

甜菜果胶的醇析工艺研究

张涛¹, 郭晓明^{1,2}, 张兵兵¹, 于淑娟^{1,2}

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

(2. 华南理工大学, 广东省天然产物绿色加工与产品安全实验室, 广东广州 510640)

摘要: 乙醇沉淀法是纯化果胶的工业化方法, 应用广泛。本文以甜菜果胶为研究对象, 考察了醇析 pH、乙醇浓度等对甜菜果胶的醇析率、物化特性的影响; 通过 zeta 电位表征甜菜果胶在醇析过程中的分子相互作用, 并采用通过高效液相体积排阻色谱 (HPSEC)、高效阴离子色谱 (HPAEC) 和高效液相色谱 (HPLC) 等技术分析醇析所得甜菜果胶的分子结构。研究表明: 纯化前后的 SBP 醇析率均在 pH 为 2.5、体系乙醇浓度为 71.25% 时达到最大, 分别为 96.81% 和 57.23%; SBP 的重均分子量范围为 145.07~404.27 kg/mol; 含有鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖和木糖等五种中性糖, 范围为 16.23~17.83%。SBP 溶液初始 pH 与体系乙醇浓度在一定范围内对 SBP 的水合作用有影响, 醇析所得 SBP 的结构受到了醇析条件的影响。

关键词: 甜菜果胶; 醇析; 水合作用; 结构表征

文章编号: 1673-9078(2017)9-217-223

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.9.032

Study on the Ethanol Precipitation Process for Sugar Beet Pectin

ZHANG Tao¹, GUO Xiao-ming^{1,2}, ZHANG Bing-bing¹, YU Shu-juan^{1,2}

(1. College of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Guangdong Province Key Laboratory for Green Processing of Natural Products and Product Safety, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Ethanol precipitation is widely used for purifying pectin in industrial production. The effects of precipitation pH and ethanol concentration on the ethanol precipitation yield and the physicochemical characteristics of sugar beet pectin (SBP) were studied. Zeta potential was used to characterize the interaction between SBP molecules during the precipitation process. The structure of SBP was analyzed by a series of techniques such as high-performance size exclusion chromatography (HPSEC), high-performance anion exchange chromatography (HPAEC), and high-performance liquid chromatography (HPLC). The results indicated that the highest precipitation rates of unpurified and purified SBPs were reached when the pH was 2.5 and the ethanol concentration in the system was 71.25%, with precipitation rates of 96.81% and 57.23%, respectively. The weight-average molar mass (Mw) of SBP ranged from 145.07 kg/mol to 404.27 kg/mol. Five neutral sugars, including rhamnose, arabinose, galactose, glucose, and xylose, were detected in SBP, and their content ranged from 16.23~17.83%. The I-pH and system ethanol concentration of SBP solution had impacts on SBP hydration to some extent, and the structures of precipitated SBP were affected by the ethanol precipitation conditions.

Key words: sugar beet pectin; ethanol precipitation; hydration; structural characterization

果胶广泛存在于高等植物细胞壁中, 具有支撑、保护和缓冲细胞等功能。成为商品化果胶干粉之前, 果胶分子在溶液中与小分子糖、杂多糖和无机盐等共存。迄今为止, 果胶提纯方法主要有乙醇沉淀法^[1]、

收稿日期: 2017-03-12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31601423); 广东省科技计划项目 (2013B051000015); 中国博士后科学基金项目 (2016M590789); 广州市科技计划项目 (201701060280)

作者简介: 张涛 (1991-), 男, 在读硕士, 主要从事甜菜果胶的醇析工艺探究

通讯作者: 于淑娟 (1955-), 女, 博士, 教授, 主要从事制糖工程、食品科学与工程以及中草药成分修饰等领域的科学技术研究

透析法^[2]、离子交换法^[3]以及金属阳离子沉淀法^[4]等多种。其中, 乙醇沉淀法具有操作简单, 不易引入杂质, 沉淀剂无毒且易挥发、残留少等优点, 该法被广泛运用于工业生产中。醇析法引发的能耗、人工费用是生产成本的主要部分。目前, 醇析法存在乙醇用量大的问题, 如何减少乙醇用量已成为果胶工艺者共同追求的目标。

醇析法的原理主要体现为乙醇的夺水作用, 果胶的亲水性越强, 需要的乙醇用量也就越大。然而, 果胶富含半乳糖醛酸和中性单糖等亲水单元, 其与水分子形成紧密的水合作用关系。为均衡乙醇用量与果胶得率的关系, 国内外学者对果胶醇析工艺进行了研究。

研究表明, 通常需要加入三倍体积酒精才能使果胶醇析完全, 且果胶分子结构与乙醇浓度耐受性存在相关性^[5,6]。

有研究表明, 甜菜果胶 (SBP) 通过聚半乳糖醛酸聚糖 (HG) 主链上的电离羧基与水分子之间的氢键作用而发生水合作用, 同时随着羧基电离程度加深, 羧基上的氧原子电负性会增强从而导致氢键作用的增强, 最终使 SBP 的水合作用加强^[7]。因此推测乙醇加入夺取水分子是导致 SBP 析出的主要原因。此外甜菜果胶的醇析过程也可以从相似相溶的角度解释, SBP 作为极性大分子多糖能够溶于极性溶剂水中, 而弱极性的乙醇加入会使溶液的极性下降^[8], 从而使果胶溶解度下降。

