

不同修饰程度对蜡质玉米淀粉理化性质和消化特性的影响

Effect of branch-chain elongation on physicochemical properties and digestibility characterization of waxy corn starch

何健^{1,2} 王韧^{1,2} 张昊^{1,2} 周星² 陈正行^{1,2}

HE Jian^{1,2} WANG Ren^{1,2} ZHANG Hao^{1,2} ZHOU Xing² CHEN Zheng-xing^{1,2}

(1. 江南大学粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122)

(1. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

摘要:利用淀粉蔗糖酶(AS)的转糖基活力修饰蜡质玉米淀粉(WCS),探索不同修饰程度对其理化性质和消化特性的影响。结果表明:在给定的反应条件下,酶反应进程可用对数函数进行模拟;与 A 型的原淀粉相比,改性 WCS 的结构更为致密,且呈现出 B 型结晶特性;改性前后淀粉的支链长度分布变化显著,随着转糖基率(TR)的增加,Fr I(聚合度(DP)>30)组分所占比例显著增加,Fr III(DP<13)组分所占比例显著减小;与原淀粉(抗性淀粉(RS)含量=0.8%)相比,改性 WCS 的 RS 含量明显提高(53.1%≤RS 含量≤73.6%),随着 TR 的增加,改性 WCS 的 RS 含量呈现先增加后缓慢降低的趋势,在 TR=88% 时,RS 含量达到最高(73.6%)。

关键词:淀粉蔗糖酶;改性淀粉;理化性质;消化特性

Abstract: Waxy corn starch (WCS) was modified by amylosucrase (AS). The effect of starch elongation degree on the digestibility and physicochemical properties of modified waxy corn starch (WCS) was investigated. The results showed that under the given reaction condition, enzymatic reaction could be fitted by a logarithmic mathematical model. Compared with native starch, the modified WCSs expressed a continuous matrix structure, and the packing arrangement of crystalline converted from A-type into B-type. With transglycosylation rate (TR) increasing, an increased tendency of proportion of Fr I (DP>30) was observed, whereas the contents of Fr III (DP<13) was significantly decreased. In vitro test showed that the resistant starches (RS) were conspicuously enhanced in modified WCSs (53.1%≤RS

content≤73.6%) compared to raw starch (RS content = 0.8%). With the increased TR, the contents of RS in modified WCSs were increased at the beginning and attained the highest content (73.6%) when TR=88%, then RS content slowly declined.

Keywords: amylosucrase; modified starch; physicochemical properties; digestibility

淀粉蔗糖酶(amylosucrase, AS)是一种葡萄糖基转移酶,隶属于糖苷水解酶 13 家族,它最大的特点是不需要外加糖基供体,仅依靠蔗糖糖苷键断裂的能量就可以形成一个新的 α-1,4-糖苷键^[1-2]。根据反应体系中是否存在糖基受体,AS 的催化途径可以分为两种:①当反应体系中仅存在蔗糖底物时,AS 将蔗糖水解成游离的葡萄糖和果糖,并以葡萄糖为初始受体发生转糖基反应,生成不同链长的直链 α-1,4-葡聚糖^[1];②当反应体系中同时存在蔗糖底物和受体时,AS 则直接将蔗糖的葡萄糖基转接到受体分子的非还原性末端,进行支链延长修饰,同时生成果糖^[3]。AS 对受体的选择具有特异性,只有通过 α-1,4-糖苷键,或者 α-1,4-糖苷键和 α-1,6-糖苷键连接的 α-葡聚糖,才能作为它的有效受体^[4]。目前,关于 AS 应用的研究主要集中在抗性淀粉(RS)或慢消化淀粉的制备方面^[5-7],但是关于 AS 不同修饰程度对支链淀粉理化性质、分子结构以及消化特性的影响,目前尚未见报道。

本研究拟以蜡质玉米淀粉(WCS)为受体,利用 AS 的转糖基活力制备出不同程度支链延长修饰的改性 WCS,并对其理化性质、分子结构和消化特性进行分析表征,以期合理利用 AS 修饰支链淀粉提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

蜡质玉米淀粉:国民淀粉化学(上海)有限公司;

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:31201381,31301505)

作者简介:何健(1991—),男,江南大学在读硕士研究生。

E-mail: Adrian_HJ@163.com

通讯作者:王韧

收稿日期:2015-10-07

蔗糖、果糖、麦芽五糖和麦芽七糖:美国 Sigma-Aldrich 公司;

