

普鲁兰酶处理对蜡质玉米淀粉结构与功能特性的影响

石雪萍 余芳 蒋彩云

(江苏经贸职业技术学院, 江苏 南京 211168)

摘要: [目的] 探究普鲁兰酶处理对蜡质玉米淀粉结构与功能的影响。[方法] 通过扫描电镜、X 射线衍射、相对分子质量及其分布、表观直链淀粉含量以及消化性能等测试方法, 系统考察了普鲁兰酶处理对蜡质玉米淀粉结构与功能特性的影响。[结果] 与未经普鲁兰酶处理的淀粉相比, 不同质量分数淀粉溶液经过普鲁兰酶处理后, 均重排形成含有 B 型结晶的相对有序聚集态结构且相对结晶度从 2.70% 增加至 22.67%; 抗性淀粉含量从 12.41% 增加至 39.25%。[结论] 普鲁兰酶处理对蜡质玉米淀粉结构与功能特性有显著影响, 不同质量分数淀粉溶液经过普鲁兰酶处理后, 相比于低质量分数溶液中的淀粉, 高质量分数溶液中的淀粉在酶解过程中更容易聚集并重排形成有序聚集体, 延缓普鲁兰酶对淀粉的催化作用, 使得高质量分数溶液中淀粉的相对分子质量较大。

关键词: 普鲁兰酶; 功能特性; 直链淀粉; 淀粉结构

Effects of pullulanase treatment on the structure and function properties of waxy corn starch

SHI Xueping YU Fang JIANG Caiyun

(Jiangsu Vocational Institute of Commerce, Nanjing, Jiangsu 211168, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effects of pullulanase treatment on the structure and functionality of waxy corn starch, providing theoretical guidance for regulating starch debranching modification. [Methods] The effects of pullulanase treatment on the structure and functional properties of waxy corn starch are systematically studied using scanning electron microscopy, X-ray diffraction, relative molecular weight and distribution, apparent amylose content, and digestibility tests. [Results] Compared with untreated starch, after pullulanase treatment, starch solutions of different mass fraction rearrange to form a relatively ordered aggregated structure containing B-type crystallinity, with the relative crystallinity increasing from 2.70% to 22.67%. The resistant starch content increases from 12.41% to 39.25%. [Conclusion] Pullulanase treatment significantly affects the structure and functional properties of waxy corn starch. After pullulanase treatment, starch in high mass fraction solutions is more likely to aggregate and rearrange into ordered aggregates during the enzymatic process compared to starch in low mass fraction solutions. This delays the catalytic effect of pullulanase on starch, resulting in high molecular weight starch in high mass fraction solutions.

Keywords: pullulanase; functional property; amylose; starch structure

淀粉是食源性重要碳水化合物来源, 其在食品、化妆品及生物医药领域具有广泛应用^[1]。它是由 α -D-葡萄糖为单元构成的直链淀粉和支链淀粉组成; 其中, 直链淀粉

是由 α -D-葡萄糖通过 α -1,4 糖苷键连接而成, 而支链淀粉是由 α -D-葡萄糖通过 α -1,4 和 α -1,6 糖苷键连接而成^[2-3]。相比于支链淀粉, 直链淀粉在贮藏过程中容易发生重排,

基金项目: 江苏省创新创业培育计划项目(编号: G-2023-0539); 江苏高校优秀科技创新团队项目(2021 年)

通信作者: 石雪萍(1974—), 女, 江苏经贸职业技术学院副研究员, 博士。E-mail: stbdw@126.com

收稿日期: 2024-03-18 改回日期: 2025-03-21

引用格式: 石雪萍, 余芳, 蒋彩云. 普鲁兰酶处理对蜡质玉米淀粉结构与功能特性的影响[J]. 食品与机械, 2025, 41(8): 46-53.

Citation: SHI Xueping, YU Fang, JIANG Caiyun. Effects of pullulanase treatment on the structure and function properties of waxy corn starch[J]. Food & Machinery, 2025, 41(8): 46-53.

使得螺旋及结晶等有序结构形成含量增多,从而降低淀粉的消化性能或提高淀粉类食品的硬度^[4]。从食品营养的视角出发,延缓淀粉类制品在人体内的消化速率能预防肥胖及2型糖尿病等慢性疾病的发生^[5]。为改善淀粉的营养功能,有学者^[6-7]通过提高淀粉中的直链淀粉或线性糊精的含量,继而诱导淀粉形成有序结构,实现淀粉消化性能的定向控制。

普鲁兰酶或异淀粉酶是一类能够水解多糖 α -1,6糖苷键的特异性酶^[8-9]。淀粉经普鲁兰酶或异淀粉酶酶解后,支链淀粉的 α -1,6糖苷键断裂并产生大量线性糊精;而这些线性糊精由于自组装时的空间位阻,极易重排形成结晶结构,继而显著延缓淀粉的消化性能^[10-12]。普鲁兰酶可以同时水解支链淀粉和直链淀粉分子中的 α -1,6糖苷键,对淀粉进行脱支改性^[13]。淀粉经过脱支改性后,分子相互缠结和聚集,重新形成疏松多孔的颗粒结构^[14]。曹川等^[15]研究了加酶量、pH、温度对玉米淀粉脱支程度的影响,但不同的质量分数玉米淀粉乳液对脱支程度的影响研究尚未涉及。Chi等^[16]研究发现,淀粉在普鲁兰酶处理过程中会发生重排,形成有序聚集体,但是不同的质量分数淀粉乳液及酶解时间如何影响酶解过程中淀粉分子的结构和功能尚未明晰。而根据淀粉代谢酶的催化反应发生^[17-18],酶与淀粉分子链的特异性结合是酶对淀粉发生催化反应的重要前提,淀粉的有序化程度越高,淀粉代谢酶对淀粉的催化作用则越弱^[17]。表明淀粉在普鲁兰酶处理过程中发生重排并形成有序聚集体,将抑制普鲁兰酶对淀粉分子链的酶解。Orford等^[19]研究发现,不同质量分数淀粉乳液可影响淀粉的重结晶行为,这些发现表明:不同质量分数淀粉乳液能够制约其在普鲁兰酶处理过程的重排行为,继而影响普鲁兰酶对淀粉的长效酶解作用。然而,酶解体系内不同质量分数淀粉乳液如何影响普鲁兰酶酶解过程的淀粉结构转变尚不清楚。若要利用普鲁兰酶高效制备线性糊精,明晰不同质量分数淀粉乳液(即酶解体系内淀粉含量)、淀粉在普鲁兰酶酶解过程的重排行为、普鲁兰酶对淀粉的长效酶解之间的相互作用,是淀粉链结构与聚集态结构调控的关键研究内容。

