

## 동적광산란법을 이용한 아밀로즈 함량에 따른 전분 분자 구조 변화 분석

— 연구노트 —

문주현 · 마진경 · 김종예

강원대학교 식품생명공학과

### Evaluation of Molecular Structural Changes in Starch Depending on Amylose Content Using Dynamic Light Scattering

Ju-Hyeon Moon, Jin-Gyeong Ma, and Jong-Yea Kim

Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University

**ABSTRACT** To evaluate the effects of amylose content and dissolution media on the molecular structure of maize starch, changes in the hydrodynamic diameter of starch molecules were assessed via dynamic light scattering depending on amylose content and dissolution media. As the amylose content of starch increased, the hydrodynamic diameter of starch molecules proportionally decreased from 204 to 92 nm. To alter ionic strength, hydrogen bonding, or polarity of dissolution media, various contents of NaCl (1, 2, or 3 M), urea (1, 2, or 3 M), or 1-butanol (0.1, 0.5, or 1.0%) were added to media, respectively, resulting in increased hydrodynamic diameter of starch. However, the degree of expansion was dependent on amylose content and the concentration and/or type of additive. The hydrodynamic diameter of starch molecules exhibited significant correlation with amylose content obtained by size exclusion chromatography, regardless of dissolution conditions.

**Key words:** amylose content, starch, size exclusion chromatography, hydrodynamic diameter, dynamic light scattering

## 서 론

전분은 아밀로스와 아밀로펙틴으로 구성된 탄수화물 소재인데 식품산업에서 광범위하게 사용되고 있다. 아밀로스는 포도당의 중합체로써 대략적인 분자량은  $10^6$  이하이며, 주로  $\alpha$ -(1→4) 결합으로 구성되어 있지만 분자 내부에 소량의  $\alpha$ -(1→6) 결합이 존재하기도 한다. 반면 아밀로펙틴은 아밀로스에 비해  $\alpha$ -(1→6) 결합으로 이루어진 가지 구조가 많은 포도당 중합체로써 대략적인 분자량은  $10^8$  이하이다. 전분의 아밀로즈 함량은 전분 입자의 물리화학적 특성에 영향을 미치는 요소로써 가공 적성, 물성 및 소화율 등과 밀접한 관련이 있다고 보고되어 왔다(1). 따라서 아밀로즈 함량은 전분의 물리화학적 특성을 예측하는 데 있어 중요한 요소로 사용되어 왔으며, 전분 분자 구조를 규명하는 데도 아밀로즈 함량을 측정하는 것은 우선적으로 수행되어야 할 부분이다.

지금까지 전분의 아밀로즈 함량을 측정하기 위한 다양한 분석방법이 개발되었으며, 요오드 비색법(2), 크기 배제 크로마토그래피 측정법(3) 및 concanavalin A 침전법(4) 등이

있다. 하지만 분석방법 간 측정 원리가 다르므로 동일한 전분 시료라도 분석방법에 따른 아밀로즈 함량에서 차이가 있다. 가장 보편적으로 사용되는 요오드 비색법의 경우 분석 환경에 따라 편차가 심한 편이며, 이는 표준물질, pH 조건, 염색 시간, 온도, 측정 파장, 용해 방법, 전분 농도 등의 차이에 의하여 발생할 수 있다(1,2). 또한, 요오드 비색법의 경우 사슬 길이가 긴 아밀로펙틴 및 가지 수가 많은 아밀로즈 유사 분자가 존재한다는 것을 고려하지 않은 분석법이다(5). Concanavalin A 침전법은 가지가 많은 아밀로펙틴을 침전 시킴으로써 아밀로즈 함량을 측정하는 방법으로 경우에 따라 아밀로즈가 함께 침전되어 측정값이 감소하는 문제가 발생할 수 있다(4). 크기 배제 크로마토그래피 측정법은 아밀로스와 아밀로펙틴 분자의 hydrodynamic volume에 따라 분획하여 아밀로즈 함량을 측정하기 때문에 비교적 정밀하게 측정할 수 있다고 생각하지만 다음과 같은 한계가 있다. 예를 들어 아밀로스와 아밀로펙틴의 dn/dc 값 차이에 따른 측정 오차(6), 전분의 불완전한 용해에 따른 오차(3), 사슬 길이가 긴 아밀로펙틴 및 가지 수가 많은 아밀로즈 유사 분자가 아밀로즈 혹은 아밀로펙틴과 함께 분획됨에 따라 발생하는 오차(5,7) 및 측정 동안 압력에 의하여 아밀로펙틴이 일부 분해되어 발생하는 오차 등이 있다(8).

