DOI:10.12441/spyswjs.20240819002 [文章编号] 1673-1689(2025)11-0078-12

酸枣多糖及其降解物的生物活性比较

周春伶[1] 黄小燕[1] 郑 萱[1] 张 菊[1,2*]

(1. 河北经贸大学生物科学与工程学院,河北 石家庄 050061; 2. 河北省农林科学院经济作物研究所,河北 石家庄 050041)

摘要:【目的】研究比较酸枣多糖(*Ziziphus jujuba* polysaccharide,ZJP)及其不同降解产物在化学组成和生物活性上的差异。**【方法】**采用*α-L*-鼠李糖苷酶、纤维素酶、蜗牛酶、三氟乙酸对ZJP进行降解,制备不同的酸枣多糖降解产物ZJP-R、ZJP-C、ZJP-S、ZJP-T,比较其化学组成及降解效果。在体外抗氧化、益生活性检测的基础上,以秀丽隐杆线虫为模型系统比较了不同降解处理对ZJP在体内抗氧化、抗衰老、抗应激及神经保护活性上的差异。**【结果】**不同降解处理方式下的ZJP中还原糖质量分数及平均聚合度差异显著。此外,Sephadex G-50凝胶层析洗脱图谱显示ZJP-S含有更多不同相对分子质量的低聚糖片段。体外活性结果显示,降解处理可显著提高ZJP的自由基清除能力、总还原力和促益生菌生长活性。体内活性结果显示,ZJP及其降解物给药处理可显著降低秀丽隐杆线虫体内氧化应激条件下的ROS积累,增强SOD酶活力,降低MDA质量摩尔浓度,延长秀丽隐杆线虫寿命,减少脂褐素的积累,增强热应激、急性氧化应激抵抗能力。ZJP降解后生物活性提高,尤其是ZJP-S在多个指标评价中活性效果最显著。此外,ZJP-C及ZJP-S在亨廷顿病和阿尔茨海默病模型秀丽隐杆线虫中均表现出显著的神经保护活性。**【结论】**降解处理可增强ZJP的生物活性,其中ZJP-S更好的生物活性可能与蜗牛酶降解产生更丰富的低聚糖及还原糖片段相关,该研究为酸枣资源的开发利用提供了参考。

关键词:酸枣多糖;降解;秀丽隐杆线虫;生物活性

Comparison of the Bioactivities of *Ziziphus jujuba* Polysaccharide and Its Degradation Products

ZHOU Chunling[1] *HUANG Xiaoyan*[1] *ZHENG Xuan*[1] *ZHANG Ju*[1,2*]

(1. College of Bioscience and Engineering, Hebei University of Economics and Business, Shijiazhuang 050061, China; 2. Institute of Cash Crops, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050041, China)

Abstract: [**Objective**] This study aims to compare *Ziziphus jujuba* polysaccharide (ZJP) and its degradation products in terms of their chemical composition and bioactivities. [**Method**] ZJP was degraded by *α-L*-rhamnosidase, cellulase, snail enzyme, and trifluoroacetic acid to prepare different degradation products (ZJP-R, ZJP-C, ZJP-S, and ZJP-T), and the chemical composition and degradation effects were compared. On the basis of *in vitro* antioxidant and probiotic activities, the *in vivo* antioxidant, anti-aging, anti-stress, and neuroprotective activities of ZJP and its degradation products were compared with *Caenorhabditis elegans* as a model system. [**Result**] The mass fraction of reducing sugar and average degree of polymerization of ZJP showed significant variations among different degradation treatments. In addition, Sephadex G-50 gel chromatography elution profile showed that ZJP-S had more oligosaccharide fragments with different relative molecular mass. *In vitro* assays

基金项目:河北省自然科学基金面上项目(H2024207001);河北省中央引导地方科技发展资金(226Z2801G);河北省重点研发计划项目(23372509D);河北省高等学校科学技术研究项目(QN2024151)。

通信作者:张菊(1987—),女,博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事食品营养与健康研究。E-mail: juzi437163804@163.com

收稿日期:2024-08-19 **修回日期:**2024-11-06

demonstrated that degradation treatments significantly enhanced the free radical scavenging ability and total reducing power of ZJP and the growth activity of probiotics exposed to ZJP. *In vivo* assays in *C. elegans* revealed that the treatments with ZJP and its degradation products significantly reduced the reactive oxygen species (ROS) accumulation, enhanced the superoxide dismutase (SOD) activity, and decreased the malondialdehyde (MDA) molality of *C. elegans* under oxidative stress. Furthermore, the treatments prolonged the lifespan, reduced the lipofuscin accumulation, and enhanced the resistance to heat stress and acute oxidative stress. ZJP demonstrated improved bioactivity after degradation, with ZJP-S exhibiting the most significant effects across multiple indicators. Additionally, both ZJP-S and ZJP-C showed significant neuroprotective activity in the *C. elegans* models of Huntington disease and Alzheimer's disease. [**Conclusion**] Degradation treatment enhanced the bioactivity of ZJP. The greater bioactivity of ZJP-S might be associated with the more abundant oligosaccharides and reducing sugars from snail enzyme degradation. The findings provide a reference for the development and utilization of *Z. jujuba* resources.

Keywords: *Ziziphus jujuba* polysaccharide; degradation; *Caenorhabditis elegans*; bioactivity

酸枣是鼠李科枣属植物酸枣（*Ziziphus jujuba* var. *spinosa*（Bunge）Hu ex H. F. Chow）的干燥成熟果实，广泛分布于中国北方地区，属于常用的药食同源中药材[1]。目前，关于酸枣的研究主要集中在酸枣仁，酸枣果肉通常作为废弃组织被丢弃[2]。酸枣果肉中富含维生素、多糖、有机酸、黄酮等多种活性成分[3]，其中多糖主要以鼠李糖、半乳糖、葡萄糖醛酸、阿拉伯糖组成[4]，单糖间以β-糖苷键连接[5]，具有抗氧化、抗结肠炎、免疫调节等多种功效[6-7]。由于相对分子质量大的多糖不能穿越机体的各种屏障，因此许多天然多糖并不能表现出理想的生物活性。而多糖降解物，具有相对分子质量小、黏度低、生物利用度高等优点[8]。

目前多糖降解的方法主要有化学降解法、物理降解法和生物降解法。化学降解法主要通过稀酸溶液水解多糖中的糖苷键，具有生产成本低，操作简易，易于实现工业化生产等优点。刘昊等[9]利用稀酸溶液降解枸杞多糖制备枸杞低聚糖，与枸杞多糖相比，所得枸杞低聚糖具有更好的体外抗氧化活性和促益生菌增殖活性。生物降解也称酶降解法，主要通过酶特异性地切断多糖中的糖苷键得到均一的产物，具有催化条件温和，易于控制，副产物少等优点。季珂等[10]利用酶法制备得到聚合度2~4的低相对分子质量的壳寡糖，该壳寡糖可与阿霉素协同发挥抗肿瘤活性。

目前，基于酸枣果肉的开发利用较少，每年有大量酸枣果肉被丢弃，且国内外关于酸枣果肉多糖抗衰老、抗应激、神经保护活性的研究较少，更鲜有降解酸枣多糖的报道。作者通过水提醇沉法制备酸枣多糖，在前期试验的基础上，选择市场上3种主要的商品化酶（α-*L*-鼠李糖苷酶、纤维素酶、蜗牛酶）和三氟乙酸对酸枣多糖进行降解，并对其降解效果进行评价。通过体外抗氧化、促益生菌生长、抗衰老、抗氧化应激、抗热应激、抗亨廷顿病（Huntington disease，HD）和抗阿尔茨海默病（Alzheimer's disease，AD）活性试验对酸枣果肉多糖及其降解物的生物活性进行比较。以期拓宽酸枣果肉多糖的应用范围，为酸枣果肉的开发与利用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

