



ТЕХНОЛОГИЯ ПРОДОВОЛЬСТВЕННЫХ ПРОДУКТОВ

УДК 577.15.08

DOI: 10.36718/1819-4036-2020-9-177-184

Евгений Дмитриевич Рожнов

Бийский технологический институт – филиал Алтайского государственного технического университета им. И.И. Ползунова, доцент кафедры биотехнологии, кандидат технических наук, Россия, Алтайский край, Бийск, e-mail: red@bti.stcna.ru

Елена Витальевна Аверьянова

Бийский технологический институт – филиал Алтайского государственного технического университета им. И.И. Ползунова, доцент кафедры биотехнологии, кандидат химических наук, доцент, Россия, Алтайский край, Бийск, e-mail: lena@bti.stcna.ru

Марина Николаевна Школьникова

Бийский технологический институт – филиал Алтайского государственного технического университета им. И.И. Ползунова, профессор кафедры биотехнологии, доктор технических наук, доцент, Россия, Алтайский край, Бийск, e-mail: shkolnikova.m.n@mail.ru

Николай Иванович Селиванов

Красноярский государственный аграрный университет, заведующий кафедрой тракторов и автомобилей, доктор технических наук, профессор, Россия, Красноярск, e-mail: info@kgau.ru

ФЕРМЕНТОЛИЗ СЫРЬЯ КАК ФАКТОР ИНТЕНСИФИКАЦИИ ПРОЦЕССА ВЫДЕЛЕНИЯ ФЕНОЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ ОБЛЕПИХОВОГО ШРОТА

Цель исследования – изучение процесса гидролиза балластных веществ обезжиренного облепихового шрота ферментными препаратами и их мультиэнзимными композициями для увеличения выхода суммы фенольных веществ. Задачи исследования: изучить содержание фенольных веществ в ферментолизатах облепихового шрота, полученных обработкой «ЦеллоЛюкс А», Ultraflo, Ultraflo MAX, Brew Zyme BGX, Pectinex BE 3-L и их мультиэнзимными композициями; изучить влияние мультиэнзимных композиций на степень разрушения клеточной стенки облепихового шрота. Использовано пять коммерческих образцов ферментных препаратов, обладающих различными ферментными активностями, а также пять мультиэнзимных композиций на их основе. Физико-химические показатели определяли стандартными методами: массовая доля влаги – по ГОСТ 13979.1-68, массовая доля золы – по ГОСТ 13979.6-69, наличие металлических примесей и посторонних веществ – по ГОСТ 11246-96, содержание экстрактивных веществ – по ГОСТ 13979.2-94, редуцирующих сахаров – перманганатным методом по ГОСТ 8756.13-87, полифенольных соединений – по ГОСТ Р 55488-2013, пектиновых веществ – кальций-пектатным методом по методическим рекомендациям «Пектин: методы выделения и свойства» (Аверьянова Е.В., 2015), показатели микробиологической безопасности – по ГОСТ 10444.15-94, ГОСТ 31747-2012 и ГОСТ 10444.12-2013. На примере обезжиренного шрота облепихи показана эффективность использования ферментных препаратов целлюлолитического и глюканолитического действия, а также мультиэнзимных композиций, обладающих комбинированными целлюлолитической и глюканолитической, целлюлолитической и пектолитической активностями для извлечения фенольных веществ. Показано, что используемый обезжиренный облепиховый шрот по основным физико-химическим и микробиологическим показателям соответствует требованиям нормативной документации и может быть использован для производства функ-

циональных пищевых ингредиентов и фармацевтических субстанций. Доказано, что возникающий синергетический эффект при использовании мультиэнзимных композиций ферментных препаратов Brew Zyme BGX – Ultraflo XL и Brew Zyme BGX – Pectinex BE 3-L способствует более глубокому разрушению клеточной стенки частиц облепихового шрота, в результате чего происходит усиление диффузионных процессов при выделении фенольных веществ.

Ключевые слова: интенсификация, биотехнологический метод, ферментативный гидролиз, облепиховый шрот, фенольные вещества.

