

# 响应面试验优化品种诱导-双酶复合法制备RS<sub>3</sub>型籼米抗性淀粉工艺

欧阳梦云, 王 燕\*, 吴卫国, 廖卢艳  
(湖南农业大学食品科技学院, 湖南 长沙 410128)

**摘 要:**以微波预糊化籼米淀粉为原料, 自制RS<sub>3</sub>型马铃薯抗性淀粉为晶种, 研究RS<sub>3</sub>型籼米抗性淀粉的晶种诱导-双酶复合法制备工艺。利用扫描电子显微镜对淀粉颗粒形貌进行表征并研究淀粉的抗酶解性。在单因素试验的基础上, 固定其他酶解条件, 以RS<sub>3</sub>型籼米抗性淀粉产率为响应值, 确定晶种添加量、异淀粉酶添加量、普鲁兰酶添加量和普鲁兰酶酶解时间作为影响产率的主要因素, 进行Box-Behnken响应面优化试验。得到RS<sub>3</sub>型籼米抗性淀粉的最佳制备工艺条件为: 晶种添加量5%、异淀粉酶添加量8 U/g、普鲁兰酶添加量8 U/g、普鲁兰酶酶解时间3.50 h。在此最佳制备工艺条件下, RS<sub>3</sub>型籼米抗性淀粉产率为27.42%, RS<sub>3</sub>失去原有的淀粉颗粒形貌, 表面变得粗糙, 结晶结构致密, 具有较强抗酶解能力。

**关键词:**晶种诱导; RS<sub>3</sub>型抗性淀粉; 异淀粉酶; 普鲁兰酶

## Response Surface Methodology for Optimization of Preparation Process for RS<sub>3</sub> Type Resistant Indica Rice Starch by Seed Crystal Induction Combined with Dual-Enzymatic Hydrolysis

OUYANG Mengyun, WANG Yan\*, WU Weiguo, LIAO Luyan  
(College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

**Abstract:** In this research, RS<sub>3</sub> type resistant potato starch was prepared and used as seed crystal to investigate the preparation of RS<sub>3</sub> type resistant indica rice starch by the combined use of seed crystal and sequential hydrolysis with isoamylase and pullulanase. Scanning electron microscopy (SEM) was used to characterize starch granule morphology. Besides, we also studied the resistance of starches to enzymatic hydrolysis. Using the one-factor-at-a-time method, the amounts of seed crystal, isoamylase and pullulanase added and pullulanase hydrolysis time were identified as factors with a significant influence on the yield of RS<sub>3</sub> type resistant starch. These variables were optimized using response surface methodology with a Box-Behnken design. The maximum yield of RS<sub>3</sub> type resistant starch of 27.42% was obtained under the following conditions: 5% seed crystal, 8 U/g isoamylase, 8 U/g pullulanase and 3.50 h hydrolysis with pullulanase. The surface of the resistant starch granules was rough, which lost the original starch granule morphology, and the crystal structure of the resistant starch was compact. In addition, its resistance to enzymatic hydrolysis was strong.

**Key words:** seed crystal induction; RS<sub>3</sub> type resistant indica rice starch; isoamylase; pullulanase

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201718038

中图分类号: TS236.9

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2017) 18-0244-07

引文格式:

欧阳梦云, 王燕, 吴卫国, 等. 响应面试验优化品种诱导-双酶复合法制备RS<sub>3</sub>型籼米抗性淀粉工艺[J]. 食品科学, 2017, 38(18): 244-250. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201718038. <http://www.spkx.net.cn>

OUYANG Mengyun, WANG Yan, WU Weiguo, et al. Response surface methodology for optimization of preparation process for RS<sub>3</sub> type resistant indica rice starch by seed crystal induction combined with dual-enzymatic hydrolysis[J]. Food Science, 2017, 38(18): 244-250. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201718038. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2016-10-25

基金项目: 湖南省重金属污染耕地治理修复机理及技术模式优化集成项目(农办财函〔2015〕38号)

作者简介: 欧阳梦云(1992—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品化学与营养。E-mail: 296471174@qq.com

\*通信作者: 王燕(1968—), 女, 教授, 博士, 研究方向为食品化学与营养、食品添加剂。E-mail: 693675748@qq.com

抗性淀粉因其具有独特的抗酶消化能力<sup>[1]</sup>和类似胰岛素<sup>[2]</sup>、膳食纤维<sup>[3]</sup>的生理活性功能,已成为新兴的食品添加剂之一,广泛应用于国外食品加工领域<sup>[4-9]</sup>。RS<sub>3</sub>指老化淀粉或重结晶淀粉,其制备方法近几年得到改善和创新<sup>[10-14]</sup>,制备原理主要是将淀粉糊化后再迅速冷藏老化回生,淀粉在外加热源的处理条件下,分子链吸水糊化,结晶高聚态瓦解,呈高能无序态;迅速冷藏过程中淀粉分子在空间构象上发生重结晶,转为结构高度致密的有序态。

