

自然发酵对青金桔酚类物质及其抑制消化相关酶活性的影响

张红建, 刘帅光, 马泽威, 王青松, 田燕, 郑联合

Analysis of Phenolic Substances in *Citrus microcarpa* with Nature Fermentation and Evaluation of Its Inhibitory Activities on Digestion-related Enzymes

ZHANG Hongjian, LIU Shuaiguang, MA Zewei, WANG Qingsong, TIAN Yan, and ZHENG Lianhe

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023070026>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

地参结合酚提取物对 α -葡萄糖苷酶和胰脂肪酶的抑制作用

Inhibitory Effects of Bound Phenolic Extracts from *Lycopus lucidus* Turez. on α -glucosidase and Pancreatic Lipase

食品工业科技. 2018, 39(23): 111-116 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.23.020>

紫娟茶提取物对血管紧张素转换酶、 α -淀粉酶和胰脂肪酶的体外抑制作用

Inhibitory effects of Zijuan tea (Camellia sinensis var. kitamura) extracts on angiotensin converting enzyme, α -amylase and pancreatic lipase in vitro

食品工业科技. 2017(19): 11-20 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.19.003>

橡子仁萃取物成分分析及对 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶的抑制作用

Composition Analysis and Inhibitory Effect against α -Amylase and α -Glucosidase of Acorn Kernel Extractions

食品工业科技. 2021, 42(17): 47-55 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020120118>

玉蜀黍不同部位提取物对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶抑制作用

Inhibitory Effects of Extracts from Different Parts of Maize on α -Glucosidase and α -Amylase

食品工业科技. 2021, 42(1): 15-21,27 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020030142>

黄精总皂苷提取工艺优化及其对 α -淀粉酶及 α -葡萄糖苷酶抑制活性

Optimization of Extraction Technology of Total Saponin from *Polygonatum sibiricum* and Its Inhibitory Activity to α -Amylase and α -Glucosidase

食品工业科技. 2020, 41(16): 163-168,175 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.16.026>

基于代谢组学分析工夫红茶发酵过程中代谢物的变化

Metabolomics Analysis of Changes in Metabolites During the Fermentation Process of Congou Black Tea

食品工业科技. 2021, 42(21): 8-16 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021030361>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

· 特邀主编专栏—组学分析技术在食品品质研究中的应用（客座主编：徐贞贞、张良晓、洪惠）·

客座主编寄语：近年来，代谢组学、蛋白组学、脂质组学等分析技术在食品品质研究中的应用日趋广泛，已成食品组学这一新兴学科的研究热点之一。传统食品品质分析常依赖常规营养素或某类功能组分等单一或少数指标开展研究，高通量组学分析技术的应用为明确各类食品品质属性、解析品质组分构成及探究品质变化规律提供了新方法。此外多组学技术的联用也为深度研究食品品质形成机制、特征功能因子挖掘与利用及全面理解食品健康效应提供了新策略。

张红建, 刘帅光, 马泽威, 等. 自然发酵对青金桔酚类物质及其抑制消化相关酶活性的影响 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(9): 1–10.
doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023070026

ZHANG Hongjian, LIU Shuaiguang, MA Zewei, et al. Analysis of Phenolic Substances in *Citrus microcarpa* with Nature Fermentation and Evaluation of Its Inhibitory Activities on Digestion-related Enzymes[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(9): 1–10. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023070026

自然发酵对青金桔酚类物质及其抑制消化相关酶活性的影响

张红建^{1,2}, 刘帅光¹, 马泽威¹, 王青松¹, 田燕², 郑联合^{1,*}

(1. 海南省粮油科学研究所, 海南琼海 571400;

2. 海南大学食品科学与工程学院, 海南海口 570100)

摘要: 为了解自然发酵对青金桔酚类物质变化及抑制消化相关酶活性的影响, 本研究测定了发酵前后青金桔可溶性总酚、总黄酮及 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶及胰脂肪酶抑制率等变化情况, 基于超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱傅里叶转换联用质谱仪鉴定了发酵前后酚类物质的种类, 筛选了发酵前后酚类差异代谢物及其富集通路。最后, 基于相关系数分析了酚类差异代谢物对抑制以上消化相关酶活性的相关性。结果表明: 自然发酵可使青金桔中可溶性总酚、总黄酮含量分别提升 9.20%、23.68%, α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶及胰脂肪酶抑制率提升 11.90%~28.50%; 青金桔中共检测到酚类物质 52 种, 发酵未改变酚类物质种类, 但可使川陈皮素、咖啡酸、牡荆素等 9 种酚类物质显著增加, 甲氧沙林显著降低 ($P<0.01$), 显著影响以上酚类差异代谢物变化的通路有苯丙烷类化合物的生物合成通路、黄酮和黄酮醇生物合成通路、类黄酮生物合成通路及多种次生代谢产物的生物合成 I 通路; 川陈皮素、芹菜素、咖啡酸、山奈酚这 4 种酚类差异代谢物与抑制以上三种消化相关酶活性呈显著正相关 ($P<0.05$)。因此, 自然发酵可促进青金桔中可溶性总酚、总黄酮释放, 提升消化相关酶抑制活性, 其可作为青金桔加工的一种有效手段。

关键词: 非靶向代谢组学, 青金桔, 酚类, 差异代谢物, α -淀粉酶, α -葡萄糖苷酶, 胰脂肪酶

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)09-0001-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023070026

本文网刊:



Analysis of Phenolic Substances in *Citrus microcarpa* with Nature Fermentation and Evaluation of Its Inhibitory Activities on Digestion-related Enzymes

ZHANG Hongjian^{1,2}, LIU Shuaiguang¹, MA Zewei¹, WANG Qingsong¹, TIAN Yan², ZHENG Lianhe^{1,*}

(1. Hainan Institute of Grain and Oil Science, Qionghai 571400, China;

2. College of Food Science and Technology, Hainan University, Haikou 570100, China)

Abstract: To understand the effects of natural fermentation on the changes of phenolic substances in *Citrus microcarpa* and the inhibition of digestive enzymes, the changes of soluble total phenol, total flavone, α -amylase, α -glucosidase, and

收稿日期: 2023-07-05

基金项目: 海南省属科研院所技术创新专项 (SQKY2022-0043, KYY5-2021-08)。

作者简介: 张红建 (1989-), 男, 博士研究生, 工程师, 研究方向: 农产品加工与贮藏, E-mail: 584564173@qq.com。

* 通信作者: 郑联合 (1968-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 粮食、油脂及植物蛋白, E-mail: zlh898@sina.com。

pancreatic lipase inhibition rates before and after fermentation were measured. The types of phenolic substances before and after fermentation were identified by UPLC-Q Exactive Orbitrap-MS, and the differential metabolites and their enrichment pathways were screened. Finally, the correlation relationships between the different phenolic metabolites and the inhibitory activities of the above digestion-related enzymes were analyzed based on the correlation coefficient. The results showed that natural fermentation could increase the contents of soluble total phenol and total flavone by 9.20% and 23.68%, respectively, and increase the inhibition rates of α -amylase, α -glucosidase and pancreatic lipase from 11.90% to 28.50%. A total of 52 phenolic substances were detected in *Citrus microcarpa*. Fermentation did not change the types of phenolic substances, but it significantly increased nine phenolic substances such as nobiletin, caffeic acid, and vitexin, and significantly decreased methoxsarin ($P<0.01$). The four kinds of pathways significantly affected the change of the above phenolic metabolites, including the biosynthetic pathway of phenylpropane compounds, flavone and flavonol biosynthesis, flavonoid biosynthesis, biosynthesis I pathway of various plant secondary metabolites. There was a significant positive correlation between the inhibitory activities of three digestive enzymes and the four different phenolic metabolites, which were nobiletin, apigenin, caffeic acid, and kaempferol ($P<0.05$). Therefore, natural fermentation can promote the release of soluble total phenol and total flavone in *Citrus microcarpa* and improve the inhibition rate of digestion-related enzymes, which can be used to effectively process *Citrus microcarpa*.

