

ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИКИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА РАСТИТЕЛЬНЫХ ПОЛИМЕРОВ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ БИОДОСТУПНОСТИ НАПИТКОВ ИЗ ЗЛАКОВЫХ КУЛЬТУР

И. Ю. Сергеева, Л. В. Пермякова, В. С. Райник, О. А. Рыбинцева

Изучена стадия ферментативной обработки полуфабриката для напитков из злаковых культур (растительной основы из риса и гречки) с целью модификации углеводного состава напитка. Для биокатализа применяли ферментные препараты фирмы Novozymes (Дания) Termamyl (термостабильная α -амилаза) и OndeaPRO (смесь пулуланызы, α -амилазы, целлюлазы, ксиллазы, протеазы и липазы). Для определения предельной скорости биокатализа и константы Михаэлиса дозировка ферментных препаратов и начальная концентрация субстрата (гидромодуль) варьировались: использовали гидромодули 1:6, 1:8, 1:10 и дозировку препаратов – 0,25; 0,5; 0,75; 1,00% к массе зернопродуктов. Гидролиз проводили в термостатируемом шейкере при постоянном перемешивании 120 об/мин в течение 180 мин при оптимальных температурах: 85 °С (при гидролизе Termamyl) и 60 °С (при гидролизе OndeaPRO), периодически отбирая пробы гидролизата для определения редуцирующих сахаров. Установлена рациональная дозировка изучаемых биокатализаторов – 0,75% к массе зернопродуктов. При этом констатировали также оптимальные вкусовые характеристики получаемой растительной основы – отсутствие крахмального привкуса, гармоничная умеренная сладость. Построены кинетические кривые процесса (зависимость скорости гидролиза от концентрации субстрата). Определены константы Михаэлиса (K_m (мг/см³)) и предельная скорость реакции (V_{max} (мг/(см³мин))) для препаратов при их использовании для ферментации растительных основ из риса и гречки: Termamyl (гречка) – 40,0 и 0,14; Termamyl (рис) – 35,0 и 0,16; OndeaPRO (гречка) – 35,0 и 0,15; OndeaPRO (рис) – 30,0 и 0,17 соответственно. Установлено, что наименьшая константа Михаэлиса характерна для препарата OndeaPRO. Совокупность ферментативных активностей препарата способствует эффективному гидролизу атакуемого субстрата – крахмала, высвобождая его от связывающих соединений белкового и некрахмального происхождения оболочек крахмальных зерен злаков. Вследствие этого фермент-субстратный комплекс более устойчив в сравнении с вариантом использования индивидуального амилолитического фермента.

Ключевые слова: ферментативный гидролиз, кинетика гидролиза, ферментные препараты, зерновые напитки, растительная основа.

Важным формирующим фактором возникновения и распространения алиментарных заболеваний является питание. В резолюции XVI Всероссийского конгресса нутрициологов и диетологов (2016 г.) основной вектор направлен на разработку и продвижение программ в области здорового питания, а также профилактики наиболее распространенных социально значимых алиментарных заболеваний. Внедрение такого подхода позволит решить важные задачи по здоровьесбережению и повышению качества жизни населения нашей страны.

В комплексе лечебно-профилактических мероприятий при таких алиментарных заболеваниях, как ожирение, сахарный диабет 2 типа, существует ряд специальных схем терапии по

снижению уровня глюкозы в крови, эффективность которых, безусловно, зависит от питания больного. Рацион должен основываться на принципах контроля энергетической ценности рациона, количественного и качественного состава основных нутриентов, пищевых волокон, витаминов и минеральных элементов. Эффективным инструментом для качественного баланса и восполнения биологически важных веществ является потребление функциональных и специализированных продуктов питания [1, 2].

