

高降糖活性柠檬皮多糖制备工艺优化及结构表征

Optimization of preparation process and preliminary structure characterization of polysaccharides from lemon peel with high hypoglycemic activity

蒋忠桂¹ 李 迪¹ 李开凤¹ 马 莉² 顾 欣¹

JIANG Zhonggui¹ LI Di¹ LI Kaifeng¹ MA Li² GU Xin¹

(1. 重庆三峡学院生物与食品工程学院, 重庆 404199; 2. 重庆汇达柠檬科技集团有限公司, 重庆 402600)

(1. College of Biology and Food Science, Chongqing Three Gorges University, Chongqing 404199, China;

2. Huida Lemon Technology Group Co., Ltd., Chongqing 402600, China)

摘要:目的:优化柠檬皮多糖制备的最佳工艺并筛选出柠檬皮多糖高降糖活性组分。方法:采用超声波辅助酶法提取柠檬皮多糖,结合响应面试验探究其最佳提取工艺,通过 DEAE-52 阴离子层析柱、Sephadex G-100 凝胶柱层析分离纯化得到均一多糖组分(命名 LPs-1a),以 α -葡萄糖苷酶筛选柠檬皮多糖有效降糖组分并分析其相对分子质量、单糖组成和特征基团。结果:柠檬皮多糖的最佳提取工艺为超声时间 44 min、超声温度 55 $^{\circ}\text{C}$ 、料液比 1:20 (g/mL)、纤维素酶添加量 1.1%,此时柠檬皮多糖得率为 6.83%,与预测值接近;筛选出的 LPs-1a 组分能显著抑制 α -葡萄糖苷酶活性 ($P < 0.05$),其 IC_{50} 值为 (1.22 ± 0.04) mg/mL。该组分相对分子质量为 195 260, α -糖苷键和 β -糖苷键连接具有吡喃糖环,形貌为纤维状的酸性多糖,由甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖组成。结论:超声波辅助酶法有助于柠檬皮多糖高降糖活性成分的筛选。

关键词:柠檬皮;多糖;制备;高降糖活性;结构表征

Abstract: Objective: This study aimed to optimize the preparation process of polysaccharides from lemon peel and screen out the components with high hypoglycemic activity. Methods: Ultrasonic assisted enzymatic extraction of lemon peel polysaccharide, combined with response surface test to explore

the best extraction process, through DEAE-52 anion chromatography and Sephadex G-100 gel column chromatography separation and purification to obtain a homogeneous polysaccharide fraction (named as LPs-1a). The effective hypoglycemic components of lemon peel polysaccharides were screened by α -glucosidase and their relative molecular weight, monosaccharide composition and characteristic groups were analyzed. Results: The optimal extraction process of lemon peel polysaccharide was ultrasonic treatment for at 55 $^{\circ}\text{C}$ for 44 min with solid-liquid ratio 1:20 (g/mL) and cellulase addition rate 1.1%. Under the control of these conditions, the yield of lemon peel polysaccharide was 6.83%, which was close to the predicted value. The LPs-1a fraction significantly inhibited the activity of α -glucosidase with (1.22 ± 0.04) mg/mL of IC_{50} ($P < 0.05$). The relative molecular weight of this component was 195 260, and it was connected by α -glycosidic bonds and β -glycosidic bonds with a pyranose ring. The morphology of the polysaccharide was fibrous, and it was composed of mannose, rhamnose, glucuronic acid, galacturonic acid, glucose, galactose and arabinose. Conclusion: Ultrasound-assisted enzymatic method is helpful in screening the highly hypoglycemic active components of lemon peel polysaccharides.

Keywords: lemon peel; polysaccharide; preparation; high hypoglycaemic activity; structural characterization

基金项目:重庆市教委科学技术研究项目(编号: KJQN202201219);重庆市研究生科研创新项目(编号: CYS22705)

作者简介:蒋忠桂,女,重庆三峡学院在读硕士研究生。

通信作者:顾欣(1983—),女,重庆三峡学院副教授,博士。

E-mail: shipinzhiang03@163.com

收稿日期:2023-10-19 **改回日期:**2024-04-08

柠檬(*Citrus limon* (L.) Burm. f.),为芸香科柑橘属植物,又称益母果、柠果等,主要分布于四川安岳、云南瑞丽、广东、广西等地^[1]。中国柠檬产量约 271 万 t,占全球产量的 13.5%,由于其深加工和副产品利用率较低,大部

分柠檬皮被浪费^[2]。柠檬皮中富含果胶、柠檬苦素、黄酮类化合物、膳食纤维及柠檬精油等成分,在抗菌活性、降低胆固醇、抑制肠道炎症、抗氧化、抗高血压、抗糖尿病、镇痛抗炎、润便等^[3-5]方面发挥着重要作用。

多糖是由 10 个以上单糖以糖苷键链接成的生物活性大分子^[6]。天然多糖具有抗氧化、降血糖、增强免疫、消炎、抗高血压等作用^[7-9]。来自不同植物源的 α -葡萄糖苷酶抑制剂 (AGIs) 可以显著抑制 α -葡萄糖苷酶活力,阻碍小肠内碳水化合物的消化和葡萄糖的吸收,是控制糖尿病患者的主要手段之一^[10]。但该药物会产生各种副作用,如呕吐、腹泻等^[11]。目前,关于柑橘属皮渣类多糖的研究主要集中在橘皮和柚皮多糖,对柠檬皮多糖的分离纯化组分的生物活性、结构解析研究较少。根据文献^[12-14],柚皮、橘皮多糖均表现出很强的抗氧化活性,对 RAW264.7 巨噬细胞有显著的免疫调节活性。Liu 等^[15]研究发现,柑橘属多糖能明显改善糖尿病大鼠的葡萄糖耐量、肝糖原含量及血脂水平,从而达到降血糖目的。但关于柠檬皮多糖有效降糖成分的筛选尚未见报道。多糖的提取多采用水浸提法、碱法、酶法、超声波法或微波法,但单一方法的柠檬皮多糖得率较低,不利于多糖的进一步分离纯化、结构解析等研究。

研究拟采用超声波辅助酶法提取柠檬皮原料中的多糖,优化柠檬皮多糖的提取工艺,经透析、DEAE-52 纤维素层析柱、Sephadex G-100 葡聚糖凝胶层析柱筛选出对 α -葡萄糖苷酶有效抑制的成分,并采用紫外可见光谱 (UV)、傅里叶变换红外光谱 (FT-IR)、高效液相色谱 (HPLC)、高效凝胶渗透色谱 (HPGPC) 和扫描电镜 (SEM) 分析其结构,为柠檬皮多糖的综合利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