Key words: untargeted metabolomics; *Citrus microcarpa*; phenolic substances; differential metabolites; α -amylase; α -glucosidase; pancreatic lipase

青金桔(*Citrus microcarpa*)为芸香科柑橘族金柑属,是宽皮柑橘(*Citrus reticulate* Blanco)和金桔(*Fortunella* spp.)的杂交品种^[1],主要分布于我国海南省、台湾地区以及马来西亚、印度尼西亚、泰国、菲律宾等热带及亚热带地区,其产量可达5~8吨/年。目前海南省青金桔产量在25万吨/年左右,占全国青金桔总产量的90%以上。酚类化合物是植物中普遍存在的次级代谢产物,也是柑橘类水果中主要的功能活性物质,具有抗氧化、降血脂、防止肥胖、改善糖尿病等多种生物活性^[2~5]。青金桔皮中酚类物质含量可达到1054~1894 mg/100 g^[6],主要以根皮素-3',5'-二-C- β -葡萄糖苷、橙皮苷、川陈皮素、桔皮素等为主^[7]。研究表明,以上酚类物质具有较好的抗氧化、抑制酪氨酸酶活性^[1],以及降血糖、降血脂、降胆固醇等生理功能^[4]。青金桔产量较高,其所含酚类物质等具有较好的功能活性,但目前青金桔深加工产品较为缺乏,现主要用于榨汁。并且,榨汁后产生大约45%的皮渣副产物,由于缺乏相应的加工技术,其基本被丢弃,从而造成较大的资源浪费和环境污染^[8]。

果蔬自然发酵是指新鲜果蔬在添加或不添加辅料的条件下,通过果蔬自身携带及环境中的微生物的新陈代谢作用,合成具有多种生物活性的酶类和代谢产物的过程。因其具有设备投入少、操作简单、发酵产品风味独特,能实现对集中收获果蔬的快速加工等特点,现已成为果蔬加工研究的热点^[9]。青金桔富含水、有机酸、果胶、糖类、维生素以及丰富的微量元素^[10],在不添加任何其他物质的条件下,可作为自然发酵的天然培养基。因此,采用全果浆自然发酵可实现青金桔100%全利用,最大程度保留青金桔营养和风味。研究表明,微生物发酵果蔬过程中可产生纤维素酶等^[11],促使植物细胞壁结构物质水解,促进可溶性酚类物质释放,从而改善发酵产物生理活性^[12]。尽管如此,目前针对青金桔酚类物质的报道主要集中

提取及抗氧化性的变化^[7,13],缺乏青金桔酚类物质种类系统、全面的研究,关于青金桔在发酵前后酚类物质的变化情况尚不清楚,青金桔酚类物质对 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶及胰脂肪酶等消化相关酶活性抑制情况也未见报道,这对青金桔的深加工及综合利用影响较大。非靶向代谢组学技术具有高通量、高灵敏度、检测范围广等特点,可最大程度检测样品中的代谢物,从而较为全面地反映样品的总代谢物特征,其在动植物代谢研究方面被广泛应用^[14~16]。

为全面、系统地阐明青金桔酚类物质种类及自然发酵对青金桔酚类物质变化、消化相关酶活性抑制情况。本研究对青金桔全果浆进行自然发酵,比较了发酵前后青金桔可溶性总酚、总黄酮、结合酚含量及抑制 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶及胰脂肪酶活性的变化情况。基于超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱傅里叶转换联用质谱仪(UPLC-Q Exactive Orbitrap-MS)代谢组学技术,对自然发酵前后酚类物质种类、酚类差异代谢物及其代谢通路进行分析,最后利用相关系数分析探讨酚类差异代谢物与可溶性总酚、 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶及胰脂肪酶抑制率的相关关系,为自然发酵在青金桔加工中的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

青金桔 海南青金桔食品科技有限公司;甲醇 色谱纯,德国CNW公司;甲酸 色谱纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;乙腈(色谱纯)、 α -淀粉酶(≥ 5 units/mg,来源于猪胰)、胰脂肪酶(8×USP)、4-硝基苯基乙酸酯(分析纯) Sigma-aldrich 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司; α -葡萄糖苷酶(≥ 50 units/mg,来源于酵母)、对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖(分析纯) 上海源叶生物科技有限公司。

DMM-40型胶体磨 上海泰硕化工机械设备有限公司;LGJ-10NS/GC型冷冻干燥机 北京亚星仪

科科技发展有限公司; CenLee16X 台式高速离心机 湖南湘立科学仪器有限公司; PLUS-E2-20TJ 实验室级超纯水机 南京易普易达科技发展有限公司; FlexA-200 酶联免疫分析仪 杭州优米仪器有限公司; UPLC-Q Exactive Orbitrap-MS 超高效液相色谱-四极杆静电场轨道阱傅里叶转换联用质谱仪 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 青金桔全果浆发酵样品的制备 青金桔清洗晾干后, 全果打浆, 过筛, 放入发酵罐中自然发酵 10 d。分别在未发酵(A 组)以及发酵 10 d 后(B 组)取样, 4 个生物学重复分别命名为 A1、A2、A3、A4 和 B1、B2、B3、B4。取样后样品存放于-80 °C 冰箱中 12 h, 取出冷冻干燥 12 h, 装入带有磨口的棕色瓶中, -18 °C 储存, 备用。

1.2.2 可溶性总酚提取及样液制备

1.2.2.1 可溶性总酚提取 酚类物质提取参考 Rodríguez 等^[15]的方法, 并进行了适当修改, 具体方法如下。准确称取冷冻干燥后的样品 0.2 g 于 15 mL 离心管中, 加入 10 mL 70% 甲醇浸泡, 将样品置于超声清洗器中, 360 W、50 °C 超声 30 min。样品提取液用 0.22 μm 孔径滤膜过滤。

1.2.2.2 UPLC-Q Exactive Orbitrap-MS 测试样液制备 取以上部分提取液于 1.5 mL 离心管中, -40 °C 静置 1 h, 于 4 °C、12000 r/min 下离心 15 min。移取 200 μL 上清, 上机测定。质控样(quality control samples)由等量 A、B 组总酚提取液混合制备而成。

1.2.3 总酚含量的测定 方法参考 Lou 等^[6], 并进行适当修改。具体如下, 125 μL 上述提取液或标准物质与 125 μL 的福林酚试剂(Folin & Ciocalteu 酚试剂)反应 3 min。混合物加入到 1.25 mL 20% 的 Na₂CO₃ 溶液中, 室温条件下、黑暗环境反应 30 min, 过 0.22 μm 孔径滤膜, 取 200 μL 于 750 nm 处测定吸光值。以 70% 甲醇溶液为空白, 标准物质为没食子酸(GA)(50~500 μg/mL)。总酚以 mgGA 当量/100 g 冻干样品表示。每个样品测试 4 次, 取平均值。

1.2.4 总黄酮测定 方法参考 Lou 等^[7], 并进行适当修改。具体如下, 取可溶性总酚提取液 500 μL 置于 2 mL 离心管中, 向其加入 30 μL 5% NaNO₂ 溶液, 振荡摇匀, 置于室温条件下 5 min; 继续加入 30 μL 的 10% AlCl₃ 溶液, 振荡摇匀后置于温室下放置 6 min; 加入 200 μL 1 mol/L NaOH 溶液, 最后用 70% 甲醇溶液将反应混合液总体积定容至 1 mL; 将溶液再次振荡混匀, 在室温下反应 30 min。用酶标仪测定其在 510 nm 处的吸光度。以 70% 甲醇溶液作为空白对照, 用 20.0~100.0 μg/mL 芦丁作为标准黄酮化合物, 绘制芦丁的标准曲线。样品中总黄酮含量以 mg 芦丁/100 g 冻干样表示。

