

# 淮山多糖的分离纯化、结构特性及抗氧化活性

肖诚熠<sup>1,2</sup>, 庞旭佳<sup>2</sup>, 张瑞芬<sup>2</sup>, 贾栩超<sup>2</sup>, 梁珊<sup>2</sup>, 易阳<sup>1</sup>, 黄菲<sup>2\*</sup>

(1. 武汉轻工大学食品科学与工程学院, 农产品加工与转化湖北省重点实验室, 湖北武汉 430023)  
(2. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 农业农村部功能食品重点实验室, 广东省农产品加工重点实验室, 广东广州 510610)

**摘要:** 该研究以酶解-超声辅助法提取得到的淮山粗多糖为原料, 采用凝胶柱进行分离纯化, 进而采用高效液相色谱、超高效聚合物色谱系统、傅里叶红外变换光谱和扫描电镜对其结构进行分析, 并探究了其铁离子还原能力和氧自由基清除能力。结果发现粗多糖经纯化后得到3个多糖级分, 其中CYP-III得率最高(65.2%), 其次是CYP-II(4.2%)和CYP-I(2.5%); 红外光谱显示, 三种多糖级分存在着吡喃糖且含有 $\alpha$ -糖苷键, 但CYP-I中含有更多的羧基; CYP-I是杂多糖(甘露糖38.29%、半乳糖30.61%、葡萄糖21.41%), 分子量最大(5.1 ku), 抗氧化活性最强; CYP-II主要由葡萄糖(87.92%)聚合而成, 分子量为4.0 ku; CYP-III是葡聚糖(葡萄糖99.09%), 分子量为2.5 ku, 抗氧化活性最弱; 扫描电镜结果显示CYP-I分布无序, 呈团簇状聚集且存在许多孔隙; CYP-II表面较为紧密但凹凸不平; CYP-III表面光滑但分布杂乱。结果表明在本研究中淮山多糖的抗氧化活性与其酸性糖、甘露糖、半乳糖、鼠李糖和羧基含量成正相关。该研究可为淮山多糖的开发利用提供理论依据。

**关键词:** 淮山多糖; 纯化; 抗氧化活性; 构效关系

文章编号: 1673-9078(2024)11-149-156

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.11.1292

## Isolation, Purification, Structural Characteristics and Antioxidant Activities of the Polysaccharides from Chinese Yam

XIAO Chengyi<sup>1,2</sup>, PANG Xujia<sup>2</sup>, ZHANG Ruifen<sup>2</sup>, JIA Xuchao<sup>2</sup>, LIANG Shan<sup>2</sup>, YI Yang<sup>1</sup>, HUANG Fei<sup>2\*</sup>

(1.College of Food Science and Engineering, Hubei Key Laboratory for Processing and Transformation of Agricultural Products, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023)  
(2.Sericultural & Agri-Food Research Institute Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory Foods, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangdong Key Laboratory Processing, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** In this study, crude polysaccharide isolated from Chinese yam by enzymatic hydrolysis and ultrasound-assisted extraction was separated and purified using a gel column, and then subjected to structural analyses by high performance liquid chromatography, ultra-high performance polymer chromatography, Fourier transform infrared spectroscopy, and scanning electron microscopy. Moreover, its ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) and oxygen

引文格式:

肖诚熠,庞旭佳,张瑞芬,等.淮山多糖的分离纯化、结构特性及抗氧化活性[J].现代食品科技,2024,40(11):149-156.

XIAO Chengyi, PANG Xujia, ZHANG Ruifen, et al. Isolation, purification, structural characteristics and antioxidant activities of the polysaccharides from Chinese yam [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(11): 149-156.

收稿日期: 2023-10-26

基金项目: 广东省重点研发计划项目(2022B0202020004); 国家重点研发计划项目(2021YFD1600103); 广东省特支计划本土创新团队项目(2019BT02N112)

作者简介: 肖诚熠(2000-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工, E-mail: chengyi.xiao@qq.com

通讯作者: 黄菲(1987-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 功能食品, E-mail: hf1311@163.com

radical absorbance capacity (ORAC) were examined. The results revealed that the crude polysaccharide after purification yielded three polysaccharide fractions. The yield of the third fraction, CYP-III, was the highest (65.2%), followed by CYP-II (4.2%) and CYP-I (2.5%). Fourier transform infrared spectroscopy revealed that all three polysaccharide fractions contained pyranose and  $\alpha$ -glycoside bonds, but CYP-I contained a higher amount of carboxyl groups. CYP-I was identified as a heteropolysaccharide composed of mannose (38.29%), galactose (30.61%), and glucose (21.41%), and had the highest molecular weight (5.1 ku) and the strongest antioxidant activity. CYP-II was found to be composed mainly of glucose (87.92%) and had a molecular weight of 4.0 ku. CYP-III was identified as a glucan (glucose 99.09%) with a molecular weight of 2.5 ku and the weakest antioxidant activity. The scanning electron microscopy examination revealed that CYP-I was disordered and appeared in clusters with numerous pores; CYP-II had a compact but uneven surface, whilst CYP-III had smooth surfaces but distributed randomly. The results showed that the antioxidant activity of Chinese yam polysaccharide in this study was significantly positively correlated with the contents of acid sugars, mannose, galactose, rhamnose, and carboxyl groups. This study can provide a theoretical basis for the development and utilization of yam polysaccharides.