빛이 입자에 가해졌을 때 대부분 빛은 입자를 통과하여 지나가지만, 일부가 산란하고 이를 다양한 각도에서 검출하여 입자의 특성을 분석하는 것을 광산란법이라고 한다. 동적

Received 24 February 2017; Accepted 19 April 2017

Corresponding author: Jong-Yea Kim, Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon, Gangwon 24341, Korea

E-mail: jongkim@kangwon.ac.kr, Phone: +82-33-250-6455

광산란법의 경우 아주 짧은 시간(마이크로 초 이내) 동안 용액 상 입자의 확산 운동은 광산란 강도의 변화를 유발하며, 이러한 강도 변화를 자동 상관기로 분석하여 입자의 hydrodynamic diameter( $D_h$ )와 분포를 분석할 수 있다. 동적광산란법은 생물고분자에도 적용이 가능하며, 다양한 용매 조건에서(pH, 이온강도 및 농도 등) 고분자의  $D_h$ 와 분포 변화가 분석 가능하다(9). 동적광산란법을 이용하여 전분의 분자 구조를 분석한 일부 연구 결과가 보고되었지만(10), 아직 전분의 분자 구조를 분석하기 위하여 동적광산란법이 본격적으로 활용되지 않고 있다.

동적광산란법은 측정 시간이 짧고 간편할 뿐 아니라 용매 조건 역시 손쉽게 변경할 수 있으므로 보다 다양한 조건에서 생물고분자의 특성을 분석하기에 적합한 분석법이라고 생각한다. 크기 배제 크로마토그래피 측정법이 전분 분자의 hydrodynamic volume에 따라 분획하는 것과 비슷하게 동적광산란법 역시 분자의  $D_h$ 의 크기를 측정할 수 있으므로 이를 활용하여 전분의 분자 구조 특성을 규명할 수 있을 것이라고 생각한다. 이에 따라 본 연구에서는 동적광산란법을 이용하여 아밀로즈 함량에 따른 전분의 분자 구조 변화를 분석하였으며, 이를 이용하여 아밀로즈 함량과 전분 분자의  $D_h$ 의 상관관계를 규명하고자 하였다. 따라서 본 연구에서는 아밀로즈 함량 및 용매 조건에 따른  $D_h$ 의 변화를 동적광산란법을 이용하여 분석하였으며, 분석 결과를 기존 크기 배제 크로마토그래피 측정법과 비교 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

본 실험에 사용한 찹옥수수과 옥수수 전분은 삼양제넥스(Seoul, Korea)에서 제공받았으며, 아밀로즈 함량이 50, 70%인 교아밀로즈 옥수수 전분은 Ingredion(Bridgewater, NJ, USA)에서 제공받았다. 다양한 분자량을 가진 dextran 표준물질(분자량 50,000, 150,000, 270,000, 670,000), sodium chloride, urea, sodium nitrate, dimethyl sulfoxide(DMSO) 및 1-butanol은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, 그 이외의 시약은 최소 분석용 등급으로 사용하였다.

### 전분의 정제

Han 등(11)의 방법을 일부 수정하여 다음과 같이 전분을 정제하였다. 전분 1 g을 90% DMSO 수용액(v/v) 100 mL에 분산한 후 1시간 동안 100 rpm으로 교반하면서 중탕 가열하고 추가로 실온에서 동일 속도로 1시간 동안 교반하였다. 준비된 전분 용액을 300 mL의 95% 에탄올 용액에 천천히 가하여 침전시켰다. 상기 용액을 원심분리 하여( $3,000 \times g$ ) 침전물을 회수한 후, 침전물을 95% 에탄올 100 mL에 재분산하고 10분 동안 교반하여 세척하였다. 이러한 세척 과정을 3회 반복하였으며 마지막 세척 과정에는 95% 에탄올 용

액 대신에 아세톤을 사용하였다. 모든 세척이 끝나고 35°C에서 건조한 후 분쇄하여 No. 120 체를 이용하여 체질하였다.

