

大孔树脂纯化薏苡多糖的研究

任海伟,陈海秀,唐学慧,李 雪,李胜召

(兰州理工大学生命科学与工程学院,甘肃兰州 730050)

摘要:为提高薏苡多糖纯度,以吸附量(率)与解吸率为评价指标,从6种大孔吸附树脂中筛选适宜的树脂,并采用静态吸附-解吸方法优化工艺。结果表明:AB-8树脂纯化薏苡多糖效果更佳;其最适条件为:上柱液的质量浓度为0.68mg/mL,上柱液的体积为4BV,乙醇体积分数为60%,洗脱液体积为4BV。FT-IR图谱表明,薏苡多糖存在分子内和分子间的氢键,分子中存在C-H伸缩振动和-OH变形振动,存在呋喃糖苷吸收峰,是典型的多糖类化合物。

关键词:薏苡,多糖,大孔吸附树脂,纯化,红外光谱

Purification of polysaccharide from *Coix lacryma-jobi* L. by macroporous adsorption resin

REN Hai-wei, CHEN Hai-xiu, TANG Xue-hui, LI Xue, LI Sheng-zhao

(College of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China)

Abstract: In order to improve the purity of polysaccharide, 6 kinds of macroporous resin were chosen to carry out static and dynamic adsorption-desorption experiments. With the indexes of adsorption capacity and desorption rate, the suitable macroporous resin was selected and process parameters were confirmed. The results showed that AB-8 resin had the best performance of adsorption and desorption effects for purification of polysaccharide, the optimum technology parameters were sample concentration of 0.68mg/mL, sample volume of 4BV, 60% ethanol for elution, elution volume of 4BV. The FT-IR spectral analysis showed that there were intramolecular hydrogen bond and intermolecular hydrogen bond. In addition, the existences of stretching vibration of the carbon-hydrogen and deformation vibration of hydroxyl group and characteristic absorption of ribofuranoside were also demonstrated.

Key words: *C. lacryma-jobi* L.; polysaccharide; macroporous adsorption resin; purification; FT-IR

中图分类号: TS201.2+3

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2012)03-0249-04

薏苡(*Coix lacrymal-jobi* L.)为禾本科薏苡属一年或多年生草本植物,营养和药用价值极高,是典型的药食兼用作物。薏苡种仁呈广卵形或长椭圆形,长4~8mm,宽3~6mm,两项端钝圆,表面乳白色,腹面有一较宽且深的纵沟。中医记载,薏苡仁具有健脾利湿、清热排脓等功效。现代研究表明,薏苡仁含碳水化合物69.1%(其中含淀粉52%),含蛋白质12.8%~18%,含脂肪3.3%~7%,并富含维生素B₁等,主要功效成分有薏苡仁酯、薏苡素和薏苡多糖等^[1]。国内外学者已从薏苡仁中分离得到多糖成分,药理学研究证明薏苡多糖具有免疫兴奋、抗补体活性以及降血糖等作用^[2-3]。本文拟研究6种不同型号的大孔吸附树脂对薏苡多糖的吸附及解吸性能,筛选适宜的大孔树脂并确定纯化工艺,以期制备高纯度薏苡多糖奠定理论基础。

1 材料与方 法

收稿日期:2011-04-06

作者简介:任海伟(1983-),男,硕士,讲师,研究方向:食品科学。

基金项目:兰州理工大学学科协调发展基金资助。

1.1 材料与仪器

薏苡 市售; AB-8、NKA、NKA-9、X-5、D3520大孔吸附树脂 天津南开大学化工厂; D101大孔吸附树脂 安徽三星树脂科技有限公司。

UV-9000紫外分光光度计 北京瑞丽分析仪器有限公司; R202-3旋转蒸发器 常州诺基仪器有限公司; 鼓风干燥箱 金坛市诚辉仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 多糖含量的测定 参考文献[4]方法。总糖测定: 蒽酮-硫酸法; 还原糖测定: 3,5-二硝基水杨酸比色法,以葡萄糖为标准品; 多糖测定: 总糖与还原糖含量的差值。

