

**ОДЕСЬКА ДЕРЖАВНА АКАДЕМІЯ
ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

Коваленко Олексій Володимирович



УДК 664.292: 557.15: 635.64

**ТЕХНОЛОГІЯ ПРЕПАРАТУ
ПЕКТИНМЕТИЛЕСТЕРАЗИ ТОМАТІВ**

03.00.20. - біотехнологія

**автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата технічних наук**

Одеса-1997

602.4



Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі технології консервування Одеської державної академії харчових технологій Міністерства України.

Науковий керівник: доктор технічних наук, професор **Безусов Анатолій Тимофійович**, завідувач кафедри технології консервування Одеської державної академії харчових технологій

Офіційні опоненти:

-доктор технічних наук, професор **Леонід Вікторович Капрельянц**, Одеська державна академія харчових технологій, зав. кафедрою біохімії та мікробіології;

-кандидат хімічних наук, старший науковий співробітник **Севастьянов Олег Всеволодович**, Фізико-хімічний інститут національної академії наук України ім. О.В.Богатського.

Провідна установа: **Український державний університет харчових технологій** Міністерства України, м. Київ.

Захист відбудеться 26 листопада 1997р. о 10³⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 05.16.03 при Одеській державній академії харчових технологій.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Одеської державної академії харчових технологій. Україна, м. Одеса, вул. Канатна 112.

Автореферат розісланий 25 жовтня 1997р

Вчений секретар спеціалізованої вченої ради

Крестинков І.С.

ТВ 1
Актуальність теми:

Проблеми підвищення ефективності використання сировини у переробчих галузях агропромислового комплексу, підвищення якості, харчової цінності, поліпшення смаку та розширення асортименту пов'язані зі створенням прогресивних технологій, що базуються на передових наукових методах. Значні перспективи для їх розширення відкриває біотехнологія, яка реалізується у вигляді цілеспрямованого використання ферментних систем.

Найбільш потрібними для промисловості поряд із аміло- та протеолітичними є ферменти пектолітичного комплексу.

Інтерес до останніх зумовлений дуже широким використанням пектинових речовин, необхідність у яких має стабільну тенденцію до підвищення. Основними споживачами пектину є харчова (консервні виробы, препарати для йогурту, кондитерські виробы) та медична промисловість. Як перша, так і друга використовують пектини з різним ступенем етеріфікації з метою структурування продукту, надання йому в'язкості, стабілізації емульсій, утворення водорозчинних оболонок. В медичній промисловості використовують також протидіарейний та детоксикаційний ефекти. Перехідну сферу складають продукти лікувального та лікувально-профілактичного харчування, у виробництві яких пектин займає одну з провідних позицій.

Каталітичний ефект пектолітичних ферментів широко використовується при виробництві плодово-ягідних соків. Зокрема під їх впливом збільшується вихід соку та відбувається його освітлення.

Під час ферментації виноматеріалів відбувається додаткове (до 20%) добування ароматичних речовин із оболонок плодів винограду, збільшується вміст екстрактивних, дубильних речовин та барвників, ферментна обробка позитивно впливає і на смакові якості вина.

В залежності від ступеню метоксилювання пектинових речовин пектолітичні препарати, що призначені для їх розщеплення, повинні мати різне співвідношення активностей пектинметилестерази і полігалактуронази. Під дією окремих ферментів стає можливим здійснення певного типу розщеплення пектинових речовин.

В промислових пектолітичних ферментних комплексах, що існують, переважає полігалактуроназа. Вміст пектинметилесте-

рази, як і її активність, в цих комплексах незначні. Препарати пектинметилестерази промисловістю не виробляються, а в кращих вітчизняних зразках пектолітичних комплексів активність пектинметилестерази не перевищує 200 Од/г. При введенні ферментного препарату мікробного походження у поліфенолвмістну сировину активність пектинметилестерази зменшується і конверсія пектину здійснюється під дією полігалактуронази.

Саме тому арсенал методів отримання цільових високомолекулярних пектинів із зниженим ступенем етерифікації репрезентований одним методом – гідролізом за допомогою гетерогенного кислотного каталізу.

Наведені аргументи обумовлюють актуальність дисертаційної роботи.

Зв'язок роботи з науковими програмами. Робота виконувалась відповідно до напрямку наукових досліджень ОДАХТ "Створення нових технологічних процесів для харчової та зернопереробчої галузей агропромислового комплексу України", програми 2/94-П за № держреєстрації 0194-U35338 "Розробка біотехнологічних процесів одержання підсолджуючих і біологічно активних речовин на основі вуглеводів", програми 2/97-П за № держреєстрації 0197U016054 "Розробка наукових основ і технологій виробництва харчових речовин та функціональних продуктів харчування на основі біотехнологічних методів переробки рослинної сировини, біомаси мікроорганізмів та екзометаболітів".

Мета та задачі дослідження. Метою цієї роботи було отримання високоактивного препарату з домінуючою активністю пектинметилестерази, а також розробка технології його виробництва та використання.

