

研究
简报

转 AGPase 基因马铃薯淀粉溶液行为及热特性比较研究

刘廷国 李斌* 谢笔钧

(华中农业大学食品科技学院,湖北武汉 430070)

摘要:比较研究了转 AGPase 基因马铃薯淀粉与对照组在不同溶剂、不同金属离子溶液中的特性黏度,结果表明,其溶液行为随转基因与否而表现不同,分子量和分子结构显示出差异,热特性、晶体学特性也显然有别,提示马铃薯品质改良中非针对淀粉结构的转基因操作对淀粉结构造成的影响不可忽略。

关键词:马铃薯淀粉;特性黏度;转基因;溶液行为;热特性

Comparative Study on the Behavior in Solution and Thermal Character of Starch in Transgenic Potato with AGPase

LIU Ting-Guo, LI Bin* and XIE Bi-Jun

(College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China)

Abstract: The viscosities of potato starch in different solvents and different cation solutions were studied. The results showed that the solution behavior of starch was varied from each other with the different treatments. The starch molecular weight and the molecular structure were different, and the thermal character and crystalline character were also different in the transgenic potato with AGPase. So it indicated that the gene modified treatment in the potato improvement, which do not aimed at the starch structure, will have obvious influence on the starch structure.

Key words: Potato starch; Instinct viscosity; Gene modified; Solution behavior; Thermal character

马铃薯栽培中病害、产量、还原糖含量等关注点,以及各类专用马铃薯的需求均使马铃薯的品种改良研究成为热点。一些研究已经注意到转基因对淀粉含量以及直链淀粉/支链淀粉比例的影响^[1-2]。ADP-葡萄糖磷酸化酶(AGPase)是淀粉生物合成的限速酶,除了影响淀粉的组成外也影响淀粉的含量,对调控不敏感的外源 AGPase 基因导入淀粉植物将会显著提高淀粉含量^[3-5]。然而,非针对淀粉结构的转基因操作是否会影响到淀粉的结构,以及如何影响淀粉结构的研究尚为空白。本文旨在初步探讨转基因对马铃薯淀粉溶液行为和热特性的影响,为后续分子链形态和聚集态行为研究奠定基础,为马铃薯品种改良提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

E₃、T 和 TR 由国家马铃薯脱毒中心武汉分中心提供, E₃ 为鄂马铃薯 3 号, T 为鄂马铃薯 3 号试管培育所得块茎, TR

为鄂马铃薯 3 号转 AGPase 基因培育所得块茎。

二甲亚砜(Dimethyl Sulfoxide, DMSO)、(NH₄)₂SO₄、KOH、NaCl、Na₂SO₃、CaCl₂·KAl(SO₄)₂ 等试剂均系国产分析纯;实验用水除特别说明外均系去离子水。

1.2 淀粉的分离纯化

马铃薯样品加 0.25% Na₂SO₃ 护色研磨^[1], 以 0.25% Na₂SO₃ 和 0.25% 十二烷基硫酸钠混合液(V/V = 2:1) 搅拌浸泡^[6] 3 h, 滤除纤维杂质, 静置沉降, 弃上清液, 刮去滤饼表面和底层杂质, 滤饼加规定量 0.5% (NH₄)₂SO₄ 搅拌浸泡 3 h, 静置, 弃上清液, 加 0.25% Na₂SO₃ 和 0.25% 十二烷基硫酸钠混合液(V/V = 2:1) 搅拌浸泡过夜, 静置, 弃上清液, 滤饼用蒸馏水反复洗涤, 抽滤, 40℃ 真空干燥 24 h, 索氏抽提[无水乙醇:无水甲醇(V/V) = 4:1] 24 h 脱脂, 干燥后贮存于干燥器备用。

1.3 特性黏度的测定

乌氏黏度计(0.58 mm, 武汉大学玻璃仪器加工工厂)置 SYP 智能玻璃恒温水浴(±0.1℃, 巩义市英峪予华仪器厂),

基金项目: 国家自然科学基金(30270938)项目。

作者简介: 刘廷国(1982-), 男, 汉族, 本科生。* 通讯作者(Corresponding author): 李斌(1972-), 男, 回族, 博士、副教授, 从事食品化学及天然产物化学研究。Tel: 027-87288636 (Fax), 13037135316, E-mail: libinfood@mail.hzau.edu.cn

Received(收稿日期): 2005-01-11; Accepted(接受日期): 2005-06-08.

