

芋头淀粉的分离和纯化

孙忠伟 张燕萍 向传万

(江南大学食品学院, 无锡, 214036)

摘要 用重结晶法可以得到纯度较高的芋头直链淀粉和支链淀粉。直、支链淀粉的蓝值分别是 1.18 和 0.20, λ_{\max} 分别为 614 nm 和 587 nm, 芋头淀粉中直链淀粉含量为 14.7%。高效液相色谱表明, 芋头支链淀粉的分子质量具有较宽的分布, 重均聚合度, 大米支链淀粉 > 芋头直链淀粉 > 大米直链淀粉 > 芋头支链淀粉, 分散度, 芋头支链淀粉 > 芋头直链淀粉 > 大米直链淀粉 > 大米支链淀粉; 芋头支链淀粉中, 长支链所占比例 > 短支链, 分散度, 长支链 > 短支链。

关键词 芋头淀粉, 分离, 纯化, 高效液相色谱

芋头(*Colocasia esculenta*(L.)Schott)别名为芋魁、土芝, 俗称芋艿, 属天南星科。芋头主产区在非洲、亚洲的中国、日本、印度、菲律宾等地。现在栽培的芋头品种有数千种。与其他块茎和块根植物相比, 芋头具有更高的营养价值, 芋头是非洲和亚洲太平洋岛国居民的主要粮食。据联合国农业组织报告, 近年来, 全世界芋头产量有显著增加, 每年全世界产量达 530 ~ 580 万 t, 这为芋头的深加工打下了牢固的基础。

关于芋头淀粉分子的基础研究尚未见报道, 因此, 分离和纯化支链淀粉和直链淀粉就成为结构研究的基础。对于支链淀粉和直链淀粉的分离和纯化已有许多报道, 本文采用沉淀法对粗分离的芋头支链淀粉和直链淀粉多次结晶可得到纯的产品, 并且易于实验室操作, 为一种方便易行的分离方法。

1 材料和方法

1.1 试验材料

芋头 购于无锡市场。

1.2 仪器和试剂

植物组织捣碎机, 高速离心机, 岛津 UV-240 紫外可见分光光度计, Waters 600 高效液相色谱仪等。

正丁醇, 异戊醇, 无水乙醇, 苯酚, NaOH,

HCl, H_2SO_4 均为分析纯试剂; 去离子水; 异淀粉酶 EC3.2.1.68(Sigma 公司 12758), 高效液相色谱仪标样: 葡聚糖标样的分子质量有 200、50、20、10、7、4、2 万 u 和 990 u(瑞典 Pharmacia 公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 芋头淀粉的制备

清洗芋头球茎, 削皮, 切割成薄片, 再清洗一遍。薄片浸入 0.03 mol/L 氨水中 2 ~ 3 min, 在有稀氨水溶液或足够的水覆盖的情况下用植物组织捣碎机在较低的速度下均浆, 此浆在 0.03 mol/L 氨水溶液中浸泡约 2 h, 然后, 分别用 80 目和 260 目的筛子过滤, 滤液沉降 48 h。除去上层及底部残渣, 水洗淀粉数次, 在 40℃ 干燥 48 h^[2]。干燥的芋头淀粉, 用体积分数 85% 甲醇脱脂 24 h 后, 用无水乙醇脱脂 6 h, 在 40℃ 干燥 48 h 待用。

1.3.2 直链淀粉与支链淀粉的分离与纯化

1.3.2.1 直链淀粉与支链淀粉的粗分离

称取 10 g 芋头淀粉, 放入 500 mL 烧杯中, 加少量的无水乙醇, 使样品湿润, 再加入 0.5 mol/L NaOH 溶液 200 mL。在沸水浴中加热搅拌 20 ~ 30 min 至完全分散。冷却后离心(6 000 r/min, 20 min), 去除未分散的残渣(沉淀部分)。用 2 mol/L HCl 中和离心液, 并加入 100 mL 正丁醇-异戊醇(体积比 3:1)混合液, 然后在沸水浴

