

## 复合酶法大黄米多孔淀粉的制备及其微观结构和理化性质

秦智欣, 郑明珠\*, 林楠, 潘楚, 刘景圣

(吉林农业大学食品科学与工程学院 小麦和玉米深加工国家工程实验室 长春 130118)

**摘要** 以吸油率为指标, 大黄米淀粉为原料, 采用复合酶法( $\alpha$ -淀粉酶和糖化酶)制备大黄米多孔淀粉。通过单因素实验与 Box-Behnken 响应面法优化大黄米多孔淀粉制备的工艺参数, 并对原淀粉及大黄米多孔淀粉进行结构表征。结果表明, 复合酶法制备大黄米多孔淀粉的最优工艺参数是: 复合酶添加量 1.2%, 酶解温度 56 °C, 酶解时间 14 h, 酶解 pH 4.6, 复合酶配比 1:4。在此条件下大黄米多孔淀粉的吸油率为(174.00±2.00)%。扫描电镜结果显示, 形成多孔淀粉后, 淀粉颗粒表面存在不均匀分布的孔洞及圆形凹陷, 内部呈中空结构。粒度分布测试结果显示, 多孔淀粉粒径均减小, 淀粉颗粒分布均一度提高。X-射线衍射分析及傅里叶红外光谱表明, 酶的水解作用不会改变大黄米淀粉的 A 型晶体结构及基本化学结构, 相对结晶度和红外吸收峰均明显增加, 淀粉颗粒内部有序程度提高。低温氮气吸附结果表明, 复合酶酶解作用使大黄米淀粉的比表面积由 13.9 m<sup>2</sup>/g 增加至 29.42 m<sup>2</sup>/g, 孔径由 4.143 nm 增加至 6.637 nm, 孔容由 14.81×10<sup>-3</sup> cm<sup>3</sup>/g 增加至 25.05×10<sup>-3</sup> cm<sup>3</sup>/g。黏度测定结果表明, 多孔淀粉峰值黏度、崩解值降低。本研究可为多孔淀粉的开发应用及大黄米的精深加工提供参考。

**关键词** 大黄米淀粉; 多孔淀粉; 吸油率; 糖化酶;  $\alpha$ -淀粉酶

**文章编号** 1009-7848(2023)05-0138-13 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.05.015

大黄米(*Panicum millaceum* L.)是糜子(黍)去皮后的产物, 约在 10 000 年前起源于中国, 目前于中国北部、欧洲、北美、澳大利亚、非洲均有广泛种植<sup>[1-2]</sup>。淀粉是大黄米的主要成分, 其含量在 60%~90%<sup>[3-4]</sup>。此外, 大黄米还富含蛋白质、维生素、多种矿物质元素以及膳食纤维, 能够预防糖尿病、肝损伤、心血管等疾病<sup>[5]</sup>。大黄米属营养价值高、药食同源的健康谷物, 越来越受欢迎。因缺乏创新的加工技术, 故使大黄米这种优质谷物资源长期处于利用率较低的状态, 对其精深加工及开发应用较少。

多孔淀粉(Porous starch)也称微孔淀粉, 因形成由表面延伸至中心的多孔结构而使比表面积变大, 具有优异的物理吸附能力, 对被吸附对象无选择性, 可作为封装剂、微胶囊芯材载体、吸附剂等, 被广泛应用于医药、环境、食品、化妆品等众多领域, 扩大了淀粉的应用范围, 发展前景广阔<sup>[6-8]</sup>。

目前制备多孔淀粉的方法主要有化学法、物理法、酶法, 其中酶水解法因绿色环保、操作易控制、底物特异性强而被广泛应用<sup>[9]</sup>。有研究表

明<sup>[10-12]</sup>,  $\alpha$ -淀粉酶和糖化酶是酶水解法最主要的酶。 $\alpha$ -淀粉酶为一种内切酶, 仅内切  $\alpha$ -1,4 糖苷键。糖化酶作为外切酶, 其专一性较差且只能从非还原末端逐步水解, 除能水解  $\alpha$ -1,4 糖苷键外, 还能缓慢水解  $\alpha$ -1,3 和  $\alpha$ -1,6 糖苷键<sup>[13]</sup>。当二者共同作用于淀粉时, 复合水解产生的协同作用使水解效果优于单一酶。近年来, 制备多孔淀粉的原料较多集中在淀粉含量较高的玉米<sup>[14]</sup>、大米<sup>[15]</sup>、木薯<sup>[16]</sup>等, 以大黄米淀粉制备多孔淀粉鲜有研究报道。

本研究以大黄米淀粉为原料, 采取 Box-Behnken Design (BBD) 试验优化复合酶法( $\alpha$ -淀粉酶和糖化酶)制备大黄米多孔淀粉的工艺, 并对大黄米多孔淀粉的结构进行表征。以期制备一种高吸附性能的多孔淀粉, 增加大黄米的综合利用价值, 为多孔淀粉的开发及应用提供理论参考。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与试剂

大黄米, 辽宁建平县惠丰源粮食加工有限公司; 大豆油, 市售;  $\alpha$ -淀粉酶(酶活 3 479 U/g, 参考国标 GB/T24401-2009《 $\alpha$ -淀粉酶制剂》测定), 糖化酶(酶活 44 074.072 U/g, 参考国标 GB1886.174-2016《食品工业用酶制剂》测定), 上海源叶生

收稿日期: 2022-05-20

基金项目: 全国粮食行业领军人才专项(LL2018201)

第一作者: 秦智欣, 女, 硕士

通信作者: 郑明珠 E-mail: zhengmzhu@163.com

物科技有限公司;氢氧化钠、磷酸氢二钠、无水柠檬酸,分析纯试剂。

## 1.2 仪器与设备

VERTEX 70 傅里叶变换红外光谱仪,德国 Bruker 公司;BT-9300HT 激光粒度分布仪,丹东市百特仪器有限公司;D/MAX2500 X-射线衍射仪,日本理学公司;Sigma 300 超低温扫描电镜,德国 Zeiss 公司;ASIQM00002-4 全自动比表面和孔径分析仪,美国 Quantachrome 公司;TLXJ-JIB 高速离心机,上海安亭科学仪器厂;Allegra X-30R 高速离心机,美国 Beckman 公司;DKZ-2 电热恒温振荡水槽,上海精宏实验设备有限公司。

## 1.3 试验方法

1.3.1 大黄米淀粉的提取 大黄米→除杂粉碎→过筛(100 目)→碱液浸泡(固液比 1:5)→离心水洗(去除上层脂质、蛋白质、色素等物质)→淀粉粗浆→匀浆→调节 pH 值至中性→离心(洗涤沉淀)→取沉淀于 40 ℃下干燥→粉碎过筛(100 目)→大黄米淀粉。

1.3.2 大黄米多孔淀粉的制备 参考 Zhang 等<sup>[17]</sup>的方法,并稍作修改。称取 10 g 大黄米淀粉溶于 50 mL 一定 pH 值(4.0,4.5,5.0,5.5,6.0)的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液中,混匀后预热 10 min。精确称取一定配比(1:2,1:3,1:4,1:5,1:6)的 $\alpha$ -淀粉酶和糖化酶,与大黄米淀粉悬浮液混合,恒温振荡反应一定时间(6,8,10,12,14,16 h)后,加入 4% NaOH 停止酶解反应。将酶解液离心所得沉淀用蒸馏水洗涤后,置于 40 ℃烘箱干燥后研碎,过 100 目筛,即酶解后大黄米多孔淀粉。