Bulkin等<sup>[15]</sup>在淀粉回生重结晶动力学的研究中表明,4个阶段构成淀粉回生整个过程,包括:单纯淀粉链高聚构象改变;晶核诱导形成;晶体增长;晶体完美形成。高能无序态淀粉分子在范德华力和氢键吸引力作用下发生重结晶生成抗性淀粉。自然起晶的溶液过饱和度,析晶时间长且易出现爆发性成核现象<sup>[16]</sup>,晶核过多,生成的晶体就多,在同一溶液中,每个晶体所分配的溶质就少,导致在同一育晶条件下,生成的抗性淀粉晶体粒径过小,结构也较为疏松,淀粉酶仍能将其酶解,从而降低RS<sub>3</sub>型抗性淀粉产率。在淀粉分子重结晶前期晶核将要形成时加入晶种,可有效降低溶液过饱和度,缩短析晶时间<sup>[17]</sup>,提高RS<sub>3</sub>型抗性淀粉产率。晶种诱导技术目前广泛应用于分子筛领域<sup>[18-20]</sup>,自2013年起已有少部分文献以该方法制备抗性淀粉<sup>[21-22]</sup>,而以晶种诱导复合异淀粉酶、普鲁兰酶的分步脱支酶解过程制备RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉的研究还鲜见报道。

直链淀粉分子间氢键结合形成双螺旋进一步堆积聚集形成结晶是淀粉短期回生的主力军<sup>[23]</sup>,马铃薯具有高含量的直链淀粉,是制备RS<sub>3</sub>晶种的最佳选择。本研究以微波预糊化糯米淀粉为原料,异淀粉酶和普鲁兰酶分步脱支酶解淀粉分子,提高体系直链淀粉含量,再以RS<sub>3</sub>型马铃薯抗性淀粉为晶种制备RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉,以期提高RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉产率,为RS<sub>3</sub>型抗性淀粉的制备新工艺提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

糯米碎米购自湖南邵阳;马铃薯淀粉 湖北仁森农业科技发展股份有限公司;异淀粉酶(50 000 U/g) 天津拓程生物科技有限公司;普鲁兰酶(1 000 ASPU/mL) 江苏锐阳生物科技有限公司;葡萄糖淀粉酶(活力 $\geq 100$  U/mg)、耐高温 $\alpha$ -淀粉酶(活力 $\geq 4 000$  U/g) 上海瑞永生物科技有限公司;胃蛋白酶(活力 $\geq 1 200$  U/g) 国药集团化学试剂有限公司;其他试剂均为国产化学纯。

### 1.2 仪器与设备

B-260恒温水浴锅 上海亚荣生化仪器厂;EG23B-DC(F)微波炉 广东美的微波炉制造有限公司;DHG-9240A电热恒温鼓风干燥箱 上海飞越实验仪器有限公司;可见分光光度计 湖南省计量检测研究院;电子天平 北京赛多利斯仪器系统有限公司;立式压力蒸汽灭菌器 上海申安医疗器械厂;JSM-6380LV型扫描电子显微镜 日本电子株式会社。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 糯米淀粉制备与微波预糊化

糯米粉碎过40目筛,参考文献[24]制备糯米淀粉。根据前期预实验,结合文献[25],微波预糊化实验方案为:糯米淀粉调节水分质量分数至30%后经微波炉功率400 W处理2 min。

#### 1.3.2 RS<sub>3</sub>型马铃薯抗性淀粉晶种的制备

称取10 g马铃薯淀粉,用蒸馏水配制淀粉质量分数为10%的马铃薯淀粉乳,85℃水浴条件下预糊化30 min,直至淀粉乳呈透明凝胶状后再于高压灭菌锅120℃、0.15 MPa条件下处理30 min,冷却后置于4℃冰箱中冷藏24 h。RS<sub>3</sub>型马铃薯抗性淀粉晶种的纯化参考Goñi等<sup>[26]</sup>方法。

#### 1.3.3 RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉的制备

称取10 g微波预糊化糯米淀粉,用pH 5.0的磷酸盐缓冲溶液配制淀粉质量分数为10%的淀粉乳,85℃恒温水浴处理30 min,冷却后添加异淀粉酶20 U/g,50℃恒温水浴条件下处理2 h,85℃恒温水浴条件下灭酶10 min,冷却,用0.1 mol/L HCl溶液将pH值调至4.5,60℃恒温水浴条件下添加普鲁兰酶20 U/g,处理2 h,85℃恒温水浴条件下灭酶10 min,冷却至50℃,添加湿晶种6%,混匀后置于4℃冰箱中冷藏24 h,60℃烘箱中烘干8 h,备用。

#### 1.3.4 RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉的纯化与产率计算

RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉的纯化参考Goñi等<sup>[26]</sup>方法,产率计算参考文献[27]。葡萄糖标准曲线的绘制参考3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)法<sup>[24]</sup>。葡萄糖标准曲线为: $y=1.0104x+0.00861$ ,  $R^2=0.99702$ 。

#### 1.3.5 RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉晶种诱导-双酶复合法制备工艺优化

##### 1.3.5.1 单因素试验

分别考察晶种添加量(2%、4%、6%、8%、10%)、晶种添加温度(30、40、50、60、70℃)、异淀粉酶添加量(0、10、20、30、40 U/g)、异淀粉酶酶解时间(1、2、3、4、5 h)、普鲁兰酶添加量(0、10、20、30、40 U/g)和普鲁兰酶酶解时间(1、2、3、4、5 h)对RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉产率的影响。单因素试验时,其余条件固定为:晶种添加量6%、晶种添加温度50℃、

