

裙带菜多糖羧甲基化修饰及降血糖活性

李灿,张慧慧,刘会平*,张欣,马笑笑,王兵,刘盈,张晓晶
(天津科技大学 食品科学与工程学院,天津 300457)

摘要: 从醇沉浓度为 65% 的多糖组分中纯化得到均一组分多糖并命名为 UPP(*Undaria pinnatifida* polysaccharide),对 UPP 的羧甲基化修饰工艺及修饰前后多糖的理化特性、体外降血糖活性进行研究。在单因素试验基础上进行响应面优化试验,得到修饰多糖并命名为 CM-UPP(carboxymethylated *Undaria pinnatifida* polysaccharide),通过傅里叶红外光谱扫描、热重、X-射线衍射对两种多糖进行表征。结果表明 UPP 的蛋白质、多酚含量较低,其总糖含量为 (93.94±0.47)%。羧甲基化修饰最优条件为氯乙酸浓度 1.46 mol/L、反应温度 65 °C、NaOH 浓度 20%,此时取代度为 0.887。UPP 和 CM-UPP 均为无定型结构并且 CM-UPP 具有更强的热稳定性。体外活性试验表明 UPP、CM-UPP 均对 α -淀粉酶抑制无剂量依赖关系,UPP 和 CM-UPP 的最高抑制率分别为 69.01%、76.82%;两种多糖对 α -葡萄糖苷酶抑制呈量-效关系,UPP 和 CM-UPP 的 IC₅₀ 值分别为 3.467、0.503 mg/mL。综上所述,羧甲基化修饰能够提高 UPP 的体外降血糖能力。

关键词: 裙带菜;羧甲基化;工艺优化;结构表征;降血糖

Study on Carboxymethylation Modification and Hypoglycemic Activity of *Undaria pinnatifida* Polysaccharide

LI Can, ZHANG Huihui, LIU Huiping*, ZHANG Xin, MA Xiaoxiao, WANG Bing, LIU Ying, ZHANG Xiaojing
(College of Food Science and Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: A polysaccharide with a homogeneous component was purified from a polysaccharide with an alcohol precipitation concentration of 65% and named *Undaria pinnatifida* polysaccharide (UPP). The carboxymethylation modification process of UPP, as well as the physicochemical properties and hypoglycemic activity *in vitro* of the polysaccharides before and after modification were studied. The modified polysaccharide was obtained and named carboxymethylated UPP (CM-UPP) by the response surface optimization experiment based on a single factor test. Fourier transform infrared spectra, thermogravimetry, and X-ray diffraction were used to characterize the two polysaccharides. The results showed that the content of protein and polyphenol in UPP was lower, and that of total sugar was (93.94±0.47)%. The optimum condition for carboxymethylation modification was as follows: Chloroacetic acid concentration of 1.46 mol/L, reaction temperature of 65 °C, NaOH concentration of 20%, and degree of substitution of 0.887. Both UPP and CM-UPP were amorphous structures, and CM-UPP had stronger thermal stability. Activity tests *in vitro* showed that the inhibition of UPP and CM-UPP on α -amylase was not dose-dependent, and the highest inhibitory rates of UPP and CM-UPP were 69.01% and 76.82%. The inhibition of α -glucosidase by the two polysaccharides showed a dose-effect relationship, and the IC₅₀ values of UPP and CM-UPP were 3.467 mg/mL and 0.503 mg/mL. In summary, carboxymethylation modification can improve the hypoglycemic ability *in vitro* of UPP. It provides a theoretical foundation for the further development of UPP.

Key words: *Undaria pinnatifida*; carboxymethylation; process optimization; structural characterization; hypoglycemic

基金项目:天津市科技计划项目(22JCYBJC01090)

作者简介:李灿(1998—),女(汉),硕士研究生,研究方向:动物资源加工及功能因子。

*通信作者:刘会平(1964—),男(汉),教授,博士,研究方向:动物性食品加工及新技术。

引文格式:

李灿,张慧慧,刘会平,等.裙带菜多糖羧甲基化修饰及降血糖活性[J].食品研究与开发,2024,45(6):60-68.

LI Can, ZHANG Huihui, LIU Huiping, et al. Study on Carboxymethylation Modification and Hypoglycemic Activity of *Undaria pinnatifida* Polysaccharide[J]. Food Research and Development, 2024, 45(6): 60-68.

近年来,糖尿病的发病率急剧增加,其中约90%患者被诊断为II型糖尿病,成为全球威胁人类健康的第三大常见疾病^[1]。目前用于糖尿病治疗的降糖药物都有一些副作用,如引起心血管疾病、胃肠道问题等,可能会对身体产生严重影响^[2-3]。海藻一直被认为是生物活性多糖的天然来源,具有降血糖、抗血栓、抗病毒、抗炎等作用,近几年已逐渐成为研究热点^[4-5]。裙带菜是一种生长在温暖海湾中的可食用海藻,具有优良的食用和药用价值。裙带菜以其优越的营养价值和丰富的活性成分被广泛熟知,褐藻糖胶是裙带菜中重要的活性成分之一^[6]。

通过化学改性开发新型多糖衍生物是一个研究热点,如羧甲基化被认为是引入官能团和提高多糖生物活性的有效手段,该反应的主要优点是易于加工,化学试剂成本低,产物无毒^[7]。刘贵珍等^[8]对罗汉果多糖的羧甲基化修饰条件进行优化并研究其体外降血糖能力,发现羧甲基化罗汉果多糖对 α -淀粉酶的抑制作用有所增强。李雪晖等^[9]对南瓜多糖的羧甲基化修饰条件进行优化并研究其体外降血糖能力,发现羧甲基化南瓜多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用有所增强。目前,关于裙带菜的羧甲基化修饰方面的研究鲜见报道。田数等^[10]通过提取裙带菜多糖并对其进行羧甲基化修饰和抗氧化活性研究,但并未对多糖的修饰工艺进行优化。

为优化裙带菜多糖的羧甲基化修饰条件,本研究通过红外光谱扫描、热重分析、X-射线衍射试验对两种多糖进行初步结构表征,并以两种多糖对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制作用来评估裙带菜多糖及羧甲基化产物的体外降血糖活性,以期开发潜在的天然口服降糖剂或功能性食品提供科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料和试剂

裙带菜叶片:大连龙海胜水产有限公司。纤维素DE-52、Sephadex G-100;瑞达恒辉公司;500 Da透析袋、葡萄糖标准品、牛血清白蛋白、二硝基水杨酸酯(dinitrosalicylate, DNS)、总酚检测试剂盒、阿卡波糖、磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)、 α -淀粉酶(猪胰腺,5 U/mg)、 α -葡萄糖苷酶(7.5 U/mg):北京索莱宝科技有限公司;异丙醇、氯乙酸、冰醋酸、氢氧化

