

响应面法优化玉米抗性淀粉制备工艺

张焕新^{1,2}, 于 博¹, 金征宇^{1,*}

(1.江南大学食品学院, 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122;

2.江苏畜牧兽医职业技术学院食品科技学院, 江苏 泰州 225300)

摘 要: 研究普鲁兰酶法制备玉米抗性淀粉的工艺。在单因素试验基础上, 采用响应曲面法研究 pH 值、反应温度、反应时间和加酶量对抗性淀粉得率的影响, 优化玉米抗性淀粉制备工艺, 建立各因素与抗性淀粉得率关系的数学回归模型。确定最佳的制备工艺条件为普鲁兰酶加酶量 12.8 ASPU/g、反应时间 32 h、反应温度 46.2℃、pH 5.0。在该制备条件下, 抗性淀粉得率为 46.2%。

关键词: 抗性淀粉; 普鲁兰酶; 玉米淀粉; 响应面

Response Surface Methodology for Optimization of Maize Resistant Starch Preparation with Pullulanase

ZHANG Huan-xin^{1,2}, YU Bo¹, JIN Zheng-yu^{1,*}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangsu Animal Husbandry and

Veterinary College, Taizhou 225300, China)

Abstract: In this study, resistant starch was prepared from maize starch with pullulanase. Based on one-factor-at-a-time experiments, the main parameters of pullulanase hydrolysis were investigated by response surface methodology (RSM), including reaction temperature, pH value, reaction time, and pullulanase amount, and a mathematical model describing resistant starch yield was developed. The optimum preparation conditions were achieved as follows: pullulanase amount 12.8 ASPU/g, reaction temperature 46.2 °C, reaction time 32 h, pH 5.0. Under these conditions, the yield of the maize resistant starch is 46.2%.

Key words: resistant starch; pullulanase; maize starch; response surface methodology (RSM)

中图分类号: TS235.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)22-0011-05

抗性淀粉(resistant starch, RS), 即不被健康人体小肠吸收的淀粉及其水解物的总称^[1]。根据抗性淀粉形态及物理化学性质, 可将其分为 4 类, 即物理包埋淀粉(RS₁)(physically trapped starch)、抗性淀粉颗粒(RS₂)(resistant starch granules)、回生淀粉(RS₃)(retrograded starch)和化学改性淀粉(RS₄)(chemically modified starch)。由于 RS₃ 是膳食中抗性淀粉的主要组成部分, 是通过食品加工而形成的, 因而具有较大的研究价值^[2]。抗性淀粉不能被小肠吸收, 从表面上看似乎是一种营养损失, 其实, 它能在结肠内被吸收利用, 因此与膳食纤维具有类似功能。抗性淀粉能降低糖尿病患者饭后血糖值, 从而有效控制糖尿病; 增加粪便体积, 对于便秘、肛门直肠等疾病有良好预防效果; 可将肠道中有毒物质释

从而预防癌症发生; 抗性淀粉在人体肠道微生物作用下, 产生短链脂肪酸代谢物, 降低结肠 pH 值, 减少肠道运送排泄物时间等; 可降低血中胆固醇和三甘油酯含量, 从而降低患心脏病危险^[3-8]。Schulz 等^[9]研究还发现抗性淀粉能在回肠中经肠内微生物发酵而降低 pH 值, 使溶解镁、钙、锌等矿物质极易通过上皮细胞被人体吸收。膳食纤维作为一种极其重要的功能性食品基料已引起营养界、医学界、食品界广泛关注。但膳食纤维添加到低水分食品时, 会引起其口感、品质的下降, 而抗性淀粉的特性与淀粉基本相似, 如白色、持水力低, 可膨化, 且膨化后不影响其抗消化性、糊化温度较高等, 因此添加到食品中后不会影响食品的感官和质构, 可有效地克服强化纤维食品的弊端, 用途更为广泛。