Современная нутрициология акцентирует употребление продуктов питания с низким гликемическим индексом. Создание таких продуктов возможно путем модификации углеводного профиля путем исключения из состава

«быстрых» сахаров и использования смеси «медленных» углеводов (например, фруктоолигосахаридов (ФОС) и пищевых волокон). Метаболизм фруктоолигосахаридов микрофлорой тонкого кишечника протекает с образованием короткоцепочечных жирных кислот, лактатов и прочих веществ, и благодаря своей определенной химической организации выступают в роли пребиотиков, поддерживая рост полезной микробиоты кишечника *Bifidobacteria* и *Lactobacilli* [3].

Следует отметить, что большинство гидроколлоидов являются биологически активными компонентами, оказывающими положительное влияние на функционирование различных систем организма. Учитывая, что большинство растительных гидроколлоидов (пектин, гемицеллюлозы, гумми-вещества) относят к пищевым волокнам, одновременно достигается увеличение пищевой и физиологической ценности напитка. Пищевым волокнам отводится очень важная роль в оптимизации питания [4].

Согласно известным данным [5, 6], рацион питания с низким гликемическим индексом способствует снижению риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, а также приводит к снижению общего холестерина и холестерина липопротеинов низкой плотности, т.е. в целом позволяет корригировать нарушения углеводного и липидного обмена.

Одним из направлений восполнения недостатка полноценного белка в рационе питания человека является повышение его переваримости. В решении этой проблемы важная роль может принадлежать модификации растительных белков в гидролизаты, получаемые путем ограниченного ферментативного гидролиза [7, 8].

Правильный выбор сырья – основа высокой биологической ценности продукта, под которой понимается сбалансированное содержание в продуктах углеводов веществ, незаменимых аминокислот, полиненасыщенных жирных кислот, минеральных веществ и витаминов.

Многочисленными исследованиями показано, что потребление продуктов из злаковых культур, богатых по содержанию β-глюканами и арабиноксиланами, белковыми веществами, и ряда других биологически активных соединений способствует профилактике заболеваний сердечно-сосудистой системы, диабета 2 типа, гиперлипидемии.

Напитки априори присутствуют в питании человека. При этом если акцентировать потребление напитков заданного нутриентного состава [9], то исследования в области разработок новых продуктов для профилактического питания перспективны и своевременны.

Растительное «молоко» из злаковых культур имеет пресный специфический вкус, ощущается крахмальный вязущий привкус. Улучшению органолептических свойств напитка и, главное, получению функционального продукта повышенной пищевой ценности и биодоступности нутриентов способствует направленный биокатализ полимеров растительного сырья.

Ферментативный гидролиз биополимеров растительного сырья является эффективным технологическим приемом с точки зрения высокой биологической безопасности, пониженной энергоемкости процесса, контролируемой скоростью реакции и отсутствием необходимости очистки гидролизатов от балластных соединений [10].

Цель исследований – исследование кинетики гидролиза углеводов веществ полуфабрикатов напитков (растительного основы) из риса и гречки ферментными препаратами амилитического и комплексного действия для модификации углеводного состава напитка.

Материалы и методы исследований

Объектами исследований служили злаковые культуры: рис короткозерный (ГОСТ Р 55289-2012, ООО «Южная рисовая компания», Краснодарский край), крупа гречневая (ГОСТ Р 56105-2014, ООО мельничный комплекс «Роса», Алтайский край), приобретенные в розничной торговле.

Для биокатализа применяли ферментные препараты (ФП) Termamyl и OndeaPRO (Novozymes, страна-производитель Дания). Termamyl – жидкий ферментный препарат, содержащий термостабильную α-амилазу, продуцируемый генетически модифицированным штаммом микроорганизмов рода *Bacillus*. Систематическое название фермента -1,4-α-D-глюкан глюканогидролаза (КФ 3.2.1.1). Активность ферментного препарата – 2500 ед/г.

OndeaPRO – жидкий ферментный препарат, представляет собой смесь пулуланызы, α-амилазы, целлюлазы, ксиналазы, протеазы и липазы. Активность ферментного препарата – 1250 ед./г.

