

天然抗性淀粉测定方法的优化

范媛媛¹, 马青¹, 谭梅青¹, 杨公明²

(1. 顺德出入境检验检疫局, 广东顺德 528303) (2. 华南农业大学食品学院, 广东广州 5106042)

摘要: 选择国内外常用几种抗性淀粉的测定方法进行比较, 找出适合天然抗性淀粉含量的测定方法, 并对此方法进行优化。通过单因素和正交试验, 对原 McCleary 法中去除可消化淀粉阶段的体系 pH、水浴时间和后期的抗性淀粉测定阶段的糖化酶添加量、作用时间、水浴温度等进行优化, 实验确定的去除可消化淀粉阶段复合酶溶液的 pH 为 6.0, 水浴时间为 12 h, 后期抗性淀粉测定阶段的糖化酶添加量为 300 μL , 水浴温度为 55 $^{\circ}\text{C}$, 水浴时间为 75 min。并从方法的稳定性和精密度等方面对优化后的测定方法进行评价, 最终确定了适合天然抗性淀粉的定量检测方法。

关键词: 抗性淀粉; 测定; 优化

文章编号: 1673-9078(2013)5-1036-1039

Quantitative Detection Method for Natural Resistant Starch

FAN Yuan-yuan¹, MA Qing¹, TAN Mei-qing¹, YANG Gong-ming²

(1. Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Shunde 528303, China)

(2. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Based on one-factor-at-a-time experiments, the main parameters influencing the quantitative detection of natural resistant starch were optimized by orthogonal test, including reaction time, pH value, reaction temperature, and saccharifying enzyme amount. For the remove of digestible starch, pH of mixed enzyme solution and water-incubation time were 6.0 and 12 h, respectively. For determination of resistant starch, the glucoamylase dosage, water-incubation temperature and time were 300 μL , 55 $^{\circ}\text{C}$ and 75 min, respectively.

Key words: resistant starch; test method; optimize

目前国内抗性淀粉的研究多集中于RS的制备及生理功能的研究^[1-8], 但无论是制备RS, 还是研究其生理功能, 以及与微生态之间的关系, 前提都需要建立一种准确又可靠的RS定量方法。而不同的测量方法, 对RS的定量结果影响较大。目前, 抗性淀粉的测定方法分体内测定法和体外测定法, 体内测定法成本高, 对人体也有一定的伤害, 作为常规法大量测定显然不现实。体外测定方法的基本原理大多是使用胰 α -淀粉酶水解样品, 再直接分析残余物中的未水解淀粉量, 或通过测定样品总淀粉和可消化淀粉含量, 以两者差值表示RS含量。文献报道的主要方法包括1986年的Bjorck^[9]等方法和Berry方法, 1992年的Englyst^[10-11]等方法, 1992和1993年的Muir和O'Dea方法^[12], 1992年的Champ^[13]等方法, 1996年的Goni等方法^[14], 1998年的Akerberg等方法和2002年的McCleary等方法^[15]。目前, 国内抗性淀粉的定量测定方法没有统一标准^[16-17], 大多采用Goni法。

收稿日期: 2013-01-09

基金项目: 粤港澳关键领域重点突破项目(200849861007)

作者简介: 范媛媛(1977-), 女, 博士, 工程师, 研究方向为食品质量与安全

本文应用文献^[8]中的结论, 直接选择适合天然抗性淀粉测定的方法, 即McCleary法进行优化, 最终确定了适合天然抗性淀粉的定量测定方法。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与仪器

青香蕉, 番禺万顷沙香蕉园; 胃蛋白酶、胰 α -淀粉酶、糖化酶, Sigma公司; HH-4数显恒温水浴锅, 金坛市富华仪器有限公司; PL203电子精密天平, 梅特勒-托利多仪器上海有限公司; HZS-H水浴振荡器, 哈尔滨市东联电子技术开发有限公司; TDL-5-A离心机, 上海安亭科学仪器厂; 葡萄糖测定试剂盒、mindray迈瑞BS-300生化分析仪, 深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 去除可消化淀粉时体系 pH 对测定结果的影响

准确称取三份 100 mg 样品分别至 50 mL 离心管中, 先加入 4 mL 酶液(含胰 α -淀粉酶 1200 U 和糖化酶 12 U), 分别调节 pH 为 5.0、6.0、7.0, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴水平震荡 16 h, 取出试管加入等量 95% 乙醇沉淀未消化的淀粉, 1500 r/min 离心后弃上清液, 沉淀再用 50% 乙醇洗

