

УДК 664

Аспирант А.Ш. Маннапова

("Казанский технологический университет" (КНИТУ))

кафедра пищевой инженерии малых предприятий

E-mail: ashamilevna@yandex.ru;

доцент З.А. Канарская, профессор А.В. Канарский

("Казанский технологический университет" (КНИТУ))

кафедра пищевой биотехнологии. тел. 89600471908

E-mail: zosya_kanarskaya@mail.ru

доцент Г.П. Шуваева

(Воронеж. гос. ун-т инж. технол.)

кафедра биохимии и биотехнологии.тел. (473) 255-55-57

Graduate A.Sh. Mannapova

("Kazan Technological University" (KNRTU))

Department of food engineering of small enterprises

E-mail: ashamilevna@yandex.ru;

associate Professor Z. A. Kanarskaya, professor A. V. Kanarskii

("Kazan Technological University" (KNRTU)) department of food biotechnology.

phone 89600471908

E-mail: zosya_kanarskaya@mail.ru

associate Professor G.P. Shuvaeva

(Voronezh state university of engineering technologies)

Department of biochemistry and biotechnology. phone (473) 255-55-57

Энзиморезистентность крахмала, амилопектина и амилозы

Enzyme resistance of genetically modified starch potatoes

Реферат. В статье представлено обоснование целесообразности применения энзиморезистентного крахмала в продуктах питания лечебно-профилактического назначения. Энзиморезистентный крахмал способен противостоять ферментативному гидролизу в тонком кишечнике человека, имеет низкий гликемический индекс, приводит к снижению в крови постпрандиальной концентрации глюкозы, холестерина, триглицеридов и инсулиновой реакции, улучшению чувствительности всего организма к инсулину, увеличению чувства сытости и уменьшению отложения жиров. Резистентный крахмал оказывает бифидогенное воздействие на микрофлору кишечника человека, приводит к увеличению количества лактобацилл и бифидобактерий и повышенному производству масляной кислоты в толстом кишечнике. В этой связи энзиморезистентный крахмал является необходимым компонентом в питании при лечении и профилактике таких заболеваний человека, как сахарный диабет, ожирение, колит, рак толстого и прямого кишечника. Для имитации переваривания крахмала в организме человека авторами уточнена методика, которая основана на определении энзиморезистентности крахмала *in vitro* путем его гидролиза до глюкозы с применением глюкоамилазы и пищеварительного ферментного препарата Панкреатин. Данная методика использована в исследованиях энзиморезистентности крахмала генетически модифицированного картофеля, высокоамилозного кукурузного крахмала Hi-Maize 1043 и HYLON VII (National Starch Food Innovation, США), амилопектина и амилозы. Показано, что энзиморезистентность крахмала, выделенного из генетически модифицированного картофеля, соответствует энзиморезистентности высокоамилозного кукурузного крахмала Hi-Maize 1043 и HYLON VII (National Starch Food Innovation, США), относящегося ко II типу энзиморезистентного крахмала. Установлено, что амилопектин не обладает энзиморезистентными свойствами. Представлены результаты исследований, позволяющие сделать вывод о том, что амилоза по сравнению с амилопектином обладает более высокой энзиморезистентностью и придает крахмалу картофеля повышенные энзиморезистентные свойства.

Summary. Here in this article the justification of expediency of enzyme resistant starch use in therapeutic food products is presented. Enzyme resistant starch is capable to resist to enzymatic hydrolysis in a small intestine of a person, has a low glycemic index, leads to decrease of postprandial concentration of glucose, cholesterol, triglycerides in blood and insulin reaction, to improvement of sensitivity of all organism to insulin, to increase in sense of fullness and to reduction of adjourment of fats. Resistant starch makes bifidogenic impact on microflora of a intestine of the person, leads to increase of a quantity of lactobacillus and bifidobacterium and to increased production of butyric acid in a large intestine. In this regard the enzyme resistant starch is an important component in food for prevention and curing of human diseases such as diabetes, obesity, colitis, a cancer of large and direct intestine. One method is specified by authors for imitation of starch digestion in a human body. This method is based on the definition of an enzyme resistance of starch *in vitro* by its hydrolysis to glucose with application of a glucoamylase and digestive enzyme preparation Pancreatin. This method is used in researches of an enzyme resistance of starch, of genetically modified potato, high amylose corn starch Hi-Maize 1043 and HYLON VII (National Starch Food Innovation, USA), amylopectin and amylose. It is shown that the enzyme resistance of the starch emitted from genetically modified potatoes conforms to the enzyme resistance of the high amylose corn starch "Hi-Maize 1043 and HYLON VII starch", (National Starch Food Innovation, the USA) relating to the II type of enzyme resistant starch. It is established that amylopectin doesn't have the enzyme resistant properties. The results of researches are presented. They allow us to make the following conclusion: amylose in comparison with amylopectin possesses higher enzyme resistance and gives to potatoes starch the increased enzyme resistant properties.

