



УДК 547.458.61/611 : 541.24.08

ИЗМЕНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОВЕСОВЫХ ПАРАМЕТРОВ КРАХМАЛА
И АМИЛОЗЫ ПРИ ИХ ГИДРОЛИЗЕ

Бендецкий К. М., Яровенко В. Л.

Всесоюзный научно-исследовательский институт продуктов брожения, Москва

При помощи гель-фильтрации на колонках с сефадексами показано, что молекулярновесовое распределение (МВР) растворимого картофельного крахмала близко к наиболее вероятному распределению (НВР). В результате действия серной кислоты на крахмал и α -амилазы из *Aspergillus batatae* на амилозу получили продукты, сохраняющие в совокупности НВР и первоначальный вид зависимости вязкости $[\eta]$ от степени полимеризации \bar{n} . Экстраполяция наблюдаемой линейной зависимости $\lg [\eta]$ от $\lg \bar{n}$ в область высоких измеренных значений $[\eta]$ для нерастворимого крахмала и амилозы позволила определить их степени полимеризации. На основании вида зависимости вязкости от молекулярных весов крахмала и амилозы можно полагать, что молекулы обоих компонентов крахмала (амилозы и амилопектина) существуют в щелочных растворах в форме статистических клубков.

Для изучения способов взаимодействия амилолитических ферментов с полисахаридами весьма важно иметь представление о МВР этих субстратов и их изменении в процессе ферментативных реакций.

МВР полимеров, в частности полисахаридов, хорошо определяется при помощи гель-фильтрации на колонках с сефадексами [1, 2]. До настоящего времени при помощи гель-фильтрации выполнено описание молекулярновесовых величин декстрана [2] и амилозы [3]. Принципиальным препятствием для описания МВР крахмала при помощи гель-фильтрации считают то, что крахмал состоит из двух видов молекул, не гомологичных по строению, — линейных (амилоза) и ветвящихся (амилопектин). Однако при фракционировании амилозы на колонках с сефадексами было отмечено, что примесь ветвящегося компонента не влияет на общую картину распределения фракций по средним величинам молекул [3]. Опыты по измерению вязкости амилозы [4, 5] показали, что в большинстве растворителей (в частности, в щелочах) амилоза описывается следующей зависимостью характеристической вязкости $[\eta]$ от молекулярного веса M : $[\eta] = KM^a$, где $a = 0,6—0,9$. Указанные значения показателя степени a характерны для статистических клубков [6]. Такая конфигурация молекул амилозы в растворе мало отличается от конфигурации молекул амилопектина, имеющего большие внешние цепи [7]. Поэтому можно полагать, что статистически при гель-фильтрации ветвящийся компонент крахмала гомологичен линейному и таким образом фракционирование крахмала будет осуществляться в соответствии с величиной (степенью полимеризации) молекул независимо от степени их ветвления.

Приведенные соображения дают основание предполагать, что и при оценке вязкости крахмала и продуктов его беспорядочного гидролиза имеем дело со статистически однородной системой, где определяющими факторами будут средний молекулярный вес и дисперсия полисахаридов.

В настоящей работе оцениваются МВР и вязкостные свойства крахмала, амилозы и продуктов их беспорядочной деградации.

В результате фракционирования на колонке с сефадексом получили фракции полисахарида, в которых определяли концентрацию общего сахара C_i и восстанавливающую способность S_i . Это позволило определить степени полимеризации фракции:

$$\bar{n}_i = C_i/S_i. \quad (1)$$

Зависимость \bar{n}_i от объема элюата отражали в координатах $\lg \bar{n}_i \div v_i/v_r$, где v_i/v_r — объем элюата, вытекший к моменту наполнения i -й фракции, по отношению к объему геля сефадекса в колонке.