Згідно зі сформульованою метою було визначено такі основні задачі дослідження:

- дослідити фруктово-овочеву сировину України з метою виявлення у ній активності поліметилестерази;
- конкретизувати тип сировини та етап її розвитку, на якому цей фермент має найбільшу активність;
- розробити технологію виділення препарату пектинметилестерази з конкретного рослинного джерела;
- здійснити апробацію розробленої технології в умовах виробництва;

–дати характеристику фізико-хімічних властивостей виділеного препарату пектинметилестерази;

–визначити спектр ферментних активностей препарату;

–розробити технологію деетерифікації пектину у ізолюванному стані, а також у складі напівфабрикатів за допомогою виділеного препарату пектинметилестерази.

Наукова новизна одержаних результатів. Відібрано рослинне джерело виділення препарату пектинметилестерази КФ (3.1.1.11.);

–вперше для виділення пектинметилестерази запропоновано процес, що базується на аутокаталітичному руйнуванні колоїдної системи та супроводжується самоконцентруванням ферментів у фазі осаду. Метод дозволяє отримати препарат з активностями 4500 Од/г – пектинметилестерази і 36 Од/г – полігалактуронази. Досягнутий рівень активності пектинметилестерази значно перевищує такий у препаратів, що виробляються промисловістю;

–вивчено властивості та характеристики препарату;

–розроблено схему та умови очистки пектинметилестерази препарату томатів з використанням аніонообмінної колонки моно-Q HR 5/5 в умовах високошвидкісної рідинної хроматографії.

Практичне значення одержаних результатів. Розроблено технічні умови на препарат пектинметил-естерази томатів та технологічну схему його виробництва;

–запропоновані технологічні процеси та їх режими дозволяють забезпечити поточний характер виробництва, максимально автоматизувати процеси управління, використовуючи для цього технологічне обладнання, яке серійно випускається вітчизняною машинобудівною промисловістю;

–апробацію технології було здійснено на Іллічівському консервному заводі. У виробничих умовах отримано ферментний препарат з виходом 20,1 % від сухої речовини та активністю пектинметилестерази 4320,6 Од/г.;

–розроблено технологічні схеми використання препарату пектинметилестерази томатів для виробництва пектину із заданим ступенем етерифікації, освітлення яблучного соку та отримання оригінальних консервів.

Особистий внесок здобувача. Автор безпосередньо планував експеримент, здійснював наукові дослідження,

інтерпретував та узагальнював отримані результати, приймав участь в обговоренні запропонованих концепцій та виступав на конференціях.

Апробація роботи. Основні результати досліджень доповідались на: 55-ій науковій конференції Одеської державної академії харчових технологій (ОДАХТ) (Одеса 11-14 квітня 1995р.), міжнародній науково-практичній конференції (Полтава 24-25 травня 1995 р.), міжнародній науково-технічній конференції "Пища. Экология. Человек" (Москва, 4-6 грудня 1995р.), 56-ій науковій конференції ОДАХТ (Одеса 1996 р).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано три друковані роботи у виданнях за фахом, одна стаття ще друкується, інформаційний листок № 024-96 (УДК 664.8), подано заявку № 96072935 від 22.07.96. на реєстрацію патенту України на винахід.

Структура та обсяг роботи. Дисертація складається із введення, шести розділів, основних висновків, списку цитованої літератури з 169 джерел та додатків. Робота викладена на 149 сторінках машинопису, ілюстрована 35 малюнками та 16 таблицями.

На захист виносяться:

- обґрунтування доцільності використання томатів сорту "Машинный" для виділення препарату пектинметилестерази;
- аутокаталітичне руйнування колоїдної системи як метод виділення препарату пектинметилестерази сорту "Машинный";
- технологія отримання препарату пектинметилестерази;
- технологічні схеми використання препарату для виробництва пектину із заданим ступенем етерифікації, освітлення яблучного соку та отримання оригінальних консервів.

ЗМІСТ РОБОТИ

У вступі обґрунтовано актуальність роботи.

У першому розділі на основі аналізу сучасних знань про пектинові речовини, методи їх виробництва, галузі використання, особливості отримання та використання низькоетерифікованих форм пектину, а також розгляду даних про пектинрозщеплюючі ферменти, їх джерела, способи виділення, фізико-хімічні характеристики та методи очистки, використання для конверсії пектину, показано принципова можливість виділення

високоактивного препарату пектинметилестерази з рослиної сировини та його використання для деетерифікації пектину. Сформульовано мету та завдання дослідження.

У другому розділі "Матеріали та методи дослідження" описано об'єкти дослідження.

Активність ферментів визначили таким чином: пектинметилестеразну активність з допомогою колориметрії за кількістю метанола, що звільнився, та з використанням потенціометрії за зростанням кількості деетерифікованих карбоксильних груп; полігалактуроазну активність за зростанням кількості редуруючих карбонільних груп, що дозволило оцінити активність усіх форм ферменту, а також за наданням в'язкості розчину – це дало можливість визначити відносний внесок екзо- і ендоформ; пектинтрансєліміназну активність досліджували за методом Хейма, який базується на спектроскопії зразка при 235 нм; протеолітичну активність визначали за модифікованим методом Ансона, реєструючи оптичну густоту при 670 нм; амілолітичну активність визначали колориметрично за інтенсивністю кольору йодного індикатора; ліполітичну активність – титриметрично, за вмістом вільних жирних кислот. Дослідження рН- та термооптима; рН- та термостабільності ферментів, кинетичних процесів гідролізу субстрата вели згідно з основами ферментативної кінетики. Визначення вмісту основних хімічних речовин здійснювали згідно з методом, рекомендованим Держстандартом. Результати досліджень обробляли методами математичної статистики.

