

摘要

瓜尔豆胶 (GG) 主要成分是半乳甘露聚糖, 是一种常用的增稠剂和稳定剂。GG 具有水合速度慢、溶液黏度过高的性质, 限制了其在食品中的应用。因此, 本课题以瓜尔豆胶为研究对象, 采用最小二乘法拟合转换方程, 建立一种高效液相凝胶色谱与示差检测器联用检测部分酶解瓜尔豆胶 (PHGG) 绝对分子量的方法。调控影响瓜尔豆胶酶解的关键因素, 制备不同分子量的 PHGG, 通过单糖组成分析、结构表征和热力学研究 PHGG 样品的性质。同时, 考察浓度、pH、温度对 PHGG 流变学性质的影响, 以及中高分子量 PHGG 对燕麦蛋白乳液稳定性和微观结构的影响。主要结论如下:

通过优化色谱柱、流动相、柱温、流速, 建立一种高效液相凝胶色谱检测 PHGG 分子量的方法: 色谱柱为 Ultrahydrogel™ linear (300×7.8 mm); 流动相为 0.3 mol/L NaNO₃; 流速为 0.6 mL/min; 柱温为 40°C; 通过 ASTRA 软件分析确定不同分子量范围内 PHGG 的 dn/dc 值; 利用最小二乘法, 建立高效液相凝胶色谱-示差检测器 (GPC-RID) 检测的相对分子量参数与高效液相凝胶色谱-多角度激光光散射 (GPC-MALLS) 检测的 PHGG 绝对分子量参数之间的拟合方程, 结果表明, 相对重均分子量范围为 $5.0 \times 10^5 \text{ Da} < M_w < 4.0 \times 10^6 \text{ Da}$ 的 PHGG, 符合分子量参数拟合方程, 绝对分子量参数计算值与 GPC-MALLS 测量值的相对误差集中在 ±10% 以内。

以 PHGG 的相对分子量为指标, 选择 β-甘露聚糖酶单一酶解, 通过考察不同酶解因素, 得到影响 PHGG 分子量的三个关键因素为酶添加量、底物浓度和酶解时间, 可控酶解制备中高分子量 PHGG1 ($8.92 \times 10^5 \text{ g/mol}$)、中分子量 PHGG2 ($5.07 \times 10^5 \text{ g/mol}$) 和低分子量 PHGG3 ($0.62 \times 10^5 \text{ g/mol}$)。通过离子色谱测定 GG 和 PHGG 的单糖组成, 核磁共振波谱、傅里叶变换红外光谱、X 射线衍射表征其结构, 差示扫描量热法和热重分析法分析其热力学特性。结果显示, PHGG 的甘露糖/半乳糖 (M/G) 较 GG 略有升高; 酶解没有改变 PHGG 的主体结构, 未引入新的官能团, 但晶体结构有较小的变化; PHGG 在较高温度下仍具有良好的热稳定性。

考察浓度、pH、温度对不同分子量 PHGG 流变学性质的影响。结果表明, 不同条件下, PHGG 溶液均表现为剪切变稀的非牛顿流体。同一浓度下, PHGG 分子量越大, 其表观粘度和储能模量越大。不同分子量和 M/G 的 PHGG 形成凝胶的 pH 条件不同, pH=6 时 PHGG1 溶液形成强度较高的弱凝胶结构。温度扫描结果表明, PHGG1 溶液活化能小于 PHGG2 和 PHGG3, 黏度对温度依赖性较弱; 并且 PHGG1 溶液粘弹性的变化趋势与 GG 相同, 在热加工中更具优势。PHGG1 可能是一种替代 GG 的稳定剂。

研究 GG 和 PHGG1 浓度对燕麦蛋白乳液稳定性和微观结构的影响。粒径及 Zeta 电位分析表明, 0.8% GG 乳液和 0.8% PHGG1 乳液的 Z 均粒径最小, 但是乳液 PDI 值较大, 说明体系中存在分子聚集; 不同浓度乳液间的 Zeta 电位无明显差异。稳定性分析结果表明, 0.8% GG 乳液储藏 14 d 后乳液分层, 而 1% PHGG1 乳液在 14 d 内保持燕麦蛋白乳液稳定, 并且乳液乳化性和乳化稳定性较好。流变学结果表明, 添加 PHGG 的乳液是剪切变稀的非牛顿流体, 其中 1% PHGG1 乳液具有较高的表观粘度和储能模量。激光

共聚焦显微镜结果显示，0.8% GG 乳液微观结构存在开放的絮凝，1% PHGG1 乳液微观结构显示燕麦蛋白和 PHGG 均匀包裹油滴形成致密网络结构。因此，添加 1% PHGG1 的燕麦蛋白乳液具有较好的储藏稳定性和微观结构。

关键词：瓜尔豆胶；可控酶解；绝对分子质量；燕麦蛋白乳液；稳定性

Abstract

Guar gum (GG), whose main component is galactomannan, is a commonly used thickener and stabilizer. However, GG has the disadvantages of slow hydration speed and high solution viscosity, which limits its application in food. Therefore, in this study, the conversion equation was fitted by the least square method, to establish a method for detecting the absolute molecular weight of partially hydrolyzed guar gum (PHGG) using gel permeation chromatography (GPC) with differential detector. The key factors affecting the enzymatic hydrolysis of GG were regulated to prepare PHGG with different molecular weights. The properties of PHGG samples were studied by monosaccharide composition analysis, structure characterization, and thermodynamics. Furthermore, the effects of concentration, pH, and temperature on the rheological properties of PHGG and the impacts of medium and high molecular weight PHGG on the stability and microstructure of oat protein emulsion were investigated. The main conclusions are as follows:

By optimizing the chromatographic column, mobile phase, column temperature, and flow rate, a method for detecting the molecular weight of PHGG by GPC was established. The chromatographic column was UltrahydrogelTM linear (300×7.8 mm). The mobile phase was 0.3 mol/L NaNO₃. The flow rate was 0.6 mL/min. The column temperature was 40°C. The dn/dc values of PHGG in different molecular weight ranges were determined by ASTRA software. Using the least square method, the fitting equation between the relative molecular weight parameters detected by gel permeation chromatography-differential detector (GPC-RID) and the absolute molecular weight parameters of PHGG detected by gel permeation chromatography-multiangle laser light scattering (GPC-MALLS) was established. The results elucidated that the relative molecular weight range of PHGG was $5.0 \times 10^5 \text{ Da} < \text{Mw} < 4.0 \times 10^6$, which was consistent with the fitting equation of molecular weight parameters. The relative error between the calculated absolute molecular weight parameters and the measured values of GPC-MALLS was within $\pm 10\%$.

With the relative molecular weight of PHGG as an indicator, β -mannanase was selected for single enzymatic hydrolysis. By investigating different enzymatic hydrolysis conditions, three key factors affecting the molecular weight of PHGG were obtained: enzyme addition, substrate concentration and enzymatic degradation time. Controlled enzymatic hydrolysis to prepare medium and high molecular weight PHGG1 ($8.92 \times 10^5 \text{ g/mol}$), medium molecular weight PHGG2 ($5.07 \times 10^5 \text{ g/mol}$) and low molecular weight PHGG3 ($0.62 \times 10^5 \text{ g/mol}$). The monosaccharide composition of GG and PHGG was determined by ion chromatography. Their structures were characterized using fourier transform infrared spectroscopy, nuclear magnetic resonance spectroscopy and X-ray diffraction. The thermodynamic properties were analyzed by differential scanning calorimetry and thermogravimetric analysis. The results indicated that the mannose/galactose ratio (M/G) of PHGG was slightly higher than that of GG. Enzymatic hydrolysis neither changed the main structure of PHGG nor introduced new functional groups, but the crystal structure changed slightly. Meanwhile, PHGG still has good thermal stability at higher temperatures.

The effects of concentration, pH, and temperature on the rheological properties of PHGG with various molecular weights were investigated. The results revealed that the PHGG solution was a shear-thinning non-Newtonian fluid under different conditions. At the same concentration, the greater the molecular weight of PHGG, the greater the apparent viscosity and storage modulus. PHGG with different molecular weight and M/G required different pH conditions to form gel. PHGG1 solution forms a weak gel structure with high strength at pH6. Temperature scanning suggested that the activation energy of PHGG1 solution was smaller than that of PHGG2 and PHGG3, and the viscosity was less dependent on temperature. Moreover, the variation trend of viscoelasticity of PHGG1 solution was the same as that of GG, which was more advantageous in thermal processing. Hence, PHGG1 may be an alternative stabilizer for GG.

The effects of GG and PHGG1 concentration on the stability and microstructure of oat protein emulsion were investigated. The particle size and Zeta potential analysis revealed that 0.8% GG emulsion and 0.8% PHGG1 emulsion had the smallest Z-average particle size, but the emulsion PDI values were larger, indicating the existence of molecular aggregation in the system. There was no significant difference in Zeta potential between different concentrations of emulsion. The 0.8 % GG emulsion was layered after 14 days of storage, while the 1 % PHGG1 emulsion maintained the stability of the oat protein emulsion within 14 days. This manifested that 1% PHGG1 emulsion had better emulsification and emulsion stability. Rheological results suggested that the emulsion with PHGG was a shear-thinning non-Newtonian fluid, and the 1% PHGG1 emulsion had higher apparent viscosity and storage modulus. Laser scanning confocal microscopy observation that the microstructure of 0.8% GG emulsion had open flocculation, and the microstructure of 1% PHGG1 emulsion demonstrated that oat protein and PHGG uniformly wrapped oil droplets to formed a dense network structure. Therefore, oat protein emulsion with 1% PHGG1 had excellent storage stability and microstructure.

Keywords: Guar gum; Controlled enzymatic hydrolysis; Absolute molecular mass; Oat protein emulsion; Stability

中英文缩写词对照表

缩略词	英文全称	中文全称
GG	Guar gum	瓜尔豆胶
PHGG	Partial hydrolysis of guar gum	部分水解瓜尔豆胶
GM	Galactomannan	半乳甘露聚糖
M/G	Mannose/Galactose	甘露糖/半乳糖
Mw	Weight average molecular weight	重均分子量
Mn	Number average molecular weight	数均分子量
PDI	Polydispersity index	多分散系数
FTIR	Fourier transform infrared absorption spectrometer	傅立叶变换红外光谱仪
NMR	Nuclear magnetic resonance	核磁共振波谱
XRD	X-ray diffraction	X 射线衍射仪
DSC	Differential scanning calorimetry	差示扫描量热法
TGA	Thermal gravimetric analyzer	热重分析仪
GPC	High performance gel permeation chromatography	高效液相凝胶渗透色谱
RID	Refractive index detector	示差折光检测器
MALLS	Multi-angle laser light scatter	多角度激光光散射
dn/dc	Refractive index increment	折射率增量
G'	Storage modulus	储能模量
G''	Loss modulus	损耗模量
CLSM	Confocal laser scanning microscope	激光共聚焦扫描显微镜

目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 瓜尔豆胶的概述.....	1
1.1.1 瓜尔豆胶的结构与性质.....	1
1.1.2 部分水解瓜尔豆胶的制备方法.....	2
1.1.3 部分酶解瓜尔豆胶的应用.....	3
1.2 燕麦乳的研究进展.....	5
1.2.1 燕麦乳的概述.....	5
1.2.2 燕麦乳的加工现状及解决方法.....	5
1.2.3 部分酶解瓜尔豆胶在乳液中的应用.....	6
1.3 聚合物分子量的检测.....	6
1.3.1 聚合物分子量表征参数.....	6
1.3.2 聚合物分子量检测方法.....	7
1.4 立题背景及研究意义.....	7
1.5 主要研究内容.....	8
第二章 一种用 GPC-RID 法测试 PHGG 绝对分子量及分子量分布的方法.....	9
2.1 前言.....	9
2.2 材料与仪器.....	9
2.2.1 实验材料.....	9
2.2.2 实验仪器.....	9
2.3 实验方法.....	9
2.3.1 GPC 分子量检测条件优化.....	9
2.3.2 GPC-MALLS 测定不同分子量 PHGG 的折射率增量.....	10
2.3.3 PHGG 溶液的制备.....	11
2.3.4 酶解瓜尔豆胶的相对分子量测定.....	11
2.3.5 酶解瓜尔豆胶的绝对分子量测定.....	11
2.3.6 利用 GPC-RID 检测绝对分子量的方法建立.....	11
2.3.7 精密度和重复性.....	11
2.3.8 数据分析.....	11
2.4 结果与讨论.....	11
2.4.1 GPC 分子量检测条件优化.....	11
2.4.2 GPC-MALLS 测定不同分子量 PHGG 的折射率增量.....	15
2.4.3 PHGG 的重均分子量测定.....	16
2.4.4 PHGG 的数均分子量测定.....	18

2.4.5 PHGG 的多分散系数测定.....	21
2.4.6 精密度和重复性.....	23
2.5 本章小结.....	24
第三章 不同分子量 PHGG 的制备、结构表征及热力学分析	25
3.1 前言.....	25
3.2 材料与仪器.....	25
3.2.1 实验材料.....	25
3.2.2 实验仪器.....	25
3.3 实验方法.....	25
3.3.1 瓜尔豆胶酶解影响因素的确定.....	25
3.3.2 瓜尔豆胶的可控酶解.....	26
3.3.3 部分酶解瓜尔豆胶的纯化.....	26
3.3.4 部分酶解瓜尔豆胶的相对分子质量测定	26
3.3.5 单糖组成分析及半乳甘露聚糖含量测定	27
3.3.6 部分酶解瓜尔豆胶的结构表征.....	27
3.3.7 部分酶解瓜尔豆胶的热稳定性分析.....	28
3.3.8 数据分析.....	28
3.4 结果与讨论.....	28
3.4.1 瓜尔豆胶酶解条件的优化.....	28
3.4.2 瓜尔豆胶的可控酶解.....	30
3.4.3 部分酶解瓜尔豆胶的单糖组成.....	31
3.4.4 部分酶解瓜尔豆胶的结构表征.....	32
3.4.5 部分酶解瓜尔豆胶的热稳定性分析.....	34
3.5 本章小结.....	36
第四章 不同分子量 PHGG 的流变学特性及对燕麦蛋白乳液稳定性和 微观结构的影响	37
4.1 前言.....	37
4.2 材料与仪器.....	37
4.2.1 实验材料.....	37
4.2.2 实验仪器.....	37
4.3 实验方法.....	37
4.3.1 不同分子量 PHGG 溶液的流变学影响因素.....	37
4.3.2 流变学性质的测定方法.....	38
4.3.3 燕麦蛋白乳液的配置.....	38
4.3.4 GG 和 PHGG1 乳液的储藏稳定性测定.....	38
4.3.5 GG 和 PHGG1 乳液的 LUMi Sizer 稳定性分析	39
4.3.6 GG 和 PHGG1 乳液的粒径和 Zeta 电位测定.....	39
4.3.7 GG 和 PHGG1 乳液的乳化性和乳化稳定性测定.....	39

