

灌浆期糯米淀粉精细结构变化

王万里^{1,2}, 田耀旗^{1,2}, 谢正军^{*1,2}

(1. 食品科学与技术国家重点实验室,江南大学,江苏 无锡 214122;2. 江南大学 食品学院,江苏 无锡 214122)

摘要: 分别对灌浆期 11、13、15、17、22、27 和 35 d 糯稻米取样,研究其淀粉形态、晶体和分子结构,揭示糯稻米成熟过程中淀粉精细结构的变化规律,以期为筛选慢消化性、抗老化性等新型糯米淀粉食品的加工原料提供科学依据。扫描电镜(SEM)和激光粒度仪(LPSA)研究结果表明,灌浆期糯米淀粉中出现球形颗粒,随着淀粉成熟,逐渐转化成为多面体状的颗粒,且颗粒峰值粒径不断增大,由 5.92 μm 增加至 6.77 μm 。X-射线衍射图谱(XRD)研究显示,灌浆期糯米淀粉晶型不变,然而淀粉晶体结晶度从 31.0%增加至 37.5%。采用阴离子色谱(HPLC-AEC)、高效尺寸排阻色谱联合多角度激光检测器与示差检测器联用系统(HPSEC-RID-MALLS)对样品分子结构进行检测发现,灌浆期淀粉分支密度逐渐增加,由 81.91%提高至 83.88%;灌浆后期大分子淀粉分子含量增加,相对分子质量 $6.817 \times 10^7 \sim 1.033 \times 10^8$;灌浆后期糯米淀粉在水中更容易聚集。

关键词: 糯米淀粉;灌浆期;淀粉结构

中图分类号: TS 23 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2018)10-1054-06

Structural Properties of the Starches Isolated from Developing Waxy Rice Seeds

WANG Wanli^{1,2}, TIAN Yaoqi^{1,2}, XIE Zhengjun^{*1,2}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In this study, waxy rice starches (WRS) were isolated from the developing waxy rice seeds that were harvested at pollination stage for 11, 13, 15, 17, 22, 27, and 35 days. The structural properties, including the shape, the crystallites, and molecular structure, were studied to find the change law of starch structure during pollination stage. The results, obtained from scanning electron microscope (SEM) and laser particle size analyzer (LPSA), showed that the spherically immature starch particles gradually disappeared and powder particle size of the peak increased from 5.92 μm to 6.77 μm . The XRD data indicated that the relative crystallinity increased from 31.0% to 37.5% during pollination stage. Molecular structure analysis suggested that the weight-average molecular weight (M_w) and the number-average molar mass (M_n) were the higher for the increased side chain during later pollination stage. WRS isolated from later pollination stage was easier to gather together

收稿日期: 2016-06-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(31571792)。

* 通信作者: 谢正军(1964—),男,江苏扬州人,工学博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事淀粉资源开发。E-mail: xiezj@jiangnan.edu.cn

引用本文: 王万里,田耀旗,谢正军. 灌浆期糯米淀粉精细结构变化[J]. 食品与生物技术学报,2018,37(10):1054-1059.

after gelatinization.

Keywords: waxy rice starches, pollination stage, starch structure

淀粉主要在植物体内合成,是食品工业的重要原料,医药、化工、纺织工业的主要配料^[1]。淀粉合成与水稻胚乳中 ADPG 焦磷酸化酶(ADPGase)、淀粉合成酶(SSase)、淀粉分支酶(SBE)和淀粉脱支酶(DBE)密切相关^[2]。其中,SSase 是一种葡萄糖转移酶,以腺苷二磷酸葡萄糖(ADPG)为底物,通过 α -1,4 糖苷键不断增加直链或者支链的葡萄糖单元^[3]; SBE 在支链淀粉形成过程中的作用机制是切断 α -1,4 糖苷键并形成 α -1,6 糖苷键,与可溶性淀粉酶共同作用形成支链淀粉^[4]。DBE 能够切去支链淀粉不规整的分支,在支链淀粉合成过程中也起重要作用^[5]。然而,在灌浆期稻米成熟过程中,上述各大酶类活性呈动态变化,会引起淀粉精细结构变化^[6]。因此收割时间必然影响其在食品应用中的性能,比如慢消化性和抗老化特性。

