

β -葡聚糖提取分离工艺及其分子量测定研究

潘妍, 吴昊, 罗晶杰, 何聪芬, 董银卯, 王昌涛*
(北京工商大学 植物资源研究开发北京市重点实验室, 北京 100048)

摘要: 利用单因素和正交试验研究不同因素的不同水平对水提燕麦成分 β -葡聚糖的工艺条件的影响。结果表明: β -葡聚糖的最佳提取工艺为提取温度 80℃、液料比 25:1(ml/g)、pH11、提取时间 4h, 影响因素由大到小依次为提取温度、pH 值、液料比和提取时间, 在此最佳工艺条件下得率达 17.30mg/g 左右。再将提取的粗 β -葡聚糖进行纯化, 纯度为 75.30%, 由此可用高效凝胶色谱测定其分子量, 得到其平均分子量为 9.697×10^5 , 平均分子半径为 83.8nm, 分子构型接近于球状。

关键词: β -葡聚糖; 正交试验; 平均分子量

GPC Determination of Molecular Weight and Extraction of Beta-glucan from Oat Bran

PAN Yan, WU Hao, LUO Jing-jie, HE Cong-fen, DONG Yin-mao, WANG Chang-tao*
(Beijing Key Laboratory of Plant Resources Research and Development, Beijing Technology and Business University,
Beijing 100048, China)

Abstract: Single factor and orthogonal array design experiments were conducted for optimization of hot water extraction of β -glucan from oat bran. Results showed that an optimum β -glucan yield of 17.30 mg/g was achieved under the following conditions: extraction for 4 h using 80 °C water at pH 11 with a ratio of liquid to material of 25:1 (ml/g); β -glucan yield was significantly influenced by ratio of liquid to material, followed in turn by extraction temperature, pH and time. In the following, β -glucan with a purity of 75.30% was obtained by purification and characterized by high performance gel permeation chromatography (GPC). GPC analysis revealed that the average molecular weight and molecular radius of β -glucan were 9.697×10^5 and 83.8 nm, respectively, and its structure was approximately spherical.

Key words: β -glucan; orthogonal array design; average molecular weight

中图分类号: S512.6

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)20-0049-04

燕麦是谷物中的全价营养食品。它富含蛋白质、不饱和脂肪酸和维生素等, 其中最引人关注的是燕麦中含有丰富的 β -葡聚糖^[1], β -葡聚糖具有清肠、降低胆固醇、降血糖、预防大肠癌等主要生理功能^[2-6], 使其成为国内外研究热点。用刚果红分光光度比色法研究 β -葡聚糖得率, 因操作简单方便、成本低而被不少研究者采用^[7]。本实验通过单因素和正交试验设计方案筛选燕麦中 β -葡聚糖的最佳工艺条件, 并采用高效凝胶色谱法对纯化的燕麦 β -葡聚糖进行分子量测定, 以期能为今后的研究工作提供一定的参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

燕麦麸皮(20~60目) 河北省张家口市农业科学院燕麦研究所。

1.2 仪器与试剂

PHS-3D pH计 上海三信仪表厂; 3-18K 离心机 Sigma 公司; HH-1 数显恒温水浴锅 国华电器有限公司; DSHZ-300 多用途水浴恒温振荡 江苏太仓市实验设备厂; 新世纪 T2 紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限公司; 高效凝胶色谱: LC-20AD 型泵、CTO-20A 型柱温箱 Shimadzu 公司, SB-803HQ 水溶性凝胶柱、SB-806HQ 线性水溶性凝胶柱、SB-G 保护柱、HELEOS-II 型激光多角度检测器、VEX 型示差检测器 美国 Wyatt 公司。

1.3 方法

收稿日期: 2009-07-11

基金项目: 北京市教委科技面上项目(KM200810011010)

作者简介: 潘妍(1984—), 女, 硕士研究生, 研究方向为应用生物技术。E-mail: panyan416@yahoo.com.cn

* 通讯作者: 王昌涛(1975—), 男, 讲师, 博士, 研究方向为功能性食品。E-mail: wangct@th.btbu.edu.cn

条件进行提取,得到 β -葡聚糖提取率为17.23mg/g左右。

2.1.2 正交试验优化 β -葡聚糖的提取

在单因素试验基础上,采用正交试验分析法进一步优化 β -葡聚糖的提取条件,以 β -葡聚糖得率为指标,以得到最佳提取工艺条件。

表1 正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels in the four-factor, three-level orthogonal array design

