

荞麦麸皮多糖的分离纯化及其外貌表征的分析

赵鑫帅, 张海生*, 杨淑芳, 朱怡霖, 薛焕焕

陕西师范大学食品工程与营养科学学院 陕西省果蔬深加工技术研究中心, 西安 710119

摘要: 采用水提醇沉法对荞麦麸皮多糖(Buckwheat bran polysaccharide, BBP)进行提取,通过 DEAE-52 纤维素柱层析法和 Sephadex G-200 对其进行分离纯化,采用凝胶过滤法对多糖组分的分子量进行测定,采用扫描电镜对荞麦麸皮多糖及其分离纯化的多糖组分的外貌进行分析,用红外光谱对分离纯化的三个荞麦麸皮多糖组分的苷键构型进行分析。结果表明:DEAE-52 纤维素和 Sephadex G-200 对荞麦麸皮粗多糖具有较好的分离纯化效果,得到了三个多糖组分(BBP-I、BBP-II 和 BBP-III),其分子量分别为 1.56×10^4 Da、 5.85×10^4 Da、 8.45×10^4 Da。扫描电镜的结果表明,BBP 其表面粗糙,凹凸不平,三个分离纯化的多糖组分形貌差异较大,分别以球状、片状、棒状为主。红外光谱扫描表明 BBP-I 和 BBP-III 为 α -糖苷键化合物,BBP-II 为 β -糖苷键化合物。荞麦麸皮多糖组分外貌的差异性为其进一步的结构探究提供了重要依据。

关键词: 荞麦麸皮多糖;分离纯化;外貌表征分析

中图分类号:TS201.2

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2017.10.011

Purification and Structural Morphology of Buckwheat Bran Polysaccharide

ZHAO Xin-shuai, ZHANG Hai-sheng*, YANG Shu-fang, ZHU Yi-lin, XUE Huan-huan

College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Research Center of Fruit and Vegetable Deep-processing Technology, Xi'an 710119, China

Abstract: In this work, Buckwheat Bran Polysaccharides (BBP) was extracted by water extraction and alcohol precipitation method. It was further purified by DEAE-52 cellulose column chromatography and Sephadex G-200. The molecular weight of the purified product was determined by gel filtration method, followed by the morphology characterization and component analysis using electron microscopy. The glycosidic bond configuration of the purified product was analyzed by infrared spectroscopy. The results showed that three polysaccharide fractions (BBP-I and BBP-II and BBP-III) were obtained by DEAE-52 cellulose column chromatography and Sephadex G-200 separation and purification and their molecular weights were 1.56×10^4 Da, 5.85×10^4 Da, 8.45×10^4 Da, respectively. The electron microscopy showed that the surface of BBP was roughness and uneven. There was significant diversity about the appearance of the purified product, which mainly characterized by spherical, lamellar and rod, respectively. IR spectra demonstrated that BBP-I and BBP-III were alpha glycosidic bond compounds, while BBP-II was beta glycosidic bond compound. The differences of polysaccharide components in buckwheat bran would provide an important foundation for further structural research.

Key words: buckwheat bran polysaccharide; separation and purification; characterization

荞麦(*Fagopyrum esculentum*, Buckwheat)属于蓼科(*Polygonaceae*)荞麦属(*Fagopyrum Mill*)^[1]别名甜荞,一年生草本。荞麦是我国民众的主要食用作物,其分布广泛,尤其是在西北地区,此外,我国荞麦除国内消费外,还远销国外,是我国主要出口的粮食作物之一,在世界荞麦出口中居世界第一。荞麦广受世界消费者的喜爱,特别是在俄罗斯、美国、中东

地区广受欢迎^[2,4]。荞麦是一种药食两用的经济作物,具有很大的研究价值。已有研究表明,荞麦具有很强的抗氧化性、对于糖尿病、心血管疾病等疾病均有一定的疗效,另外,其还具有促进肠胃蠕动,有助于消化的功效^[5,6]。

