

酶法制备黑莓果胶寡糖 及其抗氧化活性研究

丁鹏¹, 沈照鹏^{2,3}, 张京良^{2,3}, 李国霞¹, 万国韶⁴, 江晓路^{1,3,*}

(1. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东青岛 266003;

2. 中国海洋大学医药学院, 山东青岛 266003;

3. 青岛海洋生物医药研究院, 山东青岛 266071;

4. 青岛金凤凰庄园果品有限公司, 山东青岛 266213)

摘要:对黑莓果胶寡糖进行抗氧化活性研究,探究其自由基清除能力。对黑莓果胶进行提取,并利用果胶酶对其进行酶解,通过分级醇沉制得黑莓果胶寡糖。以 DPPH、ABTS、羟自由基清除能力验证不同黑莓果胶寡糖体外抗氧化活性。结果表明,4 倍醇沉寡糖对 DPPH、ABTS 自由基的 IC₅₀ 分别为 0.59、4.75 mg/mL。10 倍醇沉果胶寡糖对这两种自由基的清除作用更强,IC₅₀ 分别为 0.40、2.79 mg/mL。黑莓果胶寡糖具有显著的抗氧化活性,对 DPPH 自由基、ABTS 自由基有很强的清除作用,且具有明显的量效关系。

关键词:寡糖,果胶,黑莓,抗氧化活性

Study on preparation of pectic oligosaccharides from blackberry by enzymatic hydrolysis and its antioxidant activities

DING Peng¹, SHEN Zhao-peng^{2,3}, ZHANG Jing-liang^{2,3}, LI Guo-xia¹, WAN Guo-shao⁴, JIANG Xiao-lu^{1,3,*}

(1. College of Food Science and Engineering of Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. School of Medicine and Pharmacy of Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

3. Marine Biomedical Research Institute of Qingdao, Qingdao 266071, China;

4. Qingdao Golden Phoenix Manor Fruit Co.Ltd, Qingdao 266213, China)

Abstract: In order to study the antioxidant activity of the oligosaccharide of BlackBerry pectin, their radical scavenging activities were evaluated. After the enzymolysis of the extracted BlackBerry pectin, different oligosaccharide fragments were obtained with graded ethanol precipitation. *In vitro* antioxidant activities of that oligosaccharide were evaluated by the DPPH radicals, ABTS radicals, and hydroxyl radical scavenging activity. The results indicated that the oligosaccharide obtained with 4 times of ethanol could scavenge DPPH radicals with ABTS radicals with IC₅₀ values of 0.59 mg/mL and 4.75 mg/mL, respectively. By contrast, the oligosaccharide obtained with 10 times of ethanol showed relatively high scavenging activity on DPPH radicals and ABTS radicals with IC₅₀ value of 0.40 mg/mL and 2.79 mg/mL, respectively. The oligosaccharide of BlackBerry pectin exhibited significant antioxidant activity, and the scavenging activity on DPPH radicals and ABTS radicals presented a quantity-effect relation with the concentration of oligosaccharide.

Key words: oligosaccharides; pectin; blackberry; antioxidant activity

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2016)11-0076-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2016.11.007

黑莓属于蔷薇科悬钩子属,是欧美地区广泛种植的小果类果树,1994 年起开始在国内推广种植。黑莓含有丰富的氨基酸、维生素、微量元素,尤其硒的含量高达 2.07 μg/g,是苹果的 6~8 倍,柑橘的 12 倍^[1]。并含有大量的花色苷、黄酮、果胶、SOD 等活

性成分。

果胶是一类富含半乳糖醛酸的天然高分子化合物,存在于所有的陆生植物中^[2]。水果是果胶提取的重要原料,具有工业价值的主要是柑橘皮^[3],此外,学者还对苹果^[4]、荔枝^[5]、西番莲^[6]等作为果胶提取原

收稿日期: 2015-12-02

作者简介: 丁鹏(1990-),男,硕士,研究方向:应用微生物工程, E-mail: dpsunshine@126.com。

* 通讯作者: 江晓路(1959-),女,本科,教授,研究方向:应用微生物工程, E-mail: jiangxl@ouc.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金(U1406402-5)。

料进行了研究。通过酸法或酶法将果胶不完全降解可以得到果胶寡糖。果胶寡糖已被报道具有多种生理活性,如抗氧化活性^[7]、抑制肿瘤细胞生长^[8],改善肠道菌群^[9]等。黑莓是一种新兴水果,果胶占干重的5.23%^[10],目前未见对其果胶寡糖制备及活性研究的报道。本文以黑莓果胶寡糖为研究对象,初步探究了其在体外的抗氧化活性,以期发现一种功能性食品资源。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

