

出國報告（出國類別：研究）

赴國際稻米研究所研習水稻 GI 評估指標 之心得

服務機關：臺中區農業改良場

姓名職稱：王柏蓉助理研究員

派赴國家：菲律賓

出國期間：中華民國 105 年 11 月 7 日至 11 日

報告日期：106 年 2 月 3 日

赴國際稻米研究所研習水稻 GI 評估指標之心得

目次

一. 摘要.....	3
二. 目地.....	4
三. 研習行程.....	5
四. 研習內容	
1. SEC(Size-exclusion chromatography)操作流程與資料分析.....	6
2.體外澱粉水解試驗之實驗步驟及資料分析.....	7
3.水稻品質之分析流程.....	8
五. 心得及建議.....	9
六. 附錄.....	10

一. 摘要

依據「中華民國行政院農業委員會及國際稻米研究所農業技術合作瞭解備忘錄」合作計畫，於 2016 年 11 月 7 日至 11 日(5 天)赴國際稻米研究所 (International Rice Research Institute, IRRI)穀物品質與營養中心(Grain Quality and Nutrition Center, GQNC)進行「建構低 GI 水稻以降低健康風險」工作目標之研習及合作重點方向討論。本次主要討論及研習內容包含(一) 以分子篩選層析 SEC 分析水稻澱粉結構、(二) 討論體外澱粉水解試驗之實驗步驟及資料分析、(三) 訪察 IRRI 穀物品質與營養中心水稻品質之分析流程除了儲存澱粉，由於水稻之升糖指數亦會受儲存蛋白、非澱粉類碳水化合物，甚至是澱粉本身與脂肪酸結合產生之次級結構所影響，因此若單純由直鏈澱粉含量、糊化溫度或凝膠延展性等單一性狀為篩選指標，恐不易取得同時具備低升糖指數及符合消費市場需求的水稻品種(系)，因此穀物品質與營養中心主持人 Nesse 博士建議，在 IRRI 方面繼續釐清其種原影響程度 GI 較主要之澱粉結構，以利提供我方作為低 GI 性狀之貢獻親，我方可用與符合國內消費市場之育種材料雜交，而在實驗方法一致的基礎上，雙方可共享或共同分擔後裔族群低 GI 及品質性狀之篩選，增加目標達成效率。

二. 目的

糖尿病(diabetes)已成為全球高罹患率的慢性疾病之一。依據行政院衛生署104年統計，糖尿病始更高居國人十大死因第五位。攝食米飯所造成的血糖反應通常以升糖指數(glycemic index, GI)表示，(GI是食物食用後2小時內的血糖增加值，與食用純葡萄糖100公克後2小時內的血糖增加當作GI=100基準值來比較)，依食物GI大致可分成低GI(≤ 55)、中GI(56-69)以及高GI(≥ 70)三大類。菲律賓國際水稻研究所(IRRI)研究報告指出，全球235種稻米的GI值介於48-92。我國消費大宗之蓬萊米米飯屬中高GI值表現，因此普遍認知為攝取米食產品後，血液中的血糖值易迅速提高，對血糖調控不利，使糖尿病患對米食攝取嚴加限制。

台灣低GI水稻專用品種的開發約啟始於2013年，由於高直鏈澱粉含量之米通常較不易水消化，屬於GI較低的食物，目前國內新品種發展正朝向直鏈澱粉含量高，但口感較軟的目標努力，開發出口感可為國人接受的鮮食米種，以維護人體血糖穩定。

為擴大台灣與國際稻米研究所(International Rice Research Institute, IRRI)雙方的深層合作，與IRRI建立夥伴關係，解決國內稻作產業技術與推廣的需求與缺口，並培養國內新一代的水稻研究者之國際觀，將研發技術與世界接軌，而產生「中華民國行政院農業委員會及國際稻米研究所農業技術合作瞭解備忘錄」合作計畫，於此計畫項，有「研發低升糖指數水稻品種系以減少危害健康之風險」之工作目標。本次參訪乃據此，於2016年11月7日至11日(5天)赴國際稻米研究所穀物品質與營養中心(Grain Quality and Nutrition Center, GQNC)進行研習及分享，希望與IRRI米質中心進行學術交流，以建置與國際接軌之國內GI相關指標分析平台。

