

叶美芝, 伍紫仪, 吴金松, 等. 山药皮多糖的分离纯化、结构特征及体外抗氧化活性研究 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(19): 78–85.
doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022120074

YE Meizhi, WU Ziyi, WU Jinsong, et al. Study on Separation, Purification, Structural Characteristics and *in Vitro* Antioxidant Activity of Polysaccharides from Chinese Yam Peel[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(19): 78–85. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022120074

· 研究与探讨 ·

山药皮多糖的分离纯化、结构特征及体外 抗氧化活性研究

叶美芝, 伍紫仪, 吴金松, 钟青萍*

(广东省食品质量安全重点实验室, 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

摘要: 本研究通过三氯乙酸法、Sevag 法以及 Sevag-木瓜蛋白酶法, 研究了山药皮粗多糖的除蛋白工艺, 对提纯后的山药皮多糖组分进行红外光谱和单糖组分等结构特征分析, 并对体外抗氧化活性进行测定。研究结果表明: 提取山药皮多糖的适宜的乙醇终浓度为 90%, 多糖得率为 9.55%, 酶结合 Sevag 法为最优的脱蛋白工艺, 在此条件下多糖保留率为 64.7%, 蛋白脱除率为 76.8%。山药皮多糖经过 DEAE-52 纤维素柱层析后得到 CYPP-1 和 CYPP-2 两种主要多糖组分, 其分子量分别为 4.442 kDa 和 4.278 kDa。CYPP-1 由盐酸氨基葡萄糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖和葡萄糖醛酸组成, 摩尔比为: 11.1:14.4:21.8:35:10.8; CYPP-2 由盐酸氨基葡萄糖、甘露糖和葡萄糖醛酸组成, 摩尔比为: 10.5:47.9:16.8。红外图谱分析显示两种组分均符合植物多糖结构特征, 均为 α -型多糖。综合比较不同浓度的 CYPP-1 和 CYPP-2 对 DPPH、羟自由基、ABTS⁺ 和超氧阴离子自由基的体外清除效果, 其中 8.0 mg/mL 的 CYPP-1 的清除率分别为 89.83%、46.72%、67.27%、51.20%, 其抗氧化活性高于 CYPP-2。

关键词: 山药皮, 多糖, 分离纯化, 结构特征, 抗氧化活性

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)19-0078-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022120074



本文网刊:

Study on Separation, Purification, Structural Characteristics and *in Vitro* Antioxidant Activity of Polysaccharides from Chinese Yam Peel

YE Meizhi, WU Ziyi, WU Jinsong, ZHONG Qingping*

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Food Quality and Safety, College of Food Science,
South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: In this study, the optimal process for the deproteinization of crude polysaccharides from Chinese yam peel was investigated by using the trichloroacetic acid method, Sevag method and Sevag-papain enzyme method. The purified polysaccharide fractions were characterized by infrared spectroscopy, the monosaccharide composition analysis, and the antioxidant activity *in vitro* was determined. The results indicated that the optimal ethanol final concentration was 90%, the yield of polysaccharide reached 9.55%, and polysaccharide precipitation rate was the highest. The better deproteinization process was papain treatment combined with Sevag method. Under the condition, the polysaccharide retention rate reached 64.7% and the deproteinization rate was 76.8%. Two major polysaccharide fractions named CYPP-1 and CYPP-2 were isolated and purified from crude polysaccharide by DEAE-52 cellulose column chromatography, and their molecular weights were 4.442 kDa and 4.278 kDa respectively. CYPP-1 was consisted of glucosamine hydrochloride, galactose, glucose, mannose and glucuronic acid with the molar ratio of 11.1:14.4:21.8:35:10.8, and CYPP-2 was consisted of glucosamine hydrochloride, mannose and glucuronic acid with the molar ratio of 10.5:47.9:16.8. Infrared spectroscopy showed that both fractions were consistent with the structural characteristics of plant polysaccharides, being α -type

收稿日期: 2022-12-08

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31972046); 广东省自然科学基金项目 (2021A1515011083); 广东省科技计划项目 (2020B1212060059)。

作者简介: 叶美芝 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品微生物, E-mail: 1149951695@qq.com。

* 通信作者: 钟青萍 (1967-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品微生物、食品安全, E-mail: zhongqp@scau.edu.cn。

polysaccharides. The scavenging effects of different concentrations of CYPP-1 and CYPP-2 on DPPH, hydroxyl radicals, ABTS⁺ and superoxide anion radicals *in vitro* were compared, and the scavenging rates of 8.0 mg/mL CYPP-1 were 89.83%, 46.72%, 67.27% and 51.20%, respectively. And its antioxidant activity was higher than that of CYPP-2.

Key words: Chinese yam peel; polysaccharide; separation and purification; structural characteristics; antioxidant activity

山药具有抗氧化、提高机体免疫力、降血糖、美容护肤等功能活性^[1-3]。山药主要成分的作用机制、药理作用研究及产品开发均取得较多进展^[4-6]。而山药皮是山药加工的主要副产物,约为加工品产量的 20% 左右,除少部分作为廉价的动物饲料外,大部分作为废弃料直接焚烧或者丢弃掉,既是对资源的浪费又污染环境^[7]。因此,对山药皮资源的再利用显得尤为重要,多项研究表明,山药皮的成分与去皮山药相似,而且黄酮、总酚及尿囊素含量甚至高于去皮山药,保健功效的应用前景较好^[8]。近年来,随着山药种植面积的扩大,山药保健食品的产业化发展,山药皮的产量逐年增加。近年来,天然多糖因其无毒、高效、多功能而备受关注^[9]。从废弃生物质资源中高效回收和利用多糖已成为提高其商业价值的环保趋势^[10]。然而,从山药皮中提取的多糖是否具有资源回收再利用的工业潜力尚不确定,因此,山药皮中多糖的分离纯化工艺、结构特征及生物活性研究对于山药皮资源的充分利用有着重要意义。

