

不同分子量大豆多糖的表征和抗氧化研究

何喜珍¹, 牛延宁¹, 金明飞¹, 黄静¹, 崔红亮², 常忠义¹, 高红亮¹

(1. 华东师范大学 生命科学学院, 上海 200241; 2. 平顶山金晶生物科技有限公司, 河南 平顶山 467215)

摘要:以酸提大豆多糖为原料,通过控制降解条件得到4种不同分子量的大豆多糖样品,分子量分别为550,347,285和21 kDa。对4种多糖进行了傅里叶红外(FT-IR)分析和X射线衍射(XRD)分析,并分别测定了4种多糖对DP-PH自由基、羟基自由基的清除能力以及还原能力的大小。结果表明:4种大豆多糖都有一定的抗氧化活性,但抗氧化活性高低有所不同,分子量为285 kDa的大豆多糖对自由基的清除能力最强,还原能力最强,分子量为21 kDa的大豆多糖对自由基的清除能力最弱,还原能力最弱。

关键词:大豆多糖;降解;抗氧化;表征

中图分类号:R151 文献标识码:A DOI:10.11861/j.issn.1000-9841.2016.05.0805

Characterization and Antioxidation Study of Different Molecular Weight of Soluble Soybean Polysaccharides

HE Xi-zhen¹, NIU Yan-ning¹, JIN Ming-fei¹, HUANG Jing¹, CUI Hong-liang², CHANG Zhong-yi¹, GAO Hong-liang¹

(1. School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200241, China; 2. Pingdingshan Jinjing Biotechnology Company Limited, Pingdingshan 467215, China)

Abstract: Four different molecular-weight soluble soybean polysaccharides were prepared by controlling the degradation condition, with the molecular weights 550, 347, 285 and 21 kDa, respectively. The structures of them were identified by Fourier transform infrared spectrometer (FTIR) and X-Ray Diffraction (XRD). Antioxidant activities of four SSPS were evaluated *in vitro* by DPPH free radical scavenging capacity, hydroxyl free radical scavenging and total reducing power. The results showed that all of them had antioxidant activities. The SSPS-H with molecular weight of 285 kDa had the strongest antioxidant activities in all antioxidant systems, while the SSPS-CH with molecular weight of 21 kDa performed the worst.

Keywords: Soluble soybean polysaccharides; Degradation; Antioxidant; Characterization

水溶性大豆多糖是从生产大豆蛋白之后剩下的豆渣中提取出来的,在水溶液中具有较高的溶解性,在高浓度下也可以保持较低的粘度而不会形成凝胶^[1],水溶性大豆多糖具有良好的稳定性,耐酸、耐热、耐盐^[2-3],并且在添加量较少的条件下就可以与果胶达到相同的稳定酸性乳饮料的作用^[4]。此外,水溶性大豆多糖还具有良好的乳化性,能够使水层油层混合均匀,而且所制备的乳液在pH3~7范围内都能保持良好的稳定性^[5-6]。活性氧(reactive oxygen species, ROS)主要是指氧自由基及其活性衍生物,在正常的生理状态下,人体内自由基的产生和消除保持在极低的动态平衡水平上,当体内清除自由基的系统出现故障时,就会导致自由基增多,过量的自由基会引起生物膜脂质过氧化、细胞内蛋白质变性和DNA损害等,因此寻找抗氧化剂清除剂清除自由基,提高机体的抗氧化能力,预防和治疗氧化损伤相关的疾病是医药界始终关注的研究课题。

植物、动物以及微生物中均分布有抗氧化多

糖,并且这些多糖在体内、体外试验体系中都能表现出良好的抗氧化、抗感染和增强人体免疫力的生物活性。而关于多糖结构、分子量与其生物活性的研究表明,多糖分子量大小与其抗肿瘤、抗氧化活性等具有显著的相关性,而且只有在一定的分子量范围内才能产生较高的活性^[7-9]。本研究以酸提大豆多糖为原料,通过不同的降解处理得到不同分子量的大豆多糖,研究不同分子量大豆多糖对DPPH自由基、羟基自由基的清除率以及对亚铁离子的还原能力,为寻找天然低毒的抗氧化剂提供一定的科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

