

不同分子量余甘子多糖理化性质及其对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性比较

方嘉沁^{1,2}, 张潼², 符树勇¹, 扶雄², 郭伟雄¹, 陈春^{2*}

(1. 广州酒家集团利口福食品有限公司, 广东广州 511442)

(2. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 为了探究余甘子多糖的构效关系, 采用热水提取余甘子多糖, 用 50%和 80% (V/V) 乙醇分级醇沉获得两个组分 (PEP-50 和 PEP-80)。PEP-50 和 PEP-80 均具有相同的单糖组成, 但含量具有一定的差异, 其中半乳糖醛酸为余甘子多糖的主要成分; 且 PEP-80 组分的分子量主要为 234.45 kDa, 占 99.21%, 低于 PEP-50 (256.26 kDa, 92.51%)。同时, PEP-50 和 PEP-80 均具有降糖活性, 对 α -葡萄糖苷酶的半抑制浓度分别为 3.34 和 0.46 mg/mL, 均以混合型抑制的方式起到抑制作用。其中 PEP-80 的降糖活性大于 PEP-50, 表现出对游离 α -葡萄糖苷酶的结合以及对 α -葡萄糖苷酶-底物复合物的结合能力均强于 PEP-50, 这些差异与其不同的化学组成及分子量密切相关。以上实验表明, 分子量对余甘子多糖降血糖功能活性具有重要的影响, 也为今后开发不同类型的余甘子健康食品提供了理论依据。

关键词: 余甘子; 多糖; 分级醇沉; 理化性质; α -葡萄糖苷酶

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.11.1134

Physicochemical Characterization and Inhibitory Activity against α -Glucosidase of Polysaccharides from *Phyllanthus emblica* L. by Gradient Ethanol Precipitation

FANG Jiaqin^{1,2}, ZHANG Tong², FU Shuyong¹, FU Xiong², GUO Weixiong¹, CHEN Chun^{2*}

(1. Guangzhou Restaurant Group Likofu Food Co., Ltd., Guangzhou 511442, China)

(2. College of Food Science and Technology, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: To realize the relationship between structure and activity, *Phyllanthus emblica* L. polysaccharides was extracted by hot water and precipitated by 50% and 80% (V/V) ethanol into two fractions (PEP-50 and PEP-80). PEP-50 and PEP-80 were made up of comparable types of monosaccharides in varying quantities in which galacturonic acid was the main constituent. Besides, the molecular weight of PEP-80 was mainly distributed in 234.45 kDa (accounting for 99.21%), which was lower than PEP-50 that mainly distributed in 256.26 kDa (accounting for 92.51%). Moreover, PEP-50 and PEP-80 had hypoglycemic activity, and the IC₅₀ values were 3.34 and 0.46 mg/mL, respectively. Both of them exhibited a mixed-type inhibition of α -glucosidase. In addition, PEP-80 had stronger inhibitory effects on α -glucosidase than PEP-50, exhibiting stronger binding ability to α -glucosidase and α -glucosidase-substrate complex. These differences might be closely related to different chemical composition and molecular weight. These data suggest the molecular weight of *Phyllanthus emblica* L. polysaccharides had great impact on their hypoglycemic activity, providing important theoretical guiding significant for developing *Phyllanthus emblica* L. food products with different types.

Key words: *Phyllanthus emblica* L.; polysaccharides; gradient ethanol precipitation; physicochemical characterization; hyperglycemic activity

收稿日期: 2024-08-03; 修回日期: 2024-09-27; 接受日期: 2024-10-09

基金项目: 广东省科技计划项目 (2023A0505050132); 校企合作项目

作者简介: 方嘉沁 (1988-), 女, 博士, 高级工程师, 研究方向: 功能性碳水化合物, E-mail: 253224902@qq.com

通讯作者: 陈春 (1988-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 天然产物与营养健康, E-mail: chenc@scut.edu.cn

多糖是一种广泛存在于植物、微生物和动物中,由多个单糖组成的生物大分子^[1],同时也是药物、保健品和食品添加剂的理想来源。植物多糖以其安全和无毒的特性受到了广泛的关注。研究证明,植物多糖具有多种生物活性,其中包括抗肿瘤、免疫调节、抗病毒和抗氧化活性^[2],特别是在降血糖治疗糖尿病方面表现突出。Nardos等^[3]报道,辣木叶粗水提物可以有效地降低四氧嘧啶诱导的糖尿病小鼠的血糖水平。随后Chen等^[4]在此基础上发现辣木叶多糖对 α -葡萄糖苷酶具有强抑制作用,并进一步指出多糖可能是通过物理干扰包裹 α -葡萄糖苷酶从而延迟其与底物的作用^[5]。

余甘子是典型的药食两用植物,广泛分布于中国、印度和印度尼西亚等亚热带和热带地区,以其独特的滋味被消费者熟知。研究证明,余甘子具有降脂、降血糖、抗炎和抗癌等多种活性^[6,7]。目前,余甘子多糖已被证明具有抗氧化^[8]、降血糖^[9]和抑制群体感应^[10]等生物活性。然而大多数天然多糖具有广泛的分子量分布,且分子量对多糖的功能活性有着重要影响。但当前分子量对余甘子多糖功能活性影响的研究较少,且不同分子量的余甘子多糖的理化性质也尚未清晰。

因此,本研究采用50%和80%(V/V)的乙醇从余甘子水提取物中分离出两种具有分子量差异的多糖,同时探究两种余甘子多糖组分对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用,并通过酶动力学分析和荧光光谱分析等方法对两种不同余甘子多糖与 α -葡萄糖苷酶的相互作用机制进行了分析,旨在阐明分子量对余甘子多糖功能活性的影响机制,为今后有待开发的余甘子产品类型和形态提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

余甘子果实,由揭阳市农益社生态农业有限公司提供; α -葡萄糖苷酶,购于安徽泽升科技有限公司;对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷(p -NPG),由上海源叶生物科技有限公司;其它试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

