

金柚幼果多糖的结构鉴定与免疫调节作用

林诺怡, 刘祎帆, 王琴, 成坚, 梁嘉熹

(仲恺农业工程学院轻工食品学院, 广东广州 510000)

摘要: 为充分开发柚子产业, 进一步提高金柚幼果的利用率, 本文以金柚幼果为原料, 采用超声辅助酶法提取出金柚幼果多糖(PFCP), 得率为 9.12%。通过扫描电镜、粒径仪、气相色谱、红外光谱等对 PFCP 的结构进行表征, 结果表明 PFCP 表面为光滑的多孔网状结构, 粒径为 101 μm , 分子量为 3.31 ku, 由鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖和半乳糖醛酸组成的, 摩尔比例为 0.056:0.138:0.463:0.059:0.186:0.285, 是一种酸性杂多糖, 主要由 -OH、C=O、C-O、C=C 和 N-H 结构构成, 其糖链含有苯环和吡喃环。本研究借助小鼠 RAW 264.7 巨噬细胞模型, 发现 PFCP 在 62.5~1000 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度范围内对小鼠巨噬细胞无明显毒副作用, 能显著提高 RAW 264.7 巨噬细胞表达 NO、TNF- α 及 IL-6 细胞因子的分泌量, 在 1000 $\mu\text{g/mL}$ 浓度时细胞因子的表达量最高, NO 为 42.87 μM , TNF- α 为 14759.47 pg/mL, IL-6 为 62.20 pg/mL, 表明 PFCP 具有较强的免疫活性。该研究可为金柚幼果的开发利用提供一定的研究基础。

关键词: 金柚幼果; 多糖; 结构表征; 免疫活性

文章编号: 1673-9078(2020)09-1-8

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.9.0244

Structural Characterization and Immunomodulatory Activity of Polysaccharide Extracted from Pomelo Fruitlets

LIN Nuo-yi, LIU Hui-fan, WANG Qin, CHENG Jian, LIANG Jia-xi

(College of Light Industry and Food Sciences, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510000, China)

Abstract: In order to develop the pomelo industry and improve the utilization of pomelo fruit, in this study, the crude polysaccharide from pomelo fruitlets (PFCP) was extracted by ultrasound-assisted enzymatic method, with a PFCP yield of 9.12%. Scanning electron microscope analysis, particle size analysis, infrared spectrum analysis, and gas chromatography analysis were used to characterize the structure of PFCP. The results showed that PFCP was a heteropolysaccharide with a molecular weight of 3.31 ku, a particle size of 101 μm , and a porous network of spatial structure. The PFCP was composed of rhamnose, arabinose, galactose, glucose, mannose and galacturonic acid in a molar ratio of 0.056:0.138:0.463:0.059:0.186:0.285 with benzene and pyran rings, in which -OH, C=O, C-O, C=C, and N-H structures were contained. In addition, by RAW 264.7 cells model, PFCP has no significant toxic at the range from 62.5 $\mu\text{g/mL}$ to 1000 $\mu\text{g/mL}$. In terms of cytokine expression, PFCP can effectively promote the expression of three cytokines: NO, TNF- α , and IL-6 in a dose-dependent manner. Among them, the expression of cytokines was the highest at 1000 $\mu\text{g/mL}$ of PFCP, and the expression of NO was 42.87 μM , the secretion of TNF- α was 14759.47 pg/mL, and the expression of IL-6 reached 62.20 pg/mL, indicating that PFCP has immune activity. This study may provide some useful information for the pomelo industry.

Key words: pomelo fruitlets; polysaccharide; structure characterization; immune effects

引文格式:

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(9): 1-8

LIN Nuo-yi, LIU Hui-fan, WANG Qin, et al. Structural characterization and immunomodulatory activity of polysaccharide extracted from pomelo fruitlets [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(9): 1-8

我国是柚子生产的第一大国, 营养丰富, 口感独

收稿日期: 2020-03-16

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金项目 (2019A1515011283)

作者简介: 林诺怡 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物开发

通讯作者: 刘祎帆 (1990-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 天然产物开发

特, 深受消费者喜爱^[1,2]。在金柚的生长过程中, 出于保花保果的目的, 会对果树进行疏花疏果, 以提高金柚的质量与产量, 在这个过程中会在田间产生大量废弃的金柚幼果, 不仅易造成资源浪费, 而且会滋生大量病原菌, 致使果树的病害泛滥^[3]。

金柚幼果是一类营养丰富的农业资源,开发利用幼果资源对于资源节约有着重要意义。目前,幼果的黄酮、挥发油和柚皮素^[4]等方面已有报道,王琴等^[5]采用超声微波协同辅助方法对总黄酮的提取工艺进行优化,发现三种黄酮组分均能抑制 AAPH 自由基和降低红细胞活性氧(ROS)水平,达到抑制溶血的效果^[6]。林家逊等^[7]通过水蒸气蒸馏法并采用 GC-MS 技术,对幼果中对挥发油的化学成分进行分离鉴定,发现挥发油中含有 43 种化合物,占总挥发油量的 99.5%,并表示幼果挥发油具有药用价值,可见金柚幼果的开发具有一定的研究和开发意义。

多糖是一类广泛存在于动植物中的天然高分子活性物质,近年来,多糖的活性研究成为一大热点,其主要生物活性包括增强免疫力、抑菌、抗炎症、清除自由基^[8,9]、降血糖、抗肿瘤^[10]等。目前金柚幼果多糖的研究较少,因此,本文通过超声辅助酶解法提取金柚幼果中的多糖(PFCP),对其结构进行表征,同时研究其免疫调节能力,以期在金柚幼果的开发与利用提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

