

HALINA GAMBUŚ, RAFAŁ ZIOBRO, TOMASZ JANKOWSKI,  
DOROTA GUMUŁ, MIECZYŚLAW PAŁASIŃSKI

## PRÓBA ZASTOSOWANIA PULULANAZY DO OTRZYMYWANIA LINIOWYCH GLUKANÓW ZE SKROBI ZIEMNIACZANEJ

### Streszczenie

W pracy podjęto próbę uzyskania liniowych glukanów przez wytrącenie ich z roztworu skrobi ziemniaczanej w 20% (v/v) DMSO, poddanej działaniu pululanazy zawartej w preparacie handlowym Pulluzyme 750 (ABM Chemicals). Strącanie przebiegało 3-etapowo. Po każdym etapie otrzymywano frakcje hydrolizatu, składające się z glukanów liniowych i rozgałęzionych. W uzyskanych frakcjach oznaczano zawartość liniowych łańcuchów skrobiowych, wielkość cząsteczek, tendencję do retrogradacji oraz przemiany fazowe metodą DSC. Najbardziej interesujące właściwości wykazała frakcja III składająca się głównie z krótkich łańcuchów amylozy i wykazująca największą tendencję do retrogradacji. Znaczna entalpia jej topnienia oraz wysoki zakres temperatury tej przemiany fazowej świadczą o dużym udziale krystalitów amylozowych, charakterystycznych dla skrobi odpornej.

**Słowa kluczowe:** amyloza, pululanaza, retrogradacja, skrobia.

### Wstęp

Skrobia jest jednym z najpowszechniej występujących biopolimerów, a jej właściwości w znacznej mierze zależą od rozkładu mas cząsteczkowych i charakterystyki rozgałęzień [11, 17]. Pozbawione rozgałęzień glukany skrobiowe wydają się szczególnie ciekawe ze względu na ich cechy fizyczne, chemiczne i żywieniowe [22]. W naturalnych skrobiach wysokoamylozowych, jak i w amylozach, występują wiązania  $\alpha$ -1,6-glikozydowe [25, 27], ponieważ podczas biosyntezy skrobi niezbędne jest działanie enzymów rozgałęziających i usuwających rozgałęzienia. Alternatywą produkcji amylozy poprzez wysokoamylozowe mutacje jest stosowanie

---

*Dr hab. inż. H. Gambuś, dr inż. R. Ziobro, dr inż. D. Gumuł, prof. dr hab. M. Pałasiński, Katedra Technologii Wgłowodanów, Akademia Rolnicza, ul. Balicka 122, 30-149 Kraków, prof. dr hab. T. Jankowski Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Akademia Rolnicza, ul. Wojska Polskiego 48, 60-627 Poznań*

enzymów usuwających rozgałęzienia oraz odpowiednich metod oczyszczania powstałych produktów hydrolizy [28].

Skrobia pozbawiona rozgałęzień jest materiałem bardziej jednolitym niż glukany rozgałęzione, jednak wpływ długości łańcuchów skrobiowych na jej właściwości jest bardzo duży. W praktycznym zastosowaniu otrzymywanych w ten sposób preparatów wykorzystuje się łatwość retrogradacji, jakiej podlegają nierozgałęzione glukany skrobiowe [8]. Zretrogradowana skrobia zaliczana jest bowiem do skrobi opornych i może służyć jako składnik wielu produktów dietetycznych [4].

Pomimo korzystnych efektów żywieniowych, jakie wywiera skrobia oporna, tendencja do retrogradacji oraz słaba rozpuszczalność liniowych cząsteczek skrobiowych ogranicza zakres wykorzystania skrobi pozbawionej rozgałęzień i powoduje, że do zastosowań w technologii żywności i chemii powinna być ona modyfikowana, podobnie jak to ma miejsce w przypadku amylozy [30]. Takie preparaty mogą z powodzeniem służyć do tworzenia jadalnych błonek lub mikrokapsulek różnego rodzaju związków chemicznych [12]. Skrobia pozbawiona rozgałęzień może być także stosowana do celów analitycznych. Przykładem jest wykorzystanie jej jako wzorca do kalibracji mas cząsteczkowych w chromatografii żelowej [3].

W poprzednim etapie badań opracowano sposób hydrolizy skrobi ziemniaczanej przy zastosowaniu preparatu Pulluzyme 750 L w celu wydzielenia z niej długich łańcuchów amylozowych [13]. Wstępnie użyta metoda rozdziału glukanów skrobiowych w kolumnie chromatograficznej nie pozwoliła jednak na uzyskanie wystarczającej liczby próbek do celów praktycznych.

Celem podjętych badań było zaproponowanie nowej metody uzyskiwania hydrolizatów skrobi ziemniaczanej pozbawionych rozgałęzień.

### **Materiał i metody badań**

Na podstawie danych literaturowych o możliwości rozdziału glukanów przez samoczynne wytrącanie z roztworu [31], podjęto próbę uzyskiwania liniowych glukanów przez ich wytrącanie z roztworu skrobi w 20% DMSO poddanej działaniu pululanazy. Proces ten przebiegał 3-etapowo, przy czym ostatnią frakcję uzyskano przez wytrącanie amylozy butanolem-1. W otrzymanych frakcjach oznaczano zawartość liniowych łańcuchów skrobiowych, wielkość cząsteczek, podatność na retrogradację i przemianę fazową metodą DSC.

