

文章编号:1004-1478(2011)02-0001-04

苦荞麦麸碱提多糖的制备与分析

孙元琳¹, 陕方², 边俊生², 白洁¹

(1. 运城学院 生命科学系, 山西 运城 044000;

2. 山西省农科院 农产品综合利用研究所, 山西 太原 030031)

摘要:以苦荞麦麸为原料、0.2 mol/L NaOH 溶液为提取介质分离碱提多糖,并采用 DEAE-Sephrose CL-6B 柱层析技术进行分级纯化。结果表明:苦荞麦麸碱提多糖(ABP)主要由葡萄糖(Glc)组成,并含有少量阿拉伯糖(Ara)、木糖(Xyl)、半乳糖(Gal)和微量甘露糖(Man),初步推测 ABP 主要为 β -葡聚糖。ABP 经离子交换柱层析分级为 2 个组分:ABP₁ 和 ABP₂, ABP₁ 的多糖含量(85.30%)较 ABP₂ (64.53%)有所提高,且只含有 Glc 和少量 Xyl,其中 $n(\text{Glc}):n(\text{Xyl})=9.47:1$ 。ABP₁ 经凝胶色谱鉴定为均一组分,其相对分子质量为 8.5×10^4 。

关键词:苦荞麦麸;碱提多糖;纯化

中图分类号:S38

文献标志码:A

Preparation and analysis of alkali-soluble polysaccharide from tartary buckwheat bran

SUN Yuan-lin¹, SHAN Fang², BIAN Jun-sheng², BAI Jie³

(1. Dept. of Life Sci., Yuncheng Univ., Yuncheng 044000, China;

2. Inst. of Farm Products Comprehensive Utilization, Shanxi Academy of Agr. Sci., Taiyuan 030031, China)

Abstract: With tartary buckwheat bran as material, alkali-soluble polysaccharide was extracted with 0.2 mol/L NaOH solution and purified on DEAE-Sephrose CL-6B chromatography. The results showed that ABP was mainly composed of glucose, along with small amount of arabinose, xylose, and mannose, which was mainly β -glucan. ABP was fractionated into 2 fractions on DEAE-Sephrose CL-6B column: ABP₁ and ABP₂. ABP₁, with 85.30% of polysaccharide, consisted mainly of glucose, and small amount of xylose. The molar ratio was $n(\text{Glc}):n(\text{Xyl})=9.47:1$. The molecular weight was 8.5×10^4 determined by high-performance size-exclusion chromatography.

Key words: tartary buckwheat bran; alkali-soluble polysaccharide; purification

0 引言

苦荞麦俗称苦荞,学名鞑靼荞麦,属双子叶蓼

科荞麦属植物,具有药、食两用功能^[1-2]。苦荞麦是我国传统的小杂粮,被誉为“五谷之王”。类黄酮、蛋白质和多糖是其主要生物活性物质,具有抗氧化、

收稿日期:2010-12-28

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划子课题项目(2006BAD02B06-19)

作者简介:孙元琳(1971—),女,山西省运城市人,运城学院副教授,博士,主要研究方向为生物大分子结构与功能。

降血糖、降血压、降血脂等功效^[3-6]。 β -葡聚糖是苦荞麦麸多糖的主要组成成分,具有降血糖、降血脂、维护肠道菌群平衡、预防肠癌等生理功效^[7-8]。目前,国内外对苦荞多糖的研究较少,本文拟以苦荞麦麸为原料进行多糖的制备,并对其主要纯化组分进行分析,以期今后的结构表征及功能性研究提供理论依据。

1 实验

1.1 材料及仪器

材料:苦荞麦麸,山西大同某食品保健公司提供;标准单糖,三氟乙酸, Sigma 公司产。DEAE-Sepharose CL-6B, Sepharose CL-6B, Amersham Bioscience 公司产;牛血清蛋白,苯酚,肌醇,盐酸羟胺,乙酸酐,上海国药集团化学试剂有限公司产。

仪器:GC-14A 型气相色谱仪,日本 Shimadzu 公司产;Waters 2690 型高效液相色谱仪,美国 Waters 公司产;TENSOR27 型傅里叶变换红外光谱仪,德国布鲁克公司产;756MC 型紫外可见分光光度计,上海精科分析仪器厂产。

