

不同酯化度果胶钙的结构特征与体外消化稳定性

刘娜, 蒋茂婷, 王超, 张广文, 黄雪松*

(暨南大学理工学院 广州 510632)

摘要 为探究不同酯化度(DE)果胶形成的果胶钙的结构特征与消化稳定性,采用5种DE值的果胶与氯化钙反应获得5种DE的果胶钙,比较其产率、钙含量,红外、X衍射(XRD)、电镜(SEM)等结构特征与体外模拟消化稳定性。结果表明:果胶钙产率为50%~87%;DE=10%的果胶与Ca²⁺反应形成的果胶钙(DE10-CaP)的钙含量最高(88 mg/g),DE59-CaP钙含量最低(43.6 mg/g);果胶钙中Ca²⁺与羧酸根的结合形式为单齿配位结合型,并可分为3种结合区域,进一步完善了果胶钙的结合模式;XRD表明低酯果胶钙比高酯果胶钙多一处 $2\theta=21.5^\circ$ 的衍射峰;SEM表明低酯果胶钙的表观结构更紧密,呈块状,高酯果胶钙则呈薄片状。体外模拟胃肠消化试验表明,高酯果胶钙的钙释放率及释放量更高。本研究有助于了解果胶钙的微观结构及应用性能。

关键词 果胶钙结构; 酯化度; 钙离子

文章编号 1009-7848(2022)08-0214-09 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2022.08.024

果胶钙是果胶中半乳糖醛酸(Galacturonic acid, GalA)上自由羧基(非酯化羧基)与Ca²⁺通过离子键结合形成的产物。酯化度(DE)是果胶分子中含酯化羧基的GalA占总GalA的百分比。一般地,DE \geq 50%的果胶为高酯果胶(High methoxyl pectin, HMP),DE<50%的果胶为低酯果胶(Low methoxyl pectin, LMP),且LMP中非甲酯化的GalA区域能与Ca²⁺形成“蛋箱”结构^[1]。果胶DE是影响果胶钙结构及性能的重要因素^[2]。目前尚未有不同DE果胶的钙结合能力及所得果胶钙结构特点的相关报道。

果胶钙具有食用安全及生物相容性好的优点^[3],常以水凝胶^[4-5]、薄膜^[6-7]、药物载体^[8-9]等形式用于食品、药品、化工等诸多领域,虽应用广泛,但未见有关其消化性及补钙潜力的报道。果胶是易获得且具有益生元作用的多糖,可促进钙吸收,调节肠道菌群,改善宿主健康^[10-11];其与Ca²⁺反应所得果胶钙,除具有果胶的上述作用外,还有补钙功能。本文探究不同DE的果胶钙在体外模拟胃肠

环境中的钙释放情况和消化稳定性,研究其结构特点。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

DE=10%,18%,41%,50%,59%的柑橘果胶粉,由浙江果源康品生物科技有限公司提供;半乳糖醛酸标准品、咪唑,上海麦克林生化科技有限公司;浓硫酸,广州市信洪贸易有限公司;乙二胺四乙酸(EDTA)、碳酸钙、氯化钙、氯化钠、碳酸氢钠、氯化钾、氢氧化钠,天津大茂化学试剂厂。

1.2 仪器与设备

FC204型电子天平,上海精科天平厂;PL602-S型电子天平,梅利勒-托利多中国地区;PHS-3C精密pH计,上海安亭雷磁仪器厂;UV-9600紫外-可见分光光度计,北京瑞利分析仪器公司;LC-20AT高效液相色谱仪,日本岛津公司;2000ES蒸发光散射检测器,美国奥泰公司;DHG-9070电热恒温鼓风干燥箱,上海一恒科技有限公司;KDC-1044低速离心机,科大创新股份有限公司;SCIENTZ-10N冷冻干燥机,宁波新芝生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 果胶钙的制备 将同一系列不同DE的果胶分别制成1 g/100 mL的果胶溶液,然后以果胶中半乳糖醛酸及Ca²⁺物质的量之比 $n_{\text{果胶 GalA}}:n_{\text{Ca}^{2+}}$

收稿日期: 2021-08-19

基金项目: 广东省重点研发计划项目(2018B020239001);
广州市科技计划项目(201807010020);广东省
驻镇帮镇扶村农村科技特派员项目
(KTP20210168)

作者简介: 刘娜(1997—),女,硕士

通信作者: 黄雪松 E-mail: thxs@jnu.edu.cn

1:2 的比例加入氯化钙溶液,在 50 ℃下恒温反应 2 h 后,离心收集得到果胶钙粗品,再用蒸馏水反复洗涤沉淀,洗至其上清液中的 Ca^{2+} 浓度与蒸馏水无异,洗后沉淀经冷冻干燥后得到相应的果胶钙纯品。即以 DE=10%,18%,41%,50%,59% 的果胶制备的果胶钙分别命名为 DE10-CaP、DE18-CaP、DE41-CaP、DE50-CaP、DE59-CaP。

$$\text{果胶钙产率}(\%) = \frac{m_1}{m_0} \times 100 \quad (1)$$

式中, m_1 ——果胶钙冻干后的质量, g; m_0 ——果胶粉原料的质量, g。

1.3.2 高效凝胶色谱法测定相对分子质量^[12] 采用色谱柱 PolySep-GFC-P4000 柱 (7.8 mm×300 mm), 进样量 15 μL , 纯水流动相, 流速 0.5 mL/min, 柱温 30 ℃, 检测器为 2000ES 蒸发光散射检测器的条件进行高效凝胶色谱测定。

