

金柚多糖提取工艺优化及其抗氧化活性研究

郑丹阳^{1,2}, 梁世劲², 刘祎帆^{1,3*}, 龚盛昭², 朱永闯²

(1. 仲恺农业工程学院, 广东广州, 510225;

2. 广东轻工职业技术大学, 广东广州, 510300;

3. 广东省教育厅药食同源食品精深加工工程中心, 广东广州, 510225)

摘要: 研究旨在以金柚为研究对象, 探究超声辅助酶法提取金柚多糖的最优工艺, 并进一步评价其抗氧化活性能力。以金柚为试验材料, 在单因素试验(料液比、酶解时间、超声温度和超声时间)的基础上, 结合正交分析法优化金柚多糖提取工艺条件, 对所提多糖清除 DPPH 自由基、羟自由基、超氧阴离子自由基等能力进行测定。结果显示, 金柚多糖最佳的提取工艺条件为: 料液比 1:60g/mL、酶解时间 2h、超声温度 40℃和超声时间 50min, 此时多糖得率为 (60.86 ± 0.05)%。抗氧化活性研究表明, 金柚多糖具有较好的抗氧化活性。结果为可提高金柚的利用率, 其提取的多糖可应用在功能性食品等领域, 为金柚多糖的开发利用提供参考。

关键词: 金柚; 多糖; 提取工艺; 抗氧化活性

作者简介: 郑丹阳, 硕士研究生, 主要研究领域是日用化工功能材料开发和应用研究, 包括纳米包裹体开发及应用、斑马鱼模型功效和安全性评价、天然产物功效成分提取等。E-mail: 2020080014@gdip.edu.cn。



郑丹阳

中国是全球最大柚类主产国和消费国, 金柚主要产于广东省梅州市, 是广东省最大的柚子产区, 占全省的92%以上, 也是全球最大的沙田柚生产基地。金柚含有丰富化合物, 如多糖、黄酮、挥发油、维生素等^[1-3], 其中, 多糖是一类广泛存在于动植物中的天然高分子活性物质, 其主要生物活性包括抗氧化、增强免疫力、抑菌、抗炎、降血糖、抗肿瘤等^[4-6]; 多糖因具有无毒、提取方式多样、生物相容性好等优势, 逐渐被认为是21世纪最具有前途的材料之一。目前, 金柚多糖提取的方法包括水提法、超声波辅助法、微波辅助法、红外辅助法等^[7-10], 林诺怡^[1]等采用超声辅助酶法对提取的金柚多糖进行结构鉴定和免疫活性研究, 结果得出其多糖得率为9.12%, 具有较强的免疫活性; 王睿宁^[11]等采用酶解提取蜜柚皮多糖活性成分, 多糖得率达到(2.73 ± 0.21)%。因此, 为提高多糖得率, 优化提取工艺, 本研究以金柚多糖为研究对象, 采用超声辅助酶法提取多糖, 研究不同因素对金柚多糖得率的影响, 优化提取工艺参数, 对金柚多糖的清除自由基活性进行试验研究, 为其在功能性食品等领域的应用提供依据。

1. 材料与方法

1.1 试剂与仪器

本试验所用金柚购于广东梅州; 果胶酶(1000U/mg)、纤维素酶(50U/mg), 上海源叶生物科技有限公司;

三氯乙酸、1, 1 - 二苯基 - 三硝基苯肼(DPPH), 上海麦克林生化科技有限公司; 苯酚、Tris-HCl缓冲液, 阿拉丁生化科技有限公司, 均为分析纯; 浓硫酸、盐酸、维生素C, 广州化学试剂公司, 均为分析纯; 无水乙醇、水杨酸, 安耐吉化学公司, 均为分析纯; 过氧化氢, 上海沃凯生物技术有限公司, 均为分析纯; 邻苯三酚, 国药集团化学试剂有限公司, 均为分析纯; 硫酸亚铁, 天津市科密欧化学试剂有限公司, 均为分析纯。

旋转蒸发器 RV-10型, 艾卡仪器设备有限公司; 恒温加热磁力搅拌器 CL-4A型, 郑州长城工贸有限公司; 电热恒温水浴锅 HWS24型, 上海一恒科学仪器有限公司; 超声波清洗仪 CLEANING型, SKYMEN公司; 离心机5804型, 艾本德国际有限公司; 冷冻干燥机 FDU-1200型, 上海爱朗仪器有限公司; 紫外-可见光光度计 UV-1800PC-DS2型, 上海美谱达仪器有限公司。