中加热搅拌 20 min,此时溶液透明,冷却至室温,移入 2~4℃ 冰箱静置 24 h,离心(6 000 r/min,20 min),沉淀物即为粗直链淀粉,上清液即为粗支链淀粉溶液。分别收集备用。

1.3.2.2 直链淀粉的纯化

将沉淀物即粗直链淀粉全部转移至装有 120 mL 正丁醇饱和水溶液,然后置沸水浴中搅拌直至溶液分散透明,再逐渐冷却至室温,移入冰箱内(2~4℃)保持 24 h,取出离心(6 000 r/min,20 min),将得到的沉淀重复上述操作 6 次,然后将沉淀物浸入无水乙醇中 24 h,以无水乙醇洗涤沉淀数次,该沉淀于室温下真空干燥,即得直链淀粉纯品。无水乙醇沉淀的目的是除去直链淀粉中络合的正丁醇。

1.3.2.3 支链淀粉的纯化

支链淀粉溶液置于分液漏斗中静置,取下层溶液加 40 mL 正丁醇-异戊醇(体积比 1:1)混和液,在沸水浴中加热搅拌直至溶液分散透明,冷却至室温,移入冰箱于 2~4℃ 静置 48 h,离心(6 000 r/min,20 min),去除沉淀物,用上清液重复上述操作 3~5 次,所得上清液减压浓缩至原体积的一半,加入 2 倍体积的无水乙醇沉淀、离心,将沉淀溶于热的 200 mL 0.5 mol/L NaOH 溶液中,离心去沉淀,离心液中再加入 2 倍体积的无水乙醇,将沉淀溶于 200 mL 的蒸馏水中,用 2 倍体积的无水乙醇再沉淀,以无水乙醇洗涤数次,室温下真空干燥,即得支链淀粉纯品。

1.3.3 芋头淀粉高效液相色谱

1.3.3.1 操作条件:

色谱柱:Ultrasphere(™)Linear 300 mm × 7.8 mm;流动相:0.1 mol/L NaNO₃;柱温:45℃;流速:0.9 mL/min;进样量:10 μL。

1.3.3.2 标准工作曲线的确定

用 10 mL 含量为 90% 的甲基亚砷(DMSO)溶液在 60℃ 的水中溶解 20~50 μg 的标样,得到澄清透明的标样溶液,用台式离心机以 3 000 r/min 离心 20 min,取上层清液,过 0.45 μm 的滤膜。待色谱仪运转稳定后,取约 10 μL 经过滤的样液进行测定,记录各个标样分子质量相对应的保留时间 RT 和分子质量分布图。

把标样的摩尔分子量数值 M 和相应的保留时间 T (min)按微处理器的 GPC 法输入计算,得相关系数为 0.995 709 的回归方程:

$$\lg M_t = 1.32 \times 10 - 4.73 \times 10^{-1} T$$

式中: M 为摩尔分子量; T 为保留时间(min)。

1.3.3.3 样品分析

纯化的直链淀粉和支链淀粉按 1.3.3.2 所述方法制成溶液,以标定柱的色谱条件进样,仪器会自动绘出被测试验品的分子质量分布图。

芋头支链淀粉的脱支水解产物分子质量分布的测定:取纯化的芋头支链淀粉 22 mg 分散于 5 mL 浓度为 0.05 mol/L 的 pH 5.0 的 CH₃COOH 缓冲溶液中,加入异淀粉酶,同时滴加 2 滴甲苯,防止微生物生长,然后将反应液置于 40℃ 水浴保温。在反映过程中,不断检测反应体系的还原力(以葡萄糖计),当还原力达到一个恒定值时(约 24 h),将反应液置于沸水浴中 20 min 灭酶,冷却,得到芋头支链淀粉的脱支水解产物。用台式离心机以 3 000 r/min 离心 20 min,取上层清液,过 0.45 μm 的滤膜。以标定柱的色谱条件进样,测试。