4.3.8 GG 和 PHGG1 乳液的浊度测定	39
4.3.9 GG 和 PHGG1 乳液的黏度测定	39
4.3.10 GG 和 PHGG1 乳液的微观结构分析	39
4.3.11 数据分析	40
4.4 结果与讨论	40
4.4.1 浓度对不同分子量 PHGG 水溶液流变特性的影响	40
4.4.2 pH 对不同分子量 PHGG 水溶液流变特性的影响	42
4.4.3 温度对不同分子量 PHGG 水溶液流变特性的影响	43
4.4.4 不同浓度 GG 和 PHGG1 对燕麦蛋白乳液稳定性的影响	45
4.4.5 不同浓度 GG 和 PHGG1 对燕麦蛋白乳液粒径和 Zeta 电位的影 响	47
4.4.6 不同浓度 GG 和 PHGG1 对燕麦蛋白乳液乳化性和乳化稳 定性的影响	48
4.4.7 不同浓度 GG 和 PHGG1 对燕麦蛋白乳液流变学特性的影 响	49
4.4.8 GG 和 PHGG1 对燕麦蛋白乳液微观结构的影响	50
4.5 本章小结	52
主要结论与展望	53
主要结论	53
工作展望	54
参考文献	55
附录 I :实验相关附图	63

第一章 绪论

1.1 瓜尔豆胶的概述

1.1.1 瓜尔豆胶的结构与性质

瓜尔豆胶 (GG) 是从瓜尔豆胚乳中提取的一种非离子型中性多糖, 主要成分为半乳甘露聚糖, 以 β -1,4-糖苷键连接 D-吡喃甘露糖, 构成甘露聚糖主链, D-吡喃半乳糖通过 α -1,6-糖苷键连接在甘露糖主链上^[1]。由于瓜尔豆胶产地不同, 甘露糖与半乳糖比值 (M/G) 存在差异, 分布在 1.6-2.0 之间^[2-4]。

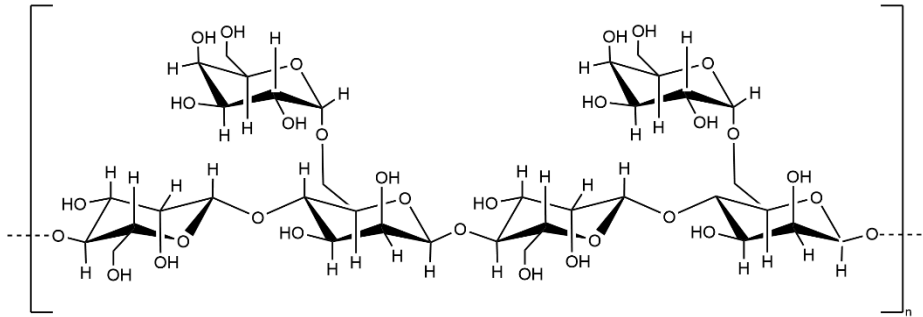


图 1-1 瓜尔豆胶的结构

Fig. 1-1 The structure of guar gum

1.1.1.1 溶解性与增稠性

半乳甘露聚糖 (GM) 中半乳糖含量与溶解度呈正相关^[5], 因此 GG 溶解度高于其它类型 GM。GG 是已发现的黏度最高的天然胶体^[6], 其半乳糖侧链能够与水分子形成氢键, 分子间缠绕导致溶液粘度增加^[7], 常作为增稠剂、稳定剂使用。GG 与其它胶体复配使用的增稠效果优于单一使用, 因为 GG 分子链间的缠结, 以及甘露糖主链上未被半乳糖取代的区域与其它胶体 (如: 黄原胶、结冷胶) 之间的氢键作用^[8], 共同导致体系黏度增加。

1.1.1.2 流变性

瓜尔豆胶溶液是一种非牛顿假塑性流体, 添加在饮料、乳品中可以使口感更加丝滑。添加 GG 的食品体系黏度和力学特性受到 GG 溶液的浓度、酸碱度 (pH) 和加工温度等因素的影响。据报道, 瓜尔豆胶溶液在 25-40°C 时黏度最大^[9], pH 对 GG 溶液表观粘度影响不大, 加工温度与 GG 溶液的表现粘度呈负相关^[10]。

1.1.1.3 应用局限性

GG 的相对分子质量较大, 其长链分子会形成卷曲的球形结构, 将大量羟基包裹在分子内部^[11], 这会导致 GG 水合速度慢、黏度不易控制, 不满足工业生产中快速水合及溶胀的要求; 此外, GG 在较低浓度下即可形成高黏度溶液, 溶液黏度较高时会降低体系中营养素的消化率^[12], 这限制了 GG 在食品中的应用。因此需要降低 GG 分子量, 提高其理化性能, 进而拓展 GG 的应用范围。

1.1.2 部分水解瓜尔豆胶的制备方法

1.1.2.1 物理降解法和化学水解法

目前,有多种制备部分水解瓜尔豆胶(PHGG)的方法,包括物理降解法和化学水解法。物理降解法是利用超声、微波、辐照等方法降低分子量^[13-16],这种方法虽然不引入新的基团,但是降解的可控性较差,通常生产分子量分布窄、分子量低的瓜尔豆胶^[17]。化学水解法是利用化学反应改变多糖的结构,形成新的化合物,如:羧甲基瓜尔豆胶和羟丙基瓜尔豆胶;化学水解法会引入新的结构进而改变GG的生物活性,且制备过程中引入的酸、碱等不环保的化学试剂,在生产中去除杂质的成本较高。

1.1.2.2 酶解法

天然多糖具有结构多样性,特定的酶解反应可以生产不同性质的产品,拓展多糖的应用范围。为了获得食品级的PHGG,食品加工中常用的制备方法是酶解法。根据GG的结构特点, α -半乳糖苷酶和 β -甘露聚糖酶是降低GG分子量的关键酶,其中 α -半乳糖苷酶作用于 α -1,6-糖苷键,去除与主链连接的半乳糖取代基^[18, 19]; β -甘露聚糖酶随机作用于甘露聚糖主链的 β -1,4-糖苷键,将GG酶解为短链寡聚物。如图1-2所示,两种酶单独或协同作用能够实现GG部分或完全酶解,当半乳糖含量低于16.2%时,GG溶液会因为形成聚合物而导致浊度增加^[20],所以选择二元酶协同水解GG时,需要注意 α -半乳糖苷酶的添加比例。不同来源的酶具有不同的特异性作用位点,GG酶解反应常用的酶包括以下三类:

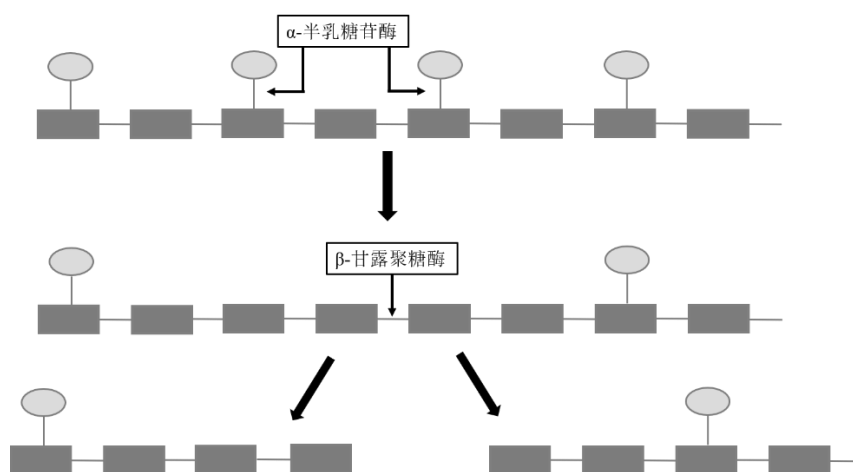


图 1-2 混合酶制剂的作用机制

Fig. 1-2 Mechanism of action of mixed enzyme preparations

1) α -半乳糖苷酶

α -半乳糖苷酶广泛存在于植物、动物及微生物中,大多数属于糖苷水解酶 27 (Glycoside hydrolase, GH)和 GH36 家族。已知真菌 α -半乳糖苷酶存在于 GH27 和 GH36 家族;细菌来源的酶多为 GH36 家族,耐热性更好,最适 pH 为 6.0-6.5,而真菌来源的酶更偏酸性^[21]。

α -半乳糖苷酶能够水解半乳甘露聚糖侧链非还原端的半乳糖残基,促进 β -甘露聚糖酶的水解作用^[22]。Xu 等人^[23]从新鲜的香菇中分离纯化出一种分子量为 64 kDa 的 α -半

乳糖苷酶，对瓜尔豆胶有一定的水解能力。黑曲霉 α -半乳糖苷酶在巴斯德毕赤酵母 (*KM71H*) 中表达水平为 1299 U/mL^[24]，米黑根毛霉 α -半乳糖苷酶在巴斯德毕赤酵母 (*GS115*) 中表达水平高达 1953.9 U/mL^[25]，因此真菌来源的 α -半乳糖苷酶降解瓜尔豆胶侧链的能力更强。Bulpin 等人^[26]利用 α -半乳糖苷酶对半乳糖含量为 38%、甘露糖含量为 62%的 GG 进行改性，得到与刺槐豆胶的性质相似的 GG，其半乳糖含量为 22%-24%。

2) β -甘露聚糖酶

β -甘露聚糖酶 (*EC3.2.1.78*) 是一种甘露聚糖的内切酶，它随机切割链内 β -1,4-糖苷键，释放短链甘露聚糖并产生新的链端，水解主要产物是甘露二糖和甘露三糖^[27]。 β -甘露糖苷酶 (*EC3.2.1.25*) 是一种外切酶，酶解甘露聚糖和甘露低聚糖等短寡糖的非还原末端，释放游离甘露糖^[28]。

通常使用的 β -甘露聚糖酶来源于微生物，具有易于处理、生产率高等优点^[29]，其适用范围大于植物来源的 β -甘露聚糖酶。李慧玲等人^[30]从亚麻液中筛选一株可降解瓜尔豆胶生产 β -甘露聚糖酶的金黄杆菌 (*HL-28*)，经紫外诱变 HL-28 获得突变菌株 (*HL-28-30*)，酶活力提高 426.54%。Erkan 等人^[31]采用发酵法生产 β -甘露聚糖酶，该酶能够将 0.5 g/L 的 GG 溶液粘度从 1883.80 mPa.s 降至 8.45 mPa.s。Mudgil 等人^[32]利用黑曲霉纤维素酶 (β -甘露聚糖酶) 将 GG 特性黏度由 9 降至 0.28，并通过核磁共振、傅里叶红外光谱和 X-ray 等表征手段发现 PHGG (Mw=7936.5 Da) 结构未发生变化。Kumar 等人^[33]用 β -甘露聚糖酶 (*MANB-1601*) 水解刺槐豆胶得到 β -甘露寡糖混合物，采用尺寸排阻层析法分离得到不同聚合度的低聚糖。

3) 普鲁兰酶

普鲁兰酶是淀粉脱支酶，可以识别支链淀粉中的 α -1,6-糖苷键，生产由 α -1,4-糖苷键连接的直链淀粉。 α -半乳糖苷酶和普鲁兰酶能够专一性的水解 α -1,6-糖苷键，实现半乳甘露聚糖的脱支化，但是 α -半乳糖苷酶用于规模化生产脱支瓜尔豆胶的成本高。张焕仕等人^[34]考察了普鲁兰酶对瓜尔豆胶脱支效应的影响，结果表明，瓜尔豆胶的半乳糖含量、相对分子质量和粘度均降低，酶解反应未改变瓜尔豆胶主链的主体结构和糖苷键的构型。高兆建等人^[35]研究发现，来源于泡盛曲霉的普鲁兰酶分离纯化后，对含有 α -1,6-糖苷键的糖类具有专一性的催化作用，在高温下催化活性和稳定性显示较高优势。

1.1.3 部分酶解瓜尔豆胶的应用

PHGG 和 GG 具有相似的化学结构，添加到食品中可以改善感官品质、营养和质构，提高消费者的可接受性，如：调味汁、乳制品和烘焙食品^[36]；中高分子量 PHGG 能够提供体系所需黏度，发挥增稠剂和稳定剂的功效并改善产品质地；低分子量 PHGG 可以作为功能性膳食纤维添加在膳食纤维强化食品中，起到调节肠道菌群的作用^[37]。因此不同分子量 PHGG 能够改善 GG 水溶液的高粘度特性，同时保留与凝胶特性相关的功能，制备不同分子量的 PHGG，可以为新产品的开发提供思路。

1.1.3.1 普通食品

PHGG 是一种天然稳定剂、可溶性膳食纤维，能够在不影响感官特性的情况下改善

产品的品质，避免了人工合成物质对人体健康的损害。在液态食品中，添加 PHGG 有利于维持酸奶凝胶网络的稳定，促进有益微生物的生长^[38]，生产出质地好、营养价值高且感官特性得到改善的酸奶^[39]；段汝清等人^[40]将 GG 酶解液与蛋清蛋白进行接枝反应，结果显示，GG 酶解液能够改善蛋清蛋白的凝胶强度、持水性及微观结构。在果汁中添加瓜尔豆胶，大果粒橙汁在五周内保持稳定，而小果粒橙汁会形成大颗粒^[41]；添加瓜尔豆胶的果汁经过热加工处理，果汁的浊度和黏度略有降低^[42]。中高分子量 PHGG 能否维持液态食品的稳定性和改善产品的品质，还需要进一步研究。

