

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА ГИДРОЛИЗА РАСТИТЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ В ПРИСУТСТВИИ ДРОЖЖЕВЫХ ПРОТЕАЗ

А.Н. Иванкин

ФГБОУ ВО «Московский государственный технический университет имени Н.Э. Баумана (национальный исследовательский университет)» (Мытищинский филиал), Россия, 141005, Московская обл., г. Мытищи, ул. 1-я Институтская, д. 1
aivankin@mgul.ac.ru

Дано описание методологии оптимизации процесса ферментативного гидролиза растительных белков дрожжевыми протеазами *Saccharomyces carlsbergensis* с использованием в качестве субстрата модельного соевого белка. Ферментативную обработку осуществляли под действием автолизированных отходов пивных дрожжей, содержащих до 40 % активных дрожжевых клеток. Показано, что в результате оптимизации процесса с использованием симплекс метода планирования эксперимента были найдены оптимальные условия ведения процесса ферментативного гидролиза растительных белков в присутствии биомассы пивных дрожжей, которые составили: концентрация белка в суспензии 30 %, количество добавляемой дрожжевой суспензии 40 %, содержание цитрата натрия 5,6 %, этанола 4,2 %, добавленной воды 20,2 %. Время гидролитической обработки в оптимуме при температуре 58 °С составляло 4,3 часа. Выход продукта, оцениваемый по содержанию азота свободных аминокислот, увеличивался с 10...12 % без оптимизации до 34 % в результате проведенной оптимизации параметров процесса. Показано, что максимальная скорость процесса гидролитического распада растительных белков в оптимальных условиях составляет более $0,48 \cdot 10^{-3}$ мгNH₂/мл·мин, а энергия активации E_a 80,7 кДж/моль. Установлена возможность дополнительного увеличения выхода целевого гидролизата за счет повторного внесения в систему ферментного препарата панкреатина, в результате чего удавалось увеличивать выход продукта до 52...55 % и получать сбалансированный по аминокислотному составу продукт. Получены данные, о том, что аминокислотный состав ферментативного гидролизата включал все незаменимые аминокислоты, г/100 г белка: Иле 4,7; Лей 7,0; Лиз 6,9; Мет 1,6; Цис 3,7; Фен 5,8; Тир 4,1; Тре 4,2; Трп 1,5; Вал 6,8; а также заменимые аминокислоты: Ала 5,9; Арг 5,5; Асп 8,8; Гис 3,3; Гли 3,8; Глу 10,2; Про 5,1; Сер 9,0. Полученный ферментативный гидролизат обладает потенциально высокой биологической ценностью, что может способствовать его эффективному использованию в составе высокопитательных систем.

Ключевые слова: растительные белки, ферментативный гидролиз, пивные дрожжи, биодеградация, оптимизация условий

Ссылка для цитирования: Иванкин А.Н. Оптимизация процесса гидролиза растительных белков в присутствии дрожжевых протеаз // Лесной вестник / Forestry Bulletin, 2024. Т. 28. № 3. С. 105–114.
DOI: 10.18698/2542-1468-2024-3-105-114

Растительные белки являются важнейшими компонентами природного сырья и должны составлять неотъемлемую часть всех пищевых систем. В связи с этим, основное направление сельскохозяйственной деятельности заключается в получении высококачественных пищевых продуктов с оптимальным для питания человека содержанием белка [1, 2].

Количество белка в сырье природного происхождения различается и может составлять в таких традиционных сельскохозяйственных продуктах, как рис — до 7 %, в пшенице — до 15 %, в сое — до 40 %. Источником белка могут выступать лесные культуры, в которых, особенно в начальном вегетационном периоде, содержание белка в листе и корнях может достигать значимых значений — 7...9 % [3–5].

К важным источникам белка относятся также промышленные отходы, получаемые при перера-

ботке сельхозпродукции [6]. В таких отходах белки находятся в связанном состоянии и не могут обладать высокой питательной ценностью вследствие трудно расщепляемых природных макрокомплексов, которые не способны давать фрагментированные в пищеварительных органах человека продукты, поэтому требуется их дополнительная трансформация [6–8].

Наиболее простым способом переработки отходов пищевой, комбикормовой и микробиологической промышленности является гидролитическая деградация в мономеры и олигомеры, которые в дальнейшем могут вновь поступать в пищевые цепи и служить строительным материалом в качестве своеобразных пищевых модулей для последующего создания на их основе высокоэффективных питательных продуктов самого широкого назначения [9–11].

Белки можно извлекать из растительного сырья лесного происхождения при переработке в биотопливо [12].

В настоящее время в нашей стране и за рубежом осуществляются научные и технологические разработки процессов гидролитической переработки практически всех видов вторичных продуктов в сфере сельскохозяйственного производства. Полученные гидролизаты, как правило, используются в комбикормовой и микробиологической промышленности как биостимулирующие добавки и основы питательных сред для выращивания микроорганизмов в биотехнологии. Кроме того, разработаны гидролизаты пищевого назначения [4, 9, 13, 14].

Ранее нами и другими исследователями была показана возможность гидролиза белковых субстратов дрожжевыми протеазами остаточных пивных дрожжей [15, 16].

Переработку белкового сырья обычно осуществляют в присутствии минеральных кислот или ферментов, причем во втором случае получают продукты с более благоприятным составом. При этом достигается не только конечная цель трансформации белка в свободные аминокислоты, но и параллельно в сравнительно мягких условиях образуются короткие пептиды, что повышает биологическую ценность продукта. Если в качестве субстрата для переработки выбраны белки с низкой биологической ценностью, происходит не только гидролиз сырьевого белка, но и собственных белков дрожжей, в результате чего полученные белковые гидролизаты обогащаются не только незаменимыми аминокислотами, в частности изолейцином и триптофаном, но также сахарами и витаминами группы В. Такие гидролизаты, как и следовало ожидать, обладают повышенной биологической ценностью.

К сожалению, выход подобных ферментативных гидролизатов невелик и может составлять 10...12 % общей массы гидролизуемого белка. Отсюда следует целесообразность изучения протекания процесса гидролиза белков в оптимальных условиях.

Цель работы

Цель работы — определение оптимальных условий ферментативного гидролиза растительных белков дрожжевыми протеазами остаточных пивных дрожжей с использованием метода математического планирования эксперимента.

Материалы и методы

В качестве сырьевого субстрата для биотрансформации использовали модельный соевый изолят с содержанием 65 % растительного белка.

