

芡实淀粉的酶解特性及体外消化模拟分析

张 余¹, 魏兆军², 袁怀波², 张 曼¹

(1.滁州学院化学与生命科学系, 安徽 滁州 239000; 2.合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽 合肥 230009)

摘 要: 研究芡实淀粉的酶解特性及其在模拟过程中的消化特性。采用 α -淀粉酶水解法, 以酶解液中还原糖释放率为指标, 对芡实淀粉的酶解特性进行分析。结果表明, α -淀粉酶的最优酶解条件为: α -淀粉酶用量 350 U/g、底物质量浓度为 10 g/100 mL、pH 值为 6, 于 50℃ 水浴中水解 60~80 min。在此条件下, 芡实淀粉酶解液中还原糖释放率可达 79.61%。体外消化模拟结果显示, 芡实淀粉在模拟消化中的还原糖和可溶性糖释放率均远低于酶解过程; 且与米淀粉相比, 芡实淀粉较难消化。研究认为, 芡实淀粉在 α -淀粉酶作用下, 较易水解; 消化模拟过程中, 芡实淀粉的可消化性稍低于米淀粉, 可能与其中残留的植物多酚类物质有关。

关键词: 芡实淀粉; α -淀粉酶; 酶解; 消化模拟

Enzymatic Hydrolysis Properties and *in vitro* Digestion of Gorgon Nut (*Euryale ferox* Salisb.) Starch

ZHANG Cuan¹, WEI Zhao-jun², YUAN Huai-bo², ZHANG Man¹

(1. Department of Chemistry and Life Science, Chuzhou University, Chuzhou 239000, China;

2. School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract: In order to explore the enzymatic hydrolysis properties of gorgon nut starch, the hydrolysis parameters of gorgon nut starch by α -amylase were optimized. The results showed that the optimal hydrolysis parameters were α -amylase amount of 350 U/g, gorgon nut starch concentration of 10 g/100 mL, hydrolysis pH of 6, hydrolysis temperature of 50 °C and hydrolysis time of 60—80 min. Under these conditions, the reducing sugar release from gorgon nut starch was 79.61%. The simulated digestion *in vitro* showed that the release of reducing sugar and soluble sugar from gorgon nut starch was much lower than that in enzymatic hydrolysis system. Moreover, the digestibility was slightly lower than that of rice starch. Therefore, gorgon nut starch was easily hydrolyzed by α -amylase. The slightly lower digestibility of gorgon nut starch may be related to polyphenols in it.

Key words: gorgon nut starch; α -amylase; enzymatic hydrolysis; simulated digestion

中图分类号: TS231

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)03-0023-05

芡实是睡莲科(*Nymphaeaceae*)芡属植物(*Euryale Salisb. ex DC.*)芡(*Euryale ferox* Salisb.)的成熟种仁, 又称鸡头米。芡实是一种药食兼用的材料, 具有多种保健功能。我国中医认为, 芡实具有显著的治疗和保健功能。《神农本草经》认为其具有“补中除暑疾, 益精气, 强志令耳目聪明”等作用^[1]。《本草纲目》中也有“芡能止渴益肾, 治小便不禁、遗精、白浊、带下”的记载^[2]。在我国民间也一直流传有许多包含芡实的中药方剂或药膳配方。现代分析研究也表明, 芡实提取物显示较高的生理活性和保健功能^[3-4]。

目前, 有关芡实的研究主要集中于其营养^[5-6]、加工^[7-9]、生理活性及其机理^[10-12]方面, 对芡实淀粉的相关

报道较少^[13-14]。芡实淀粉在扫描电子显微镜下, 芡实淀粉颗粒呈不规则多面体, 平均粒径为 1.2~6.5 μm , 与米淀粉粒径相近(2~10 μm), 属于小颗粒淀粉^[14-15]。芡实淀粉分子结构中, 直链淀粉和支链淀粉质量分数分别为 18.37%~23.06% 和 37.66%~48.30%, 支链与直链比值为 1.63~2.55^[15]。

