

巴戟天多糖亲和柱层析纯化的研究

江 咏, 李 琳, 陈 玲, 张喜梅, 李晓玺
(华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640)

摘 要: 通过静态吸附的方法探讨了巴戟天粗多糖在 Con A Sepharose 4B 亲和填料上静态吸附和脱附情况。结果表明, 吸附过程中的 pH 值和离子强度对平衡吸附量有明显影响, 得到的最佳吸附条件是 pH 7.5, NaCl 浓度 0.1 mol/L; 确定的最佳脱附条件为 pH 6.5, α -D-甲基葡萄糖苷浓度 0.02 mol/L。由 Langmuir 方程对实验数据进行拟合, 得到填料的最大吸附量 q_m 为 9.58 mg/g, 表观解离常数 K_d 为 3.43 mg/g, 巴戟天粗多糖在填料上的吸附速率 K 为 0.144 mg/h。在最佳的吸附和洗脱条件下, 巴戟天粗多糖被分为 MOP-A1 和 MOP-A2 两个组分。

关键词: 巴戟天; 多糖; 亲和层析; 吸附

Study on Affinity Chromatography Purification of *Morinda officinalis* How Polysaccharides

JIANG Yong, LI Lin, CHEN Ling, ZHANG Xi-mei, LI Xiao-xi

(School of Light Chemistry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The isolation of water-soluble polysaccharides (MOP) from *Morinda officinalis* How was discussed in detail with affinity chromatography. The static adsorption experiments of MOP revealed that the optimum conditions for the adsorption are pH 7.0 and NaCl concentration 0.1 mol/L, and optimum conditions for desorption are: pH 6.0 and the concentration of α -D-methylglucoside 0.02 mol/L. After fitting the experiments data with Langmuir equation, several adsorption parameter for

收稿日期: 2006-10-11

基金项目: 广东省科技攻关项目 (2003C104025)

作者简介: 江咏 (1984-), 男, 硕士研究生, 研究方向为多糖物质及其综合利用。

胶性增强, 淀粉糊老化速度加剧 (表 3)。究其原因, 蔗糖分子有多个羟基, 极易溶于水, 当蔗糖溶于淀粉乳中, 相对地减少了淀粉颗粒膨胀糊化所需的水分, 阻遏了淀粉的吸水膨胀, 颗粒膨胀困难, 糊化速度减慢, 表现出糊化温度和黏度均有增高, 随着蔗糖加量的增大, 对淀粉颗粒的膨胀和糊化的抑制作用增强, 糊黏度增大^[8]。

3 结 论

红小豆淀粉颗粒完整, 主要为椭圆卵形, 表面光滑, 粒径为 2.7~4.5 μm , 偏光十字位于颗粒中央, 呈“X”形, 中间有盲区, 具有类似树木年轮的轮纹结构, 脐点位于轮纹圆弧线的中心。

红小豆淀粉起糊温度较低 (为 74.8℃)、冷热稳定性较差、破损值和回升值较大, 表现出淀粉糊稳定性较差、易老化的特性。pH、蔗糖对红小豆淀粉糊的黏度性质有影响, 其中 pH 的影响极为明显, 而蔗糖的影响较小。

参考文献:

- [1] 周显青. 食用豆类加工与利用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002.
- [2] 梁丽雅, 闫师杰. 红小豆的加工利用现状[J]. 粮油加工与食品机械, 2004(3): 68-69.
- [3] 李新贵. 浅谈红小豆的经济药用价值与加工综合利用[J]. 现代化农业, 2005(7): 19.
- [4] LIU W, SHEN Q. Studies on the physicochemical properties of mung bean starch from sour liquid processing and centrifugation[J]. Journal of Food Science, 2006, 65: 1-6.
- [5] 高群玉, 姜欣, 黄立新, 等. 绿豆淀粉糊粘度性质的研究[J]. 中国粮油学报, 1999, 14(5): 22-24.
- [6] CHANG Y H, LIN C L, CHEN J C. Characteristics of mung bean starch isolated by using lactic acid fermentation solution as the steeping liquor[J]. Food Chemistry, 2005, 60: 1-9.
- [7] AGUNBIADE S O, LONGEB O G. The physico-functional characteristics of starches from cowpea (*Vigna unguiculata*), pigeon pea (*Cajanus cajan*) and yam bean (*Sphenostylis stenocarpa*) [J]. Food Chemistry, 1999, 65: 469-474.
- [8] SHIMELIS E A, MEAZA M, RAKSHIT S K. Physicochemical properties pasting behavior and functional characteristics of flours and starches from improved bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties grown in east Africa[J]. Agricultural Engineering International: the CIGR-Ejournal, 2006, 8(5): 1-19.

