

脱支降解法制备板栗抗性淀粉及工艺探究

黄兵杰^{1,2}, 程 华^{1,2}, 李琳玲^{1,2}, 张雪花^{1,2}, 陈小玲^{1,2}, 程水源^{1,3}

(1. 经济林木种质改良与资源综合利用湖北省重点实验室, 湖北 黄冈 438000; 2. 黄冈师范学院 生命科学学院, 湖北 黄冈 438000;
3. 武汉轻工大学 生物与制药工程学院, 湖北 武汉 430023)

摘 要:以板栗淀粉为试材, 采用酸法脱支结合酶法脱支等降解方法, 研究制备工艺中淀粉乳浓度、酸预处理添加量与水解时间、普鲁兰酶添加量与酶解时间对抗性淀粉产率的影响, 进一步通过响应面分析探究出最佳制备工艺并做出验证。结果表明: 脱支降解制备板栗抗性淀粉的最佳试验工艺条件为淀粉乳浓度 22.5%, 酸添加量 0.06%, 酸处理时间 136.8 min, 酶添加量 13.9 U/g, 酶解时间 407 min, 抗性淀粉得率 18.69%。

关键词:板栗; 抗性淀粉; 脱支降解法; 响应面优化

中图分类号:TS 261.2⁺1 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2015)22-0130-04

抗性淀粉(resistant starch, RS)是不被健康人体小肠吸收的淀粉及淀粉水解物的总称^[1]。具体分为 4 类: RS1 物理包埋淀粉、RS2 抗性淀粉颗粒、RS3 回生淀粉和 RS4 化学改性淀粉。其中回生淀粉(RS3)是在加热冷却等加工过程中因淀粉的结构发生变化由可消化的淀粉转化而成, 可通过加工手段制备, 因而具备很好的研究价值^[2]。随着生活水平的提高, 抗性淀粉可发挥与膳食纤维类似的生理功效, 在预防结(直)肠癌、降低肠道 pH 值等方面有良好的应用前景^[3]。

板栗是我国传统的农副产品, 口感美味而广受欢迎, 但由于生吃难消化等原因限制着板栗加工的开发应用。因此, 以板栗淀粉制备抗性淀粉成了一项新型的尝试和突破。

抗性淀粉的制备工艺主要有压热处理法、酶解或酸解脱支法、挤压处理法、微波膨化处理法、超声波法等, 这些均着眼于对 RS3 型抗性淀粉(老化回生淀粉)的制备^[4]。目前较为公认的回生淀粉生成的理论是直链淀粉糊化后重新聚集, 形成由牢固的氢键结合的双螺旋结构所致^[5]。该试验以酸法脱支结合酶法脱支探究脱支降解法在制备抗性淀粉时的各因素对产率的影响和最佳试验条件, 以期对板栗抗性淀粉的制备及生产工艺研

发提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试板栗采集于湖北省罗田县大河岸; 板栗淀粉为实验室自制; 乙醇、氢氧化钠、盐酸、乙酸钠、乙酸、3,5-二硝基水杨酸、酒石酸钾钠、无水亚硫酸钠均为分析纯; α -淀粉酶、葡萄糖苷酶、普鲁兰酶均购自北京双旋微生物培养基制品厂。

恒温培养振荡器(ZHWR-1102C); 恒温水浴锅(HH-6); 冰箱(容声 BCD-218G); 台式高速冷冻离心机(HR1716M); 分光光度计(722)。

1.2 试验方法

1.2.1 制备板栗抗性淀粉 称取 10 g 板栗淀粉, 置于 150 mL 锥形瓶中。加入一定量的蒸馏水, 充分溶解形成淀粉乳, 80℃搅拌 20 min 进行预糊化, 冷却后在 30℃添加一定量盐酸酸解一定时间, 用 NaOH 调 pH 到 6, 添加普鲁兰酶, 在 60℃水浴锅中震荡反应。冷却至室温。于 4℃冰箱中储存回生 24 h。然后干燥、粉碎、过筛得到抗性淀粉样品。