Ключевые слова: генетически модифицированный картофель, крахмал, амилоза, амилопектин, энзиморезистентность.

Keywords: genetically modified potato, starch, amylose, amylopectine, enzyme resistance.

© Маннапова А.Ш., Канарская З.А.,
Канарский А.В., Шуваева Г.П., 2015

Энзиморезистентный крахмал является перспективным пищевым сырьем для создания продуктов лечебно-профилактического назначения [1, 2]. Известно, что рафинированный крахмал имеет высокий гликемический индекс, вызывает высокий и резкий подъем уровня глюкозы в крови. Однако энзиморезистентный крахмал способен противостоять ферментативному гидролизу в тонком кишечнике человека, обеспечивая организм глюкозой в течение продолжительного периода и на более постоянном уровне. Употребление продуктов с высоким содержанием энзиморезистентного крахмала приводит к снижению в крови постпрандиальной концентрации глюкозы, холестерина, триглицеридов и инсулиновой реакции, улучшению чувствительности всего организма к инсулину, увеличению чувства сытости и уменьшению отложения жиров [3].

Энзиморезистентный крахмал в толстом кишечнике подвергается брожению, которое заканчивается образованием метана, водорода и короткоцепочечных жирных кислот [4]. Было установлено как в условиях *in vitro* [5], так и *in vivo* [6], что этот крахмал оказывает бифидогенное воздействие на микрофлору толстого кишечника человека. Добавление энзиморезистентного крахмала в рацион человека привело к увеличению количества лактобацилл и бифидобактерий, а также повышенному производству масляной кислоты [7]. Данная кислота является главным источником энергии и регулятором функции колоноцитов, поддерживает кишечный гомеостаз, предотвращает возникновение колита и колоректального рака [8]. Таким образом, энзиморезистентный крахмал можно считать необходимым компонентом в питании при лечении и профилактике таких заболеваний человека, как сахарный диабет, ожирение, колит, рак толстого и прямого кишечника [9, 10].

Основными факторами, влияющими на перевариваемость крахмала, т.е. на проявление крахмалом энзиморезистентных свойств, являются: соотношение амилоза/амилопектин в крахмале, тип кристалличности крахмала, степень желатинизации крахмала в пищевом продукте, размер гранул крахмала, взаимодействие крахмал – белок, образование комплексов амилоза-липид, процент ретроградированного крахмала [11].

Существует три типа энзиморезистентного крахмала:

I тип (RSI) - физически недоступный крахмал. Крахмал синтезируется в эндосперме зерновых культур или семян. Гранулы крахмала окружены белковой матрицей и материалом клеточных стенок, которые являются барьером

для гидролиза крахмала, в случае его применения в виде целых или крупно измельченных зерен. Такой крахмал не может быть усвоен и продукт имеет низкий гликемический индекс.

II тип (RSII) – сырой (нежелатинизированный) крахмал некоторых растений. К этому типу относится крахмал незрелых зеленых бананов и высокоамилозной кукурузы и др.

III тип (RSIII) – ретроградированный крахмал. Чем больше в крахмале амилозы, тем больше образуется энзиморезистентного крахмала в процессе ретроградации.

Для сохранения энзиморезистентных свойств крахмала в процессе термической обработки, применяют химические, физические, ферментативные и генетические методы модификации.

В настоящее время для создания крахмала, обладающего свойством резистентности действию амилолитических ферментов, перспективным является применение ферментативной модификации [12, 13] и методов генной инженерии в селекции ботанических культур. Эти методы будут более безопасными для организма людей, чем применение химической модификации, в результате которой происходят изменения в составе и структуре крахмала, посредством включения различных заместителей в цепь крахмала. Физический метод обработки имеет тенденцию либо к изменению ценных качеств других компонентов, либо к сообщению нежелательного вкуса из-за процессов, участвующих в модификации.