1.2.5 结合态多酚测定 方法参考 Multari 等^[7], 并

进行适当修改。具体如下, 取上述可溶性总酚提取后剩余滤渣, 转入真空冷冻旋转蒸发仪中, 于 50 °C 的条件下蒸干。加入 10 mol/L NaOH 溶液 2 mL(渣:NaOH 溶液=1:10, W/V), 室温条件下水解 16 h, 溶液再用 HCl(10 mol/L)调整 pH 至 2.5, 释放的酚类采用 5 mL 冷的乙醚(DE)和乙酸乙酯(EA)混合物(DE/EA, 1:1, V/V)进行振荡萃取 15 min, 4000 r/min 离心 10 min, 以上重复 3 次。合并 3 次所得的 DE/EA 层, 采用真空旋转蒸发仪 50 °C 干燥, 干燥后样品溶入一定量色谱级甲醇中, 溶液保存于带有磨口的棕色试剂瓶中, 于-18 °C 储存待用。后续测定方法参考本文中 1.2.3。

1.2.6 消化相关酶抑制率的测定

1.2.6.1 α-淀粉酶抑制率的测定 方法参考 Fu 等^[18], 并进行适当修改。将 250 μL、50 U/mL 的猪胰腺 α-淀粉酶溶液(溶于 20 mmol/L pH6.9 磷酸盐缓冲液)与 200 μL 提取液在 37 °C 水浴中孵育 10 min, 加入 1% 可溶性淀粉溶液 160 μL, 于 37 °C 水浴条件下反应 15 min, 加入 100 μL DNS 溶液终止以上反应。以上混合液于沸水浴中反应 5 min, 取出冷却, 取 150 μL 于波长 540 nm 处测定其吸光值。

$$\text{IR}(\%) = \frac{(\text{ABS}_{\text{控制}} - \text{ABS}_{\text{控制空白}}) - (\text{ABS}_{\text{样品}} - \text{ABS}_{\text{样品空白}})}{(\text{ABS}_{\text{控制}} - \text{ABS}_{\text{控制空白}})} \times 100$$

式中: IR 表示 α-淀粉酶抑制率, %; ABS_{控制} 表示酶与底物反应的吸光值; ABS_{控制空白} 表示不加酶时底物的吸光值; ABS_{样品} 表示样品、酶与底物反应的吸光值; ABS_{样品空白} 表示样品与底物反应的吸光值。

1.2.6.2 α-葡萄糖苷酶抑制率的测定 参考 Fu 等^[18]的方法, 并进行适当修改。10 μL 提取液与 50 μL α-葡萄糖苷酶(1.0 U/mL 溶于 0.1 mol/L pH6.8 的磷酸盐缓冲液中)添加到 96 孔板中, 振动均匀, 于 37 °C 条件下孵化 15 min。然后将 50 μL 的 pNPG(5 mmol/L 溶于 0.1 mol/L pH6.8 的磷酸盐缓冲液中)添加到 96 孔板中, 振动均匀, 继续于 37 °C 条件下孵化 15 min。添加 150 μL 0.5 mmol/L 的碳酸钠溶液终止反应, 于 415 nm 处测吸光值。酶活力以从 pNPG 中释放的 p-硝基酚表示。

$$\text{IR}(\%) = \frac{(\text{ABS}_{\text{控制}} - \text{ABS}_{\text{控制空白}}) - (\text{ABS}_{\text{样品}} - \text{ABS}_{\text{样品空白}})}{(\text{ABS}_{\text{控制}} - \text{ABS}_{\text{控制空白}})} \times 100$$

式中: IR 代表 α-葡萄糖苷酶抑制率, %; ABS_{控制} 代表酶与底物反应的吸光值; ABS_{控制空白} 表示不加酶时底物的吸光值; ABS_{样品} 表示样品、酶与底物反应的吸光值; ABS_{样品空白} 表示样品与底物反应的吸光值。

1.2.6.3 胰脂肪酶抑制率的测定 方法参考 Podsedek 等^[19], 并进行适当修改。配制 50 mmol/L 4-硝基苯基乙酸酯, 再用纯水稀释至 10 mmol/L。猪胰脂肪酶用水溶解为 10 mg/mL, 13000 r/min 离心 5 min, 取上清液。反应体系如下: 10 μL 提取液、50 μL 脂肪酶、140 μL 0.1 mol/L Tris 缓冲液(pH7.4), 37 °C

孵育 10 min, 再加入 50 μL 10 mmol/L 的 4-硝基苯基乙酸酯。37 °C 反应 15 min 后于 400 nm 处测其吸光度。胰脂肪酶抑制率为:

$$\text{IR}(\%) = \frac{(\text{ABS}_{\text{控制}} - \text{ABS}_{\text{控制空白}}) - (\text{ABS}_{\text{样品}} - \text{ABS}_{\text{样品空白}})}{(\text{ABS}_{\text{控制}} - \text{ABS}_{\text{控制空白}})} \times 100$$

式中: IR 为胰脂肪酶抑制率, %; ABS_{控制} 表示酶与底物反应的吸光值; ABS_{控制空白} 表示不加酶时底物的吸光值; ABS_{样品} 表示样品、酶与底物反应的吸光值; ABS_{样品空白} 表示样品与底物反应的吸光值。

1.2.7 UPLC-Q Exactive Orbitrap-MS 测定酚类物质种类及相对含量 色谱条件: 色谱柱为 ACQUITY UPLC HSS T3(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm); 柱温为 40 °C; 流速 0.3 mL/min; 流动相组成 A: 水(0.05% 甲酸), B: 乙腈(100%); 进样量: 5 μL, 自动进样器温度 4 °C; 采用梯度洗脱, 程序如下: 0~1.0 min, 95% A; 1~12.5 min, 95%~5% A; 12.5~13.5 min, 5% A; 13.5~13.6 min, 5%~95% A; 13.6~16.0 min, 95% A。质谱检测参数: 采用一级全扫描(Full Scan, m/z 70~1050)与数据依赖性二级质谱扫描(dd-MS2, TopN=10), 分辨率: 70000(一级质谱)&17500(二级质谱); 碰撞模式为高能量碰撞解离(HCD); 加热器温度 300 °C、毛细管温度为 350 °C、鞘气流速为 45 arb、辅助气流速为 15 arb、尾气流速为 1 arb; 正离子模式时电喷雾电压为 3.0 kV、S-Lens RF Level 为 30%; 负离子模式时电喷雾电压: -3.2 kV、S-Lens RF Level 为 60%。

1.3 数据处理

可溶性总酚含量、消化相关酶抑制率及 UPLC-Q Exactive Orbitrap-MS 测试均进行 4 次生物学重复, 其中可溶性总酚含量及消化相关酶抑制率结果均以平均值加减标准差表示。

UPLC-Q Exactive Orbitrap-MS 非靶向代谢组学数据分析均在美吉生物云平台(<https://www.majorbio.com/web/www/index>)进行处理。对单个峰进行过滤, 只保留单组空值不多于 50% 或所有组中空值不多于 50% 的峰面积数据。采用最小值二分之一法填补原始数据中的缺失值, 利用总和法进行归一化。处理后的数据通过与 HumanMetabolome Database (HMDB)(<http://www.hmdb.ca>)、Metlin(<https://metlin.scripps.edu>)、massbank(<http://www.massbank.jp/>)、mzcloud(<https://www.mzcloud.org/>)等数据库及自建数据库进行比对, 对酚类物质进行定性。采用正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)对差异酚类物质进行筛选, 差异酚类物质上传至 KEGG 网站, 进行功能通路及通路富集分析。

2 结果与分析

2.1 自然发酵前后青金桔可溶性总酚、总黄酮、结合酚及抑制 α-淀粉酶、α-葡萄糖苷酶、胰脂肪酶活性变化

α-淀粉酶、α-葡萄糖苷酶及胰脂肪酶是人体中

与消化相关的关键酶, 对其活性的抑制可减少膳食中糖脂类物质的吸收, 对预防 II 型糖尿病、改善肥胖具有促进作用^[20]。自然发酵对青金桔可溶性总酚、总黄酮、结合酚及抑制 α-淀粉酶、α-葡萄糖苷酶、胰脂肪酶活性的影响结果见图 1。由图 1 可知, 自然发酵可使可溶性总酚、总黄酮、结合酚含量及对 α-淀粉酶、α-葡萄糖苷酶、胰脂肪酶的抑制率均显著上升($P<0.05$), 其中总酚含量、总黄酮、结合酚分别提升 9.20%、23.68%、31.18%, α-淀粉酶、α-葡萄糖酶及胰

