

PORÓWNANIE WŁAŚCIWOŚCI HYDROLITYCZNYCH DWÓCH TERMOSTABILNYCH PREPARATÓW ENZYMATYCZNYCH

Lucyna Słomińska, Magdalena Garbacik

Streszczenie: W pracy przedstawiono wyniki procesu wstępnej enzymatycznej hydrolizy różnych rodzajów skrobi dwoma termostabilnymi preparatami amyloolitycznymi o odmiennych właściwościach: Termamyl 120 L i Termamyl Supra. Badania prowadzono zachowując te same warunki procesu, a w uzyskanych hydrolizatach oznaczano: równoważnik glukozowy, wskaźnik przezroczystości i liczbę absorpcji jodowej. Z dwóch zastosowanych preparatów zdecydowanie lepszymi właściwościami hydrolitycznymi charakteryzował się Termamyl Supra i jednocześnie wymagał użycia mniejszej dawki enzymu (korzyści ekonomiczne).

Słowa kluczowe: skrobia, hydroliza, upłynnianie, alfa-amylaza

WSTĘP

Alfa-amylaza (4-glukanohydrolaza α -1,4 glukanu, EC.3.2.1.1.), endohydrolaza rozkładająca w sposób przypadkowy wiązania α -1,4 glukozowe w cząsteczce skrobi, stosowana jest powszechnie w produkcji hydrolizatów skrobiowych takich, jak maltodekstryny, syropy skrobiowe (glukozowe, maltozowe), glukoza i maltoza. Produktami jej hydrolizy są oligosacharydy o różnej długości łańcucha, posiadające konfigurację alfa na zredukowanym końcu łańcucha glukozowego. Enzym ten stosowany jest w procesie upłynniania skrobi, tj. w pierwszym etapie przemysłowego wytwarzania hydrolizatów skrobiowych poprzedzającym proces scukrzania.

Początkowo proces upłynniania prowadzono stosując α -amylazę wytwarzaną przez *Bacillus subtilis*, której optymalna temperatura działania wynosiła 80-85°C. Pierwszą termostabilną α -amylazę wprowadzono do produkcji w 1973 r. Uzyskiwana była z hodowli szczepu *Bacillus licheniformis*, a jej optymalna temperatura działania wynosiła 90°C [Madsen i in. 1973, Tamuri i in. 1982]. Obecnie, w warunkach przemysłowych, do upłynniania skrobi stosuje się głównie termostabilne preparaty α -amylazy wytwarzane przez *Bacillus amyloliquafaciens* (Spezyme – Genecor) lub *Bacillus licheniformis* (Termamyl – Novo Nordisk).

Zastosowanie termostabilnej α -amylazy (*Bacillus licheniformis*) w procesie upłynniania pozwala na prowadzenie I etapu procesu upłynniania w temperaturze 103-107°C w czasie 5-10 min, a II etapu w temperaturze 90-98°C w czasie 1-2 h. Enzym wprowadzany jest jednorazowo, a wysoka temperatura działania enzymu nie wymaga pośredniego etapu – wygrzewania, który jest konieczny w wypadku stosowania enzymu działającego w temperaturze 80-85°C [Aleksander i Zobel 1994].

I etap upłynniania zapewnia rozpuszczenie substratu, natomiast II etap pozwala uzyskać oligosacharydy zawierające 10-13 reszt glukozy.

W wyniku upłynniania następuje:

- skleikowanie skrobi w stopniu umożliwiającym szybkie działanie enzymu,
- redukcja wysokiej lepkości skleikowanego mleczka skrobiowego,
- degradacja cząsteczki skrobi do krótkich łańcuchów, które nie ulegają retrogradacji w czasie ochładzania [Ashengreen 1981, Guzman-Maldonado i Parades-Lopez 1995, Schenck 2002].

Zastosowanie termostabilnej α -amylazy jest korzystne ze względu na dużą szybkość i wydajność reakcji związaną z wysoką temperaturą działania, minimalizację zakażenia, zapewnienie strącenia pozostałości białek zanieczyszczających substrat oraz ograniczenie niekorzystnego żelowania.

Stopień upłynniania zależy od szybkości wzrostu temperatury, stężenia skrobi i enzymu, temperatury skleikowania skrobi i jej zakresu, termostabilności i punktu inaktywacji enzymu, obecności innych składników, które mogą oddziaływać na pęcznienie ziaren skrobiowych lub aktywować enzym [Radley 1976, Birch i in. 1981].