多糖能够为生物体提供能量,是构建细胞壁的主要成分,同时还具有保护生物体的功能^[7,8]。但是,大量文献主要集中对荞麦的黄酮、多酚及生物多肽等成分的研究上^[9,10],而对于荞麦多糖的研究较少。作为荞麦面粉加工的副产物荞麦麸皮的多糖含量较高,但是实际生产中荞麦麸皮常常作为饲料进

收稿日期:2017-06-20 接受日期:2017-07-21

基金项目:陕西师范大学中央高校基本科研业务费-创新团队项目(GK201601007);仁用杏仁精深加工及其产业化关键技术研究与示范(2017NY-151)

*通信作者 Tel:86-29-85310517; E-mail:hshzh1965@snnu.edu.cn

行处理,其营养价值未得到充分的开发和利用,造成了资源的浪费。因此本试验选用荞麦面粉加工的副产物荞麦麸皮作为研究对象,在前期工作的基础上,从荞麦麸皮中提取分离活性多糖,采用凝胶过滤法,红外光谱以及电子显微镜对荞麦麸皮多糖的一级结构进行初探,以期对荞麦资源的进一步开发利用提供必要的理论依据和方法的指导。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

荞麦麸皮,由陕西省定边县荞麦加工厂提供;无水乙醇、氯仿、乙醚、丙酮、苯酚、浓硫酸、无水葡萄糖,均为分析纯,购于天津盛奥化学试剂有限公司;DEAE-52 购于 Sigma 公司;葡聚糖凝胶 Sephadex G-200 购于 Pharmacia 公司。

1.2 仪器与设备

DGX-9073B-1 电热鼓风干燥箱,上海福玛实验设备有限公司;RE-52AA 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;冷冻干燥机 LGJ-10C,北京四环科学仪器厂有限公司;傅里叶变换红外光谱仪 Avatar360E. P,美国尼高力公司;扫描电子显微镜 Quanta 200,日本岛津公司;纤维素层析柱 2.6×80 cm、凝胶层析柱 1.5×60 cm,瑞博化玻仪器供应站。

1.3 实验方法

1.3.1 荞麦麸皮多糖的提取

荞麦麸皮干粉末→脱脂→热水浸泡(料液比 1:30,提取时间 137 min,提取温度 87°C)→抽滤取上清液、浓缩→95%乙醇 4°C 醇沉 24 h→离心得沉淀→Sevag 法^[11]除蛋白→离心取上清液→浓缩、透析 48 h→冷冻干燥 24 h 得荞麦麸皮多糖(BBP)。

1.3.2 荞麦麸皮多糖的紫外光谱分析

用蒸馏水将提取的荞麦麸皮多糖配制成质量浓度为 0.2 mg/mL 多糖溶液,同时设立对照组(蒸馏水),于 $200 \sim 900 \text{ nm}$ 波长范围下对其进行紫外光谱扫描。

1.3.3 DEAE-52 纤维素离子交换层析

用蒸馏水将一定量的荞麦麸皮多糖进行溶解,离心(3000 rpm , 20 min),取其上清液缓慢注入层析柱($2.6 \times 80 \text{ cm}$),平衡后开始进行洗脱。依次用蒸馏水和不同浓度的 NaCl 溶液(0.1 、 0.2 、 0.3 、 0.4 、 0.5 mol/L)进行洗脱(1.0 mL/min , 9 min/管),用自动收集器定时定量收集不同梯度的洗脱液各 100 管^[12]。采用苯酚-硫酸法^[13]对上述收集的溶液进行

测定,绘制洗脱曲线,相同梯度的洗脱液进行合并浓缩,真空冷冻干燥 24 h 后即得 BBP-I、BBP-II 和 BBP-III 三种多糖粗品。

1.3.4 Sephadex G-200 凝胶过滤柱层析

精确称取一定量的 BBP-I、BBP-II 和 BBP-III 三种多糖粗品,溶解,分别缓慢注入 Sephadex G-200 凝胶过滤柱($1.5 \times 60 \text{ cm}$),平衡后开始洗脱(0.4 mL/min , 10 min/管),各收集 100 管。采用苯酚-硫酸法对上述收集的溶液进行测定,绘制洗脱曲线,根据洗脱曲线对各洗脱液进行合并浓缩,真空冷冻干燥 24 h 后即得 BBP-I、BBP-II 和 BBP-III 三种多糖纯品。