В качестве ферментной системы использовали автолизированные отходы пивоваренных дрожжевых культур *Saccharomyces carlsbergensis* 16-й генерации в виде водной суспензии с содержанием

сухих веществ 6...7 % и содержанием физиологически активных клеток не менее 40 %.

Для повышения выхода продукта в систему дополнительно вводили панкреатин медицинский с содержанием белка по Лоури 300...500 мг/г препарата и активностью по Ансону 5000...6000 ед./г. При использовании панкреатина в качестве ферментного препарата гидролиз проводили в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,5...8,2) с массовым соотношением фермента и субстрата 1:50 при температуре 58...60 °С в течение 4 ч при постоянном перемешивании, отбирая пробы через 15...30 мин.

Для стабилизации рН в систему добавляли цитрат натрия. Для предотвращения развития нежелательных процессов микробного обсеменения при гидролизе в систему добавляли плазмолизирующий агент этанол.

Аминокислотный состав гидролизатов анализировали на хроматографе LC 3000 фирмы Eppendorf-Biotronic (ФРГ) с использованием автоматической программы Winpeak [17, 18].

Расчет энергии активации и кинетических констант выполняли по методологии, описанной в работе [19]. Определяли основные макрокинетические константы гидролиза и энергию активации процесса по уравнению Аррениуса [18]. Для этого оценивали наличие «медленной» ($k_{\text{нп}}$) и «быстрой» ($k_{\text{пл}}$) стадий процесса. Теоретически [19, 20] предполагается, что в момент времени t скорость гидролиза химических связей V_t , обладающих близкой реакционной способностью, можно определять по уравнению

$$V_t = V_{\text{max}} e^{-kt},$$

где V_{max} — максимальная скорость биодеградации, г·л⁻¹·с⁻¹;

k — константа эффективности протекания процесса гидролиза химических связей, с⁻¹.

В ферментативной кинетике определяется также константа Михаэлиса k_M как концентрация субстратного белка, при которой скорость процесса составляет половину от максимальной V_{max} , что указывает на сродство фермента к субстрату [21–23]. Логарифмирование зависимости $V_t = f(V_{\text{max}})$ с учетом того, что скорость гидролиза V_t выражается отношением текущей концентрации расщепленных химических связей к моменту времени t , дает зависимость

$$\ln V_t = \ln(P_t/t) = \ln V_{\text{max}} - kt,$$

где P_t — концентрация расщепленных связей к моменту времени t , г/л.

Размерность этой величины, выражается в граммах азота аминокрупп высвобожденных аминокислот в 1 л (или мг/мл) реакционной смеси.

При $t \rightarrow 0, (P_i/t) \rightarrow V_0$. Продукты гидролиза белка образуются по реакции псевдопервого порядка и начальная скорость V_0 соответствует V_{max} . Построение графика в координатах $\ln(P_i/t) = f(t)$ дает возможность методом нулевой экстраполяции на ось ординат определять V_{max} .

Поиск оптимальных условий процесса гидролиза проводили с применением стандартного симплекс-метода теории планирования эксперимента [24]. Все математические расчеты проводили с использованием стандартных компьютерных программ.

В качестве критерия оптимизации был выбран один показатель — выход ферментативного гидролизата, оцениваемый по увеличению содержания свободных аминокрупп N_{amin} (азота свободных аминокрупп) [18, 20]. В качестве переменных факторов — шесть управляемых количественных параметров процесса, имеющих непрерывный характер изменения в заданных пределах (количество белка, дрожжей, цитрата натрия, этанола в смеси, продолжительность процесса и температура). Количество добавляемой в реакционную смесь дистиллированной воды являлось контролируемым фактором, определяемым по разности: 100 за вычетом суммы количеств остальных компонентов, %.

Нормированные уровни факторов $a_{(j,i)}$ переводили в реальные $x_{(j,i)}$ с использованием формулы

$$x_{(j,i)} = x_{o(j,o)} + a_{(j,i)} [x_{(j,max)} - x_{(j,o)}]. \quad (1)$$

Значения $x_{(j,max)}$ и $x_{(j,o)}$ приведены в табл. 1, $a_{(j,i)}$ — в табл. 2, $x_{(j,i)}$ — в табл. 3 (опыты 1–7).

Т а б л и ц а 1

Нормируемые уровни параметров

Normalized parameter levels

Обозначения уровней	Интервалы управляемых параметров					
	Белок, %	Дрожжи, %	Цитрат, %	Этанол, %	Температура, °С	Время, ч
$x_{(j,min)}$	20	20	1	1	45	1
$x_{(j,max)}$	50	50	7	7	75	7
$x_{(j,o)}$	35	35	4	4	60	4

Выход гидролизата контролировали по степени конверсии субстрата и по количеству освобождающихся в результате гидролиза концевых групп так, как это описано в работе [19], используя метод формольного титрования [17].

Эксперименты проводили в трех повторностях. Статистическую обработку результатов осуществляли по стандартным методикам [25, 28]. Полученные результаты не выходили за пределы доверительной вероятности $p = 0,95$.

Результаты и обсуждение

Ферментативный гидролиз природных белковых субстратов представляет собой достаточно сложный процесс, обусловленный нестандартностью применяемого сырья и ферментов [26, 27]. Использование математического подхода для оптимизации процесса позволяет усовершенствовать ведение ферментативного гидролиза и повышать его эффективность.

В настоящей работе использован симплексный метод планирования эксперимента, который описан в литературе [28]. Сущность метода заключается в следующем. Первоначально проводили исходную серию опытов так, чтобы точки параметров эксперимента, соответствующие условиям проведения этих опытов, образовывали регулярный симплекс (правильный треугольник или тетраэдр) в факторном пространстве с центром в середине симплекса. После проведения опыта выявлялись условия опыта с наименьшим выходом гидролизата. Далее строили новый симплекс, для чего наихудшую точку исходного симплекса заменяли на новую, расположенную симметрично относительно центра грани симплекса, находящегося против наихудшей точки. Новая точка вместе с оставшимися параметрами образовывала регулярный симплекс, центр которого оказывался смещенным по сравнению с исходным в направлении, противоположном от худшей точки. В общем случае такое направление поиска было направлено в сторону повышения эффективности процесса, заключавшегося в целевом увеличении выхода гидролизата. После реализации опыта в дополнительной точке проводили повторное сопоставление результатов в целях выявления наихудшей точки в новом симплексе, которую заменяли ее зеркальным отображением и т. д. Шаговое восхождение с последовательным отбрасыванием наихудших точек повторяли до достижения близкой к экстремуму области, т. е. до оптимального результата.

