

复合酶法修饰糯米淀粉分支结构 及其物化性能研究

李家豪, 桂一凡, 李 慧, 郭 丽*

(齐鲁工业大学(山东省科学院), 生物基材料与绿色造纸国家重点实验室, 食品科学与工程学院, 济南 250353)

摘要: **目的** 提高糯米淀粉的物化性质及其加工性能。**方法** 以糯米淀粉为受体, 以不同直链淀粉(小麦、玉米、大米)或麦芽糖为供体, 采用 α -淀粉酶和分支酶复合酶, 对糯米淀粉进行分子结构修饰, 测定改性前后糯米淀粉的分支度、溶解度、糊化和老化性质。**结果** 糯米淀粉通过复合酶法改性能够显著地提高改性淀粉的分支度; 改性后的淀粉易于糊化, 且糊化液的均匀性和透明度较好。通过 DSC 测定改性前后热力学性质, 发现改性淀粉未出现吸收峰, 表明淀粉结晶区中的长链被破坏, 从而形成高短链数的改性淀粉; 淀粉经过改性后得到可溶性淀粉。**结论** 糯米淀粉加入供体物质, 通过复合酶对淀粉进行改性, 能够提高改性淀粉的分支度和短链数, 制备出具有良好物化特性的改性淀粉。

关键词: 糯米淀粉; 复合酶法; 物化性质; 分支度

Physico-chemical properties and branch structure of the waxy rice starch modified by using compound enzymes

LI Jia-Hao, GUI Yi-Fan, LI Hui, GUO Li*

(State Key Laboratory of Biobased Material and Green Papermaking, School of Food Sciences and Engineering, Qilu University of Technology, Shandong Academy of Sciences, Jinan 250353, China)

ABSTRACT: Objective To improve the physico-chemical properties and processability of waxy rice starch. **Methods** The molecular structure of waxy rice starch was modified by the combination of α -amylase and branching enzyme, with waxy rice starch as receptor and different amylose (wheat, corn, rice) or maltose as donors. The branching, solubility, gelatinization and aging properties of waxy rice starch before and after modification were determined. **Results** The dual-enzymatic modification could obviously enhanced the branching degree of waxy rice starch; Comparison to native waxy rice starch, the modified waxy rice starches were easier to be gelatinized, and the gelatinized paste excellent better uniform and transparent. The thermodynamic property of the modified starch was studied using a differential scanning calorimetry. It indicated that the modified starches showed no endothermic peak. This might because the long chains in the starch crystalline were destroyed, thus forming a high number of short chains; Compared to native waxy rice starch, the solubility of the modified waxy rice starches increased to obtain

基金项目: 国家自然科学基金(31771933)、齐鲁工业大学国际合作项目(QLUTGJUZ014)

Fund: Supported by National Natural Science Foundation of China (31771933), and International Cooperation Foundation of Qilu University of Technology (QLUTGJUZ014)

*通讯作者: 郭丽, 博士, 教授, 硕士生导师, 主要研究方向为淀粉衍生物结构及其性能。E-mail: guolizhuyuer@163.com

*Corresponding author: GUO Li, Ph.D, Professor, State Key Laboratory of Biobased Material and Green Papermaking, School of Food Sciences and Engineering, Qilu University of Technology, Shandong Academy of Sciences, Jinan, Shandong Province 250353, China, E-mail: guolizhuyuer@163.com

soluble starch. **Conclusion** Adding the donor substance to the glutinous rice starch and modifying the starch by the complex enzyme can increase the branching degree and short chain number of the modified starch, and prepare the modified starch with good physicochemical properties.