Głównym zamierzeniem niniejszej pracy było porównanie właściwości hydrolytycznych dwóch termostabilnych preparatów amylolytycznych α -amylazy bakteryjnej: Termamylu 120 L i Termamylu Supra.

MATERIAŁY I METODY

Skrobia

Do badań wykorzystano następujące rodzaje skrobi: skrobię ziemniaczaną (Szeciński Zakłady Przemysłu Ziemniaczanego – Łobez), skrobię tapiokową (Tajlandia – Birkamidon), skrobię kukurydzianą (Belgia – Amylum), skrobię pszenną (Zakłady Przemysłu Ziemniaczanego – Niechlów). Skrobia została zakupiona w 2000-2001 r.

Enzymy

Skrobię traktowano termostabilnymi preparatami enzymatycznymi – α -amylazami upłynniającymi produkowanymi przez Novo Nordisk (Dania):

- Termamylem 120 L wyhodowanym ze szczepu *Bacillus licheniformis*,
- Termamylem Supra zawierającym mieszaninę wyjątkowo termostabilnych α -amylaz, produkowanych przez genetycznie zmodyfikowane szczepy z rodzaju *Bacillus*. Termamyl Supra jest nową, upłynniającą mieszaniną enzymów, zdolną do działania w niższych zakresach pH i poziomie wapnia niż tradycyjne termostabilne α -amylazy.

Aktywność preparatów Termamyl 120 L i Termamyl Supra wynosi 120 KNU/g. KNU to ilość enzymu rozkładająca 5,26 g skrobi w ciągu godziny w następujących

parametrach standardowych: substrat – skrobia rozpuszczalna, zawartość wapnia – 0,0043 M, czas reakcji – 7-20 min, temperatura – 37°C, pH – 5,6.

Parametry optymalne działania enzymów: temperatura 90-95°C i pH 6-6,5.

Hydroliza

Wodne zawiesiny skrobiowe o stężeniu 30% s.s. i pH 6,2 (odpowiednie pH osiągnęto stosując 10-procentowy kwas cytrynowy) traktowano wymienionymi powyżej preparatami enzymatycznymi stosowanymi w dawce 0,08-0,1% (10-12 KNU/g s.s. skrobi). Proces hydrolizy skrobi prowadzono w temperaturze 95°C przez 3 godziny. W odstępach godzinnych pobierano próby, w których oznaczano: zawartość cukrów redukujących i równoważnik glukozowy zmodyfikowaną metodą Schoorla-Rogenboga (PN-78/A-74701), wartość pH (PN-78/A-74701), wskaźnik przezroczystości (ekstynkcja roztworu mierzona była przy długości fali 720 nm w kuwecie o pojemności 5 ml, grubość warstwy badanej wynosiła 1 cm) i zdolność absorpcji jodu (ekstynkcja roztworu określana była w kuwecie o pojemności 4 ml, przy długości fali 500 nm po 30 minutowej reakcji z odczynnikiem jodowym w 25°C, a grubość warstwy badanej wynosiła 1 cm). Wyniki badań stanowią średnią 3 powtórzeń.

WYNIKI I DYSKUSJA

Równoważnik glukozowy

Zdolność redukcyjna hydrolizatu skrobiowego zależy od rodzaju użytego enzymu oraz od budowy i składu chemicznego ziaren skrobi. Porównanie rezultatów działania Termamylu 120 L i Termamylu Supra na skrobię różnego pochodzenia przedstawia tabela 1.

Tabela 1. Wartości równoważników glukozowych różnych rodzajów skrobi w procesie upłynnienia Termamylem 120 L i Teramylem Supra

Table 1. Dextrose equivalent value for various kind of starches during liquefaction by Termamyl 120 L and Termamyl Supra

Rodzaj skrobi Starch	Enzym – Enzyme					
	0,1% Termamyl 120 L			0,1% Termamyl Supra		
	równoważnik glukozowy – dextrose equivalent					
	1 h	2 h	3 h	1 h	2 h	3 h
Skrobia ziemniaczana Potato starch	8,2	14,5	17,7	12,2	21,8	26,6
Skrobia tapiokowa Tapioca starch	9,2	15,5	19,9	14,0	23,3	29,9
Skrobia pszenna Wheat starch	9,9	16,1	20,8	14,6	24,3	31,2
Skrobia kukurydziana Corn starch	10,5	16,2	21,3	15,6	24,6	31,9

