

УДК 663.4:577.1

ББК 36.87

И-88

Сиюхов Хазрет Русланович, доктор технических наук, доцент, заведующий кафедрой технологии, машин и оборудования пищевых производств ФГБОУ ВО «Майкопский государственный технологический университет»; 385000, Республика Адыгея, г. Майкоп, ул. Первомайская, д. 191; e-mail: siukhov@mail.ru;

Мариненко Ольга Вячеславовна, кандидат технических наук, доцент кафедры технологии, машин и оборудования пищевых производств ФГБОУ ВО «Майкопский государственный технологический университет»; 385000, Республика Адыгея, г. Майкоп, ул. Первомайская, д. 191; e-mail: marinenko.olya2015@yandex.ru;

Цей Асланбий Русланович, магистрант 3 курса кафедры технологии, машин и оборудования пищевых производств ФГБОУ ВО «Майкопский государственный технологический университет»; 385000, Республика Адыгея, г. Майкоп, ул. Первомайская, д. 191; e-mail: Ceyaslan@mail.ru;

Гемба Александр Михайлович, магистрант 1 курса кафедры технологии, машин и оборудования пищевых производств ФГБОУ ВО «Майкопский государственный технологический университет»; 385000, Республика Адыгея, г. Майкоп, ул. Первомайская, д. 191; e-mail: makedon-28@bk.ru

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОВЫШЕНИЯ БЕЛКОВО-КОЛЛОИДНОЙ СТОЙКОСТИ ПИВА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ*

(рецензирована)

В статье представлены результаты изучения возможности получения и применения иммобилизованного комплексного стабилизатора для повышения коллоидной стойкости пива. Экспериментально установлены зона рН действия и зона действия температуры иммобилизованного ферментного препарата. Приведен результат эксперимента гидролиза высокомолекулярных полипептидов пива иммобилизованным Протосубтилином Г 10х. Дана оценка физико-химическим показателям исследуемого образца пива. Результаты исследований могут быть использованы для стабилизации пива, вина, соков и т.п.

***Ключевые слова:** пиво, иммобилизованные ферментные препараты, коллоидная стойкость, ковалентная связь, физико-химические показатели.*

Siyuhov Khazret Ruslanovich, Doctor of Technical Sciences, an associate professor, Head of the Department of Technology, Machines and Equipment for Food Production, FSBEI HE "Maikop State Technological University"; 385000, the Republic of Adygea, Maikop, 191 Pervomayskaya str., e-mail: siukhov@mail.ru;

* Исследование выполнено в рамках выполнения Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 гг.» по теме «Разработка технологий производства качественных и безопасных напитков функционального назначения с использованием биологически активных компонентов нетрадиционного растительного сырья Северо-Кавказского региона»; соглашение № 14.574.21.01.74.

Marinenko Olga Vyacheslavovna, Candidate of Technical Sciences, an associate professor of the Department of Technology, Machines and Equipment for Food Production, FSBEI HE "Maikop State Technological University"; 385000, the Republic of Adygea, Maikop, 191 Pervomayskaya str.; e-mail: marinencko.olya2015@yandex.ru;

Tsey Aslanbiy Ruslanovich, 3d year Master student of the Department of Technology, Machines and Equipment for Food Production, FSBEI HE «Maikop State Technological University»; 385000, the Republic of Adygea, Maikop, 191 Pervomayskaya str.; e-mail: Ceyaslan@mail.ru;

Gemba Alexander Mikhailovich, 1 year Master student of the Department of Technology, Machines and Equipment for Food Production, FSBEI HE «Maikop State Technological University»; 385000, the Republic of Adygea, Maikop, 191 Pervomayskaya str.; e-mail: makedon-28@bk.ru

INVESTIGATION OF IMPROVEMENT OF PROTEIN AND COLLOID RESISTANCE OF BEER USING IMMOBILIZED ENZYME PREPARATIONS

(reviewed)

The article presents the results of studying the possibility of obtaining and using an immobilized complex stabilizer to enhance the colloidal resistance of beer. The pH zones of action and temperature range of the immobilized enzyme preparation have been experimentally established. The result of the experiment of hydrolysis of high molecular beer polypeptides with immobilized G 10x Protosubtilin is given. The physicochemical parameters of the beer sample under study are evaluated. Research results can be used to stabilize beer, wine, juices, etc.