1.3.3 吸油率的测定 参考吴丽荣等<sup>[18]</sup>的方法,将 0.50 g( $m_1$ )的淀粉样品置于离心管中,室温下与大豆油以质量比 1:10 的比例震荡,充分混匀后静置 30 min,离心(4 000 r/min,10 min),将上层大豆油吸出,倒置至无油滴滴下,加盖称重。吸油率( $\omega$ )计算公式:

$$\omega(\%) = \frac{m_2 - m_1 - m_0}{m_1} \times 100 \quad (1)$$

式中, $m_1$ ——淀粉样品质量(g); $m_2$ ——离心管、淀粉及油的总质量(g); $m_0$ ——离心管质量(g)。

1.3.4 单因素实验设计 选取复合酶配比(1:2,1:

3,1:4,1:5,1:6)、酶添加量(0.2%,0.6%,1.0%,1.4%,1.8%)、酶解 pH(4.0,4.5,5.0,5.5,6.0)、酶解温度(40,45,50,55,60 ℃)、酶解时间(6,8,10,12,14,16 h)进行实验,研究其对吸油率的影响。试验固定条件为复合酶配比 1:4,酶添加量 1.0%,酶解 pH 4.5,酶解温度 55 ℃,酶解时间 12 h。

1.3.5 响应面试验设计 以单因素实验为基础,采用四因素三水平的响应面分析方法对大黄米多孔淀粉的制备工艺进行优化,试验因素及水平见表 1。

表 1 试验因素与水平表

Table 1 Experimental factors and levels

水平	试验因素			
	A(酶解 pH)	B(复合酶添加量)/%	C(酶解时间)/h	D(酶解温度)/℃
-1	4.0	0.6	12	50
0	4.5	1.0	14	55
1	5.0	1.4	16	60

1.3.6 粒径分布分析 将少量淀粉粉末分散在测定池中,当遮光度升至 12%时,涡旋及超声分散后进样,平行测定 3 次,取平均值,得到粒径分布结果。

1.3.7 X-射线衍射析 参考 Qiao 等<sup>[19]</sup>的方法,并稍作修改。采用铜靶 Cu-K $\alpha$ ,管压 40 kV,管流 30 mA,扫描角度范围  $2\theta$  为 4°~40°。相对结晶度以 MDI Jade 6 进行分析。

1.3.8 扫描电镜颗粒形貌分析 为衡量多孔淀粉的成孔情况,将其均匀分布于载物台上,真空喷金处理 5 min,于电压 3 kV 下,放大 2 000 倍和 5 000 倍,观测样品颗粒形貌。

1.3.9 傅里叶红外光谱扫描 参考 Liu 等<sup>[20]</sup>的方法并作部分修改。使用傅里叶红外光谱检测(FT-IR)大黄米淀粉及其多孔淀粉的结构。称取 1 mg 干样品与 100 mg KBr 在紫外灯下充分混合,研磨,真空压片 1 min。扣除溴化钾薄片的背景,于 4 000~400  $\text{cm}^{-1}$  波数范围扫描 64 次,得到大黄米淀粉及其多孔淀粉红外光谱图。

1.3.10 比表面积及孔容孔径分析 参考 Guo 等<sup>[21]</sup>方法测定。将样品在 100 ℃真空脱气、脱水

12 h后,在液氮温度(77.35 K)下,通入高纯  $N_2$ ,对淀粉样品进行吸附测定。

1.3.11 黏度特性分析 称取 3 g 淀粉样品于 RVA 铝罐中,加入 25 mL 蒸馏水,在 960 r/min 下搅匀形成淀粉悬浮液。将样品在 50 °C 下保持 1 min,然后加热至 95 °C,保温 5 min,随后将样品冷却至 50 °C,保持 4 min,得到淀粉糊化特性结果。

#### 1.4 数据处理

所得数据采用 SPSS Statistics 25 进行显著性分析,用 Origin 2017 作图,用 Design Expert 10.0.1 进行响应面优化处理。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素实验结果及分析

由图 1a 可知,吸油率随着双酶配比的改变先升高后降低,于双酶配比 1:4 时达到最大值,表明此条件下双酶的协同效应最佳。 $\alpha$ -淀粉酶随机内切  $\alpha$ -1,4 键产生的非还原末端为糖化酶提供新的作用位点,糖化酶也能降低  $\alpha$ -淀粉酶水解产物在

水解过程中所带来的阻碍<sup>[22]</sup>。二者产生的协同作用使水解连续性地沿着淀粉双螺旋结构向内部不断深入,因此双酶配比在 1:4 为宜。

由图 1b 可知,吸油率随酶添加量的增加先升高后降低,于 1.0% 时达到最大值。这是由于在酶浓度较低时,淀粉与酶结合不充分,形成孔洞较小,孔隙较浅<sup>[23]</sup>。而酶用量超过 1.0% 时,淀粉的过度水解使小孔融合为大孔,部分形成中空结构的多孔淀粉裂解,吸油率下降,并且过量的酶会因找不到结合位点,未与淀粉结合而造成浪费。酶添加量在 1.0% 为宜。

由图 1c 可知,吸油率随 pH 值的增加先升高后降低,于 pH 4.5 时达到最大值。pH 的变化影响酶活性以及多孔淀粉的电荷特性,酶活性不同对淀粉结构的影响也不同,多孔淀粉电荷特性的改变影响其吸附能力<sup>[24]</sup>。酶解 pH 4.5 为宜。

因多孔淀粉是在亚糊化温度下水解制备的,而大黄米淀粉的糊化温度为 77 °C 左右<sup>[25-26]</sup>,故酶解温度范围在 40~60 °C 之间。由图 1d 可知,随着

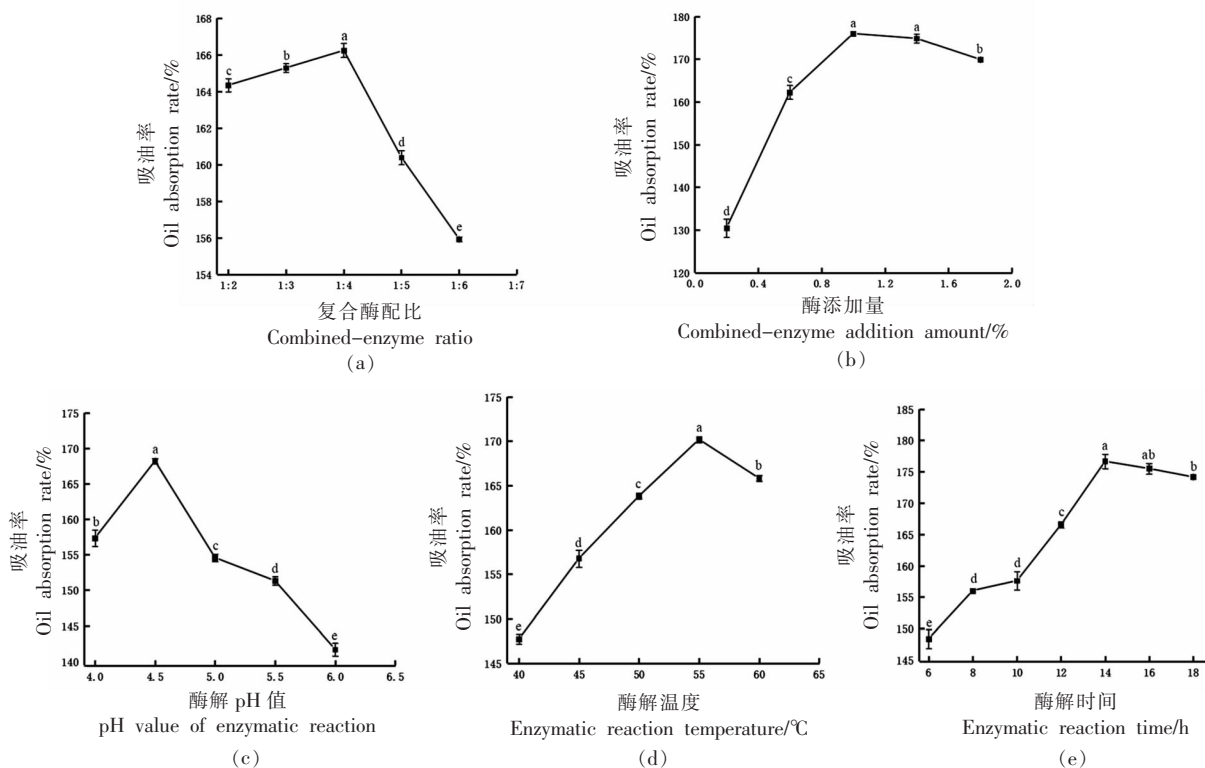


图 1 不同工艺条件对大黄米多孔淀粉吸油率的影响

Fig.1 Effect of different technological conditions on oil absorption rate of porous starch of proso millet starch

