

苦瓜自交系多糖结构组成的比较分析

张 德¹, 向长萍^{1,*}, 李俊丽², 孔令伟³

(¹华中农业大学园艺林学学院, 国家蔬菜改良中心华中分中心, 园艺植物生物学教育部重点实验室, 武汉 430070;

²武汉理工大学化学工程学院, 武汉 430070; ³南昌大学, 食品科学与技术国家重点实验室, 南昌 330047)

摘 要: 对苦瓜 3 个自交系果实中的多糖结构和组成进行了比较研究。采用热水浸提乙醇沉淀法得到苦瓜粗多糖, 进一步经过脱蛋白、透析等纯化工艺得到苦瓜多糖, 应用气相色谱法测定其多糖组成, 红外光谱法测定其糖苷键类型。研究结果表明: 在同一生长环境下, 3 个苦瓜自交系多糖在其含量、单糖组成以及结构上均存在差异; 苦瓜水溶性多糖主要由阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖组成, 此外 3 号和 8 号自交系还含有少量的鼠李糖和木糖; 构型分析表明苦瓜多糖主要以 α 型和 β 型吡喃糖形式存在。

关键词: 苦瓜; 苦瓜多糖; 单糖组成; 红外光谱; 气相色谱

中图分类号: S 642.5

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2010) 07-1169-06

Comparative Analysis of Polysaccharides Structure and Composition in Bitter Melon Inbred Lines

ZHANG De¹, XIANG Chang-ping^{1,*}, LI Jun-li², and KONG Ling-wei³

(¹College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agriculture University, Huazhong Branch of National Vegetable Improvement Center, the Ministry of Education Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Wuhan 430070, China; ²Department of Chemical Engineering, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070, China; ³State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: The polysaccharides structure and composition of fruit in three bitter melon inbred lines were compared in the paper. The crude polysaccharides were extracted in hot water and precipitated with alcohol. Then, the polysaccharides were purified by the processes of protein removing and dialysis. The polysaccharides composition and the types of its glycosidic bond were determined by gas chromatography and infrared spectroscopy respectively. The results showed that in the same growing environment, there are significant differences in the polysaccharide content, monosaccharide composition and the structure among different bitter melon inbred lines. The water-soluble polysaccharide of bitter melon is mainly composed of arabinose, mannose, glucose and galactose, with the exception that inbred lines of No.3 and No.8 contain small amount of rhamnose and xylose. In addition, configuration analysis showed the polysaccharides mainly exist in the forms of α - and β -pyranose in bitter melon.

Key words: bitter melon; bitter melon polysaccharide; monosaccharide composition; infrared spectroscopy; gas chromatography

收稿日期: 2010-01-25; 修回日期: 2010-03-24

基金项目: 教育部重点资助项目 (104134)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: chpxiang@mail.hzau.edu.cn)

苦瓜 (*Momordica charantia*) 是葫芦科苦瓜属植物, 在世界很多国家和地区都有入药记载, 有“药用蔬菜”之称。它的全株, 特别是种子和果实有很强的生理活性, 具有消暑解热、明目解毒的作用, 并且还有抗癌、降血糖、治疗糖尿病等功效 (Ishikawa, 1985)。

苦瓜多糖 (*Momordica charantia* polysaccharide, 简称 MCP) 是苦瓜主要有效成分之一 (吴笛笛和陈红漫, 2006), 目前对其研究甚少。

作者以苦瓜商品瓜为原料, 在同一生长环境下, 探究水溶性多糖在不同自交系之间, 其含量和单糖组成上的差异, 以期对苦瓜多糖的构效分析和苦瓜品质育种提供试验依据和理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料及其水溶性多糖的提取、分离和纯化

由华中农业大学苦瓜课题组提供的经多代自交纯化的 3 个苦瓜优良自交系 (表 1), 于 2008 年 4 月初定植于国家蔬菜改良中心华中分中心试验基地钢架大棚内。

商品苦瓜清洗 去籽去瓢 切片 自然晒干 粉碎 过筛 (40 目) 得苦瓜干粉备用。

分别称取苦瓜 3 个品系干粉各 150 g, 依次用乙醇、乙酸乙酯回流脱脂各 3 h, 将残渣风干, 用热水浸提乙醇沉淀方法提取苦瓜粗多糖。

提取条件为: 料: 水 = 1: 30, 提取温度为 80℃, 提取时间为 4 h, 连续提取两次, 合并提取液, 减压浓缩并用 95% 乙醇沉淀, 在 4℃ 冰箱中放置过夜, 离心 ($8\,500\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 收集沉淀, 得苦瓜粗多糖 (董英等, 2005; 李俊丽, 2006; Rioux et al., 2007)。