W celu uzyskania możliwie największej liczby liniowych produktów hydrolizy, 40 g handlowej skrobi ziemniaczanej (Superior) zadawano 400 cm<sup>3</sup> DMSO przy ciągłym mieszaniu mieszadłem magnetycznym przy 200 obr./min, uzyskując jednolitą zawiesinę, którą ogrzewano do temp. 70°C i w tej temperaturze przetrzymywano 24 h. Powstały roztwór przenoszono ilościowo do kolby i dopełniano do objętości 2 dm<sup>3</sup>

0,1M buforem octanowym o pH 5. Całość podgrzewano do temp. 70°C w dalszym ciągu mieszając. Po 24 h roztwór ochładzano do temp. 50°C i w tej temperaturze prowadono przez 72 h hydrolizę z dodatkiem 1 cm<sup>3</sup> preparatu Pulluzyme 750 (ABM Chemicals, Anglia). Po tym czasie proces przerywano, roztwór chłodzono do temp. 20 ±2°C i umieszczano w chłodziarce do wytrącenia pierwszej frakcji produktów hydrolizy. Po 48 h powstały osad odwirowywano w ciągu 10 min przy 4000 obr./min (wirówka MPW 341) i przemywano go dwukrotnie 96% etanolem, odwirowując przez 5 min po każdym przemyciu. Zbierano osad I z naczynka wirówkowego i suszono 24 h w temp. 20 ±2°C, po czym rozdrabniano w młynku uzyskując frakcję I. Otrzymany po odwirowaniu frakcji I supernatant pozostawiano na 120 h w chłodziarce do dalszego strącenia osadu (frakcja II) o przewidywanym innym składzie jakościowym. Dalsze postępowanie z uzyskanym osadem przebiegało analogicznie jak przy frakcji I. Supernatant II, otrzymany po odwirowaniu frakcji II, podgrzewano do temp. 70°C i w tych warunkach, zadawano butanolem-1 przy ciągłym mieszaniu w celu utworzenia kompleksu amylozowo-butanolowego. Ogrzewanie w tej temperaturze prowadzono 1 h, po czym roztwór stopniowo schładzano do około 20°C i umieszczano go na 48-72 h w chłodziarce, do wytrącenia się kompleksu amylozowo-butanolowego. Z kolei odwirowywano osad III i stosując podobną procedurę jak w przypadku osadu I i II, uzyskiwano frakcję III. Otrzymane frakcje II i III suszono podobnie jak frakcję I, ważono i przechowywano do dalszych analiz.

Zawartość amylozy w skrobi i poszczególnych frakcjach określano metodą Morrisona i Laigneleta [16].

Analizę chromatograficzną prowadzono przy zastosowaniu chromatografii żelowej (GPC). Zestaw do badań składał się z 4 kolumn o średnicy 16 mm i długościach : 35, 88, 88 oraz 86 cm, wypełnionych Sephacrylem (Pharmacia) odpowiednio S-200, S-200, S-500 i S-1000. Standardem były pululany (Shodex Standard, Macherey - Nagel) w ilości po 5 mg P – 10, 50, 200 i 800, o masach cząsteczkowych odpowiednio 122·10<sup>2</sup>, 48·10<sup>3</sup>, 186·10<sup>3</sup> i 853·10<sup>3</sup> Da. Wymienione standardy rozpuszczano w 2,5 cm<sup>3</sup> wody destylowanej i nanoszono na kolumny [20]. Analizę chromatograficzną próbek skrobi ziemniaczanej i frakcji I-III prowadzono w temp. 20 ±2°C, po naniesieniu na kolumnę 50 mg naważki rozpuszczonej w 4 cm<sup>3</sup> DMSO, stosując jako eluent 0,005M roztwór Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> o szybkości przepływu średnio 16,5 cm<sup>3</sup>/h. Z kolumn eluent przepływał przez detektor refraktometryczny do kolektora, gdzie był rozdzielany na 130 frakcji o objętości 5 cm<sup>3</sup>.

Analiza frakcji uzyskanych po rozdziale chromatograficznym obejmowała oznaczanie zawartości sumy węglowodanów metodą antronową [15], pomiar absorbancji kompleksu jodowo-skrobiowego przy długościach fali 525 nm i 640 nm [20] oraz oznaczanie zawartości amylozy [5]. Na podstawie uzyskanych rozkładów wyliczano wagowo średnie masy cząsteczkowe.

Proces kleikowania badano metodą różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC) według metodyki Fredrikssona i wsp. [4] z modyfikacją własną. Oznaczenie prowadzono w różnicowym kalorymetrze skaningowym firmy Shimadzu. Do aluminiowego naczynka odważano 5 mg skrobi (w przeliczeniu na suchą substancję) oraz wodę w stosunku ilościowym 1: 2, po czym mieszano oba komponenty cienką igłą w celu uzyskania jednolitej mieszaniny. Następnie naczynko hermetycznie zamykano i pozostawiano na 2 h w celu hydratacji skrobi. Po tym czasie umieszczano je w kalorymetrze i ogrzewano od temp. 20 do 180°C z szybkością 10°C/min. Próbką odniesienia było puste naczynko o tych samych parametrach geometrycznych i materiałowych. Z otrzymanych termogramów odczytywano charakterystyczne dla procesu kleikowania następujące temperatury: początku kleikowania –  $T_o$ , maksimum piku –  $T_m$  i końca przemiany –  $T_f$  oraz wyznaczano entalpię kleikowania –  $\Delta H$ .

Stopień retrogradacji skrobi oznaczano metodą Whistlera [29] zmodyfikowaną przez Gambuś [5]. Dodatkowo przeprowadzano badania endotermicznych przemian zretrogradowanej skrobi przy zastosowaniu DSC zgodnie z metodyką Sieverta i Würscha [23]. Hermetycznie zamknięte naczynka aluminiowe z żelem skrobiowym utworzonym podczas przechowywania kleików skrobiowych schładzano do temp. 8°C i przechowywano w tej temperaturze przez 24, 48 i 168 h. Po określonym czasie naczynka ponownie umieszczano w kalorymetrze i ogrzewano od temp. 20 do 180°C z szybkością ogrzewania 10°C/min. Z uzyskanych termogramów odczytywano następujące temperatury: początku topnienia krystalitów skrobiowych –  $T_o$ , maksimum piku przemiany –  $T_m$ , końca przemiany –  $T_f$ . Analogicznie do procesu kleikowania wyznaczano także entalpię topnienia krystalitów w żelu skrobiowym –  $\Delta H$ .