涤,离心去除上清液,重复三次。并用吸水纸将多余的水吸干。在沉淀中添加2 mL 2 mol/L的KOH溶液,室温震荡20 min,然后加入8 mL 1.2 mol/L乙酸钠缓冲液(pH=3.8),混匀后加入糖化酶溶液0.1 mL,于50 ℃水浴振荡45 min,1500 r/min离心,收集上清液于100 mL容量瓶中。用10 mL蒸馏水水洗沉淀,再次离心。水洗和离心操作重复三次,合并上清液,冷却至室温后定容至100 mL。测定抗性淀粉含量,比较去除可消化淀粉时体系pH对抗性淀粉测定结果的影响。

1.2.2 去除可消化淀粉时水浴时间对测定结果的影响
准确称取四份100 mg样品分别至50 mL离心管中,先加入4 mL酶液(含 α -淀粉酶1200 U和糖化酶12 U),调节pH为6.0,设置水浴时间为4、8、12、16 h,以下步骤同1.2.1。测定抗性淀粉含量,比较去除可消化淀粉时水浴时间对测定结果的影响。

1.2.3 糖化酶作用时间对抗性淀粉测定结果的影响
操作步骤同1.2.1。测定抗性淀粉含量,设置糖化酶作用时间为20 min、40 min、60 min、80 min,比较糖化酶作用时间对抗性淀粉测定结果的影响。

1.2.4 糖化酶作用温度对抗性淀粉测定结果的影响
操作步骤同1.2.1。测定抗性淀粉含量,设置糖化酶作用温度为45 ℃、50 ℃、55 ℃和60 ℃,比较糖化酶作用温度对抗性淀粉测定结果的影响。

1.2.5 糖化酶添加量对抗性淀粉测定结果的影响
操作步骤同1.2.1。测定抗性淀粉含量,设置糖化酶添加量为0.1 mL、0.2 mL、0.3 mL、0.4 mL,比较糖化酶添加量对测定结果的影响。

1.2.6 糖化酶作用条件正交优化试验

在单因素实验的基础上,选取影响抗性淀粉测定结果的主要因素:糖化酶添加量、糖化酶作用温度和糖化酶作用时间为研究对象,设计3因素3水平正交试验。

2 结果与讨论

2.1 去除可消化淀粉时体系pH对测定结果的影响

在pH=6.9、6.0、5.0条件下进行5样本重复实验,抗性淀粉测定结果分别为0.59 mg/mg、 7×10^{-4} mg/mg、0.58 mg/mg,差值不显著。在可消化淀粉去除阶段,所用复合酶为胰 α -淀粉酶和葡萄糖淀粉酶,胰 α -淀粉酶作用最佳pH范围为6.7~7.0,葡萄糖淀粉酶作用pH范围是4.5~5.0。此二酶作用的pH范围不同,需要考虑二者活力释放的最佳pH。严梅荣指出,胰 α -淀粉酶作用的最佳pH值为7.0,在pH=6.9、pH=6.0和pH=5.2的相对活性分别为100%、77%和8.3%;在37 ℃时,该酶在pH=5.2下极不稳定,95%以上在1 h内失活,稳定

性远小于pH=6.9和pH=6.0(6 h内失活分别是40%和78%)。糖化酶的最佳pH为4.5,该酶在pH=5.2、6.0和6.9的相对活性分别为100%、20%和4%;在稳定性上,糖化酶在37 ℃、pH 6.0条件下保持16 h,其活性并没有减少,但在pH=4.5条件下该酶的活性降低了30%。当酶解体系pH 6.9接近胰 α -淀粉酶作用的最适pH=7.0,酶解淀粉的能力强,但由于糖化酶作用的最适pH为4.5~5.0,此时糖化酶未发生效用;pH为6.0时,胰 α -淀粉酶和糖化酶活力都能够得到有效释放,和pH 6.9时测定结果相差不大的原因在于在可消化淀粉酶解体系中起主要作用的酶是胰 α -淀粉酶,在pH 6.0和pH 6.9条件下胰 α -淀粉酶活力释放程度差别不大。pH降低到5.0时,胰 α -淀粉酶活力受到抑制,不能彻底水解可消化淀粉为低分子糖,体系黏度增大,包埋作用变强,导致KOH分散抗性淀粉效果变差,从而使测定结果偏低。为考虑复合酶活力的释放,确定采用pH为6.0的复合酶溶液。

