

文章编号 :1009-038X(2002)05-0503-03

百合中水溶性非淀粉多糖的分离与纯化

Manal M Shehata , 王璋
(江南大学 食品学院,江苏 无锡 214036)

摘要 :百合中水溶性非淀粉多糖的提取、分离和纯化方法的研究表明,糊化淀粉经 α -淀粉酶和普鲁兰酶水解除去后,剩余多糖经 Sepharose CL-6B 与 Sephadex G-100 凝胶过滤色谱分离,得到比浓粘度为 $81.292 \text{ cm}^3/\text{g}$ 的水溶性非淀粉多糖,其相对分子质量较小(20 018.6)。研究中还发现一些多糖与蛋白质以结合形式糖蛋白存在。

关键词 :非淀粉多糖 ;百合鳞茎 ;糖蛋白 ;相对分子质量

中图分类号 :TS 245.4

文献标识码 :A

Preliminary Study of Water Soluble Non-Starch Polysaccharides from Lily Bulb

Manal M. Shehata , WANG Zhang
(School of Food Science and Technology , Southern Yangtze University , Wuxi 214036 , China)

Abstract :Water Soluble Non-starch Polysaccharides(WSNSP) from lily bulb was extracted , isolated , and purified. Starch was removed after gelatinization by incubation with α -amylase and pullulanase. WSNSP was fractionated by gel filtration chromatography on Sepharose CL-6B and Sephadex G-100. Intrinsic viscosity was determined and found to be $81.292 \text{ cm}^3/\text{g}$. The WSNSP was found to be of low molecular weight(20 018.6). Furthermore , some polysaccharides were associated with protein(glycoprotein).

Key words : non-starch polysaccharides ; lily bulb ; glycoprotein ; molecular weight

植物类食品中含有两大类植物多糖:淀粉和非淀粉多糖(NSP),其中淀粉多糖可经 α -淀粉酶水解成低聚糖,而 NSP 则不能被哺乳动物 α -淀粉酶水解。非淀粉多糖中纤维素和半纤维素是植物细胞壁的重要组成部分^[1],与木质素一起被称为“膳食纤维”。NSP 由阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖等组成,由于化学和物理学的多样性使得很难精确测定它们。因此,在不同的研究中食品的 NSP 含量有

所不同^[2]。

1975 年 Burkitt 和 Trowel^[3]指出食品中非淀粉多糖的重要性,认为饮食中缺乏膳食纤维是西方社会富贵病发生的诱因之一。人体实验表明,NSP 对正常消化和吸收特别是大肠吸收功能十分重要^[4]。此外,流行病学^[5,6]与生理学^[7]研究都表明,人体内 NSP 的生理作用与细胞壁多糖的化学组成有关。

收稿日期 2002-03-10; 修订日期 2002-07-10。

作者简介:Manal M Shehata(1970-)女,埃及人,食品科学博士研究生。

万方数据

百合(*Lilium brownii*)属百合科百合属,原产于北半球温带地区,作为观赏植物被广泛种植,是最古老的种植植物之一。

干燥的百合鳞茎每百克含 20.3 g 膳食纤维^[8]。每千克新鲜百合鳞茎(Yellow glacier)中淀粉高达 770 g(以干物质计)^[9],*Lilium maximorocizii* 的直链淀粉质量分数达到 26.8%^[10]。总之,不同品种百合中淀粉和直链淀粉的含量都高。为此,作者研究了从百合鳞茎中提取、分离和纯化含有蛋白质的可溶性非淀粉多糖的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

百合购自无锡农贸市场。

1.2 仪器与试剂

试剂:所有化学试剂均为分析纯(AR)。酶制剂:Alcalase 为 Novo 公司产品,酶活力为 2.4 AU/g; Pullulanase 为 Novo 公司产品,酶活力为 400 PUN/mL; α -Amylase 为无锡杰能科公司产品,酶活力为 2 000 U/mL。

仪器:Sepharose CL-6B 和 Sephadex G-100, Sigma 公司制造。

1.3 方法

1.3.1 蛋白质含量测定 微量凯氏定氮法。

1.3.2 凝胶过滤色谱 用 Sepharose CL-6B 和 Sephadex G-100 色谱柱分离得到水溶性非淀粉多糖(WSNSP)。两色谱柱直径为 1.6 cm,高 100 cm。上样后用 0.2 mol/L pH 6.8 的磷酸盐缓冲液洗脱,洗脱流量为 18 mL/h,每管 3 mL 分部收集。在 280 nm 处紫外光检测蛋白质,苯酚-硫酸法^[12]测定碳水化合物。

