

## ВЛИЯНИЕ ПРОТЕИНАЗЫ ИЗ *BACILLUS MEGATERIUM* НА СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КОМПЛЕКСНЫХ БЕЛКОВЫХ СУБСТРАТОВ

*Ключевые слова:* ферментные препараты, функционально-технологические свойства, мясное сырье, спектрофотометрия.

*Изучено влияние протеиназы из *Bacillus megaterium* на спектрофотометрические характеристики отдельных групп хромофоров комплексных белковых субстратов из мясного сырья с повышенным содержанием соединительной ткани. Полученные результаты позволяют положительно оценить перспективу применения протеиназы в технологии мясных продуктов и возможности создания эффективных биотехнологий в отрасли.*

*Keywords:* enzymes, functional and technological properties, raw meat, spectrophotometry.

*The effect of protease from *Bacillus megaterium* by spectrophotometric characteristics of individual groups of chromophores complex protein substrates of meat raw materials with a high content of connective tissue. The obtained results allow us to assess the positive prospect of proteases in the technology of meat products and establishing effective biotechnology industry.*

### Введение

Рост производства и потребления мясопродуктов в нашей стране вызывает необходимость изыскания новых путей повышения технико-экономической эффективности производства и улучшения качества готовой продукции. В успешном решении этих задач значительная роль принадлежит интенсификации технологических процессов, использованию современных достижений технической биохимии и, в частности, применению протеолитических ферментных препаратов для обработки мяса [1].

За последние годы значительно расширились знания о свойствах и механизме действия протеолитических ферментов, а также о функциях протеаз у животных, растений и микроорганизмов. Установлено, что протеолиз играет не только ключевую роль в белковом обмене живых организмов, но и принимает активное участие в формировании и распаде биологически активных белков и пептидов – ферментов, гормонов, токсинов, нейропептидов и т.д. Особое значение приобретает изучение протеолитических ферментов микроорганизмов. Поиски и сравнительное изучение новых ферментов из различных источников важны в теоретическом аспекте, позволяют определить функционально важные элементы и структуры, а также способствуют развитию эволюционных представлений. С другой стороны, благодаря большому разнообразию свойств и возможности их получения в значительных количествах, протеолитические ферменты микроорганизмов нашли широкое применение в научных исследованиях, в различных отраслях народного хозяйства, в производстве моющих и лекарственных средств, кожевенной, микробиологической, пищевой и других отраслях промышленности [2].

В то же время разобщенность данных и отсутствие системного подхода к изучению действия протеиназ на животные ткани, закономерностей их действия на белковые структуры под влиянием технологических факторов, необходимость разработки

научных основ создания прогрессивных технологий потребовали расширения знаний по проблемам интенсификации процессов созревания с учетом современных представлений о характере протеолиза в мышечной ткани. Это позволит определить пути интенсификации технологических процессов, улучшения качества продуктов, рационального использования сырья, сокращения энергозатрат. Можно ожидать, что откроются новые возможности применения методов биотехнологии в мясной промышленности, в управлении процессами созревания и посола мясного сырья, что, несомненно, вызовет интерес представителей промышленности [3].

### Материалы и методы исследования

В качестве объектов исследования выступали: мясное сырье – говядина II сорта с содержанием соединительной ткани 20%, модельные фарши.

Для исследований был выбран ферментный препарат протеолитического действия микробного происхождения продуцент *Bacillus megaterium*. Препарат разрешен к применению в пищевой промышленности, в том числе и мясной.

Ферментный препарат характеризуется высоким уровнем специфической активности, низкой стоимостью и неограниченностью источников. Ферментный препарат имеет температурный оптимум действия при 37 °С. При дальнейшем увеличении температуры (более 40 °С) наступает быстрая инактивация протеазы вследствие термической денатурации белковой молекулы фермента.

Общую протеолитическую активность (ПА) ферментных препаратов определяли модифицированным методом Ансона с использованием в качестве субстрата казеина по Гаммерстену при pH 7,2 [4].

Спектрофотометрические исследования проводили методом Варбурга и Христиана, путем

измерения оптической плотности белкового раствора при 280 и 260 нм [5].

Содержание белка оценивали по методу Бредфорда [5].