Из рис. 1 видно, что зависимость средней величины молекул во фракциях от объема элюата при фракционировании крахмала на колонке с сефадексом удовлетворительно описывается прямой линией в координатах $\lg \bar{n}_i \div v_i/v_r$. Эта прямая линия служила для определения исправленных значений средних степеней полимеризации $\bar{n}_{i, \text{ис}}$. Из табл. 1 видно, что значения $\bar{n}_{i, \text{ис}}$ фракций выше, чем значения $\bar{n}_{\lambda \text{ макс}}$, определенные при помощи

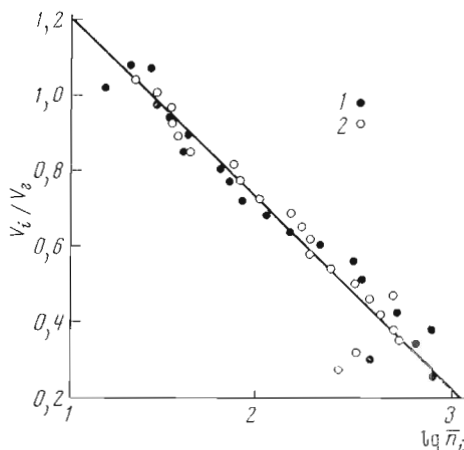


Рис. 1. Зависимость между среднечисленной степенью полимеризации фракций \bar{n}_i и относительным объемом элюата v_i/v_r при гель-фильтрации растворимого крахмала: 1, 2 — номера опытов

Таблица 1

Данные о фракционировании крахмала на колонке с сефадексом

Номер фракции	\bar{n}_i	$\bar{n}_{i, \text{ис}}$	C_i	S_i	D_i	$\bar{n}_{i, \text{ис}}/\bar{n}_{\lambda \text{ макс}}$
6	840	870	0,84	0,0040	1,0	43,5
7	381	709	1,52	0,0040	1,0	26,4
8	651	590	2,61	0,0040	1,0	16,8
9	815	490	6,53	0,0080	1,0	16,3
10	525	389	7,25	0,0138	1,2	10,2
11	510	324	7,65	0,0150	1,3	7,2
12	339	263	7,10	0,0210	1,5	5,8
13	305	209	5,50	0,0180	1,7	3,8
14	205	175	3,70	0,0180	1,6	2,9
15	146	144	2,60	0,0178	1,5	2,4
16	107	120	1,80	0,0168	1,3	2,0
17	79	95	1,31	0,0165	1,3	1,7
18	70	79	1,15	0,0165	1,2	1,5
19	61	65	1,00	0,0165	1,2	1,4
20	40	51	0,78	0,0195	1,0	1,5
21	42	43	0,71	0,0168	1,0	1,9
22	33	35	0,56	0,0168	1,0	2,2
23	29	29	0,49	0,0168	1,0	2,4
24	15	23	0,23	0,0146	1,0	
25	26	19	0,22	0,0086	1,0	
26	28	16	0,14	0,0050	1,0	
27	10	13	0,10	0,0010		

йодометрии. Это объясняется тем, что ветвящиеся молекулы амилопектина в крахмале обладают более низким сродством к йоду, чем амилоза. Отношение $\bar{n}_{i,ис}/\bar{n}_{\lambda,макс}$ мы приняли как условный показатель степени ветвления во фракциях. Из рис. 1 видно, что различная степень ветвления во фракциях (табл. 1) не влияет на линейную зависимость $\lg \bar{n}_i$ от v_i/v_r , общую при гель-фильтрации полимергомологов [1].

На основании результатов анализов фракций в одном из опытов (табл. 1) рассчитывали среднечисленную и средневесовую степени полимеризации крахмала, а также степень его полидисперсности. Значения среднечисленной степени полимеризации получали из уравнений

$$\bar{n}_{ср} = C / S, \quad (2)$$

$$\bar{n}_{ср} = \frac{\sum C_i}{\sum S_i}, \quad (2a)$$

$$\bar{n}_{ср} = \frac{\sum \bar{n}_{i,ис} S_i}{\sum S_i}, \quad (2б)$$

$$\bar{n}_{ср} = \frac{\sum C_i}{\sum C_i / \bar{n}_{i,ис}}. \quad (2в)$$

Значения средневесовой степени полимеризации получали из уравнений:

