

超声辅助酶解法提取火龙果皮结合酚及其抗氧化和酶抑制活性研究

钟烜钰^{1,2}, 刘宇佳^{2*}, 朱杰², 李琳², 杨金易¹, 王弘^{1*}

(1. 华南农业大学食品学院, 广州 510642; 2. 东莞理工学院生命健康技术学院/
中国轻工业健康食品开发与营养调控重点实验室, 东莞 523808)

摘要: **目的** 探究提取工艺对火龙果皮结合酚释放量和抗氧化活性的影响, 并揭示其潜在的酶抑制活性。

方法 以火龙果皮为原料, 去除游离酚后, 采用单因素实验分别测定柠檬酸水溶液 pH、酶解温度、超声密度和酶解时间对火龙果皮结合酚提取物的总酚、总黄酮含量和抗氧化活性的影响, 在最优提取条件下测定其对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制活性。**结果** 当提取体系 pH 为 5、酶解温度为 50℃、超声密度为 32 W/L、酶解时间为 75 min 时, 结合酚达最高产率, 即总酚含量为 (1.20 ± 0.04) mg GAE/g DW, 总黄酮含量为 (1.91 ± 0.09) mg RE/g DW。抗氧化结果显示, 结合酚提取物的 2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ammonium salt radical cation, ABTS⁺·]和 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, DPPH·)清除活性及铁离子还原抗氧化能力的最佳提取条件与总酚、总黄酮含量的一致。此外, 最佳提取条件下的结合酚提取物对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的半抑制浓度分别为 (36.50 ± 0.68) 和 (23.98 ± 0.40) mg/mL。**结论** 火龙果皮结合酚提取物具有抗氧化和酶抑制活性, 是潜在天然抗氧化剂和酶抑制剂。超声辅助酶解技术作为提取火龙果皮结合酚类化合物的有效方法, 为植物废弃物的高值化利用及其在功能性特膳食品的应用提供新思路。

关键词: 超声辅助酶解法; 火龙果皮结合酚; 抗氧化活性; 酶抑制作用

Study on ultrasonic assisted enzymatic hydrolysis for extraction of bound phenol of pitahaya peel and its antioxidant and enzyme inhibitory activities

ZHONG Xuan-Yu^{1,2}, LIU Yu-Jia^{2*}, ZHU Jie², LI Lin², YANG Jin-Yi¹, WANG Hong^{1*}

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. School of Life and Health Technology/China National Light Industry Key Laboratory of Healthy Food Development and Nutrition Regulation, Dongguan University of Technology, Dongguan 523808, China)

基金项目: 国家自然科学基金项目(31901682)、东莞理工学院高层次人才(创新团队)科研启动项目(KCYCXPT2017007)、广东省创新强校创新团队项目(2021KCXTD035)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (31901682), the ISTI, Dongguan University of Technology, China (KCXCXPT2017007), and the Foundation for Innovation Team in Higher Education of Guangdong, China (2021KCXTD035)

***通信作者:** 刘宇佳, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品分子互作。E-mail: yujiali@dgut.edu.cn

王弘, 博士, 教授, 主要研究方向为食品安全与营养。E-mail: gzwhongd@163.com

***Corresponding author:** LIU Yu-Jia, Ph.D, Associate Professor, School of Life and Health Technology/China National Light Industry Key Laboratory of Healthy Food Development and Nutrition Regulation, Dongguan 523808, China. E-mail: yujiali@dgut.edu.cn

WANG Hong, Ph.D, Professor, College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China. E-mail: gzwhongd@163.com

ABSTRACT: Objective To explore the effect of extraction technology on the release and antioxidant activity of bound phenols from pitahaya peel, and reveal its potential enzyme inhibitory activity. **Methods** Using pitahaya peel as raw material, after removing free phenol, the effects of citric acid solution pH, enzymolysis temperature, ultrasonic density and enzymolysis time on total phenolic content, total flavonoid content and antioxidant activity of the bound phenol extract from pitahaya peel were determined by single factor test, and the optimal extraction conditions were selected to determine its α -amylase and α -glucosidase inhibitory activity. **Results** When the extraction system pH was 5, the enzymolysis temperature was 50°C, the ultrasonic density was 32 W/L, and the enzymolysis time was 75 min, the highest yield of bound phenol was reached, that was, the total phenol content was (1.20 ± 0.04) mg GAE/g DW, and the total flavonoid content was (1.91 ± 0.09) mg RE/g DW. The antioxidant results showed that the optimal extraction conditions of the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ammonium salt radical cation ($\text{ABTS}^{+\cdot}$) and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical ($\text{DPPH}^{\cdot}$) radical scavenging activities and ferric reducing antioxidant power of the bound phenol extract were consistent with that of the content of total phenol and total flavonoid. In addition, under the optimal extraction conditions, the half maximal inhibitory concentrations of the bound phenol extract on α -amylase and α -glucosidase were (36.50 ± 0.68) and (23.98 ± 0.40) mg/mL, respectively. **Conclusion** The bound phenol extract from pitahaya peel has antioxidant and enzyme inhibition activities, which is a potential natural antioxidant and enzyme inhibitor. Ultrasonic assisted enzymatic hydrolysis is an effective method to extract bound phenolic compounds from pitahaya peel, which provides a new idea for the high value utilization of plant waste and its application in functional special dietary food.