在淀粉食品中，添加 PHGG 具有改善感官属性和储藏质量的功能。由于 PHGG 和淀粉竞争水分，对面筋蛋白有弱化作用，高分子量胶体会对面包品质产生负面影响^[43]，而适量的 PHGG 能够降低面团的黏度，提高面团的强度和稳定性^[44]。胡慧芳等人^[45]研究低分子量瓜尔豆胶对面团流变学和馒头品质的影响，结果表明，PHGG 添加量为 3% 时，馒头比容达到最大，馒头硬度、弹性、内聚性、咀嚼性降低而黏附性和老化时间增加；此外，面筋-淀粉混合物中添加可溶性膳食纤维（SDF）显著降低了淀粉消化率^[46]，降低馒头体外消化的升糖指数。

在肉制品中，单一胶体、蛋白质-多糖复配^[47]或 SDF-胶体复配^[48]可以作为脂肪替代品，减少肉制品中脂肪含量同时改善肉制品的质地和凝胶性；这是因为多糖/胶体会形成凝胶网络结构用来储存水分，提高肉制品的持水能力，增加产品的多汁性^[49]。Lin 等人^[50]利用超声波降解法制备不同分子量的魔芋凝胶，并添加在中式香肠中模拟脂肪的质地和感官特征。有研究表明，GG 作为脂肪替代品，可以提高产品的乳化稳定性、蒸煮得率和持水性，但是渗透能力较低，产品的色泽不自然^[51,52]。在肉制品应用中，PHGG 能否改善 GG 作为脂肪替代品的性质缺陷，仍有广泛的研究空间。

1.1.3.2 功能性食品

鉴于人们饮食结构的现状，摄入大量的油脂，容易产生高血糖、高血脂等疾病；餐间的零食摄入导致每日卡路里的摄入超标，加之久坐的工作方式、缺乏运动，导致社会肥胖比例上升，研制科学营养的减肥代餐食品成为研究趋势。高膳食纤维保健食品或膳食纤维强化食品与当代消费者的生活理念相符，具有广阔的研究前景，预计会受到市场广泛的青睐。2019 年雀巢健康科学有限公司在国内推出首款液体整蛋白全营养配方特殊医学用途配方食品“佳膳佳立畅”，含有高度可发酵的可溶性膳食纤维半乳甘露聚糖，也是国内首款添加 PHGG 的整蛋白型液体全营养配方产品。

PHGG (Mw: 2000-30000 Da) 膳食纤维能够调节血糖、降血脂、降低胆固醇、缓解肠易激综合征的症状^[53-55]。高膳食纤维含量的食物一般所需咀嚼时间长，能够降低食欲，粘性膳食纤维通过增加胃肠中食糜的黏度，延迟胃的排空时间，非粘性膳食纤维（如：PHGG）刺激胃肠激素在结肠上部释放^[37]，产生饱腹效果，达到预防肥胖的功效。此外，食品中添加 GG 会形成高黏溶液，可降低肠道通过率，通过高黏度抑制蛋白质和碳水化合物的消化，但是在不同程度上会抑制钙、铁、锌的吸收，营养素抑制效果与体系黏度呈正相关。而 Simon 等人^[56]研究表明，不同分子量瓜尔豆胶（~40 kDa, ~300 kDa, ~1350 kDa 和 ~2200 kDa）均能显著降低餐后胰岛素水平。因此不同分子量 PHGG 在功能性食

品中存在潜在优势，还需要进一步研究。

1.1.3.3 其它应用

PHGG 除应用于食品体系，还在造纸、化妆品、纺织和石油回收中作为稳定剂和增稠剂使用^[57-59]。王世彬等人^[60]添加重均分子量为 4.25×10^5 g/mol 的 PHGG 于油田改造压裂液中，防止 GG 长链互相缠绕形成聚集体堵塞通道。此外，瓜尔豆胶及其衍生物也可用于凝胶和生物可降解膜的制备、药物生产和纳米材料中，作为粘结剂和壁材^[61]。

1.2 燕麦乳的研究进展

1.2.1 燕麦乳的概述

随着消费者健康意识和购买力的提高，对于食品新颖、美味、健康的需求增强，植物蛋白饮料逐渐成为生产商的关注焦点。燕麦富含丰富的营养成分和功能性成分^[62]，含有 43%-65% 的淀粉，16% 左右的蛋白质^[63]，6.3% 左右的油脂，17%-21% 的 SDF，SDF 的主要组分是 β -葡聚糖^[64]，是一种非淀粉多糖^[65]。美国 FDA 认定燕麦为功能性食物，具有降血糖、降血脂等功能特性^[66]，燕麦经过生产加工所得的燕麦乳中保留了大部分的膳食纤维，具有有益功能。

1.2.2 燕麦乳的加工现状及解决方法

燕麦乳体系比较复杂，在加工和储藏过程中由于燕麦乳组分间的相互作用，会导致燕麦乳沉淀和分层。燕麦乳中经常添加植物油形成水包油乳液体系，来模拟与牛奶蛋白相似的口感，但是容易造成乳液稳定性降低，出现脂肪上浮现象；燕麦蛋白含量较低，乳化性较差，不能完全吸附到油水界面稳定乳液体系，导致蛋白质稳定的液滴出现絮凝、聚结现象；燕麦中含有的 β -葡聚糖容易与淀粉形成凝胶^[67]，且淀粉在储藏过程中容易老化，造成燕麦乳质地不均匀，食用风味变差^[68]。

市售燕麦乳中通过添加风味物质（如：椰浆）改善口感，添加碳酸钙等营养强化剂提高营养价值，但是如何改善燕麦乳体系的储藏稳定性是亟待解决的问题。目前提高燕麦乳稳定性的方法包括：筛选高蛋白的燕麦原料^[69]、优化加工工艺、使用先进的加工技术及添加配料等方法。有研究者^[70]通过糖基化反应修饰蛋白质，将不同分子量的葡聚糖连接在小麦蛋白的氨基酸残基上，形成蛋白质-多糖聚集体，提高蛋白质的乳化性和溶解性；且多糖分子量越高，体系乳化稳定性越好。

为了改善燕麦乳的稳定性，常用的食品添加剂包括增稠剂和乳化剂，它们提高燕麦蛋白乳液稳定性的原理是：1) 疏水作用：增稠剂/乳化剂与直链淀粉的 α -螺旋结构通过疏水作用结合起来，形成稳定的螺旋复合结构；但是燕麦蛋白是一种有序的球状蛋白质，若蛋白质暴露的非极性区域与油相结合，产生疏水吸引力，会导致液滴的絮凝。2) 空间位阻：增稠剂/乳化剂快速吸附到油水界面上燕麦蛋白无法完全覆盖的作用位点，形成粘弹性保护层，从而产生空间位阻，防止液滴的聚结和絮凝^[71]。3) 共价相互作用：乳化剂（如：蛋白质）含有游离巯基或二硫键，在相同液滴上形成共价键，提高液滴稳定性；如果不同液滴间形成共价键，将会导致液滴聚结，降低液滴稳定性。4) 氢键作用：增稠

剂（如：胶体）分子链中含有羟基与水分子产生氢键作用，提高体系的黏度，减缓液滴的重力沉降或上浮。

1.2.3 部分酶解瓜尔豆胶在乳液中的应用

近年来以燕麦为原料，加工制作燕麦乳的工艺得到广泛关注，瑞典 Oatly 公司生产的燕麦乳具有与牛奶相似的颜色和独特的风味；国内公司也陆续推出，“谷物星球燕麦 250”、“三顿半燕麦谷物饮料”、“六养燕麦奶”、“植物说燕麦奶”以及“植白说燕麦乳”，但是这些产品普遍存在口感不够顺滑、产品风味寡淡和储藏中出现沉淀的问题。为实现燕麦乳的成功商业化，提高燕麦乳的品质和储藏稳定性至关重要。

燕麦乳中含有的燕麦蛋白-水包油乳液是体系失去稳定的主要原因之一。GG 是一种天然的增稠剂和乳化剂，由亲水性的半乳糖和甘露糖单元组成，能够溶于水，形成氢键作用和空间位阻来稳定分散的油相。Lei 等人^[72]研究不同类型多糖对蛋白质（大豆卵磷脂、乳清分离蛋白）稳定的乳液体系感官性能和摩擦系数的影响，结果显示 GG 乳液形成无分子聚集的均匀体系，乳液呈乳白色，与脂肪特性更为相似；也有文献报道^[73]，瓜尔豆胶会降低蛋白质在油水界面的吸附能力，无法覆盖液滴，导致乳液的乳化性和乳化稳定性降低。Gong 等人^[74]研究表明，GG 通过二硫键、疏水作用与蛋白质结合，使蛋白质暴露出更多的疏水基团，附着在油相液滴表面；或者连接多个蛋白质形成更大的聚集体，微观结构表现为丝状的聚集，不利于界面处的吸附。GG 在不同蛋白乳液中表现出不同的性质，这可能因为：1) 蛋白质结构存在差异，多糖通过影响蛋白质二级结构的变化，进而影响其疏水作用^[70]；2) 瓜尔豆胶黏度过高，是一种不易吸附的胶体，其吸附到油水界面的速率小于分散相液滴破碎速率，无法快速形成界面膜来稳定水包油乳液。Santos 等人^[75]研究显示，虽然 0.3%-0.5% 的 GG 对马铃薯蛋白质乳状液稳定性有积极影响，但是因为“耗竭絮凝”机制，蛋白质乳液形成更多细长的聚集体，使乳液粘弹性增加形成凝胶状结构；并且马铃薯蛋白凝胶乳液与燕麦蛋白液态乳体系状态不符。

PHGG 是一种非离子型乳化剂。PHGG 与 GG 的分子结构相似，可以作为一种糖基供体，与蛋白质发生糖基化反应^[76]，提高植物蛋白乳液的乳化活性和乳化稳定性，改善乳液的储藏稳定性。此外，PHGG 分子链的羟基与水分子形成氢键，通过增稠作用稳定乳液且不影响蛋白质的乳化性^[77]。由于 PHGG 分子链缩短，形成的三维网状结构强度降低，对于其能否维持燕麦蛋白乳液的稳定性还需进一步研究。

1.3 聚合物分子量的检测

1.3.1 聚合物分子量表征参数

GG 分子量的大小与流变特性、溶解度、黏度等性质相关，聚合物分子量检测中常见的表征参数是重均分子量（ M_w ）、数均分子量（ M_n ）、峰值分子量（ M_p ）和多分散系数（PDI）。 M_w 是以质量作为加权进行统计的分子量，重均分子量更多的体现大分子物质的情况，因为分子量越大单个分子会更重； M_n 是以高分子聚合物中分子数目为加权进行统计的分子量，数均分子量更多会体现小分子物质在样品中的情况； M_p 是高效

液相凝胶渗透色谱分子量分布曲线图中最高峰处的分子量，它代表峰值分子量左右的分子在整个样品中占比最多；PDI 是 M_w 与 M_n 的比值，常用来描述多聚体分子量的分布，PDI 值大于 1，且 PDI 值越大，表明分子量分布范围越宽。因为高分子的黏度、强度等特性较多取决于大分子的情况，所以常用 M_w 来表示聚合物的分子量。

GG 和 PHGG 的分子量分布范围广，需要根据样品的分布特点选择相应的检测方法。下面详细介绍高效液相凝胶渗透色谱-示差检测器联用法（GPC-RID）和高效液相凝胶渗透色谱-多角度激光光散射联用法（GPC-MALLS）。

1.3.2 聚合物分子量检测方法

高效液相凝胶渗透色谱（GPC）是常用的聚合物分子量检测仪器，具有高效、快速、灵敏度高的特点。色谱柱填料是具有化学惰性的多孔网状凝胶^[78]，检测原理是根据待测物相对分子质量的大小分离组分，分子量较小的组分先进入填料层内，洗脱路径长，出峰时间晚于分子量大的组分。

GPC-RID 是检测聚合物相对分子质量的常用方法。首先利用 Waters 软件建立标准品分子质量对数（ $\text{Log}M_w$ ）与洗脱时间（ T ）的标准曲线，其次使用示差检测器收集待测样品洗脱信号，最后根据待测样品的保留时间，借助标准曲线计算其相对分子质量^[79]。GPC-RID 检测分子量的准确度与标准品和待测物结构的相似度有关，比如，球形蛋白质分子量测定结果偏差小于线性蛋白质^[80]。目前常用的标准品有右旋糖酐对照品^[81]和普鲁兰对照品，暂时没有与半乳甘露聚糖结构相同的聚合物标品，所以半乳甘露聚糖类胶体（如：瓜尔豆胶）的相对分子量检测结果相对偏差较大。

近年来，GPC-MALLS 法因其准确性和高效性而逐渐受到研究者的关注。此方法常用来检测聚合物的绝对分子质量，同时具备凝胶渗透色谱和光散射法的优势。首先利用激光散射仪将激光照射到聚合物表面，从各个方向产生散射光，然后借助 ASTRA 软件获取待测样品信号并进行数据处理。在不参考标准品形状结构的条件下，即可测定多糖的绝对分子质量和多分散系数^[82]，Fan 等人^[83]利用 GPC-MALLS（ $dn/dc=0.145$ ）检测 GG 的绝对分子量为 2.71×10^6 Da。GPC-MALLS 法检测准确度高，但仪器较为昂贵，检测成本较高，实验室普及度较低^[84]。

目前，张蕊鑫等人^[85]通过建立 GPC-RID 检测的相对分子量与 GPC-MALLS 检测的绝对分子量之间的转换关系，计算得到褐藻胶的绝对分子质量和多分散系数。因此，建立一种基于 GPC-RID 法检测聚合物绝对分子质量的方法，能够降低仪器成本，可以作为聚合物分子量检测研究的新方向。

