

木葡聚糖纯化鉴定研究

李兴军^{1*}, 樱井直树²

(1. 国家粮食局科学研究院, 北京 100037, 中国;
2. 日本广岛大学综合科学部, 东广岛市镜山 739-8521, 日本)

摘要: **目的** 木葡聚糖(XG)是豆类、蔬菜及水果重要的半纤维素成分, 本文探讨其纯化鉴定方法。**方法** 从乙烯催熟猕猴桃果肉提取半纤维素 II(HC-II), 采用碘沉淀, 接着阴离子交换层析。**结果** 将 XG 含量从 HC-II 干粉中 50 摩尔%提高到纯化干粉中 62 摩尔%。纯化的 XG 中葡萄糖(Glc): 木糖(Xyl): 半乳糖(Gal): 岩藻糖(Fuc)比例是 10: 6.9: 2.1: 0.3。凝胶过滤层析表明, 纯化的 XG 平均分子量是 161 kDa, 而聚合物总糖的平均分子量是 95 kDa。**结论** 糖连接分析证实了猕猴桃 XG 缺乏岩藻糖(Fuc), 有少量的阿拉伯木聚糖、低分子量的葡萄甘露聚糖与 XG 密切结合。

关键词: 木葡聚糖; 葡萄甘露聚糖; 木聚糖; 半纤维素; 植物细胞壁; 糖连接甲基化分析

Purification and identification of xyloglucan

LI Xing-Jun¹, NAOKI Sakurai²

(1. Academy of the State Administration of Grains, Beijing 100037, China;
2. Faculty of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima University, Kagamiyama, Higashi-hiroshima 739-8521, Japan)

ABSTRACT: Objective To study the purification and identification of fruit xyloglucan (XG). **Methods** The cell wall XG in pericarp tissues of a ripe kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) was purified from hemicellulose II extracted with 24% (w/v) KOH plus 0.02% NaBH₄ using iodine precipitation and anion-exchange chromatography. **Results** The cell walls in the ripe kiwifruit fruits still contain a high proportion of XG. Monosaccharide analysis of purified XG showed a molar ratio of Glc : Xyl : Gal : Fuc of 10 : 6.90 : 2.05 : 0.27. Gel permeation chromatography indicated that purified XG had an average molecular-mass of 161 kDa, a value that exceeds the 95 kDa determined for total polymeric sugars. **Conclusion** Sugar linkage analysis confirmed the lack of fucose in kiwifruit XG, but a small amount of arabinoxylan and low Mr glucomannan remained associated with this fraction.

KEY WORDS: xyloglucan; glucomannan; xylan; hemicellulose; plant cell wall; methylation analysis for sugar linkage

1 引言

水果、蔬菜、谷物及豆类中的半纤维素成分是人类重要的膳食纤维来源。通常根据多聚糖分子结构,

将半纤维素划分为木葡聚糖、木聚糖、甘露聚糖及 β-葡聚糖^[1-3]。国内对半纤维素成分的分离、鉴定研究较少, 本文以猕猴桃果实为材料, 阐明木葡聚糖纯化鉴定方法, 对我国功能性多聚糖提取与制备有参考意义。

基金项目: 国家人力资源与社会保障部留学归国启动基金(CZ1020)

*通讯作者: 李兴军, 博士, 副研究员, 研究方向: 多聚糖与分子营养。E-mail: lixingjun888@yahoo.com.cn

2 材料和方法

2.1 试验材料

以乙烯处理后软化期间的猕猴桃(*Actinidia deliciosa* cv. Hayward)为材料。果肉切成约 0.3 cm³ 小块, 液氮立即冷冻, 储藏在 -30 °C。

2.2 仪器设备

天平; 打浆机; 电磁炉; 冷冻离心机; 透析装置; 真空冻干机; 高压灭菌锅; 氮吹仪; 冰浴。日本岛津(Shimadzu)公司的液相色谱(RID 10A 示差检测器、Model 307 Gilson 泵)、气相色谱(GC-14B)、气相-质谱(GCMS-QP5000)。

