

淀粉颗粒结晶结构的测定方法研究进展

黄峻榕, 刘小晶

(陕西科技大学生命科学与工程学院, 陕西 西安 710021)

摘要: 淀粉是一种天然多晶聚合物, 由结晶区和非结晶区交替构成颗粒, 其结晶结构对于淀粉的生物合成过程、物化性质和工业应用性质等都非常重要。就淀粉结晶结构的4种测定方法: X射线衍射(X-RD)、红外光谱(IR)、原子力显微镜(AFM)及固体核磁共振(SSNMR)法进行综述, 并对以后的研究作出展望。

关键词: 淀粉; 结晶结构; X射线衍射; 红外光谱; 原子力显微镜; 固体核磁共振

Research Progress on Determination Methods for Crystal Structures of Starch Granules

HUANG Jun-rong, LIU Xiao-jing

(College of Life Science and Engineering, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an 710021, China)

Abstract: Native starch granule is a kind of multi-crystal system, which has crystal and non-crystal regions. The crystal structure of starch granules is very important for the process of biosynthesis and physicochemical and application properties of starch. In this article, four determination methods such as X-ray diffraction, infrared spectroscopy, atomic force microscopy, and solid-state nuclear magnetic resonance are reviewed. Meanwhile, their application prospects for determining crystal structure are also discussed.

Key words: starch; crystal structure; X-ray diffraction (X-RD); infrared spectroscopy (IR); atomic force microscopy (AFM); solid-state nuclear magnetic resonance (SSNMR)

中图分类号: TS231

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)15-0335-04

淀粉天然以具有双折射性的半结晶颗粒形式存在, 除少数几种淀粉如糯玉米淀粉和糯米淀粉外, 淀粉颗粒主要由直链淀粉和支链淀粉两种高分子以一定形式排列、堆积形成具有结晶区和无定形区的颗粒。原淀粉颗粒的相对结晶度在15%~45%之间^[1]。虽然结晶区的比例小于无定形区, 但对颗粒构造起重要作用。另外结晶结构对于淀粉的生物合成过程、物化性质和工业应用性质等都非常重要, 比如淀粉的冷水不可溶性、对酶解的敏感度、糊化性质、黏度性质和膨胀特性等; 颗粒的结晶结构还可影响淀粉在十二指肠中的消化或在结肠中的发酵^[2]。

随着各种分析技术的应用, 对淀粉结构的理解取得了长足进展。如凝胶渗透色谱、阴离子交换色谱和质谱主要用于测定淀粉的分子结构; X射线衍射常用于测定淀粉的结晶结构; 原子力显微镜用于观察淀粉的分子结构和颗粒的纳米级结构; 扫描电子显微镜、透射电子显微镜用于观察淀粉颗粒形貌结构; 核磁共振、红外光谱则广泛应用于测定取代基团、分子结构及结晶结构等。本文就淀粉颗粒结晶结构的测定方法进行综述。

1 X射线衍射(X-RD)法

晶体能对X射线产生衍射效应, 利用这种衍射可以测定晶态物质在原子水平上的结构, 提供详细的结构数据^[1,3-5]。X射线衍射除能提供淀粉结晶区及无定形区相对量的信息外, 还能提供淀粉颗粒中微晶晶体结构方面的信息。

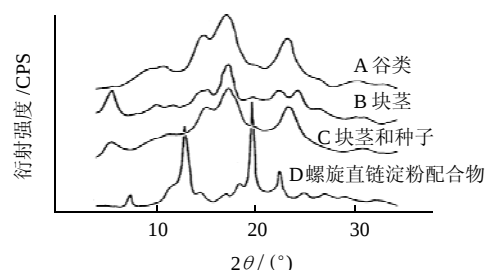


图1 不同晶型淀粉的X射线衍射图^[9]

Fig.1 X-ray diffraction of different starch crystal forms^[9]

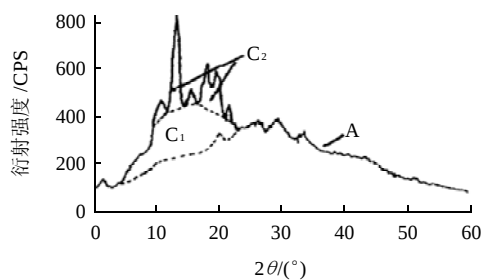
淀粉颗粒的结晶结构随不同来源的植物品种而异。各种淀粉的X射线衍射图形可以分为A、B、C种不同