KEY WORDS: waxy rice starch; dual-enzyme modification; physicochemical properties; branch degree

1 引言

淀粉作为天然大分子物质, 主要有直链淀粉和支链淀粉组成, 直链淀粉是由葡聚糖通过 α -1, 4 糖苷键连接而成的线性长链, 支链淀粉是由葡聚糖通过 α -1, 4 糖苷键连接构成主链(C 链), 分支链通过 α -1, 6 糖苷键连接到主链上^[1]。淀粉工厂化生产中常运用具有良好物化性质的改性淀粉^[2]。分支酶被广泛应用在淀粉改性, 用来改善淀粉物化性质和提高淀粉分支度。分支酶(branching enzyme, BE; EC 2.4.1.18)作用方式可分 2 步进行: (1) 通过剪切支链淀粉中长的 B₂ 链、B₃ 链以及直链淀粉等长的线性链(通常被剪切链长为聚合度 DP=2-6); (2) 在通过分支酶作用下形成 α -1, 6 糖苷键连接到淀粉链结构中的 A-链或者 B₁-链上, 从而增加淀粉的分支度和短链比例, 同时分支酶通过作用于淀粉的远程结构(即淀粉的结晶区)使得淀粉的结晶区被破坏, 分子量减小^[3-5]。为了提高糯米淀粉的物化性质及其加工性能, 本研究将糯米淀粉中加入不同种类的供体, 通过 α -淀粉酶和分支酶组成的复合酶法进行改性。糯米淀粉中加入供体(直链淀粉或者麦芽糖), 通过 α -淀粉酶的水解作用, 产生更多的短链数, 为分支酶的接枝提供丰富的接枝短链, 再通过分支酶接枝作用将聚合度 2-6 的线性链通过形成 α -1, 6 糖苷键的形式链接在淀粉的侧链上, 所以加入一定比例的线性链(小麦直链淀粉、大米直链淀粉、玉米直链淀粉、麦芽糖)和 α -淀粉酶的作用, 为分支酶的接枝提供接枝短链, 从而制备具有高分度和更多分支短链的新葡聚糖, 以期为扩大糯米淀粉的应用范围提供一定的理论基础。

2 材料和方法

2.1 材料和仪器

糯米粉(安徽燕之坊食品有限公司); 小麦淀粉、玉米淀粉、大米淀粉、 α -淀粉酶(美国 sigma 公司); 麦芽糖(分析纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 分支酶(丹麦诺维信公司产品); 无水乙醇(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

HH-4 数显恒温水浴锅(金坛市杰瑞尔电器有限公司); HJ-6A 数显恒温多头磁力搅拌器(常州市中贝仪器有限公司); SHA-C 水浴恒温振荡器(常州市中贝仪器有限公司); pHs-3C 型精密 pH 计(上海雷磁仪器厂); Christ Gamma1-16LSC 冷冻干燥机(德国 Christ 公司生产, 北京德

天佑公司); DSC8000 型差示扫描量热仪(美国 PE 公司); Agilent DD2 600 Hz 液态核磁(美国 Agilent 公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 糯米淀粉的提取和纯化

糯米淀粉的提纯参考文献^[6], 并加以改进, 糯米粉配成浓度为 2%(W/V)的淀粉浆, 加入 0.05 mol/L NaOH 溶液, 调整淀粉浆的 pH 为 10~11, 静置 24 h, 倒去上层黄色液体, 加入纯水混匀后, 3000 r/min 离心 10 min, 离心得到的固体除去最上层和最下层的黄色物质, 得到最中间白色糯米淀粉, 按照上述步骤再碱洗 3 次, 最后洗至中性。(测定糯米淀粉含量为 98.9%)。

2.2.2 直链淀粉的提取

直链淀粉的提取方法参考文献^[7], 取 2.5 g 淀粉加入 56 mL 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(浓度 90%), 加热搅拌 20 min, 直到溶液中无凝胶状肿块存在, 放置在室温下冷却 15 min, 加入 400 mL 浓度为 6% 1-丁醇和 6% 异戊醇溶液, 搅拌 15 min 充分混合后, 95 °C 水浴 1 h, 后放在恒温箱里(28 °C)下放置 20 h, 8000 r/min 离心 15 min, 得到的沉淀物继续用正丁醇和异戊醇分离, 重复 4 次。得到的直链淀粉加入乙醇不断搅拌, 抽滤后进行冷冻干燥(测定的直链淀粉含量为 72.3%)。

