

DOI: <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2021-4-4-269-277>

Поступила 13.10.2021

Поступила после рецензирования 23.11.2021

Принята в печать 06.12.2021

© Папахин А. А., Бородина З. М., 2021

<https://www.fsjour.com/jour>

Научная статья

Open access

# ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПУЛЛУЛАЗЫ В КАЧЕСТВЕ БИОКАТАЛИЗАТОРА ПРОЦЕССА ГИДРОЛИЗА КРАХМАЛА: ЧАСТЬ 1. ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ПУЛЛУЛАЗЫ НА АМИЛОПЕКТИНОВЫЙ КУКУРУЗНЫЙ КРАХМАЛ

Папахин А. А.\*, Бородина З. М.

Всероссийский научно-исследовательский институт крахмалопродуктов, Московская область, Красково, Россия

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:**

амилолитические ферменты,  
амилоза, амилопектин,  
структурные свойства,  
редуцирующие вещества,  
углеводный состав

**АННОТАЦИЯ**

Использование разветвляющихся ферментов при гидролизе крахмала является актуальным направлением для получения новых видов крахмалопродуктов с контролируемыми свойствами и потенциалом для дальнейшего использования. Целью работы являлось изучение действия пуллулазы (EC 3.2.1.41) на кукурузный амилопектиновый крахмал в нативном и клейстеризованном состоянии. Объектами исследований являлись амилопектиновый кукурузный крахмал и ферментный препарат Promozyme D6 (Novozymes, Дания). Для определения углеводного состава гидролизатов применяли метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), массовую долю редуцирующих веществ (РВ) определяли методом Лейна и Эйнона, для измерения динамической вязкости продуктов гидролиза крахмала был использован ротационный вискозиметр. Выявлено, что в нативном состоянии испытуемый крахмал проявил невысокую ферментативную восприимчивость к действию пуллулазы с незначительными изменениями вязкости, растворимости и йодсвязывающей способности образцов. Показано, что наибольшую активность на клейстеризованный крахмал пуллулаза проявляла в первые 8 часов инкубации. Установлено, что максимальная степень гидролиза крахмала пуллулазой через 8 часов при дозе 10 ед/г сухого вещества (СВ) составила 4,7% по СВ, йодсвязывающая способность гидролизата  $D_{600}-0,343$ , при этом в контрольном опыте она составила  $D_{600}-0,154$ , а вязкость гидролизата снизилась с 7887 мПа·с до 4,3 мПа·с. Гидролизаты, охлажденные до 8 °С и выдержанные в течение 20 часов наряду с охлажденными, проявили высокую атакуемость глюкоамилазой на 97–98% при 60 °С и 24 часа осахаривания, что указывало на отсутствие их резистентности к действию глюкоамилазы в условиях опыта. Использование пуллулазы при декстринизации клейстеризованного и частично гидролизованного  $\alpha$ -амилазой (РВ 6,1%) испытуемого крахмала позволяло получать гидролизаты с массовой долей редуцирующих веществ в пределах 10–24% по СВ при продолжительности процесса от 2 до 24 часов и дозировке фермента 2–10 ед., которые содержали в основном мальтотриозу, мальтогексозу и мальтогептозу с их суммарным количеством 45–60% по СВ. Результаты свидетельствуют о необходимости продолжения исследований биокаталитического действия пуллулазы для разработки новых способов ферментативной модификации крахмала.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: Статья подготовлена в рамках выполнения исследований по государственному заданию № 0585–2019–033–С-01 Федерального научного центра пищевых систем им. В. М. Горбатова Российской академии наук.

Received 13.10.2021

Accepted in revised 23.11.2021

Accepted for publication 06.12.2021

© Papakhin A. A., Borodina Z. M., 2021

Available online at <https://www.fsjour.com/jour>

Original scientific article

Open access

## USE OF PULLULANASE AS A BIOCATALYST FOR STARCH HYDROLYSIS: PART 1. STUDY OF THE EFFECT OF PULLULANASE ON MAIZE AMYLOPECTIN STARCH

Alexander A. Papakhin\*, Zinaida M. Borodina

All-Russian Scientific Research Institute for Starch Products, Moscow region, Kraskovo, Russia

**KEY WORDS:**

amylolytic enzymes, amylose,  
amylopectin, structural properties,  
reducing substances, carbohydrate  
composition

**ABSTRACT**

The use of debranching enzymes in starch hydrolysis is a topical direction for obtaining new types of starch products with controlled properties and a potential for the further use. The aim of the work was to study an effect of pullulanase (EC3.2.1.41) on maize amylopectin starch in the native and gelatinized state. The objects of the research were maize amylopectin starch and enzyme preparation Promozyme D6 (Novozymes, Denmark). High-performance liquid chromatography (HPLC) was used to determine the carbohydrate composition of hydrolysates. The mass fraction of reducing substances (RS) was determined by the Lane and Eynon method. A rotational viscometer was used to measure dynamic viscosity of the starch hydrolysis products. It was found that analyzed starch in the native state showed low enzymatic sensitivity to the action of pullulanase with insignificant changes in viscosity, solubility and iodine binding capacity of the samples. Pullulanase showed the highest effect on gelatinized starch during the first eight hours of incubation. After eight hours, the maximum degree of starch hydrolysis by pullulanase at a dose of 10 units/g dry matter (DM) was 4.7% on DM basis, iodine binding capacity

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Папахин, А. А., Бородина, З. М. (2021). Использование пуллулазы в качестве биокатализатора процесса гидролиза крахмала. Часть 1. Изучение действия пуллулазы на амилопектиновый кукурузный крахмал. *Пищевые системы*, 4(4), 269–277. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2021-4-4-269-277>

FOR CITATION: Papakhin, A.A., Borodina, Z.M. (2021). Use of pullulanase as a biocatalyst for starch hydrolysis: Part 1. Study of the effect of pullulanase on maize amylopectin starch. *Food systems*, 4(4), 269–277. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2021-4-4-269-277>

of the hydrolysate was  $D_{600} = 0.343$  (in the control experiment  $D_{600} = 0.154$ ), and the viscosity of the hydrolysate decreased from 7887 mPa·s to 4.3 mPa·s. Hydrolysates cooled to 8 °C and held for 20 hours along with hydrolysates that were not cooled showed high susceptibility to attack by glucoamilase (97–98%) at 60 °C and 24 hours of saccharification, which suggested the absence of their resistance to the action of glucoamilase in the conditions of the experiment. The use of pullulanase in dextrinization of the analyzed starch, which was gelatinized and partly hydrolyzed by  $\alpha$ -amylase (RS6.1%), enabled obtaining hydrolysates with the mass fraction of reducing substances in a range of 10–24% on DM basis with the process duration of 2 to 24 hours and the enzyme dose of 2–10 units, which contained mainly maltotriose, maltohexose and maltoheptose with their total amount of 45–60% on DM basis. The results indicate a need for further research of the biocatalytic action of pullulanase to develop new methods for enzymatic modification of starch.

FUNDING: The article was published as part of the research topic No. 0585–2019–033–C-01 of the state assignment of the V. M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of RAS.

## 1. Введение

Мировые достижения в развитии биохимии, микробиологии и энзимологии послужили основой для развития промышленности ферментных препаратов, эффективно используемых в различных отраслях пищевой и перерабатывающей промышленности, и, соответственно, для проведения научных исследований [1,2]. В последние годы на рынок поступают новые поколения препаратов ферментов, в том числе амилолитических, используемых в качестве катализаторов реакции гидролиза крахмала [3]. Гидролиз, который может быть полным или частичным, является одним из основных способов изменения физико-химических и функциональных свойств крахмала с целью получения различных сахаристых продуктов и модифицированных крахмалов. Наиболее используемые в производстве крахмалопродуктов в качестве сырья крахмалы на 75–85% состоят из амилопектина — разветвленного полисахарида, содержащего, наряду с  $\alpha$ -1,4-глюкозидными связями остатков D-глюкозы, 4–5%  $\alpha$ -1,6-глюкозидных связей в точках ветвления [4,5].