作者采用 SEM、LPSA、XRD、HPLC-AEC、HPSEC-MALLS-RI 技术,研究灌浆期间糯米淀粉形态、晶体、分子结构变化,以期揭示糯稻米灌浆期成熟过程中淀粉精细结构变化规律,为筛选慢消化性、抗老化性等新型糯米淀粉食品的加工原料提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

灌浆期糯米:湖北黄冈市售产品;葡萄糖测定试剂盒(葡萄糖氧化酶法):上海荣盛生物药业有限公司产品;异淀粉酶:1 000 u/mL,爱尔兰 megazyme 公司产品。

扫描电子显微镜:Quanta-200 型,荷兰 FEI 公司产品;激光粒度分析仪:S3500 型,美国 Microtrac 公司产品;X-射线衍射仪:D8-Advance 型,德国 Bruker AXS 公司产品;高效尺寸排阻色谱联合多角度激光检测器和示差检测器检测系统;输送泵:1525 型,美国 Waters 公司产品;多角度激光检测仪:DAWN HELEOS II 型,美国 Wyatt 公司产品;示差折光检测器:2414 型,美国 Waters 公司产品;高效阴离子交换色谱:ICS5000 型,美国 Dionex 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 灌浆期稻谷取样 灌浆期糯米稻谷收割于湖北蕲春大别山区,灌浆时间分别为扬花后 11、13、15、17、22、27 和 35 d,收割后冷冻干燥,然后置于自封袋密封于-50℃保存。

1.2.2 灌浆期淀粉提取 淀粉提取参考 Chiou 等人方法^[7],并略改进。脱壳后的糯米 500 g 于 1 L 质量分数 0.2% NaOH 溶液浸泡 24 h,去上清液后用 NaOH 溶液洗 3 次,磨碎,然后加入 3 L 质量分数 0.2% NaOH 溶液,过胶体磨,再稀释到 5 L 置于圆柱玻璃器皿中,静置 1 h,沉淀分为 3 层,取中间层(淀粉),加去离子水,并用质量分数 0.1% HCl 溶液中和,离心(5 000 r/min, 5 min),去上清液,沉淀淀粉用去离子水洗 3 遍,于 40℃热风干燥箱中干燥 3 d,过 100 目筛后,在盛有饱和氯化钠水溶液的密闭容器中平衡 1 周备用。

1.2.3 淀粉颗粒形态测定 在室温下,将原淀粉分别固定在样品台上,镀金(10 nm),抽真空后在 5.0 kV 加速电压下用扫描电镜观察,并拍下扫描图片,测定淀粉颗粒粒径分布^[8-9]。

1.2.4 淀粉晶体结构测定 分别称取 0.5 g 淀粉制成平整平面样品试片^[10]。测试条件为:加速电压 40 kV,电流 30 mA,扫描范围(2 θ)为 3°~45°,扫描速度为 2°/min,步长 0.02°,实验重复 3 次,用 MDI Jade 5.0 软件进行结果分析。

1.2.5 淀粉分子结构测定 侧链分布测定参照 Guodong Liu 等人方法^[11]。50 mg 原淀粉加入 10 mL 醋酸钠缓冲液(0.01 mol/L, pH 3.5),然后在沸水浴中加热 30 min,冷却到 37℃,取 2 mL 淀粉溶液于 5 mL 离心管中并加入 100 μ L 稀释后的异淀粉酶(100 U/mL),震荡保温 24 h 后,沸水浴 5 min 灭活,离心(5 000 r/min, 10 min),取出 0.5 mL 上清液加入 4.5 mL 去离子水,过 0.45 μ m 水相滤膜,注入高效阴离子交换色谱系统(HPAEC-PAD)。测定条件:色谱柱 CarboPac PA200,柱温 25℃,进样量 25 μ L;流动相 A 为 150 mmol/L NaOH 溶液,流动相 B 为含 500 mmol/L NaAC 的 NaOH(150 mmol/L)溶液;流量 1 mL/min,洗脱条件参照许晶晶等人的方法^[12]。

