

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240227003

响应面法优化提取大果山楂果渣果胶及其降糖活性研究

卫炳安¹, 黄元河^{1,2,3*}, 潘乔丹^{2,4*}, 王葳锐¹, 梁忠茂⁵, 徐影影¹, 赵丽阳¹

(1. 右江民族医学院基础医学院, 百色 533000; 2. 广西高校右江流域特色民族药研究重点实验室, 百色 533000;
3. 广西金钟山森林生态系统野外科学观测研究站, 隆林 533400; 4. 右江民族医学院药学院, 百色 533000;
5. 广西靖西梁鹏食品有限公司, 靖西 533800)

摘 要: 目的 建立一种高效的大果山楂果渣果胶提取工艺, 并对果胶的初步特性及降糖活性进行研究。
方法 通过响应面分析法对大果山楂果渣果胶提取工艺进行优化, 考察因素包括酶用量、液料比和提取时间等。进一步对其半乳糖醛酸含量、酯化度指标进行分析, 并借助 α -葡萄糖苷酶抑制实验及胰岛素抵抗细胞实验, 探讨大果山楂果渣果胶潜在的降糖活性。**结果** 优化果胶提取工艺参数为: 纤维素酶浓度 3.4%, 液料比 7:1 (mL:g), 提取时间 3.5 h, 此条件下果胶得率最高, 达到 13.22%。除蛋白果胶的半乳糖醛酸含量为 67.83%, 酯化度为 45.24%。体外活性实验显示果胶对 α -葡萄糖苷酶抑制率达到 89.41%, 同时可以显著促进地塞米松 (3.75 $\mu\text{mol/L}$) 和胰岛素 (0.01 $\mu\text{mol/L}$) 联合诱导的 IR-HepG2 模型葡萄糖消耗。**结论** 在所述提取工艺条件下, 大果山楂的果胶得率最优, 所提取的果胶为低酯果胶, 表现出良好的降糖功效。

关键词: 大果山楂; 果胶; 酶法; 响应面; 提取工艺; 降糖活性

Optimization of extraction of pectin from *Malus doumeri* by response surface methodology and its hypoglycemic activity

WEI Bing-An¹, HUANG Yuan-He^{1,2,3*}, PAN Qiao-Dan^{2,4*}, WANG Wei-Rui¹, LIANG Zhong-Mao⁵,
XU Ying-Ying¹, ZHAO Li-Yang¹

(1. College of Basic Medicine, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China; 2. Key Laboratory of Right River Basin Characteristic Ethnic Medicine Research in Guangxi, Baise 533000, China; 3. Guangxi Jinzhongshan Forest Ecosystem Observation and Reserch Station, Longlin 533400, China; 4. College of Pharmacy, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China; 5. Guangxi Jingxi Liang Peng Food Co., Ltd., Jingxi 533800, China)

ABSTRACT: Objective To establish the extraction process of pectin from *Malus doumeri* fruit residue, and carry out research on its preliminary characterization and hypoglycemic activity. **Methods** Response surface analysis was carried out using the factors of enzyme dosage, liquid-to-feed ratio and extraction time in order to optimize the

基金项目: 广西自然科学基金面上项目(2017GXNSFAA198011)

Fund: Supported by the Guangxi Province Natural Sciences Fund Project (2017GXNSFAA198011)

*通信作者: 黄元河, 硕士, 副教授, 主要研究方向为民族特色食品的功能性研究。E-mail: gxhyuanhe@163.com

潘乔丹, 硕士, 副教授, 主要研究方向为民族地区特色植物的活性物质基础研究。E-mail: panqiao112@163.com

*Corresponding author: HUANG Yuan-He, Master, Associate Professor, College of Basic Medicine, Youjiang Medical University for Nationalities, No.98 Chengxiang Road, Youjiang District, Baise 533000. E-mail: gxhyuanhe@163.com

PAN Qiao-Dan, Master, Associate Professor, College of Pharmacy, Youjiang Medical University for Nationalities, No.98 Chengxiang Road, Youjiang District, Baise 533000. E-mail: panqiao112@163.com

extraction process of *Malus doumeri* fruit residue pectin. Meanwhile, an in-depth analysis of its physicochemical properties was carried out, and its potential hypoglycemic activity was explored using α -glucosidase inhibition assay and insulin resistance cell assay. **Results** The optimal extraction process conditions for *Malus doumeri* fruit residue pectin were determined to be cellulase concentration of 3.4%, liquid to material ratio of 7:1 (mL:g), and extraction time of 3.5 hours, which sulted in a maximum pectin yield of (13.22%). Analysis of the physicochemical properties of the pectin showed that the galacturonic acid content was 67.83%, and the degree of esterification was 45.24%. Pectin exhibited a high α -glucosidase inhibition rate of 89.41%, increasing glucose consumption in the established IR-HepG2 model under the combined action of dexamethasone (3.75 μ mol/L) and insulin (0.01 μ mol/L) within 48 h. **Conclusion** Under this extraction process, *Malus doumeri* fruit residue pectin has the highest yield, and the extracted pectin is low ester pectin with good hypoglycemic activity.