分别用葡萄糖和 T-400 葡聚糖标定保留时间 V_1 和 V_0 , 将已知相对分子质量的 Dextran 系列标准品 (T-5、T-20、T-40、T-200、T-500) 溶于水, 配制成 1 mg/mL 的标准溶液, 过 0.45 μm 微孔滤膜后进样。由保留时间 (V_e) 计算得到相应的分配系数 (K_{av}), K_{av} 和 V_e 存在如下关系:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_1 - V_0} \quad (2)$$

以 $\lg M_w$ (分子质量的对数) 为横坐标, K_{av} 为纵坐标绘制标准曲线, 得到线性回归方程后, 将待测样品配制成 1 mg/mL 的溶液, 按上述测定条件测定, 并将结果代入标准曲线, 计算得到其分子质量。

1.3.3 X-射线衍射 采用波长为 0.1542 nm 的单色 Cu-K α 射线, 测试条件为: 管压 36 kV, 管流 20 mA, 扫描速度 2°/min, 扫描区域 10°~30°, 采样步宽 0.05^[13]。

1.3.4 傅里叶红外光谱的测定 果胶的红外扫描图谱采用 KBr 压片法, 以 1:100 的质量比将样品 KBr 混合并研磨均匀, 用压片机进行压片 (压力为 10 MPa) 30 s, 取下后得到薄片, 用傅里叶变换红外光谱仪进行红外光谱的扫描, 扫描范围 500~4 000 cm^{-1} 。

1.3.5 扫描电子显微镜 采用扫描电子显微镜观察该果胶钙的微观结构。将干燥后的果胶钙粘到

铜台的导电胶上, 在样品表面喷金后上机观察。试验条件: 加速电压为 20 kV, 电子束的穿透能力 0.6 nm。

1.3.6 测定不同 DE 果胶钙在体外模拟肠胃体系^[14]中的稳定性 果胶钙的消化过程需经过胃肠道再被肠道微生物降解利用, 人体胃肠道中并未含有可分解果胶或果胶钙的酶, 且对果胶钙消化影响最大的是胃肠酸碱环境, 故本试验用胃肠电解质液模拟其在人体胃肠中的消化情况。

胃电解质液的配制: 准确称取 3.1 g NaCl、1.1 g KCl、0.6 g NaHCO_3 , 用蒸馏水定容 1 L 后, 用 0.5 mol/L 的 HCl 溶液将 pH 值调至 2; 肠电解质液的配制: 准确称取 5.4 g NaCl 与 0.65 g KCl, 用蒸馏水定容至 1 L 后用 0.5 mol/L 的 NaOH 溶液将 pH 值调至 8。

量取 5 mL 胃电解质液放入试管中, 加入 50 mg 果胶钙样品后放入恒温振荡器 (37 ℃) 中消化 2 h 后向试管加入 5 mL 肠电解质液并用 NaOH 溶液将 pH 值调至 7.5, 在将其放入恒温振荡器 (37 ℃) 中消化 2 h。

$$\text{钙释放率}(\%) = \frac{\text{电解质液中的钙含量}}{\text{原果胶钙的钙含量}} \times 100 \quad (3)$$

1.3.7 钙含量测定方法 果胶酸钙中钙含量的测定用 GB 5009.92-2016《食品安全国家标准 食品中钙的测定》中的第一法——火焰原子吸收光谱法进行测定。

胃肠液中钙含量的测定方法用 GB 5009.92-2016《食品安全国家标准 食品中钙的测定》中的第二法——EDTA 法进行测定。

1.3.8 数据处理 用 SPSS 软件分析, 用 Origin 软件作图。

2 结果与分析

2.1 果胶 DE 对果胶钙产率的影响

从图 1a 中可以看出: 随 DE 的增大, 果胶钙产率先增加后减少。DE=41% 的果胶与氯化钙反应所得果胶钙 (DE41-CaP) 产率最高 (87%), DE10-CaP 产率最低 (50%)。从理论分析可知, Ca^{2+} 是与果胶分子中的自由羧基结合, 即 DE 越低 (其自由羧基越多), 其结合钙的能力越强, 果胶钙产率越高^[5]; 然而, 由图 1a 可知, 果胶钙产率变化趋势并

不符合上述规律,这是因为果胶钙产率除与果胶 DE 有关外,还应与其分子质量大小有关,即果胶 DE 相同时,分子质量越大,单位果胶分子结合 Ca^{2+} 的能力越强^[16](因实际上难以得到同一分子质量且 DE 不同的果胶,故本试验购买的不同 DE 果胶,其分子质量有所差异,如图 1a),故图 1a 中果胶钙产率并未完全随果胶 DE 的减小而增加,可能与果胶分子质量不同有关。