MOP were obtained as: adsorption capacity q_m 9.58 mg/g, dissociation constant K_d 3.43 mg/g, and adsorption rate K 0.144 mg/h. The dynamics absorption of MOP on Con A Sepharose 4B chromatography column were investigated by breakthrough curve. Two fractions, MOP-A1 and MOP-A2 were obtained under the optimum adsorption and elution conditions.

Key words *Morinda officinalis* How; polysaccharides; affinity chromatography; adsorption

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)12-0095-05

巴戟天(*Morinda officinalis* How), 茜草科 *Rubiaceae* 植物, 其肉质根为中药材巴戟天, 是我国著名的“四大南药”之一。现代研究表明, 巴戟天含有丰富的营养成分, 如 VC、糖分和胶质, 以及人体所需的有机物质, 是值得开发的绿色保健食品^[1]。巴戟天的主要有机成分之一多糖具有多种生物学活性, 但是由于多糖的结构复杂性, 使得人们无法确切地了解哪种基团或哪种高级结构会显著地影响到多糖的某种生物活性, 如果能针对某种活性基团进行专一特异性地吸附, 将会对多糖构效关系的研究起到事半功倍的作用。

亲和层析正是以生物大分子与固定相表面偶联的特异性配基发生亲和作用, 并有选择地吸附溶液中的溶质而进行分离的方法。作为一种高效特异性的分离纯化手段已经在多种蛋白质和核酸的纯化中得到了广泛应用, 但其用于多糖的分离纯化的研究较少^[2-4]。本实验用 Con A Sepharose 4B 亲和填料对巴戟天水溶性多糖组分进行分级纯化, 探讨不同的条件对巴戟天多糖吸附的影响, 研究亲和层析填料吸附巴戟天多糖的热力学和动力学过程, 确定巴戟多糖的亲和柱层析洗脱条件。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与设备

巴戟天(三年生) 广东德庆。

Con A Sepharose 4B 瑞典 Amersham 公司; Tris(进口分装) 上海伯奥生物技术有限公司; 其他化学试剂均为分析纯。

3K3D 型超速冷冻离心机 德国 Sigma 公司; AL-PHA 2-4 型冻干机 德国 Christ 公司。

1.2 方法

1.2.1 巴戟天粗多糖提取工艺

将烘干的巴戟天粉碎过筛, 经乙醚回流脱脂后, 进行热水浸提, 浸提后的混合液经离心和减压浓缩后, 乙醇沉淀得到水溶性多糖粗品, 脱色脱蛋白后, 经过 24h 透析, 再浓缩冻干得到巴戟天的粗多糖, 用于之后的亲和层析实验。

1.2.2 亲和层析纯化巴戟天多糖

首先将 Con A Sepharose 4B 层析填料放在水中充分溶胀, 然后将其用真空泵脱气至少 24 h。湿法装柱。以 pH7.5 的缓冲液(含 0.1 mol/L NaCl, 1 mmol/L Mn^{2+} 和