相对分子质量测定参照 Song-Ho Yoo 等人的方法^[13]。分别将样品溶解于体积分数 90% DMSO 溶液中,沸水浴 1 h,冷却后加 5 倍体积的无水乙醇静置 1 h,离心(5 000 r/min, 5 min),用乙醇洗涤 3 次后烘干。制备样品溶液,于沸水浴中加热 1 h,使样品充分分散溶解,然后过 0.45 μm 水相滤膜,注入 HPSEC-MALLS-RI 系统中。测定条件:样品测定前,系统经葡聚糖标准系列物校正;串联色谱柱为 OHpak SB-806 HQ, OHpak SB-804 HQ;流动相为含有质量分数 0.02% NaN_3 的 NaNO_3 溶液,流量 0.6 mL/min,柱温 55 $^{\circ}\text{C}$;多角度激光光散射仪的光源波长为 623.8 nm。用系统自带的 Astra 软件分析所得实验数据,并采用两阶多项式 Berry 方程拟合得出淀粉相对分子质量分布。

2 结果分析

2.1 灌浆期糯米颗粒形貌分析

由图 1 可见,不同灌浆天数的糯米淀粉颗粒大多数呈多边形,且粒径多分布在 5~8 μm 范围。淀粉颗粒呈现出一些凹坑,这是由于淀粉经碱液处理,蛋白质从淀粉表面剥离时,造成结构破损,导致颗粒表面出现凹坑^[14]。在灌浆初期可以看到有少量的小球体状,即含有未成熟淀粉颗粒的淀粉体。随着灌浆天数的增加,这种颗粒渐渐变大并裂变成多边体的颗粒。灌浆第 35 d,稻谷成熟时,这种球状体淀粉颗粒转化成为成熟的多边体淀粉颗粒并消失。

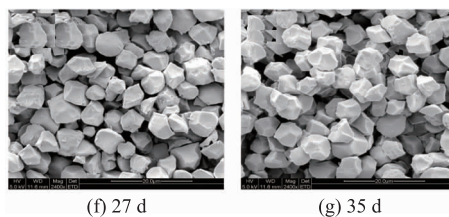
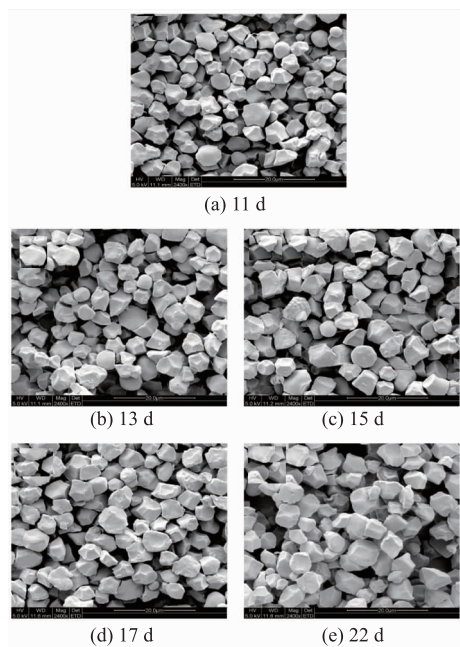


图 1 不同灌浆天数糯米淀粉扫描电镜图

Fig. 1 SEM of waxy rice starches from seeds harvested at different pollination stage

从图 2 可知,在灌浆期间,整体淀粉颗粒峰值粒径在不断增大,从 5.92 μm 增大到 6.77 μm 。反映了淀粉中未成熟淀粉颗粒粒径不断增加。在灌浆前期,有关淀粉合成的酶活性较高,淀粉积累比较快速,使粒径增长比较快。在灌浆后期大部分淀粉颗粒成熟,且主要淀粉合成酶酶活极低,使淀粉粒径维持在 6.7 μm 左右。

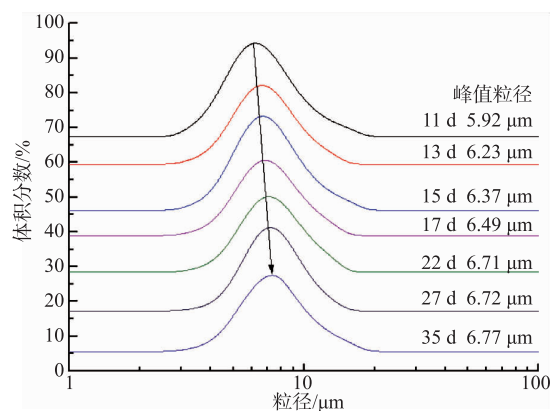


图 2 不同灌浆天数糯米淀粉颗粒粒径分布

Fig. 2 Particle diameter distribution of waxy rice starches at different pollination stage