1.4 立题背景及研究意义

在食品体系中，液体食品储藏过程中会出现溶质沉淀、乳化、絮凝等不稳定现象，会导致食品的感官品质降低。通过向食品中添加稳定剂、乳化剂能够改善这些问题。GG 是目前发现的黏度最高的天然稳定剂，它具有分子量大、羟基含量高的特点，添加少量 GG 即可形成高粘度体系。GG 的高粘度特性也造成一些使用局限^[22]：1) 溶胀和水合的速度慢；2) 影响产品品质及营养素消化率。

GG 的分子量与黏度呈正相关，所以研究人员尝试降低 GG 的分子量来降低体系黏度。根据分子量检测原理的差异，GPC-RID 法需要参考标准品来检测相对分子质量，目前暂时没有商业化的半乳甘露聚糖标品，因此 PHGG 分子量检测准确性受到影响；虽然 GPC-MALLS 法检测绝对分子量不需要对照品，但是分子量检测准确性受 dn/dc 值影响，且仪器成本较高，实验室普及度较低。此外，酶解法具有温和、可控和食用安全的特点，现阶段研究集中于利用单一酶解将 GG 降解为低分子量的寡糖，对于中高分子量和中分子量 PHGG 的可控制备、产物结构和性质的分析较少。最后，市售燕麦乳中包含的水包油乳液是体系失去稳定的主要原因之一，体系中的燕麦蛋白含量少，且乳化性低于常见的植物蛋白；因此需要添加合适的稳定剂，在维持燕麦乳营养和质地不变的情况下，提高燕麦蛋白乳液的储藏稳定性，而目前关于 PHGG 对于燕麦蛋白乳液稳定性、流变学特性及微观结构的影响研究较少。

基于上述背景，本文采用最小二乘法拟合相对分子质量和绝对分子质量的转换方程，建立一种 GPC 与通用检测器联用检测 PHGG 绝对分子质量的方法，降低分子量的检测成本，提高检测准确性。通过可控酶解制备不同分子量的 PHGG，研究不同因素对 PHGG 流变学性质的影响，及中高分子量 PHGG 对燕麦蛋白乳液的影响，为 PHGG 应用于燕麦乳体系提供实验依据，有助于燕麦乳的工业生产和 GG 的广泛应用。

1.5 主要研究内容

本课题以瓜尔豆胶为研究对象，首先建立一种利用 GPC-RID 检测 PHGG 分子量及分子量分布的方法。其次，通过调节影响酶解的关键因素制备不同分子量的 PHGG，并研究不同分子量 PHGG 单糖组成、结构和热力学性质的差异。最后，研究不同因素对于不同分子量 PHGG 流变学特性的影响，以及中高分子量 PHGG 对燕麦蛋白乳液稳定性和微观结构的影响。主要研究内容包括：

(1) 通过 GPC 检测 PHGG 分子量，对色谱柱、流动相、柱温、流速进行优化；并测定影响绝对分子量检测准确度的关键指标：折射率增量 (dn/dc)，确定不同分子量范围内 PHGG 的 dn/dc 值，以提高 GPC 检测 PHGG 分子量的准确度。

(2) 在 GPC 检测 PHGG 分子量的最优条件下，以右旋糖酐为标准品，通过 GPC-RID 检测不同分子量 PHGG 的相对分子质量参数，通过最小二乘法将相对分子质量参数与 GPC-MALLS 检测得到的绝对分子质量参数进行多项式拟合。建立一种分子量检测方法：通过 GPC-RID 检测 PHGG 绝对重均分子量、绝对数均分子量和多分散系数。

(3) 以 PHGG 的分子量为指标，通过酶解法对酶解方式、酶添加量、酶解时间、底物浓度和温度进行考察，以确定影响酶解的关键因素；同时考察不同分子量 PHGG 的单糖组成、分子结构和热力学性质的差异。

(4) 通过流变学实验，研究浓度、pH、温度对于 PHGG 流变学特性的影响，为不同分子量 PHGG 的应用提供流变学研究基础。选择与 GG 流变学性质相似的中高分子量 PHGG ($M_w=8.92 \times 10^5$ g/mol) 应用于燕麦蛋白乳液中，研究不同浓度的 GG 和中高分子量 PHGG 对燕麦蛋白乳液稳定性和微观结构的影响。

第二章 一种用 GPC-RID 法测试 PHGG 绝对分子量及分子量分布的方法

2.1 前言

瓜尔豆胶和部分酶解瓜尔豆胶的分子量分布较宽，具有多分散性。利用 GPC-RID 法和 GPC-MALLS 法测定 PHGG 分子量的结果相差较大，这与仪器检测条件和检测方法的原理有关^[86]。GPC-RID 法检测 PHGG 相对分子量的准确度与对照品、色谱柱、流动相、柱温和流速有关^[87]。根据 GPC-MALLS 法的检测原理（式 2-1、式 2-2）可知， dn/dc 值会影响 PHGG 绝对分子量检测的准确度。此外，GPC-MALLS 法用于检测绝对分子量的成本较高，与 GPC-RID 仪器相比，实验室普及度更低。因此，需要提高 GPC 检测 PHGG 分子量的准确性，降低检测成本。

本章首先优化了 GPC 检测 PHGG 分子量的色谱条件。其次，制备 12 个不同分子量的 PHGG，并测定其 dn/dc 值，确定不同分子量范围内 PHGG 的 dn/dc 值，这为准确测定 PHGG 的相对分子质量和绝对分子质量提供数据支持。最后，利用最小二乘法的多项式拟合，建立 GPC-RID 检测的相对分子量参数与 GPC-MALLS 检测的绝对分子量参数之间的转换方程。

2.2 材料与仪器

2.2.1 实验材料

酶解瓜尔豆胶样品，实验室制备样品；硝酸钠，国药集团化学试剂有限公司；右旋糖酐标准品，中国食品药品检定研究院。

2.2.2 实验仪器

Waters1525 高效液相色谱仪，美国 Waters 公司；Agilent1260 高效凝胶渗透色谱，美国怀雅特技术公司；TSK-gel G4000PW_{XL}（300×7.8 mm）凝胶色谱柱，日本 Tosoh 公司；Shodex OHpak SB-805HQ（300×8.0 mm）凝胶色谱柱，日本昭和电工株式会社；UltrahydrogelTM linear（300×7.8 mm）凝胶色谱柱，美国 Waters 公司；RET 磁力搅拌器，德国 IKA 公司。

2.3 实验方法

2.3.1 GPC 分子量检测条件优化

2.3.1.1 色谱柱型号对标准曲线的影响

设置 GPC 色谱检测条件：流速为 0.5 mL/min，流动相为 0.1 mol/L 硝酸钠，柱温为 40°C，用三种不同型号的色谱柱 TSK-gel G4000PW_{XL}（300×7.8 mm）、Shodex OHpak SB-805HQ（300×8.0 mm）和 UltrahydrogelTM linear（300×7.8 mm）分别检测右旋糖酐标准品的分子量，然后进行标准曲线拟合，比较相关性系数大小和色谱柱分离效果。

2.3.1.2 流动相对不同分子量 PHGG 检测的影响

设置 GPC 色谱检测条件：色谱柱型号为 Ultrahydrogel™ linear (300×7.8 mm)，流速为 0.50 mL/min，柱温为 40℃，流动相依次设置为 0.05 mol/L、0.10 mol/L、0.30 mol/L、0.50 mol/L 硝酸钠，分别检测 GG 和三种 PHGG 的分子量，比较样品的出峰情况。

2.3.1.3 柱温对不同分子量 PHGG 检测的影响

设置 GPC 色谱检测条件：色谱柱型号为 Ultrahydrogel™ linear (300×7.8 mm)，流动相为 0.30 mol/L 硝酸钠，流速为 0.50 mL/min，柱温依次设置为 30℃、40℃、50℃，分别检测 GG 和三种 PHGG 的分子量，比较样品的出峰情况。

2.3.1.4 流速对不同分子量 PHGG 检测的影响

设置 GPC 色谱检测条件：色谱柱型号为 Ultrahydrogel™ linear (300×7.8 mm)，流动相为 0.30 mol/L 硝酸钠，柱温为 40℃，流速依次设置为 0.50 mL/min、0.60 mL/min、0.70 mL/min、0.80 mL/min，分别检测 GG 和三种 PHGG 的分子量，比较样品的出峰情况。

2.3.2 GPC-MALLS 测定不同分子量 PHGG 的折射率增量

可控酶解制备 12 个不同分子量的 PHGG (表 2-2, 样品编号为 SD-1~SD-12)，然后分别配置为 1 mg/mL 的母液，再将母液配置为 6 个浓度梯度的水溶液，依次注入 Optilab T-rEX 示差折射率检测器中获取检测信号，使用信号 (扣除溶剂信号) 对浓度作图，利用 ASTRA 软件进行线性曲线拟合，计算斜率即为 dn/dc 值。

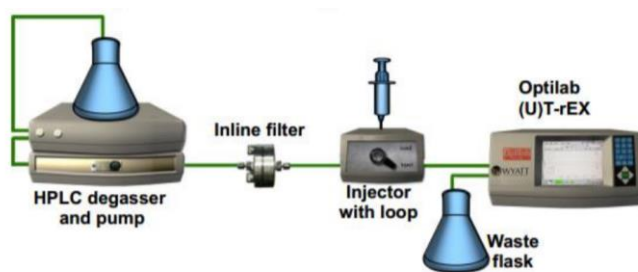


图 2-1 测定 dn/dc 值的仪器装置图

Fig. 2-1 Instrument device diagram for measuring refractive index increment

多角度激光光散射检测器的计算原理如公式 2-1、2-2 所示^[88]，多角度检测器的输出信号与绝对重均分子量和 dn/dc 的平方成正比。

$$A_{LS} = K_{LS} K' \left(\frac{dn}{dc}\right)^2 M_w m_{inj} \quad (2-1)$$

$$K' = \frac{4n_0^2 \Pi^2}{N_A \lambda_0^4} \quad (2-2)$$

式中， A_{LS} 是光散射信号峰的总面积； K_{LS} 是光散射检测器常数； m_{inj} 是注射聚合物的质量； n_0 是溶剂在 λ_0 波长下的折射率。

2.3.3 PHGG 溶液的制备

通过可控酶解制备 10 个不同分子量的 PHGG，分别配置为 10 g/L 的水溶液。根据不同 dn/dc 值，将样品标记为“ $S_{dn/dc}$ -样品编号”。选用不同酶解批次的 PHGG 验证已经构建的分子量拟合方程的相对误差，将样品标记为“ $V_{dn/dc}$ -样品编号”。

2.3.4 酶解瓜尔豆胶的相对分子量测定

GPC-RID 测试相对分子质量的色谱条件：色谱柱为 Ultrahydrogel™ linear (300×7.8 mm)，流动相为 0.3 mol/L $NaNO_3$ ，流速为 0.6 mL/min，检测器温度为 40°C，进样体积为 20 μ L。建立右旋糖酐标准品分子量对数值 (LogMw) 与保留时间 (T) 的标准曲线。

PHGG 的相对分子量和多分散系数 d_p 测定：利用 Waters 软件收集 PHGG 的保留时间，然后根据标准曲线计算其相对重均分子量 ($M_{w,R}$)、相对数均分子量 ($M_{n,R}$) 和多分散系数 ($d_{p,R}=M_{w,R}/M_{n,R}$)。

2.3.5 酶解瓜尔豆胶的绝对分子量测定

GPC-MALLS 测试绝对分子质量的色谱条件与 GPC-RID 相同。利用 ASTRA 软件采集检测器的样品信号并进行数据分析，得到不同分子量 PHGG 的绝对重均分子量 ($M_{w,M}$)、绝对数均分子量 ($M_{n,M}$) 和多分散系数 ($d_{p,M}$)。

2.3.6 利用 GPC-RID 检测绝对分子量的方法建立

利用最小二乘法，将 GPC-RID 测定的 $M_{w,R}$ 和 $M_{n,R}$ ，分别与 GPC-MALLS 测定的 $M_{w,M}$ 和 $M_{n,M}$ 进行多项式拟合，获得由相对分子量参数转换为绝对分子量参数的拟合公式。利用拟合公式计算可得绝对重均分子量 (M_{w-Cal})、绝对数均分子量 (M_{n-Cal}) 和多分散系数 ($d_{p-Cal}=\frac{M_{w-Cal}}{M_{n-Cal}}$)。最后，计算经拟合公式得到的计算值与 GPC-MALLS 测试值之间的相对误差。

2.3.7 精密度和重复性

将 $dn/dc=0.10$ 和 $dn/dc=0.11$ 的 PHGG 样品各取 3 份，用磁力搅拌器溶解后，静置水合 24 小时，经 0.45 μ m 水系滤膜过滤后进样，每个样品重复进样 6 次。以右旋糖酐标准品为对照，测定其相对分子质量；根据拟合公式计算绝对分子质量和多分散系数，并计算 PHGG 的 M_{w-Cal} 、 M_{n-Cal} 和 d_{p-Cal} 的平均值和相对标准偏差 (RSD)。

2.3.8 数据分析

所有实验重复三次，采用 Origin 2023 软件作图，并使用 SPSS Statistics 23 软件进行显著性分析 ($P<0.05$)。

2.4 结果与讨论

2.4.1 GPC 分子量检测条件优化

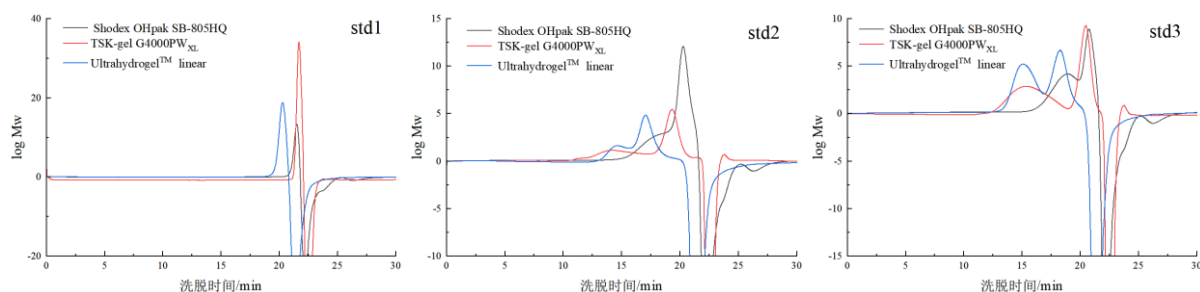
2.4.1.1 色谱柱型号对标准曲线的影响

根据样品的分子量范围选择不同的色谱柱，将三种型号的色谱柱分别连接到高效液相凝胶色谱，色谱检测条件是：柱温为 40°C，流速为 0.5 mL/min，流动相为 0.1 mol/L NaNO₃。利用 Waters 软件将右旋糖酐标准品的 LogMw 与 T 进行回归分析，得到线性回归方程和相关系数。表 2-1 为实验所用的不同型号色谱柱的参数和标准曲线拟合参数。