1 mmol/L Ca^{2+}) 平衡亲和层析柱 4h。缓慢吸去填料上端多余的缓冲液, 缓慢进样, 再用少量缓冲液冲洗柱壁。由于巴戟天多糖在填料上的吸附速度较慢, 因此需要使其在柱上吸附一段时间。然后, 再用 pH6.5 α -D-甲基甘露糖苷浓度为 0.05 mol/L 的缓冲液洗脱。最后洗去仍然吸附在填料上的杂质使填料再生。先用 0.1 mol/L pH6.5 的硼酸缓冲液洗柱, 洗柱体积用两到三倍的柱体积, 然后用 pH4.5 和 8.5 的缓冲液(其中包含 0.5 mol/L 的 NaCl) 交替冲洗三次, 每次至少为两倍柱体积。

1.2.3 巴戟天多糖在 Con A Sepharose 4B 上的静态吸附条件的确定及优化

取处理好的 Con A Sepharose 4B 填料 0.2g, 加入浓度为 0.5 mg/ml 的巴戟天粗多糖溶液 2ml 于塑料离心管中, 设定不同的离子强度和 pH, 恒温振荡 24h 后离心, 用苯酚-硫酸法^[5]在 490nm 处测定上清液的吸光度, 计算出多糖含量。分别考察离子浓度和 pH 值对巴戟天粗多糖在亲和填料上的平衡吸附量的影响规律。按下式计算填料的平衡吸附量。

$$q^* = \frac{(C_0 - C^*)V}{M} \quad (1)$$

式中, q^* 为填料的平衡吸附量 (mg 多糖/g 填料); C_0 为多糖液的初始浓度 (mg/ml); C^* 为吸附平衡上清液的多糖浓度 (mg/ml); V 为多糖溶液体积 (ml); M 为层析填料的质量 (g)。

1.2.4 巴戟天多糖在 Con A Sepharose 4B 上的静态脱附条件的确定及优化

按静态吸附实验确定的最佳吸附条件, 取处理好的 Con A Sepharose 4B 填料 0.2g, 加入 0.5 mg/ml 的巴戟天粗多糖溶液 2ml 于塑料离心管中, 恒温振荡 24h, 然后设定不同的 α -D-甲基甘露糖苷浓度和 pH, 进行脱附实验, 分别考察 α -D-甲基甘露糖苷浓度和 pH 值对巴戟天粗多糖在亲和填料上的脱附量的影响规律。

1.2.5 巴戟天粗多糖浓度对 Con A Sepharose 4B 填料平衡吸附量的影响

按静态吸附实验确定的最佳吸附条件, 分别选取浓度为 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0 和 5.0 mg/ml 的巴戟天多糖溶液, 于 25℃ 下振荡 24h 后离心, 测定上清液多糖含量, 考察巴戟天多糖浓度对填料平衡吸附量

的影响规律。以多糖浓度为横坐标, 填料的平衡吸附量为纵坐标绘制吸附等温线。

1.2.6 巴戟天粗多糖浓度对Con A Sepharose 4B填料上的吸附动力学研究

按静态吸附实验确定的最佳吸附条件, 取一定浓度的巴戟天粗多糖溶液 50ml, 加 5g 填料, 振荡吸附, 分别在 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22 和 24h 时取样测定多糖含量。以填料的吸附量对时间作图得到巴戟天多糖在亲和填料上的吸附动力学曲线。

1.2.7 穿透曲线

将 Con A Sepharose 4B 按前述方法装柱($\Phi 10 \times 200\text{mm}$), 由静态吸附实验确定的条件, 配制 0.5mg/ml 的巴戟天粗多糖溶液, 以 0.2ml/min 的流速进样, 分管收集流出液, 测定各管多糖含量, 至流出液多糖浓度和初始浓度一样, 停止进样, 合并流出液, 测定其中的多糖量, 计算出填料的动态吸附容量。

1.2.8 洗脱曲线

以 pH7.5 的缓冲液(含 0.1mol/L NaCl, 1mmol/L Mn^{2+} 和 1mmol/L Ca^{2+})配制浓度为 0.5mg/ml 的巴戟天粗多糖溶液, 先后用同样的缓冲液和上述脱附实验中确定的洗脱剂进行特异性洗脱, 绘制洗脱曲线。