水溶性大豆多糖(自制);磷酸氢二钾磷酸二氢钠;硫酸亚铁;铁氰化钾;氯化铁;三氯乙酸;无水乙醇;均为国产分析纯;邻二氮菲;双氧水;DPPH(1,1-二苯基-2-苦肟基,BR级)。

721分光光度计,上海元析仪器分析有限公司;

收稿日期:2016-04-07

基金项目:国家自然科学基金(31170920)。

第一作者简介:何喜珍(1989-),女,硕士,主要从事天然多糖应用研究。E-mail: hexizhen2010@163.com。

通讯作者:高红亮(1972-),男,博士,副教授,主要从事食品生物技术研究。E-mail: hlga@bio.ecnu.edu.cn。

数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; 凝胶渗透色谱(Viscotek 270 GPC), Malvern Co. 英国; X射线粉末衍射仪, Bruker D8 Advance(德国); 傅里叶变换红外光谱仪, Thermo Fisher(美国)。

1.2 方法

1.2.1 大豆多糖的制备 取一定量干燥粉碎之后的豆渣, 按照一定的固液比、提取 pH、提取时间、提取温度进行酸解提取 $5\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 过滤除去杂质, 定量加碱进行脱酯化处理, 之后加料液中和调 pH 至 3.5, 取上清浓缩, 醇沉, 冷冻干燥得到酸提大豆多糖成品, 备用。

1.2.2 不同分子量大豆多糖样品的制备 配制一定浓度的水溶性大豆多糖溶液, 在不同的反应条件下进行降解处理(表 1), 待降解结束之后, 将反应液冷却至室温, 浓缩醇沉, 冷冻干燥后使用。之后用凝胶渗透色谱(GPC)测定 4 种水溶性大豆多糖的分子量。

1.2.3 不同分子量大豆多糖的结构表征

(1) 红外表征: 将水溶性大豆多糖磨成粉末, 与无水溴化钾粉末按照 1:50 ~ 1:100 的比例混合后一起压片, 得到均匀的薄片进行测试, 波数范围为 $4\ 000\sim 400\ \text{cm}^{-1}$ 。

(2) X 射线衍射: 将大豆多糖粉末放在载玻片上, 再用盖玻片压平, 在德国 Bruker 公司的 D8 Advance 型 X 射线衍射仪上测试其 X 射线衍射图, $\text{Cu-K}\alpha$ 射线, 电压 40 kV, 电流 30 mA, 2θ 角扫描范围 $3^\circ\sim 50^\circ$, 扫描速度为 $10^\circ\cdot\text{min}^{-1}$ 。

1.2.4 不同分子量大豆多糖的抗氧化活性测定

(1) 对 DPPH 自由基的清除作用: 参照 Calokerinos 等^[10]的方法并略作修改。取 2 mL 不同浓度的大豆多糖溶液加入等体积的 $0.1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 DPPH-乙醇溶液, 将混合液迅速混合均匀, 于暗处反应 30 min, 以 70% 乙醇为空白, 测定 517 nm 波长下的吸光度 A。空白组以乙醇代替多糖样品。根据公式计算其清除率:

$$\text{清除率}(\%) = [1 - (A - A_1) / A_0] \times 100$$

表 1 不同分子量大豆多糖的降解条件

Table 1 Degradation conditions of SSPS with different molecular weight

大豆多糖 SSPS	反应温度 Temperature /°C	H ₂ O ₂ 浓度 H ₂ O ₂ concentration /%	反应时间 Time /h	超声功率 Ultrasonic power /W	分子量 Molecular weight /kDa
SSPS-Y	—	—	—	—	550
SSPS-C	50	—	1.0	200	347
SSPS-H	50	4.0	1.0	—	285
SSPS-CH	70	6.0	1.0	200	21

—: 未进行该项处理; SSPS-Y: 未经过降解处理的大豆多糖; SSPS-C: 经过超声波处理的大豆多糖; SSPS-H: 经过过氧化氢处理的大豆多糖; SSPS-CH: 经过超声辅助过氧化氢处理的大豆多糖。

—: Not for the processing; SSPS-Y: Native SSPS; SSPS-C: SSPS treated by ultrasonic; SSPS-H: SSPS treated by H₂O₂; SSPS-CH: SSPS treated by ultrasonic and H₂O₂.