研究不同质量分数的淀粉乳液(1%和6%)在酶解过程中(6,12,24 h)的链结构与聚集态结构变化,考察不同质量分数淀粉在酶解过程中的重排行为及其对普鲁兰酶脱支的影响,以期对淀粉脱支改性与精细结构调整提供基础数据与理论指导。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

蜡质玉米淀粉:淀粉88.35%,蛋白0.6%,脂肪0.049%,佛山市国农淀粉有限公司;

猪胰酶(P-7545):酶活为8 USP/g,西格玛奥德里奇

(上海)贸易有限公司;

直链淀粉标品(A0512)、支链淀粉标品(A8515):西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;

淀粉葡萄糖苷酶(A3306):酶活 ≥ 260 U/mL,西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;

葡萄糖氧化试剂盒(K-GLUC):爱尔兰 Megazyme 公司;

普鲁兰酶:酶活为2 000 U/g,上海麦克林有限公司;

醋酸:分析纯,西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;

叠氮化钠:分析纯,上海生工生物工程技术服务有限公司;

其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

冷冻干燥机:LGJ-10型,河南兄弟仪器设备有限公司;

台式高速离心机:TG16-WS型,湖南湘仪实验室仪器开发公司;

扫描电镜:SU1510型,日本日立公司;

X-射线多晶粉末衍射仪(XRD):Rigaku/MiniFlex II型,日本理学公司;

紫外分光光度计:TU-1810PC型,北京普析通用仪器设备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 淀粉的普鲁兰酶处理 称取一定量蜡质玉米淀粉,加入500 mL去离子水,配制得到质量分数为1%或6%(以干基计)的淀粉乳,置于100℃水浴中充分糊化30 min。糊化结束后,将淀粉糊冷却至58℃,加入100 U/g淀粉普鲁兰酶,酶解6,12,24 h。酶解结束后,立即用液氮冷却,随后用冷冻干燥机进行干燥处理^[20]。干燥后的淀粉样品加入50 mL乙醇,钝化普鲁兰酶,5 000 r/min离心5 min,利用45℃热风干燥箱对所得的淀粉进行干燥处理^[21]。WMS表示蜡质玉米淀粉,所得淀粉样品用SX-Y-D来表示,其中X表示不同质量分数淀粉乳液(1%,6%),Y表示普鲁兰酶酶解时间(6,12,24 h),D表示此类淀粉是经过普鲁兰酶处理得到的样品。

此外,按照上述方法获得糊化淀粉,随后将淀粉糊冷却至58℃,并在该条件下保温6,12,24 h。随后,参照上述方法对样品进行处理,获得不经普鲁兰酶处理的不同质量分数淀粉。所得样品用SX-Y来表示,其中X表示不同质量分数淀粉乳液(1%,6%),Y表示保温时间(6,12,24 h)。

1.3.2 淀粉形貌特征 根据文献[21]修改如下:在扫描电镜样品台上贴好导电胶,用试样勺取少量淀粉样品,用镊子轻敲或抖动试样勺,将淀粉样品轻轻洒落在导电胶上,用洗耳球吹去多余部分,将待测试样置于喷金仪,设

置电流为 24 mA, 时间为 60 s, 进行喷金处理, 利用扫描电镜在 15.0 kV 的加速电压下捕获显微照片, 对淀粉形貌特征进行观察。

1.3.3 淀粉结晶结构 根据文献[22], 利用 X-射线多晶粉末衍射仪(XRD)测试淀粉结晶结构差异。测试前, 将淀粉样品置于含有氯化钡饱和溶液的干燥器中平衡一周, 确保不同样品的水分含量相一致。测试条件: 扫描范围 $5^{\circ}\sim 50^{\circ}$, 扫描速度 $10 (^{\circ})/\text{min}$, 步长 0.013° , 工作电压 40 kV, 工作电流 40 mA。测试结束后, 利用 Jade 6.0 软件计算不同样品的结晶度。

取 1.2 g(干基)上述 1.3.1 中制备的淀粉样品于 50 mL 离心管, 加入 20 mL 超纯水, 密封后置于沸水浴中糊化 30 min。随后冷却至室温, 置于 4°C 冰箱冷藏 4 d, 随后取出样品冷冻干燥。干燥结束后, 粉碎, 利用 XRD 测定不同样品的结晶结构变化, 用于比较不同样品的老化行为差异。

1.3.4 淀粉相对分子质量及其分布测定 根据文献[23], 将淀粉样品(5 mg)与含有 5.0% 溴化锂的 5 mL 二甲基亚砜溶液充分混合, 并使用热混合器在 90°C 下加热 3 h。测定前, 样品溶液经过 $5.0\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤。测试条件: 流动相为含有 50 mmol/L 溴化锂的二甲基亚砜(超声脱气, 并经 $0.2\ \mu\text{m}$ 有机相过滤膜过滤); 色谱柱: 凝胶色谱柱(Styragel, HMW 6E, WAT 044205, 美国 Waters 公司, $7.8\ \text{mm}\times 300\ \text{mm}$, 分离范围 $5\times 10^3\sim 1\times 10^7\ \text{g/mol}$); 进样体积 $100\ \mu\text{L}$, 流速 $0.7\ \text{mL}/\text{min}$, 柱压 2 923 kPa, 测试温度 40°C , 测试波长 632.8 nm, 流动相的折光指数为 1.478 5, 淀粉溶液的示差折光(dn/dc)值为 $0.074\ \text{g}/\text{mL}$, 采用 Astra 软件处理数据。

