

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР

В работе представлено исследование ферментативной активности зерна пшеницы, ячменя и овса, определена амилолитическая и протеолитическая активность ферментов, активность липазы.

Ключевые слова: фермент, активность, пшеница, ячмень, овёс, мука, α -амилаза, β -амилаза, протеазы, липаза, гидролазы, прогоркание.

S.B. Gridina, E.P. Zinkevich,
T.A. Vladimirtseva, K.A. Zabusova

ENZYMATIC ACTIVITY OF GRAIN CROPS

The research of the grain enzymatic activity of wheat, barley and oats are presented in the article, the enzyme amylolytic and proteolytic activity and the lipase activity are determined.

Key words: enzyme, activity, wheat, barley, oats, flour, α -amylase, β -amylase, proteases, lipase, hydrolases, rancidity.

Введение. Для правильной организации технологического процесса и определения рационального пути использования растительного сырья в процессе его переработки необходимо знать не только его химический состав, но и биохимические показатели качества, а именно – активность и условия действия содержащихся в нём ферментов. Установлено, что на состав и качество зерна большое влияние оказывают внешние и внутренние факторы. К внешним факторам относят климат, почвы, агротехнические мероприятия, к внутренним сорт или наследственность [1, с.88].

В зёрнах хлебных злаков содержатся разнообразные ферменты, сосредоточенные главным образом в зародыше и периферийных частях зерна. Ввиду этого в муке высоких выходов ферментов содержится больше, чем в муке низких выходов.

Ферментативная активность у разных партий муки одного и того же сорта различна. Она зависит от условий произрастания, хранения, режимов сушки и кондиционирования зерна перед помолом. Повышенная активность ферментов отмечена у муки, полученной из несозревшего, проросшего, морозобойного или поражённого клопом-черепашкой зерна. Высушивание зерна при жёстком режиме снижает активность ферментов, при хранении муки (или зерна) она также несколько уменьшается.

Ферменты активны только при достаточной влажности среды, поэтому при хранении муки влажностью 14,5 % и ниже действие ферментов проявляется очень слабо. После замеса в полуфабрикатах начинаются ферментативные реакции, в которых участвуют гидролитические и окислительно-восстановительные ферменты муки. Гидролитические ферменты (гидролазы) разлагают сложные вещества размолотых зёрен на более простые водорастворимые продукты гидролиза. Отмечено, что протеолиз в пшеничном тесте активируется веществами, содержащими сульфгидрильные группы, и другими веществами с восстанавливающими свойствами (аминокислота цистеин, тиосульфат натрия и др.).

Вещества с противоположными свойствами (со свойствами окислителей) значительно тормозят протеолиз, укрепляют клейковину и консистенцию пшеничного теста. К ним относятся перекись кальция, бромат калия и многие другие окислители. Воздействие окислителей и восстановителей на процесс протеолиза сказывается уже при очень малых дозировках этих веществ (сотые и тысячные доли процента от массы муки). Существует теория, что влияние окислителей и восстановителей на протеолиз объясняется тем, что они меняют соотношение сульфгидрильных групп и дисульфидных связей в молекуле белка, а возможно, и самого фермента. Под действием окислителей за счёт HS-групп образуются дисульфидные связи, укрепляющие структуру белковой молекулы. Восстановители разрывают эти связи, что вызывает ослабление клейковины и пшеничного теста. Химизм действия окислителей и восстановителей на протеолиз окончательно не установлен.

Автолитическая активность пшеничной и особенно ржаной муки служит важнейшим показателем её хлебопекарного достоинства. Автолитические процессы в полуфабрикатах при их брожении, расстойке и выпечке должны протекать с определённой интенсивностью. При повышенной или пониженной автолитической активности муки в худшую сторону изменяются реологические свойства теста и характер брожения полуфабрикатов, возникают различные дефекты хлеба. Для того чтобы регулировать автолитические процессы, необходимо знать свойства важнейших ферментов муки. К основным гидролитическим ферментам муки относятся протеолитические и амилолитические ферменты [2].

