

烤烟烟叶淀粉晶体结构的光谱分析

朱晓兰¹, 徐迎波², 周顺², 高芸¹

(1.中国科学技术大学烟草与健康研究中心,安徽 合肥 230052;2.安徽中烟工业公司技术中心,安徽 合肥 230088)

摘要:利用固体核磁共振波谱仪(CP/MAS ¹³C NMR)、粉末 X-射线衍射仪(XRD)和扫描电子显微镜(SEC)研究了烤烟烟叶淀粉晶体的结构特性。结果表明:烤烟烟叶淀粉晶体 CP/MAS ¹³C NMR 波谱显示在 C1 区域,在化学位移 99.3 和 100.2 处有 2 个明显的结晶峰,同时,XRD 波谱 2 θ 在 17° 处有较强的衍射峰,在 5.6°、15°、20°、22° 和 24° 附近有较弱的衍射峰,均表现出典型的 B-型晶体特征。根据 CP/MAS ¹³C NMR 波谱计算出的烟叶淀粉晶体的相对结晶度和双螺旋含量分别为 36.1%和 21.3%,其结晶度比采用 XRD 波谱计算值略高。

关键词:烤烟;淀粉晶体;固体核磁共振波谱;结晶度

中图分类号: S572.01

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2016)01-0044-05

Spectrum analysis of crystalline structure of flue-cured tobacco leaves

Zhu Xiaolan¹, Xuyingbo², Zhoushun², Gao Yun¹

(1.Research Center of Tobacco and Health, University of Science and Technology of China, Hefei 230052,China;
2.Center of Technology, China Tobacco Anhui Industrial Corporation, Hefei 230088, China)

Abstract: The structure characteristics, crystalline characteristics and relative crystallinity of starches from flue-cured tobacco leaves were investigated with CP/MAS ¹³C NMR, X-ray powder diffraction (XRD) and scanning electron microscopy (SEC). The results indicated that there were typical doublets at about 99.3, 100.2 ppm in C1 spectrum of CP/MAS ¹³C NMR from tobacco starch. The XRD spectra of tobacco starch showed the strongest diffraction peak at around 17° 2 θ , and a few small peaks at around 5.6°, 15°, 20°, 22° and 24° 2 θ , which was the characteristic peaks of B-type starch. The percentage of the relative crystallinity and double helix content calculated from CP/MAS ¹³C NMR in tobacco starches were 36.1% and 21.3%, respectively. The relative crystallinity obtained from CP/MAS ¹³C NMR was higher than that from XRD.

Keywords: flue-cured tobacco; starch crystal; solid state nuclear magnetic resonance; crystallinity

植物淀粉颗粒分为直链淀粉(Am)和支链淀粉(Ap)2 种类型。直链淀粉和支链淀粉中的支链部分形成了双螺旋结构,这些双螺旋分子链通过分子间的相互作用力以一定的空间点阵在淀粉颗粒的某些区域形成不同的晶体结构。双螺旋结构形成致密的结晶区,直链淀粉分子以松散的结构形成无定形区。支链淀粉分子的聚合度和平均链长影响淀粉的结晶和晶体形式,与淀粉晶体类型密切相关。依据链长的不同,淀粉结晶结构分为 A-型、B-型和 C-

型 3 种类型^[1]。

烤烟中淀粉含量的高低对烟叶和卷烟品质都有重要的影响^[2]。邓云龙等^[3]研究了品质、部位和成熟度对烟叶淀粉含量及评吸质量的影响。王怀珠等^[4]研究认为,烘烤过程中外加淀粉酶可有效降低烤烟中的淀粉含量。宫长荣等^[5]研究了烘烤过程中变黄期温度、时间对烤烟淀粉代谢的影响。这些研究主要侧重于淀粉含量的分析和淀粉降解过程中其含量对烟草品质的影响,很少涉及烟草中淀粉的

