

Научная статья

УДК 577.152.32:582.736

DOI: 10.17586/2310-1164-2021-14-2-60-65

Применение ферментного препарата Ultraflo Max на стадии замачивания семян сои для снижения содержания фитиновой кислоты и ее солей

М.А. Челомбиткин, Н.В. Баракова*, А.С. Басковцева, А.В. Нечитайло

*Университет ИТМО
Россия, Санкт-Петербург, *barakova@corp.ifmo.ru*

Аннотация. Исследовали влияние дозы ферментного препарата Ultraflo Max на накопление влаги и содержание фитиновой кислоты и фитатов в сое в процессе замачивания. Семена, обработанные 0,2% раствором перекиси водорода, замачивались 48 ч в растворе, аэрируемом с расходом воздуха 4 дм³ в минуту. Содержание фитиновой кислоты и фитатов определяли модифицированным колориметрическим методом Вейда на приборе КФК-3. В результате эксперимента установлено, что средняя влажность семян, обработанных ферментным препаратом (18 единиц активности на один грамм семян), через два часа от начала замачивания была в 1,18 раза выше, нежели в контрольном образце без внесения ферментного препарата. Доза ферментного препарата выше 18 ед/г семян не оказала большего эффекта. Через сутки влажность сои достигла максимального значения (62–64%) независимо от того, добавлялся ферментный препарат или нет, но прирост влажности обработанной сои в единицу времени был выше вплоть до 6 ч замачивания. Установлено, что внесение препарата Ultraflo Max (18 ед/г сырья) снизило содержание фитиновой кислоты и фитатов в сое с 25 до 5 мг/г через 12 ч от начала замачивания. В необработанных же образцах содержание фитиновой кислоты и фитатов снизилось до того же уровня лишь через 48 ч от начала замачивания. Следовательно, обработка сои препаратом Ultraflo Max позволяет сокращать время замачивания семян с 48 до 12 ч при том же итоговом содержании фитиновой кислоты и фитатов. В силу того, что фитиновая кислота уменьшает перевариваемость соевого белка, полученные результаты имеют практическое значение для производства продуктов из сои с более высокими качественными показателями.

Ключевые слова: соя; фитиновая кислота; антипитательные вещества; биодоступность; ферментные препараты

Original article

Using the enzyme Ultraflo Max to reduce phytic acid and phytates in soybeans during steeping

Mikhail A. Chelombitkin, Nadezhda V. Barakova*, Angelina S. Baskovtseva, Anna V. Nechitaylo

*ITMO University
St. Petersburg, Russia, *barakova@corp.ifmo.ru*

Abstract. The effect of the Ultraflo Max enzyme dosage on moisture accumulation and phytic acid and phytate content in soybeans during steeping was studied. Soybeans treated with 0.2% hydrogen peroxide were being steeped for 48 h while aerating at an air flow of 4 dm³ per minute. The content of phytic acid and phytates was determined by the modified colourimetric Wade method with a CPC-3 photometer. The experiment showed that the enzyme treated soybeans (190 units of activity per 100 g of beans) accumulated 1.18 times more moisture on the average during 2 h of steeping than the control. Enzyme dose above 190 u/100 g did not amplify the effect. While the moisture content in soy rose to similar values (62–64%) independent of whether the enzyme was added or not, the moisture uptake from steeping per time unit was higher up to 6 h. Adding the enzyme Ultraflo Max (190 u/100 g of material) also proved to lower the phytic acid and phytate content in soy from 25 to 5 mg/g after 12 h of steeping. The same level of phytic acid and phytates was only reached in untreated samples after 48 h. Therefore, the treatment with the enzyme Ultraflo Max allows to shorten the soybeans steeping time from 48 to 12 h while keeping the final content of phytic acid and phytates the same. Since phytic acid lowers the digestibility of soy protein, the obtained results have practical significance for soy-based foods and feed production.

Keywords: soy; phytic acid; antinutritional factors; bioavailability; enzymes

Введение

Соя является важным компонентом пищи и кормов как источник полноценного по аминокислотному составу заменителя животного белка, которого в зрелых семенах сои содержится около 40% [1–3].

