

几种测定香蕉抗性淀粉含量方法的比较*

程燕锋,王 娟,李尚新,郭卫芸,杨公明

(华南农业大学食品学院,广东广州,510642)

摘 要 抗性淀粉具有膳食纤维所不能及的生理功能和加工特性,是近年来变性淀粉和功能食品研究的热点,其定量分析方法目前仍没有统一的标准。文中选用了3种比较有代表性的抗性淀粉(RS)测定方法:TSA法、Berry法和Goni法,对青香蕉、生马铃薯和玉米淀粉3种原料中的RS和总淀粉含量的测定进行了比较。结果表明:Goni法模拟了人体胃肠道的生理条件,具有重复性好,操作简单等明显优势而更适合于富含抗性淀粉颗粒的青香蕉原料中RS含量的测定,用该法测得的RS含量为80.12%,其中RS2占96.63%。

关键词 青香蕉,抗性淀粉,定量测定方法

抗性淀粉(resistant starch,简称RS)不能被健康人体小肠所消化吸收,在大肠内能部分或全部被肠道微生物发酵,产一些气体和短链脂肪酸,起到预防肠道疾病、控制体重、预防糖尿病、降脂、促进无机盐的吸收利用和治疗腹泻等生理功能^[1]。食物中的RS可分四类:RS1,物理包埋淀粉;RS2,抗性淀粉颗粒;RS3,回生淀粉;RS4,化学改性淀粉。利用RS特有的生理功能和物理性质应用到食品工业中,以制成不同特色的功能食品和风味食品,如糖尿病食品和减肥食品等,都是当前抗性淀粉最具社会效益和经济效益的应用领域,也是近年变性淀粉研究的热点。

香蕉(musa nanalour)是区域生产、全球热销的大宗水果,除含有丰富的营养价值外,还有良好的保健功能^[2]。研究发现,青香蕉还富含抗消化淀粉颗粒(resistant starch granules, RS2),是天然RS含量最高的果蔬来源之一。香蕉抗性淀粉的研究开发不仅能达到产品增值、农民致富目的,而且对开发天然、价格低廉的抗性淀粉,有着重要意义^[6]。目前国外对香蕉抗性淀粉的研究不多^[3~5],国内华南农业大学等不多的几家单位在进行。关于RS的测定方法,国内外研究人员做了大量探索,并摸索出了一些有价值的方法,但到目前为止,仍没有统一、标准的RS定量方法,已有的数种测定方法结果差异较大,所以,单纯地把众多研究者关于RS含量的试验数据进行比较,既无可比性,也没有太大的实际意义^[7,8]。本文就存在的众多RS测定方法中,挑选3种有代表性的RS测定方法:TSA法、Berry法和Goni法,对青香蕉原料

进行RS定量分析,旨在探索出一种比较适合香蕉RS的定量分析方法,并研究了不同处理对香蕉RS的定量影响。

1 材料与方法

1.1 材 料

青香蕉:采购于番禺万顷沙香蕉园;生马铃薯和玉米淀粉:市售;中温 α -淀粉酶、糖化复合酶(糖化酶+普鲁兰酶):广州裕立宝生物科技有限公司;高温 α -淀粉酶由Novozymes公司提供;胰 α -淀粉酶、胃蛋白酶1:10 000,购于Sigma Chemical Co(St Louis, MO, USA)。

1.2 仪器、设备及试剂

HH-4数显恒温水浴锅(金坛市富华仪器有限公司),DS-1高速组织捣碎机(上海标本模型厂),PL203电子精密天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司),HZS-H水浴振荡器(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司),100目国家标准检验筛(浙江上虞市道墟五四仪器筛厂),TDL-5-A离心机(上海安亭科学仪器厂),752N紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)等。