表 2-1 不同型号色谱柱的标准曲线拟合参数

Table 2-1 Standard curve fitting parameters of different types of chromatographic columns

色谱柱型号	拟合方程	R ²	排阻极限分子量/Da
TSK-gel G4000PW _{XL} (300×7.8 mm)	LogMw=-0.39T+11.17	0.94	3×10 ⁵
Shodex OHpak SB-805HQ (300×8.0 mm)	LogMw =-1.15T+27.20	0.97	4×10 ⁶
Ultrasphere TM linear (300×7.8 mm)	LogMw =-0.56T+13.63	0.99	7×10 ⁶



注：std1：葡聚糖（Mw=180 Da）；std2：Dextran T-300（Mw=300600 Da）和 Dextran T-10（Mw=9750 Da）混合标准品；std3：Dextran T-150（Mw=135350 Da）和 Dextran T-5（Mw=2700 Da）混合标准品

图 2-2 不同型号色谱柱检测时右旋糖酐标准品的出峰效果图

Fig. 2-2 Peak curves of dextran standards in different types of chromatographic column detection

图 2-2 是不同型号色谱柱检测时右旋糖酐标准品的出峰效果图。结果显示，TSK-gel G4000PW_{XL} 色谱柱和 OHpak SB-805 HQ 色谱柱对于不同分子量葡聚糖的分离效果较差。可能是由于三种色谱柱填充物质孔径不同，TSK-gel G4000PW_{XL} 色谱柱填料是聚甲基丙烯酸酯颗粒，填料粒径为 10 μm，最小理论塔板数为 1×10⁴，分离范围为 2×10³ Da -3×10⁵ Da，对于高分子聚合物分离效果差。OHpak SB-805 HQ 色谱柱是聚羟甲基丙烯酸酯填料的水溶性凝胶色谱柱，粒径为 13 μm，塔板数大于 1.2×10⁴，排阻极限分子量为 4×10⁶ Da，对小分子量分离效果差。UltrasphereTM linear 是羟基化聚甲基丙烯酸甲酯填充的混合填料柱，排阻极限为 7×10⁶ Da，对于分散度高、样品尺寸比较复杂的样品分离效果优于另外两根色谱柱。利用 UltrasphereTM linear 色谱柱建立的右旋糖酐标准曲线的 R²=0.99，显示更好的线性回归关系。

2.4.1.2 流动相对不同分子量 PHGG 检测的影响

图 2-3 是硝酸钠浓度在 0.05 mol/L-0.5 mol/L 范围内，GG 和不同分子量 PHGG 的色谱图，其它色谱检测条件为：色谱柱选择 UltrasphereTM linear（300×7.8 mm），柱温设置为 40°C，流速设置为 0.5 mL/min。结果显示，四种盐离子浓度下，标准曲线的相关系

数大于 0.98。小分子量 PHGG3 的出峰时间和分峰效果不受流动相浓度的影响；中分子量 PHGG2 的开始洗脱时间与流动相浓度无关，硝酸钠浓度为 0.05 mol/L 和 0.5 mol/L 时，PHGG2 的色谱峰形和峰响应强度均表现良好；在 0.05 mol/L NaNO₃ 色谱条件下，PHGG1 和 GG 的开始洗脱时间早于其它盐离子浓度，表明有大分子聚集体存在。如果适当提高盐离子浓度，能够减弱大分子间的氢键缠结，提高检测准确度，但 0.1 mol/L NaNO₃ 对于中高分子量的 PHGG1 出峰，峰形不佳。此外，盐离子浓度过高会影响仪器的使用寿命，所以选择 0.3 mol/L NaNO₃ 进行后续色谱条件的优化。

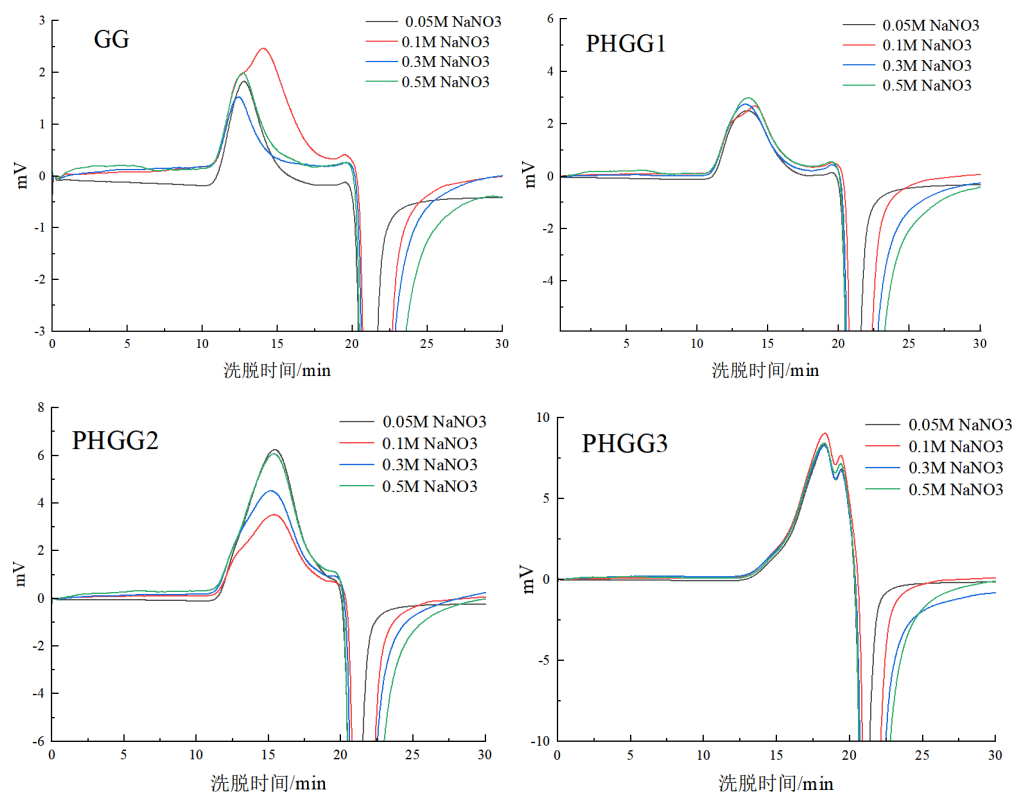


图 2-3 硝酸钠浓度对不同分子量 PHGG 色谱图的影响

Fig. 2-3 Effect of sodium nitrate concentration on the chromatograms of different molecular weights PHGG

2.4.1.3 柱温对不同分子量 PHGG 检测的影响

图 2-4 为不同柱温（30°C、40°C、50°C）对 GG 和三种不同分子量 PHGG 色谱图的影响，色谱检测条件：色谱柱选择 Ultrahydrogel™ linear (300×7.8 mm)，流动相设置为 0.3 mol/L NaNO₃，流速设置为 0.5 mL/min。结果显示，不同柱温下，标准曲线拟合的相关系数大于 0.98。柱温为 40°C 时，GG 和 PHGG 的仪器检测基线平稳，峰形良好，色谱柱分离效果好；这可能因为随着柱温升高，固定相与流动相之间的黏度降低，不同分子量样品组分的扩散系数增加，导致出峰时间提前，进而改善峰形。柱温为 50°C 时，PHGG1 和 PHGG2 样品出峰时间早且基线不平稳，并且柱温过高会缩短色谱柱的使用寿命。因此选择柱温为 40°C 进行后续色谱条件的优化。

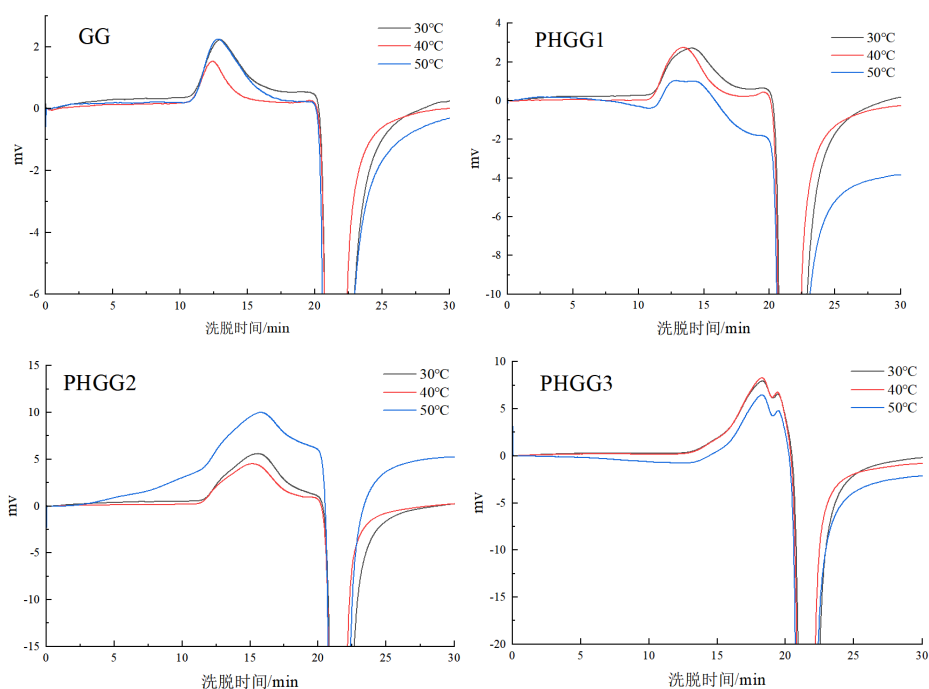


图 2-4 柱温对不同分子量 PHGG 色谱图的影响

Fig. 2-4 Effect of column temperature on the chromatograms of PHGG with different molecular weights

2.4.1.4 流速对不同分子量 PHGG 检测的影响

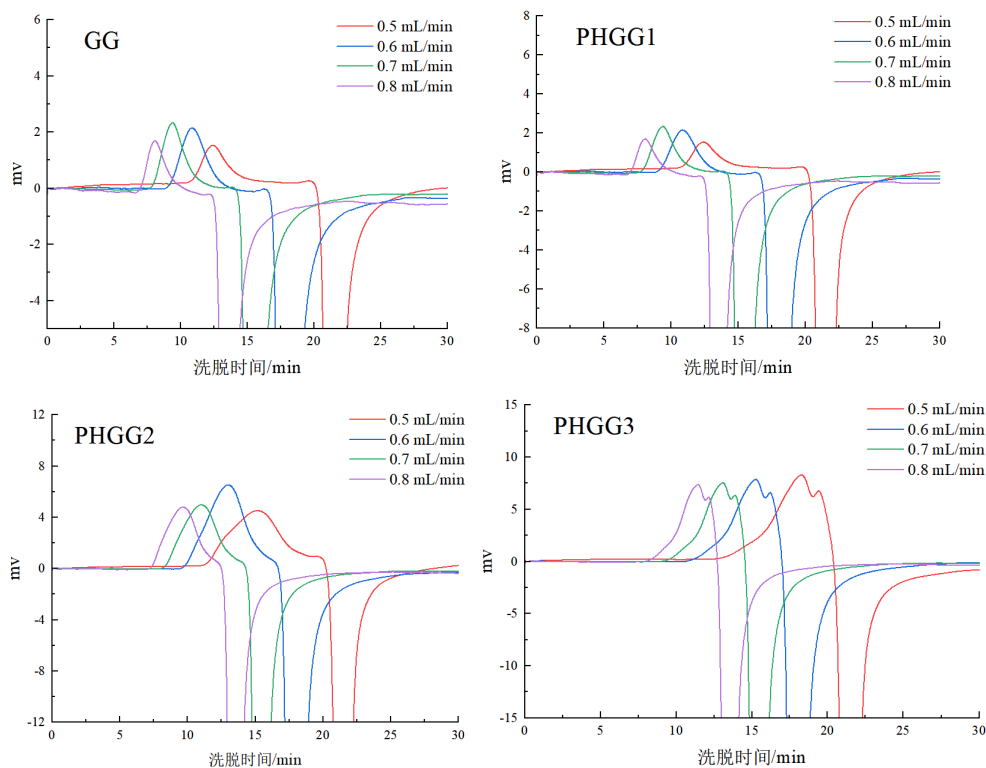


图 2-5 流速对不同分子量 PHGG 色谱图的影响

Fig. 2-5 Effect of flow rate on the chromatograms of PHGG with different molecular weights

如图 2-5 是流速在 0.5 mL/min-0.8 mL/min 范围内, GG 和三种不同分子量 PHGG 的色谱图, 其它色谱检测条件: 色谱柱选择 Ultrahydrogel™ linear (300×7.8 mm), 流动相设置为 0.3 mol/L NaNO₃, 柱温设置为 40°C。结果显示, 不同流速下, 标准曲线拟合的

相关系数大于 0.98。流速为 0.4 mL/min 时，仪器基线稳定性较差；并且样品开始出峰时间晚，样品检测所需时间长，会降低仪器效率。流速为 0.5 mL/min 时，GG 和 PHGG1 色谱峰的拖尾现象减弱，PHGG3 出现肩峰。在 0.6 mL/min-0.8 mL/min 流速范围内，四个样品的分离度、色谱峰强度和拖尾现象相似。因此选择流速为 0.6 mL/min，控制最高峰的洗脱时间为 15 min 左右能够保证基线平稳、峰形规整。