温度的升高,吸油率出现明显增加,于 55 ℃达到最大值。这是由于温度与酶反应速率、淀粉的溶胀有关<sup>[27]</sup>。随着温度的升高,酶反应速度加快,淀粉吸水溶胀,有利于酶向淀粉内部逐渐渗入,促进水解作用。当温度超过 55 ℃时淀粉趋于糊化,酶因高温而失活。酶解温度在 55 ℃为宜。

由图 1e 可知,吸油率随酶解时间的增加先升高后降低,于 14 h 达最大值。在水解的最初阶段,因淀粉内部构造紧密,故水解十分缓慢,部分颗粒还未形成孔结构,截留油脂的能力较低。随着水解

的进行,淀粉结构逐渐松散,酶对淀粉水解更加充分,淀粉颗粒表面孔洞及凹坑的数量增加,内部中空结构扩大。然而,时间过长会导致酶解过度,吸附能力下降<sup>[28]</sup>。酶解时间在 14 h 为宜。

## 2.2 响应面优化试验结果

2.2.1 Box-Behnken 试验设计及结果 在单因素实验基础上,选取影响吸油率较为显著的复合酶添加量(A)、酶解温度(B)、酶解 pH(C)和复合酶配比(D),根据 Box-Behnken 设计原理设计得到 29 组响应面试验,试验设计及结果见表 2。

表 2 响应面试验设计及结果

Table 2 Response surface test design and results

试验号	A(复合酶添加量)	B(酶解温度)	C(酶解 pH)	D(酶解时间)	吸油率/%	试验号	A(复合酶添加量)	B(酶解温度)	C(酶解 pH)	D(酶解时间)	吸油率/%
1	0	0	0	0	175.00	16	0	0	1	1	162.00
2	0	0	1	-1	154.00	17	0	1	0	1	159.25
3	-1	0	1	0	145.78	18	1	0	0	-1	167.54
4	0	-1	1	0	149.00	19	0	0	0	0	172.00
5	0	-1	-1	0	150.00	20	-1	0	0	-1	147.00
6	0	-1	0	-1	150.27	21	1	0	-1	0	158.00
7	0	0	0	0	175.00	22	0	-1	0	1	162.00
8	1	1	0	0	165.00	23	0	1	0	-1	165.00
9	0	0	-1	-1	156.86	24	-1	0	0	1	160.00
10	-1	1	0	0	147.00	25	1	0	0	1	169.00
11	0	1	1	0	156.95	26	0	0	0	0	172.35
12	0	0	0	0	175.00	27	1	-1	0	0	158.15
13	-1	0	-1	0	154.97	28	0	0	-1	1	160.59
14	0	1	-1	0	152.00	29	1	0	1	0	170.00
15	-1	-1	0	0	150.00						

2.2.2 模型回归方程拟合及方差分析 通过 Design Expert 软件对表 2 试验结果进行多元二次回归拟合,建立回归模型,得到大黄米多孔淀粉吸油率与各因素变量的二次方程模型: $Y=173.87+6.91A+2.15B+0.44C+2.68D+2.46AB+5.30AC-2.88AD+1.49BC-4.37BD+1.07CD-7.48A^2-10.96B^2-10.26C^2-4.84D^2$

从表 3 方差分析结果可看出,该回归模型极显著( $P<0.0001$ ),失拟项不显著( $P=0.3541>0.05$ )。模型的  $R^2=0.9801$ ,  $R^2_{adj}=0.9602$ ,表明试验误差小,模型拟合度较好,说明以此模型预测试验结果十

分可靠,与实际情况相符。模型中的一次项 C 和交互项 BC、CD 为不显著 ( $P>0.05$ ),其它参数均显著。根据 F 值大小可得出各因素影响吸油率的主次顺序为:复合酶添加量(A)>酶解时间(D)>酶解温度(B)>酶解 pH(C)。

2.2.3 大黄米多孔淀粉制备各因素交互作用及分析 三维响应面的曲面越陡,二维等高线图越趋于椭圆形,且排线越密集,说明各因素及因素间交互作用对吸油率影响越大<sup>[29-30]</sup>。由图 2a, 2c, 2e, 2g 所示,沿 A 因素轴向的曲面较其它轴向曲面陡峭,说明复合酶添加量对吸油率的影响最显著。由图

