DOI:10.12441/spyswjs.20230627002 [文章编号] 1673-1689(2024)09-0021-10

高支化修饰木薯淀粉及产物的理化性质研究

吴昆蓉[1,3] 李才明[1,2,3] 李兆丰[1,2,3] 张宇飞[1] 顾正彪[1,2] 班宵逢[1,2] 孔昊存[1,2,3*]

(1. 江南大学食品学院,江苏 无锡 214122; 2. 江南大学合成与生物胶体教育部重点实验室,江苏 无锡 214122; 3. 江苏集萃未来食品技术研究所有限公司,江苏 宜兴 214200)

摘要:木薯淀粉在食品工业中应用广泛,但通常需要经过改性才可用于食品中。相较于传统的改性手段,酶法改性因环保安全、副产物少、产物得率高等优点成为淀粉领域的研究热点。采用来源于极端嗜热菌 *Rhodothermus obamensis* STB05(*R. obamensis* STB05)的淀粉分支酶(GBE)对木薯淀粉进行高支化修饰,并分析了高支化修饰对木薯淀粉分子结构、稳定性及体外消化性能等理化性质的影响。结果表明,在酶添加量为 100 U/g、反应时间为 12 h 的条件下对木薯淀粉进行改性,所得产物中 α-1,6 糖苷键摩尔分数达到 7.85%,比天然木薯淀粉增加 152.41%;木薯淀粉分子中长链比例降低,短链比例上升,平均链长降低。木薯淀粉糊液的稳定性研究表明,经高支化修饰后,木薯淀粉糊的溶解度、凝沉性、透明度稳定性及冻融稳定性等性质均有不同程度的改善,且体外消化性能提高。该研究结果为木薯淀粉生物改性及其工业化应用提供了理论依据。

关键词:木薯淀粉;高支化修饰;分子结构;稳定性;消化性能

Study on Highly Branched Modification of Tapioca Starch and the Physicochemical Properties of Its Products

WU Kunrong[1,3] *LI Caiming*[1,2,3] *LI Zhaofeng*[1,2,3] *ZHANG Yufei*[1] *GU Zhengbiao*[1,2] *BAN Xiaofeng*[1,2] *KONG Haocun*[1,2,3*]

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Synergetic and Biological Colloids, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Jiangsu Jicui Future Food Technology Research Institute Co., Ltd., Yixing 214200, China)

Abstract: Tapioca starch is widely applied in the food industry. However, it usually requires modification before it can be used in food. Compared to traditional modification techniques, enzymatic modification has become a research hotspot in the field of starch due to its environmental friendliness, minimal by-product generation, and high yield. In this study, a starch branching enzyme(GBE) derived from the extreme thermophilic bacterium *Rhodothermus obamensis* STB05 (Ro-GBE) was used for the purpose of catalyzing the highly branching modification of tapioca starch. The effects of this modification on the molecular structure, stability, and *in vitro* digestibility of cassava starch were systematically investigated. The results showed that after modification with an enzyme dosage of 100 U/g and a reaction time of 12 h, the resulting product exhibited an α-1,6 glycosidic bond ratio of 7.85%, which represents an increase of 152.41% over that of native tapioca starch. Additionally, the ratio of long-chain molecules in the modified starch decreased, while the short-chain proportion increased, and the

基金项目:国家“十四五”重点研发计划项目(2022YFF1100605);国家自然科学基金青年基金项目(32302011);江苏省科技计划青年基金项目(BK20221074);江苏省重点研发计划(现代农业)项目(BE2022323);江苏省卓越博士后计划项目(2022ZB491)。

通信作者:孔昊存(1993—),男,博士,助理研究员,主要从事淀粉生物技术研究。E-mail: haocunkong@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2023-06-27 **修回日期:**2023-08-15

average chain length was reduced. Furthermore, stability tests on tapioca starch paste indicated that the highly branched modification improved properties such as solubility, precipitation stability, transparency stability, and freeze-thaw stability. The results from the *in vitro* digestion experiments revealed a reduction in the digestibility of the modified starch. These findings provide a preliminary theoretical basis for biological modification of tapioca starch and its industrial application.

Keywords: tapioca starch; high branching modification; molecular structure; stability; digestibility

木薯淀粉作为重要的生产原料，已被广泛应用于食品、化工、医药等众多领域[1-3]。与其他来源的淀粉相比，木薯淀粉具有价格低、非粮食作物、成膜性好、支链淀粉质量分数高、糊化温度低、渗透性强、蛋白质质量分数低、糊液透明度高等优点[1-2,4]。但天然木薯淀粉在抗剪切性、耐酸性和耐高温等方面存在不足，难以满足现代新型食品加工与运输环节的要求，需要对其进行改性处理[5]。常见改性方法包括物理法、化学法、生物法以及复合改性法[6]。其中，酶法改性因环保安全、副产物少、产物得率高等优点而成为淀粉改性领域研究的热点[7-8]。

淀粉分支酶（EC 2.4.1.18）是一种糖基转移酶，来源于α-淀粉酶家族[9-10]，可催化淀粉分子中的α-1，4糖苷键水解形成寡糖片段，产生具有非还原性末端的短链，通过转糖苷作用将短链的非还原性末端从C4转移至C6上，并脱去一分子水，形成α-1，6糖苷键，使淀粉分子的分支化程度增加，平均链长减小[11]。Takata 等[12]采用来源于 *Bacillus stearothermophilus* TRBE14的淀粉分支酶制备高支化糊精，与天然糊精相比，这种高支化糊精黏度更低、稳定性和水溶性更好，可以广泛应用于食品工业领域。Shim 等[13]采用来源于 *Acidothermus cellulolyticus* 11B的淀粉分支酶作用于玉米淀粉，提高了慢消化淀粉的含量。Lee等[14]证明了来源于 *Geobacillus thermoglucosidans* STB02的淀粉分支酶能够明显提高玉米淀粉的抗回生性能，并发现改性产物的回生性能与其直链淀粉质量分数及平均链长有关。