2.2.3 改性淀粉的制备

以糯米淀粉为受体, 分别以小麦直链、大米直链、玉米直链和麦芽糖为供体, 称取 6.0 g 糯米淀粉(受体: 供体=1:0.2)和 1.2 g 供体进行混合。加入 180 mL 纯水混匀配成浓度为 4%(W/V)淀粉液, 调整溶液体系为 pH 为 6.9, 加热搅拌 30 min 使得淀粉充分糊化后, 冷却至室温, 加入 17 mL α -淀粉酶(9 U/mL)至淀粉糊化液中, 在最适温度 53 °C 反应 4 h。沸水浴 10 min 灭酶活, 冷却至室温后调整溶液 pH 为 6.5, 再加入 119 μ L 分支酶(500 U/g 以淀粉的干基重), 在最适温度 60 °C 反应 24 h。沸水加热 10 min 灭酶活, 酶解液中加入 2 倍体积的无水乙醇, 进行醇沉, 将沉淀物冷冻干燥即获得糯米改性淀粉。

2.2.4 分支度的测定

采用 Agilent DD2 600 Hz 核磁共振仪, 装配 5 mm 转头, 设置采集时间为 1.0739 s, 弛缓时间 1.00 s, 自旋速度为 20 Hz, 扫描次数为 16 次, 温度 25 °C 下进行试验。5 mg 原糯米淀粉和改性淀粉加入 0.5 mL 重水(D₂O)中配成 10 mg/mL, 沸水中加热 30 min, 采用涡旋振荡器混匀后倒入核磁管中后进行测定。每组实验重复 3 次。根据 α -1, 4

键和 α -1, 6 键上质子谐振频率不同, 谐振频率的准确值的细微差值被称为“化学位移 (Chemical Shift)”, 单位为 mg/L。 α -1, 4 键在图谱上峰位置出现在 5.30 mg/L 附近, 而 α -1, 6 键则是在 4.90 mg/L 附近。分支度 (degree of branching, DB) 计算公式如下所示^[8]:

$$DB = \frac{A-1, 6}{(A-1, 6 + A-1, 4)}$$

2.2.5 溶解度的测定

取 1 g 淀粉 (以干基重) 于 20 mL 试管中配成 5% 溶液, 在室温下 2500 r/min 离心 20 min, 吸取 5 mL 上清液放置在已经恒重的培养皿中, 将培养皿放置在 105 °C 烘至恒重。每组实验重复 3 次。计算公式为^[9]:

$$S\% = \frac{A \times 4}{W} \times 100\%$$

式中 S : 溶解度, W : 样品干基重, A : 上清液恒重。

2.2.6 糊化和老化性质的测定

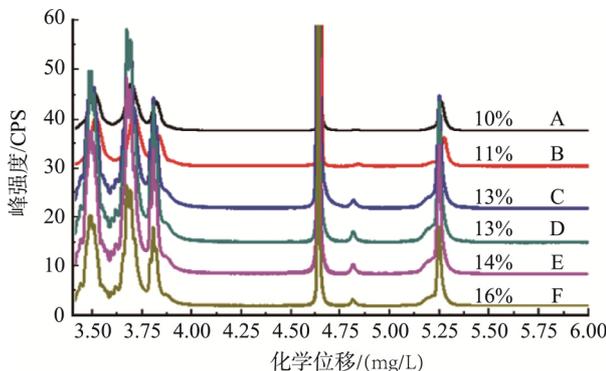
取 1 g 淀粉 (以干基重) 于 100 mL 烧杯中配成 10% 的溶液, 沸水中加热 30 min 直到淀粉完全糊化, 将糊化液倒入 10 mL 试管中观察其糊化状态。糊化液在 4 °C 冰箱中放置 7 天, 观察其老化状态。采用 Diamond DSC 8000 差示扫描量热仪, 测定样品的热力学性质。称取 0.05 g 样品以淀粉: 水为 1:4 (W/W) 的比例称于铝制坩埚并密封, 将坩埚放置在冰箱中平衡过夜, 按照 10 °C/min 的速度升温, 扫描温度范围为 30~100 °C。用 Pyris 软件分别计算出起始温度 (t_0), 峰值温度 (t_p), 终止温度 (t_c) 和相焓变 (ΔH)。每组实验重复 3 次。

