

酶解法测定多种糖混合体系中海藻糖的含量

王青云, 王越, 林亲录

(中南林业科技大学食品科学与工程学院, 稻谷及其副产物深加工国家工程实验室, 湖南长沙 410004)

摘要: 基于海藻糖水解酶(trehalase)可专一性水解海藻糖为葡萄糖的基本原理, 建立了一种快速测定多种糖混合体系中海藻糖含量的分析方法: 在 trehalase 过量的情况下, 保证样品中海藻糖短时间内完全水解为葡萄糖, 再采用 DNS 法测定酶解前后样品中还原糖含量并计算其差值, 即可折算出样品中海藻糖含量。对含已知浓度海藻糖标准品和麦芽糖、果糖、葡萄糖、蔗糖的多种糖混合溶液中海藻糖含量的测定结果分析表明, 酶解法测定海藻糖含量的样品回收率在 91.12%~105.92% 范围内, 相对标准偏差为 2.22%~3.43%, 测定结果不受样品中其它糖类的干扰。该方法的检出限为 70 $\mu\text{g/mL}$ 样品。T 检验结果表明, 酶解法和 HPLC 对发酵法生产海藻糖中间产物中海藻糖含量的检测结果无显著差异。酶解法测定海藻糖含量具有快速、准确、灵敏等特点, 不仅适合于糖成分复杂的样品中海藻糖含量的测定, 也具有广谱的应用价值。

关键词: 酶解法; 海藻糖; 多种糖混合体系; 高效液相色谱法

文章编号: 1673-9078(2015)6-329-333

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.6.052

Determination of Trehalose in Saccharide Mixtures Based on Trehalase-catalyzed Hydrolysis

WANG Qing-yun, WANG Yue, LIN Qin-lu

(Faculty of Food Science and Engineering, Central Southern University of Forestry and Technology; National Engineering Laboratory for Rice and By-product Deep Processing; Changsha 410004, China)

Abstract: Based on the specificity of trehalase in hydrolyzing trehalose to glucose, a simple and rapid method for the determination of trehalose in saccharide mixtures was established. Excess trehalase ensured that trehalose would be hydrolyzed completely into glucose in a short time period, and then, the dinitrosalicylic acid (DNS) method was used to determine the reducing sugar content in both samples before and after hydrolysis. The trehalose content could be calculated using the difference in reducing sugar content. The data of trehalose content in mixed solutions containing a trehalose standard, maltose, fructose, glucose, and sucrose were analyzed, and the results showed that the recovery rates of trehalose were in the range of 91.12%~105.92% and relative standard deviation was 2.22%~3.43%. Other saccharides in the mixture did not interfere with the content data with a detection limit of 70 $\mu\text{g/mL}$. The trehalose content in the intermediate product of fermentation was determined via the trehalase hydrolysis method and high performance liquid chromatography (HPLC). A t test showed that there was no difference between the two groups. The trehalase hydrolysis method was rapid, accurate, and sensitive. It can be used for samples with complex sugar compositions, and has a wide range of applications.

Key words: trehalase hydrolysis method; trehalose; saccharide mixture; high performance liquid chromatography

海藻糖作为一种非还原性二糖, 因其甜味纯正、致龋性低、血糖反应平稳、不发生美拉德反应、对生物细胞和生物大分子具有良好保护作用等特点, 已开始被广泛应用于食品加工、化妆品、保健品和生物医药等领域^[1~4]。随着研究和应用技术的不断深入和拓

收稿日期: 2014-09-01

基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目 (12JJ5009); 粮油深加工与品质控制湖南省 2011 协同创新资助项目 (湘教通[2013]448 号)