1.2 操作方法

1.2.1 苦荞麦麸碱提多糖(ABP)的提取 将苦荞麦麸皮粉碎,用体积分数为 80% 的乙醇溶液于 85 °C 热处理 2 次,抽滤,真空干燥,得到预处理苦荞麸。预处理苦荞麸于 90 °C 热水中浸提 2 次,离心后的沉淀用 0.2 mol/L NaOH 溶液于室温提取 2 次,合并上清液,调 pH = 4.5, 3 000 r/min 离心分离 20 min 去除蛋白。上清液浓缩,加入 4 倍 95% 乙醇,静置。沉淀复溶,透析,经冷冻干燥制得 ABP。

1.2.2 DEAE-Sepharose CL-6B 柱层析分级

ABP 经 DEAE-Sepharose CL-6B 柱层析(D 2.6 cm \times 30 cm),依次用水、0 ~ 1 mol/L NaCl 溶液进行线性梯度洗脱,洗脱速度为 3 mL/min,每管 4 mL 分部收集,逐管检测多糖含量($A_{490\text{nm}}$)和蛋白质含量(紫外 $A_{280\text{nm}}$)。收集单一峰组分 ABP₁ 和 ABP₂,透析,冷冻干燥。

1.2.3 Sepharose CL-6B 柱层析 ABP₁ 组分经 Sepharose CL-6B(D 1.0 cm \times 120 cm)柱层析,用水洗脱,流速为 12 mL/h,每管 4 mL 分部收集,逐管检测多糖含量。

1.2.4 单糖组成分析 将多糖样品 5 mg 溶于 2 mol/L 三氟乙酸(TFA)溶液中,于 100 °C 水解 4 h。

水解液除尽过量的 TFA 后,采用糖腈乙酸酯衍生化法衍生。反应产物直接进样进行气相色谱(GC)分析,根据出峰时间判断单糖种类,根据峰面积的比值确定各单糖间的比例关系。采用 DB-1701 毛细管色谱柱(0.53 mm \times 30 m),载气为 N₂,流速 1.5 mL/min, FID 氢焰检测器,汽化室温度 260 °C,检测器温度 260 °C。采用程序升温:起始 120 °C (2 min) $\xrightarrow{10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}}$ 195 °C (1 min) $\xrightarrow{3\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}}$ 240 °C (10 min)。进样量 0.8 μL 。

校正因子的测定和计算:准确称取烘干的标准单糖,按上述方法进行糖腈乙酰化和 GC 测定。各标准单糖的校正因子 $K = A_s W_i / A_i W_s$ (A_s 为标准单糖的峰面积, W_i 为内标的质量, A_i 为内标的峰面积, W_s 为标准单糖的质量)。

1.2.5 红外光谱(IR)分析 取样品微量,采用 KBr 研磨压片后,在 4 000 ~ 400 cm^{-1} 红外波数范围内进行扫描。

1.3 测定方法

多糖含量的测定采用苯酚-硫酸法^[9],以葡萄糖为标准绘制标准曲线。蛋白质含量的测定采用 Lowry 法^[10],以牛血清蛋白为标准绘制标准曲线。HPLC 纯度鉴定及相对分子质量测定:将相对分子质量分别为 6 100, 16 500, 26 290, 40 000, 84 000, 158 000 的标准 Dextran 相继进样,记录保留时间 T_R ,以 T_R 为横坐标, $\lg M$ 为纵坐标绘制标准曲线,求得回归方程。待测样品进样 20 μL ,根据所得的 T_R ,通过回归方程计算多糖的相对分子质量。采用色谱柱 Waters Ultrahydrogel™ Linear (ϕ 7.8 mm \times 300 mm) 两柱串连,检测器为 Waters 2410 示差折光检测器,以 0.1 mol/L NaNO₃ 为流动相,流速 0.9 mL/min,柱温 45 °C。

2 结果与分析

2.1 ABP 的离子交换柱层析分级

ABP 经 DEAE-Sepharose CL-6B 柱层析分级后得到 2 个组分:ABP₁ 和 ABP₂ (见图 1),分别由水和 0 ~ 1 mol/L NaCl 线性梯度洗脱得到。水洗脱组分 ABP₁ 没有蛋白质洗脱峰,表明蛋白含量极低。ABP₂ 中存在一蛋白洗脱峰,且蛋白含量较高。收集各组分,以去离子水透析,冷冻干燥。