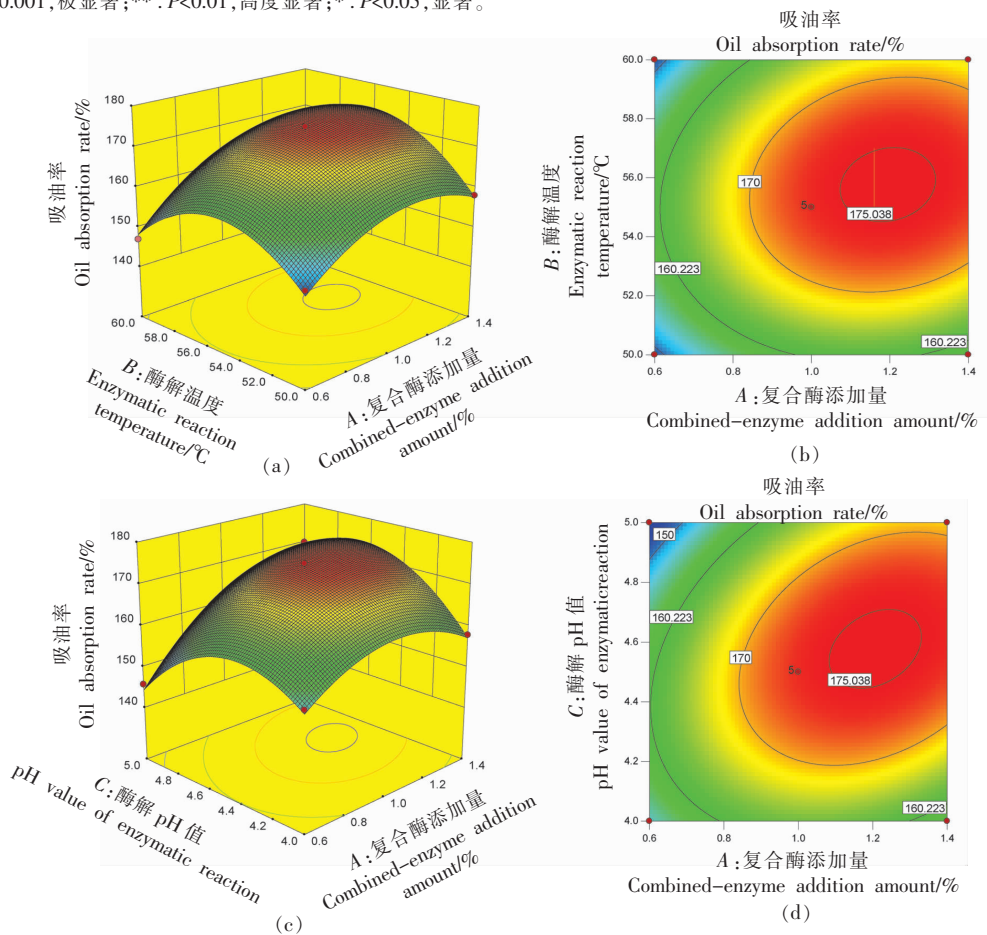
表3 模型回归方程方差分析

Table 3 Analysis of variance of regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	2 328.77	14	166.34	49.26	<0.0001	***
A(复合酶添加量)	573.25	1	573.25	169.75	<0.0001	***
B(酶解温度)	55.38	1	55.38	16.40	0.0012	**
C(酶解 pH)	2.35	1	2.35	0.70	0.4182	
D(酶解时间)	86.24	1	86.24	25.54	0.0002	**
AB	24.26	1	24.26	7.18	0.0179	*
AC	112.25	1	112.25	33.24	<0.0001	**
AD	33.29	1	33.29	9.86	0.0072	**
BC	8.85	1	8.85	2.62	0.1278	
BD	76.39	1	76.39	22.62	0.0003	**
CD	4.56	1	4.56	1.35	0.2647	
A <sup>2</sup>	362.76	1	362.76	107.42	<0.0001	***
B <sup>2</sup>	778.57	1	778.57	230.56	<0.0001	***
C <sup>2</sup>	683.43	1	683.43	202.38	<0.0001	***
D <sup>2</sup>	152.24	1	152.24	45.08	<0.0001	***
残差	47.28	14	3.38			
失拟项	37.64	10	3.76	1.56	0.3541	
纯误差	9.64	4	2.41			
总和	2 376.05	28				

$R^2=0.9801$        $R^2_{adj}=0.9602$        $CV=1.15\%$

注:\*\*\*.  $P<0.001$ ,极显著;\*\* .  $P<0.01$ ,高度显著;\* .  $P<0.05$ ,显著。



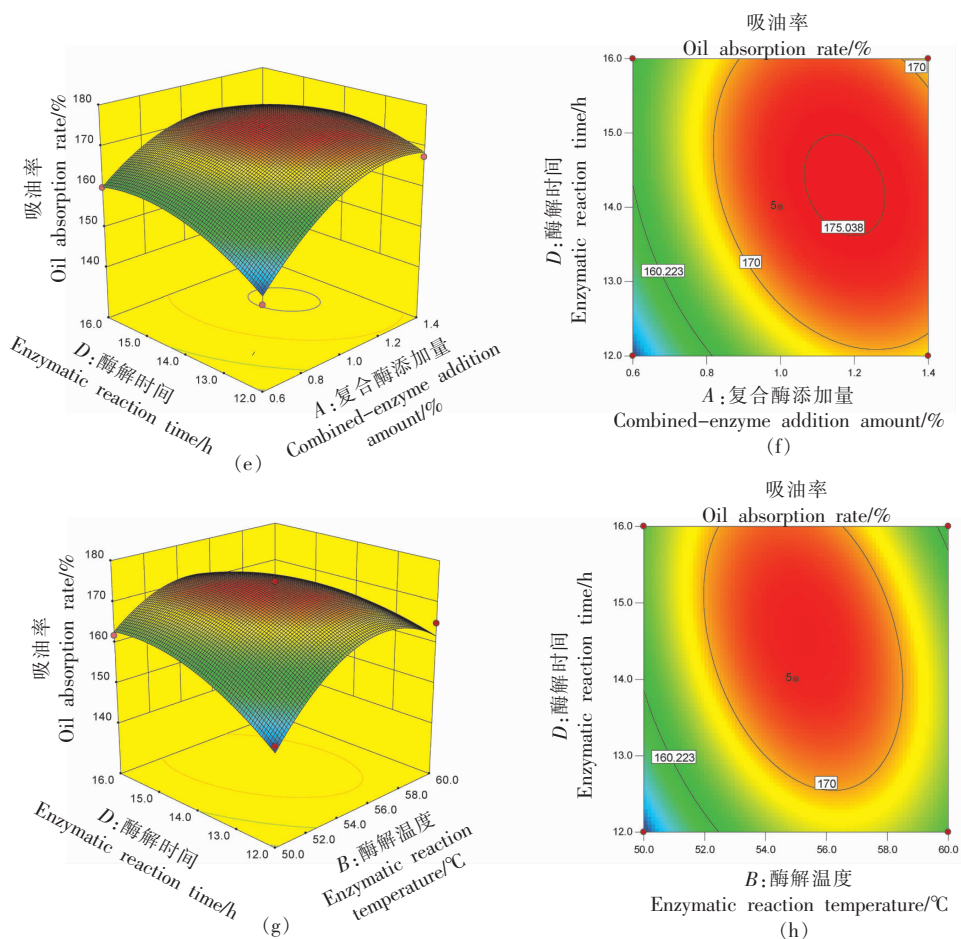


图 2 因素交互作用的曲面图及等高线图

Fig.2 Surface and contour map of interactive effects of different factors

3b,2d,2f,2h 可知,等高线均呈椭圆形,说明复合酶添加量与酶解 pH、酶解时间、酶解温度,酶解时间与酶解温度两因素间交互作用显著,其它因素的交互作用不明显,与表 3 结果一致。

2.2.4 验证试验 采用 Design-Expert 10.0.7 分析方程模型。考虑到降低能耗、操作便利,将拟合所得最佳工艺条件修正为:复合酶添加量 1.2%,酶解温度 56 °C,酶解时间 14 h,酶解 pH 4.6,复合酶配比 1:4。在此条件下做 3 次平行验证试验,测出吸油率为(174.00±2.00)%,与预测最大吸油率 176.022%基本相符,且远高于原淀粉(原淀粉吸油率为 88%),表明此回归模型用于预测大黄米多孔淀粉制备工艺有效、可靠。

### 2.3 结构表征

2.3.1 粒径分布 由仪器自动分析得到表 4 参数。

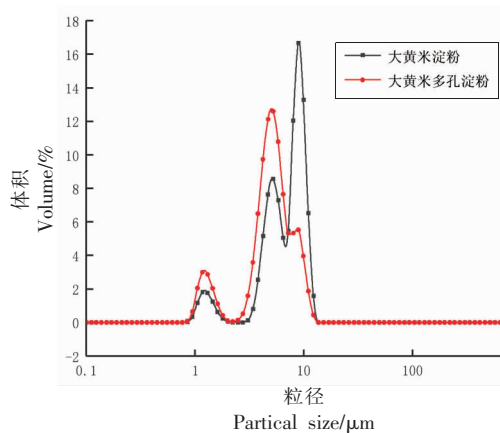


图 3 大黄米淀粉及多孔淀粉的粒度分布

Fig.3 Particle size distribution of proso millet starch and porous starch

粒度分布是表征淀粉颗粒尺寸的重要标准。由图 3 可知,大黄米淀粉颗粒粒度分布范围在 1~14 μm,较其它淀粉小,因此其本身聚合、吸附及

化学反应的活性较大<sup>[31]</sup>。大黄米淀粉呈现3个主峰的颗粒分布,经复合酶水解后,分布更为集中,稍向较低粒径范围转移,7~14 μm处的峰值降低,1~7 μm处的峰值增高,说明复合酶的酶解作用使淀粉颗粒均一性明显提高<sup>[32]</sup>。根据仪器自动分析表4结果, $D_{10}$ 、 $D_{50}$ 、 $D_{90}$ 代表粒度分布情况, $D_{[4,3]}$ 、 $D_{[3,2]}$ 代表淀粉颗粒的大小<sup>[33]</sup>。由表4可知,在形成多孔淀粉后粒径分布发生明显改变,上述数值均减小,这是由于酶解使淀粉颗粒表面形成凹陷、孔洞及孔隙,也有部分淀粉颗粒因水解过度崩解而变成小颗粒碎片,粒径有所下降。