3 结果与分析

3.1 复合酶法改性前后糯米淀粉分支度的变化

改性前后糯米淀粉 ¹H NMR 图谱峰强度和分支度如图 1 所示。在 5.25 mg/L 附近的峰为 α -1, 4 糖苷键的峰, 在 4.90 mg/L 附近的峰为 α -1, 6 糖苷键的峰, 在 4.65 mg/L 附近的峰为重水峰^[10]。对比样品 A 和样品 B, 样品 B 在 4.90 mg/L 处的信号峰值略有增强, 这说明仅利用复合酶改性糯米淀粉就可以使其 α -1, 6 糖苷键含量略有提升。对比样品 B 和样品 C、D、E、F, 我们发现样品 C、D、E、F 在 4.90 mg/L 处的峰信号强度明显增强, 表明糯米淀粉中加入供体通过复合酶法改性, 对于提高 α -1, 6 糖苷键含量更有效。

根据分支度大小的比较, 样品 A 的分支度 (10%) 和样品 B 的分支度 (11%) 之间的比较, 经过复合酶法改性后糯米淀粉分支度提高了 10%, 证明 α -淀粉酶+分支酶组成的复合酶法能够提高糯米淀粉的分支度。对比样品 B 的分支度和样品 C、D、E、F 的分支度, 分支度分别提高了 18%、18%、27%、45%, 证明糯米淀粉中加入供体通过复合酶法改性能够显著提高改性淀粉的分支度, 然而加入的供体种类不同, 对于分支度提高程度也不一样, 其中糯米淀粉中加入麦芽糖进行改性的样品分支度最高 (16%), 而糯米淀粉中加入小麦直链淀粉进行改性的样品分支度相对较低 (13%)。



注: A: 原糯米淀粉; B: 糯米淀粉 (α -淀粉酶+分支酶); C: 糯米淀粉: 小麦直链淀粉 (α -淀粉酶+分支酶); D: 糯米淀粉: 玉米直链淀粉 (α -淀粉酶+分支酶); E: 糯米淀粉: 大米直链淀粉 (α -淀粉酶+分支酶); F: 糯米淀粉: 麦芽糖 (α -淀粉酶+分支酶)。

图 1 利用 ¹H NMR 分析复合酶改性淀粉前后糯米淀粉分支度的变化。

Fig.1 The branching degree of waxy rice starch before and after enzyme modification using ¹H NMR analysis

3.2 复合酶改性前后糯米淀粉溶解度的变化

复合酶改性前后糯米淀粉溶解度如表 1 所示, 对比样品 A 溶解度和样品 B 溶解度, 溶解度从 9.0% 上升到 89.6%, 表明 α -淀粉酶+分支酶组成的复合酶法改性糯米淀粉, 能够提高改性淀粉的溶解度, 对比样品 B 和样品 C、D、E、F 溶解度, 我们发现除了样品 E (89.9%) 外, 样品 C、D、F 的溶解度对比样品 B 的溶解度, 样品 C、D、F 的溶解度都超过 91.0%, 而样品 B 的溶解度为 89.6%, 表明糯米淀粉加入供体后, 在通过复合酶法进行改性, 更加显著地提高改性淀粉的溶解度, 从而得到可溶性淀粉。

表 1 改性前后糯米淀粉溶解度 ($n=3$)

Table 1 The solubility of native and modified waxy rice starches ($n=3$)

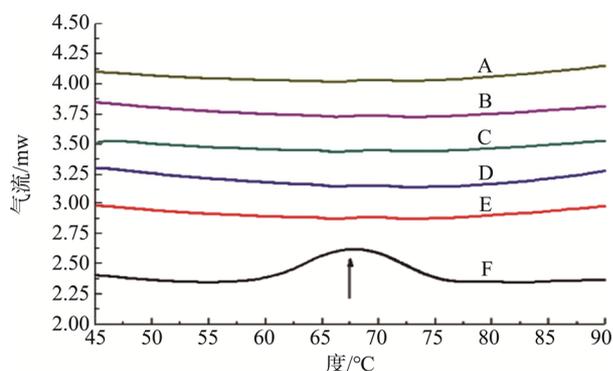
样品	A/%	B/%	C/%	D/%	E/%	F/%
溶解度 / %	9.0±0.3	89.6±0.2	91.0±0.6	92.5±0.3	89.9±0.5	93.5±0.2