金柚幼果购于广东省梅州市场,单果平均重量为 60 g;纤维素酶(50 U/mg)、果胶酶(1000 U/mg),上海源叶生物科技有限公司;小鼠 IL-6 Elisa 试剂盒、小鼠 TNF- α Elisa 试剂盒,欣博生物科技有限公司;NO 试剂盒,南京建成生物工程研究所;DMEM 培养基粉剂, Gibco 公司;单糖标准品,美国 Sigma 公司。

浓硫酸、苯酚、葡萄糖标准品、三氯乙酸、氢氧化钠、盐酸、无水乙醇、乙酸、乙酸酐、硼氢化钠、氯仿均为分析纯。

1.2 仪器与设备

Infinite M1000 Pro 酶标仪,美国 Thermo 公司;倒置显微镜,德国 Leica 公司;超纯水系统(型号 Academic A10) Millipore 公司;CO₂ 培养箱,美国 Thermo 公司;傅里叶变换红外光谱仪,德国 Bruker 公司;激光衍射粒度分析仪(Malvern Mastersizer 2000),英国马尔文公司;高速冷冻离心机(5424R),德国 Eppendorf 公司;Supra55 扫描电镜,德国 Zeiss 公司;HG-9013A 型恒温烘箱,上海善治有限公司;XY-FD-100F 真空冷冻干燥机,上海欣渝仪器有限公司;超净工作台(型号 SZX),上海跃欣实业有限公司;数控超声波清洗器,深圳市洁康洗净电器有限公司;

气相色谱仪,美国惠普公司。

1.3 试验方法

1.3.1 金柚幼果多糖的提取

金柚幼果切丁后置于 55 °C 烘箱中烘至恒重,待冷却至室温后将幼果丁进行粉碎,过 60 目筛后得到金柚幼果粉,密封置于干燥皿中备用。

参考 Sun 等^[11]的方法,精密称取 10 g 金柚幼果粉,用 80%乙醇 70 °C 冷凝回流 6 h 进行脱脂^[12],置于通风橱中烘干。将 10 g 脱脂金柚幼果粉按照 1:30 g/mL 料液比加入蒸馏水溶解,加入纤维素酶和果胶酶(1:1,添加量为 1.7%),调节 pH 至 6.0 后在 50 °C 条件下酶解 1.2 h,之后在 80 °C 下灭酶 15 min,灭酶后在 70 °C 下超声处理 29 min,离心取上清液(4500 r/min, 15 min),浓缩后加入四倍体积的无水乙醇,在 4 °C 下静置沉淀过夜,离心取沉淀后加入蒸馏水复溶,往溶液中加入三氯乙酸溶液(添加量为 3%,浓度为 80%)除蛋白^[13],将上清液浓缩后加入四倍体积的无水乙醇沉淀^[14],离心 15 min 后取沉淀,在蒸馏水中透析 72 h 后,冻干得到金柚幼果多糖(PFCP)。

1.3.2 标准曲线的绘制及多糖含量的测定方法

采用苯酚-硫酸法^[15]测定 PFCP 多糖含量,以葡萄糖为标准,于 490 nm 处测定吸光度。

1.3.3 多糖得率的测定

$$\text{得率}/\% = \frac{\text{提取的PFCP多糖重量}}{\text{金柚幼果原料重量}} \times 100\%$$

1.3.4 扫描电镜分析

根据 Xu 等^[16]的方法,通过扫描电子显微镜对 PFCP 的微观结构进行观察。将适量已烘干的多糖置于铜片上,粘贴固定好后,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 10.00 kx。

1.3.5 粒径分析

参照王小梅等^[17]方法,配置多糖溶液,采用激光粒度分析仪,在 633 nm 波长,90°散射角和 25 °C 的条件下,测定 PFCP 的粒度分布情况,并通过 CONTIN 程序进行分析。

1.3.6 分子量分布情况

精密称取 2.5 mg 冻干 PFCP,充分溶解在 1 mL KH₂PO₄ (0.02 M) 溶液中并通过 0.22 μ m 微孔过滤膜,采用高效凝胶色谱来测定样品的分子量。

色谱柱条件:TSK G-5000PWXL 凝胶柱(7.8×300 mm)和 TSK G-3000PWXL 凝胶柱(7.8×300 mm)串联,流动相为 0.02 mol/L KH₂PO₄,流速为 0.6 mL/min,柱温为 35 °C,检测器为 2414 型示差折光检测器。

1.3.7 红外光谱分析

参考 WANG 等^[18], 精密称取 2 mg 干燥多糖样品与 100 mg KBr 粉末混合, 研磨均匀后压片, 放入红外光谱仪中在 400~4000 cm^{-1} 之间进行扫描, 对所得的红外图谱进行分析。

1.3.8 单糖组成测定

单糖组成采用董洲^[19]的方法并加以修改。取各样品 4 mg 左右于安瓿瓶中, 加入 2 M TFA 1 mL, 120 $^{\circ}\text{C}$ 水解 3 h。准确吸取 200 μL 酸水解溶液转移至 1.5 mL EP 管中氮吹吹干, 加入 1 mL 水涡旋混匀, 12000 r/min 离心 5 min。取上清进 IC 分析。色谱柱: Dionex CarbpacTM PA20 (3 $\times$ 150); 流动相: A: H_2O ; B: 250 mM NaOH; C: 50 mM NaOH & 500 mM NaOAc; 流速: 0.3 mL/min; 进样量: 5 μL ; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 检测器: 电化学检测器。