**2.3.2 X-射线衍射分析结果** 大黄米淀粉及其多孔淀粉的X射线衍射结果如图4所示,二者均在15°,17°,18°,23°处出现4个主峰,为典型的谷物类A型结晶结构,说明复合酶的水解作用对淀粉的晶型无影响。多孔淀粉出现比天然淀粉更强且尖锐的吸收峰,相对结晶度由(23.43±0.45)%增至(26.34±0.69)%。这主要是由于淀粉颗粒结晶少、密度小的无规则部分及无定形区经酶作用后出现大范围水解,结晶区比例升高,分子排列的有序性增强<sup>[34]</sup>,而未被水解部分彼此缔合形成多孔淀粉<sup>[35]</sup>。

**2.3.3 扫描电镜颗粒形貌分析结果** 大黄米淀粉及其多孔淀粉的微观颗粒形貌如图5所示。大黄米淀粉表面相对光滑,大多呈多角形且伴有凹陷,部分颗粒表面有小孔,凹陷及小孔的存在可为酶分子提供接触位点,使复合酶分子更易渗入颗粒内部进行水解。经复合酶水解后,淀粉颗粒表面变得十分粗糙,存在由颗粒表面至内部延伸的孔洞及圆形凹陷,且分布不均匀,透过孔洞可看到淀粉颗粒的同心环层结构及内部的空腔结构,而颗粒

表4 大黄米淀粉及多孔淀粉的粒度分布

Table 4 Particle size distribution of proso millet starch and porous starch

	大黄米淀粉	多孔淀粉
$D_{10}/\mu\text{m}$	4.09 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.56 ± 0.02 <sup>b</sup>
$D_{50}/\mu\text{m}$	8.01 ± 0.02 <sup>a</sup>	5.39 ± 0.08 <sup>b</sup>
$D_{90}/\mu\text{m}$	10.88 ± 0.07 <sup>a</sup>	9.25 ± 0.02 <sup>b</sup>
$D_{[3,2]}/\mu\text{m}$	5.41 ± 0.04 <sup>a</sup>	4.00 ± 0.04 <sup>b</sup>
$D_{[4,3]}/\mu\text{m}$	7.44 ± 0.04 <sup>a</sup>	5.59 ± 0.04 <sup>b</sup>

注: $D_{10}$ :颗粒累积分布为10%的粒径; $D_{50}$ :中位径; $D_{90}$ :颗粒累积分布为90%的粒径; $D_{[4,3]}$ :体积平均粒径; $D_{[3,2]}$ :表面积平均粒径;同一列的不同的小写字母表示之间存在显著性差异, $P<0.05$ 。

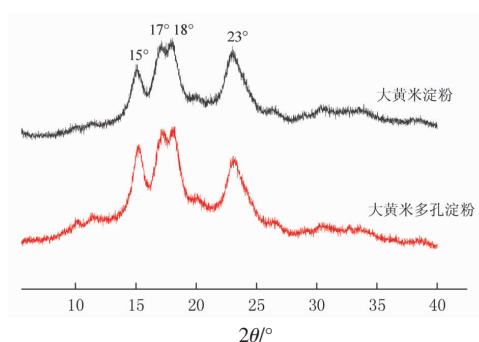
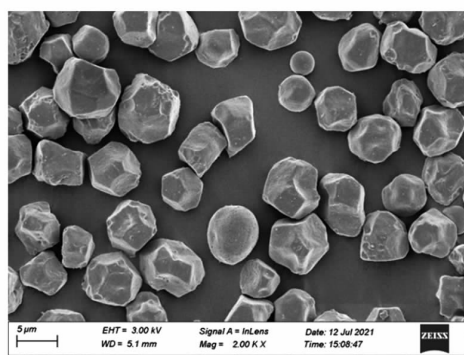


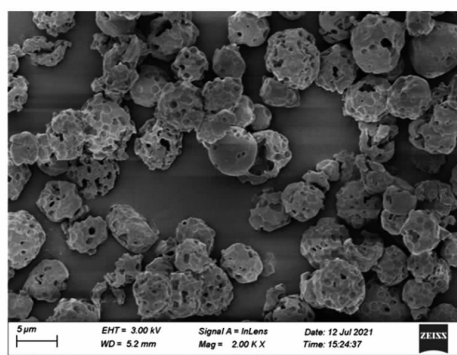
图4 大黄米淀粉及其多孔淀粉的X-射线衍射图

Fig.4 X-ray diffraction pattern of proso millet starch and porous starch

形状几乎未发生改变,说明制得大黄米多孔淀粉。复合酶对淀粉的水解从淀粉颗粒不规则表面开始,从小孔渗入,糖化酶的外切活性能够增加孔深, $\alpha$ -淀粉酶的内切活性能够增加孔宽<sup>[36]</sup>,使水解连续由外至内径进入淀粉分子内部,孔洞逐渐增多,孔径增大,然后在中心附近熔融,再从中心向外水解,形成中空结构<sup>[37]</sup>。



(a)大黄米淀粉(×2 000)



(b)多孔淀粉(×2 000)

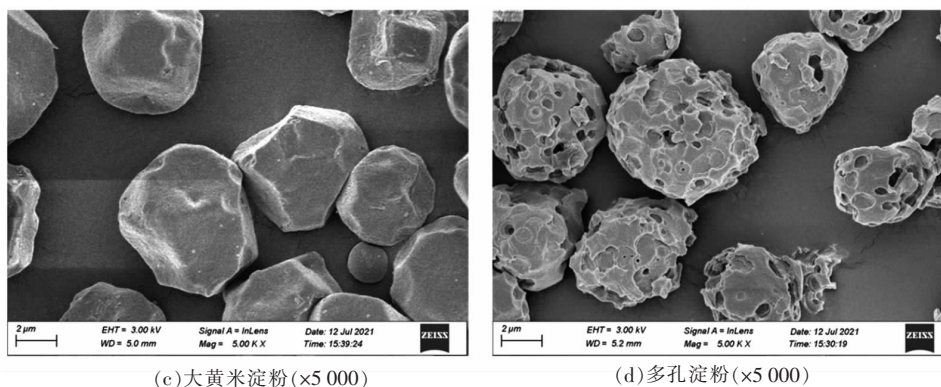


图 5 大黄米淀粉及其多孔淀粉的 SEM 图

Fig.5 Scanning electron micrographs of proso millet starch and porous starch

2.3.4 傅里叶红外光谱分析结果 对于傅里叶红外光谱而言,  $1\ 047\ \text{cm}^{-1}$  和  $1\ 022\ \text{cm}^{-1}$  处的红外吸收峰分别代表淀粉颗粒中结晶区和无定形区,  $995\ \text{cm}^{-1}$  与 C-6 处羟基的分子内氢键有关, ( $1\ 047/1\ 022$ )  $\text{cm}^{-1}$  和 ( $1\ 022/995$ )  $\text{cm}^{-1}$  的峰强度比值代表淀粉颗粒的短程有序结构<sup>[38-39]</sup>。由图 6 红外光谱结果可知, 大黄米淀粉与大黄米多孔淀粉的光谱图基本一致, 特征吸收峰位置未发生变化, 说明酶解过程并未改变淀粉的基本化学键组成, 也未产生新的基团。而峰强度明显增加, 于  $3\ 400\ \text{cm}^{-1}$  (O-H 键的伸缩振动),  $2\ 931\ \text{cm}^{-1}$  (C-H 键的伸缩振动),  $1\ 640\ \text{cm}^{-1}$  ( $\text{H}_2\text{O}$  的弯曲振动) 处较明显, 峰值强度的增加与淀粉颗粒被水解后亲水亲脂基团暴露有关<sup>[40]</sup>, 使大黄米多孔淀粉吸附能力增强。大黄米淀粉在形成多孔淀粉后 ( $1\ 047/1\ 022$ )  $\text{cm}^{-1}$  比值由 1.668 增到 2.413, ( $1\ 022/995$ )  $\text{cm}^{-1}$  比值由 0.626 降到 0.255, 表明淀粉分子间氢键数量增加, 促进淀粉分子螺旋结构的堆积和缠绕, 使淀粉颗粒内部有序性更高, 这与 XRD 所得相对结晶度变化结果一致<sup>[41]</sup>。