如果引入果胶钙中 Ca^{2+} 与果胶物质的量之比 A ($A = n_{\text{果胶}} : n_{\text{Ca}^{2+}}$, 可反映单个果胶分子结合钙的能力),则从图 1b 可以看出,对于低酯果胶钙(Ca-LMP)来说,其 A 值与果胶原料的分子质量大小成正比;而对于高酯果胶钙(Ca-HMP)来说,其 A 值则与果胶原料中自由羧基量成正比。这说明分子质量对 LMP 分子结合钙的能力(即 A 值)影响较

大,而 DE 对 HMP 分子结合钙的能力影响较大。此外,Ca-HMP 的 A 值范围为 716~859,Ca-LMP 的 A 值范围为 1372~1548,远大于 Ca-HMP 的 A 值,从总体来说,果胶 DE 对单个果胶分子钙结合能力的影响比分子质量更大。

由图 1a 可知,Ca-LMP 的钙含量较高,适合做补钙剂,且未经洗涤的果胶钙中钙含量更高。周建烈等^[17]的报道称正常成人钙摄入量推荐量为 800 mg/d,而我国居民每日从饮食中摄入的钙约为 400 mg,故额外摄入 4~5 g DE10-CaP 可满足正常成人每日钙需求。果胶钙进入肠道后,经肠道菌群逐步发酵分解,可改善肠道健康、缓解便秘,且不会产生反射性抑制钙吸收作用,是良好的钙制剂原料^[18]。

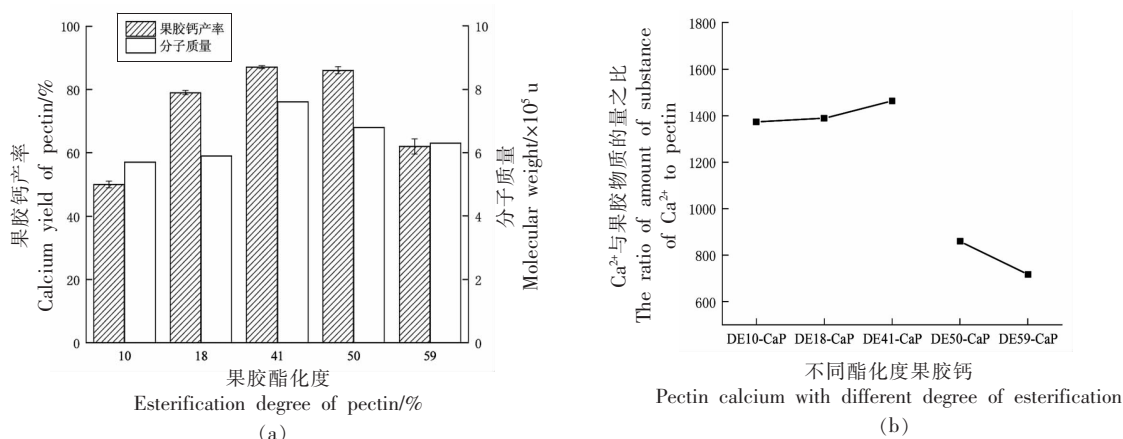


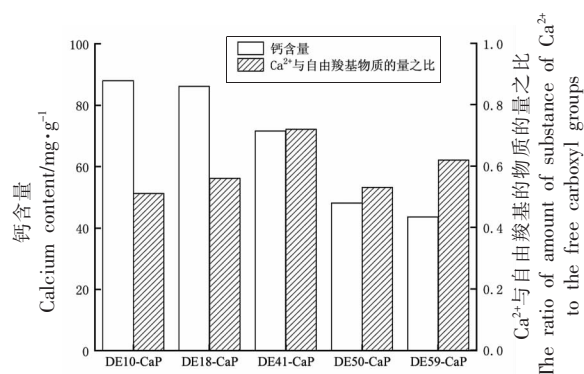
图 1 不同 DE 果胶所得果胶钙的产率及 Ca^{2+} 与果胶物质的量之比

Fig.1 The yield of pectin calcium obtained from pectin with different DE and its ratio of amount of substance of Ca^{2+} to pectin

2.2 果胶 DE 对果胶钙含钙率和果胶钙结构的影响

由图 2 可知,DE10-CaP 的钙含量最高(88 mg/g),DE59-CaP 的钙含量最低(43.6 mg/g),随果胶 DE 的增大,果胶钙的钙含量逐渐减小,且 Ca-HMP 的钙含量远低于 Ca-LMP,是因为果胶 DE 越小,自由羧基的比例越高,单位物质的量(或质量)果胶结合的 Ca^{2+} 数量越多。分析图 2 中不同 DE 果胶与钙反应时的 Ca^{2+} 物质的量数与自由羧基物质的量数之比($I = n_{\text{Ca}^{2+}} : n_{\text{-COOH}}$)可知:5 种果胶钙的 I 值均在 0.51~0.72 范围, I 值可在一定程度