采用外推法于 $(25 \pm 0.1)^\circ\text{C}$ 下测定。

分别用 90% 的 DMSO 水溶液、0.5 mol/L KOH 溶液和 H_2O 作溶剂, 制得各马铃薯淀粉样品溶液^[7]。在马铃薯淀粉的 DMSO 溶液中, 分别加入 NaCl 、 Na_2SO_3 、 CaCl_2 、 $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$, 考察不同金属离子对特性黏度的影响。

1.4 示差扫描量热分析 (Differential Scanning Calorimeter, DSC)

采用 DSC-822e/400 示差扫描量热仪 (METTLER-TOLEDO, Switzerland) 测定, 加热速率 $10^\circ\text{C}/\text{min}$, 测试范围 $0 \sim 500^\circ\text{C}$, 取样约 2.0 mg。

1.5 X 射线衍射分析 (X-ray Diffraction, XRD)

采用粉晶衍射仪 D/MAX H1B 测定, 测定条件为 Cuka 辐射, 管压 30 kV, 管流 50 mA, 扫描速率 $5^\circ/\text{min}$, 狭缝宽度 0.3 mm, 滤光片 Ni, 温度 20°C , 湿度 70%。

2 结果与分析

2.1 特性黏度的测定

特性黏度 $[\eta]$ 与聚合物的分子质量有关, 也与聚合物的分子结构、形态和在溶剂中的扩张程度有关^[8]。可利用 $[\eta]$ 来比较高分子分子质量以及分子结构之间的差异。采用外推法作图, 在 90% (DMSO) 溶液中 $[\eta]_{\text{E}_3} = 133.77 \text{ mL/g}$, $[\eta]_{\text{TR}} = 147.79 \text{ mL/g}$, $[\eta]_{\text{T}} = 120.94 \text{ mL/g}$ 。说明 3 种淀粉中, TR 的淀粉分子量最大, E_3 次之, 而 T 最小。

良溶剂中高分子链较为舒展, 其 $[\eta]$ 较大; 在不良溶剂中高分子链较为卷曲, $[\eta]$ 值较小^[9]。淀粉在水相中易发生氢键缔合, 分子体积变大。3 种不同马铃薯淀粉的 $[\eta]$ 见表 1, 对任何一种马铃薯淀粉均 $[\eta](\text{H}_2\text{O}) > [\eta](\text{KOH}) > [\eta](\text{DMSO})$, 这与大多数多羟基化合物一致, 因为 KOH 可以破坏一部分分子间缔合, 而 DMSO 为强极性溶剂, 可以强烈破坏分

表 1 马铃薯淀粉在不同溶剂中的特性黏度
Table 1 The intrinsic viscosity of potato starch in different solvents (mL/g)

| Solvent | E_3 | TR | T |
|----------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| H_2O | $295.27 \pm 1.98 \text{ a, } \alpha$ | $290.55 \pm 2.46 \text{ a, } \beta$ | $252.87 \pm 1.36 \text{ a, } \gamma$ |
| KOH | $252.87 \pm 2.20 \text{ b, } \alpha$ | $199.25 \pm 1.22 \text{ b, } \gamma$ | $224.87 \pm 3.48 \text{ b, } \beta$ |
| DMSO | $133.77 \pm 2.68 \text{ c, } \beta$ | $147.79 \pm 1.44 \text{ c, } \alpha$ | $120.94 \pm 3.69 \text{ c, } \gamma$ |

注: 不同的字母表示存在显著性差异 ($P < 0.05$), 其中英文字母表示同种样品在不同溶剂中是否存在显著差异, 希腊字母表示同种样品在同种溶剂中是否存在显著差异。

子间氢键, 3 种淀粉在 DMSO 中 $[\eta]$ 均为水中的 50%, 强氢键受体 DMSO 拆开了淀粉的单独螺旋, 使分子体积下降。

尽管 3 种淀粉在不同溶剂中表现了总体相同的变化趋势, 却显示了不同的细节。TR 在低浓度 KOH 下, 更易破坏分子间氢键, 而强极性溶剂 DMSO 使其 $[\eta]$ 下降却不到 50%, 说明 TR 淀粉具有更少的螺旋结构, 分子间的相互作用较小。而 E_3 和 T 淀粉显然不容易在低浓度 KOH 作用下破坏氢键, 分子中存在的螺旋相对较多。