Key words: *beer, immobilized enzyme preparations, colloidal resistance, covalent bond, physicochemical parameters.*

Требования к качеству пива не исчерпываются прозрачностью, нормальным вкусом и хорошей пеной. Важнейшим показателем качества пива является его стойкость, т.е. время, в течение которого пиво, разлитое в бутылки, сохраняет прозрачность и нормальный вкус.

Проблема повышения белково-коллоидной стойкости в последние годы приобрела первостепенное значение в связи с резким увеличением выпуска бутылочного пива и применением стабилизации. Весьма перспективным направлением повышения коллоидной стойкости пива является применение комплексных стабилизаторов пива: иммобилизованных ферментных гидролитических препаратов и адсорбентов, способных многократно участвовать в технологическом процессе приготовления пива.

Пиво представляет собой сложную систему органических и неорганических кристаллоидов и коллоидов в слабом водно-спиртовом растворе. При выдержке достигается определенное равновесие этой системы. Большая часть составных частей пива находится в коллоидном состоянии (белки, декстрины, хмелевые смолы и др.). В виде отдельных ионов находятся в пиве минеральные соли и органические кислоты; адсорбируясь на поверхности молекул коллоидных веществ, они создают сложные комплексы, которые в силу изменения электрического заряда могут находиться в стабильном состоянии, либо выделяться из пива [1]. В этом отношении большое значение имеет создающаяся в пиве концентрация водородных ионов. Коллоидная и кристаллоидная система пива обуславливают его характерные особенности: вкус,

прозрачность, способность к пенообразованию, игристость. Для сохранения этих свойств необходимо, чтобы система находилась в стабильном состоянии [2].

Главную роль в процессе коллоидного помутнения ранее приписывали белкам [2], поэтому поиск стабилизации пива проводили в направлении изучения протеолитических ферментов.

Применение обычных растворимых ферментных препаратов выявляет их существенные недостатки: однократность их применения, нахождение их в готовом продукте, невозможность использования их в непрерывных процессах и остановки ферментативной реакции на нужной стадии.

На основании работ, проведенных по стабилизации пива в нашей стране и за рубежом [4, 5], можно сделать вывод, что самых эффективных результатов можно достичь, применяя в качестве стабилизаторов пива иммобилизованные ферментные препараты, гидролизующие высокомолекулярные белки и полисахариды в комплексе с адсорбентами, осаждающими полифенолы и антоцианогены. Однако для эффективности любых стабилизаторов и получения качественного пива с высокой стойкостью обязательным условием является строгое соблюдение технологии и санитарного режима производства [6].

В настоящее время широкое распространение получил способ фиксации ферментных препаратов ковалентной связью, благодаря широкому выбору носителей, связывающих агентов, многочисленности путей проведения иммобилизации [7]. Полученные комплексы фермент-носитель отличаются высокой стойкостью к рН среде, условиям растворителя, денатурации и микробному действию.

Для иммобилизации ферментов используются в основном высокоочищенные ферментные препараты, что значительно повышает их стоимость и усложняет технологию их получения.

Целью наших исследований стало изучение возможности иммобилизации ферментных препаратов, выпускаемых отечественными предприятиями без дополнительной очистки с сохранением стабильности и высокой степени ферментативной активности и на их основе возможности получения и применения иммобилизованного комплексного стабилизатора для повышения коллоидной стойкости пива.