上反应自由羧基与 Ca^{2+} 的结合方式,而钙离子与自由羧基的结合方式有 3 类^[19](如图 3): (a) 桥式配位型, (b) II 双齿配位型(螯合); (c) III 单齿配位型。其中, I 型结合可分为 2 种: ① 一个自由羧基结合两个 Ca^{2+} , $I=2$, 其电荷不平衡, 难以形成稳定的果胶钙结构; ② 两个自由羧基与两个 Ca^{2+} 结合, $I=1$, 可达到电荷平衡; II 型属于稳定的四元环结构, 其 $I=1$, 可达到电荷平衡; III 型结构也可分为 2 种: ① 一个自由羧基结合一个 Ca^{2+} , $I=1$, 其电荷不平衡; ② 两个自由羧基结合一个 Ca^{2+} , $I=0.5$, 可达到电荷平衡。



不同酯化度的果胶钙
Pectin calcium with different degree of esterification

图 2 不同 DE 果胶钙的钙含量及 Ca²⁺与自由羧基物质的量之比

Fig.2 The calcium content and the ratio of amount of substance of Ca²⁺ to the free carboxyl groups of pectin calcium with different degrees of esterification

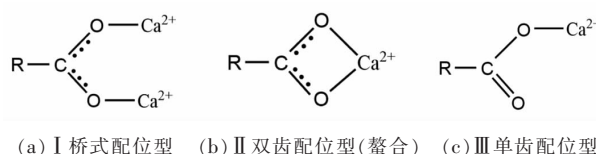


图 3 羧酸根与 Ca²⁺的配位方式

Fig.3 Coordination mode of carboxylate and Ca²⁺

由图 2 可知,果胶钙的 I 值更接近 0.5,故果胶钙中自由羧基与 Ca²⁺最可能的结合方式是 III 型中第②种,即一个 Ca²⁺结合两个自由羧基的单齿配位结构,由此进一步了解并完善果胶钙的结合示意图(如图 4)。部分果胶钙的 $I > 0.5$,可能是因为大分子果胶具有包埋力,致使少量 Ca²⁺虽未与自由羧基结合但仍残存在果胶钙内。

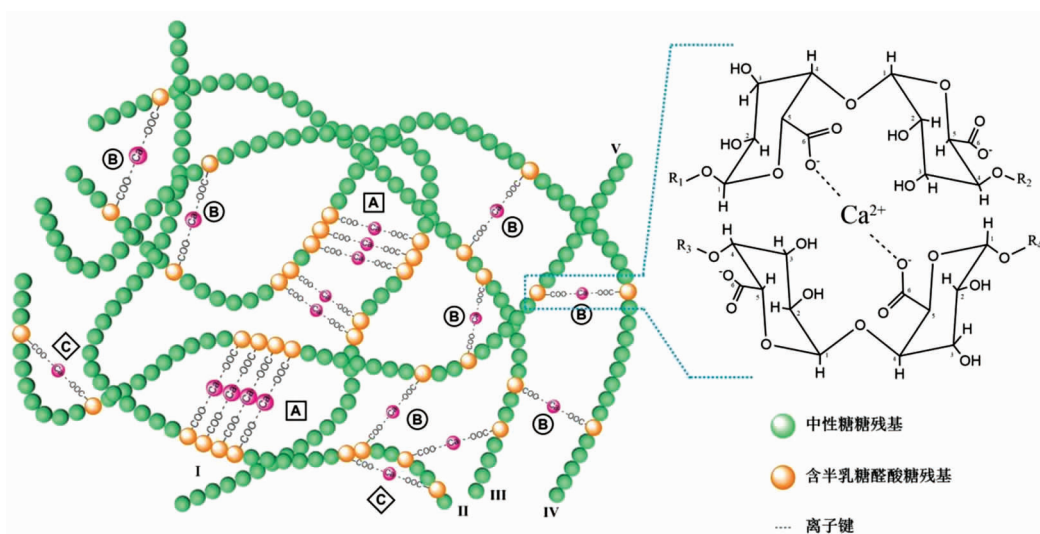


图 4 果胶钙中羧酸根与 Ca²⁺的结合形式示意图

Fig.4 The binding form of carboxylate and Ca²⁺ in pectin calcium

从图 4 可以看出,羧酸根与 Ca²⁺的结合区域可分为以下 2 种类型:1)A 型,连续结合型,即为 Grant 等^[1]提出的“蛋箱”结构,A 型结合区域的比例会随着自由羧基含量的增加而增加,即低 DE、高 GalA 含量的果胶钙分子中,A 型结合区域占比更高;其应主要存在于 Ca-LMP 中。这种多个离子键的紧密结合会形成较强的结构特性,提高干性果胶钙凝胶的刚性、结晶度等,但该结构的包埋力可能较差。2)B 型,不同果胶链间通过单个或两个 Ca²⁺交联,且交联位置、方向、角度随机;其应主要存在于 Ca-HMP 中,该型结合区域对于果胶钙的

包埋性质可能有重要影响。3)C 型,同一条果胶分子链上的不同羧基与 Ca²⁺结合,该结合区域存在的概率虽可能较小,但在 Ca-HMP 和 Ca-LMP 中都应存在;其亦应影响果胶钙的包埋性质。

