

胡芦巴中性多糖酸水解工艺优化的研究

缪月秋¹, 张卫明², 顾龚平², 沈 奇¹, 吴国荣^{1,*}

(1. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210097;

2. 南京野生植物综合利用研究院, 江苏 南京 210042)

摘 要: 本文对胡芦巴中性多糖酸水解的工艺条件进行研究。以还原糖得率为指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交设计对酸浓度、反应时间、反应温度的参数进行优选。结果表明, 从水解产物低聚糖产量考虑, 6 mol/L 盐酸浓度, 100 °C 反应温度, 1 h 反应时间为最佳工艺条件, 此时低聚糖的得率为 43.97%, 低聚糖的分子量约为 500~1000 Da; 以获得较小分子量的低聚糖为目的, 则 6 mol/L 盐酸浓度, 90 °C 反应温度, 2 h 反应时间为最佳实验条件, 此时低聚糖的分子量约为 300~750 Da, 得率为 13.52%。

关键词: 胡芦巴中性多糖; 酸水解; 正交试验; 低聚糖得率; 低聚糖分子量

Study on Technological Optimization for Acid Hydrolysis of Fenugreek Neutral Polysaccharide

MIAO Yue-qiu¹, ZHANG Wei-ming², GU Gong-ping², SHEN Qi¹, WU Guo-rong^{1,*}

(1. College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China

2. Nanjing Institute for Comprehensive Utilization of Wild Plant, Nanjing 210042, China)

Abstract: This paper studied the acid hydrolysis conditions of fenugreek neutral polysaccharide. The orthogonal test table $L_9(3^4)$ was used to optimize 3 factors, namely HCl concentration, reaction time and reaction temperature. The yield of oligosaccharide was used the index in the orthogonal test. Results showed that as far as the yield of oligosaccharide was concerned, it would be as high as 43.97% when under the conditions of 6 mol/L HCl, 100 °C reaction temperature and 1 h reaction time, where as the molecular weight of the obtained oligosaccharide is about 500~900 Da. For the final goal to obtain small molecule oligosaccharide, the optimal conditions would be 6 mol/L HCl, 90 °C reaction temperature and 2 h reaction time. Under the conditions, the molecular weight of the obtained oligosaccharide is about 500~1000 Da and its yield is 43.97%.

Key words fenugreek neutral polysaccharide; acid hydrolysis; orthogonal test; the yield of oligosaccharide; the molecular weight of oligosaccharide

中图分类号: 0623.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)05-0134-04

胡芦巴 (*Trigonella foenumgraecum* Linn) 又名香豆子、芦巴、香草等, 系豆科胡芦巴属一年生草本植物, 在我国新疆、河北、陕西等地均有分布。胡芦巴中性多糖系胡芦巴种子内胚乳中提取出的一种多糖胶, 主要成分为半乳甘露聚糖^[1], 其分子式为 $(C_6H_{10}O_5)_n \cdot 2H_2O$, 摩尔质量接近 250000, 其中所含的半乳糖与甘露糖之比为 1:1.2, 这类高分子多糖可作为增稠剂、稳定剂等, 广泛应用于食品、石油、纺织、造纸等领域^[2~4]。近年来对分子量高的植物多糖进行酸水解或酶解等的研究发现, 水解后的低聚糖具有许多独特的生物学活性^[5,6]; 在人体肠道内能活化增殖双歧杆菌, 抑制大肠杆菌的生

长; 促进脾脏抗体生成, 抑制肿瘤细胞的生长; 强化肝脏功能, 防止胃溃疡; 降低血压、血糖、血脂, 吸附胆固醇等, 而且水溶性好, 稳定性高, 安全无毒。因此, 类似的低聚糖在食品添加剂、功能性食品、医疗保健等多方面显示出极为广泛的应用范围和发展前途, 将大分子植物多糖水解为低聚糖, 已成为大分子多糖开发、应用研究的热点。

