DOI:10.13652/j.spjx.1003.5788.2023.80804 [文章编号] 1003-5788(2024)03-0156-09

黄皮不同部位多糖的结构特性及体外降血糖活性

Structural characteristics and hypoglycemic activity of polysaccharides from different parts of wampee

何俊叶 刘 成 于宠洋 孙朋朋 任圆圆

HE Junye LIU Cheng YU Chongyang SUN Pengpeng REN Yuanyuan

(长江大学生命科学学院,湖北 荆州 434025)

(*College of Life Science, Yangtze University, Jingzhou, Hubei* 434025, *China*)

摘要:目的:开发黄皮抗氧化产品和防治糖尿病的药物。**方法:**从化学组成、相对分子质量、单糖组成、外观形态、DPPH 自由基清除率和 α-淀粉酶抑制率等方面分析黄皮果肉多糖(CWP-F)、果皮多糖(CWP-P)和种子多糖(CWP-S)的结构特性,以及体外抗氧化和体外降血糖活性。**结果:**CWP-F 的相对分子质量最大,主要由半乳糖和阿拉伯糖组成;CWP-P 主要由半乳糖醛酸和阿拉伯糖组成;CWP-S 主要由葡萄糖组成。3 种多糖的红外光谱都有羧酸结构特征吸收峰;电镜显示其表面结构蓬松。CWP-P 有最强的抗氧化能力,其 DPPH 自由基清除率、OH 自由基清除率和总还原力均高于 CWP-F 和 CWP-S 的。CWP-P 有最强的降血糖能力,CWP-F 的次之,而 CWP-S 无降血糖能力。**结论:**CWP-F、CWP-P 和 CWP-S 具有不同的组成结构、体外抗氧化和降血糖活性,其中 CWP-P 具有最好的体外抗氧化和降血糖能力。

关键词:黄皮;多糖;结构特性;抗氧化;降血糖

Abstract: Objective: This study aimed to develop antioxidant products and anti-diabetes drugs of wampee. The study aimed to research the structural characteristics, anti-oxidation and hypoglycemic properties in vitro of polysaccharides from different parts of wampee. **Methods:** The structural properties, *in vitro* antioxidant and hypoglycemic activities of polysaccharides from the fruit, peel and seeds of wampee (CWP-F, CWP-P, and CWP-S) were analyzed and compared from the aspects of chemical composition, molecular weight, monosaccharide composition, appearance, DPPH free radical scavenging rate and α-amylase inhibition rate. **Results:** CWP-F had the highest molecular weight and was mainly composed of galactose and arabinose, CWP-P was mainly composed of galacturonic acid and arabinose, and CWP-S was mainly composed of glucose. The absorption peaks of the carboxylic acid structure were found in the Fourier transform infrared spectra of the three polysaccharides. Scanning electron microscopy results showed that the surface structure of the three polysaccharides was fluffy. CWP-P had the strongest antioxidant capacity, and its DPPH free radical scavenging rate, OH free radical scavenging rate, and total reducing power all were higher than those of CWP-F and CWP-S. CWP-P had the strongest hypoglycemic ability, followed by CWP-F, and CWP-S had no hypoglycemic ability. **Conclusion:** *In vitro*, CWP-F, CWP-P, and CWP-S exhibited varying compositions, structures, and antioxidant and hypoglycemic activity. Notably, CWP-P has shown the most robust antioxidant and hypoglycemic properties.

Keywords: wampee; polysaccharide; structural characteristics; antioxidant; hypoglycemia

黄皮,芸香科黄皮属乔木植物,主要分布在中国南方和东南亚的热带和亚热带地区[1]。黄皮果具有独特的味道和丰富的生物活性物质,深受消费者欢迎[2]。黄皮的每一个部位都具有极高的药用价值:种子可治疝气;果皮可消风肿、去疳积;果肉可健胃消食、顺气镇咳,有润肺生津、清热消暑的功效[3]。Wu 等[4]发现黄皮酸性多糖具有抗氧化能力;Song 等[5]研究发现黄皮果胶具有益生元功能。

植物多糖是自然界来源最广泛的多糖,无细胞毒性,而且某些多糖已被临床用于疾病治疗和健康改善[6]。据报道[7-10],植物多糖具有很多生物活性,如抗肿瘤、抗细胞凋亡、抗病毒、抗凝血、抗氧化、降血糖、镇痛和抗疲劳等。

糖尿病,是一种以高血糖为特征的代谢紊乱疾病,目前尚缺乏治疗糖尿病的有效方法,临床上还是以降糖药

基金项目:天津市自然科学基金重点项目(编号:16JCZDJC34100);食品营养与安全国家重点实验室开放课题(编号:SKLFNS-KF-202108);长江大学大学生创新创业训练计划项目(编号:Yz2022233)

作者简介:何俊叶,女,长江大学在读硕士研究生。

通信作者:任圆圆(1991—),女,长江大学讲师,博士。E-mail: yuanyren@yangtzeu.edu.cn

收稿日期:2023-08-22 **改回日期:**2023-12-30

物为主[11]。但是,这些药物通常有一定的副作用,或者对患者的依从性较差,不能完全满足患者的需求。Wu等[12]研究发现刺梨多糖有抑制α-淀粉酶和α-葡萄糖苷酶的能力;赵凯迪等[13]研究表明桔梗多糖对2型糖尿病大鼠有降低血糖作用,但有关黄皮多糖降血糖活性的研究尚未见报道。研究拟从黄皮果肉、果皮和种子3个部位提取多糖,比较其结构特性和抗氧化性,并重点分析其体外降血糖活性,旨在提高黄皮的利用率,为其抗氧化产品和防治糖尿病药物的开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

黄皮:市售;

α-淀粉酶(猪胰腺)、α-葡萄糖苷酶、对硝基苯基-α-*D*-吡喃葡萄糖苷(PNPG)、半乳糖醛酸:上海源叶生物科技有限公司;

甘露糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖醛酸、溴化钾:上海麦克林生化科技股份有限公司;

其他试剂均为国产分析纯。

1.2 设备

集热式恒温加热磁力搅拌器:DF-101S型,上海科升仪器有限公司;

离心机:Allegra 25R型,默瑞(上海)生物科技有限公司;

紫外分光光度计:UV-2600型,岛津企业管理(中国)有限公司;

傅里叶变换红外光谱仪:IR-960型,天津瑞岸科技有限公司;

扫描电镜:TESCAN VEGA3型,泰思肯(中国)有限公司;

高效液相色谱仪:Waters e2695型,美国沃特斯公司;