三. 研習行程

中華民國 105 年 11 月 7 日至 11 日

日期	上午	下午	備註
11/7 (一)		桃園 13:45 →馬尼拉 15:50 中華航空 CI703	住宿: Swaminathan Guestroom
11/8 (二)	IRRI 穀物品質與營養中心 ▶ 與主持人 Nesse 博士討論此行行程 ▶ 以分子篩選層析 SEC 分析水稻澱粉結構 樣品前處理、上機		
11/9 (三)	IRRI 穀物品質與營養中心 ▶ 以分子篩選層析 SEC 分析水稻澱粉結構結果 換算與資料判讀 ▶ 討論體外澱粉水解動力學實驗及換算心得		
11/10 (四)	IRRI 穀物品質與營養中心 ▶ 訪察 IRRI 穀物品質與營養中心水稻品質之分析 流程 ▶ 與主持人 Nesse 博士分享訪察心得並討論未來 合作方向		
11/11 (五)	馬尼拉 10:45 →桃園 12:45 中華航空 CI702		

四. 研習內容

2016 年 11 月 7 日至 11 日 (5 天) 赴國際稻米研究所 (International Rice Research Institute, IRRI) 穀物品質與營養中心 (Grain Quality and Nutrition Center, GQNC) 進行研習及分享。本次主要討論及研習內容如下：

(一) 以分子篩選層析 SEC 分析水稻澱粉結構

分子篩選層析 (SEC, Size-exclusion chromatography) 又稱膠體滲透層析 (GPC, Gel Permeation Chromatography)。此一技術適用於較大分子量 (約 2 kDa 以上) 樣品之分離，並可測量高分子聚合物的平均分子數、平均分子量，以及分子量的分布。SEC 是先將聚合物溶於溶劑，經動相 (Mobile Phase) 沖提，藉由不同分子量之間的高分子與靜相 (Stationary Phase) 的大小顆粒不同，造成在管柱內滯留時間的不同而分離。較高分子量的聚合物在管柱的滯留時間較短，分子量較低的聚合物則因可通過管柱孔洞而滯留時間較長，藉此得知此聚合物分子量的分布。

分子篩選層析待測樣品製備處理流程包含秤取 (糙) 米粉末，萃取總澱粉、經酵素水解去除分支 (debranch) 及標記 (labeling)，IRRI 穀物品質與營養中心分子篩選層析的樣品前處理操作步驟如下：

總澱粉萃取

1. 秤取樣品 (糙米粉末) 50 mg，放入玻璃閃爍計數瓶，加入攪拌子，秤重
2. 加入 400 μ l 乙醇 (需完全覆蓋樣品粉末，以免後續加入 NaOH 時會結塊)
3. 加入 1.0 ml 0.25M NaOH
4. 置於 150°C 平台攪拌，待沸騰開始計時 10 分鐘，加入 0.8ml 熱水*
5. 10 分鐘後分二次各加入 0.8ml 熱水，沸騰後再加熱 2 分鐘。
6. 以超純水定重到 4g

