
**НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ
В МАШИНОСТРОЕНИИ**

УДК 54.03;54.05

**ИНТЕНСИФИКАЦИЯ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА КРАХМАЛА
С ПОМОЩЬЮ ВОЛНОВЫХ РЕЗОНАНСНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ**

© 2023 г. С. Р. Ганиев¹, В. П. Касилов¹, О. Н. Кислогубова^{1,*},
О. А. Бутикова¹, Н. Е. Кочкина^{1,2}

¹Институт машиноведения им. А.А. Благонравова РАН, Москва, Россия

²Институт химии растворов им. Г.А. Крестова РАН, Иваново, Россия

*e-mail: kobjakovinka@mail.ru

Поступила в редакцию 04.08.2022 г.

После доработки 10.10.2022 г.

Принята к публикации 20.10.2022 г.

В настоящей статье впервые показана возможность интенсификации с помощью волновых резонансных воздействий процесса ферментативного гидролиза кукурузного и картофельного крахмала под действием β -амилазы. Установлено, что концентрация образуемых в результате ферментации кукурузного крахмала сахаристых веществ, через 2 часа проведения процесса при наложении волновых резонансных воздействий в 3.5 раза выше, чем при традиционным режиме перемешивания. Также, волновые воздействия повышают выход сахаров при ферментативной обработке картофельного крахмала. Полученные результаты являются основой для создания высокоэффективных ресурсосберегающих волновых технологий получения сахаристых веществ и пористых крахмалов методом ферментативного гидролиза.

Ключевые слова: волновые воздействия, кукурузный и картофельный крахмалы, β -амилаза, ферментативный гидролиз

DOI: 10.31857/S0235711923010054, **EDN:** ASPWIU

Процесс гидролиза крахмала широко используется при производстве различных сахаристых продуктов (кристаллической глюкозы, фруктозы, патоки, глюкозо-фруктозных сиропов, мальтодекстринов и др.) для пищевой и медицинской промышленности [1]. Традиционно в промышленности используют кислотный [2], ферментативный [3–5], либо комбинированный способы гидролиза биополимера. Кислотный гидролиз крахмала (преимущественно серной кислотой) является простым и недорогим способом получения сахаристых веществ. Однако низкий выход продуктов реакции и необходимость их последующей очистки, а также повышенная температура процесса ограничивают применение этого метода в технологии переработки крахмалсодержащего сырья [6].

Наиболее перспективным способом осахаривания биополимера является ферментативный гидролиз. Несмотря на высокую стоимость биокатализаторов, процесс ферментации крахмала широко используется в технологии получения сахаристых продуктов пищевого назначения, а также, биоэтанола [7]. Преимущество такого способа заключается в высокой избирательности действия амилалитических ферментов по отношению к α -1,4- и α -1,6-глюкозидным связям в макромолекуле крахмала. Это дает возможность путем подбора условий проведения гидролиза биополимера (типа фер-

ментного препарата и температурно-временных параметров обработки) контролировать углеводный состав получаемых сахаристых веществ.

Традиционная технология ферментативного гидролиза крахмала заключается в обработке концентрированной суспензии биополимера (10–40 мас.%) раствором амилолитического ферментного препарата при постоянном перемешивании в течение длительного промежутка времени (48–72 ч) при повышенной температуре (50–90°C) [8–10]. Это требует больших энергозатрат, сократить которые можно путем использования различных интенсифицирующих механических воздействий. Однако, число работ, посвященных усовершенствованию технологии ферментативного осахаривания крахмальных полисахаридов крайне ограничено.

Например, авторами работ [11, 12] показана возможность интенсификации ферментативного гидролиза крахмала с помощью ультразвуковой обработки (УЗ). В то же время, наряду с ускорением биоконверсии крахмальных полисахаридов использование УЗ может приводить к снижению каталитической активности ферментного препарата [13–16], что в итоге замедляет процесс накопления сахаристых веществ. Кроме того, существует необходимость подбора оптимальных параметров УЗ-воздействий на гидролиз крахмала в зависимости от типа используемого ферментного препарата.

Известны также работы посвященные исследованию влияния микроволнового излучения на процесс ферментативного гидролиза крахмала [17, 18]. Установлено, что применение микроволн ограничено низкими концентрациями биополимера и возможной дезактивацией биокатализатора.