异淀粉酶添加量20 U/g、异淀粉酶酶解时间2 h、普鲁兰酶添加量20 U/g、普鲁兰酶酶解时间2 h。

### 1.3.5.2 Box-Behnken优化设计试验

在单因素试验基础上,结合响应面设计原理,选取晶种添加量、异淀粉酶添加量、普鲁兰酶添加量和普鲁兰酶酶解时间4个主要因素进行响应面优化设计,RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉产率为响应值,对晶种诱导-双酶复合法制备RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉工艺进行优化,试验设计因素与水平见表1。

表1 Box-Behnken试验设计因素与水平

Table 1 Factors and their coded levels used in Box-Behnken design

水平	因素			
	A晶种添加量/%	B异淀粉酶添加量/(U/g)	C普鲁兰酶添加量/(U/g)	D普鲁兰酶酶解时间/h
-1	5	8	8	3.5
0	6	10	10	4.0
1	7	12	12	4.5

### 1.3.6 RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉颗粒形貌分析与抗酶解性测定

用扫描电子显微镜观察原微波糊化淀粉与最优条件下制备成的RS<sub>3</sub>的颗粒形貌<sup>[28]</sup>,并测定淀粉的抗酶解性能<sup>[29]</sup>。

### 1.4 数据处理与分析

所有试验均重复3次,各项指标数据均采用Origin 7.5软件处理作图,Design-Expert 8.0.6软件进行方差分析和响应面分析。 $P<0.01$ 表示有极显著影响, $P<0.05$ 表示有显著影响。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验结果

#### 2.1.1 晶种添加量对RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉产率的影响

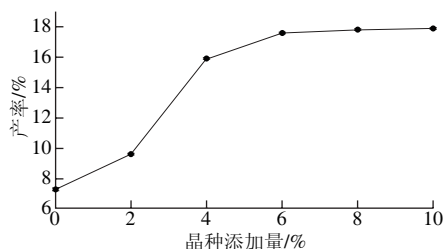


图1 晶种添加量对RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉产率的影响

Fig. 1 Effect of the amount of added seed crystal on the yield of RS<sub>3</sub> type resistant indica rice starch

由图1所见,随着晶种添加量的增加,RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉产率明显提高,未添加晶种的试验组产率仅为7.26%,当晶种添加量为6%时,产率可达17.6%。分析原因,可能是糯米淀粉以外加RS<sub>3</sub>晶种为晶核,在此基础上快速发生聚集,形成高度致密结构,避免了其自身成核

时生成大量小晶体的爆发成核现象。晶种添加量由6%增加到10%时,RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉产率变化幅度很小,仅由17.6%提高到17.9%,过多的增加晶种添加量也意味着生产成本的提高,因此,适宜的晶种添加量为6%左右。

#### 2.1.2 晶种添加温度对RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉产率的影响

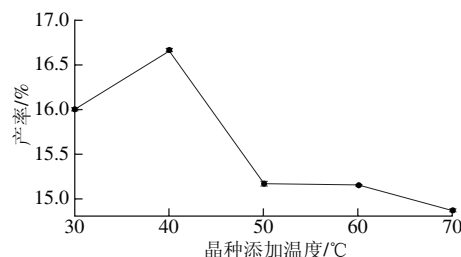


图2 晶种添加温度对RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉产率的影响

Fig. 2 Effect of temperature of seed crystal on the yield of RS<sub>3</sub> type resistant indica rice starch

过饱和度是结晶过程的主推动力,溶液体系在不同温度条件下有不同的过饱和度<sup>[30]</sup>。当溶液体系温度高时,溶质溶解度大,过饱和度小,此时添加晶种,晶种趋于溶解,起不到降低过饱和度和控制晶核形成的作用。当溶液体系温度低时,体系中已自发形成晶核。温度处于介稳区时,体系不会出现自发成核现象,此时添加晶种,就能良好地降低体系过饱和度,抑制大量晶核的形成,从而提高RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉产率。由图2所见,当晶种添加温度为40℃时,RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉产率达到峰值,为16.66%。考虑到实际操作可行性和精确度,在响应面设计过程中将晶种添加温度定为40℃。

#### 2.1.3 异淀粉酶添加量对RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉产率的影响

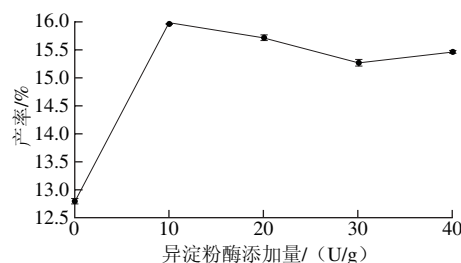


图3 异淀粉酶添加量对RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉产率的影响

Fig. 3 Effect of isoamylase dosage on the yield of RS<sub>3</sub> type resistant indica rice starch