KEY WORDS: *Malus doumeri* (Bois) Chev.; pectin; enzymic method; response surface analysis; extraction technology; hypoglycemic activity

0 引言

大果山楂为蔷薇科苹果属植物台湾林檎 [*Malus doumeri*(Bois)Chev.]的果实,作为一种具有药用价值的水果,主要分布我国西南亚热带地区^[1],其果实可以用于山楂糕、山楂醋,山楂酒的加工^[2]。大果山楂在外形上与商品山楂(*Crataegus pinnatifida* Bunge)有较大的区别,果实较大,直径为5~12 cm,果皮青色,果肉酸涩清香^[1]。广西壮族自治区靖西地区栽培大果山楂历史悠久,其果实较大,靖西大果山楂被认定为我国地理标志产品^[2-4]。然而,大果山楂的果实成熟期会产生大量的生理落果,以及在酿造山楂果酒、制作山楂醋时^[5-7],会产生果渣,大多数情况这些生理落果及果渣会被加工企业作为废弃物丢弃或堆肥发酵后用于土壤基肥,造成垃圾填埋场,增加环境负担。因此,合理处理果渣成为现今亟待解决的问题。

果胶主要存在于植物性废弃物或副产品中,是一种具有高营养价值和经济效益的天然酸性杂多糖且作为可溶性膳食纤维(soluble dietary fiber, SDFs),常被视为益生元,具有调整脂质代谢,降低胆固醇水平,提高葡萄糖耐量等活性,同时果胶还具有免疫刺激、抗转移、抗溃疡、抗肾病和药物递送能力的作用^[8-12]。因此从农作副产品中提取果胶并发掘果胶潜在的价值成为研究热点。国内外学者对大果山楂的活性成分研究主要集中在黄酮类、酚类、酚酸类、三萜酸类化合物上^[13-16],但对大果山楂果渣中果胶的提取和活性研究鲜为报道。鉴于此,本研究采用响应面法对大果山楂果渣果胶提取工艺进行优化,初步测定其理化性质包括半乳糖醛酸含量和酯化度,并研究其降糖活性,旨在提升大果山楂果渣的综合应用,为大果山楂果渣果胶的进一步加工提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大果山楂果渣粉(广西靖西梁鹏食品有限公司); D-(+)-

半乳糖醛酸(纯度 $\geq 98\%$)、纤维素酶(分析纯, 50 U/mg)、酸性蛋白酶(分析纯, 50 U/mg)、木聚糖酶(30 万 U/g)(上海源叶生物科技有限公司); α -葡萄糖苷酶(≥ 60 U/mg, 合肥博美生物科技有限责任公司); 阿卡波糖[纯度 98%, 梯希爱(上海)化成工业发展有限公司]; 对硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷(纯度 $\geq 98\%$)、3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(纯度 $\geq 98\%$)、二甲基亚砜(纯度 $>9.5\%$)、地塞米松(纯度 $\geq 98\%$)、重组人胰岛素(纯度 97%)、葡萄糖检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司); 唑啉(纯度 98%,上海阿达玛斯试剂有限公司); 柠檬酸、98%浓硫酸、无水乙醇、NaOH(分析纯, 西陇科学股份有限公司); 人肝癌细胞系 HepG2 细胞、DMEM 高糖培养基、特级胎牛血清(武汉普诺赛生命科技有限公司); 盐酸二甲双胍缓释片(metformin, Met, 青岛黄海制药有限责任公司)。

1.2 仪器与设备

DF-101S 集热式磁力搅拌器(河南予华仪器有限公司); BSA224S-CW 赛多利斯万分之一电子天平(德国赛多利斯公司); UV5100 紫外可见分光光度计(上海元析仪器有限公司); Midi 40 细胞恒温培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); HFsafe-1200LC(A2) 生物安全柜(上海力康生物医疗科技控股有限公司); Microfuge20R 小型台式冷冻离心机(美国 Beckman 公司); Spark 多功能微孔板检测仪(瑞士 Tecan 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 果胶的提取

精确称取 5.0 g 的大果山楂果渣粉末于烧杯中,按照液料比为 9:1 (mL:g)加入蒸馏水,调至 pH 为 4.9,加入 4%纤维素酶,于磁力搅拌器中 50℃提取 3 h,后沸水灭酶 5 min,收集滤液。在滤液中加入等体积的 75%乙醇,醇沉过夜。5000 r/min 离心 15 min,收集沉淀物后冷冻干燥获得粗果胶。粗果胶采用 Sevage 法除蛋白,用于后续测定半乳糖醛酸和酯化度,以及降糖活性研究,计算公式

见式(1)。

$$\text{粗果胶得率} / \% = \frac{m_{\text{果胶质量}}}{m_{\text{大果山楂果渣粉末}}} \times 100\% \quad (1)$$

1.3.2 单因素实验

参照 1.3.1 的方法。以粗果胶得率为评估标准, 选用纤维素酶、木聚糖酶与酸性蛋白酶分别进行实验, 筛选出适合的生物酶后, 进一步分析液料比、提取时间和加酶量对粗果胶得率的影响。液料比设定为 5:1、6:1、7:1、8:1、9:1 (mL:g, 下同); 提取时间为 2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 h; 加酶量为 1%、2%、3%、4%、5%。

1.3.3 响应面实验

基于单因素实验结果, 本研究采用 Box-Behnken 设计方法构建了一个包含 3 个变量及各自 3 个不同水平的实验, 以粗果胶得率作为检测指标, 并对响应面进行优化分析。实验设计条件见表 1。

表 1 响应面实验设计条件
Table 1 Conditions of response surface design

水平	因素		
	A: 液料比(mL:g)	B: 时间/h	C: 酶用量/%
-1	6	3.0	2
0	7	3.5	3
1	8	4.0	4

1.3.4 半乳糖醛酸及酯化度测定

采用咔唑实验法测定果胶中半乳糖醛酸的含量^[17-18]。取一定量的标准品, 做 5 个浓度梯度半乳糖醛酸标准溶液。加一定量浓硫酸 85℃水浴 15 min, 取出冷却, 最后加 0.15% 咔唑无水乙醇避光反应 30 min, 在波长 525 nm 测吸光度值, 绘制标准曲线。其中横坐标为半乳糖醛酸浓度, 纵坐标为吸光度值。取一定量除蛋白果胶样品, 按照上述方法进行操作, 测定样品中半乳糖醛酸的含量。果胶中半乳糖醛酸的质量分数计算公式见式(2)。

$$X_{\text{半乳糖醛酸质量分数}} / \% = \frac{C_{\text{半乳糖醛酸质量浓度}} \times V_{\text{果胶体积}} \times N_{\text{样品稀释倍数}}}{m_{\text{粗果胶质量}}} \times 100\% \quad (2)$$