### 크기 배제 크로마토그래피를 이용한 전분 분자 구조 분석

Han과 Lim(12)의 방법을 일부 수정하여 전분의 아밀로즈 함량을 분석하였다. 정제된 전분(5 mg)을 1.0 M NaOH 용액 1 mL에 분산하여 녹이고 50 mM  $\text{NaNO}_3$  용액 3 mL를 가하여 희석한 후 1.0 M HCl로 중화하였다. 상기 준비된 전분 용액을 121°C에서 20분간 가압 멸균한 후 공극 크기가 5.0  $\mu\text{m}$ 인 필터(Millipore, Darmstadt, Germany)로 여과하였다. 준비된 전분 용액을 크기 배제 크로마토그래피에 주입하여 전분 분자를 분자량 크기별로 분획한 후 아밀로즈 함량을 측정하였다. 본 연구에 사용한 크기 배제 크로마토그래피 시스템(Waters, Milfold, MA, USA)은 펌프와 200  $\mu\text{L}$  루프가 장착된 주입기, 굴절률 검출기로 구성되어 있다. 크기 배제 크로마토그래피 시스템에 주입된 전분 분자는 TSK gel 5000 PWxl 칼럼(TOSOH, Tokyo, Japan)을 통과하면서 분자 크기별로 분획되었고, 분획된 전분 분자들의 농도는 굴절률 검출기를 이용하여 측정하였다. 다양한 분자량을 가진 텍스트란 표준물질을 동일한 시스템에 주입하여 분자량별 검출 시간을 분석하였다.

### 동적광산란을 이용한 전분 구조 분석

Chiou 등(10)의 조건을 일부 변경하여 다음과 같이 연구를 수행하였다. 용매 조건에 따른 전분 분자의 크기 변화를 규명하기 위하여 다음과 같이 총 3가지 조건에서 전분 용액을 제조하였다; 1) 다양한 농도의 NaCl 용액을 사용하여 용매의 이온 강도를 조절, 2) 수소 결합 억제제으로써 다양한 농도의 urea 용액을 사용, 3) 다양한 양의 1-butanol을 첨가하여 용매의 극성을 조절. 정제된 전분(2 mg)을 1.0 M NaOH 용액 1 mL에 분산하여 녹이고 증류수 혹은 다양한 농도의 NaCl 및 urea 용액(1, 2, 3 M) 8 mL를 가한 후 희석하고 1.0 M HCl로 중화하였다. 상기 준비된 전분 용액을 121°C에서 20분간 가압 멸균하고 공극 크기가 5.0  $\mu\text{m}$ 인 필터를 이용하여 여과한 후 분석하였다. 별도로 정제된 전분(2 mg)을 1.0 M NaOH 용액에 분산하여 녹인 후 증류수 8 mL를 가하여 희석하고 1.0 M HCl로 중화하였다. 상기 준비된 전분 용액을 121°C에서 20분간 가압 멸균한 후 1% 1-butanol을 가하고 공극 크기가 5.0  $\mu\text{m}$ 인 필터를 이용하여 여과한 후 분석하였다. 상기 다양한 조건에서 제조된 전분 용액의  $D_h$ 와 분포를 동적광산란 분석기(SZ-100, HORIBA, Ltd., Kyoto, Japan)를 이용하여 실온에서 총 60초 동안 산란각 90°로 분석하였다.

### 통계 분석

모든 실험은 최소 3회 이상 반복하였으며, 도출된 결과는 평균과 표준편차로 나타내었다. 선형 회귀분석을 이용하여 동적광산란법과 크기 배제 크로마토그래피 결과 값들이 서

로 유의적인 관계를 가졌는지 분석하였으며,  $P$  값은 0.05 이하일 때 유의적인 관계를 갖는다고 판단하였다.