Для симплекса, совпадающего с началом координат, одна из вершин находится на координатной оси, остальные располагаются симметрично относительно координатных осей, а координаты симплекса задавались матрицей X

$$X = \begin{vmatrix} x_1 & x_2 & x_j & x_{k-1} & x_k \\ -x_1 & x_2 & x_j & x_{k-1} & x_k \\ 0 & -2x_2 & x_j & x_{k-1} & x_k \\ 0 & 0 & -jx_j & x_{k-1} & x_k \\ 0 & 0 & 0 & -(k-1)x_{k-1} & x_k \\ 0 & 0 & 0 & 0 & -kx_k \end{vmatrix}. \quad (2)$$

Т а б л и ц а 2

**Факторный план эксперимента по гидролизу растительного белка
в присутствии дрожжей рода *Saccharomyces carlsbergensis***

Factorial design of the experiment on the hydrolysis of plant protein
in the presence of yeast of the genus *Saccharomyces carlsbergensis*

Номер опыта	Нормированные уровни факторов, $a_{(j,i)}$					
	Белок, %	Дрожжи, %	Цитрат, %	Этанол, %	Температура t , °C	Время, ч
1	0,5	0,277	0,206	0,153	0,127	0,111
2	-0,5	0,277	0,206	0,153	0,127	0,111
3	0	-0,277	0,206	0,153	0,127	0,111
4	0	0	-0,614	0,153	0,127	0,111
5	0	0	0	-0,629	0,127	0,111
6	0	0	0	0	-0,343	0,111
7	0	0	0	0	0	-0,655

Т а б л и ц а 3

**Зависимость содержания свободных аминокрупп от условий гидролиза белка
в присутствии дрожжей рода *Saccharomyces carlsbergensis***

Dependence of the content of free amino groups on the conditions of protein hydrolysis
in the presence of yeast of the genus *Saccharomyces carlsbergensis*

Номер опыта	Реальные уровни экспериментальных факторов $x_{(j,i)}$												
	Белок		Дрожжи		Цитрат (5%-й раствор)		Этанол		t , °C	Время, ч	Вода		$N_{\text{амин}}$
	V , мл	%	V , мл	%	V , мл	%	V , мл	%			V , мл	%	
1	1,91	42,5	1,78	39,5	0,21	4,6	0,20	4,5	62	4,3	0,40	8,9	1,89
2	1,24	27,5	1,78	39,5	0,21	4,6	0,20	4,5	62	4,3	1,08	23,9	3,36
3	1,58	35,0	1,19	26,5	0,21	4,6	0,20	4,5	62	4,3	1,32	29,4	2,31
4	1,58	35,0	1,58	35,0	0,10	2,2	0,20	4,5	62	4,3	1,05	23,3	0,84
5	1,58	35,0	1,58	35,0	0,18	4,0	0,09	2,1	62	4,3	1,08	23,9	1,26
6	1,58	35,0	1,58	35,0	0,18	4,0	0,18	4,0	50	4,3	0,99	22,0	1,68
7	1,58	35,0	1,58	35,0	0,18	4,0	0,18	4,0	60	2,0	0,99	22,0	2,52
8	1,58	35,0	1,58	35,0	0,29	6,4	0,15	3,3	57	3,5	0,90	20,0	2,31
9	1,58	35,0	1,58	35,0	0,24	5,3	0,17	3,8	56	3,3	0,93	20,9	1,68
10	1,44	32,0	1,57	34,9	0,23	5,1	0,18	4,0	60	3,5	1,08	24,0	3,78
11	1,35	30,0	1,80	40,0	0,25	5,6	0,19	4,2	58	4,3	0,91	20,2	4,20
12	1,47	32,6	1,57	34,9	0,26	5,1	0,18	4,0	60	3,5	0,90	20,0	3,88
13	1,33	29,4	1,51	33,8	0,27	5,2	0,18	4,0	60	3,4	0,90	20,0	3,71

При длине стороны, равной 1, значения x_j равны

$$x_j = \sqrt{1/2j(j+1)}. \quad (3)$$

Высоту симплекса hk (расстояние от вершины до противоположной грани) определяли из равенства

$$hk = \frac{k+1}{\sqrt{1/2k(k+1)}}, \quad (4)$$

где k — размерность симплекса.

Число опытов N в симплексной матрице для k независимых факторов равно

$$N = k + 1. \quad (5)$$

Первоначальные числовые значения матрицы (1) подсчитаны с использованием формулы (3) (см. табл. 2). Учитывая низкую степень конверсии белка в процессе гидролиза, была составлена матрица планирования эксперимента с реальными факторами для всех проведенных опытов (см. табл. 1–3), выполненных при решении задачи оптимизации в пересчете на 5 мл общего объема реакционной смеси. Из данных табл. 3 следует, что оптимальным вариантом проведения опыта по ферментативному гидролизу является опыт № 11.

В результате оптимизации установлено, что процесс гидролиза растительного белка ферментами биомассы автолизированных остаточных пивных дрожжей рода *Saccharomyces carlsbergensis* целесообразно проводить при температуре 58 °C

в течение 4,2 ч в присутствии 4,2 % об. плазмолизирующего агента этанола и стабилизирующего реагента цитрата натрия 5,6 % об., при содержании белка в реакционной смеси 30 % об., в суспензии дрожжей 40 % об. Выход целевого ферментативного гидролизата белка при этом увеличивался против первоначального уровня с 12 до 34 %.

Результат использованного метода классической оптимизации технологического процесса был независимо подтвержден с использованием искусственного интеллекта [29]. Оптимальные параметры по симплексному методу планирования эксперимента оказались практически неотличимыми от информации, полученной для данных условий по нейросети.

Для полного понимания протекания процесса ферментативного гидролиза растительного белка в оптимальных условиях определены его макрокинетические параметры, на основании которых можно в дальнейшем устанавливать основные технологические параметры [30, 31]. На рис. 1 представлены кривые зависимости накопления продуктов суммарной реакции гидролитического расщепления при различных температурах ведения процесса.