Stwierdzono, że wraz z postępowaniem procesu hydrolizy wzrasta wartość równoważnika glukozowego w stopniu uzależnionym od rodzaju hydrolizowanej skrobi. Przyrost DE po dwóch godzinach hydrolizy Termamyłem 120 L w stosunku do wielkości DE po jednej godzinie hydrolizy dla wszystkich rodzajów hydrolizatów skrobiowych wynosi 6 DE, a po trzech godzinach waha się od 9 do 11 DE, w zależności od zastosowanego surowca. W wypadku zastosowania w procesie hydrolizy Termamyłu Supra różnice to są większe i kształtują się odpowiednio: 9 DE i 14-16 DE. .

Badania wykazują, że najwyższe wartości DE osiągnęła skrobia zbożowa: kukurydziana i pszenna, natomiast skrobia tapiokowa i ziemniaczana osiągnęły wartości niższe. Większą podatność skrobi kukurydzianej i pszennej na działanie α -amylazy bakteryjnej stwierdzili również w swych badaniach Gallant i in. [1972]. Podobnie Leach i Schoch [1961], porównując działanie upłynniające α -amylaz na skrobię ziemniaczaną i kukurydzianą, uzyskiwali upłynnienie skrobi ziemniaczanej od 0,5 do 22%, natomiast skrobi kukurydzianej wyższe – od 0,5% do 50%. Większą oporność na działanie enzymów skrobi ziemniaczanej niż skrobi kukurydzianej i ryżowej stwierdzili również Fuwa i in. [1977].

Wielkość wskaźnika przezroczystości hydrolizatów

Na przezroczystość hydrolizatu przede wszystkim ma wpływ budowa i skład chemiczny ziarna skrobi. Hydrolizując skrobię z różnych gatunków roślin, uzyskano hydrolizaty o różnym wskaźniku przezroczystości (rys. 1).

Największą przezroczystość osiągnął hydrolizat tapiokowy, a następnie ziemniaczany. Hydrolizaty pochodzące ze skrobi zbożowej charakteryzowały się gorszą przezroczystością, co jest ściśle związane z budową i składem chemicznym tej skrobi. Główną przyczyną zmniejszonej przezroczystości, a co za tym idzie jakości hydrolizatów jest to, że skrobia kukurydziana zawiera lizofosfolipidy, a z kolei pszenna – pentozany.

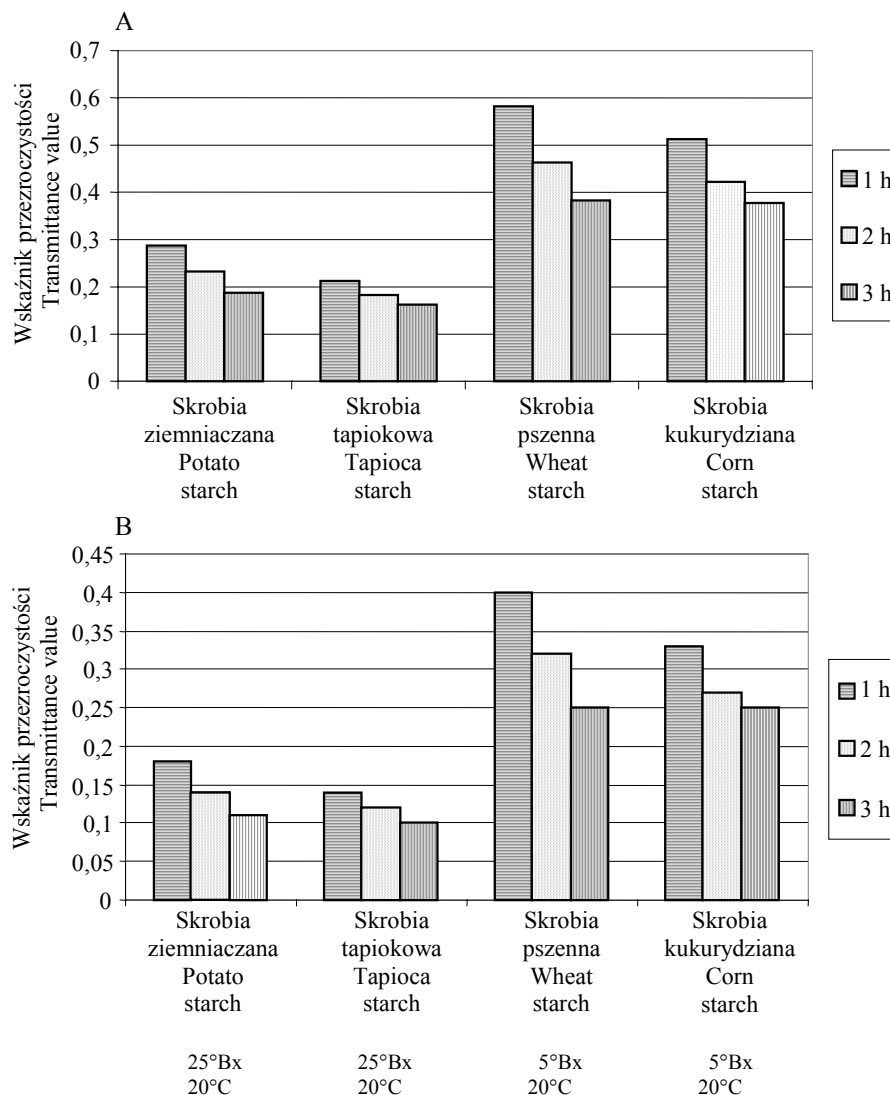
Pomiar przezroczystości skrobi zbożowej przeprowadzono dla zawartości rzeczywistej suchej substancji równej 5°Bx, a skrobi bulwowej dla 25°Bx.

