

荔枝多糖级分的溶液性质研究

黄菲^{1,2}, 张瑞芬^{1,2}, 刘慧娟¹, 董丽红^{1,2}, 赖婷¹, 张名位^{1*}

(1. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 农业部功能食品重点实验室, 广东省农产品加工重点实验室, 广州 510610; 2. 华中农业大学食品科技学院, 武汉 430070)

摘要: **目的** 研究荔枝多糖级分在溶液中的构象, 以丰富荔枝多糖的结构信息。**方法** 采用原子力显微镜 (AFM)、圆二色谱 (CD)、碘-碘化钾反应和激光粒度仪等方法分析各个级分的形态、结构以及粒径大小。**结果** AFM 分析表明 LP1-4 均含有分散的球状颗粒; LP2 还含有较大的球状聚集物; LP3 则出现部分蠕虫链状; LP4 含有部分无规线团和支链交联状。CD 分析发现 LP3 中含有不对称结构, 推测其为三股螺旋结构。碘-碘化钾实验发现 LP1-4 均存在较长的侧链和较多的支链。LP1-4 的平均粒度分别是 189.2、193.9、244.6 和 275.5 nm; 分散指数分别是 0.301、0.463、0.479 和 0.518; LP1 在溶液中呈无规卷曲状且未发生聚集, LP2-4 则在溶液中有较大的聚集行为。

结论 4 种荔枝多糖级分具有不同的结构特征以及不同的溶液形态。

关键词: 荔枝; 多糖级分; 溶液性质

Study on the solution properties of polysaccharide fractions from litchi pulp

HUANG Fei^{1,2}, ZHANG Rui-Fen^{1,2}, LIU Hui-Juan¹, DONG Li-Hong^{1,2}, LAI Ting¹,
ZHANG Ming-Wei^{1*}

(1. Sericultural & Agri-Food Research Institute Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Functional Foods, Ministry of Agriculture, Guangdong Key Laboratory of Agricultural Products Processing, Guangzhou 510610, China; 2. Department of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

ABSTRACT: Objective To explore the solution properties of 4 polysaccharide fractions from litchi pulp. **Methods** Atomic force microscopy (AFM), circular dichroism (CD), iodine-potassium iodide reaction and laser particle size analyzer were used to analyze the solution conformation, structure and particle size of 4 polysaccharide fractions. **Results** AFM showed that LP1 was sphere-like conformation in solution. LP2 showed many large spherical particles aggregates. LP3 contained both spherical particles and rod-like structure. LP4 contained spherical particles and branched crosslinking structure. CD spectroscopy showed that there was an asymmetric structure in LP3, which would be a triple helix structure. LP1-4 existed longer and more branched side chains. The average particle sizes of LP1-4 were 189.2, 193.9, 244.6 and 275.5 nm, and their

基金项目: 国家自然科学基金-广东联合基金重点项目(U1301211)、国家 973 项目(2012CB722904)、广州市民生科技重大专项(201300000077)、科技部科技型中小企业技术创新基金项目-广东省科技型中小企业技术创新专项资金项目(12C26214405243-2012CY004)

Fund: Supported by a Joint Fund of the National Natural Science Foundation of China and Guangdong Provincial Government (U1301211), the Special Prophase Project of the National Basic Research Program of China (2012CB722904), the Major Special Project for People's Livelihood Science and Technology of Guangzhou (201300000077), and the Small and Medium Enterprises Technology Innovation Fund Project of Ministry of Science and Technology-Guangdong Province (12C26214405243-2012CY004)

*通讯作者: 张名位, 博士, 研究员, 主要研究方向为功能性食品。E-mail: mwzhh@vip.tom.com

*Corresponding author: ZHANG Ming-Wei, Researcher, Sericultural and Agri-Food Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510610, China. E-mail: mwzhh@vip.tom.com

particle dispersion index were 0.301, 0.463, 0.479 and 0.518, respectively. LP1 was random coil and existed no aggregation in solution while LP2-4 existed a greater aggregation behavior in solution. **Conclusion** Four litchi polysaccharide fractions have different structural characteristics as well as different solution properties.

