

МОСКОВСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ
ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ АКАДЕМИЯ

УДК 664.2.059.22
на правах рукописи

ФИЛАТОВА Анна Григорьевна .

РГБ ОД

- 1 ФЕВ 2000

**АНАЛИЗ МИКРОСТРУКТУРЫ ВОДНЫХ
КРАХМАЛЬНЫХ СИСТЕМ МЕТОДАМИ
ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ**

Специальность 02.00.02 — Аналитическая химия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва 2000 г.

Работа выполнена в Институте биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Институте элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова РАН, Институте химической физики им. Н. Н. Семенова.

- Научный руководитель — заслуженный деятель науки и техники РФ, доктор химических наук, профессор
Ю. А. Клячко
- Научный консультант — кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник
В. К. Латов
- Официальные оппоненты — доктор химических наук
В. Д. Копылова,
— доктор химических наук
К. З. Гумаргалиева
- Ведущая организация — Институт биохимии им. А. Н. Баха

Защита состоится _____ 2000 г. в часов в аудитории _____ на заседании диссертационного совета К.063.45.02. в Московской Государственной технологической академии (Москва, Ж-4, ул. Земляной Вал, д. 73).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Московской Государственной технологической академии.

Автореферат разослан « _____ » _____ 2000 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук,
доцент

Касьяненко Г. Р.

АНАЛИЗ МИКРОСТРУКТУРЫ ВОДНЫХ ДИСПЕРСИЙ И КРИОГЕЛЕЙ КРАХМАЛА

Актуальность темы

Крахмал является одним из наиболее распространенных веществ в растительном мире. Широкое распространение крахмала в природе, его возобновляемость как растительного сырья, относительная легкость применения различных технологий для физико-химической, энзиматической, термодинамической модификации крахмала позволяют получить продукты с различными физико-химическими, функциональными и потребительскими свойствами. Крахмал играет решающую роль в определении структуры многих пищевых продуктов, очень важной как для потребителей, так и для производителей. Структура - это важнейший фактор, регулирующий вкусовые качества большей части пищевых продуктов. Понимание взаимосвязи между структурой крахмала и другими компонентами пищевых систем имеет большое значение для контроля свойств крахмалосодержащих продуктов.

В последние годы в пищевой промышленности широко используются ароматизаторы, которые вносятся в пищевые продукты с целью улучшения их органолептических свойств. Актуальной задачей является изучение влияния ароматообразующих веществ на структуру крахмальных систем. Ранее при исследовании сорбционной способности криотекстуратов крахмала было показано, что необратимая сорбция наблюдается в случае соединений, содержащих *n*-октильную углеводородную цепь. Поэтому представляет интерес изучить влияние этих соединений на структуру криотекстурата крахмала.

В настоящее время для изучения структуры биополимерных систем широко используется электронная микроскопия. Особенностью метода электронной микроскопии является необходимость использования особой препаративной техники для подготовки объекта к анализу. При электронномикроскопическом исследовании систем биополимер-вода приходится учитывать то обстоятельство, что точные количественные методы анализа, используемые в современных приборах, ограничиваются неопределенностями, связанными с подготовкой объекта к анализу. Поэтому необходимо изучить возможности препаративной техники электронной микроскопии применительно к водным крахмальным системам.

Цели и задачи исследования

1. Изучение влияния ароматообразующих веществ на микроструктуру и поверхностный состав криогелей кукурузного крахмала.

2. Определение микроструктуры набухших зерен и дисперсий клейстеризо-

ванного крахмала.

3. Изучение возможностей криостата к РЭМ с целью исключения артефактов, вызванных разрушающим действием электронного пучка, а также влиянием препаративной техники на структуру образца.

Для этого мы считали необходимым:

- изучить возможности криостата РУПИК к РЭМ 100У, позволяющего исследовать образец без артефактов применительно к различным биополимерным системам - белкам и полисахаридам.

- определить оптимальный режим работы криостата для получения информации о реальной структуре водосодержащего объекта.

- изучить возможности криостата РУПИК к РЭМ 100У для уменьшения локального нагрева электронного пучка в процессе исследования термочувствительных полимерных систем.

- сравнить различные препаративные методы, использующие низкотемпературную фиксацию структуры образца, на примере водных дисперсий и гелев биополимеров. С этой целью дополнительно привлекались методы термического анализа и рентгенографии.

- выявить структурные закономерности при набухании, клейстеризации водных дисперсий крахмала, криогелей крахмала методами РЭМ, ПЭМ и СТМ

- определить влияние ароматообразующих соединений на микроструктуру криогелей крахмала, используя различные структурные методы: электронную микроскопию, рентгенографию и рентгеновскую фотоэлектронную спектроскопию.

