

刘永玲, 刘向炼, 陶欣, 等. 八月瓜果皮多糖提取工艺优化及其体外抗氧化、降糖活性分析 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(19): 17–24. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024010091

LIU Yongling, LIU Xianglian, TAO Xin, et al. Optimization of Polysaccharides Extraction from the Peels of *Akebia trifoliata* and Evaluation of Its *in Vitro* Antioxidant and Hypoglycemic Activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(19): 17–24. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024010091

·特邀主编专栏—生物大分子: 性质、结构、特性和功效机制 (特邀主编: 于寒松、方亚鹏、刘回民) ·

八月瓜果皮多糖提取工艺优化及其体外 抗氧化、降糖活性分析

刘永玲¹, 刘向炼¹, 陶欣¹, 杨炜¹, 许粟^{1,2,*}

(1. 贵阳学院食品科学与工程学院, 贵州贵阳 550005;

2. 贵州省高等学校药食两用资源特征风味感知及品质调控工程研究中心, 贵州贵阳 550005)

摘要: 本文旨在优化八月瓜果皮多糖的提取工艺, 评估其体外抗氧化和降糖活性。通过单因素实验结合正交试验优化八月瓜果皮多糖的超声提取工艺; 以 DPPH 自由基清除率及总还原能力为指标测定果皮多糖的抗氧化活性, 以 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶抑制率为指标测定其降糖活性。结果显示, 八月瓜果皮多糖超声提取的最佳工艺条件为: 超声功率 280 W、超声时间 60 min、提取温度 50 °C、料液比 1:40 g/mL, 在此条件下八月瓜果皮多糖的得率为 5.91%±0.20%; 在测定浓度范围内, 果皮多糖具有较好的 DPPH 自由基清除力和还原能力, 其中果皮多糖和 V_C 清除 DPPH 自由基的半数抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 0.329、0.077 mg/mL; 果皮多糖抑制 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶活性的 IC_{50} 值分别为 0.386、0.307 mg/mL。研究表明, 该工艺条件下纯化的八月瓜果皮多糖具有较好的体外抗氧化性和降糖活性。

关键词: 八月瓜果皮, 多糖, 提取工艺, 抗氧化, 降血糖

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)19-0017-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024010091



本文网刊:

Optimization of Polysaccharides Extraction from the Peels of *Akebia trifoliata* and Evaluation of Its *in Vitro* Antioxidant and Hypoglycemic Activity

LIU Yongling¹, LIU Xianglian¹, TAO Xin¹, YANG Wei¹, XU Su^{1,2,*}

(1. College of Food Science and Engineering, Guiyang University, Guiyang 550005, China;

2. Guizhou Engineering Research Center for Characteristic Flavor Perception and Quality Control of Drug-Food Homologous Resources, Guiyang 550005, China)

Abstract: The aim of this research was to optimize the polysaccharides extraction process from the peels of *Akebia trifoliata*, and evaluate its *in vitro* antioxidant and hypoglycemic activity. The ultrasonic-assisted extraction process of polysaccharides from the peels of *Akebia trifoliata* was optimized using single-factor combined with orthogonal experiment. The antioxidant activity of polysaccharides from the peels of *Akebia trifoliata* was investigated by using DPPH radical scavenging rate and total reducing ability as the indicators. The hypoglycemic activity of polysaccharides from the peels of *Akebia trifoliata* was explored using α -glucosidase and α -amylase inhibition rate as the indicators. The results demonstrated that the optimal ultrasonic-assisted extraction process of polysaccharides from the peels of *Akebia trifoliata* was ultrasound power 280 W, ultrasound time 60 min, extraction temperature 50 °C, solid-liquid ratio 1:40 g/mL, respectively. Under the

收稿日期: 2024-01-10

基金项目: 贵州省教育厅青年科技人才成长项目 (黔教合 KY 字 [2022]007 号); 大学生创新训练项目 (S202110976022, S202110976006); 贵州省高等学校药食两用资源特征风味感知及品质调控工程研究中心 (黔教技 [2023]042 号)。

作者简介: 刘永玲 (1985-), 女, 硕士, 实验师, 研究方向: 食品和药品分析, E-mail: GYULYL@163.com。

*** 通信作者:** 许粟 (1988-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品风味化学、农产品加工, E-mail: xs8515@126.com。

optimal process condition, the extraction rate of polysaccharides from the peels of *Akebia trifoliata* was $5.91\% \pm 0.20\%$. Within the measured concentration range, polysaccharides from the peels of *Akebia trifoliata* had the preferable DPPH radical scavenging and reducing ability. In addition, the IC_{50} values of polysaccharides from the peels of *Akebia trifoliata* and V_C for scavenging DPPH free radicals were 0.329 and 0.077 mg/mL, separately. The IC_{50} values of polysaccharides from the peels of *Akebia trifoliata* for inhibiting α -glucosidase and α -amylase activity were 0.386 and 0.307 mg/mL, respectively. This research proved that the polysaccharides from the peels of *Akebia trifoliata* extracted by this optimal process had better *in vitro* antioxidant and hypoglycemic activity.

