

干酪乳杆菌发酵豆粉粗多糖结构特征与抗氧化活性

屈雅宁¹, 许梦粤¹, 李慧¹, 王璐¹, 郭瑞², 王红波^{1,2*}

¹ 江汉大学生命科学学院 食品营养与安全研究中心 武汉 430056

² 湖北省豆类(蔬菜)植物工程技术研究中心 武汉 430056

摘要 制备 8 种干酪乳杆菌发酵豆粉粗多糖样品,比较其粗多糖得率、结构特征和抗氧化活性的差异。结果表明:发酵豆粉粗多糖得率为 1.07%~11.42%,其中发酵红豆粉粗多糖得率最高(11.42%)。发酵豆粉粗多糖中均含有糖醛酸结构,其中发酵菜豆粉粗多糖中糖醛酸含量最高(7.46%)。发酵豆粉粗多糖分子质量为 0.35~36.67 ku,其中发酵绿豆粉粗多糖含有的多糖分子种类最多。发酵豆粉粗多糖由甘露糖、葡萄糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖和阿拉伯糖以不同含量组成。发酵豆粉粗多糖表现形态呈片状松散状态且形状不规则,其中发酵绿豆粉粗多糖表现出最疏松程度。红外光谱显示 8 种发酵豆粉粗多糖均符合多糖化合物的特征吸收。8 种发酵豆粉粗多糖表现出不同的抗氧化活性:发酵扁豆粉和发酵绿豆粉粗多糖清除 DPPH 的 IC₅₀ 值分别为 0.07 mg/mL 和 0.98 mg/mL,发酵扁豆粉粗多糖清除效果最好;发酵绿豆粉粗多糖清除 ABTS⁺ 的能力最好,其 IC₅₀ 值为 0.67 mg/mL;发酵绿豆粉粗多糖对铁离子也表现出最高的还原能力。比较 8 种发酵豆粉粗多糖,发酵绿豆粉粗多糖表现出最佳的抗氧化活性。研究结果对干酪乳杆菌发酵制备不同豆粉食品的营养评价提供了理论依据。

关键词 发酵豆粉;粗多糖;结构特征;抗氧化活性

文章编号 1009-7848(2024)08-0112-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.08.011

豆类不仅含有蛋白质、维生素和矿物质等营养物质,还含有功能多糖等生物活性成分,使豆类具有抗氧化、抑菌、降血糖和降血压等多种生物学功能^[1-2]。豆类也是重要的发酵食品原料,微生物的生物代谢作用能改善豆类食品的营养性能和生物活性。干酪乳杆菌是一种被广泛应用于豆类食品研究和乳酸菌豆粉食品开发的益生菌^[3]。陈佩等^[4]将 1 株具有降糖作用的干酪乳杆菌应用于发酵豆乳,生产开发具有降糖作用的新型发酵豆类食品,该研究发现该菌株具有良好的耐酸、耐胆盐和黏附的生物特性。近年来,多糖因潜在的生物功能而备受关注,特别是其抗氧化活性方面。多糖的化学组成、分子质量及其结构特征都对多糖的生物活性有一定的影响。弓建红等^[5]研究表明扁豆多糖在抗氧化、免疫调节和对神经细胞的凋亡保护方面具有重要作用。Yang 等^[6]提取红豆多糖,分离纯化

后分析其单糖组成和结构特征,发现红豆多糖是潜在的抗氧化剂和免疫调节剂。发酵豆类食品的生物活性成分是食品营养研究的热点,而有关发酵豆类食品多糖的研究还鲜有报道。本研究以干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei* NRRL B-441)为发酵菌株,发酵 8 种常见食用豆类种子,对比 8 种干酪乳杆菌发酵豆粉粗多糖的组成、分子质量分布、单糖组成、红外光谱特征和扫描电镜外观形态的结构特征及其抗氧化活性能力的差异,为进一步开发利用乳酸菌发酵豆粉的功能食品提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

蚕豆(CD-035)、菜豆(SJ-0052)、大豆(MD-065)、豇豆(鄂豇豆 7 号)、扁豆(德扁 3 号)、豌豆(汉豌 1 号)、红豆(红珍珠)、绿豆(绿宝石)、干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)NRRL B-441 由湖北省豆类(蔬菜)植物工程技术研究中心提供。1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(1-Phenyl-3-methyl-5-pyrazolone, PMP)、三氟乙酸(Trifluoroacetic acid, TFA)、鼠李糖(Rhamnose, Rha)等单糖标品、三氯乙酸(Trichloroacetic acid, TCA)、磷酸缓冲盐溶

收稿日期: 2023-08-24

基金项目: 市属高校产学研项目(CXY202202);湖北省高价值知识产权培育工程项目(鄂知发[2021]2 号);湖北省重点研发计划项目(2022BBA0064);教育部产学研合作协同育人项目(231007156305207)

第一作者: 屈雅宁,女,硕士生

通信作者: 王红波 E-mail: bobo110110165@sina.com

液(Phosphate buffered saline, PBS), 国药集团化学试剂有限公司; 2,4,6-三(2-吡啶基)-1,3,5-三嗪(2,4,6-tri(2-pyridine)-1,3,5-triazine, TPTZ), 索莱宝公司; 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)和2,2'-联氨-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(2,2'-Azinobis-3-ethylbantzthiazoline-6-sulfonate, ABTS) 购买于麦克林公司。

1.2 仪器与设备

NICOLET iS50R 傅里叶变换显微红外光谱仪, 美国 Thermo Scientific 公司; Nova NanoSEM450 场发射扫描电子显微镜, 美国 FEI 公司; 全波长酶标仪, Thermo Fisher 公司; Dionex(戴安)U3000 高效液相色谱仪, 美国 Thermo 公司; 冷冻干燥机, 美国 LABCONCO 公司。

1.3 方法

1.3.1 豆粉发酵方法 参考 Li 等^[7]的发酵方法。MRS 液体培养基中接种干酪乳杆菌 NRRL B-441, 37 °C, 24 h, 得到发酵种子液。豆子磨粉(直径<1 mm)。三角瓶内分别添加 12 g 豆粉, 121 °C 灭菌, 冷却, 接入 5% 的种子液, 补加 12 mL 无菌水, 37 °C, 3 d。发酵结束后, 冷冻干燥备用。