目前，国内外对淀粉分支酶改性淀粉的研究已取得了一定成果，与其他来源的淀粉分支酶相比，*Rhodothermus obamensis* 来源的淀粉分支酶具有较好的热稳定性和工业应用潜力。因此，采用来源于 *R. obamensis* STB05的淀粉分支酶对木薯淀粉进行高支化修饰，系统分析高支化木薯淀粉的分子结构和理化性质，并探究分子结构和理化性质之间的构效关系，对于弥补天然木薯淀粉的不足，拓宽木薯淀粉的工业应用范围具有重要意义，有助于提高淀粉资源深加工的经济效益。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

木薯淀粉（水分质量分数12.63%）：中国嘉吉公司；淀粉葡萄糖苷酶（A7095，EC 3.2.1.3）、异淀粉酶（I5284，EC 3.2.1.68，3.0×10^6 U/mg）、胰酶（P7545）、重水：美国Sigma公司；重组淀粉分支酶（来源于 *R. obamensis* STB05）：作者所在课题组自制并保藏；普鲁兰酶：日本天野公司；其余试剂（分析纯）：国药集团化学试剂有限公司。

1.2 方法

1.2.1 高支化木薯淀粉的制备

将木薯淀粉溶于水配制成5 g/L（以干质量计）的淀粉乳，用1 mol/L的NaOH溶液将pH调至7.0。温度升高至95 ℃并维持30 min，糊化后的木薯淀粉降温至65 ℃，保温30 min。随后分别添加10、20、30、50、100 U/g淀粉分支酶（以干质量计）并分别反应0、2、4、6、8、12 h。反应结束后，沸水浴30 min灭酶。

灭酶后的样品溶液于37 ℃保温10 min，然后加入10 000 U/g异淀粉酶及6 000 U/g普鲁兰酶脱支24 h。沸水浴30 min灭酶，冷却至室温，10 000 r/min离心10 min取上清液，采用3，5-二硝基水杨酸（DNS）法测定体系中还原糖质量分数，并计算葡萄糖当量（DE）值。

1.2.2 透光率测定

将分光光度计波长调至620 nm，用去离子水校零，测定原淀粉及各样品溶液（5 g/L，以干质量计）的透光率。

1.2.3 最适加酶量下高支化木薯淀粉的制备

参照1.2.1的方法，淀粉分支酶添加量为100 U/g，分别反应0、2、4、6、8、12 h。样品灭酶后

冷冻干燥72 h，研磨后过100目筛，分别命名为R_0、R_2、R_4、R_6、R_8、R_{12}。

1.2.4 溶解度测定

分别称取0.05 g预糊化木薯淀粉（对照组）及改性样品，加入适量去离子水，沸水浴30 min，自然冷却。后续步骤参照GB5009.3——2016《食品安全国家标准 食品中水分的测定》中的烘箱法进行，溶解度计算见公式（1）。

$$X_1=(m_1-m_2)/(m_1-m_0)\times 100\% \quad (1)$$

式中：

X_1——样品的溶解度，%；

m_0——质量恒定后空铝盒和盖的总质量，g；

m_1——干燥前装有样品的铝盒和盖的总质量，g；

m_2——干燥后装有样品的铝盒和盖的总质量，g。

1.2.5 凝沉性测定

分别称取一定质量的预糊化木薯淀粉（对照组）及改性样品，配制为5 g/L（以干质量计）的木薯淀粉水溶液，糊化30 min。冷却后在4 ℃下静置2周，以10 000 r/min离心30 min，弃去上清液，测定沉淀物质量，以沉淀物质量分数表征凝沉性，计算方法见公式（2）。

$$X_2=(m_4-m_5)/m_3\times 100\% \quad (2)$$

式中：

X_2——样品的凝沉性，%；

m_3——试样的质量，g；

m_4——倒掉上清液后离心管和沉淀物的总质量，g；

m_5——离心管的质量，g。

1.2.6 糊液透明度稳定性测定

分别称取1 g（以干质量计）预糊化木薯淀粉（对照组）及改性样品于40 mL样品瓶中，加入20 mL去离子水，沸水浴30 min。糊化结束后转移至4 ℃冰箱储存，每隔一段时间取样测定透光率。测定波长为620 nm，用去离子水校零。

1.2.7 冻融稳定性测定

分别称取一定量的预糊化木薯淀粉（对照组）及改性样品，配制为5 g/L（以干质量计）的木薯淀粉水溶液，糊化30 min。称取2 g溶液转移至5 mL离心管中，测定总质量。将离心管在−18 ℃冷冻22 h，30 ℃下解冻2 h，此为一次冻融循环，溶液经历5次冻融循环后，在3 500 r/min离心30 min，弃去上清液，称取离心管及沉淀物总质量。样品的沉淀析出率见式（3）。

$$X_3=(m_8-m_6)/(m_7-m_6)\times 100\% \quad (3)$$

式中：

X_3——样品的沉淀析出率，%；

m_6——离心管的质量，g；

m_7——离心管和样品的总质量，g；

m_8——倒掉上清液后离心管和沉淀物的总质量，g。

1.2.8 体外消化性能测定

淀粉体外模拟消化参照Englyst等[15]的方法并适当修改。分别称取0.3 g预糊化木薯淀粉（对照组）及改性样品，加入10 mL乙酸钠缓冲液（0.25 mol/L）。样品经糊化处理后，加入25 mg瓜尔胶和15颗玻璃珠（d=5 mm），混合均匀。加入2.5 mL混酶液（167 U/g糖化酶和6.45×10^4 U/g胰淀粉酶），在37 ℃水浴条件下反应。