式中, A_0 : DPPH 与 70% 乙醇混合液的吸光度值;

A_1 : 样品与 70% 乙醇混合液的吸光度值;

A: 水溶性大豆多糖与 DPPH 混合液吸光度值。

(2) 对羟基自由基的清除作用: 根据 Zhao^[11]和 Zeng 等^[12]的方法加以改进建立 OH^- 产生模型。

样品组: 移取 1.0 mL $7.5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 邻二氮菲溶液, 依次加入 2.0 mL $0.15\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS 缓冲液 (pH7.4)、1.0 mL $7.5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸亚铁溶液、1.0 mL 不同浓度的大豆多糖溶液、1.0 mL 0.1% 的过氧化氢溶液, 加蒸馏水补至 10 mL, 混匀于 37°C 水浴反应 1 h, 测定 510 nm 下的吸光度, 记为 $A_{\text{样品}}$ 。

空白组: 以蒸馏水代替样品, 其余同样品组, 测量值记为 A_0 ;

对照组: 以蒸馏水代替样品和过氧化氢, 其余同样品组, 测量值记为 $A_{\text{对照}}$ 。按照下式计算羟基清除率:

$$\text{清除率}(\%) = (A_{\text{样品}} - A_0) / (A_{\text{对照}} - A_0) \times 100$$

(3) 亚铁离子还原能力: 根据 Wong 等^[13]的方法略作修改。移取 1 mL 不同浓度的大豆多糖溶液, 分别加入 2.5 mL $0.2\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PBS 缓冲液 (pH6.6) 和 2.5 mL 1% 的 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 50°C 水浴反应 20 min, 快速冷却后加入 2.5 mL 10% 的 TCA 溶液, 静置 10 min。取 1 mL 上清液, 分别加入 0.2 mL 0.1% 的 FeCl_3 溶液和 1 mL 蒸馏水混匀, 静置 10 min, 测定 700 nm 下的吸光度。

2 结果与讨论

2.1 不同降解处理的大豆多糖的分子量测定

按照表 1 所列的条件对大豆多糖进行降解处理, 并利用凝胶渗透色谱对降解之后的大豆多糖进行分子量的测定。得到 4 种大豆多糖的分子量分别为 550, 347, 285 和 21 kDa。

2.2 不同分子量大豆多糖的红外表征

图 1 显示 SSPS-Y 即未经降解的大豆多糖的红外图谱, $3\ 200 \sim 3\ 500\ \text{cm}^{-1}$ 出现的强的宽峰是由 O-H 的伸缩振动产生的, $2\ 928\ \text{cm}^{-1}$ 处出现的吸收峰是由 C-H 的伸缩振动产生的, $1\ 620\ \text{cm}^{-1}$ 处的峰归属为 $-\text{COO}^-$ 中 C=O 的不对称伸缩振动, $1\ 420\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰是 $=\text{CH}_2$ 的变形吸收峰, $1\ 070\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰为 O-H 的变角振动。这和尹艳^[14]利用微波提取、热水浸提及苏浩^[15]利用酶法提取出的水溶性大豆多糖的官能团种类相似。不同的是, 尹艳提取的大豆多糖在 $3\ 200 \sim 3\ 500\ \text{cm}^{-1}$ 处的宽峰出现分离, 在 $3\ 500\ \text{cm}^{-1}$ 处多出 1 个较弱的由 N-H 的伸缩振动产生吸收峰, 因此推测结构中含有游离氨基, 而本文所用的酸式浸提法提取的水溶性大豆多糖在 $3\ 200 \sim 3\ 500\ \text{cm}^{-1}$ 处表现为强吸收的宽峰, 基本不含有游离氨基。对比不同分子量的大豆多糖的红外图谱可知, 大豆多糖经过降解处理之后, 官能团基本种类没有发生变化, 但是经过过氧化氢降解之后的大豆多糖同原始大豆多糖对比, 在 $1\ 731\ \text{cm}^{-1}$ 处多出 1 个吸收峰, 经过归属, 该峰是醛基 ($-\text{CHO}$) 伸缩振动的特征峰, 即, 经过过氧化氢降解处理之后的大豆多糖, 其分子结构中增加了醛基, 相对于 $-\text{COOH}$ 中的 H 来说, 醛基中的 C-H 变得非常活泼, 容易被氧化, 因此可以推断经过过氧化氢处理之后的大豆多糖可能具有较强的还原性。