2.3.5 比表面积及孔容孔径分析 根据 IUPAC 分类方法, 如图 7a 和 7c 所示的两个样品的吸脱附等温线均是 II 型, 吸附和脱附等温线并未重合, 出现 H3 型回滞环, 这是多层吸附的介孔淀粉质原料的特征<sup>[42]</sup>。在同等条件下, 大黄米多孔淀粉的吸-脱附等温线在大黄米淀粉上方,  $\text{N}_2$  吸附量更高, 并随  $p/p_0$  的增加不断缓慢上升, 淀粉颗粒内孔洞及外表面对  $\text{N}_2$  由单分子层吸附转变为多层吸附, 在  $p/p_0$  接近 1 时急剧升高, 发生毛细凝聚现

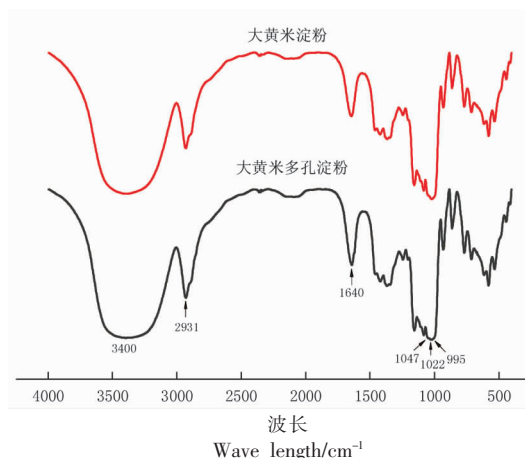


图 6 大黄米淀粉及其多孔淀粉的 FT-IR 光谱图

Fig.6 FT-IR spectra of proso millet starch and porous starch

象, 说明大黄米淀粉经酶解已形成粗糙的多孔结构<sup>[43]</sup>。由图 7b 和 7d 孔径分布结果及表 5 结果可知, 原淀粉及多孔淀粉的孔径均分布在 2~50 nm 间, 曲线趋势基本相同, 而多孔淀粉的介孔分布范围明显较高, 这说明大黄米淀粉本身虽含有孔洞, 但孔径较小, 在酶解处理后孔洞增加且变大。平均孔径由 4.143 nm 增至 6.637 nm, 比表面积由  $13.90\ \text{m}^2/\text{g}$  增至  $29.42\ \text{m}^2/\text{g}$ , 总孔容明显增加, 意味着大黄米多孔淀粉承载物质的量更多, 与吸油率增加有关, 这与电镜结果中呈现的多孔及粗糙的多孔淀粉颗粒的表观形态一致。

2.3.6 黏度特性 由表 6 可知, 与原淀粉相比, 多孔淀粉的黏度相关参数、崩解值、回生值均降低, 糊化温度升高。崩解值与淀粉颗粒稳定性有关, 崩



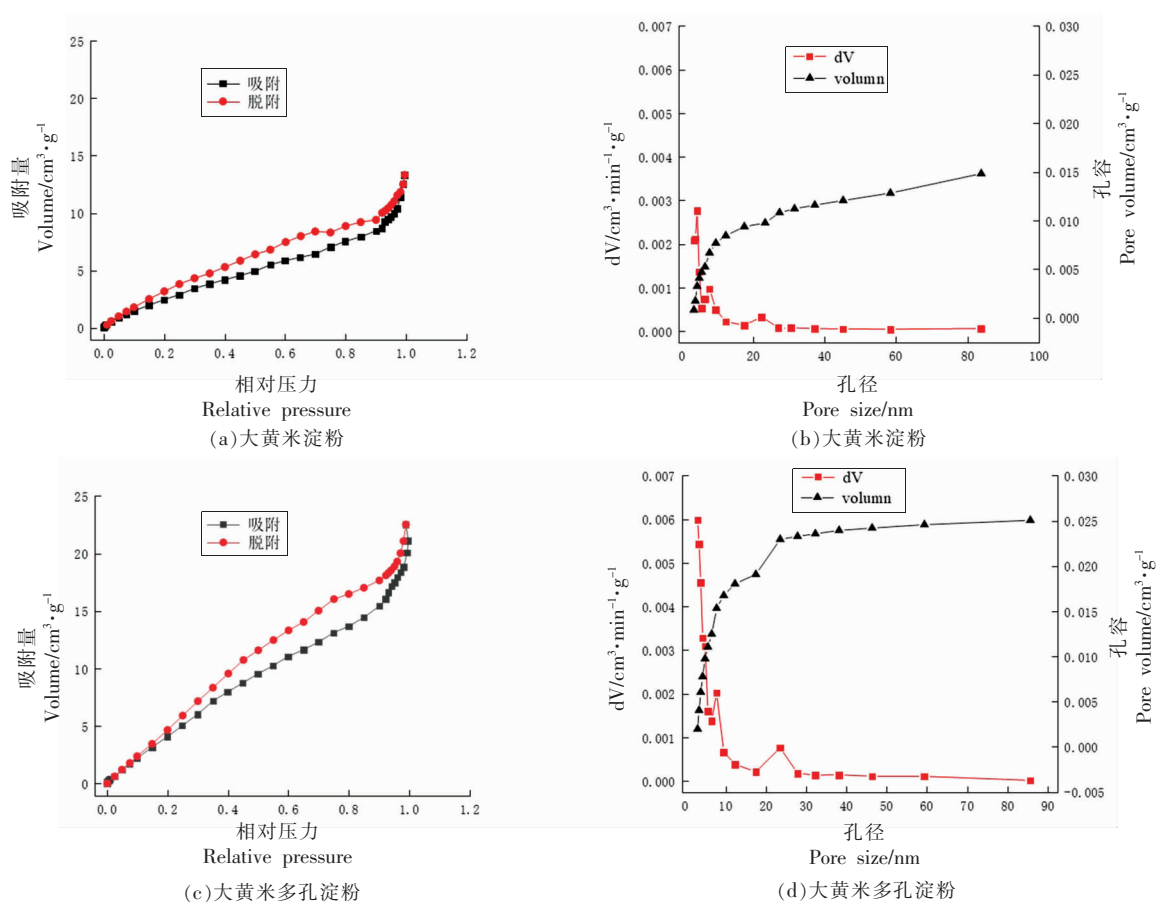


图7 大黄米淀粉及其多孔淀粉的氮气吸-脱附等温线及孔径分布图

Fig.7 The nitrogen adsorption and desorption isotherms of proso millet starch and porous starch

表5 大黄米淀粉及其多孔淀粉的比表面积和孔结构参数

Table 5 Surface area and pore structure parameters for proso millet starch and porous starch

样品	比表面积/ $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$	总孔容/ $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$	平均孔径/ $\text{nm}$
原淀粉	13.90	$14.81 \times 10^{-3}$	4.143
大黄米淀粉	29.42	$25.05 \times 10^{-3}$	6.637

解值降低,说明多孔淀粉在加热过程中抗剪切性能增强。Benavent-Gil等<sup>[7]</sup>研究表明,孔径大小及水结合力与峰值黏度呈负相关,多孔淀粉峰值黏

