

# 环糊精酶改性对淀粉结构及消化性的影响

纪杭燕<sup>1,2,3</sup>, 金征宇<sup>\*1,2,3</sup>

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 3. 江南大学 食品营养与安全协同创新中心, 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 淀粉是人类主食的主要组分和能量供应的主要来源, 提升淀粉的营养品质对人体健康具有重要价值。酶法改性具有高效、专一性强和符合清洁标签等优势, 是提升淀粉品质的重要手段。作者主要研究了环糊精葡萄糖基转移酶(Cyclodextrin glucosyltransferase, CGTase)和环糊精水解酶(Cyclodextrinase, CDase)对玉米淀粉的协同改性效果。分别采用CGTase单独添加、CGTase和CDase同时添加、CGTase和CDase顺序添加3种改性方式, 并对改性后淀粉产物的结构以及消化性进行分析。结果表明, 双酶改性使得产物中麦芽低聚糖比例显著提升, 而对应的环糊精比例显著下降。经3种方式改性后淀粉结构发生明显解聚, DP 13~24、DP 25~36和DP > 37的链长比例下降, 而DP < 13的链长比例显著提升。此外, 酶改性显著提升了抗性淀粉组分的含量。因此, CGTase和CDase双酶改性在提升淀粉营养品质中具有良好的应用前景。

**关键词:** 环糊精葡萄糖基转移酶; 环糊精水解酶; 淀粉结构; 低聚糖; 淀粉消化

中图分类号: TS 235.1 文章编号: 1673-1689(2022)11-0048-09 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2022.11.006

## Effects of Modified Cyclodextrin by Enzyme on Starch Structure and Digestibility

Ji Hangyan<sup>1,2,3</sup>, Jin Zhengyu<sup>\*1,2,3</sup>

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Synergetic Innovation Center of Food Safety and Nutrition, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** Starch is the main component of human staple food and the main source of energy supply. The improvement of starch nutrition quality is of great value to human health. Enzymatic modification is an important method to improve the starch quality due to its advantages of high efficiency, high specificity, and compliance with clean label. This research mainly studied the synergistic modification effect of cyclodextrin glucosyltransferase (CGTase) and cyclodextrinase (CDase) on corn starch. The structure and digestibility of modified starch products were analyzed by adding CGTase alone, CGTase and CDase simultaneously, and CGTase and CDase sequentially. The

收稿日期: 2022-05-17

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK20221077); 中国博士后创新人才支持计划项目(BX20220135); 中国博士后科学基金面上项目(2022M711367); 江苏省“卓越博士后计划”项目(2022ZB490)。

作者简介: 纪杭燕(1993—), 女, 博士, 助理研究员, 主要从事碳水化合物资源的酶法开发方面的研究。E-mail: jhangyan@jiangnan.edu.cn

\* 通信作者: 金征宇(1960—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事碳水化合物资源开发与利用方面的研究。

E-mail: fpcenter@jiangnan.edu.cn

results indicated that the dual-enzyme modification significantly increased the proportion of malto-oligosaccharides in the products, while that of cyclodextrins decreased significantly. After modified in three ways, the starch structure was significantly depolymerized. The chain length ratios of DP 13~24, DP 25~36 and DP > 37 decreased, while the chain length ratio of DP < 13 increased significantly. In addition, the content of resistant starch was significantly increased after enzymatic modification. Thus, dual-enzyme modification via CGTase and CDase has a good application prospect in improving the nutritional quality of starch.

**Keywords:** cyclodextrin glucosyltransferase, cyclodextrinase, starch structure, oligosaccharides, starch digestion

淀粉是自然界中来源最为广泛的碳水化合物资源之一,在小麦、玉米等谷物的种子和红薯、木薯等薯类根茎中储存丰富。淀粉是人类主要的膳食碳水化合物,对维持能量代谢水平和保证机体健康起重要作用。淀粉消化是餐后重要的代谢反应之一,对餐后血糖水平和胰岛素调节至关重要,选择性的摄入慢消化速率淀粉对各类糖代谢疾病的预防和缓解具有重要意义<sup>[1-2]</sup>。淀粉依据其营养消化组分通常被划分为快消化淀粉(Rapidly Digestible Starch, RDS)、慢消化淀粉(Slowly Digestible Starch, SDS)、抗性淀粉(Resistant Starch, RS)等3类组分<sup>[3]</sup>。在不同的淀粉中RDS的质量分数比例通常可达70%~80%,增加淀粉的慢消化和抗性组分对淀粉营养品质的提升具有重要价值<sup>[4-5]</sup>。

淀粉是由交替的“生长环”的无定形和半结晶层组成,其无定形和半结晶层分别主要由直链淀粉(质量分数占15%至35%)和支链淀粉(质量分数占65%~85%)构成。为了提升淀粉的营养品质,通常采用物理、化学和生物等手段对淀粉结构进行修饰,其中湿热处理、脉冲电场以及酶法催化由于其环境友好特性而受到广泛关注<sup>[6-7]</sup>。相比于其他方法,淀粉的酶法改性还具有反应机理明晰、催化效率高以及专一性强等优势<sup>[8-9]</sup>。 $\alpha$ -葡萄糖基转移酶( $\alpha$ -Glucanotransferase, AGTase)是一类能够通过转苷的作用方式对淀粉糖链排列和连接方式进行重构从而达到提升淀粉原有特性的酶类<sup>[10-11]</sup>。近年来,越来越多的报道表明,AGTase在提升淀粉基食品的营养消化品质、控制其在体内消化产生的葡萄糖的释放具有十分有益的效应。环糊精葡萄糖基转移酶(Cyclodextrin glucosyltransferase, CGTase)是一类通过环化活力将淀粉及其衍生物转化为环糊精