KEY WORDS: litchi; polysaccharide fractions; solution properties

1 引言

荔枝(*Litchi chinensis* Sonn.)是无患子科荔枝属植物,其果肉味甜肉脆,营养丰富,富含多糖、多酚、V_C、膳食纤维、矿物质等多种成分,具有较高的营养价值和生物活性,深受消费者喜爱。近年来荔枝中的一些活性物质如花色苷、酚酸、多糖、原花色苷等引起了人们的广泛关注,其中多糖已被证实是荔枝果肉的主要活性成分^[1,2]。孔凡利等^[3,4]发现荔枝多糖具有体外清除自由基、体内增强肝脏和血清等抗氧化能力的作用;李巍巍、Jing 等^[5,6]研究发现荔枝多糖能体外促进淋巴细胞增殖、NK 细胞杀伤肿瘤细胞活性等表现出显著的免疫调节作用;张钟等^[7,8]发现荔枝多糖具有体外抑制 α -葡萄糖苷酶的活性、体内降低小鼠血糖浓度等潜在的降血糖作用。

基于荔枝多糖丰富的生物活性,因而探究清楚其结构特征显得尤为重要。但是目前关于荔枝多糖结构的研究主要集中在多糖的分离纯化和一级结构的解析。其中 Hu 等^[9]分离制备的荔枝多糖 LCP50S-2 由鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖和木糖(摩尔比是 1:7.3:3.06:15.6:8.18)组成;陈卫云^[10]纯化得到分子量分别是 54.5 kDa 和 14.1 kDa 的 2 种荔枝多糖组分。关于荔枝多糖在溶液中的形态特征尚未见报道。而多糖的溶液行为直接影响其生物活性。如具有半柔顺结构的龙眼多糖 LP111 比含刚性螺旋链结构的高度分支有序的紧密球型构象的 LP1 具有更好的促进淋巴细胞增殖、巨噬细胞吞噬和抗肿瘤活性^[11,12];具有线性结构的冬虫夏草多糖比有支链结构的多糖具有更好的抗肿瘤和免疫调节活性^[13]。

课题组前期研究发现热风干燥获得的荔枝多糖(LPD)具有较好的抗氧化活性和免疫调节作用^[2,14],因而本研究进一步以 LPD 为原料,采用 DEAE-52 离子交换树脂进一步分离纯化,得到 4 种多糖级分,采用原子力显微镜(AFM)、圆二色谱(CD)、碘-碘化钾反应和激光粒度仪分析其溶液形态及结构特征,来探究荔枝多糖的溶液性质。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

荔枝品种为“桂味”,由广东省农业科学院果树研究所提供。再生纤维素透析袋 MWCO8000 购自美国 Spectrum 公司;DEAE-52 纤维素离子交换树脂购自美国 Sigma 公司;云母片购自中镜科仪公司;其他试剂均为国产分析纯。

2.2 设备与仪器

Multimode Nanoscope III 原子力显微镜(Veeco Metrology, Santa Barbara, CA); Zetasizer Nano ZS 粒度电位分析仪(英国马尔文仪器有限公司); JASCO-815 圆二色谱仪(日本 JASCO 公司); UV-2450 紫外可见分光光度计(日本岛津有限公司); EYELA N-1100 旋转蒸发仪(京东理化学株式会社); 冷冻干燥仪(北京德天佑科技发展公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 荔枝多糖级分的制备