1.3.4 纯化的芋头直链淀粉和支链淀粉碘复合物吸收光谱测定

支链淀粉和直链淀粉溶液的制备:5 mg 样品,加无水乙醇 0.1 mL 浸润,再加 0.5 mL 2 mol/L NaOH,充分振荡,室温下放置 12 h 后,用 HCl 将此溶液调至 pH 7.0 左右,加水使其体积为 5 mL。此溶液的浓度为 1 mg/mL。取 1 mL 淀粉溶液,加 35 mL 蒸馏水,用 0.05 mol/L HCl 调节 pH 为 3.0,加入 0.5 mL 碘试剂(含 2% 碘化钾,0.2% 碘),定容至 50 mL,充分混匀后采用 UV-1100 紫外可见分光光度计于波长 400~800 nm 对样品进行吸收光谱测定。

1.3.5 蓝 值

蓝值是表示淀粉与碘结合性能的一个指标,通过测定所形成络合物在一定波长下的光吸收值,按下式计算而得:蓝值 = $OD_{680\text{nm}} \times 4 / \text{样品的浓度}(\text{mg/mL})$ 。

1.3.6 直链淀粉含量的测定

参考文献 [4]。

2 结果与讨论

2.1 分离纯化后的直链淀粉和支链淀粉高效液相分析

直链淀粉和支链淀粉不是单一的化合物，化学结构不同性质也有差异；直链淀粉在溶液状态下分子伸展，很容易与一些极性有机化合

物如正丁醇、百里酚、异戊醇等通过氢键缔合，形成结晶性化合物而沉淀；支链淀粉在溶液中呈分枝状，当溶液中有极性有机化合物存在时，由于有较大的空间位阻，不易形成复合物沉淀。因此，利用这种性质可以把直链淀粉和支链淀粉分开。