1.3.5 表观直链淀粉含量测定 根据文献[24]修改如下: 准确称取 0.05 g 淀粉, 加入 10 mL NaOH 溶液(浓度为 1 mol/L), 沸水浴中充分加热 10 min 后加水定容至 50 mL。接着, 取其中的 2.5 mL 溶液与 1 mL 浓度为 1 mol/L 的醋酸水溶液及 6 mL 碘试剂(含 20 g/L 碘化钾, 1 g/L 碘), 用去离子水定容至 50 mL, 避光贮藏 10 min 后, 利用紫外分光光度计测定溶液在 620 nm 处的吸光值, 根据直链淀粉与支链淀粉标准品溶液的吸光度值计算样品中的直链淀粉含量。

1.3.6 老化淀粉消化性能测定 根据文献[25]修改如下: 测定老化淀粉的消化性能差异, 具体操作过程为: 称取 0.5 g(干基质量)淀粉样品于 50 mL 离心管, 加入 10 mL 醋酸钠缓冲液(pH 5.2)、5 颗直径为 3 mm 的玻璃珠及 2.5 mL 酶液(酶液配制方法: 6 g 猪胰酶加入 40 mL 去离子水, 200 r/min 震荡 20 min 后, 离心取上清液, 加入 1.4 mL 淀粉葡萄糖苷酶和 3.6 mL 去离子水), 混合均匀后, 在温度为 37°C 、转速为 190 r/min 的条件下酶解 20, 120 min; 随后, 取 2.5 mL 酶液与 20 mL 乙醇水溶液(乙醇体积分数

为 70%)充分混合, 5 000 r/min 离心 5 min, 取上清液用葡萄糖氧化试剂盒测定葡萄糖含量, 并计算淀粉的消化性能。

1.4 数据统计分析

利用 SPSS 22.0 软件包中的 LSD 和 Duncan 多重分析对所获得的数据进行统计学分析, 分析数据间的统计学差异性(检验水平 $P=0.05$)。图表中字母不同表示数据间有显著性差异($P<0.05$)。3 次平行试验。

2 结果与分析

2.1 普鲁兰酶酶解过程中淀粉的形貌特征变化

如图 1 所示, 未经普鲁兰酶处理的淀粉形貌特征在处理过程中并未发生显著性变化。低质量分数淀粉糊呈现网状结构, 而高质量分数淀粉糊主要呈纤维片状结构。经普鲁兰酶处理后, 所有淀粉溶液中形成明显的球状结构, 尺寸为 $0.5\sim 1.0\ \mu\text{m}$ 。低质量分数淀粉在 6~12 h 酶解过程形成的颗粒结构分布均一, 未严重聚集形成大颗粒; 而随着酶解时间的延长, 低质量分数淀粉颗粒逐步团聚。这可能是因为酶解过程中淀粉颗粒形成的数量逐步增多, 诱导淀粉颗粒团聚。高质量分数淀粉在经过 6 h 酶解处理后, 颗粒已经团聚形成大颗粒, 可能是因为高质量分数淀粉溶液在经过 6 h 酶解后已经形成了大量淀粉颗粒, 继而诱导淀粉颗粒聚集体形成^[26]。由以上结果可知, 普鲁兰酶酶解过程中不同质量分数淀粉乳液可能较显著影响淀粉分子链的聚集, 高质量分数淀粉在水溶液中可能更快形成颗粒结构并团聚形成聚集体。

2.2 普鲁兰酶酶解过程中淀粉结晶结构变化

如图 2 所示, 所有未经普鲁兰酶处理的淀粉在 X-射线衍射图谱中都不含有任何衍射峰, 表现为无定型结构。而经过普鲁兰酶处理的淀粉在 $17^{\circ}, 22^{\circ}(2\theta)$ 处有明显衍射峰, 表明淀粉在酶解过程中重排形成 B 型结晶结构^[6]。此外, 随着酶解时间的延长, B 型结晶结构特征衍射峰强度逐步增强, 这是由于淀粉持续酶解与重排的结果。相比于低质量分数淀粉, 高质量分数淀粉在酶解 6~12 h 后含有更强的衍射峰信号; 而在酶解 24 h 后, 高质量分数淀粉的衍射信号强度低于低质量分数淀粉的, 可能是由于淀粉乳液的质量分数差异致使淀粉重排行为不同所导致的^[27]。

如图 3 所示, 低质量分数随着酶解时间的延长, 淀粉的结晶度逐步提高。高质量分数淀粉在 6~12 h 酶解过程中, 其结晶度随酶解时间的延长而增大, 在 12 h 后趋于稳定, 不再有明显变化。相同酶处理时间, 相比于低质量分数淀粉的结晶度, 高质量分数淀粉在 6, 12 h 时的结晶度更高; 而经过 24 h 酶解后, 高质量分数淀粉的结晶度相对较低。这可能是在酶解过程中, 淀粉重排行为影响了普鲁兰酶对淀粉的催化作用^[28]。