Key words: *Akebia trifoliata* peels; polysaccharides; extraction process; antioxidant; hypoglycemic

八月瓜(*Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz)属木通科藤本植物,植物学名为三叶木通,又名八月炸、八月扎、野香蕉等,为药食两用资源,据 2020 版《中国药典》记载,其干燥近成熟果实可作为中药预知子入药,干燥藤茎可作为中药“木通”入药,有舒肝理气、活血止痛、除烦利尿和抗菌消炎等功效^[1]。八月瓜富含常春藤皂苷、黄酮、多酚、多糖、萜类等活性成分,且被证实存在于其茎、果实和种子中^[2]。八月瓜果皮厚实,约为总果重的 70%,过去常作为副产物被大量丢弃^[3]。近年来,发现其果皮可作为一种潜在的提取皂苷^[4-5]、果胶^[6-7]和抗氧化剂^[8]等化合物的优良来源,因此从八月瓜中探究其他潜在的高价值天然产物,不仅能提高八月瓜的经济附加值,还能拓宽其活性成分在食品、医药领域的应用范围。

八月瓜多糖是八月瓜的活性成分之一,近年来天然植物多糖因具有免疫调节、抗肿瘤、抗氧化、抗菌和降血糖等功能而成为研究的热点^[9-10],但目前对八月瓜多糖的研究甚少,仅有其根多糖具有较好的抗氧化活性^[11]和良好保湿效果^[12]的报道,尚未见果皮多糖含量、活性及其相关工艺的研究。朱绍荣等^[13]发现八月瓜果肉中总糖含量(22.92%)与葡萄、香蕉相当,张孟琴等^[14]报道了八月瓜果皮中总糖(32.61%)和还原糖(19.31%)含量较高,因此探究八月瓜果皮中多糖及其功效具有重要的意义。课题组前期已对八月瓜果皮多糖中的单糖组分进行了初步分析^[15],发现前期的提取工艺对后期多糖得率、生物活性和化学结构有较大的影响,因此,开发一种高效提取果皮多糖的方法,以提高得率、增强生物活性和降低结构损伤具有重要的意义。

目前多糖的提取方式常有溶剂提取、微波辅助、超声波辅助和酶辅助等几种提取方式,其中超声提取是利用超声波的空化、机械和剪切等作用有效促进多糖的释放、扩散和溶解,更有助于多糖生物活性的保留,具有操作方便、提取时间短、提取效率高和无污染等优点。本研究采用单因素结合正交试验优化八月瓜果皮多糖的超声提取工艺,并研究其体外抗氧化和降糖活性,旨在为八月瓜果皮中多糖的生物活性研究和产品开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

八月瓜果实 采自贵州省麻江县宣威镇卡乌村

第二组,挑选果皮炸裂开口度占比为整个果实的 2/3、颜色均一的八月瓜果实采收;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 南京奥多福尼生物科技有限公司;4-硝基苯- α -D-吡喃葡萄糖苷(P-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside, PNPG)、 α -葡萄糖苷酶(50 U/mg)、 α -淀粉酶(50 U/mg) 上海源叶生物科技有限公司;3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)试剂、MD77 透析袋(8000~14000 Da) 北京索莱宝科技有限公司;阿卡波糖(Acarbose, ACR, 98%) 上海麦克林生化科技有限公司;

TD4 台式低速离心机 湖南赫西仪器装备有限公司;RE-52A 旋转蒸发仪 上海亚荣生化仪器厂;KQ-500 超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司;UV-2100 紫外可见光度计 日本岛津有限公司;SCIENTZ-18N 冷冻干燥机 宁波新芝生物科技股份有限公司;I550 酶标仪 百乐科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品处理 将采收的八月瓜果皮和果肉完全剥离,果皮于 45 ℃ 下烘干处理,粉碎,过 40 目筛备用。称取八月瓜果皮粉 500 g,加入 1:20 g/mL 95% 乙醇,于 80 ℃ 下回流提取 30 min,取出,过滤后弃去滤液除去部分单糖、寡糖、双糖等物质,滤渣重复回流两次。过滤后所得滤渣于 45 ℃ 烘箱低温烘干,装自封袋,4 ℃ 下保存备用。

1.2.2 八月瓜果皮多糖提取工艺 参考陈艳萍等^[16]方法,并稍作修改。称取八月瓜果皮粉约 2.0 g,以一定料液比加入蒸馏水,置于超声仪中以一定的提取时间、超声功率和提取温度提取,提取结束后 4000 r/min 离心 10 min,上清液即为多糖提取液,提取两次,过滤,合并提取液,浓缩至原体积的 1/3 时加入 4 倍体积的无水乙醇使多糖沉淀,4 ℃ 静置过夜 12 h,抽滤,依次用无水乙醇、丙酮各 20 mL 分三次淋洗,冻干后得八月瓜果皮粗多糖。

1.2.3 八月瓜果皮多糖得率的计算

1.2.3.1 葡萄糖标准曲线的绘制 多糖含量的测定参照硫酸-苯酚法^[17]并略作修改,精密称取葡萄糖标准品 10.0 mg 于 100 mL 容量瓶中,加蒸馏水定容,制得 100 μ g/mL 葡萄糖标准溶液,并逐级稀释至浓度为 100、50、25、12.5、6.25 μ g/mL。分别吸取上述浓度葡萄糖溶液各 1 mL 于 10 mL 刻度试管中,以蒸

馏水为空白对照,加入 1 mL 5% 苯酚溶液,混匀后迅速加入 5 mL 浓硫酸,充分混匀后静置 10 min,最后置于 30 ℃ 的恒温水浴锅中水浴 20 min,取出,待其冷却至室温,于 490 nm 处测量其吸光度值,拟合吸光度值(y)和进样浓度(x, μg/mL)绘制葡萄糖标准曲线,得回归方程为: $y=0.0087x-0.0033$, $R^2=0.9994$ 。该方程在葡萄糖浓度为 0~100 μg/mL 范围内呈现良好的线性关系。

1.2.3.2 八月瓜多糖得率的测定 将 1.2.2 项提取的八月瓜果皮粗多糖用蒸馏水溶解并定容至 150 mL 容量瓶,精密吸取 1 mL 于 10 mL 刻度试管中,按“1.2.3.1”测定样品的吸光值,平行 3 份,按下式计算八月瓜果皮多糖的得率。

$$w(\%) = \frac{A_x - b}{a \times 10^6 \times m} \times V \times n \times 100$$

式中: w 为八月瓜果皮多糖的得率,%; A_x 为待测样液的吸光值; a 为标准曲线的斜率; b 为标准曲线的截距; V 为样品溶液的体积, mL; n 为样品溶液的稀释倍数; m 为八月瓜果皮粉的质量, g。

