

籽用西瓜多糖的分离纯化、一级结构分析及体外生物活性研究

代彩玲, 王萍*, 李书颀, 杨永升, 于晓婧

(内蒙古农业大学, 呼和浩特 010018)

摘要:【目的】对籽用西瓜果实瓜瓢多糖进行单糖组成及其一级结构进行鉴定, 分析其与生物活性的关系, 以评价籽用西瓜多糖的利用价值。【方法】通过水提醇沉法提取籽用西瓜瓜瓢粗多糖, 使用 Sephadex-G75 (葡聚糖凝胶柱层析-G75) 和 DEAE-Sepharose (DEAE-纤维素柱层析) 色谱分离纯化粗多糖得到纯化多糖 (S I), 利用高效液相色谱法 (HPLC) 测定其相对分子质量和单糖组成, 再通过红外光谱和核磁共振进一步鉴定其一级结构, 最后采用体外抗氧化试验和体外抑菌试验分析其生物活性。【结果】纯化多糖 S I 的 HPLC 分析结果表明该多糖相对分子质量为 1 747 Da, 由甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖 7 种单糖组成, 摩尔比为 2.4:2.2:6.6:36.8:32.1:7.2:12.7; 红外光谱分析和核磁共振分析显示 S I 含有糖类化合物、糖醛酸基团和吡喃糖环的特征吸收峰, 多糖中葡萄糖和半乳糖为 α -D 构型, 甘露糖为 β -D 构型, 鼠李糖为 β -L 构型。S I 对羟自由基和 DPPH 自由基均有清除作用, 对 Fe^{3+} 具有一定还原力。S I 对酵母菌有较好的体外抑制效果。【结论】籽用西瓜瓜瓢多糖由多种单糖组成, 单糖构型多样, 具有较好的抗氧化活性和抑菌活性, 在食品和医疗保健等行业中具有很大的开发利用价值。

关键词: 籽用西瓜; 多糖; 分离纯化; 结构鉴定; 体外生物活性

中图分类号: S651

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2020)08-1196-11

A studies on the extraction, purification, structure identification of polysaccharides from seed watermelon and their biological activities

DAI Cailing, WANG Ping*, LI Shujie, YANG Yongsheng, YU Xiaojing

(Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, Inner Mongolia, China)

Abstract: 【Objective】Seed watermelon (*Citrullus lanatus* var. *megalasnemus* Lin et Chao) is rich in the phytochemical compounds such as polysaccharides, pectin, vitamins, trace elements, amino acids and so on, and thus has high nutritional value and benefit to human health. But, at present, seed watermelon is mainly used to get seeds as a snack, while the peel and pulp are discarded creating huge waste of resources. It is well known that polysaccharides have many biological functions, and their biological activity is closely related to their chemical structures. However, to date there have been few studies on the monosaccharide components and antioxidant activity of polysaccharides in seed watermelon. The purpose of this study was to identify the monosaccharide components in seed watermelon and their primary structures and biological activities. The results will be helpful for utilization of seed watermelon polysaccharides as a potential natural antioxidant in the food and pharmaceutical industry. 【Methods】‘Neimeng Heizhongpian’ seed watermelon pulp was used as the material to extract crude polysaccharides using water extraction and alcohol precipitation method. Effects of extraction time, extraction temperature and material-liquid ratio on the yield of crude polysaccharide were studied through an orthogonal experiment of $L_9(3^3)$ to optimize the extraction protocol to improve polysaccharide extraction yield.

收稿日期: 2019-12-08 接受日期: 2020-05-07

基金项目: 内蒙古科技计划项目 (20090707、20100704、20110711、20120212), 内蒙古自然科学基金项目 (2016MS0356)

作者简介: 代彩玲, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为高寒区蔬菜栽培与生理。Tel: 13694712079, E-mail: 765145036@qq.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 13514715879, E-mail: wangping@imau.edu.cn

Proteins and pigments were removed from the crude polysaccharides by Sevag and by activated carbon, respectively, and polysaccharides were purified by Sephadex-G75 chromatography. The purified polysaccharides S I, S II and S III were obtained through DEAE-Sepharose chromatography. The polysaccharide fraction defined as S I with the highest contents of polysaccharides and uronic acids was used for qualitative analysis of monosaccharide component, and the relative molecular weight was measured by HPLC. The structures of S I were studied by IR and NMR. Finally, antioxidant activity and antibacterial activity of S I were measured *in vitro*. The antioxidant activity was quantified by hydroxyl radical scavenging capacity, 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging capacity, and ferric ion reducing antioxidant power (FRAP). Antimicrobial activities of S I were studied through determining bacteriostatic diameter. *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Rhizopus nigricus*, *Aspergillus niger* and yeast were selected as the test strains.【Results】S I, which accounted for 70.26% of polysaccharide and 7.09% of uronic acid, was chosen for subsequent research. The results showed the relative molecular weight of S I was 1 747 Da. It was composed of mannose, rhamnose, galacturonic acid, glucose, galactose, xylose and arabinose with a molar ratio of 2.4:2.2:6.6:36.8:32.1:7.2:12.7. S I had some characteristic absorption peaks in the range of 400-4 000 cm^{-1} . The three absorption peaks within 950-1 250 cm^{-1} indicated that S I contains pyran ring and furan ring. There were several vibration absorption peaks within 750-920 cm^{-1} , suggesting that S I probably contains xylose, rhamnose, arabinose and mannose and other monosaccharides. The hydrogen signal peak of the $^1\text{H-NMR}$ spectra in 4.971 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and 5.124 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and the carbon signal peak of the $^{13}\text{C-NMR}$ spectra in 98.11 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and 101.55 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ showed that the S I contains α -D-glucose and α -D-galactose. Similarly, the hydrogen signal peak of the $^1\text{H-NMR}$ spectra in 4.887 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and 4.686 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and the carbon signal peak of the $^{13}\text{C-NMR}$ spectra in 94.6 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ indicated that the S I contains β -D-mannose and β -L-rhamnose. *In vitro* antioxidant experimental results showed that S I possesses high activities of scavenging hydroxyl free radical and DPPH radical as well as high FRAP, and the antioxidant capacity of S I had dose-dependent manner within certain concentration range, but its antioxidant activity was lower than VC. *In vitro* antimicrobial test results showed that S I possessed some antimicrobial activity and had certain specificity, as it had had no inhibitory effect on black *Rhizopus nigricans* and *Aspergillus niger*, a weak inhibitory effect against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*, and a strong inhibitory effect on yeast, and the inhibition ability increased with the increase in S I concentration.【Conclusion】The result showed that polysaccharides of seed watermelon pulp possess antioxidant and antimicrobial activity *in vitro*, which is closely related to their chemical structure. They can be potentially used as natural antioxidant for food and pharmaceuticals industries.