将荔枝干去壳和核,打浆机粉碎,加入乙醇,使其终浓度为 80%,4 °C 浸泡 12 h,脱去脂肪、色素等小分子物质,离心(4500 r/min, 10 min)收集沉淀。将沉淀按料液比 1:20 加入蒸馏水,95 °C 水浴浸提 4 h,趁热抽滤,滤渣重复浸提一次,抽滤后合并滤液。滤液在 65 °C 真空浓缩至原来体积的 1/4。加入 95%乙醇至体系中使乙醇终浓度达到 80%,4 °C 静置过夜,抽滤得到多糖沉淀。沉淀用无水乙醇洗涤 3 次后收集,真空冷冻干燥得粗多糖。取粗多糖 100 mg 过 DEAE-52 柱,用蒸馏水、0.1、0.2 和 0.3 mol/L NaCl 进行洗脱,苯酚-硫酸法追踪测吸光度,按照洗脱峰分别收集组分,透析袋透析 3 d 脱去盐离子,冷冻干燥得到 4 个荔枝多糖级分分别是 LP1、LP2、LP3 和 LP4。

采用气质联用(GC-MS)分析荔枝多糖级分 LP1-4 的单糖组成发现 LP1 主要由阿拉伯糖、木糖、半乳糖、葡萄糖(摩尔比是 2.59: 1: 1.31: 2.54)组成,

LP2 则由甘露糖、葡萄糖和半乳糖(摩尔比是 1: 2.29: 1.18)组成, LP3 和 LP4 则主要由阿拉伯糖、半乳糖和鼠李糖(摩尔比分别是 1.42: 3.81: 1: 1.1 和 1.34: 3.35: 1: 1.45)组成。此外, 采用凝胶渗透色谱(GPC)检测 LP1-4 的分子量分别是 3.38 kDa、124.1 kDa、122.6 kDa 和 1026 kDa。

2.3.2 原子力显微镜观察

将荔枝多糖级分 LP1-4 用蒸馏水配制为 0.01 mg/mL 的溶液, 滴加 5 μ L 多糖溶液到新鲜剥离的云母片上, 室温下置于干燥器内干燥 24 h 后进行测试。采用 Multimode Nanoscope III 原子力显微镜, 在非接触模式(tapping mode)下获得图像。探针为 Si_3N_4 , 微悬臂长: 200 μm , 弹性系数 0.28 N/m)。图像的采集分析采用 Nanoscope IIIa 软件(Version 5.30r3.sr3)。

2.3.3 圆二色谱

将荔枝多糖级分 LP1-4 分别配制为 1 mg/mL 的多糖溶液, 以 Jasco-815 圆二色谱仪进行测定, 测定波长范围 180 nm~400 nm。扫描时充氮气, 测试温度为室温。

2.3.4 碘-碘化钾反应

分别称取多糖级分 LP1-4 样品 2 mg, 溶于 2 mL 蒸馏水, 加入 1.2 mL 碘试剂(含 0.02% I_2 的 0.2% KI

溶液), 充分混匀后用分光光度计扫描: 300~700 nm。

2.3.5 平均粒径和分布分析

将荔枝多糖级分 LP1-4 配制成 0.5 mg/mL 的多糖溶液, 5000 r/min, 10 min 离心取上清后, 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 采用 Zetasizer Nano ZS 粒度仪基于动态光散射(DLS)对其粒径分布进行测定。

3 结果与讨论

3.1 多糖级分 LP1-4 的原子力显微镜图

多糖的构象以及其在溶液中的形态对其功能活性有着重要的影响。AFM 是近年来发展起来的研究多糖高级结构的有效工具, 能使多糖样品在接近生理环境的条件下直接观测, 可以获得多糖高级结构稳定、清晰的图像, 为多糖结构的深入研究提供了极大的方便。通过 AFM 可以清晰的看到荔枝多糖级分子在水溶液中的形貌, 如图 1 所示。LP1-4 均含有分散的球状颗粒, 直径大小为 15~20 nm; 其中 LP2 还含有较大的球状聚集物, 直径为 50~150 nm; LP3 则出现部分蠕虫链状, 链长范围是 150~300 nm; LP4 则含有无规线团和支链交联状, 其链长范围是 50~400 nm。