1.2.4 八月瓜果皮多糖提取工艺的优化

1.2.4.1 单因素实验 按“1.2.2”方法制备八月瓜果皮多糖,固定工艺条件设为超声功率 200 W,提取时间 40 min,提取温度 30 ℃,料液比 1:10 g/mL。控制其单一变量,以八月瓜果皮多糖得率为标准,分别选取超声功率为 200、240、280、320、360 W;提取时间为 40、50、60、70、80 min;提取温度为 30、40、50、60、70 ℃;料液比为 1:10、1:20、1:30、1:40、1:50 g/mL,进行单因素实验。

1.2.4.2 正交试验设计 在单因素实验的基础上,选择超声功率、提取时间、提取温度、料液比为考察因素,每个因素选择 3 个水平,利用正交软件进行 4 因素 3 水平 $L_9(3^4)$ 的正交试验设计,优化八月瓜果皮多糖的最佳提取工艺,因素水平设计见表 1。

表 1 多糖提取的正交试验因素水平设计
Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment for polysaccharide extraction

水平	因素			
	A超声功率 (W)	B提取时间 (min)	C提取温度 (℃)	D料液比 (g/mL)
1	240	50	40	1:20
2	280	60	50	1:30
3	320	70	60	1:40

1.2.5 八月瓜果皮粗多糖除蛋白 精密称取最优工艺下提取的果皮粗多糖 10.00 g,用蒸馏水溶解至 500 mL,加入其 1/2 体积的 Sevag 试剂(三氯甲烷:正丁醇=4:1),以 180 r/min 的转速在振荡器中振摇 10 min,倒入分液漏斗,静置分层,舍去下层的 Sevag 试剂和中间层的蛋白质乳浊液,收集上层的多糖溶液,重复此步骤直至中间层没有蛋白质乳浊液出现,

除蛋白后旋蒸上清液以除去残留的 Sevag 试剂,然后将多糖溶液转移至透析袋中(截流分子量为 8000~14000 Da),蒸馏水透析 48 h,每 7~8 h 更换一次蒸馏水,透析完的多糖溶液加入 4 倍体积的无水乙醇使多糖沉淀,4 ℃ 静置过夜 12 h,抽滤,依次用无水乙醇、丙酮各 20 mL 分三次淋洗,冻干得八月瓜果皮多糖 7.94 g,精密称取多糖 5.00 mg,用水定容至 10 mL,用苯酚-硫酸法计算其多糖纯度。

1.2.6 体外抗氧化活性分析

1.2.6.1 DPPH 自由基清除率的测定 参照文献 [18] 方法略作修改,取不同浓度果皮多糖溶液 0.5 mL 依次加入 5 mL 0.04 mg/mL 的 DPPH 乙醇溶液,混匀后在室温下避光反应 30 min,于 517 nm 处测定其吸光度(A_a),样品本底对照以等体积无水乙醇代替 DPPH 溶液(A_b),空白对照组以等体积去离子水代替样品(A_0), V_C 为阳性对照。按下式计算 DPPH 自由基的清除率。

$$\text{DPPH自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_a - A_b}{A_0}\right) \times 100$$

式中: A_a 为反应液的吸光度值; A_b 为背景吸光值; A_0 为空白组的吸光度值。

1.2.6.2 总还原能力的测定 参照文献 [19] 方法略作修改,取不同浓度果皮多糖溶液 2 mL,依次加入 1% 的铁氰化钾 2.5 mL 和磷酸盐缓冲液(pH6.6, 0.2 mol/L)2.0 mL,混匀,于 50 ℃ 水浴反应 20 min,快速冷却后加入 10% 的三氯乙酸 2 mL,混匀,于 4000 r/min 离心 10 min,取上清液 2.5 mL,依次加入去离子水 2.5 mL 和 0.1% 的三氯化铁 0.5 mL,混匀,静置 10 min,于 700 nm 处测定其吸光度(A_1),空白对照以等体积去离子水代替样品溶液(A_0), V_C 为阳性对照。按下式计算总还原力。

$$\text{总还原力} = A_1 - A_0$$

1.2.7 八月瓜果皮多糖体外降糖活性的研究

1.2.7.1 α -葡萄糖苷酶抑制活性的测定 参照李思维等 [20] 方法并略作修改,取不同浓度果皮多糖溶液 40 μL 和 1 U/mL α -葡萄糖苷酶溶液(0.2 mol/L, pH6.8 磷酸盐配制)25 μL,混匀,于 37 ℃ 水浴 10 min 后,避光加 5 mmol/L PNPG 溶液(0.2 mol/L, pH6.8 磷酸盐配制)40 μL,继续 37 ℃ 水浴 10 min,最后加 2 mol/L Na_2CO_3 溶液 50 μL 终止反应,于 405 nm 处测定其吸光值,以阿卡波糖代替多糖样品为阳性对照,按下式计算多糖溶液对 α -葡萄糖苷酶的抑制率。

$$\alpha\text{-葡萄糖苷酶活性抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{背景}}}{A_{\text{空白}}}\right) \times 100$$

式中: $A_{\text{样品}}$ 为 α -葡萄糖苷酶溶液+八月瓜果皮多糖溶液+PNPG 溶液的吸光值; $A_{\text{背景}}$ 为磷酸盐缓冲液+八月瓜果皮多糖溶液+PNPG 溶液的吸光值; $A_{\text{空白}}$ 为 α -葡萄糖苷酶溶液+磷酸盐缓冲液+PNPG 溶液的吸光值。