普鲁兰多糖标准品:日本昭和电工科学仪器有限公司;

异淀粉酶、RS 测定试剂盒:爱尔兰 Megazyme 公司;

三(羟甲基)氨基甲烷、盐酸、3,5-二硝基水杨酸:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

高效液相色谱仪:1260 系列,配备示差检测器,美国安捷伦科技有限公司;

色谱柱:Shodex OHpak SB(804、802.5)HQ,日本昭和电工科学仪器有限公司;

X-射线衍射仪:D8 型,德国 BRUKER AXS GMBH 有限公司;

水浴恒温振荡器:SHZ-B 型,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;

扫描电子显微镜:Quanta-200 型,荷兰 FEI 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 AS 的制备及酶活测定 AS 的基因克隆、表达、分离和纯化参考文献[2]。酶活的测定在振荡速率为 120 r/min 的 35 °C 的水浴摇床中进行,蔗糖底物浓度为 0.1 mol/L, WCS 浓度为 1 mg/mL,反应时间 10 min,以 0.05 mol/L Tris—HCl(pH 7.0)作为缓冲溶液。1 个酶活单位(U)被定义为:在此反应条件下每分钟释放 1 μmol 的果糖^[5]。果糖的测定采用 3,5-二硝基水杨酸法(DNS 法)^[8]。酶液蛋白质浓度测定采用 Bradford 法,以牛血清蛋白作为标准物。

1.2.2 转糖基率的测定 转糖基率被定义为转接到原淀粉上的葡萄糖基的质量与原淀粉质量的百分比,根据 AS 反应原理,可通过 DNS 法测定反应体系中释放出的果糖的量来计算转糖基率,见式(1)。

$$TR = \frac{162 \times m_f}{180 \times m_i} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

TR——转糖基率,%;

m_f ——果糖质量,g;

m_i ——初始淀粉质量,g。

1.2.3 改性 WCS 的制备

(1) 酶反应进程的数学模拟:改性反应在酶反应器中进行,反应前淀粉(0.1%, m/V)在常压下煮沸 1 h 进行糊化预处理,反应温度 35 °C,蔗糖浓度 0.02 mol/L,酶活 280 U/L。在不同反应时间下取样,煮沸灭酶后测定转糖基率,以反应时间为横坐标(X),转糖基率为纵坐标(Y),利用软件 Origin 8.0 中的对数函数模型对酶反应进程进行非线性拟合,得到回归方程。

(2) 不同程度支链延长修饰改性 WCS 的制备:对淀粉大分子进行支链延长修饰会导致其沉淀析出,针对这种现象,本研究在反应体系出现沉淀前后共选取了 4 个不同的目标转糖基率(50%,90%,130%,170%),并利用上述回归方程计算出理论反应时间 T_i ,从而精确控制酶反应制备出不同支链延长修饰程度的改性淀粉。反应结束后,加热煮沸 10 min 灭酶,随后将其置于 4 °C 冰箱中过夜,通过离心(10 000 r/min,15 min)、洗涤、冻干、研磨、过筛(200 目)后得

到改性淀粉样品。对照样的制备是将淀粉(0.1%)在常压下煮沸 1 h 糊化后,置于 4 °C 冰箱中过夜,冷冻干燥。

1.2.4 淀粉颗粒形态表征 淀粉的颗粒形态采用扫描电子显微镜表征,将研磨过筛后的样品粘于薄层双面胶上,真空喷涂铂金,在电压为 5 kV 的电子束中观察样品,拍摄具有代表性的淀粉颗粒形态照片。

1.2.5 淀粉结晶特性分析 淀粉的结晶特性采用 X-射线衍射仪测定。将淀粉样品置于相对湿度 100% 的干燥器中平衡 18 h,随后将样品压入带有凹槽的玻璃片中,并保证淀粉样与玻璃片保持水平^[5]。X-射线衍射测试条件:衍射角 $2\theta = 4^\circ \sim 40^\circ$;步长:0.02°;扫描速度:2°/min;靶型:Cu/K α ;管压:40 kV。

