

doi: 10.3969/j.issn.0253-2417.2015.05.003

HPLC 结合 MALDI-TOF-MS 分析木聚糖水解产物



LI Hai-long

黎海龙¹, 李成国¹, 秦光辉¹, 刘健¹, 甘礼惠¹, 谢茹胜², 龙敏南^{1*}

(1. 厦门大学能源学院, 福建 厦门 361102;

2. 福建生物工程职业技术学院药学系, 福建 福州 350002)

摘要: 利用 HPLC 结合 MALDI-TOF-MS 对 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (PMP) 衍生化后山毛榉木聚糖水解产物进行分析, 检测到了难以获得标准品对照的木聚糖水解产物。结果表明, 稀硫酸水解山毛榉木聚糖的主要水解产物有木糖和 4-O-甲基葡萄糖醛酸-木糖 (B_2), 以及少量 4-O-甲基葡萄糖醛酸 (B_1)。内切重组木聚糖酶 AnXyn10C 水解山毛榉木聚糖产生木糖、木二糖和 4-O-甲基葡萄糖醛酸-木三糖 (B_3), 而内切重组木聚糖酶 HoXyn11A 水解山毛榉木聚糖主要产生木糖、木二糖、木三糖、4-O-甲基葡萄糖醛酸-木四糖 (B_4) 和 4-O-甲基葡萄糖醛酸-木五糖 (B_5)。基于 PMP 柱前衍生化的 HPLC 结合 MALDI-TOF-MS 方法能高效地分析复杂的木聚糖水解产物。

关键词: 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮; 低聚木糖; 4-O-甲基葡萄糖醛酸; MALDI-TOF-MS; HPLC

中图分类号: TQ35

文献标识码: A

文章编号: 0253-2417(2015)05-0010-05

引文格式: 黎海龙, 李成国, 秦光辉, 等. HPLC 结合 MALDI-TOF-MS 分析木聚糖水解产物[J]. 林产化学与工业, 2015, 35(5): 10-14.

HPLC and MALDI-TOF-MS Analysis of Hydrolysates of Xylan

LI Hai-long¹, LI Cheng-guo¹, QIN Guang-hui¹, LIU Jian¹,
GAN Li-hui¹, XIE Ru-sheng², LONG Min-nan¹(1. College of Energy, Xiamen University, Xiamen 361102, China; 2. Department of Pharmacy,
Fujian Vocational College of Bio-engineering, Fuzhou 350002, China)

Abstract: The hydrolysis end products of beechwood xylan, which were released by sulfuric acid or enzymes and then labeled at their reducing ends with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) derivatization, were analyzed by HPLC assisted with MALDI-TOF-MS. Some of the hydrolysates, which were lack of related commercial available standard substances, were determined. It was found that the xylose and 4-O-methyl-glucuronic acid-xylose (B_2) were the main products with minor amounts of 4-O-methylglucuronic acid (B_1) in the hydrolysates of beechwood xylan by sulfuric acid. Recombinant endo- β -1,4-xylanase AnXyn10C released xylose, xylobiose, and 4-O-methyl-glucuronic acid-xylotriose (B_3) as the main hydrolysates from beechwood xylan, whereas recombinant endo- β -1,4-xylanase HoXyn11A released xylose, xylobiose, xylotriose, 4-O-methyl-glucuronic acid-xylotetrose (B_4) and xylopentaose (B_5), and aldohexaouronic acid. These results revealed that HPLC assisted with MALDI-TOF-MS based on PMP derivatization was a very useful and robust method for the determination of products in hydrolysis of xylan.

Key words: 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone; xylo-oligosaccharides; 4-O-methylglucuronic acid; MALDI-TOF-MS; HPLC

利用资源丰富的木质纤维素生物质生产燃料和化学品是目前研究的热点。半纤维素占生物质总量的 20% ~ 35%, 其含量仅次于纤维素^[1]。木聚糖是半纤维素的主要成分, 其主链是由 β -1,4-糖苷键相

收稿日期: 2014-09-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31170067); 厦门市海洋经济发展专项资金项目(14GZP59HJ29); 福建省海洋高新产业发展专项项目(闽海洋高新[2014]25号)

作者简介: 黎海龙(1988—), 男, 湖南耒阳人, 博士生, 主要从事生物质转化制生物基燃料与生物基化学品的研究; E-mail: longtimegogo@126.com

* 通讯作者: 龙敏南(1965—), 男, 教授, 博士, 博士生导师, 从事生物质转化制生物基燃料与生物基化学品的研究; E-mail: longmn@xmu.edu.cn.

