

ВПЛИВ ФЕРМЕНТІВ НА ЧУТЛИВІСТЬ КРОХМАЛЮ ГОРОХОВОГО СОЛОДУ

Н.Е. Фролова, науковий співробітник

В.М. Кошова, кандидат технічних наук

В.А. Домарецький, доктор технічних наук

Український державний університет харчових технологій

Чутливість субстрату до впливу ферментів (атакованість) у першу чергу пов'язана з дією амілаз — власних, активованих пророщуванням чи внесених ззовні. Це можуть бути амілази тваринного, рослинного чи мікробного походження.

Гороховий солод накопичує незначну кількість амілолітичних ферментів, особливо α -амілаз, здатних гідролізувати нативний крохмаль. Як наслідок цього, затори з борошна горохового солоду не оцукрюються навіть при збільшенні тривалого пророщування. Це дає підставу вважати його специфічним субстратом, гідроліз якого під дією амілаз різного походження буде мати свої особливості. Щоб їх виявити, були використані такі джерела амілолітичних ферментів: ячмінний солод, суміш солодів (ячмінний, просяний і вівсяний у співвідношенні 2:1:1), соєвий солод, бактеріальна амілаза ферментного препарату — α -мілосубтиліну Г20х. Для більш детальної характеристики атакваності крохмалю гороховою солоду було вивчено дію на нього водної витяжки власних амілаз.

Амілосубтилін Г20х, амілази солодів використовували у вигляді водних витяжок. У зв'язку з різним складом амілазного комплексу обраних ферментів та для порівняння їх дії на крохмаль горохового солоду в них були визначені за аналогічних умов амілолітична та оцукрююча активність, показники якої наведені в таблиці. Виділення крохмалю з горохового солоду здійснювали за методикою, згідно з якою відмивання білків з крохмального розчину проводилось 0,06%—ним розчином лугу та спиртовими розчинами різних концентрацій. Мікроскопічними дослідженнями визначено, що склад

препаратів крохмалю — цілі крохмальні зернини овальної форми, без сторонніх домішок. Вологість препаратів крохмалю — 14,6 %. Усі розрахунки проводилися для сухих речовин крохмалю.

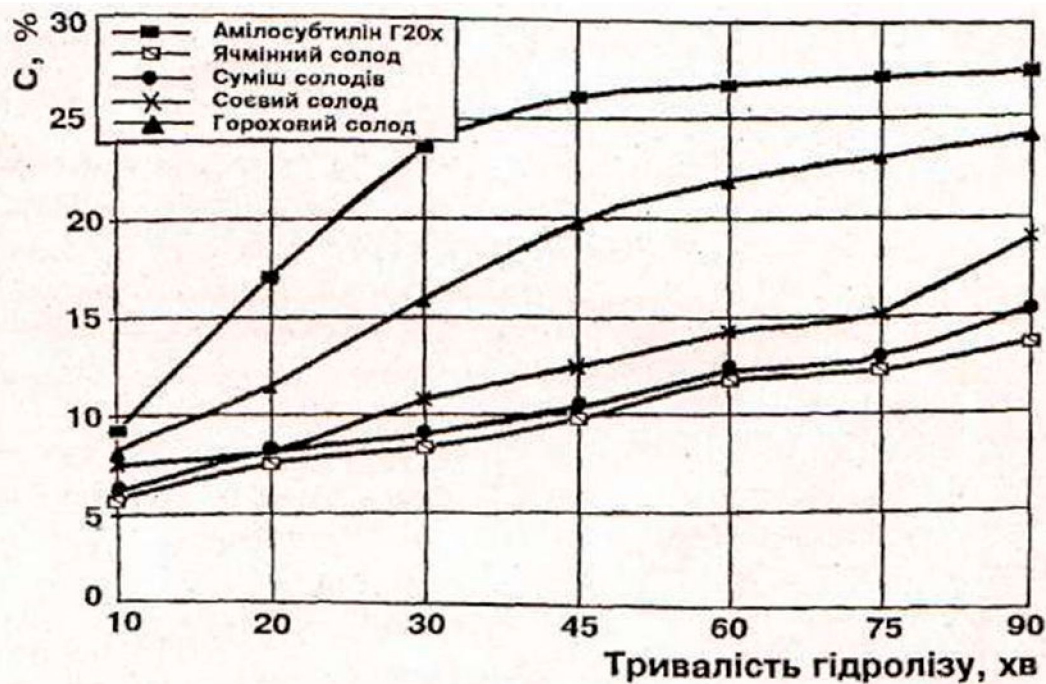


Рис. 1. Кінетичні криві перетворення крохмалю горохового солоду під дією амілаз різного походження.