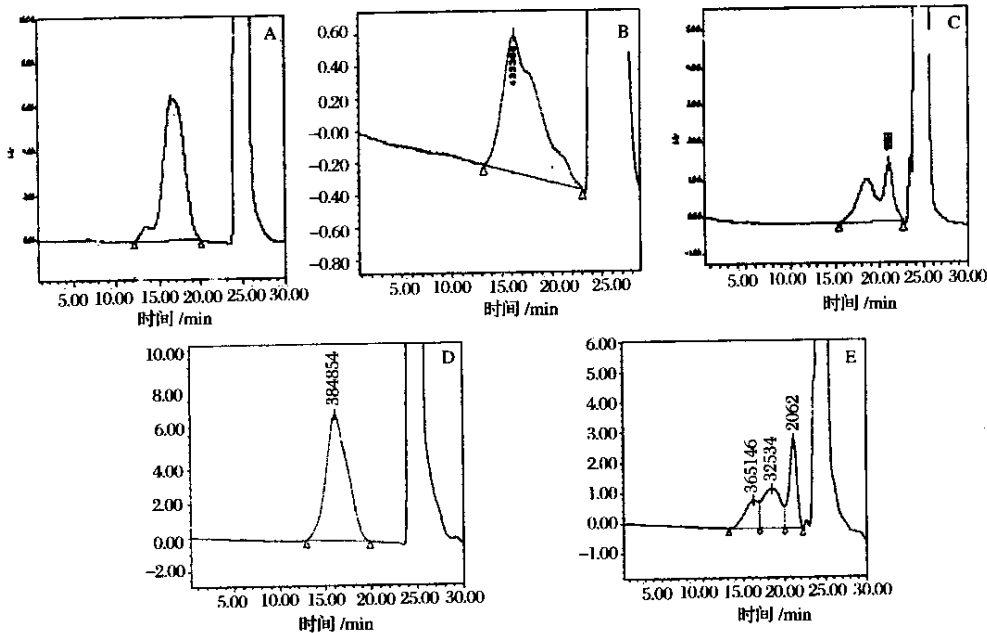


图 1 淀粉的高效液相色谱图

(A) 芋头直链淀粉 (B) 芋头支链淀粉 (C) 芋头支链淀粉的脱支水解产物 (D) 大米直链淀粉 (E) 大米支链淀粉

因为组成淀粉分子的脱水葡萄糖单元的相对分子量为 162，则淀粉分子的聚合度 $DP = \text{摩尔分子量}/162$ ，样品的分散度 $D = \overline{DP_w} / \overline{DP_n}$ 。该值反映分子大小差别的范围。淀粉样品的分子量分布见图 1，色谱图以保留时间(min)为横坐标，以表示摩尔分子量大小的响应值——电压(MV)为纵坐标。从图 1 可见，直、支链淀粉在高效液相色谱上均表现为一个峰，这表明分离、提纯得到的直、支链淀粉非常纯，而支链淀粉的分子质量则具有较宽的分布。

表 1 数据表明，重均聚合度，大米支链淀粉 > 芋头直链淀粉 > 大米直链淀粉 > 芋头支链淀粉，分散度，芋头支链淀粉 > 芋头直链淀粉 > 大米直链淀粉 > 大米支链淀粉。

表 1 分子量测定结果

样 品	重均聚合度 $\overline{DP_w}$	数均聚合度 $\overline{DP_n}$	分散度 D
芋头直链淀粉	3929	661	5.94
大米直链淀粉	3645	961	3.79
芋头支链淀粉	2550	56	45.54
大米支链淀粉	4575	2501	1.83

由表 2 可以看到，芋头支链淀粉中，长支链所占比例大于短支链，分散度，长支链大于短支链。

表 2 支链淀粉分子的聚合度分布比例 %

样 品	重均聚合度 $\overline{DP_w}$	数均聚合度 $\overline{DP_n}$	分散度 D	比 例
芋头支链淀粉长支链	345	133	2.59	57.29
芋头支链淀粉短支链	13.4	9.5	1.41	42.71

2.2 蓝值的测定

直链淀粉和支链淀粉由于它们分子结构和线性聚合度的差异,所测蓝值也不同,一般直链淀粉的蓝值为 0.8 ~ 1.2,支链淀粉 0.08 ~ 0.22^[3]。试验测得芋头直链淀粉的蓝值为 1.18,支链淀粉蓝值是 0.20,均处于相应的分布范围内。

2.3 纯化的芋头直链淀粉支链淀粉碘复合物吸收谱测定

直链淀粉在水溶液中并不是线型分子,而是由分子内氢键作用使链卷曲成螺旋状,每个环含有 6 个葡萄糖残基。当直链淀粉遇碘时,每个螺旋吸附 1 个碘分子,碘分子位于螺旋中央,借助范德华力联系在一起,形成深蓝色络合物。支链淀粉与碘按照其分支和聚合度的不同而生成紫红-棕红色,碘-淀粉络合物吸收峰也随之发生变化。利用淀粉结合碘后所呈现的颜色差异,也可相对确定所分离的淀粉纯度。图 2 表明,经 400 ~ 800 nm 扫描后,芋头直链淀粉的 λ_{\max} 为 614 nm,支链淀粉的 λ_{\max} 为 587 nm。

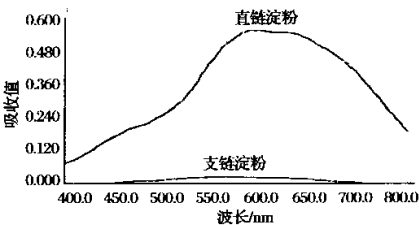


图 2 芋头直链淀粉和支链淀粉碘复合物吸收光谱

2.4 芋头直链淀粉的含量

如表 3 所示,不同品种芋头直链淀粉的含量为 12.2% ~ 40.4%,最大差别达 3 倍以上。本文所测芋头淀粉的直链淀粉含量为 14.7%。不同品种芋头直链淀粉含量差别较大,除因品种(芋头至少有 100 个属及超过 1 500 个种)、产地、产期、栽培环境(如生长温度、湿度、土壤、及施肥状况)、病虫害、成熟度、采收时候的机械外力伤害、采收后的贮藏条件不同外与分析方法也有一定关系。

