文章编号:1673-1689(2005)03-0094-04

多孔淀粉的形成过程

姚卫蓉, 姚惠源
(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 从两个方面研究了多孔淀粉的形成过程,其中扫描电子显微镜照片形象、直观地展现了糖化酶和 α-淀粉酶协同作用原淀粉颗粒的宏观效果;水解不同时间后残留物的直链淀粉含量、吸热焓的变化说明了复合酶水解的优先次序,二者从不同角度说明了酶水解原淀粉得到多孔淀粉这一过程.

关键词: 多孔淀粉;直链淀粉含量;吸热焓;扫描电子显微镜
中图分类号:Q 539.1 **文献标识码**: A

The Process of Porous Starch Formation

YAO Wei-rong, YAO Hui-yuan
(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The process of porous starch formation was observed by SEM, and the change of amylyse content and endothermic enthalpy during hydrolyzation occurred in sequence. This fact described the process of porous starch formation.

Key words: porous starch; amylose content; endothermic enthalpy; SEM

玉米、籼米和木薯淀粉经糖化酶和 α-淀粉酶协同水解,能形成多孔淀粉[1]. 用 α-淀粉酶制备多孔淀粉,其形成过程中各成分的变化,包括分子大小、外观等曾有研究[2],但至今仍然还不是很清楚糖化酶和 α-淀粉酶协同作用形成多孔淀粉的过程.

本研究试图对糖化酶和 α-淀粉酶复合水解淀粉形成多孔淀粉的机理,从两个方面作一些探索. 首先,用扫描电子显微镜(SEM)照片列出多孔淀粉的形成过程,对多孔的形成进行直观描述;再从淀粉在不同水解阶段残留物的直链淀粉含量和糊化吸热焓的变化,解释多孔的形成机理.

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

黑曲霉糖化酶:购自 Sigma 公司,酶活 6 000 U/mL,在 pH 值 4.5,55 ℃条件下 3 min 由淀粉释放 1.0 mg 葡萄糖为 1 U;杆菌 α-淀粉酶:购自 Sigma 公司,酶活 51 U/mg,在 pH 值 6.9,20℃条件下 3 min 由淀粉释放 1.0 mg 麦芽糖为 1 U;"南秀"籼米淀粉:市售籼米去蛋白后得到;玉米淀粉:市售.

1.2 多孔淀粉的制备

分别以玉米、籼米淀粉为原料. 根据文献报道[1]的酶解工艺条件制备多孔淀粉. 水解后加入质量分数 1%NaOH 溶液终止反应,洗涤,干燥,得到的样品分别进行各指标的测定.

1.3 扫描电子显微镜观察多孔淀粉的形成过程

以玉米淀粉为原料,复合酶水解不同时间后加入质量分数 1%NaOH 溶液终止反应,洗涤,干燥,得到多孔淀粉样品. 样品以戊二醛固定,磷酸缓冲液漂洗,再用锇酸固定,磷酸缓冲液冲洗,然后依次

收稿日期:2004-08-11; **修回日期**:2004-10-28.
作者简介: 姚卫蓉(1970-),女,江苏吴江人,副教授,工学博士.

万方数据

用体积分数 50%，70%，90%，100%乙醇脱水，醋酸异戊酯过滤，临界点干燥，离子溅射后，置于电镜下观察，电压 15 kV.

1.4 光学显微镜观察

将多孔淀粉凝固在石蜡中，再切成薄片，薄片经复红染色后，用酒精洗涤，再用碘染色，置于光学显微镜下观察.

1.5 差热扫描量热仪测定糊化温度、吸热焓

采用美国 PE 公司产 Pyris-1 型差热扫描量热仪(DSC)，仪器先用金属铟校正(铟的熔融焓 28.45 J/g，熔点 156.4℃). 将淀粉样品用过量水溶胀，于冰箱过夜，离心(3 000 r/min，10 min)，弃去上清液，测定溶胀淀粉的含水量. 准确称取一定量的溶胀淀粉样品于 DSC 坩埚中，加盖密封. 用惰性材料 Al_2O_3 作参比. 从 35 ℃加热到 110 ℃，升温速率 10 ℃/min. DSC 计算机软件根据得到的吸热图谱，自动处理计算，得到糊化温度(包括起始糊化温度 T_0，峰值温度 T_p，终了温度 T_c)和吸热焓，再根据样品含水量计算按干基计的吸热焓.

