



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20150042

裸燕麦多糖酶解产物 OP-1 纯化组分结构分析

王楠, 张民, 李茜, 孟雅倩, 侯滕, 刘锐

(食品营养与安全教育部重点实验室, 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘要: 以裸燕麦麸皮为原料提取裸燕麦多糖, 采用纤维素酶对裸燕麦多糖进行酶解, 并对酶解产物进一步纯化, 获得裸燕麦多糖酶解产物纯化组分 OP-1; 利用高效液相色谱(HPLC)和气相色谱(GC)分别测定 OP-1 组分的相对分子质量分布和单糖组成, 采用紫外光谱(UV-VIS)、红外光谱(FTIR)、原子力显微镜(AFM)、扫描电子显微镜(SEM)对 OP-1 组分的微观结构和形貌进行表征。结果表明: 裸燕麦多糖酶解产物 OP-1 纯化组分中数均相对分子质量为 2.2×10^3 , 峰面积比为 80.9%; OP-1 组分主要由葡萄糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖等单糖构成, 其物质的量比为 37.4 : 1.1 : 1.4 : 1.0; 并含有 β -D-吡喃葡萄糖环; 微观形貌呈线状、棒状和碎屑状分布。

关键词: 裸燕麦麸皮; 多糖; 酶解; 纯化; 结构分析

中图分类号: TS210.9

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2016)01-0008-05

Structural Analysis of OP-1 Purified Fraction from Naked Oat Polysaccharide Hydrolysates

WANG Nan, ZHANG Min, LI Qian, MENG Yaqian, HOU Teng, LIU Rui

(Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Naked oat polysaccharide was extracted from naked oat bran and hydrolyzed with cellulose enzyme. Naked oat polysaccharide hydrolysates were then purified by Sephadex G-25 column. The structural properties of purified fraction OP-1 were further investigated. The molecular weight distribution and monosaccharide composition of OP-1 were measured by high performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography (GC), respectively. The microstructure and morphology of OP-1 were determined by ultraviolet-visible spectrophotometer (UV-VIS), fourier transform infrared (FTIR), atomic force microscope (AFM) and scanning electron microscope (SEM). The results suggest that the molecular weight and relative area percentage of the predominant proportion of OP-1 are 2.2×10^3 and 80.9%, respectively. OP-1 is composed of glucose, arabinose, xylose and mannose with the molar ratio of 37.4 : 1.1 : 1.4 : 1.0. OP-1 also has β -D-glucopyranoside ring. The morphology of OP-1 shows a mixed distribution of linear, rodlike and clastic polysaccharide aggregates.

Key words: naked oat bran; polysaccharide; enzymatic hydrolysis; purification; structural analysis

燕麦是禾本科燕麦族燕麦属 (*Avena* L.) 的一种重要农作物, 主要分为普通燕麦 (*A. sativa* L.)、东方燕麦 (*A. orientalis* Schreb)、地中海燕麦 (*A. byzantina* Koch) 和裸燕麦 (*A. nuda* L.), 前 3 种的子粒带稃又被称为皮燕麦。国外以皮燕麦种植为主, 而国内以裸燕麦种植为主。

燕麦是一种营养价值很高的粮饲作物, 其加工过

程中产生的燕麦麸皮中含有大量的活性多糖, 具有调节血糖、降低血脂、抗肿瘤、增强免疫力等多种生理活性^[1]; 并且由于燕麦多糖性质稳定, 具有良好的持水性, 可形成高黏度溶液^[2], 因此可用于食品增稠剂、胶凝剂、稳定剂等, 应用前景广阔。

但是, 由于燕麦多糖相对分子质量较大, 在水中的溶解性较差, 限制了在食品领域中其他方面的应

收稿日期: 2015-04-01; 修回日期: 2015-05-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31171781); 高等学校博士学科点专项科研基金博导类联合资助课题(20121208110003)

作者简介: 王楠(1989—), 女, 辽宁锦西人, 硕士研究生; 通信作者: 刘锐, 讲师, lr@tust.edu.cn.