1.2.2 单因素试验 参考淀粉制备抗性淀粉试验^[2,6-7], 结合前期试验结果, 确定试验影响因子为: 淀粉乳浓度、酸添加量与淀粉量质量比、酸解时间、酶添加量和酶解时间。在探究单因素影响时, 固定淀粉乳浓度 25%, 酸加质量比 0.1%, 酸解时间 3 h, 普鲁兰酶添加量 12 APS U/S, 酶解时间 8 h, 改变对应的探究变量范围。如考察淀粉乳浓度时, 固定其它条件, 探究 15%、20%、25%、30%、35% 淀粉乳浓度对试验结果的影响; 考察酸添加量时, 固定其它条件, 探究 0.02%、0.04%、0.06%、0.08%、

第一作者简介:黄兵杰(1989-), 男, 硕士研究生, 现主要从事板栗产品加工工艺研究工作。E-mail: 234113948@qq.com.

责任作者:程水源(1965-), 男, 教授, 博士生导师, 现主要从事经济林木种质资源评价与利用等研究工作。E-mail: s_y_cheng@sina.com.

基金项目:湖北省自然科学基金重点资助项目(2010CBB03901); 湖北省教育厅高校产学研合作重点资助项目(C2010060)。

收稿日期:2015-05-25

0.10%酸添加量对抗性淀粉得率的影响;考察酸解时间时,固定其它条件,探究酸解 1、2、3、4、5 h 对抗性淀粉得率的影响;考察酶添加量时,固定其它条件,探究 6、8、10、12、14 U/g 酶添加量对抗性淀粉得率的影响;考察酶解时间时,固定其它条件,探究 5、6、7、8、9 h 对抗性淀粉得率的影响。

1.2.3 响应面分析 根据单因素试验结果,采用 Design Expert 8.06 中的响应面试验设计法(response surface method,RSM),对影响抗性淀粉得率显著的因素:淀粉乳浓度、酸处理时间、普鲁兰酶添加量、酶解时间进行 4 因素 3 水平的响应面试验,优化酸解法生产抗性淀粉的工艺条件。因素水平编码值见表 1。

表 1 响应面试验因素水平

Table 1 Parameters and test levels for Box-Behnken experiment

水平 Test level	A 淀粉乳浓度 The concentration of soluble starch/%	B 酸处理时间 Acid treatment /h	C 酶添加量 Amount of enzyme /(U·g ⁻¹)	D 酶解时间 The time of enzymolysis/h
-1	15	2	10	5
0	20	3	12	6
1	25	4	14	7

1.3 项目测定

抗性淀粉测定采用 AOAC 法;还原糖含量测定采用 DNS 法^[8]。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 淀粉乳浓度对抗性淀粉得率的影响 由图 1 可知,淀粉乳浓度过高或过低都不利于抗性淀粉的形成。单因素考查中,随着淀粉乳浓度的升高,抗性淀粉得率逐渐升高。淀粉乳浓度约为 20%时,抗性淀粉得率最高。淀粉乳浓度继续升高,得率开始逐渐下降。主要原因在于,淀粉乳浓度太低时,脱支过于迅速,会形成较短的直链分子,直链分子也过于分散,不利于回生过程中的重聚结晶;淀粉乳浓度过高时,脱支不完全,而且糊化后淀粉乳糊粘度很大。分子链相互影响,难以有序排列和重结晶^[6]。

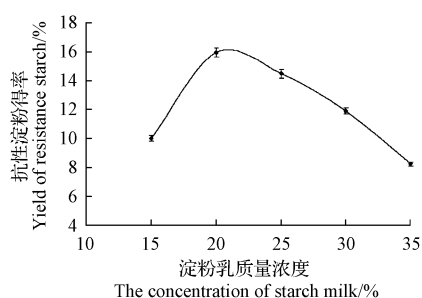


图 1 淀粉乳浓度对抗性淀粉得率的影响

Fig.1 Effect of starch milk concentration on yield of resistance starch

2.1.2 酸添加量对抗性淀粉得率的影响 酸量的多少会直接影响抗性淀粉得率。由图 2 可知,添加的盐酸量过少无法达到脱支的效率和目的,当酸添加量为 0.06%时是较合适的条件。随着酸浓度增加,脱支太过细碎,影响抗性淀粉得率。一般酸水解分为 2 步:第 1 步,快速水解无定型区的支链淀粉;第 2 步,缓慢水解结晶区域的直链淀粉和支链淀粉^[9]。由于酸添加量与酶添加量均对淀粉进行脱支,故在下一步分析中以 0.06%的酸添加量为最佳条件,来探究其它条件的综合影响。因为下一步还有普鲁兰酶的处理,所以酸添加量只是对淀粉乳进行广泛的预脱支处理。