综上，GPC 检测 GG 和 PHGG 分子量的最优色谱条件是：色谱柱为 Ultrahydrogel™ linear (300×7.8 mm)，流动相为 0.3 mol/L NaNO₃，柱温为 40℃，流速为 0.6 mL/min。

2.4.2 GPC-MALLS 测定不同分子量 PHGG 的折射率增量

现阶段研究表明，不同来源的半乳甘露聚糖分子量不同，Nwokocha 等人^[89]检测凤凰木叶半乳甘露聚糖的绝对分子质量为 7.23×10^5 g/mol ($dn/dc=0.14$)；Zohra 等人^[90]选择示差检测器、多角度检测器和黏度检测器联用法，将 Shodex OHpak SB-806HQ 色谱柱和 Shodex OHpak SB-804HQ 色谱柱串联，流动相设置为 0.1 mol/L LiNO₃，流速设置为 0.5 mL/min，检测得到白木香半乳甘露聚糖分子量为 1.40×10^6 g/mol。关于瓜尔豆胶的分子量检测结果也存在明显差异。Rishikesh 等人^[91]使用 GPC-MALLS 法检测的瓜尔豆胶绝对分子质量为 2.20×10^5 g/mol，而 Martin 等人^[92]实验所用的瓜尔豆胶绝对分子质量为 3×10^6 g/mol；Liu 等人^[93]用 GPC-RID 法测定瓜尔豆胶相对分子质量为 2.66×10^6 Da，与本文第二章的检测结果相差较大。GG 分子量检测结果不同的原因可能是色谱检测条件不同，如： dn/dc 值的设置不同，根据式 (2-1)、(2-2) 计算可知，当待测样品的 dn/dc 值设置为 0.09 时，其绝对重均分子量的计算值是 $dn/dc=0.12$ 时的 1.78 倍。

表 2-2 不同分子量 PHGG 的折射率增量

Table 2-2 Refractive index increment of PHGG with different molecular weights

样品编号	dn/dc	R^2	绝对分子质量范围/g mol ⁻¹	相对分子质量范围/Da
SD-1	0.09	0.99	$M_w > 2 \times 10^6$	$M_w > 4 \times 10^6$
SD-2	0.09	0.99		
SD-3	0.10	1	$2 \times 10^6 > M_w > 1 \times 10^6$	$4 \times 10^6 > M_w > 2 \times 10^6$
SD-4	0.10	1		
SD-5	0.11	1		
SD-6	0.11	0.99		
SD-7	0.11	1	$1 \times 10^6 > M_w > 1 \times 10^5$	$2 \times 10^6 > M_w > 5 \times 10^5$
SD-8	0.11	0.99		
SD-9	0.11	1		
SD-10	0.11	1		
SD-11	0.12	0.99		
SD-12	0.12	1		

表 2-2 为不同分子量 PHGG 的 dn/dc 值。利用 ASTRA 软件分别对 12 个样品进行线性拟合，相关系数均大于 0.99。实验结果表明，当 PHGG 的绝对分子质量 $M_w > 2 \times 10^6$ g/mol 时， $dn/dc=0.09$ ；当 PHGG 的绝对分子质量 2×10^6 g/mol $> M_w > 1 \times 10^6$ g/mol 时， $dn/dc=0.10$ ；当 PHGG 的绝对分子质量 1×10^6 g/mol $> M_w > 1 \times 10^5$ g/mol 时， $dn/dc=0.11$ ；当 PHGG 的绝对分子质量 $M_w < 1 \times 10^5$ g/mol 时， $dn/dc=0.12$ 。上述 dn/dc 值将用于建立分子量的转换方法。

2.4.3 PHGG 的重均分子量测定

利用最小二乘法将表 2-3 中不同分子量 PHGG 的 $M_{w,R}$ 和 $M_{w,M}$ 进行多项式拟合，拟合曲线如图 2-6 所示。重均分子量的多项式拟合方程为：

$$M_w\text{-Cal} = -2E-05M_{w,R}^2 + 0.49M_{w,R} - 57.53 \quad (2-3)$$

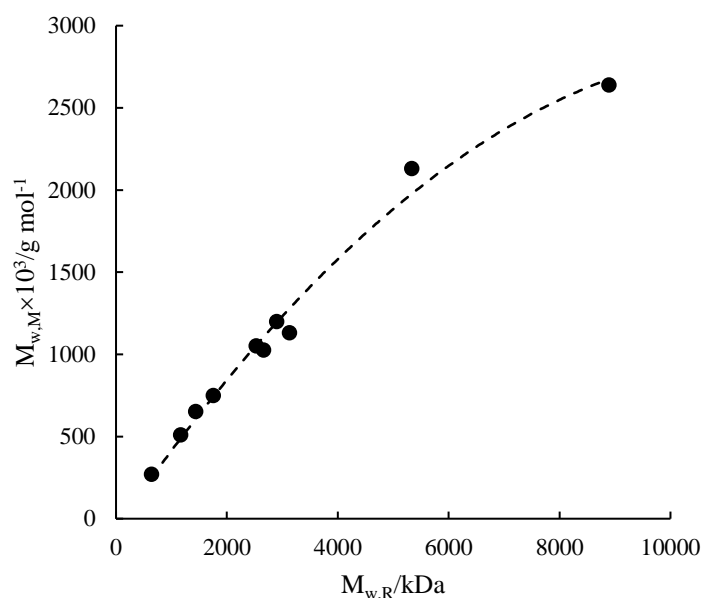
拟合方程的 $R^2=0.99$ ，表明此拟合方程计算绝对重均分子量的可靠度较高。当 PHGG 的 $M_{w,M} < 1 \times 10^5$ g/mol 时，不可以用重均分子量转换方程（式 2-3）计算 $M_w\text{-Cal}$ ，这可能是因为分子量小于 1×10^5 g/mol 的 PHGG 样品与右旋糖酐标品的结构更相似，导致相对分子质量与绝对分子质量的检测值基本相同，不符合多项式拟合方程。

表 2-3 PHGG 的相对重均分子量 ($M_{w,R}$) 与绝对重均分子量 ($M_{w,M}$)

Table 2-3 Relative weight-average molecular weight ($M_{w,R}$) and absolute weight-average molecular weight ($M_{w,M}$) of PHGG

Sample	$M_{w,R}/\text{kDa}$	$M_{w,M} \times 10^3/\text{g mol}^{-1}$
S _{0.09-1}	8888.67	2640.67
S _{0.09-2}	5333.50	2132.00
S _{0.10-1}	3029.33	1131.67
S _{0.10-2}	2898.33	1201.33
S _{0.10-3}	2660.33	1026.33
S _{0.10-4}	2526.67	1052.33
S _{0.11-1}	1756.50	750.57
S _{0.11-2}	1436.33	654.10
S _{0.11-3}	1167.00	510.60
S _{0.11-4}	641.00	271.05

注：以“S_{dn/dc-编号}”标记用于构建分子量转换方程的样品；S_{0.09-x}：dn/dc=0.09 的 PHGG；S_{0.10-x}：dn/dc=0.10 的 PHGG；S_{0.11-x}：dn/dc=0.11 的 PHGG。

图 2-6 PHGG 相对重均分子量 ($M_{w,R}$) 与绝对重均分子量 ($M_{w,M}$) 的拟合曲线Fig. 2-6 The fitting curve between $M_{w,M}$ and $M_{w,R}$ of PHGG

如表 2-4 所示, 通过 GPC-RID 法检测得到 PHGG 的 $M_{w,R}$, 用拟合公式 (2-3) 转换得到 $M_w\text{-Cal}$, $M_w\text{-Cal}$ 与 $M_{w,M}$ 的相对误差在 $\pm 10\%$ 以内。

表 2-4 PHGG 绝对重均分子量 ($M_w\text{-Cal}$) 计算值与 GPC-MALLS 测试值 ($M_{w,M}$) 的相对误差Table 2-4 The relative error between $M_w\text{-Cal}$ and $M_{w,M}$ of PHGG

Sample	$M_{w,M} \times 10^3 / \text{g mol}^{-1}$	$M_w\text{-Cal} \times 10^3 / \text{g mol}^{-1}$	Relative error/%
S _{0.09-1}	2640.67	2738.20	-3.56
S _{0.09-2}	2132.00	1999.23	6.64
S _{0.10-1}	1131.67	1250.28	-9.49
S _{0.10-2}	1201.33	1201.32	0.01
S _{0.10-3}	1026.33	1110.61	-7.59
S _{0.10-4}	1052.33	1058.67	-0.60
S _{0.11-1}	750.57	745.49	0.68
S _{0.11-2}	654.10	608.32	7.53
S _{0.11-3}	510.60	489.75	4.26
S _{0.11-4}	271.05	249.82	8.50

选择不同酶解批次的 PHGG 对重均分子量转换方程 (2-3) 进行检验。表 2-5 是不同酶解批次 PHGG 的 $M_w\text{-Cal}$ 与 GPC-MALLS 测试值之间的相对误差。计算结果表明, $M_w\text{-Cal}$ 与 $M_{w,M}$ 的相对误差基本在 $\pm 10\%$ 以内。

表 2-5 不同酶解批次 PHGG 的绝对重均分子量 (M_w -Cal) 计算值与测试值 ($M_{w,M}$) 的相对误差
Table 2-5 The relative error of M_w -Cal and $M_{w,M}$ of different enzymatic hydrolysis batches of PHGG

Sample	$M_{w,M} \times 10^3 / \text{g mol}^{-1}$	M_w -Cal $\times 10^3 / \text{g mol}^{-1}$	Relative error/%
V _{0.09-1}	1162	1054.75	10.17
V _{0.09-2}	2231.67	2013.11	10.86
V _{0.10-1}	989.70	936.95	5.63
V _{0.10-2}	1091.00	1021.98	6.75
V _{0.11-1}	645.90	584.96	10.42
V _{0.11-2}	328.77	322.12	2.06

注：以“V_{dn/dc}-样品编号”标记用于检验分子量转换方程的样品；V_{0.09-x}：dn/dc=0.09 的 PHGG；V_{0.10-x}：dn/dc=0.10 的 PHGG；V_{0.11-x}：dn/dc=0.11 的 PHGG。

图 2-7 是折射率增量在 0.09-0.11 范围内的 PHGG 绝对重均分子量计算值与测试值的对比。如图所示，两种方法的测试结果基本一致， M_w -Cal 与 $M_{w,M}$ 之间的相对误差基本在 $\pm 10\%$ 以内。因此，通过 GPC-RID 检测 PHGG 的 $M_{w,R}$ ，再利用拟合方程进行转换，能够较准确地获得不同分子量 PHGG ($M_w > 1 \times 10^5 \text{ g/mol}$) 的 M_w -Cal。

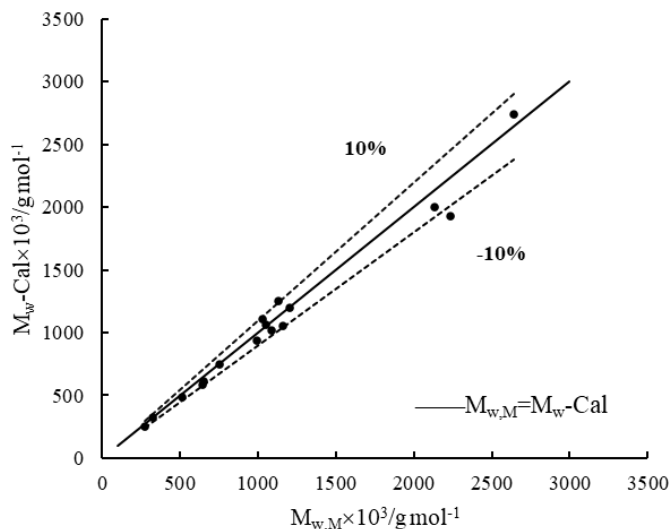


图 2-7 PHGG 的绝对重均分子量计算值 (M_w -Cal) 与测试值 ($M_{w,M}$) 的对比

Fig. 2-7 The absolute weight average molecular weight (M_w -Cal) of PHGG was compared with the test value ($M_{w,M}$)

2.4.4 PHGG 的数均分子量测定

利用最小二乘法将表 2-6 中不同分子量 PHGG 的 $M_{n,R}$ 和 $M_{n,M}$ 进行多项式拟合，拟合曲线如图 2-8 所示。数均分子量的多项式拟合方程为：

$$M_n$$
-Cal = -0.0023 $M_{n,R}^2$ + 6.27 $M_{n,R}$ + 24.59 \quad (2-4)

拟合方程的 $R^2=0.99$ ，表明此拟合方程计算绝对数均分子量的可靠度较高。如表 2-7 所示，通过 GPC-RID 法检测得到 PHGG 的 $M_{n,R}$ ，用拟合公式 (2-4) 转换得到 M_n -Cal，

M_n -Cal 与 $M_{n,M}$ 的相对误差在 $\pm 10\%$ 以内。

表 2-6 PHGG 的相对数均分子量 ($M_{n,R}$) 与绝对数均分子量 ($M_{n,M}$)

Table 2-6 Relative number-average molecular weight ($M_{n,R}$) and absolute number-average molecular weight ($M_{n,M}$) of PHGG

Sample	$M_{n,R}/\text{kDa}$	$M_{n,M} \times 10^3/\text{g mol}^{-1}$
S _{0.09-1}	1380.50	4261.00
S _{0.09-2}	2274.15	2248.00
S _{0.10-1}	171.33	932.27
S _{0.10-2}	154.00	962.93
S _{0.10-3}	129.00	818.80
S _{0.10-4}	129.67	836.87
S _{0.11-1}	125.00	724.60
S _{0.11-2}	72.00	477.17
S _{0.11-3}	43.67	322.30
S _{0.11-4}	9.99	92.25

表 2-7 PHGG 绝对数均分子量计算值 (M_n -Cal) 和 GPC-MALLS 测试值 ($M_{n,M}$) 的比较

Table 2-7 Comparison of the calculated absolute number-average molecular weight of PHGG (M_n -Cal) and the GPC-MALLS test value ($M_{n,M}$)