1.2.6 淀粉支链长度分布测定

(1) 样品预处理:精确称取改性 WCS 50 mg 于 25 mL 具塞玻璃瓶中,加 1 mL 超纯水润湿后,再加入 9 mL DMSO 和十字形磁力搅拌子,盖塞后置于沸水浴中加热(同时磁力搅拌)1 h,随后在室温条件下搅拌过夜。精确量取 1 mL 的上述溶液于 15 mL 的 Falcon 离心管中,加入 6 mL 无水乙醇,混匀后离心(4 500 r/min)15 min,弃去上清后将离心管放在通风橱中沥干,加入 9 mL 煮沸的超纯水,并置于沸水浴中加热 10 min;将离心管转入 50 °C 的恒温水浴锅中,待温度稳定后加入 1 mL 0.05 mol/L 醋酸钠缓冲液(pH 3.5),混匀后立即加入 2 μL 异淀粉酶(1 000 U/mL)进行脱支,反应 48 h 后沸水浴加热终止反应,过 0.22 μm 水系滤膜后趁热进样。

(2) 高效体积排阻色谱(HPSEC):采用 HPSEC 对脱支后的淀粉支链长度分布进行表征,色谱柱为 Shodex SB-804 HQ 和 SB-802.5 HQ 串联并配备 Shodex SB-G 保护柱,柱温为 50 °C,检测器温度为 30 °C,流动相为超纯水,流速为 1.0 mL/min,进样量为 20 μL。以麦芽五糖、麦芽七糖以及不同分子量的普鲁兰多糖(P-5、P-10、P-20 和 P-50)作为标样,标样进样浓度为 1 mg/mL。所得示差信号归一化处理后,不同链段 Fr I(聚合度(DP)>30)、Fr II(13<DP<30)、Fr III(DP<13)所占比例通过峰面积累积积分计算获得^[9-10]。

1.2.7 RS 含量测定 采用 RS 测定试剂盒。

2 结果与讨论

2.1 不同程度支链延长修饰改性 WCS 的制备

改性反应进程中转糖基率随反应时间的变化见图 1。采用对数函数模型对其进行拟合,回归方程为 $Y = 38.87 \ln X + 101.44$,校正系数 $R^2 = 0.987$,表明该回归方程能很好的模拟 AS 对 WCS 的改性反应进程。反应过程中可以观测到:在反应进行 48 min 后,反应体系开始浑浊并慢慢有沉淀生成。在此基础上,本研究在沉淀出现前后共选取了 4 个不同的目标转糖基率(50%,90%,130%,170%)作为反应终点,来制备不同程度支链延长修饰的改性 WCS。表 1 给出了制备这些样品的理论反应时间及其实测转糖基率值,由表 1 可知:制备不同程度支链延长修饰改性 WCS(50%,90%,130%,170%)所需的理论反应时间 T_i 分别为 16,45,125,350 min;改性淀粉的实测转糖基率值均与目标值非常接近,进一步证实上述回归方程能够很好地模拟酶反应进程。

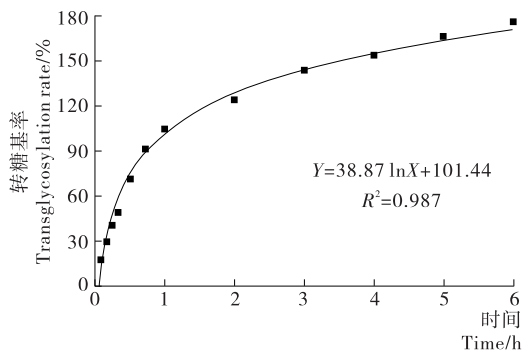


图 1 酶反应进程的数学模拟

Figure 1 Mathematical simulation of the process of enzymatic reaction

2.2 淀粉颗粒形态

如图 2 所示, WCS 的原淀粉颗粒呈现出不规则多边形或球状, 表面较为光滑, 粒径大小在 $5 \sim 25 \mu\text{m}$, 这与 Hizukuri^[9]

表 1 制备改性 WCS 的理论反应时间及实测转糖基率值

Table 1 Theoretical reaction time for preparing modified waxy corn starch and measured value of transglycosylation rate ($n=3$)

目标转糖基率/%	理论反应时/min	实测 TR/%
50	16	52 ± 1
90	45	88 ± 1
130	125	130 ± 2
170	350	168 ± 3

和杨留枝等^[11]报道的结果相一致。对照样呈现无颗粒片状形态, 这是糊化淀粉冷冻干燥后的典型形态。改性淀粉颗粒呈现出大小形状不规则、堆积致密的块状结构, 这与 Zieba 等^[12]报道的回生淀粉颗粒形态相似。Kim 等^[6]在研究 AS 修饰改性大米、大麦淀粉时, 也报道了类似的颗粒形态变化。