多糖是山药皮主要的生物活性成分之一,山药皮多糖不仅具有增强机体免疫力、降血糖和血脂等一系列作用,还具有保护肝脏和脾胃、促进肠道蠕动等功效。除上述作用外,山药皮多糖对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、白色念球菌、枯草芽孢杆菌均有一定的抑制效果^[11]。多糖的提取方法有超声辅助提取法^[12]、纤维素酶酶解法^[13]、浸提法^[14]和脱蛋白方法^[15]等,传统的水浸提法使多糖的提取率偏低,在其基础上采用辅助技术,如超声波辅助提取法和酶解提取法可提高其得率。山药多糖中的羟基、亲电基团可能使其具有清除羟自由基和超氧阴离子自由基的作用,而其单糖组成、糖苷键及构型可能使其具备清除 DPPH 自由基能力,因此山药多糖具有抗氧化作用^[16]。本研究采用水浸提法提取山药皮多糖,以蛋白脱除率及多糖保留率为评价指标,比较几种脱蛋白工艺的效果,再通过 DEAE-52 纤维素层析进行纯化,对纯化的山药皮多糖主要组分进行红外光谱和单糖组分等结构特征分析,并测定其多糖组分对 DPPH 自由基、羟自由基、超氧阴离子自由基及 ABTS 自由基等的体外清除效果,以期对山药皮资源的充分利用和活性多糖的开发应用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

山药 为产自河南温县的铁棍山药,山药皮为加工山药粉后的皮渣副产物;葡萄糖 分析纯,南京森贝伽生物科技有限公司;DEAE-52 纤维素、考马斯亮蓝 G-250、牛血清蛋白、Sephadex-100、各种标

准葡聚糖和蓝色葡聚糖(Dextran T-2000) 北京索莱宝科技有限公司;木瓜蛋白酶(食品级,≥100000 U/g) 河南万邦化工科技有限公司;单糖标准品(岩藻糖、鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、甘露糖、果糖、核糖、半乳糖醛酸、葡萄糖醛酸、氨基半乳糖盐酸盐、盐酸氨基葡萄糖、N-乙酰-D 氨基葡萄糖、古罗糖醛酸、甘露糖醛酸) 均为分析纯,博睿糖生物公司;其他试剂均为分析纯。

723N 可见分光光度计 上海佑科仪器仪表有限公司;UV1902 双光束紫外可见分光光度计 上海奥析科学仪器有限公司;IS100 傅里叶红外光谱仪 美国尼高力有限公司;22176-60004 离子色谱仪 赛默飞公司。

1.2 实验方法

1.2.1 山药皮粗多糖提取 削皮后的山药皮于烘箱中 60 ℃ 烘 5 h,粉碎后过 100 目筛;用 95% 乙醇在 80 ℃ 条件下进行脱脂脱色处理 4 h,再次烘干后得到山药皮干粉密封备用。精确称取 10.0 g 山药皮干粉加入蒸馏水于水浴锅中浸提(料液比为 1:30),设置 85 ℃ 的浸提温度,浸提 5 h 后,用真空泵抽滤后进行蒸发浓缩(60 ℃, 30 min),再采用不同终浓度(分别为 50%、60%、70%、80%、90%)的乙醇进行醇沉(4 ℃, 12 h)^[17],真空泵进行抽滤、滤渣于 55 ℃ 烘箱中烘至恒重,即得到粗多糖样品。在得到较优的乙醇终浓度后,在此浓度下大量制备山药皮粗多糖,并进行后续的脱蛋白处理。

1.2.2 山药皮多糖的脱蛋白方法 将上述制备的山药皮粗多糖(浓度为 200 μg/mL)分别采用三氯乙酸法、Sevag 法、木瓜蛋白酶-Sevag 法进行脱蛋白^[18-19]。其中,蛋白脱除率和多糖保留率分别公式为:

蛋白脱除率(%)=(脱蛋白前的蛋白含量-脱蛋白后的蛋白含量)/脱蛋白前的蛋白含量×100

多糖保留率(%)=脱蛋白后的多糖含量/脱蛋白前的多糖含量×100

1.2.2.1 Sevag 法脱蛋白 按氯仿和正丁醇体积比 4:1 配制 Sevag 试剂,取山药皮粗多糖溶液(200 μg/mL) 50 mL,加入等体积的 1/4 的 Sevag 试剂,剧烈摇晃 30 min,静置 1.5 h 使溶液分层,弃去下层的浑浊有机溶剂层和不溶性蛋白质层后再次加入 Sevag 试剂,上述操作重复 6 次以上,直至有机溶剂层澄清及不出现蛋白质层。

1.2.2.2 三氯乙酸法脱蛋白 配制 200 μg/mL 的粗多糖溶液,取 50 mL,分别加入三氯乙酸使其终浓度分别为 3%、6%、9%、12%、15%,充分混匀后静置过

夜,离心(10000 r/min, 15 min)除去不溶性沉淀。

1.2.2.3 酶法(木瓜蛋白酶)-Sevag 法 取山药皮粗多糖溶液(200 $\mu\text{g/mL}$) 50 mL,加入多糖重量 4% 的木瓜蛋白酶,于 55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下酶解 3 h,迅速升温至 90 $^{\circ}\text{C}$ 进行灭酶处理 10 min,后续操作同 1.2.2.1。

1.2.3 样品中蛋白含量测定 采用考马斯亮蓝法测定蛋白质含量^[20],以标准牛血清蛋白绘制标准曲线,得标准曲线方程为 $y=0.0109x-0.0086$, $R^2=0.9996$,其中纵坐标为吸光度,横坐标为蛋白质浓度。样品按同样条件进行反应,根据标准曲线得蛋白质含量。

