

超高压微射流技术提取对裸藻 β -葡聚糖 结构和抗氧化活性的影响

乜世成, 张炜*, 高红, 宋林, 隋成博, 荆永康

(青海师范大学 化学化工学院, 青海 西宁 810008)

摘要: 利用超高压微射流技术 (UHPM) 对裸藻 β -葡聚糖 (EBG) 进行提取, 通过单因素实验及响应面优化设计实验考察了时间、压力、料液比及十二烷基硫酸钠 (SDS) 质量浓度对 EBG 提取率的影响, 同时采用刚果红实验以及 FTIR、XRD、SEM 对其结构进行了表征, 还比较了裸藻 β -葡聚糖标准品 (EBGS) 和 EBG 对 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基 (DPPH \cdot) 和 \cdot OH 的清除能力。结果表明, EBG 提取最佳条件为微射流时间 93 s、微射流压力 34 MPa、料液比 (g : mL, 下同) 1 : 270、SDS 质量浓度 4.2 g/L。在此条件下, EBG 提取率为 80.27%, 与理论值 81.69% 接近。EBG 具有有序的三螺旋结构, UHPM 使 EBG 的结晶度减小, EBG 表面出现裂痕与空隙。在质量浓度为 0.4~2.0 g/L 时, EBGS 和 EBG 对 DPPH \cdot 清除率基本相同, 在质量浓度为 4.0 g/L 时, EBG 对 DPPH \cdot 清除率达到 50.26%, 高于 EBGS 对 DPPH \cdot 的清除率 (35.14%); 而 EBGS 和 EBG 对 \cdot OH 清除效果不明显, 清除率相对较低。

关键词: 超高压微射流技术; 裸藻 β -葡聚糖; 响应面优化法; 结构; 抗氧化活性; 中药现代化技术

中图分类号: O636.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2022) 08-1633-09

Effect of ultra-high pressure micro-jet technology extraction on structure and antioxidant activity of β -glucan from *Euglena gracilis*

NIE Shicheng, ZHANG Wei*, GAO Hong, SONG Lin, SUI Chengbo, JING Yongkang

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Qinghai Normal University, Xining 810008, Qinghai, China)

Abstract: β -Glucan from *Euglena gracilis* (EBG) was extracted by ultra-high pressure micro-jet technology (UHPM). The effects of time, pressure, solid-liquid ratio and sodium dodecyl sulfate (SDS) mass concentration on the extraction rate were investigated by single factor experiments as well as response surface optimization design experiments. The structure of EBG was characterized and analyzed by congo red experiment, FTIR, XRD and SEM. Furthermore, experiments were conducted to explore the scavenging abilities of EBG and its standard (EBGS) towards 1, 1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine free radicals (DPPH \cdot) and hydroxyl radical (\cdot OH). The results showed that the optimum extraction conditions of EBG were as follows: time of 93 s, pressure of 34 MPa, solid-liquid ratio (g : mL) of 1 : 270 and SDS mass concentration of 4.2 g/L. Under these conditions, the extraction rate of EBG reached 80.27%, which was close to the theoretical value of 81.69%. Characterization analyses indicated that EBG had an orderly triple helix structure, but with surface cracks and voids due to the reduction of crystallinity induced by UHPM. EBG demonstrated higher scavenging efficiency (50.26%) towards DPPH \cdot in comparison to EBGS (35.14%) at mass concentration of 4.0 g/L while showed similar scavenging rate at mass concentrations from 0.4 g/L to 2.0 g/L. Meanwhile, it seemed that EBGS and EBG had no obvious scavenging effect on \cdot OH with relatively low scavenging rates.

Key words: ultra-high pressure micro-jet; β -glucan from *Euglena gracilis*; response surface optimization method; structure; antioxidant activity; modernization technology of traditional Chinese medicines

收稿日期: 2021-11-21; 定用日期: 2022-03-07; DOI: 10.13550/j.jxhg.20211286

基金项目: 高原人工湿地生态平衡构建与应用示范 (2021-SF-139)

作者简介: 乜世成 (1995—), 男, 硕士生, E-mail: nie950715@163.com。联系人: 张炜 (1972—), 女, 教授, E-mail: zhangwei@qhnu.edu.cn。

裸藻 (*Euglena gracilis*) 又称眼虫, 是一种极其简单的单细胞真核生物, 具有无细胞壁的特点, 对营养成分具有高达 93.1% 的高效吸收率^[1]。裸藻 β -葡聚糖 (EBG) 在形态上类似于淀粉, 但其对碘不显色, 是裸藻用来储存能量的最常见的物质^[2], 在碳源充足时, 裸藻合成的 β -葡聚糖可占生物体干重的 50%~80% 左右^[3]。EBG 结晶是微纤维的高阶聚集体, 是由无分支三螺旋结构的 β -1,3-D-葡聚糖链组成^[4-5], 仅含有葡萄糖^[6], 不易被水解。EBG 结构上的特点使其不能够溶于水、醇类和大部分有机试剂, 但可以溶解在稀碱溶液、二甲基亚砷 (DMSO)、非质子传递试剂等物质中。