高效液相色谱仪:LC1200型,安捷伦科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 黄皮不同部位粗多糖提取　取一定量的黄皮果肉、果皮和种子。果肉打浆,加入两倍体积的无水乙醇脱脂;果皮和种子剪碎,50 ℃烘干,粉碎,加无水乙醇(湿重的4倍)搅拌24 h脱脂,10 000 r/min离心15 min,沉淀干燥后粉碎,待用。

取一定量黄皮果肉、果皮和种子干燥粉末,以料液比($m_{粉末}$ ∶ $V_{水}$)1∶40 (g/mL)热水浴(80 ℃)连续提取3次,每次2 h(黄皮种子在第一次热水提取时加入高温淀粉酶除淀粉),10 000 r/min离心15 min,合并上清滤液,旋转蒸发,浓缩至原体积的1/5。准确量取浓缩液,加入4倍体积的无水乙醇,边加边搅拌,4 ℃静置20 h,10 000 r/min离心15 min,沉淀用少量去离子水复溶,用截留相对分子质量100 000的透析袋透析72 h,冷冻干燥得到黄皮果肉、果皮和种子粗多糖,将其分别命名为CWP-F、CWP-P和CWP-S。

1.3.2 化学组成测定

(1) 总糖含量:采用苯酚—硫酸法[14]。

(2) 还原糖含量:采用DNS法[15]。

(3) 蛋白质含量:采用考马斯亮蓝法[16]。

1.3.3 相对分子质量测定　采用高效凝胶渗透色谱法。色谱柱为TSK gel G4000PW$_{XL}$色谱柱(7.8 mm×300 mm);柱温30 ℃;示差折光检测器(RID)温度35 ℃;流动相为超纯水;流速0.6 mL/min。采用标准葡聚糖(T-10、T-40、T-70、T-110、T-500和T-2000)绘制标准曲线。

1.3.4 单糖组成　分别称取10 mg CWP-F、CWP-P和CWP-S于样品瓶中,加入4 mL三氟乙酸(2 mol/L)溶液溶解,110 ℃油浴4 h,分3次加入甲醇溶液,旋转蒸发以除去三氟乙酸。单糖标准品和样品水解液经PMP柱前衍生法进行分析。色谱柱为Agilent Eclipse XDB-C_{18}色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相A为乙腈—0.05 mol/L磷酸缓冲液(KH_2PO_4—NaOH,pH 6.9)($V_{乙腈}$ ∶ $V_{磷酸缓冲液}$ = 40 ∶ 60),流动相B为乙腈—0.05 mol/L磷酸缓冲液(KH_2PO_4—NaOH,pH 6.9)($V_{乙腈}$ ∶ $V_{磷酸缓冲液}$ = 15 ∶ 85);梯度洗脱(0~10 min,2%~6% A;10~22 min,6%~12% A;22~26 min,12%~9% A;26~40 min,9%~2% A;40~42 min,2% A);柱温30 ℃;流速1 mL/min;检测波长245 nm;进样体积10 μL。

1.3.5 傅里叶变换红外光谱(FT-IR)　将样品与溴化钾按$m_{样品}$ ∶ $m_{溴化钾}$为1∶100混匀,充分研磨后压片,利用傅里叶红外光谱(FTIR)进行扫描,扫描波数范围为4 000~400 cm^{-1}。

1.3.6 扫描电镜(SEM)　取适量样品,用导电胶固定后进行镀金,扫描电子显微镜于20 kV下放大500,2 000倍对样品的表面形态进行观察并拍照。

1.3.7 体外抗氧化性

(1) DPPH自由基清除能力:根据文献[17]并修改。将3 mL乙醇—DPPH(0.1 mmol/L)溶液分别加入到2 mL质量浓度为0,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mg/mL的多糖样品溶液中,混匀,避光30 min,测定517 nm处吸光值。以V_C作为阳性对照,按式(1)计算DPPH自由基清除率。

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

式中:

a——DPPH自由基清除率,%;

A_1——样品组吸光度;

A_2——样品对照组吸光度;

A_0——空白组吸光度。

(2) 羟自由基清除能力:参考文献[18]。

(3) 总还原力:根据文献[19]并修改。分别取1 mL

质量浓度为 0,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mg/mL 的多糖样液，依次加入 2 mL PBS(0.2 mol/L,pH 6.6)和 0.5 mL 1%铁氰化钾溶液,50 ℃水浴 30 min,冷却至室温,加入 1 mL 10%三氯乙酸,4 500 r/min 离心 10 min,取 2 mL 上清液,加 0.1 mL 0.1%三氯化铁和 3 mL 去离子水,避光反应20 min,测定 700 nm 处吸光值。

1.3.8　体外降血糖活性

(1) α-淀粉酶抑制率:根据文献[20]。

(2) α-葡萄糖苷酶抑制率:根据文献[21]并修改。分别取 30 μL 不同浓度的样液于 96 孔板中,加入 30 μL α-葡萄糖苷酶溶液(0.5 U/mL),37 ℃孵育 10 min,加入 30 μL PNPG 溶液(5 mmol/L),37 ℃孵育 30 min,加入 60 μL Na_2CO_3 溶液(0.2 mmol/L)终止反应,测定 405 nm 处吸光值,以阿卡波糖为阳性对照。按式(2)计算多糖对 α-葡萄糖苷酶的抑制率。

$$b=\left(1-\frac{A_1-A_2}{A_3-A_4}\right)\times 100\%, \tag{2}$$

式中:

b——α-葡萄糖苷酶的抑制率,%;

A_1——样品组吸光度;

A_2——样品对照组吸光度;

A_3——空白组吸光度;

A_4——空白对照组吸光度。

(3) 抑制 α-淀粉酶和 α-葡萄糖苷酶动力学分析:根据文献[22]并修改。固定 α-淀粉酶(5 U/mL)活力,测定不同质量浓度 CWP-F(0,2,4,6 mg/mL)和 CWP-P(0,0.025,0.050,0.100 mg/mL)存在时,对应体系的反应速率随底物质量浓度(1,2,4,8,10 mg/mL)的变化。固定 α-葡萄糖苷酶(0.5 U/mL)活力,测定不同质量浓度 CWP-F(0,2,4,6 mg/mL)和 CWP-P(0,0.005,0.010,0.050 mg/mL)存在时,对应体系的反应速率随底物浓度(1,2,4,8,10 mmol/L)的变化。

