

doi:10.12301/spxb202200901

文章编号:2095-6002(2023)06-0065-10

引用格式:孔志强,赵玉红.沙棘降解多糖结构表征和功能特性研究[J].食品科学技术学报,2023,41(6):65-74.



KONG Zhiqiang, ZHAO Yuhong. Structural characterization and functional properties of sea buckthorn degraded polysaccharides[J]. Journal of Food Science and Technology, 2023,41(6):65-74.

沙棘降解多糖结构表征和功能特性研究

孔志强¹, 赵玉红^{1,2,*}

(1. 东北林业大学 生命科学院, 黑龙江 哈尔滨 150040;

2. 黑龙江省森林食品资源利用重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要:为评价 H_2O_2 降解对沙棘多糖(sea buckthorn polysaccharides, SBP)结构和性质的影响,采用 H_2O_2 联合 Fe^{2+} 法降解 SBP,研究沙棘降解多糖(sea buckthorn degraded polysaccharides, SBDP)的分子质量、单糖组成、粒径、结构特征和抗氧化能力。结果表明,SBDP 分子质量(2.902×10^4 Da)显著低于 SBP(3.016×10^5 Da)。离子色谱分析表明,SBDP 和 SBP 均由相同的单糖(岩藻糖、鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖和半乳糖醛酸)以不同的物质的量比组成。红外光谱及核磁共振波谱证实,SBDP 和 SBP 具有相似的结构特征。与 SBP 相比,SBDP 溶解度提高 20.72%,具有更好的吸湿性和保湿性,表观黏度($5.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)更低,具有剪切稀化行为。与 SBP 相比,SBDP 表现出较高的抗氧化活性,DPPH·、ABTS·及羟基自由基清除率分别为 $89.44\% \pm 0.12\%$ 、 $96.09\% \pm 0.22\%$ 和 $73.25\% \pm 1.16\%$ 。 H_2O_2 联合 Fe^{2+} 处理显著降低了 SBP 分子质量,增强了 SBP 的功能特性和抗氧化活性,研究旨在为拓展 SBP 在食品领域的应用提供理论参考。

关键词:沙棘多糖;降解;结构表征;流变特征;抗氧化活性**中图分类号:** TS214.2**文献标志码:** A

植物多糖具有抗衰老^[1]、抗炎^[2]、降血糖^[3]、降血脂^[4]和抗氧化^[5]等生理功能,其生物活性受到其分子质量和结构特征(单糖组成、异构碳构型、糖单元顺序、聚合度和分支特性)等影响^[6-9]。研究表明,高分子质量多糖不容易穿透生物体的细胞膜屏障,从而导致生物学效应减弱^[7,10]。通过降解处理降低多糖分子质量,为提高其生物利用率提供了可行的方法^[11]。

多糖降解方法有物理、化学和生物降解^[9]。物理降解高效且环保,但需要专门的设备^[12]。生物降解反应温和,但需要基于复杂多糖结构对酶和微生物进行筛选^[11]。化学降解包括酸降解、碱降解和 H_2O_2 降

解^[13]。 H_2O_2 降解因其条件温和且绿色环保而被广泛应用^[14]。 H_2O_2 主要是通过 Fenton 反应生成羟基活性自由基与氢原子,导致多糖解聚^[15]。使用单一 H_2O_2 降解多糖通常不会导致分子质量显著降低,必须激活 H_2O_2 以增加其解聚能力^[16]。 Fe^{2+} 是一种还原剂,对 H_2O_2 促进多糖的降解有很强的催化能力^[17]。与天然多糖相比,经 H_2O_2 联合 Fe^{2+} (H_2O_2 - Fe^{2+})降解得到的多糖具有更好的生物活性^[11,18]。因此,基于 H_2O_2 - Fe^{2+} 体系的 Fenton 降解是提高多糖生物活性的一种有效方法^[8]。

沙棘(*Hippophae rhamnoides* L.),胡颓子科沙棘属,是广泛种植于亚欧大陆的一种多刺落叶灌木植

收稿日期:2022-09-22

基金项目:黑龙江省应用技术与开发计划项目(GA19C106)

Foundation: Heilongjiang Province Applied Technology Research and Development Project (GA19C106).

第一作者:孔志强,男,硕士研究生,研究方向为天然产物化学。

*通信作者:赵玉红,女,副教授,博士,主要从事天然产物化学方面的研究。

物^[19],富含维生素、多酚、不饱和脂肪酸和多糖等多种生物活性物质^[20]。沙棘多糖(sea buckthorn polysaccharides, SBP)具有降血糖^[21]、抗氧化^[22]和缓解肝损伤^[10]等药理活性,但其分子质量较高,水溶性较差,影响其生物活性的发挥与应用^[23]。有研究证明高分子质量多糖经降解处理后其生物活性可显著提高^[24]。目前,有关沙棘多糖降解及其理化功能特性方面的研究鲜见报道。

本研究拟采用 $\text{H}_2\text{O}_2\text{-Fe}^{2+}$ 法对 SBP 进行降解,研究沙棘降解多糖(sea buckthorn degraded polysaccharides, SBDP)的结构、功能特性及抗氧化活性,旨在为拓展 SBPD 在食品领域的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

沙棘果渣,黑龙江省黑河市孙吴县长乐山地大果沙棘开发有限公司,经粉碎、过筛(60 目)、脱脂、干燥,得到沙棘果渣粉,备用。DPPH、ABTS,上海远业生物科技有限公司;单糖标准品和葡聚糖标准品(分子质量为 5.000×10^3 、 1.160×10^4 、 2.380×10^4 、 4.860×10^4 、 8.090×10^4 、 1.480×10^5 、 2.730×10^5 、 4.098×10^5 、 6.678×10^5 Da),扬州博睿糖生物科技有限公司;其他化学品均为分析纯。

1.2 仪器与设备

EPOCH12 型酶标仪,美国伯腾仪器有限公司;LC-10A 型高效液相色谱仪,日本岛津公司;RI-10A 型示差检测器,日本岛津公司;ICS5000 型离子色谱仪,美国马萨诸塞州沃尔瑟姆赛默飞世尔科技公司;FD5-2.5E 型冷冻干燥机,北京金西盟仪器有限公司;AR2000ex 型动态旋转流变仪,美国 TA 公司;FTIR-650 型傅里叶变换红外光谱仪,天津港东科技发展股份有限公司;Zeta plus 型激光粒度分析仪,美国布鲁克海文仪器有限公司;AVANCE III HD 500MHz 型核磁共振波谱仪,瑞士布鲁克公司。

1.3 实验方法

1.3.1 SBP 的制备

参照裴晋红等^[25]的方法进行多糖提取。准确称量沙棘果渣粉,按料液比 1:30(g/mL)[m (沙棘果渣粉): V (提取液) = 1 g:30 mL]加入蒸馏水,90℃ 提取 2 h,4 000 r/min 离心 15 min,收集上清液,重复 2 次,合并提取液。提取液浓缩后用 Sevage 法除蛋白 9 次,醇沉静置 48 h,抽滤、取沉