1.3.5 多糖组分相对分子量的测定

用蒸馏水将标准品葡聚糖系列(T-10、T-40、T-70、T-100)均配置成 2 mg/mL 的溶液,依次过凝胶柱(Sephadex G-200),采用蒸馏水进行洗脱(6 mL/h , 20 min/管),使用自动收集器分别收集各系列洗脱液,采用苯酚-硫酸法对各收集液进行检测,并绘制洗脱曲线,获得洗脱体积(V_e),然后将蓝色葡聚糖以上述同样条件进行过柱,从而获得该洗脱柱的外水体积(V_o)。以 $\log M$ 为横坐标, V_e/V_o 为纵坐标,绘制出多糖相对分子质量标准曲线^[13]。以上述的同样条件对待测样品进行上柱,从而得出 V_e ,根据标准曲线得出样品的相对分子量的大小。

1.3.6 荞麦麸皮多糖扫描电子显微镜形貌观察

取多糖样品粘着于样品台上,置真空喷镀仪内喷金镀导电层,采用 Quanta 200 型环境扫描电镜进行扫描并观察,拍照。

1.3.7 荞麦麸皮多糖红外光谱分析

精确称取不同组分多糖纯品与干燥的溴化钾粉末混合研磨压片,将制成的薄片放入傅立叶变换红外光谱仪中进行分析。扫描的范围从 $400 \sim 4000 \text{ cm}^{-1}$ 。

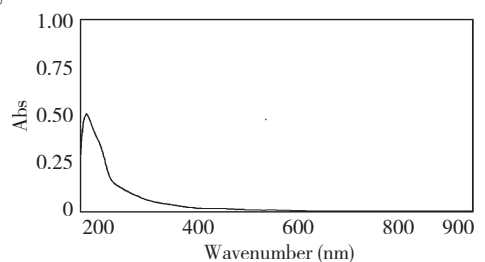


图1 荞麦麸皮多糖的紫外扫描图

Fig. 1 UV spectrum of BBP

2 结果与分析

2.1 荞麦麸皮多糖的紫外光谱分析

利用紫外光谱在 200 ~ 900 nm 波长范围内对荞麦麸皮多糖进行扫描,结果如图 1 所示。

由图 1 可知,荞麦麸皮多糖在 260 nm 和 280 nm 处无吸收峰,说明荞麦麸皮多糖中不含核酸和蛋白质。

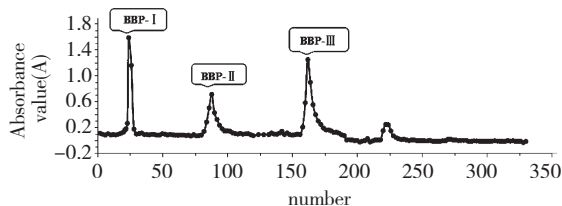


图 2 荞麦麸皮多糖的 DEAE-52 纤维素柱洗脱曲线

Fig. 2 Elution curve of polysaccharide from buckwheat bran on a DEAE-52 cellulose column

