

稻米抗性淀粉含量测定方法的比较分析

罗 曦^{1,2,3}, 黄锦峰^{1,2,3}, 朱永生^{1,2,3}, 谢鸿光^{1,2,3}, 张建福^{1,2,3}, 谢华安^{1,2,3}

(1. 福建省农业科学院水稻研究所, 福建 福州 350018; 2. 福州国家水稻改良分中心/华南超级稻种质创新与分子育种重点实验室/福建省作物分子育种工程实验室/福建省水稻分子育种重点实验室, 福建 福州 35000; 3. 福建省作物种质创新与分子育种省部共建国家重点实验室培育基地, 福建 福州 350003)

摘 要: 以高抗性淀粉水稻品种功米 3 号、梗稻日本晴、中籼品种 9311 为材料, 比较其蒸煮前后抗性淀粉含量的变化, 以及在不同 pH 值下水解后的抗性淀粉含量的差异。研究结果表明, 蒸煮前后各材料的抗性淀粉含量依次为: 未蒸煮处理>蒸煮隔夜处理>蒸煮处理, 未蒸煮处理与其他两种处理相比较差异显著, 蒸煮隔夜处理与蒸煮处理相比较差异不显著; 不同 pH 值处理各材料的抗性淀粉含量依次为 pH5.2>pH6.0>pH6.9, 其中 pH5.2 的 RS 含量与 pH6.9、pH6.0 比较呈极显著差异, pH6.9 与 pH6.0 差异不显著; 3 份材料抗性淀粉含量大小依次为功米 3 号>9311>日本晴, 功米 3 号抗性淀粉含量明显高于 9311 和日本晴, 而 9311 略高于日本晴。总之, 消化可溶性淀粉缓冲液的 pH 值为 6.0 时以及蒸煮处理后所得抗性淀粉含量的变异系数最低, 重现性好, 重复间差异小。

关键词: 水稻; 抗性淀粉; 测定方法

中图分类号: S 511

文献标识码: A

Determination and Properties of Starch in Rice

LUO Xi^{1,2,3}, HUANG Jin-feng^{1,2,3}, ZHU Yong-sheng^{1,2,3}, XIE Hong-guang^{1,2,3}, ZHANG Jian-fu^{1,2,3}, XIE Hua-an^{1,2,3}

(1. *Rice Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350019, China;*
2. *Fuzhou Branch, National Rice Improvement Center of China/Key Laboratory of South China Super Rice Germplasm Creation and Molecular Breeding/Fujian Engineering Laboratory of Crop Molecular Breeding/Fujian Key Laboratory of Rice Molecular Breeding, Fuzhou, Fujian 350003, China;*
3. *Incubator of National key Laboratory of Fujian Germplasm Innovation and Molecular Breeding between Fujian and Ministry of Sciences & Technology, P. R. China, Fuzhou, Fujian 350003, China*)

Abstract: The high resistant starch rice, Gongmi 3, a typical Japonica rice, Nipponbare, and Indica rice 9311 were selected to study the cooking and pH effect on their starches. The results showed that the resistant starch content decreased in the order of no cooking>cooking and overnight-holding>cooking. A significant difference existed between no cooking and the other two. The pH effect on the resistant starch content was pH 5.2 > pH 6.0 > pH 6.9. A significant difference was shown between pH 5.2 and the others, but no difference was found between pH 6.0 and pH 6.9. Among the three rice varieties, the resistant starch content decreased in the order of Gongmi 3>9311>Nipponbare. When the pH of the starch hydrolysis buffer was 6.0, cooking seemed to induce the minimal change in the resistant starch content of the rice. The results were also reproducible with minor differences between the replicates.