У третьому розділі "Порівняльна характеристика пектолітичного комплексу ферментів плодоовочевої сировини" на основі аналізу 14 видів плодоовочевої сировини на присутність активності пектинметилестерази (рис. 1), полігалактуроази (рис. 2), активності ферментів у чотирьох культурах, які видібрано на першому етапі, у період споживчого та технічного ступенів зрілості, як перспективні джерела для виділення препарату, що містить переважно пектинметилестеразну активність, було відібрано томати. У виборці із 36 промислово культивованих сортів томатів (табл. 1) за активністю пектинметилестерази та співвідношенню активностей гідролітичних пектинрозщеплюючих ферментів було відібрано томати сорту "Машинний" технічного ступеню зрілості як джерело ферментного препарату.

*Активність пектинметилестерази, % від максимальної

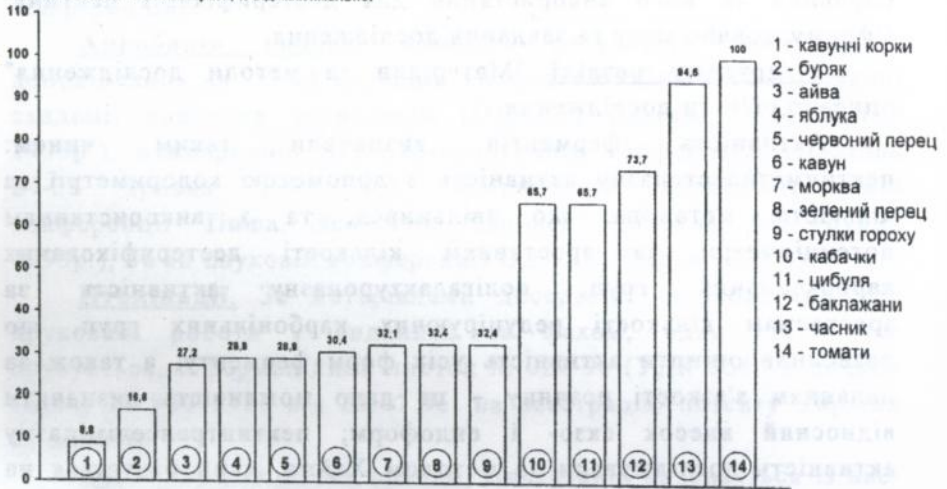


Рис. 1 Порівняльна активність пектинметилестерази у сировині у період зрілості.

* за максимальну прийнято активність пектинметилестерази томатів яка дорівнює 70 Од/г

*Активність полігалактуронази, % від максимальної

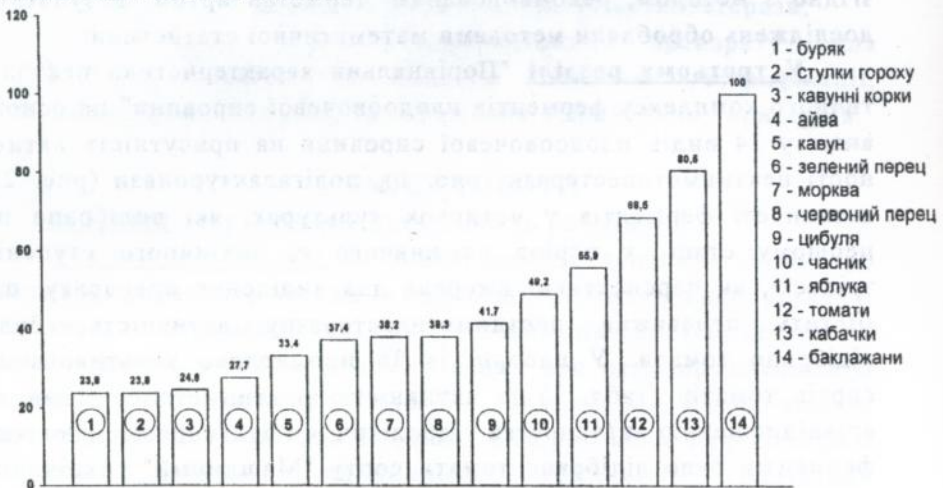


Рис. 2 Порівняльна активність полігалактуронази у сировині у період зрілості.

* за максимальну прийнято активність полігалактуронази баклажанів яка дорівнює 67,1 Од/г

Порівняльна характеристика активностей
пектинметилестерази та полігалактуронози в томатах
різних сортів технічного ступеню зрілості.