1.3.9 PFCP 的免疫调节活性

1.3.9.1 PFCP 溶液的配制

用 DMEM 培养基将 PFCP 溶解后配成 1 mg/mL 的母液, 并梯度稀释成 1000 $\mu\text{g/mL}$ 、500 $\mu\text{g/mL}$ 、250 $\mu\text{g/mL}$ 、125 $\mu\text{g/mL}$ 、62.5 $\mu\text{g/mL}$ 五组金柚幼果多糖 PFCP 溶液。

1.3.9.2 内毒素的测定

多糖中内毒素的含量是用显色基质萤试剂盒来测定的, 其具体的操作步骤如下: 往试管加入 100 μL 细菌内毒素检查专用水与萤试剂, 使萤试剂完全溶解, 阴性对照试管中加入 0.1 mL 专用水, 阳性对照管中加入 100 μL 浓度 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS 溶液, 多糖样品中加入 100 μL 浓度为 1 mg/mL 的多糖溶液, 然后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温烘箱中温育 60 min, 取出反应管, 先后分别加入偶氮化试剂 1、2 和 3 溶液并混匀, 静置 5 min 后在 545 nm 处测吸光值。

1.3.9.3 细胞培养

将 RAW 264.7 解冻后迅速移入 15 mL 无菌离心管, 加入 12 mL DMEM 培养基, 混匀后离心 (1000 r/min, 5 min)。除去上清液后加入新鲜 DMEM 培养基, 用 5 mL 的移液器轻轻吹打使细胞悬浮后转移至细胞培养瓶中。将复苏后的细胞置于 CO_2 培养箱中培养 (37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2), 每两天更换一次培养基。

1.3.9.4 细胞存活率

参照罗海清^[20]的方法测定细胞的存活率。取对数生长期的 RAW 264.7 细胞, 用 DMEM 培养液调整浓度为 5×10^5 cells/mL, 以 100 μL /孔加入 96 孔板中, 后置于培养箱中贴壁培养 6 h, 吸取上清培养液, 去除未贴壁细胞。每孔加入含有 PFCP 的培养液 100 μL , 另设培养基为空白对照。培养板于培养箱中孵育 24 h 后, 按照 MTT 试剂盒操作, 检测每孔 OD 值, 计算巨噬

细胞的存活率。

$$\text{细胞存活率}/\% = \frac{\text{OD}_{\text{样品}} - \text{OD}_{\text{空白}}}{\text{OD}_{\text{对照}} - \text{OD}_{\text{空白}}} \times 100\%$$

1.3.9.5 PFCP 对小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 分泌细胞因子 (NO、TNF- α 和 IL-6) 的影响

将处于生长对数期的小鼠巨噬细胞用胰蛋白酶消化后配成细胞悬浮液, 接种在 96 孔板后置于培养箱培养 24 h 后吸去培养基, 加入 100 μL 不同浓度 (250、500、1000 $\mu\text{g/mL}$) 的 PFCP 溶液, 分别以含 DMEM 培养基和脂多糖 LPS 为空白对照组和阳性对照组, 按照 NO 和 Elisa 试剂盒说明书测定细胞上清液的 NO、TNF- α 和 IL-6 的分泌量, 每组实验三个平行。

1.3.10 数据分析

数据以平均值 $\pm$ 标准差表示, 试验设 3 个平行, 用 Origin 8.0 软件对分析数据作图, 采用 SPSS 19.0 软件, 对数据进行单因素方差分析, 并以邓肯检验比较各组之间的差异, 显著性水平为 $p < 0.05$, 以不同字母代表差异显著。

2 结果与分析

2.1 PFCP 的得率

经过超声辅助酶解法所得的金柚幼果多糖 PFCP 是一种白色絮状粉末, 多糖得率为 9.12%, 多糖含量为 5.82%。王莹等^[21]通过复合酶辅助提取柚子皮多糖, 平均得率为 8.26%, 我们推测金柚原料的成熟度与多糖含量有直接关系, 考虑到品种与提取方法的差异, 具体原因还有待进一步分析与讨论。

2.2 PFCP 的扫描电镜分析

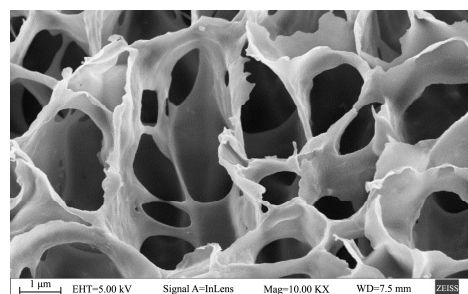


图 1 PFCP 的扫描电镜图

Fig.1 The SEM analysis of PFCP

图 1 为 PFCP 扫描电镜的分析结果, 显示在 10.00 kx 的放大倍数下 PFCP 的表面形态为密集的多孔网状结构, 且相互连接, 这可能与多糖分子间受力作用不同有关^[22], 而且这种结构对多糖的性质、生物活性等均会产生影响, 这与董洲^[23]的野葛根多糖 GE-1 组分的蜂窝多孔状结构类似, 且该组分具有一定的免疫活

性能促进小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 分泌细胞因子 NO、TNF- α 和 IL-6, 因此猜测 PFCP 也具有一定的免疫调节作用。

2.3 PFCP 的粒径分析

粒径及其分布分析结果如图 2, 结果显示金柚幼果多糖 PFCP 的体积平均粒径达为 101 μm , 分布宽, 表明该多糖在水中易形成大小不均一的聚集体, 聚集体的形成与多糖分子中的糖醛酸分布有关联^[24]。多糖微粒的粒径大小对于该多糖微粒在体内的代谢即吸收和利用有很大的影响^[25], 一般来说, 小分子物质更容易被人体的小肠吸收利用, 且多糖溶液在稀溶液中的分散度较高^[26]。

