

不同酶制备木薯抗性淀粉的性质比较

谭瑶瑶¹, 吴亨¹, 古碧², 金欢¹, 谢丽燕¹, 林莹^{1,*}

(1. 广西大学轻工与食品工程学院, 广西南宁 530004;

2. 广西大学淀粉化工研究所, 广西南宁 530004)

摘要:以木薯淀粉为原料,用耐高温 α -淀粉酶和普鲁兰酶分别制备了RS3型抗性淀粉,并对其直链淀粉含量、冻融稳定性、持水性进行测定与比较。结果表明, α -淀粉酶制备抗性淀粉含量在9.4%~12.4%之间,直链淀粉含量随着酶解作用降低,且直链淀粉含量高的抗性淀粉其冻融稳定性略低,持水性保持在3.7~5.8g/g之间波动不明显。普鲁兰酶制备抗性淀粉含量在4%~7.9%之间,直链淀粉含量不一定随着酶解作用而增加,且直链淀粉含量高的抗性淀粉其冻融稳定性和持水性高。耐高温 α -淀粉酶制备的木薯抗性淀粉含量、冻融稳定性高于普鲁兰酶,对直链淀粉含量的影响较直观,但持水性低于普鲁兰酶。

关键词:耐高温 α -淀粉酶,普鲁兰酶,抗性淀粉,性质,直链淀粉含量

Property comparison of cassava resistant starch prepared by different amylases

TAN Yao-yao¹, WU Heng¹, GU Bi², JIN Huan¹, XIE Li-yan¹, LIN Ying^{1,*}

(1. Institute of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning 530004 China;

2. Chemical Starch Institute, Guangxi University, Nanning 530004, China)

Abstract: Cassava resistant starch (RS3) was prepared by thermostable α -amylase and pullulanase. The RS content, the amylose contents, freeze-thaw stabilization and water-holding capacity of the RS were determined and compared between the α -amylase-RS and the pullulanase-RS. The results indicated that the α -amylase-RS content was ranging in 9.4%~12.4%, the amylose content decreased with the increasing of the acting time. The higher-amylose-content-RS might have lower freeze-thaw stability. The water-holding capacity of it was ranging in 3.7~5.8g/g. The pullulanase-RS content was ranging in 4%~7.9%, the amylose content did not necessarily increase with the increasing of the acting time. The higher-amylose-content-RS may have higher freeze-thaw stability and water-holding capacity. Compared with the pullulanase-RS, the α -amylase-RS had higher RS content, higher freeze-thaw stability but lower water-holding capacity.

Key words: thermostable α -amylase; pullulanase; resistant starch; property; amylose content

中图分类号: TS235.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)11-0088-04

抗性淀粉(Resistant starch, 简称RS)也称抗淀粉、抗消化淀粉,由英国生理学家Englyst提出。1996年,欧洲抗性淀粉研究协会(EURESTA)将其定义为“健康者小肠中不被吸收的淀粉及其降解产物的总称”^[1-3]。RS3是最主要的抗性淀粉,国内外对此类淀粉研究较多。根据文献,目前较为公认RS3生成是直链淀粉糊化后重新聚集形成由牢固氢键结合的双螺旋结构所致^[4-5]。天然淀粉中的抗性淀粉含量低,需要对其进一步处理以提高抗性淀粉含量。在抗性淀粉的制备中常用耐高温 α -淀粉酶和普鲁兰酶对原淀粉进行酶解。酶解作用不但可以改变抗性淀粉含量,也会影响淀粉的其它性质。两种酶的作

机理不同,制得样品的性质也会有所差异。比较不同酶法制备的抗性淀粉的抗性淀粉含量、直链淀粉含量、冻融稳定性、持水性等性质,可以为抗性淀粉的进一步应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

木薯原淀粉 水分含量7.7%,广西安宁淀粉有限责任公司;普鲁兰酶 0.4U/L,广西泰诺生物药剂有限责任公司;耐高温 α -淀粉酶 300U/mg,广西泰诺生物药剂有限责任公司。