Lineweaver-Burk 方程:

$$\frac{1}{v}=\frac{1}{V_{max}}+\frac{K_m}{V_{max}}\times\frac{1}{[S]}, \tag{3}$$

混合型抑制:

$$\frac{1}{v}=\frac{K_m}{V_{max}}\left(1+\frac{C}{K_i}\right)\frac{1}{[S]}+\frac{1}{V_{max}}\left(1+\frac{C}{K_{is}}\right), \tag{4}$$

$$k=\frac{K_m}{V_{max}}+\frac{K_mC}{V_{max}K_i}, \tag{5}$$

$$b=\frac{1}{V_{max}}+\frac{c}{V_{max}K_{is}}, \tag{6}$$

式中:

v——酶促反应速率,μmol/min;

V_{max}——最大酶反应速率,μmol/min;

$[S]$——淀粉质量浓度或对硝基苯基-α-D-吡喃葡萄糖苷浓度,mg/mL 或 mmol/L;

c——CWP-F 和 CWP-P 质量浓度,mg/mL;

K_m——米氏常数;

K_i——抑制剂与酶结合的平衡常数;

K_{is}——抑制剂与酶—底物复合物结合的平衡常数;

k——斜率;

b——截距。

1.3.9　数据处理　所有试验均重复 3 次,利用 Origin 软件绘图,采用 SPSS 软件进行差异显著性分析,$P<0.05$ 为差异显著。

2　结果与分析

2.1　黄皮不同部位多糖的化学组成

由表 1 可知,从黄皮不同部位提取的粗多糖的化学组成明显不同($P<0.05$),其中果肉部位提取的多糖含量最高,且蛋白质含量最低;果皮部位的多糖含量最低,但还原糖含量最高;种子部位的总糖、蛋白质含量最高。

表 1　黄皮不同部位粗多糖的化学组成†

Table 1　Polysaccharide content, reducing sugar and protein content of CWP-F, CWP-P and CWP-S

%

组别	总糖含量	还原糖含量	蛋白质含量	多糖含量
CWP-F	66.18±2.85^a	0.97±0.04^c	2.22±0.04^c	65.24±2.85^a
CWP-P	52.40±1.43^b	15.18±0.47^a	5.66±0.04^b	37.22±1.30^c
CWP-S	70.65±0.78^a	12.24±0.74^b	13.44±0.15^a	58.41±1.46^b

†　同列字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

2.2　相对分子质量分布

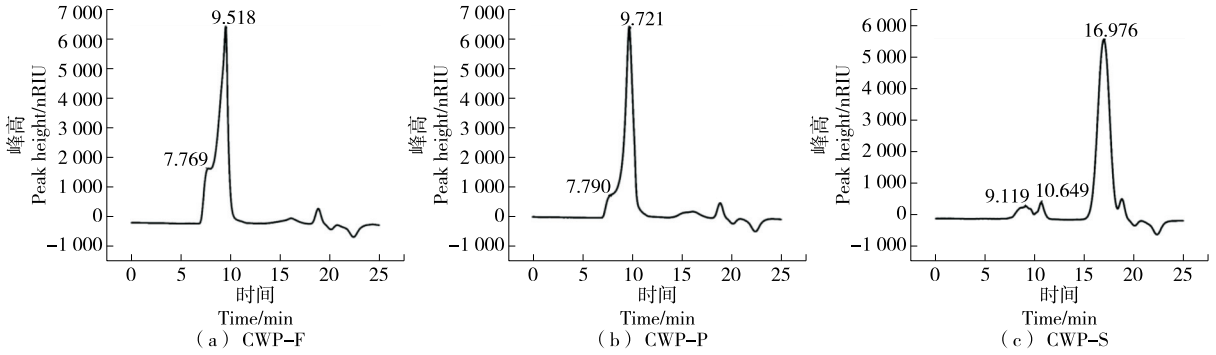
由图 1 可知,CWP-F、CWP-P 和 CWP-S 的峰均不对称,说明其存在不同相对分子量的黄皮多糖组分。根据标准曲线 $\lg M_w=-0.342\ 3t+9.421$,$R^2=0.995\ 6$,计算每种多糖第 1 个峰所对应的相对分子质量分别为 5 776 600,5 681 800,1 993 300,其中 CWP-S 的相对分子质量显著低于 CWP-F 和 CWP-P。

2.3　单糖组成

由表 2 可知,CWP-F、CWP-P 和 CWP-S 3 种多糖均含有甘露糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖,但各自比例(摩尔分数)不同。此外,CWP-P 还含有鼠李糖,但只占 0.06%。CWP-F、CWP-P 和 CWP-S 中占比最大的单糖分别为半乳糖(60.10%)、半乳糖醛酸(35.54%)和葡萄糖(89.77%)。3 个样品的单糖组成及摩尔分数有所差异,主要是样品来源部位不同引起的。

2.4　傅里叶变换红外光谱

由图 2 可知,3 407 cm^{-1} 处吸收峰是由—OH 的伸缩振动引起的,2 932 cm^{-1} 附近吸收峰是—CH_2 基团中 C—H 的不对称伸缩振动引起的[23]。CWP-F 和 CWP-P 在 1 751 cm^{-1} 附近的吸收峰归属为被酯化的羧基(—COOR),CWP-F、CWP-P和CWP-S在1 641 cm^{-1} 附



（a）CWP-F　（b）CWP-P　（c）CWP-S

图 1　多糖液相色谱图

Figure 1　Liquid chromatography of polysaccharide

表 2　CWP-F、CWP-P 和 CWP-S 的单糖组成

Table 2　Monosaccharide composition of CWP-F, CWP-P and CWP-S　%

单糖	CWP-F	CWP-P	CWP-S
甘露糖	0.54	4.69	0.49
鼠李糖	—	0.06	—
葡萄糖醛酸	3.22	0.85	1.34
半乳糖醛酸	10.32	35.54	0.90
葡萄糖	0.36	0.39	89.77
半乳糖	60.10	28.64	6.16
阿拉伯糖	25.47	29.83	1.34