В качестве биокатализаторов процесса гидролиза крахмала используют амилолитические ферменты класса гидролаз. Наиболее востребованные ферменты, используемые в процессе гидролиза крахмала в научных и промышленных масштабах: альфа-амилаза (бактериальная и грибная), бета-амилаза (бактериальная и растительная), глюкоамилаза (грибная) [3]. Альфа- и бета-амилазы расщепляют  $\alpha$ -1,4-глюкозидные связи в крахмале, но не действуют на  $\alpha$ -1,6-связи, а глюкоамилаза, помимо  $\alpha$ -1,4-связей, расщепляет и  $\alpha$ -1,6-связи, но со скоростью во много раз меньшей, чем  $\alpha$ -1,4. В научном и практическом плане все более возрастающий интерес вызывает использование ферментов альфа-1,6-гликозидаз, в частности пуллулазы (ЕС3.2.1.41-пуллулан-6-глюканогидролаза), способной расщеплять  $\alpha$ -1,6-глюкозидные связи в молекулах пуллулана, крахмала, амилопектина и родственных олигосахаридов [6]. Каталитическое действие пуллулазы обеспечивает полное и эффективное преобразование разветвленных полисахаридов в олигосахариды с линейной структурой, хорошо ферментируемые в процессе дальнейшего осахаривания, в частности, при получении глюкозы.

Пуллулаза известна в литературе как деразветвляющий фермент прямого действия под наименованиями:  $\alpha$ -декстрин-6-глюканогидролаза, пуллулан-6-глюканогидролаза, конечная декстриназа и амилопектин-6-глюканогидролаза [7,8]. О применении пуллулазы в крахмалоперерабатывающей промышленности известно и в России, и за рубежом. Она играет ключевую роль в полном деразветвлении и гидролизе крахмала, улучшая тем самым качество продукции, повышая производительность и снижая производственные затраты при изготовлении резистентного крахмала, глюкозного сиропа и пива [9]. Применение ферментных препаратов данного вида является перспективным направлением в производстве сахаристых крахмалопродуктов. Было установлено, что использование пуллулазы

в процессе осахаривания клейстеризованного и разжиженного  $\alpha$ -амилазой крахмала в композиции с осахаривающими ферментами (глюкоамилазой, бета-амилазой и др.) позволяет повысить скорость процесса, снизить количество осахаривающих ферментов, увеличить степень гидролиза и, соответственно, выход готовой продукции, а также увеличить концентрацию сухих веществ (СВ) субстрата, что приводит к снижению затрат на выпаривание [9–11]. Так, использование препарата Promozyme D2 (Novozymes, Дания) в композициях с глюкоамилазами и мальтогенными ферментами позволяет увеличить выходы глюкозы и мальтозы в конечных продуктах от 2,5 до 30% [10]. Двухстадийный процесс осахаривания с применением пуллулазы при переходной температуре 50 °C на первой стадии, о котором сообщается в исследовании [11], резко увеличивал скорость гидролиза мальтодекстрина, продуцировал значительно больше мальтозы и меньше побочных продуктов. Данный процесс может представлять собой эффективную, экологически безопасную стратегию производства мальтозного сиропа в промышленности.

В последнее время большое внимание исследователей уделяется изучению действия пуллулазы на крахмал в клейстеризованном и в нативном состоянии. Этот процесс может быть использован для получения модифицированных крахмалов и крахмалопродуктов с повышенной резистентностью к действию амилаз желудочно-кишечного тракта человека и животных [12–14]. Исследователи сообщали о получении декстринов с повышенной на 5–10% резистентностью путем одновременного деразветвления пуллулазой и кристаллизации восковидного кукурузного крахмала при 50 °C с последующим гидролизом серной кислотой или  $\alpha$ -амилазой [12].

За счет использования циклической обработки нагреванием и охлаждением после стадии деразветвления пуллулазой клейстеризованного пшеничного крахмала получали резистентный крахмал типа R3 (ретроградный) с низким гликемическим индексом порядка 34% и низкой усвояемостью [13]. Последовательная обработка  $\beta$ -амилазой, трансглюкозидазой и пуллулазой нативного рисового крахмала позволяла получить модифицированный крахмал с сильной устойчивостью к ферментному гидролизу и более низким гликемическим индексом, причем наиболее устойчивые кристаллы образовывались из линейных цепей со степенью полимеризации 9–11 [14].

Установлено, что модификация свойств нативного крахмала пуллулазой зависит от вида крахмала и условий проведения процесса, а механизм гидролиза подобен таковому для амилаз, гидролизующих  $\alpha$ -1,4-глюкозидные связи [15]. Кроме того, площадь поверхности, а также размер частиц гранул крахмала оказывают важное влияние на начальную скорость, с которой нативный крахмал расщепляется деразветвляющим ферментом. Li P. и др. [16] отмечали, что в нативном состоянии картофельный крахмал показал более

высокую восприимчивость к пуллулазае по сравнению с кукурузным, у которого наблюдалось незначительное изменение вязкостных и других свойств.

Исследования Hong Y. и др. [17] показали, что набухшие крахмалы после обработки пуллулазае могут образовывать гели, при этом кристалличность структуры гелей изменялась после гидролиза из А-типа до смеси В- и V-типа. Способность образовывать гели связана с полкой структурой кристаллитов V-типа, что является перспективой для доставки лекарств и биоматериалов.

Полученные данные в ходе изучения физико-химических и структурных свойств крахмалов различных видов, обработанных пуллулазае в клейстеризованном состоянии, показали значительные изменения в свойствах испытуемых крахмалов [5]. Так, деразветвленные крахмалы обладали большей йодсвязывающей способностью, чем нативные, а также более высокой растворимостью, но низкой вязкостью клейстеров. Комплексообразующая способность (в случае с жирными кислотами) зависела от длины отщепленных цепочек глюканов и, следовательно, от вида крахмала. Возможность образования стабильных гелей достигалась при высокой концентрации сухих веществ крахмала. Ряд исследователей сообщили о возможности использования деразветвляющих ферментов прямого действия (пуллулазае, изоамилазае) на крахмал как в клейстеризованном, так и в нативном состоянии при получении резистентных крахмалов, амилозы, циклодекстринов [18–20].

Путем деразветвления нормального кукурузного крахмала и автоклавирования в исследованиях Xu R. и др. [18] получали образцы, содержащие фракции амилозы со степенью полимеризации СП 22–260 и с резистентностью до 17%, увеличивающейся в диапазоне СП 22–75. Совместное действие пуллулазае с альфа-амилазае на кукурузный крахмальный гель при pH 5,5 и температуре 60 °C в течение 12 часов повышало содержание амилозы в геле на 17–28%, и при дальнейшей ретроградации увеличивало выход резистентного крахмала до 19% с изменением кристалличности от типа А до В [19]. При действии пуллулазае может быть деразветвлено более 80% клейстеризованного восковидного кукурузного крахмала при концентрации суспензии 25% с образованием высококристаллического крахмалопродукта типа В с содержанием резистентного крахмала до 70,7% [20]. Данный процесс происходит при последующей выдержке обработанного клейстеризованного восковидного кукурузного крахмала в течение 24 часов при 25 °C.

Таким образом, модифицированные крахмалы, получаемые с использованием пуллулазае, за счет линейной структуры с различной длиной цепей, высокой степени кристалличности, склонности к образованию комплексных соединений, имеют хорошую перспективу использования для получения резистентных крахмалопродуктов. Кроме того, они могут применяться в качестве защитных инкапсуляторов биологически активных соединений с повышенной антиоксидантной активностью, комплексообразователей, а также компонентов функциональных продуктов питания с низким гликемическим индексом для диетического питания и лечения диабета.

Цель работы — изучение действия пуллулазае, как индивидуального, так и в композиции с  $\alpha$ -амилазае на амилопектиновый крахмал в нативном и клейстеризованном состоянии.