柠檬:重庆汇达柠檬科技集团有限公司;
纤维素酶:山东圣斯德食品添加剂有限公司;
氢氧化钠标准溶液:广州市刺水科技有限公司;
 α -葡萄糖苷酶:上海源叶生物科技有限公司;
三氟乙酸、单糖标品:美国 Sigma 公司;
其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

紫外可见分光光度计:UV-2450 型,日本岛津公司;
超声波清洗机:H-008S 型,广州市繁花科技有限公司;
高速离心机:TGL-20B 型,上海安亭科学仪器厂;
傅里叶变换红外光谱仪:FTIR-650 型,天津港东科技股份有限公司;
三重四极杆液相色谱—质谱联用仪:Xevo TQ-S

micro 型,美国 Waters 公司;

高效液相色谱仪:I-class UPLC Waters 1515 型,美国 Waters 公司;

冷冻干燥机:ALPH1-2/LD-Plus 型,德国 CHRIST 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 柠檬皮多糖提取工艺 新鲜柠檬皮洗净后取白色内表皮,烘干,粉碎过 80 目筛,得柠檬皮粉。称取 10 g 柠檬皮粉,按一定料液比加入蒸馏水,用 NaOH 溶液调节 pH 至 9.0,控制超声波温度、超声波时间及纤维素酶用量提取多糖,4 000 r/min 离心 5 min,取上清液,加入 5 倍体积的无水乙醇进行醇沉,4 ℃ 静置 12 h,4 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,冷冻干燥,得柠檬皮粗多糖。

1.3.2 单因素试验 固定料液比 1:30 (g/mL),纤维素酶添加量 1%,超声功率 300 W,超声温度 50 ℃、超声时间 30 min,分别考察超声时间(10,20,30,40,50 min)、超声温度(30,40,50,60,70 ℃)、料液比[1:10,1:20,1:30,1:40,1:50 (g/mL)]、纤维素酶添加量(0,0.5%,1.0%,1.5%,2.0%)对柠檬皮粗多糖得率的影响。

1.3.3 响应面试验 根据单因素试验结果,以超声时间、超声温度、料液比和纤维素酶添加量为影响因素,柠檬片粗多糖得率为指标,设计四因素三水平响应面试验优化柠檬皮粗多糖提取工艺。

1.3.4 柠檬皮多糖分离纯化 采用 Sevag 法除蛋白,透析(2 000 Da),冷冻干燥,按质量浓度 20 mg/mL,采用 DEAE-52 纤维素层析柱(2.5 cm×50 cm),用 0,0.1,0.3,0.5 mol/L NaCl 梯度洗脱,流速 1 mL/min,10 mL/管,收集 100 管,用苯酚硫酸法测定 490 nm 处各管吸光度,绘制管数—吸光度洗脱曲线。收集每个浓度主要吸收峰的洗脱液,透析(300 Da),浓缩,冷冻干燥,按质量浓度 10 mg/mL 上 Sephadex G-100(2.5 cm×50 cm)葡聚糖凝胶层析柱进一步纯化,流速 0.5 mL/min,20 mL/管,收集 50 管,采用苯酚硫酸法测定 490 nm 处各管吸光度,绘制管数—吸光度洗脱曲线,合并吸收峰,冷冻干燥,得纯化多糖。

1.3.5 柠檬皮多糖得率测定 准确称取 10 mg 葡萄糖于 100 mL 容量瓶中定容,分别吸取 0,0.1,0.2,0.3,0.4,0.5,0.6 mL 葡萄糖溶液,用蒸馏水补至 2 mL,加入 5% 苯酚溶液 1.0 mL,浓硫酸 5 mL 混匀,室温放置 20 min,测定 490 nm 处吸光度,以葡萄糖质量浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程 $y = 0.004\ 9x + 0.060\ 5$ ($R^2 = 0.999$)。按式(1)计算多糖得率。

$$Y = \frac{C \times V}{W} \times N \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

Y——多糖得率,%;

C——按标准曲线计算的多糖质量浓度, mg/mL;

V——多糖溶液体积, mL;

W——柠檬皮粉质量, g;

N——稀释倍数。

1.3.6 α -葡萄糖苷酶抑制活性测定 根据文献[16]并修改。在 96 孔板中加入不同质量浓度样液和 PNPG 溶液充分混匀, 37 °C 孵育 10 min, 加入 α -葡萄糖苷酶溶液, 37 °C 孵育 20 min, 立即用碳酸钠溶液终止反应, 测定 405 nm 处吸光度值, 以阿卡波糖作阳性对照。按式(2)计算经透析及分离纯化筛选出的各组分多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制率。

$$Y = \left(1 - \frac{A - A_2}{A_1 - A_0} \right) \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

Y——抑制率, %;

A_1 ——不加样品组的吸光度值;

A_0 ——不加样品组和酶溶液的吸光度值;

A——样品组的吸光度值;

A_2 ——不加酶溶液的吸光度值。

1.3.7 柠檬皮多糖结构表征

(1) 相对分子质量: 采用 HPGPC 法^[17]。

(2) 单糖组成: 采用 HPLC 法^[18]。

(3) 紫外光谱(UV): 称取适量柠檬皮多糖粉末, 以蒸馏水为溶剂配制成柠檬多糖溶液, 用紫外可见分光光度计于 200~400 nm 处扫描分析, 检测柠檬皮多糖是否存在核酸和蛋白质。

(4) 红外光谱(FT-IR): 称取适量柠檬皮多糖粉末, 与干燥后的 KBr(质量比 1 : 50)混合后充分研磨, 压片, 采用傅里叶变换红外光谱于 4 000~400 cm^{-1} 内进行扫描, 通过 FT-IR 光谱确定多糖的甲基酯化度(DE)^[19]。

