИ Т.А., канд. техн. наук, доцент**

Одесская национальная академия пищевых технологий

## **СОВРЕМЕННЫЕ ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ В ПРОИЗВОДСТВЕ РЕСТРУКТУРИРОВАННЫХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ**

Приведен обзор ферментов и ферментативных процессов, приводящих к образованию cross – links взаимодействий, применительно к пищевым системам.

**Ключевые слова:** Трансглутаминаза, пероксидаза, лакказа, тирозиназа, сульфгидрильные оксидазы, липоксигеназы, глюкоза оксидазы, гексозо оксидазы.

Enzyme and enzymatic processes leading to the formation of cross – links interactions in food system revied.

**Keywords:** Transglutaminase, peroxidase, laccase, tyrosinase, sulfhydryl oxidase, lipoksygenase, glucose oxidase, hexose oxidase.

Современное мировое рыболовство и аквакультура производят в год около 150 млн. тонн различных видов гидробионтов, что обеспечивает около 20% потребления животных белков на планете. Из всех направлений производства пищевого сырья животного происхождения аквакультура является самой быстрорастущей в мире отраслью со средним ежегодным приростом около 7%. Однако, несмотря на некоторые успехи в отдельных секторах производства, в мире продолжается рост дефицита пищевого белка животного происхождения. Это связано с опережающим ростом численности населения и высоким уровнем отходов и потерь сырья при переработке и хранении пищевых продуктов. Так, к примеру, в процессе порционирования филе лосося на филе - кусочки и филе - ломтики образуются отходы – «обрезь», количество которых, составляет 12...14% от массы исходного сырья.

Очевидно, что подобные отходы могут быть использованы для производства различных видов пищевой продукции, но особый интерес представляют реструктурированные продукты, близкие по своим свойствам к исходному сырью.

В результате реструктурирования из разрозненных фрагментов ткани, в том числе фарша, удается получить продукт с монолитной, сочной и нежной структурой. Использование технологий реструктурирования улучшает функционально - технологические свойства сырья, способствует расширению ассортимента, созданию продуктов управляемого химического состава, повышению рентабельности и эффективности производства.

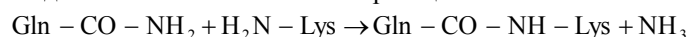
Перспективным направлением в технологии реструктурированных продуктов, является ферментативная сшивка (cross – links) полимерных макромолекул сырья, которая с успехом может быть реализована как на белковых, так и на углеводных субстратах.

Ферментативная сшивка макромолекул может происходить с участием ароматических групп, присутствующих в белках и углеводах или с участием определенных аминокислот, входящих в состав белка. Cross – links взаимодействие может быть результатом прямого ферментативного катализа или косвенного процесса, при котором фермент катализирует образование cross – links агентов, таких как перекись водорода, которая, в свою очередь способна окислять ак-

тивнющие фрагменты макромолекул с их последующей сшивкой.

В структуре белков выделяют несколько активных групп, принимающих участие в ферментных cross – links взаимодействиях. Это глутамин, лизин, тирозин и остатков цистеина. Среди полисахаридов, ферментативные cross – links взаимодействия отмечены для арабиноксиланов и пектинов.

Наиболее изученным способом ферментативного реструктурирования рыбного и мясного сырья является применение трансглутаминазы (ЕС 2.3.2.13). [1]. Этот фермент катализирует прямое образование ковалентных поперечных связей между белковыми цепочками (cross – links взаимодействие). Эти связи возникают в результате ацильного переноса между  $\gamma$  - карбоксиамидной группой глутаминового остатка белка или пептида (ацил - донор) и первичными аминогруппами разнообразных аминосоединений (ацил - акцептор), включая  $\epsilon$ -аминогруппу лизинового остатка пептида в соответствии со схемой реакции:

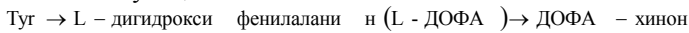


В результате связывания остатков глутамин и лизина пептидов или белков образуются высокомолекулярные соединения, содержащие  $\epsilon$ -( $\gamma$ -глутамил) - лизиновые внутри- и межмолекулярные изопептидные связи. Образование этих связей оказывает влияние на структуру и функциональные свойства белков [1, 2, 3, 4, 5, 6].