分析天平 赛多利斯公司;JRA-6 磁力搅拌水浴锅 金坛市科杰仪器厂;DHG-9146A 型电热鼓风干燥箱 上海精宏实验设备有限公司;TD6.台式低速自动平衡离心机 长沙非凡仪器仪表有限公司;722型可见分光光度计 上海佑科仪器仪表有限公司。

1.2 实验方法

收稿日期:2012-11-23 *通讯联系人

作者简介:谭瑶瑶(1989-),女,硕士研究生,研究方向:食品科学。

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项资金(CRAS-12);广西科学研究与技术开发项目(科桂攻1298004-4)资助。

1.2.1 α -淀粉酶法制备木薯抗性淀粉 称取一定量木薯淀粉,用 pH 为 6.8 的磷酸盐缓冲液将其配制成质量分数为 20% 的淀粉乳,搅拌,升温至 80℃,添加耐高温 α -淀粉酶 0.3U/g 淀粉,于 80℃ 分别酶解一段时间后,用 1mol/L 的盐酸将淀粉乳的 pH 调至 3,在温度 100℃ 下灭酶 10min 后,用浓度为 1mol/L 的氢氧化钠溶液将乳液 pH 调至 7,自然冷却至室温,于 4℃ 储藏 24h,60℃ 干燥,粉碎,过 80 目筛,成品待用。

1.2.2 普鲁兰酶法制备木薯抗性淀粉 称取一定量木薯淀粉,用 pH 为 4.8 的醋酸盐缓冲液将其配制成质量分数为 20% 的淀粉乳,搅拌,升温至 55℃,添加普鲁兰酶 4U/g 淀粉,于 55℃ 分别酶解一段时间后,用 1mol/L 的氢氧化钠溶液将乳液 pH 调至 7,在温度 100℃ 下灭酶 10min 后,自然冷却至室温,于 4℃ 储藏 24h,60℃ 干燥,粉碎,过 80 目筛,成品待用。

1.2.3 抗性淀粉含量测定 抗性淀粉 (RS) 含量的测定采用 Goni^[6] 法。

用不同浓度的葡萄糖标准液与酚酶试剂反应,以葡萄糖标准液含量为 0.00 的试剂调整分光光度计的零点,在波长 510nm 测定吸光度,以吸光度为纵坐标,葡萄糖当量为横坐标,绘制标准曲线。

$$RS(\%) = [(0.9 \times C \times 100) / W] \times 100$$

其中 0.9 为葡萄糖与脱水葡萄糖之间的换算系数, C 为从标曲上找出的葡萄糖当量 (mg); W 为样品的绝干质量 (mg)。

1.2.4 直链淀粉含量测定 直链淀粉含量的测定采用碘蓝比色法。

称取 50mg 样品,加几滴无水乙醇,加 10mL 浓度为 0.5mol/L 氢氧化钠溶液,沸水浴 10min。自然冷却至室温,用蒸馏水定容至 50mL,混匀。准确移取 2.5mL 糊液,加 20mL 蒸馏水,调 pH 至 3.5 左右。加 0.5mL 碘试剂 (2g 碘化钾溶于少量蒸馏水,加 0.2g 碘,溶解后定容至 100mL),定容后静置 10min。以蒸馏水调 0,在 620nm 处用分光光度计测定样品的吸光度,以吸光度为纵坐标,直链淀粉含量为横坐标,绘制标准曲线得出回归方程。并从直链淀粉含量标准曲线上找出对应的直链淀粉含量。

