

Биотехнология получения амилопектина

Е.А. ЦВЕТКОВА, Л.В. ХРУЩЕВА, О.М. ХРАМЧЕНКОВА, Т.В. АРАСТОВИЧ, Н.И. ДРОЗДОВА

Предложена биотехнология получения амилопектина из легко доступного сырья – картофельного крахмала, с использованием антисептической молочной сыворотки. Полученный амилопектин можно использовать как гелеобразующий и желирующий агент в медицине и пищевой промышленности.

Ключевые слова: амилопектин, крахмал, гидроколлоиды, сыворотка, гель.

Biotechnology of obtaining the amylopectin from readily available raw materials – potato starch, using antiseptic whey is offered. Amylopectin obtained can be used as gelling and gelling agent in medicine and food industry.

Keywords: amylopectin, starch, hydrocolloids, whey, gel.

Введение. Одной из важных задач химической, фармацевтической, парфюмерной, пищевой промышленности является обеспечение населения продукцией высокого качества, полученной по безотходным, экономичным и экологически чистым технологиям. Свойства гидроколлоидов, полученных из природного сырья, позволяют эффективно использовать их в качестве основы в производстве.

По химической природе гидроколлоиды представлены двумя видами биополимеров – полисахаридами и белками, особенности которых и определяют индивидуальную специфику поведения каждого из них в гидрофильной среде при различных условиях [1]. Гидроколлоиды включают в рецептуру в количестве менее 1 %, но их влияние на текстуру конечного продукта очень велико. Эффективность действия гидроколлоидов полисахаридной природы и их производных определяется структурными особенностями их молекул: длиной цепи, степенью разветвления, природой мономерных звеньев и функциональных групп, их расположением в молекуле, наличием гликозидных связей; зависит от состава изделия и способа приготовления [2].

Наиболее доступным веществом полисахаридной природы, которое обладает свойством образовывать коллоидные растворы, является амилопектин, основным источником которого является крахмал. В качестве сырья для производства крахмала используются корнеклубнеплоды и зерновые культуры [3]. Содержание амилопектина в картофельном крахмале составляет около 80 %. Одно из главных свойств амилопектина – образование устойчивых гелей и желе. Их отличительными чертами является отсутствие выделения воды при стоянии или хранении, а также при многократном замораживании – размораживании. Вышеназванные ценные свойства позволяют считать амилопектин одним из наиболее перспективных гидроколлоидов полисахаридной природы.

Разделение крахмала на фракции для получения амилопектина связано с большими трудностями, так как сложно подобрать такие агенты, которые разъединяли бы комплекс амилопектина и амилозы, не затрагивая связей между остатками глюкозы. Сравнительные характеристики амилозы и амилопектина представлены в таблице 1. Получение амилопектина – сложный многостадийный технологический процесс.

В этой связи практический интерес представляет поиск и/или разработка новых экономических способов получения амилопектинов из растительного сырья с использованием натуральных ингредиентов.

Таблица 1 – Сравнительные характеристики амилозы и амилопектина

Характеристика	Амилоза	Амилопектин
1. Содержание в крахмале, %		
• картофельный крахмал	20 – 21	79 – 80
• кукурузный крахмал	20 – 28	72 – 80
• кукурузный (воск.) крахмал	0,8	99,2
• тапиоковый крахмал	16 – 17	83 – 84
• пшеничный крахмал	20 – 28	72 – 80
• рисовый крахмал	18	82
2. Растворимость в воде	Растворима в горячей воде, растворы неустойчивы – происходит ретроградация	Набухает в горячей воде, образуя клейстеры
3. Окраска с йодом	Синяя	Пурпурная или красная
4. Адсорбция йода	Высокая	Низкая
5. Адсорбция на целлюлозе	Высокая	Низкая
6. Расщепляемость амилазой, %	100	50
7. Реакция с органическими соединениями (1-бутанол)	Образует комплексы	Неспособен связываться с 1-бутанолом и др. органическими соединениями
8. Молекулярная масса	От 500 до 1600	От 10000 до 6 млн.
9. Содержание остатков глюкозы	От 100 до нескольких тысяч	До 50 тысяч
10. Строение	Линейное	Разветвленное

Материалы и методы исследования. Выбор сырья для получения амилопектина обоснован доступностью, ценовым показателем и большим объемом выпуска. Основными базовыми материалами для исследований служили крахмал, молочная сыворотка и сахар-песок.