水平	因素			
	A 提取温度(°C)	B 液料比	C pH	D 提取时间(h)
1	60	20:1	9	3
2	70	25:1	10	4
3	80	30:1	11	5

表2 正交试验结果

Table 2 Arrangement of the four-factor, three-level orthogonal array design and experimental results

试验号	A	B	C	D	β -葡聚糖得率(mg/g)		
1	1	1	1	1	9.51	9.67	9.62
2	1	2	2	2	14.45	14.59	14.53
3	1	3	3	3	14.85	15.25	15.10
4	2	1	2	3	12.91	12.77	12.88
5	2	2	3	1	16.69	17.02	16.87
6	2	3	1	2	15.09	15.05	14.99
7	3	1	3	2	16.77	16.64	16.78
8	3	2	1	3	15.77	15.61	15.84
9	3	3	2	1	16.36	16.20	16.28
K_1	39.18	39.18	40.38	42.75			
K_2	44.76	47.13	43.65	46.29			
K_3	48.75	46.38	48.66	43.65			
k_1	13.06	13.06	13.46	14.25			
k_2	14.92	15.71	14.55	15.43			
k_3	16.25	15.46	16.22	14.55			
R	3.19	2.65	2.76	1.19			

表3 方差分析结果

Table 3 ANOVA for β -glucan yield with various extraction conditions

因素	平方和	自由度	均方	F值	显著性
组间差异	0.015	2	0.0076	0.57	不显著
A	46.11	2	23.05	1730.60	极显著
B	32.51	2	19.25	1245.22	极显著
C	34.72	2	17.36	1303.17	极显著
D	6.82	2	3.41	255.83	极显著

由表2、3可知,四个因素对 β -葡聚糖得率均有极显著影响,影响大小为 $A > C > B > D$,即分别为提取温度、pH值、液料比和提取时间;确定最佳提取工艺组合为 $A_3B_2C_3D_2$,即提取温度80°C、液料比25:1(ml/g)、pH11、提取时间4h。

用正交最佳组合进行试验,得到 β -葡聚糖得率在17.30mg/g左右,与单因素试验结果相吻合。正交与单因素试验都得到最佳工艺条件为提取温度80°C、液料比

25:1(ml/g)、pH11、提取时间4h。

2.2 β -葡聚糖的纯化

燕麦麸皮中存在大量的蛋白质是造成最终产品纯度低的一个主要原因。从操作性和经济成本来考虑,本实验采用等电点沉淀法去除蛋白质。提取过程中,由于温度的升高,淀粉在提取液中糊化和 β -葡聚糖一起提取出来,因此也要将淀粉除去。本实验用高温 α -淀粉酶在80°C将淀粉出去。蛋白质和淀粉去除过程中燕麦粗提液中 β -葡聚糖、蛋白和总糖的变化见图2。

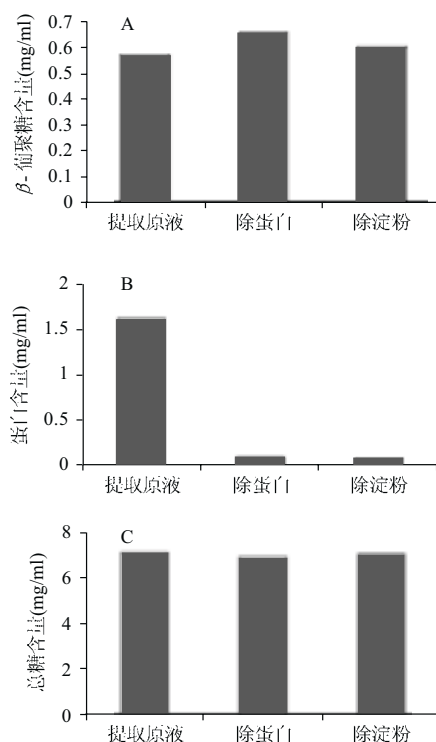


图2 纯化过程中营养成分的含量变化

Fig.2 Changes of β -glucan, protein and total sugar contents of water extract of oat bran during purification