KCl-HCl缓冲液、磷酸盐缓冲液、2 mol/L KOH溶液、4 mol/L KOH、2 mol/L HCl溶液等。

1.3 原料预处理

将青香蕉和生马铃薯去皮,无需护色加水直接打浆,所得浆液为实验所用。

1.4 香蕉抗性淀粉含量的测定

1.4.1 耐高温型 α -淀粉酶(TSA)法测定RS和非抗性淀粉含量

1.4.1.1 RS含量测定

称取一定量浆液,加入HCl-KCl缓冲溶液和一

第一作者:硕士研究生(杨公明教授为通讯作者)。

* 广东省农业攻关计划项目(No. 2006B20401005)。

收稿日期:2007-03-14,改回日期:2007-07-20

定量胃蛋白酶, 37℃保持 16 h (不断振荡), 调整 pH 后加入磷酸盐缓冲溶液和一定量耐高温 α -淀粉酶, 100℃恒温 30 min (不断振荡), 冷却至室温, 调整 pH 值后, 加入糖化复合酶, 60℃保持 1 h (不断振荡), 冷却, 加入 4 倍体积 95 % 乙醇, 混合均匀, 离心 (4 000 r/min, 30 min), 弃去上清液, 醇洗 3 次, 将沉淀物溶解于 4 mol/L KOH 溶液中, 用 HCl 溶液中和, 加入糖化复合酶, 60℃恒温 1 h (不断振荡), 离心 (4 000 r/min, 30 min), 收集上清液。对沉淀物至少水洗 3 次, 离心后合并上清液, 用水定容至 50 mL。用 DNS 法进行显色, 在 540 nm 处测其吸光度, 利用葡萄糖标准曲线计算出葡萄糖含量, 按公式计算: RS 含量 = 葡萄糖含量 \times 0.9。按上述方法制备空白对照 (调 pH, 但不加任何酶) 进行测定^[9]。

称入一定量浆液后第一步不加入胃蛋白酶外, 其余与上述操作相同, 以作对比。

1.4.1.2 非抗性淀粉含量测定

称取一定量试样, 加入 HCl-KCl 缓冲溶液, 加入胃蛋白酶, 37℃保持 16 h (不断振荡), 加入磷酸盐缓冲溶液和耐高温 α -淀粉酶, 100℃恒温 30 min (不断振荡), 冷却至室温, 调整 pH 值后, 加入糖化复合酶, 60℃保持 1 h (不断振荡), 冷却, 离心 (4 000 r/min, 30 min), 收集上清液。对沉淀物至少水洗 3 次, 离心后合并上清液, 用水定容至 50 mL。用 DNS 法进行显色, 在 540 nm 处测其吸光度, 利用葡萄糖标准曲线计算出葡萄糖含量, 按公式计算: 非抗性淀粉含量 = 葡萄糖含量 \times 0.9。按上述方法制备空白对照 (调 pH, 但不加任何酶) 进行测定。

1.4.2 Berry 法测定 RS 和非抗性淀粉含量

1.4.2.1 RS 含量测定

称取一定量样品, 加入 KCl-HCl 缓冲液和一定量胃蛋白酶, 40℃恒温 60 min, 调节 pH, 加入磷酸盐缓冲液和中温 α -淀粉酶, 60℃恒温水浴 60 min (不断振荡), 冷却至室温, 加入糖化复合酶, 60℃恒温水浴 60 min (不断振荡), 离心 (3 000 r/min, 30 min) 后弃去上清液, 反复洗涤 3 次, 加入 2 mol/L KOH 溶液, 超声波处理 30 min, 加入乙酸钠缓冲液和淀粉葡萄糖苷酶, 60℃恒温水浴 60 min (不断振荡), 冷却, 离心 (3 000 r/min, 30 min) 后收集上清液, 反复水洗 3 次离心收集, 合并上清液, 用水定容至 50 mL, 用 DNS 法进行显色, 在 540 nm 处测其吸光度, 利用葡萄糖标准曲线计算出葡萄糖含量, 按公式计算: RS 含量 = 葡萄糖含量 \times 0.9。按上述方法制备空白对照