$$\bar{n}_в = \frac{\sum (C_i / S_i)^2 S_i}{\sum C_i}, \quad (3a)$$

$$\bar{n}_в = \frac{\sum \bar{n}_{i,ис}^2 S_i}{\sum \bar{n}_{i,ис} S_i}, \quad (3б)$$

$$\bar{n}_в = \frac{\sum \bar{n}_{i,ис} C_i}{\sum C_i}. \quad (3в)$$

Степень полидисперсности крахмала определяли по уравнению $D = \bar{n}_в / \bar{n}_{ср}$. Аналогичным образом определяли указанные параметры во фракциях после повторной гель-фильтрации. Учет полидисперсности фракций, $D_i = \bar{n}_{i,в} / \bar{n}_{i,ср}$, приводит к соответствующему увеличению значений $\bar{n}_в$

$$\bar{n}_в = \frac{\sum (C_i / S_i)^2 S_i D_i}{\sum C_i}, \quad (4a)$$

$$\bar{n}_в = \frac{\sum \bar{n}_{i,ис} S_i D_i}{\sum \bar{n}_{i,ис} S_i}, \quad (4б)$$

$$\bar{n}_в = \frac{\sum \bar{n}_{i,ис} C_i D_i}{\sum C_i} \quad (4в)$$

и значений D . Результаты указанных расчетов приведены в табл. 2.

МВР крахмала определяли, вычисляя функцию распределения:

$$F(n) = \sum_{i=1}^n C_i / \sum_{i=1}^{\infty} C_i.$$

Плотность распределения определяли при помощи графического дифференцирования экспериментальной кривой функции распределения: $f(n) = F'(n)$. Результаты определения МВР крахмала приведены на рис. 2.

Из данных табл. 2 видно, что значения $\bar{n}_{ср}$, определенные до фракционирования крахмала по уравнению (2) и после фракционирования крах-

мала по уравнениям (2а) — (2в), близки. Степень полидисперсности крахмала близка к 2. Ввиду этого экспериментальную плотность МВР крахмала сравниваем с ПВР:

$$f(n) = \alpha^2 n e^{-\alpha n}, \quad (5)$$

где e — основание натурального логарифма, n — степень полимеризации, α — обратная величина среднечисленной степени полимеризации полимера, определенная из опыта:

$$\alpha = 1/\bar{n}_{\text{ср}} = 1/4,7 \cdot 10^2 = 0,006.$$

На рис. 2 видно, что экспериментальные точки лежат вблизи от расчетной кривой. Наблюдаемое расположение точек в области средних значений n несколько выше расчетной кривой объясняется тем, что при определении экспериментальных значений $F(n)$ и, следовательно, значений $f(n)$ не учитывали дисперсности фракций. Из данных табл. 1 видно, что средние фракции гель-фильтрата крахмала обладают наибольшей дисперсностью.

В работах [8—10] было показано, что при беспорядочном гидролизе полисахарида, обладающего НВР, сохраняется его первоначальное МВР: продукты гидролиза также обладают НВР. Очевидно, что сохранение первоначального МВР у продуктов деградации полимера определяет сохранение первоначального вида зависимости вязкости от степени полимеризации: из $[\eta] = K\bar{n}^a$ следует $[\eta]_t = K\bar{n}_t^a$, где $[\eta]$ и $[\eta]_t$ — характеристические вязкости полимера до и после беспорядочного гидролиза, \bar{n} и \bar{n}_t — средние степени полимеризации полимера до и после беспорядочного гидролиза. При этом значения \bar{n} и \bar{n}_t могут быть любыми средними, в частности, если

$$[\eta] = K\bar{n}_{\text{ср}}^a, \quad (6)$$

$$\text{то } [\eta]_t = K\bar{n}_{\text{ср},t}^a. \quad (6a)$$

Из уравнений (6) и (6а) следует:

$$\frac{[\eta]_t}{[\eta]} = \frac{\bar{n}_{\text{ср},t}^a}{\bar{n}_{\text{ср}}^a},$$