Липаза расщепляет жиры муки при хранении на глицерин и свободные жирные кислоты. В зерне пшеницы активность липазы невысока. Если хранить муку в течение длительного срока, свыше девяти-десяти месяцев, начинается нежелательный процесс ее прогоркания. Крупа также легко может подвергаться прогорканию. Прогоркание муки и крупы связано с разложением жира. Скорость прогоркания муки или крупы зависит от нескольких факторов. Во-первых, от доступа кислорода. Под влиянием кислорода воздуха происходит окисление ненасыщенных жирных кислот, причём образуются их перекиси и гидроперекиси, которые легко окисляют различные вещества, имеющиеся в муке и крупе, в том числе каротиноиды и другие молекулы жирных кислот. В результате образуются продукты окислительного разложения жира, в частности различные кетоны и альдегиды, обладающие горьким вкусом и неприятным запахом. В бескислородной среде прогоркания муки и крупы не наблюдается. Однако прогоркание ускоряется под влиянием липоксигеназы – фермента, катализирующего окисление жирных кислот. Вместе с тем процесс прогоркания ускоряется благодаря действию липазы, расщепляющей жиры с образованием свободных жирных кислот, которые окисляются быстрее, чем жирные кислоты, связанные в жире в виде триацилглицеринов. Второй важный фактор, от которого зависит скорость прогоркания, – температура. Чем выше температура хранения муки и крупы, тем быстрее наступает прогоркание. Наоборот, если хранить муку и крупу при низких температурах, прогоркание происходит значительно медленнее. Третий фактор, от которого зависит процесс прогоркания, – это качество исходного зерна [3].

Цель исследований. Обнаружение и изучение активности ферментов пшеницы, ячменя и овса, выращенных в условиях Новосибирской области в 2012–2013 гг.

Задачи исследований. Определить амилолитическую и протеолитическую активность зерновых культур; определить активность липазы зерновых культур.

Объект и методы исследований. Объектом исследования служили сорта мягкой яровой пшеницы Алтайская 325, ячменя Биом, овса СИР 4. Пшеница мягкая яровая Алтайская 325 относится к группе средне-спелых сортов, вегетационный период 85–90 дней. Устойчива к полеганию. Умеренно восприимчива к септориозу, восприимчива к корневым гнилям. Сильновосприимчива к бурой ржавчине, мучнистой росе. Масса 1000 зёрен 38–42 г. Средняя урожайность в Западно-Сибирском регионе составила 27,3 ц/га. Хлебопекарные качества хорошие. Ценная пшеница [4]. Яровой ячмень Биом относится к группе среднеранних сортов с вегетационным периодом 79–82 дня. Устойчив к полеганию, головнёвым заболеваниям. Крупнозёрный, масса 1000 зёрен 47,7 г. Содержание белка в зерне 11,3–13,0 %. Средняя урожайность 42,4 ц/га. Ячмень сорта Биом пивоваренного и зернокармального назначения [5]. Овёс СИР 4 (ДАБ, 0,1%, Сельма – исходный сорт) районирован в Новосибирской, Омской областях и Алтайском крае с 1989 г. Этот сорт обладает высокой продуктивностью и устойчивостью к полеганию. Потенциал урожайности – 70–90 ц/га [6, с.44].

Выделение из зёрен пшеницы, ячменя и овса α - и β -амилазы основано на хорошей растворимости в воде, поэтому их можно получить в виде водной вытяжки. Для получения раствора амилаз навеску размельчённых зёрен (10 г) растирают в ступке с небольшим количеством воды до однородной массы и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл. Объём доводят до метки, содержимое перемешивают и оставляют на холоде (4–2°C) на 10–12 часов. По истечении времени экстрагирования содержимое перемешивают и центрифугируют в течение 10 минут со скоростью 3000 об/мин. Центрифугат используют в качестве источника α - и β -амилаз [7, с.37].

Разделение α -амилазы и β -амилазы из водной вытяжки основано на различной устойчивости этих ферментов к температуре и pH среды. При нагревании водной вытяжки до 70°C β -амилаза денатурирует, тогда как α -амилаза при этой температуре сохраняет нативную конформацию и активность. Оптимум действия β -амилазы проявляется при pH 4,8, однако α -амилаза при таких значениях pH теряет свою активность, а при понижении до pH 3,3 – денатурирует.

Активность амилаз определяли колориметрическим методом, по массе расщеплённого крахмала, предложенным Б.П. Плешковым [8, с.223]. Принцип метода состоит в том, что активность амилаз рассчитывается по разности между массами взятого для опыта и оставшегося по окончании опыта нерасщеплённого крахмала, определяемого фотометрическим анализом по цветной реакции с йодом. Активность амилаз выражают в условных единицах (мг расщеплённого крахмала на 1 г зерна за 1 мин).