2.2 DEAE-52 纤维素柱层析分离结果

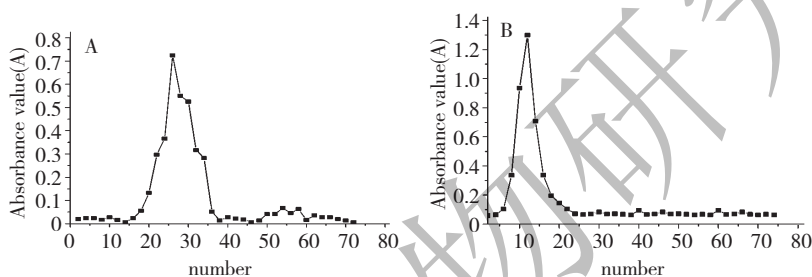


图 3 系列溶液洗脱曲线

Fig. 3 Elution curve of the series solution on column

2.4 荞麦麸皮多糖分子量的测定

多糖标品的洗脱体积与分子量间的标准曲线的线性回归方程为: $Y = 5.37075 - 0.86875X$ ($R^2 = 0.99825$), 其中: $Y = V_e/V_0$ (V_e 代表洗脱体积, V_0 代表外水体积), $X = \log M$ (M 代表多糖的分子量)。将上述分离纯化的三个荞麦麸皮多糖组分 BBP-I、BBP-II 和 BBP-III 的洗脱体积 (53.7、38.3、34.0 mL) 代入回归方程求得平均分子量分别为 1.56×10^4 Da、 5.85×10^4 Da 和 8.45×10^4 Da。

2.5 荞麦麸皮多糖扫描电子显微镜形貌观察

利用扫描电镜对荞麦麸皮多糖及各组分进行观察,结果如图 4 示。图 4(A) 为 BBP 电镜图,可看到其表面粗糙,凹凸不平;图 4(B) 为 BBP-I 电镜图,其形貌主要为球状;图 4(C) 为 BBP-II 电镜图,其形貌多以片状为主;图 4(D) 为 BBP-III 电镜图,其形貌

通过 DEAE-52 纤维素柱层析对荞麦麸皮多糖 (BBP) 进行分离纯化,试验中采用蒸馏水、NaCl 溶液进行梯度洗脱,洗脱曲线如图 2 所示。

由图 2 可以看出,荞麦麸皮粗多糖经过 DEAE-52 纤维素柱层析分离得到了三个明显的洗脱峰,分别对应蒸馏水、0.1 mol/L NaCl 和 0.2 mol/L NaCl 洗脱梯度,得到相对应的多糖成分 BBP-I、BBP-II 和 BBP-III。

2.3 Sephadex G-200 凝胶过滤柱层析结果

对分离得到的三个荞麦麸皮多糖组分 BBP-I、BBP-II 和 BBP-III 分别采用 Sephadex G-200 进行进一步的纯化,检测结果如图 3 所示。由图可以看出,分离出来的 3 个荞麦麸皮多糖组分均为单一峰,说明 DEAE-52 纤维素柱层析对荞麦麸皮多糖具有较好的分离效果,分离得到的 3 个多糖组分 [BBP-I (A)、BBP-II (B)、BBP-III (C)] 的纯度较高。由此可认为 3 个荞麦麸皮多糖 (BBP-I、BBP-II、BBP-III) 经过 Sephadex G-200 柱层析得到的均为纯品。

多以棒状为主。由此,可以看出荞麦麸皮多糖各组分间有较大的形貌差异,但其内部结构尚未能从图中得出,需做进一步研究。

2.6 荞麦麸皮多糖组分的红外光谱解析

对经过 Sephadex G-200 凝胶过滤柱层析纯化后的三个多糖组分 (BBP-I、BBP-II、BBP-III) 进行红外光谱解析,其结果如图 5 所示:

图 5A、B、C 分别为 BBP-I、BBP-II、BBP-III 的红外光谱图,由图可以看出,BBP-I、BBP-II、BBP-III 分别在 3388 、 3290 、 3408 cm^{-1} 处均出现一个很明显的宽峰,此为羟基 (-OH) 伸缩振动峰,表明这三种多糖组分的分子间均存在氢键;同时,BBP-I、BBP-II、BBP-III 分别在 2937 、 2947 cm^{-1} 处均出现了 C-H 伸缩振动吸收峰;此外,BBP-I、BBP-II、BBP-III 还分别在 1645 、 1660 、 1647 cm^{-1} 处均出现了 C=O 的非对称伸