1.2.7.2 α -淀粉酶抑制活性的测定 参照龚频等^[21]方法并略作修改,取不同浓度果皮多糖溶液 40 μL 和 1 U/mL α -淀粉酶溶液(0.2 mol/L, pH6.8 磷酸盐配制) 25 μL ,混匀,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min,再加入 2 mg/mL 可溶性淀粉溶液 25 μL ,混匀,继续 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min 后,再加入 DNS 试剂 50 μL ,沸水浴反应 5 min 使酶灭活,冷却至室温,于 540 nm 处测定其吸光值。以阿卡波糖代替多糖样品为阳性对照,按下式计算多糖溶液对 α -淀粉酶的抑制率。

$$\alpha\text{-淀粉酶活性抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{背景}}}{A_{\text{空白}}}\right) \times 100$$

式中: $A_{\text{样品}}$ 为 α -淀粉酶溶液+八月瓜果皮多糖溶液+可溶性淀粉+DNS 显色剂; $A_{\text{背景}}$ 为磷酸盐缓冲液+八月瓜果皮多糖溶液+可溶性淀粉+DNS 显色剂; $A_{\text{空白}}$ 为 α -淀粉酶溶液+磷酸盐缓冲液+可溶性淀粉+DNS 显色剂。

1.3 数据处理

实验数据用平均值 $\pm$ 标准误差表示,每组实验进行 3 次平行;采用正交设计助手 V3.1 软件进行正交优化试验设计和分析;试验数据采用 IBM SPSS 22.0 软件进行 IC_{50} 值计算及单因素差异分析(ANOVA),以 $P < 0.05$ 为具有统计学显著差异;使用 GraphPad Prism 7.0 作图。

2 结果与分析

2.1 八月瓜果皮多糖提取单因素实验结果

2.1.1 提取功率对果皮多糖得率的影响 不同提取功率对果皮多糖得率的影响如图 1 所示,随着提取功率的增加,果皮多糖得率呈先升后降的趋势,当功率为 280 W 时有最大值为 $3.25\% \pm 0.14\%$ ($P < 0.05$),而功率为 240、320 W 时多糖得率差异不显著($P > 0.05$)。这可能是超声提取的空化效应、机械效应和热效应使植物细胞膜的通透性改变,随着超声功率的变化加速了植物多糖的溶出,但当超过一定的功率,多糖溶出率反而降低,部分多糖发生降解,使多糖得率降低^[22]。根据结果,后续优化试验中提取功率的选

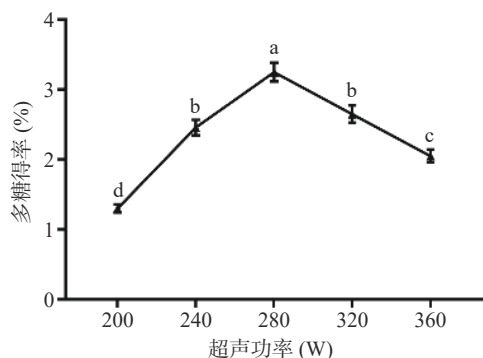


图 1 超声功率对多糖得率的影响

Fig.1 Influence of ultrasonic power on the yield of the polysaccharides

注:图中不同字母表示差异显著, $P < 0.05$; 图 2~图 4、图 7、图 8 同。

取范围为 240~320 W。

2.1.2 提取时间对果皮多糖得率的影响 不同提取时间对果皮多糖得率的影响如图 2 所示,八月瓜果皮多糖的得率随超声时间延长呈现先升后降的趋势,当超声时间为 60 min 时得率有最大值为 $4.01\% \pm 0.15\%$,与超声时间为 50、70 min 相比具有显著性差异($P < 0.05$)。当超声时间超过 60 min,多糖的得率反而下降,这可能是超声时间过长致使提取液中的多糖被分解,且伴随着其他醇溶物质溶出^[23]。根据结果,后续优化试验中提取时间的选取范围为 50~70 min。

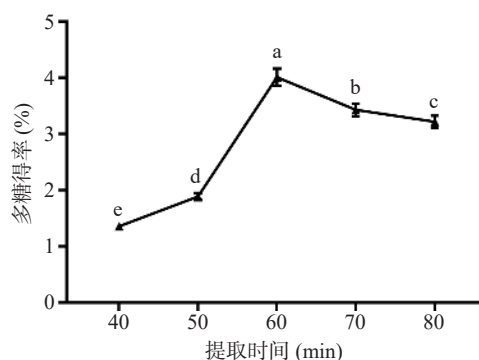


图 2 提取时间对多糖得率的影响

Fig.2 Influence of extraction time on the yield of the polysaccharides

2.1.3 提取温度对果皮多糖得率的影响 不同提取温度对果皮多糖得率的影响如图 3 所示,随提取温度的增加,果皮多糖得率呈先升后降的趋势,当温度为 50 $^{\circ}\text{C}$ 得率达最大值为 $4.35\% \pm 0.20\%$,与提取温度为 40、60 $^{\circ}\text{C}$ 相比具有显著性差异($P < 0.05$)。这可能是随着提取温度的增加,有利于增加多糖在水中的溶解和分散度,但随着温度的继续升高,不仅促进了其他物质的溶出,还可能导致多糖降解和氧化^[24]。根据结果,后续优化试验中提取温度的选取范围为 40~60 $^{\circ}\text{C}$ 。

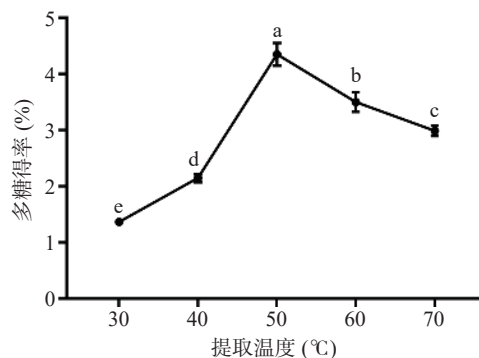


图 3 提取温度对多糖得率的影响

Fig.3 Influence of extraction temperature on the yield of the polysaccharides

2.1.4 料液比对果皮多糖得率的影响 不同料液比对果皮多糖得率的影响如图 4 所示,果皮多糖得率在料液比为 1:30 g/mL 时得率最大为 $3.67\% \pm 0.17\%$,