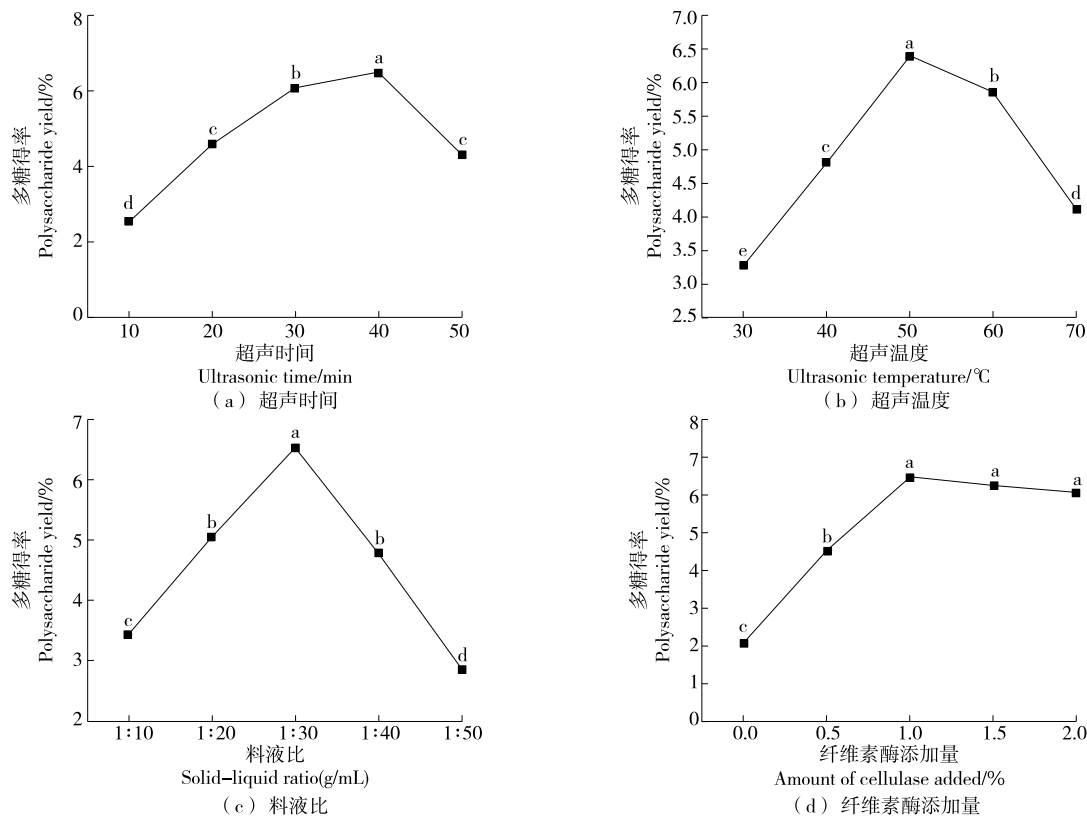
(5) 扫描电镜(SEM): 取适量柠檬皮多糖粉末, 喷金处理后于扫描电子显微镜下观察并拍摄多糖的表面形貌。

1.3.8 数据处理 根据 Design-Expert 8.0.6 软件中的 Box-Behnken 中心组合设计原理, 采用 Origin 2022 软件对数据进行处理, 运行 SPSS 26.0 软件计算 α -葡萄糖苷酶抑制活性 IC_{50} 值, 每组试验均重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

由图 1(a)可知, 当超声时间 < 40 min 时, 柠檬皮多糖得率随超声时间的延长不断提高 ($P < 0.05$), 以 40 min



小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

图 1 各因素对柠檬皮多糖得率的影响

Figure 1 Effects of various factors on the yield of polysaccharide from lemon peel

为临界点,柠檬皮多糖得率开始下降,继续延长超声时间,多糖会被超声波的空化作用、机械效应破坏或分解,同时释放出的热量使反应体系温度升高引起多糖分解^[20]。超声时间较短则不利于破坏柠檬皮的细胞壁,影响多糖的溶出。因此,选择超声时间为 30,40,50 min 进行后续响应面优化试验。

由图 1(b)可知,当超声温度为 50 ℃时,多糖得率达到最高值(6.39 %)($P<0.05$)。超声温度过高,多糖得率反而下降,可能是由于超声温度的升高导致溶剂分子扩散运动更加剧烈,多糖更容易降解;同时,超声温度过高,蛋白酶发生变性继而破坏纤维素酶活性,反应速率下降,粗多糖得率降低^[21]。因此,选择超声温度为 40,50,60 ℃进行后续响应面优化试验。

由图 1(c)可知,多糖得率随料液比的减小呈先增加后减少趋势($P<0.05$),且在料液比为 1 : 30 (g/mL)时达到峰值。这主要是因为植物细胞壁内外存在质量浓度差异,会推动多糖扩散进入溶剂中,质量浓度越大,溶剂中多糖的溶解量越多,当溶剂中溶质的溶解量达到平衡时,再增加溶剂的量也不会增大溶质的量。此外,酶的质量浓度因溶剂的量增加而降低,从而影响植物细胞膜的结构,多糖得率降低^[22]。因此,选择料液比为 1 : 20,1 : 30,1 : 40 (g/mL)进行后续响应面优化试验。

由图 1(d)可知,当纤维素酶添加量 $<1\%$ 时,柠檬皮多糖得率随纤维素酶添加量的增加而提高($P<0.05$),其原因在于酶与纤维素分子的接触机率随酶量的增加而增加,纤维素水解速率提高,多糖得率也随之提高。当纤维素酶添加量 $>1\%$ 时,进一步增加酶用量,柠檬皮多糖得率不再增加,说明该添加量下,酶浓度几乎达到饱和,继续添加纤维素酶也无法进一步影响多糖得率^[23]。因此,选择纤维素酶添加量为 0.5 %,1.0 %,1.5 %进行后续响应面优化试验。

2.2 响应面优化试验

2.2.1 响应面试验设计及结果 在单因素试验基础上,选取超声时间、超声温度、料液比和纤维素酶添加量 4 个因素进行响应面分析,以柠檬皮多糖得率为响应值。响应面试验因素水平见表 1,试验设计及结果见表 2。

表 1 响应面试验因素与水平

Table 1 Response surface experimental factors and levels

水平	A 超声时间/min	B 超声温度/℃	C 料液比(g/mL)	D 纤维素酶添加量/%
—1	30	40	1 : 20	0.5
0	40	50	1 : 30	1.0
1	50	60	1 : 40	1.5

表 2 响应面分析设计及结果

Table 2 Response surface analysis design and results

试验号	A	B	C	D	多糖得率/%
1	0	0	—1	—1	6.05±0.28
2	0	—1	—1	0	5.97±0.30
3	0	0	1	—1	5.60±0.34
4	0	1	0	—1	5.70±0.31
5	0	—1	1	0	5.50±0.20
6	0	0	0	0	6.33±0.35
7	—1	0	0	—1	4.85±0.16
8	1	—1	0	0	5.20±0.16
9	—1	1	0	0	5.56±0.48
10	1	0	0	—1	5.28±0.05
11	1	0	—1	0	6.43±0.35
12	0	0	0	0	6.40±0.15
13	0	1	—1	0	6.44±0.29
14	0	0	0	0	6.41±0.17
15	—1	—1	0	0	4.90±0.29
16	0	—1	0	—1	5.38±0.10
17	—1	0	1	0	5.73±0.17
18	0	1	1	0	6.13±0.06
19	1	0	0	1	5.62±0.37
20	0	0	0	0	6.33±0.09
21	0	—1	0	1	5.41±0.59
22	1	0	1	0	5.23±0.28
23	0	0	—1	1	6.15±0.33
24	0	0	0	0	6.41±0.17
25	—1	0	0	1	5.34±0.29
26	—1	0	—1	0	5.36±0.17
27	0	0	1	1	6.07±0.05
28	0	1	0	1	6.32±0.22
29	1	1	0	0	5.82±0.31

