

УДК 664 162.1

STUDY OF LIQUEFIED STARCH SACCHARIFICATION USING β -AMYLASE ENZYME PREPARATIONS

N. Sabadash, O. Grabovska

*National University of Food Technologies***Key words:**

*Maltose syrup
Saccharification
Fermentation
preparations
 β -amylase*

Article history:

Received 13.12.2014

Received in revised form
05.01.2015

Accepted 25.01.2015

ABSTRACT

This article presents the results of studies of the kinetics of cornstarch liquefied suspension saccharification using maltogenic enzyme preparation of β -amylase. Kinetic laws which allow to determine the optimal conditions of saccharification using this enzyme preparation are determined. β -amylase enzyme preparation provides obtaining syrups characterized by maltose content of above 50 % and by low glucose content (approximately 2.5 % of reducing agents weight). Such content is the main indicator of production quality of caramel syrup and many other foods.

Corresponding author:

N. Sabadash

E-mail:

npnuht@ukr.net

ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОЦЕСУ ЗЦУКРЮВАННЯ РОЗРІДЖЕНОГО КРОХМАЛЮ ФЕРМЕНТНИМ ПРЕПАРАТОМ β -АМІЛАЗИ

Н.І. Сабадаш, О.В. Грабовська

Національний університет харчових технологій

У статті наведено результати досліджень кінетики процесу зцукрювання розрідженої суспензії кукурудзяного крохмалю мальтогенним ферментним препаратом β -амілази, встановлено кінетичні закономірності, що дають змогу визначити оптимальні умови зцукрювання при використанні даного ферментного препарату. Використання β -амілази дозволяє отримати сиропи з вмістом мальтози понад 50 % і низьким вмістом глюкози (близько 2,5 % до маси редуковувальних речовин), що є основним показником якості сиропів при виробництві карамелі та інших харчових продуктів.

Ключові слова: мальтозні сиропи, зцукрювання, ферментні препарати, β -амілаза.

Постановка проблеми. Цукристі крохмалепродукти стали важливим складовим елементом світового ринку підсолоджувачів і суттєво впливають на

кон'юнктуру ринку цукру. Донедавна вітчизняна промисловість виробляла лише один вид крохмальної патоки — карамельну. Розширення виробництва сучасних амілолітичних ферментних препаратів (ФП) дозволяє розробити технології цілого спектру крохмальних сиропів з високими якісними характеристиками. Ця продукція не містить генетично модифікованих організмів [1, 2, 3].

До ключових крохмалепродуктів, які виробляються в Україні, відносяться мальтозні сиропи (до 65 % мальтози до маси редукувальних речовин (РР)), які використовуються в пивоварінні завдяки вмісту великої кількості зброджуваних цукрів. У результаті цього збільшується продуктивність та екстрактивність сусла. Мальтозні сиропи широко використовуються у хлібопекарській промисловості: завдяки їхнім властивостям підвищується пористість та еластичність м'якиша, випічка набуває золотистої скоринки й приємного аромату, виробли довше залишаються свіжими. Мальтозні сиропи застосовуються в кондитерській і консервній промисловості. При виготовленні варення, різних джемів, повидла мальтозний сироп підвищує в'язкість продукції, за рахунок чого збільшується термін її зберігання. Окрім того, мальтозні сиропи покращують смакові якості харчових продуктів [2, 3, 4].

Основним показником якості патоки при виробництві карамелі є вміст глюкози, оскільки цей моносахарид з усіх наявних у патоці редукувальних сахаридів має найбільшу гігроскопічність, що скорочує термін зберігання карамельних виробів. До того ж при виробництві карамельної маси під впливом високих температур (близько 150 °C) відбуваються фізико-хімічні зміни сахаридів, які входять до складу рецептурної суміші. Утворені продукти розкладання сахаридів підвищують забарвленість і погіршують якість патоки, тому кондитерська промисловість зацікавлена в отриманні сиропів з низьким вмістом глюкози [1, 2].

