

Е. В. Никитина, Р. А. Губайдуллин, Л. З. Габдукаева,
М. И. Зелди

ИЗМЕНЕНИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КАРТОФЕЛЬНЫХ КРАХМАЛОВ ПОСЛЕ ОБРАБОТКИ МУЛЬТИФЕРМЕНТНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ

Ключевые слова: картофельный ферментированный крахмал, амилаза Bacillus licheniformis, амилосубтилин, вязкость, генопротекторные свойства.

Ферментированные картофельные крахмалы, полученные с помощью амилолитических препаратов амилосубтилина (амилосубт) и Bacillus licheniformis (BL), в зависимости от времени модификации обладают различными технологическими и биологическими свойствами. Выявлено, что ферментированные крахмалы лучше снимают генотоксический эффект, чем нативный картофельный крахмал. Кроме того, ферментированные крахмалы (амилосубт-8 и BL-8) проявляют защитные свойства по отношению к молочнокислым бактериям.

Keywords: potato fermented starches, Bacillus licheniformis amylase, amilosubtilin, viscosity, genoprotective properties.

The fermented potato starches obtained by amylolytic preparations Amilosubtilin (amylo), and Bacillus licheniformis (BL), depending of modification time have different technological and biological properties. Revealed that fermented starches better remove genotoxic effect than native potato starch. Furthermore, fermented starches (amilosubt-8 and BL-8) exhibit protective properties respect to lactic acid bacteria.

Введение

Одним из направлений использования амилолитических ферментов в промышленном масштабе является гидролиз крахмала с целью получения глюкозы и фруктозы в различных формах. Вначале крахмал гидролизвали в глюкозные сиропы с использованием кислотной обработки. Этот способ включает в себя обработку кислотой водно-крахмальной смеси с повышением температуры до 100-170 °С. В настоящее время кислотный гидролиз с целью получения глюкозных сиропов заменен на ферментативную обработку с применением трех или четырех различных энзимов [1; 2].

Первоначально для процесса гидролиза использовали α -амилазу *Bacillus amyloliquefaciens*, но в настоящее время она заменена на α -амилазу *Bacillus stearothermophilus* или *Bacillus licheniformis*. Степень полимеризации крахмал-гидролизованного сиропа зависит от времени инкубирования и уровня добавленного фермента.

В настоящее время, активно развиваются исследования в области получения модифицированных крахмалов с помощью амилолитических ферментов, а также исследования по выявлению зависимостей, особенностей действия ферментов амилолитического ряда на крахмалы различной природы с целью получения крахмального продукта с улучшенными технологическими и функциональными качествами. Ключевой показателем понимания действия амилаз является сама структура крахмала, которая различается в зависимости от вида природного крахмала. Объектом исследования выступают различные по своей природе крахмалы – картофельный, из сладкого картофеля [3], кукурузный [4], саговый [5], рисовый и из раги [6], ячменный [7].

С целью получения кукурузного крахмала с повышенными эмульгирующими способностями его модифицируют бактериальными α - или β -амилазами,

глюкоамилазой, декстрозензимом (препарат, состоящий из глюкоамилазы и пуллулаказы) [4]. В результате ферментной обработки кукурузного крахмала различными препаратами размер гранул крахмального зерна значительно уменьшается по сравнению с нативным образцом (с 12-14 мкм до 2-4 мкм), что показано с помощью сканирующей электронной микроскопии.

С целью получения диетического резистентного крахмала из раги (индийского просо) и риса, их обрабатывают α -амилазой (слюны человека), β -амилазой (ячменного солода), амилоглюкозидазой (*Aspergillus niger*) или пуллулаказой (*Klebsiella pneumoniae*) [6]. Сравнение ферментнообработанных крахмалов разного происхождения показало, что молекулярная масса и степень кристаллизации остатков крахмала раги были значительно выше, чем рисового крахмала. Анализ с помощью электронной микроскопии крахмальных остатков указывало высокую степень фрагментации в случае рисового, и только несколько больших кусков в случае раги.