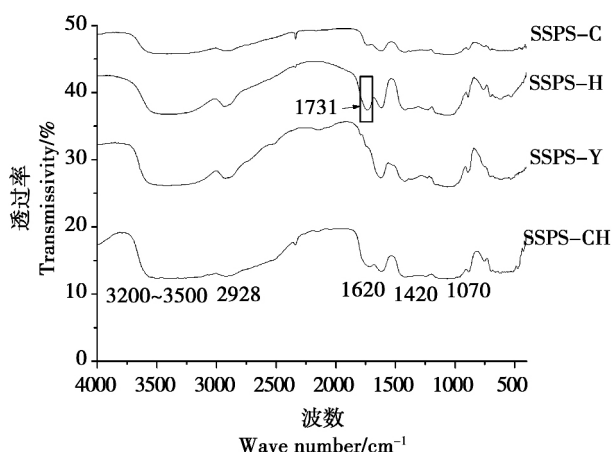


图 1 4 种水溶性大豆多糖的傅里叶红外变换光谱图

Fig. 1 FT-IR chromatographic of four kinds of SSPS

2.3 不同分子量大豆多糖的 XRD 表征

图 2 显示了 4 种大豆多糖的 XRD 谱图。从 SSPS-Y 即未经降解处理的水溶性大豆多糖的 XRD 谱图可以看出, 大豆多糖在 2θ 约为 21° 时有较明显的弥散的宽峰, 低的结晶度表现为弱的峰强度, 说明大豆多糖内部的结晶性很弱, 基本属于无定型结

构, 这和 Salaebashi 等^[16]的结果相同, 但是和尹艳等^[17]用微波法提取的大豆多糖相差较大, 这可能和 大豆多糖的提取条件有关。大豆多糖经不同方法降解之后, 在 2θ 约为 21° 时都存在较为明显的弥散的宽峰, 且其弥散宽峰出现位置与 SSPS-Y 基本相同, 说明降解后的大豆多糖与未降解大豆多糖一样属于无定型结构, 降解并没有改变大豆多糖的晶型结构。