KEY WORDS: ultrasonic assisted enzymatic hydrolysis; bound phenols of pitahaya peel; antioxidant activity; enzyme inhibition

0 引言

我国火龙果产量接近 200 万 t/年, 已成为世界第一大火龙果生产国^[1]。据报道, 2015 年我国火龙果种植面积 39 万亩, 产量 48.6 万 t, 到 2020 年种植面积 99 万亩, 产量 152.6 万 t, 分别是 2015 年的 2.5 倍和 3 倍^[2]。火龙果皮约占整个果实的 30%~45%, 目前处理主要为直接丢弃, 不仅严重浪费了果皮中仍存留的大量丰富活性物质资源, 同时对环境卫生也产生了巨大的压力。研究表明, 火龙果皮含有大量活性物质, 如花青素、多糖和黄酮^[3-4], 所含有结合酚在植物基原料中贮备丰富, 具有显著的生物活性, 如抗氧化、降血糖、抗癌和抑菌活性^[5]。因此, 亟需经济有效且环境友好的高效提取火龙果皮中结合酚成分的新思路和新方法, 最大限度提高火龙果皮等植物废弃物利用度。

酚类化合物是植物体内的一种次级代谢物, 具有多种生物活性与药用价值^[6], 主要以游离形式和结合形式存在^[7]。目前, 大多数研究主要集中于通过甲醇、乙醇、丙酮等有机溶剂或有机-水混合体系萃取植物体中游离酚成分并测定其生物活性^[8]。然而, 与植物体以各类共价键结合形式存在的结合酚类化合物是植物体总酚类物质的重要部分, 传统的提取与研究方向往往忽视了这类酚类物质的存在, 并严重低估了植物组织中酚含量及其所具有更优秀的生物活性^[9]。还有学者认为, 某些植物结合酚具有较高的抗氧化活性, 甚至优于游离酚^[10]。结合酚被保留在提取

游离酚后的残留物中, 与植物细胞壁中的果胶、纤维素、半纤维素等以酯键、醚键和碳碳单键等共价结合, 可通过化学法、生物法或物理法被释放出来, 并以游离形式被识别和表征^[11]。最新研究表明, 结合酚有助于预防结肠癌等肠道疾病, 具有益生菌特性, 同时具有抗炎、抗肥胖等生物活性^[12]。此外, 更有研究表明, 一些农业废弃物中结合酚的抗氧化活性甚至高于游离酚^[13]。

酶解法是提取结合酚的一种主要方法, 植物细胞在较温和的条件下, 所使用的酶能使细胞壁与其内容物间的共价键断裂, 从而释放出结合酚, 具有反应条件温和与高度专一性的特点^[14-16]。为了使更多结合位点断裂, 有学者通过超声辅助酶解法提取西兰花中酚类化合物, 相较于单一酶水解法显现处更明显的优势^[17]。也有学者采用超声辅助法提取火龙果皮多酚发现, 火龙果皮多酚提取物具有较高的总酚、总黄酮含量和抗氧化活性^[18]。但迄今为止, 仍没有研究报道超声辅助酶解法对火龙果皮结合酚的提取效果。为了进一步明确超声辅助技术结合酶解法对火龙果皮结合酚的提取功效, 本研究通过优化提取工艺, 重点分析不同工艺条件下火龙果皮中结合酚的总酚与总黄酮含量, 使用 2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ammonium salt radical cation, $\text{ABTS}^{+\cdot}$]和 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, $\text{DPPH}^{\cdot}$)清除活性及铁离子还原抗氧化能力(ferric reducing antioxidant power, FRAP)实验测定结合酚的抗氧化能力, 同时探讨最佳工艺条件下结合酚对 α -淀粉酶和 α -葡萄

糖苷酶的抑制作用, 为采用超声辅助酶解法改善火龙果皮等大宗植物废弃物的高值化利用及其在特膳食品中的应用提供新思路。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

新鲜火龙果购于当地市场, 经鉴定为 *Hylocereus undatus* Foo-Lon' 品种。果皮预处理方法为洗净、切块、冻干、过 40 目筛后储藏于 -80°C 。

DPPH、ABTS、2,4,6-三吡啶基三嗪[2,4,6-tri(pyridin-2-yl)-1,3,5-triazine, TPTZ]、6-羟基-2,5,7,8-四甲基色烷-2-羧酸(6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, Trolox)(分析纯, 美国 Sigma-Aldrich 公司); 果胶酶(500 U/mg)、纤维素酶(50000 U/g)、半纤维素酶(20000 U/g)、 α -淀粉酶(1500 U/g)、 α -葡萄糖苷酶(50000 U/g)、3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)、对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷(4-nitrophenyl α -D-glucopyranoside, pNPG)(分析纯, 上海源叶生物科技有限公司)。

1.2 仪器与设备

SH2-DIH 循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限公司); RE-2000A 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂); Delta2-24/LSC 冷冻干燥机(德国 Christ 公司); 5804R 高速离心机(德国 Eppendorf 公司); KQ-200KDE 高效率数控超声波(昆山市超声仪器有限公司); ThermoVarioskanLUX 多功能酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); TE601-L 电子天平(精度 0.1 mg; 德国赛多利斯公司); ZD-2pH 计(上海精科有限公司); DK-98-IIA 电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司); PHS-3G 磁力搅拌器(上海仪电有限公司); XHF-DY 高速分散器(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.3 去除游离酚

参考文献[19]方法去除游离酚。将 6 g 样品溶于 45 mL 的甲醇溶液中, 将其在 10000 r/min 的转速下均质 10 min。在冰上放置 1 min 后, 将混合物以 5000 r/min 的转速离心 10 min。用 80% 甲醇重复上述步骤。去除上清液保留残渣备用。

