

文章编号: 1673-1689(2011)02-0194-06

4- α 糖基转移酶对大米淀粉消化特性的影响

曹旭^{1,2}, 王金鹏^{1,2}, 陈光耀^{1,2}, 田耀旗^{1,2}, 徐学明^{1,2}, 金征宇*^{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: 用4- α 糖基转移酶对大米淀粉进行改性, 采用体外模拟消化实验测定了改性后大米淀粉的消化特性, 并通过差示扫描量热(DSC)、X-射线衍射(X-ray)、扫描电镜(SEM)对改性后大米淀粉消化特性改变的原因进行了探讨。结果表明, 大米淀粉经4- α 糖基转移酶改性后, 慢消化淀粉质量分数先增加后减小, 并在改性3~4 h达到最大值; DSC测定发现, 酶改性2~6 h时样品回生焓增加, 而酶改性6 h及以上则淀粉回生焓逐渐降低; X-ray结果显示, 改性淀粉晶型逐渐由A型变为B型; SEM结果表明, 改性后淀粉变得粗糙不规则, 且有很多小颗粒紧密堆叠。这些理化特性的变化可以在机理上对淀粉消化性的变化进行一定的解释。

关键词: 4- α 糖基转移酶; 大米淀粉; 消化特性

中图分类号: TS 231

文献标识码: A

Effect of 4- α Glucanotransferase Modification on the Digestibility of Rice Starch

CAO Xu^{1,2}, WANG Jin-peng^{1,2}, CHEN Guang-yao^{1,2}, TIAN Yao-qi^{1,2},
XU Xue-ming^{1,2}, JIN Zheng-yu*^{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: This manuscript study the effect of 4- α -GTase on the digestibility of rice starch, then the corresponding mechanisms was elucidated by differential scanning calorimetry (DSC), X-ray diffraction (X-ray), and scanning electron microscope (SEM). It was found that: 1) The content of the slowly digestible starch (SDS) in starch increased to the maximum value when modified for 3~4 h by 4- α -GTase (50 U/g dry starch), and then decreased with increasing of the modification time; 2) During of 2~6 h modification, the rate of retrogradation was accelerated, then gradually decreased after 6 h; 3) The crystal structure of starch was changed from A-type to B-type after treated by 4- α -GTase; 4) The surface of starch became rough and irregular with more and smaller fraction stacked. From the above results, it is can be concluded that the changes of the digestibility could be attributed to the changes of structure and property.

收稿日期: 2010-04-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(20976070); 江苏省科技支撑计划项目(BE2008317); 江苏省自然科学基金项目(BK2009069)。

* 通信作者: 金征宇(1960-), 男, 江苏扬州人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事碳水化合物方面的研究。Email: jinlab2008@yahoo.com

Key words: 4- α glucanotransferase, rice starch, digestibility

淀粉作为人体能量供应的主要来源之一,在人体的新陈代谢过程中发挥了极其重要的作用。淀粉在人体内的主要消化部位是小肠,并以不同的速率和程度被消化。Englyst 等人^[1]模拟小肠内消化环境,在体外分析了淀粉的消化特性,并根据淀粉的消化速率将其分为 3 类: 1) 快消化淀粉(RDS),在 20 min 内被消化的部分; 2) 慢消化淀粉(SDS),在 20~120 min 内被消化的部分; 3) 抗性淀粉(RS),120 min 内不能被消化的部分。

研究证实,SDS 相比 RDS 有许多有益于人体健康的优点,如在控制血糖代谢、糖尿病、肥胖等方面有很大益处^[2]。SDS 在人体内消化较慢,可以维持一个持续的血糖供应和较低的血糖指数(GI)。而较低的 GI 在一定程度上有助于降低糖尿病和心血管疾病的风险^[3]。此外 SDS 不仅对生理有益,而且对心理还有一定的影响^[2]。

SDS 的生产通常采用物理、化学、生物等多种技术。近来许多研究利用 α 淀粉酶、普鲁兰酶或异淀粉酶来水解淀粉分子中 α 1,4-糖苷键和 α 1,6-糖苷键,从而破坏淀粉的结构并产生更多的短链,再利用淀粉链的部分回生来生产 SDS。Guraya 等人^[4]用脱枝酶处理蜡质大米淀粉生产 SDS,在此基础上 Miao^[5]对脱枝程度和回生时间对淀粉消化性的影响进行了研究。