1.6 直链淀粉含量的测定——标准曲线法

纯马铃薯直链淀粉和蜡质大米支链淀粉以不同比例配置标准溶液，加入碘液后在 600 nm 比色，绘制标准曲线. 根据被测样品的碘吸光度，在标准曲线上读出对应的直链淀粉含量[3].

2 结果与讨论

2.1 用 SEM 照片观察多孔淀粉的形成过程

以玉米淀粉为例，分别水解不同时间，取水解残留物进行 SEM 观察，结果见图 1.

A，B，C，D，E 分别为玉米淀粉经复合酶酶解不同时间得到的水解残余物的 SEM 照片，其水解时间 A. 1 h；B. 2.5 h；C. 5 h；D. 24 h；E. 36 h；—表示 5 μm

图 1 多孔淀粉形成过程的 SEM 照片

Fig. 1 The SEM photographs during the forming process of porous starch

由图 1 中 A，B，C，D 可以看出多孔的形成过程. 酶解作用首先在粒子表面形成一个个很浅的凹坑(图 1A)，再沿着径向逐步向颗粒中心推进(图 1B，C)，然后在中心附近相互融合，形成一个中空的结构，颗粒仍保持基本形状(图 1D). 从图可以直观形象地看出多孔的形成过程，由外向内逐级推进，直至形成一个中空结构. 本实验加入的酶以糖化酶为主，酶活占总量的 80%，可以说 SEM 照片反映的水解过程完全吻合糖化酶水解原淀粉机理. 糖化酶酶解时由淀粉链的非还原性末端以 1 个葡萄糖分子为单位切割，由于淀粉分子成链状，水解连续进行. 水解沿螺旋方向进行，直至颗粒中心.

继续作用至图 1E，淀粉颗粒的部分外壳已被腐蚀、破裂，不再是一个完整颗粒，因此，在多孔淀粉的制备工艺中，应尽量避免造成此现象发生.

需要说明的是，图 1B 中各凹坑的内壁由一轮一轮的梯状物组成，犹如梯田，反映了淀粉粒子的天然结构. 说明淀粉粒子经酶作用后，天然立体结构仍然存在.

Jingan Zhao 等[4]认为，多孔淀粉形成过程中，水解酶(糖化酶，α-淀粉酶)首先进入颗粒上天然存在的微细管道，将其扩展成大镗孔，互相靠近，再于中心附近互相连接，形成大洞穴，沿着微细管道钻穿表面，形成镗孔. Huber 等人[5]也曾报道天然淀粉颗粒上有微细管道存在，这些微细管道从表面一直通向颗粒的中心附近. 但从图 1 证明，Jingan Zhao 等人[4]的观点不符合实际情况，图 1B 很好地说明各镗孔形成时是由外向内逐级推进，而不是由内向外钻穿颗粒，更不是那些可能天然存在的微细管道.

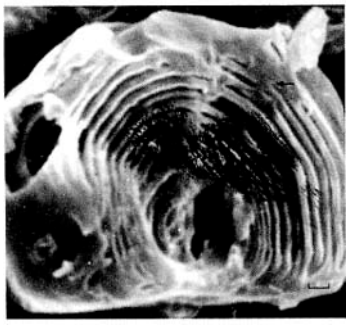
2.2 淀粉颗粒的酶解轨迹

从图 1B 可以看到水解轨迹，图 2 可以更明显地看到酶水解轨迹. 残留的螺旋状结构很好地说明了淀粉颗粒的天然结构，反映了淀粉形成过程受光照的影响，这些螺旋有点类似树的年轮.

从图 2 看出，每个螺旋之间有连接点(图中箭头所示)，有的是相邻的 2 个螺旋有一个连接点，有的是 4～5 个或更多螺旋有一个连接点. 在图正中的一个大连接点的左右两边，螺旋的数目并不一致，该颗粒的右上部与左边相对照，缺了一环，右下

万方数据

部位多了一环，左右并不对称，说明淀粉粒生长过程中，生长速度不均衡. 这一结果对研究淀粉粒子的生物合成等有一定的意义.



—表示 4 μm

图 2 酶水解原淀粉的轨迹(玉米淀粉经复合酶酶解 24 h)

Fig. 2 The tracks of the raw starch hydrolyzed by enzymes (the corn starch was hydrolyzed by the complex enzymes for 24 h)

2.3 光学显微镜观察多孔淀粉的内部结构

SEM 照片可以明显地观察到多孔淀粉的表面结构，并呈现出多孔的分布概况，但无法得知颗粒内部的有关信息. 分布在颗粒表面的各个孔的深度如何？孔与孔之间是否有连接？如果要得知这些信息，就必须用透射电子显微镜(TEM)观察. 鉴于实验条件，本实验拟用光学显微镜观察多孔淀粉的内部结构.