连的 β -D-吡喃型木糖残基聚合而成,根据其来源的不同,可以有不同的侧链取代基,主要是4-O-甲基葡萄糖醛酰基、阿拉伯糖酰基和乙酰基^[2]。木质纤维素生物质中木聚糖可以通过酸催化或者酶水解选择性转化为木糖或者低聚木糖^[3-4]。木糖可以进一步经生物化学法转化为燃料或者高附加值产品。低聚木糖由于其独特的生理功能,已于2008年被中国卫生部批准为新资源食品^[5]。利用富含木聚糖的木质纤维素生物质生产木糖或者低聚木糖具有巨大市场潜力。常用的木聚糖水解产物分析方法有高效液相色谱-示差检测法(HPLC-RID)和高效阴离子交换色谱-脉冲安培法(HPAEC-PAD)^[6-7]。HPLC-RID对糖的检测灵敏度较低并且对低聚木糖分离效果不佳^[8-10]。HPAEC-PAD已经广泛应用于各种单糖和寡糖的分析,但由于其洗脱液中含有高浓度的盐,限制了其与质谱的联用^[11-12]。仅用HPLC或者HPAEC分析,无法对复杂的木聚糖水解液中缺乏商业化标准品的糖类进行分析。结合质谱使用能获得相关化合物的分子质量,有助于对木聚糖水解产物的解析。目前仍然缺乏一种简单、可靠、灵敏的方法分析木聚糖水解产物中无标准品的物质,这在很大程度上限制了木聚糖高效转化的研究和工业化应用。1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)能显著提高单糖和寡糖的离子化程度和检测的灵敏度^[13-14],作者所在课题组建立的PMP柱前衍生化HPLC方法能同时分离检测木糖、阿拉伯糖和低聚木糖^[15]。林雪等^[16]发现,利用氨水替代氢氧化钠作为碱液,能直接将PMP衍生化后的葡萄糖进行基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)分析,避免了复杂的脱盐步骤。然而该方法应用于木聚糖结构分析尚未见报道。作者在前期的工作基础上^[15],利用基于PMP衍生化的HPLC结合MALDI-TOF-MS方法对复杂的山毛榉木聚糖水解产物进行了分析,以期为木质纤维素生物质转化制取功能性低聚糖及化学品的相关研发提供方法借鉴和技术支持。

1 实验

1.1 材料与仪器

甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸等购自上海国药集团(分析纯);木二糖、木三糖、木四糖、木五糖和木六糖购自Megazyme公司(纯度>90%,爱尔兰);1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP,分析纯)购自比利时Acros Organics公司;山毛榉木聚糖和乙腈(色谱纯)购自美国Sigma公司。2,5-二羟基苯甲酸(DHB)基质由美国Bruker公司提供。基质用50%乙腈(含0.1%甲酸)配制饱和溶液。

Waters 2695-2996型高效液相色谱仪,CAPCELL PAK C₁₈ MG型色谱柱(250 mm×3.0 mm,5 μm)购自日本资生堂公司;MicroFlex基质辅助激光解析电离质谱仪(MALDI-TOF-MS,美国Bruker公司),激光波长337 nm,频率60 Hz。

1.2 实验方法

1.2.1 酸水解木聚糖 用4%稀硫酸在121℃条件下水解山毛榉木聚糖1 h,冷却后用碳酸钙进行中和,12 000 r/min离心取上清液待测。

1.2.2 酶水解木聚糖 重组木聚糖酶(HoXyn11A、AnXyn10C)的制备参考文献[17]。用HoXyn11A和AnXyn10C分别对山毛榉木聚糖(20 g/L)进行酶水解,HoXyn11A和AnXyn10C酶添加量为300 IU/g,酶水解反应在乙酸钠缓冲液(pH值5.0,0.05 mol/L)中进行,水解时间和温度分别为24 h和50℃,反应结束后煮沸灭活,12 000 r/min离心取上清液待测。

1.2.3 PMP衍生化 PMP衍生化以氨水替代氢氧化钠作为碱液,分别取配制好的标准品溶液(单糖、糖醛酸和低聚木糖)和处理好的木聚糖水解液(酸和酶水解液)50 μL加到200 μL氨水溶液中,混合均匀后,取该溶液100 μL与100 μL的PMP甲醇溶液(0.5 mol/L)混合,在70℃下反应30 min取出冷却至室温,加入1 mL超纯水,真空干燥。干燥后的样品用0.5 mL超纯水和1 mL氯仿溶解,漩涡振荡后除去有机溶剂,重复3次,12 000 r/min离心取上清液待测。