与料液比为 1:20、1:40 g/mL 相比具显著性差异 ($P<0.05$), 继续增大溶剂比例多糖得率略有降低, 这可能是随着提取溶剂的增大, 杂质的析出抑制了多糖的析出^[25]。根据结果, 后续优化试验中料液比的选取范围为 1:20~1:40 g/mL。

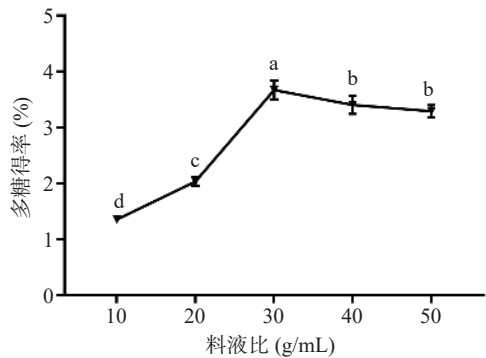


图 4 料液比对多糖得率的影响
Fig.4 Influence of material-to-liquid ratio on the yield of the polysaccharides

2.2 正交试验优化八月瓜果皮多糖的提取工艺

正交试验优化果皮多糖的提取工艺如表 2 所示, 由于 R 值与考察因素对多糖得率的影响呈正相关, 八月瓜果皮多糖得率受各因素影响的程度由大到小依次为: C>B>D>A。最佳工艺组合为 A₂B₂C₂D₃, 即超声功率 280 W, 提取时间 60 min, 提取温度 50 ℃, 料液比 1:40 g/mL, 在此条件下进行验证试验, 重复试验 3 次, 测得果皮多糖的得率为 5.91%±0.20%, 高于正交处理组中的最高值(5.84%±0.29%)。

表 2 正交试验结果及分析

Table 2 Results and analysis of orthogonal experimental

试验号	因素				重复			多糖得率 (%)
	A超声功率	B提取时间	C提取温度	D料液比				
1	1	1	1	1	2.42	2.63	2.49	2.51
2	1	2	2	2	5.54	6.10	5.88	5.84
3	1	3	3	3	3.85	4.21	3.97	4.01
4	2	1	2	3	4.93	5.15	4.70	4.92
5	2	2	3	1	4.21	4.34	4.57	4.37
6	2	3	1	2	3.55	3.91	3.67	3.71
7	3	1	3	2	2.89	3.15	3.09	3.04
8	3	2	1	3	4.50	4.84	4.73	4.69
9	3	3	2	1	5.21	5.41	4.98	5.20
K1	37.05	31.41	32.70	36.22				
K2	38.99	44.67	47.86	37.74				
K3	38.76	38.72	34.24	40.84				
k1	4.117	3.490	3.634	4.025				
k2	4.333	4.964	5.318	4.194				
k3	4.307	4.303	3.805	4.538				
R	0.216	1.473	1.684	0.513				
主次因素				C>B>D>A				
最优方案				A ₂ B ₂ C ₂ D ₃				

根据最优提取工艺条件提取, 10.0 g 果皮粗多糖经 Sevag 试剂除蛋白后, 其多糖纯度为 62.50%, 提取率为 79.4%, 本文将以此果皮多糖初步探究其抗氧化

活性和降糖活性。

2.3 八月瓜果皮多糖的抗氧化作用

2.3.1 DPPH 自由基清除作用 不同浓度果皮多糖对 DPPH 自由基的清除能力见图 5。当浓度在 0.06~0.96 mg/mL 范围内, 多糖对 DPPH 自由基的清除能力逐渐增加, 呈现一定的剂量依赖性, 随后随着多糖浓度的增加自由基清除效果增加变缓, 其中多糖浓度在 0.96 mg/mL 和 7.68 mg/mL 时对 DPPH 自由基的清除率分别为 75.02%±2.30%、86.18%±2.38%。经计算, 阳性对照 V_C 和多糖对 DPPH 自由基的半数抑制浓度(IC₅₀)分别为 0.077 和 0.329 mg/mL。邵显慧^[11]也仅在三叶木通根多糖除蛋白的情况下, 研究了其多糖的抗氧化活性, 发现藤茎多糖浓度为 0.6 mg/mL 时清除为 90%, 与之相比, 果皮多糖较根多糖的抗氧化能力弱, 这可能是与多糖的纯化方式及多糖在藤茎和果皮中的结构特征略有差异有关, 但都显示出较强的清除 DPPH 自由基能力。

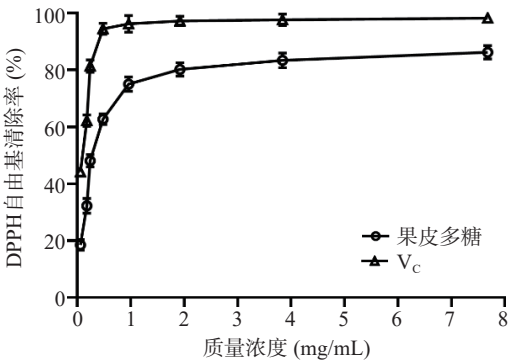
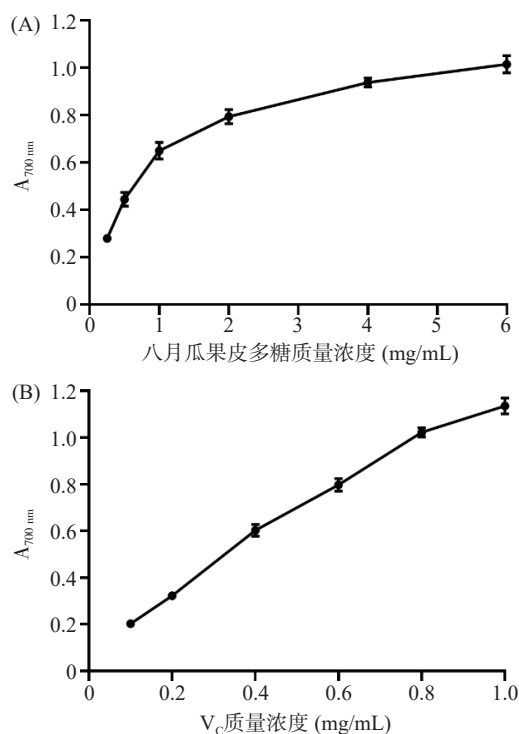
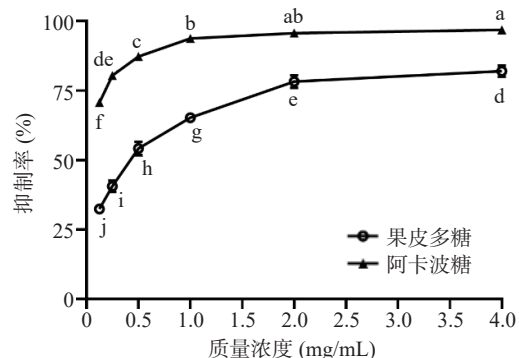