苦瓜粗多糖用蒸馏水溶解后, 用 Sevage 试剂去除蛋白, 按多糖溶液: 三氯甲烷: 正丁醇 = 15: 4: 1 的比例混匀, 振荡 20 min, 冷冻高速离心机离心 15 min, 转速为 $8\,500\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 重复多次, 直到无蛋白质沉淀出现为止。然后用蒸馏水透析 24 h, 减压浓缩, 95% 乙醇沉淀, 得多糖样品 (李俊丽, 2006)。

1.2 苦瓜多糖结构组成分析

碘—碘化钾反应: 配制多糖溶液 $1\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 逐滴加入碘—碘化钾溶液, 观察颜色变化。

紫外扫描分析: 配制多糖溶液 $1\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 在紫外区 (190~360 nm) 范围内扫描。观察在 200 nm 处是否存在多糖特征吸收峰, 在 260 nm 和 280 nm 是否出现核酸和蛋白质特征吸收峰。

红外光谱分析: 称取各苦瓜品系多糖 1 mg, 制溴化钾 (KBr) 压片。在 $400 \sim 4\,000\text{ cm}^{-1}$ 波数范围内进行红外扫描 (李俊丽, 2006)。

气相色谱分析: 分别称取苦瓜试材多糖各 10 mg, 经 $2\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸 120℃ 封管水解 3 h, 用旋转蒸发仪 40℃ 减压蒸干除去三氟乙酸, 加 2 mL 甲醇, 蒸干, 重复 3~5 次, 以完全除去三氟乙酸, 得混合单糖糖样, 再依次加入 10 mg 盐酸羟胺、5 mg 内标物肌醇六乙酯、0.5 mL 吡啶, 放入 90℃ 水浴中加热反应 30 min, 并振荡, 取出后冷却至室温, 加入 0.5 mL 醋酸酐, 在 90℃ 继续反应 30 min, 进行乙酰化, 反应产物进行气相色谱分析 (王运强, 2009)。

色谱分析条件: Agilent HP6890N 气相色谱仪, FID 检测器, HP-5 色谱柱 ($30\text{ m} \times 0.53\text{ mm}$), 气化温度 250℃, 检测温度 270℃, 柱温起始 140℃ 停留 3 min, 升温程序为 $7\text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, 上升至 240℃, 停留 10 min。H₂ 流速 $30\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 空气流速 $200\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, N₂ 流速 $20\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ (康学军和曲见松, 2006; 张剑韵等, 2007)。

2 结果与分析

2.1 苦瓜 3 个品系表观性状及多糖提取率比较

从表 1 可以看出，3 个苦瓜品系在瓜色、瓜形上差异明显；在瓜的硬度和可溶性固形物含量上，3 号品系硬度最高，而可溶性固形物含量最低，8 号品系硬度最低而可溶性固形物含量最高。

已有研究表明：果实硬度和细胞壁多糖的含量及其单糖组成变化密切相关，尤其是和果实细胞壁阿拉伯糖含量、半乳糖含量和 β - 葡聚糖含量直接相关（金昌海和水野雅史，2006）。

从表 2 还可看出，在维生素 C 含量和多糖提取率上，5 号最高，8 号最低。

表 1 苦瓜 3 个自交系品质性状的差异
Table 1 Quality Characteristics of *Momordica charantia* L.between three cultivars

| 自交系代号 Lines | 瓜色 Fruit color | 瓜形 Fruit shape | 硬度/ (kg · cm ⁻²) Hardness | 可溶性固形物/% Content of soluble solids | 维生素 C/ (mg · kg ⁻¹) Vitamin C | 多糖提取率/% Extraction rate of polysaccharides |
|----------------|--------------------|--|---|--|---|--|
| 3 | 墨绿 Dark green | 短纺锤，刺瘤 Short spindle in shape , sting tumour | 15.92 | 4.63 | 869.7 | 5.2 |
| 5 | 白色 White | 长棒形，大直瘤 Long cylindrical in shape , big straight tumour | 13.61 | 4.87 | 920.9 | 5.5 |
| 8 | 浅绿色 Light green | 长棒形，粒条相间 Long cylindrical in shape | 12.03 | 5.25 | 632.0 | 4.7 |