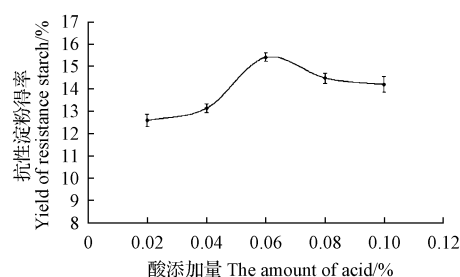


图 2 酸添加量对抗性淀粉得率的影响

Fig.2 Effect of the amount of acid on yield of resistance starch

2.1.3 酸解时间对抗性淀粉得率的影响 由图 3 可知,酸解时间的长短对抗性淀粉的得率有着显著的影响。在酸处理的前 1 h,抗性淀粉得率迅速上升到最大值。随着酸处理时间增加,抗性淀粉含量开始下降。酸解时间直接影响溶液中的淀粉分子被水解的程度,酸解时间过长,分子链就被分解的过短,在回生结晶过程中无法形成稳固晶体。酸解时间过短,分子链过长和过少也同样不利于重结晶形成。因此,2 h 是抗性淀粉得率较为合适的酸解时间。

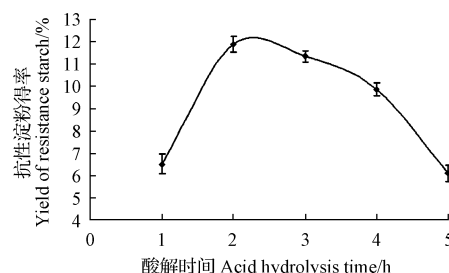


图 3 酸解时间对抗性淀粉得率的影响

Fig.3 Effect of acid hydrolysis time on yield of resistance starch

2.1.4 酶添加量对抗性淀粉得率的影响 普鲁兰酶能够专一性切开支链分子中的 α -1,6 糖苷键,切下整个分支结构,形成直链淀粉^[10]。经过前面的盐酸预处理,已能使绝大部分淀粉分子水解分散,结合一定量的普鲁兰

酶就可以达到提高抗性淀粉得率的目的。酶添加量低于 12 U/g 时,抗性淀粉得率与酶添加量呈正相关。但酶添加量高于 12 U/g 时会降低抗性淀粉得率,造成脱支得到的分子链过短而难以重聚和结晶。若是过少,降解效率太低,则需要延长酶解的时间。因此,酶添加量在 12 U/g 时,抗性淀粉得率较高。

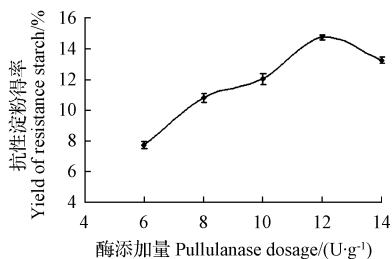


图4 酶添加量对抗性淀粉得率的影响

Fig. 4 Effect of pullulanase dosage on yield of resistance starch

2.1.5 酶解时间对抗性淀粉得率的影响 由图 5 可知,酶解时间在 6 h 左右时,抗性淀粉得率最高。酶解时间会影响淀粉乳中支链淀粉的水解程度。直链分子过少,就难以簇拥聚合,过长会相互排斥而难以聚集。酶作用时间过长,直链分子过短。运动区域太自由和活跃,碰撞成链不稳定,难以聚合成晶体,抗性淀粉得率下降。

