

# 燕麦中 $\beta$ - 葡聚糖的分离纯化及结构表征

汪海波<sup>1,2</sup>, 谢笔钧<sup>2</sup>, 刘大川<sup>1</sup>, 汪海婴<sup>3</sup>

(1. 武汉工业学院食品系, 湖北 武汉 430022; 2. 华中农业大学食品系, 湖北 武汉 430000;

3. 华中科技大学同济医学院基础部, 湖北 武汉 430000)

**摘 要:** 以我国山西产燕麦(晋燕8号)为原料提取并分离纯化, 得到Oglu-1和Oglu-2两个燕麦 $\beta$ -葡聚糖级分, 经凝胶渗透色谱层析和Sephacryl-400SF柱层析, 证实Oglu-1为单一组分, 纸层析和HPLC分析表明该级分多糖由葡萄糖为单一糖基组成, 红外光谱和核磁共振分析证明该多糖分子链中存在 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)和 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)两种糖苷键, 其比例为2.1:1, 该结果与国外学者的研究基本一致。采用凝胶渗透色谱和激光光散射联用仪(GPC-LLS)测定Oglu-1的重均相对分子质量为 $4.49 \times 10^5$ 。

**关键词:** 燕麦;  $\beta$ -葡聚糖; 结构分析

## Separation, Purification and Structural Analysis of $\beta$ -glucan from Oat

WANG Hai-bo<sup>1,2</sup>, XIE Bi-jun<sup>2</sup>, LIU Da-chuan<sup>1</sup>, WANG Hai-ying<sup>3</sup>

(1. Food Science and Engineering Department, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430000, China

2. Food Science Department, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430000, China

3. Basic Department, College of Tongji Medicine, Huazhong Science University, Wuhan 430000, China)

**Abstract:** Two kinds of  $\beta$ -glucan, Oglu-1 and Oglu-2, were extract and purified from Oat. Oglu-1 was shown to be a single homogeneous component by GPC and Sephacryl-400SF column chromatography. It was found that Oglu-1 was composed of glucose units only and joined by  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 4) and  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 3) linkage with the linkage number ratio 2.1:1 by using the methods of paper chromatography, UV, IR, NMR and HPLC. The molecular average-weight of Oglu-1 is  $4.49 \times 10^5$  was determined by GPC-LLS.

**Key words:** Oat;  $\beta$ -glucan; structural analysis

中图分类号: Q539

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)12-0090-04

近年来的诸多研究表明, 大麦及燕麦中的 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-(1 $\rightarrow$ 4)-D-葡聚糖(以下简称 $\beta$ -葡聚糖)具有显著的降血脂、降血糖及提高机体免疫能力等多种重要生理功效, 从而使之成为研究热点<sup>[1~3]</sup>。关于 $\beta$ -葡聚糖的一级结构, 国外学者已进行了大量研究工作, 现已确定该多糖是由D-葡萄糖以 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)和 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)糖苷键连接而成的线型多糖, 这两种糖苷键的比例约为7:3<sup>[4~6]</sup>。我国关于燕麦和大麦 $\beta$ -葡聚糖的研究工作起步较晚, 有关我国大麦及燕麦品种中 $\beta$ -葡聚糖分子的一级结构研究至今尚未见报道。为此, 本文首次以我国产燕麦品种(晋燕8号)为原料, 提取分离纯化 $\beta$ -葡聚糖(以下简称Oglu), 并通过高效液相色谱、紫外、红外光谱分析和核磁共振碳谱及氢谱分析对燕麦 $\beta$ -葡聚糖Oglu-1级分的一级结构进行结构表征。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 燕麦原料

山西产燕麦(品种: 晋燕8号) 山西省农科院高寒作物研究所提供。燕麦全籽经布勒磨粉机和布勒打麸机处理分离得到燕麦麸皮, 麸皮进一步粉碎后过筛备用。

#### 1.1.2 主要实验试剂与仪器

Sephacryl-400SF Pharmacia公司, 美国 层析用聚酰胺(30~50目) 青岛海洋化学试剂厂; 考马斯亮兰G-25 武汉大风生物技术有限公司进口分装; 木糖、阿拉伯糖、葡萄糖、半乳糖等生化试剂为武汉大风生物技术有限公司进口分装, 乙醇等其他化学试剂均为国产分析纯。

收稿日期: 2004-12-29

作者简介: 汪海波(1971-), 男, 副教授, 博士, 研究方向为食品化学与天然活性产物。

高效液相色谱仪 美国 Waters 公司; 傅立叶红外光谱 Lg105-2 型, 美国尼高; 激光光散射仪 DLS-700, 日本; 超导核磁共振仪 Bruker DMX-500, 美国; 紫外可见分光光度计 Cary-50, 美国 Varian。