作者简介: 王青云 (1975-), 女, 讲师, 研究方向: 食品生物技术

通讯作者: 林亲录 (1966-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 农产品加工及贮藏工程

展, 如何快速、准确地检测海藻糖的含量, 显得越来越重要。特别是当样品中同时含有葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖等多种糖类时, 现有的糖类物质含量测定方法, 如菲林试剂法、蒽酮比色法等, 由于很难排除其它糖分的干扰, 因而无法准确测出样品中海藻糖的含量; 利用高效液相(HPLC)法虽然可实现对多糖混合体系中海藻糖含量的测定, 但常用的氨基色谱柱开机后需要较长时间才能稳定, 且必须对流动相组成进行恰当的优化才有可能将样品中的海藻糖与其它糖类完全分开, 因此测定周期长, 无法实现快速测定。

利用海藻糖水解酶能专一性地将一分子海藻糖水

解为两分子葡萄糖的基本原理, 通过向待测样品中添加足够量的海藻糖水解酶, 可确保在较短时间内, 海藻糖完全水解。再利用 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 法或滴定法等测定还原糖含量的常规方法, 分别检测酶解后和酶解前样品中还原糖含量并计算两者差值, 即可准确折算出样品中海藻糖的含量。该方法具有快速、便捷的特点, 且不需大型仪器设备, 测试成本较低。本研究对酶解法测定多种糖混合体系中海藻糖含量的样品回收率、测定精确度、最低检出限等进行了研究, 并对酶解法和 HPLC 法测定海藻糖含量的结果进行了差异分析, 旨在为探讨多种糖混合体系中海藻糖含量的快速测定方法提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

海藻糖标准品: D-(+)-Trehalose dihydrate (纯度 ≥99%), sigma 原装试剂; 中性海藻糖水解酶 trehalase (pH7.0, 25 °C 条件下, 该酶的活力单位为 2105.26 IU/mL)、pH7.0 咪唑缓冲液: 爱尔兰 Megazyme 公司生产; 乙腈: 色谱纯; 大米麦芽糖浆: 食品级; 3,5-二硝基水杨酸、麦芽糖、葡萄糖、果糖、蔗糖等均为分析纯。

1.2 主要仪器

岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪; Lichrospher 氨基色谱柱 (5 μm, 4.6×250 mm); 示差折光检测器; 上海光谱 SP-756P 紫外可见分光光度计; 微量移液器, 分析天平等。

1.3 含已知浓度海藻糖标准品的多种糖混合

溶液的制备

表 1 含海藻糖标准品的多种糖混合溶液的稀释

Table 1 The dilutions of the saccharide mixture containing the trehalose standard

管号	0	1	2	3	4	5
基准液/mL	0	2	4	6	8	10
蒸馏水/mL	10	8	6	4	2	0
加标浓度/(mg/mL)	0	1.013	2.026	3.039	4.052	5.065

海藻糖标准品经 110 °C 烘干至恒重, 准确称取 559.8 mg, 同时分别称取适量的麦芽糖、葡萄糖、果糖和蔗糖, 称量后的以上各糖混合后用蒸馏水溶解并定容至 100 mL, 该溶液中海藻糖标准品的浓度为

5.598 mg/mL。由于所用海藻糖标准品为海藻糖二水合物, 除去结晶水后海藻糖的理论浓度为 5.065 mg/mL。以该溶液为基准液, 按表 1 进行系列稀释, 备用。

1.4 酶解法测定含已知浓度海藻糖标准品的

多种糖混合溶液中海藻糖含量的操作方法

1.4.1 样品的酶解

1.4.1.1 酶解时间的确定

取干净试管 5 支, 各管中均依次加入海藻糖标准品浓度为 5.065 mg/mL 的多种糖的混合溶液 0.1 mL、pH 7.0 的咪唑缓冲液 0.1 mL、trehalase 0.1 mL 和蒸馏水 0.7 mL, 混匀后, 将各管置于 25 °C 条件下分别反应 20、30、40、50、60 min, DNS 法测定各反应液中还原糖含量。试验重复三次, 结果取平均值。比较不同酶解时间样品中还原糖的含量, 以测得的还原糖含量已基本稳定时的反应时间为最适酶解时间。