2.2.2 结果分析及模型方程的建立 对表 2 数据进行回归拟合,得多元二次回归方程为:

$$Y=6.38+0.153\ 3A+0.300\ 8B-0.178\ 3C+0.170\ 8D-0.01AB-0.392\ 5AC-0.037\ 5AD+0.04BC+0.147\ 5BD+0.092\ 5CD-0.691\ 3A^2-0.315\ 1B^2-0.023\ 8C^2-0.381\ 5D^2。$$

(3)

由表 3 可知,回归模型 $P<0.000\ 1$,极显著;失拟项 $P>0.05$,不显著;相关系数 $R^2=0.992\ 9$,说明模型与实际试验吻合程度较好,决定系数 $R^2_{Adj}=0.987\ 5$,表明实际值与预测值相关度好。由 F 值可知,各因素对柠檬皮多糖得率的影响顺序依次为超声温度 $>$ 料液比 $>$ 纤维素酶添加量 $>$ 超声时间,各因素对多糖得率影响均极显著。

表 3 方差分析及显著性检验[†]

Table 3 Analysis of variance and significance test

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	6.720 0	14	0.480 3	139.24	<0.000 1	* *
A	0.282 1	1	0.282 1	81.79	<0.000 1	* *
B	1.090 0	1	1.090 0	314.82	<0.000 1	* *
C	0.381 6	1	0.381 6	110.63	<0.000 1	* *
D	0.350 2	1	0.350 2	101.52	<0.000 1	* *
AB	0.000 4	1	0.000 4	0.12	0.738 5	
AC	0.616 2	1	0.616 2	178.63	<0.000 1	* *
AD	0.005 6	1	0.005 6	1.63	0.222 4	
BC	0.006 4	1	0.006 4	1.86	0.194 7	
BD	0.087 0	1	0.087 0	25.23	0.000 2	* *
CD	0.034 2	1	0.034 2	9.92	0.007 1	* *
A ²	3.100 0	1	3.100 0	898.69	<0.000 1	* *
B ²	0.644 0	1	0.644 0	186.68	<0.000 1	* *
C ²	0.003 7	1	0.003 7	1.07	0.318 9	
D ²	0.961 9	1	0.961 9	278.83	<0.000 1	* *
残差	0.048 3	14	0.003 4			
失拟项	0.041 2	10	0.004 1	2.31	0.217 5	
纯误差	0.007 1	4	0.001 8			
总和	6.770 0	28				

[†] * 为差异显著($P<0.05$); ** 为差异极显著($P<0.01$);
 $R^2=0.992\ 9$; $R_{Adj}^2=0.987\ 5$ 。

2.2.3 各因素交互作用 由图 2(b)、图 2(e)和图 2(f)可知,三者响应面图的曲面呈爬坡状态,说明超声时间和料液比、纤维素酶添加量和料液比、超声温度和纤维素酶添加量之间的交互作用对试验结果影响较大,与方差分析结果相符。通过 Design-Expert 8.0.6 软件得到柠檬皮多糖提取的最佳工艺参数为超声时间 43.88 min,超声温度 54.47 ℃,料液比 1:20 (g/mL),纤维素酶添加量 1.08%,此条件下柠檬皮多糖得率预测值为 6.70%。为便于操作,调整工艺参数为超声时间 44 min,超声温度 55 ℃,料液比 1:20 (g/mL),纤维素酶添加量 1.1%,测得柠檬皮多糖得率为 6.83%,与预测值接近,说明通过 Box-Behnken 设计确定柠檬皮多糖提取的最佳工艺参数较为可靠。

2.3 柠檬皮多糖的分离纯化

对柠檬皮粗多糖(LPs)透析后得到的多糖(LPs-T)采用 DEAE-52 阴离子层析柱分离,得到 3 个组分(图 3),分别为去离子水洗脱组分(LPs-0)、0.1 mol/L NaCl 洗脱组分(LPs-1)、0.3 mol/L NaCl 洗脱组分(LPs-2),得率分别为 $(17.60\pm1.06)\%$ 、 $(68.80\pm1.45)\%$ 、 $(13.20\pm0.55)\%$,考虑到时间成本效应,对 LPs-1 继续采用 Sephadex G-100 葡聚糖凝胶层析洗脱,得到单一组分(LP-1a),洗脱峰峰型呈对称状态,得率为 $(77.5\pm0.74)\%$ 。

