

鲜辣椒多糖组分变化初步分析及抗氧化活性研究

凌洁玉, 周文轩, 庄志雄, 程慧玲, 周盼盼, 吴欣鑫, 潘滋先

(武汉设计工程学院食品与生物科技学院, 武汉 430205)

摘要:采用相同条件,对鲜辣椒原料、发酵20 d与40 d鲜辣椒中的可溶性多糖进行提取和DEAE-Cellulose52柱层析分离,结果表明三个时期均出现相同的4种多糖:中性多糖ZPS-1和酸性多糖ZPS-2、ZPS-3、ZPS-4,另有一种新的中性多糖ZPS-N在发酵20 d时出现,又随发酵时间延长而消失。中性多糖ZPS-1在发酵过程中持续下降,而发酵20 d的鲜辣椒中酸性多糖含量最高,对其5个多糖组分采用SephadexG-200凝胶柱层析进一步纯化,测得ZPS-3糖醛酸含量最高。抗氧化活性研究表明,三种酸性多糖的抗氧化性均显著强于中性多糖ZPS-1,糖醛酸含量与其抗氧化性呈一定正相关。发酵20 d的鲜辣椒其粗多糖具有更高的抗氧化能力,故而食用价值相对更高。

关键词:鲜辣椒;多糖组分;抗氧化活性

中图分类号:TS201.3

文献标识码:A

文章编号:2096-5877(2022)03-0145-05

Analysis of Components and Antioxidant Activity of Fermented Cayenne Polysaccharides

LING Jieyu, ZHOU Wenxuan, ZHUANG Zhixiong, CHENG Huiling, ZHOU Panpan, WU Xinxin, PAN Zixian

(College of Food Science and Technology, Wuhan Institute of Design and Sciences, Wuhan 430205, China)

Abstract: The soluble polysaccharides from the raw materials, 20 d fermented and 40 d fermented cayenne, were extracted and separated by DEAE-Cellulose 52 column under the same conditions. The results showed that the same four polysaccharides appeared in the three periods: Neutral polysaccharide ZPS-1 and Acidic polysaccharides ZPS-2, ZPS-3, ZPS-4, and a new Neutral polysaccharide ZPS-N appeared on the 20th day and disappeared with the prolongation of fermentation time. The Neutral polysaccharide ZPS-1 continued to decrease during the fermentation process, the 20 d fermented cayenne had the highest acid polysaccharide content, and its 5 polysaccharide fractions were further purified by SephadexG-200 column chromatography, and the highest uronic acid content was the ZPS-3. The results showed that the antioxidant activity of the three Acidic polysaccharides was significantly stronger than that of the Neutral polysaccharide ZPS-1, and the uronic acid content was positively correlated with its antioxidant activity. The crude polysaccharides from the 20 d fermented cayenne had a higher antioxidant capacity, so the edible value was relatively higher.

Key words: Fermented cayenne; Polysaccharide component; Antioxidant activity

鲜辣椒是以玉米粉和红辣椒为主要原料、经自然发酵制成的独具特色的佐餐食品^[1],主要流行于湖北、湖南、四川等省份,其独特风味受到众多旅游者的欢迎。而目前对其营养价值和功能国内鲜见相关研究。

已有研究表明许多发酵食品因富含活性营养

成分而具有保健功能,如多糖具有抗氧化与降血糖等功能^[2]。多糖广泛存在于天然植物中^[3],玉米和辣椒作为鲜辣椒的主要原料,均含有较多的活性多糖,具有抗氧化、抗衰老等多种功效^[4-5],而经过微生物的自然发酵,这些多糖的组分是否会发生变化,生物活性是否会受到影响,对于鲜辣椒的营养价值研究十分重要。

本研究对鲜辣椒发酵不同时期的可溶性多糖进行分离纯化和比较,旨在初步探究鲜辣椒发酵过程中多糖组分及生物活性的变化,为验证该传统发酵食品的营养价值奠定基础。

收稿日期:2019-12-17

基金项目:湖北省高等学校优秀中青年科技创新团队计划项目(201635)