Подготовка субстрата для ферментативного гидролиза проводилась поэтапно. Первый



этап – замачивание зерна. Гречка и рис промываются водой для удаления загрязнений. Далее зерно замачивается на 2 часа при температуре воды 20 ± 2 °С. Для определения оптимальной дозировки препаратов применяли гидромодуль 1:8 (соотношение частей зерно:вода). Второй этап – приготовление растительного основы. Помол зерна вместе с замочной водой производился на блендере марки REDMONTRFP-3909 (мощность 1500 Вт, скорость вращения измельчителя 18 500 об/мин, продолжительность измельчения 5 минут).

Для определения скорости биокатализа и константы Михаэлиса дозировка ферментных препаратов, начальная концентрация субстрата (гидромодуль) варьировались: использовали гидромодули 1:6, 1:8, 1:10 и дозировку препаратов – 0,25; 0,5; 0,75; 1,00% к массе зернопродуктов.

Гидролиз проводили в термостатируемом шейкере при постоянном перемешивании 120 об/мин в течение 180 мин при оптимальных температурах: 85 °С (при гидролизе Termamyl) и 60 °С (при гидролизе OndeaPRO), периодически отбирая пробы гидролизата для определения редуцирующих сахаров.

Определение редуцирующих веществ проводили при помощи 3,5-динитросалициловой кислоты с последующим фотоколориметрированием окрашенных растворов.

Результаты и их обсуждение

Для определения скорости гидролиза крахмала растительного основы (растительного молока) ферментные препараты вносили в количестве: 0,25; 0,5; 0,75; 1,00% к массе зернопродуктов при гидромодуле 1:8. С интервалом в 30 мин отбирали пробы гидролизатов и определяли в них выход редуцирующих веществ. Результаты показаны на рисунках 1–4.

Далее определили скорость гидролиза (в условных единицах) для применяемых ферментных препаратов как тангенс угла наклона касательной к кинетической кривой (рис. 5).

Анализируя полученные данные, рациональной дозировкой изучаемых биокатализаторов является 0,75%. При этом констатировали также оптимальные вкусовые характеристики получаемой растительной основы – отсутствие крахмального привкуса, гармоничная умеренная сладость.

Для построения кинетических кривых (зависимость скорости гидролиза от концентрации субстрата) принимали концентрацию ФП 0,75% и в зависимости от гидромодуля, исходного содержания крахмала в рисе и гречке строили графики зависимости выхода редуцирующих веществ от концентрации субстрата и определяли скорость реакции как тангенс угла наклона к кинетической кривой (рис. 6).