При проведении исследований применяли картофельный крахмал торговой марки «Моя домашняя кухня» (производитель Гомельский жировой комбинат). Антисептическую молочную сыворотку получали путем сбраживания молочной сыворотки, применяя продукт ОАО «Милка-вита» дрожжами штамма *Saccharomyces acedum lactis-1*, при температуре от 28°C до 32°C в хладотермостате в течение 72 часов до образования гомогенной биомассы с рН равной 4,5–5,0.

Данная культура соответствует *Saccharomyces cerevisiae* (синонимы – *Saccharomyces aceti Santa Maria 1959*, *Saccharomyces acedum lactam*), автор описания – Meyenex Hansen, 1883 г. Штамм дрожжей *Saccharomyces acedum lactis-1* выделен из корня хрена *Armoracia*. Используемая культура отличается высокой ферментативной активностью (таблица 2), также обладает и антибиотической активностью по отношению к грамположительным бактериям и грибам. В процессе ферментации плотность дрожжевых клеток достигает от 2,5 до 3,5 млрд/мл [4].

Таблица 2 – Ферментативная активность дрожжей *Saccharomyces acedum lactis-1*

Штамм	Показатели сбраживания сахаров				
	глюкоза	мальтоза	лактоза	сахароза	крахмал
<i>Saccharomyces lactis</i>	+	–	+	–	–
<i>Saccharomyces acedum lactis-1</i>	+	–	+	+	+

Антисептическая молочная сыворотка обладает следующим антибиотическим потенциалом (таблица 3).

Выбор дрожжей обусловлен тем, что дрожжи занимают доминирующее положение в биотехнологии благодаря тому, что продуцируемые ими метаболиты обладают повышенной лабильностью, которая обуславливает исключительно высокую эффективность ферментативной системы дрожжей. Эта особенность позволяет им выживать при значительных колебаниях температуры, влажности, состава и свойств питательных сред. Дрожжи длительно сохраняют присущие им биосистему и биопотенцию, переходя в анабиоз, что способствует его выживанию в неблагоприятных условиях [5].

Таблица 3 – Антибиотическая активность дрожжевой молочной сыворотки

Тест культуры	Ширина стерильных зон вокруг блоков с препаратом, мм	Пенициллиновый эквивалент активности
<i>Sarcinae flava</i>	7,3	5,0
<i>Staphylococcus albicans</i>	6,0	5,0
<i>Sporolact. sylvestris</i>	6,5	5,0
<i>Bac. subtilis</i>	9,0	5,0
<i>Bac. brevis</i>	12,0	10,0
<i>Bac. thuringiensis</i>	9,7	5,0
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	9,4	5,0
<i>Pseudomonas liquefaciens</i>	8,8	5,0
<i>Cand. scoti</i>	9,1	-
<i>Cand. tenuis</i>	2,0	-
<i>Torul nitralophyla</i>	1,5	-
<i>Penicillium viridae</i>	8,9	-
<i>Aspergillus niger</i>	10,3	-
<i>Trichoderma lignorum</i>	9,0	-

Широкое использование дрожжевой продукции в жизни и деятельности человека объясняется также тем, что они практически безвредны для животных и растений. Более того, некоторые дрожжи применяют для производства лечебно-профилактических препаратов [6]–[10]. На основе пекарских дрожжей *Sacharomyces cerevisiae* получены сотни рас, используемых в пищевой промышленности. Все сахаромикеты активно сбраживают простые углеводы до этилового спирта, синтезируют и аккумулируют витамины группы В и используются в медицине при авитаминозах [11], [12].

Экспериментальные образцы амилопектина получали из крахмала, суспензированного в обогащенной молочной антисептической сыворотке. Для подготовки которой применяли хладотермостат суховоздушный ХТ-3/70-2. Суспензию крахмала в антисептической молочной сыворотке обрабатывали в автоклаве YXQ-LS-18SI. Полученные образцы подвергали экспериментальной проверке методами ИК-спектроскопии (ИК-Фурье спектрофотометр NI-COLET 6700), дифференциально-сканирующей калориметрии (ДСК) и микробиологическому анализу, используя тест-культуру кишечной палочки (*Escherichia coli*) из паспортизированных штаммов УО «Гомельский государственный медицинский университет». Методика исследования состояла в выращивании культуры кишечной палочки (*Escherichia coli*) на простой питательной среде – агаре Мюллер-Хинтона в чашках Петри, погружении в нее образца и наблюдении за ростом колоний по наличию или отсутствию зон стерильности.