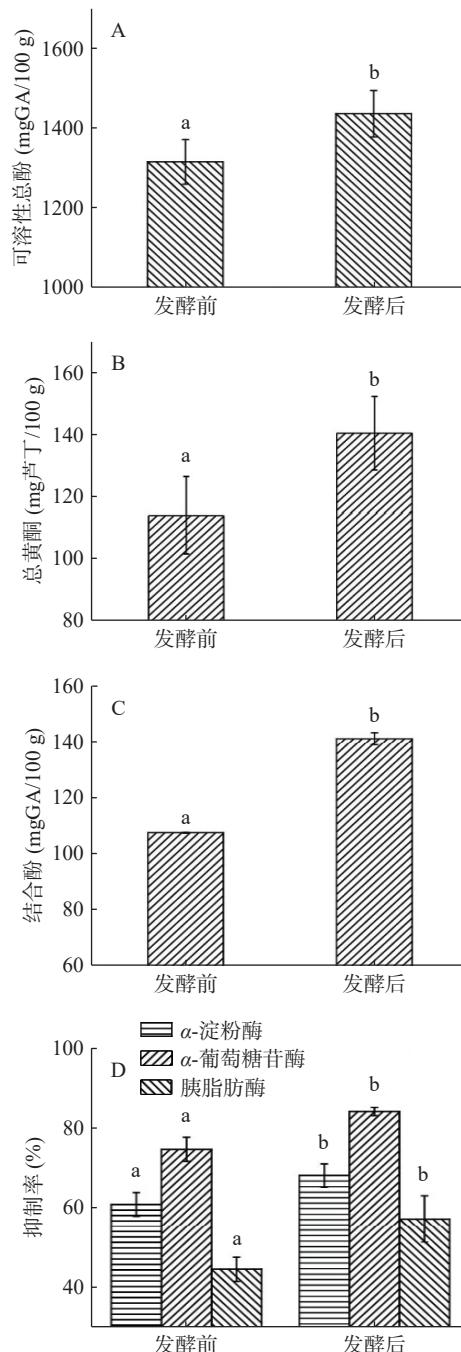


图 1 自然发酵前后青金桔可溶性总酚、总黄酮、结合酚及抑制 α-淀粉酶、α-葡萄糖苷酶、胰脂肪酶活性变化

Fig.1 Changes of soluble total phenol, total flavone, bound phenol and inhibitory activities of α -amylase, α -glucosidase and pancreatic lipase of *Citrus microcarpa* before and after natural fermentation

注: 不同字母表示发酵前后存在显著差异($P<0.05$)。

脂肪酶抑制率分别提升 11.90%、12.64%、28.50%。本次实验结果与 Kim 等^[21]、董玉婷等^[22]研究结果一致。发酵过程中酵母、乳酸菌等微生物, 可合成、释放纤维素酶、 β -糖苷酶等水解酶, 断裂酚类与植物细胞壁结构物质间、糖类及肽类间的化学键, 促使不溶性结合态多酚转化为可溶性多酚, 缔合态多酚转化为游离态多酚, 增加可溶性总酚含量、提升其功能活性^[12,17]。本研究中发酵后结合酚含量没有因转化为可溶性酚类而降低, 反而呈现显著增加($P<0.05$)。其原因可能是发酵等加工使植物细胞壁结构被破坏, 结合酚更容易被提取, 此结果也与 Lou 等^[7]、Multari 等^[17]研究结果一致。

2.2 自然发酵前后青金桔酚类物质的鉴定

基于 UPLC-Q Exactive Orbitrap-MS 对自然发酵前后青金桔酚类物质进行测定, 利用 HMDB、Metlin、massbank、mzcloud 和自建数据库对自然发酵前后青金桔酚类物质进行定性, 发酵前后总离子流图如图 2, 鉴定到的酚类物质种类结果见表 1。在正、负离子模式下从自然发酵青金桔中共检测出 52 种酚类物质, 与未发酵青金桔酚类物质种类一致, 即自然发酵未改变酚类物质种类。青金桔酚类物质中, 黄酮类物质种类最多, 达到了 18 种, 其次为酚酸类 8 种, 二氢黄酮类 7 种, 香豆素类 6 种, 二氢查耳酮类 5 种, 黄酮醇类 2 种, 异黄酮、木质素类及花青素类均为 1 种, 其他酚类 3 种。Roowi 等^[23]基于 HPLC-PDA-MS² 对青金桔中酚类物质进行了定性, 确定了根皮素-3',5'-二-C- β -葡萄糖苷、橙皮苷、维采宁-2 等 7 种酚类物质; Lou 等^[7]对不同溶剂提取的青金桔酚类进行了测定, 共检测到类黄酮物质 6 种, 酚酸类物质 5 种。本次实验结果涵盖了已报道青金桔中所有的酚类物质种类^[1], 并首次在青金桔中发现了异鼠李素、牡荆素、枇杷苷等 30 种酚类物质。

2.3 自然发酵前后青金桔酚类物质差异性分析

2.3.1 青金桔酚类物质主成分分析 主成分分析(principal component analysis, PCA)得分图可反映样品的相似性程度, 图中样品越聚集, 表明样品相似性越强。由图 3 可知, 质控样(quality control samples, QC)样品聚集性较高, 表明仪器设备运行稳定、实验方法可靠、数据质量高。A、B 组样品聚集程度都较高, 其中 A 组样品分布于 PCA 图中左上角, B 组样品分布于右上角, 且第一主成分(PC1)和第二主成分(PC2)的解释率分别为 83.85%、7.84%, 两者累计贡献率达到 91.69%。因此, A、B 组中各组内样品间重复性较好, A、B 组间样品差异显著, 自然发酵处理可有效改变青金桔酚类物质组成。

2.3.2 自然发酵前后青金桔酚类差异代谢物的筛选与分析 以 PLS-DA 模型中变量影响投影值(variable influence on projection, VIP)>1、差异倍数(fold change)>1 或<0.5 且 $P<0.05$ 为标准, 对自然发酵前后青金桔中酚类差异代谢物进行筛选, 其结果见

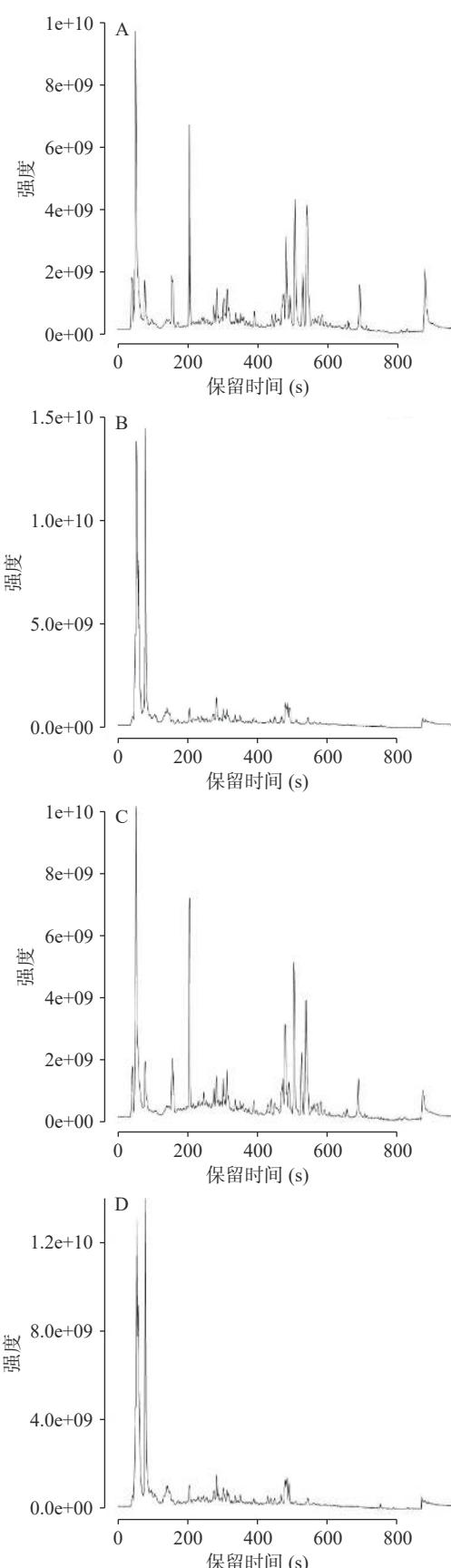


图 2 青金桔自然发酵前后酚类提取物总离子流图

Fig.2 TIC of phenolic extract of *Citrus microcarpa* before and after natural fermentation

