蔡鲁宁, 刘雪茹, 陈磊, 等. 三维荧光光谱结合二阶校正算法对两种植物病原菌快速定性定量分析 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 1−12. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090083

CAI Luning, LIU Xueru, CHEN Lei, et al. Qualitative and Quantitative Analysis of Two Plant Pathogens by Three Dimensional Fluorescence Spectroscopy Combined with Second Order Correction Algorithm[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 1−12. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090083

·未来食品·

三维荧光光谱结合二阶校正算法对两种植物病原菌快速定性定量分析

蔡鲁宁[1], 刘雪茹[1], 陈　磊[1], 李　欣[1,2,3,*], 古绍彬[1,*]

（1.河南科技大学食品与生物工程学院, 河南洛阳 471023;
2.河南科技大学微生物资源开发与利用校级重点实验室, 河南洛阳 471023;
3.河南省食品微生物工程技术研究中心, 河南洛阳 471023）

摘　要: 本文以黄瓜细菌性角斑病病原菌丁香假单胞菌黄瓜致病变种（*Pseudomonas syringae* pv. *Lachrymans*-8, PSL-8）和小麦赤霉病病原菌禾谷镰孢菌（*Fusarium graminearum*-ACCC37687）为研究对象，运用三维荧光光谱分析技术快速鉴别植物真菌病害和细菌病害的病原微生物，探索三维荧光光谱分析技术快速识别植物真菌细菌病害的可行性。通过收集梯度混合菌液样本的三维荧光光谱数据，使用二阶校正算法交替三线性分解（Alternating Trilinear Decomposition，ATLD）、平行因子分析（Parallel Factor Analysis，PARAFAC）、自加权交替三线性分解（Self-weighted Alternating Trilinear Decomposition，SWATLD）、交替惩罚三线性分解（Alternating Penalty Trilinear Decomposition，APTLD）和一阶算法偏最小二乘回归系数法（Partial Least Squares，PLS）对数据进行解析，提取特征激发和特征发射波长，通过对特征波长荧光强度数据和菌液在 600 nm 波长下的吸光度（OD_{600}）进行多元线性回归从而建立浓度预测模型，使用留一法交叉验证（Leave-One-Out Cross Validation，LOOCV）衡量模型预测性能，进而实现复杂的菌液混合体系下对单组分的定性定量分析。丁香假单胞菌荧光特征峰是激发/发射（E_x/E_m）=285 nm/340 nm、290 nm/340 nm、285 nm/332.4 nm、280 nm/361.6 nm、295 nm/361.6 nm。禾谷镰孢菌荧光特征峰是激发/发射（E_x/E_m）=380 nm/468 nm、390 nm/512 nm、340 nm/511.2 nm、415 nm/511.2 nm。结果表明：丁香假单胞菌浓度预测模型（R^2_{cv}=0.92441191，RMSEP=0.005163633，R=0.961463421）比禾谷镰孢菌浓度预测模型（R^2_{cv}=0.583953931，RMSEP=0.027653679，R=0.764168784）效果更佳。本研究结果为快速鉴别真菌及细菌病害提供可利用性方法。

关键词: 三维荧光光谱, 二阶校正算法, 丁香假单胞菌, 禾谷镰孢菌, 浓度预测

中图分类号: S431.9; O433.4　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0001−12

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090083　　本文网刊:

Qualitative and Quantitative Analysis of Two Plant Pathogens by Three Dimensional Fluorescence Spectroscopy Combined with Second Order Correction Algorithm

CAI Luning[1], LIU Xueru[1], CHEN Lei[1], LI Xin[1,2,3,*], GU Shaobin[1,*]

（1.College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, China;
2.Key Laboratory of Microbial Resources Exploitation and Utilization, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, China;
3.Henan Engineering Research Center of Food Microbiology, Luoyang 471023, China）

收稿日期: 2021−09−07

基金项目: 国家重点研发计划（2017YFC1600802）。

作者简介: 蔡鲁宁（1995−）, 男, 硕士研究生, 研究方向: 三维荧光光谱分析和微生物学, E-mail: 141416100201@stu.haust.edu.cn。

*** 通信作者:** 李欣（1979−）, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 微生物学, E-mail: lixin@haust.edu.cn。

古绍彬（1975−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 微生物学, E-mail: shaobingu@haust.edu.cn。

Abstract: *Pseudomonas syringae* pv. *Lachrymans*-8 and *Fusarium graminearum*-ACCC37687 were used to quickly identify the pathogenic microorganisms of plant fungal diseases and bacterial diseases. To explore the feasibility of rapid identification of plant fungal and bacterial diseases by three-dimensional fluorescence spectroscopy. By collecting the three-dimensional fluorescence spectrum data of gradient mixed bacterial solution samples, the data were analyzed by second-order correction algorithm alternating trilinear decomposition (ATLD), parallel factor analysis (PARAFAC), self weighted trilinear decomposition (SWATLD), alternating penalty trilinear decomposition (APTLD) and first-order algorithm partial least squares regression coefficient method (PLS), and the characteristic excitation and emission wavelengths were extracted. The concentration prediction model was established by multiple linear regression between the fluorescence intensity data of characteristic wavelength and the absorbance (OD_{600}) of bacterial solution at 600 nm wavelength. The prediction performance of the model was measured by the left one out cross validation (LOOCV), so as to realize the qualitative and quantitative analysis of single component in complex bacterial solution mixed system. The fluorescence characteristic peaks of *Pseudomonas syringae* were excitation/emission=285 nm/340 nm, 290 nm/340 nm, 285 nm/332.4 nm, 280 nm/361.6 nm, 295 nm/361.6 nm. The fluorescence characteristic peaks of *Fusarium graminearum* were excitation/emission=380 nm/468 nm, 390 nm/512 nm, 340 nm/511.2 nm, 415 nm/511.2 nm. The results showed that the concentration prediction model of *Pseudomonas syringae*-8 (R^2_{cv}=0.92441191, RMSEP=0.005163633, R=0.961463421) was better than that of *Fusarium graminearum*-ACCC37687 (R^2_{cv}=0.583953931, RMSEP=0.027653679, R=0.764168784). The results of this study provide an available method for rapid identification of fungal and bacterial hazards.

Key words: three dimensional fluorescence spectrum; second order correction algorithm; *Pseudomonas syringae* pv. *Lachrymans*; *Fusarium graminearum*; concentration prediction

传统的微生物鉴定方法主要是通过形态学观察并辅以生化实验对微生物种属进行判断[1], 存在操作复杂繁琐, 耗时费力, 准确率不高等缺点。分子生物学鉴定方法虽然能够实现准确分类, 但需要专业的机构和人员且操作成本高。使用荧光检测仪器快速获得微生物样本的数据信息, 并依据微生物独特的信息表达实现微生物的快速分类和定量, 是一种新颖的研究角度。三维荧光光谱技术具有选择性好、灵敏度高、测试快速等优点。二阶校正可以在干扰存在的情况下对组分进行定性定量分析, 这一特点也被称为二阶优势[2]。三维荧光光谱结合二阶校正算法目前已在农药检测[3]、食用植物油真伪鉴别[4]、酚类物质检测[5]、原油检测[6−7]、水环境[8−9]、医药[10] 等众多领域中广泛应用。

荧光光谱分析技术在微生物鉴别方面已有研究, 例如, 通过紫外线激发的固有荧光可实现细菌和酵母物种的区分[11], KANG 等[12] 使用三维荧光光谱实现口腔中 7 种不同细菌的鉴定。此外, 内源荧光法作为一种更便捷、灵敏的研究方法, 在细菌鉴别方面受到广泛关注[13]。目前, 利用三维荧光光谱技术对单一体系下的纯种微生物进行检测鉴定的研究较多。然而, 在对含有多种微生物的复杂体系中目标微生物的定性和定量分析鲜有研究。黄瓜细菌性角斑病与霜霉病症状表现类似, 给黄瓜细菌性角斑病的诊断和预防增加了难度, 黄瓜细菌性角斑病与霜霉病的区分是诸多学者研究黄瓜病害的热门话题[14], 黄瓜细菌性角斑病的病原菌是丁香假单胞菌黄瓜致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. *Lachrymans*, PSL), 它的检测通常依据形态学、生理生化检验和分子生物学鉴定等方法实现[15], 三维荧光光谱分析技术能否成为 PSL 的检测方法仍值得探究; 小麦赤霉病是由多种镰孢菌侵染所引起的小麦病害, 禾谷镰孢菌(*Fusarium graminearum*)是其中之一[16], 赤霉病能够使小麦种子发芽生长受阻[17], 病麦中含有多种真菌毒素包括脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)和玉米赤霉烯酮(ZEN)等[18−19], 能导致人畜中毒, 因此, 探寻快捷而又经济的病原菌检测方法对于小麦赤霉病的预防具有重大意义。

本文以黄瓜细菌性角斑病病原菌丁香假单胞菌黄瓜致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. *Lachrymans*-8, PSL-8)[20−21] 和小麦赤霉病病原菌禾谷镰孢菌(*Fusarium graminearum*-ACCC37687)[22−23] 为研究对象, 运用三维荧光光谱分析技术快速鉴别植物真菌病害和细菌病害的病原微生物, 探索三维荧光光谱分析技术快速识别植物真菌细菌病害的可行性。通过收集梯度混合菌液样本的三维荧光光谱数据, 探究二阶校正算法对三维荧光光谱数据进行解析、提取特征激发和特征发射波长的能力, 对特征波长荧光强度数据和菌液在 600 nm 波长下的吸光度(OD_{600})进行多元线性回归从而建立浓度预测模型, 使用留一法交叉验证(Leave-One-Out Cross Validation, LOOCV)衡量模型预测性能, 进而实现复杂的菌液混合体系下对单组分的定性定量分析。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

LB 液体培养基: 酵母浸粉 5 g、胰蛋白胨 10 g、氯化钠 10 g　北京奥博星生物技术有限责任公司; PDA 斜面培养基　青岛海博生物技术有限公司; 丁香假单胞菌 PSL-8　中科院植保所赵廷昌教授惠赠; 禾谷镰孢菌　中国农业微生物菌种保藏管理中心, 菌株编号: ACCC37687。

Smart Fluo-Pro Flex One 型三维荧光光谱仪

北京卓立汉光仪器有限公司；LDZX-30KBS 型立式压力蒸汽灭菌锅　上海申安医疗器械厂；SW-CJ-1FD 型洁净工作台　苏州安泰空气技术有限公司；H1650-W 型医用离心机　湖南湘仪实验室仪器有限公司；THZ-92C 台式恒温振荡器　上海跃进医疗器械有限公司；DNP-9022 型电热恒温培养箱　北京市永光明医疗仪器厂；722s 可见分光光度计　上海精密科学仪器有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　单菌液制备

1.2.1.1　丁香假单胞菌菌液制备　将活化后的丁香假单胞菌菌液按百分之一接种量接种到 LB 液体培养基，28 ℃、220 r/min 振荡培养 15 h，菌液离心 7000 r/min，10 min，弃上清，用无菌双蒸水制成菌悬液，检测吸光度 OD_{600}，用无菌双蒸水将 OD_{600} 调整到 0.5[24]。

1.2.1.2　禾谷镰孢菌孢子悬液制备　在超净工作台中挑取小块禾谷镰孢菌菌块接种到灭菌的 PDA 斜面培养基上，28 ℃ 培养 3~5 d，将培养好的禾谷镰孢菌菌种斜面，倒入 5 mL 无菌水，轻轻将 PDA 培养基表面的孢子刮下，将孢子悬液置于已灭菌的 50 mL 三角瓶内，瓶内预先放置数粒无菌玻璃球，采用充分振荡后灭菌的纱布（180 r/min，10 min，28 ℃，八层纱布）进行过滤，即得孢子悬浮液。一组实验需要 9~10 个禾谷镰孢菌菌种斜面。检测孢子悬浮液吸光度 OD_{600}，用无菌双蒸水将 OD_{600} 调整到 0.5[25]。

1.2.2　混合菌液制备

将制备得到的丁香假单胞菌菌液（OD_{600}=0.5）和禾谷镰孢菌孢子悬液（OD_{600}=0.5）梯度混合，每个样本期望 OD_{600} 如表 1 所示共 11 个梯度。后续建立浓度预测模型需要扩大样本量，为了扩大样本量同时验证低浓度下混合菌液荧光的规律性，建模时混合菌液 OD_{600} 从 0.5 调整到 0.2，括号内为建模时每个样本的期望 OD_{600}，收集 40 组混合菌液样本三维荧光光谱信息用于建模。设置激发波长范围为 200~450 nm，步长为 5 nm，共 51 个激发波长；发射波长范围为 260~800 nm，步长 0.4 nm，共 1351 个激发波长，积分时间是 1 s。按照以上设置扫描三维荧光光谱，每一组光谱数据量为 11×51×1351，将光谱数据输入 MATLAB 软件进行预处理、数据解析和建模。

表 1　混合菌液浓度梯度设置及期望 OD_{600}

Table 1　Concentration gradient setting and expected OD_{600} of mixed bacteria solution

样本编号	丁香假单胞菌（PSL-8）		禾谷镰孢菌（ACCC37687）	
	体积（mL）	期望OD_{600}	体积（mL）	期望OD_{600}
1	0	0	1	0.50(0.20)
2	0.1	0.05(0.02)	0.9	0.45(0.18)
3	0.2	0.10(0.04)	0.8	0.40(0.16)
4	0.3	0.15(0.06)	0.7	0.35(0.14)
5	0.4	0.20(0.08)	0.6	0.30(0.12)
6	0.5	0.25(0.10)	0.5	0.25(0.1)
7	0.6	0.30(0.12)	0.4	0.20(0.08)
8	0.7	0.35(0.14)	0.3	0.15(0.06)
9	0.8	0.40(0.16)	0.2	0.10(0.04)
10	0.9	0.45(0.18)	0.1	0.05(0.02)
11	1	0.50(0.20)	0	0