Przezroczystość hydrolizatów rośnie po kolejnych godzinach hydrolizy. Wskaźniki przezroczystości osiągają niższe wartości dla Termamyłu Supra niż Termamyłu 120 L.

Zdolność absorpcji jodu

Próba jodowa, czyli zdolność skrobi do tworzenia barwnych kompleksów z jodem, jest miarą depolimeryzacji skrobi. Zdolność absorpcji jodu jest również miarą zdolności do tworzenia zamglenia hydrolizatu: im niższa liczba absorpcji jodowej, tym mniejsza opalizacja hydrolizatu. Wskaźnik ten jest ważny w produkcji maltodekstryn, bowiem mniejsza zdolność absorpcji jodu hydrolizatu maltodekstrynowego wiąże się z lepszą rozpuszczalnością sproszkowanego produktu [Kennedy i in. 1986].

Badania zdolności absorpcji jodu (rys. 2) wykazały, że wraz z postępowaniem procesu hydrolizy (wzrostem DE) maleje wskaźnik jodowy.

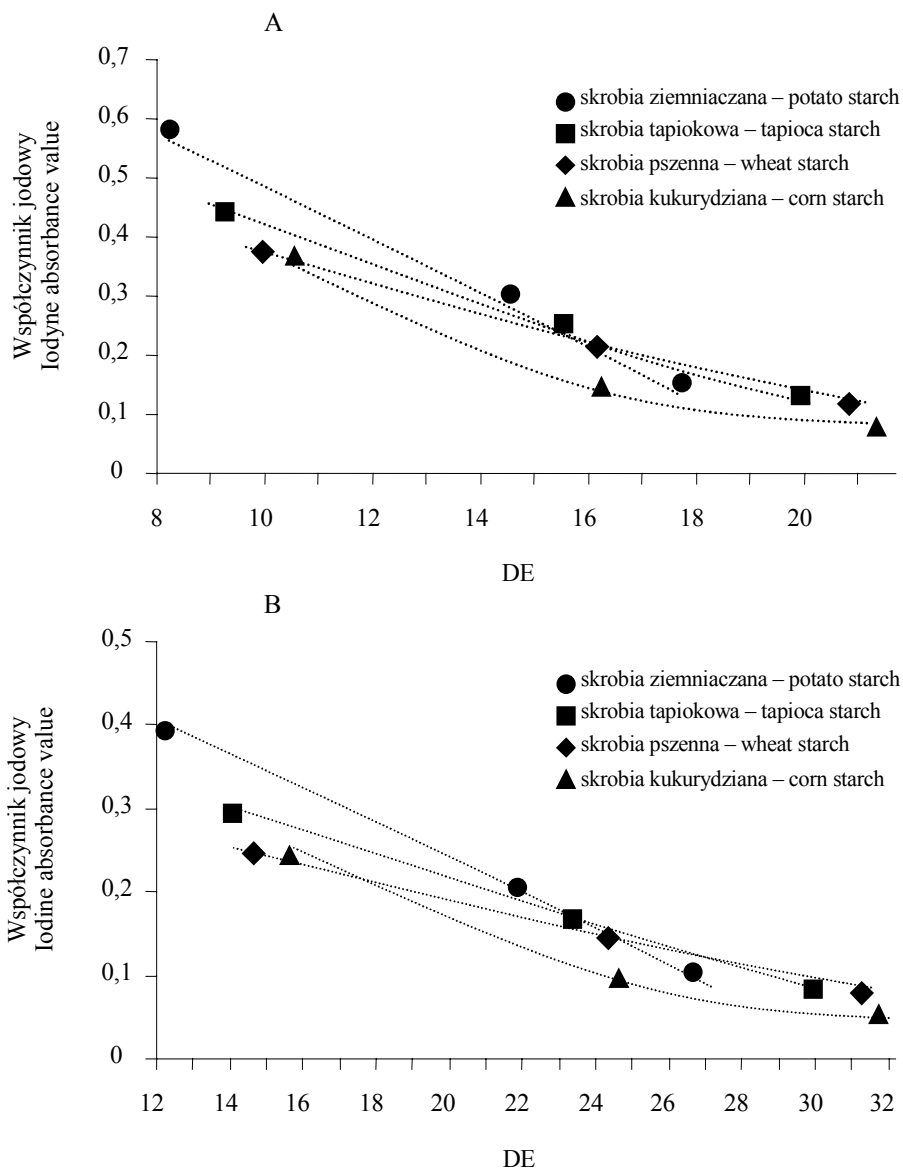


Rys. 1. Wskaźnik przezroczystości hydrolizatów skrobiowych podczas 3-godzinnego upłyniania skrobi Termamylem 120 L (A) i Termamylem Supra (B)

Fig. 1. Turbidity measurement of hydrolysates during 3h of starch liquefaction by using Termamyl 120 L (A) and Termamyl Supra (B)

Analiza wykresu pozwala stwierdzić, że skrobia charakteryzująca się lepszą redukcją, a więc bardziej podatna na działanie α -amylazy, osiąga znacznie niższe wartości współczynników jodowych niż skrobia, w której proces depolimeryzacji zachodzi w mniejszym stopniu. Najniższe wartości współczynnika jodowego osiąga skrobia kukurydziana, a następnie skrobia pszenna. Konsekwencją są wysokie wartości DE.

Skrobia ziemniaczana i tapiokowa, której DE jest niższe, uzyskuje relatywnie wyższe wartości współczynników jodowych.