晶型和结晶度等结构特性。淀粉结构的分析多采用 XRD 波谱研究^[6-7], 贺帆等^[8]用此法研究烤烟烟叶淀粉颗粒结构特征和晶体特征, 但由于淀粉是多晶结构, 用 XRD 计算淀粉结晶度有一定的困难。李统帅等^[9]采用光学显微镜观察了烘烤过程中非晶颗粒态烟草淀粉微生物降解特性和淀粉颗粒结构的变化。He 等^[10]也采用扫描电镜考察了上部烟叶在烘烤过程中淀粉颗粒晶体结构的变化。近年来, 固体核磁共振波谱仪(CP/MAS ¹³C NMR)技术被用于研究淀粉的结构^[11]。笔者采用亚硫酸溶液提取了烤烟烟叶中的淀粉, 利用 CP/MAS ¹³C NMR 和 XRD 光谱研究了烟草淀粉晶体的类型, 并计算烤烟淀粉的双螺旋含量和相对结晶度, 结合 SEC 光谱考察了烟草淀粉颗粒的表面结构和性状, 以期对烟草调制过程中淀粉的降解、烤后烟叶淀粉的结构变化以及提升烤烟的质量提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料和主要仪器设备

直链淀粉(纯度 99.5%)和支链淀粉(纯度 95.5%)购自上海百灵威化学品公司。K326 烟叶取自安徽中烟工业公司皖南烟叶基地, 采摘成熟的青烟样品, 去除泥沙和主脉, 一部分用于提取淀粉, 另一部分同时测定烟叶中的水分。所有淀粉样品在-20 °C 保存备用, 分析测试前置于恒温恒湿机(25 °C, 相对湿度 80%)平衡 48 h。

主要仪器: AVANCE AV 400 超导傅立叶数字化核磁共振谱仪(瑞士布鲁克公司出品); TTR-III 型 18KW 样品水平型大功率 X 射线粉末衍射仪(日本玛珂公司出品); JSM-6700F 型扫描电子显微镜(日本 JEOL 公司出品)。

1.2 方法

1.2.1 烟草淀粉的提取和分离

鲜烟叶样品淀粉依照文献^[12]方法提取, 无定形淀粉取直链淀粉样品依照文献^[1]方法制备。

1.2.2 淀粉晶体的光谱测试

CP/MAS ¹³C NMR 光谱测试条件: 场强 9.40 T, 7 mm 魔角探头, 转速 15 kHz, 脉冲宽度 90°, 交叉极化时间 4 μs, 接触时间 2 ms, 采样时间 34 ms, 采样间隔时间 2.0 s, 扫描次数 1 024, 谱宽 300, 一级定标用四甲基硅烷(CH₃)₄Si。CP/MAS ¹³C NMR 光谱化学位移、光谱峰面积及分解峰形拟合的计算采用 MestReNova 6.1.1 核磁软件进行分析, 淀粉分子中双螺旋含量(有序部分)根据 Atichokudomchai 的方法^[13]计算, 相对结晶度的计算根据 Paris 的方法^[14]计算。

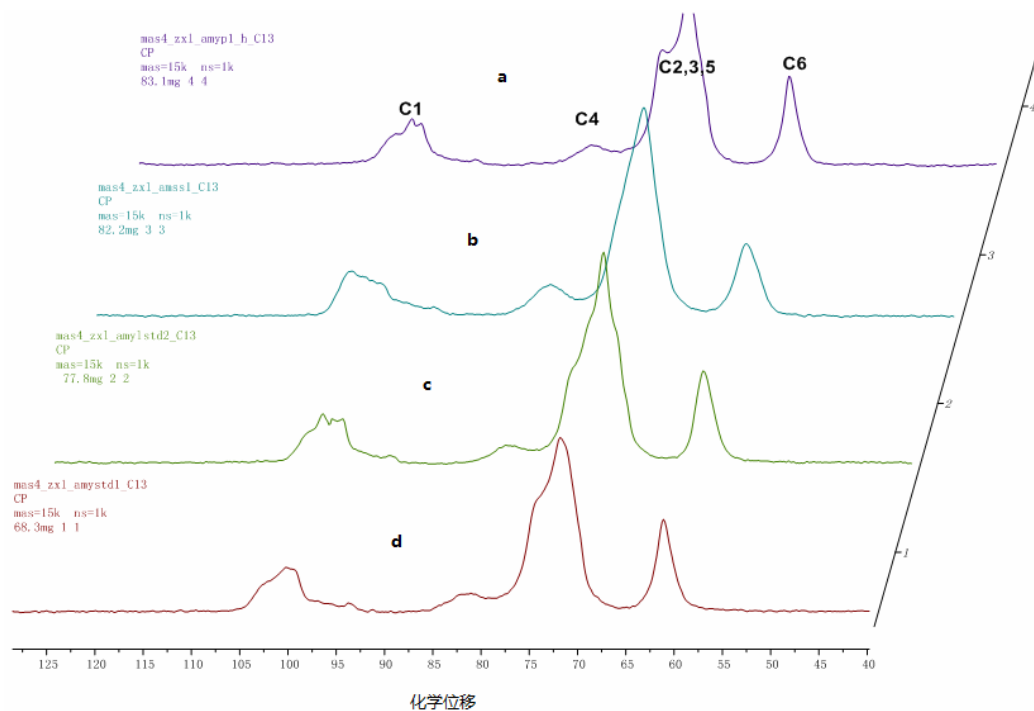
XRD 分析测试条件: 淀粉样品过孔径 45 μm 筛, 采用乙醇涂片法制作试片, 安放在玻璃样品架上。Ni 滤波, Cu 靶 K_α 射线, 管压 40 kV, 管电流 200 mA, 扫描速度 2°/min, 2θ 扫描范围 3°~50°, 波长 0.154 184 1 nm。利用 Origin 软件获得 XRD 波谱图, 按照文献^[15]方法求相对结晶度。