## 2. Объекты и методы

В работе использовали кукурузный амилопектиновый крахмал стандартного качества по ГОСТ 32159–2013 [21]. В качестве испытуемой пуллулазае применяли фермент-

ный препарат нового поколения Promozyme D6, предоставленный компанией Novozymes (Дания). Испытуемая пуллулазае является ферментом, катализирующим процесс гидролиза крахмала в нативном и клейстеризованном состоянии путем разрыва  $\alpha$ -1,6-гликозидных связей. По данным производителя, пуллулазае активностью препарата составляет 4000 ед. Пул/г. Одна единица активности пуллулазае определяет количество фермента, который гидролизует пуллулан в стандартных условиях (при показателе pH 5,0, температуре 40 °C, времени инкубации 20 мин.), высвобождая 1 моль редуцирующего углевода в минуту. Оптимальные условия действия пуллулазае на крахмал: температура 60 °C и показатель pH = 5,0–5,5. Наряду с пуллулазае использовали препарат термостабильной бактериальной  $\alpha$ -амилазае Liquazyme Supra 2.8 компании Novozymes (Дания). Амилолитическая активность  $\alpha$ -амилазае, определенная методом, изложенным в ГОСТ 54330–2011 [22], составляла 2000 ед. АС/г препарата.

Химический состав и качественные показатели крахмала определяли по ГОСТ 7698–93 [23]. Содержание общих и растворимых сухих веществ (СВ) в крахмале и продуктах гидролиза выявляли методом высушивания и с использованием рефрактометра ИРФ-454Б2М («АналитЛаб», Россия); углеводный состав гидролизатов — методом ВЭЖХ на углеводном анализаторе Bischoff 8120 (Schmidt, Германия) с использованием хроматографической колонки Resex RSO Oligosaccharide [24]. Редуцирующие вещества (РВ, ГЭ) в гидролизатах определяли методом Лейна-Эйнона (ГОСТ Р 50549–93) [25]. Динамическую вязкость гидролизатов измеряли на ротационном вискозиметре Reotest-2 (Mettingen, Германия). Морфологию гранул крахмала определяли путем микроскопирования с использованием светового микроскопа Leica (Германия) при 500-кратном увеличении. Йодопоглощение образцов исходного и обработанного пуллулазае амилопектинового крахмала оценивали согласно методике, приведенной в ГОСТ ISO 6647–1–2015 [26], с некоторыми изменениями. Анализируемую пробу (100 ± 0,5) мг по СВ помещали в мерную колбу на 100 мл, доводили до метки водой и тщательно перемешивали. Отбирали пипеткой 5 мл полученного раствора в мерную колбу на 100 мл, содержащую 50 мл воды, затем вносили 1 мл 0,2 М ацетатного буфера с pH 5,0, добавляли 2 мл 0,02 н. раствора йода в йодистом калии, затем доводили до метки водой и перемешивали. После 10 мин. отстаивания измеряли оптическую плотность анализируемых растворов при длине волны 600 нм в сопоставлении с йодным раствором сравнения, используя спектрофотометр СФ-2000 (ОКБ СПЕКТР, Россия). Физико-химические показатели полученных продуктов определяли по принятым в крахмалопаточном производстве методикам [27]. Все реактивы, используемые для анализов, были аналитического качества. Математическую обработку результатов проводили с использованием пакета анализа Microsoft Office Excel 2007 (критерий наименьшей существенной разницы НСР при уровне значимости  $\alpha = 0,05$ ).

Эксперименты по гидролизу нативного крахмала в присутствии пуллулазае проводили по схеме, ранее принятой для низкотемпературного биокатализа гидролиза кукурузного крахмала глюкоамилазае, с некоторыми изменениями [28]. Готовили крахмальную суспензию концентрацией 9–10% по СВ, доводили pH до значения  $5,2 \pm 0,1$ , вносили расчетную дозу пуллулазае и инкубировали с перемешиванием при 130 об/мин и температуре  $60 \pm 1$  °C. Дозировку пуллулазае варьировали в пределах 0–50 ед. Пул/г СВ крахмала, продолжительность процесса составляла от 0 до 48 часов с отбором проб через 8, 22, 48 часов. Пробы реакционной смеси посредством вакуум-фильтрации разделяли на

жидкую фракцию — фильтрат, и твердую — осадок крахмала с последующей промывкой осадка дистиллированной водой при гидромодуле 1:4. Фильтрат смешивали с промывными водами и в смеси определяли массовую долю растворимых СВ крахмала. Осадок высушивали при температуре 50 °С до воздушно-сухого состояния. Результаты процесса гидролиза оценивали путем определения степени растворения (СРК) и степени гидролиза крахмала (СГК) согласно ранее разработанной методике [29].

Оценку индивидуального действия пуллулаказы на клейстеризованный крахмал проводили по следующей схеме: приготовление 10%-ной суспензии крахмала в 0,02 М ацетатном буфере со значением pH 5,0; нагревание и выдерживание при температуре 90–95 °С в течение 40 мин. при постоянном перемешивании; выдерживание клейстеризованной массы под давлением 0,1 МПа при температуре 110–115 °С в течение 10 мин. (для обеспечения полной клейстеризации); охлаждение клейстера до температуры 65 °С, внесение расчетной дозы пуллулаказы и выдерживание в шейкере-инкубаторе KS4000i (IKA, Германия) при температуре  $62 \pm 1$  °С в течение 24 часов при 130 об/мин с периодическим отбором проб; подкисление отобранных проб до pH = 4,0 и нагревание в кипящей водяной бане в течение 10 мин. для инактивации пуллулаказы; охлаждение и анализ полученных гидролизатов.

Эксперименты по изучению действия пуллулаказы на клейстеризованный амилопектиновый крахмал, разжиженный и частично гидролизованный термостабильной  $\alpha$ -амилазой, проводили по традиционной схеме получения низкосахаренных продуктов гидролиза крахмала (мальтодекстринов, низкосахаренной патоки), включающей стадии разжижения и декстринизации (осахаривания): приготовление суспензии крахмала с концентрацией СВ 10%, доведение pH до  $5,4 \pm 0,1$ ; нагревание суспензии до температуры 60 °С при постоянном перемешивании, внесение термостабильной  $\alpha$ -амилазы в количестве 0,2 ед. АС/г СВ крахмала, нагрев до температуры 93–95 °С и выдерживание в течение 30 мин.; обработка суспензии под давлением 0,1 МПа при температуре 110 °С в течение 10 мин. для полной клейстеризации; охлаждение гидролизата до температуры 65 °С, внесение расчетной дозы пуллулаказы и инкубация при температуре  $62 \pm 1$  °С в течение 24 часов с периодическим отбором проб через 2, 8 и 24 часа; нагрев проб, подкисленных до pH = 4,0 в кипящей водяной бане в течение 10 мин. для инактивации ферментов, а также анализ полученных гидролизатов.

### 3. Результаты и обсуждение

Ранее авторами было установлено, что амилопектиновый (восковидный) кукурузный крахмал в нативном состоянии проявлял высокую восприимчивость к ферменту глюкоамилазе, по сравнению с другими видами крахмалов [30]. Амилопектиновый кукурузный крахмал, в отличие от нормального кукурузного крахмала, состоит почти исключительно из высокомолекулярных макромолекул амилопектина, разветвленных за счет внутримолекулярных  $\alpha$ -1,6-гликопиранозных связей [31]. С применением дезактивирующих ферментов данные  $\alpha$ -1,6-связи в амилопектине могут быть эффективно гидролизованы с высвобождением линейных  $\alpha$ -1,4-связанных цепей с различной степенью полимеризации (СП), обуславливающих изменение структурных, физико-химических и функциональных свойств крахмала. В связи с этим было решено использовать амилопектиновый крахмал в качестве испытуемого для оценки его ферментативной восприимчивости к пуллулаказе в нативном и клейстеризованном состоянии.

Первый этап исследований посвящен изучению действия пуллулаказы на амилопектиновый крахмал в гетерогенной водной среде при температурных условиях, не превышающих начальную точку клейстеризации. Дозировку пуллулаказы варьировали в пределах 0–50 ед. Пул/г СВ крахмала, продолжительность процесса — от 0 до 48 часов с отбором проб через 8, 22, 48 часов. В полученных фильтратах после разделения проб определяли массовую долю СВ и, соответственно, степень растворения крахмала (СРК, % на СВ). Результаты действия испытуемой пуллулаказы на нативный амилопектиновый крахмал представлены в Таблице 1.