表 2 马铃薯淀粉在不同盐溶液中的特性黏度
Table 2 The intrinsic viscosity of potato starch in different salt solution (mL/g)

| Salt solution | E_3 | TR | T |
|-----------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| NaCl | $206.76 \pm 5.37 \text{ c, } \alpha$ | $198.89 \pm 2.33 \text{ b, } \beta$ | $180.44 \pm 2.05 \text{ b, } \gamma$ |
| Na_2SO_3 | $222.75 \pm 1.44 \text{ b, } \alpha$ | $226.36 \pm 1.45 \text{ a, } \alpha$ | $220.50 \pm 6.11 \text{ a, } \alpha$ |
| CaCl_2 | $234.83 \pm 4.85 \text{ a, } \alpha$ | $112.21 \pm 1.68 \text{ e, } \beta$ | $112.19 \pm 3.20 \text{ d, } \beta$ |
| $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ | $198.53 \pm 1.84 \text{ d, } \alpha$ | $166.67 \pm 2.32 \text{ c, } \beta$ | $120.62 \pm 4.07 \text{ c, } \gamma$ |
| Cont. | $133.77 \pm 1.80 \text{ e, } \beta$ | $147.79 \pm 1.44 \text{ d, } \alpha$ | $120.94 \pm 0.82 \text{ c, } \gamma$ |

盐能破坏淀粉表面的水化膜, 使淀粉分子链更易与溶剂结合, 使淀粉溶液的特性黏度增大。如表 2 所示, 3 种马铃薯淀粉的 DMSO 溶液在添加盐溶液后 $[\eta]$ 大都有所增加, 但增加比率不同, E_3 的淀粉在各种盐溶液中均显示了较大的增长, 特别是在 Al^{3+} 存在下, 与其他 2 种淀粉的 $[\eta]$ 变化趋势显然不同, 大幅增加了 $[\eta]$; 至于其中的原因是三者的磷酸根含量的影响, 还是分子构象存在差异, 尚有待进一步研究。TR 的淀粉显示了相对较小的增幅, 这可能是其分子链螺旋较少, 而盐离子破坏无规链水化膜不及破坏螺旋中水化膜多的缘故。

2.2 热特性分析

3 种马铃薯淀粉的 DSC 分析结果列于表 3, E_3 、TR、T 三者中 T_0 以 TR 最大, 说明其相变起始温度较高, 相变结束温度 T_c 具有同样的规律, 说明 TR 淀粉中可能存在较多弱的结晶区 (可能主要以支链结晶为主), 而 TR 的焓变在三者中却是最小的, 说明该淀粉分子结晶度较小, 因而破坏结晶需要较少的能量, 这与溶液行为的研究结果一致。而其他 2 种淀粉的焓变比较接近, 考虑到溶液行为的差异, 可以推断, 3 种马铃薯淀粉中, TR 淀粉的结构与其他 2 种具有比较显著的差异。并且可以初步推测, TR 淀粉分子中有更多的无规链穿插于螺圈中间, 形成多晶区。

表 3 3 种马铃薯淀粉的热特性

Table 3 Thermal properties of three kinds of potato starch

| 样品 Sample | 初始温度 Onset temperature (T_0 , $^\circ\text{C}$) | 峰值温度 Peak temperature (T_p , $^\circ\text{C}$) | 终止温度 Conclusion temperature (T_c , $^\circ\text{C}$) | 外推峰值温度 Extrapol peak temperature (T_E , $^\circ\text{C}$) | 焓变 Enthalpy (ΔH , $\text{J} \cdot \text{g}^{-1}$) |
|--------------|--|---|---|--|--|
| E_3 | 32.99 | 52.18 | 100.75 | 41.81 | -217.45 |
| TR | 42.83 | 65.86 | 105.35 | 62.58 | -157.54 |
| T | 29.50 | 72.99 | 94.80 | 95.81 | -200.25 |

2.3 X 射线衍射分析

3 种马铃薯淀粉的 XRD 分析如图 1 所示, 是稍有差异的

衍射图谱, TR 的淀粉 2θ 在 16.86° 、 17.26° 、 21.98° 、 31.14° 、 34.86° 处出现了衍射峰, 其中 16.86° 和 21.98° 处的衍射峰在 3

种马铃薯淀粉中都存在,是淀粉的特征衍射峰。不同的是,TR淀粉结晶度最低,为34.21%,而E₃和T分别为42.32%和38.67%。此外,与其他2种淀粉显著不同的是,TR淀粉在2 θ (31.14°、34.86°)较大的位置存在衍射峰,强吸收峰的强