SEC 分析: 淀粉标样和样品按照常规方法, 先进行喷金处理, 再放入扫描显微样品室进行观察。

2 结果与分析

2.1 烟草淀粉晶体的 CP/MAS ¹³C NMR 光谱

烟草淀粉样品和直链淀粉标样、支链淀粉标样、无定型淀粉样品的 CP/MAS ¹³C NMR 光谱如图 1 所示。图 1-a 为烟草淀粉样品 NMR 光谱光谱吸收所对应的化学位移归属图。在化学位移 100 处附近对应的为淀粉六元吡喃糖元中 C1 区域, 有多重吸收峰, 其中在化学位移 102 附近的宽峰是葡萄糖 C1 区域的无定形峰, 与直链淀粉含量有关, 另外的吸收峰为结晶结构^[14], 明显可见直链淀粉的结晶结构吸收明显比支链淀粉弱。在化学位移 82 处附近的宽峰为 C4 区域无定形结构的吸收峰, 其中无定形淀粉中此处吸收峰最强。在化学位移 68~76 区域重叠的为 C-2, 3, 5 吸收峰。在化学位移 61 处为淀粉六元吡喃糖元中 C6 区域, 吸收峰的位置稳定, 峰形对称性较好, 其峰面积与淀粉的存在量呈良好的线性关系, 可实现烟草样品中淀粉的定量固态分析。



a 烟草淀粉 ; b 无定形淀粉 ; c 支链淀粉 ; d 直链淀粉。

图1 烟草淀粉晶体的CP/MAS ^{13}C NMR光谱

Fig.1 CP/MAS ^{13}C NMR spectra of starch sample extracted from tobacco

CP / MAS ^{13}C NMR 光谱可见淀粉的 NMR 图谱均有 4 个主要的波谱峰区域, 分别为 C1、C4、C2, 3, 5 和 C6 区域, 不同类型淀粉的主要区别在 C1 区域。A-型淀粉在 C1 区域处有 3 个典型的结晶峰^[16], 在化学位移 102.2 处有一弱的肩峰(无定形峰); 烟草淀粉在化学位移 100.2 和 99.3 处有 2 个典型的结晶峰, 在化学位移 102.5 处有一无定形峰, 具有 B-型淀粉的典型特征^[1], 因此, 确定烟草淀粉

属于 B-型淀粉结构。

由 NMR 光谱化学位移、光谱峰面积及分解峰形拟合的峰面积, 计算出的不同淀粉样品的结构信息(无定形淀粉比例、相对双螺旋含量及相对结晶度)列于表 1。以无定形淀粉为基准, 烟草淀粉和直链淀粉中无定形比例高于支链淀粉, 其相对双螺旋含量比例低于支链淀粉, 相对结晶度也表现出类似的规律, 支链淀粉的相对结晶度略高, 为 46.8%。

表 1 由 NMR 光谱计算的不同来源的淀粉晶体的结构信息

Table 1 The structure information for starch sample from different sources by NMR data

样品	C4 峰面积占总面积比率/%	无定形淀粉的比例/%	相对双螺旋含量/%	相对结晶度/%	
				NMR 法	XRD 法
无定形淀粉	9.24	100.0	0.0	18.8	6.49
直链淀粉	6.13	66.3	33.7	30.6	20.8
支链淀粉	5.32	57.1	42.9	46.8	31.3
烟草淀粉	7.27	78.7	21.3	36.1	23.8