1.4.1.2 含海藻糖标准品的多种糖混合溶液系列稀释液的酶解

取含海藻糖标准品的多种糖混合溶液的系列稀释液各 0.1 mL, 按照 1.4.1.1 的方法依次添加各试剂, 25 °C 条件下酶解。酶解时间采用 1.4.1.1 确定的最适酶解时间。

1.4.2 酶解前后样品中还原糖含量的测定方法

采用 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 法, 参考赵亚华等^[5]的方法。

1.4.2.1 制备葡萄糖标准曲线

配置 500 μg/mL 的葡萄糖标准溶液, 然后按下表操作添加各种试剂:

表 2 葡萄糖标准曲线的制备

Table 2 The preparation of the glucose standard curve

试剂/mL	试管编号					
	1	2	3	4	5	6
500 μg/mL 葡萄糖标准溶液	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
蒸馏水	1	0.8	0.6	0.4	0.2	0
DNS 试剂	1	1	1	1	1	1
加热	沸水浴 5 min, 取出冷却					
蒸馏水	8	8	8	8	8	8

将上述各试管溶液摇匀, 以 1 号管溶液调零, 测定其它各管的 OD_{540nm} 值。以样品中葡萄糖含量 (μg/mL) 为纵坐标、OD_{540nm} 值为横坐标绘制葡萄糖标准曲线。所得线性方程为 $y = 492.94x + 23.933$, 相关系数 $R^2 = 0.9937$ 。

1.4.2.2 酶解前、后样品中还原糖含量的测定方法

取样品 1 mL, 参照葡萄糖标准曲线制作的方法依次加入 DNS 试剂、沸水浴 5 min、冷却、加入 8 mL 蒸馏水, 测定 OD_{540nm} 值, 根据线性方程计算出还原糖浓度, 乘以样品的稀释倍数即得样品中还原糖含量。

1.4.3 样品中海藻糖含量的计算

1 分子海藻糖水解为 2 分子葡萄糖的过程中增加了 1 个 H_2O 分子, 因此, 应按下式计算样品中海藻糖含量:

$$\text{海藻糖含量}/\% = (\text{酶解后还原糖含量}\% - \text{酶解前还原糖含量}\%) \times 342 / 360$$

1.5 发酵法生产海藻糖中间产物的制备

以大米麦芽糖浆为主要原料配制液体发酵培养基, 本实验室所保存的海藻糖高产酵母为菌种, 所得发酵产物经细胞破碎, 5000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 即为微生物发酵法生产海藻糖的中间产物。

1.6 酶解法测定中间产物样品中海藻糖含量的

的操作方法

分别按照 1.4.1.2 和 1.4.2.2 的方法对海藻糖生产中间产物进行酶解, 并测定酶解前后样品中的还原糖含量; 再按照 1.4.3 的方法计算出海藻糖含量。对于海藻糖含量可能较高的中间产物, 应进行充分稀释以保证样品中海藻糖酶解完全。

1.7 HPLC 法测定海藻糖含量的操作方法

参照 GB/T 23529-2009^[6]推荐的方法。以标样的质量浓度 (mg/mL) 为纵坐标, 峰面积为横坐标, 得回归方程 $y = 3.8028 \times 10^{-6}x + 0.3682$, $R^2 = 0.9998$ 。

