

一种荔枝壳多糖的分离鉴定

杨 宝, 赵谋明, 刘 洋, 李宝珍

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640)

摘 要: 本研究采用 DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换柱和 G50 葡聚糖凝胶柱从荔枝壳中分离出一种水溶性多糖组分, 并对其进行结构分析。气相色谱法分析结果表明其主要由甘露糖和半乳糖组成, 含少量的阿拉伯糖, 摩尔百分比为 65.6%:33.0%:1.4%。通过高碘酸氧化和 Smith 降解法分析表明分子间存在 1, 2 键, 1, 3 键和 1, 6 键, 其摩尔百分比为 8.7%:83.3%:8.0%。凝胶渗透色谱测定该多糖分子量为 14000D。采用红外光谱进一步分析其结构特征。

关键词: 荔枝壳; 多糖; 凝胶渗透色谱; 红外光谱

Isolation and Identification of a Polysaccharide in Litchi Pericarp

YANG Bao, ZHAO Mou-ming, LIU Yang, LI Bao-zhen

(College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: DEAE sepharose fast flow anion exchange column and sephadex G50 gel column were used to isolate and purify the major polysaccharide extracted from litchi pericarp. Mannose composition was determined by gas chromatography. It mainly comprised of mannose, galactose, and arabinose. The profile of gel permeation chromatography (GPC) showed that its molecular weight is 14000D and its structure is further identified by infrared (IR) spectra.

Key words: litchi pericarp; polysaccharide; gel permeation chromatography; infra-red spectra

中图分类号: R931.6

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)02-0081-03

荔枝是东南亚地带的一种特色水果, 以其独特的口感而深受消费者的欢迎^[1]。中国的广东、福建等地每年有大量种植, 2004 年全国年产量为 150 万吨。荔枝肉除了直接食用外, 常加工成罐头、果酱或果酒等产品, 剩余的荔枝壳通常被当做垃圾处理掉, 造成了很大的浪费。实际上, 荔枝壳富含活性多糖类成分, 具备良好的保健功效, 有较高的加工利用价值。现有的研究资料表明^[2], 活性多糖有着良好的抗氧化性能和清除自由基能力, 对降血压、降血脂、抗肿瘤、防止动脉粥样硬化、消炎镇痛、增强免疫能力有一定功效。

目前国内外对于荔枝壳多糖的研究, 目前尚未见报道。对荔枝壳的研究主要集中在以下几个方面: 不同生长阶段荔枝壳花青素的变化^[3]; 荔枝壳褐变过程中花青素、多酚类物质的变化^[4,5]; 荔枝壳红色素和棕色素的稳定性研究^[6,7]。本研究采用 DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换柱和 G50 葡聚糖凝胶柱分离纯化荔枝壳多糖, 并采用气相色谱法分析其单糖组成和连接键, 凝

胶渗透色谱测定其分子量, 红外光谱分析其结构特征。

1 材料与方法

1.1 材料

荔枝(槐枝品种) 采摘于广州从化荔枝园。DEAE Sepharose Fast Flow 和 Superdex G50 Pharmacia; 赤藓醇 Sigma 公司; 其它试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器

Amersham 液相色谱系统; HP 4890D 气相色谱系统; BRUKER VECTOR 33 红外光谱; FA2004 分析天平; RE-52AA 旋转蒸发器; ZK-83A 真空干燥箱。

1.3 方法

1.3.1 荔枝壳多糖的分离纯化

称取 5g(干基)荔枝壳, 加入 100ml 蒸馏水, 在 60℃ 温度浸提 2h, 过滤, 滤渣再加水提取, 重复三次, 合并滤液 50℃ 真空浓缩至一定体积。加无水乙醇沉淀 24h, 离心, 重复该步骤三次, 以除去醇溶性色素。

收稿日期: 2005-03-31

基金项目: 广东省农业攻关项目(2003A203507)

