

小角 X 射线散射仪、原子力显微镜等联合分析为果胶高级结构 解表征提供新视角

包郁明^{1,2}, 范志影¹, 何夙旭¹, 崔洁芬³, 赵维香¹, 朱超¹

(1.中国农业科学院 饲料研究所, 北京 100089; 2.中国仪器仪表学会科学仪器设备验证评价中心(生命科学站), 北京 100089; 3.青岛农业大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266109)

摘要: 本文通过小角 X 射线散射仪、扫描电镜、原子力显微镜表征不同处理的柚皮果胶结构, 不同仪器表征结果既互相独立, 又相互印证, 为果胶高级结构分析及制备应用提供参考。

关键词: 小角 X 射线散射仪;原子力显微镜;果胶结构

The combination of Small angle X-ray scattering and Atomic force microscopy provides a new perspective for the characterization of pectin advanced structural solutions

Bao Yuming^{1,2}, Fan Zhiying¹, He Suxu¹, Cui Jiefen³, Zhao Weixiang¹, Zhu Chao¹

(Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; 2. Scientific Instruments and Equipment Verification and Evaluation Center of China Instruments and Apparatus Society (Bioscience Station); 3.College of Food Science and Engineering, Qingdao Agriculture University,Qingdao,266019, China)

Abstract: The pectin structure of grapefruit peel was characterized by small angle X-ray scattering, Scanning electron microscopy and Atomic force microscopy, it can be used as a reference for pectin advanced structure analysis and preparation application.

Keywords: SAXS; AFM;Pectin Structure

水果果胶是结构复杂的杂多糖, 具有多样的理化性质和多元的健康功能^[1、2]。水果果胶存在于植物的初生细胞壁和中胶层中, 经常与半纤维素和纤维素发生交联, 其提取

涉及到水解、分离和溶解过程。提取水果果胶常用的方法是酸提、碱提、酶提和发酵酶提等方法，其中酸提法和碱提法由于效率高、温和不破坏 RG-I 区域引起学者广泛兴趣^[3]。研究表明提取方法对果胶的结构影响较大，进而影响其功能及应用^[4]。本文以酸提、碱提柚皮果胶为研究对象，在阴离子交换色谱法、高效液相色谱、气相色谱质谱联用、红外光谱仪等常规表征果胶结构方法^[5]外，提供适合表征果胶高级结构的小角 X 射线散射仪、扫描电镜、原子力显微镜方法，为果胶结构研究提供新的分析视角和手段。

1 实验原料

柚皮粉加入去离子水(1:30)，用 3M HCl 和 6M NaOH 将 pH 分别调节至 1,2,3,9,10 和 11。80°C 搅拌加热 1h，300 目滤袋过滤，离心 15 分钟，上清液醇沉淀 12h，冻干样品。以上条件下提取的柚皮果胶分别称为 P1、P2、P3、P9、P10 和 P11（以下简称“不同处理的果胶”）。

2 实验方法

扫描电镜：仪器 SU8010, Hitachi, Tokyo, Japan；条件：放大倍数 3000 倍、加速电压 10kV。原子力显微镜：仪器 NX-10, Park Scientific Instruments, Suwon, South Korea；实验条件：Si₃N₄ 探针，弹簧常数 0.2 N/m，谐振频率 10kHz。图像分析软件 XEI。SAXS：仪器 Anton Paar SAXS；条件：样品密封于 1.5 mm 玻璃毛细管中，提纵横背景散射最小化，SDD540.74mm，每组散射数据由 3 × 900s 曝光组成使用 GIFT 软件进行数据统计分析。

3 实验结果及结果分析

扫描电镜(SEM)对柚皮果胶表面形貌观察结果：如图 1 所示，酸提果胶呈片状结构，碱提果胶结构松散，表面有颗粒状粒子。P3 呈现出均匀的层状结构，P1 和 P2 呈现出不规则和不均匀的层状表面，并伴有一些裂纹。P9 和 P11 表面有纹路和孔洞，P10 表面有许多颗粒和孔洞。通常认为，具有多孔和褶皱表面的果胶比具有层状结构的果胶具有更好的溶解性。多孔表面结构可提高果胶与胆固醇和胆汁酸的结合能力，孔隙率可能与可溶性膳食纤维的抗氧化活性有关^[6]。上述结果表明，碱提果胶具有疏松多孔结构，而酸提果胶具有致密片状结构。据表面结构差异推测不同方法提取的果胶的纳米结构也可能存在差异。