4- α 糖基转移酶(4- α GTase, EC 2.4.1.25)是一个多功能性酶,属于 α 淀粉酶家族^[6]。已有许多学者研究了该酶的酶学性质,其对淀粉的作用可以概括为歧化、环化、偶合、水解 4 种。该酶可催化淀粉分子间的转糖基作用,使得糖苷链从一个分子链转到另一个分子链上,此反应为歧化反应;该酶也可催化分子内的转糖基作用形成环糊精,即环化反应,其逆反应称为偶合反应。关于该酶对淀粉分子结构、流变特性、回生特性都有所研究^[7-10]。Cho 等人^[9]实验证明 4- α GTase 的改性可以加速大米淀粉凝胶回生, Park^[10]证明 4- α GTase 改性大米淀粉会有低、中等相对分子质量高分子簇的支链淀粉产生。而 Lehmann^[2]认为支链淀粉回生形成的不完美晶体有利于淀粉慢消化特性的形成。所以应用 4- α GTase 改性大米淀粉,理论上可以提高淀粉体系中 SDS 的质量分数。然而,关于 4- α 糖基转移酶对大米淀粉消化特性的影响尚无报道。

作者利用 4- α GTase 改性大米淀粉,研究了改

性淀粉的消化性变化,并通过 DSC、X-ray、SEM 进一步探讨了该酶引起大米淀粉消化性变化的机理。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

大米粉:购自无锡市场;4- α 糖基转移酶:由基因工程菌 *E. coli* 培养发酵,再经分离纯化得到^[6,9];淀粉葡萄糖苷酶:由江苏无锡赛德生物工程有限公司提供(黑曲霉发酵生产);猪胰 α 淀粉酶(EC 3.2.1.1):Sigma 公司产品;其它试剂均为分析纯。

1.2 实验仪器

差示扫描量热仪(DSC):Pyris-1 型,美国 Perkin-Elmer 公司;X-射线衍射仪(X-rad):D&Advance 型,德国 Bruker AXS 公司;扫描电镜仪(SEM):Quanta-200 型,荷兰 Philips-FEI 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 改性淀粉的制备 采用碱消化法^[11]提取大米淀粉,干燥后粉碎并过 100 目筛网。配制淀粉溶液(水分质量分数 65%)并在 100 °C 水浴锅中加热 1 h 使其充分糊化,降低温度并维持在 75 °C。然后向淀粉糊中分别加入 25、50 U/g 干淀粉的 4- α GTase(酶活的定义参见文献[9]),酶解 0、2、6、12、24 h 后分别取样,立即将样品置于 120 °C 的油浴锅中加热 30 min 灭酶。待淀粉凝胶冷却到室温后,置于 4 °C 贮藏 3 d,然后在 30 °C 烘箱中干燥 48 h,最后粉碎并过 100 目筛网。

1.3.2 淀粉消化性的测定 慢消化淀粉的测定参考 Englyst^[1]和 Ming Mao^[5]。称取 200 mg 淀粉,加入 15 mL pH 值为 5.2 的磷酸盐缓冲液,并于 37 °C 的水浴锅中预热 5 min。然后加入在 37 °C 预热的 5 mL 猪胰 α 淀粉酶(290 U/mL)和淀粉葡萄糖苷酶(15 U/mL)的混酶(酶活的定义为:在 pH 5.2, 37 °C 条件下,水解 2 g/dL 的可溶性淀粉溶液 1 min 产生 1 mg 葡萄糖量为一个酶活单位),立即置于 37 °C 的水浴锅中振荡(150 r/min)并准确计时。在 20 和 120 min 时分别取出 0.5 mL 水解液,迅速加入 4.5 mL 的无水乙醇灭酶。吸取上层溶液,采用 DNS 法测定对应样品的葡萄糖质量分数。各样品重复测定 3 次。

样品中快消化淀粉(RDS)、慢消化淀粉(SDS)和抗性淀粉(RS)的质量分数按式(1)~(3)计算:

$$RDS = (G_{20} - Fc) \times 0.9 \quad (1)$$

$$\text{SDS} = (G_{120} - G_{20}) \times 0.9 \quad (2)$$

$$\text{RS} = T_s - (\text{RDS} + \text{SDS}) \quad (3)$$

式中: G_{20} 为混酶水解 20 min 后产生的葡萄糖质量分数(mg/g); F_c 为混酶水解处理前淀粉中游离葡萄糖质量分数(mg/g); G_{120} 为混酶水解 120 min 后产生的葡萄糖质量分数(mg/g); T_s , 样品中总淀粉质量分数(mg/g)。