1.4 超声波辅助酶解提取结合酚

取将上述残渣 0.2 g 使用复合酶(果胶酶:纤维素酶:半纤维素酶=1:1:1, $m:m:m$, 共 0.06 g)酶解, 置于超声波仪中进行超声处理, 工艺条件包括体系 pH (3、4、5、6、7)、酶解温度(30、40、50、60、 70°C)、超声密度(24、28、32、36、40 W/L)和酶解时间(15、45、75、105、135 min)。提取完毕后, 将其置于 80°C 烘箱 10 min 使酶失活, 加入等量的乙酸乙酯于 1000 r/min 搅拌 10 min, 在 4000 r/min 离心 10 min。重复上述步骤 3 次。将所有上清液于 40°C 旋转蒸发, 并加入 4 mL 70% 甲醇溶液复溶得到质量浓度为 50 mg/mL 的结合酚提取液, 在 -20°C 下储存用于后续分析。

1.5 总酚与总黄酮含量测定

1.5.1 总 酚

采用福林酚比色法测定提取物总酚含量^[20]。取结合酚提取液 100 μL 与 10% 的福林酚试剂 500 μL 室温下反应 10 min。将 500 μL 7.5% 碳酸钠溶液添加到混合物中, 室温孵育 60 min 进行显色反应, 并在 765 nm 处测得其吸光度值。标准曲线为以没食子酸(0~300 $\mu\text{g/mL}$)为标准品, 结果以每克样品干重(dry weight, DW)的没食子酸毫克数当量值表示, 即 mg GAE/g DW。

1.5.2 总黄酮

采用亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠比色法测定提取物总黄酮含量^[21]。500 μL 提取液与 30 μL 5% NaNO_2 溶液混合 5 min 后, 将 30 μL 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液加入混合液中反应 6 min。随后加入 NaOH 溶液(1 mol/L, 400 μL)和 75% 乙醇溶液 40 μL , 在室温下继续反应 10 min, 并于 510 nm 处测定吸光度值。标准曲线以芦丁(0~400 $\mu\text{g/mL}$)为标准品, 结果以 mg RE/g DW 表示。

1.6 抗氧化能力

1.6.1 ABTS⁺清除能力

参考文献[22]方法并做以下修改: 分别取 ABTS 储备液(7.4 mmol/L)和过硫酸钾储备液(2.6 mmol/L)等量混合并于黑暗中放置 12~16 h。用蒸馏水将上述混合溶液稀释至 734 nm 处的吸光度值为 0.70 ± 0.02 , 并取出其中 1 mL 混合溶液与 20 μL 提取物于黑暗反应 5 min, 随后在 734 nm 记录吸光度值。标准曲线以 Trolox 为标准品, 结果表示为 $\mu\text{mol Trolox/g DW}$ 。

1.6.2 DPPH⁺清除能力

参考文献[23]方法并稍作修改: 将提取液与 12 mg/mL DPPH 乙醇溶液按 1:9.5 ($V:V$)混合均匀, 室温下暗处反应 30 min, 在 517 nm 处测定吸光度值。标准曲线以 Trolox 为标准品, 结果表示为 $\mu\text{mol Trolox/g DW}$ 。

1.6.3 铁离子还原抗氧化能力

参考文献[24]方法并稍作修改, 分别配制浓度为 300 mmol/L 的醋酸缓冲液、10 mmol/L 的 TPTZ 盐酸溶液和 20 mmol/L 的三氯化铁溶液。将上述 3 种溶液以 10:1:1 的体积比混合得到工作液。取 1 mL FRAP 工作液与 50 μL 的提取液混合均匀, 室温下暗处反应 60 min, 在 593 nm 处测定吸光度值。结果以每 100 克干物质中含有 mmol Fe^{2+} 当量计算, 表示为 mmol $\text{Fe}^{2+}/100\text{g DW}$ 。

1.7 酶活性抑制作用

1.7.1 α -淀粉酶抑制活性

参考文献[25]方法并稍作修改, 用 pH 6.9 的磷酸缓冲液将提取液稀释至不同质量浓度(0~40 mg/mL), 分别取不同质量浓度提取液 400 μL 与 0.1 U/mL 的 α -淀粉酶溶液 50 μL 混合并于 37°C 保持 10 min。加入 100 μL 的 1% 可溶性淀粉溶液反应 6 min, 随后, 取 500 μL DNS 试剂加入反应体系

终止反应。将反应体系在沸水浴中加热 10 min, 冷却至室温, 用 1 mL 蒸馏水稀释, 并在 540 nm 处测定吸光度值。实验空白组和对照空白组均用磷酸缓冲液代替酶液, 对照组用磷酸缓冲液代替提取液。抑制率按照公式(1)计算:

$$\text{抑制率}/\% = 1 - \left(\frac{\text{OD}_A - \text{OD}_a}{\text{OD}_B - \text{OD}_b} \right) \times 100 \quad (1)$$

式中: OD_A 为实验组的吸光度值; OD_a 为实验空白组的吸光度值; OD_B 为对照组的吸光度值; OD_b 为对照空白组的吸光度值。

1.7.2 α -葡萄糖苷酶抑制活性

参考文献[26]方法并稍做修改, 首先将 1 U/mL 的 α -葡萄糖苷酶溶液(50 μ L)与提取液(50 μ L)混合并在 37°C 下保持 10 min。移取 10 mmol/L p NPG 溶液加入混合体系中反应 6 min, 随后加入 500 μ L 的碳酸钠溶液终止反应, 并在 400 nm 处检测吸光度值。实验空白组和对照空白组均用磷酸缓冲液代替酶液, 对照组用磷酸缓冲液代替提取液。抑制率按照公式(1)计算。

