

doi: 10.12301/spxb202400813

文章编号:2095-6002(2025)05-0104-11

引用格式:张皓然,于婷婷,刘颖,等.淀粉颗粒内取代基分布对蜡质玉米淀粉物化特性的影响[J].食品科学技术学报,2025,43(5):104-114.



ZHANG Haoran, YU Tingting, LIU Ying, et al. Effect of substituent distribution within starch granules on physicochemical properties of waxy corn starch[J]. Journal of Food Science and Technology, 2025,43(5):104-114.

## 淀粉颗粒内取代基分布对蜡质玉米淀粉物化特性的影响

张皓然, 于婷婷, 刘颖, 赵凯\*  
(哈尔滨商业大学食品工程学院, 黑龙江哈尔滨 150028)

**摘要:**为探究取代基在淀粉颗粒内分布对蜡质玉米淀粉物化特性的影响,以蜡质玉米淀粉为原料,采用普鲁兰酶与葡萄糖淀粉酶对其进行酶解处理,通过控制酶解与乙酰化改性条件制备不同改性程度的酶解乙酰化淀粉。对酶解乙酰化淀粉进行表面糊化处理,通过糊化度、凝胶渗透色谱确定颗粒内不同区域取代度变化,并通过扫描电子显微镜、差示扫描量热仪、红外光谱仪和X射线衍射仪对不同取代基分布的淀粉进行分析,测定不同取代基分布淀粉的冻融稳定性。结果表明,根据对淀粉颗粒糊化度及糊化前后取代度的分析,随着酶解与改性程度的增加,糊化后剩余淀粉取代度增加;乙酰基能够被引入淀粉颗粒内部,使淀粉颗粒取代基分布相对均匀。扫描电镜结果显示,淀粉颗粒随改性程度加深,表面结构被破坏,出现凹陷及孔洞,淀粉颗粒内部取代增加。红外光谱、差示扫描量热分析和X射线衍射及冻融稳定性结果表明,随着淀粉颗粒内部乙酰基取代度的增加,淀粉分子的玻璃化转变温度降低、结晶特征峰减弱、相对结晶度下降、冻融稳定性增强。研究旨在为复合改性淀粉在食品工业中的应用及后续的取代基分布研究提供参考。

**关键词:**蜡质玉米淀粉;酶解;乙酰化;取代基分布;物化特性

**中图分类号:** TS231

**文献标志码:** A

蜡质玉米淀粉(waxy corn starch, WCS)也叫糯玉米淀粉,几乎全部由支链淀粉组成,具有高产量、低价格和高再生性等优点<sup>[1-2]</sup>。与普通玉米淀粉相比,WCS中支链淀粉接近100%,高支链结构使其空间位阻大,膨胀力、黏滞性以及透明度都远远高于普通玉米淀粉<sup>[3-4]</sup>。同时,WCS因颗粒间结构排列松散<sup>[5]</sup>,较普通淀粉更容易引入外来基团,对WCS进行脱支化处理能够使其成为更优秀的包合物材料<sup>[6]</sup>。

乙酰化改性通过引入乙酰基团,利用空间位阻

效应和更广阔的电子云分布,可显著提升淀粉溶胀力、溶解度和吸水能力,同时颗粒尺寸会略微增大。乙酰化淀粉通过增强保水性和稳定性能够改善食品质地、口感及加工流变特性,从而可在多种食品体系中改善淀粉的物化特性<sup>[7-8]</sup>。Cao等<sup>[9]</sup>通过电场和超声波处理乙酰化马铃薯淀粉,对其表面糊化后发现,乙酰化反应主要从马铃薯淀粉颗粒表面开始,大部分的基团取代发生在淀粉颗粒外围。Huang等<sup>[10]</sup>对乙酰化马铃薯蜡质淀粉和乙酰化马铃薯淀粉进行表面糊化,发现乙酰基在淀粉颗粒内部分布

收稿日期:2024-12-25

基金项目:黑龙江省自然科学基金项目(LH2020C062)。

Foundation: Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (LH2020C062)。

第一作者:张皓然,男,硕士研究生,研究方向为淀粉化学与工艺学。

\*通信作者:赵凯,男,教授,博士,主要从事淀粉化学与淀粉加工机理方面的研究。

是不均匀的,且大部分的乙酰基团分布在颗粒外围。这可能与淀粉颗粒的致密结晶结构密切相关,未经酶解处理的淀粉颗粒表面结晶区阻碍了化学试剂的渗透<sup>[11]</sup>。为了使乙酰基进入淀粉颗粒内部,在乙酰化改性前通过普鲁兰酶和葡萄糖淀粉酶的协同作用可特异性切割支链淀粉的 $\alpha$ -1,6-糖苷键,形成多孔结构<sup>[7]</sup>。研究表明,酶解预处理不仅能提高取代度,还能通过调控水解程度实现取代基的定向分布<sup>[8,12]</sup>。Zhang等<sup>[13]</sup>发现,酶解后的WCS经乙酰化改性后,乙酰基可深入颗粒内部,显著提升冻融稳定性。此外,表面糊化技术通过破坏、剥离颗粒表层,可分析内外取代基分布<sup>[14]</sup>。赵凯等<sup>[15]</sup>利用表面糊化结合红外光谱,发现乙酰化单一改性及乙酰化羟丙基复合改性的取代反应主要发生在淀粉颗粒表层,内部取代概率较小。目前,大多数乙酰化改性因淀粉颗粒特性,基本仅发生于淀粉颗粒表层;而采用限制性酶解将乙酰基团引入淀粉颗粒内部、确定酶解程度与乙酰基分布的定量关系,以及其对玻璃化转变温度( $T_g$ )、结晶度等关键物化性质的影响机制仍不明确。

本研究以WCS为原料,拟对其采用普鲁兰酶与葡萄糖淀粉酶进行限制性酶解和乙酰化改性。将取代基团引入淀粉颗粒内部,使取代基团与内部的淀粉分子发生乙酰化反应。通过控制酶解条件和乙酰化改性程度来控制取代基团在淀粉颗粒内的分布,从而分析取代基位置分布对淀粉颗粒物化特性的影响,希望为改性淀粉在食品领域的进一步应用奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

蜡质玉米淀粉,保龄宝生物股份有限公司;普鲁兰酶(2 000 U/mL),沧州夏盛酶生物技术有限公司; $\alpha$ -淀粉酶(3 700 U/g)、葡萄糖淀粉酶(100 000 U/g),北京奥博星生物技术有限责任公司;苯酚、亚硫酸钠、冰醋酸、氢氧化钠、无水氯化钙,天津市天力化学试剂有限公司;乙醇,天津市富宇精细化工有限公司;3,5-二硝基水杨酸、酚酞,天津市福晨化学试剂厂;乙酸酐、盐酸,西陇化工股份有限公司;酒石酸钾钠,汕头市西陇化工股份有限公司;葡萄糖、无水醋酸钠,天津市致远化学试剂有限公司;琼脂糖凝胶CL-2B,瑞典Pharmacia LKB公司;氯化钠,天津市东

丽区天大化学试剂厂;叠氮钠,成都贝斯特试剂有限公司。实验所用试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