(Cyclodextrin, CD)的酶类。作为典型的AGTase,该酶在改性淀粉中的应用效果良好。据报道,CGTase可与分支酶协同作用淀粉以提升淀粉的慢消化性质<sup>[12]</sup>。此外,CGTase在糊化温度以下处理颗粒淀粉,所得到的产物有利于维持小鼠的餐后血糖水平<sup>[13]</sup>。

在CGTase改性淀粉的过程中,通常会有高比例的CD产生,过量的CD可能会有导致肾毒性的风险<sup>[14]</sup>。此外,CD作为底物还会对CGTase具有一定的抑制作用,降低酶反应效率<sup>[15]</sup>。环糊精水解酶(Cyclodextrinase, CDase)是一类具有高度CD水解特异性的酶类。因此,将CGTase和CDase协同改性淀粉,一方面降低反应体系中CD的含量,另一方面CDase可以将CD水解为具有益生效果的麦芽低聚糖,来进一步提升淀粉的营养品质。作者利用CGTase和CDase协同改性淀粉,系统探究了酶改性对淀粉的结构、环状和低聚糖组成、消化特性的影响,旨在为提升淀粉营养消化特性提供一种新的酶法改性途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

CGTase(来源于*Thermoanaerobacter* sp.,  $\beta$ -CGTase);Novozymes有限公司(中国);异淀粉酶(来源于*Pseudomonas* sp.);Megazyme有限公司(爱尔兰);葡萄糖测定试剂盒(GOPOD试剂盒,葡萄糖氧化酶法);北京利德曼生化股份有限公司;普通和高直链玉米淀粉(直链淀粉质量分数分别为25%和45%);杭州普罗星淀粉有限公司; $\alpha$ -淀粉酶(来源于猪胰腺,50 U/mg)和淀粉葡萄糖苷酶(来源于黑曲霉,70 U/mg);美国Sigma-Aldrich公司。麦芽低聚糖标准品(麦芽三糖(G3)、麦芽四糖(G4)、麦芽五糖

(G5)、麦芽六糖(G6)、麦芽七糖(G7)、麦芽八糖(G8)):英国卡博森斯化学科技有限公司;葡萄糖(G1)、麦芽糖(G2)等其他分析纯生化试剂:国药集团化学试剂有限公司。

## 1.2 仪器与设备

高效液相色谱仪(HPLC):日本岛津公司;氨基柱(APS-2HYPERSIL柱,250 mm×4.6 mm,5 μm):美国赛默飞世尔科技公司;高压反应釜:上海霍桐实验仪器有限公司;多角度激光散射凝胶色谱系统(HPSEC-MALLS-RI系统):Waters 1525泵(美国Waters公司);多角度激光散射检测器(Dawn Heleos-Ⅱ):美国Wyatt公司;示差折光检测器(Optilab T-rEX):美国Wyatt公司;尺寸排阻色谱柱(Shodex OHpak SB-806 HQ和SB-804 HQ):日本Shodex公司;离子色谱仪ICS-5000(GP40梯度泵,脉冲安培检测器和电化学法检测器,Chromeleon 6.8色谱分析工作站):美国戴安公司;阴离子交换色谱柱CarboPac PA20(250 mm×3 mm):美国戴安公司。

## 1.3 实验方法

**1.3.1 CDase 及 CGTase 的制备及酶活测定** CDase的制备及酶活测定参考 Ji<sup>[6]</sup>的方法。挑取宿主菌株 *E. coli* BL21 (DE3) 于 LB 液体培养基中(含 100 μg/mL 氨苄青霉素),在 37 ℃、200 r/min 培养 8~10 h。以 1%的接种体积分数将上述培养液扩大培养,OD<sub>600</sub> 为 0.4~0.6 时加入终摩尔浓度为 0.4 mmol/L 的 IPTG,于 25 ℃、160 r/min 诱导 8~10 h。将发酵液在 10 000 g、4 ℃条件下离心 15 min,收集菌体沉淀。使用 pH 7.5 的 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液重悬菌体,随后超声 20 min 破壁,超声功率为 260 W,每超声 2 s 停顿 3 s,离心、收集破壁菌体悬浮液的上清液(即为粗酶液)。采用 70 ℃保温 20 min 热处理和镍层析两步法对 CDase 粗酶液进行纯化。参考文献[17]使用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法测定 CDase 酶活,在最适反应条件下,每分钟从环糊精中释放 1 μmol 还原末端所需要的酶量定义为一个酶活单位(U)。将购买的 CGTase 稀释到适当酶浓度,采用酚酞法测定 β-CD 的含量,计算 CGTase 的酶活<sup>[8]</sup>。一个酶活单位(U)定义为每分钟生成 1 μmol β-CD 所需要酶的添加量。

**1.3.2 CGTase 和 CDase 改性淀粉样品的制备** 使用磷酸盐缓冲液(pH 6.0,20 mmol/L)配制质量分数

5%的普通/高直链玉米淀粉底物溶液。利用高压反应釜在 121 ℃、160 r/min 条件下充分糊化 30 min,随后将糊化后的淀粉溶液降温至反应温度 75 ℃。本研究使用的 CDase 对 CD 具有高度水解特异性而对淀粉无水解活力,因此,按如下方式利用 CGTase 和 CDase 制备改性淀粉。1)CGTase:CGTase(3.8 U/g 干基淀粉)与淀粉底物保温 6 h;2)CDase/CGTase:将 CDase(14.2 U/g 干基淀粉)和 CGTase(3.8 U/g 干基淀粉)共同与淀粉底物保温 6 h;3)CGTase+CDase:CGTase(3.8 U/g 干基淀粉)与淀粉底物保温 6 h,沸水浴 30 min 灭酶,将反应产物与 CDase(14.2 U/g 干基淀粉)保温 6 h。酶反应结束后均采用沸水浴 1 h 灭酶,将产物冷冻干燥、研磨、过 100 目筛备用。空白对照为不添加酶液制备的样品。