Ферментному гідролізу піддавали нативний крохмаль, у вигляді 2,75%-ної водної суспензії, а також однопроцентного крохмального клейстеру.

Ефективність ферментного гідролізу контролювали динамікою перетворення крохмалю (%) та ступенем оцукрювання (мг мальтози на один грам сухої речовини крохмалю).

Для визначення динаміки перетворення крохмалю було застосовано колOMETричний метод вимірювання оптичної густини йод-крохмальних комплексів. З метою порівняння оцукрюючої можливості амілаз досліджували накопичення редукованих цукрів. Досліди проводили за аналогічних умов: кількість і структура субстрату, механічна дія при перемішуванні, температура (63 °С, 90 хвилин — при вивченні динаміки; 50°С, 60 хвилин — при оцукрюванні), а також однакова кількість одиниць активності - 1 од. ОА та 0,7 од. АА на один грам сухої речовини крохмалю горохового солоду.

Така кількість одиниць АА мала забезпечувати, за результатами попередніх дослідів, ступінь гідролізу субстрату не більш як на 30 відсотків). Для одержання заданої кількості ОА ферментні препарати змішували з водою у співвідношенні амілосубтилін Г20х — 1:2500; витяжка ячмінного солоду — 1:625, суміші солодів — 1:150, соєвого солоду — 1:8, горохового солоду — 1:4 з використанням фосфорного буферного розчину. Ферментний гідроліз проводили без корекції рН затору на рН оптимуму ферментів.

Процентну кількість перетвореного крохмалю при цьому розраховували за формулою $C = (D_1 - D_2)/D_1 \cdot 0,1 \cdot 100$, де D_1 і D_2 — оптична густина на один грам сухих речовин контрольного розчину й розчину, що аналізується; $0,1$ — маса крохмалю, взятого на аналіз.

З аналізу результатів досліджень, поданих на рис. 1, видно, що амілази різного походження мають різну чутливість до крохмального клейстеру горохового солоду.

Найбільш чутлива — бактеріальна амілаза (амілосубтилін Г20х), в якій широка субстратна специфічність може зумовлювати інтенсивний гідроліз субстрату. На кінетичних кривих розщеплення крохмалю під дією амілосубтиліну Г20х можна побачити дві ділянки. Для першої характерна значна швидкість розщеплення крохмалю — за 30 хвилин від початку гідролізу було зруйновано близько 85% глюкозидних зв'язків, гідролізованих ферментом протягом дослідного періоду. На другому етапі швидкість руйнування зв'язків істотно скорочується, і протягом 60 наступних хвилин розщеплення крохмалю здійснювалося лише на 15%.

Така послідовність руйнування глюкозидних зв'язків крохмалю властива всім α -амілазам мікробного походження з різними концентраціями ферменту й субстрату. За даних умов максимальна глибина розщеплення крохмального клейстеру горохового солоду під дією амілосубтиліну Г20х становить 28% .

Криві розщеплення крохмального субстрату під дією солодових амілаз мають більш похилу початкову ділянку. За період вивчення амілази

ячмінного солоду та суміші солодів здійснили близько 15% заданого ступеня гідролізу. Для одержання більш високих показників потрібно продовжувати час гідролізу, або збільшувати кількість ферментів. Амілази соєвого солоду більш чутливі до субстрату, ніж амілази зернових солодів.