DF-101S型集热式恒温加热磁力搅拌器、HH-ZK4型双列四孔水浴锅,巩义予华仪器有限公司;ALC-2100型分析天平,上海精密仪器有限公司;TG16-WS型台式高速离心机,上海卢湘仪离心机仪器有限公司;DHG-9203A型电热恒温干燥箱,上海一恒科学仪器有限公司;722E型分光光度计,上海光谱仪器有限公司;SHA-C型水浴恒温振荡器,杭州旌斐仪器科技有限公司;PHS-25型pH计,上海雷磁电科学仪器有限公司;DJ1C型增力搅拌器,金坛市三和仪器有限公司;Versamax型酶标仪,美国Molecular Devices公司;DBS-160F型液相色谱层析分离仪,上海精科实业有限公司;Spectrum 100型红外光谱仪(fourier transform infrared spectrometer, FT-IR)、DSC4000型差示扫描量热仪(differential scanning calorimetry, DSC),美国Perkin Elmer公司;Smart Lab(9)型X射线衍射仪(X-ray diffraction, XRD),日本理学株式会社;SU8020型扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM),日本日立公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 酶解淀粉的制备及淀粉酶解程度的测定

取15.0 g淀粉(干基)加入乙酸-乙酸钠缓冲液,分别选取pH值、温度、酶种类(普鲁兰酶、 $\alpha$ -淀粉酶、葡萄糖淀粉酶)及比例、酶添加量、酶解时间为单因素进行实验。酶解完成后加入氢氧化钠终止反应。根据单因素实验结果设计正交试验。

取1.0 mL稀释10倍的上清液于25 mL反应管中,加入1.0 mL蒸馏水,再加入1.5 mL DNS试剂,沸水浴中加热5 min,定容放置20 min后在波长550 nm处测量吸光度<sup>[16]</sup>。

#### 1.3.2 酶解乙酰化淀粉的制备及乙酰化淀粉取代度的测定

将酶解后淀粉制备成质量分数为30%的淀粉乳,分别选取乙酸酐用量、温度、时间、pH值为单因素,制备不同取代度的乙酰化改性淀粉<sup>[17]</sup>。

分别称取2.0 g原淀粉(干基)、乙酰化淀粉于250 mL锥形瓶中,加入50 mL蒸馏水,并滴加3滴酚酞指示剂,混匀后用0.1 mol/L的氢氧化钠将反应溶液滴定至微红色,再加入25 mL 0.5 mol/L的氢氧化钠溶液,恒温振荡0.5 h后,用0.5 mol/L的盐

酸溶液滴定至红色消失即为终点<sup>[9,15]</sup>,取代度计算见式(1)、式(2)。

$$W_{AC} = \frac{(V_2 - V_1) \times c \times 0.043}{m} \times 100\% \quad (1)$$

$$DS = \frac{162W_{AC}}{4300 - 42W_{AC}} \quad (2)$$

式(1)、式(2)中,  $W_{AC}$ , 乙酰基含量, %;  $V_1$ , 样品消耗 HCl 体积, mL;  $V_2$ , 原淀粉消耗 HCl 体积, mL;  $c$ , 盐酸溶液浓度, mol/L;  $m$ , 称样质量, g;  $DS$ , 乙酰化淀粉取代度。

### 1.3.3 淀粉的表面糊化及糊化程度的测定

取 17.5 mL 4 mol/L 的无水氯化钙, 将 7.5 g 酶解乙酰化改性淀粉悬浮其中, 在磁力搅拌器中 (160 ~ 200 r/min, 21 °C) 搅拌一定时间。以 0 °C 冰水混合物终止反应, 离心 (8 000 r/min, 20 min), 弃上清液。为去除残留氯化钙, 以蒸馏水润洗沉淀 15 ~ 25 min, 离心, 即得表面糊化淀粉<sup>[10,18]</sup>。

将表面糊化淀粉置于 500 mL 烧杯中, 加入 200 mL 蒸馏水, 磁力搅拌器快速搅拌 10 min (重复 3 次), 静置 25 min, 倒出上清液, 旋转蒸发去除水分, 醇洗后离心 (8 000 r/min, 30 min), 置于 40 °C 真空干燥箱中烘干, 即得糊化淀粉<sup>[10,14]</sup>。在沉淀中继续加入一定量蒸馏水, 重复搅拌和旋转蒸发步骤, 最后将沉淀醇洗 2 次后离心, 40 °C 烘干至恒重, 即得未糊化淀粉。淀粉糊化率计算见式(3)。

淀粉糊化率 =

$$\frac{m(\text{糊化淀粉})}{m(\text{糊化淀粉}) + m(\text{未糊化淀粉})} \times 100\% \quad (3)$$

### 1.3.4 淀粉理化特性测定

#### 1.3.4.1 分子质量分布测定

将 5 mL 样品 (1 mg/mL) 注入凝胶柱, 用质量分数为 0.025% 的脱气 NaCl 和 0.01% NaOH 溶液洗脱样品, 流速为 30 mL/h, 使用自动分析仪收集级分<sup>[19-20]</sup>。

#### 1.3.4.2 总糖含量的测定

通过苯酚-硫酸法测定总糖含量。取 40  $\mu$ L 1.3.4.1 节中收集的级分于酶标板内, 加入 40  $\mu$ L 质量分数为 5% 的苯酚溶液和 140  $\mu$ L 浓硫酸, 室温下保持 30 min, 使用酶标仪在 490 nm 测定吸光度<sup>[19]</sup>。

#### 1.3.4.3 淀粉蓝值测定

取 100  $\mu$ L 1.3.4.1 节中收集的级分于酶标板内, 加入 100  $\mu$ L 0.02 mol/L 碘标准溶液, 利用酶标

仪测定样品在 650 nm 的吸光度<sup>[14]</sup>。

### 1.3.5 淀粉颗粒微观结构的观察

取一定量的样品均匀分散至导电双面胶上, 将双面胶粘贴于载物台上, 进行镀金处理, 然后将其放入 SEM 放大 2 000 倍观察。

### 1.3.6 淀粉颗粒玻璃化转变温度的测定

将样品与蒸馏水按质量比 1:2 置于 DSC 铝盘中, 密封, 于室温下平衡 2 h, 以空皿为参比, 进行二次扫描, 淀粉的  $T_g$  在第 2 次扫描后的曲线中点取值<sup>[21]</sup>。温控程序设置为 20 °C 恒温 1 min, 随后以 10 °C/min 的速率从 20 °C 降至 -30 °C, 再以 10 °C/min 的速率从 -30 °C 升至 30 °C。得到热流曲线后对其取一阶导数得最大冷冻浓缩状态下玻璃化转变温度 ( $T_g$  of maximally freeze-concentrated state,  $T'_g$ )。

### 1.3.7 淀粉颗粒有序程度的测定

将样品与干燥的溴化钾混合压片后进行红外扫描, 观察淀粉样品的分子基团变化。扫描范围为 450 ~ 4 000  $\text{cm}^{-1}$ 。

### 1.3.8 淀粉颗粒结晶特性分析

参考 Chen 等<sup>[22]</sup>的方法, 使用 XRD 对样品的结晶特性进行分析。衍射角 ( $2\theta$ ) 扫描范围为 1 ~ 60°, 步长 0.02°, 扫描速度 10°/min。