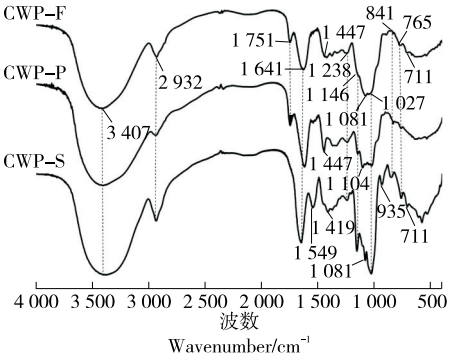


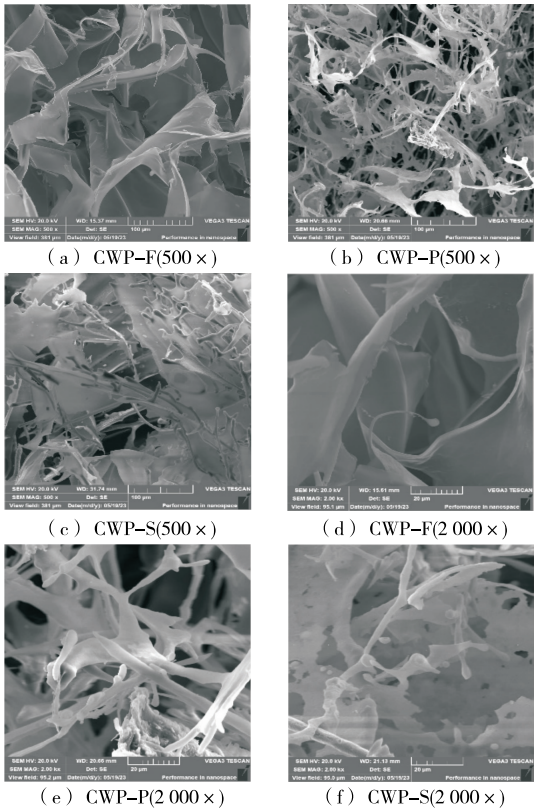
图 2　多糖红外光谱图

Figure 2　FITR spectra of polysaccharide

近的吸收峰归属为离子化的羧基(—COO—)[24]。CWP-S在1 549 cm^{-1}处的吸收峰归属为 N—H 弯曲振动[25]。CWP-F 和 CWP-P 在 1 447 cm^{-1} 以及 CWP-S 在 1 419 cm^{-1}处的吸收峰是由 C—H 弯曲振动引起的[20]。CWP-F、CWP-P 和 CWP-S 在 1 238 cm^{-1}附近的吸收峰归属于 C—O 伸缩振动,在 1 146,1 027 cm^{-1}处的吸收峰归属于 C—O—C 拉伸振动[21]。CWP-F 和 CWP-S 在 1 081 cm^{-1}以及 CWP-P 在 1 104 cm^{-1}处的吸收峰表示有 β-半乳聚糖,在 1 027 cm^{-1}处的峰表示有阿拉伯聚糖[26]。CWP-S在 935 cm^{-1}处的吸收可能与糖单元之间的 β-糖苷键有关[27]。CWP-F、CWP-P 和 CWP-S 在 841 cm^{-1}处的峰表明存在 α-糖苷键;在 765,711 cm^{-1}处的吸收峰表明存在呋喃环[26]。综上,CWP-F、CWP-P 和 CWP-S 是含有羟基、羧基、α-糖苷键和呋喃糖环的阿拉伯半乳聚糖,而 CWP-S 还具有 β-糖苷键构型。

2.5　扫描电子显微镜

由图 3 可知,CWP-F 呈连续的片状结构,表面光滑且有褶皱;CWP-P 由许多带有分支的小片连成,且片与片之间有很大的空隙;CWP-S由许多不规则的片状结构堆成,



（a）CWP-F(500×)　（b）CWP-P(500×)

（c）CWP-S(500×)　（d）CWP-F(2 000×)

（e）CWP-P(2 000×)　（f）CWP-S(2 000×)

图 3　多糖扫描电子显微镜图

Figure 3　Scanning electron microscope of polysaccharide

有空隙。3 个样品微观结构差异可能是由于它们的相对分子质量和单糖组成不同，从而影响了分子内氢键与多糖之间的相互作用，形成不同结构[28]。

2.6 体外抗氧化性

2.6.1 DPPH 自由基清除率　由图 4(a)可知，CWP-F、CWP-P 和 CWP-S 均具有清除 DPPH 自由基的能力，且随质量浓度的增大而增大($P<0.05$)，在 1 mg/mL 时达到最大值，分别为 73.81%，75.62% 和 41.26%。此外，3 种多糖清除 DPPH 自由基的能力大小依次为 CWP-P>CWP-F>CWP-S。

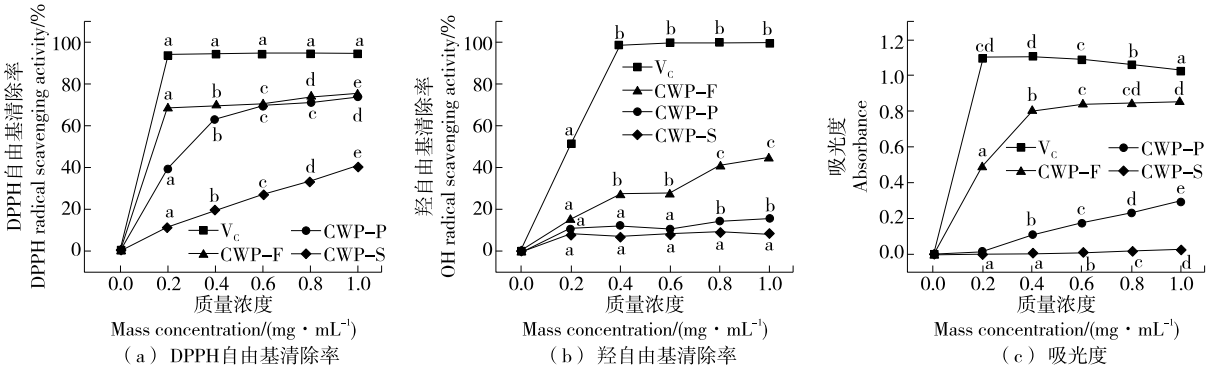
2.6.2 羟自由基清除率　由图 4(b)可知，3 种多糖均具有清除羟自由基的能力，CWP-P 的清除力与其质量浓度成正比($P<0.05$)，在 1 mg/mL 时达到了 45.38%，而 CWP-F 和 CWP-S 的清除能力随质量浓度的增加无明显变化。此外，CWP-F、CWP-P 和 CWP-S 的羟自由基清除率均明显低于维生素 C 的，其清除能力大小为 CWP-P>CWP-F>CWP-S。

2.6.3 总还原力　由图 4(c)可知，CWP-F 和 CWP-P 具有一定的还原力，且随质量浓度的增加显著增大($P<0.05$)，在 1 mg/mL 时达到了最大值，分别为 0.30 和0.86。而 CWP-S 的还原力较弱。