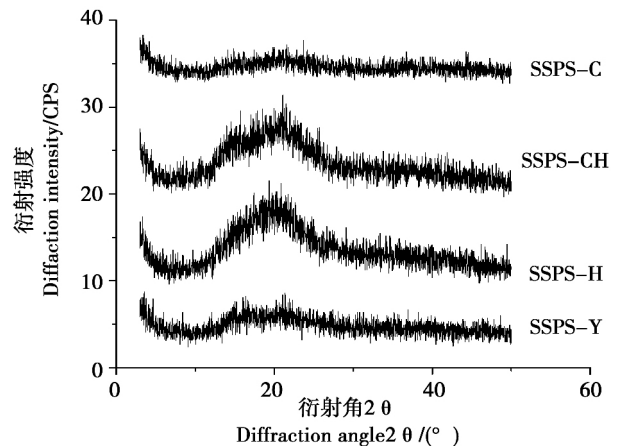


图 2 4 种水溶性大豆多糖的 XRD 图谱

Fig. 2 XRD patterns of four kinds of SSPS

2.4 不同分子量大豆多糖对 DPPH 自由基的清除作用

由图 3 可知, 4 种大豆多糖对 DPPH 自由基的清除作用随着大豆多糖浓度的增加而增加, 但程度略有不同。经过超声辅助过氧化氢处理的大豆多糖, 多糖分子量为 $21\ \text{kDa}$, 当其浓度从 1 增大到 $3\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 清除率仅提高了 10%; 而经过过氧化氢处理的大豆多糖, 多糖分子量为 $285\ \text{kDa}$, 当提高到相同浓度时, 清除率提高了约 60%。在大豆多糖浓度为 $3.0\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, SSPS-Y、SSPS-H、SSPS-C、SSPS-CH 对 DPPH 自由基的清除率分别为 67.8%、86.4%、55.2%、21.9%。在相同浓度条件下, 分子量为 $285\ \text{kDa}$ 的 SSPS-H 大豆多糖对 DPPH 的清除率最高, 而分子量为 $21\ \text{kDa}$ 的 SSPS-CH 大豆多糖清除率最低。

2.5 不同分子量大豆多糖对羟基自由基的清除作用

由图 4 可知, 大豆多糖对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率与浓度呈正相关。浓度在 $2.5\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, SSPS-Y、SSPS-H、SSPS-C、SSPS-CH 对羟基自由基的清除率分别为 21.8%、38.2%、26.8% 和 18.1%。同等浓度下, 分子量为 $285\ \text{kDa}$ 的 SSPS-H 对羟基自由基的清除能力大于其它的大豆多糖, 分子量为 $347\ \text{kDa}$ 的大豆多糖次之, 分子量为 $21\ \text{kDa}$ 的 SSPS-CH 对 $\cdot\text{OH}$

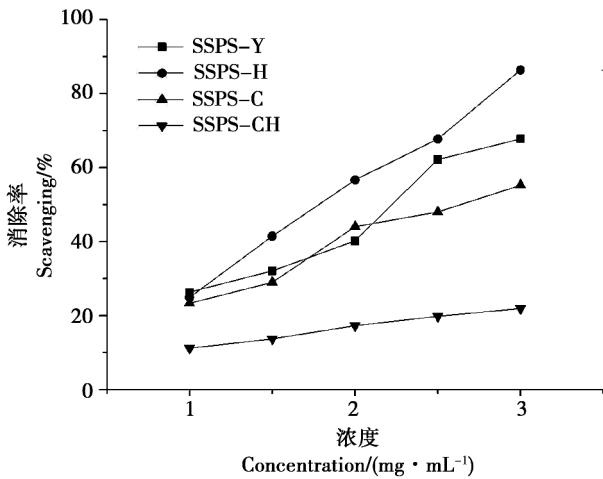


图3 不同分子量大豆多糖对 DPPH 自由基的清除效果

Fig. 3 The scavenging effect of SSPS with different molecular weights on DPPH

的清除能力最弱。Halliwell 等^[18]认为,多糖可以抑制和清除·OH,主要是由于多糖分子中的醇羟基能够螯合金属离子,从而抑制了金属离子催化过氧化氢产生·OH的反应,因此加入水溶性大豆多糖之后,大豆多糖能够螯合 Fe^{2+} ,并抑制了它在Fenton反应中的活性从而起到清除羟基自由基的作用。而不同分子量的大豆多糖可能是由于多糖大分子在溶液中的构象不同,导致发挥活性的醇羟基的数量不同,因此导致清除·OH的能力也有所不同。

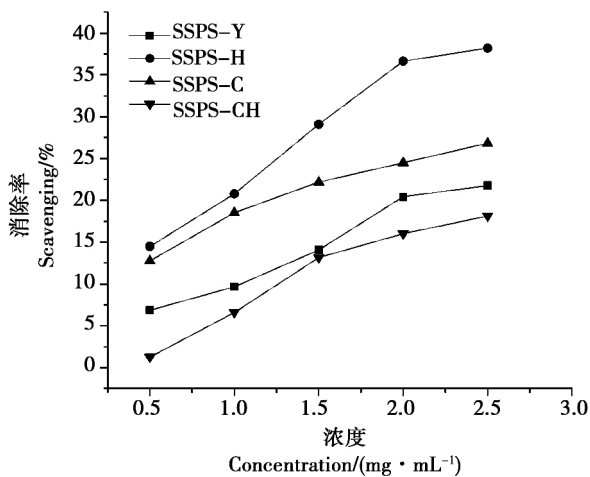


图4 不同分子量大豆多糖的对羟基自由基的清除能力

Fig. 4 The scavenging capacity of SSPS with different molecular weights against hydroxyl free radicals