1.2.4 山药皮多糖含量的测定 用苯酚-硫酸法测山药皮多糖含量^[21],以葡萄糖绘制标准曲线,得标准曲线方程为 $y=0.0036x+0.4527$, $R^2=0.9931$,其中纵坐标为吸光度,横坐标为多糖浓度。准确称取山药皮多糖 0.100 g,配制成 100 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,测其在波长 490 nm 处的吸光度,根据标准曲线回归方程计算出多糖的质量浓度,多糖得率按式(1)计算。

$$\text{山药皮多糖得率}(\%) = \frac{\rho \times V \times n}{m} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

式中: m 为山药皮粉质量, g ; V 为山药皮多糖溶液总体积, mL ; n 为稀释倍数; ρ 为样品多糖质量浓度, $\mu\text{g/mL}$ 。

1.2.5 山药皮多糖的分离纯化 取 200 mg 去蛋白的粗多糖溶液上样,用 DEAE-52 纤维素柱层析,分别用蒸馏水、0.05、0.10、0.20、0.50 mol/L 的 NaCl 溶液进行梯度洗脱。用苯酚-硫酸法检测收集的多糖溶液,收集含量最高的多糖组分。

1.2.6 山药皮多糖分子量的测定 采用 Sephadex G-100 葡聚糖凝胶过滤柱层析法^[17],用蒸馏水洗脱,洗脱速度为 0.5 mL/min。各标准葡聚糖和蓝色葡聚糖上样量均为 2.0 mg,首先用蓝色葡聚糖测得洗脱体积为 V_0 ,然后用型号 T-110、T-70、T-40、T-10 标准葡聚糖相继上柱。收集洗脱液,每管 3 mL,苯酚-硫酸法进行检测,根据吸光度确定洗脱体积 V_e 。以 V_e/V_0 为纵坐标,分子量的自然对数 $\lg M_r$ 为横坐标,绘制标准曲线,该标准曲线的回归方程是: $(V_e/V_0) = -1.4265(\lg M_r) + 7.5362$, $R^2=0.9976$ 。在同样洗脱条件下,取 2.0 mg 纯化后的 CYPP-1 和 CYPP-2 上柱,测定各自的洗脱体积 V_e' ,结合标准曲线和 V_e'/V_0 值计算出相应的分子量。

1.2.7 山药皮多糖的红外光谱扫描 取 1.5 mg 经过冷冻干燥后的多糖组分 CYPP-1、CYPP-2 与 100 mg 溴化钾粉末完全充分混合,用研钵研磨后压片,在傅里叶红外光谱仪中的 4000~500 cm^{-1} 波数范围内进行扫描分析。

1.2.8 山药皮多糖的单糖组成分析 准确称量 5 mg 样品于安瓿瓶中,加入 2 mL 三氟乙酸(3 mol/L),在 120 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下水解 3 h,然后吸取 1 mL 溶液于干净试管中氮吹至干,加入 5 mL 去离子水并涡旋,吸

取 50 μL 加入 950 μL 超纯水并离心(12000 r/min, 5 min)。取上清液进行离子色谱仪分析,进样量为 5 μL 。色谱条件参照陈怡君等^[22]。

1.2.9 山药皮多糖组分体外抗氧化活性 纯化后的 CYPP-1 和 CYPP-2 分别溶于超纯水,分别配制不同浓度的溶液备用。以相同浓度的抗坏血酸(Ascorbic acid, V_C)作为阳性对照。采用李尧等^[23]的方法,测定 CYPP-1 和 CYPP-2 对 DPPH 自由基、羟自由基、ABTS⁺ 自由基和超氧阴离子的清除能力。

1.3 数据处理

各组实验均平行 3 次,通过 Excel 2010 软件处理数据,进行单因素方差和显著性差异分析($P < 0.05$),并用 Origin 8.6 软件绘制图表。

2 结果与分析

2.1 不同乙醇终浓度对山药皮粗多糖得率的影响

乙醇的加入会使多糖的溶解度降低,从而被析出。由图 1 可知,随着乙醇终浓度的升高,山药皮粗多糖的得率不断增大,在乙醇终浓度为 90% 时,得率最高,为 9.55%,故在此浓度下大量制备山药皮粗多糖,并进行下一步的脱蛋白。

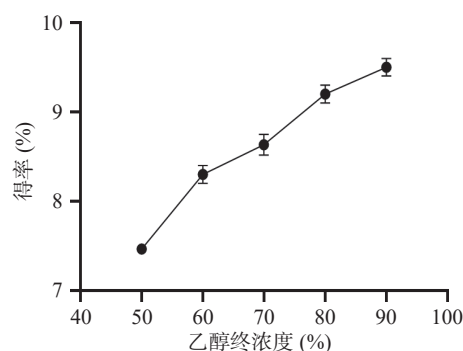


图 1 不同乙醇终浓度对山药皮多糖得率的影响

Fig.1 Effects of different final concentrations of ethanol on the yield of polysaccharides from yam bark

2.2 山药皮多糖脱蛋白工艺

如图 2A,在 Sevag 试剂的持续脱蛋白处理下,蛋白质去除率随之增加,处理次数达 8 次后,蛋白脱除率可达 75% 以上;但随着脱蛋白次数的增加,多糖保留率降低,经过 6 次处理后多糖保留率低于 65%,然后趋于平稳。多糖保留率随脱蛋白次数增加而降低,这可能是由于部分糖蛋白会在 Sevag 试剂的处理过程中沉淀下来。用该法脱蛋白,多糖保留率以及蛋白去除率都比较高,8 次处理具有良好的效果。