1.3.2 发酵豆粉粗多糖提取与制备方法 取冻干样品 6 g, 按料液比 1:10 加入 95% 乙醇, 摇床 6 h (200 r/min) 去除油脂杂质, 6 000 r/min 离心 10 min, 收集沉淀, 烘干^[8]。取烘干后样品, 按料液比 1:20 加蒸馏水, 95 °C 水提 6 h, 6 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液。上清液中加入等体积 3% TCA 去除蛋白杂质, 4 °C 静置过夜, 8 000 r/min 离心 10 min, 取上清液^[9]。上清液中加入等体积无水乙醇, 4 °C 静置过夜, 8 000 r/min 离心 10 min, 收集沉淀, 冷冻干燥(真空度 4 Pa, 温度 -85 °C, 冷冻干燥 12 h), 制备得到发酵豆粉粗多糖样品^[10]。发酵豆粉粗多糖得率按公式(1)计算。

得率(%)=(粗多糖质量/称取豆粉质量)×100 (1)

1.3.3 粗多糖样品化学组成测定方法 总糖含量用蒽酮比色法测定^[11]。糖醛酸含量用间羟基联苯比色法测定^[12]。蛋白质含量用考马斯亮蓝法测定^[13]。

1.3.4 粗多糖分子量测定方法 多糖分子量分布用高效凝胶渗透色谱串联柱检测^[14]。

1.3.5 粗多糖单糖组成测定方法 参考张武霞等^[15]的单糖组成测定方法, 依次配制单糖标准品, 溶解稀释后过 0.22 μm 微孔滤膜后装入进样瓶中。

色谱条件: ThermoU3000 液相色谱系统, 色谱柱为 ZORBAX EclipseXDB-C18, 流动相为乙腈, 用磷酸盐缓冲液(磷酸二氢钾 12 g/L, 2 mol/L NaOH 调整 pH 值至 pH=6.8) 等度洗脱, 乙腈和磷酸盐缓冲液的体积比为 17:83, 流速为 0.8 mL/min, 柱温 30 °C, 检测波长 250 nm, 进样量 10 μL。

1.3.6 傅里叶红外光谱测定方法 在 4000~400 cm⁻¹ 波数范围内用傅里叶变换显微红外光谱仪扫描样品, 绘制红外光谱图^[16]。

1.3.7 电镜扫描测定方法 取适量粗多糖样品于导电碳胶带上, 喷金处理后, 置于扫描电子显微镜中观察拍照, 设定工作电压 10.0 kV, 在不同的放大倍数下观察样品的固体形貌, 进行相应的清晰度调试, 直至得到理想的观察视野, 选取 40 000 放大倍数视野拍照记录^[17]。

1.3.8 多糖抗氧化测定方法

1.3.8.1 DPPH 自由基清除能力测定 参考陈珊等^[18]的试验方法。分别取梯度质量浓度 0.25, 0.50, 1.00, 1.50 mg/mL 粗多糖溶液各 200 μL 和 200 μL DPPH 乙醇溶液(0.1 mmol/L) 混合均匀, 反应 30 min(避光), 于波长 517 nm 处测定吸光度, 蒸馏水作空白, 50% 乙醇作对照, VC 为阳性对照组, 平行测定 3 次, 结果按公式(2)计算 DPPH 自由基清除率:

$$\text{清除率}(\%)=[1-(A_2-A_1)/A_0] \times 100 \quad (2)$$

式中: A_0 为 200 μL H₂O 和 200 μL DPPH 混合吸光度; A_1 为 200 μL 样品溶液和 200 μL 50% 乙醇混合吸光度; A_2 为 200 μL 样品溶液和 200 μL DPPH 乙醇溶液混合吸光度。

1.3.8.2 ABTS⁺ 自由基清除能力测定 参考 Jiang 等^[19]的试验方法。ABTS 溶液(7.4 mol/L) 和硫酸钾溶液(3.8 mmol/L) 按体积比 1:1 混匀过夜得到母液(避光), 在波长 734 nm 处用 PBS(pH 7.4) 调整母液吸光度为 0.70±0.02, 为反应溶液。分别取梯度质量浓度 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/mL 粗多糖溶液各 25 μL, 加 250 μL 反应溶液混合, 静置 15 min, 于波长 734 nm 处测吸光度, 蒸馏水作空白, PBS(pH

7.4) 缓冲溶液作对照, VC 为阳性对照组, 平行 3 次, 结果按公式(3)计算 ABTS⁺自由基清除率。

$$\text{清除率}(\%) = [1 - (A_2 - A_1) / A_0] \times 100 \quad (3)$$

式中: A_0 为 H_2O 加反应溶液吸光度; A_1 为样品溶液加 PBS 缓冲液吸光度; A_2 为样品溶液加反应溶液吸光度。

1.3.8.3 铁离子还原能力测定 参考 Benzie 等^[20]的试验方法。制备工作液, 将 900 μL FRAP 工作液与梯度质量浓度 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/mL 各 100 μL 的粗多糖样品溶液混合, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 min, 于波长 595 nm 处测定吸光度, 平行测定 3 次。作 FeSO_4 浓度变化曲线。计算粗多糖样品的铁离子还原能力 ($\mu\text{mol/L}$)。

1.3.9 数据分析 结果测定重复 3 次, 数据以平均值 \pm 标准差表示, 运用 Microsoft Excel 2010 整理, SPSS 27 分析显著性, 采用 Origin Pro 2021 绘制相关图表。

2 结果与分析

表 1 8 种发酵豆粉粗多糖得率与主要成分

Table 1 The yields and main components of crude polysaccharide from eight kinds of fermented bean flour

| 样品 | 得率/% | 总糖含量/% | 糖醛酸含量/% | 蛋白质含量/% |
|----|------------------|------------------|-----------------|-----------------|
| 蚕豆 | 9.35 \pm 0.41 | 28.84 \pm 4.54 | 2.84 \pm 0.99 | — |
| 豌豆 | 2.89 \pm 0.46 | 45.83 \pm 8.52 | 3.89 \pm 0.24 | — |
| 扁豆 | 8.47 \pm 1.08 | 13.34 \pm 0.62 | 2.35 \pm 0.29 | — |
| 绿豆 | 5.86 \pm 0.36 | 83.67 \pm 6.36 | 4.81 \pm 0.12 | 0.39 \pm 0.55 |
| 红豆 | 11.42 \pm 1.32 | 64.12 \pm 8.38 | 2.39 \pm 0.81 | — |
| 菜豆 | 11.11 \pm 0.35 | 36.74 \pm 1.53 | 7.46 \pm 0.38 | — |
| 豇豆 | 11.37 \pm 0.73 | 24.20 \pm 4.44 | 1.71 \pm 0.09 | — |
| 大豆 | 1.07 \pm 0.03 | 31.98 \pm 0.99 | 5.21 \pm 0.81 | 5.95 \pm 0.52 |