Evgeny D. Rozhnov

Biysk Technological Institute – Branch of I.I. Polzunov Altai State Technical University, associate professor of the chair of biotechnology, candidate of technical sciences, Russia, Altai Region, Biysk, e-mail: red@bti.stcna.ru

Elena V. Averyanova

Biysk Technological Institute – Branch of I.I. Polzunov Altai State Technical University, associate professor of the chair of biotechnology, candidate of chemical sciences, associate professor, Russia, Altai Region, Biysk, e-mail: lena@bti.stcna.ru

Marina N. Shkolnikova

Biysk Technological Institute – Branch of I.I. Polzunov Altai State Technical University, professor of the chair of biotechnology, doctor of technical sciences, associate professor, Russia, Altai Region, Biysk, e-mail: shkolnikova.m.n@mail.ru

Nikolay I. Selivanov

Krasnoyarsk State Agrarian University, head, chair of tractors and cars, doctor of technical sciences, professor, Russia, Krasnoyarsk, e-mail: info@kgau.ru

ENZYMOLYSIS OF RAW MATERIALS AS A FACTOR OF INTENSIFICATION OF THE PROCESS OF ISOLATION OF PHENOLIC SUBSTANCES OF SEA BUCKTHORN MEAL

The aim of the research is to study the process of hydrolysis of ballast substances of defatted sea buckthorn meal by enzyme preparations and their multienzyme compositions to increase the yield of the sum of phenolic substances. The research objectives are to study the content of phenolic substances in sea buckthorn meal fermentolysates obtained by processing CelloLux A, Ultraflo, Ultraflo MAX, Brew Zyme BGX, Pectinex BE 3-L and their multienzyme compositions; to study the effect of multienzyme compositions on the degree of destruction of the cell wall of sea buckthorn meal. Five commercial samples of enzyme preparations with various enzyme activities have been used, as well as five multienzyme compositions based on them. Physical and chemical indicators are determined by standard methods: mass fraction of moisture – according to State Standard 13979.1-68, mass fraction of ash – according to State Standard 13979.6-69, the presence of metallic impurities and foreign substances – according to State Standard 11246-96, the content of extractive substances – according to State Standard 13979.2-94, reducing sugars – by the permanganate method according to State Standard 8756.13-87, polyphenolic compounds – according to State Standard R 55488-2013, pectin substances – by the calcium-pectate method according to the guidelines "Pectin: isolation methods and properties" (Averyanova E.V., 2015), microbiological safety indicators – according to State Standard 10444.15-94, State Standard 31747-2012 and State Standard 10444.12-2013. Using the example of defatted sea buckthorn meal, the efficiency of using enzyme preparations of cellulolytic and glucanolytic action, as well as multienzyme compositions with combined cellulolytic and glucanolytic, cellulolytic and pectolytic activities for the extraction of phenolic substances, is shown. It is shown that the used fat-free sea buckthorn meal meets the requirements of regulatory documents in terms of basic physical and chemical and microbiological parameters and can be used for the production of functional food ingredients and pharmaceutical substances. It has been proved that the arising synergistic effect when using multienzyme compositions of enzyme preparations BrewZyme BGX – Ultraflo XL and BrewZyme BGX – Pectinex BE 3-L promotes deeper destruction of the cell wall of sea buckthorn meal particles, as a result of which diffusion processes are enhanced during the release of phenolic substances.

Keywords: intensification, biotechnological method, enzymatic hydrolysis, sea buckthorn meal, phenolic substances.

Введение. Одним из важных аспектов интенсификации технологии выделения целевых продуктов из различных биологических объектов, в том числе растительного сырья и продуктов его переработки, является использование высокоэффективных биотехнологических методов подготовки сырья [1–3]. Так, предобработка сырья ферментными препаратами, с одной стороны, может быть рассмотрена как способ интенсификации последующих стадий производства биологически активных веществ за счет повышения доступности сырья к дальнейшей переработке, с другой – применение ферментных препаратов позволяет освободить готовый продукт от части балластных веществ, существенно влияющих на выход целевого продукта, в том числе снижая его качественные характеристики и затрудняя очистку [4].