黑莓 青岛金凤凰庄园果品有限公司,-18℃下保存;果胶酶 产果胶酶菌株 *Aspergillus niger* M-8 经发酵制得果胶酶制剂^[11],酶活力为 298 U/mL; DPPH、ABTS sigma 公司;无水乙醇、水杨酸等试剂均为分析纯。

冷冻干燥机 北京博医康实验仪器有限公司; L530 离心机 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; HWS24 型电热恒温水浴锅 上海一恒科学仪器有限公司; J722S 分光光度计 上海精密科学仪器有限公司。

1.2 黑莓果胶的提取

果胶的提取采用酸提醇沉法,但由于黑莓本身含有较多的还原糖,所以对酸提法^[12]略作改进。取 300 g 黑莓,解冻后加入 600 mL 乙醇进行匀浆,匀浆后 4000 r/min 离心 10 min,取沉淀加入到 750 mL 的 0.01 mol/L 的盐酸溶液中,90℃振荡提取 100 min,提取完成后,4000 r/min 离心 10 min,向上清中加入 2 倍体积的无水乙醇并放置 4 h,离心得到沉淀,将沉淀用无水乙醇漂洗两次,冻干得到黑莓果胶。测定得到果胶得率及其总糖和还原糖含量^[13]、糖醛酸含量^[14],并与酸提法进行比较。

1.3 黑莓果胶寡糖的分级制备

取 12 g 黑莓果胶溶解到 200 mL 水中,加热使果胶完全溶解,冷却至室温后,加入果胶酶 1.49×10^4 U, 35℃震荡酶解 12 h。酶解完成后,离心将不溶部分除掉,上清液分别加入 2 倍、4 倍、10 倍体积的乙醇进行分级醇沉,将得到的果胶寡糖冻干,分别标记为 2 倍、4 倍、10 倍醇沉果胶寡糖,计算得率,测定其总糖、还原糖、糖醛酸含量,采用 folin-酚法测定蛋白质含量^[15]。

1.4 黑莓果胶寡糖抗氧化能力的测定

通过分级醇沉得到的果胶寡糖,冻干后计算得率,将醇沉得率较高的糖配制成一定的浓度梯度,进行抗氧化活性研究。

1.4.1 清除 DPPH 自由基的能力 参考文献[13],向 2 mL DPPH 溶液(0.2 mmol/L,甲醇配制)中加入 2 mL 不同醇沉倍数的样品,混匀,室温避光条件下反

应 30 min,测定 517 nm 下的吸光值。计算不同浓度果胶寡糖对 DPPH 自由基的清除作用。

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

式中, A_i 为 2 mL DPPH 溶液 + 2 mL 样品的吸光值, A_0 为 2 mL 甲醇溶液 + 2 mL 样品的本底吸光值, A_0 为 2 mL DPPH 溶液 + 2 mL 蒸馏水的吸光值。

1.4.2 清除 ABTS 自由基的能力 参考文献[16]的方法,配制 7 mmol/L 的 ABTS 溶液 10 mL(用 0.2 mol pH7.4 的 PBS 配制),向其中加入过硫酸铵使过硫酸铵的终浓度为 2.45 mmol/L,室温黑暗环境下放置 16 小时,使用前,用 pH7.4 的 PBS 缓冲液将其稀释,使稀释后的 ABTS 自由基在 734 nm 下的吸光值为 0.7 ± 0.02 。

取 5 mL ABTS 溶液于试管中,加入 100 μ L 的寡糖溶液,混匀,室温黑暗环境下放置 5 min,测定 734 nm 下的吸光值。

$$\text{清除率}(\%) = (1 - A_i / A_0) \times 100$$

式中, A_i 为 5 mL ABTS 溶液 + 100 μ L 寡糖溶液的吸光值, A_0 为 5 mL ABTS 溶液 + 100 μ L 蒸馏水的吸光值。

1.4.3 清除羟自由基的能力 向试管中分别加入 9 mmol/L 的 FeSO_4 溶液 1 mL,9 mmol/L 的水杨酸-乙醇溶液 1 mL,样品 1 mL,最后加入 8 mmol 的 H_2O_2 溶液 1 mL,涡旋混匀后,37℃水浴 30 min,测定 510 nm 下的吸光值。