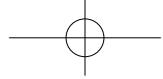
1.2 试验方法

1.2.1 金柚多糖的提取

金柚切丁后置于烘箱中烘至恒重, 待冷却至室温后将果丁进行粉碎, 过60目筛后得到金柚粉, 密封置于干燥器中备用。

准确称取5g金柚粉, 用80%乙醇冷凝回流6h进行脱脂, 置于烘箱中烘干至恒重。将5g金柚粉按一定的料液比加入蒸馏水溶解, 加入果胶酶和纤维素酶(添加量为2%, 1:1, pH=6.0), 在50℃下进行水浴酶解一定时间。酶

基金项目: 药食同源食品精深加工工程技术研究中心(2024GCZX002)



解完成后加热煮沸 10min 除去生物酶，然后在一定温度的水中超声一定的时间，超声前通过加入 80% 三氯乙酸（3% 添加量）除去蛋白质。超声完成后进行第一次离心取上清液，使用旋转蒸发器于 60℃ 下除去溶液，旋蒸完成后用无水乙醇进行沉淀，低温保存过夜后进行第二次离心，将沉淀取出并进行冷冻干燥，得到金柚多糖提取物。

1.2.2 葡萄糖标准曲线的绘制及多糖得率的测定

本研究中，以葡萄糖溶液作为标准物质，采用苯酚-硫酸法^[12]制作葡萄糖标准曲线并测定金柚多糖提取物中多糖含量。首先，将葡萄糖粉末干燥至恒重，精确称取 50.0mg 并将其置于 100.0mL 容量瓶中，加适量蒸馏水溶解后定容，得到 0.5g/L 葡萄糖标准溶液。制备 5 种不同浓度梯度的标准溶液（0.02g/L、0.04g/L、0.06g/L、0.08g/L、0.10g/L）。分别取 2.0mL 各浓度葡萄糖溶液置于 10mL 比色皿中，加入 5% 苯酚溶液，混合均匀后，迅速加入 10mL 浓硫酸，摇匀，沸水浴 15min 后取出冷却至室温，在 490nm 的波长下测定其吸光度。根据测得的吸光度及对应的葡萄糖溶液浓度绘制标准曲线，所得标准曲线线性回归方程： $y=7.1314x+0.0522$ ，决定系数 $R^2=0.9854$ 。将所得金柚多糖提取物用蒸馏水配制成 1mg/mL 的待测溶液，按照苯酚-硫酸法检测其吸光度，代入方程计算样品中的多糖含量，计算多糖得率。

$$\text{多糖含量 (g/L)} = \text{样品质量浓度} \times \text{样品稀释倍数} \times 0.9$$

$$\text{多糖得率 (\%)} = \frac{\text{多糖含量} \times \text{多糖溶液体积}}{\text{果粉质量}} \times 100\%$$

1.2.3 单因素试验

本研究以 1.2.1 中金柚多糖提取工艺流程为基础条件，采用单因素试验法，依次改变下述 4 个工艺参数：①料液比为 1:20、1:30、1:40、1:50、1:60 g/mL；②酶解时间为 0.5、1、1.5、2、2.5h；③超声温度为 40、50、60、70、80℃；④超声时间为 20、30、40、50、60 min。每组试验均设置 3 个平行试验，得率取 3 次试验平均值。以金柚多糖得率为评价指标，考察料液比、酶解时间、超声温度、超声时间对金柚多糖得率的影响。

1.2.4 正交试验

以单因素试验结果为依据，结合 SPSS 设计的 3 因素 4 水平 $L_9(3^4)$ 正交试验表进行正交试验，各正交试验组合均设置 3 次平行试验。以 A 料液比、B 酶解时间、C 超声温度、D 超声时间为因素，以金柚多糖得率为评价指标，探

究金柚多糖提取过程中，最佳多糖提取工艺参数组合，并以此条件进行验证试验，证实该工艺参数组合对金柚多糖得率的提升效果。

表 1 正交试验因素水平表

因素	A 料液比 / g·mL ⁻¹	B 酶解时间 / h	C 超声温度 / °C	D 超声时间 / min
-1	1:40	1	35	30
0	1:50	1.5	40	40
1	1:60	2	45	50

