

抗性淀粉分子结构特征研究

李光磊¹, 刘秀芳², 曾 洁¹

(1.河南科技学院食品学院, 河南新乡 453003; 2.河南工业大学粮油食品学院, 河南郑州 450052)

摘 要:利用高效排阻色谱、紫外扫描、红外扫描等方法对玉米、小麦、马铃薯等不同来源抗性淀粉的分子结构特征进行了研究。结果表明:来自不同原料的抗性淀粉的聚合度类似,抗性淀粉的分子量分布不受淀粉种类的影响;抗性淀粉的聚合度小于直链淀粉的聚合度,且分子量分布比较集中;抗性淀粉形成过程中,其分子结构特征没有变化。

关键词:抗性淀粉, 分子量, 结构特征

Study on molecular structure of resistant starch

LI Guang-lei¹, LIU Xiu-fang², ZENG Jie¹

(1.School of Food Science, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China

2.Grain College, Henan University of Technology, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: The characterize of molecular structure of resistant starch was studied by HPSEC, UV spectra and IR spectra. The results showed that the mean molecular weights of RS scattered in a specified range, irrespective of the botanical resource, and the formation of resistant starch was only a physical process.

Key words: resistant starch; molecular weights; characterization

中图分类号: TS236.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2008)08-0156-04

抗性淀粉(Resistant Starch, RS)是指那些不被健康人体小肠消化吸收的淀粉^[1]。抗性淀粉主要分为4类^[2],即RS₁(物理包埋淀粉, Physically Trapped Starch)、RS₂(抗性淀粉颗粒, Resistant Starch Granules)、RS₃(回生淀粉, Retrograded Starch)和RS₄(化学改性淀粉, Chemically Modified Starch)。其中RS₃最令人感兴趣,因为它具有很高的热稳定性,具有很大的商业价值。抗性淀粉有结晶区和无定形区两部分,结晶区主要是直链淀粉晶体。在抗性淀粉形成过程中,淀粉粒完全水合,直链淀粉从淀粉粒中逸出,进入水相,呈自由卷曲状态。在冷却过程中,直链淀粉分子之间或分子内不同链段之间相互接近,通过氢键结合在一起,形成双螺旋。双螺旋晶体结构具有很高的热稳定性,于水中加热到80~150℃不被破坏,更重要的是它具有抗淀粉酶水解能力^[3,4]。国外主要用凝胶渗透色谱、高效离子交换色谱和高效排阻色谱测抗性淀粉的平均聚合度或平均分子量,但是一般只涉及粗略的聚合度的分布范围研究^[5,7]。抗性淀粉主要是由直链淀粉组成的,而直链淀粉与碘能形成复合物,这种复合物的最大吸收波长、吸收峰的范围和吸光度的变化都与直链淀粉分

子量有密切关系,反映出抗性淀粉的特征性状。红外光谱分析法是淀粉等有机高分子物质分析的重要工具,通常用于淀粉衍生物有机官能团鉴定,利用有机化合物官能团在红外区的选择性吸收,可对有机化合物结构,特别是官能团进行对应的定性分析^[8~10]。本文以玉米抗性淀粉、小麦抗性淀粉和马铃薯抗性淀粉为原料,利用高效排阻色谱、紫外光谱和红外光谱等分析方法对抗性淀粉的分子结构特征进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

玉米抗性淀粉、小麦抗性淀粉、马铃薯抗性淀粉实验室自制;耐热 α -淀粉酶、普鲁兰酶、葡萄糖淀粉酶均由丹麦诺维信公司提供。

TDL-5-A离心机 上海安亭科学仪器厂; SHA-B恒温振荡器 常州国华电器有限公司; 7200型分光光度计 尤尼柯(上海)仪器有限公司; water-991型高效液相色谱仪 美国water公司; UV1600紫外可见分光光度计 北京瑞利分析仪器有限公司; Nicolet 470型FT-IR 美国尼高力仪器公司。

1.2 实验方法

1.2.1 抗性淀粉的制备 将淀粉与水以一定比例混合,经沸水浴预糊化,高温高压下(121℃)处理一定时间,取出,自然冷却,4℃放置一定时间,80℃烘干16h,粉碎,过100目筛。