2.2 晶体特性分析

淀粉在合成过程中,支链淀粉的非还原端与颗粒表面垂直,由内到外,呈放射状排列分子链之间通过氢键缔结,形成晶体层和无定形层交替的半晶体结构^[15]。其中晶体层由侧链的双螺旋结构紧密排列而成;无定形层主要包括松散分支点与直链淀粉^[16]。在淀粉合成过程中,侧链都有一定的长度要求。并影响分支簇结构的形成,同时造成了淀粉粒晶体结构的差异。如图 3 所示,不同灌浆天数糯米淀粉的 X-衍射图,样品的 2θ 角为 15.2 $^{\circ}$ 、18.5 $^{\circ}$ 、18.2 $^{\circ}$ 、23.2 $^{\circ}$ 。显示较强的衍射峰,为 A 型结晶峰,与先前报道一致^[17]。但不同样品间晶体结构差异主要表现在

X衍射图谱出峰之间的相对强度上,比如灌浆 22 和 27 d 样品在 $2\theta=18.2^\circ$ 峰强度比 $2\theta=17.5^\circ$ 高,而灌浆 13 d 淀粉则相反。说明在灌浆期淀粉的晶型不发生改变,但淀粉结晶区内的 α -1,6 糖苷键上的葡萄糖基间的夹角可能发生了变化^[18]。说明在灌浆期间糯米淀粉微晶排列或者结晶区的晶胞结构发生了变化。淀粉的结晶度也受支链淀粉侧链长短的影响^[19]。在 2θ 角为 20° 附近没有衍射峰出现,表明淀粉中几乎不含淀粉-脂质复合物晶体。

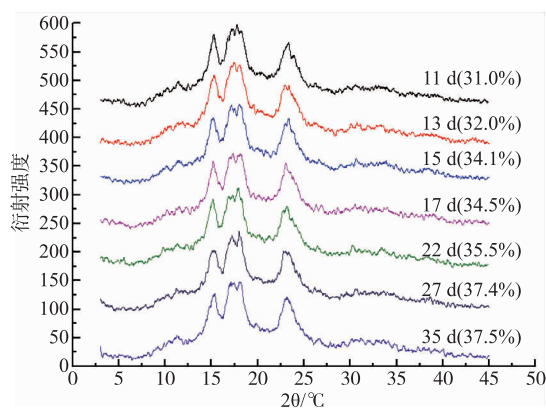


图 3 不同灌浆天数糯米淀粉的 X-衍射图

Fig. 3 X-ray diffraction patterns of waxy rice starches from seeds harvested at different pollination stage