目前, 国内传统的 EBG 提取方法主要包括碱法提取法、超声波辅助法等。栗晓庆等^[7]将除脂后的裸藻粉加入 0.6 mol/L 的 NaOH 溶液, 在 50 °C 下处理 3 h, 然后乙醇沉淀、离心, 得到的 EBG 使用质量分数为 1% 的十二烷基硫酸钠 (SDS) 水溶液多次洗涤以除去蛋白, 最后使用蒸馏水、乙醇、丙酮反复洗涤。鞠海军^[8]将裸藻粉按料液比为 1 : 20 (g : mL) 加入水中, 然后在水中加入一定量的 SDS, 超声 18.5 min 后离心, 沉淀中加入质量浓度为 1 g/L 的 SDS 水溶液, 90 °C 水浴 1 h, 离心取沉淀重复此操作 3 次, 冷冻干燥后得到样品。而国外 EBG 的提取方法有溶剂浸提法、酶提取法。VISMARA 等^[9]使用质量分数为 1% 的 SDS 和质量分数为 5% 的 Na₂EDTA 裂解液浸泡裸藻, 在 37 °C 下搅拌 30 min, 然后离心回收 EBG, 重复使用 SDS-Na₂EDTA 溶液处理 2 次, 得到的 EBG 用 70 °C 蒸馏水冲洗 2 次, 90 °C 烘干。KONDO 等^[10]将 50 g 裸藻加入到含有 50 mmol/L 胰蛋白酶、0.3 mol/L 蔗糖和 0.38 mol/L 甘露糖的 pH=7.01 的磷酸缓冲液中, 放入摇床内。然后离心收集 EBG 颗粒, 使用蒸馏水冲洗, 冷冻干燥后得到目标产物。这些传统方法存在步骤繁琐、提取效率低、资源浪费严重、影响产品品质等明显的缺点。 β -葡聚糖具有很广的生物活性, 如免疫刺激^[11]、抗炎^[12]、抗菌、保肝^[13]、降胆固醇^[14]、抗纤维化^[15]、抗肿瘤^[16]、抗糖尿病和降血糖等。所以, 寻找一种快捷、高效、节约的提取方法迫在眉睫。超高压微射流技术 (UHPM) 是一种新兴的天然成分提取技术, 具有环保、高效、对营养价值影响小等优点^[17]。目前, 已被应用于多糖和蛋白质提取、淀粉改性、食品加工^[18-19]等领域。

本文拟以裸藻为原料, 利用 UHPM 来提取 EBG, 以提取率为指标, 采用响应面法优化提取工艺, 并分析 UHPM 对产物结构和抗氧化活性的影响, 旨在探究 UHPM 提取 EBG 的工艺, 为 EBG 的提取和应用提供理论支撑。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

裸藻, 青海光子生态有限公司; 裸藻 β -葡聚糖标准品 (EBGS), 西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司; 刚果红, 上海麦克林生化科技有限公司; NaOH, 天津市凯通化学试剂有限公司; NaH₂PO₄·2H₂O、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH), 国药集团化学试剂有限公司; SDS, 北京索莱宝科技有限公司。

UH-24 超高压微射流, 永联生物科技上海有限公司; TU-1901 双光束紫外-可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; VFD-2000 冷冻干燥机, 北京博医康实验仪器有限公司; H1850 湘仪高速离心机, 湖南湘仪实验仪器开发有限责任公司; XRD-6000 X 射线衍射仪、IRSpirit 傅里叶变换红外光谱仪, 日本 Shimadzu 公司; SU8010 扫描电子显微镜, 日本 Hitachi 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 EBG 的提取

将 1.0 g 裸藻和 270 mL 质量浓度为 4.2 g/L 的 SDS 溶液加入烧杯中, 利用 UHPM 在压力 34 MPa、时间 93 s 下进行提取, 将破碎后的溶液在 4000 r/min 下离心 5 min, 用质量分数为 1% 的 SDS 洗涤沉淀 2~3 次, 然后用蒸馏水洗涤 3 次, -30 °C 冷冻干燥 12 h 得到 EBG, 样品冷藏备用。

1.2.2 提取率的测定与计算

原料中 β -葡聚糖的含量根据鞠海军^[8]的刚果红染色法测定, 上清液中可溶性多糖的含量根据苯酚-硫酸法测定^[20], 并按式 (1)~(3) 计算 β -葡聚糖提取率 (R_E , %):

$$m_0 = n \cdot \rho_0 \cdot V_0 \cdot 10^{-3} \quad (1)$$

$$m_1 = n \cdot \rho_1 \cdot V_0 \cdot 10^{-3} \quad (2)$$

$$R_E / \% = \frac{m_1}{m_1 + m_0} \times 100 \quad (3)$$

式中: m_0 为上清液中可溶性多糖质量, mg; ρ_0 为上清液中可溶性多糖质量浓度, mg/L; V_0 为取样体积, mL; m_1 为 EBG 的质量, mg; ρ_1 为 EBG 质量浓度, mg/L; n 为稀释倍数。

1.2.3 单因素实验

分别对微射流时间 (30、60、90、120、150 s)、微射流压力 (10、20、30、40、50 MPa)、料液比 (g : mL) (1 : 100、1 : 150、1 : 200、1 : 250、1 : 300)、SDS 质量浓度 (2、4、6、8、10 g/L) 进行单因素实验, 探究各单因素对 EBG 提取率的影响。

1.2.4 Box-Behnken 响应面优化实验

根据单因素实验结果, 采用响应面 Box-Behnken 中心组合实验设计优化方案, 以时间 (A)、压力 (B)、料液比 (C)、SDS 质量浓度 (D) 为因素, β -葡聚糖提取率为指标, 得到四因素三水平表见表 1。

表 1 响应面分析法的因素与水平表

水平	因素			
	A/s	B/MPa	$C/(g : mL)$	$D/(g/L)$
-1	60	20	1 : 200	2
0	90	30	1 : 250	4
1	120	40	1 : 300	6

1.3 结构表征和性能测试

1.3.1 三螺旋结构测定

配制 624 $\mu\text{mol/L}$ 刚果红溶液, 配制浓度分别为 0、0.05、0.10、0.15、0.20、0.30、0.40、0.50 mol/L 的 NaOH 溶液和质量浓度为 1 g/L 的裸藻 β -葡聚糖悬浮液 (分别为 EBG 和 EBGs 悬浮液)。分别取 2 mL 不同浓度的 NaOH 溶液于比色管中, 实验组分别滴加 1 mL 质量浓度为 1 g/L 的 EBG 和 EBGs 悬浮液。对照组滴加 1 mL 蒸馏水, 然后分别加入刚果红溶液 1 mL, 28 $^{\circ}\text{C}$ 下作用 30 min^[21]。采用紫外-可见分光光度计在 400~600 nm 进行扫描, 并记录其最大吸收波长。

1.3.2 结构表征

FTIR 测试: 样品与 KBr 按质量比 1 : 100 混合进行压片, 在分辨率为 4 cm^{-1} 、波数范围 4000~400 cm^{-1} 条件下进行测试。XRD 测试: 采用 Cu K_{α} 射线, 在 40 kV, 30 mV 条件下对膜样品进行测试, $2\theta=5^{\circ}\sim 80^{\circ}$ 。SEM 测试: 用 SEM 对样品进行表面形貌分析。