### 1.3.9 淀粉颗粒冻融稳定性的测定

参考李新华等<sup>[12]</sup>的方法, 并加以改进。配制质量分数为 6% 的淀粉乳, 于沸水浴中加热 30 min 糊化。待淀粉乳自然冷却至室温后, 称取一定质量淀粉乳 ( $m_1$ ) 于 15 mL 离心管中, 放置于 -18 °C 冰箱中贮藏 24 h 取出, 自然解冻后重复离心 5 次 (4 000 r/min, 20 min), 弃去上清液, 称得沉淀质量 ( $m_2$ )。析水率计算见式(4)。

$$\text{析水率} = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100\% \quad (4)$$

## 1.4 数据处理

所有实验均重复 3 次, 数据以平均值  $\pm$  标准偏差表示。利用 SPSS 与 Excel 软件对数据进行分析; Duncan 多重比较进行差异显著性分析,  $P < 0.05$  表示差异显著。使用 Origin 软件绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 酶解乙酰化淀粉制备条件优化结果

通过单因素实验确定酶解乙酰化淀粉的处理条

件,结合正交试验得到优化组合。实验结果表明,当普鲁兰酶:葡萄糖淀粉酶的质量比为1:1时,还原力最强。由于还原力的高低能够影响后续取代基进入淀粉颗粒的位置,所以需要选取有梯度的还原力条件。各因素对淀粉酶解效率的影响程度从大到小依次为反应时间、酶浓度、反应温度,pH值对酶水解过程无显著影响。优化的淀粉酶解条件为反应时间20 h、酶浓度100 U/g、反应温度45℃、pH值为4.5,此时还原力(DE值)最高,为0.78。结合单因素实验和正交试验结果,选择低、中、高3类不同还原力程度的限制性酶解淀粉:(1)低还原力组(low reducing power, LRP),反应时间5 h、酶浓度40 U/g、反应温度35℃、pH值为4.5,DE值0.23;(2)中还原力组(middle reducing power, MRP),反应时间15 h、酶浓度60 U/g、反应温度40℃、pH值为4.5,DE值0.48;(3)高还原力组(high reducing power, HRP),反应时间20 h、酶浓度100 U/g、反应温度45℃、pH值为4.5,DE值0.78。

通过单因素实验结果,对乙酰化取代反应的工艺条件进行了研究,探究乙酸酐添加量、反应温度、反应时间以及pH值对取代度的影响,进而选出低、中、高3类不同取代度乙酰化淀粉:(1)低取代度组(low substitution degree, LSD),乙酸酐添加量4%、反应温度50℃、反应时间1 h、pH值为7.5;(2)中取代度组(middle substitution degree, MSD),乙酸酐添加量6%、反应温度40℃、反应时间1.5 h、pH值为9;(3)高取代度组(high substitution degree, HSD),乙酸酐添加量10%、反应温度45℃、反应时间2 h、pH值为8.5。

## 2.2 酶解乙酰化淀粉糊化度分析

不同酶解、改性程度淀粉的糊化度见图1。由图1可知,相同反应条件下,表面糊化后不同改性程度淀粉的糊化度不同,还原力与取代度越高,改性淀粉的糊化度越高。根据糊化度的高低,淀粉颗粒表面被不同程度剥离,糊化度越高淀粉颗粒表面被剥离的越多,其剩余淀粉取代发生的位置就越深,说明取代基已经进入淀粉颗粒内部。这可能是由于淀粉酶解后形成了蜂窝状孔洞,酶解程度越高,孔洞越多,而乙酰化改性后淀粉表面结构被破坏,外部面积增大,因此酶解改性程度越高,淀粉的表面糊化程度越大,其糊化度越高。中还原力淀粉糊化度相对较低还原力淀粉提升幅度较大,高还原力淀粉却提升幅度较小,可能是由于外部淀粉在中还原力时已经能

被基本糊化,再提高还原力对糊化度提升较小。

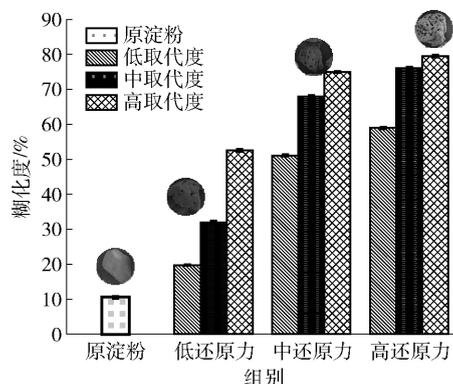


图1 不同酶解乙酰化淀粉的糊化度

Fig. 1 Gelatinization degree of different hydrolyzed acetylated starch

## 2.3 酶解乙酰化淀粉取代度分析

不同酶解、改性淀粉表面糊化后的取代度见表1。由表1可知,表面糊化后剩余淀粉的取代度均比表面糊化前有所降低;同时可以发现,相同酶解条件下,改性程度越高,剩余淀粉取代度较原取代度下降越明显,这可能是由于乙酸酐是一种快速反应剂,在侵入颗粒内部之前就已经与淀粉分子外部的羟基发生了反应,因此乙酰化主要发生在淀粉颗粒外层,

表1 不同酶解乙酰化淀粉的取代度

Tab. 1 Substitution degree of different hydrolyzed acetylated starch

样品	取代度	
	糊化前	糊化后
LRP-LSD	0.0249 ± 0.0026 <sup>f</sup>	0.0164 ± 0.0010 <sup>g</sup>
LRP-MSD	0.0345 ± 0.0014 <sup>e</sup>	0.0196 ± 0.0015 <sup>g</sup>
LRP-HSD	0.0552 ± 0.0012 <sup>cd</sup>	0.0282 ± 0.0049 <sup>d</sup>
MRP-LSD	0.0391 ± 0.0010 <sup>e</sup>	0.0208 ± 0.0018 <sup>f</sup>
MRP-MSD	0.0599 ± 0.0070 <sup>e</sup>	0.0299 ± 0.0009 <sup>e</sup>
MRP-HSD	0.0765 ± 0.0016 <sup>b</sup>	0.0380 ± 0.0024 <sup>b</sup>
HRP-LSD	0.0515 ± 0.0025 <sup>d</sup>	0.0252 ± 0.0032 <sup>e</sup>
HRP-MSD	0.0793 ± 0.0010 <sup>b</sup>	0.0380 ± 0.0016 <sup>bc</sup>
HRP-HSD	0.0958 ± 0.0006 <sup>a</sup>	0.0459 ± 0.0016 <sup>a</sup>

LRP-LSD为低酶解程度低取代度淀粉,LRP-MSD为低酶解程度中取代度淀粉,LRP-HSD为低酶解程度高取代度淀粉,MRP-LSD为中酶解程度低取代度淀粉,MRP-MSD为中酶解程度中取代度淀粉,MRP-HSD为中酶解程度高取代度淀粉,HRP-LSD为高酶解程度低取代度淀粉,HRP-MSD为高酶解程度中取代度淀粉,HRP-HSD为高酶解程度高取代度淀粉。不同小写字母表示同列数据差异显著( $P < 0.05$ )。

