

黄原胶降解及其抗氧化性能研究

孙涛*, 熊小英, 魏颖隽, 谢晶, 薛斌

上海海洋大学食品学院, 上海 201306

摘要: 酸性条件下对黄原胶进行氧化降解, 透析得到两种黄原胶寡糖, 对产物进行 FT-IR 表征, GPC 法测定两种寡糖的分子量分别为 7500、10100。考察两种产物对超氧阴离子自由基 $O_2^{\cdot-}$ 和过氧化氢的清除活性以及还原能力, 结果表明 10100-XG 较 7500-XG 具有更强的抗氧化性能。这可能与黄原胶寡糖活性羟基数目有关。

关键词: 黄原胶; 氧化降解; 抗氧化性能

中图分类号: R285; Q539; TS202.3

文献标识码: A

Degradation and Antioxidant Activity of Xanthan Gum

SUN Tao*, XIONG Xiao-ying, WEI Ying-juan, XIE Jing, XUE Bin

College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306

Abstract: Two xanthan oligosaccharides were prepared by oxidative degradation in acidic condition. The products were characterized by FT-IR, and the molecular weight of the products determined by GPC method was 7500 and 10100, respectively. The antioxidant activities of the xanthan oligosaccharides were investigated by the scavenging of superoxide anion, hydrogen peroxide and reducing power. The result indicated that 10100-XG exhibited higher antioxidant activity than 7500-XG. It may be related to the the content of hydroxyl groups.

Key words: xanthan; oxidative degradation; antioxidant activity

生物体内自由基处于不断产生与清除的动态平衡中。一旦自由基产生过量或者机体清除自由基的能力减弱, 就会造成自由基的代谢失衡。许多疾病与自由基的代谢失衡导致的生物大分子损伤有关, 其中活性氧如超氧阴离子自由基与癌症、糖尿病、心脑血管疾病等密切相关^[1]。因此研究和寻找外源性自由基清除剂保持机体自由基代谢平衡具有重要意义。目前, 已发现多种微生物多糖具有抗氧化活性。黄原胶在 1952 年首先由美国农业部从野油菜假单胞分离得到, 因其优良的理化性能而被广泛关注^[2]。目前国内外对于黄原胶的研究主要集中在发酵提取及理化性能方面, 对其生物活性的研究较少。

黄原胶分子量大, 溶解性能差, 刚性双螺旋结构将活性基团包围在内部^[3], 限制了其生物活性, 故需对其进行改性, 其中降解是改性的重要手段之

一^[4], 降解后的黄原胶具有一定生物活性^[5]。本文采用氧化手段对黄原胶进行降解, 考察两种不同分子量黄原胶寡糖的抗氧化活性, 以期为黄原胶进一步开发研究提供思路。

1 实验部分

1.1 材料

黄原胶(食品级, 上海联合食品添加剂有限公司); 鲁米诺、DPPH(Sigma 公司); 其余试剂(均为分析纯, 上海化学试剂公司); 抗氧化测试所需溶液, 由二次蒸馏水配制。

WFZ UV2000 型紫外分光光度计(上海合利仪器有限公司); Delta 320 型 pH 计(梅特勒—托利多仪分析仪器上海有限公司); IFFM-D 型流动注射化学发光分析仪(西安瑞迈科技有限公司); JB90-D 型强力电动搅拌机, METTLER AE200 型电子分析天平, JI80-2B 型台式离心机。

1.2 黄原胶降解产物制备

将 36 g 黄原胶(XG)溶于 2000 mL 浓度为 0.4 mol/L 的 HCl 溶液中, 向其中加入 50 mL 30% H_2O_2 , 于 80 °C 下降解 5d, 冷却, 用 0.2 mol/L NaOH

收稿日期: 2010-10-21 接受日期: 2011-03-03

基金项目: 上海市生物医药和农业科技领域重点科技项目(08391911500); 2009 年上海市优秀学科带头人计划(09XD1402000); 上海市教委重点学科建设项目(J50704)

* 通讯作者 Tel: 86-21-61900363; E-mail: taosun@shou.edu.cn

调节溶液 pH 至 7, 先通过微孔过滤器过滤 (0.45 μm), 然后在蒸馏水中透析 (7000, 14000) 6 d, 冷冻干燥后分别得到两种黄原胶寡糖 (A, B) 各约 1.0 g。

1.3 测试表征

红外光谱在 EQUINOX55 傅立叶红外-拉曼光谱仪上进行, 采用 KBr 压片法制样, 测定波数范围为 400 ~ 4000 cm^{-1} , 分辨率为 0.8 cm^{-1} 。

采用 GPC 法测定黄原胶降解产物的相对平均分子量及其分布。GPC 测试条件如下: 柱子: TOSOH BIOSEP G4000SWXL; 流动相: 0.2 M 醋酸钠溶液; 色谱仪: Waters 515 型凝胶色谱仪; 检测器: Waters 2410 示差折光检测器; 进样量: 50 μL ; 柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$ 。标准物质为: 葡聚糖, 分子量分别为 473000、188000、76900、43200、10500。