收稿日期: 2011-06-13

基金项目: 江苏省自然科学基金创新学者攀登项目(BK2008003); 江苏畜牧兽医职业技术学院科技项目(YB201004); 江苏省“青蓝工程”资助项目

作者简介: 张焕新(1972—), 男, 副教授, 博士研究生, 研究方向为碳水化合物。E-mail: hxinzh@hotmail.com

* 通信作者: 金征宇(1960—), 男, 教授, 博士, 研究方向为碳水化合物。E-mail: jinlab2008@yahoo.com

抗性淀粉制备的基本方法是通过对淀粉的糊化——老化处理来实现的。所施加的处理使淀粉分子发生部分重结晶,从而提高淀粉分子中结晶部分的比例。常用的制备方法有压热——冷却循环处理、螺旋杆挤压处理、微波辐射处理等^[10-12]。同时,也有研究工作结合了酸水解处理,来进一步提高抗性淀粉的得率^[13]。虽然不同的处理方法、条件参数等对抗性淀粉制备时的得率有不同程度的影响,整体上看,由于淀粉中的直链淀粉分子比支链淀粉分子易老化,分子之间很容易产生有序的排列而形成抗性淀粉,二者的比率越大,抗性淀粉含量越高。本实验采用普鲁兰酶对普通玉米淀粉进行脱支处理,以响应面法考察各因素对玉米抗性形成的影响,确定其最佳的工艺条件,提高产品中抗性淀粉的含量。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

普通玉米淀粉 美国国民淀粉化学公司;普鲁兰酶(酶活 1000ASPU/g) 美国杰能科公司; α -淀粉酶(酶活 20000U/g) 美国 Sigma 公司;葡萄糖淀粉酶(酶活 100000U/g) 无锡赛德生物有限公司。其他所用化学试剂均为分析纯;水为去离子水。

1.2 仪器与设备

AL204 分析天平、DELTA-320 精密 pH 计 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;YXQ-LS-100G 立式压力蒸汽灭菌器、DZF-6050 型真空干燥箱 上海博迅实业有限公司医疗设备厂;THZ-82A 水浴恒温振荡器 江苏荣华仪器制造有限公司;80-2 离心机 上海浦东物理光学仪器厂;HHD-2 电热恒温水浴锅 上海比朗仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 抗性淀粉制备

取 5g 玉米淀粉(M)于 150mL 三角瓶中,加 95mL 水,淀粉液(5%, m/m)于高压灭菌锅中 121℃ 糊化处理 20min。迅速降至一定温度,用 1mol/L HCl 溶液调整 pH 值,添加普鲁兰酶进行脱支处理后于 4℃ 冰箱保存 24h,向充分老化后的样品中加入 1mL 1% α -淀粉酶,60℃ 水浴 24h 以酶解糊化状态的淀粉为单糖和低聚糖;沸水浴加热 5min,加 4 倍体积 95% 乙醇溶解单糖和低聚糖 12h,4000r/min 离心 20min;弃去上清液,加入 10mL 95% 乙醇洗涤沉淀 2 次,沉淀 50℃ 烘干称量(m_0),粉碎、过 100 目筛^[14]。

1.3.2 抗性淀粉含量的测定^[15-16]

取 1g(M_1)粉碎后的抗性淀粉样品于离心管中,加 6mL 水和 6mL 4mol/L KOH 溶液,室温搅拌 30min;加入 11.5mL 2mol/L HCl 溶液和 6mL 0.4mol/L 乙酸钠缓冲液

(pH4.75),调节 pH 4.5;加入 1mL 1% 糖化酶(1500U/mL),60℃ 水解 45min;沸水浴加热 5min,4000r/min 离心 20min,收集上清液,10mL 蒸馏水洗涤沉淀 2 次;上清液合并,定容至 100mL。菲林滴定法测定上清液中还原糖含量,数据乘以 0.9 即为抗性淀粉量(M_2)。计算抗性淀粉的含量(X),并以此计算抗性淀粉的得率(Y)。

$$X/\% = \frac{M_1}{M_2} \times 100$$

$$Y/\% = \frac{M_0 \times X}{M} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 普鲁兰酶生产抗性淀粉单因素试验