淀粉颗粒内部乙酰基含量均较低,即改性淀粉颗粒表面糊化程度越高,获得的剩余颗粒取代度较原取代度就越小<sup>[23]</sup>;相同乙酰化改性条件下,酶解程度越高,剩余淀粉取代度较原取代度下降越明显,是由于酶解后淀粉结构被破坏,导致改性淀粉糊化度增加,因此剩余淀粉颗粒取代度下降就越明显。但随着酶解程度的继续升高,淀粉的糊化度升高,且在剩余淀粉颗粒表面被更大程度剥离的情况下,表面糊化后剩余颗粒的取代度是升高的。这充分证明了在酶解条件下,引入淀粉颗粒内部的取代基增多,与正常乙酰化改性相比,其取代基在淀粉颗粒内外分布更均匀。所以根据低、中、高还原力与取代度的梯度覆盖,及引入淀粉颗粒内取代基的情况,后续实验着重选取3种典型程度的改性淀粉(LRP-LSD、MRP-MSD、HRP-HSD)进行分析。

## 2.4 酶解乙酰化淀粉分子质量分布分析

凝胶渗透色谱法可用于不同组分分离鉴定及分析高分子同系物。依据淀粉分子流出凝胶柱顺序,淀粉组成可分为高分子质量级分、中分子质量级分和低分子质量级分。而淀粉分子质量分布的改变会致使总糖及蓝值发生相应变化,通过深入分析总糖及蓝值在这一过程中的前后变化情况,能够为淀粉的改性和表面糊化后的淀粉颗粒长、短链的变化提供更具价值的分析依据,证实淀粉颗粒的表面被降解、剥离。

不同酶解乙酰化淀粉的分子质量分布见图2。原淀粉[图2(a)]的峰形较高且尖锐,酶解乙酰化处理对淀粉分子质量大小及分布有一定影响,其总糖含量及蓝值均呈下降趋势。由图2(a)、(c)、(e)、(g)可知,淀粉分子的峰值降低,峰位置也逐渐推后,且开始出现第2个峰,这可能是由于改性反应将淀粉分子内的支链进一步的裂解,成为支化度较小的级分<sup>[24]</sup>,随着改性程度的加大,淀粉分子降解程度也加大。分别对比图2(a)、(b),图2(c)、(d),图2(e)、(f),图2(g)、(h),即表面糊化前后淀粉分子质量分布,可以发现表面糊化处理不同改性程度淀粉与糊化前的总糖与蓝值相对变化趋势相同,但表面糊化处理淀粉的总糖含量与蓝值均较表面糊化前低,说明在表面糊化处理过程中,淀粉分子的支链部分断裂成不同分子质量的短链,且部分短链发生降解,短链的形成也导致第2个峰的出现。这表明,经表面糊化处理总糖与蓝值降低,WCS的表面被部分降解。且由于酶解与乙酰化处

理也有这种作用,因此改性程度越大,总糖与蓝值下降就越明显,降解程度就越大。不同改性程度WCS的糊化度、表面糊化前后取代度和分子质量的分析表明,酶解乙酰化改性可以将取代基团引入颗粒内部,使取代度的分布更均匀,且改性程度越大,内部取代效果越明显。

## 2.5 酶解乙酰化淀粉颗粒形貌特征分析

不同酶解乙酰化淀粉颗粒形貌见图3。由图3可知,蜡质玉米原淀粉呈多面体形,棱角圆滑,淀粉表面结晶结构完整。图3(b)、(d)、(f)分别为不同酶解改性程度的WCS扫描电镜图,与图3(a)对比可知,淀粉颗粒大小没有发生明显的变化,可能是由于淀粉酶解后,淀粉颗粒表面产生不同程度的凹陷孔洞,导致改性后的淀粉颗粒大小增大不明显。随着酶解与改性程度的加大,凹陷导致的孔洞越来越多,孔洞也越来越深,从而使乙酰基能够进入淀粉颗粒内部,这可从酶解过程取代度分析结果得到证实。分别对比图3(b)至(g)可知,经表面糊化后,由于表面的糊化淀粉被破坏剥离,淀粉颗粒不再完整,且随着酶解改性程度的提高,剩余淀粉颗粒表面更粗糙,形成了较为明显的片层结构,淀粉颗粒失去原有结构,颗粒形状有所改变<sup>[25]</sup>。

## 2.6 酶解乙酰化淀粉玻璃化转变温度分析

当水分含量较低( $< 20\%$ )时,一般采用常速DSC测定 $T_g$ ;当水分含量高( $> 20\%$ )时,普遍以 $T'_g$ 来表示, $T'_g$ 是特定的 $T_g$ ,特指在过量水分含量条件下进行冷冻处理时,体系达到最大冷冻浓缩状态时对应的 $T_g$ <sup>[26-27]</sup>。

不同酶解乙酰化淀粉的 $T_g$ 见表2。由表2可知,随水分含量增加,表面糊化前后酶解乙酰化淀粉的 $T_g$ 均下降。这是因为多余的水分可以增加淀粉体系的自由体积,从而为溶质的分子链段运动提供所需的空间<sup>[28]</sup>。随着酶解和改性程度的提高、取代基分布的均匀,淀粉 $T_g$ 降低,这是因为取代度越大,进入淀粉分子内部的乙酰基越多。由于取代基空间位阻作用,淀粉原有结构发生变化,其链段自由体积增大,分子流动性增强。这与水对淀粉体系的作用相似,最终导致 $T_g$ 下降<sup>[29]</sup>。同时可以发现,经表面糊化后,淀粉分子的 $T_g$ 降低,且酶解和改性程度越大,取代基分布越均匀的淀粉温度降低越明显。Yu等<sup>[30]</sup>认为,这可能是由于表面糊化导致WCS支链结构发生降解,降解后的短支链倾向于形成凝胶球,