Из рис. 1 следует, что процесс гидролиза в оптимальных условиях протекает сложнее, нежели в обычных условиях [32, 33], по-видимому, вследствие участия различных ферментов (полиферментная активность), содержащихся в дрожжевом ферментном комплексе. Кривые зависимости накопления свободных аминокрупп от времени при различных значениях температуры имеют сложный S-образный характер, четко выраженный для температур ниже 63 °C в течение первых 2 ч ведения процесса (см. рис. 1, кривые 1 и 2). При температуре 63 °C происходит интенсивное накопление продуктов гидролиза в реакционной смеси, выход гидролизата при этом оказывается ниже, чем при более низких температурах, поскольку ферментная система, очевидно, инактивируется раньше, чем достигается максимально возможная глубина протекания процесса. Расчет эффективных макрокинетических констант гидролиза был осуществлен в соответствии с описанным ранее [20, 27] так же, как и для обычного гидролиза (рис. 2, 3). Экспериментальные и расчетные данные по определению констант гидролиза, представлены в табл. 4.

Как следует из полученных данных, использование одних дрожжевых протеаз в оптимальных условиях позволяет увеличить выход ферментативного гидролизата практически в три раза. Однако достигнуть большей величины степени гидролиза за счет действия только одних дрожжевых протеаз не удается.

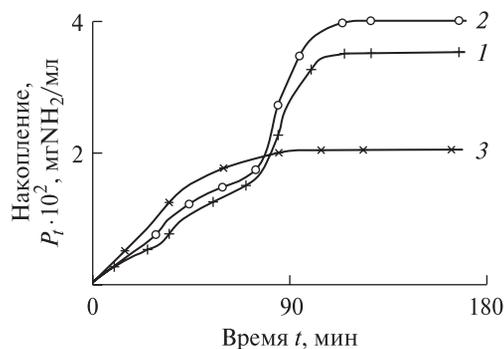


Рис. 1. Зависимость накопления продуктов (P_t) оптимизированного гидролиза белка дрожжевым автолизатом от времени при различных температурах, °C: 1 — 53; 2 — 58; 3 — 63

Fig. 1. Dependence of products accumulation (P_t) of optimized protein hydrolysis by yeast autolysate on time at different temperatures, °C: 1 — 53; 2 — 58; 3 — 63

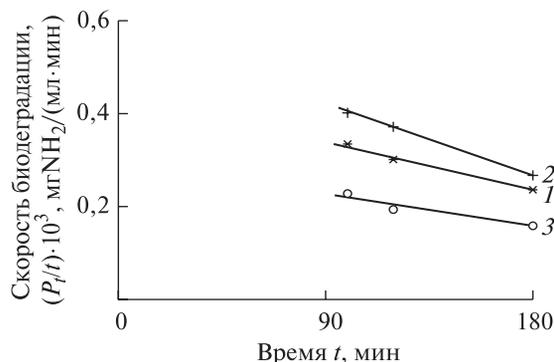


Рис. 2. Графическое определение максимальных эффективных скоростей и константы интенсивности (k) протекания процесса оптимизированного гидролиза дрожжевым автолизатом: 1 — 53 °C; 2 — 58 °C; 3 — 63 °C ($k = 1/125 = 0,8 \cdot 10^{-2}$)

Fig. 2. Graphical determination of the maximum effective rates and intensity constant (k) of the process of optimized hydrolysis by yeast autolysate: 1 — 53 °C; 2 — 58 °C, 3 — 63 °C ($k = 1/125 = 0,8 \cdot 10^{-2}$)

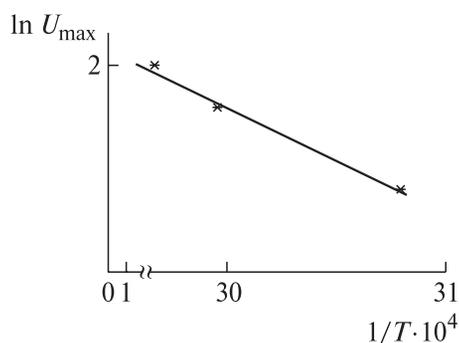


Рис. 3. Графическое определение энергии активации процесса оптимизированного гидролиза растительного белка дрожжевым автолизатом для начальной стадии процесса

Fig. 3. Graphical determination of the activation energy of the plant protein optimized hydrolysis by yeast autolysate for the initial stage of the process

Макрокинетические константы ферментативного гидролиза растительного белка дрожжевыми протеазами

Macrokinetic constants of enzymatic hydrolysis of plant protein by yeast proteases

$t, ^\circ\text{C}$	Скорость реакции на медленной (I) и быстрой (II) стадиях		Энергия активации $E_{a, \text{I}}$, кДж/моль	Константа интенсивности $k_{\text{II}} \cdot 10^2, \text{мин}^{-1}$	Константа Михаэлиса $k_M \cdot 10^2, \text{мг NH}_2/\text{мл}$	Степень конверсии, %
	$V_{\text{max I}} \cdot 10^3, \text{мг NH}_2/\text{мл} \cdot \text{мин}$	$V_{\text{max II}} \cdot 10^3, \text{мг NH}_2/\text{мл} \cdot \text{мин}$				
53	$0,294 \pm 0,006$	$0,410 \pm 0,008$	$80,7 \pm 11,4$	$0,81 \pm 0,03$	$0,54 \pm 0,12$	32,0
58	$0,445 \pm 0,008$	$0,479 \pm 0,009$				
63	$0,712 \pm 0,089$	$0,311 \pm 0,008$				

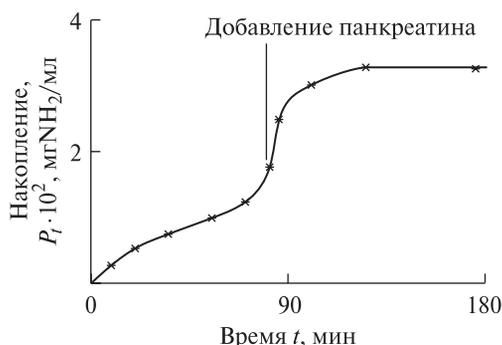


Рис. 4. Зависимость накопления продуктов сочетанного гидролиза растительных белков (P_t) в оптимизированных условиях при температуре 58°C ферментами дрожжей рода *Saccharomyces carlsbergensis* и панкреатином (контроль по содержанию азота свободных аминокислотных групп $N_{\text{амин}}$)

Fig. 4. Dependence of the products accumulation of combined plant protein hydrolysis (P_t) under optimized conditions at a temperature of 58°C by enzymes of the yeast of the genus *Saccharomyces carlsbergensis* and pancreatin (control by nitrogen content of free amino groups $N_{\text{амин}}$)

Это может быть связано со многими факторами, из которых, как отмечалось ранее [19, 20, 32], возможно существенное значение имеет процесс ингибирования ферментов продуктами реакции. В этом случае добавление дополнительно экзогенных ферментных препаратов может значительно увеличивать конверсию субстрата [34]. В нашем случае был использован прием добавления полиферментного препарата панкреатина эффективность которого часто используется в биотехнологии [35].