Учитывая специфичность действия ферментов для проведения эксперимента использовался отечественный ферментный препарат Протосубтилин Г 10х и готовое фильтрованное пиво сорта "Белореченское" производства ООО «Белореченский пивоваренный завод», имеющее стандартные показатели.

Данные по иммобилизации Протосубтилина Г 10х приведены в таблице 1.

Из таблицы 1 видно, что при правильном подборе соотношений мономера сшивателя активности полученных препаратов составили 88-99 % от исходной. Набухший гель после хранения в течение 1 недели (4°C, рН – 3,5) терял 1% активности, потеря активности через 30 суток (в тех же условиях) составляла 4%.

Подтверждением способности ацилированного Протосубтилина Г 10х вступать в реакцию сополимеризации являются результаты определения скорости вымывания иммобилизованного ацилированного Протосубтилина Г10х (рис. 1).

Таблица 1 - Данные по иммобилизации ферментного препарата Протосубтилина Г 10х

№ примера	Количество ферментного пр-та	Суммарная активность препарата, ед./г.			Количество воды, мл.	Всего соотношение препарат: хлорангидрид	Количество хлорангидрида, г.	Количество гидрофильного мономера, г.	Количество бифункционального сплывателя, г.	Суммарная активность геля, ед./г.			Степень иммобилизации, % по активности		
		Протеолитическая	Амилоглитическая	Эндоглюконазная						Протеолитическая	Амилоглитическая	Эндоглюконазная	Протеолитическая	Амилоглитическая	Эндоглюконазная
1.	10	700	1500	7000	100	1:0,5	5 МХх	8 ААх	0,8 БИСх	679	1485	6720	97	99	96
2.	10	700	1500	7000	100	1:1	10 АХ	15 АА	1,5 БИС	574	1380	6300	82	92	90
3.	20	1400	3000	14000	100	1:0,5	10 АХ	10 АА	1,0 БИС	1372	2970	13160	98	99	94
4.	15	1050	2250	10500	100	1:0,67	10 АХ	10 АА	1,0 БИС	987	2160	10185	94	96	97
5.	15	1050	2250	10500	100	1:1	15 МХ	20 АА	2,0 БИС	609	1395	6700	58	62	64
6.	20	1400	3000	14000	100	1:1	20 МХ	30 ВП	3,0 ТГМ-3	1358	2820	12800	97	94	92
7.	20	1400	3000	14000	100	1:0,5	10 АХ	25 МА	2,5 БИС	1218	2730	12600	87	91	90
8.	20	1400	3000	14000	100	1:1	20 АХ	35 МА	3,5 ТГМ-13	672	1620	7840	48	51	56
9.	20	1400	3000	14000	100	1:1	20 АХ	30 АА	3,0 БИС	756	1710	11065	54	57	79
10.	10	700	1500	7000	100	1:1,5	15 АХ	40 АА	4,0 БИС	42	105	210	6	7	3

Условные обозначения: АХ - акрилолхлорид, МХ - метакрилолхлорид, АА - акриламид, МА - метакриламид, ВП - винилпирролидон, БИС - этиленбисакриламид, ТГМ-3 и ТГМ-13 - диэфиры метакриловой кислоты и этиленгликоля со степенью полимеризации 3 и 13.