1.3.3 淀粉的回生性 采用差示扫描量热仪(DSC)测定淀粉的回生特性。用铝盒准确称量 3.0 mg 预先处理好的样品,再用微量注射器加入 6 μL 去离子水,将铝盒密封并在室温平衡静置 2 h,然后以 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的升温速率在 30~90 $^{\circ}\text{C}$ 进行温度扫描。

1.3.4 淀粉的晶体分析 采用 X-射线衍射仪分析淀粉的晶型。采用铜靶 $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 0.15406 \text{ nm}$), 功率为 1600 W (40 kV \times 40 mA), 采用 NaI 晶体闪烁计数器测量 X-射线的强度,扫描范围为 10~30 $^{\circ}$,扫描速度 2 $^{\circ}/\text{min}$ 。DS-SS-RS 设置分别为 1 mm-1 mm-0.1 mm(发散狭缝、防散射狭缝、接受狭缝)。

1.3.5 改性淀粉的扫描电镜观察 在室温下,将干燥的、精细磨碎的淀粉固定在样品台上,镀金(10 nm)处理后在 10 kV 的加速电压下用扫描电镜观察,并拍下扫描图片。

1.3.6 数据分析 采用 Origin 7.5 分析软件进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 改性时间对大米淀粉消化特性的影响

大米淀粉糊化后,以不同的酶浓度和不同的酶解时间对大米淀粉进行改性,淀粉体系中 SDS 质量分数随改性时间的变化情况见图 1。由图 1 可以看出,SDS 的质量分数随着 4- α -GTase 改性时间的增加,先增加后减小,在 3~4 h 时达到最大值。这说明选用较高的酶浓度和较短的时间改性大米淀粉,可以得到较高含量的 SDS;随着改性时间进一步延长,淀粉中 SDS 质量分数明显降低;而且酶浓度越高,其下降得越快。

因为酶浓度和酶改性时间不同时,淀粉体系中各组分结构特性也就不同^[10]。在 4- α -GTase 改性大米淀粉的过程中,会有长侧链支链淀粉、中等相对分子质量的支链淀粉、大环糊精、低聚糖以及单糖等多种组分产生^[9-10],这些复杂的组分对淀粉的消化特性作用不一。因此,在 4- α -GTase 改性的不同阶段,改性淀粉消化特性有较大的差异。

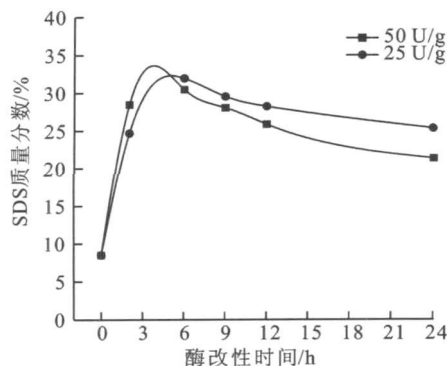


图 1 4- α -GTase 改性对慢消化淀粉的影响

Fig. 1 Effect of 4- α -GTase modification on the SDS

2.2 影响改性淀粉消化特性变化的因素

2.2.1 改性淀粉的回生特性 大米淀粉用 4- α -GTase (50 U/g 干淀粉) 改性不同时间后,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 回生 3 d,用 DSC 分析回生性,其回生情况见图 2。从图 2 可知:淀粉的回生焓随着酶改性时间的增加呈先增加后减少的趋势。空白淀粉(不加酶的淀粉)的回生焓值为 0.79 J/g。酶改性 2 h 时,淀粉的回生焓值为 1.21 J/g,即改性加速了淀粉凝胶的回生。然而改性 6 h ($\Delta H = 0.85 \text{ J/g}$) 以及更长时间时,淀粉的回生焓值逐渐减小,9 h 和 12 h 改性淀粉的回生焓值分别降为 0.47 J/g 和 0.28 J/g。由此可以看出,较短时间(2~6 h)的酶改性加速淀粉回生,而较长时间(大于 6 h)的酶改性则抗淀粉回生。推测其原因可能为:改性时间较短时,4- α -GTase 的转糖基作用相对明显,由于分子内或分子间转糖基作用使得支链淀粉侧链变长^[9],而聚合度(DP)的增加可加速淀粉凝胶的回生^[12];另一方面,改性时间较长时,4- α -GTase 的水解作用显著,淀粉链崩解并同时生成高分子簇糊精、环糊精、低聚糖等抗淀粉体系回生的物质^[10,13],从而淀粉体系回生焓降低。