**Key words:** Chinese yam polysaccharide; purification; antioxidant activity; structure-activity relationship

广东淮山是山药的一种,是薯蓣属薯蓣科植物。山药在全球大概有 600 个品种,主要分布在热带或者亚热带地区,最早记录在《神农本草经》上<sup>[1]</sup>。它不仅是一种重要的药材更是一种家中常用的食材。《本草纲目》中记载:山药能益肾气,健脾胃,止泄痢,化痰涎,润皮毛<sup>[2]</sup>;同时现代药理学研究表明山药具有提高免疫力<sup>[3]</sup>、改善肠道菌群<sup>[4]</sup>、抗衰老、降血糖和降血脂等功效<sup>[5]</sup>。

山药中不仅含有丰富的淀粉<sup>[6]</sup>,能作为人类生命活动能量的来源,还拥有着众多的活性物质如:皂苷<sup>[7]</sup>、尿囊素<sup>[8]</sup>、多酚<sup>[9]</sup>和多糖<sup>[10]</sup>等。目前多糖被认为是山药中最为重要的活性物质之一,且相关研究主要集中在山药多糖的高效提取及提取过程中活性的变化,例如:Xue 等<sup>[11]</sup>采用响应面法优化改进了白玉山药多糖的超滤辅助提取工艺,并发现该多糖具有清除 DPPH 自由基、羟基自由基和超氧阴离子自由基的能力,且对人胃癌 BGC-823 细胞生长有较强的抑制作用;Liu 等<sup>[12]</sup>选择酶辅助提取法提取山药多糖,同时将其与传统的热水提取法进行对比,发现木瓜蛋白酶水解得到的多糖具有较好的乳化性和稳定性,可作为 O/W 乳化剂以增加山药的工业价值。目前已有许多研究表明多糖的结构与其生物活性密切相关<sup>[13-15]</sup>,Li 等<sup>[16]</sup>通过热水提取、加压热水提取、超声波辅助提取、酸辅助提取和碱辅助提取对沙棘中的多糖成分进行提取,实验结果显示:高相对分子质量和半乳糖醛酸含量有助于多糖形成较强的交联网络,从而提高黏度。Gu 等<sup>[17]</sup>对比研究了热水提取、超声辅助提取和亚临界水提取对慈姑多糖的影响。结果发现,经亚临界水提取得到的多糖具有更高的相对分子质量、糖醛酸含量和鼠李糖

占比,且具有最强的 DPPH、ABTS 和羟自由基清除能力。目前,虽然许多研究者致力于淮山多糖的高效提取以及提取过程中淮山多糖结构和活性变化的研究,但由于目前所采用的提取方法得到的多糖均为粗制品,存在着杂质多、成分复杂等问题,既影响了对其结构的研究,也会干扰多糖生物活性的测定,从而限制了对多糖构效关系的探索。

实验室前期建立了一套高得率高活性的淮山多糖制备工艺,为进一步地提供山药多糖的开发利用理论依据,基于以上问题本研究在酶解-超声辅助提取淮山多糖工艺的基础上,通过 HiPrep-Sephacryl S-300HR 凝胶柱将所提取得到的淮山粗多糖进行纯化。期望通过对比不同级分多糖在基本成分、单糖组成、相对分子质量、官能团、显微结构等理化特性之间差异的同时,探讨其与铁离子还原能力 (FRAP) 和氧自由基清除能力 (ORAC) 之间的联系,并建立淮山多糖理化特性与生物活性之间的关系,为淮山多糖的开发利用提供理论依据。

## 1 实验方法

### 1.1 实验材料与仪器

淮山购自广东茂名,品种为广东深薯。纤维素酶 (500 U/mg)、果胶酶 (500 U/mg)、木瓜蛋白酶 (800 U/mg),购自上海瑞永生物公司; $\alpha$ -淀粉酶,购自诺维信生物技术有限公司;各单糖标准品(葡萄糖醛酸、葡聚糖、葡萄糖、木糖、岩藻糖、阿拉伯糖、甘露糖、半乳糖、鼠李糖,肌醇),购自上海源叶生物科技有限公司;葡聚糖标准品,购自美国 Sigma 公司;FRAP 试剂盒,购自上海碧云天生物技

术有限公司；其余试剂纯度皆为分析纯，购自国药集团化学试剂有限公司；HiPrep-Sephacryl S-300HR 凝胶柱，购自美国 GE healthcare 公司。