淀,分别用丙酮和无水乙醇洗 2 次,冻干后得到沙棘粗多糖。

1.3.2 SBDP 的制备

参照 Zhang 等^[11]的方法并加以修改。分别将 12.5 mL H_2O_2 (1.0 mol/L)、12.5 mL FeSO_4 (1.0 mol/L) 加到 100 mL 的 SBP 溶液(质量浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)中,25℃ 搅拌 2 h。多糖溶液经 72 h 透析(截留分子质量 3 500 Da)后,真空浓缩、冻干,得到 SBDP。

1.3.3 多糖分离纯化

参照李顺峰等^[26]的方法,采用 DEAE-52 纤维素色谱柱对 SBP 和 SBDP 进行分离纯化,自动采集器收集(流速为 1 mL/min,每管收集 10 mL)并测定各组分多糖的回收率。

1.3.4 多糖分子质量及单糖组成测定

参照张嘉园^[27]的方法并加以修改。采用高效液相色谱法测定 SBP 和 SBDP 的分子质量。参照 Wang 等^[28]方法处理样品,采用离子色谱法分析 SBP 和 SBDP 的单糖组成。

1.3.5 多糖溶解度、粒径和 pH 值的测定

样品用质量浓度为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的多糖溶液制备,室温下用 pH 计测定其 pH 值。将 10 mg 多糖样品溶于 10 mL 去离子水中,离心后得上清液,用激光粒度仪对样品进行粒径评价。测定温度为 25℃ (折射率为 1.543,散射角为 90°)。参照 Chen 等^[29]的方法测定 SBP 和 SBDP 的水溶性。

1.3.6 多糖化学键分析

参照齐奇等^[30]的方法,将干燥的多糖样品和溴化钾(光谱级)按质量比 1:100 混合研磨成粉末,然后压成薄片,用傅里叶变换红外光谱仪进行扫描。扫描范围为 $400 \sim 4\,000 \text{ cm}^{-1}$,以 4 cm^{-1} 的分辨率扫描 16 次。

1.3.7 多糖结构测定

参照 Ma 等^[24]的方法并加以修改。将多糖(15 mg)室温下溶解在 D_2O (0.5 mL)中,并转移到核磁管中,使用 AVANCE III HD 500 MHz 核磁共振波谱仪获得 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 谱图。

1.3.8 多糖流变特性测定

通过流变仪在 $(25.0 \pm 0.1)^\circ\text{C}$ 下,将多糖溶液与平板($d=40 \text{ mm}$)结合。在 $0.1 \sim 100.0 \text{ s}^{-1}$ 的剪切速率内测试多糖溶液的表观黏度,在 1% 的恒定应变和 $1 \sim 100 \text{ rad/s}$ 的角频率下测量其储能模量(G')和损耗模量(G'')。

1.3.9 多糖吸湿性和保湿性测定

参照 Li 等^[31]的方法。取一定量的多糖样品置于 105 ℃ 中烘至恒重,精密称取 50 mg,放入相对湿度 81% (饱和硫酸铵溶液) 的干燥器中。多糖样品在室温下每 1 h 称重一次,甘油作为阳性对照。吸湿性根据式(1)计算。

$$\text{保湿性} = \frac{m_t - m_0}{m_0} \times 100\% \quad (1)$$

将吸湿饱和的样品置于装有变性硅胶的干燥器中。在室温下进行保湿实验,每 1 h 称重一次。保湿性根据式(2)计算。

$$\text{保湿性} = \frac{m_t - m_0}{m - m_0} \times 100\% \quad (2)$$

式(1)、(2)中, m 代表饱和的样品质量,mg; m_t 是处理一定时间后的样品质量,mg; m_0 是质量恒定的样品质量,mg。

1.3.10 多糖的体外抗氧化活性测定

1.3.10.1 DPPH 自由基清除活性测定

参照 Xu 等^[8]的方法,将 1.0 mL 的 DPPH 溶液(0.2 mmol/L)与 1.0 mL 的 SBP 或 SBDP 溶液(质量浓度为 0.2 ~ 2.0 mg·mL⁻¹)混合,25 ℃ 避光孵育 30 min,于 517 nm 处测定吸光度,以抗坏血酸(VC)为阳性对照。根据式(3)计算多糖清除率。

DPPH 自由基清除率 =

$$\left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\% \quad (3)$$

式(3)中, A_0 为用去离子水代替样品时,溶液的吸光度; A_1 为样品溶液和标准液混合物的吸光度; A_2 为用乙醇代替标准液与样品溶液混合物的吸光度。

1.3.10.2 ABTS⁺ 自由基清除活性测定

参照魏晨业等^[32]的方法,取 4.0 mL ABTS 工作液,加入 1.0 mL 不同质量浓度(0.2 ~ 2.0 mg·mL⁻¹)的多糖溶液,混合,避光反应 6 min,于 734 nm 波长处测定吸光度。以 VC 为阳性对照,按式(4)计算样品 ABTS⁺ 自由基清除率。

ABTS⁺ 自由基清除率 =

$$\left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\% \quad (4)$$

式(4)中, A_0 为用去离子水代替样品时对照溶液的吸光度; A_1 为样品溶液和标准液混合物的吸光度; A_2 为用乙醇代替标准液与样品溶液混合物的吸光度。

1.3.10.3 羟基自由基清除活性测定

参照谭诗敏^[33]的方法,将 1.0 mL 硫酸亚铁溶液(9 mmol/L)和 1.0 mL 水杨酸-乙醇溶液(9 mmol/L)完全混合,加入不同质量浓度(0.2 ~ 2.0 mg·mL⁻¹)的多糖溶液,混匀后加入 1.0 mL H₂O₂ 溶液(9 mmol/L)启动反应,37 ℃ 水浴 30 min,于 510 nm 波长处测定吸光值。以 VC 作为阳性对照,根据式(5)计算自由基清除率。

羟基自由基清除率 =

$$\left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\% \quad (5)$$

式(5)中, A_0 为用去离子水代替样品时对照溶液的吸光度; A_1 为样品溶液和标准液混合物的吸光度; A_2 为用乙醇代替标准液与样品溶液混合物的吸光度。

1.4 数据处理

每个样品进行 3 次独立重复实验,使用 SPSS 22.0 对所有实验数据进行统计学分析。结果使用平均值 ± 标准差表示, $P < 0.05$ 表示结果差异具有显著性。采用 Origin Pro 2021 软件绘制图表。