Key words: Seed watermelon; Polysaccharides; Separation and purification; Structure identification; Bioactivity

籽用西瓜 (*Citrullus lanatus* var. *megalasnemus* Lin et Chao) 简称籽瓜, 在我国新疆、甘肃、内蒙古、宁夏、广西等地区广泛种植, 年播种面积约 32 万 hm^2 , 产值近 55 亿元^[1]。籽瓜在生产中主要以取籽为目的, 利用率仅为 5%~7%, 占 90% 以上的瓜瓤和瓜皮常被丢弃在农田, 造成了资源的浪费和环境污染^[2-4]。然而, 籽瓜瓜瓤中含有多种营养物质, 如果胶、多糖、维生素、氨基酸和微量元素等^[5], 籽瓜瓤汁

可溶性糖含量低, 富含多种氨基酸、维生素及多种微量元素, 具有利尿、润肺、健脾的功效, 具备低脂、低糖、低热量的特性, 对糖尿病、肥胖症有辅助医疗作用^[6]。

籽瓜瓜瓤中含有 2%~5% 的多糖^[7-8], 目前籽瓜多糖的研究主要集中在提取方法方面^[8-9], 有关籽瓜多糖的单糖组成的研究报道较少, 而且各研究结果不完全一致。宋珅等^[7]采用气相色谱-质谱联用仪分析

了甘肃省靖远县籽瓜瓜瓢多糖的单糖组成,结果表明由6种单糖组成,而张美枝等^[10]将纯化后的粗多糖通过高效离子色谱法测定表明内蒙古巴盟磴口县的籽瓜瓜瓢多糖由七种单糖组成并具有一定的抗氧化活性。在籽瓜多糖的生物活性研究方面,主要集中在抗氧化活性方面,刘琴等^[11]研究了籽瓜多糖对 H₂O₂ 致 PC12 细胞氧化应激损伤的影响及其机制,研究表明籽瓜瓜瓢多糖对 H₂O₂ 致 PC12 氧化损伤细胞有保护作用。钱雅雯等^[9]通过分析不同浓度的籽瓜多糖与甘氨酸和牛磺胆酸钠的结合能力,评价了籽瓜多糖体外降血脂的作用,结果表明籽瓜多糖有较好的降血脂活性。以上有关籽瓜多糖的研究主要集中在单糖组成或体外抗氧化实验方面,还未见有关籽用西瓜多糖的组成、结构及其与生物活性关系的系统报道。

由于多糖的生物活性与其结构特征如分子量大小、单糖组成及比例、糖醛酸含量和糖苷键类型等密切相关^[12],因此,非常有必要对籽用西瓜多糖分子质量、单糖组成及其比例、糖苷键等初级结构特征进行鉴定分析,并阐明其多糖结构特征与生物活性的构效关系,为今后籽用西瓜多糖的生物活性作用机制和应用提供数据支持和理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

试验材料为籽用西瓜品种‘内蒙黑中片’,2017年5月3日温室育苗,5月20日定植于内蒙古农业大学示范园区实验基地,大田栽培,人工套袋授粉,双蔓整枝,一蔓一瓜,成熟后取瓜瓢冷冻保存于-20℃冰箱备用。

Sephadex-G75 北京瑞达恒辉科技发展有限公司;DEAE Sepharose Fast Flow Solarbio Life Sciences;1,1-二苯基-2-硝基苦肼、2,4,6-三嘧啶基三嗪、葡聚糖标准品、1-苯基-3-甲基-5-吡啶酮均购于上海麦克林生化科技有限公司;大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、黑根霉、黑曲霉、酵母菌均由内蒙古农业大学生命科学院提供。

1.2 仪器与设备

DBS-100 电脑全自动部分收集器(上海沪西分析仪器厂有限公司);TU-1910 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);SX-500 灭菌锅(TOMY DIGITAL BIOLOGY CO, LTD);超

净工作台(哈尔滨市东联公司);Nicolet i S50 型红外光谱仪(赛默飞世尔科技公司);Bruker 型核磁共振仪(布鲁克(北京)科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 籽用西瓜瓜瓢粗多糖的提取 将籽用西瓜瓢捣碎成小块,真空冷冻干燥后粉碎得到籽用西瓜瓢粉。称取5g籽用西瓜瓢粉,按一定料液比与蒸馏水混合,搅拌均匀后在一定温度下水浴加热一段时间,真空抽滤并离心,吸取上清液,浓缩至1/3体积后沉淀离心,收集沉淀,真空冷冻干燥即得籽用西瓜瓢粗多糖。

通过单因素试验测定温度、提取时间、料液比对粗多糖得率的影响。固定其他因素,分别在不同温度(40、60、80、95、100℃)、不同提取时间(1、2、3、4、5h)、不同料液比(1:60、1:80、1:100、1:120、1:140)条件下提取粗多糖,按下式计算粗多糖得率。筛选出最佳提取温度、提取时间、料液比。

粗多糖得率/%=粗多糖质量/籽用西瓜瓢粉质量×100。

各因素依据单因素试验中的最佳值确定出三个正交试验水平,对提取温度(A)、提取时间(B)、料液比(C)进行三因素三水平正交试验,从而消除各因素之间的相互作用,进一步优化籽用西瓜瓢粗多糖提取条件,试验因素水平见表1。

表1 正交试验因素水平

Table 1 Orthogonal test factor level

水平/因素 Level/Factor	A 提取温度 A extraction temperature/℃	B 提取时间 B extraction time/h	C 料液比 C Solid-liquid ratio/(g·mL ⁻¹)
1	85	2.5	90
2	90	3.0	100
3	95	3.5	110

1.3.2 籽用西瓜瓜瓢粗多糖的总糖含量测定与检验 采用苯酚-硫酸法测^[13]定多糖含量,得到葡萄糖标准曲线以及线性回归方程 $y=0.1451x-0.1479$, $R^2=0.9996$ 。将多糖样品配制成一定浓度,按照同样方法测定出吸光度值,代入标准曲线计算出多糖的含量。分别采用苯酚-硫酸法、蒽酮-硫酸法、molish 反应、茚三酮反应和紫外光谱扫描检验多糖。

1.3.3 籽用西瓜瓜瓢粗多糖的分离纯化 采用 Sevage 法脱蛋白,活性炭粉末脱除色素,然后将多糖溶液经过 Sephadex-G75 层析柱经蒸馏水洗脱,采用苯酚-硫酸法比色,将多糖分离成单一分子质量的

多糖。然后将经过 Sephadex-G75 柱层析的单一分子质量的多糖配制成为一定浓度的水溶液,经过 DE-AE Sepharose Fast Flow 层析柱,依次用蒸馏水和不同浓度的 NaCl(0.1、0.3、0.5 mol·L⁻¹)洗脱,经透析得到纯化后多糖样品。

1.3.4 籽用西瓜瓜瓢纯化多糖的糖醛酸含量测定采用硫酸-咔唑法测定糖醛酸含量^[14],以葡萄糖糖醛酸作为对照品,得到标准曲线以及回归方程 $y = 0.1301x - 0.1228$, $R^2 = 0.9992$,依据标准曲线测定纯化后多糖样品中糖醛酸含量。

1.3.5 籽用西瓜瓜瓢纯化多糖的初级结构鉴定(1)分子质量测定。采用高效液相色谱法(HPLC)测定纯化后多糖的分子质量。色谱柱条件及标准曲线的绘制参照郭燕娇等^[15]的方法,葡聚糖标准品分子质量分别为 708、642、337、194、107、47.1、21.1、9.6、6.1 ku,得到标准曲线方程为 $y = -1.53x + 20.43$ ($R^2 = 0.9983$)。