2.2 碘—碘化钾反应

碘—碘化钾反应中，多糖水溶液无蓝色和紫红色出现，说明溶液中不含有直链淀粉和支链淀粉。

2.3 紫外扫描分析

紫外扫描在波长 200 nm 左右有多糖特征吸收峰，在 260 和 280 nm 无特征吸收峰出现，说明该多糖样中不含有核酸且已完全脱蛋白。

2.4 红外光谱分析

3 个苦瓜品系多糖的红外光谱图如图 1。

3 号在波数 3 434 cm⁻¹ 的吸收峰和 5 号、8 号在 3 418 cm⁻¹ 的吸收峰都为多糖分子间或分子内羟基 O-H 的伸缩振动吸收峰；3 个自交系在 2 940 ~ 2 920 cm⁻¹ 的吸收峰为 C-H 的伸缩振动吸收峰；3 个自交系在 1 750 cm⁻¹ 处都存在 C=O 的伸缩振动吸收峰；1 620 cm⁻¹ 附近为结晶水的吸收峰和酰氨基 C=O 的伸缩振动；1 400 ~ 1 200 cm⁻¹ 为 C-H 的变形振动；1 200 ~ 1 010 cm⁻¹ 为吡喃环的醚键 C-O-C 和羟基的吸收峰；3 个自交系在 900 ~ 890 cm⁻¹ 和 850 ~ 840 cm⁻¹ 处都出现一吸收峰，表明苦瓜多糖主要以 α 型和 β 型的吡喃糖形式存在。

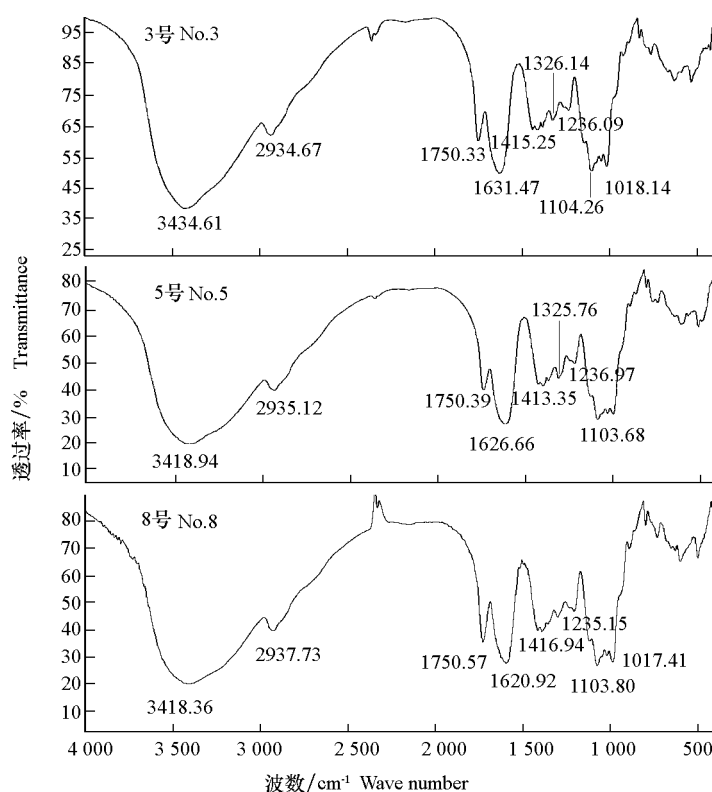


图1 苦瓜自交系多糖3号、5号和8号红外光谱图

Fig.1 Infrared spectra of polysaccharide of three inbred lines No.3, No.5 and No.8

2.5 水溶性多糖单糖组成分析

由气相色谱图(图2)可以看出,各单糖在本气相色谱条件下,分离效果良好。

通过对比不同自交系苦瓜多糖的气相色谱与混合单糖标准气相色谱图的相对保留时间和峰面积,可以确定不同自交系苦瓜多糖的单糖组成(表2)。

不同品系多糖在单糖组成上存在差异(表2)。苦瓜水溶性多糖主要由阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖4种单糖组成,在单糖含量上,它们的摩尔百分比分别在8.29%~10.38%、5.46%~12.57%、19.34%~23.50%和54.64%~55.25%之间,摩尔百分比的分布范围除甘露糖之外,其它3种单糖都很窄。在3个自交系中,半乳糖含量是最多的,其他单糖含量5号和8号自交系是一致的,依次为葡萄糖、甘露糖、阿拉伯糖,3号自交系含量依次为葡萄糖、阿拉伯糖和甘露糖。在单糖组成中3号和8号自交系还含有少量的鼠李糖和木糖,5号自交系多糖是由阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖4种单糖组成的。