作者简介: 杨宝(1979-), 男, 博士研究生, 研究方向为食品生物技术。

采用 Seavage 法脱蛋白, 活性炭脱色后真空干燥得多糖粗品。经 DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换柱(16 × 100mm)(洗脱条件: 流速 0.3ml/min, 先用超纯水洗脱 45min, 再用 0.5mol/L NaCl 洗脱 60min)和 G50 葡聚糖凝胶柱(10 × 300mm)(洗脱条件: 超纯水洗脱, 流速为 0.5ml/min)分离纯化得均一多糖样品, 以苯酚-硫酸法^[8]测定糖含量来确定出峰位置。

1.3.2 单糖组成测定

根据 Erbing 等^[9]报道的方法, 称取 10mg 多糖样品, 加 5ml 2mol/L 三氟乙酸 120℃ 反应 6h, 真空浓缩至干。采用三甲基硅烷化法^[10]衍生化单糖, 进行气相色谱鉴定, 以肌醇为内标。气相色谱的条件为: 氢气流速 16ml/min, 空气流速 150ml/min, 氮气流速 20ml/min, 进口温度 230℃, 检测器温度 230℃, 柱采用程序升温, 起始温度 130℃, 以 5℃/min 升至 180℃, 保持 2min, 再以 5℃/min 升至 220℃, 保持 3min。对照样品与标准品的出峰位置判断多糖组成。

1.3.3 糖苷键连接方式鉴定

采用 Smith 降解法^[11], 同时采用气相色谱进行定性和定量分析, 方法同 1.3.2。

1.3.4 分子量测定^[12]

采用 Waters 凝胶渗透色谱(GPC)进行测定。选用 Ultrahydrogel 凝胶柱, 以超纯水洗脱, 流速为 0.6ml/min, Waters2410 型差示检测器进行检测, 采用 Millennium 32 软件系统分析数据。选用葡聚糖标准品制作标准曲线, 其分子量分别为 4400、9900、21400、43500、124000、196000、277000、845000D。

1.3.5 红外光谱分析^[13]

称取多糖样品 2mg, 与 400mg 干燥的 KBr 混匀, 在玛瑙研钵中研磨 5~10min, 压片, 放入红外光谱仪探测 4000~500cm⁻¹ 范围内的吸收谱带。

2 结果与讨论

2.1 荔枝壳多糖分离纯化

通过阴离子交换层析表明(见图 1), 荔枝壳多糖主要为非阴离子多糖, 还含有少量的阴离子多糖。收集主要的非阴离子多糖部分, 通过葡聚糖 G50 凝胶柱进一步纯化。从凝胶过滤层析(见图 2)的结果来看, 主要组分集中的 20min 左右, 其他分子量的多糖含量较少。收集主要组分进行下一步测定。

2.2 单糖组分及其连接键方式

比较荔枝壳多糖的单糖与标准品的气相色谱图(图 3)可知, 荔枝壳多糖主要由甘露糖和半乳糖组成, 含少量的阿拉伯糖。内标法计算得出这三种单糖的组成摩尔百分比为甘露糖 65.6%, 半乳糖 33.0%, 阿拉伯糖 1.4%。