1.2.5 扫描电镜分析

通过扫描电子显微镜对金柚多糖的微观结构进行观察，将适量金柚多糖粉末置于铜片上，粘贴固定后，放于镀金室内中，镀金操作完成后进行扫描并拍照，放大倍数为 250×。

1.2.6 金柚多糖抗氧化活性测定

DPPH 自由基 (DPPH·) 清除能力的测定 参考 GB/T 39100-2020^[13] 国家推荐性标准，配制 0.1mmol/L 的 DPPH 乙醇溶液，4℃ 冰箱保存备用。取 4.0mL 浓度 (0.5、1.0、1.5、2.0、2.5mg/mL) 的样品溶液置于试管，加入等体积 0.1mmol/L 的 DPPH 无水乙醇溶液 4mL，充分混匀后避光反应 30min，517nm 测定吸光度 ($A_{\text{样}}$)。用等量无水乙醇代替 DPPH 乙醇溶液测定相应样品吸光度 ($A_{\text{对}}$)，等量蒸馏水代替样品测定吸光度 ($A_{\text{空}}$)。同时用维生素 C (VC) 代替样品做阳性对照，计算 DPPH· 清除率，其计算公式如下：

$$\text{DPPH 自由基清除率 (\%)} = \left[1 - \frac{A_{\text{样}} - A_{\text{对}}}{A_{\text{空}}} \right] \times 100\%$$

羟自由基 ($\cdot\text{OH}$) 清除能力的测定 采用水杨酸法测定多糖·OH 清除能力^[14]，配制 20mmol/L 水杨酸乙醇溶液和 1.5mmol/L 硫酸亚铁溶液于 4℃ 冰箱保存备用，6mmol/L 过氧化氢溶液现配现用。取 3.0mL 浓度 (0.5、1.0、1.5、2.0、2.5mg/mL) 的样品溶液于试管，分别加入水杨酸乙醇溶液、硫酸亚铁溶液和过氧化氢溶液，迅速混匀，水浴 30min，于 510nm 处测定吸光度 ($A_{\text{样}}$)。用等量无水乙醇代替水杨酸溶液测定相应样品吸光度 ($A_{\text{对}}$)，等量蒸馏水代替样品测定吸光度 ($A_{\text{空}}$)。同时以 VC 为阳性对照，计算 $\cdot\text{OH}$ 的清除率，其计算公式如下：

$$\text{羟自由基清除率 (\%)} = \left[1 - \frac{A_{\text{样}} - A_{\text{对}}}{A_{\text{空}}} \right] \times 100\%$$

超氧阴离子自由基 ($\text{O}_2^{\cdot-}$) 清除能力的测定 采用邻苯三酚自氧化法测定 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除能力^[15]，配制 50mmol/L 的 Tris-盐酸缓冲液 (pH=8.1)、25mmol/L 邻苯三酚溶液和

80mmol/L 盐酸溶液于4℃冰箱保存备用。取1.0mL (0.5、1.0、1.5、2.0、2.5mg/mL) 的样品溶液于试管, 分别加入 Tris-HCl 缓冲液和邻苯三酚溶液, 混匀后在25℃水浴反应 5min, 立即加入盐酸溶液调节溶液 pH 值, 使得溶液处于酸性环境, 从而终止反应, 于320nm 处测定吸光度 ($A_{\text{样}}$)。用等量蒸馏水代替邻苯三酚溶液测定相应样品吸光度 ($A_{\text{对}}$), 等量蒸馏水代替样品测定吸光度 ($A_{\text{空}}$)。同时以 VC 为阳性对照, 计算超氧阴离子自由基的清除率, 其计算公式如下:

$$\text{超氧阴离子自由基清除率}(\%) = \left[1 - \frac{A_{\text{样}} - A_{\text{对}}}{A_{\text{空}}} \right] \times 100\%$$

1.3 数据统计与分析

利用 Excel 软件对所有试验结果进行记录、整理和统计。利用 SPSS 20.0 软件进行统计分析, 采用软件中的极差分析和多因素方差分析模块, 对正交试验数据进行统计分析, Duncan's 法进行多重比较, $P < 0.05$ 表示差异显著, 数据统计图使用 Origin 2019b 生成。