作者首先将上述玉米多孔淀粉凝固在石蜡中，再切成薄片，薄片经复红染色后，用酒精洗涤，再用碘染色，其目的是为了增加色差，便于观察. 然后置于光学显微镜下观察，如果切片时正好切在颗粒的中心附近，就完全可以得到多孔淀粉的内部结构图(见图 3).

—表示 6 μm

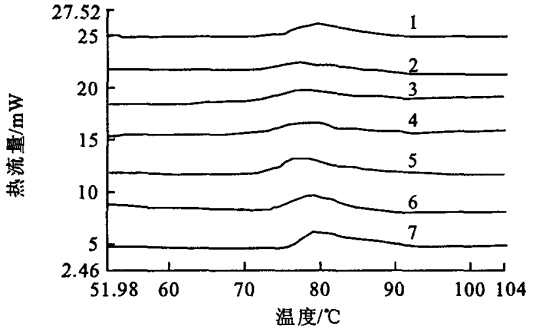
图 3 玉米多孔淀粉的内部结构

Fig. 3 The inner structure of porous starch from raw corn starch

图为在光学显微镜下观测到的正好切在颗粒中间的一个淀粉粒子，深色区为紫色，淡色区为红色，非常易于辨别. 由图可知，深色边缘靠颗粒中心的区域为空心区，证明多孔淀粉为中空结构，孔道分布在颗粒的四周，大部分孔道在颗粒中心相互熔融，形成一个空心帽壳.

2.4 从直链淀粉含量及吸热焓的变化看水解过程

分别测定籼米淀粉经酶水解不同时间后残留物的 DSC 图谱及直链淀粉含量，DSC 图谱见图 4；再根据 DSC 图谱计算各残留物的吸热焓，与直链淀粉含量一起对水解时间作图，结果见图 5.



1. 0 h;2. 0.5 h; 3. 2 h; 4. 7 h; 5. 13 h; 6. 24 h;7. 36 h

图 4 不同水解时间残留物的 DSC 图谱

Fig. 4 The DSC graphs of the residuals at different time during hydrolysis

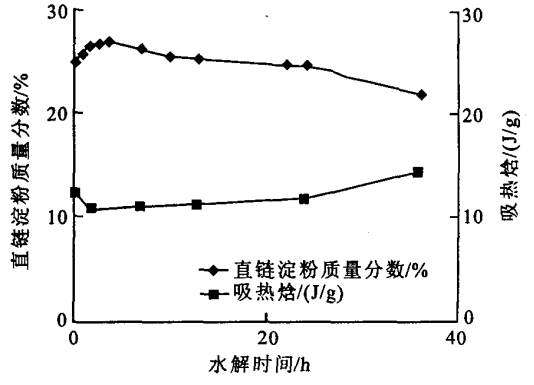


图 5 水解过程中直链淀粉和吸热焓的变化

Fig. 5 The Changes of amylose content and enthalpy during hydrolysis

由图 5 可知，反应 4 h 以前，随着水解的进行，直链淀粉含量逐渐升高，4 h 以后，逐渐减少，至 36 h 时低于原淀粉；吸热焓的变化正相反，反应刚开始，吸热焓下降，随后又逐渐上升，至 36 h 时又高于原淀粉，这两条曲线形状对应于横轴似乎是对称的.

淀粉分子内的淀粉链分为直链淀粉和支链淀粉分子链，支链淀粉分子之间相互排列聚集组成了淀粉粒子的结晶结构；而无定形区主要由直链淀粉组成，直链淀粉又与脂肪酸组成较难水解的复

合物.

直链淀粉含量的先升后降说明水解刚开始时，糖化酶优先水解淀粉突出在颗粒表面、不规则的分子基团，相对地优先被作用的大多为支链淀粉分子. 而直链淀粉分子与脂质形成了复合物，使糖化酶难以接近，再者，刚开始水解时，淀粉颗粒也没有充分溶涨，使 α-淀粉酶无法发挥作用. 因此，相对来说，体系内直链淀粉含量升高. 随着水解的进行，淀粉的溶涨使 α-淀粉酶能接近颗粒内部，使 α-淀粉酶开始起作用. 有研究者[6]也曾发现，用 pH 3.5 醋酸缓冲液 60 ℃浸泡 2 h，西米淀粉的粒子内部更易水解，其原理应该是一致的. α-淀粉酶的内切作用将淀粉分子内部随机水解，暴露出新的非还原性末端，而且 α-淀粉酶能很好地水解直链淀粉脂质复合物[7]，不像糖化酶那样受该复合物的阻碍，此时 α-淀粉酶不断随机水解淀粉分子链，为糖化酶提供新的非还原性末端，使直链淀粉含量逐渐降低.