Rys. 2. Liczba absorpcji jodowej hydrolyzatów podczas 3-godzinnego upłynniania skrobi Termamylem 120 L (A) i Termamylem Supra (B)

Fig. 2. Iodine absorbance value of hydrolysates during 3 h of starch liquefaction by using Termamyl 120 L (A) and Tremamyl Supra (B)

Analiza porównawcza wyników działania Termamylu 120 L oraz Termamylu Supra na różne rodzaje skrobi pod względem korzyści ekonomicznych

Zastosowanie badanych preparatów w tych samych warunkach reakcji pozwoliło stwierdzić, że hydrolizaty uzyskane w wyniku działania Termamylu Supra charakteryzują się wyższym stopniem depolimeryzacji skrobi (tab. 2).

Tabela 2. Porównanie rezultatów 3-godzinnego działania Termamylu 120 L i Termamylu Supra na skrobię różnego rodzaju
Table 2. Comparison of 3h action of Termamyl 120 L and Termamyl Supra on various kinds of starches

Rodzaj skrobi Kind of starch	Enzym – Enzyme					
	0,1% Termamyl 120 L			0,1% Termamyl Supra		
	DE	wskaźnik jodowy iodine absorbance value	wskaźnik przezroczystości transmittance value	DE	wskaźnik jodowy iodine absorbance value	wskaźnik przezroczystości transmittance value
Skrobia ziemniaczana Potato starch	17,7	0,154	0,187	26,6	0,105	0,117
Skrobia tapiokowa Tapioca starch	19,9	0,131	0,162	29,9	0,084	0,102
Skrobia pszenna Wheat starch	20,8	0,118	0,382	31,2	0,079	0,257
Skrobia kukurydziana Corn starch	21,3	0,080	0,377	31,7	0,053	0,252

W ciągłym procesie technologicznym produkcji hydrolizatów skrobiowych na skalę przemysłową bardzo istotna jest strona ekonomiczna przedsięwzięcia. Poszukuje się takich rozwiązań, które pozwoliłyby obniżyć koszty procesu, zachowując równocześnie wysoką jakość produktu.

