

УДК: 631.45:633.16:577.152.34

АМИЛОЛИТИЧЕСКИЕ И ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ ЯЧМЕННОГО СОЛОДА, ПОЛУЧЕННОГО С ПРИМЕНЕНИЕМ ПРЕПАРАТОВ ФИТОРЕГУЛЯТОРОВ

Т.И. ШАТИЛОВА¹, С.Л. БЕЛОПУХОВ¹, Е.В. РОМАНОВА¹, И.С. ВИТОЛ², Г.П. КАРПИЛЕНКО²

(¹ РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева;² Московский государственный университет пищевых производств)

Показана принципиальная возможность использования препаратов фиторегуляторов «Циркон», «Новосил», «АОБ-С₇» с целью интенсификации процесса солодоращения, улучшения технологических и биохимических показателей качества солода как при обработке вегетирующих растений, так и при добавлении в раствор для проращивания зерна. Солод, полученный из ячменя, обработанного фиторегуляторами, характеризуется более высокой активностью и термостабильностью амилаз, а также нейтральных и кислых протеиназ, обеспечивающих протеолиз запасных белков при проращивании.

Ключевые слова: ячменный солод, показатели качества солода, фиторегуляторы, амилазы, нейтральные и кислые протеиназы.

Регулирование процесса прорастания в производстве солода для пивоваренной промышленности является одной из важных задач. В нативном зерне регуляция ростовых процессов осуществляется несколькими группами соединений различной химической природы, действующих взаимосвязанно в метаболических цепях. Роль фитогормонов в этих процессах наиболее изучена. Роль других соединений, в том числе фенольной и терпеновой природы изучена явно недостаточно. Физиологическая активность подавляющего большинства фиторегуляторов обусловлена их способностью влиять на какой-либо компонент фитогормональной системы, оказывать индуцирующие или ингибирующие эффекты на различные ферментные системы, изменять интенсивность метаболических процессов [1, 2, 3, 6, 8, 9, 10, 14, 15].

Целью работы являлось изучение влияния препаратов регуляторного действия — фиторегуляторов — на активность ферментов амилолитического и протеолитического действия и технологические показатели качества солода и полученного из него сусла.

Методы исследований

Исследования проводились на образцах пивоваренного ячменя сорта Михайловский, выращенного на хорошо окультуренной почве с применением рекомендованных доз удобрений, в условиях Нечерноземья.

В работе использовали препараты-фиторегуляторы «Циркон», «Новосил» и «АОБ-С₇».

«Циркон» — действующее вещество — смесь гидроксикоричных кислот, получаемых из растительного сырья — эхинацеи пурпурной. Обладает ростстимулирующим и рострегулирующим эффектами, проявляет антибактериальное, противовирусное и фунгипротекторное действие.

«Новосил» — действующее вещество — смесь тритерпеновых кислот. Представляет собой экстракт из пихты сибирской, стимулирует рост растений и является индуктором иммунитета, обладает антибиотическим эффектом к комплексу грибных, бактериальных и вирусных болезней, повышает защитные функции растительного организма при воздействии неблагоприятных условий среды (засухи, мороза и т.п.) Препарат предназначен для предпосевной обработки семян или опрыскивания в период вегетации. [7, 9].

«АОБ-С₇» — алкилоксибензол, относящийся к группе фенольных липидов и иначе называемый алкилрезорцином. АОБ обладают антиоксидантным действием, повышают устойчивость к неблагоприятным воздействиям (стресс, механические повреждения, температура) [8].

В первой серии экспериментов изучали влияние препаратов «АОБ-С₇» и «Новосил» на активность протеаз солода, полученного из зерна ячменя, обработанного в процессе вегетации растений.

Обработку вегетирующих растений ячменя проводили препаратами «АОБ-С₇» и «Новосил» в 3-кратной повторности, с нормой расхода 100 мл/га. Препараты использовали совместно с обработкой полей гербицидами в фазе кушения культуры. На опытных и контрольных участках применялась одинаковая технология возделывания.