直链淀粉的回生老化是糯米RS<sub>3</sub>形成的主因,根据前期预实验得原料中含24.81%的直链淀粉,44.39%的支链淀粉。由图3所见,当异淀粉酶添加量为10 U/g时,RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉产率达最大值16.00%,增大异淀粉酶添加量,产率反而降低,可能是因为原料中残留的脂质与脱支产物与直链淀粉形成复合物,降低了水分迁移率,抑制了直链淀粉分子间重新排列,间接降低了RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉产率。因此,适宜的异淀粉酶添加量为10 U/g左右。

#### 2.1.4 异淀粉酶酶解时间对RS<sub>3</sub>型籼米抗性淀粉产率的影响

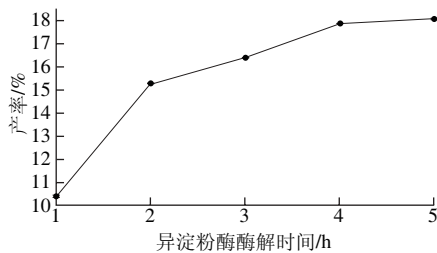


图4 异淀粉酶酶解时间对RS<sub>3</sub>型籼米抗性淀粉产率的影响

Fig. 4 Effect of isoamylase hydrolysis time on the yield of RS<sub>3</sub> type resistant indica rice starch

由图4所见,随着异淀粉酶酶解时间的延长,RS<sub>3</sub>型籼米抗性淀粉产率显著提高,当酶解时间为4 h时,产率达17.9%,延长酶解时间,产率变化幅度不大,可能是因为异淀粉酶与体系中的支链淀粉接触已达饱和。因此,适宜的异淀粉酶酶解时间为4 h。

#### 2.1.5 普鲁兰酶添加量对RS<sub>3</sub>型籼米抗性淀粉产率的影响

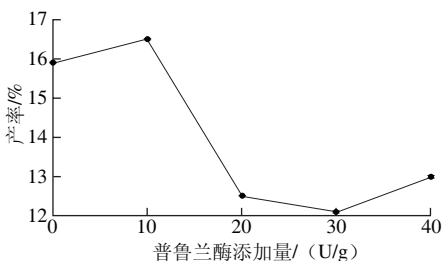


图5 普鲁兰酶添加量对RS<sub>3</sub>型籼米抗性淀粉产率的影响

Fig. 5 Effect of pullulanase dosage on the yield of RS<sub>3</sub> type resistant indica rice starch

由图5所见,当普鲁兰酶添加量为10 U/g时,RS<sub>3</sub>型籼米抗性淀粉产率出现峰值16.5%,随着普鲁兰酶添加量的继续增加,RS<sub>3</sub>型籼米抗性淀粉产率显著降低。分析原因,可能是因为体系中的支链淀粉在高酶浓度条件下过度脱支,生成的直链淀粉分子链长过短,此时的直链淀粉分子运动剧烈,扩散速度很快,分子间发生碰撞时间很短,难以聚集,从而降低了RS<sub>3</sub>型籼米抗性淀粉产率。因此,适宜的普鲁兰酶添加量为10 U/g左右。

#### 2.1.6 普鲁兰酶酶解时间对RS<sub>3</sub>型籼米抗性淀粉产率的影响

由图6所见,当普鲁兰酶酶解时间在1~4 h时,RS<sub>3</sub>型籼米抗性淀粉产率出现短暂降低后显著提高的现象。分析原因,可能是因为原料经异淀粉酶酶解后灭酶阶段,体系水分挥发,变得黏稠,直链淀粉分子间运动变得缓慢,所以RS<sub>3</sub>型籼米抗性淀粉产率降低,酶解时间2~4 h时,RS<sub>3</sub>型籼米抗性淀粉产率提高,在4 h时出现最

大值21.6%,是因为普鲁兰酶与支链淀粉充分接触发挥脱支作用,体系黏度降低,直链淀粉分子间运动加快,碰撞时间充裕发生聚集。因此,适宜的普鲁兰酶酶解时间为4 h左右。

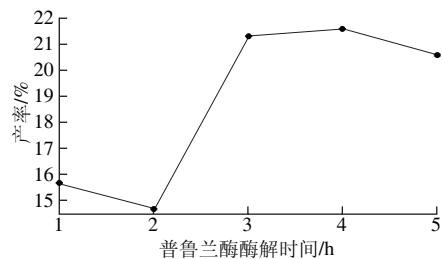


图6 普鲁兰酶酶解时间对RS<sub>3</sub>型籼米抗性淀粉产率的影响

Fig. 6 Effect of pullulanase hydrolysis time on the yield of RS<sub>3</sub> type resistant indica rice starch