Цель работы - определение энзиморезистентности крахмала, выделенного из генетически модифицированного картофеля, и сравнение с энзиморезистентностью нативного и высокоамилозного кукурузного крахмала.

Для достижения цели решались следующие задачи:

- определение энзиморезистентности крахмала генетически модифицированного картофеля;

- определение энзиморезистентности нативного крахмала картофеля и кукурузы;

- определение энзиморезистентности высокоамилозного кукурузного крахмала Hi-Maize 1043 и HYLON VII (National Starch Food Innovation, США);

- определение энзиморезистентности амилопектина;

- определение энзиморезистентности амилозы.

В исследованиях использовали крахмал:
- выделенный из контрольного картофеля Луговской и крахмал, выделенный из его генетически модифицированного аналога,

предоставленного Центром «Биоинженерия» РАН (г. Москва);

- нативный кукурузный и картофельный крахмал;

- крахмал Hi-Maize 1043 и NYLON VII (National Starch Food Innovation, США), которые являются немодифицированными высокоамилозными кукурузными крахмалами (II тип энзиморезистентного крахмала);

- амилопектин, выделенный из генетически модифицированного картофеля методом электродиализа и амилоза, выделенная из картофельного крахмала методом электродиализа и химическим методом [14].

Известны два метода определения энзиморезистентности крахмала, которые основаны на определении количества образовавшейся глюкозы в результате обработки крахмала ферментами [15, 16]. Недостатком методов является длительность и сложность проведения эксперимента. При этом в методе, изложенном в работе [15], не учитывается продолжительность пребывания крахмала в желудочно-кишечном тракте человека, в частности первый отбор проб для определения содержания глюкозы в ферментализате проводят после двух часов обработки крахмала ферментами. Потребление энзиморезистентного крахмала предполагает постепенное увеличение количества глюкозы в крови человека, поэтому важно определять количество образовавшейся глюкозы в первые 30 мин обработки крахмала ферментами. Метод, изложенный в работе [16] разработан для крахмалосодержащего продукта. Поэтому для имитации переваривания в нем используется большее количество реактивов. В этой связи методика определения энзиморезистентности крахмала была уточнена и представлена ниже.

Для проведения ферментативного крахмала, приготавливали смесь ферментов в следующей последовательности. В мензурку (100 мл) налили 10 мл дистиллированной воды, добавили 0,138 мл ферментного препарата глюкоамилазы (DISTILLASE L400+, Genencor International, Бельгия) с активностью 350 GAU (глюкоамилазных единиц) в расчете на 1,57 г/г крахмала и довели метку до 64 мл раствором панкреатина (пищеварительное ферментное средство) концентрацией 0,15 мг/мл воды дистиллированной.

Ферментативный гидролиз проводили на образце крахмала массой 120 мг. Затем крахмал засыпали в конусообразную мерную колбу (50 мл) с закрывающейся крышкой. Заливали 10 мл буферного ацетатного раствора (рН 5,2) и перемешивали до получения однородной суспензии. В исследуемый образец крахмала добавили 5 мл смеси ферментов. Колбу устанавли-

вали в термостат, предварительно разогретый до 37 °С. Через 30, 60, 120, 180 минут отбирали от инкубируемого образца 0,5 мл аликвотной доли и заливали в отдельную пробирку с 20 мл этанола (для прекращения реакции). Через час аликвотную долю центрифугировали при 3000 об./мин в течение 10 минут.

Основным показателем, характеризующим степень гидролиза, соответственно степень переваривания крахмала, является концентрация глюкозы. Для определения содержания глюкозы колориметрически – ферментативным УФ-методом использовали набор ферментов фирмы R-BiopharmRoche. Набор включает в себя фермент гексокиназу, в качестве хромогена используется глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа. Рекомендуемая длина волны для колориметрирования 365 нм и кювета с длиной оптического пути 0,5 см. В качестве калибратора использовали стандартную глюкозу, предложенную фирмой.

Принцип измерения основан на том, что фермент гексокиназа катализирует фосфорилирование глюкозы аденозинтрифосфатом. Фермент глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа окисляет глюкозо-6-фосфат до 6-фосфоглюконата с одновременным восстановлением никотинамидаденина в никотинамидаденилинуклеотид фосфат, который определяется колориметрически [17, 18].