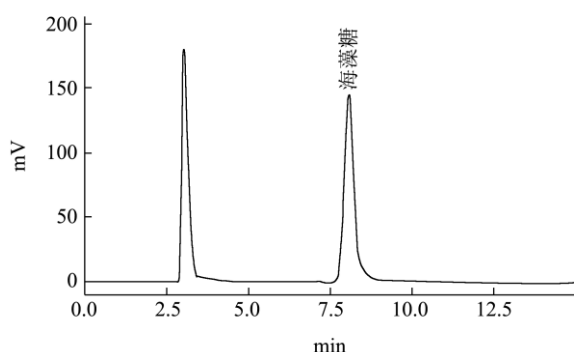


图 1 海藻糖标准的 HPLC 图

Fig.1 HPLC chromatogram of the trehalose standard

2 结果与讨论

2.1 最适酶解时间

经过不同时间的酶解后, 含海藻糖标准品的多种

糖混合溶液中还原糖的含量测定值如表 3。酶解时间由 20 min 延长至 30 min 时, 还原糖含量有明显升高; 继续延长酶解时间至 40 min, 测得的还原糖与 30min 时相比, 虽略有升高但已基本稳定。酶解时间延长至 50、60 min, 还原糖含量反而稍有下降, 这可能与 25 °C 条件下长时间保温时, 样品中糖分易被少量杂菌分解有关。由于酶解 40 min 时测得的还原糖含量比 30 min 时升高不到 1%, 对测定结果的影响极小。因此, 从有利于快速测定的角度考虑, 确定最适的酶解时间为 30 min。

表 3 不同酶解时间的含海藻糖标准品多种糖混合溶液中还原糖含量

Table 3 The reducing sugar in a saccharide mixture containing the trehalose standard after different enzymatic hydrolysis time

酶解时间/min	20	30	40	50	60
还原糖含量/(mg/mL)	12.498	13.235	13.336	13.041	12.891

由于本实验所用含海藻糖标准品的多种糖混合溶液中海藻糖的理论含量为 5.065 mg/mL, 添加量为 0.1 mL; 而本研究所用 trehalase, 其活力单位为 2105.26 IU/mL, 相当于每毫升酶液可在 30 min 内水解 24 mg 海藻糖, 即 0.1 mL trehalase 30 min 可水解 2.4 mg 海藻糖, trehalase 的添加量是水解样品中海藻糖 (0.5065 mg) 所需酶量的 4.74 倍。足量的 trehalase 保证了海藻糖能在较短时间内充分酶解。虽然延长反应时间可减少 trehalase 的使用量, 但由于样品中糖分在水解反应条件下易被空气中杂菌分解, 反应时间过长将导致测试误差增大, 同时也会降低试验效率。因此, 采用酶解法测定海藻糖含量时, 建议 trehalase 的添加量应为样品中海藻糖水解所需酶量的 5 倍以上, 水解时间为 30 min。

2.2 酶解法测定多种糖混合溶液中海藻糖标

准品含量的检测结果

酶解法测得含海藻糖标样的糖混合溶液中海藻糖的浓度如表 3 所示。由表 3 可以看出, 该方法的样品回收率介于 91.12%~105.92%, 相对标准偏差为 2.22%~3.43%。

2.3 检出限

采用酶解法测定海藻糖含量时, 为保证测定数据的可靠性, 酶解后、酶解前样品分别与 DNS 试剂反应测得的 OD_{540nm} 值, 其差值 ΔOD_{540nm} , 应不小于 0.100。根据线性方程 $y = 492.94x + 23.933$, 即相当于酶解产生的葡萄糖量应不低于 73.227 $\mu\text{g/mL}$, 折算成

海藻糖的含量为 $32.737 \times 342 / 360 = 69.566 \mu\text{g/mL} \approx 70 \mu\text{g/mL}$ 。可见该方法具有较高的灵敏度，可满足海藻糖生产研究及常规检测的需要。

表 3 酶解法测定多种糖混合溶液中海藻糖含量的样品回收率 (n=3)

Table 3 Results of the recovery of the trehalose standard in samples of saccharide mixtures (n = 3)

管号	1	2	3	4	5
海藻糖标准品添加量/(mg/mL)	1.013	2.026	3.039	4.052	5.065
测得海藻糖含量/(mg/mL)	1.002	1.987	2.985	3.876	4.740
回收率/%	97.43~101.58	98.08~105.92	94.41~100.10	91.12~97.09	93.58~98.50
RSD/%	2.22	3.85	2.97	3.30	3.43