**1.3.3 改性淀粉中环状和线性低聚糖的组成测定** 参考 Xia<sup>[9]</sup>等报道的方法使用 HPLC 对改性淀粉样品中 CD 和线性麦芽低聚糖的组成进行分析。使用的分析柱为 X-Bridge BEH 氨基柱(250 mm×4.6 mm,Waters),流动相为体积分数 65%乙腈溶液,流速设定为 0.8 mL/min,进样量为 20 μL,柱温维持在 30 ℃。

**1.3.4 改性淀粉的分子结构测定** 将改性的淀粉样品参考 Ji<sup>[20]</sup>等报道的方法使用 HPSEC-MALLS-RI 系统进行分子结构的测定。将样品分散于体积分数 90%的二甲亚砷溶液中,使得终质量分数为 0.5%,沸水浴 1 h 充分溶解样品。随后将样品置于 37 ℃、160 r/min 下恒温振荡 48 h。向样品溶液中加入 9 倍体积的无水乙醇,10 000 g、4 ℃下离心 10 min,取沉淀并用无水乙醇洗涤 2 次。测定前将无水乙醇蒸干,用流动相复溶,并过 0.45 μm 滤膜。流动相使用 0.1 mol/L NaNO<sub>3</sub>(含质量分数 0.02%NaN<sub>3</sub>),流量为 0.6 mL/min,柱温保持 50 ℃,所得数据使用 Astra(Version 5.3.4,Wyatt Technologies)进行分析。

**1.3.5 改性淀粉的链长分布测定** 将改性的淀粉样品参考 Ji<sup>[21]</sup>等的方法使用 HPAEC-PAD 系统进行链长分布的测定。将样品溶解在乙酸钠缓冲溶液中(50 mmol/L,pH 4.5)使得终质量分数为 0.2%,沸水浴 30 min 充分分散。随后将样品溶液置于 42 ℃保温,加入 2 U 异淀粉酶脱支处理 24 h,沸水浴 20 min 灭酶。在 10 000 g 下离心 10 min,取上清液过 0.22 μm 滤膜。测定流量为 0.4 mL/min,柱温保持 30 ℃,流动相使用 150 mmol/L NaOH 和 40~400

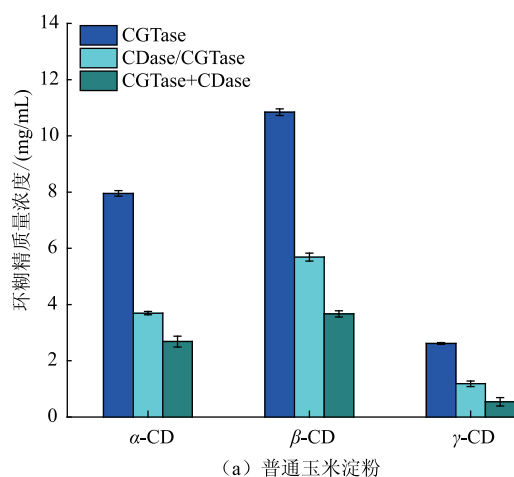
mmol/L 梯度 NaOAc 进行洗脱。

**1.3.6 改性淀粉的体外消化性测定** 参考 Englyst<sup>[22]</sup> 等报道的方法并稍作改进测定改进淀粉的体外消化性。使用淀粉葡萄糖苷酶和猪胰腺  $\alpha$ -淀粉酶以去离子水配制小肠模拟溶液,其中猪胰腺  $\alpha$ -淀粉酶的酶活力为 150 U/mL,淀粉葡萄糖苷酶的酶活力为 80 U/mL。将 200 mg 样品分散于 15 mL 0.2 mol/L 乙酸钠缓冲液中(1 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ , pH 5.2)。在 37 °C 平衡 5 min 后,在充分分散的样品溶液中加入 5 mL 的小肠模拟溶液,37 °C、200 r/min 水浴条件下酶解。随后在 0、20、120 min 分别取 200  $\mu\text{L}$  水解反应液,立即加入 9 倍体积的无水乙醇灭酶。将样品液在 10 000 g 离心 5 min,取上清液利用 GOPOD 试剂盒测定其中的葡萄糖含量。RDS、SDS 和 RS 的比例根据游离葡萄糖的质量分数( $G_0$ )、酶解 20 min 的葡萄糖质量分数( $G_{20}$ )和酶解 120 min 的葡萄糖质量分数( $G_{120}$ )参照如下公式计算:

$$\text{RDS}(\%) = (G_{20} - G_0) \times 0.9 \times 100$$

$$\text{SDS}(\%) = (G_{120} - G_{20}) \times 0.9 \times 100$$

$$\text{RS}(\%) = 100 - \text{RDS}(\%) - \text{SDS}(\%)$$



**1.3.7 数据处理** 实验结果均重复 3 次,计算标准偏差作为其误差限。数据的显著性分析使用 SPSS 19.0 进行,  $P < 0.05$  表明实验数据差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 双酶改性淀粉产物的环糊精组成分析

为了探究 CGTase 与 CDase 复合改性淀粉的效果,基于 CGTase 主导的环化活力,首先对产物中的 CD 组成进行分析。如图 1 所示,相比于 CGTase 单独转化淀粉底物,经 CGTase 和 CDase 双酶复合改性后产物中的  $\alpha$ -CD、 $\beta$ -CD 和  $\gamma$ -CD 均有不同程度的下降。该结果表明在双酶复合改性的过程中,CDase 能充分的发挥 CD 的水解作用。此外,使用不同的淀粉底物以及不同的双酶改性方式时,产物中不同 CD 的剩余比例不同,这可能是由 CGTase 的产物特异性和 CDase 的底物选择性共同导致的<sup>[23-24]</sup>。相比于 CGTase 和 CDase 双酶顺序添加,双酶同时添加的改性方式具有更为显著的 CD 水解效果。相比于使用高直链玉米淀粉为底物,以普通玉米淀粉为底物不同双酶改性方式的 CD 产物差异更显著。

