

**Римарева Любовь Вячеславовна, академик РАН, д.т.н., гл.н.с.,
Кривова Анна Юрьевна, в.н.с., д.т.н., проф.,
Шелехова Наталья Викторовна, д.т.н.,
Оверченко Марина Борисовна, в.н.с., к.т.н.,
Серба Елена Михайловна, д.б.н., доцент, проф. РАН**
ВНИИПБ – филиал ФГБУН «ФИЦ питания, биотехнологии и безопасности
пищи», г. Москва

КАТАЛИТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПРОТЕАЗ И ФИТАЗ ПРИ ПЕРЕРАБОТКЕ ПОЛИМЕРОВ ТРИТИКАЛЕВОГО СУСЛА В ПРОИЗВОДСТВЕ СПИРТА⁵

Аннотация. Установлено, что применение на стадии подготовки тритикалевого сусла комплекса ферментов протеолитического и фитолитического действия способствовало повышению его качественных показателей. Совместное действие протеолитических и фитолитических ферментов обеспечивало эффективную конверсию белковых и углеводных полимеров; повышение содержания РВ в сусле в 1,3 раза, NH₂ – в 1,8 раза. Обработка зерна тритикале гидролитическими комплексами изменяло ионный состав сусла, высвобождая ионы фосфора, аммония, натрия и кальция и увеличивая их содержание более чем в 2 раза; приводило к снижению вязкости сусла на 30%. Синергизм каталитического действия протеолитических и фитолитических ферментов выразился в более эффективной конверсии белковых, углеводных и фитиновых полимеров.

Ключевые слова: тритикалевое сусло, фитаза, протеаза, ионы.

**Rimareva Lyubov Vyacheslavovna, Chief Researcher, Doctor of Technical
Science, Academician of RAS,
Krivova Anna Yuryevna, Leading Researcher, Doctor of Technical Science, Pro-
fessor,
Shelekhova Natalya Viktorovna, Doctor of Technical Science,
Overchenko Marina Borisovna, Leading Researcher, Candidate of Technical
Science,
Serba Elena Mikhaylovna, Doctor of Biological Science, Docent, Professor RAS**
All-Russian Research Institute of Food Biotechnology – Branch of the Federal Re-
search Center for Nutrition and Biotechnology, Moscow, Russia

CATALYTIC FEATURES OF PROTEAS AND FITAZ WHEN PROCESSING POLITICALS OF THE TRITITICAL-WITHOUT IN MANUFACTURE OF ALCOHOL

⁵ Исследования проведены за счет средств субсидии на выполнение государственного задания в рамках Программы Фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 г.г. (тема № 0529-2019-0066).

Annotation. It has been established that use of proteolytic and phytolytic enzymes at the stage of preparing triticale mash complex promoted increase in its quality indicators. Combined action of proteolytic and phytolytic enzymes ensured effective protein and carbohydrate polymers conversion; an increase in reducing substances (RS) content in wort by 1.3 times, NH_2 - by 1.8 times. Triticale grain processing with hydrolytic complexes changed the ionic wort composition, releasing phosphorus, ammonium, sodium and calcium ions and increasing their content by more than 2 times; led to decrease in wort viscosity by 30%. Catalytic action synergism of proteolytic and phytolytic enzymes was expressed in more efficient protein conversion, carbohydrate, and phytin polymer.

Key words: triticale wort, phytase, protease, ions.

Введение. Гибрид пшеницы с рожью – тритикале – вобрал в себя все лучшие свойства обоих видов. К основным достоинствам тритикале можно отнести: повышенную морозостойкость; сниженную требовательность к плодородной почве; устойчивость к инфекциям; увеличенное содержание белков (на 1-1,5 % выше, чем у пшеницы); содержание микро- и макроэлементов в зерне на уровне пшеницы [1,2]. В основном тритикале выращивают в кормовых целях. Средняя урожайность (60 ц/га) заметно выше, чем у растений родительских форм: у пшеницы исходных сортов урожайность зерна была равна 30-40 ц/га, у ржи 25-30 ц/га [3]. Тритикале, наряду с рожью и пшеницей является перспективным сырьем для переработки его на этиловый спирт. Относительно высокий уровень белка (11,7-22,5%) и улучшенный аминокислотный состав по сравнению с пшеницей - высокое содержание лизина, метионина и других аминокислот, содержание крахмала 49,0-57,0%, гемицеллюлоз, пектинов до 12,0%, фитина до 1,3%, а также активных комплексов собственных ферментов служат позитивной основой для интенсификации роста дрожжей на данном субстрате [4,5]. Использование ферментов протеолитического действия позволит перевести белковые полимеры в доступные для дрожжей легкоусвояемые азотистые вещества [6].