## Wyniki i dyskusja

W naturalnej (wyjściowej) skrobi ziemniaczanej oznaczono 28% amylozy (tab. 1) i 29% metodą GPC (rys. 1b). W związku z przewagą amylopektyny stopień retrogradacji 1% kleików tej skrobi był ograniczony zarówno stężeniem amylozy, jak i długością jej łańcuchów (rys. 1b) [19]. Niezależnie od temperatury przechowywania kleików, po 48 h pozostał on na takim samym poziomie jak po pierwszej, tzn. około 3% skrobi uległo retrogradacji w temp. 20°C i około 6% zretrogradowało w temp. 8°C (tab. 1). We wczesnym stadium przechowywania retrograduje głównie amyloza [14], dlatego też należy przypuszczać, że wyraźny wzrost retrogradacji po 168 h w temp. 8°C (tab. 1) jest wynikiem wspólnej rekrytalizacji amylozy i bocznych łańcuchów amylopektyny [18, 24].

Podczas kleikowania wyjściowej skrobi ziemniaczanej oznaczono dosyć wąski zakres temperatury tej przemiany cieplnej od 63,3 do 79,4°C (przy różnicy temperatur  $\Delta T = 16,1^\circ\text{C}$ ) (tab. 2), co świadczy o podobnej strukturze rejonów krystalicznych [4] w tej skrobi. Zarówno wysoka temperatura początku kleikowania, jak i duża entalpia tego

procesu (17,6 J/g) dowodzą dużej krystaliczności skrobi, spowodowanej krystalicznością amylopektyny. Jak bowiem twierdzą Tester i Morrison [26], entalpia kleikowania ( $\Delta H$ ) jest miarą całkowitej krystaliczności amylopektyny, czyli miarą ilości i jakości krystalitów skrobi.

Tabela 1

Wyniki pomiarów kompleksu jodowo-skrobiowego przy długości fali 635 nm oraz stopnia retrogradacji [%] 1% wodnych kleików skrobi ziemniaczanej i uzyskanych z niej frakcji.

Measuring results of the iodine-starch complex at a wave length of 635 nm and of the retrogradation degree [%] of 1% water pastes of potato starch and of the fractions obtained from potato this starch.

Nazwa próbki Sample	Zawartość amylozy Amylose content [%]	Czas przechowywania Storage duration [h]	20°C	8°C	-20°C	Stopień retrogradacji Retrogradation degree [%]		
			Ekstynkcja / Extinction			20°C	8°C	-20°C
Skrobia ziemniaczana Potato starch	28	1	1,2267					
		24	1,1882	1,1518	0,8551	3,1	6,1	30,3
		48	1,1882	1,1470		3,1	6,5	
		168	1,1875	0,9556		3,2	22,1	
Fracja I Fraction I	33	1	1,1297					
		24	1,0134	0,7805	0,0251	10	31	98
		48	1,0058	0,7183		11	36	
		168	0,8548	0,4477		24	60	
Fracja II Fraction II	21	1	0,8018					
		24	0,7594	0,7726	0,0309	5,3	3,5	96,1
		48	0,7636	0,7688		5,3	4,9	
		168	0,7187	0,6874		6,3	14,3	
Fracja III Fraction III	62	1	1,1956					
		24	0,1777	0,0633	0,0334	85	95	97
		48	0,0941	0,0215		92	98	
		168	0,0514	0,0084		96	99	

W naturalnej skrobi uporządkowanie molekularne w tworzeniu podwójnej helisy jest znacznie większe niż uporządkowanie krystalitów [6], dlatego entalpia kleikowania odzwierciedla głównie stratę uporządkowania podwójnej helisy [1]. W warunkach, w jakich badano proces retrogradacji w różnicowym kalorymetrze skaningowym, tj. przy wzroście temp. od 20 do 180°C była odwracalna tylko retrogradacja amylopektyny [7], a duże agregaty utworzone z cząsteczek amylozy i amylopektyny były termicznie bardziej labilne niż agregaty z samej amylozy [10]. Oznaczona niewielka entalpia topnienia po 24 h ( $\Delta H = 1,72$  J/g) i o 13°C niższa temperatura początku tej przemiany

cieplnej, w porównaniu z temperaturą początku kleikowania (tab. 2 i 3), świadczą o topnieniu takich właśnie krystalitów, utworzonych głównie z bocznych odgałęzień amylopektyny, a nie z długich łańcuchów amylozy ziemniaczanej (o wagowo średniej masie cząsteczkowej  $3,38 \cdot 10^6$  g/mol) (rys. 1a), która w dalszym ciągu nie wytrąciła się z roztworu i tworzyła kompleks z jodem (tab. 1), a więc w bardzo małym stopniu uległa procesowi rekrytalizacji.

Tabela 2

Wyniki pomiarów entalpii kleikowania oraz temperatur charakterystycznych dla tej przemiany, wyznaczone metodą DSC, naturalnej skrobi ziemniaczanej i uzyskanych z niej frakcji.

Enthalpy of gelatinisation and phase transition temperatures for natural potato starch and obtained fractions, acquired by DSC

Nazwa próbki Sample	Kleikowanie / Gelatinisation			
	T <sub>o</sub> [°C]	T <sub>m</sub> [°C]	T <sub>f</sub> [°C]	ΔH [J/g s.s.]
Skrobia naturalna Native starch	63,3	67,8	79,4	17,6
Fracja I Fraction I	46,6	68,7	78,1	4,5
Fracja II Fraction II	47,4	61,4	74,1	4,8
Fracja III Fraction III	W warunkach pomiaru ΔH < 1 [J/g s.s.] Under applied conditions ΔH < 1 [J/g s.s.]			

Natomiast stwierdzono wyraźną zmianę entalpii topnienia po 168 h, gdyż postępowała retrogradacja amylopektyny, która jest procesem długotrwałym [14, 19], a dodatkowo było możliwe oznaczenie topnienia krystalitów utworzonych przez samą amylozę (tab. 3).

We frakcji I, uzyskanej przez samorzutne wytrącenie się z roztworu łańcuchów skrobiowych po działaniu enzymu pululanazy, oznaczono średnio około 34% amylozy, zarówno przez zastosowanie metody GPC (rys. 2b), jak i tradycyjnej metody barwienia z jodem (tab. 3). Zgodność wyników badań przy stosowaniu obu tych metod sygnalizowano już w pracach wcześniejszych [4, 9]. Większe o 6% stężenie amylozy we frakcji I w porównaniu z jej zawartością w wyjściowej skrobi ziemniaczanej miało wpływ na większy stopień retrogradacji już po 24 h przechowywania kleików w temp. 20 i -20°C. Godnym wytłumaczenia wydaje się fakt oznaczenia niewielkiej ilości amylozy (34%) w osadzie, który najszybciej spontanicznie wytrącił się z roztworu, tj. po 48 h przechowywania hydrolizatu w chłodziarce, w temp. 8°C. Najbardziej

prawdopodobnym wyjaśnieniem tego zjawiska jest niecałkowite usunięcie rozgałęzień w cząsteczkach skrobi przez enzym pululanazę.

