

МОДИФИКАЦИЯ ПШЕНИЧНОГО КРАХМАЛА РАЗЛИЧНЫМИ АМИЛАЗАМИ

*Л. В. Капрельянци
Т. В. Шпырко
Е. Ф. Помазанова*

Одесская национальная академия пищевых технологий

E-mail: Kaprelyants@paco.net

Исследовано влияние различных препаратов α -амилазы на пшеничный крахмал и его фракции. В образцах определяли олигосахариды с различной молекулярной массой. Показано, что гидролизаты с низким глюкозным эквивалентом обладают термореверсивными свойствами при определенном соотношении низко- и высокомолекулярных фракций крахмала.

Ключевые слова: крахмал, амилазы, гидролизат, ферментативный гидролиз, мальтоолигосахариды.

Для улучшения качества пищевых продуктов, придания им желаемой консистенции, снижения калорийности применяют различные пищевые добавки: загустители, студнеобразователи, желирующие вещества, эмульгаторы и стабилизаторы [1].

Понижение калорийности достигается уменьшением содержания жиров и сахара в продуктах. Вместо них используют масло и жирозаменители, получаемые из крахмала путем его модификации с целью улучшения растворимости, усваиваемости, совместимости с другими пищевыми компонентами [2, 3].

Один из способов получения модифицированного крахмала — его ферментативная обработка различными амилазами. Специфическая деградация полисахаридных фракций крахмала способствует получению продуктов с различной степенью расщепления, измеряемой глюкозным эквивалентом (ГЭ).

Выбор ферментов определяется желаемым углеводным составом конечного продукта. Фермент α -амилаза дает в основном мальтодекстрины, а глюкоамилаза — большое количество глюкозы, гидролизуя последовательно α -(1,4)-связи. В результате гидролиза ферментом β -амилазой образуется значительное количество мальтозы. Используя комбинации ферментов, можно получать продукты гидролиза с различным ГЭ. Гидролизаты крахмала с низким ГЭ находят широкое применение в пищевой промышленности [4, 5].

Традиционно для получения различных продуктов биоконверсии крахмала в качест-

ве субстрата используют кукурузный крахмал [6]. Однако, учитывая масштабы производства пшеницы в Украине, значительный интерес вызывает использование пшеничного крахмала как альтернативного сырьевого источника. В процессе переработки пшеницы из нее получают клейковину, используемую при производстве диетических сортов хлеба и для улучшения хлебопекарных свойств муки низкого качества [7–10]. Крахмальная фракция может служить субстратом для ферментативной модификации.

Настоящая работа посвящена изучению действия различных амилаз на пшеничный крахмал в зависимости от размера крахмальных гранул.

Материалы и методы

В работе использовали пшеничный крахмал, выделенный из муки пшеницы сорта Одесская 51 урожая 2005 г. по методу [12].

Результаты анализа крахмала показали, что он отвечает требованиям стандарта [13].

Полученный крахмал фракционировали по размеру крахмальных зерен путем седиментации и центрифугирования. Для характеристики фракций диаметр зерен измеряли под микроскопом: фракция I — 20–25 мкм; фракция II — 2–5 мкм. Фракционирование на амилозу и амилопектин проводили по методу [12].

В работе применяли ферментные препараты: амилосубтилин П10х (3500 ед. АС/г препарата), амилоризин П10х (1600 ед.

АС/г), пуллуназу из *Klebsiella aerogenes*, выпускаемые Ладжинским заводом ферментных препаратов, и Fungamyl 800 фирмы Novo (4500 ед. АС/г).

Ферментные препараты отличаются степенью активности, способом получения (глубинное, поверхностное), видом микроорганизма-продуцента и условиями оптимальной активности.

Ферментативную обработку пшеничного крахмала (15 мг/мл) выполняли при рН 6 (0,1 М ацетатный буфер) и температуре 40–50 °С.

Через определенные промежутки отбирали пробы гидролизата. Ферментативную обработку проводили в реакторе при постоянном перемешивании (250 мин⁻¹).