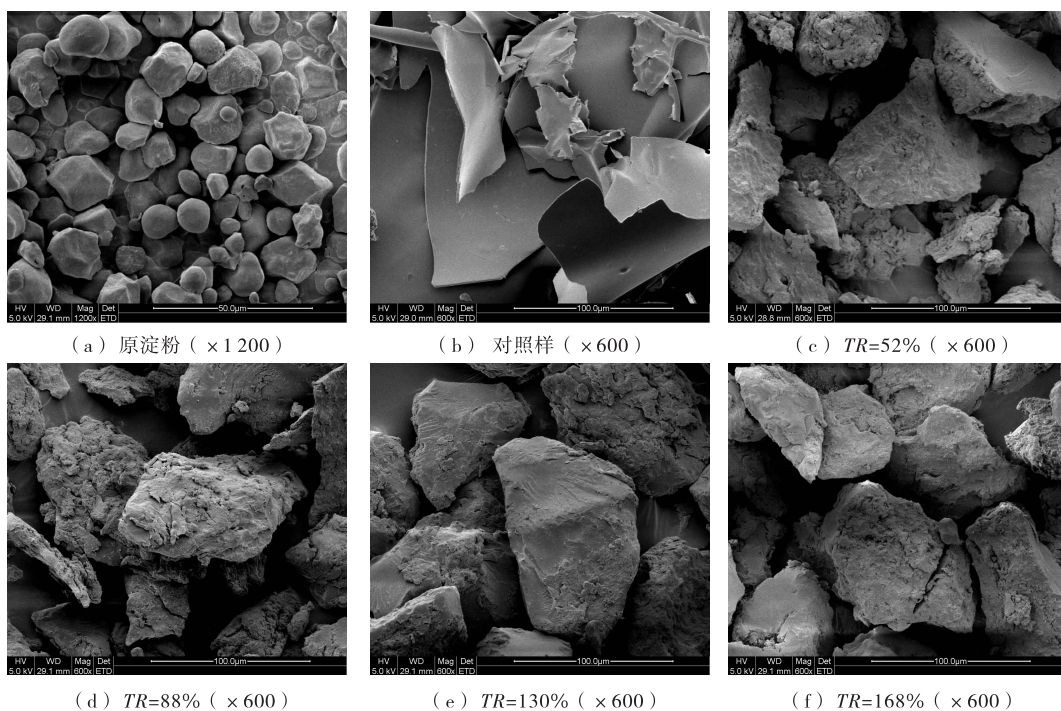


图 2 原淀粉及改性淀粉扫描电镜图

Figure 2 Scanning electron micrographs of the native and modified waxy corn starches

2.3 淀粉颗粒晶体结构

由 X-射线衍射图谱(图 3)可知, 原淀粉呈现出典型的 A 型结晶特征, 对照样的曲线中只有弥散特征而无衍射特征, 改性 WCS 则呈现出典型的 B 型结构特征, 这与 Ryu 等^[5]报道的结果相一致。Hizukuri 等^[9]在研究支链淀粉结晶类型与淀粉链长关联时发现, A 型淀粉链长较短, 且短链 ($6 < DP < 12$) 部分所占比例较大, 而 B 型淀粉相反。Cai 等^[13]认为淀粉在高浓度、高温、短链条件下易形成 A 型结晶结构, 而在低浓度、低温、长链条件下易形成 B 型结晶结构。在本研究中, 对照样经过热处理后失去淀粉原有的结晶结构, 但由于 WCS 分子中含有较多的短链, 阻碍了淀粉分子在低温环

境下通过回生形成结晶, 因此谱图中无衍射特征; 而在改性 WCS 样品中, 由于 AS 的修饰改性使得淀粉的支链得到显著延长, 降低了短链所占比例, 从而促进了淀粉分子的中长链两两缔合形成稳定的双螺旋结构, 并通过氢键堆积最终形成 B 型结晶结构; 此外, 从图 3 中还可以发现, 与 $TR=52\%$ 和 88% 的改性淀粉相比, $TR=130\%$ 和 168% 的两个样品的衍射峰明显要低, 表明这两个改性淀粉样品具有较低的结晶度。