- определить на какой стадии получения криогеля крахмала происходит изменение его структуры, вызванное добавлением к золю ароматообразующих веществ. Для этого использовались различные методы электронной микроскопии: РЭМ и СТМ.

Научная новизна

Впервые методом электронной микроскопии, методами термического анализа и рентгенографии определены условия препарирования водных крахмальных систем. Установлено, что крахмальные системы с концентрацией полимера 20% и более могут быть препарированы методом замораживания-высушивания без появления артефактов препарирования, а системы меньшей концентрацией полимера необходимо исследовать с применением криостатов, поддерживающих температуру образца -130 -140° С.

Впервые изучены методологические возможности криостатов для получения безартефактной структуры дисперсий набухших зерен крахмала, ди-

ерсий волокон целлюлозы, гелей желатины при исследовании этих систем методами РЭМ и ПЭМ.

Впервые изучена микроморфология криогелей крахмала, содержащих различные ароматообразующие соединения, методами электронной микроскопии, рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии и рентгенографии. Согласно данным, полученным ранее методом газовой хроматографии, наибольшая сорбция криогелей крахмала наблюдается для *n*-октилацетата (95%), наименьшая для *n*-бутилацетата (38%). В нашей работе показано, что *n*-октилацетат оказывает наибольшее влияние на структуру криогелей кукурузного крахмала, *n*-бутилацетат практически не вызывает заметных изменений в структуре образца.

Впервые рентгенографическим методом изучено структурообразование криогелей крахмала в процессе ретроградации. Определена степень кристалличности криогеля крахмала, содержащего *n*-октилацетат, и исходного, без ароматообразующего соединения. В процессе структурообразования криогелей определена продолжительность индукционного периода, которая зависит от наличия или отсутствия ароматообразующих соединений в системе.

Впервые методом РЭЭС установлено, что ароматообразующее соединение стабильно в системе при длительном хранении криогеля крахмала на воздухе и в условиях вакуума, что представляет интерес при разработке технологий, связанных с применением ароматизаторов в пищевой промышленности.

Практическая значимость работы

Изучены возможности электронномикроскопического метода с использованием криостатов применительно к пищевым системам. Показано, что с помощью криостатов можно проводить экспресс-анализ структуры пищевых систем, что позволяет проводить аналитический контроль качества пищевых продуктов, так как структура и свойства взаимосвязаны.

Изучено влияние различных ароматообразующих соединений на структуру криогелей кукурузного крахмала. Показано, что методами РЭМ и РЭЭС можно дать количественную характеристику влияния ароматообразующих соединений, вызывающих модификацию структуры поверхности криогеля крахмала. В течение длительного времени структура модифицированной поверхности сохраняется, а ароматообразующее соединение не улетучивается из криогеля при помещении образца в высокий вакуум.

Разработанный метод аналитического контроля может быть рекомендован для производства пищевых продуктов.

Реализация результатов исследования

Изучение криогенной препаративной техники на примере водных крахмальных систем позволили определить условия препарирования биополимеров, содержащих воду. Показано, что при электронномикроскопическом исследовании систем биополимер-вода определяющим фактором является концентрация полимера в системе. В зависимости от концентрации полимера необходимо выбирать условия препарирования, позволяющие исключить артефакты, вызванные замораживанием образца. Разработанный метод можно рекомендовать научным лабораториям, исследующим структуру гелей, дисперсий, растворов биополимеров.

Изучение различных режимов работы криостата РУПИК и РЭМ 100У и определение надежности отдельных узлов приставки в процессе работы позволили внести некоторые конструктивные изменения в криостат РУПИК; что в дальнейшем были учтены при серийном производстве приборов на Сумском ПО "Электрон" (Украина).

Апробация работы.

Результаты работы докладывались на следующих конференциях и симпозиумах:

1) на 2-й Международной конференции "Строение, свойства, качества древесины" (Москва-Мытщи, Россия, 1996 г.); на 16-й Российской конференции по электронной микроскопии (Москва, Черноголовка, 1996 г.); на 10-й Российской конференции по растровой электронной микроскопии (Москва, Черноголовка, 1997 г.); на 17-й Российской конференции по электронной микроскопии, (Москва, Черноголовка, 1998 г.); на 11-й Всероссийской конференции по растровой электронной микроскопии (Черноголовка, 1999 г.).