Углеводный состав гидролизатов определяли на жидкостном хроматографе (колонка С₁₆, 4,6×250 мм), фаза DEAE-SI 100; 0,005 мм; носитель — ацетонитрил — вода (80:20); скорость — 1 мл/мин; температура 20 °С; время — 20–30 мин; детектор — рефрактометр; ГЭ определяли методом Шамодьи–Нельсона [13].

Гель-хроматографирование низко- и высокомолекулярных фракций продуктов ферментативной обработки проводили на колонке сефадекса G-100 (100×1,5 см). Полисахарид массой 10–15 мг, растворенный в воде либо гидроксиде натрия в концентрации 0,5 моль/л, вносили в колонку, уравновешенную соответствующим растворителем. Объем собираемых фракций 3 мл, скорость истечения 10 мл/час. Выход фракций контролировали по антрону и фенолсерным методом.

Калибровку колонки осуществляли с помощью стандартного набора декстранов в диапазоне молекулярных масс от 10⁴ до 10⁶.

Результаты и обсуждение

Влияние различных концентраций ферментных препаратов на гидролиз пшеничного крахмала представлено на рис. 1.

Концентрацию ферментных препаратов выбирали из расчета на 1 г крахмала — 1 ед. активности ферментного препарата.

Феномен различной активности амилолитических ферментов по отношению к крахмальным полисахаридам также обусловлен тем, что ряд полисахаридаз обладает сорбционными доменами [10].

Исходя из результатов наших исследований можно предположить, что большая способность разрушать нерастворимый субстрат пшеничного крахмала препаратами

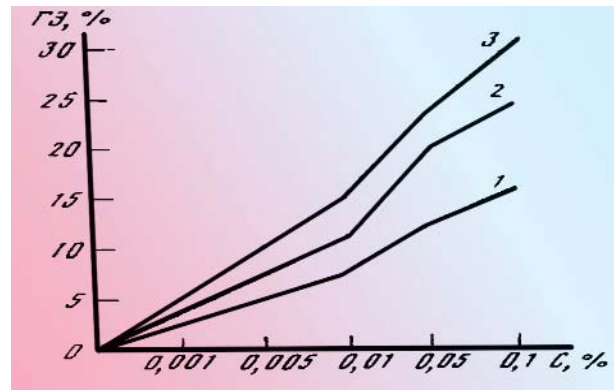


Рис. 1. Влияние концентрации ферментных препаратов (С) на накопление редуцирующих веществ за 30 мин реакции:

- 1 — амилоризин П10х;
- 2 — амилосубтилин Г10х;
- 3 — фунгамил 800

фунгамил 800 и амилосубтилин Г10х обусловлена присутствием сорбционных доменов, обеспечивающих избирательное связывание фермента.

В табл. 1 приведены экспериментальные данные, характеризующие ферментативный гидролиз двух фракций пшеничного крахмала, проведенный с помощью различных препаратов, отличающихся размерами крахмальных гранул: фракция I — 20–25 мкм, фракция II — 2–5 мкм.

Таблица 1. Влияние ферментных препаратов на накопление редуцирующих веществ в зависимости от размера крахмальных гранул, %

Время гидролиза, мин	Амилосубтилин Г10х		Амилоризин П10х		Фунгамил 800	
	Номер фракции					
	I	II	I	II	I	II
5	4,9	3,7	2,3	2,0	10,1	8,8
10	13,4	12,1	5,7	4,9	16,3	14,3
15	17,7	16,6	10,1	10,0	19,4	17,3
30	21,5	19,8	15,8	16,1	24,3	20,8
60	26,5	25,4	19,2	18,0	27,8	26,5
90	29,4	28,7	20,6	19,2	32,4	30,3

Примечание. Фракция I — размер крахмальных гранул 20–25 мкм; фракция II — размер крахмальных гранул 2–5 мкм.

В выбранных условиях ферментные препараты амилосубтилин Г10х и фунгамил 800 быстрее расщепляют крупные крахмальные зерна, чем мелкие. Препарат амилоризин П10х практически с одинаковой скоростью расщепляет как крупные, так и мелкие зерна крахмала.