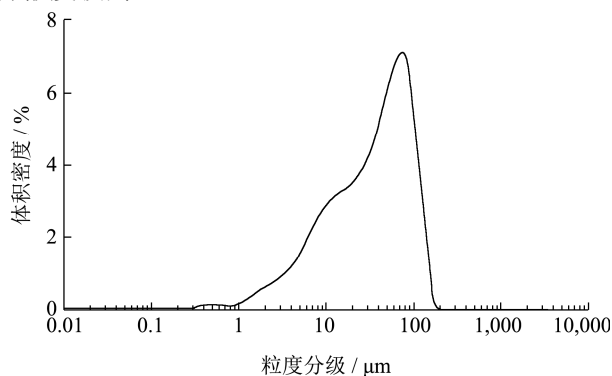


图 2 PFCP 的粒径分析图

Fig.2 The particle size analysis of PFCP

2.4 PFCP 的分子量分布

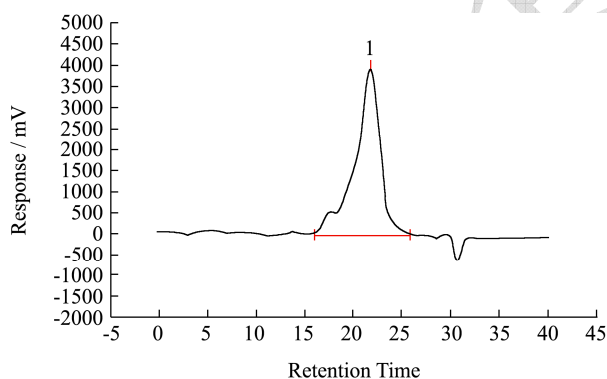


图 3 PFCP 的分子量分布图

Fig.3 The molecular weight of PFCP

图 3 的分子量分布结果显示, 图中 21 min 为多糖样品 PFCP 的色谱峰, 峰形不对称, 为多个对称的峰重叠, 说明聚合可能有多个引发点, 制备的 PFCP 多糖为尺寸不均一的共聚物^[27]。PFCP 的数均分子质量为 3.31 ku, 分子质量分布宽度为 3.26, 这与郭文^[28]分级提取的柚皮粗多糖相似, 其粗多糖 a、b、c 的分子量大小分别为 21.3 ku、2.06 ku 和 1.89 ku, 其分布宽度分别为 1.06、1.04 和 1.12。分散性程度相比较较大,

猜测可能与提取多糖过程中加入乙醇的浓度和加入的顺序有关。

2.5 PFCP 的红外光谱分析

采用傅里叶变换红外光谱仪在 4000~400 cm^{-1} 范围内对 PFCP 进行红外扫描, 结果如图 4, PFCP 样品在 3293 cm^{-1} 处的吸收峰型较宽, 是由羟基 (-OH) 的伸缩振动引起, 峰型宽是由于多糖分子有含量较高的羟基, 其分子内的氢键作用所导致^[29-31], 说明 PFCP 存在分子内的缔合。在 1724 cm^{-1} 、1652 cm^{-1} 的吸收峰分别是酰胺、羰基的特征峰, 是 C=O 的伸缩振动所引起的强吸收, 表明 PFCP 含有少量酸性多糖或存在乙酰基团。在 2922 cm^{-1} 的吸收峰是由于烷基中的 C-H 的伸缩及面外弯曲振动引起的, 包括甲基、亚甲基和次甲基的堆成与不对称伸缩振动^[32]。在 2362 cm^{-1} 的峰是氨基 N-H 弯曲振动引起的, 在 2161 cm^{-1} 炔烃是 C=C 伸缩振动引起的。据报道, 红外光谱在 1333~650 cm^{-1} 范围内为多糖的指纹区, 可用于判断多糖取代类型、几何异构、同分异构等有关分子精细结构^[19]。在 1230 cm^{-1} 、1075 cm^{-1} 、和 952 cm^{-1} 、830 cm^{-1} 处的吸收峰主要由 C-O 伸缩振动和弯曲振动吸收, 其中 1230 cm^{-1} 是由吡喃环伸缩振动引起的, 830 cm^{-1} 处的吸收峰证明存在苯环的对位取代。在 1011 cm^{-1} 的吸收峰则是糖环骨架 C-O 和 C-C 振动引起的, 623 cm^{-1} 处的吸收峰是 C-H 引起的, 该吸收峰可判断为多糖类物质的特征峰^[33]。因此, PFCP 是一种含有酸性单糖的残基聚集体, 且残基中含有苯环对位取代和吡喃环。

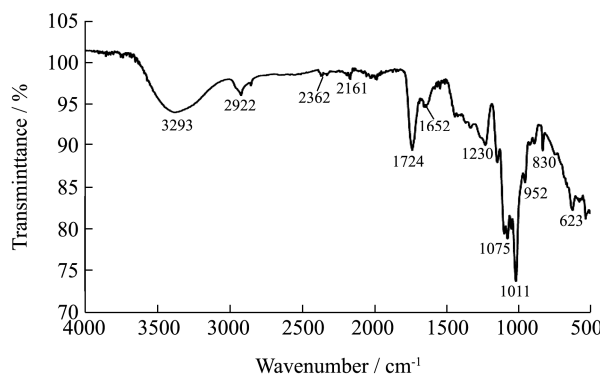


图 4 PFCP 的红外吸收光谱

Fig.4 Infrared spectroscopic analysis of PFCP

2.6 PFCP 的单糖组成分析

本研究通过离子色谱分析 PFCP 的单糖组成, 结果如图 5 所示, 根据混合标准物 (图 5a) 的出峰时间推断出 PFCP (图 5b) 是由鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖和半乳糖醛酸组成, 摩尔比为 0.056:0.138:0.463:0.059:0.186:0.285, 其中半乳糖最多,