Ферменты различных групп используют совместно для повышения степени синергизма их действия и повышения эффективности. Обработка рисового крахмала α -амилазой совместно с интродуцированной в желированную структуру пуллулаказой (для модификации амилопектина) позволила получить рисовый крахмал с высокой долей резистентного полисахарида [8].

Таким образом, ферментная обработка позволяет получить крахмалы с улучшенными и даже полезными свойствами. Целью данных исследований было провести модификацию картофельного крахмала с помощью бактериальных мультиферментных препаратов при варьировании времени обработки и исследовать свойства полученных полисахаридов.

Материалы и методы исследования

В качестве объекта исследования выступали пшеничный крахмалы: нативный (ГОСТ Р 53501-2009) и ферментированные комплексным препаратом амилосубтилином и амилазой *Bacillus licheniformis*. Ферментацию проводили в течение от 4 до 8 часов, в зависимости от продолжительности ферментации биомодифицированные крахмалы были названы: амилосубт-4, амилосубт-6, амилосубт-8, а также В1-4, В1-6, В1-8, время ферментации 4,6 8 часов, соответственно.

Модификацию осуществляли в дистиллированной воде при pH=7,5 при 40 °С. Концентрация крахмала в реакционной смеси 30 г/100 мл. Активность используемых амилаз в реакционной смеси была 8,3 У/г крахмала. Для этого добавляли 1 мл к. ж. *Bacillus licheniformis*/100 мл реакционной смеси, а амилосубтилина – 0,0067 г/г крахмала (0,201 г/100 мл реакционной смеси) (расчетная амилазная активность амилосубтилина в этом случае составляла 8,3 У/г крахмала).

Реакцию гидролиза останавливали путем добавления концентрированной серной кислоты до pH=2. Затем крахмал отделяли от жидкости фильтрованием и высушивали при 40 °С.

Для дальнейших исследований готовили клейстеры крахмалов в концентрации 1% с предварительным завариванием и выдерживанием при 90 °С, 5 мин.

Определение вязкости крахмалов. В коническую колбу отобрали 20 мл дистиллированной воды, в части воды (5 мл) развели крахмал массой 0,2 г, а затем оставшиеся 15 мл довели до кипения. Разведенный крахмал осторожно влили в кипяток. После чего смесь остужается до комнатной температуры. Отобрали 5 мл каждого образца крахмального клейстера и измерили массу на аналитических весах, затем на вискозиметре замеряли время истечения крахмального клейстера. Расчет производили по общепринятой формуле.

Определение эмульгирующей активности. Для определения эмульгирующей активности смешивали 0,5 мл подсолнечного масла, 1,5 мл исследуемого образца 1% крахмального клейстера и встряхивали на шейкере 2 минуты. После этого берут 0,5 мл перемешанной эмульсии со дна и смешивают с 4,5 раствором 0,1% SDS (додецил сульфат натрия), проводят измерением при 500 нм [9].

Определение амилазы. Реактивы: А – KJ – 20 г и 2 г J₂ растворяют в 100 мл дистиллированной воды (сначала растворяют в минимальном количестве этилового спирта). В – 10 мл раствора А разводят водой до 100 мл в мерной колбе.

Для определения содержания амилазы 20 мг крахмала смешивают с 10 мл 0,5 Н КОН в мерной колбе и перемешивают на магнитной мешалке 5 мин, затем доводят до 100 мл дистиллированной водой. От этого объема отбирают 10 мл и смешивают с 5 мл 1Н НСl и 0,5 мл йодного раствора В и доводят дистиллированной водой до 50 мл. В течение 5 минут измеряют при 625 нм.

Расчет процентного количества амилазы вычисляем по формуле:

$$Y = 85,24 \times X - 13,19,$$

где X – это величина поглощения при 625 нм [10].