*加水以避免經氧化物產生，使澱粉分子鏈結斷裂。

去除總澱粉分支

1. 將 794 μ l 糊化澱粉移入 2 ml 微量離心管
2. 將 10 ml 0.2M 醋酸鈉 pH4 緩衝液及 360 μ l 冰醋酸充分混合，取 206 μ l 移入離心管
3. 加入 8 μ l debranching isoamylase (250 U/mL)
4. 上下搖晃數次以混合均勻
5. 50°C 溫水浴 2 小時 (期間每 15 分鐘搖晃一次)
6. 100 °C 失活 5 分鐘使酵素失活
7. 12500 rpm 離心 10min
8. 小心將上澄液置入具有離子交換樹脂的 2.0mL 微量離心管 (BioRad) 至 0.5mL 刻度
9. 50°C 溫水浴 30 分鐘 (期間每 10 分鐘搖晃一次)
10. 將 198 μ l 溶液以定量吸管吸取至 105 μ l 注液軸心，置入蓋子有隙縫之樣品小瓶

完成樣品制備後，HPLC 上機設定如下：

- 洗液(eluent)-0.05m NH₄ acetate, pH 4.75 w/ 0.02% NaN₃
- 流速(flow rate)-0.5 ml/min, 50% line A, 50% line B
- 注射體積(injection volume)-40μ l
- 上機時間(run time)-35 分鐘（一個樣品完成上機約需 42 分鐘。）
- 自行設定之標準品(in-house standard) IR36ae (amylose extent mutant)：直鏈澱粉含量 22~28% (33%)。
- 校正用標準品(calibration standard)：Pullulan standards (8 組)

本次研習亦利用上機結果練習如何從實驗結果中與標準品比較，求得相對之直鏈澱粉百分比及聚合度。實際操作乃以校正用標準品每一時間點讀值所對應之直鏈澱粉含量為參考，將樣品所有時間點換算之澱粉讀值總合為分母，第一個波峰對應之累積讀值為分子，求得直鏈澱粉佔直鏈澱粉-支鏈澱粉之百分比。

(二) 討論體外澱粉水解試驗之實驗步驟及資料分析

1. 樣品前處理

- (1) 秤取樣品（白米粉末）25 mg
- (2) 加入 5 mL HCL-KCL buffer (pH1.5)
- (3) 加入 0.1 mL Pepsin solution (1 g Pepsin 10 mL HCL-KCL buffer)
- (4) 置於 40°C 水浴鍋震盪 1 h
- (5) 加入 7.4 mL Tris-Maleate buffer (pH = 6.9) 總體積共 12.5 mL
- (6) 加入 2.5 mL α -amylase 溶液 (含 2.6 UI 的α -amylase)
- (7) 置於 37 °C 水浴鍋震盪 0/ 5/ 10/ 20/ 30/ 60/ 90/ 120/ 150/ 180 min
- (8) 100 °C 失活 5 min，冷卻
- (9) 布氏濾斗以 4 號濾紙 (2 張) 過濾，定容到 100 mL
- (10) 2000 rpm 離心 5min，取上澄液
- (11) 取 1 mL 樣品以 GOPOD (glucose oxidase-peroxidase) Analysis Kit 測定葡萄糖含量

2. 體外澱粉水解動力學常數 (min^{-1})之計算

- (1) 澱粉水解速率 (starch hydrolysis rate)：以下列算式將讀值換算成葡萄糖含量

$$\text{水解速率 (\%)} = \Delta A \times \frac{F}{W} \times FV \times 0.9$$

ΔA = 扣除空白試驗的吸光值

$$F = \frac{100 (\mu\text{g 葡萄糖標準品含量})}{100 \mu\text{g 葡萄糖吸光值}} \quad (\text{將吸光值換算成 } \mu\text{g})$$

FV = 定量後的體積

W = 樣品重量 (mg)

$$0.9 = \text{澱粉水解成葡萄糖} = \frac{162}{180}$$

(2) 澱粉水解動力(kinetics of starch hydrolysis)：以下列算式將不同時間點測得的澱粉水解速率算出水解曲線，可得平衡水解動力學常數(k)

$$C = C_{\infty}(1 - e^{-kt})$$

C：於 t 時間之澱粉水解速率

C_{∞} ：水解 180 min 後的平衡澱粉水解率

k：動力學常數(kinetic constant, min^{-1})