## 2.2 响应面试验结果

### 2.2.1 响应面优化试验设计及结果

表2 Box-Behnken试验设计方案及结果  
Table 2 Box-Behnken design with experimental results

试验号	A品种添加量	B异淀粉酶添加量	C普鲁兰酶添加量	D普鲁兰酶酶解时间	Y <sub>1</sub> 产率/%
1	-1	-1	0	0	23.09
2	1	-1	0	0	14.20
3	-1	1	0	0	17.21
4	1	1	0	0	20.61
5	0	0	-1	-1	20.99
6	0	0	1	-1	16.67
7	0	0	-1	1	18.05
8	0	0	1	1	22.16
9	-1	0	0	-1	21.17
10	1	0	0	-1	17.17
11	-1	0	0	1	17.80
12	1	0	0	1	21.38
13	0	-1	-1	0	22.57
14	0	1	-1	0	18.05
15	0	-1	1	0	16.00
16	0	1	1	0	21.13
17	-1	0	-1	0	23.02
18	1	0	-1	0	18.29
19	-1	0	1	0	18.47
20	1	0	1	0	20.69
21	0	-1	0	-1	18.79
22	0	1	0	-1	16.97
23	0	-1	0	1	17.49
24	0	1	0	1	21.92
25	0	0	0	0	23.22
26	0	0	0	0	23.98
27	0	0	0	0	22.31
28	0	0	0	0	24.29
29	0	0	0	0	22.97

以品种添加量、异淀粉酶添加量、普鲁兰酶添加量和普鲁兰酶酶解时间为响应变量,RS<sub>3</sub>型籼米抗性淀粉产率为响应值,对表2试验数据采用Design-Expert 8.0.6



软件分析得到的二次多项式回归模型如下： $Y=23.75-0.70A+0.31B-0.49C+0.59D+3.07AB+1.74AC+1.89AD+2.41BC+1.56BD+2.11CD-2.07A^2-2.70B^2-1.69C^2-2.38D^2$ 。

表3 响应面方差分析结果

Table 3 Analysis of variance for the response surface regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
A晶种添加量	5.91	1	5.91	9.91	0.007 1**
B异淀粉酶添加量	1.17	1	1.17	1.97	0.182 7
C普鲁兰酶添加量	2.85	1	2.85	4.78	0.046 2*
D普鲁兰酶酶解时间	4.13	1	4.13	6.93	0.019 7*
AB	37.76	1	37.76	63.33	<0.000 1**
AC	12.08	1	12.08	20.25	0.000 5**
AD	14.36	1	14.36	24.09	0.000 2**
BC	23.28	1	23.28	39.05	<0.000 1**
BD	9.77	1	9.77	16.38	0.001 2**
CD	17.77	1	17.77	29.80	<0.000 1**
A <sup>2</sup>	27.69	1	27.69	46.45	<0.000 1**
B <sup>2</sup>	47.29	1	47.29	79.31	<0.000 1**
C <sup>2</sup>	18.58	1	18.58	31.16	<0.000 4**
D <sup>2</sup>	36.86	1	36.86	61.82	<0.000 1**
模型	214.43	14	15.32	25.69	<0.000 1**
残差	8.35	14	0.60		
失拟项	6.82	10	0.68	1.79	0.302 3
纯误差	1.53	4	0.38		
总和	222.78	28			

注：\*\*.  $P<0.01$ ，影响极显著；\*.  $P<0.05$ ，影响显著。

二次多项式回归模型的方差分析见表3。模型 $P$ 值小于0.000 1，表示该模型极显著；失拟项不显著， $P=0.302\ 3>0.05$ ，说明本试验的二次多项式回归方程能较好地对响应值进行预测；决定系数 $R^2$ 为96.25%，表明试验数据实际值与软件预测值之间具有良好的拟合度；调整系数 $R^2_{Adj}$ 为92.51%，说明该二次多项模型能模拟92.51%响应值的变化，可信度高，拟合程度较好；回归方程中各因素的二次项的影响均为极显著，说明各因素对RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉产率的影响并非简单的线性关系； $AB$ 、 $AC$ 、 $AD$ 、 $BC$ 、 $BD$ 、 $CD$ 均存在极显著的交互作用；根据回归方程一次项的 $F$ 值大小，可得选取的响应变量对响应值的影响顺序为 $A>D>C>B$ ，即晶种添加量>普鲁兰酶酶解时间>普鲁兰酶添加量>异淀粉酶添加量。

2.2.2 响应面交互作用分析

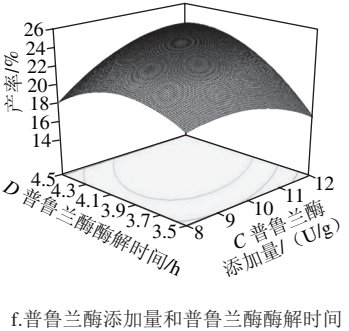
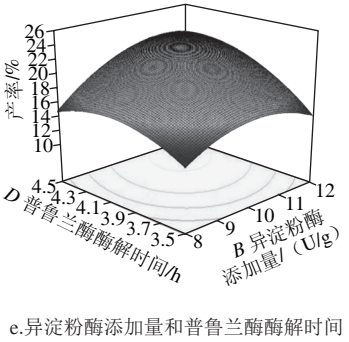
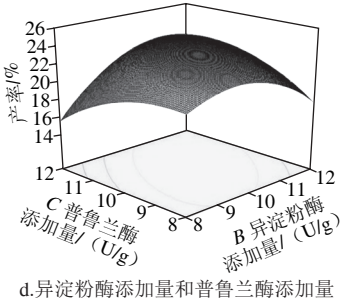
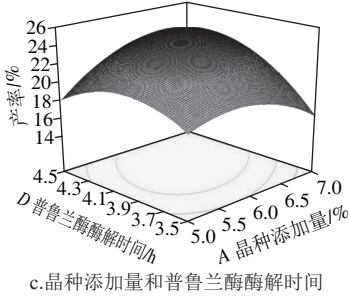
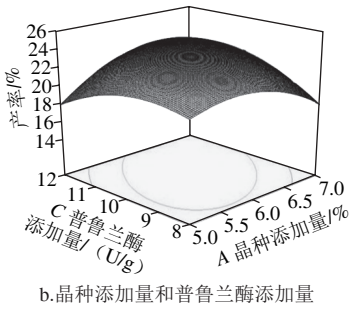
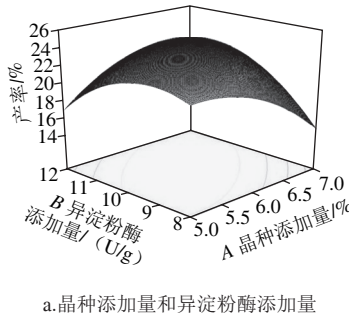