1.2.2 抗性淀粉的纯化方法^[11] 准确称取一定量抗性淀粉样品,加入耐热 α -淀粉酶溶液,90℃恒温

收稿日期: 2007-12-28

作者简介: 李光磊(1970-),男,副教授,博士,研究方向:农产品深加工与转化。

基金项目: 河南科技学院重点资助项目(06014);河南科技学院青年骨干教师资助项目。

30min,再加入葡萄糖淀粉酶溶液,60℃恒温60min,然后再加入胃蛋白酶溶液,45℃恒温60min,冷却,离心($3000 \times g$,30min),水洗,至少4次,50℃烘干48h,粉碎,过100目筛。

1.2.3 抗性淀粉分子量分析-高效排阻色谱法

1.2.3.1 抗性淀粉样品溶液的制备 称取50mg(精确至0.1mg)抗性淀粉样品,溶解于0.3mL 2mol/mL KOH溶液中,加3mL水,用1mol/mL HCl溶液中和至 $\text{pH}7.0 \pm 0.2$,用水定容至25mL,离心($4000 \times g$,20min)。

1.2.3.2 色谱条件 柱子:ultrahydrogel 250型+保护柱;洗脱液:0.1mol/mL NaCl溶液;流速:0.6mL/min;进样量:50 μL 。

1.2.4 抗性淀粉的碘吸收曲线分析 称取淀粉样品20mg,加入0.5mL无水乙醇润湿样品,加入2mol/mL的KOH溶液1mL,使样品充分溶解。加入10mL去离子水,用0.1mol/mL的HCl将pH调至6.0~7.0,加水定容至50mL。取10mL于100mL容量瓶,加入80mL去离子水和2mL I_2 -KI溶液(2mg I_2/mL 和20mg KI/mL)。定容至100mL,立即混匀。用紫外分光光度计扫描,波长500~800nm。

1.2.5 抗性淀粉的红外扫描图谱分析 KBr压片法,具体过程为:称取约2mg样品,在红外灯的照射下,置于玛瑙研钵中研磨4~10min,再与150mg左右干燥的KBr粉末充分混合,继续研磨2~5min。将研磨好的混合物粉末倒在硫酸纸上,灌注于压模中,抽真空,缓慢除去压力,放入样品架上,置于红外谱仪内全波段扫描,绘出红外光谱图。

2 结果与分析

2.1 抗性淀粉分子量的测定

用6个葡聚糖分子量标样作高效排阻色谱,得到相应的6个保留时间值,绘制出分子量标准曲线。

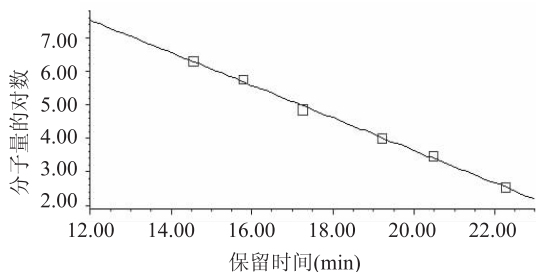


图1 分子量标准曲线

将分离提纯的玉米抗性淀粉样品、小麦抗性淀粉样品和马铃薯抗性淀粉样品分别过柱,得到色谱图图2~图4。

从图2~图4中可以看出,分离出来的玉米、小麦、马铃薯抗性淀粉均呈单峰分布,其峰值分子量分别为7168、6991、8043。

根据公式计算,玉米抗性淀粉的数均分子量为3777,重均分子量为9088;小麦抗性淀粉的数均分子量为3198,重均分子量为7291;马铃薯抗性淀粉的数均分子量为3506,重均分子量为9528。从实验结果可以看出,来自不同原料的抗性淀粉的聚合度相类似,说明抗性淀粉的分子量分布不受淀粉种类的