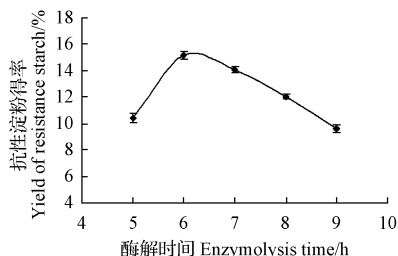


图5 酶解时间对抗性淀粉得率的影响

Fig. 5 Effect of pullulanase enzymolysis time on yield of resistance starch

2.2 响应面分析

由表 2、3 可知,模型的 $P < 0.001$,表明回归方程达到极显著水平,失拟项 $P > 0.05$,模型失拟不显著。回归方程的 $R^2 = 0.9847$,模型的校正决定系数 $R_{Adj}^2 = 0.9694$,说明此模型可以解释 96.94% 的数据结果。

通过 Design-Expert 软件进行二次响应面回归分析,得到如下多元响应面回归模型:

$R(\%) = 16.23 + 0.62A - 0.81B + 1.03C + 1.29D - 0.11AB + 0.100AC + 0.21AD - 0.10BC - 0.22BD + 0.14CD - 0.45A^2 - 0.50B^2 - 0.59C^2 - 0.20D^2$ 。可见,4 因素对抗性淀粉得率的影响程度大小顺序为酶解时间 > 酶添加量 > 酸处理时间 > 淀粉乳浓度。

通过响应面分析,初步认为当淀粉乳浓度为

22.5%,酸处理时间 136.8 min,酶添加量 13.9 U/g,酶解时间 407 min,抗性淀粉得率最高,为 18.69%。经 3 组平行试验验证,抗性淀粉得率分别为 18.67%、18.70%、18.67%,较为符合预测值。

表2 Box-Behnken 试验设计及其响应值

Table 2 Box-Behnken design matrix along with the experimental values

序号 No.	处理设计 Test level				响应值 Response value
A	B	C	D		
1	0	0	0	0	16.23
2	0	0	-1	1	15.63
3	0	0	0	0	16.07
4	1	1	0	0	14.82
5	-1	1	0	0	14.02
6	0	0	-1	-1	13.12
7	0	-1	-1	0	14.93
8	-1	0	0	-1	13.99
9	0	1	-1	0	13.51
10	-1	0	-1	0	13.68
11	0	1	1	0	15.36
12	0	1	0	-1	13.49
13	1	0	0	1	17.8
14	0	0	1	1	17.94
15	0	0	0	0	16.19
16	0	1	0	1	15.85
17	0	-1	0	-1	14.66
18	-1	-1	0	0	15.42
19	1	0	-1	0	14.50
20	1	0	1	0	16.79
21	0	0	0	0	16.29
22	0	0	0	0	16.37
23	1	0	0	-1	15.25
24	0	-1	1	0	17.18
25	0	-1	0	1	17.89
26	-1	0	0	1	15.71
27	-1	0	1	0	15.57
28	0	0	1	-1	14.87
29	1	-1	0	0	16.65

表3 回归模型方差分析

Table 3 Analysis of variance for regression

方差来源 Source of variation	平方和 Sum of square	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value
模型 Model	49.33	14	3.52	64.44	0.000 1
残差 Residual	0.77	14	0.055		
失拟 Lack of fit analysis	0.72	10	0.072	5.68	0.054 4
纯误差 Traditional error	0.050	4	0.013		
总和 Total	50.09	28			

3 讨论

利用响应面设计试验,选择对抗性淀粉得率有显著影响的4个因素:淀粉乳浓度、酸处理时间、酶添加量、酶解时间做4因素3水平的响应面分析所得到的最佳工艺为淀粉乳浓度22.5%,酸添加量0.06%,酸处理时间136.8 min,酶添加量13.9 U/g,酶解时间407 min,抗性淀粉得率18.69%。