Публикации. по результатам исследований опубликовано 10 работ.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части и заключения. Работа изложена на 95 страницах машинописного текста, содержит 2 таблицы, 6 графиков, 19 рисунков. Список литературы включает 139 наименований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Обзор литературы посвящен методическим аспектам криогенной техники при электронномикроскопическом исследовании систем биополимер-вода. Известно, что криометоды в электронной микроскопии могут быть использованы как для фиксации структуры образца в процессе препаративных операций, так и с целью предотвращения изменения структуры объекта по-

действием электронного пучка. В обзоре кратко описаны различные формы низкотемпературной фиксации структуры водосодержащего образца, которые по мнению авторов этих работ позволяют уменьшить размеры кристалликов льда при замораживании образца. Приводится оценка возможностей каждого метода в плане получения информации о реальной структуре объекта при исследовании его в электронном микроскопе. Обсуждаются работы, в которых замораживание образца позволяет уменьшить радиационный и термический эффект электронного пучка при исследовании его методами растровой (РЭМ), просвечивающей (ПЭМ) электронной микроскопии, а также методом рентгеноспектрального микроанализа (РСМА).

Рассматриваются различные источники возможных артефактов при исследовании образца с использованием криотехники. В обзоре литературы приводятся в основном те работы, которые оказали влияние на развитие препаративной техники при исследовании биополимерных систем методами ПЭМ и РЭМ. На основании литературных данных определены цели и сформулированы задачи исследования.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

II. Вторая глава диссертации посвящена методическим аспектам исследования биополимерных систем в РЭМ с использованием криостатов. Рассматриваются два методических вопроса применения криостатов:

- 1) как способ препарирования водосодержащего образца,
- 2) как защита образца от термического действия электронного пучка в процессе исследования.

Объекты и методы исследования

Для установления общего характера полученных закономерностей в эксперименте использовались различные водные биополимерные системы; эти системы являются неравновесными, поэтому они восприимчивы к действию препаративной техники.

В качестве объектов исследования были выбраны следующие системы:

- 1) дисперсии целлюлозы Munktell, фирма "Palascia" (Швеция) различной концентрации (5%, 10%, 20%, 30%),
- 2) дисперсии измельченного свекольного жома с концентрацией полимера в системе (5%, 20%).
- 3) дисперсии набухших зерен кукурузного и картофельного крахмала (5%).
- 4) гели желатины различной концентрации (2%, 5%, 10%, 20%).

В качестве вспомогательных объектов исследования применялись термочувствительные полимерные системы с металлосодержащими кластерами.

Использовался нафтоиленимидобензимидазол (ПНИБ), взятый как полимерная матрица, в которую через общий раствор вводились различные количества эквимольной смеси -капролактама и диацетилферроцена.

Образцы исследовались в растровом электронном микроскопе S-2500 фирма Hitachi, (Япония), а также РЭМ-100У с криопроставкой РУПИК, которая вмонтирована в колонну микроскопа. Приставка имеет криомикротом который позволяет производить послойное исследование структуры образца при температуре $-100 - -150^{\circ}\text{C}$. Толщина срезов составляет $0,1-0,5\ \mu\text{м}$. Перенос замороженного образца в колонну микроскопа производится в среде жидкого азота, что исключает нагрев образца при контакте его с теплым воздухом. Образцы исследовались как с напылением электропроводящего слоя золота, так и без напыления. Слой золота толщиной $20\ \text{нм}$ наносили в колонне микроскопа с помощью лазерной установки, приспособленной для этой цели. Исследование одного и того же участка образца проводили как методом РЭМ, так и методом ПЭМ. В эксперименте с использованием метода ПЭМ на поверхность замороженного образца в колонне микроскопа наносили углеродо-платиновую реплику толщиной $50-80\ \text{нм}$, которую затем изучали в просвечивающем электронном микроскопе ЭМ - 12 (Украина).

Известно, что при замораживании водосодержащего образца возникает явление артефактов обусловлено образованием кристалликов льда. Поэтому для контроля качества низкотемпературной фиксации образца использовался метод термического анализа. С помощью индикатора ИСК (П.О. "Электрон", Украина), по термограммам определяли наличие или отсутствие кристалликов льда в системе при замораживании образца. Скорость замораживания, определенная с помощью индикатора ИСК для всех исследованных нами образцов составила $100\ \text{град/с}$. Для измельчения образца использовался диспергатор УЗДН-А в режиме цилиндрического или экспоненциального концентратора при частоте $22\ \text{кГц}$. В эксперименте также применялись следующие приборы препаративного назначения: Ultratom II (Швеция) для получения ультратонких срезов; криогенная вакуумная установка ВАР-901 (Balzers, Швеция).