Для получения лабораторного солода проводили проращивание зерна ячменя при температуре 12-14 °С с предварительным замачиванием, чередующимся с длительными воздушными паузами (4 ч — вода, 8 ч — воздух), до влажности 42-45% [4]. Продолжительность проращивания составила 5 сут. Сушку зерна осуществляли по следующей схеме: первую влагу удаляли теплым воздухом (около 50 °С); подвяливание солода проводили при комнатной температуре в течение 36 ч. На следующем этапе солод подвергали сушке в воздушном термостате с постепенным поднятием температуры в течение 10 ч до 80 °С и выдерживали при этой температуре в течение 3 ч.

Активность протеаз определяли модифицированным методом Ансона по накоплению продуктов, не осаждаемых ТХУ [11]. В качестве субстрата при определении активности нейтральной протеазы (оптимум рН 6,1) использовали бычий сывороточный альбумин, кислой протеазы (оптимум рН 3,8) — лиофилизированный гемоглобин с добавлением в инкубационную смесь цистеина, конечная концентрация которого составляла 0,5%. Активность ферментов выражали по начальной скорости реакции в единицах шкалы прибора как разницу оптической плотности между нулевой и двадцатиминутной пробой (ΔD_{280}). Удельную активность протеаз выражали как отношение активности фермента к количеству белка в ферментном препарате в мг. Содержание водорастворимого белка определяли по методу Лоури [12].

Во второй серии экспериментов изучали действие препаратов фиторегуляторов, добавленных в последний раствор для замачивания при проращивании, на активность амилаз солода. Ранее было показано, что добавление в последнюю замочную воду препаратов «Новосил» и «Циркон» в концентрации 0,05 мг/мл позволяет интенсифицировать процесс солодоращения [11]. Определение активности амилаз проводили фотоколориметрическим методом. Метод основан на определении ско-

рости ферментативной реакции гидролиза крахмала, которую устанавливают по количеству прогидролизованного крахмала в процессе колориметрической реакции с йодом [5].

На заключительном этапе был проведен анализ качественных показателей лабораторного солода (органолептическая оценка, влажность, экстрактивность, продолжительность осахаривания) и сусла (активная кислотность, цветность, вязкость), полученного с применением препаратов регуляторного действия. При этом использовали методы, принятые в пивоваренной отрасли, в соответствии с действующими ГОСТами [5].

Результаты и их обсуждение

Динамика изменения активности нейтральных протеаз ячменя, выращенного на хорошо окультуренной почве с рекомендованными дозами удобрений в цепи непросошенное зерно — подвяленный солод — лабораторный солод, представлена на рисунке 1.