综上，CWP-P 具有最强的抗氧化力，CWP-F 的次之，CWP-S 的较弱。多糖具有抗氧化能力，可能是其结构中的氢与附近的自由基结合形成稳定的自由基，从而结束自由基链式反应[29]。此外，Wang 等[30]认为半乳糖醛酸的存在会螯合金属离子，随后清除 DPPH 自由基，而 CWP-P 单糖组成中含量最多的为半乳糖醛酸，这可能是其清除 DPPH 自由基能力最强的主要原因。

2.7 体外降血糖

2.7.1 α-淀粉酶和 α-葡萄糖苷酶抑制率　由图 5(a)可知，CWP-F 和 CWP-P 有抑制 α-淀粉酶的能力，且其抑制率随质量浓度的增加而增大($P<0.05$)，其中CWP-P的

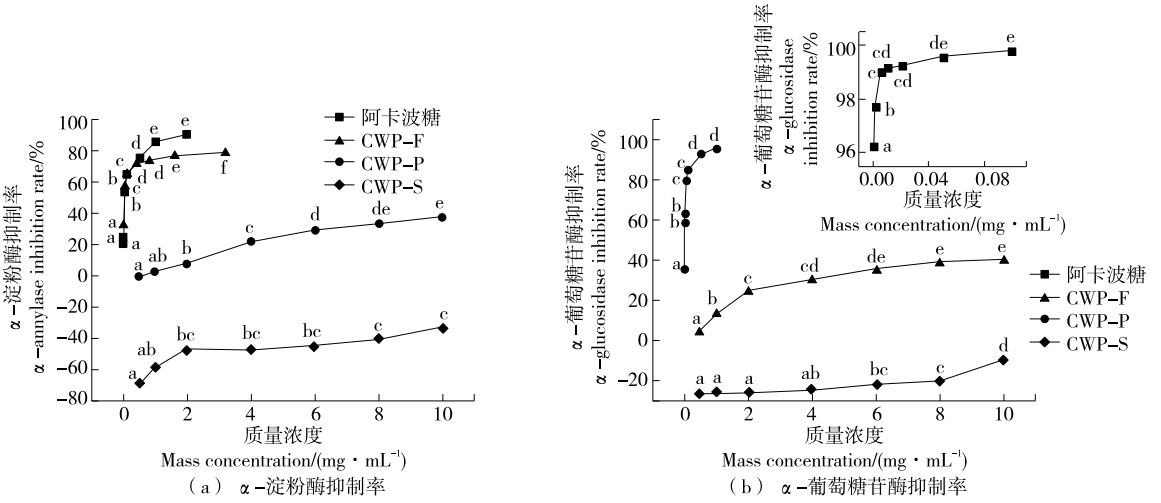


(a) DPPH自由基清除率　(b) 羟自由基清除率　(c) 吸光度

小写字母不同表示组间差异显著($P<0.05$)

图 4　CWP-F、CWP-P 和 CWP-S 的抗氧化能力

Figure 4　Antioxidant capacity of CWP-F, CWP-P and CWP-S



(a) α-淀粉酶抑制率　(b) α-葡萄糖苷酶抑制率

小写字母不同表示组间差异显著($P<0.05$)

图 5　CWP-F、CWP-P 和 CWP-S 的降血糖活性

Figure 5　Hypoglycemic activitiesof CWP-F, CWP-P and CWP-S

抑制能力最强,略低于阿卡波糖。CWP-F 和 CWP-P 的 IC_{50} 值分别为 13.803 8,0.040 8 mg/mL。而 CWP-S 无抑制 α-淀粉酶的能力。

肠上皮细胞分泌的 α-葡萄糖苷酶是将低聚糖水解为单糖的关键酶,α-葡萄糖苷酶抑制剂可以延缓膳食中碳水化合物的摄入,降低餐后高血糖,因此可以用于治疗糖尿病[31]。由图 5(b)可知,CWP-F 和 CWP-P 的抑制率与其浓度呈正相关($P<0.05$),但明显低于阿卡波糖,其 IC_{50} 值分别为 14.223 300,0.008 649 mg/mL,而 CWP-S 对 α-葡萄糖苷酶无抑制力。

综上,CWP-P 抑制 α-淀粉酶和 α-葡萄糖苷酶的能力均显著大于 CWP-F,而 CWP-S 无降血糖的能力。多糖具有 α-淀粉酶和 α-葡萄糖苷酶抑制作用,可能与其高醛酸含量、高酯化程度和高相对分子质量有关[32]。CWP-P 具有最好的体外降血糖能力可能是其具有高半乳糖醛酸和高相对分子质量。此外,抗糖尿病作用是通过抗氧化活性和保护胰腺组织实现的[33]。Zhang 等[34]发现 TFE 和 TTE(翻白草总黄酮提取物和总三萜提取物)通过减弱脂质过氧化而引起抗氧化特性,从而影响脂质特征并负责其抗糖尿病特性。CWP-P 的降血糖活性高于 CWP-F 和 CWP-S,可能是因为其抗氧化能力更高。而 Chung 等[35]认为,多糖具有降血糖作用,其作用机理可能是通过抑制淀粉水解成葡萄糖,延缓葡萄糖的吸收和运输,从而降低血糖含量。

2.7.2　α-淀粉酶和 α-葡萄糖苷酶抑制动力学　由图 5 可知,CWP-S 对 α-淀粉酶、α-葡萄糖苷酶无抑制能力,因此试验只分析 CWP-F 和 CWP-P 对 α-淀粉酶和 α-葡萄糖苷酶的抑制类型。

表 3～表 6 和图 6 为 CWP-F、CWP-P 对 α-淀粉酶和 α-葡萄糖苷酶的抑制类型。由表 3 和图 6(a)可知,随着 CWP-F 质量浓度的增加,K_m 和 V_{max} 逐渐减小,各质量浓度的酶促反应速率拟合直线互相平行,说明 CWP-F 对 α-淀粉酶为反竞争性抑制作用,即 CWP-F 不能与游离的 α-淀粉酶结合,只能在酶和底物结合成复合物后再与酶结合而抑制酶活性[36]。

由表 4 和图 6(b)可知,随着 CWP-P 质量浓度的增加,K_m 和 V_{max} 同时减小,各质量浓度的酶促反应速率拟合直线相交于第 3 象限,说明 CWP-P 对 α-淀粉酶为非竞争性和反竞争性的混合型抑制[22]。其中,K_i 值为 0.107 9,K_{is} 值为0.041 0,说明 CWP-P 更倾向于与 α-淀粉