在以體外澱粉水解試驗求得推估升糖指數 (estimated glycemic index, eGI)之實驗步驟及資料分析一致性的討論結果顯示，台灣本工作目標小組的樣品前處理方式與 IRRI 穀物品質與營養中心大致相同，而筆者在國內進行體外澱粉水解實驗過程中，以 α -amylase 與樣品澱粉作用時，常有時間點 0 時葡萄糖含量非零的困擾，副研究員 Maria Krishna D. de Guzman 建議 α -amylase 與樣品澱粉作用的前 30 分鐘內，應在第 5/10/20 分鐘都要測定葡萄糖含量，以免損失許多澱粉水解效率資訊。

(三) 訪察 IRRI 穀物品質與營養中心水稻品質之分析流程

1. 碾米品質、米粒外觀及理化特性分析：

以完整米率 75% 為門檻，高於此者方繼續量測粒長(短、中、長、特長)、粒型(粗、中、細)，以及白垩質率等米粒外觀性狀，以及米粒延展程度、直鏈澱粉含量、糊化溫度、凝膠展延性及糊液黏度特性等理化特性分析。該中心支米粒外觀性狀皆以 SeedCount 影像處理分析系統進行粒徑及白垩質維度分析，大大減輕人力成本。米粒理化特性分析之項目及方法與本場稻作與米質研究室差異不大，唯米粒延展程度是該地區消費者十分重視的品質，關乎以最少的消費量得到最大的飽足感。

2. 烹調及食用品質評估：

除了凝膠展延性及糊液黏度特性等物性指標外，該中心亦利用質地剖析(TPA，Texture Profile Analysis)及官能品評(Sensory Evaluation)。質地分析為以水：米重 1：1 煮 30 分鐘之三粒白米為樣品，重複三次而得。IRRI 穀物品質與營養中心之官能品評流程乃參照美國農部(USDA)之方法，其樣品調製之條件，以及表格的評價描述會因試驗的不同跟著調整。由於該中心所面對的消費市場需求相當多元，其官能品評並非以單一特別品種(如我國固定使用台梗 9 號)為對照，而是使用不同物質作為各感官項目之標準，因此需要定期重新校正品評員之感官標準(約每 6 個月一次)。

五. 心得及建議

在「中華民國行政院農業委員會及國際稻米研究所農業技術合作瞭解備忘錄」合作計畫中「建構低 GI 水稻以降低健康風險」之工作目標雖明確，但除了儲存澱粉，由於水稻之升糖指數亦會受儲存蛋白、非澱粉類碳水化合物，甚至是澱粉本身與脂肪酸結合產生之次級結構所影響，因此若單純由直鏈澱粉含量、糊化溫度或凝膠延展性等單一性狀為篩選指標，恐不易取得同時具備低升糖指數及符合消費市場需求的水稻品種(系)。

IRRI 以 SEC 分析直鏈-支鏈澱粉比例，則能對白米主成分澱粉中(米澱粉含量占米粒 80-90%)，直鏈澱粉、支鏈澱粉及直鏈-支鏈澱粉複合物之交感作較完整的考量，唯穀物品質與營養中心主持人 Nesse 博士表示，SEC 分析直鏈-支鏈澱粉比例對白米 GI 解釋力仍可能僅佔 65% (儲存蛋白及其他非儲存澱粉之碳水化合物等約佔 35%)。本次研習亦利用上機結果練習如何從實驗結果中與標準品比較，求得相對之直鏈澱粉百分比及聚合度。唯本次筆者所操作之樣品上機結果有過多異常雜訊，推測為前處理(萃取總澱粉、去除分支(debranch))過程澱粉糊化不完全而有雜質殘留所導致，因此在結果分析乃藉 IRRI 技術人員操作之試驗樣品讀值作為練習對象。本次研習結果顯示以分子篩選層析分析水稻澱粉結構，需要較完整的實際操作訓練。每日可測定之樣品數僅約 9~10 組，以台灣本工作目標小組的人力，欲實際應用在低 GI 水稻品種選育過程常規篩選項目實有難度，因此 Nesse 博士建議，在 IRRI 方面繼續釐清其種原影響程度 GI 較主要之澱粉結構，以利提供我方我做為低 GI 性狀之貢獻親，我方可用與符合國內消費市場之育種材料雜交。而在實驗方法一致的基礎上，雙方可共享或共同分擔後裔族群低 GI 及品質性狀之篩選，增加目標達成效率。