2.1.1 pH 值对抗性淀粉得率的影响

玉米淀粉液(5%, m/m)经高压(121℃, 20min)糊化后,迅速降温到 45℃,用 1mol/L HCl 溶液调整 pH 值至 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5,添加普鲁兰酶(10ASPU/g)进行脱支处理 24h,按 1.3 节操作测定抗性淀粉得率,每组处理重复 3 次,结果见图 1。

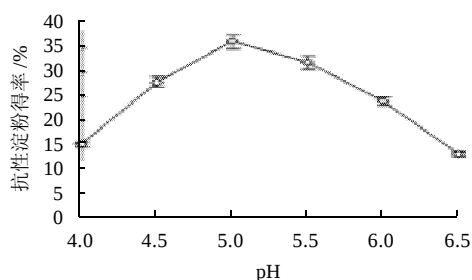


图 1 pH 值对抗性淀粉得率的影响

Fig.1 Effect of pH on resistant starch yield

由图 1 可知,抗性淀粉的得率随 pH 值先升高后降低。当 pH 值升高至 5 时,抗性淀粉得率最大(36.3%),随着 pH 值进一步的升高,抗性淀粉得率逐渐减小,说明普鲁兰酶活性受 pH 值影响较大,在 pH5 左右,具有较高活性,能大量降解玉米淀粉中的 α -1,6 糖苷键,产生更多的直链淀粉分子。在低温老化时,分子间的阻力减弱,有利于晶体的形成,从而使抗性淀粉的产量得到大幅的提高。

2.1.2 反应温度对抗性淀粉得率的影响

玉米淀粉液(5%, m/m)经高压(121℃, 20min)糊化后,迅速降温至 40、42、44、46、48、50℃,用 1mol/L HCl 溶液调整 pH 值至 5.0,添加普鲁兰酶(10ASPU/g)进行脱支处理 24h,按 1.3 节操作测定抗性淀粉得率,每组处理重复 3 次,结果见图 2。

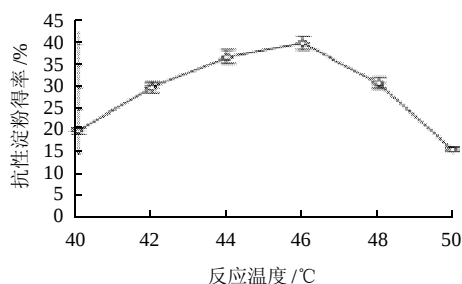


图2 反应温度对抗性淀粉得率的影响

Fig.2 Effect of reaction temperature on resistant starch yield

由图2可知,反应温度对抗性淀粉得率也有显著影响,当温度升高至46℃时,抗性淀粉得率高达40.2%,随着温度的进一步升高,抗性淀粉得率下降迅速,其原因可能是普鲁兰酶活性受温度影响显著,温度超过46℃时,酶的活性受到抑制。

2.1.3 反应时间对抗性淀粉得率的影响

玉米淀粉液(5%, m/m)经高压(121℃, 20min)糊化后,迅速降温到46℃,用1mol/L HCl溶液调整pH值至5.0,添加普鲁兰酶(10ASPU/g),分别进行脱支处理8、16、24、32、40、48h,按1.3节操作测定抗性淀粉得率,每组处理重复3次,结果见图3。