2.2 烟草淀粉晶体的 XRD 光谱

淀粉标样(直链淀粉、支链淀粉和无定形淀粉)和烟草淀粉样品的 XRD 波谱如图 2 所示。支链淀粉在 14.9°、17.0°、17.9° 和 22.9° 附近有强的衍射峰, 其中 17° 和 17.9° 附近的衍射峰为相连的双峰, 这是 A-型晶体淀粉的 XRD 波谱特征, 与文献报道的禾谷类作物种子淀粉的波谱^[17]相同。无定形淀粉在这

些区域的衍射峰强度很弱。直链淀粉仅在 17.0° 附近有一较强的衍射峰, 在 5.6°、22.0° 和 24.0° 附近有较弱的衍射峰, 具有 B-型晶体淀粉的 XRD 波谱特征, 但强度弱。烟草淀粉样品的 XRD 波谱显示在 5.6° 附近有 B-型晶体淀粉的典型吸收峰, 在 17.0° 处有一较强的衍射峰, 在 22.0° 和 24.0° 附近有中等强度的衍射峰, 因此, 烟草淀粉属于 B-型晶体淀粉,

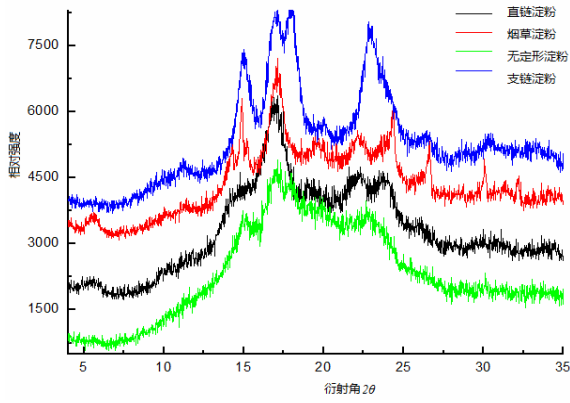


图 2 烟草淀粉晶体的 XRD 波谱

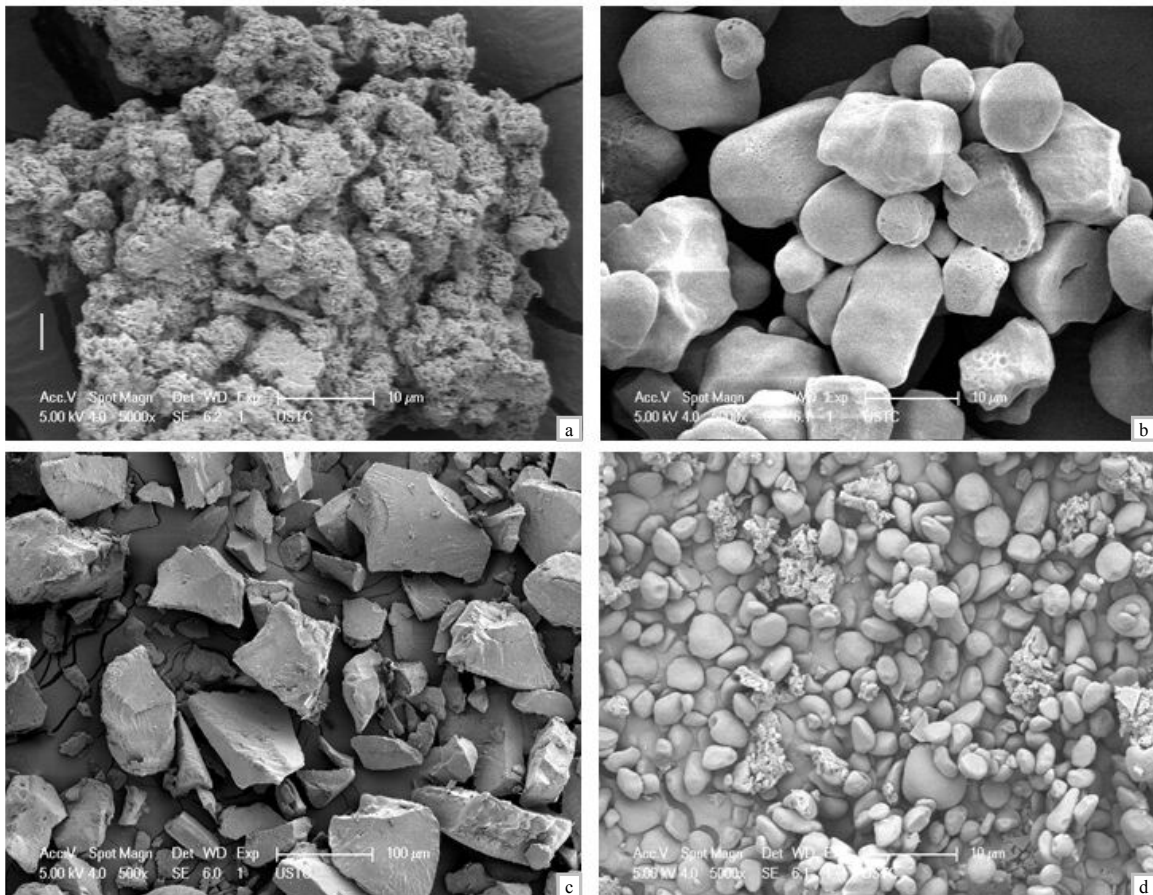
Fig.2 XRD spectra of starch samples from tobacco