Tabela 3

Wyniki pomiarów entalpii rekrytalizacji skrobi ziemniaczanej i uzyskanych frakcji oraz temperatur charakterystycznych dla tej przemiany metodą DSC.

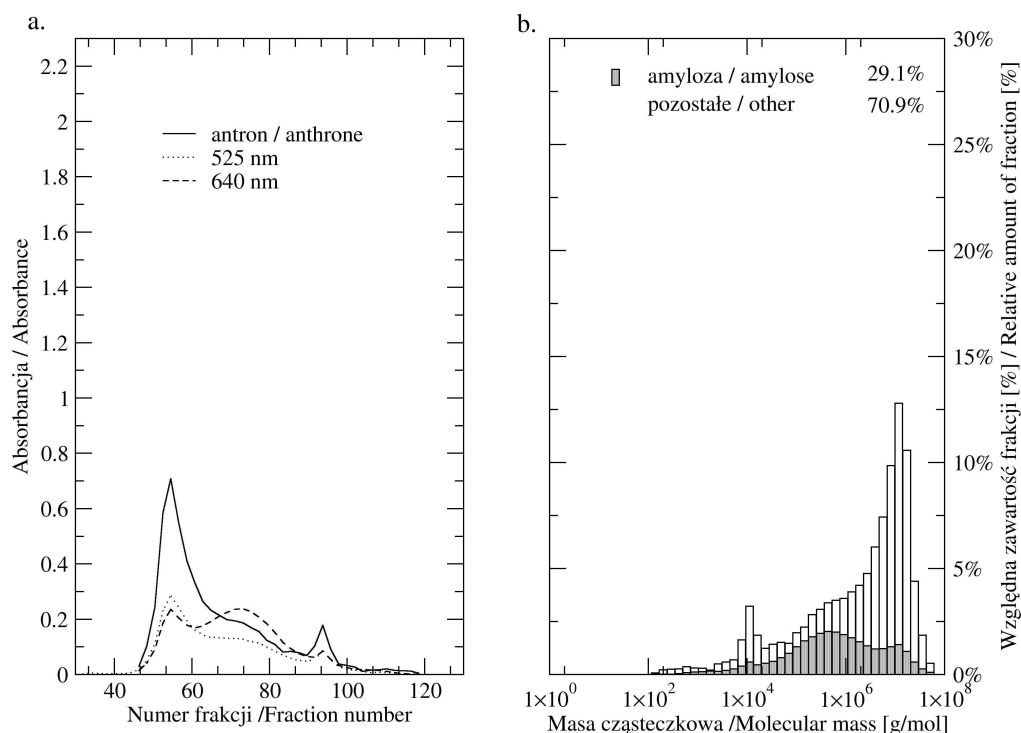
Enthalpy of melting and phase transition temperatures for recrystallised natural potato starch and fractions, acquired by DSC.

Nazwa próbki Sample	Retrogradacja / Retrogradation											
	24 h				48 h				168 h			
	T <sub>o</sub> [°C]	T <sub>m</sub> [°C]	T <sub>f</sub> [°C]	ΔH [J/g s.s.]	T <sub>o</sub> [°C]	T <sub>m</sub> [°C]	T <sub>f</sub> [°C]	ΔH [J/g s.s.]	T <sub>o</sub> [°C]	T <sub>m</sub> [°C]	T <sub>f</sub> [°C]	ΔH [J/g s.s.]
Skrobia ziemniaczana Potato starch	50,2	59,1	70,5	1,72	34,8	57,1	77,4	6,73	36,9	55,4	82,5	9,72
									163,5	168	172	0,55
Frakcja I Fraction I	111,2	124,6	133,3	1,20	97,1	123,2	136,6	3,44	105,7	124,7	137,1	4,68
Frakcja II Fraction II	35,7	51,5	79,3	4,97	38,6	51,4	79,7	5,07	37,8	49,7	76,6	5,59
Frakcja III Fraction III	119,6	134,6	150,2	16,9	119,1	133,1	153,6	17,9	127	128	147	18,8

Niektóre fragmenty amylopektyny zmniejszyły się do rozmiarów łańcuchów amylozy, której wagowo średnia masa cząsteczkowa wynosiła  $1,41 \cdot 10^4$  g/mol, a wagowo średnia masa cząsteczkowa amylopektyny zmniejszyła się z  $8,42 \cdot 10^6$  g/mol w skrobi naturalnej do  $2,84 \cdot 10^6$  g/mol we frakcji I (rys. 2). Ze względu więc na większą ruchliwość związaną z małymi rozmiarami, fragmenty te mogły szybciej utworzyć zarodki krystalizacji czy też podwójne helisy z cząsteczkami amylozy i razem z nią wytrącić się z roztworu [32]. Oznaczona przy użyciu GPC niewielka wagowo średnia masa cząsteczkowa tej frakcji ( $2,34 \cdot 10^4$  g/mol), jak i niewielka masa cząsteczkowa zawartej w niej amylopektyny ( $2,84 \cdot 10^4$  g/mol) w pełni przemawiają za tą hipotezą (rys. 2b).



Badając proces kleikowania glukanów zawartych we frakcji I metodą DSC, określono znacznie niższą temperaturę początku kleikowania, jak i szerszy zakres temperatury tej przemiany ( $31,4^{\circ}\text{C}$ ) oraz czterokrotnie mniejszą entalpię kleikowania ( $\Delta H = 4,5 \text{ J/g}$ ) niż w wyjściowej skrobi naturalnej (tab. 2), co świadczy o mniejszej całkowitej krystaliczności tej frakcji [26] i niejednorodności rejonów krystalicznych [4].