分别于反应20、120 min时取125 μL反应液于5 mL去离子水中混匀，沸水浴30 min灭酶。5 000 r/min离心5 min，取50 μL上清液用GOPOD显色法测定样品的葡萄糖质量分数。样品中快消化淀粉（RDS）、慢消化淀粉（SDS）及抗性淀粉（RS）的质量分数计算参照公式（4）~（6）。

$$\omega_{RDS}=G_{20}\times 0.9\times 100\% \quad (4)$$

$$\omega_{SDS}=(G_{120}-G_{20})\times 0.9\times 100\% \quad (5)$$

$$\omega_{RS}=100-\omega_{RDS}-\omega_{SDS} \quad (6)$$

式中：

ω_{RDS}——RDS质量分数，%；

ω_{SDS}——SDS质量分数，%；

ω_{RS}——RS质量分数，%；

G_{20}——淀粉酶水解20 min后产生的葡萄糖质量分数，mg/mg；

G_{120}——淀粉酶水解120 min后产生的葡萄糖质量分数，mg/mg。

1.2.9 α-1,6糖苷键摩尔分数测定

预糊化木薯淀粉（对照组）及改性样品溶解于重水中，形成质量浓度为40 mg/mL的淀粉乳，沸水糊化30 min。糊化后的样品冻干后再次溶于重水。通过^{1}H-NMR测定样品的α-1,6糖苷键摩尔分数，测试条件及相关计算方法参照文献[16]。

1.2.10 链长分布测定

分别称取 10 mg 预糊化木薯淀粉（对照组）及改性样品，加入 2 mL 醋酸钠缓冲液（50 mmol/L，pH 3.5），沸水浴 30 min 使其分散，然后置于 37 ℃保温 15 min，加入 10 000 U/g 异淀粉酶及 6 000 U/g 普鲁兰酶，于 37 ℃脱支 24 h，沸水浴 30 min 灭酶，10 000 r/min 离心 10 min，取上清液过 0.22 μm 水系滤膜，采用高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测器（HPAEC-PAD）测定样品链长分布。检测条件参照文献[17]，平均链长的计算见公式（7）。

$$L_{CL}=\sum_{i=1}^{n}\left(N_{DPi}\times M_{DPi}\right) \quad (7)$$

式中：

L_{CL}——平均链长，以葡萄糖单元数计；

N_{DPi}——聚合度，以葡萄糖单元数计；

M_{DPi}——聚合度为 i 的链段摩尔分数，%。

1.2.11 β-淀粉酶水解率

用 40 mmol/L 磷酸盐缓冲液（pH 5.50）配制质量浓度为 5 mg/mL 的淀粉溶液，沸水浴加热糊化 30 min。60 °C 水浴保温 10 min，加入 100 U/mL β-淀粉酶，反应 24 h 后在沸水中灭酶 20 min。冷却至室温后用 DNS 法测定水解液中麦芽糖质量，计算方法见公式（8）~（10）。

$$\omega_{DBL}=m/m_T\times 100\% \quad (8)$$

$$L_{ECL}=L_{CL}\times\omega_{DBL}+1.5 \quad (9)$$

$$L_{LCL}=L_{CL}-L_{ECL}-1 \quad (10)$$

式中：

ω_{DBL}——β-淀粉酶水解率，%；

m——还原糖（以麦芽糖计）质量，mg；

m_T——总糖质量，mg；

L_{ECL}——平均外链长，以葡萄糖单元数计；

L_{CL}——平均链长，以葡萄糖单元数计；

L_{LCL}——平均内链长，以葡萄糖单元数计。

1.2.12 碘结合力的分析

称取 10 mg 预糊化木薯淀粉（对照组）及改性样品，加入 2 mL 去离子水，沸水浴 30 min。冷却后移取 200 μL 样品至 4.55 mL 去离子水中，加入 250 μL 碘液（KI 和 I_2 的质量分数分别为 0.2% 和 0.02%），充分混匀。避光静置 15 min 后于 400~850 nm 进行全波长扫描。

1.2.13 数据处理与分析

结果取 3 次测定的平均值，数据以平均值±标准偏差表示。选用 SPSS 17.0 软件对数据进行 Pearson 相关性分析。采用 Origin 2018 软件进行数据处理和绘图。

2 结果与讨论

2.1 反应条件对木薯淀粉高支化修饰效果的影响

淀粉分支酶最适 pH 为 7.0，最适反应温度为 65 ℃。在此条件下，综合考虑生产成本和效率，控制加酶量分别为 10、20、30、50、100 U/g，反应时间分别为 0、2、4、6、8、12 h，探究两种反应条件对木薯淀粉高支化修饰效果的影响。

2.1.1 高支化修饰程度分析

采用异淀粉酶和普鲁兰酶协同处理，将高支化修饰产物进行彻底脱支，再通过 DNS 法进行定量分析。淀粉分支酶添加量不同时，木薯淀粉的 DE 值见图 1。木薯淀粉脱支后，DE 值均有增加。反应时间为 2 h 时，10 U/g 加酶量下，DE 值较对照组增加了 0.109 4；100 U/g 加酶量下，DE 值较对照组增加了 0.538 7，说明木薯淀粉的分支程度也随之增加。木薯淀粉脱支后，DE 值与加酶量呈正相关；在淀粉分支酶添加量为 100 U/g 时，高支化木薯淀粉脱支后的 DE 值最高，即分支度最高。

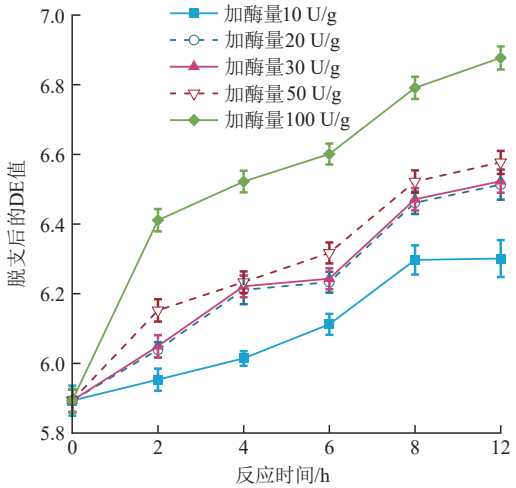


图 1 加酶量对木薯淀粉高支化修饰程度的影响

Fig. 1 Effect of GBE dosage on the degree of highly branched modification of tapioca starch

2.1.2 糊液透光率分析

各加酶量下高支化修饰木薯淀粉在波长 620 nm 处的透光率如图 2 所示。对照组的透光率较低，只有 71.2%。相较于对照组，各处理组的透光率均有明显提升，且提升效果与反应时间呈正相