用。因此,针对燕麦多糖进行改性,可以提高燕麦多糖的加工特性。目前,燕麦多糖改性方法主要有超微粉碎、挤压处理、蒸汽加热等物理预处理以及化学水解和生物酶解等^[3]。其中,生物酶解法具有环境友好安全、反应温和等优点,不但能改善燕麦多糖的加工特性,而且研究发现其酶解产物具有显著的胆汁酸结合能力,能够降低体内胆固醇和甘油三酯含量,起到调节血脂的功效^[4]。

多糖的加工特性及生物活性与其相对分子质量、单糖组成、糖苷键类型、空间结构等存在密切关系,因此对燕麦多糖结构研究是解释多糖加工特性作用机制的基础问题。目前,已开展裸燕麦多糖酶解过程相对分子质量和结构的变化及其对物理化学性质、流变特性和功能活性的影响等方面研究^[5-6]。进一步分析裸燕麦酶解纯化产物的结构和性质,将为后续高品质裸燕麦多糖产品的研究与开发提供基础理论支持。

1 材料与方法

1.1 原料与设备

裸燕麦麸皮,河北省张北县燕北绿色保健食品厂;耐高温 α -淀粉酶和纤维素酶,天津诺奥酶制剂有限公司;糖化酶,苏柯汉生物工程有限公司;葡聚糖凝胶树脂(Sephadex G-25),Solarbio公司;单糖标准品(岩藻糖、核糖、鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、山梨糖、甘露糖、半乳糖、葡萄糖),Sigma公司;去离子水,实验室自制;其他试剂均为分析纯,市售。

LGJ0.5型冷冻干燥机,北京四环科学仪器厂;LC-20AT型高效液相色谱仪、CTO-20A柱温箱,日本岛津公司;7890A型气相色谱仪,Agilent公司;752型紫外-可见光分光光度计,上海菁华科技仪器有限公司;VECTOR 22型傅里叶变换红外光谱仪,布鲁克仪器公司;JSPM-5200型原子力显微镜、GEOL型扫描电子显微镜,日本电子公司。

1.2 实验方法

1.2.1 裸燕麦多糖提取及酶解

裸燕麦多糖的提取采用水提醇沉法^[7]。称取100g普通粉碎裸燕麦麸皮样品加入体积分数75%乙醇,料液比(g:mL)1:4,80℃加热10min,抽滤除去滤液,重复3次,滤渣烘干备用。滤渣加水搅拌,料液比(g:mL)1:10,60℃提取1.5h,3400r/min离心15min,收集上清液,重复3次,合并上清液。加入适量的耐高温 α -淀粉酶,90℃反应30min至上清

液经碘液测定不变蓝;冷却至60℃后加入适量糖化酶,反应30min;3400r/min离心15min,取上清液真空浓缩,4℃醇沉过夜,离心。沉淀挥干乙醇,采用Sevag法脱除蛋白,真空冷冻干燥后得裸燕麦多糖,得率为(10.92±0.03)%^[7]。采用纤维素酶对裸燕麦多糖进行酶解,酶解条件:纤维素酶添加量为76U/g,温度55℃,pH5.5,酶解时间1.5h。获得裸燕麦多糖酶解产物,冷冻干燥后备用。

1.2.2 裸燕麦多糖酶解产物纯化

将预装的Sephadex G-25葡聚糖凝胶树脂柱平衡24h后上样使用。称取已冻干的裸燕麦多糖酶解产物10mg溶于5mL去离子水中,振荡使多糖完全溶解,溶液过膜后沿着色谱柱壁缓慢加入Sephadex G-25凝胶色谱柱中,柱床体积为25mm×450mm,脱气去离子水洗脱,流量为2mL/min,每管接4mL洗脱液,苯酚-硫酸法测定总糖含量。以试管数为横坐标,吸光度为纵坐标绘制洗脱曲线。

1.2.3 裸燕麦多糖酶解纯化组分相对分子质量分布测定

采用HPLC法测定裸燕麦多糖酶解纯化组分的相对分子质量分布,并通过相对分子质量比值法对纯化组分进行纯度鉴定。色谱测定条件:RID-10A示差折光检测器,OHpak SB-803HQ色谱柱,柱温30℃,流动相为去离子水,进样量20 μ L,流量0.8mL/min。相对分子质量标准曲线公式为

$$Y = -8.158 X^7 + 5.346 X^6 - 1.497 X^5 + 23.263 X^4 - 216.996 X^3 + 1217.598 X^2 - 3813.937 X + 5161.62$$

1.2.4 裸燕麦多糖酶解纯化组分的单糖组成测定

采用GC法测定裸燕麦多糖酶解纯化组分的单糖组成。单糖标准品糖醇乙酸酯衍生化方法如文献所述^[8]。裸燕麦多糖酶解纯化组分样品制备方法如下:准确称取裸燕麦多糖酶解纯化样品10mg,加入1mL2mol/L三氟乙酸,封管,置于烘箱120℃水解4h,冷却至室温;同样按单糖标准品糖醇乙酸酯衍生化方法对样品进行衍生。色谱测定条件:OV-1701毛细管色谱柱,FID检测器;H₂流量40mL/min,空气流量450mL/min,N₂流量34mL/min;初温150℃,进样口温度240℃,检测器温度280℃;进样量3 μ L,分流比10:1。