图 5 V_C 和八月瓜果皮多糖对 DPPH 自由基的清除作用
Fig.5 DPPH radical scavenging activity of V_C and polysaccharides from *Akebia trifoliata* peels

2.3.2 还原能力 还原能力是物质抗氧化活性的重要表现, 通常采用三价铁离子还原法观察物质的还原能力, 吸光值与还原能力呈正相关^[26]。果皮多糖的还原能力如图 6 所示, 在测定质量浓度范围内, 随着果皮多糖和 V_C 质量浓度的增加, 还原能力逐渐增大并有着一定的剂量相关性, 当果皮多糖浓度为 1 mg/mL 时, 其还原能力达到了同等浓度 V_C 的 57.1%。

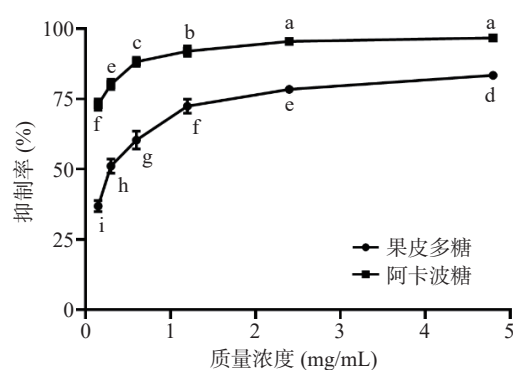
2.4 八月瓜果皮多糖降糖活性

2.4.1 α-葡萄糖苷酶抑制活性 α-葡萄糖苷酶可通过水解葡萄糖苷键释放葡萄糖而使血糖升高, 当其被抑制时可达到控制血糖的目的^[27]。果皮多糖抑制 α-葡萄糖苷酶的活性变化如图 7 所示, 当浓度在 0.125~4.00 mg/mL 时, 果皮多糖对 α-葡萄糖苷酶的抑制率由 32.88%±1.40% 上升至 82.01%±2.06%, 对照组阿卡波糖在浓度为 1.00 mg/mL 对 α-葡萄糖苷酶的抑制率为 93.75%±1.34%, 之后随着浓度的增加对 α-葡萄糖苷酶的抑制率趋于平缓。其中多糖浓度为 2.00、4.00 mg/mL 与对照组浓度为 0.25 mg/mL 时对 α-葡萄糖苷酶的抑制率差异不显著 ($P>0.05$)。

图6 V_C 和八月瓜果皮多糖的还原能力Fig.6 Reducing power of V_C and polysaccharides from *Akebia trifoliolate* peels图7 八月瓜果皮多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性Fig.7 Inhibition of α -glucosidase activity by polysaccharides from *Akebia trifoliolate* peels

经计算,果皮多糖和阿卡波糖抑制 α -葡萄糖苷酶活性的 IC_{50} 值分别为 0.386 和 0.041 mg/mL。

2.4.2 α -淀粉酶抑制活性 α -淀粉酶是能够催化糖原、淀粉等水解的酶,存在于唾液和胰腺中, α -淀粉酶抑制剂可以与体内的 α -淀粉酶发生作用,阻止淀粉等转化为葡萄糖,有效控制血糖水平^[28]。果皮多糖对 α -淀粉酶的抑制活性见图 8,当浓度为 0.15~4.80 mg/mL 时,果皮多糖对 α -淀粉酶活性的抑制率由 $36.68\% \pm 2.02\%$ 上升至 $83.43\% \pm 1.25\%$,呈现一定的剂量依赖性,其中多糖浓度为 2.4 mg/mL 与对照组浓度为 0.3 mg/mL 时对 α -淀粉酶的抑制率差异不显著($P>0.05$),多糖浓度为 1.20 mg/mL 与对照组浓度为 0.15 mg/mL 时对 α -淀粉酶的抑制率差异不显著($P>0.05$)。经计算,果皮多糖和阿卡波糖抑制 α -淀粉酶活性的 IC_{50} 值分别为 0.307 和 0.039 mg/mL。

图8 八月瓜果皮多糖对 α -淀粉酶的抑制活性Fig.8 Inhibition of α -amylase activity by polysaccharides from *Akebia trifoliolate* peels

综上,八月瓜果皮多糖对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的抑制作用相近,据文献报道^[29],八月瓜果皮提取物对 α -葡萄糖苷酶具有显著的抑制作用(IC_{50} 值为 14.15 μ g/mL),本试验结果说明八月瓜果皮提取物中的多糖组分对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的抑制具有积极的作用。此外,课题组前期测得果皮多糖中单糖组分主要有甘露糖 (11.23 mg/g)、鼠李糖 (12.42 mg/g)、半乳糖醛酸 (212.84 mg/g)、葡萄糖 (73.23 mg/g)、半乳糖 (30.30 mg/g) 和阿拉伯糖 (60.01 mg/g),其平均物质的量比为 1.18:1.00:23.25:11.73:3.51:5.88^[15],而具有较高活性的植物多糖可能与其单糖组分甘露糖、半乳糖、糖醛酸、葡萄糖、鼠李糖的含量有关^[30],如糖醛酸的含量高可能会呈现更高的抗氧化活性^[31]。