2.3 试剂

80%乙醇; 无水乙醇; 丙酮; 氯仿; 甲醇(1:1, v/v); 50 mmol/L 醋酸钠缓冲液(pH6.5); 猪胰腺 α -淀粉酶; 假单胞菌(*Pseudomonas*)异构淀粉酶; EDTA 溶液; 含有 0.02% NaBH₄ 的 0.71 mol/L KOH; 含有 0.02% NaBH₄ 的 4.28 mol/L KOH; 冰醋酸; 5.9 mol/L CaCl₂; 3% I₂/4% KI; Na₂S₂O₃ 固体; 10 mmol/L 磷酸钠缓冲液 pH6.0; 0.2 mol/L 磷酸钠缓冲液 pH6.0; 1 mol/L NaOH。试剂均为分析纯。分子量标准物采用葡聚糖 Dextran(美国 Sigma 公司) 系列, 各是 9.4、35.6、66.3、580 和 2000 kDa。

2.4 凝胶柱

DEAE-Sephadex A25 凝胶柱(美国 GE Healthcare 公司); Bio-Sil TSK gel 5000 PW 凝胶色谱柱(7.5 mm i.d.×60 cm, 日本 Tosoh 公司); 气相-质谱用毛细管柱 SP-2340(Supelco, 0.25 mm i.d.×15 m, 美国 Bellefonte 公司)。

2.5 方法

2.5.1 半纤维素制备

方法如图 1。果肉组织解冻后, 用 80%乙醇溶液匀浆, 然后沸水煮 10 min, 1400 g 离心 10 min, 弃上清液。下层沉淀物用蒸馏水洗涤 1 次, 丙酮洗涤 2 次, 氯仿: 甲醇(1:1, v/v)洗涤 2 次, 最后在 37 °C 过夜干燥得到细胞壁材料。细胞壁材料用 50 mmol/L 醋酸钠缓冲液 (pH 6.5) 洗涤 1 次, 再用该缓冲溶液将细胞壁材料悬浮 1 min, 随后沸水煮沸 1 min。冷却后加入 8 units/mL 猪胰腺 α -淀粉酶和 118 units/mL 假单胞菌异构淀粉酶, 37 °C 酶解 3 h 后, 1400 g 离心 10 min。

收集的细胞壁沉淀物加入 50 mmol/L EDTA (pH 6.5), 沸水煮 15 min, 提取果胶质。此果胶质提取步骤重复 3 次。沉淀物依次用 0.71 mol/L KOH 溶液 (含 0.02% NaBH₄)和 4.28 mol/L KOH 溶液(含 0.02% NaBH₄)提取, 分别提取的是 HC-I 和 HC-II 层分, 并用冰醋酸中和。剩余残渣是纤维素。果胶质、HC-I 和 HC-II 溶液透析 24 h 后, 真空冷冻干燥, 得到的各多聚糖干粉用 8 units/mL 猪胰腺 α -淀粉酶和 118 units/mL 假单胞菌异构淀粉酶处理后, 透析并冻干。总糖(TS)含量采用酚-硫酸法测定。果胶酸(UA)含量采用 *m*-羟基联苯法测定, 制作标准曲线采用半乳糖醛酸。木葡聚糖(XG)含量采用碘染色法测定, 1 个单位 A640 等于 155 μ g/mL XG^[4](图中的 M 均为 mol/L 的缩写)。