注: —表示未检出; 表中数据均以平均值加减标准偏差表示。

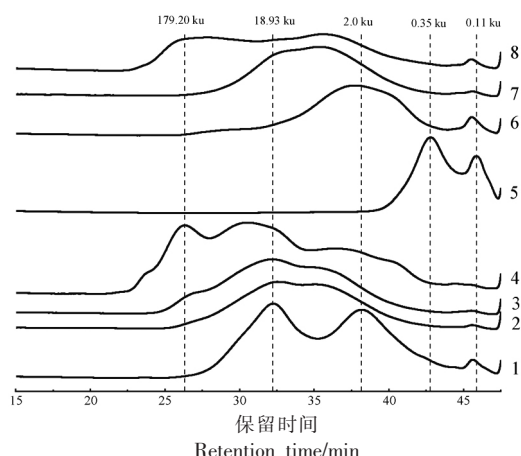
2.2 粗多糖分子质量分析

8 种发酵豆粉粗多糖分子质量分布结果如图 1 所示。这 8 种发酵豆粉粗多糖的特征多糖主要为低分子质量的多糖分子, 其所占峰面积较大。发酵后的豇豆粉、绿豆粉、大豆粉、红豆粉、蚕豆粉、菜豆粉、扁豆粉和豌豆粉的粗多糖, 特征峰分子质量分别为 18.90, 36.67, 18.93, 17.10, 0.35, 5.51, 18.87, 2.44 ku。发酵绿豆粉的粗多糖组分较多, 分子质量分别为 179.20, 36.67, 4.3, 0.19 ku, 其占比

2.1 粗多糖得率与主要成分分析

8 种不同发酵豆粉粗多糖得率与主要成分见表 1。发酵红豆粉粗多糖得率最高, 达 11.42%; 而发酵大豆粉粗多糖的得率最低, 为 1.07%。陈红等^[21]也研究了不同提取方法对大豆多糖得率的影响, 其中热水浸提法的大豆多糖得率为 1.21%~3.45%。大豆中粗多糖的含量偏低。8 种发酵豆粉粗多糖样品中总糖含量在 13.34%~83.67%, 其中发酵绿豆粉粗多糖成分中总糖含量最高。Jiang 等^[19]也从绿豆皮中提取了多糖, 其总糖含量为 63.43%。8 种发酵豆粉粗多糖中均含有糖醛酸, 其含量区间在 1.71%~7.46%, 其中发酵菜豆粉粗多糖的糖醛酸含量最高。这一结果表明干酪乳杆菌发酵豆粉粗多糖中均存在酸性多糖分子^[22]。粗多糖中糖醛酸等结构也对多糖的抗氧化活性具有不同程度的影响^[23]。发酵后的豆粉粗多糖中蛋白质含量较低, TCA 方法可以有效的脱去粗多糖中蛋白杂质。

分别为 24.95%, 43.57%, 30.16%, 1.13%。发酵绿豆粗多糖含有 1 个高分子质量多糖组分 (179.20 ku)。张瑞平等^[24]的研究表明, 多糖分子质量能影响其抗氧化能力, 分子质量大的多糖分子空间结构相对较稳定, 其生物活性较高。发酵豌豆粉粗多糖主要由分子质量为 2.44 ku 的多糖分子构成, 其占比为 95.33%。发酵菜豆粉粗多糖中特征多糖的分子质量为 5.51 ku, 其占比为 86.87%。干酪乳杆菌的发酵过程可能会改变豆粉多糖的分子质量。



注:1. 大豆,2. 红豆,3. 豇豆,4. 绿豆,5. 蚕豆,6. 豌豆,7. 扁豆,8. 菜豆,下同。

图 1 8 种发酵豆粉粗多糖的分子质量分布
Fig.1 Molecular weight distribution of crude polysaccharide from eight fermented bean flour

2.3 粗多糖的单糖组成

8 种发酵豆粉粗多糖样品的单糖组成结果如表 2 所示。8 种发酵豆粉单糖组成存在差异。发酵绿豆粉粗多糖主要由甘露糖(0.527%)、半乳糖醛酸(2.506%)、葡萄糖(93.545%)和半乳糖(3.421%)组成。发酵菜豆粉粗多糖主要由半乳糖醛酸(8.227%)、葡萄糖(63.957%)、半乳糖(8.816%)、木糖(4.371%)和阿拉伯糖(14.630%)5种单糖组成。发酵大豆粉粗多糖分子由甘露糖(26.175%)、半乳糖醛酸(5.622%)、半乳糖(55.844%)和阿拉伯糖(12.359%)组成。发酵豌豆粉粗多糖由半乳糖醛酸(2.892%)、葡萄糖(85.557%)、半乳糖(7.740%)和阿拉伯糖(3.811%)组成。发酵扁豆粉粗多糖由葡萄糖(96.065%)、半乳糖(2.079%)、木糖(0.151%)和阿拉伯糖(1.704%)