Nowa, wyjątkowo termostabilna α -amylaza – Termamyl Supra – spełnia oba te warunki. Pozwala uzyskać hydrolizaty skrobiowe tej samej jakości jak w wypadku zastosowania Termamylu 120 L, obniżając jednocześnie koszty procesu, co ma ogromne znaczenie w produkcji hydrolizatów na skalę przemysłową.

W tym celu zaproponowano modyfikację hydrolizy: przeprowadzono proces upłynniania w tych samych warunkach co poprzednio, ale zmniejszono dawkę Termamylu Supra do 0,08%. Wyniki badań procesu upłynniania badanej skrobi przedstawia tabela 3.

Analiza powyższych zestawień wskazuje, że zastosowanie Termamylu Supra o stężeniu 0,08% pozwala uzyskać hydrolizaty skrobiowe o wysokiej jakości (niższe wskaźniki jodowe i przezroczystości) oraz osiągnąć następujące korzyści ekonomiczne:

- a) zmniejszyć dawkę enzymu o 0,02%,
- b) skrócić czas hydrolizy do 2 godzin.

Tabela 3. Porównanie rezultatów działania preparatów Termamyl 120 L i Termamyl Supra na skrobię: ziemniaczaną (A), tapiokową (B), pszenną (C), kukurydzianą (D)
 Table 3. Comparison of Termamyl 120 L and Termamyl Supra action on potato starch (A), tapioca starch (B), wheat starch (C), corn starch (D)

Czas Time	Enzym – Enzyme					
	0,1% Termamyl 120 L			0,08% Termamyl Supra		
	DE	wskaźnik jodowy iodine absorbance value	wskaźnik przezroczy- stości transmittance value	DE	wskaźnik jodowy iodine absorbance value	wskaźnik przezroczy- stości transmittance value
A						
1 h	8,2	0,582	0,287	9,9	0,467	0,232
2 h	14,5	0,305	0,232	17,4	0,244	0,187
3 h	17,7	0,154	0,187	21,4	0,122	0,147
B						
1 h	9,2	0,442	0,213	11,1	0,354	0,163
2 h	15,5	0,254	0,182	18,7	0,206	0,138
3 h	19,9	0,131	0,163	24,1	0,105	0,118
C						
1 h	9,9	0,375	0,582	11,8	0,295	0,482
2 h	16,1	0,216	0,462	19,2	0,167	0,382
3 h	20,8	0,118	0,382	24,9	0,094	0,302
D						
1 h	10,5	0,369	0,512	12,4	0,285	0,417
2 h	16,2	0,146	0,422	19,5	0,115	0,322
3 h	21,3	0,080	0,377	25,4	0,058	0,292

Biorąc pod uwagę wyniki powyższych badań, jest wskazane, aby w produkcji hydrolizatów skrobiowych, na etapie upłynniania, zamiast Termamylu 120 L o stężeniu 0,1%, stosować Termamyl Supra o stężeniu 0,08%. Cena Termamylu Supra jest nieco wyższa (17,85 zł/kg) od ceny Termamylu 120 L (17,10 zł/kg). Jednakże możliwość zmniejszenia chociażby o 20% dawki preparatu celem uzyskania porównywalnego stopnia upłynniania skrobi nie tylko niweluje tą nieznaczną różnicę ceny, ale nawet umożliwia obniżenia kosztów produkcji hydrolizatów.

Preparaty glukoamylazy, Termamyl 120 L i Termamyl Supra mają jednakową aktywność enzymatyczną, jednak ich działanie różni się efektywnością działania na skrobię uzależnioną od naturalnych inhibitorów i aktywatorów obecnych w surowcu poddawanym hydrolizie. Efektywność tę można ocenić jedynie wtedy, gdy prowadzone są badania procesu hydrolizy skrobi.