2.4 α -葡萄糖苷酶抑制能力筛选

α -葡萄糖苷酶是水解碳水化合物中的 α -1,4糖苷键

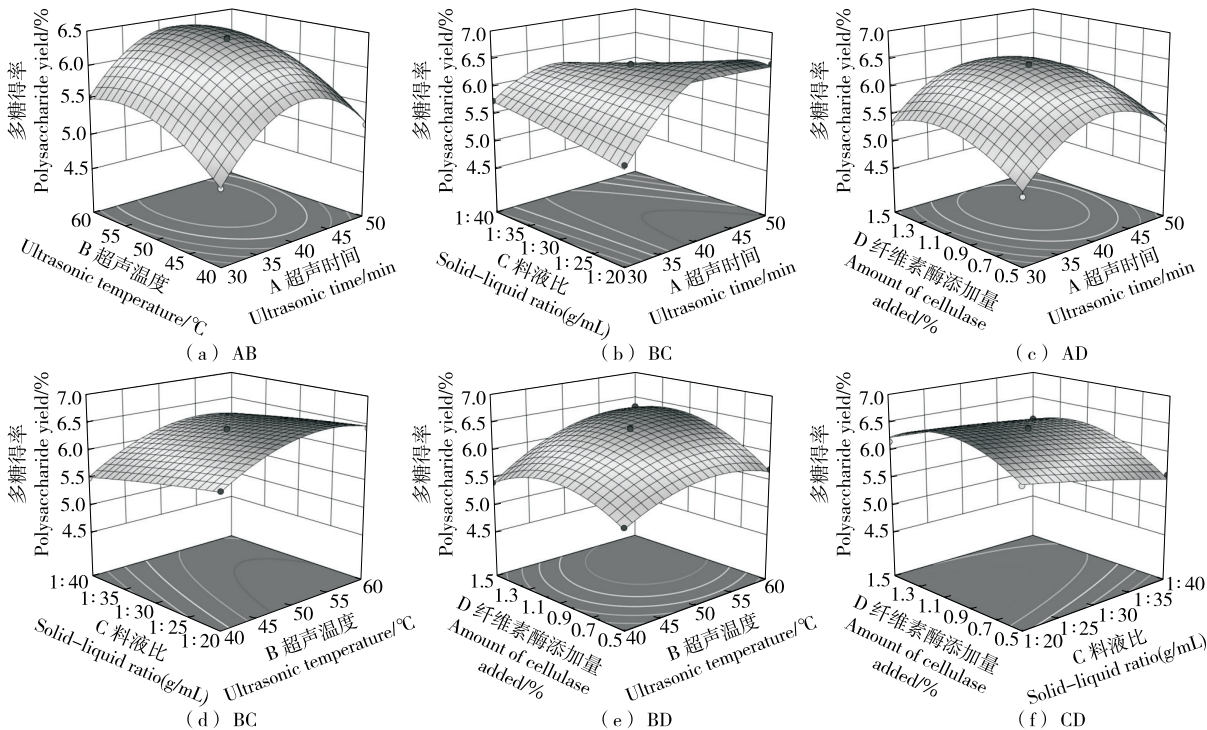


图 2 交互作用对柠檬皮多糖得率的影响

Figure 2 Interaction of two factors on the yield of polysaccharide from lemon peel

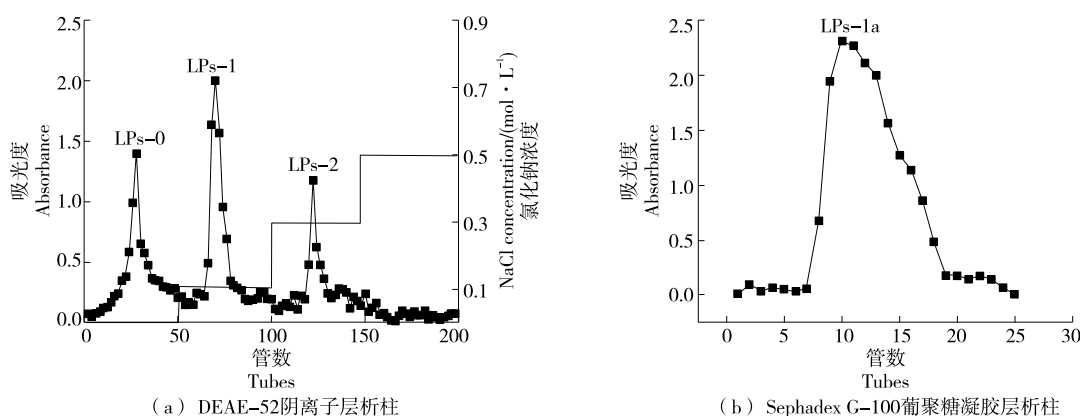
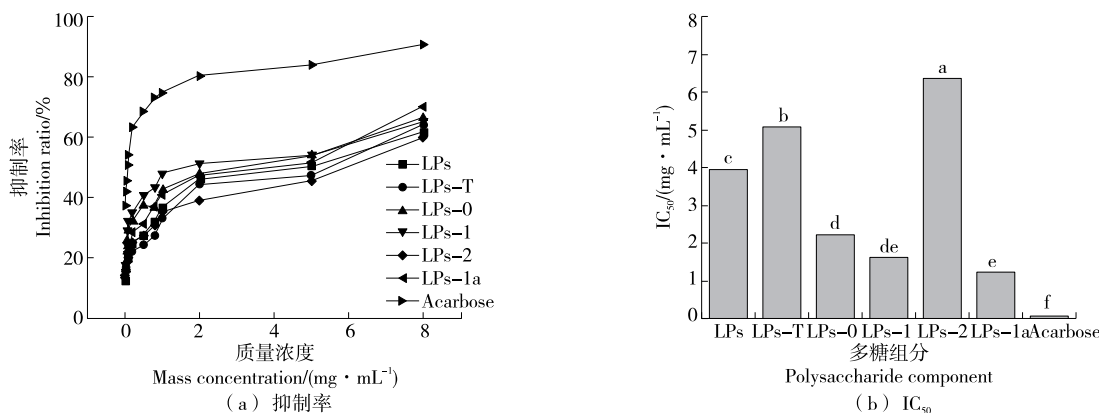


图 3 柠檬皮多糖的分离纯化

Figure 3 Isolation and purification of polysaccharides from lemon peel

释放葡萄糖的关键酶,因此,抑制其活性可以降低餐后血糖,达到预防糖尿病及其并发症的目的。柠檬皮粗多糖经透析、DEAE-52 纤维素层析柱、Sephadex G-100 葡聚糖凝胶层析柱后共筛选出 6 个组分。由图 4 可知,在 0.01~8.00 mg/mL 质量浓度范围内,各组分与阿卡波糖的抑制率变化趋势保持一致,随着质量浓度的增加,抑制率增强 ($P<0.05$),且各组分间差异显著 ($P<0.05$)。各组分 IC_{50} 值为 1.22~6.37 mg/mL,其中 LPS-1a 为 LPS-1 (0.1 mol/L NaCl 洗脱组分)经 Sephadex G-100 层析柱继

续纯化后的多糖,LPS-1 与 LPS-1a 的 IC_{50} 值最低,进一步纯化后的 LPS-1a 的 IC_{50} 值较 LPS-1 下降了 24.22%,但其纯度提升了 12.45%。与其他植物多糖相比,LPS-1a 对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性比蓝靛果多糖组分 HEP-2^[24]、刺梨果实组分 RTFP-3^[25]更显著。LPS-1a 对 α -葡萄糖苷酶有较强的抑制能力,可能是其含有 α -1,4 糖苷键,而 α -1,4 糖苷键是抑制 α -葡萄糖苷酶活性所必需的化学键^[26]。此外,LPS-1a 得率为 6 个组分中最大,说明经筛选后 LPS-1a 组分为柠檬皮多糖的主要降血糖成分。



小写字母不同表示差异显著 ($P<0.05$)

图 4 各多糖组分对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用Figure 4 Effects of different polysaccharide component on α -glucosidase inhibition

2.5 柠檬皮多糖结构鉴定

2.5.1 HPGPC/HPLC 分析 对分离纯化后具有良好降糖活性的单一组分 LPS-1a 进行相对分子质量测定,其 M_w 为 195 260, M_n 为 119 730,分布系数 M_w/M_n 为 1.63。由表 4 可知,LPS-1a 主要由 7 种单糖组成,分别为 D-半乳糖醛酸 (GalA)、D-甘露糖 (Man)、D-葡萄糖 (Glc)、D-半乳糖 (Gal)、L-鼠李糖 (Rha)、D-葡萄糖醛酸 (GlcA) 以及 L-阿拉伯糖 (Ara),其中 GalA 和 Ara 含量最多,与金辰光等^[27]的研究结果类似。 R_1 反映了线性果胶