由此可见,不同 DE、分子质量、GalA 含量的果胶所形成的果胶钙,其钙含量、结构特征、物理性能等有很大的差异。需要注意的是,不同 DE 果胶钙中羧酸根与 Ca²⁺的结合情况复杂且不均匀,图 4 为羧酸根与 Ca²⁺结合类型的模式图,不代表所有果胶钙中的实际情况。

2.3 果胶钙中羧酸根与钙结合的红外光谱特征

由图 5 可知,果胶 DE 越大,所得果胶钙中甲基酯羧基的特征峰 PK1(1 741~1 744 cm^{-1})越强。此外,PK2 为羧酸钙 COO 的非对称伸缩振动峰

(1 612~1 615 cm^{-1});PK3 为 COO 的非对称伸缩振动峰 (1 331~1 334 cm^{-1});PK4 为 CH_3 不对称变角振动与 CH_2 变角振动的重叠峰(1 424~1 436 cm^{-1})。

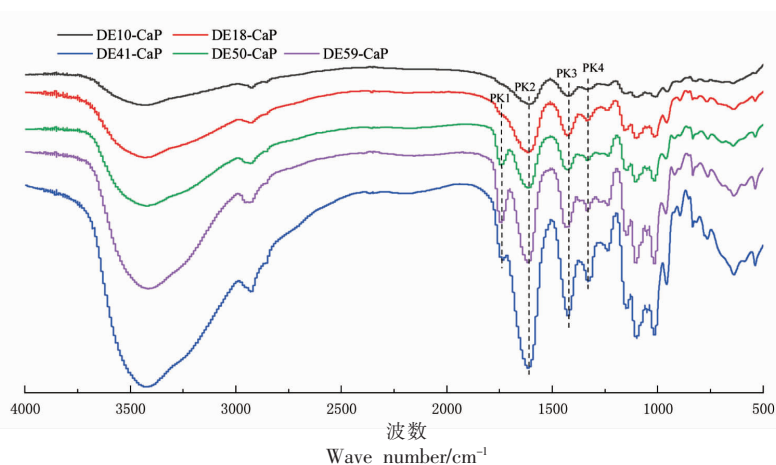


图 5 不同 DE 果胶钙的红外光谱图

Fig.5 Infrared spectrum of pectin calcium with different DE

据羧酸盐类化合物基团的振动频率理论^[9], Ca^{2+} 与自由羧基可能有 3 种结合方式(见图 3),其中 Ca^{2+} 与羧酸根以单齿配位结构存在时,其差值应在 200 cm^{-1} 以上。由表 1 可知:所得 5 种果胶钙

的差值都大于 200 cm^{-1} ,符合 III 型单齿配位结构存在的规律,进一步证实了 2.2 节中根据 $I=0.5$ 所得的分析与结论。

表 1 不同 DE 果胶钙中羧酸根(COO)非对称和对称伸缩振动波数差值

Table 1 Difference between asymmetric and symmetric stretching vibration frequencies of carboxylate (COO) in pectin calcium with different DE

果胶钙种类	COO 非对称伸缩振动/ cm^{-1}	COO 对称伸缩振动/ cm^{-1}	差值/ cm^{-1}
DE10-CaP	1 613.1	1 334.6	278.5
DE18-CaP	1 614.7	1 333.9	280.8
DE41-CaP	1 612.9	1 328.8	284.1
DE50-CaP	1 612.7	1 331.8	280.9
DE59-CaP	1 615.4	1 331.6	283.8

2.4 不同 DE 果胶钙的 XRD 衍射图分析

果胶钙的 XRD 图只有宽衍射峰(如图 6),表明其晶体有缺陷且结晶程度低,其中 DE10-CaP、DE18-CaP、DE41-CaP 3 种 Ca-LMP 的峰形与峰位置与郭秀君^[20]的研究结果接近,即分别在 $2\theta=13^\circ\sim 15^\circ$ 及 $2\theta=21.5^\circ$ 处出现了宽而矮的“馒头峰”,根据布拉格方程,其对应的晶面 d 间距约为 0.63 nm 和 0.41 nm,故 $2\theta=13^\circ\sim 15^\circ$ 衍射峰提供分子链间的横向堆积形式的信息; $2\theta=21.5^\circ$ 衍射峰则提供沿分子链方向的层间距信息^[21-22]。

比较各果胶钙的 XRD 衍射图可知,随 DE 的增加,果胶钙在 $2\theta=21.5^\circ$ 处的衍射峰逐渐宽化、弥散且衍射强度变小直至消失,表明其对应的晶面数减少或晶面完整度减小。由此推断,Ca-HMP 的特征峰为 $2\theta=13^\circ\sim 15^\circ$,而 Ca-LMP 的特征峰为 $2\theta=13^\circ\sim 15^\circ$ 及 $2\theta=21.5^\circ$ 。此外,考虑到前述的 A 型区域(即“蛋箱”结构)应主要存在于 Ca-LMP 中,因此推断 $2\theta=21.5^\circ$ 处的衍射峰应是果胶钙中“蛋箱”结构的特征峰。