Активність амілолітичних ферментів солоду гороху дуже низька, але за умовою експерименту вона дорівнювала активності амілаз з інших джерел. За даними одержаних результатів чутливість амілаз горохового солоду до його крохмального субстрату висока, що підтверджується високим ступенем руйнування глюкозидних зв'язків – 24,6%. Але для проведення такого гідролізу треба використати зерна гороху в 50000 разів більше, ніж амілосубстиліну Г20х, в 500 раз більше, ніж ячмінного солоду, в 2,5 рази більше, ніж соєвого солоду. На рис. 2 показано залежність накопичування мальтози від дії амілаз різного походження на нативний та клейстеризований крохмаль горохового солоду. Порівнюючи одержані результати, бачимо, що структура субстрату має великий вплив на ефективність дії ферментів. Нативний крохмаль значно важче піддається деградації ферментами, як рослинного, так і мікробного походження. На відмінно від клейстеризованого (аморфізованого) крохмалю, нативний крохмаль, крім аморфної частки – амілопектину, має кристалічну складову, амілозу. Аморфна частка крохмалю значно краще піддається дії ферментів внаслідок можливості проникнення його до її внутрішніх глюкозидних зв'язків. Гідролізуватися кристалічна складова може лише на поверхні субстрату, де дії ферменту підлягає лише частина таких зв'язків. Нативний крохмаль гороху, як і його солоду, на відміну від крохмалю зернових, має високий вміст амілози, що позначається на ефективності його гідролізу. На початку ферментного гідролізу на субстраті має адсорбуватись фермент. β – амілази не можуть на кристалічній амілазі нативного крохмалю і гідролізувати її. Цим можна пояснити низьке накопичення цукрів при гідролізі нативного крохмалю витяжками горохового та соєвих солодів, яких значною мірою складаються з β -амілаз. Тим часом α -амілази можуть гідролізувати нативний крохмаль. Бактеріальна

α -амілаза гідролізує його на окремі фрагменти. В подальшому з меншою швидкістю на декстрини і деяку кількість мальтози. Як видно з рис. 2, за аналогічних умов гідролізу α -амілази зернових солодів значно гірше атакують нативний крохмаль горохового солоду, ніж амілосубтилін Г20х.

Активність амілаз різного походження		
Джерело амілаз	Амілолітична активність, АА, од/г	Оцукрююча активність, ОА, од/г
Ячмінний солод	18,8	6,2
Суміш солодів	13,58	2,76
Соевий солод	0,15	0,287
Гороховий солод	0,05	0,169
Амілосубтилін Г20х	2600,0	160,0



Рис. 2. Ферментна атакваність крохмальних субстратів горохового солоду амілазами різного походження.

Клейстеризація (аморфізація) крохмалю горохового солоду підвищує атакваність ферментами. Під дією температури кристалічні частки крохмалю аморфізуються. За таких умов β -амілаза "працює" швидше, ніж

α -амілаза, накопичуючи значну кількість мальтози. При цьому вона може конкурентно інгібувати α -амілазу ферментів, що обмежує її здатність збільшувати кількість проміжних продуктів для β -амілази. Це інгібування та низька чутливість амілаз ячмінного солоду до глюкозидних зв'язків крохмалю горохового солоду позначається на кількості мальтози меншій, ніж при гідролізі амілазами інших джерел. Поширення спектра дії ферментів ячмінного солоду завдяки амілазам і декстринам просяного та вівсяного солодів дає змогу витяжкою суміші солодів атакувати клейстер крохмалю горохового солоду глибше, ніж витяжкою ячмінного солоду. В цьому випадку вихід мальтози становить 116% стосовно ячмінного.

Бактеріальний ферментний препарат — це поліферментна амілазна система з широкою субстратною специфічністю. Його дія на субстрат дає змогу збільшити вихід мальтози в два рази до дії витяжки суміші солодів та ячмінного солоду.

Найкраще атакують крохмальний клейстер горохового солоду власні амілази. При дії на субстрат вони накопичують мальтози у 2,5 рази більше, ніж при дії на нього витяжкою ячмінного солоду, в 1,5 рази більше, ніж амілосубтиліном Г20х, що підтверджує високу чутливість власних амілаз солоду до крохмалю зерна.

Таким чином, крохмаль горохового солоду є специфічним субстратом, який атакується ферментами різного походження з різною ефективністю. Найбільша чутливість до глюкозидних зв'язків крохмальних субстратів горохового солоду — за амілосубтиліном Г20х, який досить глибоко гідролізує як нативний, так і аморфізований крохмалі. Власні амілази горохового солоду виявляють значну чутливість до крохмального клейстеру і майже не атакують нативний крохмаль зерна. Для одержання ефективної витяжки амілолітичних ферментів із горохового солоду необхідно використати зерна горохового солоду в 50000 разів більше, ніж амілосубтиліну Г20х.