JSM-7500F 扫描电子显微镜,日本电子株式会社;DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器,上海予正仪器设备有限公司;SY-2000 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;Nicolet 6700 研究型红外光谱仪,赛默飞世尔科技公司;Agilent 126 高效液相色谱,安捷伦科技有限公司;SuperMax 3100 型多功能酶标仪,上海闪谱生物科技有限公司;ICS 5000 多功能离子色谱,赛默飞世尔科技公司。

1.3 实验方法

1.3.1 不同分子量余甘子多糖的制备

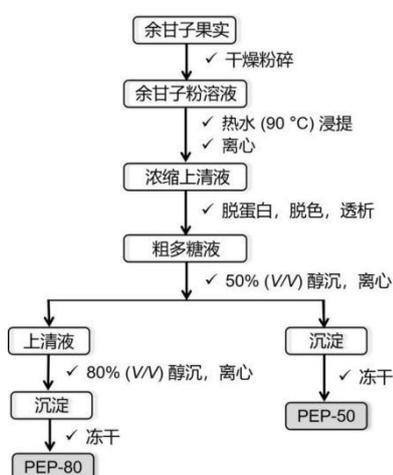


图1 余甘子多糖的制备流程

Fig.1 Scheme for the extraction and fraction of PEPs

余甘子果实去核在 45 °C 下干燥 48 h, 随后粉碎过 60 目筛。称取 60.000 g 余甘子粉于烧杯中, 加入 1 800 mL 蒸馏水后置于 90 °C 水浴锅中浸提 3 h, 真空抽滤, 滤液经旋蒸浓缩到原体积的 1/4~1/5。随后浓缩液用 Sevage 试剂 (氯仿:正丁醇=4:1) 脱蛋白, 4 000 r/min 离心 1 min 除去中间蛋白层与下层有机溶液, 重复上述步骤 12 次直至离心后无中层蛋白质。脱蛋白后的多糖液以 1:4 (g/mL) 的比例加入 AB-8 大孔吸附树脂进行静吸附, 200 r/min 振荡 12 h, 过滤。滤液采用透析袋 (分子截留量为 3 500 Da) 透析 72 h, 直至外部去离子水电荷不再变化。在上述透析后的多糖液中加入无水乙醇, 使乙醇总浓度达到 50% (V/V), 随后置于 4 °C 过夜, 离心 (5 000 r/min, 10 min), 除去上清液, 沉淀用 50% (V/V) 乙醇溶液重复洗涤 3 次, 经冷冻干燥后定义为 50% 醇沉的余甘子多糖 (PEP-50)。在上述上清液中加入无水乙醇, 得到 80% (V/V) 的沉淀馏分, 定义为 80% 醇沉的余甘子多糖 (PEP-80)^[11]。具体步骤如图 1 所示。

1.3.2 化学组成分析

以 D-葡萄糖为标准, 采用硫酸-苯酚法测定余甘子多糖的总碳水化合物含量^[12]。以牛血清白蛋白为标准, 采用 Bradford 法测定余甘子多糖的蛋白质含量^[13]。

单糖组成和糖醛酸含量采用离子色谱 ICS 5000 分析, 配备 Dionex Carbopac™ PA20 色谱柱 (3×150 mm)。余甘子多糖 (5 mg) 采用 2 mL 三氟乙酸 (3 mol/L) 在 120 °C 下在安培瓶中水解 3 h。准确吸取酸水解溶液转移至管中氮吹吹干, 加入 5 mL 水涡旋混匀, 吸取 50 μL 加入 950 μL 超纯水, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液进行分析。流动相: A: H₂O; B: 250 mmol/L NaOH; C: 500 mmol/L NaOH&50 mmol/L NaAc; 流量: 0.3 mL/min; 洗脱梯度: 0 min A 相/B 相/C 相 (98:2:0, V/V), 23 min A 相/B 相/C 相 (98:2:0, V/V), 23.1 min A 相/B 相/C 相 (80:20:0, V/V), 33 min A 相/B 相/C 相 (80:20:0, V/V), 33.1 min A 相/B 相/C 相 (80:0:20, V/V), 46 min A 相/B 相/C 相 (80:0:20, V/V), 46.1 min A 相/B 相/C 相 (20:0:80, V/V), 66 min A 相/B 相/C 相 (20:0:80, V/V), 66.1 min A 相/B 相/C 相 (98:2:0, V/V), 80 min A 相/B 相/C 相 (98:2:0, V/V)。进样量为 25 μL, 柱温为 30 °C

1.3.3 分子量的测定

余甘子多糖 (PEP-50 和 PEP-80) 的分子量测定采用配备有示差折光检测器的高效液相色谱系统测定。将余甘子多糖组分溶于 0.02 mol/L 的磷酸二氢钾溶液 (2 mg/mL), 并过 0.22 μm 水相滤膜用于分析。色谱条件如下: 流动相, 0.02 mol/L 磷酸二氢钾; 流量, 0.6 mL/min; 柱温, 35 °C; 检测器温度, 45 °C; 进样量, 20 μL。普鲁兰系列的分子量作为标准。样品的分子量是根据洗脱体积的校准曲线方程和上述分子量的对数来确定的^[14]。

1.3.4 红外光谱

将余甘子多糖 (PEP-50 和 PEP-80) 与溴化钾粉完全混合, 磨碎后压成 1 mm 的压片。所制备的样品采用研究型红外光谱仪测定^[15]。红外光谱扫描范围为 400~4 000 cm⁻¹, 分辨率为 1 cm⁻¹。