1.2.5 冻融稳定性测定 用去离子水将样品配成质量分数为 3% (w/v) 的淀粉乳,放入 80℃ 水浴中加热 20min,取出冷却至室温,称取 3g 淀粉糊,放入离心管, -20~-10℃ 的冰箱中放置 24h。取出解冻,放入离心机以 3000r/min 离心 15min。弃去上清液,称沉淀物的重量 m_1 (g),计算析水率^[7]。

$$\text{析水率}(\%) = m_1 / 3 \times 100$$

1.2.6 持水性测定 将 1g 抗性淀粉 (干基) 置于 50mL 离心管,称重 W_1 ,加入 10mL 去离子水,震荡均匀,静置 12h,使淀粉充分润湿。放入离心机以 4000r/min 离心 15min,称取离心管和沉淀的总质量 W_2 。计算抗性淀粉的持水率 (WHC)^[8]。

$$WHC(g/g) = (W_2 - W_1) / 1$$

1.3 数据处理

所有实验都采用三组平行,取平均值。应用 Microsoft excel 和 SPSS 进行数据分析和制图。

2 结果与分析

2.1 酶解对抗性淀粉含量的影响

2.1.1 耐高温 α -淀粉酶对抗性淀粉含量的影响

耐高温 α -淀粉酶 0.3U/g 淀粉,于 80℃ 分别作用不同时间制备的样品中抗性淀粉含量如图 1 所示。添加耐高温 α -淀粉酶的样品抗性淀粉含量明显高于原淀粉。酶解时间为 10min 所得的抗性淀粉含量达到最高值 12.4%,继续延长酶解时间不能使抗性淀粉的含量得到提高。

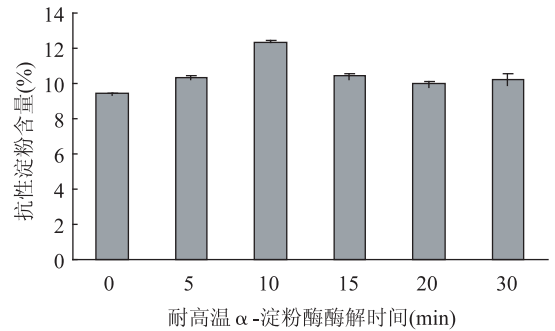


图 1 耐高温 α -淀粉酶对抗性淀粉含量的影响

Fig.1 The effect of thermostable α -amylase on the RS content

在一定聚合度范围内的淀粉分子更利于抗性淀粉的形成, α -淀粉酶作用于淀粉分子的 α -1,4 糖苷键,将淀粉分子链迅速随机切开成小段,因此 α -淀粉酶的作用效果是改变了淀粉分子的聚合度^[9],从而影响抗性淀粉的含量。在添加耐高温 α -淀粉酶 0.3U/g 的条件下,低于 10min 时,酶解作用时间不足,聚合度过高,不利于分子的充分散开和重结晶。随着酶解时间的延长,聚合度降低。过低的聚合度使分子运动性增加,也不利于抗性淀粉的形成。一定小分子糖的存在也会阻碍抗性淀粉的形成。连喜军等的研究^[10]也得到相同的结论。

2.1.2 普鲁兰酶对抗性淀粉含量的影响 添加普鲁兰酶 4U/g 淀粉,55℃ 分别作用不同时间后,样品的抗性淀粉含量如图 2 所示。普鲁兰酶的添加使抗性淀粉含量提高,酶解时间为 2h 所得的抗性淀粉含量达到极大值 7.9% 后略有下降,总体趋势较稳定。考虑到生产条件等因素,没有设定更长的作用时间。

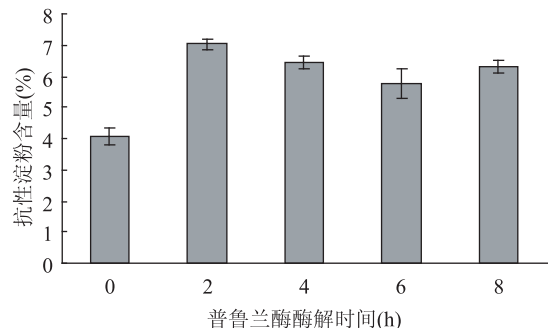


图 2 普鲁兰酶对抗性淀粉含量的影响

Fig.2 The effect of pullulanase on the RS content

普鲁兰酶的作用是切断淀粉分子的 α -1,6 糖苷键,使淀粉脱支。有研究表明,抗性淀粉的含量与长

直链分子的含量有直接关系,因为RS3的形成主要由直链淀粉的重结晶所致^[9],因此普鲁兰酶的作用提高了抗性淀粉含量。图2的结果说明抗性淀粉含量不一定随着酶解时间的增加而提高。4U/g淀粉普鲁兰酶2h的脱支作用已经可以满足抗性淀粉形成所需的直链淀粉,在此程度上再增加,不但不能使抗性淀粉含量增加,反而会由于小分子的大量生成而使抗性淀粉含量略有降低。