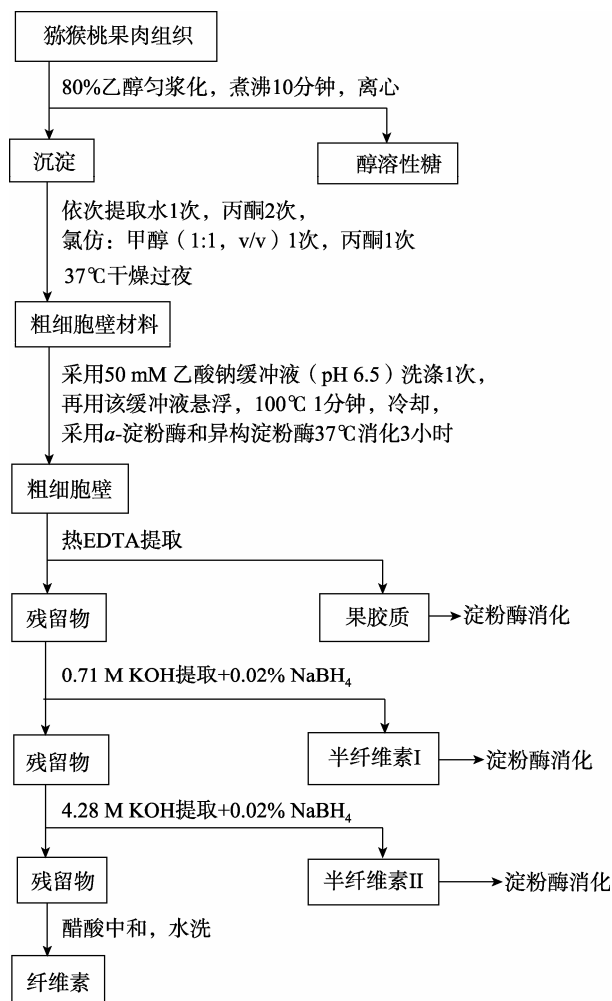


图 1 细胞壁半纤维素制备

Fig. 1 The preparation of cell wall hemicellulose

2.5.2 木葡聚糖纯化及鉴定

HC-II 层分中 XG 纯化参照 Kato 和 Matsuda^[5]的方法稍作修改, 具体步骤如图 2 所示。

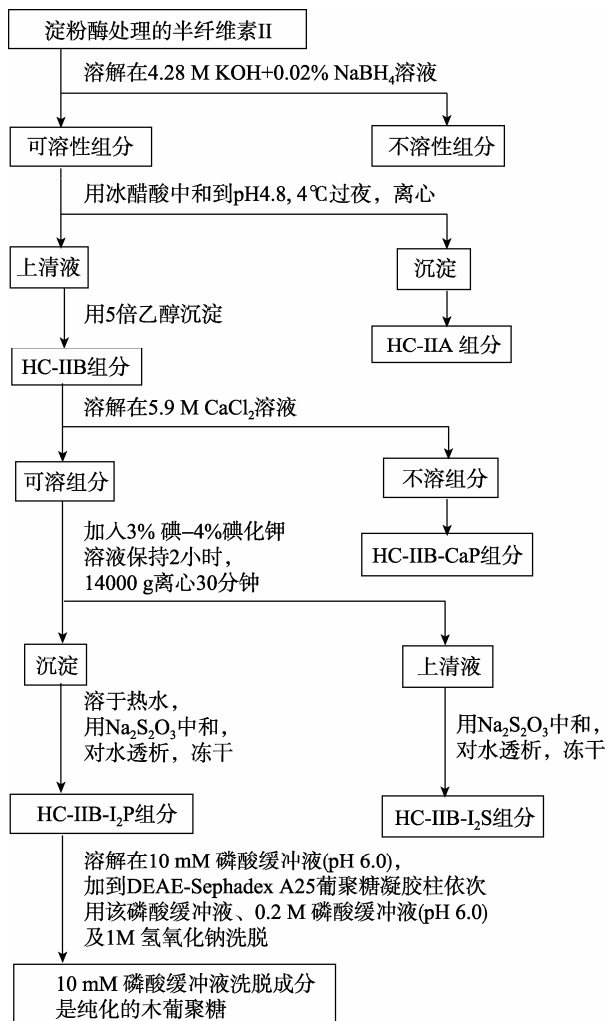


图 2 木葡聚糖纯化技术方案

Fig. 2 The process of purification of xyloglucan

(1) 碘沉淀

实验发现, 400 g 果肉组织可制备 679.7 mg HC-II 层分。准确称取 0.4 g HC-II 干粉溶解在 10 ml 含 0.02 % NaBH₄ 的 4.28 mol/L KOH 溶液中, 12000 g 离心 15 min, 取上清液。上清液用乙酸中和到 pH 4.8, 4 °C 过夜, 12000 g 离心 15 min 后取上清液, 用 5 倍体积无水乙醇沉淀, 4 °C 过夜。将沉淀(HC-IIB 组分) 溶于 40 mL 的 5.9 mol/L CaCl₂ 水溶液, 12000 g 离心 15 min, 取上清液, 与 3 mL 碘溶液(3 % I₂/4% KI)混匀, 4 °C 搅动 2 h。该混合物 14000 g 离心 30 min, 收集沉淀。沉淀溶于热蒸馏水, 采用固体 Na₂S₂O₃ 中和, 对蒸馏水透析, 冻干, 此为碘沉淀层分(HC-IIB-I₂P 组分, 305 mg) (图中的 M 均为 mol/L 的缩写)。

(2) 阴离子交换层析

称取 52 mg HC-IIB-I₂P 组分干粉溶于 6 mL 的

10 mmol/L 磷酸盐缓冲液(PB)(pH 6.0), 12000 g 离心 15 min 除去不溶物。上清液过 DEAE-Sephadex A-25 (磷酸型)柱(1.8×5.5 cm)(用 10 mmol/L PB (pH 6.0)平衡柱子)。依次用各 40 mL 的 10 mmol/L PB (pH 6.0)、0.2 mol/L PB(pH 6.0)和 1 mol/L NaOH 溶液洗脱 3 个峰层分, 每个峰层分对蒸馏水透析 24 h, 冻干。