作者简介:凌洁玉(1984-),女,讲师,硕士,研究方向为食品质量与安全。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 原料及试剂

玉米面、红辣椒、蒜、生姜和食盐均为正规超市购买。Sephadex G-200 凝胶、间羟基联苯、半乳糖醛酸标准品(上海伊卡生物技术有限公司);DEAE-Cellulose52(东京化成工业株式会社);DPPH(上海金穗生物科技有限公司);邻苯三酚、水杨酸(郑州勤实科技有限公司);纤维素酶、中性蛋白酶、乙醇、浓硫酸、苯酚等(国药集团化学试剂有限公司)。

1.1.2 主要仪器设备

754PC 紫外可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司);RJ-TDL-40C 低速离心机(上海比朗仪器有限公司);冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司);BXM-30R 高压灭菌锅、FYL-YS 恒温培养箱(上海博讯实业有限公司);SW-CJ-D 超净工作台:苏州净化设备有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 鲜辣椒制备

按照农家常规做法,将新鲜红辣椒洗净切碎,与玉米粉以 1:5 混匀,加入适量的盐及姜蒜,装坛液封,于 25℃ 恒温发酵。

1.2.2 鲜辣椒多糖的提取及含量测定

分别对原料、发酵 20 d 与 40 d 的鲜辣椒进行多糖提取。料液比 1:15,纤维素酶和中性蛋白酶各加入 2.5%,60℃ 水浴反应 2 h,90℃ 静置 30 min 促使酶钝化。然后以 5 000 r/min 离心 10 min,取上清液加入三倍体积 95% 的乙醇,静置过夜,使多糖充分沉淀。5 000 r/min 离心 15 min,取沉淀用无水乙醇洗涤,37℃ 干燥后得到粗多糖,对粗多糖进行称重。

采用苯酚-硫酸法^[6]绘制葡萄糖标准曲线,以标准葡萄糖的含量为横坐标,吸光度值为纵坐标,得回归方程为: $y=0.0059x+0.0188$, $R^2=0.9991$ 。待测多糖样品同标准曲线操作,测得数据带入标准曲线求得其多糖净含量。

1.2.3 鲜辣椒多糖的纯化

各粗多糖首先采用 DEAE-Cellulose52 柱层析,上样浓度为 2 mg/mL,体积为 10 mL。先用蒸馏水洗脱,再用 0.2、0.5、0.8 mol/L 的 NaCl 溶液依次进行梯度洗脱,流速为 1 mL/min,每 4 min 收集一管。收集洗脱峰组分,分别上样 SephadexG-200 凝胶柱,用 0.1 mol/L NaCl 溶液洗脱,流速为 1 mL/min,每 4 min 收集一管,分别收集洗脱峰组分,冷冻干燥,即得纯化的各组分多糖。两次纯化洗脱时,均在

波长为 490 nm 处以苯酚-硫酸法跟踪检测,以管号为横坐标,吸光度值为纵坐标做洗脱曲线。

1.2.4 酸性多糖糖醛酸含量测定

采用间羟基联苯法^[7]绘制半乳糖醛酸标准曲线,以半乳糖醛酸含量为横坐标,吸光度值为纵坐标,得回归方程为: $y=0.0092x+0.0626$, $R^2=0.9958$ 。分别取 3 种酸性多糖溶于蒸馏水,其余操作同标曲。

1.2.5 多糖的抗氧化性研究

羟基自由基($\cdot\text{OH}$)清除能力测定采用水杨酸法^[8];DPPH 自由基($\text{DPPH}\cdot$)与超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)进行清除能力测定,参照刘洋等^[9]的方法。以同浓度的 V_c 作为对照。

2 结果与分析

2.1 鲜辣椒不同发酵时期的多糖组分比较

对从原料、发酵 20 d 与发酵 40 d 鲜辣椒中提取的粗多糖分别采用 DEAE-Cellulose52 进行分离,依次采用蒸馏水及不同浓度的 NaCl 溶液进行梯度洗脱,控制三次分离条件完全相同,结果见图 1~图 3。