其次为半乳糖醛酸和甘露糖,与红外光谱和粒径的分析结果一致。这与 Juan Yu 等^[34]发现的柚皮多糖的单糖组成结果相似,该柚皮多糖由鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、葡萄糖和半乳糖组成,摩尔比为 0.63:1.00:0.48:11.52:0.57,其摩尔比的差异可能是由于柚子在生长过程中各单糖的累积程度不同导致的^[35]。

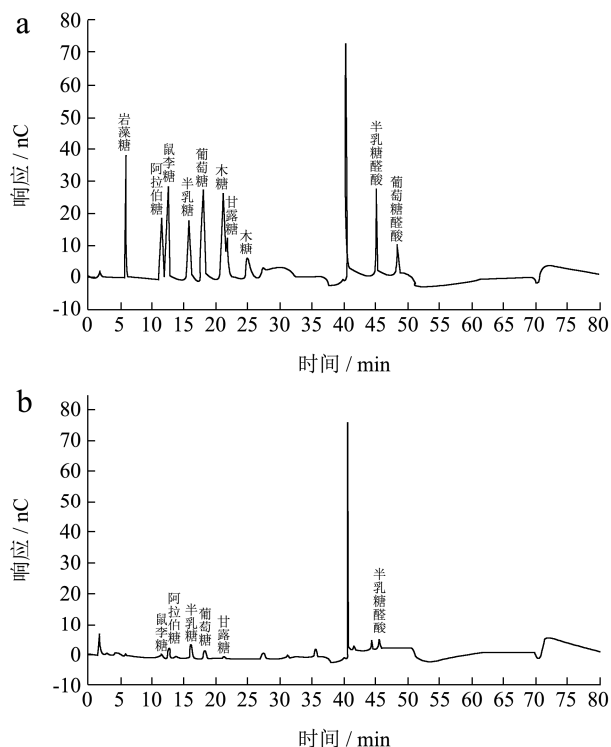


图5 单糖标准品(a)与多糖 PFCP(b) 离子色谱图

Fig.5 Ion exchange chromatographic analysis of the monosaccharide standard mixture (a) and PFCP (b)

2.7 PFCP 的免疫活性

2.7.1 内毒素的测定

为保证后续的金柚幼果粗多糖 PFCP 的免疫活性实验不受内毒素的干扰,本研究对 PFCP 进行内毒素的检测。PFCP 在 1 mg/mL 时未检出内毒素,而阳性对照 LPS 在 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 时就被检出,高达 1.45 EU/mL,少于 1.5 EU/mL,可认为对巨噬细胞的激活作用可忽略^[36],表明 PFCP 的免疫活性试验中可以排除内毒素的干扰。

2.7.2 对 RAW 264.7 细胞存活率的影响

图 6 显示,在 62.5 $\mu\text{g/mL}$ ~1000 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下,随着 PFCP 的浓度上升,小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 的存活率逐渐下降,但始终维持在 105%~120%之间,说明 PFCP 在 62.5 $\mu\text{g/mL}$ 至 1000 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度下对小鼠巨噬细胞无毒副作用,均可用于后续的免疫活性试验。

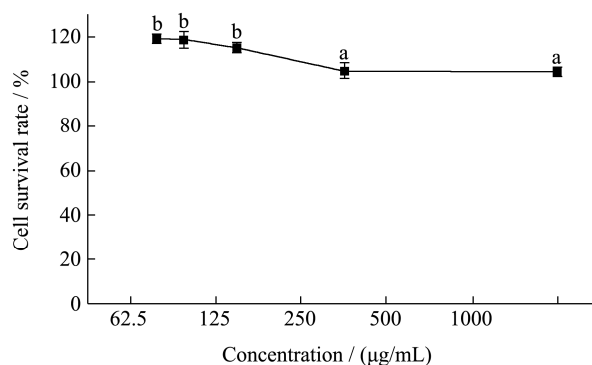


图6 不同浓度 PFCP 对小鼠巨噬细胞的毒性评价

Fig.6 Effects of PFCP on the viability to RAW 264.7 cells

注:不同浓度组之间字母不同表示差异性显著, $p < 0.05$,

下同。

2.7.3 PFCP 对 RAW 264.7 细胞表达 NO、TNF- α 和 IL-6 的影响

先天性免疫应答的刺激调节可增强机体对病原体的抵抗能力。据报道,通过激活巨噬细胞,可以对机体的免疫系统将进行调节^[37-39]。本试验研究了不同浓度 PFCP (250、500 和 1000 $\mu\text{g/mL}$) 对小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 分泌细胞因子 NO、TNF- α 和 IL-6 的作用,其结果如图 7 中 A-C 所示,可见小鼠巨噬细胞中 NO、TNF- α 和 IL-6 的表达量随着 PFCP 的浓度升高而升高,均显现出明显的剂量效应关系。

图 7a 指出,空白对照组仅分泌少量 NO (浓度为 2.57 μM),细胞经 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 和浓度梯度的 PFCP 激活后 NO 的分泌量均显著增加 ($p < 0.05$),其中在 1000 $\mu\text{g/mL}$ 时 PFCP 对 NO 表达量最高,浓度为 42.87 μM 。图 7b 结果显示,PFCP 能显著提高 TNF- α 的表达量 ($p < 0.01$),随着 PFCP 的浓度增加, TNF- α 的分泌量呈上升趋势,与空白对照组对比,经 1000 $\mu\text{g/mL}$ PFCP 处理的 RAW 264.7 细胞其表达量为 14759.47 pg/mL,为空白对照组的 9.8 倍左右。由图 7c 可知,PFCP 刺激细胞表达 IL-6 的含量明显高于空白对照组的含量 ($p < 0.01$),经 1000 $\mu\text{g/mL}$ PFCP 处理后其 IL-6 的表达水平最高,为 62.20 pg/mL。