## 1.2 淮山粗多糖的提取

参考课题组前期建立的淮山多糖的提取方法<sup>[18]</sup>：将新鲜的淮山洗净、去皮、护色后烘干（40℃，20 h），经粉碎机粉碎后过 80 目筛待用。将淮山粉使用 95% 乙醇（V/V）回流提取，去除小分子糖后，离心取沉淀，烘干后按料液比 30 mL/g 加入蒸馏水，调节 pH 值至 5.5，添加复合酶（纤维素酶 8 000 U/g、果胶酶 4 000 U/g 和木瓜蛋白酶 8 000 U/g）并置于 60℃ 水浴酶解 90 min。待反应结束后沸水浴 10 min 灭酶，在超声温度 63℃、超声功率 232 W 条件下浸提 48 min。然后 8 000 r/min 离心 15 min，收集上清液，并将沉淀重新提取一次，合并两次收集的上清液，加入 0.1（m/V）的高温  $\alpha$ -淀粉酶（V/V）于 95℃ 水浴除去淀粉，减压浓缩至原体积的 1/5 后使用 Sevag 法除蛋白 5 次，加入 4 倍体积的 95% 乙醇（V/V）并置于 4℃ 过夜。离心收集沉淀，使用无水乙醇清洗沉淀 2 次，将沉淀冻干得淮山粗多糖。

## 1.3 淮山多糖的分离纯化

采用 HiPrep-Sephacryl S-300HR 凝胶柱（26 mm×600 mm）对粗多糖进行纯化，将淮山粗多糖配制成 10 mg/mL 的溶液，过 0.45  $\mu$ m 滤膜后上样，上样量为 10 mL，洗脱液为去离子水，流速 1 mL/min，洗脱体积为 1 个柱体积（320 mL），用自动收样器收集洗脱液，每管收集 5 mL，苯酚-硫酸法逐管测定多糖含量，按峰收集、合并各级分洗脱液，减压浓缩后冻干得各级分多糖。按照如下公式计算各级分多糖的得率：

$$Y = \frac{m_1}{m_2} \times 100\% \quad (1)$$

式中：

Y——多糖得率，%；

$m_1$ ——各级分冻干后质量，mg；

$m_2$ ——上样量，mg。

## 1.4 基本成分的测定

基本组成的测定参考本实验室前期方法<sup>[19]</sup>，中性糖的测定采用苯酚-硫酸法，以葡萄糖作为标准品；还原糖的测定采用 DNS 法，以葡萄糖作为标准品；酸性糖的测定采用改良间羟基联苯比色法，以半乳糖醛酸作为标准品。

## 1.5 单糖组成分析

采用 HPLC 法测定样品的单糖组成<sup>[18]</sup>。具体方法如下：称取 2 mg 样品，加入 0.5 mL 2 mol/L 的三氟乙酸，于 120℃ 水解 2 h 后用氮气吹干。加入溶于无水甲醇的 0.5 mol/L 的 1-苯基-3-甲基-5-吡啶啉酮（PMP）试剂和 0.3 mol/L 的 NaOH 溶液各 0.5 mL，混匀后于 70℃ 水浴反应 30 min 进行衍生化。反应结束后加入 0.3 mol/L 的 HCl 0.5 mL，再使用氯仿萃取 3 次，取水相层过 0.22  $\mu$ m 滤膜上机检测。采用 Agilent 1260 高效液相色谱系统和 ThermoODS-2 C18 色谱柱（4.6 mm×250 mm，i.d. 5  $\mu$ m），流动相为磷酸盐（0.1 mol/L，pH 值 7.0）和乙腈的混合液（83:17，V/V），流量为 1 mL/min，进样量 10  $\mu$ L，检测器 DAD 波长为 245 nm。

## 1.6 分子量测定

采用超高效聚合物色谱系统（Acquity APC，Waters 公司）检测多糖分子量。参照刘慧君等<sup>[19]</sup>的方法稍作修改，将淮山多糖配制成 2 mg/mL 的溶液，过 0.45  $\mu$ m 膜后上机检测，采用葡聚糖标准品（1.27、5.22、11.6、23.8、48.6、80.9、147.6、273、409.8、667.8 ku）建立标准曲线。色谱条件为：Waters ACQUITY APCTM AQ 450、ACQUITY APCTM AQ 200 和 ACQUITY APCTM AQ 45 三根色谱柱串联，流动相为超纯水，流量为 0.7 mL/min，检测器为 RI 示差检测器，柱温箱和检测器温度保持在 40℃，进样量为 10  $\mu$ L。

## 1.7 傅里叶变换红外光谱分析

采用 VERTEX33 型红外光谱仪分析三个多糖级分的官能团差异。将 1 mg 各级分山药多糖与 100 mg 溴化钾混合研磨，并压成 1 mm 的薄片，在中红外区域（4 000~400  $\text{cm}^{-1}$ ）内以 4  $\text{cm}^{-1}$  的分辨率进行扫描。

## 1.8 扫描电镜观察

称取适量多糖样品，将其粘附于样品台上，置于真空喷镀仪内镀导电层，然后将其置于电镜台上进行观察。工作条件：低真空模式、5 kV 电压、3.0 光斑尺寸，放大倍数分别为 500、1 k 和 2 k 倍。扫描电子显微镜仪器型号为 S-3400N-II，HITACHI 公司。