Key words: rice; resistant starch; determination method

抗性淀粉 (resistant starch, RS) 是指在健康人体小肠中不被吸收的淀粉及其降解产物^[1]。抗性

淀粉具有降低糖尿病患者饭后血糖值^[2]、减少肠机能失调及结肠癌发病率^[3]等重要的生理功能。抗性

收稿日期: 2011-06-21 初稿; 2011-08-03 修改稿

作者简介: 罗曦 (1982-), 男, 硕士, 研究实习员, 主要从事水稻高抗性淀粉遗传育种研究

通讯作者: 张建福 (1971-), 男, 博士, 副研究员, 主要从事水稻分子生物学与分子育种研究 (E-mail: jianfzhang@163.com);

谢华安 (1941-), 男, 研究员, 中国科学院院士, 主要从事水稻遗传育种研究 (E-mail: huaanxie@yahoo.com.cn)

基金项目: 国家“863”计划项目 (2006AA1001101、2010AA101801、2010AA101804); 福建省科技厅国家科技项目配套经费项目 (F2006AA100101); 福建省自然科学基金项目 (2011J0901109); 福建省农业科学院创新团队项目 (STIF-Y04)

淀粉是近年来功能食品领域的研究热点之一。水稻为世界一半以上人口的主食,适当增加其中的抗性淀粉含量对人体的健康有重要的意义。

水稻中的抗性淀粉含量属于多基因控制的数量性状,如果要对该性状进行遗传改良以及基因定位等深入研究,必须要有可靠的、重复性高的、性状差异明显的表型分析方法。目前,抗性淀粉的测定方法主要有体内测定法和体外测定法。体内测定法主要是在活体肠道中消化样品,然后测定未消化的淀粉含量。在大量的样品测定中这种方法费时,成本高,而且有研究^[4]发现人体本身的年龄、生理状况及生活环境,也会造成淀粉消化能力的差异。在某一个体中作用类似于RS,在其他人体内可能不被看作RS。因此目前的抗性淀粉定量分析法以体外法为主。体外测定法的基本原理是模拟人体的消化环境利用淀粉酶消化可溶性淀粉,然后测定剩余淀粉的含量(直接法)或者测定总淀粉含量和可消化淀粉的含量做差求得抗性淀粉含量(间接法)。体外测定法已有文献报道:1986年的Bjorck法和Berry法^[5-6],1992年的Englyst法^[7],1992年和1993年的Muir法和O'Dea法^[8-9]1992年的Champ法^[10],1996年的Goni等^[11]方法,1998年的Akerberg法^[12]和2002年的McCleary法^[13]等,其中常见的方法有Englyst法、Goni法、McCleary法,McCleary法是目前唯一被AOAC采用的方法^[14]。

上述方法大多是以玉米、马铃薯、豆类、香蕉等(RS含量10%~50%以上)高抗性淀粉作物为材料的分析测定方法,对于水稻这种抗性淀粉含量极低的(普通品种RS含量不到1%^[15])作物而言,这些方法则存在着精密度差、重复性差、误差大等缺点。本研究以高抗性淀粉材料功米3号、典型粳稻日本晴以及中粳品种9311这3份稻米材料为研究对象,通过不同消化条件的处理,试图找出一种最适合测定稻米抗性淀粉含量的方法,以期对稻米中影响抗性淀粉含量的基因的定位提供表型数据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

高抗性淀粉粳稻品种“功米3号”由云南省农业科学院提供,粳稻“日本晴”(Nipponbare)、中粳品种9311由本实验室保存。

1.2 试验试剂和仪器

1.2.1 主要试剂 α -淀粉酶(α -amylase) A-3176 500KU、淀粉葡萄糖苷酶(AMG)活性 >100 U \cdot mg⁻¹、马来酸购自Sigma公司,Tris base 购

自NOVON公司,氯化钾、氯化氢、氢氧化钾、醋酸钠等试剂均购自厦门国药集团(均为分析纯)。

1.2.2 主要仪器 台州粮仪厂产JLGJ-45型电动垄谷机,台州粮仪厂产JNMJ3检验碾米机, JYL-B031九阳牌料理机, pH计, Eppendorf离心机, Beckman DU-800分光光度计, 上海智诚分析仪器有限公司产ZHWHY-110X型往返式水浴恒温摇床。