2 结果与分析

2.1 多糖纯化结果及回收率分析

SBP 和 SBDP 经 DEAE-52 纤维素树脂分级洗脱实验,结果如图 1。由图 1 可知,SBP 分离得到 5 个组分,分别为 SBP-0、SBP-0.1、SBP-0.2、SBP-0.3、SBP-0.4。SBDP 分离得到 3 个组分,分别为 SBDP-0、SBDP-0.1、SBDP-0.2。SBP-0 和 SBDP-0 是通过蒸馏水洗脱下来的,为中性多糖,其余组分通过盐溶液洗脱,为酸性多糖。所得的各组分含量及回收率,见表 1。由表 1 可知,SBP 与 SBDP 的蒸馏水洗脱组分回收率最高,质量分数分别为 38.92% 和 49.10%。后续实验均选择收集蒸馏水洗脱的组分制备 SBP 和 SBDP。

2.2 降解对 SBP 的理化性质分析

多糖理化性质分析结果见表 2。由表 2 可知,与 SBP 相比,SBDP 分子质量由 3.016×10^5 Da 下降到 2.902×10^4 Da,平均粒径由 (302.46 ± 3.63) nm 下降到 (237.30 ± 1.76) nm。H₂O₂-Fe²⁺ 降解多糖是基于 Fenton 反应生成大量羟自由基,通过羟自由基攻击分子间或分子内的氢键,破坏多糖的聚集^[15],显著降低多糖分子质量和粒径。相比 SBP,SBDP 的

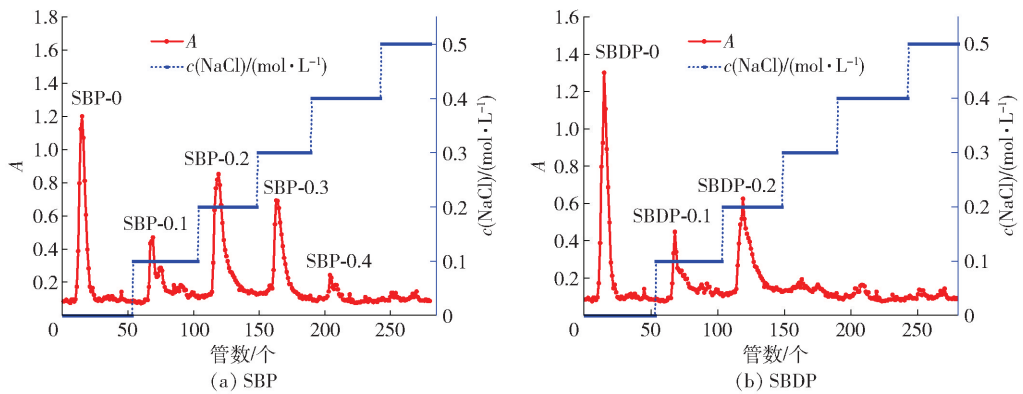


图1 SBP 与 SBDP 洗脱曲线

Fig.1 Elution curves of SBP and SBDP

表 1 多糖洗脱回收率

Tab.1 Recovery rate of polysaccharides after resin elution						
$c(\text{NaCl})/$ ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	m/mg		$w/\%$		回收率/ $\%$	
	SBP	SBDP	SBP	SBDP	SBP	SBDP
0	72.00	82.00	38.92	49.10		
0.10	11.00	32.00	5.95	19.16		
0.20	55.00	44.00	29.73	26.35	74.00	63.20
0.30	42.00	—	22.70	—		
0.40	5.00	—	2.70	—		
总计	185.00	158.00	—	—		

表 2 SBP 和 SBDP 理化性质

Tab.2 Physicochemical properties of SBP and SBDP		
理化性质	SBP	SBDP
M_w/Da	3.016×10^5	2.902×10^4
d/nm	302.46 ± 3.63^a	237.30 ± 1.76^b
溶解度/($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	11.87 ± 0.26^a	14.33 ± 0.24^b
pH 值	4.05 ± 0.03^a	4.17 ± 0.02^b
单糖物质的量比例/ $\%$	岩藻糖	19.20
	鼠李糖	1.40
	阿拉伯糖	11.40
	半乳糖	4.40
	葡萄糖	5.90
	甘露糖	7.90
	半乳糖醛酸	49.80

溶解度增加了 20.72%，可能是 SBDP 糖环上的碳 1(C1)、碳 4(C4)及碳 5(C5)处的氢原子被羟自由基提取,使 SBDP 含有更多的羟基、羧基等亲水基团^[34]。通过 $\text{H}_2\text{O}_2\text{-Fe}^{2+}$ 降解多糖,可有效提高多糖溶解度^[35]。

单糖组成的分析结果如表 2。SBDP 的单糖组成与 SBP 相似,主要由岩藻糖、鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖、半乳糖醛酸组成,其中半乳糖醛酸是 SBP 主要成分,甘露糖是 SBDP 主要成分。半乳糖醛酸含量经 $\text{H}_2\text{O}_2\text{-Fe}^{2+}$ 处理后降低,说明 SBP 中高半乳糖醛酸区的糖苷键和半乳糖醛酸残基可能被羟自由基攻击,产生半乳糖醛酸含量占比更低的组分,并暴露出更多的甘露糖^[36]。 $\text{H}_2\text{O}_2\text{-Fe}^{2+}$ 降解多糖具有高效且温和的特点且几乎不破坏多糖一级结构^[8]。

2.3 降解对 SBP 的结构特征的影响

2.3.1 红外光谱分析

2 种多糖主要的官能团 FT-IR 见图 2。SBP 和 SBDP 有相似的光谱谱带,说明 $\text{H}_2\text{O}_2\text{-Fe}^{2+}$ 处理后,SBP 的主要官能团组成无显著变化。在 3419.17 cm^{-1}

不同字母表示同行数据差异显著($P < 0.05$)。

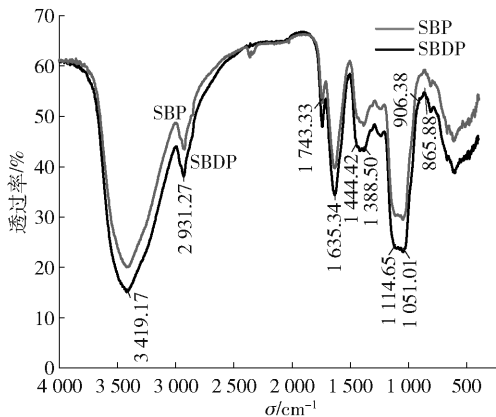


图2 SBP 和 SBDP 的红外光谱

Fig.2 Infrared spectra of SBP and SBDP

处出现宽峰和强峰是源于 O—H 的伸缩振动^[8], 2931.27 cm^{-1} 处所出现的相对较弱的吸收峰为

C—H 伸缩振动峰^[37], 1 743. 33 cm⁻¹处为 C=O 伸缩振动峰^[38]。在 1 635. 34、1 444. 42、1 388. 5 cm⁻¹处所呈现的吸收峰表示存在 COO—的伸缩振动^[39-40], 证明了 2 种多糖均含有糖醛酸。这与单糖组成结果相对应。在 1 200 ~ 1 000 cm⁻¹处出现的吸收峰表明, 2 种多糖都是以吡喃糖环的形式构成的^[41]。906. 38 cm⁻¹和 865. 88 cm⁻¹处出现的特征峰证明, SBP 和 SBDP 同时存在 β 和 α-吡喃糖构型^[42-43]。多糖降解后, 特征吸收峰相似, 但部分特征峰强度变弱, 表明降解处理可能会导致某些官能团数量发生变化^[11]。