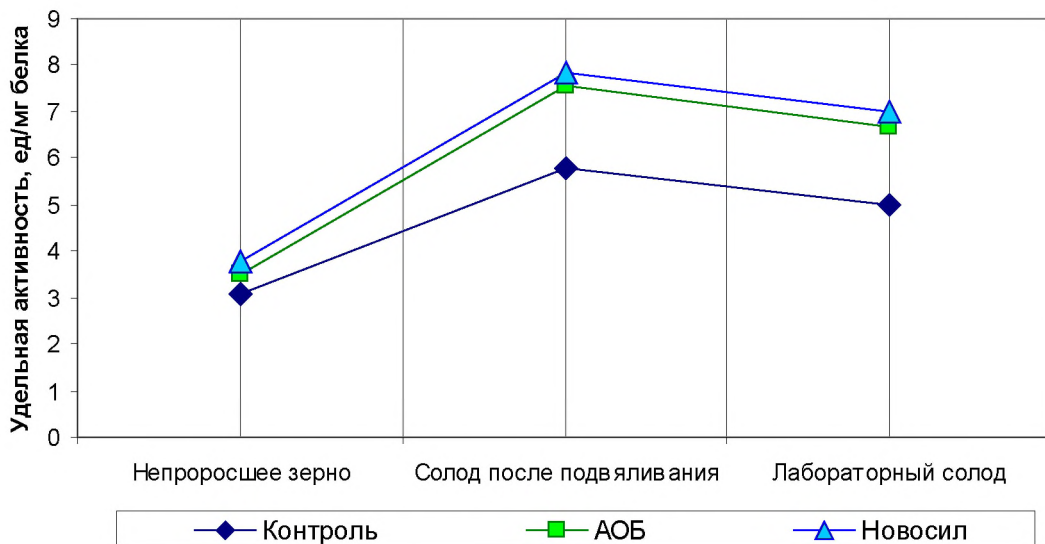


Рис. 1. Динамика изменения активности нейтральных протеаз ячменя при получении лабораторного солода

Как видно из рисунка 1, в образцах лабораторного солода, полученного из зерна ячменя, обработанного препаратами регуляторного действия, активность нейтральных протеаз снижается на 30% против 45% в контроле.

Это косвенно подтверждает данные о том, что используемые препараты регуляторных веществ являются индукторами иммунитета растений и способствуют усилению устойчивости к воздействию внешних факторов, в частности, высокой температуры, повышая термостабильность ферментов.

Такие изменения можно отнести к позитивным, поскольку нейтральные протеазы с оптимумом рН действия 6,1 играют важную роль не только в процессе солодоращения, но и в процессе затириания, обеспечивая необходимую степень «белкового растворения».

Анализ активности кислых протеиназ лабораторного солода, полученного после отсушки при 80 °С в течение 3 ч, показывает значительное снижение активности кислых протеиназ по сравнению с активностью в подвяленном солоде. По сути дела, величина активности кислых протеиназ в лабораторном солоде практически возвращается к величине активности этих ферментов в непроросшем зерне: отмечается превышение активности в среднем на 5% для необработанного зерна и на 10-15% для солода, полученного из зерна, обработанного препаратами регуляторных веществ. Так, на рисунке 2 представлена динамика изменения активности кислых протеаз ячменя, выращенного на хорошо окультуренной почве с рекомендованными дозами удобрений в цепи непроросшее зерно — подвяленный солод — лабораторный солод.

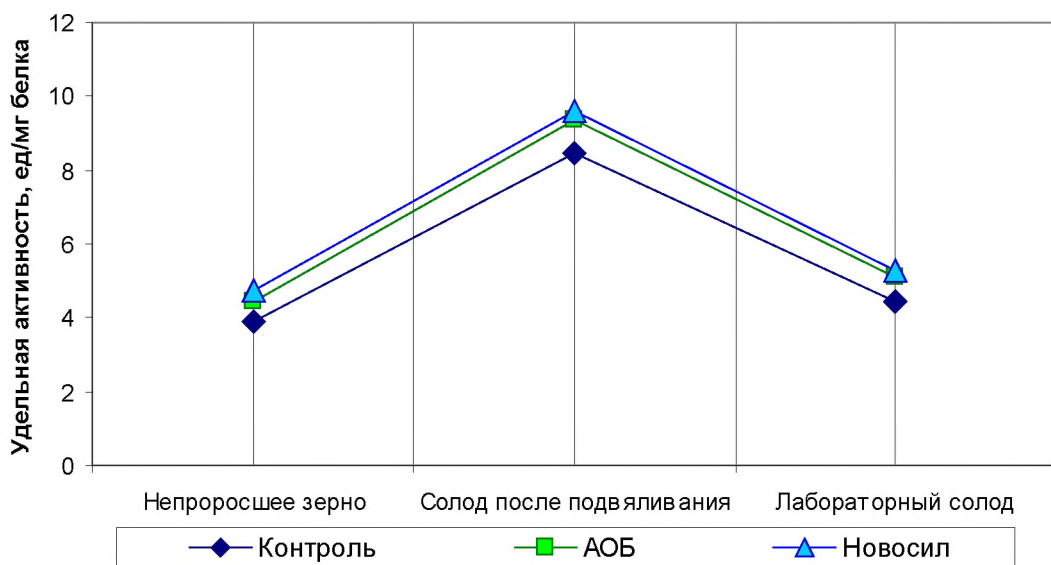


Рис. 2. Динамика изменения активности кислых протеаз ячменя при получении лабораторного солода