1.3　数据处理

1.3.1　荧光数据预处理　对采集到的荧光光谱数据进行预处理来消除瑞丽散射的干扰。瑞丽散射一般在发射波长等于 1 倍或 2 倍激发波长区域及其临近区域（±10~15 nm 左右）[7]。先将瑞丽散射区域数据扣除，采用 Delaunay 三次多项式插值方法，以瑞丽散射相邻区域的数据为基准进行三次多项式插值。然后使用（Savizkg-Golag，SG）多项式曲面平滑[26] 来消除图谱中的噪音毛刺，并将预处理后的三维荧光光谱数据用于后续分析。

1.3.2　核心一致性诊断（CORCONDIA）　正确的组分数对于平行因子分析（Parallel Factor Analysis，PARAFAC）算法提取正确的特征波长起到关键的作用，CORCONDIA 法[27] 通过计算 Tucker3 模型中的超对角矩阵与最小二乘拟合阵之间的相近程度来估算组分数，相近程度用核心一致值来衡量。核心一致函数计算公式如下：

$$\text{核心一致值}(\%) = 100\times\left(1-\frac{\sum_{i=1}^{N}\sum_{j=1}^{N}\sum_{k=1}^{N}(g_{ijk}-t_{ijk})^2}{\sum_{i=1}^{N}\sum_{j=1}^{N}\sum_{k=1}^{N}t_{ijk}^2}\right) \quad \text{式（1）}$$

式中，g_{ijk} 是 Tucker3 模型超对角矩阵元素；t_{ijk} 为单位超对角矩阵；N 是模型组分数；i、j、k 分别表示三维荧光数据阵对应的第 i 个激发波长、第 j 个发射波长和第 k 个混合菌液样本。

当预测组分数 N 小于等于正确组分数时，计算得到的核心一致值越接近 100%，此时模型符合三线性；N 大于正确组分数时，计算得到的核心一致值接近 0，模型偏离三线性。当组分数取到 N 时核心一致值大于 60%，此时 N-1 就是正确组分数[2]。

1.3.3　三线性模型　将菌种荧光实验设定为 I 个激发波长和 J 个发射波长，对梯度浓度下的 K 个样本进行三维荧光光谱数据收集，得到大小为 I×J×K 的三维数据阵 X[3]。三维数据阵的元素（i，j，k）设置为 X_{ijk}，则 X_{ijk} 的表达式如下：

$$X_{ijk}=\sum_{n=1}^{N}a_{in}b_{jn}c_{kn}+e_{ijk}$$
$$(i=1,\cdots,I;\ j=1,\ldots,J;\ K) \quad \text{式（2）}$$

式中，a_{in} 是相对激发矩阵 A（I×N）中的元素，b_{jn} 是相对发射矩阵 B（J×N）中的元素，c_{kn} 是相对浓度阵 C（K×N）中的元素。e_{ijk} 是相对残差数阵 E（I×J×K）中的元素。N 是对样品体系中贡献响应信号的所有组分数，包括感兴趣组分、仪器噪声干扰组

分和样品溶液杂质干扰组分[28]。

1.3.4 平行因子分析(PARAFAC) Harshman 在 1970 年提出了平行因子分析(Parallel Factor Analysis, PARAFAC)算法[29], 通过对以下目标函数的最小化求解相对激发矩阵 A、相对发射矩阵 B、相对浓度阵 C:

$$L(E)=\sum_{K=1}^{K}\left\|X_K-A\,\mathrm{diag}(c_{(K)})\,B^{T}\right\|_F^2 \qquad 式（3）$$

$$A=\left(\sum_{K=1}^{K}X_K B\,\mathrm{diag}(c_{(K)})\right)\left(\sum_{K=1}^{K}\mathrm{diag}(c_{(K)})\,B^{T}B\,\mathrm{diag}(c_{(K)})\right)^{-1} \qquad 式（4）$$

$$B=\left(\sum_{K=1}^{K}X_K{}^{T}A\,\mathrm{diag}(c_{(K)})\right)\left(\sum_{K=1}^{K}D_K A^{T}A\,\mathrm{diag}(c_{(K)})\right)^{-1} \qquad 式（5）$$

$$c_{(K)}=\{(B^{T}B)\times(A^{T}A)\}^{-1}\{(A^{T}X_K B)\times I\}1 \qquad 式（6）$$

PARAFAC 算法同时进行的另外一个过程是将三维数据阵展开成二维数据阵, 分别沿三个方向进行交替分解[30]:

$$X_{I\times JK}=A(C\odot B)^{T}+E_{I\times JK} \qquad 式（7）$$

$$X_{J\times KI}=B(A\odot C)^{T}+E_{J\times KI} \qquad 式（8）$$

$$X_{K\times IJ}=C(B\odot A)^{T}+E_{K\times IJ} \qquad 式（9）$$

以上公式最小化可得:

$$A=X_{I\times JK}((C\odot B)^{T})^{+} \qquad 式（10）$$

$$B=X_{J\times KI}((A\odot C)^{T})^{+} \qquad 式（11）$$

$$C=X_{K\times IJ}((B\odot A)^{T})^{+} \qquad 式（12）$$

迭代计算过程如下:

第一步: 确定样本体系的组分数 N; 第二步: 相对激发矩阵 A 和相对发射矩阵 B 的初始化; 第三步: 根据相对激发矩阵 A 和相对发射矩阵 B 计算相对浓度阵 C; 第四步: 根据对相对发射矩阵 B 和相对浓度阵 C 计算相对激发矩阵 A, 并且将相对激发矩阵 A 归一化; 第五步: 根据相对激发矩阵 A 和相对浓度阵 C 计算相对发射矩阵 B, 并且将相对发射矩阵 B 归一化; 第六步: 根据相对激发矩阵 A 和相对发射矩阵 B 计算相对浓度阵 C, 重复第 4~6 步, 直到 $(SSRE_{(m)}-SSRE_{(m-1)})/SSRE_{(m-1)}\le 1\times10^{-6}$

1.3.5 交替三线性分解(ATLD) 吴海龙在 1998 年提出了交替三线性分解(Alternating Trilinear Decomposition, ATLD)算法[31], 相比于 PARAFAC 算法, ATLD 提出了切片矩阵和广义逆运算的思想, 将三维数据阵沿三个方向的切片矩阵为单位对相对激发矩阵 A、相对发射矩阵 B、相对浓度阵 C 进行分解解析, 如下:

$$a_{(i)}=\left(\mathrm{diagm}\left(B^{+}X_{i..}(C^{T})^{+}\right)\right)^{T} \qquad 式（13）$$

$$b_{(j)}=\left(\mathrm{diagm}\left(C^{+}X_{j.}(A^{T})^{+}\right)\right)^{T} \qquad 式（14）$$

$$c_{(k)}=\left(\mathrm{diagm}\left(A^{+}X_{..k}(B^{T})^{+}\right)\right)^{T} \qquad 式（15）$$

1.3.6 自加权交替三线性分解(SWATLD) 自加权交替三线性分解(Self-weighted Alternating Trilinear Decomposition, SWATLD)是在 ATLD 基础上进行了改进, 将每个矩阵的迭代更新公式优化[7], 例如对相对激发矩阵 A 的更新如下:

$$a_{(i)}=\frac{1}{2}(\mathrm{diagm}(C^{+}X_{i..}{}^{T}B)./\mathrm{diagm}(B^{T}B)+\mathrm{diagm}(B^{+}X_{i..}C)./\mathrm{diagm}(C^{T}C))^{T} \qquad 式（16）$$

SWATLD 与 ATLD 思路一致, 因此具有 ATLD 具有的对组分不敏感, 收敛快的优点, 同时缓解了 ATLD 对背景噪声信号敏感的缺点。

1.3.7 交替惩罚三线性分解(APTLD) 交替惩罚三线性分解(Alternating Penalty Trilinear Decomposition, APTLD)是将平行因子分析(PARAFAC)和自加权三线性分解(SWATLD)两种算法进行组合优化[4], 在三线性模型目标函数中引入约束条件, 将求解问题转变为约束条件下的最优解问题, 同时引入惩罚项将有约束问题变成无约束问题[32]。以相对激发矩阵 A 为例:

矩阵 A 元素残差平方和定义为:

$$\sigma_1(A)=\sum_{i=1}^{I}\left\|X_{i..}-B\,\mathrm{diag}(a_i)C^{T}\right\|_F^2 \qquad 式（17）$$

式中: F 为三维数据阵 X 中的主因子数; A 是相对激发矩阵、B 是相对发射矩阵、C 是相对浓度阵; $X_{i..}$、为三维数据阵 X 的第 i 个水平矩阵(J×K); a_i 为载荷阵 A 的第 i 行矩阵; diag(a_i)、为 a_i 对应的 U×U 阶对角矩阵; U 是所有对荧光做出贡献的组分数。

相对激发矩阵 A 定义为:

$$A=\left\{\sum_{k=1}^{K}[\mathrm{diag}(a_k)B^{T}B\,\mathrm{diag}(c_k)]+2\alpha I\right\}^{+}\times\left\{\sum_{k=1}^{K}X_{..k}\left\{\left[B+\alpha(B^{T})^{+}W_C^2\right]\mathrm{diag}(c_k)\right\}+\beta\sum_{j=1}^{J}X_{j.}^{T}(C^{+})^{T}W_B^2\,\mathrm{diag}(b_j)\right\} \qquad 式（18）$$

式中: A^{+}、B^{+}、C^{+}分别为 A、B、C 的 Moore-Penose 广义逆矩阵, 上标＋为广义逆; W_A、W_B、W_C 为权重矩阵; α、β 为平行因子分析(PARAFAC)与自加权三线性分解(SWATLD)的权重。

1.3.8 偏最小二乘回归系数法(PLS) 偏最小二乘回归系数法(Partial Least Squares, PLS)分别对混合菌液样本特征激发和特征发射波长进行提取[33−34]。偏最小二乘回归系数法是通过分别构建禾谷镰孢菌和丁香假单胞菌混合菌液下梯度上升和梯度下降的浓度值对激发光谱和发射光谱的回归模型, 波长的回归系数代表该波长的贡献比重, 回归系数的绝对值越大, 代表该波长对回归模型预测性能的影响程度越大。

1.3.9 留一法交叉验证(LOOCV) 留一法交叉验证

（Leave-One-Out Cross Validation，LOOCV）可以验证混合菌液浓度预测模型的性能，每次只留下一个样本做测试集，其它样本做训练集，直至所有样本均充当过测试集和验证集，模型预测能力由相关系数 R、交叉验证决定系数 R^2_{cv}、预测均方根误差 RMSEP 来衡量[35]。相关系数 R 和交叉验证决定系数 R^2_{cv} 越接近 1、预测均方根误差 RMSEP 越小，表明浓度预测模型的性能越好，准确率越高，模型得到的预测值越接近真实值。

$$R^2_{cv} = 1 - \frac{\mathrm{PRESS}}{\mathrm{SS_{total}}} \qquad 式（19）$$

$$\mathrm{RMSEP} = \left[\frac{1}{N-1}\sum_{i=1}^{N}(c_{act} - c_{pred})^2\right]^{1/2} \qquad 式（20）$$

式中 PRESS 是预测残差平方和，SS_{total} 是总平方和，c_{act} 和 c_{pred} 分别是实际样本浓度和预测样本浓度。

2　结果与分析

2.1　荧光数据预处理结果

图 1（A）是 OD_{600}=0.5 的丁香假单胞菌和禾谷镰孢菌混合菌液的原始三维荧光光谱图，图 1（B）是去除瑞丽散射再经过 SG 平滑处理后的三维荧光光谱图。通过前后对比发现，采集混合菌液的三维荧光数据时出现的瑞丽散射强度非常高以至于产生瑞丽墙，位于等高线图的右下方，原始三维荧光光谱的特征信息受到瑞丽散射形成的背景墙的干扰而难以凸显真实的三维荧光光谱信息。由图 1（B）可以发现，去除瑞丽散射再经过 SG 平滑处理后，右下方的瑞丽散射墙被消除，混合菌液的特征峰位置信息得以呈现，完整保留荧光信息的同时能够有效消除瑞丽散射带来的不良影响，为后续特征信息的提取工作打下良好的基础。

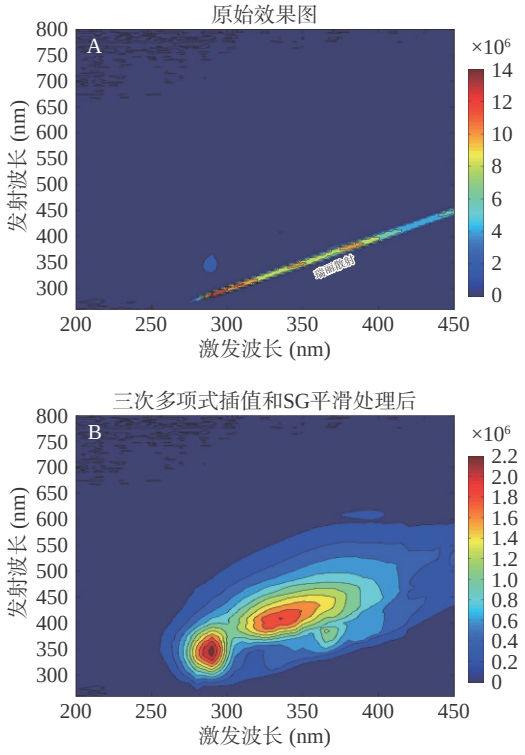


图 1　混合菌液 SG 平滑处理前和 SG 平滑处理后的光谱等高线图

Fig.1　Spectral contour map of mixed bacterial solution before and after SG smoothing treatment

2.2　单一菌种的三维荧光光谱图

图 2（A）是 OD_{600}=0.5 的丁香假单胞菌经过 SG 平滑处理后的光谱图，图 2（B）是 OD_{600}=0.5 的禾谷镰孢菌经过 SG 平滑处理后的光谱图。丁香假单胞菌和禾谷镰孢菌的波峰位置和荧光强度清晰可见，差异明显，说明丁香假单胞菌和禾谷镰孢菌在混合菌液定性分析时相互干扰较小。丁香假单胞菌波峰位置为激发/发射（E_x/E_m）=285~290 nm/336~360 nm，禾谷镰孢菌波峰位置为激发/发射（E_x/E_m）=340~390 nm/410~470 nm。为实现混合菌种定量分析，需确定单一菌种所对应出峰位置，并与各类方法分解光谱图数据得到的每一组分出峰位置做出比较，依此判断每一组分所对应的菌种类别。

