

# 大豆木糖葡聚糖的结构研究

郑建仙 丁霄霖

(华南理工大学,广州,510641) (无锡轻工大学,无锡,214036)

**摘要** 利用 4mol/L NaOH 提取结合层析柱提纯,从大豆细胞壁物质(膳食纤维)中分离出 PRF6 聚合物组分(即木糖葡聚糖),并对该组分的结构特征作了详尽的剖析。

**主题词** 大豆;膳食纤维;木糖葡聚糖

**中图分类号** TS201.2

## 0 前言

木糖葡聚糖(简称木葡聚糖)是一种多糖化合物,又称为类淀粉(Amyloids)。作者利用 4mol/L NaOH 提取并经层析柱提纯,从纯净的大豆细胞壁物质(膳食纤维)中分离出 PRF6 纯组分,经组成单糖分析、甲基化分析、酸部分水解试验、纤维素酶降解结合 GC-MS 联机分析,建立了 PRF6 组分详细的化学结构模型,证实是一种木葡聚糖,但它又有其结构上的特点。由于 PRF6 在大豆细胞壁物质中所占的比例很大(24.8%),因此是食用大豆纤维的重要组成成分。

## 1 材料与方 法

### 1.1 木葡聚糖粗组分(RF6)的提取(纯组分称为 PRF)

利用经改良的冷中性洗涤剂纤维提取法(CNDF),从大豆湿加工所得新鲜不溶性残渣中提取出纯净的细胞壁物质,再依次用热水、0.2mol/L  $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ 、NaCl-HAC 和 1mol/L NaOH 循环提取,将残余物分散于 4mol/L NaOH-10mmol/L  $\text{NaBH}_4$  水溶液中,通入  $\text{N}_2$  在 20℃ 温度下搅拌提取 2h,离心所得上清液对水透析 72h,冷冻干燥即得 RF6 组分。

### 1.2 RF6 的提纯

取 60mg RF6 缓慢溶解于 2ml 2mol/L NaOH 中,过滤,取滤液进 Sepharose CL-2B 凝胶层析柱(2×100cm),用 0.6mol/L NaOH 进行洗脱得一中性成分,再注入 DEAE-Sephadex A-50 离子交换柱(1×30cm)中,用 50mmol/L 醋酸钠中 NaCl 浓度由(0~0.6)mol/L 呈线性上升的梯度洗脱,得一很陡峭的大峰,收集后经脱盐并冷冻干燥,即为纯组分 PRF6。

收稿日期:1995-01-10

### 1.3 单糖和甲基化分析

PRF6 先经 4mol/L  $H_2SO_4$  在 100℃ 下水解 5h, 后转化成糖醇乙酰化衍生物, 在日本岛津公司 GC-14A 气相色谱仪上分析鉴定 PRF6 的组成单糖。甲基化分析时, 先将 PRF6 分散于 DMSO 溶剂中, 在  $N_2$  保护下滴加甲基亚磺酰负离子, 再经水解和乙酰化后用气相色谱进行分离鉴定<sup>[1]</sup>。

### 1.4 PRF6 的纤维素酶降解

取 60mg PRF6 分散于 20ml 0.1mol/L 醋酸钠缓冲液(pH=4.5)中, 加入 0.5ml 纤维素酶(在 37℃ 温度下 0.1ml 的这种酶每小时可释放 10 $\mu$ mol 的葡萄糖)和数滴甲苯, 于 37℃ 恒温条件下保持 3d, 结束后加入乙醇以沉淀可能残留的聚合物(乙醇终浓度 80%), 离心所得上清液通入  $N_2$  去除残留乙醇, 再经 Dowex 50W( $H^+$ ) 柱子脱去  $Na^+$ , 冷冻干燥得酶降解产物。

### 1.5 酶降解产物的 GC-MS 联机分析

酶降解产物经甲基亚磺酰负离子甲基化后, 取一半再经完全水解后转化成糖醇乙酰化分析甲基化单糖的组成, 另一半直接进 GC-MS 联机分析酶降解所生成低聚糖的化学结构。

## 2 结果与讨论

### 2.1 PRF6 的单糖组成与甲基化分析

表 1 的结果表明, 纯净的 PRF6 不含糖醛酸, 水解分离出 4 种单糖。从表 2 的甲基化分析结果, 可知其主链是通过(1 $\rightarrow$ 4)糖苷键连接的葡聚糖, 在此主链上约有 33% 的 Glc 通过 C<sub>6</sub> 带有分支点。Ara, Gal 和部分 Xyl 以非还原尾端残基形式出现, 只能位于侧链。另有相当部分的 [ $\rightarrow$ 2)Xyl(1 $\rightarrow$ )] 存在(占 Xyl 总量的 64%), 从其含量看很可能是与位于非还原尾端的 Ara, Gal 或 Xyl 残基相连在一起作为主链葡聚糖的支链。3 种非还原尾端单糖摩尔比总和正好与主链中带有分支的木糖残基的摩尔比相等, 表明多糖的甲基化完全彻底。