Характер изменения активности кислых протеиназ говорит о том, что им принадлежит ведущая роль в расщеплении запасных белков в процессе солодоращения. Нейтральные протеиназы, сохраняющие большую часть своей активности после сушки солода, наряду с термостабильными пептидазами, играют важную роль в превращении белковых соединений в процессе затириания, обеспечивают накопление низкомолекулярных азотистых соединений, являющихся источником азотистого питания дрожжей и продуктов гидролиза белков со средней молекулярной массой, отвечающих за пенообразование.

Обработка препаратами регуляторных веществ во всех случаях повышает активность нейтральных и кислых протеиназ, что является положительным моментом, поскольку способствует лучшему «белковому растворению» при солодоращении и затирании солода, в результате чего повышается выход экстрактивных веществ.

Проводилось также исследование влияния фиторегуляторов на активность амилаз подвяленного и готового лабораторного солода, полученного из ячменя, при проращивании которого в последнюю замочную воду вносили препараты регуляторного действия «Циркон» и «Новосил» с конечной концентрацией 0,05 мг/л.

Данные, представленные в таблице 1, позволяют констатировать, что в солоде после подвяливания удельная активность амилаз возрастает в 2,5-3 раза.

Таблица 1

Изменение амилолитического комплекса под действием фиторегуляторов

Вариант	Активность амилаз					
	Непроросшее зерно		Солод после подвяливания		Лабораторный солод после отсушки при 80 °С в течение 3 ч	
	УА*	%	УА	%	УА	%
Контроль	3,20±0,20	100	9,54±0,59	298	6,40±0,39	200
Циркон	7,84±0,55	100	21,11 ±1,35	269	20,38±1,52	260
Новосил	9,23±0,64	100	25,09±0,17	271	24,92± 1,43	270

* удельная активность, ед./мг белка.

В готовом лабораторном солоде после отсушки активность амилаз в опытных образцах снижается на 1-9%, в то время как в контроле — на 98%.

Это подтверждает способность исследуемых препаратов усиливать устойчивость к воздействию внешних факторов, в том числе и высокой температуры, повышая термостабильность ферментов.

Анализ качественных показателей лабораторного солода и суслу, полученного с применением препаратов регуляторного действия (обработка вегетирующих растений препаратами «АОБ-С₇», «Новосил» и добавление препаратов «Циркон» и «Новосил» в последнюю замочную воду при солодоращении), показал, что все образцы солода, полученного из ячменя, выращенного с применением регуляторов метаболизма, по органолептическим показателям соответствуют требованиям: имеют желтый цвет и типичный солодовый запах.

Другие показатели качества лабораторного солода представлены в таблице 2.

Обработка препаратами регуляторных веществ увеличивает экстрактивность солода на 1,0-2,0%.

Время, характеризующее продолжительность осахаривания, остается не достаточно высоким, хотя и сокращается при использовании препаратов регуляторных веществ.

**Показатели качества лабораторного солода,
полученного с применением фиторегуляторов**

Вариант	Влажность, %	Экстрактивность, %	Продолжительность осахаривания, мин
Контроль*	6,8±0,2	76,1 ±0,3	30
Контроль**	7,4±0,3	76,0±0,4	30
Циркон	6,8±0,2	78,2±0,3	25
Новосил	6,8±0,2	77,4±0,2	20
АОБ-С ₇	7,4±0,3	78,1 ±0,4	25
Новосил	7,4±0,3	77,0±0,3	25

Примечание: * добавление в раствор для замачивания при проращивании; ** обработка вегетирующих растений.