1.3.3 粘度法测定相对分子质量

1) 样品溶液制备:已知质量的干燥样品溶于 0.155 mol/L 醋酸钠溶液中,分别配制成 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 g/dL 的样品。

2) 粘度测定:采用乌氏粘度计在 25 °C 水浴中测定。

3) 粘度公式

$$\eta = \eta_{sp}/c, \quad \eta_{sp} = (\eta_o - \eta_s) \eta_s$$

其中: η 为比浓粘度; η_{sp} 为增比粘度; η_s 为溶剂粘度; η_o 为样品粘度; c 为样品质量浓度(g/cm³)。

相对分子质量计算公式:

$$\eta = K_{[\eta]} \cdot \bar{M}^a$$

其中: $K_{[\eta]}$ 与 a 是常数, $K_{[\eta]} = 0.014 \times 10^{-2}$, $a = 1.34$ ^[13]。 \bar{M} 为相对分子质量。

1.3.4 百合中水溶性非淀粉多糖(WSNSP)的提取、分离与纯化

1) WSNSP 的制备

重约 500 g 干净的百合片投入沸腾的柠檬酸溶液(pH 3.5)中热烫 2~3 min 后,与一定量蒸馏水一起在组织捣碎机中匀浆。用 1 L 蒸馏水在 40 °C 和不断搅拌的条件下提取 2 次(每次 1 h),混合物 3 000 r/min 离心 10 min。分离上清液和沉淀,合并 2 次上清液,冷却,贮藏,即为 WSNSP 提取物。

2) WSNSP 的纯化

在 WSNSP 分离和纯化过程中的一个重要步骤是将淀粉完全除去。如果富含淀粉的食物中仍残留少量淀粉,就会使测得的 WSNSP 含量误差很大。现已证明小麦和豆类的淀粉颗粒很难糊化。此外,当淀粉特别是直链淀粉分散时,可絮凝且不溶于水并产生抗性,也就不能被 α -淀粉酶和普鲁兰酶水解^[14]。

二甲基亚砜(DMSO)是一种可有效地打断分子内氢键的试剂,现已将它用在淀粉的测定中,且 DMSO 比醋酸缓冲液的分散效果好^[15]。抗性淀粉(RS)不能分散在醋酸缓冲液中,所以不能被酶水解,但是所有的淀粉,包括抗性淀粉均可分散在 DMSO 中,利于酶法除去。百合鳞茎中的主要成分是淀粉,故用 DMSO 分散淀粉,然后用 α -淀粉酶和普鲁兰酶水解除去。

室温下,将 WSNSP 提取物与 500 mL DMSO 混合,100 °C 水浴中加热 1 h 以分散水溶性淀粉。用 α -淀粉酶(5 g 酶溶于 500 mL pH 5.2 醋酸钠缓冲液,过滤后使用)在 55 °C 酶解 30 min,再加入 3 mL 普鲁兰酶(使用之前,立即以 1:100 稀释酶液)和 2.5 mL Alcalase 酶(水解蛋白质),40 °C 反应 20 h,并用碘液检验淀粉是否水解完全。反应结束后,于 100 °C 保温 10 min 使酶失活,然后将混合液置于醇浴中冷却到 0 °C,用 5 mol/L HCl 调至 pH 2。混合液中加入体积分数为 80% 的酸化乙醇,0 °C 保持 1 h,然后在 3 000 r/min 离心 10 min,去除上清液。在沉淀中再次加入体积分数为 85% 的酸化乙醇搅拌混合,3 000 r/min 离心 10 min,去除上清液,再分别用无水乙醇、丙酮重复以上步骤。于 40 °C 烘箱中去除产品中的丙酮,然后复水、混合、中和并冷冻干燥^[11]。

2 结果与讨论

2.1 蛋白质质量分数

蛋白质质量分数的测定结果表明,WSNSP 中

蛋白质的质量分数为 5.2%(见表 1),说明一些多糖可能和某些蛋白质结合。

表 1 百合和 WSNSP 中的蛋白质质量分数

Tab.1 Protein content in lily bulb and WSNSP

样 品	蛋白质质量分数/%
新鲜百合	6
百合(干基)	17.1
WSNSP(干基)	5.2

2.2 Sephrose CL-6B 和 Sephadex G-100 凝胶过滤

试验用 Sephrose CL-6B 蛋白质分级范围是 $10^4 \sim 4 \times 10^6$ U,多糖的分级范围是 $10^4 \sim 1 \times 10^6$ U)和 Sephadex G-100(蛋白质分级范围是 4 000 ~ 150 000 U,多糖的分级范围是 1 000 ~ 100 000 U)凝胶过滤色谱测定分离 WSNSP 中的多糖组分,采用苯酚-硫酸法测定所收集的各个部分中的多糖含量,按下式计算:

$$Y = 84.329X - 3.2174 \quad (R^2 = 0.9957)$$

其中, Y 为葡萄糖的质量浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$), X 为 490 nm 处的紫外吸收光值。