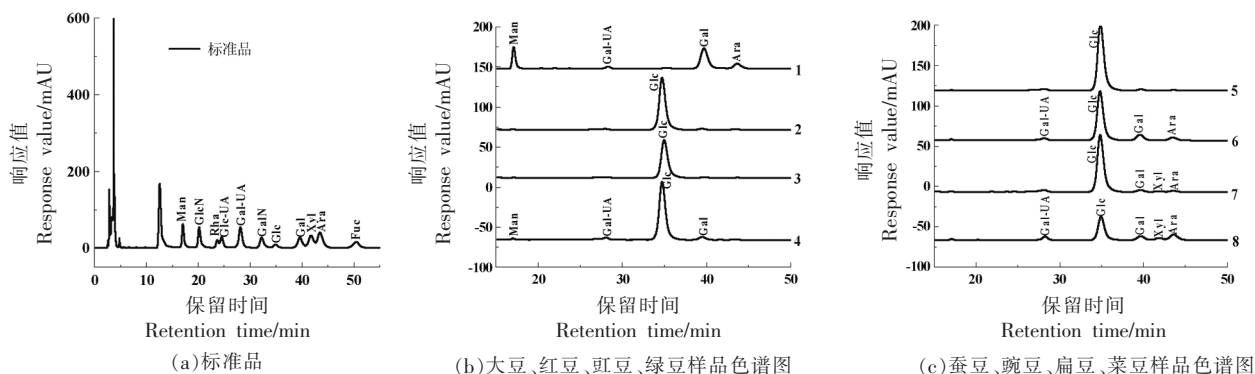


图 2 8 种发酵豆粉粗多糖单糖组成液相色谱图

Fig.2 Liquid chromatogram of crude polysaccharide monosaccharide composition of eight fermented bean flour

表 2 单糖组成

Table 2 Monosaccharide composition

| 样品 | 单糖含量/% | | | | | | | | | | |
|----|--------|-------|-------|--------|--------|-------|---------|--------|-------|--------|-------|
| | Man | GlcN | Rha | Glc-UA | Gal-UA | GalN | Glc | Gal | Xyl | Ara | Fuc |
| 绿豆 | 0.527 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 2.506 | 0.000 | 93.545 | 3.421 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 菜豆 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 8.227 | 0.000 | 63.957 | 8.816 | 4.371 | 14.630 | 0.000 |
| 蚕豆 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 100.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 红豆 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 100.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 豇豆 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 100.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 大豆 | 26.175 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 5.622 | 0.000 | 0.000 | 55.844 | 0.000 | 12.359 | 0.000 |
| 扁豆 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 96.065 | 2.079 | 0.151 | 1.704 | 0.000 |
| 豌豆 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 2.892 | 0.000 | 85.557 | 7.740 | 0.000 | 3.811 | 0.000 |

注:Man. 甘露糖, GlcN. 氨基葡萄糖盐酸盐, Rha. 鼠李糖, Glc-UA. 葡萄糖醛酸, Gal-UA. 半乳糖醛酸, GalN. 氨基半乳糖盐酸盐, Glc. 葡萄糖, Gal. 半乳糖, Xyl. 木糖, Ara. 阿拉伯糖, Fuc. 岩藻糖。

构成,葡萄糖含量最高。尹术华等^[25]研究也发现白扁豆多糖中葡萄糖含量最高,其主要组成为葡聚糖。发酵蚕豆粉、红豆粉和豇豆粉的粗多糖主要由葡萄糖单糖构成,主要为葡聚糖分子结构。Meng等^[26]的研究表明多糖的抗氧化活性与多糖的单糖组分比例和糖苷键的类型有一定关系,不同单糖比例对多糖的抗氧化活性有一定影响。

2.4 粗多糖红外光谱

8种发酵豆粉粗多糖红外光谱结果如图3所示。 $3\ 650\sim 3\ 200\ \text{cm}^{-1}$ 的特征峰是由O-H伸缩振动引起,多糖分子内和分子间的氢键能使其形成较宽的特征峰^[27]。8种发酵豆粉粗多糖均在 $3\ 420\ \text{cm}^{-1}$ 附近具有强吸收峰。在 $2\ 930\ \text{cm}^{-1}$ 附近出现的特征峰,是多糖分子中的C-H结构^[28]。在波数大于 $3\ 000\ \text{cm}^{-1}$ 的区域,不饱和烃的碳氢键伸缩振动吸收峰相对较弱,通常表现为饱和碳氢键吸收峰的一个小侧峰^[29]。发酵大豆粉粗多糖在 $3\ 009\ \text{cm}^{-1}$ 处有一个小峰。8种发酵豆粉在 $1\ 747\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 671\ \text{cm}^{-1}$ 处均具有吸收峰,其为C=O伸缩振动吸收峰^[30]。这表明8种发酵豆粉多糖中均存在糖醛酸,与粗多糖主要成分分析结果一致。 $1\ 640\ \text{cm}^{-1}$ 处未出现吸收峰,表明粗多糖样品中蛋白含量低^[31]。 $980\sim 1\ 200\ \text{cm}^{-1}$ 范围内的吸收峰是吡喃型糖苷环伸缩振动吸收峰^[32]。这表明多糖分子中存在糖环C-O-C结构,8种发酵豆粉粗多糖在 $1\ 023\ \text{cm}^{-1}$ 附近均具有此吸收峰。 $842\ \text{cm}^{-1}$ 和 $896\ \text{cm}^{-1}$ 附近处的吸收峰表明发酵豆粉粗多糖分子中含有 α 和 β 两种糖苷键构型^[33]。经过综合分析,所有8种发酵豆粉中的粗多糖在红外光谱上显示出典型的多糖化合物的吸收特征。多糖的结构特征可能影响多糖分子的抗氧化活性,如-COOH、-OH等基团的存在也可能增加多糖分子的抗氧化能力^[34]。

2.5 粗多糖电镜扫描

8种发酵豆粉粗多糖在40 000倍电镜下的电镜扫描表观形态如图4所示。发酵后豇豆粉、绿豆粉、扁豆粉和蚕豆粉的粗多糖表面具有片状疏松的结构,其中发酵绿豆粉粗多糖表现出最高的疏松程度。尹术华等^[29]电镜扫描白扁豆多糖结果显示该多糖表面微观形貌为片状。发酵红豆粉、发酵豌豆粉和发酵菜豆粉粗多糖不平整的表面出现凹陷,且凹陷四周厚度不均一、形状不规则。发酵大

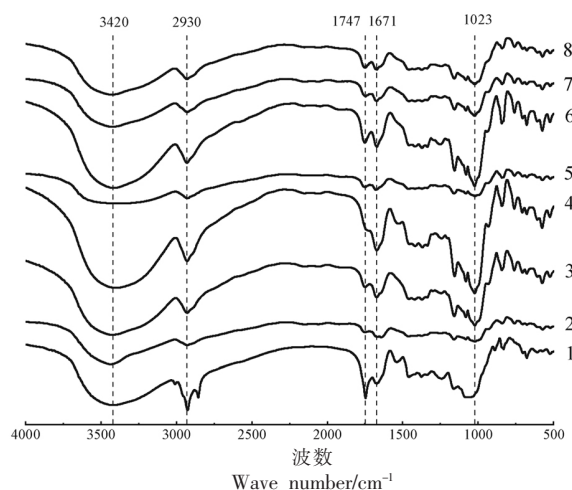


图3 8种发酵豆粉粗多糖的红外光谱图

Fig.3 FT-IR spectra of crude polysaccharide from eight kinds of fermented bean flour