收稿日期: 2011-08-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(31071562); 陕西省科学技术厅国际科技合作项目(2011KW-26)

作者简介: 黄峻榕(1971—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为淀粉资源的开发与利用。E-mail: huangjunrong2000@163.com

的形态。通过物理或化学的方法处理淀粉还可以得到具有 V 型衍射图样的淀粉。不同晶型的淀粉都具有明显的特征峰^[6-8](图 1)。张本山等^[10]提出在淀粉颗粒中存在着大量的介于微晶和非晶之间的亚微晶结构,任何淀粉颗粒的物态组成都可以看成是由亚微晶、微晶和非晶态三者中 1 种、2 种或 3 种成分组合而成(图 2)。



C₁. 亚微晶区; C₂. 结晶区; A. 非晶区。

图 2 马铃薯淀粉的广角 X 射线衍射曲线^[10]

Fig.2 Wide angle X-ray diffraction of potato starch^[10]

1948 年 Hermans 等^[11]和 1959 年 Wakelin 等^[12]建立两种测定纤维素结晶度的方法,后来被广泛应用于淀粉结晶度的测定中,这两种方法对比见表 1。张本山等^[13]研究了运用测试样品的 X 射线衍射曲线来确定样品绝对结晶度大小的方法,该法是将曲线中的微晶、亚微晶和非晶衍射区域以及背底(曲线中全峰左右两端起峰点的连线与横轴之间的部分)准确地划分出来,从而利用各自区域的累计衍射强度来估算淀粉结晶度的大小。该法快捷、方便、可靠,但忽略了 X 射线对结晶区和无定形区衍射效应不同以及其他散射因子对衍射图的影响等,会导致结果出现误差^[14]。

表 1 Hermans 法^[11]和 Wakelin 法^[12]对比

Table 1 Comparison between Hermans method^[11] and Wakelin method^[12]

方法	样品个数	定量依据	计算方法
Hermans 法	1(待测样)	峰面积	结晶区 非晶区 + 结晶区
Wakelin 法	3(结晶样、非晶样、待测样)	峰强度	结晶样-非晶样 待测样-非晶样

MDI Jade 软件是 X 射线衍射仪配套的分析软件,具有对样品 X 射线衍射图谱进行平滑、扣背底、寻峰、峰型拟合、结晶度计算等功能,能快速、简便、可靠地分析计算淀粉的结晶度^[15]。陈翠兰等^[15]提出了计算淀粉结晶度的新方法,即在张本山绝对结晶度计算原理的基础上,利用 MDI Jade 软件打开淀粉样品 X 射线衍射图谱,多次平滑,取衍射角 4°~30° 范围内的图谱,扣除背底,直接读出样品结晶度。

刘延奇等^[16]通过酸解及糊化脱支等方法处理玉米淀粉得到微晶淀粉,经过 X 射线衍射分析得出随着形成结晶时温度(-5~35℃)升高,结晶浓度(酸解后的淀粉经

加热溶解离心后得到的短链淀粉,配制成的淀粉水溶液的浓度)的增大,微晶的晶型从 B 型向 A 型转化;酸解后的短链直链淀粉有利于形成 A 型结构,而脱支反应切断支链淀粉侧链后的长链倾向于形成 B 型结构。

周玉东等^[17]采用 X 射线衍射法研究了水分含量对马铃薯淀粉颗粒结晶度的影响,结果表明:当水分含量小于 19.20% 时,衍射图形显示的是微晶区域和无定形区域两部分的衍射图形的综合。随着水分含量(19.20%~37.56%)增加,样品的结晶度从小变大,并达到一个平衡值(约 45%),衍射图形中大多数由无定形区域产生的弥散衍射区减少。

晶型是结晶结构的基本性质,而淀粉的晶型是通过 X 射线衍射的特征峰形图谱来确定的,因此该方法为研究淀粉颗粒结晶结构的基础方法。X 射线衍射法对结晶结构的定性比较直观,另外还能通过峰面积计算出结晶度,对结晶结构进行初步定量。