## 1.9 抗氧化活性

### 1.9.1 铁离子还原能力（FRAP）

参照徐湘等<sup>[18]</sup>的方法稍作修改，配制 5 mg/mL

的多糖溶液,以  $\text{FeSO}_4$  为标准品建立标准曲线,取 5  $\mu\text{L}$  样品 (5 mg/mL) 或  $\text{FeSO}_4$  标准溶液 (100~1 500  $\mu\text{mol/L}$ ),加入 180 mL FRAP 工作液,放置于 37  $^\circ\text{C}$  恒温培养箱中孵育 6 min 后,在 593 nm 处测定吸光值,将吸光值带入标准曲线计算样品的铁离子还原能力。测定结果以每克干重多糖中所含的  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  当量 ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  equivalents/g dry weight) 表示,简称为  $\mu\text{molFeE/g DW}$ 。

### 1.9.2 氧自由基清除能力 (ORAC)

参 Zhang 等<sup>[20]</sup>的方法稍作修改,取 20  $\mu\text{L}$  样品 (5 mg/mL) 或 Trolox 标准溶液 (6.25、12.5、25、50  $\mu\text{mol/L}$ ),加入 200  $\mu\text{L}$  荧光素工作液 (0.96  $\mu\text{mol/L}$ ),放置于 37  $^\circ\text{C}$  恒温培养箱中孵育 20 min,加入 20  $\mu\text{L}$  AAPH 溶液 (119 mmol/L),每隔 4.5 min 测定一次荧光强度 (激发波长为 485 nm,发射波长为 538 nm),重复 35 次。根据 Trolox 标准曲线计算样品的 ORAC 值,以每克干重多糖中所含的 Trolox 当量表示,简称为  $\mu\text{mol TE/g DW}$ 。

### 1.10 数据处理与分析

所有实验样本均为一式三份,并采用 SPSS 19 进行数据分析,Origin 2022 绘图,结果以平均值  $\pm$  标准差的形式表示。

## 2 结果与讨论

### 2.1 淮山多糖的分离纯化

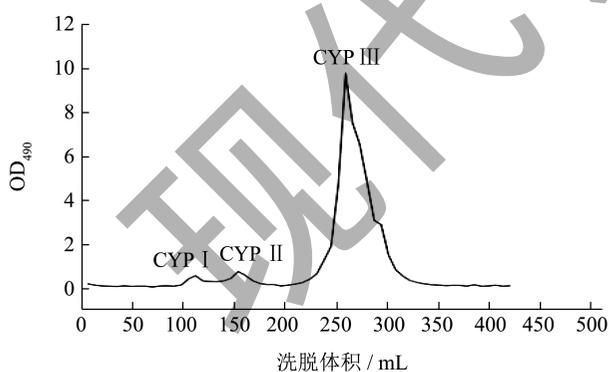


图 1 淮山多糖的洗脱曲线图

Fig.1 Elution profile of Chinese yam polysaccharide

淮山粗多糖经 HiPrep-Sephacryl S-300HR 凝胶柱纯化后的洗脱曲线如图 1 所示,结果表明淮山粗多糖有 3 个不同级分,根据出峰顺序分别命名为 CYP-I、CYP-II 和 CYP-III,得率为分别为 2.52%、4.23%、65.21%。三个级分的峰形良好,说明经过分离后各级分多糖纯度较高,且 CYP-III 是淮山多

糖中的主要级分。

### 2.2 淮山多糖各级分的化学组成

3 个多糖级分的基本化学组成见表 1。由表可知,三个级分主要由中性糖组成,含有少量的糖醛酸和还原糖。CYP-I 的糖醛酸含量最高为 11.93%,还原糖含量最低为 1.85%,CYP-II 的中性糖 (51.92%) 和糖醛酸 (4.38%) 含量最低,CYP-III 的中性糖 (72.58%) 和还原糖 (15.63%) 含量最高。当糖分子含有醛基且以开链的形式存在于水溶液中时,其就可以作为还原剂将 3,5-二硝基水杨酸还原为 3-氨基-5-硝基水杨酸,因而被检测出为还原糖<sup>[21]</sup>。多糖分子中各单糖通过其半缩羟基与半缩醛基或醇羟基缩合形成糖苷键连接,多糖聚合度越高,其含有的“开链”醛基含量越少,表现出的还原能力越弱,采用 DNS 法检测出的还原糖含量越低。本研究中,由于凝胶色谱柱分离多糖时根据其分子量大小来进行分离,聚合度高、分子量大的级分先出峰,聚合度小、分子量小的级分后出峰,因此,CYP-I 的分子量和聚合度大于 CYP-III,这可能是 DNS 法检测出 CYP-I 中还原糖低,CYP-III 中还原糖含量较高的原因之一。

表 1 淮山多糖的基本化学组成

Table 1 Basic chemical composition of polysaccharides from Chinese yam

化学组成 / %	CYP-I	CYP-II	CYP-III
中性糖	61.16 $\pm$ 0.50 <sup>b</sup>	51.92 $\pm$ 0.96 <sup>c</sup>	72.58 $\pm$ 2.68 <sup>a</sup>
还原糖	1.58 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	1.80 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	15.63 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>
糖醛酸	11.93 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	4.38 $\pm$ 0.29 <sup>c</sup>	8.14 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>