### 결과 및 고찰

#### 분석방법에 따른 덱스트란 표준물질 분자 특성

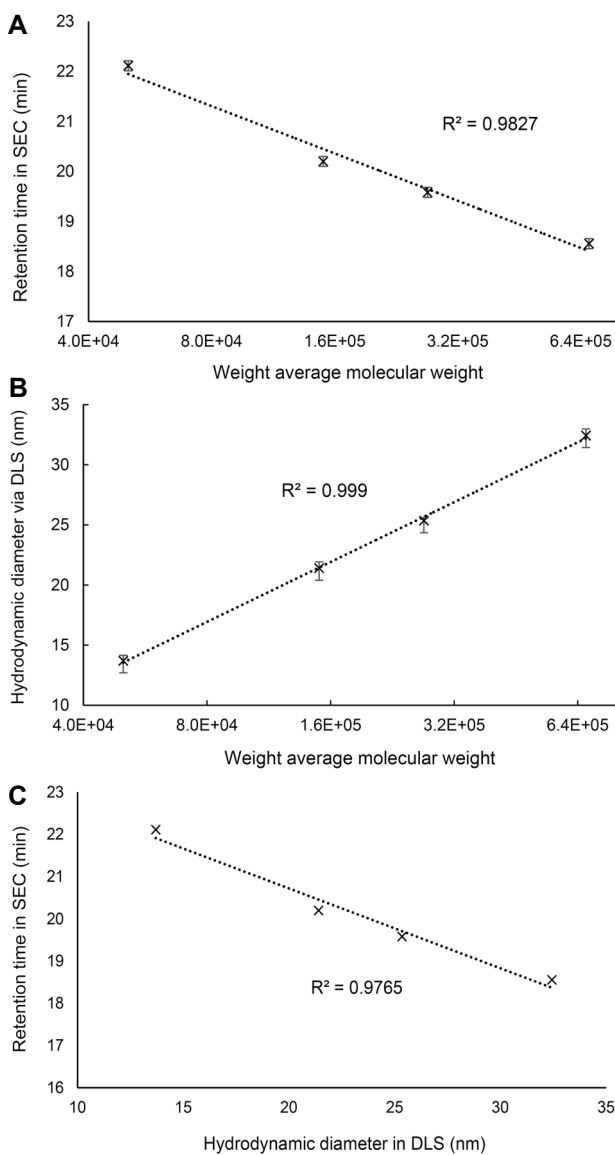
일반적으로 크기 배제 크로마토그래피를 이용하여 전분 분자의 분자량을 구할 때는 동일한 구조를 가지고 분자량만 다른 표준물질이 가장 이상적이지만, 전분은 크게 분자 구조가 상이한 아밀로스와 아밀로펙틴으로 구성되어 있기 때문에 현실적으로 전분을 위한 이상적인 표준물질은 없다. 따라서 분자구조가 아밀로펙틴과 유사한 덱스트란을 표준물질

로 사용하는 경우가 많다. Fig. 1A는 덱스트란 표준물질 분자량과 크기 배제 크로마토그래피 검출 시간의 상관관계를 나타낸 것으로 표준물질의 분자량과 검출 시간은 매우 높은 상관관계를 가지고 있다. Fig. 1B는 덱스트란 표준물질 분자량과 동적광산란법을 이용하여 측정된  $D_h$ 의 상관관계를 나타낸 것으로 이 역시 매우 높은 상관관계를 나타내었을 뿐만 아니라 크기 배제 크로마토그래피 검출 시간과  $D_h$  역시 유의적인 상관관계를 나타내었다(Fig. 1C). 이론상 크기 배제 크로마토그래피에서 시료의 분획은 분자량에 따른 hydrodynamic volume 값 차이에 의하여 일어나기 때문에 상기 언급된 유의적인 상관관계가 나왔다고 생각되며, 이는 동적광산란법이 분자량에 따른  $D_h$  값 차이를 정확하게 분석할 수 있다는 사실을 나타낸다. 따라서 동적광산란법으로 측정된  $D_h$  값을 활용하여 시료 간 전분 분자 특성의 차이를 비교할 수 있다고 생각한다.