关。当反应时间为2 h时，高支化修饰木薯淀粉溶液的透光率显著增加；但继续延长反应时间，高支化修饰木薯淀粉透光率的波动幅度趋于稳定。加酶量为100 U/g时，高支化修饰木薯淀粉透光率的改善效果最为明显。

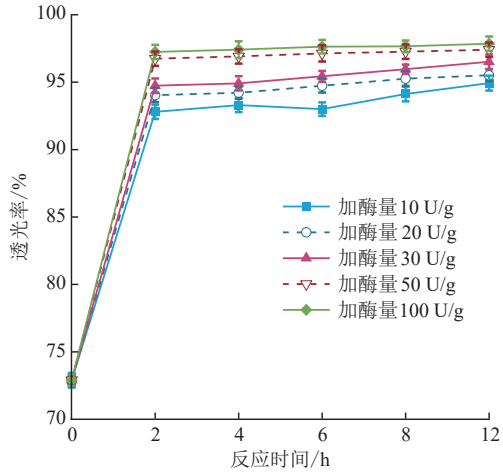


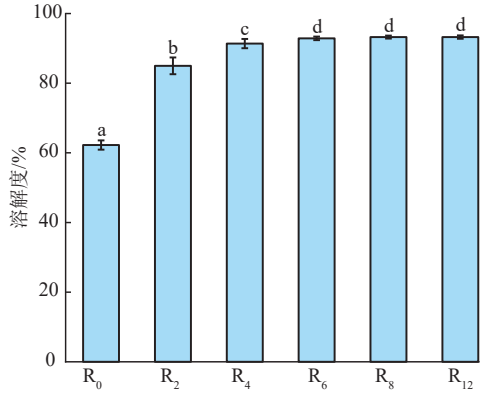
图2　加酶量对高支化修饰木薯淀粉透光率的影响

Fig. 2　Effect of GBE dosage on transmittance of highly branched modifide tapioca starch

2.2　高支化修饰对木薯淀粉性质的影响

2.2.1　溶解度分析

木薯淀粉经过高支化修饰后，淀粉分子结构发生了变化，糊化之后的溶解度也会随之改变。图3为淀粉分支酶作用不同时间后木薯淀粉的溶解度。预糊化木薯淀粉溶解度较低，仅有62.25%，而经不同时长的高支化修饰后，所得木薯淀粉的溶解度较预糊化木薯淀粉均有大幅度提升，高支化修饰时间为2、4、6、8、12 h的木薯淀粉的溶解度较对照组分别提升了36.51%、46.80%、49.19%、49.78%和49.76%。可见，在一定反应时间内，高支化修饰对木薯淀粉溶解度的改善效果随反应时间增加而增加，在反应前期，改善效果比较明显，反应后期改善效果变缓，最后趋于稳定。



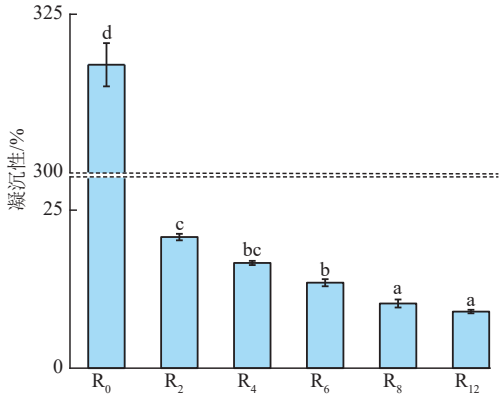
R_0、R_2、R_4、R_6、R_8、R_{12}分别表示木薯淀粉经GBE改性0、2、4、6、8、12 h后所得产物；不同小写字母表示差异显著（$P<0.05$）。

图3　淀粉分支酶作用不同时间后木薯淀粉的溶解度

Fig. 3　Solubility of tapioca starch after different durations of GBE modification

2.2.2　凝沉性分析

预糊化木薯淀粉溶液在储存过程中发生沉降是其凝沉性最直观的表现，将经过不同改性时间的样品溶液在4 ℃下静置2周后，测定沉淀物质量分数，以此表征淀粉溶液的凝沉性，结果见图4。预糊化木薯淀粉溶液的凝沉性为317.01%，这可能是存放时间较长，木薯淀粉吸水所致。经淀粉分支酶改性后，高支化修饰木薯淀粉溶液凝沉性显著减弱，且随改性时间的延长其减弱程度越来越大，改性时间为12 h的木薯淀粉溶液的凝沉性仅为8.95%，说明淀粉分支酶改性减弱了预糊化木薯淀粉溶液的凝沉性，使其稳定性增加。



R_0、R_2、R_4、R_6、R_8、R_{12}分别表示木薯淀粉经GBE改性0、2、4、6、8、12 h后所得的产物；不同小写字母表示差异显著（$P<0.05$）。

图4　淀粉分支酶作用不同时间后木薯淀粉的凝沉性

Fig. 4　Condensation of tapioca starch after different durations of GBE modification

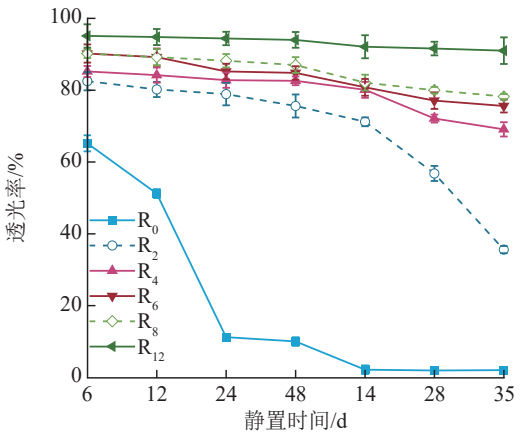
2.2.3　透明度稳定性分析

在分析高支化修饰对木薯淀粉溶液透光率影响的基础上，进一步分析储存时间对溶液透光率的影响，结果如图5所示。预糊化木薯淀粉在4 ℃下储存6 d后，透光率已降低到接近60%，溶液呈现浑浊状态；而高支化修饰时间为2、4、6、8、12 h的样品溶液静置6 d后，透光率均高于80%，且在