1.3.3 抗氧化活性测试

1.3.3.1 DPPH 自由基 (DPPH \cdot) 清除能力的测定

按文愉熙等^[22]的方法加以修改, 分别配制质量浓度为 4 g/L 的 EBG 与 EBGs 溶液备用, 按照稀释倍数 (1、2、4、6、8、10) 稀释至 0.40、0.50、0.67、1.0、2.0、4.0 g/L, 然后量取样品溶液与 DPPH-乙醇溶液 (0.2 mmol/mL) 各 3 mL, 静置反应 30 min, 在 517 nm 处测定吸光度, 按式 (4) 计算 DPPH \cdot 的清除率:

$$R/\% = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}\right) \times 100 \quad (4)$$

式中: R 为 DPPH \cdot 的清除率, %; A_i 为样品溶液与 DPPH-乙醇溶液吸光度; A_j 为无水乙醇与 DPPH-乙醇溶液吸光度; A_0 为 DMSO 与 DPPH-乙醇溶液吸光度。

1.3.3.2 OH 自由基 ($\cdot\text{OH}$) 清除能力测定

按照 1.3.3.1 方法配制样品溶液, 然后量取样品

溶液、 FeSO_4 溶液 (9 mmol/L)、 H_2O_2 溶液 (8.8 mmol/L) 和水杨酸-乙醇溶液 (9 mmol/L) 各 1 mL, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下避光反应 30 min 后, 在 510 nm 处测定吸光度, 按式 (5) 计算 $\cdot\text{OH}$ 的清除率:

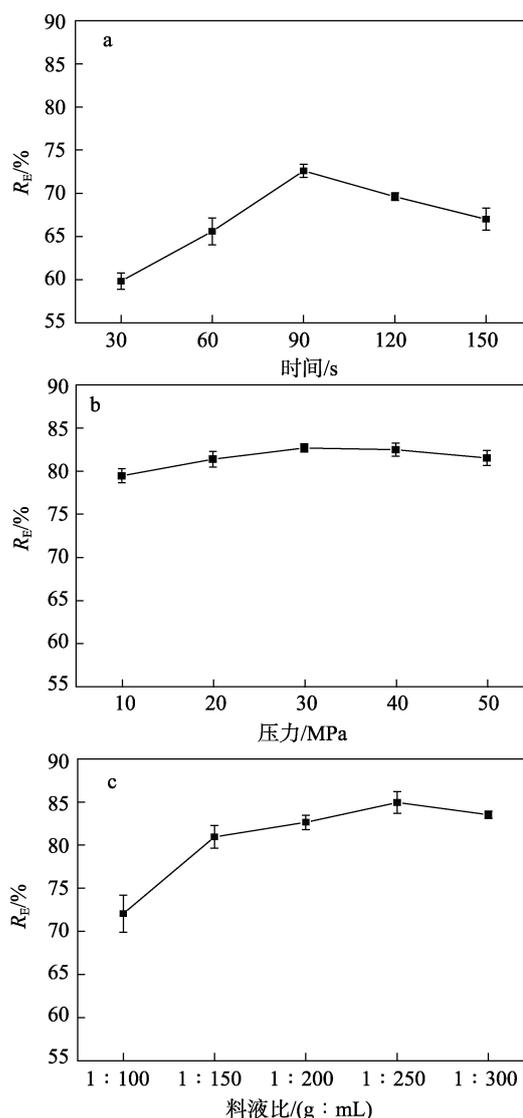
$$R/\% = \left(1 - \frac{A'_i - A'_j}{A'_0}\right) \times 100 \quad (5)$$

式中: R 为 $\cdot\text{OH}$ 的清除率, %; A'_i 为样品溶液与 FeSO_4 溶液、 H_2O_2 溶液和水杨酸-乙醇溶液吸光度; A'_j 为样品溶液与 FeSO_4 溶液、蒸馏水和水杨酸-乙醇溶液吸光度; A'_0 为 DMSO 与 FeSO_4 溶液、 H_2O_2 溶液和水杨酸-乙醇溶液吸光度。

2 结果与讨论

2.1 单因素实验结果

固定微射流压力为 30 MPa、料液比 1 : 250、SDS 质量浓度为 4 g/L, 考察微射流时间对 EBG 提取率的影响, 结果如图 1a 所示。



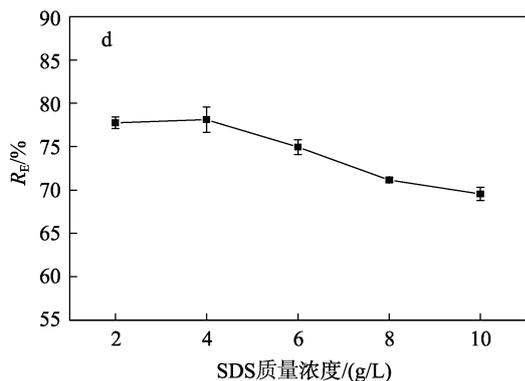


图 1 4 个单因素对 EBG 提取率的影响

Fig. 1 Effects of four single factors on extraction rate of EBG

由图 1a 可知,当微射流时间在 30~90 s 之间时,随着时间的增加,裸藻细胞破碎和细胞质溶出,EBG 提取率呈升高的趋势;但 90 s 后,随着时间的增加,EBG 提取率呈下降的趋势。处理时间过短 EBG 溶出不充分,处理时间过长,会造成 EBG 降解成可溶性多糖^[23]。当时间为 90 s 时,EBG 提取率达到最大值,为 72.60%,因而确定最佳微射流时间为 90 s。

接着,固定微射流时间为 90 s,料液比 1 : 250、SDS 质量浓度为 4 g/L,考察微射流压力对 EBG 提取率的影响,结果见图 1b。由图 1b 可知,微射流压力在 10~30 MPa 范围内,压力增大有利于裸藻细胞破碎和溶质溶出,EBG 提取率呈升高的趋势;但压力>30 MPa 后,压力过大可能使 EBG 的糖苷键断裂转变为可溶于水的单糖、寡糖或低聚糖^[24],所以,EBG 提取率呈降低的趋势。当破碎压力为 30 MPa 时,EBG 提取率达到最大值 (82.68%),因而确定最佳微射流压力为 30 MPa。