2.2 ABP₁ 的凝胶柱层析及相对分子质量测定

ABP₁ 的 Sepharose CL-6B 柱层析洗脱曲线见图 2。

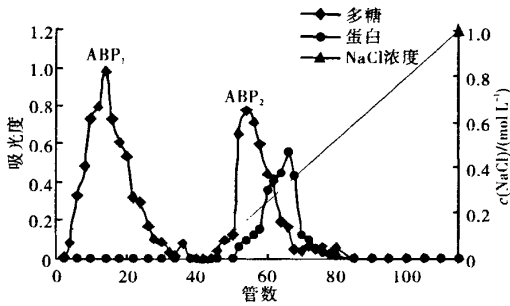


图1 ABP的DEAE-Sepharose CL-6B柱层析洗脱曲线

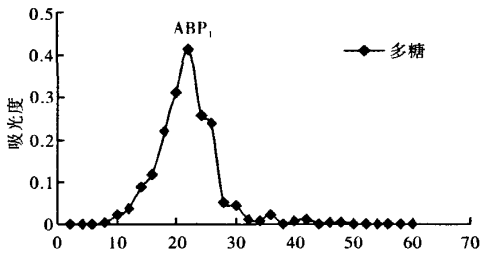


图2 ABP₁的Sepharose CL-6B柱层析洗脱曲线

ABP₁经Sepharose CL-6B层析柱进一步分级得到单一峰,表明ABP₁的相对分子质量分布比较均一。

采用HPLC凝胶柱色谱对ABP₁的相对分子质量分布进行测定.凝胶柱色谱图与其相应的Sepharose CL-6B凝胶柱层析洗脱结果一致,为单一峰,相对分子质量为 8.5×10^4 。

2.3 多糖化学组成分析

对ABP及其纯化组分进行化学组成分析,结果见表1。

表1 ABP及其DEAE-Sepharose CL-6B柱层析分级组分的化学组成分析

样品	$w(\text{蛋白质})$ / $w(\text{多糖})$		单糖组成 ^a / %				
	/%	/%	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal
ABP	13.34	64.53	0.90	1.0	0.16	13.91	0.96
ABP ₁	3.17	85.30	—	1.0	— ^b	9.47	—
ABP ₂	23.66	61.02	0.24	1.0	—	1.87	0.34

注:a表示各组成单糖的物质质量比;b表示不存在。

由表1可以看出,ABP的多糖含量为64.53%,主要由葡萄糖(Glc)组成,由此可初步推测ABP主要为 β -葡聚糖.此外,样品中还存在少量阿拉伯糖(Ara),木糖(Xyl)和半乳糖(Gal),以及微量甘露糖(Man).这是由于苦荞麦麸细胞壁半纤维素之间以

共价键或次级键紧密缔合,因此提取得到的多糖通常是 β -葡聚糖和阿拉伯木聚糖、葡甘露聚糖等其他半纤维素的混合物,这些半纤维素与 β -葡聚糖缔合并发生物理性缠结,在提取过程中被一并融出^[11]. ABP的单糖组成为 $n(\text{Ara}):n(\text{Xyl}):n(\text{Glc}):n(\text{Gal})=0.90:1.00:13.94:0.96$ 。

ABP经离子交换柱层析分级后得到的水洗脱组分ABP₁多糖含量有所提高,蛋白含量降低.与ABP相比,ABP₁不再含有Ara,Man和Gal,只含有Glc和少量Xyl,其中 $n(\text{Glc}):n(\text{Xyl})=9.47:1$. NaCl梯度洗脱组分ABP₂与ABP相比,多糖含量降低,蛋白含量有所增加,且Glc的相对含量降低,其单糖组成为 $n(\text{Ara}):n(\text{Xyl}):n(\text{Glc}):n(\text{Gal})=0.24:1:1.87:0.34$ 。