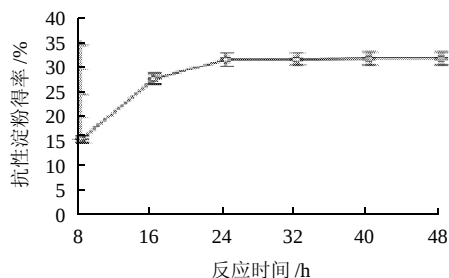


图3 反应时间对抗性淀粉得率的影响

Fig.3 Effect of reaction time on resistant starch yield

由图3可知,随着反应时间的延长,抗性淀粉得率增大;当反应时间延长至24h时,抗性淀粉得率增至最大(32.2%),脱支反应趋于平衡,可以得到稳定的抗性淀粉得率。继续增加反应时间,抗性淀粉得率没有发生显著改变。

2.1.4 普鲁兰酶加酶量对抗性淀粉得率的影响

玉米淀粉液(5%, m/m)经高压(121℃, 20min)糊化后,迅速降温至46℃,用1mol/L HCl溶液调整pH值至5.0,分别添加6、8、10、12、14、16ASPU/g的普鲁兰酶,进行脱支处理24h,按1.3节操作测定抗性淀粉得率,每组处理重复3次,结果见图4。

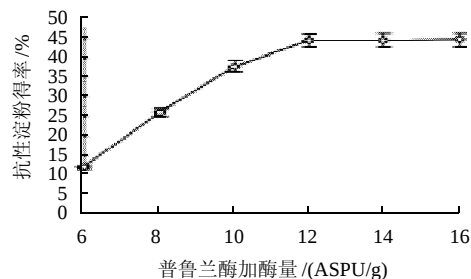


图4 加酶量对抗性淀粉得率的影响

Fig.4 Effect of pullulanase amount on resistant starch yield

由图4可知,随着普鲁兰酶加酶量的增加,抗性淀粉得率迅速增加;当加酶量增大到12ASPU/g时,抗性淀粉得率最高(44.7%),选择合适的普鲁兰酶加酶量对抗性淀粉的生产具有重要作用。

2.2 响应面优化试验

2.2.1 响应面试验设计及结果

表1 响应面试验因素水平表

Table 1 Coded values and corresponding actual values of optimization parameters used in response surface analysis

水平	A pH	B 反应温度 / °C	C 反应时间 / h	D 加酶量 / (ASPU/g)
-1	4.5	44	16	10
0	5.0	46	24	12
1	5.5	48	32	14

表2 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 2 Box-Behnken experimental design and corresponding results

试验号	A pH	B 反应温度 / °C	C 反应时间 / h	D 加酶量 / (ASPU/g)	Y 得率 / %
1	-1	-1	0	0	30.5
2	1	-1	0	0	35.2
3	-1	1	0	0	37.6
4	1	1	0	0	32.2
5	0	0	-1	-1	35.7
6	0	0	1	-1	36.9
7	0	0	-1	1	40.8
8	0	0	1	1	43.6
9	-1	0	0	-1	31.2
10	1	0	0	-1	32.5
11	-1	0	0	1	33.8
12	1	0	0	1	38.5
13	0	-1	-1	0	35.6
14	0	1	-1	0	42.8
15	0	-1	1	0	43.3
16	0	1	1	0	44.3
17	-1	0	-1	0	33.4
18	1	0	-1	0	37.6
19	-1	0	1	0	37.7
20	1	0	1	0	41.2
21	0	-1	0	-1	34.4
22	0	1	0	-1	34.3
23	0	-1	0	1	34.7
24	0	1	0	1	42.4
25	0	0	0	0	46.2
26	0	0	0	0	44.7
27	0	0	0	0	44.3
28	0	0	0	0	43.2
29	0	0	0	0	45.2

根据单因素试验结果,采用 Design Expert 7.1 中的响应面试验设计法(response surface method, RSM),对影响抗性淀粉得率的 pH 值、反应温度、反应时间、加酶量进行 4 因素 3 水平的响应面试验,优化普鲁兰酶法生产抗性淀粉的工艺条件。因素水平编码值见表 1,结果见表 2。