Анализ протекторной силы крахмалов по отношению к молочнокислым бактериям. Метод основан на культивировании молочнокислых бактерий совместно с известным токсикантом CuSO₄ и клейстерами исследуемых крахмалов.

Подготовка культуры. За 12-15 часов до проведения эксперимента культуру молочнокислых бактерий ввели со скошенной 2 % среды «Капустный агар» в пробирки с 5 мл жидкой капустной среды для получения «ночной культуры». Пробирку с посеянной культурой ставили в термостат с температурой 37 °С оптимальной для роста.

Капустный агар: в 1 л водопроводной воды добавляют 0,2 кг размельченной свежей белокочанной капусты, смесь доводят до кипения, кипятят 10-15 мин. Фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Фильтрат разводят в два раза. Добавляют 20 г глюкозы, 10 г пептона, 10 г карбоната кальция, и 22 г агара. Устанавливают pH 7-7,4, стерилизуют 20 мин при 121 °С. Жидкую капустную среду готовят аналогично без добавления агара.

Проведение эксперимента. Ночную культуру молочнокислых бактерий добавляли в 100 мл жидкой капустной среды, разливали по 5 мл в пробирки, туда же вводили 0,1 мл 2 % водного раствора CuSO₄ и 1 мл 5 % крахмального клейстера, в контрольный образец токсикант не добавляли. Смесь перемешивали и проводили культивирование 3 суток при 37 °С. После этого проводили посев микробной суспензии на капустный агар с целью выявления количества выживших микроорганизмов, культивировали 5 сут при 37 °С, проводили подсчет колониеобразующих единиц молочнокислых бактерий.

ДНК-протективный тест. В исследованиях использовали штаммы *Escherichia coli*: Wp - дикий тип (работают все системы репарации); Pol A- - polA- 1 (нарушен синтез ДНК-полимеразы 1); Uvt A- - uvtA- 155 (нарушена эксцизионная репарация); Rec A- - recA- (нарушена пострепликативная репарация, общая рекомбинация).

Принцип метода заключается в селективном ингибировании роста мутантных штаммов по сравнению с диким типом. Активность тестировали как описано у Никитиной с соавт. [11]. Однако, при исследовании генопротекторных свойств проводили идентичный эксперимент, но с добавлением в экспериментальные образцы 0,1 мл раствора фурациллина (200 мкг/мл), параллельно с контролем ставили негативный контроль с фурациллином без исследуемых растворов. Процент выживаемости 96-100 % указывает на отсутствие ДНК-повреждающей активности, 86-96 % - активность слабая, менее 85 % – наличие ДНК-повреждающего действия..

Исследование хелатирующей способности крахмалов. Методика основана на спектрофотометрическом определении концентрации медного купороса и способности

полимерных биологических молекул связывать тяжелые металлы. Исходные растворы для проведения экспериментов: 2 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (раствор 1), 0,4 % клейстер крахмальный (раствор 2). Смешиваем растворы в указанных пропорциях:

	раствор 1	раствор 2	H_2O
А (0,08	1 мл	1 мл	3 мл
Б (0,2 %)	1 мл	2,5 мл	1,5 мл

Общий объем реакционной смеси составляет 5 мл, оставляем раствор на 30 мин, после чего фильтруем, и проводим измерение при 780 нм. Предварительно необходимо измерить начальную концентрацию CuSO_4 (1 мл CuSO_4 и 4 мл H_2O). Измерение проводят против раствора, в который вместо CuSO_4 добавляют воду.

Результаты исследований и обсуждение

Анализ физико-химических свойств ферментированных крахмалов показал, что обработка амилосубтилином и амилазой *B.licheniformis* приводит к резкому уменьшению вязкости по сравнению с нативным. Причем в случае амилазы *B.licheniformis*, вязкость клейстеров была ниже, это может свидетельствовать о большем масштабе воздействия на крахмальную зерно испытуемого фермента (табл. 1).