2.4 发酵法生产海藻糖中间产物的检测结果

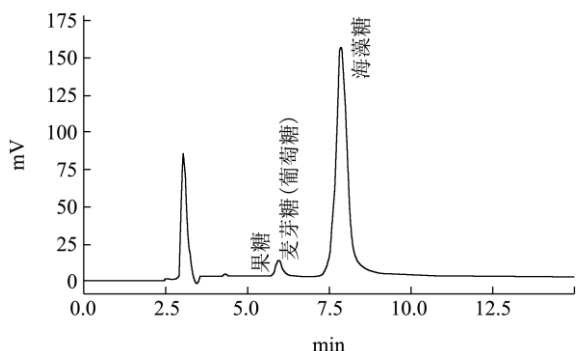


图 2 发酵法生产海藻糖中间产物的 HPLC 图

Fig.2 HPLC chromatogram of intermediate products of trehalose by fermentation

分别采用酶解法和 HPLC 法对发酵法生产海藻糖测定中间产物中海藻糖的含量进行了测定，结果如表 4。

表 4 酶解法和 HPLC 法对海藻糖中间产物样品中的海藻糖含量的测定结果 (n=5)

Table 4 Contents of trehalose in the intermediate product determined by trehalase hydrolysis and HPLC (n = 5)

测定次数	1	2	3	4	5	平均值
酶解法测得的含量/(mg/mL)	13.093	13.004	12.926	12.897	13.070	12.998
HPLC 法测得的含量/(mg/mL)	12.986	13.190	13.225	13.177	12.903	13.096

为了说明酶解法和 HPLC 法对海藻糖含量测定结果的差异性，利用 SPSS 软件对表 4 中两组测定结果进行 t 检验分析，计算出 $t=1.3181$ 。α=0.05 时，查 t 检验临界值分布表得 $t_{(0.05,8)}=2.306$ ， $t < t_{(0.05,8)}$ ，说明这两组数据无显著差异。

采用 HPLC 法测定多种糖混合物中海藻糖含量时，往往需要花费较长时间对流动相的组成配比进行合理优化，才能把结构相近的糖类分开。而酶解法测

定多糖混合物中海藻糖含量，则基本上不受样品中其它糖类的干扰，测定快速、准确、灵敏度高，且不需要昂贵的大型设备，易于实施和推广。

2.5 测定结果影响因素的讨论

2.5.1 样品中其它糖分含量高低对测试结果的影响

海藻糖水解酶具有高度的专一性，且该水解反应的可逆程度低，样品中麦芽糖、葡萄糖、果糖和蔗糖的含量高低通常不会影响到海藻糖水解酶对海藻糖的催化水解反应，只会影响到 DNS 法测定还原糖含量时所得 OD_{540nm} 值的高低，但并不影响酶解后、酶解前样品分别与 DNS 试剂反应测得吸光度的差值 ΔOD_{540nm}，因此，从理论上讲，样品中其它糖类的含量高低通常情况下不会影响到测定的结果。

但是，当样品中其它糖分的总浓度过高且远高于海藻糖浓度的情况下，为保证还原糖含量不超出 DNS 法测定的线性范围，必须对样品进行充分的稀释。当出现将样品稀释至酶解后的还原糖浓度不超过 DNS 法线性范围的最大限 (OD_{540nm} ≤ 1.000) 时，若样品中海藻糖的浓度已低于本方法的最低检出限 (ΔOD_{540nm} < 0.100) 的情况，即相当于由海藻糖水解产生的葡萄糖含量小于酶解后样品中全部还原糖含量的 1/10 时，测定结果的精密度将会受到影响。这种情况下，可采用硼氢化钠还原法来去除样品中的还原糖。具体操作方法为：取待测样品 1 mL，加入足量的浓度为 10 mg/mL 的硼氢化钠溶液（用浓度为 2 g/L 的 NaOH 溶液配制），40 °C 反应 30 min 以保证样品中的还原糖全部转变成糖醇；再加入稀盐酸（至 pH 值降低至 4.5），振荡以除去多余的硼氢化钠；最后用 pH7.0 咪唑缓冲液将溶液 pH 调至 7。