2. 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 料液比对金柚多糖得率的影响

由图1可知, 金柚多糖得率随着料液比的升高, 呈现先逐渐增大后下降的趋势。当料液比达到1:50时, 金柚多糖得率最高, 为56.67%, 可能是由于随着液料比的增加, 多糖浓度下降不利于多糖溶出。当料液比为1:40、1:60时, 金柚多糖得率仅次于1:50处理组。因此, 在后续正交试验中, 料液比的水平选择为1:40、1:50、1:60。

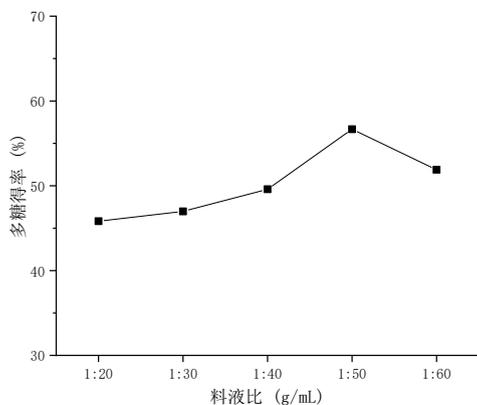


图1 料液比对金柚多糖得率的影响

2.1.2 酶解时间对金柚多糖得率的影响

由图2可知, 金柚多糖得率随着酶解时间延长, 呈现先增加后降低再上升的趋势, 原因是随着酶解时间的增加会使得部分多糖会被生物酶溶解。当酶解时间达到1.5h时, 金柚多糖得率最高, 为54.81%。当酶解时间为1h、2h时, 金柚多糖得率仅次于1.5h处理组。因此, 在后续正交试验中, 酶解时间的水平选择为1、1.5、2h。

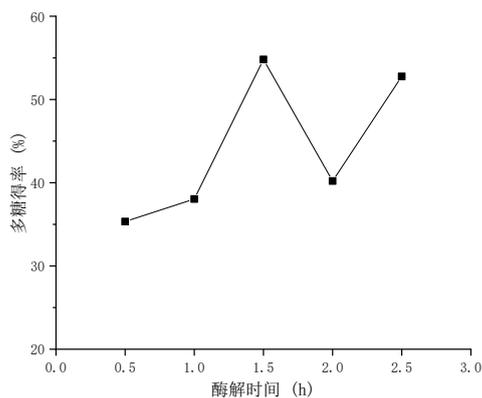


图2 酶解时间对金柚多糖得率的影响

2.1.3 超声温度对金柚多糖得率的影响

由图3可知, 金柚多糖得率随着超声温度的升高, 呈现先下降后上升的趋势, 可能是由于随着超声温度的上升多糖结构被破坏。当超声温度达到40℃时, 金柚多糖得率最高, 为53.60%。当超声温度为50℃时, 金柚多糖得率仅次于40℃处理组。因此, 在后续正交试验中, 超声温度的水平选择为35、40、45℃。

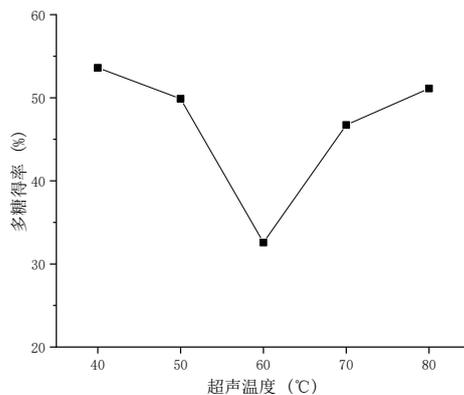
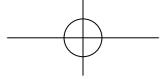


图3 超声温度对金柚多糖得率的影响

2.1.4 超声时间对金柚多糖得率的影响

由图4可知, 金柚多糖得率随着超声时间的升高, 呈现先逐渐增大后下降的趋势, 可能是由于随着超声时间的



增加多糖结构被破坏或者有部分多糖重新水解。当超声时间达到40min时,金柚多糖得率最高,为58.45%。当超声时间为30、50min时,金柚多糖得率仅次于40min处理组。因此,在后续正交试验中,超声时间的水平选择为30、40、50min。