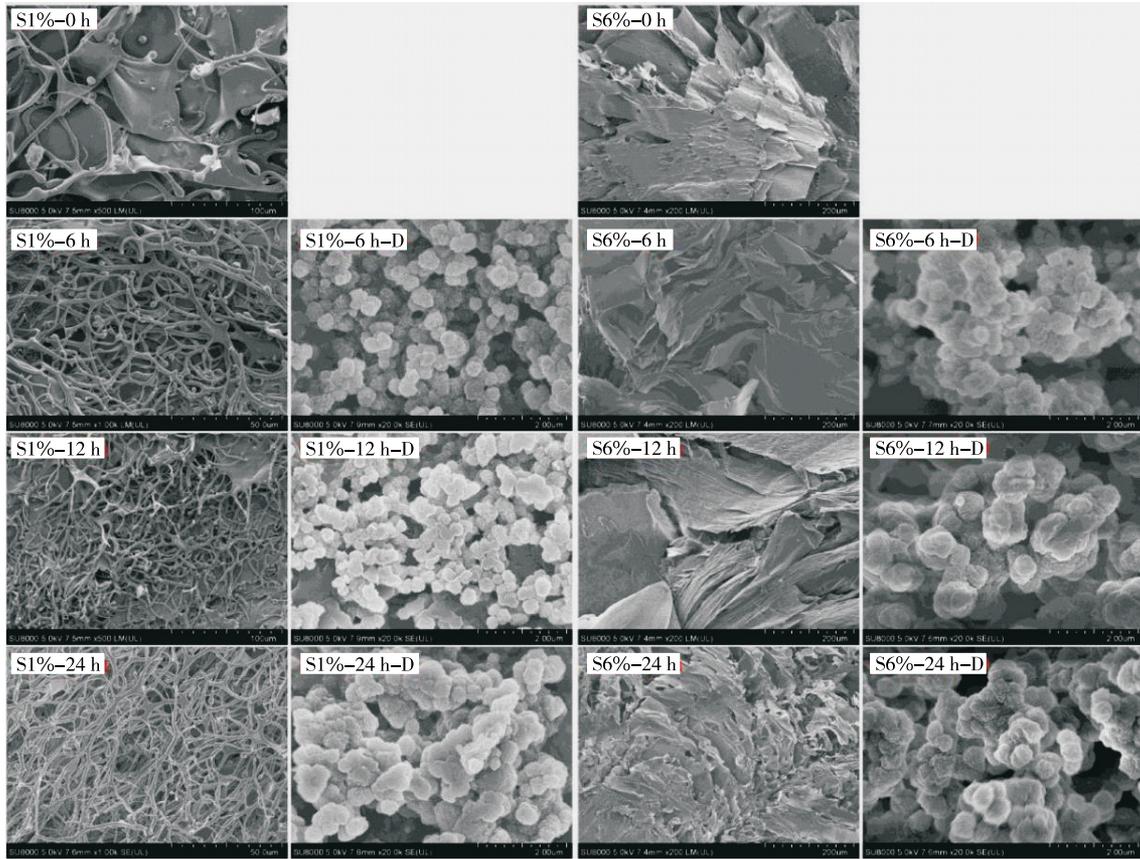


图1 普鲁兰酶酶解不同阶段下淀粉的形貌特征

Figure 1 Morphological characteristics of starch at different stages of pullulanase enzymatic hydrolysis

淀粉在酶解过程能够发生重排并形成有序聚集体^[3]。图1和图2也证实了这一点。从淀粉结构对酶催化的角度^[12],淀粉链结构与酶的活性位点结合是酶催化淀粉的基础。淀粉聚集体结构的形成将抑制酶对淀粉结构的催化^[12]。根据普鲁兰酶处理过程中淀粉的直链淀粉、相对分子质量及结晶度差异(图2~图3和表1)可知,不同质量分数的淀粉乳液可显著影响普鲁兰酶对淀粉链结构的催化作用。

2.3 普鲁兰酶酶解过程中淀粉相对分子质量及其分布变化

普鲁兰酶酶解过程中淀粉的相对分子质量变化如表1所示。经普鲁兰酶处理的玉米淀粉在37~60 min处有一明显洗脱峰,这是由支链淀粉的流出导致的。而经过普鲁兰酶酶解后,淀粉分子的洗脱时间延长到64~87 min,表明普鲁兰酶显著降解了淀粉分子。不同酶解处理的淀粉洗脱峰在64~75 min范围内的示差信号强度有

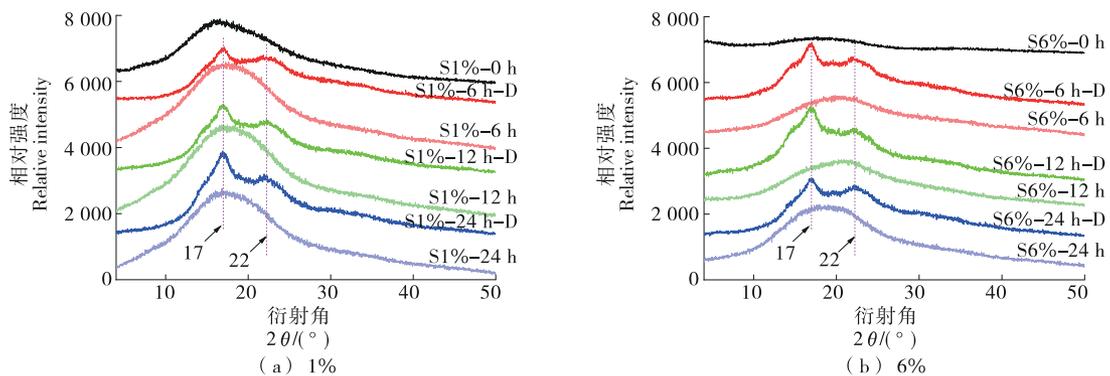
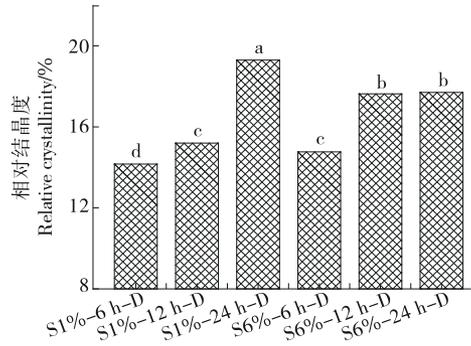


图2 1%和6%淀粉乳液在普鲁兰酶酶解不同阶段下的X-射线衍射图谱

Figure 2 X-ray diffraction patterns of 1% and 6% starch suspensions at different stages of pullulanase enzymatic hydrolysis