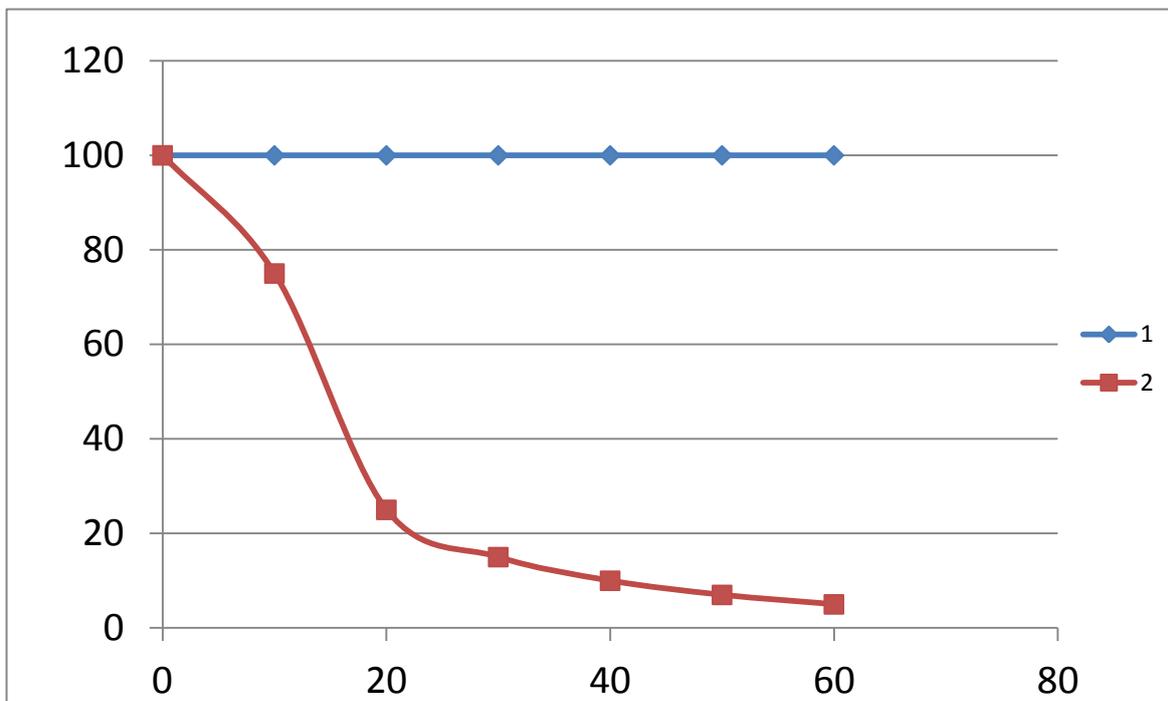


Рис. 1. Зависимость протеолитической активности Протосубтилина Г10х иммобилизованного в полиакриламидном геле от времени вымывания:

- 1 - Протосубтилин Г 10х ацилированный хлорангидридом акриловой кислоты;
 2 - Протосубтилин Г 10х ацилированный хлорангидридом уксусной кислоты

Из рисунка 1 видно, что Протосубтилин Г 10х ацилированный уксусной кислотой, не вступал в реакцию сополимеризации с акриламидом и вымывался из геля в течение 40мин. Ацилированный хлорангидридом акриловой кислоты Протосубтилин Г 10х, напротив, встраивался в матрицу полимерного геля и после многократного промывания геля почти полностью оставался в нем, сохраняя высокую активность.

Представляло, также, интерес выяснить, меняются ли свойства Протосубтилина Г 10х при таком способе иммобилизации. С этой целью исследовалось влияние рН и температуры на протеолитическую активность растворимого и иммобилизованного препарата Протосубтилин Г 10х.

Для определения оптимального значения рН-действия растворимой и иммобилизованной протеиназы в качестве субстрата использовали 2 %-й раствор гемоглобина со значением рН 2,8-2,9. Протеолитическую активность препаратов определяли модифицированным методом Ансона при 37°C.

Проведенные эксперименты показали, что растворимая протеиназа полностью инактивировалась при рН – 3,8, а при рН – 9,2 проявляла 76-80 % от максимальной активности. Максимальную активность фермент проявлял при рН – 7,0-7,2. Понижение рН от 5,4 до 4,4 резко снижало активность растворимой протеиназы – на 76-90 % от максимальной активности. Активность иммобилизованной протеиназы составляла 82-96 % от исходной активности.