Исследовались различные режимы работы электронного микроскопа РЭМ-100У с криопроставкой РУПИК для выбора оптимальных условий получения РЭМ-изображения для различных водных биополимерных систем: дисперсий целлюлозы, свекольного жома, крахмала и гелей желатины. Изучены условия препарирования образца криометодами. Показано, что метод замораживания-высушивания можно использовать для водных систем с локально

концентрацией полимера 20% и выше. В этом случае артефакты препарирования не возникают. При локальной концентрации полимера ниже 20% необходимо исследовать дисперсии и гели биополимеров в криостате при температуре -130° - 150° С в зависимости от природы полимера и его концентрации в системе.

Методом РЭМ и ПЭМ с использованием криостата определена микроструктура водных дисперсий целлюлозы Munktell, свекольного жома, дисперсий набухших зерен картофельного крахмала, а также гелей желатины.

Для изучения возможностей криостата с целью уменьшения термического действия электронного пучка на объект были выбраны полимерные системы с металлосодержащими кластерами. Методом ПЭМ было показано, что размер кластеров зависит от температуры прогрева образца. Термочувствительные полимерные системы с металлосодержащими кластерами можно исследовать методом РЭМ без артефактов, если образец охлажден до температуры -130° С. Если эти образцы исследовать в растровом электронном микроскопе без криостата, то наблюдается изменение структуры образца вследствие локального нагрева под действием электронного пучка.

В работе установлено, что растровые электронные микроскопы с криостатами могут быть использованы для проведения экспресс-анализа структуры водных пищевых систем.

III. Третья глава посвящена сканирующей туннельной микроскопии водных дисперсий клейстеризованного крахмала. Применение СТМ для изучения структуры поверхности позволяет получить изображение биополимерных систем с более высоким разрешением, чем в РЭМ. Сканирующая туннельная микроскопия дает возможность получения трехмерного изображения, в отличие от ПЭМ и РЭМ. Математическая обработка полученных результатов устраняет случайные шумы и помехи, связанные с работой туннельного микроскопа. Кроме того, при исследовании в СТМ не происходит нагрева образца и, следовательно, разрушения его структуры. В эксперименте исследовались дисперсии клейстеризованного картофельного и кукурузного крахмала. Картофельный крахмал был выбран для отработки препаративной методики применительно к СТМ, т.к. он ранее был изучен методом лазерной корреляционной спектроскопии.

Для исследования микроструктуры этих крахмальных систем 0,1% дисперсий нативного крахмала нагревали на водной бане до температуры 80° С и выдерживали при данной температуре в течение 20 мин. В предварительных экспериментах, выполненных с помощью дифференциального сканирующего калориметра ДАСМ-4 (ИБП, РАН, Пушкино), было установлено, что

при данной температуре процесс клейстеризации 0,1% нативных дисперсий крахмала полностью завершен.

Структура дисперсий клейстеризованного крахмала исследовалась методами СТМ и ПЭМ. Препарирование объектов для ПЭМ осуществлялось согласно методикам, используемым при исследовании биологических и синтетических полимеров. В эксперименте использовался сканирующий туннельный микроскоп фирмы "Omigron" (Германия). Этот прибор может работать как на воздухе, так и в сверхвысоком вакууме. Для установления туннельного контакта в СТМ "Omigron" в специальных окнах задаются основные параметры: значения величины туннельного тока, напряжения смещения и глубины обратной связи. Структура кластеров дисперсий клейстеризованного крахмала в режиме "постоянного расстояния между зондом и поверхностью. Образцы исследовались на воздухе.

В работе определены размеры кластеров конечной длины для исследованных крахмальных систем (400-500 нм). Имеет место корреляция данных сканирующей туннельной микроскопии и просвечивающей электронной микроскопии, а также данных, полученных ранее методом лазерной корреляционной спектроскопии. Для изучения влияния ароматообразующего вещества на структуру кукурузного крахмала были приготовлены два образца - исходный 3% золь и золь, содержащий 1 ммоль н-октилцетата.

Методом СТМ также определены размеры кластеров клейстеризованного кукурузного крахмала (500-800 нм), которые представляют собой компактные частицы анизоdiamетрической формы. В образцах золя, обработанного н-октилцетатом, структура кластеров изменяется. Наблюдаются кластеры имеющие рыхлую структуру. Кластер состоит из более мелких структурных элементов сферической формы, размер которых составляет приблизительно 50 нм. Полученные результаты показывают, что молекулярно-организованные системы полисахаридов начинают формироваться в золе. Эти супрамолекулярные структуры претерпевают изменения в присутствии н-октилцетата; наблюдается разрыхление кластеров на стадии золя.

IV. Четвертая глава посвящена изучению микроструктуры и поверхностного состава криогелей кукурузного крахмала. Большинство продуктов питания представляют собой гели. Однородность структуры гелей крахмала способность прочно удерживать влагу делает их удобными объектами для изучения сорбции ароматизаторов, а также металлосодержащих соединений.