Таблица 1

**Влияние дозировки пуллулаказы и продолжительности гидролиза на степень растворения (СРК) нативного кукурузного амилопектинового крахмала**

Доза пуллулаказы, ед. Пул/г СВ крахмала	Продолжительность гидролиза, ч				НСР <sub>0,05</sub>
	0	8	22	48	
0 (ВТО)	0,23	0,23	0,28	0,35	0,06
5	0,23	1,70	1,94	2,12	0,09
10	0,23	2,61	2,97	3,01	0,15
15	0,23	3,11	3,47	3,40	0,07
20	0,23	3,96	4,52	3,89	0,10
25	0,23	4,25	5,00	3,94	0,07
35	0,23	4,24	4,15	3,85	0,09
50	0,23	4,06	4,09	3,67	0,08

При анализе результатов проведенных опытов отмечено, что контрольный опыт (без пуллулаказы) представляет собой влаготермическую обработку (ВТО) крахмала в данных условиях. При внесении пуллулаказы в опытах осуществляются два процесса: ВТО и гидролиз крахмала, что необходимо учитывать при анализе результатов. В целом, с увеличением дозировки пуллулаказы степень растворения образцов крахмала повышалась (Таблица 1), достигнув максимума 4,5–5,0% при дозировках 20–25 ед. Пул/г СВ крахмала, выше которых она начинала снижаться. Отмечено, что при дозировках 20–50 ед. Пул/г СВ с увеличением продолжительности инкубации степень растворения амилопектинового крахмала быстро нарастала к 8 часам инкубации, но после 22 часов снижалась на 0,3–1,0% в зависимости от дозировки. Вероятно, это связано с частичной набухаемостью гранул амилопектинового крахмала в ходе продолжительной влаготермообработки в течение 48 часов.

В образцах обработанного пуллулаказой амилопектинового крахмала установлено незначительное снижение динамической вязкости 3%-ных клейстеров полученных образцов и водоудерживающей способности, а также повышение степени растворения, обусловленные его структурными свойствами. Йодсвязывающая способность образцов, определяемая при 600 нм, оставалась практически неизменной —  $D_{600} - 0,200$ , что можно объяснить небольшой длиной отщепленных линейных цепочек, не образующих комплексов с йодом. Морфология гранул испытуемых крахмалов, определяемая путем микроскопирования, не претерпевала видимых изменений при действии пуллулаказы. Некоторое увеличение объемов гранул происходило по всей вероятности из-за их набухания в ходе влаготермической обработки при температуре 60 °С. В целом, амилопектиновый крахмал проявил невысокую ферментативную восприимчивость к действию пуллулаказы в указанных условиях низкотемпературного биокатализа, что можно объяснить его структурными свойствами и экзо-механизмом действия пуллулаказы.

На следующем этапе работы изучалось действие пуллулазы на испытуемый крахмал в клейстеризованном состоянии.

Дозировка пуллулазы в опытах составляла: 0, 2, 6, 10 ед. Пул/г СВ крахмала. Действие пуллулазы на клейстеризованный крахмал оценивали путем определения степени гидролиза крахмала и показателей вязкости и йодсвязывающей способности, характеризующих степень разветвления и свойства получаемых гидролизатов.

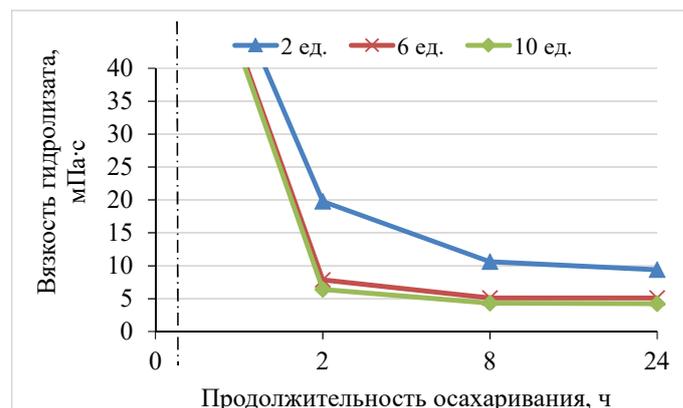
Визуально отмечено, что гидролизаты амилопектинового крахмала при охлаждении после инактивации фермента до температуры 25 °С, а также хранении при данной температуре в течение 8 часов, оставались подвижными и достаточно прозрачными, т. е. доступными к проведению анализов. При хранении гидролизатов в течение 16–20 часов при температуре 25 °С они становились белыми мягкими гелями, и для проведения анализов их подвергали нагреванию до температуры 60–70 °С с последующим охлаждением до температуры 25 °С. Восстановительная способность гелей указывала на низкую способность полученных разветвленных гидролизатов амилопектинового крахмала в заданных условиях к ретроградации. В подобных исследованиях сообщалось о повышении резистентности клейстеризованного амилопектинового крахмала в среднем до 20% после обработки пуллулазой [32,33].

С целью определения степени резистентности гидролизатов разветвленного амилопектинового крахмала к действию глюкоамилазы гидролизаты, полученные через 24 часа обработки пуллулазой с дозировками 2, 6, 10 ед. Пул/г СВ крахмала, прокипятили в кипящей водяной бане в течение 15 мин. для инактивации пуллулазы. Затем гидролизаты разделили на 2 части: первую охладили до температуры 62 °С, довели рН до 4,2, внесли раствор глюкоамилазы 3,0 ед. ГлС/г СВ гидролизата и инкубировали на термостатической ИКА при температуре 60 °С в течение 24 часов. Полученный осадочный гидролизат взвешивали, фильтровали и гравиметрически определяли количество фильтра, степень гидролиза и количество негидролизованного осадка в процентах по СВ гидролизата и анализировали. Вторую часть 24-х часовых гидролизатов после охлаждения до температуры 30 °С поместили в холодильник и выдержали при температуре 8 °С в течение 20 часов, затем нагрели до температуры 60 °С, довели рН до 4,2, внесли раствор глюкоамилазы 3,0 ед. ГлС/г СВ и также инкубировали при 60 °С в течение 24 часов, затем фильтровали и обрабатывали так же, как первую часть.

В фильтрах (глюкозных сиропах) определяли массовую долю РВ (ГЭ) и углеводный состав методом ВЭЖХ. Полученные результаты, представленные в Таблице 2, показали, что

застывшие гели, полученные при охлаждении гидролизатов в течение 20 часов при температуре 8 °С, осаживались глюкоамилазой так же, как и неохлажденные, т. е. повышения устойчивости амилопектиновых гидролизатов к действию глюкоамилазы в условиях опыта не было достигнуто.

Было установлено, что пуллулаза активно действовала на клейстеризованный амилопектиновый крахмал в первые часы инкубации при всех испытуемых дозах. С увеличением продолжительности процесса вязкость гидролизатов пуллулазы 2–6 ед. Пул/г СВ крахмала в период от 8 до 24 часов происходит заметное увеличение степени гидролиза, то при дозах 6–10 ед. Пул/г СВ процесс практически заканчивается через 8 часов инкубации при данных условиях опыта.



**Рисунок 1.** Зависимость вязкости гидролизатов амилопектинового крахмала от продолжительности осахаривания при различной дозировке пуллулазы

Это явление также отражалось и на йодсвязывающей способности (Рисунок 2). Максимальная степень гидролиза амилопектинового крахмала пуллулазой при дозе 10 ед. Пул/г СВ составила через 8 часов 4,7% по СВ, йодсвязывающая способность гидролизата —  $D_{600} = 0,343$  против  $D_{600} = 0,154$  в контрольном опыте (без пуллулазы), а вязкость гидролизата снизилась с 7887 мПа·с до 4,3 мПа·с.