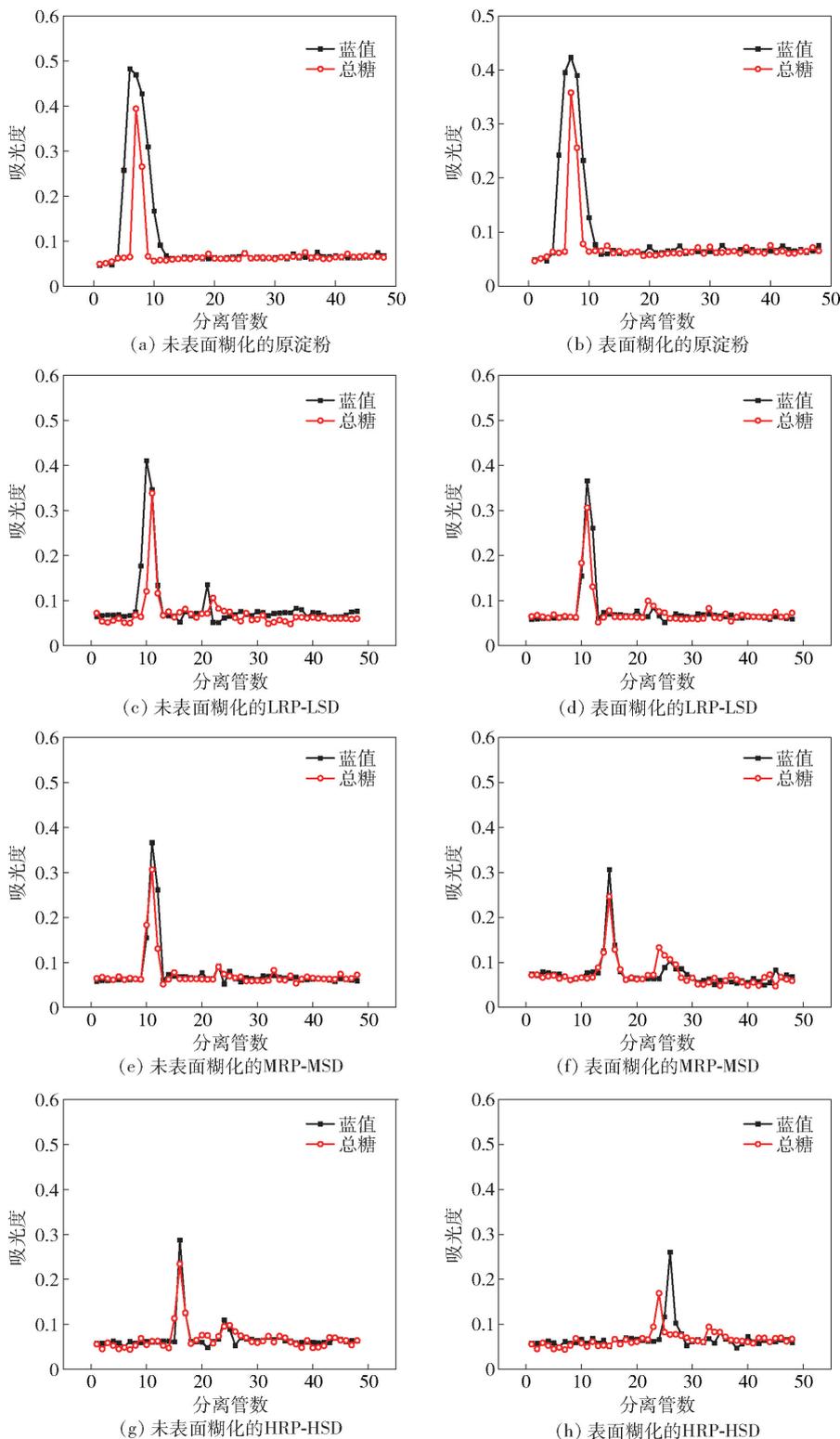


图2 不同酶解乙酰化淀粉的分子质量分布

Fig.2 Molecular weight distribution of different hydrolyzed acetylated starch

且1个支链淀粉分子可能形成1个相对独立的大簇和超球,由于它们的支链更小,长度更短,凝胶球和超级球之间的分子纠缠比线性聚合物链之间的分子

纠缠要小。因此,这些由支链淀粉形成的凝胶球比那些由长线性链形成的凝胶球需要更少的能量来移动;而由于取代基分布均匀,糊化后形成的凝胶球分

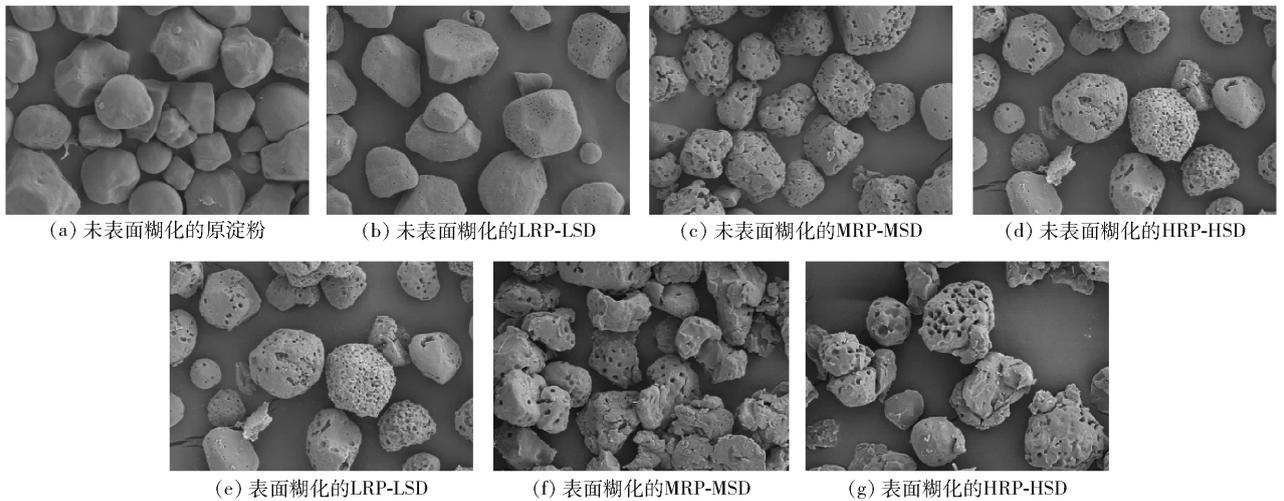


图3 不同酶解乙酰化淀粉颗粒形貌

Fig. 3 Morphology of different hydrolyzed acetylated starch granules

表2 不同酶解乙酰化淀粉的玻璃化转变温度

Tab. 2 Glass transition temperatures of different hydrolyzed acetylated starches

样品	$T_g$					$T'_g$	
	$w(\text{水}) = 2\%$	$w(\text{水}) = 6\%$	$w(\text{水}) = 10\%$	$w(\text{水}) = 14\%$	$w(\text{水}) = 18\%$	$w(\text{水}) > 20\%$	
表面糊化前	原淀粉	93.43 ± 0.17 <sup>a</sup>	82.67 ± 0.47 <sup>a</sup>	73.29 ± 0.24 <sup>a</sup>	63.06 ± 0.57 <sup>a</sup>	48.43 ± 0.48 <sup>b</sup>	-4.29 ± 0.75 <sup>a</sup>
	LRP-LSD	92.77 ± 0.48 <sup>a</sup>	80.29 ± 0.23 <sup>b</sup>	66.83 ± 0.02 <sup>b</sup>	57.57 ± 0.48 <sup>c</sup>	45.86 ± 0.46 <sup>d</sup>	-5.36 ± 0.66 <sup>b</sup>
	MRP-MSD	90.86 ± 0.44 <sup>b</sup>	78.22 ± 0.97 <sup>c</sup>	63.52 ± 0.25 <sup>c</sup>	53.62 ± 0.40 <sup>d</sup>	44.22 ± 0.15 <sup>e</sup>	-7.19 ± 0.58 <sup>b</sup>
	HRP-HSD	83.14 ± 0.46 <sup>d</sup>	70.30 ± 0.13 <sup>e</sup>	61.27 ± 0.38 <sup>d</sup>	48.74 ± 0.18 <sup>g</sup>	42.11 ± 0.19 <sup>f</sup>	-12.33 ± 0.18 <sup>a</sup>
表面糊化后	原淀粉	92.89 ± 0.49 <sup>a</sup>	80.57 ± 0.11 <sup>b</sup>	67.11 ± 0.49 <sup>b</sup>	59.53 ± 0.29 <sup>b</sup>	46.98 ± 0.48 <sup>c</sup>	-4.32 ± 0.34 <sup>d</sup>
	LRP-LSD	91.40 ± 0.35 <sup>b</sup>	77.51 ± 0.15 <sup>c</sup>	63.76 ± 0.24 <sup>c</sup>	52.29 ± 0.18 <sup>e</sup>	43.75 ± 0.01 <sup>e</sup>	-5.72 ± 0.67 <sup>e</sup>
	MRP-MSD	86.05 ± 0.45 <sup>c</sup>	72.35 ± 0.11 <sup>d</sup>	61.07 ± 0.09 <sup>d</sup>	50.24 ± 0.27 <sup>f</sup>	42.82 ± 0.01 <sup>f</sup>	-9.37 ± 0.44 <sup>c</sup>
	HRP-HSD	81.50 ± 0.38 <sup>e</sup>	69.74 ± 1.33 <sup>e</sup>	58.34 ± 0.28 <sup>e</sup>	48.61 ± 0.19 <sup>g</sup>	40.88 ± 0.47 <sup>g</sup>	-13.98 ± 0.48 <sup>e</sup>