目前大分子多糖主要采取化学降解法、酶降解法和物理降解法三种方法水解^[7]。胡芦巴中性多糖具有较高的应用价值, 作者所在的课题组及国内其他同行已经从不同角度对其进行研究, 主要集中在其粘度^[8]、流动

收稿日期 2005-07-29

*通讯作者

基金项目: “十五” 国家科技攻关计划基金项目 (2001BA502B03); 中全国供销合作总社科学技术发展项目

作者简介: 缪月秋 (1980-), 女, 在读硕士, 主要从事植物化学及天然活性物质研究。

性^[9,10]、降血糖^[11,12]等方面,而在其水解工艺和水解物的生物学特性等方面的尚缺乏较为系统的研究。本实验采用化学降解法以水解形成的低聚糖产量和其分子量大小作参照,对胡芦巴中性多糖的酸水解进行工艺优化的研究,以期为其水解工业化生产及其水解产物在食品、医药等领域的开发、应用提供有价值的研究资料。

1 材料与方法

1.1 仪器与设备

UV-754型紫外可见分光光度计 上海第三仪器厂;电热恒温水浴锅 江苏南通市通海电器厂;氧气减压器上海减压器厂;MA 系列电子天平 上海第二天平仪器厂等。

1.2 材料

胡芦巴中性多糖由中华全国供销合作总社南京野生植物综合利用研究院提供, Sephadex G-50 凝胶为 Pharmacia 公司产品,其余试剂均为分析纯。

1.3 方法

1.3.1 标准曲线的制备 参照张志良方法^[13],在625nm波长下测定吸光度(A),由含糖浓度(C)一吸光度(A)标准曲线拟合得回归方程: $A=0.0074C+0.0102$, $r=0.9937$ 。

1.3.2 总糖含量测定 精密称取50mg胡芦巴中性多糖置50ml容量瓶中,配成1mg/ml的溶液。按照标准曲线的测定方法测定吸光度,代入标准曲线方程中计算样品液的总糖含量。

1.3.3 还原糖含量的测定 采用DNS法^[14]。

1.3.4 还原糖得率的测定 胡芦巴中性多糖水解后,样液适当稀释后用DNS法测定水解液中以甘露糖计的还原糖量(mg/ml)。还原糖得率按下式公式计算。

$$\text{还原糖得率} = \frac{\text{还原糖含量(g)}}{\text{总糖含量(g)}} \times 100\%$$

1.3.5 葡聚糖凝胶层析 将按工艺条件制备所得样品溶于少量蒸馏水中, Sephadex G-50凝胶柱(1.8×75cm i.d)层析,以蒸馏水洗脱,流速0.5ml/min,硫酸-萘酮法检测。

1.3.6 高效液相色谱分析 色谱条件: Agilent 1100高效液相色谱仪, Zorbox NH₂柱(250×4.6mm i.d, 5μm),流动相V(乙腈):V(水)=70:30,柱温30℃,进样20μl,流速1.5ml/min,示差折光检测器。

1.3.7 脱色脱蛋白 采用活性炭法脱色, Sevag法脱蛋白。

1.3.8 统计学方法

采用SPSS13.0统计软件包。实验数据均为三次实验的平均值,采用Univariate进行分析,各处理之间差异采用Duncan检验,均以 $p < 0.05$ 为显著性差异。

2 结果与分析

2.1 胡芦巴中性多糖的酸水解

2.1.1 因素水平

在预实验的基础上,选择反应温度(A)、反应时间(B)、酸浓度(C)作为考查因素,每个因素选择三个水平做正交试验,因素水平见表1。

表1 因素水平表
Table 1 Factors and levels

水平	因素		
	A (°C)	B (h)	C (mol/L)
1	80	1	2
2	90	2	4
3	100	3	6

2.1.2 水解工艺的试验与结果

采用L₉(3⁴)正交表设计试验。精密称取300mg的胡芦巴中性多糖,充氮,在不同条件下反应后,用NaOH调pH至中性,终止反应。试验结果见表2。以还原糖得率为考查指标,经SPSS13.0软件分析表明,各因素的影响程度依次为B>A>C,且B因素对还原糖得率的影响达到显著水平($p < 0.05$),但A和C两因素未达到显著水平($p > 0.05$),即反应时间对还原糖得率的影响最大,其次是反应温度。