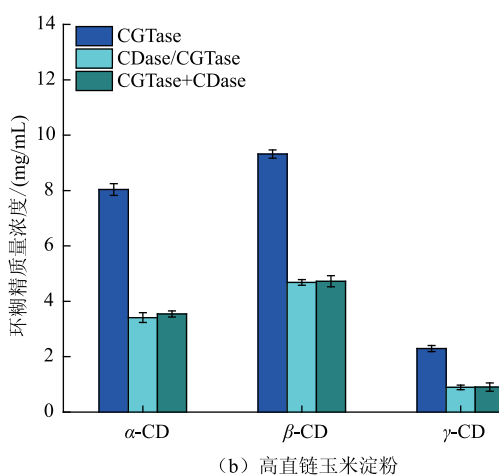


图 1 双酶改性对产物中 CD 质量浓度的影响

Fig. 1 Effects of dual-enzyme modification on the content of CD in products

### 2.2 双酶改性淀粉产物中麦芽低聚糖组成分析

麦芽低聚糖是一类由  $\alpha$ -1,4 糖苷键连接聚合度范围为 2~10 个葡萄糖单元的低聚寡糖,具有良好保湿性、适中粘度以及调节肠道菌群等益生功能<sup>[25-26]</sup>。利用具有 CD 水解活力的 CDase 以 CD 为底物,可以高效制备具有特定聚合度的麦芽低聚糖<sup>[27-28]</sup>。因此,麦芽低聚糖是 CGTase 与 CDase 复合改性淀

粉的重要产物。如图 2 所示,相比于 CGTase 单独改性,CGTase 和 CDase 复合改性显著提升了淀粉产物中的麦芽低聚糖质量浓度,不同聚合度的低聚糖比例也有明显差异。单独使用 CGTase 时,产物中仅有少量的 G2、G3 和 G6~G8 生成。当使用双酶改性时,产物中的 G2~G8 比例均显著提升,其中 G6 和 G7 质量浓度最高。这可能是由于本研究中使用的

CDase 对  $\alpha$ -CD 和  $\beta$ -CD 具有高效的水解活力,而对麦芽低聚糖的水解则相对缓慢<sup>[29]</sup>。因此,CDase 将体系中的  $\alpha$ -CD 和  $\beta$ -CD 主要水解为 G6 和 G7,这也与图 1 中的 CD 下降比例相一致。同样,淀粉底物以及双酶改性方式对产物中麦芽低聚糖组成也具

有显著影响。当以普通玉米淀粉为底物时,淀粉产物中麦芽低聚糖的得率更高,且双酶顺序添加改性生成的麦芽低聚糖质量浓度高于双酶同时添加改性。当以高直链玉米淀粉为底物时,产物中不同的双酶改性方式所得麦芽低聚糖组成则相对较为接近。

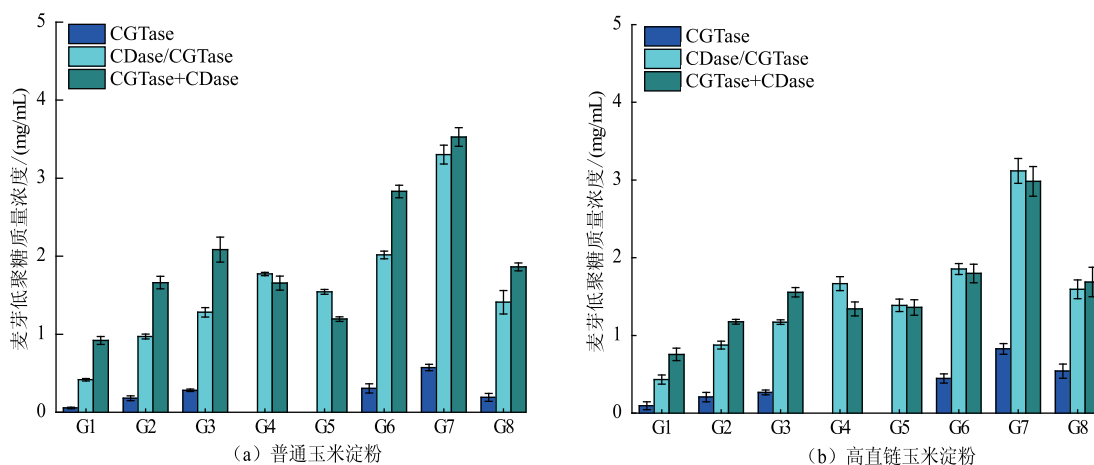


图 2 双酶改性对产物中麦芽低聚糖含量的影响

Fig. 2 Effects of dual-enzyme modification on the content of malto-oligosaccharides in products

### 2.3 双酶改性淀粉产物的相对分子质量分布表征

淀粉的分子结构对其性质具有重要影响,分子量分布是其重要的分子结构特征<sup>[30]</sup>。如图 3 和表 1 所示,当以不同玉米淀粉为底物时,经酶改性后的分子结构变化规律较为一致。经 CGTase 改性后产物相对分子质量分布曲线均显著右移,其中普通玉米淀粉相对分子质量由  $158.4 \times 10^5$  下降至  $0.5 \times 10^5$ ,高直链玉米淀粉相对分子质量由  $11.7 \times 10^5$  下降至  $0.7 \times 10^5$ ,表明了两种淀粉结构均发生明显降解。此