(调 pH, 但不加任何酶) 进行测定^[7]。

称入一定量浆液后第一步不加入胃蛋白酶外, 其余与上述操作相同, 以作对比。

1.4.2.2 非抗性淀粉含量测定

称取一定量样品, 加入 KCl-HCl 缓冲液和一定量胃蛋白酶, 40℃恒温 60 min, 调节 pH, 加入磷酸盐缓冲液和中温 α -淀粉酶, 60℃恒温水浴 60 min (不断振荡), 冷却至室温, 加入糖化复合酶, 60℃恒温水浴 60 min (不断振荡), 离心 (3 000 r/min, 30 min) 后收集上清液, 反复水洗 3 次离心收集, 合并上清液, 用水定容至 50 mL, 用 DNS 法进行显色, 在 540 nm 处测其吸光度, 利用葡萄糖标准曲线计算出葡萄糖含量, 按公式计算: 非抗性淀粉含量 = 葡萄糖含量 \times 0.9。按上述方法制备空白对照 (调 pH, 但不加任何酶) 进行测定。

1.4.3 Goni 法测定 RS 和非抗性淀粉含量

1.4.3.1 RS 含量测定

先将一定量样品分别置于 50 mL 离心管, 加 KCl-HCl 缓冲液, 再加胃蛋白酶溶液, 充分混合, 在 40℃下水浴振荡 60 min, 调节 pH, 添加磷酸盐缓冲液和胰 α -淀粉酶溶液, 充分混合, 37℃下水浴振荡 16 h, 接着离心 (3 000 r/min, 15 min), 去除上清液, 用蒸馏水洗涤后, 再次离心, 去除上清液。所得残余物用 3 mL 蒸馏水润湿, 加 3 mL 4 mol/L KOH 混合, 室温振荡 30 min, 再加 5.5 mL HCl 和 3 mL 0.4 mol/L 醋酸钠缓冲溶液, 使 pH 为 4.5, 加 80 μ L 糖化复合酶, 混合, 在 60℃水浴 45 min, 最后离心 (3 000 r/min, 15 min), 收集上清液于容量瓶中, 用 10 mL 蒸馏水洗涤一次, 离心 (3 000 r/min, 15 min), 收集上清液, 合并后置于容量瓶中, 用水定容至 50 mL。用 DNS 法进行显色, 540 nm 处测其吸光度, 利用葡萄糖标准曲线计算出葡萄糖含量, 按公式计算 RS 含量 = 葡萄糖含量 \times 0.9。按上述方法制备空白对照 (调 pH, 但不加任何酶) 进行测定^[10,11]。

称入一定量鲜样后第一步不加胃蛋白酶外, 其余与上述操作相同的作一个对照。

1.4.3.2 非抗性淀粉含量测定

将一定量样品分别置于 50 mL 离心管, 加 KCl-HCl 缓冲液, 再加胃蛋白酶溶液, 充分混合, 在 40℃下水浴振荡 60 min, 室温冷却, 添加磷酸盐缓冲液和胰 α -淀粉酶溶液, 充分混合, 37℃下水浴振荡 16 h, 收集上清液于容量瓶中, 用 10 mL 蒸馏水洗涤一次, 离心 (3 000 r/min, 15 min) 后收集上清液, 合并后置于

容量瓶中,用水定容至 50 mL。用 DNS 法进行显色,在 540 nm 处测其吸光度,利用葡萄糖标准曲线计算出葡萄糖含量,按公式计算 RS 含量=葡萄糖含量 \times 0.9。按上述方法制备空白对照(调 pH,但不加任何酶)进行测定。

总淀粉含量=非抗性淀粉含量+抗性淀粉含量;
抗性淀粉占总淀粉的百分含量/%=抗性淀粉含量/
总淀粉含量 \times 100。

2 结果与分析

不同测定方法对不同原料中的 RS 定量结果见表 1。

表 1 不同方法对不同原料中抗性淀粉和总淀粉含量的测定结果¹⁾ %

原 料		测定方法		
		TSA 法	Goni 法	Berry 法
青香蕉	RS 含量	2.70	80.12	42.40
	总淀粉含量	80.75	80.62	59.32
生马铃薯	RS 含量	9.50	57.86	30.62
	总淀粉含量	58.24	58.17	42.81
玉米淀粉	RS 含量	16.52	17.97	3.55
	总淀粉含量	70.43	70.39	78.24