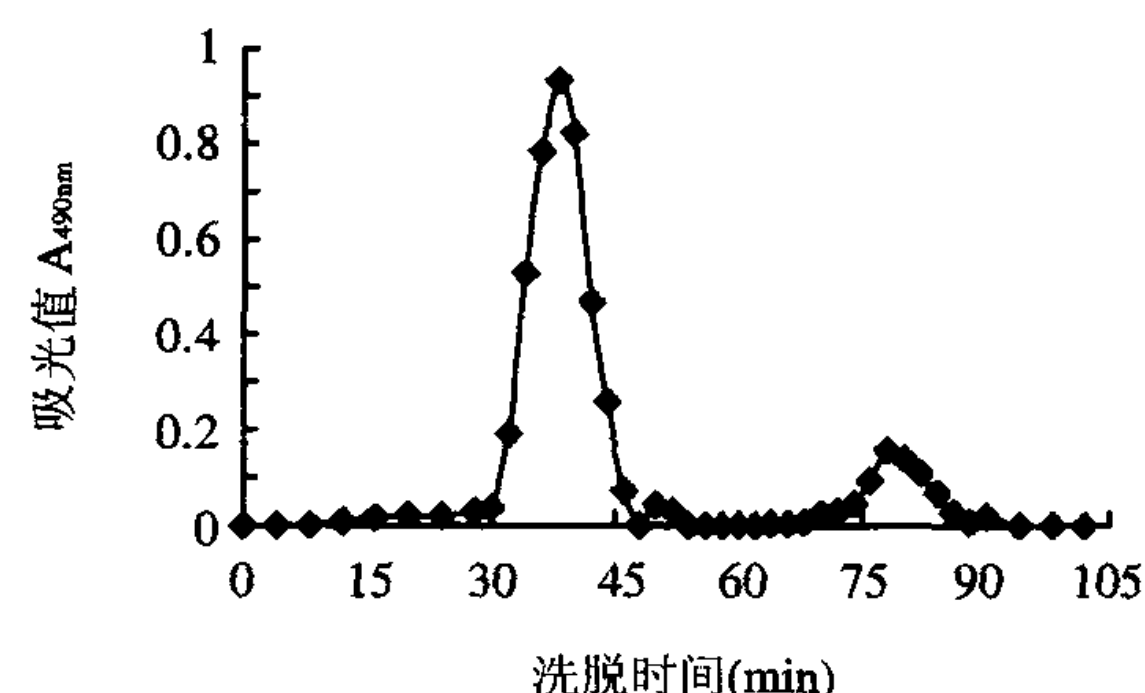


图 1 荔枝壳粗多糖阴离子交换层析图
Fig.1 DEAE Sepharose chromatogram of the crude polysaccharides extracted from pericarp tissues of litchi fruit

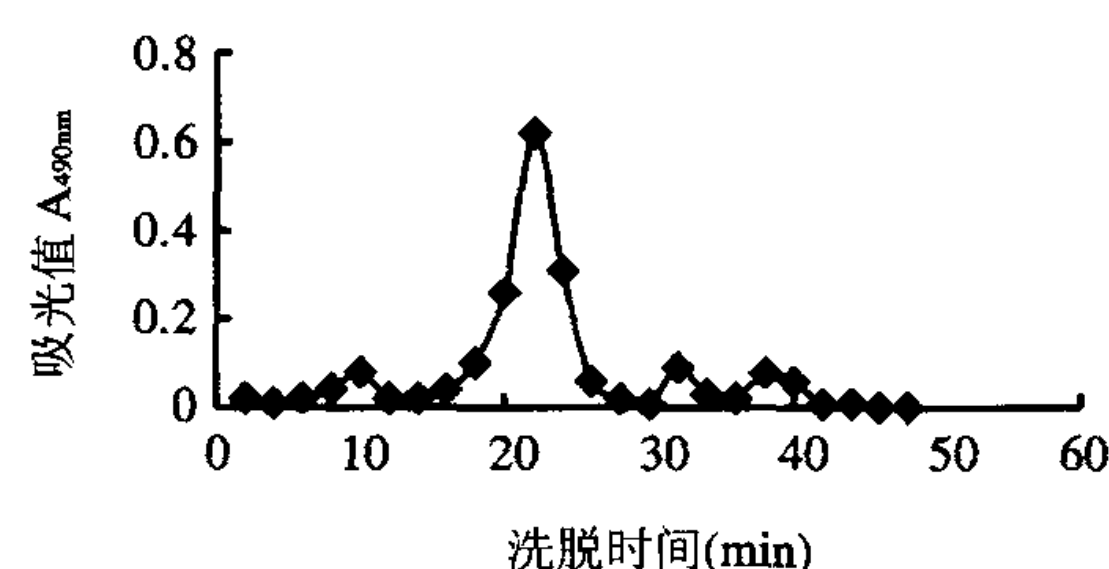
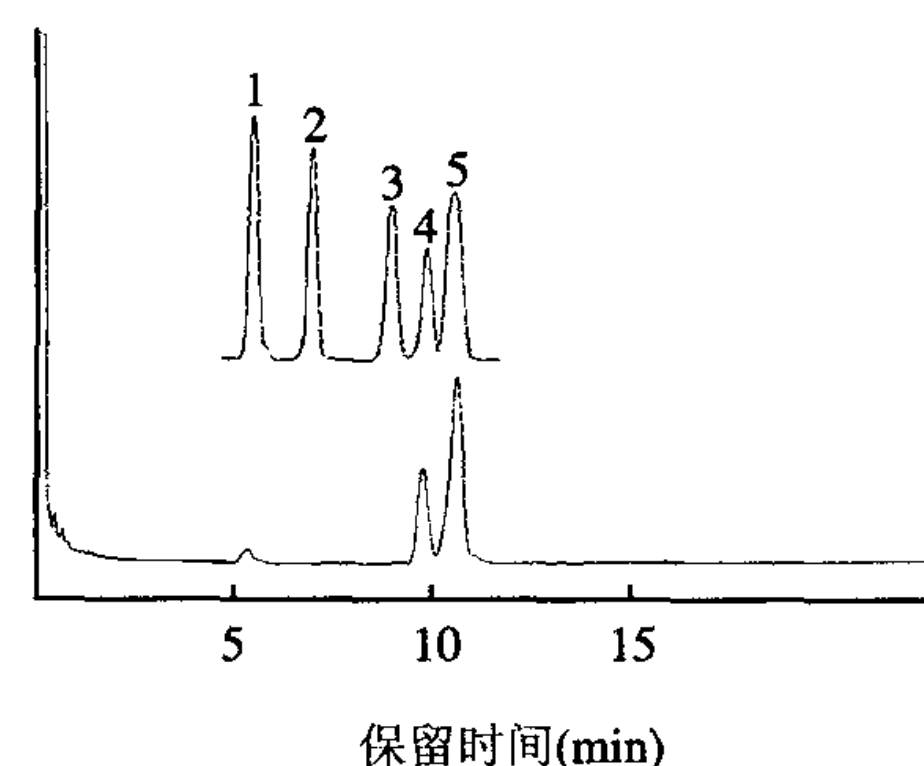