综合上述的指标,表明 PFCP 有显著的免疫调节效果,PFCP 能显著促进小鼠 RAW 264.7 细胞中 NO、TNF- α 及 IL-6 的分泌。多糖的免疫调节效果与分子量、理化性质、单糖组成等有关, Huang 等^[40]发现荔枝果肉多糖 LP-HP 组分由半乳糖和阿拉伯糖组成,在体外显示比以葡萄糖为主要单糖的 LP-VF 和 LP-VM 组分都强的免疫调节活性, Tiffany 等^[41]报道的香菇多糖中,比较两个不同组分对巨噬细胞的刺激作用,由阿

拉伯糖、甘露糖、木糖、半乳糖组成的组分比由葡萄糖为主的组分的刺激作用强。因此,推测 PFCP 表现较强免疫调节作用的原因之一可能是其富含阿拉伯糖和半乳糖。

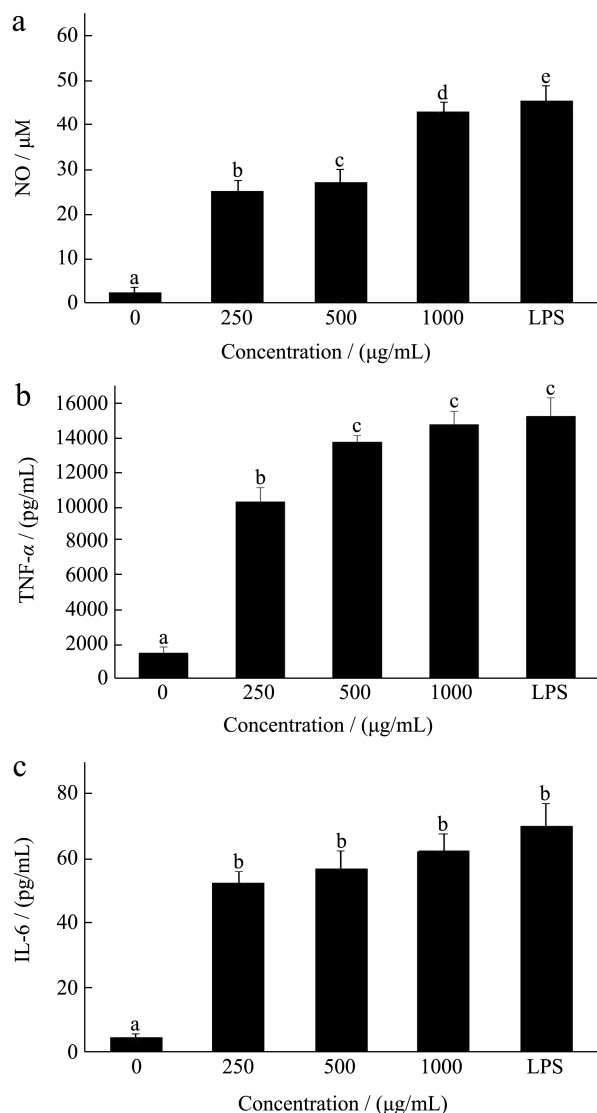


图7 不同浓度 PFCP 对小鼠巨噬细胞的 NO (a)、TNF-α (b)、IL-6 (c) 的表达

Fig.7 Effects of PFCP on the secretion levels of NO (a), TNF-α (b), IL-6 (c) to RAW 264.7 cells

3 结论

本研究以金柚幼果为对象,采用超声辅助酶解法提取的粗多糖 PFCP,是一种以半乳酸和半乳糖醛酸为主的小分子量酸性吡喃糖,具有较强的免疫活性,有关 PFCP 调节免疫的具体机制还有待进一步研究。该研究可为柚子资源的综合利用提供新思路,为金柚幼果中天然产物的开发与应用提供理论依据。

参考文献

- [1] 张鹰,王满生,曾新安,等.金柚柚皮精油提取条件优化及其抑菌性能研究[J].食品工业,2014,35(5):54-58
ZHANG Ying, WANG Man-sheng, ZENG Xin-an, et al. Study on extractive condition optimization of essential oil in pomelo peel of golden-pomelo and antibacterial activity [J]. Food Industry, 2014, 35(5): 54-58
- [2] 苏东林,单杨.柑橘果皮中功能性成分的作用概述[J].现代食品科技,2006,22(2):260-262
SU Dong-lin, SHAN Yang. Review of physiologically-active compounds in citrus peels [J]. Modern Food Science and Technology, 2006, 22(2): 260-262
- [3] 窦姣,郭玉蓉,李洁,等.苹果疏除幼果多糖TYAP-2的分离纯化及其特性研究[J].西北农林科技大学学报(自然科学版), 2016,44(2):193-200
DOU Jiao, GUO Yu-rong, LI Jie, et al. Isolation, purification and characteristics of polysaccharides TYAP-2 from young apple dredging [J]. Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition), 2016, 44(2): 193-200
- [4] 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
XU Peng-cheng. Determination of naringenin in Shatian pomelo young fruits [J]. Inner Mongolia Medical Journal, 2016, 48(4): 397-399
- [5] 王琴,刘祎帆,罗洁莹,等.响应面法优化超声-微波协同辅助提取金柚幼果总黄酮工艺[J].食品研究与开发,2020,41(2): 83-91
WANG Qin, LIU Hui-fan, LUO Jie-ying, et al. Response surface methodology for optimizing ultrasonic-microwave cooperative extraction of total flavonoids from young fruits of Jinyou [J]. Food Research and Development, 2020, 41(2): 83-91
- [6] Wang Qin, Luo Jie-ying, Liu Hui-fan. Protective effects of the flavonoid fraction obtained from pomelo fruitlets through ultrasonic-associated microwave extraction against AAPH-induced erythrocyte hemolysis [J]. RSC Adv., 2019, 9: 16007-16017
- [7] 林家逊,许有瑞,顾生玖,等.GC-MS 法分析沙田柚幼果中挥发油化学成分的研究[J].安徽农业科学.2008,36(24):10527-10537
LIN Jia-xun, XU You-rui, GU Sheng-jiu, et al. GC-MS analysis of chemical constituents of volatile oil in young fruit of Shatian pomelo [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2008, 36(24): 10527-10537
- [8] 陈庆,李超,黄婷,等.刺梨多糖的理化性质、体外抗氧化和 α-葡萄糖苷酶抑制活性[J].现代食品科技,2019,35(11):114-