酸枣：购自河北邢台，经河北省农林科学院药用植物研究中心谢晓亮研究员鉴定为鼠李科枣属植物酸枣（ *Ziziphus jujuba* var. *spinosa*（Bunge）Hu ex H. F. Chow）的干燥成熟果实；秀丽隐杆线虫（*Caenorhabditis elegans*，以下简称"线虫"，野生型N2，转基因型HA759、CL2355、CL2122）、大肠杆菌OP50（*Escherichia coli* OP50）：美国明尼苏达大学线虫遗传中心；植物乳植杆菌（*Lactobacillus plantarum*）、乳酸片球菌（*Pediococcus acidilactici*）：河北经贸大学微生物保藏中心。

α-*L*-鼠李糖苷酶：郑州宇控生物科技有限公司；纤维素酶、蜗牛酶：北京索莱宝科技有限公司；2',7'-二氯荧光素二乙酸酯（DCFH-DA）、双乙酰：美国西格玛奥德里奇公司；1,1-二苯基-2-三硝基苯肼（DPPH）、三氟乙酸：上海麦克林生化科技

股份有限公司；BCA 蛋白质浓度测定试剂盒、总 SOD 活性检测试剂盒（WST-8 法）、活性氧（ROS）检测试剂盒、脂质氧化（MDA）检测试剂盒：上海碧云天生物技术有限公司；其余试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

荧光倒置显微镜：B-510LD4 型，意大利 OPTIKA 公司；多功能酶标仪：SpectraMax iD5 型，美国 Molecular Devices 公司；紫外-可见分光光度计：2L5V177202 型，美国 Thermo Fisher 公司；真空冷冻干燥机：FDS-2000 型，日本东京理化器械株式会社。

1.3 试验方法

1.3.1 酸枣多糖及其降解物的制备

1）酸枣多糖制备：酸枣果实洗净晾干、去核、粉碎后，称取酸枣肉粉末 100 g，按料液比 1 g∶5 mL 加入体积分数 95% 乙醇，80 ℃冷凝回流 2 h，除去脂溶性成分。收集酸枣果肉滤渣，加入 1 000 mL 蒸馏水，80 ℃水浴浸提 2 h，纱布粗滤，收集滤液，重复提取 3 次，合并滤液后 50 ℃减压浓缩至 200 mL，5 000 r/min 离心 10 min，取上清，加入无水乙醇 800 mL，静置过夜，抽滤后将沉淀溶解于适量的蒸馏水中，Sevage 法脱蛋白质 4 次，再次醇沉过夜，抽滤收集多糖沉淀，真空冷冻干燥（4.0 Pa、−80 ℃）48 h 后得到酸枣多糖（ZJP）2.63 g，多糖得率为 2.63%。

2）酶法降解：称取酸枣多糖 200 mg 溶于 100 mL 蒸馏水，根据预试验，分别加入 40 mg *α*-*L*-鼠李糖苷酶、纤维素酶、蜗牛酶进行酶解，置于 45 ℃恒温摇床中，反应 4 h 后，100 ℃水浴加热 10 min，使酶失去活性。冰水冷却溶液至室温后，减压浓缩并离心，收集上清液。真空冷冻干燥（4.0 Pa、−80 ℃）48 h 后得到不同的酸枣多糖酶解产物，分别命名为 ZJP-R、ZJP-C、ZJP-S。

3）酸法降解：称取酸枣多糖 200 mg，加入浓度为 0.5 mol/L 的三氟乙酸 100 mL，于 100 ℃下水解 2 h 后，减压蒸干溶液，加入甲醇清洗，再减压蒸干，重复清洗步骤 3 次，完全除去三氟乙酸后，蒸馏水重溶，真空冷冻干燥（4.0 Pa、−80 ℃）48 h 后得到酸枣多糖三氟乙酸降解物（ZJP-T）。

1.3.2 ZJP 及其降解物化学组成测定

参照胡腾根[11]的方法，测定总糖质量分数（微孔板苯酚-硫酸法）、还原糖质量分数（3，5-二硝基水杨酸法），以及对不同样品的平均聚合度（average degree of polymerization，DPa）。采用考马斯亮蓝法测定蛋白质质量分数[12]。参照余菲等[13]的方法，以系列浓度的芦丁标准溶液为参照，采用分光光度法测定各样品中的黄酮质量分数。采用 Folin-Ciocalteu 法测定各样品的总酚质量分数。

1.3.3 ZJP 降解效果测定

采用 Sephadex G-50 凝胶层析柱对不同降解方式下 ZJP 的降解效果进行评价。取质量浓度为 10 g/L 的 ZJP 及其降解物溶液 2 mL，过 0.45 μm 微孔滤膜后，将样品加入凝胶柱，用超纯水洗脱，收集洗脱液，洗脱液流量 0.25 mL/min，每管收集 3 mL，用微孔板苯酚-硫酸法测定总糖质量分数，绘制洗脱曲线。

1.3.4 ZJP 及其降解物体外抗氧化活性测定

参照刘宇等[14]的方法，对 DPPH 自由基、羟自由基、超氧阴离子自由基清除率以及总还原力进行测定。配制系列质量浓度梯度的样品溶液，以 VC 作为阳性对照。

1.3.5 ZJP 及其降解物促益生菌生长活性测定

参照吴雨炯等[15]和董婷等[16]的方法，取培养活化 48 h 的植物乳植杆菌、乳酸片球菌菌液 100 μL，接种于 5 mL 含不同质量浓度样品的培养基中，混匀，37.5 ℃恒温培养 24 h 至稳定期，以菊粉为阳性对照，不加样品、菊粉的 MRS 培养基为空白对照组。测定波长 600 nm 处的吸光度。

1.3.6 ZJP 及其降解物体内活性测定

1）线虫同期化及培养：参照 Li 等[17]的方法，采用次氯酸钠裂解法将线虫同步化至 L1 期。将同步化至 L1 期的线虫转移到含有（样品质量浓度为 2 g/L）或不含有样品的线虫固体培养板（nematode growth medium，NGM）中培养。

2）抗氧化活性测定：待 L1 期线虫 N2 在对应 NGM 板中生长 48 h 后，选用百草枯溶液进行氧化造模，除空白对照组外，将线虫转移至含有样品及终浓度为 15 mmol/L 百草枯的 NGM 板中，模型组中的样品溶液用蒸馏水代替。培养 24 h 后，收集并清洗线虫至 EP 管中，加入裂解液匀浆后，4 ℃、5 000 r/min 离心 10 min，取上清液。根据 BCA 蛋白质浓度测定结果，参照试剂盒说明书对 ROS 水平、SOD 酶活力、MDA 质量摩尔浓度进行测定。

3）抗衰老活性测定：寿命试验每组挑取30条L1期线虫N2至对应的NGM板中，当线虫产卵或板中出现污染时，及时将线虫转至新的对应NGM板中，每天记录线虫存活情况，直至所有线虫死亡。根据线虫生存和死亡的时间绘制生存曲线。脂褐素试验线虫准备方法同寿命试验，待线虫培养15 d后，收集线虫，并加入体积分数2%异氟烷溶液将其麻醉，吸取线虫置于载有质量分数2 g/dL琼脂糖的载玻片上，使用倒置荧光显微镜观察其红色自发荧光（激发波长530 nm，发射波长590 nm）强度并拍摄单条线虫照片，同时挑取30条存活线虫转至黑色96孔板，使用多功能酶标仪测定其荧光强度。