注:1)表 1 数据为干基含量。

由表 1 结果可知,同种原料的不同测定方法中,Goni 法和 TSA 法测得的总淀粉含量最接近,而 Berry 法的测定结果与前两者相比偏差大,原因是 Berry 法未模拟人体胃肠道消化环境,在溶解抗性淀粉时还需超声波处理,作用条件剧烈,操作繁琐,从而使结果偏差大。同时,Goni 法和 TSA 法对 3 种原料(青香蕉、生马铃薯和玉米淀粉)的 RS 测定结果中,后者均比前者普遍偏低,尤其对于青香蕉和生马铃薯原料来说,结果差异尤为明显,分析其原因是 TSA 法没模拟人体胃肠道消化环境,会低估人体对抗性淀粉的真正摄入量,其表现在因青香蕉和生马铃薯富含抗性淀粉颗粒(RS2),其特点是不耐高温,在 60~80℃热水中,会发生溶胀,结构受破坏而被糊化即可酶解而作为可消化淀粉,而 TSA 法采用高温液化淀粉,此时 RS2 被糊化而能被酶所作用而被当作可消化淀粉除去,完全排除了 RS2,使结果大幅度下降,不能真实地反映青香蕉和马铃薯原料中的抗性淀粉含量。同时,因 TSA 法所用的耐高温酶的活性没有胰 α -淀粉酶稳定而会使结果重现性差;而玉米淀粉本身不含天然抗消化淀粉颗粒或含量很少,因此,用 Goni 法和

TSA 法 2 种方法对 RS 的测定影响不大,结果比较接近(RS 含量分别为 16.52%和 17.97%)。

表 2 为对 3 种方法的简单对比,由表 1 和表 2 可知,因 Goni 法是在 Berry 法基础上改进的,它基本包括除去蛋白质、彻底消化可溶性淀粉和酶解步骤,还模拟了人体胃肠道的生理条件,作为体外测定方法中与现在所使用的 RS 定义最相近,最能估量人体对 RS 的摄入量,同时也能真实地反映样品中 RS2 含量等优点,更适用于像青香蕉、生土豆等富含 RS2 的样品中 RS 含量的测定。

杨光^[9]等人研究了 RS 的测量方法,发现 TSA (使用耐高温 α -淀粉酶的 RS 测定方法)比 PPA(使用胰腺 α -淀粉酶的 RS 测定方法)的准确性高,重现性好,认为前者更适合 RS 含量的测定,原因是其测定目标是耐热性良好的回生淀粉 RS3,该方法能排除 RS2 的干扰,故只适合于以 RS3 为目标的 RS 制备样品的检测方法。因此,RS 含量的测定方法的选择要视原料和具体测定目标而定,而不能一概而论。

现普遍认为使用耐高温 α -淀粉酶煮沸和胰 α -淀粉酶 37℃下酶解这 2 种方法可以近似地区别样品中的 RS2 和 RS3,是建立在煮沸过程中样品中的 RS2 能糊化完全而被除去,而 RS3 却丝毫没被破坏这个假设成立的基础上。然而有研究指出,这假设不适用于像高直链玉米淀粉的样品^[12]。若此假设适用于青香蕉样品的话,由表 1 结果可推断出,青香蕉中的抗性淀粉颗粒(RS2)含量非常高,占 RS 总量的 96.63%。

从表 1 还可看出,3 种原料中除含 RS 外,还含一部分非抗性淀粉(含量各异),这点非常重要,因为食品加工和研究不光只是与所含的 RS 成分有关,更重要的是与所含 RS 的物质的物理和营养特性有关。而且从表 1 结果推算可得,用 Goni 法测得青香蕉中的 RS 占总淀粉含量的 99.38%。