1.3.5 扫描电镜

余甘子多糖 (PEP-50 和 PEP-80) 在减压下用铂金溅射, 并在高真空和 5 kV 加速电压下通过 SEM 系统在不同放大倍数下进行测定。

1.3.6 α-葡萄糖苷酶抑制作用

1.3.6.1 α-葡萄糖苷酶抑制活性

余甘子多糖 (PEP-50 和 PEP-80) 的 α-葡萄糖苷酶抑制活性的测定如 Chen 等^[16]所述。不同质量浓度的余甘子多糖样品、α-葡萄糖苷酶 (1 U/mL)、对硝基苯基-α-D-吡喃葡萄糖苷 (p-NPG) 溶液 (4 mmol/L) 均用 100 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 6.9) 来制备。在 100 μL 余甘子多糖样品中加入 20 μL α-葡萄糖苷酶, 在 37 °C 孵育 10 min, 然后加入 100 μL p-NPG 溶液, 在 37 °C 孵育 10 min, 加入 50 μL 碳酸钠 (1 mol/L) 终止反应。不含多糖样品的混合物作为对照, 阿卡波糖作为阳性对照。采用酶标仪在 400 nm 处测定吸光度, 对 α-葡萄糖苷酶的抑制率的计算公式 (1) 所示:

$$\alpha\text{-葡萄糖苷酶抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{A_s - A_d}{A_c}\right) \times 100 \quad (1)$$

式中:

A_s —样品反应溶液的吸光度

A_d —不添加酶的样品反应溶液的吸光度

A_c —对照组反应溶液的吸光度

1.3.6.2 α -葡萄糖苷酶的抑制动力学

采用 Lineweaver-Burk 方程对余甘子多糖 (PEP-50 和 PEP-80) 对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性进行了动力学研究。简而言之, 多糖的质量浓度分别为 1, 2, 4 mg/mL, 同时 p -NPG 溶液的浓度范围为 0.5~4 mmol/L, 并保持酶的浓度为 0.5 U/mL。将数据绘在 Lineweaver-Burk 图上, 分析抑制类型和动力学参数, 包括酶-抑制剂结合常数 (K_i) 和抑制剂-酶-底物结合常数 (K_{is}), 可通过公式 (2)、(3) 和 (4) 计算。

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_{is}}\right) \quad (2)$$

$$\text{Slope} = \frac{K_m}{V_{\max}} + \frac{K_m [I]}{V_{\max} K_i} \quad (3)$$

$$Y\text{-intercept} = \frac{1}{V_{\max}^{app}} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{1}{K_{is} V_{\max}} [I] \quad (4)$$

式中:

v —酶促反应速率;

K_m —抑制动力学的米氏常数;

V_{\max} —最大反应速率;

$[I]$ —抑制剂质量浓度;

K_i —酶-抑制剂结合常数;

$[S]$ —底物浓度;

K_{is} —抑制剂-酶-底物结合常数;

Slope—Lineweaver-Burk 图的斜率;

Y-intercept—Lineweaver-Burk 图的截距。

1.3.6.3 α -葡萄糖苷酶的抑制机制

为了研究余甘子多糖对 α -葡萄糖苷酶结构的影响, 通过多功能酶标仪测定 α -葡萄糖苷酶-多糖混合物的荧光发射光谱。 α -葡萄糖苷酶溶液 (100 μ L, 0.5 U/mL) 与余甘子多糖溶液 (0.015 625~10 mg/mL) 在 25 $^{\circ}$ C 孵育 10 min。波长扫描范围为 300~400 nm 之间, 激发波长为 280 nm。结合参数, 包括结合常数 (K_a)、荧光淬灭常数 (K_q) 和结合位点的数量 (n), 采用公式 (5) 和 (6) 计算:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad (5)$$

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_a + n \log [Q] \quad (6)$$

式中:

F —含有余甘子多糖的荧光强度;

F_0 —无余甘子多糖的荧光强度;

τ_0 —没有淬灭剂时荧光分子的平均寿命, 取 10-8 s;

$[Q]$ —多糖的质量浓度;

K_{sv} — F_0/F 对 $[Q]$ 的线性回归计算。

1.4 数据统计

所有实验重复3次,数值以平均值±标准偏差(SD)表示。使用SPSS 22.0进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 分级醇沉余甘子多糖组分的特性及化学组成

余甘子多糖的提取率为7.59 wt%。其中PEP-50的得率占比为34.17 wt%,而PEP-80的得率占比为65.83 wt%,相较于PEP-50为主要组分。此外,PEP-50和PEP-80的中性糖含量分别为82.64 wt%和89.37 wt%,同时蛋白质含量分别为0.10 wt%和0.07 wt%,表明蛋白质几乎被除去。

表1 余甘子多糖的特性及化学组成

项目	PEP-50	PEP-80
得率 (wt%)	34.17±2.82	65.83±2.82
中性糖含量 (wt%)	82.64±3.69	89.37±6.12
蛋白质含量 (wt%)	0.10±0.01	0.07±0.01
单糖组成 (摩尔比, %)		
阿拉伯糖	6.06	8.19
半乳糖	27.53	31.04
葡萄糖	2.38	3.88
木糖	2.14	3.24
甘露糖	3.74	4.27
糖醛酸含量 (摩尔比, %)		
半乳糖醛酸	58.14	49.38
分子量分布 (kDa)		
峰1	256.26	234.45
占比 (%)	92.51	99.21
峰2	13.34	0.19
占比 (%)	4.51	0.79
峰3	0.07	Nd
占比 (%)	2.98	Nd

离子色谱图谱(图2)显示,不同浓度醇沉的余甘子多糖组分具有相同的单糖组成,但含量具有一定的差异。如表1所示,PEP-50和PEP-80均由阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、木糖和甘露糖组成。其中PEP-50的摩尔比分别为6.06、27.53、2.38、2.14和3.74%,而PEP-80的摩尔比分别为8.19、31.04、3.88、3.24和4.27%。余甘子多糖的单糖组成与以往的研究略有不同。Chen等^[2]报道余甘子多糖由阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖、鼠李糖和海藻糖组成,而Guo等^[7]报道余甘子多糖含有阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖和甘露糖。这可能是由于原料、提取方法或纯化程序的差异造成的。此外,PEP-50和PEP-80中半乳糖醛酸的摩尔比分别为58.14和49.38%,占据主要成分。这表明,通过分级乙醇沉淀得到的余甘子多糖组分具有不同的化学组成成分^[4]。