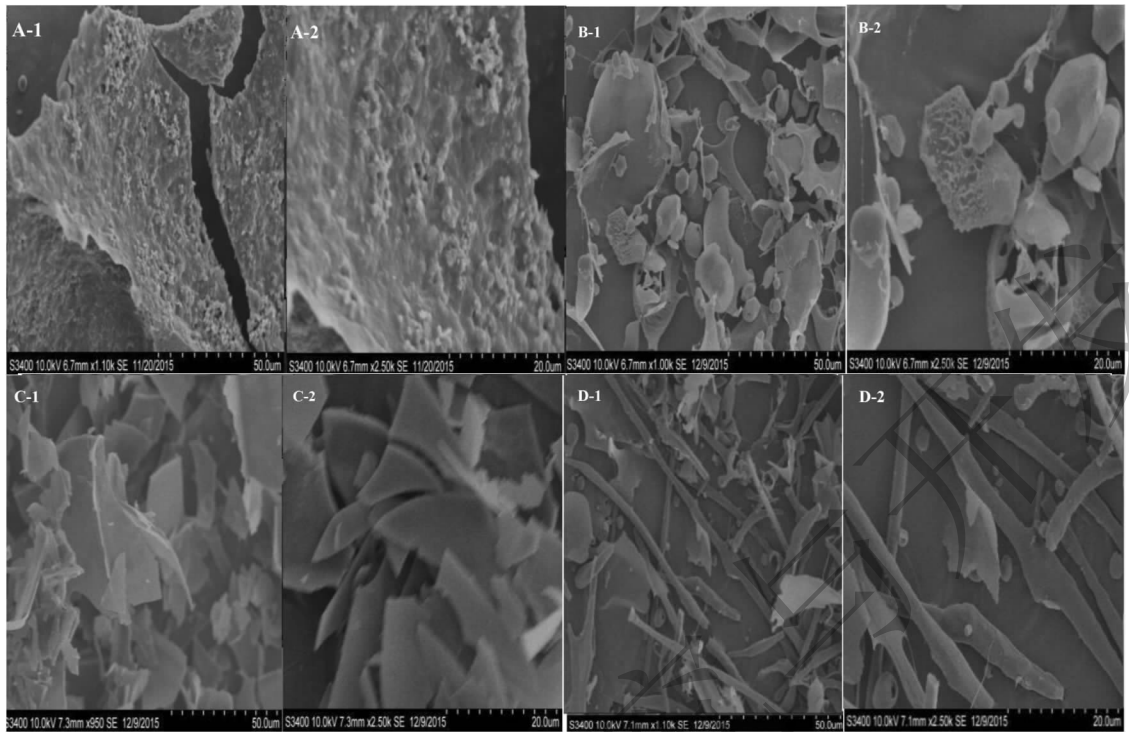


图4 BBP (A)、BBP-I (B)、BBP-II (C) 及 BBP-III (D) 的电镜扫描图

Fig. 4 SEM images of BBP (A), BBP-I (B), BBP-II (C) and BBP-III (D)