钠、乙醇酸、乙酸铵、变色酸:天津市江天化工技术股份有限公司;可溶性淀粉、4-硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷(4-nitrophenyl β -D-glucopyranoside, pNPG):上海源叶生物科技有限公司;所用试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

紫外可见分光光谱仪(UV-2550PC):日本岛津仪器有限公司;多功能酶标仪(Synergy HTX):美国伯腾仪器有限公司;热重分析仪(Q50):美国TA仪器(沃特世有限责任公司);傅里叶红外光谱仪(IS50):美国尼高利仪器有限公司;X-射线衍射仪(日本 Rigaku Ultima IV):广州智汇科学仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 多糖纯化

先前试验通过 CaCl_2 溶液提取裙带菜褐藻糖胶后逐级沉淀得到4组多糖样品(UPP-45、UPP-55、UPP-65、UPP-75),其中UPP-65组分降血糖效果较好^[11]。采用DEAE-52纤维素柱和Sephadex G-100柱进一步纯化UPP-65组分。将UPP-65溶液(10 mg/mL)上样到DEAE-52纤维素柱(1.6 cm \times 40 cm)上,并用超纯水和系列浓度梯度的NaCl溶液(0.1、0.3、0.5、0.7 mol/L)以1.6 mL/min的流速逐步洗脱。采用苯酚-硫酸法检测馏分中的多糖含量,由于超纯水洗脱液中的总糖含量较高,因此对超纯水洗脱液再进一步纯化。将超纯水洗脱液浓缩,然后冷冻干燥,以10 mg/mL的浓度在Sephadex G-100色谱柱上样,洗脱液为超纯水,条件为0.6 mL/min,4 mL/管,得到洗脱曲线,收集最高管获得纯化多糖并命名为UPP(*Undaria pinnatifida* polysaccharide)。

1.3.2 基本化学组成测定

以葡萄糖为标准品,采用苯酚-硫酸法测定UPP的总糖含量^[12]。以半乳糖醛酸为标准品,采用间羟基联苯法测定糖醛酸含量^[13]。以牛血清白蛋白为标准品,采用考马斯亮蓝法测定蛋白质含量^[14]。以葡萄糖为标准品,采用3,5-二硝基水杨酸法测定还原糖含量^[15]。通过总酚检测试剂盒测定总酚含量^[16]。

1.3.3 紫外全波长扫描

将多糖样品配制成1 mg/mL的溶液,对照组为蒸馏水,在190~500 nm范围内进行紫外光谱扫描。

1.3.4 羧甲基衍生物的制备

UPP的羧甲基化基于Yu等^[17]的方法进行修改,

将 UPP(200 mg)与异丙醇(20 mL)混合搅拌 30 min 后加入一定浓度的 NaOH 溶液(10 mL),在室温下搅拌 1.5 h。然后加入一定量的异丙醇和氯乙酸溶液,在一定温度下搅拌 3 h。将反应混合物冷却至室温,用冰醋酸调节 pH 值至中性,并在 500 Da 透析袋中用蒸馏水透析 72 h,旋蒸浓缩后冷冻干燥,得到 CM-UPP。

1.3.5 羧甲基化取代度(degree of carboxymethylation substitution, DS)的测定

裙带菜多糖的羧甲基化取代度测定基于 Shi 等^[18]的方法进行修改,吸取不同体积的乙醇酸对照品和 CM-UPP(均为 1 mg/mL)至具塞试管(25 mL)内,加入 NaOH 溶液(0.25 mol/L)补足至 1 mL,然后各加入 0.1% 变色酸溶液(5 mL)和浓硫酸(1 mL),水浴加热 0.5 h 后冷却至室温,滴加 30% 乙酸铵溶液,使各具塞试管内溶液至刻度,在 570 nm 处测定吸光度值。DS (Y)的计算公式如下。

$$Y = \frac{162m}{76 - 80m}$$

式中:Y 为羧甲基化修饰取代度;m 为每克羧甲基糖样品中相当于乙醇酸的量,g;162 为多糖的失水葡萄糖单元的摩尔质量,g/mol;76 为乙醇酸摩尔质量,g/mol;80 为 CH₂COONa 取代后每单位的净增加量,g/mol。

1.3.6 单因素试验

1.3.6.1 氯乙酸浓度对取代度的影响

称取 200 mg UPP 与 20 mL 异丙醇混合搅拌 30 min,加入 10 mL 20% 的 NaOH 溶液在室温下搅拌 1.5 h。加入 4 mL 异丙醇作为溶剂,然后再加入 6 mL 氯乙酸溶液(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mol/L),65 °C 搅拌 3 h,得到羧甲基化多糖后测定取代度,确定最佳氯乙酸浓度。

1.3.6.2 反应温度对取代度的影响

称取 200 mg UPP 与 20 mL 异丙醇混合搅拌 30 min,加入 10 mL 20% 的 NaOH 溶液在室温下搅拌 1.5 h。加入 4 mL 异丙醇作为溶剂,然后再加入 6 mL 1.5 mol/L 氯乙酸溶液,在一定反应温度(45、55、65、75、85 °C)下搅拌 3 h,得到羧甲基化多糖后测定取代度,确定最佳反应温度。

1.3.6.3 NaOH 浓度对取代度的影响

称取 200 mg UPP 与 20 mL 异丙醇混合搅拌 30 min,加入 10 mL 一定浓度(15%、20%、25%、30%、35%)的 NaOH 溶液,在室温下搅拌 1.5 h。加入 4 mL 异丙醇作为溶剂,然后再加入 6 mL 1.5 mol/L 氯乙酸溶液,65 °C 搅拌 3 h,得到羧甲基化多糖后测定取代度,确定最佳 NaOH 浓度。

1.3.7 响应面试验设计

根据单因素试验结果,采用 Box-Behnken 原理设计取代度优化试验,考察氯乙酸浓度、反应温度、NaOH 浓度对羧甲基化取代度的影响,确定多糖的最佳提取

条件。试验因素和水平见表 1。

表 1 响应面试验各因素和水平
Table 1 Factors and levels of response surface test

水平	因素		
	A 氯乙酸浓度/(mol/L)	B 反应温度/°C	C NaOH 浓度/%
-1	1.0	55	15
0	1.5	65	20
1	2.0	75	25