甜菜果胶是来自于甜菜粕的一种新型果胶, 具有良好的乳化活性。与橘皮和苹果渣等来源的果胶不同, 甜菜果胶的分子量较小, 支链较多, 乙酰化程度较高, 甲酯化程度较低, 从而具有良好的乳化性^[9], 可作为水包油型食品乳饮料的乳化剂, 在食品工业中具有良好的应用前景。我国是世界第六大甜菜主产国, 甜菜粕年产量十分可观^[10]。据报道, 甜菜粕中的果胶含量达 25%^[11]。因此, 利用甜菜粕生产甜菜果胶对于甜菜糖业的发展将具有重要的意义。

本文以甜菜果胶为研究对象, 旨在阐明 pH 和乙醇浓度等因素对甜菜果胶的醇析率、物化特性的影响; 采用多种色谱技术分析甜菜果胶的分子结构, 以揭示甜菜果胶与溶剂分子间的相互作用关系。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

甜菜粕, 由新疆绿翔糖业公司提供; 甜菜果胶, 自制, 提取工艺详见^[6]; 乙酸钠, 分析纯, 国药化学试剂集团有限公司; 冰乙酸, 分析纯, 江苏强盛功能化学股份有限公司; 叠氮化钠, 分析纯, 上海润捷试剂公司; 3-苯基苯酚, 日本 TCI 公司; 三氟乙酸, 上海西格玛奥德里奇公司; 盐酸, 广州化学试剂厂; Viscozyme-L 果胶酶, 诺维信公司; 硝酸钠和色谱纯, 阿拉丁试剂公司; 甲醇和乙酸均为色谱纯, 天津科密欧试剂公司; 异丙醇为色谱纯, 美国 Fisher chemical 公司; D-半乳糖醛酸、D-鼠李糖、L-阿拉伯糖、D-半乳糖、D-葡萄糖和 D-木糖, 均为色谱纯, 购自美国 Sigma 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

TU1901 紫外可见分光光度计, 北京普析公司;

KA-1000 台式离心机, 上海安亭科学仪器厂; Marlvern Nano ZS 仪, 英国马尔文公司; DCT21 表面张力仪, 德国 Dataphysics 公司; GR22G 高速冷冻离心机, 日本日立公司; RW20 搅拌机和 HS-4 磁力搅拌机均购自德国 IKA 公司; ICS-5000 高效离子色谱仪, CarboPac PA-1 阴离子分析柱, Guard column, CarboPac PA-1 保护柱, 均购自美国戴安公司; Waters-600 高效液相色谱仪, X-bridge C18 分析柱, Ultrahydrogel 2000、1000 凝胶色谱柱, 2414 示差折光仪, 均购自美国 Waters 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 甜菜果胶的酸提及纯化

采用热酸法提取甜菜果胶, 料液比 1:20, 盐酸调节 pH 至 1.5, 在搅拌桨搅拌下 85 °C 提取 1.5 h。混合液过 400 目滤布后弃去滤渣, 将滤液离心 (10000 g, 15 min) 后取上清液, 在玻璃棒搅拌下缓缓加入三倍体积 95%乙醇, 静置离心得到果胶, 再用 75%的乙醇清洗 2 次, 95%的乙醇清洗 1 次。果胶在 45 °C 烘至恒重, 记为 SBP₁。将 SBP₁ 在去离子水中配成 1% (m/V) 的储备液, 用稀盐酸和稀氨水将储备液调节为 2.5、3.0、3.5、4.0 和 4.5 等几个 pH 梯度, 待用。

将 SBP₁ 溶解于去离子水中, 配制成 1% (m/V) 的果胶溶液, 离心后取上清液, 将上清液缓慢通过 001×7 强酸性阳离子树脂柱, 收集过柱液, 经冻干得到去除内源性阳离子的果胶样品, 记为 SBP₂。将 SBP₂ 在去离子水中配成 1% (m/V) 的储备液, 用稀盐酸和稀氨水将储备液调节为 2.5、3.0、3.5、4.0 和 4.5 等几个 pH 梯度, 待用。

1.3.2 醇析实验

选择 pH 为 2.5、3.0、3.5、4.0 和 4.5 的 SBP₁ 储备液, 分别将 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 和 3.0 倍储备液体积的 95%乙醇加入其中, 加入的过程要缓慢并且伴随玻璃棒的搅拌, 从而使乙醇与溶液充分接触。添加乙醇完毕后, 原本澄清的溶液中出现絮状果胶沉淀。将醇沉体系在 25 °C 下静置 5 h 使果胶能够沉淀完全。离心 (10000 r/min, 20 min) 将果胶沉淀分离, 上清液保留。用 75%的乙醇清洗果胶两次, 再用 95%的乙醇清洗果胶一次, 最后在热风干燥箱中 45 °C 烘至恒重, 得到果胶样品, 称重记录。采用硫酸苯酚法测定醇沉前溶液中和醇沉后上清液中的果胶含量^[12], 分别计算醇析率。

选择 pH 为 2.5、3.0、3.5、4.0 和 4.5 的 SBP₂ 储备液, 重复以上步骤, 分别计算各自对应醇析率。

1.3.3 ζ-电位的测定

ζ -电位是表征胶体分散系稳定性的重要指标, 本文通过测定不同醇析条件下醇析体系的 ζ -电位来辅助揭示醇析过程中 SBP 分子、水分子以及乙醇分子之间的相互关系。本实验使用 Marlvern Nano ZS 仪测定醇析体系的 ζ -电位值。