采用滴定法测定果胶酯化度^[19]。首先, 从果胶溶液中取 1 mL 作为样品液, 加入酚酞指示剂。接着, 滴加 0.1 mol/L NaOH 溶液至溶液出现粉红色, 并记录消耗的 NaOH 溶液体积 V_1 。再往果胶溶液里滴加 10 mL 0.1 mol/L NaOH 溶液随后酯化反应 2 h, 再加入 10 mL 0.1 mol/L HCl 溶液。最后, 利用 1 mol/L NaOH 溶液进行滴定, 直至溶液刚刚出现粉红色且 30 s 内不褪色, 并记录消耗的 NaOH 溶液体积 V_2 。根据以下果胶酯化度(degree of esterification, DE)值的计算公式见式(3)。

$$\text{DE} / \% = \frac{V_2}{V_1 + V_2} \times 100\% \quad (3)$$

1.3.5 体外 α -葡萄糖苷酶活性实验

采用除蛋白果胶制备不同浓度溶液, 以阿卡波糖为阳性对照, 依据文献[20-21]的方法, 开展体外 α -葡萄糖苷酶活性实验。实验进行 3 组平行实验, 每组重复 3 次, 计算大果山楂果胶与阿卡波糖对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制率及半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC_{50})。

1.3.6 果胶对 HepG2 细胞胰岛素抵抗的影响

参照姜慰等^[22]的方法, 采用地塞米松(3.75 $\mu\text{mol/L}$)和胰岛素(0.01 $\mu\text{mol/L}$)联合给药的无血清 DMEM 高糖培养基诱导 HepG2 细胞, 经过 48 h 的处理后, 收集细胞上清液, 并利用试剂盒测定葡萄糖消耗量并加以计算。在 IR-HepG2 细胞模型基础上, 分别用 25 $\mu\text{g/mL}$ 的 Met 和 50 $\mu\text{g/mL}$ 的除蛋白果胶进行干预培养, 同时在不同时间点(24、48、72 h)收集细胞上清液, 测定相应时间的葡萄糖消耗量, 计算公式如(4)。

$$\text{葡萄糖消耗量} = 25 - \text{干预后上清液的葡萄糖含量} \quad (4)$$

式中: 25 mmol/L 为 DMEM 高糖培养基初始浓度。

1.4 数据处理

实验过程重复 3 次, 数据处理运用 Prism 8.0 软件, 所有数据表达为“平均值 $\pm$ 标准偏差”。统计分析采用单因素方差分析及 Tukey 多重比较检验。同时采用 Origin 2021 进行绘图, 并借助 Graph Pad prism 8 软件计算 IC_{50} 值。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

果胶主要分布于果皮细胞壁中, 与纤维素、半纤维素、木质素等通过共价键结合, 形成原果胶^[23]。纤维素酶能将纤维素水解为纤维二糖和葡萄糖^[24], 从而有利于果胶的提取。根据图 1a 显示, 采用纤维素酶提取的果胶得率最高可达 8.90%, 而木聚糖酶和中性蛋白酶可能因为 pH 或温度因素, 不如纤维素酶得率高。因此选用纤维素酶并展开后续实验。根据图 1b 结果, 提取溶剂增加时, 果胶得率呈现先升后降的趋势。当液料比为 7:1 时, 得率达到最高值 13.64%。然而, 随着溶剂用量增加, 底物浓度降低导致纤维素酶作用减弱, 酶解能力下降, 同时降低溶液中果胶浓度, 从而致使醇沉时无法充分析出, 反使果胶得率降低。综合考虑, 液料比选择 7:1 较为适宜。根据图 1c 所示, 提取时间增加时, 果胶得率先升后降。提取时间为 3.5 h 时, 得率可达 12.31%。超过 3.5 h 后, 得率逐渐下降, 可能由于提取时间过短, 果胶未能完全溶解出植物细胞。当提取时间达到 3.5 h, 果胶基本完全溶解, 继续延长提取时间将导致部分果胶降解, 进而降低果胶得率。因此, 最佳提取时

间为 3.5 h。根据图 1d 结果, 酶量增加使果胶得率不断提高。酶量为 3%时, 大果山楂果渣果胶得率最高, 可达 10.03%。然而, 继续增加酶用量后, 得率反而有所下降, 这表明酶用量达到一定临界状态后, 反应体系会饱和, 可能抑制酶活性或加速产物转变。因此, 选择 3%酶用量进行后续实验。