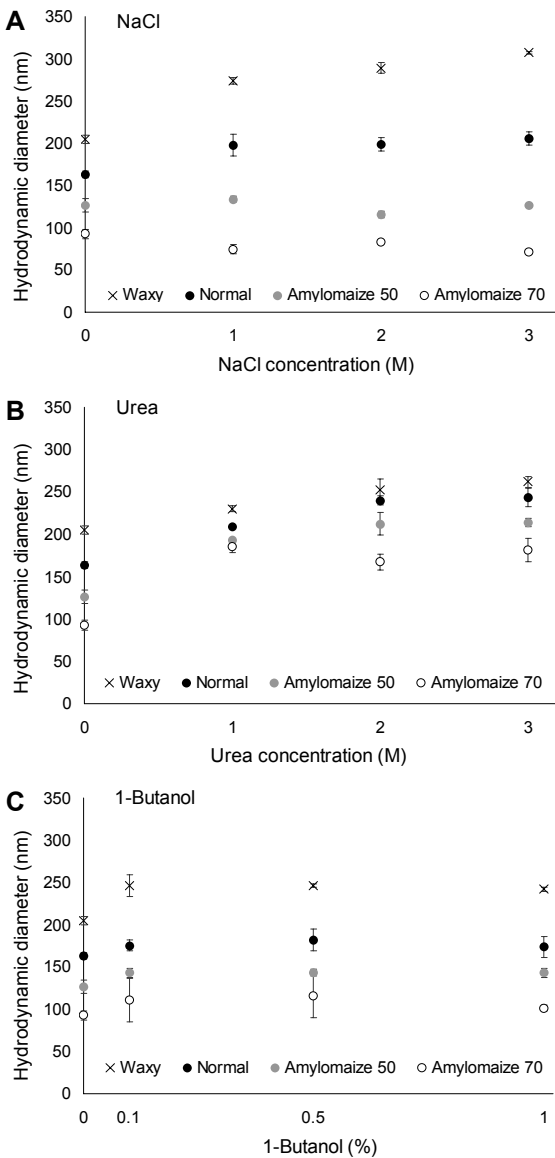
#### 동적광산란법을 이용한 전분 분자 구조

아밀로즈 함량이 높은 고아밀로즈 옥수수 전분의 경우에 물에 완전히 녹이기 힘들어서 전분 용액 제조 시 전분 시료를 증류수 대신 1 M NaOH 1 mL에 분산하여 녹인 후 8 mL의 용매로 희석하고 HCl로 중화하는 방식으로 제조하였으며 희석 용매의 조건을 달리하여 전분 분자 구조를 분석하였다. 따라서 기준이 되는 용매의 NaCl 최종 농도는 0.1 M이지만 본 논문에서는 편의상 희석용매의 농도를 기준으로 시료를 지칭하였다. 희석 용매는 용매의 이온 강도를 조절하기 위하여 1, 2 및 3 M의 NaCl을 첨가하였고, 수소 결합 억제제로 1, 2 및 3 M의 urea 용액을 사용하였다. 용매의 극성을 조절하기 위하여 0.1, 0.5 및 1.0%(w/v)의 1-butanol을 첨가하여 사용하였다. Fig. 2는 용매 조성에 따른 전분 분자의  $D_h$ 를 나타낸 것으로, 용매 조성 및 아밀로즈 함량에 따라 전분 분자의  $D_h$ 는 70~307 nm의 분포를 나타냈다. 용매 조건과 상관없이 아밀로즈 함량이 감소할수록  $D_h$  값이 감소하였으며, 이는 Bello-Pérez 등(13)의 보고와 일치한다. Han 등(11)의 보고에 따르면 아밀로펙틴의 radius of gyration( $R_g$ ) 값은 214~241 nm에 분포하는 반면, 아밀로스의  $R_g$  값은 이보다 작은 83~164 nm에 분포한다. 동적광산란법의 경우 분자량별로 시료를 분획하지 않고 혼합된 상태에서 시료를 측정하여 아밀로스와 아밀로펙틴의  $R_g$  값 차이에 의하여 독립된 두 개의 크기 분포를 나타낼 것이라고 예상하였지만 하나의 분포만을 나타냈다. 반면 상대적으로 작은 아밀로스의  $R_g$  값으로 인하여 전분 전체 분자의  $D_h$  값은 아밀로즈 함량이 증가함에 따라 감소하는 것으로 생각한다.

Fig. 2A는 NaCl 농도에 따른 전분 분자의  $D_h$  변화를 나타낸 것으로 NaCl 농도가 증가할수록  $D_h$  값이 증가하였지만, 전분의 아밀로즈 함량이 증가할수록 이러한 증가 폭이 감소하였고 고아밀로즈 전분의 경우 주목할 만한  $D_h$  값 변화를 보이지 않았다. Chiou 등(10) 역시 용매의 NaCl 농도가 증가할수록 옥수수 전분의  $D_h$  값이 증가한다고 발표하였다.