然后,固定微射流压力为 30 MPa、微射流时间为 90 s、SDS 质量浓度为 4 g/L,考察料液比对 EBG 提取率的影响,结果见图 1c。由图 1c 可知,当料液比在 1 : 100~1 : 250 范围内,EBG 含量不断升高,浓度梯度不断增大,EBG 向外扩散的传质动力不断变大,有利于 EBG 溶出,所以 EBG 提取率呈升高的趋势。用溶剂提取固体颗粒中有效成分时,溶质通过多孔固体的扩散可以用有效扩散系数来描述,有效扩散系数与 Fick 定律有关,料液比越大越有利于有效成分的溶出^[25]。但当料液比为 1 : 300 时,有效成分在溶液中含量过低,EBG 提取率降低。当料液比为 1 : 250 时,EBG 提取率达到最大值 (84.94%),因而确定最佳料液比为 1 : 250。

最后,固定微射流压力为 30 MPa、微射流时间为 90 s、料液比 1 : 250,考察 SDS 质量浓度对 EBG 提取率的影响,结果见图 1d。由图 1d 可知,过小的 SDS 质量浓度不能充分提取裸藻中的 EBG,又因

为 SDS 具有起泡性,过大的 SDS 质量浓度起泡量增大,溶液黏度及泡沫量升高,泡沫夹带率变高^[26],当 SDS 质量浓度过大时,EBG 会附着在泡沫上,所以 EBG 提取率降低。因而确定最佳 SDS 质量浓度为 4 g/L。

综上所述,确定最佳单因素实验条件为:时间 90 s、压力 30 MPa、料液比 1 : 250、SDS 质量浓度 4 g/L。以此进行响应面实验设计。

2.2 响应面优化实验结果

2.2.1 响应面实验设计和结果

响应面实验设计见表 2。运用 Design-Expert8.0.6 软件对表 2 中实验数据进行多元线性回归拟合后,并对模型进行方差分析得到二项式拟合方程:
 $R_E = 81.37 + 0.42A + 1.27B + 0.32C + 0.67D + 0.39AB - 0.89AC + 0.080AD + 2.27BC + 0.047BD - 1.54CD - 2.06A^2 - 2.31B^2 - 2.44C^2 - 2.31D^2$ 。

表 2 响应面实验设计及结果

Table 2 Response surface design and experimental results

实验号	A/s	B/MPa	C/(g : mL)	D/(g/L)	R _E /%
1	90	30	1 : 200	6	76.26
2	120	30	1 : 300	4	78.41
3	90	30	1 : 250	4	81.37
4	60	20	1 : 250	4	75.55
5	60	30	1 : 250	6	76.79
6	120	30	1 : 250	2	76.15
7	90	40	1 : 250	2	76.52
8	90	30	1 : 200	2	77.95
9	90	20	1 : 250	2	75.13
10	90	30	1 : 250	4	80.27
11	90	30	1 : 250	4	81.63
12	90	40	1 : 200	4	79.97
13	60	30	1 : 250	2	75.13
14	90	30	1 : 250	4	81.12
15	60	30	1 : 300	4	75.51
16	90	20	1 : 200	4	73.32
17	120	30	1 : 200	4	76.92
18	90	20	1 : 300	4	77.37
19	60	40	1 : 250	4	77.12
20	90	30	1 : 300	6	78.38
21	90	30	1 : 250	4	81.64
22	90	40	1 : 250	6	78.66
23	90	30	1 : 300	2	73.91
24	120	30	1 : 250	6	78.13
25	120	40	1 : 250	4	78.91
26	90	20	1 : 250	6	77.08
27	120	20	1 : 250	4	75.79
28	90	40	1 : 300	4	74.71
29	60	30	1 : 200	4	77.68

2.2.2 回归模型的建立与检验

表 3 为响应面实验设计及结果。由表 3 可知, 该回归模型线性关系极显著 ($P < 0.0001$), 失拟项不显著 ($P = 0.6885 > 0.05$), 表明该模型拟合性好, 相关系数 $R^2 = 0.9755$, 校正决定系数 $R^2_{adj} = 0.9509$, 说明本实验模型与实际实验拟合度高, 实验误差较小, 能够较好地反应各因素与 EBG 得率之间的关系。其中, $F_B = 71.79 > F_D = 19.92 > F_A = 7.98 > F_C = 4.69$, 即 4 个单因素的影响程度大小顺序为 $B > D > A > C$ 。B、D、AC、BC、CD、 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 对 EBG 提取率的影响极显著 ($P < 0.01$)。可得出结论, 4 个单因素中, 压力与 SDS 质量浓度对 EBG 提取率的影响效果更加显著。交互相中 AB、AD、BD 对实验结果不显著 ($P > 0.05$)。