№	Сорт томатов	Активности ферментов, Ед/г		№	Сорт томатов	Активности ферментов, Ед/г	
		пектин-метил-эстеразы	поли-галак-туро-назы			пектин-метил-эстеразы	поли-галак-туро-назы
1	Киевский 139	127,6	28,6	19	Темно-красный 114	134,1	13,6
2	Новичок	130,4	25,4	20	Восход 119	138,8	23,1
3	Титан	120,2	20,6	21	Велетенский 5	130,1	31,4
4	Нистру	126,2	28,1	22	Зориле	109,8	10,6
5	Факел	130,6	17,5	23	Талалихин 186	115,6	28,9
6	Кросс 525	126,1	21,1	24	Марглоб 104	128,7	16,8
7	Машинный	150,2	15,0	25	Еревани 14	125,6	33,4
8	Волгоградский 5/95	105,2	16,4	26	Харьковский 55	131,5	22,6
9	Ахтубинский 85	117,8	18,4	27	Чудо рынка	123,6	29,1
10	Бируница	131,4	35,6	28	Колхозный 34	110,2	17,8
11	Глория	131,7	12,0	29	Одесский 19	121,4	21,5
12	Кубанский штабмовый 220	112,3	35,0	30	Кубань 557	140,6	30,1
13	Маяк 12/20-4	90,4	31,1	31	Новинка Приднестровья	127,8	24,5
14	Молдавский ранний	131,2	8,6	32	Чикош	132,4	15,2
15	Первенец 190	127,5	21,8	33	Вентура	131,5	17,4
16	Советский 679	115,6	30,1	34	Оригинальный	145,0	18,0
17	Ранний 83	132,0	31,2	35	Кемпбелл	128,4	12,5
18	Чико	143,2	28,7	36	Наполи	128,7	34,6

У четвертому розділі "Розробка методу виділення препарату пектинметилестерази" порівнювали класичні методи виділення препарату (як екстрагенти використовували 0,2 М ацетатний буфер, 0,1 М фосфатний буфер, розчини NaCl з різною концентрацією у діапазоні 3,6...8,5 рН) з наступною очисткою пектинметилестерази, виділення з застосуванням органічних розчинників та можливість використання для виділення препарату пектинметилестерази нативної ферментної системи томатів.

Порівняльний аналіз використаних методів дозволив вибрати процес аутокаталітичного руйнування колоїдної системи підготовленого соку томатів, що супроводжується самоконцентруванням ферментів у фазі осаду, як базовий для розробки технології. Метод дозволяє отримати ферментний препарат з активністю пектинметилестерази 4500 Од/г та полігалактуранази 36,3 Од/г. Активності ферментів у препараті та його вихід залежать від терміну проведення процесу, рН середовища та його температури.

У п'ятому розділі "Характеристики препарату пектинметилестерази" на основі дослідження хімічного складу виділеного препарату (89,2 % сухої речовини складають біополімери, у тому числі білок – 40,7%, полісахариди – 48,5%, вологість препарату – 20,2%), ферментних активностей, які він має (табл. 3) та властивостей пектинметилестерази і полігалактуранази досліджували можливість використання ферментних активностей для конверсії пектинових речовин у ізольованому стані та у складі напівфабрикатів.

Таблиця 2

Ферментні активності, що виявлено у препараті

Ферментний	Ферментні активності, Од/г					
	пектин-метил-естеразна	полігалактураназна	пектинліазна	липолітична	амілолітична	протеолітична
препарат з томатів	4500	36,3	—	10,5	976,7	4,1

Показано, що рН-оптимум пектинметилестерази має широкий максимум з екстремумом при рН 7,8. Для полігалактуранази має місце два широкі піка активності з максимумами при рН 2,6 та рН 4,8 (рис. 3). Складний вигляд рН-

залежності пояснюється багатоконпонентністю полігалактуронази. У піках диференційовано внесок екзо- та ендоскладових полігалактуронази.

Дані, що отримані при порівняльному вивченні термооптимумів та термостабільності пектинметилестерази і полігалактуронази препарату томатів та препарату мікробіального походження "Пектофостидин П20х", свідчать про те, що стабільність обох ферментів по відношенню до температури у виділеному з томатів препараті перевищує той самий показник препарату мікробіологічного походження. Це дозволяє здійснювати ферментативну реакцію при більш високих температурах і таким чином з більшою ефективністю. Термооптимум пектинметилестерази препарату томатів - 50°C , полігалактуронази - 35°C .

Швидкість деметоксилювання яблучного та цитрусового пектинів препаратом пектинметилестерази томатів перевищує аналогічний показник препарату "Пектофостидин П 20х". При цьому максимальний ступінь детерифікації – 80,1% досягається через 20 хв. від початку реакції. Зниження початкового ступеню етерифікації пектину дозволяє підвищити швидкість реакції, але не впливає на глибину детерифікації.

Активність ферментів,
% від максимальної

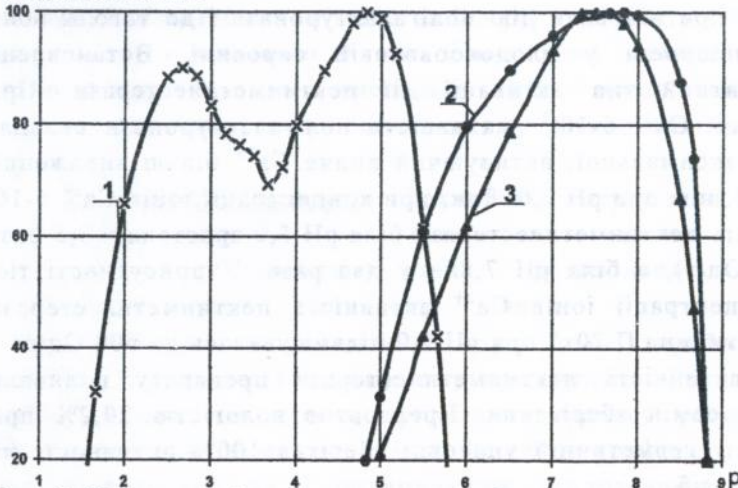


Рис. 3 рН-оптимум 1-полігалактуронази, 2-пектинметилестерази, 3-пектинметилестерази, очищеної хроматографуванням.