豆粉粗多糖表面是不规则的小球状结构。电镜扫描表观形态的形态差异可能与不同发酵豆粉的理化性质、分子质量大小以及分子结构有关^[35]。

2.6 粗多糖抗氧化活性分析

2.6.1 DPPH自由基清除能力 由图5可知,8种发酵豆粉粗多糖的质量浓度(0.25~1.5 mg/mL)与DPPH自由基清除率之间具有一定的正相关关系。8种发酵豆粉粗多糖对DPPH自由基清除效果均低于VC。这8种发酵豆粉的粗多糖溶液对DPPH自由基清除率的 IC_{50} 值,分别为发酵大豆粉粗多糖0.60 mg/mL、发酵豇豆粉粗多糖2.18 mg/mL、发酵红豆粉粗多糖5.58 mg/mL、发酵绿豆粉粗多糖0.98 mg/mL、发酵扁豆粉粗多糖0.07 mg/mL、发酵豌豆粉粗多糖2.07 mg/mL、发酵蚕豆粉粗多糖9.30 mg/mL和发酵菜豆粉粗多糖2.76 mg/mL。发酵扁豆粉粗多糖对DPPH自由基清除效果最好,当其质量浓度达到0.25 mg/mL时,清除率超过50%;当其质量浓度达到1.5 mg/mL时,清除率可达63.89%。杨强等^[36]的研究发现豇豆多糖质量浓度在4 mg/mL时对DPPH自由基清除率能达68.40%。

2.6.2 ABTS⁺自由基清除能力 由图6可知,8种发酵豆粉粗多糖的质量浓度(0.5~4 mg/mL)与ABTS⁺自由基清除率之间具有一定的正相关关系。发酵红豆粉、绿豆粉、大豆粉、豇豆粉、蚕豆粉、菜

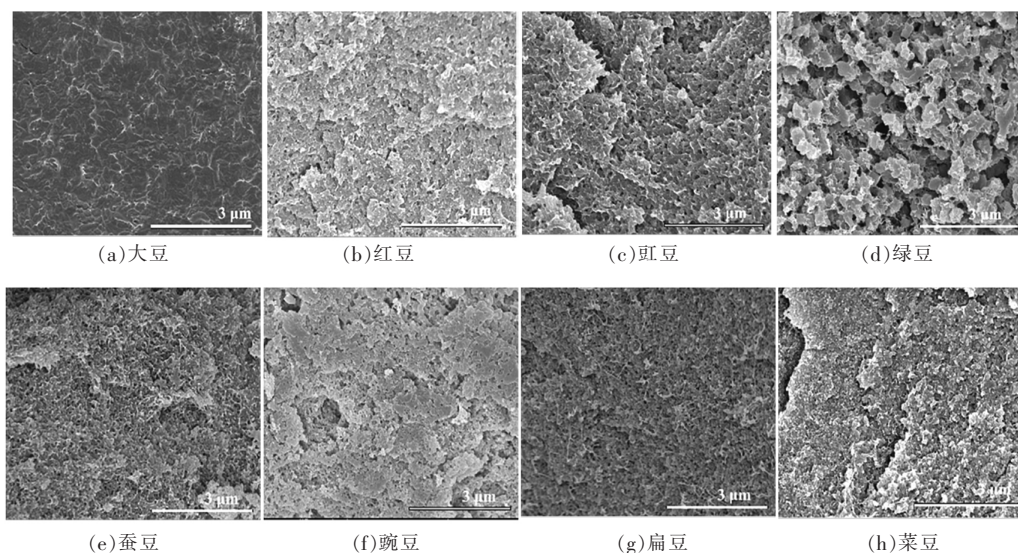


图 4 8 种发酵豆粉粗多糖的扫描电镜图

Fig.4 Scanning electron microscopic images of crude polysaccharide from eight kinds of fermented bean flour

豆粉、扁豆粉和豌豆粉的粗多糖的半清除率 IC_{50} 值分别为 67.96, 0.67, 0.95, 21.01, 7.50, 6.02, 215.00, 2.65 mg/mL。8 种发酵豆粉粗多糖对 $ABTS^+$ 自由基清除能力依次为绿豆>大豆>豌豆>菜豆>蚕豆>豇豆>红豆>扁豆。发酵绿豆粉粗多糖对 $ABTS^+$ 自由基清除能力最大, 而发酵扁豆粉粗多糖对 $ABTS^+$ 自由基清除能力最弱。聂琳然等^[23]研究表明

多糖的抗氧化活性会受到其分子质量的影响, 分子质量较低的多糖在提取过程中其分子空间结构可能被破坏, 导致其抗氧化活性降低。发酵绿豆粉粗多糖中含有 1 个 179.2 ku 的高分子质量组分, 可能有利于其表现出对 $ABTS^+$ 自由基较好的清除效果。