如图2所示,随着乙醇的浓度从50% (V/V)增加到80% (V/V),PEP-80中主峰的保留时间延迟,反应了样品分子量的降低。根据标准曲线的计算,PEP-50和PEP-80的分子量见表1。PEP-50分子量主要在0.07~256.26 kDa之间,其中分子量256.26 kDa的片段占92.51%;PEP-80分子量主要分布在0.19~234.45 kDa之间,其中分子量234.45 kDa的片段占99.21%,总体而言PEP-50组分的分子量高于PEP-80。此外,本研究所得到的余甘子多糖分子量高于目前报道的余甘子多糖^[8,18],这可能与余甘子来源具有一定的关系^[11]。余甘子多糖的分子量随着乙醇浓度的增加而降低,说明粗多糖的分子量与其在乙醇水溶液中的溶解度呈负相关^[19]。

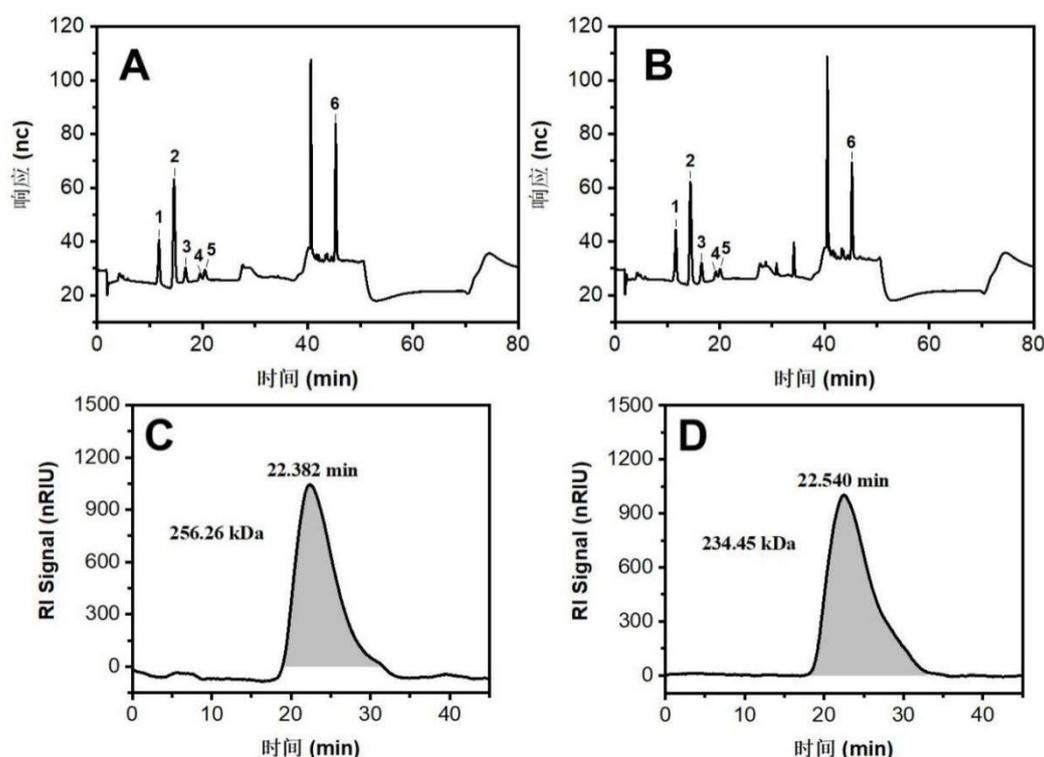


图2 (A) PEP-50 和 (B) PEP-80 的离子交换色谱 (1-阿拉伯糖, 2-半乳糖, 3-葡萄糖, 4-木糖, 5-甘露糖, 6-半乳糖醛酸); (C) PEP-50 和 (D) PEP-80 分子量分布的高效液相色谱图

Fig.2 Ion-exchange chromatography of (A) PEP-50 and (B) PEP-80 (1-arabinose, 2-galactose, 3-glucose, 4-xylose, 5-mannose, and 6-galacturonic acid). The HPLC chromatogram of molecular weight distribution of (C) PEP-50 and (D) PEP-80

2.2 红外光谱分析

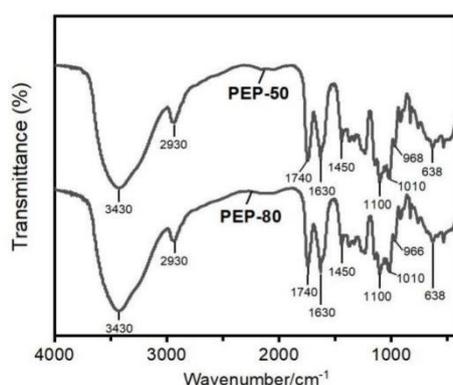


图3 余甘子多糖 (PEP-50 和 PEP-80) 的红外光谱

Fig.3 IR spectra of PEP-50 and PEP-80

余甘子多糖的构型可以通过 FTIR 光谱学来阐明, PEP-50 和 PEP-80 的红外光谱如图 3 所示。结果表明, PEP-50 和 PEP-80 在 4 000~400 cm^{-1} 范围内都呈现出典型的多糖吸收峰。在 3 430 cm^{-1} 的强吸收峰是由于 O-H 的拉伸振动, 而在 2 930 cm^{-1} 左右的吸收峰代表着 C-H 振动。在 1 630 cm^{-1} 处的显著吸收峰表示存在游离羧酸基。在 1 740 cm^{-1} 处的吸收峰为酯羰基 C=O 的伸缩振动, 说明在余甘子多糖中可能含有糖醛酸。在 1 094 cm^{-1} 和 1 011 cm^{-1} 处的信号与糖苷结构中 C-O-C 的伸缩振动有关^[14]。在 968 cm^{-1} 和 638 cm^{-1} 处的吸收峰表明了吡喃糖的存在^[20]。两种分级醇沉的多糖组分 (PEP-50 和 PEP-80) 的 FTIR 光谱基本一致, 且是一种酸性多糖, 这与其高含量的半乳糖醛酸一致。此外, -OH 和 -COOH 基团是化合物发挥生物活性的典型基团, 这表明它们可能具有潜在的生物活性^[11]。