Результаты исследований. Анализ литературных источников показал, что существующие способы получения амилопектина сопровождаются использованием различных реагентов (бензол, жидкие алифатические углеводы, бромид триметиллоктиламмония и др.) и высокой температурой. Наиболее оптимальным решением поставленной задачи является способ [13] получения амилопектина из обычного крахмала путем обработки его водой при постоянном перемешивании при температуре 160 С и выше и давлении насыщенного пара (рН 4–9). В связи с этим для достижения цели нами была применена ферментативная биотехнология, позволяющая снизить температуру обработки сырья и ускорить процесс разделения крахмала на амилозу и амилопектин.

В промышленности крахмал обычно гидролизуют в виде гидросуспензии при температуре 100–150°С, применяя в качестве катализатора серную или соляную кислоту. Сначала происходит ослабление и разрыв связей между макромолекулами амилопектина и амилозы, что сопровождается нарушением структуры крахмальных зерен и образованием гомогенной массы. При дальнейшем действии кислоты в полисахаридах разрываются валентные α -1,4- и α -1,6-глюкозидные связи, и по месту их разрыва присоединяется молекула воды. В растворимое состояние крахмал переходит сравнительно быстро, а гидролизуется значительно медленнее. Поскольку глюкозидные связи разрываются одновременно в различных частях молекул амилозы и амилопектина, образуются продукты с различной молекулярной массой.

Для получения амилопектина использовали три варианта суспензий крахмала: водную, нативной молочной сыворотки и антисептической молочной сыворотки (рН~5).

После смешения исходных компонентов суспензии подвергали термической обработке при разных технологических режимах: давление от 1 до 1,7 атм., температура от 100 С до 140 С и время от 10 до 40 минут. Затем, после охлаждения композиций, отделяли нерастворенную фракцию. Состав композиций представлен в таблице 4

Таблица 4 – Состав композиций (масс. %)

I суспензия	II суспензия	III суспензия
крахмал – 11	крахмал – 11	крахмал – 11
сахар – 22	сахар – 22	сахар – 22
вода – 67	молочная сыворотка – 67	антисептическая молочная сыворотка – 67

Анализ показал, что продукт автоклавирования суспензии (III) в реакции на йод дает красно-фиолетовое окрашивание и нерастворим в холодной воде, а продукты суспензий I и II – не соответствуют требуемым свойствам. Полученные результаты можно объяснить тем, что при обработке крахмала сывороткой, полученной с использованием дрожжей *Saccharomyes acidum lacti*, происходит процесс частичного ферментативного гидролиза крахмала. Так как данная культура отличается высокой ферментативной активностью, а именно сбрасывает глюкозу, лактозу сахарозу и крахмал, все последующие эксперименты проводили с использованием дрожжей *Saccharomyes acidum lacti*.

Для оптимизации содержания крахмала в композициях использовали концентрацию крахмала от 15 до 50 грамм в сывороточной суспензии, что составляло от 3 до 11 масс. %. Содержание сахара во всех композициях было постоянным – 22 масс. %, а количество антисептической молочной сыворотки зависело от концентрации крахмала и составляло от 67 до 72 масс. %. Общий объем композиций постоянно соответствовал 500 мл. Исследуемые композиции подвергали автоклавированию, охлаждению и отделению растворенной фракции. Установлено, что оптимальное содержание крахмала в композициях составило 6 масс. %. При большем содержании крахмала в исходной композиции наблюдался его избыток в конечном продукте.

Для выбора режимов автоклавирования пользовались таблицей соответствия давления температуре (таблица 5).

Таблица 5 – Соответствие давления температуре в процессе автоклавирования

Температура, °С	100	102	105	109	112	115	119	121	126	128	134	135
Давление, атм	0	0,1	0,2	0,4	0,5	0,7	0,9	1,0	1,3	1,5	2,0	2,1

Эксперимент показал, что при варьировании температуры и давления автоклавирования, а также времени предварительной выдержки композиции, можно получать вещества с различными свойствами. Особый интерес представляют технологические режимы, отображенные в таблице 6.