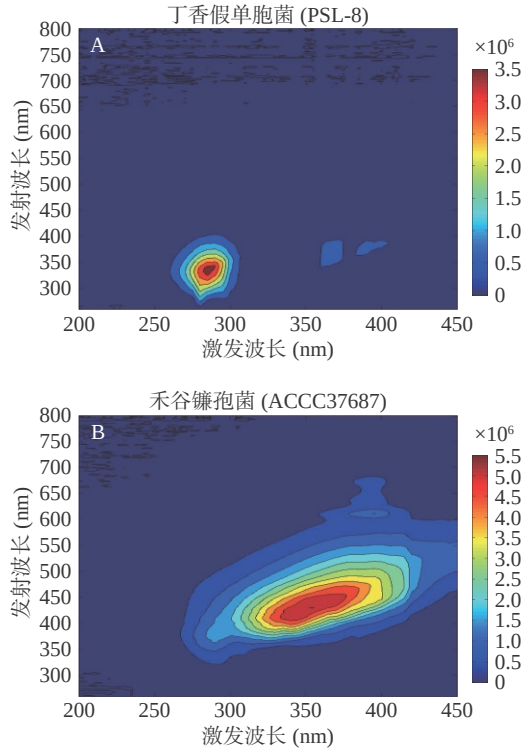


图 2　丁香假单胞菌（PSL-8）和禾谷镰孢菌（ACCC37687）使用 SG 平滑处理后的光谱等高线图

Fig.2　Spectral contour map of *Pseudomonas syringae* pv. *Lachrymans*-8 and *Fusarium graminearum*- ACCC37687 smoothed by SG

2.3　组分数确定

在进行三线性模型分解解析时，组分数的确定是分解过程中极为关键的一环，尤其是在使用平行因子分析时，需要找到合理的组分数[36]。虽然交替三线性分解对组分数不敏感，但是过高或者过低的组分数都会导致计算模型的误差[5]，合适的组分数会使结果更加准确。故用核心一致性诊断（CORCONDIA）对

预处理后的三维荧光光谱进行组分数的确定。图 3 反映了 OD_{600}=0.5 混合菌液不同组分数所对应的核心一致值。

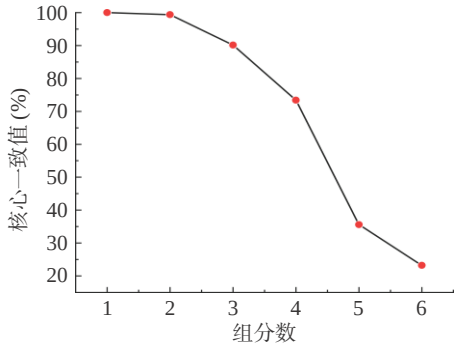


图 3 不同组分数对应的核心一致值

Fig.3 Core consistent values of different component scores

随着组分数的增加，核心一致值逐渐降低，1~4 组分时核心一致值大于 60%，当组分数大于 4 的时候核心一致值小于 60%，故混合菌液的最佳组分数应是 4。

2.4 使用二阶校正算法对混合菌液样品进行分析

将最佳组分数设定为 4，分别使用交替三线性分解（ATLD）、平行因子分析（PARAFAC）、自加权三线性分解（SWATLD）、交替惩罚三线性分解（APTLD）对 OD_{600}=0.5 混合菌液样品三维荧光光谱进行分解解析。会得到每一组分的相对激发强度光谱、相对发射强度光谱和组分相对浓度。四种组分的激发波长出峰位置清晰可见并且相互独立，未出现出峰位置交叠的情况，组分之间无相互干扰。分析激发发射光谱数据可以得到各个组分所对应的荧光峰出峰位置，汇总结果至表 2。

将二阶校正算法分解光谱得到的各个组分的激发光谱发射光谱波峰位置与单一丁香假单胞菌和禾谷镰孢菌激发光谱发射光谱波峰位置相比较，对比每一组分波峰位置下的荧光强度变化趋势，结合菌种浓度变化规律，把既满足组分波峰位置和菌种波峰位置一致，又满足波峰位置荧光强度变化规律和菌种浓度变化规律一致的组分视为该菌种的特征组分，特征组分的波峰位置视为该菌种的特征波长。可以看出每一算法都能分解出一个符合丁香假单胞菌波峰位置和一个符合禾谷镰孢菌波峰位置的组分。由于采集三维荧光光谱时激发波长 E_x 的步长设置为 5 nm，可以看出每种方法提取出的丁香假单胞菌的特征组分波峰位置只相差 1~2 个步长，波峰位置具有高度相似性，提取出的禾谷镰孢菌特征组分波峰位置也有相同的规律。将四种二阶校正算法提取出的丁香假单胞菌和禾谷镰孢菌相对激发光谱图（A）、相对发射光谱图（B）和组分相对浓度图（C）汇总进行对比，如图 4。

由图 4（A）和图 4（B）可以看出四种二阶方法所提取出来的丁香假单胞菌的相对激发光谱峰形相似，相对发射光谱也具有高度一致性，出峰位置激发/发射（E_x/E_m）=285（290）/332.4（340）nm。禾谷镰孢菌激发光谱和发射光谱峰形亦是如此，具有高度一致性，出峰位置激发/发射（E_x/E_m）=380（390）/468（512）nm。由图 4（C）可以看出，四种二阶方法预测浓度曲线趋势大致相同，可以分解出上升趋势和下降趋势两种曲线，符合实验设计的丁香假单胞菌浓度逐渐升高、禾谷镰孢浓度逐渐降低的规律。使用交替三线性分解（ATLD）、自加权交替三线性分解（SWATLD）、交替惩罚三线性分解（APTLD）获得的浓度曲线规律更明显，而平行因子分析（PARAFAC）在相同的荧光数据下的获得的浓度曲线在 2 号样品和 8 号样品出现异常浮动。

2.5 使用偏最小二乘回归系数法（PLS）对混合菌液样品进行分析

用偏最小二乘回归系数法（PLS）提取 OD_{600}=0.5 混合菌液的特征激发波长和特征发射波长，得到混合菌液的前三组分权重系数图。分别按浓度逐渐上升和浓度逐渐下降对混合菌液三维荧光光谱数据使用 PLS 方法，结果如图 5 所示。

每个波长所对应回归系数绝对值的大小代表该波长对预测模型性能影响的程度[37]。由图 5 可知，第 1 组分和第 2 组分不同波长所对应的回归系数波动范围较小，不能较好的体现不同样本之间的差异。因此选取波动幅度更大、能更好的体现样本差异的第 3 组分作为特征组分，该组分回归系数的波峰波谷对应的波长为特征波长。由图 5（A）可得，按浓度上升使用 PLS 得到的特征激发波长分别为 270、280、295、315、320、345、415 nm。由图 5（B）可得特征发射波长分别为 361.6、416、515.6 nm。由图 5（C）可得，按浓度下降使用 PLS 得到的特征激发波长分别为 285、295、315、320、340、415 nm。由图 5（D）可得特征发射波长为 360.8、415.2、511.2 nm。

先将筛选出来的特征波长与单一丁香假单胞菌和禾谷镰孢菌波峰位置进行比对，再通过对比各特征波长下荧光强度变化趋势，结合菌种浓度变化规律，

表 2 在 4 组分下用二阶校正算法分解出的每一组分出峰位置

Table 2 Peak position of each component decomposed by second-order correction algorithm under 4 components

组分数	平行因子分析E_x/E_m（nm）	交替三线性分解E_x/E_m（nm）	自加权交替三线性分解E_x/E_m（nm）	交替惩罚三线性分解 E_x/E_m（nm）
组分1	345/427.6	345/430.8	285/340	330/410
组分2	380/468	285/332.4	380/468	285/340
组分3	290/340	390/512	330/410	350/435.2
组分4	325/387.2	365/382.4	350/435.2	380/468

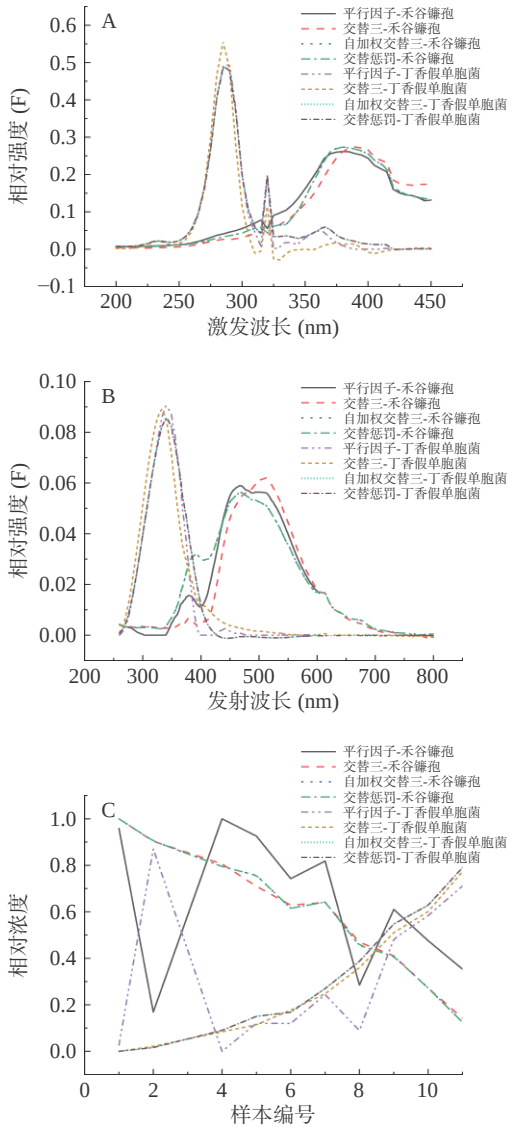


图 4　二阶校正算法获得的 OD_{600}=0.5 混合菌液丁香假单胞菌和禾谷镰孢菌相对激发强度光谱图(A)、相对发射强度光谱图(B)和组分相对浓度图(C)(N=4)

Fig.4　Relative excitation intensity spectrum (A), relative emission intensity spectrum (B) and component relative concentration diagram (C) (N=4) of *Pseudomonas syringae* pv. *Lachrymans*-8 and *Fusarium graminearum*-ACCC37687 in mixed bacterial solution with OD_{600}=0.5 obtained by the second-order correction algorithm method

把既满足特征波长位置和菌种波峰位置一致，又满足该波长下荧光强度变化规律和菌种浓度变化规律一致的波长叫做该菌种的特征波长，筛选得出激发/发射(E_x/E_m)=280 nm/361.6 nm 和激发/发射(E_x/E_m)=295 nm/361.6 nm 是丁香假单胞菌的特征激发发射波长位置。激发/发射(E_x/E_m)=340 nm/511.2 nm 和激发/发射(E_x/E_m)=415 nm/511.2 nm 是禾谷镰孢菌的特征激发发射波长位置。PLS 提取得到的特征波长用于后续混合菌液的定量分析。

2.6　光谱拟合定性分析

为了验证上述判断，并且考察各个算法定性分析能力，将每个算法分解得到的特征激发光谱和特征发射光谱与单一丁香假单胞菌和单一禾谷镰孢菌的

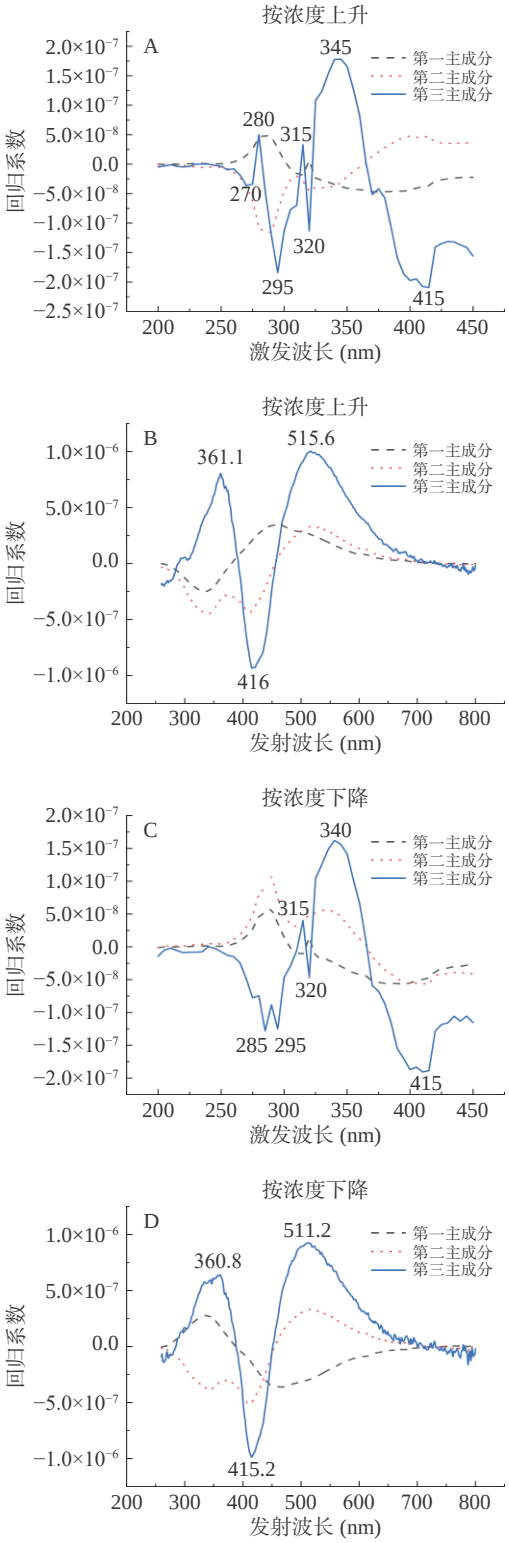


图 5　激发波长权重系数图和发射波长权重系数图

Fig.5　Excitation wavelength weight coefficient diagram and emission wavelength weight coefficient diagram