如图 2B,在三氯乙酸终浓度为 12% 时,蛋白去除率较高,可达 71.2%。随着其浓度增加至 15% 时,多糖保留率逐渐降低至 41.6%。与 Sevag 法比较,三氯乙酸导致大量蛋白变性而沉淀下来,但此法对山药皮多糖破坏大,因此多糖保留率低,此方法没有 Sevag 法的脱蛋白效果好。

如图 2C,在木瓜蛋白酶作用并经过 Sevag 试剂 6 次处理后,蛋白去除率和多糖保留率变化不

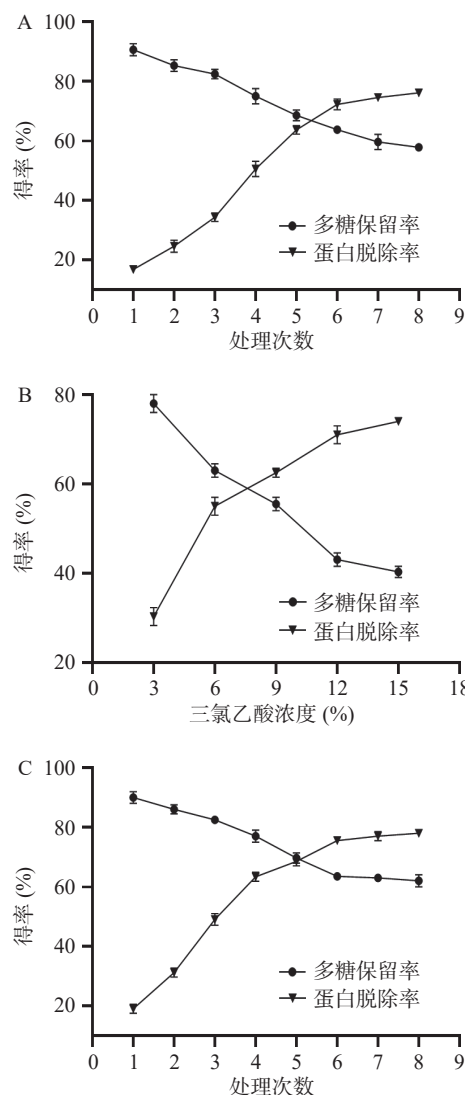


图2 Sevag 法(A)、三氯乙酸法(B)和木瓜蛋白酶-Sevag 法(C)除蛋白

Fig.2 The results of Sevag method (A), trichloroacetic acid method (B) and the papain-Sevag method (C) for protein removal

大, 同时对比图 2A 可知, 木瓜蛋白酶结合 Sevag 试剂脱蛋白 6 次后即可达到 Sevag 法脱蛋白 8 次的效果, 这可能是由于木瓜蛋白酶对蛋白质大分子的酶解, 使得脱蛋白处理次数减少, 脱蛋白效果提高。因此木瓜蛋白酶-Sevag 法是山药皮粗多糖除蛋白的最佳方法。

2.3 山药皮多糖 DEAE-纤维素阴离子交换层析纯化

由图 3 可知, 山药皮粗多糖的主要组分为 CYPP-1 和 CYPP-2, 分别收集进行冷冻干燥, 并进行下一步分析。

2.4 山药皮多糖分子量的测定

由图 4 可知, 分别收集 CYPP-1 和 CYPP-2 的 490 nm 处的吸光度大于 0.1 的管数为 24-37 管和 25-36 管, 洗脱体积 V_e 分别为 43 mL 和 39 mL。已测得标准蓝色葡聚糖外水体积 V_0 为 30 mL, 根据 V_e/V_0 值, 计算其平均相对分子量分别为 4.442 kDa 和 4.278 kDa。