Одним из перспективных путей интенсификации химических процессов при помощи специальным образом сформированных механических воздействий является применение волновых технологий, разработанных на основе методов нелинейной волновой механики в ИМАШ РАН. В частности, на основе использования волновой турбулизации компонентов реакции в воздушной среде разработаны новые оригинальные технологии получения модифицированных крахмалов по наиболее перспективному – “сухому” методу проведения процесса [19]. Работоспособность и высокая эффективность новых волновых технологий получили экспериментальное подтверждение в результате серии экспериментов по получению карбоксиметилированных и катионированных крахмалов с различной степенью замещения [20, 21].

Целью настоящей статьи являлась оценка влияния волновых резонансных воздействий на процесс ферментативного гидролиза разных видов крахмалов биопрепаратами амилолитического действия. Изучена кинетика накопления растворимых сахаров, образуемых в данном процессе, интенсифицированном волновым способом.

Экспериментальная часть. В исследовании были использованы картофельный (ГОСТ Р53876-2010) и кукурузный (ГОСТ 32159-2013) крахмалы. В качестве амилолитического ферментного препарата для биоконверсии крахмальных полисахаридов применяли зерновую β -амилазу (Optimal BBA, Genencor, USA).

Ферментативный гидролиз крахмала выполняли следующим образом. На первом этапе готовили разбавленный раствор (0.5:100) β -амилазы. Для этого в колбе на 500 мл смешивали 2.5 мл исходного промышленного концентрата и 497.5 мл дистиллированной воды. Следующим этапом было приготовление суспензии крахмала с концентрацией 15 мас.%, которую получали путем смешения навески биополимера с предварительно нагретым до 40°C разбавленным раствором ферментного препарата. Полученную крахмальную суспензию загружали в волновой аппарат оригинальной конструкции (разработка НЦ НВМТ РАН), схема которого представлена на рис. 1.

В рабочей камере аппарата при помощи резонансного электромеханического привода формируются необходимые режимы волнового воздействия. Обработку проводили в течение 120 минут при частоте 53.6 Гц без дополнительного подогрева системы. Для оценки эффективности протекания процесса гидролиза через заданные промежутки времени (10, 20, 30, 45, 60, 90 и 120 минут) отбирали 10 мл суспензии крахмала и

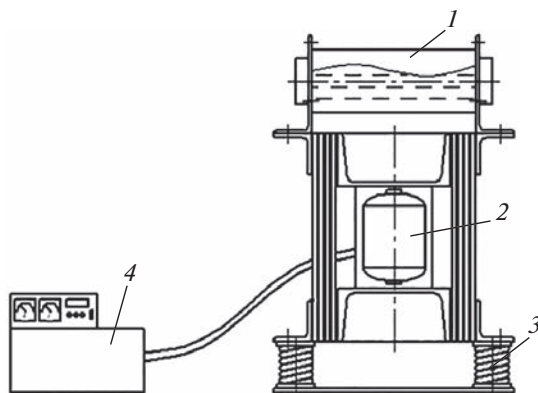


Рис. 1. Схема волнового аппарата оригинальной конструкции, разработанной в НЦ НВМТ РАН. 1 – рабочая камера; 2 – резонансный волновой привод; 3 – виброизолирующие опоры; 4 – узел питания и управления.

центрифугировали в течение 10 мин при 10000 об/мин. В центрифугате определяли содержание растворимых сахаров по реакции с 3.5-динитросалициловой кислотой [22]. Образующийся при отборе проб недостаток объема реакционной среды компенсировали добавлением равного количества раствора ферментного препарата соответствующей концентрации.

Осадок, полученный после центрифугирования, тщательно промывали дистиллированной водой для удаления остатков фермента и высушивали на воздухе.

Морфологию гранул образцов нативного и модифицированных крахмалов, полученных после ферментативного гидролиза, оценивали по фотографиям, полученным с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) QuattroS (ThermoFisher-Scientific, Чехия).

В качестве сравнения проведен ферментативный гидролиз крахмальной суспензии на лабораторном встряхивателе MLW THYS 2 (Германия) в термостатируемых условиях при постоянном перемешивании и нагреве до 40°C.

Обсуждение результатов. На рис. 2 представлены временные зависимости концентрации сахаристых веществ, образуемых в водных дисперсиях образцов кукурузного (рис. 2а) и картофельного крахмала в результате их ферментативного гидролиза (рис. 2б) с использованием различных способов перемешивания.