Действительно, как видно из рис. 4, добавление к реакционной массе небольшого количества панкреатина (0,1 % масс.) увеличивает степень конверсии процесса биогидролиза до 52...55 %.

Как следует из табл. 5, аминокислотный состав гидролизата, полученного в оптимальных условиях, близок по составу к эталонному яичному протеину, что указывает на его потенциально высокую биологическую ценность [27, 34]. Это может способствовать эффективному использованию

Аминокислотный состав эталонного белка и ферментативного гидролизата, полученного в оптимальных условиях

Amino acid composition of the reference protein and enzymatic hydrolyzate obtained under optimal conditions

Аминокислота	Количество аминокислот, г/100 г белка	
	Яичный белок (эталон)	Ферментативный гидролизат
Аланин	6,7	$5,9 \pm 0,6$
Аргинин	2,4	$5,5 \pm 0,4$
Аспарагиновая кислота	7,0	$8,8 \pm 0,7$
Цистин	2,3	$3,7 \pm 0,2$
Глутаминовая кислота	12,4	$10,2 \pm 1,4$
Гистидин	2,4	$3,3 \pm 0,3$
Изолейцин	6,6	$4,7 \pm 0,3$
Лейцин	8,8	$7,0 \pm 0,6$
Лизин	6,4	$6,9 \pm 0,5$
Метионин	3,1	$1,6 \pm 0,2$
Фенилаланин	5,8	$5,8 \pm 0,4$
Пролин	4,2	$5,1 \pm 0,5$
Серин	8,4	$9,0 \pm 0,8$
Треонин	5,0	$4,2 \pm 0,3$
Тирозин	4,3	$4,1 \pm 0,2$
Триптофан	1,7	$1,5 \pm 0,1$
Валин	7,9	$6,8 \pm 0,7$
Глицин	3,5	$3,8 \pm 0,3$

полученного продукта в пищевых системах, а также в кормовых целях [35]. В полученном оптимизированном продукте примерно половина массы приходится на свободные аминокислоты. Наличие свободных аминокислот в составе биопродукта увеличивает его питательную ценность.

Выводы

В результате оптимизации процесса гидролиза и введения в реакционную массу дополнительно панкреатина удалось увеличить выход ферментативного гидролизата из растительного белка до 52...55 %. Кинетический анализ подтвердил

многопрофильность механизма гидролиза растительных белков в присутствии остаточных пивных дрожжей рода *Saccharomyces carlsbergensis*.