Криогели кукурузного крахмала получали из 3% золя замораживанием при температуре -18°C с последующим оттаиванием в течение 24 часов

Для изучения микроструктуры образовавшейся криогубки и влияния на нее добавок ароматообразующих соединений гидрофобных веществ выбрано 5 образцов: исходный криогель и 4 образца криогеля, полученных замораживанием 40 мл 3% золь крахмала, содержащего 1 ммоль органического вещества. В качестве ароматообразующих соединений выбраны *n*-октилацетат, *t*-бутилацетат, 2-деканон и *n*-октанол-1.

В настоящей работе влияние ароматообразующих соединений на структуру и поверхностный состав криогелей кукурузного крахмала изучали методами растровой электронной микроскопии (РЭМ), рентгенографии и рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФЭС).

Объекты исследовались в растровом электронном микроскопе S-2500 фирмы Hitachi (Япония) в режиме вторичных электронов. Препарирование объектов было выполнено методом замораживания-высушивания. Условия препарирования определяли методом термического анализа с помощью индикатора ИСК, который позволяет определять наличие или отсутствие кристалликов льда при замораживании водосодержащего образца. Анализ полученных нами термограмм показал, что при замораживании криогеля крахмала со скоростью 100 град/с и последующим высушиванием замороженного образца в вакууме при температуре $-80-90^{\circ}\text{C}$ артефакты, вызванные кристаллизацией и рекристаллизацией льда, не возникают. Установлена нами корреляция результатов, полученных из дифрактограмм для лиофильно высушенных образцов и влажных криогелей.

В таблице I представлены данные, полученные из дифрактограмм для двух образцов исходного криогеля: влажного и лиофильно высушенного, в таблице II представлены аналогичные данные, полученные для криогеля, обработанного *n*-октилацетатом, где 2θ - угол отражения, d - межплоскостное расстояние, J - интенсивность.

Полученные дифрактограммы показывают, что нет заметных различий в структуре влажных криогелей и криогелей, препарированных методом замораживания-высушивания. Дополнительно выявленный рефлекс в табл. II у криогеля, обработанного ароматизатором, имеет очень слабую интенсивность и может быть объяснен удалением растворителя в процессе высушивания, что позволяет определить пик слабой интенсивности.

Таблица I

Исходный криогель без обработки ароматизаторами через 7 суток хранения

	$z \theta$	$d A$	
Влажный	5.60	15.781	163
	17.20	5.155	245
	20.20	4.396	213
Замораживание- высушивание	5.60	15.781	192
	17.20	5.155	208
	22.20	4.291	229

Таблица II

Криогель, обработанный н-октилацетатом.

	$z \theta$	$d A$	
Влажный	5.60	15.781	124
	17.70	5.011	237
	22.30	3.986	287
Замораживание- высушивание	5.50	16.068	80
	9.90	8.934	74
	17.40	5.096	150
	20.10	4.418	142

Рентгенографическое исследование было выполнено на автоматизированном дифрактометре "Дрон-3", управляемом персональной ЭВМ. Диффрактограммы получали от влажных образцов криогелей крахмала. Использовалось излучение $Cu K (\lambda=1,5418 \text{ \AA})$, монохроматизированное графитовым монохроматором; параметры генератора 40 кВ*20 мА; шаг сканирования

0,05", скорость сканирования 2"/мин. Обработка дифрактограмм - вычитание фона, нахождение пиков (2 θ - угол отражения), расчет межплоскостных расстояний (d) - проводилось по стандартной программе управления дифрактометром XRAY.

Анализ поверхности методом РФЭС проводили на приборе XSAM-800, фирмы Kratos (Великобритания). Метод РФЭС основан на явлении фотоэффекта с использованием характеристического рентгеновского излучения и позволяет определить энергии электронных уровней на основании измеренных кинетических энергий фотоэлектронов. Запись спектров осуществляли в вакууме порядка 10 Па. В качестве возбуждающего излучения применяли характеристическую линию магния K_{α} ($h\nu=1253,6$ эВ). Мощность рентгеновского пучка не превышала 60 Вт, при этом деструкция образца не наблюдалась. Обработку РФЭС-спектров проводили при помощи пакета программ DS-800. Подарядку образцов учитывали по компоненте углерода с наименьшей энергией связи (285,0 эВ).