Некрахмалистые полисахариды, являясь компонентами растительных клеточных стенок, придают им прочность и обуславливают жесткость структуры. Применение ферментов, расщепляющих пектин, целлюлозу и гемицеллюлозу, неизбежно вызовет их деструкцию, приведет к необратимым нарушениям целостности клеточной стенки, ее дестабилизации и, как следствие, увеличению выхода экстрактивных веществ [5–7]. Кроме того, гидролиз полисахари-

дов сопровождается высвобождением связанных с ними фенольных веществ. Поэтому определяющее значение имеет выбор ферментных препаратов, под действием которых растительная ткань размягчается, клеточная проницаемость возрастает, выход экстракта увеличивается, за счет этого извлечение фенольных веществ из шрота облепихи крушиновидной (*Hippophae rhamnoides* L.) возможно реализовать с максимальной эффективностью.

Цель исследования: изучение процесса гидролиза балластных веществ обезжиренного облепихового шрота ферментными препаратами и их мультиэнзимными композициями для увеличения выхода суммы фенольных веществ.

Задача исследования: исследовать содержание фенольных веществ в ферментолизатах облепихового шрота, полученных обработкой «ЦеллоЛюкс А», Ultraflo, Ultraflo MAX, Brew Zyme BGX, Pectinex BE 3-L и их мультиэнзимными композициями; изучить влияние мультиэнзимных композиций на степень разрушения клеточной стенки облепихового шрота.

Объектами исследования являлись:

1. Ферментные препараты и их мультиэнзимные композиции (МЭК), характеристика которых приведена в таблице 1.

Таблица 1

Свойства используемых ферментных препаратов

Ферментный препарат	Механизм действия	Оптимальные условия для действия	
		Активная кислотность среды, ед. рН	Температура, °С
«ЦеллоЛюкс А» (ООО ПО «Сиббиофарм», Россия)	Гидролиз целлюлозы, β-глюкана, ксилана, глюкоамилазы	3,5–6,0	45–60
Ultraflo XL (Novozymes A/S, Дания)	Гидролиз целлюлозы и гемицеллюлозы	4,0–6,0	30–60
Ultraflo MAX (Novozymes A/S, Дания)	Гидролиз гемицеллюлозы, ксилана, целлюлозы, арабиноксиланов	4,0–6,0	50–60
Brew Zyme BGX (Polfa Tarchomin Pharmaceutical Works S.A., Польша)	Гидролиз β-глюканов, ксиланов и целлюлозы	5,0–5,5	50–55
Pectinex BE 3-L (Novozymes A/S, Дания)	Гидролиз пектина	4,5–6,0	50–60

2. Образцы обезжиренного облепихового шрота (рис. 1), полученные в результате реализации промышленной технологии выделения облепихового масла АО «Алтайвитамины» (2016–2018 гг.) [8], основные характеристики которых приведены в таблицах 2, 3.



Рис. 1. Внешний вид обезжиренного облепихового шрота

Таблица 2

Физико-химические показатели образцов облепихового шрота (n = 3)

Показатель, %	2016 г.	2017 г.	2018 г.	Среднее значение
Массовая доля влаги	5,1±0,4	5,2±0,4	5,0±0,4	5,1±0,4
Массовая доля золы	2,8±0,2	2,9±0,2	3,0±0,2	2,9±0,2
Металлопримеси и посторонние вещества	Не обнаружено			
Массовая доля органических кислот в пересчете на яблочную	3,1±0,4	3,2±0,4	3,3±0,4	3,2±0,4
Массовая доля сахаров	4,6±0,1	4,7±0,1	4,5±0,1	4,6±0,1
Массовая доля экстрактивных веществ	18,8±0,5	19,2±0,5	19,0±0,5	19,5±0,5
Массовая доля пектиновых веществ (протопектин)	1,39±0,04	1,30±0,04	1,36±0,04	1,35±0,04
Массовая доля суммы полифенолов	0,54±0,1	0,50±0,1	0,52±0,1	0,52±0,1

Таблица 3

Показатели микробиологической безопасности образцов облепихового шрота (n = 3)