系统了解芡实原料的基本组成及其功能特性是研究开发芡实深加工产品的基本前提。作为芡实中含量最高的生物大分子, 芡实淀粉的颗粒结构及其营养、功能特性直接影响芡实产品的加工条件和品质特性。目前有关芡实淀粉营养和功能特性方面的文献报道很少。该研究采用酶解和体外模拟消化的方法, 对芡实淀粉的酶解

收稿日期: 2011-01-29

基金项目: 安徽省应用化学省级重点学科建设项目(200802187C); 滁州市科技计划项目(201057)

作者简介: 张余(1970—), 女, 副教授, 博士, 主要从事食品化学与营养学、膳食蛋白研究。

E-mail: zhangchuan2005@126.com

特性和消化过程进行初步研究,为系统了解芡实淀粉在人体的消化过程及营养特性提供较直接的理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

带壳新鲜芡实,由滁州市天长市胜达芡实经济专业合作社提供;经 40℃ 干燥,手工去除种壳,粉碎(过 80 目筛网),得到芡实全粉,装入聚乙烯自封袋内,于 4℃ 冰箱贮存,备用。米淀粉 实验室自制。

α -淀粉酶(比活力 5000U/g,最适 pH 5.5~7.5,最适温度 50~75℃,将其配制成为酶活力 250U/mL 的酶液,备用) 天津市福晨化学试剂厂。

无水乙醚、丙酮、硫酸铜、硼酸、蔗糖、葡萄糖、苯酚、四水合酒石酸钾钠、高氯酸、浓硫酸、氢氧化钠、3,5-二硝基水杨酸 国药集团上海化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

CP224s 型电子天平 德国 Sartorius AG 公司; L-550 型离心机 湖南湘仪离心机厂; DGX-9073BC-1 型电热鼓风干燥箱 上海福玛实验设备有限公司; 712E 型可见分光光度计 上海光谱仪器有限公司; KDN-102F 型自动定氮仪上海纤检仪器有限公司; HYP-1004 型消化炉上海纤检仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 组分测定^[16]

粗蛋白质含量测定:采用 GB/T5009.5—2003《食品中蛋白质的测定》凯氏定氮法;水分测定:采用 GB/T 5009.3—2003《食品中水分的测定》直接干燥法;灰分测定:采用 GB/T5009.4—2003《食品中灰分的测定》灼烧法;芡实粗纤维的测定:采用质量法;淀粉测定:采用苯酚-硫酸法;还原糖测定:采用 3,5-二硝基水杨酸比色法;可溶性糖测定:采用苯酚-硫酸法;总酚含量测定:采用 Folin-Ciocalteus(FC)试剂法,以焦性没食子酸为标准物进行测定^[17]。

1.3.2 芡实淀粉制备^[14,18]

芡实中含有一定量的植物多酚,会导致淀粉变色,必须除去。称取一定量芡实全粉,体积分数 50% 的丙酮水溶液浸提 2~3 次,离心分离,弃上清液,取沉淀。

于沉淀物中加入 20 倍量的 0.01mol/LNaOH 溶液,搅拌浸提 3~5 次(以脱除蛋白质组分),离心分离,弃上清液,收集沉淀。将沉淀用去离子水漂洗至中性,悬浮于水中,用 3 层纱布过滤,滤液抽滤分离,得滤饼,于 40℃ 条件下干燥,即得芡实淀粉。

1.3.3 芡实淀粉酶解处理及水解程度分析^[19]

称取芡实淀粉,按比例加入去离子水,于 90℃ 水

浴中糊化 30 min,取出,冷却后,按实验计划加入 α -淀粉酶液,在设定条件下进行酶解。酶解结束后,于沸水浴中灭酶 15 min,取出,冷却至室温,4000r/min 离心 5 min,取上清液,沉淀用水重复提取 1 次,离心,合并上清液于容量瓶内,定容,即得芡实淀粉水解液。以水解液中还原糖(或可溶性糖)含量表示芡实淀粉的水解程度。计算还原糖释放率和可溶性糖释放率。

$$\text{还原糖释放率(以葡萄糖计)/\%} = \frac{m_1}{m} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{可溶性糖释放率(以蔗糖计)/\%} = \frac{m_2}{m} \times 100 \quad (2)$$