注:同一行不同小写字母表示样品间有显著差异 ( $P < 0.05$ )。

### 2.3 淮山多糖各级分的单糖组成及分子量分布

3 个多糖级分的单糖组成如表 2 所示,与实验室前期实验结果相似,淮山多糖主要由葡萄糖组成,同时含有少量的甘露糖、半乳糖和阿拉伯糖<sup>[18]</sup>。其中 CYP-I 和 CYP-II 含有 6 种单糖,CYP-III 含有 5 种单糖。在 CYP-I 中,主要由甘露糖 (38.29%)、葡萄糖 (21.24%) 和半乳糖 (30.61%) 组成,而 CYP-II 和 CYP-III 则主要由葡萄糖组成,但是两者中葡萄糖的构成比不一样,CYP-II 以葡萄糖 (87.92%) 为主,含有少量的甘露糖 (2.78%)、半乳糖 (4.60%) 和木糖 (3.10%),而 CYP-III 中葡萄糖含量占比为 99.09%,是一种葡聚糖。

表 2 淮山多糖的单糖组成和分子量分布

Table 2 Monosaccharide composition and molecular weight distribution of polysaccharides from Chinese yam

级分	单糖组成/(mol%)							分子量分布 Mw/(ku)/PID
	甘露糖	鼠李糖	半乳糖酸	葡萄糖	半乳糖	木糖	阿拉伯糖	
CYP-I	38.29 ± 3.81 <sup>c</sup>	2.55 ± 0.08 <sup>b</sup>	1.47 ± 0.01 <sup>c</sup>	21.41 ± 6.59 <sup>a</sup>	30.61 ± 2.42 <sup>c</sup>	—	5.65 ± 0.32 <sup>b</sup>	5.1/1.23
CYP-II	2.78 ± 0.26 <sup>b</sup>	—	0.76 ± 0.06 <sup>b</sup>	87.92 ± 0.57 <sup>b</sup>	4.60 ± 0.26 <sup>b</sup>	3.10 ± 0.60	0.82 ± 0.12 <sup>a</sup>	4/1.1
CYP-III	0.23 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.18 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.09 ± 0.05 <sup>a</sup>	99.09 ± 0.18 <sup>c</sup>	0.38 ± 0.03 <sup>a</sup>	—	—	2.5/2.04

注: 不同字母表示样品间具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

3 个多糖级分的平均分子量如表 2 所示, CYP-I、CYP-II 和 CYP-III 的分子量大小为: 5.1、4.0 和 2.5 ku。3 个级分的分子量分布情况与其分离纯化过程中的出峰顺序相吻合, 出峰时间早的级分分子量大, 出峰时间晚的级分分子量大, 三种样品的分散系数 (PID) 均在 1~3 之间, 表明这三个级分的样品分子量分布较为均匀, 且纯度较高。

#### 2.4 淮山多糖各级分的红外光谱

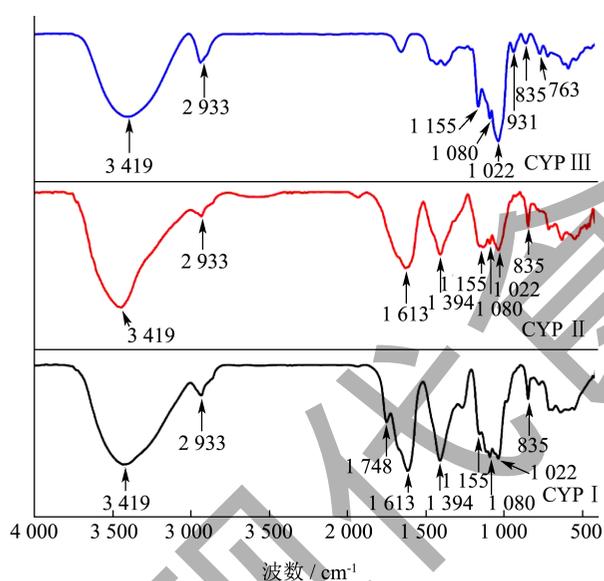


图 2 淮山多糖的 FT-IR 图谱

Fig.2 FT-IR spectra of polysaccharide from Chinese yam

3 个多糖级分的红外光谱图见图 2。三个多糖级分的红外光谱图具有一定的相似性, 如在  $3419\text{ cm}^{-1}$  处大而宽的峰是羟基伸缩振动的特征吸收峰,  $2933\text{ cm}^{-1}$  和  $1394\text{ cm}^{-1}$  处尖峰分别为 C-H 的伸缩振动和 C-H 的弯曲振动吸收峰, 这三种特征吸收峰是多糖的标志性峰<sup>[22]</sup>。在  $1155$ 、 $1080$  和  $1022\text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰表明存在吡喃糖结构,  $931\text{ cm}^{-1}$  和  $763\text{ cm}^{-1}$  的谱带也证实了吡喃糖的存在<sup>[23]</sup>。在  $835\text{ cm}^{-1}$  是  $\alpha$ -糖苷键的特征吸收峰<sup>[24]</sup>, 表明三种多糖都存在着吡喃糖且含有  $\alpha$ -糖苷键。此外, 3 个多糖级分的红外光谱图

也有其特异性, 如  $1748\text{ cm}^{-1}$  的吸收峰是酯化羧基的 C=O 收缩振动产生<sup>[25]</sup>, 该吸收峰只在 CYP-I 中出现, 表明只有其含有酯化羧基;  $1613\text{ cm}^{-1}$  的吸收峰是游离羧基的 C=O 收缩振动产生<sup>[25]</sup>。