## 1.2 方法

### 1.2.1 燕麦 $\beta$ -葡聚糖的分离纯化

山西产晋燕 8 号燕麦经布勒磨粉机处理分离麸皮, 粉碎过 60 目筛后称重, 以无水乙醇沸腾回流灭内源性  $\beta$ -葡聚糖酶 30min 后离心, 残渣用 50℃ 温水搅拌浸提二次(料液比 1:10), 每次 60min, 得到多糖的浸提液, 调等电点脱蛋白后淋洗过活性炭柱脱色, 减压浓缩, 加入无水乙醇至乙醇总浓度为 50%, 沉淀, 得到燕麦  $\beta$ -葡聚糖粗提物。粗燕麦多糖用水重新溶解后加入  $\alpha$ -淀粉酶在 90℃ 条件下酶解淀粉至酶解液遇碘液不显兰色, 加入无水乙醇再次沉淀得到燕麦葡聚糖半纯品, 相对于燕麦原料其得率约为 1.8%。半纯品进一步用聚酰胺柱层析分级, 分别用水和 0.1mol/L NaOH 洗脱。收集各洗脱峰, NaOH 洗脱部分用 20% HCl 中和后透析脱盐, 所有洗脱液减压浓缩后用无水乙醇再次沉淀 2 次, 冷冻干燥得到  $\beta$ -葡聚糖纯品。经水洗脱得到 1 个主  $\beta$ -葡聚糖洗脱峰, 命名为 Oglu-1; 0.1mol/L NaOH 洗脱得到一个小峰, 命名为 Oglu-2。Oglu-1 和 Oglu-2 相对于上样量的得率分别为: 56% 和 0.8%(Oglu-2 的得率过低, 故未作进一步研究)。

### 1.2.2 多糖纯度鉴定

#### 1.2.2.1 凝胶渗透色谱层析

Oglu-1 样品配制 0.15mg/ml 溶液, 在下述条件下测定: 采用 TSK-gel G4000 HHR 柱, 示差检测器 RI-150, P100 泵及恒温炉, 流动相 0.2mol/L NaCl, 流速 0.5ml/min, 运行时间 30min。根据峰数目和峰的对称性判断多糖的纯度。

#### 1.2.2.2 Sephacryl-400SF 柱层析

10.0mg 样品溶于最小体积的去离子水中, 上 Sephacryl-400SF 柱( $\Phi$  1.6 × 70cm), 用去离子水洗脱, 流速 0.2ml/min, 分部收集(12min/管)。改进荧光法<sup>[7]</sup>跟踪检测  $\beta$ -葡聚糖含量, 以洗脱溶液的管数为横坐标, 吸光值为纵坐标作图。

### 1.2.3 燕麦 $\beta$ -葡聚糖一级结构表征

#### 1.2.3.1 单糖组成分析

A: 多糖的完全水解:

10.0mg 燕麦  $\beta$ -葡聚糖 Oglu-1 加入 1mol/L 硫酸 2ml, 充 N<sub>2</sub> 封管, 100℃ 水解 5h, 用饱和 Ba(OH)<sub>2</sub> 中和, 过滤, 用去离子水洗涤沉淀数次, 合并滤液, 冷冻干燥后, 用 2ml 蒸馏水溶解备用。

B: 纸层析:

多糖水解样品和半乳糖、木糖、葡萄糖及甘露糖标准品点样后在正丁醇:乙酸:水=4:1:5(V/V/V)溶剂系统中展开, 苯胺-邻苯二甲酸显色剂(1.0ml 苯胺和 1.66g 邻苯二甲酸溶于 100ml 水饱和正丁醇中)显色。

C: 高效液相色谱法分析:

色谱条件: 采用 Waters 高效液相色谱系统, 色谱柱 Sugar Pak I (300 × 6.5mm ID Waters)、流动相为重蒸水、流速 0.4ml/min、柱温 85℃、灵敏度  $8 \times 10^{-6}$  RIU, 示差检测器, CR-3A 自动积分仪, 分别以葡萄糖、甘露糖、半乳糖和木糖为标准品, 标准品进样量 10  $\mu$ l, 多糖水解样品进样量 25  $\mu$ l。

#### 1.2.3.2 红外光谱分析

Oglu-1 经 KBr 压片, 于红外光谱仪上扫描分析, 扫描范围为 4000~400cm<sup>-1</sup>。

#### 1.2.3.3 核磁共振 <sup>1</sup>H NMR 和 <sup>13</sup>C NMR 分析

将多糖样品 Oglu-1 溶于碱性重水(D<sub>2</sub>O)中, 5ml 样品管, 测定温度为室温, 在 Bruker DMX(500 仪器上测其核磁共振波谱。500MHz NMR 测氢谱, 125MHz NMR 测碳谱。