(2)单糖组成分析。采用三氟乙酸 N₂ 吹排法将纯化多糖水解为单糖^[11]。单糖组成测定采用 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮柱前衍生高效液相色谱(PMP-HPLC)法,参照郭燕娇等^[15]的方法。

(3)籽用西瓜瓜瓢纯化多糖红外光谱分析。称取籽用西瓜纯化多糖 1 mg, KBr100 mg, 将其置于研钵中混合,研磨成粉末后在红外模具上压片,在红外光谱仪系统中进行扫描鉴定,扫描波数范围是 400~4 000 cm⁻¹,初步测定多糖结构。

(4)籽用西瓜瓜瓢纯化多糖核磁共振分析。称取 20 mg 籽用西瓜瓜瓢纯化多糖,溶解在 0.5 mL 重水中,震荡使其充分溶解后转移至核磁管中,在 Bruker 型核磁共振波谱仪上,600 MHz 条件下测定其 ¹H NMR, 150 MHz 条件下测定其 ¹³C NMR 谱。

1.3.6 籽用西瓜瓜瓢多糖的生物活性测定 (1)籽用西瓜瓜瓢多糖抗氧化活性测定。将纯化多糖溶液分别配制成 20、40、60、80、100 μg·mL⁻¹ 质量浓度梯度备用,以同样质量浓度的维生素 C 做对照。采用硫酸亚铁-水杨酸法^[16]测定精多糖对羟自由基的清除能力,采用甲醇-DPPH 法^[17]测定精多糖对 DPPH 自由基的清除能力,采用 FRAP 法测定精多糖还原力^[18]。

(2)籽用西瓜瓜瓢多糖抑菌活性分析。配制培养基并灭菌,细菌培养采用营养琼脂培养基,真菌培养采用马铃薯葡萄糖琼脂培养基。将冷冻保存的菌种反复接种于新的培养基上培养活化至少三

代。然后采用滤纸圆片法测定多糖抑菌活性,多糖质量浓度分别为 0.1、0.3、0.5、1、3、5、50、100 mg·mL⁻¹,每个质量浓度重复 3 次,以无菌水做空白对照。将细菌倒置于 37 °C 的培养箱中培养 24 h,真菌倒置于 28 °C 培养箱中培养 2~3 d,测量抑菌圈直径大小。

1.4 数据分析

所有原始数据均使用 Excel2016 和 SPSS18.0 软件分析。

2 结果与分析

2.1 籽用西瓜瓜瓢粗多糖提取工艺优化

提取温度、提取时间、料液比各个因素对多糖得率的影响见图 1。由图 1-A 可以看出,随着水浴

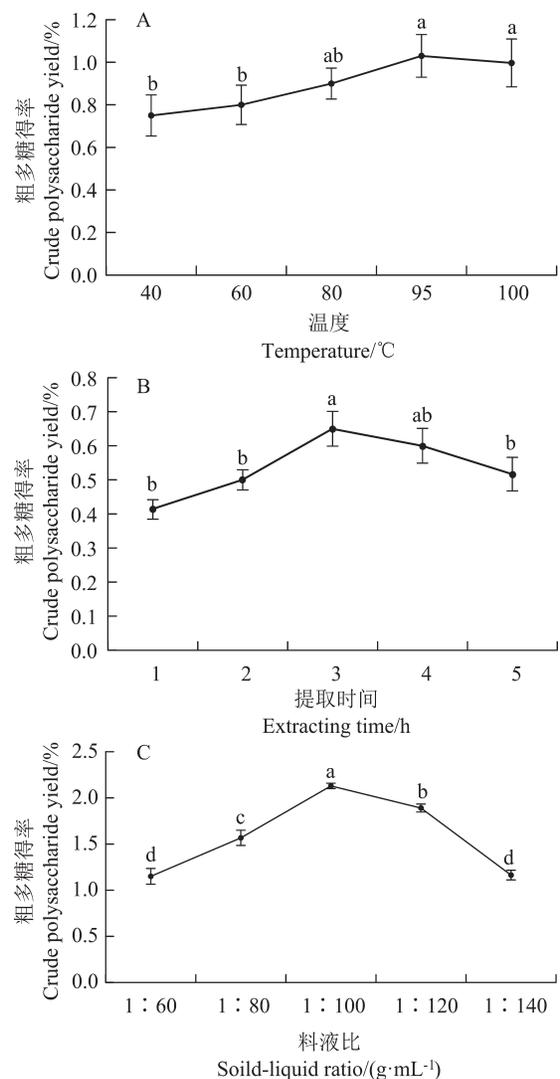


图1 温度(A)、提取时间(B)和料液比(C)对籽用西瓜瓜瓢粗多糖得率的影响

Fig. 1 Effect of temperature, extraction time and ratio of solid-liquid ratio on the yield of crude polysaccharides from seed watermelon pulp

温度的升高粗多糖得率持续增大,在 95 ℃时多糖得率达到最大值。随着提取时间的延长,多糖得率先增大后减小,在提取 3 h 的时候多糖得率是最高的(图 1-B),说明一定范围内延长有利于多糖溶解,提高提取率,超过最适时间反而使多糖转变为其他物质,从而降低提取率。多糖得率伴随料液比的增加先增大后减小,1:100 为最佳料液比(图 1-C),这可能是因为一定范围内增加料液比可使多糖充分溶解至溶液,而持续增加料液比会使浓缩倍数

不够,多糖浓度较低,从而在乙醇沉淀时造成多糖损失较多。

通过正交分析以及利用 SPSS 18.0 进行方差分析可知,各个因素对粗多糖提取率的影响差异很大, $R_A > R_C > R_B$,即温度 > 料液比 > 提取时间,且温度的影响达到了极显著。最佳提取工艺为 $A_3B_3C_2$,即温度为 95 ℃,提取时间为 3.5 h,料液比为 1:100。结果见表 2 和表 3,在最佳工艺条件下,测得籽用西瓜瓜瓢粗多糖得率为

表 2 籽用西瓜瓜瓢粗多糖提取的正交试验结果

Table 2 Orthogonal test results of crude polysaccharides extraction from seed watermelon pulp

序号 The serial number	因素 Factors			粗多糖得率 Crude polysaccharide yield/%
	A 温度 A The temperature/℃	B 提取时间 B Extracting time/min	C 料液比 C Solid-liquid ratio/(g · mL ⁻¹)	
1	1	1	1	1.72
2	1	2	2	1.81
3	1	3	3	1.87
4	2	1	2	2.06
5	2	2	3	2.11
6	2	3	1	1.96
7	3	1	3	2.13
8	3	2	1	2.23
9	3	3	2	2.30
K1	1.80	1.97	1.97	
K2	2.04	2.05	2.06	
K3	2.22	2.04	2.04	
R	0.42	0.08	0.09	

表 3 粗多糖提取的正交试验方差分析结果

Table 3 Anova results of orthogonal test for extraction of crude polysaccharides

变异来源 Sources of variation	III型平方和 Type III sum of squares	自由度 Degrees of freedom	均方 Mean square	F值 F value	显著性 Significant
温度 Temperature/℃	0.804	2	0.402	12.562	0.000
提取时间 Extracting time/h	0.036	2	0.018	0.561	0.579
料液比 Solid-liquid ratio/(g · mL ⁻¹)	0.038	2	0.019	0.590	0.564
误差 Error	0.640	20	0.032		
校正总计 Total correction	1.519	26			

注: $R^2 = 0.578$ (调整 $R^2 = 0.452$)。

Note: $R^2 = 0.578$ (adjusted $R^2 = 0.452$).