注: A 为发酵前正离子模式下总离子流图; B 为发酵前负离子模式下总离子流图; C 为发酵 10 d 后正离子模式下总离子流图; D 为发酵 10 d 后负离子模式下总离子流图。

表 1 自然发酵前后青金桔中酚类物质种类
Table 1 Types of phenols in *Citrus microcarpa* before and after natural fermentation

序号	类别	物质名称	保留时间(min)	分子量	母离子(m/z)	MS/MS(m/z)	CAS号	发酵前	发酵后	首次报道
1	黄酮类	桔皮素	8.985	372.12	373.13[M+H] ⁺	373.13,343.08	481-53-8	+	+	否
2	黄酮类	芹菜素	6.92	270.06	271.06[M+H] ⁺	271.06	520-36-5	+	+	否
3	黄酮类	芹菜素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	4.97	432.11	433.11[M+H] ⁺	433.11,271.06	578-74-5	+	+	否
4	黄酮类	香叶木素	5.32	300.07	301.07[M+H] ⁺	301.07,286.05	520-34-3	+	+	否
5	黄酮类	异鼠李素	6.16	316.06	317.06[M+H] ⁺	317.06,302.04	480-19-3	+	+	是
6	黄酮类	山奈酚	7.05	286.05	287.05[M+H] ⁺	287.05	520-18-3	+	+	是
7	黄酮类	木犀草素	6.31	286.05	287.05[M+H] ⁺	287.05	491-70-3	+	+	是
8	黄酮类	川陈皮素	8.41	402.13	403.13[M+H] ⁺	403.13,373.09	478-01-3	+	+	否
9	黄酮类	荭草苷	4.35	448.11	449.11[M+H] ⁺	449.11,329.07	28608-75-5	+	+	是
10	黄酮类	牡荆素	4.58	432.11	433.11[M+H] ⁺	433.11,283.06	3681-93-4	+	+	是
11	黄酮类	地奥司明	6.19	608.16	607.16[M-H] ⁻	607.16,299.05	520-34-3	+	+	否
12	黄酮类	枇杷苷	3.84	596.16	595.16[M-H] ⁻	595.16,355.08	13463-28-0	+	+	是
13	黄酮类	岩豆素	8.32	344.08	343.08[M-H] ⁻	343.08,313.03	152743-19-6	+	+	是
14	黄酮类	西宁素	5.04	372.11	371.11[M-H] ⁻	371.11,59.01	2306-27-6	+	+	是
15	黄酮类	三叶草素	4.344	448.09	447.09[M-H] ⁻	447.09,61.98	23627-87-4	+	+	是
16	黄酮类	维采宁-2	4.002	594.15	593.15[M-H] ⁻	593.15,353.06	23666-13-9	+	+	否
17	黄酮类	牡荆素-2"-O-鼠李糖苷	4.57	578.17	579.17[M+H] ⁺	579.17,313.07	64820-99-1	+	+	是
18	黄酮类	柠檬黄素	5.12	346.07	347.07[M+H] ⁺	347.07,332.05	489-33-8	+	+	是
19	二氢黄酮类	橙皮素	4.96	302.08	303.08[M+H] ⁺	303.08,153.08	520-33-2	+	+	否
20	二氢黄酮类	橙皮苷	5.31	610.18	609.18[M-H] ⁻	609.18,301.07	520-26-3	+	+	否
21	二氢黄酮类	黄柏甙	7.45	518.17	517.17[M-H] ⁻	517.17,168.04	52589-11-4	+	+	是
22	二氢黄酮类	新橙皮苷	5.199	610.19	611.09[M+H] ⁺	303.08	13241-33-3	+	+	否
23	二氢黄酮类	金柑甙	13.71	592.27	593.27[M+H] ⁺	593.27,533.25	20633-93-6	+	+	是
24	二氢黄酮类	Isomargaritene	5.17	592.18	593.18[M+H] ⁺	327.08	64271-11-0	+	+	是
25	二氢黄酮类	Margaritene	5.50	592.18	593.18[M+H] ⁺	327.08,297.07	64271-10-9	+	+	是
26	二氢查耳酮	柚皮素	5.005	272.07	273.07[M+H] ⁺	273.07,153.01	480-41-1	+	+	否
27	二氢查耳酮	根皮素	5.49	274.09	275.09[M+H] ⁺	107.04	60-82-2	+	+	是
28	二氢查耳酮	柚皮苷	5.07	610.19	611.19[M+H] ⁺	303.08	10236-47-2	+	+	否
29	二氢查耳酮	根皮苷	5.48	436.12	435.12[M-H] ⁻	273.07	60-81-1	+	+	是
30	二氢查耳酮	根皮素-3',5'-二-C-β-葡萄糖苷	4.714	598.18	597.18[M-H] ⁻	357.09	357401-40-2	+	+	否
31	酚酸类	2-羟基肉桂酸	5.61	164.03	163.03[M-H] ⁻	119.04	583-17-5	+	+	是
32	酚酸类	咖啡酸	4.27	180.03	179.03[M-H] ⁻	179.03,135.04	501-16-6	+	+	否
33	酚酸类	绿原酸	3.8	354.08	353.08[M-H] ⁻	191.05	327-97-9	+	+	否
34	酚酸类	丁香酚	6.11	164.07	163.07[M-H] ⁻	119.04	97-53-0	+	+	是
35	酚酸类	芥子酸	5.096	224.06	223.06[M-H] ⁻	223.06,208.03	7362-37-0	+	+	否
36	酚酸类	没食子酸	2.26	170.02	171.02[M+H] ⁺	111.00	149-91-7	+	+	否
37	酚酸类	龙胆酸	0.78	211.85	212.85[M+H] ⁺	212.85	25351-24-0	+	+	否
38	酚酸类	没食子酸	2.26	170.02	171.02[M+H] ⁺	111.00,139.00	149-91-7	+	+	否
39	香豆素类	7-羟基香豆素	11.9	162.03	163.03[M+H] ⁺	163.03	93-35-6	+	+	是
40	香豆素类	香豆素	5.36	146.04	147.04[M+H] ⁺	91.05	91-64-5	+	+	否
41	香豆素类	秦皮乙素	5.31	178.03	179.03[M+H] ⁺	133.10	305-01-1	+	+	是
42	香豆素类	甲氧沙林	7.42	216.04	217.04[M+H] ⁺	217.04,202.02	298-81-7	+	+	是
43	香豆素类	东莨菪碱	5.19	192.04	193.04[M+H] ⁺	193.04,133.02	92-61-5	+	+	是
44	香豆素类	秦皮苷	3.85	370.08	369.08[M-H] ⁻	125.02	524-30-1	+	+	是
45	黄酮醇类	槲皮素	6.36	302.04	301.03[M-H] ⁻	151.00	117-39-5	+	+	否
46	黄酮醇类	芦丁	4.64	610.15	609.15[M-H] ⁻	609.15,300.02	153-18-4	+	+	否
47	异黄酮类	鱼藤酮	9.078	394.15	395.15[M+H] ⁺	395.15,365.06	83-79-4	+	+	是
48	花青素类	花青素鼠李糖苷	4.74	594.16	595.16[M+H] ⁺	287.05	18719-76-1	+	+	是
49	木脂素类	牛蒡子苷	7.948	534.20	533.20[M-H] ⁻	61.98	20362-31-6	+	+	是
50	其他	雌酮	5.22	270.17	271.17[M+H] ⁺	271.17	53-16-7	+	+	是
51	其他	芥子酰基苯果酸酯	4.993	340.07	339.07[M-H] ⁻	223.06	76656-81-0	+	+	是
52	其他	异土大黄苷	5.12	420.13	419.13[M-H] ⁻	213.09	32727-29-0	+	+	是