2.4 支链链长分布

由图 4 可知, 原淀粉与对照样的支链链长分布无明显差异, 均在 $DP 14$ 出现主峰。当 $TR \leq 88\%$ 时, 改性 WCS 支链

链长呈正态分布,而且随着 TR 的增加,主峰向左平移($DP=26,32$),表明 WCS 的支链被 AS 显著延长;当 $TR>88\%$ 时,改性 WCS 支链链长分布图谱中的主峰不再移动,均出现在

$DP 36$ 处,但在主峰左侧逐渐形成副峰,尤其是在 $TR=168\%$ 时,在链长为 $DP 122$ 处出现一个较大的副峰。结合样品制备过程中的沉淀现象,可以推测:当 $TR\leq 88\%$ 时,淀粉分子处于较好的溶解状态,AS 对 WCS 的每个支链都进行了延长,因此在图 4 中表现为主峰逐渐向左平移;而当 $TR>88\%$ 时,由于反应体系中逐渐形成淀粉沉淀,AS 的反应活性位点急剧减少,导致 AS 仅能够对暴露在沉淀表面的少数非还原性末端进行延长修饰,从而产生一部分的超长链,在图 4 中表现为主峰位置不变,而副峰逐渐形成。

通过对图 4 不同链段部分所占面积进行积分计算可得表 2。由表 2 可知:在酶改性反应初始阶段($TR\leq 52\%$),Fr III 链段含量由原淀粉中的 24.6% 迅速降低至 2.1%,Fr I 和 Fr II 链段分别由 26.1%,49.3% 增加至 42.5%,55.3%。随着酶改性反应的进行,Fr II 链段含量逐渐下降,Fr I 链段仍持续增加。综上所述,AS 对 WCS 的修饰改性,在整体上延长了淀粉的每一个非还原性末端,增加了长链的比例,而对淀粉的理化性质和消化特性产生影响。