注: A: 原糯米淀粉; B: 糯米淀粉 (α -淀粉酶+分支酶); C: 糯米淀粉: 小麦直链淀粉 (α -淀粉酶+分支酶); D: 糯米淀粉: 玉米直链淀粉 (α -淀粉酶+分支酶); E: 糯米淀粉: 大米直链淀粉 (α -淀粉酶+分支酶); F: 糯米淀粉: 麦芽糖 (α -淀粉酶+分支酶)。

3.3 复合酶改性前后糯米淀粉糊化状态和热力学性质

糯米淀粉中加入供体物质进行改性, 其糊化状态如图 2, 热力学性质如图 3 所示, 改性前后糯米淀粉的糊化状态和热力学性质产生一些差别。通过图 2 可以看出, 糯米原淀粉的糊化液很浑浊, 而改性淀粉的糊化液很澄清, 表明经过改性提高了糯米淀粉糊化液的透明度和均匀性。改

性前后糯米淀粉的热力学性质产生一些差别。可以很明显的观察到 DSC 图中除了糯米原淀粉外, 改性淀粉未出现吸收峰。淀粉加热糊化过程的本质就是微晶束溶解过程, 淀粉糊化过程中淀粉的有序结构被破坏即淀粉结晶区被破坏, 而淀粉的结晶区主要是以支链淀粉的 B₂ 和 B₃ 链等长链组成^[11-13]。改性的糯米淀粉通过 DSC 未检测出吸收峰, 表明淀粉结构中结晶区破坏, 而结晶区以淀粉长链组成为主。通过 DSC 检测改性前后糯米淀粉的热力学性质表明, 糯米淀粉经过改性后, 淀粉的结晶区被破坏即淀粉的长链被剪切, 从而形成高短链比的改性淀粉^[14,15]。Han 等^[11]认为淀粉经过分支酶改性后, 改性淀粉中的长链(主要为 B₃ 链)被分支酶剪切为聚合度 DP=6-7 的线性短链, 这些被剪切短链在通过分支酶链接在侧链, 因为淀粉的长链被破坏, 所以改性淀粉热力学性质中不会出现糊化吸收峰, 这个与本实验结果类似。



注: A: 原糯米淀粉; B: 糯米淀粉(α -淀粉酶+分支酶); C: 糯米淀粉: 小麦直链淀粉(α -淀粉酶+分支酶); D: 糯米淀粉: 玉米直链淀粉(α -淀粉酶+分支酶); E: 糯米淀粉: 大米直链淀粉(α -淀粉酶+分支酶); F: 糯米淀粉: 麦芽糖(α -淀粉酶+分支酶)。

图 2 改性淀粉热力学性质

Fig.2 The thermodynamic property of the modified starch

4 结论

糯米淀粉中加入供体通过复合酶法改性, 能够提高改性淀粉分支度, 从而制备得到高分支度的改性淀粉。

糯米淀粉中加入供体通过复合酶法改性, 能够提高改性淀粉的溶解度, 制备得到可溶性淀粉。

通过观察改性淀粉糊化状态, 老化状态和热力学性质的测定, 改性后的糯米淀粉结晶区被破坏, 制备得到高短链比的改性淀粉, 同时改性淀粉的糊化液和老化液的均匀性和透明性得到很大的提升, 改性糯米淀粉老化液不易发生老化回生。

糯米淀粉中加入供体为原料, 以 α -淀粉酶水解供体和糯米淀粉, 从而在体系中产生丰富的短链数, 为后面分支酶的接枝提供接枝短链, 从而提高分支酶的作用效率, 制备出具有高分支度和高短链比的改性淀粉, 从而提高改性淀粉的物化性质。