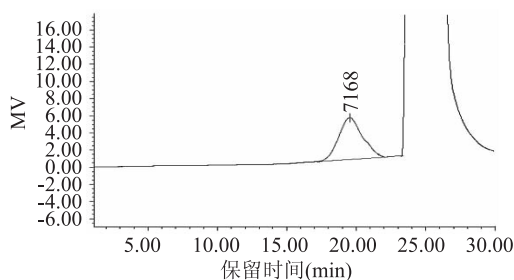


图2 玉米抗性淀粉高效排阻色谱图

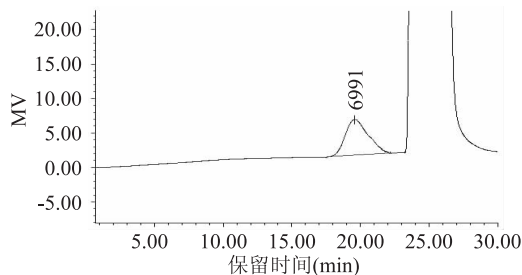


图3 小麦抗性淀粉高效排阻色谱图

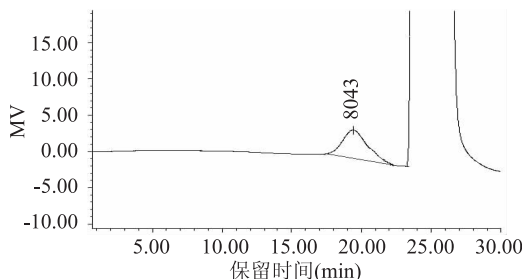


图4 马铃薯抗性淀粉高效排阻色谱图

影响。

关于抗性淀粉的聚合度,不同的研究者用不同的研究方法得到的结果,差异较大。Russel et al的研究发现^[7],来自小麦淀粉和高直链玉米淀粉的抗性淀粉的聚合度为50,而从脱脂处理的蜡质玉米制备的抗性淀粉,其聚合度为20。与此结论相反的是,Eerlingen R. C. et al则从不同聚合度(DP从40~160)的直链淀粉的稀溶液(0.83%)得到抗性淀粉,GPC分析确定其聚合度为19~26,从而作者认为抗性淀粉的聚合度不受所用原料中直链淀粉聚合度的影响^[12]。Leloup V.M.则研究了不同浓度直链淀粉糊中的抗性淀粉的聚合度,发现当淀粉糊的浓度从2.7%增加到7.8%时,抗性淀粉的聚合度从32增加到38^[13]。

从Eerlingen R. C. 和Leloup V. M.的研究中我们可以推断,在稀溶液中,直链淀粉相互之间交叠的部分比较少,在随后的冷却过程中,两个直链淀粉分子形成的双螺旋也就比较短。所以可以推测造成各个文献报道的平均聚合度相互不同的原因是:在抗性淀粉制备时,所用的淀粉糊的浓度、结晶温度以及抗性淀粉分离时所用的水解酶的差异。