Как видно, в ходе ферментации кукурузного крахмала (рис. 2а) волновые резонансные воздействия оказывают интенсифицирующее влияние уже на первом этапе гидролиза (кривая 2). В течение первых десяти минут обработки наблюдается возрастание концентрации сахаров в растворе в 4.7 раза по сравнению с традиционным режимом перемешивания (кривая 1). Увеличение продолжительности ферментативной обработки до 120 мин сопровождается дальнейшим накоплением растворимых сахаров в системах. В итоге, количество сахаристых веществ в дисперсии крахмала, обрабатываемой при наложении волновых резонансных воздействий, составляет 2.55 мг/мл, а при традиционном способе перемешивания 0.72 мг/мл.

Очевидно, интенсивное механическое перемешивание суспензии кукурузного крахмала при наложении волновых резонансных воздействий способствует увеличению частоты взаимодействий между его гранулами и ферментом. Это приводит к

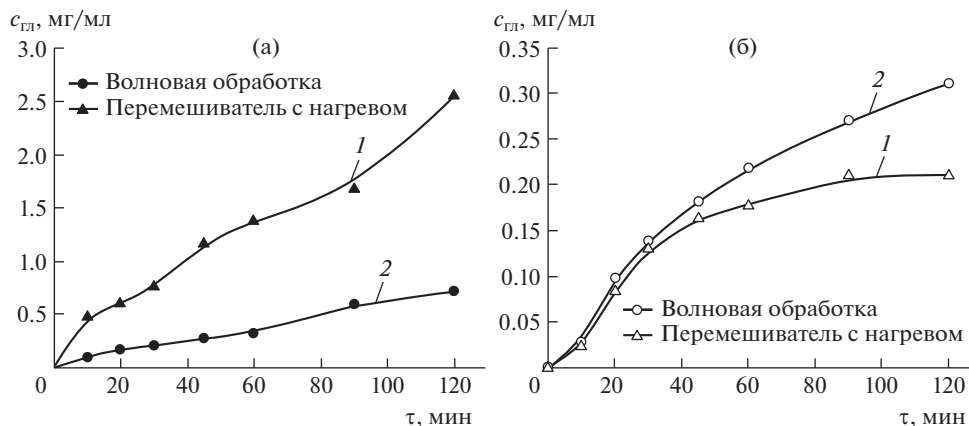


Рис. 2. Временные зависимости концентрации сахаристых веществ, образуемых в водных дисперсиях образцов кукурузного (а) и картофельного (б) крахмала в результате их ферментативного гидролиза при традиционном способе перемешивания (кривые 1) и с использованием волновых резонансных воздействий (кривые 2).

ускорению протекания реакции ферментативного гидролиза биополимера и повышению концентрации растворимых сахаров.

Известно [23, 24], что продуктом ферментативного гидролиза крахмала под действием амилалитических ферментов, помимо водорастворимых сахаров, является пористый крахмал. Данный вид модифицированных крахмалов находит применение в качестве природного адсорбента, носителя красителей, ароматизаторов, лекарственных препаратов и т.п. В настоящем исследовании формирование пор на поверхности гранул кукурузного крахмала при его ферментации зерновой β -амилазой подтверждено фотографиями (рис. 3), полученными методом СЭМ. Как видно, образец исходного кукурузного крахмала характеризуется отсутствием пор на поверхности его гранул (рис. 3а), в то время как на зернах биополимера, подвергнутого ферментативному гидролизу отчетливо видны поры (рис. 3а, б) диаметром 0.5–1.0 мкм.

Размер поровых пространств не зависит от вида используемого механического воздействия, а определяется, по-видимому, специфичностью действия, которую проявляет β -амилаза по отношению к субстрату (кукурузному крахмалу) [9].

Результаты исследования влияния волновых резонансных воздействий на процесс ферментативного гидролиза картофельного крахмала представлены на рис. 2б. Прежде всего, необходимо отметить, что при ферментации данного вида крахмала по традиционному способу содержание сахаристых веществ через 120 мин в 3.4 раза ниже соответствующей величины, полученной для кукурузного крахмала. Полученные результаты согласуются с данными, представленными авторами [25], где показано, что картофельный крахмал менее подвержен ферментативному гидролизу, чем кукурузный. Между тем, использование волновых резонансных воздействий в ходе осахаривания картофельного крахмала способствует ускорению процесса спустя 40 мин после его начала. При этом в результате интенсифицирующего влияния волновой обработки на ферментативный гидролиз картофельного крахмала наблюдается увеличение количества растворимых сахаров на 11% в сравнении с ферментативным гидролизом по