Различное действие ферментов на крахмальные зерна разных размеров, очевидно, связано с неодинаковой способностью образовывать ферментсубстратные комплексы, а также с различным содержанием в субстрате связей α -1,4- и α -1,6-, обусловленным разным количеством амилозы и амилопектина в крахмале.

Как показали исследования, в крупных зернах пшеничного крахмала (фракция I) содержится $29,1 \pm 0,4\%$ амилозы, а в мелких зернах (фракция II) — $23,9 \pm 0,5\%$. Следовательно, фракция II обладает меньшей чувствительностью к ферментализу, поскольку содержит большее количество α -1,6-связей, недоступным для действия молекул α -амилаз.

В литературе имеются противоречивые сведения об углеводном составе ферментных гидролизатов различных фракций пшеничного и других зерновых крахмалов. Так, в работе [15] указывается на разный олигосахаридный состав продуктов амилолиза мелких и крупных гранул. В то же время авторы работы [16] при ферментативном гидролизе α -амилазой суспензий двух фракций пшеничного крахмала показали идентичность продуктов гидролиза.

Сравнение олигосахаридного состава ферментализатов мелких и крупных фракций пшеничного крахмала под действием различных препаратов α -амилаз позволило получить представление о различии продуктов реакции в результате деструкции крахмальных молекул (табл. 2).

Таблица 2. Углеводный состав различных фракций пшеничного крахмала, %

Углеводы	Амилосуб- тилин Г10х		Амилори- зин П10х		Фунгамил 800	
	Номер фракции					
	I	II	I	II	I	II
Глюкоза	5,2	5,4	3,3	2,9	7,7	7,9
Мальтоза	10,0	9,7	12,4	12,0	14,1	13,8
Мальто- триоза	11,3	11,0	14,5	13,9	14,0	12,6
Мальто- пентоза	17,3	17,3	12,8	13,0	21,3	20,3
Мальто- гексоза	12,4	10,1	9,8	8,8	7,1	6,7
Мальто- гептоза	7,5	6,9	9,7	9,7	4,1	3,8
Высокомо- лекулярные декстрины	32,6	34,0	33,7	36,1	25,1	29,1

Примечание. Фракция I — размер крахмальных гранул 20–25 мкм; фракция II — размер крахмальных гранул 2–5 мкм.

Из приведенных в табл. 2 данных видно, что по углеводному составу фракции пшеничного крахмала, подвергнутые гидролизу различными препаратами α -амилаз, не различаются.

Количество олигосахаридов в продуктах гидролиза зависит от специфичности ферментного препарата. Так, если в гидролизате крахмала, подвергнутого обработке амилосубтилином Г10х, низкомолекулярных олигомеров содержится 63,7 % (фракция I) и 60,4 % (фракция II), то в продуктах гидролиза фунгамилем 800 — 68,3 % и 65,1 % соответственно.

Высокомолекулярные составляющие продуктов амилолитической деструкции пшеничного крахмала были разделены с помощью гель-хроматографии на сефадексе G-100 (рис. 2).

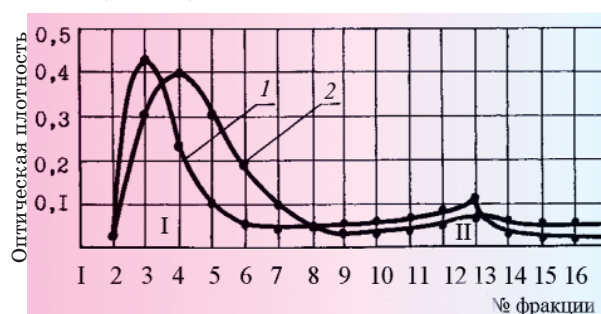


Рис. 2. Выходная кривая гель-хроматографирования пшеничного крахмала на сефадексе G-100: 1 — исходный; 2 — обработанный амилосубтилином Г10х

Средневесовая степень полимеризации (СП) высокомолекулярной фракции в результате деструкции полисахаридов крахмала составила 70–500. Высокомолекулярная часть продуктов гидролиза имеет бимодальное распределение средневесовой СП, где выделяются фракции с СП 60–240 и 200–500.