取 pH 为 2.5、3.0、3.5、4.0 和 4.5 的 SBP₁ 溶液若干, 分别标记为 a、b、c、d 和 e 溶液, 取 pH 为 2.5、3.0、3.5、4.0 和 4.5 的 SBP₂ 溶液若干, 分别标记为 a'、b'、c'、d' 和 e' 溶液。各取 5 mL a、b、c、d、e、a'、b'、c'、d' 和 e' 溶液于 10 mL 离心管, 编号测定 zeta 电位; 各取 4 mL a、b、c、d、e、a'、b'、c'、d' 和 e' 溶液于 10 mL 离心管, 各加一倍体积的 95% 乙醇, 离心后取上清液, 编号测定 zeta 电位; 各取 2 mL a、b、c、d、e、a'、b'、c'、d' 和 e' 溶液于 10 mL 离心管, 各加两倍体积的 95% 乙醇, 离心后取上清液, 编号测定 zeta 电位; 各取 1 mL a、b、c、d、e、a'、b'、c'、d' 和 e' 溶液于 10 mL 离心管, 各加三倍体积的 95% 乙醇, 离心后取上清液, 编号测定 zeta 电位。用 SBP₁-1、SBP₁-2 和 SBP₁-3 分别表示加入 1、2 和 3 倍溶液体积乙醇的 SBP₁ 胶体分散系曲线; 用 SBP₂-1、SBP₂-2 和 SBP₂-3 分别表示加入 1、2 和 3 倍溶液体积乙醇的 SBP₂ 胶体分散系曲线。

1.3.4 表面张力的测定

取果胶样品溶解于 pH 为 3.5 的柠檬酸钠缓冲液中, 配制成 0.5% 的溶液, 用 DCT21 表面张力仪测定果胶溶液的表面张力, 进行三次平行测定。

1.3.5 中性糖含量测定

使用高效阴离子色谱 (HPAEC) 来测定甜菜果胶中中性糖含量^[13]。

样品预处理: 准确称取 5 mg 果胶样品于消化管, 加入 1 mL、Viscozyme-L 果胶酶 (乙酸缓冲液稀释 250 倍), 45 °C 水浴下酶解 12 h, 然后加入 1 mL、4 M 三氟乙酸 (TFA), 120 °C 油浴 2 h 使样品完全酸解。在 75 °C 下水浴蒸干, 加蒸馏水震荡洗出消化管内物质, 加 100 μ L 氨水定容至 100 mL。

色谱条件: 采用 Carbowpac PA-1 保护柱 (4 mm \times 50 mm) 和 Carbowpac PA-1 分析柱 (4 mm \times 250 mm); 采用 10 mM NaOH 进行中性糖洗脱; 利用 ED40 电化学检测器对样品进行检测; pH 参比电极为 P/N: 067819; 柱温箱温度为 30 °C; 进样量为 25 μ L。

1.3.6 甲酯化度、乙酰化度含量测定

采用高效液相色谱 (HPLC) 测定甜菜果胶的甲酯化度和乙酰化度^[14]。

样品预处理: 准确称量 30 mg 果胶样品于 2 mL 离心管, 加入 0.5 mL 由异丙醇和超纯水 1:1 配置的混

合液, 再加入 0.5 mL、0.4 M NaOH 皂化 2 h, 离心 (10000 r/min) 5 min 后取上清液于 1 mL 进样瓶中 (经 45 μ m 滤头过滤)。

色谱条件: 采用 C18 分析柱; 5 mM H₂SO₄ 溶液作为流动相; 采用 Waters 2414 示差折光检测器进行检测; 进样量为 20 μ L; 柱温箱温度为 30 °C; 流速为 0.5 mL/min。

1.3.7 半乳糖醛酸 (GalA) 含量测定

通过建立半乳糖醛酸的标准曲线来测定果胶中半乳糖醛酸含量^[15]。配制浓度为 64 μ g/mL 的半乳糖醛酸标准品, 取 5 mg 待测果胶样品溶解定容至 100 mL, 采用 3-苯基苯酚作为显色剂, 待溶液显色后在 520 nm 处利用紫外可见分光光度计测定最大吸光值, 绘制标曲 $y=0.07651+0.02547x$ ($R^2=0.9993$), 计算半乳糖醛酸含量。

1.3.8 蛋白含量测定

采用凯氏定氮法测定果胶样品中蛋白含量。该法根据蛋白质中氮恒定的原理, 通过测定甜菜果胶样品中氮的含量从而计算果胶蛋白质含量。转换系数 $N=6.25$ 。

1.3.9 分子量测定

采用高效液相体积排阻色谱 (HPSEC) 来测定甜菜果胶样品的分子量。

色谱条件: 流动相为 100 mM 硝酸钠 (含 0.04% 叠氮化钠); 采用 guard column、2000、1000 凝胶色谱柱串联; 流速为 0.6 mL/min; 柱温箱为 35 °C; 进样量为 100 μ L; 样品采用流动相溶解, 浓度为 1 mg/mL。