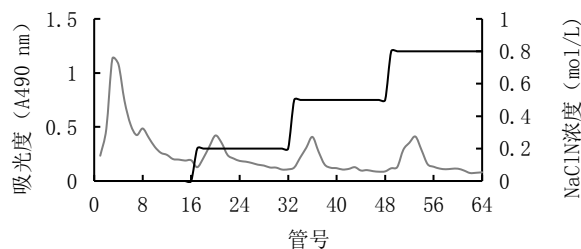


图 1 原料多糖 DEAE-Cellulose52 柱梯度洗脱图谱

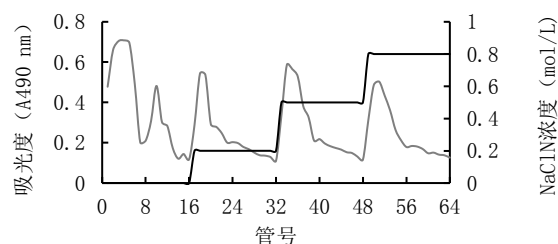


图 2 发酵 20 d 鲜辣椒多糖 DEAE-Cellulose52 柱梯度洗脱图谱

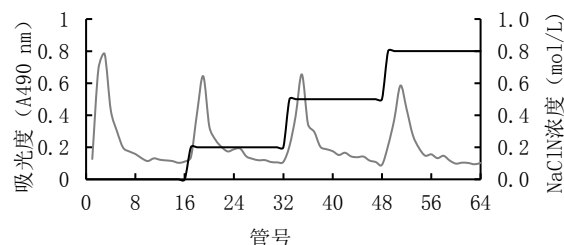


图 3 发酵 40 d 鲜辣椒多糖 DEAE-Cellulose52 柱梯度洗脱图谱

收集各峰型的多糖组分,测定各组分的含量,并计算其在上样粗多糖(20 mg)中所占比例,如表1所示。

表1 不同发酵时期各组分多糖含量 %

	原料多糖	发酵20 d多糖	发酵40 d多糖
ZPS-1	20.68	12.91	8.19
ZPS-N	-	5.58	-
ZPS-2	5.94	7.65	6.82
ZPS-3	5.02	9.51	7.33
ZPS-4	5.47	8.28	7.11

采用蒸馏水洗脱得到的为中性多糖组分。比较图1~图3可知:原料多糖、发酵20 d、发酵40 d鲜辣椒多糖的第1个组分,出峰时间一致,因此可认为是同一种中性多糖,命名为ZPS-1。发酵20 d鲜辣椒多糖的第2个组分,命名为ZPS-N,这是在发酵过程中新生成的一种中性多糖,至发酵40 d时,该组分不再存在。

采用NaCl洗脱所得为酸性多糖组分。由图1~图3可知,三个时期的粗多糖,梯度洗脱各出现3个峰值,且出峰时间与峰形范围均一致,因此可以认为这是3个相同的酸性多糖组分,依次命名为ZPS-2、ZPS-3、ZPS-4。

由此可见,鲜辣椒在发酵过程中,多糖组分变化不大。然而,表1显示,三个时期各组分多糖的相对含量变化较大。对于中性多糖ZPS-1,其在原料粗多糖中含量最高,发酵中持续下降直至40 d的8.19%,由此推断,ZPS-1在发酵过程中能被其中的微生物分解利用,而ZPS-N极有可能是其分解过程中的中间产物,故会在发酵中先出现后消失,当然进一步确证还需后续的结构研究。三种酸性多糖在原料粗多糖中所占比例都较低,而发酵20 d后,其比例都升高,总体占25.44%,继续发酵至40 d,比例均略有下降。

2.2 各组分多糖的纯化及基本性质研究

由于发酵20 d的鲜辣椒粗多糖含有多糖组分最多且酸性多糖含量最高,故对其5个组分分别采用Sephadex G-200凝胶柱层析进一步纯化。由图4~图8可知,5个组分均只得到一个洗脱峰,且峰形对称性良好,证明其均为单一组分的多糖。分别收集5个洗脱峰组分进行真空冷冻干燥,得到纯化固体多糖,于-20℃保存备用。苯酚-硫酸法测得各组分多糖的纯度见表1。