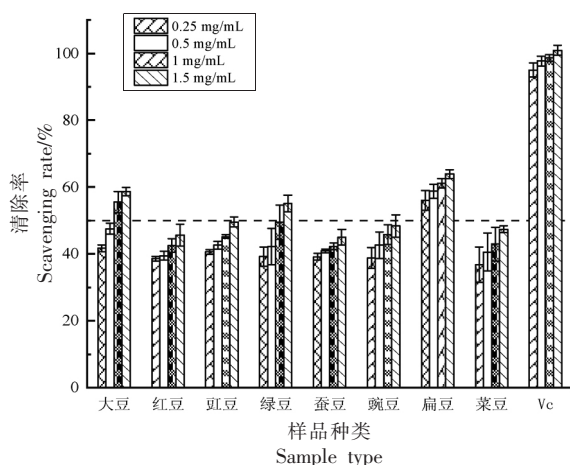


图 5 DPPH 自由基清除率活性

Fig.5 DPPH free radical scavenging activities

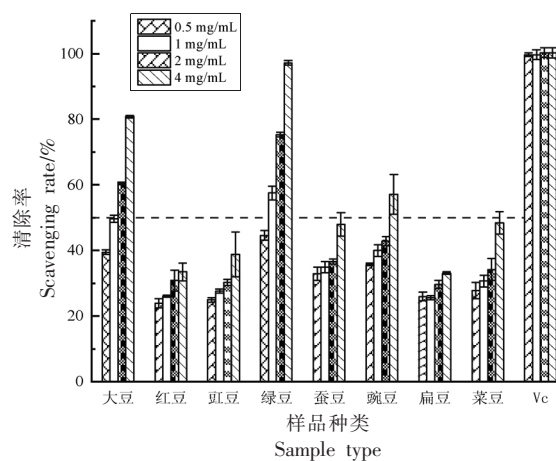


图 6 $ABTS^+$ 自由基清除率活性

Fig.6 $ABTS^+$ free radical scavenging activities

2.6.3 铁离子还原能力 由图 7 可知, 8 种发酵豆粉粗多糖的质量浓度 (0.5~4 mg/mL) 的增加, 其对铁离子的还原能力均增加。当粗多糖质量浓度

为 4 mg/mL 时, 发酵红豆粉、绿豆粉、扁豆粉、大豆粉、豇豆粉、豌豆粉、蚕豆粉和菜豆粉的粗多糖 FRAP 值分别为 89.40, 155.85, 97.90, 115.67, 94.04,

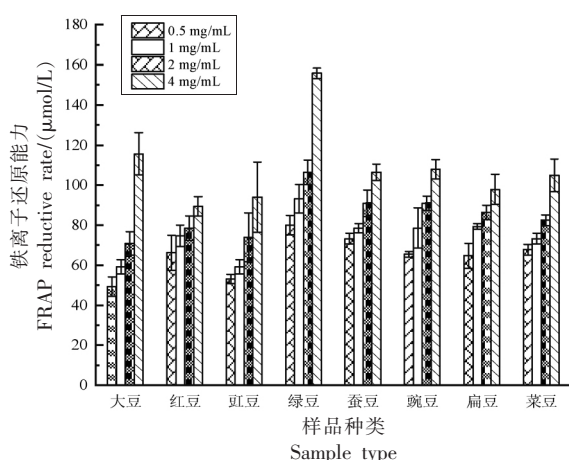


图7 铁离子还原能力

Fig.7 Iron ion-reducing abilities

107.94, 106.40, 104.85, 107.94 $\mu\text{mol/L}$, 其中发酵绿豆粗多糖的铁离子还原能力最强, 发酵红豆粗多糖的铁离子还原能力最弱。发酵绿豆粉粗多糖表现呈现出最高的疏松程度可能会增加其对铁离子的还原能力。辛玥等^[37]研究的豇豆种皮多糖在质量浓度为 4 mg/mL 时对铁离子还原能力为 350 $\mu\text{mol/L}$ 。

3 结论

本研究对 8 种干酪乳杆菌发酵豆粉粗多糖的结构特性与抗氧化能力进行了比较分析。发酵红豆粉粗多糖得率最高(11.42%), 发酵大豆粉粗多糖得率最低(1.07%)。8 种发酵豆粉粗多糖中均含有糖醛酸分子, 发酵菜豆粗多糖糖醛酸含量最高。8 种发酵豆粉粗多糖主要由低分子质量的多糖分子构成, 其主要分子质量区间为 0.35~36.67 ku, 其中发酵绿豆粉的粗多糖包含的多糖分子种类最多。发酵菜豆粉、大豆粉、扁豆粉和豌豆粉的粗多糖中均含有半乳糖和阿拉伯糖; 而发酵蚕豆粉、红豆粉和豇豆粉的粗多糖主要为葡聚糖分子结构。8 种发酵豆粉粗多糖红外光谱均符合多糖化合物的特征吸收。不同发酵豆粉粗多糖电镜扫描表现形态存在差异, 其中发酵绿豆粉表现呈现最高的疏松程度。发酵后的扁豆粉(IC_{50} : 0.07 mg/mL)、大豆粉(IC_{50} : 0.60 mg/mL)和绿豆粉(IC_{50} : 0.98 mg/mL)的粗多糖对 DPPH 自由基表现出良好的清除效果。发酵绿豆粉的粗多糖 (IC_{50} : 0.67 mg/mL)对

ABTS⁺自由基清除能力最强。发酵绿豆粉粗多糖的铁离子还原能力最强。综合分析, 干酪乳杆菌发酵的 8 种豆粉粗多糖中发酵绿豆粉粗多糖表现出最佳的抗氧化活性。

参 考 文 献

- [1] 郑虹君, 朱叙丞, 李耀基, 等. 白芸豆功能成分、生物活性及其产品开发研究进展[J]. 中国粮油学报, 2022, 37(12): 277-285.
ZHENG H J, ZHU X C, LI Y J, et al. A review of functional components, bioactivities and product development of white kidney bean[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2022, 37(12): 277-285.
- [2] 屈雅宁, 李慧, 向大松, 等. 两种细菌发酵豆粉粗多糖体外降血糖、降血脂活性比较[J]. 食品工业科技, 2024, 45(12): 140-150.
QU Y N, LI H, XIANG D S, et al. Comparative on the hypoglycemic and lipid-lowering activities *in vitro* of crude polysaccharides from fermented bean flour by two types of bacteria[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(12): 140-150.
- [3] 宋虹, 李一雪, 李然, 等. 顶空固相微萃取/气质联用技术结合电子鼻分析类干酪乳杆菌发酵豆渣饮料过程中风味特征[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(5): 253-262.
SONG H, LI Y X, LI R, et al. SPME/GC-MS combined with electronic nose to analyze the flavor characteristics of okara beverages fermented by *Lactobacillus casei*[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(5): 253-262.
- [4] 陈佩, 党辉, 贺国旗, 等. 一株干酪乳杆菌生物学特性及其发酵豆乳的研究[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(17): 17-21.
CHEN P, DANG H, HE G Q, et al. Study on the biological characteristics of *Lactobacillus casei* and application in the fermented soymilk produce [J]. Food Research and Development, 2017, 38(17): 17-21.
- [5] 弓建红, 许小华, 王俊敏, 等. 白扁豆多糖对正常小鼠体内抗氧化和免疫实验研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(9): 337-338.
GONG J H, XU X H, WANG J M, et al. Experimental study on polysaccharide in *Dolichos lablab* L.