1.3.10 数据分析

实验数据采用分析统计软件 SPSS (19.0, 美国 IBM 公司) 进行单因素方差分析并在结果之间进行相关性统计。采用 SPSS 的 Duncan 多范围检验进行显著性分析, $p<0.01$ 表示极显著, $p<0.05$ 表示显著, $p>0.05$ 表示不显著。

2 结果与讨论

2.1 醇析率

如图 1 所示, pH、乙醇浓度对果胶醇析率具有显著的影响。纯化后的果胶 SBP₂ 的醇析率如图 1a 所示。在初始 pH=2.5 的条件下, 与 0.5 倍体积乙醇混合后 (体系乙醇浓度为 31.67%), 果胶的醇析率为 27.34%。随着体系乙醇浓度的不断增加, 果胶的醇析率虽然不断上升, 但醇析率最高只能达到 57.23% (体系乙醇浓度 57%)。随后, 乙醇浓度从 57% 进一步升高, 醇析率也趋于平缓。通过纵向比较不同 pH 之间醇析率

关系可知,当 I-pH 从 2.5 逐渐增加至 4.5 时, SBP₂ 的醇析率反而呈下降趋势。在图 1b 中,当 I-pH 为 2.5 时,未纯化果胶 SBP₁ 的醇析率随乙醇浓度增加而不断升高;当体系乙醇浓度为 31.67% 时,对应的醇析率为 62.12%。随着体系乙醇浓度的增加,果胶的醇析率也随之升高,乙醇浓度为 71.25% 处达到最大值 96.81%。在乙醇浓度相同的情况下, I-pH 从 2.5 增加至 4.5 时, SBP₁ 的醇析率呈整体下降趋势。

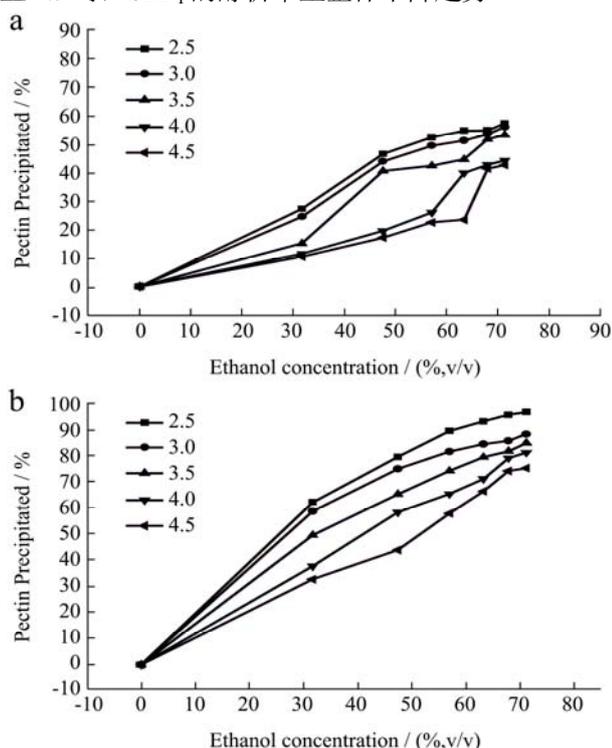


图 1 不同 pH 下 SBP₁ 与 SBP₂ 的醇析率随乙醇浓度变化曲线

Fig.1 Pectin precipitation rates of SBP₁ and SBP₂ as a function of ethanol concentration at different pH values

上述结果表明,甜菜果胶的醇析率在一定范围内均与乙醇浓度成正比。当乙醇浓度达到 71.25% 时醇析率变化趋于平缓,可推断三倍体积的 95% 乙醇为乙醇影响 SBP 醇析率的极限。当体系 I-pH 从 2.5 提升至 4.5 时, SBP 的醇析率反而下降,这是因为 HG 作为果胶的主要特征结构区域,其中含有的羧基在溶液中会发生电离从而使果胶带有电负性,而果胶主要通过 HG 上的羧基以及羟基与水发生氢键作用而水合,同时羧基电离程度越大, SBP 的水合作用也就越强^[7]。当 I-pH 为 2.5 时, SBP 的羧基处于较强酸性环境下,半乳糖醛酸自由羧基的电离程度小,此时其水合作用相对较弱,与水分子之间的氢键作用也就更容易被乙醇破坏从而析出;当 I-pH 逐渐升高时,随着羧基电离程度的不断增加,果胶的水合作用也不断增强,因此在相同体系乙醇浓度时,果胶也更容易析出,醇析率也随之降低。

本文所得果胶醇析率显著高于前人研究结果^[20],这有可能是以下几种因素导致的。一方面,本实验研究的醇析对象为纯净的果胶溶液且果胶浓度为固定的 1%,而参考文献的醇析体系为实际提取液,果胶浓度为 0.5%~1%,其中除果胶外还含有阳离子和杂多糖等物质,二者的醇析条件具有显著差异;另一方面,参考文献对果胶提取液采取了透析处理,相较于本文采用的阳离子树脂法,透析法对于甜菜果胶中内源性阳离子尤其是钙离子的去除更加彻底,而研究表明^[21],二价钙离子能够有效提升甜菜果胶的醇析率,因此本实验具有更高的醇析率。此外,相较于参考文献甜菜果胶的提取条件(1 h, 80 °C),本实验的提取条件更为苛刻(1.5 h, 85 °C),Yapo 等^[16]的研究表明,果胶在剧烈的酸提条件下其侧链容易发生降解,而 Larsen 等^[22]则发现阿拉伯半乳糖侧链亲水性对于提升果胶水合作用具有重要的作用。结合以上结论,推断本实验条件下酸提的果胶侧链发生更大程度的降解从而导致水合作用下降,最终反映为醇析率升高。