2.2.3 响应曲面分析及最佳工艺条件的确定

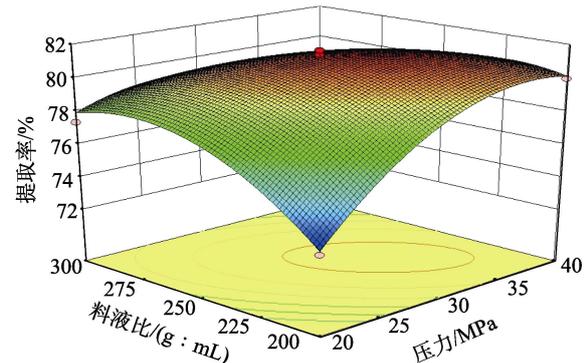
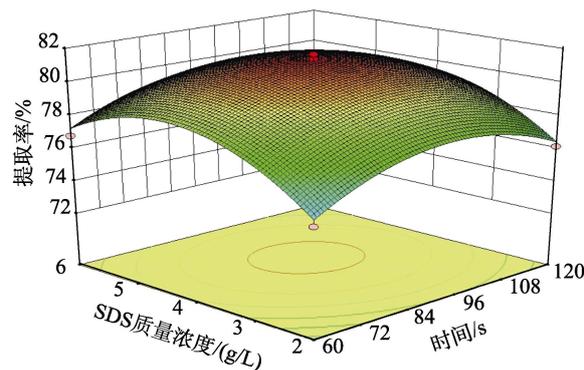
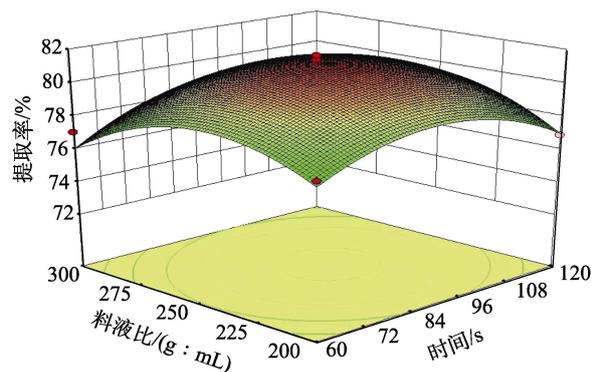
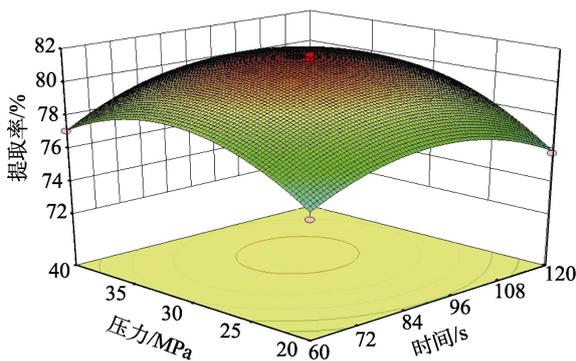
图 2 为两因素的交互作用对 EBG 提取率的影响。由图 2 可知, 响应面曲线呈抛物线状, 响应面曲面坡度越陡峭, 等高线越偏椭圆形, 因素之间的交互作用越明显, 响应曲面中心有凸起, 表明 EBG 提取率存在最大值。AC、BC、CD 的响应面曲线陡峭, 等高线为椭圆, 且等高线密集, 因此 AC、BC、CD 的交互作用对 EBG 提取率的影响为极显著 ($P < 0.01$); AB、AD、BD 等高线偏圆形, AB、AD、BD 的交互作用对 EBG 提取率的影响为不显著 ($P > 0.05$), 这与方差分析结果一致。

表 3 线性回归分析

Table 3 ANOVA for response of extraction rate

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	143.57	14	10.25	39.76	< 0.0001	**
A	2.06	1	2.06	7.98	0.0135	*
B	18.52	1	18.52	71.79	< 0.0001	**
C	1.21	1	1.21	4.69	0.0481	*
D	5.14	1	5.14	19.92	0.0005	**
AB	0.60	1	0.60	2.32	0.1502	
AC	3.27	1	3.27	12.70	0.0031	**
AD	0.026	1	0.026	0.099	0.7574	
BC	21.20	1	21.20	82.20	< 0.0001	**
BD	0.009	1	0.009	0.035	0.8543	
CD	9.68	1	9.68	37.53	< 0.0001	**
A^2	27.64	1	27.64	107.17	< 0.0001	**
B^2	34.59	1	34.59	134.12	< 0.0001	**
C^2	34.79	1	34.79	134.88	< 0.0001	**
D^2	34.76	1	34.76	134.76	< 0.0001	**
残差	3.61	14	0.26			
失拟项	2.33	10	0.23	0.73	0.6885	不显著
纯误差	1.28	4	0.32			
总和	147.18	28				

注: **表示极显著 ($P < 0.01$); *表示显著 ($0.01 < P < 0.05$); 不显著 ($P > 0.05$)。



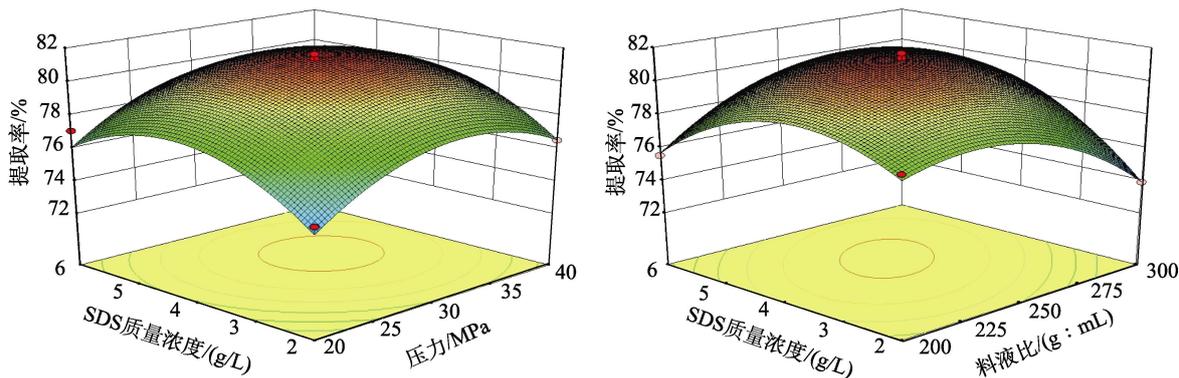


图 2 两因素的交互作用对 EBG 提取率的影响
Fig. 2 Effects of the interaction of two factors on the extraction rate of EBG

利用 Design-Expert8.0.6 软件对 EBG 提取工艺参数进行了优化, EBG 最佳提取工艺参数为: 时间 92.92 s, 压力 33.82 MPa, 料液比 1 : 270, SDS 质量浓度 4.17 g/L。在此条件下, EBG 提取率为 81.69%。

2.2.3 工艺验证结果

为验证预测模型的可靠性, 从实际情况出发, 将最佳工艺条件进行调整: 时间 93 s, 压力 34 MPa, 料液比 1 : 270, SDS 质量浓度 4.2 g/L。在此条件下, EBG 平均提取率为 80.27%。接近其预测值 81.69%, 说明由 Design-Expert8.0.6 设计软件得到的最佳工艺条件可行。