Метод РЭМ (в режиме вторичных электронов) и метод РФЭС позволяют получить информацию о микроструктуре и составе поверхностного слоя толщиной 5 - 20 нм. Электронномикроскопическое исследование структуры криогелей кукурузного крахмала показало, что характер надмолекулярной организации для всех пяти образцов криогелей имеет большое сходство. Было обнаружено два типа пор: мелкие, диаметром от 1 до 15 мкм и крупные, достигающие 60 - 70 мкм. Что касается стенок криогубки, то в этом случае наблюдаются различия для каждого образца. Структура поверхности исходного криогеля однородна и имеет менее развитый рельеф, чем образцы, содержащие ароматообразующие соединения. Характерной особенностью для криогелей с добавками является наличие крупных анизодиаметрических образований, размеры которых составляют от 0,5 до 5 мкм. Наиболее сильное влияние на структуру поверхности криогеля оказывает *n*-октилацетат, наименьшее - *n*-бутилацетат, что можно объяснить большой разницей в сорбции криогелями этих ароматообразующих соединений (98% и 38% соответственно, согласно данным хроматографического метода, полученным ранее). Из электронных микрофотографий определена площадь стенок криогеля, занимаемая структурами с развитым рельефом поверхности. Для криогеля с *n*-октилацетатом она составляет 20-25% от площади всей поверхности, а для криогеля с 2-деканолом и *n*-октанолом-1 - 10-13%.

При исследовании образцов методом РФЭС поверхностное содержание крахмала и ароматообразующего соединения определяли из соотношения интегральных интенсивностей отдельных углеродных компонент. В работе

приводятся РФЭС-линии C1s исходного криогеля крахмала и криогеля, содержащего н-октилацетат. Разложением РФЭС - линии на вклады от отдельных химических групп можно выделить компоненты, обусловленные присутствием атомов, связанных с атомами углерода (C-C, Eсв=285,0 эВ), с одним (C-O, Eсв=286,5 эВ) и двумя (C=O, Eсв=288,0 эВ) атомами кислорода.

Данные анализа РФЭС-спектров показывают, что обработка исходного 3% золя крахмала н-октилацетатом приводит к существенным изменениям в поверхностном составе криогеля. В РФЭС-линии углерода C1s существенно усиливается вклад компоненты C-C (Eсв=285,0 эВ), интенсивность компоненты крахмала существенно снижается. Результаты количественного анализа показывают, что 20 - 25% поверхности криогеля крахмала в модифицированных образцах покрыто слоем н-октилацетата. Данные РФЭС и РЭМ дополняют друг друга, что позволяет получить большую информацию о структуре модифицированной поверхности криогеля крахмала. Методами РФЭС и РЭМ показано, что появление крупных анизодиаметрических образований на поверхности стенок криогеля можно объяснить сорбцией ароматообразующих соединений.

Результаты, полученные методом РФЭС показывают, что исследованные нами ароматообразующие соединения, добавленные к 3% золю крахмала, не улетучиваются из криогубки при длительном хранении и при помещении образцов в высокий вакуум.

Представлял интерес изучить взаимодействие металл-биополимер на модельных системах - криогелях кукурузного крахмала. Известно, что характер взаимодействия ионов металла с биополимерными системами может оказать большое влияние на физиологическую активность образующихся комплексов. В работе исследовали методом РЭМ и РФЭС сорбцию металлосодержащих соединений. На примере криогелей крахмала, обработанных 5% раствором FeCl₃, показано, что после отмывки образцов дистиллированной водой, на поверхности криогубки обнаружены металлосодержащие кластеры различных размеров. Их средняя поверхностная концентрация, определенная методом РФЭС, в исходном криогеле и криогеле, обработанном н-октилацетатом, оказалась практически одинаковой и составила 2 ат.%, что совпадает с данными электронной микроскопии. Энергия связи уровня FeCl₃ 2р_{3/2} (711,4-711,5 эВ) совпадает с величиной, приводимой в литературе для чистого Fe (711,5 эВ). Следовательно, химическое взаимодействие между металлосодержащими частицами и крахмалом не происходит.

Рентгенографический метод позволяет изучить структуру влажных криогелей в объеме. Основная цель исследования - проследить структуро-