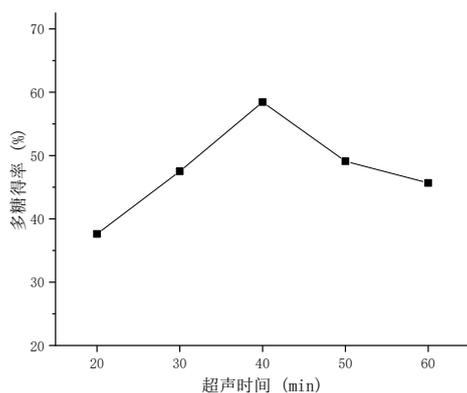


图4 超声时间对金柚多糖得率的影响

2.2 正交试验结果

正交试验极差分析结果见表2。在4个影响因素中,依据各因素R值排序可知,不同因素对金柚多糖得率的影响重要性依次为: B(酶解时间)>D(超声时间)>C(超声温度)>A(料液比)。

表2 正交试验极差分析结果

序号	A	B	C	D	多糖得率/%			
					平行1	平行2	平行3	均值
1	1	1	1	1	60.45	60.33	60.42	60.40
2	1	2	2	2	60.52	60.54	60.5	60.52
3	1	3	3	3	60.61	60.62	60.68	60.64
4	2	1	2	3	60.59	60.62	60.6	60.60
5	2	2	3	1	60.51	60.51	60.47	60.50
6	2	3	1	2	60.49	60.52	60.47	60.49
7	3	1	3	2	60.45	60.44	60.47	60.45
8	3	2	1	3	60.62	60.57	60.6	60.60
9	3	3	2	1	60.72	60.71	60.69	60.71
K ₁	181.56	181.46	181.49	181.60				
K ₂	181.59	181.61	181.83	181.47				
K ₃	181.76	181.84	181.59	181.84				
k ₁	60.52	60.49	60.50	60.53				
k ₂	60.53	60.54	60.61	60.49				
k ₃	60.59	60.61	60.53	60.61				
R	0.05	0.13	0.08	0.12				

对所有试验组的3次平行试验结果进行多因素方差分析,结果见表3。由表3可知,料液比、酶解时间、超声温度、超声时间均对金柚多糖得率有显著影响。综合极差分析和方差分析结果,以k值为依据,选择各影响因素中k值最大的结果为最优参数水平,则在金柚多糖的提取过程中,最优的生产工艺参数组合为A₃B₃C₂D₃:料液比1:60g/mL、酶解时间2h、超声温度40℃和超声时间50min。

表3 正交试验方差分析结果

项目	平方和	自由度	均方	F值	P值
截距	98974.425	1	98974.425	108190667.142	0.0000
A	0.023	2	0.011	12.393	0.0004
B	0.073	2	0.036	39.866	0.0000
C	0.061	2	0.031	33.551	0.0000
D	0.070	2	0.035	38.263	0.0000
误差	0.016	18	0.001		

注 R²=0.932。

2.3 最优工艺条件下金柚多糖得率

根据2.2中得到的最优工艺组合:料液比1:60g/mL、酶解时间2h、超声温度40℃和超声时间50min,以此条件重新进行金柚多糖提取,检测其金柚多糖得率,结果见表4。

由表4可知,在最佳提取工艺组合条件下,金柚多糖得率达(60.86±0.05)%,相较单因素试验和正交试验中获得的金柚多糖得率有明显提升。

表4 最佳工艺条件下金柚多糖得率

项目	1	2	3	平均值
多糖得率/%	60.78	60.89	60.90	60.86

2.4 金柚多糖扫描电镜分析

图5为金柚多糖扫描电镜的分析结果,在250x的放大倍数下金柚多糖的表面形态为不规则结构,这可能与多糖分子间受力作用不同有关,这种结构对多糖的体外活性等均会产生影响。