Rys. 1a. Suma cukrów oraz zdolność wiązania jodu przez frakcje skrobi ziemniaczanej uzyskane po rozdziale w kolumnach chromatograficznych GPC.

Fig. 1a. The amount of total carbohydrates and the ability of potato starch fractions, obtained from native potato starch using GPC, to bind iodine.

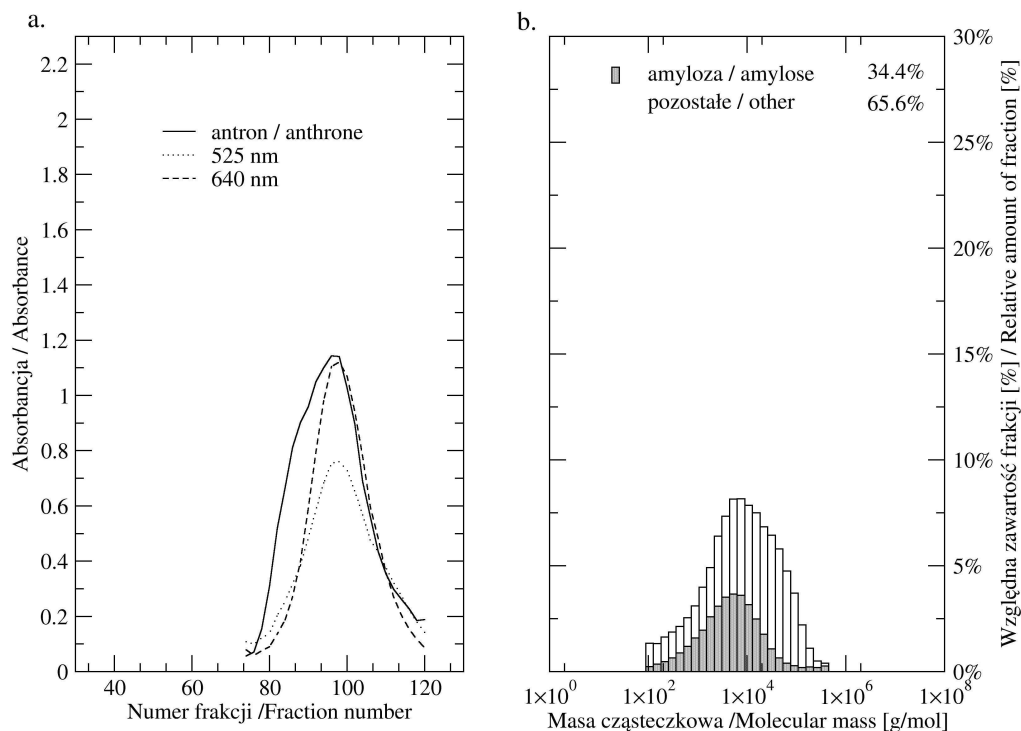
Rys. 1b. Rozkład mas cząsteczkowych amylozy i rozgałęzionych glukanów skrobi ziemniaczanej.

Fig. 1b. The molecular weight distribution of amylose and branched glucans present in native potato starch.

Jak już wcześniej zaobserwowali Fredriksson i wsp. [4], wielkość entalpii kleikowania skrobi jest ściśle skorelowana z wielkością entalpii jej retrogradacji. Zgodnie z powyższymi obserwacjami entalpia topnienia, podobnie jak entalpia kleikowania krystalitów utworzonych z cząsteczek skrobi we frakcji I, były mniejsze w porównaniu ze skrobią wyjściową, niezależnie od czasu przechowywania żelu (tab. 3). Jednak w miarę upływu czasu jego przechowywania entalpia topnienia ( $\Delta H$ ) wzrastała,



co świadczy o postępującym procesie rekrytalizacji żelu. Obserwowana przemiana fazowa dotyczyła głównie krystalitów utworzonych przez rekrytalizację łańcuchów amylozy, czego dowodzi wysoka, powyżej 100°C, temperatura początku tej przemiany (tab. 3).



Rys. 2a. Suma cukrów oraz zdolność wiązania jodu przez glukany skrobiowe zawarte we frakcji I uzyskane po rozdziale w kolumnach chromatograficznych GPC.

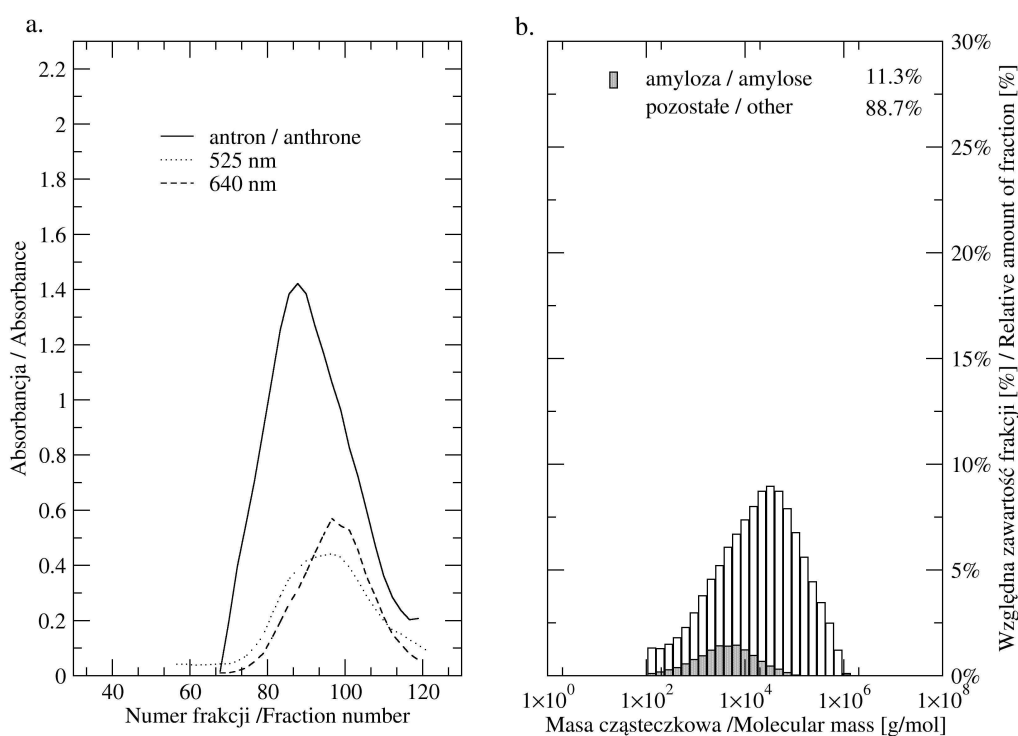
Fig. 2a. The amount of total carbohydrates and the ability of starch glucans in fraction I, obtained using GPC, to bind iodine.

