

Нативные и модифицированные крахмалы широко используются в пищевой промышленности для придания продукту необходимой вязкости и структуры [1, 2,3,4]. Они также могут влиять на ряд важнейших параметров конечного продукта, таких как выход, вкус, текстура, сроки хранения и др. [5]. Синтез крахмала в растениях крахмал результатом фотосинтеза, процесса превращения энергии солнечного света в химическую энергию. Крахмал, синтезированный в пластидах, остается в них как запасное вещество для расходования при дыхании в темные периоды. Он также синтезируется в амилопластах, находящихся в клубнях, корнях и семенах в качестве долгосрочного запасного вещества. Именно в этих органах растения наибольшее количество крахмала аккумулируется в виде водо-нерастворимых гранул. Форма и размеры этих гранул зависят от ботанического источника. Для коммерчески интересных источников крахмала, диапазон размеров гранул от 2-30 (крахмал маиса) до 5-100 мкм (картофельный крахмал) [6]. В незначительном количестве крахмал содержит липиды, а также азотистые вещества (протеины, пептиды, аминокислоты, ферменты, нуклеокислоты), фосфаты и некоторые минералы (до 0,4 %) – кальций, магний, калий, фосфор и натрий [7, 8]. Крахмал является полимером глюкозы, связанный друг к другу через кислород C1, называемый гликозидным гидроксил. Этот гликозидный гидроксил стабилен при высоком уровне pH, но гидролизует при низком значении pH. В конце полимерной цепи присутствует латентная группа альдегида. Эта группа называется редуцирующей. Два типа полимеров глюкозы присутствуют в крахмале: 1) амилоза и 2) амилопектин. Амилоза – это линейный полимер, состоящий вплоть до 6000 остатков глюкозы с α -1-4 гликозидной связью. Число остатков глюкозы в цепи, характеризующаяся как степень полимеризации (DP - degree of polymerization), варьирует у крахмалов различного происхождения. Амилоза картофеля или тапиоки имеет показатель DP равный 1000-6000, тогда так DP амилозы крахмала кукурузы и пшеницы варьирует на уровне 200-1200. Среднее количество амилозы в крахмалах может колебаться между почти 0 и до 75%, но в среднем эта величина равна 20-25%. Соотношение полисахаридов в крахмале различно и зависит от источника крахмала. В связи с этим различают восковидные крахмалы, содержание амилозы в которых меньше 15 %, нормальные (20-25 % амилозы), и высокоамилозные крахмалы (более 40 % амилозы). Равновесная влажность при относительной влажности воздуха составляет 14-18 % для корнеклубнеплодных крахмалов и 10-12 % для зерновых [9]. Амилопектин состоит из коротких α -1,4-связанных линейных цепей длиной 10-60 остатков глюкозы и α -1,6-связанных боковых цепей с 15-45 остатками глюкозы. В среднем разветвленных остатков в амилопектине 5%, но изменяется в зависимости ботанического источника крахмала. Полная амилопектиновая молекула содержит в среднем 2000000 остатков глюкозы, таким образом, это одна из самых больших молекул природного происхождения. Наиболее общая

допустимая модель структуры амилопектина является кластерной моделью, в которой боковые цепи скомпонованы в группы с более длинными основными цепями [10; 11]. Гранулы крахмала организованы в аморфные и кристаллические структуры (рис. 1). Полисахариды в крахмальном зерне связаны между собой главным образом водородными связями. Существует предположение, что макромолекулы амилопектина и амилозы находятся в неупорядоченной конформации, неопределенная степень их организации свидетельствует о существовании блоков. В кристаллических блоках сильно разветвленные макромолекулы амилопектина образуют аморфные и кристаллические ламели [13]. Эта модель предполагает, что линейные частично кристаллические слои состоят из чередующихся аморфных и кристаллических ламелей, расположенных в аморфной фазе. Кристаллические ламели представляют собой области с упорядоченным расположением двойных спиралей амилопектина, а аморфные ламели – области, в которых находятся точки ветвления молекул амилопектина [14]. Рис. 1 - Схема картофельного крахмала в клубне: А клубень; В - изображение гранул картофеля при электронной микроскопии; С - срез крахмальных гранул, показывающий рост колец, состоящих из полукристаллических и аморфных областей; D - детальное изображение полукристаллической области; E организация амилопектиновой молекулы в древоподобной структуре; F - две глюкозы, связанной 1,4-гликозидной связью [12]