Образец	КМАФАнМ, КОЕ/1 г	Дрожжи, КОЕ/г	Плесневые грибы, КОЕ/г	БГКП не допускаются в массе продукта, г
Норма по ТР ТС 021/2011 мг/кг, не более	5,0·10 ⁴	200	500	0,1
2016 г.	< 15	< 15	Не обнаружено	Не обнаружено
2017 г.	< 15	< 15		
2018 г.	< 15	< 15		

Методы исследования. Физико-химические показатели определяли стандартными методами: массовая доля влаги – по ГОСТ 13979.1-68, массовая доля золы – по ГОСТ 13979.6-69, наличие металлических примесей и посторонних веществ – по ГОСТ 11246-96, содержание экстрактивных веществ – по ГОСТ 13979.2-94, редуцирующих сахаров – перманганатным методом по ГОСТ 8756.13-87, полифенольных соединений – по ГОСТ Р 55488-2013, пектиновых веществ – кальций-пектатным методом по [9], показатели микробиологической безопасности – по ГОСТ 10444.15-94, ГОСТ 31747-2012 и ГОСТ 10444.12-2013.

Для проведения ферментативного гидролиза облепихового шрота навеску предварительно измельченного шрота помещали в емкость и приливали дистиллированную воду до достижения гидромодуля 1 : 20. Смесь нагревали до температуры 40 °С и при перемешивании добавляли ферментный препарат или МЭК в количестве 0,05 % к массе обрабатываемого шрота. Полу-

ченный субстрат термостатировали при температуре 55 °С в течение 1,5 ч. Образующийся гидролизат отфильтровывали под вакуумом и использовали для дальнейшего определения суммы фенольных веществ.

Для оценки эффективности обработки облепихового шрота ферментными препаратами и МЭК в гидролизатах определяли сумму фенольных веществ колориметрическим методом с использованием сканирующего спектрофотометра *Shimadzu UV 1800* (*Shimadzu*, Япония) и реактива Фолина-Чокальтеу [10].

Результаты исследования и их обсуждение. С учетом данных о составе полисахаридов облепихового шрота для проведения ферментализации были выбраны коммерческие ферментные препараты, обладающие пектолитической, целлюлазной, бета-глюканазной, ксиланазной, глюкоамилазной активностями. Дозировка ферментных препаратов составляла 0,05 % к массе обрабатываемого облепихового шрота. Результаты эксперимента представлены на рисунке 2.

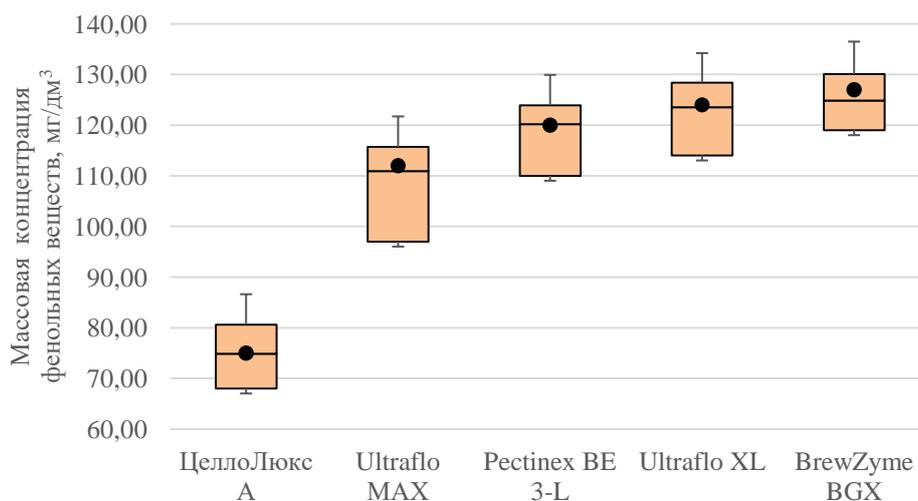


Рис. 2. Содержание суммы фенольных веществ в ферментализатах облепихового шрота в зависимости от используемого ферментного препарата

Так, усредненное значение массовой концентрации суммы фенольных веществ при использовании ферментных препаратов целлюлолитического и глюканолитического действия Ultraflo XL (штамм продуцент – *Humicola insolens*) и Brew Zyme BGX (штамм продуцент – *Trichoderma longibrachiatum*) в условиях эксперимента оказалось максимальным, так как указанные ферментные препараты характеризуются наличием в их составе активных компонентов целлюлолити-

ческой системы (комплекса эндо- и экзоферментов) и содержат β -глюканазу и набор пентозаназ, в том числе ксиланазу и арабаназу, гидролизующих слизистые вещества шрота.