2.2 ζ-电位对醇析过程的表征

为进一步探究羧基结构与形态对 SBP 醇析率的影响,检测了甜菜果胶在醇析过程中 zeta 电位随 I-pH 的变化,如图 2 所示。

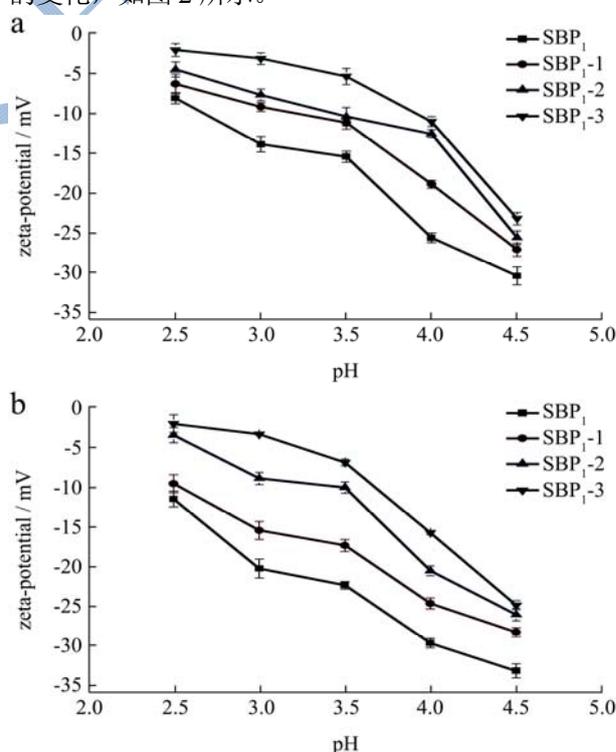


图 2 不同体系乙醇浓度下 SBP₁ 与 SBP₂ 的 ζ-电位随 pH 变化曲线

Fig.2 ζ-potentials of SBP₁ and SBP₂ as a function of pH in different system ethanol concentrations

甜菜果胶溶液作为胶体分散系,可以通过 zeta 电位的变化表征其醇沉过程中的稳定性变化。甜菜果胶作为一种阴离子多糖带负电,而 zeta 电位为带电粒子滑动平面与溶液之间的电位差,因此测得电位显示为负值。

在乙醇溶液中,SBP 的 zeta 电位依赖于 I-pH。在 I-pH 由 2.5 升高到 4.5 的过程中,SBP₁ 溶液的电位绝对值由 8.2 mV 升高到 30.4 mV,SBP 醇析变得困难,与 2.1 中醇析率下降的结果一致。这是因为当 pH 为 2.5 时,果胶主链的羧基基本处于电离质子化状态,SBP 与水分子之间的亲附度不高,故 SBP 醇析容易发生。当 pH 升高时,羧基电离程度加剧,电离羧基与水分子之间形成氢键的数目增加,从而水合作用提升,果胶变得较难析出。纵向比较 SBP₁₋₁、SBP₁₋₂ 和 SBP₁₋₃ 发现,果胶分散系稳定性随着加入乙醇量的增加而下降,体系电位绝对值逐渐趋近于 0 mV,果胶醇析难度降低。

图 2b 表示了 SBP₂ 的电位变化情况。其整体变化趋势与 SBP₁ 类似,不同之处在于 SBP₂ 的电位曲线绝对值整体更加趋近于 30 mV,其在醇析过程中与水分子结合得更紧密,对乙醇浓度的依赖性也更高。

2.3 果胶的结构分析

如表 1 所示,醇析所得 SBP 的半乳糖醛酸(GalA)范围为 64.81%~68.37%。如表 1 所示,当加入三倍 95%乙醇进行醇析时,GalA 含量随着 I-pH 的升高而下降,这是因为在低 pH 环境下 HG 上的羧基电离被抑制,

表 1 不同提取条件果胶的醇析率 (m/m , %)、化学结构 (m/m , %)、甲酯化度 (mol%)、乙酰化度 (mol%) 和重均分子量 (kg/mol)

Table 1 Precipitation yield (m/m , %), chemical constitution (m/m , %), DM (mol%), DA (mol%), and weight-average molar mass (kg/mol) under different pectin extraction conditions