结构域如 HG 型在多糖中的占比,LPS-1a 的 R_1 为 1.40,结果较大,推测其应为直链多糖聚半乳糖醛酸 (HG 型结构域); R_2 反映了由 GalA 和 Rha 构成的主链,再由 Gal 和 Ara 构成支链的鼠李糖半乳糖醛酸聚糖 (RG-I 结构域) 在多糖中的占比, R_2 值较小,说明含量较低; R_3 则反映了 RG-I 型结构域侧链含量占比, R_3 为 8.95,说明 LPS-1a 侧链占比高,分支较多^[28-29]。而果胶的类型和分支程度影响其生物活性,例如富含 RG-I 结构的果胶可以提高预防癌症、心血管疾病和纤维化的活性^[30]。RG-I 型结构侧链

表 4 LPS-1a 的单糖组成

Table 4 Monosaccharide composition of LPS-1a

Man/%	Rha/%	GlcA/%	GalA/%	Glc/%	Gal/%	Ara/%	R ₁	R ₂	R ₃
0.88	4.06	0.84	56.53	1.32	11.96	24.41	1.40	0.07	8.95

含量高则可以显著抑制 α -葡萄糖苷酶活性,促进 PI3K-AKT 信号通路的表达从而表现出较强的降血糖活性^[31]。Zhou 等^[32]研究发现,茶赤柑多糖主要由 GalA、Gal、Ara 及少量的 Glc 组成,而这些单糖是阿拉伯半乳聚糖蛋白和果胶的重要构成单位,具有很好的生物活性。综上,阿拉伯半乳聚糖蛋白和果胶可能是柠檬皮中的重要生物活性多糖。单糖组成与降血糖能力相关,含有阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、半乳糖醛酸和鼠李糖的多糖的降血糖能力较强^[33],LPS-1a 的单糖组成与其分析较为一致,可以有效抑制 α -葡萄糖苷酶活性,达到降血糖目的。柠檬皮多糖的主要成分 LPS-1a 单糖组成为 Man (0.88%), Rha (4.06%), GlcA (0.84%), GalA (56.53%), Glc (1.32%),

Gal (11.96%), Ara (24.41%), 对 α -葡萄糖苷酶抑制能力的 IC₅₀ 值为 1.22 mg/mL, 具有降血糖作用。

2.5.2 UV、FTIR 光谱分析 由图 5(a)可知, LPS-1a 多糖在 260, 280 nm 处无明显峰, 说明多糖中核酸(260 nm)及蛋白质(280 nm)基本被去除。

由图 5(b)可知, 3 426 cm⁻¹ 处有 O—H 伸缩振动吸收峰, 表示多糖存在分子内与分子间氢键^[34]; 2 929 cm⁻¹ 处为亚甲基上的 C—H 伸缩振动峰, 为多糖类物质的特征吸收峰^[35]; 1 747 cm⁻¹ 处有吸收峰, 可能是由于糖醛酸甲酯化羧基 C=O 伸缩振动引起的^[36]; 1 633 cm⁻¹ 处的吸收峰为 C=O 的伸缩振动或结合水引起的^[37]; 1 232 cm⁻¹ 处为 O—H 的伸缩振动吸收峰; 1 103 cm⁻¹ 处

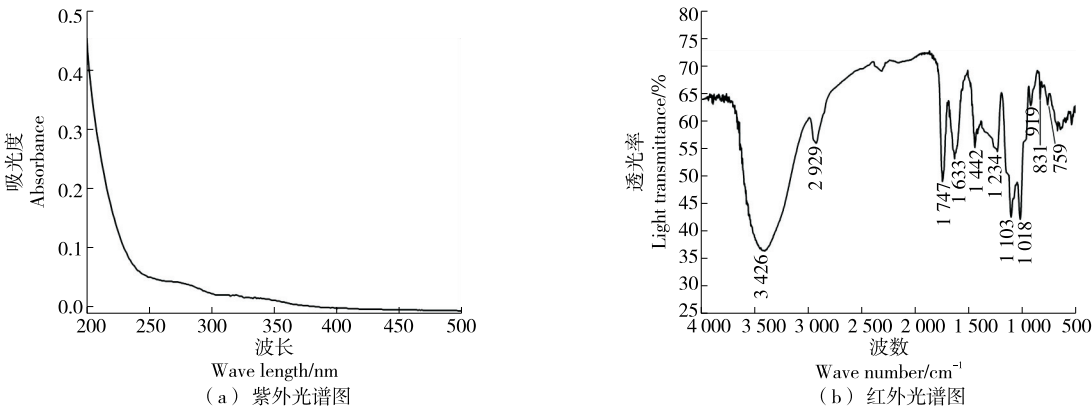


图 5 柠檬皮多糖的紫外光谱图和红外光谱图

Figure 5 UV spectrum and IR spectra of lemon peel polysaccharide

为 C—O—C 的伸缩振动; 1 018 cm⁻¹ 处强吸收峰说明有吡喃糖存在^[38]; 919, 831 cm⁻¹ 处吸收峰则表示为 β -糖苷键和 α -糖苷键的连接方式^[39]。因此, 进一步推测柠檬皮多糖 LPS-1a 为部分羧基甲酯化的 β -糖苷键、 α -糖苷键连接具有吡喃糖环的酸性多糖。此外, 1 747 cm⁻¹ 处的峰面积与 1 747 cm⁻¹ 和 1 633 cm⁻¹ 处的峰面积之和的比值与 DE 密切相关, 计算得到 DE = 44.38% < 50%, 属于低甲氧基果胶。

2.5.3 SEM 分析 由图 6 可知, 放大 100 倍时, LPS-1a 整体呈丝绒状, 有许多小孔, 可能是在超声波的影响下使得多糖呈多孔网状。放大 300 倍时, 多糖表面有大量纤维, 个别呈片状结构。放大 500, 1 000 倍时, 多糖表面不完全光滑, 有小颗粒, 整体疏松多孔, 可能为多糖附加更好的生物活性。