Для интенсификации ферментализации и увеличения выхода фенольных веществ на следующем этапе исследования проводили ферментативный гидролиз облепихового шрота с применением МЭК. Результаты эксперимента представлены на рисунке 3.

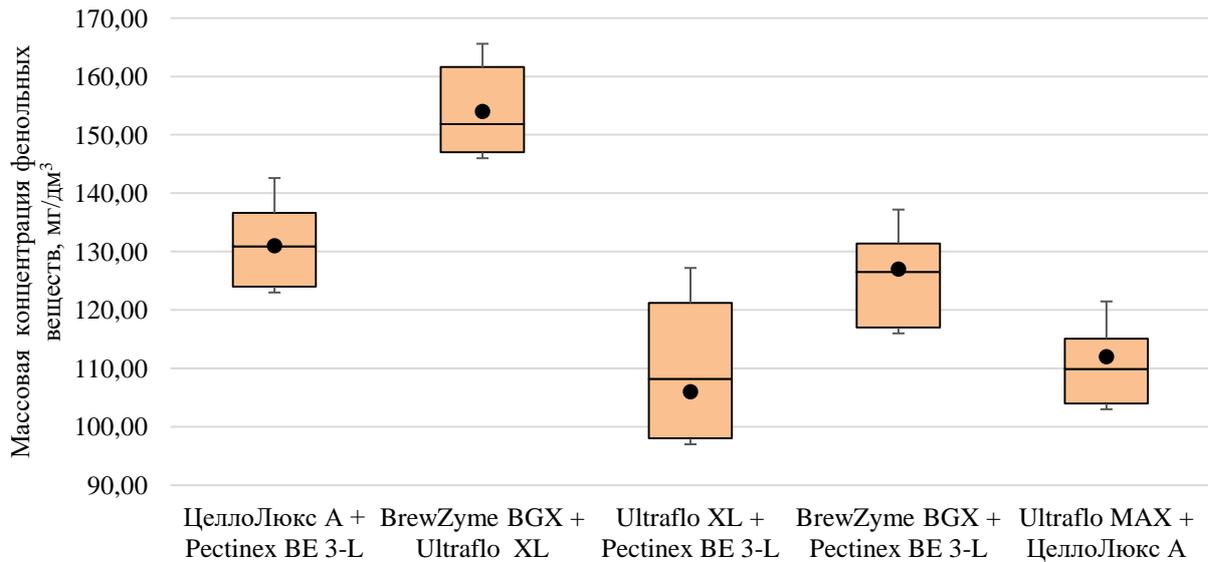
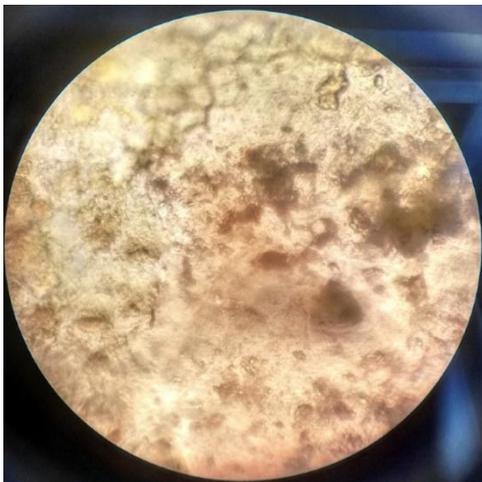


Рис. 3. Содержание суммы фенольных веществ в ферментолизатах облепихового шрота в зависимости от используемой МЭК