注：使用 PLS 分别按浓度上升和浓度下降得到激发波长权重系数图和发射波长权重系数图。

真实光谱，归一化后进行拟合。

图 6、图 7 分别是各个算法分解混合菌液三维荧光数据阵得到的激发光谱和发射光谱与单一丁香假单胞菌和禾谷镰孢菌的真实激发发射光谱两者拟合得到的。可以看出，平行因子分析(PARAFAC)、

交替三线性分解(ATLD)、自加权交替三线性分解(SWATLD)、交替惩罚三线性分解(APTLD)对丁香假单胞菌都具有良好的定性效果,不论激发光谱还是发射光谱都可以分解出一个和丁香假单胞菌光谱形状高度一致的组分,验证了前面的推论。

平行因子分析(PARAFAC)、交替三线性分解(ATLD)、自加权交替三线性分解(SWATLD)、交替惩罚三线性分解(APTLD)对禾谷镰孢菌的鉴定效果

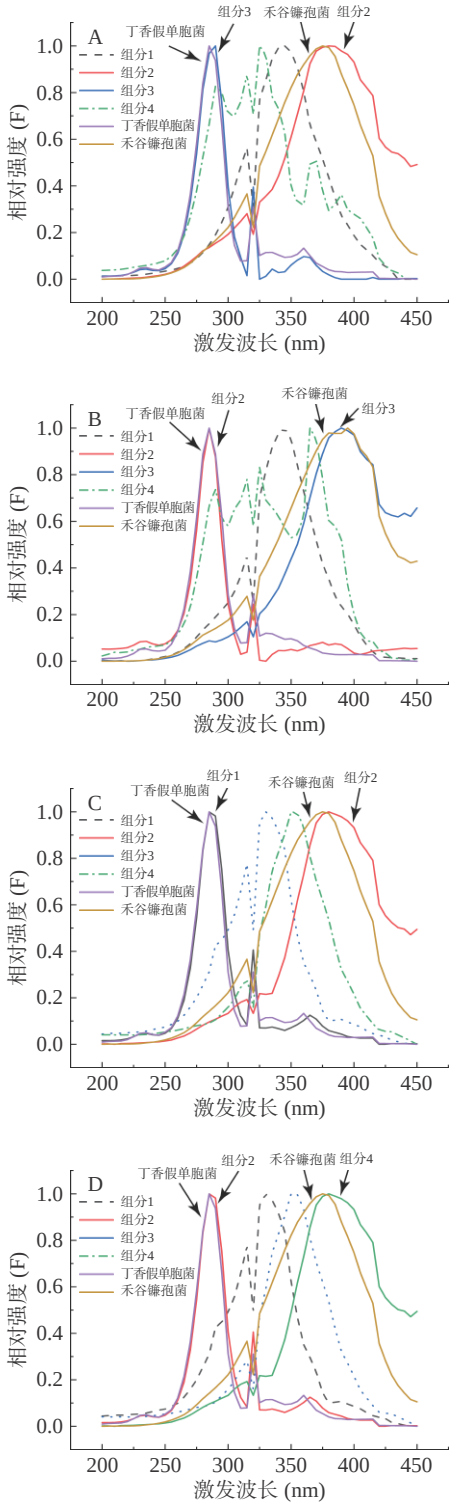


图 6　平行因子分析(A)、交替三线性分解(B)、自加权交替三线性分解(C)、交替惩罚三线性分解(D)方法获得的激发光谱和丁香假单胞菌(PSL-8)、禾谷镰孢菌(ACCC37687)的真实激发光谱

Fig.6　The excitation spectra obtained by PARAFAC (A), ATLD (B), SWATLD (C), APTLD (D) and the real excitation spectra of *Pseudomonas syringae* pv. *Lachrymans*-8 and *Fusarium graminearum*-ACCC37687

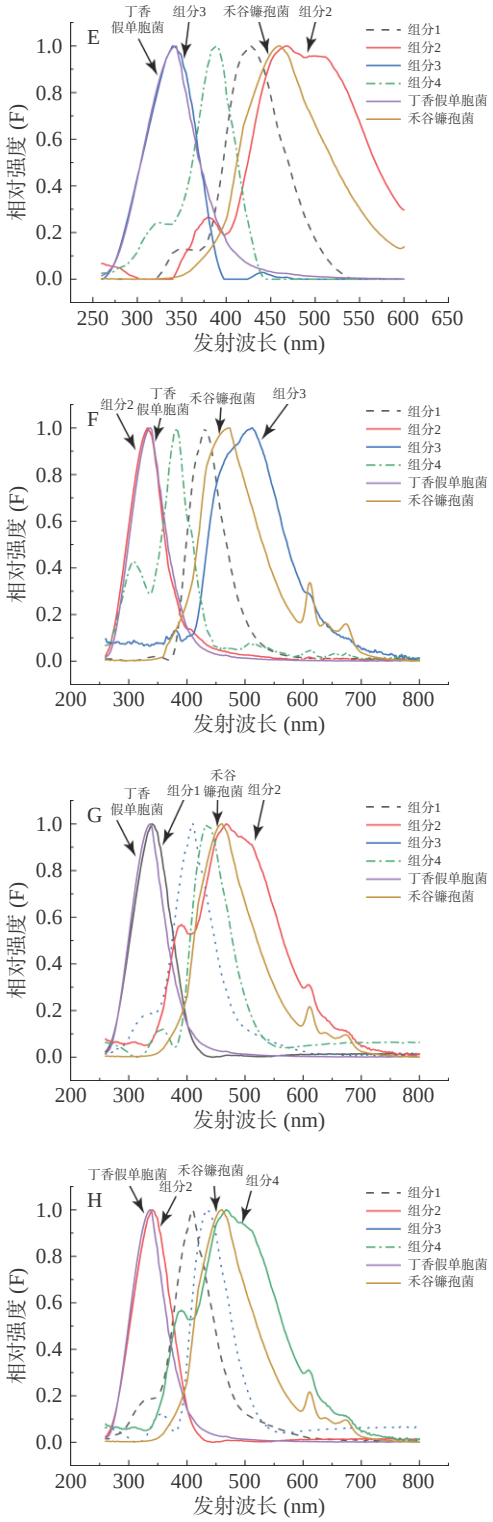


图 7　平行因子分析(E)、交替三线性分解(F)、自加权交替三线性分解(G)、交替惩罚三线性分解(H)方法获得的发射光谱和丁香假单胞菌(PSL-8)、禾谷镰孢菌(ACCC37687)的真实发射光谱

Fig.7　The emission spectra obtained by PARAFAC (E), ATLD (F), SWATLD (G), APTLD (H) and the real emission spectra of *Pseudomonas syringae* pv. *Lachrymans*-8 and *Fusarium graminearum*- ACCC37687

较差，无峰形完全一致的组分与之对应。自加权交替三线性分解（SWATLD）、交替惩罚三线性分解（APTLD）有部分与禾谷镰孢菌真实光谱高度重叠的波形，因此效果优于平行因子分析（PARAFAC）、交替三线性分解（ATLD）。与禾谷镰孢菌真实光谱相比，四种二阶校正算法分解出来的禾谷镰孢菌对应组分的光谱峰形均发生后移。将单一禾谷镰孢菌特征激发波长和特征发射波长处的光谱与混合菌液下禾谷镰孢相同波长处的光谱进行拟合，发现菌液混合后禾谷镰孢菌峰形确实发生变化。有文献表明峰形后移的原因可能有多种，色氨酸与配体结合，或蛋白质与蛋白质结合以后发射波长会发生位移[13]，峰形后移的原因需要进一步探索验证。同时每种算法都会有两种未知干扰组分，推测是两种菌共同拥有的荧光基团或者是出峰位置相近的荧光基团。

2.7　留一法交叉验证（LOOCV）多元线性回归构建浓度预测模型

浓度预测模型的构建需要大批量实验作为测试集和验证集，故将混合菌液 OD_{600} 变更为 0.2，同时也能验证高浓度样本提取出来的特征波长在样品浓度降低时是否依旧有规律。总共做了 40 组混合菌液样本，每组 11 个浓度梯度样本，总共 440 个样本三维光谱数据。应用交替惩罚三线性分解（APTLD）、自加权交替三线性分解（SWATLD）、平行因子分析（PARAFAC）、交替三线性分解（ATLD）、偏最小二乘回归系数法（PLS）提取出来的丁香假单胞菌主荧光峰位置的激发波长和发射波长分别是激发/发射（E_x/E_m）=285 nm/340 nm、290 nm/340 nm、285 nm/332.4 nm、280 nm/361.6 nm、295 nm/361.6 nm。提取出来的禾谷镰孢菌主荧光峰位置激发波长和发射波长分别是激发/发射（E_x/E_m）=380 nm/468 nm、390 nm/512 nm、340 nm/511.2 nm、415 nm/511.2 nm。使用多元线性回归函数对样本 OD_{600} 和筛选得到的菌种对应特征波长处的荧光强度构建回归模型，将混合菌液每种菌种的期望 OD_{600} 值作为因变量 Y，将各类方法挑选出的特征波长的荧光强度作为自变量 X，分别得到丁香假单胞菌和禾谷镰孢菌两种菌的浓度预测模型，再使用留一法交叉验证（LOOCV）浓度预测模型的准确性，分别计算单一方法和综合方法下模型的相关系数 R、交叉验证决定系数 R^2_{cv}、预测均方根误差 RMSEP，依此选出最佳的模型方案，结果汇总见表 3，最佳预测模型下，两种菌浓度预测结果见表 4。

由表 3 可知，使用单一方法建立浓度预测模型时，交替三线性分解（ATLD）建立的丁香假单胞菌浓度预测模型效果最好，自加权交替三线性分解（SWATLD）、交替惩罚三线性分解（APTLD）的浓度预测效果次之，平行因子分析（PARAFAC）和偏最小二乘回归系数法（PLS）效果最差。偏最小二乘回归系数法（PLS）建立的禾谷镰孢菌浓度预测模型效果最好，交替三线性分解（ATLD）的浓度预测效果次之，平行因子分析（PARAFAC）、自加权交替三线性分解（SWATLD）、交替惩罚三线性分解（APTLD）的效果最差。将所有方法提取的特征波长综合应用从而建立的丁香假单胞菌和禾谷镰孢菌浓度预测模型效果最好。丁香假单胞菌和禾谷镰孢浓度预测模型如下：

混合菌液丁香假单胞菌浓度预测模型：

$$\begin{aligned} Y_{PSL\text{-}8} =& 0.0375335 - 8.3549351357155\times10^{-8}\times X_1 \\ &+ 8.77626547301689\times10^{-7}X_2 \\ &- 2.92147836751779\times10^{-7}X_3 \\ &- 1.53122781917997\times10^{-8}X_4 \\ &- 4.46594593563619\times10^{-7}X_5 \end{aligned} \quad \text{式（21）}$$

式中：$Y_{PSL\text{-}8}$ 是丁香假单胞菌的 OD_{600} 预测值；X_1 是 ATLD 筛选出来的组分 2 特征波长处的荧光强度；X_2 是 PARAFAC 筛选出来的组分 3 特征波长处的荧光强度；X_3 和 X_4 是 PLS 按菌液浓度线性上升筛选出来的两个特征波长处的荧光强度。APTLD、SWATLD 筛选得到的丁香假单胞菌特征波长相同，X_5 是 APTLD（SWATLD）筛选出来的特征波长处的荧光强度。

混合菌液禾谷镰孢菌浓度预测模型：

$$\begin{aligned} Y_{禾谷镰孢} =& 0.0732227 + 2.76512058965897\times10^{-7}\times X_6 \\ &- 7.29466203382164\times10^{-7}\times X_7 \\ &+ 6.50237950559675\times10^{-7}\times X_8 \\ &+ 8.55498855727367\times10^{-7}\times X_9 \end{aligned} \quad \text{式（22）}$$

式中：$Y_{禾谷镰孢}$ 是禾谷镰孢菌的 OD_{600} 预测值；X_6 是 ATLD 筛选出来的组分 3 特征波长处的荧光

表 3　模型稳定性参数汇总

Table 3　Summary of model stability parameters

方法	丁香假单胞菌（PSL-8）			禾谷镰孢菌（ACCC37687）		
	预测均方根误差	交叉验证决定系数	相关系数	预测均方根误差	交叉验证决定系数	相关系数
平行因子分析	0.0159391	0.7638007	0.8739569	0.0162897	0.4410537	0.6641187
交替三线性分解	0.0142342	0.7880493	0.8877214	0.0330325	0.5026141	0.7089527
自加权交替三线性分解	0.0154848	0.7705392	0.8778036	0.0371236	0.4410537	0.6641188
交替惩罚三线性分解	0.0154848	0.7705392	0.8778036	0.0371236	0.4410537	0.6641188
偏最小二乘回归	0.0165903	0.7520257	0.8671941	0.0296696	0.5538585	0.7442167
所有方法混合	0.0051636	0.9244119	0.9614634	0.0276536	0.5839539	0.7641687

强度; X_7 是 PARAFAC 筛选出来的组分 2 特征波长处的荧光强度; APTLD、SWATLD 筛选得到的禾谷镰孢菌特征波长与 PARAFAC 筛选出来的特征波长相同; X_8 和 X_9 是 PLS 按菌液浓度线性下降筛选出来的两个特征波长处的荧光强度。

表 4 两种菌的浓度预测结果

Table 4 Predicted results of two bacterial concentrations

样本编号	丁香假单胞菌(PSL-8)		禾谷镰孢菌(ACCC37687)	
	期望OD_{600}	预测OD_{600}	期望OD_{600}	预测OD_{600}
1	0	0.010745±0.012678	0.2	0.160018±0.051817
2	0.02	0.029711±0.008979	0.18	0.142877±0.048362
3	0.04	0.043974±0.007256	0.16	0.137069±0.040486
4	0.06	0.061862±0.00937	0.14	0.124539±0.036834
5	0.08	0.07908±0.011471	0.12	0.112268±0.031701
6	0.1	0.096959±0.011287	0.1	0.099817±0.02607
7	0.12	0.115624±0.016775	0.08	0.087965±0.0217083
8	0.14	0.135663±0.017707	0.06	0.075024±0.016023
9	0.16	0.156118±0.022067	0.04	0.063771±0.011435
10	0.18	0.176105±0.025576	0.02	0.053139±0.008331
11	0.2	0.19416±0.028586	0	0.043514±0.00513