Таблица 6 – Технологические режимы эксперимента

Режимы	Предварительная выдержка композиции	Давление, атм	Температура, °С	Время, мин
1	применялась	0,5	105	20 – 30
2	не применялась	1,5	120	20 – 30

При первом технологическом режиме применялась предварительная выдержка композиции в суховоздушном хладотермостате в течение 48–72 часов при температуре ~ 30°С, сопровождающаяся периодическим перемешиванием. Предположительно, при хранении происходил процесс ферментативного гидролиза крахмала. После извлечения из хладотермостата композицию перемешивали и подвергали термической обработке при температуре от 105°С до 110°С и давлении около 0,5 атм в течение 20 минут. В результате были получены продукты неполного гидролиза крахмала (смесь декстринов с глюкозой). Они представляли собой слегка желтоватую, очень вязкую массу сладкого вкуса, характеризующуюся высокой липкостью. Обычно такие смеси декстринов с глюкозой (патока) используют в качестве клея, для загустения красок при нанесении рисунков на ткань, в кондитерской промышленности и т. д.

При втором технологическом режиме, композицию из крахмала, сахара и антисептической молочной сыворотки подвергали автоклавированию ($P = 1,5$ атм. и $T = 120^{\circ}\text{C}$), что привело к получению вещества, при фильтрации которого через марлевые фильтры, происходило разделение на фракции: растворенную – амилозу и нерастворенную – амилопектин. На рисунке 1 представлена экспериментальная партия вещества – амилопектина, полученного при втором режиме автоклавирования. Размеры кристаллов представленных на фотографии соответствуют $\sim 2\text{--}7$ мм.



Рисунок 1 – Внешний вид образцов экспериментальной партии амилопектина

Технологический процесс получения амилопектина схематично можно разделить на пять этапов, от подготовки антисептической молочной сыворотки до блистерной упаковки полученных образцов амилопектина. Технологическая схема получения сывороточного амилопектина представлена на рисунке 2. Количество получаемого конечного продукта – амилопектина, по разработанной технологии, зависит от марки используемого крахмала.

Для подтверждения соответствия полученного материала амилопектину полученное аморфное вещество проверяли на растворимость: не растворимо в холодной воде, а в горячей – образует студенистую часть клейстера. При проведении йодометрии дает красно-фиолетовое окрашивание, что характерно для амилопектина [14].

Анализ фрагментов инфракрасных спектров исследуемых образцов в сравнении с фрагментами стандартного ИК-спектра амилопектина показал достаточно большое совпадение характеристических полос поглощения, соответственно подтверждающих отношение исследуемых образцов к полисахаридам [15]. Наблюдали интенсивные и широкие полосы поглощения: в области 3400 см^{-1} , характеризующие валентные колебания связанных ОН-групп; в области от 2800 до 3000 см^{-1} находятся полосы валентных колебаний СН-групп; полосы при 1740 и 1620 см^{-1} обусловлены валентными колебаниями СН-групп неионизированных и ионизированных кислот, в области от 1400 до 1450 см^{-1} расположены полосы плоских деформационных колебаний СН-групп; в области от 1000 до 1100 см^{-1} находятся полосы колебаний скелета молекулы.

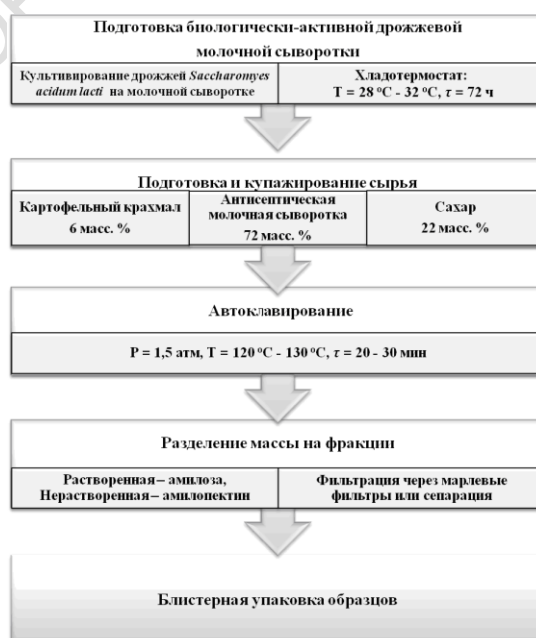


Рисунок 2 – Технологическая схема получения амилопектина

Исследование полученных образцов амилопектина методом дифференциально-сканирующей калориметрии проводили при стандартном режиме нагревания от 20 до 220°C со скоростью 5°C/мин. Появление пиков на кривой ДСК свидетельствовало об изменении энтальпии, связанной с фазовым переходом вещества при температуре около 125°C в расплав. Таким образом, температура плавления находится в соответствующем диапазоне.