2.4 红外光谱分析

图3为ABP₁的红外光谱图.可以看出,多糖组分在 $500 \sim 4000 \text{ cm}^{-1}$ 范围具有糖类的特征吸收峰. $2400 \sim 3600 \text{ cm}^{-1}$ 出现的宽峰是分子内或分子间O—H伸缩振动的结果. 2932 cm^{-1} 附近的吸收峰由C—H伸缩振动引起,这个吸收峰常常被O—H伸缩振动引起的宽峰所掩盖. 1412 cm^{-1} ($1460 \sim 1370 \text{ cm}^{-1}$)附近的吸收峰属C—H的弯曲振动. 1647 cm^{-1} 的吸收峰是糖的水化物样品的吸收峰. $1300 \sim 1000 \text{ cm}^{-1}$ 间的吸收峰是由C—O伸缩振动所引起的,归属于糖环上的C—O—H和糖苷键C—O—C^[12]。

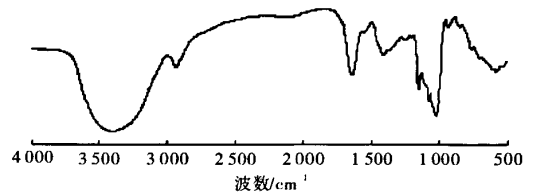


图3 ABP₁的红外光谱图

3 结论

采用 0.2 mol/L NaOH 溶液提取得到ABP. ABP主要由Glc组成,并含有少量Ara, Xyl, Gal和微量Man,初步推测ABP主要为 β -葡聚糖. ABP经DEAE-Sepharose CL-6B柱层析分级为2个组分ABP₁和ABP₂, ABP₁的多糖含量(85.30%)较ABP(64.53%)有所提高,且只含有Glc和Xyl,其中 $n(\text{Glc}):n(\text{Xyl})=9.47:1$. ABP₁经HPLC凝胶色谱

鉴定为均一组分,测得其相对分子质量为 8.5×10^4 。与 ABP 相比,ABP₂ 的多糖含量降低(61.02%),蛋白含量有所增加(23.66%),且 Glc 的相对含量降低,其单糖组成为 $n(\text{Ara}):n(\text{Xyl}):n(\text{Glc}):n(\text{Gal})=0.24:1:1.87:0.34$ 。

参考文献:

- [1] 陆大彪. 中国农业百科全书农作物卷(上)[M]. 北京: 中国农业出版社,1991:448.
- [2] Ikeda Kiyokazu. Buckwheat composition, chemistry, and processing[J]. Adv in Food and Nutrition Research, 2002, 44:395.
- [3] 林汝法. 中国荞麦[M]. 北京: 中国农业出版社,1994.
- [4] Sun Ting, Ho Chi-tang. Antioxidant activities of buckwheat extracts[J]. Food Chem, 2005, 90:743.
- [5] Holasova M, Fiedlerova V, Smrcinova H, et al. Buckwheat—the source of antioxidant activity in functional foods[J]. Food Research Int, 2002, 35(2/3):207.
- [6] Yusuke Ushida, Toshiro Matsui, Mitsuru Tanaka. Endothelium-dependent vasorelaxation effect of rutin-free tartary buckwheat extract in isolated rat thoracic aorta[J]. The J of Nutritional Biochemistry, 2008, 19(10):700.
- [7] Steadman K J, Burgoon M S, Lewis B A, et al. Buckwheat seed milling fractions: description, macronutrient composition and dietary fibre[J]. J of Cereal Sci, 2001, 33(3):271.
- [8] 张超, 李冀新. 荞麦壳的研究进展[J]. 粮食工程, 2006, 14(3):8.
- [9] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 2版. 杭州: 浙江大学出版社, 1998.
- [10] 王肇慈. 粮油食品品质分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994.
- [11] Izydorczyk M S, Dexter J E. Barley β -glucans and arabinoxylans: molecular structure, physicochemical properties, and uses in food products—a review[J]. Food Research Int, 2008, 41(9):850.
- [12] Kacurakova M, Capek P, Sasinkova V, et al. FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses[J]. Carbohydrate Polymers, 2000, 43(2):195.
- [13] Hromádková Z, Ebringerová A. Ultrasonic extraction of plant materials—Investigation of hemicellulose release from buckwheat hulls[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2003, 10(3):127.
- [14] Liu Huijun, Michael Eskin N A, Steve Cui W. Effects of yellow mustard mucilage on functional and rheological properties of buckwheat and pea starches[J]. Food Chem, 2006, 95(1):83.