式中: m_1 为水解液中还原糖质量/g; m_2 为水解液中可溶性糖质量/g; m 为样品中淀粉质量/g。

1.3.4 芡实淀粉体外消化模拟^[20]

分别称取一定量的芡实淀粉和米淀粉加蒸馏水配制成质量浓度约 10g/100mL 的淀粉悬浮液,于沸水中糊化 20 min,冷却,加入约 1/2 体积的人工胃液(用 0.5mol/L 盐酸调节 pH 值在 1.5 左右),在 37℃ 水浴中保温 3 h。每 20 min 取 5 mL 消化液于离心管中,立刻加入 1 mL 0.2mol/L 的 NaCO₃ 溶液以终止消化,4000r/min 离心 10 min,取上清液定容,测定其中的还原糖和可溶性糖含量。

1.3.5 数据处理

所有实验数据重复测定 3 次,结果取平均值。采用 Excel 软件和 DPSv7.55 数据处理软件对实验数据进行处理。

2 结果与分析

2.1 芡实组分分析

表 1 芡实样品组分分析

Table 1 Compositions of chemical composition of gorgon nut flour, gorgon nut starch and rice starch

指标	芡实全粉	芡实淀粉	米淀粉
水分含量/%	9.88	12.21	11.05
淀粉含量/%	82.14	91.55	90.78
蛋白质含量/%	10.40	1.20	1.09
粗纤维含量/%	0.50	0.13	0.21
灰分含量/%	0.81	0.32	0.28
总酚含量/(mg/g)	0.93	0.12	0.03

注:各指标含量(水分除外)都以芡实干基计算。

由表 1 可知,芡实中的主要营养组分为淀粉和蛋白质,其含量与谷物接近。因芡实全粉中含有较丰富的植物多酚物质,易氧化褐变,须经 50% 丙酮水溶液脱

除多酚,再以稀碱液脱除其中蛋白质,所得芡实淀粉色泽亮白,质地细腻,淀粉含量超过91%。所得米淀粉基本组分与芡实淀粉相近,其中,芡实全粉中富含植物多酚(可提取总酚含量0.93mg/g),因此所得芡实淀粉中仍残留有少量多酚类物质(0.12mg/g),相比之下,米淀粉中所含总酚较低(0.03mg/g),远低于大米原料中的总酚含量(0.36mg/g)。

2.2 芡实淀粉酶解条件

2.2.1 酶用量

在芡实淀粉质量浓度为10g/100mL, pH值中性条件下,于40℃水浴中酶解30min,以水解液中还原糖释放率为指标,分析不同 α -淀粉酶用量对芡实淀粉水解程度的影响。

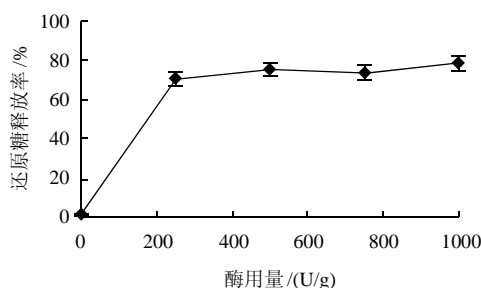


图1 α -淀粉酶用量对芡实淀粉水解程度的影响

Fig.1 Effect of enzyme dosage on reducing sugar release from gorgon nut starch

由图1可知,随 α -淀粉酶用量的增加,还原糖释放率显著增加($P < 0.05$)。当酶用量增加至250U/g以上时,还原糖释放率变化不大。因此,取 α -淀粉酶用量为250U/g。