Список литературы

- [1] Mileti O., Baldino N., Lupi F.R., Gabriele D. Interfacial behavior of vegetable protein isolates at sunflower oil/water interface // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2023, v. 221, p. 113035. doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.113035
- [2] Adeva-Andany M.A., Fernandez-Fernandez C., Carneiro-Freire N., Vila-Altesor M., Ameneiros-Rodríguez E. The differential effect of animal versus vegetable dietary protein on the clinical manifestations of diabetic kidney disease in humans // *Clinical Nutrition ESPEN*, 2022, v. 48, pp. 21–35. doi.org/10.1016/j.clnesp.2022.01.030
- [3] Castro-Rubio A., García M.C., Marina M.L. Rapid separation of soybean and cereal (wheat, corn, and rice) proteins in complex mixtures: Application to the selective determination of the soybean protein content in commercial cereal-based products // *Analytica Chimica Acta*, 2006, v. 558, no. 2, pp.28–34. doi.org/10.1016/j.aca.2005.10.076
- [4] Ijarotimi O.S., Fakayejo D.A., Oluwajuyitan T.D. Nutritional characteristics, glycaemic index and blood glucose lowering property of gluten-free composite flour from wheat, soybean, oat-bran and rice-bran // *Applied Food Research*, 2021, v. 1, no. 2, p. 100022. doi.org/10.1016/j.afres.2021.100022
- [5] Dizlek H., Girard A.L., Awika J.M. High protein and gliadin content improves tortilla quality of a weak gluten wheat // *LWT*, 2022, v. 160, no. 4, p. 113320. doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113320
- [6] Sadh P.K., Chawla P., Kumar S., Das A., Kumar R., Bains A., Sridhar K., Duhan J.S., Sharma M. Recovery of agricultural waste biomass: A path for circular bioeconomy // *Science of The Total Environment*, 2023, v. 870, no. 4, p. 161904. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.161904
- [7] Кузнецова Т.Г., Иванкин А.Н., Куликовский А.В. Наносенсорный анализ мясного сырья и растительных объектов. Саарбрюккен: Lambert Academic Publishing, 2012, 232 p.
- [8] Awogbemi O., Von Kallon D.V. Pretreatment techniques for agricultural waste // *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, 2022, v. 6, no. 12, p. 100229. doi.org/10.1016/j.cscee.2022.100229
- [9] Korkmaz K., Tokur B. Optimization of hydrolysis conditions for the production of protein hydrolysates from fish wastes using response surface methodology // *Food Bioscience*, 2022, v. 45, no. 2, p. 101312. doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101312
- [10] Ariaenejad S., Kavousi K., Sheykh A., Mamaghani A., Ghasemitabesh R., Salekdeh G.H. Simultaneous hydrolysis of various protein-rich industrial wastes by a naturally evolved protease from tannery wastewater microbiota // *Science of The Total Environment*, 2022, v. 815, no. 4, p. 152796. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152796
- [11] Srivastava R. K., Nedungadi S.V., Akhtar N., Sarangi P.K., Subudhi S., Shadangi K.P., Govarthanam M. Effective hydrolysis for waste plant biomass impacts sustainable fuel and reduced air pollution generation: A comprehensive review // *Science of The Total Environment*, 2023, v. 859(2), no. 2, p. 160260. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160260
- [12] Кадыров Ф.Ф., Яббаров А.М., Парамонова Т.А., Гнусарев С.С. Проект комплексной безотходной заготовки и переработки древесины // *Интенсификация использования и воспроизводства лесов. Ульяновск*, 2024. С. 91–96.
- [13] Kumar D., Tarafdar F., Kumar Y., Dass S.L., Pareek S., Badgujar P.C. Production of functional spent hen protein hydrolysate powder and its fortification in food supplements: A waste to health strategy // *Food Bioscience*, 2022, v. 50(B), no. 12, p. 102193. doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102193
- [14] Muhammad Mustafa Abeer M.M., Trajkovic S., Brayden D.J. Measuring the oral bioavailability of protein hydrolysates derived from food sources: A critical review of current bioassays // *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021, v. 144, no. 12, p. 112275. doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112275
- [15] Neklyudov A.D., Ivankin A.N., Berdutina A.V. Production and purification of protein hydrolysates (review) // *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2000, v. 36, no. 4, pp. 317–324.
- [16] Marson G.V., Machado M.T., de Castro R.J., Hubinger M.D. Sequential hydrolysis of spent brewer's yeast improved its physico-chemical characteristics and antioxidant properties: A strategy to transform waste into added-value biomolecules // *Process Biochemistry*, 2019, v. 84, no. 9, pp. 91–102. doi.org/10.1016/j.procbio.2019.06.018
- [17] Лисицын А.Б., Иванкин А.Н., Неклюдов А.Д. Методы практической биотехнологии. М.: Изд-во ВНИИМП, 2002, 408 с.
- [18] Иванкин А.Н., Олиференко Г.Л., Куликовский А.В. Аналитическая химия. М.: Кнорус, 2021, 300 с.
- [19] Neklyudov A.D., Berdutina A.V., Ivankin A.N., Karpo B.S., Osoka A.V. Determination of the kinetic constants of hydrolysis of keratin-containing raw materials // *Applied Biochemistry and Microbiology*, 1999, v. 35, no.1, pp. 45–49.
- [20] Иванкин А.Н., Красноштанова А.А. Гидролиз нанобиомолекулярных систем: монография. М.: МГУЛ, 2010, 396 с.
- [21] Liu P., Zhao Y., Guo H., Chang J.S., Lee D.J. Enzymolysis kinetics of corn straw by impeded Michaelis model and Box-Behnken design // *Environmental Research*, 2024, v. 242, no. 2, p. 117658. doi.org/10.1016/j.envres.2023.117658
- [22] Douglas J., Carter C.W., Wills P.R. A Michaelis-Menten model for non-homogeneous enzyme mixtures // *iScience*, 2024, v. 27, no. 2, p. 108977. doi.org/10.1016/j.isci.2024.108977
- [23] Yang M., Ye A., Yang Z., Everett D.W., Gilbert E.P., Singh H. Kinetics of pepsin-induced hydrolysis and the coagulation of milk proteins // *Journal of Dairy Science*, 2022, v. 105, no. 2, pp. 990–1003. doi.org/10.3168/jds.2021-21177
- [24] Raska P., Ulrych Z. Comparison of Modified Downhill Simplex and Differential Evolution with other Selected Optimization Methods used for Discrete Event Simulation Models // *Procedia Engineering*, 2015, v. 100, no. 2, pp. 807–815. doi.org/10.1016/j.proeng.2015.01.435
- [25] Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 351 с.
- [26] Vyckova E., Rozhdestvenskaya L., Podgorbunskikh E., Kudachyova P. The problems and prospects of developing food products from high-protein raw materials // *Food Bioscience*, 2023, v. 56, no. 12, p. 103286. doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103286
- [27] Feng L., Wu Y., Han Y., Yao X., Li Q., Liu M., Cao Y. Structural characteristics, functional properties and nutritional value of walnut protein by limited enzymatic hydrolysis // *LWT*, 2024, v. 197, no. 4, p. 115923. doi.org/10.1016/j.lwt.2024.115923
- [28] Саутин С.Н. Планирование эксперимента в химии и химической технологии. Л.: Химия, 1975, 48 с.

- [29] Нейросеть Chat GPT. URL: <https://gpt-chatbot.ru/> (дата обращения: 15.05.2023).
- [30] Dai H., An H. Effect of protease hydrolysis pretreatment on extruder response and the structural characteristics of high-moisture plant-protein extrudates // *Journal of Food Engineering*, 2024, no. 3, p. 112062. doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2024.112062
- [31] Wang Y., Li Z., Li H., Selomulya K. Effect of hydrolysis on the emulsification and antioxidant properties of plant-sourced proteins // *Current Opinion in Food Science*, 2022, v. 48, no. 12, p. 100949. doi.org/10.1016/j.cofs.2022.100949
- [32] Neklyudov A.D., Fedorova N.V., Plyukhina V.P., Lisitsa E.P. Enzymatic profile of autolyzing yeast of the genus *Saccharomyces* // *Applied Biochemistry and Microbiology*, 1993, v. 29, no. 5, pp. 734–743.
- [33] Blayo C., Vidcoq O., Lazennec F., Dumay E. Effects of high pressure processing (hydrostatic high pressure and ultra-high pressure homogenisation) on whey protein native state and susceptibility to tryptic hydrolysis at atmospheric pressure // *Food Research International*, 2016, v. 79, no. 1, pp. 40–53. doi.org/10.1016/j.foodres.2015.11.024
- [34] Luo L., Yan B., Xu S., Zhou J., Liang J., Zhao J., Tyagi R.D., Wong W.C. Regulation of acidogenic fermentation through exogenous additives for promoting carbon conversion of food waste in two-phase anaerobic system // *Bioresource Technology*, 2023, v. 368, no. 1, p. 128368. doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128368
- [35] Zhao Q., Fan Y., Zhao L., Zhu Y., Jiang Y., Gu J., Xue Y., Hao Z., Shen Q. Identification and molecular binding mechanism of novel pancreatic lipase and cholesterol esterase inhibitory peptides from heat-treated adzuki bean protein hydrolysates // *Food Chemistry*, 2024, v. 439, no. 5, p. 138129. doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.138129

Сведения об авторе

Иванкин Андрей Николаевич — д-р хим. наук, академик МАН ВШ, профессор кафедры химии и химических технологий лесного комплекса, ФГБОУ ВО «Московский государственный технический университет имени Н.Э. Баумана (национальный исследовательский университет)» (Мытищинский филиал), aivankin@mgul.ac.ru

Поступила в редакцию 16.05.2023.

Одобрено после рецензирования 22.05.2023.

Принята к публикации 02.02.2024.