从图2A、2C中可以看出,在去除蛋白和淀粉的过程中 β -葡聚糖的含量和总糖含量几乎没有变化。图2A中在除去蛋白后, β -葡聚糖有少量增加,这可能是由于少量与蛋白结合的 β -葡聚糖由于蛋白的沉淀而析出,从而溶于燕麦粗提液中。在除淀粉这一步, β -葡聚糖有少量损失。从图2B可以看出,调pH值到4.5后,大量蛋白被沉淀出来。由此最终得到的 β -葡聚糖纯度达到75.30%。

2.3 β -葡聚糖分子量测定

用高效凝胶色谱测定分子量,通过ASTRA 5.3.4.13软件分析可得到相关结果见图3~5和表4。

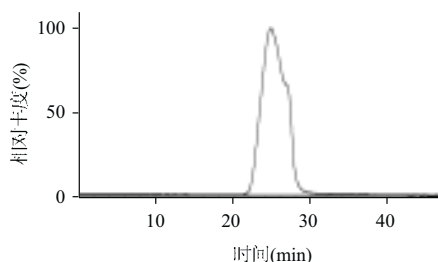


图3 燕麦β-葡聚糖分子量测定色谱图

Fig.3 GPC of chromatogram of oat bran β-glucan

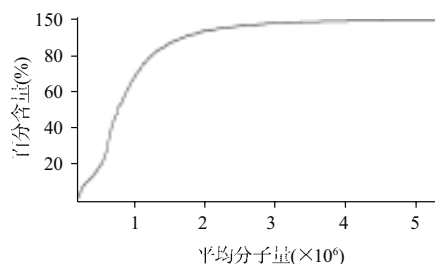


图4 燕麦β-葡聚糖分子量分布情况

Fig.4 Molecular weight distribution of oat bran β-glucan

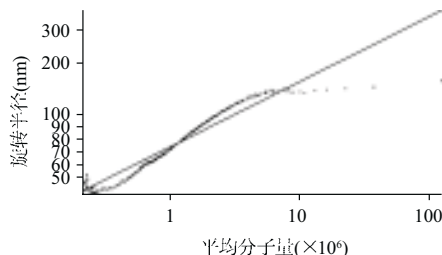


图5 燕麦β-葡聚糖分子的形状分析

Fig.5 Molecular radius-average molecular weight plot for conformational analysis of oat bran β-glucan molecular

表4 燕麦β-葡聚糖分子量

Table 4 Average molecular weight and molecular radius of oat bran β-glucan

	重均分子量(M_w)/数均分子量(M_n)	平均分子量	平均分子半径(nm)
燕麦β-葡聚糖	1.426	9.697×10^5	83.8
误差(%)	1	0.9	0.5

由表4可知,燕麦β-葡聚糖粗品的平均分子量为 9.697×10^5 ,平均分子半径为83.8nm。重均分子量(M_w)/数均分子量(M_n)值为1.426,接近于1,说明β-葡聚糖粗品中分子量分布集中在平均分子量左右(图4)。其中重均分子量(M_w)表示聚合物中用不同分子量的分子重量平均的统计平均分子量,数均分子量(M_n)表示聚合物中用不同分子量的分子数目平均的统计平均分子量。图5为燕麦β-葡聚糖分子的形状分析,根据其斜率可以得出其分子形状,图中横坐标代表 $\lg M_i$,其纵坐标代表 $\lg r_i$ 。不论是分布较宽或是多峰分布的样品,皆可通过测量分子量及分子旋转半径得到分子形状的数据。球形分子: $r_i^3 \propto M_i \rightarrow \lg r_i = k + 1/3 \lg M_i$; 无规则线团状分子: $r_i^2 \propto M_i \rightarrow \lg r_i = k + 1/2 \lg M_i$; 棒状分子: $r_i^1 \propto M_i \rightarrow \lg r_i = k +$