2.37%。

2.2 籽用西瓜瓜瓢粗多糖的总糖含量测定及多糖检验

通过标准曲线方程,计算出籽用西瓜粗多糖中总糖含量为 5.62%。脱除蛋白质和色素后的粗

多糖经过苯酚硫酸法检验,在交界处出现棕色环;通过蒽酮硫酸法检验,样品颜色由无色变成绿色;经 molish 反应,在样品与硫酸的交界处呈现紫色环,均可说明样品确实为糖类化合物。经过茚三酮反应,溶液为无色透明;同时经过紫外光谱检验

无核酸(260 nm)和蛋白质(280 nm)的特征吸收峰,如图2,说明该粗多糖不含蛋白质和核酸。

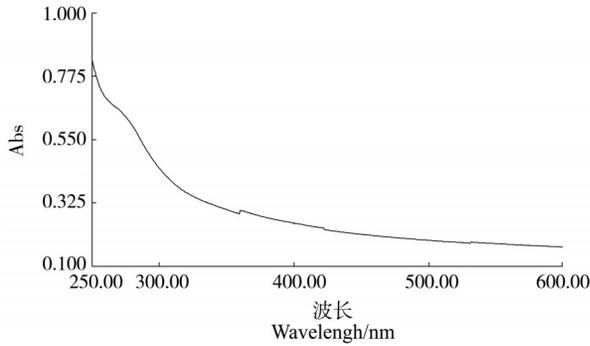


图2 籽用西瓜瓜瓢粗多糖紫外光谱扫描图

Fig. 2 UV spectrogram of crude polysaccharides from seed watermelon pulp

2.3 籽用西瓜瓜瓢粗多糖的分离纯化

籽用西瓜瓜瓢粗多糖经 Sephadex-G75 柱层析收集洗脱液与苯酚-硫酸法反应后测定 490 nm 处吸光值并作图3。由图3可看出呈现出大小两个吸收峰,由于小的吸收峰多糖含量太低,不做回收,合并

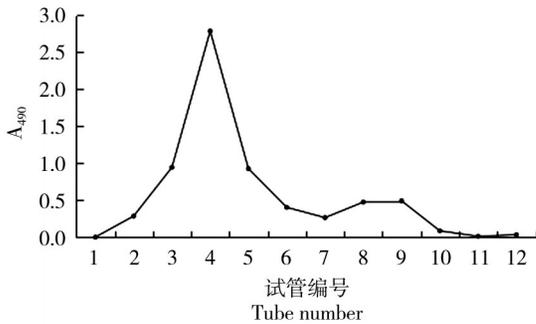


图3 籽用西瓜瓜瓢多糖的 The sephadex-G75 洗脱曲线

Fig. 3 The sephadex-G75 elution curve of polysaccharides from seed watermelon pulp

收集大的吸收峰对应的试管中的溶液,即为含量高且单一分子质量的多糖,进行后续的研究。

将图3得到的含量高且单一分子质量的多糖经过 DEAE Sepharose Fast Flow 柱层析分别使用蒸馏水、 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaCl}$ 、 $0.3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaCl}$ 、 $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaCl}$ 溶液洗脱后与苯酚-硫酸法反应后测定 490 nm 的吸光值绘制得到图4。由图4可知,粗多糖经不同浓度 NaCl 溶液洗脱后得到了三个吸收峰,依次为 13~20 号管之间的酸性多糖 I,命名为 S I; 25~33 号管之间的酸性多糖 II,命名为 S II; 39~45 号管之间的酸性多糖 III,命名为 S III。

S I、S II 和 S III 的多糖含量和糖醛酸含量如表4,其由高到低均为: S I > S III > S II,因此选择 S I 进行后续研究。

2.4 籽用西瓜瓜瓢多糖结构鉴定

2.4.1 籽用西瓜瓜瓢多糖分子质量测定和单糖组成分析 (1)相对分子质量测定。如图5所示,S I 在 15.469 min 时出现了一个很高的吸收峰,结合葡聚糖标准品的标准曲线方程,可测得 S I 的相对分子质量是 1 747 Da,为小分子质量多糖。

(2)单糖组成分析。如图6可知,将 S I 多糖水解为单糖后和各个单糖标准品的高效液相色谱分析对照可以得到多糖 S I 的单糖组成是:甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖和阿拉伯糖。

计算多糖的高效液相色谱图中各个吸收峰的面积,可得到 S I 中各单糖组分及摩尔比为:甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖,摩尔比为 2.4:2.2:6.6:36.8:32.1:7.2:12.7,

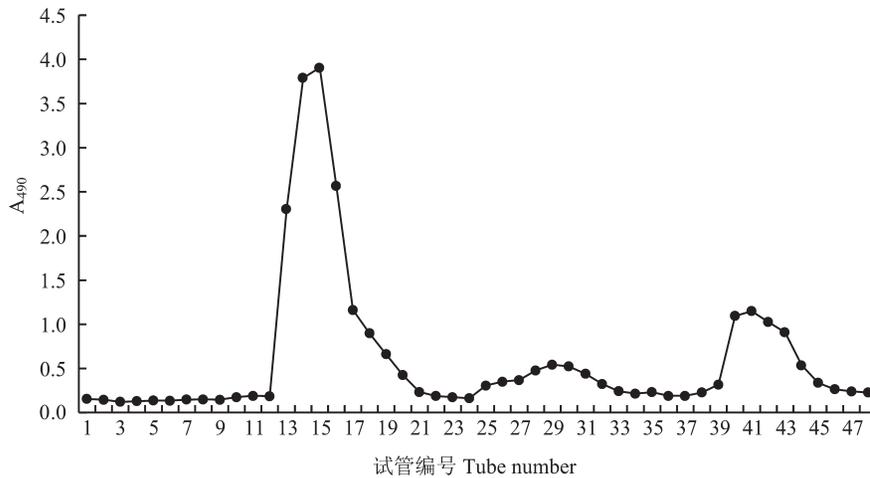


图4 籽用西瓜瓜瓢多糖 DEAE sepharose fast flow 柱层析洗脱曲线

Fig. 4 DEAE sepharose fast flow column elution curve of polysaccharide from seed watermelon pulp

表4 DEAE Sepharose Fast Flow 柱层析洗脱出的各组分多糖含量

Table 4 The Contents of each polysaccharide component though DEAE Sepharose Fast Flow column

多糖组分名称 Polysaccharide component name	质量 Mass/g	w(多糖) Polysaccharide content/%	w(糖醛酸) Uronic acid content/%
S I	1.45±0.06	70.26±0.82	7.09±0.11
S II	1.20±0.06	51.71±0.66	4.93±0.10
S III	0.59±0.08	65.38±0.62	5.76±0.09