1.3 试验方法

1.3.1 材料种植 将上述3份材料于2010年种植于福建省沙县夏茂试验站试验田,5月10日播种,5月20日插秧,试验采用随机区组设计,重复3次。每小区3行,每行7丛,株行距20 cm \times 20 cm,单本栽插。采用湿润育秧,大田常规栽培管理,成熟时收获。

1.3.2 试验设计 根据Englyst法、Goni法、McCleary法设计了3种不同的淀粉水解pH值:5.2、6.0、6.9。根据稻米中淀粉的回生性质设计了3种处理:未蒸煮M₁,蒸煮隔夜M₂,蒸煮M₃。

1.3.3 待测材料的制备 每份材料取10~20 g稻谷,脱壳后将糙米打磨成精米,用料理机把精米打磨成细粉,过100目筛待测。

1.3.4 抗性淀粉含量的测定

(1)准确称取100 mg米粉于15 mL离心管中,每份材料分别用3种pH值的溶液处理,设置3种处理,每个处理3个重复。

(2)消化前的蒸煮分为:a未蒸煮的处理:待测;b蒸煮处理:加单蒸水180 μ L蒸煮15 min,保温10 min,待测;c蒸煮隔夜处理:加单蒸水180 μ L蒸煮15 min,冷却至室温,放入4℃冰箱中过夜。

(3)加4 mL Tris-马来酸钠缓冲液(pH 5.2、pH 6.0、pH 6.9)和4 mL α -淀粉酶(含AMG 10 U \cdot mL⁻¹,现用现配,1 500 r \cdot min⁻¹离心10 min)37℃水浴震荡16 h。

(4)取出样品7 500 r \cdot min⁻¹离心10 min,弃上清,用50%酒精洗涤2次(7 500 r \cdot min⁻¹离心4 min去上清),去掉酒精后离心管倒置1 h。

(5)在离心管中先加入1 mL蒸馏水将沉淀搅拌均匀后再加入1 mL浓度为4 mol \cdot L⁻¹ KOH,冰水浴20 min后加入1.2 mol \cdot L⁻¹、pH 3.8的醋酸钠缓冲液8 mL,再加入3 300 U \cdot mL⁻¹的AMG 100 μ L,60℃水浴振荡1 h。

(6)取上清100 μ L于50 mL容量瓶中,加入3 mL GODPOD试剂,50℃水浴振荡20 min。

(7)在510 nm的波长条件下测吸光值,用100 μ L醋酸钠缓冲液(0.1 mol \cdot L⁻¹, pH 4.5)

做空白对照，标准葡萄糖浓度 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

1.3.5 数据处理 利用 DPS 7.05 和 Excel 进行数据处理和统计分析。抗性淀粉含量计算公式：抗性淀粉含量 $= A_1/A_0 \times 0.9 \times 0.1 \times 10.5/0.1 \times 100/[W \times (1-H)]$ ，其中 A_1 为样品的吸光值， A_0 为葡萄糖标样的吸光值， H 为样品的水分含量。通过计算变异系数确定平均值的波动程度（公式 $CV = s/x \times 100\%$ ，其中 CV 表示变异系数； s 表示标准差； x 表示平均值且 $x > 0$ ）。利用独立样本 t 检验，确定各处理之间的平均值是否具有显著差异。

2 结果与分析

2.1 不同条件下 3 份稻米材料的抗性淀粉含量差

表 1 不同蒸煮条件下 3 个品种的抗性淀粉含量差异
Table 1 Resistant starch contents of 3 rice varieties under different conditions