(3) 凝胶过滤层析

称取 2.0 mg DEAE-XG 组分干粉溶于 1.0 mL 的 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 7.2), 进样 50 μl 到有示差检测器和凝胶过滤柱 TSK-GEL5000 PW 的 HPLC 系统。样品采用 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 7.2)洗脱, 流速 1 mL/min, 以 1.0 min 间隔收集层分。每个层分中 XG 含量测定用碘染色方法。XG 的质量平均分子量测定按照 Nishitani 和 Masuda^[6]方法, 分子量标准物 Dextrans 系列, 各是 9.4、35.6、66.3、580 和 2000 kDa。

(4) 单糖组成和连接分析

按照改动的 Chaplin 和 Kennedy^[7]方法制备中性糖醇乙酸酯(alditol acetate)。称取 DEAE-XG、TSK-XG 和 TSK-MAN 各 2.0 mg 的干粉, 在 2 mol/L 三氯乙酸溶液在 121 °C 水解 1 h。释放出的中性单糖用含 2% 硼氢化钠的 2 mol/L 氨水溶液还原, 然后加入 1-甲基咪唑和乙酸酐发生过乙酰基化。过乙酰基化的糖采用三氯甲烷提取, 氮气吹干, 溶于 200 μl 丙酮, 上机分析。1 μl 糖醇乙酸酯生物进样装有毛细管柱(SP-2340)的气相-液相色谱(GC-14B)。炉温从 180 °C 升到 240 °C, 速率 4 °C/min。

糖连接分析采用甲基化分析^[8]。DEAE-XG、TSK-XG 和 TSK-MAN 层分样品溶于 1 mL DMSO, 在甲基碘存在下发生甲基化作用。1 μL 制备样品注射 GC-MS 系统(GCMS-QP5000), 毛细管柱是 SP-2340。柱温在 160 °C 保持 1 min, 接着以 2 °C/min 速率升到 245 °C。