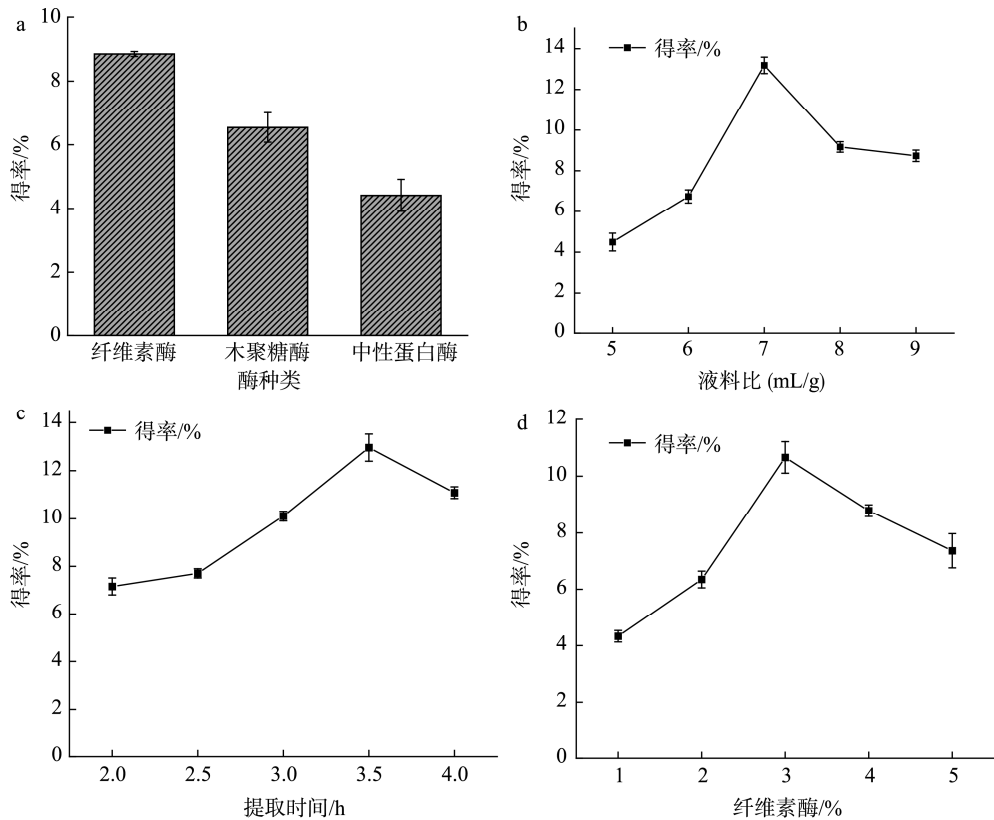


图 1 单因素实验及结果
Fig.1 Effects of single factors on the yield of pectin.

表 2 响应面分析实验及结果				
Table 2 Response surface methodology and analysis results				
序号	A: 液料比 (mL:g)	B: 提取时间 /h	C: 纤维素酶量 /%	果胶得率/%
1	-1	0	-1	8.44
2	1	1	0	10.37
3	1	0	1	11.35
4	0	0	0	13.58
5	-1	-1	0	9.67
6	0	0	0	13.32
7	0	0	0	13.63
8	0	1	1	11.94
9	1	0	-1	8.47
10	0	-1	-1	8.45
11	-1	0	1	10.51
12	-1	1	0	10.88
13	0	0	0	13.47
14	0	0	0	14.04
15	1	-1	0	9.53
16	0	1	-1	8.46
17	0	-1	1	11.45

2.2 响应面实验

2.2.1 Box-Behnken 响应面结果

根据 Box-Behnken 中心组合原理, 在本次实验中, 我们以山楂果渣果胶得率为响应值, 对提取工艺中的 3 个关键因素: 酶量(C)、时间(B)和液料比(A)进行了考察, 共计 17 组, 采用响应面设计方法。实验结果见表 2。

本研究对表 2 中的实验数据进行了二次多项式回归拟合, 旨在揭示果胶得率(Y)与液料比(A)、提取时间(B)、纤维素酶量(C)之间的关系。经过分析得到了如下回归模拟方程: $Y=13.61+0.028A+0.32B+1.43C-0.093AB+0.2AC-1.94A^2-1.56B^2-1.98C^2$, 并进行了方差分析, 结果如表 3 所示。从表 3 中可以看出, 实验模型的 $P<0.0001$, 达到了极显著的水平。这证明建立的模型在统计学上高度可信。同时, 失拟项的 P 为 0.1048, 大于 0.05, 说明失拟项不显著, 进一步证实了模型的可靠性。通过 F 得 3 个因素对果胶得率 Y 的影响强度依次为: $C>B>A$ 。其中, C 及二次项 A^2 、 B^2 对 Y 的影响均达到了极显著水平。相关系数 r^2 达到了 0.9822, 这证实响应值的变化中有 98.22% 可以归因于所选变量。校正相关系数 R^2_{adj} 为 0.9594, 说明该模型可以解释 95.94% 的响应值变化。同时, 变异系数为 3.71%, 小于 5%, 表明实验设计的精确性和重复性极为显著。

表 3 大果山楂果渣果胶得率的回归模型方程方差分析
Table 3 Analysis and statistical parameters of regression model on the extraction yield of *Malus doumeri* pomace

方差来源	平方和	自由度	均方	<i>F</i>	<i>P</i>
模型	64.810	9	7.200	43.020	<0.0001
<i>A</i> 液料比	6.050E-003	1	6.050E-003	0.036	0.8546
<i>B</i> 提取时间	0.810	1	0.810	4.860	0.0634
<i>C</i> 纤维素酶量	16.330	1	16.330	97.570	<0.0001
<i>AB</i>	0.034	1	0.034	0.200	0.6648
<i>AC</i>	0.160	1	0.160	0.980	0.3552
<i>BC</i>	0.058	1	0.058	0.340	0.5759
<i>A</i> ²	15.830	1	15.830	94.580	<0.0001
<i>B</i> ²	10.200	1	10.200	60.950	0.0001
<i>C</i> ²	16.450	1	16.450	98.280	<0.0001
残差	1.170	7	0.170		
失拟项	0.880	3	0.290	4.060	0.1048
纯误差	0.290	4	0.072		
总和	65.980	16			

2.2.2 Box-Behnken 响应面图分析

各响应因素对大果山楂果渣果胶得率的交互作用如图 2 所示。液料比与时间、液料比与纤维素酶量、时间与纤维素酶量的高线图均呈椭圆形，表明这 3 个因素之间存在显著的交互作用。特别是，液料比与纤维素酶量的曲面图坡度最为陡峭，说明二者之间的交互作用对大果山楂果渣果胶得率的影响尤为显著。

2.2.3 最佳条件确定与回归模型验证

通过 Box-Behnken 响应面优化实验得到纤维素酶提取大果山楂果渣果胶的最佳工艺为液料比 7.02:1，提取时间 3.56 h，纤维素酶量 3.37%。为便于实际操作，优化调整工艺技术参数为液料比 7:1，提取时间 3.5 h，纤维素酶量 3.4%，用此参数进行 3 次重复验证，果胶得率平均值为 13.22%，与理论值 13.89%接近($P>0.05$)。研究结果表明，基于 Box-Behnken 响应面法优化酶法提取果胶的工艺技术具有可靠性。