表 3　CWP-F 抑制 α-淀粉酶的 V_{max} 和 K_m 值

Table 3　V_{max} and K_m values of α-amylase inhibited by CWP-F

抑制剂质量浓度/(mg·mL^{-1})	双倒数曲线方程	V_{max}/(ΔA·min^{-1})	K_m/(mg·mL^{-1})
0	$y=21.298x+5.972\ 6$,$R^2=0.995\ 6$	0.167 4	3.566 0
2	$y=21.853x+6.851\ 4$,$R^2=0.984\ 3$	0.146 0	3.189 6
4	$y=21.643x+8.109\ 4$,$R^2=0.984\ 3$	0.123 3	2.668 9
6	$y=21.392x+10.567$,$R^2=0.970\ 4$	0.094 6	2.024 4

表 4　CWP-P 抑制 α-淀粉酶的 V_{max} 和 K_m 值

Table 4　V_{max} and K_m values of α-amylase inhibited by CWP-P

抑制剂质量浓度/(mg·mL^{-1})	双倒数曲线方程	V_{max}/(ΔA·min^{-1})	K_m/(mg·mL^{-1})	K_i/(mg·mL^{-1})	K_{is}/(mg·mL^{-1})
0.000	$y=18.608x+6.736\ 9$,$R^2=0.987\ 0$	0.148 4	2.762 1	0.107 9	0.041 0
0.025	$y=26.745x+17.213$,$R^2=0.996\ 8$	0.058 1	1.553 8		
0.050	$y=35.540x+27.055$,$R^2=0.972\ 1$	0.037 0	1.313 6		
0.100	$y=38.590x+31.682$,$R^2=0.925\ 9$	0.031 6	1.218 0		

表 5　CWP-F 抑制 α-葡萄糖苷酶的 V_{max} 和 K_m 值

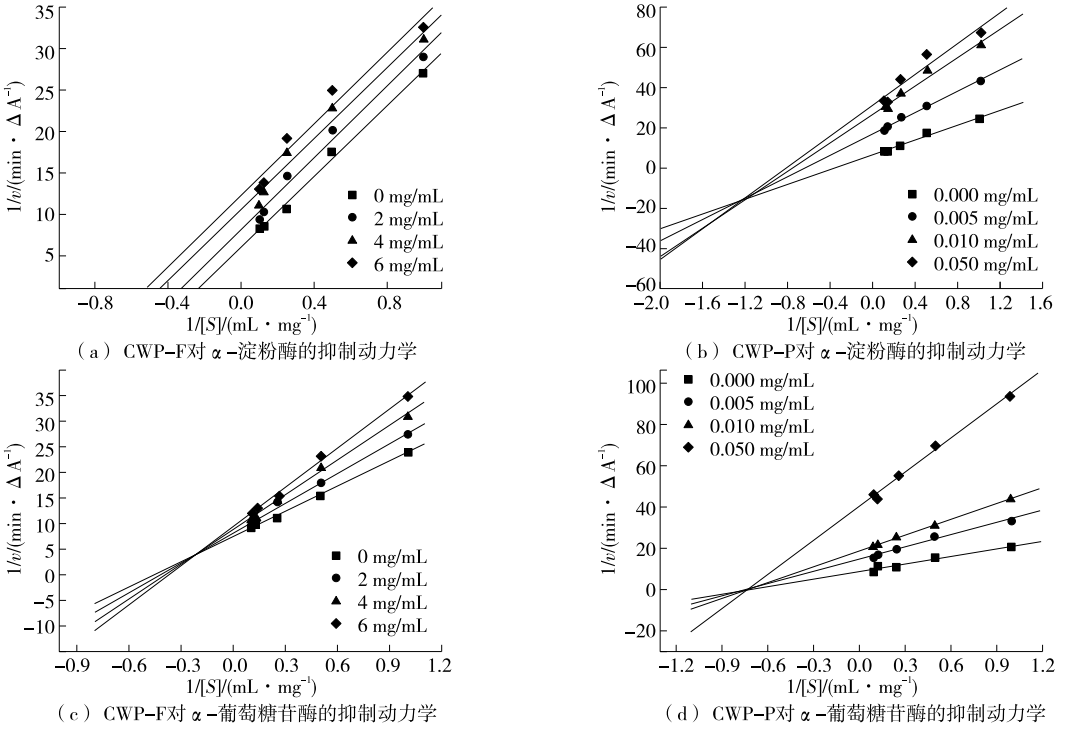
Table 5　V_{max} and K_m values of α-glucosidase inhibited by CWP-F

抑制剂质量浓度/(mg·mL^{-1})	双倒数曲线方程	V_{max}/(ΔA·min^{-1})	K_m/(mg·mL^{-1})	K_i/(mg·mL^{-1})	K_{is}/(mg·mL^{-1})
0	$y=16.539x+7.451\ 6$,$R^2=0.996\ 4$	0.134 2	2.219 5	10.901 6	21.524 8
2	$y=19.522x+8.029\ 2$,$R^2=0.999\ 5$	0.124 5	2.431 3		
4	$y=22.724x+8.806\ 5$,$R^2=0.999\ 3$	0.113 6	2.580 4		
6	$y=25.587x+9.487\ 5$,$R^2=0.996\ 9$	0.105 4	2.617 5		

表 6　CWP-P 抑制 α-葡萄糖苷酶的 V_{max} 和 K_m 值

Table 6　V_{max} and K_m values of α-glucosidase inhibited by CWP-P

抑制剂质量浓度/(mg·mL^{-1})	双倒数曲线方程	V_{max}/(ΔA·min^{-1})	K_m/(mg·mL^{-1})
0.000	$y=12.334x+8.397\ 3$，$R^2=0.948\ 8$	0.119 1	1.468 8
0.005	$y=19.662x+14.341$，$R^2=0.980\ 1$	0.069 7	1.371 0
0.010	$y=25.368x+18.411$，$R^2=0.999\ 3$	0.054 3	1.377 9
0.050	$y=54.885x+39.681$，$R^2=0.993\ 5$	0.025 2	1.383 2