**Fig. 1.** Correlation of weight average molecular weight of dextran standard with A) retention time in size exclusion chromatography (SEC) and B) hydrodynamic diameter via dynamic light scattering (DLS), and C) retention time and hydrodynamic diameter.



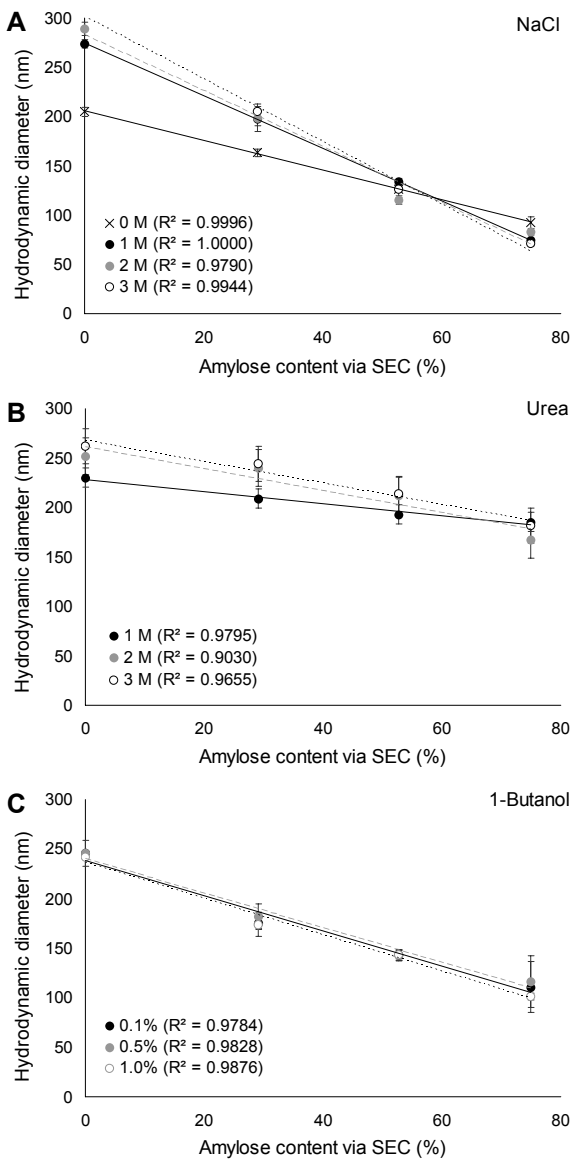
**Fig. 2.** Hydrodynamic diameter change of starch molecules as a function of solution environments depending on amylose content.

이는 염이 전분 사슬의 하이드록시기와 전기적으로 결합함에 따라 전분 사슬 간 재결합을 억제함으로써 나타나는 현상이라고 생각된다. 또한, 가지 구조가 많은 아밀로펙틴의 경우 이러한 효과가 더 많이 일어날 수 있으므로 염에 의한  $D_h$  값의 변화가 더 크다고 생각한다. Urea는 대표적인 수소 결합 억제제로써 NaCl의 경우와 마찬가지로 urea 농도가 증가할수록  $D_h$  값이 증가하였지만, 찰옥수수 전분은 NaCl의 경우보다는  $D_h$  증가 폭이 감소하였다. 반면 찰옥수수를 제외한 전분은 아밀로즈 함량이 증가할수록 NaCl보다는  $D_h$  증가 폭이 증가하였다(Fig. 2B). McGrane 등(14)의 발표에 따르면 urea는 인접한 전분 분자들 간 수소 결합 형성을 억제할 수 있지만, 전분 분자 내부의 수소 결합 형성은 효과적으로 억제하지 못한다. 가지 구조가 많아 분자 내부의 수소