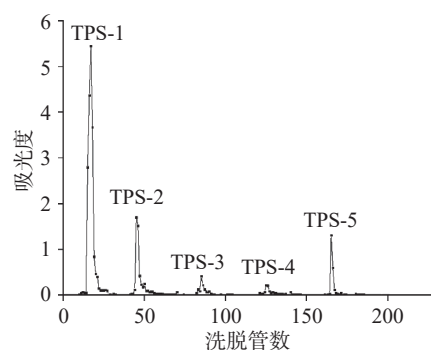


图3 山药皮多糖洗脱曲线

Fig.3 Elution curve of polysaccharides from yam bark

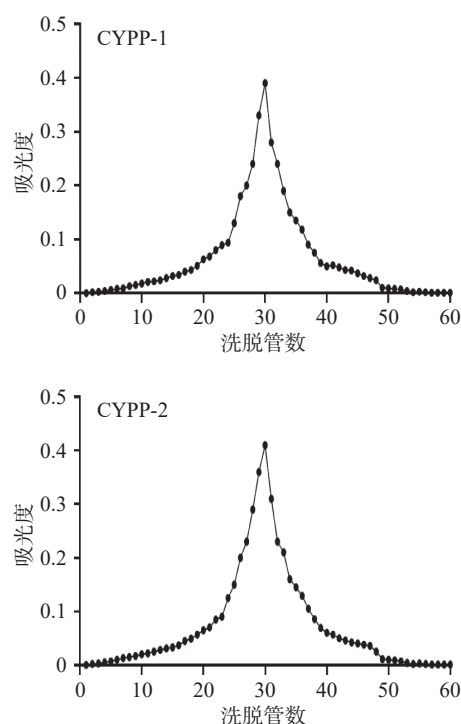


图4 CYPP-1 和 CYPP-2 的分子量测定

Fig.4 The molecular weights of CYPP-1 and CYPP-2

2.5 山药皮多糖组分红外扫描图谱

如图 5 所示, CYPP-1 和 CYPP-2 分别在 3426 cm^{-1} 和 3425 cm^{-1} 波数处产生较强宽带为 -OH 伸缩振动吸收峰; 在 2984 cm^{-1} 和 2985 cm^{-1} 处的吸收峰为 C-H 键的不对称伸缩振动, 是多糖的特征基团吸收峰; 在 1617 cm^{-1} 和 1609 cm^{-1} 处的吸收峰为该分子中的羰基 C=O 的伸缩振动; 两者均在 1255 cm^{-1} 处没有吸收峰, 表明多糖中没有硫酸基, 证明 CYPP-1 和 CYPP-2 是不带电荷的中性多糖^[24]。CYPP-1 在 1396 cm^{-1} 、 1351 cm^{-1} 处产生的吸收峰为 C-H 变角振动, 786 cm^{-1} 处产生的吸收峰表明此多糖以 α -型差向异构为主^[25]。由红外光谱分析, 山药皮多糖组分 CYPP-1 具有多糖的结构特征, 为 α -型多糖。CYPP-2 在 $1200\sim 1000\text{ cm}^{-1}$ 处的三个吸收峰 1173 、 1079 、 1008 cm^{-1} 是由醚键 C-O-C 振动而产生, 表明 CYPP-2 中的糖环为吡喃糖环。在 799 cm^{-1} 和 859 cm^{-1} 处的吸收峰表明多糖以 α 型差

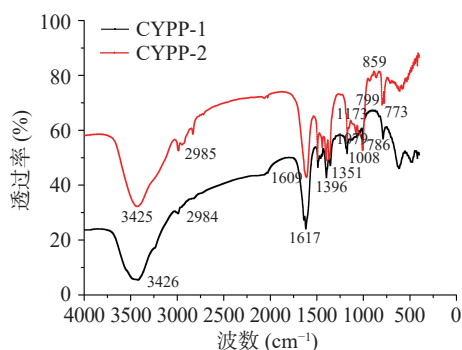


图5 CYPP-1和CYPP-2红外扫描图谱

Fig.5 Infrared scanning diagrams of CYPP-1 and CYPP-2
向异构为主,且在 773 cm^{-1} 处产生了 α -异构体吡喃己糖环的对称振动^[26-27]。由红外光谱分析可知,山药

皮多糖组分 CYPP-2 具有多糖的结构特征,为 α -异构体吡喃己糖环多糖。

2.6 山药皮多糖单糖组分分析

采用 16 种不同单糖标准品制作单糖标准品液相色谱图(图 6A)。CYPP-1 主要含有盐酸氨基葡萄糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖、葡萄糖醛酸,摩尔比为 11.1:14.4:21.8:35.0:10.8, CYPP-2 主要含有盐酸氨基葡萄糖、甘露糖、葡萄糖醛酸,摩尔比为 10.5:47.9:16.8(图 6B 和 6C)。

2.7 山药皮多糖体外抗氧化活性分析

在本研究中, CYPP-1 和 CYPP-2 的体外抗氧化活性性能通过对四种自由基的清除能力来进行评价,并用 V_C (浓度为 $0.5\sim 8.0\text{ mg/mL}$)作为阳性对照。

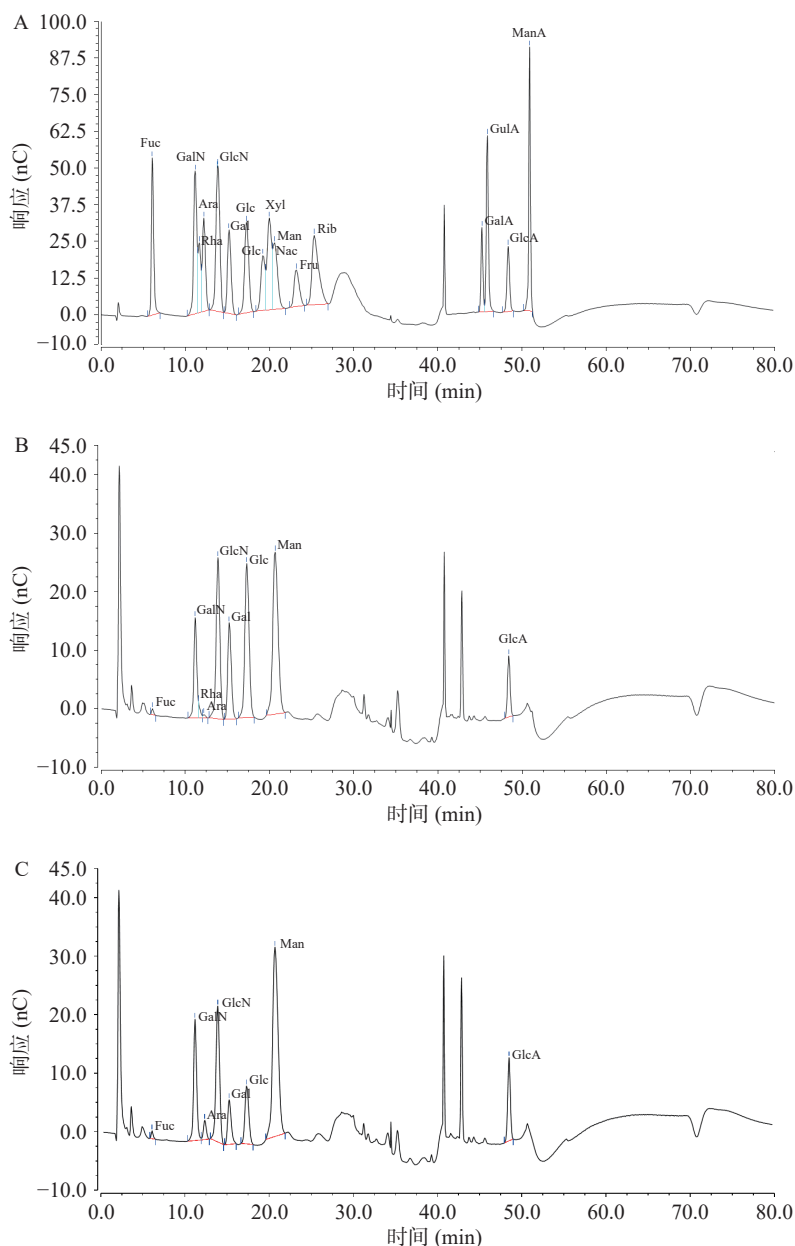


图6 单糖标准品(A)、CYPP-1(B)和CYPP-2(C)的离子色谱图

Fig.6 Iron liquid chromatograms of monosaccharide standards (A), CYPP-1 (B) and CYPP-2 (C)