1.8 数据处理

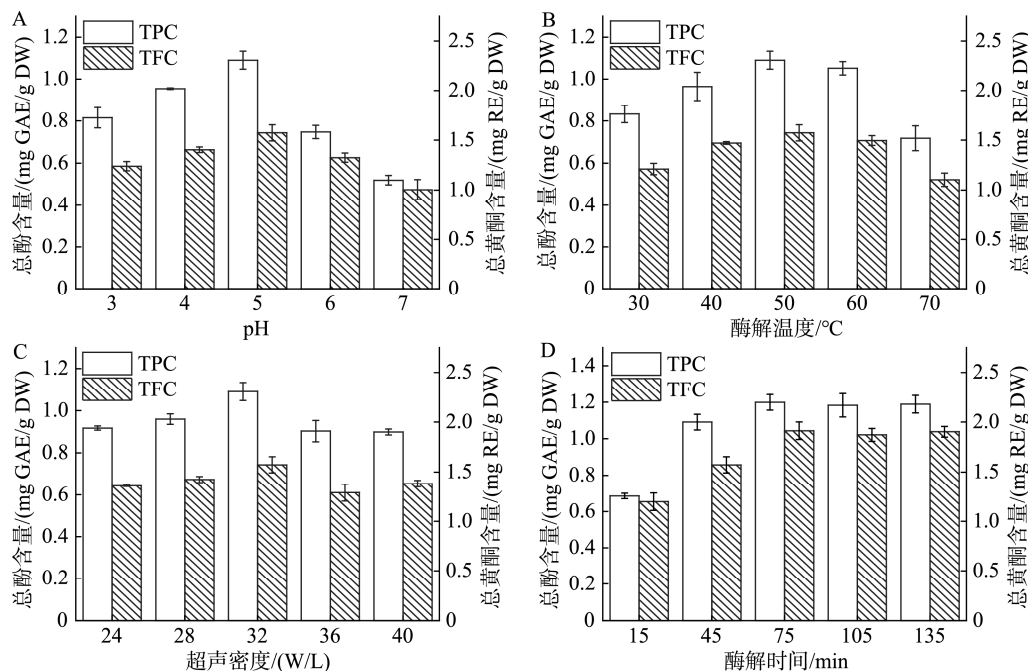
上述所有实验至少重复 3 次。使用 Excel 2010 进行数据分析, 并用 Origin 2022 进行作图。数据表示为平均值 $\pm$ 标准偏差, $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 提取工艺对结合酚提取量的影响

体系 pH 对结合酚总酚含量影响较大, 在 pH 3~5 范围,

总酚含量有明显的上升趋势, 并在 pH 为 5 时, 总酚含量达最大值, 之后继续增大体系 pH, 含量反而下降(图 1A)。这是体系 pH 影响酶的活性导致的^[27-28]。说明使用的复合酶的最适 pH 为 5 左右, 增大或减小 pH, 酶的活性降低。结合酚提取物中总黄酮含量变化趋势与总酚含量大致相同。随着酶解温度不断升高, 结合酚总酚含量和总黄酮均先增加后降低, 并且在 50°C 时达最大值(图 1B)。这可能有两个原因: 其一, 温度影响复合酶活性, 复合酶的最适温度为 50°C 左右, 升高或降低温度, 酶的活性降低或失活^[29-30]; 其二, 过高的温度可能会导致酚类化合物降解^[31]。随着超声密度的增大, 提取物的总酚和总黄酮含量逐渐升高, 当超声密度达 32 W/L 时, 释放量达最大值。进一步增大超声密度, 总酚和总黄酮含量降低(图 1C)。这可归因于超声波的“空化效应”, 当能量达到阈值时, 产生的小气泡急剧崩塌, 并产生瞬时的高温高压破坏植物细胞, 促进目标化合物溶出^[32]。随着超声密度的增大, 这种“空化效应”作用更为明显。但过高的超声密度会产生过度的空化效应, 瞬时的高温高压可能导致目标物活性降低^[33]。酶解时间对结合酚释放量有较大影响。在 15~75 min 范围, 总酚和总黄酮释放量显著升高, 随着酶解时间的延长, 更多的目标化合物溶出, 直至达到动态平衡, 在 75 min 后释放量均无明显变化(图 1D)。有文献表明, 石榴花的多酚提取^[32]和芦笋嫩茎的黄酮提取^[34]中, 提取时间过长会导致酚类化合物由于其热不稳定性而降解。因此, 适当的延长提取时间能提高酚类化合物的提取效果, 而盲目延长提取时间, 不仅浪费能源, 还可能会使提取效果变差。



注: A: 体系 pH; B: 酶解温度; C: 超声密度; D: 酶解时间, 图 2 相同; 总酚含量(total phenolic content, TPC); 总黄酮含量(total flavonoid content, TFC)。

图 1 不同因素对结合酚释放量的影响

Fig.1 Effects of different factors on the release amounts of bound phenol

综上所述, 在体系 pH 5、酶解温度 50℃、超声密度 32 W/L、酶解时间 75 min 的提取条件下结合酚释放量达最佳值, 总酚含量为(1.20±0.04) mg GAE/g DW, 总黄酮含量达(1.91±0.09) mg RE/g DW。