	功米 3 号($\bar{x} \pm s$)	日本晴($\bar{x} \pm s$)	9311($\bar{x} \pm s$)
pH 5.2			
M ₁	40.761Aa±7.9875	14.616Aa±4.5067	16.4115Aa±1.4154
M ₂	3.4823Bb±0.9422	2.0648Ab±0.8353	2.2018Bb±0.4410
M ₃	2.5373Bb±0.1136	1.1529Ab±0.5670	1.134Bb±0.0267
pH 6.0			
M ₁	33.957Aa±4.4045	11.6235Aa±7.3071	14.5782Aa±1.0133
M ₂	2.8836Bb±0.1002	1.0882Ab±0.0109	1.1858Bb±0.0055
M ₃	1.1655Bb±0.0793	0.0567Ab±0.0089	0.1733Bb±0.0254
pH 6.9			
M ₁	9.5728Aa±1.2666	4.2998Aa±0.3784	4.8124Aa±0.5245
M ₂	1.9531Bb±1.3431	0.3702Bb±0.2268	0.4647Bb±0.1737
M ₃	0.9041Bb±0.2107	0.094Bb±0.0134	0.1039Bc±0.0134

注：不同大写字母表示在 0.01 水平上差异显著，不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。

图 1~3 分别表示功米 3 号、9311、日本晴这 3 个品种随着 pH 值的升高，其 RS 含量的变化。首先，随着 pH 值升高，3 个品种的 3 种处理都呈下降趋势，其中 M₁ 的下降程度最明显，M₂、M₃ 下降程度较缓；在同一 pH 值下，M₁ 的 RS 含量远高于 M₂、M₃ 的 RS 含量，M₂ 的 RS 含量略高于 M₃；这种结果说明稻米在蒸煮前，含有更多的不被 α -淀粉酶消化的淀粉，而煮过之后有相当一部分抗酶解的淀粉转化为可消化淀粉，使得稻米中的抗性淀粉含量明显下降。

2.2 不同蒸煮条件下 3 份稻米材料的抗性淀粉含量变异系数分析

从表 2 的结果可以看出，在同一 pH 值下，3 个品种，不同处理的总变异系数分别为：pH5.2 (202.60%) > pH6.9 (157.28%) > pH6.0

异分析

从表 1 的结果可以看出，在同一 pH 值条件下，这 3 份水稻材料都表现为 M₁、M₂ 和 M₃ 具有显著差异或极显著差异，M₂ 和 M₃ 比较差异不显著。3 种处理抗性淀粉的含量比较为 M₁ > M₂ > M₃；同一材料在不同 pH 值下，抗性淀粉的含量比较为 pH5.2 > pH6.0 > pH6.9，其中 pH 5.2 的 RS 含量与 pH 6.9、pH 6.0 比较呈极显著差异，pH 6.9 与 pH 6.0 差异不显著 (t 检验)。3 份材料之间抗性淀粉含量比较为功米 3 号 > 9311 > 日本晴。其中，功米 3 号的 RS 含量与 9311、日本晴呈极显著差异 (t 检验)。

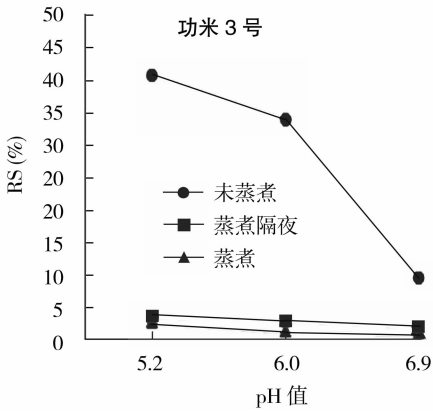


图 1 不同处理下功米 3 号的 RS 含量变化

Fig. 1 Resistant starch content of Gongmi 3 under different conditions

(126.69%),结果表明在 pH6.0 条件下数据的差异最小;同一处理下,3 份材料不同 pH 值的总变异系数分别为: M_2 (188.09%) > M_1 (154.86%) > M_3