注：“+”表示该酚类物质在相应样品中被检测到；“-”表示该酚类物质在相应样品中未被检测到。

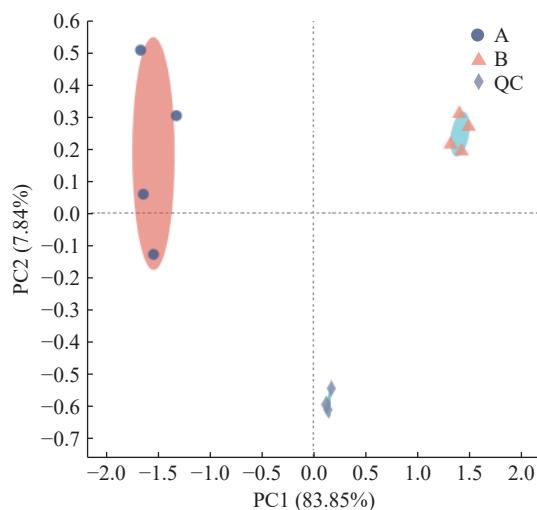


图 3 自然发酵前后青金桔酚类物质 PCA 模型的得分图

Fig.3 PCA scores of phenolic substances of *Citrus microcarpa* before and after natural fermentation

注: A 为发酵前样品, B 为发酵后样品, QC 为控制样。

表 2。由表 2 可知, 自然发酵后共有 10 种酚类物质发生显著变化, 占全部酚类物质种类的 19.23 %, 其中包括 5 种黄酮类、3 种香豆素类、2 种酚酸类。差异代谢物中, 除甲氧沙林下调外, 其余 9 种物质均上调, 根据 FC 值可以看出, 山奈酚上调倍数最大, 达到 13.82, 其次为芹菜素(10.99)、咖啡酸(5.02)、三叶草素(3.06)、芥子酸(2.55)、东莨菪碱(2.17)、7-羟基香豆素(1.24)、川陈皮素(1.15)、牡荆素(1.07)。

Hu 等^[12]对固态发酵条件下不同菌种发酵柑橘果渣后酚类物质变化情况进行了测定, 发现植物乳杆菌 P10、枯草芽孢杆菌 BF2 等单独或混合发酵均能使得糖苷类黄酮如柚皮苷、橙皮苷及苷元类黄酮如

表 2 自然发酵前后青金桔中显著差异的酚类物质
Table 2 Significant difference of phenolic substances in *Citrus microcarpa* before and after natural fermentation

类别	物质名称	VIP-PLS-DA值	FC(B/A)值	P值	显著上调(up)或下调(down)
酚酸类	咖啡酸	3.18	5.02	<0.01	up
	芥子酸	1.34	2.55	<0.01	up
	三叶草素	1.01	3.06	<0.01	up
黄酮类	芹菜素	1.14	10.99	<0.01	up
	山奈酚	1.42	13.82	<0.01	up
	川陈皮素	12.85	1.15	<0.01	up
香豆素类	牡荆素	2.05	1.07	<0.01	up
	7-羟基香豆素	1.43	1.24	<0.01	up
	甲氧沙林	1.28	0.02	<0.01	down
	东莨菪碱	1.27	2.17	<0.01	up

注: VIP: variable influence on projection, 为变量影响投影值; FC: fold change, 差异倍数; P<0.01 表示极显著。

橙皮素、柚皮素、川陈皮素等含量显著增加。这一结果与本研究基本一致。而 Kim 等^[21]采用自然发酵剂对柑橘副产物进行液体发酵时, 仅橙皮素、柚皮素等苷元类黄酮增加, 而芦丁、柚皮苷等糖苷类黄酮减少。这可能与发酵方式及微生物所产酶种类有关, 采用固态发酵或半固态发酵时, 发酵基质等流动性差, 微生物只能利用周边营养物质, 故迫使其多产纤维素酶、木聚糖酶等^[24], 促进结合态多酚与植物细胞壁结构物质分离, 糖苷类、苷元类酚类物质均增加。而液体发酵过程中, 微生物可能优先产 β -糖苷酶等, 促使糖苷类黄酮上与葡萄糖等糖类物质链接的 O-糖苷或 C-糖苷等断裂, 糖苷类黄酮转化为苷元类黄酮, 导致糖苷类黄酮减少, 苷元类黄酮增加^[25]。

2.3.3 青金桔酚类差异代谢物通路富集分析 为明确哪些代谢通路在自然发酵过程中对青金桔酚类物

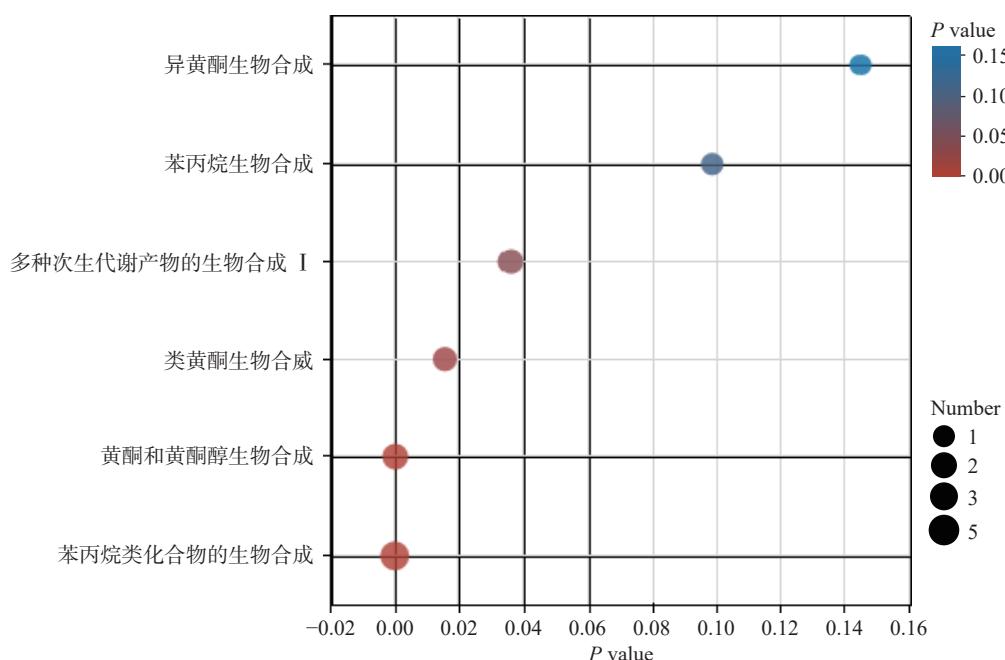


图 4 自然发酵前后青金桔中差异酚类物质的 KEGG 富集图

Fig.4 KEGG enrichment of differential phenolic substances in *Citrus microcarpa* before and after natural fermentation

表 3 显著差异酚类物质参与的代谢途径
Table 3 Metabolic pathways involved in significant differences of phenolic substances

代谢途径	KEGG编号	差异代谢物名称
异黄酮生物合成	map00943	芹菜素
苯丙烷生物合成	map00940	咖啡酸; 芥子酸
类黄酮生物合成	map00941	芹菜素; 山奈酚; 牡荆素
多种次生代谢产物的生物合成 I	map00999	7-羟基香豆素; 甲氧沙林; 东莨菪碱
黄酮和黄酮醇生物合成	map00944	芹菜素; 山奈酚; 牡荆素; 三叶草素
苯丙烷类化合物的生物合成	map01061	7-羟基香豆素; 芹菜素; 山奈酚; 东莨菪碱; 咖啡酸; 芥子酸