Rys. 2b. Rozkład mas cząsteczkowych amylozy i rozgałęzionych glukanów skrobi zawartej we frakcji I.

Fig. 2b. The molecular weight distribution of amylose and branched glucans present in fraction I.

We frakcji II oznaczono tylko około 20% amylozy metodą klasyczną (tab.1) i około 11% metodą GPC (rys. 3a), a więc znacznie mniej niż w skrobi wyjściowej. Osad ten otrzymano przez spontaniczne wytrącenie się cząsteczek z hydrolizatu po 96 h przechowywaniu go w temp. 8°C i wcześniejszym usunięciu frakcji I. Były to głównie duże fragmenty amylopektyny powstałe w wyniku działania pululanazy, o wagowo średniej masie cząsteczkowej  $7,9 \cdot 10^4$  g/mol (rys. 3b), a więc mniejsze od amylopektyny skrobi wyjściowej, ale większe od fragmentów amylopektyny zawartych we frakcji pierwszej (I). Na skutek większych rozmiarów i mniejszej ruchliwości cząsteczki te znacznie wolniej mogły tworzyć ośrodki krystalizacji, a tym samym

wytrącać się z roztworu [19, 32]. Z tych samych powodów w temp. 20°C nawet po 168 h przechowywania oznaczono niewielki stopień retrogradacji (3 lub 6%) (tab. 1), który zwiększył się wprawdzie w temp. 8°C, ale i tak pozostał kilkakrotnie mniejszy w porównaniu z retrogradacją glukanów zawartych we frakcji I (tab. 1). Sądząc z procesu kleikowania tej frakcji (tab. 2), jej całkowita krystaliczność związana z przewagą cząsteczek amylopektyny [26] była zbliżona do krystaliczności frakcji I (tab. 1). Inaczej natomiast następowała rekrytalizacja obu tych frakcji, gdyż zakres temperatury topnienia krystalitów powstających podczas retrogradacji frakcji I był typowy dla amylozy, zaś w przypadku frakcji II charakterystyczny dla amylopektyny. Również entalpia retrogradacji, czyli topnienia krystalitów powstałych z udziałem cząsteczek amylopektyny (tab. 3) odbiegała od oznaczonej w przypadku frakcji I.



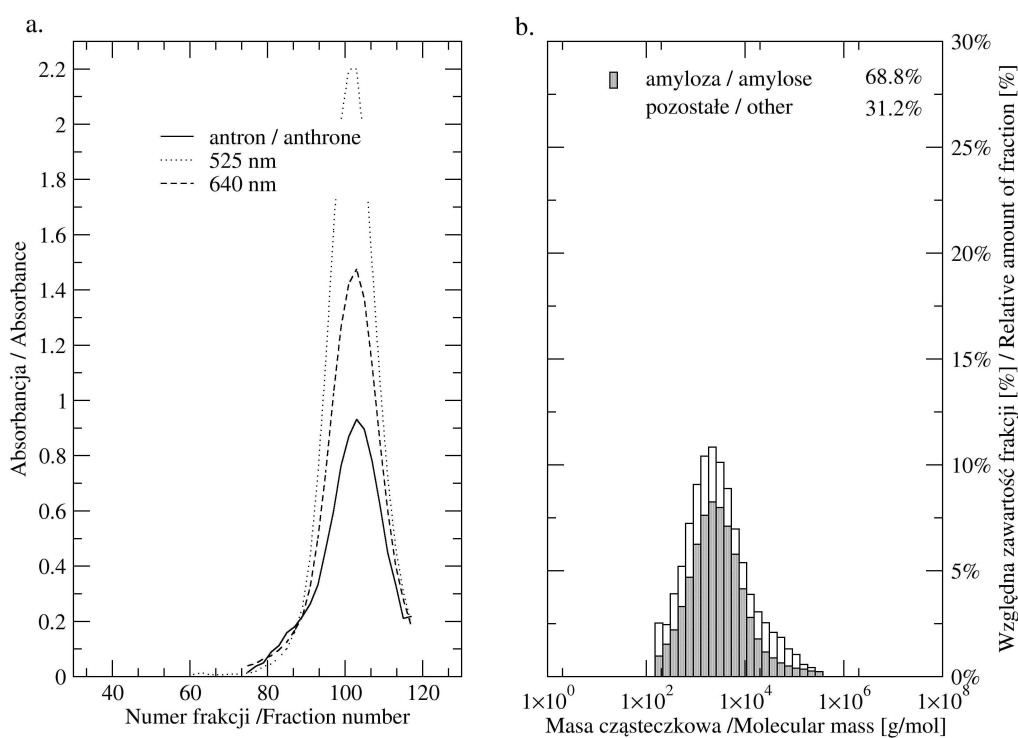
Rys. 3a. Suma cukrów oraz zdolność wiązania jodu przez glukany skrobiowe zawarte we frakcji II uzyskane po rozdiale w kolumnach chromatograficznych GPC.

Fig. 3a. The amount of total carbohydrates and the ability of starch glucans in fraction II, obtained using GPC, to bind iodine.

Rys. 3b. Rozkład mas cząsteczkowych amylozy i rozgałęzionych glukanów skrobi zawartej we frakcji II.

Fig. 3b. The molecular weight distribution of amylose and branched glucans present in fraction II.