	SBP _{1-pH 2.5-1} ^b	SBP _{1-pH 2.5-2}	SBP _{1-pH 2.5-3}	SBP _{1-pH 3.5-3}	SBP _{1-pH 4.5-3}
PR%	79.51±0.31 ^c	93.23±0.52 ^e	96.82±0.76 ^f	84.94±0.82 ^d	75.27±0.22 ^b
GalA	68.37±0.82 ^d	65.46±0.12 ^b	66.37±0.35 ^e	65.12±0.23 ^b	64.81±0.33 ^b
Rha	3.91±0.31 ^b	3.47±0.17 ^b	3.68±0.19 ^b	4.18±0.28 ^c	4.42±0.56 ^d
Ara	5.13±0.23 ^b	5.49±0.07 ^c	4.58±0.42 ^b	5.37±0.36 ^c	5.61±0.75 ^c
Gal	7.27±0.26 ^c	7.19±0.73 ^b	7.33±0.82 ^d	7.24±0.40 ^c	7.15±0.14 ^b
Glc	0.26±0.03 ^b	0.38±0.05 ^c	0.21±0.13 ^b	0.43±0.11 ^d	0.31±0.12 ^c
Xyl	0.31±0.07 ^c	0.26±0.08 ^b	0.43±0.04 ^c	0.22±0.14 ^b	0.34±0.06 ^c
NS	16.88±0.43 ^c	16.79±0.35 ^c	16.23±0.12 ^b	17.44±0.26 ^c	17.83±0.25 ^c
DM	47.88±1.93 ^c	48.14±1.76 ^c	51.49±1.68 ^e	48.41±1.81 ^c	45.36±2.45 ^b
DA	23.97±1.11 ^c	22.55±2.34 ^c	21.82±1.94 ^c	20.51±1.67 ^b	19.32±0.97 ^b
M _w ^c	404.27	385.73	368.64	210.37	145.07
Protein	9.27±1.34 ^b	9.06±0.81 ^b	9.22±0.97 ^b	8.81±1.15 ^b	9.13±0.48 ^b

注: ^a 数据为平均值±标准偏差 (n=3); 不同字母标注的同行平均值之间具有显著性差异 ($p<0.05$); ^bSBP_{1-pH 2.5-1} 表示由 SBP₁ 在 I-pH 为 2.5, 一倍体积的 95%乙醇条件下醇析所得果胶; ^c 单次重复。

水合作用下降从而导致 HG 析出程度增大, GalA 含量升高。不同乙醇浓度下析出的甜菜果胶的 GalA 含量并无显著性差异, 因此推测乙醇浓度并非 HG 析出的主要影响因素。

SBP 的中性糖 (图 3) 包括鼠李糖 (Rha)、阿拉伯糖 (Ara)、半乳糖 (Gal)、葡萄糖 (Glc) 和木糖 (Xyl), 含量分布为 3.47%~4.42%、4.58%~5.61%、7.15%~7.33%、0.21%~0.43% 和 0.22%~0.43%。这与文献报道的结果一致^[16]。对于 SBP 中性糖而言, Rha、Ara 和 Gal 含量占中性糖总量的 95% 以上, 为甜菜果胶主要的中性糖组分。在 I-pH 相同的情况下, 中性糖 (NS) 含量与乙醇浓度并无直接相关性; 但乙醇浓度为 71.25% 时, SBP_{1-pH 2.5-3} 的 NS ($p<0.05$) 较低。这可能是蛋白等组分的含量增加, 从而降低了 NS 和 GalA 等的相对含量。

甜菜果胶样品的甲酯化度和乙酰化度分别为 45.36%~51.49% 和 19.32%~23.97%, 属于低酯果胶。不同体系乙醇浓度醇析出的样品其甲酯化度 (DM) 并无显著性差异 ($p>0.05$), 但是在相同乙醇浓度下, 果胶样品的醇析率随着 I-pH 的升高而下降, 相应的 DM 也呈下降趋势。I-pH 对果胶的 DM 值并没有显著影响, 但是 DM 值越高的样品其可电离羧基数量就越低, 一方面其水合作用理应下降, 另一方面果胶分子上带电荷数量越少, 相互之间的排斥作用就越弱, 更容易聚集析出。因此推断 DM 值对醇析率有影响, 该推断尚且需要进一步实验证明。

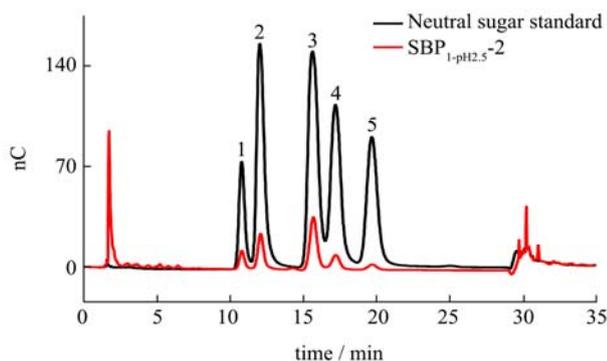


图3 中性糖标品和 SBP_{1-pH2.5-2} 的离子色谱图, 依次为鼠李糖 (Rha)、阿拉伯糖 (Ara)、半乳糖 (Gal)、葡萄糖 (Glc) 和木糖 (Xyl)

Fig.3 Ion chromatograms of NS standards and SBP_{1-pH2.5-2} as follows: Rha, Ara, Gal, Glc, and Xyl

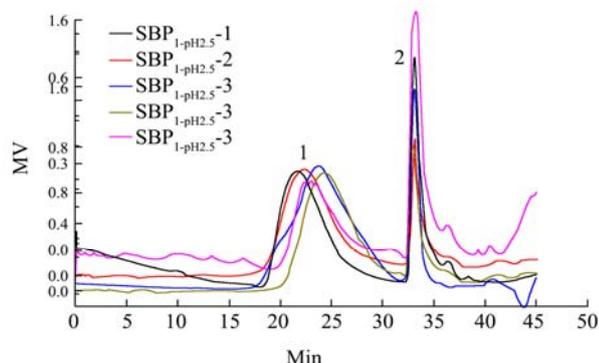


图4 不同醇析条件所得果胶样品的分子量分布曲线

Fig.4 Molecular weight distribution curve of SBP in different precipitation conditions