Трансглутаминазы присутствуют в различных твердых и жидких тканях сухопутных животных, рыб, птиц, беспозвоночных, земноводных, растений. Эти ферменты содержат клетки многих микроорганизмов. В организме трансглутаминазы участвуют в процессах свертывания крови, заживления ран, эпидермального ороговения и др. [1, 7]. Свойства трансглутаминаз существенно различаются в зависимости от источника получения. Так, из печени морской свинки получена  $\text{Ca}^{2+}$  зависимая трансглутаминаза с молекулярной массой около 75 кДа, а трансглутаминаза на основе культуры *Streptomyces mobaraensis* имеет молекулярную массу 38 кДа и не зависит от концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . Этот фермент имеет рН оптимум между 5 и 8, но проявляет существенные активность при рН 4...9. Фермент сохраняет полную активность в 40 °С в течение 10 минут. Тепловая инактивация наблюдается после нагрева, в течение нескольких минут при температуре 70 °С.[8, 9].

Кроме трансглутаминазы, прямой катализ ферментативного cross – links процесса, могут осуществлять различные оксидоредуктазы – тирозиназы, лакказы, пероксидазы, сульфгидрильные оксидазы. В этом случае cross – links процесс протекает по окислительному механизму.

Тирозиназа (ЕС 1.14.18.1) катализируют окисление свободного и пептид-связанного тирозина в соответствующие хиноны по схеме:



Образовавшиеся на каталитической стадии из пептид-связанного тирозина хиноны неферментативно реагируют со свободных сульфгидрильных и аминогруппами белков по механизму близкому к реакции меланоидирования с образованием тирозин-цистеин, тирозин-лизин и тирозин-тирозин межмолекулярных ковалентных связей [10, 11, 12].

Тирозиназа относится к группе медьсодержащих оксидоредуктаз. Она выделена из тканей растений и животных, клеток микроорганизмов [13]. Большинство известных тирозиназ проявляют рН оптимум в слабнокислой среде, но тирозиназы, выделенные из культур *Trichoderma reesei* и *Thermomicrobium gosseum* имеют значения рН оптимума в диапазоне 9...9,5. Тирозиназы, в основном, теряют свою активность в течение нескольких минут при температуре 70...90 °С [14, 15].

Еще одним возможным вариантом прямого катализа cross – links процесса является применение лакказы (ЕС 1.10.3.2) [16, 17]. Молекулярная масса лакказ различного происхождения колеблется между 40 и 100 кДа. Они содержат четыре атома меди в активном центре и использовать молекулярный кислород в качестве акцептора электронов. Лакказы имеют широкую субстратную специфичность. Они способны окислять различные фенолы, например дифенолы, полифенолы, ароматические амины, и даже некоторые неорганические соединения. Способность лакказ окислять фенолы предполагает их эффективность по отношению к растительным субстратам, содержащим полифенол - лигнин. Механизм собственно cross – links процесса, катализируемого лакказой, основан на взаимодействиях фенольных оксидрадикалов. Полученные в результате ферментативного окисления реакционноактивные радикалы неферментативно участвуют в межпечочных реакциях полимеризации, гидратации и диспропорционирования (дисмутации), создавая устойчивые высокомолекулярные структуры [18].

Лакказы выделены из растений и плесневых грибов, а также из некоторых видов бактерий и тканей насекомых. Большинство исследованных лакказ имеют рН оптимум в кислой области, но известны ферменты с рН оптимумом в нейтральных и щелочных зонах. [19, 20]. Термоустойчивость лакказ значительно различается, в зависимости от источника фермента. Грибковые лакказы стабильны при 30...60 °С, но быстро теряют свою активность при температуре выше 60 °С. Лакказы бактериального происхождения выделенные из культуры *Streptomyces lavendulae* со-

храняют свою активность 100 мин при 70 °С, а выделенные из культуры *Bacillus subtilis* - 112 минут при 80 °С [21, 22].