2.3 半乳糖醛酸含量与酯化度测定

对上述工艺提取除蛋白果胶的半乳糖醛酸含量进行测定，结果显示半乳糖醛酸含量为 67.83%，达到国家标准 GB 25533—2010《食品安全国家标准 食品添加剂果胶》的要求。果胶中由 *D*-半乳糖醛酸(GalpA)通过 α -1,4 糖苷键连接的无分支侧链的聚合物骨架具有免疫抑制活性，且半乳糖醛酸含量越高，降糖活性就越强^[25]。DE，又称甲基化，是果胶中甲酯化、乙酰化和酞胺化比例的总和，能反

映果胶特性的重要指标^[26]。根据果胶酯化度及酯化种类的不同，将果胶分为两大类，分别为高酯果胶(DE > 50%)和低酯果胶(DE < 50%)。通过检测分析得知，在所述工艺条件下提取除蛋白的果胶，其酯化度为 45.24%，因此，它被归类为低酯果胶。低酯果胶能显著提高益生菌的耐受性，因此能有效促进益生菌在胃肠道内的靶向递送，从而消耗肠道中的葡萄糖从而降低血糖^[27-28]。

2.4 体外抑制 α -葡萄糖苷酶活性实验

α -葡萄糖苷酶在生物体内发挥着至关重要的作用，它能催化二糖水解为单糖，为生物体提供能量。然而，过度活性的 α -葡萄糖苷酶可能导致血糖水平升高，进而增加糖尿病风险。因此，抑制 α -葡萄糖苷酶活性成为预防和治疗糖尿病的有效策略^[29]。研究显示，果胶对 α -葡萄糖苷酶活性具有显著抑制效果。如图 3 所示，随着果胶质量浓度升高，其对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用逐步增强，呈现量效关系。当果胶质量浓度达到 0.09 mg/mL 时，抑制率高达 (89.41±1.48)%。这表明，果胶能有效降低 α -葡萄糖苷酶活性，有助于调控血糖。此外，在一定范围内，果胶抑制效果接近抗糖尿病药物阿卡波糖。阿卡波糖通过抑制 α -葡萄糖苷酶降低血糖，当果胶质量浓度为 0.09 mg/mL 时，其抑制效果与阿卡波糖相当。比较果胶和阿卡波糖的 IC₅₀ 值发现，果胶的 IC₅₀ 值为 0.030 mg/mL，与阿卡波糖的 IC₅₀ 值(0.017 mg/mL)接近。这表明，大果山楂果渣果胶在较低浓度下具有显著抑制效果，具备较高药效潜力。

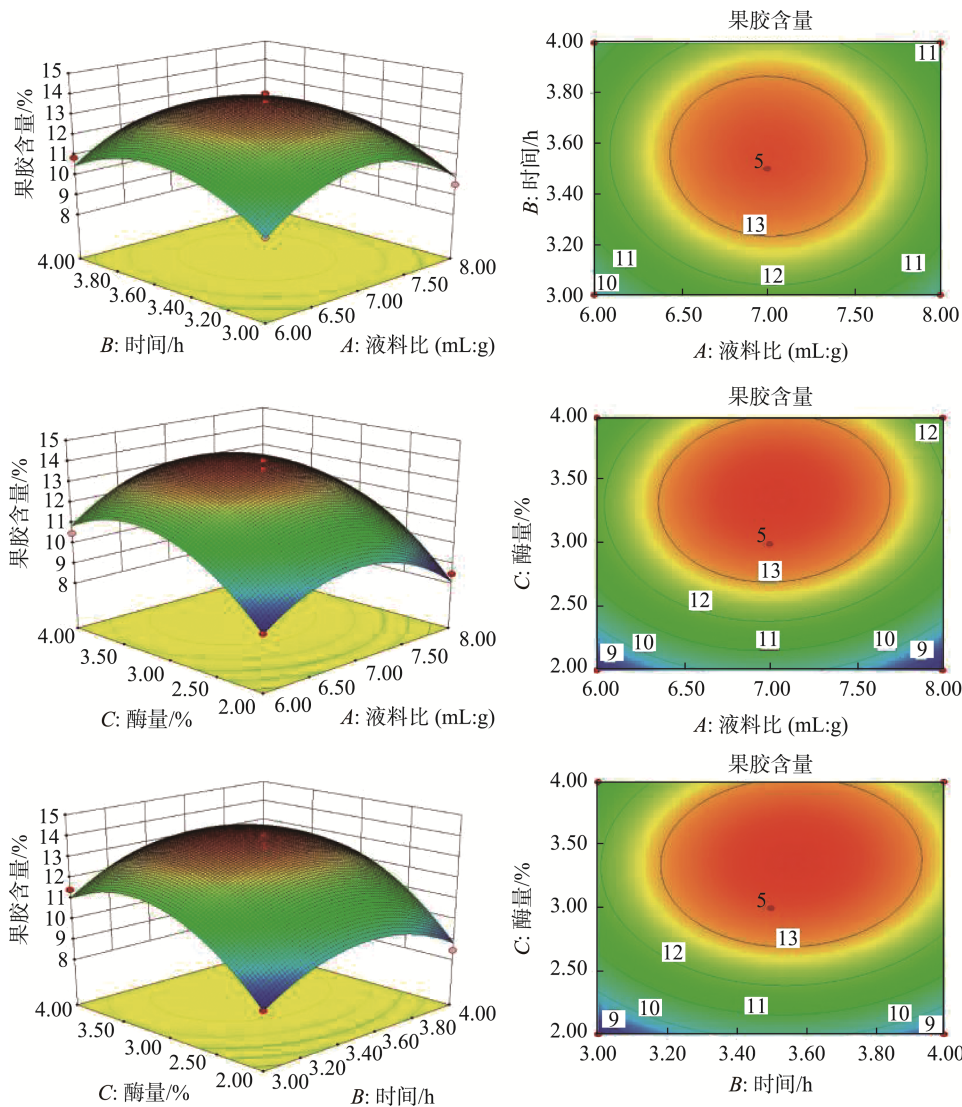


图 2 各响应因素交互作用对果胶提取量影响的响应面和等高线图

Fig.2 Response surface and contour plots of the interaction of each factor to the extraction of pectin