表明籽用西瓜瓜瓢多糖的单糖组成以葡萄糖为主。
2.4.2 籽用西瓜瓜瓢多糖红外光谱分析官能团和化学键 由图7可以看出,多糖的红外光谱测定显示 3 876.63 cm⁻¹、3 835.46 cm⁻¹和 3 300 cm⁻¹吸收峰为游离-OH 和缔合-OH 伸缩振动吸收峰,推测存在醇羟基和多个分子间氢键,2 900 cm⁻¹处吸收峰为饱和 C-H 伸缩振动吸收峰,由此可初步确定该化合物为糖类物质;1 641.41 cm⁻¹和 1 426.36 cm⁻¹为 COOH

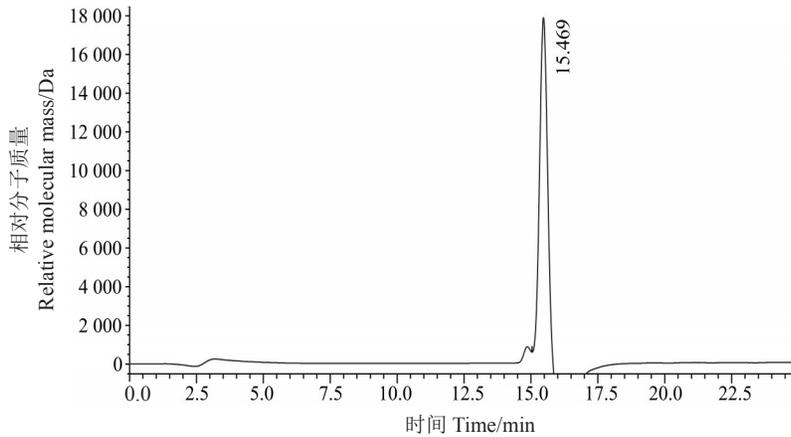


图5 籽用西瓜瓜瓢多糖 S I 的高效液相色谱分析图谱

Fig. 5 HPLC analysis of polysaccharide S I from seed watermelon pulp

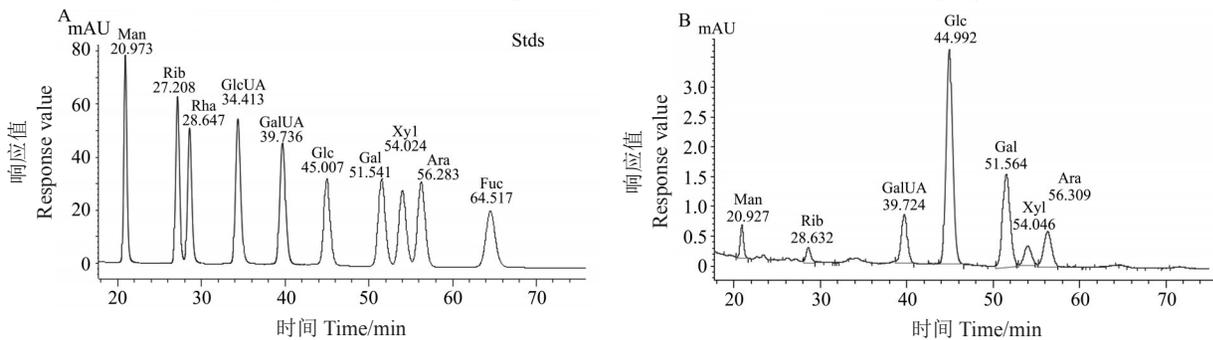


图6 单糖标准品(a)和籽用西瓜瓜瓢多糖 S I (b)水解产物的高效液相色谱分析图谱

Fig. 6 PMP- HPLC analysis of monosaccharide standards (a) and all monosaccharides from the hydrolysate of S I from seed watermelon pulp(b)

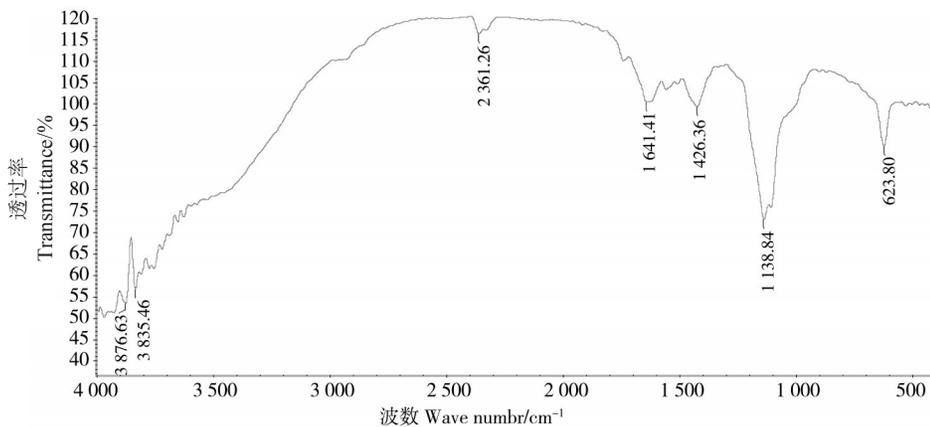


图7 籽用西瓜瓜瓢多糖 S I 的红外光谱图

Fig. 7 Infrared spectrum of polysaccharide S I from seed watermelon pulp

中 C=O 和 C-O 吸收峰,推测可能含有糖醛酸; 1 138.84 cm^{-1} 为环上 C-O 伸缩振动吸收峰,在 950~1 250 cm^{-1} 有三个吸收峰,表明含有吡喃环,且其中有两个吸收峰较强,一个吸收峰较弱,表明可能有呋喃环叠加伸缩振动峰^[12]; 750~920 cm^{-1} 有多个伸缩振动吸收峰,表明可能存在木糖、鼠李糖、阿拉伯糖、甘露糖等,其中 759 cm^{-1} 左右代表木糖特征吸收峰,810 cm^{-1} 左右代表甘露糖特征吸收峰,830 cm^{-1} 左右为鼠李糖特征吸收峰,840 cm^{-1} 为 α -糖苷键特征吸收峰,842.64 cm^{-1} 为阿拉伯糖特征吸收峰^[19], 915.67 cm^{-1} 为 α -D-葡萄糖特征吸收峰,623.80 cm^{-1} 为 C-H 平面外弯曲伸缩震动吸收峰^[20]。

2.4.3 籽用西瓜瓜瓤精多糖核磁共振鉴定分子结构 由图 8 的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图上分析得到,S I 溶剂峰左侧存在两组端基质子信号峰,分别在 4.971 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、5.124 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 且均大于 4.95 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,可以确定其构型为 α 型,结合 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱图上 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 附近出现的 98.11 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 101.55 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 两组信号,表明含有两个异头碳,可推测出该化合物含有 α -D-葡萄糖和 α -D-半乳糖两种单糖。 $^1\text{H-NMR}$ 谱图上 4.887 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 4.686 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 两组信号均小于 4.95 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,可以确定为 β 型,结合 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱图上 94.6 附近的多组信号,推测该化合物含有 β -D 甘露糖和 β -L 鼠李糖^[12]。此外, $^{13}\text{C-NMR}$ 谱图中 62 附