（a）CWP-F对 α-淀粉酶的抑制动力学　（b）CWP-P对 α-淀粉酶的抑制动力学

（c）CWP-F对 α-葡萄糖苷酶的抑制动力学　（d）CWP-P对 α-葡萄糖苷酶的抑制动力学

图 6　CWP-F 和 CWP-P 的抑制动力学

Figure 6　Inhibition kinetics of CWP-F and CWP-P

酶—底物复合物结合。

由表 5 和图 6(c)可知，随着 CWP-F 质量浓度的增加，K_m 逐渐增大，V_{max} 逐渐减小，各质量浓度的酶促反应速率拟合直线相交于第 2 象限，说明 CWP-F 对 α-葡萄糖苷酶为竞争性和非竞争性的混合型抑制。其中，K_i 值为 10.901 6，K_{is} 值为 21.524 8，说明 CWP-F 更倾向于与游离的 α-葡萄糖苷酶结合。

由表 6 和图 6(d)可知，随着 CWP-P 质量浓度的增加，K_m 不变，V_{max} 逐渐减小，各质量浓度的酶促反应速率拟合直线相交于 x 轴，说明 CWP-P 对 α-葡萄糖苷酶为非竞争性抑制作用[37]。

3　结论

从黄皮不同部位提取的果肉多糖(CWP-F)、果皮多糖(CWP-P)和种子多糖(CWP-S)的理化指标、结构和活性存在显著差异($P<0.05$)，其中，CWP-F 多糖含量最高，相对分子量最大，单糖组成主要为半乳糖，体外抗氧化和降血糖能力居中；CWP-P 多糖含量最低，单糖组成主要为半乳糖醛酸，体外抗氧化和降血糖能力最强；CWP-S 多糖相对分子质量最小，单糖组成主要为葡萄糖，体外抗氧化能力最弱，无降血糖能力；CWP-F 和 CWP-P 对 α-淀粉酶和 α-葡萄糖苷酶的抑制类型不同，表明多糖的结构特征会影响其体外抗氧化和体外降血糖活性，但还需深入探究。此外，CWP-P 具有良好的抗氧化和降血糖活性。因此，CWP-P 可以作为一种新的抗氧化剂和潜在辅助治疗 2 型糖尿病的功能性食品。

参考文献

[1] WANG S, LIU Z, ZHAO M, et al. Chitosan-wampee seed essential oil composite film combined with cold plasma for refrigerated storage with modified atmosphere packaging: A promising technology for quality preservation of golden pompano fillets[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 224: 1 266-1 275.

[2] CHANG X, YE Y, PAN J, et al. Comparative assessment of phytochemical profiles and antioxidant activities in selected five varieties of wampee (*Clausena lansium*) fruits[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2018, 53(12): 2 680-2 686.

[3] 冯莉, 余洪清, 黄少华, 等. 无核黄皮病虫害的发生及综合防治[J].广东农业科学, 2004(6): 63-65.
FENG L, YU H Q, HUANG S H, et al. Occurrence and comprehensive control of seedless *Clausena lansium* pests and diseases[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2004(6): 63-65.

[4] WU H, MIN T, LI X, et al. Physicochemical properties and antioxidant activities of acidic polysaccharides from wampee seeds [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 59: 90-95.

[5] SONG C, HUANG F, LIU L, et al. Characterization and prebiotic properties of pectin polysaccharide from *Clausena lansium* (Lour.) Skeels fruit[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 194: 412-421.

[6] 陈渭慧. 生姜茎叶多糖的结构解析、体外消化酵解和保肝活性研究[D]. 重庆: 西南大学, 2022: 4.
CHEN X H. Structural analysis, in vitro digestion and fermentation, and hepatoprotective activity of polysaccharides from ginger stems and leaves[D]. Chongqing: Southwest University, 2022: 4.

[7] QIONG L, JUN L, JUN Y, et al. The effect of *Laminaria japonica* polysaccharides on the recovery of the male rat reproductive system and mating function damaged by multiple mini-doses of ionizing radiations[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2011, 31(2): 286-294.

[8] ZHANG L, QIAO H Y, LIU H X, et al. Antioxidant, hypoglycemic and protection of acute liver injury activities of Ganoderma lucidum spore water extract [J]. Journal of Functional Foods, 2022, 97: 105254.

[9] JIA R B, LI Z R, WU J, et al. Physicochemical properties of polysaccharide fractions from Sargassum fusiforme and their hypoglycemic and hypolipidemic activities in type 2 diabetic rats[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 147: 428-438.

[10] JAHAN S, NESA M, HOSSAIN M E, et al. In vivo and in silico evaluation of analgesic and hypoglycemic activities of *Amaranthus blitum* L.[J]. South African Journal of Botany, 2022, 150: 565-575.

[11] MA W, XIAO L, LIU H, et al. Hypoglycemic natural products with in vivo activities and their mechanisms: A review[J]. Food Science and Human Wellness, 2022, 11(5): 1 087-1 100.

[12] WU H, LI M, YANG X, et al. Extraction optimization, physicochemical properties and antioxidant and hypoglycemic activities of polysaccharides from roxburgh rose (Rosa roxburghii Tratt.) leaves [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 165: 517-529.

[13] 赵凯迪, 王秋丹, 林长青, 等. 桔梗多糖抗氧化特性及对2型糖尿病大鼠降血糖作用[J]. 食品与机械, 2022, 38(7): 186-190, 198.
ZHAO K D, WANG Q D, LIN C Q, et al. Antioxidant properties of polysaccharides from platycodon grandiflorum and its hypoglycemic effect on type 2 diabetic rats[J]. Food & Machinery, 2022, 38(7): 186-190, 198.

[14] MASUKO T, MINAMI A, IWASAKI N, et al. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format[J]. Analytical Biochemistry, 2005, 339(1): 69-72.

[15] GONÇALVE C, RODRIGUEZ-JASS R M, GOMES N, et al. Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates[J]. Analytical Methods, 2010, 2(12): 2 046-2 048.

[16] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1/2): 248-254.

[17] 杜妹玲. 芍药不同部位多糖提取、体外活性研究及其花草茶研制[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2021: 19.
DU M L. Extraction and in vitro activity analysis of polysaccharides from different parts of paeonia lactiflora pall., and development of herbal tea[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2021: 19.

[18] 张嘉园. 荨麻多糖的分离纯化、结构鉴定及降糖活性研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2021: 27.
ZHANG J Y. Study on separation, purification, structure identification and hypoglycemic activity of polysaccharides from urtica fissa E. pritz[D]. Xi'an: Shaanxi University of Science & Technology, 2021: 27.

[19] YUE Q, WANG Z, YU F, et al. Changes in metabolite profiles and antioxidant and hypoglycemic activities of Laminaria japonica after fermentation[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 158: 113122.

[20] SHANG H, ZHAO J, GUO Y, et al. Extraction, purification, emulsifying property, hypoglycemic activity, and antioxidant activity of polysaccharides from comfrey[J]. Industrial Crops & Products, 2020, 146: 112183.