Кінетичний експеримент дозволив визначити для пектинметилестерази препарату $K_m=4,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л и $V_{max}=2,28 \cdot 10^{-6}$ моль/с за яблучним та $K_m = 4,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л та $V_{max} = 2,28 \cdot 10^{-6}$ моль/с за цитрусовим пектином. Ці значення знаходяться у межах відповідних значень для пектинметилестерази мікробіологічного походження. Згідно з отриманими даними пектинметилестераза препарату має більшу спорідненість до яблучного пектину, ніж до цитрусового, при практично однакових максимальних швидкостях реакції розпаду інтермедіату на продукти реакції.

Вивчаючи вплив основних ефекторів на пектинметилестеразу визначили, що при введенні у реакційне середовище пірокатехіну спостерігається конкурентний тип інгібування, яке може бути усунено шляхом збільшення концентрації субстрату. Характерним є значно менший вплив пірокатехіну, типового представника поліфенолів, на пектинметилестеразу томатів, ніж на пектинметилестеразу "Пектофостидина П20х". Можливо це пов'язано з присутністю в поматах більших концентрацій поліфенолів та адаптації до них пектинметилестерази; відомим феноменом є потенціювання синтезу мікроорганізмом ферменту при додаванні у живильне середовище субстрату даного фермента, щось подібне може спотерігатись і в цьому випадку.

Серед активаторів пектинметилестерази найбільший інтерес мали іони Ca^{2+} , оскільки, потенціюючи дію цього ферменту вони одночасно пригнічували дію полігалактуранази і до того ж вони широко поширені у плодовоовочевій сировині. Встановлено неконкурентний тип активації дії пектинметилестерази. При концентарції $Ca^{2+} 6 \cdot 10^{-3}$ активність полігалактуранази складає 50% від максимальної; активуючий вплив Ca^{2+} більш виражений при рН 5,0, ніж при рН 7,0. Так, при концентрації іонів $Ca^{2+} 6 \cdot 10^{-3}$ активність пектинметилестерази біля рН 5,0 зростала у 3,5 раза (до 2800 Од/г), а біля рН 7,8 – у два раза. У присутності тієї самої концентрації іонів Ca^{2+} активність пектинметилестерази "Пектофостидина П 20х" при рН 5,0 підвищувалась до 600 Од/г.

На активність пектинметилестерази препарату впливали умови та термін зберігання. Препарат з вологістю 20,2% при зберіганні у герметичній упаковці зберігав 100% активності на протязі 365 діб.

Очищений $(NH_4)SO_4$ (фракція 50...60% насичення) демінералізований та обезсолений препарат піддавали електрофорезу на

системі Laemli у 10% ПААГ+0,1% ДДС – Na на протязі 6 годин при силі струму 20 мА. Фіксували 12% трихлороцетовою кислотою та забарвлювали стандартним Coupassi R-250. Експеримент дозволив визначити присутність у препараті неоднорідного спектру білків з масою 14...18 кД (рис. 4).

Гельфільтрація на колонці HR 10/30 Superose -12 у буфері $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4\text{-}0,05 \text{ M} + 0,15\text{M NaCl}$ рН 7,0, що відкалібрована маркерами "Serva", також підтвердила неоднорідність білкового спектру. Було зібрано п'ять фракцій. Активність пектинметилестерази мала місце у 3-х фракціях.

Для подальшої очистки препарату використовували аніонообмінну колонку моно-Q HR 5/5 в умовах високошвидкісної хроматографії. Робочий тиск 5 мПа, термін розділення 20 хв.

Підбір кількості препарату, що вносять у колону та сольового градієнту для кращого розділення дозволив зупинитися на 5 мг/500 мкл та ступеневому градієнті 3 M NaCl.

Хроматографування за даних умов дозволило розділити пробу на три фракції з активністю пектинметилестерази в одній з них. Подальше хроматографування проби визначило молекулярну масу пектинметилестерази 20...37 кД. Рівень активності пектинметилестерази, який було досягнуто на кінцевому етапі, склав 50000 Од/г.

рН-залежність активності очищеної таким чином пектинметилестерази зміщена на 0,3 рН в кислий бік шкали рН у порівнянні з вихідною й має більш різкі межі. Це дозволяє припустити, що у препараті має місце іммобілізація пектинметилестерази на полімерному компоненті вуглеводної складової.

У шостому розділі "Технологія отримання препарату пектинметилестерази та його застосування" здійснена оптимізація основного етапу розробленої технології аутокаталітичного процесу, який призводить до самоконцентрування ферментів. При цьому приймалось, що активності ферментів у кінцевому препараті та його кількісний вихід залежать від терміну проведення процесу, рН середовища та температури термостатування. Значення коефіцієнтів регресії, які розраховано за D-оптимальним квадратичним планом з урахуванням міжфакторної взаємодії, свідчать про значний рівень спільного впливу аргументів на функцію.