将5个组分的纯化多糖分别与碘-碘化钾溶液以及班氏试剂反应,结果如表2所示。5组多糖

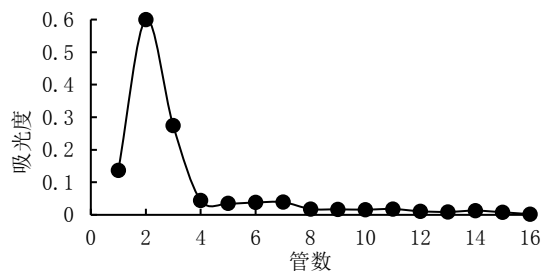


图4 ZPS-1 Sephadex G-200分离图谱

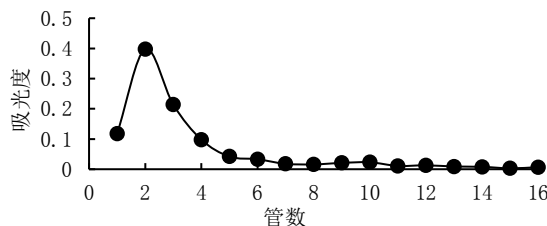


图5 ZPS-N Sephadex G-200分离图谱

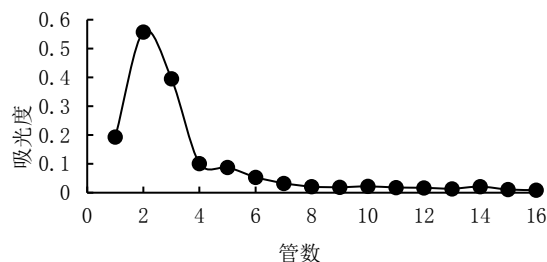


图6 ZPS-2 Sephadex G-200分离图谱

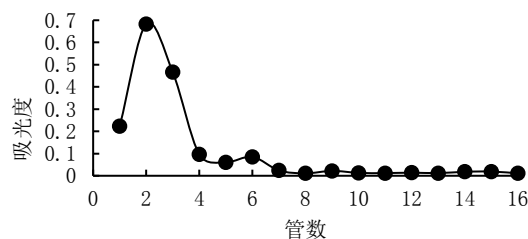


图7 ZPS-3 Sephadex G-200分离图谱

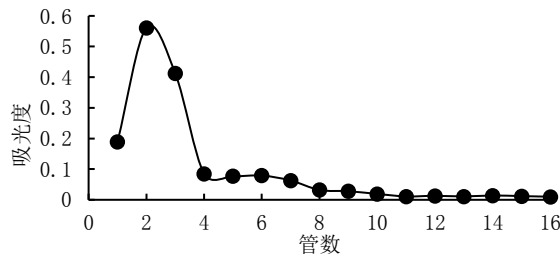


图8 ZPS-4 Sephadex G-200分离图谱

均不能和碘-碘化钾溶液发生颜色反应,证明其均不是淀粉或者糊精类多糖,且其中不含淀粉或糊精。5组多糖与班氏试剂共热都不发生颜色反应,证明其均不具备还原性,且其中未混入还原性单糖。

对3个酸性多糖组分进行糖醛酸含量测定,

表 2 各多糖组分的纯度及基本性质					
多糖组分	ZPS-1	ZPS-N	ZPS-2	ZPS-3	ZPS-4
纯度(%)	81.39	81.88	82.75	83.76	82.24
碘-碘化钾	-	-	-	-	-
班氏试剂	-	-	-	-	-
糖醛酸含量(μg/mg)	未测定	未测定	0.73	2.09	1.82

由表 2 可知,ZPS-3 酸性多糖的糖醛酸含量最高,略高于 ZPS-4,而 ZPS-2 的糖醛酸含量相对较低。已有研究表明,糖醛酸含量与多糖抗氧化性呈正相关^[10],故在后续抗氧化性研究时对此相关性进行分析。