度低于E₃和T,并且分化为2个强度相近的吸收峰,这些表明TR淀粉中存在较多的晶区,但强度较弱,总结晶度较小,与DSC分析吻合。

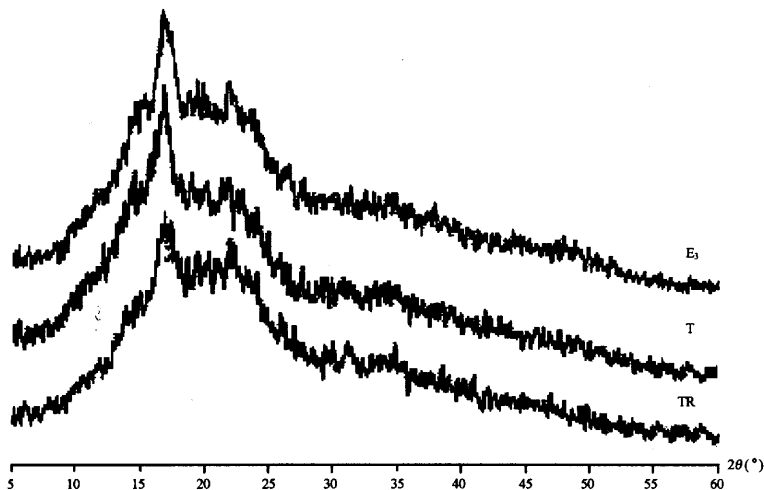


图1 3种不同马铃薯淀粉的X射线衍射图谱
Fig.1 XRD of three kinds of potato starch

3 讨论

溶液行为、聚集态结构分析是研究高分子材料的常用方法。上述研究结果表明,E₃、T、TR的马铃薯淀粉在结构上确实存在差异,其中E₃和T在分子结构上比较接近,而各种分析均证实TR的分子结构与其他2种显然不同,这显示出非针对淀粉结构的基因操作对淀粉结构带来的影响不可忽略。因此,在评价马铃薯等作物品质改良的效果时,淀粉结构的变化及其影响应该同时纳入考虑范围。但对于转基因操作为何会使产物产生结构差异,其产生机理如何,这种差异是否会影响到淀粉的品质,以及是否会对人体、环境产生危害,均有待进一步研究。

References

- [1] Qin B-T(秦波涛), Li H-P(李和平), Wang X-X(王晓曦). Potato Processing(薯类加工). Beijing: China Light Industry Press, 2001. pp 1-5, 70-92 (in Chinese)
- [2] Tan G-R(谭国荣). A broad perspective of potato starch. Starch & Starch Sugar(淀粉与淀粉糖), 2000, (4): 10-11 (in Chinese with English abstract)
- [3] Shu X-L(舒小丽), Shu Q-Y(舒庆尧). Advance in starch biosynthesis and transgenic modification in crops. Biotech Bull(生物技术通报), 2004, (4): 19-26 (in Chinese with English abstract)
- [4] Song M(宋敏), Li Y-Y(李援亚), Zhang Y-S(张云孙). Studies on transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants transformed with ACPase gene and its economic characters. Acta Agric Boreali-Sin(华北农学报), 2001, 16(4): 11-14 (in Chinese with English abstract)
- [5] Cheng S-H(成善洪), Su Z-H(苏振洪), Xie C-H(谢从华), Liu J(柳俊). Effects of variation in activities of starch-sugar metabolic enzymes on reducing sugar accumulation and processing quality of potato tubers. Sci Agric Sin(中国农业科学), 2004, 37(12): 1904-1910 (in Chinese with English abstract)
- [6] Zhan G-Y(詹谷宇), Wang P-L(王萍莉), Mu J(穆娟). Study on improvement of process for medical starch. Chin J Pharmaceuticals(中国医药工业杂志), 1995, 26(10): 441-442 (in Chinese with English abstract)
- [7] Svegmärk K, Helmersson K, Nilsson G. Comparison of potato amylopectin starch and potato starches influence of year and variety. Carbohydrates Polymers, 2002, (47): 331-340
- [8] Li A-P(李爱萍), Han W-J(韩文俊), Chen Y-S(陈玉顺), He J-Z(何进章), Cai F-L(蔡夫柳). Viscometry of molecular mass of polytrimethylene terephthalate. Polyester Industry(聚酯工业), 2001, (2): 19-22 (in Chinese with English abstract)
- [9] Yu Z-G(虞志光). Determination on Polymer Molecular Weight and Its Distribution(高聚物分子量及其分布的测定). Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1984. pp 23-24 (in Chinese)