原子力显微镜 (AFM) 提供了果胶纳米级结构^[7]的高级构象图片 (图 2)。与酸提果胶相比，碱提果胶表现出高度支化的糖链。具体来说，酸提果胶呈线状结构，P3 具有最高的分枝程度，其次是 P2 和 P1。在碱提果胶中，图像显示 P10 的分枝水平最高，而 P9 的分枝水平最低。P9 的分子链比 P10 和 P11 短，这可能与其 RG-I 含量较低和分子间相互

作用较弱有关。P10 和 P11 具有高度交联的网络结构，这表明分子间和分子内相互作用可能增强更高的支链化结构。上述分析进一步证实柚皮果胶的高级构象具较大差异。

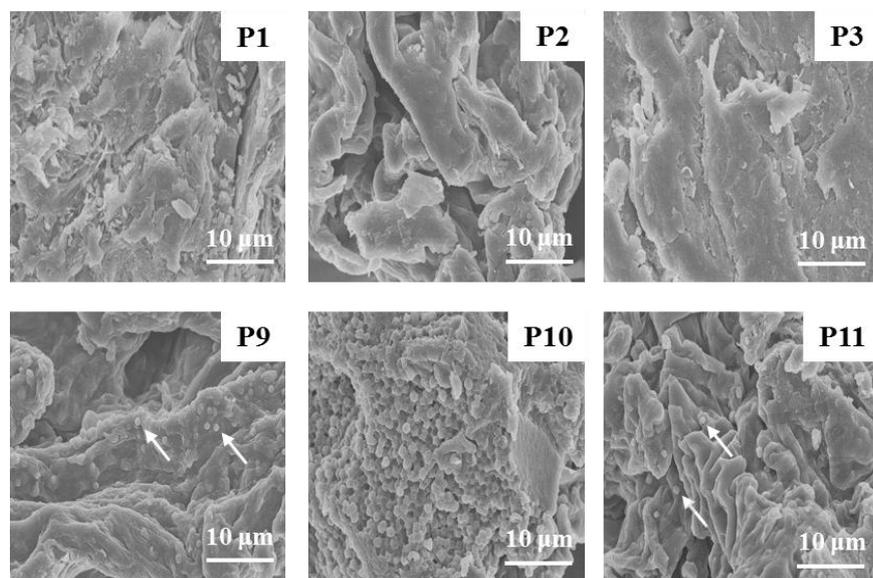


图 1 不同处理的果胶在扫描电镜下（放大倍数 3000）对比图片

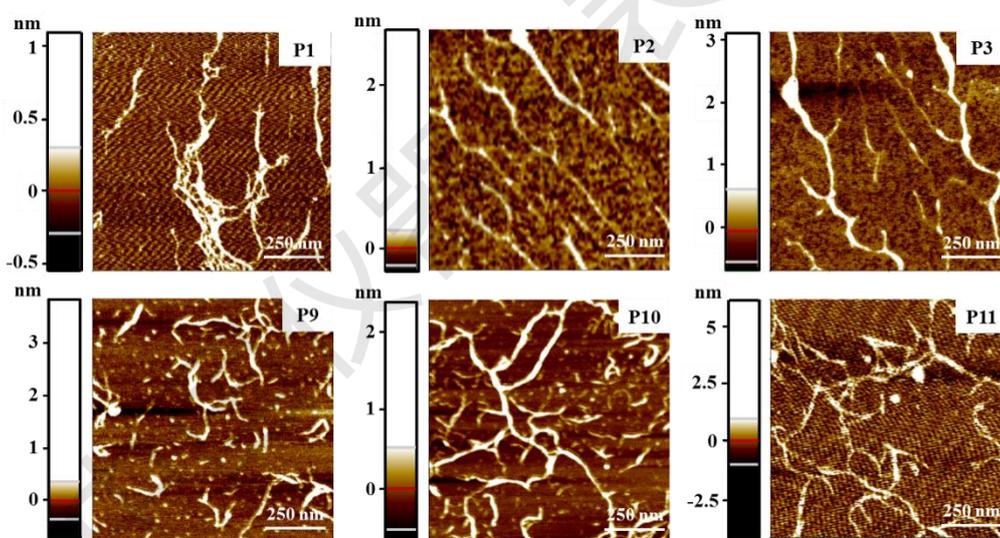


图 2 不同处理的果胶在原子力显微镜下的对比图片