在以體外澱粉水解試驗求得推估升糖指數 (estimated glyceic index, eGI)之實驗步驟及資料分析一致性的討論結果，副研究員 Maria Krishna D. de Guzman 表示，該中心對於水稻升糖指數之推估，並無進一步計算水解曲線下面積 (the area under the hydrolysis curve, AUC)、水解指數 (hydrolysis index, HI) 及推估升糖指數 (estimated glyceic index, eGI)，而以平衡水解動力學常數(k)的決定該樣品之相對澱粉水解速率，k 越大，表示澱粉水解速率越小，GI 較低，此項作法在篩選育種材料過程可大大減少計算步驟，不失為自行處理大量樣品資料時增加篩選效率之方法。

六. 附錄



IRRI GQNC 使用之磨粉機



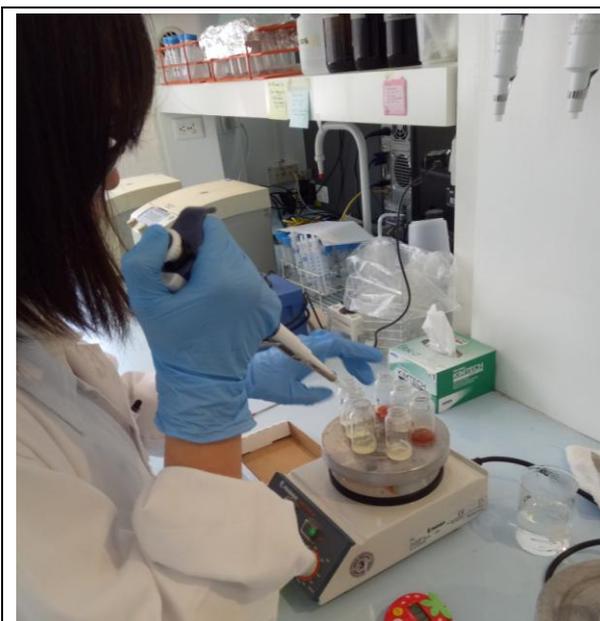
粉類樣品之秤取與分裝



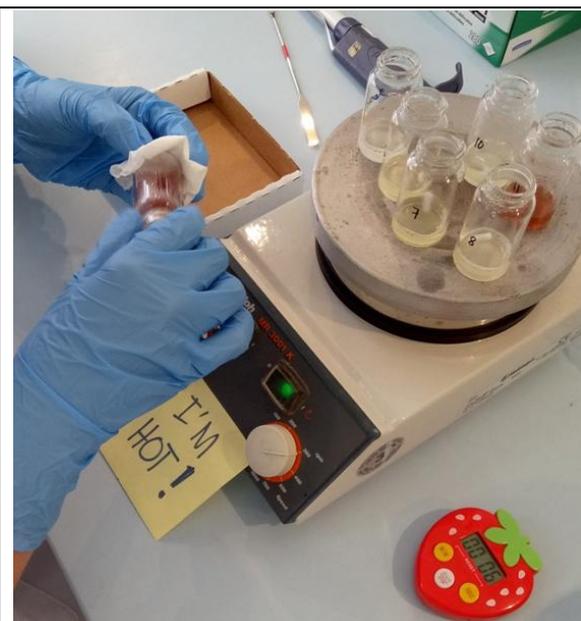
樣品粉末加入乙醇及 NaOH