что равносильно

$$\lg [\eta]_t = \lg [\eta] - a \lg \bar{n}_{\text{ср}} + a \lg \bar{n}_{\text{ср},t},$$

где $\lg [\eta] - a \lg \bar{n}_{\text{ср}} = \text{const.}$

Таким образом, беспорядочная деградация полимера (многоцепочечный механизм эндогидролиза) обуславливает линейную зависимость $\lg [\eta]_t$ ($\lg \bar{n}_t$) для продуктов деградации. Такую зависимость для гидролизатов полисахаридов наблюдаем на рис. 3 и 4. Для фракций, полученных при гель-фильтрации растворимого крахмала через колонку с сефадексом, наблюдаем нелинейную зависимость $\lg [\eta]_t$ ($\lg \bar{n}_t$), как это видно из рис. 3. Фракции гель-фильтрата в отличие от гидролизатов полисахарида обладают различной дисперсностью. Это и определяет нелинейность указанной зависимости. Из табл. 1 видно, что наибольшей дисперсностью обладают средние фракции. Они ближе всего по МВР к исходному образцу и его гидролизатам ($D_i = 1,5 \div 1,7$). Соответственно их зависимость $\lg [\eta]_t$

Таблица 2

Значения степеней полимеризации и полидисперсности крахмала, вычисленные различными способами (средние по данным двух опытов)

Вычислено по уравнениям	Степень полимеризации		Степень полидисперсности D
	$\bar{n}_{\text{ср}}$	\bar{n}_v	
(2)	166		
(2а)	183		
(3а)		356	1,9
(2б)	162		
(3б)		318	2,0
(4б)		378	2,3
(2в)	168		
(3в)		298	1,8
(4в)		368	2,2

($\lg \bar{n}_i$) близка к аналогичной зависимости для исходного образца и его гидролизатов. Крайние фракции близки по МВР к монодисперсным ($D_i = 1$). Они наиболее удалены по МВР от исходного образца и его гидролизатов. Соответственно зависимость $\lg [\eta]_i$ ($\lg \bar{n}_i$) для этих фракций заметно отклоняется от аналогичной зависимости для исходного образца и его гидролизатов.

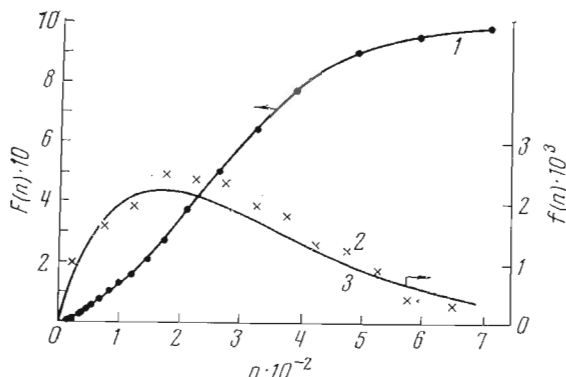


Рис. 2. МВР крахмала: 1 — экспериментальная кривая функции распределения, 2 — экспериментальные точки плотности распределения, 3 — расчетная кривая, полученная по уравнению (5)

Согласно графикам на рис. 3 и 4, имеем следующие уравнения зависимости вязкости от молекулярного веса: для крахмала

$$[\eta] = 0,83 \cdot \bar{n}_{\text{ср}}^{0,69} = 2,34 \cdot 10^{-2} M_n^{0,69};$$

для амилозы

$$[\eta] = 1,55 \cdot \bar{n}_{\text{ср}}^{0,65} = 5,23 \cdot 10^{-2} M_n^{0,65}.$$

Из указанных равенств видно, что амилоза по своим гидродинамическим свойствам мало отличается от крахмала. Показатель степени a характеризует одинаковое состояние молекул крахмала (амилопектина) и амилозы в щелочном растворе — в виде статистического клубка.