1.4 抗氧化性能测定

1.4.1 对超氧阴离子自由基 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除

采用邻苯三酚-鲁米诺化学发光体系来检测 $\text{O}_2^{\cdot-}$ [6], 配制 pH = 10.20 的 0.5 mol/L Na_2CO_3 - NaHCO_3 缓冲溶液。并以此缓冲液作为溶剂配制 1.5×10^{-3} mol/L 的鲁米诺溶液以及不同浓度的样品溶液, 用 1×10^{-3} mol/L 的盐酸配制浓度为 0.1 mol/L 的邻苯三酚储备液, 使用前用去离子水稀释至浓度为 1×10^{-4} mol/L。用流动注射化学发光分析仪依次测定从稀到浓的样品溶液 (缓冲液为空白溶液), 读出峰面积, 试验重复三次。并按下式计算样品溶液对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除率: 清除率 = $(A_0 - A_i) / A_0 \times 100\%$ 。式中: A_0 —空白溶液峰面积 A_i —样品溶液峰面积

1.4.2 对过氧化氢的清除

配制 pH = 7.20 的 0.2 mol/L Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 缓冲溶液。取 7 支比色管, 分别加入浓度为 0.1 mol/L 的 H_2O_2 溶液 (磷酸盐缓冲液配)、不同浓度样品溶液各 2.0 mL。充分摇匀后于 33 $^{\circ}\text{C}$ 避光静置半小时, 在 230 nm 处测量吸光度 A_i 。空白组以去离子水代替样品溶液测定 A_0 , 对照组以磷酸盐缓冲溶液代替 H_2O_2 溶液测定 A_j 。试验重复三次, 并按下式计算样品溶液对过氧化氢的清除率: 清除率 = $[1 - (A_i - A_j) / A_0] \times 100\%$

式中: A_0 —空白组吸光度 A_i —不同浓度样品溶液吸光度 A_j —对照组吸光度

1.4.3 还原能力的测定

还原能力测定根据文献 [7] 进行并稍做改动, 具体操作为取 8 支比色管, 分别加入 pH = 6.60 的 0.2 mol/L 磷酸缓冲液、1% 铁氰化钾溶液各 2.5 mL, 然

后向每根管其中加入不同浓度样品溶液 2.0 mL。充分混匀后于 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 20 min, 取出后立即置于冰水中冷却, 然后加入 2.5 mL 10% 三氯乙酸溶液, 混匀后 2000 r/min 下离心 10 min, 另取 8 支比色管, 取离心后上层清液 2.0 mL 并加入去离子水 2.5 mL 和重新配制的 0.1% 的三氯化铁溶液 0.5 mL, 静置十分钟, 以去离子水为空白对照, 于 700 nm 处测定吸光度。吸光度的增强表明还原能力的增强。

2 结果与讨论

2.1 原料黄原胶及其寡糖的结构表征

图 1 是原料黄原胶 (XG) 以及黄原胶寡糖 (A、B) 的红外光谱图。由图可知, 酸性条件下氧化降解得到的两种分子量寡糖均保留了黄原胶的特征吸收峰 [8], 即 2920 cm^{-1} 处 $-\text{CH}_2$ 伸缩振动吸收峰; 1623 cm^{-1} 处丙酮酸酯中 $-\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动吸收峰; 1418 cm^{-1} 处羧酸盐中 $-\text{C}-\text{O}$ 伸缩振动吸收峰及 894 cm^{-1} 处 β -吡喃糖环中 C1-H 弯曲振动吸收峰, 这表明降解后的黄原胶基本结构单元未被破坏。XG 的 $-\text{OH}$ 伸缩振动吸收峰出现在 3436 cm^{-1} 处, 而 A 和 B 的伸缩振动吸收峰分别出现在 3408 cm^{-1} 和 3417 cm^{-1} 处, 表明降解后的黄原胶寡糖形成了更多的分子内或分子间氢键, 这可能是由于降解使得更多羟基暴露出来 [9]。