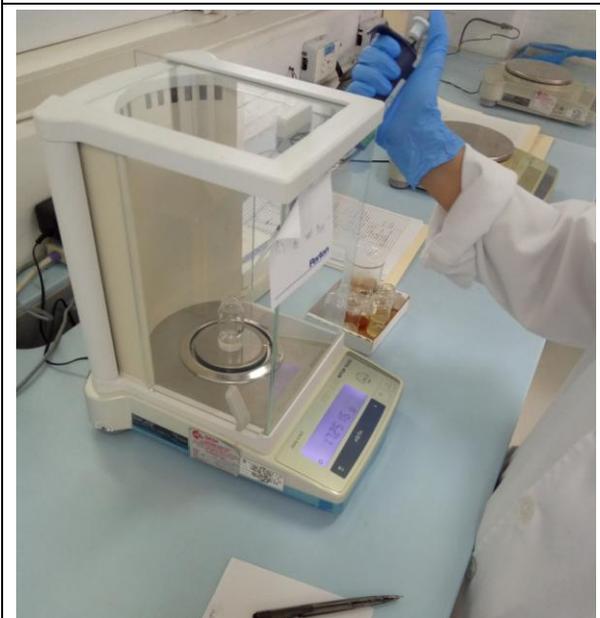
於 150°C 平台攪拌，待沸騰計時 10 分鐘



沸騰 10 分鐘後分二次各加入 0.8ml 熱水



加熱水過程應傾斜轉動溫和混勻樣品



以超純水定重到 4g



糊化澱粉溶液移入 2 ml 微量離心管，另加入醋酸鈉緩衝液及冰醋酸混合液



加入 debranching isoamylase 後 50°C 溫水浴 2 小時（期間每 15 分鐘搖晃一次）



100 °C 失活 5 分鐘使酵素失活



12500 rpm 離心 10min



將上澄液置入具有離子交換樹脂的微量離心管



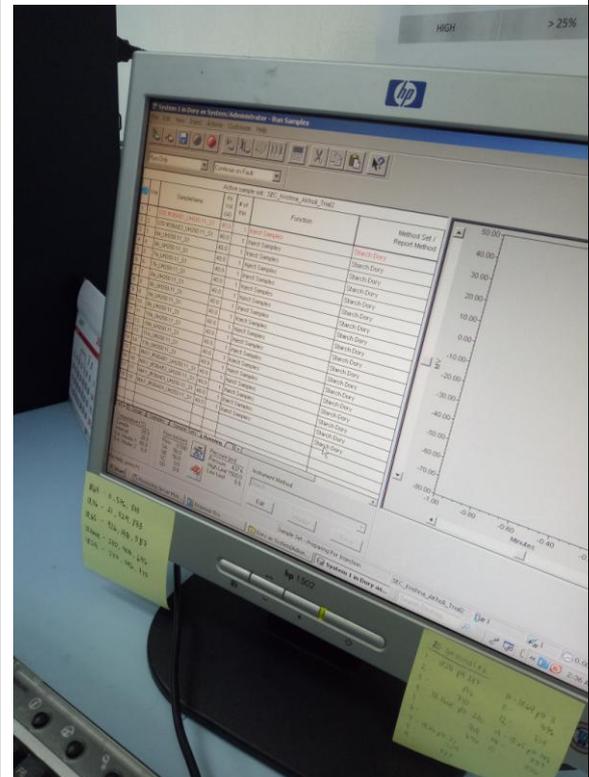
BioRad 離子交換樹脂



將 198 μ l 溶液吸取至樣品小瓶



HPLC 儀器



HP-SEC 上機畫面



附自動上機裝置的近紅外光分析儀



近紅外光分析儀的樣品槽



IRRI 品飯室，每位品飯員的隔間



IRRI 米飯品評的玻璃小鉢及烹煮鍋