2.2.2 芡实淀粉质量浓度

在 α -淀粉酶用量为250U/g, pH值中性条件下,于40℃水浴中水解30min,分析淀粉质量浓度对芡实淀粉酶解过程的影响。

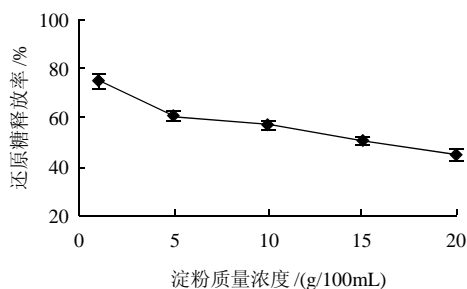


图2 淀粉质量浓度对芡实淀粉水解程度的影响

Fig.2 Effect of substrate concentration on reducing sugar release from gorgon nut starch

由图2可知,随芡实淀粉质量浓度增加,还原糖释放率显著降低($P < 0.01$),其中还原糖释放率在芡实淀粉质量浓度 $> 10\text{g}/100\text{mL}$ 时迅速降低。因此 α -淀粉酶酶解芡实淀粉的适宜的淀粉质量浓度为10g/100mL。

2.2.3 体系pH值

在芡实淀粉质量浓度为10g/100mL, α -淀粉酶用量250U/g的条件下,于40℃水浴中水解30min,分析体系pH值对芡实淀粉酶解过程的影响。

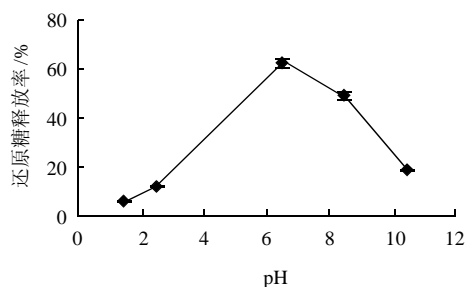


图3 pH值对芡实淀粉水解程度的影响

Fig.3 Effect of hydrolysis pH on reducing sugar release from gorgon nut starch

由图3可知, pH值在6左右时,还原糖释放率显著增加($P < 0.05$)。此后,随pH值的增加,偏离了 α -淀粉酶的最佳pH值范围,酶活降低,还原糖释放率迅速降低。因此, α -淀粉酶酶解芡实淀粉的适宜pH值为6~7。

2.2.4 酶解温度

在芡实淀粉质量浓度为10g/100mL, α -淀粉酶用量250U/g的条件下,于水浴中水解30min,分析酶解温度对芡实淀粉水解的影响。

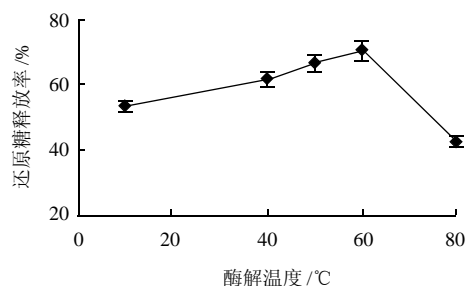


图4 酶解温度对芡实淀粉水解程度的影响

Fig.4 Effect of hydrolysis temperature on reducing sugar release from gorgon nut starch

由图4可知,酶解温度在10~60℃范围内,随温度升高还原糖释放率增加显著($P < 0.05$)。在酶解温度为80℃时,因高温导致 α -淀粉酶钝化,还原糖释放率迅速降低。因此, α -淀粉酶酶解芡实淀粉的适宜温度为50~60℃。