2.2.2 建立模型方程与显著性检验

应用 Design Expert 7.1 统计分析软件对 29 个试验点的响应值进行回归分析拟合,分别得到回归方程模型方差分析(表 3)及回归方程系数估计值(表 4)。

表 3 回归方程模型的方差分析

Table 3 Analysis of variance for the fitted regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	620.45	14	43.32	21.74	< 0.0001**
残差	28.54	14	2.04		
失拟	23.64	10	2.36	1.93	0.2760
纯误差	4.91	4	1.23		
总和	649.00	28			

注:*.差异显著, $P < 0.05$; **.差异极显著, $P < 0.01$ 。下同。

由表 3 方差分析结果可看出,模型 $P < 0.0001$, 方程模型达到极显著,失拟 $P = 0.2760 > 0.05$, 不显著,因此二次模型成立,应用此模型可以预测抗性淀粉得率及优化普鲁兰酶法生产抗性淀粉的工艺。根据表 4, 去掉不显著因素,获得二次多项回归方程:

$$Y\% = 44.72 + 1.08A + 1.66B + 1.76C + 2.40D - 2.52AB - 1.55BC + 1.95BD - 6.72A^2 - 3.54B^2 - 4.6D^2 (R^2 = 0.9560)$$

方程的复相关系数为 0.9778, 说明该模型能解释 97.78% 响应值的变化,即该模型与实际试验拟合良好,试验误差小。

表 4 回归方程中回归系数估计值

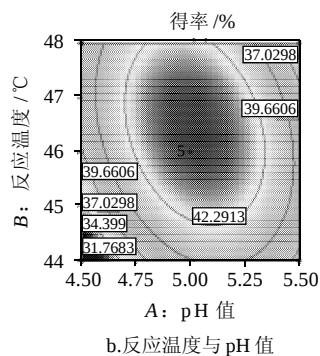
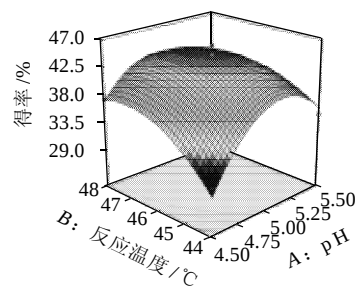
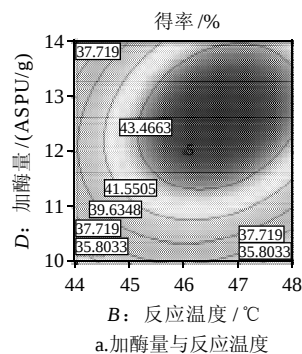
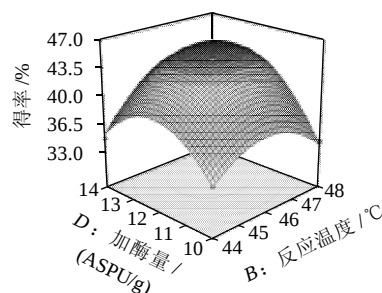
Table 4 Estimated regression coefficients in the fitted regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
A	14.08	1	14.08	6.91	0.0199	*
B	33.00	1	33.00	16.19	0.0013	**
C	37.10	1	37.10	18.20	0.0008	**
D	69.12	1	69.12	33.90	< 0.0001	**
AB	25.50	1	25.50	12.51	0.0033	**
AC	0.12	1	0.12	0.060	0.8099	
AD	2.89	1	2.89	1.42	0.2536	
BC	9.61	1	9.61	4.71	0.0476	*
BD	15.21	1	15.21	7.46	0.0162	**
CD	0.64	1	0.64	0.31	0.5841	
A ²	297.88	1	297.88	146.10	< 0.0001	**
B ²	81.25	1	81.25	39.85	< 0.0001	**
C ²	0.75	1	0.75	0.37	0.5549	
D ²	137.35	1	137.35	67.37	< 0.0001	**