#### 1.2.3.4 相对分子质量测定

采用凝胶渗透色谱和激光光散射联用仪(GPC-LLS)测定燕麦多糖的重均相对分子质量(M<sub>w</sub>)、平均相对分子质量(M<sub>n</sub>)和多分散系数(M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub>)。测定条件: DAWN-DSP 多角光散射仪, 配置 P100 泵、TSK-GEL G6000PWXL 柱( $\Phi$  7.8 × 300mm)和示差检测器(RI-150), 色谱柱温 25℃, 流动相为 0.2mol/L NaCl, 流速 1.0ml/min, 激光波长 632.8nm。数据处理采用 Astra 软件。

## 2 结果与讨论

### 2.1 燕麦 $\beta$ -葡聚糖的分级纯化

冷冻干燥得到的 Oglu-1 和 Oglu-2 均为纤维状白色固体, 经紫外分光光度法检测除 200nm 处有多糖特征吸收峰外, 无核酸(260nm)、蛋白质(280nm)及色素(600nm)等杂质峰。分别采用 TSK 凝胶渗透色谱和 Sephacryl-400SF 柱色谱对 Oglu-1 级分进行纯度鉴定, 均得到一个单一对称的单峰(图 1, 图 2), 证明该多糖级分为分子量分布较为均一的纯品。

### 2.2 燕麦 $\beta$ -葡聚糖一级结构表征

#### 2.2.1 单糖组成分析

Oglu-1 样品经水解后分别采用纸色谱和 HPLC 分析其单糖组成。Oglu-1 水解样品纸色谱为单一斑点, 比移值(R<sub>f</sub>)为 0.29, 与葡萄糖标准品的比移值一致; HPLC 测定其为一单峰(图 3), 保留时间为 13.5min, 与葡萄糖保留时间一致, 表明该多糖是由葡萄糖为单一糖基组成的葡聚糖。

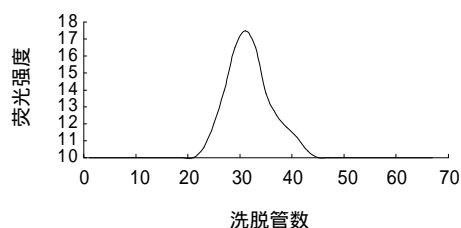


图1 Sephacryl-400SF 凝胶柱色谱

Fig.1 Gel chromatographic isolation of Oglu-1 on Sephacryl-400SF column

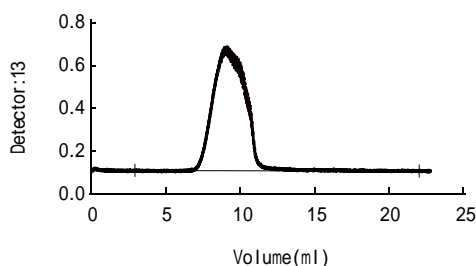
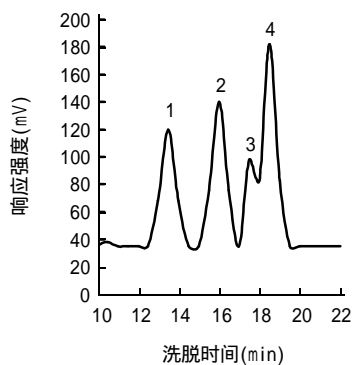
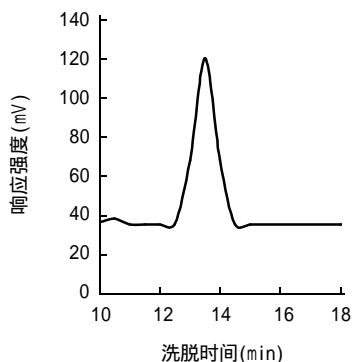


图2 燕麦葡聚糖凝胶渗透色谱图

Fig.2 The GPC map of Oglu-1



a 标样



b 样品

1. Glu 2. Man 3. Gal 4. Xyl

图3 标准单糖(a)和燕麦多糖水解物(b)液相色谱分析

Fig.3 HPLC of standard monosaccharides(a) and Oglu-1 hydrolysate(b)