质变化产生影响, 本研究对自然发酵前后青金桔中酚类差异代谢物的代谢通路进行了富集分析, 具体的代谢通路及相应的代谢物见图 4 及表 3。图 4 中每个气泡表示一条代谢通路, 气泡的大小代表该通路中富集到差异代谢物种类的多少, 气泡越大, 表示该通路中酚类差异代谢物种类越多。气泡所在位置和颜色表示 P 值大小, P 值越小, 颜色越红, 富集程度越显著。由图 4 及表 3 可知, 自然发酵影响青金桔酚类物质变化的代谢通路有 6 条, 其中显著富集的有 4 条, 分别为苯丙烷类化合物的生物合成通路、黄酮和黄酮醇生物合成通路、类黄酮生物合成通路及多种次生代谢产物的生物合成 I 通路。该研究结果与张子洁等^[26]研究结果一致。

植物中酚类物质以糖代谢中部分中间体为前体物质, 经由莽草酸途径产生苯丙氨酸, 再经苯丙烷代谢途径产生香豆酰-CoA、黄酮代谢途径合成查耳酮、二氢查耳酮。二氢查耳酮作为其他黄酮类化合物的主要前体物质, 经过不同的分支合成途径, 最终生成黄酮、黄酮醇、异黄酮、黄烷酮和花青素等^[27]。本研究富集到的显著代谢通路中包含了苯丙烷代谢途径、黄酮代谢途径及其分支代谢通路, 涉及到酚类代谢差异物质有 7-羟基香豆素、芹菜素、山奈酚、东

莨菪碱、咖啡酸、芥子酸、牡荆素、三叶草素。本研究中未富集到莽草酸途径, 可能是其核心代谢物质莽草酸、香豆酰-CoA 等作为非酚类物质未被鉴定。

因此, 除多种次生代谢产物的生物合成 I 通路因涉及甲氧沙林降解而可能引起可溶性总酚下降外, 苯丙烷类化合物的生物合成通路、黄酮和黄酮醇生物合成通路、类黄酮生物合成通路等都与自然发酵过程中青金桔酚类物质增加有关。

2.4 青金桔酚类差异代谢物与生物活性相关性研究

α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶及胰脂肪酶作为主要存在于小肠中影响人体糖脂类物质消化、吸收的关键酶, 抑制其活性对防止肥胖、改善糖尿病等代谢紊乱症具有显著作用。本研究利用 Spearman 相关系数分析了青金桔中酚类差异代谢物与其抑制 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶及胰脂肪酶活性间的互作关系。相关性分析热图见图 5。由图 5 可知, 除甲氧沙林外, 其余 9 种差异代谢物均与可溶性总酚含量及抑制消化相关酶活性呈正相关。其中, 7 种酚类差异代谢物与抑制胰脂肪酶活性呈显著正相关(相关系数 >0.6 且 $P<0.05$), 物质分别为川陈皮素、芹菜素、咖啡酸、山奈酚、7-羟基香豆素、芥子酸、东莨菪碱; 6 种酚类差异代谢物与抑制 α -葡萄糖苷酶活性呈显

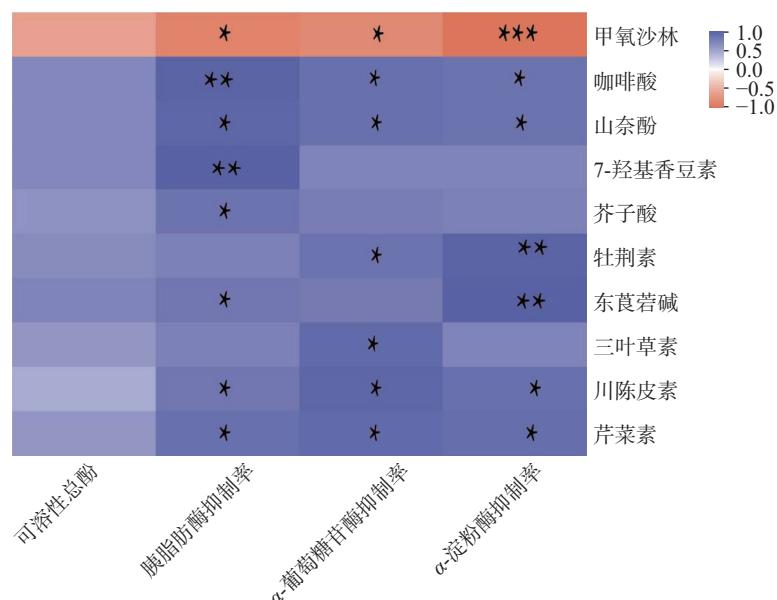


图 5 青金桔酚类差异代谢物与生物活性相关性热图

Fig.5 Thermal map of correlation between phenolic differential metabolites and biological activity of *Citrus microcarpa*

注: “*”表示相关性 $P<0.05$; “**”表示相关性 $P<0.01$; “***”表示相关性 $P<0.001$ 。

著正相关(相关系数 >0.7 且 $P<0.05$), 物质分别为川陈皮素、芹菜素、咖啡酸、山奈酚、牡荆素、三叶草素; 6 种酚类差异代谢物与抑制 α -淀粉酶活性呈显著正相关(相关系数 >0.6 且 $P<0.05$), 物质分别为川陈皮素、芹菜素、咖啡酸、山奈酚、牡荆素、东莨菪碱。而以上 10 种酚类差异代谢物与可溶性总酚含量均未表现出显著相关性($P>0.05$)。

本研究中川陈皮素、芹菜素、咖啡酸、山奈酚等四种酚类对抑制 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶及胰脂肪酶活性均呈显著正相关($P<0.05$), 由此可推测以上四种物质对消化相关酶活性具有一定抑制作用。相关研究表明, 芹菜素^[28]、山奈酚^[28]、咖啡酸^[29]对胰脂肪酶抑制的 IC_{50} 值分别为 4.53×10^{-4} mol/L、 2.29×10^{-4} mol/L、 0.88 mg/mL。酚类物质主要通过与酶结合, 诱导酶结构发生改变, 从而发挥抑制作用。酚类物质种类不同, 其与酶结合的作用力也不同。Yan 等^[30]研究发现川陈皮素主要通过氢键与胰脂肪酶结合, 而芹菜素与胰脂肪酶结合的主要驱动力是范德华力和氢键, 山奈酚^[28]、咖啡酸^[29]为疏水作用力; 芹菜素对 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶抑制的 IC_{50} 值分别为 21.66 、 1.43×10^{-5} mmol/L, 抑制类型均为非竞争抑制, 与 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶之间仅有一个或一类结合位点^[31]。以上研究证实, 川陈皮素、芹菜素、咖啡酸、山奈酚等均能有效抑制消化相关酶活性, 但其在青金桔多酚中对消化相关酶具体抑制率的贡献大小及是否对消化相关酶活性存在协同抑制作用等仍需进一步研究。