1.2.2 薏苡多糖的提取 选取籽粒饱满的薏苡仁粉碎后过100目筛,按1:5比例加85%乙醇80℃恒温浸提3h; 然后以1:2比例加90℃蒸馏水超声辅助浸提4h,3000r/min离心10min,上清液采用Sevage法除去蛋白,即得薏苡多糖粗提液(经测定浓度为1.02mg/mL)。

1.2.3 树脂的预处理 用蒸馏水反复清洗大孔树脂至洗出液无泡沫为止;再用无水乙醇浸泡24h,然后

用无水乙醇洗涤树脂至流出液不呈白色浑浊为止,蒸馏水洗至无醇味;用5% HCl液冲洗树脂至流出液呈酸性后浸泡4h,蒸馏水冲至中性,最后用2% NaOH液冲洗树脂至流出液呈碱性后用碱浸泡4h,蒸馏水洗至中性备用。

1.2.4 树脂的筛选

1.2.4.1 静态吸附研究 准确称取预处理过的六种湿树脂1.00g于100mL锥形瓶中,加入30mL薏苡多糖粗提液,常温下160r/min振荡吸附,每隔1h取样测定多糖含量,计算吸附量和吸附率^[5]。

$$\text{吸附量 (mg/g)} = \frac{(c_0 - c_1) \times V}{M}$$

$$\text{吸附率 (\%)} = \frac{c_0 - c_1}{c_0} \times 100\%$$

式中: c_0 为吸附前液体多糖浓度(mg/mL); c_1 为吸附后液体多糖浓度(mg/mL); V 为液体体积(mL); M 为树脂湿重(g)。

1.2.4.2 静态解析研究 将充分吸附的树脂过滤,用水冲洗后滤干置于锥形瓶中,加入30mL 60%乙醇密闭振荡,每隔1h取样测定多糖含量,计算解析率。

$$\text{解析率 (\%)} = \frac{c_0}{c_1 - c_2} \times 100\%$$

式中: c_0 为解析液多糖浓度(mg/mL); c_1 为粗提液多糖浓度(mg/mL); c_2 为上清液的平衡多糖浓度(mg/mL)。

1.2.5 AB-8树脂对薏苡多糖的静态吸附解析性能研究 按上述静态吸附实验方法,研究薏苡多糖pH(4.0、5.0、6.0、7.0、8.0)、温度(23、26、28、30、32、35℃)和振荡速度(160、180、200、220、240r/min)对AB-8树脂吸附效果的影响;按静态解析方法研究乙醇浓度(20%、40%、60%、80%、100%)对解析效果的影响。

1.2.6 AB-8树脂对薏苡多糖的动态吸附解析性能研究 将预处理好的5.00g AB-8树脂装柱后,研究上柱液多糖浓度(稀释倍数为2.5、2、1.5、1、0.5B)、上样量(2、4、6、8、10BV)对AB-8树脂吸附效果的影响;在相同条件下研究洗脱液体积(0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5BV)对洗脱效果的影响。上柱流速和洗脱速度均为3.5BV/h^[6]。

$$\text{吸附率 (\%)} = \frac{m - m_1}{m} \times 100\%$$

式中: m :上柱液多糖质量(mg); m_1 :漏出液多糖质量(mg)。

$$\text{解析率 (\%)} = \frac{m_0}{m - m_1 - m_2} \times 100\%$$

式中: m_0 :解析液多糖质量(mg); m :上柱液多糖质量(mg); m_1 :漏出液多糖质量(mg); m_2 :水洗液多糖质量(mg)。

1.2.7 薏苡多糖的FT-IR光谱分析 称取1.5mg多糖干燥样品与150mg KBr混合研磨后压片,采用傅里叶变换红外光谱仪扫描分析,扫描范围为4000~400cm⁻¹,观察吸收峰确定其基团类型。

2 结果与分析

2.1 大孔吸附树脂的筛选

2.1.1 不同树脂对薏苡多糖的吸附性能 图1表明,

吸附初始的前6h内,6种大孔树脂能够快速吸附薏苡多糖,随着时间推移吸附速率趋缓,吸附量在9h左右饱和,基本达到吸附平衡。同时,各种树脂的静态吸附总量略有差异,顺序依次是:AB-8>D101>X-5>NKA-9>NKA>D3520。AB-8树脂静态饱和吸附量为29.72mg/g,说明大孔树脂对薏苡多糖的吸附具有选择性,其吸附能力与树脂类型有关。