由表 4 可知,影响抗性淀粉得率的因素主次为 $D > C > B > A$, 即普鲁兰酶加酶量 > 反应时间 > 反应温度 > pH 值。其中普鲁兰酶加酶量、反应时间、反应温度对反应的影响达到极显著程度, pH 值在试验范围内也有显著影响,且普鲁兰酶加酶量与反应温度、反应温度与反应时间取时间、反应温度与 pH 值有交互作用。

2.2.3 抗性淀粉得率响应面分析与最优工艺条件的确定

响应面图形是响应值 Y 对应于试验因素 A、B、C、D 所构成的三维空间的曲面图及其在二维平面上的等高线图。响应面图形可以直观地反映各因素及它们之间的交互作用对响应值的影响。将两个因素固定在零水平,可作出另外两因素交互作用的响应曲面图及等高线图,结果见图 5。



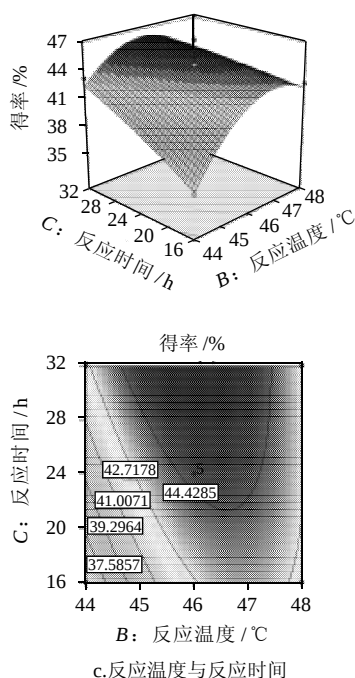


图5 各因素交互影响抗性淀粉得率的响应面及等高线图
Fig.5 Response surface and contour plots showing the interactive effects of 4 variables on resistant starch yield

由图 5a 可知,随着普鲁兰酶加酶量增大与反应温度的升高,抗性淀粉得率先升高后降低,等高线形状椭圆形,酶量与反应温度的交互作用对反应的影响极显著。由此可见选择合适的普鲁兰酶加酶量与反应温度,可以一定程度提高抗性淀粉得率。由图 5b 可知,随着反应温度升高与 pH 值增大,抗性淀粉得率迅速升高然后缓慢下降,等高线形状椭圆形,说明反应温度升高与 pH 值的交互作用对反应的影响也极显著。由图 5c 可知,随着反应温度的升高和反应时间的延长,抗性淀粉得率迅速升高然后缓慢下降,反应温度与反应时间的交互作用对反应也有显著影响。因此,在实际生产中,一定温度条件下,可以通过控制普鲁兰酶加酶量、反应时间和 pH 值以获得较高的抗性淀粉得率。

二次多项回归模型中二次项系数都为负值,说明响应曲面开口向下(从图 5 中的响应面亦可看出),方程有极大值。普鲁兰酶法生产抗性淀粉的最优条件为普鲁兰普酶加酶量 12.8ASPU/g、反应时间 32h、反应温度 46.2℃、pH5.0。在此条件下,抗性淀粉得率预测值为 46.6%。根据最佳工艺条件,做 3 组验证实验,测得抗性淀粉得率分别为 46.4%、45.9%、46.2%,平均得率 46.2%,与该条件下的理论预测值 46.6% 相比,相对误差小于 1%,说明采用 RSM 法优化得到的生产工艺参数准确可靠。

3 结 论

3.1 影响普鲁兰酶法制备抗性淀粉的主要因素为反应环

境的 pH 值、反应温度、反应时间和普鲁兰酶的加酶量,各因素对玉米抗性淀粉得率的影响大小不同,通过响应面法试验设计发现各因素的显著性为普鲁兰酶加酶量>反应时间>反应温度>pH 值。其中普鲁兰酶加酶量、反应时间、反应温度对反应的影响达到极显著程度,pH 值在试验范围内也有显著影响,且普鲁兰酶加酶量与反应温度、反应温度与反应时间、反应温度与 pH 值有交互作用。