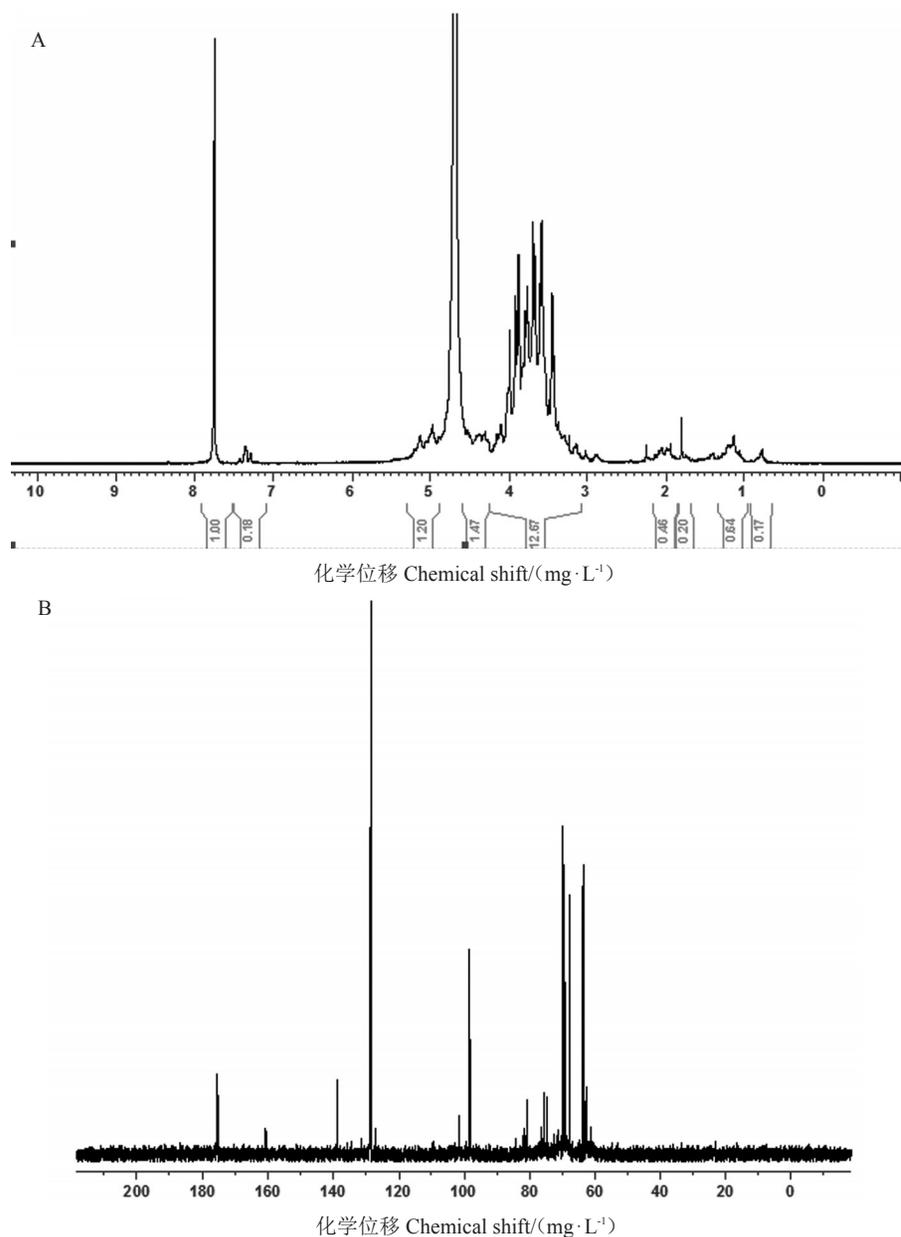


图 8 籽用西瓜瓜瓤多糖 S I $^1\text{H-NMR}$ (A)谱图和 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱图(B)

Fig. 8 $^1\text{H-NMR}$ (A) and $^{13}\text{C-NMR}$ (B) spectra of polysaccharide S I from seed watermelon pulp

近为 CH_2OH 信号, 68~85 为 CHOH 信号。170~185 有 175.30 羧基信号峰, 结合红外光谱 $1\ 641.41\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 426.36\ \text{cm}^{-1}$ 吸收峰推测可能含有半乳糖醛酸。

2.5 籽用西瓜瓜瓢多糖生物活性分析

2.5.1 籽用西瓜瓜瓢多糖抗氧化活性测定 多糖 S I 对羟自由基、DPPH 自由基的清除率和还原力均表现出随着多糖浓度的增加逐渐上升的趋势, 但均低于同浓度下维生素 C 的清除能力及还原力(图 9)。经计算籽用西瓜瓜瓢多糖对羟自由基和 DPPH 自由基清除率 IC_{50} 值分别为 $9.27\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $13.92\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 有研究显示沙棘多糖对羟自由基清除率 IC_{50}

值分别为 $0.97\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $1.55\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ [21], 这表明籽用西瓜瓜瓢多糖对两种自由基的清除率高于沙棘多糖。

2.5.2 籽用西瓜瓜瓢多糖抑菌活性测定 多糖 S I 对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和大肠杆菌三种细菌在较低浓度下均没有抑制作用, 当质量浓度达到 $100\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时有微弱抑制效果, 但抑菌圈直径均 $<5\ \text{mm}$, 抑菌效果不明显。各个浓度的多糖 S I 对黑根霉和黑曲霉没有抑制作用, 但对酵母菌表现出抑制作用, 且随着多糖浓度的增大, 抑菌作用增强。在多糖质量浓度 $<50\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 抑菌圈直径 $<5\ \text{mm}$, 抑菌效果较弱; 当多糖质量浓度 $\geq 50\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 抑菌圈直径为 $5\sim 10\ \text{mm}$, 抑菌效果增强(表 5)。

3 讨论

由于多糖的分子结构与其生物学活性具有密切的关系, 多糖构效关系研究表明, 多糖抗氧化活性的强弱与多糖的相对分子质量、单糖组成、构型和糖苷键连接方式等结构特征的多方面因素有关 [12]。因此, 从多糖的结构入手可以更深入的揭示其生物活性的机制。本研究表明籽用西瓜多糖表现出较强的抗氧化活性, 且随质量浓度的增加而增加, 呈现一定的剂量-效应关系。这种特性与结构密切相关, 红外光谱和核磁分析表明籽用西瓜瓜瓢多糖含有较高糖醛酸, 糖醛酸含有丰富的羧基和羟基, 能够给 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{DPPH}\cdot$ 提供氢, 氢可以与自由基结合, 形成稳定的自由基来终止自由基反应, 还可以提供电子还原 Fe^{3+} , 阻止自由基产生。因此, 籽用西瓜瓜瓢表现出一定的抗氧化活性。此外, 籽用西瓜瓜瓢多糖属于小分子质量的酸性多糖, 7 种单糖组成中葡萄糖含量最高, 这种结构特征对其抗氧化活性的影响已有文献报道。Mao 等 [22] 研究发现毛竹多糖中主要单糖是葡萄糖的组分对 DPPH 自由基清除能力最强, 朱晓冉等 [23] 报道木耳低分子质量多糖抗氧化活性强于高分子质量多糖, 这可能是对于相同质量的多糖溶液, 低分子质量多糖组分的物质的量摩尔浓度要高于其高分子质量, 进而多糖的多羟基醛还原性末端会增多, 抗氧化活性较高。