1.3.8 傅里叶红外光谱分析

称取多糖样品(1.0 mg)和干燥的 KBr 粉末(150.0 mg),充分研磨、压为薄片,置于傅里叶红外光谱仪中,在 4 000~400 cm⁻¹ 范围内扫描 16 次,分辨率为 4 cm⁻¹[19]。

1.3.9 热重分析

称取 5.0 mg 多糖粉末,将样品置于热重分析仪的氧化铝坩埚中,以 N₂ 为载气,流速为 20 mL/min,设置初始温度和结束温度分别为 25 °C 和 600 °C,以 10 °C/min 的速度进行加热测试。

1.3.10 X-射线衍射分析

分别取 50 mg UPP 和 CM-UPP 样品,将表面压平后置于 X-射线衍射仪的检测板上进行 X 射线扫描,扫描条件:2θ,变化范围 5°~90°,速度 2°/min。

1.3.11 体外降血糖活性试验

1.3.11.1 α-淀粉酶的抑制活性测定

根据 Xu 等^[20]的方法测定 UPP 和 CM-UPP 对 α-淀粉酶的抑制活性。以阿卡波糖为阳性对照,用 25 μL 不同浓度梯度的多糖溶液与 α-淀粉酶溶液(25 μL, 40 U/mL)混匀,37 °C 孵育 10 min 后,加入 1% 的可溶性淀粉溶液(25 μL, 0.1 mol/L PBS 溶液配制),混匀置于 99 °C 的水浴锅,反应 15 min 后迅速冷却至室温,立即与 50 μL DNS 溶液反应,置于 95 °C 的水浴锅水浴 5 min 显色后,冰水浴迅速冷却,加入 750 μL 蒸馏水,于 540 nm 处测定吸光度。α-淀粉酶抑制率(Y₁,%)计算公式如下。

$$Y_1 = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100$$

式中:A₁ 表示样液反应后吸光度;A₂ 表示 α-淀粉酶替换为 PBS 溶液后重复实验的吸光度;A₀ 表示样液替换为 PBS 溶液后重复实验的吸光度。

1.3.11.2 α-葡萄糖苷酶的抑制活性测定

根据 Chen 等^[21]的方法测定多糖对 α-葡萄糖苷酶的抑制活性。以阿卡波糖为阳性对照,用 150 μL 不同浓度梯度的多糖溶液与 α-葡萄糖苷酶溶液(50 μL, 0.8 U/mL)混匀,37 °C 孵育 10 min。加入 pNPG 溶液(100 μL, 0.9375 mmol/L),37 °C 反应 20 min 后加入 Na₂CO₃ 溶液(500 μL, 1 mol/L)停止反应,于 405 nm 处

测定吸光度。 α -葡萄糖苷酶抑制率($Y_2, \%$)计算公式如下。

$$Y_2 = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0} \right) \times 100$$

式中: A_1 为反应溶液的吸光度; A_2 表示 α -葡萄糖苷酶替换为PBS后重复试验的吸光度; A_0 表示样液替换为PBS后重复实验的吸光度。

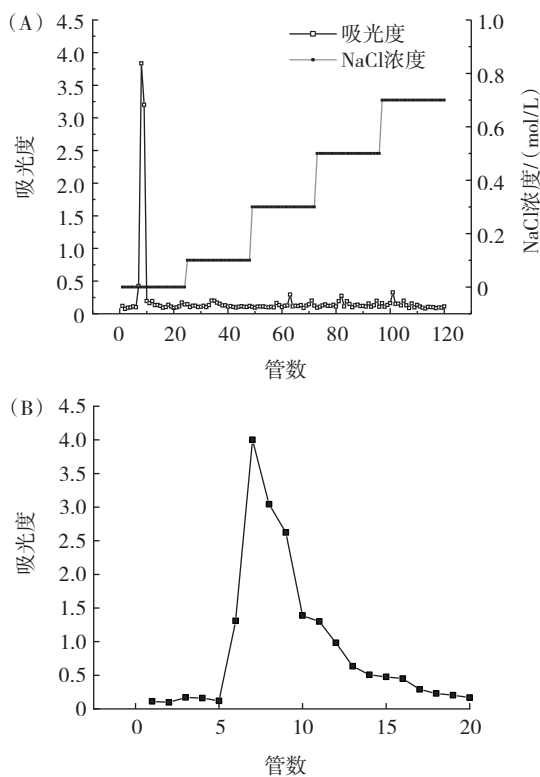
1.4 数据处理

所有测定指标均作3次平行处理,利用SPSS16.0软件对数据统计学进行处理,所有数据均以平均值 \pm 标准差表示。使用Origin2018和Graphpad Prism 8对图表制作与处理。

2 结果分析

2.1 多糖分离纯化

UPP-65的DEAE-52纤维素柱和Sephadex G-100柱层析洗脱曲线如图1所示。



(A)DEAE-52 纤维素柱;(B)Sephadex G-100 柱。

图1 UPP-65 洗脱曲线图

Fig.1 Elution curve of UPP-65

由图1可知,主要得到1个洗脱峰。收集、浓缩、冻干这一组多糖,并通过Sephadex G-100葡聚糖凝胶过滤柱进一步纯化,收集最高管,冻干后得到纯多糖(UPP)用于后续羧甲基化试验。

2.2 基本组成成分分析

UPP的基本组成成分结果如表2所示。

表2 UPP基本化学成分测定结果

Table 2 Results of basic chemical composition determination of UPP %

总糖	还原糖	蛋白质	糖醛酸	总酚
93.94 \pm 0.47	-	0.97 \pm 0.26	1.90 \pm 0.31	0.03 \pm 0.01

注:-表示多糖中不存在某种成分。

由表2可知,纯化后的多糖组分总糖含量较高且无还原糖存在,总糖含量为(93.94 \pm 0.47)%。蛋白质含量和总酚含量均低,分别为(0.97 \pm 0.26)%和(0.03 \pm 0.01)%,表明多糖含杂质较少。UPP的糖醛酸含量较低,为(1.90 \pm 0.31)%,表明纯化后的多糖为中性多糖。

2.3 紫外光谱分析

UPP的紫外光谱扫描如图2所示。

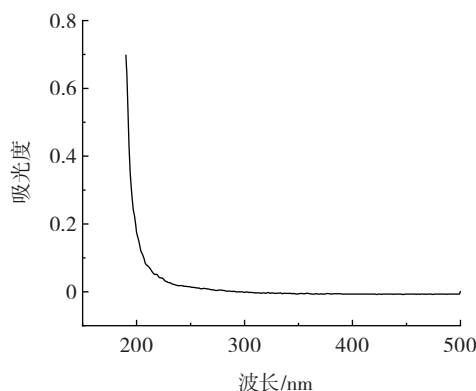


图2 UPP的紫外光谱扫描

Fig.2 Ultraviolet spectrum analysis of UPP

由图2可知,多糖溶液在260 nm和280 nm处均无明显的吸收峰,表明UPP不含或含有少量的核酸和蛋白质,这一结果与UPP化学成分测定的蛋白质含量较少的结果相一致。