2.3.2 核磁共振波谱分析

SBP 和 SBDP 的¹H 和¹³C 谱图如图 3。由图 3 可知, 2 种多糖在 δ_H 3.0 ~ 5.5 和 δ_C 60 ~ 110 处出现了几乎相同的典型多糖峰的分布^[23], 其中 δ_H 为 4.3 ~ 5.3 和 δ_C 为 90 ~ 110 的多糖峰信号表明, 存在 α 和 β 构型糖苷键^[18]。根据文献[14]和[44]的研究结果对单糖残基的信号进行了归属, 氢-1/碳-1 的异常区(H-1/C-1)所对应的糖苷键, 组成分析结果如表 3^[9,23,45]。表 3 结果表明, SBP 和 SBDP 的主链由 7 种相同的糖苷键组成, 证明这 2 种多糖具有相

似的主干结构。此外, δ_H 为 1. 10 和 δ_C 为 16. 75 附近的共振信号归因于鼠李糖的 CH₃ 基团, δ_H 为 2. 07 和 δ_C 为 20. 23 附近的共振信号证明多糖中存在乙酰基团, 而 δ_C 在 170 附近的化学位移表明, 糖链中存在糖醛酸^[46]。

表 3 SBP 和 SBDP 的糖苷键组成

Tab. 3 Glycosidic bond compositions of SBP and SBDP				
δ _H /δ _C	SBP	SBDP	糖苷键	参考文献
H-1/C-1	5. 33/101. 30	5. 25/101. 34	(1→3,4)-α-L-Fucan	
	5. 21/107. 64	5. 22/107. 91	(1→5)-α-L-Araf	
	5. 13/95. 97	5. 14/95. 87	(1→2)-α-L-Rhap	
	5. 06/98. 65	5. 07/98. 30	(1→4)-α-D-GalpA	[9, 23, 45]
	5. 03/103. 61	5. 04/104. 14	(1→3,6)-α-D-Manp	
	4. 37/102. 79	4. 52/102. 61	(1→6)-β-D-Glep	
	4. 27/105. 89	4. 36/104. 41	(1→3)-β-D-Galp	

从单糖组成、FT-IR 光谱和核磁共振光谱来看, 甘露糖是 SBDP 中主要的多糖组分, 可能以(1→3,6)-α-D-Manp 为骨架, (1→4)-α-D-GalpA 和(1→2)-α-L-Rhap 为主要侧链。研究结果证明, H₂O₂-Fe²⁺ 处理并没有改变 SBP 的一级结构。

2.4 降解对 SBP 的吸湿性和保湿性的影响

多糖吸湿性和保湿性检测结果, 见图 4。由图 4(a) 可知, 多糖和甘油的吸湿率随时间延长而增大, 且 SBDP 吸湿率一直高于 SBP。当吸湿时间达到 12 h 时, SBP 和 SBDP 的吸湿能力趋于饱和, 最大吸湿率分别为 40. 67% ± 0. 35% 和 42. 67% ± 0. 12%, 证明 SBDP 吸湿性能远强于 SBP。由图 4(b) 可知, 多糖和甘油的保湿率均随时间的延长而下降。保湿 4 h 内, 甘油保湿能力明显高于 SBP 和 SBDP。保湿 5 h 后, SBP 和 SBDP 的保湿能力趋于稳定, 最大保湿率分别为 24. 24% ± 0. 94% 和 26. 56% ± 0. 69%, 均高于甘油(17. 36% ± 0. 07%)。多糖的吸湿性和保湿性是由多糖分子中亲水基团与水分子形成氢键所表现的效果, 与多糖分子中的亲水基含量相关^[46]。同时, 多糖链可以相互交织, 形成网状结构, 这对保持水分含量很重要^[47]。H₂O₂-Fe²⁺ 处理使得 SBDP 具有更多羟基、羧基等亲水基团, 并且 SBDP 多糖链更容易形成网状结构。基于此结果, SBDP 有望开发为保湿剂。