На рис. 3 можно отметить, что в координатах $\lg [\eta] \div \lg \bar{n}$ точки для гидролизатов растворимого и нерастворимого крахмалов объединяются

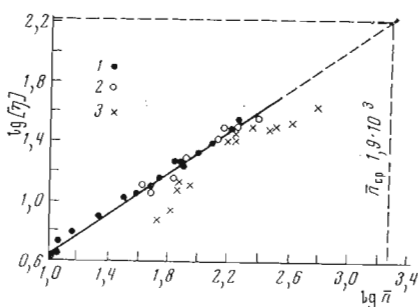


Рис. 3.

Рис. 3. Зависимость характеристической вязкости $[\eta]$ от степени полимеризации \bar{n} для крахмалов: 1, 2 — кислотные гидролизаты растворимого и нерастворимого крахмалов соответственно, 3 — фракции геля-фильтрата растворимого крахмала, полученные на колонке с септадексом

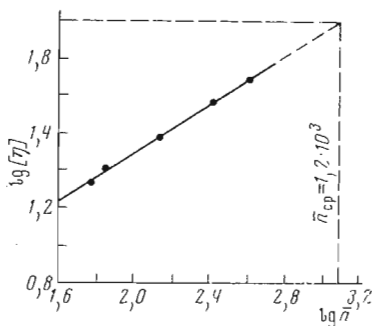


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость вязкости $[\eta]$ от средних значений степени полимеризации \bar{n} ферментативных гидролизатов амилозы

одной прямой. Это означает, что нерастворимый крахмал, подобно растворимому крахмалу, обладает НВР. Ввиду высокой степени полимеризации нерастворимого крахмала \bar{n} определить ее значение при помощи прямого измерения восстанавливающей способности S невозможно. Аналогичную ситуацию имеем при определении степени полимеризации амилозы. В этих условиях эффективным является экстраполирование линейной зависимости $\lg [\eta]$ ($\lg \bar{n}$) в область высоких значений $[\eta]$, определяемых для исходных образцов полисахаридов. На рис. 3 и 4 прямые, отражающие за-

зависимость $\lg [\eta]$ от $\lg \bar{n}$, продолжены до пересечения с горизонтальными прямыми, соответствующими значениям вязкости нерастворимого крахмала и амилозы. Абсциссы точек пересечения представляют значения $\lg \bar{n}$ этих полисахаридов. Получили следующие величины среднечисленных степеней полимеризации: $\bar{n}_{\text{ср}} = 1,9 \cdot 10^3$ для нерастворимого крахмала и $\bar{n}_{\text{ср}} = 1,2 \cdot 10^3$ для амилозы.

Таким образом, мы использовали зависимость $\lg [\eta]$ ($\lg \bar{n}$), полученную для кислотных и ферментативных гидролизатов крахмала и амилозы, в качестве калибровочной для определения степеней полимеризации и полидисперсности этих полисахаридов.

На основании вышеизложенного можно предложить следующую процедуру для оценки молекулярно-весовых параметров полисахарида. Проводится беспорядочный эндогидролиз полисахарида. Для крахмала лучше осуществлять деградацию кипячением в 0,1 н. серной кислоте. Для амилозы в качестве беспорядочно деградирующего фактора можно использовать α -амилазу, осуществляющую эндогидролиз полисахарида по многоцепочечному механизму (например, α -амилазы из плесневых грибов и из *Bacillus subtilis*, не обладающие множественной атакой на амилозу [10, 11]). Определяются значения $\bar{n}_{\text{ср}} = C/S$ и $[\eta]$ гидролизатов с различной глубиной превращения. Если полученные точки, отвечающие зависимости $\lg [\eta]$ от $\lg \bar{n}$, объединяются прямой линией и она совпадает с прямой, полученной для образца с НВР ($D = 2$), то можно считать, что изучаемый полисахарид также имеет НВР.