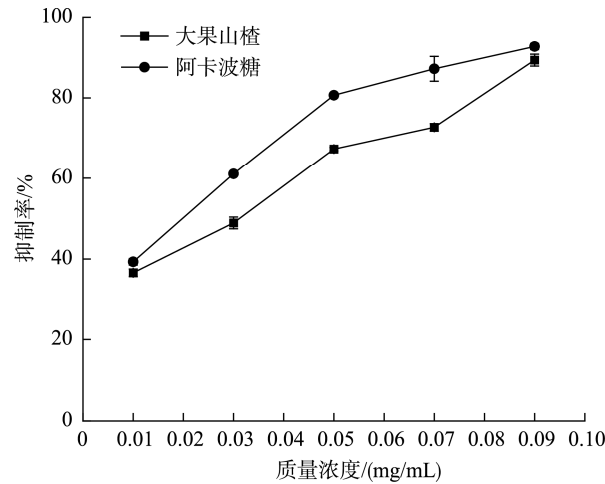
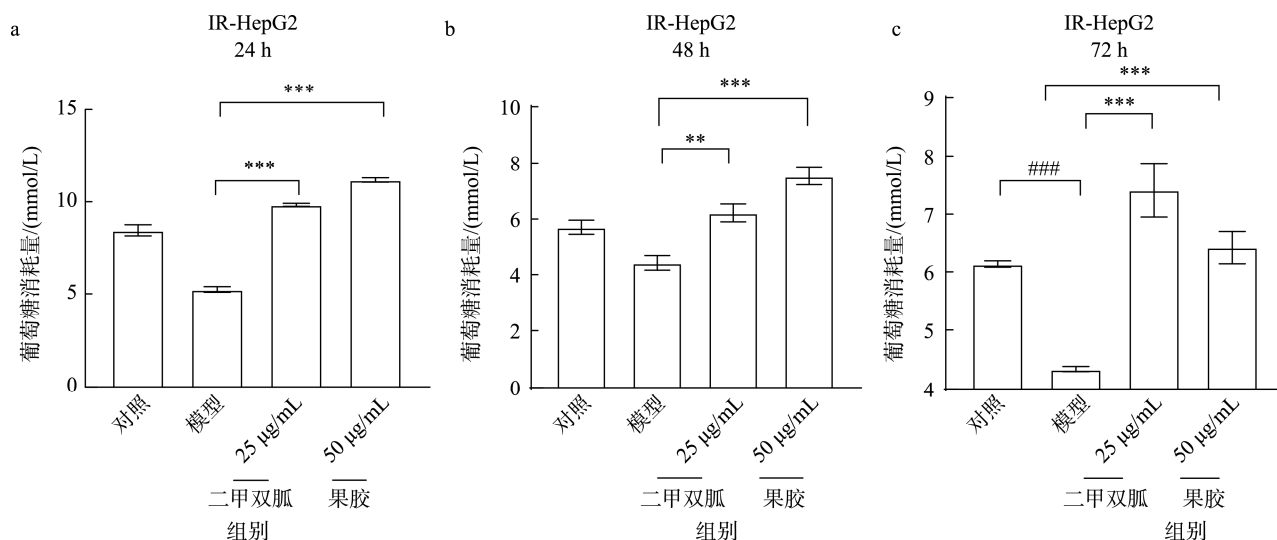


图 3 果胶对 α -葡萄糖苷酶活性抑制曲线

Fig.3 Inhibition curve of pectin on α -glucosidase activity

2.5 果胶对 HepG2 细胞胰岛素抵抗的影响

胰岛素抵抗是一种生理现象, 表现为机体胰岛素无法正常发挥生物学功能, 导致糖耐量受损, 可能进一步发展成糖尿病^[30]。胰岛素抵抗不仅是 2 型糖尿病的主要发病基础, 也是许多代谢相关疾病, 如心血管疾病、高脂血症、高尿酸血症和代谢综合征的共同病理基础。在本研究通过地塞米松(3.75 μmol)与胰岛素(0.01 μmol)联合诱导 HepG2 细胞, 经过 48 h 的诱导时间, 成功构建了胰岛素抵抗模型。在此基础上, 本研究进行了阳性药物 Met 以及大果山楂果渣果胶的干预研究。实验结果如图 4(a~c)所示, 与对照组相比, 阳性 Met 药物组(25 $\mu\text{g/mL}$)和果胶质量浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 时, 能显著促进 IR-HepG2 模型葡萄糖的消耗。值得关注的是, 在作用细胞 24、48 h 的时间点, 果胶的降糖效果相较于二甲双胍更为显著, 显示出最佳的降糖潜力。



注: *表示二甲双胍组、果胶组与模型组相比差异显著($P<0.05$), **($P<0.01$)、***($P<0.001$)表示与模型组相比差异极显著;
#表示模型组与对照组相比差异显著($P<0.05$), ##($P<0.01$)、###($P<0.001$)表示模型组与对照组相比差异极显著。

图 4 果胶对 HepG2 细胞胰岛素抵抗的影响

Fig.4 Effects of pectin on glucose consumption in IR-HepG2 cells

3 结 论

本研究通过响应面实验优化了纤维素酶法提取大果山楂果渣果胶的最佳工艺,并对提取得到的除蛋白果胶进行半乳糖醛酸含量和酯化度检测。此外,从抑制 α -葡萄糖苷酶活性和改善 HepG2 细胞胰岛素抵抗的角度,探讨大果山楂果渣果胶在改善抗糖尿病活性方面的潜在作用。在单因素和响应面法的实验研究中,系统地探讨了液料比、提取时间和纤维素酶用量等因素对粗果胶得率的影响。实验结果表明最佳工艺条件为:纤维素酶浓度为 3.4%,液料比为 7:1 (mL:g),提取时间为 3.5 h,酶解条件为 pH 4.9,温度 60℃。在这样的条件下,粗果胶的得率可以达到 13.22%,提取的果胶呈现出清澈淡黄色,杂质少,呈果冻胶状,黏性低,与模型预测的果胶得率相近。初步理化性质分析显示,除蛋白果胶的半乳糖醛酸含量为 67.83%,酯化度为 45.24%,属于低酯果胶。进一步的体外实验表明,大果山楂果渣果胶对 α -葡萄糖苷酶具有较高的抑制活性,其抑制率高达 89.41%, IC_{50} 值为 0.030 mg/mL,与阿卡波糖相当,表明其具有很高的开发价值。在胰岛素抵抗细胞实验中,我们发现果胶在质量浓度为 50 μ g/mL 时,能有效改善 IR-HepG2 细胞对葡萄糖的利用能力。这一机制可能与果胶增强糖酵解的同时抑制糖异生密切相关。