Пероксидазы также способны к прямому катализу cross – links процессов. Эти ферменты представляют различные группы оксидоредуктаз, которые используют перекись водорода в качестве акцептора электронов для окисления субстратов. В результате окисления, образуются внутрицепочные активные радикалы, которые неферментативно взаимодействуют с остатками лизина, тирозина или цистеина с созданием межпечочных ковалентных связей [23, 24].

Сульфгидрильные оксидазы (SOX) катализируют прямое cross – links взаимодействие по механизму окислительного формирования дисульфидных связей между двумя молекулами цистеина. Некоторые сульфгидрильные оксидазы относятся к глутатион оксидазам (GTOX, ЕС 1.8.3.3), другие к тиол оксидазам (ЕС 1.8.3.2). Глутатион оксидазы в процессе каталитического окисления цистеина восстанавливают молекулярный кислород до перекиси водорода, а тиоловые оксидазы до воды. Окисленные остатки цистеина неферментативно взаимодействуют с образованием внутри - и межпечочных дисульфидных связей [25, 26].

Косвенный механизм ферментативного cross – links процесса катализируется ферментами классов липоксигеназ (LOX, ЕС 1.13.11.12), глюкоза оксидаз (ЕС 1.1.3.4), гексоз оксидаз (ЕС 1.1.3.5). Во всех случаях ведущую роль играет каталитический синтез перекиси водорода, которая неферментативно создает активные свободные радикалы, которые в свою очередь рекомбинируют образуя как меж так и внутрицепочные ковалентные связи [27].

Промышленное применение ферментативного реструктурирования в пищевой промышленности началось в конце XX-го века с появления на рынке микробных трансклутаминаз производства компании Ajinomoto Co. Inc. (Япония), которая полностью контролирует рынок и доминирует в производстве этого ферментного препарата [1]. Технология промышленного получения микробной трансклутаминазы на основе культуры *Streptomyces mobaraensis* Ajinomoto Co. Inc, эффективно защищена серией патентов, которые пока обойти не удалось.

В тоже время перспективными для решения прикладных технологических задач являются малоисследованные методы управления активностью трансклутаминазы естественно присутствующей в тканях сырья, способы получения и применения других ферментов, катализирующих cross – links взаимодействия по прямой или косвенной схеме.

Поступила 11.2011

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1.Yokoyama K, Nio N and Kikuchi Y. Properties and applications of microbial transglutaminase., Appl. Microbiol. Biotechnol, 2004, 64, 447–454.
- 2.Zhu Y., Rinzena A., Tramper J. and Bol J. Microbial transglutaminase – a review of its production and application in food processing. Appl Microbiol Biotechnol, 1995, 44, 277–282
- 3.Motoki M. and Seguro K. Transglutaminase and its use for food processing, Trends Food Sci Technol, 1998, 9, 204–210.
- 4.Nielsen G. S., Petersen B. R. and Miller A. J. Impact of salt, phosphate and temperature on the effect of a transglutaminase (F XIIIa) on the texture of restructured meat, Meat Sci, 1995, 41, 293-299.
- 5.Nielsen P. M. Reactions and potential industrial applications of transglutaminase. Review of literature and patents, Food Biotechnol, 1995, 9(3), 119-156.
- 6.Kuraishi C., Sakamoto J., Yamazaki K., Sasa Y., Kuhara C. and Soeda T. Production of restructured meat using microbial transglutaminase without salt and cooking. J. Food Sci 1997, 62, 488–490, 515.
- 7.Griffin M., Casadio R. and Bergamini C. M. Transglutaminases: nature's biological glues, Biochem J., 2002, 368, 377–396.
- 8.Ando H., Adachi M., Umeda K., Matsuura A., Nonaka M., Uchio R., Tanaka H. and Motoki M. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms, Agric Biol Chem, 1989, 53, 2613–2617.