2 结果与分析

2.1 NaCl 浓度对平衡吸附量的影响

调节巴戟天粗多糖溶液的 pH 为 7.5。通过加入不同浓度的 NaCl 溶液来改变巴戟天粗多糖溶液的离子强度。图 1 为 NaCl 浓度对巴戟天粗多糖在 Con A Sepharose 4B 填料上的平衡吸附量的影响规律。由图可知, 离子强度对巴戟天多糖的吸附量影响很大, 较低的离子浓度有利于多糖的吸附, 在氯化钠浓度小于 0.1mol/L 时, 多糖吸附容量随盐浓度增加而增加; 但是, 当氯化钠浓度大于 0.1mol/L 时, 多糖吸附容量随盐浓度增加而迅速降低。在低的盐浓度下, 增加离子强度可以减小 Con A 和

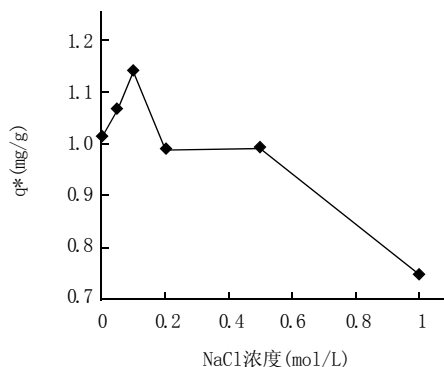


图 1 NaCl 浓度对平衡吸附容量的影响

Fig.1 Effects of NaCl concentrations on adsorption capacity q^*

多糖分子之间的静电斥力, 从而使吸附容量增大; 而在较高的盐浓度下, 提高离子强度可能会由于 Con A 和琼脂糖基质之间的疏水性作用而使 Con A 更强烈地吸附在琼脂糖表面, 从而降低了与多糖有效结合的配基数目。

2.2 pH 值对平衡吸附量的影响

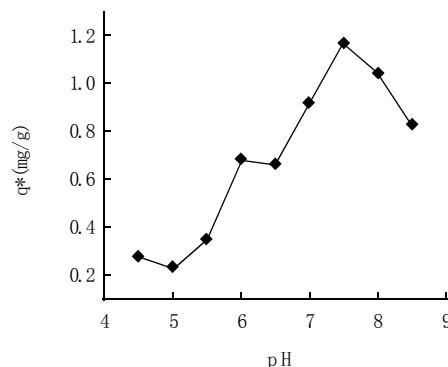


图 2 pH 值对平衡吸附容量的影响

Fig.2 Effects of pH values on adsorption capacity q^*

固定缓冲液 NaCl 浓度 0.1mol/L, 不同 pH 值(pH4.0、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 和 8.5)时填料对多糖平衡吸附量的影响如图 2。由图 2 可知, 缓冲液的 pH 值对巴戟天多糖的吸附也有着显著的影响, 碱性条件下的平衡吸附容量明显高于酸性环境, 在 pH7.5 时达到最大。pH 值是通过改变配基和多糖上带电基团的离子化程度对亲和结合产生影响, 它对吸附的影响有两方面, 首先, 由于多糖物质本身较难电离, 较高的 pH 值有利于多糖的电离, 易于和配基形成阴离子络合物而稳定存在于水溶液中。但是, 另一方面, pH 值也不能过高, 因为 Con A 的等电点为 7.1, 在 pH 值大于其等电点 pI 时, 蛋白质带负电, 使它与多糖之间的静电斥力作用会有所增加, 因此会有一个最佳的吸附 pH 条件^[6]。从以上两部分的讨论, 可以确定巴戟天多糖在 Con A Sepharose 4B 上的最佳吸附条件是: pH7.5, NaCl 浓度 0.1mol/L。