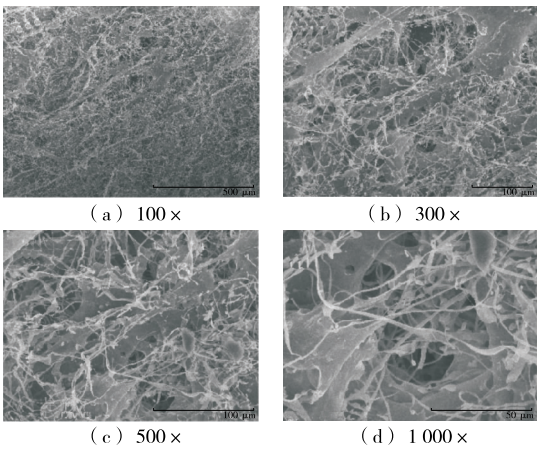


图 6 柠檬皮多糖的扫描电镜图

Figure 6 Scanning electron microscopy of lemon peel polysaccharide

3 结论

超声波辅助酶法提取柠檬皮多糖的最佳工艺条件为超声时间 44 min、超声温度 55 ℃、料液比 1 : 20 (g/mL)、纤维素酶添加量 1.1%, 此时柠檬皮多糖得率为 6.83%, 与预期结果无显著差异。经分离纯化筛选出均一组分 LPs-1a, 其相对分子质量为 195 260, 主要由不同比例的半乳糖醛酸、阿拉伯糖、半乳糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、甘露糖和葡萄糖组成。LPs-1a 为具有糖类特征基团, 纤维状, 含吡喃糖环的酸性多糖, 属于低甲氧基果胶, 对 α -葡萄糖苷酶表现出一定的抑制效果。后续可运用核磁共振、甲基化等手段进一步研究 LPs-1a 结构, 推测其糖苷键类型及连接方式。同时, 柠檬皮多糖的体内降血糖作用机制也有待进一步研究。

参考文献

- [1] 农仲文, 于立梅, 曾晓芳, 等. 柠檬营养成分及其综合利用研究进展[J]. 农产品加工, 2018(10): 73-76.
NONG Z W, YU L M, ZENG X F, et al. Nutrient composition of lemon and its comprehensive application [J]. Farm Products Processing, 2018(10): 73-76.
- [2] 陈婷, 段宙位. 柠檬皮中多酚的超声辅助提取及其抗氧化性研究[J]. 食品科技, 2023, 48(2): 246-252.
CHEN T, DUAN Z W. Ultrasonic-assisted extraction and antioxidant activity of polyphenols from lemon peel [J]. Food Science and Technology, 2023, 48(2): 246-252.
- [3] PRESENTATO A, SCURRIA A, ALBANESE L, et al. Superior antibacterial activity of integral lemon pectin extracted via hydrodynamic cavitation[J]. Chemistry Open, 2020, 9(5): 628-630.
- [4] SUN Y J, HE Y, WANG F, et al. Low-methoxyl lemon pectin attenuates inflammatory responses and improves intestinal barrier integrity in caerulein-induced experimental acute pancreatitis[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2017, 61(4): 1600885.
- [5] OBOH G, OLASEHINDE T A, ADEMOSUN A O. Inhibition of enzymes linked to type-2 diabetes and hypertension by essential oils from peels of orange and lemon[J]. International Journal of Food Properties, 2017, 20: S586-S594.
- [6] 韩晓磊, 吕慧英, 梁珏钦, 等. 春生田头菇粗多糖超声辅助提取及抗氧化性测定[J]. 食品与机械, 2023, 39(9): 169-176.
HAN X L, LU H Y, LIANG J Q, et al. Ultrasound-assisted extraction and antioxidant study of crude polysaccharide from *Agrocybe praecox*[J]. Food & Machinery, 2023, 39(9): 169-176.
- [7] BIAN Z Y, ZHANG R, ZHANG X, et al. Extraction, structure and bioactivities of polysaccharides from *Rehmannia glutinosa*: A review[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2023, 305: 116132.
- [8] CHENG N, WANG H, HAO H F, et al. Research progress on polysaccharide components of *Cistanche deserticola* as potential pharmaceutical agents[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2023, 245: 114892.
- [9] HASSAN I, GANI A, AHMAD M, et al. Extraction of polysaccharide from *Althea rosea* and its physicochemical, anti-diabetic, anti-hypertensive and antioxidant properties[J]. Scientific Reports, 2022, 12(1): 17116.
- [10] HOSSAIN U, DAS A K, GHOSH S, et al. An overview on the role of bioactive α -glucosidase inhibitors in ameliorating diabetic complications [J]. Food and Chemical Toxicology, 2020, 145: 111738.
- [11] 魏鑫悦, 陈克保, 关统伟. 攀枝花黑松露多糖的抗氧化和降血糖活性[J]. 现代食品科技, 2022, 38(3): 1-7.
WEI X Y, CHEN K B, GUAN T W. Antioxidant and hypoglycemic activity of polysaccharide from Panzhihua black truffle[J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(3): 1-7.
- [12] KIM S Y. Chemical composition and antioxidant activity of crude polysaccharide from citron (*Citrus junos* Sieb. Ex TANAKA) seed[J]. Preventive Nutrition and Food Science, 2018, 23(4): 335-340.
- [13] CHEN R Z, JIN C G, TONG Z G, et al. Optimization extraction, characterization and antioxidant activities of pectic polysaccharide from tangerine peels [J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 136: 187-197.
- [14] FANG Y, ZHU C Y, QIU D Y, et al. Activation of RAW264.7 macrophages by an acidic polysaccharide derived from *Citrus grandis* 'Tomentosa' [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 156: 1 323-1 329.
- [15] LIU Y L, DONG M, YANG Z Y, et al. Anti-diabetic effect of citrus pectin in diabetic rats and potential mechanism via PI3K/Akt signaling pathway [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 89: 484-488.
- [16] 何俊叶, 刘成, 于宪洋, 等. 黄皮不同部位多糖的结构特性及体外降血糖活性[J]. 食品与机械, 2024, 40(3): 156-164.
HE J Y, LIU C, YU C Y, et al. Structural characteristics and hypoglycemic activity of polysaccharides from different parts of wampee[J]. Food & Machinery, 2024, 40(3): 156-164.
- [17] 高涛. 川明参多糖的结构解析及对消化酶活性的影响[D]. 重庆: 重庆三峡学院, 2021: 15-26.
GAO T. Structure analysis and effect of polysaccharide on digestive enzyme activity of *Panax chuanmingensis* [D]. Chongqing: Chongqing Three Gorges University, 2021: 15-26.
- [18] 顾欣, 高涛, 刘梦雅, 等. 梁平柚柚皮多糖的提取、结构解析及抗氧化能力研究[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(7): 137-145.
GU X, GAO T, LIU M Y, et al. Optimization of extraction technology, structure analysis and antioxidant activity of polysaccharides from Liangping pomelo peel [J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(7): 137-145.
- [19] LIU N, YANG W N, LI X, et al. Comparison of characterization and antioxidant activity of different citrus peel pectins[J]. Food Chemistry, 2022, 386: 132683.
- [20] 秦令祥, 周婧琦, 崔胜文, 等. 超声波协同复合酶法提取香菇多糖的工艺优化[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(19): 63-67.
QIN L X, ZHOU J Q, CUI S W, et al. Optimization of ultrasonic-