表2 L₉(3⁴)正交试验结果
Table 2 Results of L₉(3⁴)orthogonal test

试验号	A	B	C	D(空白)	水解率(%)
1	1	1	1	1	43.79
2	1	2	2	2	64.12
3	1	3	3	3	77.01
4	2	1	2	3	44.45
5	2	2	3	1	84.54
6	2	3	1	2	80.35
7	3	1	3	2	40.08
8	3	2	1	3	68.10
9	3	3	2	1	79.18

从表2中可见各试验方案的水解率高低不同,其中方案5最高达84.54%,方案7最低水解率仅为40.08%。按照试验5和7的工艺条件制备样品,所得样品的Sephadex G-50层析曲线分别见图1、2。图1的糖峰出现在68管,图2的糖峰出现在43管,表明试验方案5所得的水解低聚糖分子量明显小于试验方案7的水解产物。对图1和图2中洗脱峰分别进行扫描,其峰面积之比约为1/3,表明方案5所得低聚糖的量明显低于方案7所得的低聚糖。可见,在投入水解的胡芦巴多糖量一定的情况下,由于水解条件不同,直接影响水解的结果,其还原糖得率与水解低聚糖的产量存在反相关的关系,亦影响水解产物的分子量大小。从低聚糖的产量

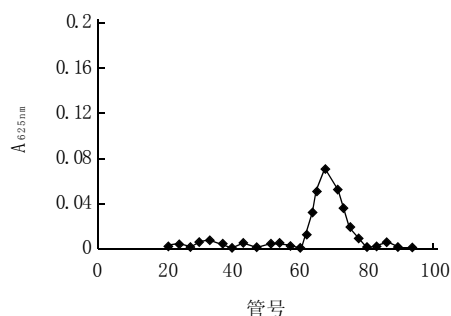


图1 方案5样品 Sephadex G-50 柱层析图
Fig.1 Separation of No.5 sample by Sephadex G-50

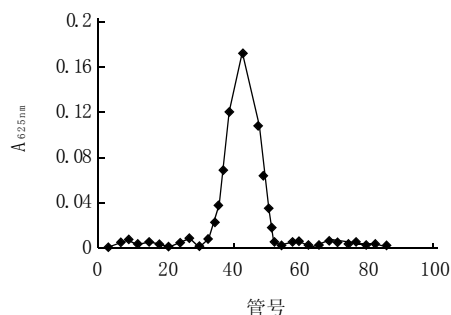


图2 方案7样品 Sephadex G-50 柱层析图
Fig.2 Separation of No.7 sample by Sephadex G-50

考虑可选用方案7 ($A_3B_1C_3$) 为最佳试验方案, 即 6mol/L 盐酸浓度, 100℃ 反应温度, 1h 反应时间为最佳试验条件。如果从水解所得低聚糖的分子量较小的角度考虑, 则可选用方案5 ($A_2B_2C_3$) 方案, 即 6mol/L 盐酸浓度, 90℃ 反应温度, 2h 反应时间为最佳试验条件。

2.2 验证实验

根据方案5和方案7的条件, 分别制备3份产品, 经脱色、脱蛋白, 真空干燥, 得浅黄色粉末状的样品。将样品溶解于水, 进行HPLC, 分别见图3和图4。图3中主峰含量为83.35%, 其保留时间3.555min落在单糖峰时间之间, 可判断其成分为单糖。另一峰的保留时间为4.463min, 含量为13.52%, 是分子量在300~750Da之间的低聚糖。表明在方案5条件下, 葫芦巴胶中性多糖几乎85%以上水解为单糖, 低聚糖的得率仅为13.52%, 可能是因为水解条件过于剧烈, 所得低聚糖含量较少且分子量较小。图4中三个主峰的保留时间分别为3.380、4.130和4.498min, 除第一个峰落在单糖保留时间内以外, 其余两个峰均为低聚糖, 三个峰的含量依次为41.98%、12.05%、31.92%。表明在方案7条件下, 水解产物主要为三种, 其中单糖占41.98%, 其余的为低聚糖, 含量已达到43.97%, 分子量范围在500~1000Da。此外, 图3中保留时间4.463min峰的含量与图4中后两主峰的含量之比约为1/3, 这与图1和图2的洗脱峰面积之比相一致。葫芦巴中性多糖水解物经