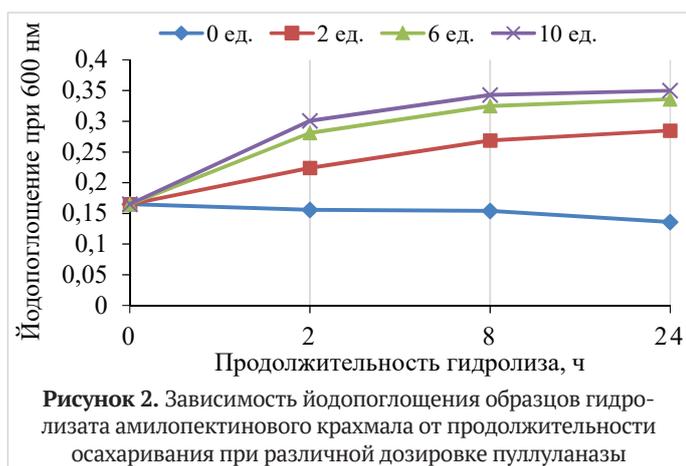
На следующем этапе исследований было изучено действие пуллулазы на клейстеризованный амилопектиновый крахмал, разжиженный и частично гидролизованный термостабильной  $\alpha$ -амилазой.

В проведенных опытах варьировали дозировки пуллулазы и  $\alpha$ -амилазы на стадии декстринизации. Контрольным был опыт 1, в котором на процесс декстринизации ферменты не дозировали, а полученные после разжижения гидролизаты также инкубировали при температуре 60 °С в течение 24 часов с отбором проб. В опыте 2 на стадии

Таблица 2

**Результаты осахаривания пуллулазных гидролизатов клейстеризованного амилопектинового крахмала глюкоамилазой (при температуре 60 °С и продолжительности 24 часа)**

Доза, ед. Пул/г СВ крахмала	РВ сиропа, % по СВ	СГК, % по СВ	Выход осадка, % по СВ	Углеводный состав сиропа, %			
				Глюкоза	Мальтоза	Мальтотриоза	ВМС
Без охлаждения перед осахариванием							
2,0	98,30	96,99	3,01	97,93	0,62	0,0	1,45
6,0	99,73	96,50	3,50	99,37	0,63	0,0	0,0
10,0	99,13	94,60	5,41	98,57	0,75	0,69	0,0
С охлаждением перед осахариванием							
2,0	99,20	96,23	3,70	98,73	0,65	0,0	0,61
6,0	99,21	96,60	3,40	98,70	0,65	0,0	0,64
10,0	99,18	96,70	3,30	98,64	0,74	0,62	0,0
НСП <sub>0,05</sub>	1,95	2,44	0,95	2,57	0,30	0,20	0,34



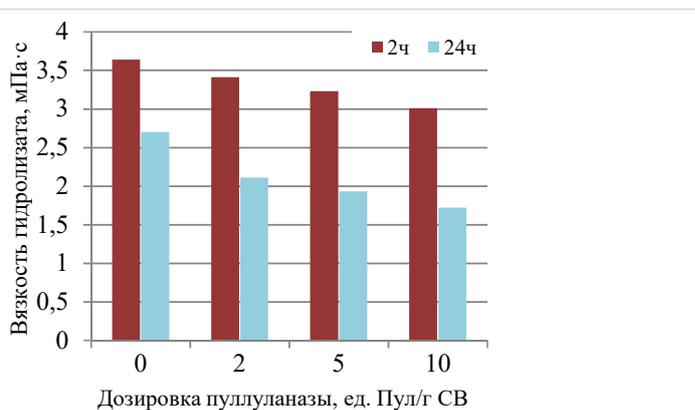
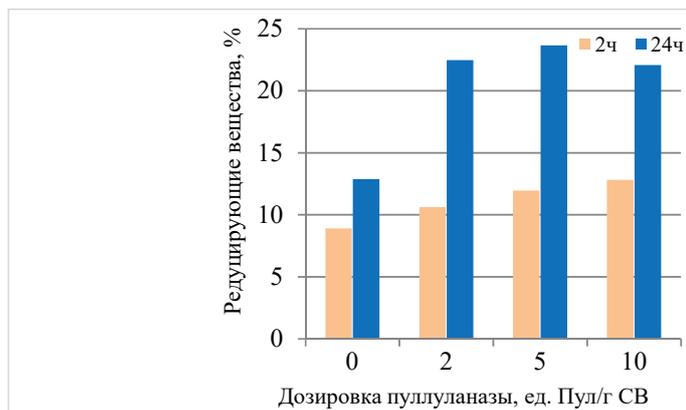
декстринизации разжиженного крахмала в качестве катализатора использовали только  $\alpha$ -амилазу в количестве 0,2 ед. АС/г СВ; в опытах 3, 5, 6 вносили только пуллулазу с дозировкой 2, 5 и 10 ед. Пул/г СВ соответственно, а в опыте 4 к 5,0 ед. Пул/г СВ добавляли 0,2 ед. АС/г СВ  $\alpha$ -амилазы. Полученные результаты представлены в Таблице 3 и на Рисунке 3.

Таблица 3

**Характеристика гидролизатов, полученных при действии пуллулазы на разжиженный  $\alpha$ -амилазой амилопектиновый крахмал индивидуально и в композиции с  $\alpha$ -амилазой**

№ опыта	Доза ферментов на декстринизацию:		Время осахаривания, ч	Показатели гидролизатов			
	Ед. АС/г СВ	Ед. Пул/г СВ		РВ, % по СВ	СГК, % по СВ	Иодопоглощение при 600 нм	Вязкость, мПа·с
1	-	-	0*	6,12	13,86	0,081	4,23
			2	8,90	18,90	0,048	3,64
			24	12,86	27,31	0,0	2,70
2	0,2	-	2	16,86	35,81	0,0	2,82
			24	24,80	56,20	0,0	1,70
3	-	2,0	2	10,6	43,0	0,065	3,41
			24	22,47		0,007	1,93
4	0,2	5,0	2	17,2	56,7	0,053	2,62
			24	30,68	57,46	0,0	1,57
5	-	5,0	2	11,95	14,3	0,077	3,23
			24	23,66	30,9	0,009	1,97
6	-	10,0	2	12,8	43,84	0,079	3,01
			24	22,07		0,014	1,72
НСР <sub>0,05</sub>				0,47	0,62	0,01	0,35

Прим.: 0\* – контрольный образец после разжижения.



**Рисунок 3.** Влияние дозы пуллулазы на накопление РВ в гидролизатах и на их вязкость после 2 и 24 часов декстринизации разжиженных крахмалов

При анализе результатов проведенных опытов отмечено, что индивидуальное использование пуллулазы в процессе декстринизации клейстеризованного и частично гидролизованного  $\alpha$ -амилазой (РВ 6,1%) испытуемого амилопектинового крахмала позволяет получать гидролизаты с массовой долей редуцирующих веществ (РВ) в пределах 10–24% по СВ. Это возможно при продолжительности процесса от 2 до 24 часов и дозировке фермента в интервале 2–10 ед. Пул/г СВ крахмала (Рисунок 3).

Результаты опытов, в которых для декстринизации использовали 0,2 ед. АС/г (опыт 2) и композицию 0,2 ед. АС/г и 5,0 Пул/г СВ (опыт 4), показали, что накопление РВ в гидролизатах в первые 2 часа интенсивнее проходит при биокатализе  $\alpha$ -амилазой, чем смесью  $\alpha$ -амилазы с пуллулазой. В конечных пробах (через 24 часа) максимальное накопление РВ (30,68%) получено в гидролизате амилопектинового крахмала при использовании смеси ферментов. Очевидно, пуллулаза как экзофермент действует медленнее, чем  $\alpha$ -амилаза, и механизм ее действия на разжиженный крахмал близок к глюкоамилазе. Вязкость гидролизатов была значительно снижена после предварительного гидролиза (разжижения) клейстеризованного крахмала альфа-амилазой до 4,23 мПа·с. При действии пуллулазы вязкость гидролизатов незначительно, но характерно снижалась с увеличением дозировки и с увеличением продолжительности инкубации на 0,3–1,25 мПа·с (Рисунок 3), что указывало на снижение длины и молекулярной массы расщепленных полисахаридных цепей гидролизата. На протяжении 24 часов инкубации йодсвязывающая способность контрольных образцов без пуллулазы снижалась от 0,081 до полного исчезновения окрашивания к исходу 24 часов (Таблица 2), что указывает на действие исходной разжижающей альфа-амилазы, расщепляющей 1,4-связи, т. к. короткие расщепленные цепи амилопектина не дают комплексов с йодом. Однако с внесением пуллулазы йодсвязывающая способность сохранялась, снижалась с продолжительностью инкубации, но повышалась с увеличением дозы внесенной пуллулазы от 2 до 10 ед. Пул/г СВ крахмала после 24 часов инкубации от 0,007 до 0,014. Данное увеличение указывает на то, что пуллулаза, расщепляя  $\alpha$ -1,6-гликозидные связи, приводит к образованию в гидролизатах большего количества линейных цепей, повышающих окрашивание с йодом, но не расщепляющихся  $\alpha$ -амилазой, активно действующей на высокомолекулярные субстраты.