OPTIMISATION OF PLANT PROTEIN HYDROLYSIS IN PRESENCE OF YEAST PROTEASES

A.N. Ivankin

BMSTU (Mytishchi branch), 1 st. Institutskaya, 141005, Mytishchi, Moscow reg., Russia

aivankin@mgul.ac.ru

A methodology is described for optimizing the process of enzymatic hydrolysis of plant proteins by yeast proteases *Saccharomyces carlsbergensis* using model soy protein as a substrate. Enzymatic treatment was carried out under the influence of autolyzed brewer's yeast waste containing up to 40 % active yeast cells. It is shown that as a result of process optimization using the simplex method of experiment planning, optimal conditions for conducting the process of enzymatic hydrolysis of plant proteins in the presence of brewer's yeast biomass were found, which were: protein concentration in the suspension 30 %, amount of added yeast suspension 40 %, sodium citrate content 5,6 %, ethanol 4,2 %, added water 20,2 %. The time of hydrolytic treatment at the optimum temperature of 58 °C was 4,3 hours. The product yield, assessed by the nitrogen content of free amino groups, increased from 10...12 % without optimization to 34 % as a result of the optimization of process parameters. It has been shown that the maximum rate of the process of hydrolytic decomposition of plant proteins under optimal conditions is more than $0,48 \cdot 10^{-3}$ mgNH₂/ml·min, and the activation energy E_a is 80,7 kJ/mol. The possibility of additionally increasing the yield of the target hydrolyzate by re-introducing the enzyme preparation pancreatin into the system was established, as a result of which it was possible to increase the yield of the product to 52...55 % and obtain a product balanced in amino acid composition. It was found that the amino acid composition of the resulting enzymatic hydrolyzate included all essential amino acids, g/100 g protein: Ile 4,7; Leu 7,0; Lys 6,9; Met 1,6; Cys 3,7; Phe 5,8; Tyr 4,1; Tre 4,2; Trp 1,5; Val 6,8; as well as non-essential amino acids: Ala 5,9; Arg 5,5; Asp 8,8; His 3,3; Gly 3,8; Glu 10,2; Pro 5,1; Ser 9,0. It has been shown that the enzymatic hydrolyzate has potentially high biological value, which can facilitate its effective use as part of highly nutritious systems.

Keywords: plant proteins, enzymatic hydrolysis, brewer's yeast, biodegradation, optimization of conditions

Suggested citation: Ivankin A.N. *Optimizatsiya protsessa gidroliza rastitel'nykh belkov v prisutstvii drozhzhevykh proteaz* [Optimisation of plant protein hydrolysis in presence of yeast proteases]. *Lesnoy vestnik / Forestry Bulletin*, 2024, vol. 28, no. 3, pp. 105–114. DOI: 10.18698/2542-1468-2024-3-105-114