1.2.4 HPLC分离及MALDI-TOF-MS分析 HPLC分离参考文献[15],为了获得更好的分离度,流速由0.5 mL/min调整为0.4 mL/min;流动相A为磷酸缓冲液(0.04 mol/L,pH值8.0),流动相B为乙

腈,采用等度洗脱(A/B,体积比79:21);紫外检测波长:245 nm。MALDI-TOF-MS分析:取1 μL 用乙腈配制好的DHB基质溶液滴于样品台上,再取1 μL PMP衍生化样品与之混合,室温干燥后,放入质谱仪进行检测。

2 结果与讨论

2.1 木聚糖酸水解液分析

如图1(a)所示,PMP衍生化甘露糖、鼠李糖、葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸等5种单糖和2种糖醛酸实现了基线分离。山毛榉木聚糖主要由4-O-甲基葡萄糖醛酸和木糖构成^[18]。如图1(b)所示,山毛榉木聚糖酸水解液中主要成分是木糖,同时出现了两个未知的色谱峰 B_1 和 B_2 ,另外在葡萄糖醛酸位置上并没有出现相应的色谱峰。该结果表明PMP衍生化的4-O-甲基葡萄糖醛酸与葡萄糖醛酸在HPLC上保留时间可能不一致。当前部分木质纤维素水解产物的标准品一般都难以获取,因此仅用HPLC难以对其进行分析。如图1(c)所示, m/z 481.5和503.2分别代表PMP衍生化木糖的[M+H]和[M+Na]峰,结合的2个PMP残基相对分子质量为330,木糖的相对分子质量为150,理论上PMP衍生化的木糖相对分子质量为480,这与实际测定值相吻合。4-O-甲基葡萄糖醛酸的理论相对分子质量为208, m/z 539.6代表PMP衍生化4-O-甲基葡萄糖醛酸的[M+H]峰, m/z 671.8和693.7分别代表PMP衍生化4-O-甲基葡萄糖醛酸-木糖的[M+H]和[M+Na]峰。在酸水解过程中,由于4-O-甲基葡萄糖醛酸侧链与木糖残基之间的连接键很难被酸水解断裂,导致4-O-甲基葡萄糖醛酸-木糖二聚体的产生^[19]。根据样品中化合物在HPLC和质谱中的丰度,推测HPLC分析中出现的两个色谱峰 B_1 和 B_2 分别是4-O-甲基葡萄糖醛酸和4-O-甲基葡萄糖醛酸-木糖二聚体。