В то же время соя содержит антипитательные вещества — соединения с высокой хелатообразующей

способностью, связывающие белки и ионы металлов и уменьшающие их биодоступность [4–6]. Фитиновая кислота и фитаты считаются главным антипитательным фактором сои, поскольку в организме, имеющем однокамерный желудок, в том числе человеческом, эта кислота и ее соли не могут нейтрализоваться из-за отсутствия нужного фермента — фитазы [7, 8]. Фитаза, относящаяся к группе фосфатаз, дефосфорилирует кислотный остаток фитата, лишая его нативных свойств [9].

По последним данным, содержание фитатов в сое составляет 50–85% от общего количества фосфора в растении [10], фитиновой кислоты – 1–2,2% массы семян [11]. Поскольку влияние этого антипитательного фактора на усвояемость соевого белка можно уменьшить с помощью фитазы, отсутствующей у человека и нежвачных животных, возникает вопрос о рациональных условиях воздействия фитазой при переработке сои, а также других зернобобовых, содержащих фитиновую кислоту.

Большинство ферментов семян не имеет заметной активности до повышения влажности внутри семени до определенного уровня. Разрыхляя оболочку семян, состоящие в основном из гемицеллюлоз, можно повысить их проницаемость и ускорить водопоглощение, тем самым ускоряя рост активности фитазы и дефосфорилирование фитиновой кислоты [12]. Для разрыхления оболочек предлагается использовать препарат Ultraflo Max, в состав которого входят ксиланаза и β -глюканаза, способные разрушать основные структурные полисахариды, препятствующие проникновению воды в семена.

В статье [11] описано применение с этой целью цитолитических ферментов при замачивании зерна перед проращиванием. Поскольку выбор ферментных препаратов и дозы их внесения необходимо проводить индивидуально для каждого вида зерна, актуально провести такие исследования для сои. Действие ферментов на процесс деградации фитиновой кислоты при замачивании семян сои также ранее не исследовалось.

Снижение содержания антипитательных веществ в сое позволит включать это сырье в рецептуры пищевых и кормовых продуктов, повышать их питательную ценность, не прибегая к генетическим и иным модификациям сои.

Цель данной работы – исследовать влияние ферментного препарата Ultraflo Max на процесс накопления влаги и снижение содержания фитиновой кислот в семенах сои.

Материалы и методы

Семена сои, импортированные из Китая, приобретались в Санкт-Петербурге в вакуумной упаковке 500 г и хранились в ней до начала эксперимента при +4°C. Ферментный препарат ксиланазы (200 ед/мл) и β -глюканызы (700 ед/мл) Ultraflo Max (Novozymes) также приобретался в Санкт-Петербурге в таре 500 мл и хранился в ней при той же температуре.

Перед замачиванием семена сои дезинфицировали 0,2% раствором перекиси водорода 30 мин. Далее их замачивали в фосфатном буфере с pH 6,0 (500 мл на 100 г сои). pH 6,0 находится в оптимальном для цитолитических ферментов диапазоне [13]. Замачивание проводили 48 ч при комнатной температуре. Известно, что поглощение семенами воды длится до 20 ч [14], но по данным, приведенным ниже, содержание фитиновой кислоты и фитатов стабилизируется лишь через двое суток. Проводили аэрирование (4 дм³/мин) прибором Barbus AIR003. Контроль pH осуществляли pH-метром P-061 одновременно с контролем насыщения семян водой. Влажность определяли автоматическим влагомером «Симадзу» МОС-120Н. Перед измерением семена сушили на фильтровальной бумаге 10 мин. Фитиновую кислоту определяли после измельчения, отбирая по 1 г (в пересчете на сухую массу) измельченной сои.