2.4 单因素试验结果分析

2.4.1 氯乙酸浓度对羧甲基化取代度的影响

氯乙酸浓度对羧甲基化取代度的影响见图3。

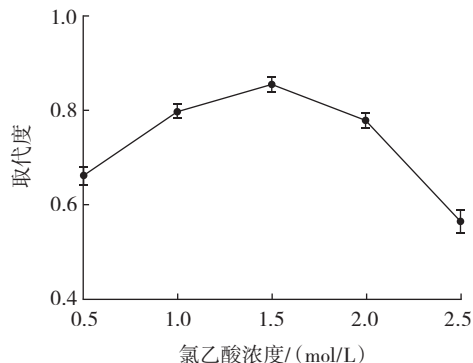


图3 氯乙酸浓度对羧甲基化取代度的影响

Fig.3 Effect of chloroacetic acid concentration on carboxymethylation substitution

由图3可知,当氯乙酸浓度小于1.5 mol/L时,随

着氯乙酸浓度的增加,取代度逐渐增加,但浓度达到1.5 mol/L后,取代度逐渐下降。在碱性的环境中,多糖的羟基会被去质子化暴露出孤电子对,更容易与氯乙酸发生取代反应,但过量的氯乙酸会直接破坏碱性环境,不利于取代反应的进行,且过量的氯乙酸会与氢氧化钠生成乙醇酸钠导致取代度降低^[22]。因此选择氯乙酸浓度为1.5 mol/L左右进行响应面试验设计。

2.4.2 反应温度对羧甲基化取代度的影响

反应温度对羧甲基化取代度的影响见图4。

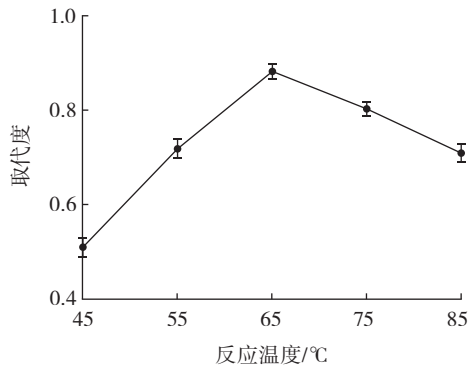


图4 反应温度对羧甲基化取代度的影响

Fig.4 Effect of reaction temperature on carboxymethylation substitution

由图4可知,适当的反应温度有利于提高CM-UPP的取代度,当反应温度低于65℃时,取代度随反应温度升高而升高,在65℃时取代度最高,之后逐渐下降。这是因为低温很难加速氯乙酸钠与羟基的反应,也很难加速羧甲基的形成^[23]。但温度过高,取代度反而会降低,其原因可能是反应温度升高会减小空间反应,不利于醇氧化物的形成^[24]。因此选择反应温度为65℃左右进行响应面试验设计。

2.4.3 NaOH浓度对羧甲基化取代度的影响

NaOH浓度对羧甲基化取代度的影响见图5。

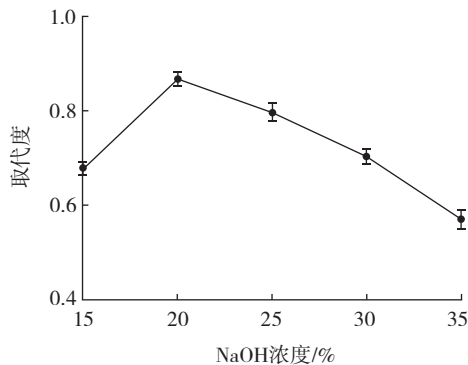


图5 NaOH浓度对羧甲基化取代度的影响

Fig.5 Effect of NaOH concentration on carboxymethylation substitution

由图5可知,NaOH浓度为15%~35%时,多糖的取代度先增大后减小,NaOH浓度为20%时,取代度最

大。这是因为羧甲基化反应本质为亲核取代反应,NaOH浓度过低时,多糖羟基的去质子化程度低,亲核性较弱。氢氧化钠浓度过高时,过量的氢氧化钠与氯乙酸接触的机会也增多,可能发生副反应,不利于取代度反应的进行^[25]。因此选择NaOH浓度为20%左右进行响应面试验设计。

2.5 响应面结果分析

2.5.1 响应面试验结果与分析

在单因素试验结果的基础上,利用Design-Expert10.0采用响应面法进一步优化UPP羧甲基化的反应条件。试验设计及结果见表3。

表3 响应面试验设计
Table 3 Design of response surface test

序号	A 氯乙酸浓度/(mol/L)	B 反应温度/°C	C NaOH浓度/%	Y 取代度
1	1.5	65	20	0.890
2	1.0	75	20	0.636
3	1.0	65	15	0.627
4	1.0	55	20	0.566
5	1.5	75	25	0.711
6	2.0	65	25	0.608
7	1.5	65	20	0.889
8	1.5	55	15	0.654
9	1.5	65	20	0.890
10	1.5	75	15	0.624
11	1.5	65	20	0.884
12	1.0	65	25	0.700
13	2.0	55	20	0.559
14	1.5	55	25	0.605
15	1.5	65	20	0.881
16	2.0	75	20	0.547
17	2.0	65	15	0.653

利用Design-Expert 10.0软件对试验数据进行多元回归拟合,得到二阶多项式回归方程为 $Y=0.89-0.020A+0.017B+8.25\times 10^{-3}C-0.021AB-0.03AC+0.034BC-0.16A^2-0.15B^2-0.084C^2$ 。

2.5.2 方差分析和二次多项回归方程拟合

对模型进行方差分析,结果见表4。

由表4可知,模型F值为912.89, $P<0.0001$,表明回归模型极显著且模型拟合度良好。相关系数 R^2 和校正决定系数 R^2_{Adj} 分别为0.9991和0.9981,表示此模型能较好预测羧甲基化取代度,试验结果与分析结果差异较小,具有较高的可信度。由F值可知,3个因素对羧甲基化取代度的影响程度为 $A>B>C$,即氯乙酸浓度>反应温度>NaOH浓度。