Сусло, полученное из всех исследуемых образцов, — прозрачное. Активная кислотность сусла колеблется в пределах от 5,70 до 5,85. Цветность лабораторного сусла, определяемая с помощью фотоэлектроколориметра, изменяется в пределах от 0,17 до 0,36 мл 0,1 г йода на 100 см³ Н₂О, что в целом укладывается в показатели цветности для светлого солода. Причем применение регуляторов метаболизма увеличивает этот показатель, что, очевидно, связано с общим повышением экстрактивности. Обработка препаратами регуляторных веществ снижает время фильтрации более чем в полтора раза, что, очевидно, связано с лучшей степенью растворения солода. Эти данные коррелируют с показателями относительной вязкости (контроль — 1,6264 мПас; опыт — 1,3298 мПас) и косвенно свидетельствуют о достаточно высоком содержании β-глюкана в совокупности с высокомолекулярными белками в образцах солода, полученного из ячменя, не прошедшего обработку регуляторными препаратами.

Выводы

1. Показана принципиальная возможность использования препаратов регуляторного действия с целью улучшения показателей качества солода как при обработке вегетирующих растений, так и при добавлении в замочную воду в процессе солодоращения.
2. Характер изменения активности нейтральных и кислых протеиназ при получении лабораторного солода свидетельствует о том, что они обеспечивают протеолиз запасных белков при проращивании; их активность в подвяленном солоде возрастает примерно в 2 и 3 раза (без применения и с применением регуляторных препаратов соответственно).
3. Обработка препаратами регуляторных веществ повышает термостабильность исследуемых протеиназ. В большей степени свою активность после сушки

солода сохраняют нейтральные протеиназы, что свидетельствует о том, что в процессе затиранья именно им принадлежит ведущая роль в превращении белковых соединений.

4. Применение фиторегуляторов «Циркон» и «Новосил» при добавлении в последнюю замочную воду при проращивании позволяет повысить термостабильность амилаз солода и получить лабораторный солод с более высокой (на 30-70%) амилотической активностью, чем в необработанных образцах.

5. Использование препаратов фиторегуляторов улучшает качественные показатели лабораторного солода и полученного из него сусле: экстрактивность, продолжительность осахаривания, цветность, время фильтрации.

Библиографический список

1. *Витол И. С., Карпиленко Г.П.* Белково-протеиназный комплекс ячменя, выращенного на разном агрофоне с применением препаратов регуляторного действия // Прикладная биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. № 3. С. 1—10.

2. *Карпиленко Г.П., Витол И.С.* Пути решения проблем создания отечественной сырьевой базы пивоваренного производства / Труды МГУПП. Вып. 1. М.: ПК МГУПП 2009. С. 118-135.

3. *Кулаева О.Н., Прокопцева О.С.* Новейшие достижения в изучении механизма действия фитогормонов // Биохимия. 2004. № 3. С. 293-310.

4. *Кунце П, Мит Г.* Технология солода и пива (пер. с нем.). СПб.: Профессия, 2001. 912 с.

5. *Мальцев П.М., Великая Е.П.* Химико-технологический контроль производства солода и пива. / М.: Пищевая промышленность. 1976. 446 с.

6. *Прусакова Л.Д., Малеванная Н.Н., Белопухов С.Л., Вакуленко В.В.* Регуляторы роста растений с антистрессовыми и иммунопротекторными свойствами // Агробиохимия. 2005. № 11. С. 76-86.

7. Современные технологии и перспективы использования экологически безопасных средств защиты растений и регуляторов роста / под ред. В.Г. Сычева. М.: ЦИНАО. 2001. 156 с.

8. *Степаненко И.Ю., Смирнова Е.А., Шаненко Е.Ф., Эль-Регистан Г.П.* Влияние алкилксибензолов на процессы солодоращения // Прикладная биохимия и микробиология. 2004. № 1. С. 83-88.