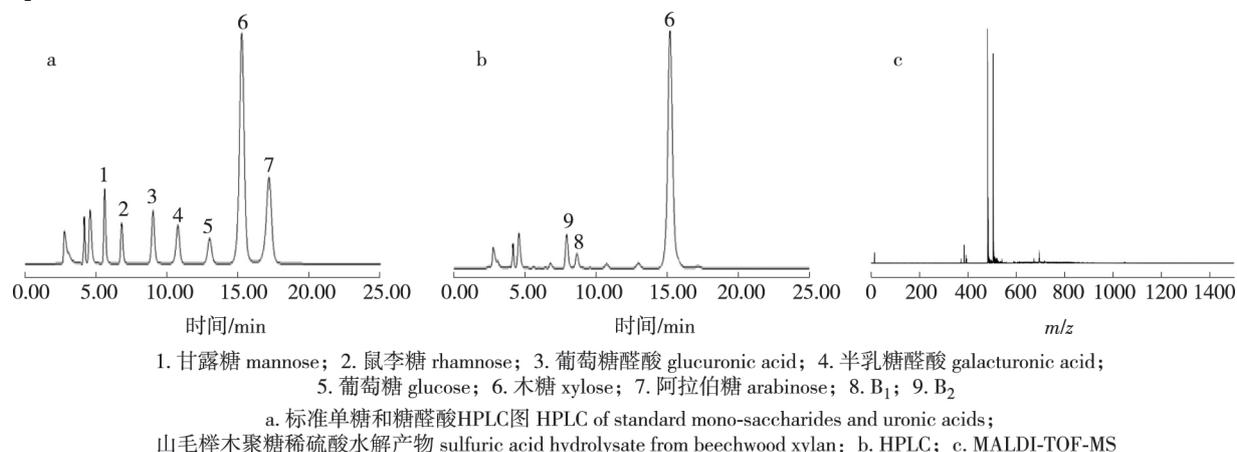


图1 酸水解产物的HPLC和MALDI-TOF-MS图

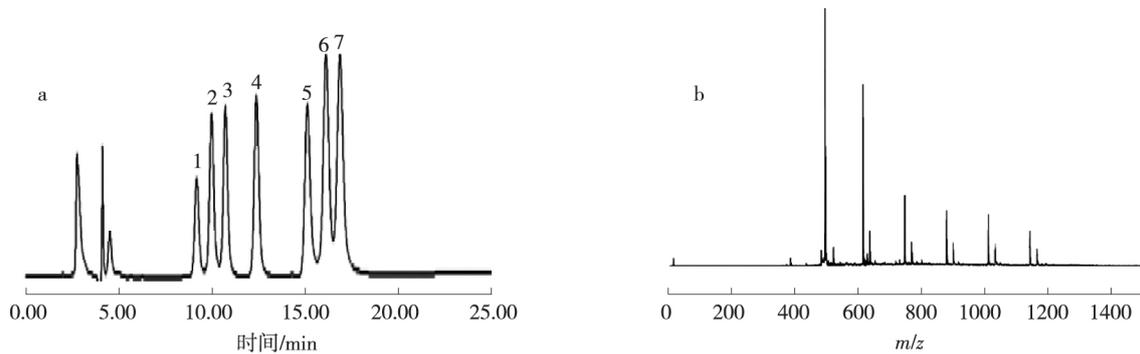
Fig.1 HPLC and MALDI-TOF-MS spectra of acid hydrolysate

2.2 木聚糖酶水解液分析

2.2.1 标准品 如图2(a)所示,PMP衍生化木糖、阿拉伯糖和低聚木糖(木二糖~木六糖)在HPLC上基本实现了基线分离。 m/z 613.5、635.6 m/z 745.7、767.8 m/z 877.9、899.9 m/z 1010.2、1032.1 m/z 1142.3、1164.2分别代表衍生化后的木二糖、木三糖、木四糖、木五糖和木六糖的[M+H]和[M+Na]峰(如图2(b)所示)结果表明MALDI-TOF-MS能够灵敏检测低聚木糖。

2.2.2 两种酶木聚糖水解液 内切重组木聚糖酶AnXyn10C水解木聚糖产生木糖、木二糖和 B_3 ,内切重组木聚糖酶HoXyn11A水解木聚糖产生木糖、木二糖、木三糖、 B_4 和 B_5 (见图3(a)与(b))。MALDI-TOF-MS分析表明(见图3(c)与(d)), B_3 是PMP衍生化的4-O-甲基葡萄糖醛酸-木三糖(m/z 936、958),而 B_4 和 B_5 分别是PMP衍生化的4-O-甲基葡萄糖醛酸-木四糖(m/z 1068.2、1090.1)和4-O-甲基葡萄糖醛酸-木五糖(m/z 1200.3、1222.2)。此外,在HoXyn11A水解产物中发现少量的4-O-甲基葡萄糖

糖醛酸-木三糖 (m/z 936) 和 4-O-甲基葡萄糖醛酸-木六糖 (m/z 1332.5)。相对于 HoXyn11A, AnXyn10C 水解木聚糖产生更短的水解产物,并能产生比较多的木糖。该结果与 AnXyn10C 和 HoXyn11A 分别所属的糖苷水解酶(GH) 10 和 11 家族作用机制相一致^[18-20]。