Унаслідок невисокого вмісту глюкози (менше 10 % до маси РР) мальтозні сиропи не гігроскопічні, а тому придатні для виготовлення твердої карамелі. Відомо [2, 3, 4], що гігроскопічність карамелі, виготовленої з використанням мальтозного сиропу, приблизно на 50 % нижча, ніж карамелі, виготовленої з використанням карамельної патоки. В процесі варіння з цукром мальтозні сиропи менше темніють, а отримані вироби відрізняються підвищеною стійкістю при зберіганні, порівняно з виробами, які виготовлені з використанням звичайної карамельної патоки. Це особливо важливо для виробництва прозорих виробів. Також відомо [2, 4], що в карамелях, виготовлених з використанням карамельної патоки, значно вищий вміст оксиметилфурфуролу, який утворюється при дегідратації глюкози. Вказані переваги мальтозних сиропів надають можливість не лише частково замінити крохмальну патоку при виробництві карамелі, але й використовувати сиропи в більшій кількості (80...100 % до маси СР цукру), замінюючи при цьому частину цукру і, як наслідок, знизити собівартість карамелі. Збільшення вмісту звичайної патоки в карамельній масі підвищує її гігроскопічність і зменшує термін зберігання [2, 3].

Існують різні варіанти отримання мальтозних сиропів [1]. Проте кожен з них передбачає використання ферментних препаратів у рекомендованих у сертифікаті відповідності кількостях, комбінаціях та за умови дотримання оптимальних параметрів проведення процесу оцукрювання, за яких можна отримати сироп

лише відповідного вуглеводного складу. До того ж витрати ферментних препаратів, які рекомендовані в сертифікатах відповідності надаються в кг/т, а не в одиницях активності, що зобов'язує використовувати ферментні препарати лише вказаного виробника. Зазначення витрат ферментних препаратів в одиницях активності дозволить уникнути вказаних обмежень і надасть можливість використовувати даний ферментний препарат в інших композиціях або з ферментними препаратами іншого виробника за умови наявності відповідних кінетичних кривих зцукрювання.

На виробництві при виникненні потреби отримати сироп іншого вуглеводного складу, який не зазначений у сертифікаті відповідності, комбінування ферментних препаратів та визначення їх витрат здійснюють емпіричним шляхом. Тобто процес зцукрювання при отриманні мальтозних сиропів на виробництві не має наукового підґрунтя. Дані щодо кінетики зцукрювання крохмальних гідролізатів до мальтози не представлені в літературних джерелах. Зазначається лише оглядова інформація стосовно отримання мальтозних сиропів, яка представлена в сертифікатах відповідності та у рекламних буклетах виробників. Унаслідок цього в промислових умовах можливі перевитрати ферментного препарату. З теорії ферментативного каталізу [1, 5, 6] відомо, що чим більші витрати ферменту, тим швидше проходить ферментативна реакція, але це призводить до збільшення собівартості продукції, погіршення її якості, підвищення вмісту небажаних домішок, які вносяться з препаратом.

Мальтозні сиропи отримують з крохмалю [1, 7, 8], використовуючи як біо-каталізатор реакції гідролізу мальтогенний ферментний препарат β -амілази. Фермент β -амілаза виявляє зцукрюючу дію. Він гідролізує кожен другий α -1,4-глюкозидний зв'язок крохмалю, по чергово відщеплюючи від нередукувального краю лінійних ділянок молекул по два залишки глюкози (молекулу мальтози). Кінцевими продуктами гідролізу крохмалю при дії β -амілази є мальтоза, мальтотриоза та β -декстрини.

Мета дослідження. Вивчення кінетики ферментативного зцукрювання розрідженої суспензії кукурудзяного крохмалю до мальтози залежно від витрат ФП β -амілази.

Відомо [1, 9], що найвища швидкість зцукрювання крохмалю спостерігається протягом першої години, а загалом процес накопичення в гідролізаті мальтози досить тривалий (48—72 год), тому для досягнення поставленої мети необхідно дослідити процес зцукрювання протягом перших 60 хв, а також протягом 72 год визначити оптимальні витрати фермента й тривалість зцукрювання, оскільки від цих чинників залежать не тільки технологічні, але й техніко-економічні показники.