度降低,说明酶解使淀粉分子链长变短,形成疏松的多孔凹坑结构,有利于水分渗透,使淀粉膨胀糊化能力增加。

表6 大黄米淀粉及其多孔淀粉的黏度特性

Table 6 Pasting parameters of proso millet starch and porous starch

样品	峰值黏度/cP	谷值黏度/cP	崩解值/cP	最终黏度/cP	回生值/cP	成糊温度/ $^{\circ}\text{C}$
大黄米淀粉	$2\,921.6 \pm 35.80^a$	$1\,906.3 \pm 41.74^a$	$1\,015.3 \pm 29.57^a$	$2\,195.7 \pm 15.31^a$	$289.3 \pm 27.15^a$	$76.20 \pm 0.44^b$
大黄米多孔淀粉	$1\,572.3 \pm 6.66^b$	$755.3 \pm 9.45^b$	$817.0 \pm 9.00^b$	$986.3 \pm 12.06^b$	$231.0 \pm 14.42^b$	$77.52 \pm 0.08^a$

### 3 结论

复合酶法制备大黄米多孔淀粉的最优工艺:

复合酶添加量 1.2%, 酶解温度  $56^{\circ}\text{C}$ , 酶解时间 14 h, 酶解 pH 4.6, 复合酶配比 1:4。在此条件下

的吸油率为(174.00±2.00)%。大黄米淀粉经复合酶作用后结构发生明显改变。形成多孔淀粉后,比表面积及孔容孔径明显增加,淀粉颗粒表面粗糙形成凹坑、多孔结构,峰值黏度、崩解值降低,糊化温度升高,粒径稍有减小。复合酶的水解作用并未改变大黄米淀粉的 A 型结晶结构和化学结构,相对结晶度由(23.43±0.45)%增至(26.34±0.69)%,淀粉颗粒内部有序度提高。从大黄米多孔淀粉的高吸附能力也可以看出,大黄米淀粉可作为制备多孔淀粉的一种非常有前景的优质原料。

### 参 考 文 献

- [1] ZHANG P P, SONG H, KE X W, et al. GGE biplot analysis of yield stability and test location representativeness in proso millet (*Panicum miliaceum* L.) genotypes[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2016, 15(6): 1218–1227.
- [2] YANG Q H, ZHANG P P, QU Y, et al. Comparison of physicochemical properties and cooking edibility of waxy and non-waxy proso millet (*Panicum miliaceum* L.)[J]. Food Chemistry, 2018, 257: 271–278.
- [3] XIAO Y, ZHENG M Z, YANG S, et al. Physicochemical properties and *in vitro* digestibility of proso millet starch after addition of Proanthocyanidins [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 168: 784–791.
- [4] 周睿, 曹龙奎, 鹿保鑫. 黄米淀粉的制备及流变学特性的研究[J]. 中国食品添加剂, 2011(2): 93–98.  
ZHOU R, CAO L K, LU B X. Study on property and preparation rheological of proso millet starch[J]. China Food Additives, 2011(2): 93–98.
- [5] 刘勇, 姚惠源, 王强. 黄米营养成分分析[J]. 食品工业科技, 2006, 27(2): 172–174.  
LIU Y, YAO H Y, WANG Q. Analysis of nutritional components of proso millet[J]. Science and Technology of Food Industry, 2006, 27(2): 172–174.
- [6] XIE Y, LI M N, CHEN H Q, et al. Effects of the combination of repeated heat-moisture treatment and compound enzymes hydrolysis on the structural and physicochemical properties of porous wheat starch[J]. Food Chemistry, 2019, 274: 351–359.
- [7] BENAVENT-GIL Y, RODRIGO D, ROSELL C M. Thermal stabilization of probiotics by adsorption onto porous starches [J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 197: 558–564.
- [8] BELINGHERI C, GIUSSANI B, RODRIGUEZ-ESTRADA M T, et al. Oxidative stability of high-oleic sunflower oil in a porous starch carrier[J]. Food Chemistry, 2015, 166: 346–351.
- [9] CHEN J H, WANG Y X, LIU J, et al. Preparation, characterization, physicochemical property and potential application of porous starch: A reviews[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 148: 1169–1181.
- [10] 张国权, 张艳, 张洁, 等. 双酶法制备小麦微孔淀粉的动力学[J]. 食品科学, 2012, 33(23): 184–188.  
ZHANG G Q, ZHANG Y, ZHANG J, et al. Kinetics of enzymatic hydrolysis of wheat starch by  $\alpha$ -amylase and glucoamylase for preparation of microporous starch [J]. Food Science, 2012, 33 (23): 184–188.
- [11] ZHANG B, DHITAL S, GIDLEY M J. Synergistic and antagonistic effects of  $\alpha$ -amylase and amyloglucosidase on starch digestion[J]. Biomacromolecules, 2013, 14(6): 1945–1954.
- [12] DURA A, BASZCZAK W, ROSELLA C M. Functionality of porous starch obtained by amylase or amyloglucosidase treatments [J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 101: 837–845.
- [13] 董芝宏. 酶水解方式对多孔淀粉结构、性质的影响及其应用研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2019.  
DONG Z H. Hydrolysis method influence on structure and properties of porous starch and its application[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2019.
- [14] 甘招娣, 彭海龙, 熊华. 酶解-交联法制备多孔淀粉及其负载红景天苷研究[J]. 食品工业科技, 2017, 38(3): 68–73.  
GAN Z D, PENG H L, XIONG H. Preparation of crosslinked porous starch by enzymatic hydrolysis combined with crosslinking modification to encapsulate salidroside[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(3): 68–73.
- [15] KEERATIBURANAAB T, HANSEN A R, SOON-TARANONC S, et al. Porous high amylose rice starch modified by amyloglucosidase and maltogenic  $\alpha$ -amylase [J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 230: 115611.