Сочетание беспорядочного гидролиза полисахарида с определением вязкости и восстанавливающей способности гидролизатов дает возможность определять степени полимеризации образцов с высоким молекулярным весом. Экстраполяция указанных выше прямых зависимости $\lg [\eta]$ ($\lg \bar{n}$) к значению вязкости исходного образца определяет значение его степени полимеризации.

Экспериментальная часть

Определение МВР крахмала. 500 мг растворимого крахмала Рижского завода «Реагент» растворяли в 1,5 мл 1 н. КОН и разбавляли до 5 мл 0,005 н. КОН. Полученный раствор крахмала количественно переносили на колонку с сефадексом G-100 фирмы «Pharmacia» (Швеция). Диаметр колонки 2,6 см, высота 60 см, объем геля в первом опыте 234 мл, во втором — 260 мл. Фракционирование вели в 0,005 н. КОН при скорости элюирования 1 мл/мин. Элюат собирали во фракциях объемом по 10 мл. Из фракций отбирали по 2 мл и к ним прибавляли по 0,2 мл 0,05 н. уксусной кислоты для нейтрализации. Сразу же после нейтрализации методом Нельсона — Шомоди — Хироми [12] определяли восстанавливающую способность фракций S_i в миллиграммах концевой глюкозы на 1 мл фракции. Во фракциях определяли спектры поглощения комплексов полиглюкозидов с йодом на спектрофотометре СФ-10 [3] и при помощи ординового реактива [13] определяли концентрацию общего сахара C_i в миллиграммах глюкозы на 1 мл фракции. По длине волны максимума оптической плотности комплекса полисахарида с йодом во фракции $\lambda_{\text{макс}}$ определяли степень полимеризации линейного полисахарида $\bar{n}_{\lambda_{\text{макс}}}$ [3]. Для определения дисперсности фракций проводили повторную гель-фильтрацию фракций. В колонку вносили 5 мл раствора из фракции и выполняли те же процедуры, что и при фракционировании исходного образца.

Определение зависимости вязкости от степени полимеризации гидролизатов полисахаридов. 1) Кислотный гидролиз. Раствор А : 200 или 400 мг растворимого картофельного крахмала Рижского завода «Реагент» (13% влажности) растворяли в 10 мл воды и приливали 10 мл 0,2 н. H_2SO_4 .

Раствор Б : 240 мг нерастворимого картофельного крахмала суспендировали в 40 мл воды и приливали 40 мл 0,2 н. H_2SO_4 .

Растворы А и Б осторожно кипятят 2—20 мин, затем приливали к раствору А 5 мл 1 н. КОН и к раствору Б 20 мл 1 н. КОН. После остывания пробы доводили до объема: А — 25 мл, Б — 100 мл. Для нейтрализации к 6 мл гидролизата приливали 0,4 мл 0,5 н. уксусной кислоты.

2) Ферментативный гидролиз. Около 500 мг амилозы, полученной из нерастворимого картофельного крахмала по методу Шоха с соавт. [3] и хранившейся под бутанолом в холодильнике, освобождали при помощи центрифугирования от бутанола. Амилозу суспендировали в воде, а затем приливали 2,5 мл 1 н. NaOH и растворяли полностью. Раствор оставляли на ночь в холодильнике, затем нейтрализовали 2,5 мл раствора 1 н. уксусной кислоты, прибавляли 5 мл 1 н. NaCl, 5 мл 1 н. ацетатного буфера (рН 5, 6) и 5 мл разбавленного в 10 раз раствора α -амилазы из *Aspergillus batatae*, полученной по методу, описанному ранее [14]. После доведения объема водой до 50 мл вели инкубацию при 30°. Через различные промежутки времени отбирали из инкубационной смеси по 8 мл и останавливали реакцию нагреванием в кипящей водяной бане 5 мин.

В указанных пробах и нейтрализованных кислотных гидролизатах крахмалов определяют концентрацию общего сахара (C , мг/мл) и восстанавливающую способность (S , мг конечной глюкозы на 1 мл). Среднечисленную степень полимеризации гидролизатов рассчитывали по уравнению (2).