Выход глюкозы (%) определяли по формуле:

$$C = \frac{c}{M} \cdot 100, \quad (1)$$

где c – концентрация глюкозы в анализируемой пробе, г/л; M – начальная концентрация крахмальной суспензии, г/л.

Ниже на рисунках 1-3 представлены результаты исследований, отражающие зависимость выхода глюкозы от продолжительности обработки ферментами и источника крахмала. Анализ представленных на рисунках результатов показывает, что при одной и той же продолжительности гидролиза выход глюкозы из нативного кукурузного и картофельного крахмала увеличивается с увеличением продолжительности обработки. При обработке крахмала, выделенного из генетически модифицированного картофеля сорта Луговской и Невский выход глюкозы ниже, чем выход глюкозы из их контрольных образцов этих сортов картофеля и из нативного крахмала. Сравнивая выходы глюкозы, можно сказать, что энзиморезистентность крахмала генетически модифицированного картофеля сопоставима с энзиморезистентностью высокоамилозного кукурузного крахмала NYLON VII и Hi-Maize 1043.

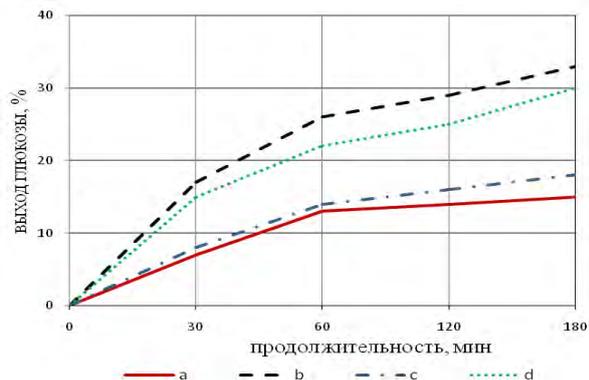


Рисунок 1. Зависимость выхода глюкозы от продолжительности гидролиза крахмала, выделенного из картофеля сортов Луговской и Невский и их генетически модифицированных аналогов, при обработке ферментами (а – крахмал ГМ картофеля Луговской, б – крахмал картофеля Луговской (контроль), с – крахмал ГМ картофеля Невский, d – крахмал картофеля Невский)

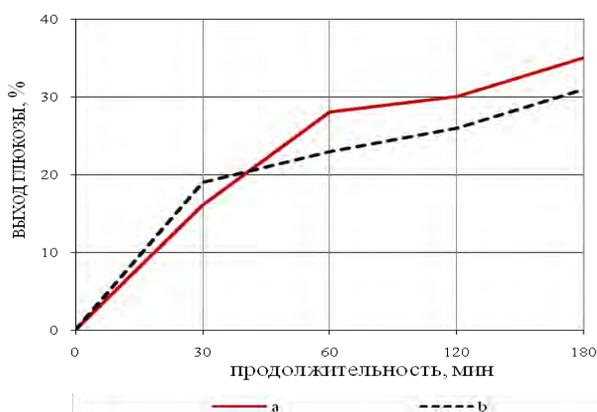


Рисунок 2. Зависимость выхода глюкозы от продолжительности гидролиза нативного крахмала при обработке ферментами (а – кукурузный крахмал, b – картофельный крахмал)

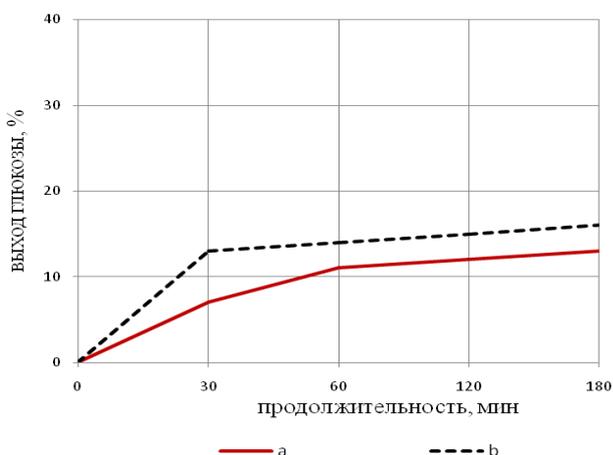


Рисунок 3. Зависимость выхода глюкозы от продолжительности гидролиза высокоамилозного кукурузного крахмала при обработке ферментами (а – NYLON VII, b – Hi-Maize 1043)