4）抗应激能力测定：每试验组取30条给药处理72 h的线虫N2分别置于对应新的NGM培养基（热应激试验）和含体积分数0.1% H_2O_2溶液的NGM培养基（急性氧化应激试验）中，热应激试验需将线虫置于37 ℃培养箱中培养。每隔1 h记录线虫存活情况直至全部死亡，并绘制生存曲线。

5）抗HD活性测定：神经元存活试验参照Wang等[18]的方法，L1期线虫HA759在对应NGM培养基中生长72 h后，收集线虫，于荧光显微镜下统计线虫咽部两侧与头部感觉（amphid sensory neuron of the head，ASH）神经元共表达的绿色荧光蛋白（green fluorescent protein，GFP）荧光点数目。ASH神经元的存活与否可通过与神经元共表达的GFP荧光点来判断，GFP消失代表神经元死亡。正常情况下，2个ASH神经元处于存活状态，可在线虫咽部两侧观察到2个GFP荧光点，经过72 h的培养，由于多聚谷氨酰胺（PolyQ）表达聚集产生的毒性作用，线虫HA759的ASH神经元可能受损或死亡，导致共表达的GFP荧光点缺失。每个试验组统计30条线虫，按式（1）计算神经元存活率，同时对各处理组中线虫的ROS水平进行测定。

$$N=\frac{A}{A+B}\times 100\% \quad (1)$$

式中：

N——神经元存活率，%；

A——存活的神经元数量，个；

B——死亡的神经元数量，个。

线虫HA759中的ASH神经元属于化学感觉神经元的一种，调控着线虫对高渗溶液（甘油）的回避行为。当ASH神经元因PolyQ的聚集损伤死亡后，线虫对高渗溶液的回避能力消失，线虫将会在引诱剂的诱导下，跨越高渗溶液区。线虫HA759避化行为学试验需提前准备测试平板：取30 μL浓度为8 mol/L的高渗甘油溶液将9 cm的NGM板（不涂菌）均分为正常侧和引诱侧。将收集的线虫HA759（处理方法同神经元存活试验）约200条均匀滴加在正常侧中间，待其适应1 min后，于引诱侧距平板边缘1 cm位置滴加2 μL引诱剂（双乙酰溶液），盖上平板盖，转移测试平板至23 ℃恒温培养箱中培养1.5 h，取出，显微镜下统计两侧的线虫数量，按式（2）计算避化率。

$$R=\frac{A}{A+B}\times 100\% \quad (2)$$

式中：

R——避化率，%；

A——测试平板正常侧线虫数量，条；

B——测试平板引诱侧线虫数量，条。

6）抗AD活性测定：参照Zhang等[19]的方法，将同步化的L1期线虫CL2122（无Aβ）、CL2355（表达$A\beta_{1\text{-}42}$）置于对应的NGM培养基中，在15 ℃下培养36 h后转至23 ℃培养箱中培养36 h，收集、清洗线虫后，将线虫均匀滴加在9 cm趋化琼脂板的中心线上，琼脂板被分为正常侧和引诱侧。于引诱侧“引诱点”滴加2 μL异氟烷和气味剂（体积分数为0.1%的苯甲醛乙醇溶液），在相反的位置，加入2 μL异氟烷和无水乙醇溶液。盖上平板盖，转移平板至25 ℃恒温培养箱中培养1 h，取出，显微镜下统计两侧线虫数量，按式（3）计算趋化指数。

$$I=\frac{B-A}{A+B} \quad (3)$$

式中：

I——趋化指数；

A——测试平板正常侧线虫数量，条；

B——测试平板引诱侧线虫数量，条。

1.4 数据处理与分析

试验重复测定3次，结果以平均值±标准差（mean±SD）表示。采用GraphPad Prism 8对试验数据进行处理分析并作图，图、表中用不同符号表示各组之间的差异。

2 结果与讨论

2.1 ZJP及其降解物化学组成分析

ZJP及其降解物化学组成分析结果如表1所示。ZJP中蛋白质、黄酮、多酚的质量分数较低，分别为（5.82±0.51）%、（6.69±1.80）%、（0.54±0.04）%，样品纯度较高。DPa的高低反映了聚合物的大小和长度，高DPa的多糖分子含有的重复单元数量较多，结构复杂，具有较高的黏度和强度；低DPa表示多糖已被部分分解为低聚糖或寡糖，有利于生物体的吸收和利用[11]。不同降解处理对ZJP的总糖、蛋白质、黄酮、多酚质量分数无显著影响，但可显著增加还原糖的质量分数、降低DPa，表明降解处理可有效断裂ZJP中的糖苷键，将多糖转化为低相对分子质量的糖。

表1 ZJP及其降解物化学组成

Table 1 Chemical composition of ZJP and its degradation products

样品	总糖质量分数/%	还原糖质量分数/%	蛋白质质量分数/%	黄酮质量分数/%	多酚质量分数/%	DPa
ZJP	52.52±0.95	11.37±0.73	5.82±0.51	6.69±1.80	0.54±0.04	4.64±0.37
ZJP-R	50.36±0.94	22.94±1.27***	4.92±0.98	6.07±0.44	0.56±0.04	2.20±0.09***
ZJP-C	51.62±1.07	34.70±1.77***	5.77±0.71	6.26±0.65	0.54±0.04	1.49±0.07***
ZJP-S	50.95±1.88	28.98±1.72***	4.31±0.63	5.82±0.62	0.50±0.04	1.76±0.17***
ZJP-T	51.55±1.20	37.06±2.01***	4.10±0.57	4.02±0.59	0.32±0.03	1.39±0.10***

注：“***”表示与ZJP相比差异极其显著（P<0.001）。

2.2 ZJP降解效果评价

为评价不同降解方式下ZJP的降解效果，使用Sephadex G-50凝胶层析柱对不同样品进行洗脱。首先通过由ZJP、蔗糖、葡萄糖溶液组成的混合溶液考察Sephadex G-50对多糖、低聚糖及单糖的分离效果，见图1。如图1（a）所示，酸枣多糖最先出峰，其次是蔗糖，最后是葡萄糖，3个混合组分被较好地分离。因此，可根据Sephadex G-50凝胶层析柱洗脱图谱评价ZJP的降解效果，即洗脱图谱中吸收峰越多，降解效果越好。如图1（b）所示，ZJP洗脱后可观察到2个吸收峰，表明多糖中含有少量低聚糖，与还原糖测定结果一致。酶法降解条件下，