外,经 CDase 和 CGTase 双酶改性后产物相对分子质量与经 CGTase 单独改性接近,双酶顺序改性相比于双酶同时改性对淀粉结构降解效果更为显著,这与上述体系中 CD 和麦芽低聚糖的测定结果一致。可能是由于双酶顺序改性时,经 CGTase 改性后的产物具有更多的短链结构,更利于 CDase 的进一步水解。CDase 对淀粉几乎无水解作用,但可缓慢水解低聚寡糖,因此在顺序改性过程中促进了淀粉分子结构的降解。此外,淀粉分子多分散系数(PDI)也

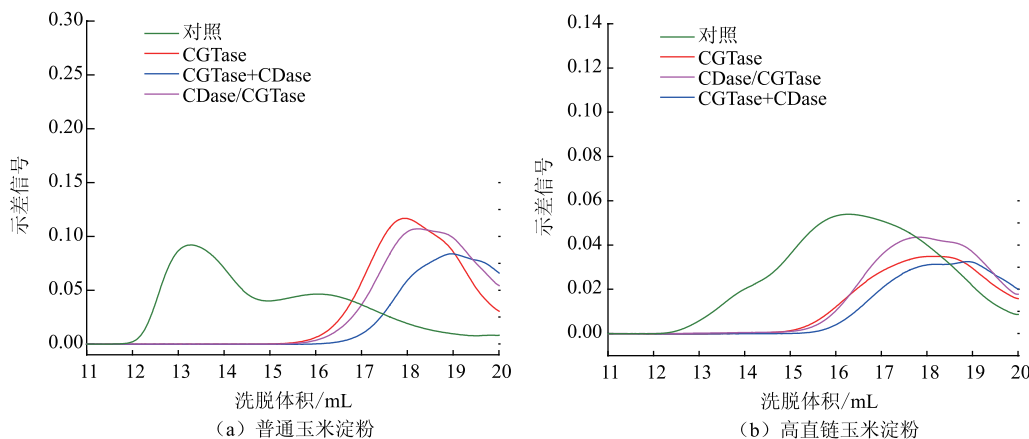


图 3 双酶改性对淀粉分子结构的影响

Fig. 3 Effects of dual-enzyme modification on starch molecular structure

能有效反映淀粉相对分子质量分布特征<sup>[31]</sup>。如表 1 所示,相比于原玉米淀粉,酶改性后产物的 PDI 值均增加,这表明改性淀粉样品具有更广泛的相对分子质量差异性。然而,当以高直链玉米淀粉为底物

时,与双酶同时改性相比,另两种改性方法会使得产物的相对分子质量分布差异性增大<sup>[32]</sup>,相对分子质量的分布特征会显著影响淀粉酶解产物的理化及营养特性。

表 1 双酶改性淀粉产物的重均相对分子质量( $M_w$ )和尺寸参数

Table 1 Weight-average molecular weight( $M_w$ ) and size parameters of dual-enzyme modified starch products

| 样品           | 普通玉米淀粉                  |                        | 高直链玉米淀粉               |                        |
|--------------|-------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|
|              | $M_w \times 10^5$       | PDI                    | $M_w \times 10^5$     | PDI                    |
| 对照           | 158.4±3.2 <sup>aB</sup> | 1.65±0.05 <sup>a</sup> | 11.7±0.2 <sup>c</sup> | 4.37±0.20 <sup>a</sup> |
| CGTase       | 0.5±0.1 <sup>b</sup>    | 2.27±0.40 <sup>b</sup> | 0.7±0.1 <sup>b</sup>  | 5.37±0.50 <sup>b</sup> |
| CDase/CGTase | 0.5±0.1 <sup>b</sup>    | 2.14±0.70 <sup>b</sup> | 0.7±0.0 <sup>b</sup>  | 7.01±0.20 <sup>c</sup> |
| CGTase+CDase | 0.3±0.1 <sup>a</sup>    | 2.29±0.90 <sup>b</sup> | 0.5±0.0 <sup>a</sup>  | 5.30±0.10 <sup>b</sup> |

<sup>a</sup> $M_w$ :重均分子量;PDI:多分散系数, $M_w/M_n$ ; <sup>B</sup>同一列中标有不同小写字母的代表在 T 检验下( $P<0.05$ )具有显著性差异。

## 2.4 双酶改性淀粉的精细结构表征

依据支链淀粉链长比例的周期性分布模式,淀粉链长通常被分为 DP<6、DP 6~12、DP 13~24、DP 25~36、DP>36 共 5 个组分,分别与淀粉 A、B1、B2、B3 和更长链对应<sup>[33]</sup>。淀粉不同链长比例反映了其内在精细结构且与淀粉性质密切相关<sup>[34]</sup>。如图 4 和表 2 所示,经 CGTase 单独和双酶改性的不同玉米淀粉链长分布均呈现明显左移,表明淀粉结构显著降解,对应的链长组分 DP 13~24、DP 25~36 和 DP>36 的比例显著下降。当以普通玉米淀粉为底物时,

CGTase 改性将 DP<13 的葡萄糖链比例提升了约 40%以上。当使用 CGTase 和 CDase 复合改性时,对应的葡萄糖链比例进一步提升约 20%左右,并且双酶顺序改性比双酶同时改性对短链比例的提升具有更为显著的效果。当以高直链玉米淀粉为底物时,改性淀粉链长比例具有类似的组成,CGTase 和 CDase 的不同复合改性方式的产物链长比例组成差异不大,因此,双酶改性淀粉的精细结构测定结果与上述的环状、线性麦芽低聚糖质量浓度和摩尔质量分布结论一致。此外,由于测定的样品是由酶改