Технологические режимы низкотемпературных механико-ферментативных схем переработки сырья, внедренные на отечественных спиртовых заводах, требуют использование экзогенных ферментных препаратов, наряду с эндогенной ферментативным арсеналом зерна, для приготовления суслу [6,7]. Амилолитические, протеолитические, гемицеллюлазные комплексы ферментов широко используются в отечественной спиртовой промышленности, что нельзя сказать о фитазе [8]. Фитаза микробного происхождения широко представлена на нашем рынке для составления премиксов в виде двух типов: фитаза 3, которая отщепляет фосфорную группу на третьем атоме углерода инозитного кольца и характерна для грибных культур, и фитаза 6 - отщепляет фосфорную группу на шестом атоме и свойственна бактериальной микрофлоре [9,10]. Оба типа фитазы присутствуют в растительном сырье. Остатки фосфорной кислоты химически активны и способны связывать ионы металлов — кальций, натрий, калий, цинк, медь. Таким образом, фитаты являются не только резервом фосфора, но и связывают зна-

чительную часть микроэлементов, а также белков, углеводов, аминокислот, превращая их в комплексные нерастворимые конгломераты [11]. Применение в вышеназванных комплексах фитаз потенциально может быть основой для создания инновационной технологии в процессах подготовки зернового сырья для сбраживания.

Целью работы явилось исследование влияния комплексных ферментных препаратов, содержащих протеазы и фитазу, на степень конверсии полимеров тритикалевого сусла.

Материалы и методы исследований. Работа выполнялась на базе ВНИИ-ПБТ – филиала ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» в отделе биотехнологии ферментных препаратов, дрожжей, органических кислот и БАД. Объектами исследования служили зерно тритикале с крахмалистостью 54%; ферментные препараты (ФП) с различной субстратной специфичностью: ФП – источники амилолитических ферментов для декстринизации и гидролиза крахмала; гемицеллюлаз для деструкции некрахмальных полисахаридов и гумми-веществ; протеаз, катализирующих гидролиз белковых веществ; а также ФП «Phytaflow» производства Novozymes – источник фитолитических ферментов.

Приготовление зернового сусла проводили по «мягкой» ферментативной схеме разваривания зерна при гидромодуле 1:2. На стадии замеса в контрольном варианте для декстринизации крахмала применяли термостабильную α -амилазу из расчета 0,6 ед.АС/г крахмала; на стадии осахаривания ферментные препараты – источники глюкоамилазы в дозировке 9,0 ед.ГлС/г крахмала и гемицеллюлаз (0,15 ед.КС/г сырья). В опытных вариантах наряду с ферментами амилолитического, глюкоамилазного и ксиланазного действия вводили ферментный препарат (ФП) «Phytoflow», содержащий только фитазу, в дозировках от 1,0 до 2,5 ед.ФС/г сырья, а также ФП протеолитического действия (0,1 ед.ПС/г сырья).

Химический состав зернового сырья, концентрацию зернового сусла, содержание редуцирующих (РВ) и общих (ОРВ) углеводов, определяли общепринятыми методами согласно инструкции теххимического контроля спиртового производства; концентрацию аминного азота (NH_2) - медным способом. Изучение ионного состава пшеничного и кукурузного сусла, осуществляли, используя систему капиллярного электрофореза серии PrinCE-560 (Нидерланды), оснащенную кондуктометрическим детектором [12].

Результаты работы и их обсуждение. На первом этапе исследовали влияние ферментных препаратов протеолитического и фитолитического действия на степень конверсии полимеров тритикалевого сусла, на фоне традиционно используемых в спиртовых производствах энзимных препаратов - источников α -амилазы (АС), глюкоамилазы (ГлС), ксиланазы (КС) и β -глюканазы (β -ГкС). Установлено, что действие фитазы способствовало некоторому повышению концентрации редуцирующих веществ (РВ) и аминного азота (NH_2) в зерновом сусле: на 6,5-13,0 % и 12,9-17,8% соответственно, в зависимости от дозировки фермента (рис.1).