Для определения вязкости к 5 мл кислотного гидролизата крахмала приливали 2,5 мл 1 н. КОН, а к 4,5 мл ферментного гидролизата амилозы приливали 1,5 мл 2 н. КОН, растворы фильтровали через стеклянный фильтр № 2 и определяли их характеристическую вязкость в вискозиметре Уббелюде.

Значения $[\eta]$ определяли, используя соотношение

$$[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} \frac{(t - t_0) k}{C t_0},$$

где t_0 и t — соответственно время истечения растворителя и раствора, выраженное в секундах, C — концентрация общего сахара в растворе, г/мл, k — поправка на кинетическую энергию истечения жидкости из капилляра вискозиметра. Используя жидкости с известной абсолютной вязкостью (бутанол, ацетон, воду), определили значение k 1,18 по способу, изложенному в работе [5]. Концентрацию общего сахара в растворах, находившихся в вискозиметре, изменяли в пределах от $0,5 \cdot 10^{-3}$ до $5 \cdot 10^{-3}$ г/мл.

Таким же образом определяли характеристическую вязкость фракций элюата растворимого крахмала, полученных в результате гель-фильтрации на колонке с сефадексом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белецкий Б. Г., Виленчик Л. З., Новиков Д. Д. (1968) в сб.: Новое в методах исследования полимеров, стр. 81—118, М.
2. Гранат К. А. (1967) в сб.: Методы химии углеводов, стр. 273—280, М.
3. Бяццкий К. М., Яровенко В. Л., Лукьянова Л. Н. (1971) Прикл. биохимия и микробиология, 7, 218—224.
4. Everett W. W., Foster J. F. (1959) J. Amer. Chem. Soc., 81, 3464—3469.
5. Гринвуд С. Т. (1967) в сб.: Методы химии углеводов, стр. 386—394, М.
6. Бреслер С. Е., Ерусалимский Б. Л. (1965) Физика и химия макромолекул, М.—Л.
7. Степаненко Б. Н. (1968) Углеводы. Успехи в изучении строения и метаболизма, М.
8. Robytt J. F., French D. (1967) Arch. Biochem. and Biophys., 122, 8—16.
9. Banks W., Greenwood C. T. (1968) Stärke, 20, 315—322.
10. Banks W., Greenwood C. T. (1970) Carbohydr. Res., 12, 79—82.
11. Бяццкий К. М., Яровенко В. Л., Лукьянова Л. Н. (1972) Биохимия, 37, 117—123.

12. Ono S., Hiromi K., Zinbo M. (1964) *J. Biochem.*, 55, 315—320.
13. Francois C., Marshall A. D., Neuberger A. (1962) *Biochem. J.*, 83, 335—341.
14. Бендецкий К. М., Яровенко В. Л., Коргачина Г. Т., Сенаторова Т. П., Хаханова Т. С. (1974) *Биохимия*, 39, 968—974.

Поступила в редакцию
18.IX.1974

CHANGES IN MOLECULAR WEIGHT PARAMETERS OF STARCH AND AMYLOSE ON HYDROLYSIS

BENDETSKY K. M., YAROVENKO V. L.

All-Union Research Institute of Fermentation Products, Moscow

By gel filtration on Sephadex, the molecular weight distribution (MWD) of potato soluble starch was found to be close to the most probable weight distribution (MPD). The products of starch degradation by sulfuric acid and those of amylose treatment with *Aspergillus batatae* γ -amylase resemble the parent polysaccharides in their MPD and viscosity ($[\eta]$) dependence on the degree of polymerization (\bar{n}). By extrapolation of linear dependence $\lg [\eta]$ ($\lg \bar{n}$) to the high viscosity range, the \bar{n} values were determined for insoluble starch and amylose. Based on observed relationship between viscosity and molecular weights, a statistical coil conformation was proposed for starch and amylose in alkaline solution.