图 2 荔枝壳多糖凝胶过滤层析图
Fig.2 Sephadex G-50 gel chromatogram of the polysaccharides purified partially from by DEAE Sepharose column



注: 1.阿拉伯糖; 2.木糖; 3.果糖; 4.半乳糖; 5.甘露糖

图 3 荔枝壳多糖的单糖组成与单糖标样对照气相色谱图
Fig.3 Gas chromatogram of monosaccharide compositions of the polysaccharide purified from pericarp tissues of litchi fruit

测定高碘酸氧化产物表明, 1mol 己糖消耗 0.25mol NaIO₄, 生成 0.08mol 甲酸, 可计算出 1, 6 键占 8%。Smith 降解产物中不含赤藓醇, 表明多糖不含 1, 4 键。由表 1 数据可推算出该荔枝壳多糖的 1, 2 键、1, 3 键和 1, 6 键摩尔百分比约为 8.7%:83.3%:8.0%。

2.3 荔枝壳多糖的分子量

利用 Millennium 32 软件得出, 八个不同分子量的葡聚糖标准品所制得的标准曲线为 $\text{LogWt} = 121.9 - 9.17t + 0.242t^2 - 0.00217t^3$ (Wt 表示样品分子量, t 表示洗脱时间)。荔枝壳多糖的洗脱时间为 36.66min, 经计算其分子量为 14000D。

2.4 荔枝壳多糖的红外光谱谱带

由图 4 可以看出, 3407cm⁻¹ 处存在一个较宽的吸收

表1 荔枝壳多糖 Smith 降解产物气相分析结果

Table 1 Smith degradation of the polysaccharide purified from pericarp tissues of litchi fruit