2.5 降解对 SBP 的流变特性的影响

具有良好流变性的多糖可以用作食品行业的

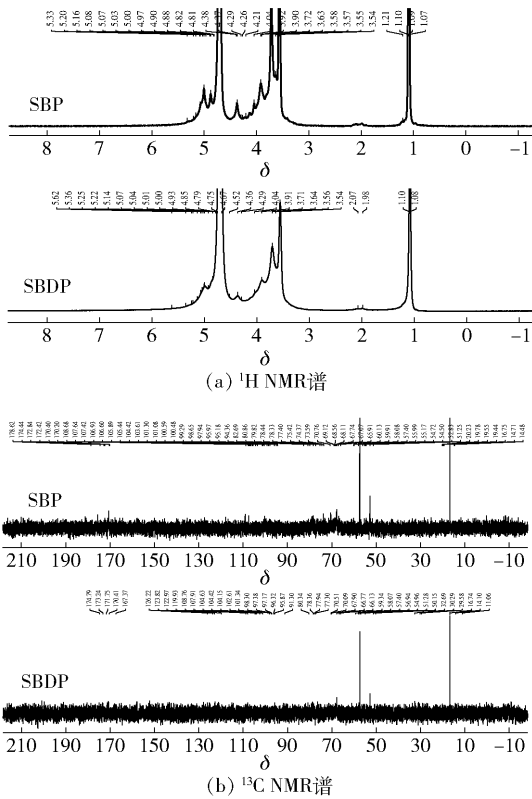


图 3 SBP 和 SBDP 的核磁共振¹H 谱和¹³C 谱
Fig. 3 ¹H and ¹³C NMR spectra of SBP and SBDP

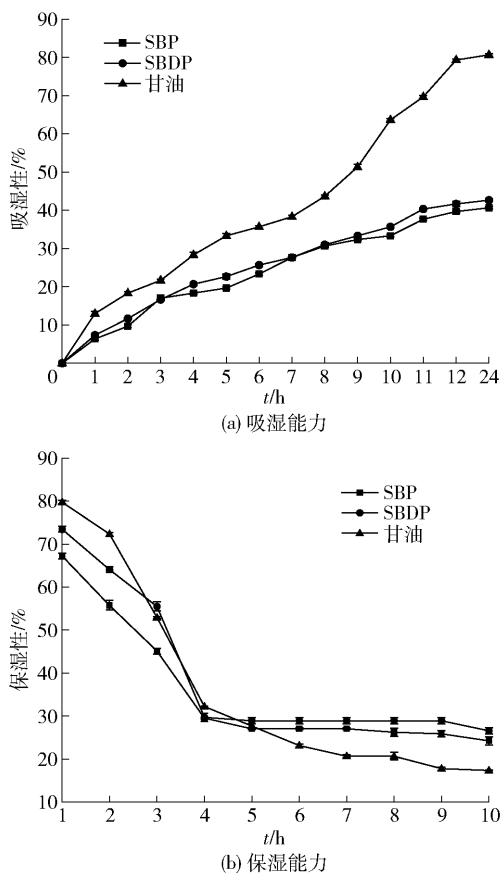


图4 SBP 和 SBDP 的吸湿和保湿能力

Fig. 4 Hygroscopicity and moisturizing property of SBP and SBDP

增稠剂、凝胶剂、混悬剂和乳化剂^[48]。多糖的流变特性检测结果,见图5。由图5可知,2种多糖溶液均表现出剪切稀化特性和牛顿流体行为,且SBDP的溶液黏度始终低于SBP。在低剪切速率下,多糖黏度随着剪切速率的增加而降低,多糖溶液表现出典型的剪切稀化行为。这种现象是由于多糖分子的链-链结构被剪切力破坏,导致黏度下降^[48]。同时,高分子质量多糖的分子间相互作用力强于低分子量多糖,导致多糖链更容易缠结^[49]。在高剪切速率下,较长的多糖链可能解开缠绕,2种多糖的表观黏度保持稳定,多糖溶液性质更接近牛顿流体^[23]。

储能模量(G')为弹性应力应变之比,损耗模量(G'')为黏性应力应变之比。 G' 和 G'' 的交叉点可用于确定多糖溶液的线性黏弹性区域^[50]。由图5可知,2种多糖的 G' 和 G'' 均随角频率的升高而增加。在低频区域, G'' 大于 G' ,表示多糖呈现液体黏性^[49]。而在高频区域, G' 大于 G'' ,此时多糖溶液表现出弱

凝胶状特性^[48]。SBDP 交汇点(3.98 rad/s) 低于 SBP 交汇点(5.12 rad/s),由于多糖链之间连接点的数量和复杂性增加,SBDP 更有可能在水溶液中形成强大的分子间(或分子内)相互作用力和纠缠网络^[48]。实验结果表明,降解处理使多糖具有更好的凝胶性能和体系稳定性^[23-24]。

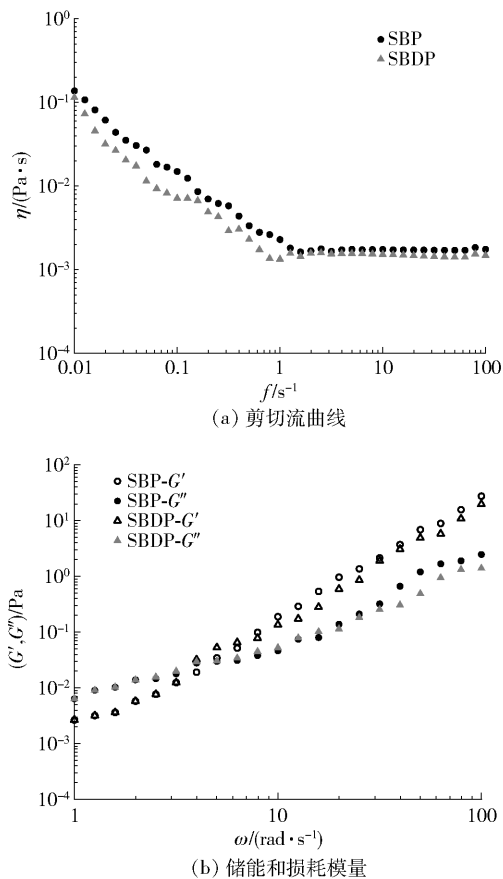


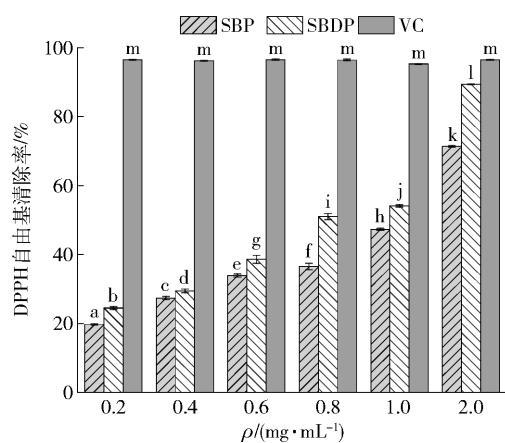
图5 SBP 和 SBDP 的流变特性

Fig. 5 Rheological characterization of SBP and SBDP

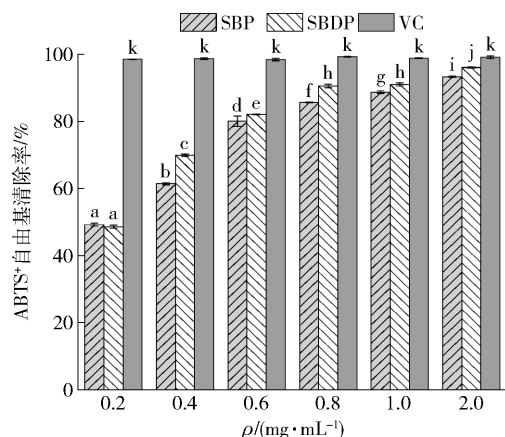
2.6 降解对 SBP 体外抗氧化活性的影响

将所得到的 SBP 和 SBDP 按比例稀释进行体外抗氧化活性测定,并与 VC 的抗氧化活性进行对比,研究结果如图6。由图6可知,SBP 对 DPPH 自由基清除能力具有浓度依赖性。当多糖质量浓度为 0.4 mg·mL⁻¹时,SBP 和 SBDP 对 DPPH 自由基清除能力无明显差异。但随着多糖质量浓度增加(0.6 ~ 2.0 mg·mL⁻¹),SBDP 的 DPPH 自由基清除能力明显高于相同质量浓度的 SBP($P < 0.05$)。在质量浓度为 2.0 mg·mL⁻¹时,SBDP 对 DPPH 自由基的清除能力显著高于 SBP($P < 0.05$),达到 89.44% ± 0.12%。同时,SBP 和 SBDP 的半抑制浓度(IC₅₀值)分别为 1.06 mg·mL⁻¹和 0.71 mg·mL⁻¹,证明 SBDP