2.2 去除可消化淀粉时水浴时间对测定结果的影响

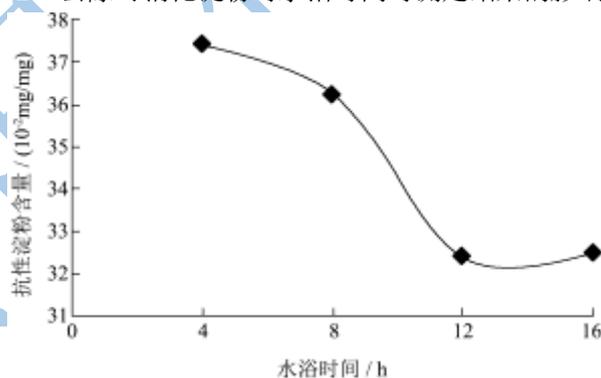


图1 水浴时间对抗性淀粉测定结果的影响

Fig.1 The effect of water-bath time on determination of banana resistant starch content

从图1可以看出,随着可消化淀粉去除时水浴时间的延长,抗性淀粉测定结果呈现先降低后趋于稳定的趋势。水浴时间在12 h左右对抗性淀粉的测定已经无影响。许多方法在测定抗性淀粉时为了尽量模拟食物在人体消化道中的环境,采取了37 ℃水浴16 h的操作。为简化试验又不影响抗性淀粉体外测定结果,确定水浴时间为12 h。

2.3 糖化酶作用温度的影响

如图2所示,糖化酶作用温度从45 ℃升高到60 ℃过程中,抗性淀粉含量测定结果呈现先升高后降低趋势。在该实验条件下,糖化酶作用的最适温度为55 ℃。这与程燕峰等人^[19-20]报道的Goni法中糖化酶测定最适温度为60 ℃和McCleary法规定的测定温度为50 ℃存在一定的差异,可能是由酶种类和浓度不同所致。

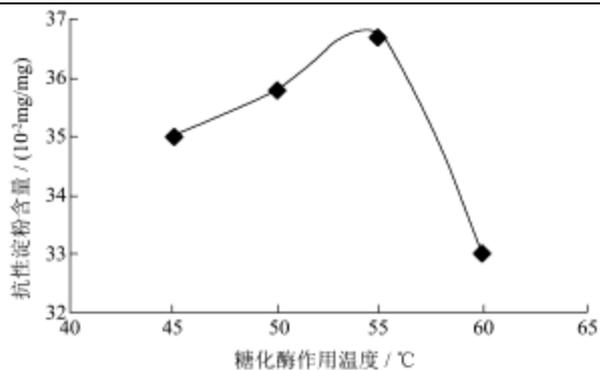


图2 糖化酶作用温度对抗性淀粉测定结果的影响

Fig.2 The effect of AMG action temperature on determination of banana resistant starch content

2.4 糖化酶添加量的影响

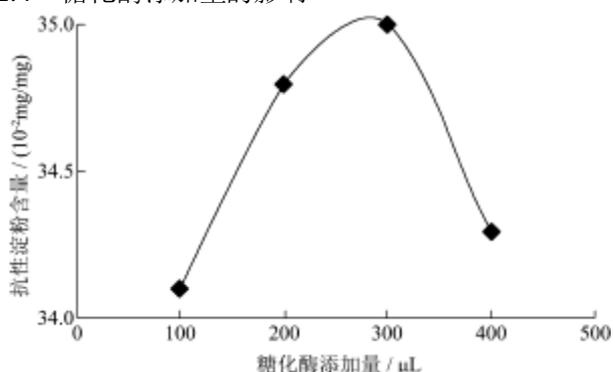


图3 糖化酶添加量对抗性淀粉测定结果的影响

Fig.3 The effect of banana resistant starch content by addition quantity of AMG

由图3可知,随着糖化酶添加量从100 μL升高到400 μL,试验测得的抗性淀粉含量呈现先升高后降低趋势。在糖化酶添加量300 μL时有最大测定值。依据酶的作用特性,当底物浓度一定时,在一定范围内随着酶浓度增大,底物水解程度趋于完全;当酶浓度增大到一定程度时,其与底物结合位点已经饱和,过高的酶浓度反而会对底物的水解产生抑制作用。