### Результаты исследований и обсуждение

Основным критерием сортировки мяса, предназначенного для колбасного производства, в нашей стране является содержание в нем мышечной ткани как наиболее ценной в пищевом отношении. Соединительная ткань, особенно сухожилия, содержащие большое количество эластиновых трудноперевариваемых волокон, характеризуются низкой питательной ценностью. При жиловке выделяют в основном хрящи, крупные сухожилия и становую жилу.

Сухожилия составляют в среднем 2,4% к массе обваленной говядины. Удельный вес лимфоузлов в общем содержании соединительной ткани незначителен. В среднем из обваленного говяжьего мяса удаляется грубых сухожилий около 2,5% [6].

В данной работе на первоначальном этапе исследования, были изучены основные функционально-технологические характеристики мясного сырья 1 и 2 сортов. Оценивались показатели влагосодержания, влагосвязывающая и влагоудерживающая способности, выход после термической обработки и содержание водо- и солерастворимых белков. Результаты исследований сведены в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристика мясного сырья

Показатель	1 сорт	2 сорт
Влага, %	68,67	61,62
ВСС, %	59,17	42,62
ВУС, %	68,32	60,21
Выход, %	73,23	71,84

Полученные данные свидетельствуют, что мясо первого сорта обладает несколько большими уровнями связывания и удержания влаги, а также имеет больший выход после термической обработки. Тем не менее, имеющиеся в литературе данные [5] указывают, что продукты гидролиза коллагена, входящего в состав соединительной ткани - глютин и желатозы, обладают высокой влагосвязывающей и экструдированной способностью. Трансформация коллагена при тепловой обработке позволяет ему образовывать желейные структуры - тонкий трехмерный каркас, включающий в ячейки воду с растворенными в ней низкомолекулярными веществами. Таким образом, рассматриваемое сырье, несмотря на свои невысокие потребительские свойства и наличие в своем составе балластных веществ, не усваиваемых организмом человека, имеет потенциально высокие технологические свойства. К сожалению, современный уровень научных исследований не позволяет полноценно использовать данный вид сырья при выработке пищевой продукции. Данные обстоятельства предопределяют необходимость поиска

путей решения задачи более полного и рационального использования коллагенсодержащего сырья при производстве мясопродуктов.

Применение протеолитических ферментных препаратов при обработке мяса с низкими функционально-технологическими свойствами позволит скорректировать его качественные характеристики и увеличить выход готовой продукции за счет целенаправленного воздействия на белковые комплексы [6].

Перспективными источниками ферментов, производимых в промышленном масштабе, являются микроорганизмы-продуценты. Известно, что бактерии *Bacillus megaterium*, наряду с другими гидролазами, секретируют металлпротеиназу. Ранее нами была показана перспективность и целесообразность использования данной протеиназы в технологии мяса при выпуске эмульгированных мясопродуктов и цельномышечных изделий из мясного сырья с повышенным содержанием соединительной ткани. Поэтому представлялось интересным в данной работе изучить возможность его применения для обработки мясного сырья с повышенным содержанием соединительной ткани.

В ходе данной работы нами было изучено влияние микробной протеиназы из *Bacillus megaterium* на комплексные белковые субстраты, полученных на основе мясного сырья с повышенным содержанием соединительной ткани.

На рисунках 1-2 представлены данные, показывающие динамику изменения спектрофотометрических характеристик отдельных групп хромофоров под действием ферментативной обработки мясного сырья с повышенным содержанием соединительной ткани. Анализируя представленные данные необходимо отметить, что характер изменения хромофоров носил экстремальный характер с выраженными максимумами при 60-180 минутах обработки для гемовых групп, окси- деокси- и метмиоглобина. Вероятно, наблюдаемую картину можно объяснить протеолитическим действием протеиназы, под действием которой происходила частичная денатурация белковых комплексов мяса, образование высокомолекулярных пептидов, влияющих на спектрофотометрическую картину. Тем не менее, в дальнейшем все рассматриваемые хромофоры показали устойчивую тенденцию к снижению от первоначальных значений, что является следствием протеолитического воздействия. Косвенным подтверждением этого является накопление в системе свободных аминокислот, регистрируемых в диапазоне длин волн 210-280 нм во всех исследуемых белковых фракциях. Следует отметить, что наиболее интенсивно процесс накопления аминокислот протекал в водорастворимых белковых фракциях.