образование криогелей кукурузного крахмала при хранении, выявить влияние на структуру ароматообразующих соединений. Полученные результаты показывают, что на дифрактограммах всех свежеприготовленных криогелей кукурузного крахмала отсутствуют дифракционные пики, характерные для кристаллических структур. При хранении исходных криогелей при температуре 10°C в течение 7 и 14 суток на дифрактограммах появляются дифракционные пики, характерные при отражении рентгеновских лучей от кристаллических областей. Наиболее сильные пики на дифрактограммах этих образцов соответствуют межплоскостным расстояниям $d_1=16,068$ А; $d_2=5,155$ А; $d_3=4552$ А. Для криогелей крахмала, обработанных *n*-октилацетатом, наблюдаются изменения в дифракционной картине после хранения образцов в течение 8-10 суток. Для зерен крахмала получены следующие значения межплоскостных расстояний: $d_1=5,754$ А; $d_2=5,039$ А; $d_3=3,801$ А; $d_4=4,396$ А. Следовательно, наблюдаются значительные различия в структуре зерен крахмала и криогелей, полученных при замораживании - оттаивании 3% золя крахмала. Степень кристалличности, определенная из дифрактограмм, для исходного криогеля и криогеля, обработанного *n*-октилацетатом, составляет 8% и 5% соответственно. Можно полагать, что *n*-октилацетат сорбируется криогелем во всем объеме и влияет на укладку цепей молекул крахмала.

Данные литературы показывают, что перевод полимерных систем в область, где термодинамическому равновесию соответствует кристаллическое состояние полимера, начало кристаллизации связано с возникновением кристаллических зародышей, т.е. с наличием более или менее продолжительного индукционного периода. На основании результатов полученных из дифрактограмм следует, что индукционный период исходного криогеля крахмала составляет 5 - 7 суток. Для криогелей крахмала с *n*-октилацетатом индукционный период несколько больше и составляет 8 - 10 суток, что, по-видимому, можно объяснить наличием примесей - ароматических добавок.

Исследование криогеля крахмала методами РЭМ, СТМ, РФЭС и рентгенографии показало, что наибольшее влияние на структуру криогеля оказывает *n*-октилацетат. В этом случае в золе образуются надмолекулярные ассоциаты полисахаридов с *n*-октилацетатом. На стадии криотекстурирования такие надмолекулярные ассоциаты могут упрочняться за счет нековалентных связей между полисахаридами. Имеет место корреляция результатов, полученными различными методами исследования структуры. Совпадение результатов, полученных для влажных образцов и лиофильно высушен-

ных, показывает, что препарирование не вносит артефактов. Электронно-микроскопический метод с использованием методологически обоснованной криотехники позволяет выявить реальную структуру водных крахмальных систем.

Таким образом, в работе проведено исследование различных крахмальных систем - дисперсий набухших зерен крахмала, дисперсий клейстеризованного крахмала, криогелей крахмала методами растровой и просвечивающей микроскопии, а также сканирующей туннельной микроскопии. Полученные результаты позволяют установить закономерности структурообразования этих биополимерных систем.

ВЫВОДЫ

1. Проведено электронномикроскопическое исследование различных водных биологических систем - гелей и растворов полисахаридов и белков. Данное исследование включало в себя качественный и количественный анализ: определение химического состава и надмолекулярной структуры, а также получение информации о морфологической и кристаллической структуре исходных и модифицированных объектов.

2. Впервые изучены методологические вопросы применения криоскопии в растровой электронной микроскопии систем биополимер-вода. Показано, что при исследовании водных биополимерных систем: дисперсий набухших зерен крахмала, дисперсий целлюлозы, гелей желатины с концентрацией полимера в системе менее 20% необходимо использовать криостат, позволяющий поддерживать температуру образца -140 - -130 С. В этом случае артефакты препарирования не возникают.

3. Методами электронной микроскопии, рентгенографии и термического анализа установлено, что биополимерные системы с концентрацией полимера более 20% могут быть исследованы без артефактов, если используется стандартная препаративная техника замораживания-высушивания.

4. Показано, что при исследовании термочувствительных полимерных систем с металлосодержащими кластерами криостат позволяет защитить образец от локального нагрева и изменения структуры вследствие термического действия электронного пучка.

5. Впервые проведено исследование дисперсий клейстеризованного картофельного крахмала методом сканирующей туннельной микроскопии. Определены условия препарирования образцов и получения СТМ-изображения этих крахмальных систем.

6. Определены размеры кластеров конечной длины - около 500 нм - для дисперсий клейстеризованного картофельного крахмала. Данные сканирующей туннельной микроскопии коррелируют с данными просвечивающей электронной микроскопии.

7. Впервые методами растровой электронной микроскопии и рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии исследована в водной среде сорбция ароматизаторов *n*-октилацетата, *n*-октанола, 2-деканона и *n*-бутилацетата криогелями кукурузного крахмала. Показано, что в результате обработки поверхности криогеля соединениями с углеводородными заместителями *n*-С возникают надмолекулярные ассоциаты криогеля кукурузного крахмала с ароматообразующими соединениями размером 0,3 - 0,5 мкм, ко-

торы в случае *n*-октилацетата занимают 25% площади стенок криогеля и 10 - 13% в случае *n*-октанола и 2-деканона. Результаты свидетельствуют о гидрофобном характере сорбции органических веществ криогелями крахмала. Показано, что ароматообразующие соединения не улетучиваются из образца в условиях высокого вакуума.