1.2.5 裸燕麦多糖酶解纯化组分的结构测定

采用紫外-可见光分光光度计测定质量浓度为1mg/mL样品在190~400nm范围内的特征吸收。将1mg样品加入150mgKBr,充分研磨制样,采用傅里叶变换红外光谱仪测定样品结构特征,扫描

波数 $4\ 000 \sim 400\ \text{cm}^{-1}$, 分辨率 $4\ \text{cm}^{-1}$, 扫描次数 16 次. 配制 $1\ \text{mg/mL}$ 样品溶液, 充分溶解稀释至 $1.0 \times 10^{-3}\ \text{mg/mL}$, 采用原子力显微镜测定样品微观结构, 探针 Si_3N_4 , 微悬臂长 $(110 \pm 5)\ \mu\text{m}$, Tapping 模式, 共振频率 $1\ \text{kHz}$. 采用扫描电子显微镜观测样品的微观形貌, 放大倍数为 500 和 1 000 倍.

2 结果与讨论

2.1 裸燕麦多糖酶解产物的纯化

裸燕麦多糖酶解产物 Sephadex G-25 洗脱曲线如图 1 所示. 由图 1 可知, 裸燕麦多糖酶解产物经 Sephadex G-25 纯化后大致可以被洗脱成 3 个组分. 多糖经葡聚糖凝胶洗脱时, 多糖相对分子质量大小不同, 其洗脱液流出的先后顺序是不同的. 相对分子质量大的组分由于不能通过凝胶树脂, 便从树脂间的空隙流出, 进而经过的路程较短, 先被洗脱出; 而相对分子质量小的组分则可以通过凝胶树脂, 相对经过的路程较长, 从而后被洗脱出. 裸燕麦多糖酶解产物经凝胶柱洗脱出 3 个组分, 由于后面两个组分相对分子质量较小, 因此只收集洗脱后第 1 个组分进行后续研究, 记为 OP-1.

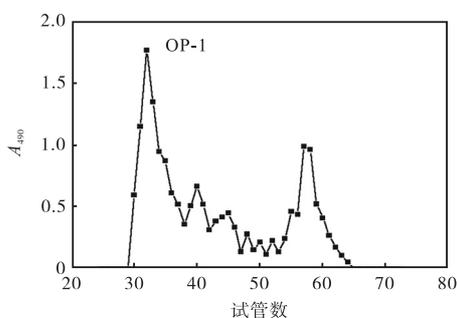


图 1 裸燕麦多糖酶解产物 Sephadex G-25 洗脱曲线

Fig. 1 Elution curve of naked oat polysaccharide hydrolysates on Sephadex G-25 column

2.2 裸燕麦多糖酶解纯化产物的相对分子质量分布

采用 HPLC 法测定 OP-1 组分的相对分子质量分布, 如图 2 和表 1 所示. 结果表明: OP-1 组分在保留时间 $10.432\ \text{min}$ 处有 1 主峰, 数均相对分子质量为 2.2×10^3 , 峰面积比为 80.9%; 同时在保留时间为 $7.539\ \text{min}$ 处存在较高相对分子质量的裸燕麦多糖组分, 数均相对分子质量为 4.3×10^5 , 峰面积比为 14.2%. Álvarez 等^[9]研究表明裸燕麦多糖相对分子质量约为 1.28×10^5 , 对比说明裸燕麦多糖经酶解生成

大量低相对分子质量多糖组分, 相对分子质量主要集中在 10^3 数量级. 此外, 采用相对分子质量比值法进行纯度检验. M_w/M_n 之比为多糖相对分子质量的多分散指数 (PDI), 可用来判断样品相对分子质量分布是否均匀, 如果样品分子大小比较均一, 纯度较高, PDI 值应接近于 1.0. 由表 1 可知, OP-1 主峰部分多分散指数为 1.7, 含量(峰面积比)占 80.9%, 表明 OP-1 组分纯度并不是很高, 仅在一定程度上分布相对均一.