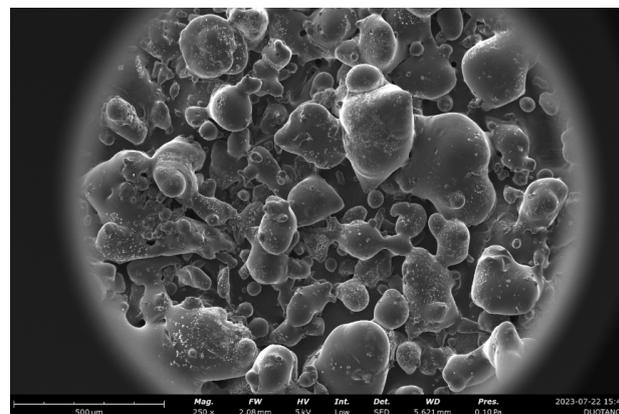


图5 金柚多糖扫描电镜图

2.5 金柚多糖抗氧化活性测定结果

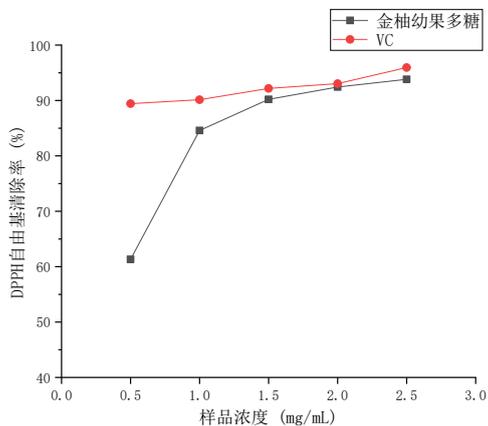


图6 金柚多糖对 DPPH 自由基的清除作用

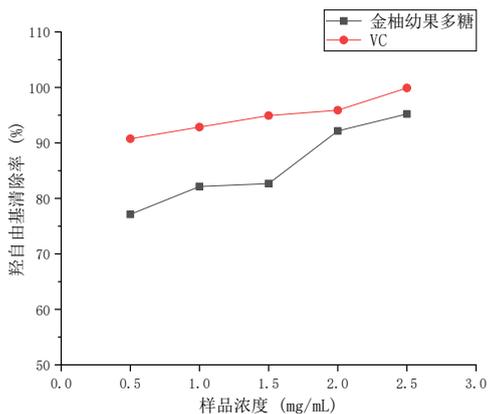


图7 金柚多糖对羟自由基的清除作用

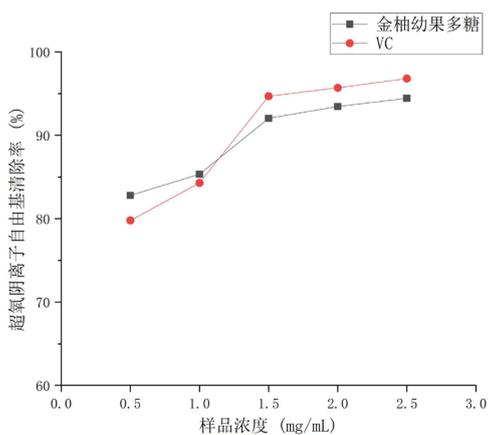


图8 金柚多糖对超氧阴离子自由基的清除作用

由图6、图7、图8所示，在0.5~2.5mg/mL浓度范围内，金柚多糖对DPPH自由基、羟自由基和超氧阴离子自由基的清除率均随着浓度的增加呈现上升趋势，其中，在0.5~2.5mg/mL浓度范围内，超氧阴离子自由基的清除能力最强，其次是羟自由基，而对DPPH自由基的清除能力最弱。在0.5~1.0mg/mL浓度范围内，金柚多糖对超氧阴离

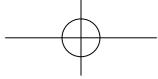
子自由基的清除能力略高于VC组，说明在此浓度下，金柚多糖的抗氧化性能强于VC。

3. 结论

本研究以金柚为研究对象，采用超声辅助酶法提取多糖，利用正交试验法优化其提取工艺。结果显示，4个影响金柚多糖得率的因素重要性依次为：酶解时间>超声时间>超声温度>料液比；最优提取工艺组合为：料液比1:60、酶解时间2h、超声温度40℃和超声时间50min；此工艺条件下，金柚多糖得率为(60.86±0.05)%；根据扫描电镜分析得出金柚多糖的表面形态为不规则结构；清除自由基结果显示，金柚多糖具有较好的抗氧化活性。