与 NMR 分析结果相一致。按照 XRD 光谱也可计算出不同来源的淀粉样品的相对结晶度 (表 1), 几种样品中支链淀粉的相对结晶度略高(>30%), 对比由 NMR 数据计算的相对结晶度, 二者在趋势上有明显的一致性, 但由于 XRD 计算的相对结晶度略低于 NMR 数据计算的, 这一点与文献[13]相一致。与 XRD 相比, ¹³C NMR 波谱测定的是大分子的短

程有序, 而长程有序才能被 XRD 测定; 部分短程有序能被 ¹³C NMR 测定, 而 XRD 不能测定, 因此, XRD 测定的结晶度比 ¹³C NMR 低^[17]。由 2 种方法测定的不同来源的淀粉标样和样品的 2 组数据具有明显的相关性, 其线性关系为 $y = 8.9816 + 1.20667x$, 其中 x 为由 XRD 数据计算的相对结晶度, y 为由 NMR 数据计算的相对结晶度, 二者之间的相关系数为 0.9859。

2.3 烟叶淀粉 SEC 光谱分析

图 3 为 SEC 观察不同淀粉样品的图片, 3 种标样和烟草淀粉具有明显不同的形状特征、大小和微观形貌: 直链淀粉表面呈絮状, 颗粒界限不明; 支链淀粉颗粒表面光滑, 主要为圆柱状和圆球形, 其中个别呈现不规则形状; 无定形淀粉呈现明显的分布不均的块状, 属于磨碎的表面; 烟叶淀粉呈单粒状, 形状与支链淀粉颗粒类似, 表面光滑, 主要为圆球形和长圆柱状, 且部分淀粉颗粒表面均存在明



a 直链淀粉; b 支链淀粉; c 无定形淀粉; d 烟草淀粉。

图 3 烟草淀粉晶体扫描电子显微镜观察结果

Fig.3 SEC spectra of different starch samples

显的内陷凹槽。另外,烟草淀粉粒径明显较小,主要集中在3~4 μm,与块茎和谷物类淀粉^[17]相比,烟草淀粉粒是烟草叶片产生的瞬时淀粉粒。

3 结论与讨论

淀粉是由直链淀粉和支链淀粉组成的半晶体结构,其中支链淀粉和直链淀粉的比例及支链淀粉的晶体结构决定淀粉的特性^[17],进而影响烟叶的外观质量和内在品质。CP/MAS ¹³C NMR 波谱显示烟草淀粉在 C1 区域化学位移 100.2 和 99.3 处有 2 个典型的淀粉结晶峰,属于 B-型淀粉结构。NMR 波谱定量研究淀粉的结晶度和双螺旋含量结果表明,烟草淀粉中无定形比例较高,其相对双螺旋含量比例和相对结晶度分别为 21.3%和 36.1%。XRD 波谱也显示烟草淀粉在 5.6° 附近有 B-型晶体淀粉的典型吸收峰,在 17.0° 处衍射峰最强,在 22.0° 和 24.0° 附近有中等强度的衍射峰。由 XRD 波谱和 CP/MAS ¹³C NMR 波谱计算出的相对结晶度具有显著的相关性($R=0.9859$)。烟叶淀粉颗粒以圆球形和圆柱形为主,粒径约 3~4 μm。