Количество амилозы у исследуемых крахмалов различалось в зависимости от используемого фермента. Так ферментация амилосубтилином в течении 4-6 ч привела к увеличению доли амилозы, тогда как обработка амилазой *B.licheniformis* наоборот уменьшила процентное содержание данной фракции. Видимо, это связано с преимущественным действием амилазы *B.licheniformis* на амилозную фракцию, амилосубтилин же предпочтительнее воздействует на амилопектиновую.

Важным технологическим показателем является эмульгирующая активность крахмальных клейстеров. У тестируемых образцов эмульгирующая способность после 4 и 6 часов обработки была меньше, чем у нативного крахмала. Увеличение исследуемой способности увеличивалось только после 8 часов обработки не зависимо от используемого фермента. Увеличение эмульгирующей активности у крахмалов амилосубт-8 и BL-8, видимо, является следствием наибольшего снижения вязкости.

Таблица 1 – Физико-химические свойства ферментированных крахмалов

Вид крахмала	Вязкость, Т	Количество амилозы, %	Эмульгирующая активность, D 500 нм
Нативный	28,07	16,63	0,079
амилосубт-4	1,870	6,67	0,059
амилосубт-6	1,818	1,73	0,064
амилосубт-8	1,638	1,21	0,092
BL-4	1,170	0,80	0,073
BL-6	1,117	0,72	0,068
BL-8	1,081	0,89	0,101

С целью использования ферментированных крахмалов в продуктах функционального назначения необходимо исследовать их положительные свойства, которые могут влиять на здоровье человека. С этой целью проверили влияние ферментированных крахмалов на выживаемость молочно-кислых бактерий в присутствии токсиканта. Выявлено, что крахмалы 4 и 6 часовой обработки проявили себя как худшие протекторы для бактерий, чем нативный крахмал. Количество колоние-образующих единиц в тесте было высоким, только в случае использования крахмалов амилосубт-8 и BL-8 (рис. 1).

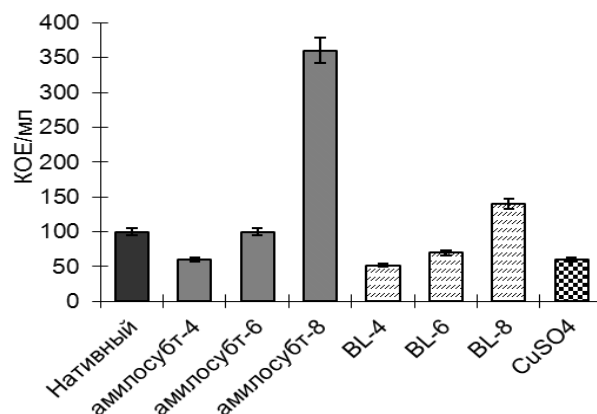


Рис.1 – Влияние ферментированных картофельных крахмалов на выживаемость молочно-кислых бактерий

Возможно, это связано с повышенной способностью этих крахмалов эмульгировать.

Кроме того, защитная сила крахмалов может быть обусловлена хелатирующими свойствами (рис. 2). Однако, проверка способности связывать тяжелые металлы не коррелировала со способностью защищать клетки бактерий от этих металлов.

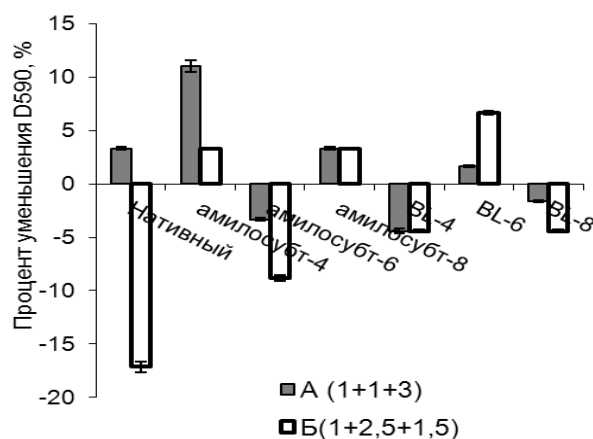


Рис. 2 – Влияние на хелатирующую активность ферментированных картофельных крахмалов полученных с использованием бактериальных мультиферментов