表4 方差分析
Table 4 Variance analysis

来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	0.27	9	0.03	912.89	<0.000 1	**
A	3.28×10^{-3}	1	3.28×10^{-3}	98.85	<0.000 1	**
B	2.25×10^{-3}	1	2.25×10^{-3}	67.63	<0.000 1	**
C	5.45×10^{-4}	1	5.45×10^{-4}	16.41	0.004 9	**
AB	1.68×10^{-3}	1	1.68×10^{-3}	50.65	0.000 2	**
AC	3.48×10^{-3}	1	3.48×10^{-3}	104.89	<0.000 1	**
BC	4.62×10^{-3}	1	4.62×10^{-3}	139.34	<0.000 1	**
A ²	0.10	1	0.10	3 073.86	<0.000 1	**
B ²	0.10	1	0.10	3 014.90	<0.000 1	**
C ²	0.03	1	0.03	898.45	<0.000 1	**
残差	2.32×10^{-4}	7	3.32×10^{-5}			
失拟项	1.66×10^{-4}	3	5.52×10^{-5}	3.30	0.1393	不显著
纯误差	6.68×10^{-5}	4	1.67×10^{-5}			
总和	0.27	16				

注:**表示影响极显著($P < 0.01$)。

2.5.3 响应面和等高线分析

各因素交互作用的响应面如图6所示。

由图6可知,响应面的开口均向下,曲面呈中间凸四周凹的形状,说明曲面有最高点,即存在最优条件,这也表明3个因素两两之间均有交互作用。响应面图

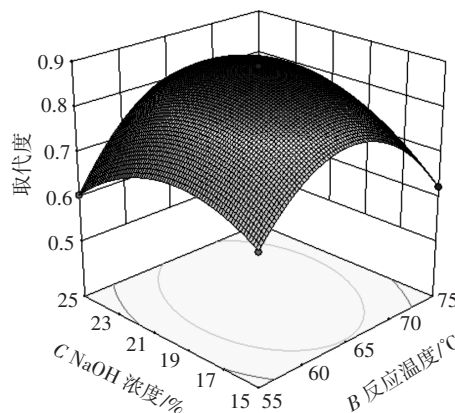


图6 各因素交互作用对取代度影响的响应面

Fig.6 Response surface plots of effects of interaction among various factors on degree of substitution

可以直观反映出各因素对羧甲基化取代度的影响,曲面越陡,影响越大。响应面曲面在底部的投影图中氯乙酸浓度与NaOH浓度、NaOH浓度与反应温度之间的二维等高线图均为椭圆形,表明因素之间交互作用极显著,而氯乙酸浓度与反应温度之间的二维等高线图近似圆形,表明氯乙酸浓度与反应温度交互作用的显著性低于另外两组因素的交互作用,与表4中的方差分析结果一致。

2.5.4 验证试验结果分析

根据响应面试验得出羧甲基化取代度最优条件为氯乙酸浓度 1.462 mol/L、反应温度 65.682 °C、NaOH 浓度 20.383%,此时羧甲基化取代度为 0.888。在实际试验过程中将条件修正为氯乙酸浓度 1.46 mol/L、反应温度 65 °C、NaOH 浓度 20%,利用修正条件重复3次对UPP羧甲基化修饰,得到羧甲基化取代度为 0.887。实际得率与预测得率相差较小,说明用此模型预测羧甲基化取代度可行。

2.6 红外光谱扫描分析

UPP和CM-UPP的傅里叶红外光谱分析见图7。

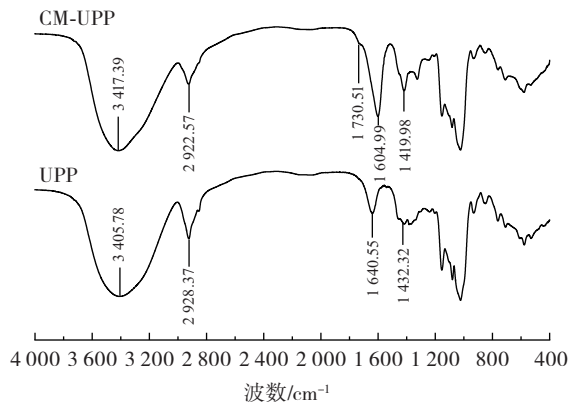
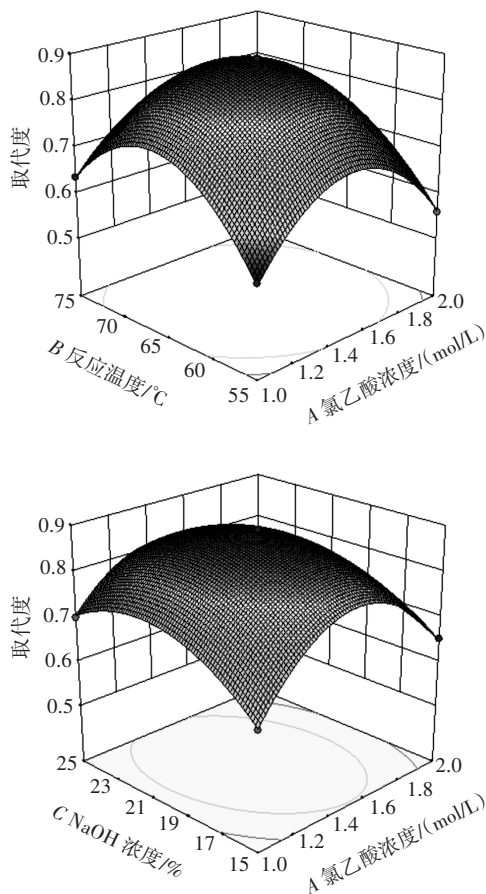