Таким образом, рН-стабильность иммобилизованной протеиназы сравнительно мало зависит рН реакционной среды и имеет значительно широкий диапазон рН-действия (3,8-9,8), чем растворимая протеиназа.

Сделан вывод, что иммобилизация бактериальной протеиназы из *Bac. Subtilis* путем включения ее в полиакриламидный гель положительно сказывается на свойствах фермента, повышает его рН-стабильность, особенно в кислой зоне, что открывает перспективу широкого применения этого препарата для стабилизации пива, вина, соков и т.п.

Зависимость активности растворимого и иммобилизованного препарата Протосубтилина Г 10х от температуры определяли по обычной методике (2 %-ый гемоглобин), изменяя температуру инкубационной смеси от 20°C до 80°C. Исследования показали, что у иммобилизованного препарата Протосубтилин Г 10х наблюдалось расширение зоны температурного оптимума в сторону более высоких температур на 20°C

Таким образом, введение в молекулу фермента ненасыщенной С = С – связи позволяет осуществлять ковалентное связывание фермента с полимерными носителями непосредственно на стадии синтеза последнего, с получением иммобилизованного препарата Протосубтилин Г 10х с высокой степенью сохранения ферментативной активности и стабильности (86-100 %).

Изучен гидролиз высокомолекулярных полипептидов пива иммобилизованным Протосубтилин Г 10х.

Ферментативный гидролиз высокомолекулярных полипептидов проводили в объеме готового фильтрованного пива сорта "Белореченского" при 30°C и постоянном перемешивании в течение 30 минут на термостатируемой качалке. Дозу равновесно набухшего иммобилизованного препарата варьировали от 0,005 г до 2,0 г на 100 мл пива.

Обработанное пиво декантировали и определяли в нем таниновый показатель и высокомолекулярную белковую фракцию А по Лундину. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 2.

Из таблицы 2 следует, что таниновый показатель и высокомолекулярная фракция А снижаются с повышением дозы препарата до 0,5 г на 0,1 литр пива. При дальнейшем повышении дозы вносимого иммобилизованного фермента таниновый показатель и фракция А по Лундину не снижаются и остаются на том же уровне.

Согласно экспериментальным данным оптимальной дозой для гидролиза высокомолекулярных полипептидов иммобилизованным ферментным препаратом Протосубтилин Г 10х является 0,5 г на 0,1 литр пива, или 500 г на 1гл пива.

Таблица 2 - Изменение танинового показателя и высокомолекулярной белковой фракции А от дозы иммобилизованного препарата Протосубтилина Г 10х

Доза равновесно набухшего иммобилизованного препарата на 100 мл пива		Таниновый показатель; опт. плотн.	Снижение танинового показателя, %	Высокомолекулярная фракция А по Лундину, мг./100 мл	Снижение фракции А, %
Г	ПС ед. акт.				
1	2	3	4	5	6
контроль	0	0,576	-	22,50	-
0,005	0,013	0,576	-	22,50	-
0,01	0,026	0,560	2,8	21,92	2,6

0,03	0,078	0,532	7,4	20,91	7,3
0,05	0,13	0,560	2,8	21,92	2,6
0,1	0,26	0,520	9,7	20,43	9,4
0,2	0,52	0,501	13,1	19,78	12,5
0,3	0,78	0,430	25,4	17,21	23,5
0,4	1,0	0,380	34,1	15,54	30,9
0,5	1,3	0,305	47,1	12,68	43,7
0,6	1,5	0,285	50,6	11,90	47,1
0,7	1,8	0,242	58,0	10,68	52,5
1,0	2,6	0,230	59,1	10,21	54,6
2,0	5,2	0,225	59,4	9,82	56,4

Исследования действие иммобилизованного препарата Протосубтилина Г 10х в зависимости от температуры и времени стабилизации проводили при обработке в объеме готового фильтрованного пива сорта "Белореченское" равновесно набухшим иммобилизованным препаратом Протосубтилин Г 10х в дозе 0,5 г на 100 мл пива при постоянном перемешивании на термостатируемой качалке. Температурный интервал ферментативного гидролиза высокомолекулярных пептидов варьировали от 1°C до 60°C.