Матеріали і методи. В ході досліджень готували суспензію крохмалю з масовою часткою сухих речовин (СР) 30 %. Ферментативне розріджування суспензії проводили в одну стадію ферментним препаратом термостабільної бактеріальної α -амілази — Alphasin T7L (компанії Genencor) — у кількості 4 одиниці амілолітичної активності на грам сухих речовин (од.АА/г СР) кукурудзяного крохмалю. Для виявлення максимальної активності ФП оптимальним є значення рН 5,8, досягнуте шляхом додавання у субстрат необхідної кількості 1 моль/дм³ розчину HCl. Ферментативне розріджування суспензії проводили

під впливом електромагнітного поля НВЧ або під незначним надлишковим тиском у спеціальному термостаті за температури 110 °С. Загальна тривалість розріджування становила 4...13 хв до досягнення значення глюкозного еквіваленту (ГЕ) гідролізату в межах 12...15 %, яке і є оптимальним для подальшого зцукрювання [9].

Після розріджування гідролізат охолоджували до температури 57 °С і доводили рН до значення 5,2...5,5 шляхом додавання у субстрат розчину НСІ концентрацією 1 моль/дм³. Ці параметри є оптимальними для дії ФП β-амілази Optimalt ВВА (компанії Genencor). ФП β-амілази Optimalt ВВА, який використовувався в даному аналізі, отриманий з рослинної сировини — ячменю (очищеного та стабілізованого).

У суспензію крохмалю для зцукрювання вносили ФП β-амілази, витрати ферменту варіювали від 0,005 до 0,6 одиниць зцукрюючої активності на грам сухих речовин (од.3А/г СР) крохмалю. Високе значення верхньої межі витрат β-амілази обумовлене необхідністю оцінити максимальне накопичення мальтози, яке можливо отримати шляхом зцукрюванням вказаного субстрату ФП β-амілази. Зцукрювання проводили в термостаті EL-20R за температури 57 °С при постійному перемішуванні. Проби відбирали через 20 і 40 хв; 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 48, 72 год, термостатували на киплячій водяній бані протягом 15 хв для інактивації ферменту. Проведення експерименту протягом 72 год обумовлене необхідністю встановити оптимальну тривалість процесу зцукрювання. В охолоджених пробах визначали ступінь зцукрювання за показником ГЕ (в перерахунку на глюкозу) йодометричним методом Вільштеттера та Шудля [10].

Результати і обговорення. За експериментальними даними будували кінетичні криві процесу зцукрювання суспензії розрідженого крохмалю ФП β-амілази залежно від витрат протягом перших 60 хв (рис. 3), а також протягом 72 год зцукрювання (рис. 1). На рис. 2 наведено результати досліджень в інших координатах. Вуглеводний склад мальтозних сиропів досліджували за допомогою рідинного хроматографа [11]. Хроматограму гідролізату, отриманого за оптимальних витрат β-амілази, наведено на рис. 4.

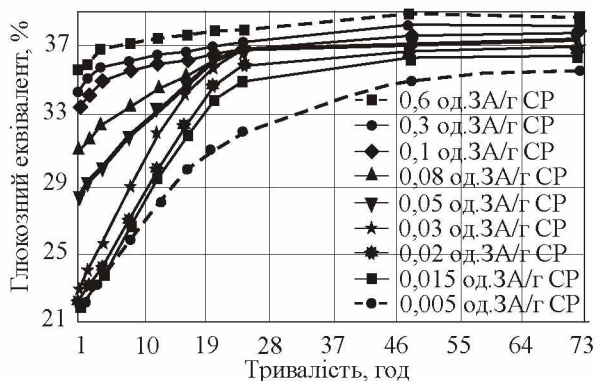


Рис. 1. Кінетика ферментативного зцукрювання розрідженого крохмалю за різних витрат ФП β-амілази