参考文献

- [1]林诺怡,刘祎帆,王琴等.金柚幼果多糖的结构鉴定与免疫调节作用[J].现代食品科技,2020,36(09):1-8.
- [2]罗洁莹.超声波微波协同提取金柚幼果黄酮及其抗氧化机理[D].仲恺农业工程学院,2019.
- [3]徐鹏程.沙田柚幼果中柚皮素的含量测定研究[J].内蒙古医学杂志,2016,48(4):397-399.
- [4]QIU S L, CHEN J, CHEN X, et al. Optimization of selenylation conditions for Lycium barbarum polysaccharide based on antioxidant activity[J]. Carbohydr Polym,2014,103: 148-153.
- [5]娄红波,王宏宏,何丽莲,等.甘蔗茎叶化学成分的研究[J].中成药,2021,43(8):2086-2091.
- [6]朱鹤云,关皎,王佳林,等.紫外分光光度法测定黄芩多糖的含量[J].吉林医药学院学报,2016,37(5):334-335.
- [7]沈晓静,秦宇,华宗,等.白及多糖的提取纯化、结构鉴定及生物活性研究进展[J].中华中医药学刊,2024,42(05):225-232.
- [8]周欣.香菇多糖提取工艺的优化及其体外抗菌试验研究[J].饲料研究,2023,46(13):87-92.
- [9]张一文,刘晓庆,沈伟.响应面优化提取玄参碱溶性多糖及对高眼压小鼠视网膜的影响[J].中国食品添加剂,2024,35(04):208-218.
- [10]严薇,邓丽莎,王燕,等.基于红外辐射处理的米糠多糖组分、提取率及抗氧化活性的影响[J].食品科学,2020,41(15):158-163.
- [11]王睿宁,胡宇鑫,陈强,等.福建平和蜜柚皮多糖酶解提取工艺的优化[J].食品研究与开发,2023,44(22):74-79.
- [12]梁昌祥,林云晓,陈兵兵.酶法辅助提取柚皮多糖工艺条件的优化探究[J].农产品加工,2021,(13):48-52.



[13] 黄俊豪, 伍健, 秦怡, 等. 响应面法优化香菇柄花粉酵素制备工艺 [J]. 粮食与油脂, 2025, 38(01): 87-91+100.
[14] 杨艾华, 宋姗姗, 王微微. 湄潭白茶多糖抗氧化活性及稳定性研

究 [J]. 食品科技, 2021, 46(10): 194-199.

[15] 张熠璇, 雷敏, 黄家浩, 等. 微生物降解制备水溶性茯苓多糖及其抗氧化活性 [J]. 食品研究与开发, 2023, 44(15): 136-141.

Optimizing Pomelo Polysaccharide Extraction and Analyzing Their Antioxidant Properties

Zheng Dan-yang^{1,2}, Liang Shi-jing², Liu Hui-fan^{1,3*}, Gong Sheng-zhao², Zhu Yong-chuang²

(1. Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangdong, Guangzhou, 510225;

2. Guangdong Industry Polytechnic University, Guangdong, Guangzhou, 510300;

3. Guangdong Provincial Department of Education of Medicinal and Edible Food Intensive Processing Engineering Technology Research Center, Guangdong, Guangzhou, 510225)

Abstract : The present study seeks to explore the optimal extraction process for polysaccharides from pomelo utilizing ultrasound-assisted enzymatic extraction, and to subsequently assess their antioxidant activity. Employing golden pomelo as the experimental material, the extraction process was refined through single-factor experiments—examining variables such as solid-to-liquid ratio, enzymatic hydrolysis duration, ultrasonic temperature, and ultrasonic duration - in conjunction with orthogonal analysis. The antioxidant capacity of the extracted polysaccharides was evaluated by measuring their ability to scavenge DPPH radicals, hydroxyl radicals, and superoxide anion radicals. The results identified the optimal extraction conditions for pomelo polysaccharides as follows: a solid-to-liquid ratio of 1:60 g/mL, an enzymatic hydrolysis time of 2 hours, an ultrasonic temperature of 40°C, and an ultrasonic duration of 50 minutes, yielding a polysaccharide extraction efficiency of (60.86±0.05)%. The study of antioxidant activity revealed that the polysaccharides derived from pomelo demonstrated significant antioxidant properties. These findings have the potential to enhance the utilization rate of pomelo, with the extracted polysaccharides being applicable in the domain of functional foods, providing a reference for the development and utilization of pomelo polysaccharides.

Keywords : pomelo; polysaccharide; extraction process; antioxidant activity