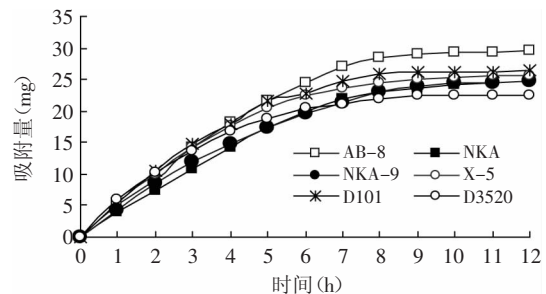


图1 不同树脂对薏苡多糖的吸附率

Fig.1 Effect of different types of resins on adsorption rate

2.1.2 不同树脂对薏苡多糖的解析性能 不同类型树脂的静态解析曲线如图2所示,60%乙醇溶液对6种树脂都具有较好的解析能力,解析速率也较快,3h内就基本达到解析平衡。AB-8树脂最大解析率可达96.70%。综合以上结果,AB-8树脂对薏苡多糖物质不仅具有较强的吸附能力,而且容易洗脱,是纯化薏苡多糖的优良材料,因此选用AB-8树脂吸附纯化薏苡多糖。

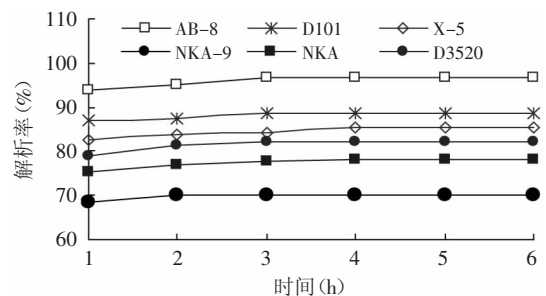


图2 不同树脂对薏苡多糖的解析率

Fig.1 Effect of different types of resins on desorption rate

2.2 AB-8树脂的静态吸附解析研究

2.2.1 温度对AB-8树脂静态吸附的影响 由图3可知,AB-8树脂对薏苡多糖的吸附率随温度升高呈先升后降的趋势,28℃时吸附率达峰值(69.82%),这是因为温度过低往往在短时间达不到平衡,温度升高有助于提高吸附率,但AB-8树脂的吸附属放热过程,温度

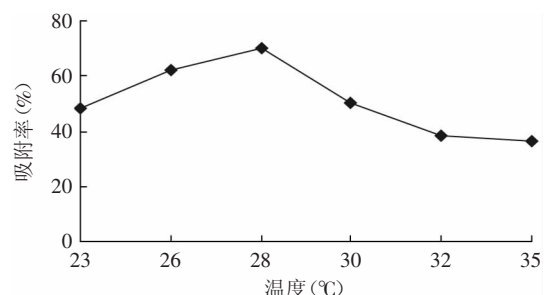


图3 温度对AB-8树脂吸附率的影响

Fig.3 Effect of temperature on adsorption rate

过高反而不利于吸附,因此选择28℃作为吸附温度。

2.2.2 pH对AB-8树脂静态吸附性能的影响 由图4可知,随着pH的升高,AB-8树脂对薏苡多糖的吸附率增加,但pH大于6以后趋于平缓,结合树脂本身工作性质要求,本实验选择pH为6。

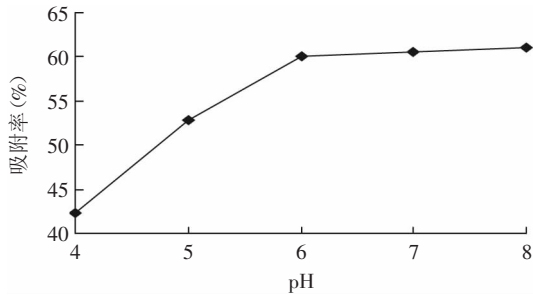


图4 pH对AB-8大孔树脂吸附率的影响

Fig.4 Effect of pH on adsorption rate

2.2.3 振荡转速对AB-8树脂静态吸附性能的影响 由图5可知,AB-8树脂在振荡速度为200r/min时吸附率最大,这是因为速度的增加促进了树脂对多糖的吸附,但速度过大同时也会导致多糖发生解析,因此本实验选择振荡速度为200r/min。