表 3 几种不同品种芋头的直链淀粉含量

芋头品种	直链淀粉含量/%
莱阳芋头 ^[5]	14
五种美国芋头 ^[6]	18.1 ~ 22.2
十种印度芋头 ^[7]	14.0 ~ 19.4
几种 Colocasia 属台湾芋 ^[8]	24.4 ~ 29.3
几种 Xanthosoma 属台湾芋头 ^[8]	39.4 ~ 40.4

3 结 论

用重结晶法可以得到纯度较高的芋头直链淀粉和支链淀粉,高效液相色谱表明,重均聚合度,芋头直链淀粉 > 大米直链淀粉,大米支链淀粉 > 芋头支链淀粉;分散度,芋头支链淀粉 > 芋头直链淀粉 > 大米直链淀粉 > 大米支链淀粉;芋头支链淀粉中,长支链所占比例 > 短支链;分散度,长支链 > 短支链。

芋头直、支链淀粉的蓝值分别是 1.18 和 0.20, λ_{\max} 分别为 614 nm 和 587 nm,芋头淀粉中直链淀粉含量为 14.7%。

参 考 文 献

1 李雅臣,李德玉,吴寿金.芋头化学成分的研究[J].中草药,1995,26(10):555
2 Moorthy S N. Extraction of starches from tuber crops using ammonia[J]. Carbohydrate Polymers, 1991, 16: 391 ~ 398
3 Gilbert G T, Spragg S P. Iodimetric determination of amylose iodine sorption: blue value. In: Whistler R L, ed. Methods in Carbohydrate Chemistry(Vol IV). New York and London: Academic Press, 1964. 168 ~ 169
4 二国二郎编,王薇青,高寿青,任可达等译.淀粉科学手册[M].轻工业出版社,北京:1990.214 ~ 222
5 姜瑞敏,史美丽,陈玉珍等.芋头淀粉性能及化学组成的研究[J].莱阳农学院学报,1998,15(2):128 ~ 131
6 Jane L S. Physical and chemical studies of taro starches and flours. Cereal chemistry, 1992, 69(5): 529 ~ 534
7 Moorthy S N, Thankamma Pillai P K. Variability in starch extracted from taro[J]. Carbohydrate Polymers, 1993, 20: 169 ~ 173
8 王俊权,王建文,张永和.不同品种芋头淀粉的理化性质之探讨[J].食品科学(台湾),1997,24(3): 282 ~ 294

The Separation and Purification of Amylose and Amlopectin from Taro Starch

Sun Zhongwei Zhang Yanping Xiang Chuanwan

(School of Food Science and Technology , Southern Yangtze University , Wuxi 214036)

ABSTRACT Highly purified amylopectin and amylose from taro starch could be obtained by re-crystallization. Taro amylose and amylopectin exhibited blue values of 1.18 and 0.20 and λ_{\max} of I-KI blue color at 614nm and 587nm respectively. Amylose content of taro starch was 14.7%. Results of gel permeation chromatography (GPC) showed that taro amylopectin molecular weight had a wide distribution in the GPC profile. For \overline{DP}_w the following sequence was observed : rice amylopectin > taro amylose > rice amylose > taro amylopectin. As regards to dispersion , Taro amylopectin > taro amylose > rice amylose > rice amylose. For taro amylopectin , both the dispersion and the proportion of long-branch chains were greater than those of short-branch chains.