2.3 α -D-甲基葡萄糖苷浓度对脱附率的影响

由于 Con A 和多糖属于特异性结合, 采用一般的方法必然会将非特异性结合在配基上的各种多糖一起洗脱下来, 因此要考虑用特异性置换剂对其进行洗脱。考虑到 Con A 对 α -D-葡萄糖基、 α -D-甘露糖基结构具有特异吸附性, 可以使用 α -D-甲基葡萄糖苷或 α -D-甲基甘露糖苷作为脱附剂。 α -D-甲基葡萄糖苷的加入可以明显地提高巴戟天多糖的脱附率, 当浓度达到 0.02mol/L 时脱附率已经达到了 81.2%, 表明巴戟天多糖和配基的结合作用力较弱。此后继续增大浓度对脱附效果没什么明显影响。因此, 实验选用的洗脱液中 α -D-甲基葡萄糖苷的浓度为 0.02mol/L。

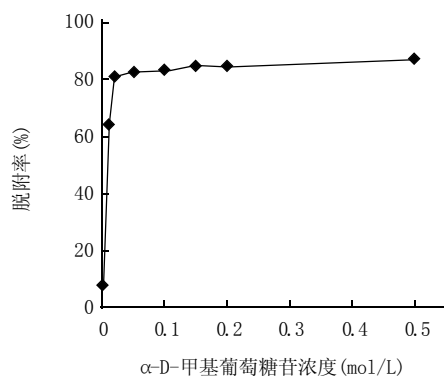


图3 α-D-甲基葡萄糖苷浓度对脱附率的影响

Fig.3 Effects of α-D-methylglucoside concentrations on desorption rate

2.4 pH 值对脱附率的影响

图4 是不同 pH 值的洗脱液中的巴戟天多糖的脱附率。由图4 可以看出, 溶液 pH 对多糖脱附率影响不是很明显。总体来说, 中性偏酸的环境比碱性环境的脱附效果好, pH6.5 时有最好的脱附效果。鉴于此, 本实验选用 pH6.5 α-D-甲基葡萄糖苷浓度为 0.02mol/L 的缓冲液为洗脱剂。

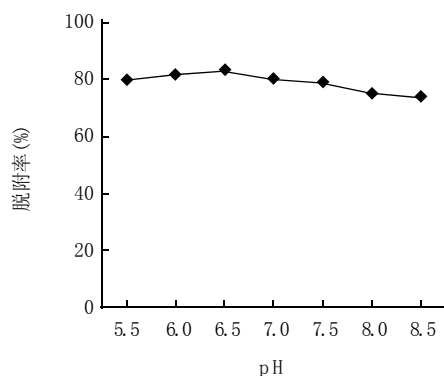


图4 pH 值对脱附率的影响

Fig.4 Effects of pH values on desorption rate

2.5 巴戟天粗多糖浓度对 ConA Sepharose 4B 填料静态吸附的影响

在 25℃ 和最佳静态吸附条件下考察了巴戟天粗多糖浓度对 Con A Sepharose 4B 填料平衡吸附量的影响, 并得出其吸附等温曲线。图5 中虚线是 pH7.5、NaCl 浓度 0.1mol/L 条件下的填料对巴戟天多糖的吸附等温线, 很明显是一条优惠型的吸附等温线, 即等温线的斜率随浓度的增加而减小。Langmuir 方程是根据单分子层均匀吸附的假设提出的一种简单化的吸附模型, 由于多糖的亲合吸附可能是一种多位点吸附的过程, 它的吸附行为可能会不完全满足 Langmuir 方程的假设, 有人提出其它一些吸附模型如 Freundlich 经验方程代替, 但这些新的模型需要拟合的参数多, 不容易收敛, 对初值要求高,