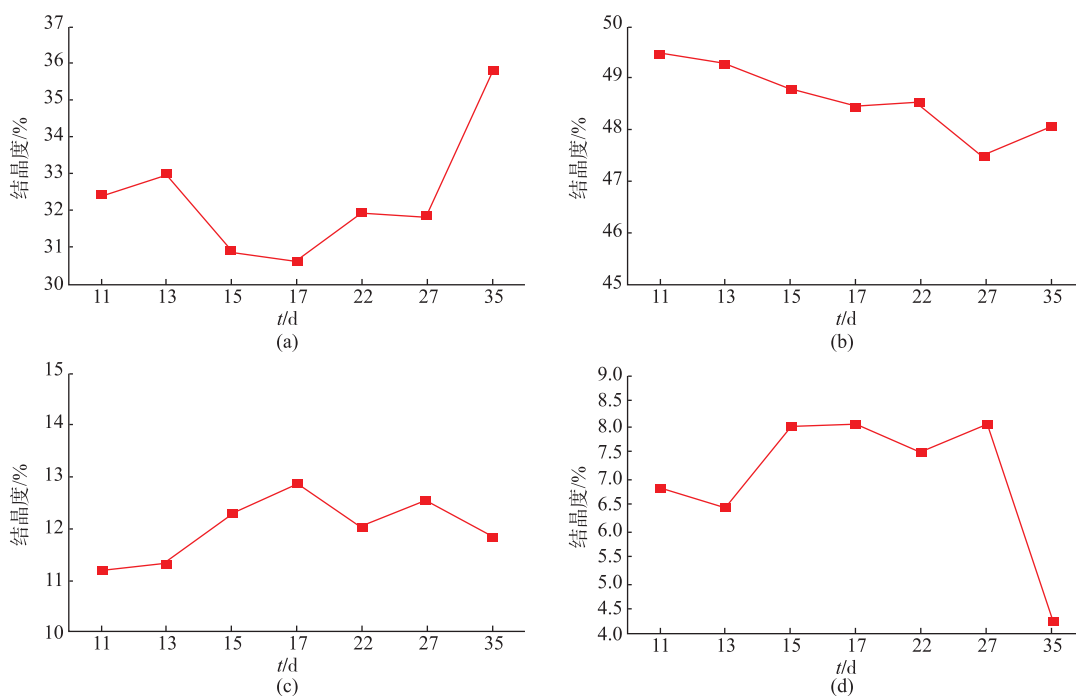


图 4 不同灌浆天数的糯米淀粉侧链分布变化

Fig. 4 Unit chain distribution of debranched amylopectins isolated from waxy rice starches at different pollination stage

图 3 中相对结晶度的大小表征了淀粉中晶体的含量。从灌浆 11~35 d, 糯米淀粉的结晶度从 31.0% 增加到 37.5%, 说明了反映了晶体含量在不断增加, 从而使灌浆期间淀粉颗粒的结构越来越坚固。

2.3 淀粉分子结构分析

2.3.1 淀粉侧链分析 根据 Liu G 报道^[11], 不同聚合度侧链划分: A 链, DP 6~12; B1 链, DP 13~24; B2 链, DP 25~36; B3 链, DP ≥ 37 。在淀粉颗粒成长过程中, 各种有关淀粉合成酶的变化一直在变化, 导致淀粉颗粒内外部侧链比例以及相对分子质量存在差异, 糯米淀粉颗粒粒径分布的变化必然引起分子结构的变化。由图 4 可见, 在整个灌浆期间 A 链结晶度整体表现为先略下降再增加的趋势, B1 链结晶度整体为下降态势。B2 链结晶度基本在 11.21%~12.85% 范围内, 变化比较小。其中 A 和 B1 链占淀粉侧比较大的比例, 并形成双螺旋进而形成结晶。它们的变化趋势与淀粉相对结晶度变化不一致, 但对微晶的排列和晶体的结构产生影响, 反映了在灌浆期侧链变化不足以对淀粉结晶度产生影响, 说明其结晶的增加是由其他无定形的转变而来。链 B3 所占比例较小, 在灌浆前期略有增加, 在灌浆后期减少到 4.25%, 在后期, 短链增加使长链含量减少。

2.3.2 淀粉分子特性分析 在食品中,淀粉多处于水环境中,用水溶液作溶解液和流动相得出的研究

结果更能反映淀粉在水环境中真实的状态。

由表 1 可以看出,在灌浆期间,旋转半径(R_w)

表 1 不同灌浆时间糯米淀粉分子特性

Table 1 Molecular characterization of waxy rice starches at different pollination stage

t/d	M_w/M_n^*	M_n	M_w	R_n	R_w
11	1.150 ^b	5.929e+7 _d	6.817e+7 ^c	149.4 _d	153.3 ^c
13	1.352 ^a	6.750e+7 ^c	9.127e+7 ^c	157.2 ^c	170.2 ^b
15	1.186 ^b	6.335e+7 ^c	7.514e+7 _d	164.4 ^b	169.8 ^b
17	1.199 ^b	4.924e+7 ^c	5.905e+7 ^f	154.9 ^c	157.3 ^c
22	1.273 ^a	9.684e+7 ^b	1.233e+8 ^b	162.6 ^b	174.4 ^b
27	1.188 ^b	1.428e+8 ^a	1.696e+8 ^a	200.5 ^a	207.6 ^a
35	1.262 ^a	8.183e+7 ^b	1.033e+8 ^b	153.9 ^c	165.7 ^b