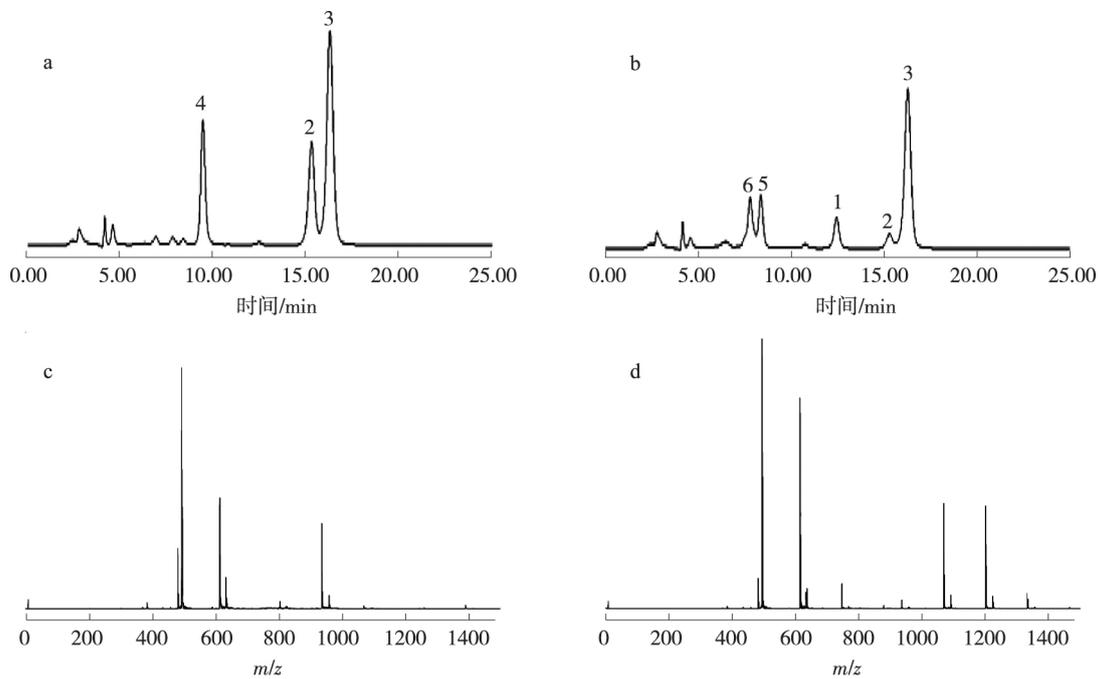


1. 木六糖 xylohexaose; 2. 木五糖 xylopentaose; 3. 木四糖 xylotetraose; 4. 木三糖 xylotriose;
5. 木糖 xylose; 6. 木二糖 xylobiose; 7. 阿拉伯糖 arabinose.

a. HPLC图 HPLC chromatogram; b. 低聚木糖MALDI-TOF-MS图 MALDI-TOF-MS spectra of xylo-oligosaccharides

图 2 单糖和寡糖标准品的 HPLC 和 MALDI-TOF-MS 图

Fig.2 HPLC and MALDI-TOF-MS spectra of standard mono-saccharides oligosaccharides



1. 木三糖 xylotriose; 2. 木糖 xylose; 3. 木二糖 xylobiose; 4. B₃; 5. B₄; 6. B₅
AnXyn10C酶水解产物 hydrolysates released by AnXyn10C: a. HPLC; c. MALDI-TOF-MS;
HoXyn11A 酶水解产物 hydrolysate released by HoXyn11A: b. HPLC; d. MALDI-TOF-MS

图 3 酶水解产物的 HPLC 和 MALDI-TOF-MS 图

Fig.3 HPLC and MALDI-TOF-MS spectra of enzymatic hydrolysate

3 结论

3.1 利用基于 PMP 衍生化的 HPLC 结合 MALDI-TOF-MS 方法对复杂的山毛榉木聚糖酸水解和酶水解产物进行了分析,发现稀硫酸水解山毛榉木聚糖的主要水解产物有木糖和 4-O-甲基葡萄糖醛酸-木糖,以及少量 4-O-甲基葡萄糖醛酸。内切重组木聚糖酶 AnXyn10C 水解山毛榉木聚糖主要产生木糖、木二糖和 4-O-甲基葡萄糖醛酸-木三糖,而内切重组木聚糖酶 HoXyn11A 水解山毛榉木聚糖主要产生木糖、