8. Методом СТМ определен этап получения криогеля крахмала, на котором происходит процесс разрыхления структуры.

9. Рентгенографическим методом определена степень кристалличности зерен кукурузного и картофельного крахмала, а также криогелей кукурузного крахмала без обработки и с обработкой *n*-октилацетатом. Для исходного криогеля степень кристалличности составляет 5 - 8%, для криогеля с *n*-октилацетатом 2 - 5%, для зерен кукурузного и картофельного крахмала 25% и 20% соответственно.

10. Впервые рентгенографическим методом определена продолжительность индукционного периода криогелей кукурузного крахмала, исходного и содержащего *n*-октилацетат, в процессе ретроградации. Показано, что добавление ароматообразующей добавки увеличивает индукционный период (5 - 7 суток до 8 - 10 суток).

11. Изучена сорбция физиологически активных ионов железа с криогелями кукурузного крахмала. Средняя поверхностная концентрация, определенная методом РФЭС, в исходном и модифицированном криогеле составляет 2 ат.%, что совпадает с данными электронной микроскопии. Показано, что химическое взаимодействие между металлосодержащими частицами и крахмалом не происходит.

12. Основным результатом данной работы является научно-экспериментальное обоснование применения современных форм электронно-микроскопического метода водно-полимерных систем в интересах пищевой промышленности и науки.

Основное содержание диссертации опубликовано в следующих работах:

1. А.Г.Филатова, И.И.Чемерис, В.К.Латов, Е.М.Белавцева, Ю.А.Клячко. Методические аспекты исследования в растровом электронном микроскопе водных суспензий целлюлозы. Заводская лаборатория. (Диагностика термалов), 1997г., N 2, с.33.
2. А.Г.Филатова, И.О.Волков, Н.И.Крикунова, Т.А.Мишарина, Р.В.Голвяня. Микроструктура и поверхностный состав криогелей крахмала. Известия АН (серия химическая). 2000 г., N 2, с.54.
3. А.Г. Филатова, В.К.Латов, И.И.Чемерис, Е.М.Белавцева. Исследование структуры водных суспензий целлюлозы криометодами электронной микроскопии (ПЭМ, РЭМ, СТМ). 2-- Международный симпозиум "Строение, свойства, качество древесины" 1996г., Москва-Мытщи, Россия, с.33.
4. А.Г.Филатова, И.И.Чемерис, И.И.Пономарев, Ю.А.Клячко. Методические особенности исследования в РЭМ полимерных систем с металлосодержащими кластерами. 15-- Российская конференция по электронной микроскопии, Черногоровка, 1996г., с.130.
5. И.И.Чемерис, А.Г.Филатова, В.К.Латов. Криометоды РЭМ применительно к исследованию суспензий биополимеров. 16-- Российская конференция по электронной микроскопии. Черногоровка, 1996г., с.243.
6. Ю.А.Вакал, А.Н.Кныш, П.А.Павленко, Ю.В.Шестаков, Ю.В.Каменский, А.Г.Филатова, Е.М.Белавцева. Растровый туннельный микроскоп ЖТ-100. 10-- Российский симпозиум по растровой электронной микроскопии и аналитическим методам. Черногоровка, 1997г., с.7.
7. А.Г.Филатова, А.И.Лапшин, Н.И.Крикунова, Т.А.Мишарина, Р.В.Голвяня. Методические аспекты исследования структуры криогелей крахмала РЭМ. 10-- Российский симпозиум по растровой электронной микроскопии аналитическим методам. Черногоровка, 1997г., с.98.
8. А.Г.Филатова, И.О.Волков, Т.Л.Бабаян, В.К.Латов, Ю.А. Клячко. Изучение сорбции FeCl на поверхности криогеля крахмала. 17-- Российская конференция по электронной микроскопии. Черногоровка, 1998г., с.299.
9. А.Г.Филатова, М.В.Гришин, Б.Р.Шуб, В.П.Юрьев. Сканирующая туннельная микроскопия дисперсий клейстеризованного крахмала. 11-- Всероссийский симпозиум по растровой электронной микроскопии и аналитическим методам. Черногоровка, 1999г., с.
10. Е.М. Белавцева, И.О.Волков, А.Г.Филатова, Р.В.Головня, И.И.Крикунова, Т.А.Мишарина. Микроструктура и поверхностный состав криогелей крахмала. Методические аспекты. 11-- Всероссийский симпозиум по растровой электронной микроскопии и аналитическим методам. Черно-