静置时间为35 d时，仍有较高的透光率，可见高支化修饰对木薯淀粉的透光率起到了明显的改善作用。高支化修饰时间为12 h时，对木薯淀粉溶液透光率的改善效果最好。

2.2.4 冻融稳定性分析

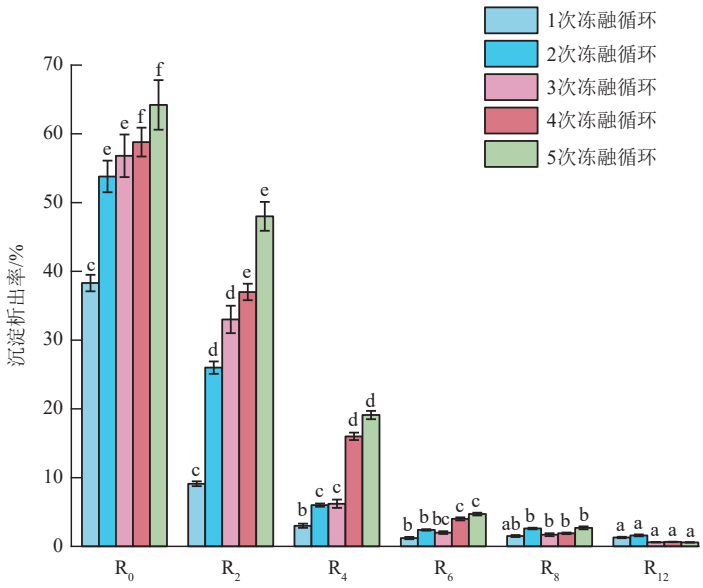
木薯淀粉溶液在冻融循环过程中的稳定性可用沉淀析出率表示，沉淀析出率越低，冻融稳定性越好。各组木薯淀粉经1~5次冻融循环后的沉淀析出率见图6。在每次冻融循环过程中，预糊化木薯淀粉均大量析出，说明木薯原淀粉的冻融稳定性很差。经淀粉分支酶改性后，木薯淀粉的冻融稳定性明显增强，说明高支化修饰对冻融稳定性有明显的改善作用，且效果随高支化修饰时间的延长而提升。反应时间为12 h的高支化修饰木薯淀粉几乎没有析出。高支化修饰木薯淀粉的分子具有较强的空间位阻作用，故其在冻融过程中的回生受到抑制[18]，难以形成长而紧密的平行氢键链，因此无法形成固定晶格或硬凝胶，冻融稳定性较好[19]。



R_0、R_2、R_4、R_6、R_8、R_{12}分别表示木薯淀粉经GBE改性0、2、4、6、8、12 h后所得的产物。

图5 淀粉分支酶作用不同时间后木薯淀粉的透明度稳定性

Fig. 5 Transmittance stability of tapioca starch after different durations of GBE modification



R_0、R_2、R_4、R_6、R_8、R_{12}分别表示木薯淀粉经GBE改性0、2、4、6、8、12 h后所得的产物；不同小写字母表示差异显著（$P<0.05$）。

图6 淀粉分支酶作用不同时间后木薯淀粉的冻融稳定性

Fig. 6 Freeze-thaw stability of tapioca starch after different durations of GBE modification

2.3 高支化修饰对木薯淀粉体外消化性能的影响

为了评价高支化修饰木薯淀粉的消化性能，测定了高支化修饰后RDS、SDS和RS的质量分数，表1显示了淀粉分支酶作用不同时间后木薯淀粉的体外消化情况。淀粉分支酶改性处理可有效改善木薯淀粉的消化性能。改性处理后，高支化修饰木薯淀粉RDS质量分数均降低，SDS及RS质量分数均增加。在反应时间为12 h时，高支化修饰木薯淀粉RDS质量分数最低，为64.54%，与对照组相比降低了23.47%，且SDS及RS质量分数最高，为25.72%及9.73%，较对照组分别增加了116.86%和155.38%。

2.4 高支化修饰对木薯淀粉分子结构的影响

2.4.1 α-1,6糖苷键摩尔分数分析

采用^{1}H-NMR分析高支化修饰木薯淀粉样品，

表1　淀粉分支酶作用不同时间后木薯淀粉的体外消化特性

Table 1　*In vitro* digestibility of tapioca starch after different durations of GBE modification

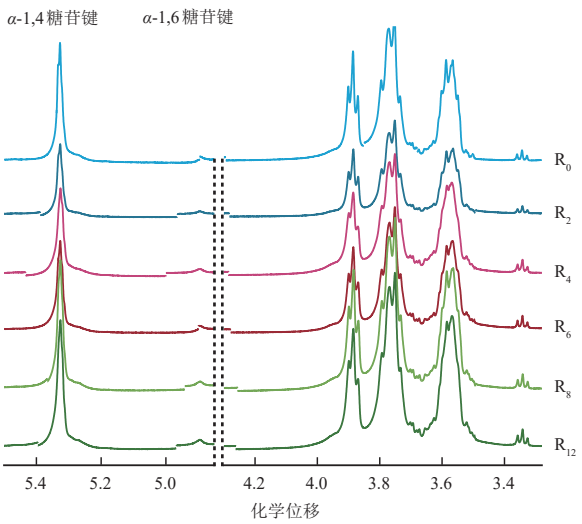
样品	RDS质量分数/%	SDS质量分数/%	RS质量分数/%
R_0	84.33±0.65^a	11.86±1.35^d	3.81±1.01^d
R_2	73.00±0.50^a	20.44±0.92^c	6.56±0.56^c
R_4	72.47±0.39^b	20.90±0.87^c	6.62±0.77^c
R_6	68.74±1.34^b	24.18±1.62^b	7.08±0.54^c
R_8	66.25±0.86^c	24.91±1.44^a	8.80±0.78^b
R_{12}	64.54±0.77^d	25.72±1.78^a	9.73±0.98^a