2.3 扫描电镜分析

余甘子多糖的表面形貌如图 4 所示，PEP-50 表观上起皱（图 3A），相比之下，PEP-80 表观上较为平坦（图 3D）。在微观上，PEP-50 由紧密排列的孔隙组成（图 3B 和 3C），这与多糖的分子间力效应有关^[21]。而 PEP-80 表面平坦光滑，结构致密（图 4E 和 4F）。据报道，所用的制备工艺会显著影响脱水多糖的形态，这可能会影响其功能^[22]。

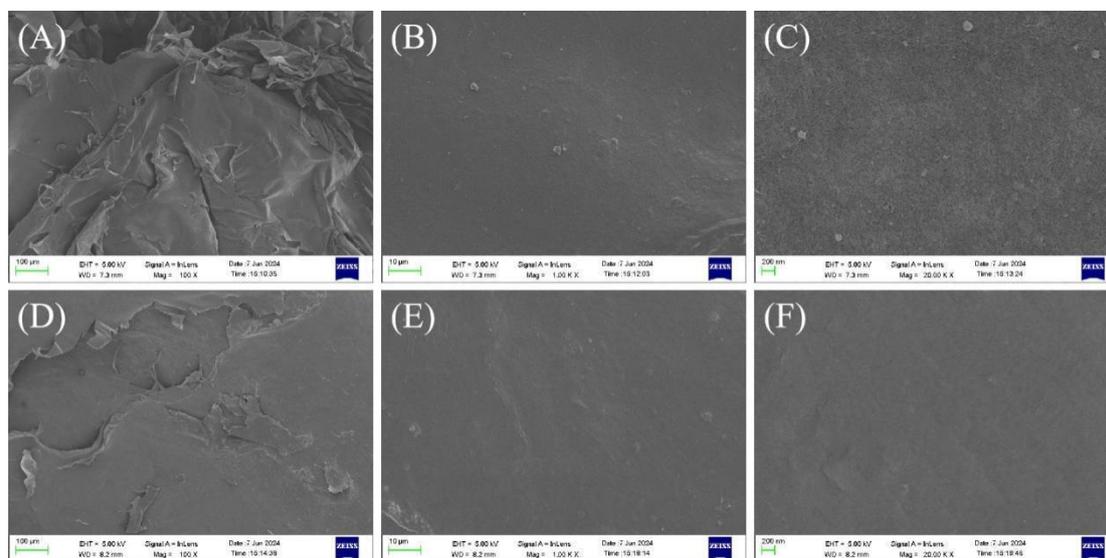


图 4 余甘子多糖的扫描电镜图：PEP-50 (A) 100×；(B) 1 000×；(C) 20 000×和 PEP-80；(D) 100×；(E) 1 000×；(F) 20 000×

Fig.4 The SEM of PEP-50 ((A)100×; (B)1 000×; (C)20 000×) and PEP-80 ((D)100×; (E)1 000×; (F)20 000 ×)

2.4 余甘子多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性

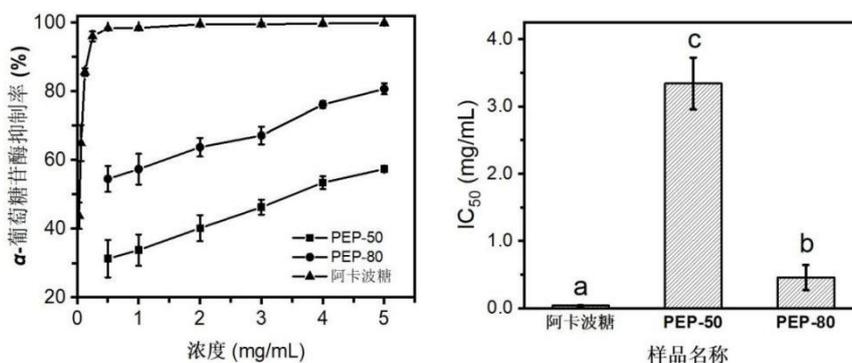


图 5 (A) 余甘子多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性以及 (B) α -葡萄糖苷酶的半抑制浓度值 (IC₅₀)

Fig.5 (A) α -Glucosidase inhibitory activity and (B) IC₅₀ value of inhibitory activity of PEP-50 and PEP-80

抑制 α -葡萄糖苷酶活性可以减缓碳水化合物的消化和对葡萄糖的吸收，对控制餐后血糖治疗糖尿病具有重要意义。不同浓度乙醇沉淀的多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性如图 5A 所示。在 0.5~5 mg/mL 质量浓度范围内，PEP-50 和 PEP-80 对 α -葡萄糖苷酶表现出明显的剂量依赖性抑制作用。阿卡波糖、PEP-50 和 PEP-80 的半抑制浓度值分别为 0.038、3.342 和 0.457 mg/mL（图 5B）。结果表明，对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性下降的顺序如下：阿卡波糖>PEP-80>PEP-50。PEP-80 的降糖活性明显强于 PEP-50，这一趋势表明高浓度乙醇沉淀的粗多糖的降糖活性强于低浓度乙醇沉淀，与康桥等^[23]提取的金铃子多糖结论一致。这样的现象可归因于其分子量^[11]。多糖的分子量与其生物活性呈负相关^[24]，这与表 1 中的结果一致。高分子量多糖限制了对酶活性位点的流动性和可及性，而低分子量多糖由于分子量小，与消化酶结合的阻碍较小，更多的还原羟基末端以及糖醛酸的活性基团得到充分利用，可与 α -葡萄糖苷酶的氨基酸残基相互作用，从而影响消化酶的结构，因而具有更好的降糖活性。虽然不同浓度醇