Key words taro starch , purification , separation , HPLC



蔬菜水果的 10 种保鲜新技术

保鲜纸箱 由日本食品流通系统协会研制的一种新式纸箱。研究人员用一种“里斯托瓦尔石”(硅酸岩的一种)作为纸浆的添加剂,这种石粉对各种气体具良好的吸收作用,价格便宜又不需低温高成本设备,且具有较长时间的保鲜作用,所保鲜的蔬果分量不会减轻,尤其适合远距离贮运。

微波保鲜 由荷兰一家公司对水果、蔬菜和鱼肉类食品进行低温消毒的保鲜办法。它采用微波,在很短的时间内(120s)将食品加热到 72℃,然后将这种处理后的食品在 0~4℃ 环境条件下上市,可贮存 42~45 天,不会变质,十分适宜淡季供应“时令蔬果”,备受人们青睐。

可食用的蔬果保鲜剂 这是由英国一家食品协会研制成的可食用的蔬果保鲜剂。它采用蔗糖、淀粉、脂肪酸和聚酯物配制而成的一种“半透明乳液”,既可喷雾,又可涂刷,还可浸渍覆盖于西瓜、西红柿、甜椒、茄子、黄瓜、苹果、香蕉等表面,其保鲜期长达 200 天以上。这种保鲜剂可在蔬果表面形成一层“密封薄膜”,完全阻止了氧气进入蔬果内部,从而达到延长蔬果熟化过程,增强保鲜效果的目的。

新型薄膜保鲜 这是日本研制开发出的一种一次性消费的吸湿保鲜塑料包装膜,它是由两片具有较强透水性的半透明尼龙膜所组成,并在膜之间装有天然物料和渗透压高的砂糖糖浆,能缓慢地吸收从蔬菜、果实、肉品表面渗出的水分,达到保鲜作用。

加压保鲜 由日本京都大学粮科所研制成功,利用压力制作食品,蔬菜加压杀菌后可延长保鲜时间,提高新鲜味道,但在加压状态下酸无法发挥作用。

陶瓷保鲜袋 这是由日本一家公司研制的一种具有远红外线效果的蔬果保鲜袋,主要在袋的内侧涂上一层极薄的陶瓷物质,于是通过陶瓷所释放出来的红外线就能与蔬果中所含的水分发生强烈的“共振”运动,从而促使蔬果得到保鲜作用。

微生物保鲜法 乙烯具有促进蔬果老化和成熟的作用,所以要使蔬果能达到保鲜目的,就必须去除乙烯。科学家经过筛选研究,分离出一种“NH-10 菌株”,这种菌株能够除去乙烯,可防止葡萄贮存中发生的变褐、松散、掉粒,对番茄、辣椒起到防止失水、变色和松软的作用,有明显的保鲜作用。

减压保鲜法 它是一种新兴的蔬果贮存法,有很好的保鲜效果,且具有管理方便、操作简单、成本不高等优点,目前英、美、德、法等一些国家已研制出了具有标准规格的低压集装箱,已广泛应用在长途运输蔬果中。

烃类混合物保鲜法 这是英国一家塞姆培生物工艺公司研制出的一种能使番茄、辣椒、梨、葡萄等蔬果贮藏寿命延长 1 倍的“天然可食保鲜剂”。它采用一种复杂的烃类混合物。在使用时,将其溶解于水中成溶液状态,然后将需保鲜的蔬果浸泡在溶液中,使蔬果表面很均匀地涂上一层液剂。这样可大大降低氧的吸收量,使蔬果所产生的 CO_2 几乎全部排出。因此,保鲜剂的作用,酷似给蔬果施了“麻醉药”,使其处于休眠状态。

电子技术保鲜法 它是利用高压负静电场所产生的负氧离子和臭氧来达到目的的。负氧离子可以使蔬果进行代谢的酶钝化,从而降低蔬果的呼吸强度,减弱乙烯的生成。臭氧是一种强氧化剂、消毒剂和杀菌剂,既可杀灭消除蔬果上的微生物及其分泌毒素,又能抑制并延缓蔬果有机物的水解,从而延长蔬果储藏期。