标准品	Smith 降解产物摩尔百分含量(%)
甘油	16.7
赤藓醇	* —
阿拉伯糖	—
甘露糖	53.5
半乳糖	29.8

* —: 表示未测出。

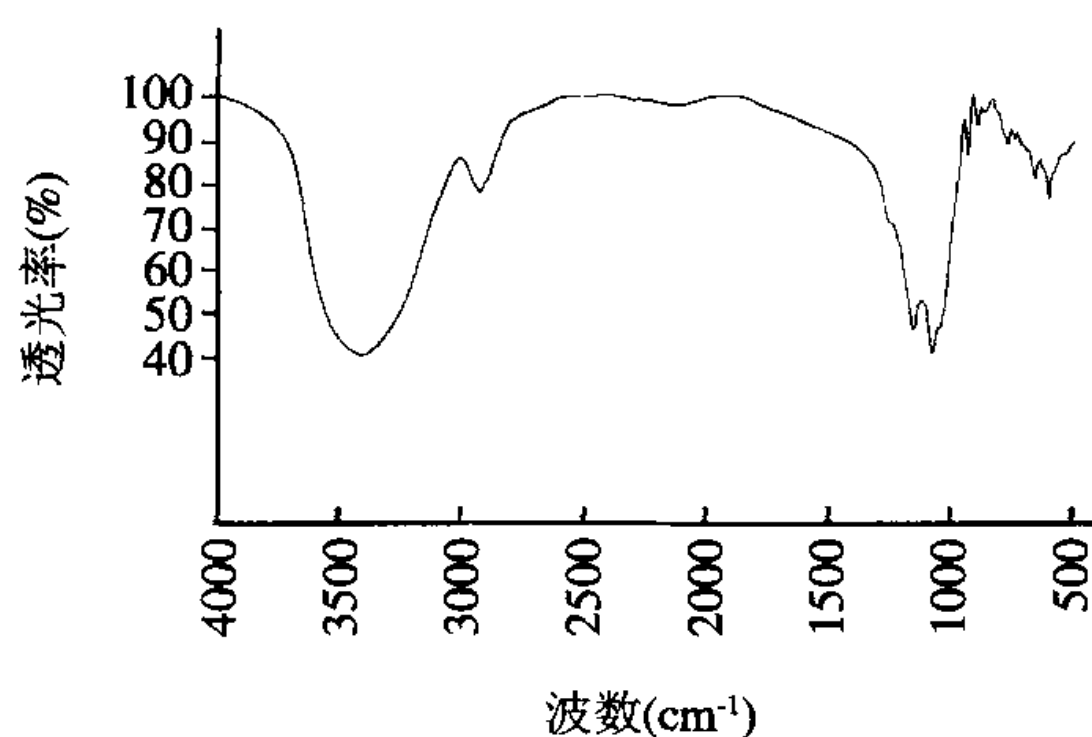


图4 荔枝壳多糖红外光谱图

Fig.4 Infrared spectra of the polysaccharide purified from pericarp tissues of litchi fruit

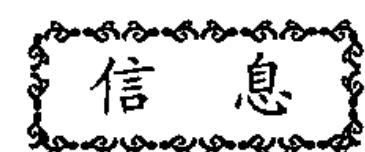
峰, 为己糖环上的羟基特征峰。2931 cm^{-1} 为 C-H 键的伸缩振动峰, 2360 cm^{-1} 为 C-H 键的变角振动峰, 1077 cm^{-1} 和 1154 cm^{-1} 为 C-O 键的伸缩振动峰, 932 cm^{-1} 为非对称环伸缩振动峰, 893 cm^{-1} 为 β -D-甘露糖的特征峰, 771 cm^{-1} 为对称环振动峰, 600 为 O-H 的外平面振动峰^[14,15]。

3 结 论

经阴离子交换树脂和葡聚糖凝胶分离纯化的荔枝壳多糖, 由甘露糖、半乳糖和少量的阿拉伯糖组成, 摩尔百分比为 65.6%:33.0%:1.4%。单糖分子间连接键有 1, 2 键, 1, 3 键和 1, 6 键, 其摩尔百分比为 8.7%:83.3%:8.0%。凝胶渗透色谱测定该多糖分子量为 14000D。

参考文献:

- [1] Chyau C C, Ko P T, Chang C H, et al. Free and glycosidically bound aroma compounds in lychee[J]. Food Chemistry, 2003, 80: 387-392.
- [2] Javier R L, Cesar O F, Pedro W E. Changes in anthocyanin concentration in lychee (litchi chinensis sonn) pericarp during maturation [J]. Food Chemistry, 1999, 65: 195-200.
- [3] Zhaoqi Z, Xuequn P, Zuoliang J. Role of anthocyanin degradation in litchi pericarp browning[J]. Food Chemistry, 2001, 75: 217-221.
- [4] Yueming J. Role of anthocyanins, polypehnol oxidase and phenols in lychee pericarp browning[J]. Journal of Science of Food and Agriculture, 2000, 80: 305-310.
- [5] Lee H S, Wicker L. Anthocyanin pigments in the skin of lychee fruit [J]. Journal of Food Science, 1991, 56: 466-468.
- [6] 何战胜, 李贵荣, 刘传湘. 荔枝壳红色素的提取及稳定性观察[J]. 南华大学学报(医学版), 2002, 30: 269-271.
- [7] 张前军, 陈青, 伍静. 荔枝壳棕色素的提取及稳定性研究[J]. 贵州化工, 2000, (1): 19-21.
- [8] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. Analytic Chemistry, 1956, 28: 350-356.
- [9] Erbing b, Jansson P E, Widmalm G, et al. Structure of the capsular polysaccharide from the Klebsiella K8 reference strain 1015 [J]. Carbohydrate Research, 1995, 273: 197-205.
- [10] Guentas L, Pheulpin P, Michaud P, et al. Structure of a polysaccharide from a rhizobium species containing 2-deoxy- β -D-arabino-hexuronic acid [J]. Carbohydrate Research, 2001, 332: 167-173.
- [11] Golovchenko V V, Ovodova R G, Shashkov A S, et al. Structural studies of the pectic polysaccharide from duckweed *Lemna minor* L.[J]. Phytochemistry, 2002, 60: 89-97.
- [12] Yamamoto Y, Nunome T, Yamauchi R, et al. Structure of an exocellular polysaccharide of *Lactobacillus helveticus* TN-4, a spontaneous mutant strain of *Lactobacillus helveticus* TY1-2[J]. Carbohydrate Research, 1995, 275: 319-332.
- [13] Kumar C G, Joo H S, Choi J W, et al. Purification and characterization of extracellular polysaccharide from haloalkalophilic *Bacillus* sp. I-450 [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2004, 34: 673-681.
- [14] Santhiya D, Subramanian S, Natarajan K A. Surface chemical studies on sphalerite and galena using extracellular polysaccharide isolated from *Bacillus polymyxa*[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2002, 256: 237-248.
- [15] Chiovitti A, Bacic A, Craik D J, et al. Cell-wall polysaccharide from Australian red algae of the family Solieriaceae (Gigartinales, Rhodophyta): novel, highly pyruvated carrageenans from the genus *Callophycus*[J]. Carbohydrate Research, 1997, 299: 229-243.



日本最近研制开发大米鲜度判定仪器

日本从事农业用测量仪器的研究开发、销售等业务的 Ketsuto 科学研究所(东京都大田区), 与日本谷物检定协会共同开发了大米鲜度判定器。

该仪器主要利用判定鲜度的 pH 指示药, 染在大米上, 并通过图象来确认大米的新鲜程度。在任意抽出的 72 粒大米, 每一粒都放在托盘中进行染色, 利用扫描仪读取图像, 图像的表示方法有柱状形及圆形。

近几年, 大米产地标识不规范的现象时有发生, 为了坚决杜绝此类事件的重演, 对大米的新鲜度进行检测是再方便不过的事情了, 因此该研究所自 2003 年 4 月起, 开始开发研究相关仪器, 并取得了突破性的进展。

另外, 日本大米消费正在逐年递减, 消费者对大米的质量、口感及安全性的要求越发的严格起来, 如何确保上述标准, 也是有关行情倍受关注的事情。