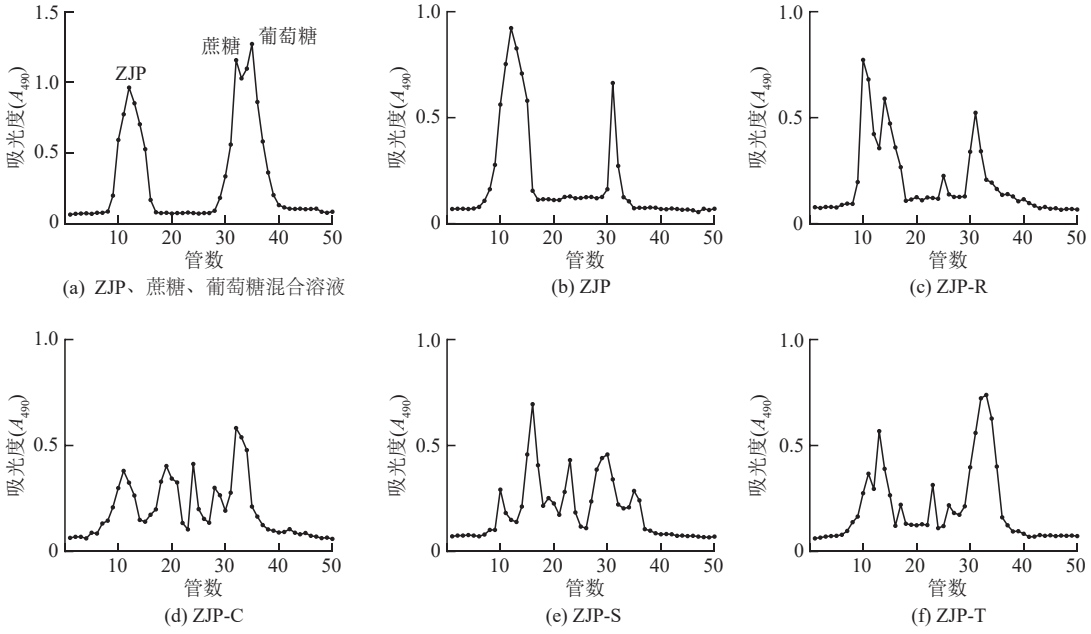


图1 ZJP及其降解物的Sephadex G-50凝胶层析柱洗脱曲线

Fig. 1 Sephadex G-50 column elution curves of ZJP and its degradation products

降解程度由低到高依次是ZJP-R、ZJP-C、ZJP-S和ZJP-T，见图1(c)~(f)，与DPa测定结果一致。ZJP-C和ZJP-S洗脱图谱显示出更多的吸收峰，表明纤维素酶和蜗牛酶对ZJP的降解效果更好，三氟乙酸降解ZJP的程度最高，但ZJP-T含有更多的单糖片段。

2.3　ZJP及其降解物的体外抗氧化活性

氧化应激会引起自由基的大量产生，在加速衰老的同时，还会引发神经退行性疾病、癌症、糖尿病等疾病[20]，因此，对ZJP及其降解物的体外抗氧化活性进行测定，见图2。当质量浓度为2 g/L时，ZJP、ZJP-R、ZJP-C、ZJP-S、ZJP-T的DPPH自由基清除率分别为87.39%、87.35%、88.42%、90.12%、82.66%，见图2(a)。其中，ZJP-S对DPPH自由基的半数效应浓度(EC_{50})值最低(表2)。在质量浓度为5 g/L时，ZJP、ZJP-R、ZJP-C、ZJP-S、ZJP-T的羟自由基清除率分别为58.62%、59.04%、59.30%、57.58%、63.89%，见图2(b)。其中，ZJP-T对羟自由基的EC_{50}值最低(表2)。当质量浓度为5 g/L时，ZJP及其降解物的超氧阴离子自由基清除能力相当，见图2(c)，其中ZJP-S的EC_{50}值最低(表2)。当质量浓度为5 g/L时，ZJP、ZJP-R、ZJP-C、ZJP-S、ZJP-T的总还原力分别为1.78、1.87、1.81、1.80、1.57，见图2(d)。综上所述，ZJP及其降解物可通过增强总还原能力，直接或间接阻断自由基反应并清除过量自由基，在体外表现出显著的抗氧化活性，且降解处理有助于提升ZJP的体外抗氧化活性。

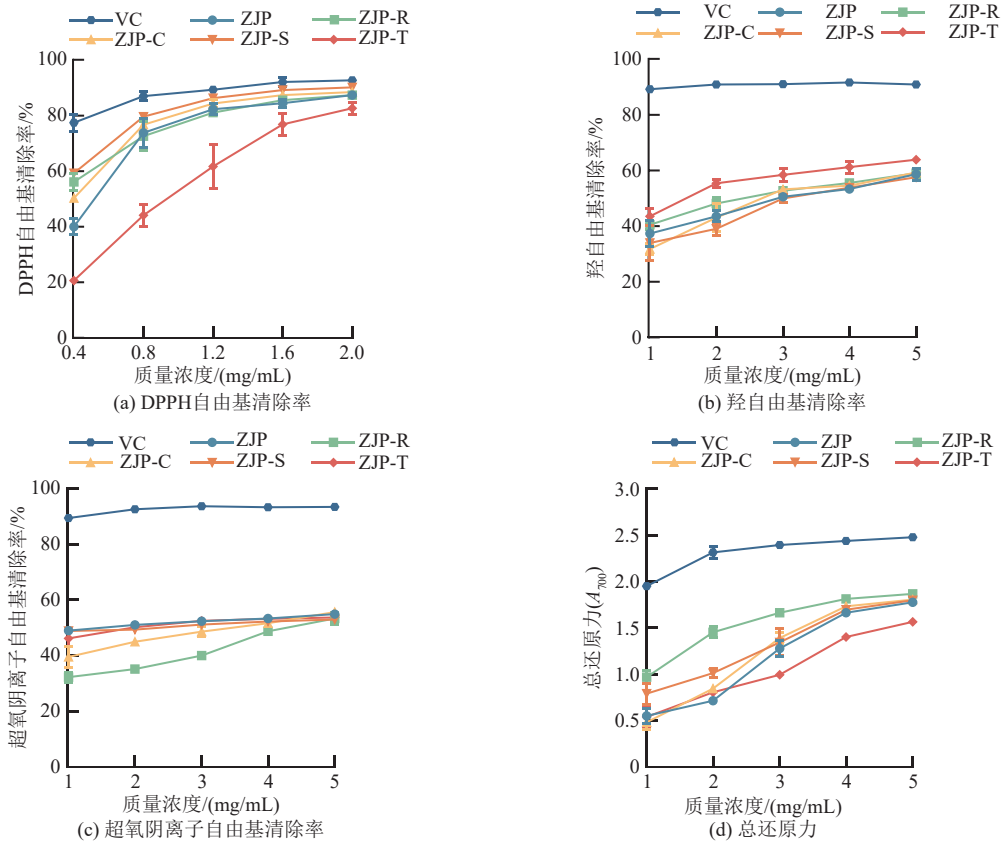


图2　ZJP及其降解物的体外抗氧化活性

Fig. 2　*In vitro* antioxidant activity of ZJP and its degradation products

2.4　ZJP及其降解物的促益生菌生长活性

与多糖相比，低聚糖可被肠道微生物更高效地吸收利用，可通过改变菌群组成及比例，发挥更好的生物活性[21]。以菊粉为阳性对照，选择食品工业中广泛应用的植物乳植杆菌和乳酸片球菌，评估ZJP及其降解物的促益生菌生长活性。如图3所示，在试验范围内，2组益生菌的增殖呈现先增加后降低的趋势，当质量浓度为1 g/L时，益生菌菌液吸光度最高。此时，在植物乳植杆菌中，促益生菌生长活性从高到低依次是ZJP-T、ZJP-S、ZJP-R、ZJP-C、ZJP和菊粉；

对于乳酸片球菌，促益生菌生长活性从高到低依次是ZJP-T、ZJP-R、ZJP-S、ZJP、菊粉和ZJP-C。结果表明，与Control组相比，ZJP及其降解物均能促进植物乳植杆菌和乳酸片球菌的增殖，且ZJP-T对2种益生菌的促生长活性最强。推测与三氟乙酸降解多糖程度最高、益生菌对ZJP-T的利用率更高有关。

2.5　ZJP及其降解物的体内抗氧化活性

基于ZJP及其降解物显著的体外抗氧化和促益生菌生长活性，利用线虫评价其体内生物活性。氧化应激条件下，ROS水平测定结果如图4(a)所示，与Control组相比，Model组线虫体内ROS水平显著升高(P<0.05)，表明氧化胁迫造模成功。与Model组相比，ZJP、ZJP-R、ZJP-C、ZJP-C、ZJP-T组线虫体内的ROS水平分别降低了14.98%、28.35%、43.50%、41.31%、35.84%；ZJP及其降解物给药处理后均可显著增强线虫体内的SOD酶活力、降低MDA质量摩尔浓度，见图4(b)~(c)，与Model组相比，线虫体内SOD酶活力分别升高了28.03%、32.12%、47.34%、51.60%、43.97%；MDA质量摩尔浓度分别降低了30.41%、36.23%、44.93%、42.61%、41.36%。以上结果表明，ZJP