木二糖、木三糖、4-O-甲基葡萄糖醛酸-木四糖和4-O-甲基葡萄糖醛酸-木五糖。

3.2 基于PMP衍生化的HPLC和MALDI-TOF-MS方法能高效分析木聚糖水解液中复杂的单糖、糖醛酸和寡糖,可以应用于无标准品寡糖的定性分析。该方法在利用木质纤维素生物物质转化为高附加值生物活性物质、化学品及燃料中具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] SAHA B C. Hemicellulose bioconversion[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2003, 30(5): 279-291.
- [2] PENG Feng, PENG Pai, XU Feng, et al. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses[J]. *Biotechnology Advances* 2012, 30(4): 879-903.
- [3] LAVARACK B P, GRIFFIN G L, RODMAN D. The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose, arabinose, glucose and other products[J]. *Biomass and Bioenergy* 2002, 23(5): 367-380.
- [4] VAZQUEZ M J, ALOSONSO J L, DOMINGUEZ H, et al. Enzymatic processing of crude xylooligomer solutions obtained by autohydrolysis of eucalyptus wood[J]. *Food Biotechnology* 2002, 16(2): 91-105.
- [5] 卫生部. 卫生部关于批准嗜酸乳杆菌等7种新资源食品的公告[EB/OL]. <http://www.moh.gov.cn/mohbgt/pw10807/200805/35651.shtml>.
The Ministry of Health. The announcement of ministry of health on approval of 7 kinds of new resource food about *Lactobacillus acidophilus* et al [EB/OL]. <http://www.moh.gov.cn/mohbgt/pw10807/200805/35651.shtml>.
- [6] LI Xia, CONVERSE A O, WYMAN C E. Characterization of molecular weight distribution of oligomers from autocatalyzed batch hydrolysis of xylan[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2003, 107(1/2/3): 515-522.
- [7] XU Yong, FAN Li, WANG Xing, et al. Simultaneous separation and quantification of linear xylo- and cello-oligosaccharides mixtures in lignocellulosics processing products on high-performance anion-exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection[J]. *BioResources* 2013, 8(3): 3247-3259.
- [8] AGBLEVOR F A, MURDEN A, HAMES B R. Improved method of biomass sugars using high-performance liquid chromatography[J]. *Biotechnology Letters* 2004, 26(15): 1207-1210.
- [9] AKPINAR O, ERDOGAN K, BOSTANCI S. Enzymatic production of xylooligosaccharide from selected agricultural wastes[J]. *Food and Bioproducts Processing* 2009, 87(2): 145-151.
- [10] BRIENZO M, CARVALHO W, MILAGRES A M. Xylooligosaccharides production from alkali-pretreated sugarcane bagasse using xylanases from *Thermoascus aurantiacus*[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2010, 162(4): 1195-1205.
- [11] BRULL L, HUISMAN M, SCHOLS H, et al. Rapid molecular mass and structural determination of plant cell wall derived oligosaccharides using off-line high-performance anion-exchange chromatography/mass spectrometry[J]. *Journal of Mass Spectrometry* 1998, 33(8): 713-720.
- [12] DAAS P J H, ARISZ P W, SCHOLS H A, et al. Analysis of partially methyl-esterified galacturonic acid oligomers by high-performance anion-exchange chromatography and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. *Analytical Biochemistry* 1998, 257(2): 195-202.
- [13] HONDA S, AKAO E, SUZUKI S, et al. High performance liquid chromatography of reducing carbohydrates as strongly ultraviolet-absorbing and electrochemically sensitive 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives[J]. *Analytical Chemistry* 1989, 61(2): 351-357.
- [14] ZHANG Ling-yi, XU Jin, ZHANG Li-hua, et al. Determination of 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone-labeled carbohydrates by liquid chromatography and micellar electrokinetic chromatography[J]. *Journal of Chromatography B* 2003, 793(1): 159-165.
- [15] LI Hai-long, LONG Chuan-nan, ZHOU Juan, et al. Rapid analysis of mono-saccharides and oligo-saccharides in hydrolysates of lignocellulosic biomass by HPLC[J]. *Biotechnology Letters* 2013, 35(9): 1405-1409.
- [16] 林雪, 王仲孚, 黄琳娟, 等. 改进的PMP柱前衍生化方法用于单糖的组成分析[J]. *高等学校化学学报* 2006, 27(8): 1456-1458.
LIN Xue, WANG Zhong-fu, HUANG Lin-juan, et al. An improved PMP derivatization method for analyzing monosaccharide composition[J]. *Chemical Journal of Chinese Universities* 2006, 27(8): 1456-1458.
- [17] LI Hai-long, WU Jin-lian, JIANG Feng-jiao, et al. Functional expression and synergistic cooperation of xylan-degrading enzymes from *Hypocrea orientalis* and *Aspergillus niger*[J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 2014, DOI: 10.1002/jctb.4521.
- [18] BIELY P, VRSANSKA M, TENKANEN M, et al. Endo- β -1,4-xylanase families: Differences in catalytic properties[J]. *Journal of Biotechnology* 1997, 57(1): 151-161.
- [19] WALTERS J S, HEDGES J I. Simultaneous determination of uronic acids and aldoses in plankton, plant tissues, and sediment by capillary gas chromatography of N-hexylaldonamide and alditol acetates[J]. *Analytical Chemistry* 1988, 60(10): 988-994.
- [20] KOLENOVA K, VRSANSKA M, BIELY P. Mode of action of endo- β -1,4-xylanases of families 10 and 11 on acidic xylooligosaccharides[J]. *Journal of Biotechnology* 2006, 121(3): 338-345.