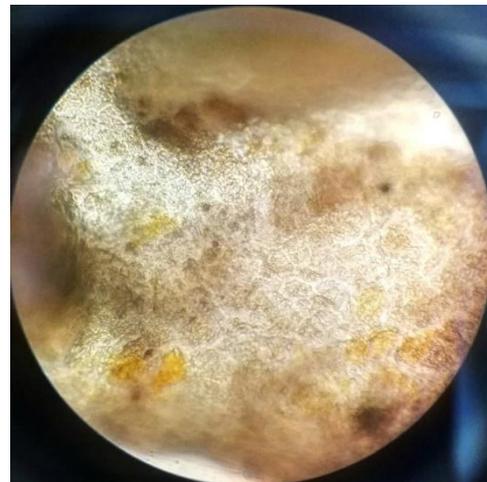
На данном этапе исследования наиболее удачными МЭК были BrewZymeBGX–UltrafloXL (1:1) и Brew Zyme BGX – Рестинек ВЕ 3-Л (1:1). В результате более эффективного ферментативного гидролиза полисахаридов облепихового шрота происходит интенсификация экстракции комплекса полифенолов за счет разрушения

клеточной стенки частичек шрота и увеличения движущей силы диффузионных процессов.

Для подтверждения гипотезы о глубоком разрушении клеточной стенки облепихового шрота дополнительно проводили прямое микроскопирование размоченных в капле глицерина частичек шрота до и после обработки МЭК Brew Zyme BGX – Ultraflo XL (1:1) (рис. 4).



а



б

Рис. 4. Микроскопический анализ облепихового шрота ($\times 600$ крат): а – до гидролиза; б – после гидролиза

Из рисунка 4 видно, что пористость клеточной стенки после обработки ферментными препаратами существенно увеличивается.

Заключение. Установлено, что максимальная концентрация суммы фенольных веществ в ферментолизатах облепихового шрота при использовании ферментных препаратов Ultraflo XL

и Brew Zyme BGX – 123,0 и 128,0 мг/дм³ соответственно, за счет наличия в их составе активных компонентов целлюлолитической системы, а также содержания β -глюканазы и пентозаназ, гидролизующих слизистые вещества шрота. За счет более полной и глубокой конверсии полисахаридов облепихового шрота ферментными препаратами в составе мультиэнзимных композиций наблюдается синергетический эффект, который проявляется во взаимном усилении их действия, выражающийся в интенсификации процесса разрушения клеточной стенки и облегчении последующей экстракции комплекса фенольных веществ из разрушенных клеток. Так, содержание суммы фенольных веществ в ферментализате облепихового шрота, обработанного мультиэнзимной композицией Brew Zyme BGX – Ultraflo XL (1:1) составило 153,0 мг/дм³, что превышает содержание суммы фенольных веществ в ферментализатах ферментных препаратов в 1,2–2,0 раза. При микроскопировании частичек шрота до и после обработки мультиэнзимной композицией Brew Zyme BGX – Ultraflo XL установлено, что пористость клеточной стенки после обработки ферментными препаратами существенно увеличивается, что способствует интенсификации диффузионных процессов. Таким образом, экспериментально доказано, что ферментативный гидролиз можно рассматривать как эффективный способ подготовки облепихового шрота к выделению фенольных веществ.

Литература

1. Hatti-Kaul R., Törnvall U., Gustafsson L., Börjesson P. (2007). Industrial biotechnology for the production of bio-based chemicals – a cradle-to-grave perspective. *Trends in Biotechnology*, 25(3), 119–124.
2. Chakraborty A., Sain M., Kortschot M. (2005). Cellulose microfibrils: A novel method of preparation using high shear refining and cryocrushing. *Holzforschung*, 59(1), 102–107.
3. Vieira F.R., de Andrade M.C.N. (2016). Optimization of substrate preparation for oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) cultivation by studying different raw materials and substrate preparation conditions (composting: phases I