3 结果与讨论

3.1 木葡聚糖分离纯化

Terasaki 等^[9]报道收获期猕猴桃细胞壁有大量的 XG, 可能是碘染色方法过高估计了来自共质体淀粉的污染。本研究中, 从乙烯处理后的猕猴桃成熟果实中提取细胞壁 XG, 共质体淀粉对该细胞壁的污染消失。从 400 g 果肉组织获得 679.7 mg HC-II 干粉(表 1)。由于 HC-II 层分中葡萄糖+木糖含量占总糖的 73

摩尔%, 所以选择 HC-II 层分纯化 XG。进一步纯化 XG, HC-II 层分连续采用乙醇、CaCl₂ 沉淀, 接着上清液采用碘沉淀(图 2)。碘沉淀原理是, 从支链(可溶)多聚糖中分离线性(不溶)多聚糖^[10]。碘溶液溶解的支链多聚糖显示紫红色, 主要包括葡萄糖和阿拉伯糖; 碘沉淀的线性(不溶)多聚糖显示绿色, 是 XG 的特性, 包含大量木糖和葡萄糖。

表 1 成熟猕猴桃果实木葡聚糖纯化期间所获得的半纤维素多聚糖数量

Table 1 Amount of hemicellulose in ripe kiwifruit during XG purification

	数量	含量(μg 粉末/g FW 鲜重)
鲜重	400 g	
半纤维素 II 干粉	679.7 mg	1699
I ₂ 沉淀干粉(I ₂ ppt)	305.4 mg	764
木葡聚糖干粉	166.7 mg	418

3.2 阴离子交换层析

碘不溶多糖在 DEAE Sephadex A-25 柱上进行阴离子交换层析, 目的是除去酸性多聚糖和蛋白质。采用 10 mmol/L 磷酸缓冲液 (PB, pH 6.0)、0.2 mol/L PB (pH 6.0) 和 1 mol/L NaOH 溶液连续洗脱, 产生 3 个峰(图 3)。10 mmol/L PB 洗脱的 XG 峰类似总糖, 而 0.2 mol/L PB 和 1 mol/L NaOH 溶液洗脱的多聚糖主要是果胶酸, 与总糖峰保持一致。采用酚-硫酸方法分析总糖, 10 mmol/L PB 层分的 A490/480 比值 (0.89) 大于 0.8 (表 2), 表明该层分中存在大量的戊糖, 而 0.2 mol/L PB 和 1 mol/L NaOH 洗脱层分中 A490/480 比值低于 0.8, 表明存在己糖。因此, 10 mmol/L PB (pH 6.0) 洗脱的多聚糖被认为是 XG 层分, 定义为 DEAE-XG。

3.3 凝胶过滤层析

为了验证 DEAE-XG 的均质性, 将它在 TSK-

GEL5000 PW 柱上凝胶过滤层析, 结果仅一个洗脱峰,

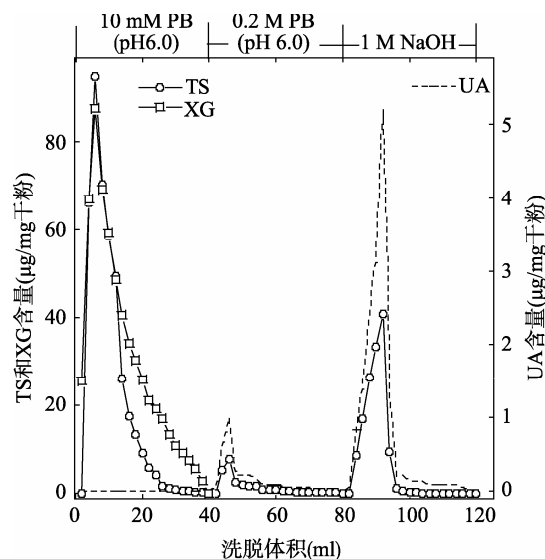


图 3 DEAE-Sephadex A-25 柱层析 HC-IIB-I₂P 组分
Fig. 3 The purification of XG with DEAE Sephadex A-25 column