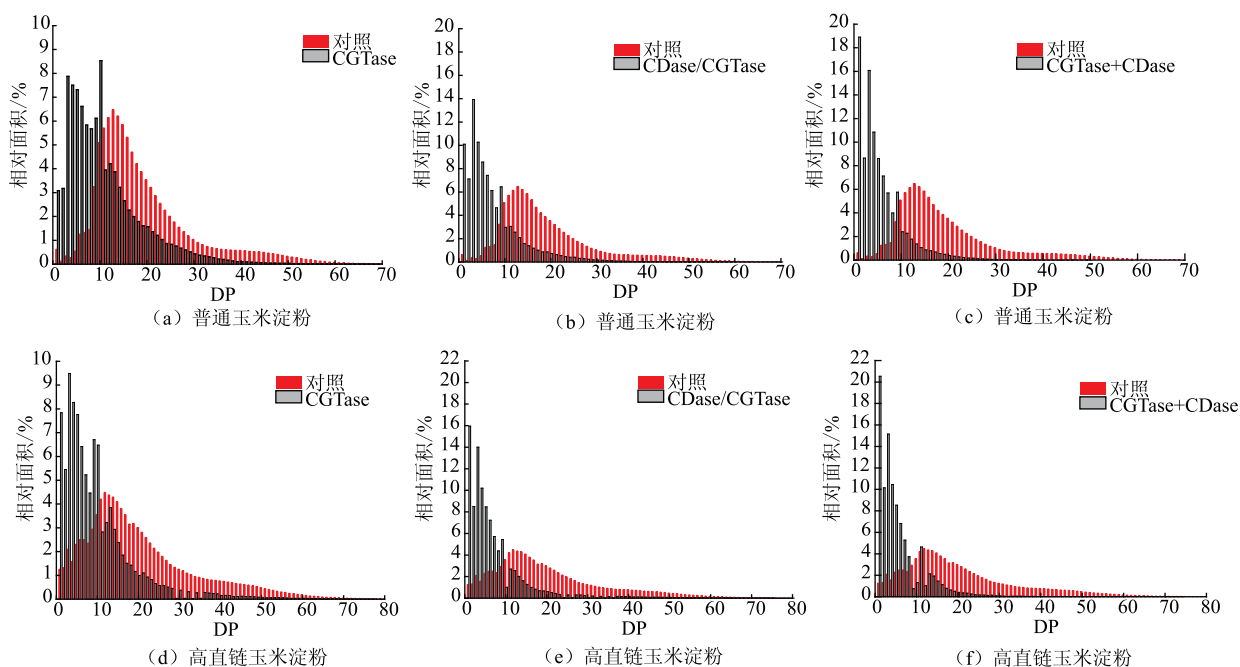


图 4 双酶改性对淀粉链长分布的影响

Fig. 4 Effects of dual-enzyme modification on the chain length distribution of starch

表 2 双酶改性淀粉产物的链长比例

Table 2 Chain length distribution ratio of dual-enzyme modified starch products

| 样品           | 链长分布 %                  |                         |                         |                         |                         |
|--------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|              | DP<6                    | DP6~12                  | DP13~24                 | DP25~36                 | DP>36                   |
| 普通玉米淀粉       | 1.95±0.22 <sup>ab</sup> | 24.27±0.38 <sup>a</sup> | 51.13±2.31 <sup>d</sup> | 13.38±0.65 <sup>d</sup> | 9.28±0.27 <sup>b</sup>  |
| CGTase       | 28.94±0.13 <sup>b</sup> | 40.92±0.33 <sup>d</sup> | 23.42±0.32 <sup>c</sup> | 5.48±0.54 <sup>c</sup>  | 1.25±0.09 <sup>a</sup>  |
| CDase/CGTase | 51.18±0.66 <sup>c</sup> | 28.26±0.22 <sup>b</sup> | 16.86±0.15 <sup>b</sup> | 3.00±0.10 <sup>b</sup>  | 0.70±0.21 <sup>a</sup>  |
| CGTase+CDase | 63.06±3.51 <sup>d</sup> | 29.01±0.11 <sup>c</sup> | 7.16±0.08 <sup>a</sup>  | 0.72±0.14 <sup>a</sup>  | 0.06±0.22 <sup>a</sup>  |
| 高直链玉米淀粉      | 8.58±0.93 <sup>ab</sup> | 22.58±3.1 <sup>ab</sup> | 39.42±0.99 <sup>c</sup> | 15.58±2.10 <sup>b</sup> | 13.83±1.10 <sup>b</sup> |
| CGTase       | 38.81±0.77 <sup>c</sup> | 35.34±0.23 <sup>d</sup> | 19.63±1.12 <sup>b</sup> | 3.47±0.38 <sup>a</sup>  | 2.75±0.16 <sup>a</sup>  |
| CDase/CGTase | 57.11±2.31 <sup>d</sup> | 29.01±1.12 <sup>c</sup> | 10.01±0.28 <sup>a</sup> | 1.75±0.09 <sup>a</sup>  | 2.13±0.05 <sup>a</sup>  |
| CGTase+CDase | 64.80±1.65 <sup>e</sup> | 23.56±1.36 <sup>b</sup> | 10.12±0.29 <sup>a</sup> | 1.02±0.03 <sup>a</sup>  | 0.50±0.01 <sup>a</sup>  |

<sup>A</sup> 链长分布比例由相对峰面积(%)计算;<sup>B</sup> 同一列中标有不同小写字母的代表在 Tukey 检验下 ( $p<0.05$ ) 具有显著性差异。

性淀粉产物经脱支处理后侧链和 CD 经 CDase 降解得到的麦芽低聚糖组成,可以看出经酶改性后的淀粉产物主要以短支链结构为主。

## 2.5 双酶改性淀粉的体外消化性分析

使用改进的 Englyst 体外模拟消化法对酶改性淀粉样品的营养组分进行测定。如图 5 所示,经充分糊化的普通玉米淀粉和高直链玉米淀粉中 RS 质量分数分别为 15.6%和 31.0%。可以看出,当以不同淀粉为底物时,经 CGTase 和双酶改性后产物中 RS 的比例均显著提升。其中,以普通玉米淀粉为底物时,经 CGTase 单独酶改性可以获得最高的 RS 质量分数为 39.0%。结合上述分子结构的测定结果,这可能是由于经 CGTase 作用后淀粉样品的分子量显著下降,分子尺寸减小,DP < 13 的葡萄糖链长比例显著增加。据报道,高比例 DP < 13 的葡萄糖侧链能有效提升淀粉的抗酶解性。CD 通过强氢键稳定环结构来抵抗水解,因而改性样品中高比例的 CD 也