2.5 不同 DE 果胶钙消化前、后的表现结构分析

图 7a 为以 DE10-CaP 为代表的 Ca-LMP 的 SEM 图,图 7c 为以 DE59-CaP 为代表的 Ca-HMP 的 SEM 图,DE10-CaP 的空间形貌以厚块状为主,而 DE59-CaP 则呈轻薄、光滑、平整的大薄片状。一般地,Ca-LMP 表现结构更致密且呈块状,可能是因为它有更高比例、更完整的 A 型结合域,这种结构上的差异会影响消化稳定性。

经模拟消化后,Ca-LMP、Ca-HMP 的表现结构均有不同程度的破坏。消化后的 DE10-CaP (7b)表面有许多被分解的残片及絮状物,其中图 7b1 是消化后的 DE10-CaP 表面残片在 2 000×倍下的电镜图,可清晰地看到果胶钙被解离留下的孔洞;而消化后的 DE59-CaP(7d)则出现了明显的碎片化,其分解程度较 DE10-CaP 更高,这说明 Ca-HMP 结构稳定性更差。

2.6 不同 DE 果胶钙在模拟胃肠环境中的消化稳定性

由图 8 可知,随果胶钙 DE 增大,其经胃肠消化后 Ca^{2+} 的释放量及释放率皆呈增加趋势,DE10-CaP 的钙释放率最低 (20.64%),DE59-CaP 最高 (57.34%),其消化率及解离程度亦最高,与 SEM 的表征结果相符。Ca-LMP 的钙释放量、钙释放率比 Ca-HMP 低,是因为 Ca-LMP 中有更多、更完整的 A 型结合区域, Ca^{2+} 结合得更稳固;而 Ca-HMP 则易被破坏。这说明 Ca-LMP 的稳定性更强。

由图 9 可知,随果胶钙 DE 的增加,其在胃液中的 GalA 释放量大体上呈逐渐增大的趋势。对比图 8 可知,GalA 释放量与钙释放量的趋势存在一定程度的一致性,是因为果胶钙中 Ca^{2+} 的释放会引起 GalA 的释放,其释放量越大,结构破坏则越严重,故图 7 中消化后的 DE59-CaP 表现结构破坏程度比 DE10-CaP 严重。

3 结论

本研究用 DE=10%、18%、41%、50%、59% 5 种果胶制备了 5 种果胶钙,所得果胶钙的产率范围为 50%~87%;果胶的 DE 越小、分子质量越大,所得果胶钙的产率越高;果胶钙的钙含量范围为 43.6~88 mg/g,以 DE=10%的果胶与 Ca^{2+} 反应形成的果胶钙(DE10-CaP)的钙含量最高(88 mg/g),

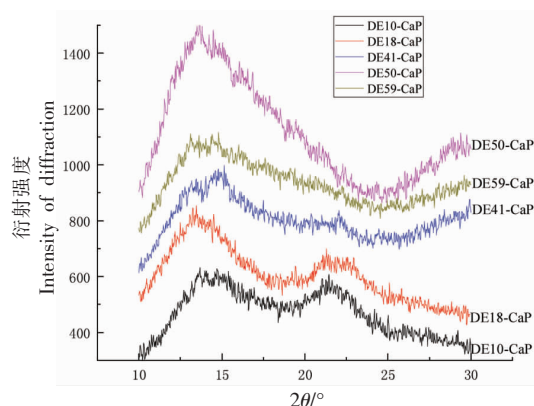
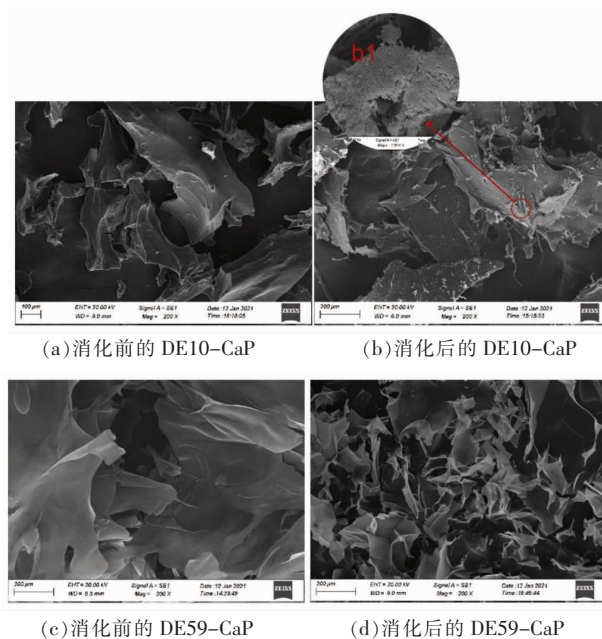