Кристаллическая ламель состоит из упорядоченных спиралей. В основном образованных А-цепями амилопектина, и проходных цепей амилозы, находящихся в вытянутой конформации типа струны [8, 14]. Аморфная ламель, по-видимому, состоит из тех же амилозных цепей в неупорядоченной конформации и амилопектиновых В-цепей. Амилопектиновые крахмалы в зависимости от источника имеют три типа кристаллической решетки: А (зерновые), В (корнеклубнеплодные), С (бобовые) [7, 15]. Такие типы кристаллических решеток различаются по плотности упаковки макромолекул и содержанию связанной воды. В отличие от амилопектиновых крахмалов, кристаллическая упаковка макромолекул высокоамилозных крахмалов остается под вопросом. На сегодняшний день исследование нативных картофельных крахмалов с содержанием амилозы от 1,5 % до 39,5 % показало, что толщина кристаллической ламели остаются неизменными, независимо от содержания амилозы. В то время, при переходе от амилопектиновых к высокоамилозным крахмалам наблюдалось понижение степени кристалличности. Оценка размеров кластеров в крахмалах мутантного картофеля представляет собой важную задачу, т.к. дает возможность установить структурные особенности и получить представления о взаимосвязи между молекулярными и супрамолекулярными структурами и их термодинамическими параметрами. Недавно были опубликованы результаты исследования термодинамических свойств крахмалов мутантного картофеля. Выдвинуто предположение, что причиной наблюдаемого

уменьшения температуры плавления с увеличением содержания амилозы может быть аккумуляцией дефектов в структуре гранулы [16]. Молекулы крахмальных полисахаридов расположены в зерне радиально. В клубне и корневых крахмалах, кристаллические структуры исключительно сформированы амилопектином, тогда как амилоза, присутствует в аморфных структурах. В крахмалах хлебных злаков амилопектин - также наиболее важный компонент кристаллических частей, а амилоза в крахмалах хлебных злаков - комплексуется с липидами, что приводит к усилению слабой кристаллической структуры и переходу её в гранулу. Амилопектин растворим в воде, а амилоза и сами гранулы крахмала нерастворимы в холодной воде. Это свойство делает сравнительно легким процесс извлечения гранул крахмала из растительных источников. Когда водно-крахмальный жидкий раствор нагревают, гранулы разбухают до того момента пока не будет достигнута точка, в которой разбухший крахмал не может перейти в исходное состояние. Это разбухание характеризуется термином желирование. В течение этого процесса, амилоза выходит из гранулы, что и вызывает увеличение вязкости жидкого раствора. Дальнейшее увеличение температуры приведет к максимальному разбуханию гранул и повышению вязкости. Наконец, гранулы разрушаются на части, при этом получается полностью вязкий коллоидный раствор. Последующее охлаждение сконцентрированной коллоидной дисперсии крахмала заканчивается образованием эластичного геля. В течение ретроградации, субстанция крахмала подвергается изменению, переходя из растворенного и разобщенного состояния в связанное состояние. Ретроградация крахмала первоначально происходит с амилозой; амилопектин, из-за своей очень разветвленной организации, менее склонен к ретроградации. Многочисленные промышленные и пищевые применения нативных крахмалов ограничены, из-за его тенденции к ретроградации и подверженности синерезису [17]. Кроме того, их нативная форма, гели или пасты из крахмалов хлебных злаков подобно восковому кукурузному крахмалу (с 99 % амилопектина) [18], имеют тенденцию к разрушению при длительном нагревании, сильном перемешивании или в кислых условиях. Обработка крахмала как этерификация, эстерификация и перекрестное сшивание используют, чтобы улучшить способность к желированию, пищевые характеристики и предотвращать ретроградацию [19, 20]. Поэтому широко развиваются исследования в области получения модифицированных крахмалов, в том числе и с помощью амилолитических ферментов как более экологически безопасные. Большинство ферментов, которые способны воздействовать на крахмал принадлежат к одному семейству, объединенному по гомологии аминокислотной последовательности: α -амилазное семейство или семейство 13 гликозилгидролаз согласно классификации Henrissat [21]. Эта группа включает те ферменты, которые имеют следующие характеристики: 1) они действуют на α -гликозидный конец и гидролизуют этот