注：“1”为“×1000”倍率，“2”为“×2500”倍率

Note: “1” is “×1000” magnification, “2” is “×2500” magnification

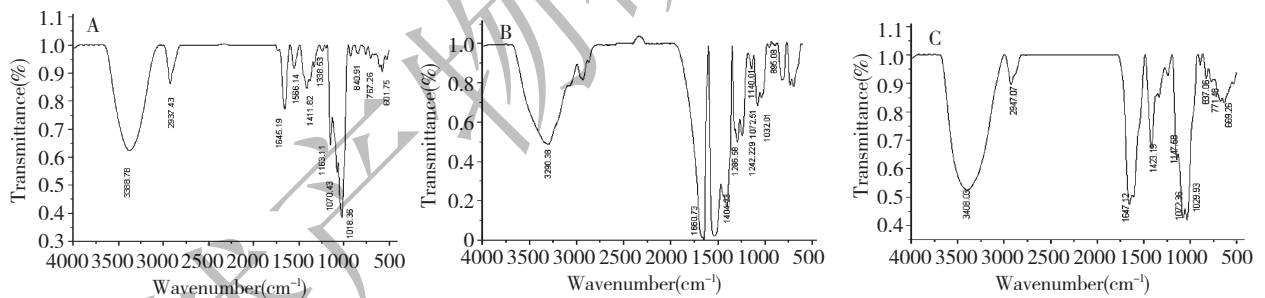


图5 BBP-I (A)、BBP-II (B) 及 BBP-III (C) 的红外光谱图

Fig. 5 IR spectra of BBP-I (A), BBP-II (B) and BBP-III (C)

缩振动峰以及均在 $1200 \sim 1400 \text{ cm}^{-1}$ 处出现了 C-H 面内弯曲振动峰；由图还可以看出三种多糖组分均在 $1000 \sim 1200 \text{ cm}^{-1}$ 之间出现了 C-O 伸缩振动峰，引起这种振动峰的情况可能有两种，一是由于糖环 C-O-C 的存在造成，再者可能由 C-O-H 所导致；由于 BBP-I、BBP-III 分别在波长为 $840/837 \text{ cm}^{-1}$ 处有吸收峰，而此处的特征峰属于 α -端基差向异构 CH 变角振动峰，说明 BBP-I、BBP-III 均为 α -糖苷键化合物；而 BBP-II 在波长为 895 cm^{-1} 处有吸收峰，由于波长 895 cm^{-1} 处的特征峰属于 β -端基差向异构 CH 变角振动峰，说明 BBP-II 为 β -糖苷键化合物。

3 讨论与结论

本实验将提取的荞麦麸皮粗多糖，依次通过 DEAE-52、Sephadex G-200 柱层析纯化后得到 BBP-I、BBP-II、BBP-III 三个多糖组分。多糖的活性很大程度上取决于其分子量的大小，因此对三个多糖组分的分子量进行测定，结果与 Lee 等^[14]研究的具有较好的免疫特性的高分子量多糖 CPMN Fr III 的分子量 (21 KDa) 相差较小，多糖组分的活性有待做进一步研究。

对荞麦麸皮多糖以及其三个多糖组分进行电镜扫描可看出其形貌特征差异明显, BBP- I 的外貌主要以球状为主, 颗粒直径相对其他两种多糖组分较小, 这与其相对分子量小的特征相吻合; BBP- II 的外貌以片状为主, 且片状结构表面平整, 较为紧密, 说明分子之间相互作用较强; BBP- III 的形貌以棒状为主, 棒状交织在一起形成了网状结构; 由于 SEM 技术用来观察物质表面状态, 其结果受干燥方法的条件、外力作用等因素影响非常大^[16], 因此荞麦麸皮多糖的外貌粗糙, 杂乱无章, 凹凸不平, 有可能是由于在提取过程中温度过高, 多糖的结构遭到了破坏, 亦或者是由于冷冻干燥不彻底, 多糖表面未彻底冻结而引起的^[17]。至于荞麦麸皮多糖的内部结构以及具体的连接方式, 还需做进一步分析。

最后对三种多糖组分进行傅立叶变换红外光谱分析, 其结果主要表示多糖分子的一级结构^[18], 从图可以看出三种多糖分子都是通过多种键链接而成, 形成不同的官能团, 使三种多糖分子的结构存在较大的差异性。由于分子结构的差异是荞麦麸皮多糖组分功能性差异的物质基础, 因此可以为荞麦麸皮多糖分子结构的进一步分析提供重要的依据。

采用 DEAE-52 纤维素层析柱和 Sephadex G-200 对荞麦麸皮粗多糖进行分离纯化, 得到三个多糖组分 BBP- I、BBP- II 和 BBP- III。其分子量分别为 1.56×10^4 Da, 5.85×10^4 Da, 8.45×10^4 Da。苷键的构形为 BBP- I 和 BBP- III 为 α -糖苷键化合物, BBP- II 为 β -糖苷键化合物。三个分离纯化多糖组分的形貌差异大, BBP- I 形貌主要为球状, BBP- II 形貌以片状为主, BBP- III 形貌以棒状为主。