В качестве тест-объекта взята культура микроорганизма кишечной палочки *Escherichia coli* ATCC 25922 (кишечная палочка, антибиотикочувствительная, бактерия грамтрицательная). Выбор данного штамма обусловлен доступностью культуры микроорганизма, дешевизной и простой культивирования, широким использованием штамма в подобного рода экспериментах.

Экспериментально установлено угнетение роста тестового штамма кишечной палочки (*E. coli*) вокруг образцов амилопектина. Диаметр зоны подавления роста микроорганизма на плотной питательной среде составил от 3 до 5 мм (рисунок 4).



Рисунок 4 – Зоны подавления роста на культуре *E. Coli*

Заключение. Разработана простая, экономически выгодная и экологически безопасная импортозамещающая биотехнология получения амилопектина из картофельного крахмала с использованием антисептической молочной сыворотки. При варьировании технологических режимов возможно получение материалов с различной степенью гелеобразования, желирования или липкости в зависимости от целей и задач конкретного потребителя.

Литература

1. Филипс, Г.О. Справочник по гидроколлоидам / Г.О. Филипс, П.А. Вильямс ; пер. с англ.; под ред. А.З. Рубинова. – Санкт-Петербург : ГИОДР, 2006. – 535 с.
2. Подвойская, И.А. Перспективы разработки композиций гидроколлоидов Торгового дома / И.А. Подвойская, Д.И. Кучерук // Мясная Индустрия. – 2004. – № 5. – С. 23–24
3. Кнорре, Д.Г. Биологическая химия: учеб. для хим., биол., и мед. спец. вузов / Д.Г. Кнорре, С.Д. Мызина. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : Высш. шк., 1998. – 479 с.
4. МПК С12N 1/5, А23С 19/032. Штамм *Saccharomyces acedum lactis*-1 продуцент ферментов сычужного действия.
5. Беккер, М.Е. Структурные перестройки дрожжевых клеток при их переходе в состояния анабиоза и последующих регидратаций и реактиваций / М.Е. Беккер, Б.Э. Дамберг, А.И. Раппопорт // Анабиоз микроорганизмов. – Рига, 1981. – С. 77–135.
6. Новое в систематике и номенклатуре грибов / редкол. Ю.Т. Дьяков, Ю.В. Сергеев. – Москва : Национальная академия микологии. Медицина для всех, 2003. – 494 с.
7. Влияние биологически активной добавки автолизата обогащенных селеном пекарских дрожжей на состояние кишечного барьера у крыс при анофилаксии / М.А. Голубкина [и др.] // Вопросы питания. – 1998. – № 3. – С. 18–21.
8. Эвенштейн, З.М. Ацидофильно-дрожжевое молоко в комплексе мер стимуляции секреторной и кислотообразующей функции желудка у больных туберкулезом легких / З.М. Эвенштейн // Вопросы питания. – 1977. – № 3. – С. 91–92.
9. Чистяков, М.Г. Сравнительные исследования иммуногенеза у крыс, содержащихся на рационах с экспериментальными молочно-яичными продуктами / М.Г. Чистяков, А.П. Парахонский // Вопросы питания. – 1977. – № 1. – С. 57–60.

10. Модифицирующее действие *Saccharomyces boulabor* на биологические свойства энтеробактерий / Д.А. Кирилов [и др.] // Бюл. эксп. биологии и медицины. – 2002. – № 4. – С. 57–59.
11. Саттон, Д. Определитель патогенных и условно патогенных грибов / Д. Саттон, А. Фетергилл, М. Ринальди ; пер. с англ. – М. : Мир, 2001. – 354 с.
12. Сахаромицеты // Биология. Большой энциклопедический словарь. – 3-е изд. – М. : БРЭ, 1998. – С. 560.
13. Патент 3296501 JP, C08B30/20; C08B30/00; (IPC1 – 7): C08B30/20. Method for separating amylase and amylopectin / Takahashi Chie, Ibaraki Takamasa № JP19900098823 19900413 ; pub. 27.12.1991.
14. Гулюк, Н.Г. Крахмал и крахмалопродукты / Н.Г. Гулюк, А.И. Жушман. – Москва : Агропромиздат, 1985. – 240 с.
15. Анализ инфракрасных спектров крахмала [Электронный ресурс] // Крахмал. – Режим доступа : http://www.nprb.ru/uslugi_IR.html. – Дата доступа : 09.12.2013.

Гомельский государственный
университет им. Ф. Скорины

Поступила в редакцию 30.03.2015

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