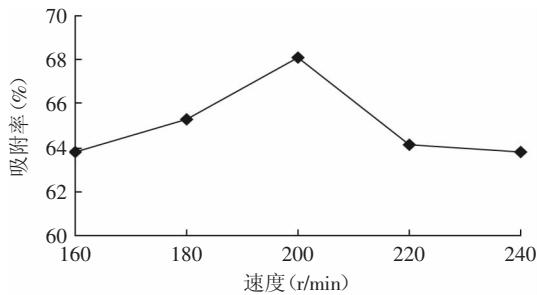


图5 振荡速度对AB-8树脂吸附率的影响

Fig.5 Effect of shake speed on adsorption rate

2.2.4 乙醇浓度对洗脱效果影响 由图6可知,随乙醇浓度增加解析率先升高后下降;当乙醇浓度为60%时解析率达最大(87.31%)。因此选用60%乙醇作为解析液(即动态纯化的洗脱剂)。

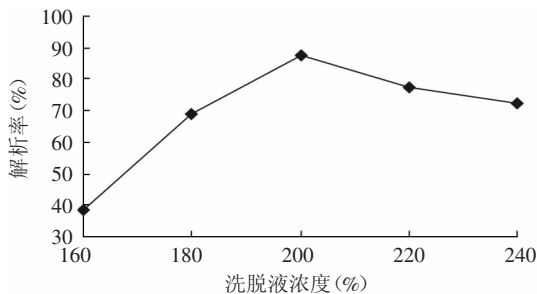


图6 乙醇浓度对AB-8树脂解析率的影响

Fig.6 Effect of ethanol concentration on desorption rate

2.3 AB-8树脂动态吸附解析研究

2.3.1 上样液浓度对AB-8树脂动态吸附的影响 由图7可知,AB-8树脂对薏苡多糖的吸附率随上样液浓度的增加先上升后下降,当浓度小于0.68mg/mL(稀释1.5倍以上)时,吸附量随上样液浓度的增加而升高,这是因为低浓度范围,上样液浓度的增加可以促进多糖分子与树脂的接触,加速多糖进入树脂内

部并迅速扩散;另一方面,当上样液浓度增加至一定值后,若继续提高浓度,树脂接触表面多糖分子过多,阻碍其他多糖分子进入树脂内部,影响多糖在树脂内部的扩散能力,导致树脂吸附量下降,同时浓度的增加导致能与多糖竞争吸附的杂质也会增加,因此选择上样液稀释1.5倍。

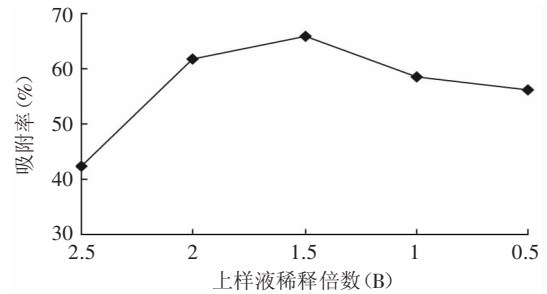


图7 上样液浓度对AB-8树脂吸附率的影响

Fig.7 Effect of solution concentration on adsorption rate

2.3.2 上样液体积对AB-8树脂动态吸附的影响 由图8可知,随上样液体积的增大吸附率降低,当薏苡多糖溶液的体积为2~4BV(树脂床体积)时树脂的吸附率较高,之后随上样液体积增加,吸附率急剧下降。当上样量为10BV时,吸附率仅为14.62%。综合考虑吸附率和纯化效率,选择上样液体积为4BV。