综上,本研究提出的纤维素酶法提取工艺不仅能提高粗果胶得率,而且提取得到的低酯果胶具有显著的降糖活性。因此,大果山楂果渣果胶有望作为一种天然抗糖尿

剂,为预防和治疗糖尿病的健康食品开发提供科学依据。这不仅对糖尿病的防治具有重要的临床意义,同时也为我国南方大果山楂资源的开发利用提供了新的思路。

参考文献

- [1] 张开平,刘玫梅,刘燕丽,等. 响应面法优化大果山楂红枣复合果酒发酵工艺及其抗氧化活性分析[J]. 食品工业科技, 2023, 44(23): 184–193.
ZHANG KP, LIU MM, LIU YL, et al. Optimization of fermentation technology of *Malus doumeri* (Bois) chev. and *Zizyphus jujube* Mill. compound fruit wine by response surface methodology and its antioxidant activity analysis [J]. Sci Technol Food Ind, 2023, 44(23): 184–193.
- [2] 潘莹,张林丽. 大果山楂的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2007, (12): 2972–2973.
PAN Y, ZHANG LL. Research progress on *Malus domeri* (Bois) Chev. [J]. J Tradit Chin Med Mater Med, 2007, (12): 2972–2973.
- [3] 靖西县县志编纂委员会. 靖西县志[M]. 广西人民出版社, 2000.
Jingxi County Compilation Committee. Jingxi County annals [M]. Nanning: Guangxi People's Publishing House, 2000.
- [4] 曾维忠,蓝金宣,梁忠茂,等. 靖西大果山楂酒加工工艺及营养活性成分价值分析[J]. 热带农业科学, 2021, 41(4): 94–98.
ZENG WZ, LAN JX, LIANG ZM, et al. Processing technique and the activity nutritive ingredient value analysis of *Malus domeri* (Bois) Chev. [J]. Trop Agric Sci, 2021, 41(4): 94–98.
- [5] 钟平娟,叶丽芳,门戈阳,等. 大果山楂酒发酵过程中抗氧化活性和香气成分分析[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(8): 24–29.
ZHONG PJ, YE LF, MEN GY, et al. Analysis of antioxidant activity and