2.2 提取工艺对结合酚抗氧化活性的影响

植物多酚是一类含有酚羟基的化合物, 具有多种分子结构, 体现出不同的生物活性能力, 本研究分别采用 ABTS⁺和 DPPH·清除能力及铁还原抗氧化能力对比了提取工艺对结合酚抗氧化活性的影响。由图 2A 可知, 随着体系 pH 的增大, 结合酚的 ABTS⁺清除活性先增加后降低, 在 pH 5 时, 清除活性最强, 而在强酸性和中性条件下, 复合酶的活力受到抑制, 从而不利于催化进程, 最终导致结合酚的释放数量降低, 提取物体系的 ABTS⁺清除活性也相应降低。由图 2B 可知, 在 30~50℃范围内, ABTS⁺清除能力不断升高, 于 50℃时达到最佳值。继续升高温度, 酶活性降低或失活, 清除能力也随之下降。有学者认为温度过高, 不仅酶容易受热变性使活性降低, 而且多酚物质结构易受热而破坏, 直接影响多酚的得率^[35]。当超声密度为 32 W/L 时, 结合酚的 ABTS⁺清除能力也达到最高值(图 2C), 当酶解时间到 75 min 后, 结合酚的 ABTS⁺清除活性并不会随着时间的增加而提高(图 2D)。此外, DPPH·清除活性实验和 FRAP 实验也得到了相同的结果。

因此, 综合提取工艺与抗氧化结果可以发现, 在体系 pH 5、酶解温度 50℃、超声密度 32 W/L、酶解时间 75 min 的提取条件为最佳提取条件。在最佳提取条件下, 质量浓度为 50 mg/mL 的结合酚对 ABTS⁺和 DPPH·清除能力分别为(7.18±0.07) μmol Trolox/g DW 和(4.94±0.07) μmol Trolox/g DW, FRAP 达到(1.70±0.03) mmol Fe²⁺/g DW。有学者采用复合酶法提取火龙果皮结合酚, 发现在相同质量浓度(50 mg/mL)条件下, 结合酚的 ABTS⁺清除能力[(4.24±0.33) μmol Trolox/g DW]、DPPH·清除能力[(1.28±0.14) μmol Trolox/g DW]和 FRAP 为[(13.68±0.47) μmol Fe²⁺/g DW]^[36]均明显低于本研究结果。这可能的原因有两个: 其一, 不同品种火龙果的果皮多酚含量不同; 其二, 不同提取工艺的提取效果存在差异, 超声辅助酶解法的提取效果优于单一的酶解法。

2.3 酶抑制作用研究

由于出色的α-淀粉酶和α-葡萄糖苷酶活性抑制作用, 多酚在成为商业降血糖药物替代品方面具有巨大潜力^[37-38]。多酚对α-淀粉酶和α-葡萄糖苷酶的抑制作用很大程度上取决于多酚结构上的羟基、结合位点的氢键及稳定活性位点的共轭体系的形成^[37,39]。研究表明, 结合酚与α-淀粉酶和α-葡萄糖苷酶具有强烈的亲和力与相互作用, 从而抑制酶的活性, 延缓消化道中碳水化合物等糖类物质的水解和吸收, 从而控制血糖的快速升高^[40]。

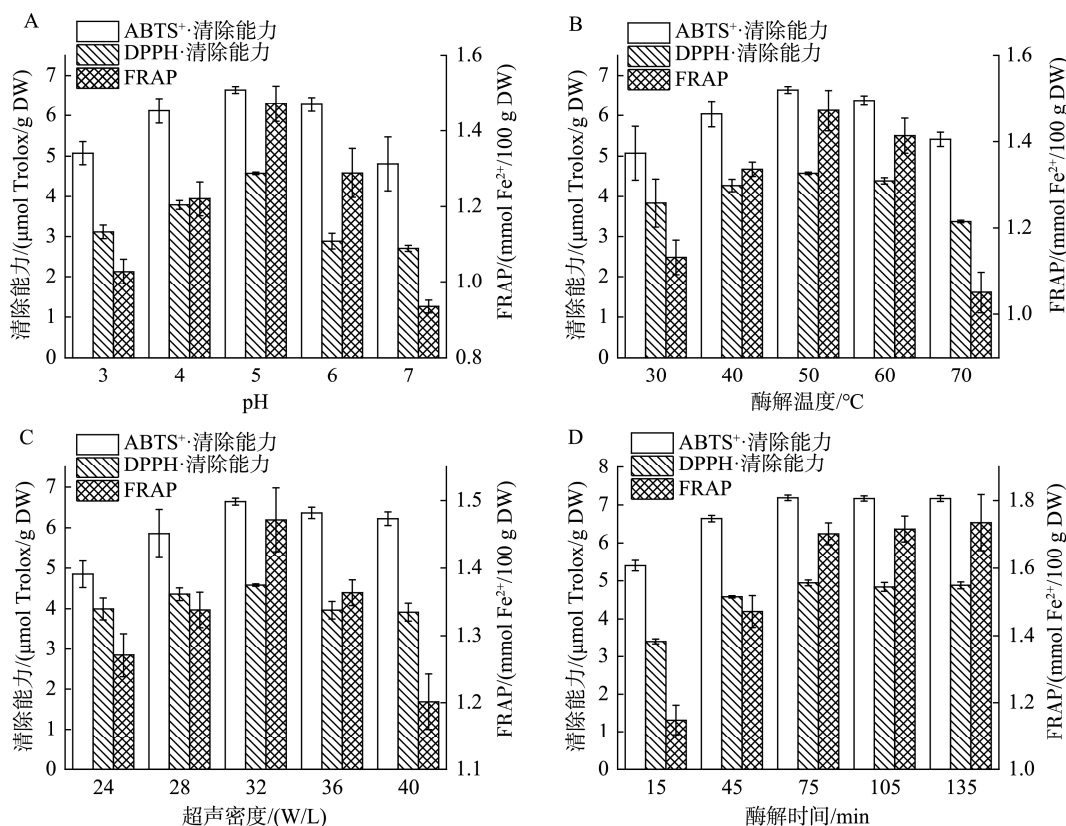
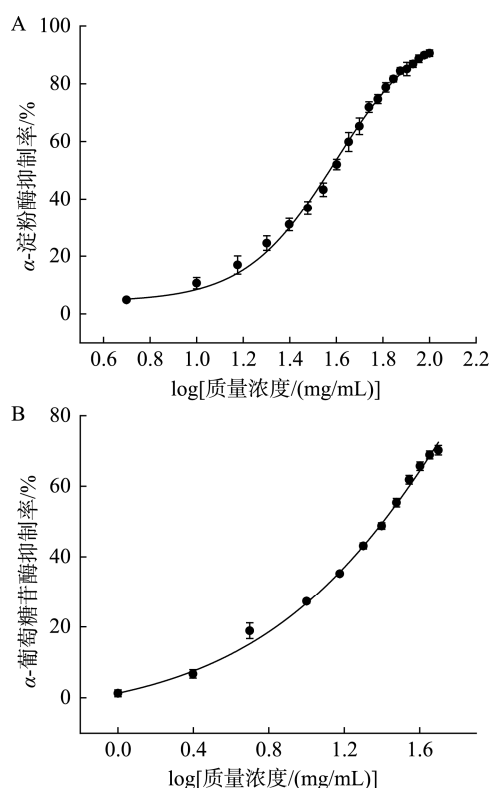