Образцы помещали в градуированную центрифужную пробирку 15 мл, приливали 10 мл 0,5М HCl, интенсивно встряхивали и оставляли в покое на час, затем центрифугировали 3 мин с числом оборотов ротора 6000 мин⁻¹. Супернатант переносили в другую пробирку и добавляли одну объемную часть смеси хлороформа с изоамиловым спиртом (24:1) на три объемные части экстракта. Образцы охлаждали при температуре +4°C в течение часа и центрифугировали еще 4 мин, отчего в каждой пробирке выделялись две фазы и интерфаза с белками. Верхнюю фазу, не допуская перемешивания, переносили в другую пробирку, приливали 1,5 мл 0,03% роданистого аммония (NH₄SCN) в 0,5М соляной кислоте, затем вносили 0,75 мл 0,0026М конкурентного раствора хлорида железа (FeCl₃). Для снятия спектра

поглощения (рисунок 1) и холостой пробы использовали смесь 0,03% солянокислого роданистого аммония и 0,0026М хлорида железа, доведенного до равного объема дистиллированной водой. Спектр снимали в диапазоне 300–700 нм после установки нуля по дистиллированной воде.

Полоса наибольшего поглощения была обнаружена в окрестности $\lambda = 330$ нм, но поскольку при этой длине волны была также высока сила фототока для пробы фитиновой кислоты в экстракте, что могло исказить результат, длина волны подбиралась так, чтобы сигнал пробы А в отсутствие конкурентных растворов был минимален. При 455 нм А имело значение 0,023 против 0,453 при 335 нм.

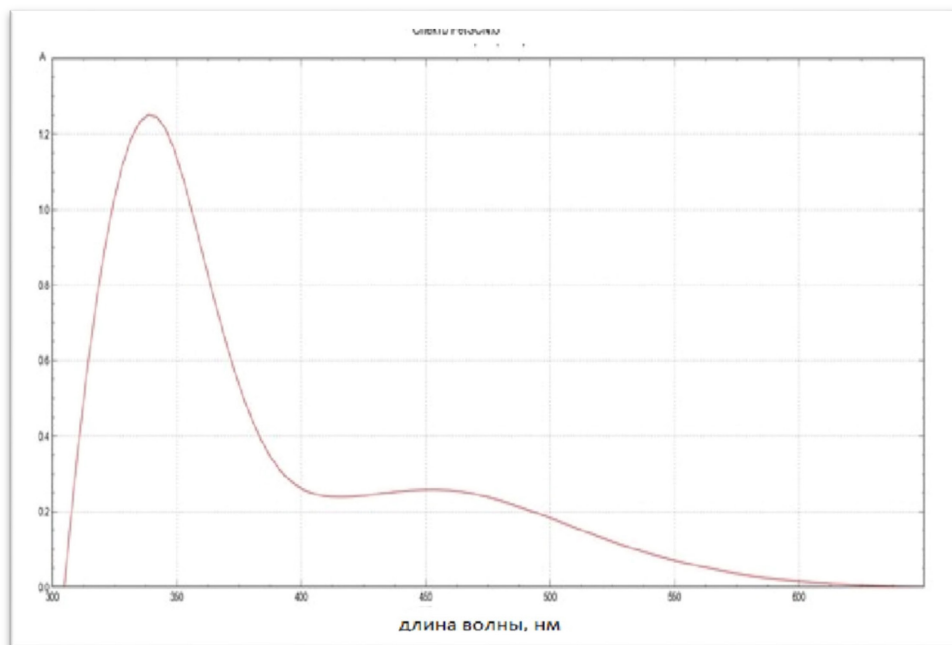


Рисунок 1 – Участок спектра поглощения водного раствора роданистого железа
Figure 1. Absorption spectrum region of ferrous thiocyanate aqueous solution

Образцы колориметрировали в кюветках 10 мм при длине волны 335 нм после установки нуля по дистиллированной воде. Концентрацию искомых веществ рассчитывали по калибровочной кривой (рисунок 2) (основана на предположении, что с каждым кислотным остатком реагируют 4 Fe^{3+}) [15].