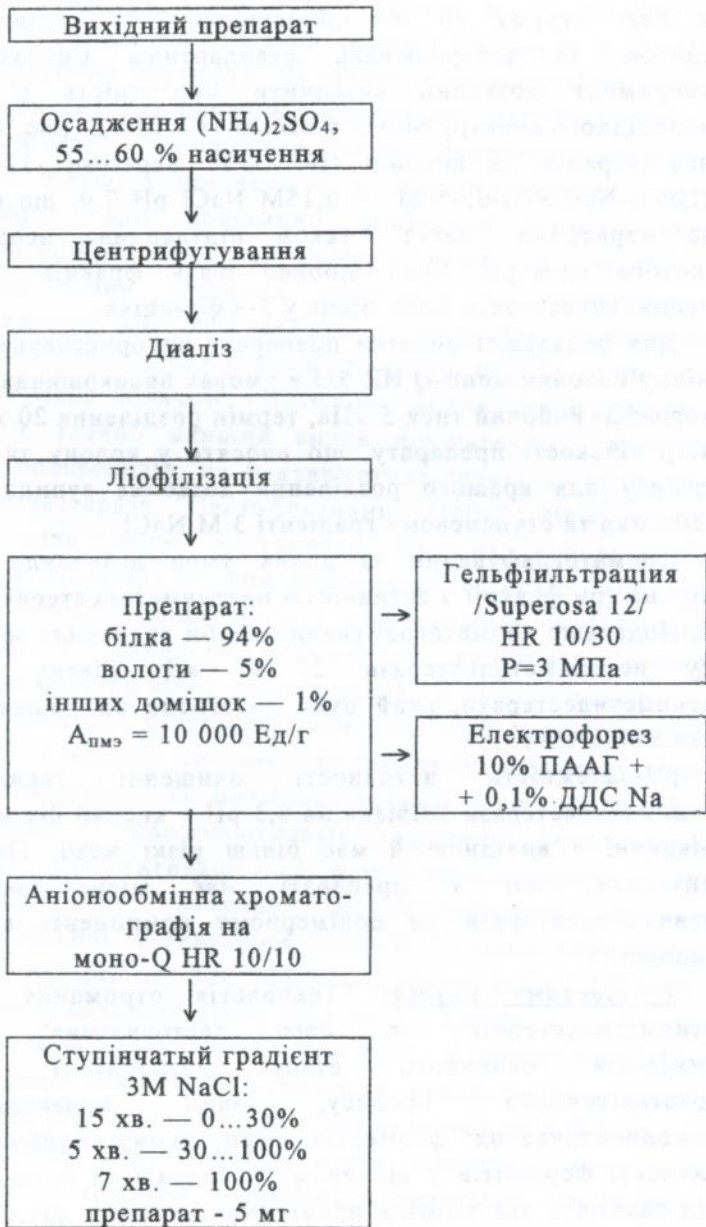


Рис. 4 Схема очищення пектинметилестеразы препарата томатів сорту "Машинный" технічного ступеню зрілості.

Отримане рівняння регресії має такий вигляд:

$$Y(X_1, X_2, X_3) = 333,55 + 31,1030X_1 + 31,9780X_2 + 51,8333X_3 - 177,5161X_1^2 + 22,0222X_2^2 - 99,0378X_3^2 + 12,3621X_1X_2 + 16,3671X_1X_3 + 12,9046X_2X_3$$

де X_1 - температура середовища, $^{\circ}\text{C}$; X_2 - рН термостатованого середовища; X_3 - термін проведення процесу термостатування; Y - активність пектинметилестерази препарату. Отримане рівняння адекватно описує процес. Виконані дослідження обґрунтували розробку технології отримання препарату шляхом термостатування підготовленої з томатів рідкої фази на протязі 23...25 хв при рН 4,7...5,0 та температури 32...37 $^{\circ}\text{C}$. Завдяки використанню аутокаталітичних процесів для концентрування ферментного препарату забезпечено екологічно чистий технологічний процес в апаратах та приміщеннях без спеціальних витяжних пристроїв. У м'яких умовах відбувається деструкція колоїдної колоїдної системи. Осад - це ферментний препарат, а рідка фаза, що відокремлюється може бути використана для отримання маринадів, що дозволяє поряд з екологічною чистотою процесу забезпечити комплексну переробку томатів. Запроваджені технологічні процеси та їх режими дозволяють забезпечити безперервний характер виробництва, максимально автоматизувати процеси управління, використовуючи для цієї мети технологічне обладнання, що серійно випускається вітчизняною машинобудівною промисловістю. Технологічні режими, які обґрунтовані науковими дослідженнями, дозволяють рекомендувати схему процесу отримання препарату пектинметилестерази з томатів сорту "Машинный" технічного ступеню зрілості (рис. 5).

Технологічний процес, який рекомендовано, забезпечується відповідною організацією вимірювально-інформаційної системи, що дозволяє постадійно виконувати вимоги технології, які визначені технохімічним контролем. Розроблена технологія виробництва, відповідні технологічні режими на окремих операціях, виконання технохімічного контролю виробництва опробовані при переробці 500 кг томатів сорту "Машинный" технічного ступеню зрілості та виробки 10 кг препарату пектинметилестерази з активністю 4320,6 Од/г на Іллічівському консервному заводі.