不同醇析条件下所得的果胶样品其示差 (RI) 信号如图4所示, SBP 的分子量分布曲线具有典型的宽分布特征, 由峰 1 (19~30 min) 和峰 2 (32.5~35 min) 组成, 峰 2 较峰 1 窄。峰 1 主要为果胶分布洗脱曲线, 而峰 2 则可能含有低聚糖和无机盐等小分子物质。如表 1, 在 I-pH 为 2.5 的不同体系乙醇浓度下, SBP_{1-pH2.5-1}, SBP_{1-pH2.5-2}, SBP_{1-pH2.5-3} 之间的 M_w 值接近, 分别为 404.27 kg/mol、385.73 kg/mol 以及 368.64 kg/mol, 这表明醇析乙醇浓度对甜菜果胶的分子量影响不大。SBP_{1-pH2.5-1} 在较低乙醇浓度下获得, 而 M_w 最大, 可能是甜菜果胶中大组分物质更加容易析出。如表 1 所示, 在三倍体系乙醇浓度下, SBP_{1-pH2.5-3} 的 M_w 最高, 为 368.64 kg/mol, 随着 I-pH 的升高, 果胶的 M_w 值显著降低, 当 I-pH 为 4.5 时 SBP_{1-pH4.5-3} 的 M_w 下降到了 145.07 kg/mol。由此可见, 醇析体系的 I-pH 对甜菜果胶的分子量有较大程度的影响, 在较低 I-pH 下, 甜菜果胶中分子量较大的组分更加容易析出。

另外, 各样品均含有蛋白, 其含量介于 8.81%~

9.27%之间。鉴于在图 4 中除峰 1 峰 2 外并无独立的大分子峰出现, 因此推断果胶中的蛋白主要以结合态存在。各样品之间的蛋白含量存在差异, 说明乙醇浓度对含蛋白组分具有选择性。有研究表明蛋白是果胶具有乳化性的重要组成部分^[17], 此外也有研究指出蛋白对于果胶的乳化稳定性有重要的影响^[18]。

2.4 表面张力

表 2 不同果胶溶液 (0.5% m/V) 的表面张力 (mN/m)

Table 2 Surface tension (mN/m) of different pectin solutions

(0.5% m/V)	
	Surface tension
Buffer	71.27±0.019
SBP _{1-pH2.5-1}	62.81±0.028
SBP _{1-pH2.5-2}	59.13±0.024
SBP _{1-pH2.5-3}	61.71±0.020
SBP _{1-pH3.5-1}	56.29±0.029
SBP _{1-pH4.5-1}	63.46±0.017

如表 2 所示, SBP 的表面活性与醇析工艺有关。甜菜果胶样品均表现出一定的表面活性, 其溶液的表面张力均小于缓冲液 (71.27 mN/m)。这间接说明 SBP 具有两亲性, 能有效降低缓冲液的表面张力。不同样品溶液的表面活性也不尽相同, 其中 SBP_{1-pH3.5-1} 的表面活性最高, 为 56.29±0.029 mN/m。从胶体化学上看, 表面张力形成的根本原因无论是从能量角度还是力的角度而言, 都是由于表面分子间距变大, 导致分子间合力表现为引力, 宏观上形成表面张力^[19]。果胶结构是 SBP 表面活性的直接原因。由表 1 可知, 醇析工艺对 SBP 蛋白含量具有显著的影响, 而蛋白所具有的亲水性又会对果胶的表面活性造成一定程度的影响。因此, 我们推测蛋白含量可能是决定 SBP 表面张力的关键因子。

3 结论

3.1 本文对阳离子树脂柱纯化前后甜菜果胶 (SBP₁ 和 SBP₂) 在相同醇析条件下的醇析率进行对比, SBP₂ 的醇析率均明显低于 SBP₁, 说明在甜菜果胶的醇析过程中内源性阳离子对于果胶的醇析率有促进作用。

3.2 通过醇析实验及电位实验得出结论: 随着乙醇浓度的提升, 甜菜果胶的电位绝对值下降, 果胶溶液体系变得不再稳定, 果胶水合作用下降变得容易析出, 醇析率升高。在该过程中乙醇是通过夺取与果胶结合的水分子而破坏果胶的水合作用; 随着溶液初始 pH 的下降, 果胶的电位绝对值下降, 水合作用下降, 醇析率升高。可知甜菜果胶的醇析率受到果胶溶液的

I-pH 与醇析体系乙醇浓度的影响。

3.3 甜菜果胶样品的半乳糖醛酸含量范围为 64.81%~68.37%; 所得果胶样品均含有中性糖, 分别为鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖和木糖, 其中鼠李糖、阿拉伯糖和半乳糖为主要中性糖组成成分; 果胶样品的甲酯化度和乙酰化度分别为 45.36%~51.49%和 19.32%~23.97%, 属于低酯果胶; 果胶的分子量范围为 145.07~404.27 kg/mol; 果胶中的蛋白主要为结合蛋白, 范围为 8.81%~9.27%。果胶溶液的 I-pH 与醇析体系乙醇浓度对甜菜果胶的结构均有不同程度地影响。