Sephrose CL-6B 的洗脱曲线(见图 1)表明,蛋白质只有一个洗脱峰,这个宽峰对应的洗脱体积接近柱的床体积。多糖有 2 个洗脱峰,第 2 个宽峰的洗脱体积对应蛋白质峰的洗脱体积,而另一多糖峰却没有对应的蛋白质峰。

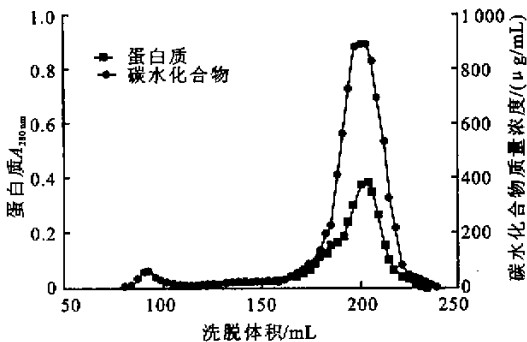


图 1 Sephrose CL-6B 凝胶过滤色谱图

Fig. 1 Elution profile from gel filtration chromatography on Sephrose CL-6B

Sephadex G-100 的洗脱曲线见图 2。蛋白质在 2 个单独的峰中被洗脱,第 1 个峰较小,洗脱体积只有 54 mL,第 2 个宽峰洗脱体积是 165 mL。多糖也

在 2 个单独的峰中被洗脱,多糖的峰与 2 个蛋白质峰相对应。现在已经知道一些与蛋白质相连的多糖称为糖蛋白。从色谱图看,百合中可能存在糖蛋白。

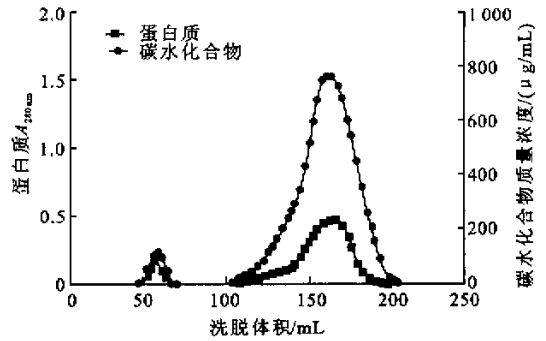


图 2 Sephadex G-100 凝胶过滤色谱图

Fig. 2 Elution profile from gel filtration chromatography on Sephadex G-100

2.3 相对分子质量

测定了 WSNSP 的比浓粘度和相对分子质量。在浓度为 0 时,比浓粘度为 $81.292 \text{ cm}^3/\text{g}$ (见图 3),根据 Mark-Houwink 公式 $\eta = K[\eta] \cdot \bar{M}^a$,WSNSP 的相对分子质量为 20 018.6。

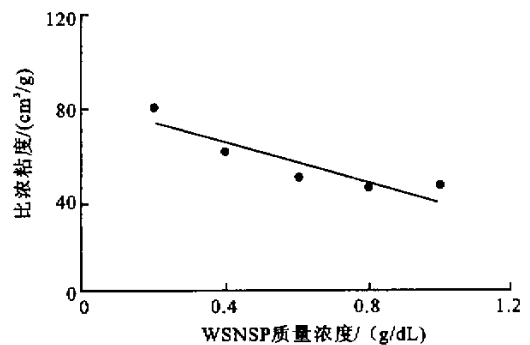


图 3 比浓粘度和 WSNSP 质量浓度的关系

Fig. 3 The relationship between intrinsic viscosity and WSNSP concentration

3 结 论

研究了百合中非淀粉水溶性多糖的提取、分离与纯化,结果表明:百合中的碳水化合物可能与蛋白质相结合,非淀粉水溶性多糖的比浓粘度和相对分子质量分别为 $81.292 \text{ cm}^3/\text{g}$ 和 20 018.6。

参考文献:

[1] SOUTHGATE D A T. Dietary Fiber in Health and Disease[M]. New York : Plenum Press , 1982. 1 - 7.
[2] JAMES W P T , THEANDER O. The Analysis of Dietary Fiber in Food Marcel Dekker[M]. New York : Basel Press , 1981.