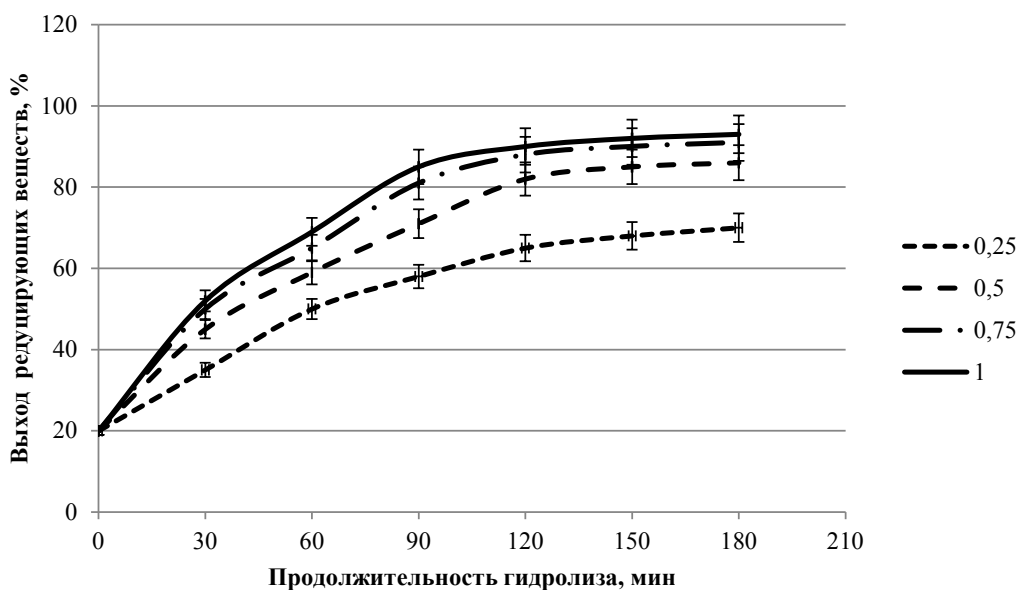


Рис. 1. Влияние концентрации Termamyl (в % к массе зернопродуктов) на гидролиз крахмала растительной основы из риса

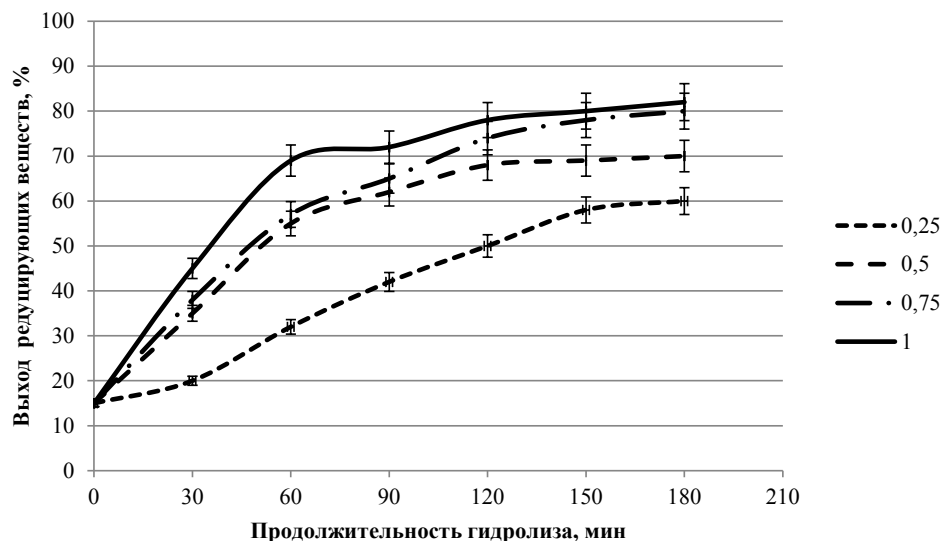


Рис. 2. Влияние концентрации Терматил (в % к массе зернопродуктов) на гидролиз крахмала растительной основы из гречки