多糖是通过与细菌或真菌的蛋白质、磷脂等结合从而影响细菌和真菌的代谢来达到抑菌效果的, 所以抑菌活性与多糖的结构有关, 此外, 高春燕等 [24] 研究表明多糖抑菌活性受 pH 值的影响。本研究对

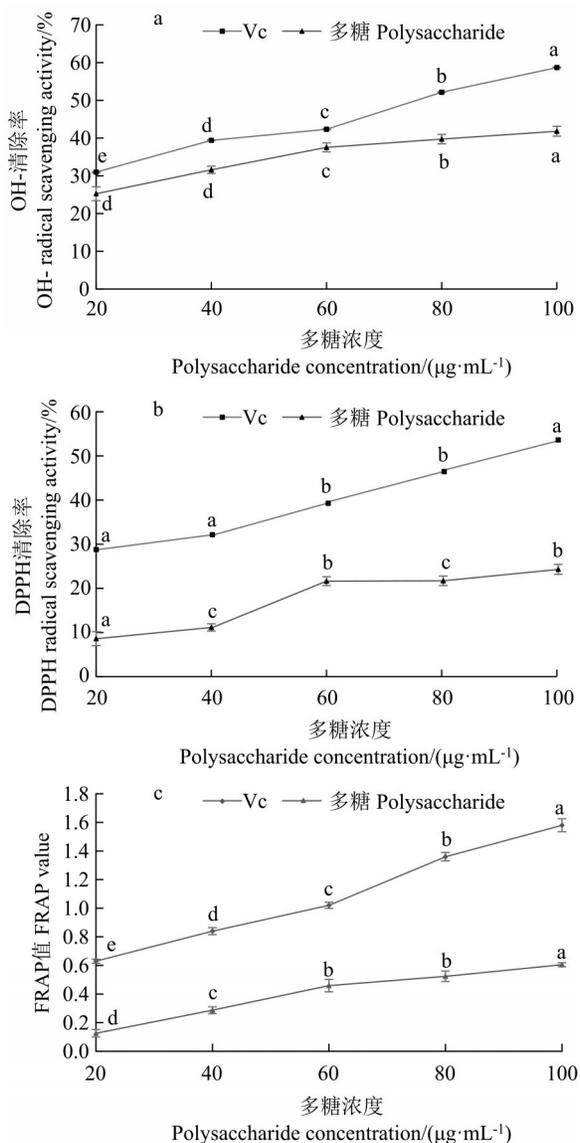


图9 籽用西瓜瓜瓢多糖 S I 对羟自由基(a)、DPPH 自由基(b)的清除能力、 Fe^{3+} 还原力(c)的影响

Fig. 9 The scavenging ability hydroxyl radicals (a) and DPPH free radicals (b) and Fe^{3+} reduction power (c) of polysaccharide S I

表5 籽用西瓜瓜瓢多糖 S I 的抑菌效果

Table 5 The antibacterial effects of polysaccharide S I from seed watermelon pulp

ρ (多糖) Polysaccharide concentrations/(mg·mL ⁻¹)	抑菌圈直径 Bacteriostatic zone diameter/mm					
	金黄色葡萄球菌 Staphylococcus aureus	枯草芽孢杆菌 Bacillus subtilis	大肠杆菌 E. coli	黑根霉 Black rhizopus	黑曲霉 Aspergillus niger	酵母菌 Yeast
0.1	-	-	-	-	-	1.63±0.36
0.3	-	-	-	-	-	2.24±0.22
0.5	-	-	-	-	-	2.48±0.16
5	-	-	-	-	-	4.24±0.14
50	-	-	-	-	-	5.77±0.21
100	3.04±0.02	2.18±0.08	1.83±0.24	-	-	7.10±0.12

注:“-”表示抑菌圈直径为0,即无抑菌作用。

Note:“-” means the diameter of bacteriostatic circle is 0, that is, there is no bacteriostatic effect.

籽用西瓜瓜瓢纯化多糖 S I 抑菌活性进行了探究,结果表明该多糖对酵母菌有较好抑制效果,而对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和大肠杆菌抑制作用微弱,对霉菌无抑制作用,这表明籽用西瓜瓜瓢多糖的抑菌活性有特异选择性。酵母菌其细胞壁主要成分为葡聚糖和甘露聚糖,籽用西瓜多糖可能通过细胞壁影响其生长代谢过程,从而表现出抑菌效果,这可能与籽用西瓜瓜瓢多糖的结构和 pH 值有关,具体机制有待于进一步研究。有些酵母菌可以使人致病,如念珠菌、白色隐球菌、红酵母等,因此,今后籽用西瓜多糖可作为天然的酵母菌抑制剂应用于食品及药品行业。

本文只对籽用西瓜瓜瓢多糖的生物活性进行了部分体外实验,今后还需将体外与体内实验相结合来进一步证实籽用西瓜多糖的生物活性,为籽用西瓜多糖的生物活性及其精细化结构研究奠定基础,也为丰富植物性多糖资源及其开发利用提供理论依据。

4 结 论

本文研究结果表明籽用西瓜瓜瓢多糖是一种小分子质量,高糖醛酸含量,由甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖 7 种单糖组成多样的植物多糖。籽用西瓜瓜瓢多糖具有良好的抗氧化活性,抑菌活性中多糖具有特异选择性,对酵母菌有较好的体外抑制作用,本研究为进一步深入研究籽用西瓜多糖构效关系机理奠定了基础,也为籽用西瓜功能性食品的开发和种质资源综合利用提供了依据。

参考文献 References:

[1] 王旭辉,王卉,山其米克,再吐尼古丽·库尔班,叶凯,涂振东.

我国籽瓜的开发现状与研究进展[J]. 北方园艺,2018(6):149-153.

WANG Xuhui, WANG Hui, SHAN QI Mike, Zaituniguli · Kuerban, YE Kai, TU Zhendong. Present status of development and research progress of seed-using watermelon[J]. Northern Horticulture, 2018(6):149-153.

[2] 石磊,王萍,杨静,王丰丰,孙晓华. 籽用西瓜种质资源 SSR 分析及初级核心种质库构建[J]. 西北植物学报, 2016, 36(6): 1125-1134.

SHI Lei, WANG Ping, YANG Jing, WANG Fengfeng, SUN Xiaohua. SSR analysis of seed germplasm resources of watermelon and construction of primary core germplasm bank[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2016, 36(6): 1125-1134.

[3] 张政,王倩,吴斌,李维霞,张辉. 新疆籽瓜副产物加工利用研究现状及前景[J]. 保鲜与加工, 2015, 15(6): 93-96.

ZHANG Zheng, WANG Qian, WU Bin, LI Weixia, ZHANG Hui. Research status and prospect of processing and utilization of by-products of Xinjiang seed melon[J]. Storage and Process, 2015, 15(6): 93-96.

[4] 席冬华. 籽瓜果实中几种功能性成分的分析研究[D]. 乌鲁木齐:新疆大学,2015.

XI Donghua. Analysis and study of several functional components in seed melon and fruit[D]. Urumqi: Xinjiang University, 2015.

[5] 赵雪平. 籽瓜瓢中多糖的提取及其功能性评价[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2012.