图 2 不同因素对 ABTS⁺和 DPPH·清除活性及 FRAP 的影响

Fig.2 Effects of different factors on ABTS⁺ and DPPH· scavenging activities and FRAP

在最佳提取条件下,本研究探讨了结合酚对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用。结果如图3表示,随着质量浓度的增加,提取物对两种酶的抑制作用逐渐增强,这表明结合酚对酶的抑制作用呈现剂量依赖性。结合酚对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC_{50})分别为 (36.50 ± 0.68) mg/mL 和 (23.98 ± 0.40) mg/mL。有学者在不同水稻品种麸皮结合酚提取物^[41]和绿豆皮结合酚提取物^[37]中也发现了相似现象。类似地,3种不同藜麦种子中结合酚对 α -葡萄糖苷酶的 IC_{50} 为 $37.58 \sim 55.58$ mg/mL^[42]。穿心莲提取物对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的 IC_{50} 分别为 (50.9 ± 0.17) 和 (17.2 ± 0.15) mg/mL^[43]。这也提示火龙果皮结合酚可以作为一种温和的 α -淀粉酶或 α -葡萄糖苷酶抑制剂用于特膳食品具有改善餐后血糖的潜力。



注: A: α -淀粉酶抑制率; B: α -葡萄糖苷酶抑制率。

图3 结合酚提取物对两种酶的抑制作用

Fig.3 Inhibitory effect of bound phenol extract on 2 kinds of enzymes

3 讨论与结论

本研究发现,结合酚的总酚、总黄酮含量与抗氧化活性的最佳提取条件相同,且两者的单因素实验变化趋势大致相同。在体系 pH 5、酶解温度 50°C、超声密度 32 W/L、酶解时间 75 min 的最佳提取条件下,总酚含量为 (1.20 ± 0.04) mg GAE/g DW,总黄酮含量为 (1.91 ± 0.09) mg RE/g DW,其 ABTS⁺和 DPPH·清除活性及 FRAP 均达到最高值。本研究采用超声

辅助酶解法提取的火龙果皮结合酚的抗氧化活性强于 TANG 等^[36]采用单一酶解法提取的结合酚,这种差异可能是火龙果的品种及(或)提取工艺不同所产生的。此方法得到的火龙果皮结合酚的最佳提取参数条件具有可行性,且提取效率较高,为火龙果皮结合酚的化合物鉴定及体内活性的研究提供了理论支持。此外,体外抑制 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶活性结果表明,火龙果皮结合酚提取物具有一定的抑制 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶活性作用。若想进一步确定提取物中发挥酶抑制作用的主要成分,后续还需要对提取物成分进行鉴定、筛选,并验证其酶抑制作用。因此,本研究将火龙果皮作为天然抗氧化剂和酶抑制剂的原料来源,采用超声辅助酶解提取技术,释放火龙果皮活性成分,为火龙果皮等果蔬皮的回收利用提供了新思路,也为进一步揭示火龙果皮酚类化合物的体内抗氧化及酶抑制活性奠定了理论基础。

参考文献

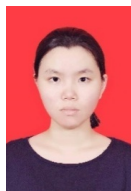
- [1] 曾媛,彭宏祥,何珊珊,等. 越南火龙果产业现状及国际合作发展路径探析[J]. 中国南方果树, 2021, 50(1): 156–160.
- ZENG Y, PENG HX, HE SS, *et al.* Analysis on the current situation of vietnam's pitaya industry and the development path of international cooperation [J]. South China Fruits, 2021, 50(1): 156–160.
- [2] 王举兵. 广西火龙果产业高质量发展的思考[J]. 南方园艺, 2022, 33(4): 59–62.
- WANG JB. Thoughts on the high-quality development of Guangxi pitahaya industry [J]. Southern Hortic, 2022, 33(4): 59–62.
- [3] JIANG HT, ZHANG WL, LI XX, *et al.* Nutrition, phytochemical profile, bioactivities and applications in food industry of pitaya (*Hylocereus* spp.) peels: A comprehensive review [J]. Trends Food Sci Technol, 2021, 116: 199–217.
- [4] LE NL. Functional compounds in dragon fruit peels and their potential health benefits: A review [J]. Int J Food Sci Technol, 2022, 57(5): 2571–2580.
- [5] WANG Z, LI S, GE S, *et al.* Review of distribution, extraction methods, and health benefits of bound phenolics in food plants [J]. J Agric Food Chem, 2020, 68(11): 3330–3343.
- [6] GIL-MARTÍN E, FORBES-HERNÁNDEZ T, ROMERO A, *et al.* Influence of the extraction method on the recovery of bioactive phenolic compounds from food industry by-products [J]. Food Chem, 2022, 378: 131918.
- [7] WANG ZY, LI SY, GE SH, *et al.* Review of distribution, extraction methods, and health benefits of bound phenolics in food plants [J]. J Agric Food Chem, 2020, 68(11): 3330–3343.
- [8] 钟煜钰,王弘,杨金易,等. 植物基原料游离多酚的提取与分离纯化方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(20): 6620–6627.
- ZHONG XY, WANG H, YANG JY, *et al.* Research progress of extraction, separation and purification method of free polyphenols in plant-based raw materials [J]. J Food Saf Qual, 2022, 13(20): 6620–6627.