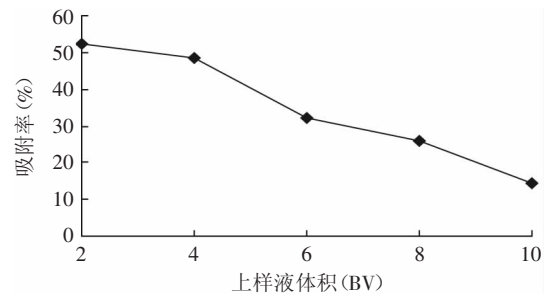


图8 上样液体积对AB-8树脂吸附率的影响

Fig.8 Effect of the solution volume on adsorption rate

2.3.3 洗脱液体积对洗脱效果的影响 由图9可知,60%乙醇的洗脱能力与其用量呈正相关,用量越大,解吸率越大。当洗脱剂用量为0.5BV时,解析几乎不会发生;而洗脱剂用量达到4BV时,78.52%的薏苡多糖被洗脱下来。从节约成本角度考虑,60%乙醇洗脱以4BV的用量为宜。

2.3.4 薏苡多糖FT-IR图谱分析 由图10可知,在4000~400cm⁻¹区间具有多糖类物质的一般特征;在3409.26cm⁻¹

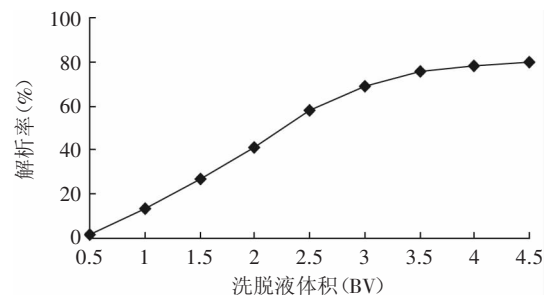


图9 洗脱液体积对AB-8树脂解析率的影响

Fig.9 Effect of the effluent volume on desorption rate

(下转第254页)

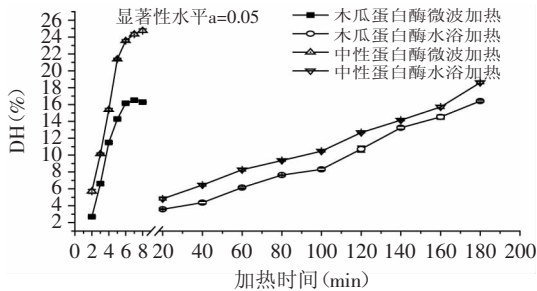


图4 核桃蛋白水解度随酶解时间的变化关系曲线

Fig.4 Effect of time on degree of hydrolysis

物浓度为5%,中性蛋白酶的底物浓度为6%,考察微波作用时间对水解的影响,结果见图4。

微波加热辅助酶解蛋白质技术的最大特点是瞬时加热,使得酶促反应在短时间内迅速完成。由图4可知,当酶用量一定时,水解时间愈长,水解效果愈好,但达到一定时间后,递增速度变得缓慢。微波加热时,随着反应的进行,反应液温度持续升高,因此核桃蛋白的水解度也跟着增加,但是5min以后,反应液的温度已经过高,酶的活性受到抑制,反应速度开始减慢。对比研究图4不难看出,微波加热相对于水浴加热最大的优势就是在较短的时间内即可达到较高的水解度,利用微波加热只需5min左右的时间就可以达到水浴加热条件下200min才能达到的水解度,因此将微波加热技术应用于核桃蛋白肽的生产,可以大大提高水解速度约10~40倍。姜莉^[8]采用木瓜蛋白酶水解自制的核桃蛋白,结果发现木瓜蛋白酶的水解度为9%,本实验中在微波加热条件下加热5min,水解效果即可达到15%,高于其实验效果。

3 结论

(上接第251页)

处的吸收峰(强,宽),是糖类的O-H伸缩振动,表明多糖存在分子内和分子间的氢键;2851.80cm⁻¹的强吸收峰和2815.52cm⁻¹处的弱峰代表CH₂或CH₃的C-H伸缩振动;1538.16cm⁻¹处的吸收峰为C-H变角振动。另外,1638.46cm⁻¹处吸收峰对应于C-O非对称伸缩振动,为多糖的水合振动峰;在1103.12cm⁻¹(弱)和1057.86cm⁻¹(强)处出现的吸收峰为呋喃糖苷吸收峰,说明该组分中存在呋喃糖苷。