其中总糖(TS)与 XG 巧合, XG 数量是 TS 数量的 50% (图 4)。但图 3 中 TS 数量等于 XG 数量, 表明 TSK-GEL5000 PW 柱能够将 XG 与其他多糖区分。深入比较 TS 和 XG 的洗脱峰, 差异在低 M_r 区域。XG 均质分子重量是 161 kDa, 而 TS 则是 95 kDa。这表明纯化的 DEAE-XG 层分中可能含有少量其他低 M_r 的多聚糖, 如甘露聚糖和木聚糖。凝胶过滤层析保留时间 (RT) 12~16 min 和 RT 17~21 min 层分, 分别定义为 TSK-XG 和 TSK-MAN。

3.4 糖组成和连接分析

收集的 DEAE-XG、TSK-XG 和 TSK-MAN 层分, 对蒸馏水透析, 冻干。干粉酸水解后, 发生过乙酰化, 用气相-液相色谱仪分析糖组分(表 3)。DEAE-XG 的 Glc : Xyl : Gal : Fuc 摩尔比例是 10 : 6.9 : 2.1 : 0.3,

表 2 DEAE-Sephadex A-25 柱层析层分

Table 2 Sugar content in powders purified with DEAE Sephadex A-25 column

洗脱缓冲液	木葡聚糖 (μg/mg I ₂ ppt 干粉)	果胶酸 (μg/mg I ₂ ppt 干粉)	总糖(μg/mg I ₂ ppt 干粉)	A490/480
10 mM PB	389.8±140.6 ^a	忽略	396.1±134.0	0.89
0.2 M PB	忽略	1.9±0.9	24.3±14.3	0.78
1 M NaOH	忽略	11.7±3.7	81.9±41.3	0.75

a) 数据是平均值±SD (n=5)

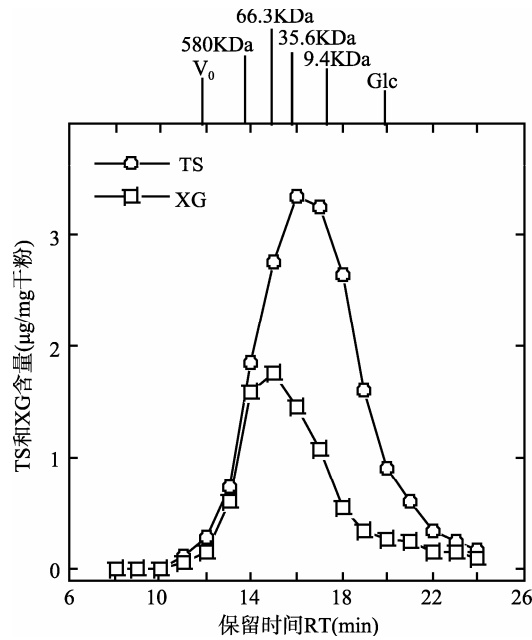


图 4 纯化的 DEAE-XG 进行 TSK 5000PW 柱凝胶过滤层析(V_0 是空体积)

Fig. 4 Determination of molecular mass of the purified DEAE-XG with gel permeation chromatography on a TSK Gel 5000 PW column

表 3 纯化的木葡聚糖干粉中单糖组成
Table 3 Monosaccharide composition of the purified xyloglucan

中性糖 ^a	含量 ($\mu\text{g mg}^{-1}$)	摩尔%
Rha	15.6±2.5	1.7
Fuc	10.6±4.3	1.2
Ara	45.6±9.1	5.4
Xyl	251.5±5.7	29.4
Man	113.6±22.5	11.2
Gal	88.5±11.5	8.7
Glc	431.4±48.6	42.5

a)单糖分析采用 GLC, 数据是均值±SD(n=3).