注: 表中数据为平均值±标准差。

使用留一法交叉验证(LOOCV)浓度预测模型的准确性,得到混合菌液下丁香假单胞菌浓度预测模型的交叉验证决定系数 R^2_{cv}=0.92441191,预测均方根误差 RMSEP=0.005163633,相关系数 R=0.961463421。混合菌液下禾谷镰孢菌浓度预测模型的交叉验证决定系数 R^2_{cv}=0.583953931,预测均方根误差 RMSEP=0.027653679,相关系数 R=0.764168784。两者比较可以看出丁香假单胞菌浓度预测模型的预测效果明显好于禾谷镰孢菌浓度预测模型。推测禾谷镰孢菌浓度预测模型预测效果不佳的原因可能在于真菌本身不适用于比浊法来衡量真菌孢子浓度,当使用 OD_{600} 作为真菌孢子浓度衡量标准时,实验操作本身带来的操作误差较大,不同样本相同 OD_{600} 下的真菌孢子悬液的孢子浓度可能有所不同,这样极大的影响了荧光的规律性。

3 结论

本文采集丁香假单胞菌和禾谷镰孢菌梯度混合菌液的三维荧光光谱数据,结合二阶校正算法及一阶校正算法筛选出菌种特征波长,通过对特征波长荧光强度数据和菌液在 600 nn 波长下的吸光度(OD_{600})进行多元线性回归从而建立浓度预测模型。实验表明,通过多元线性归建回立的丁香假单胞菌浓度预测模型(R^2_{cv}=0.92441191, RMSEP=0.005163633, R=0.961463421)比禾谷镰孢菌浓度预测模型(R^2_{cv}=0.583953931,RMSEP=0.027653679,R=0.764168784)效果更佳,定性定量分析结果符合预期。而利用荧光光谱技术对真菌的定量分析可能存在一定的局限性,禾谷镰孢菌浓度预测模型对禾谷镰孢菌的浓度预测误差明显,梯度混合菌类别太少,这进一步限制了该方法的普适性和推广。所得实验结果对该研究的价值与预期有所差别,但实验方法对研究利用荧光光谱技术对真菌的定量分析提供了利用价值。

参考文献

[1] 杜昕波, 赵耘, 李伟杰. 菌种保藏中的细菌鉴定方法[J]. 中国兽药杂志, 2009, 43(3): 50−52. [DU X B, ZHAO Y, LI W J. Identification of bacteria in strain preservation[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2009, 43(3): 50−52.]

[2] 王予. 交替三线性分解二阶校正方法在复杂体系中的应用研究 [D]. 长沙: 湖南大学, 2013. [WANG Y. Application of second order correction method of alternating trilinear decomposition in complex system[D]. Changsha: Hunan University, 2013.]

[3] 王玉田, 边旭, 商凤凯, 等. 三维荧光光谱结合自加权交替三线性分解算法检测农药类混合物[J]. 光谱学与光谱分析, 2018, 38(12): 3780−3784. [WANG Y T, BIAN X, SHANG F K, et al. Detection of pesticide mixtures by three dimensional fluorescence spectroscopy combined with self weighted alternating trilinear decomposition algorithm[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2018, 38(12): 3780−3784.]

[4] 孔德明, 李雨蒙, 崔耀耀, 等. 结合小波压缩和 APTLD 的三维荧光光谱技术在掺伪芝麻油鉴别中的应用[J]. 光学学报, 2019, 39(3): 412−422. [KONG D M, LI Y M, CUI Y Y, et al. Application of 3D fluorescence spectroscopy combined with wavelet compression and aptld in identification of adulterated sesame oil[J]. Acta Optica Sinica, 2019, 39(3): 412−422.]

[5] 孙洋洋, 张立娟, 王玉田, 等. 三维荧光光谱结合二阶校正方法同时测定水中两种酚类[J]. 光谱学与光谱分析, 2020, 40(1): 119−124. [SUN Y Y, ZHANG L J, WANG Y T, et al. Simultaneous determination of two phenols in water by three dimensional fluorescence spectrometry combined with second order calibration [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2020, 40(1): 119−124.]

[6] 沈海东, 白玉洪, 郑华. 三维荧光光谱分析技术和应用[J]. 海洋石油, 2017, 37(2): 61−65. [SHEN H D, BAI Y H, ZHENG H. Three dimensional fluorescence spectroscopy and its application[J]. Offshore Oil, 2017, 37(2): 61−65.]

[7] 孔德明, 李雨蒙, 崔耀耀, 等. 海面溢油三维荧光光谱消除瑞利散射方法的研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2020, 40(9): 2791−2797. [KONG D M, LI Y M, CUI Y Y, et al. Study on elimination of Rayleigh scattering by three dimensional fluorescence spectrum of oil spill on the sea[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2020, 40(9): 2791−2797.]

[8] 杨金强, 赵南京, 殷高方, 等. 城市生活污水处理过程三维荧光光谱在线监测分析方法[J]. 光谱学与光谱分析, 2020, 40(7): 1993−1997. [YANG J Q, ZHAO N J, YIN G F, et al. On line monitoring and analysis method of three dimensional fluorescence spectrum for municipal sewage treatment process[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2020, 40(7): 1993−1997.]

[9] 蔡文君, 孙瑞芃, 王浩, 等. 济南市北大沙河水体溶解性有机物的三维荧光光谱分析[J]. 环境与发展, 2020, 32(8): 132−134. [CAI W J, SUN R P, WANG H, et al. Three dimensional fluorescence spectrum analysis of dissolved organic matter in beidasha river of Jinan City[J]. Inner Mongolia Environmental Sciences, 2020, 32(8): 132−134.]

[10] 樊凤杰, 轩凤来, 白洋, 等. 基于三维荧光光谱特征的中药

药性模式识别研究[J]. 光谱学与光谱分析，2020，40(6)：1763−1768. [FAN F J, XUAN F L, BAI Y, et al. Pattern recognition of traditional Chinese medicine properties based on three-dimensional fluorescence spectrum characteristics[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2020, 40(6): 1763−1768.]

[11] BHATTA H, GOLDYS E M, LEARMONTH R P. Use of fluorescence spectroscopy to differentiate yeast and bacterial cells[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 71(1): 121−126.

[12] KANG S, EDJD J, HIGHAM S M, et al. Fluorescence fingerprints of oral bacteria[J]. J Biophotonics, 2020, 13(1): e201900190.

[13] 高杜娟，张国梅，白巨利，等. 内源荧光法在鉴别细菌表征中的应用[J]. 中国生物化学与分子生物学报，2009，25(3)：219−224. [GAO D J, ZHANG G M, BAI J L, et al. Application of endogenous fluorescence method in identification of bacteria[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2009, 25(3): 219−224.]

[14] 刘燕妮，范惠冬，季维春，等. 黄瓜细菌性角斑病与霜霉病的辨识[J]. 吉林蔬菜，2018(Z2)：26−27. [LIU Y N, FAN H D, JI W C, et al. Identification of bacterial angular spot and downy mildew of Cucumber[J]. Jilin Vegetable, 2018(Z2): 26−27.]

[15] GAZDIK F, PENAZOVA E, CECHOVA J, et al. Quantitative real-time PCR assay for rapid detection of *Pseudomonas amygdali* pv. *lachrymans* in cucumber leaf rinse[J]. J Plant Dis Protect, 2019(21).

[16] SPANIC V, COSIC J, ZDUNIC Z, et al. Characterization of agronomical and quality traits of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) for fusarium head blight pressure in different environments[J]. Agronomy, 2021, 11(2): 213.

[17] NUTTALL J G, O'LEARY G J, PANOZZO J F, et al. Models of grain quality in wheat—a review[J]. Field Crop Res, 2017, 202: 136−145.

[18] MISHRA S, SRIVASTAVA S, DEWANGAN J, et al. Global occurrence of deoxynivalenol in food commodities and exposure risk assessment in humans in the last decade: A survey[J]. Crit Rev Food Sci, 2019, 60(2): 1−29.

[19] CAI G, LIU S, ZHONG F, et al. Zearalenone and deoxynivalenol inhibited IL-4 receptor-mediated Th2 cell differentiation and aggravated bacterial infection in mice[J]. Toxicol Appl Pharm, 2021, 415(Suppl.1): 115441.

[20] 魏亚博，郑鄢燕，赵晓燕，等. 气调箱贮藏对鲜切黄瓜品质的影响及对假单胞菌的抑制作用[J]. 食品与发酵工业，2020，46(4)：180−186. [WEI Y B, ZHENG Y Y, ZHAO X Y, et al. The effect of air conditioning box storage on the quality of fresh cut cucumber and the inhibition of *Pseudomonas*[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(4): 180−186.]

[21] 卢胜国. 黄瓜细菌性角斑病的识别与防治[J]. 中国瓜菜，2020，33(6)：82−83. [LU S G. Identification and control of cucumber bacterial angular leaf spot[J]. China Cucurbits and Vegetables, 2020, 33(6): 82−83.]

[22] 苏爱国，王帅帅，段赛茹，等. 玉米抗禾谷镰孢菌穗粒腐病种质资源鉴定[J]. 植物遗传资源学报，2021：1−9. [SU A G, WANG S S, DUAN S R, et al. Identification of germplasm resources of maize resistant to *Fusarium gramineum*[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2021: 1−9.]

[23] 谢顺培，李海洋，张宛莹，等. 假禾谷镰孢子囊壳的田间采集和子囊孢子后代室内杂交条件优化[J]. 植物病理学报，2021：1−12. [XIE S P, LI H Y, ZHANG W Y, et al. Field collection of sporangium shells of *Fusarium pseudograminearum* and optimization of indoor hybridization conditions of ascospore progenies[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2021: 1−12.]

[24] 刘欢欢，焦伟，乔保明，等. 一种利用铁离子螯合剂恢复丁香假单胞菌菌落荧光的方法[J]. 中国农业科技导报，2012，14(4)：142−147. [LIU H H, JIAO W, QIAO B M, et al. A method to restore the fluorescence of *Pseudomonas syringae* colony with iron chelator[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2012, 14(4): 142−147.]

[25] 袁洪威，陈湖芳，高东民，等. 分光光度法测定黑曲霉孢子浓度的研究[J]. 中国酿造，2017，36(4)：122−126. [YUAN H W, CHEN H F, GAO D M, et al. Determination of spore concentration of *Aspergillus niger* by spectrophotometry[J]. China Brewing, 2017, 36(4): 122−126.]

[26] 杜树新，杜阳锋，武晓莉. 基于 Savizky-Golay 多项式的三维荧光光谱的曲面平滑方法[J]. 光谱学与光谱分析，2011(2)：154−157. [DU S X, DU Y F, WU X L. Surface smoothing method for 3D fluorescence spectra based on Savizky-Golay polynomials [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2011(2): 154−157.]

[27] BRO R, KIERS H. A new efficient method for determining the number of components in PARAFAC models[J]. Journal of Chemometrics, 2010, 17(5): 274-286.

[28] 刘雪茹，李欣，殷勇，等. 黄瓜贮藏中微生物信息三维荧光判别及其数量监控模型构建[J]. 食品科学，2021，42(5)：32−38. [LIU X R, LI X, YIN Y, et al. Three dimensional fluorescence identification of microbial information in cucumber storage and construction of its quantity monitoring model[J]. Food Science, 2021, 42(5): 32−38.]

[29] HARSHMAN R A. Foundations of the PARAFAC procedure: Model and conditions for an "explanatory" multi-mode factor analysis[J]. Ucla Working Papers in Phonetics, 1970.

[30] BRO R, PARAFAC. Tutorial and applications[J]. Chemometrics & Intelligent Laboratory Systems, 1997, 38: 149−171.

[31] 于永杰. 三维二阶校正算法及其应用研究 [D]. 长沙：湖南大学，2009. [YU Y J. 3D second order correction algorithm and its application[D]. Changsha: Hunan University, 2009.]

[32] WU H L, SHIBUKAWA M, OGUMA K. An alternating trilinear decomposition algorithm with application to calibration of HPLC-DAD for simultaneous determination of overlapped chlorinated aromatic hydrocarbons[J]. Journal of Chemometrics, 1998, 12(1): 1−26.

[33] 黄锋华，张淑娟，杨一，等. 油桃外部缺陷的高光谱成像检测 [J]. 农业机械学报，2015，46(11)：252−259. [HUANG F H, ZHANG S J, YANG Y, et al. Hyperspectral imaging detection of nectarine external defects[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2015, 46(11): 252−259.]

[34] 于慧春，殷勇，戴松松. 基于高光谱特征选择的霉变玉米黄曲霉毒素 Bsub1/sub 的检测方法[J]. 核农学报，2019，33(2)：305−312. [YU H C, YIN Y, DAI S S. Detection of aflatoxin Bsub1/sub

in moldy corn based on hyperspectral feature selection[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2019, 33(2): 305−312.]

[35] WU J, MEI J, WEN S, et al. A self-adaptive genetic algorithm-artificial neural network algorithm with leave-one-out cross validation for descriptor selection in QSAR study[J]. Journal of Computational Chemistry, 2010, 31(10): 1956−1968.

[36] 祝鹏, 刘成林, 祝飞. 平行因子法分解成分分析在三维荧光光谱数据中的实现[J]. 光谱学与光谱分析, 2015, 35(6): 1611−1617. [ZHU P, LIU C L, ZHU F. The realization of component analysis by parallel factor method in three-dimensional fluorescence data[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2015, 35(6): 1611−1617.]

[37] 张棣, 殷勇, 于慧春, 等. 高光谱融合马氏距离的贮藏黄瓜腐败预警方法[J]. 核农学报, 2020, 34(12): 2749−2755. [ZHANG D, YIN Y, YU H C, et al. Early warning method of stored cucumber spoilage based on hyperspectral fusion Mahalanobis distance[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2020, 34(12): 2749−2755.]