淀粉回生本质上是糊化淀粉中无序分子链重排和结晶的过程。回生产生的重结晶阻碍了淀粉酶与淀粉分子活性部位的接触,从而抗淀粉酶的水解^[2],通过 DSC 的结果可部分解释改性淀粉消化性的变化。改性 2~6 h 时,样品回生度较高,所以 2~6 h 改性淀粉的 SDS 质量分数较高;而随着改性时间的增加,改性淀粉的回生程度逐渐降低,即淀粉的重结晶度逐渐降低,因此导致淀粉体系中 SDS 质量分数逐渐降低。另一方面,虽然 2 h 改性淀粉的回生焓大于 6 h 改性淀粉的回生焓,但 2 h 改性淀粉的 SDS 质量分数却小于 6 h 改性淀粉的 SDS 质量分数。这表明,淀粉回生性对消化性的影响并不是绝对的。综上可以推断:改性淀粉的回生性在很

大程度上影响并决定着淀粉消化特性, 然而淀粉的消化性可能还受到其它因素的影响。

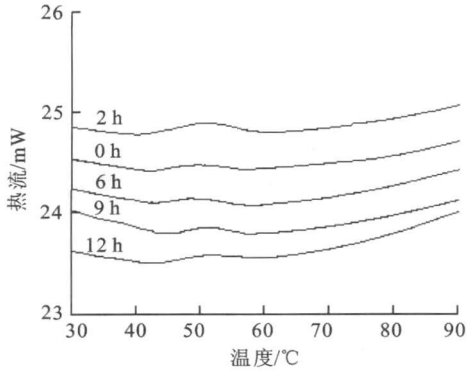


图 2 不同改性时间的淀粉糊回生 DSC 曲线

Fig. 2 Differential scanning calorimetry thermograms of the control and treated starches

2.2.2 改性淀粉的晶体分析 淀粉的晶体结构可分为 4 类, 即 A 型, B 型, C 型, 和 V 型^[14]。不同的晶体在分子链的堆叠和水分含量是不同的。这些差异会影响淀粉的消化特性, 通常与 A 型晶体淀粉相比, B 型晶体淀粉更能抗酶的水解^[15]。

大米淀粉用 4 α GTase (50 U/g 干淀粉) 改性不同时间后, 放置在 4 °C 回生 3 d, 其 X-射线衍射图谱见图 3。从图 3 可以看出: 原淀粉在 15°、17°、18° 和 23° 处显示了较强的衍射峰, 这说明大米原淀粉为典型的 A 型晶体。而在同样测定条件下, 改性淀粉显示了不同的 X-射线衍射图谱。酶改性 2 h 时, 样品无明显的特征衍射峰, 即淀粉糊化使得其 A 型晶体特征迅速丧失; 酶改性 6 h 和 9 h 时, 改性淀粉的 X-射线衍射峰变得明显, 且在 $2\theta = 17^\circ$ 和 20° 处出现强峰, $2\theta = 13^\circ$ 、 22° 和 24° 处出现弱峰, 即为 B 型和 V 型晶体的特征峰; 酶改性 12 h 和 24 h 时, 淀粉晶体的 B+V 型特征也逐渐丧失, 淀粉无明显特性衍射峰。

通过分析改性淀粉的晶体结构, 可进一步解释改性淀粉消化性的变化。酶改性 2 h 时, 淀粉无明显的特征衍射峰; 而酶改性 6 h 时, 淀粉呈现 B+V 型晶体的特征峰。因为 B 型晶体结构更适合形成淀粉的慢消化特性, 结合 DSC 的结果, 则可进一步能解释“2 h 改性淀粉比 6 h 改性淀粉回生程度高, 而 SDS 质量分数却低”的原因。另一方面, 虽然酶改性 9 h 时, 淀粉晶体同为 B+V 型晶体, 但由于其回生焓较低, 致使 SDS 质量分数较低。综合分析可知: 改性淀粉的消化性不仅受其回生性的影响, 而且还在一定程度上受淀粉晶体结构的影响。