表2　ZJP及其降解物对DPPH自由基、羟自由基、超氧阴离子自由基的EC_{50}值

Table 2　EC_{50} values of ZJP and its degradation products in scavenging DPPH, hydroxyl, and superoxide anion free radicals

样品	EC_{50}值/(mg/mL)		
	DPPH自由基	羟自由基	超氧阴离子自由基
ZJP	0.48±0.04	2.88±0.24	1.76±0.41
ZJP-R	0.32±0.05	2.35±0.06**	4.76±0.35***
ZJP-C	0.38±0.01	2.88±0.14	3.18±0.09***
ZJP-S	0.29±0.01	3.20±0.08	1.41±0.16
ZJP-T	0.89±0.09*	1.53±0.22***	1.97±0.48*

注："*"表示与ZJP相比差异显著(P<0.05)；"**"表示与ZJP相比差异极显著(P<0.01)；"***"表示与ZJP相比差异极其显著(P<0.001)。

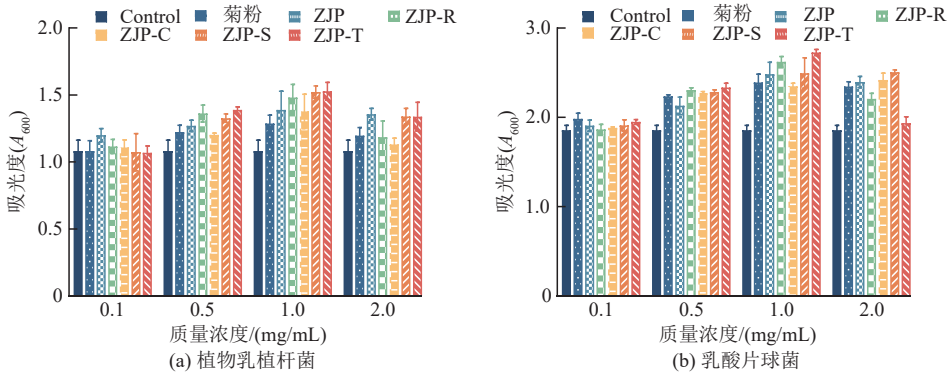
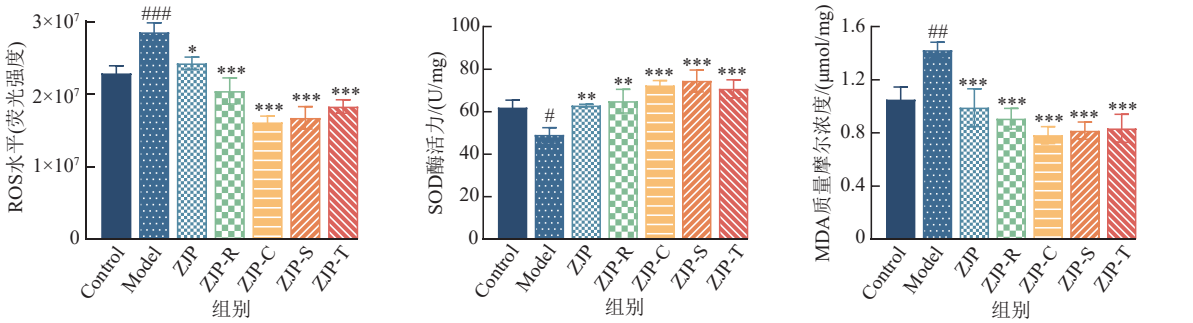


图3　ZJP及其降解物对植物乳植杆菌和乳酸片球菌生长的影响

Fig. 3　Effects of ZJP and its degradation products on the growth of *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus acidilactici*



###—与Control组相比差异极其显著(P<0.001)；*—与Model组相比差异显著(P<0.05)；***—与Model组相比差异极其显著(P<0.001)。(a) ROS水平

#—与Control组相比差异显著(P<0.05)；**—与Model组相比差异极显著(P<0.01)；***—与Model组相比差异极其显著(P<0.001)。(b) SOD酶活力

##—与Control组相比差异极显著(P<0.01)；***—与Model组相比差异极其显著(P<0.001)。(c) MDA质量摩尔浓度

图4　ZJP及其降解物的体内抗氧化活性

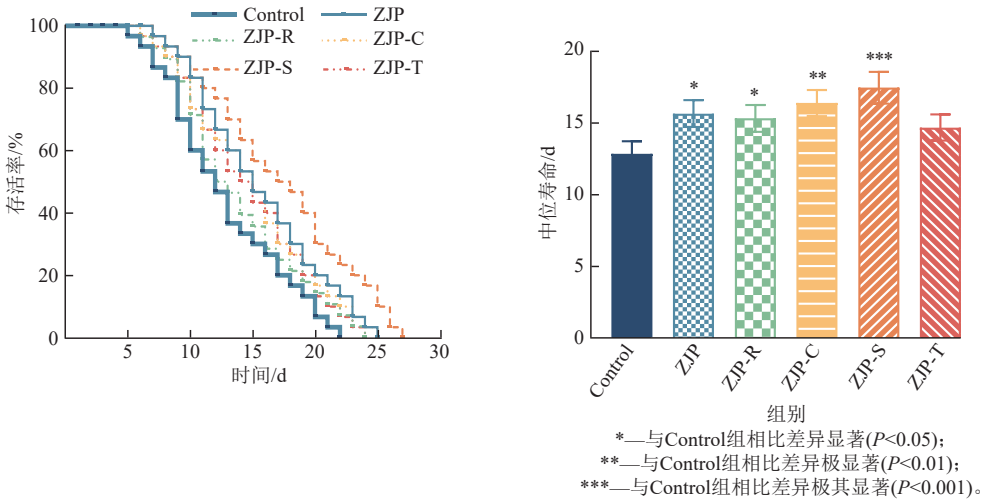
Fig. 4　*In vivo* antioxidant activity of ZJP and its degradation products

及其降解物可通过增强线虫体内SOD酶活力、降低MDA质量摩尔浓度来减少ROS水平，进而发挥体内抗氧化活性，且降解处理可提升ZJP的体内抗氧化活性。

2.6　ZJP及其降解物的抗衰老活性

2.6.1　ZJP及其降解物对线虫寿命的影响

氧化应激理论认为氧化损伤的积累可导致衰老和引发与衰老相关的疾病，样品的抗氧化活性可反映其抗衰老及治疗与衰老相关疾病的潜力[22]。寿命作为衡量衰老的量化指标，在线虫正常生长条件下，Control组线虫的最大寿命和中位寿命分别为22.00、12.77 d，ZJP及其降解物处理组线虫的寿命和中位寿命均有所延长，见图5。ZJP、ZJP-R、ZJP-C、ZJP-S、ZJP-T组的中位寿命分别为15.57、15.24、16.30、17.36、14.60 d，其中ZJP-S组的中位寿命最长，见图5(b)。