С применением ферментативного гидролиза высокомолекулярной фракции продуктов гидролиза крахмала препаратом пуллуназы установлено, что в ее составе представлены разветвленные молекулы с преобладанием α -1,6-связей, что свидетельствует о происхождении этой фракции из амилопектина. На рис. 3 показана сравнительная гидролизуемость высокомолекулярных фракций крахмала амилосубтилином Г10х и амилосубтилином Г10х + пуллуназой.

При изучении свойств продуктов деструкции полисахаридов пшеничного крахмала α -амилазами было отмечено, что гидролизаты с низким глюкозным эквивалентом (ГЭ — 5–12%) и определенным распределе-

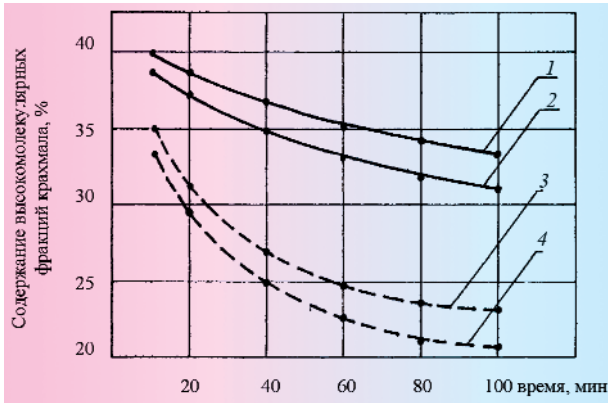


Рис. 3. Сравнительная гидролизуеть пшеничного крахмала:

1, 2 — амилосубтилин Г10х (фракции 1, 2);
3, 4 — амилосубтилин Г10х + пуллуназа (фракции 1, 2)

нием молекул низко- и высокомолекулярных фракций обладают способностью к образованию термически обратимых гелей аналогично продуктам ферментативной обработки α -амилазами картофельного крахмала [17,18].

Термореверсивные свойства гидролизатов обнаруживаются при определенной комбинации двух фракций в продуктах амилолиза. Структурная сеть геля, очевидно, образуется за счет межмолекулярного взаимодействия высокомолекулярных компонентов разветвленных фракций крахмала из

остатков молекул амилопектина, а низкомолекулярные декстрины выполняют межмолекулярную стабилизирующую роль [19].

Разное соотношение фракций в продуктах гидролиза пшеничного крахмала α -амилазами приводит к образованию гелей, отличающихся прочностью, консистенция гелей зависит также от содержания сухих веществ в гидролизатах.

Полученные гидролизаты из пшеничного крахмала с низким ГЭ (5–12%) легко смешиваются с жирами без изменения их структуры, поэтому могут быть использованы в качестве заменителей в продуктах с пониженной калорийностью.

Таким образом, регулируя условия ферментативной модификации пшеничного крахмала α -амилазами, можно получить гидролизаты с различным углеводным составом. Степень деструкции полисахаридов пшеничного крахмала зависит от структуры крахмальных зерен и показателей используемого ферментного препарата. Продукты амилолитической деструкции пшеничного крахмала, обладающие термореверсивными свойствами, могут быть использованы в продуктах питания, а исходный крахмал – в качестве сырья для биотехнологической переработки.