2.2.5 酶解时间

在淀粉质量浓度为10g/100mL, α -淀粉酶用量250U/g, pH值6~7的条件下, 于50℃水浴中酶解, 分析酶解时间对芡实淀粉酶解过程的影响。

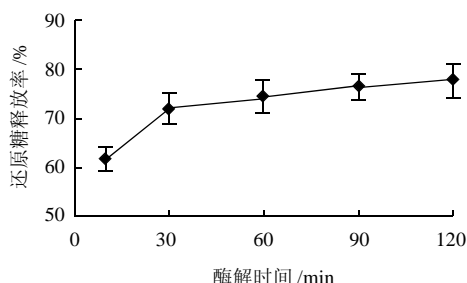


图5 酶解时间对芡实淀粉水解程度的影响

Fig.5 Effect of hydrolysis time on reducing sugar release from gorgon nut starch

由图5可知, 随酶解时间的延长, 酶解液中还原糖释放率显著增加($P < 0.05$)。酶解60min后, 随酶解时间的继续增加, 还原糖释放率增加缓慢。因此, 分析认为, α -淀粉酶水解芡实淀粉的酶解时间以60min较合适, 此时酶解液中还原糖释放率为72.68%。

2.3 芡实淀粉酶解条件优化

表2 α -淀粉酶水解芡实淀粉的正交试验设计及结果

Table 2 Orthogonal array design and results for optimizing enzymatic hydrolysis of gorgon nut starch

试验号	A 酶解时间 / min	B 底物质量浓度 / (g/100mL)	C pH 值	D 温度 / °C	E 酶用量 / (U/g)	还原糖释放率 / %
1	1(60)	1(2)	1(5)	1(50)	1(150)	39.64
2	1	2(5)	2(6)	2(60)	2(250)	68.28
3	1	3(8)	3(7)	3(70)	3(350)	57.62
4	1	4(11)	4(8)	4(80)	4(450)	39.68
5	2(80)	1	2	3	4	52.15
6	2	2	1	4	3	38.87
7	2	3	4	1	2	58.71
8	2	4	3	2	1	51.77
9	3(100)	1	3	4	2	37.51
10	3	2	4	3	1	46.76
11	3	3	1	2	4	70.76
12	3	4	2	1	3	79.61
13	4(120)	1	4	2	3	69.36
14	4	2	3	1	4	71.66
15	4	3	2	4	1	43.83
16	4	4	1	3	2	53.03
K_1	205.22	198.66	202.30	249.62	182.00	
K_2	201.50	225.57	243.87	260.17	217.53	
K_3	234.64	230.92	218.56	209.56	245.46	
K_4	237.88	224.09	214.51	159.89	234.25	
k_1	51.31	49.67	50.58	62.41	45.50	
k_2	50.38	56.39	60.97	65.04	54.38	
k_3	58.66	57.73	54.64	52.39	61.37	
k_4	59.47	56.02	53.63	39.97	58.56	
R	9.10	8.07	10.39	25.07	15.87	

因子主次

 $D > E > C > A > B$

在酶解条件单因素分析的基础上, 以还原糖释放率为指标, 采用 $L_{16}(4)^5$ 正交试验设计, 对 α -淀粉酶水解芡实淀粉的条件进行优化, 同时对各因素的主次关系进行分析。因素水平设置表、试验设计及试验结果见表2。影响还原糖释放率的因子主次顺序为: $D > E > C > A > B$, 即酶解温度 $>$ 酶用量 $>$ pH值 $>$ 酶解时间 $>$ 底物质量浓度。pH值、酶解时间和底物质量浓度的影响较小, 主要原因与其正交试验中的设置水平差异较小有关。表中最优酶解条件为试验号12($A_3B_4C_2D_1E_3$), 即酶用量350U/g, 底物质量浓度为11g/100mL, pH值为6, 于50℃水浴中水解100min。在此条件下, 芡实淀粉酶解液中还原糖释放率为79.61%。该酶解条件中各参数水平适中, 易于控制, 可作为 α -淀粉酶水解芡实淀粉的最优工艺条件。

以还原糖释放率(y)为指标对试验数据进行二项式逐步回归, 得到还原糖释放率的回归模型为: $y = 36.78 + 2.64B + 12.17D - 3.76D^2 + 1.50AE$ ($r = 0.8810$)。

表3 各因素与RSR的相关性分析

Table 3 Correlation analysis between reducing sugar release from gorgon nut starch and hydrolysis parameters

r 值	偏相关	t 检验值	P 值
(y, B)	0.4253	1.5583	0.1451
(y, D)	0.3580	1.2716	0.2276
(y, D^2)	-0.5162	1.9991	0.0688
(y, AE)	0.6923	3.1822	0.0079