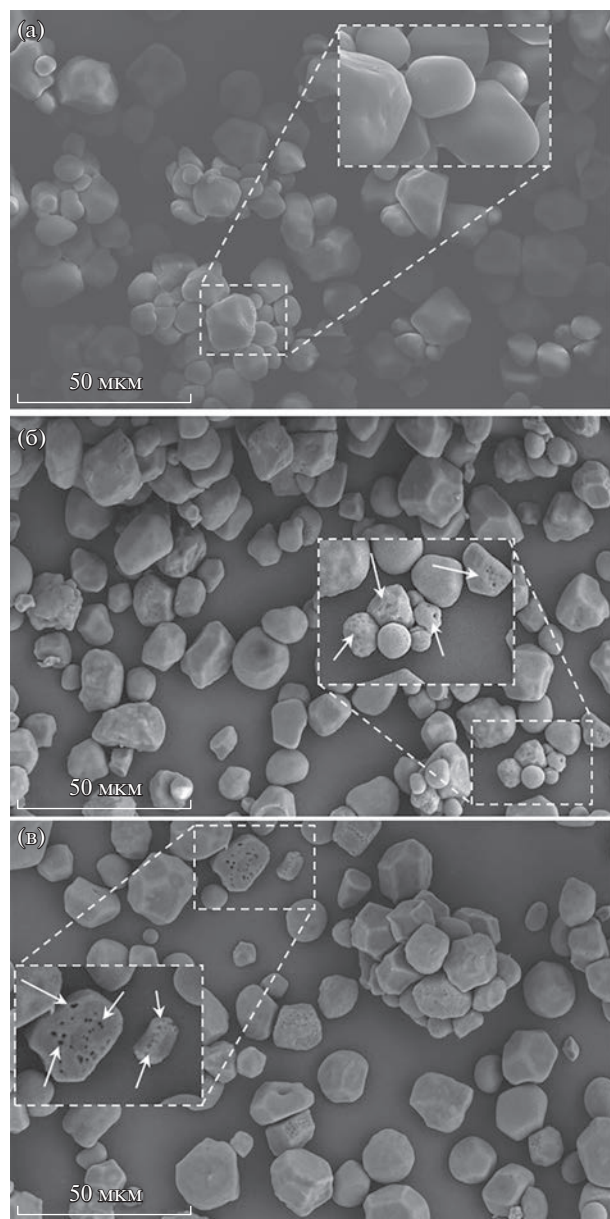


Рис. 3. Сканирующая электронная микроскопия образцов исходного кукурузного крахмала (а) и после ферментативного гидролиза β -амилазой традиционным способом перемешивания на лабораторном встряхивателе (б) и с использованием волновых резонансных воздействий (в).

традиционному режиму. Через 120 мин разница в содержании сахаров увеличивается до 33%.

Таким образом, в статье впервые показана возможность применения волновых резонансных воздействий для интенсификации процесса ферментативного гидролиза