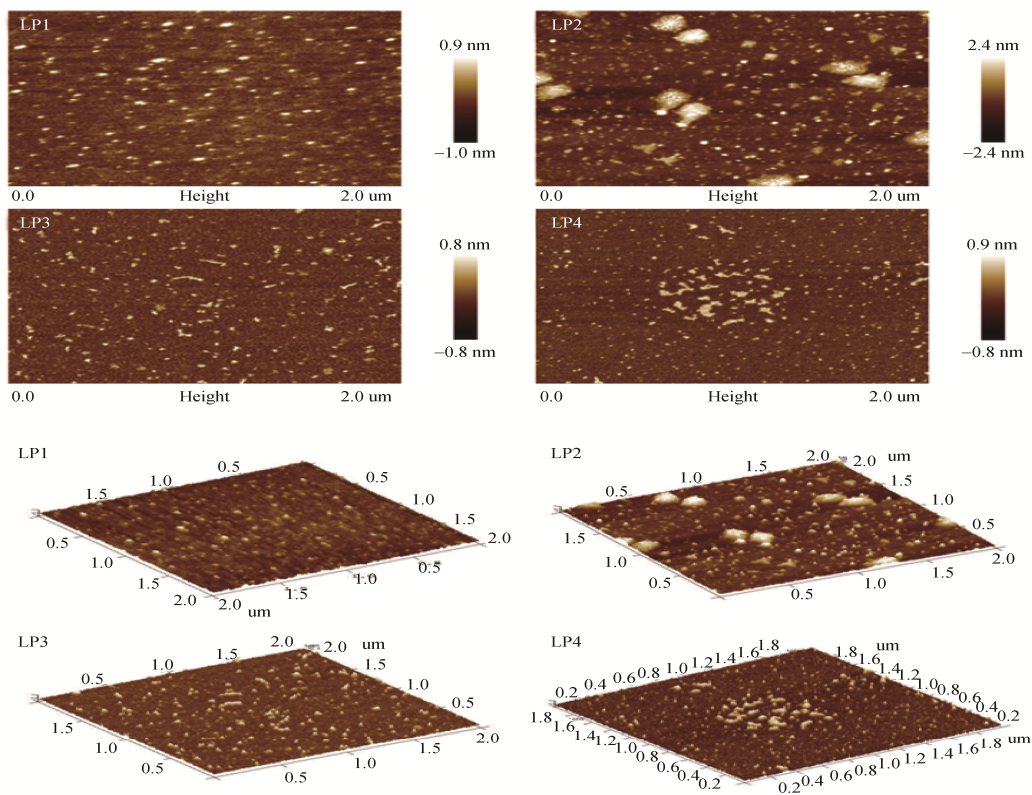


图1 荔枝多糖级分 LP1-4 的原子力显微镜图

Fig. 1 AFM images of LP1-4

3.2 多糖级分 LP1-4 的圆二色谱分析

圆二色谱可以通过测定多糖分子在溶液中的构象变化来分析多糖的高级结构。一般情况下, 多糖因缺乏紫外区的光谱特性, 在 CD 谱上面无显著 Cotton 效应。但在水溶液中, 由于多糖分子间的相互作用导致分子呈现折叠、缠绕等无规形态, 使其产生不对称性, 从而导致 Cotton 效应^[15]。LP1、LP2 和 LP4 无显著的 Cotton 效应, 而 LP3 在 200 nm 处有一个较大的正吸收峰, 说明 LP3 中存在不对称结构, 推测其可能和凝胶多糖 Gellan 一样具有螺旋结构^[16]。

3.3 多糖级分 LP1-4 的支链结构

荔枝多糖 4 个级分和碘试剂混合后扫描图谱如图 3 所示, 从图中可以看到荔枝多糖与 I₂-KI 的反应物在 350 nm 处均有最大吸收, 而在 565 nm 出无吸收, 说明 4 种多糖均存在较长的侧链和较多的支链^[17]。

3.4 多糖级分 LP1-4 的粒度分布

由于活性多糖的分子间和分子内部存在着较为复杂的相互作用力, 在溶液中这种作用力会导致多糖构象发生变化, 从而会引起多糖的无规卷曲、聚集等形态变化, 而这些变化在粒度上表现出粒径大小