3 结论

本研究基于 UPLC-Q Exactive Orbitrap-MS 代谢组学研究了自然发酵对青金桔酚类物质变化及其抑制 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶及胰脂肪酶活性的影响。结果表明: 自然发酵可促进青金桔中可溶性总酚、总黄酮释放, 显著提升以上三种消化相关酶抑制率($P<0.05$); 青金桔中共检测到酚类物质 52 种, 自然发酵未改变酚类物质种类, 但可使川陈皮素、咖啡酸、牡荆素等 9 种酚类物质含量显著增加($P<0.01$), 其中川陈皮素、芹菜素、咖啡酸、山奈酚等四种酚类差异代谢物对抑制以上三种消化相关酶活性呈显著正相关($P<0.05$)。因此, 自然发酵可作为青金桔加工的一种有效手段。青金桔中酚类物质种类较多, 含量相差较大, 下一步将探讨酚类物质在发酵过程中绝对含量的变化情况, 及川陈皮素、芹菜素等对 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶、胰脂肪酶的具体抑制率的贡献大小及协同抑制效果。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] LOU S N, HO C T. Phenolic compounds and biological activities of small-size citrus: Kumquat and calamondin[J]. *Journal of Food And Drug Analysis*, 2017, 25(1): 162–175.
- [2] SAINI R K, RANJIT A, SHARMA K, et al. Bioactive compounds of citrus fruits: A review of composition and health benefits of carotenoids, flavonoids, limonoids, and terpenes[J]. *Antioxidants*, 2022, 11(2): 239.
- [3] HUANG C H, HSIAO S Y, LIN Y H, et al. Effects of fermented citrus peel on ameliorating obesity in rats fed with high-fat diet[J]. *Molecules*, 2022, 27(24): 8966.
- [4] ZENG S L, LI S Z, XIAO P T, et al. Citrus polymethoxyflavones attenuate metabolic syndrome by regulating gut microbiome and amino acid metabolism[J]. *Science Advances*, 2020, 6(1): eaax6208.
- [5] WANG F, ZHAO C Y, YANG M K, et al. Four citrus flavanones exert atherosclerosis alleviation effects in ApoE-/-Mice via different metabolic and signaling pathways[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2021, 69(17): 5226–5237.
- [6] LOU S N, HSU Y S, HO C T. Flavonoid compositions and antioxidant activity of calamondin extracts prepared using different solvents[J]. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2014, 22(3): 290–295.
- [7] LOU S N, LIN Y S, HSU Y S, et al. Soluble and insoluble phenolic compounds and antioxidant activity of immature calamondin affected by solvents and heat treatment[J]. *Food Chemistry*, 2014, 161: 246–253.
- [8] 张红建, 梁爱文, 王青松, 等. 青金桔籽油螺旋压榨工艺及其理化特性研究[J]. 中国粮油学报, 2021, 36(12): 65–63. [ZHANG H J, LIANG A W, WANG Q S, et al. Screw pressing technology and physical and chemical properties of green kumquat seed oil[J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2021, 36(12): 65–63.]
- [9] ZHANG L, LIU S, CHEN Y, et al. Metatranscriptomic approach reveals the functional and enzyme dynamics of core microbes during noni fruit fermentation[J]. *Food Research International*, 2021, 141: 109999.
- [10] ZOU Y, ZHANG H J, ZHENG L H. Physicochemical characteristics of calamondin (*Citrus microcarpa*) from Hainan[J]. *Asian Agricultural Research*, 2020, 12(12): 58–62.
- [11] CONIGLIO R O, DÍAZ G V, BARUA R C, et al. Enzyme-assisted extraction of phenolic compounds and proteins from sugarcane bagasse using a low-cost cocktail from *Auricularia fuscosuccinea*[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2021, 57(2): 1114–1121.
- [12] HU X, ZENG J R, SHEN F, et al. Citrus pomace fermentation with autochthonous probiotics improves its nutrient composition and antioxidant activities[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2022, 157: 113076.
- [13] 段宙宇, 窦志浩, 何艾, 等. 青金桔皮中多酚的提取及其抗氧化性研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(10): 244–248. [DUAN Z W, DOU Z H, HE A, et al. Extraction and antioxidant activity of polyphenols from green kumquat peel[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2015, 36(10): 244–248.]
- [14] LONG P P, WEN M C, GRANATO D, et al. Untargeted and targeted metabolomics reveal the chemical characteristic of pu-erh tea (*Camellia assamica*) during pile-fermentation[J]. *Food Chemistry*, 2020, 311: 125895.
- [15] RODRÍGUEZ C C, VÁZQUEZ V, MIGUES I, et al. Flavonoids and limonoids profiles variation in leaves from mandarin culti-

- vars and its relationship with alternate bearing[J]. *Agronomy*, 2022, 12(1): 121.
- [16] WANG F, CHEN L, CHEN H P, et al. Analysis of flavonoid metabolites in citrus peels (*Citrus reticulata* "Dahongpao") using UPLC-ESI-MS/MS[J]. *Molecules*, 2019, 24(15): 2680.
- [17] MULTARI S, GUZZON R, CARUSO M, et al. Alcoholic fermentation of citrus flavedo and albedo with pure and mixed yeast strains: Physicochemical characteristics and phytochemical profiles [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2021, 144: 111133.
- [18] FU W, ZHAO G, LIU J. Effect of preparation methods on physicochemical and functional properties of yeast β -glucan[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2022, 160: 113284.
- [19] PODSĘDEK A, MAJEWSKA I, REDZYNIA M, et al. *In vitro* inhibitory effect on digestive enzymes and antioxidant potential of commonly consumed fruits[J]. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 2014, 62(20): 4610–4617.
- [20] BENAYAD O, BOUHRIM M, TIJI S, et al. Phytochemical profile, α -glucosidase, and α -amylase inhibition potential and toxicity evaluation of extracts from *Citrus aurantium* (L) peel, a valuable by-product from Northeastern Morocco[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(11): 1555.
- [21] KIM S S, PARK K J, AN H J, et al. Phytochemical, antioxidant, and antibacterial activities of fermented *Citrus unshiu* byproduct[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2017, 26(2): 461–466.
- [22] 董玉婷, 蔡宏浩, 李志朋, 等. 乳杆菌发酵提高坛紫菜的抗氧化和抑制糖脂代谢关键酶活性[J]. 食品科学, 2022, 43(10): 162–171. [DONG Y T, CAI H H, LI Z P, et al. *Lactobacillus* fermentation improves the antioxidant activity of porphyra haitanensis and its inhibitory activity on key enzymes of glycolipid metabolism [J]. *Food Science*, 2022, 43(10): 162–171.]
- [23] ROOWI S, CROZIER A. Flavonoids in tropical citrus species[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(22): 12217–12225.
- [24] XUE P, LIAO W, CHEN Y, et al. Release characteristic and mechanism of bound polyphenols from insoluble dietary fiber of navel orange peel via mixed solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger*[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2022, 161: 113387.
- [25] 唐富豪, 滕建文, 韦保耀, 等. 基于非靶向代谢组学评价传统发酵对客家酸芥菜酚类化合物组成的影响[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(8): 128–133. [TANG F H, TENG J W, WEI B Y, et al. Evaluation of the influence of traditional fermentation on the composition of phenolic compounds in Hakka pickled mustard greens based on non-targeted metabolomics[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(8): 128–133.]
- [26] 张子洁, 唐曼秋, 夏玲, 等. 基于代谢组学分析四川黄酒麦曲制曲发酵过程中黄酮类物质的代谢[J]. 食品科技, 2022, 47(7): 250–255. [ZHANG Z J, TANG M Q, XIA Y, et al. Metabolic analysis of flavonoids during Koji making and fermentation of Sichuan yellow wine wheat Koji based on metabonomics[J]. *Food Science and Technology*, 2022, 47(7): 250–255.]
- [27] 林春草, 陈大伟, 戴均贵. 黄酮类化合物合成生物学研究进展[J]. 药学学报, 2022, 57(5): 1322–1335. [LIN C C, CHEN D W, DAI J G. Advances of synthetic biology of flavonoids[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2022, 57(5): 1322–1335.]
- [28] 黎沙. 基于光谱法结合分子模拟技术研究黄酮化合物对胰脂肪酶的抑制作用机制[D]. 南昌: 南昌大学, 2021. [LI S. Study on the inhibitory effect of flavonoids on pancreatic lipase by spectroscopy combined with molecular simulation technology[D]. Nanchang: Nanchang University, 2021.]
- [29] 范金波, 王晓露, 姜海静, 等. 荧光光谱法研究咖啡酸与胰脂肪酶相互作用[J]. 食品工业科技, 2017, 38(2): 152–155. [FAN J B, WANG X L, JIANG H J, et al. Study on the interaction between caffeic acid and pancreatic lipase by fluorescence spectroscopy[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(2): 152–155.]
- [30] YAN T C, YUE Z X, GU Y X, et al. Screening of lipase inhibitors in citrus fruits by electrophoretically-mediated microanalysis combined with molecular docking[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2022, 105: 104185.
- [31] 杨继晨. 黄酮类化合物对 α -淀粉酶/ α -葡萄糖苷酶的抑制机制及其构效关系研究[D]. 天津: 天津大学, 2021. [YANG J C. Studies on inhibitory mechanism and structure-activity relationship of flavonoid compounds against α -amylase/ α -glucosidase[D]. Tianjin: Tianjin University, 2021.]