* 同一列不相同字母表示显著性差异($p<0.05$)。

则在 153.3~207.6 nm 之间,在灌浆后期变大,与重均相对分子质量(M_w)变化一致。重均相对分子质量(M_w)从灌浆 11 d 的 6.817×10^7 ,到灌浆 17 d 为 5.905×10^7 ,然后灌浆 27 d 淀粉的相对分子质量 1.696×10^8 最大。糯米淀粉的数均相对分子质量(M_n)变化范围从 $4.924 \times 10^7 \sim 1.428 \times 10^8$ 。Z 均相对分子质量(M_z)在 $4.634 \times 10^7 \sim 1.800 \times 10^8$ 范围内。整体来看,灌浆后期淀粉的 M_w 和 M_n 比前期大,说明了具有高密度侧链的大分子淀粉含量增加。

2.3.3 淀粉分子构象分析 淀粉大分子在水溶液中重均相对分子质量与均方根半径(RMS)的关系,可以用公式表示: $RMS=KM\gamma$ 表示。RMS 随着 M_w 的增大而增大。指数 γ 可表征溶液中大分子不同的构象。 γ 为 0.33 时,大分子为球状构象, γ 为 0.5~0.6 时为无规则的线团构象。

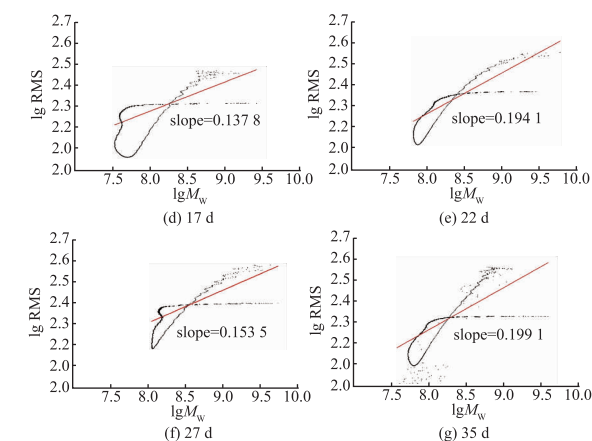
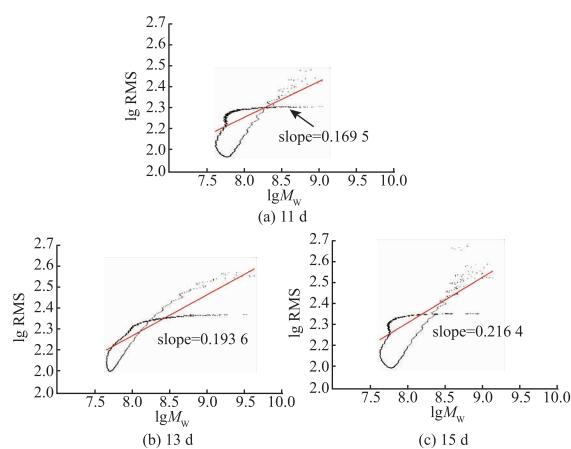


图 5 不同灌浆天数糯米淀粉的 RMS 半径对摩尔质量图 (直线是对数据的拟合)

Fig. 5 Relationships of between the weight-average molecular weight (M_w) and z-averaged mean square radius (RMS)

由图 5 可见,斜率即 γ 在 0.1378~0.2164 范围内,这是由于淀粉在水溶液中聚集导致的。近似水平的数据点所在的 RMS 代表着不同样品的聚集体所占体积的大小。聚集特性受淀粉相对分子质量的大小和排列的影响。灌浆 11、13、15、17、22、27、35 d 糯米淀粉聚集体的 RMS 分别为 200、235、220、207、230、250、213 nm。灌浆 27 d 糯米淀粉具有较大聚集体,说明其在水溶液中比较容易聚集。

3 结 语

1)在灌浆初期出现小球体状未成熟淀粉颗粒,随着灌浆天数的增加,颗粒峰值粒径从 $5.92 \mu\text{m}$ 增

加到 6.77 μm 。

2)从灌浆 11~35 d,糯米淀粉的晶体结构发生了变化且结晶度从 31.0%增加到 37.5%,反映了在灌浆期间淀粉中的晶体含量在不断增加。

3)在灌浆后期,灌浆后期淀粉的 M_w, M_n, M_z 比前期较大,具有高密度侧链的大分子淀粉分子含量增加;灌浆后期的糯米淀粉分子在水溶液比较容易聚集,且形成最大聚集体。