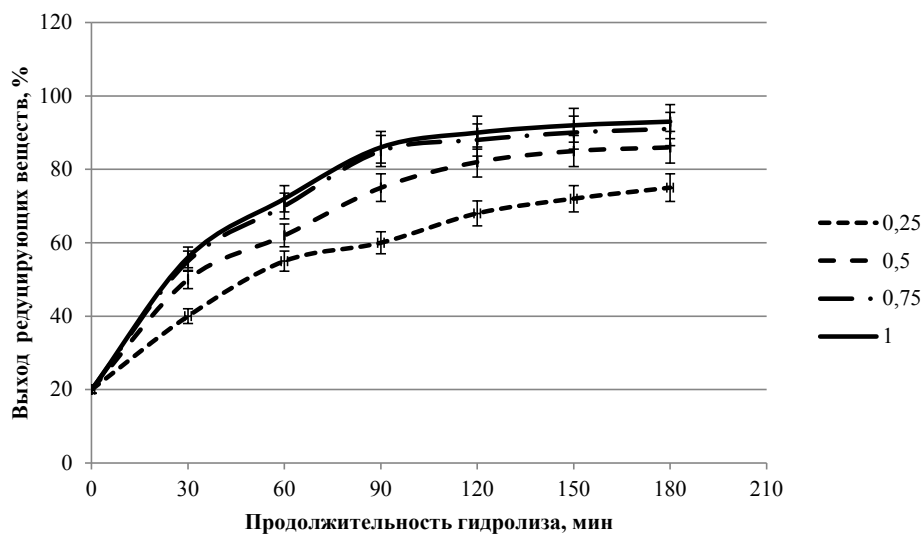


Рис. 3. Влияние концентрации OndeaPRO (в % к массе зернопродуктов) на гидролиз крахмала растительной основы из риса

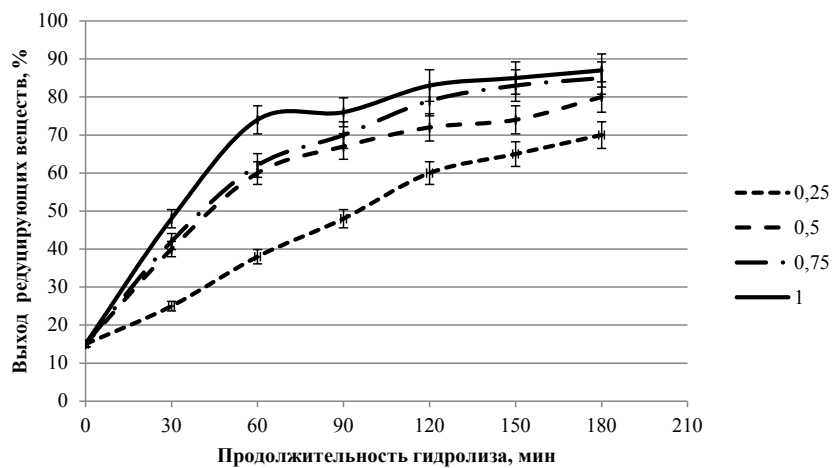


Рис. 4. Влияние концентрации OndeaPRO (в % к массе зернопродуктов) на гидролиз крахмала растительной основы из гречки



Константа Михаэлиса количественно равна концентрации субстрата при половине предельной скорости реакции гидролиза.

Полученные экспериментальные данные из рисунка 7 представлены в таблице 1.

Подставив данные из таблицы 1, получаем уравнения Михаэлиса-Ментен (1) для исследуемых ферментных препаратов и субстратов (растительных материалов) для принятых условий стационарной кинетики:

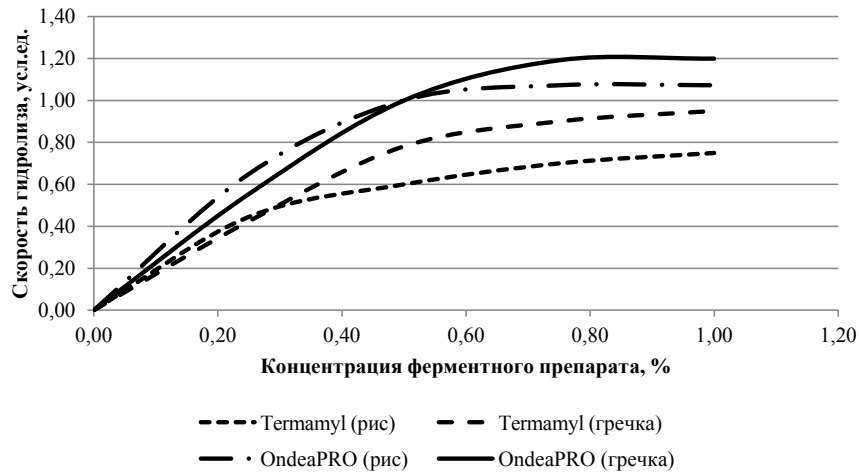


Рис. 5. Зависимость начальной скорости реакции от концентрации фермента

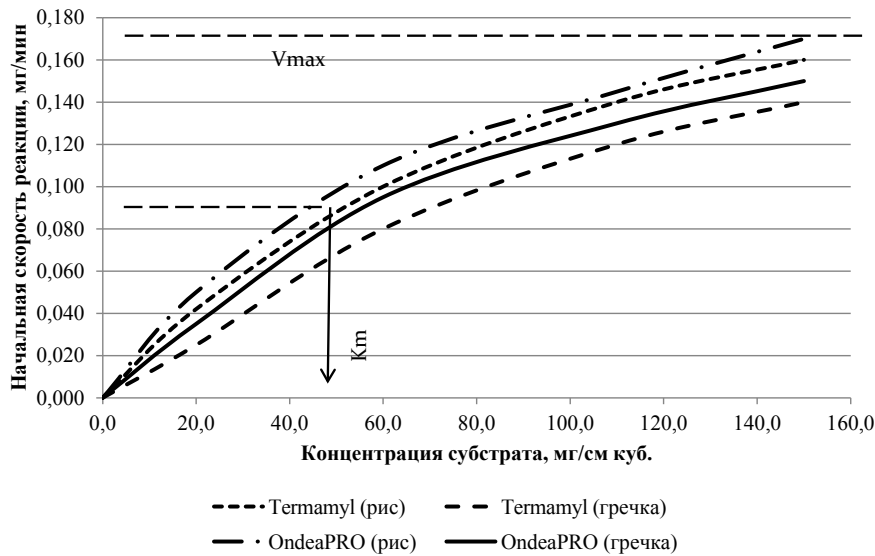


Рис. 6. Зависимость начальной скорости реакции от начальной концентрации субстрата

Таблица 1 – Константа Михаэлиса и предельная скорость биокатализа крахмала риса и гречки исследуемыми ферментными препаратами

Ферментный препарат (субстрат)	Константа Михаэлиса, K_m (мг/см ³)	Предельная скорость биокатализа, V_{max} (мг/(см ³ мин))
Termamyl (гречка)	40,0	0,14
OndeaPRO (гречка)	35,0	0,15
Termamyl (рис)	35,0	0,16
OndeaPRO (рис)	30,0	0,17

$$V = V_{\max} \frac{[S]}{K_m + [S]}, \quad (1)$$

$$V = \frac{0,14[S]}{40 + [S]} - \text{для ферментного препарата}$$

Termamyl при гидролизе растительной основы из гречки;

$$V = \frac{0,15[S]}{35 + [S]} - \text{для ферментного препарата}$$

Ondeapro при гидролизе растительной основы из гречки;

$$V = \frac{0,16[S]}{35 + [S]} - \text{для ферментного препарата}$$

Termamyl при гидролизе растительной основы из риса;

$$V = \frac{0,17[S]}{30 + [S]} - \text{для ферментного препарата}$$

Ondeapro при гидролизе растительной основы из риса.

Таким образом, исследования биокатализа растительных материалов ферментными препаратами индивидуального амилолитического действия (Termamyl) и комплексного (Ondeapro) показали, что наименьшая константа Михаэлиса характерна для препарата Ondeapro, представляющего собой смесь пулуланызы, α -амилазы, целлюлазы, ксиалазы, протеазы и липазы. Совокупность ферментативных активностей препарата способствует эффективному гидролизу атакуемого субстрата – крахмала, высвобождая его от связывающих соединений белкового и некрахмального происхождения оболочек крахмальных зерен злаков. Вследствие этого фермент-субстратный комплекс более устойчив в сравнении с вариантом использования индивидуального амилолитического фермента.