Время гидролиза – 5, 15, 30, 60 мин., 3, 12, 24, 48 часов. Сводные данные проведенных исследований приведены в таблице 3.

Как видно из таблицы 3, гидролиз высокомолекулярных полипептидов иммобилизованным препаратом Протосубтилином Г 10х при 30°C достигается за 15 мин., при 40-60°C – за 5мин. При дальнейшем увеличении времени обработки существенного изменения танинового показателя и высокомолекулярной белковой фракции А по Лундину не происходит. Обработка пива стабилизатором при изменении на 1°C удлиняется до 24-48часов.

Таблица 3 - Действие иммобилизованного препарата Протосубтилина Г 10х на высокомолекулярные полипептиды в зависимости от температуры и времени стабилизации

Время обработки	Таниновый показатель, оптическая плотность						Высокомолекулярная фракция А, мг./100 мл.					
	Температура, °С											
	1	10	30	40	50	60	1	10	30	40	50	60
Контроль	0,510						20,11					
5 мин	0,512	0,510	0,380	0,280	0,250	0,220	20,18	20,11	15,58	11,76	10,68	9,60
15 мин	0,510	0,500	0,265	0,242	0,215	0,240	20,11	19,75	11,28	10,68	9,80	10,6
30 мин	0,470	0,510	0,280	0,230	0,249	0,205	18,66	20,11	11,76	10,21	11,30	9,30
60 мин	0,430	0,428	0,267	0,254	0,210	0,215	17,21	17,12	11,30	10,82	9,45	9,80

3 час.	0,41 0	0,43 2	0,28 0	0,24 0	0,28 0	0,38 0	16,4 8	17,2 6	11,7 6	10,4 4	10,2 1	15,6
12 час.	0,38 0	0,31 5	0,24 2	0,21 0	0,28 6	0,31 5	15,6 0	12,2 2	10,4 4	9,45	11,8 2	12,3
24 час.	0,30 5	0,28 7	0,23 5	0,19 8	0,20 5	0,28 6	12,6 8	11,9 0	10,1 2	8,80	9,30	11,9
48 час.	0,28 0	0,24 2	0,21 6	0,23 0	0,18 0	0,30 0	11,8 2	10,4 0	9,51	10,2 1	8,15	12,6

Физико-химические показатели пива – действительный экстракт, алкоголь, рН, кислотность, цветность, пеностойкость и другие показатели [8] остались на уровне контроля. Стойкость пастеризованного пива при этом повысилась до 91 суток (табл. 4).

Таблица 4 - Действие иммобилизованного препарата Протосубтилина Г 10х на физико-химические показатели пива "Белореченского".

Показатели	Контроль	Пиво, обработанное стабилизатором
Действительный экстракт, %	5,72	5,66
Алкоголь, %	3,64	3,67
рН	4,42	4,4
Кислотность, мл 1н. N аОН	2,52	2,55
Азот фракции А по Лундину, мг/100 мл	17,21	10,20
Снижение, %	-	40,73
Вязкость, Мпа	1,6234	1,5438
Снижение, %	-	2,1
Цветность, мл. 0,1н.	1,1	1,11
Таниновый показатель, опт. плотн.	0,487	0,236
Предел осаждения сульфатом аммония, мл/100 мл	7,2	11,4
Тест 2/1, 40°/0°, ед. ЕВС	4,2	2,1
Пеностойкость, мин.	5,0	5,0
Стойкость, сутки	30	91

Полученные экспериментальные данные показали возможность иммобилизации ферментного препарата Протосубтилина Г 10х путем ковалентного связывания в гель.

Установлено, что зона рН действия иммобилизованного Протосубтилина Г 10х сдвигается как в щелочную, так и кислую сторону (3,8-9,8).