图 6 不同 DE 果胶钙的 XRD 衍射图

Fig.6 XRD patterns of pectin calcium with different DE



(a) 消化前的 DE10-CaP

(b) 消化后的 DE10-CaP

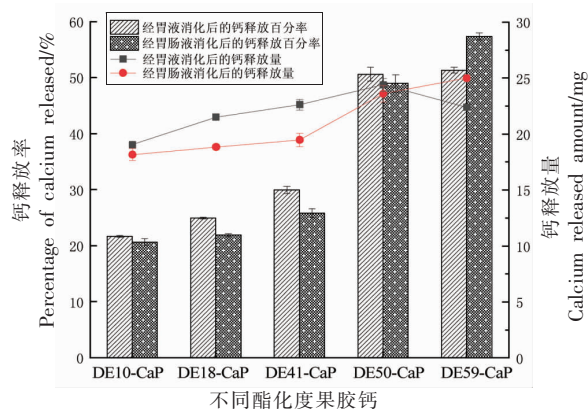
(c) 消化前的 DE59-CaP

(d) 消化后的 DE59-CaP

图 7 DE10-CaP、DE59-CaP 消化前、后的 SEM 图

Fig.7 SEM images of DE10-CaP and DE59-CaP before and after digestion

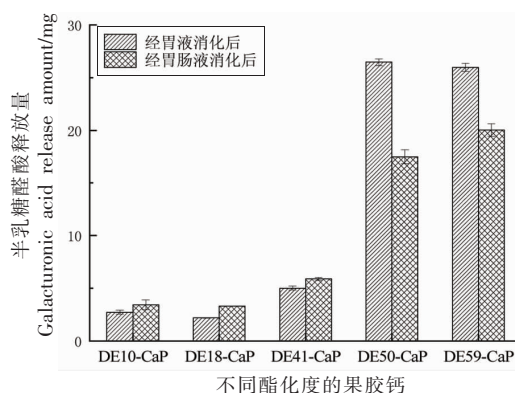
DE59-CaP 的钙含量最低(43.6 mg/g);根据果胶钙中的 Ca^{2+} 与自由羧基的物质的量之比与红外光谱分析,得出 Ca-LMP、Ca-HMP 中 Ca^{2+} 与羧酸根均以单齿配位型结合;进一步提出了果胶钙中羧酸根与 Ca^{2+} 的 3 种结合区域类型,既肯定了果胶钙原有的“蛋箱”结构,又完善了其结合模式。XRD 表明,Ca-HMP 仅有一个 $2\theta=13^\circ\sim 15^\circ$ 衍射特征峰,而 Ca-LMP 还多一个 $2\theta=21.5^\circ$ 衍射特征峰(“蛋箱”结构特征峰),这两个峰所代表的具体意义还有待进一步分析;SEM 表明 Ca-LMP 的表现结构



Pectin calcium with different degree of esterification

图8 不同DE果胶钙的钙释放量及释放百分率

Fig.8 Calcium release amount and percentage of pectin calcium with different degrees of esterification



Pectin calcium with different degree of esterification

图9 不同DE果胶钙的GalA释放量

Fig.9 The amount of galacturonic acid releasing of pectin calcium with different degrees of esterification

更紧密且呈块状, Ca-HMP 则呈薄片状。两种果胶钙在包埋能力、干性凝胶刚性等方面的差异, 还有待进一步对比研究。

在果胶钙体外消化试验中, 通过扫描电镜对以 DE10-CaP 为代表的 Ca-LMP 及以 DE59-CaP 为代表的 Ca-HMP 进行了分析, 发现 Ca-HMP 的表观破坏程度明显大于 Ca-LMP。最后, 对比了5种果胶钙在体外胃肠模拟消化中钙及 GalA 的释放情况, 发现 Ca-HMP 的钙释放率、钙释放量及 GalA 释放量均高于 Ca-LMP, 即 Ca-LMP 在胃肠环境中的稳定性高于 Ca-HMP。

本文研究有助于深入理解果胶钙的微观结构, 同时为以果胶钙为原料的补钙产品开发提供了体外模拟胃肠消化的数据, 还需其它更多更深入的研究促进果胶钙在保健品领域的应用, 例如探究人体肠道菌群对果胶钙的利用情况。

参 考 文 献

- [1] GRANT G T, MORRIS E R, REES D A, et al. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model[J]. FEBS Letters, 1973, 32(1): 195-198.
- [2] CHEN S G, ZHENG J Q, ZHANG L M, et al. Synergistic gelling mechanism of RG-I rich citrus pectic polysaccharide at different esterification degree in calcium-induced gelation[J]. Food Chemistry, 2021, 350: 129177-129177.
- [3] ZHAO S, ZHANG Y, LIU Y, et al. Optimization of preparation conditions for calcium pectinate with response surface methodology and its application for cell encapsulation[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 115: 29-34.
- [4] MOREIRA H R, MUNARIN F, GENTILINI R, et al. Injectable pectin hydrogels produced by internal gelation: pH dependence of gelling and rheological properties [J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 103: 339-347.
- [5] ISHWARYA S P, NISHA P. Advances and prospects in the food applications of pectin hydrogels [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2021, 62(16): 21-25.
- [6] BYUN C, ZHENG Y, PIERCE A, et al. The effect of calcium on the cohesive strength and flexural properties of low-methoxyl pectin biopolymers [J]. Molecules, 2020, 25(1): 75.
- [7] GAO H X, HE Z, SUN Q, et al. A functional polysaccharide film forming by pectin, chitosan, and tea polyphenols [J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 215: 1-7.
- [8] ELENA A, GÜNTER, OXANA V P. Calcium pectinate gel beads obtained from callus cultures pectins as promising systems for colon-targeted drug delivery[J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 147: 490-499.
- [9] ZAINUDIN B H, WONG T W, HAMDAN H. Poly-