由表3可知, 在用 α -淀粉酶水解芡实淀粉的过程中, 底物质量浓度、酶解温度和酶解时间与酶用量交互作用与酶解液中还原糖释放率呈正相关, 与 D^2 呈负相关。其中酶解时间与酶用量交互作用对还原糖释放率的影响达极显著水平($P < 0.01$), 其次是温度。体系pH值影响较小的主要原因与试验中设置水平范围较窄有关(pH 5~8), 并不表明该因素影响小。这一点在条件分析部分已有体现。

2.4 芡实淀粉体外消化模拟

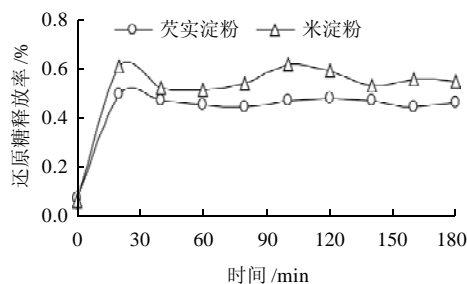


图6 淀粉模拟消化过程中还原糖释放率变化

Fig.6 Changes in reducing sugar release from gorgon nut starch and rice starch during in vitro simulated digestion

由图6可知,两种淀粉在模拟胃液中的还原糖释放率远低于酶解过程。主要原因在于模拟胃液中不含淀粉酶,且pH1.5的酸性条件又不足以使淀粉发生明显水解,所以释放出的还原糖也就很低了。在最佳实验条件,还原糖释放率最高值在模拟消化20min时出现,此后还原糖释放率虽有小幅波动,但变化很小。模拟消化过程中,芡实淀粉的还原糖释放率低于米淀粉的,但差异不显著($P < 0.05$),表明芡实淀粉较不易消化。

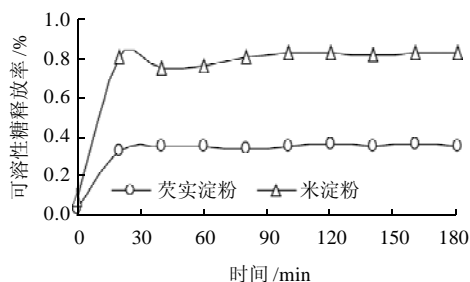


图7 淀粉模拟消化过程中可溶性糖释放率变化

Fig.7 Changes in soluble sugar release from gorgon nut starch and rice starch during *in vitro* simulated digestion

图7是模拟消化过程中,可溶性糖释放率随时间的变化趋势,与还原糖释放率变化基本一致,最高释放率也出现在消化20min时,不同的是可溶性糖释放率稍高于还原糖释放率,且米淀粉显著高于芡实淀粉($P < 0.05$)。该结果进一步印证了“芡实淀粉较米淀粉较不易消化”的结论。米淀粉和芡实淀粉同属于小颗粒淀粉,造成芡实淀粉较低消化率的一个原因可能与芡实淀粉中残余较多的植物多酚类物质有关^[21]。此类物质可以与多糖、蛋白质分子结合,从而影响其消化水解。

3 讨论

3.1 芡实淀粉的酶解特性

芡实淀粉的最优酶解条件为: α -淀粉酶用量为350U/g、底物淀粉质量浓度为10g/100mL,pH值为6,于50℃水浴中水解60~80min。在此条件下,酶解液中还原糖释放率可达79.61%。回归模型和相关性分析表明,在 α -淀粉酶水解芡实淀粉的过程中,底物质量浓度、酶解温度和酶解时间与酶用量交互作用对酶解液中还原糖释放率值呈正相关,与 D^2 呈负相关。其中酶解时间与酶用量交互作用的影响达极显著水平($P < 0.01$)。