2.2 抗性淀粉的碘吸收曲线测定

淀粉样品用2mol/mL KOH溶解之后,与 I_2 -KI形成的络合物的吸收光谱如图5~图7所示。

从实验结果可以看出,抗性淀粉-碘络合物的最大吸收波长小于直链淀粉-碘络合物的最大吸收波长,说明抗性淀粉的聚合度小于直链淀粉的聚合度。

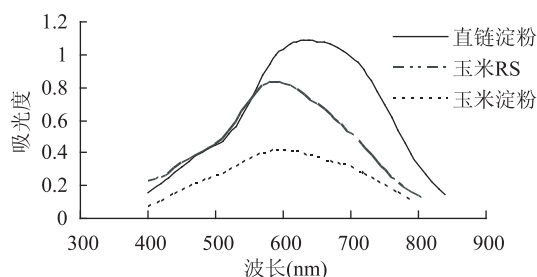


图5 玉米抗性淀粉碘吸收曲线

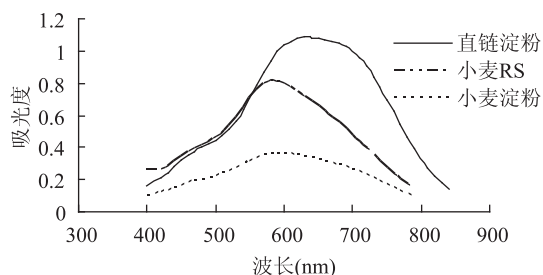


图6 小麦抗性淀粉碘吸收曲线

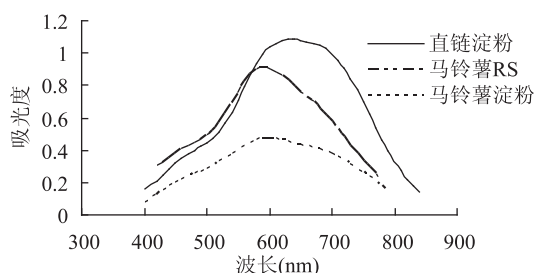


图7 马铃薯抗性淀粉碘吸收曲线

另外,抗性淀粉的碘的络合物吸收峰比直链淀粉和原淀粉都窄,说明抗性淀粉分子的分子量分布比较集中。

2.3 抗性淀粉的红外扫描图谱分析

将淀粉样品处理后,分别于红外谱仪内全波段扫描,得出红外光谱图,如图8~图10所示,小麦、马铃薯抗性淀粉红外光谱图略。

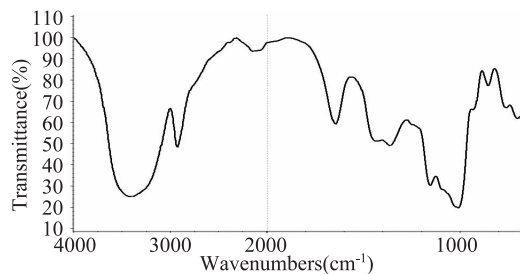


图8 玉米淀粉的红外光谱图

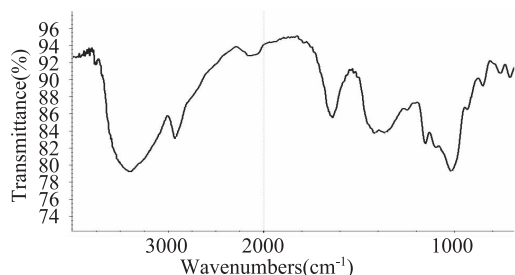


图9 玉米抗性淀粉的红外光谱图

原淀粉与抗性淀粉的图谱相比较,其主要特征峰基本重合,证明经压热处理的抗性淀粉没有形成

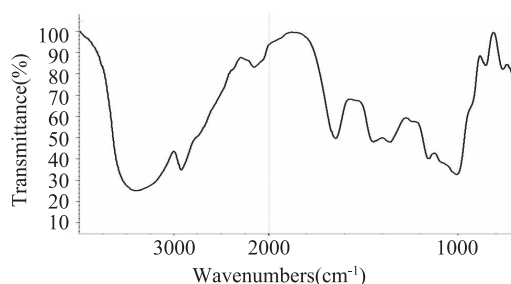


图10 玉米提纯抗性淀粉的红外光谱图

新的基团,说明抗性淀粉为物理变性,其化学结构没有改变。

抗性淀粉与分离提纯抗性淀粉的红外图谱相比较,两者官能团的特征吸收峰基本没有区别,可以说明抗性淀粉经分离提纯后,其分子结构也没有变化。

3 结论

3.1 经高效排阻色谱测定,玉米抗性淀粉的数均分子量为3777,重均分子量为9088;小麦抗性淀粉的数均分子量为3198,重均分子量为7291;马铃薯抗性淀粉的数均分子量为3506,重均分子量为9528。从实验结果可以看出,来自不同原料的抗性淀粉的聚合度相类似,说明抗性淀粉的分子量分布不受淀粉种类的影响。

3.2 经紫外扫描知,抗性淀粉-碘络合物的最大吸收波长小于直链淀粉-碘络合物的最大吸收波长,说明抗性淀粉的聚合度小于直链淀粉的聚合度。另外,抗性淀粉的碘的络合物吸收峰比直链淀粉和原淀粉都窄,说明抗性淀粉分子的分子量分布比较集中。

3.3 经红外扫描图谱分析,原淀粉与抗性淀粉的图谱相比较,其主要特征峰基本重合,证明经压热处理的抗性淀粉没有形成新的基团,说明抗性淀粉为物理变性,其化学结构没有改变。抗性淀粉与分离提纯抗性淀粉的红外图谱相比较,两者官能团的特征吸收峰基本没有区别,可以说明抗性淀粉经分离提纯后,其分子结构没有变化。

参考文献:

- [1] Escarpa A, M C González, M D Morales, et al. An approach to the influence of nutrients and other food constituents on resistant starch formation[J]. Food Chemistry, 1997, 60: 527~532.
- [2] Eerlingen R C, Delcour J A. Formation, analysis, structure and properties of type III enzyme resistant starch[J]. Journal of Cereal Science, 1995, 22: 129~138.
- [3] Wu H-CH, Sarko A. The double-helical molecular structure of crystalline β -amylose[J]. Carbohydrate Research, 1978, 61: 7~25.
- [4] Jane J-L, Robyt J F. Structure studies of amylase-V complexes and retrograded amylase by action of alpha amylases, and a new method for preparing amyloextrins[J]. Carbohydrate Research, 1984, 132: 105~118.
- [5] Berry C S, K Ianson. Physical chemical characterization of resistant starch from wheat [J]. Journal of Cereal Science, 1988

纳他霉素产生菌的诱变育种研究

郑凤娥, 孟宪军, 李颖畅, 魏宝东
(沈阳农业大学食品学院, 辽宁沈阳 110161)