栗晓庆等^[7]采用碱法提取了 EBG, 最佳条件确定为提取温度 50 °C、提取时间 3 h、NaOH 浓度 0.6 mol/L, 多糖提取率为 42.35%。鞠海军^[8]利用超声波辅助法提取了 EBG, 最佳条件确定为 SDS 质量浓度 8.5 g/L、料液比 1 : 20、超声时间 18.5 min, 在此条件下裸藻多糖得率为 95.26%。与两种传统方法相比, 本文的 UHPM 具有提取效率高、节约资源、保证产品品质等优点。

2.3 结构分析

2.3.1 三螺旋结构测定

图 3 为刚果红与 EBGs 及 EBG 形成的络合物的最大吸收波长随 NaOH 浓度的变化趋势。由图 3 可以看出, NaOH 浓度在 0~0.2 mol/L 时, 随着 NaOH 浓度的增加, 刚果红-EBGS 与刚果红-EBG 形成的络合物的最大吸收波长移向长波, 表明 EBGs 与 EBG 有规则的三螺旋构象^[27]; 当 0.2 mol/L < NaOH 浓度 < 0.3 mol/L 时, 刚果红-EBG 与刚果红-EBGS 形成的络合物的最大吸收波长迅速下降, 随着 NaOH 浓度的继续增加, 络合物的最大吸收波长直至平缓, 表明螺旋结构解体, 变成无规则线团形式。综上所述, UHPM 提取 EBG 没有破坏其双螺旋结构。

2.3.2 FTIR 分析

通过 FTIR 可以鉴定糖环的构型、种类和异头碳的信息等^[28]。对 EBG 和 EBGs 进行了 FTIR 测试, 结果如图 4 所示。由图 4 可见, 3200~3600 cm⁻¹ 处

为 O—H 键的伸缩振动吸收峰, 而 2800~3000 cm⁻¹ 处归属于 C—H 键的伸缩振动吸收峰, 以上吸收峰是多糖所特有的吸收峰。在 800~1200 cm⁻¹ 范围内能推测出多糖的结构和类型, 此范围是多糖的指纹区。

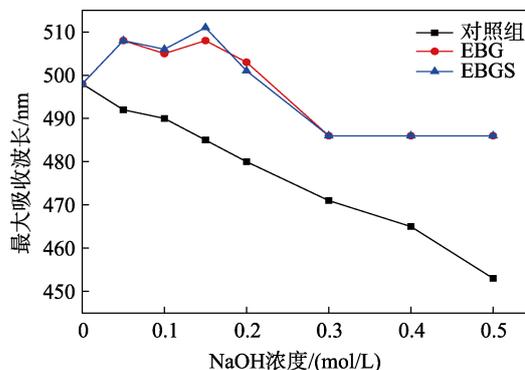


图 3 样品最大吸收波长随 NaOH 浓度的变化
Fig. 3 Change of maximum absorption wavelength of samples with NaOH concentration

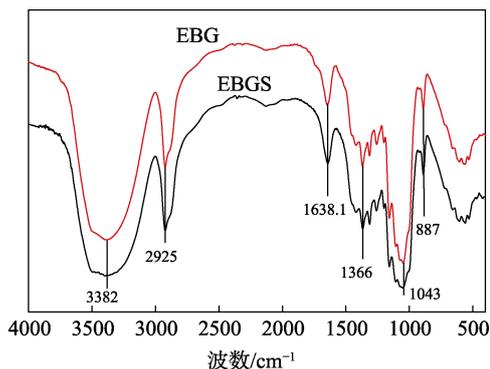


图 4 EBGs 与 EBG 的 FTIR 谱图
Fig. 4 FTIR spectra of EBGs and EBG

由图 4 可知, EBGs 与 EBG 的 FTIR 谱图基本一致, 在 3382 和 2925 cm⁻¹ 处为 O—H 和 C—H 键的伸缩振动吸收峰, 而 C=O 键的伸缩振动吸收峰一般在 1650 cm⁻¹ 附近, 1366 cm⁻¹ 附近的吸收峰归属于 C—H 键的伸缩振动^[29]。1000~1200 cm⁻¹ 附近为吡喃糖环的 C—O—C 和 C—O—H 键的单键吸收峰^[30]。887 cm⁻¹ 处出现 β-D-吡喃葡萄糖的特征峰^[31]。

这与鞠海军^[8]利用超声波辅助法提取的 EBG 的 FTIR 结果一致。以上结果表明, UHPM 提取并没有破坏 EBG 的吡喃糖环结构。

2.3.3 XRD 分析

图 5 为 EBSGS 与 EBG 的 XRD 谱图。

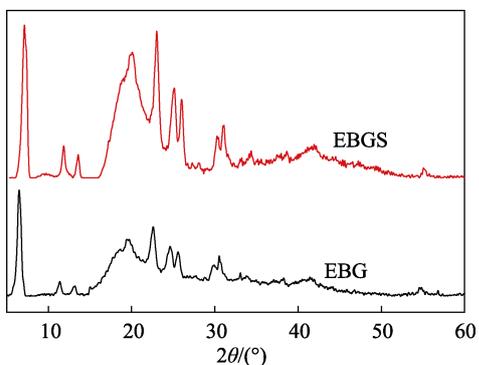


图 5 EBSGS 与 EBG 的 XRD 谱图
Fig. 5 XRD patterns of EBSGS and EBG

由图 5 可以发现, EBG 在 $2\theta=6.68^\circ$ 、 19.42° 、 22.62° 、 24.38° 、 30.50° 左右出现了明显的衍射峰, 这与文献^[8]报道的结果相同, 说明 EBG 有部分结晶的区域。而且 EBG 在 $2\theta=19.42^\circ$ 、 22.62° 左右衍射峰的强度明显低于 EBSGS, 说明 EBG 的结晶度低于 EBSGS^[32]。通过 Jade6.0 处理, 寻峰、积分后 EBSGS 结晶度为 81.91%, 大于 EBG 的结晶度 (76.49%), 这与根据衍射峰强度分析的结果一致。综上所述, UHPM 提取对 EBG 结晶区产生一定影响。