- assisted compound enzyme extraction technology of *Lentinan* [J]. Food Research and Development, 2018, 39(19): 63-67.
- [21] 何传波, 魏好程, 熊何健, 等. 枇杷叶多糖酶法提取工艺优化及其离子交换层析纯化[J]. 食品科学, 2016, 37(8): 45-50.
- HE C B, WEI H C, XIONG H J, et al. Optimization of enzymatic extraction of polysaccharides from loquat leaves and purification by ion exchange chromatography[J]. Food Science, 2016, 37(8): 45-50.
- [22] 荆瑞勇, 王丽艳, 张跃文. 从脐橙皮中提取可溶性多糖工艺条件研究[J]. 食品科学, 2009, 30(8): 90-92.
- JING R Y, WANG L Y, ZHANG Y W. Study on extraction conditions of soluble polysaccharides from navel orange peel[J]. Food Science, 2009, 30(8): 90-92.
- [23] 蒋德旗, 黄利敏, 王艳, 等. 响应面优化纤维素酶法提取桂花多糖工艺及其抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(2): 271-275, 281.
- JIANG D Q, HUANG L M, WANG Y, et al. Optimization of enzymatic extraction technology of polysaccharide from *Osmanthus fragrans* using response surface methodology and investigation on its antioxidant activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(2): 271-275, 281.
- [24] FU X T, YANG H H, MA C L, et al. Characterization and inhibitory activities on α -amylase and α -glucosidase of the polysaccharide from blue honeysuckle berries [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 163: 414-422.
- [25] WANG L, CHEN C, ZHANG B, et al. Structural characterization of a novel acidic polysaccharide from *Rosa roxburghii* Tratt fruit and its α -glucosidase inhibitory activity[J]. Food & Function, 2018, 9(7): 3 974-3 985.
- [26] PENG Y Q, ZHANG Z H, CHEN W Y, et al. Structural characterization, α -glucosidase inhibitory activity and antioxidant activity of neutral polysaccharide from apricot (*Armeniaca Sibirica* L. Lam) kernels[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 238: 124109.
- [27] 金辰光. 夏枯草、橘皮中多糖分离纯化、结构及抗氧化活性研究[D]. 长春: 长春师范大学, 2016: 27-34.
- JIN C G. The Isolation, purification, structure and antioxidant activity of polysaccharides from *Prunella vulgaris* Linn and tangerine peel [D]. Changchun: Changchun Normal University, 2016: 27-34.
- [28] 吴轲, 刘爽, 马宽, 等. 豆腐柴果胶多糖理化指标及乳化性质[J/OL]. 食品与发酵工业. (2023-06-02)[2023-10-15]. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.035332>.
- WU R, LIU S, MA K, et al. Physicochemical indexes and emulsification properties of pectin polysaccharide from *Premna microphylla* Turcz. [J/OL]. Food and Fermentation Industries. (2023-06-02)[2023-10-15]. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.035332>.
- [29] 赵佳莹, 辛玥, 宋萧萧, 等. 鹰嘴豆多糖分离纯化和结构表征[J]. 食品科学, 2023, 44(8): 40-45.
- ZHAO J Y, XIN Y, SONG X X, et al. Isolation, purification and structural characterization of polysaccharides from Chickpea[J]. Food Science, 2023, 44(8): 40-45.
- [30] ZHANG H, CHEN J L, LI J H, et al. Extraction and characterization of RG-I enriched pectic polysaccharides from mandarin citrus peel[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 79: 579-586.
- [31] GONG P, LONG H, GUO Y X, et al. Isolation, structural characterization and hypoglycemic activities in vitro of polysaccharides from *Pleurotus eryngii*[J]. Molecules, 2022, 27: 7 140.
- [32] ZHOU T, JIANG Y M, WEN L R, et al. Characterization of polysaccharide structure in Citrus reticulata 'Chachi' peel during storage and their bioactivity [J]. Carbohydrate Research, 2021, 508: 108398.
- [33] 杨玉洁, 刘静宜, 谭艳, 等. 多糖降血糖活性构效关系及作用机制研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(23): 355-363.
- YANG Y J, LIU J Y, TAN Y, et al. Progress in understanding the structure-activity relationship and hypoglycemic mechanism of polysaccharides[J]. Food Science, 2021, 42(23): 355-363.
- [34] 刘艳秋, 王亚茹, 毛迪锐, 等. 轮叶党参多糖的分离纯化及结构研究[J]. 食品与机械, 2023, 39(9): 162-168, 240.
- LIU Y Q, WANG Y R, MAO D R, et al. Isolation, purification and structure analysis of polysaccharide from lanceasiabell root[J]. Food & Machinery, 2023, 39(9): 162-168, 240.
- [35] 李佳颖, 高誉, 刘红, 等. 绵马贯众多糖超声提取工艺优化及抗氧化活性分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(1): 79-87.
- LI J Y, GAO Y, LIU H, et al. Optimization of ultrasonic assisted extraction of polysaccharides from male fern rhizome and its antioxidant activity[J]. Genomics and Applied Biology, 2020, 39(1): 79-87.
- [36] 刘宁, 任歌, 贺人杰, 等. 枸杞渣多糖的乙酰化修饰及其表征[J]. 陕西科技大学学报, 2021, 39(5): 39-43.
- LIU N, REN G, HE R J, et al. Acetylated modification of *Lycium barbarum* residue polysaccharide and its characterization [J]. Journal of Shaanxi University of Science & Technology, 2021, 39(5): 39-43.
- [37] LI X, HUANG S M, CHEN X, et al. Structural characteristic of a sulfated polysaccharide from *Gracilaria Lemaneiformis* and its lipid metabolism regulation effect[J]. Food & Function, 2020, 11(12): 10 876-10 885.
- [38] 张倩, 刘宇, 戴晓娟, 等. 黑木耳多糖结构分析及其保护肝细胞氧化损伤活性[J]. 菌物研究, 2021, 19(3): 170-176.
- ZHANG Q, LIU Y, DAI X J, et al. Structural analysis of *Auricularia heimuer* polysaccharide and its activity in protecting liver cells against oxidative damage[J]. Journal of Fungal Research, 2021, 19(3): 170-176.
- [39] FAN M H, SUN X, QIAN Y L, et al. Effects of metal ions in tea polysaccharides on their in vitro antioxidant activity and hypoglycemic activity [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 113: 418-426.