9. *Шатовалов А.А., Зубкова Н.Ф.* Отечественные регуляторы роста растений // Агробиохимия. 2003. № 11. С. 33-47.

10. *Шатилова Т.П., Витол И.С., Карпиленко Г.П., Семко В.Т.* Влияние фиторегуляторов на качество пивоваренного ячменя, выращенного на различном агрофоне // Доклады ТСХА. 2010. Вып. 282. С. 688-692.

11. *Шатилова Т.П., Герчиу Я.П., Бобков А.А., Тюленева Е.А., Попова С.А., Витол И.С., Карпиленко Г.П.* Препараты фиторегуляторы в производстве и формировании качества зерновых культур // Известия ТСХА. 2007. Вып. 3. С. 72-79.

12. *Anson M.I.* The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin // J. Gen. Physiol. 1938. Vol. 22. P. 79-82.

13. *Lowry O.P., Rosebrougt N.J., Farr A.I., Randall R.J.* Protein measurement with Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193. P. 265.

14. *Шатилова Т.П., Витол И.С., Герчиу Я.П., Белопухов С.Л., Семко В.Т.* Действие препаратов — фиторегуляторов на формирование качества зерновых культур // Достижения науки и техники АПК. 2010. № 12. С. 47-48.

15. *Шатилова Т.П., Витол И.С., Карпиленко Г.П., Белопухов С.Л., Семко В.Т.* Характеристика ферментного препарата фитазы микробного происхождения // Бутлеровские сообщения. 2010. Т.20. № 6. С. 70-73.

AMYLOLYTIC AND PROTEOLYTIC ENZYMES OF BARLEY MALT OBTAINED WITH THE USE OF PHYTOREGULATORS

T.I. SHATILOVA¹, S.L. BELOPUKHOV¹, YE.V. ROMANOVA¹,
I.S. VITOL², G.P. KARPILENKO²

0 RSAU-MAA named after K. A. Timiryazev;
² Moscow State University of Food Industry)

The principal possibility of using such phyto regulators as «Zircon», «Novosil» and «ЛОВ-С₇» has been shown. They can be applied either during plant growth period or along with the solution used for grain germination in order to intensify the process of malting as well as to improve product quality and biochemical parameters of malt. Malt produced from barley treated with phyto regulators is characterized by higher activity and thermal stability of amylases and of neutral and acidic proteinases, providing proteolysis of storage proteins during germination.

Key words: barley malt, malt quality, phyto regulators, amylase, neutral and acidic proteinases.

Шатилова Татьяна Ивановна — к. б. н., доцент кафедры «Агрономическая, биологическая химия и радиология» ФГБОУ ВПО РГАУ-МСХА имени К. А. Тимирязева, автор более 70 научных и учебно-методических работ. Специалист в области агрохимии и биохимии растений.

Белопухов Сергей Леонидович — д. с.-х. н., профессор, заведующий кафедрой физической и органической химии ФГБОУ ВПО РГАУ-МСХА имени К. А. Тимирязева, автор более 350 научных и учебно-методических работ. Специалист в области физико-химической биологии. E-mail: belopuhov@mail.ru

Романова Елена Владимировна — сотрудник УНКЦ «Агроэкология пестицидов и агрохимикатов» РГАУ-МСХА имени К. А. Тимирязева.

Витол Ирина Сергеевна — к. б. н., доцент кафедры «Органическая, пищевая и биохимия» ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет пищевых производств», автор более 50 научных и учебно-методических работ. Специалист в области биохимии растений и энзимологии. E-mail: vitolis@yandex.ru.

Карпиленко Геннадий Петрович — д. т. н., профессор кафедры «Органическая, пищевая и биохимия» ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет пищевых производств», автор более 160 научных и учебно-методических работ. Специалист в области биохимии растений, биохимии зерна, энзимологии, пищевых технологий.