2.5 糖化酶作用时间的影响

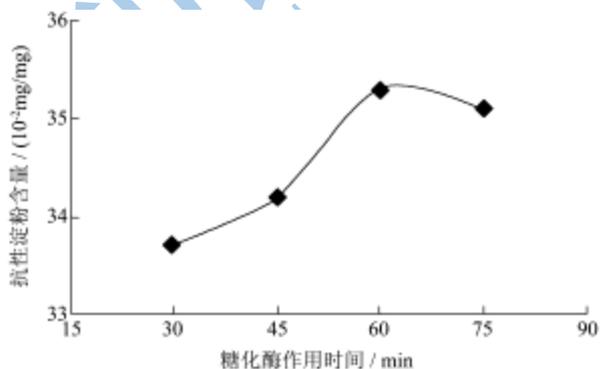


图4 糖化酶作用时间对抗性淀粉测定结果的影响

Fig.4 The effect of AMG action time on determination of banana resistant starch content

如图4所示,在30 min~60 min范围内,随着糖化酶作用时间的延长,抗性淀粉测定结果呈现逐渐升高的趋势,超过60 min,抗性淀粉含量趋于稳定,故确定糖化酶作用的时间为60 min。

2.6 糖化酶作用条件正交试验

在单因素实验的基础上,选取影响抗性淀粉测定结果的主要因素:糖化酶添加量、糖化酶作用温度和糖化酶作用时间为研究对象,设计3因素3水平正交试验见表1。

表1 糖化酶作用条件正交优化试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment

水平	A(温度/°C)	B(酶添加量/μL)	C(水浴时间/min)
1	50	200	45
2	55	300	60
3	60	400	75

表2 糖化酶作用条件正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal experiments

实验号	A	B	C	抗性淀粉含量 / (10 ² mg/mg)
1	1	1	1	33.1
2	1	2	2	35.8
3	1	3	3	36.5
4	2	1	2	36.7
5	2	2	3	37.4
6	2	3	1	36.8
7	3	1	3	35.1
8	3	2	1	35.8
9	3	3	2	36.2
K ₁	35.13	34.97	35.23	
K ₂	36.97	36.33	36.23	
K ₃	35.7	36.5	36.33	
极差 R	1.83	1.53	1.1	

由表2极差分析结果可以看出,各因素对抗性淀粉影响的大小关系为:温度>酶添加量>水浴时间,实验确定的最佳组合为A₂B₃C₃,即在温度55 °C,糖化酶添加量400 μL,水浴时间为75 min的条件下进行测定,所测得的样品中抗性淀粉数值最高。试验组确定的最佳组合为A₂B₂C₃,正好是各单因素确定的最佳处理条件。正交得到的最佳组合不在实验组范围内,验证实验表明A₂B₃C₃测定值为0.37 mg/mg,同时考虑到节约酶用量的等因素,故确定测定时糖化酶的最佳组合为A₂B₂C₃,即温度为55 °C,酶添加量为300 μL,水浴时间为75 min。

2.7 讨论

McCleary 法在样品水解时加入糖化酶,目的是避

免淀粉水解产物(如麦芽糖、麦芽三糖)对胰 α -淀粉酶活性的抑制。McCleary 法与 Goni 法相比,减少了一些步骤,修改了一些参数,如去除了胃蛋白酶添加这一步骤^[21],采用胰 α -淀粉酶和糖化酶在 pH=6.0 和 37 °C 条件下振荡 16 h 处理,用醇洗替代水洗去除可消化淀粉等。这些改动更有利于可消化淀粉的去除以及抗性淀粉含量的准确测定。在酶降解淀粉时利用高浓度的乙酸钠缓冲液调节 pH,避免了因 HCl 强酸加入量差异而导致的缓冲液调节 pH 的繁琐步骤,因而平行实验间的相对偏差较小^[21]。

2.8 方法的稳定性分析

对优化前后的抗性淀粉测定方法进行稳定性分析,其两种方法的相对标准偏差见表3。

表3 两种方法测定结果的相对标准偏差 (RSD/%)

Table 3 The relative standard deviation of results by two methods

相对标准偏差	大蕉	粉蕉	香蕉
优化前	1.78	2.21	2.64
优化后	1.34	1.21	1.43

由表3可以看出,对于不同的品种,利用优化后的方法测定抗性淀粉含量,其方法的稳定性、精密度均比优化前提高,说明优化后的方法比优化前的方法更适用于测定天然抗性淀粉的含量。