比较耐高温 α -淀粉酶和普鲁兰酶的在制备木薯抗性淀粉中的作用效果,耐高温 α -淀粉酶的作用时间短,在10min既达到抗性淀粉含量极高值12.4%,总体含量也在9%以上。而普鲁兰酶的作用时间较长,在第2h达到极高值7.9%。因此,耐高温 α -淀粉酶制备特点是酶解时间短、抗性淀粉含量较高,普鲁兰酶的作用时间略长,但是效果较稳定。这可能是由于木薯淀粉中支链淀粉含量高,简单的脱支作用不能直接快速得到利于抗性淀粉形成的分子片段。因此可以尝试采用耐高温 α -淀粉酶和普鲁兰酶结合的方式,先液化再脱支,对酶法制备木薯抗性淀粉中提高抗性淀粉含量的方法进行进一步的探索研究。

2.2 酶解对直链淀粉含量的影响

2.2.1 耐高温 α -淀粉酶对抗性淀粉中直链淀粉含量的影响 如图3可见,添加耐高温 α -淀粉酶0.3U/g淀粉,于80℃分别作用不同时间制备的抗性淀粉,在酶解时间为0时样品的直链淀粉含量24.4%,随着酶解时间的增加,直链淀粉含量在酶解10min升高至22.4%后降低。耐高温 α -淀粉酶的作用会降低抗性淀粉的直链淀粉含量,可能是由于 α -淀粉酶使长直链淀粉分子被酶解为短链片段,小分子增多,直链淀粉含量降低。

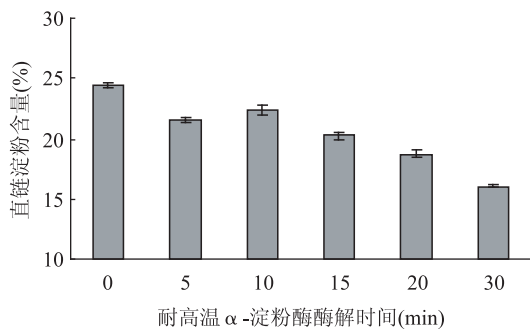


图3 耐高温 α -淀粉酶对直链淀粉含量的影响

Fig.3 The effect of thermostable α -amylase on the amylose content

2.2.2 普鲁兰酶对抗性淀粉中直链淀粉含量的影响

添加普鲁兰酶4U/g淀粉,55℃分别作用不同时间后,样品的直链淀粉含量如图4所示。直链淀粉含量在水解初期缓慢降低,6h得到极小值15.7%后开始上升,8h得到直链淀粉含量的极大值20.4%。如果需要进一步研究普鲁兰酶的作用时间与产品中直链淀粉含量之间的关系,则需要增加酶解时间。