图7 各因素交互作用对RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉产率影响的响应面  
Fig. 7 Response surface plots showing the interactive effects of various factors on the yield of RS<sub>3</sub> type resistant indica rice starch

根据回归方程将两个因素固定在0水平,可以得到各因素两两交互作用的响应面图。

由图7a可知,固定品种添加量,RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉产率随着异淀粉酶添加量的增加呈先提高后降低的趋势,且品种添加量多时的RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉产率比品种添加量少时提高幅度大;当异淀粉酶添加量较少时,随着品种添加量的增加,RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉产率先缓慢提高后迅速降低,当异淀粉酶添加量较多时,RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉产率随着品种添加量的增加提高幅度大。从图7a中RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉产率出现最大值的区域可得,品种添加量并不是越多越好。由异淀粉酶添加量与品种添加量交互作用响应面下方的等高线为椭圆得两者有显著的交互作用,由等高线延轴方向变化的密集程度可得,品种添加量对RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉产率的影响大于异淀粉酶添加量,与上述方差分析结果相符。

由图7b可知,固定品种添加量,随着普鲁兰酶添加量的增加,RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉产率先提高后降低,但提高和降低的幅度并不大,且在品种添加量较多时,增幅较明显;固定普鲁兰酶添加量,RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉产率随着品种添加量的增加而呈先提高后降低的趋势。由图7b中RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉产率出现最大值的区域可得,在品种添加量较低时,适当增加普鲁兰酶添加量有助于RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉产率的提高。由等高线为椭圆得普鲁兰酶添加量与品种添加量有较显著的交互作用,与上述方差分析结果相符。

由图7c可知,固定普鲁兰酶酶解时间,RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉产率随着品种添加量的增加先提高后降低;固定品种添加量,RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉产率随着普鲁兰酶酶解时间的延长先提高后略有下降。因此,在低品种添加量条件下,适当延长普鲁兰酶酶解时间,有助于提高RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉产率。由等高线延轴方向变化的疏密程度可知,品种添加量对RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉产率的影响大于普鲁兰酶酶解时间,相符与上述方差分析结果。

由图7d可知,固定异淀粉酶添加量,RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉产率随着普鲁兰酶添加量的增加呈先提高后降低的趋势,在低异淀粉酶添加量条件下,RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉产率降低幅度大于提高幅度;固定普鲁兰酶添加量,RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉产率随着异淀粉酶添加量的增加先提高后降低,且在高普鲁兰酶添加量条件下,提高增幅明显。由等高线为椭圆得普鲁兰酶添加量与异淀粉酶添加量有较显著的交互作用,与上述方差分析结果相符。

由图7e可知,固定异淀粉酶添加量,RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉产率随着普鲁兰酶酶解时间的延长呈先提高后略有下降的趋势;固定普鲁兰酶酶解时间,RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉产率随着异淀粉酶添加量的增加先提高后降低。由图7e中RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉产率出现最大值的范围可得,在

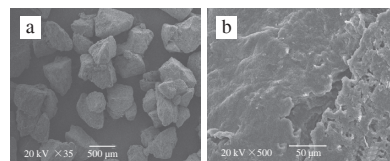
低异淀粉酶添加量的条件下,适当延长普鲁兰酶酶解时间有助于提高RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉产率。

由图7f可知,固定普鲁兰酶添加量,RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉产率随着普鲁兰酶酶解时间的延长先提高后降低,且在高普鲁兰酶添加量的条件下,提高幅度大;固定普鲁兰酶酶解时间,RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉产率随着普鲁兰酶添加量的增加先提高后降低,在较短酶解时间的条件下,降低幅度较大。因此,在低普鲁兰酶添加量的条件下,适当延长普鲁兰酶酶解时间,有助于提高RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉产率。

### 2.2.3 模型验证

利用Design-Expert 8.0.6对回归模型进行优化分析,预测品种诱导-双酶复合法制备糯米RS<sub>3</sub>型抗性淀粉的最优方案为品种添加量5%、异淀粉酶添加量8 U/g、普鲁兰酶添加量8 U/g、普鲁兰酶酶解时间3.50 h,在该条件下RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉产率可达28.38%,以此条件进行3次验证实验,RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉产率平均值为27.42%,与最优预测值相近,说明该回归模型能有效指导优化工艺。