- [9] 张正海, 姬妍茹, 杨庆丽, 等. 黑菊芋结合酚的提取及其抗氧化活性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(3): 759–766.
ZHANG ZH, JI YR, YANG QL, *et al.* Study on extraction and antioxidant activity of bound polyphenols from black Helianthus tuberosus [J]. J Food Saf Qual, 2022, 13(3): 759–766.
- [10] 裘芳成, 张涛, 常明, 等. 山茶油中不同形态酚类化合物的分离提取及抗氧化能力评价[J]. 中国油脂, 2020, 45(12): 88–92.
QIU FC, ZHANG T, CHANG M, *et al.* Extraction method of phenolic compounds in different forms from *Camellia oleifera* oil and its antioxidant ability [J]. China Oils Fats, 2020, 45(12): 88–92.
- [11] ROCCHETTI G, GREGORIO RP, LORENZO JM, *et al.* Functional implications of bound phenolic compounds and phenolics-food interaction: A review [J]. Compr Rev Food Sci F, 2022, 21(2): 811–842.
- [12] ZHANG B, ZHANG YJ, LI HY, *et al.* A review on insoluble-bound phenolics in plant-based food matrix and their contribution to human health with future perspectives [J]. Trends Food Sci Technol, 2020, 105: 347–362.
- [13] MADHUIJITH T, SHAHIDI F. Antioxidant potential of barley as affected by alkaline hydrolysis and release of insoluble-bound phenolics [J]. Food Chem, 2009, 117(4): 615–620.
- [14] DOMÍNGUEZ-RODRÍGUEZ G, MARINA ML, PLAZA M. Enzyme-assisted extraction of bioactive non-extractable polyphenols from sweet cherry (*Prunus avium* L.) pomace [J]. Food Chem, 2021, 339: 128086.
- [15] ESPARZA-MARTÍNEZ FJ, MIRANDA-LÓPEZ R, MATA-SÁNCHEZ SM, *et al.* Extractable and non-extractable phenolics and antioxidant capacity of mandarin waste dried at different temperatures [J]. Plant Food Hum Nutr, 2016, 71(3): 294–300.
- [16] RADENKOV V, JUHNEVICA-RADENKOVA K, GÓRNAŚ P, *et al.* Non-waste technology through the enzymatic hydrolysis of agro-industrial by-products [J]. Trends Food Sci Technol, 2018, 77: 64–76.
- [17] WU H, ZHU JX, YANG L, *et al.* Ultrasonic-assisted enzymatic extraction of phenolics from broccoli (*Brassica oleracea* L. var. italica) inflorescences and evaluation of antioxidant activity *in vitro* [J]. Food Sci Technol Int, 2015, 21(4): 306–319.
- [18] 孙卉, 康蒙, 陈玉凤, 等. 火龙果果皮多酚及其抗氧化活性研究[J]. 食品安全导刊, 2022, (31): 124–129.
SUN H, KANG M, CHEN YF, *et al.* Study on polyphenols and antioxidant activity of hylocereus undulates britt peel [J]. China Food Saf Magaz, 2022, (31): 124–129
- [19] GONZALES GB, RAES K, COELUS S, *et al.* Ultra (high)-pressure liquid chromatography-electrospray ionization-time-of-flight-ion mobility-high definition mass spectrometry for the rapid identification and structural characterization of flavonoid glycosides from cauliflower waste [J]. J Chromatogr A, 2014, 1323: 39–48.
- [20] ZHANG XJ, ZHU KX, XIE JH, *et al.* Optimization and identification of non-extractable polyphenols in the dietary fiber of jack fruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) pulp released by alkaline, acid and enzymatic hydrolysis: Content, composition and antioxidant activities [J]. LWT, 2021, 138: 110400.
- [21] 赵超阳, 隋会敏, 刘心雨, 等. 亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠比色法测定肾上腺酮[J]. 广东化工, 2021, 48(12): 314–315.
ZHAO CY, SUI HM, LIU XY, *et al.* Determination of adrenone by sodium nitrite aluminum nitrate sodium hydroxide colorimetry [J]. Guangdong Chem Ind, 2021, 48(12): 314–315.
- [22] RE R, PELLEGRINI N, PROTEGGENTE A, *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay [J]. Free Radical Biol Med, 1999, 26(9–10): 1231–1237.
- [23] DONG RH, LIU S, XIE JH, *et al.* The recovery, catabolism and potential bioactivity of polyphenols from carrot subjected to *in vitro* simulated digestion and colonic fermentation [J]. Food Res Int, 2021, 143: 110263.
- [24] BENZIE IFF, STRAIN JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay [J]. Anal Biochem, 1996, 239(1): 70–76.
- [25] 丁华杰, 叶云, 安欢, 等. 虎杖白藜芦醇的提取及抑制 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶活性的研究[J]. 中国调味品, 2020, 45(2): 176–181.
DING HJ, YE Y, AN H, *et al.* Study on extraction and inhibition of resveratrol from *Polygonum cuspidatum* α -amylase and α -glucosidase activity [J]. China Cond, 2020, 45(2): 176–181.
- [26] 潘玥. 蓝莓叶多酚提取物对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制作用及其在低 GI 米糕中应用研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2021.
PAN Y. Effect of polyphenol extract from blueberry leaves on α -amylase and α -inhibition of glucosidase and its application in low GI rice cake [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2021.
- [27] DAI MD, LI YR, XU LY, *et al.* A novel bacteriocin from *Lactobacillus pentosus* ZFM94 and its antibacterial mode of action [J]. Front Nutr, 2021, 8: 710862.
- [28] PEREIRA NDLÁ, FANGIO MF, RODRIGUEZ YE, *et al.* Characterization of liquid protein hydrolysates shrimp industry waste: Analysis of antioxidant and microbiological activity, and shelf life of final product [J]. J Food Process Pres, 2022, 46(8): e15526.
- [29] NNAEMEKA IC, SAMUEL OE, MAXWELL IO, *et al.* Optimization and kinetic studies for enzymatic hydrolysis and fermentation of *Colocynthis vulgaris* Shrad seeds shell for bioethanol production [J]. J Bioresour Bioprod, 2021, 6(1): 45–64.
- [30] 高阳, 冯悦, 吕姝锦, 等. 酶水解法释放甘薯结合酚[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(11): 118–125.
GAO Y, FENG Y, LV SJ, *et al.* Enzymatic hydrolysis release of sweet potato bound phenol [J]. Food Res Dev, 2022, 43(11): 118–125.
- [31] ROHN S, BUCHNER N, DRIEMEL G, *et al.* Thermal degradation of onion quercetin glucosides under roasting conditions [J]. J Agric Food Chem, 2007, 55(4): 1568–1573.
- [32] WU WX, JIANG S, LIU MM, *et al.* Simultaneous process optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols and ellagic acid from pomegranate (*Punica granatum* L.) flowers and its biological activities [J]. Ultrason Sonochem, 2021, 80: 105833.
- [33] ZHONG XY, ZHANG SY, WANG H, *et al.* Ultrasound-alkaline combined extraction improves the release of bound polyphenols from pitahaya (*Hylocereus undatus* ‘Foo-Lon’) peel: Composition, antioxidant