不同小写字母表示同列数据差异显著 ( $P < 0.05$ )。

布也相对均匀,这会增大分子间的空间位阻,导致分子内自由体积增大,从而降低了  $T_g$  [31-32]。

## 2.7 酶解乙酰化淀粉有序程度分析

酶解乙酰化淀粉红外光谱见图4。由图4可知,原淀粉在  $3350\text{ cm}^{-1}$  处出现—OH 振动峰,在  $1184, 1000, 828\text{ cm}^{-1}$  处出现非对称的 C—O—C 伸缩振动和 C—O 伸缩及骨架振动峰。与原淀粉相比,酶解乙酰化改性后的淀粉在  $1735\text{ cm}^{-1}$  处出现酯羧基的特征峰,此峰为 C=O 伸缩振动峰,证明了乙酰基的存在 [33-34]。随着酶解乙酰化程度的增大,—OH 振动峰、C—O—C 伸缩振动和 C—O 伸缩及骨架振动峰越来越弱,引入的乙酰基数量越多, C=O 伸缩振动峰越强。同时可以发现,表面糊化处理后,剩余颗粒的特征峰减弱。由图1、表1分析可知,这是由于淀粉颗粒的平均取代度由外向内逐渐降低,在表面糊化过程中,外层含乙酰基较多的结

构被剥离。但 HDH-HSD 经表面糊化后,剩余颗粒的特征峰并没有明显的减弱,可能是因为 HDH-HSD 酶解程度高,乙酰基已经均匀地分布在淀粉颗粒中,内外层的乙酰基含量相似。同时  $1022\text{ cm}^{-1}$  和  $1047\text{ cm}^{-1}$  分别表示淀粉颗粒中无定形和有序(结晶)区域的数量,  $1022\text{ cm}^{-1}/1047\text{ cm}^{-1}$  的比值可以表征晶体的有序程度(orderliness degree, OD)。由图4计算可知,经酶解乙酰化改性处理后 WCS 的 OD 较原淀粉均降低,且 HDH-HSD 的降低程度最大。这可能是由于分布均匀的取代基会阻碍淀粉分子在晶核周围聚集,破坏分子间氢键的形成,导致淀粉分子有序性降低,增强了淀粉延缓回生的能力 [8]。

## 2.8 酶解乙酰化淀粉结晶特性分析

酶解乙酰化淀粉 X 射线衍射分析见图5。由图5可知, WCS 在  $15.22^\circ$ 、 $17.65^\circ$ 、 $18.12^\circ$ 、 $23.46^\circ$

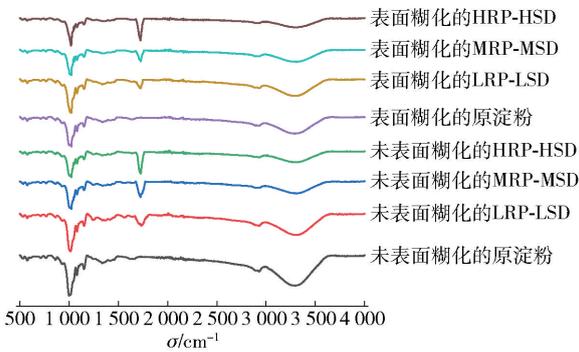


图 4 酶解乙酰化淀粉红外光谱

Fig. 4 Infrared spectrum of hydrolyzed acetylated starch

呈现出典型的 A 型结晶特征峰<sup>[35]</sup>。经 Origin 计算相对结晶度可得,未糊化的原淀粉、LRP-LSD、MRP-MSD、HRP-HSD 结晶度为 36.95%、32.18%、26.22%、19.47%;表面糊化后剩余淀粉的结晶度分别为原淀粉 33.82%、LRP-LSD 29.78%、MRP-MSD 22.54%、HRP-HSD 16.18%。

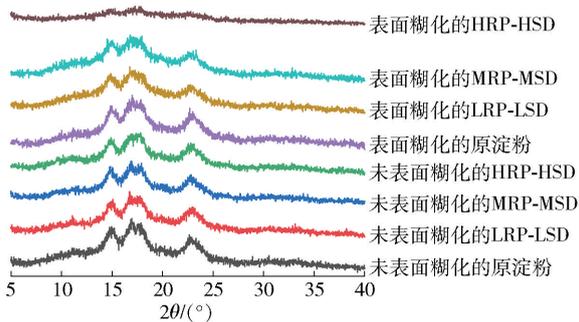
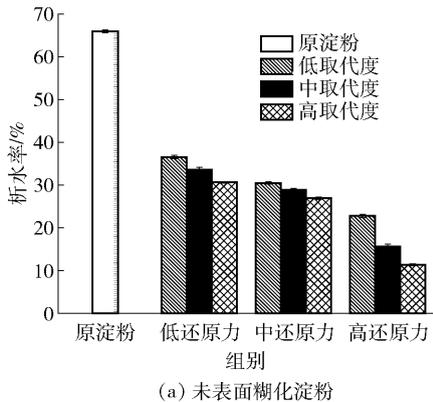


图 5 酶解乙酰化淀粉 X 射线衍射结果

Fig. 5 X-ray diffraction results of hydrolyzed acetylated starch

淀粉经酶解乙酰化改性后仍然保留了 A 型结晶特征峰,说明在改性过程中未形成新晶型;但随着



酶解改性程度的提高、取代基分布得更均匀,特征峰强度大幅降低、峰宽增加。这可能是因为随着酶解乙酰化程度的升高,更多的乙酰基取代了淀粉分子上的羟基,产生空间位阻,进而对淀粉分子的结晶结构造成破坏<sup>[11]</sup>。对比各组糊化前后淀粉结晶度可以发现,经过表面糊化处理后,淀粉主要特征峰减弱。这是由于表面糊化使淀粉颗粒内结晶区的分子间氢键断裂,晶体结构破碎、双折射现象逐渐消失,进而破坏了结晶区。而且化学表面糊化是淀粉颗粒由外向内剥落的过程,因此,随着外层淀粉分子逐渐被剥离,剩余颗粒的结晶度会降低<sup>[36]</sup>。此外,HDH-HSD 经表面糊化处理后结晶度降幅较大,这可能是因为取代基在淀粉颗粒中分布更均匀,内部取代更多,使淀粉颗粒内部逐渐趋于中空,CaCl<sub>2</sub> 溶液更易进入颗粒内部,导致晶体结构被破坏<sup>[37]</sup>。