淀粉在烟叶烘烤过程中发生急剧变化,淀粉的分解和转化对烤后烟叶内部化学成分之间的协调程度有重要影响。淀粉的水解和降解过程同时伴随着淀粉结构的变化^[18],虽然不同烤烟烟叶淀粉的颗粒表面特征基本一致,但内部分子链结构并不完全相同,在烟叶调制过程中,淀粉的降解过程也不尽相同,因此,应用 XRD 和 CP/MAS ¹³C NMR 波谱技术不仅为研究烟草淀粉晶体结构提供重要手段,而且对于烟叶的烘烤合理调控、促进烟叶内部的化学成分协调一致、向着提高烟叶品质方向发展也有重要的意义。

参考文献:

- [1] Cai J, Cai C, Man J, et al. Structural and functional properties of C-type starches[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 101(2): 289-300.
- [2] 王文超,贺帆,徐成龙,等.半晾半烤对上部烟叶淀粉降解和相关酶活性及品质的影响[J].湖南农业大学学报(自然科学版),2012,38(2):131-134.
- [3] 邓云龙,崔国民,孔光辉,等.品种、部位、成熟度对烟叶淀粉含量及评吸质量的影响[J].中国烟草学报,2006,27(4):18-23.
- [4] 王怀珠,杨焕文,郭红英,等.淀粉类酶降解鲜烟叶中淀粉的研究[J].中国烟草科学,2005,26(2):37-39.
- [5] 宫长荣,毋丽丽,袁红涛,等.烘烤过程中变黄条件对烤烟淀粉代谢的影响[J].西北农林科技大学学报(自

然科学版),2009,37(1):117-121.

- [6] Wei C, Qin F, Zhou W, et al. Comparison of the crystalline properties and structural changes of starches from high-amylose transgenic rice and its wild type during heating[J]. Food Chemistry, 2011, 128(3): 645-652.
- [7] Man J, Cai J, Cai C, et al. Physicochemical properties of rhizome starch from a traditional Chinese medicinal plant of Anemone altaica[J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 89(2): 571-577.
- [8] 贺帆,王涛,王梅,等.烤烟烟叶淀粉颗粒结构特征与基本特性[J].中国烟草学报,2013,19(3):49-53.
- [9] 李统帅,宋朝鹏,米建华,等.烘烤过程中非晶颗粒态烟草淀粉微生物降解特性[J].江西农业学报,2010,22(1):10-13.
- [10] He F, Wang T, Tian B, et al. Changes of granule structure and enzyme hydrolysability of starch in upper flue-cured tobacco leaves during bulk flue-curing[J]. Agricultural Science & Technology, 2012, 13(12): 2642-2647.
- [11] Wei C, Xu B, Qin F, et al. C-type starch from high-amylose rice resistant starch granules modified by antisense RNA inhibition of starch branching enzyme[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(12): 7383-7388.
- [12] 王涛,贺帆,田斌强,等.烤烟烟叶淀粉的提取工艺优化[J].烟草科技,2012(6):80-83.
- [13] Atichokudomchai N, Varavinit S, Chinachoti P. A study of ordered structure in acid-modified tapioca starch by ¹³C CP/MAS solid-state NMR[J]. Carbohydrate Polymers, 2004, 58(4): 383-389.
- [14] Paris M, Bizot H, Emery J, et al. Crystallinity and structuring role of water in native and recrystallized starches by ¹³C CP-MAS NMR spectroscopy 1: spectral decomposition[J]. Carbohydrate Polymers, 1999, 39(4): 327-339.
- [15] 徐斌,满建民,韦存虚.粉末X射线衍射图谱计算植物淀粉结晶度方法的探讨[J].植物学报,2012,47(3):278-285.
- [16] 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.
- [17] 满建民,蔡金文,徐斌,等.作物淀粉晶体结构的波谱分析[J].作物学报,2012,38(4):691-698.
- [18] Wang S J, Yu J L, Zhu Q H, et al. Granule structure and allomorph position in C-type Chinese yam starch granule revealed by SEM, CP/MAS ¹³C NMR and XRD[J]. Food Hydrocolloid, 2009, 23(2): 426-433.

责任编辑:罗慧敏

英文编辑:罗维