参考文献

- Pe'rez S, Bertoft E. The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: A comprehensive review [J]. *Starch/Stärke*, 2010, 62 (8): 389-420.
- Guo L, Zhang JJ, Hu J, *et al.* The effects of entanglement concentration on the hydrodynamic properties of cereal starches [J]. *J Sci Food Agric*, 2017, 97, 2795-2802.
- Tharanathan RN. Starch-value addition by modification [J]. *Crit Rev Food Sci*, 2005, 45(5): 371-384.
- Hernandez JM, Gaborieau M, Castignolles P, *et al.* Mechanistic investigation of a starch-branching enzyme using hydrodynamic volume SEC analysis [J]. *Biomacromolecules*, 2008, 9: 954-965.
- Jensen SL, Larsen FH, Bandsholm O, *et al.* Stabilization of semi-solid-state starch by branching enzyme-assisted chain-transfer catalysis at extreme substrate concentration [J]. *Biochem Eng J*, 2013, 72: 1-10.
- Jo AR, Kim HR, Choi SJ, *et al.* Preparation of slowly digestible sweet potato Daeyumi starch by dual enzyme modification [J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 143: 164-171.
- 易翠平, 倪凌燕, 姚惠源. 大米淀粉的纯化及性质研究[J]. *中国粮油学报*, 2005, 20(3): 6-8.
Yi CP, Ni LY, Yao HY. The purification and properties of rice starch [J]. *J Cere Oils Ass*, 2005, 20(3): 6-8.
- Zhu F, Corke H, Bertoft E. Amylopectin internal molecular structure in relation to physical properties of sweet potato starch [J]. *Carbohydr Polym*, 2011, 84: 907-918.
- Li WW, Li CM, Gu ZB, *et al.* Relationship between structure and retrogradation properties of corn starch treated with 1, 4- α -glucan branching enzyme [J]. *Food Hydrocolloid*, 2016, 52: 868-875.
- Jensen SL, Larsen FH, Bandsholm O, *et al.* Stabilization of semi-solid-state starch by branching enzyme-assisted chain-transfer catalysis at extreme substrate concentration [J]. *Biochem Eng J*, 2013, 72: 1-10.
- Han X, Ao Z, Janaswamy S, *et al.* Development of a low glycemic maize starch: Preparation and characterization [J]. *Biomacromolecules*, 2006, 7: 1162-1168.
- Liu PF., Kang XM, Cui B, *et al.* Effects of glycerides with different molecular structures on the properties of maize starch and its film forming capacity [J]. *Ind Crop Prod*, 2019, 129: 512-517.
- Ren JY, Li Y, Li CM, *et al.* Pasting and thermal properties of waxy corn starch modified by 1,4- α -glucan branch enzyme [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 97: 679-687.
- Šárka E, Dvořáček V. New processing and applications of waxy starch (a review) [J]. *J Food Eng*, 2017, 206: 77-87.
- Yuan C, Sang LY, Wang YL, *et al.* Influence of cyclodextrins on the gel properties of kappa-carrageenan [J]. *Food Chem*, 2018, 266: 545-550.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



李家豪，硕士研究生，主要研究方向为淀粉基材料结构与功能性研究。
E-mail: 772763647@qq.com



郭丽，博士，教授，硕士生导师，主要研究方向为食品生物大分子结构与功能性、食品营养与酶学相关研究。
E-mail: guolizhuyuer@163.com

“发酵食品及其安全性评价”专题征稿函

发酵食品因其独特的风味受到消费者的普遍欢迎。发酵是一种传统的食品储存与加工方法，是指利用有益微生物加工制造的一类食品，包括发酵乳制品、酒类、泡菜、酱油、食醋、豆豉等。由于其独特的加工方式，发酵食品或存在一定的安全隐患，可能会影响人体健康。

鉴于此，本刊特别策划了“**发酵食品及其安全性评价**”专题，主要围绕**(1)菌种的选育和保藏；(2)发酵工艺的条件优化，发酵机制，发酵工程动力学；(3)发酵食品的分析与检测；(4)发酵食品的安全性评价及风险评估类；(5)发酵食品的种类与加工方式；(6)发酵食品的营养成分及其对人体健康的影或您认为有意义的相关领域**展开论述和研究，本专题计划在 2020 年 1 月出版。

鉴于您在该领域的成就，**本刊主编吴永宁研究员及编辑部全体成员**特别邀请您为本专题撰写稿件，以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述及研究论文均可，请在 2019 年 12 月 1 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并优先发表。

同时，希望您能够推荐该领域的相关专家并提供电话和 E-mail。

感谢您的参与和支持！

投稿方式：

网站: www.chinafoodj.com

E-mail: jfoodsqa@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部