注：R_0、R_2、R_4、R_6、R_8、R_{12}分别表示木薯淀粉经GBE改性0、2、4、6、8、12 h后所得的产物；同一列中不同字母表示组间存在显著差异（P<0.05）。

结果如图7所示。根据α-1,4糖苷键与α-1,6糖苷键分别于5.37×10^{-6}和4.95×10^{-6}化学位移处的峰面积，计算样品的α-1,6糖苷键摩尔分数，结果如图8所示。在淀粉分支酶添加量为100 U/g时，各样品中α-1,6糖苷键的摩尔分数较木薯原淀粉均有增加，反应时间为2、4、6、8、12 h的样品中，α-1,6糖苷键摩尔分数较木薯原淀粉分别增加了47.59%、62.70%、78.14%、130.87%和152.41%。其中，反应时间为12 h的木薯淀粉高支化效果最好。

2.4.2　链长分布分析

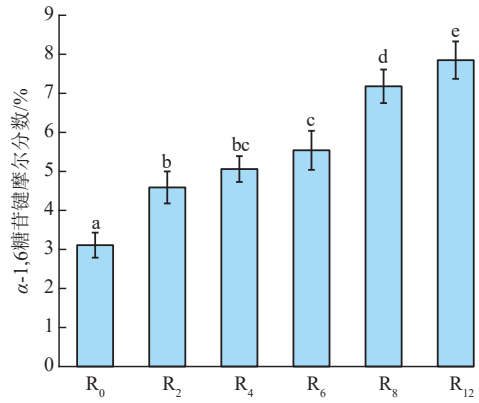
通过测定线性链段的链长分布情况可以反映高支化修饰木薯淀粉的精细结构。在不同高支化



R_0、R_2、R_4、R_6、R_8、R_{12}分别表示木薯淀粉经GBE改性0、2、4、6、8、12 h后所得的产物。

图7　淀粉分支酶作用不同时间后木薯淀粉的^{1}H-NMR谱图

Fig. 7　^{1}H-NMR spectrum of tapioca starch after different durations of GBE modification



R_0、R_2、R_4、R_6、R_8、R_{12}分别表示木薯淀粉经GBE改性0、2、4、6、8、12 h后所得的产物；不同小写字母表示差异显著（P<0.05）。

图8　淀粉分支酶作用不同时间后木薯淀粉中α-1,6糖苷键的摩尔分数

Fig. 8　Molar fraction of α-1,6 glycosidic bonds in tapioca starch after different durations of GBE modification

改性时间下，木薯淀粉的链长分布见表2。经淀粉分支酶改性后，木薯淀粉聚合度（DP）<13的链段占比显著提高，其余链段占比均降低。改性12 h后，DP<13的链段占比由原木薯淀粉的34.56%提高至51.37%。这说明使用淀粉分支酶对木薯淀粉改性的过程中，会水解较长的链段，生成更多短链（DP<13）。

表2　淀粉分支酶作用不同时间后木薯淀粉的链长分布

Table 2　Chain length distribution of tapioca starch after different durations of GBE modification

样品	链长分布/%			
	DP<13	DP 13~24	DP 25~36	DP>37
R_0	34.56±0.25^a	45.65±0.14^e	14.03±0.11^e	5.80±0.24^d
R_2	38.35±0.17^b	43.82±0.08^d	13.59±0.00^d	4.23±0.21^c
R_4	40.58±0.21^c	42.10±0.01^c	13.28±0.08^d	4.04±0.16^c
R_6	41.90±0.18^d	40.92±0.06^b	12.65±0.20^c	4.53±0.17^c
R_8	45.32±0.11^e	40.17±0.10^b	11.69±0.12^b	2.83±0.13^b
R_{12}	51.37±0.09^f	38.01±0.13^a	9.12±0.16^a	1.51±0.19^a

注：R_0、R_2、R_4、R_6、R_8、R_{12}分别表示木薯淀粉经GBE改性0、2、4、6、8、12 h后所得的产物；同一列中的不同字母表示组间差异显著（P<0.05）。

2.4.3　β-淀粉酶水解率及平均内/外链长分析

通过DNS法测定反应后麦芽糖的质量可计算改性前后木薯淀粉样品的β-淀粉酶水解率，并进一步计算平均链长及平均内/外链长[20-21]，结果如表3所示。木薯淀粉经淀粉分支酶改性后，β-淀粉

酶水解率显著降低，当改性 12 h 时，样品的 β-淀粉酶水解率与对照组相比降低了 18.93%。根据淀粉分支酶及 β-淀粉酶的作用机理，推测是因为淀粉分支酶作用于木薯淀粉后，提高了样品的分支度，分支点数量增加，导致 β-淀粉酶作用减弱。根据样品的 β-淀粉酶水解率及平均链长，计算平均内/外链长。样品的平均外链长降低，平均内链长增加，说明淀粉分支酶作用于木薯淀粉时，倾向于将所得链段以分支的形式连接至外链上，生成短簇状分支结构[21-22]。

表 3　淀粉分支酶作用不同时间后木薯淀粉的 β-淀粉酶水解率、平均链长及平均内/外链长

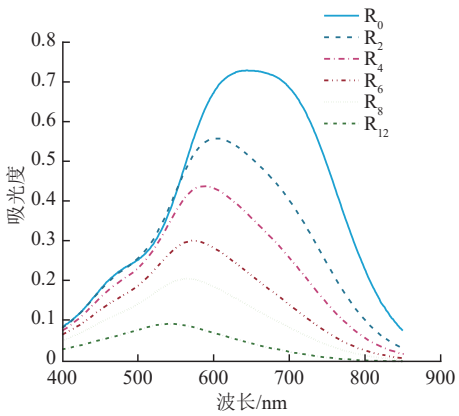
Table 3　β-amylase hydrolysis rate, average chain length, average inner chain length and average outer chain length of tapioca starch after different durations of GBE modification