## 2.9 酶解乙酰化淀粉冻融稳定性分析

酶解乙酰化淀粉冻融稳定性见图 6。由图 6 可知,随淀粉酶解改性程度的提高,改性淀粉的析水率均降低,冻融稳定性增强。这可能是由于引入的乙酰基与淀粉中的羟基形成分子间氢键,乙酰基的亲水性增加了空间位阻,提高了共混体系淀粉分子内部网络结构的稳定性。此外,酶解处理会使淀粉颗粒表面产生孔隙,使乙酰基更易进入淀粉颗粒内部,这进一步增强了淀粉颗粒的吸水能力,减少了水分的析出,增强了淀粉分子的冻融稳定性<sup>[13]</sup>。且高还原力改性淀粉的析水率明显低于低、中还原力改性淀粉,这可能是由于乙酰基进入淀粉颗粒内部,致使淀粉分子链结晶过程受扰,结晶区域 OD 下降,结晶结构趋于松散。这种松散结构有利于应对冰晶生长引发的体积变动,在淀粉无定形区域,内部乙酰基可增强分子链柔韧性,乙酰基的嵌入也能够改变分子

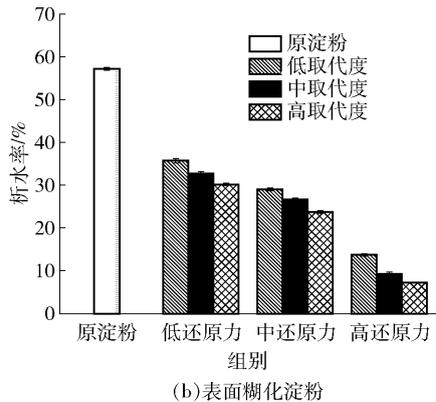


图 6 酶解乙酰化淀粉的冻融稳定性

Fig. 6 Freeze-thaw stability of hydrolyzed acetylated starch

链间的相互作用。遇冰晶生长压力时,无定形区域分子链可借链段运动缓冲压力,从而减少结构破坏<sup>[11]</sup>。对比淀粉糊化前后的析水率可以发现,表面糊化处理可以增强淀粉分子的冻融稳定性。这可能是由于表面糊化处理淀粉分子的支链结构被破坏,形成不同分子质量的短链,这与图2分子质量分布的结果相同。同时,乙酰基在颗粒表层的流失导致了颗粒内部取代基相对增多,进一步增强了分子链的柔韧性和网络结构的稳定性,从而提高了淀粉分子的冻融稳定性。相较于表面取代,内部取代显著抑制水分迁移<sup>[38]</sup>。

### 3 结 论

本研究通过酶解和乙酰化改性 WCS,使乙酰基进入淀粉颗粒内部,并均匀分布。通过测定表面糊化前后淀粉的取代度、分子质量分布可知,随着酶解和改性程度的提高,表面糊化后剩余淀粉颗粒的取代度呈升高趋势。对不同酶解和改性程度的 WCS 进行  $T_g$ 、红外光谱、X 射线衍射及冻融稳定性的分析。结果表明,随改性程度的增加, $T_g$  降低,结晶区域 OD 降低,冻融稳定性即吸水保水能力增大,但淀粉仍保持原有的 A 型结晶结构。经表面糊化处理后,进入淀粉颗粒内部的取代基越多,改性淀粉  $T_g$  降低越多,晶体结构破坏程度也越大,冻融稳定性更强,极大地提升了淀粉的食品加工耐受性。本研究旨在为酶解乙酰化复合改性淀粉在食品工业,尤其是冷冻食品中的进一步应用提供理论依据。

#### 参考文献:

- [1] 马永强, 薛鹏飞, 王鑫. 蜡质玉米改性淀粉物化及形态学特性比较研究[J]. 中国食品添加剂, 2017, 28(2): 117-123.  
MA Y Q, XUE P F, WANG X. Comparative study on physico-chemical properties and morphology characteristics of waxy corn modified starch[J]. China Food Additives, 2017, 28(2): 117-123.
- [2] YANG Q Y, LU X X, CHEN Y Z, et al. Fine structure, crystalline and physicochemical properties of waxy corn starch treated by ultrasound irradiation[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2019, 51: 350-358.
- [3] LEWANDOWICZ J, LE THANH-BLICHAZ J, SZWENGIEL A. Insight into rheological properties and structure of native waxy starches: cluster analysis grouping[J]. Molecules, 2024, 29(11): 2669.
- [4] LIU Y, GAO J M, WU H, et al. Molecular, crystal and physicochemical properties of granular waxy corn starch after repeated freeze-thaw cycles at different freezing temperatures[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 133: 346-353.
- [5] ZHENG B, GUO X B, TANG Y K, et al. Development changes in multi-scale structure and functional properties of waxy corn starch at different stages of kernel growth[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 191: 335-343.
- [6] 宁珂, 李松原, 赵凯. 直链淀粉-香叶醇包合物的制备及其性质[J]. 食品科学技术学报, 2024, 42(3): 139-146.  
NING K, LI S Y, ZHAO K. Preparation of amylose-geraniol inclusion complexes and their properties[J]. Journal of Food Science and Technology, 2024, 42(3): 139-146.
- [7] PUNIA BANGAR S, ASHOGBON A O, SINGH A, et al. Enzymatic modification of starch: a green approach for starch applications[J]. Carbohydrate Polymers, 2022, 287: 119265.
- [8] SINHMAR A, PATHERA A K, SHARMA S, et al. Impact of various modification methods on physicochemical and functional properties of starch: a review[J]. Starch-Stärke, 2023, 75(1/2): 2200117.
- [9] CAO M F, GAO Q Y. Internal structure of high degree substitution acetylated potato starch by chemical surface gelatinization[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 145: 133-140.
- [10] HUANG J R, ZHANG P, CHEN Z H, et al. Characterization of remaining granules of acetylated starch after chemical surface gelatinization[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80(1): 215-221.
- [11] ZHANG C L, DU M Y, CAO T T, et al. The effect of acetylation on the physicochemical properties of chickpea starch[J]. Foods, 2023, 12(13): 2462.
- [12] 李新华, 杨强, 王琳, 等. 银杏果淀粉与玉米、马铃薯淀粉理化性质的比较研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(9): 142-145.  
LI X H, YANG Q, WANG L, et al. Comparison of physical and chemical properties of *Ginkgo* starch and corn, potato starch[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(9): 142-145.
- [13] ZHANG W F, HE R D, YU Z Y, et al. Preparation conditions optimization and functional characteristics investigation of cationic-acetylated glutinous rice starch[J]. LWT-Food Science and Technology, 2024, 201: 116239.
- [14] LIANG W, ZHANG Q, DUAN H, et al. Understanding  $\text{CaCl}_2$  induces surface gelatinization to promote cold