Выводы

В результате изучения процесса биокатализа растительных основ из злаковых культур (риса и гречки) с использованием ферментных препаратов амилолитического и комплексного действия получены кинетические характеристики – константа Михаэлиса и предельная скорость реакции гидролиза при заданных условиях стационарной кинетики. Ферментативный гидролиз растительных биополимеров

позволяет в «мягких» условиях (при практически нейтральном pH, температуре ниже 100 °C и нормальном давлении) направленно регулировать нутриентный состав и получать продукты питания функциональной направленности.

Список литературы

1. Birch C. S., Bonwick G. A. Ensuring the future of functional foods // *International Journal of Food Science & Technology*. 2018. Vol. 54. № 5. P. 1467–1485.
2. Production of highly nutritious functional food with the supplementation of wheat flour with lysine / C. Albert [et al.] // *Acta Universitatis Sapientiae, Alimentaria*. 2017. Vol. 10. № 1. P. 5–20.
3. Dietary fructooligosaccharides and potential benefit on health / M. Sabater-Molina, E. Lague, F. Torella, S. Zamora // *Physiol. Biochem*. 2009. Vol. 65. № 3. P. 315–328.
4. Роль пищевых волокон в питании человека / В. А. Тутельян [и др.]. М. : Новое тысячелетие, 2008. 325 с.
5. Glycemic index, glycemic load, and chronic disease risk – a meta-analysis of observational studies / A. W. Barclay [et al.] // *Am. J. Clin. Nutr*. 2008. Vol. 87. P. 627–637.
6. Low glycaemic index diets and blood lipids: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials / L. M. Goff, D. E. Cowland, L. Hooper, G. S. Frost // *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis*. 2013. Vol. 23. № 1. P. 1–10.
7. Пат. № 2444905 Частично гидролизованный зерновой белок A23J3/14, A23J3/34, A23J3/18 / Де саделер Йос Вилли Гислен Корнел (ВЕ), Карлескинд Даниэль Мари-Антуанетт (ВЕ), Маккрае Катарина Хиллагонда (ВЕ), Мехеус Элиза Маргрит Мария (ВЕ) ; заявл. 07.03.2008 ; опубл. 20.03.2012. Режим доступа : <https://www.freepatent.ru/patents/2444905>.
8. Development of a specialized high protein product for adaptive nutrition / E. I. Reshetnik, Yu. I. Derzhapolskaya, S. L. Gribanova, I. V. Khamaganova // *Prensa Medica Argentina*. 2019. T. 105. № 4. С. 197–204.
9. Теоретические аспекты формирования состава напитка для профилактического питания / И. Ю. Сергеева, В. С. Райник, А. С. Марков, Е. А. Вечтомова // *Техника и технология пищевых производств*. 2019. Т. 49. № 3. С. 356–366. DOI: 10.21603/2074-9414-2019-3-356-366.
10. Изучение кинетики ферментативного гидролиза растительных материалов на примере



овсяной муки / К. В. Доме [и др.] // Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности : матер. XIV Всерос. науч.-практ. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых с междунар. участием,

посвящ. 90-летнему юбилею акад. Саковича Г. В. Бийск : Алтайский государственный технический университет им. И. И. Ползунова, 2021. С.263–266. DOI: 10.25699/tohbipp.2021.99.56.010.

Сергеева Ирина Юрьевна, д-р техн. наук, доцент, заведующий кафедрой технологии продуктов питания из растительного сырья, ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет».
E-mail: sergeeva.76@list.ru.

Пермякова Лариса Викторовна, д-р техн. наук, доцент, профессор кафедры технологии продуктов питания из растительного сырья, ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет».
E-mail: delf-5@yandex.ru.

Райник Виталий Сергеевич, аспирант, кафедра технологии продуктов питания из растительного сырья, ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет».
E-mail: rainikwit@mail.ru.

Рыбинцева Ольга Анатольевна, студентка, кафедра технологии продуктов питания из растительного сырья, ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет».
E-mail: rybintseva1985@mail.ru.

* * *