На рисунке 4 представлены результаты исследований, отражающие зависимость выхода глюкозы от продолжительности обработки ферментами амилозы или амилопектина. Анализ представленных на рисунке результатов показывает, что амилопектин не обладает энзиморезистентными свойствами, поскольку наблюдается значительное увеличение выхода глюкозы в первый час обработки амилопектина, выделенного как из крахмала картофеля сорта Невский, так и из его генетически модифицированного аналога. При гидролизе амилозы, выделенной методом электродиализа, выход глюкозы больше выхода глюкозы из амилозы, полученной химическим методом. Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод, что амилоза по сравнению с амилопектином обладает более высокой энзиморезистентностью и придает крахмалу генетически модифицированного картофеля повышенные энзиморезистентные свойства.

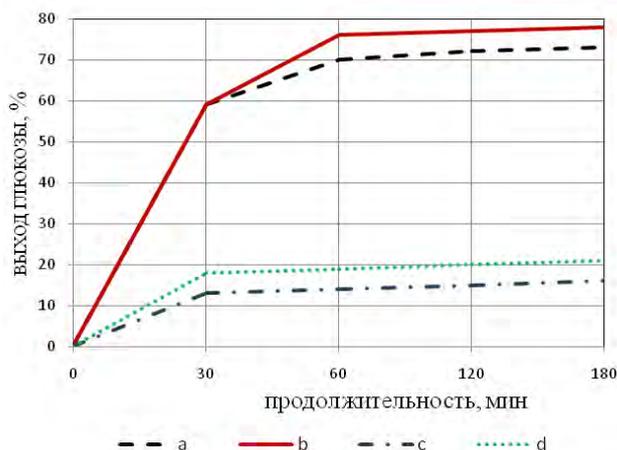


Рисунок 4. Зависимость выхода глюкозы от продолжительности гидролиза амилопектина и амилозы при обработке ферментами (а – амилопектин ГМ картофеля Невский, b – амилопектин картофеля Невский (контроль), с – амилоза, выделенная химическим методом, d – амилоза, выделенная методом электродиализа)

Выводы:

Крахмал генетически модифицированного картофеля сортов Луговской и Невский по энзиморезистентным свойствам сопоставим с энзиморезистентными свойствами высокоамилозного кукурузного крахмала Hi-Maize 1043 и NYLONVII (National Starch Food Innovation, США). Амилоза повышает энзиморезистентность крахмала генетически модифицированного картофеля.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Nugent A.P. // Nutr. Bull. 2005. №30. P. 27–54.
- 2 Fuentes-Zaragoza E., Sanchez-Zapata E., Sendra E., Sayas E. et al. Starch-Stärke. 2011. №63. P. 406–415.
- 3 Higgins J.A., Brown M.A., Storlien L.H. Consumption of resistant starch decreases postprandial lipogenesis in white adipose tissue of the rat // Nutrition Journal. 2006. № 5:25.
- 4 Robertson J.A., Ryden P., Ring S.G. Unavailable carbohydrates: behavior during digestion and consequences for fermentation // Res. Adv. Agri. Food Chem. 2000. №1. P. 59-71.
- 5 Wang X., Gibson G.R. // J Appl. Bacteriol. 1993. № 75. P. 373–386.
- 6 Topping D.L., Fukushima M., Bird A.R. Resistant starch as a prebiotic and synbiotic: state of the art // Proceedings of the Nutrition Society. 2003. № 62. P. 171-176.
- 7 Silvi S., Rummey C.J., Cresci A., Rowland I.R. // J Appl. Microbiol. 1999. №86. P. 521-530.
- 8 Pryde S.E., Duncan S.H., Hold G.L., Stewart C.S. et al. // FEMS Microbiol. Lett. 2002. № 217. P. 133-139.
- 9 DuPont A.W., DuPont H.L. // Nat. Rev. Gastroenterol Hepatol. 2011. №8. P. 523–531.
- 10 Holmes E., Kinross J., Gibson G.R., Burcelin R. et al. // Sci. Transl. Med. 2012. № 6. P. 137.
- 11 Leszczynski W. Resistant starch - classification, structure, production // Polish Journal of Food and Nutrition Sciences. 2004. № 1. P. 37-50.
- 12 Никитина Е.В., Габдукаева Л.З., Решетник О.А. Резистентность модифицированных картофельных крахмалов, обработанных альфа- и бета-амилазами // Вестник Казанского технологического университета. 2010. №10. С. 382-387.
- 13 Никитина Е.В., Габдукаева Л.З., Губайдуллин Р.А. Влияние обработки альфа- или бета-амилазами на технологические и морфологические свойства картофельного крахмала // Вестник Казанского технологического университета. 2013. №14. С. 148-150.
- 14 Ягофаров Д.В. дисс. ... канд. тех. наук. Воронеж: ВГУ, 2012. 168 с.
- 15 Сучкова Т.Н. автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Воронеж: ВГУ, 2009. 22 с.
- 16 Пат. РФ 2311798 Способ регулирования содержания глюкозы и обеспечения ее регулируемой подачи и пищевой продукт для его осуществления, 2007.
- 17 Колеснов А.Ю. Биохимические системы в оценке качества продуктов питания (ферментативный гидролиз). М.: Пищевая промышленность, 2000. 416 с.
- 18 Гамаюрова В.С., Зиновьева М.Е. Ферменты. Лабораторный практикум. СПб.: Проспект науки, 2011. 256 с.