徐朝辉, 邹苑, 陈瑛, 等. 基于网络药理学和分子对接探讨肉苁蓉治疗帕金森病的作用机制 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 13−22. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100009

XU Zhaohui, ZOU Yuan, CHEN Ying, et al. Mechanism of Cistanches Herba in Treatment of Parkinson's Disease Based on Network Pharmacology and Molecular Docking[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 13−22. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100009

· 未来食品 ·

基于网络药理学和分子对接探讨肉苁蓉治疗帕金森病的作用机制

徐朝辉[1], 邹　苑[1], 陈　瑛[1], 梁　彪[1], 赵　卿[2,*]

(1.上海中医药大学, 上海 201203;
2.上海市养志康复医院(上海市阳光康复中心), 同济大学附属养志康复医院, 上海 201619)

摘　要: 基于网络药理学及分子对接对肉苁蓉治疗帕金森疾病的作用机制进行研究。利用 TCMSP 筛选肉苁蓉中的活性成分作为候选化合物，再利用 PubChem 和 sea 数据库获取肉苁蓉的靶点信息。在 GeneCard 数据库中获取帕金森病靶点信息，通过比对中药和疾病靶点，得到共有靶点基因信息。运用 STRING 进行靶点蛋白互作（protein-protein interaction，PPI）网络的构建，在 DAVID6.8 数据库中对关键靶基因进行基因本体（gene ontology，GO）富集和基因组百科全书（Kyoto encyclopedia of genes and geomes，KEGG）通路富集得出治疗靶基因，利用 cytoscape 软件构建中药-化合物-靶点网络图。并将该网络中的基因靶点以 degree 值高低进行排序，选择前 5 个关键靶点，最后利用 AutoDock Vina 工具将 5 个关键靶点与肉苁蓉有效活性成分进行分子对接。结果表明：从肉苁蓉中共筛选得到 6 个有效活性成分，分别为 β-谷甾醇、花生四烯酸、脱水内酯、丁香树脂二甲醚、槲皮素、枫马京。交集获得 308 个预测靶点，将其进行 PPI 分析，并从中筛选出 38 个关键靶基因，对关键靶基因进行 GO 与 KEGG 通路富集。最终发现，GO 富集中生物过程（biologica process，BP）包括细胞内信号转导等；细胞成分（cellular component，CC）分析主要为蛋白质复合物、线粒体等；分子功能（molecular function，MF）结果主要为腺嘌呤核苷三磷酸结合、蛋白质复合物结合等。KEGG 通路富集主要包括磷脂酰肌醇-3-激酶（phosphatidylinositol-3-kinase，PI3K）/蛋白激酶 B（Protein Kinase B，PKB/AKT）、微型核醣核酸（microRNAs，miRNAs）、缺氧诱导因子-1（hypoxia inducible factor-1，HIF-1）、肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor，TNF）、叉形头转录因子 O 亚型（forkhead box O，FOXO）等相关信号通路。筛选前 5 个关键靶点分别为 MAPK8、ESR1、SRC、JAK2、AKT1。分子对接结果显示肉苁蓉 6 个有效活性成分与 5 个关键靶点具有较好的结合活性，结合能均小于 −5 kcal/mol。本研究得出肉苁蓉通过保护线粒体功能、调节蛋白质活动、调节自噬、抑制神经炎症反应等治疗帕金森病，发挥多成分、多通路、多靶点协同作用。

关键词: 肉苁蓉, 帕金森病, 网络药理学, 分子对接
中图分类号: R285.5　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0013−10
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100009
本文网刊:

Mechanism of Cistanches Herba in Treatment of Parkinson's Disease Based on Network Pharmacology and Molecular Docking

XU Zhaohui[1], ZOU Yuan[1], CHEN Ying[1], LIANG Biao[1], ZHAO Qing[2,*]

(1.Shanghai University of Tranditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;
2.Shanghai YangZhi Rehabilitation Hospital (Shanghai Sunshine Rehabilitation Center), Tongji University School of Medicine, Shanghai 201619, China)

收稿日期: 2021−10−11
基金项目: 上海市 2021 年度"科技创新行动计划"医学创新研究专项重大项目 丁氏内科程门雪学术经验分期辨治帕金森病的临床循证评价研究（21Y31920307）; 上海市中医医院第二届中医传承项目 沪中医人【2020】2 号。
作者简介: 徐朝辉（1996−）, 男, 硕士研究生, 研究方向: 中西医结合防治神经系统疾病, E-mail: zhaohuixuon@163.com。
*** 通信作者:** 赵卿（1978−）, 女, 博士, 副主任医师, 研究方向: 神经内科相关疾病的临床和基础研究, E-mail: qingzhao2010@hotmail.com。

Abstract: The study aimed to explore the mechanism of Cistanches Herba in treatment of Parkinson's disease based on network pharmacology and molecular docking. The active components in Cistanches Herba were selected as candidate compounds by the TCMSP. And the target information of Cistanches Herba was obtained by PubChem and sea database. The target information of Parkinson's disease was obtained by GeneCard database and the common target gene information was obtained by comparing traditional Chinese medicine and disease targets. PPI network was constructed by means of STRING. The key target genes were enriched by GO and KEGG pathway in DAVID 6.8 database. The Cytoscape software was applied to construct the network diagram of traditional Chinese medicine-chemical compound-target. The gene targets in the network were sorted according to the degree value, the first five key targets were selected. Finally, the five key targets were in connection with the effective active components of Cistanches Herba by using AutoDock Vina tool. In the end, the results showed that 6 active components were screened from Cistanches Herba beta-sitosterol, arachidonate, suchilactone, Yangambin, quercetin, Marckine. 308 prediction targets were obtained by intersection, which were analyzed by PPI. 38 key target genes were filtered out, and the key target genes were enriched by GO and KEGG pathway. Finally, it was found that GO rich BP includes intracellular signal transduction; CC analysis mainly included protein complex, mitochondrion; MF results mainly included ATP binding, protein complex binding. KEGG pathway enrichment mainly included PI3K/Akt, miRNAs, HIF-1, TNF, FOXO signal pathways, etc. The first five key targets were MAPK8, ESR1, SRC, JAK2 and AKT1. The results of molecular docking showed that the six active components of Cistanches Herba had good binding activity with five key targets. This study found that Cistanches Herba could play a multi-component, multi-channel and multi-target synergistic role in the treatment of Parkinson's disease by protecting mitochondrial function, regulating protein activity, regulating autophagy and inhibiting neuroinflammatory response.

Key words: Cistanches Herba; Parkinson's disease; network pharmacology; molecular docking

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种常见的中老年神经系统退行性疾病,临床上以运动迟缓、静止性震颤、肌强直、姿势平衡障碍等运动症状以及睡眠障碍、嗅觉障碍、自主神经功能障碍、认知和精神障碍等非运动症状为显著特征[1]。PD 主要病理特征为黑质中多巴胺能神经元的丢失和由 α-突触核蛋白(α-Synuclein, α-Syn)组成的路易小体的存在,但发病机制尚未完全明确。目前我国 65 岁以上人群中 PD 发病率为 1.7%,且随着老龄化程度加剧,据推测我国 PD 患病人数到 2030 年将达到 500 万人,约占到全球 PD 患病人数的一半[2]。目前 PD 的药物治疗多以左旋多巴制剂为主,虽然能够在一定程度上改善症状,但长期使用存在药效减退、剂末现象、异动症等运动并发症,且无法从根本上阻止疾病进展。

肉苁蓉,俗称大芸,始载于《神农本草经》,列属上品,味甘、咸,性温,归肾、大肠经,中医认为其具有补肾阳,益精血,润肠通便之效。研究表明,肉苁蓉具有抗凋亡、抗氧化、抗衰老、抗脑缺血再灌注损伤等神经保护作用[3],其化学成分有苯苷类、环烯醚萜及其苷类、木脂素及其苷类、多糖以及单萜苷类、生物碱等,其中又以苯乙醇苷类和多糖为主[4],药理学研究发现肉苁蓉在 PD 及阿尔兹海默病等神经退行性疾病中发挥的作用显著[5−6]。据统计,肉苁蓉在抗衰老延年类古方中的出现率仅次于人参[7]。目前,肉苁蓉常被应用于 PD 的临床治疗,但其发挥疗效的具体机制并不明确,本文主要从网络药理学和分子对接的角度,利用相关数据库筛选肉苁蓉的主要活性化合物,并将其作用靶点与 PD 靶点比对,得出关键作用靶点,探析其治疗 PD 的物质基础与作用机制,以期为深入研究提供指导。

1 资料与方法

1.1 有效化合物

本研究使用中药系统药理数据库(Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform TCMSP, http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php)检索肉苁蓉成分,口服生物利用度(oral bioavailability, OB)≥30%,类药性(drug-likeness, DL)≥0.18[8]为阈值,因血脑屏障功能障碍与 PD 病程有关[9],故设定血脑屏障通透性(blood brain barrier, BBB)≥−0.85,通过以上限定条件筛选肉苁蓉中的活性成分作为有效化合物。

1.2 查询 PD 相关疾病靶点

利用 PubChem 数据库(www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound/)、sea 数据库(http://sea.bkslab.org/)获得肉苁蓉所有靶点基因名称。应用 GeneCard 数据库(https://www.genecards.org/)以“Parkinson's disease”为检索词获取 PD 靶点基因名称。过比对中药和疾病靶点,利用 VENNY2.1 软件作交集饼图得到 PD 与肉苁蓉共有靶点基因信息。

1.3 靶点蛋白互作(protein-protein interaction, PPI)网络的构建

将 1.1 及 1.2 获得的中药、疾病共有基因输入 STRING(https://string-db.org/),选择“Homo sapiens”,将最小相互作用阈值设为中等“Highest confidence>0.9”,其余设置为默认值[10],进行 PPI 网络构建。

1.4 基因本体(gene ontology, GO)富集和基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and geomes, KEGG)通路富集

筛选关键靶基因(大于 2 倍 degree),将筛选出

的靶基因导入 DAVID6.8 数据库(https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp)，限定物种为“Homo Sapiens”，以 P<0.05 为阈值，选择其中 BP、CC、MF 3 对关键靶基因进行 GO 功能富集分析，筛选具有显著差异的生物过程及可靠的靶点通路，按照 P 值从小到大排序，前 20 个作为重要通路用 Omicshare（http://www.omicshare.com/）制作成可视化气泡图。通过 KEGG 通路富集分析靶点信号通路，以 P<0.05 为阈值，依据 count 值排序，选取前 20 条信号通路选用 Omicshare（http://www.omicshare.com/）制作成可视化气泡图。

1.5　构建“肉苁蓉-化合物-靶点”网络图

选取前 20 条 KEGG 信号通路上的基因作为治疗靶基因，将筛选的治疗靶基因对应的化合物和中药导入到 cytoscape 软件中，构建“肉苁蓉-化合物-靶点”网络图。

1.6　“活性成分-靶点”分子对接

选取网络药理学筛选出的肉苁蓉有效化合物与帕金森病的关键靶点，利用 AutoDock Vina 工具进行分子对接，了解靶点蛋白质与活性成分的结合方式。

2　结果与分析

2.1　肉苁蓉有效化合物及靶点基因筛选

使用 TCMSP 网站筛选出肉苁蓉中药共 6 个有效化合物，分别为 beta-sitosterol（β-谷甾醇）、arachidonate（花生四烯酸）、suchilactone（脱水内酯）、Yangambin（丁香树脂二甲醚）、quercetin（槲皮素）、Marckine（枫马京）。见表 1。根据有效成分筛选出 435 个靶点基因名称。

表 1　肉苁蓉有效成分

Table 1　Effective components of Cistanches Herba

编号	化合物名称	OB(%)	DL	BBB
MOL000358	beta-sitosterol	36.91	0.75	0.99
MOL005320	arachidonate	45.57	0.20	0.58
MOL005384	suchilactone	57.52	0.56	0.28
MOL007563	Yangambin	57.53	0.81	0.01
MOL000098	quercetin	46.43	0.28	-0.77
MOL008871	Marckine	37.05	0.69	-0.10

2.2　帕金森病靶点基因筛选

检索 GeneCard 数据库（https://www.genecards.org/）得到 PD 相关基因，共计 7846 个，如 *LRRK2*、*SNCA*、*PRKN*、*PARK7*、*GBA*、*PINK1*、*MAPT* 等。

2.3　肉苁蓉活性成分治疗帕金森病预测靶点的筛选

通过 TCMSP 收集肉苁蓉 6 个活性化合物对应靶点，去重得到 435 个蛋白靶标，与 GeneCard 数据库去重所得 7846 个蛋白靶标进行比对取交集，运用 VENNY2.1 软件对疾病靶点与药物靶点整理后得到 308 个交集靶点，见图 1。蓝色代表 PD 靶点，黄色代表肉苁蓉靶点，重叠部分为共同靶点。

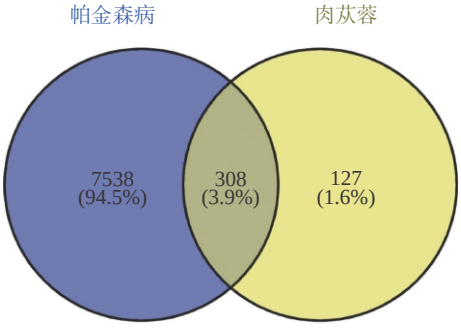


图 1　帕金森病-肉苁蓉靶点交集韦恩图

Fig.1　Wayne diagram of target intersection of Parkinson's disease-Cistanches Herba

2.4　PPI 网络的构建及关键靶点筛选

将上述筛选出的靶基因导入 STRING（https://string-db.org/）数据库，物种选“Homo sapiens”进行 PPI 分析，得到肉苁蓉作用于 PD 的 PPI 网络图，见图 2。共得到 283 个节点，3509 条边。

2.5　GO 功能富集分析

筛选关键靶基因（大于 2 倍 degree），将筛选出的靶基因导入 DAVID6.8 数据库，限定物种为“Homo Sapiens”，对 38 个靶基因进行 GO 富集分析。结果包括生物过程（biologica process，BP）305 条、细胞成分（cellular component，CC）25 条、分子功能（molecular function，MF）69 条，按照 P 值从小到大排序，前 20 个重要通路用 Omicshare 作气泡图进行可视化分析，如图 3。图中气泡越大富集基因个数越多，气泡颜色越红，P 值越小，显著性越高。图 3A 中 BP 包括 RNA 聚合酶 II 启动子的转录负调控、以 DNA 作为模板转录、细胞增殖、凋亡过程的正调控、细胞内信号转导等；图 3B 可见 CC 分析中包括膜筏、神经元突触、细胞膜、细胞核膜、蛋白质复合物、线粒体等；图 3C 可见 MF 富集结果主要为腺嘌呤核苷三磷酸结合、蛋白异源二聚体活性、蛋白质复合物结合、蛋白质酪氨酸激酶活性等。