表 1 提纯前后木葡聚糖的单糖组成(mol%)

组分	Rha	Ara	Gal	Man	Xyl	Glc	UA
RF6	6.5	7	19	6	11	45.4	5.1
PRF6	—	4.5	9.2	—	21.3	65	—

Rha 鼠李糖; Ara 阿拉伯糖; Gal 半乳糖; Man 甘露糖; Glc 葡萄糖;  
UA 糖醛酸, 用改良的吡啶法测定<sup>[2]</sup>。

表 2 PRF6 的甲基化分析结果(mol%)

甲基化单糖	糖苷键位置	原组分	酸部分水解组分	纤维素酶降解组分
2,3,5-Me <sub>3</sub> Ara	Ara(1 $\rightarrow$ )	4.5	—	5.7
2,3,4-Me <sub>3</sub> Xyl	Xyl(1 $\rightarrow$ )	7.6	11.6	9.8
3,4-Me <sub>2</sub> Xyl	$\rightarrow$ 2)Xyl(1 $\rightarrow$ )	13.7	10.7	17.5
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> Gal	Gal(1 $\rightarrow$ )	9.2	9.7	12
Penta-Me <sub>5</sub> Glc	—	—	—	26
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> Glc	Glc(1 $\rightarrow$ )	+	4.2	—
2,3,6-Me <sub>3</sub> Glc	$\rightarrow$ 4)Glc(1 $\rightarrow$ )	43.7	42.5	—
2,3,4-Me <sub>3</sub> Glc	$\rightarrow$ 6)Glc(1 $\rightarrow$ )	—	—	20.9
2,3-Me <sub>2</sub> Glc	$\rightarrow$ 4,6)Glc(1 $\rightarrow$ )	21.3	21.3	8.1

2,3,5-Me<sub>3</sub>Ara 1,4 di O acetyl-2,3,5-tri-O-methyl-arabinitol, etc.

为了获得 PRF6 分子中 Ara 的存在与连接方面的信息,特进行酸部分水解试验。将纯净的 PRF6 用 12.5mmol/L 草酸水溶液在 100℃ 水解 7h,水解液装入透析袋中对去离子水透析 48h,冷冻干燥后进行甲基化分析,结果如表 2 所示。酸降解后出现的变化有:2,3,5-Me<sub>3</sub>Ara 消失,说明 Ara 确以呋喃形式存在;2,3,4-Me<sub>3</sub>Xyl 的含量增多,而 3,4-Me<sub>2</sub>Xyl 的含量减少,表明 Ara 是与 Xyl 通过 [Ara(1→2)Xyl(1→)] 结构一起作为侧链的,由于酸部分水解去除了 Ara,使得作为非还原尾端的 [Xyl(1→)] 含量增多而 [→2)Xyl(1→)] 含量减少;2,3,4,6-Me<sub>4</sub>Glc 的存在数量有所增大,表明主链在酸部分水解过程中也有断裂,使少数链中间 Glc 转变成末端 Glc。

## 2.2 PRF6 的酶降解与 GC-MS 联机分析

从表 2 可发现,Ara,Gal 和部分 Xyl 是以酶降解产生低聚糖的非还原末端残基形式出现的,同时主链葡聚糖已被完全水解,因为 2,3,6-Me<sub>3</sub>Glc 完全消失了,而 2,3-Me<sub>2</sub>Glc 仅少量存在,这同时说明主链葡萄糖是 β-D-Glc 构型。大量存在的五甲基葡萄糖衍生物是来自酶解产生低聚糖的还原末端,而酶解产生大量的游离葡萄糖转变成极易挥发的六甲基衍生物,2,3,4-Me<sub>3</sub>Glc 来自包含 (1→6) 键联葡萄糖残基的低聚糖。试验表明:葡萄糖的构型是 β-D-Glc; [→2)Xyl(1→)] 不是位于主链中。因此,在 PRF6 中 [→2)Xyl(1→)] 只能与非还原尾端的 Ara,Gal 一起作为旁链连接在主链葡萄糖的 C<sub>6</sub> 分支点上。

PRF6 经纤维素酶解后,产生的低聚糖用 NaBH<sub>4</sub> 还原成低聚糖醇后经甲基化处理,进 GC-MS 联机分析。图 1 为 GC 的重构总离子流图,共分离出 4 个主要的峰,相对比值为 5:1:3:1.3(PK1:PK2:PK3:PK4)。