从表 3 与表 1 结果相比较可看出,在淀粉酶水解若删除添加胃蛋白酶一步,3 种方法所测得的 RS 含量均偏低,分析其原因是青香蕉中的内源蛋白质会对淀粉有起包埋、束缚作用,若测定中淀粉酶前不加蛋白酶降解蛋白,其所包埋、束缚的淀粉均无法释放出来而被忽略,使结果偏差较大,同时,由表 1 与表 2 结果可推断出,所包埋、束缚的淀粉均为抗性淀粉颗粒的多。

表2 各种测定抗性淀粉含量的方法比较

项 目	测定方法		
	TSA 法	Berry 法	Goni 法
基本原理	高温处理除去可溶性淀粉后测定沉淀中的抗性淀粉	测定经 α -淀粉酶酶解所残留的抗性淀粉	模拟人体胃肠道对食物进行研磨和除去可消化淀粉后测定抗性淀粉
主要不同	使用耐高温 α -淀粉酶	对 α -淀粉酶无要求	使用胰液 α -淀粉酶
主要测定对象	RS3	RS1 以外的 RS	RS
经济性	成本较低,操作较简便	成本高,操作繁琐	成本低,操作简便
准确性	好	低	好
重现性	较差	差	好
缺 点	未模拟胃肠道环境,结果比人体真实摄入量低	未模拟胃肠道环境,也缺少直接的人体体内试验法验证资料	缺少直接的人体体内试验法验证资料

表3 不添加蛋白酶解处理对青香蕉抗性淀粉测定结果的影响¹⁾

测定方法	TSA 法	Berry 法	Goni 法
RS 含量/%	2.55	10.62	64.93

注:1)以上测定方法为数据为 Goni 法,为干基含量。

3 结论与讨论

(1)试验证明,TSA 法因作用剧烈,与人体胃肠道生理条件相差甚远,完全排除了 RS2,使结果大幅度下降;Berry 法也因未模拟人体胃肠道生理条件而不能真实地反映样品中的 RS 含量和摄入量;Goni 法则模拟了人体肠道环境,具有更好的重现性,费用低、操作简单等特点而最适合于像富含抗性淀粉颗粒的青香蕉和生土豆等样品中 RS 含量的测定。

(2)青香蕉中的蛋白质会对部分抗性淀粉颗粒起包埋、束缚作用,因此,样品在淀粉酶作用前需加入蛋白酶处理步骤,否则结果会偏低。

(3)香蕉的淀粉含量随品种、成熟度等影响变化非常大,本次实验仅仅是同样条件下不同方法测定结果的比较。用 Goni 方法测得所采用的青香蕉原料中的总淀粉含量为 80.62%(干基),其中的 RS 占总淀粉含量的 99.38%。

青香蕉中富含抗性淀粉颗粒,若能利用青香蕉生产出品质好、保持稳定的高 RS 水平且深受消费者喜爱的香蕉食品,或采用各种加工技术来提高香蕉淀粉中 RS 含量以发展自然界存在的 RS 基产品或保持香蕉中 RS 水平的稳定等方面的应用^[14],既可充分发挥其特有的生理功能和加工特性来造福人类的同时,又能更好地促进香蕉深加工工业的发展。