从Oglu-1的红外光谱图(图4)可看出该多糖具有以下结构特征:  $3500\sim 3100\text{cm}^{-1}$  的宽峰是 O-H 和 C-H 的伸缩振动, 为糖类物质的特征吸收, 该峰出现在  $3400\text{cm}^{-1}$  左右, 说明存在着明显的分子间氢键。在  $3000\sim 2800\text{cm}^{-1}$  的一组峰是糖类 C-H 伸缩振动,  $1400\sim 1200\text{cm}^{-1}$  的一组峰是糖类的 C-H 变角振动, 由这两组峰则可初步判断该化合物为糖类化合物。 $1643\text{cm}^{-1}$  处的一弱吸收峰说明燕麦多糖有少量结晶水存在,  $1650\sim 1500\text{cm}^{-1}$  无吸收谱带, 说明无蛋白质存在。 $1200\sim 1000\text{cm}^{-1}$  的强吸收峰是吡喃糖环的醚键(C-O-C)和羟基的吸收峰。 $894\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰是  $\beta$ -D-吡喃葡萄糖的特征吸收。根据红外光谱分析可推测 Oglu-1 是含有  $\beta$ -D-吡喃葡萄糖环的非蛋白质单一多糖。

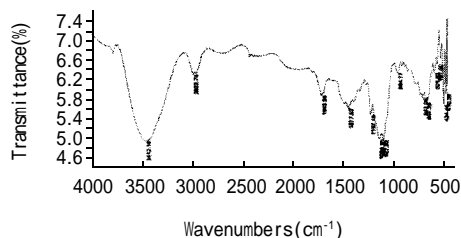


图4 燕麦葡聚糖的红外光谱图

Fig.4 IR spectrum of Oglu-1

### 2.2.3 核磁共振分析

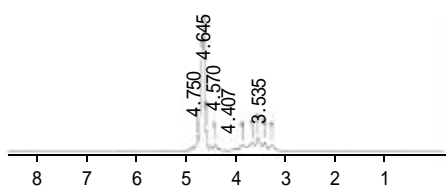
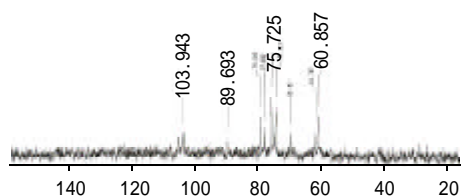
$^1\text{H}$ NMR 谱图中, 多糖的信号大多数集中在  $\delta 3.5 \times 10^{-6} \sim 5.5 \times 10^{-6}$  狭小的范围内,  $\delta 3.5 \times 10^{-6} \sim 4.5 \times 10^{-6}$  为糖环质子位移信号。一般(构型糖苷的异头碳上氢的共振比(构型糖苷向低场位移  $0.3 \times 10^{-6} \sim 0.5 \times 10^{-6}$ , 前者一般出现在  $\delta 4.8 \times 10^{-6} \sim 5.3 \times 10^{-6}$ , 而后者一般出现在  $\delta 4.4 \times 10^{-6} \sim 4.8 \times 10^{-6}$  处。Oglu-1 只在小于  $\delta 5.0 \times 10^{-6}$  处有信号(图5), 因此表明它只存在  $\beta$ -糖苷键构型。

结合  $\beta$ -葡聚糖分子结构模拟图(图7)分析燕麦葡聚糖  $^{13}\text{C}$ NMR 谱(图6), 其特征信号归属分析见表1。从  $^{13}\text{C}$ NMR 谱可以清楚的看出该多糖只存在一种单糖糖基(在  $99 \times 10^{-6} \sim 110 \times 10^{-6}$  共振范围清楚呈现1个共振信号)。 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)和  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)糖苷键的比例可通过(b)糖环上的C-3的化学位移谱线( $89.69 \times 10^{-6}$ )强度与(a)、(c)、(d)糖环上的C-4的化学位移谱线( $79.18 \times 10^{-6}$ )强度之比来衡量(谱线高度比)<sup>[8]</sup>, 经测算其二者之比大致为2.1, 说明本次测定的燕麦葡聚糖分子链中  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)和  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)糖苷键数量之比约为2.1:1, 与国外学者的研究结果基本一致。

### 2.2.4 相对分子质量测定

采用凝胶渗透色谱和激光光散射联用仪(GPC-LLS)测定燕麦葡聚糖 Oglu-1 和 Oglu-2 的相对分子质量, 其测定结果如表2所示。Oglu-1 的重均相对分子质量( $M_w$ )为  $4.49 \times 10^5$ , 多分散系数( $M_w/M_n$ )为1.320, 说明其分子