- plasma modified maize starch: structure-effect relations [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2023, 320: 121200.
- [15] 赵凯, 刘宁, 李君, 等. 表面糊化处理确定乙酰化羟丙基小麦淀粉中取代基团分布[J]. *食品科学*, 2020, 41(7): 66-72.
- ZHAO K, LIU N, LI J, et al. Distribution of substitution groups in acetylated and hydroxypropylated wheat starch after chemical surface gelatinization [J]. *Food Science*, 2020, 41(7): 66-72.
- [16] 赵凯, 陈威, 宫玉晶, 等. 酶脱支处理对颗粒态缓慢消化淀粉形成的影响[J]. *食品科学技术学报*, 2019, 37(2): 42-47.
- ZHAO K, CHEN W, GONG Y J, et al. Effect of enzyme debranching treatment on formation of granular slowly digestible starch[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2019, 37(2): 42-47.
- [17] 赵凯, 雷鸣, 刘丽艳, 等. 乙酰化羟丙基复合改性玉米淀粉物化特性研究[J]. *中国粮油学报*, 2019, 34(10): 29-35.
- ZHAO K, LEI M, LIU L Y, et al. Physicochemical-properties of acetylated and hydroxypropylated dual-modified corn starch[J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2019, 34(10): 29-35.
- [18] BARTZ J, DA ROSA ZAVAREZE E, DIAS A R G. Study of heat-moisture treatment of potato starch granules by chemical surface gelatinization [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2017, 97(10): 3114-3123.
- [19] PAN D D, JANE J I. Internal structure of normal maize starch granules revealed by chemical surface gelatinization[J]. *Biomacromolecules*, 2000, 1(1): 126-132.
- [20] JANE J L, SHEN J J. Internal structure of the potato starch granule revealed by chemical gelatinization [J]. *Carbohydrate Research*, 1993, 247: 279-290.
- [21] YANG Y, WANG L, LI Y, et al. Investigation the molecular degradation, starch-lipid complexes formation and pasting properties of wheat starch in instant noodles during deep-frying treatment [J]. *Food Chemistry*, 2019, 283: 287-293.
- [22] CHEN L, TIAN Y Q, SUN B H, et al. Measurement and characterization of external oil in the fried waxy maize starch granules using ATR-FTIR and XRD [J]. *Food Chemistry*, 2018, 242: 131-138.
- [23] LIN D R, ZHOU W, YANG Z F, et al. Study on physicochemical properties, digestive properties and application of acetylated starch in noodles [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 128: 948-956.
- [24] GE J L, CHEN X, ZHANG X B, et al. Comparisons of rice taste and starch physicochemical properties in superior and inferior grains of rice with different taste value [J]. *Food Research International*, 2023, 169: 112886.
- [25] 聂丹. 多种淀粉颗粒的扫描电镜下的形态分析[J]. *安徽农业科学*, 2014, 42(33): 11863-11865.
- NIE D. Morphology analysis of a variety of starch granules by using scanning electron microscope [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2014, 42(33): 11863-11865.
- [26] ZHAO J H, KUMAR P K, SABLANI S S. Glass transitions in frozen systems as influenced by molecular weight of food components [J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2022, 21(6): 4683-4715.
- [27] SAADI S, ARIFFIN A A, GHAZALI H M, et al. Structure-energy relationship of food materials using differential scanning calorimetry [J]. *Journal of Food Process Engineering*, 2023, 46(7): e14336.
- [28] JOTHI J S, LE T N D, KAWAI K. Effects of trehalose and corn starch on the mechanical glass transition temperature and texture properties of deep-fried food with varying water and oil contents [J]. *Journal of Food Engineering*, 2020, 267: 109731.
- [29] WŁODARCZYK-STASIAK M, MAZUREK A, KOWALSKI R, et al. Physicochemical properties of waxy corn starch after three-stage modification [J]. *Food Hydrocolloids*, 2017, 62: 182-190.
- [30] YU L, CHRISTIE G. Microstructure and mechanical properties of orientated thermoplastic starches [J]. *Journal of Materials Science*, 2005, 40(1): 111-116.
- [31] HUANG J R, CHEN Z H, XU Y L, et al. Comparison of waxy and normal potato starch remaining granules after chemical surface gelatinization: pasting behavior and surface morphology [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 102: 1001-1007.
- [32] WANG H, ZHU Q M, WU T, et al. Glass transition temperature, rheological, and gelatinization properties of high amylose corn starch and waxy cassava starch blends [J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2020, 44(9): e14682.
- [33] ZHAO X Y, ZENG L J, HUANG Q L, et al. Structure and physicochemical properties of cross-linked and acetylated tapioca starches affected by oil modification [J]. *Food Chemistry*, 2022, 386: 132848.
- [34] WANG X T, WANG H W, SONG J N, et al. Understanding the structural characteristics, pasting and rheological behaviours of pregelatinised cassava starch [J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2018, 53(9): 2173-2180.

- [35] ZHONG Y Y, LI Z H, QU J Z, et al. Relationship between molecular structure and lamellar and crystalline structure of rice starch [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 258: 117616.
- [36] PARK E Y, MA J G, KIM J, et al. Effect of dual modification of HMT and crosslinking on physicochemical properties and digestibility of waxy maize starch [J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 75: 33–40.
- [37] 肖云鹏, 余世锋. 酶解处理对糯性玉米淀粉多层次结构特性及热性质的影响 [J]. *食品科技*, 2019, 44(8): 248–253.
- XIAO Y P, YU S F. Effects of enzymolysis treatment on the microstructure and thermal properties of waxy corn starch granule [J]. *Food Science and Technology*, 2019, 44(8): 248–253.
- [38] ZHANG C, WANG Z J, LIU Q Q, et al. Improvement of pasting and gelling behaviors of waxy maize starch by partial gelatinization and freeze-thawing treatment with xanthan gum [J]. *Food Chemistry*, 2022, 375: 131656.

## Effect of Substituent Distribution Within Starch Granules on Physicochemical Properties of Waxy Corn Starch

ZHANG Haoran, YU Tingting, LIU Ying, ZHAO Kai\*

(College of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150028, China)

**Abstract:** To explore the influence of the distribution of substituents within starch granules on the physicochemical properties of waxy corn starch, waxy corn starch was used as the raw material. Enzymatic hydrolysis was performed using pullulanase and glucoamylase. Enzymatically hydrolyzed acetylated starches with different degrees of modification were prepared by controlling the conditions of enzymatic hydrolysis and acetylation modification. The enzymatically hydrolyzed acetylated starches were subjected to surface gelatinization treatment. The changes in the degree of substitution in different regions within the granules were determined by the degree of gelatinization and gel permeation chromatography. The starches with different substituent distributions were analyzed by scanning electron microscopy, differential scanning calorimetry, infrared spectroscopy, and X-ray diffractometry. The freeze-thaw stability of starches with different substituent distributions was measured. The results showed that based on the analysis of the gelatinization degree of starch granules and the degree of substitution before and after gelatinization, with the increase in the degree of enzymatic hydrolysis and modification, the degree of substitution of the remaining starch after gelatinization increased, acetyl groups were introduced into the interior of starch granules, resulting in a relatively uniform distribution of the substituents in the starch granules. The scanning electron microscopy results indicated that as the degree of modification deepened, the surface structure of starch granules was damaged, with depressions and holes appearing, and the internal substitution of starch granules increased. The results of infrared spectroscopy, differential scanning calorimetry, X-ray diffractometry, and freeze-thaw stability analyses showed that as the degree of acetyl substitution inside the starch granules increased, the glass transition temperature of starch molecules decreased, the characteristic crystallization peaks weakened, the relative crystallinity decreased, and the freeze-thaw stability enhanced. The purpose of this study was to provide a reference for the further application of composite modified starch in the food industry and the subsequent study of substituent distribution.

**Keywords:** waxy corn starch; enzymatic hydrolysis; acetylation; substituent distribution; physicochemical properties

(责任编辑:张逸群)