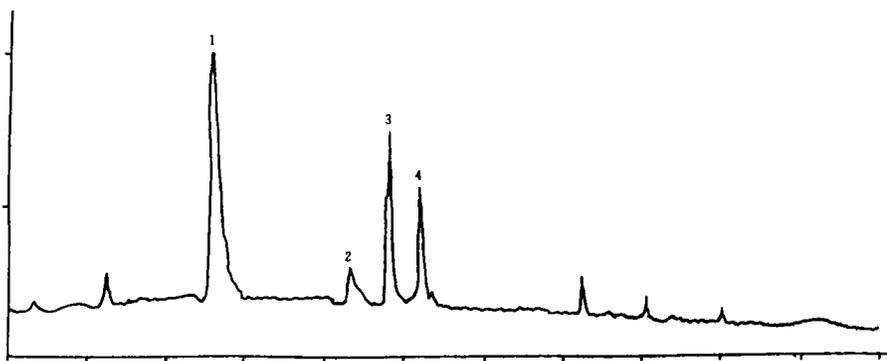


图 1 PRF6 酶降解产物甲基化衍生物的重构总离子流图

2.2.1 对 Peak1 的质谱分析 见图 2。

2.2.2 对 Peak2 的质谱分析 此峰较小,峰型较宽,表明存在多种低聚糖因保留值很相似而混杂在一块,表 3 只给出其中一种组分(保留值相对最大)的质谱数据。

表 3 酶降解 PRF6 产物甲基化衍生物的部分质谱数据

峰号	相对丰度 (m/z)							
PK1	46(43)	88(63)	90(36.2)	101(100)	134(12.5)	143(34.6)	146(16.5)	175(49)
	178(8.3)	187(0.5)	236(8.5)	296(1.6)				
PK2	46(14)	88(100)	90(10.6)	101(75.4)	134(7.5)	143(32)	146(1.3)	175(39)
	178(0.3)	187(1.5)	219(0.5)	236(19)	296(0.7)	303(1.7)	335(0.5)	347(0.6)
	379(0.2)	408(0.4)	440(0.1)	500(0.2)				

续表 3

峰号	相对丰度 (m/z)							
PK3	46(8)	88(82)	90(6.5)	101(100)	134(6.7)	143(42)	146(4.5)	175(51)
	178(0.2)	187(2.3)	236(52)	296(5.4)	303(48.7)	335(3.9)	347(0.3)	379(0.1)
	408(1.5)	440(0.5)	500(1.2)	660(1.1)	746(0.1)			
PK4	46(6.9)	88(100)	90(5.2)	101(59)	134(4.9)	143(12.5)	146(1.5)	175(6.5)
	178(0.2)	187(30)	219(8)	236(37)	296(2.5)	303(1.8)	335(0.3)	347(22.5)
	379(0.6)	408(1.2)	440(0.4)	500(0.3)	660(2.2)			

2.2.3 对 Peak3 的质谱分析 见图 3.

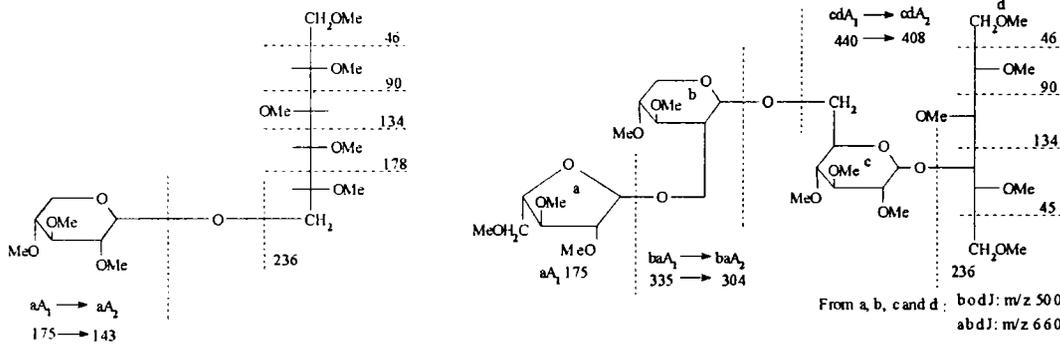


图 2 Peak3 质谱分析部分碎片离子的由来

图 3 Peak3 质谱分析部分碎片离子的由来

2.2.4 对 Peak4 的质谱分析 见图 4.