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

式中, A_i 为各样品吸光值, A_0 为用蒸馏水代替 H_2O_2 溶液测得的本底吸收, A_0 为以蒸馏水代替样品测得的吸光值。

1.5 数据统计与分析

所得数据采用 Excel 和 SPSS Statistics 进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 黑莓果胶的提取

黑莓中还原糖的含量非常高,以黑莓为原料提取果胶,需要一种得率高,提得粗果胶还原糖含量少的提取方法。通过醇辅助酸提得到粗果胶,得率为 5.61% (以黑莓干重计)。对粗果胶进行成分分析,测得粗果胶中总糖含量为 67.70%,糖醛酸含量为 47.44%,还原糖含量为 22.89%。这种提取方法相较于酸提法得率略有降低,但是得到的粗果胶中总糖含量、糖醛酸含量都有明显提升,尤其糖醛酸含量提高了 10.07%。半乳糖醛酸是果胶的主要组成部分,糖醛酸含量的提高也能在一定程度上表征果胶在粗果胶中含量的提高。提得果胶的品质提高可能是醇辅助匀浆过程中还原糖溶出且两倍体积的乙醇不足以使其沉淀,所以存在于上清中,离心后去除,使得

表 1 不同方法提取黑莓果胶的性质比较

Table 1 Comparison of properties of pectin extracted by different methods

提取方法	得率(%)	糖醛酸含量(%)	还原糖含量(%)	总糖含量(%)
酸提法	6.52 ± 0.44	37.37 ± 2.94	25.16 ± 0.23	58.87 ± 0.97
醇辅助酸提法	5.61 ± 0.10	47.44 ± 1.36	22.89 ± 1.54	67.70 ± 0.52

最终得到的粗果胶中还还原糖含量较少,而果胶含量相对提高。

2.2 黑莓果胶寡糖的分级制备

计算分级醇沉果胶寡糖得率,2倍醇沉果胶寡糖得率为3.17%,4倍醇沉寡糖得率最高,达到30.67%,10倍醇沉的得率为8.50%。通过比较,发现4倍、10倍醇沉的果胶寡糖中总糖含量较高,糖醛酸含量高达85.34%和83.20%。并且随着醇沉倍数的增加,还原糖的含量也大大增加。2倍醇沉寡糖中蛋白质杂质最多,这可能是加入的果胶酶被沉淀出来导致的。

相较于黑莓粗果胶,分级醇沉得到的果胶寡糖溶解性能大大提高。果胶溶解时,果胶粉末会与水接触迅速水合形成块状,并在块状表面形成高度水化的外壳,溶解极慢。而果胶寡糖极易溶于水,在冷水中稍加搅拌即可溶解。这种溶解性能的提高有利于对果胶寡糖进行进一步的加工利用。

表2 黑莓果胶寡糖性质比较

黑莓果胶寡糖	2倍醇沉果胶寡糖	4倍醇沉果胶寡糖	10倍醇沉果胶寡糖
得率(%)	3.17 ± 0.42	30.67 ± 2.50	8.50 ± 0.83
总糖含量(%)	67.54 ± 4.03	88.78 ± 3.52	88.56 ± 2.70
糖醛酸含量(%)	42.44 ± 5.42	85.34 ± 5.10	83.20 ± 5.28
还原糖含量(%)	34.37 ± 0.22	46.90 ± 2.84	57.45 ± 1.10
蛋白质含量(%)	20.63 ± 0.71	10.25 ± 0.73	10.09 ± 0.59

2.3 黑莓果胶寡糖体外抗氧化活性

2.3.1 清除DPPH自由基的能力 黑莓果胶寡糖对DPPH自由基的清除效果如图1所示,随着浓度的增加,对DPPH自由基的清除作用也越来越强。两种寡糖对DPPH自由基都有十分明显的清除作用,在较低的浓度下就有较好的清除效果,且10倍醇沉得到的果胶寡糖对DPPH自由基的清除作用强于4倍醇沉果胶寡糖。杜丽娟报道的4种山楂果胶酶解片段在浓度为1 mg/mL时,对DPPH自由基的清除均低于40%^[17]。而两种黑莓果胶寡糖在相同浓度下,DPPH自由基的清除率均在60%以上,这可能是不同来源的果胶,结构和活性基团的差异导致的。