- mer science and innovative applications[M]. Amsterdam: Elsevier, 2020: 257–286.
- [10] MARASCO G, CIROTA G G, ROSSINI B, et al. Probiotics, prebiotics and other dietary supplements for gut microbiota modulation in celiac disease patients[J]. *Nutrients*, 2020, 12(9): 2674.
- [11] WHISNER C M, CASTILLO L F. Prebiotics, bone and mineral metabolism[J]. *Calcified Tissue International*, 2018, 102(4): 443–479.
- [12] CHEN J, CHEONG K L, SONG Z, et al. Structure and protective effect on UVB-induced keratinocyte damage of fructan from white garlic[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 92(1): 200–205.
- [13] LI L B, FANG Y P, VREEKER R, et al. Reexamining the egg-box model in calcium-alginate gels with X-ray diffraction[J]. *Biomacromolecules*, 2007, 8(2): 464–468.
- [14] 张凯, 侯虎, 彭喆, 等. 鲑鱼骨明胶多肽螯合钙制备工艺及其在体外模拟消化液中的稳定性[J]. *食品科学*, 2016, 37(24): 1–7.
ZHANG K, HOU H, PENG J, et al. Optimization of preparation of calcium-chelated cod bone gelatin peptide and its stability in simulated gastrointestinal system[J]. *Food Science*, 2016, 37(24): 1–7.
- [15] ZHAO S, YANG F, LIU Y, et al. Study of chemical characteristics, gelation properties and biological application of calcium pectate prepared using apple or citrus pectin[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 109: 180–187.
- [16] 朱天赐. 羧酸盐聚合物微球对金属离子 (Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+}) 吸附性能的研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2019.
ZHU T C. Study on the adsorption of metal ions (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+}) by carboxylate polymer microspheres[D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2019.
- [17] 周建烈, 刘忠厚. 补充钙和维生素 D 防治骨质疏松症的全球临床指南进展[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2017, 23(3): 371–380.
ZHOU J L, LIU Z H. The progress in global clinical guidelines on the prevention and treatment of osteoporosis using calcium and vitamin D supplementation[J]. *Chinese Journal of Osteoporosis*, 2017, 23(3): 371–380.
- [18] BANG S J, KIM G, LIM M Y, et al. The influence of *in vitro* pectin fermentation on the human fecal microbiome[J]. *Amb Express*, 2018, 8(1): 1–9.
- [19] 翁诗甫, 徐怡庄. 傅里叶变换红外光谱分析[M]. 北京: 化学工业出版社, 2016: 336–345.
WENG S F, XU Y Z. Fourier transform infrared spectrum analysis [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2016: 336–345.
- [20] 郭秀君. 果胶钙及果胶的生产工艺研究[D]. 广州: 暨南大学, 2014.
GUO X J. Research on the production process of pectin calcium and pectin[D]. Guangzhou: Jinan University, 2014.
- [21] 杨舒. β -谷甾醇和硬脂酸油脂凝胶的性质及作用机理研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2018.
YANG S. Study on the characteristic and mechanism of oleogel based on β -sitosterol and stearic acid[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2018.
- [22] LI L B, FANG Y P, VREEKER R, et al. Reexamining the egg-box model in calcium-alginate gels with X-ray diffraction[J]. *Biomacromolecules*, 2007, 8(2): 464–468.

Structural Characteristics and *in Vitro* Digestion Stability of Pectin Calcium with Different Esterification Degrees

Liu Na, Jiang Maoting, Wang Chao, Zhang Guangwen, Huang Xuesong*
(College of Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632)

Abstract In order to explore the structural characteristics and digestion stability of pectin calcium formed by pectin with different degrees of esterification (DE), this article used five different pectin with different DE to react with calcium chloride to obtain five different pectin calcium with different DE. And its yield, calcium content, infrared, X-ray diffraction (XRD), electron microscopy(SEM) et al., structural features and its stability *in vitro* simulated digestion were

compared. Results showed that the yield of pectin calcium was 50%–87%. Pectin calcium formed by the reaction of pectin with DE=10% and Ca^{2+} (DE10–CaP) had the highest calcium content (88 mg/g). DE59–CaP had the lowest calcium content (43.6 mg/g). The binding form of Ca^{2+} in calcium pectinate and carboxylate was single monodentate coordination binding type, with three binding regions intermolecular and intramolecular, which further improved the binding mode of pectin calcium. XRD showed that low–ester pectin calcium had a $2\theta=21.5^\circ$ diffraction peak more than that of high–ester pectin calcium. SEM showed that the apparent structure of low–ester pectin calcium was more compact and massive, and high–ester pectin calcium was in the form of flakes. It can be obtained by the *in vitro* simulated gastrointestinal digestion test that the calcium release rate of high–ester pectin calcium was higher. This research is helpful for in–depth understanding of the microstructure and application properties of pectin calcium.

Keywords pectin calcium structure; degree of esterification; calcium ion