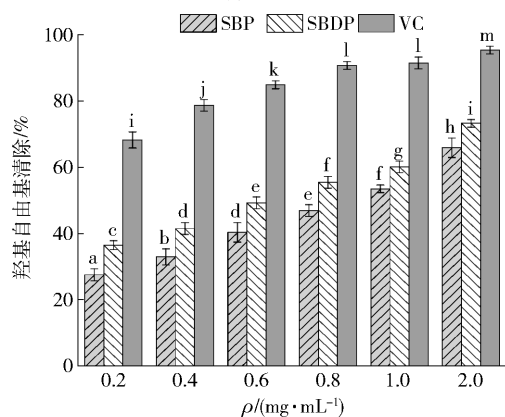
对 DPPH 自由基清除效果更好。 $\text{H}_2\text{O}_2\text{-Fe}^{2+}$ 处理提高了多糖供氢能力,使 SBDP 更容易与 DPPH 自由基反应生成稳定的产物,从而提高了对 DPPH 自由基清除能力^[35]。



(a) DPPH 自由基



(b) ABTS+ 自由基



(c) 羟基自由基

不同字母表示组间数据差异显著 ($P < 0.05$)。

图6 SBP 和 SBDP 对自由基的清除活性

Fig. 6 Scavenging activities of SBP and SBDP on radical

由图6可知,ABTS⁺自由基清除能力与多糖质量浓度的增加具有良好的相关性,自由基清除能

力与多糖质量浓度成正比。当多糖质量浓度达到 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,SBP 和 SBDP 的 ABTS⁺ 自由基清除率分别为 $93.37\% \pm 0.13\%$ 和 $96.09\% \pm 0.22\%$, IC_{50} 值分别为 $0.22 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $0.21 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。SBDP 的自由基清除能力更好,清除效果接近 VC ($99.15\% \pm 0.37\%$)。研究表明多糖的官能团中,自由羟基可能通过提供电子将自由基还原为更稳定的形式,或者通过直接与自由基反应终止自由基连锁反应而参与抗氧化作用^[15]。结果说明,SBP 糖环中 C5 处的氢原子可能被 $\text{H}_2\text{O}_2\text{-Fe}^{2+}$ 产生的羟自由基提取,SBP 糖环被打开,暴露出更多的自由羟基^[51],从而显著提高 SBDP 的 ABTS⁺ 自由基清除能力。

由图6可知,随着多糖浓度的提高,2种多糖的羟基自由基清除能力均呈现上升趋势,且在相同浓度下,SBDP 的清除能力始终高于 SBP。SBP 和 SBDP 对羟基自由基清除的 IC_{50} 值分别为 $0.90 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $0.56 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。多糖质量浓度为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,SBDP 的羟基清除能力显著增强 ($P < 0.05$),达到 $73.26\% \pm 1.16\%$ 。与 SBP 相比,SBDP 具有更强的羟基自由基清除活性。在清除羟基自由基反应中,多糖作为电子供体或氢供体参与反应中^[52],而 $\text{H}_2\text{O}_2\text{-Fe}^{2+}$ 处理导致 SBDP 的分子质量更低,使其成为更好的电子或氢的供体,同时,SBDP 具有更好的水溶性,这可能导致 SBDP 中的化学基团与羟基自由基相互作用的机会增加,提升 SBDP 分子的反应效率,使得 SBDP 表现出更强的羟基自由基清除能力^[11]。

通过上述结果可知,经 $\text{H}_2\text{O}_2\text{-Fe}^{2+}$ 降解所得到的 SBDP 具有良好的抗氧化活性,且随着浓度的提升,对 DPPH 自由基、ABTS⁺ 自由基及羟基自由基的清除能力均优于 SBP。

3 结 论

本研究对 SBDP 的结构表征、功能特性和抗氧化活性进行了分析。SBDP 和 SBP 是含有相同单糖的杂多糖,其主链主要由相同的 7 种糖苷键组成。SBDP ($2.902 \times 10^4 \text{ Da}$) 的分子质量明显低于 SBP ($3.016 \times 10^5 \text{ Da}$),说明 $\text{H}_2\text{O}_2\text{-Fe}^{2+}$ 法是制备低分子质量 SBDP 的有效方法。SBDP 水溶性更高,表观黏度更低,低剪切速率下为假塑性流体,表现出黏弹性行为,具有较强的抗氧化活性。但 SBDP 的体内生物活性和构效关系有待进一步研究。

参考文献:

- [1] ZHANG M, SU N, HUANG Q, et al. Phosphorylation and antiaging activity of polysaccharide from trichosanthes peel [J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2017, 25(4): 976–983.
- [2] LIU Y, YE Y F, HU X B, et al. Structural characterization and anti-inflammatory activity of a polysaccharide from the *lignified okra* [J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 265: 118081.
- [3] GONG P, CUI D, GUO Y, et al. A novel polysaccharide obtained from *Siraitia grosvenorii* alleviates inflammatory responses in a diabetic nephropathy mouse model via the TLR4-NF-kappaB pathway [J]. Food & Function, 2021, 12(19): 9054–9065.
- [4] WANG D, ZHAO X, LIU Y. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of a polysaccharide from flower buds of *Lonicera japonica* in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 102: 396–404.
- [5] ZHOU S, HUANG G, CHEN G. Extraction, structural analysis, derivatization and antioxidant activity of polysaccharide from Chinese yam [J]. Food Chemistry, 2021, 361: 130089.
- [6] LUO M, ZHANG X, WU J, et al. Modifications of polysaccharide-based biomaterials under structure-property relationship for biomedical applications [J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 266: 118097.
- [7] LI S, SHAH N P. Antioxidant and antibacterial activities of sulphated polysaccharides from *Pleurotus eryngii* and *Streptococcus thermophilus* ASCC 1275 [J]. Food Chemistry, 2014, 165: 262–270.
- [8] XU Y, NIU X, LIU N, et al. Characterization, antioxidant and hypoglycemic activities of degraded polysaccharides from blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) fruits [J]. Food Chemistry, 2018, 243: 26–35.
- [9] WU D T, HE Y, FU M X, et al. Structural characteristics and biological activities of a pectic-polysaccharide from okra affected by ultrasound assisted metal-free Fenton reaction [J]. Food Hydrocolloids, 2022, 122: 107085.
- [10] LIN S, ALWRAIKAT M, NIU L, et al. Degradation enhances the anticoagulant and antiplatelet activities of polysaccharides from *Lycium barbarum* L. leaves [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 133: 674–682.
- [11] ZHANG Z, WANG X, ZHAO M, et al. Free-radical degradation by $\text{Fe}^{2+}/\text{Vc}/\text{H}_2\text{O}_2$ and antioxidant activity of polysaccharide from *Tremella fuciformis* [J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 112: 578–582.
- [12] MA C, ZHAO M, SI T, et al. Comparative study of adsorption polysaccharide on bioactive components and *in vitro* antioxidant activity of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) pulp oil [J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 141: 110896.
- [13] WANG S, BLAZEK J, GILBERT E, et al. New insights on the mechanism of acid degradation of pea starch [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 87(3): 1941–1949.
- [14] XU Y, ZHANG X, YAN X H, et al. Characterization, hypolipidemic and antioxidant activities of degraded polysaccharides from *Ganoderma lucidum* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 135: 706–716.
- [15] OFOEDU C E, YOU L, OSUJI C M, et al. Hydrogen peroxide effects on natural-sourced polysacchrides: free radical formation/production, degradation process, and reaction mechanism-a critical synopsis [J]. Foods, 2021, 10(4): 699.
- [16] CHEN X, ZHANG R, LI Y, et al. Degradation of polysaccharides from *Sargassum fusiforme* using $\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2$ and its effects on structural characteristics [J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 230: 155647.
- [17] ZOU M Y, NIE S P, YIN J Y, et al. Ascorbic acid induced degradation of polysaccharide from natural products: a review [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 151: 483–491.
- [18] XU Y Q, GAO Y K, LIU F, et al. Sulfated modification of the polysaccharides from blackcurrant and their antioxidant and alpha-amylase inhibitory activities [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 109: 1344–1354.
- [19] OLAS B, SKALSKI B, ULANOWSKA K. The anticancer activity of sea buckthorn *Elaeagnus rhamnoides* (L.) A. nelson [J]. Frontiers in Pharmacology, 2018, 9: 232.
- [20] CIESAROVA Z, MURKOVIC M, CEJPEK K, et al. Why is sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) so exceptional? A review [J]. Food Research International, 2020, 133: 109170.
- [21] 郭凤霞, 曾阳, 马继雄. 沙棘粗多糖对正常和造模糖尿病小鼠血糖影响的研究 [J]. 中国药物警戒, 2012, 9: 647–651.
- GUO F X, ZENG Y, MA J X. Effects of *Hippophae rhamnoides* L. subsp. *Chinensis* rousi polysaccharide on alpha-glucosidase enzyme activity and level of blood glucose [J]. Chinese Journal of Pharmacovigilance, 2012, 9: 647–651.