- activities and enzyme inhibitory activity [J]. *Ultrason Sonochem*, 2022, 90: 106213.
- [34] CAO QM, YAN JY, SUN ZC, *et al.* Simultaneous optimization of ultrasound-assisted extraction for total flavonoid content and antioxidant activity of the tender stem of *Triarrhena lutarioriparia* using response surface methodology [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2021, 30(1): 37–45.
- [35] 闫巧珍, 李玮钰, 李玥霞, 等. 复合酶法提取小米多酚及其抗油脂氧化作用的研究[J]. *中国调味品*, 2020, 45(4): 17–23.
- YAN QZ, LI WY, LI YX, *et al.* Research on extraction of polyphenols from millet by composite enzymatic method and their antioxidant abilities to lipid [J]. *China Cond*, 2020, 45(4): 17–23.
- [36] TANG WP, LI W, YANG YZ, *et al.* Phenolic compounds profile and antioxidant capacity of *Pitahaya* fruit peel from two red-skinned species (*Hylocereus polyrhizus* and *Hylocereus undatus*) [J]. *Foods*, 2021, 10(6): 1183.
- [37] ZHENG Y, LIU S, XIE J, *et al.* Antioxidant, α -amylase and α -glucosidase inhibitory activities of bound polyphenols extracted from mung bean skin dietary fiber [J]. *LWT*, 2020, 132: 109943.
- [38] DENG N, ZHENG B, LI T, *et al.* Assessment of the phenolic profiles, hypoglycemic activity, and molecular mechanism of different highland barley (*Hordeum vulgare* L.) varieties [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(4): 1175.
- [39] GAO H, NISHIOKA T, KAWABATA J, *et al.* Structure-activity relationships for α -glucosidase inhibition of baicalein, 5,6,7-trihydroxyflavone: The effect of a-ring substitution [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2014, 68(2): 369–375.
- [40] ETXEBERRIA U, GARZA AL, CAMPION J, *et al.* Antidiabetic effects of natural plant extracts via inhibition of carbohydrate hydrolysis enzymes with emphasis on pancreatic alpha amylase [J]. *Expert Opin Ther Tar*, 2012, 16(3): 269–297.
- [41] WU N, LI H, TAN B, *et al.* Free and bound phenolic profiles of the bran from different rice varieties and their antioxidant activity and inhibitory effects on α -amylase and α -glucosidase [J]. *J Cere Sci*, 2018, 82: 206–212.
- [42] TANG Y, ZHANG B, LI XH, *et al.* Bound phenolics of quinoa seeds released by acid, alkaline, and enzymatic treatments and their antioxidant and α -glucosidase and pancreatic lipase inhibitory effects [J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(8): 1712–1719.
- [43] SUBRAMANIAN R, ASMAWI M Z, SADIKUN A. *In vitro* α -glucosidase and α -amylase enzyme inhibitory effects of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide [J]. *Acta Biochim Pol*, 2008, 55(2): 391–398.

(责任编辑: 郑 丽 张晓寒)

作者简介



钟烜钰, 硕士研究生, 主要研究方向为食品多酚提取与功能化。
E-mail: xuanyuz@foxmail.com

刘宇佳, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品分子互作。
E-mail: yujiali@dgut.edu.cn

王 弘, 博士, 教授, 主要研究方向为食品安全与营养。
E-mail: gzwhongd@163.com