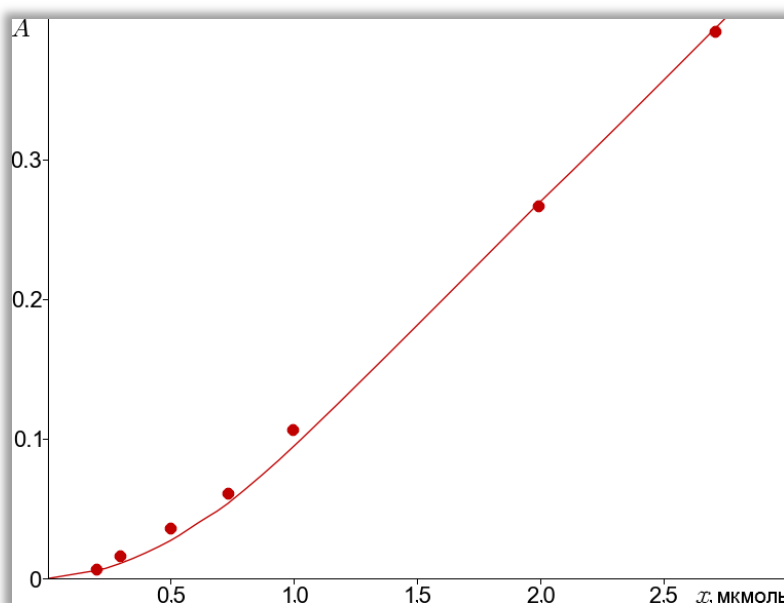


Рисунок 2 – Калибровочная кривая ($A = 0,11(x + 1)^{-1,18}$)
Figure 2. Calibration curve ($A = 0,11(x + 1)^{-1,18}$)

Результаты и обсуждение

Первый опыт состоял в определении рациональной дозы ферментного препарата. Следующие дозы ферментных препаратов Ultraflo Max вносились в воду, в которой семена сои замачивались 2 ч: 1,5 единиц активности на 1 г семян; 3,0 ед/г; 11 ед/100 г; 18 ед/ г; 48 ед/1 г. Рациональной считалась доза ферментного препарата, при которой по окончании 2 ч замачивания в семенах было накоплено наибольшее количество воды.

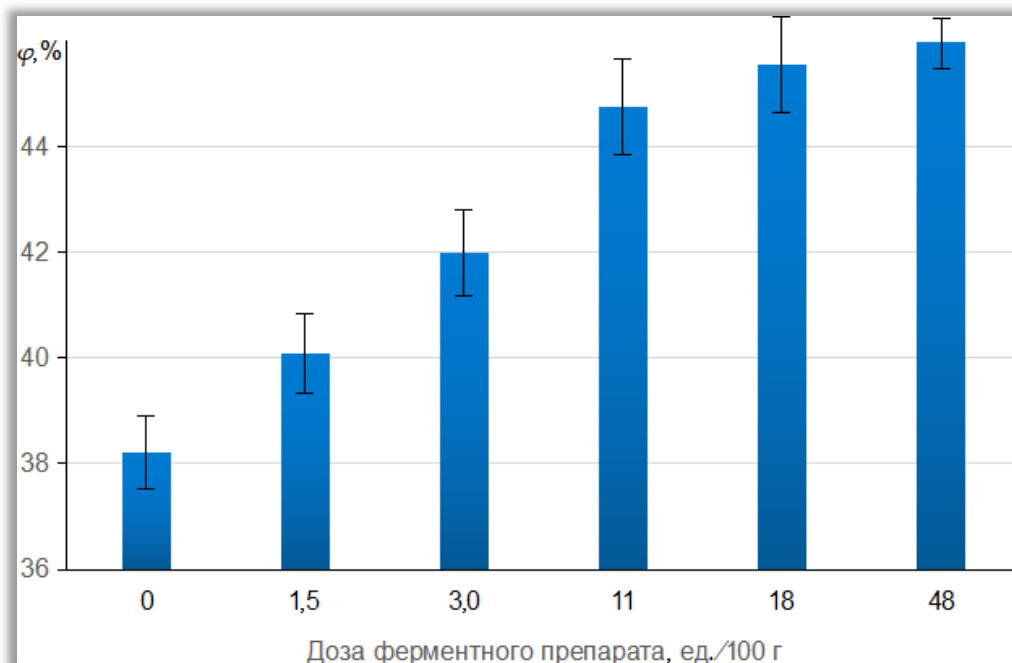


Рисунок 3 – Содержание влаги в семенах сои после 2 ч замачивания
Figure 3. Moisture content in soybeans steeped for 2 h