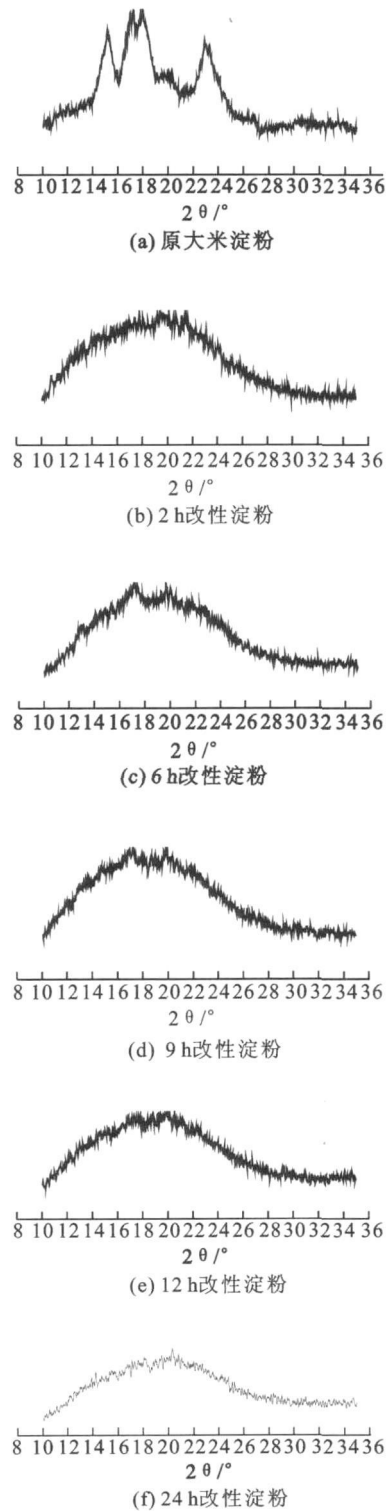


图 3 淀粉的 X 射线衍射图谱

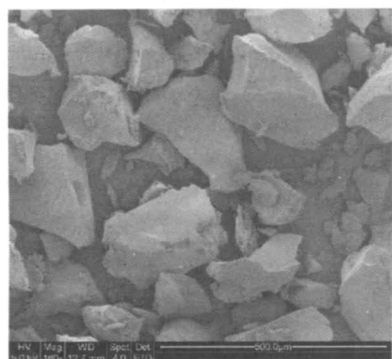
Fig. 3 X-ray diffraction patterns of samples

2.2.3 改性淀粉的表观结构 大米淀粉用 4 α GTase (50 U/g 干淀粉) 改性后, 放置在 4 °C 回生 3 d, 用扫描电镜观察淀粉颗粒的微观结构, 结果见图 4。从图 4 可以看出: 空白淀粉颗粒表面结构光滑, 颗粒较大, 有棱有角, 且其颗粒尺寸分布在 100~300 μm (图 4a); 然而, 改性淀粉呈现粗糙不规则的表面结构, 并且可以观察到有很多堆叠密度较高的

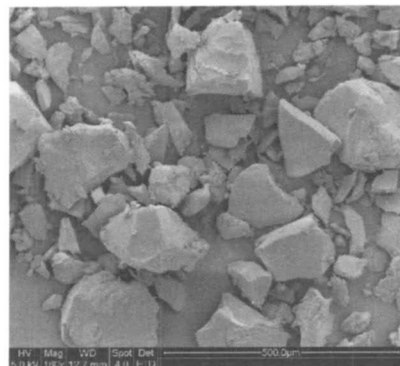
小碎片生成, 这些小碎片的颗粒尺寸分布在 30~100 μm (图 4b~ d)。

许多研究证明, 结晶区和非结晶区的堆叠对淀粉酶解的敏感性有一定程度的影响^[15-16]。

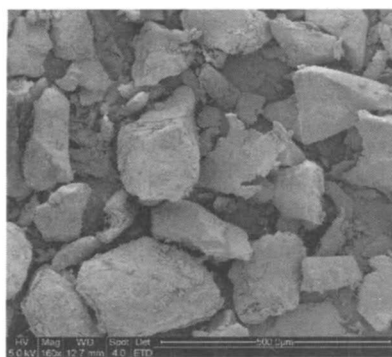
Zhang^[15]认为结晶区和非结晶区堆叠作为一个整体可以阻碍淀粉的快速消化, 最终导致形成淀粉的慢消化特性。因此, 大米淀粉经 4- α -GTase 改性后, 堆叠密度较高的碎片可能更适宜于 SDS 的形成。