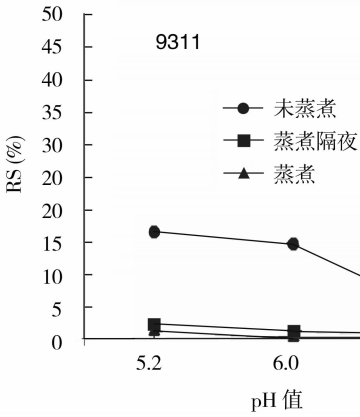


图 2 不同处理下 9311 的 RS 含量
Fig. 2 Resistant starch content of 9311 under different conditions

(143.62%),结果表明在蒸煮处理下数据的差异最小。

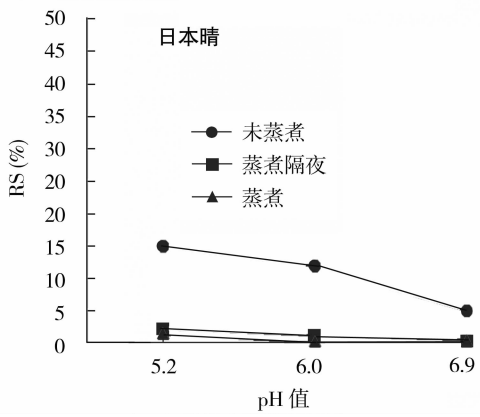


图 3 不同处理下日本晴的 RS 含量
Fig. 3 Resistant starch content of Nipponbare under different conditions

表 2 不同蒸煮条件下 3 份材料的抗性淀粉含量变异系数

Table 2 Coefficient of variation of resistant starch content in 3 rice varieties under different conditions (单位: %)

	pH 5.2			pH 6.0			pH 6.9			处理 ($\sum cv$)
	功米 3 号	日本晴	9311	功米 3 号	日本晴	9311	功米 3 号	日本晴	9311	
M_1	19.60	30.83	8.62	12.97	42.96	6.95	13.23	10.90	8.80	154.86
M_2	27.06	40.45	20.03	11.34	12.36	2.96	45.48	16.55	11.86	188.09
M_3	4.48	49.18	2.35	6.80	15.70	14.65	23.30	14.26	12.90	143.62
pH($\sum cv$)	202.60			126.69			157.28			

3 讨 论

本研究表明, 稻米蒸煮前后 RS 含量变化明显, 相同 pH 值条件下, 3 个品种的 RS 含量未煮处理比煮过处理高 10 倍左右, 煮过隔夜处理的 RS 含量高于煮过处理 1% 左右 (差异不显著), 这种差异是由于稻米的抗性淀粉性质决定的, Englyst 等学者根据淀粉的来源和抗酶解特性的不同, 将抗性淀粉分成 4 类: RS1 (物理难接近淀粉)、RS2 (抗性淀粉颗粒)、RS3 (回生淀粉) 和 RS4 (化学修饰淀粉)。其中 RS1 和 RS2 在经过蒸煮处理后转化为可消化淀粉, RS3 和 RS4 不会被淀粉酶水解。RS3 即回生淀粉或老化淀粉, 是凝沉的淀粉聚合物, 主要由糊化的淀粉冷却后形成, 本研究中, 3 份稻米材料在蒸煮后, RS 含量急剧降低, 而煮过隔夜处理由于一部分淀粉回生所以略高于煮过处理, 说明这 3 份稻米的 RS 组成以 RS1、RS2 这 2 种煮后可被消化的抗性淀粉居多, RS3、RS4 较少。

在诸多抗性淀粉的体外测定方法中, α -淀粉酶消化可溶性淀粉是最为关键的一步, 而各种方法的主要不同是缓冲液的 pH 值不同, McCleary^[13]研究表明: α -淀粉酶在 pH6.9, 6.0 和 5.2 的相对活性分别为 100%、77% 和 8.3%。在本试验中, 同一材料在同一处理下, 抗性淀粉含量随着 pH 值升高而下降, 当 pH 为 6.9 时达到 α -淀粉酶的最高活性, RS 含量最低。