Анализ углеводного состава гидролизатов данных опытов, проведенный в конечных пробах после истечения 24 часов (Таблица 4), показал, что при индивидуальном действии пуллулазы на разжиженный  $\alpha$ -амилазой амилопектиновый крахмал в процессе осахаривания в гидролизатах обра-

Таблица 4

## Углеводный состав гидролизатов

№	Доза ферментов на декстринизацию		Углеводный состав гидролизатов, % по СВ											НСР <sub>0,05</sub>
	Ед Пул/г СВ	Ед АС/г СВ	Д <sub>1</sub>	Д <sub>2</sub>	Д <sub>3</sub>	Д <sub>4</sub>	Д <sub>5</sub>	Д <sub>6</sub>	Д <sub>7</sub>	Д <sub>8</sub>	Д <sub>9</sub>	Д <sub>10+</sub>	РВ, % по СВ	
1 конт.	–	–	0,0	3,42	8,08	2,62	5,76	14,10	11,88	3,30	1,98	48,97	10,86	1,46
2	–	0,2	1,05	7,51	11,21	3,75	12,76	20,24	4,72	1,62	2,71	32,43	24,80	1,59
3	2,0	–	0,0	3,97	11,37	4,24	7,32	16,85	16,05	6,32	4,11	29,77	22,47	1,36
4	5,0	0,2	1,05	8,46	17,60	6,40	16,18	27,68	13,87	0,0	0,0	8,77	30,68	1,71
5	5,0	–	0,41	4,30	12,89	4,76	7,75	18,27	17,83	7,62	5,04	21,12	23,66	1,68
6	10,0	–	0,34	6,56	14,23	5,57	7,54	17,31	18,01	8,26	5,68	16,51	22,07	1,55

\* Примечание: Д<sub>n</sub> — количество молекул глюкозы (декстрозы) в данном компоненте углеводного состава.

зуется в основном мальтотриоза (Д<sub>3</sub>), мальтогексоза (Д<sub>6</sub>) и мальтогептоза (Д<sub>7</sub>), их сумма составляет от 45 до 50% по СВ в зависимости от дозировки фермента.

При композиции 0,2 ед. АС/г СВ + 5,0 ед. Пул/г СВ массовая доля указанных сахаридов значительно увеличилась (до 60%). Возросло также содержание мальтозы (DP2), мальтопентозы (DP5) и снизилось содержание олигосахаридов DP8, DP9 и DP10+, что указывает на действие  $\alpha$ -амилазы и подтверждается углеводным составом опыта 2, где вместо пуллулазы декстринизация производилась  $\alpha$ -амилазой (0,2 ед. АС/г СВ). Полученные результаты согласуются с литературными данными [20,33] об изменении при действии пуллулазы структурных свойств крахмала и получении продуктов, представляющих собой смесь мальтоолигосахаридов с различной степенью полимеризации и низким содержанием глюкозы, мальтозы и высокомолекулярных декстринов. Мальтоолигосахариды, полученные из амилопектинового кукурузного крахмала, обладают пониженной способностью к ретроградации, а следовательно, пониженной устойчивостью к действию других гидролитических ферментов. Для повышения резистентности обработанного пуллулазой амилопектинового крахмала представляется необходимой дополнительная обработка получаемых гидролизатов с целью увеличения степени ретроградации крахмала. В целом, полученные результаты указывают на актуальность проведенной работы, а также научных исследований в области применения пуллулазы — как индивидуального, так и в композиции с другими амилолитическими ферментами при разработке новых способов ферментативной модификации крахмалов.)

#### 4. Заключение

Проведены экспериментальные исследования процесса ферментативного гидролиза кукурузного амилопектинового крахмала в нативном и клейстеризованном состоянии

с применением в качестве биокатализатора пуллулазы (ЕС 3.2.1.41). При действии пуллулазы на крахмал в нативном состоянии отмечено незначительное снижение вязкости 3%-го клейстера и водосвязывающей способности, а также повышение растворимости полученных образцов. Йодсвязывающая способность образцов до и после обработки пуллулазой оставалась практически неизменной. Микроскопирование гранул крахмала тоже не показало видимых изменений до и после обработки, что указывало на низкую ферментативную восприимчивость крахмала в нативном состоянии. При действии на клейстеризованный крахмал пик активности пуллулазы приходился на первые часы инкубации с достижением максимальной степени гидролиза в 4,7% по СВ через 8 часов при дозе 10 ед. Пул/г СВ. При этом повышалась йодсвязывающая способность гидролизатов с D<sub>600</sub>–0,154 в контроле до D<sub>600</sub>–0,343 в конечном гидролизате со снижением вязкости с 7887 мПа·с до 4,3 мПа·с. Полученные при остывании гидролизатов гели с выдержкой при 8 °С в течение 20 часов и без нее не проявили резистентности к действию глюкоамилазы в условиях опыта, что указывает на необходимость дополнительной обработки гидролизатов для повышения степени ретроградации крахмала. При действии пуллулазы индивидуально и в композиции с  $\alpha$ -амилазой на клейстеризованный и разжиженный до РВ 6,1% крахмал получали гидролизаты с РВ 10–30% при дозировке пуллулазы 2–10 ед. Пул./г СВ и продолжительности процесса 2–24 часов. При этом в гидролизатах основными продуктами являлись короткоцепочечные олигосахариды: мальтотриоза СП-3 мальтогексоза (СП-6) и мальтогептоза (СП-7) с суммарным количеством 45–60% в зависимости от дозировки ферментов при низком содержании глюкозы до 1,0%. Полученные результаты указывают на целесообразность продолжения исследований каталитического действия пуллулазы на крахмал для разработки новых способов его ферментативной модификации.

### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Raveendran, S., Parameswaran B., Ummalya, S. B., Abraham, A., Mathew, A.K., Madhavan, A. et al. (2018). Applications of microbial enzymes in food industry. *Food Technology and Biotechnology*, 56(1), 16–30. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.01.18.5491>
- Shinde, V., Deshmukh, S., Bhojar, M.G. (2015). Applications of major enzymes in food industry. *Indian Farmer*, 2(6), 497–502.
- Hashim, S.O. (2020). Starch-modifying enzymes. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 172, 221–244. [https://doi.org/10.1007/10\\_2019\\_91](https://doi.org/10.1007/10_2019_91)
- Tester, R.F., Karkalas J., Qi X. (2004). Starch structure and digestibility enzyme-substrate relationship. *World's Poultry Science Journal*, 60(2), 186–195+248+250. <https://doi.org/10.1079/WPS20040014>
- Klaochanpong, N., Puttanlek, C., Rungsardthong, V., Rungsardthong V., Pancha-arnon, S., Uttapap, D. (2015). Physicochemical and structural properties of debranched waxy rice, waxy corn and waxy potato starches. *Food Hydrocolloids*, 45, 218–226. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.11.010>
- Hii, S.L., Tan, J.S., Ling, T.C., Ariff, A.B. (2012). Pullulanase: role in starch hydrolysis and potential industrial application. *Enzyme research*, 2012, Article 921362. <https://doi.org/10.1155/2012/921362>
- Manners, D.J. (1997). Observations of the specificity and nomenclature of starch debranching enzymes. *Journal of Applied Glycoscience*, 44, 83–85.
- Xia, W., Zhang, K., Su, L., Wu, J. (2021). Microbial starch debranching enzymes: Developments and applications. *Biotechnology Advances*, 50, Article 107786. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107786>
- Xu, P., Zhang, S.-Y., Luo, Z.-G., Zong, M.-H., Li, X.-X., Lou, W.-Y. (2021). Biotechnology and bioengineering of pullulanase: state of the art and perspectives. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(3), Article 43. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03010-9>
- Соловьева, С.Ю. (2004). Разработка технологии биоконверсии крахмала при производстве патоки различного углеводного состава. Автореф. дис. канд. техн. наук. Москва, МГУПП. — 25 с.