Frakcję III otrzymano poprzez strącenie butanolem najkrótszych łańcuchów amylozy, powstałych prawdopodobnie w wyniku działania  $\alpha$ -amylazy, którą był zanieczyszczony preparat pullulanazy [13]. Osad ten zawierał więc głównie liniowe glukany, o czym świadczy oznaczona w nim zawartość amylozy na poziomie 60%, o wagowo średniej masie cząsteczkowej  $8,79 \cdot 10^3$  g/mol (rys. 4b). Jak wynika z rysunku, we frakcji III oznaczono jeszcze około 30% glukanów, które nie tworzyły barwnego kompleksu z jodem, a ich średnia wagowo masa cząsteczkowa była większa niż liniowych łańcuchów i wynosiła  $1,36 \cdot 10^4$  g/mol.



Rys. 4a. Suma cukrów oraz zdolność wiązania jodu przez glukany skrobiowe zawarte we frakcji III uzyskane po rozdiale w kolumnach chromatograficznych GPC.

Fig. 4a. The amount of total carbohydrates and the ability of starch glucans in fraction III, obtained using GPC, to bind iodine.

Rys. 4b. Rozkład mas cząsteczkowych amylozy i rozgałęzionych glukanów skrobi zawartej we frakcji III.

Fig. 4b. The molecular weight distribution of amylose and branched glucans present in fraction III.

Strącanie liniowych łańcuchów butanolem trwało kilkadziesiąt godzin, stąd w tym czasie mogła zachodzić współkryształizacja rozgałęzionych fragmentów amylopektyny, które pozostały w supernatancie po sedymentacji frakcji II. Te zretrogradowane

fragmenty zostały odwirowane razem z kompleksami amylozowo-butanolowymi, tworząc w rezultacie niejednorodną frakcję III.

Ze względu na to, że całkowite zdyspergowanie łańcuchów amylozy lub skrobi wysokoamylozowych w wodzie wymaga temp. powyżej 150°C, w warunkach stosowanej do oznaczania stopnia retrogradacji metody Whistlera [29] rozpuszczenie frakcji III nie było możliwe, dlatego też zastosowano po autoklawie dodatkowe ogrzewanie suspensji przez 2 h w łaźni olejowej, w temp. 160°C. Sposób ten umożliwił częściowe rozpuszczenie cząsteczek glukanów zawartych w tej frakcji i oznaczenie stopnia retrogradacji uzyskanych kleików (tab. 1). Zgodnie z oczekiwaniami uległy one znacznej rekrytalizacji, bo aż w 80%, już po 24 h przechowywania tych kleików w temp. 20°C, a po 168 h w tej temperaturze jej wartość zwiększyła się do ponad 90%. W niższej temp. (8°C) stopień retrogradacji był jeszcze większy i po 24 h przekraczał 90%.

Oznaczona entalpia kleikowania wynosiła poniżej 1 J/g, co spowodowane było szczególnie wysoką zawartością amylozy, niedającej endotermy w badanym zakresie temperatur. Frakcja ta może być więc uznana za zretrogradowaną amylozę, bardzo trudno rozpuszczalną w wodzie nawet podczas gotowania, a zatem za rodzaj skrobi odpornej [2]. Temperatury topnienia krystalitów amylozowych obecnych we frakcji III były wyższe niż w przypadku frakcji I, a entalpia tej przemiany kilkakrotnie przewyższała wartości uzyskane w odniesieniu do pozostałych próbek i nie ulegała znaczącym zmianom podczas przechowywania, co oznacza że jest to preparat o dużym udziale struktur krystalicznych. Następowoło jednak pewne porządkowanie się tych struktur, o czym świadczy zawężenie zakresu temperatur przemiany fazowej  $\Delta T=20^\circ\text{C}$  po 168 h przechowywania w temp. 8°C (tab. 3).

Preparaty tego rodzaju znajdują zastosowanie jako środki poprawiające wartość dietetyczną produktów spożywczych, gdyż lepiej niż błonnik pokarmowy spełniają funkcje fizjologiczne w przewodzie pokarmowym człowieka [21]. W związku z tym, spośród trzech uzyskanych frakcji hydrolizatów, frakcja III wykazała najbardziej interesujące właściwości, sugerujące możliwości jej praktycznego zastosowania, a także inspirujące do dalszych badań nad jej składem i strukturą.

## Wnioski

1. Hydroliza skrobi ziemniaczanej preparatem Pulluzyme 750 nie spowodowała całkowitego usunięcia rozgałęzień z cząsteczek amylopektyny, co w połączeniu z działaniem  $\alpha$ -amylazy zawartej w tym preparacie doprowadziło do uzyskania trzech frakcji hydrolizatów, które różniły się wagowo średnią masą cząsteczkową, stopniem i entalpią retrogradacji oraz endotermami przejść fazowych.
2. Najbardziej interesujące właściwości funkcjonalne wykazała frakcja III, w największym stopniu ulegająca retrogradacji, o dużym udziale krystalitów

amylozowych, znacznej entalpii i wysokich zakresach temperatury topnienia, czyli cechach charakterystycznych dla skrobi odpornej.