4)灌浆 11 d 糯米淀粉短链 A、B1 链含量较多,相对分子质量较小,同时在水中不易聚集,可作为米糕、糯米团的原料以抑制产品回生;灌浆 27 d 糯米淀粉短链 A、B1 链含量较少,相对分子质量大,容易聚集,可作为粉丝、粉条等产品的原料以促进产品回生硬化。灌浆 35 d 糯米颗粒最大且结晶度最大,可用来制作抗性淀粉、慢消化淀粉等产品的主要原料。

参考文献:

- [1] LOURDIN D, PUTAUX J L, POTOCKI V G, et al. Crystalline Structure in Starch[M]//Starch. Springer Japan, 2015: 61-90.
- [2] NAKAMURA Y, YUKI K, PARK S Y, et al. Carbohydrate metabolism in the developing endosperm of rice grains[J]. **Plant and Cell Physiology**, 1989, 30(6): 833-839.
- [3] JIANG D, CAO W, DAI T, et al. Activities of key enzymes for starch synthesis in relation to growth of superior and inferior grains on winter wheat (*Triticum aestivum* L.) spike[J]. **Plant Growth Regulation**, 2003, 41(3): 247-257.
- [4] WU A C, MORELL M K, GILBERT R G. A Parameterized model of amylopectin synthesis provides key insights into the synthesis of granular starch[J]. **PLoS ONE**, 2013, 8(6): 1-12.
- [5] JAMES M G, DENYER K, MYERS A M. Starch synthesis in the cereal endosperm [J]. **Current Opinion in Plant Biology**, 2003, 6(3): 215-222.
- [6] ZHAO B, ZHANG W, WANG Z, et al. Changes in activities of the key enzymes related to starch synthesis in rice grains during grain filling and their relationships with the filling rate and cooking quality[J]. **Agricultural sciences in China/sponsored by the Chinese Academy of Agricultural Sciences**, 2004, 4(1): 26-33.
- [7] HERBERT C, MARGRIT M, MELISSA F. Effect of purification methods on rice starch structure[J]. **Starch/Starke**, 2002, 549.
- [8] TIAN Y, ZHANG L, XU X, et al. Effect of temperature-cycled retrogradation on slow digestibility of waxy rice starch[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2012, 51(5): 1024-1027.
- [9] LI C, LI C Y, ZHANG R Q, et al. Effects of drought on the morphological and physicochemical characteristics of starch granules in different elite wheat varieties[J]. **Journal of Cereal Science**, 2015, 66: 66-73.
- [10] 魏本喜. 淀粉纳米晶的制备、分散、改性及乳化性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2015.
- [11] LIU G, HONG Y, GU Z, et al. Pullulanase hydrolysis behaviors and hydrogel properties of debranched starches from different sources[J]. **Food Hydrocolloids**, 2015, 45: 351-360.
- [12] XU Jingjing, LI Youran, ZHANG Liang. Mechanism analysis of thermobifida fusca isoamylase[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2014(7): 690-695. (in Chinese)
- [13] YOO S H, JANE J L. Molecular weights and gyration radii of amylopectins determined by high-performance size-exclusion chromatography equipped with multi-angle laser-light scattering and refractive index detectors [J]. **Carbohydrate Polymers**, 2002, 49(3): 307-314.
- [14] 李玥. 大米淀粉的制备方法及物理化学特性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008.
- [15] IMBERTY A, BULEON A, TRAN V, et al. Recent advances in knowledge of starch structure [J]. **Starch - Starke**, 1991, 43(10): 375-384.
- [16] JANE J. Current understanding on starch granule structures[J]. **Journal of Applied Glycoscience**, 2006, 53(3): 205-213.
- [17] LOPEZ R A, FLANAGAN B M, GILBERT E P, et al. A novel approach for calculating starch crystallinity and its correlation with double helix content; A combined XRD and NMR study[J]. **Biopolymers**, 2008, 89(9): 761-768.
- [18] ZENG F, MA F, KONG F, et al. Physicochemical properties and digestibility of hydrothermally treated waxy rice starch [J]. **Food Chem**, 2015, 172: 92-98.
- [19] WEI B, HU X, ZHANG B, et al. Effect of defatting on acid hydrolysis rate of maize starch with different amylose contents[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2013, 62: 652-656.