- 120
CHEN Qing, LI Chao, HUANG Ting, et al. Physicochemical properties, *in vitro* antioxidant and α -glucosidase inhibitory activity of polysaccharides from Prickly pear [J]. Modern Food Science and Technology. 2019, 35(11): 114-120
- [9] JIAO Rui, LIU Ying-xia, GAO Hao, et al. The anti-oxidant and antitumor properties of plant polysaccharides [J]. Am J Chin Med, 2016, 44(3): 463-488
- [10] 沈明花,李巍,金梅花.小黄蘑多糖对 H22 荷瘤小鼠的抗肿瘤作用研究[J].中草药,2013,17(4):2433-2436
SHEN Ming-hua, LI Wei, JIN Mei-hua. Study on the antitumor effect of polysaccharides from *Pleurotus ostreatus* on H22 tumor-bearing mice [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2013, 17(4): 2433-2436
- [11] SUN Yan-dong, WANG Zai-hua, YE Qing-sheng. Composition analysis and anti-proliferation activity of polysaccharides from *Dendrobium chrysotoxum* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 62(1): 291-295
- [12] 李春龙,贾云钗.地椒多糖提取工艺研究[J].化学世界,2019, 9:549-553
LI Yong-long, JIA Yun-chai. Study on extraction technology of polysaccharides from ground pepper [J]. Chemical World, 2019, 9: 549-553
- [13] 辛泉伯,罗薇,孙可澄,等.除蛋白方式对湛江等鞭金藻多糖的组成、结构特征和体外抗肿瘤活性的影响[J].大连海洋大学学报,2019,34(3):428-435
XIN Quan-bo, LUO Wei, SUN Ke-cheng, et al. Effects of protein removal methods on the composition, structural characteristics, and antitumor activity of *Isochrysis galbana* polysaccharides in Zhanjiang [J]. Journal of Dalian Ocean University, 2019, 34(3): 428-435
- [14] 张荔菲,刘莹,王益,等.超声辅助酶法提取柚子皮多糖工艺的响应面优化[J].食品工业科技,2018,39(5):146-150
ZHANG Li-fei, LIU Ying, WANG Yi, et al. Response surface optimization of ultrasonic-assisted enzymatic extraction of polysaccharide from grapefruit peel [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(5): 146-150
- [15] 张倩茹,凌蕾,何芋岐,等.苯酚硫酸法测定苗药艾纳香中多糖含量[J].中国民族民间医药,2019,28(14):30-32
ZHANG Qian-ru, LING Lei, HE Yu-qi, et al. Determination of polysaccharides content in Miao medicine Ainaxiang by phenol sulfuric acid method [J]. Chinese Folk Medicine, 2019, 28(14): 30-32
- [16] CHEN Xu, DU Xian-feng, CHEN Pei-rong, et al. Morphologies and gelatinization behaviours of high-amylose maize starches during heat treatment [J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 157: 637-642
- [17] 王小梅.超声对麦冬多糖结构、溶液行为及生物活性影响的研究[D].西安:陕西师范大学,2013
WANG Xiao-mei. Study on the effects of ultrasound on the structure, solution behavior and biological activity of *Ophiopogon* polysaccharide [D]. Xi'an: Shaanxi Normal University, 2013
- [18] WANG Ming-chun, JIANG Chang-xing, MA Li-ping, et al. Preparation, preliminary characterization and immunostimulatory activity of polysaccharide fractions from the peduncles of *Hovenia dulcis* [J]. Food Chemistry, 2013, 138(1): 41-47
- [19] 董洲,李惠娴,张猛猛,等.野葛根酸性多糖的结构鉴定及免疫活性[J].现代食品科技,2018,34(7):68-75
DONG Zhou, LI Hui-xian, ZHANG Meng-meng, et al. Structure identification and immune activity of acid polysaccharide from radix puerariae [J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(7): 68-75
- [20] 罗海青,吴磊,强倩,等.黑蒜提取物对脂多糖诱导 RAW264.7 细胞炎症因子的影响[J].食品科技,2017,42(8): 199-205
LUO Hai-qing, WU Lei, QIANG Qian, et al. Effect of black garlic extract on lipopolysaccharide-induced inflammatory factors in RAW 264.7 cells [J]. Food Science and Technology, 2017, 42(8): 199-205
- [21] 王莹,陈圆,聂倩倩,等.复合酶法辅助提取柚子皮多糖的工艺优化[J].湖南农业科学,2018,5:86-88
WANG Ying, CHEN Yuan, NIE Qian-qian, et al. Optimization of complex enzymatic method for extraction of pomelo peel polysaccharides [J]. Hunan Agricultural Sciences, 2018, 5: 86-88
- [22] 郭振楚.糖类化学[M].北京:化学工业出版社,2005
GUO Zhen-chu. Carbohydrate Chemistry [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005
- [23] 董洲.野葛根多糖的提取、分离纯化、结构鉴定及对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 的免疫调节活性研究[D].广州:华南理工大学,2018
DONG Zhou. Extraction, isolation, purification, structure identification and immunomodulatory activity of polysaccharides from wild kudzu root on mouse macrophage RAW264.7 [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018
- [24] 王波.灵芝多糖提取、分离纯化、表征及体外抗氧化活性