$1/1 \lg M_i$ 。所以当斜率为1时,其分子形状为线性,结构比较疏松。当斜率值为0.4时,其分子形状为棒状。当斜率为0.33时,其分子形状为球状,结构较紧密。本实验中其比值为 0.35 ± 0.00 ,所得燕麦β-葡聚糖分子形状接近于球型。

3 结论

β-葡聚糖是一种非常具有潜力的食品添加剂。通过单因素试验研究了水提β-葡聚糖的最佳工艺条件,结合实际生产过程中的成本与产品质量,确定最佳条件为提取温度80℃、液料比25:1、pH11、提取时间4h。在此基础上,进一步采用正交试验优化水提β-葡聚糖的最佳方案,并通过方差分析探讨得出对β-葡聚糖得率影响最大的因素为提取温度,其次依次是pH值、液料比和提取时间,且四个因素均影响极显著。此方法高效率、快速简单。在此最佳工艺条件下,不需进行脱脂和灭酶处理,β-葡聚糖得率可达17.30mg/g。为测定β-葡聚糖的分子的相关参数,需要将此粗β-葡聚糖经过除蛋白和除淀粉的纯化过程,最终纯度可达到75.30%左右。再通过高效凝胶色谱测定燕麦β-葡聚糖分子的相关参数,可知其平均分子量为 9.697×10^5 ,平均分子半径为83.8nm,结构较紧密,分子构型接近于球状,为后续分子特性的进一步研究提供了一定的理论依据。

参考文献:

- [1] 刘河. 裸燕麦保健功能及其开发[J]. 粮食与油脂, 1999(2): 11-12.
- [2] 王凤梅, 樊明寿, 郑克宽. 燕麦β-葡聚糖的保健作用及影响其积累的因素[J]. 麦类作物学报, 2005, 25(2): 116-118.
- [3] BEER M U, ARRIGONI E, AMADO R. Effect of oat gum on blood cholesterol levels in healthy young men[J]. Eur Clin Nutr, 1995, 49(7): 517-522.
- [4] WOOD P J, BEER M U, BUTLER G. Evaluation of role of concentration and molecular weight of oat beta-glucan in determining effect of viscosity on plasma glucose and insulin in following and oral glucose load[J]. British Journal of Nutrition, 2000, 84(1): 19-23.
- [5] 王宁, 赵明. 大麦β-葡聚糖的研究进展[J]. 青海农林科技, 2007(7): 34-36.
- [6] 李志洲, 杨海涛, 邓百万. 大枣多糖中β-葡聚糖含量的测定[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(2): 117-119.
- [7] 段中华, 乔有明. 不同因子对燕麦β-葡聚糖提取纯度影响的研究[J]. 食品科技, 2007(8): 122-125.
- [8] 李永仙, 尹象胜. 刚果红法测定麦汁和啤酒中的β-葡聚糖[J]. 无锡轻工大学学报, 1997, 16(1): 8-13.
- [9] 崔红华, 李超英, 张大方. 用苯酚-硫酸法测定人参多糖含量的研究[J]. 中国中医药信息杂志, 1999, 6(2): 24-26.
- [10] 宋欣. 微生物转化技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 182-183.
- [11] SKENDI A, BILIADERIS C G, LAZARIDOU A, et al. Structure and rheological properties of water soluble β-glucans from oat cultivars of *Avena sativa* and *Avena bysantina*[J]. Journal of Cereal Science, 2003, 38(1): 15-31.
- [12] PAPAGEORGIOU A M, LAKHDARAB N, LAZARIDOU A, et al. Water extractable (1 → 3, 1 → 4)-β-D-glucans from barley and oats: An intervarietal study on their structural features and rheological behaviour[J]. Journal of Cereal Science, 2005, 42(2): 213-224.
- [13] AJITHKUMAR A, ANDERSSON R, AMAN P. Content and molecular weight of β-glucan in American and Swedish oat samples[J]. Journal of Agricultural and Chemistry, 2005, 53(4): 1205-1209.
- [14] 管晓, 姚惠源, 周素梅. 燕麦麸中β-葡聚糖的提取及其分子量分布测定[J]. 食品科技, 2003, 24(7): 40-43.