- on antioxidant and immune of polysaccharide in normal mice[J]. Science and Technology of Food Industry, 2010, 31(9): 337-338.
- [6] YANG Y, ZHU Y Y, REN G X. Antioxidant and immunoregulatory activity of alkali-extractable polysaccharides from mung bean [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 84: 289-294.
- [7] LI S L, JIN Z Y, HU D J, et al. Effect of solid-state fermentation with *Lactobacillus casei* on the nutritional value, isoflavones, phenolic acids and antioxidant activity of whole soybean flour[J]. LWT, 2020, 125: 109264.
- [8] 马高兴, 王晗, 杨文建, 等. 不同提取工艺对杏鲍菇多糖结构特征及免疫活性的影响[J]. 食品科学, 2022, 43(17): 42-49.
- MA G X, WANG H, YANG W J, et al. Effects of different extraction processes on structural characteristic and immunomodulatory activity of *Pleurotus eryngii* polysaccharide [J]. Food Science, 2022, 43(17): 42-49.
- [9] HUANG G L, CHEN F, YANG W J, et al. Preparation, deproteinization and comparison of bioactive polysaccharides[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 109: 564-568.
- [10] 屈雅宁, 许梦粤, 唐双庆, 等. 枯草芽孢杆菌发酵对豆类粗多糖结构与抗氧化活性的影响[J]. 食品工业科技, 2023, 44(17): 129-138.
- QU Y N, XU M Y, TANG S Q, et al. Effects of the structure and antioxidant activity of legume crude polysaccharides after *Bacillus subtilis* fermentation[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(17): 129-138.
- [11] 刘艺珠, 刘佩冶, 赵玉梅, 等. 黄花菜多糖的表征与抗氧化活性分析[J]. 食品工业科技, 2022, 43(12): 54-61.
- LIU Y Z, LIU P Y, ZHAO Y M, et al. Characterization and antioxidant activity analysis of polysaccharides from day lily[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(12): 54-61.
- [12] 王轶帆, 邓媛元, 张雁, 等. 龙眼多糖与燕麦多糖的结构特征及其益生活性比较[J]. 中国食品学报, 2020, 20(12): 62-71.
- WANG Y F, DENG Y Y, ZANG Y, et al. Comparison of structural characteristics and beneficial properties of longan polysaccharides and oat polysaccharides [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(12): 62-71.
- [13] 王思琪, 胡彦波, 翟丽媛, 等. 豆渣可溶酸性多糖的分离纯化及结构解析[J]. 食品科学, 2021, 42(10): 52-57.
- WANG S Q, HU Y B, ZHAI L Y, et al. Purification and structure analysis of soluble acidic polysaccharides from soybean dregs[J]. Food Science, 2021, 42(10): 52-57.
- [14] ZHENG C P, DONG Q, CHEN H J, et al. Structural characterization of a polysaccharide from *Chrysanthemum morifolium* flowers and its antioxidant activity[J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 130: 113-121.
- [15] 张武霞, 胡懿化, 何嘉琦, 等. 两种泽兰酸性多糖的结构和生物活性[J]. 食品科学, 2022, 43(9): 95-102.
- ZHANG W X, HU Y H, HE J Q, et al. Structures and biological activities of two acidic polysaccharides from Lycopi Herba[J]. Food Science, 2022, 43(9): 95-102.
- [16] 袁博, 卜伟, 戴威威, 等. 紫甘薯多糖分离、组分鉴定及抗氧化代谢机理[J]. 食品科学, 2022, 43(15): 69-78.
- YUAN B, BU W, DAI W W, et al. Isolation and structural characterization of an antioxidant polysaccharide from purple sweet potato and metabonomic evaluation of its antioxidant mechanism[J]. Food Science, 2022, 43(15): 69-78.
- [17] 刘韞滔, 李林键, 李诚, 等. 两种富硒黄牛肝菌伞多糖的制备、表征及其抗氧化活性[J]. 食品科学, 2022, 43(7): 31-37.
- LIU Y T, LI L J, LI C, et al. Preparation, characterization and antioxidant activity of two selenium-enriched polysaccharides from *Suillellus luridus* [J]. Food Science, 2022, 43(7): 31-37.
- [18] 陈栅, 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 S, FENG R F, YUAN Y, et al. Study on carboxylation modification and activity of polysaccharide acid jujube[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(4): 55-66.
- [19] JIANG L, WANG W J, WEN P W, et al. Two water-soluble polysaccharides from mung bean skin: Physicochemical characterization, antioxidant and