#### 2.5 淮山多糖各级分的微观结构

扫描电镜可以直观地观察多糖的微观结构<sup>[26]</sup>, 淮山多糖各级分的微观结构如图 3 所示。结果表明, 3 个级分具有不同的表现形貌。CYP-I 分布杂乱, 且存在许多孔隙, 在放大倍数为 2 k 时可以发现 CYP-I 呈团簇状聚集并形成了许多不规则的细小突触状结构; CYP-II 表面形成了较为紧密但凹凸不平的结构, 在高倍镜下能明显观察到许多的突起, 不存在明显的裂缝和孔洞。CYP-III 呈现出杂乱、不规则的碎片状, 当放大倍数提高到 2 k 倍时可以观察到 CYP-III 的表面呈现出光滑的构造。

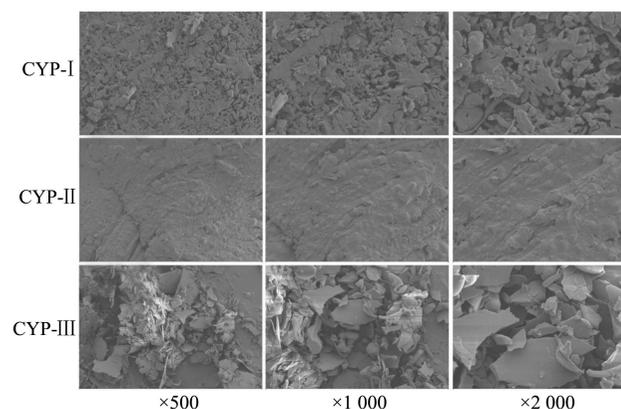


图 3 淮山多糖的扫描电镜图

Fig.3 Scanning electron microscope image of polysaccharide from Chinese yam

#### 2.6 淮山多糖各级分的抗氧化活性

氧化应激可对蛋白质、DNA 和脂质等大生物分子造成氧化损伤, 从而增加患癌症和心血管疾病的风险<sup>[27]</sup>, 研究表明, 补充抗氧化剂对疾病的预防和治疗具有积极作用<sup>[28]</sup>。具有抗氧化能力的物质通

常以提供电子的形式清除自由基,因此其抗氧化能力通常与还原力呈现明显的正相关。FRAP法是通过化学法计量铁离子含量的变化,来反映物质的抗氧化能力<sup>[29]</sup>。FRAP实验结果表明三个多糖级分皆有良好的铁离子还原能力,其中,CYP-I的还原能力最强达到了16.1  $\mu\text{mol FeE/g DW}$ ,CYP-II的还原力为12.5  $\mu\text{mol FeE/g DW}$ ,CYP-III的还原力最弱(7.5  $\mu\text{mol FeE/g DW}$ )仅为CYP-I的49.67%,其差异具有显著性( $P < 0.05$ ) (图4)。

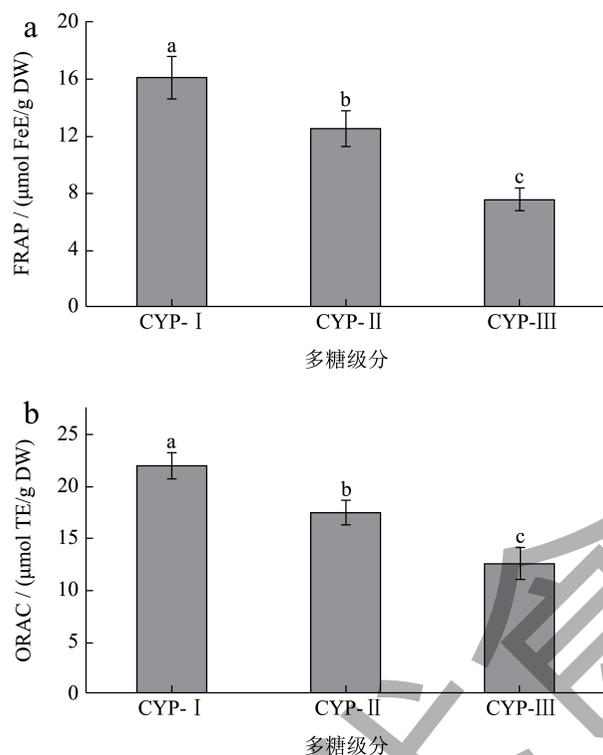


图4 淮山多糖的抗氧化能力

Fig.4 Antioxidant capacity of polysaccharide from Chinese yam

注:不同字母表示样品间具有显著性差异( $P < 0.05$ )。

与FRAP的单电子转移的反应机制不同,ORAC是通过抑制氢原子的转移从而终止自由基的链式反应。并且ORAC法使用了与生物体系类似的自由基,更接近生物体内的反应过程<sup>[27,28]</sup>。三个级分多糖的氧自由基抗氧化能力如图4所示,其大小依次为CYP-I (22  $\mu\text{mol TE/g DW}$ ) > CYP-II (17.5  $\mu\text{mol TE/g DW}$ ) > CYP-III (12.48  $\mu\text{mol TE/g DW}$ ),具有显著差异( $P < 0.05$ )。