参 考 文 献

1 赵国华,阚建全,李洪军,等.食物中抗性淀粉的研究进展

[J]. 中国粮油学报,1999,14(4):37~40

- 赵国建,杨公明,鲍金勇.香蕉营养保健价值及综合利用[J].食品研究与开发,2005,26(6):175~178
- Alejandro Aparicio-Saguilana, Emmanuel Flores Huicochea, Juscelino Tovar. Resistant starch-rich powders prepared by autoclaving of native and lintnerized banana starch: partial characterization[J]. Starch/Starke, 2005, 57: 405~412
- Rosalía A Gonzalez Soto, Edith Agama Acevedo, Javier Solorza Feria. Resistant starch made from banana starch by autoclaving and debranching[J]. Starch/Starke, 2004, 56: 495~499
- Pingyi Zhang, Roy L Whistler, James N BeMiller et al. Banana starch: production, physicochemical properties, and digestibility-a review[J]. Carbohydrate Polymers, 2005, 59: 443~458
- 赵国建,杨公明.香蕉的加工现状及发展对策[J].食品与机械,2005,3,21(2):81~82
- 石 励,徐贵发.抗性淀粉测定方法的研究进展[J].卫生研究,2005,34(4):504~507
- 宾石玉,印遇龙,李铁军,et al.谷物中抗性淀粉含量的测定[J].饲料研究,2006(5):30~31
- 杨光,丁霄霖.抗性淀粉定量测定方法的研究.中国粮油学报,2003,17(3):59~62
- Goni L, Garcia Diz, Manas E, et al. Analysis of resistant starch: a method for foods and food products[J]. Food Chemistry, 1996, 56(4): 445~449
- Sung Kon Kim, Jae Eun Kwak, Woo Kyung Kim. A simple method for estimation of enzyme-resistant starch content[J]. Starch/Starke, 2003, 55: 366~368
- Donald B. Thompson. Strategies for the manufacture of resistant starch[J]. Food Science & Technology, 2000 (11): 245~253

Comparison of Resistant Starch of Green Banana by Using Different Methods

Cheng Yanfeng, Wang Juan, li Shangxin, Guo Weiyun, Yang Gongming

(College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

ABSTRACT There are great economic and social benefits to study the resistant starch, which is the hot topic on denaturation starch and functional food in these years. The method of determination hasn't unified standardization yet. In this article three typical methods, TSA, Berry and Goni, were used to determine and compare the content of the resistant starch of green bananas, green potato and corn starch. The results showed that Goni was the most suitable one for the determination of the materials like green bananas and potatoes that were rich in resistant starch granules. It had good simulating in the condition of gastrointestinal tract, good reproducibility and simple procure. The content of resistant starch of green banana was 80.12% determined by Goni, among which 96.63% was RS₂.

Key words green banana, resistant starch, methods for determination

政策法规标准

欧盟使用食品添加剂统一标准

欧盟国家于2007年7月就建立食品使用添加剂的认证制度达成协议,以在欧盟国家使用统一的标准,此项对食品添加剂的管理规定估计在2007年正式在欧盟国家中实施和在2010年起对所有进入欧盟国家市场的食品实施同一标准。根据此决议和将执行的标准,对已经在使用中的300多项食品添加剂将要重新审定和确认其安全性。

涉及在食品中添加的色素、调味和调节口感的添加剂都将受到更加严格的规定,随着此规定的出台,现时批准使用的300多项食品添加剂也将重新被审定的认证。因此,今后未经批准的新食品添加剂将禁止在食品加工过程中使用,而且婴儿食品中使用的添加剂也将受到更加严格的管理。

市场动态

英联公司将在中国扩大其糖类食品生产

世界500强企业之一的英国联合食品公司将耗资7千万英镑,与中国河北天露糖业有限公司合作建立生产甜菜的合资企业。

英联公司是位于英国的食品、原料生产及零售公司。它将拥有该合资企业51%的股份,天露公司拥有其余股份。英联公司已在中国东北地区建立了生产蔗糖的工厂。英联方面表示在英国,公司利润下降,然而在中国它却获利良多,足以弥补其在国内的损失。资本股票经纪有限公司的分析师克里夫·布莱克表示:“在中国建立的这个分公司将在未来3~5年内给英国投资者带来丰厚的回报。”

欧洲消费者出于对健康的考虑,减少了对糖的需求量,因此欧洲的总糖食品产量近年来持续下降。然而在亚洲,年均糖食品消费量却不断增长,达到了136万t,占全球年均糖食品消费增长量的65%。亚洲,尤其中国与印度的经济腾飞使人民的生活方式发生了变化,这种变化在城市居民身上更为显著。人们愈发青睐如清凉饮料和加工食品之类的西式食品。

英联食品公司称将在中国扩大其糖类食品生产,并使生产达到中等规模。公司去年产量为14.5万t,销售额为3400万英镑。2007年是英国财政年度,英联方面希望今年其糖食品产量能超过50万t。