以及分散指数的改变。因此, 本研究用激光粒度仪来分析荔枝多糖级分的粒度分布情况, 如图 4 和表 1。粒度分散指数(PDI)反映的是粒度分布的均匀程度, 粒度分布越不均匀, 分散指数就越大。从表 1 中可以看出 LP1-4 的分散指数越来越大, 表明粒度分布越来越不均匀, 说明多糖在溶液中发生了聚集。此外, LP1 在粒度分布图上只存在一个峰, 说明多糖分子可能呈无规卷曲而不发生聚集。LP2-4 均有 2 个峰, 说明 LP2-4 在溶液中存在较大的聚集行为。

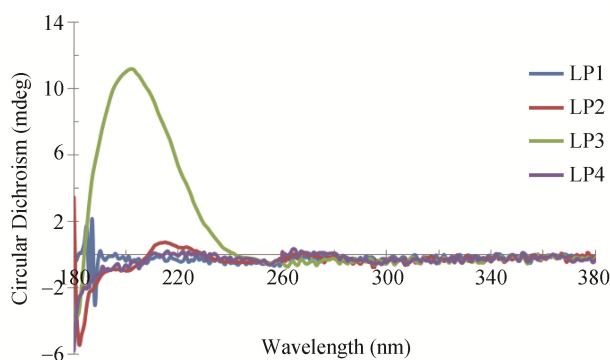


图 2 荔枝多糖级分 LP1-4 的圆二色谱图
Fig. 2 CD spectrum of LP1-4

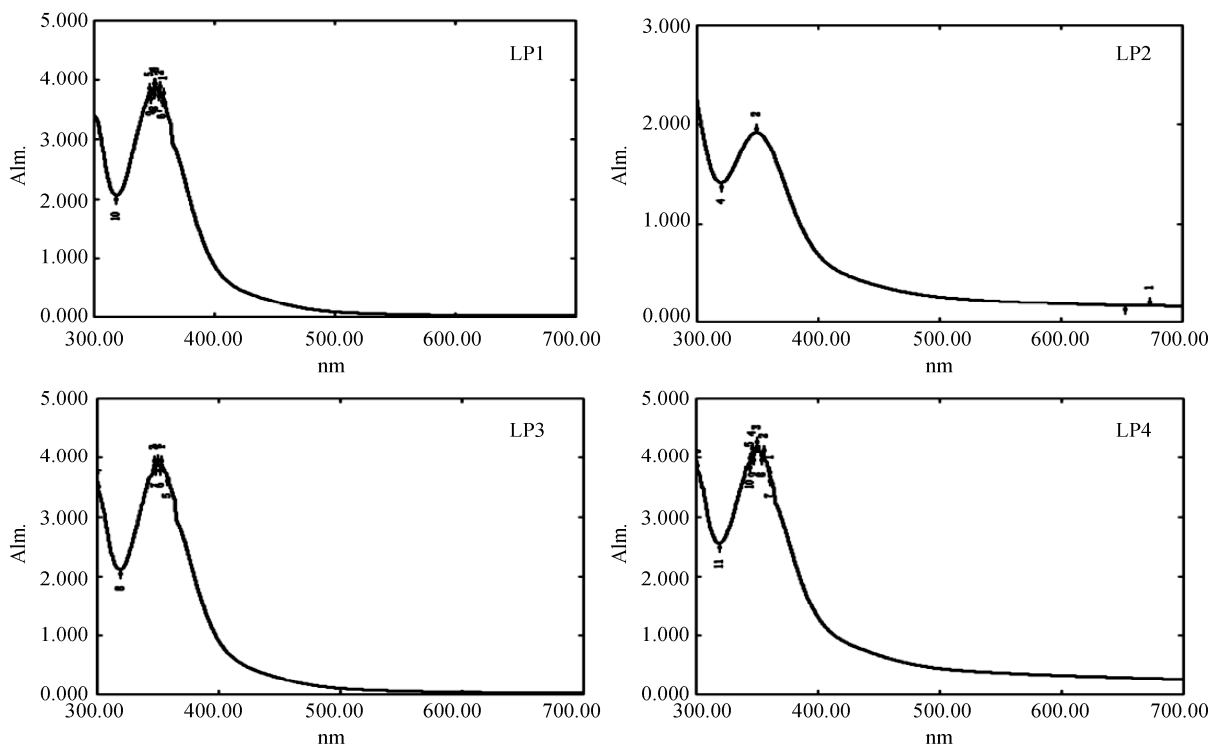


图 3 荔枝多糖级分与碘-碘化钾的扫描图谱
Fig. 3 UV spectrum after LP1-4 reacted with I₂-KI

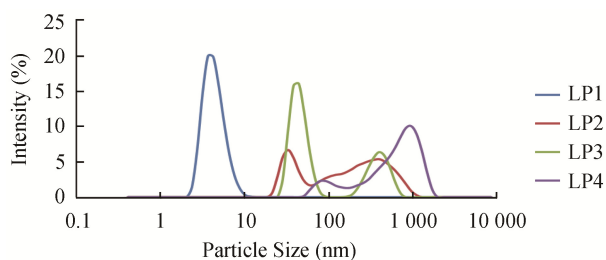


图4 荔枝多糖级分LP1-4的粒度分布图

Fig. 4 Longnormal size distribution of LP1-4

表1 荔枝多糖级分LP1-4的粒度分布参数

Table 1 Size distribution parameters of LP1-4

Polysaccharide	平均粒度(nm)	分散指数(PDI)
LP1	189.2	0.301
LP2	193.9	0.463
LP3	244.6	0.479
LP4	275.5	0.518

从微观角度上来看,颗粒和大分子在溶液中一直在不停的做布朗运动,从而导致颗粒和溶剂分子之间的碰撞。多糖分子间的相互碰撞以及多糖分子中大量的羟基等基团的相互作用,导致多糖分子发生聚集,从而导致多糖粒度的增大和粒度分散指数的变大^[18]。

4 结论

本实验主要利用原子力显微镜、圆二色谱、激光粒度仪等现代仪器对荔枝多糖4个级分的溶液行为及结构特征进行了研究,研究发现LP1-4均含有分散的球状颗粒;LP2还含有较大的球状聚集物;LP3则出现部分蠕虫链状;LP4含有部分无规线团和支链交联状。此外,LP3中含有不对称结构,推测其为三股螺旋结构。碘-碘化钾实验发现LP1-4均存在较长的侧链和较多的支链。LP1-4的平均粒度和分散指数依次增大,表明LP1在溶液中呈无规卷曲状且未发生聚集,LP2-4则在溶液中有较大的聚集行为。本研究首次探究了荔枝多糖的溶液行为,丰富了荔枝多糖的结构信息。

参考文献

[1] Huang F, Guo Y, Zhang R, *et al.* Effects of drying methods on physicochemical and immunomodulatory properties of

polysaccharide-protein complexes from litchi pulp [J]. *Molecules*, 2014, 19(8): 12760-12776.

[2] Huang F, Zhang R, Yi Y, *et al.* Comparison of physicochemical properties and immunomodulatory activity of polysaccharides from fresh and dried litchi pulp [J]. *Molecules*, 2014, 19(4): 3909-3925.

[3] Kong FL, Zhang MW, Liao ST, *et al.* Antioxidant activity of polysaccharide-enriched fractions extracted from pulp tissue of *Litchi chinensis* sonn [J]. *Molecules*, 2010, 15(4): 2152-65;

[4] Kong FL, Zhang MW, Kuang RB, *et al.* Antioxidant activities of different fractions of polysaccharide purified from pulp tissue of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) [J]. *Carbohydr Polym*, 2010, 81(3): 612-616.

[5] Jing Y, Huang L, Lv W, *et al.* Structure characterization of a novel polysaccharide from pulp tissues of *Litchi chinensis* and its immunomodulatory activity [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62: 902-911

[6] 李巍巍. 荔枝多糖的提取分离纯化及其免疫调节作用研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.