沉的余甘子多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用低于阿卡波糖，但由于没有副作用，兼具之具有多种生物活性，在糖尿病治疗中仍具有很大的潜力。不同浓度醇沉的余甘子多糖通过抑制 α -葡萄糖苷酶，具有降糖作用，有助于开发具降糖活性的余甘子产物。

2.5 余甘子多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制动力学分析

不同浓度醇沉的余甘子多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制动力学分析即是通过 Lineweaver-Burk 双倒数作图来确定抑制类型。如图 6A 所示，在不同质量浓度的余甘子多糖作用下（0、1、2、4 mg/mL），PEP-50 和 PEP-80 所有具有不同斜率和截距的谱线均在第二象限相交，表明 PEP-50 和 PEP-80 对 α -葡萄糖苷酶的抑制类型均为混合型抑制^[25]。混合型抑制意味着 PEP-50 和 PEP-80 既可以与 *p*-NPG 竞争与 α -葡萄糖苷酶结合，又可以与 α -葡萄糖苷酶-*p*-NPG 复合物相互作用形成多糖- α -葡萄糖苷酶-*p*-NPG 三级复合物。

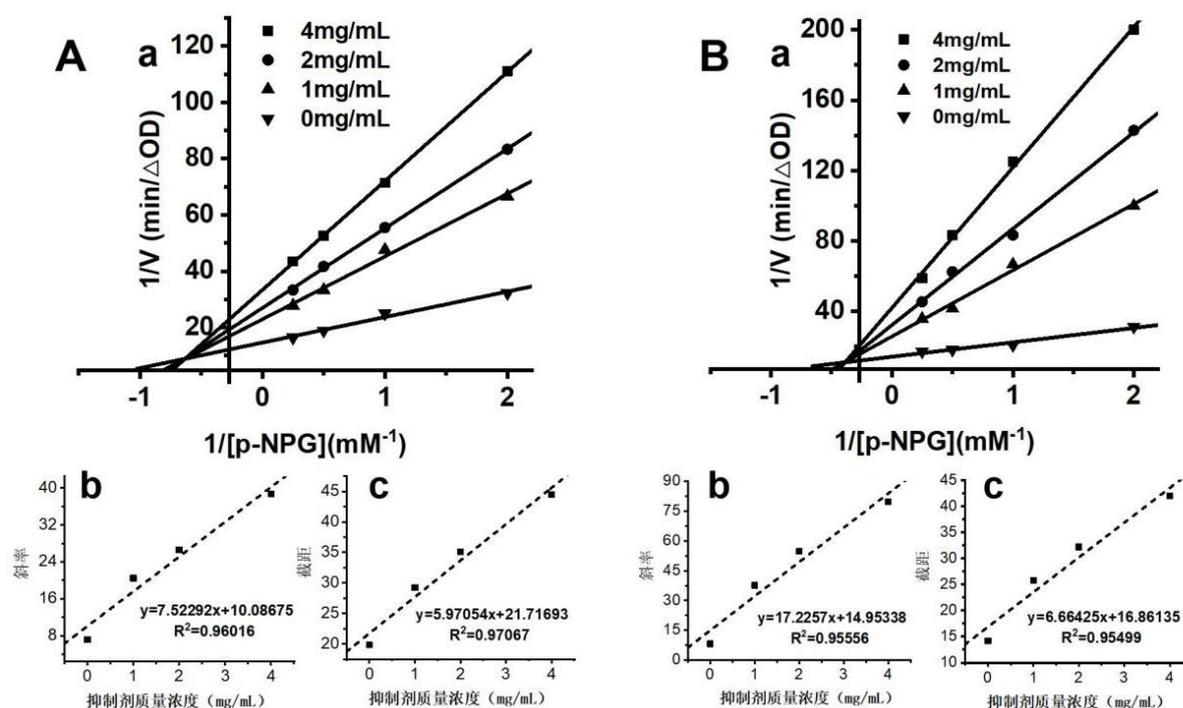


图 6 PEP-50 (A) 和 PEP-80 (B) 抑制 α -葡萄糖苷酶的 Lineweaver-Burk 图分析 (a)，斜率与抑制剂质量浓度的关系图 (b)，截距与抑制剂质量浓度的关系图 (c)

Fig.6 Lineweaver-Burk plots analysis (a) of α -glucosidase inhibition by (A) PEP-50 and (B) PEP-80, plot of slope versus inhibitor (b), plot of intercept versus inhibitor concentration (c)

表 2 PEP-50 和 PEP-80 与 α -葡萄糖苷酶作用的抑制动力学参数

项目	PEP-50/(mg/mL)			PEP-80/(mg/mL)		
	1	2	4	1	2	4
抑制类型	混合型抑制			混合型抑制		
$V_{max}/(\Delta A_{405}/min)$	0.044	0.037	0.030	0.039	0.031	0.034
$K_i/(mg/mL)$	1.75			0.87		
$K_{is}/(mg/mL)$	3.74			2.53		

根据 Lineweaver-Burk 方程计算可知，PEP-50 和 PEP-80 的最大反应速率均随着质量浓度的增加而减少，说明 50%和 80%（*V/V*）醇沉的余甘子多糖的存在降低了酶促反应的速率，阻碍了 α -葡萄糖苷酶和底物之间的反应。 K_i 值与 K_{is} 值越小则代表其结合能力越强。PEP-50 的 K_i 和 K_{is} 分别为 1.75 和 3.74 mg/mL，高于 PEP-80 (K_i 为

0.87 mg/mL, K_{is} 为 2.53 mg/mL), 表明高乙醇浓度沉淀的余甘子多糖对游离 α -葡萄糖苷酶和 α -葡萄糖苷酶-pNPG 复合物的结合能力显著增加, 使得 PEP-80 对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性更强。PEP-50 和 PEP-80 的 K_i 值均低于 K_{is} 值, 说明余甘子分级醇沉多糖对游离 α -葡萄糖苷酶的结合亲和力大于 α -葡萄糖苷酶-pNPG 复合物^[25]。