样品	β-淀粉酶水解率/%	平均链长	平均外链长	平均内链长
R_0	66.38±0.35^f	18.06±0.15^d	13.49±0.35^e	3.57±0.31^a
R_2	60.97±0.46^e	17.07±0.35^c	11.91±0.36^d	4.16±0.28^b
R_4	56.23±0.34^d	16.70±0.27^c	10.89±0.26^c	4.81±0.08^c
R_6	54.67±0.56^c	16.15±0.28^c	10.33±0.46^c	4.82±0.06^c
R_8	50.34±0.25^b	15.57±0.09^b	9.34±0.24^b	5.23±0.25^d
R_{12}	47.45±0.56^a	14.15±0.45^a	8.21±0.02^a	5.30±0.16^d

注：R_0、R_2、R_4、R_6、R_8、R_{12} 分别表示木薯淀粉经 GBE 改性 0、2、4、6、8、12 h 后所得的产物；同一列中的不同字母表示组间差异显著（P<0.05）。

2.4.4　碘结合能力分析

碘可以结合 DP>12 的寡糖链，且颜色与聚合度有关，淀粉和碘的结合能力可以反映其分子结构[21-22]。对高支化修饰木薯淀粉-碘结合物进行全波长扫描，结果如图 9 所示。经分支酶改性后的木薯淀粉峰高均降低，最大吸收波长明显左移，且最大吸收波长的左移程度随着反应时间的增加而增加。表明淀粉分支酶处理后，产物结构更趋于分支化。这一现象也说明，淀粉分支酶能够改变木薯淀粉分子的结构，有效提升木薯淀粉分子的分支程度，且对木薯淀粉分子的作用效果与改性时间呈正相关。



R_0、R_2、R_4、R_6、R_8、R_{12} 分别表示木薯淀粉经 GBE 改性 0、2、4、6、8、12 h 后所得的产物。

图 9　淀粉分支酶作用不同时间后木薯淀粉-碘结合物的可见光吸收曲线

Fig. 9　Visible light absorption curves of tapioca starch-iodine conjugate after different durations of GBE modification

2.5　高支化修饰后木薯淀粉理化性质与分子结构的相关性

通过建立 Pearson 线性关系模型对淀粉分支酶改性前后木薯淀粉的稳定性与分子结构进行相关性分析，结果如表 4 所示。高支化修饰后木薯淀粉的透明度稳定性与 DP<13 的链段占比、平均内链长呈显著正相关，与平均链长、平均外链长呈显著负相关；冻融稳定性与平均链长、平均

表 4　高支化修饰木薯淀粉稳定性与分子结构的相关性

Table 4　Correlation between stability and molecular structure of highly branched modified tapioca starch

性质	α-1,6 糖苷键摩尔分数	DP<13 的链段占比	平均链长	平均外链长	平均内链长
溶解度	0.799	0.742	−0.759	−0.849*	0.929**
凝沉性	−0.713	−0.651	0.671	0.755	−0.835*
透明度稳定性	0.914**	0.892*	−0.901*	−0.961**	0.961**
冻融稳定性	−0.895*	−0.861*	0.871*	0.940**	−0.964**
RDS 质量分数	−0.939**	−0.895*	0.910*	0.955**	−0.923**
SDS 质量分数	0.903*	0.853*	−0.873*	−0.929**	0.925**
RS 质量分数	0.987**	0.958**	−0.961**	−0.976**	0.876*

注：**代表在 P<0.01 的水平上极显著相关；*代表在 P<0.05 的水平上显著相关。

外链长呈显著正相关，与DP<13的链段占比、平均内链长呈显著负相关；溶解度与平均内链长呈显著正相关，与平均外链长呈显著负相关；凝沉性与平均内链长呈显著负相关。由于上述性质均与平均内链长具有显著相关性，因此推断，淀粉分支酶通过转糖苷作用提高木薯淀粉的分支度，且在转移链段过程中倾向于将所得链段以分支的形式连接至外链上，生成短簇状分支结构，空间位阻增大，分子间缔合减少，不易聚合沉淀，抑制木薯淀粉回生，从而使得木薯淀粉的透光率、溶解度、冻融稳定性增强，凝沉性明显降低[17,23]。

RDS质量分数与DP<13的链段占比及平均内链长呈显著负相关，与平均链长及平均外链长呈显著正相关。一方面，高支化修饰后，转糖苷作用使直链淀粉质量分数降低，分支度增加，淀粉空间位阻增强，阻碍淀粉消化；另一方面，高支化修饰后短链（DP<13）占比及平均内链长增加，平均外链长减小，淀粉分子趋于短簇状结构[24]。这些变化不仅阻碍了胰酶水解，而且降低了消化酶作用的连续性，使消化速率降低。此外，高支化修饰过程还生成了部分环状聚合物，因这一聚合物不存在还原性末端，故一定程度上能够延缓消化酶的水解作用[21-22]。

3 结论

采用来源于*R. obamensis* STB05的淀粉分支酶对木薯淀粉进行高支化修饰，并对产物的分子结构和理化性质进行了分析。结果显示，高支化改性后，木薯淀粉的α-1,6糖苷键摩尔分数、分支度均随修饰时间增加而增加，平均链长随修饰时间增加而明显降低；产物的溶解度、凝沉性、透光率及冻融稳定性均有明显改善，且RDS质量分数较低，SDS及RS质量分数均增加。该研究结果为木薯淀粉生物改性及其工业应用提供了理论依据。

参考文献

[1] ABAD M C，BINDERUP K，RIOS-STEINER J，et al. The X-ray crystallographic structure of *Escherichia coli* branching enzyme[J]. Journal of Biological Chemistry，2002，277(44)：42164-42170.

[2] PAL K，KUMAR S，SHARMA S，et al. Crystal structure of full-length *Mycobacterium* tuberculosis H37Rv glycogen branching enzyme：insights of N-terminal beta-sandwich in substrate specificity and enzymatic activity[J]. Journal of Biological Chemistry，2010，285(27)：20897-20903.