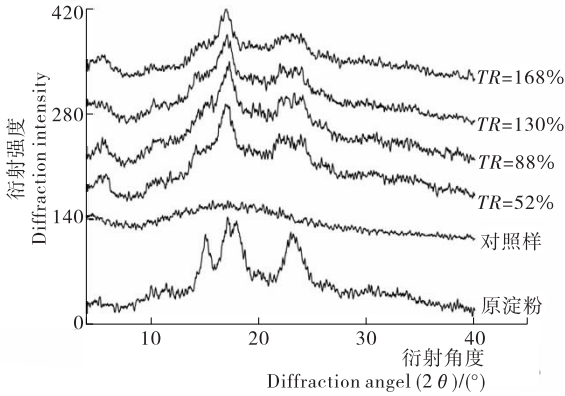


图 3 原淀粉和改性淀粉的 X-射线衍射图

Figure 3 XRD patterns of the native and modified waxy corn starches

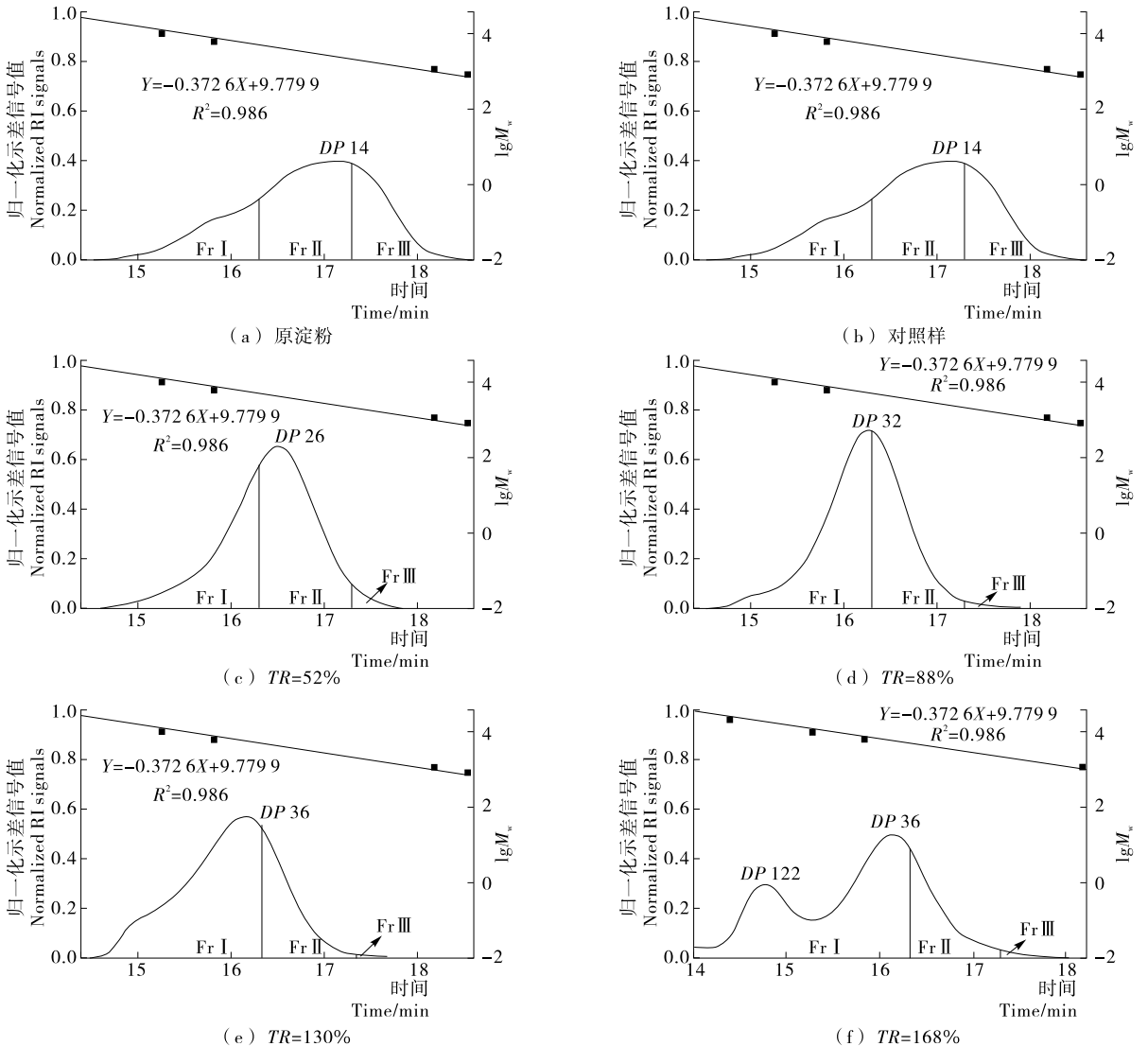


图 4 改性淀粉分子支链长度分布图

Figure 4 HPSEC profiles of the debranched waxy corn starches

表 2 淀粉不同链段所占比例

Table 2 Percentage area of Fr I, Fr II and Fr III in HPSEC profiles of the debranched starches %

淀粉样品	Fr I ($DP>30$)	Fr II ($13<DP<30$)	Fr III ($DP<13$)	\overline{DP}_w (重均聚合度)
原淀粉	26.1	49.3	24.6	25.5
对照样	26.5	49.4	24.1	26.0
TR=52%	42.5	55.3	2.1	31.7
TR=88%	61.5	37.5	1.0	38.7
TR=130%	75.0	24.6	0.5	46.1
TR=168%	77.6	21.6	0.8	53.3

2.5 抗性淀粉含量

目前,RS 含量的测定方法主要是体外消化法,具体包括:McClearly 法、Englyst 法、Goni 法和 Champion 法等。本研究使用的 RS 测定试剂盒是遵照 McClearly 法设计的。由表 3 可知,与原淀粉相比(RS 含量=0.8%),改性 WCS 的 RS 含量明显提高($53.1\% \leq \text{RS 含量} \leq 73.6\%$),且随着 TR 的增加,改性 WCS 的 RS 含量呈现出先增加后缓慢降低的趋势,在 TR=88%时,RS 含量达到最高(73.6%)。

表 3 原淀粉及改性淀粉中抗性淀粉含量

Table 3 The content of resistant starch for the native and modified waxy corn starches ($n=3$)

TR	原淀粉	对照样	52%	88%	130%	168%
RS 含量/%	0.8 ± 0.0	0.0	53.1 ± 0.4	73.6 ± 2.3	67.1 ± 1.0	61.1 ± 0.7