3.2 通过响应面法试验,确定了普鲁兰酶法生产抗性淀粉的最优条件:普鲁兰普酶加酶量 12.8ASPU/g、反应时间 32h、反应温度 46.2℃、pH5.0。在该条件下,抗性淀粉得率为 46.2%。将本实验结果与相关文献[17]报道(32.4%)对比发现,响应面法的最优工艺可以有效提高玉米抗性淀粉得率,说明响应面法能更好反映各因素之间的相互作用,是一种较好的方法。

参考文献:

- [1] 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(Suppl 2): 33-50.
- [2] 魏衍超, 杨连生. 抗消化淀粉研究最新进展[J]. *郑州粮食学院学报*, 2000, 21(1): 70-72.
- [3] 洪洁. 抗性淀粉对大鼠盲肠内发酵及发酵产物的影响[D]. 北京: 中国预防医学科学院, 2001.
- [4] 杨参. 甘薯抗性淀粉对大鼠矿物质元素吸收的影响研究[D]. 重庆: 西南农业大学, 2003.
- [5] HEDEMANN M S, BACH KNUDSEN K E. Resistant starch for weaning pigs: effect on concentration of short chain fatty acids in digesta and intestinal morphology[J]. *Livestock Science*, 2007, 108(1): 175-177.
- [6] BRENNAN C S, TUDORICA C M. The role of complex carbohydrates and nonstarch polysaccharides in the regulation of postprandial glucose and insulin responses in cereal foods[J]. *Journal of Nutraceuticals-, Functional- and Medical-Foods*, 2003, 4(2): 49-55.
- [7] MORITA T, HAYASHI J, MOTOI H, et al. *In vitro* and *in vivo* digestibility of recrystallized amylose and its application for low glyce-mic foods[J]. *Journal of Food Science*, 2005, 70(3): 179-185.
- [8] AUNG K H, SURJANI U, UDAYASIKA P, et al. The effect of acid dextrinisation on enzyme-resistant starch content in extruded maize starch [J]. *Food Chemistry*, 2010, 120(11): 140-149.
- [9] SCHULZ A G M, VAN A J M, BEYENEN A C. Dietary native resistant starch but not retrograded resistant starch raises magnesium and calcium absorption in rats[J]. *American Institute of Nutrition*, 1993, 4(6): 724-731.
- [10] BERRY C S. Resistant starch: Formation and measurement of starch that survives exhaustive digestion with amylolytic enzymes during the determination of dietary fibre[J]. *Journal of Cereal Science*, 1986, 4(4): 301-314.
- [11] THOMPSON D B. Strategies for the manufacture of resistant starch[J]. *Trends in Food Science and Technology*, 2000, 11(7): 245-253.
- [12] VASANTHAN T, BHATTY R S. Enhancement of resistant starch (RS3) in amylomaize, barley, field pea and lentil starches[J]. *Starch*, 1998, 50(7): 286-291.
- [13] CHUNG Y L, LAI H M. Molecular and granular characteristics of corn starch modified by HCl-methanol at different temperatures[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2006, 63(4): 527-534.
- [14] 关杨, 王可兴, 陆文彬, 等. 压热法制备荞麦抗性淀粉工艺优化[J]. *食品科学*, 2007, 28(8): 219-223.
- [15] GONI I, GARCIA-DIZ L, MANAS E, et al. Analysis of resistant starch: A method for foods and food products[J]. *Food Chemistry*, 1996, 56(4): 445-449.
- [16] 林杨, 赵新淮. 高直链玉米淀粉制备抗性淀粉的技术改进及成品分析[J]. *农业工程学报*, 2008, 24(11): 284-287.
- [17] 林杨, 赵新淮. 酶法制备抗性淀粉新工艺的研究[J]. *食品工业科技*, 2009, 30(3): 258-260.