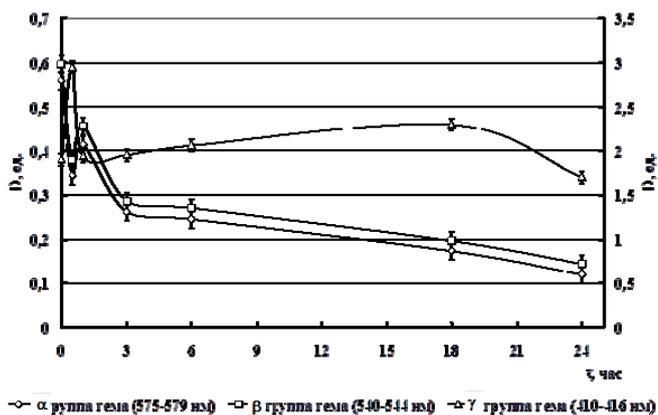


Рис. 1 – Динамика изменения хромофоров гемовых групп водорастворимых белков мяса в процессе ферментативной обработки

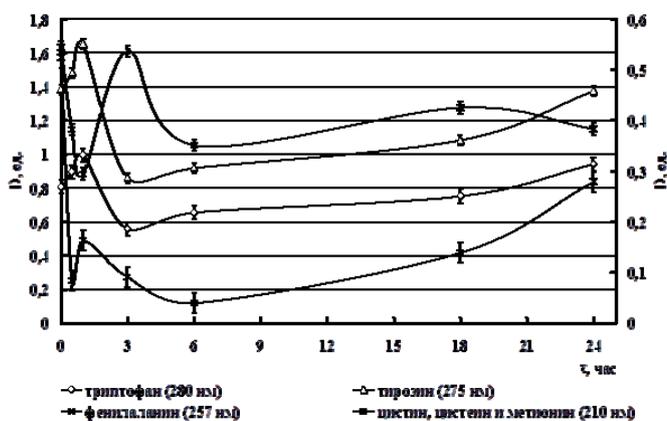


Рис. 2 – Динамика изменения свободных аминокислот водорастворимых белков мяса в процессе ферментативной обработки

В дальнейшем было изучено влияние ферментативной обработки на степень гидролиза белковых комплексов. Результаты исследования представлены на рисунках 3-4. Было исследовано влияние ферментативной обработки на содержание белков в опытных образцах модельных фаршевых систем, изучена динамика убыли субстрата под действием ферментативной обработки и оценена степень гидролиза белковых веществ рассматриваемых субстратов. На основании имеющихся данных можно сделать вывод, что ферментативная обработка приводит к снижению содержания белка во всех исследуемых фракциях. Наиболее интенсивно этот процесс протекал в первые 3-6 часов обработки достигая минимальных значений при времени обработки 3 часа. Необходимо отметить, что снижение концентрации белка более интенсивно происходило в водорастворимых белковых фракциях.

Анализируя имеющиеся данные можно говорить о том, что максимальная степень гидролиза белка отмечена при воздействии ферментного препарата на водорастворимые фракции мясного сырья.

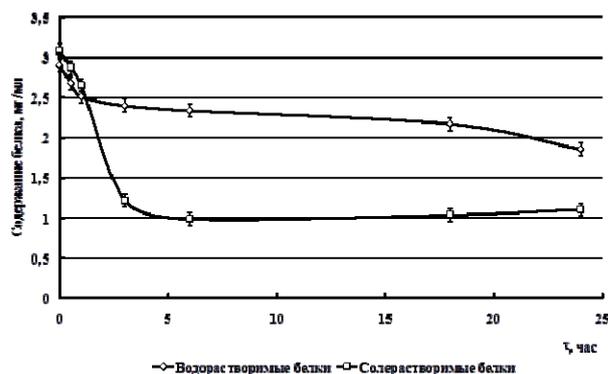


Рис. 3 - Динамика изменения содержания белка в процессе ферментативной обработки белковых фракций