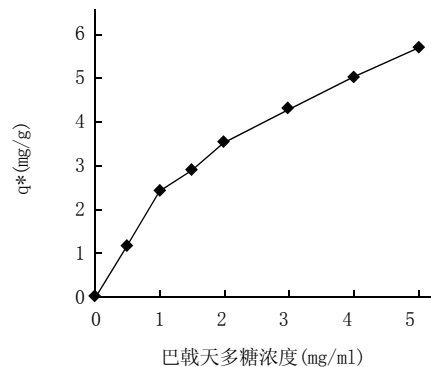


图5 25℃时巴戟天多糖的吸附等温线

Fig.5 Adsorption isotherm of *Morinda officinalis* How polysaccharides at 25℃

在实际拟合中效果并不理想。本研究尝试利用 Langmuir 吸附等温式:

$$q^* = \frac{q_m C}{K_d + C} \quad (2)$$

式中, q^* 为填料的平衡吸附量; q_m 为填料的最大吸附量; C 为吸附质浓度; K_d 为表观解离常数。

对巴戟天粗多糖地亲和吸附行为进行了拟合, 得到: 填料的平衡最大吸附量 $q_m = 9.58 \text{ mg/g}$, 表观解离常数 $K_d = 3.43 \text{ mg/g}$, 相关系数 $R^2 = 0.948$ 。说明 Langmuir 吸附等温式可以很好的拟合实验数据, 巴戟天多糖在 Con A Sepharose 4B 上的吸附等温曲线可描述为:

$$q^* = \frac{9.58C}{3.43 + C}$$

2.6 巴戟天粗多糖浓度对 Con A Sepharose 4B 填料上的吸附动力学研究

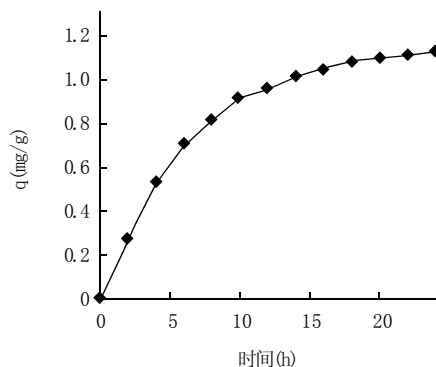


图6 巴戟天多糖的吸附动力学曲线

Fig.6 Adsorption dynamics curve of *Morinda officinalis* How polysaccharides

图6 中虚线是浓度为 0.5mg/ml 的巴戟天粗多糖溶液在最佳吸附条件下的吸附动力学曲线。开始阶段吸附量随着时间增加上升很快, 随着时间延长, 上升趋势逐

渐减慢, 超过 15h 后吸附量基本无明显变化, 吸附达到平衡。根据 Langmuir 吸附速率方程 $-\ln(1 - \frac{q_t}{q^*}) = Kt$ 对实验数据拟合, 得到吸附速率常数 $K = 0.144 \text{ mg/h}$, $R^2 = 0.981$ 。这说明 Langmuir 吸附速率方程与实验数据拟合得很好。在最佳吸附条件下, 巴戟天多糖在亲和填料上的吸附速率方程为:

$$-\ln(1 - \frac{q_t}{q^*}) = 0.144t$$

2.7 穿透曲线

以 0.5 mg/ml 的巴戟天粗多糖溶液连续流过层析柱, 流速 0.2 ml/min , 按 2 ml/管 分部收集, 绘制流出液多糖浓度随时间变化的穿透曲线 (如图 7 所示)。该穿透曲线基本呈 “S” 状。由该穿透曲线也可以看出, 巴戟天

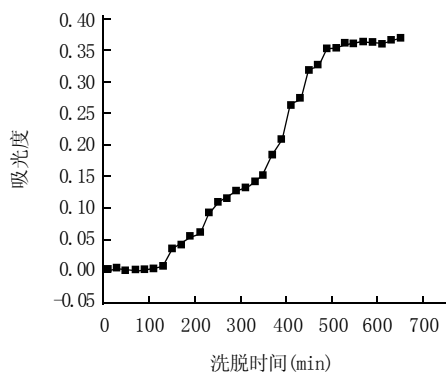


图7 巴戟天多糖在 Con A Sepharose 4B 柱上的穿透曲线

Fig.7 Breakthrough curve of *Morinda officinalis* How polysaccharides on Con A Sepharose 4B column