2.3 多糖的抗氧化性研究

7 种多糖自由基清除能力测定见表 3~表 5,除

表 3 各多糖对 DPPH·清除率					
%					
浓度(mg/mL)	0.4	1.0	1.6	2.2	2.8
ZPS-1	12.86 ± 0.23dE	20.88 ± 0.07dD	28.26 ± 0.18dC	37.31 ± 0.23dB	46.57 ± 0.06dA
ZPS-2	18.69 ± 0.22bE	28.69 ± 0.06bD	38.03 ± 0.14bC	47.37 ± 0.23bB	57.76 ± 0.18bA
ZPS-3	22.03 ± 0.18aE	31.49 ± 0.22aD	41.47 ± 0.18aC	51.01 ± 0.22aB	60.67 ± 0.18aA
ZPS-4	14.68 ± 0.05cE	22.86 ± 0.25cD	34.49 ± 0.15cC	44.90 ± 0.10cB	54.75 ± 0.07cA
原料粗多糖	-	-	30.37 ± 1.80eA	-	27.49 ± 1.86fA
发酵 20 d 粗多糖	-	-	34.23 ± 1.38eA	-	38.88 ± 2.10eA
发酵 40 d 粗多糖	-	-	21.92e ± 1.51fA	-	32.46 ± 0.50eB
V _c	72.32 ± 0.18	92.33 ± 0.18	99.34 ± 0.10	99.31 ± 0.10	99.54 ± 0.15

注: 同列数据不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),同行数据具有不同大写字母表示差异显著($P<0.05$),下同

表 4 各多糖对·OH的清除率					
%					
浓度(mg/mL)	0.4	1.0	1.6	2.2	2.8
ZPS-1	14.98 ± 0.17 ^{dE}	19.39 ± 0.11 ^{cD}	25.58 ± 0.06 ^{dC}	28.77 ± 0.20 ^{dB}	31.59 ± 0.17 ^{dA}
ZPS-2	16.45 ± 0.11 ^{bE}	21.43 ± 0.06 ^{bD}	28.27 ± 0.01 ^{bC}	30.43 ± 0.12 ^{bB}	34.54 ± 0.11 ^{bA}
ZPS-3	17.27 ± 0.06 ^{aE}	22.12 ± 0.13 ^{aD}	29.07 ± 0.06 ^{aC}	31.99 ± 0.12 ^{aB}	36.52 ± 0.15 ^{aA}
ZPS-4	15.59 ± 0.20 ^{cE}	19.39 ± 0.17 ^{cD}	26.78 ± 0.10 ^{cC}	29.69 ± 0.05 ^{cB}	33.67 ± 0.12 ^{cA}
原料粗多糖	-	-	25.88 ± 0.18 ^{eA}	-	28.96 ± 0.62 ^{fA}
发酵 20 d 粗多糖	-	-	25.62 ± 1.53 ^{eA}	-	38.03 ± 2.11 ^{eB}
发酵 40 d 粗多糖	-	-	19.28 ± 0.79 ^{fA}	-	27.03 ± 0.97 ^{fB}
V _c	37.50 ± 0.17	50.96 ± 0.07	63.26 ± 0.10	70.47 ± 0.19	78.16 ± 0.16