9. Pasternack R., Dorsch S., Otterbach J.T., Wolf S. and Fuchbauer H. L. Bacterial pro- transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense* – purification, characterization, and sequence of the zymogen, *Eur J Biochem*, 1998, 257, 570–576.
10. Ito M. and Oda. An organic solvent resistant tyrosinase from *Streptomyces* sp. REN-21: purification and characterization, *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, 64(2), 261–267.
11. Ito S., Kato T., Shinpo K. and Fujita K. Oxidation of tyrosine residues in proteins by tyrosinase, *Biochem J*, 1984, 222, 407–411.
12. Halaoui S., Asther M., Sigoillot J.-C., Hamdi M. and Lomascolo A. 'Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications', *J Appl Microbiol*, 2006, 100, 219–232.
13. Lerch K. *Neurospora* tyrosinase: structural, spectroscopic and catalytic properties, *Mol Cell Biochem*, 1983, 52(2), 125–138.
14. Zawistowski J., Biliaderis C. and Eskin M. Polyphenol oxidase, in Robinson D.S and Eskin M.N.A, *Oxidative Enzymes in Foods*, Elsevier, London, 1991 217–273
15. Selinheimo E., Saloheimo M., Ahola E., Westerholm-Parvinen A., Kalkkinen N., Buchert J. and Kruus K. Production and characterization of a secreted, C-terminally processed tyrosinase from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*, *FEBS J*, 2006, 273, 4322–4335.
16. Yamaguchi S (2000), Method for Cross-linking Protein by Using Enzyme, US Patent 6121013.
17. Mattinen M.-L., Kruus K., Buchert J., Nielsen J. H., Andersen H. J. and Steffensen C. L. Laccase-catalysed polymerization of tyrosine-containing peptides', *FEBS J*, 2005, 272, 3640–3650).
18. Hurston C. The structure and function of fungal laccases, *Microbiology*, 1994, 140, 19–26.
19. Xu F. Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition, *Biochemistry*, 1996, 35, 7608–7614.
20. Kiskinen L.-L., Vilkari L. and Kruus K. Purification and characterization of a novel laccase from the ascomyte *Melanocarpus albomyces*, *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 59, 198–204.
21. Suzuki T., Endo K., Ito M., Tsujibo H., Miyamoto K. and Inamori Y. A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: purification, characterization, nucleotide sequence, and expression, *Biosci Biotechnol Biochem*, 2003, 67, 2167–2175.
22. Martins L.O., Soares C.M., Pereira M.M., Teixeira M., Costa T., Jones G.H. and Henriques A.O. Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat, *J Biol Chem*, 2002, 277, 18849–18859.
23. Oudgenoeg G., Hilhorst R., Piersma S.R., Boeriu C.G., Gruppen H., Hessing M., Voragen A. and Laane C. Peroxidase-mediated cross-linking of a tyrosine-containing peptide with ferulic acid, *J Agric Food Chem*, 2001, 49, 2503–2510.
24. Matheis G. and Whitaker J. R. Modification of proteins by polyphenol oxidase and peroxidase and their products, *J Food Biochem*, 1984, 8, 137–162.
25. Kusakabe H., Kuninaka A. and Yoshino H. Purification and properties of a new using crosslinking enzymes to improve properties of food. Glutathione oxidase from *Penicillium* sp. K-6-5, *Agric Biol Chem*, 1982, 46, 2057–2067.
26. Aurbach G. and Jakoby W. The multiple functions of thiooxidase, *J Biol Chem*, 237, 1962, 565–568.
27. Li D.-C., Liu Z.-W. and Lu J. Purification and characterization of lipoxygenase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*, *Mycol Res*, 2001, 105, 190–194.