图7 UPP和CM-UPP的红外光谱图

Fig.7 Infrared spectra of UPP and CM-UPP

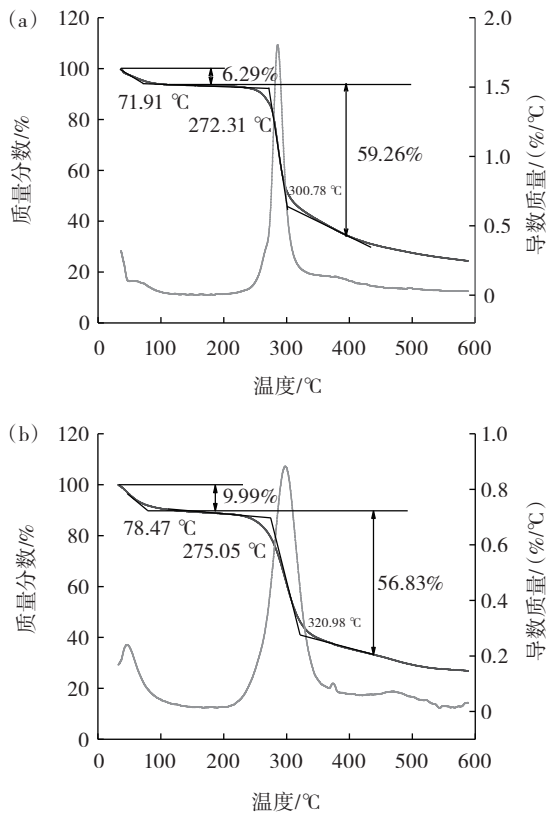
由图7可知,UPP中 3405.78 cm^{-1} 出现了 O—H 伸

缩振动; $2\ 928.37$ 、 $1\ 432.32\ \text{cm}^{-1}$ 两处分别出现了 C—H 伸缩振动和 C—H 弯曲振动; $1\ 640.55\ \text{cm}^{-1}$ 出现了 C=O 伸缩振动, 以上为多糖的特征吸收峰^[26]。 $1\ 200\sim 1\ 000\ \text{cm}^{-1}$ 范围内的吸收峰由 C—O—C 糖苷环的振动产生, 表明 UPP 中含有吡喃糖。

引入 $-\text{CH}_2\text{COOH}$ 后, CM-UPP 中除含有以上多糖的基本特征峰外, 在 $1\ 730.51\ \text{cm}^{-1}$ 处增加了新的吸收峰, 表明糖醛酸含量增加^[16]。 并且 $1\ 604.99\ \text{cm}^{-1}$ 处的 C=O 伸缩振动以及 $1\ 419.98\ \text{cm}^{-1}$ 处的 C—H 弯曲振动幅度均有加强, 表明 UPP 羧甲基化成功^[27]。

2.7 热重分析(thermo-gravimetric analysis, TGA)

UPP 和 CM-UPP 的 TGA 曲线见图 8。



(a)UPP;(b)CM-UPP。

图 8 UPP 和 CM-UPP 的 TGA 曲线
Fig.8 TGA curves of UPP and CM-UPP

由图 8 可知, UPP 和 CM-UPP 均有 3 个不同的失重阶段。第一阶段在 $100\ ^\circ\text{C}$ 以下, 可能由于多糖游离和结合水的蒸发, UPP 和 CM-UPP 的初始质量损失率分别为 6.29% 和 9.99% ^[28]。第二阶段在 $200\sim 400\ ^\circ\text{C}$ 之间, 出现了明显的质量损失, 归因于多糖的热分解及生物聚合物结构的分解, UPP 和 CM-UPP 的失重率分别为 59.26% 和 56.83% ^[29]。第三阶段在 $450\sim 600\ ^\circ\text{C}$ 之间, 剩余多糖缓慢碳化, 最终转化为灰分和无机成分。与 UPP 相比, CM-UPP 在第二阶段损失质量少, 说明 CM-UPP 具有更强的热稳定性, 这一结果可能与 CM-

UPP 比 UPP 糖醛酸高有关^[30]。

2.8 X-射线衍射(X-ray diffraction, XRD)试验

X 射线衍射是研究多糖结构的重要技术, 可用于分析材料晶体结构的一种方法^[31]。 XRD 中晶体结构显示为尖锐的窄衍射峰, 而无定型结构显示为宽峰^[16]。 UPP 和 CM-UPP 的 XRD 结果见图 9。

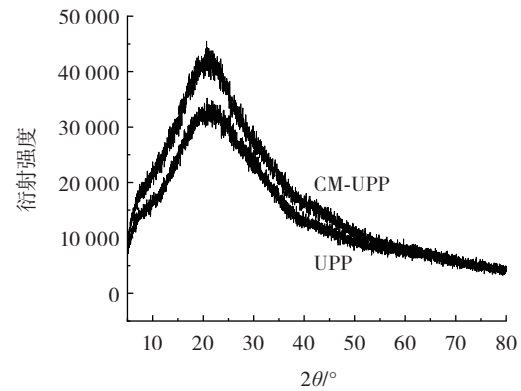


图 9 UPP 和 CM-UPP 的 XRD 图
Fig.9 XRD diagram of UPP and CM-UPP

由图 9 可知, 在 $5^\circ\sim 80^\circ(2\theta)$ 范围内, UPP 和 CM-UPP 在 21° 左右均出现 1 个衍射峰, 这是主要的结晶反射区, 谱图中无尖峰出现, 这表明两种多糖无结晶现象, 是一种无定型结构。该结果与丁素芸等^[32]的研究结果相似。两者衍射峰宽窄程度不同, CM-UPP 衍射峰的宽度和强度均高于 UPP, 表明羧甲基化修饰可能会破坏多糖内部的晶体结构^[33]。

2.9 体外降血糖活性分析

2.9.1 UPP 和 CM-UPP 对 α -淀粉酶的抑制

以阿卡波糖为阳性对照, 通过测定两种多糖对 α -淀粉酶活性的抑制作用来研究其体外降血糖作用。 UPP 和 CM-UPP 对 α -淀粉酶的抑制作用见图 10。

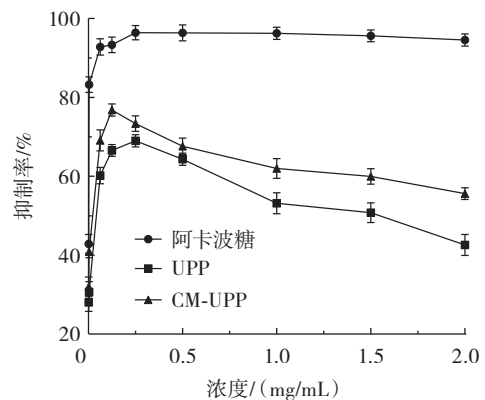


图 10 UPP 和 CM-UPP 对 α -淀粉酶的抑制作用

Fig.10 Inhibitory effect of UPP and CM-UPP on α -amylase

由图 10 可知, UPP、CM-UPP 均对 α -淀粉酶有抑制作用, 抑制程度都低于阿卡波糖。两种多糖对 α -淀粉酶的抑制无剂量依赖关系, 呈现先升高后降低的

趋势,此现象与陈舒桐等^[34]研究结果相似。UPP在0.25 mg/mL时达到最高抑制率,抑制率为69.01%。CM-UPP在0.125 mg/mL时达到最高抑制率,抑制率为76.82%。CM-UPP的抑制率较高表明羧甲基化修饰增强多糖的 α -淀粉酶抑制能力。引入 $-\text{CH}_2\text{COOH}$ 后,裙带菜多糖的酸性糖增多,可能会增强羧甲基化裙带菜多糖对 α -淀粉酶的抑制作用,此现象与Chen等^[35]研究结果相似。