Sample	$M_{n,M} \times 10^3/\text{g mol}^{-1}$	$M_n\text{-Cal} \times 10^3/\text{g mol}^{-1}$	Relative error/%
S _{0.09-1}	4261.00	4297.86	-0.86
S _{0.09-2}	2248.00	2389.83	-5.93
S _{0.10-1}	932.27	1031.44	-9.61
S _{0.10-2}	962.93	935.72	2.91
S _{0.10-3}	818.80	795.22	2.96
S _{0.10-4}	836.87	799.01	4.74
S _{0.11-1}	724.60	772.48	-6.20
S _{0.11-2}	477.17	464.15	2.80
S _{0.11-3}	322.30	294.02	9.62
S _{0.11-4}	92.25	87.00	6.03

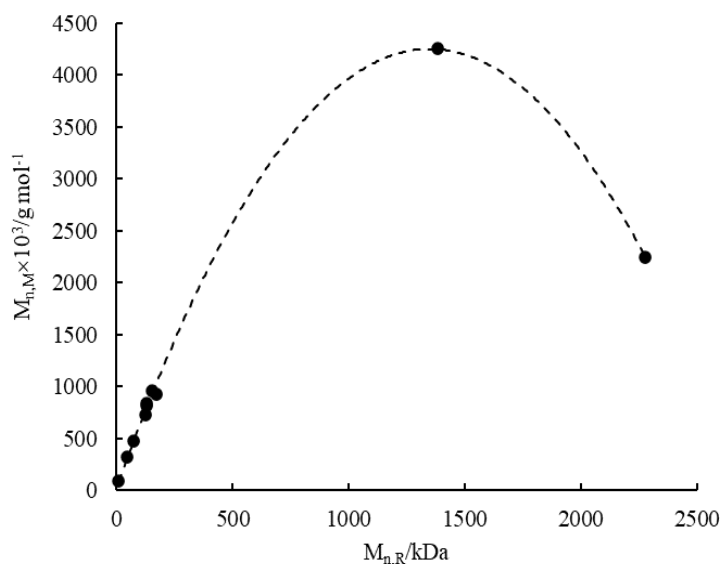


图 2-8 PHGG 绝对数均分子量 ($M_{n,M}$) 与相对于右旋糖酐的相对数均分子量 ($M_{n,R}$) 的对应关系

Fig. 2-8 The relationship between $M_{n,M}$ and $M_{n,R}$ of PHGG

选择不同酶解批次的 PHGG 对数均分子量转换方程 (2-4) 进行检验。如表 2-8 所示, 对于 $dn/dc=0.10$ 和 $dn/dc=0.11$ 的 PHGG, 其 M_n -Cal 与 $M_{n,M}$ 的相对误差基本在 $\pm 10\%$ 以内, 但是 $dn/dc=0.09$ 的 PHGG 相对误差值很大。这可能由于 $M_w > 2 \times 10^6$ g/mol 的 PHGG 分子链更长, 分子链间易卷曲缠结形成团聚分子, 分子链的聚集影响仪器检测的分子数量, 进而导致数均分子量的相对误差值增大。

表 2-8 不同酶解批次 PHGG 的绝对重均分子量计算值 (M_n -Cal) 与测试值 ($M_{n,M}$) 的相对误差

Table 2-8 The relative error of M_n -Cal and $M_{n,M}$ of different enzymatic hydrolysis batches of PHGG

Sample	$M_{n,M} \times 10^3 / \text{g mol}^{-1}$	$M_n\text{-Cal} \times 10^3 / \text{g mol}^{-1}$	Relative error/%
V _{0.09-1}	929.60	1542.94	-39.75
V _{0.09-2}	1796.00	3061.52	-41.34
V _{0.10-1}	724.93	746.80	-2.93
V _{0.10-2}	829.73	766.78	8.21
V _{0.11-1}	406.90	453.45	-10.27
V _{0.11-2}	110.17	115.37	-4.51

图 2-9 是折射率增量在 0.09-0.11 范围内的 PHGG 绝对数均分子量计算值与测试值的对比。如图所示, 除 $dn/dc=0.09$ 的 PHGG, 两种方法的测试结果基本一致, M_n -Cal 与 $M_{n,M}$ 之间的相对误差基本在 $\pm 10\%$ 以内。结果表明, 通过 GPC-RID 检测 PHGG 的 $M_{n,R}$, 再利用拟合方程进行转换, 能够较准确地获得不同分子量 PHGG (2×10^6 g/mol $> M_w > 1 \times 10^5$ g/mol) 的 M_n -Cal。

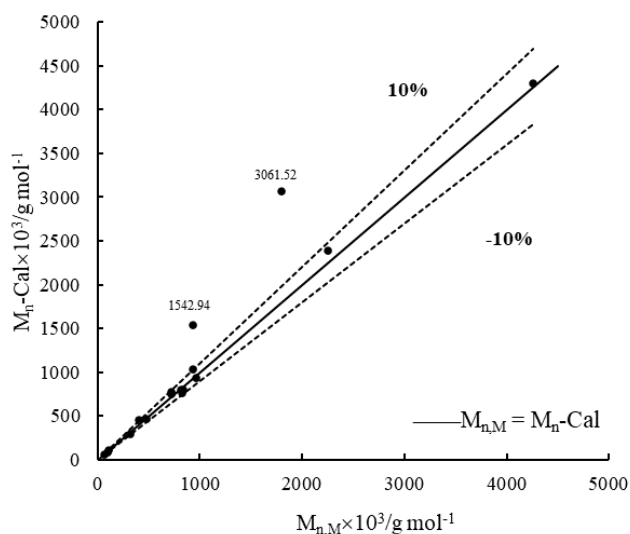
图 2-9 PHGG 的绝对数均分子量计算值 ($M_n\text{-Cal}$) 与测试值 ($M_{n,M}$) 的对比

Fig. 2-9 The absolute number-average molecular weight ($M_n\text{-Cal}$) of PHGG was compared with the test value ($M_{n,M}$)

2.4.5 PHGG 的多分散系数测定

多分散系数表示样品分子量的分散程度，多分散系数越大，多糖分子量分布越宽。如附录I中表I-1 所示，PHGG 样品相对于右旋糖酐的 $d_{p,R}$ 远大于 $d_{p,M}$ ，可能因为 PHGG 与右旋糖酐的分子链组成不同，或者分子链的空间结构不同。

表 2-9 是利用重均分子量转换公式和数均分子量转换公式分别计算 $M_w\text{-Cal}$ 和 $M_n\text{-Cal}$ ，再经公式 (2-5) 计算得到的 $d_p\text{-Cal}$ 。结果显示，除 $dn/dc=0.09$ 的 PHGG 样品，多分散系数计算值与测试值之间的相对误差主要集中在 $\pm 10\%$ 范围内。

$$d_p\text{-Cal} = \frac{M_w\text{-Cal}}{M_n\text{-Cal}} = \frac{-2E-05M_{w,R}^2 + 0.49M_{w,R} - 57.53}{-0.0023M_{n,R}^2 + 6.27M_{n,R} + 24.59} \quad (2-5)$$

表 2-9 PHGG 多分散系数计算值 ($d_p\text{-Cal}$) 与 GPC-MALLS 测试值 ($d_{p,M}$) 的比较Table 2-9 Comparison of the calculated polydispersity coefficient ($d_p\text{-Cal}$) with $d_{p,M}$ of PHGG

Sample	$d_{p,M}$	$d_p\text{-Cal}$	Relative error/%
S _{0.09} -1	1.06	0.64	66.30
S _{0.09} -2	2.72	0.84	224.60
S _{0.10} -1	1.21	1.21	0.13
S _{0.10} -2	1.25	1.28	-2.79
S _{0.10} -3	1.25	1.40	-10.26
S _{0.10} -4	1.26	1.32	-5.13
S _{0.11} -1	1.00	0.97	3.62
S _{0.11} -2	1.37	1.31	4.53
S _{0.11} -3	1.58	1.67	-4.86
S _{0.11} -4	2.94	2.87	2.33

选择不同酶解批次的 PHGG 样品对 GPC-RID 多分散系数计算方程进行检验。如表 2-10 所示, $dn/dc=0.10$ 和 $dn/dc=0.11$ 的样品 $d_p\text{-Cal}$ 与 $d_{p,M}$ 的相对误差在 $\pm 10\%$ 以内。由于 $dn/dc=0.09$ 的 PHGG 进行数均分子量拟合方程检验的相对误差值较高, 导致多分散系数的相对误差较大。

表 2-10 不同酶解批次 PHGG 的多分散系数计算值 ($d_p\text{-Cal}$) 与测试值 ($d_{p,M}$) 的相对误差
Table 2-10 The relative error of $d_p\text{-Cal}$ and $d_{p,M}$ of different enzymatic hydrolysis batches of PHGG

Sample	$d_{p,M}$	$d_p\text{-Cal}$	Relative error/%
V _{0.09-1}	1.45	0.68	112.31
V _{0.09-2}	1.24	0.66	88.88
V _{0.10-1}	1.38	1.25	9.76
V _{0.10-2}	1.33	1.33	-0.21
V _{0.11-1}	1.41	1.29	8.99
V _{0.11-2}	3.00	2.79	7.50

图 2-10 是折射率增量在 0.09-0.11 范围内的 PHGG 多分散系数计算值 ($d_p\text{-Cal}$) 与测试值 ($d_{p,M}$) 的对比。如图所示, 除 $dn/dc=0.09$ 的 PHGG 外, 两种方法的测试结果基本一致, 相对误差基本在 $\pm 10\%$ 以内。结果表明, 利用重均分子量转换公式和数均分子量转换公式分别计算 $M_w\text{-Cal}$ 和 $M_n\text{-Cal}$, 再经公式 (2-5) 计算得到的 $d_p\text{-Cal}$, 能够较准确地获得不同分子量 PHGG ($2 \times 10^6 \text{ g/mol} > M_w > 1 \times 10^5 \text{ g/mol}$) 的 $d_p\text{-Cal}$ 。较好地反映了 PHGG 分子量的分散程度。

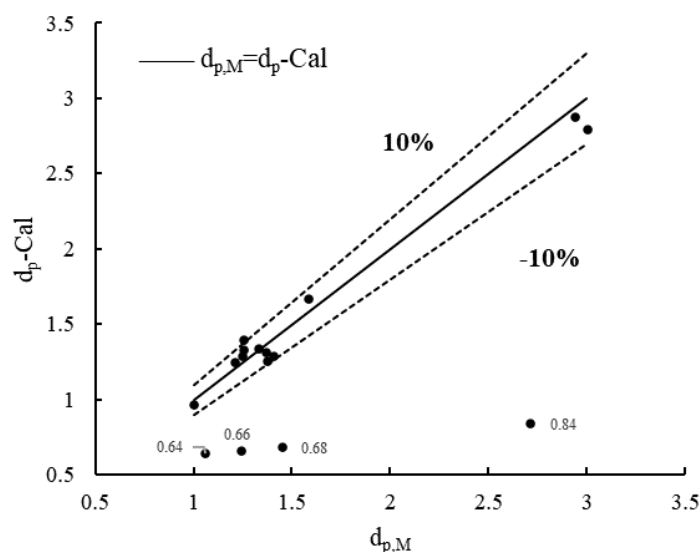


图 2-10 PHGG 的多分散系数计算值 ($d_p\text{-Cal}$) 与 GPC-MALLS 测试值 ($d_{p,M}$) 的对比

Fig. 2-10 The polydispersity index of PHGG ($d_p\text{-Cal}$) was compared with GPC-MALLS ($d_{p,M}$)

由上述实验结果可知, 绝对重均分子量范围为 $2 \times 10^6 \text{ g/mol} > M_w > 1 \times 10^5 \text{ g/mol}$ (相对重均分子量范围为 $4 \times 10^6 \text{ Da} > M_w > 5 \times 10^5 \text{ Da}$) 的 PHGG, 符合相对分子量参数向绝对分子量参数转换的公式 (2-3, 2-4, 2-5), 分子量参数计算值与测试值的相对误差在 $\pm 10\%$

以内。因此, 选择 $2 \times 10^6 \text{ g/mol} > M_w > 1 \times 10^5 \text{ g/mol}$ ($dn/dc=0.10$ 和 $dn/dc=0.11$) 的 PHGG 样品进行精密度和重复性实验。

2.4.6 精密度和重复性

表 2-11 拟合方程计算 PHGG 绝对分子量的重复性

Table 2-11 The repeatability of absolute molecular weight calculated of PHGG by fitting equation

样品编号	dn/dc=0.10			dn/dc=0.11		
	$M_w\text{-Cal/g mol}^{-1}$	$M_n\text{-Cal/g mol}^{-1}$	$d_p\text{-Cal}$	$M_w\text{-Cal/g mol}^{-1}$	$M_n\text{-Cal/g mol}^{-1}$	$d_p\text{-Cal}$
1	1207.17	883.51	1.37	548.71	305.14	1.80
2	1118.30	774.19	1.44	592.80	304.52	1.95
3	1005.62	786.70	1.28	519.25	295.25	1.76
平均值	1110.37	814.80	1.36	553.59	301.64	1.83
重复性 (RSD, %, n=3)	9.10	7.34	6.10	6.69	1.84	5.40

注: $M_w\text{-Cal}$, $M_n\text{-Cal}$ 数值均乘以 10^3

表 2-12 拟合方程计算 PHGG 绝对分子量的精密度

Table 2-12 The precision of absolute molecular weight calculated of PHGG by fitting equation

测试次数	dn/dc=0.10			dn/dc=0.11		
	$M_w\text{-Cal/g mol}^{-1}$	$M_n\text{-Cal/g mol}^{-1}$	$d_p\text{-Cal}$	$M_w\text{-Cal/g mol}^{-1}$	$M_n\text{-Cal/g mol}^{-1}$	$d_p\text{-Cal}$
1	1128.83	833.97	1.35	555.03	305.83	1.81
2	1112.07	774.70	1.44	529.97	311.00	1.70
3	1098.43	730.69	1.50	584.32	301.89	1.94
4	1078.99	716.89	1.51	564.23	299.37	1.88
5	1102.67	843.21	1.31	548.71	305.14	1.80
6	1111.18	809.11	1.37	532.46	303.44	1.75
平均值	1113.11	779.79	1.43	556.44	306.24	1.82
重复性 (RSD, %, n=6)	1.37	6.65	5.24	4.89	1.49	6.37