3.4 所得果胶样品对应溶液均具有表面活性, 不同 I-pH 与醇析体系乙醇浓度下析出的果胶对应的溶液表面张力不同, 有可能是在不同的醇析条件下果胶的结构发生变化, 导致靠近溶液表面的果胶分子之间相互作用力发生变化引起的表面张力变化。具体机理有待进一步探究。

3.5 本文对于甜菜果胶生产环节中的醇沉步骤提供了一定程度的理论依据, 对于平衡醇沉过程中的系列条件组合, 节约原料, 控制成本有积极意义。而对于不同醇沉条件对于甜菜果胶结构以及各取代基团的影响机理尚不清楚, 需要做进一步的研究。

参考文献

- [1] Mañas E, Saura-Calixto F. Ethanol precipitation: a source of error in dietary fibre determination [J]. *Food Chemistry*, 1993, 47(4): 351-355
- [2] Fishman M L, Chau H K, Qi P X., et al. Physico-chemical characterization of protein-associated polysaccharides extracted from sugar beet pulp [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 92(2): 2257-2266
- [3] Vries J A D. Structural studies of apple pectins with pectolytic enzymes [J]. *Recent Advances in the Chemistry & Function of Pectins M*, 1986, 310(1): 38-48
- [4] Chou, Teh-Chien D. The role of shape and aggregation on rheological properties of dilute and concentrated pectin solutions [J]. 1989
- [5] Xu J, Yue R Q, Liu J, et al. Structural diversity requires individual optimization of ethanol concentration in polysaccharide precipitation [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2014, 67(6): 205-209
- [6] Guo X, Meng H, Zhu S, et al. Stepwise ethanol precipitation of sugar beet pectins from the acidic extract [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 136(2): 316-321
- [7] Noto R, Martorana V, D Bulone, et al. Role of charges and solvent on the conformational properties of poly (galacturonic acid) chains: A molecular dynamics study [J]. *Biomacromolecules*, 2005, 6(5): 2555-2562
- [8] Franks F, Ives D J G. The structural properties of alcohol-water mixtures [J]. *Quarterly Reviews Chemical Society*, 1996, 20(20): 1-44
- [9] Weibel M K. Sugar beet pectins and their use in comestibles. In: US. European Patent Office: 0426434 A1 [P] 1991
- [10] 潘智,杨枝煌.中国甜菜糖业现状及其应对[J].*中国糖料*, 2014,1:68-73
PAN Zhi, YANG Zhi-huang. Present situation and guide line of beet sugar industry of China [J]. *Sugar Crops of China*, 2014, 1: 68-73
- [11] May C D. Industrial pectins: sources, production and applications [J]. *Carbohydrate Polymers*, 1990, 12(1): 79-99
- [12] 赵启铎,舒乐新,马琳,等.硫酸-苯酚法测定槐甘菌质多糖的含量[J].*宜春学院学报*,2011,33(8):74-76
ZHAO Qi-duo, SHU Le-xin, MA Lin, et al. Determination of polysaccharide in huaiganjunzhi by phenol-sulfuric acid method [J]. *Journal of Yichun College*, 2011, 33(8): 74-76
- [13] Gama H, Emaga T H, Robert C, et al. New method for the purification of electrically charged polysaccharides [J]. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25(5): 1219-1226
- [14] Levigne S, Thomas M, Ralet M C, et al. Determination of the degrees of methylation and acetylation of pectins using a C18 column and internal standards [J]. *Food Hydrocolloids*, 2002, 16(6): 547-550
- [15] Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. New method for quantitative determination of uronic acids [J]. *Analytical Biochemistry*, 1973, 54(2): 484-489
- [16] Yapo B M, Robert C, Etienne I, et al. Effect of extraction conditions on the yield, purity and surface properties of sugar beet pulp pectin extracts [J]. *Food Chemistry*, 2007, 100(4): 1356-1364
- [17] Nuñez A, Fishman M L, Fortis L L, et al. Identification of extensin protein associated with sugar beet pectin [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(22): 10951-10958
- [18] Funami T, Zhang G, Hiroe M, et al. Effects of the proteinaceous moiety on the emulsifying properties of sugar beet pectin [J]. *Food Hydrocolloids*, 2007, 21(8): 1319-1329
- [19] 张晋,杨亮,张毅,等.液体表面张力产生机理及方向分析[J].*中国石油和化工标准与质量*,2012,32(5):73-74
ZHANG Jin, YANG Liang, ZHANG Yi, et al. Mechanism and direction analysis of liquid surface tension [J]. *China*

- Petroleum and Chemical Standard and Quality, 2012, 32(5): 73-74
- [20] X Guo, H Meng, Q Tang, et al. Effects of the precipitation pH on the ethanolic precipitation of sugar beet pectins [J]. Food Hydrocolloids, 2016, 52: 431-437
- [21] X Guo, T Zhang, H Meng, et al. Ethanol precipitation of sugar beet pectins as affected by electrostatic interactions between counter ions and pectin chains [J]. Food Hydrocolloids, 2016
- [22] F H Larsen, I Byg, I Damager, et al. Residue specific hydration of primary cell wall potato pectin identified by solid-state ^{13}C single-pulse MAS and CP/MAS NMR spectroscopy [J]. Biomacromolecules, 2011, 12(5): 1844-1850

现代食品科技