2.9.2 UPP和CM-UPP对 α -葡萄糖苷酶的抑制

以阿卡波糖为阳性对照,通过测定两种多糖对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用来研究其体外降血糖作用。UPP和CM-UPP对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用见图11。

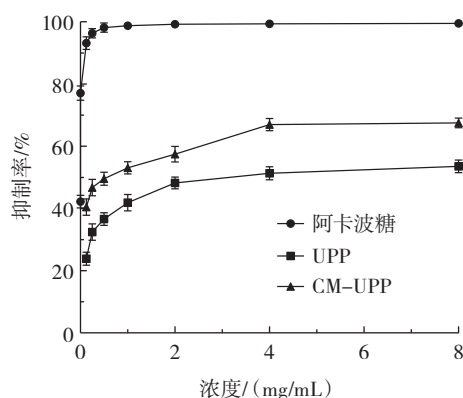


图11 UPP和CM-UPP对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用

Fig.11 Inhibitory effect of UPP and CM-UPP on α -glucosidase

由图11可知,UPP、CM-UPP均对 α -葡萄糖苷酶有抑制作用,抑制程度均低于阿卡波糖。UPP和CM-UPP对 α -葡萄糖苷酶的抑制呈浓度依赖关系,随着多糖浓度的增加,两种多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制率逐渐升高。阿卡波糖、UPP、CM-UPP的 IC_{50} 值分别为0.002、3.467、0.503 mg/mL,CM-UPP的 IC_{50} 值低于UPP,可以看出羧甲基化修饰增强了多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用,其原因可能是由于裙带菜多糖中引入了 $-\text{CH}_2\text{COOH}$ 后,其电负性和水溶性有所改变,所以增强了羧甲基化裙带菜多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用^[9]。

3 结论

通过DEAE-52纤维素柱和Sephadex G-100柱层析对分级醇沉组分UPP-65进行纯化,获得中性多糖UPP。通过对UPP的基本化学组成分析可知,UPP不含有还原糖,其总糖、糖醛酸、蛋白质、总酚含量分别为(93.94±0.47)%、(1.90±0.31)%、(0.97±0.26)%、(0.03±0.01)%。利用响应曲面法对UPP的羧甲基化修饰进行最佳工艺优化:氯乙酸浓度为1.46 mol/L、反应温度为65℃、NaOH浓度为20%,此时羧甲基化取代度为0.887。

采用红外光谱扫描、热重和X-射线衍射对两种多糖进行初步结构表征。由红外光谱分析可知,UPP和CM-UPP都具有多糖的基本特征峰,并且UPP羧甲基化修饰成功。由热重分析结果可知,CM-UPP比UPP具有更强的热稳定性。由X-射线衍射试验可知,两种多糖均无结晶现象,为无定型结构。

体外降血糖试验表明UPP和CM-UPP均对 α -淀粉酶活性和 α -葡萄糖苷酶有一定的抑制作用,但都低于阿卡波糖的抑制作用。两种多糖对 α -淀粉酶的抑制呈现先升高后下降的趋势,UPP在0.25 mg/mL时达到最高抑制率,抑制率为69.01%,CM-UPP在0.125 mg/mL时达到最高抑制率,抑制率为76.82%;两种多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制均呈剂量依赖关系,UPP和CM-UPP的 IC_{50} 值分别为3.467 mg/mL和0.503 mg/mL。与UPP相比,CM-UPP抑制率更好,表明羧甲基化修饰能够增强裙带菜多糖的体外降血糖活性,为裙带菜多糖的应用研究提供了一定的理论基础。

参考文献:

- [1] HUANG X Z, WEN Y X, CHEN Y H, et al. Structural characterization of *Euglena gracilis* polysaccharide and its *in vitro* hypoglycemic effects by alleviating insulin resistance[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 236: 123984.
- [2] JI X L, GUO J H, CAO T Z, et al. Review on mechanisms and structure-activity relationship of hypoglycemic effects of polysaccharides from natural resources[J]. Food Science and Human Wellness, 2023, 12(6): 1969-1980.
- [3] GUO H Q, WU H L, KONG X Q, et al. Oat β -glucan ameliorates diabetes in high fat diet and streptozotocin-induced mice by regulating metabolites[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2023, 113: 109251.
- [4] MENSAH E O, KANWUGU O N, PANDA P K, et al. Marine fucoidans: Structural, extraction, biological activities and their applications in the food industry[J]. Food Hydrocolloids, 2023, 142: 108784.
- [5] ETMAN S M, ELNAGGAR Y S R, ABDALLAH O Y. 'Fucoidan, a natural biopolymer in cancer combating: From edible algae to nano-carrier tailoring'[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 147: 799-808.
- [6] ZENG J S, LUAN F, HU J W, et al. Recent research advances in polysaccharides from *Undaria pinnatifida*: Isolation, structures, bioactivities, and applications[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 206: 325-354.
- [7] CHAKKA V P, ZHOU T. Carboxymethylation of polysaccharides: Synthesis and bioactivities[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 165: 2425-2431.
- [8] 刘贵珍, 杨志伟. 不同取代度羧甲基化罗汉果多糖的制备及生理活性研究[J]. 食品工业科技, 2023, 44(13): 224-232. LIU Guizhen, YANG Zhiwei. Preparation and physiological activity of carboxymethylated *Siraitia grosvenorii* polysaccharide with different degrees of substitution[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(13): 224-232.
- [9] 李雪晖, 罗心雨, 王莹. 羧甲基化南瓜多糖的制备及抗氧化、降血糖活性研究[J]. 食品与机械, 2022, 38(3): 178-183, 246.