表2 苦瓜3个自交系单糖摩尔百分比

Table 2 Molar ratio of monosaccharide composition between three cultivars

/%

| 自交系代号 Lines | 鼠李糖 Rha | 阿拉伯糖 Ara | 木糖 Xyl | 甘露糖 Man | 葡萄糖 Glu | 半乳糖 Gal |
|----------------|------------|-------------|-----------|------------|------------|------------|
| 3 | 2.73 | 9.84 | 3.83 | 5.46 | 23.50 | 54.64 |
| 5 | — | 10.38 | — | 12.57 | 22.40 | 54.64 |
| 8 | 2.21 | 8.29 | 3.31 | 11.60 | 19.34 | 55.25 |

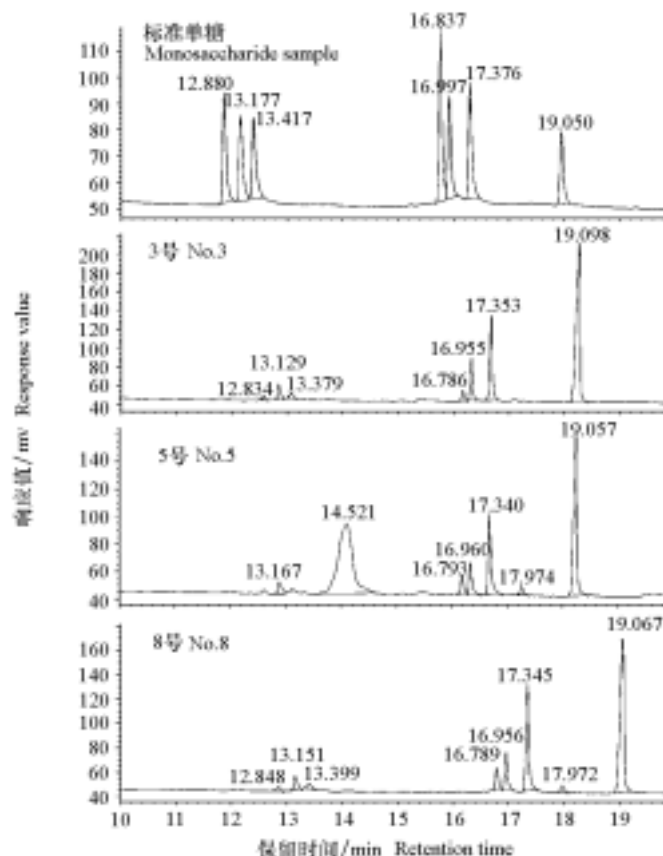


图 2 苦瓜自交系多糖气相色谱图

Fig. 2 Gas chromatograms of bitter melon inbred lines

3 讨论

多糖结构的研究一直是多糖领域研究的热点、难点,目前提取纯化技术已经成熟。已有研究表明,同一原料,用水、酸、碱提取得到的多糖成分是不尽相同的(董英等,2005)。本研究中用水提法主要提取的是果胶物质,它主要存在于植物初生细胞壁和细胞之间的中间层内,是细胞壁的基质多糖。从结构角度上看,果胶物质包括两种酸性多糖(聚半乳糖醛酸、聚鼠李半乳糖醛酸)和3种中性多糖:阿拉伯聚糖、半乳聚糖和阿拉伯半乳聚糖。植物多糖随着植物的来源、组织发育阶段的不同,其侧链中残基数、种类、链接方式以及其他取代基存在的情况都有相当大的变化(Wu et al., 2009)。即使在同一环境作用,植物果实在其硬度、蛋白质含量和多糖含量上也都存在差异(Sophie et al., 2009)。

目前,在大麦多糖的研究中已证实遗传因素是引起 β -葡聚糖含量变异的主要原因(Athina et al., 2008)。有研究表明: β -葡聚糖含量受加性—显性遗传系统控制,低含量为显性(张国平和丁守仁,1998;Liisa et al., 2008)。本试验证明在同一生长环境下,苦瓜不同自交系水溶性多糖在其单糖组成和含量上具有明显差异,其中5号自交系多糖中不含鼠李糖和木糖,且多糖提取率最高;但是在多糖糖苷键类型上,3个自交系并无大的差异,主要以 α 型和 β 型的吡喃糖存在。提取同多糖始终是多糖结构研究的突破口和切入点,其中5号自交系仅具有4种单糖,这为苦瓜多糖结构的进一步深入研究提供了可能。研究苦瓜多糖的单糖组成和含量差异为苦瓜品质育种提供理论参考。