Протеолитическую активность определяли ферментным препаратом, выделенным из зерна пшеницы, ячменя и овса, действуя на раствор стандартного белка гемоглобина рН 3,0 и казеина рН 8,0, затем неразложившийся белок осаждали, а в фильтрате определяли количество разложившегося белка по колориметрической реакции Фолина. Протеолитическую активность препарата выражают в единицах протеолитической активности на 1 г зерна за 1 час.

Ферментную вытяжку готовили: 2 г размолотых зёрен заливали 20 мл воды и настаивали при температуре 3–5°C в течение 1 ч при периодическом помешивании. Затем центрифугировали 10 минут при 5000 об/мин [8, с.228].

Принцип метода определения активности липазы основан на определении количества жирных кислот, образующихся при действии липаз на растительный жир. Для определения липазы зерна пшеницы, ячменя и овса готовили ферментную вытяжку из 3 г размолотого зерна, залитого 50 мл щелочного боратного буфера рН 8,5. Настаивали 45 минут, периодически встряхивая, затем центрифугировали 10 минут при 3000 об/мин. Для определения ферментативной активности берут 2 пробы по 20 мл и переносят их в конические колбы на 100 мл с притёртыми пробками. Содержимое одной из колб кипятят 3 минуты для инактивации ферментов. Затем в колбы вносят по 1 мл чистого подсолнечного масла, которое служит субстратом для действия липаз, добавляют по 5 капель толуола, перемешивают и ставят в термостат при температуре 30°C на 20–24 часа.

После инкубации в термостате во все колбы приливают по 50 мл смеси этилового спирта с эфиром (4:1) и взбалтывают. После отстаивания титруют 0,1 н. спиртовым раствором NaOH в присутствии нескольких капель тимолфталейна. Активность щелочных липаз выражают в мл 0,1 н. NaOH, пошедшей на нейтрализацию жирных кислот, образовавшихся в результате действия липаз на 1 г зерна [8, с.219].

Обсуждение и результаты исследований. Амилазы действуют на крахмал следующим образом: во-первых, они разжижают крахмал. Далее, амилазы обладают декстринирующим действием, т.е. они способны превращать крахмал в различные декстрины, что можно легко проследить по изменению окраски с йодом. И наконец, поскольку при действии амилаз на крахмал образуется сахар (мальтоза), они обладают осахаривающим действием.

Амилазы имеют очень большое значение в оценке качества зерна и муки: процесс накопления сахара во время брожения теста и сам процесс брожения зависят от скорости накопления в тесте мальтозы, что в свою очередь зависит от действия этого фермента. Амилазы имеют очень большое значение в спиртовой и пивоваренной промышленности, где применяется солод, представляющий собой проросшее и осторожно высушенное зерно, которое является источником активной амилазы [3; 9, с.10].

α - и β -амилазы существенно различаются по своим свойствам: β -амилаза в более кислой среде действует интенсивнее, чем α -амилаза. Таким образом, если подкислять тесто, α -амилаза будет быстро терять свою активность. Это имеет очень большое значение при переработке муки из проросшего зерна, в которой как раз много α -амилазы, ухудшающей её хлебопекарные качества.

α - и β -амилазы различаются также по своей термостабильности, устойчивости к действию высоких температур. α -амилаза пшеницы термостабильнее, она действует при более высоких температурах, чем β -амилаза. Поэтому зерновая α -амилаза может действовать во время выпечки хлеба.

Результаты исследований показали, что амилолитическая активность зерна мягкой яровой пшеницы Алтайская 325 составила 63,0 усл.ед.; активность α -амилазы 1,85 усл.ед., β -амилазы 1,25 усл.ед. Амилолитическая активность зерна ячменя Биом 60,53 усл.ед., активность α -амилазы 1,9 усл.ед., β -амилазы 2,85 усл.ед. Амилолитическая активность овса СИР 4 за годы исследований составила 8,59 усл.ед., активность α -амилазы 1,67 усл.ед., β -амилазы 1,46 усл.ед.