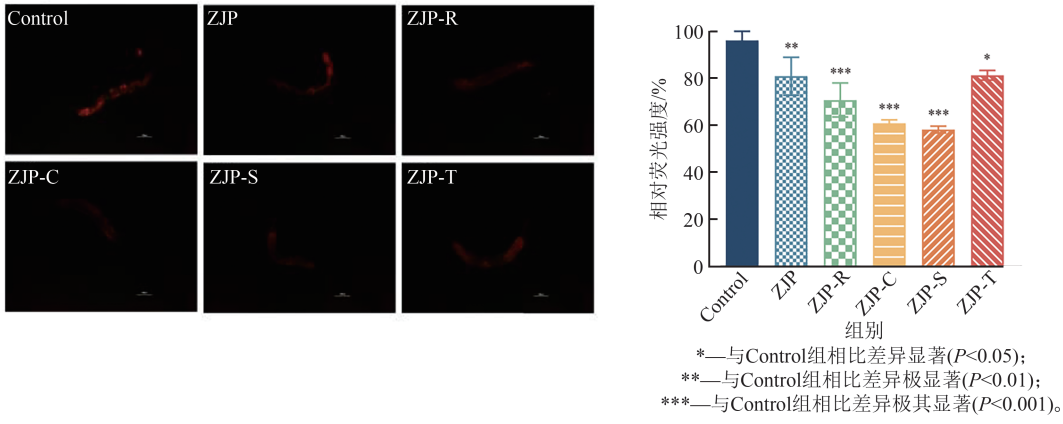
(a) 线虫存活曲线　　(b) 线虫中位寿命

图5　ZJP及其降解物对线虫寿命的影响

Fig. 5　Effects of ZJP and its degradation products on the lifespan of *C. elegans*

2.6.2　ZJP及其降解物对线虫脂褐素积累的影响

在线虫体内，脂褐素会随着年龄的增长而在线虫肠道内积累，脂褐素积累的减少可反映样品的抗衰老作用[23]。给药处理后线虫肠道中的脂褐素的积累明显减少，见图6(a)，与Control组相比，给药组的脂褐素相对荧光强度显著降低，见图6(b)，表明ZJP及其降解物能够显著延长线虫的寿命，减少线虫体内脂褐素的积累，且ZJP-S的抗衰老活性最显著。



(a) 线虫脂褐素的代表性图像(100×)　　(b) 线虫脂褐素积累水平

图6　ZJP及其降解物对线虫脂褐素积累的影响

Fig. 6　Effects of ZJP and its degradation products on the lipofuscin accumulation of *C. elegans*

2.7 ZJP 及其降解物对线虫抗应激能力的影响

热应激和氧化应激已被证明可通过加速生物体内细胞的氧化导致生物衰老[24]。在热应激条件下，与 Control 组相比，给药组线虫生存曲线明显右移，展现出了较好的抗热应激能力，其中 ZJP-S 组的存活时间最长为 17 h，其次是 ZJP-R、ZJP、ZJP-C 和 ZJP-T，见图 7(a)。在急性氧化应激条件下，与 Control 组相比，ZJP 组可延长线虫存活时间 1 h，ZJP 降解物可延长线虫存活时间 2 h，见图 7(b)。试验结果表明，ZJP 及其降解物可通过增强线虫对热应激、急性氧化应激的抵抗能力，延长线虫寿命。

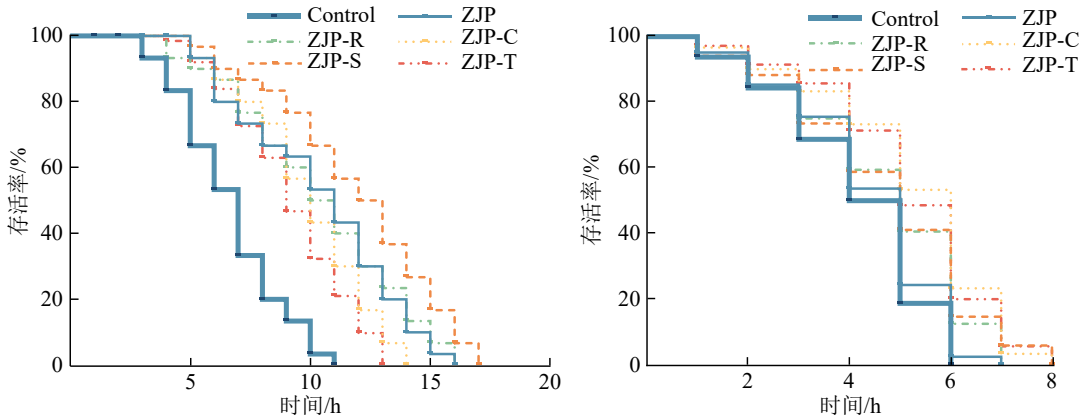


图 7 ZJP 及其降解物对线虫抗应激能力的影响

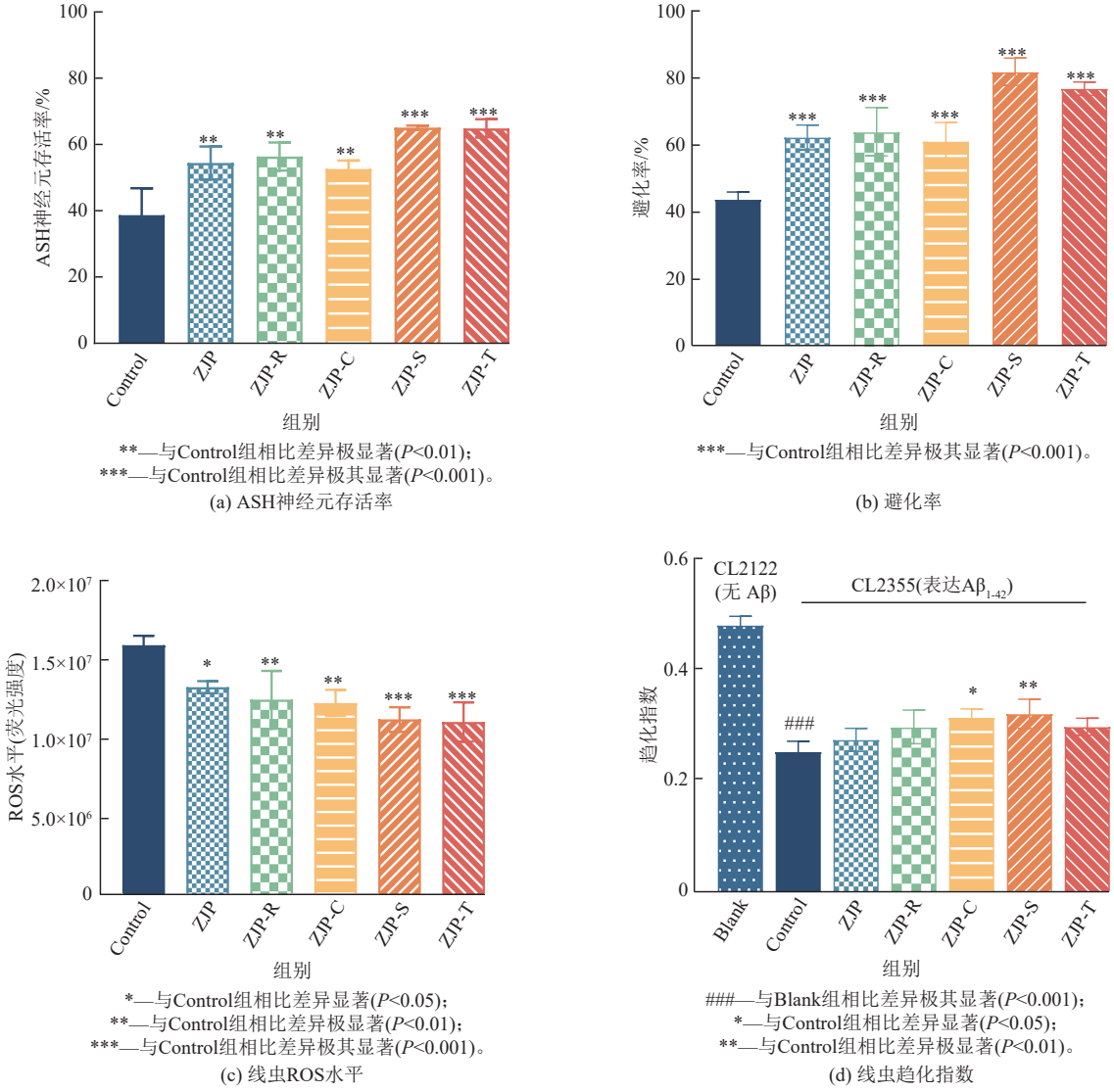
Fig. 7 Effects of ZJP and its degradation products on the stress resistance activity of *C. elegans*