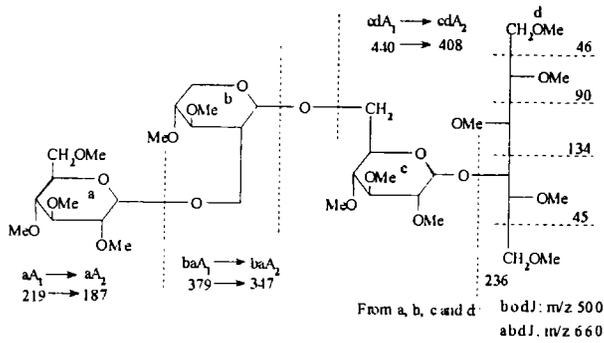


图 4 Peak4 质谱分析部分碎片离子的由来

从上述出现 4 个峰的相对含量可以得出以下几点推论: 当侧链只有一个 [Xyl(1→)] 时, 酶降解产物主要是 Xyl(1→6)Glc, Xyl(1→6)Glc(1→4)Glc 的数量很少; 当侧链为 [Ara(1→2)Xyl(1→)] 时, 降解产物主要是 Ara(1→2)Xyl(1→6)Glc(1→4)Glc, 而 Ara(1→2)Xyl(1→6)Glc 数量很少, 这很可能是由于旁链基因的增大产生了空间障碍, 使得纤维素酶分子无法接近与旁链直接相连的纤维二糖分子; 当侧链为 [Gal(1→2)Xyl(1→)] 时, 由于 Gal 分子较 Ara 大, 产生了更大的空间障碍, 降解产物的聚合度更大, 因为所检出的 Gal(1→2)Xyl(1→6)Glc(1→4)Glc 低聚糖相对于第(2)种情况来说少了很多, 而 Gal(1→2)Xyl(1→6)Glc 的数量就更少。

2.3 PRF6 组分结构模型的确定

综合上述分析与结果, 可确定 PRF6 组分的化学结构: 主链是 β-D-Glcp 通过 (1→4) 糖苷键连接, 在主链上约有 30%~33% 的葡萄糖在 C<sub>6</sub> 位置上带有分支点、连有侧链; 侧链有 [Xyl(1→)], [Araf(1→2)Xyl(1→)] 和 [Glap(1→2)Xyl(1→)] 等 3 种, 对 PRF6 来说, 还存在

[Man(1→2)Xyl(1→)]第4种侧链。对 PRF6 多糖分子来说, Ara : Gal : Xyl : Glc=1 : 2 : 4.8 : 14.5, 即主链上平均 14~15 个葡萄糖单元带有 5 个支链, 其结构特征如图 5 所示。

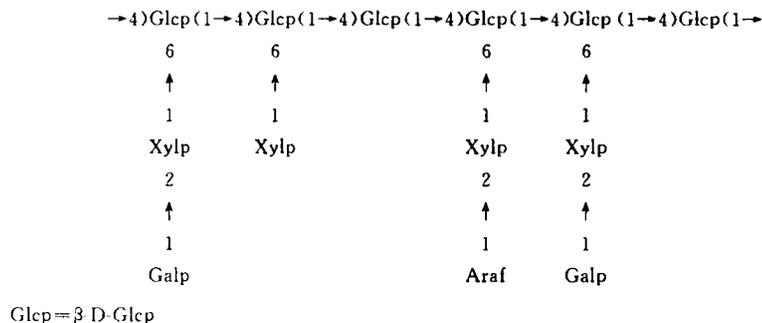


图 5 PRF6 多糖分子的结构模型

### 2.4 木葡聚糖在细胞壁中的存在

本研究得出的 PRF6 多糖分子框架结构, 与存在于其它植物或种子中的木葡聚糖结构相类似, 主要区别在于 PRF6 还存在作为侧链非还原尾端的阿拉伯呋喃糖, 因而 PRF6 组分全称应为阿半木葡聚糖(Arabinogalactoxyloglucan)。

作者应用 4mol/L 强碱提取法, 显示大豆中木葡聚糖与果糖物质之间出现共价相连的可能性较小。同时用 4mol/L 碱液使纤维素膨胀而破坏 α-纤维素与木葡聚糖之间的氢键结合力, 从而提取出较完全的木葡聚糖组分。

## 3 结 论

1) 用 4mol/L 强碱提取结合凝胶层析柱提纯, 从纯净大豆细胞壁物质中分离出的 PRF6 是一种木糖葡聚糖, 其主链是 β-D-Glc p 通过(1→4)糖苷键连接, 在主链上约有 30%~33%的葡糖残基通过 C<sub>6</sub> 分支点连有侧链。

2) 大豆 PRF6 组分与其它木糖葡聚糖的结构区别在于 PRF6 分子中有[Ara(1→2)Xyl(1→)]连接方式以及在侧链非还原尾端有阿位伯呋喃糖出现。

### 参 考 文 献

1 郑建仙. 活性多糖化学与工艺学的研究. [博士学位论文]. 1993  
 2 Bitter T et al. Anal. Biochem. 1962,4:330

## Studies on the Structure of Soybean Xyloglucan

Zheng Jianxian

Ding Xiaolin

(South China University of Technology) (Wuxi University of Light Industry)

**Abstract** A PRF6 polymer xyloglucan was isolated from soybean call wall material (dietary fibre) through 4mol/L NaOH extraction and chromatography column purification and the structural features of it were characterized.

**Subject-words** Soybean; Dietary fibre; Xyloglucan