ZHAO Xueping. Extraction and functional evaluation of polysaccharide from seed melon pulp[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2012.

[6] 陈菁菁,许勇,张建农,陈年来. 我国籽用西瓜生产与研究进展[J]. 中国蔬菜,2015(12):12-18.

CHEN Jingjing, XU Yong, ZHANG Jiannong, CHEN Nianlai. Production and research of seed using watermelon in China[J]. China Vegetables, 2015(12):12-18.

[7] 宋坤,赵保堂,殷振雄,刘琴,梁俊玉,张继. 籽瓜多糖的提取分离及单糖组成的 GC-MS 分析[J]. 食品与发酵工业,2013

- (5):238-245.
SONG Shen, ZHAO Baotang, YIN Zhenxiong, LIU Qin, LIANG Junyu, ZHANG Ji. Extraction and separation of polysaccharide from seed melon and gc-ms analysis of monosaccharide composition[J]. Food and Fermentation Industry, 2013(5) : 238-245.
- [8] 赵雪平, 李正英, 李艳梅. 籽瓜瓤中多糖提取条件优化[J]. 食品工业, 2012, 33(10):40-42.
ZHAO Xueping, LI Zhengying, LI Yanmei. Optimization of extracted polysaccharide from seed melon pulp[J]. Food Industry, 2012, 33(10):40-42.
- [9] 钱雅雯, 魏佳, 张政, 王霞, 张健, 吴斌. 籽瓜多糖提取工艺的响应面优化及其体外降血脂活性[J]. 食品工业科技, 2020, 41(2): 101-107.
QIAN Yawen, WEI Jia, ZHANG Zheng, WANG Xia, ZHANG Jian, WU Bin. Optimization of polysaccharides extraction from seed melon by response surface methodology and its hypolipidemic effects *in vitro*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(2): 101-107.
- [10] 张美枝, 赵雪平, 李正英. 籽瓜瓤多糖的单糖组分测定及抗氧化活性评价[J]. 食品工业, 2014, 5(4):219-222.
ZHANG Meizhi, ZHAO Xueping, LI Zhengying. Determination of monosaccharide components and evaluation of antioxidant activity of seed melon flesh polysaccharide[J]. Food Industry, 2014, 5(4):219-222.
- [11] 刘琴, 宋坤, 郭杰, 罗顺, 张继. 籽瓜多糖对 H₂O₂ 致 PC12 细胞氧化损伤的保护作用[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(2): 338-343.
LIU Qin, SONG Shen, GUO Jie, LUO Shun, ZHANG Ji. Protective effects of polysaccharide from seed watermelon on the oxidative damage of PC12 cells induced by H₂O₂[J]. Natural Product Research and Development, 2015, 27(2):338-343.
- [12] 陈杨扬, 李娇, 王向红, 李琪, 刘晓宇, 桑亚新. 滑子菇多糖的结构及体外生物活性探究[J]. 中国食品学报, 2019, 19(6): 68-73.
CHEN Yangyang, LI Jiao, WANG Xianghong, LI Qi, LIU Xiaoyu, SANG Yaxin. Structural characterization and bioactivities of polysaccharides from *Pholiota nameko* *in vitro*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(6):68-73.
- [13] 徐广侠. 苯酚-硫酸法测定党参提取物中多糖的含量[J]. 中国中医药现代远程教育, 2011, 9(15):144.
XU Guangxia. Determination of polysaccharides in the extract of codoginseng by phenol-sulfuric acid method[J]. Modern Distance Education of Chinese Traditional Medicine, 2011, 9(15): 144.
- [14] 王文平, 郭祀远, 李琳, 王明力, 梁桂娟. 野木瓜多糖中糖醛酸含量测定[J]. 食品科技, 2007, 32(10):84-86.
WANG Wenping, GUO Siyuan, LI Lin, WANG Mingli, LIANG Guijuan. Determination of uronic acid content in papaya polysaccharide[J]. Food Science and Technology, 2007, 32(10): 84-86.
- [15] 郭燕娇, 何钢, 颜军, 刘续成, 邬晓勇, 易勇, 苟小军. 仙人掌多糖的分子质量及单糖组成分析[J]. 现代食品科技, 2012, 28(12): 1796-1799.
GUO Yanjiao, HE Gang, YAN Jun, LIU Xucheng, WU Xiaoyong, YI Yong, GOU Xiaojun. Molecular weight and monosaccharide composition analysis of cactus polysaccharide[J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 28(12): 1796-1799.
- [16] LAI F R, WEN Q B, LI L, WU H, LI X F. Antioxidant activities of water-soluble polysaccharide extracted from mung bean (*Vigna radiata* L.) hull with ultrasonic assisted treatment[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 81(2):323-329.
- [17] PRIOR R L, WILKES S E, ROGERS T R. Purified blueberry anthocyanins and blueberry juice alter development of obesity in mice fed an obesogenic high-fat diet[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2010, 58(7):3970-3976.
- [18] VASCO C, RUALES J, KAMAL-ELDIN. A total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador [J]. Food Chemistry, 2008, 111(4):816-823.
- [19] LIU Y H. Identification of polysaccharides from chinese yam (*Dioscoreae opposita* 'Qi') by infrared spectroscopy[J]. Agricultural Science & Technology, 2016, 17(8):1941-1943.
- [20] 圣志存, 陈晓兰. 安徽产地桑叶多糖分离纯化、结构鉴定与抗氧化活性研究[J]. 中国食品添加剂, 2020(1):59-66.
SHENG Zhicun, CHEN Xiaolan. Purification, characterization and antioxidant properties of polysaccharides of Anhui mulberry leaves[J]. China Food Additives, 2020(1):59-66.
- [21] 任薇, 包晓玮, 张志芳, 韩蕾, 曾兰君, 张亚涛. 沙棘多糖清除自由基及抗脂质过氧化作用研究[J]. 食品工业科技, 2019, 40(8): 272-277.
REN Wei, BAO Xiaowei, ZHANG Zhifang, HAN Lei, ZENG Lanjun, ZHANG Yatao. Study on free radical scavenging and antilipid peroxidation of seabuckthorn polysaccharide[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(8): 272-277.
- [22] MAO J W, JUN Y, QING G, JIANG Z L, GONG J Y. *In vitro* antioxidant activities of polyacchrides extracted from Moso Bamboo-leaf[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2003, 55:1-5.
- [23] 朱晓冉, 徐颖, 李德海, 赵楠楠, 龚金华. 酸碱性和分子量对木耳多糖抗氧化活性及相关性的影响[J]. 现代食品科技, 2018, 34(3):59-67.
ZHU Xiaoran, XU Ying, LI Dehai, ZHAO Nannan, GONG Jinhua. Correlation of the antioxidant activity and of polysaccharides from *Auricularia Auricularia* with its molecular weight and extracting agent properties[J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(3):59-67.
- [24] 高春燕, 蒋丽珠, 田呈瑞. 枸杞多糖抑菌活性研究[J]. 食品科技, 2007(10):100-102.
GAO Chunyan, JIANG Lizhu, TIAN Chengrui. Study on antibacterial activity of *Lycium barbarum* polysaccharide[J]. Food Science and Technology, 2007(10):100-102.