GPC 测试结果表明: 两种黄原胶寡糖 A、B 相对分子量分别为 7500 和 10100。

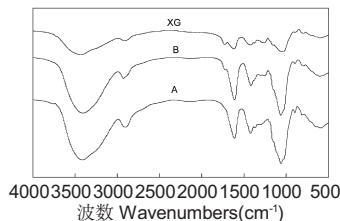


图 1 原料黄原胶及其寡糖的红外光谱图

Fig. 1 IR spectra of the xanthan polysaccharide and oligosaccharides

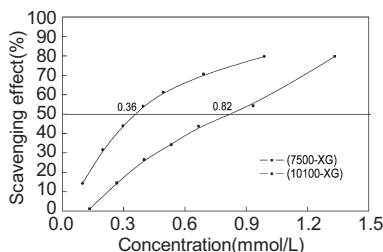


图 2 黄原胶寡糖对超氧阴离子 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除

Fig. 2 $\text{O}_2^{\cdot-}$ scavenging abilities of xanthan oligosaccharides

2.2 抗氧化性能测定

2.2.1 对超氧阴离子自由基 $O_2^{\cdot-}$ 清除

超氧阴离子自由基是所有活性氧自由基中的第一个自由基,它具有重要的生物功能和与多种疾病有密切关系。图2描述了不同分子量的黄原胶寡糖(7500-XG和10100-XG)对超氧阴离子 $O_2^{\cdot-}$ 清除效果。它们对超氧阴离子 $O_2^{\cdot-}$ 的清除活性随着浓度的升高而逐渐增强,其半抑制浓度 IC_{50} (对自由基清除率为50%时所需要的自由基清除剂浓度)分别为0.82和0.36 mmol/L。即对超氧阴离子清除能力为:10100-XG > 7500-XG。在该体系中,抗坏血酸对超氧阴离子自由基 $O_2^{\cdot-}$ 的半抑制浓度 IC_{50} 为0.191 mmol/L。

2.2.2 对过氧化氢的清除

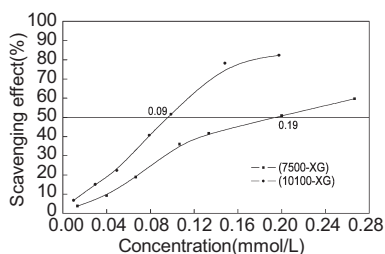


图3 黄原胶寡糖对过氧化氢的清除

Fig. 3 H_2O_2 scavenging abilities of xanthan oligosaccharides

过氧化氢按结构划分不属于自由基范畴,但在人体内的损伤作用和自由基类似,并能够形成毒性最大的羟基自由基,引发细胞膜中的不饱和脂肪酸发生过氧化反应,从而产生危害,因此在自由基损伤研究中过氧化氢也被算作一种自由基^[10]。图3描述了两种不同相对分子质量的黄原胶(7500-XG和10100-XG)对过氧化氢的清除效果。它们对过氧化氢的清除活性随着浓度的升高而逐渐增强,其对于过氧化氢的半抑制浓度 IC_{50} 分别为0.19和0.09 mmol/L。即对过氧化氢的清除能力为:10100-XG > 7500-XG。在该体系中,抗坏血酸对过氧化氢半抑制浓度 IC_{50} 为0.0030 mmol/L。

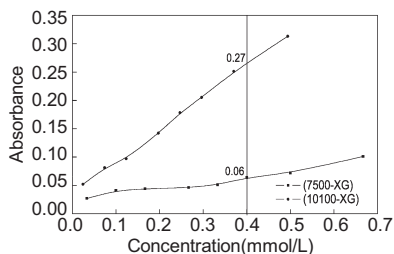


图4 黄原胶寡糖的还原能力

Fig. 4 Reducing power of xanthan oligosaccharides

2.2.3 还原能力的测定

还原能力是表示抗氧化物质提供电子能力的重要指标。研究表明抗氧化活性和还原能力之间存在着密切的关系^[11]。图4描述了不同分子量黄原胶寡糖(7500-XG和10100-XG)的还原能力。由图可知,随着浓度的增加,样品的吸光值也随之增加,还原能力逐渐增强。在0.4 mmol/L时,其吸光度分别为0.06和0.27,即还原能力为:10100-XG > 7500-XG。在相同体系下,抗坏血酸浓度为0.4 mmol/L时,吸光度为1.06。

综上所述,两种黄原胶寡糖对超氧阴离子自由基 $O_2^{\cdot-}$ 和过氧化氢的清除活性以及还原能力的强弱为:10100-XG > 7500-XG。黄原胶结构中含所有大量羟基可能是其具有抗氧化活性的主要因素^[12]。黄原胶结构单元的分子量是900,其中含有11个羟基。黄原胶的降解主要由主链葡萄糖链断裂引起,羟基含量基本保持不变^[13]。故一个7500-XG分子平均含有92个羟基,而一个10100-XG分子平均含有123个羟基。由此可知,10100-XG的羟基含量较高,这可能是导致其对超氧阴离子自由基 $O_2^{\cdot-}$ 和过氧化氢的清除活性以及还原能力较强的主要原因,相关机理还有待进一步研究。

3 结论

在酸性条件下氧化降解黄原胶,经过透析,筛选出两种不同分子量的寡糖,抗氧化性能测试表明,10100-XG > 7500-XG,这可能与黄原胶寡糖分子羟基含量有关。本研究为黄原胶寡糖进一步的改性接枝提供依据,为黄原胶的功能化应用研究提供有益的参考。

参考文献

- Forrest VJ, Kang YH, McClain DE, *et al.* Oxidative stress-induced apoptosis prevented by trolox. *Free Radic Biol Med*, 1994, 16: 675-684.
- Jansson PE, Kenne L, Lindberg B. Structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. *Carbohydr Polym*, 1975, 45: 275-282.
- Guo R (郭瑞), Ding EY (丁恩勇). Structure performance and applications of xanthan gum. *Chin Surfact Deterg Cosmet* (日用化学工业), 2006, 36(2): 42-45.
- Jiang LL (江丽丽), Zhang Q (张庆), Xu SA (徐世艾). Review of research on xanthan gum degradation. *Microbiol* (微生物学通报), 2008, 35: 1292-1296.