Li WW. Studies on extraction, separation, purification and Immunomodulating activities of litchi polysaccharide [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2009.

[7] 张钟, 吴文婷, 王萍, 等. 荔枝水溶性多糖作为 α -葡萄糖苷酶抑制剂的活性测定 [J]. *食品科学*, 2013, 34(13): 175-179

Zhang Z, Wu WT, Wang P, *et al.* Activity determination of Litchi water-soluble polysaccharide (LCWSP) as α -Glucosidase Inhibitor [J]. *Food Sci*, 2013, 34(13): 175-179

[8] 张钟, 黄丽花, 张玲, 等. 荔枝肉水溶性多糖降血糖作用[J]. *食品科学*, 2013, 34(15): 303-306

Zhang Z, Huang LH, Zhang L, *et al.* Hypoglycemic effect of water-soluble polysaccharides from Litchi Flesh [J]. *Food Sci*, 2013, 34(15): 303-306

[9] Hu XQ, Huang YY, Dong QF, *et al.* Structure characterization and antioxidant activity of a novel polysaccharide isolated from pulp tissues of *Litchi chinensis* [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(21): 11548-52

[10] 陈卫云, 荔枝果肉多糖超声微波酶解协同提取及其生物活性初析 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.

Chen WY. Studies on ultrasonic-microwave-enzyme synergistic extraction technology of polysaccharides from litchi pulp and preliminary exploration for its bioactivity [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2011.

[11] Yi Y, Zhang MW, Liao ST, *et al.* Structural features and immunomodulatory activities of polysaccharides of longan pulp

- [J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 87(1): 636–643
- [12] Yi Y, Huang F, Zhang MW, *et al.* Solution properties and in vitro anti-tumor activities of polysaccharides from longan pulp [J]. *Molecules*, 2013, 18(9): 11601–11613
- [13] Yan JK, Wang WQ, Li L, *et al.* Physicochemical properties and antitumor activities of two α -glucans isolated from hot water and alkaline extracts of *Cordyceps* (Cs-HK1) fungal mycelia [J]. *Carbohydr Polym*, 2011, 85(4): 753–758
- [14] 黄菲, 张瑞芬, 董丽红, 等. 热风干制对荔枝果肉多糖抗氧化活性的影响 [J]. *现代食品科技*, 2014. 30(5): 56–61
Huang F, Zhang RF, Dong LH, *et al.* Effect of hot-air drying of litchi on antioxidant activity of polysaccharides in the pulp [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2014, 30(5): 56–61
- [15] 郭琦, 枸杞多糖的提取, 分离纯化, 溶液性质及其结构的初步研究 [D]. 西安: 陕西师范大学, 2012.
Guo Q. The extraction, isolation and purification, solution properties and structural analysis of *Lycium barbarum* polysaccharide [D]. Xi'an: Shaanxi Normal University, 2012.
- [16] Nitta Y, Kim BS, Nishinari K, *et al.* Synergistic gel formation of xyloglucan/gellan mixtures as studied by rheology, DSC, and circular dichroism [J]. *Biomacromolecules*, 2003, 4(6): 1654–1660.
- [17] Yamada H, Yanahira S, Kiyohara H, *et al.* Water-soluble glucans from the seed of *Coix lacryma-jobi* var. *ma-yuen* [J]. *Phytochemistry*, 1985, 25(1): 129–132.
- [18] 闫景坤, 抗氧化新型冬虫夏草胞外多糖的制备, 结构与溶液特征研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2010
Yan JK, Preparation, structure, and solution properties of a novel antioxidant exopolysaccharide from *Cordyceps sinensis* [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2010.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



黄 菲, 博士研究生, 主要研究方向为功能性食品。

E-mail: hf1311@163.com



张名位, 博士, 研究员, 主要研究方向为功能性食品。

E-mail: mwzhh@vip.tom.com