### 2.3 表观形貌与抗酶解性



a.微波预糊化糯米淀粉; b.最优条件下制备RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉。

图8 淀粉颗粒扫描电子显微镜图

Fig. 8 Morphological observation of starch granules under scanning electron microscopy

由图8a可知,微波预糊化淀粉颗粒呈不规则多棱角的形状,淀粉经微波处理后,颗粒表面出现爆裂微孔和酥松絮状物,有利于直链淀粉的溶出和酶的接触。经品种诱导-双酶复合法制备成的RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉失去原有淀粉颗粒形貌,结晶结构明显,表面变得凹凸不平,形成致密的黏附在一起的块状结构且有一些沟壑和蜂窝小孔,如图8b所示,这是因为异淀粉酶和普鲁兰酶对淀粉分子的 $\alpha$ -1,6糖苷键进行脱支水解,生成更多的直链淀粉,直链淀粉在外加RS<sub>3</sub>品种的基础上快速发生重结晶,生成致密的晶体团聚体。

基于还原糖在波长540 nm处有最大吸光度,通过测定此波长处吸光度的变化可间接反映淀粉的抗酶解性能,由图9可知,品种诱导-双酶法制备的RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉试样在过量淀粉酶酶解4 h后,吸光度仍为0,说明溶液中未明显检测到还原糖;当酶解时间延长至6 h时,才出现还原糖的较低吸光度;持续酶解至12 h后,溶液体系中还原糖的吸光度已无明显变化。而微波预糊化糯米淀粉对

照试样在酶解4 h后,吸光度已达0.102,随着酶解时间的延长,溶液体系中还原糖的吸光度呈持续上升状态。由此证实了RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉具有较强的抗酶解性能。

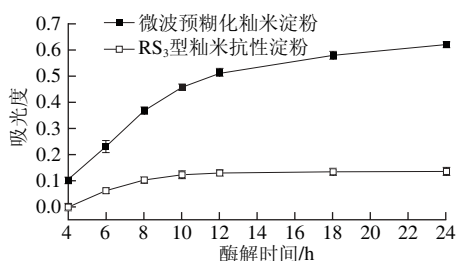


图9 抗酶解性分析

Fig. 9 Resistance of starches to enzymatic hydrolysis

### 3 结论

在单因素试验结果的基础上,利用响应面优化试验对品种诱导-双酶复合法制备RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉工艺进行优化,建立了RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉产率与品种添加量、异淀粉酶添加量、普鲁兰酶添加量及普鲁兰酶酶解时间四因素三水平的二次多项式回归模型,通过平行验证实验证明该模型是科学可靠的。分析可得,四因素对RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉产率影响的主次顺序为:品种添加量>普鲁兰酶酶解时间>普鲁兰酶添加量>异淀粉酶添加量。固定酶解pH值、温度及其他条件,该模型得出的最优工艺条件为品种添加量5%、异淀粉酶添加量8 U/g、普鲁兰酶添加量8 U/g、普鲁兰酶酶解时间3.50 h,RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉产率平均值为27.42%,与预测值相近,且比任何一次单因素试验结果都高,证明此优化条件能较好地提高RS<sub>3</sub>型糯米抗性淀粉产率。扫描电子显微镜结果和抗酶解实验表明,微波预糊化糯米淀粉经双酶处理后,原有的颗粒形貌消失,表面变得粗糙,形成致密的晶体团聚体,具有极强的抗酶解性能,表面形态结构与原微波预糊化糯米淀粉差异非常显著。

### 参考文献:

- [1] 贺永朝, 吴泉铸, 宋洪波, 等. 高压均质改性淮山药淀粉及其消化性的研究[J]. 现代食品科技, 2016(5): 227-233.
- [2] 张文青, 张月明. 抗性淀粉对糖尿病大鼠胰岛素抵抗的影响[J]. 营养学报, 2008, 30(3): 257-261. DOI:10.3321/j.issn:0512-7955.2008.03.008.
- [3] 薛山. 新型膳食纤维: 抗性淀粉在食品工业中的应用及前景[J]. 中国高新技术企业, 2009(3): 85-88. DOI:10.3969/j.issn.1009-2374.2009.03.043.
- [4] ZHANG Huanxin, JIN Zhengyu. Preparation of products rich in resistant starch from maize starch by an enzymatic method[J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 86(4): 1610-1614. DOI:10.1016/j.carbpol.2011.06.070.
- [5] NIU Lili, ZHANG Shenggyi, GUO Yiqiao, et al. Effect of microwave heat-moisture treatment on resistant starch content and properties of potato starches[J]. Science & Technology of Food Industry, 2013, 34(14): 156-155.
- [6] ZHANG Zhong, XIA Dandan, WANG Li. Optimization of parameters for preparation of maize retrograded starch by acid-microwave method[J]. Science & Technology of Food Industry, 2014, 35(12): 282-286.