- [22] MA C G, ZHAO M, SI T L, et al. Comparative study of adsorption polysaccharide on bioactive components and *in vitro* antioxidant activity of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) pulp oil [J]. LWT-Food Science & Technology, 2021, 141: 110896.
- [23] XU Y, LIU N, FU X, et al. Structural characteristics, biological, rheological and thermal properties of the polysaccharide and the degraded polysaccharide from raspberry fruits [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 132: 109 – 118.
- [24] MA C, BAI J, SHAO C, et al. Degradation of blue honeysuckle polysaccharides, structural characteristics and antiglycation and hypoglycemic activities of degraded products [J]. Food Research International, 2021, 143: 110281.
- [25] 裴晋红, 栗学清, 张建斌, 等. 葡萄籽粗多糖的体内外抗氧化作用[J]. 食品科学技术学报, 2022, 40(5): 93 – 100.
- PEI J H, LI X Q, ZHANG J B, et al. Antioxidant effect of crude polysaccharides from grape seeds *in vitro* and *in vivo* [J]. Journal of Food Science and Technology, 2022, 40(5): 93 – 100.
- [26] 李顺峰, 许方方, 崔国梅, 等. 不同纯化程度香菇柄多糖的乙酰化修饰及降血糖活性[J]. 食品科学技术学报, 2022, 40(6): 127 – 133.
- LI S F, XU F F, CUI G M, et al. Acetylation modification and hypoglycemic activity of *Lentinus edodes* stipe polysaccharide with different purification degrees [J]. Journal of Food Science and Technology, 2022, 40(6): 127 – 133.
- [27] 张嘉园. 苎麻多糖的分离纯化, 结构鉴定及降糖活性研究 [D]. 西安: 陕西科技大学, 2021.
- ZHANG J Y. Study on separation, purification, structure identification and hypoglycemic activity of polysaccharides from *Urtica fissa* E. pritz [D]. Xi'an: Shaanxi University of Science and Technology, 2021.
- [28] WANG X, ZHOU X, WANG K, et al. Structural characterisation and bioactivity of polysaccharides isolated from fermented *Dendrobium officinale* [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2022, 102(1): 280 – 290.
- [29] CHEN J, LEI C, LIN S, et al. Preparation and structural characterization of a partially depolymerized beta-glucan obtained from *Poria cocos* sclerotium by ultrasonic treatment [J]. Food Hydrocolloids, 2015, 46(1): 1 – 9.
- [30] 齐奇, 李艳霞, 杨凯, 等. 内源多酚对各组分松仁蛋白理化性质、功能特性和结构的影响 [J]. 食品科学, 2022, 43: 81 – 89.
- QI Q, LI Y X, YANG K, et al. Effects of endogenous polyphenols on the physicochemical, functional properties and structure of each component pine kernel proteins [J]. Food Science, 2022, 43: 81 – 89.
- [31] LI J, CHI Z, YU L, et al. Sulfated modification, characterization, and antioxidant and moisture absorption/retention activities of a soluble neutral polysaccharide from *Enteromorpha prolifera* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 105: 1544 – 1553.
- [32] 魏晨业, 包晓玮, 王娟, 等. 沙棘多糖分离纯化及抗氧化活性 [J]. 食品科学, 2021, 42: 227 – 232.
- WEI C Y, BAO X W, WANG J, et al. Isolation, purification and antioxidant activity of polysaccharides from the fruit of *Hippophaë rhamnoides* [J]. Food Science, 2021, 42: 227 – 232.
- [33] 谭诗敏. 不同分子量香水莲花多糖的制备及其活性研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2021.
- TAN S M. Study on preparation and activity of nymphaea hybrid polysaccharides with different molecular weight [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2021.
- [34] CHEN X, SUN-WATERHOUSE D, YAO W, et al. Free radical-mediated degradation of polysaccharides: mechanism of free radical formation and degradation, influence factors and product properties [J]. Food Chemistry, 2021, 365: 130524.
- [35] ZHANG Z, WANG X, MO X, et al. Degradation and the antioxidant activity of polysaccharide from *Enteromorpha linza* [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 92(2): 2084 – 2087.
- [36] CAO J, YANG J, YUE K, et al. Preparation of modified citrus pectin (MCP) using an advanced oxidation process with hydroxyl radicals generated by UV-H₂O₂ [J]. Food Hydrocolloids, 2020, 102: 105587.
- [37] TIAN W, DAI L, LU S, et al. Effect of *Bacillus* sp. DU-106 fermentation on *Dendrobium officinale* polysaccharide: structure and immunoregulatory activities [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 135: 1034 – 1042.
- [38] LI J, LI S, ZHENG Y, et al. Fast preparation of rhamnogalacturonan I enriched low molecular weight pectic polysaccharide by ultrasonically accelerated metal-free Fenton reaction [J]. Food Hydrocolloids, 2019, 95: 551 – 561.
- [39] WANG Z B, PEI J J, MA H L, et al. Effect of extraction media on preliminary characterizations and antioxidant activities of *Phellinus linteus* polysaccharides [J].