WNIOSKI

Porównanie efektywności działania Termamylu Supra z Termamylem 120 L wskazuje, że działanie Termamylu Supra powoduje uzyskanie hydrolizatów charakteryzujących się:

- większą zdolnością upłynniania skrobi mierzoną równoważnikiem glukozowym,
- niższymi wartościami wskaźników przezroczystości i liczby absorpcji jodowej.

Większą podatność na działanie α -amylaz wykazuje skrobia pochodzenia zbożowego niż skrobia bulwowa.

Hydrolizaty skrobiowe uzyskane ze skrobi bulwowej mają korzystniejsze wskaźniki przezroczystości i zdolności absorpcji jodu niż uzyskane ze skrobi zbożowej.

Zmniejszenie dawki Termamylu Supra o 20%, w porównaniu z ilością stosowanego Termamylu 120 L (0,1%), pozwala uzyskać hydrolizaty skrobiowe o porównywalnej jakości i jednocześnie obniżyć koszty produkcji hydrolizatów.

PIŚMIENNICTWO

- Alexander R.J., Zobel H.F., 1994. Developments in Carbohydrate Chemistry. The American Association of Cereal Chemists. St. Paul, Minnesota, USA.
- Ashengreen N.W., 1981. Enzyme process in the production of sweeteners from starch. The Beijing Food Processing and Packaging Exhibition. Beijing 1-23.
- Biliaderis C.G., 1991. The structure and interactions of starch with food constituents. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 69, 60-65.
- Birch G.G., Blakebrough N., Parker K.J., 1981. New Development in Starch Syrup technology. Applied Science London.
- Fuwa H., Nakajima M., Hamada A., 1977. Comparative susceptibility to amylases of starches from different plant species and several single endospore mutants and their double-mutant combinations. *Cereal Chem.*, 52 (2), 230-237.
- Gallant D., Mercier C., Guibot A., 1972. Electronic microscopy of starch granules modified by bacterial α -amylase. *Cereal Chem.*, 49 (3), 354-365.
- Greenwood C.T., 1976. Starch in Advances in Cereal Science and Technology. Pomeranz Y., Ed., St. Paul, Minnesota, USA.
- Guzman-Maldonado H., Parades-Lopez O., 1995. Amylolytic enzymes and products derived from starch: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 35 (5), 373-403.
- Hizukuri S., Takeda Y., Yasuda M., Suzuki A., 1981. Multibranched nature of amylose and the action of debranching enzymes. *Carbohydr. Res.*, 94, 205-209.
- Kennedy J.F., Cabalda V.C., White C.A., 1988. Enzymatic starch utilization and genetic engineering. *Trends Biotechnol.*, 8 (6), 184-189.
- Kennedy J.F., Noy R.J., Stead J.A., White C.A., 1986. Factors affecting, and prediction of, the low temperature precipitation of commercial low DE maltodextrins. *Stärke*, 38 (8), 273-281.
- Leach H.W., Schoch T.J., 1961. Structure of starch granule. Action of various amylases on granule starches. *Cereal Chem.*, 38 (1), 34-46.
- Madsen G.B., Norman B.E., Slott S., 1973. A new, heat stable bacterial amylase and its use in high temperature liquefaction. *Stärke*, 25, 304-309.
- Radley J.A., 1976. Industrial Uses of Starch and Derivatives. Applied Science Publishers Ltd, London.
- Schenck F.W., 2002. Starch hydrolysates. *Int. Sugar INL.*, 104, 1238, 82-86.
- Tamuri M., Mitsuo Y., Miyoshi K., Ishii Y., 1982. Heat and acid stable alpha-amylase enzymes and processes for producing the same. Patent USA, Nr 4,284,722.

**COMPARISON OF HYDROLYTICAL PROPERTIES
OF TWO TERMOSTABLE ENZYMATIC PREPARATIONS**

Summary: The initial enzymatic hydrolysis of various starch kinds by two thermostable alfa-amylases (Termamyl 120 L and Termamyl Supra) with different properties were carried out. Experimental conditions were similar for both enzymatic preparations. The obtained hydrolysates were tested by the following measurements: dextrose equivalent, turbidity measurement and iodine absorbance value. Termamyl Supra indicated better hydrolytic properties, higher quality of hydrolysates and economical profits.

Key words: starch, hydrolysis, liquefaction, alfa-amylase

L. Słomińska, H. Garbacik, Instytut Biotechnologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Zielonogórski, ul. Monte Cassino 21 b, 65-561 Zielona Góra, tel. (068) 323-43-33