2.6　KEGG 通路分析及构建“肉苁蓉-化合物-靶点“网络图

通过 KEGG 通路富集分析靶点信号通路，以 P<0.05 为阈值，依据 count 值排序，选取前 20 条信号通路，其中主要包括 PI3K/AKT 信号通路、miRNAs 调控、HIF-1、TNF、FOXO 信号通路等，依据结果绘制气泡图，见图 4。图中气泡越大富集基因个数越多，气泡颜色越红，P 值越小，显著性越高。选取前 20 条 KEGG 信号通路上的基因作为治疗靶基因，将 91 个治疗靶基因对应的化合物和中药导入到 cytoscape 软件中，构建中药-化合物-靶点网络图，见图 5。网络中的节点表示靶标或化合物，而边则表示活性成分与 PD 靶标之间的相互作用，颜色越深，degree 值越高。

2.7　“活性成分-靶点”分子对接

从中药-化合物-靶点网络中将基因靶点以

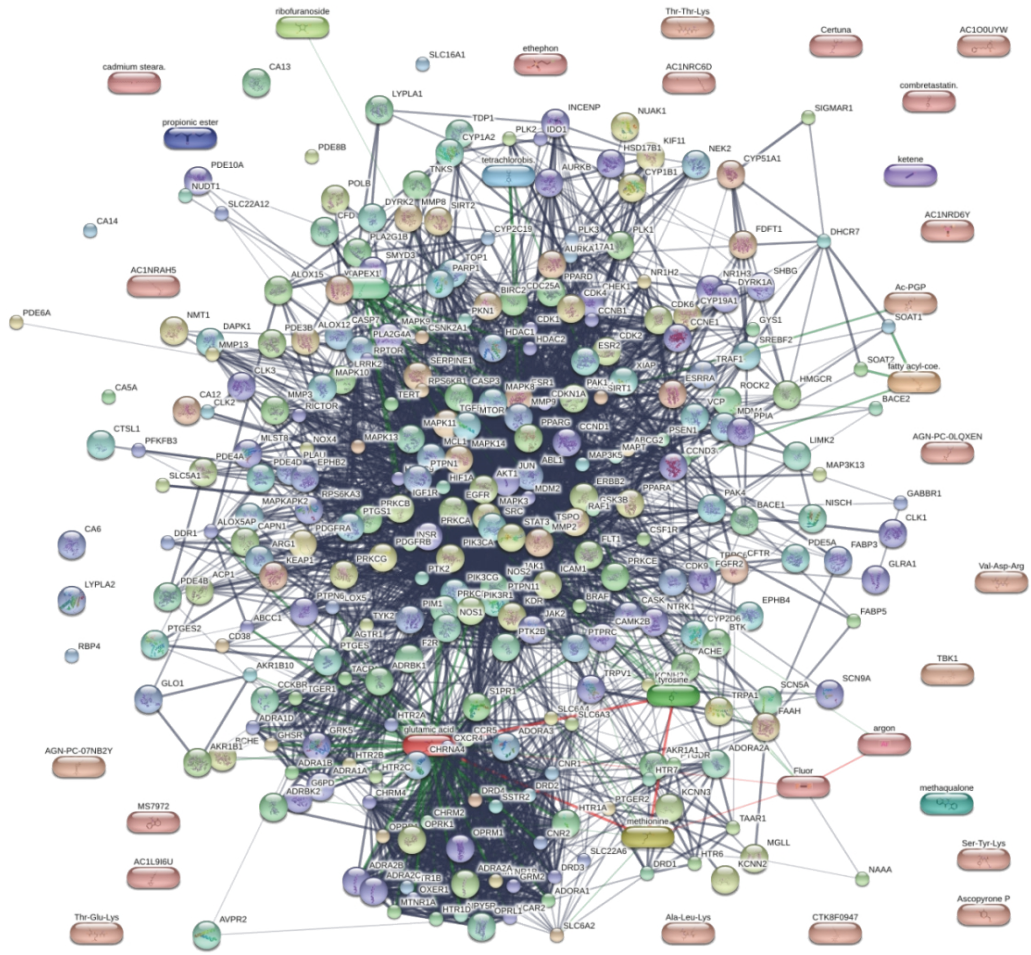
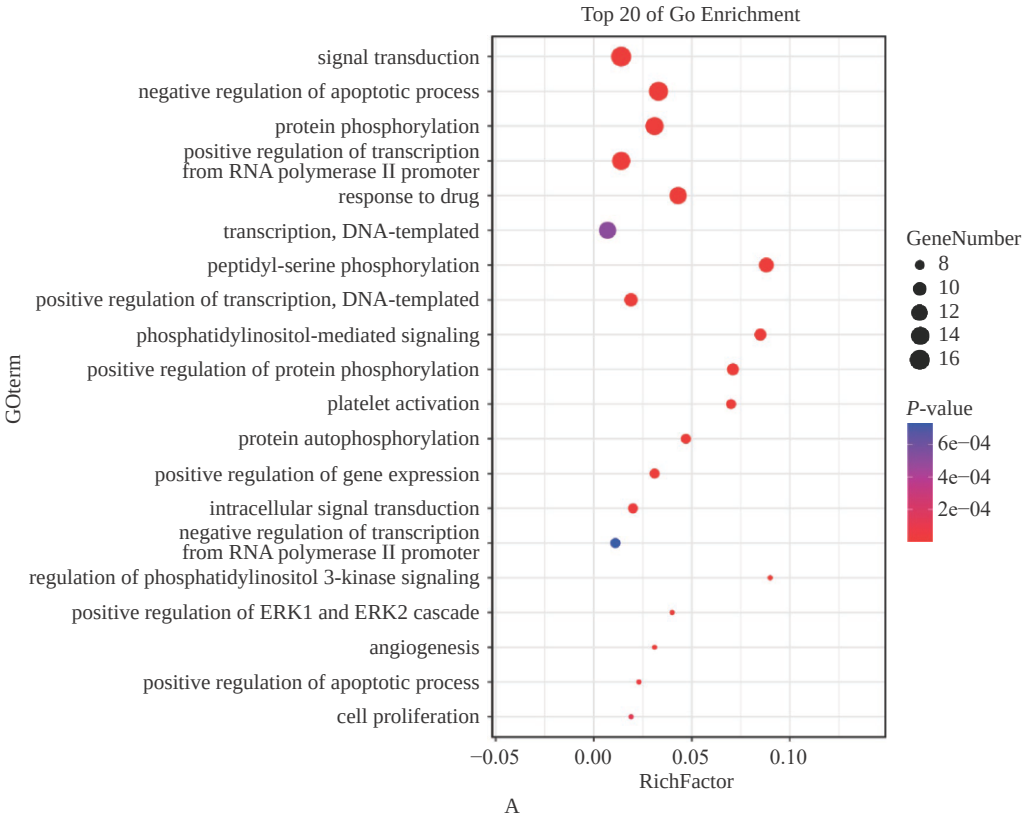


图 2　靶点蛋白互作网络图

Fig.2　Protein-protein interaction network



A

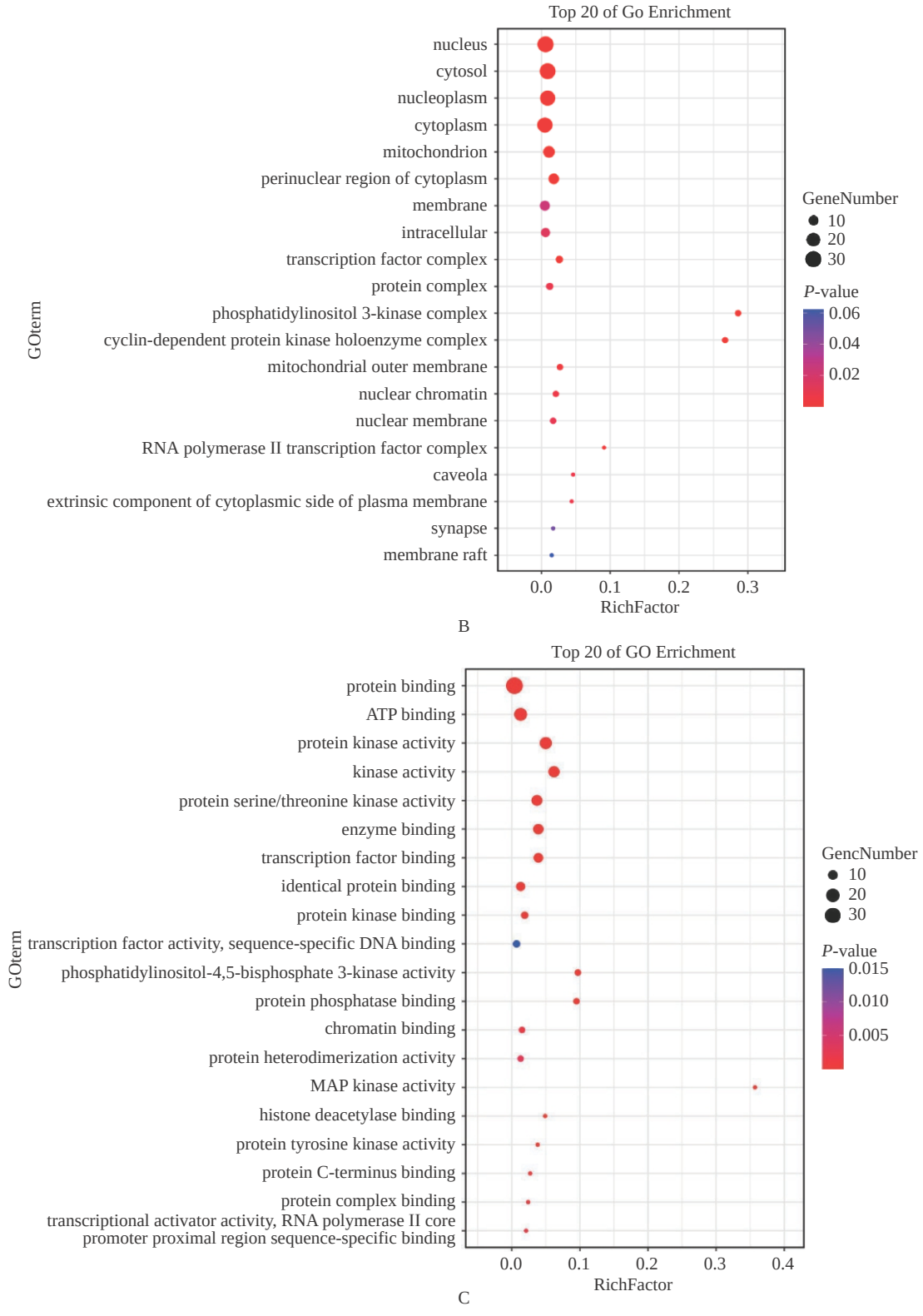


图 3　GO 功能富集分析

Fig.3　Gene ontology function enrichment analysis

注：A：GO-BP；B：GO-CC；C：GO-MF。

degree 值高低进行排序，选择前 5 个关键靶点，分别为丝裂原活化蛋白激酶 8（mitogen-activated protein kinase 8，MAPK8）、雌激素受体 1（estrogen receptor alpha 1，ESR1）、类固醇受体辅助活化因子（steroid receptor coactivator，SRC）、蛋白酪氨酸激酶 2（janus kinase signal transducers 2，JAK2）、丝氨酸/苏氨酸激酶 1（serine/threonine kinases 1，AKT1）。利用 AutoDock Vina[11] 分别与肉苁蓉的 6 个活性成分（β-谷甾醇、花生四烯酸、脱水内酯、丁香树脂二甲醚、槲皮素和枫马京）进行分子对接。结合能<−4.25 kcal/mol 提示配体小分子与受体蛋白之间有一定的结合活性；结合能<−5.0 kcal/mol 表明二者之间有较好的结合

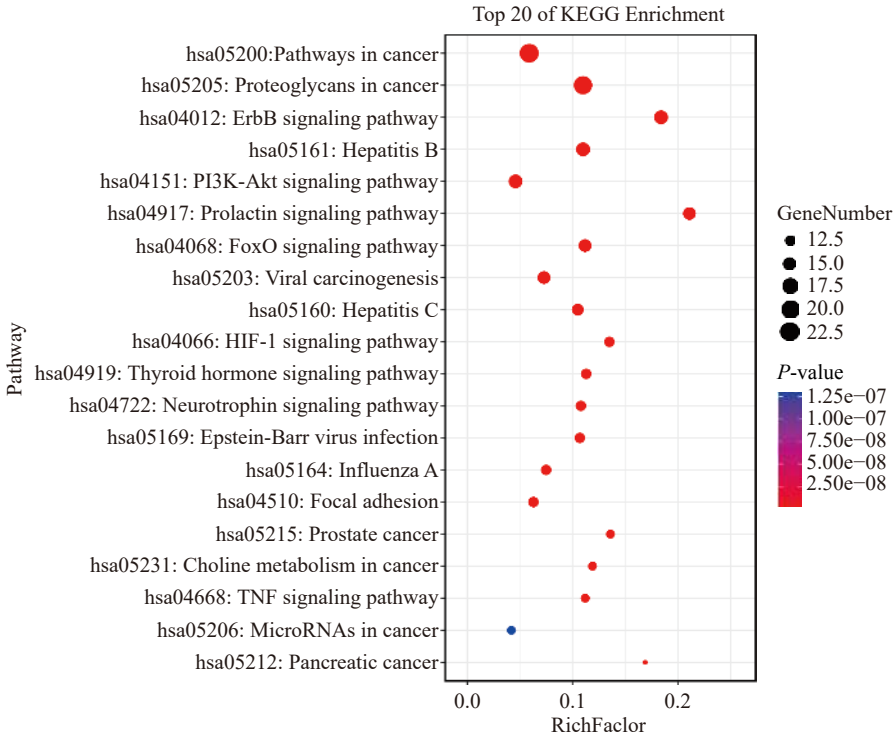


图 4 KEGG 信号通路富集分析

Fig.4 Enrichment analysis of Kyoto encyclopedia of genes and geomes signal pathway