- antibacterial activities[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 100: 105412.
- [20] BENZIE I F F, STRAIN J J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': The FRAP assay[J]. *Analytical Biochemistry*, 1996, 239(1): 70-76.
- [21] 陈红, 王大为, 李侠, 等. 不同方法提取大豆多糖的工艺优化研究[J]. *食品科学*, 2010, 31(4): 6-10. CHEN H, WANG D W, LI X, et al. Study on the optimization of extraction process of soybean polysaccharide by different methods [J]. *Food Science*, 2010, 31(4): 6-10.
- [22] ZHANG C H, YU Y, LIANG Y Z, et al. Purification, partial characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Glycyrrhiza uralensis* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 79: 681-686.
- [23] 聂琳然, 郝利民, 王滔滔, 等. 不同来源红缘拟层孔菌粗多糖的抗氧化活性[J]. *食品科学*, 2019, 40(19): 60-68. NIE L R, HAO L M, WANG T T, et al. Antioxidant activity of crude polysaccharides from *Fomitopsis pinicola* from different geographical origins [J]. *Food Science*, 2019, 40(19): 60-68.
- [24] 张瑞平, 任昭辉, 张皓楠, 等. 香加皮多糖的分离纯化、单糖组成及其抗氧化活性研究[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(13): 71-78. ZHANG R P, RENG Z H, ZHANG H N, et al. Isolation, purification, monosaccharide composition and antioxidant activity of polysaccharides from cortex periplocae[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2023, 44(13): 71-78.
- [25] 尹术华, 吴文英, 宋也好, 等. 白扁豆非淀粉多糖的理化性质、抗氧化活性及其抑菌性能[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(19): 39-44. YIN S H, WU W Y, SONG Y H, et al. Physicochemical properties, antioxidant and antibacterial capacities of non-starch polysaccharide from *Dolichos lablab* L. [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(19): 39-44.
- [26] MENG L, SUN S S, LI R, et al. Antioxidant activity of polysaccharides produced by *Hirsutella* sp. and relation with their chemical characteristics [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 117: 452-457.
- [27] 张曼, 张宇, 徐少博, 等. 平贝母多糖铁配合物的合成、结构特征及抗氧化活性[J]. *食品科学*, 2020, 41(6): 36-42. ZHANG M, ZHANG Y, XU S B, et al. Preparation, structural characteristics and antioxidant activity of polysaccharide-iron complex from *Fritillaria ussuriensis*[J]. *Food Science*, 2020, 41(6): 36-42.
- [28] WANG K J, GUO J T, CHENG J X, et al. Ultrasound-assisted extraction of polysaccharide from spent *Lentinus edodes* substrate: Process optimization, precipitation, structural characterization and antioxidant activity[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 191: 1038-1045.
- [29] 邓芹英, 刘岚, 邓慧敏. 波普分析教程[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 74-75. DENG Q Y, LIU L, DENG H M. Pop analysis tutorial[M]. Beijing: Science Press, 2007: 74-75.
- [30] MA C L, BAI J W, SHAO C T, et al. Degradation of blue honeysuckle polysaccharides, structural characteristics and antiglycation and hypoglycemic activities of degraded products[J]. *Food Research International*, 2021, 143: 110281.
- [31] 艾于杰. 抗氧化活性茶多糖构效关系研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2019. AI Y J. Study on the structure-activity relationship of antioxidant tea polysaccharides[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2019.
- [32] 教小磐, 刘云. 甜茶叶多糖的表征、体外抗氧化活性与体内毒性[J]. *食品科学*, 2020, 41(15): 201-207. JIAO X Q, LIU Y. Characterization, antioxidant activity *in vitro* and toxicity *in vivo* of polysaccharides from *Rubus suavissimus* S. Lee leaves[J]. *Food Science*, 2020, 41(15): 201-207.
- [33] 景永帅, 张丹参, 吴兰芳, 等. 远志多糖的分离纯化、结构特征及生物活性[J]. *食品科学*, 2017, 38(17): 126-131. JING Y S, ZHANG D S, WU L F, et al. Purification and structural characterization of polysaccharide from *Polygala tenuifolia* and its biological activity[J]. *Food Science*, 2017, 38(17): 126-131.
- [34] WEI C Y, HE P F, HE L, et al. Structure characterization and biological activities of a pectic polysaccharide from cupule of *Castanea henryi* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 109: 65-75.
- [35] 王帅, 赵冬雪, 韩成凤, 等. 6种活性多糖的结构、性质及其抗氧化活性的比较研究[J]. *食品研究与开发*, 2021, 42(16): 7-15.

- WANG S, ZHAO D X, HAN C F, et al. A comparative study on the structure, properties and antioxidant activity of six active polysaccharides [J]. Food Research And Development, 2021, 42(16): 7-15.
- [36] 杨强, 王柱, 盖智涵, 等. 超声辅助提取豇豆多糖的优化及体外抗氧化研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2021, 52(2): 224-231.
- YANG Q, WANG Z, GAI Z H, et al. Optimization of ultrasonic assisted extraction of cowpea polysaccharide and study on its anti-oxidation *in vitro* [J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2021, 52(2): 224-231.
- [37] 辛玥, 宋萧萧, 王玉箫, 等. 豇豆不同部位多糖结构特征及抗氧化性能比较[J]. 食品科学, 2022, 43(16): 61-67.
- XIN Y, SONG X X, WANG Y X, et al. Comparison of structural characteristics and antioxidant properties of polysaccharides from different parts of cowpea [J]. Food Science, 2022, 43(16): 61-67.

Structural Characteristics and Antioxidant Activities of Crude Polysaccharides from Fermented Bean Flour by *Lactobacillus casei*

Qu Yaning¹, Xu Mengyue¹, Li Hui¹, Wang Lu¹, Guo Rui², Wang Hongbo^{1,2*}

¹Research Center of Food Nutrition and Safety, School of Life Sciences, Jiangnan University, Wuhan 430056

²Hubei Province Engineering Research Center for Legume Plants, Wuhan 430056

Abstract In this study, the samples of crude polysaccharides were prepared from 8 kinds of fermented bean flour by *Lactobacillus casei*, and the yield, structural characteristics and antioxidant activities of these crude polysaccharides were compared and analyzed. The results showed that the yields of crude polysaccharides were between 1.07% and 11.42%, and the yield of crude polysaccharides from fermented red bean flour showed the highest value (11.42%). All of the crude polysaccharides contained uronic acid, and the uronic acid in crude polysaccharides from fermented kidney bean flour showed the highest content 7.46%. The molecular weight of main polysaccharides was between 0.35-36.67 ku, and the crude polysaccharides from fermented mung bean flour contained the most types of polysaccharide molecules. The crude polysaccharides were composed of mannose, glucuronic acid, glucose, galactose, xylose and arabinose with different contents. The apparent form of crude polysaccharides was flaky, loose and irregular, and the crude polysaccharide from fermented mung bean flour showed the highest degree of looseness. The infrared spectra of crude polysaccharides from 8 kinds of fermented bean flour was consistent with the characteristic absorption of polysaccharide compounds. The crude polysaccharides from 8 kinds of fermented bean flour showed different antioxidant activities: the IC₅₀ values for scavenging DPPH radical of fermented lentil and crude mung bean polysaccharides were 0.07 mg/mL and 0.98 mg/mL, respectively, the crude polysaccharides from fermented lentil flour had the best scavenging effect on DPPH radical. The IC₅₀ value for scavenging ABTS radical cation of crude polysaccharides from fermented mung bean flour was 0.67 mg/mL, which showed the best scavenging ability for ABTS radical cation and crude polysaccharides from mung bean flour also showed the highest reduction ability to iron ions. Compared with the crude polysaccharides from 8 kinds of fermented bean flour by *Lactobacillus casei*, the crude polysaccharides from fermented mung bean flour showed the best antioxidant activity. It provided an important theoretical basis for the nutritional evaluation of fermented bean foods by *Lactobacillus casei*.

Keywords fermented bean flour; crude polysaccharide; structural characteristics; antioxidant activity