在三个多糖级分中CYP-I表现出最强的抗氧化活性,这可能与不同级分多糖间的结构差异有关。半乳糖醛酸的存在可能使得多糖有着较好的金

属离子螯合作用导致其抗氧化有一定提升<sup>[28]</sup>。Shen等<sup>[30]</sup>发现分子量较大的多糖具有更高的抗氧化活性,通过对比三种不同级分的单糖组成,我们发现阿拉伯糖、鼠李糖和半乳糖醛酸的占比均呈现出CYP-I > CYP-II > CYP-III的趋势,在本研究中这几种单糖的含量可能与抗氧化性成正比,这与他人文献中所报道的结论相符,多糖中鼠李糖、阿拉伯糖和半乳糖的占比越高,其对自由基的清除能力就越强<sup>[31,32]</sup>。通过对比三个多糖级分的官能团我们还发现CYP-I中拥有着更多的羧基,在一些化合物中羧基基团能够提供电子从而增强溶剂中分子间的相互作用,从而增强化合物的抗氧化活性<sup>[33]</sup>,因此这也可能是其有着更高的抗氧化活性的原因之一<sup>[34]</sup>。

### 3 结论

本研究以酶解-超声辅助法提取得到的淮山粗多糖为原料,采用HiPrep-Sephacryl S-300HR凝胶柱进行分离纯化得到3个不同多糖级分,并对比了不同级分的理化性质和抗氧化活性差异。发现CYP-I的得率最低(2.5%)、糖醛酸含量最高(11.93%);CYP-III的得率最高(65.2%)、中性糖含量最高(72.58%);3个多糖级分的分子量大小为:CYP-I (5.1 ku) > CYP-II (4.0 ku) > CYP-III (2.5 ku);CYP-I主要由甘露糖(38.29%)、半乳糖(30.61%)和葡萄糖(21.41%)组成,CYP-II和CYP-III则主要由葡萄糖组成(葡萄糖 > 85%);3种多糖都具有多糖的特征吸收峰,存在着吡喃糖且含有 $\alpha$ -糖苷键,但CYP-I中含有更多的羧基;扫描电镜结果显示CYP-I分布无序,呈团簇状聚集且存在许多孔隙;CYP-II表面形成了较为紧密但凹凸不平的结构;CYP-III呈现出表面光滑但分布杂的碎片状。3种多糖级分均有较好的铁离子还原力和氧自由基吸收能力,其中CYP-I的抗氧化活性显著强于CYP-II和CYP-III,这可能与其含有较多的糖醛酸、半乳糖、鼠李糖、阿拉伯糖和羧基等有关。本研究可为淮山多糖的开发利用提供理论依据。

虽然本研究成功地从淮山多糖中分离出三个不同的多糖级分,并对这些多糖级分的结构和抗氧化活性进行了初步的研究,但是多糖结构复杂,且各级结构对多糖活性皆有影响;因此淮山多糖高级结构(糖苷键构成、空间构型等)对其抗氧化活性的影响有待进一步研究。