[3] 李书华，李红艳. 薯类淀粉加工新模式：“移动方箱”[J]. 粮食与油脂，2016，29(1)：60-61.
LI S H，LI H Y. A new model of potato starch processing：“mobile box”[J]. Cereals & Oils，2016，29(1)：60-61.(in Chinese)

[4] 李岫怡，杨桂芹，郭东新. 不同来源淀粉的组成、结构及其在动物生产上的应用研究进展[J]. 动物营养学报，2019，31(3)：1053-1060.
LI X Y，YANG G Q，GUO D X. Research progress on composition，structure and application of different starch sources in animal production[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition，2019，31(3)：1053-1060.(in Chinese)

[5] 王晨曦，黎庆涛，王远辉，等. 木薯淀粉改性方法的研究进展[J]. 轻工科技，2017，33(2)：3-6.
WANG C X，LI Q T，WANG Y H，et al. Research progress on modification methods of cassava starch[J]. Light Industry Science and Technology，2017，33(2)：3-6.(in Chinese)

[6] 刘义军，朱德明，黄茂芳，等. 不同改性方法对木薯淀粉结构的影响[J]. 食品工业，2014，35(10)：115-117.
LIU Y J，ZHU D M，HUANG M F，et al. Effects of different modification on granule structure of cassava starch[J]. The Food Industry，2014，35(10)：115-117.(in Chinese)

[7] YANG W K，SU L Q，WANG L，et al. Alpha-glucanotransferase from the glycoside hydrolase family synthesizes α(1-6)-linked products from starch：features and synthesis pathways of the products[J]. Trends in Food Science & Technology，2022，128：160-172.

[8] 李兆丰，孔昊存，刘延峰，等. 未来食品：机遇与挑战[J]. 中国食品学报，2022，22(4)：1-13.
LI Z F，KONG H C，LIU Y F，et，al. Future foods：opportunity and challenge[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology，2022，22(4)：1-13.(in Chinese)

[9] HENRISSAT B，BAIROCH A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases[J]. Biochemical Journal，1996，316(2)：695-696.

[10] PALOMO M，PIJNING T，BOOIMAN T，et al. *Thermus thermophilus* glycoside hydrolase family 57 branching enzyme：crystal structure，mechanism of action，and products formed[J]. Journal of Biological Chemistry，2011，286(5)：3520-3530.

[11] TETLOW I J，EMES M J. A review of starch-branching enzymes and their role in amylopectin biosynthesis[J]. IUBMB Life，2014，66(8)：546-558.

[12] TAKATA H，TAKAHA T，NAKAMURA H，et al. Production and some properties of a dextrin with a narrow size distribution by the cyclization reaction of branching enzyme[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering，1997，84(2)：119-123.

[13] SHIM Y E，SONG Y B，YOO S H，et al. Production of highly branched α-limit dextrins with enhanced slow digestibility by various glycogen-branching enzymes[J]. Carbohydrate Polymers，2023，310：120730.

[14] LEE B H，YAN L K，PHILLIPS R J，et al. Enzyme-synthesized highly branched maltodextrins have slow glucose generation at the mucosal α-glucosidase level and are slowly digestible *in vivo*[J]. PLoS ONE，2013，8(4)：e59745.

[15] ENGLYST H N，HUDSON G J. The classification and measurement of dietary carbohydrates[J]. Food Chemistry，1996，57(1)：15-21.

[16] 任俊彦. 淀粉的高支化修饰及其产物的消化性能研究[D]. 无锡：江南大学，2018.

[17] 李雯雯. 玉米淀粉的高支化改性及其对回生性质的影响[D]. 无锡：江南大学，2016.

[18] QIAO L，GU Q，CHENG H N. Enzyme-catalyzed synthesis of hydrophobically modified starch [J]. Carbohydrate Polymers，2006，66：135-140.

[19] LIU Y F，CHEN J，WU J Y，et al. Modification of retrogradation property of rice starch by improved extrusion cooking technology [J]. Carbohydrate Polymers，2019，213：192-198.

[20] KONG H C，YU L X，GU Z B，et al. Fine structure impacts highly concentrated starch liquefaction process and product performance [J]. Industrial Crops and Products，2021，164：113347.

[21] 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.

[22] YU L X，KONG H C，GU Z B，et al. Two 1，4-α-glucan branching enzymes successively rearrange glycosidic bonds：a novel synergistic approach for reducing starch digestibility [J]. Carbohydrate Polymers，2021，262：117968.

[23] LI Y D，LI C M，GU Z B，et al. Effect of modification with 1，4-α-glucan branching enzyme on the rheological properties of cassava starch[J]. International Journal of Biological Macromolecules，2017，103：630-639.

[24] 陈园荟，纪杭燕，邱超，等. 酶法制备低热量淀粉及其衍生物的研究进展[J]. 食品与生物技术学报，2022，41(11)：31-39.
CHEN Y H，JI H Y，QIU C，et al. Research progress in enzymatic preparation of low calorie starch and its derivatives [J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2022，41(11)：31-39.(in Chinese)

（责任编辑：史润东东）

（上接第 9 页）

[52] TAHERI-GARAVAND A，FATAHI S，SHAHBAZI F，et al. A nondestructive intelligent approach to real-time evaluation of chicken meat freshness based on computer vision technique [J]. Journal of Food Process Engineering，2019，42(4)：13039.

[53] ALTMANN B A，GERTHEISS J，TOMASEVIC I，et al. Human perception of color differences using computer vision system measurements of raw pork loin[J]. Meat Science，2022，188：108766.

[54] GIROLAMI A，NAPOLITANO F，FARAONE D，et al. Measurement of meat color using a computer vision system[J]. Meat Science，2013，93(1)：111-118.

[55] SUN X，YOUNG J，LIU J H，et al. Prediction of pork color attributes using computer vision system[J]. Meat Science，2016，113：62-64.

[56] SÁNCHEZ C N，ORVAÑANOS-GUERRERO M T，DOMÍNGUEZ-SOBERANES J，et al. Analysis of beef quality according to color changes using computer vision and white-box machine learning techniques[J]. Heliyon，2023，9(7)：e17976.

[57] CAFFARINI J G，BRESOLIN T，DOREA J R R. Predicting ribeye area and circularity in live calves through 3D image analyses of body surface[J]. Journal of Animal Science，2022，100(9)：skac242.

（责任编辑：刘冬梅）