收、富集和释放;发现了以藻类为主的放氧现象和微生物对银的解毒功能,揭示出微型动物在根系生态系统中处于消费者地位。在此综合作用下,污染物被分解或富集,随着凤眼莲的人工收获,根系上

富集的有机质、重金属、各种生物体一起被移出水体,达到水质净化和进一步资源化的目的。

致谢 中国科学院南京地理与湖泊研究所戴全裕、陈源高,无锡阿尔梅感光公司张珩、皮宇等参加了研究,特此致谢。

参考文献:

- [1] 吴振斌. 高等水生植物净化水质方面的研究概况[J]. 淡水生物学科情报, 1983(5):5-8.
- [2] 谢心义. 凤眼莲净化污水试验研究[J]. 环境科学, 1984, 5(3):15-18.
- [3] 张雁秋. 凤眼莲的容量对净化利用的影响[J]. 农村生态环境, 1989(1):40-43.
- [4] 戴树桂. 凤眼莲对污水中重金属的净化[J]. 环境科学, 1987, 8(2):43-46.
- [5] 戴全裕. 凤眼莲对重金属的吸收与喂鱼后二次富集状况的初步研究[J]. 水产学报, 1988, 12(2):135-144.
- [6] Curdg C R. The flocculation of suspended matter by paramecium[J]. *Caudatum Jgem Microbid*, 1963, 33:357-363.
- [7] 沈福芬. 周从生物与微型动物[J]. 淡水生物学科情报, 1982(2):1-2.
- [8] 戴全裕, 郭耀基. 凤眼莲对含银废水的净化研究——动态模拟试验[J]. 环境科学学报, 1990, 10(3):362-370.
- [9] 戴全裕, 郭耀基. 凤眼莲等水生植物对含银废水的净化与银回收研究[J]. 科学通报, 1991, 36(21):1657-1660.
- [10] 郭耀基. 凤眼莲根系微生物在含银废水净化中的作用[J]. 中国科学院南京地理与湖泊研究所集刊, 1991(8):79-89.
- [11] 戴全裕. TMK-SLS光度法测定含银废水、水生植物及底泥中的微量银[J]. 环境监测管理与技术, 1989, 1(2):40-44.
- [12] 戴全裕. 催化动力比色法测定水中痕量银及其在水生植物净化含银废水中的应用[J]. 环境污染与防治, 1990, 12(1):45-46.

(责任编辑:秦和平)

(上接第505页)

- [3] BURKITT D P, TROWELL H C. Refined Carbohydrate Foods and Disease[M]. London: Academic Press, 1975.
- [4] Royal College of Physicians. Medical Aspects of Dietary Fibre[M]. London: Pitmans Medical, 1980.
- [5] BINGHAM S, WILLIAMS D R R, COLE T J *et al.* Dietary fibre and regional large bowel cancer mortality in Britain[J]. **Br J Cancer**, 1979, 40:456-463.
- [6] ENGLYST H N, BINGHAM S A, WIGGINS H S *et al.* Non-starch polysaccharide consumption in flour Scandinavian population[J]. **Nutr Cancer**, 1982, 4:50-60.
- [7] CUMMINGS J H, SOUTHGATE D A T, BRANCH W *et al.* Colonic response to dietary fibre from carrot, cabbage, apple, bran, and guar gum[J]. **Lancet**, 1978, 1:5-7.
- [8] CANDLISH JK, GOURLEY-L, LEE-HP. Dietary fibre and starch in some southeast asian food[J]. **Asean Food Journal**, 1987, 3(2):81-83.
- [9] MULLIN WJ, PEACOCK S, LOEWEN DC *et al.* Macronutrients content of Yellow Glacier lily and balsamroot: root vegetables used by indigenous peoples of northwestern North America[J]. **Food Research International**, 1997, 30(10):769-775.
- [10] TAKEDA C, TAKEDA Y, HIZUKURI S. Physicochemical properties of lily starch[J]. **Cereal Chemistry**, 1983, 60:313-316.
- [11] HANS N ENGLYST, MICHAEL E QUIGLEY, GEOFFREY J HUDSON. Determination of dietary fibre as NSP with GLC, HPLC or spectrophotometric measurement of constituent sugar[J]. **Analyst**, 1994, (119):1497-1509.
- [12] DUBOIS M, GILLES K A, HAMILTON J *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. **Anal Chem**, 1956, 28:350-356.
- [13] BRANDRUP J, IMMERGUT E H. The Polymer Handbook[M]. New York: Wiley-Interscience, 1966.
- [14] BACON J S, BERKELEY R C W, GGOODAY G W *et al.* Microbial Polysaccharides and Polysaccharides[M]. London: Academic Press, 1979. 269.
- [15] HANS N ENGLYST, JOHN H CUMMINGS. Simplified method for the measurement of total NSP by gas-liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetate[J]. **Analyst**, 1984, 109(7):937-942.

(责任编辑:李春丽)