Из данных, представленных на рисунке 3, видно, что ферментный препарат цитолитического действия облегчает поглощение воды семенами. Различия в степени насыщения водой были выявлены на уровне значимости $p = 0,05$, погрешности на графиках представляют собой стандартную ошибку, расчет проводился в программе MS Office Excel. Разности влажности в образцах составили 2,1; 4; 6,71; 7,74; 8,2% для 1,5 ед/г сырья; 3,0 ед/г сырья; 12,0 ед/г сырья; 18,0 ед/г сырья и 48,0 ед/г сырья относительно пробы без фермента соответственно. Средняя влажность семян в образце с добавлением ферментного препарата (18 ед/г) через два часа от начала замачивания была в 1,18 раза выше, нежели в контрольном образце без внесения ферментного препарата. В последующие 5 ч замачивания эта разность сохранялась, но в дальнейшем сошла на нет, и к концу замачивания, на 24-й ч, разница нивелировалась, сошла на нет, и влажность в обоих образцах стала равна.

Поскольку разность влажности двух последних серий образцов находилась в пределах погрешности, для дальнейших опытов использовали дозу препарата Ultraflo Max 18 ед/г. Интенсивность поглощения воды семенами сои с добавлением 18 ед/г ферментного препарата и без него в течение 24 ч замачивания представлена на рисунке 4. Из графиков следует, что наибольшее влияние на процесс накопления влаги в семенах сои происходит в первые два часа замачивания. Различия были выявлены на уровне значимости $p = 0,05$, погрешности на графиках представляют собой стандартную ошибку, расчет проводился в программе MS Office Excel.

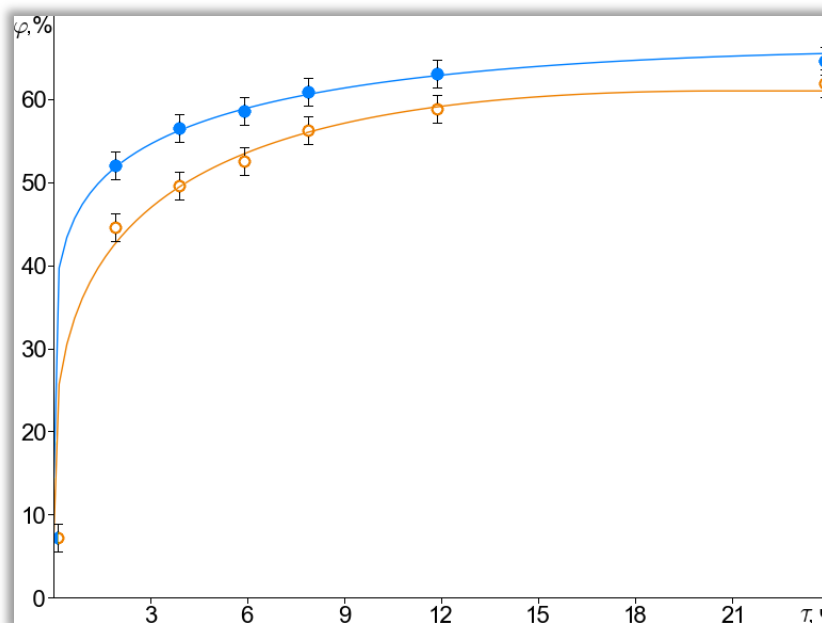


Рисунок 4 – Накопление влаги в семенах сои в течение 24 ч замачивания: ● Ultraflo Max (18 ед/г), ○ контроль
 Figure 4. Moisture uptake by soybeans during 24 h of steeping: ● Ultraflo Max (18 u/g), ○ control