2.5.2 样品颜色对测定结果的影响

对于有颜色的多种糖混合溶液，其色泽可能会导致 DNS 法测定还原糖含量时的 OD_{540nm} 值偏大。因此，

当测定样品的颜色较深时,通常可对样品进行适当稀释处理来降低其对 OD_{540nm} 值的影响。特殊情况下,对于海藻糖含量极低同时颜色又很深的样品,稀释可能使海藻糖含量低于本方法的检出限时,可采用活性炭脱色法^[7]对样品进行处理。

3 结论

本研究建立了酶解法测定含多种糖的混合体系中海藻糖含量的测定方法:在 trehalase 添加量为海藻糖水解所需酶量 5 倍以上的情况下水解 30 min,确保样品中海藻糖完全水解为葡萄糖,通过 DNS 法测定水解前后样品中还原糖含量并计算其差值,由此可折算出样品中海藻糖含量。此方法的样品回收率为 91.12%~105.92%,相对标准偏差 2.22%~3.43%,海藻糖的检出限为 70 μg/mL。对发酵法生产海藻糖的中间产物中海藻糖含量的检测结果表明,酶解法与 HPLC 法的检测结果无显著差异。酶解法测定海藻糖含量具有快速、准确、简便易行,不受样品中其它糖类干扰等优点。该方法不仅特别适用于糖成分组成复杂的样品中海藻糖含量的测定,也可用于常规样品中海藻糖含量测定,具有广谱的应用价值。

参考文献

- [1] Satoshi O Y, John W. Trehalose: current use and future applications [J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2011, 100(6): 2020-2053
- [2] Khadijeh P, Jamshid G G, Rahim B. Effect of addition of raffinose and trehalose at andromed on post thawed semen characteristics of buffalo spermatozoa [J]. International Journal of Biosciences, 2014, 4(1): 393-398
- [3] Sze-Yin S, Lai-Hoong C. Effects of maltodextrin and trehalose on the physical properties of Chinese steamed bread made from frozen doughs [J]. International Food Research Journal, 2013, 20(4): 1529-1535
- [4] Patroklos V, Dimitris P, Petropoulou A, Tsamitropoulou F. Plackett-burman experimental design for investigating the effect of porcine plasma protein, trehalose and bovine meat protein isolate on cook yield and texture of minced bovine meat [J]. Journal of Food Research, 2013, 2(3): 122-136
- [5] 赵亚华,高向阳.生物化学与分子生物学实验技术教程[M].北京:高等教育出版社,2005
ZHAO Ya-Hua, GAO Xiang-Yang. An experimental technique course in biochemistry and molecular biology [M]. Beijing: Higher Education Press, 2005
- [6] GB/T 23529-2009,海藻糖[S]
GB/T 23529-2009, Trehalose [S]
- [7] 廖春燕,黄敏,黄瑶,等.车前草多糖的脱色工艺研究[J].现代食品科技,2012,28(8):1028-1030
LIAO Chun-Yan, HUANG Min, HUANG Yao, et al. Decoloring process of polysaccharide extracted from plantago asiatica L [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 28(8): 1028-1030

欢迎订阅 EI 收录期刊、中文核心期刊

《现代食品科技》

邮发代号: 46-349 刊号: ISSN 1673-9078/CN 44-1620

地址: 广州五山华南理工大学轻工与食品学院麟鸿楼 508, 邮编: 510640

电话: 020-87113352

E-mail: xdspkj@126.com

投稿系统: www.xdspkj.cn