Использование протеолитических ферментов способствовало глубокому гидролизу белковых веществ и существенному накоплению в сусле аминного азота. Кроме того, наряду с гидролизом белка наблюдалось повышение степени

деструкции полисахаридов с образованием растворимых редуцирующих веществ. По-видимому, это связано с разрушением белково-углеводных комплексов, способствующим повышению доступности амилалитических ферментов к субстрату и увеличению эффективности их каталитического действия по отношению к крахмалу. Содержание РВ в тритикалевом сусле, обработанном протеазами возрастало в 1,24 раза.

По сравнению с показателями контрольного варианта и суслу, обработанного фитазой, концентрация аминного азота увеличивалась в 1,5 и 1,3 раза соответственно. Совместное действие протеолитических и фитолитических ферментов способствовало еще более эффективной конверсии белковых и углеводных полимеров: содержание РВ в сусле увеличилось в 1,3 раза, NH_2 – в 1,8 раза.

Установлено, что реологические свойства суслу варьировали в широких пределах, в зависимости от субстратной специфичности используемых ферментных препаратов (ФП). Показано, что введение в реакционную смесь фитазы (5,0 ед. ФС/см³) практически не влияло на вязкость суслу, которая составила 89,4 мПа.с. против контроля 90,6 мПа.с. (рис. 2). Повышение дозировки фитазы (15 ед.ФС) приводило к снижению вязкости на 19% (до 72,9 мПа.с).