吸热焓先降后升说明刚开始水解时，酶解主要发生在无定形区，将那些突出在颗粒表面、不规则的分子基团首先水解. 相对来说，优先酶解颗粒的无定形区，从而使结晶区含量相对升高，造成糊化难度，使吸热焓相对上升；其后，由于 α-淀粉酶的随机作用且能很好地水解直链淀粉脂质复合物，为糖化酶不断提供新的非还原性末端，此时的酶解作用相对刚开始就没有选择性，逐渐将体系内成分还原成原先状态，因而吸热焓开始慢慢恢复至原淀粉的吸热焓，至 24 h 左右多孔形成的时候，吸热焓基本恢复至原淀粉的吸热焓；随着水解的继续进行，逐渐破坏原有的颗粒结构，将各颗粒破碎成较小的颗粒，这时的情况在反映多孔形成过程的 SEM 照片中(图 1E)得到直观说明. 此时的平均粒径应该是 24 h 左右的一半，甚至更小，而糊化是体系中每个小结晶的熔化总和[8]，颗粒变小，吸热焓升高，因而作用 36 h 时淀粉颗粒的吸热焓会高于原淀粉.

3　结　论

实验从两个方面说明了多孔淀粉的形成过程，其中 SEM 照片形象、直观地展现了糖化酶和 α-淀粉酶协同作用原淀粉颗粒的宏观效果；水解不同时间后残留物的直链淀粉含量、吸热焓的变化说明了复合酶水解的优先次序，两者从不同角度说明了原淀粉酶水解原淀粉得到多孔淀粉这一过程. 首先糖化酶酶解突出在原淀粉颗粒表面的不规则部分，以及较容易水解的无定形区，沿着淀粉分子的非还原末端逐级水解；随着水解的进行，淀粉的溶涨使 α-淀粉酶能接近颗粒内部，α-淀粉酶的随机内切作用为糖化酶提供新的非还原性末端，两种酶的协同作用不仅提高了水解速度，也使水解沿着更多的点逐级向淀粉分子内部推进，原淀粉的天然立体结构支持了这种水解行为的连续性.

另外，从 SEM 照片上还可以明显地看到酶水解轨迹，残留的螺旋状结构很好地说明了淀粉的天然生长环.

参考文献：

[1] 姚卫蓉，姚惠源. 多孔淀粉的研究之 I：酶和原料粒度对形成多孔淀粉的影响[J]. 中国粮油学报，2001，16(1)：36－38.

[2] Tetsuya Yamada, Makoto Hisamatsu, Katsunori Teranishi, *et al*. Components of the porous maize starch granule prepared by amylase treatment[J]. **Starch/stärke**, 1995, 47(9): 358－361.

[3] Mcgrance S C, Cornell H J, Rix C J. A simple a rapid colorometric method for the processing on formation of resistant starch type III[J]. **Cereal Chemistry**, 1998, 75(6): 802.

[4] Zhao Jingan, Michael A Madson, Roy L Whistler. Cavities in porous corn starch provide a large storage space[J]. **Cereal Chemistry**, 1996, 73(3): 379－380.

[5] Huber K C, BeMiller J N. Channels of maize and sorghum starch granules[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2000, 41: 269－276.

[6] Wang W J, Powel A D, Oates C G. Pattern of enzyme hydrolysis in raw sago starch: effects of processing history[J]. **Carbohydrate Polymers**, 1995, 26: 91－97.

[7] Jun Ichi Abe, Kou H Nakahma, Hhoshi Nagano, *et al*. Properties of the raw-starch digesting amylase of *Aspergillus* sp. K-27: A synergistic action of glucoamylase and alpha-amylase[J]. **Carbohydrate Research**, 1988, 175: 85－92.

[8] Vasanthan T, Bhatty R S. Physicochemical properties of small- and large-granule starches of waxy, regular, and high-amylose barleys[J]. **Cereal Chemistry**, 1996, 73(2): 199－207.

(责任编辑：杨　勇)

万方数据