кукурузного и картофельного крахмалов. Это, в перспективе, позволит сократить продолжительность данной технологической операции и усовершенствовать соответствующие способы получения сахаристых веществ и пористых крахмалов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Amaraweera S.M., Gunathilake C., Gunawardene O.H.P., Fernando N.M.L., Wanninayaka D.B., Dassanayake R.S., Rajapaksha S.M., Manamperi A., Fernando C.A.N., Kulatunga A.K., Manipura A. Development of starch-based materials using current modification techniques and their applications: A Review // *Molecules*. 2021. V. 26. P. 6880.
2. Wang S., Copeland L. Effect of acid hydrolysis on starch structure and functionality: A Review // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2015. V. 5. P. 1081.
3. Punia S., Sandhu K.S., Dhull S.B., Kaur M. Dynamic, shear and pasting behaviour of native and octenyl succinic anhydride (OSA) modified wheat starch and their utilization in preparation of edible films International // *J. of Biological Macromolecules*. 2019. V. 133. P. 110.
4. Park S., Kim Y. Clean label starch: production, physico-chemical characteristics, and industrial applications // *Food Science and Biotechnology*. 2021. V. 30. № 1. P. 1.
5. Miao Z., Zhang Y., Lua P. Novel active starch films incorporating tea polyphenols-loaded porous starch as food packaging materials // *Int. J. of Biological Macromolecules*. 2021. V. 192. P. 1123.
6. Azmi A.S., Malek M.I.A., Puad N.I.M. A review on acid and enzymatic hydrolyses of sago starch // *Int. Food Research J.* 2017. V. 24 (Suppl). P. 265.
7. Favaro L., Viktor M.J., Rose S.H., Viljoen-Bloom M., Zyl W.H., Basaglia M., Cagnin L., Casella S. Consolidated bioprocessing of starchy substrates into ethanol by industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains secreting fungal amylases // *Biotechnology and Bioengineering*. 2015. V. 112. P. 1751.
8. Sánchez O.J., Cardona C.A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks // *Bioresource Technolgy*. 2008. V. 99. P. 5270.
9. Грачева И.М. Технология ферментных препаратов М.: Агропромиздат, 1987. 335 с.
10. Sun H., Zhao P., Ge X., Xia Y., Hao Z., Liu J., Peng M. Recent advances in microbial raw starch degrading enzymes // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2010. V. 60. P. 988.
11. Wang D., Ma X., Yan L., Chantapakul T., Wanga W., Dinga T., Yea X., Liu D. Ultrasound assisted enzymatic hydrolysis of starch catalyzed by glucoamylase: Investigation on starch properties and degradation kinetics // *Carbohydrate Polymers*. 2017. V. 175. P. 47.
12. Gaquere-Parker A., Taylor T., Hutson R., Rizzo A., Folds A., Crittenden S., Zahoor N., Hussein B., Arruda A. Low frequency ultrasonic-assisted hydrolysis of starch in the presence of α -amylase // *Ultrasonics – Sonochemistry*. 2018. V. 41. P. 404.
13. Delgado-Povedano M.M., Luque de Castro M.D. A review on enzyme and ultrasound: a controversial but fruitful relationship // *Analytica Chimica Acta*. 2015. V. 889. P. 1.
14. Islam M.N., Zhang M., Adhikari B. The inactivation of enzymes by ultrasound – a review of potential mechanisms // *Food Reviews Int.* 2014. V. 30. P. 1.
15. Huang G., Chen S., Dai C., Sun L., Sun W., Tang Y., Xiong F., He R., Ma H. Effects of ultrasound on microbial growth and enzyme activity // *Ultrasonics Sonochemistry*. 2017. V. 37. P. 144.
16. Oliveira H.M., Pinheiro A.Q., Fonseca A.J.M., Cabrita A.R.J., Maia M.R.G. The intensification of amyloglucosidase-based saccharification by ultrasound // *Ultrasonics – Sonochemistry*. 2018. V. 49. P. 128.
17. Das A., Banik B.K. Chapter 7 – Microwave-assisted enzymatic reactions // In Book: *Microwaves in Chemistry Applications*. 2021. P. 245.
18. Osowiec A., Marciniak M., Lukaszewicz M. Microwave-assisted enzymatic hydrolysis of starch // The 13th Int. Electronic Conf. on Synthetic Organic Chemistry session Symposium on Microwave Assisted Synthesis. 2009.
19. Ганиев Р.Ф., Ганиев С.Р., Касилов В.П., Кислогубова О.Н., Коптелова Е.К., Кузьмина Л.Г., Курмиев Д.В., Лукин Н.Д., Маслов П. М., Украинский Л.Е., Юдкин В.Ф. Волновой способ получения карбоксиметилированного крахмала. РФ Патент 2702592 С1, 2019.

20. Коптелова Е.К., Никитина М.Ф., Кузина Л.Б., Касилов В.П., Кислогубова О.Н. Изменение физико-химических и реологических свойств кукурузного крахмала в процессе катионирования с применением метода нелинейного волнового диспергирования // Достижения науки и техники АПК. 2019. Т. 33. № 8. С. 79.
21. Ганиев С.Р., Кузьмина Н.Д., Лукин Н.Д., Касилов В.П., Кислогубова О.Н., Курменев Д.В., Маслов П.М. Применение волновых технологий для получения модифицированных крахмалов КМК // Справочник. Инженерный журнал. 2019. № 11. С. 24.
22. ГОСТ 31662-2012. Препараты ферментные. Методы определения ферментативной активности целлюлазы от 20.06.2012.
23. Dura A., Błaszczak W., Rosell C.M. Functionality of porous starch obtained by amylase or amyloglucosidase treatments // Carbohydrate Polymers. 2014. V. 101. P. 837.
24. Han X., Wen H., Luo Y., Yang J., Xiao W., Ji X., Xie J. Effects of α -amylase and glucoamylase on the characterization and function of maize porous starches // Food Hydrocolloids. 2021. V. 116. P. 106661.
25. Gonzalez A., Wang Y.J. Surface removal enhances the formation of a porous structure in potato starch // Starch – Stärke. 2021. 2000261.