注: Fuc(岩藻糖)、GalN(盐酸氨基半乳糖)、Rha(鼠李糖)、Ara(阿拉伯糖)、GlcN(盐酸氨基葡萄糖)、Gal(半乳糖)、Glc(葡萄糖)、GlcNAc(N-乙酰-D-氨基葡萄糖)、Xyl(木糖)、Man(甘露糖)、Fru(果糖)、Rib(核糖)、GlcA(半乳糖醛酸)、GulA(古罗糖醛酸)、GlcA(葡萄糖醛酸)、ManA(甘露糖醛酸)。

在浓度为 0.5~8.0 mg/mL 时, CYPP-1 和 CYPP-2 对 DPPH 清除率分别为 20.25%~89.83% 和 19.12%~80.14%, 两种 CYPP 都展现了较好的 DPPH 自由基清除能力; 浓度为 8.0 mg/mL 时, CYPP-1 清除 DPPH 活性略高于 CYPP-2(图 7A)。CYPP-1 和 CYPP-2 对羟自由基的清除率分别为 21.78%~46.72% 和 16.9%~40.30%; CYPP-1 最高浓度清除羟自由基活性略高于 CYPP-2(图 7B)。在浓度为 0.5~8.0 mg/mL 时, CYPP-1 和 CYPP-2 对 ABTS⁺ 自由基清除率分别为 24.69%~67.27% 和 23.51%~59.27%; CYPP 浓度

为 8.0 mg/mL 时, CYPP-1 清除率高于 CYPP-2, 差异较显著(图 7C)。超氧阴离子自由基的清除率不存在浓度依赖性; CYPP-1 和 CYPP-2 对超氧阴离子自由基在不同浓度下最高清除率分别为 58.70% 和 50.70%(图 7D)。

CYPP-1 和 CYPP-2 的单糖组成和比例存在显著差异, 可能导致它们抗氧化活性不同。多糖的抗氧化活性与分支程度、糖苷键、单糖组成、分子量、结构修饰和结构特征等密切相关^[28-29]。CYPP-1 的抗氧化活性高于 CYPP-2, CYPP-1 的单糖组成中还含有半乳糖和葡萄糖, CYPP-2 中甘露糖和葡萄糖醛酸的含量较高, 推测半乳糖和葡萄糖能提升多糖的抗氧化活性, 但有研究表明糖醛酸含量高也能提升多糖的抗氧化活性^[30], 具体的单糖组成和比例对抗氧化活性的影响还有待继续研究。CYPP-1 的分子量比 CYPP-2 的大, 验证了分子量大的多糖抗氧化性较好^[31]。CYPP-1 和 CYPP-2 清除自由基的效果都较好, 因此具有一定的应用前景。

3 结论

本文对山药皮多糖进行分离纯化和结构特征分析, 并考察了纯化组分的体外抗氧化活性。探究了乙醇终浓度和 3 种脱蛋白方法对山药皮多糖得率的影响, 离子交换层析纯化后得到山药皮多糖 CYPP-1 和 CYPP-2。两种纯化多糖的分子量分别为 4.442 kDa 和 4.278 kDa, 红外光谱分析显示其均为 α -型植物多糖的结构特征。通过离子色谱分析, CYPP-1 由盐酸氨基葡萄糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖和葡萄糖醛酸组成, 摩尔比分别为: 11.1:14.4:21.8:35.0:10.8; CYPP-2 由盐酸氨基葡萄糖、甘露糖和葡萄糖醛酸组成, 摩尔比分别为: 10.5:47.9:16.8。综合比较 CYPP-1 和 CYPP-2 的体外抗氧化效果, 除了超氧阴离子外, CYPP-1 和 CYPP-2 对 DPPH 自由基、羟自由基和 ABTS⁺ 自由基清除能力都与多糖的浓度呈正相关, 单糖组成含有半乳糖和葡萄糖且分子量较大的 CYPP-1 的抗氧化活性高于 CYPP-2。

随着山药的食用价值、保健功效和药用价值越来越受到人们的重视, 对于山药的研究应用也会更加深入, 但随之而来的关于山药副产物资源的充分利用问题也需要相应重视。本研究对山药皮多糖进行了分离纯化, 并对其结构特征和体外抗氧化活性进行了探究, 为山药皮的再利用以及山药皮多糖的研究和应用提供一定的理论依据。

参考文献

- [1] WANG X, HUO X Z, LIU Z, et al. Investigations on the anti-aging activity of polysaccharides from Chinese yam and their regulation on klotho gene expression in mice[J]. *Journal of Molecular Structure*, 2020, 1208(C): 127895.
- [2] SUN Y P, LIU T, SI Y P, et al. Integrated metabolomics and 16S rRNA sequencing to investigate the regulation of Chinese yam on antibiotic-induced intestinal dysbiosis in rats[J]. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2019, 47(1): 3382-3390.