2 红外光谱(IR)法

红外光谱是检测高分子物质组成与结构的最重要方法之一,其对分子的构象和螺旋结构的改变十分敏感,因此可以利用红外光谱的定量技术研究淀粉的结晶结构^[18]。

van Soest 等^[19]通过研究马铃薯原淀粉及其无定形淀粉,发现在 1047cm⁻¹ 的红外吸收是淀粉结晶区的结构特征,代表了短程分子内的有序结构;而在 1022cm⁻¹ 的红外吸收则是淀粉非晶区的结构特征,两处吸收峰强度的比值可用来表示淀粉颗粒在短程范围内的结晶程度。

刘天一等^[20]以低温行星式球磨机研磨玉米淀粉来制备非晶化玉米淀粉,并经傅里叶变换红外光谱仪(FTIR)分析球磨后的非晶化淀粉,发现表征有序结构的 1047cm⁻¹ 特征峰消失,而在 1020cm⁻¹ 处出现一个宽化的特征峰,说明已形成非晶化淀粉。

李玥等^[21]采用衰减全反射傅里叶变换红外光谱仪(ATR-FTIR),即利用 FTIR 光谱仪结合衰减全反射附件和 OMNI 采样器跟踪测定了 4 种不同直链淀粉含量大米淀粉的加热糊化过程,结果表明,质量浓度为 6g/100mL 的淀粉在加热过程中,随着温度的升高,代表结晶结构的 1047cm⁻¹ 附近的吸收峰强度越来越小,说明淀粉的结晶结构被破坏,而且发现直链淀粉质量含量越高,其结晶结构在糊化过程中破坏越慢,说明直链淀粉能抑制淀粉结晶结构的破坏。

陈玲等^[22]通过对红外光谱图 1300~800cm⁻¹ 波数段的玉米原淀粉及其变性淀粉(取代度分别为 1.31、1.42、2.04、2.40 的醋酸酯化淀粉和交联度小于 0.05 的三氯氧磷交联淀粉)的特征峰进行解卷积处理,得到 980、1022、1047cm⁻¹ 处的峰面积,3 者的变化分别显示的是淀粉原有结晶结构、无定形结构及变性后新型结晶结构的变化,计算 980cm⁻¹/1022cm⁻¹、980cm⁻¹/1047cm⁻¹、(980+1047)cm⁻¹/1022cm⁻¹和 980cm⁻¹/(1022+1047)cm⁻¹的相对

峰面积比值,发现醋酸酯化变性会导致淀粉结晶程度降低,而三氯氧磷交联对淀粉结晶结构影响不明显。

红外光谱除了对淀粉颗粒的结晶结构进行定性和定量分析外,对变性淀粉的取代基团也可以进行定性和定量研究,因此在研究变性淀粉颗粒结晶结构,以及变性对颗粒结晶结构的影响方面具有X射线衍射法不可替代的优势。

3 原子力显微镜(AFM)法

原子力显微镜是利用针尖与样品表面原子间的微弱作用力作为反馈信号,维持针尖与样品之间作用力恒定,同时针尖在样品表面扫描,从而得知样品表面的高低起伏^[23-24]。

郭云昌^[25]利用AFM对沉积在新解离的云母表面的淀粉样品进行观测,发现支链淀粉在溶液中呈现糜状和菊花状的构型,而直链淀粉为螺旋或线形构型。安红杰^[26]利用AFM观察到溶液中淀粉颗粒轻度糊化后的分子链,同时测量了淀粉中各种链的数据,发现淀粉中存在几种不同水平的链,它们的链径分别为100、15、2.2、0.5nm。其中2.2nm的链为双螺旋结构,而0.5nm的链与葡萄糖单分子水平链的理论值接近。

Baker等^[27]将淀粉包埋于三聚氰胺甲醛树脂中,固化后所得样品用钻石刀进行分区,得到80~100nm的薄片,用白金双环圈收集,最后将收集到的薄片固定在新鲜干净的云母表面,然后利用接触式AFM观察淀粉颗粒内部的纳米结构,发现玉米淀粉颗粒存在放射状结构,脐心周边环境环绕着400~500nm的生长环,由于切割的作用,有些颗粒的脐心完全暴露,脐心的空洞最深可达90nm(图3)。