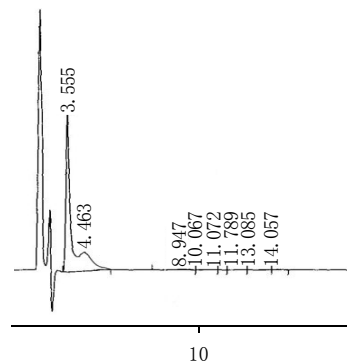


图3 方案5样品高效液相色谱图
Fig.3 The HPLC chromatogram of No.5 sample

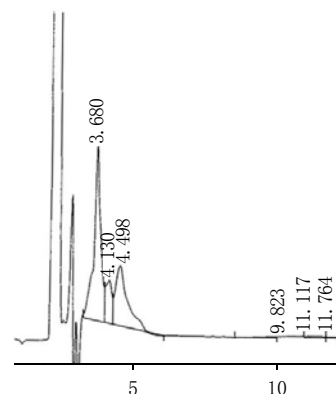


图4 方案7样品高效液相色谱图
Fig.4 The HPLC chromatogram of No.7 sample

Sephadex G-50柱层析后所得的低聚糖(图1和图2中糖峰收集物)经单糖组分鉴定, 其分子组成为半乳糖和甘露糖。

3 讨论

低聚糖又称寡糖, 是多糖水解后得产物之一, 由2至10个单糖单位通过糖苷键连接起来的一类糖。低聚糖分子量低, 容易被吸收利用, 目前有报道, 称其有多种生物学活性^[5,6]。国内外现已把低聚糖广泛用作食品或饲料添加剂, 或直接用作保健食品^[15]。本实验通过正交试验法优选葫芦巴胶酸水解的最佳工艺, 以利于提取、纯化寡糖, 为进一步探讨其生物活性及药理药效奠定基础。

由于对多糖酸水解起主要作用的因素有酸浓度、反应温度和反应时间等, 因此选择了这3个因素进行考查, 采取了 $L_9(3^4)$ 的正交设计试验。从试验的结果看, 如果以低聚糖的产物量为衡量指标, 最好的组合方式是 $A_3B_1C_3$, 其中反应时间对得率影响最大, 已达到显著水平($p < 0.05$)。而如果从获得较小分子量的低聚糖考虑, 则最好的组合方式为 $A_2B_2C_3$ 。其后的验证实验表明 $A_3B_1C_3$ 的组合低聚糖得率较高, $A_2B_2C_3$ 的组合分子量明显较前者小。作者正在对这两类低聚糖的生物学活

几种添加剂对油炸薯片中丙烯酰胺产生的抑制作用

欧仕益, 张玉萍, 黄才欢, 李绪杰, 梁灿明, 欧云付
(暨南大学食品科学与工程系, 广东 广州 510632)

摘 要: 采用葡萄糖-天冬酰胺模拟反应体系研究了阿魏酸、儿茶素、 CaCl_2 、 NaHSO_3 、VC、L-半胱氨酸等物质对丙烯酰胺产生的抑制作用, 筛选出了抑制效果良好的三种添加剂 NaHSO_3 、 CaCl_2 和半胱氨酸。分别用0.1%、0.3%和0.5%的 NaHSO_3 、 CaCl_2 和半胱氨酸在油炸前浸泡土豆片, 发现它们都能显著减少油炸土豆片中丙烯酰胺的产生; 当半胱氨酸和 CaCl_2 浓度分别为0.3%和0.5%时, 油炸薯片中检测不到丙烯酰胺。