УДК 663.257.3:661.184.23 (043.3)

**ГЕОК В.Н., канд. техн. наук, доцент**

Южный филиал Национального университета биоресурсов и природопользования Украины  
«Крымский агротехнологический университет»

## **ВЛИЯНИЕ СПОСОБА ЭКСТРАГИРОВАНИЯ МЕЗГИ НА СОДЕРЖАНИЕ АЗОТИСТЫХ ВЕЩЕСТВ В КРАСНЫХ СТОЛОВЫХ ВИНМАТЕРИАЛАХ**

В статье представлены результаты исследований, которые показали, что термовинификация способствует снижению массовой концентрации общего и аминного азота, однако способ экстрагирования мезги необходимо выбирать с учётом дегустационной оценки для каждого сорта винограда отдельно. Установлено, что при переработке винограда сортов Саперави и Мерло лучше использовать брожение мезги до 50 % сахаров, а сортов Бастардо магарачский и Каберне Совиньон – нагревание до 40 °C с подбраживанием.

**Ключевые слова:** сусло, мезга, термовинификация, брожение мезги, общий азот, аминный азот, фенольные вещества.

The results of studying are showed, that termovinification helps reduce the mass concentration of total and amino-nitrogen, but a way to extract the pomace, should be chosen taking into account the tasting scores for each grape variety separately. It is established that in the processing of grapes Saperavi and Merlot is better to use up the pomace fermentation to 50 % of sugar and varieties Bastardo Magarach and Cabernet Sauvignon - heating to 40 °C with fermentation.

**Keywords:** mast, pomace, termovinification, pomace fermentation, general nitrogen, amino-nitrogen, and phenolic substances.

В настоящее время остаётся актуальной проблема стабилизации столовых полусухих и полусладких вин, которые относятся к категории биологически неустойчивых, т. е. склонных к забраживанию. Аммиачный и аминный азот является источником питания дрожжевых клеток, поэтому высокая его концентрация может способствовать забраживанию готового вина. Кроме того, повышенное содержание азотистых веществ в столовых винах может стать причиной появления в них окисленных мадерных тонов вследствие образования альдегидов при окислении аминокислот. По этим причинам учёными предложены различные способы снижения массовой концентрации азотистых веществ на стадии производства виноматериалов.

Значительного снижения содержания азотистых веществ удаётся добиться обработкой сусла перед брожением оклеивающими веществами, тепловой обработкой и внесением ферментных препаратов [1]. Наибольший эффект удаления общего, аминного и

белкового азота получен при оклейках сусла бентонитом, ПВП.

Большое влияние на содержание азотистых веществ в сусле имеет способ переработки винограда. В технологии многих столовых вин, особенно красных, предусматривается контакт сусла с мезгой для перехода в сусло из виноградной ягоды ароматических и фенольных веществ. При длительном контакте с твёрдой фазой в сусло переходит большое количество азотистых веществ. С другой стороны, белки адсорбируются на твёрдых поверхностях, образуя комплексы с нерастворимыми полисахаридами (например, с целлюлозой). При брожении мезги в технологии красных виноматериалов отмечается снижение азота [2].

Нагревание мезги, сусла и виноматериалов позволяет снизить содержание белкового и аминного азота. При нагревании происходит денатурация белка. В результате гидролиза белка и пептидов количество аминокислот может увеличиться. При нагревании изменяется состав аминокислот [3]. Аминный азот снижается в результате сахароаминных реакций, в результате которых происходит образование различных ароматических веществ и меланоидинов. Это приводит к появлению карамельных тонов и потемнению среды [4]. Внешение сернистой кислоты приостанавливает ход меланоидинообразования, защищая вино от появления карамельных тонов, но не прекращает образования промежуточных продуктов в начальный период сахароаминной реакции. Следовательно, расход аминокислот на эту реакцию не снижается, диоксид серы только препятствует течению реакции до конечных продуктов [4, 5]. При этом достаточно небольшой дозы сульфитации – 50 мг/дм<sup>3</sup> общей сернистой кислоты. При аэрации возможно окислительное дезаминирование аминокислот.