摘要:采用硫酸二乙酯(DES)对纳他霉素产生菌恰塔努加链霉菌(*Streptomyces chattanoogensis*) SC21 进行诱变处理, 以添加了硫酸链霉素的平板进行筛选, 选育出一株正突变株 SC216, 在同等发酵条件下, 纳他霉素产量达到 1.262g/L, 比出发菌株提高了 1.31 倍, 连续 5 次传代, 其产量稳定在 1.2g/L 左右, 性状无大突变, 表明该菌株遗传性状稳定。

关键词: 恰塔努加链霉菌, 硫酸二乙酯, 诱变育种, 纳他霉素

Study on mutagenic breeding of Natamycin producing strain

ZHENG Feng-e, MENG Xian-jun, LI Ying-chang, WEI Bao-dong

(The Food Science Department of Shenyang Agricultural College, Shenyang 110161, China)

Abstract: Using the DES as mutagenic agent to treatment SC21 (*Streptomyces natalensis*), using streptomycin sulfate plat screening resist strains, a high - Natamycin mutant strain SC216 was obtained. At the same fermentation conditions, the yield of Natamycin was 1.262g/L and increased about 1.31 times. The production of Natamycin ranged around 1.2g/L which proved that the genetic quality of SC216 was stable after incubated for five subsequent generations.

Key words: *Streptomyces chattanoogensis*; DES; mutagenic breeding; Natamycin

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2008)08-0159-03

纳他霉素是一种二十六元环多烯大环内酯类抗真菌剂, 是由恰塔努加链霉菌 (*Streptomyces chattanovgensis*), 纳塔尔链霉菌 (*Streptomyces natalensis*) 和褐黄孢链霉菌 (*Streptomyces gilvosporeus*) 等链霉菌^[1]经发酵、提取、精制而成的一种次级代谢产物。由于它能够专性的抑制酵母菌和霉菌, 阻止丝状真菌中黄曲霉毒素的形成, 并具有良好的稳定性^[2,3], 几十年来已被许多国家应用于食品工业、饲料工业和医药上。我国卫生部 1997 年正式批准其为食品添加剂, 应用于乳制品、水果、肉类、饮料等多种

食品中^[4,5]。目前, 纳他霉素生产水平较低, 国内无法实现大规模生产, 这严重限制了纳他霉素的应用^[6]。对纳他霉素产生菌的研究也主要集中在褐黄孢链霉菌上, 恰塔努加链霉菌的研究国内尚未见报道。本文对纳他霉素产生菌——恰塔努加链霉菌进行诱变育种, 并结合了抗性筛选, 快速、有效地获得了理想的抗性高产突变株。

1 材料与方法

1.1 实验材料

出发菌株 恰塔努加链霉菌 (*Streptomyces chattanoogensis*) SC21, 本实验室保藏菌种; 斜面培养基(%) 可溶性淀粉 1.5, 酵母浸粉 0.4, K_2HPO_4 0.05, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05, 琼脂 1.5, pH7.3; 种子培养基(%) 葡萄糖 2.0, 大豆蛋白胨 0.6, 酵母浸粉 0.6,

收稿日期: 2007-12-11

作者简介: 郑凤娥(1979-), 女, 在读博士研究生, 研究方向: 微生物发酵。

(8): 203~206.

[6] M J Gidley, D Cooke, A H Darke. Molecular order and structure in enzyme - resistant retrograded starch [J]. Carbohydrate Polymers, 1995, 28: 23~31.

[7] Russell P L, Berry C S. Characterization of resistant starch from wheat and maize [J]. Cereal chemistry, 1989(9): 1~15.

[8] 邓芹英, 刘岚, 邓慧敏编著. 波谱分析教程 [M]. 北京: 科学出版社, 2003.

[9] 贾春晓. 现代仪器分析技术及其在食品中的应用 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005.

[10] 谢晶曦, 常俊标, 王绪明编著. 红外光谱在有机化学和

药物化学中的应用(修订版) [M]. 北京: 科学出版社, 2001.

[11] Goni I, Garcia-díaz. Analysis of resistant starch: a method for foods and food product [J]. Food Chemistry, 1996, 56(4): 445~449.

[12] Eerlingen R C, Crombez M, Delcour J A. Enzyme - resistant starch. I. Quantitative and qualitative influence of incubation time and temperature of autoclaved starch on resistant starch formation [J]. Cereal Chemistry, 1993, 70(3): 339~344.

[13] Leloup V M, Colonna P, S G Ring. Physico - chemical aspects of resistant starch [J]. Journal of Cereal Science, 1992, 16: 253~255.