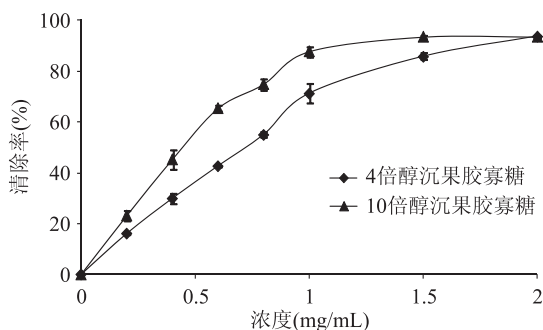


图1 黑莓果胶寡糖对DPPH自由基的清除作用

Fig.1 DPPH scavenging activity of pectic oligosaccharides from blackberry

利用SPSS软件,进行probit分析计算得到4倍

醇沉果胶寡糖的 IC_{50} 为0.59 mg/mL,而10倍醇沉寡糖的 IC_{50} 为0.40 mg/mL。 IC_{50} 的值越低,说明样品的清除效果越显著,10倍寡糖具有较低的 IC_{50} ,即10倍醇沉果胶寡糖对DPPH自由基的清除效果较好。

2.3.2 清除ABTS自由基的能力 黑莓果胶寡糖对ABTS自由基的清除作用如图2所示,两种寡糖都有十分明显的清除作用,10倍醇沉果胶寡糖的清除效果尤为突出,浓度为8 mg/mL时,对ABTS自由基的清除率就已经达到了99.59%。probit分析计算得到4倍醇沉果胶寡糖的 IC_{50} 为4.75 mg/mL,10倍醇沉寡糖的 IC_{50} 为2.79 mg/mL。

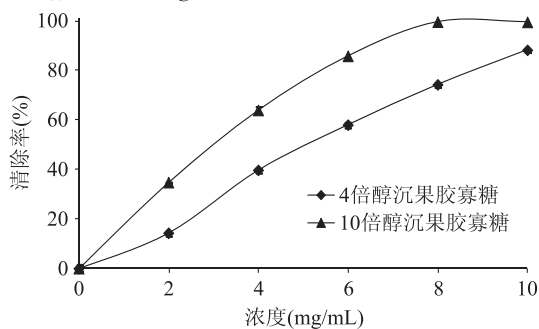


图2 黑莓果胶寡糖对ABTS自由基的清除作用

Fig.2 ABTS scavenging activity of pectic oligosaccharides from black berry

分析发现,在一定范围内,黑莓果胶寡糖对ABTS自由基的清除作用呈现出显著的量效关系,4倍、10倍醇沉的寡糖浓度与自由基清除率均呈现正比关系。基于这种正比关系,可以在一定浓度范围内,在已知寡糖浓度的情况下,对清除率进行预测。

2.3.3 清除羟自由基的能力 果胶寡糖对羟自由基的清除作用如图3所示,清除效果随寡糖浓度的增大而增强,但寡糖浓度达到20 mg/mL时,对羟自由基的清除率仍不到50%,所以黑莓果胶寡糖对羟自由基的清除效果不佳。

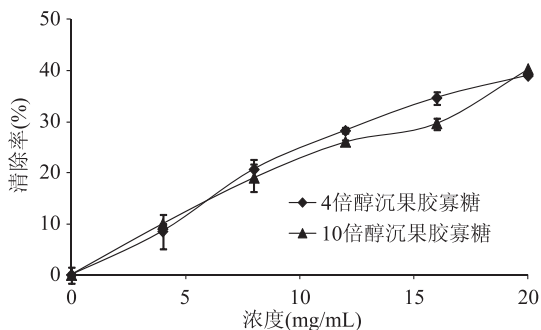


图3 果胶寡糖对羟自由基的清除作用

Fig.3 Hydroxy free radical scavenging activity of pectic oligosaccharides from black berry

黑莓果胶寡糖具有显著的抗氧化作用,是一种有效且天然的抗氧化剂,是一种潜在的功能食品资源。随着黑莓种植的推广和消费者对黑莓认可度的提高,对黑莓利用开发提出了新的要求,开发黑莓果汁无疑为一条很好的出路。通常果汁加工中添加果胶酶的作用是高出汁率和澄清度,却忽略了添加果胶酶后,生成的果胶寡糖对功能性的提高作用,本

研究为这一观点提供了有力的支持。

3 结论

经体外自由基清除实验证实果胶寡糖具有显著的抗氧化作用。4 倍醇沉寡糖对 DPPH 自由基、ABTS 自由基的 IC_{50} 分别为 0.59、4.75 mg/mL。10 倍醇沉果胶寡糖对这两种自由基的 IC_{50} 分别为 0.40、2.79 mg/mL。两种果胶寡糖对自由基都有显著的清除作用,且 10 倍醇沉寡糖表现更为突出。目前尚未见对黑莓果胶寡糖制备及其活性的报道,本文对其抗氧化活性进行了初步探究,为黑莓研究开发提供了理论支持。