2.8 ZJP 及其降解物对线虫的神经保护活性

基于 ZJP 及其降解物显著的抗氧化、抗衰老、抗应激活性，推测 ZJP 及其降解物同样可能具有缓解神经退行性疾病中蛋白质聚集引起的神经毒性的能力。HD 模型线虫 HA759 在其头部 ASH 神经元中过度表达致病蛋白质，可导致 ASH 神经元退行性衰退和死亡，丢失与 ASH 神经元共表达的荧光标记性状及相应的避化功能[19]。如图 8(a)~(b)所示，在 Control 组中，ASH 神经元存活率和避化率分别为 38.53% 和 43.67%，表明约有 40% 的线虫丧失了 ASH 神经元功能。ZJP 及其降解物给药处理后，与 Control 组相比，ASH 神经元存活率及避化率均显著提高，表现出了良好的 ASH 神经元保护活性，其中 ZJP-S 组的 ASH 神经元被保护得最好。为明确 ZJP 及其降解物的神经保护活性与其抗氧化活性间是否相关，对线虫 HA759 的 ROS 水平进行了测定。如图 8(c)所示，与 Control 组相比，给药处理后线虫 HA759 体内 ROS 水平显著降低，该结果与 ASH 神经元存活试验结果相符，推测 ZJP 及其降解物显著的 ASH 神经元保护活性与其抗氧化活性密切相关。

在 AD 模型线虫 CL2355 的神经元中高度表达 $A\beta_{1\text{-}42}$ 蛋白质，通过温度诱导(23～25 ℃)可加速 Aβ 蛋白质的表达和聚集，大约培养 36 h 后，$A\beta_{1\text{-}42}$ 蛋白质聚集毒性可引起神经元损伤和认知功能障碍，破坏线虫对苯甲醛溶液的敏感性，出现趋化功能障碍[25]。如图 8(d)所示，Blank 组线虫 CL2122 和未给药处理的线虫 CL2355 的趋化指数分别为 0.48 和 0.25，表明未处理的线虫 CL2355 出现了趋化功能障碍。ZJP 及其降解物给药处理后，虽然可以提高线虫 CL2355 的趋化指数，但只有 ZJP-S、ZJP-C 组具有显著性影响，表明 ZJP-S 及 ZJP-C 组给药处理可显著增强线虫的认知能力，减轻 Aβ 蛋白质聚集毒性对线虫神经元的损伤。

综上所述，经不同降解处理后，ZJP 降解物的还原糖质量分数显著增加，低聚糖组成发生变化。ZJP 经降解处理后具有更强的生物活性，且不同的降解处理方式间活性存在差异，推测活性差异与降解程度相关。ZJP 降解后多糖分子链断裂，更多的活性基团暴露在溶液中，降解后的产物相对分子质量更小、水溶性更好、表面积更大、生物利用度更高，使得生物活性提升。李文青等[26]对羊栖菜多糖进行降解，发现小相对分子质量的降解羊栖菜多糖具有更好的降血脂活性。



**—与Control组相比差异极显著(P<0.01)；
***—与Control组相比差异极其显著(P<0.001)。
(a) ASH神经元存活率

***—与Control组相比差异极其显著(P<0.001)。
(b) 避化率

*—与Control组相比差异显著(P<0.05)；
**—与Control组相比差异极显著(P<0.01)；
***—与Control组相比差异极其显著(P<0.001)。
(c) 线虫ROS水平

###—与Blank组相比差异极其显著(P<0.001)；
*—与Control组相比差异显著(P<0.05)；
**—与Control组相比差异极显著(P<0.01)。
(d) 线虫趋化指数

图 8　ZJP 及其降解物对线虫神经保护活性的影响

Fig. 8　Neuroprotective activities of ZJP and its degradation products for *C. elegans*

然而，并非相对分子质量越小越好，Guo 等[27]研究发现，相对分子质量在 49 600 左右的龙须菜多糖降解产物对受损 HK-2 细胞修复作用最强，相对分子质量大于或小于 49 600 的样品的修复能力减弱。在 ZJP 及其降解物中，ZJP-T 的降解程度最高，但其生物活性低于 ZJP-S 和 ZJP-C，推测相对分子质量过小反而会因糖苷键的断裂使生物活性减弱或丢失。此外，在 ASH 神经元存活试验中，ZJP 及其降解物均能发挥显著的神经保护活性，但只有 ZJP-S 和 ZJP-C 具有缓解 Aβ 蛋白质聚集毒性的神经保护活性，推测 ZJP-S、ZJP-C 的神经保护活性可能与降解后的某些特殊结构或片段相关。潘文锋[28]对黄芪多糖进行降解并分级，发现相对分子质量为 3~10 000 组分的神经保护活性最佳，提示中等相对分子质量的黄芪多糖降解物可能是黄芪多糖发挥活性的主要片段。基于降解处理不改变多糖的单糖组成及比例，作者只对 ZJP 的降解效果和生物活性进行了初步分析，未来可对多糖及其降解物的组成、糖苷键连接方式和类型进行深入研究。通过代谢组学、肠道菌群等分析，更加系统地深入探究其体内生物活性机制，为酸枣多糖在食品领域中的开发提供理论依据。

3　结论

作者制备了 4 种不同的酸枣果肉多糖降解物，

通过测定其化学组成、平均聚合度及Sephadex G-50凝胶层析洗脱图谱对降解效果进行了评价，并比较了包括DPPH自由基清除率、羟自由基清除率、总还原力、促益生菌生长、抗氧化、抗衰老、抗急性氧化应激、抗热应激和神经保护在内的多种生物活性。结果表明，ZJP降解物中ZJP-S、ZJP-C的降解效果较好，平均聚合度显著降低，具有更多的低聚糖片段。ZJP降解物在抗氧化、抗衰老、抗急性氧化应激、抗热应激和神经保护活性方面显著增强。ZJP-S表现出最强的DPPH自由基清除率、羟自由基清除率和总还原力。体内试验进一步表明，ZJP-S在延长线虫寿命、减少脂褐素积累、保护ASH神经元及减轻Aβ蛋白质诱导的神经毒性方面效果最为显著，推测其显著的生物活性与其丰富的低聚糖组成有关。本研究为酸枣果肉多糖的开发应用提供了新的方向和依据。

参考文献

[1] 解玉军，李泽，崔小芳，等. 酸枣化学成分及药理作用研究进展[J]. 中成药，2021，43(5)：1269-1275.
XIE Y J，LI Z，CUI X F，et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Ziziphus jujuba* Mill.[J]. Chinese Traditional Patent Medicine，2021，43(5)：1269-1275.(in Chinese)

[2] 段金廒，郭盛，严辉，等. 药材生产过程副产物的价值发现和资源化利用是中药材产业扶贫的重要途径[J]. 中国中药杂志，2020，45(2)：285-289.
DUAN J A，GUO S，YAN H，et al. Value discovery and resource utilization of by-products in production process of medicinal materials are important ways for poverty alleviation with Chinese herbal medicine industry[J]. China Journal of Chinese Materia Medica，2020，45(2)：285-289.(in Chinese)

[3] 杨冲，李宪松，刘孟军. 酸枣的营养成分及开发利用研究进展[J]. 北方园艺，2017(5)：184-188.
YANG C，LI X S，LIU M J. Research progress on chemical constituents and utilization of sour jujube (*Z. acidojujuba* Cheng et Liu)[J]. Northern Horticulture，2017(5)：184-188.(in Chinese)

[4] JI X L，HOU C Y，YAN Y Z，et al. Comparison of structural characterization and antioxidant activity of polysaccharides from jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) fruit[J]. International Journal of Biological Macromolecules，2020，149：1008-1018.