- [7] 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.
- [8] 张钟, 夏丹丹, 王丽. 酸解-微波法制备RS<sub>3</sub>型玉米抗性淀粉工艺参数优化[J]. 食品工业科技, 2014, 35(12): 282-286. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2014.12.053.
- [9] ZENG S, WU X, LIN S, et al. Structural characteristics and physicochemical properties of lotus seed resistant starch prepared by different methods[J]. Food Chemistry, 2015, 186: 213-222. DOI:10.1016/j.foodchem.2015.03.143.
- [10] NOR M Z M, TALIB R A, NORANIZAN M A, et al. Increasing resistant starch content in fish crackers through repetitive cooking-chilling cycles[J]. International Journal of Food Properties, 2014, 17(5): 966-977. DOI:10.1080/10942912.2012.685681.
- [11] MAZIARZ M, SHERRARD M, JUMA S, et al. Sensory characteristics of high-amylose maize-resistant starch in three food products[J]. Food Science & Nutrition, 2013, 1(2): 117-124. DOI:10.1002/fsn3.15.
- [12] REN C, SHIN M. Effects of cross-linked resistant rice starch on the quality of Korean traditional rice cake[J]. Food Science & Biotechnology, 2013, 22(3): 697-704. DOI:10.1007/s10068-013-0134-5.
- [13] SANKHON A, AMADOU I, YAO W R. Application of resistant starch in bread: processing, proximate composition and sensory quality of functional bread products from wheat flour and African locust bean flour[J]. Agricultural Sciences, 2013, 4(5B): 122-129. DOI:10.4236/as.2013.45B023.
- [14] ZIAR H, GERARD P, RIAZI A. Calcium alginate - resistant starch mixed gel improved the survival of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 and *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS in yogurt and simulated gastrointestinal conditions[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2012, 47(7): 1421-1429. DOI:10.1111/j.1365-2621.2012.02989.x.
- [15] BULLKIN B J, KWAK Y, DEA I C M. Retrogradation kinetics of waxy-corn and potato starches; a rapid, Raman-spectroscopic study[J]. Carbohydrate Research, 1987, 160(87): 95-112. DOI:10.1016/0008-6215(87)80305-1.
- [16] 张纲, 王静康, 熊晖. 沉淀结晶过程中的添加品种技术[J]. 化学世界, 2002, 43(6): 326-328. DOI:10.3969/j.issn.0367-6358.2002.06.014.
- [17] 曹玉平, 周学晋, 陈学兵, 等. 晶种法对植物甾醇结晶的影响[J]. 粮食与饲料工业, 2013(6): 36-38.
- [18] MULLIN J W, CHAKRABORTY M, MEHTA K. Nucleation and growth of ammonium sulphate crystals from aqueous solution[J]. Journal of Applied Chemistry, 2007, 20(12): 367-371. DOI:10.1002/jctb.5010201202.
- [19] 张海燕, 杨承广, 孟祥举, 等. 无有机模板条件下晶种导向合成微孔分子筛晶体材料[J]. 化学学报, 2012, 70(23): 2387-2392.
- [20] 陈艳红, 李春义, 杨朝合. 晶种法合成ZSM-5分子筛规律的研究[J]. 石油炼制与化工, 2013, 44(11): 24-28. DOI:10.3969/j.issn.1005-2399.2013.11.005.
- [21] LIAN X, LIU L, GUO J, et al. Screening of seeds prepared from retrograded potato starch to increase retrogradation rate of maize starch[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 60(6): 181-185. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2013.05.025.
- [22] 孟宪昉, 刘立增, 郭俊杰, 等. 草酸侵蚀马铃薯回生淀粉制备晶种促进玉米淀粉回生的研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(3): 131-148. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2016.03.019.
- [23] SONG R, HUANG M, LI B, et al. The Effect of three gums on the retrogradation of indica rice starch[J]. Nutrients, 2012, 4(6): 425-435. DOI:10.3390/nu4060425.
- [24] 张晓, 任清. 压热酶脱支重结晶法制备甜荞抗性淀粉的工艺优化及颗粒形貌[J]. 食品科学, 2013, 34(8): 64-69.
- [25] 李周勇, 韩育梅, 夏德冬. 马铃薯抗性淀粉的微波预处理条件及性质研究[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(2): 1-6. DOI:10.3969/j.issn.1005-6521.2014.02.001.
- [26] GONÍ I, GARCÍA-DIZ L, MAÑAS E, et al. Analysis of resistant starch: a method for foods and food products source[J]. Food Chemistry, 1996, 56(4): 445-449. DOI:10.1016/0308-8146(95)00222-7.
- [27] 吴红引, 王泽南, 张效荣, 等. 微波辅助酶法制备碎米抗性淀粉的工艺研究[J]. 食品科学, 2010, 31(18): 203-205.
- [28] 高群玉, 李素玲. 绿豆抗性淀粉的制备及特性[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2011, 39(4): 88-93. DOI:10.3969/j.issn.1000-565X.2011.04.016.
- [29] GURAYA H S, JAMES C, CHAMPAGNE E T. Effect of cooling, and freezing on the digestibility of debranched rice starch and physical properties of the resulting material[J]. Starch-Stärke, 2001, 53(2): 64-74.
- [30] 李俊宏, 叶世超, 谭巍, 等. 添加晶种对磷酸二氢钾结晶特性的影响[J]. 化工矿物与加工, 2014(3): 19-22.