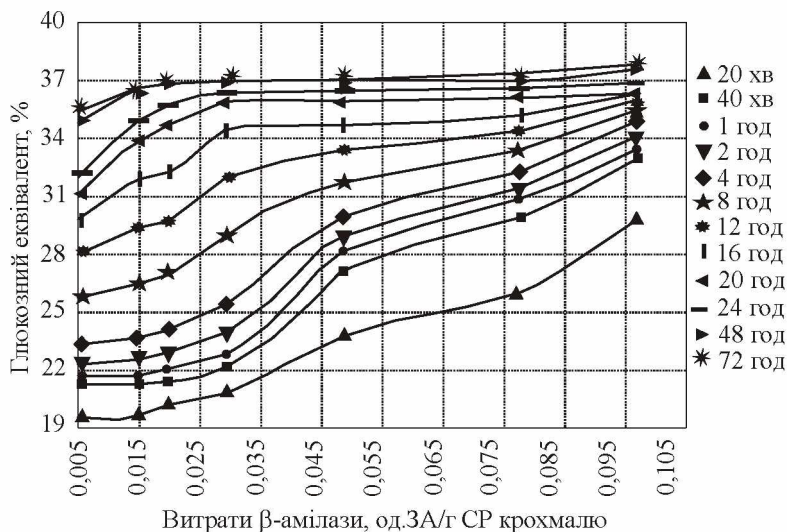


Рис. 2. Залежність глюкозного еквіваленту від витрат ФП β -амілази

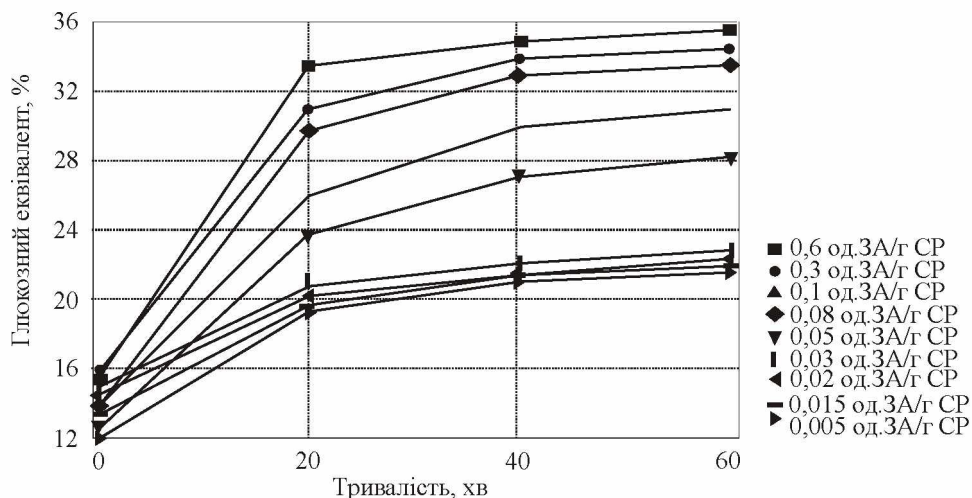


Рис. 3. Кінетика ферментативного зцукрювання гідролізатів крохмалю на початку процесу за різних витрат β -амілази

З результатів досліджень, представлених на рис. 1—3, видно, що швидкість ферментативної реакції пропорційна витратам ферменту. На початку процесу зцукрювання (рис. 3) протягом перших 20 хв швидкість ферментативної реакції для усіх зразків значно вища, ніж при подальшому зцукрюванні. За витрат ФП β -амілази 0,1; 0,3; 0,6 од.3А/г СР крохмалю уже через 4 год ГЕ досягає значень 35, 36, 36,8 % відповідно (рис. 1), в подальшому спостерігається уповільнення зростання швидкості процесу зцукрювання. Натомість, за значно менших витрат β -амілази (0,02—0,08 од.3А/г СР крохмалю), ГЕ сягає фактично тих самих значень — 35,9—36,8 % за 24 год зцукрювання (рис. 1, 2) і майже не зростає впродовж подальшого зцукрювання. Процес зцукрювання триває до

певної межі, оскільки β -амілаза не гідролізує та не може обійти α -1,6-глюкозидні зв'язки амілопектину і припиняє свою дію на передостанньому перед розгалуженням α -1,4-глюкозидному зв'язку, залишаючи при цьому негідролізованими β -граничні декстрини.