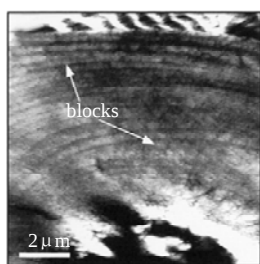


图3 玉米淀粉颗粒脐心附近的AFM图^[25]

Fig.3 AFM image of corn starch granules close to hilum^[25]

Ridout等^[28]将淀粉进行包埋切割处理后,用AFM观察玉米和马铃薯淀粉的内部结构,发现淀粉颗粒内弹性模量的差异会导致AFM图像对比度的变化。结晶结构的刚性强、弹性模量大、对比度高,在图像中表现为较亮的区域。淀粉内无定形区和结晶区的AFM图像有显著差异,较亮的区域和较暗的区域交替排列,即结晶区和无定形区交替排列。

原子力显微镜可以直观地观察淀粉颗粒的纳米级结构,以及结晶结构的分布形态,即结晶结构与无定形结构在颗粒中的分布,因此对结晶结构可以间接定性,但不能进行定量。作为X射线衍射法和红外光谱法的补充,可以用于研究结晶结构在淀粉颗粒中的排列方式,以及由微晶和无定形共同构成的纳米结构的形态。

4 固体核磁共振(SSNMR)法

SSNMR用于淀粉颗粒结构研究的主要原理是淀粉颗粒的结晶区和无定形区在SSNMR图谱上的化学位移和弛豫时间不同。物质在固态时的许多性质在液态时是无法观察到的,SSNMR可以直接测定固体样品,通过交叉极化(cross polarization, CP)、魔角旋转(magic angle spinning, MAS)等方法可以缩短弛豫时间,得到高分辨率的宽线谱图,具有不破坏样品、制样方便、测定快速、精度高、重现性好等优点^[29-30]。

Morgan等^[31]利用单脉冲-魔角旋转(SP/MAS)SSNMR技术研究小麦淀粉颗粒的结构。研究表明,小麦淀粉颗粒是由3种不同的区域构成:支链淀粉的双螺旋结构形成的高度结晶区域、直链淀粉-脂复合物构成的类似固态物质的区域、完全的无定形区域。

Bogacheva等^[32]提出了淀粉双螺旋含量的定量分析方法。这种方法首先假设天然淀粉的SSNMR图谱是由无定形区与双螺旋排列形成的结晶区构成的,制备无定形淀粉并得到无定形淀粉的SSNMR图谱,在天然淀粉的SSNMR图谱中减去无定形区得到结晶区,通过无定形区、结晶区相对于天然淀粉的面积比例,进而计算双螺旋结构的相对含量。但此法将V型单螺旋结构归于无定形组分,导致计算结果偏小。

Tan等^[33]采用¹³C交叉极化/魔角旋转(CP/MAS)SSNMR技术分别对4种不同直链淀粉含量的玉米淀粉和大米淀粉及其无定形淀粉进行测试并对得到的图谱进行分峰和拟合,以无定形淀粉¹³C CP/MAS SSNMR图谱中C4在化学位移为84处的值为参考点,用Excel差减法从天然马铃薯淀粉图谱中减去无定形部分,再从得到的结晶淀粉图谱中分出由单螺旋和双螺旋结构所引起的峰,从而通过峰面积的比值计算出每种淀粉中所含双螺旋结构的比例。并且指出了无定形淀粉的制备条件对淀粉图谱的影响。刘延奇等^[34]参照Tan等^[33]的方法计算出了天然马铃薯淀粉的无定形组分以及双螺旋、单螺旋组分相对含量。

与X射线衍射法和红外光谱法类似,固体核磁共振技术能够进行淀粉颗粒结晶结构的定性和定量研究,由于其是将作为结晶结构基础的双螺旋结构进行定量分析,因此是对定量精度不高的上述2种方法的最好确证和补充。固体核磁共振能够从双螺旋结构层面更精细地反映淀粉颗粒的结晶结构,是该领域研究的发展方向之一。