- 探究[D].郑州:郑州大学,2016
- WANG Bo. Extraction, separation, purification, characterization of *Ganoderma lucidum* polysaccharide and its antioxidant activity *in vitro* [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2016
- [25] 徐春兰. *Enterobacter cloacae* Z0206 富硒多糖的制备、结构分析及其主要生物学功能研究[D]. 杭州:浙江大学,2008
- XU Chun-lan. Preparation, structure analysis and main biological function of *Enterobacter cloacae* Z0206 selenium-rich polysaccharide [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2008
- [26] 于蕾,季宇彬,高世勇,等.野西瓜多糖(CSPSI-C)表征结构研究[J].中国科技论文,2013
- YU Lei, JI Yu-bin, GAO Shi-yong, et al. Study on the characterization structure of wild watermelon polysaccharide (CSPSI-C) [J]. Chinese Science and Technology Paper, 2013
- [27] 郜珺珩.功能性高分子聚合物的合成[D].北京:北京交通大学,2016
- GAO Jun-hang. Synthesis of functional polymer [D]. Beijing: Beijing Jiaotong University, 2016
- [28] 郭文,陶红,于立梅,等.柚皮多糖提取分级及分子质量的分布[J].食品与发酵工业.2015,41(3):233-237
- GUO Wen, TAO Hong, YU Li-mei, et al. Extraction grading and molecular mass distribution of naringin polysaccharide [J]. Food and Fermentation Industries. 2015, 41(3): 233-237
- [29] 张婷,吴晖,赖富饶,等.紫芝菌丝体多糖的结构鉴定及免疫活性研究[J].现代食品科技,2017,33(4):52-61
- ZHANG Ting, WU Hui, LAI Fu-rao, et al. Structure identification and immune activity of mycelium polysaccharides from *Polygonum lucidum* [J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(4): 52-61
- [30] XING Xiao-hui, CUI Steve W, NIE Shao-ping, et al. Study on *Dendrobium officinale* o-acetyl-glucomannan (dendronan®): part ii. fine structures of o-acetylated residues [J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 117: 422-433
- [31] WEI Wei, FENG Lei, BAO Wan-rong, et al. Structure characterization and immunomodulating effects of polysaccharides isolated from *Dendrobium officinale* [J]. Planta Medica, 2016, 64(4): 881
- [32] SUN Yan-dong, WANG Zai-hua, YE Qing-sheng. Composition analysis and anti-proliferation activity of polysaccharides from *Dendrobium chrysotoxum* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 62(1): 291
- [33] Khowala L R S. Effect of pretreatment on hexavalent chromiumbiosorption and multimetal biosorption efficiency of *Trichoderma reesei* biomass [J]. Int. J. Int sci. Inn. Tech. Sec. B, 2012, 1(1): 7-15
- [34] YU Juan, YU Hai-yu, JI, LIU An-jun. Preliminary structural characteristics of polysaccharides from pomelo peels and their antitumor mechanism on S180 tumor-bearing mice [J]. Polymers, 2018, 10: 419
- [35] 甘霖,夏先强.嘉平大枣果实发育过程中糖份累积规律研究[J].西南农业大学学报,2000,22(6):510-512
- GAN Lin, XIA Xian-qiang. Study on sugar accumulation during the fruit development of jujube [J]. Journal of Southwest Agricultural University, 2000, 22(6): 510-512
- [36] CHANG Hui-hsin, P J Chien, M H Tong, et al. Mushroom immunomodulatory proteins possess potential thermal/freezing resistance, acid/alkali tolerance and dehydration stability [J]. Food Chemistry, 2007, 105(2): 597-605
- [37] 王波.灵芝多糖提取、分离纯化、表征及体外抗氧化活性探究[D].郑州:郑州大学,2016
- WANG Bo. Extraction, separation, purification, characterization of *Ganoderma lucidum* polysaccharide and its antioxidant activity *in vitro* [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2016
- [38] 王君巧,聂少平,余强,等.黑灵芝多糖对免疫抑制小鼠的免疫调节和抗氧化作用[J].食品科学,2012,33(23):274-277
- WANG Jun-qiao, NIE Shao-ping, YU Qiang, et al. Immune regulation and antioxidant effects of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* on immunosuppressed mice [J]. Food Science, 2012, 33(23): 274-277
- [39] Tseng Y, Yang J, Mau J. Antioxidant properties of polysaccharides from *Ganoderma tsugae* [J]. Food Chemistry, 2008, 107(2): 732-738
- [40] HUANG Fei, GUO Ya-juan, ZHANG Rui-fen, et al. Effects of drying methods on physicochemical and immunomodulatory properties of polysaccharide e-protein complexes from litchi pulp [J]. Molecules, 2014, 19(8): 12760-12776
- [41] Tiffany Chien Ting Lo, Yi Huei Jiang, Anne Lien Ju Chao, et al. Use of statistical methods to find the polysaccharide structural characteristics and the relationships between monosaccharide composition ratio and macrophage stimulatory activity of regionally different strains of *Lentinula edodes* [J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 584(1): 50-56