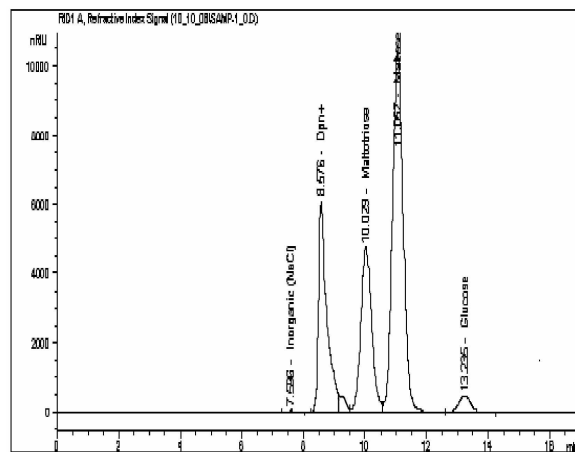


Рис. 4. Хроматограма гідролізату, отриманого при зцукрюванні крохмалю β -амілазою (з розрахунку 0,03 од.ЗА/г СР гідролізату) протягом 24 год: глюкози — 2,5 %; мальтози — 50,8 %; трисахаридів — 23,5 %; тетрасахаридів — 1,8 %; DP5 і більше (в т.ч. декстрини) — 21,4 % до маси РР

Те, що швидкість ферментативної реакції зростає зі збільшенням витрат ферментного препарату, можна пояснити так: усі реакції, що каталізують ферменти, відбуваються на порівняно невеликій ділянці молекули, яка називається активним центром ферменту. При створенні третинної структури активні групи ферменту зосереджуються в одній області молекули, яка взаємодіє із субстратом. З кожною молекулою ферменту, а саме: з кожним її активним центром, реагує одна молекула субстрату.

Згідно з гіпотезою американського біохіміка Д. Кошленда [5, 6, 12], взаємодія між молекулою субстрату і каталітичним центром ферменту виникає лише тоді, коли вони зближаються один з одним. Субстрат викликає в молекулі ферменту таку зміну розташування хімічних груп у просторі, що між ними виникає взаємодія і з'являється можливість утворення фермент-субстратного комплексу (теорія ферментативного каталізу Л. Міхаеліса та М. Ментен) [5, 12], який проходить один або декілька етапів хімічних перетворень, що складає проміжну стадію реакції. В результаті цих перетворень субстрат розкладається на продукти реакції, а фермент виходить з реакції у незмінному вигляді і здатен вступити у взаємодію з наступною молекулою субстрату, тобто цикл реакції може багаторазово повторюватись за участю однієї й тієї ж молекули ферменту.

При збільшенні витрат ФП зростає швидкість проходження процесу гідролізу. За низьких концентрацій одного з компонентів ферментативної реакції швидкість утворення фермент-субстратного комплексу значно зменшується. Так, за низьких концентрацій субстрату наприкінці процесу зцукрювання спостерігаємо низьку швидкість ферментативної реакції (рис. 1, 2). А за низьких витрат

ферментного препарату β -амілази (0,005 од.ЗА/г СР крохмалю) ГЕ досягає значення 35,6 % за 48 год, яке майже не зростає протягом третьої доби (рис. 1, 2). Цієї концентрації ферменту недостатньо для проведення реакції в повному обсязі. Збільшення часу зцукрювання може викликати розвиток мікрофлори, що вплине на якість кінцевого продукту. Крім цього, більш тривале використання обладнання призведе до зменшення продуктивності виробництва.

З отриманих даних можна зробити висновок, що найбільш ефективним є застосування β -амілази у кількості 0,03 од.ЗА/г СР крохмалю (рис. 1, 2), підвищення витрат ФП понад цю величину є недоцільним з економічної точки зору. Основне зцукрювання відбувається за 24 год, а протягом другої та третьої доби ГЕ зростає лише на 0,3...1 % залежно від кількості внесеного ФП. Додавання більшої кількості ФП β -амілази прискорює утворення мальтози за коротший час зцукрювання.

За результатами хроматографічного аналізу (рис. 4) встановлено, що використовуючи лише ферментний препарат β -амілази у кількості 0,03 од.ЗА/г СР крохмалю можна досягти вмісту мальтози в гідролізатах 50 % і навіть більше, ГЕ при цьому становить 37 %. Паралельно з утворенням мальтози в гідролізатах підвищується вміст мальтотриози під впливом ФП β -амілази на декстрини з непарним числом глюкозних залишків, також вона утворюється під час розріджування. Накопичення ж глюкози незначне, вона формується в першу чергу під час розріджування.

При збільшенні інтенсивності перемішування збільшується швидкість зцукрювання крохмалю та швидше досягається необхідне значення ГЕ.

У подальшому необхідно вивчити кінетику процесу зцукрювання розрідженого крохмалю комплексом ФП β -амілази та пуллулази з метою отримання сиропів з більш високим вмістом мальтози.