конец с образованием как α -иномеров моно- или олигосахаридов (гидролиз), так и α -1-4 или 1-6 гликозидных последовательностей (трангликозилирование), или комбинируются обе активности; 2) они обладают (β/α)8 или TIM бочкообразными структурами, образующие каталитический центр; (3) у них есть четыре очень хорошо сохранившиеся области в первичной последовательности ДНК [12], которая содержит аминокислоты, которые формируют каталитический центр, а также несколько аминокислот, которые придают устойчивости всей структуре TIM [22]. Крупномасштабная крахмал-перерабатывающая промышленность возникла в середине 20 века. Процессу переработки и использования крахмала предшествует трудоемкий процесс по сбору и переработке крахмал-содержащих культур растений [23]. На промышленный ферментный гидролиз крахмала влияют различия относительно химической и физической природы крахмалов (относительное содержание амилозы и амилопектина или степень кристаллизации гранул) и их суспензий (вязкость, сопротивление, степень ретроградации или желирования). Также эти различия сказываются на каталитическом процессе, особенностях его протекания (pH, температура, фермент/субстратный коэффициент или энзимная дезактивация и явления ингибирования). Этот последний феномен был изучен главным образом в крахмал-глюкоамилазных системах [24, 25, 26], но есть также исследования с α -амилазой [27, 28, 29, 30]. В случае гидролиза обычных источников крахмала подобно зерну, картофелю, пшенице или рису, эти эффекты хорошо изучены [31, 32, 33]. Тем не менее, в случае другой природы этих субстратов, ферментная подготовка, кинетическая модель процесса и методы ферментирования мало изучены, но важны с различных точек зрения, том числе и прикладного характера. 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 °C. В настоящее время кислотный гидролиз с целью получения глюкозных сиропов заменен на ферментативную обработку с применением трех или четырех различных энзимов [34, 35]. Для полной конверсии крахмала в глюкозный сироп необходимо провести несколько этапов. Первый из них заключается в расплавлении коротко-цепочечных декстринов. Для этого 30-35 % по сухому веществу раствор крахмала при pH 6 смешивают с α -амилазой и он проходит сквозь струйные печи при температуре 95-105 °C в течение 90 мин. В настоящее время же важна возможность повышения максимального уровня субстрата до 65 %, что влечет уменьшение энергозатрат, экономии водных ресурсов и сокращается использование оборотных ресурсов на 17 % [36]. Недостаток α -амилаз, используемых в настоящее время – это то, что они не активны при pH ниже 5,9 и при высоких температурах. Следовательно, pH

должен быть скорректирован от естественного pH 4.5 жидкого раствора крахмала до pH 6 добавлением NaOH. Также должны быть добавлены ионы Ca^{2+} из-за Ca^{2+} -зависимости этих энзимов. *Rhizoglyphus foetidus* имеет внеклеточную α -амилазу, которая показывает многообещающие характеристики для использования в крахмал-перерабатывающей промышленности. Этот фермент очень высоко термостабилен при отсутствии ионов металла, активен при температуре 130 °C, и имеет уникальный продукт реакции и специфичность к субстрату [37]. Наиболее часто используют глюкоамилазу *Aspergillus niger* или родственного ему вида. Эта глюкоамилаза имеет оптимум pH 4,2 и стабильна при 60 °C. Для того, чтобы запустить эффективный процесс осахаривания, pH крахмал-гидролизованного сиропа снижают до 4,5 с использованием хлористоводородной кислоты. В зависимости от специфичности конечного продукта, этот этап длится 12-96 ч при 60-62 °C. Практическая проблема в этом процессе в том, что глюкоамилаза, специфично разрывает α -1,4-гликозидную связь и медленно гидролизует α -1,6-гликозидную связь, присутствующую в мальтодекстринах. Это ведет к накоплению изомальтозы. Решением в этой проблемы может быть использование пуллулазы, которая эффективно гидролизует α -1,6-гликозидную связь, однако она имеет тот же pH и температурный оптимум как глюкоамилазы. Вторая проблема вызвана с высоким содержанием сухой твердой фазы, которое должно быть использовано в процессе для того, чтобы производство высоко концентрированных глюкозных сиропов (более 95% глюкозы) было экономным. Глюкоамилаза может легко образовывать реверсированные продукты как например, мальтоза и изомальтоза за счет полученной глюкозы. В настоящее время растворы балансируют по количеству фермента, температуре и времени инкубации [34]. Хлебопекарная промышленность – это наиболее крупный потребитель крахмала и ферментов, осуществляющих их модификацию. Выпечка хлеба начинается с подготовки теста, что включает операции по смешиванию муки, воды, дрожжей и соли, а также в ряде случаев добавок. Мука состоит главным образом из глютена (клейковины), крахмала, не-крахмальных полисахаридов и липидов. Сразу же после замеса теста, дрожжи начинают бродить, превращая доступные сахара в спирты и углекислый газ, что является причиной увеличения объема теста. Амилазы могут быть добавлены к тесту, чтобы деградировать поврежденный крахмал муки в более короткие декстрины, который впоследствии будут включаться дрожжами в процесс брожения. Добавление солода или грибной α -амилазы в тесто в результате приводит к повышению объема буханки и улучшению текстуры печеного продукта [38]. После увеличения объема теста, оно печется, а когда хлеб извлекается из печи, начинается серия изменений, которые, в конечном счете, ведут к ухудшению качества. Эти изменения включают увеличение твердости крошки, уменьшения хруста корки, уменьшаются влажности крошки и улетучивание особого аромата хлеба. Все эти нежелательные изменения,