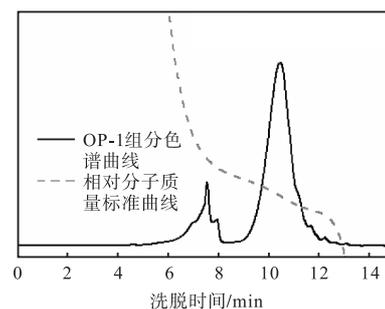


图 2 OP-1 的液相色谱图与相对分子质量标准曲线

Fig. 2 HPLC chromatogram and relative molecular mass standard curve of OP-1

表 1 OP-1 相对分子质量分布

Tab. 1 Relative molecular mass distribution of OP-1

时间/min	M_n	M_w	M_w/M_n	峰面积比/%
7.539	4.3×10^5	3.9×10^{11}	895 814.0	14.2
7.938	8.6×10^4	8.9×10^4	1.0	2.4
10.432	2.2×10^3	3.9×10^3	1.7	80.9
11.649	0.5×10^3	0.5×10^3	1.0	1.9
12.198	0.3×10^3	0.3×10^3	1.0	0.5

2.3 裸燕麦多糖酶解纯化产物的单糖组成

采用 GC 法测定裸燕麦多糖和 OP-1 组分的单糖组成, 结果如图 3 所示. 由图 3 可知: 裸燕麦多糖和 OP-1 组分均由葡萄糖 (33.949 min)、阿拉伯糖 (21.509 min)、木糖 (22.974 min)、甘露糖 (32.621 min) 等组成. 结果表明, 裸燕麦多糖和 OP-1 组分主要是由葡萄糖组成, 为葡聚糖^[10]; 除了葡萄糖外, 还含有少量的阿拉伯糖、木糖和甘露糖. 其物质的量比分别为 $32.52 : 1.0 : 1.01 : 1.12$ 和 $37.4 : 1.1 : 1.4 : 1.0$. 通过比较裸燕麦多糖和 OP-1 单糖组成可知, 裸燕麦多糖经酶解及 Sephadex G-25 纯化后, 其单糖组成并未变化, 但单糖组成物质的量发生改变.

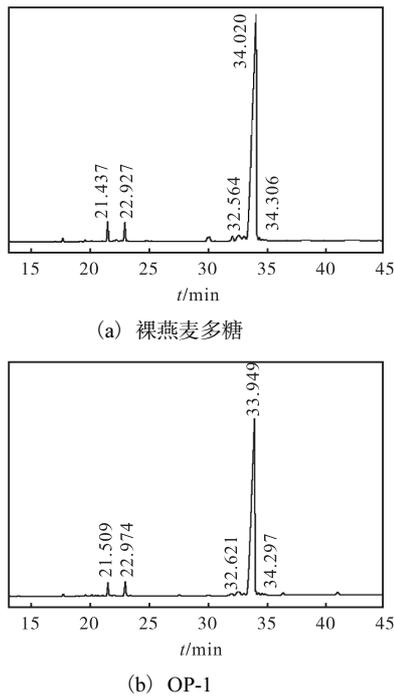


图3 裸燕麦多糖和 OP-1的气相色谱图

Fig. 3 GC chromatograms of naked oat polysaccharide and OP-1

2.4 裸燕麦多糖酶解纯化产物的微观结构和形貌

2.4.1 紫外-可见光光谱分析

采用紫外-可见分光光度法考察 OP-1 组分是否含有核酸和蛋白质等其他组分,结果如图 4 所示.由图 4 可知:OP-1 组分最大吸收波长在 200 nm 左右,为多糖的特征吸收波长;在 260 nm 处无特征吸收,说明 OP-1 组分中不含有核酸;在 280 nm 处吸收不明显,说明 OP-1 组分中蛋白质含量较低.因此,裸燕麦多糖经酶解纯化后 OP-1 组分主要是多糖组分,显示多糖的紫外-可见光特征吸收峰.

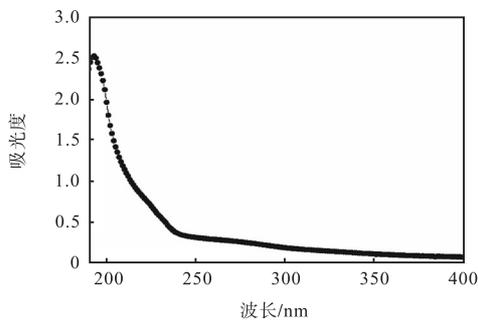


图4 OP-1紫外-可见光光谱图

Fig. 4 UV-VIS spectrum of OP-1

2.4.2 红外光谱分析

采用 FTIR 光谱测定 OP-1 组分的官能团等结构信息,结果如图 5 所示.由图 5 可知:在 3 600 ~ 3 200 cm^{-1} 、3 200 ~ 2 800 cm^{-1} 、1 400 ~ 1 200 cm^{-1} 和