Висновки

Дослідження кінетики процесу зцукрювання розрідженого крохмалю ферментним препаратом β -амілази дозволило встановити кінетичні закономірності, що дають змогу визначити оптимальні умови зцукрювання при використанні даного ферментного препарату. Найбільший вміст мальтози в гідролізаті спостерігається за витрат β -амілази 0,03 од.ЗА/г СР крохмалю, тривалості зцукрювання — 24 год, що дає змогу отримати мальтозний сироп з вмістом мальтози 50 % і вище до маси РР. Використання ФП β -амілази дозволяє отримати мальтозні сиропи з низьким вмістом глюкози (близько 2,5 %), що є основним показником якості сиропів при виробництві карамелі та багатьох інших харчових продуктів.

Література

1. Гулюк Н.Г. Крахмал и крахмалопродукты / Н.Г. Гулюк, А.И. Жушман, Т.А. Ладур, Е.А. Штыркова. — М.: Агропромиздат, 1985. — 240 с.
2. Магомедов О.Г. Технология карамели / О.Г. Магомедов, А.Я. Олейникова, И.В. Плотникова, А.Ф. Брехов. — М.: ГИОРД. — 2008. — 218 с.
3. Драгилев А.И. Технология кондитерских изделий / А.И. Драгилев, И.С. Лурье. — М.: ДеЛи принт, 2001. — 483 с.

4. Кравченко Т.И. Разработка технологии получения высокомальтозных сиропов из крахмала с применением ферментных препаратов: дис. ... канд. техн. наук: 05.18.05 / Т.И. Кравченко. — М., 1989. — 125 с.
5. Фогарти В. Амилолитические ферменты / В. Фогарти. В кн.: Микробные ферменты и биотехнология. — М., 1986. — Ч.1. — С. 9—80.
6. Келети Т. Основы ферментативной кинетики: пер. с англ./ Т. Келети. — М.: Мир, 1990. — 325с.
7. Linko Y.Y. A Novel Process for High-Maltose Syrup Production from Barley Starch / Y.Y. Linko, H. Makela, P. Linko // Biotechnology and Bioengineering. — 2006. — Volume 4, Issue 13. — P. 352—354.
8. Ghiasi Note on the Hydrolysis of Amylose by Beta-Amylase / Ghiasi et al.// Starch/Stärke. — 1997. — Volume 33, Issue 12. — P. 428—430.
9. Сабадаш Н.І. Дослідження впливу ступеня розріджування крохмалю на кінетику зцукрювання гідролізатів до мальтози / Н.І. Сабадаш, О.В. Грабовська // Цукор України. — 2013. — № 7—8. — С. 47—50.
10. Штангеева Н.І. Методи контролю харчових виробництв: Лабораторний практикум / Н.І. Штангеева, Л.І. Чернявська, Л.П. Рева та ін. — К.: УДУХТ, 2000. — 240 с.
11. EN ISO 10504:2000 «Производные крахмала. Определение составов сиропов глюкозы, фруктозы и гидрорированной глюкозы. Метод использования высокоэффективной жидкостной хроматографии».
12. Технологія спирту / В.О. Маринченко, В.А. Домарецький, П.Л.Шиян, В.М. Швець та ін.; під ред. В.О. Маринченка. — Вінниця: «Поділля-2000», 2003. — 496 с.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА ОСАХАРИВАНИЯ РАЗЖИЖЕННОГО КРАХМАЛА ФЕРМЕНТНЫМ ПРЕПАРАТОМ β -АМИЛАЗЫ

Н.И. Сабадаш, Е.В. Грабовская

Национальный университет пищевых технологий

В статье приведены результаты исследований кинетики процесса осахаривания разжиженной суспензии кукурузного крахмала мальтогенным ферментным препаратом β -амилазы, установлены кинетические закономерности, позволяющие определить оптимальные условия осахаривания при использовании этого ферментного препарата. Использование β -амилазы позволяет получить сиропы с содержанием мальтозы более 50 % и низким содержанием глюкозы (около 2,5 % к массе редуцирующих веществ), что является основным показателем качества сиропов при производстве карамели и других пищевых продуктов.

Ключевые слова: мальтозные сиропы, осахаривание, ферментные препараты, β -амилаза.