References

- Athina Lazaridou , Tricia Chornick , Costas G Biliaderis , Marta S Izydorczyk. 2008. Composition and molecular structure of polysaccharides released from barley endosperm cell walls by sequential extraction with water , malt enzymes , and alkali. *Cereal Science* , 48 : 304 – 318.
- Dong Ying , Xu Bin, Lu Qi. 2005. Studies on the isolation , purification and composition of *Momordica charantia* L. polysaccharide. *Foods Science* , 26 (11) : 115 – 119. (in Chinese)
- 董 英 , 徐 斌 , 陆 琪. 2005. 水提苦瓜多糖的分离纯化及组成性质研究. *食品科学* , 26 (11) : 115 – 119.
- Ishikawa T. 1985. Steam volatile constituents from seed oils of *Momordica charantia*. *Nihon Daigoku Kogakubu Kiyo Bunrui A* , (26) : 165.
- Jin Chang-hai , Mizuno Masashi. 2006. Degradation of cell wall polysaccharides during postharvest fruit ripening and softening of different apple varieties. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology* , 32 (6) : 617 – 626. (in Chinese)
- 金昌海 , 水野雅史. 2006. 不同品种苹果采后熟软化过程中细胞壁多糖的降解. *植物生理与分子生物学学报* , 32 (6) : 617 – 626.
- Kang Xue-jun , Qu Jian-song. 2006. Analysis of angelica dahurica polysaccharide by gas chromatography. *Chin J Pharm Anal* , 26 (7) : 891 – 894. (in Chinese)
- 康学军 , 曲见松. 2006. 白芷多糖中单糖组成的气相色谱分析. *药物分析杂志* , 26 (7) : 891 – 894.
- Li Jun-li. 2006. Studies on genetic and polysaccharide diversity in cucurbita germplasm resources [Ph. D. Dissertation]. Wuhan : Huazhong Agricultural University : 95 – 110. (in Chinese)
- 李俊丽. 2006. 南瓜种质资源遗传多样性与多糖多样性的研究 [博士论文]. 武汉 : 华中农业大学 : 95 – 110.
- Liisa Johansson , Mikko Karesoja , Paivi Ekholm. 2008. Comparison of the solution properties of (1 → 3) , (1 → 4) - β -D-gucans extracted from oats and barley. *Science Direct* , 41 : 180 – 184.
- Rioux L E , Turgeon S L , Beaulieu M. 2007. Characterization of polysaccharides extracted from brown seaweeds. *Carbohydrate Polymers* , 69 : 530 – 537.
- Sophie Aboughe Angone , Muriel Bardor , Eric Nguema-Ona. 2009. Structural characterization of cell wall polysaccharides from two plant species endemic to central Africa , *Fleurya aestuans* and *Phragmenthera capitata*. *Carbohydrate Polymers* , 75 : 104 – 109.
- Wang Yun-qiang. 2009. Studys on structure characterization and bioactivities of water soluble polysaccharide of pumpkin [M. D. Dissertation]. Wuhan : Huazhong Agricultural University : 40 – 41.
- 王运强. 2009. 南瓜水溶性多糖的结构表征及生物活性的研究 [硕士学位论文]. 武汉 : 华中农业大学 : 40 – 41. (in Chinese)
- Wu Jia-di , Chen Hong-man. 2006. Study on separation , purification and biological activity for soluble polysaccharide from momordica charantia. *Food Science* , 27 (3) : 82 – 86. (in Chinese)
- 吴笏笛 , 陈红漫. 2006. 水溶性苦瓜多糖的分离纯化及生物学活性的研究. *食品科学* , 27 (3) : 82 – 86.
- Wu Y , Cui W , EsKin N A M. 2009. Fractionation and partial characterization of non-pectic polysaccharides from yellow mustard mucilage. *Food Hydrocolloids* , 23 : 1535 – 1541.
- Zhang Jian-Yun , Bao Li-Jun. Liang Jin. 2007. Infrared spectrum and gas chromatogram analysis of the polysaccharides separation from mulberry leaves. *Science of Sericulture* , 33 (4) : 549 – 552. (in Chinese)
- 张剑韵 , 包立军 , 梁 进. 2007. 桑叶多糖的分离及红外光谱和气相色谱分析. *蚕业科学* , 33 (4) : 549 – 552.
- Zhang Guo-ping , Ding Shou-ren. 1998. Environmental and genotypic variations of β -glucan content and their genetic modification. *Barley Science* , (3) : 4 – 9. (in Chinese)
- 张国平 , 丁守仁. 1998. 大麦 β -葡聚糖含量的环境和基因型变异及其遗传改良. *大麦科学* , (3) : 4 – 9.