参考文献

- [1] 陆新龙.黑莓菊花饮料生产工艺[J].饮料工业,2002,5(5).
- [2] Willats W G T, Knox J P, Mikkelsen J D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel[J]. Trends in Food Science & Technology, 2006, 17(3): 97-104.
- [3] Cho C W, Lee D Y, Kim C W. Concentration and purification of soluble pectin from mandarin peels using crossflow microfiltration system[J]. Carbohydrate Polymers, 2003, 54(03): 21-26.
- [4] 章凯, 黄国林, 陈中胜, 等. 微波辅助萃取柠檬皮中果胶动力学及热力学研究[J]. 食品科学, 2010, 31(15): 107-111.
- [5] 姜翠翠, 陈小巧, 邱松山, 等. Box-Behnken 法优化提取荔枝渣中果胶工艺[J]. 食品科学, 2014, 10: 98-102.
- [6] Pinheiro E R, Silva I, Gonzaga L V, et al. Optimization of extraction of high-ester pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis flavicarpa*) with citric acid by using response surface methodology[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(13): 5561-5566.

[7] Li T, Li S, Du L, et al. Effects of haw pectic oligosaccharide on lipid metabolism and oxidative stress in experimental hyperlipidemia mice induced by high-fat diet [J]. Food Chemistry, 2010, 121(4): 1010-1013.

[8] 徐溪. 苹果果胶寡糖的分离制备及其活性研究[D]. 西安: 西北大学, 2010.

[9] G T, AK G, JM G, et al. A novel galactooligosaccharide mixture increases the bifidobacterial population numbers in a continuous *in vitro* fermentation system and in the proximal colonic contents of pigs *in vivo* [J]. Journal of Nutrition, 2005, 135(7): 1726-1731.

[10] 田金辉. 黑莓果汁的研制[D]. 无锡: 江南大学, 2006.

[11] 王志伟. 聚半乳糖醛酸酶的酶学性质及产物分析[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2007.

[12] 刘义武, 王碧. 柠檬皮中果胶提取工艺研究[J]. 内江师范学院学报, 2011, 10: 14-17.

[13] 赵丽. *P. fluorescens* 发酵生产胞外多糖的结构分析及活性评价[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.

[14] 曲昊杨, 朱文学, 刘琛, 等. 苹果渣果胶提取工艺优化及碱法降酯效果评价[J]. 食品科学, 2014, 14: 87-92.

[15] Li L, Ban Z, Li X, et al. Effect of 1-methylcyclopropene and calcium chloride treatments on quality maintenance of 'Lingwu Long' Jujube fruit [J]. Journal of Food Science and Technology-Mysore, 2014, 51(4): 700-707.

[16] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay [J]. Free radical biology and medicine, 1999, 26(9): 1231-1237.

[17] 杜丽娟, 李拖平, 王娜, 等. 山楂果胶分解物抗氧化作用研究[J]. 食品研究与开发, 2009, 6: 18-20.

《食品工业科技》扩增审稿专家的通知

首先感谢广大读者和作者对《食品工业科技》杂志的支持与帮助。

近年来《食品工业科技》杂志投稿量大幅增加,并且由于食品科学稿件覆盖面广,交叉学科多,现有审稿专家很难满足读者希望稿件及时审回的要求。为了进一步缩短审稿时间,及时发布稿件评审情况,本刊拟增加审稿专家,希望得到相关领域专业人士的支持。

审稿专家需同时符合以下基本条件:

- 1、食品、生物、营养、化学、分析检测及相关专业。
- 2、具有较高的专业英文水平。
- 3、高级职称。
- 4、以第一作者或通讯作者在中文核心期刊发表论文5篇以上。
- 5、能及时将稿件审回。

请有意者提供真实姓名、出生年、职称、学历、单位、联系电话、电子信箱、详细通信地址及自己最擅长的研究方向,并列五篇最能体现您学术水平的论文。

以上信息发送至 food100419@163.com。

收到您提交的信息后,杂志社组织遴选,对入选的审稿专家,我们会给您发送采编平台专家审稿区的用户名和密码。编辑部会根据您的研究方向提交送审稿件,审稿方式为登陆我刊网站在线审稿。编辑部会定期按审稿数量和我刊审稿费标准邮寄审稿稿酬。

谢谢支持!

《食品工业科技》杂志社