普鲁兰酶水解淀粉的 α -1,6糖苷键,产物是麦芽三糖和短直链分子以及脱支后的长直链分子,高聚合度的长直链分子和低聚合度的小分子多,中间

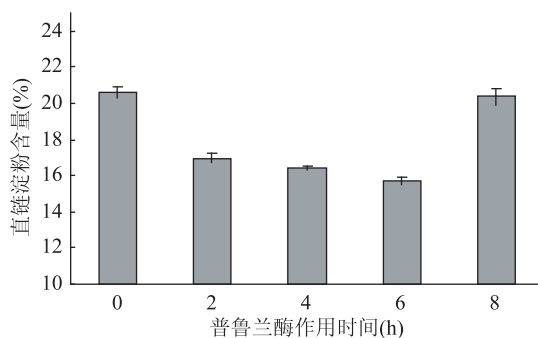


图4 普鲁兰酶酶解时间对抗性淀粉中直链淀粉含量的影响

Fig.4 The effect of pullulanase on the amylose content

级数较少。木薯淀粉分子支链较多,酶解时间不足时,水解脱下的侧链依然是支链淀粉,并产生低聚的短直链分子和麦芽三糖,使得非直链淀粉的比例增高,相对的降低了直链淀粉的含量。 α -淀粉酶的作用目标是所有分子的 α -1,4糖苷键,而普鲁兰酶的作用目标只是支链淀粉分子的 α -1,6糖苷键,因为直链淀粉含量是一个相对比值,所以普鲁兰酶的酶解对其的影响不如耐高温 α -淀粉酶直观。

2.3 酶解对抗性淀粉冻融稳定性的影响

添加耐高温 α -淀粉酶0.3U/g淀粉,80℃分别作用不同时间和添加普鲁兰酶4U/g淀粉,55℃分别作用不同时间后制得的木薯抗性淀粉,其冻融稳定性随直链淀粉含量的变化如图5所示。在直链淀粉含量15%~25%区间,随着直链淀粉含量的增加, α -淀粉酶制备的样品冻融稳定性由78.2%降低到66.4%,普鲁兰酶制备的样品冻融稳定性由46.7%增加至60.4%,低于 α -淀粉酶制备的样品。

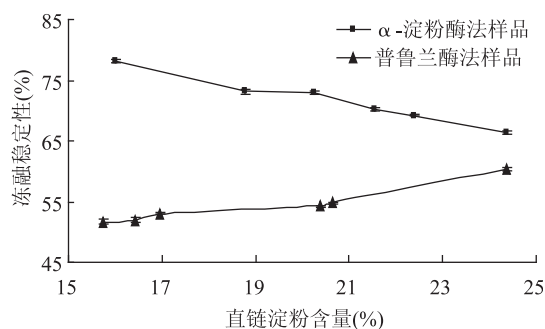


图5 酶解对抗性淀粉冻融稳定性的影响

Fig.5 The effect of enzymolysis on freeze-thaw stability

淀粉的冻融现象是淀粉直链分子在冻结-融化过程中通过氢键结合形成有序的结构,将水排挤出去^[11],因此随着直链淀粉含量的增加 α -淀粉酶制备的样品冻融稳定性而降低。但是普鲁兰酶的作用使淀粉分子出现两极化,除直链淀粉外,大部分是低聚合度的小分子,与水结合度高,因此冻融稳定性反而提高。但是由于耐高温 α -淀粉酶使淀粉中的长直链分子数目减少,所以其冻融稳定性高于普鲁兰酶制备的抗性淀粉。

2.4 酶解对抗性淀粉持水性的影响

添加耐高温 α -淀粉酶 0.3U/g 淀粉, 80℃ 分别作用不同时间和添加普鲁兰酶 4U/g 淀粉, 55℃ 分别作用不同时间后制得的木薯抗性淀粉, 其持水性随直链淀粉含量的变化如图 6 所示。在直链淀粉含量 15%~25% 区间, 随着直链淀粉含量的增加, α -淀粉酶制备的样品持水性由 3.7g/g 升高至 5.8g/g, 普鲁兰酶制备的样品持水力由 5.8g/g 下降至直链淀粉含量 17% 时的极小值 5.3, 然后升高至 6.8g/g, 高于 α -淀粉酶制备的样品。