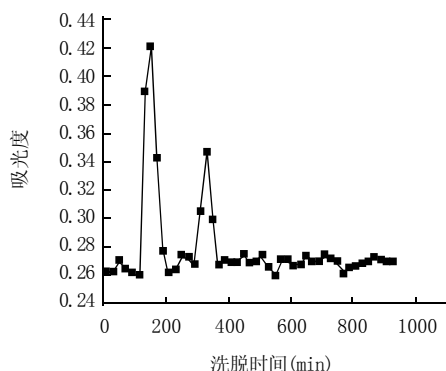


图8 巴戟天粗多糖在 Con A Sepharose 4B 柱上的洗脱曲线

Fig.8 Elution curve of *Morinda officinalis* How polysaccharides on Con A Sepharose 4B column

多糖在亲和填料上达到吸附平衡的时间较长。

2.8 洗脱曲线

根据前面的吸附和脱附实验确定的条件, 以 $\text{pH} 7.5$ 0.1 mol/L NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液进样, 由于巴戟天多糖在填料上的吸附速度较慢, 因此, 需要使其在柱上吸附一段时间, 然后再用 $\text{pH} 6.5$ $\alpha\text{-D-}$ 甲基甘露糖苷浓度为 0.05 mol/L 的缓冲液洗脱, 得到的洗脱曲线如图 8 所示。经亲和柱层析后获得两个巴戟天多糖组分, 分别称为 MOP-A1 和 MOP-A2。经过透析、浓缩、冻干后, 两组分的量分别为 17.6 mg 和 4.8 mg , 占进样总糖量 (50 mg) 的 44.8% , 对其有待进一步的结构鉴定。

3 结论

3.1 静态吸附实验得到巴戟天多糖的最佳吸附条件是 $\text{pH} 7.5$, NaCl 浓度 0.1 mol/L ; 确定的最佳脱附条件为: $\text{pH} 6.5$, $\alpha\text{-D-}$ 甲基葡萄糖苷浓度 0.02 mol/L 。

3.2 通过吸附等温线和吸附动力学曲线考察了巴戟天多糖在 Con A Sepharose 4B 上吸附的热力学和动力学过程, 由 Langmuir 方程得出填料的最高吸附量 q_m 为 9.58 mg/g 、表观解离常数 K_d 为 3.43 mg/g 、巴戟天多糖在填料上的吸附速率常数 K 为 0.144 mg/h 。

3.3 通过穿透曲线考察了巴戟天多糖的动态吸附情况。在最佳的吸附和洗脱条件下, 巴戟天粗多糖被分为 MOP-A1 和 MOP-A2 两个组分, 两组分的量分别为 17.6 mg 和 4.8 mg , 占进样总糖量 (50 mg) 的 44.8% 。

参考文献:

- [1] 王卫平. 巴戟天化学成分和药理作用研究概况[J]. 时珍国医国药, 2000, 11(7): 37-39.
- [2] SUN R C, JONES G L, TOMKINSON J, et al. Fractional isolation and partial characterization of non-starch polysaccharides and lignin from sagopith[J]. Industrial Crops and Products, 1999, 19: 211-220.
- [3] ENDO T. Fractionation of glycoprotein-derived oligosaccharides by affinity chromatography using immobilized lectin columns[J]. Journal of Chromatography, 1996, 790: 251-261.
- [4] FRANCO FRAGUAS L, PLA A, FERREIRA F, et al. Preparative purification of soybean agglutinin by affinity chromatography and its immobilization for polysaccharide isolation[J]. Journal of Chromatography, 2003, 790: 365-372.
- [5] 张惟杰. 糖复合生化研究技术[M]. 2版. 杭州: 浙江大学出版社, 2003: 7-15.
- [6] LEE W C, LEE K H. Application of affinity chromatography in proteomics[J]. Analytical Biochemistry, 2004, 324: 1-10.