参考文献

- Chen QF (陈庆富). Karyotype analysis of five *Fagopyrum* species native to China. *Guihaia* (广西植物), 2001, 21: 107-110.
- Lin R, Zhou Y, Wang R, et al. A study on the extract of tartary buckwheat. Toxicological Safety of the Extract of Tartary Buckwheat. *Adv Buc Res*, 2001: 602-607.
- Zang Z, Yang B, Shen Q, et al. Buckwheat production, research and market in China. *Adv Buck Res*, 2001: 690-693.
- Xu LH (徐丽华), Pan H (潘宏), Zhao YM (赵英明). Buckwheat-a new kind of multipurpose crops. *Rain Fed Crops* (国外农学-杂粮作物), 1998, 18(3): 1-4.
- Wang Q, Ogura T, Wang L. Research and development of new products from bitter-buckwheat. *Cur Adv Buck Res*, 1995, 873-879.
- Zhao G, Tang Y, Hu Z, et al. Selection and application of tartary buckwheat new variety Xiqiao One. *Adv Buck Res*, 2001: 382.
- Zong A, Cao H, Wang F. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. *Carbohydr Polym*, 2012, 90: 1395-1410.
- Wasser S. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl Micro Biot*, 2002, 60: 258-274.
- Bi YP (毕研平), Su YF (苏艳芳), Chai X (柴欣), et al. The development of the chemical constituents and biological activity of buckwheat. *Northwest Pharm* (西北药学杂志), 2008, 32: 116-118.
- Lu JJ (路静静), Zhao YQ (赵余庆). Research progress on components, bioactivity and applications of buckwheat Hulls. *Food Res Dev* (食品研究与开发), 2016, 22: 210-213.
- Xi XG, Wei XL, Wang YF, et al. Determination of tea polysaccharides in *Camellia sinensis* by a modified phenol-sulfuric acid method. *Arch Biol Sci*, 2010, 62: 669.
- Fan SH (范三红), Liu YR (刘艳荣), Yang ML (杨民乐), et al. Separation, purification and structural analysis of polysaccharide from Chinese pine pollen. *Food Sci* (食品科学), 2009, 30(15): 127-129.
- Xu WT (许文涛), Zhang FF (张方方), Luo YB (罗云波), et al. Isolation and purification of water-soluble polysaccharide from Common Buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) and determination of its molecular weight. *Food Sci* (食品科学), 2009, 30(13): 22-24.
- Yang YJ (杨勇杰), Jiang RZ (姜瑞芝), Chen YB (陈英红), et al. Determination of sugars in heteropolysaccharide by phenol-sulfuric acid method. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2005, 6: 706-708.
- Lee JS, Kwon JS, Yun JS, et al. Structural characterization of immunostimulating polysaccharide from cultured mycelia of *Cordyceps militaris*. *Carbohydr Polym*, 2010, 80: 1011-1017.
- Su H (苏浩). Study on extraction, structure identification and physical properties of water-soluble soybean polysaccharide from soybean dregs. Xinjiang: Xinjiang Agricultural University (新疆农业大学), MSc. 2009.
- Liang T (梁涛), Zhang J (张静), Zhang LN (张力妮), et al. Preliminary structure analysis and structure morphology observation of alkali-extractable polysaccharide PEAP-1 from *Pleurotus eryngii*. *J Food Sci Biotech* (食品与生物技术学报), 2013, 32: 951-956.
- Su Y (苏瑛), Zheng XC (郑晓翠), Liu PJ (刘鹏举), et al. Purification and determination of the structure of Epimedium polysaccharide. *Food Ferment Ind* (食品与发酵工业), 2009, 35(12): 93-96.