2.6 不同分子量大豆多糖的亚铁离子还原能力

由图5可知,4种分子量大豆多糖的还原能力与其浓度呈正相关,在最大浓度处呈现最强还原能力,在大豆多糖浓度为 $2.0\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,SSPS-Y、SSPS-H、SSPS-C、SSPS-CH在700 nm处的吸光度值分别为0.27、0.57、0.29、0.21。同等浓度下,分

子量为347 kDa的SSPS-H大豆多糖还原能力最强,分子量为347 kDa的大豆多糖还原能力次之,分子量为21 kDa的SSPS-CH大豆多糖还原能力最弱。在分析4种大豆多糖的傅里叶红外图谱时提到,SSPS-H大豆多糖在 1731 cm^{-1} 处有1个明显的吸收峰,归属为醛基的吸收峰,也就是说,相对于原始大豆多糖SSPS-Y来说,SSPS-H分子结构中醛基官能团数目增多,而醛基是一种还原性很强的官能团,因此这就从结构方面阐释了SSPS-H具有较强的还原能力的原因。

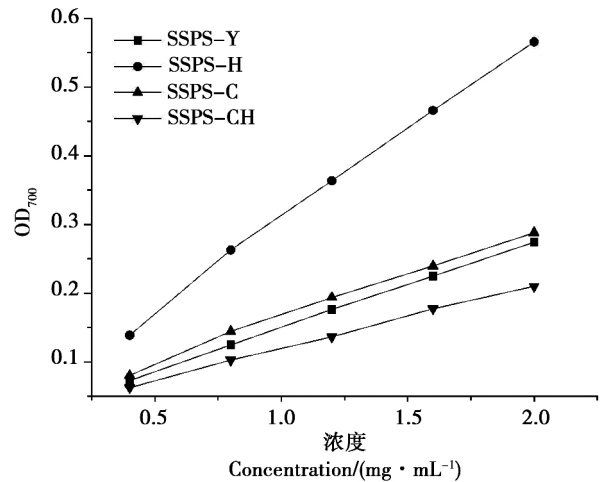


图5 不同分子量大豆多糖的还原能力

Fig. 5 Total reducing power of SSPS with different molecular weights

3 结论

利用酸提大豆多糖为原料,通过控制降解条件得到4种分子量的大豆多糖,并对4种大豆多糖进行了红外和X射线衍射分析,得出经降解之后4种分子量大豆多糖官能团结构基本相似,多糖晶型并未改变;利用3种不同的评价方法对4种分子量的大豆多糖进行了抗氧化活性探究,结果表明,4种分子量的大豆多糖均具有一定的抗氧化活性,且抗氧化活性与多糖浓度呈正相关,4种大豆多糖的抗氧化能力有所不同,其中,分子量为285 kDa的大豆多糖对自由基的清除能力最强,还原能力也最强,分子量为21 kDa的大豆多糖对自由基的清除能力最弱,还原能力最弱。

参考文献

- [1] Furuta H, Takahashi T, Tobe J, et al. Extraction of water-soluble soybean polysaccharides under acidic conditions [J]. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 1998, 62(12): 2300-2305.
- [2] Furuta H, Tobe J, Kiwata R, et al. Rheological properties of a