В связи с возрастающим интересом общественности к влиянию продуктов питания на генетический аппарат, исследуемые крахмалы были

протестированы на способность снимать генотоксическое действие известного генотоксиканта фурацилина. Выявлено, что все исследуемые экспериментальные крахмалы лучше снимают генотоксический эффект, чем нативный крахмал (рис.3). Наилучшие результаты были получены в случае использования крахмалов BL-6 и BL-8.

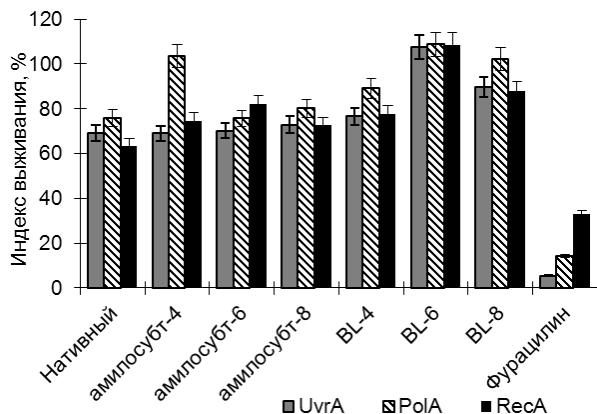


Рис. 3 – Генопротекторная сила ферментируемых крахмальных клейстеров от используемого бактериального мультифермента и времени обработки

Таким образом, применение частичной ферментации для изменения свойств картофельного крахмала препаратами амилазы *B.subtilis* и *B.licheniformis* в течение 8 часов улучшает не только

технологические свойства полисахарида, но и улучшаются протекторные свойства по сравнению с нативным крахмалом. Применение таких ферментированных крахмалов в пищевой промышленности будет способствовать повышению полезности продуктов питания.

Литература

1. Crabb, W.D., Mitchinson, C. // Trends Biotechnol. 1997. 15, 349–352.
2. Crabb, W.D., Shetty, J.K. // Curr. Opin. Microbiol. 1999. 2, 252–256.
3. Yadav, B.S., Sharma, A. and Yadav, R.B. // Journal of Agricultural Technology 2007. 3,1: 21-27
4. Ma Y., C. Cai, J. Wang, D.-W. Sun // J. Food Engineering. 2006. 73, 3. 297-303.
5. Wong C.W., S.K.S. Muhammad, M.H. Dzulkifly, N. Saari, H.M. Ghazali // Food Chemistry. 2007. 100. 774–780
6. Mohana B.H., A. Gopala, N.G. Malleshia, R.N. Tharanathan // Carbohydrate Polymers 2005. 59. 43–50.
7. You S., M.S. Izydorczyk // Carbohydrate Polymers. 2007. 69. 489–502.
8. Pongjanta J., A. Utaipattanaceep, O. Naivikul, K. Piyachomkwan // Carbohydrate Polymers, 2009. 78, 1, 5-9.
9. A. Kato, K. Minaki, K. Kobayashi, J. Agric. Chem, 1993. 41, 540-543.
10. Williams PC, Kuzina FD and Hlynka I, A. Cereal Chem 1970. 47, 411–420.
11. Никитина Е.В., О.В. Старовойтова, З.Ш. Мингалеева, О.А. Решетник // Вестник Казанского технологического университета, 2007. - № 5-6, - С.86-91.

© **Е. В. Никитина** – к.б.н., доц. каф. технологии пищевых производств КНИТУ, НОЦ «Фармацевтика» (К(П)ФУ), ev-nikitina@inbox.ru; **Р. А. Губайдуллин** . –магистр каф. технологии пищевых производств КНИТУ **Л. З. Габдукаева** – асс. той же кафедры; **М. И. Зелди** – асп. той же кафедры.