3 结论

3.1 通过单因素和正交试验,对原 MC 法中去除可消化淀粉阶段的体系 pH、水浴时间和后期的抗性淀粉测定阶段的糖化酶添加量、作用时间、水浴温度等进行优化,确定了适合香蕉天然抗性淀粉的定量检测方法。具体检测方法如下:

3.2 准确称取100 mg样品至50 mL离心管中,加入pH为6.0的复合酶液4 mL(含胰 α -淀粉酶1200 U, AMG 12 U),于37 °C水浴震荡12 h,取出试管加入等量95%乙醇沉淀未消化的淀粉,1500 r/min离心10 min,之后弃上清液,沉淀再用50%乙醇洗涤,离心去除上清液,重复三次,并用吸水纸将多余的水吸干。在沉淀中添加1 mL蒸馏水后震荡,将沉淀润湿分散后加入1 mL 4 mol/L的KOH溶液,室温震荡20 min,然后加入8 mL 1.2 mol/L乙酸钠缓冲液(pH=3.8),混匀后加入糖化酶溶液0.3 mL,于55 °C水浴震荡75 min,1500 r/min离心10 min,收集上清液于100 mL容量瓶中;用10 mL50%的乙醇洗涤沉淀,再次离心。洗涤和离心操作重复三次,合并上清液,冷却至室温后定容至100 mL。利用DNS法^[22]或仪器法等测定葡萄糖含量,并转化为样品中抗性淀粉含量。

参考文献

- [1] 杜冰,程燕峰,杨公明.不同干燥工艺对香蕉抗性淀粉的影响[J].食品科学,2009,12:31-35
- [2] 刘长海,夏雨,杜冰,等.香蕉粉的制备工艺优化研究[J].食品科学,2008,27(12):4
- [3] 程燕峰,王娟,李尚新,等.香蕉抗性淀粉提取工艺优化研究[J].中国粮油学报,2008,23(3):2
- [4] 黄东东,寇秀颖,王学文,等.知名抗性淀粉热性质分析[I][J].现代食品科技,2007:91-92
- [5] 黄东东,寇秀颖,王学文,等.知名抗性淀粉的热性质分析[II][J].现代食品科技,2007,2:82-83
- [6] 程燕峰,杨公明,王娟,等.喷雾干燥工艺对香蕉抗性淀粉保留率的影响[J].农业工程学报,2008,24(6):282-286
- [7] 张志英,沈建福.抗性淀粉最新研究进展[J].粮油食品科技,2005,13(4):29-31
- [8] 陈平生,黄智君,王娟.不同热处理方式对大蕉抗性淀粉理化性质的影响[J].现代食品科技,2012,1:9-13
- [9] Bjorck I, Nyman M, Pedersen B, et al. On the digestibility of starch in wheat bread studies *in vitro* and *in vivo* [J]. Journal of Cereal Science, 1986, 4: 1-11
- [10] 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 (2): 33-50
- [11] ENGLYST H N, HUDSON G J. The classification and measurement of dietary carbohydrates [J]. Food Chemistry, 1996, 57(1): 15-21.
- [12] MUIR J G, O' DEA K. Validation of an *in vitro* assay for predicting the amount of starch that escapes digestion in the small intestine of humans [J]. Am J Clinical Nutr, 1993, 57: 540
- [13] CHAMP M. Determination of resistant starch in foods and food products: inter laboratory study[J]. European Journal of Clinical Nutrition, 1992, 46(2):51-62
- [14] GONI, MANAS E, GARCIA DIZ L, et al. Analysis of resistant starch: a method for food and food products [J]. Food Chemistry, 1996, 56:445-449
- [15] MCCLEARY B V, MONAGHAN D A. Measurement of resistant starch [J]. Journal of AOAC International, 2002, 85(3): 665-675
- [16] 石劭.抗性淀粉测定方法的研究进展[J].卫生研究,2005, 34(4): 504-507
- [17] 严梅荣.抗性淀粉测定方法的研究进展[J].食品科学,2006, 27(4):251-254

[18] 范媛媛,毛联凯,夏雨,等.香蕉天然抗性淀粉测定方法的比较[J].食品科技,2011,36(5):256-259
[19] 程燕峰.香蕉抗性淀粉的制备及其特性研究[D].广州:华南农业大学,2008

[20] 程燕峰,王娟,杨公明,等.几种测定香蕉抗性淀粉含量方法的比较[J].分析与检测,2007,3:14
范媛媛.香蕉抗性淀粉降解规律及机理研究[D].广州:华南农业大学,2012