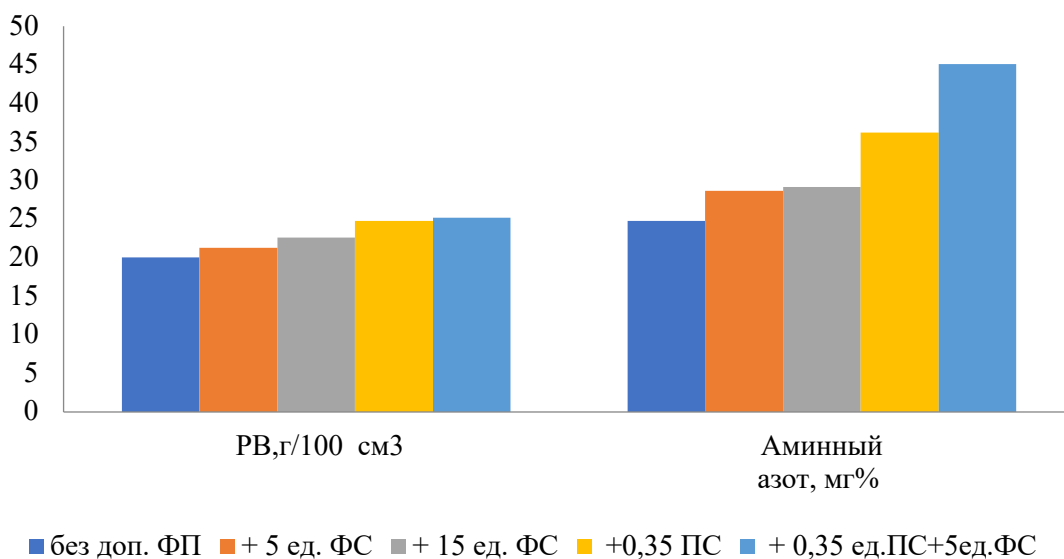


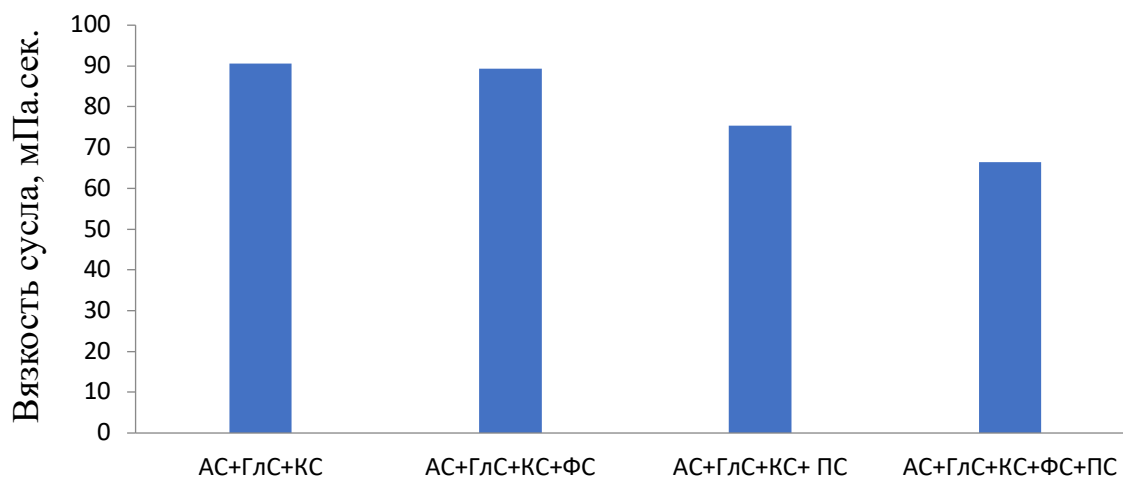
Рисунок 1 – Биохимические показатели суслу из тритикале

Внесение протеолитических ферментов оказывало более существенное влияние на реологические свойства тритикалевого суслу. Совместное присутствие протеаз и фитазы обеспечивало снижение вязкости на 30% (рис.2).

Результаты исследования показали, что использование ферментов протеолитического и фитолитического действия при приготовлении суслу из зерна тритикале способствовало повышению его качественных показателей: концентрация редуцирующих углеводов увеличилась с 20,0 до 25,2 г/100см³, аминного азота с 24,8 до 45,1 мг%.

Изучение ионного состава зернового суслу показало существенные изменения при использовании протеазы и фитазы в концентрациях 0,35 ед/см³ и 5,0

ед/см³ соответственно (табл.1). Как известно в зерне содержатся фитиновые полимеры (фитиновая кислота и ее соли), являющиеся сильными хелатирующими агентами, связывающими катионы двухвалентных металлов, что может негативно сказаться на каталитической активности ряда металлозависимых ферментов [13]. Установлено, что каталитическое действие фитазы способствовало разрушению фитиновых полимеров и высвобождению микро- и макроэлементов (табл. 1).



Состав ферментативных комплексов

Рисунок 2 – Влияние субстратной специфичности ферментативных комплексов на вязкость тритикалевого сусла

Таблица 1 – Ионный состав сусла, приготовленного из зерна тритикале

Определяемые ионы, мг/дм ³	Состав ферментативного комплекса		
	АС+ГлС+КС (контроль)	АС+ГлС+КС +ФС	АС+ГлС+КС+ФС+ПС
Хлориды	178,59	215,45	167,59
Нитраты	6,17	7,42	6,42
Сульфаты	79,36	95,29	85,29
Оксалаты	51,75	46,81	56,81
Фумараты	66,62	89,21	80,21
Малаты	251,14	308,15	298,15
Цитраты	235,65	289,49	249,49
Сукцинаты	23,76	30,21	31,21
Ацетаты	26,53	34,06	35,06
Фосфаты	668,42	1446,51	1497,78
Аммоний	33,98	63,42	53,42
Калий	1025,56	1141,00	1159,00
Кальций	10,51	28,67	31,69
Натрий	22,11	48,36	45,36
Магний	355,98	324,20	342,04

Особенно действие фитазы (как и индивидуальное, так и в комплексе с протеазами) сказалось на повышении концентрации ионов. При этом содержание

фосфора увеличивалось в 2,2 раза, аммония – в 1,9 раза, калия – в 1,1 раза, кальция – 2,7 раза и натрия – в 2,2 раза. Концентрация магния осталась практически без изменений.

Обогащение зернового сусла катионами и анионами в биодоступной форме в результате фитолитического действия на полимеры зерна тритикале позитивно скажется на процессах генерации дрожжей и спиртового брожения.