2.3.4 SEM 分析

通过 SEM 对 EBSGS 与 EBG 的形貌进行了测试, 结果见图 6。

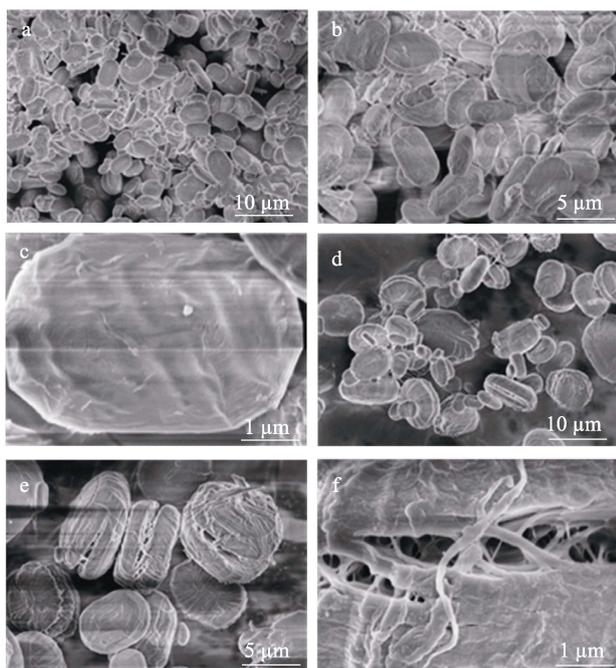


图 6 EBSGS (a、b、c) 及 EBG (d、e、f) 的 SEM 图
Fig. 6 SEM images of EBSGS (a, b, c) and EBG (d, e, f)

从图 6 可以看出, EBG 颗粒明显, 呈规则统一的椭圆饼状, 且外表无凹坑、棱角。随着放大倍数的增加, EBG 的表面出现皱纹及空隙, 这可能是与提取过程中 UHPM 有关, UHPM 的强剪切速率、高频振动、高速冲击力和瞬时压降的合力等作用都可能导致这种结果, 说明 UHPM 提取对 EBG 外观形貌有一定的影响。

2.4 抗氧化活性分析

测试了 EBG 对 DPPH \cdot 和 \cdot OH 的清除能力, 结果见图 7。

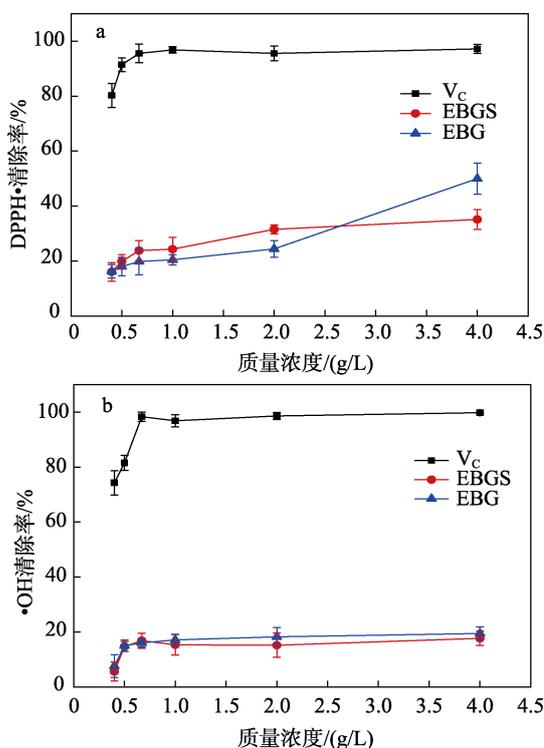


图 7 EBSGS 和 EBG 的 DPPH \cdot (a)、 \cdot OH (b) 清除能力测定

Fig. 7 Determination of DPPH \cdot (a) and \cdot OH (b) scavenging capacity by EBSGS and EBG

由图 7a 可知, EBSGS 和 EBG 对 DPPH \cdot 都有一定的清除能力, 且清除能力都随着质量浓度的增大而增大, 当样品溶液质量浓度为 0.4~2.0 g/L 时, EBSGS 和 EBG 对 DPPH \cdot 清除率基本相同; 当样品溶液质量浓度为 4.0 g/L 时, EBG 对 DPPH \cdot 清除率为 50.26%, 大于 EBSGS 对 DPPH \cdot 的清除率 (35.14%), 与文愉熙等^[22]报道的 DPPH \cdot 清除率 55% 接近, 这可能是由于 UHPM 的强剪切速率、高频振动、高速冲击力和瞬时压降的合力等作用使 EBG 相对分子质量减小, 而且相对分子质量较小的多糖具有更高的 DPPH \cdot 清除率, 这与赵岩岩等^[33]报道的动态高压微

射流辅助提取对鱼鳞多糖对 DPPH·清除能力影响的结果一致。由图 7b 可知, EBSG 和 EBG 对·OH 具有一定的清除能力, 而且清除能力与其质量浓度有关, 这与 DPPH·清除能力结果相似。当样品质量浓度在 0.5~1.0 g/L 时, 随着质量浓度的增加, 对·OH 的清除能力迅速增大, 而当质量浓度>1.0 g/L 时, 对·OH 清除能力增加不明显。这可能与本文的样品质量浓度较高有关, 当样品质量浓度较高时, —CH 基团导致多糖的整合, 并在溶液中产生簇, 簇的存在减少了·OH 与多糖接触的机会^[34], 从而导致·OH 清除能力较低。综上所述, UHPM 提取得到的 EBG 对 DPPH·的清除能力有一定的增强, 对·OH 清除能力效果不明显, 但都不及 V_c 。

3 结论

(1) 通过单因素及响应面设计实验, 优化了 UHPM 时间、压力、料液比及 SDS 质量浓度对 EBG 提取率的影响。EBG 提取最佳条件为时间 93 s、压力 34 MPa、料液比 1 : 270 (g : mL)、SDS 质量浓度 4.2 g/L。在此条件下, EBG 提取率为 80.27%。碱法提取 EBG 提取率仅为 42.35%, 而且破坏了 EBG 的三螺旋结构; 超声波处理时间为 18.5 min 时, 裸藻多糖得率为 95.26%。与前者相比本实验效率更高、用时更少, 节约了能源, 保证了产品质量。