которые происходят при хранении, вместе названы старением. Ретроградация крахмальной фракции в хлебе считается очень важным в процессе старения [39]. Особенно уровень ретроградации амилопектина сильно коррелирует с величиной плотности хлеба [40]. Старение – важный экономический показатель в хлебопекарной промышленности, поскольку это ограничивает продолжительности пребывания печеных продуктов на полках магазинов. В США, например, хлеб общей стоимостью более чем миллиард американских долларов забраковывается ежегодно [38]. Для того, чтобы задерживать старение, чтобы улучшать текстуру, объем и вкус хлебопекарных продуктов, могут быть использованы несколько добавок при выпечке хлеба. Они включают химические вещества, низкомолекулярные сахара, энзимы или их комбинации. Известные добавки: молочный порошок, клейковина, эмульгаторы (моно- или диглицериды, эфиры сахаров, лецитин, и т.п.), гранулированный жир, окислители (аскорбиновая кислота или бромат калия), цистеин, сахара или соли [41]. Быстрый успех в биотехнологии сделали «новые» ферменты доступные для промышленности. Поскольку ферменты произведены из натуральных компонентов, они найдут большее применение у потребителей из-за особого спроса на продукты без химических веществ. Несколько ферментов рекомендовали для воздействия как на тесто и/или как хлебный улучшитель, посредством модификации одного из основных компонентов теста. Например - глюкозооксидаза, гемицеллюлаза, липаза, протеаза, ксиланаза. Эти энзимы, однако, не действуют на фракцию крахмала в тесте. Энзимы, активные в отношении крахмала, предлагают к использованию как анти-стареющие агенты. Например: α -амилазы [42, 43], ферменты синтеза [44] и разрушения боковых цепей [45], мальтозгенерирующие амилазы [46], β -амилазы [47], и амилоглюкозидазы [48]. Ферменты, разветвляющие полисахарид, были заявлены как агенты способные увеличить сроки хранения и объем хлебобулочных товаров [44; Spendler, 41]. Эти эффекты были достигнуты с помощью модифицированными крахмальными продуктами, добавляемыми в тесто при выпечке. Улучшенное качество печеных продуктов также получено, когда разветвляющие энзимы были использованы в комбинации с другими ферментами, как например, α -амилаза, мальтозгенерирующая амилаза, циклодекстрин гликозилтрансфераза, β -амилаза, целлюлаза, оксидаза и/или липаза [41]. Использование циклодекстрин гликозилтрансферазы как добавки к тесту призвано увеличить объем буханки хлебобулочного изделия [49]. Эффект, как предлагается, происходит из-за постепенного образования циклодекстринов в тесте после смешивания. Экзоамилаза, как например, β -амилаза и амилоглюкозидаза, сокращает внешние боковые цепи амилопектина, посредством отщепления мальтозы или молекулы глюкозы, соответственно. Оба эти энзима предлагают задерживать старение хлеба, посредством уменьшения склонности к ретроградации амилопектиновых соединений в хлебопекарных