REFERENCES

- 1 Nugent A.P. // Nutr. Bull. 2005. №30. P. 27–54.
- 2 Fuentes-Zaragoza E., Sanchez-Zapata E., Sendra E., Sayas E. et al. Starch-Stärke. 2011. №63. P. 406–415.
- 3 Higgins J.A., Brown M.A., Storlien L.H. Consumption of resistant starch decreases postprandial lipogenesis in white adipose tissue of the rat // Nutrition Journal. 2006. № 5:25.
- 4 Robertson J.A., Ryden P., Ring S.G. Unavailable carbohydrates: behavior during digestion and consequences for fermentation // Res. Adv. Agri. Food Chem. 2000. №1. P. 59-71.
- 5 Wang X., Gibson G.R. // J Appl. Bacteriol. 1993. № 75. P. 373–386.
- 6 Topping D.L., Fukushima M., Bird A.R. Resistant starch as a prebiotic and synbiotic: state of the art // Proceedings of the Nutrition Society. 2003. № 62. P. 171-176.
- 7 Silvi S., Rummey C.J., Cresci A., Rowland I.R. // J Appl. Microbiol. 1999. №86. P. 521-530.
- 8 Pryde S.E., Duncan S.H., Hold G.L., Stewart C.S. et al. // FEMS Microbiol. Lett. 2002. № 217. P. 133-139.
- 9 DuPont A.W., DuPont H.L. // Nat. Rev. Gastroenterol Hepatol. 2011. №8. P. 523–531.
- 10 Holmes E., Kinross J., Gibson G.R., Burcelin R. et al. // Sci. Transl. Med. 2012. № 6. P. 137.
- 11 Leszczynski W. Resistant starch - classification, structure, production // Polish Journal of Food and Nutrition Sciences. 2004. № 1. P. 37-50.
- 12 Nikitina E.V., Gabdukaeva L.Z., Reshetnik O.A. Resistance modified potato starches, processed alpha and beta-amylase. Herald seemed University of Technology, 2010, no.10, pp. 382-387. (In Russ.).
- 13 Nikitina E.V., Gabdukaeva L.Z., Gubaidullin R.A. The effect of treatment of alpha or beta amylase for technological and morphological properties of potato starch. Herald seemed University of Technology, 2013, no. 14, pp 148-150. (In Russ.).
- 14 Yagofarov D.V. Diss. Cand. thech. sci. Voronezh: Voronezh State University, 2012. 168 p. (In Russ.).
- 15 Suchkov T.N. Abstr. diss. cand. biol. sci. Voronezh: Voronezh State University, 2009. 22 p. (In Russ.).
- 16 Method for controlling glucose and ensuring its controlled supply and a food product for implementing. Patent RF, no. 2311798, 2007. (In Russ.).
- 17 Kolesnov A.Yu. Biochemical system in the evaluation of the quality of food products (enzymatic hydrolysis). Moscow, Food Industry, 2000. 416 p. (In Russ.).
- 18 Gamayurova V.S., Zinoviev M.E. Enzymes. Laboratory workshop. Sent-Petersburg, Science Prospect, 2011. 256 p. (In Russ.).