- [16] 吴思芸, 王继虎, 张燕萍, 等. 交联微孔木薯淀粉的制备及其性能研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(1): 238-242.  
WU S Y, WANG J H, ZHANG Y P, et al. Preparation and characterization of cross-linked microporous starch[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(1): 238-242.
- [17] ZHANG B, CUI D P, LIU M Z, et al. Corn porous starch: Preparation, characterization and adsorption property[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2012, 50(1): 250-256.
- [18] 吴丽荣, 叶兴乾, 田金虎, 等. 超声辅助复合酶法制备碎米多孔淀粉及结构比较[J]. 中国粮油学报, 2020, 35(6): 120-126.  
WU L R, YE X Q, TIAN J H, et al. Preparation of porous broken rice starch by ultrasound assisted composite enzymatic method and comparison of their properties[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2020, 35(6): 120-126.
- [19] QIAO D L, XIE F W, ZHANG B J, et al. A further understanding of the multi-scale supramolecular structure and digestion rate of waxy starch[J]. Food Hydrocolloids, 2017, 65: 24-34.
- [20] LIU C, WANG S J, COPELAND L, et al. Physicochemical properties and *in vitro* digestibility of starches from field peas grown in China[J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 64(2): 829-836.
- [21] GUO L, LI J H, GUI Y F, et al. Porous starches modified with double enzymes: Structure and adsorption properties[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 164: 1758-1765.
- [22] 张欢欢, 郅琦. 双酶法制备板栗微孔淀粉的工艺研究[J]. 食品工业, 2017, 38(2): 81-84.  
ZHANG H H, ZHI Q. Study on preparation of chestnut microporous starch by double enzyme hydrolysis method[J]. The Food Industry, 2017, 38(2): 81-84.
- [23] UTHUMPORN U, ZAIDUL I S M, KARIMA A A. Hydrolysis of granular starch at sub-gelatinization temperature using a mixture of amylolytic enzymes[J]. Food and Bioproducts Processing, 2010, 88(1): 47-54.
- [24] 陆冬梅, 杨连生. 微孔木薯淀粉吸附特性研究[J]. 应用化工, 2005(4): 205-208.  
LU D M, YANG L S. Study on adsorption property of microporous tapioca[J]. Applied Chemical Industry, 2005(4): 205-208.
- [25] 林楠, 肖瑜, 杨新标, 等. 麦芽糖对糯性谷物淀粉糊化和流变性质的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(10): 1-7.  
LIN N, XIAO Y, YANG X B, et al. Effect of maltose on gelatinization and rheological properties of waxy cereal starch[J]. Food Science, 2021, 42(10): 1-7.
- [26] 周昊, 王成章, 叶建中, 等. 生物酶法制备白果微孔淀粉及其特性研究[J]. 生物质化学工程, 2014, 48(1): 18-22.  
ZHOU H, WANG C Z, YE J Z, et al. Preparation and characterization of ginkgo microporous starch with enzyme[J]. Biomass Chemical Engineering, 2014, 48(1): 18-22.
- [27] 杜敏华, 刘福林. 大米微孔淀粉的酶法制备工艺优化研究[J]. 粮油加工, 2007(5): 104-106.  
DU M H, LIU F L. Optimization of enzymatic preparation technology of rice microporous starch[J]. Cereals and Oils Processing, 2007(5): 104-106.
- [28] 阮杨峰, 周裔彬, 宋岑, 等. 酶量和酶解时间对玉米多孔淀粉制备效果的影响[J]. 农产品加工(学刊), 2012(6): 19-22.  
RUAN Y F, ZHOU Y B, SONG C, et al. Influence of enzyme concentration and enzymolysis time on preparation effect of porous corn starch[J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2012(6): 19-22.
- [29] 杨丽芝, 杨贤庆, 黄卉, 等. 响应面法优化南海鸕乌贼墨汁多糖提取工艺[J]. 食品工业科技, 2016, 37(18): 292-296.  
YANG L Z, YANG X Q, HUANG H, et al. Optimization of extraction technology polysaccharide from the ink of the *Sthenoteuthis oualaniensis* in South China Sea by response surface methodology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(18): 292-296.
- [30] ÜNSAL M, İŞİK-GÜLSAÇ I, ÜRESİN E, et al. Optimisation of biomass catalytic depolymerisation conditions by using response surface methodology[J]. Waste Management & Research, 2020, 38(3): 322-331.
- [31] 文红丽. 薏苡淀粉提取纯化技术及其理化特性和微孔淀粉的制备研究[D]. 重庆: 西南大学, 2012.  
WEN H L. Study on the extraction and purification of adlay starch by alkaline and ultrasonic wave and

- physical and chemical properties and preparation of micro porous starch[D]. Chongqing: Southwest University, 2020, 38(3): 322-331.
- [32] 姚卫蓉, 姚惠源. 多孔淀粉研究 II 淀粉开孔后的物性变化[J]. 中国粮油学报, 2005, 20(1): 17-21.  
YAO W R, YAO H Y. Researches on porous starch II the changes of physical characteristics during porous starch formation[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2005, 20(1): 17-21.
- [33] 邓银凤. 红薯多孔淀粉的酶法制备、表征和吸附性能的研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2019.  
DENG Y F. Enzymatic preparation, characterization and adsorptive properties of porous sweet potato starch[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2019.
- [34] CHEN Y S, HUANG S R, TANG Z F, et al. Structural changes of cassava starch granules hydrolyzed by a mixture of  $\alpha$ -amylase and glucoamylase[J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 85(1): 272-275.
- [35] 顾香玉, 张晓云, 刘景顺. 玉米微孔淀粉的制备及显微结构研究[J]. 食品科学, 2006, 27(12): 241-245.  
GU X Y, ZHANG X Y, LIU J S. Preparation of corn starch and its microstructure study [J]. Food Science, 2006, 27(12): 241-245.
- [36] SHARIFFA Y N, KARIMA A A, FAZILAH A, et al. Enzymatic hydrolysis of granular native and mildly heat-treated tapioca and sweet potato starches at sub-gelatinization temperature[J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23(2): 434-440.
- [37] 徐忠, 王鹏, 缪铭. 复合酶水解生淀粉形成微孔的机理研究[J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版), 2007, 23(1): 49-52, 57.  
XU Z, WANG P, MIAO M. Study on mechanism of aperture forming in raw starch enzymatic hydrolysis [J]. Journal of Harbin University of Commerce(Natural Sciences Edition), 2007, 23(1): 49-52, 57.
- [38] LI H Y, JIAO A Q, WEI B X, et al. Porous starch extracted from Chinese rice wine vinasse: Characterization and adsorption properties[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 61: 156-159.
- [39] VAN SOEST J J G, TOURNOIS H, DEWIT D, et al. Short-range structure in (partially) crystalline potato starch determined with attenuated total reflectance Fourier-transform IR Spectroscopy[J]. Carbohydrate Research, 1995, 279: 201-214.
- [40] ZHAO A Q, YU L, YANG MO, et al. Effects of the combination of freeze-thawing and enzymatic hydrolysis on the microstructure and physicochemical properties of porous corn starch[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 83: 465-472.
- [41] WANG H W, WANG Y, XU K, et al. Causal relations among starch hierarchical structure and physicochemical characteristics after repeated freezing-thawing[J]. Food Hydrocolloids, 2022, 122: 107121.
- [42] 余雅倩. 脉冲电场辅助酶解制备多孔淀粉-海藻酸盐微球及其包埋叶黄素研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2020.  
YU Y Q. Preparation of porous starch-alginate microbeads and entrapment of lutein by pulsed electric field assisted enzymatic hydrolysis[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2020.
- [43] JUSZCZAK L, FORTUNA T, WODNICKA K. Characteristics of cereal starch granules surface using nitrogen adsorption[J]. Journal of Food Engineering, 2002, 54(2): 103-110.

### Preparation, Structure and Physicochemical Properties of Proso Millet Porous Starch by Combined-enzyme Method

Qin Zhixin, Zheng Mingzhu\*, Lin Nan, Pan Chu, Liu Jingsheng

(National Engineering Laboratory for Wheat and Corn Deep Processing, College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118)

**Abstract** Porous starch was prepared by combined-enzyme method (sqaccharase and  $\alpha$ -amylase) by using proso millet starch as raw material and oil absorption rate as index. On the basis of single factor experiment, the process parameters

for the preparation of proso millet porous starch was optimized by Box-Behnken response surface methodology. The structure of the original starch and proso millet porous starch were characterized. The results indicated that the optimal process parameters for preparing proso millet porous starch by combined-enzyme method were combined-enzyme addition of 1.2%, enzymatic reaction temperature of 56 °C, enzymatic reaction time of 14 h, enzymatic reaction pH of 4.5, combined-enzyme ratio of 1:4. Under the optimized process condition, oil absorption rate of proso millet porous starch was (174.00±2.00)%. The surface of porous starch granules had uneven distribution of holes, circular depressions, and the internal structure was hollow by SEM. The particle size distribution test indicated that the particle size decreased slightly and the distribution uniformity of starch particles increased. The enzyme hydrolysis did not change the A-type crystal structure and basic chemical structure of proso millet starch by FT-IR and X-ray diffraction. The relative crystallinity and infrared absorption peak of proso millet starch were significantly increased. The inner order degree of starch granules was improved. Low temperature nitrogen adsorption results showed that the enzymatic digestion of the complex enzyme increased the specific surface area of proso millet starch from 13.9 m<sup>2</sup>/g to 29.42 m<sup>2</sup>/g, the pore size from 4.143 nm to 6.637 nm and the pore volume from 14.81×10<sup>-3</sup> cm<sup>3</sup>/g to 25.05×10<sup>-3</sup> cm<sup>3</sup>/g. The pasting property test indicated that the peak viscosity and breakdown of porous starch were reduced. This study can provide reference frame for the development and application of porous starch and the deep processing of proso millet.

**Keywords** proso millet starch; porous starch; oil absorption rate; saccharase; α-amylase