- heat-reversible gel of water-soluble soybean polysaccharide extracted under acidic condition [J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 1999, 63(12): 2075-2081.
- [3] Furuta H, Maeda H. Rheological properties of water-soluble soybean polysaccharides extracted under weak acidic condition [J]. *Food Hydrocolloids*, 1999, 13(3): 267-274.
- [4] Nakamura A, Nobuhara T, Matsumiya K, et al. Stabilization of milk protein dispersion by soybean soluble polysaccharide under acidic pH conditions [J]. *Food Hydrocolloids*, 2014, 34(1): 39-45.
- [5] Nakamura A, Maeda H, Corredig M. Emulsifying properties of enzyme-digested soybean soluble polysaccharide [J]. *Food Hydrocolloids*, 2006, 20(7): 1029-1038.
- [6] Nakamura A, Yoshida R, Maeda H, et al. Soy soluble polysaccharide stabilization at oil-water interfaces [J]. *Food Hydrocolloids*, 2006, 20(2): 277-283.
- [7] Aimin T, Hongwei Z, Gang C, et al. Influence of ultrasound treatment on accessibility and regioselective oxidation reactivity of cellulose [J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2005, 12(6): 467-472.
- [8] Zha X, Wang J, Yang X, et al. Antioxidant properties of polysaccharide fractions with different molecular mass extracted with hot-water from rice bran [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2009, 78(3): 570-575.
- [9] Im S, Oh S, Song S, et al. Identification of optimal molecular size of modified Aloe polysaccharides with maximum immunomodulatory activity [J]. *International Immunopharmacology*, 2005, 5(2): 271-279.
- [10] Christodouleas D C, Fotakis C, Papadopoulos K, et al. Evaluation of total reducing power of edible oils [J]. *Talanta*, 2014, 130(5): 233-240.
- [11] Zhao X H. Some factors that affect the free radical scavenging activity of tea extracts [J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 1999, 5(1): 62-67.
- [12] Zeng Y, Deng M, Lyu Z, et al. Evaluation of antioxidant activities of extracts from 19 Chinese edible flowers [J]. *Springerplus*, 2014, 3(1): 1-5.
- [13] Wong C, Li H, Cheng K, et al. A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay [J]. *Food Chemistry*, 2006, 97(4): 705-711.
- [14] 尹艳. 两种水溶性大豆多糖的红外光谱分析 [J]. *食品研究与开发*, 2013, 34(8): 67-68. (Yin Y. Study on the infrared spectrum analysis of two kinds of soluble soybean polysaccharides [J]. *Food Research and Development*, 2013, 34(8): 67-68.)
- [15] 苏浩. 豆渣中水溶性大豆多糖提取、结构鉴定及物性学研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2009: 83. (Su H. Study on extraction, structure identification and physical properties of water-soluble soybean polysaccharide from soybean dregs [D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2009: 83.)
- [16] Salarbashi D, Mortazavi S A, Noghabi M S, et al. Development of new active packaging film made from a soluble soybean polysaccharide incorporating ZnO nanoparticles [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 140: 220-227.
- [17] 尹艳, 高文宏. 两种水溶性大豆多糖的 X-射线衍射分析 [J]. *食品研究与开发*, 2014, 35(6): 1-2. (Yin Y, Gao W H. Study on analyzing X-ray diffraction patterns of two kinds of soluble soybean polysaccharides [J]. *Food Research and Development*, 2014, 35(6): 1-2.)
- [18] Halliwell B, Gutteridge J, Aruoma O. The deoxyribose method: A simple 'test-tube' assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals [J]. *Analytical Biochemistry*, 1987, 165(1): 215-219.

《园艺与种苗》征订启事

《园艺与种苗》为省级专业学术期刊,创刊于2011年,CN 21-1574/S ISSN 2095-0896。刊登范围主要涉及园艺、种苗、中草药、花卉、林业、园林(景观)板块,内容延伸到贮运与加工、质量管理与产品安全等相关领域。重点覆盖粮食作物与经济作物种苗,同时涉足种业行业分析和导向的相关研究。刊物主要面向全国高校、农业科研院所、各省市下属农业推广机构及相关农事企业发行。

主管、主办单位: 辽宁省农业科学院 协办单位: 辽宁省园艺学会辽宁省昆虫学会
邮发代号: 8-155 月刊单价: 15元 全年: 180元

欢迎通过本编辑部直接征订期刊(有优惠)

邮局汇款 辽宁省沈阳市东陵路84号 辽宁省农业科学院《园艺与种苗》编辑部

邮编: 110161(请在汇款单附言栏写上期刊征订信息)

银行转账 开户名: 辽宁省农业科学院 开户行: 沈阳农行马官桥分理处;

账号: 06130101040008400(请注明《园艺与种苗》期刊征订)

办公电话(传真): 024-31023002 电子信箱: yyyzm001@163.com

广告经营许可证: 2101001500050