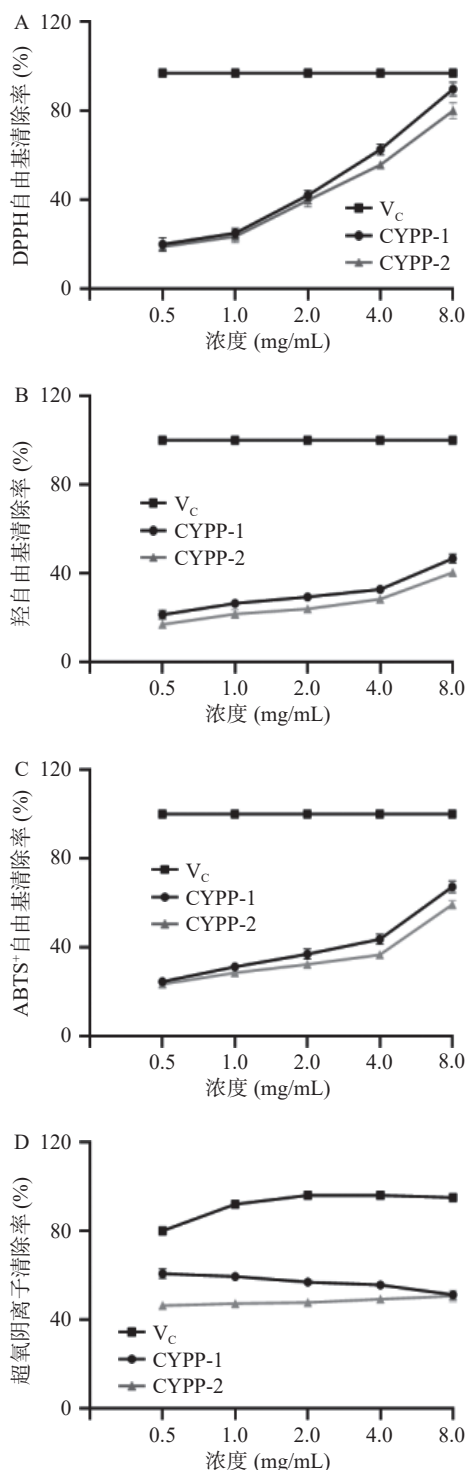


图 7 CYPP-1 和 CYPP-2 的抗氧化活性

Fig.7 The antioxidant activities of CYPP-1 and CYPP-2

- [3] GUO X X, SHA X H, LIU J, et al. Chinese purple yam (*Dioscorea alata* L.) extracts inhibit diabetes-related enzymes and protect hepG2 cells against oxidative stress and insulin resistance induced by FFA[J]. *Food Science and Technology Research*, 2015, 21(5): 677–683.
- [4] DENG J H, ZHANG J Z, CHANG Y D, et al. Effects of Chinese yam polysaccharides on the immune function and serum biochemical indexes of broilers[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2022, 9: 1013888.
- [5] BAI Y J, ZHOU Y, ZHANG R F, et al. Gut microbial fermentation promotes the intestinal anti-inflammatory activity of Chinese yam polysaccharides[J]. *Food Chemistry*, 2023, 402: 134003.
- [6] EYINLA T E, SANUSI R A, MAZIYA D B. Evaluation of *in vitro* and *in vivo* glycemic index of common staples made from varieties of white yam (*Dioscorea rotundata*)[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2022, 9: 983212.
- [7] 马艳弘,殷剑美,魏建明,等.山药皮多糖超声辅助提取工艺及其抗氧化活性[J].食品研究与开发,2016,37(19):34–39.
- [8] MA Y H, YIN J M, WEI J M, et al. Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from yam bark and their antioxidant activity[J]. *Food Research and Development*, 2016, 37(19): 34–39.
- [8] 吕鹏,贾秀梅,张振凌,等.怀山药及非药用部位总黄酮含量测定[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(2):65–68.
- [9] LÜ P, JIA X M, ZHANG Z L, et al. Determination of the total flavonoid content of Chinese yam and non-medicinal parts[J]. *Chinese Journal of Experimental Formulary*, 2012, 18(2): 65–68.
- [9] YANG Y, JI J, DI L Q, et al. Resource, chemical structure and activity of natural polysaccharides against alcoholic liver damages[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 241: 116355.
- [10] KUMAR K, SRIVASTAV S, SHARANAGAT V S. Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2021, 70: 105325.
- [11] 于莲,张俊婷,马淑霞,等.山药多糖提取工艺优化及其抗菌活性研究[J].中成药,2014,36(6):1194–1198.
- [12] YU L, ZHANG J T, MA S X, et al. Optimization of extraction process of yam polysaccharide and its antibacterial activity[J]. *Prepared Chinese Medicine*, 2014, 36(6): 1194–1198.
- [12] 段伟萍,李新蕊,司明东,等.山药多糖提取工艺的响应面法优化及其功能活性分析[J].食品研究与开发,2020,41(7):118–123.
- [13] DUAN W P, LI X R, SI D M, et al. Optimization of the extraction process of yam polysaccharides by response surface methodology and its functional activity analysis[J]. *Food Research and Development*, 2020, 41(7): 118–123.
- [13] 喻随,邓霞,陈思颖,等.纤维素酶法提取佛手山药多糖的工艺[J].食品工业,2020,41(9):60–63.
- [14] YU S, DENG X, CHEN S Y, et al. Cellulose enzymatic extraction of polysaccharides from fructus yam[J]. *Food Industry*, 2020, 41(9): 60–63.
- [14] 王涛,朱晓伟,邵果园,等.正交设计法优选紫山药多糖的提取工艺[J].安徽农业科学,2015,43(34):62–64.
- [15] WANG T, ZHU X W, SHAO G Y, et al. Optimization of the extraction process of purple yam polysaccharides by orthogonal design method[J]. *Anhui Agricultural Science*, 2015, 43(34): 62–64.
- [15] 李倩倩,陈贵元.刺梨果多糖提取过程中脱蛋白和脱色方法研究[J].安徽农业科学,2022,50(11):162–166,183.
- [16] LI Q Q, CHEN G Y. Study on deproteinization and decolorization methods in the extraction of prickly pear polysaccharides[J]. *Anhui Agricultural Science*, 2022, 50(11): 162–166,183.
- [16] 梁杉,王琨,刘佩瑶,等.山药多糖结构、生物活性及其机制研究进展[J].食品科学,2022,43(23):296–304.
- [17] LIANG S, WANG K, LIU P Y, et al. Progress in understanding the structure, biological activity and mechanism of yam polysaccharides[J]. *Food Science*, 2022, 43(23): 296–304.
- [17] 吴金松,耿广威,陈晓培,等.信阳毛尖茶末多糖的分离纯化和体外抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2020,41(13):181–186.
- [18] WU J S, GENG G W, CHEN X P, et al. Isolation and purification of polysaccharides from Xinyang Mao Jian tea powder and *in vitro* antioxidant activity[J]. *Food Industry Technology*, 2020, 41(13): 181–186.