2.6 α -葡萄糖苷酶荧光光谱分析

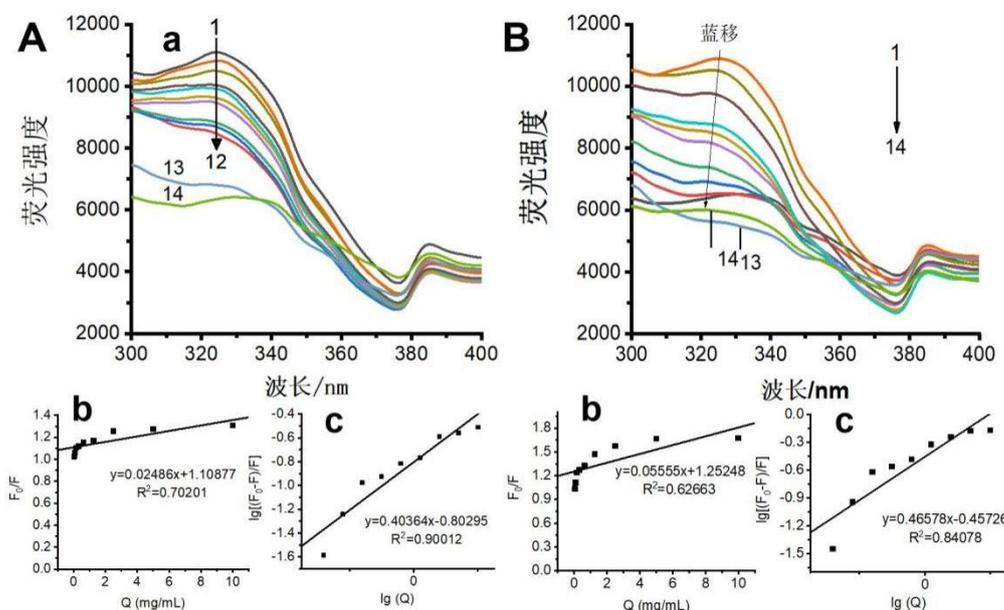


图 7 不同质量浓度 (光谱 1~12, 0~10 mg/mL) 的(A) PEP-50 和(B) PEP-80 存在下 α -葡萄糖苷酶的荧光光谱(a), 曲线 13 和 14 分别为余甘子多糖和水的发射光谱;余甘子多糖(PEP-50 和 PEP-80)对 α -葡萄糖苷酶淬灭作用的 Stern-Volmer 图(b), 以及 $\log[(F_0-F)/F]$ 与 $\log[Q]$ 的关系图(c)

Fig.7 Fluorescence spectra (a) of α -glucosidase in the presence of (A) PEP-50 and (B) PEP-80 at various concentrations (spectra 1~12, 0~10 mg/mL), the curve 13 and 14 were the emission spectra of the PEP-50/PEP-80 polysaccharide and the water, (b) Stern-Volmer plots for the quenching effects of α -glucosidase with PEP-50/PEP-80, (c) plots of $\log[(F_0-F)/F]$ versus $\log[Q]$ for quenching effects of PEP-50/PEP-80 on α -glucosidase.

色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸等芳香族氨基酸具有内源性荧光, 可作为探针来确定 α -葡萄糖苷酶与多糖之间的相互作用^[26]。在不同质量浓度的 PEP-50 和 PEP-80 作用下, α -葡萄糖苷酶的荧光强度如图 7 所示。在实验使用的浓度下, PEP-50, PEP-80 和水在最大波长处没有显示出荧光或表现为弱荧光。然而, 随着 PEP-50 和 PEP-80 浓度的增大, α -葡萄糖苷酶的荧光强度迅速降低, 说明 α -葡萄糖苷酶的固有荧光被淬灭, 且 PEP-80 组的荧光强度下降幅度大于 PEP-50。可以注意到, 在 PEP-50 作用下, 荧光发射的最大波长没有变化, 说明 α -葡萄糖苷酶的内部微环境不受 PEP-50 处理的影响。出现这种现象的原因可能是 PEP-50 引起 α -葡萄糖苷酶局部结构的颗粒展开或松动, 从而导致了色氨酸等疏水残基的暴露程度增加^[25]。另一方面, 在 PEP-80 组中, 荧光发射光谱的最大波长随着 PEP-80 作用浓度的增加发生了明显的蓝移, 这说明 α -葡萄糖苷酶-PEP-80 的结合改变了 α -葡萄糖苷酶的内部微环境, 导致了 α -葡萄糖苷酶空间构象的转变^[27]。

PEP-50 和 PEP-80 的 K_a 值分别为 1.57×10^3 L/mL 和 3.49×10^3 L/mL, 而 K_a 值表示抑制剂对 α -葡萄糖苷酶残基的结合力强度。PEP-80 的 K_a 值更大, 表明 PEP-80 与 α -葡萄糖苷酶残基的结合能力更强。此外, PEP-50 和 PEP-80 的荧光淬灭常数 K_q 值分别为 2.49×10^6 L/mL 和 5.56×10^6 L/mL, 即 PEP-80 的 K_q 值也高于 PEP-50。以上结果表明, PEP-80 对 α -葡萄糖苷酶的荧光特性有更大的影响。这可以解释 PEP-80 对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性比 PEP-50 高的原因。

3 结论

本研究采用乙醇分级沉淀法成功获得了两种粗多糖 (PEP-50 和 PEP-80)。它们都是由相同类型的单糖组成,

但比例不同,包括阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、甘露糖和半乳糖醛酸。在分子量分布、中性糖含量、半乳糖醛酸含量方面也存在差异,PEP-80的分子量分布总体相比于PEP-50更低,中性糖含量也比PEP-50更高,说明二者具有不同的理化性质。此外,PEP-50和PEP-80均以混合抑制的方式对 α -葡萄糖苷酶起到抑制作用,其中PEP-80的抑制活性显著强于PEP-50。研究表明,余甘子多糖具有作为 α -葡萄糖苷酶抑制剂的潜力,特别是在处理高血糖方面,及其不同的理化性质和结构特性提供了在未来发展中各种可选择的余甘子产品的类型和形态,为实现余甘子的综合利用提供了理论依据。