这与从菜豆(10 : 7 : 2.5 : 1)^[5]、豌豆(10 : 6 : 1.8 : 1)^[11]、松树(10 : 6.8 : 2.9 : 0.5)^[11]和柿子(10 : 6.0 : 3.4 : 1.4)^[12]提取的 XG 特性一致。猕猴桃 DEAE-XG 中岩藻糖含量低^[13], 检测到 11.2 摩尔%甘露糖, 表明存在甘露聚糖。DEAE-XG、TSK-XG 和 TSK-MAN 这 3 个层分中存在 4-Man *p* 和 4, 6-Man *p*, 表明半纤维素多聚糖中存在甘露糖, 或葡萄糖甘露聚糖, 或半乳糖甘露聚糖^[14]。以摩尔%计, 甘露聚糖含量等于 4-Man *p*、4, 6-Man *p*、T-Gal *p*(等于 4, 6-Gal *p*)之和。DEAE-XG、TSK-XG 和 TSK-MAN 三层分中甘露聚

糖含量各是 9.31%、8.72 %和 13.69 %。TSK-MAN 层分中存在 T-Gal *p*、T-Glc *p* 和 4-Glc *p*, 说明存在葡萄糖甘露聚糖、半乳糖甘露聚糖; TSK-XG 层分中缺乏 T-Glc *p*, 表明仅存在甘露聚糖。另外, 4-Xyl *p*、2, 4-Xyl *p* 和 T-Ara *f* 是阿拉伯木聚糖的成分, DEAE-XG、TSK-XG 和 TSK-MAN 这 3 个层分中阿拉伯木聚糖含量分别是 10.41%、12.26%和 9.31%, 表明纯化的 TSK-XG 和 TSK-MAN 干粉中存在阿拉伯木聚糖污染。以 T-Gal *p*、4-Gal *p* 和 4, 6-Gal *p* 计算半乳糖含量, 它们在 DEAE-XG 和 TSK-XG 含量各是 3.51%和 4.84%。XG 通常包含 4-Glc *p*、4, 6-Glc *p*、T-Xyl *p*、2-Xyl *p*、2-Gal *p* 和 T-Fuc *p*^[2]。XG 含量等于 4, 6-Glc *p*、4-Glc *p*(等于 1/3 的 4, 6-Glc *p*)、T-Xyl

表 4 甲基化分析鉴定纯化的猕猴桃果实木葡聚糖
Table 4 Methylation analysis for identification of the purified kiwifruit xyloglucan

中性糖	DEAE-XG	TSK-XG	TSK-MAN
摩尔%			
2-Rha <i>p</i>	0.13	—	—
2, 4-Rha <i>p</i>	0.58	—	—
T-Ara <i>f</i>	—	2.53	0.60
T-Ara <i>p</i>	—	—	0.75
3,5-Ara <i>f</i>	—	2.79	—
T-Xyl <i>p</i>	9.52	9.55	7.00
2-Xyl <i>p</i>	0.81	3.83	—
4-Xyl <i>p</i>	9.40	6.94	6.90
2, 4-Xyl <i>p</i>	1.01	—	1.16
T-Gal <i>p</i>	2.66	—	3.58
2-Gal <i>p</i>	3.72	1.59	2.95
3-Gal <i>p</i>	0.06	—	—
4-Gal <i>p</i>	0.73	—	0.91
3, 4-Gal <i>p</i>	0.26	—	0.37
4, 6-Gal <i>p</i>	0.12	—	0.35
T-Man <i>p</i>	0.27	1.61	—
4-Man <i>p</i>	4.09	3.76	6.24
4, 6-Man <i>p</i>	2.56	3.37	3.87
T-Glc <i>p</i>	—	—	0.40
4-Glc <i>p</i>	28.70	24.44	30.72
4, 6-Glc <i>p</i>	34.84	35.33	32.98
4-Gal <i>A</i>	0.33	4.25	0.70
3, 4-Gal <i>A</i>	0.23	—	0.60