表 5 各多糖对 O ²⁻ ·的清除率					
%					
浓度(mg/mL)	0.4	1.0	1.6	2.2	2.8
ZPS-1	16.23 ± 0.09 ^{dD}	16.35 ± 0.22 ^{cD}	18.20 ± 0.22 ^{dC}	19.39 ± 0.11 ^{cB}	21.21 ± 0.10 ^{cA}
ZPS-2	17.60 ± 0.21 ^{cE}	33.10 ± 0.14 ^{bD}	39.15 ± 0.11 ^{cC}	44.68 ± 0.08 ^{bB}	50.37 ± 0.14 ^{bA}
ZPS-3	29.39 ± 0.13 ^{aE}	33.12 ± 0.21 ^{bD}	40.18 ± 0.16 ^{bC}	47.14 ± 0.11 ^{aB}	52.97 ± 0.18 ^{aA}
ZPS-4	28.35 ± 0.14 ^{bE}	35.09 ± 0.28 ^{aD}	41.04 ± 0.14 ^{aC}	47.57 ± 0.20 ^{aB}	53.48 ± 0.11 ^{aA}
原料粗多糖	-	-	23.06 ± 1.20 ^{eA}	-	26.04 ± 0.91 ^{eA}
发酵 20 d 粗多糖	-	-	27.71 ± 0.51 ^{eA}	-	27.98 ± 0.52 ^{eA}
发酵 40 d 粗多糖	-	-	15.68 ± 0.65 ^{fA}	-	24.36 ± 1.56 ^{eB}
V _c	51.83 ± 0.08	78.19 ± 0.11	92.44 ± 0.18	98.50 ± 0.23	99.42 ± 0.11

个别情况外,自由基清除能力均随多糖浓度升高而增强。3 种酸性多糖(ZPS-2、ZPS-3、ZPS-4)对 DPPH·、·OH 和 O²⁻·的清除能力均高于同浓度的中性多糖 ZPS-1 且差异显著($P<0.05$)。已有大量研究证实,酸性多糖的抗氧化性要强于中性多糖,其原因是酸性基团(糖醛酸和硫酸根)使多糖分子带有更多的负电荷,分子形态伸展,降低了

自由基攻击分子时的空间位阻,进而加快自由基的猝灭^[11]。

研究表明,糖醛酸含量越高,多糖的抗氧化性越强^[10]。在 3 个酸性多糖组分中,ZPS-3 糖醛酸含量最高,而其对 DPPH·与·OH 的清除率也显著高于其他两个酸性多糖($P<0.05$)。然而,ZPS-2 的糖醛酸含量低于 ZPS-4,但其对 DPPH·与·OH 的

清除率却强于ZPS-4且差异显著($P<0.05$)。分析已有报道,影响多糖抗氧化活性的因素除了糖醛酸含量,还有硫酸根含量^[12]、羟基数量、单糖组成、糖苷键的连接方式等^[10],故推测造成这一现象是这些其他因素作用的结果,有待于后续多糖结构的深入研究。相对于最低的DPPH·与·OH清除率,ZPS-4却表现出最高 $O_2^{\cdot-}$ 清除率,推测其可能含有较特殊的结构。

对于3个时期的粗多糖,发酵20 d的鲜辣椒粗多糖表现出最高的抗氧化活性,对3种自由基的清除能力多数情况都显著高于同浓度其他两个时期的粗多糖($P<0.05$),这与前述研究所得结果发酵20 d粗多糖所含多糖组分最多、酸性多糖含量最高相符,说明鲜辣椒的原料通过一定时间的发酵作用,其抗氧化活性增强。而继续发酵至40 d后,由于各组分多糖的降解,其抗氧化活性呈现下降趋势。

3 结 论

本研究对地方特色食品鲜辣椒发酵过程中的多糖组成及抗氧化活性进行了初步探讨,结果表明3个发酵时期的多糖组分变化不大,但各组分相对含量有差异。原料多糖中以中性多糖ZPS-1为主,而随着发酵时间的延续,ZPS-1下降明显,推测其可以被发酵体系中的微生物分解利用,而ZPS-N很可能是其分解的中间产物,进一步验证还有待于后续对各组分多糖结构的研究。发酵20 d的鲜辣椒酸性多糖含量最高。

抗氧化研究表明,发酵20 d的多糖组分,3种酸性多糖对自由基的清除能力均显著强于中性多糖,糖醛酸含量与抗氧化性呈现一定正相关,但它并不是唯一影响因素。对于粗多糖,发酵20 d时具有最高的抗氧化活性,这与发酵20 d鲜辣椒

多糖组分最丰富,且酸性多糖含量最高相关。由于按照农家做法,鲜辣椒腌制20 d时就已成熟可以食用,故基于其多糖的含量和活性分析,发酵20 d的鲜辣椒食用价值更高。本研究首次探究了鲜辣椒发酵过程中所含多糖组分和活性的变化,初步得出一定时间的发酵能增强其营养功效,为该传统特色食品营养价值的验证和推广奠定了基础。