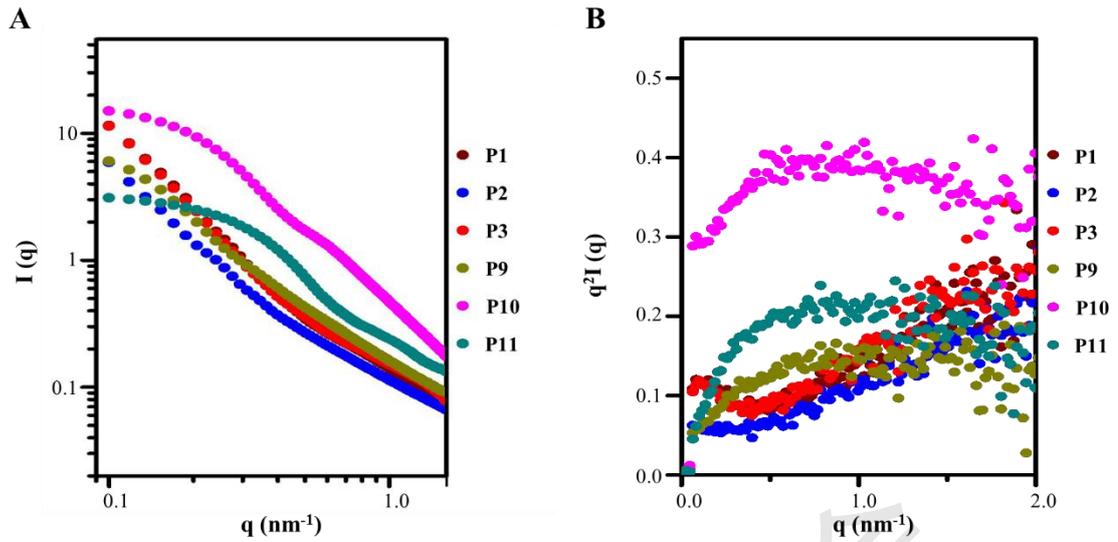


图3 不同处理的果胶在小角 X 射线衍射仪测试结果 (A、B)

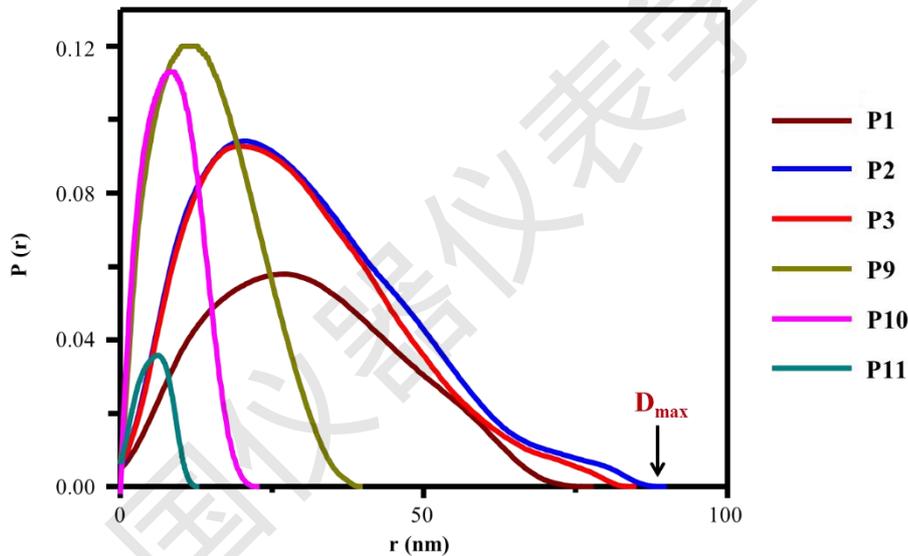


图4 小角 X 射线衍射仪测试不同处理的果胶结果分析

小角散射光谱(SAXS)结果(图3A)表明,酸提取的果胶,散射曲线的总体形状保持不变,表明P1, P2和P3的分子间相互作用可以忽略不计。而碱提果胶的散射强度变化较大。特别是P9在高 q 区表现出较高的散射强度。用动态光散射模型构建了Kratky图(图3B),通过高 q 范围内的散射特征,进一步表征不同提取方法对果胶空间结构的影响。Kratky曲线主要用于区分曲线与高斯链、棒状结构和三维结构。在本研究中,P2单调的增加,呈现无序和扩展的构象。P9、P10和P11在 0.8 nm^{-1} 左右表现出明显的峰值,呈现三维结构和折叠构象的形成。