- [18] 许静.北苍术多糖的提取、性质及抗肿瘤活性研究[D].天津:天津医科大学,2015.
- [19] XU J. Extraction, properties and antitumor activity of polysaccharides from *Atractylodes macrocephala* [D]. Tianjing: Tianjin Medical University, 2015.
- [19] 周鸿立,杨晓虹.玉米须多糖中蛋白质脱除的Sevag与酶法联用工艺优化[J].食品科学,2011,32(8):129–132.
- [20] ZHOU H L, YANG X H. Optimization of Sevag and enzymatic process for protein removal from maize whisker polysaccharides[J]. *Food Science*, 2011, 32(8): 129–132.
- [20] 周艳星,侯敢,陈泳诗,等.乳制品饮料中蛋白质含量测定方法的比较分析[J].食品安全导刊,2021(9):101–103.
- [21] ZHOU Y X, HOU G, CHEN Y S, et al. Comparative analysis of methods for the determination of protein content in dairy beverages[J]. *Food Safety Guide*, 2021(9): 101–103.
- [21] 刘刚,梁琪,宋雪梅,等.复合诱变选育高产胞外多糖嗜热链球菌菌株[J].食品与发酵科技,2019,55(1):11–18,70.
- [22] LIU G, LIANG Q, SONG X M, et al. Compound mutagenesis for the selection of strains of *Streptococcus thermophilus* with high extracellular polysaccharide production[J]. *Food and Fermentation Technology*, 2019, 55(1): 11–18,70.
- [22] 陈怡君,王晓慧,陈艳萍,等.响应面法优化超声波-微波协同辅助酸法提取猕猴桃果皮果胶工艺及果胶理化性质分析[J].食品与发酵工业,2022,48(13):238–246.
- [23] CHEN Y J, WANG X H, CHEN Y P, et al. Optimization of ultrasonic-microwave-assisted acid extraction of kiwifruit peel by response surface methodology and analysis of pectin physicochemical properties[J]. *Food and Fermentation Industry*, 2022, 48(13): 238–246.
- [23] 李尧,卢承蓉,刘丹,等.乳酸片球菌胞外多糖的分离纯化、结构分析及抗氧化活性研究[J].食品与发酵工业,2021,47(19):35–42.
- [24] LI Y, LU C R, LIU D, et al. Isolation and purification, structural analysis and antioxidant activity of extracellular polysaccharides from *Lactococcus lactis* [J]. *Food and Fermentation Industry*, 2021, 47(19): 35–42.
- [24] GRINTZALIS K, GEORGIU C D, SCHNEIDER Y J. An accurate and sensitive coomassie brilliant blue G-250-based assay for protein determination[J]. *Analytical Biochemistry*, 2015, 480: 28–30.
- [25] 陈俊彰.佛手山药中性多糖的结构分析及体外抗氧化活性研究[D].武汉:湖北中医药大学,2015.
- [26] CHEN J Z. Structural analysis and *in vitro* antioxidant activity of neutral polysaccharides from Fructus yam[D]. Wuhan: Hubei University of Chinese Medicine, 2015.
- [26] 陈运中,廖晓铃,陈莹莹.佛手山药多糖的分离纯化及组分结构分析[J].湖北中医药大学学报,2013,15(4):33–37.
- [27] CHEN Y Z, LIAO X L, CHEN Y Y. Isolation and purification of polysaccharides from Fructus yam and structural analysis of the components[J]. *Journal of Hubei University of Chinese Medicine*, 2013, 15(4): 33–37.
- [27] 顾林,姜军,孙婧.山药多糖的分离纯化及其结构鉴定[J].

食品科技, 2007, 5: 109–112. [GU L, JIANG J, SUN J. Isolation and purification of polysaccharides from yam and their structural identification[J]. Food Technology, 2007, 5: 109–112.]

[28] 黄少杰, 黎攀, 杜冰. 山药多糖的纯化、结构及生物活性研究进展[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(16): 209–215. [HUANG S J, LI P, DU B. Progress in the purification, structure and bioactivity of yam polysaccharides[J]. Food Research and Development, 2022, 43(16): 209–215.]

[29] WU J S, HAN X P, YE M Z, et al. Exopolysaccharides synthesized by lactic acid bacteria: Biosynthesis pathway, structure-function relationship, structural modification and applicability[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2022: 2043822.

[30] 石曾卉, 刘丽阳, 洪慧丽, 等. 山芹菜多糖的分离纯化、结构分析及抗氧化活性比较[J]. 现代食品科技, 2022, 38(10): 124–132. [SHI Z H, LIU L Y, HONG H L, et al. Isolation and purification, structural analysis and comparison of antioxidant activity of polysaccharides from the mountain celery, *Celastrus sativus*[J]. Modern Food Technology, 2022, 38(10): 124–132.]

[31] 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, REN Z H, ZHANG H N, et al. Isolation and purification of shoga bark polysaccharides, their monosaccharide composition and antioxidant activity[J]. Food Industry Technology, 2023, 44(13): 71–78.]