

УДК 577.152.1

ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ ФОРМЫ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ХЛЕБОПЕЧЕНИИ**П.Ю. Стадольникова, А.И. Сидоров, Б.Б. Тихонов, М.Г. Сульман***ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет», Тверь, Россия*

Оксидоредуктазы (К.Ф. – 1) – класс ферментов, катализирующих реакции, лежащие в основе биологического окисления, сопровождающиеся переносом электронов с одной молекулы (восстановителя – акцептора протонов или донора электронов) на другую (окислитель – донор протонов или акцептор электронов) [1]. Среди ферментов класса оксидоредуктаз наиболее широко применяется в пищевой промышленности глюкозооксидаза. Глюкозооксидаза (К.Ф. 1.1.3.4) – димерный флавопротеин, относящийся к семейству глюкоза/метанол/холин оксидоредуктаз, который катализирует окисление β -D-глюкозы по С-1 позиции до D-глюконо- δ -лактона (δ -глюконо-1,5-лактона) и перекиси водорода H_2O_2 с использованием молекулярного кислорода в качестве акцептора электронов [2]. В последние годы одной из серьезных проблем хлебопекарной промышленности является недостаточно высокое качество муки с точки зрения ее хлебопекарных свойств, обеспечивающих в процессе выпечки объем, правильную форму, окраску, эластичность мякиша, выраженный вкус и аромат готового изделия [3]. Наиболее экономически обоснованным решением проблемы плохого качества муки является применение специальных улучшителей качества хлеба, которые могут использоваться как для улучшения муки с низкими хлебопекарными свойствами, так и для ускорения процесса созревания теста из муки с хорошими хлебопекарными свойствами.

Одним из обепринятых хлебопекарных улучшителей является свободная форма глюкозооксидазы (пищевая добавка Е1102). Внесение глюкозооксидазы в тесто при замесе вызывает окисление свободных сульфгидрильных групп в структуре клейковинных белков, посредством чего образуются дисульфидные связи, способствующие укреплению клейковины, увеличению эластичности теста и объёма изделий, при этом сам фермент инактивируется в процессе выпечки [4]. Однако использование фермента в нестабилизированном виде приводит к существенным потерям его активности и значительному снижению полезного эффекта фермента на качество теста и готовых хлебобулочных изделий. Более целесообразно использовать в качестве хлебопекарных улучшителей препараты глюкозооксидазы, иммобилизованные на биodeградируемых и безопасных для использования в пищевых продуктах носителях – модифицированных биополимерах (таких, как альгинат натрия и хитозан), что существенно повысит эффективность использования глюкозооксидазы и снизит ее потери. В частности, Tang и др. иммобилизовали глюкозооксидазу на частицах «хитозан-триполифосфат натрия» методом адсорбции и использовали в хлебопечении совместно с α -амилазой [4]. В работе Wang и др. глюкозооксидаза была инкапсулирована в микросферах из альгината кальция и хитозана с использованием последовательного метода эмульсификации – внутреннего гелеобразования – адсорбции – покрытия хитозана для применения в качестве улучшителя муки [5].

Иммобилизованная глюкозооксидаза была синтезирована следующим образом. 0,08 г. микрокристаллического порошка карбоната кальция $CaCO_3$ добавили в 20 мл 1,5 % масс. раствора альгината натрия при постоянном перемешивании. Полученная суспензия диспергировалась в 40 мл растительного масла с добавлением Span 80 (2 % об.) и интенсивно перемешивалась в течение 2 минут. После эмульгирования в смесь добавляли 30 мл растительного масла, содержащего 2 % (об.) Span 80 и 0.2 мл ледяной уксусной кислоты. Интенсивное перемешивание продолжалось в течение 10 минут. Далее в смесь добавляли 150 мл дистиллированной воды, перемешивание продолжалось при умеренной интенсивности в течение 30 минут. Для отделения образовавшихся гелевых кальций-альгинатных микросфер от масляной фазы добавляли 250 мл осаждающего раствора 0,05 М хлорида кальция, содержащего 1 % (об.) Tween 80. Полученные микросферы осаждали из масляной фазы, которая удалялась из системы декантацией. Далее осадок альгинатных микросфер промывали 0,05 М раствором хлорида кальция, содержащего 1 % (об.) Tween 80. Микросферы отмывали несколько раз водой до полного удаления следов масла, наблюдаемых в поле оптического микроскопа. Полученные альгинатные микросферы выдерживались в течение 12 часов в 50 мл раствора, содержащего N-(3-диметиламинопропил) – N'-этил-карбодиимид гидрохлорид и N-гидроксисукцинимид для активации карбоксильных групп альгинатных микросфер. Глюкозооксидаза ковалентно связывалась с поверхностью носителя за счет образования пептидной связи [6]. Далее микрочастицы промывались дистиллированной водой, выдерживались в течение 6 часов в растворе глюкозооксидазы в буферном растворе (рН = 6,0), снова промывались дистиллированной водой и хранились до проведения экспериментов в холодильнике при температуре 4 ± 1 °C.