注: 采用 GC-MS 分析糖连接。数据是两次均值; DEAE-XG 是 10 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 6.0)从 DEAE Sephadex A-25 柱洗脱的层分; TSK-XG 是凝胶过滤层分 12~16min 保留时间层分; TSK-MAN 是凝胶过滤层分 17~21 min 保留时间层分。

和 2-Xyl *p*、2-Gal *p*、T-Fuc *p* 的摩尔百分数之和。DEAE-XG、TSK-XG 和 TSK-MAN 层分中 XG 含量各是 60.4 %、62.08 %和 53.92 %。这些结果表明, 纯化的猕猴桃 XG 类似其他双子叶植物 XG。成熟猕猴桃细胞壁具有高比例 XG, 这种 XG 与葡萄甘露聚糖和阿拉伯木聚糖强烈结合, 可以采用木聚糖酶处理 TSK-XG, 然后采用凝集素柱除去甘露聚糖污染物, 获得纯的 XG。

参考文献

- [1] Rose JKC. The Plant Cell Wall (Annual Plant Reviews), 8th edition [M]. Washington: Wiley-Blackwell, 2003.
- [2] Hayashi T. Xyloglucan in the primary cell wall [J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1989, 40: 139–168.
- [3] Waldron KW, Parker ML, Smith AC. Plant cell walls and food quality [J]. Compr Rev Food Sci Food Saf, 2003, 2: 101–118.
- [4] Wakabayashi K, Sakurai N, Kuraishi S. Differential effect of auxin on molecular weight distributions of xyloglucans in cell walls of outer and inner tissues from segments of dark growth squash (*Cucurbita maxima* Duch.) hypocotyls [J]. Plant Physiol., 1991, 95: 1070–1076.
- [5] Kato Y, Matsuda K. Presence of a xyloglucan in the cell wall of *Phaseolus aureus* hypocotyls [J]. Plant Cell Physiol, 1976, 17: 1185–1198.
- [6] Nishitani K, Masuda Y. Auxin-induced changes in the cell wall structure: Changes in the sugar compositions, intrinsic viscosity and molecular weight distributions of matrix polysaccharides of the epicotyl cell wall of *Vigna angularis* [J]. Physiol Plant, 1981, 52: 482–494.
- [7] Chaplin MF, Kennedy JF. Carbohydrate analysis: a practical ap-

proach [M]. London: IRL Press Limited. 1986: 33.

- [8] Conrad HE. Methylation of carbohydrates with methylsulphonyl anion and methyl iodide in dimethyl sulfoxide [M]/Whistler RL, BeMiller JN, eds. Methods in Carbohydrate Chemistry VI. New York: Academic Press. 1972: 361–364.
- [9] Terasaki S, Sakurai N, Yamamoto R, *et al.* Changes in cell wall polysaccharides of kiwifruit and the visco-elastic properties detected by a laser Doppler method [J]. J Jpn Soc Hort Sci, 2001, 70: 572–580.
- [10] Acebes JL, Moral R, Zarra I. Purification and structure of xyloglucan in pine hypocotyls[J]. Phytochemistry, 1993, 33: 1343–1345.
- [11] Hayashi T, Maclachlan G. Pea xyloglucan and cellulose. I. Macromolecular organization [J]. Plant Physiol, 1984, 75: 594–604.
- [12] Cutillas-Iturralde A, Peña MJ, Zarra I, *et al.* A xyloglucan from persimmon fruit cell walls [J]. Phytochemistry, 1998, 48, 607–610.
- [13] Redgwell RJ. Cell-wall polysaccharides of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*): chemical features in different tissue zones of the fruit at harvest [J]. Carbohydrate Res, 1988, 182: 241–258.
- [14] Li XJ, Nakagawa N, Nevins DJ, *et al.* Changes in the cell-wall polysaccharides of outer pericarp tissues of kiwifruit during development [J]. Plant Physiol Biochem., 2006, 44: 115–124.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



李兴军, 博士, 副研究员, 研究方向: 多聚糖与分子营养。

E-mail: lixingjun888@yahoo.com.cn