字母不同表示数据之间存在显著性差异 ($P < 0.05$)

图3 普鲁兰酶酶解不同阶段下淀粉的相对结晶度

Figure 3 Relative crystallinity of starch at different stages of pullulanase enzymatic hydrolysis

明显差异,表明不同酶解处理淀粉的相对分子质量有明显的差异性。

由表1可知,普鲁兰酶显著降低了淀粉的相对分子质

量(M_r)。随着普鲁兰酶酶解时间的延长,低质量分数和高质量分数淀粉的小相对分子质量片段的含量均逐步增多、淀粉的相对分子质量也逐步降低,表明普鲁兰酶在持续降解淀粉。在相同酶解时间下,相比于高质量分数的淀粉,低质量分数的淀粉在6~24 h酶解过程中的小相对分子质量片段的含量更高、相对分子质量显著更低,说明低质量分数的淀粉更有利于普鲁兰酶对淀粉分子链结构的催化。此外,低质量分数淀粉在经历12 h普鲁兰酶处理后,其相对分子质量不再随时间的延长而降低,说明低质量分数的淀粉在12 h内可能酶解较为彻底。而高质量分数的淀粉在12~24 h范围内,其相对分子质量仍进一步降低,说明高质量分数的淀粉在12~24 h范围内仍被普鲁兰酶催化降解。根据淀粉相对分子质量的变化结果(表1)可知,在12~24 h酶解过程中,低质量分数的淀粉溶液中的淀粉不再发生降解;而高质量分数的淀粉溶液中的淀粉由于结晶度较高,普鲁兰酶对其降解作用更弱,使得溶液中的淀粉相对分子质量更高。

表1 淀粉的相对分子质量(M_r)大小及分布[†]

Table 1 Relative molecular weight (M_r) and distribution of starch

样品	M_r	相对分子质量分布			
		<5%	5~10%	10~20%	>20%
WMS	18 895.58 ± 3.20 ^a	0.00 ± 0.00 ^f	0.00 ± 0.00 ^e	0.00 ± 0.00 ^f	100.00 ± 0.00 ^a
S1%-6 h-D	4.57 ± 0.02 ^c	70.17 ± 0.18 ^d	20.37 ± 0.09 ^c	8.69 ± 0.07 ^e	0.76 ± 0.02 ^c
S1%-12 h-D	4.30 ± 0.06 ^c	72.29 ± 0.17 ^a	19.83 ± 0.13 ^d	7.36 ± 0.06 ^d	0.45 ± 0.01 ^e
S1%-24 h-D	4.33 ± 0.09 ^e	72.04 ± 0.17 ^a	20.13 ± 0.19 ^{cd}	7.38 ± 0.06 ^d	0.44 ± 0.01 ^e
S6%-6 h-D	4.90 ± 0.10 ^b	67.48 ± 0.17 ^e	21.01 ± 0.09 ^a	10.28 ± 0.07 ^a	1.22 ± 0.03 ^b
S6%-12 h-D	4.46 ± 0.04 ^d	70.78 ± 0.19 ^c	20.69 ± 0.10 ^b	7.99 ± 0.06 ^b	0.51 ± 0.01 ^d
S6%-24 h-D	4.38 ± 0.03 ^e	71.47 ± 0.18 ^b	20.33 ± 0.09 ^c	7.76 ± 0.01 ^c	0.43 ± 0.01 ^e
保留时间/min		76.9~85.1	71.5~76.9	70.5~71.5	69.8~70.5

[†] 同列字母不同代表差异显著 ($P < 0.05$)。

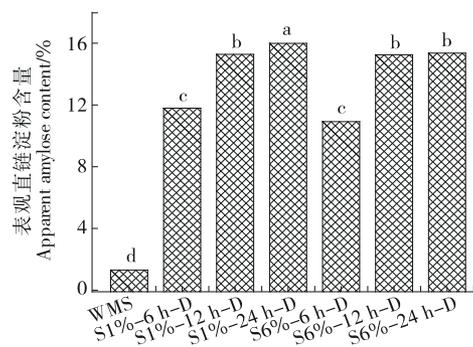
2.4 普鲁兰酶酶解过程中淀粉的表现直链淀粉含量变化

普鲁兰酶酶解过程中淀粉的表现直链淀粉含量影响如图4所示。蜡质玉米淀粉基本不含直链淀粉,而普鲁兰酶处理显著提高了淀粉的表现直链淀粉含量,与Shi等^[7]的研究结果相一致。随着酶解时间的延长,低质量分数及高质量分数淀粉的表现直链淀粉含量均呈逐步提高的变化趋势,并在酶解24 h后达到相同含量。需要注意的是,普鲁兰酶处理6 h后,低质量分数淀粉的表现直链淀粉含量与高质量分数淀粉的无显著差异;而在相同酶解时间(24 h),低质量分数淀粉的表现直链淀粉含量显著较高。说明低质量分数淀粉在前期酶解过程较有利于直链淀粉的产生,可能与淀粉酶解与重组装协同作用有关^[29]。

尽管此时不同质量分数淀粉溶液中的淀粉的直链淀粉含量无显著差异(图4),但在高质量分数淀粉溶液中的

淀粉的直链淀粉含量势必高于低质量分数淀粉溶液中的。而当溶液中的直链淀粉比例较高时,淀粉分子链之间的碰撞概率势必会更高,致使高质量分数淀粉溶液中的淀粉分子链重排程度较高,即淀粉结晶度较高(图3)。