3 结论

本研究以八月瓜果皮为研究对象,初步探究了其粗多糖的提取工艺和活性,通过单因素及正交试验,八月瓜果皮多糖超声提取的最佳工艺条件为:超声功率 280 W、提取时间 60 min、提取温度 50 $^{\circ}$ C、料液比 1:40 g/mL,该条件下果皮多糖得率为 $5.91\% \pm 0.20\%$;通过测定 DPPH 自由基清除率及还原力证实了八月瓜果皮粗多糖具有良好的抗氧化活性,果皮多糖清除 DPPH 自由基的 IC_{50} 值为 0.329 mg/mL;通过测定对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的活性抑制证实了八月瓜果皮多糖具有较好的降糖潜力,果皮多糖对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶活性抑制的 IC_{50} 值分别为 0.386、0.307 mg/mL。后期研究中,需进一步对果皮多糖分离、纯化及鉴定,探究与其生物活性相关的结构特征,如分子量、糖苷键类型及分子构象等,为八月瓜果皮多糖的开发应用提供理论基础和数据支持。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

[1] JIANG Y L, YIN H, ZHOU X F, et al. Antimicrobial, antioxi-

- dant and physical properties of chitosan film containing *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz. peel extract/montmorillonite and its application[J]. *Food Chemistry*, 2021, 361: 130111.
- [2] ZHANG Y M, CAO Y M, WANG Y D, et al. Somatic embryogenesis induction and genetic stability assessment of plants regenerated from immature seeds of *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz[J]. *Forests*, 2023, 14: 473.
- [3] 李朝阁. 八月瓜酒酿造及籽油、多酚提取和抗氧化性研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2016. [LI C G. *Akebia trifoliata* wine brewing, extraction of seed oil, polyphenols and its antioxidant activity research[D]. Xi'an: Shaanxi University of Science & Technology, 2016.]
- [4] IWANAGAS S, WARASHINA T, MIYASEA T. Triterpene saponins from the pericarps of *Akebia trifoliata*[J]. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2012, 60(10): 1264–1274.
- [5] WANG X Y, YU N X, PENG H L, et al. The profiling of bioactives in *Akebia trifoliata* pericarp and metabolites, bioavailability and *in vivo* anti-inflammatory activities in DSS-induced colitis mice[J]. *Food Function*, 2019, 10(7): 3977–3991.
- [6] JIANG Y, DU Y X, ZHU X M, et al. Physicochemical and comparative properties of pectins extracted from *Akebia trifoliata* var. *australis* peel[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 87(2): 1663–1669.
- [7] 张孟琴, 欧根友, 徐路, 等. 不同产地三叶木通果胶的理化性质、抗氧化活性及对癌细胞 A549 和 K562-2 生长的抑制作用[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(22): 128–133. [ZHANG M Q, OU G Y, XU L, et al. Physicochemical properties, antioxidant activities, and inhibitory capabilities of pectins in the pericarps of *Akebia trifoliata* from different regions on cancer cells A549 and K562-2[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(22): 128–133.]
- [8] LUO M, ZHOU D D, SHANG A, et al. Influences of microwave-assisted extraction parameters on antioxidant activity of the extract from *Akebia trifoliata* peels[J]. *Foods*, 2021, 10(6): 1432.
- [9] WANG Y J, XIONG X, HUANG G L. Ultrasound-assisted extraction and analysis of maidenhairtree polysaccharides[J]. *Ultrason Sonochem*, 2023, 95: 106395.
- [10] KHACHATRYAN K, KHACHATRYAN G, CIESIELSKI W. Special issue on polysaccharides: From extraction to applications[J]. *Applied Sciences*, 2022, 12: 12461.
- [11] 邵显会. 三叶木通总黄酮和多糖的提取纯化及生物活性研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2012. [SHAO X H. Extraction, purification, and biological activity study of total flavonoids and polysaccharides from *Akebia trifoliata*[D]. Xi'an: Shaanxi Normal University, 2012.]
- [12] LI X, WEI J, LIN L Z, et al. Extraction, moisturizing activity and potential application in skin cream of *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz polysaccharide[J]. *Industrial Crops and Products*, 2023, 197: 116613.
- [13] 朱绍荣, 杨歌, 杨东, 等. 八月瓜与 9 种常见水果的有机营养成分比较分析[J]. 昆明学院学报, 2022, 44(3): 70–74. [ZHU S R, YANG G, YANG D, et al. Comparative analysis of organic nutrients between *Holboellia latifolia* and nine common fruits[J]. Journal of Kunming University, 2022, 44(3): 70–74.]
- [14] 张孟琴, 徐路, 张俊波, 等. 三叶木通果皮主要营养成分、活性成分含量测定及果皮提取物抗氧化活性评价[J]. 食品工业科技, 2022, 43(10): 388–394. [ZHANG M Q, XU L, ZHANG J B, et al. Determination of contents of the main nutritional components, functional components of *Akebia trifoliata* pericarps and evaluation of the antioxidant activity of peel extracts[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(10): 388–394.]
- [15] 刘永玲, 赵建国, 赵治兵, 等. PMP 柱前衍生 HPLC 法测定八月瓜果皮多糖中单糖组成[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(21): 131–137. [LIU Y L, ZHAO J G, ZHAO Z B, et al. Determination of monosaccharide composition of polysaccharides from *Akebia trifoliata* peel by PMP-HPLC with pre-column derivatization[J]. Food Research and Development, 2023, 44(21): 131–137.]
- [16] 陈艳萍, 贺菊萍, 刘意, 等. 超声波-微波辅助提取杜仲叶多糖工艺优化及其体外抗凝血活性分析[J]. 食品工业科技, 2023, 44(17): 202–211. [CHEN Y P, HE J P, LIU Y, et al. Optimization of ultrasonic-microwave assisted extraction of polysaccharides from *Eucommia ulmoides* leaves and its anticoagulant activity *in vitro*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(17): 202–211.]
- [17] 周香辉, 莫晓宁, 凌楠, 等. 广西产‘桂桑优’桑叶不同溶剂提取物的抗氧化及降糖活性分析[J]. 食品科技, 2022, 47(12): 193–199. [ZHOU X H, MO X N, LING N, et al. Analysis of antioxidant and hypoglycemic activities of different solvent extracts from Guangxi ‘GuiSangyou’ mulberry leaf[J]. Food Science and Technology, 2022, 47(12): 193–199.]
- [18] 陈丽叶, 常希光, 冯晓光, 等. 山药多糖的体外抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2021, 42(19): 122–128. [CHEN L Y, CHANG X G, FENG X G, et al. Study on the *in vitro* antioxidant activity of Chinese yam polysaccharides[J]. Food Science, 2021, 42(19): 122–128.]
- [19] 林栋, 陈昌兴, 杨强, 等. 贵长猕猴桃多酚抗氧化及抑制亚硝化作用研究[J]. 食品科技, 2019, 44(4): 230–235, 243. [LIN D, CHEN C X, YANG Q, et al. The effect of polyphenols from Guichang kiwifruit on antioxidization and inhibition of nitrosation[J]. Food Science and Technology, 2019, 44(4): 230–235, 243.]
- [20] 李思维, 卫倩倩, 宋宵, 等. 党参多糖的抗氧化及降糖活性研究[J]. 临床医学研究与实践, 2020, 5(32): 8–11. [LI S W, WEI Q Q, SONG X, et al. Study on antioxidant and hypoglycemic activities of *Codonopsis pilosula* polysaccharide[J]. Clinical Research and Practice, 2020, 5(32): 8–11.]
- [21] 龚频, 王佩佩, 同美霖, 等. 红枣多糖的提取工艺及药理活性研究[J]. 食品工业科技, 2022, 43(13): 198–207. [GONG P, WANG P P, TONG M L, et al. Study on extraction technology and pharmacological activities of polysaccharide from *Ziziphus jujube* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(13): 198–207.]
- [22] 陈蕾, 郑甜甜, 朱贺宇, 等. 响应面法优化超声辅助提取姬菇多糖及其体外抗氧化性[J]. 中国食品添加剂, 2024, 35(1): 143–149. [CHEN L, ZHENG T T, ZHU H Y, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from *Agaricus blazei* by response surface methodology and its *in vitro* antioxidant activity[J]. China Food Additives, 2024, 35(1): 143–149.]
- [23] 李文宇, 王茜, 沈静, 等. 超声波辅助提取新疆香梨多糖的工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(4): 136–142. [LI W Y, WANG Q, SHEN J, et al. Study on ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from fragrant pears in Xinjiang[J]. Food Research and Development, 2023, 44(4): 136–142.]
- [24] 曾祥玉. 松塔鳞片多糖的提取及其免疫生理活性研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2021. [ZENG X Y. Study on extraction of pinecone scale polysaccharide and its immunological activity[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2021.]
- [25] LIU Y, QIANG M, SUN Z, et al. Optimization of ultrasonic extraction of polysaccharides from *Hovenia dulcis* peduncles and their antioxidant potential[J]. *International Journal of Biological*