Заключение. Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что применение комплекса ферментов протеолитического и фитолитического действия для обработки зерна тритикале способствовало повышению степени конверсии растительных полимеров и улучшению биохимических показателей и качества зернового сусла для производства спирта. Показано, что эффективность действия ферментов зависело от их каталитических особенностей и субстратной специфичности.

Обработка зерна тритикале ферментными комплексами, в состав которых включена фитаза, приводила к высвобождению ионов фосфора, натрия и кальция, увеличению их содержания более чем в 2-3 раза. Отмечена также тенденция повышения концентрации редуцирующих веществ и аминного азота.

Использование протеолитических ферментов способствовало более глубокому гидролизу белковых веществ и существенному накоплению в сусле аминного азота, концентрация которого увеличилась в 1,5 раза.

Синергизм каталитического действия протеолитических и фитолитических ферментов выразился в еще более эффективной конверсии белковых, углеводных и фитиновых полимеров: содержание РВ в сусле увеличилось в 1,3 раза, NH₂ – в 1,8 раз, фосфора – в 2,2 раза.

Список литературы

1. ГОСТ 34023-2016 «Тритикале. Технические условия».
2. Римарева Л.В., Фурсова Н.А., Соколова Е.Н. и др. Биодеструкция белков зернового сырья для получения новых хлебобулочных изделий // Вопр. питания. 2018. Т. 87, № 6. С. 67–75. doi: 10.24411/0042-8833-2018-10068.
3. Корячкина, С.Я. Технология хлеба из целого зерна тритикале: монография / С.Я. Корячкина, Е.А. Кузнецова, Л.В. Черепнина. – Орел: ФГБОУ ВПО «Госуниверситет - УНПК», 2012. – 177 с. ISBN 978-5-93932-446-5.
4. Оверченко М.Б., Игнатова Н.И., Серба Е.М. и др. Исследование различных сортов тритикале для использования их в спиртовом производстве // Пиво и напитки. – 2014. - № 6. – С. 14-19.
5. Жульков А.Ю, Витол И.С., Карпиленко Г.П. Роль зерновой фитазы при производстве и сбраживании ржаного сусла. Часть I. Исследование фитазного комплекса ржи. Хранение и переработка сельхозсырья, 2009, №5, С. 50–55.
6. Серба Е.М., Оверченко М.Б, Игнатова Н.И. и др. Состав концентрированного зернового сусла, приготовленного из различных видов зернового сырья // Сборник трудов «Актуальные вопросы индустрии напитков», 2018. – С.166-170. DOI: 10.21323/978-5-6041190-3-7-2018-2-166-170.

7. Абрамова И.М. Особенности переработки пшеничного сырья, обеспечивающие производство спирта с высокими показателями качества //Производство спирта и ликероводочных изделий. – 2012. - № 1. – С. 4-6.
8. Римарева Л.В., Игнатова Н.И., Оверченко М.Б. и др. Исследование ферментов фитолитического действия на показатели зернового сусла и процесс спиртового брожения //Сборник трудов «Актуальные вопросы индустрии напитков», 2018. – С.136-140. DOI: 10.21323/978-5-6041190-3-7-2018-2-136-140.
9. Мухаметзянова А. Д..Микроорганизмы, как продуценты фитаз / А. Д. Мухаметзянова, А. И. Ахметова, М. Р. Шарипова // Микробиология, 2012, том 81, № 3, с. 291-300.
10. Vohra A., Satyanarayana T. Phytases: microbial sources, production, purification and potential biotechnological applications // Crit. Rev. Biotechnol. - 2003, - V.23 - No 1. - P. 29-60.
11. Редкозубов О. Фитаза, что изменилось за последние 15 лет / О. Редкозубов Комбикорма, №12 2014, с.71-74.
12. ГОСТ Р 55792-2013. Бражка из пищевого сырья. Газохроматографический метод определения содержания летучих органических примесей. Москва: Стандартиформ, 2014, III, 18 с.
13. Римарева Л.В., Оверченко М.Б., Игнатова Н.И., Кривова А.Ю., Серба Е.М. Генерация спиртовых дрожжей на средах, приготовленных из зерновых культур с различным содержанием фитата //Пищевая промышленность, 2019 - № 4. – С. 83-85.