### 2.2.2 红外光谱分析

图5 燕麦葡聚糖Oglu-1的<sup>1</sup>H NMR图谱Fig.5 <sup>1</sup>H NMR spectrum of Oglu-1图6 燕麦葡聚糖Oglu-1的<sup>13</sup>C NMR图谱Fig.6 <sup>13</sup>C NMR spectrum of Oglu-1表1 燕麦葡聚糖的<sup>13</sup>C NMR特征信号Table 1 Characteristic shift signals of <sup>13</sup>C NMR of Oglu-1

化学位移( $\times 10^{-6}$ )	信号来源
103.9	C-1 of (c) glycosyl
89.69	C-3 of (b) glycosyl
79.18	C-4 of (a), (c) and (d) glycosyl
77.84	C-5 of (b) glycosyl
75.72	C-3 of (a), (c) and (d) glycosyl
74.18	C-5 of (a), (c) and (d) glycosyl
69.45	C-4 of (b) glycosyl
61.74	C-6 of (b) glycosyl
60.85	C-6 of (a), (c) and (d) glycosyl

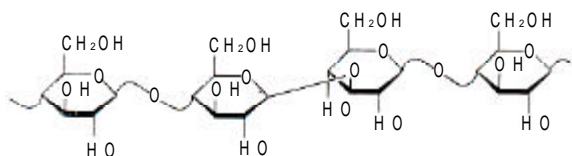


图7 燕麦葡聚糖分子链结构模拟图

Fig.7 The simulated chart of molecule structure of Oglu-1

量分布相对均一。Oglu-2的重均相对分子质量为 $1.65 \times 10^5$ ，多分散系数为1.678，远大于Oglu-1，说明其分子量分布极不均匀，同时该组分在燕麦葡聚糖组分中仅占极少部分，推测该多糖组分可能含有提取纯化过程中

表2 燕麦葡聚糖相对分子质量的测定

Table 2 Experimental results of molecular weights of Oglu

样品	$M_n \times 10^4$	$M_w \times 10^4$	$M_w / M_n$
Oglu-1	34.03	44.91	1.320
Oglu-2	9.84	16.51	1.678

的部分降解级分。

参考文献：

- [1] Bourdon I, Yokoyama W, Davis P, et al. Postprandial lipid, glucose, insulin, and cholecystokinin responses in men fed barley pasta enriched with beta-glucan[J]. Am J Clin Nutr, 1999, 69(1): 55-63.
- [2] Tappy L, Gugolz E, Wursch P. Effects of breakfast cereals containing various amounts of beta-glucan fibers on plasma glucose and insulin responses in NIDDM subjects[J]. Diabetic Care, 1996, 19(8): 831-834.
- [3] Braaten J T, Wood P J, Scott F W, et al. Oat beta-glucan reduces blood cholesterol concentration in hypercholesterolemic subjects[J]. Eur J Clin Nutr, 1994, 48(7): 465-474.
- [4] Izawa M, Kano Y, Koshino S. Relationship between structure and solubility of (1 leads to 3), (1 leads to 4)-beta-D-glucan from barley[J]. J Am Soc Brew Chem, 1993, 51(3): 123-127.
- [5] Morgan K R, Roberts C J, Tendler S J B, et al. A <sup>13</sup>C CP/MAS NMR spectroscopy and AFM study of the structure of Glucagel, a gelling beta-glucan from barley[J]. Carbohydr Res, 1999, 315(1/2): 169-179.
- [6] Yamamoto R, Nevins D J. Structural studies on the beta-D-glucan of the Avena [oat] coleoptile cell wall[J]. Carbohydr Res, 1978, 67(1): 275-280.
- [7] 汪海波, 刘大川, 谢笔钧, 等. 改进荧光法测定β-葡聚糖含量研究[J]. 中国粮油学报, 2004, 19(1): 70-74.
- [8] Wood P J, Weisz J, Blackwell B A. Structural studies of (1 leads to 3), (1 lead to 4)-beta-D-glucans by <sup>13</sup>C-nuclear magnetic resonance spectroscopy and by rapid analysis of cellulose-like regions using high-performance anion-exchange chromatography of oligosaccharides released by lichenase[J]. Cereal Chem, 1994, 71(3): 301-307.

## 信息

## 研究人员发现可以用糖来生产塑料

近日，由陶氏德国公司和德国 Fraunhofer 化工研究所联合进行的一项课题，找到了把糖转化成为短链多元醇的方法。目前，这些短链多元醇是石化企业生产聚酯和聚合亚胺酯的原料。这意味着在不久的将来，人们可以用糖，无论葡萄糖、蔗糖或者果糖，来代替原油，作为生产塑料的原材料。科研人员下阶段的工作是继续进行试验，以验证其它的碳水化合物，如淀粉和纤维素，是否有同样的结果。