- Carbohydrate Polymers, 2014, 109: 49 – 55.
- [40] SOUISSI N, BOUGHRIBA S, ABDELHEDI O, et al. Extraction, structural characterization, and thermal and biomedical properties of sulfated polysaccharides from razor clam *Solen marginatus* [J]. RSC Advances, 2019, 9(20): 11538 – 11551.
- [41] LIU W, LIU Y, ZHU R, et al. Structure characterization, chemical and enzymatic degradation, and chain conformation of an acidic polysaccharide from *Lycium barbarum* L. [J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 147: 114 – 124.
- [42] SUN L, LING W, JING L, et al. Characterization and antioxidant activities of degraded polysaccharides from two marine chrysophyta [J]. Food Chemistry, 2014, 160: 1 – 7.
- [43] YU C H, DAI X Y, CHEN Q, et al. Hypolipidemic and antioxidant activities of polysaccharides from *Rosae laevigatae* fructus in rats [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 94(1): 56 – 62.
- [44] MA Z, SUN Q, CHANG L, et al. A natural anti-obesity reagent derived from sea buckthorn polysaccharides; structure characterization and anti-obesity evaluation *in vivo* [J]. Food Chemistry, 2022, 375: 131884.
- [45] PONCE N M A, FLORES M L, PUJOL C A, et al. Fucoidans from the phaeophyta *Scytosiphon lomentaria*: chemical analysis and antiviral activity of the galactofucan component [J]. Carbohydrate Research, 2019, 478: 18 – 24.
- [46] 徐雅琴, 杨海红, 李大龙, 等. 黑加仑果实降解多糖理化特性、结构及体外降血糖活性 [J]. 食品科学, 2021, 42(15): 37 – 43.
- XU Y Q, YANG H H, LI D L, et al. Physicochemical properties, structural characterization and hypoglycemic activity *in vitro* of degraded polysaccharides from blackcurrants [J]. Food Science, 2021, 42(15): 37 – 43.
- [47] CHOU C H, SUNG T J, HU Y N, et al. Chemical analysis, moisture-preserving, and antioxidant activities of polysaccharides from *Pholiota nameko* by fractional precipitation [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 131: 1021 – 1031.
- [48] WANG L, ZHANG B, XIAO J, et al. Physicochemical, functional, and biological properties of water-soluble polysaccharides from *Rosa roxburghii* Tratt fruit [J]. Food Chemistry, 2018, 249: 127 – 135.
- [49] MINJARES FUENTES R, MEDINA TORRES L, LAREDO R G, et al. Influence of water deficit on the main polysaccharides and the rheological properties of aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) mucilage [J]. Industrial Crops and Products, 2017, 109: 644 – 653.
- [50] YUAN D, LI C, HUANG Q, et al. Ultrasonic degradation effects on the physicochemical, rheological and antioxidant properties of polysaccharide from *Sargassum pallidum* [J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 239: 116230.
- [51] LINDSAY S E, FRY S C. Redox and wall-restructuring [M]//VERBELEN J P, VISSENBERG K. The Expanding cell. Berlin, Springer Berlin Heidelberg. 2007: 159 – 190.
- [52] KANG Q, CHEN S, LI S, et al. Comparison on characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* by ultrasound and conventional extraction [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 124: 1137 – 1144.

Structural Characterization and Functional Properties of Sea Buckthorn Degraded Polysaccharides

KONG Zhiqiang¹, ZHAO Yuhong^{1,2,*}

(1. College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China;

2. Key Laboratory of Forest Food Resources Utilization of Heilongjiang Province, Harbin 150040, China)

Abstract: To evaluate the effect of degradation on the structure and properties of sea buckthorn polysaccharides (SBP), the H₂O₂ combined with Fe²⁺ method was used to degrade SBP. The effects of degradation on the molecular weight, monosaccharide composition, particle size, structural characteristics and antioxidant capacity of sea buckthorn degraded polysaccharides (SBDP) were investigated. The

(下转第 138 页)

separate and embe the two probiotics. Sodium alginate was used as wall material and sodium mercapto carboxymethyl cellulose (CMC-SH) was added to enhance the adhesion of probiotics in intestinal tract. Probiotics double bacteria multi-core microcapsules were prepared by endogenous emulsification and extrusion. The microcapsule embedding rate was used as the evaluation index, and the optimal conditions for the preparation of probiotic double bacteria microcapsules were determined by single factor and response surface experiments. The results showed that when the concentration of sodium alginate in the inner core was 1.82%, the concentration of CMC-SH in the bacterial solution was 0.9%, the volume ratio of water to oil was 1.0:2.9, and the concentration of sodium alginate in the outer layer was 2.9%, the embedding rate of probiotics double bacteria microcapsules could reach 72.93%. The probiotic double bacteria microcapsules under this process condition had good acid resistance and intestinal solubility. In the artificial intestinal fluid, the release rate of microcapsules reached 86.3% at 180 min, which was basically completely disintegrated, and the ideal effect was achieved. The results of this study provided a reference for solving the technical problems of activity maintenance and synergism of mixed probiotic microecologies in China.

Keywords: probiotics; microcapsule; multi-core; separation and embedding; sodium alginate

(责任编辑:郝一铭)

(上接第 74 页)

results showed that, the molecular weight of SBDP (2.902×10^4 Da) was significantly lower than that of SBP (3.016×10^5 Da). Ion chromatography analysis proved that both SBDP and SBP were composed of the same monosaccharides (fucose, rhamnose, arabinose, galactose, glucose, mannose and galacturonic acid) in different molar ratios. SBDP showed similar structural characteristics to SBP as confirmed by FTIR and NMR spectroscopy. The solubility of SBDP was increased by 20.72%, and SBDP had better hygroscopicity and moisture retention. SBDP had lower apparent viscosity ($5.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) and shear thinning behavior. SBDP exhibited higher antioxidant activity, with the DPPH radical, ABTS⁺ radical and hydroxyl radical scavenging rates of $89.44\% \pm 0.12\%$, $96.09\% \pm 0.22\%$ and $73.26\% \pm 1.16\%$, respectively. The H_2O_2 combined with Fe^{2+} treatment significantly reduced the molecular weight of SBP and enhanced its functional properties and antioxidant activity. This research aimed to expand the application of SBP in food applications.

Keywords: sea buckthorn polysaccharides; degradation; structural characterization; rheological characteristics; antioxidant activity

(责任编辑:郝一铭)