当高质量分数淀粉溶液中的淀粉形成有序聚集体后,溶液中淀粉有序度增大,普鲁兰酶对淀粉的酶解作用减弱。反观低质量分数淀粉溶液,由于淀粉在前6 h内的重排程度低(图3),使其在6~12 h内仍能较好地被普鲁兰酶酶解,继而显著提高低质量分数淀粉溶液中淀粉的直链淀粉含量。因此,经历12 h普鲁兰酶处理后,相较于高质量分数淀粉溶液中的淀粉,低质量分数淀粉溶液中的淀粉的直链淀粉含量较高(图4)、相对分子质量较低(表1)。然而,低质量分数淀粉溶液中的直链淀粉尚未重排形成晶体,使得高质量分数淀粉溶液中的淀粉结晶度



字母不同表示数据之间存在显著性差异($P < 0.05$)

图4 普鲁兰酶解不同阶段下淀粉中表观直链淀粉含量
Figure 4 Apparent amylose content of starch at different stages of pullulanase enzymatic hydrolysis

仍比低质量分数淀粉溶液中的高。

2.5 不同酶解淀粉老化后的结晶结构差异

如图5所示,蜡质玉米淀粉经老化处理后,其X-射线衍射图谱上没有明显衍射峰,说明淀粉几乎不含有结晶结构。经普鲁兰酶处理后的淀粉在X-射线衍射图谱上有明显的衍射峰(17° 及 22°),表明淀粉含有典型的B型结晶结构^[6]。不同酶解处理的淀粉经老化后,在 17° 及 22° 处衍射峰的信号强度有较明显差异,说明酶解处理工艺显著影响淀粉在贮藏过程的重排行为。

如图5所示,随着酶解时间的延长,老化淀粉的结晶度逐步提高,这可能与淀粉相对分子质量的降低及直链淀粉的产生有关^[10]。6、24 h酶解处理的低质量分数和高质量分数淀粉,在老化后的结晶度无显著差异;然而,12 h酶解处理的低质量分数淀粉在老化后的结晶度比12 h酶解处理的高质量分数淀粉经老化后的要高。这些结果与图4的表观直链淀粉含量变化趋势相一致。众所周知,直链淀粉重排后可作为晶核促进晶体成长^[11]。直链淀粉含量影响淀粉在老化过程中的结晶行为。因此,老化淀粉的结晶结构差异可能与淀粉中直链淀粉含量密切相关。

2.6 不同酶解淀粉老化后的消化性能差异

如表2所示,不经酶解处理的淀粉在老化后的快消化淀粉(RDS)、慢消化淀粉(SDS)和抗性淀粉(RS)含量分别为79.00%,8.59%,12.41%。经过普鲁兰酶处理后,所有淀粉的RDS含量显著降低,RS含量显著升高。随着酶解前处理的时间增加,低质量分数及高质量分数淀粉在老化后的RDS含量逐步降低,二者在24 h酶解前处理后的RDS含量达到最低,均为55%左右。需要注意的是,低质量分数及高质量分数淀粉在经过6 h(或24 h)酶解及老化处理后的RDS含量无显著性差异,但经12 h酶解及老化处理后的低质量分数淀粉的RDS含量相对于高质量分数淀粉显著升高。RDS含量的变化与老化淀粉的结晶度及酶解淀粉的直链淀粉含量的变化趋势相一致,说明酶解

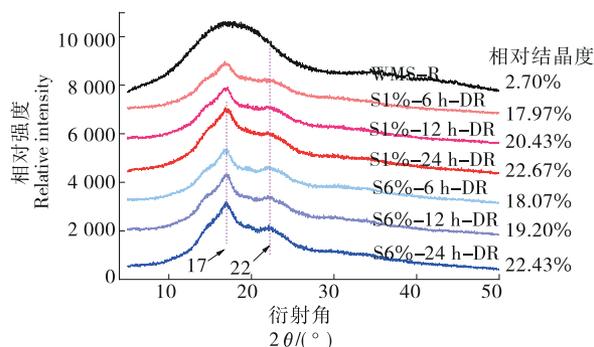


图5 普鲁兰酶解不同阶段下淀粉老化后的X-射线衍射图谱及淀粉相对结晶度

Figure 5 X-ray diffraction patterns and relative crystallinity of starch after aging at different stages of pullulanase enzymatic hydrolysis

淀粉的直链淀粉含量影响淀粉在老化过程中的重排行为,继而影响老化淀粉的消化性能差异。

从淀粉消化与机体餐后血糖应答水平来看,淀粉类产品的RDS含量越高,其餐后血糖应答水平越高^[30]。长期食用富含RDS的淀粉类制品容易导致肥胖及糖尿病等慢性疾病的病发,不利于人体健康发展^[8-9]。淀粉经普鲁兰酶酶解及老化处理后,RDS含量显著降低,对于人体健康水平的维持较为有利。而从淀粉酶解的角度来看,低质量分数淀粉在12 h酶解及老化处理后比相同条件下高质量分数淀粉的RDS含量要高,故12 h以内的普鲁兰酶改性对象应该选择低质量分数淀粉体系。从食品加工效率来看,高质量分数淀粉体系更适合于淀粉的加工与改性。

表2 不同酶解淀粉老化后的消化性能[†]

Table 2 Digestibility of starch after enzymatic hydrolysis and aging

样品	RDS	SDS	RS
WMS-R	79.00 ± 1.19 ^a	8.59 ± 1.44 ^a	12.41 ± 1.04 ^d
S1%-6 h-DR	67.92 ± 1.54 ^b	4.43 ± 1.30 ^b	27.64 ± 2.09 ^c
S1%-12 h-DR	59.06 ± 2.56 ^d	6.99 ± 3.76 ^{ab}	33.94 ± 1.92 ^b
S1%-24 h-DR	54.53 ± 2.18 ^e	6.33 ± 3.61 ^{ab}	39.15 ± 2.69 ^a
S6%-6 h-DR	68.43 ± 2.16 ^b	3.98 ± 2.39 ^b	27.59 ± 1.62 ^c
S6%-12 h-DR	64.24 ± 1.36 ^c	5.12 ± 0.71 ^b	30.63 ± 1.97 ^b
S6%-24 h-DR	55.35 ± 2.34 ^e	5.39 ± 1.66 ^b	39.25 ± 2.11 ^a