关键词: 丙烯酰胺; 添加剂; 抑制

Inhibition of Acrylamide Formation in Fried Potato Crisps by Some Food Additives

OU Shi-yi, ZHANG Yu-ping, HUANG Cai-huan, LI Xu-jie, LIANG Can-ming, OU Yun-fu
(Department of Food Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: A glucose-asparagines reaction model system was used to test the effect of ferulic acid, catechin, CaCl_2 , NaHSO_3 , vitamin C and L-cysteine on inhibition of acrylamide formation and it was found that NaHSO_3 , CaCl_2 and L-cysteine significantly

收稿日期: 2005-07-28

基金项目: 广东省科技攻关项目(2003C20410); 广东省自然科学基金项目(031899); 粤港招标重大项目(2005A20501003)

作者简介: 欧仕益(1963-), 教授, 博士, 主要从事食品化学和功能性食品研究。

性的区别作进一步的探讨。

酸水解实验表明, 反应温度高, 盐酸浓度大, 水解条件过于剧烈, 产物分子量也不易控制, 而且对环境造成了巨大的污染。有文献报道^{[7][16]}, 酶解反应温度比酸解低, 水解条件相对温和, 降解过程和降解产物的分子量易于控制, 而且不会造成环境污染, 酶解更适于工业化生产。关于酶解的工作我们也正在进一步研究之中。

参考文献:

- [1] 王宗训. 中国资源植物利用手册[M]. 北京: 中国科技出版社, 1989. 463-465.
- [2] Bociek M S, Izzard J M, Morrison A, et al. The ^{13}C -NMR spectra of (1-6) α -D-galactosyl-(1-4) β -D-mannans[J]. Carbohydr Res, 1981, 93: 279-283.
- [3] 李欣, 范明娟, 冯廉彬, 等. 24种豆科植物的半乳甘露聚糖胶的分析[J]. 植物学报, 1980, 14(4): 323-328.
- [4] Madar Z, Shomer I J. Polysaccharides composition of gel fraction derived from fenugreek and its effect on starch digestion and bile acid absorption in rats[J]. Agric food Chem, 1990, 38: 1535-1595.
- [5] 金其荣. 低聚糖及根霉低聚糖生理功能[J]. 食品科学, 1994, (1): 5.
- [6] 宁君, 孔繁祚. 具有重要生理活性寡糖的发现及其应用[J]. 科技前沿与学术评论, 1999, (1): 22-23.
- [7] 赖萍, 林跃鑫. 天然多糖分子修饰研究进展[J]. 生命的化学, 2003, 23(3): 183-187.
- [8] 蒋建新, 张卫明, 等. 胶粉粒径对植物多糖胶粘度的影响[J]. 中国野生植物资源, 2003, 10: 65-66.
- [9] 姚健, 郭守军, 丁兰, 等. 葫芦巴胶粗粉的流变性研究[J]. 西北师范大学学报, 1999, (4): 55-57.
- [10] 郭守军, 杨永利, 张继, 等. 热水溶葫芦巴胶的流变性研究[J]. 西北植物学报, 1999, 19(6): 185-188.
- [11] 蒋建新, 朱莉伟, 张卫明, 等. 食品级葫芦巴胶及其降血糖功效的研究[J]. 食品科学, 2002, 23: 123-125.
- [12] 丁霄霖, 方涛. 葫芦巴胶的降血糖疗效[J]. 无锡轻工大学学报, 1999, (1): 16-20.
- [13] 张志良. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990. 160.
- [14] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999. 10-11.
- [15] 郭敏辰. β -甘露聚糖酶及其水解产物的应用研究[J]. 江苏调味副品, 2001, 69: 6-7.
- [16] 严钦, 沈月新, 王隼. 壳寡糖制备研究进展[J]. 上海水产大学学报, 2002, (12): 383-387.