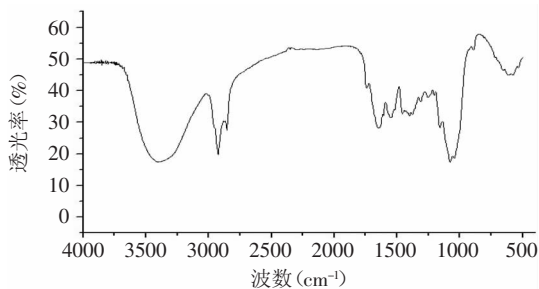


图10 薏苡多糖纯化后FT-IR谱图

Fig.10 The infrared spectrum of purified polysaccharide

3 结论

通过对6种大孔树脂吸附薏苡多糖对比研究,筛

3.1 初步确定了木瓜蛋白酶和中性蛋白酶对核桃蛋白的较佳水解条件分别是:木瓜蛋白酶:酶和底物之比为6000U/g, pH7.0, 底物浓度为5%, 水解时间为5min; 中性蛋白酶:酶和底物之比为6000U/g, pH9.0, 底物浓度为6%, 水解时间为6min。

3.2 同等条件下中性蛋白酶的水解效果较木瓜蛋白酶好。

3.3 微波加热相对于水浴加热最大的优势是在较短的时间内就可以达到较高的水解度, 利用微波加热只需5min左右的时间就可以达到水浴加热条件下200min才能达到的水解度, 这对提高生产力水平具有重要意义。

参考文献

- [1] 李菊芳,董绪燕,魏芳,等.微波/超声波及固定化酶技术在食品蛋白质高效水解中的应用研究进展[J].中国农业科技导报,2009,11(6):86-92.
- [2] 张树政.酶制剂工业(下册)[M].北京:科学出版社,1986:387.
- [3] 郭杰炎,蔡武城.微生物酶[M].北京:科学出版社,1986:246.
- [4] JFeng YL Xing. Interaction and functionality of mixed myofibrillar and enzyme-hydrolyzed soy proteins[J]. Journal of Food Science,2003,68(3):803-809.
- [5] 袁斌,吕桂善,刘小玲.蛋白质水解度的简易测定方法[J].广西农业生物科学,2002,21(2):113-115.
- [6] 李书国,陈辉,庄玉亭.复合酶法制备活性寡肽研究[J].食品与油脂,2001(3):5-7.
- [7] 刘静,陈均志.微波双酶协同水解大豆分离蛋白制备小分子肽的研究[J].食品研究与开发,2006,27(8):9-12.
- [8] 姜莉.核桃渣制备核桃蛋白和多肽的研究[D].陕西:西北农林科技大学,2007.

选出吸附量大、解吸率高的AB-8树脂。通过静态-动态实验确定最佳纯化条件为:上柱液质量浓度0.68mg/mL,上柱液体积4BV,洗脱液乙醇体积分数60%,洗脱液体积4BV。FT-IR光谱分析发现:薏苡多糖具有多糖的特征吸收峰,存在分子内和分子间的氢键,分子中存在C-H键伸缩振动,存在-OH的变形振动,存在呋喃糖苷吸收峰,是典型的多糖类化合物。

参考文献

- [1] 凌关庭.保健食品原料手册[M].北京:化学工业出版社,2007,5.
- [2] 徐梓辉,周世文,黄林清.薏苡仁多糖的分离提取及其降血糖作用的研究[J].第三军医大学学报,2000,22(6):578-581.
- [3] TAKATMSHI M, KONOO C, HIKINO H. Isolation and hypoglycemic of coixan A, B and C, glycans of coix lachrymal jobi var. ma-yuen seeds[J]. Planta medica, 1986, 53(2):64-65.
- [4] 王丽波,赵玉,徐雅琴.南瓜多糖大孔吸附树脂纯化工艺[J].农业机械学报,2010,41(9):138-142.
- [5] 尹忠平,上官新晨,张月红,等.大孔树脂吸附纯化青钱柳叶三萜化合物[J].食品科学,2011,32(6):61-65.
- [6] 钟运琴,杨宏志,阎福林,等.大孔树脂纯化沙棘果渣多糖的研究[J].食品工业科技,2009,30(10):230-236.