продуктах [47]. Анти-стареющие эффекты амило-глюкозидазы в выпечке заявлены в нескольких патентах [50, 48]. Синергическое использование α - и β -амилаз, также призвано увеличивать жизнь печеных хлебобулочных товаров на полках магазинов [50]. В настоящее время, активно развиваются исследования в области получения модифицированных крахмалов с помощью амилалитических ферментов, а также исследования по выявлению зависимостей, особенностей действия ферментов амилалитического 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 [51], кукурузный [52], саговый [53], рисовый и из раги [54], ячменный [55]. Основным ферментом, используемым для биохимической модификации, является α -амилаза, глюкоамилаза. В случае использования глюкоамилазы из *Rhizopus* для модификации картофельной муки выявлена деградация крахмала до низкомолекулярных компонентов, при этом доля высокомолекулярных углеводных цепей уменьшается, пропорционально увеличивается доля более низкомолекулярных соединений [51]. В настоящее время активно изучается возможность использования как чистых ферментных препаратов для модификации картофельного крахмала [56], так и комплексных препаратов для направленной ферментации пшеничного и кукурузного крахмалов [57, 58] с целью получения полисахарида с заданными свойствами, пригодными для пищевой промышленности. α -Амилаза, пуллуланаза, циклодекстрин гликозилтрансфераза и малтопродуцирующая амилаза, в настоящее время широко используются промышленностью в различных областях, из этих ферментов α -амилаза, вероятно, имеет наиболее широко распространение. Кроме их использования для осахаривания и перевода в жидкую фазу крахмала, эти энзимы также используются для подготовки вязких, стабильных крахмальных растворов, используемых для разделения текстильных волокон, для ректификации пива от мутности или мякоти во фруктовых соках, или для предобработки животного корма с целью повышения усвояемости. Одно из направлений использования амилалитических ферментов состоит в модификации пищевых источников, обладающих низкими вкусовыми качествами, но высокими питательными. Например, в некоторых странах каштановая культура деревьев играет важную экологическую и экономическую роль. Плоды их обычно используют в локальном производстве, чтобы получать кондитерскую продукцию как засахаренная мякоть каштана. Поскольку эти деликатесные продукты требуют высококачественных каштанов (с точки зрения размера, формы или соответствия для чистки и обработки), то только небольшой процент годового каштанового урожая поступает в промышленную переработку.

Тем не менее, на основе их крахмалистой природы, переобработанные каштаны могут быть использованы для выпуска альтернативной пищи или для биотехнологических целей [59]. В Галии (Испания) - одной из наиболее высокопродуктивных областей в Европе по выпуску каштанов, в настоящее время внедряются две реальных промышленных альтернативы для использования перепроизводства каштанов: во-первых, разрабатывается технология получения сладкой муки для людей с заболеваниями брюшной полости без глютена, во-вторых, производства алкогольного напитка из дистиллятов перебродившего каштана. В первом случае, требуется только частичный ферментный гидролиз крахмала, в то время как во втором необходим полный гидролиз. С целью получения модели полного гидролиза крахмала в каштанах испытывались термостабильные α -амилаза (Termamyl 120L, тип S) и глюкоамилаза (AMG 300L) в смеси, причем глюкоамилаза имеет две формы с различной термостабильностью. Полный гидролиз достигается только в том случае, когда используют оптимальные высокие концентрации обоих ферментов [59], кроме того выявляется синергический эффект используемых ферментов. Два ферментных препарата, произведенных Novo Nordisk, Дания: BAN 480L (бактериальная α -амилаза, выделенная из селективного штамма *Bacillus amyloliquefaciens*) и Dextrozyme E (сбалансированная смесь глюкоамилазы, полученной из генетически модифицированного штамма *Aspergillus niger* и пуллулаказы, полученной из генетически модифицированного штамма *Bacillus*), были использованы для гидролиза [60]. Таким образом, амиолитические ферменты являются широко применяемыми компонентами для пищевой промышленности, а новые высокоактивные бактериальные препараты перспективны в использовании для модификации растительного сырья.