3.2 芡实淀粉体外消化模拟

体外消化模拟结果显示,芡实淀粉在模拟胃液中的还原糖和可溶性糖释放率均远低于酶解过程。主要原因

在于模拟胃液中不含淀粉酶,且pH1.5的酸性条件又不足以使淀粉发生明显水解。

在相同的消化模拟体系中,芡实淀粉的还原糖和可溶性糖释放率均低于米淀粉的,表明芡实淀粉较米淀粉较不易消化,原因可能与芡实淀粉中残留的植物多酚类物质有关,此类物质可与淀粉分子结合,并影响其水解。

参考文献:

- [1] 顾观光. 神农本草经[M]. 兰州: 兰州大学出版社, 2004: 60.
- [2] 李时珍. 本草纲目[M]. 中国书店影印, 2003: 121.
- [3] DUTTA R N, JHA S N, JHA U N. Plant contents and quality of Makhana (*Euryale ferox*)[J]. Plant and Soil, 1986, 96: 429-432.
- [4] JHA S N, PRASAD S. Determination of processing conditions for Gorgon nut (*Euryale ferox*) [J]. J Agric Eng Res, 1996, 63: 103-112.
- [5] JHA S N. Physical and hygroscopic properties of Makhana[J]. J Agric Eng Res, 1999, 72: 145-150.
- [6] 刘玉鹏, 刘梅, 刘俊英, 等. 30 种中草药的抗氧化活性研究[J]. 烟台大学学报: 自然科学与工程版, 2000, 13(1): 70-73.
- [7] DAS S, DER P, RAYCHAUDHURI U, et al. The effect of *Euryale ferox* (Makhana), an herb of aquatic origin, on myocardial ischemic reperfusion injury[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2006, 289: 55-63.
- [8] 张名位, 池建伟, 孙玲, 等. 潮州芡实的营养学评价[J]. 广东农业科学, 1999(2): 27-29.
- [9] 凌庆枝, 袁怀波, 赵美霞, 等. 瓦埠湖产芡实种仁的蛋白质、氨基酸测定[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(6): 118-120.
- [10] ZHAO Haoru, ZHAO Shouxun, SUN Chongqing, et al. Glucosylsterols in extracts of *Euryale ferox* identified by high resolution NMR and mass spectrometry[J]. Journal of Lipid Research, 1989, 30: 1633-1637.
- [11] 李美红, 杨雪琼, 万直剑, 等. 芡实的化学成分[J]. 中国天然药物, 2007, 5(1): 24-26.
- [12] 李美红, 李璠, 太志刚, 等. 芡实中的三个环二肽[J]. 昆明学院学报, 2009, 31(3): 39-41.
- [13] 刘永, 严子军. 肇实淀粉理化特性的研究[J]. 食品科学, 2006, 27(8): 119-122.
- [14] 张余, 侯长平, 贾小丽, 等. 芡实淀粉糊黏度特性分析[J]. 中国粮油学报, 2010, 25 (4): 20-23; 27.
- [15] 吴仰风. 芡实的种子发育及其淀粉特性的初步研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2007.
- [16] 陈毓荃. 生物化学试验方法和技[M]. 北京: 科学出版社, 2005: 138-142.
- [17] MUCUWETI M, ZENDA G, AAHWELL R, et al. Sugars, organic acid and phenolic compounds of *Ziziphus mauritiana* fruit[J]. Europe Food Research Technology, 2005, 221: 570-574.
- [18] 陈季旺, 孙庆杰, 夏文水, 等. 影响碱酶两步法制备大米淀粉工艺条件的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(1): 158-163.
- [19] 张国权, 史一一, 魏益民, 等. 荞麦淀粉的真菌淀粉酶酶解动力学研究[J]. 农业工程学报, 2007, 23(5): 43-46.
- [20] HEMANDEZ O, EMALDI U, TOVAR J. *in vitro* digestibility of edible films from various starch sources[J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 71: 648-655.
- [21] 张余, 薛连海, 贾小丽, 等. D101 树脂分离纯化芡实多酚的特性研究[J]. 食品科学, 2009, 30(20): 260-264.