参考文献:

- [1] 崔小利,王 薇,阚建全.鲜辣椒纯种发酵的菌株优选[J].食品科学,2014,35(21):149-153.
- [2] 吴兰芳,蒋爱民,郑开颜,等.基于抗氧化活性的豆豉多糖提取工艺优化[J].食品研究与开发,2016,37(20):37-40.
- [3] 李素红,王昭曦,姜晓坤,等.超声波辅助法提取玉竹多糖工艺优化研究[J].东北农业科学,2018,43(3):61-64.
- [4] 张 钟,高红梅,叶林杰.玉米多糖的抗衰老作用[J].中国粮油学报,2017,29(7):18-21.
- [5] 杨 萍,郑先哲.酶法提取黑甜糯玉米多糖技术初探[J].中国食品添加剂,2012(5):149-153.
- [6] 何忠梅,管春红,李盛钰.植物乳杆菌C88联合短梗五加多糖抗疲劳作用[J].东北农业科学,2016,41(2):99-103.
- [7] 王翠竹,张楠淇,王振洲,等.林下参片中总糖、还原糖及糖醛酸的含量测定[J].特产研究,2016,38(3):54-57.
- [8] 薛丁萍,魏玉西,刘 淇,等.浒苔多糖对羟自由基的清除作用研究[J].海洋科学,2010,34(1):44-47.
- [9] 刘 洋,郭宇星,潘道东.4种乳酸菌体外抗氧化能力的比较研究[J].食品科学,2012,33(11):25-29.
- [10] 赵鹤鹏,许秋达,周鸿立.玉米须多糖中糖醛酸含量的测定及抗氧化作用的研究[J].河南工业大学学报,2017,38(4):81-85.
- [11] 李景艳.乳酸菌胞外多糖的抗氧化活性及其结构[D].无锡:江南大学,2013.
- [12] 熊双丽,李安林.酸性多糖的最新研究进展[J].食品科技,2010,35(5):80-83.
- [13] (上接第141页)China[J].International Journal of Cancer,1993,53(6):902-906.
- [14] 李 歌,张 超,苏优拉,等.高粱糠乙醇提取物对4种植物油氧化稳定性的影响[J].食品工业科技,2017,38(3):118-121,126.
- [15] 万 茵,李益珍,梁玉禧,等.谷物杂粮醇提物体外抑制黄嘌呤氧化酶的作用[J].中国食品学报,2018,18(5):29-36.
- [16] 赵 彬.典型谷物酚类化合物的抗癌细胞增殖活性及其吸收转运的研究[D].镇江:江苏大学,2017.
- [17] 陈华敏.高粱糠酚类物质的抗氧化和抗炎活性及模拟小肠吸收的研究[D].广州:华南理工大学,2018.
- [18] 陈华敏,赖富饶,孙崇臻,等.高粱糠不同存在形态酚类物质的AB-8大孔树脂纯化及对红细胞氧化溶血的保护作用[J].现代食品科技,2017,33(9):63-70,19.
- [19] 申迎宾.四种谷物多酚抗氧化、降血脂作用评价研究[D].无锡:江南大学,2016.
- [20] Lemlioglu-Austin D, Turner N D, McDonough C M, et al. Effects of sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] crude extracts on starch digestibility, estimated glycemic index (EGI), and resistant starch (RS) contents of porridges[J]. Molecules, 2012, 17(12): 11124-11138.
- [21] Amoako D B, Awika J M. Polymeric tannins significantly alter properties and in vitro digestibility of partially gelatinized intact starch granule[J]. Food Chemistry, 2016, 208: 10-17.
- [22] 尚凯宁,李 敏,刘永乐,等.高粱单宁对小麦蛋白体外消化率及其结构的影响[J].中国食品学报,2017,17(11):216-222.

(责任编辑:王丝语)

(责任编辑:王丝语)