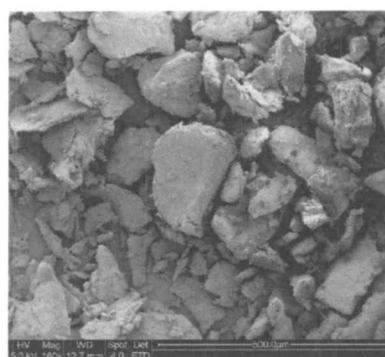
(a) 空白淀粉



(b) 2 h 改性淀粉



(c) 6 h 改性淀粉



(d) 9 h 改性淀粉

图 4 不同改性时间的淀粉 SEM 图

Fig. 4 Scanning electron micrograph of the control and treated starches

3 结 语

1) 通过控制 4- α -GTase 的改性时间可以提高大米淀粉中 SDS 的质量分数。淀粉经 4- α 糖基转移酶改性 3~4 h, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置回生时, 淀粉体系中慢消化淀粉含量最高。通过 DSC、X-ray、SEM 探讨消化性变化的机理: 淀粉体系的加速回生和晶型的转

变共同影响着改性淀粉的消化特性。

2) 该研究证实了 4- α -GTase 改性淀粉的优良消化特性, 为今后进一步利用 4- α -GTase 改善淀粉的性质并扩展该酶改性淀粉在食品工业的应用提供了更好的理论依据。至于应用 4- α -GTase 改性淀粉提高 SDS 质量分数的最适酶浓度和酶解时间, 有待进一步优化研究。

参考文献(References):

- [1] Englyst H N, Kingman S M, Cummings J H. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions [J]. *European Journal of Clinical Nutrition*, 1992, 46: S33- S50.
- [2] Lehmann U, Robin F. Slowly digestible starch its structure and health implications: a review [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2007, 18: 346- 355.
- [3] Sajilata M G, Singhal R S, Kulkarni P K. Resistant starch: a review [J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2006, 5: 1- 17.
- [4] Guraya H S, James C, Champagne E T. Effect of cooling and freezing on the digestibility of debranched rice starch and

- physical properties of the resulting material[J]. **Starch/Stärke**, 2001a, 53: 64–74.
- [5] 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: 214–221.
- [6] 冀雪霞, 王金鹏, 金征宇, 等. 产大环糊精 4- α 糖基转移酶的分离纯化及其性质研究[J]. **食品与生物技术学报**, 2010, 29(3): 338–341.
- JI Xue Xia, WANG Jin Peng, JIN Zheng Yu, et al. Purification and properties of 4- α -glucanotransferase producing large-ring cyclodextrin[J]. **Journal Food Science and Biotechnology**, 2010, 29(3): 338–341. (in Chinese)
- [7] Lee K Y, Kim Y R, Park K H, et al. Effects of α -glucanotransferase treatment on the thermo-reversibility and freeze-thaw stability of a rice starch gel[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2006, 63: 347–354.
- [8] Lee K Y, Kim, Y R, Park K H, et al. Rheological and gelation properties of rice starch modified with 4- α -glucanotransferase[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2008, 42: 298–304.
- [9] Cho K H, Auh J H, Ryu J H, et al. Structural modification and characterization of rice starch treated by *Thermus aquaticus* 4- α -glucanotransferase[J]. **Food Hydrocolloids**, 2009, 23: 2403–2409.
- [10] Park J H, Kim H J, Cha H, et al. The action mode of *Thermus aquaticus* YT-1 4- α -glucanotransferase and its chimeric enzymes introduced with starch-binding domain on amylose and amylopectin[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2007, 67: 164–173.
- [11] Lumdubwong N, Seib P A. Rice starch isolation by alkaline protease digestion of wet-milled rice flour[J]. **Journal of Cereal Science**, 2000, 31: 63–74.
- [12] Chang Y H, Lin J H. Effects of molecular size and structure of amylopectin on the retrogradation thermal properties of waxy rice and waxy corn starches[J]. **Food Hydrocolloids**, 2007, 21: 645–653.
- [13] Tian Y Q, Jin Z Y, Jin Z Y, et al. Influence of β -cyclodextrin on the short-term retrogradation of rice starch[J]. **Food Chemistry**, 2009, 116(1): 54–58.
- [14] Bulon A, Colonna P, Planchot V, et al. Starch granules: structure and biosynthesis[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 1998, 23: 85–112.
- [15] Zhang G Y, Sofyan M, Hamaker B R, et al. Slowly digestible state of starch: mechanism of slow digestion property of gelatinized maize starch[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2008, 56: 4695–4702.
- [16] Colonna P, Leloup V, Bulon A. Limiting factors of starch hydrolysis[J]. **European Journal of Clinical Nutrition**, 1992, 46: S17–S32.