对其抗消化性具有重要的贡献作用。当使用 CGTase 和 CDase 双酶同时和顺序改性时,RS 质量分数分别提升至 35.4%和 34.2%,与原淀粉相比明显提升但低于 CGTase 单独改性。这可能是由于双酶改性将淀粉产物中 CD 转化为高比例的麦芽低聚糖。其中高聚合度的麦芽低聚糖如 G4~G8,可以相对容易被  $\alpha$ -淀粉酶和淀粉葡萄糖苷酶水解,直至不能被进一步利用。当以高直链玉米淀粉为底物时,经 CGTase、CGTase 和 CDase 同时添加和顺序添加,改性后淀粉产物中的 RS 质量分数分别为 59.3%、49.7%和 52.3%,RS 的变化具有与以普通玉米淀粉较为一致的规律。

以 CGTase 改性不同淀粉能够显著增加淀粉的抗性组分比例,提升淀粉的营养消化品质。然而,产物体系中高比例的 CD 可能会对人体造成一定的肾毒性危害。在双酶改性过程中,高比例的 CD 被 CDase 水解转化为麦芽低聚糖,并且 CGTase 单独改

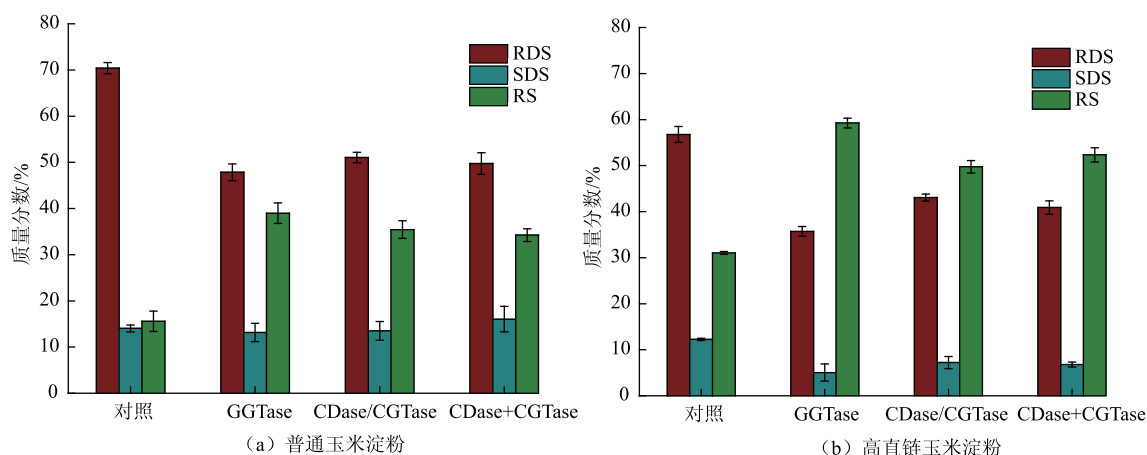


图 5 双酶改性对淀粉中营养消化组分的影响

Fig. 5 Effects of dual-enzyme modification on nutrient digestible components in starch

性淀粉与双酶改性产物具有相近的体外消化性。这可能是由于麦芽低聚糖本身也是具有良好的益生效果的功能性寡糖<sup>[35]</sup>。因此,CGTase与CDase复合改性是一种有效提升淀粉营养消化品质的方法,具有良好的应用前景。

### 3 结 语

在利用以CGTase主导的双酶改性普通和高直链玉米淀粉时,发现CGTase与CDase具有明显的

协同改性效果。经CDase的水解作用,产物中CD比例显著下降而麦芽低聚糖比例显著提升。此外,CGTase和双酶改性使得淀粉相对分子质量和分子尺寸显著下降,DP 13~24,DP 25~36和DP > 37的链长比例显著下降,而DP < 13的链长比例显著提升。经CGTase和双酶改性后淀粉中RS的比例显著提升,这与淀粉产物组成和分子结构相对应。综上所述,利用CGTase和CDase可通过产物组成和分子结构的修饰显著提升淀粉的营养消化品质。