결합 형성이 쉬운 아밀로펙틴의 경우 urea에 의한 전분 사슬의 재결합 억제가 상대적으로 제한적이지만, urea에 의하여 인접한 아밀로즈 간의 재결합은 효율적으로 억제되어 이러한 차이가 발생한 것이라고 생각한다. 1-Butanol은 소수성 물질로써 전분에서 아밀로즈를 분리하기 위하여 사용되는데, 이는 아밀로즈와 1-butanol이 복합체를 형성하기 때문이다(15). 따라서 1-butanol은 전분 분자의  $D_h$ 에 영향을 미칠 것이라고 생각된다. 본 실험에서 1-butanol의 함량은 최대 1.0%까지 사용하였는데 그 이상 첨가할 경우 전분이 침전되는 현상이 일어날 수 있기 때문이다. 1-Butanol을 첨가함에 따라 전분 분자의  $D_h$ 가 소폭 증가하였지만, 첨가량에 따른 유의적인 차이는 보이지 않았다(Fig. 2C). 하지만 전분의 아밀로즈 함량에 따른  $D_h$  또한 주목할 만한 변화가 없었다. 이는 아밀로즈와 1-butanol 사이의 복합체가 형성되지 않았다는 것을 나타내며, 온도 조절 없이 단순히 1-butanol 첨가만으로는 아밀로즈와 1-butanol 사이의 복합체 형성을 유도할 수 없기 때문이라고 생각한다.

**아밀로즈 함량과 전분 분자 구조의 상관관계**

크기 배제 크로마토그래피를 이용하여 찰옥수수, 옥수수, 아밀로즈 함량이 50, 70%인 고아밀로즈 옥수수 전분의 아밀로즈 함량을 측정된 결과, 각각 0, 29.06, 52.72, 74.99%로 나타났다. 아밀로즈 함량에 따른  $D_h$ 의 변화를 상세히 규명하기 위하여 크기 배제 크로마토그래피로 분석한 아밀로즈 함량과 동적광산란법으로 측정된 전분 분자의  $D_h$  사이의 상관관계를 분석하였다(Fig. 3). 증류수에 희석한 경우 아밀로즈 함량이 증가할수록 전분 분자의  $D_h$  값이 204 nm에서 92 nm로 감소하였으며, 용매 조건에 상관없이 모든 용매에서 아밀로즈 함량과  $D_h$ 는 유의적인 상관관계를 보였고 이는 아밀로즈가 전분 분자의  $D_h$ 에 중요하게 영향을 미친다는 사실을 나타낸다. 반면에 용매 조건에 따라 추세선의 기울기 값이 변하였는데, NaCl의 경우 용매의 NaCl 농도가 증가할수록 추세선의 기울기의 절댓값이 증가하였다(0 M: 1.504, 1 M: 2.667, 2 M: 2.834, 3 M: 3.175). Urea의 경우 용매의 urea 농도가 증가할수록 추세선 기울기의 절댓값이 증가하였지만 2 M 조건 이후에는 추가적인 증가를 하지는 않았다(1 M: 0.6071, 2 M: 1.1128, 3 M: 1.080). 이러한 추세선 기울기 변화는 용매 조건에 따라 전분 분자의  $D_h$  값 변화에 의한 것이라고 생각된다. 다만 1-butanol의 경우 첨가량에 따른 추세선의 기울기 변화가 없었다(0.1%: 1.7763, 0.5%: 1.8364, 1.0%: 1.7304). 상기 결과를 종합해볼 때 아밀로즈 함량과  $D_h$  사이의 유의적인 상관관계를 활용하여 전분의 아밀로즈 함량을 측정할 수 있다고 기대한다. 또한, 추세선의 기울기 값이 가장 큰 3 M NaCl을 용매로 사용하는 것이 분석에 유리하다고 생각한다. 다만 본 연구에서는 비교적 아밀로즈 함량 차이가 많은 시료를 대상으로 분석을 진행하여 상기 언급된 유의적인 차이를 도출할 수 있었을 가능성이 있다. 옥수수 전분 이외의 전분 역시 동적광산란법으로 아밀



**Fig. 3.** Correlation between amylose content via size exclusion chromatography (SEC) and hydrodynamic diameter of starch in different solution environments.

로즈 함량을 측정할 수 있다고 기대하지만 아밀로즈 함량 차이가 작은 전분의 경우 동적광산란법으로 아밀로즈 함량을 측정할 수 있을지 추가 연구를 할 필요가 있다.