[5] 孙延芳，梁宗锁，单长卷，等. 野生酸枣果硒多糖纯化与光谱分析[J]. 农业机械学报，2011，42(6)：148-151，147.
SUN Y F，LIANG Z S，SHAN C J，et al. Purification and corresponding spectroscopic analysis of selenium polysaccharide in sour jujube fruits[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery，2011，42(6)：148-151，147.(in Chinese)

[6] YUE Y，WU S C，LI Z K，et al. Wild jujube polysaccharides protect against experimental inflammatory bowel disease by enabling enhanced intestinal barrier function[J]. Food & Function，2015，6(8)：2568-2577.

[7] 郎杰，崔娜，张立斌. 酸枣果肉多糖保健功能的初步研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版)，2014，42(2)：162-166.
LANG J，CUI N，ZHANG L B. Preliminary study on healthcare effects of wild jujube pulp polysaccharides[J]. Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)，2014，42(2)：162-166.(in Chinese)

[8] 朱玥明，陈朋，刘德川，等. 海藻寡糖的生理活性与酶法转化研究进展[J]. 食品与生物技术学报，2022，41(8)：22-34.
ZHU Y M，CHEN P，LIU D C，et al. Progress on physiological activities and enzymatic conversion of algal oligosaccharides[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2022，41(8)：22-34.(in Chinese)

[9] 刘昊，崔波，于滨. 枸杞低聚糖体外抗氧化活性及增殖益生菌能力研究[J]. 食品与机械，2022，38(5)：138-142，148.
LIU H，CUI B，YU B. Study on antioxidant activity and probiotic proliferation of *Lycium barbarum* oligosaccharides *in vitro*[J]. Food & Machinery，2022，38(5)：138-142，148.(in Chinese)

[10] 季珂，李恒，龚劲松，等. 酶法制备壳寡糖及其抗肿瘤活性评价[J]. 食品与生物技术学报，2021，40(6)：93-99.
JI K，LI H，GONG J S，et al. Preparation of chitosan oligosaccharides by enzymatic hydrolysis and evaluation of antitumor activities[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2021，40(6)：93-99.(in Chinese)

[11] 胡腾根. 桑叶低聚糖的酶法制备及其通过肠道微生物介导调控糖脂代谢的作用机制研究[D]. 广州：华南理工大学，2021.

[12] 邓丽莉，潘晓倩，生吉萍，等. 考马斯亮蓝法测定苹果组织微量可溶性蛋白含量的条件优化[J]. 食品科学，2012，33(24)：185-189.
DENG L L，PAN X Q，SHENG J P，et al. Optimization of experimental conditions for the determination of water soluble protein in apple pulp using coomassie brilliant blue method[J]. Food Science，2012，33(24)：185-189.(in Chinese)

[13] 余菲，赵晓燕，周昌艳，等. 不同品种生菜的多酚、黄酮

差异比较与抗氧化活性[J]. 食品科学，2024，45（13）：17-25.
YU F，ZHAO X Y，ZHOU C Y，et al. Comparison of polyphenols，flavonoids and antioxidant activities of different varieties of lettuce[J]. Food Science，2024，45（13）：17-25.（in Chinese）

[14] 刘宇，戴沅霖，马越，等. 金银花粗多糖提取工艺优化及其抗氧化活性评价[J]. 食品工业科技，2023，44（7）：188-196.
LIU Y，DAI Y L，MA Y，et al. Extraction process optimization and antioxidant activity evaluation of crude polysaccharides from *Lonicera japonica*[J]. Science and Technology of Food Industry，2023，44（7）：188-196.（in Chinese）

[15] 吴雨炯，周礼红，方月月，等. 小叶苦丁枝条提取物的植物乳杆菌发酵代谢组分析[J]. 食品与生物技术学报，2023，42（6）：104-111.
WU Y T，ZHOU L H，FANG Y Y，et al. Analysis of extracts of *Ligustrum robustum*（Rxob.）blume twigs fermented by *Lactobacillus plantarum* based on metabolomics [J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2023，42（6）：104-111.（in Chinese）

[16] 董婷，周志江，韩烨. 乳酸片球菌PA003发酵培养基及发酵条件的优化[J]. 食品工业科技，2014，35（14）：192-196.
DONG T，ZHOU Z J，HAN Y. Optimization of fermentation medium and fermentation conditions for *Pediococcus acidilactici* PA003[J]. Science and Technology of Food Industry，2014，35（14）：192-196.（in Chinese）

[17] LI W，LI Z Y，PENG M J，et al. Oenothein B boosts antioxidant capacity and supports metabolic pathways that regulate antioxidant defense in *Caenorhabditis elegans* [J]. Food & Function，2020，11（10）：9157-9167.

[18] WANG Q Q，ZHANG J，JIANG Y Y，et al. *Caenorhabditis elegans* as a model system for discovering bioactive compounds against polyglutamine-mediated neurotoxicity [J]. Journal of Visualized Experiments，2021（175）：e63081.

[19] ZHANG J，SHI R N，LI H F，et al. Antioxidant and neuroprotective effects of *Dictyophora indusiata* polysaccharide in *Caenorhabditis elegans*[J]. Journal of Ethnopharmacology，2016，192：413-422.

[20] LI N，LI Q C，HE X Y，et al. Antioxidant and anti-aging activities of *Laminaria japonica* polysaccharide in *Caenorhabditis elegans* based on metabonomic analysis [J]. International Journal of Biological Macromolecules，2022，221：346-354.

[21] GHOSH T S，SHANAHAN F，O'TOOLE P W. The gut microbiome as a modulator of healthy ageing[J]. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology，2022，19（9）：565-584.

[22] HUI H P，XIN A Y，CUI H Y，et al. Anti-aging effects on *Caenorhabditis elegans* of a polysaccharide，*O*-acetyl glucomannan，from roots of *Lilium davidii* var. unicolor Cotton [J]. International Journal of Biological Macromolecules，2020，155：846-852.

[23] PINCUS Z，MAZER T C，SLACK F J. Autofluorescence as a measure of senescence in *C. elegans*：look to red，not blue or green[J]. Aging，2016，8（5）：889-898.

[24] JEON H，SEOK C. Anti-aging properties of *Ribes fasciculatum* in *Caenorhabditis elegans* [J]. Chinese Journal of Natural Medicines，2016，14（5）：335-342.

[25] 剡宁宁. 姜叶多酚提取及其对阿尔茨海默症的缓解活性研究[D]. 雅安：四川农业大学，2022.

[26] 李文青，祝孙婷，李圣洁，等. 羊栖菜多糖及辅助超声降解对高脂斑马鱼的降血脂作用[J]. 食品与生物技术学报，2024，43（5）：156-163.
LI W Q，ZHU S T，LI S J，et al. Hypolipidemic effect of *Sargassum fusiforme* polysaccharide and ultrasonic-assisted degradation on hyperlipidemic zebrafish [J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2024，43（5）：156-163.（in Chinese）

[27] GUO D，YU K，SUN X Y，et al. Structural characterization and repair mechanism of gracilaria lemaneiformis sulfated polysaccharides of different molecular weights on damaged renal epithelial cells[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity，2018，2018：7410389.

[28] 潘文锋. 黄芪多糖降解物的制备及其抗衰老作用研究[D]. 广州：广东药科大学，2020.