注: $M_w\text{-Cal}$, $M_n\text{-Cal}$ 数值均乘以 10^3

表 2-11 是拟合方程计算 PHGG 绝对分子量的重复性。选择 $dn/dc=0.10$ 和 $dn/dc=0.11$ 的 PHGG 样品 ($2 \times 10^6 \text{ g/mol} > M_w > 1 \times 10^5 \text{ g/mol}$), 分别配置为 3 份平行样品, 利用 GPC-RID 检测 $M_{w,R}$ 、 $M_{n,R}$ 和 $d_{p,R}$, 根据式 (2-3, 2-4, 2-5) 分别计算 PHGG 的 $M_w\text{-Cal}$ 和 $M_n\text{-Cal}$ 和 $d_p\text{-Cal}$ 。两个 PHGG 样品 $M_w\text{-Cal}$ 和 $M_n\text{-Cal}$ 和 $d_p\text{-Cal}$ 的 RSD 值均小于 10%。

表 2-12 是拟合方程计算 PHGG 绝对分子量的精密度。选择 $M_w\text{-Cal}$ 分别为 1118.30 g/mol 和 548.71 g/mol 的 PHGG 溶液连续进样 6 次, 利用 GPC-RID 检测相对分子质量参数, 根据式 (2-3, 2-4, 2-5) 分别计算 PHGG 的绝对分子量参数。两个 PHGG 样品分别

进样 6 次的 RSD 值均小于 7%。

因此, 采用 GPC-RID 检测 PHGG 相对分子量参数, 再利用分子量拟合方程计算绝对分子量参数的方法, 具有良好的精密度和重复性。

2.5 本章小结

(1) 通过优化 GPC 的检测条件, 形成一种比较准确的 GPC 检测 PHGG 分子量的方法: 色谱柱为 Ultrahydrogel™ linear (300×7.8 mm); 流动相为 0.3 mol/L NaNO₃; 流速为 0.6 mL/min; 柱温为 40°C。

(2) 采用 ASTRA 软件分析法, 确定不同分子量范围内 PHGG 的 dn/dc 值: $M_w > 2 \times 10^6$ g/mol 时, $dn/dc = 0.09$; 2×10^6 g/mol $> M_w > 1 \times 10^6$ g/mol 时, $dn/dc = 0.10$; 1×10^6 g/mol $> M_w > 1 \times 10^5$ g/mol 时, $dn/dc = 0.11$; $M_w < 1 \times 10^5$ g/mol 时, $dn/dc = 0.12$; 从而形成一种更准确的 GPC-MALLS 联用检测 PHGG 绝对分子量的方法。

(3) 采用最小二乘法, 将 GPC-RID 测得的右旋糖酐当量的相对分子量与 GPC-MALLS 测得的 PHGG 绝对分子量进行多项式拟合, 分别得到:

重均分子量拟合公式为: $M_w\text{-Cal} = -2E-05M_{w,R}^2 + 0.49M_{w,R} - 57.53$, 相关系数 R^2 为 0.99;

数均分子量拟合公式为: $M_n\text{-Cal} = -0.0023M_{n,R}^2 + 6.27M_{n,R} + 24.59$, 相关系数 R^2 为 0.99;

多分散系数计算公式为: $dp\text{-Cal} = \frac{M_w\text{-Cal}}{M_n\text{-Cal}} = \frac{-2E-05M_{w,R}^2 + 0.49M_{w,R} - 57.53}{-0.0023M_{n,R}^2 + 6.27M_{n,R} + 24.59}$ 。

(4) 绝对重均分子量范围为 2×10^6 g/mol $> M_w > 1 \times 10^5$ g/mol (相对重均分子量范围为 4×10^6 Da $> M_w > 5 \times 10^5$ Da) 的 PHGG, 符合重均分子量、数均分子量和多分散系数的拟合公式, 绝对重均分子量、绝对数均分子量和多分散系数计算值与 GPC-MALLS 测量值的相对误差基本集中在 $\pm 10\%$ 以内。

(5) 采用 GPC-RID 检测 PHGG 相对分子量参数, 再利用分子量拟合方程计算绝对分子量参数的方法。两个不同分子量的 PHGG 分别取 3 组平行样品, 绝对分子量参数计算值的 RSD 均小于 10%; 两个不同分子量的 PHGG 样品, 连续进样 6 次, 绝对分子量参数计算值的 RSD 均小于 7%。结果表明该方法具有良好的精密度和重复性。

第三章 不同分子量 PHGG 的制备、结构表征及热力学分析

3.1 前言

瓜尔豆胶是从瓜尔豆胚乳中提取的一种天然胶体，具有种植范围广、价格低廉的优势，其分子结构包含许多羟基，能够与水分子相互作用，形成高粘度溶液。但是 GG 吸水膨胀的速率较小，溶解速度慢，其高粘性限制了在食品、化工、石油等领域的使用。GG 的黏度与分子量大小紧密相关，目前常通过化学水解法：酸水解、碱水解^[51]，降低 GG 的分子量，但是水解程度不易控制，使用的溶剂不够绿色环保；相较于化学水解法，酶解法具有酶解特异性、反应条件温和、易于控制的优势。现阶段报道较多的是通过 β -甘露聚糖酶或 α -半乳糖苷酶，作用于 GG 主链的 β -1,4-糖苷键或侧链 α -1,6-糖苷键，将 GG 酶解为小分子寡糖，缺少对中高分子量 PHGG 的制备方法和结构性质的研究。

本章采用上一章 GPC 检测 PHGG 分子量的最优条件，以 PHGG 分子量为指标，探索影响 GG 酶解的关键因素，通过可控酶解制备不同分子量的 PHGG。对不同分子量的 PHGG 进行单糖组成分析，并采用 NMR、FTIR 和 XRD 表征其结构，通过 TGA 和 DSC 分析其热力学性质的变化。

3.2 材料与仪器

3.2.1 实验材料

瓜尔豆片，苏州昕能胶体技术有限公司提供； β -甘露聚糖酶 (5×10^4 U/g)，上海麦克林生化科技有限公司产品；普鲁兰酶 (LP482001, 2000 U/mL)，酷尔化学科技有限公司。

3.2.2 实验仪器

RET 加热磁力搅拌器，德国 IKA 公司；DHG-9053A 电热恒温鼓风干燥箱，上海一恒科学仪器有限公司；DV2T 旋转粘度计，美国 Brookfield 公司；SCIENTZ-10N 冷冻干燥机，宁波新芝生物科技股份有限公司；NEXUS 傅里叶变换红外光谱仪，美国 Thermo Nicolet 公司；Avance III 400MHZ 全数字化核磁共振波谱仪，德国 Bruker 公司；TGA2 热重分析仪，梅特勒-托利多仪器有限公司；D2 PHASER X 射线衍射仪，德国布鲁克 AXS 有限公司；DSC8500 差示扫描量热仪，美国珀金埃尔默公司；Waters1525 高效液相色谱仪，美国 Waters 公司；Agilent1260 高效凝胶渗透色谱，美国怀雅特技术公司；Dionex ICS-5000⁺ 高效离子色谱，美国赛默飞世尔科技公司。

3.3 实验方法

3.3.1 瓜尔豆胶酶解影响因素的确定

3.3.1.1 不同复合酶解方式对瓜尔豆胶分子量的影响

(1) 采用质量浓度 10 g/L 瓜尔豆胶溶液，酶解温度 45°C，酶解时间为 20 min，普鲁兰酶添加量 140 U/ (g GG)，考察 β -甘露聚糖酶为 100、200、300、400、500、600 U/

(g GG) 条件下对 GG 相对分子质量的影响, 反应结束后迅速转移至 90°C 水浴中保留 20 min, 通过 GPC-RID 法检测不同条件处理后 GG 的相对分子质量。

(2) 采用质量浓度 10 g/L 瓜尔豆胶溶液, 酶解温度 45°C, 酶解时间为 20 min, β -甘露聚糖酶添加量为 500 U/ (g GG), 考察普鲁兰酶为 100、120、140、160、180、200 U/ (g GG) 条件下对 GG 相对分子质量的影响, 反应结束后迅速转移至 90°C 水浴中保留 20 min。通过 GPC-RID 法检测不同条件处理后 GG 的相对分子质量。

3.3.1.2 低分子量部分酶解瓜尔豆胶的酶解条件优化

(1) 采用质量浓度 10 g/L 瓜尔豆胶溶液, β -甘露聚糖酶添加量 500 U/ (g GG), 反应温度 45°C, 考察酶解时间为 10、20、30、40、50、60 min 条件下对 GG 相对分子质量的影响; 通过 GPC-RID 法检测不同条件处理后 GG 的相对分子质量。

(2) 采用质量浓度 10 g/L 瓜尔豆胶溶液, 酶解时间 20 min, 反应温度 45°C, 考察 β -甘露聚糖酶添加量为 100、200、300、400、500、600 U/ (g GG) 条件下对 GG 相对分子质量的影响; 通过 GPC-RID 法检测不同条件处理后 GG 的相对分子质量。

(3) 采用 β -甘露聚糖酶添加量 200 U/ (g GG), 酶解时间 20 min, 反应温度 45°C, 考察底物质量浓度为 2、4、6、8、10、50、60 g/L 条件下对 GG 相对分子质量的影响; 通过 GPC-RID 法检测不同条件处理后 GG 的相对分子质量。

(4) 采用 β -甘露聚糖酶添加量 200 U/ (g GG), 酶解时间 20 min, 质量浓度 60 g/L 瓜尔豆胶溶液, 考察温度为 35、40、45、50、55、60°C 条件下对 GG 相对分子质量的影响。通过 GPC-RID 法检测不同条件处理后 GG 的相对分子质量。

3.3.2 瓜尔豆胶的可控酶解

固定料液比 (瓜尔豆胶: 水) 为 1: 1, 调整影响瓜尔豆胶酶解的关键因素: 酶添加量和酶解时间, 按照表 3-1 制备不同分子量的 PHGG。

表 3-1 可控酶解的实验方案

Table 3-1 Experimental scheme of controllable enzymatic hydrolysis

样品名称	酶添加量/ (U/g GG)	酶解时间/min	料液比/ (v/v)	温度/°C
PHGG1	0.05	5	1	55
PHGG2	0.05	60	1	55
PHGG3	4	20	1	55

3.3.3 部分酶解瓜尔豆胶的纯化

将可控酶解制备的样品, 配置质量浓度为 10 g/L 瓜尔豆胶水溶液, 8000 rpm 下离心 10 min 去除不溶性杂质, 取上清液加入无水乙醇, 使溶液中无水乙醇体积分数达到 80%, 4°C 条件下醇沉 12 h。沉淀用 80% 无水乙醇洗涤 3 次后, 冷冻干燥保存。

3.3.4 部分酶解瓜尔豆胶的相对分子质量测定

将可控酶解制备的样品, 充分水合后离心取上清液用 0.45 μm 的滤膜过滤, GPC-

MALLS 法的色谱条件为: 色谱柱: UltrahydrogelTMLinear (300×7.8 mm), 检测器: Optilab T-rEX 示差折光检测器和 DAWN HELEOS 8+多角度光散射检测器, 流动相: 0.3 mol/L 硝酸钠, 流速: 0.6 mL/min, 柱温: 40°C。

GPC-RID 法的色谱条件为: 色谱柱: UltrahydrogelTMLinear (300×7.8 mm), 检测器: Waters2410 示差折光检测器, 流动相: 0.3 mol/L 硝酸钠, 流速: 0.6 mL/min, 柱温: 40°C, 分子量校正曲线标准品: Dextran T-300 (Mw=300600 Da)、Dextran T-150 (Mw=135350 Da)、Dextran T-10 (Mw=9750 Da)、Dextran T-5 (Mw=2700 Da)、葡萄糖 (Mw=180 Da)。

3.3.5 单糖组成分析及半乳甘露聚糖含量测定

将纯化后的样品冷冻干燥, 选用 Dionex ICS-5000+离子色谱仪检测, 色谱柱: Carbo Pac PA20 (150×3.0 mm), 流动相: A 液为水, B 液为 250 mmol/L NaOH, C 液为 1 mol/L NaAc。梯度洗脱程序见表 3-2。

表 3-2 梯度洗脱程序

Table 3-2 The program of gradient elution

时间/min	A/%	B/%	C/%
0	98	2.0	0
21	98	2.0	0
21.1	93	2.0	5.0
30	78	2.0	20
30.1	20	80	0
50	20	80	0

瓜尔豆胶纯度用半乳甘露聚糖含量表示:

$$GM = \frac{(C_{\text{man}} + C_{\text{gal}}) \times 0.9 \times V}{W \times 1000} \quad (3-1)$$

式中: GM 为半乳甘露聚糖含量, %; C_{man} 为甘露糖质量浓度, mg/L; C_{gal} 为半乳糖质量浓度, mg/L; V 为水解体积, L; W 为样品质量, g。

3.3.6 部分酶解瓜尔豆胶的结构表征

3.3.6.1 红外光谱分析

傅里叶变换红外光谱仪在 4000 cm^{-1} -400 cm^{-1} 范围内分别对纯化 PHGG 样品进行红外光谱扫描, 对比观察 PHGG 的红外光谱图。

3.3.6.2 核磁共振波谱分析

将纯化 PHGG 样品溶于重水, 核磁共振波谱仪的氢谱测定频率为 400 MHz (^1H -NMR), 碳谱测定频率为 125 MHz (^{13}C -NMR)。对比观察 PHGG 的碳谱和氢谱。

3.3.6.3 X-射线衍射分析

将纯化 PHGG 样品的粉末利用 X-射线衍射仪测定晶型, X 射线发生器输出功率为

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/398020067003006042>