### 参考文献:

- [1] KONG H C, YU L X, GU Z B, et al. An innovative short-clustered maltodextrin as starch substitute for ameliorating postprandial glucose homeostasis[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(1):354-367.
- [2] 米红波, 邓婷月, 李毅, 等. 抗性淀粉的消化特性及其在食品中的应用[J]. *食品与生物技术学报*, 2021, 40(9):9-15.
- [3] LEHMANN U, ROBIN F. Slowly digestible starch-its structure and health implications:a review[J]. *Trends in Food Science and Technology*, 2007, 18(7):346-355.
- [4] 江帆, 杜春微, 任妍婧, 等. 不同藜麦品种淀粉的理化性质与消化特性[J]. *中国粮油学报*, 2021, 36(7):77-83.
- [5] 何健, 王韧, 张昊, 等. 不同修饰程度对蜡质玉米淀粉理化性质和消化特性的影响[J]. *食品与机械*, 2016, 32(1):1-5.
- [6] DUPUIS H J, LIU Q, Yada Y R. Methodologies for increasing the resistant starch content of food starches;a review [J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2015, 13(6):1219-1234.
- [7] MANIGLIA B C, CASTANHA N, LE-BAIL P, et al. Starch modification through environmentally friendly alternatives;a review [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2021, 61(15):2482-2505.
- [8] 宿玲恰, 吴敬. 淀粉基未来食品及其制备方法研究[J]. *食品与生物技术学报*, 2021, 40(12):5-16.
- [9] REN J Y, LI C M, GU Z B, et al. Digestion rate of tapioca starch was lowered through molecular rearrangement catalyzed by 1,4- $\alpha$ -glucan branching enzyme[J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 84:117-124.
- [10] MAAREL M, LEEMHUIS H. Starch modification with microbial alpha-glucanotransferase enzymes[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 93(1):116-121.
- [11] SORNDECH W, MEIER S, JANSSON A, et al. Synergistic amylomaltase and branching enzyme catalysis to suppress cassava starch digestibility[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 132:409-418.
- [12] LI Y, LI C M, GU Z B, et al. Digestion properties of corn starch modified by  $\alpha$ -D-glucan branching enzyme and cyclodextrin glycosyltransferase[J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 89:534-541.
- [13] DURA A, YOKOYAMA W, ROSELL C M. Glycemic response to corn starch modified with cyclodextrin glycosyltransferase and its relationship to physical properties[J]. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2016, 71(3):252-258.
- [14] FRIJLINK H W, EISSENS A C, HEFTING N R, et al. The effect of parenterally administered cyclodextrins on cholesterol levels in the rat[J]. *Pharmaceutical Research*, 1991, 8(1):9-16.
- [15] CHEN S D, LI Z F, GU Z B, et al. Variants at position 603 of the CGTase from *Bacillus circulans* STB01 for reducing product inhibition[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 136:460-468.
- [16] JI H Y, BAI Y X, LI X X, et al. Preparation of malto-oligosaccharides with specific degree of polymerization by a novel cyclodextrinase from *Palaeococcus pacificus*[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2019, 210:64-72.
- [17] MILLER G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. *Analytical Chemistry*, 1959, 31(3):426-428.
- [18] MAKELA M, KORPELA T, LAAKSO S. Colorimetric determination of  $\beta$ -cyclodextrin:two assay modifications based on molecular complexation of phenolphthalein[J]. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 1987, 14(2):85-92.
- [19] XIA L X, BAI Y X, MU W M, et al. Efficient synthesis of glucosyl- $\beta$ -cyclodextrin from maltodextrins by combined action of cyclodextrin glucosyltransferase and amyloglucosidase[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(29):6023-

6029.

- [20] JI H Y, BAI Y X, LI X X, et al. Structural and property characterization of corn starch modified by cyclodextrin glycosyltransferase and specific cyclodextrinase[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2020, 237: 116137.
- [21] JI H Y, LI X X, BAI Y X, et al. Synergetic modification of waxy maize starch by dual-enzyme to lower the *in vitro* digestibility through modulating molecular structure and malto-oligosaccharide content[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2021, 180: 187-193.
- [22] ENGLYST H N, KINGMAN S M, CUMMINGS H J. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions [J]. **European Journal of Clinical Nutrition**, 1992, 46: S33-S50.
- [23] HAN R Z, LI J H, SHIN H, et al. Recent advances in discovery, heterologous expression, and molecular engineering of cyclodextrin glycosyltransferase for versatile applications[J]. **Biotechnology Advances**, 2014, 32: 415-428.
- [24] BUEDENBENDER S, SCHULZ G E. Structural base for enzymatic cyclodextrin hydrolysis[J]. **Journal of Molecular Biology**, 2009, 385(2): 606-617.
- [25] WANG L, XU J, FAN X, et al. Effect of disaccharides of different composition and linkage on corn and waxy corn starch retrogradation[J]. **Food Hydrocolloids**, 2016, 61: 531-536.
- [26] 信成夫, 景文利, 于丽, 等. 麦芽四糖生产工艺的研究[J]. **中国食品添加剂**, 2017, 10: 149-153.
- [27] LI X L, LI D. Preparation of linear maltodextrins using a hyperthermophilic amylopullulanase with cyclodextrin- and starch-hydrolysing activities[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2015, 119: 134-141.
- [28] YANG S, LEE H, KIM J, et al. Enzymatic preparation of maltohexaose, maltoheptaose, and maltooctaose by the preferential cyclomaltooligosaccharide (cyclodextrin) ring-opening reaction of *Pyrococcus furiosus* thermostable amylases[J]. **Carbohydrate Research**, 2006, 341(3): 420-424.
- [29] JI H Y, YU W, BAI Y X, et al. Application of cyclodextrinase in non-complexant production of  $\gamma$ -cyclodextrin[J]. **Biotechnology Progress**, 2020, 36(2): e2930.
- [30] LI C, WU A, YU W, et al. Parameterizing starch chain-length distributions for structure-property relations[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2020, 241: 116390.
- [31] LUCKETT C R, WANG Y. Effects of  $\beta$ -amylolysis on the resistant starch formation of debranched corn starches[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2012, 60(18): 4751-4757.
- [32] GRANT L A, OSTENSON A M, DUARTE-RAYAS P. Determination of amylose and amylopectin of wheat starch using high performance size-exclusion chromatography (HPSEC)[J]. **Cereal Chemistry**, 2002, 79(6): 771-773.
- [33] HANASHIRO I, ABE J I, HIZUKURI S. A periodic distribution of the chain length of amylopectin as revealed by high-performance anion-exchange chromatography[J]. **Carbohydrate Research**, 1996, 283: 151-159.
- [34] BENAVENT-GIL Y, ROSELL C M, GILBERT E P. Understanding CGTase action through the relationship between starch structure and cyclodextrin formation[J]. **Food Hydrocolloids**, 2021, 112: 106316.
- [35] FARIAS D, ARAUJO F, NERI-NUMA I A, et al. Prebiotics: Trends in food, health and technological applications[J]. **Trends in Food Science and Technology**, 2019, 93: 23-35.