ЛИТЕРАТУРА

- Капрельяниц Л. В. Функціональні продукти. — Одеса: Друк, 2003. — 333 с.
- Капрельяниц Л. В. Ферменты семейства α -амилаз и их применение в биоконверсии крахмала // *Зерновые продукты и комбикорма*. — 2006. — №1. — С. 34–36.
- Капрельяниц Л. В. Ферменты в пищевых технологиях: вчера, сегодня, завтра // *Пищевые ингредиенты и добавки*. — 2006. — №2. — С. 48–51.
- Капрельяниц Л. В. Біотехнологія у виробництві харчових продуктів // *Харчова і переробна промисловість*. — 1992. — №8. — С. 121.
- Grabb W. D., Mitchinson C. Enzymes involved in the processing of starch to sugars // *Trends Biotechnol.* — 1997. — V. 15. — P. 349–352.
- Grabb W. D., Shetty J. K. Commodity sale production of sugars from starches // *Curr. Opin. Microbiol.* — 1999. — V. 2. — P. 252–256.
- Капрельяниц Л. В., Шпырко Т. В. Гидролиз крахмалов пшеничной муки амилазами // *Материалы I Междунар. конференции «Крахмал и крахмалсодержащие источники — структура, свойства и новые технологии»*. — М., 2001. — С. 119–120.
- Капрельяниц Л. В., Шпырко Т. В. Биотехнологические приемы при получении клейковины из низкокачественной пшеницы // *Зерновые продукты и комбикорма*. — 2002. — №4. — С. 23–26.
- Капрельяниц Л. В., Иоргачева Е. Г., Шпырко Т. В. Ферментативная модификация зерновых крахмалов // *Хранение и переработка зерна*. — 2002. — №10. — С. 53–55.
- Шпырко Т. В. Розробка біотехнології переробки зернової сировини в харчові добавки: Дис. ... канд. техн. наук: 03.00.20. — Одеса, 2003. — 183 с.
- Лукин Н. Д., Ладур Т. А. Применение термостабильной альфа-амилазы — амилолихетерм Г18х в производстве сахаристых крахмалопродуктов // *Хранение и переработка сельхозсырья*. — 1999. — №4. — С. 39.
- Рихтер М., Аугустат З., Ширбаум Ф. Избранные методы исследования крахмала. — М.: Пищевая промышленность, 1975. — С. 183.
- Методы биохимических исследований растений* / Под ред. А.И. Ермакова. — Л.: Агропромиздат, 1987. — С. 4.

14. Рабинович М. Л. Полисахаридазы: новый материал для белкового дизайна: Новости науки и техники. Сер. Биотехнология. — М., 1990. — Вып. 4. — С. 22.
15. Alkins D. P., Kennedy J. F. Starch granules of developing wheat kernels // *Starke*. — 1985. — V. 37, N12. — P. 421–427.
16. MacGregor A. W. In *New Approaches to Research Cereal Carbohydrates*. — Florida CRC Press, 1985. — P. 149–160.
17. Bradshaw I. J., Lidsay M., Kennedy J. F. Molecular structure of starch// *Food Sci. Technol. Today*. — 1987. — V. 1, N1. — P. 24–27.
18. Bulpin P. V., Cutler A. N., Dea I. C. M. Starch and its components// *Gums and Stabilisers for the Food Industry*. — Oxford, 1984. — P. 541–550.
19. Van der Maarel M., Euverink G. J., Binne-
ma D. J. Amylomaltase from hyperther-
mophilic bacterium *Thermus thermophilus*:
enzyme characteristics and applications in
the starch industry // *Med. Fac. Landbouwniv
Gent*. — 2000. — V.65. — P. 231–234.

МОДИФІКАЦІЯ ПШЕНИЧНОГО КРОХМАЛЮ РІЗНИМИ АМІЛАЗАМИ

*Л. В. Капрельяни
Т. В. Шпирко
О. Ф. Помазанова*

Одеська національна академія
харчових технологій

E-mail: Kaprelyants@paco.net

Досліджено вплив різних препаратів α -амілази на пшеничний крохмаль та його фракції. У зразках визначали олігосахариди з різною молекулярною масою. Показано, що гідролізати з низьким глюкозним еквівалентом мають термореверсивні властивості за певного співвідношення низько- і високомолекулярних фракцій крохмалю.

Ключові слова: крохмаль, амілази, гідролізат, ферментативний гідроліз, мальтоолігосахариди.

MODIFICATION OF WHEAT STARCH BY DIFFERENT AMYLASES

*L. V. Kaprelyants
T. V. Shpirko
O. F. Pomazanova*

Odessa National Academy
of Food Technologies

E-mail: kaprelyants@paco.net

Effect of different preparations of α -amylase on the wheat starch and its fractions has been studied. Oligosaccharides with different molecular mass have been detected in the samples. It has been shown that hydrolysates with low glucose equivalent have the thermally reversible properties under the determined interrelation between low- and high-polymeric fractions of the starch.

Key words: starch, amylases, hydrolysate, enzymatic hydrolysis, oligosaccharides.