1 200 ~ 1 000 cm^{-1} 波数范围均显示了典型的多糖物质吸收峰;而在 3 385 cm^{-1} 处存在宽峰,为 O—H 伸缩振动峰,表明 OP-1 多糖组分均存在分子内和分子间氢键,由于羟基形成氢键,所以吸收峰变宽;在 2 925 cm^{-1} 处的吸收峰为糖类 C—H 伸缩振动吸收峰^[11];在 1 262 cm^{-1} 和 1 317 cm^{-1} 处的吸收峰是糖类的 C—H 变角振动吸收峰^[12];在 1 073 cm^{-1} 和 1 155 cm^{-1} 处吸收峰是由于吡喃糖环 C—O 伸缩振动引起的;OP-1 组分在 897 cm^{-1} 处有弱小尖峰,是 β -吡喃环 C—H 的弯曲振动特征峰^[13],由此可以推断多糖结构中含有 β -型糖苷键,OP-1 组分是含有 β -D-吡喃葡萄糖环的多糖.

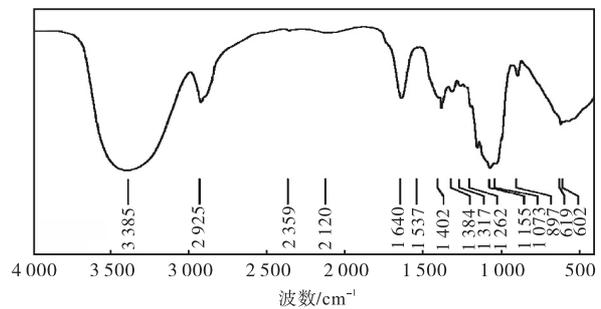


图5 OP-1的红外图谱

Fig. 5 FTIR spectrum of OP-1

2.4.3 原子力显微镜表征

多糖高级结构是多糖分子链的微观有序构象及多聚链间非共价键结合形成的聚集体.不同种类的多糖的分子结构和相对分子质量大小的不同会使其分子链的形状各不相同,因此分子链形状的研究也是裸燕麦多糖结构研究的一个重要方面.长期以来,AFM 和 SEM 是研究多糖样品微观结构和表面形貌非常重要的手段.采用 AFM 表征 OP-1 组分的微观结构,结果如图 6 所示.

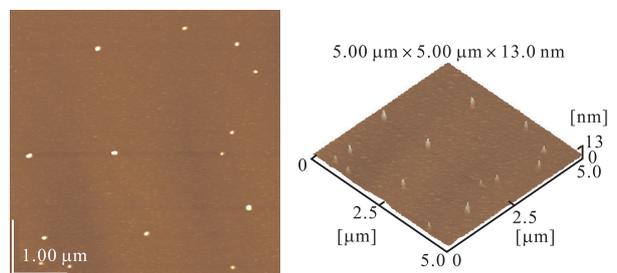


图6 OP-1的原子力显微图像

Fig. 6 AFM images of OP-1

由图 6 可知:OP-1 组分多糖呈分散状,聚集体平均直径为 1.2 nm,高度为 8.0 nm;而裸燕麦多糖和裸燕麦多糖酶解产物的平均直径和平均高度分别为

3.8 nm、40.3 nm 和 2.7 nm、14.1 nm, 说明裸燕麦多糖经过纤维素酶解其平均直径和平均高度均显著下降; 并且经过 Sephadex G-25 纯化后, 其平均直径和平均高度进一步显著下降, 这是由于纯化过程中未收集高相对分子质量多糖组分. 因此, 裸燕麦多糖、裸燕麦多糖酶解产物、OP-1 聚集体的平均直径及平均高度依次减小.

2.4.4 扫描电子显微镜表征

采用 SEM 表征裸燕麦多糖和 OP-1 组分的微观形貌, 结果如图 7 所示. 由图 7 可知: 裸燕麦多糖形貌尺寸分布为几微米至几十微米的块状结构; 而 OP-1 多糖组分尺寸分布显著下降, 呈现几微米的线状、棒状和碎屑状分布, 且片状、块状和团聚状的聚集体形态明显减少.