## 参考文献

- [1] 潘景芝,孟庆龙,崔文玉,等.山药功能性成分及药理作用研究进展[J].食品工业科技,2023,44(1):420-428.
- [2] 陈艳.山药的药理作用与产品开发[J].食品与发酵科技,2015,51(1):60-62,69.
- [3] MENG X, HU W, WU S, et al. Chinese yam peel enhances the immunity of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) by improving the gut defence barrier and modulating the intestinal microflora [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 95: 528-537.
- [4] ZHANG N, LIANG T, JIN Q, et al. Chinese yam (*Dioscorea opposita* Thunb.) alleviates antibiotic-associated diarrhea, modifies intestinal microbiota, and increases the level of short-chain fatty acids in mice [J]. Food Research International, 2019, 122: 191-198.
- [5] OBIDIEGWU J E, LYONS J B, CHILAKA C A. The *Dioscorea* genus (yam)-an appraisal of nutritional and therapeutic potentials [J]. Foods, 2020, 9(9): 1304.
- [6] JIANG Q, GAO W, SHI Y, et al. Physicochemical properties and *in vitro* digestion of starches from different *Dioscorea* plants [J]. Food Hydrocolloids, 2013, 32(2) : 432-439.
- [7] SAUTOUR M, MITAINE-OFFER A C, LACAILLE-DUBOIS M A. The *Dioscorea* genus: a review of bioactive steroid saponins [J]. Journal of Natural Medicines, 2007, 61(2) : 91-101.
- [8] MA J, MENG X, LIU Y, et al. Effects of a rhizome aqueous extract of *Dioscorea batatas* and its bioactive compound, allantoin in high fat diet and streptozotocin-induced diabetic mice and the regulation of liver, pancreas and skeletal muscle dysfunction [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2020, 259(15): 112926.
- [9] 李孔会,廖森泰,李倩,等.山药多酚对结肠炎小鼠肠黏膜损伤预防作用研究[J].食品科学技术学报,2021,39(4): 46-54.
- [10] BAI Y, ZHOU Y, ZHANG R, et al. Gut microbial fermentation promotes the intestinal anti-inflammatory activity of Chinese yam polysaccharides [J]. Food Chemistry, 2023, 402(15): 134003.
- [11] XUE H Y, LI J R, LIU Y G, et al. Optimization of the ultrafiltration-assisted extraction of Chinese yam polysaccharide using response surface methodology and its biological activity [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 121: 1186-1193.
- [12] LIU X X, YAN Y Y, LIU H M, et al. Emulsifying and structural properties of polysaccharides extracted from Chinese yam by an enzyme-assisted method [J]. LWT-Food Science and Technology, 2019, 111: 242-251.
- [13] FERNANDES P A R, COIMBRA M A. The antioxidant activity of polysaccharides: a structure-function relationship overview [J]. Carbohydrate Polymers, 2023, 314(15): 120965.
- [14] MENG Y, LYU F, XU X, et al. Recent advances in chain conformation and bioactivities of triple-helix polysaccharides [J]. Biomacromolecules, 2020, 21(5) : 1653-1677.
- [15] WANG Z C, ZHOU X Y, SHENG L L, et al. Effect of ultrasonic degradation on the structural feature, physicochemical property and bioactivity of plant and microbial polysaccharides: a review [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 236: 123924.
- [16] LI Q, DOU Z, DUAN Q, et al. A comparison study on structure-function relationship of polysaccharides obtained from sea buckthorn berries using different methods: antioxidant and bile acid-binding capacity [J]. Food Science and Human Wellness, 2024, 13(1) : 494-505.
- [17] GU J Y, ZHANG H H, YAO H, et al. Comparison of characterization, antioxidant and immunological activities of three polysaccharides from *Sagittaria sagittifolia* L [J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 235: 115939.
- [18] 徐湘,庞旭佳,张名位,等.不同提取工艺淮山多糖的理化性质及抗氧化活性分析[J].现代食品科技,2023,39(10): 128-138.
- [19] 刘慧君,黄菲,张瑞芬,等.龙眼果肉多糖超微粉碎-酶解提取工艺优化及其免疫活性[J].中国食品学报,2020,20(3): 112-120.
- [20] ZHANG S, MA Q, DONG L, et al. Phenolic profiles and bioactivities of different milling fractions of rice bran from black rice [J]. Food Chemistry, 2022, 378(1): 132035.
- [21] SAQIB A A N, WHITNEY P J. Differential behaviour of the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent towards mono- and di-saccharide sugars [J]. Biomass and Bioenergy, 2011, 35(11) : 4748-4750.
- [22] LIU W, LU W, CHAI Y, et al. Preliminary structural characterization and hypoglycemic effects of an acidic polysaccharide Serp1 from the residue of *Sarcandra glabra* [J]. Carbohydr Polym, 2017, 176: 140-151.
- [23] ZHI F, YANG T L, WANG Q, et al. Isolation, structure and activity of a novel water-soluble polysaccharide from *Dioscorea opposita* Thunb [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 133: 1201-1209.
- [24] CHAI Z, HUANG W, ZHAO X, et al. Preparation, characterization, antioxidant activity and protective effect against cellular oxidative stress of polysaccharide from *Cynanchum auriculatum* Royle Ex Wight [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 119: 1068-1076.
- [25] YUAN Q, HE Y, XIANG P Y, et al. Influences of different drying methods on the structural characteristics

- and multiple bioactivities of polysaccharides from okra (*Abelmoschus esculentus*) [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 147: 1053-1063.
- [26] LI Z, XIAO W, XIE J, et al. Isolation, characterization and antioxidant activity of yam polysaccharides [J]. Foods, 2022, 11(6): 800.
- [27] HUANG F, ZHANG R, DONG L, et al. Antioxidant and antiproliferative activities of polysaccharide fractions from *Litchi pulp* [J]. Food & Function, 2015, 6(8) : 2598-2606.
- [28] CHEN Y, LIN Q, WANG J, et al. Proteins, polysaccharides and their derivatives as macromolecular antioxidant supplements: a review of *in vitro* screening methods and strategies [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 224: 958-971.
- [29] SOMOGYI A, ROSTA K, PUSZTAI P, et al. Antioxidant measurements [J]. Physiological Measurement, 2007, 28(4): R41-R55.
- [30] SHEN S G, JIA S R, WU Y K, et al. Effect of culture conditions on the physicochemical properties and antioxidant activities of polysaccharides from *Nostoc flagelliforme* [J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 198: 426-433.
- [31] TANG W, DONG M, WANG W, et al. Structural characterization and antioxidant property of released exopolysaccharides from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* Srfm-1 [J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 173: 654-664.
- [32] YI Y, LAMIKANRA O, SUN J, et al. Activity diversity structure-activity relationship of polysaccharides from lotus root varieties [J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 190: 67-76.
- [33] ALAVI RAFIEE S, FARHOOSH R, SHARIF A. Antioxidant activity of gallic acid as affected by an extra carboxyl group than pyrogallol in various oxidative environments [J]. European Journal of Lipid Science and Technology, 2018, 120(11) : 1800319.
- [34] AJISAKA K, AGAWA S, NAGUMO S, et al. Evaluation and comparison of the antioxidative potency of various carbohydrates using different methods [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(8): 3102-3107.