5 4种测定方法的比较

淀粉颗粒结晶结构的4种测定方法中只有X射线衍

射法能够确定淀粉颗粒结晶结构类型, 样品制备方法简单、测试费用适中; 红外光谱法测定时需对淀粉进行干燥、压片, 测试费用较低; 原子力显微镜测定时需对淀粉进行树脂包埋、固化、超微切片等处理, 样品制备难度较大; 固体核磁共振技术虽然能对结晶结构进行定性, 但由于测试费用较高, 一般用于结晶结构的精确定量研究(表 2)。4 种测定方法对结晶结构的表征侧重不同, 一般先用 X 射线衍射法确定结晶结构的存在和晶型、相对结晶度等, 再与其他 3 种方法中的 1 种或几种结合, 从定性、定量、精细结构、形态、立体分布等不同角度对淀粉颗粒的结晶结构进行分析。

表 2 淀粉颗粒结晶结构 4 种测定方法对比

Table 2 Comparison among four determination methods for crystal structures of starch granules

方法	样品制备 难易程度	对结晶结构的表征			样品测试费用
		类型	定性	定量	
X 射线衍射法	+	√	√	√	++
红外光谱法	++	×	√	√	+
原子力显微镜法	+++	×	√	×	+++
固体核磁共振法	+	×	√	√	++++

注: +. 越多表示难度越大或费用越高; √. 肯定; ×. 否定。

6 结 语

本文所介绍的 4 种方法: X 射线衍射法、红外光谱法、原子力显微镜及固体核磁共振技术可分别用于测定淀粉颗粒结晶结构类型、结晶度、立体分布、构成单位双螺旋结构的相对含量等。由于淀粉颗粒结构的复杂性, 其精细结构中仍存在许多有待解决的问题: 如结晶结构在淀粉颗粒中的整体分布及其对淀粉性质的决定作用; 结晶结构中直链淀粉所处的位置和作用; 双螺旋结构与结晶度的准确换算等。因此除了上述 4 种研究方法, 还需要通过与淀粉的其他物理性质(如糊化性质、黏度性质和流变性质等)、营养性质(各种消化酶对淀粉颗粒的降解)、支链淀粉分子结构(如不同侧链的聚合度)的测试相结合, 以及通过分形(数学)进行分析与综合, 才能破解淀粉颗粒结晶结构的更多奥秘。

参考文献:

- [1] TANG H, MITSUNAGA T, KAWAMURA Y. Molecular arrangement in blocklets and starch granule architecture[J]. Carbohydrate Polymers, 2006, 63(4): 555-560.
- [2] BULEON A, GALLANT D J, BOUCHET B, et al. Starches from A to C[J]. Plant Physiology, 1997, 115: 949-957.
- [3] ELFSTRAND L, FRIGARD T, ANDERSSON R, et al. Recrystallisation behaviour of native and processed waxy maize starch in relation to the molecular characteristics[J]. Carbohydrate Polymers, 2004, 57(4): 389-400.
- [4] ALESHIN A E, FENG P H, HONZATKO R B, et al. Crystal structure and evolution of a prokaryotic glucoamylase[J]. Journal of Molecular Biology, 2003, 327(1): 61-73.
- [5] BLENNOW A, BAY-SMIDT A M, OLSEN C E, et al. The distribution of covalently bound phosphate in the starch granule in relation to starch crystallinity[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2000, 27(3): 211-218.
- [6] BULEON A, COLONNA P, PLANCHOT V, et al. Starch granules structure and biosynthesis[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 1998, 23(2): 85-112.
- [7] 刘延奇, 杨留枝, 于九皋, 等. 微晶淀粉的制备及应用[J]. 粮食与饲料工业, 2006(8): 20-22.
- [8] 黄强, 罗发兴, 杨连生. 淀粉颗粒结构研究进展[J]. 高分子材料科学与工程, 2004, 20(5): 19-23.
- [9] ZOBEL H F. Starch crystal transformations and their industrial importance [J]. Starch/Stärke, 1988, 40: 1-7.
- [10] 张本山, 张友全, 杨连生, 等. 玉米、木薯及马铃薯淀粉颗粒微晶结构及性质的研究[J]. 食品科学, 2001, 22(2): 11-13.
- [11] HERMANS P H, WEIDINGER A. Quantitative X-ray investigations on the crystallinity of cellulose fibers. A background analysis [J]. Journal of Applied Physics, 1948, 19: 491- 506.
- [12] WAKELIN J H, VIRGIN H S, GRYSTAL E. Development and comparison of two X-Ray methods for determining the crystallinity of cotton cellulose[J]. Journal of Applied Physics, 1959, 30: 1654-1660.
- [13] 张本山, 张友全, 杨连生, 等. 淀粉多晶体系结晶度测定方法研究[J]. 华南理工大学学报:自然科学版, 2001, 29(5): 55-58.
- [14] 陈福泉, 张本山, 卢海凤, 等. X-射线衍射在淀粉颗粒结晶度研究中的应用[J]. 食品科学, 2010, 31(3): 284-287.
- [15] 陈翠兰, 张本山, 陈福泉. 淀粉结晶度计算的新方法[J]. 食品科学, 2011, 32(9): 68-71.
- [16] 刘延奇, 杨留枝, 于九皋, 等. 微晶淀粉的制备及影响微晶晶型的因素研究[J]. 中国粮油学报, 2007, 22(1): 56-59.
- [17] 周玉东, 龙功瑾. 水分含量对马铃薯淀粉颗粒结晶度影响的研究[J]. 粮油加工, 2010, 10: 80-82.
- [18] 赵凯, 张守文, 杨春华, 等. 现代分析技术在淀粉研究中的应用[J]. 粮油食品科技, 2004, 6(12): 49-50.
- [19] van SOEST J J G, TOURNOIS H, de WIT D. Short-range structure in (partially) crystalline potato starch determined with attenuated total reflectance Fourier-transform IR spectroscopy[J]. Carbohydrate Research, 1995, 279: 201-214.
- [20] 刘天一, 马莺, 陈历水, 等. 非晶化玉米淀粉的制备及其结构表征[J]. 哈尔滨工业大学学报, 2010, 42(2): 286-291.
- [21] 李玥, 钟芳, 麻建国, 等. 大米淀粉糊化过程的光谱分析[J]. 高分子学报, 2008(7): 720-725.
- [22] 陈玲, 黄嫣然, 李晓玺, 等. 红外光谱在研究改性淀粉结晶结构中的应用[J]. 中国农业科学, 2007, 40(12): 2821-2826.
- [23] 庄海宁, 张燕萍. 原子力显微镜在淀粉颗粒结构研究中的应用[J]. 中国食品添加剂, 2006(6): 157-161.
- [24] 黄强, 罗发兴. 原子力显微镜(AFM)在淀粉纳米级结构分析中的应用[J]. 粮食与饲料工业, 2004(5): 44-46.
- [25] 郭云昌. 淀粉结构的原子力显微镜观察研究[D]. 郑州: 郑州工程学院, 2000.
- [26] 安红杰. 纳米级淀粉结构研究[D]. 郑州: 郑州工程学院, 2002.
- [27] BAKER A A, MILES M J, HELBERT W. Internal structure of the starch granule revealed by AFM[J]. Carbohydrate Research, 2001, 330: 249-256.
- [28] RIDOUT M J, GUNNING A P, PARKER M L, et al. Using AFM to image the internal structure of starch granules[J]. Carbohydrate Polymers, 2002, 50: 123-132.
- [29] 徐忠, 缪铭. 高分子物理近代分析方法在淀粉研究中的应用[J]. 食品工业科技, 2006, 27(4): 197-200.
- [30] TAVARES M I B, BATHISTA A L B S, SILVA E O, et al. ¹³C-NMR study of dipteryx alata vogel starch[J]. Journal of Applied Polymer Science, 2004, 92: 2151-2154.
- [31] MORGAN K R, FURNEAUX R H, LARSEN N G. Solid-state NMR studies on the structure of starch granules[J]. Carbohydrate Research, 1995, 276: 387-399.
- [32] BOGRACHEVA T Y, WANG Y L, HEDLEY C L. The effect of water content on the ordered/disordered structures in starches[J]. Biopolymers, 2001, 58(3): 247-259.
- [33] TAN I, FLANAGAN B M, HALLEY P J, et al. A method for estimating the nature and relative proportions of amorphous, single, and double-helical components in starch granules by ¹³C CP/MAS NMR[J]. Biomacromolecules, 2007, 8(3): 885-891.
- [34] 刘延奇, 吴史博. 马铃薯淀粉双螺旋结构定量分析方法的研究[J]. 中国粮油学报, 2010, 25(2): 54-56.