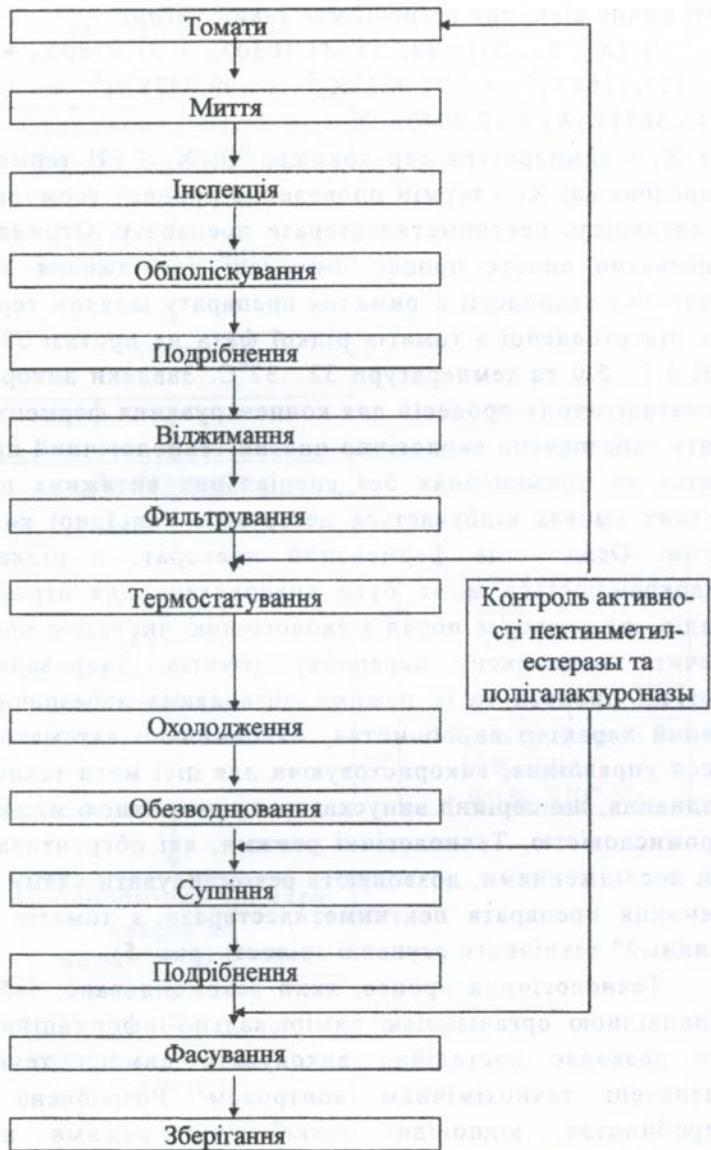


Рис. 5 Принципова схема виробництва препарату пектинметилестерази томатів.

В розділі наведено розроблену технологічну схему отримання високомолекулярних пектинів заданого ступеню етерифікації; удосконалена технологія освітлення яблучного соку пектиновими та пектовими кислотами, що розроблена колективом кафедри технології консервування ОДАХТ. Застосування ферментації яблучного соку препаратом пектинметилестерази, який виділено з томатів, як освітлювача, успішно замінює процес внесення пектинових кислот у технології, яка розроблена на цій кафедрі. Освітлення відбувається на протязі двох хвилин при внесенні 2000 Од/л яблучного соку.

Розроблено технологічну схему отримання консервів з гарбуза та кабачків з структурованими елементами довільної форми (кубики, палички), які мають запах ароматизаторів, що додаються до продукту.

ВИСНОВКИ

1. На підставі порівняльної характеристики активностей пектинметилестерази та полігалактуранази в основній плодоовочевій сировині України, а також динаміки їх зміни у процесі дозрівання обгрунтовано доцільність використання томатів сорту "Машинний" як джерела препарату пектинметилестерази.

2. Розроблено метод виділення препарату пектинметилестерази з активністю 4500 Од/г, що значно перевищує активність препаратів мікробного походження, які виробляються промисловістю. Метод зосновано на аутокаталітичному процесі руйнування колоїдної системи, який супроводжується самоконцентруванням ферментів.

3. Досліджено хімічний склад та фізико-хімічні властивості препарату. Встановлено, що в ньому поєднуються активності п'яти гідролітичних ферментів. рН-оптимум пектинметилестерази має максимум при 7,8 рН, термооптимум – при 50⁰С. Показано, що рН- та термостабільність обох ферментів препарату перевищує цей показник промислово вироблених зразків.

4. Вивчено кінетику деетерифікації пектину препаратом пектинметилестерази. Визначено константи Міхаеліса. Показано, що вони мають значення, звичайні для ферментів даного класу.

Досліджено вплив основних ефекторів на пектинметилестеразу препарату. Показано, що при введенні в реакційне

середовище пірокатехіну має місце конкурентний тип інгібування. Активатором пектинметилестерази є іони Ca^{2+} , які потенціюють дію фермента та пригнічують дію полігалактуронази. Активація має неконкурентний характер.