[†] 同列字母不同代表差异显著($P < 0.05$)。

2.7 普鲁兰酶处理对不同质量分数淀粉结构的影响机制

根据普鲁兰酶酶解过程中淀粉链结构及聚集态结构差异,推测普鲁兰酶处理过程中淀粉乳液质量分数对淀粉结构影响机制如图6所示。低质量分数和高质量分数淀粉在起始酶解过程中(< 6 h), α -1,6糖苷键被切断,溶

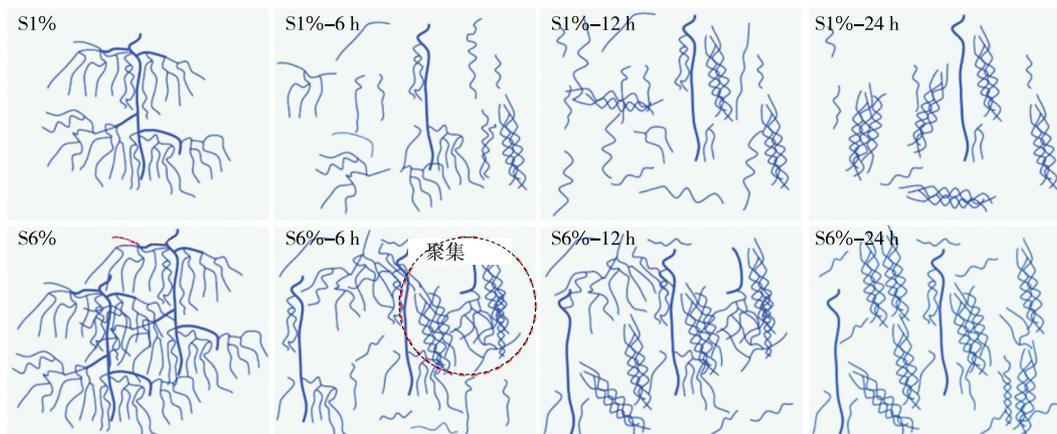


图 6 淀粉在普鲁兰酶处理过程中的结构转变模型图

Figure 6 Structural transformation model of starch during pullulanase treatment

液中产生大量线性糊精；尽管低质量分数淀粉溶液及高质量分数淀粉溶液中的淀粉的直链淀粉含量一样，但前者的相对分子质量更低，对淀粉重排形成结晶结构更为有利^[31]，使得低质量分数淀粉溶液中的淀粉的结晶度显著增大。因此，低质量分数淀粉溶液中的淀粉在普鲁兰酶处理 24 h 后，其结晶度高于高质量分数淀粉溶液中的。综上，淀粉乳液质量分数显著影响普鲁兰酶对淀粉分子链的催化作用。淀粉在普鲁兰酶处理过程中将重排形成有序结构，继而抑制普鲁兰酶对淀粉的催化作用。高质量分数淀粉溶液中淀粉容易重排形成聚集体，抑制普鲁兰酶对淀粉的长效酶解，从而影响淀粉的直链淀粉含量及相对分子质量分布情况，最终制约淀粉的老化行为及老化淀粉的消化性能。

3 结论

不同质量分数淀粉溶液在普鲁兰酶处理过程中均重排形成含有 B 型结晶的有序聚集体，相比于低质量分数溶液中的淀粉，高质量分数溶液中的淀粉在酶解过程中更容易聚集并重排形成有序聚集体，延缓普鲁兰酶对淀粉的催化作用，使得高质量分数溶液中淀粉的相对分子质量较大。当酶解时间为 12 h 时，低质量分数溶液中的淀粉在老化后的消化性能更低。研究结果证实了淀粉在普鲁兰酶处理过程中发生重排并形成有序聚集体，淀粉乳液质量分数影响淀粉的重结晶行为，抑制普鲁兰酶对淀粉分子链的酶解。淀粉乳液质量分数制约淀粉在普鲁兰酶处理过程的重排行为，继而影响普鲁兰酶对淀粉的长效酶解作用。基于该研究的方法，可以选取不同类型的淀粉开展研究，完善普鲁兰酶调控淀粉链结构和功能特性的普遍适用性体系。

参考文献

[1] OGUNSONA E, OJOGBO E, MEKONNEN T. Advanced

material applications of starch and its derivatives[J]. *European Polymer Journal*, 2018, 108: 570-581.

[2] AHMAD ASHWAR B, GANI A, SHAH A, et al. Preparation, health benefits and applications of resistant starch: a review[J]. *Starch-Stärke*, 2016, 68(3/4): 287-301.

[3] TESTER R F, KARKALAS J, QI X. Starch: composition, fine structure and architecture[J]. *Journal of Cereal Science*, 2004, 39(2): 151-165.

[4] IMBERTY A, BULÉON A, TRAN V, et al. Recent advances in knowledge of starch structure[J]. *Starch-Stärke*, 1991, 43(10): 375-384.

[5] WANG S J, LI C L, COPELAND L, et al. Starch retrogradation: a comprehensive review[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2015, 14(5): 568-585.

[6] LIU W, HONG Y, GU Z B, et al. In structure and *in-vitro* digestibility of waxy corn starch debranched by pullulanase[J]. *Food Hydrocolloids*, 2017, 67: 104-110.

[7] SHI M M, CHEN Y, YU S J, et al. Preparation and properties of RS III from waxy maize starch with pullulanase[J]. *Food Hydrocolloids*, 2013, 33(1): 19-25.

[8] HII S L, TAN J S, LING T C, et al. Pullulanase: role in starch hydrolysis and potential industrial applications[J]. *Enzyme Research*, 2012, 2 012: 921362.

[9] XIA W, ZHANG K, SU L Q, et al. Microbial starch debranching enzymes: developments and applications[J]. *Biotechnology Advances*, 2021, 50: 107786.

[10] MIAO M, JIANG B, ZHANG T. Effect of pullulanase debranching and recrystallization on structure and digestibility of waxy maize starch[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2009, 76(2): 214-221.