References

- [1] Mileti O., Baldino N., Lupi F.R., Gabriele D. Interfacial behavior of vegetable protein isolates at sunflower oil/water interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2023, v. 221, p. 113035. doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.113035
- [2] Adeva-Andany M.A., Fernandez-Fernandez C., Carneiro-Freire N., Vila-Altesor M., Ameneiros-Rodríguez E. The differential effect of animal versus vegetable dietary protein on the clinical manifestations of diabetic kidney disease in humans. *Clinical Nutrition ESPEN*, 2022, v. 48, pp. 21–35. doi.org/10.1016/j.clnesp.2022.01.030
- [3] Castro-Rubio A., García M.C., Marina M.L. Rapid separation of soybean and cereal (wheat, corn, and rice) proteins in complex mixtures: Application to the selective determination of the soybean protein content in commercial cereal-based products. *Analytica Chimica Acta*, 2006, v. 558, no. 2, pp.28–34. doi.org/10.1016/j.aca.2005.10.076
- [4] Ijarotimi O.S., Fakayejo D.A., Oluwajuyitan T.D. Nutritional characteristics, glycaemic index and blood glucose lowering property of gluten-free composite flour from wheat, soybean, oat-bran and rice-bran. *Applied Food Research*, 2021, v. 1, no. 2, p. 100022. doi.org/10.1016/j.afres.2021.100022
- [5] Dizlek H., Girard A.L., Awika J.M. High protein and gliadin content improves tortilla quality of a weak gluten wheat. *LWT*, 2022, v. 160, no. 4, p. 113320. doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113320
- [6] Sadh P.K., Chawla P., Kumar S., Das A., Kumar R., Bains A., Sridhar K., Duhan J.S., Sharma M. Recovery of agricultural waste biomass: A path for circular bioeconomy. *Science of The Total Environment*, 2023, v. 870, no. 4, p. 161904. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.161904
- [7] Kuznetsova T.G., Ivankin A.N., Kulikovskiy A.V. *Nanosensornyy analiz myasnogo syr'ya i rastitel'nyh ob'ektov*. [Nanosensor analysis of meat raw materials and plant objects]. Saarbrücken: LAMBERT Academic Publishing, 2012, 232 p.
- [8] Awogbemi O., Von Kallon D.V. Pretreatment techniques for agricultural waste. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, 2022, v. 6, no. 12, p. 100229. doi.org/10.1016/j.cscee.2022.100229
- [9] Korkmaz K., Tokur B. Optimization of hydrolysis conditions for the production of protein hydrolysates from fish wastes using response surface methodology. *Food Bioscience*, 2022, v. 45, no. 2, p. 101312. doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101312
- [10] Ariaeenejad S., Kavousi K., Sheykh A., Mamaghani A., Ghasemitabesh R., Salekdeh G.H. Simultaneous hydrolysis of various protein-rich industrial wastes by a naturally evolved protease from tannery wastewater microbiota. *Science of The Total Environment*, 2022, v. 815, no. 4, p. 152796. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152796
- [11] Srivastava R. K., Nedungadi S.V., Akhtar N., Sarangi P.K., Subudhi S., Shadangi K.P., Govarthanan M. Effective hydrolysis for waste plant biomass impacts sustainable fuel and reduced air pollution generation: A comprehensive review. *Science of The Total Environment*, 2023, v. 859(2), no. 2, p. 160260. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160260
- [12] Kadyrov F.F., Yabbarov A.M., Paramonova T.A., Gnusarev S.S. *Proekt kompleksnoy bezotkhodnoy zagotovki i pererabotki drevesiny* [Project for integrated waste-free harvesting and processing of wood]. *Intensifikatsiya ispol'zovaniya i vosproizvodstva lesov* [Intensification of forest use and reproduction]. Ulyanovsk, 2024, pp. 91–96.
- [13] Kumar D., Tarafdar F., Kumar Y., Dass S.L., Pareek S., Badgujar P.C. Production of functional spent hen protein hydrolysate powder and its fortification in food supplements: A waste to health strategy. *Food Bioscience*, 2022, v. 50(B), no. 12, p. 102193. doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102193
- [14] Muhammad Mustafa Abeer M.M., Trajkovic S., Brayden D.J. Measuring the oral bioavailability of protein hydrolysates derived from food sources: A critical review of current bioassays. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021, v. 144, no. 12, p. 112275. doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112275
- [15] Neklyudov A.D., Ivankin A.N., Berdutina A.V. Production and purification of protein hydrolysates (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2000, v. 36, no. 4, pp. 317–324.
- [16] Marson G.V., Machado M.T., de Castro R.J., Hubinger M.D. Sequential hydrolysis of spent brewer's yeast improved its physico-chemical characteristics and antioxidant properties: A strategy to transform waste into added-value biomolecules. *Process Biochemistry*, 2019, v. 84, no. 9, pp. 91–102. doi.org/10.1016/j.procbio.2019.06.018
- [17] Lisitsyn A.B., Ivankin A.N., Neklyudov A.D. *Metody prakticheskoy biotekhnologii* [Methods of practical biotechnology]. Moscow: VNIIMP, 2002, 408 p.
- [18] Ivankin A.N., Oliferenko G.L., Kulikovskiy A.V. *Analiticheskaya himiya* [Analytical chemistry]. Moscow: Knorus, 2021, 300 p.
- [19] Neklyudov A.D., Berdutina A.V., Ivankin A.N., Karpo B.S., Osoka A.V. Determination of the kinetic constants of hydrolysis of keratin-containing raw materials. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 1999, v. 35, no. 1, pp. 45–49.
- [20] Ivankin A.N., Krasnoshtanova A.A. *Gidroliz nanobiomakromolekulyarnykh sistem* [Hydrolysis of nanobio-macromolecular systems]. Moscow: Moscow State Forest University, 2010, 396 p.
- [21] Liu P., Zhao Y., Guo H., Chang J.S., Lee D.J. Enzymolysis kinetics of corn straw by impeded Michaelis model and Box-Behnken design // *Environmental Research*, 2024, v. 242, no. 2, 117658. doi.org/10.1016/j.envres.2023.117658
- [22] Douglas J., Carter C.W., Wills P.R. A Michaelis-Menten model for non-homogeneous enzyme mixtures // *Science*, 2024, v. 27, no. 2, p. 108977. doi.org/10.1016/j.isci.2024.108977
- [23] Yang M., Ye A., Yang Z., Everett D.W., Gilbert E.P., Singh H. Kinetics of pepsin-induced hydrolysis and the coagulation of milk proteins // *Journal of Dairy Science*, 2022, v. 105, no. 2, pp. 990–1003. doi.org/10.3168/jds.2021-21177
- [24] Raska P., Ulrych Z. Comparison of Modified Downhill Simplex and Differential Evolution with other Selected Optimization Methods used for Discrete Event Simulation Models // *Procedia Engineering*, 2015, v. 100, no. 2, pp. 807–815. doi.org/10.1016/j.proeng.2015.01.435
- [25] Lakin G.F. *Biometriya* [Biometrics]. Moscow: Higher School, 1990, 351 p.
- [26] Bychkova E., Rozhdestvenskaya L., Podgorbunskikh E., Kudachyova P. The problems and prospects of developing food products from high-protein raw materials // *Food Bioscience*, 2023, v. 56, no. 12, p. 103286. doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103286
- [27] Feng L., Wu Y., Han Y., Yao X., Li Q., Liu M., Cao Y. Structural characteristics, functional properties and nutritional value of walnut protein by limited enzymatic hydrolysis // *LWT*, 2024, v. 197, no. 4, p. 115923. doi.org/10.1016/j.lwt.2024.115923
- [28] Sautin S.N. *Planirovanie eksperimenta v himii i himicheskoy tekhnologii* [Planning an experiment in chemistry and chemical technology]. Leningrad: Chemistry, 1975, 48 p.

- [29] Chat GPT neural network. Available at: <https://gpt-chatbot.ru/> (accessed 15.05.2023).
- [30] Dai H., An H. Effect of protease hydrolysis pretreatment on extruder response and the structural characteristics of high-moisture plant-protein extrudates // *Journal of Food Engineering*, 2024, no. 3, p. 112062. doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2024.112062
- [31] Wang Y., Li Z., Li H., Selomulya K. Effect of hydrolysis on the emulsification and antioxidant properties of plant-sourced proteins // *Current Opinion in Food Science*, 2022, v. 48, no. 12, p. 100949. doi.org/10.1016/j.cofs.2022.100949
- [32] Neklyudov A.D., Fedorova N.V., Ilyukhina V.P., Lisitsa E.P. Enzymatic profile of autolyzing yeast of the genus *Saccharomyces* // *Applied Biochemistry and Microbiology*, 1993, v. 29, no. 5, pp. 734–743.
- [33] Blayo C., Vidcoq O., Lazennec F., Dumay E. Effects of high pressure processing (hydrostatic high pressure and ultra-high pressure homogenisation) on whey protein native state and susceptibility to tryptic hydrolysis at atmospheric pressure // *Food Research International*, 2016, v. 79, no. 1, pp. 40–53. doi.org/10.1016/j.foodres.2015.11.024
- [34] Luo L., Yan B., Xu S., Zhou J., Liang J., Zhao J., Tyagi R.D., Wong W.C. Regulation of acidogenic fermentation through exogenous additives for promoting carbon conversion of food waste in two-phase anaerobic system // *Bioresource Technology*, 2023, v. 368, no. 1, p. 128368. doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128368
- [35] Zhao Q., Fan Y., Zhao L., Zhu Y., Jiang Y., Gu J., Xue Y., Hao Z., Shen Q. Identification and molecular binding mechanism of novel pancreatic lipase and cholesterol esterase inhibitory peptides from heat-treated adzuki bean protein hydrolysates // *Food Chemistry*, 2024, v. 439, no. 5, p. 138129. doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.138129

Author's information

Ivankin Andrey Nikolayevich — Dr. Sci. (Chem.), Member of the International Higher Education Academy of Sciences (IHEAS), Professor of the Department of Chemistry BMSTU (Mytishchi branch), aivankin@mgul.ac.ru

Received 16.05.2023.

Approved after review 22.05.2023.

Accepted for publication 02.02.2024.