5. Встановлено присутність у препараті пектинметилестерази неоднорідного спектру білків з масою 14...80 кД. Наведено характеристику активності кожної фракції. У результаті багато-стадійного хроматографування в умовах високошвидкісної рідинної хроматографії отримано субфракцію з молекулярною масою 20...37 кД та рівнем активності пектинметилестерази 50000 Од/г.

6. Розроблено технологію отримання пектинметилестерази. Її реалізацію здійснено на Іллічівському консервному заводі. У виробничих умовах отримано ферментний препарат з виходом 20,1 % від сухої речовини та активністю пектинметилестерази 4320,6 Од/г.

Розроблено умови та визначено термін зберігання препарату пектинметилестерази.

Розроблено технічні умови на препарат та технологічну інструкцію на його виробництво.

7. Розроблено технологічні схеми застосування препарату пектинметилестерази томатів для виробництва пектину із заданим ступенем етерифікації, освітлення яблучного соку та одержання консервів з кабачків та кавуна зі структурованими елементами.

Основний зміст дисертації викладено в наступних публікаціях:

1. Коваленко О.В., Безусов А.Т. Розробка методу виділення пектинметилестерази із рослинної сировини та її характеристика // Зб. наукових праць Одеської державної академії харчових технологій. - Одеса: ОКФА. - 1996. - С. 76-80.

2. Коваленко А.В., Безусов А.Т. Новый пектолитический препарат // Пищевая промышленность. - 1996. - № 12. - С. 35.

3. Пектолітичний препарат з рослинної сировини. Виділення та деякі характеристики // Зб. наукових праць Одеської державної академії харчових технологій. - Одеса: ОКФА - 1997. - С. 127-130.

Анотація

Коваленко О.В. Технологія препарату пектинметилестерази томатів. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеню кандидата технічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Одеська державна академія харчових технологій, Одеса, 1997.

Розроблено метод виділення препарату пектинметилестерази з томатів, зоснований на аутокаталітичному руйнуванні колоїдної системи, що супроводжується самоконцентруванням ферментів. Отримано препарат з активністю пектинметилестерази 4500 Од/г та полігалактуронази 36,3 Од/г. Досліджено його фізико-хімічні властивості. В умовах високошвидкісної рідинної хроматографії отримано субфракцію з молекулярною масою 20...37 кД та рівнем активності пектинметилестерази 50000 Од/г. Розроблено технологію отримання пектинметилестерази. Її реалізацію здійснено на Іллічівському консервному заводі. Розроблено технологічні схеми застосування препарату пектинметилестерази томатів для виробництва пектину із заданим ступенем етерифікації, освітлення яблучного соку та отримання оригінальних консервів.

Ключові слова: томати, ферменти, пектинметилестераза, полігалактуроназа, активність, виділення, технологія.

Аннотация

Коваленко А.В. Технология препарата пектинметилэстеразы томатов. - Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 03.00.20. - биотехнология. - Одесская государственная академия пищевых технологий, Одесса, 1997.

Разработан метод выделения препарата пектинметилэстеразы из томатов, основанный на аутокаталитическом процессе разрушения коллоидной системы, сопровождающемся самоконцентрацией ферментов. Получен препарат с активностями 4500 Ед/г - пектинметилэстеразы и 36 Ед/г - полигалактуроназы. Изучены его физико-химические характеристики. В условиях высокоскорост-

ной жидкостной хроматографии получена субфракция пектинметилэстеразы с молекулярной массой 20...37 кД и активностью пектинметилэстеразы 50000 Ед/г. Разработана технология получения препарата пектинметилэстеразы. Её реализация осуществлена на Ильичевском консервном заводе. Разработаны технологические схемы применения препарата пектинметилэстеразы томатов для производства пектина с заданной степенью этерификации, осветления яблочного сока и выработки оригинальных консервов.

Ключевые слова: томаты, ферменты, пектинметилэстераза, полигалактуроназа, активность, выделение, технология.

Abstracts

Kovalenko A. V. Tomato fruit pectinmethylesterasa preparat technology - Script.

This thesis is presented for the candidate's (Ph. D.) degree in the technical sciences along speciality 03.00.20 - biotechnology. - Odessa state academy of food technologies, Odessa, 1997.

The tomato fruit pectinmethylesterasa preparat extraction method, based on an autocatalysis colloid system destruction process, taken around of enzymes concentration, is developed. Preparat has 4500 U/g pectinmethylesterasa and 36 U/g polygalacturonasa activity. It's physico-chemical characteristics are investigated. Under the conditions of high-speed liquid chromatography the subfraction of pectinmethylesterasa with molecular mass 20-37 кД and 50000 U/g activity is obtained. The technology of pectinmethylesterasa preparat extraction is developed and implemented at the Illichevsk canning plant. There are developed the technological schematics of the pectinmethylesterasa enzyme preparat application to produce specified esterification rate pectin, original cans and apple juice plaining.

Key words: tomatoes, enzymes, pectinmethylesterasa, polygalacturonasa, activity, extraction, technology.

Підписано до друку 24.10.1997. Формат 60x84 1/16. Об'єм
0,7 умов. друк. арк. Замовлення № 245. Тираж 100 прим.
Відділ поліграфії ОЦНТЕІ (вул. Ришельєвська 28, 10 пов.)

422249

AB 38.795