11. Li, C., Kong, H., Yang, Q., Gu, Z., Ban, X., Cheng, L. et al. (2020). A temperature-mediated two-step saccharification process enhances maltose yield from high-concentration maltodextrin solutions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(9), 3742–3748. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11005>
12. Xie, A.-J., Lee, D.-J., Lim, S.-T. (2021). Characterization of resistant waxy maize dextrans prepared by simultaneous debranching and crystallization followed by acidic or enzymatic hydrolysis. *Food Hydrocolloids*, 121, Article 106942. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106942>
13. Arp, C. G., Correa, M. J., Ferrero, C. (2020). Production and characterization of type III resistant starch from native wheat starch using thermal and enzymatic modifications. *Food and Bioprocess Technology*, 13(7), 1181–1192. <https://doi.org/10.1007/s11947-020-02470-5>
14. Li, H., Li, J., Xiao, Y., Cui, B., Fang, Y., Guo, L. (2019). In vitro digestibility of rice starch granules modified by  $\beta$ -amylase, transglucosidase and pullulanase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 136, 1228–1236. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.111>
15. Li, P., He, X., Dhital, S., Zhang, B., Huang, Q. (2017). Structural and physicochemical properties of granular starches after treatment with debranching enzyme. *Carbohydrate Polymers*, 169, 351–356. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.04.036>
16. Jung, K.-H., Kim, M.-J., Park, S.-H., Hwang, H.-S., Lee, S., Shim, J.-H. et al. (2013). The effect of granule surface area on hydrolysis of native starches by pullulanase. *Starch – Stärke*, 65(9–10), 848–853. <https://doi.org/10.1002/star.201200226>
17. Hong, Y., Liu, G., Gu, Z. (2015). Preparation and characterization of hydrophilic debranched starch modified by pullulanase on swollen granule starch. *Food Research International*, 67, 212–218. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.020>
18. Xu, R, Xu, D.-H., Xu, H.-H. (2012). Effect of enzymatic hydrolysis on the resistant starch yield. *Italian Journal of Food Science*, 24(4), 367–375.
19. Gao, Q, Li, S., Jian, H., Liang, S. (2011). Preparation and properties of resistant starch from corn starch with enzymes. *African Journal of Biotechnology*, 10(7), 1186–1193.
20. Shi, J., Sweedman, M. C., Shi, Y.-C. (2018). Structural changes and digestibility of waxy maize starch debranched by different levels of pullulanase. *Carbohydrate Polymers*, 194, 350–356. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.04.053>
21. ГОСТ 32159–2013 «Крахмал кукурузный. Общие технические условия». — Москва: Стандартинформ, 2019. — 12 с.
22. ГОСТ 34440–2018 «Ферментные препараты для пищевой промышленности. Методы определения амилолитической активности». — Москва: Стандартинформ, 2018. — 18 с.
23. ГОСТ 7698–93 «Крахмал. Правила приемки и методы анализа». — Минск: Издательство стандартов, 2001. — 43 с.
24. ГОСТ 33917–2016 «Патока крахмальная. Общие технические условия». — Москва: Стандартинформ, 2017. — 52 с.
25. ГОСТ Р 50549–93 (ИСО 5377–81) «Продукты гидролиза крахмала. Определение восстанавливающей способности и эквивалента глюкозы. Метод постоянного титра Лейна и Эйнона». — Москва: Издательство стандартов, 1994. — 11 с.
26. ГОСТ ISO 6647–1–2015 «Рис. Определение содержания амилозы. Часть 1. Контрольный метод». — Москва: Стандартинформ, 2015. — 16 с.
27. Лукин, Н.Д., Ананских, В.В., Лапидус, Т.В., Хворова, Л.С. (2007). Технологический контроль производства сахаристых крахмалопродуктов. Москва: Россельхозакадемия, 2007. — 261 с.
28. Wasserman, L.A., Papachin, A.A., Borodina, Z.M., Krivandin, A.V., Sergeev, A.I., Tarasov, V.F. (2019). Some physico-chemical and thermodynamic characteristics of maize starches hydrolyzed by glucoamylase. *Carbohydrate Polymers*, 212, 260–269. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.01.096>
29. Папахин, А.А., Бородина, З.М., Лукин, Н.Д., Гулакова, В.А., Маннова И. Г. (2014). Методика оценки действия оценки действия амилолитических ферментов на нативный крахмал. *Хранение и переработка сельхозсырья*, 4, 14–17.
30. Папахин, А.А., Бородина, З.М. (28–30 октября 2020 года). Действие глюкоамилазы на различные виды крахмала в нативном состоянии. Материалы международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Москва: ООО «Экспобιοхим-технологии», Россия, 2020. <https://doi.org/10.37747/2312-640X-2020-18-284-285>
31. Šárka, E., Dvořáček, V. (2017). Waxy starch as a perspective raw material (a review). *Food Hydrocolloids*, 69, 402–409. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.03.001>
32. Liu, W., Hong, Y., Gu, Z., Cheng, L., Li, Z., Li, C. (2017). In structure and in vitro digestibility of waxy corn starch debranched by pullulanase. *Food Hydrocolloids*, 67, 104–110. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.12.036>
33. Shi, M., Chen, Y., Yu, S., Gao, Q. (2013). Preparation and properties of RS III from waxy maize starch with pullulanase. *Food Hydrocolloids*, 33(1), 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.02.018>