SAXS结果分析可定量表征果胶链的尺寸。配对距离分布函数 $P(r)$ 表示大分子中原子之间所有距离的分布。 $P(r)$ 提供了大分子的最大尺寸(D_{max})的粒度分布和模型

无关的测定^[8]。P1, P2, P3, P9, P10 和 P11 最常见的颗粒分别为 27, 20, 20, 11, 9 和 6nm (图 4)。D_{max} 是根据高 r 值的 P(r) 曲线达到零点距离确定的^[9]。从 P(r) 曲线得到的 D_{max} 值分别为 78,90,85,40,23 和 13nm。碱提果胶的 D_{max} 低于酸提果胶, 说明碱提果胶具有致密的构象。P1、P2 和 P3 呈不对称的钟形曲线, 与较为扩展的分子构象一致。基于这些结果, 我们得出结论: 碱提取的果胶具有致密构象(通常为 P11 的 13nm), 而酸提取的果胶具有相对延伸的构象(通常为 P2 的 90nm)。这与扫描电镜的观察结果和原子力显微镜的纳米级构象分析结果一致。

4 实验结论

采用不同 pH 值(1、2、3、9、10、11) 提取柚皮果胶, 并对其构象性质进行了研究。用扫描电镜、原子力显微镜对果胶的表面结构和果胶支链的复杂形态进行了表征, 揭示了 P10 和 P11 的交联网络。SAXS 分析结果表明, 酸提果胶具有相对较长伸展的构象, 而碱提果胶具有三维结构和致密的折叠构象。本研究结合直接观察、原位分析、数理模型多个分析视角, 结果生动、互相印证, 可信度高, 为果胶等多糖类物质研究提供新的视角和方法。

参考文献:

- [1] Celus, M., Kyomugasho, C., Kermani, Z. J., Roggen, K., Van Loey, A. M., Grauwet, T., et al.(2017). Fe 2+ adsorption on citrus pectin is influenced by the degree and pattern of methylesterification. *Food Hydrocolloids*, 73, 101–109.
- [2] Chen, J., Ye, F., Zhou, Y., & Zhao, G. (2018). Thiolated citrus low-methoxyl pectin: Synthesis, characterization and rheological and oxidation-responsive gelling properties. *Carbohydrate Polymers*, 181, 964–973.
- [3] Yang, J., Mu, T., & Ma, M. (2018). Extraction, structure, and emulsifying properties of pectin from potato pulp. *Food Chemistry*, 244, 197–205.
- [4] Christiaens, S., Buggenhout, S. V., Houben, K., Kermani, Z. J., Moelants, K. R. N., Ngouémazong, E. D., et al. (2016). Process-structure-function relations of pectin in food. *Critical Reviews in Food Technology*, 56(6), 1021–1042.
- [5] Cui, J., Zhao, Feng., Han, Du., et al. (2021). Pectins from fruits: Relationships between extraction methods, structural characteristics, and functional properties, *Trends in Food*

Science & Technology,110,39-54,

- [6] Ubando, J., Navarro, A., & Valdivia, M. A. (2005). Mexican lime peel: Comparative study on contents of dietary fiber and associated antioxidant activity. *Food Chemistry*, 89, 57–61
- [7] Round, A. N., Macdougall, A. J., Ring, S. G., & Morris, V. J. (1997). Unexpected branching in pectin observed by atomic force microscopy. *Carbohydrate Research*, 303(3),251–253.
- [8] Khan, S., Birch, J., Harris, P., Van Calsteren, M. R., Ipsen, R., Peters, G. H. J., et al. (2017). Revealing the compact structure of lactic acid bacterial heteropolysaccharides by SAXS and DLS. *Biomacromolecules*, 18(3), 747–756.
- [9] Rajulapati, V., Sharma, K., Dhillon, A., & Goyal, A. (2018). SAXS and homology modelling based structure characterization of pectin methyltransferase a family 8 carbohydrate esterase from *Clostridium thermocellum* ATCC 27405. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 641, 39–49.