Для оценки возможности использования иммобилизованного биокатализатора в хлебопечении была проведена пробная выпечка с помощью лабораторной хлебопечки DI-9154 (Daewoo, Южная Корея) по стандартной программе «Традиционный белый хлеб», после которой органолептически оценивались изменения в свойствах изделия. Фотографии проведенной пробной выпечки приведены на рисунке 1.

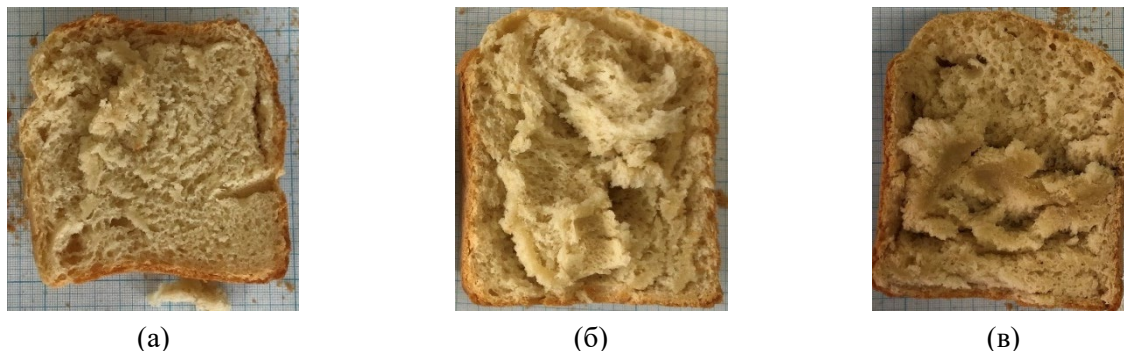


Рисунок 1 – Результаты пробной выпечки: а) без использования биокатализатора; б) 50 мг биокатализатора на 225 г. муки; в) 100 мг биокатализатора на 225 г. муки

Как показали эксперименты, без использования биокатализатора хлеб отличается неравномерной пористостью, невыраженным вкусом, сильно крошится, липнет к ножу при нарезке, имеются небольшие участки непромеса, более темный, корка непрочная (рисунок 1а). При использовании 50 мг биокатализатора хлеб получается более пористым, с мелкими равномерными порами, со сладковатым привкусом, не крошится и не липнет к ножу при нарезке, корка хрустящая и прочная, цвет – более светлый, чем без добавок, участков непромеса нет (рисунок 1б). При увеличении содержания биокатализатора до 100 мг существенно ухудшаются органолептические свойства мякиша – появляются участки непромеса, мякиш становится более липким и менее пористым (рисунок 1в). Таким образом, экспериментально доказано, что добавление биокатализатора в количестве до 50 мг на 225 г. муки благоприятно отражается на хлебопекарных свойствах муки и органолептических показателях готового хлебобулочного изделия.

Разработанные и синтезированные хлебопекарные улучшители на основе иммобилизованной глюкозооксидазы могут быть использованы в пищевой промышленности для улучшения свойств теста (повышение эластичности и пористости) и совершенствования технологии производства и повышения качества различных видов хлебобулочных изделий, в том числе – функционального назначения, в дозировке 0,001–0,002 % от массы муки для улучшения пшеничного хлеба, 0,02–0,05 % от массы муки для улучшения качества ржаного хлеба.

В статье проведен синтез гетерогенного биокатализатора на основе альгинатных микросфер, полученных методом эмульгирования и внутреннего гелеобразования, и глюкозооксидазы, ковалентно иммобилизованной на поверхности микросфер с помощью N-(3-диметиламинопропил) – N' – этилкарбодиимид гидрохлорида и N-гидроксисукцинимид. Проведена оценка возможности использования синтезированного биокатализатора в качестве хлебопекарного улучшителя. Выявлено, что добавление биокатализатора в количестве до 50 мг на 225 г. муки благоприятно отражается на хлебопекарных свойствах муки и органолептических показателях готового хлебобулочного изделия.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 21–19–00192)

ЛИТЕРАТУРА

1. Price N.C. Fundamentals of enzymology: the cell and molecular biology of catalytic proteins. – 3rd ed. – Oxford: Oxford University Press, 1999. – 478 p.
2. Bankar S.B., et al. Glucose oxidase – An overview // Biotech. Adv. 2009. Vol. 27. pp. 489–501.
3. Федорова Р.А. «Биохимические основы продуктов переработки зерна. Мука». СПб.: Университет ИТМО; 2017. – 98 с.
4. Tang L., Yang R., Hua X., Yu Ch., Zhang W., Zhao W. Preparation of immobilized glucose oxidase and its application in improving breadmaking quality of commercial wheat flour // Food Chemistry. 2014. Vol. 161. P. 1–7.
5. Wang X., et al.. Immobilization of Glucose Oxidase in Alginate-Chitosan Microcapsules // Int. J. Mol. Sci. 2011. Vol. 12. P. 3042–3054.
6. Zhu, X., Su, M., Tang, Sh., Wang, L., Liang, X., Meng, F., Hong, Y., Xu, Zh. 2012. Synthesis of thiolated chitosan and preparation nanoparticles with sodium alginate for ocular drug delivery. Mol. Vis. 18, 1973–1982.