[11] SHI J L, SWEEDMAN M C, SHI Y C. Structural changes and digestibility of waxy maize starch debranched by different levels of pullulanase[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 194: 350-356.

[12] ZHANG B J, CHEN L, ZHAO Y, et al. Structure and enzymatic resistivity of debranched high temperature-pressure

- treated high-amylose corn starch[J]. *Journal of Cereal Science*, 2013, 57(3): 348-355.
- [13] 段绪果, 吴敬. 微生物GH13家族淀粉脱支酶研究进展[J]. *微生物学报*, 2013, 53(7): 648-656.
- DUAN X G, WU J. Advances in studying microbial GH13 starch debranching enzyme: a review[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(7): 648-656.
- [14] 徐兵, 刘洁, 刘亚伟. 普鲁兰酶脱支对淀粉结构及热稳定性的影响[J]. *食品科技*, 2020, 45(7): 255-261.
- XU B, LIU J, LIU Y W. Effect of debranching by pullulanase on structure and thermal stability of starch[J]. *Food Science and Technology*, 2020, 45(7): 255-261.
- [15] 曹川, 解鹏. 响应面优化普鲁兰酶酶解玉米淀粉工艺研究[J]. *牡丹江师范学院学报(自然科学版)*, 2020(2): 44-48.
- CAO C, XIE P. Response surface methodology for optimization of hydrolysis conditions for corn starch by pullulanase[J]. *Journal of Mudanjiang Normal University (Natural Sciences Edition)*, 2020(2): 44-48.
- [16] CHI C D, ZHOU Y C, CHEN B L, et al. A facile method for classifying starch fractions rich in long linear dextrin[J]. *Food Hydrocolloids*, 2023, 135: 108182.
- [17] DHITAL S, WARREN F J, BUTTERWORTH P J, et al. Mechanisms of starch digestion by α -amylase: structural basis for kinetic properties[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2017, 57(5): 875-892.
- [18] PUNIA BANGAR S, ASHOGON A O, SINGH A, et al. Enzymatic modification of starch: a green approach for starch applications[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2022, 287: 119265.
- [19] ORFORD P D, RING S G, CARROLL V, et al. The effect of concentration and botanical source on the gelation and retrogradation of starch[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1987, 39(2): 169-177.
- [20] ZHANG Y J, ZHU K X, HE S Z, et al. Characterizations of high purity starches isolated from five different jackfruit cultivars[J]. *Food Hydrocolloids*, 2016, 52: 785-794.
- [21] 张雨桐, 张彦军, 徐飞, 等. 不同淀粉脱支酶对菠萝蜜种子淀粉分子结构的影响及糊化特性研究[J]. *热带作物学报*, 2019, 40(1): 150-157.
- ZHANG Y T, ZHANG Y J, XU F, et al. Effect of different starch debranching enzymes on the molecular structure of jackfruit seed starch and pasting properties[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2019, 40(1): 150-157.
- [22] WANG H W, WANG Y, WANG R, et al. Impact of long-term storage on multi-scale structures and physicochemical properties of starch isolated from rice grains[J]. *Food Hydrocolloids*, 2022, 124: 107255.
- [23] CHI C D, GUO X, ZHOU Y C, et al. A facile method for isolating long branch-chains of amylopectin from starch by preheating and pullulanase treatment[J]. *Industrial Crops and Products*, 2023, 191: 115987.
- [24] LU P, LI X X, JANASWAMY S, et al. Insights on the structure and digestibility of sweet potato starch: effect of postharvest storage of sweet potato roots[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 145: 694-700.
- [25] ENGLYST H, CUMMINGS J. Digestion of the polysaccharides of some cereal foods in the human small intestine[J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1985, 42(5): 778-787.
- [26] 莫琰, 杨尚威, 赵灿, 等. 普鲁兰酶酶解对葛根淀粉理化特性的影响[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(13): 79-85.
- MO Y, YANG S W, ZHAO C, et al. Effect of enzymatic hydrolysis by pullulanase on the physicochemical properties of kudzu starch[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(13): 79-85.
- [27] 刘程玲, 胡煜莹, 王力翔, 等. 普鲁兰酶酶解处理红薯淀粉及其性质研究[J]. *中国粮油学报*, 2018, 33(2): 6-11.
- LIU C L, HU Y Y, WANG L X, et al. Pullulanase enzymatic treatment on sweet potato starch[J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2018, 33(2): 6-11.
- [28] 陈彩雯, 田佳宁, 于坤正, 等. 电场处理对普鲁兰酶水解糯米淀粉的影响[J]. *食品与机械*, 2022, 38(7): 1-6.
- CHEN C W, TIAN J N, YU K Z, et al. Effect of the electric field treatment on the pullulanase-catalyzed hydrolysis of waxy rice starch [J]. *Food & Machinery*, 2022, 38(7): 1-6.
- [29] 赵凯, 陈威, 宫玉晶, 等. 酶脱支处理对颗粒态缓慢消化淀粉形成的影响[J]. *食品科学技术学报*, 2019, 37(2): 42-47.
- ZHAO K, CHEN W, GONG Y J, et al. Effect of enzyme debranching treatment on formation of granular slowly digestible starch[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2019, 37(2): 42-47.
- [30] 王艳, 张煜松, 刘兴丽, 等. 湿热处理对绿豆淀粉结构及理化特性的影响[J]. *轻工学报*, 2022, 37(3): 36-42.
- WANG Y, ZHANG Y S, LIU X L, et al. Effect of heat moisture treatment on the structural and physicochemical properties of mung bean starch[J]. *Journal of Light Industry*, 2022, 37(3): 36-42.
- [31] PU H Y, CHEN L, LI L, et al. Multi-scale structural and digestion resistibility changes of high-amylose corn starch after hydrothermal-pressure treatment at different gelatinizing temperatures[J]. *Food Research International*, 2013, 53(1): 456-463.