- LI Xuehui, LUO Xinyu, WANG Ying. Preparation of carboxymethylated pumpkin polysaccharide and its antioxidant and hypoglycemic activities[J]. Food & Machinery, 2022, 38(3): 178-183, 246.
- [10] 田数, 邢雨晴, 李力群, 等. 裙带菜多糖的提取、羧甲基化修饰及抗氧化活性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(6): 279-284.
- TIAN Shu, XING Yuqing, LI Liqun, et al. Extraction, carboxymethylation and antioxidant activity of *Undaria pinnatifida* polysaccharide[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2023, 14(6): 279-284.
- [11] 李灿, 吕金博, 刘会平, 等. 分级醇沉裙带菜褐藻糖胶及其体外降血糖活性研究[J/OL]. 食品工业科技. (2023-10-09)[2023-11-27] <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023060186>.
- LI Can, LV Jinbo, LIU Huipin, et al. Study on gradient alcohol precipitation of fucoidan from undaria pinnatifida and their hypoglycemic activity *in vitro*[J/OL]. Science and Technology of Food Industry.(2023-10-09)[2023-11-27] <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023060186>.
- [12] ROVER M R, JOHNSTON P A, LAMSAL B P, et al. Total water-soluble sugars quantification in bio-oil using the phenol-sulfuric acid assay[J]. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, 2013, 104: 194-201.
- [13] ZHANG W J, XIANG Q F, ZHAO J, et al. Purification, structural elucidation and physicochemical properties of a polysaccharide from *Abelmoschus esculentus* L (okra) flowers[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 155: 740-750.
- [14] FENG S M, LUAN D, NING K, et al. Ultrafiltration isolation, hypoglycemic activity analysis and structural characterization of polysaccharides from *Brasenia schreberi*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 135: 141-151.
- [15] TEIXEIRA R S S, DA SILVA A S, FERREIRA-LEITÃO V S, et al. Amino acids interference on the quantification of reducing sugars by the 3, 5-dinitrosalicylic acid assay mislead carbohydrase activity measurements[J]. Carbohydrate Research, 2012, 363: 33-37.
- [16] JI X L, HOU C Y, YAN Y Z, et al. Comparison of structural characterization and antioxidant activity of polysaccharides from jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) fruit[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 149: 1008-1018.
- [17] YU Q Y, YUAN S A, YAN Y Y, et al. Extraction, preparation and an assessment of the activity of carboxymethyl polysaccharide from *Panax japonicus*[J]. Food Science and Technology, 2022, 42:82221.
- [18] SHI M J, WEI X Y, XU J, et al. Carboxymethylated degraded polysaccharides from *Enteromorpha prolifera*: Preparation and *in vitro* antioxidant activity[J]. Food Chemistry, 2017, 215: 76-83.
- [19] SHANG X L, LIU C Y, DONG H Y, et al. Extraction, purification, structural characterization, and antioxidant activity of polysaccharides from Wheat Bran[J]. Journal of Molecular Structure, 2021, 1233: 130096.
- [20] XU Y Q, NIU X J, LIU N Y, et al. Characterization, antioxidant and hypoglycemic activities of degraded polysaccharides from blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) fruits[J]. Food Chemistry, 2018, 243: 26-35.
- [21] CHEN Z H, LIU Y X, WANG D, et al. Preparation, chemical structure and α -glucosidase inhibitory activity of sulfated polysaccharide from *Grifola frondosa*[J]. Journal of Functional Foods, 2022, 98: 105289.
- [22] GOYAL P, KUMAR V, SHARMA P. Carboxymethylation of Tamarind kernel powder[J]. Carbohydrate Polymers, 2007, 69(2): 251-255.
- [23] 陈珊, 冯润芳, 袁野, 等. 酸枣多糖羧甲基化修饰及活性研究[J]. 中国食品学报, 2022, 22(4): 55-66.
- CHEN Shan, FENG Runfang, YUAN Ye, et al. Studies on carboxymethylation modification and activity of wild jujube polysaccharide [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(4): 55-66.
- [24] LIU W, HU C, LIU Y M, et al. Preparation, characterization, and α -glycosidase inhibition activity of a carboxymethylated polysaccharide from the residue of *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 99: 454-464.
- [25] AN Y Z, LIU H T, LI X X, et al. Carboxymethylation modification, characterization, antioxidant activity and anti-UVC ability of *Sargassum fusiforme* polysaccharide[J]. Carbohydrate Research, 2022, 515: 108555.
- [26] WANG L, ZHAO Z W, ZHAO H Q, et al. Pectin polysaccharide from *Flos Magnoliae* (Xin Yi, *Magnolia biondii* Pamp. flower buds): Hot-compressed water extraction, purification and partial structural characterization[J]. Food Hydrocolloids, 2022, 122: 107061.
- [27] LI Y T, CHEN B J, WU W D, et al. Antioxidant and antimicrobial evaluation of carboxymethylated and hydroxamated degraded polysaccharides from *Sargassum fusiforme*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 118: 1550-1557.
- [28] LIN D R, LONG X M, XIAO L J, et al. Study on the functional properties and structural characteristics of soybean soluble polysaccharides by mixed bacteria fermentation and microwave treatment [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 157: 561-568.
- [29] KARIMI S, GHANBARZADEH B, ROUFEGARINEJAD L, et al. Polysaccharide extracted from *Athaea officinalis* L. root: New studies of structural, rheological and antioxidant properties[J]. Carbohydrate Research, 2021, 510: 108438.
- [30] YANG X B, ZHAO Y, LV Y. *In vivo* macrophage activation and physicochemical property of the different polysaccharide fractions purified from *Angelica sinensis*[J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 71 (3): 372-379.
- [31] BEN JEDDOU K, CHAARI F, MAKTOUF S, et al. Structural, functional, and antioxidant properties of water-soluble polysaccharides from potatoes peels[J]. Food Chemistry, 2016, 205: 97-105.
- [32] 丁素芸, 闫芝茜, 刘会平, 等. 紫苏叶多糖的提取工艺优化及理化特性分析[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(1): 95-101.
- DING Suyun, YAN Zhiqian, LIU Huiping, et al. Optimization of extraction technology of polysaccharide from *Perilla frutescens* var. *frutescens* and its physicochemical properties[J]. Food Research and Development, 2023, 44(1): 95-101.
- [33] XIONG F, LI X, ZHENG L H, et al. Characterization and antioxidant activities of polysaccharides from *Passiflora edulis* Sims peel under different degradation methods[J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 218: 46-52.
- [34] 陈舒桐, 周庆玲, 杨睿宇, 等. 两种马尾藻岩藻多糖的理化性质、结构表征及其增强免疫和降血糖活性[J]. 食品科学, 2023: 1-12. DOI: 11.2206.ts.20230328.1433.018.
- CHEN Shutong, ZHOU Qingling, YANG Ruiyu, et al. Physicochemical properties, structural characterization, immunoenhancing and hypoglycemic activities of fucoidan extracts from two sargassum species[J]. Food Science, 2023: 1-12. DOI: 11.2206.ts.20230328.1433.018.
- [35] CHEN S H, CHEN H X, TIAN J G, et al. Chemical modification, antioxidant and α -amylase inhibitory activities of corn silk polysaccharides[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 98(1): 428-437.