*Praca wykonana w ramach grantu PBZ/KBN/021/P06/99/03.*

### Literatura

- [1] Cooke, D., Gidley, J.: Loss of crystalline and molecular order during starch gelatinization, origin of the enthalpic transition. *Carbohydrate Res.*, 1992, **277**, 550-561.
- [2] Eerlingen, R., Deceuninck, M., Delcour, J.: Enzyme-resistant starch. II. Influence of amylose chain length on resistant starch formation. *Cereal Chem.*, 1993, **70** (3), 345-350.
- [3] Fredriksson, H., Andersson, R., Koch, K., Aman, P.: Calibration of a size-exclusion chromatography system using fractions with defined amylopectin unit chains. *J. Chromatography A*, 1997, **768**, 325-328.
- [4] Fredriksson, H., Silverio, H., Andersson, R., Eliasson, R., Aman, P.: The influence of amylose and amylopectin characteristics on gelatinization and retrogradation properties of different starches. *Carbohydr. Polym.*, 1998, **35**, 119-134.
- [5] Gambuś, H.: Wpływ fizyczno-chemicznych właściwości skrobi na jakość i starzenie się pieczywa (badania modelowe). *Zesz. Nauk. AR Kraków*, 1997, Rozprawy **226**.
- [6] Gidley, M.: Quantification of the structural features of starch polysaccharides by NMR spectroscopy. *Carbohydrate Res.*, 1985, **139**, 85-93.
- [7] Gudmundsson, M., Eliasson, A.: Retrogradation of amylopectin and the effect of amylose and added surfactants/emulsifiers. *Carbohydrate Polym.*, 1995, **13**, 295-315.
- [8] Guraya, H., James, C., Champagne, E.: Evaluation of debranched rice starch sample preparation methods for anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detector. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 2001, **24** (15), 2303-2314.
- [9] Kalichevsky, M., Oxford, P., Ring, S.: The retrogradation and gelation of amylopectin from various botanical sources. *Carbohydr. Res.*, 1990, **198**, 49-55.
- [10] Klucinec, J., Thompson, D.: Amylose and amylopectin interact in retrogradation of dispersed high-amylose starches. *Cereal Chem.*, 1999, **76** (2), 282-291.
- [11] Kortsee, A., Suurs, L., Vermeesch, A., Keetels, C., Jacobsen, E., Visser, R.: The influence of an increased degree of branching on the physico-chemical properties of starch from genetically modified potato. *Carbohydr. Polym.*, 1998, **37**, 173-184.
- [12] Kubik, S., Wulff, G.: Characterization and chemical modification of amylose complexes. *Starch*, 1993, **45** (6), 220-225.
- [13] Kujawski, M., Ziobro, R., Gambuś, H.: Preparation of unbranched glucans by hydrolysis of starch of various botanical origin with pullulanase. *EJPAU*, 2003, **6** (2), series: 'Food Science and Technology'.
- [14] Matsukura, V., Matsunaga, A., Kainuma, K.: Structural studies on retrograded normal waxy corn starches. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, 1983, **30**, 106-111.
- [15] Morris, D.: Quantitative determination of carbohydrates with dreywoods anthrone reagent. *Science*, 1948, **107**, 254-255.

- [16] Morrison, W., Laignelet, B.: An improved colorimetric procedure for determining apparent and total amylose in cereal and other starches. *J. Cereal Sci.*, 1983, **1**, 9-20.
- [17] Mua, J. P., Jackson, D. S.: Relationships between functional attributes and molecular structures of amylose and amylopectin fractions from cornstarch. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, **45**, 3848-3854.
- [18] Mua, J. P., Jackson, D. S.: Retrogradation and gel textural attributes of cornstarch amylose and amylopectin fractions. *J. Cereal Sci.*, 1998, **27**, 157-166.
- [19] Pfannemueller, B.: Struktura i właściwości skrobi. W: *Materiały IV Letniej Szkoły Skrobiowej – Problemy modyfikacji skrobi*, Oddz. Małopolski PTTŻ, Zawoja, 1992, 63-78.
- [20] Praznik, W., Smidt, S., Ebermann, R.: Gelchromatographische Untersuchungen an hydrolytisch abgebauten Amylosen. *Starch/Stärke*, 1983, **35**, 58-61.
- [21] Puupponen-Pimia, R., Aura, A., Oksman-Caldentey, K., Myllarinen, P., Saarela, M., Malttila-Sandholm, T., Poutanen, K.: Development of functional ingredients for gut health. *Trends Food Sci. Technol.*, 2002, **13**, 3-11.
- [22] Richardson, P., Jeffcoat, R., Shi, Y.-C.: High amylose starches: from biosynthesis to their use as food ingredients. *MRS Bulletin*, 2000, **31**, 20-24.
- [23] Sievert, D., Wuersch, P.: Amylose chain association based on differential scanning calorimetry. *Food Sci.*, 1993, **58**, 1332-1334.
- [24] Silverio, J., Fredriksson, H., Andersson, R., Eliasson, A., Aman, P.: The effect of temperature cycling on the amylopectin retrogradation of starches with different amylopectin unit-chain length distribution. *Carbohydr. Polym.*, 2000, **42**, 175-184.
- [25] Slattery, C., Kavakli, I. H., Okita, T.: Engineering starch for increased quantity and quality. *Trends Plant Sci.*, 2000, **5** (7), 291-298.
- [26] Tester, R., Morrison, W.: Swelling and gelatinization of cereal starches. II. Waxy rice starches. *Cereal Chem.*, 1990, **67**, 205-212.
- [27] Van de Wal, M., D'Hulst, C., Vincken, J.-P., Buleon, A., Visse, R., Ball, S.: Amylose is synthesized in vitro by extension of and cleavage from amylopectin. *J. Biol. Chem.*, 1998, **273** (35), 22232-22240.
- [28] Vorweg, W., Radosta, S.: Study of a preparative-scale process for the production of amylose. *Carbohydr. Polym.*, 2002, **47**, 181-189.
- [29] Whistler, R., Wolfrom, M.: Analysis and preparation of sugars. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 1962, **1**, 386-388.
- [30] Wulff, G., Steinert, A., Hoeller, O.: Modification of amylose and investigation of its inclusion behavior. *Carbohydr. Res.*, 1998, **307**, 19-31.
- [31] Young, A.: Fractionation of starch. W: *Starch chemistry and technology*, J. Whistler, Ed. 1984, 249-283.
- [32] Zhang, W., Jackson, D.: Retrogradation behavior of wheat starch gels with differing molecular profiles. *J. Food Sci.*, 1992, **57** (6), 1428-1432.

#### AN ATTEMPT TO USE PULLULANASE FOR THE PRODUCTION OF LINEAR GLUCANS FROM POTATO STARCH

##### S u m m a r y

Under this paper's project, an attempt was made to obtain linear glucans by precipitating them from a solution of potato starch dissolved in DMSO and hydrolyzed by a commercial pullulanase preparation

called 'Pulluzyme 750' (ABM Chemicals). The precipitation procedure included three steps, after each step completed, a different fraction of hydrolyzate was obtained. The following values were determined in individual fractions obtained: the amylose chains content, the molecular mass distribution, the retrogradation tendency, and the phase transition characteristics using a DSC method. It was stated that the fraction III had the most interesting properties. The fraction III was composed mostly of short-chain amylose and it exhibited the highest tendency to retrograde. A significant enthalpy of the melting of the retrograded fraction III and the high phase transition temperatures prove a high content of amylose crystallites, which appear characteristic of a resistant starch.

**Key words:** amylose, pullulanase, retrogradation, starch 