参考文献

- [1] CHEN C, FU X. Spheroidization on *Fructus Mori* polysaccharides to enhance bioavailability and bioactivity by anti-solvent precipitation method [J]. Food Chemistry, 2019, 300: 125245.
- [2] CHEN Y Y, CHEN S Y, CHANG H Y, et al. *Phyllanthus emblica* L. polysaccharides ameliorate colitis via microbiota modulation and dual inhibition of the RAGE/NF- κ B and MAPKs signaling pathways in rats [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 258: 129043.
- [3] NARDOS A, MAKONNEN E, DEBELLA A. Effects of crude extracts and fractions of *Moringa stenopetala* (Baker f) *Cufodontis* leaves in normoglycemic and alloxan-induced diabetic mice [J]. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2011, 5(20): 2220-2225.
- [4] CHEN C, ZHANG B, HUANG Q, et al. Microwave-assisted extraction of polysaccharides from *Moringa oleifera lam.* leaves: characterization and hypoglycemic activity [J]. Industrial Crops & Products, 2017, 100: 1-11.
- [5] CHEN C, YOU L J, MEHMOOD A A, et al. Characterization of polysaccharide fractions in mulberry fruit and assessment of their antioxidant and hypoglycemic activities in vitro [J]. Food & Function, 2016, 7(1): 530-539.
- [6] MA Q G, WANG L, LIU R H, et al. *Phyllanthus emblica* Linn: A comprehensive review of botany, traditional uses, phytonutrients, health benefits, quality markers, and applications [J]. Food Chemistry, 2024, 446: 138891.
- [7] GAN J, ZHANG X, MA C J, et al. Purification of polyphenols from *Phyllanthus emblica* L. pomace using macroporous resins: Antioxidant activity and potential anti-alzheimer's effects [J]. Journal of Food Science, 2022, 87(3): 1244-1256.
- [8] LI Y Y, CHEN J Y, CAO L L, et al. Characterization of a novel polysaccharide isolated from *Phyllanthus emblica* L. and analysis of its antioxidant activities [J]. Journal of Food Science and Technology, 2018, 55(7): 2758-2764.
- [9] 王锐.余甘子多糖体外降血糖及抗氧化活性研究[J].食品研究与开发,2018,39(17):189-92+224.
- [10] 曹莉莉,王芳,杨贺忠,等.余甘子果实水溶性多糖抑菌及群体感应抑制活性初探[J].亚热带植物科学,2015,44(4):289-92.
- [11] LIU S S, SHI X W, XIANG W, et al. Bioactivities and physicochemical properties of crude polysaccharides from mulberry twigs, agricultural by-products [J]. Industrial Crops & Products, 2023, 193: 116191.
- [12] DUBOIS M, GILLES K A, HAMILTON J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. Anal Chem, 2002, 28(3): 350-356.
- [13] 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): 248-254.
- [14] 刘莎,邓利玲,钟耕,等.酶解法制备臭黄荆叶果胶的结构、理化性质、抗氧化和抗菌活性[J].食品科学,2023,44(23):55-63.
- [15] DOU Z M, CHEN C, HUANG Q, et al. The structure, conformation, and hypoglycemic activity of a novel heteropolysaccharide from the blackberry fruit [J]. Food & Function, 2021, 12(12), 5451-5464.
- [16] CHEN C, YOU L J, ABBASI A M, et al. Optimization for ultrasound extraction of polysaccharides from mulberry fruits with antioxidant and hyperglycemic activity in vitro [J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 130: 122-132.
- [17] GUO P, CHEN M, WANG W, et al. Exploration of polysaccharides from *Phyllanthus emblica*: Isolation, identification, and evaluation of antioxidant and anti-glycolipid metabolism disorder activities [J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2024, 29(8): 1751.
- [18] ZENG Z, LV W, JING Y, et al. Structural characterization and biological activities of a novel polysaccharide from *Phyllanthus emblica* [J]. Drug Discoveries & Therapeutics, 2017, 11(2): 2017.01010.
- [19] ZHANG K, YUAN D, LI C, et al. Physicochemical properties and bioactivity of polysaccharides from *Sargassum pallidum* by fractional ethanol precipitation [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2021, 56(7): 3536-3545.

- [20] LIANG Y, YU W, WANG H, et al. Flash extraction of ulvan polysaccharides from marine green macroalga *Ulva linza* and evaluation of its antioxidant and gut microbiota modulation activities [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 262(Pt 2): 130174-.
- [21] WANG Y J, XIONG X, HUANG G L. Ultrasound-assisted extraction and analysis of maidenhairtree polysaccharides [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2023, 95(2023): 106395.
- [22] LI Q, ZHAO T T, SHI J L, et al. Physicochemical characterization, emulsifying and antioxidant properties of the polysaccharide conjugates from Chin brick tea (*Camellia sinensis*) [J]. Food Chemistry, 2022, 395(2022): 133625.
- [23] 康桥,孙越,刘梦瑶,等.金铃子果皮多糖超声辅助提取工艺优化及其抗氧化和降糖活性研究[J].食品工业科技,2024,45(21):164-173.
- [24] 谭西,周欣,陈华国.植物多糖构效关系研究进展[J].中国中药杂志,2017,42(21):4104-4109.
- [25] DOU Z M, CHEN C, HUANG Q, et al. The structure, conformation, and hypoglycemic activity of a novel heteropolysaccharide from the blackberry fruit [J]. Food & Function, 2021, 12(12): 5451.
- [26] HUA F, ZHOU P, WU H Y, et al. Inhibition of α -glucosidase and α -amylase by flavonoid glycosides from Lu'an GuaPian tea: molecular docking and interaction mechanism [J]. Food & Function, 2018, 9(8): 4173-4183.
- [27] JIA Y N, XUE Z H, WANG Y J, et al. Chemical structure and inhibition on α -glucosidase of polysaccharides from corn silk by fractional precipitation [J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 252(prepublish): 117185.