### 요 약

본 연구에서는 동적광산란법을 이용하여 아밀로즈 함량과 용매 조건에 따른 전분 분자 구조 변화를 규명하였다. 분자량이 다른 여러 가지 텍스트란 표준물질을 이용하여 동적광산란법의 정확성을 검증하였으며, 이를 전분에 적용해본 결과 아밀로즈 함량에 따른 전분 분자의  $D_h$  변화를 규명할 수 있었고 아밀로즈 함량이 높아질수록 전분 분자의  $D_h$  값이 증가하였다. 또한, 용매 조건에 따른 전분 분자의  $D_h$  변화를

동적광산란법으로 규명할 수 있었으며, NaCl의 경우 농도가 높아질수록 아밀로펙틴의  $D_h$ 가 증가했지만, 아밀로즈의  $D_h$ 는 urea에 더 큰 영향을 받는 것으로 생각된다. 1-Butanol의 경우 전분 분자의  $D_h$ 를 증가시켰지만 주목할 만한 경향은 관찰하지 못하였다. 또한, 전분의 아밀로즈 함량과 전분 분자의  $D_h$ 는 유의적인 상관관계를 보였으며, 이를 활용할 경우 전분의 아밀로즈 함량을 예측하는 데 도움이 될 수 있을 것이라고 기대한다.

### 감사의 글

본 연구는 2015년 강원대학교 대학회계 학술연구조성비로 연구하였다(관리번호 520150115).

### REFERENCES

- Vilaplana F, Hasjim J, Gilbert RG. 2012. Amylose content in starches: Toward optimal definition and validating experimental methods. *Carbohydr Polym* 88: 103-111.
- Morrison WR, Laignelet B. 1983. An improved colorimetric procedure for determining apparent and total amylose in cereal and other starches. *J Cereal Sci* 1: 9-20.
- You SG, Lim ST. 2000. Molecular characterization of corn starch using an aqueous HPSEC-MALLS-RI system under various dissolution and analytical conditions. *Cereal Chem* 77: 303-308.
- Gibson TS, Solah VA, McCleary BV. 1997. A procedure to measure amylose in cereal starches and flours with concanavalin A. *J Cereal Sci* 25: 111-119.
- Vilaplana F, Gilbert RG. 2010. Two-dimensional size/branch length distributions of a branched polymer. *Macromolecules* 43: 7321-7329.
- Tizzotti MJ, Sweedman MC, Tang D, Schaefer C, Gilbert RG. 2011. New  $^1H$  NMR procedure for the characterization of native and modified food-grade starches. *J Agric Food Chem* 59: 6913-6919.
- Vilaplana F, Gilbert RG. 2010. Characterization of branched polysaccharides using multiple-detection size separation techniques. *J Sep Sci* 33: 3537-3554.
- Cave RA, Seabrook SA, Gidley MJ, Gilbert RG. 2009. Characterization of starch by size-exclusion chromatography: the limitations imposed by shear scission. *Biomacromolecules* 10: 2245-2253.
- Murphy RM. 1997. Static and dynamic light scattering of biological macromolecules: what can we learn?. *Curr Opin Biotechnol* 8: 25-30.
- Chiou H, Fellows CM, Gilbert RG, Fitzgerald MA. 2005. Study of rice-starch structure by dynamic light scattering in aqueous solution. *Carbohydr Polym* 61: 61-71.
- Han JA, Lim H, Lim ST. 2005. Comparison between size exclusion chromatography and micro-batch analyses of corn starches in DMSO using light scattering detector. *Starch/Stärke* 57: 262-267.
- Han JA, Lim ST. 2004. Structural changes in corn starches during alkaline dissolution by vortexing. *Carbohydr Polym* 55: 193-199.
- Bello-Pérez LA, Colonna P, Roger P, Parees-López O. 1998. Laser light scattering of high amylose and high amylopectin materials in aqueous solution, effect of storage time. *Carbo-*

- hydr Polym* 37: 383-394.
14. McGrane SJ, Mainwaring DE, Cornell HJ, Rix CJ. 2004. The role of hydrogen bonding in amylose gelation. *Starch/Stärke* 56: 122-131.
  15. Le Bail P, Rondeau C, Buléon A. 2005. Structural investigation of amylose complexes with small ligands: helical conformation, crystalline structure and thermostability. *Int J Biol Macromol* 35: 1-7.