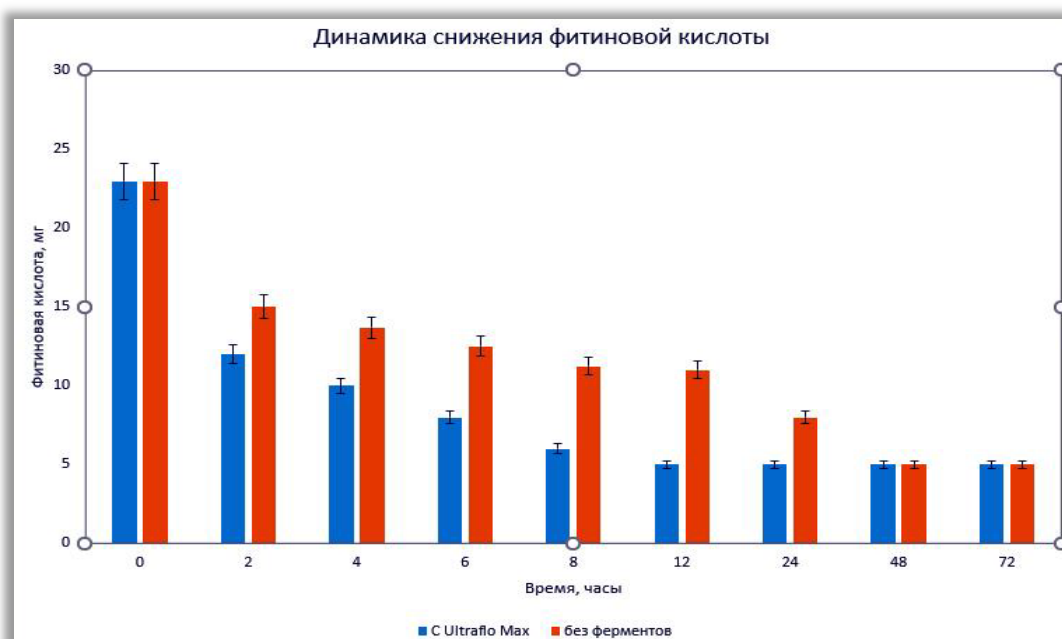


Рисунок 5 – Динамика снижения содержания фитиновой кислоты
 Figure 5. Dynamic of phytate content decrease

Динамика снижения содержания фитиновой кислоты в семенах сои показана на рисунке 5. Из представленной информации видно, что наиболее значимые результаты снижения фитиновой кислоты с применением фермента Ultraflo Max (18 ед/г сырья) достигается на стадии замачивания к 12 ч, в то же самое время такой результат для проб без фермента достигнут только через 48 ч после замачивания. Дальнейшее замачивание не приводит к значительному снижению фитиновой кислоты и укладывается в рамки погрешности.

Заключение

В данной работе рассмотрен способ снижения фитиновой кислоты в семенах сои при замачивании семян в воде с добавлением ферментного препарата цитолитического действия Ultraflo Max. Существуют и другие способы снижения фитиновой кислоты в зерновых культурах, например, внесение ферментного

препарата, содержащего фитазу на стадии приготовления зерновых гидролизатов. Целесообразно в дальнейшем провести исследования по оценке эффективности способа снижения содержания фитиновой кислоты в сое с применением ферментного препарата, содержащего фитазу, или исследовать совместное внесение ферментных препаратов, содержащих как фитазу, так и целлюлазу. Применение такого способа снижения фитиновой кислоты в сырье позволит разрабатывать продукты питания с более высокой перевариваемостью соевого белка.