[21] DENG Q, WANG W, ZHANG Q, et al. Extraction optimization of polysaccharides from Gougunao tea and assessment of the antioxidant and hypoglycemic activities of its fractions in vitro[J]. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 2021, 26: 100287.

[22] 周一鸣, 马思佳, 蒋晴怡, 等. 苦荞中芦丁和槲皮素对淀粉消化酶的抑制能力[J]. 食品科学, 2022, 43(18): 30-37.
ZHOU Y M, MA S J, JIANG Q Y, et al. Inhibition of starch-digesting enzymes by rutin and quercetin in tartary buckwheat[J]. Food Science, 2022, 43(18): 30-37.

[23] LI S, LIU M, CHEN Z, et al. Cross-linking treatment of arabinoxylan improves its antioxidant and hypoglycemic activities after simulated in vitro digestion[J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 145: 111386.

[24] 刘功继. 酸碱处理对热加工莲藕片品质和细胞壁多糖结构的

影响研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2021: 35.
LIU G J. Effects of acid and alkali treatment on quality and cell wall polysaccharide of thermal processed lotus rhizomes slices[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2021: 35.

[25] ZHU J, CHEN Z, CHEN L, et al. Comparison and structural characterization of polysaccharides from natural and artificial Se-enriched green tea [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 130: 388-398.

[26] CHEN J, ZHOU M, LIU M, et al. Physicochemical, rheological properties and in vitro hypoglycemic activities of polysaccharide fractions from peach gum [J]. Carbohydrate Polymers, 2022, 296: 119954.

[27] HSU W K, HSU T H, LIN F Y, et al. Separation, purification, and α-glucosidase inhibition of polysaccharides from Coriolus versicolor LH1 mycelia[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 92(1): 297-306.

[28] WANG Y, SHEN X, YIN K, et al. Structural characteristics and immune-enhancing activity of fractionated polysaccharides from Athyrium Multidentatum (*Doll*.) Ching[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 205: 76-89.

[29] LU J, HE R, SUN P, et al. Molecular mechanisms of bioactive polysaccharides from Ganoderma lucidum (Lingzhi), a review[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 150: 765-774.

[30] WANG C C, CHANG S C, INBARAJ B S, et al. Isolation of carotenoids, flavonoids and polysaccharides from *Lycium barbarum* L. and evaluation of antioxidant activity [J]. Food Chemistry, 2010, 120(1): 184-192.

[31] KIM Y M, JEONG Y K, WANG M H, et al. Inhibitory effect of pine extract on α-glucosidase activity and postprandial hyperglycemia[J]. Nutrition, 2005, 21(6): 756-761.

[32] FU Y, FENG K L, WEI S Y, et al. Comparison of structural characteristics and bioactivities of polysaccharides from loquat leaves prepared by different drying techniques [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 145: 611-619.

[33] JIAO Y, HUA D, HUANG D, et al. Characterization of a new heteropolysaccharide from green guava and its application as an α-glucosidase inhibitor for the treatment of type II diabetes[J]. Food & Function, 2018, 9(7): 3 997-4 007.

[34] ZHANG L, YANG J, CHEN X Q, et al. Antidiabetic and antioxidant effects of extracts from Potentilla discolor Bunge on diabetic rats induced by high fat diet and streptozotocin[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2010, 132(2): 518-524.

[35] CHUNG J O, YOO S H, LEE Y E, et al. Hypoglycemic potential of whole green tea: Water-soluble green tea polysaccharides combined with green tea extract delays digestibility and intestinal glucose transport of rice starch[J]. Food & Function, 2019, 10(2): 746-753.

[36] 郑丽婷, 周鸿, 刘奕明, 等. 黄柏碱对 α-葡萄糖苷酶的体外抑制作用[J]. 南京中医药大学学报, 2020, 36(6): 853-858.
ZHENG L T, ZHOU H, LIU Y M, et al. Inhibitory effect of phellodendrine on α-glucosidase in vitro [J]. Journal of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, 2020, 36(6): 853-858.

[37] 姜丽丽, 张中民, 陈道玉, 等. 白藜芦醇对 α-葡萄糖苷酶的抑制动力学及抑制机制[J]. 食品科学, 2019, 40(11): 70-74.
JIANG L L, ZHANG Z M, CHEN D Y, et al. Inhibition kinetics and mechanisms of resveratrol on α-glucosidase[J]. Food Science, 2019, 40(11): 70-74.

(上接第 103 页)

[10] 汪瑶, 李天祥, 朱静. 膜蒸馏技术在工业废水处理中的研究进展[J]. 化学工业与工程, 2021, 38(4): 56-63.
WANG Y, LI T X, ZHU J. Research progress of membrane distillation technology in industrial wastewater treatment [J]. Chemical Industry and Engineering, 2021, 38(4): 56-63.

[11] BREDUN M A, PRESTES A A, PANCERI C P, et al. Bioactive compounds recovery by freeze concentration process from winemaking by-product [J]. Food Research International, 2023, 173: 113220.

[12] KANNA M R R, JERUSHA E, BHATTACHARYA S, et al. Mechanical properties of micro and Nano-Filler content on polypropylene composites[J]. Materials Today: Proceedings, 2022, 59: 1 261-1 265.

[13] VUBA K K, ETAKULA N, UTTARAVALLI A N. Preparation of polypropylene co-polymer (PPCP) based composites with improved properties in presence of MWCNT and MAgPP fillers[J]. Materials Today: Proceedings, 2023, 80: 1 096-1 100.

[14] 陈东, 谢继红. 热泵技术手册[M]. 2 版. 北京: 化学工业出版社, 2018: 2-9.
CHEN D, XIE J H. Heat pump technical manual [M]. 2nd ed. Beijing: Chemical Industry Press, 2018: 2-9.

[15] ALEXANDRU M G, ALINA M H. Value-added ingredients and enrichments of beverages[M]. New York: Academic Press, 2019: 465-485.

[16] LOWREY S, HUGHES C, SUN Z. Thermal-hydraulic performance investigation of an aluminium plate heat exchanger and a 3D-printed polymer plate heat exchanger [J]. Applied Thermal Engineering, 2021, 194: 117060.

[17] 胡胜威. 液膜表面蒸发型果蔬汁常压低温浓缩装置研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2023: 49-50.
HU S W. Research on a liquid film surface evaporation type low temperature concentration device for fruit and vegetable juice under normal pressure[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2023: 49-50.