## REFERENCES

1. Raveendran, S., Parameswaran B., Ummalya, S. B., Abraham, A., Mathew, A.K., Madhavan, A. et al. (2018). Applications of microbial enzymes in food industry. *Food Technology and Biotechnology*, 56(1), 16–30. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.01.18.5491>
2. Shinde, V., Deshmukh, S., Bhojar, M.G. (2015). Applications of major enzymes in food industry. *Indian Farmer*, 2(6), 497–502.
3. Hashim, S.O. (2020). Starch-modifying enzymes. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 172, 221–244. [https://doi.org/10.1007/10\\_2019\\_91](https://doi.org/10.1007/10_2019_91)
4. Tester, R.F., Karkalas J., Qi X. (2004). Starch structure and digestibility enzyme-substrate relationship. *World's Poultry Science Journal*, 60(2), 186–195+248+250. <https://doi.org/10.1079/WPS20040014>
5. Klaohanpong, N., Puttanlek, C., Rungsardthong, V., Rungsardthong V., Pancha-arnon, S., Uttapap, D. (2015). Physicochemical and structural properties of debranched waxy rice, waxy corn and waxy potato starches. *Food Hydrocolloids*, 45, 218–226. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.11.010>
6. Hii, S.L., Tan, J.S., Ling, T.C., Ariff, A.B. (2012). Pullulanase: role in starch hydrolysis and potential industrial application. *Enzyme research*, 2012, Article 921362. <https://doi.org/10.1155/2012/921362>
7. Manners, D.J. (1997). Observations of the specificity and nomenclature of starch debranching enzymes. *Journal of Applied Glycoscience*, 44, 83–85.
8. Xia, W., Zhang, K., Su, L., Wu, J. (2021). Microbial starch debranching enzymes: Developments and applications. *Biotechnology Advances*, 50, Article 107786. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107786>
9. Xu, P., Zhang, S.-Y., Luo, Z.-G., Zong, M.-H., Li, X.-X., Lou, W.-Y. (2021). Biotechnology and bioengineering of pullulanase: state of the art and perspectives. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(3), Article 43. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03010-9>
10. Solovyova, S. Yu. (2004). Development of starch bioconversion technology in the production of molasses with various carbohydrate composition. Author's abstract of the dissertation for the scientific degree of Candidate of Technical Sciences. Moscow, MGUPP, 25 p. (In Russian)
11. Li, C., Kong, H., Yang, Q., Gu, Z., Ban, X., Cheng, L. et al. (2020). A temperature-mediated two-step saccharification process enhances maltose yield from high-concentration maltodextrin solutions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(9), 3742–3748. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11005>
12. Xie, A.-J., Lee, D.-J., Lim, S.-T. (2021). Characterization of resistant waxy maize dextrans prepared by simultaneous debranching and crystallization followed by acidic or enzymatic hydrolysis. *Food Hydrocolloids*, 121, Article 106942. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106942>
13. Arp, C. G., Correa, M. J., Ferrero, C. (2020). Production and characterization of type III resistant starch from native wheat starch using thermal and enzymatic modifications. *Food and Bioprocess Technology*, 13(7), 1181–1192. <https://doi.org/10.1007/s11947-020-02470-5>
14. Li, H., Li, J., Xiao, Y., Cui, B., Fang, Y., Guo, L. (2019). In vitro digestibility of rice starch granules modified by  $\beta$ -amylase, transglucosidase and pullulanase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 136, 1228–1236. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.111>
15. Li, P., He, X., Dhital, S., Zhang, B., Huang, Q. (2017). Structural and physicochemical properties of granular starches after treatment with debranching enzyme. *Carbohydrate Polymers*, 169, 351–356. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.04.036>
16. Jung, K.-H., Kim, M.-J., Park, S.-H., Hwang, H.-S., Lee, S., Shim, J.-H. et al. (2013). The effect of granule surface area on hydrolysis of native starches by pullulanase. *Starch – Stärke*, 65(9–10), 848–853. <https://doi.org/10.1002/star.201200226>
17. Hong, Y., Liu, G., Gu, Z. (2015). Preparation and characterization of hydrophilic debranched starch modified by pullulanase on swollen granule starch. *Food Research International*, 67, 212–218. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.020>
18. Xu, R, Xu, D.-H., Xu, H.-H. (2012). Effect of enzymatic hydrolysis on the resistant starch yield. *Italian Journal of Food Science*, 24(4), 367–375.
19. Gao, Q, Li, S., Jian, H., Liang, S. (2011). Preparation and properties of resistant starch from corn starch with enzymes. *African Journal of Biotechnology*, 10(7), 1186–1193.
20. Shi, J., Sweedman, M. C., Shi, Y.-C. (2018). Structural changes and digestibility of waxy maize starch debranched by different levels of pullulanase. *Carbohydrate Polymers*, 194, 350–356. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.04.053>
21. ГОСТ 32159–2013 “Maize starch. General specifications”. — Moscow: Standartinform, 2019. — 12 p. (In Russian)
22. GOST 34440–2018 “Enzyme preparations for food industry. Methods for the determination of amylase activity”. — Moscow: Standartinform, 2018. — 18 p. (In Russian)
23. GOST 7698–93 “Starch. Acceptance rules and methods of analysis”. — Minsk: Publishing House of Standards, 2001. — 43 p. (In Russian)
24. GOST 33917–2016 “Starch syrup. General specifications”. — Moscow: Standartinform, 2017. — 52 p. (In Russian)
25. GOST R50549–93 (ISO 5377–81) “Starch hydrolysis products. Determination of reducing power and dextrose equivalent Lane and Eynon constant titre method”. — Moscow: Publishing House of Standards, 1994. — 11 p. (In Russian)
26. ГОСТ ISO 6647–1–2015 “Rice. Determination of amylose content. Part 1. Reference method”. — Moscow: Standartinform, 2015. — 16 p. (In Russian)

27. Lukin, N.D., Ananskikh, V.V., Lapidus, T.V., Khvorova, L.S. (2007). Technological control of the production of sugary starch products. Moscow: Russian Agricultural Academy. 2007. — 261p. (In Russian)
28. Wasserman, L.A., Papachin, A.A., Borodina, Z.M., Krivandin, A.V., Sergeev, A.I., Tarasov, V.F. (2019). Some physico-chemical and thermodynamic characteristics of maize starches hydrolyzed by glucoamylase. *Carbohydrate Polymers*, 212, 260–269. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.01.096>
29. Papakhin, A.A., Borodina, Z.M., Lukin, N.D., Kulakova, V.A., Manova, I.G. (2014). Assessment methodology of amylolytic enzymes actions on native starch. *Storage and Processing of Farm Products*, 4, 14–17. (In Russian)
30. Papakhin, A.A., Borodina, Z.M. (28–30 Oktober, 2020). *The effect of glucoamylase on various types of starch in the native state*. Proceedings of international congress “Biotechnology: State of the art and perspectives”. Moscow: EXPO-Biohim-Technologies LLC, Russia, 2020. <https://doi.org/10.37747/2312-640X-2020-18-284-285> (In Russian)
31. Šárka, E., Dvořáček, V. (2017). Waxy starch as a perspective raw material (a review). *Food Hydrocolloids*, 69, 402–409. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.03.001>
32. Liu, W., Hong, Y., Gu, Z., Cheng, L., Li, Z., Li, C. (2017). In structure and in vitro digestibility of waxy corn starch debranched by pullulanase. *Food Hydrocolloids*, 67, 104–110. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.12.036>
33. Shi, M., Chen, Y., Yu, S., Gao, Q. (2013). Preparation and properties of RS III from waxy maize starch with pullulanase. *Food Hydrocolloids*, 33(1), 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.02.018>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ	AUTHOR INFORMATION
<b>Принадлежность к организации</b>	<b>Affiliation</b>
<p><b>Папахин Александр Алексеевич</b> — кандидат технических наук, заведующий лабораторией Биотехнологии крахмалопаточного сырья, Всероссийский научно-исследовательский институт крахмалопродуктов 140051, Московская обл., г.о Люберцы, д. п. Красково, ул. Некрасова, д. 11 Тел.: +7-495-557-15-00 E-mail: papahin_aleksandr@mail.ru ORCID: <a href="https://orcid.org/0000-0003-1178-8254">https://orcid.org/0000-0003-1178-8254</a> * автор для контактов</p>	<p><b>Alexander A. Papakhin</b>, Candidate of Technical Sciences, Head of the Laboratory of Biotechnology of starch raw materials, All-Russian Research Institute of Starch Products Nekrasov Str., 11, item Kraskovo, Lyubertsy district, Moscow region, Russia Tel.: +7-495-557-15-00 E-mail: papahin_aleksandr@mail.ru ORCID: <a href="https://orcid.org/0000-0003-1178-8254">https://orcid.org/0000-0003-1178-8254</a> * corresponding author</p>
<p><b>Бородина Зинаида Михайловна</b> — кандидат технических наук, ведущий научный сотрудник, лаборатория Биотехнологии крахмалопаточного сырья, Всероссийский научно-исследовательский институт крахмалопродуктов 140051, Московская обл., г.о Люберцы, д. п. Красково, ул. Некрасова, д. 11 Тел.: +7-495-557-15-00 E-mail: borodina7292@yandex.ru ORCID: <a href="https://orcid.org/0000-0001-9636-1537">https://orcid.org/0000-0001-9636-1537</a></p>	<p><b>Zinaida M. Borodina</b>, Candidate of Technical Sciences, Senior Researcher, Laboratory of Biotechnology of starch raw materials, All-Russian Research Institute of Starch Products Nekrasov Str., 11, item Kraskovo, Lyubertsy district, Moscow region, Russia Tel.: +7-495-557-15-00 E-mail: borodina7292@yandex.ru ORCID: <a href="https://orcid.org/0000-0001-9636-1537">https://orcid.org/0000-0001-9636-1537</a></p>
<b>Критерии авторства</b>	<b>Contribution</b>
Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат	Authors equally relevant to the writing of the manuscript, and equally responsible for plagiarism
<b>Конфликт интересов</b>	<b>Conflict of interest</b>
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов	The authors declare no conflict of interest