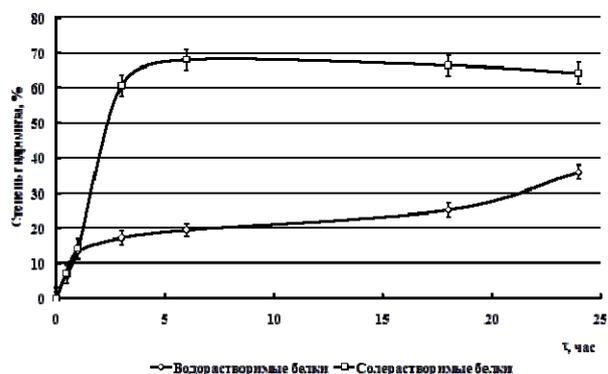


Рис. 4 - Динамика изменения степени гидролиза в процессе ферментативной обработки белковых фракций

Степень гидролиза для водорастворимых белков составила  $\approx 60\%$  к 3 часам обработки и  $67\%$  к 6 часам ферментализации и практически не меняясь в дальнейшем. Для солерастворимых белковых фракций этот показатель находился на уровне 20-35% при длительности экспозиции 6-12 часов. Данные различия в воздействии протеиназы на рассматриваемые субстраты вероятно объясняются их субстратной специфичностью и большим сродством протеиназы к белкам, входящим в состав водорастворимых белковых фракций (миоглобин, оксимиоглобин, миоальбумин, кельмодулин и др.). Наблюдаемые уровни гидролитического расщепления белков на макромолекулярном и микроструктурном уровне, вероятно, будут вызывать изменения, сходные с процессами созревания мясного сырья, отличаясь от естественных процессов автолиза степенью выраженности наблюдаемых явлений и скоростью их достижения.

На основании проведенных исследований можно говорить о том, что применение протеиназы из *Bacillus megaterium* целесообразно для обработки мясного сырья с повышенным содержанием соединительной ткани с целью повышения сортности сырья и перспективой его использования в технологии производства мясных продуктов в качестве основного компонента рецептуры.

Для данного вида сырья по результатам исследований определена рекомендованная длительность обработки 1-3 часа при дозировке препарата 0,03 %. Данный режим обработки соответствует длительности посола мясного сырья при выработке большинства видов колбасных изделий и не потребует существенного изменения технологического процесса.

Опираясь на проведенные исследования и суммируя полученные результаты можно прийти к заключению, что введение в рецептуру модельных фаршевых систем протеиназы из *Bacillus megaterium* представляется целесообразным и будет иметь выраженный технологический эффект, связанный прежде всего с увеличением показателей функционально-технологических свойств фаршевых систем и повышения пищевой и биологической ценности продукта за счет гидролитического действия вносимого ферментного препарата на компоненты соединительной ткани.

## Литература

1. В.Я. Пономарев, Э.Ш. Юнусов, Э.Ш. Шайхиева, Г.О. Ежкова, В.П. Коростелева, О.А. Решетник Вестник Казанского технологического университета, 22, 93-98, (2011)
2. Э.Ш. Юнусов, В.Я. Пономарев, К.Г. Валеулов, Г.О. Ежкова, В.П. Коростелева, О.А. Решетник Вестник Казанского технологического университета, 22, 88-92, (2011)
3. Пономарев В.Я. Биотехнологические основы применения препаратов микробиологического синтеза для обработки мясного сырья с пониженными функционально-технологическими свойствами / В.Я. Пономарев, Э.Ш. Юнусов, Г.О. Ежкова, О.А. Решетник - Казань: КГТУ, 2009. - 192 с.;
4. Adler Nisseg J. Enzimic hydrolysis of food protein 4211 Dan Kemi / Adler Nisseg J. - 1989 (1). - P. 19-25. - N67(2), P. 37-43.
5. В.Я. Пономарев, Э.Ш. Юнусов, Г.О. Ежкова, О.А. Решетник Вестник Казанского технологического университета, 1, 103-111 (2006)
6. В.Я. Пономарев, Э.Ш. Юнусов, Г.О. Ежкова, О.А. Решетник – Вестник казанского технологического университета 9, 590-594, (2010)

---

© В. Я. Пономарев – канд. техн. наук, доц. каф. технологии пищевых производств КНИТУ, v.y.ponomarev@gmail.com;  
Э. Ш. Юнусов - канд. биол. наук, доц. той же кафедры, ed.yunusov@gmail.com.