(2) 经过刚果红实验及 FTIR、XRD、SEM 分析, 超高压微射流技术提取的 EBG 仍具有有序性的三螺旋结构; EBG 的结晶度降低, EBG 外表出现裂痕与空隙。

(3) 测定 EBSG 和 EBG 对 DPPH·和·OH 的清除能力, 在质量浓度为 0.4~2.0 g/L 时 EBSG 和 EBG 对 DPPH·清除率基本相同, 在质量浓度为 4.0 g/L 时, EBG 对 DPPH·清除率达到 50.26%, 高于 EBSG 对 DPPH·的清除率 (35.14%)。而 EBSG 和 EBG 对·OH 清除效果不明显, 清除率相对较低。

EBG 的结构特点使其水溶性较差, 抗氧化活性较弱, 限制了其在食品、医药等领域的应用。所以增强 EBG 的水溶性是亟待解决的问题。

参考文献:

- [1] IVANOVA I M, NEPOGODIEV S A, SAALBACH G, *et al.* Fluorescent mannosides serve as acceptor substrates for glycosyltransferase and sugar-1-phosphate transferase activities in *Euglena gracilis* membranes[J]. Carbohydrate Research, 2017, 438: 26-28.
- [2] BARSANTI L, VISMARA R, PASSARELLI V, *et al.* Paramylon (β -1,3-glucan) content in wild type and WZSL mutant of *Euglena gracilis*. Effects of growth conditions[J]. Journal of Applied Phycology, 2001, 13(1): 59-65.
- [3] RODRÍGUEZ-ZAVALA J S, ORTIZ-CRUZ M A, MENDOZA-HERNANDEZ G, *et al.* Increased synthesis of α -tocopherol, paramylon and tyrosine by *Euglena gracilis* under conditions of high biomass production[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 109(6): 2160-2172.
- [4] LAKSHMINARAYANAN R, KESSELMAN E, COHEN R, *et al.* Curdlan complexes as a potential food-grade delivery system: Genistein case study[J]. Ther Deliv, 2011, 2(2): 181-192.
- [5] CLARKE A E, STONE B A. Structure of the paramylon from *Euglena gracilis*[J]. Biochim Biophys Acta, 1960, 44(1): 161-163.
- [6] BARSANTI L, PASSARELLI V, EVANGELISTA V, *et al.* Chemistry, physico-chemistry and applications linked to biological activities of β -glucans[J]. Natural Product Reports, 2011, 28: 457-466.
- [7] LI X Q (栗晓庆), LYU J P (吕俊平), LIU Q (刘琪), *et al.* Optimization of alkaline extraction and antioxidant activities of paramylon *in vitro*[J]. Food Science and Technology (食品科技), 2019, 44(9): 209-215.
- [8] JU H J (鞠海军). Separation, structure identification of paramylon and study on its bioactivities[D]. Shanghai: East China University of Science and Technology (华东理工大学), 2020.
- [9] VISMARA R, VESTRI S, FRASSANITO A M, *et al.* Stress resistance induced by paramylon treatment in *Artemia sp.*[J]. Journal of Applied Phycology, 2004, 16(1): 61-67.
- [10] KONDO Y, KATO A, HOJO H, *et al.* Cytokine-related immunopotentiating activities of paramylon, a β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan from *Euglena gracilis*[J]. Journal of Pharmacobio-Dynamics, 1992, 15(11): 617-621.
- [11] BROWN G D, GORDON S. Fungal β -glucans and mammalian immunity[J]. Immunity, 2003, 19(3): 311-315.
- [12] HUNTER J K W, GAULT R A, BERNER M D. Preparation of microparticulate β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae* for use in immune potentiation[J]. Letters in Applied Microbiology, 2002, 35: 267-271.
- [13] SUTHERLAND I W. Novel and established applications of microbial polysaccharides[J]. Trends in Biotechnology, 1998, 16: 41-46.
- [14] BROWN L, ROSNER B, WILLETT W W, *et al.* Cholesterol-lowering effects of dietary fiber: A meta-analysis[J]. American Journal of Clinical Nutrition, 1999, (1): 30-42.
- [15] TREPEL F. Dietary fibre: More than a matter of dietetics. I. Compounds, properties, physiological effects[J]. Wiener klinische Wochenschrift, 2004, 116(14): 465-476.
- [16] CHAN C F, CHAN W K, SZE M Y. The effects of β -glucan on human immune and cancer cells[J]. Journal of Hematology & Oncology, 2009, 2(1): 1-11.
- [17] ZHAO Q L, YAN W Q, LIU Y F, *et al.* Modulation of the structural and functional properties of perilla protein isolate from oilseed residues by dynamic high-pressure microfluidization[J]. Food Chemistry, 2021, 365: 130497.
- [18] KASEMWONG K, RUKTANONCHAI U R, SRINUANCHAI W, *et al.* Effect of high-pressure microfluidization on the structure of cassava starch granule[J]. Starch, 2011, 63(3): 76-81.
- [19] QIN L X (秦令祥), ZHOU J Q (周婧琦), CUI S W (崔胜文), *et al.* Study on extraction of polysaccharides from *Auricularia auricular* by dynamic high pressure[J]. Food Research and Development (食品研究与开发), 2019, 40(19): 155-159.
- [20] WU Y (吴云), CHEN W (陈薇), TIAN W H (田文慧), *et al.* Ultrasonic extraction optimization of raspberry (*Rubus idaeus* L.) pulp polysaccharides and its anti-fatigue activity[J]. Natural Product Research and Development (天然产物研究与开发), 2020, 32(12): 2081-2093.
- [21] WANG Z M, CHEUNG Y C, LEUNG P H, *et al.* Ultrasonic treatment for improved solution properties of a high-molecular weight exopolysaccharide produced by a medicinal fungus[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(14): 5517-5522.
- [22] WEN Y X (文愉熙), HUANG X Z (黄晓舟), LIN X S (林晓思). Analysis of chemical composition and antioxidant activities of non-water-soluble and water-soluble polysaccharides from *Euglena gracilis*[J]. Science and Technology of Food Industry (食品工业科技): 2022, 43(5): 105-113.