- and II). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(11).
4. Румарева Л.В., Сербя Е.М., Соколова Е.Н. и др. Ферментные препараты и биокаталитические процессы в пищевой промышленности // Вопросы питания. 2017. № 5. С. 63–74.
5. Dongowski G., Sembries S. (2001). Effects of Commercial Pectolytic and Cellulolytic Enzyme Preparations on the Apple Cell Wall. *J. Agric. Food Chem*, 49(9), 4236–4242.
6. Fleurence J., Massiani L., Guyader O., Mabeau S. (1995). Use of enzymatic cell wall degradation for improvement of protein extraction from *Chondrus crispus*, *Gracilaria verrucosa* and *Palmaria palmata*. *Journal of Applied Phycology*, 7(4), 393–397.
7. Zhang D., VanFossen A.L., Pagano R.M., Johnson J.S., Parker M.H., Pan S. et al. (2011). Consolidated Pretreatment and Hydrolysis of Plant Biomass Expressing Cell Wall Degrading Enzymes. *BioEnergy Research*, 4(4), 276–286.
8. Elena V. Averyanova, Marina N. Shkolnikova, Evgeniy D. Rozhnov (2019). Prospects and Ways of Berries Oil Seed Meal. *Индустрия питания | Food Industry*, 4(2), 20–27. DOI: 10.29141/2500-1922-2019-4-2-3.
9. Аверьянова Е.В., Школьникова М.Н. Пектин: методы выделения и свойства: метод. рекомендации. Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2015. 42 с.
10. Granato D., Shahidi F., Wrolstad R., Kilmartin P., Melton L.D., Hidalgo F.J. et al. (2018). Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban in vitro screening methods? *FoodChemistry*, 264, 471–475.

Literatura

1. Hatti-Kaul R., Törnvall U., Gustafsson L., Börjesson P. (2007). Industrial biotechnology for the production of bio-based chemicals – a cradle-to-grave perspective. *Trends in Biotechnology*, 25(3), 119–124.
2. Chakraborty A., Sain M., Kortschot M. (2005). Cellulose microfibrils: A novel method of preparation using high shear refining and cryocrushing. *Holzforschung*, 59(1), 102–107.
3. Vieira F.R., de Andrade M.C.N. (2016). Optimization of substrate preparation for oyster

- mushroom (*Pleurotus ostreatus*) cultivation by studying different raw materials and substrate preparation conditions (composting: phases I and II). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(11).
4. *Rimareva L.V., Serba E.M., Sokolova E.N.* i dr. Fermentnye preparaty i biokataliticheskie processy v pishhevoj promyshlennosti // *Voprosy pitaniya*. 2017. № 5. S. 63–74.
 5. *Dongowski G., Sembries S.* (2001). Effects of Commercial Pectolytic and Cellulolytic Enzyme Preparations on the Apple Cell Wall. *J. Agric. Food Chem.*, 49(9), 4236–4242.
 6. *Fleurence J., Massiani L., Guyader O., Mabeau S.* (1995). Use of enzymatic cell wall degradation for improvement of protein extraction from *Chondrus crispus*, *Gracilaria verrucosa* and *Palmaria palmata*. *Journal of Applied Phycology*, 7(4), 393–397.
 7. *Zhang D., VanFossen A.L., Pagano R.M., Johnson J.S., Parker M.H., Pan S.* et al. (2011). Consolidated Pretreatment and Hydrolysis of Plant Biomass Expressing Cell Wall Degrading Enzymes. *BioEnergy Research*, 4(4), 276–286.
 8. *Elena V. Averyanova, Marina N. Shkolnikova, Evgeniy D. Rozhnov* (2019). Prospects and Ways of Berries Oil Seed Meal. *Industrija pitaniya | Food Industry*, 4(2), 20–27. DOI: 10.29141/2500-1922-2019-4-2-3.
 9. *Aver'janova E.V., Shkol'nikova M.N.* Pektin: metody vydelenija i svoystva: metod. rekomendacii. *Bijsk: Izd-vo Alt. gos. tehn. un-ta*, 2015. 42 s.
 10. *Granato D., Shahidi F., Wrolstad R., Kilmartin P., Melton L.D., Hidalgo F.J.* et al. (2018). Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban in vitro screening methods? *Food Chemistry*, 264, 471–475.