为了确定同一处理下, 不同 pH 值或同一 pH 值, 不同处理间的变异程度, 本试验在数据统计中引入了总变异系数这一参数, 结果表明: 在不同 pH 值下, M_3 处理即煮过处理总变异系数最低, 在不同处理下, pH 值 6.0 的总变异系数最低。也就是说, 在对不同稻米材料的 RS 含量测定条件中, 煮过处理、pH6.0 条件下变异系数小, 重复性好。虽然在 pH6.9 条件下达到最大酶活, 可溶性淀粉消化比较完全, 但是在 pH6.0 条件下变异系数更小, 不同材料之间差异性更大, 而且所得 RS 含量与 pH6.9 条件下的 RS 含量没有显著差异

(t 检验)。

综上所述,本试验中的 3 份稻米材料蒸煮后有很大一部分转变为可消化淀粉;pH6.0 条件下,煮过处理适合稻米中抗性淀粉的测定。本试验结果证明了 McCleary 法是现有方法中最适合水稻抗性淀粉测定的一种方法,但是由于抗性淀粉本身的原因使其含量容易受各种因素干扰而发生变化,如研磨程度、蒸煮方式、水浴震荡方式等物理因素以及 pH 值、酶的活性等化学因素的影响,这就要求测定人员要规范统一每次试验的步骤,试剂浓度,用量等细节并且熟练操作每一步,尽量减小人为误差。

参考文献:

- [1] ENGLYST H N, CUMMINGS J H. Digestion of the polysaccharides of some cereal foods in the human small intestine [J]. American Journal of Clinical Nutrition, 1985, 42: 778—787.
- [2] HIGGINS J A. Resistant starch: metabolic effects and potential health benefits [J]. Journal of AOAC International, 2004, 87 (3): 761—768.
- [3] BROUNS F, KETTLITZ B, ARRIGONI E. Resistant starch and " the butyrate revolution" [J]. Trends in Food Science & Technology, 2002, 13: 251—261.
- [4] SHI M, XU GF. Resistant starch: a potential functional food ingredient [J]. Prev Med Trib, 2005, 11: 70—72.
- [5] BJORCK I, NYMAN M, PEDERSEN B, et al. On the digestibility of starch in wheat bread studies in vitro and in vivo [J]. Journal of Cereal Science, 1986, (4): 1—11.
- [6] BERRY C S. Resistant starch formation: 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): 301—314.
- [7] ENGLYST H N, ANDERSON V, CUMMINGS J. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions [J]. European Journal of Clinical Nutrition, 1992, 45: 533—550.
- [8] MUIR J G, O'DEA K. Measurement of resistant starch: factors affecting the amount of starch escaping digestion in vitro [J]. American Journal of Clinical Nutrition, 1992, 56: 123—127.
- [9] MUIR J G, O'DEA K. Validation of an in vitro assay for predicting the amount of starch that escapes digestion in the small intestine of humans [J]. American Journal of Clinical Nutrition, 1993, 57: 540—546.
- [10] CHAMP M. Determination of resistant starch in foods and food products: interlaboratory study [J]. European Journal of Clinical Nutrition, 1992, 46 (2): 51—62.
- [11] 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.
- [12] AKERBERG AKE, LILJEBERG HGM, GRANFELDT, et al. An invitro method, based on chewing, to Predict resistant starch content in foods allows parallel determination of potentially available starch and dietary fiber [J]. Journal of Nutrition, 1998, 128: 651—660.
- [13] BARRY V. MCCLEARY, DYMUNA A. MONAGHAN. Measurement of Resistant Starch [J]. Journal of AOAC International, 2002, 85 (3): 665—675.
- [14] MCCLEARY V, MCNALLY M, ROSSITER P. Measurement of resistant starch by enzymatic digestion in starch and selected plant materials: collaborative study [J]. Journal of AOAC International, 2002, 85 (5): 1103—1111.
- [15] 杨朝柱, 李春寿, 舒小丽, 等. 富含抗性淀粉水稻突变体特性 [J]. 中国水稻科学, 2005, 19 (6): 516—520.

(责任编辑: 柯文辉)