目前,随着试验理论与技术的不断发展,抗性淀粉的制备方法趋于成熟和多样化。早期单一的压热法、酸法、酶法等制备方法产量较低,如解华东^[7]用加热回生的方法制备板栗抗性淀粉产率为14.84%;冷志富等^[11]采用普鲁兰酶制备玉米抗性淀粉产率为9.75%。多种制备技术结合优化能显著提高抗性淀粉得率,是抗性淀粉生产发展的必然趋势,如连喜军等^[12]采用多种酶法相互结合制备马铃薯的抗性淀粉产率达17.748%;薛慧等^[6]以鲜木薯淀粉为原料,采用压热结合酶法制备的抗性淀粉质量分数达15.48%。因此,探索抗性淀粉制备的最佳条件,技术相互补缺,是提高抗性淀粉制备效率与产率的有效途径。作为试验产品的原料,不同品种淀粉对抗性淀粉得率也有直接影响。目前对抗性淀粉研究较多的试验原料一般为甘薯、大米和玉米之类,也研究出适应其特性的制备方法且取得了较好的制备成果。而板栗淀粉中支链淀粉较直链多,因此在生产中需要添加适量的酸或酶进行脱支,希望该试验的方法能为板栗抗性淀粉的制备提供一定参考。

参考文献

- [1] WEN Q B, LORENZ K J, MATIN D J, et al. Carbohydrate digestibility and resistant starch of steamed bread[J]. *Starch*, 1996, 48(5): 180-185.
- [2] 吴亨,尹秀华,谢丽燕,等. 酶法联合压热-冷却循环处理制备抗性淀粉[J]. *现代食品科技*, 2014(5): 245-250.
- [3] 张焕新. 抗性淀粉酶法制备及其特性与应用的研究[D]. 无锡:江南大学, 2012.
- [4] 别同玉,许加生,别同德. 我国抗性淀粉制备工艺研究进展[J]. *分子通报*, 2011(5): 34-38.
- [5] KEREN S, HAVAZELET B P, EYAL S. Polymorphism of resistant starch type III [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2003, 54(8): 363-369.
- [6] 薛慧,闫庆祥,蒋盛军,等. 鲜木薯抗性淀粉的制备与性质[J]. *农业工程学报*, 2013(7): 284-292.
- [7] 解华东. 板栗制品的老化研究和抗性淀粉制备[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2007.
- [8] 程燕锋,王娟,李尚新,等. 几种测定香蕉抗性淀粉含量方法的比较[J]. *食品与发酵工业*, 2007(8): 153-157.
- [9] 阮少兰,刘亚伟. 大米抗性淀粉制备工艺条件优化的研究[J]. *河南工业大学学报*, 2006(6): 43-46.
- [10] NAIR S U, SINGHAL R S, KAMAT M Y. Induction of pullulanase production in *Bacillus cereus* FDTA 213 [J]. *Biores Technol*, 2007, 98(4): 856-859.
- [11] 冷志富,杜双奎,蔡萌,等. 普鲁兰酶法制备玉米抗性淀粉工艺优化[J]. *中国粮油学报*, 2014(8): 28-32.
- [12] 连喜军,杨美静,郑绍达. 多种酶法处理提高马铃薯回生抗性淀粉制备率[J]. *粮食与油脂*, 2010(3): 42-47.

Debranching Degradation Preparation of Chestnut Resistant Starch and the Optimum Process

HUANG Bingjie^{1,2}, CHENG Hua^{1,2}, LI Linling^{1,2}, ZHANG Xuehua^{1,2}, CHEN Xiaoling^{1,2}, CHENG Shuiyuan^{1,3}

(1. Economic Forest Germplasm Improvement and Comprehensive Utilization of Resources of Hubei Key Laboratories, Huanggang, Hubei 438000; 2. College of Life Science, Huanggang Normal University, Huanggang, Hubei 438000; 3. School of Biology and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan, Hubei 430023)

Abstract: Taking the chestnut starch as material, the debranching degradation resistant starch was prepared by acid and enzymolysis debranching methods. The preparation process of the concentration of starch milk, add the amount of acid pretreatment and hydrolysis time, add the amount of influence and pullulanase hydrolysis time on the yield were studied. Then, to explore the best preparation process and make verification by response surface methodology. The results showed that the optimum process conditions for the preparation of resistant starch chestnut as follow, starch milk concentration was 22.5%, the additive amount of acid was 0.06%, acid treatment time was 136.8 min, enzyme dosage was 13.9 U/g, hydrolysis time was 407 min, resistant starch yield of 18.69%.

Keywords: chestnut; resistant starch; debranching degradation; response surface optimization