在淀粉的体外消化过程中,猪胰腺 α -淀粉酶与葡萄糖淀粉酶协同水解淀粉,其中占主导作用的是猪胰腺 α -淀粉酶。Casset 等^[14]研究表明,直链淀粉双螺旋具有抗性消化性,是因为猪胰腺 α -淀粉酶的结合位点无法容纳直链淀粉形成的体积大而且强度高的双螺旋片段。在本研究中,改性淀粉的 RS 含量变化应该与淀粉的支链长度分布以及淀粉蔗糖酶的作用模式相关。推测:在反应体系出现沉淀前($TR \leq 88\%$),AS 对 WCS 进行支链延长修饰显著提高了长链组分 Fr I 所占比例,从而促进抗酶解的双螺旋结构的形成,提高 RS 的含量;但是当反应体系出现沉淀后($TR > 88\%$),AS 只能对暴露在沉淀表面的非还原性末端进行延长修饰,而这部分被延长修饰的淀粉支链由于相互之间的间距较大,可能无法形成稳定的双螺旋结构,只是疏松的包覆在淀粉颗粒表面,从而易被淀粉酶水解,导致 RS 含量降低。

3 结论

通过本研究,可以得出以下结论:① 采用对数函数模型可以较好地模拟 AS 酶改性反应进程;② 与原淀粉相比,改性 WCS 的颗粒形态和晶体结构都发生了明显的变化;③ AS 能够显著延长 WCS 的支链长度,但是在反应体系出现沉淀前后,其作用模式也不同;④ 改性 WCS 的 RS 含量不仅与淀粉的支链长度分布有关,而且与淀粉蔗糖酶的作用模式相

关,体系出现沉淀后继续反应不利于 RS 含量的提高。

参考文献

- [1] Potocki-Veronese G, Putaux J L, Dupeyre D, et al. Amylose synthesized in vitro by amylosucrase: Morphology, structure, and properties[J]. Biomacromolecules, 2005, 6(2): 1 000-1 011.
- [2] Wang Ren, Kim Jung-Hwan, Kim Bum-Sool, et al. Preparation and characterization of non-covalently immobilized amylosucrase using a pH-dependent autprecipitating carrier[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(10): 6 370-6 374.
- [3] Putaux J L, Potocki-Veronese G, Remaud-Simeon M, et al. Alpha-D-glucan-based dendritic nanoparticles prepared by in vitro enzymatic chain extension of glycogen[J]. Biomacromolecules, 2006, 7(6): 1 720-1 728.
- [4] Rolland-Sabate A, Colonna P, Potocki-Veronese G, et al. Elongation and insolubilisation of alpha-glucans by the action of Neisseria polysaccharea amylosucrase[J]. Journal of Cereal Science, 2004, 40(1): 17-30.
- [5] Ryu J-H, Lee B-H, Seo D-H, et al. Production and characterization of digestion-resistant starch by the reaction of Neisseria polysaccharea amylosucrase[J]. Starch-Starke, 2010, 62(5): 221-228.
- [6] Kim B-S, Kim H-S, Hong J-S, et al. Effects of amylosucrase treatment on molecular structure and digestion resistance of pregelatinised rice and barley starches[J]. Food Chemistry, 2013, 138(2/3): 966-975.
- [7] Shin H J, Choi S J, Park C S, et al. Preparation of starches with low glycaemic response using amylosucrase and their physicochemical properties[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 82(2): 489-497.
- [8] Sumner J B, Howell S F. A method for determination of saccharase activity[J]. Journal of Biological Chemistry, 1934, 108(1): 51-54.
- [9] Hizukuri S. Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins, and its significance[J]. Carbohydrate Research, 1986, 147(2): 342-347.
- [10] 缪铭. 慢消化淀粉的特性及形成机理研究[D]. 无锡: 江南大学, 2009: 32-33.
- [11] 杨留枝, 周婧琦, 赵光远, 等. 多次超高压处理对玉米淀粉的影响[J]. 食品与机械, 2007, 23(6): 42-44.
- [12] Zieba T, Szumny A, Kapelko M. Properties of retrograded and acetylated starch preparations: Part 1. Structure, susceptibility to amylase, and pasting characteristics[J]. Lwt-Food Science and Technology, 2011, 44(5): 1 314-1 320.
- [13] Cai Li-ming, Shi Yong-cheng. Structure and digestibility of crystalline short-chain amylose from debranched waxy wheat, waxy maize, and waxy potato starches[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 79(4): 1 117-1 123.
- [14] Casset F, Imbert A, Haser R, et al. Molecular modelling of the interaction between the catalytic site of pig pancreatic alpha-amylase and amylose fragments[J]. European Journal of Biochemistry, 1995, 232(1): 284-293.