- aromatic components of *Malus doumeri* (Bois) Chev. wine during fermentation [J]. Food Res Dev, 2021, 42(8): 24–29.
- [6] 劳风华, 郭婷, 段振华, 等. 干燥方式对冻融大果山楂片品质的影响[J]. 食品工业, 2020, 41(1): 92–96.
- FANG FH, GUO T, DUAN ZH, *et al.* Effect of drying treatment methods on the quality characteristics of freeze-thaw *Malus domeri* (Bois) Chev. slices [J]. Food Ind, 2020, 41(1): 92–96.
- [7] 刘雪平, 赵莉, 王靖, 等. 山楂加工及综合开发利用研究进展[J]. 保鲜与加工, 2024, 24(1): 83–89.
- LIU XP, ZHAO L, WANG J, *et al.* Research progress on processing and comprehensive development and utilization of hawthorn [J]. Storage Process, 2024, 24(1): 83–89.
- [8] KUMAR S, KONWAR J, PURKAYASTHA MD, *et al.* Current progress in valorization of food processing waste and by-products for pectin extraction [J]. Int J Biol Macromol, 2023, 239: 124332.
- [9] 李雪臻, 刘佳. 苹果渣果胶超声辅助提取工艺优化与抗氧化性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(3): 767–773.
- LI XC, LIU J. Study on the ultrasonic-assisted extraction process optimization and antioxidant activity of pectin from apple pomace [J]. J Food Saf Qual, 2022, 13(3): 767–773.
- [10] FERREIRA SS, CORREIA A, SILVA AMS, *et al.* Structure-function relationships of pectic polysaccharides from broccoli by-products with *in vitro* B lymphocyte stimulatory activity [J]. Carbohydr Polym, 2023, 303: 120432.
- [11] KIM M, KIM SR, PARK J, *et al.* Structure and antiviral activity of a pectic polysaccharide from the root of *Sanguisorba officinalis* against enterovirus 71 *in vitro/vivo* [J]. Carbohydr Polym, 2022, 281: 119057.
- [12] KONRADE D, GAIDUKOV S, VILAPLANA F, *et al.* Pectin from fruit- and berry-juice production by-products: Determination of physicochemical, antioxidant and rheological properties [J]. Foods, 2023, 12(8): 1615.
- [13] 孙博, 霍华珍, 蔡爱华, 等. 不同产地大果山楂总黄酮含量及抗氧化活性[J]. 广西科学, 2020, 27(4): 356–361.
- SUN B, HUO HZ, CAI AIH, *et al.* Total flavonoids content and antioxidant activity of *Malus doumeri* fruit from different producing areas [J]. Guangxi Sci, 2020, 27(4): 356–361.
- [14] 刘艳, 商飞飞, 唐小闲, 等. 正交实验法优化微波辅助提取大果山楂皮多酚工艺研究[J]. 粮食与油脂, 2021, 34(9): 134–137.
- LIU Y, SHANG FF, TANG XX, *et al.* Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Malus domeri* (Bois) Chev. peel by orthogonal experiment method [J]. Gere Oils, 2021, 34(9): 134–137.
- [15] 孙博, 霍华珍, 蔡爱华, 等. HPLC 法测定大果山楂果实中八种酚酸类成分的含量[J]. 广西植物, 2021, 41(7): 1135–1144.
- SUN B, HUO HZ, CAI AIH, *et al.* Determination of contents of eight phenolic acids in *Malus doumeri* fruit by HPLC [J]. Guihaia, 2021, 41(7): 1135–1144.
- [16] 霍华珍, 蔡爱华, 谢运昌. 高效液相色谱法测定大果山楂果实中6种三萜酸类成分的含量[J/OL]. 食品工业科技, 1–13. [2024-03-29]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023090167>
- HUO HZ, CAI AH, XIE YC. Determination of content of 6 kinds of triterpenic acids in *Malus doumeri* fruit by high-performance liquid chromatography [J/OL]. Sci Technol Food Ind, 1–13. [2024-03-29]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023090167>
- [17] 让凤菊, 王俊龙, 刘伟, 等. 西兰花茎果胶的提取及理化性质研究[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(16): 104–110.
- RANG FJ, WANG JL, LIU W, *et al.* Extraction and physicochemical characterization of pectin from *broccoli stalks* [J]. Food Res Dev, 2022, 43(16): 104–110.
- [18] 祁玥, 陆娟. 胎菊多糖分离纯化、结构及抗氧化活性分析[J]. 中国食品添加剂, 2023, 34(10): 137–142.
- QI M, LU J. Separation and purification of the polysaccharides from *Foetus chrysanthemum* and their structure and antioxidant activity [J]. China Food Add, 2023, 34(10): 137–142.
- [19] 李晓娇, 汪玉洁, 杨丽华, 等. 不同提取和改性方式小粒咖啡果皮果胶的理化性质及其抗氧化活性[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(19): 115–124.
- LI XJ, WANG YJ, YANG LH, *et al.* Physicochemical properties and antioxidant activity of small-grain coffee pectin extracted and modified by different methods [J]. Food Ferment Ind, 2022, 48(19): 115–124.
- [20] 王玉洁. 金银花绿原酸和总黄酮同步提取工艺及其体外降糖活性研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江东方学院, 2023.
- WANG YJ. Study on the synchronous extraction process and hypoglycemic activity *in vitro* of chlorogenic acid and total flavonoids from Honeysuckle [D]. Harbin: Heilongjiang Dongfang University, 2023.
- [21] DING HF, HUANG SH, CHOOK YC, *et al.* Blood glucose-lowering activity of protocatechuic acid is mediated by inhibiting α -glucosidase [J]. Food Sci Hum Well, 2024, 13(3): 1212–1219.
- [22] 姜慰, 史茜, 刘晓颖, 等. HepG2 细胞胰岛素抵抗模型建立及在筛选天然有效多糖中的应用[J]. 新疆大学学报, 2023, 40(4): 461–466.
- JIANG W, SHI X, LIU XY, *et al.* Establishment of insulin resistance model of HepG2 cells and application in selection of active natural polysaccharides [J]. J Xinjiang Univ, 2023, 40(4): 461–466.
- [23] 刘英, 邱逸凡, 许希贤. 果胶研究和应用进展[J]. 现代食品, 2019, (24): 17–20.
- LIU Y, QIU YF, XU XX. Research and applications of pectin [J]. Mod Food, 2019, (24): 17–20.
- [24] 赵鑫, 张红, 门中华, 等. 纤维素酶的研究与应用进展[J]. 化学与生物工程, 2023, 40(9): 1–9.
- ZHAO X, ZHANG H, MEN ZH, *et al.* Research and application progress of cellulase [J]. Chem Biol Eng, 2023, 40(9): 1–9.
- [25] CHANDEL V, BISWAS D, ROY S, *et al.* Current advancements in pectin: Extraction, properties and multifunctional applications [J]. Foods, 2022, 11(17): 2683.
- [26] DU J, ANDERSON CT, XIAO C. Dynamics of pectic homogalacturonan in cellular morphogenesis and adhesion, wall integrity sensing and plant development [J]. Nat Plants, 2022, 8(4): 332–340.
- [27] XU D, ZHAO X, MAHSA GC, *et al.* Controlled release of

Lactiplantibacillus plantarum by colon-targeted adhesive pectin microspheres: Effects of pectin methyl esterification degrees [J]. Carbohydr Polym, 2023, 313: 120874.

- [28] HANNA S, FRANK BP, ANDREA MC, *et al.* Effects of pectin methyl-esterification on intestinal microbiota and its immunomodulatory properties in naive mice [J]. Carbohydrate Polymers, 2024, 334: 122007.
- [29] DENG N, GUO RX, ZHENG BS, *et al.* IRS-1/PI3K/Akt pathway and miRNAs are involved in whole grain highland barley (*Hordeum vulgare* L.) ameliorating hyperglycemia of db/db mice [J]. Food Funct, 2020, 11(11): 9535–9546.
- [30] 苏黑艳·帕尔哈提, 张姣姣, 王俊人, 等. 基于 AMPK 信号通路探究櫻桃李多酚提取物对胰岛素抵抗 HepG2 细胞糖代谢的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2023, 39(12): 2234–2241.
- SU HY·PARHATI, ZHANG JJ, WANG JR, *et al.* Effects of *Prunus cerasifera* Ehrh. polyphenol extract on glucose metabolism in insulin-resistant HepG2 cells based on AMPK signaling pathway [J]. Chin J Pathophysiol, 2023, 39(12): 2234–2241.

(责任编辑: 蔡世佳 韩晓红)

作者简介



卫炳安, 硕士研究生, 主要研究方向为民族特色食品的功能性研究。
E-mail: 496788873@qq.com



黄元河, 硕士, 副教授, 主要研究方向为民族特色食品的功能性研究。
E-mail: gxhyuanhe@163.com



潘乔丹, 硕士, 副教授, 主要研究方向为民族地区特色植物的活性物质基础研究。
E-mail: panqiao112@163.com