Литература/References

1. Mateos-Aparicio I., Redondo-Cuenca A., Villanueva-Suárez M.J., Zapata-Revilla M.A. Soybean, a promising health source. *Nutr. Hosp.* 2008, V. 23, Is. 4, pp. 305–312.
2. González N. Meat consumption: Which are the current global risks? A review of recent (2010–2020) evidences. *Food Res. Int.* 2020, pp. 1–6.
3. Salter A.M. The effects of meat consumption on global health. *Rev. Sci. Tech.* 2018, V. 37, Is. 1, pp. 47–55.
4. Rostichelli L.G.N., Laurentiz A.C., Pedro Souza's R.P., Filardi R.S. Valuation of the nutritional matrix by phytase and soy gum in the diet formulation for broiler chickens. *Rev. Caatinga.* 2020, V. 33, Is. 4, pp. 1102–1110.
5. Silva E.O., Bracarense A.P.F.R.L. Phytic acid: from antinutritional to multiple protection factor of organic systems. *J. Food Sci.* 2016, V. 81, Is. 6, pp. R1357–R1362.
6. Rosa-Sibakov N., Re M., Karsma A., Laitila A., Nordlund E. Phytic acid reduction by bioprocessing as a tool to improve the in vitro digestibility of faba bean protein. *J. Agric. Food Chem.* 2018, V. 66, Is. 40, pp. 10394–10399.
7. Raboy V. Myo-Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate. *Phytochemistry.* 2003, V. 64, no. 6, pp. 1033–1043.
8. Schlemmer U., Frölisch W., Prieto R.M., Grases F. Phytate in foods and significance for humans: food sources, intake, processing, bioavailability, protective role and analysis. *Mol. Nutr. Food Res.* 2009, V. 53, Is. 2, pp. S330–S375.
9. Ohanenye I.C., Tsopmo A., Ejike C.E.C.C., Udenigwe C. Germination as a bioprocess for enhancing the quality and nutritional prospects of legume proteins. *Trends Food Sci. & Technol.* 2020, V. 101, pp. 213–222.
10. Boncompagni E. et al. Antinutritional factors in pearl millet grains: Phytate and goitrogens content variability and molecular characterization of genes involved in their pathways. *PLoS One.* 2018, V. 13, Is. 6, pp. 1–30.
11. Gupta R.K., Gangoliya S.S., Singh N.K. Reduction of phytic acid and enhancement of bioavailable micronutrients in food grains. *J. Food Sci. Technol.* 2015, V. 52, Is. 2, pp. 676–684.
12. Marolt G., Kolar M. Analytical methods for determination of phytic acid and other inositol phosphates: a review. *Molecules.* 2020, V. 26, Is. 1, pp. 174–202.
13. Phitsuwan P., Laohakunjit N., Kerdchoechuen O., Ratanakhanokchai K., Kyu K.L. Present and potential applications of cellulases in agriculture, biotechnology, and bioenergy. *Folia Microbiol. (Praha).* 2013, V. 58, Is. 2, pp. 163–176.
14. Gentili R., Montagnani C., Caronni S., Citterio S., Ambrosini R. Effect of soil pH on the growth, reproductive investment and pollen allergenicity of *Ambrosia artemisiifolia* L. *Front. Plant Sci.* 2018, V. 9, pp. 1–12.
15. Zemlyanukhina O.A., Veprintsev V.N., Kalaev V.N., Al-Hachami F.R.H., Kalaeva E.A., Slavskiy V.A. Modification of waid method for quantitative determination of phytin content in nut endosperme. *Proceeding of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy.* 2018, no. 3, pp. 163–169. (In Russian)

Информация об авторах

Михаил Александрович Челомбиткин – аспирант факультета биотехнологий
Надежда Васильевна Баракова – канд. техн. наук, доцент факультета биотехнологий
Ангелина Станиславовна Басковцева – магистрант факультета биотехнологий
Анна Владимировна Нечитайло – магистрант факультета биотехнологий

Information about the authors

Mikhail A. Chelombitkin, Postgraduate Student of the Faculty of Biotechnology
Nadezhda V. Barakova, Ph.D., Associate Professor of the Faculty of Biotechnology
Angelina S. Baskovtseva, Undergraduate of the Faculty of Biotechnology
Anna V. Nechitaylo, Undergraduate of the Faculty of Biotechnology

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов / The authors declare no conflicts of interests

Статья поступила в редакцию 17.05.2021
Одобрена после рецензирования 17.09.2021
Принята к публикации 20.09.2021

The article was submitted 17.05.2021
Approved after reviewing 17.09.2021
Accepted for publication 20.09.2021