Macromolecules, 2015, 80: 350–357.

[26] 刘宇, 熊亮, 彭成, 等. 姜黄醇提物化学成分及其抗氧化活性分析[J]. 食品科学, 2019, 40(12): 226–231. [LIU Y, XIONG L, PENG C, et al. Chemical constituents from ethanol extract of *Curcuma longa* L. Rhizoma and their antioxidant activity[J]. Food Science, 2019, 40(12): 226–231.]

[27] 常相娜, 陈雪峰, 龚频, 等. 融水香菇多糖结构表征及体外抗氧化、降糖活性[J]. 中国食品添加剂, 2022, 33(4): 1–9. [CHANG X N, CHEN X F, GONG P, et al. Structural characterization, *in vitro* anti-oxidative effect and hypoglycemic activity of lentinan from Rongshui county[J]. China Food Additives, 2022, 33(4): 1–9.]

[28] 李晓萌, 李佳惠, 王雨行, 等. 响应面优化莲藕多酚提取工艺及其生物活性研究[J]. 食品科技, 2022, 47(1): 203–211. [LI X M, LI J H, WANG Y X, et al. Optimization of extraction process and bioactivities of polyphenols from lotus root by response surface method[J]. Food Science and Technology, 2022, 47(1): 203–211.]

[29] 罗宗洪, 蔡圣宝, 易俊洁. 八月瓜的化学组成、抗氧化性及 α -葡萄糖苷酶活性抑制研究[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(1): 130–135. [LUO Z H, CAI S B, YI J J. Phytochemical composition, antioxidant activity and α -glucosidase inhibitory ability of *Akebia trifoliata*[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(1): 130–135.]

[30] 姜荣华, 蒲铎文, 樊梓鸾, 等. 老山芹多糖的分离纯化、结构表征及体外降糖活性研究[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(18): 113–118, 124. [XIAN R H, PU D W, FAN Z L, et al. Isolation, purification, structure characterization, and hypoglycemic activity analysis of polysaccharides from *Heracleum dissectum*[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(18): 113–118, 124.]

[31] 刘楠楠. 黑木耳多糖的提取纯化、结构表征及降糖活性研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2022. [LIU N N. Study on extraction, purification, structure characterization and hypoglycemic activity of *Auricularia auricularia* polysaccharide[D]. Xi'an: Shaanxi University of Science and Technology, 2022.]