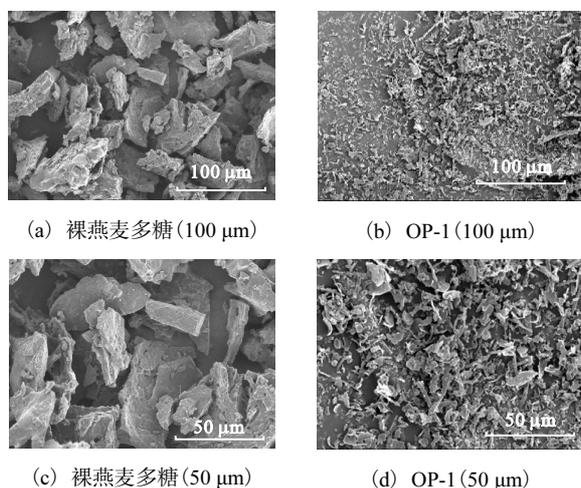


图 7 裸燕麦多糖和 OP-1 扫描电镜图

Fig. 7 SEM images of naked oat polysaccharide and OP-1

3 结论

采用 Sephadex G-25 对裸燕麦多糖酶解产物进行纯化, 收集第 1 个组分得到 OP-1 纯化组分. 该组分相对分子质量分布较均一, 主峰部分数均相对分子质量为 2.2×10^3 , 峰面积比为 80.9%; 单糖组成为葡萄糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖等单糖组成, 其物质的量比为 37.4 : 1.1 : 1.4 : 1.0; OP-1 组分无核酸, 含少量蛋白; 并含有 β -D-吡喃葡萄糖苷键; 多糖聚集体平均直径和平均高度分别为 1.2 nm 和 8.0 nm; 微观形貌呈线状、棒状和碎屑状分布. 研究结果为进一步探明裸燕麦多糖加工特性的结构特点提供了基础数据支持.

参考文献:

[1] Mantovani M S, Bellini M F, Angeli J P F, et al. β -

Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer[J]. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 2008, 658(3): 154-161.

[2] Biliaderis C G, Izydorczyk M S. Functional Food Carbohydrates[M]. Boca Raton: CRC Press, 2006.

[3] Zhang Min, Liang Yi, Pei Ying, et al. Effect of process on physicochemical properties of oat bran soluble dietary fiber[J]. Journal of Food Science, 2009, 74(8): 628-636.

[4] Bae I Y, Kim S M, Lee S, et al. Effect of enzymatic hydrolysis on cholesterol-lowering activity of oat β -glucan[J]. New Biotechnology, 2010, 27(1): 85-88.

[5] Gamel T H, Abdel-Aal S M, Ames N P, et al. Enzymatic extraction of beta-glucan from oat bran cereals and oat crackers and optimization of viscosity measurement[J]. Journal of Cereal Science, 2014, 59(1): 33-40.

[6] Bae I Y, Lee S, Kim S M, et al. Effect of partially hydrolyzed oat β -glucan on the weight gain and lipid profile of mice[J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23(7): 2016-2021.

[7] 张民, 白鑫, 边东哲, 等. 燕麦多糖的提取工艺及分子量分布研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(2): 218-219.

[8] Zhang Min, Wang Fang, Liu Rui, et al. Effects of superfine grinding on physicochemical and antioxidant properties of *Lycium barbarum* polysaccharides[J]. LWT-Food Science and Technology, 2014, 58(2): 594-601.

[9] Álvarez D, Barbut S. Effect of inulin, β -Glucan and their mixtures on emulsion stability, color and textural parameters of cooked meat batters[J]. Meat Science, 2013, 94(3): 320-327.

[10] 申瑞玲, 姚惠源. 裸燕麦麸 β -葡聚糖的提纯分离及结构研究[J]. 郑州工程学院学报, 2004, 25(4): 44-47.

[11] Zhang Xuewei, Yu Peiqiang. Differentiation of mixtures of co-product blend with barley grain based on Fourier transform infrared attenuated total reflection molecular spectroscopy: Carbohydrate molecular spectral profiles and nutritive characteristics in dairy cattle[J]. Journal of Dairy Science, 2012, 95(11): 6624-6634.

[12] Peng Feng, Ren Junli, Xu Feng, et al. Comparative studies on the physico-chemical properties of hemicelluloses obtained by DEAE-cellulose-52 chromatography from sugarcane bagasse[J]. Food Research International, 2010, 43(3): 683-693.

[13] 陈雪峰, 贾士儒, 王岳, 等. 发菜多糖的红外光谱分析与抗氧化活性的研究[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(7): 133-137.

责任编辑: 郎婧