Протеолитические ферменты обычно разделяют на пептидазы и протеиназы. Пептидазы катализируют гидролитическое расщепление полипептидов и дипептидов, а протеиназы осуществляют гидролиз непосредственно белков. Несмотря на то что отдельные протеолитические ферменты получены в кристаллическом виде и хорошо изучены, в целом эта группа ферментов исследована ещё недостаточно. Поэтому при

обычных биохимических исследованиях наиболее просто определить суммарную активность протеолитических ферментов.

Ферментативная активность кислых протеаз в зерне мягкой яровой пшеницы Алтайская 325 составила 0,15 усл.ед., щелочных протеаз 0,2 усл.ед. В зерне ячменя Биом в 2012 г. активность кислых протеаз не выявлена, в 2013 г. составила 0,22 усл.ед.; активность щелочных протеаз за годы исследований 0,92 усл.ед. В зерне овса СИР 4 активность кислых протеаз составила 0,69 усл.ед., активность щелочных протеаз в 2012 г. – 0,02 усл.ед., в 2013 г. активность щелочных протеаз не выявлена.

В любом зерне содержится липаза, но особенно активна она в семенах клещевины. Липаза зерна злаков отличается от клещевинной лучшей растворимостью в воде. Липаза пшеничных зародышей имеет оптимум действия при pH 8.

Улучшение качества клейковины и хлебопекарных качеств пшеничной муки при созревании объясняется тем, что сразу же после размола зерна в муке начинается процесс гидролиза жира, происходящий под действием липазы. Образующиеся в результате гидролиза свободные ненасыщенные жирные кислоты – олеиновая, линолевая и другие – оказывают сильное действие на белки клейковины, укрепляют её, вследствие чего она становится более упругой, более эластичной. По-видимому, именно этим объясняется улучшение качества клейковины и хлебопекарных качеств, которое наблюдается при созревании пшеничной муки [3].

Активность щелочных липаз у мягкой яровой пшеницы Алтайская 325 составила 2,28 усл.ед., ячменя Биом 3,38 усл.ед. и овса СИР 4 2,17 усл.ед.

Выводы

1. Амилолитическая активность у зерна мягкой яровой пшеницы Алтайская 325 и зерна ячменя Биом выше по сравнению с амилолитической активностью зерна овса СИР 4.

2. Активность β -амилазы у зерна ячменя Биом выше, чем у зерна мягкой яровой пшеницы Алтайская 325 и зерна овса СИР 4.

3. За годы исследований кислые протеазы обнаружены у зерна мягкой яровой пшеницы Алтайская 325 и зерна овса СИР 4, щелочные протеазы – у зерна мягкой яровой пшеницы Алтайская 325 и зерна ячменя Биом.

4. Активность щелочной липазы у зерна ячменя Биом больше по сравнению с активностью зерна мягкой яровой пшеницы Алтайская 325 и зерна овса СИР 4.

Литература

1. *Зинкевич Е.П., Гридина С.Б.* Качество зерна яровой мягкой пшеницы // *Инновации – приоритетный путь развития АПК.* – Кемерово, 2009. – С. 246.
2. Химический состав муки. – URL: <http://www.hlebopechka.net/h42.php> (дата обращения: 28.02.2013).
3. *Техническая биохимия* / под ред. *В.Л. Кретовича.* – М.: Высш. шк., 1973. – 456 с.
4. Пшеница мягкая яровая, сорт Алтайская 325. – URL: <http://agrovista.agronationale.ru/sorta/8/sort-7492.htm> (дата обращения: 24.02.2014).
5. Сорт яровой ячмень Биом. – URL: <http://altayfarmer.ru/products/173/816> (дата обращения: 19.11.2013).
6. *Азовцева А.П.* Использование химического мутагенеза в селекции овса на качество // *Селекция сельскохозяйственных культур на качество.* – Новосибирск, 2001. – С. 152.
7. *Биохимия: сб. лаборатор. работ / В.В. Шапкарин, А.П. Королёв, С.Б. Гридина [и др.].* – Кемерово, 2005. – 84 с.
8. *Плешков Б.П.* Практикум по биохимии растений. – М.: Агропромиздат, 1985. – 255 с.
9. *Ильченко В.Е.* Роль агрофона в формировании углеводно-амилазного комплекса зерна пшеницы: автореф. дис. ... канд. техн. наук: 03.00.04. – М., 2008. – 10 с.