Определено, что зона действия температуры ферментного препарата расширяется в сторону увеличения температуры на 20°С.

Исследовано, что при обработке пива иммобилизованным препаратом Протосубтилином Г10х в дозе 500-600 г на 1 гл высокомолекулярная белковая фракция А снижается на 40%.

Все остальные физико-химические показатели пива остаются на уровне контроля. Стойкость пастеризованного пива при этом повышается до 91 суток.

Таким образом, в результате проведенных исследований, можно сделать вывод, что иммобилизованные ферментные препараты создают возможность для реализации совмещенных процессов в пивоварении, упрощения аппаратного оформления, а также более широкого внедрения средств автоматизации и повышение производительности труда.

Литература:

1. Булгаков Н.И. Биохимия солода и пива. Москва: Пищ. пром-сть, 1976. 358 с.
2. Шустер (Вайноруртер), Нарцисс Л. Пивоварение / пер. А.М. Калашниковой; под ред. И.М. Трагевой. Москва: Пищ. пром-сть, 1980. 503 с.
3. Suomalainin H., Lentonen M. The production of arom components by yeast // *Jouz. Inst Brew.* 1979. №3. P. 149-156.
4. Перечень коммерческих стабилизаторов пива // *Brauwelt.* 1972. №38. С. 773-798.
5. Луничева Т.Н., Михайлова Т.Н. Новые препараты для пивоваренной и безалкогольной промышленности. Вып. 3. Москва: Пищепром, 1981. С. 16-17.
6. Цей А.Р., Мариненко О.В. Способы оценки коллоидной стойкости: материалы XXXIV Недели науки МГТУ: XXX Всероссийская научно-практическая конференция «Образование – наука – технологии». Майкоп: Кучеренко В.О., 2017. С. 124-130.
7. Основы биохимии. Том 1 / Уайт А. [и др.], пер. с англ. под ред. акад. Ю.А. Овчинникова. Москва: Мир, 1981. 532 с.
8. Мальцев П.М. Химико-технологический контроль производства пива и солода. Москва: Пищ. пром-сть, 1976. 446 с.
9. Косминский Г.И. Технология солода, пива и безалкогольных напитков: лабораторный практикум по технохимическому контролю производства. Минск: Дизайн ПРО, 1998. 351 с.

Literature:

1. *Bulgakov N.I. Biochemistry of malt and beer. Moscow: Food industry, 1976. 358 p.*
2. *Schuster (Vainorurter), Narcissus L. Brewing / transl. by A.M. Kalashnikova; ed. by I.M. Trageva. Moscow: Food industry, 1980. 503 p.*
3. *Suomalainin H., Lentonen M. The production of aromatic components by yeast // Jouz. Inst Brew. 1979. No. 3. P. 149-156.*
4. *List of commercial beer stabilizers // Brauwelt. 1972. No. 38. P. 773-798.*
5. *Lunicheva T.N., Mikhailova T.N. New preparations for brewing and nonalcoholic industry. Issue 3. Moscow: Pishcheprom, 1981. P. 16-17.*
6. *Tsey A.R., Marinenko O.V. Methods for assessing colloidal resistance: materials of the XXXIV Science Week of MSTU: XXX All-Russian Scientific and Practical Conference “Education - Science – Technologies”. Maikop: Kucherenko V.O., 2017. P. 124-130.*
7. *Fundamentals of biochemistry. Volume 1 / White A. [and others], trans. from English under acad. Yu.A. Ovchinnikov’s ed. Moscow: Mir, 1981. 532 p.*
8. *Maltsev P.M. Chemical and technological control of beer and malt production. Moscow: Food industry, 1976. 446 p.*
9. *Kosminsky G.I. Technology of malt, beer and non-alcoholic beverages: laboratory workshop on technochemical production control. Minsk: Design PRO, 1998. 351 p.*