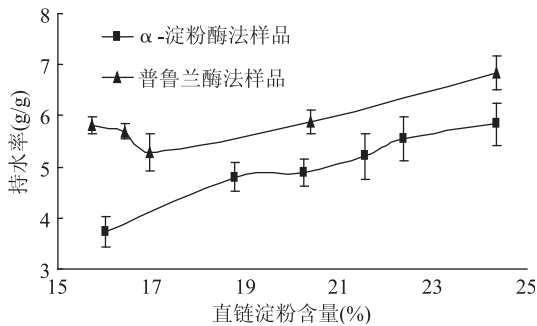


图 6 酶解对抗性淀粉持水性的影响

Fig.6 The effect of enzymolysis on freeze-thaw stability

影响淀粉持水性的水是自由水, 存在于分子间隙和凝胶的网状结构之中^[12], 靠表面张力与淀粉相结合, 由于淀粉凝胶状态的持水性强而不能自由移动, 被淀粉凝胶的空间网络结构所包围^[13]。抗性淀粉由于空间结构排列比原淀粉更加紧密, 持水性低于原淀粉。 α -淀粉酶使淀粉的聚合度降低, 普鲁兰酶使淀粉分子脱支, 聚合度两极分化。因此在 α -淀粉酶制备的抗性淀粉中, 直链淀粉含量低时, 整体分子聚合度低, 难以保持水分。直链淀粉含量相近, 普鲁兰酶制备的抗性淀粉长链分子高于 α 淀粉酶制备的抗性淀粉, 因此前者的持水性高于后者。

3 结论

木薯淀粉糊化后的酶解对抗性淀粉含量的提高有明显的效果。

耐高温 α -淀粉酶法制备的样品抗性淀粉含量在 9.4%~12.4% 之间, 直链淀粉含量在酶解 10min 达到 22.4% 后随着酶解的作用降低。直链淀粉含量高的样品冻融稳定性略低, 持水性保持在 3.7~5.8g/g 之间波动不明显。普鲁兰酶法制备的样品抗性淀粉含量在 4%~7.9% 之间, 直链淀粉含量不一定随着酶

解的作用而增加, 酶解 8h 达到直链淀粉含量的极大值 20.2%。直链淀粉含量高的样品冻融稳定性高; 持水性高于 5.2g/g。

综上所述, 酶解对抗性淀粉的形成、直链淀粉含量、冻融稳定性和持水性产生影响。耐高温 α -淀粉酶法在抗性淀粉含量、冻融稳定性高于普鲁兰酶法, 但在产品的持水性及稳定性方面不及普鲁兰酶法。因此在选择制备方法的时候需要优先考虑所需产品的特点。

参考文献

- [1] Englyst H N, Trowel H, Southgate D, et al. Dietary fiber and resistant starch [J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 1987(46):873-874.
- [2] 罗志刚. 功能性食品添加剂—抗性淀粉[J]. 淀粉与淀粉糖, 2007(2):14-17.
- [3] 余焕玲, 曾凯. 抗性淀粉研究方法[J]. 粮食与油脂, 2001(9):32-34.
- [4] Keren S, Havazelet B P, Eyal S. Polymorphism of resistant starch type III [J]. Carbohydrate Polymers, 2003, 54(8):363-369.
- [5] Bravo L, Siddhuraju P, Sara-Calixto F. Effect of various processing methods on the in vitro starch digestibility and resistant starch content of indian pulses [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46(13):4667-4674.
- [6] Goni I, Garacia-Diz L, Manas E. Analysis of resistant starch: a method for foods and food Products [J]. Food Chemistry, 1996, 56(4):445-449.
- [7] 黄祖强, 童张法, 胡华宇, 等. 机械活化对木薯抗性淀粉冻融稳定性的影响[J]. 食品工业科技, 2006(3):58-60.
- [8] 林莹, 辛志平, 古碧. 不同变性淀粉对冷冻面团热力学特性的影响[J]. 食品工业科技, 2012, 33(5):59-66.
- [9] 张泽生, 曹力心, 张健昌. 酶法制备马铃薯抗性淀粉的工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2006(5):57-60.
- [10] 连喜军, 何丽君, 李建颖, 等. 酶法水解不同品种甘薯制备抗性淀粉[J]. 食品研究与开发, 2008(10):45-47.
- [11] 李妙莲. 含淀粉质食品的冻融稳定性[J]. 食品工业科技, 2004, 25(7):141-142, 105.
- [12] 张忠, 郭巧玲, 李凤林. 食品生物化学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2009.
- [13] 李秋菊. 食品化学简明教程及实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005.

一套《食品工业科技》在手,
纵观中国食品工业全貌!