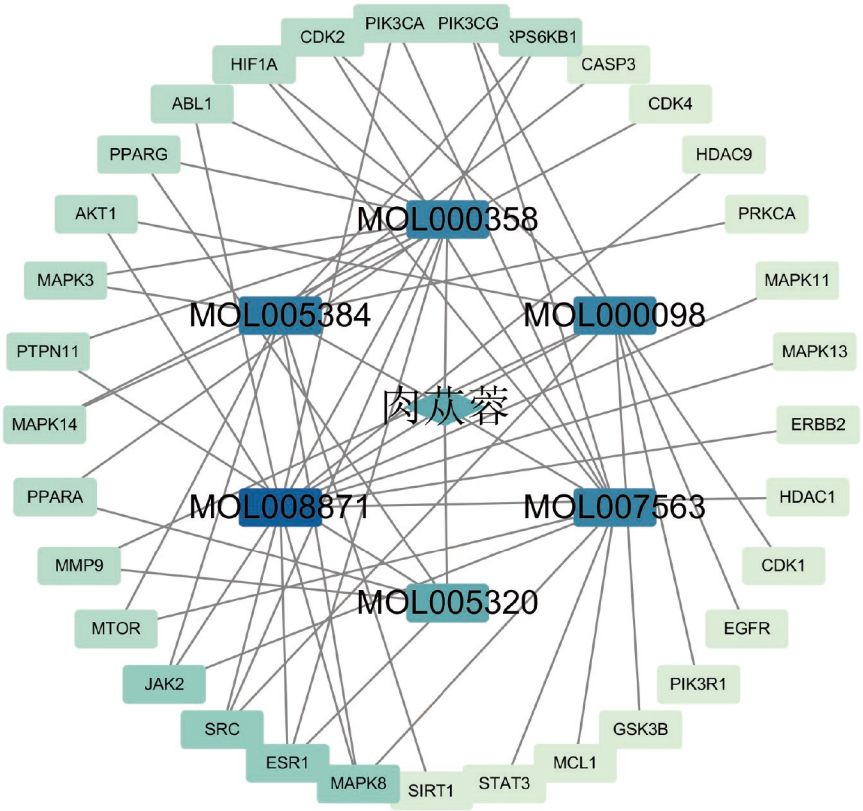


图 5 “肉苁蓉-化合物-靶点”网络图

Fig.5 Network diagram of “Cistanches Herba-compound-target”

活性；结合能<−7.0 kcal/mol 表示配体与受体具有强烈的结合活性[12]。分子对接结果见表 2，β-谷甾醇、花生四烯酸、脱水内酯、丁香树脂二甲醚、槲皮素和枫马京 6 种化合物与关键作用靶点 MAPK8、ESR1、SRC、JAK2 和 AKT1 的结合能均小于−5 kcal/mol，说明药物与靶点的结合活性较好[10]。其中 β-谷甾醇、脱水内酯和丁香树脂二甲醚与 JAK2、MAPK8 和 SRC，以及槲皮素和枫马京与 ESR1、JAK2、MAPK8 和 SRC 的结合能均小于−7 kcal/mol，说明药物与靶点之间具有较强的结合活性。随后利用 PyMol

（www.pymol.org）对 6 个肉苁蓉有效成分与其结合活性最高靶点的分子对接结果进行可视化分析，如图 6 所示。其中 β-谷甾醇与活性位点附近的 ASN-397 形成氢键结合到 SRC，花生四烯酸与活性位点附近的 ARG-394 形成氢键结合到 ESR1，脱水内酯与活性位点附近的 SER-936 和 ARG-980 形成氢键结合到 JAK2，丁香树脂二甲醚与活性位点附近的 ARG-980 形成氢键结合到 JAK2，槲皮素与活性位点附近的 THR-338、GLU-339、MET-341 和 ASP-404 形成氢键结合到 SRC，枫马京与活性位点附近的 PRO-361、GLN-362、GLU517、PHE520 和 SER-522 形成氢键结合到 SRC。

表 2　肉苁蓉有效活性成分与对应核心靶点的分子对接

Table 2　Molecular docking of effective active components of Cistanches Herba with corresponding core targets

有效活性成分	MAPK8	ESR1	SRC	JAK2	AKT1
beta-sitosterol（β-谷甾醇）	−7.8	−6.8	−8.1	−7.4	−6.3
arachidonate（花生四烯酸）	−5.4	−6.3	−6.3	−6.1	−5.3
suchilactone（脱水内酯）	−7.9	−5.9	−7.7	−8.6	−5.9
Yangambin（丁香树脂二甲醚）	−7.4	−6.2	−7.5	−7.9	−6.2
quercetin（槲皮素）	−8.1	−7.2	−9.2	−9	−6.6
Marckine（枫马京）	−9	−7.9	−10.2	−10	−7.2

注：单位：结合能（kcal/mol）。

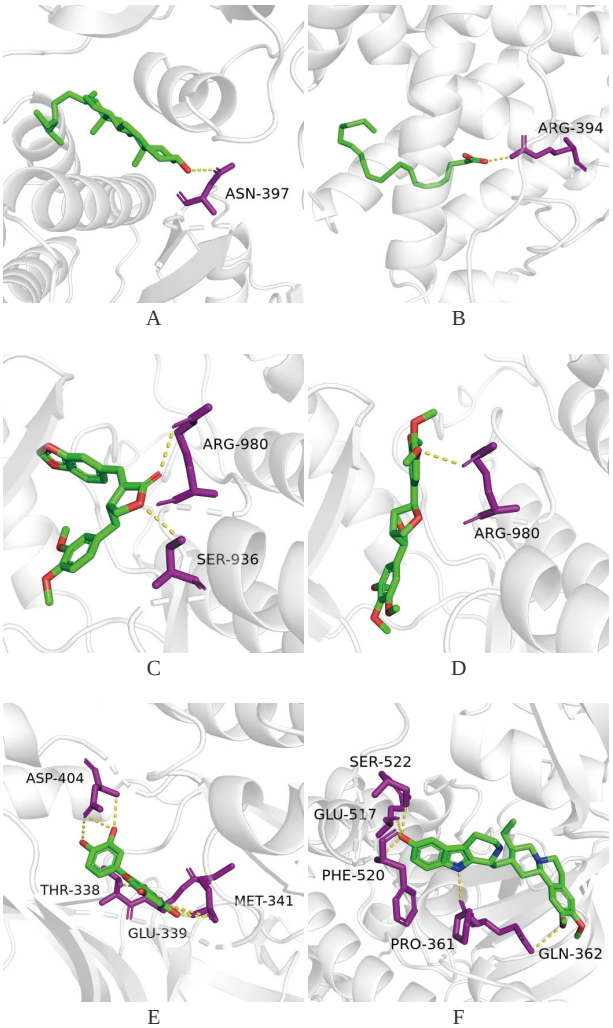


图 6　分子对接模式图

Fig.6　Molecular docking mode

注：A：β-谷甾醇和 SRC 的对接图；B：花生四烯酸和 ESR1 的对接图；C：脱水内酯和 JAK2 的对接图；D：丁香树脂二甲醚和 JAK2 的对接图；E：槲皮素和 SRC 的对接图；F：枫马京和 SRC 的对接图。

3　讨论

研究表明肉苁蓉主要成分苯乙醇苷可通过抑制 Caspase-3 的活性，对抗 1-甲基-4-苯基吡啶离子（1-methyl-4- phylpyridiniumion，MPP$^+$）导致的多巴胺能神经细胞凋亡[13]。研究也发现松果菊苷作为肉苁蓉活性成分之一，能抑制 PD 小鼠黑质多巴胺能神经元的减少，且通过 GFRa1/AKT 信号通路上调胶质细胞源性神经营养因子（glial cell-derived neurotrophic factor，GDNF）表达[14]，通过 ROS/ATF3/CHOP 通路抑制神经细胞凋亡[15]，增加纹状体多巴胺神经递质含量，改善 PD 小鼠的行为学异常，表现出良好的神经保护和修复作用[16]。但关于肉苁蓉其他有效成分在治疗 PD 中的作用机制仍未探究。

本研究通过筛选发现肉苁蓉的有效活性成分一共 6 种，分别是 beta-sitosterol（β-谷甾醇）、arachidonate（花生四烯酸）、suchilactone（脱水内酯）、Yangambin（丁香树脂二甲醚）、quercetin（槲皮素）、Marckine（枫马京）。研究发现 β-谷甾醇具有抗氧化、抑制细胞凋亡等作用[17]，而氧化应激损伤是 PD 发病的关键环节之一[18]，推测 β-谷甾醇可能通过抗氧化应激治疗 PD。花生四烯酸可以通过激活过氧化物酶增殖体激活受体（peroxisome proliferators-activated receptors，PPAR）及促进新蛋白合成来增强神经组织内部的抗氧化系统，发挥抗氧化应激的作用，保护神经元细胞[19]。有研究发现槲皮素能够通过抑制 AGEs/RAGE/NF-κB 炎症通路，从而降低脑组织炎性因子的生成[20]。而另一项研究发现中药提取物可通过抑制晚期糖基化终末产物（advanced glycation end products，AGEs），阻断晚期糖基化终产物受体（receptor of advanced glycation endproducts，RAGE）表达，从而抑制人神经母细胞瘤细胞（human neuroblastoma cells，SH-SY5Y）中甲基乙二醛（methylglyoxal，MGO）触发的核因子 κB（nuclear factor kappa-B，NF-κB）激活和易位，而已知 MGO 是一种二羰基代谢物，与神经退行性疾病的发展有关，提示可通过调节 AGEs/RAGE/NF-κB 通路减轻反应性二羰基化合物的神经毒性[21]。此外，另一项研究发现具有高氧化还原活性的铁可催化大脑氧化反应，还参与产生高毒性自由基（Fenton 反应），从而对细胞造成氧化应激损伤，最终导致多巴胺能神经元死亡，而槲皮素可充当强有力的铁螯合剂发挥抗氧化作用，表现出一定的神经保护作用[22]。

GO 功能富集分析表明肉苁蓉具有促进 ATP 合成、保护线粒体呼吸链的功能完整的作用，而线粒体功能障碍是引起多巴胺能神经元变性、死亡机制之

—[23]。肉苁蓉还可以调节蛋白质的合成、折叠、降解等活动，维持“蛋白质内稳态”。而研究表明蛋白质构象异常或过度沉积可抑制突触功能，干扰细胞内信号传导，导致由泛素蛋白酶体系统介导的蛋白质降解功能紊乱，最终导致多巴胺能神经细胞死亡[24]。

通过 KEGG 富集得到活性成分与 PD 靶标之间相互作用的主要信号通路，包括 PI3K/AKT 信号通路、miRNAs 调控、HIF-1、TNF 及 FOXO 信号通路等，表明肉苁蓉通过多条通路作用于 PD 发病的调控过程。AKT，又名蛋白激酶 B，是一种促进细胞存活的激酶，其存在于磷脂酰肌醇-3-激酶（phosphatidylin-ositol-3-kinase，PI3K）信号途径中。PI3K 激活后的产物与 AKT 的 PH 结构域相结合，使其 Ser473 和 Thr308 位点磷酸化，从而激活 AKT。研究发现 PD 患者黑质致密部（substantia nigra compacta，SNc）中总 AKT 水平及活性磷酸化 AKT 水平均显著降低[25]。林瑶等[26] 发现肉苁蓉可使 PD 大鼠黑质纹状体中 PI3K、ATK 的表达升高及其下游凋亡相关蛋白 Bcl-2 表达升高、Bax 表达降低，提示肉苁蓉通过激活 PI3K/AKT 通路，从而升高 Bcl-2/Bax 比值，减少神经细胞凋亡来发挥神经保护作用。糖原合成酶激酶-3β（glycogen synthase kinase-3β，GSK-3β）活性增高，诱导多巴胺能神经元凋亡，而研究发现载有碱性成纤维细胞生长因子（basic fibroblast growth factor，bFGF）的脂质体通过激活 PI3K/AKT 通路增加 GSK-3β 的磷酸化，从而抑制 GSK-3β 活性保护神经元[27]。此外，哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mammalian target of rapamycin，mTOR）作为 PI3K/AKT 下游信号分子，是自噬过程的主要调节因子，而 α-Syn 的聚集是 PD 发病机制的核心之一，激活 PI3K/ATK/mTOR 通路诱发自噬途径使聚集的 α-Syn 降解，从而发挥治疗 PD 的作用[28]。由此可见肉苁蓉有效成分可能通过激活 PI3K/AKT 信号通路促进神经细胞存活发挥治疗 PD 的作用。同样涉及 α-Syn 聚集导致 PD 的发病机制，Pino 等[29] 发现叉形头转录因子 O 亚型（forkhead box O，FOXO）家族重要的自噬调控因子 FOXO3 有效地减少可溶性 α-Syn 含量，且 FOXO3 控制神经元细胞中的自噬流量。由此可以推测，肉苁蓉有效成分可能通过 FOXO 信号通路减少 α-Syn 的积累保护多巴胺神经元。

miRNAs 作为一簇微小的内源性非编码小 RNA 分子，能够通过序列特异性的方式来调节靶基因表达，参与调控多巴胺神经元增殖、凋亡及自噬等生物过程[30]。研究发现 α-Syn（其编码基因为 SNCA）的异常表达会诱导多巴胺神经元凋亡，而 miRNA-7 及 miRNA-153 可降低 PD 模型中 SNCA 的表达水平，改善 PD 症状[31]；同时 miR-425 可以恢复功能失调的多巴胺能神经院并改善 PD 小鼠行为缺陷[32]。这些也验证了肉苁蓉通过调控 miRNA 影响 PD 发病过程，但具体机制尚需进一步研究。

缺氧诱导因子-1（hypoxia inducible factor-1，HIF-1）是一种对氧敏感的转录激活因子，由组成型表达的 β 亚基和低氧诱导型的 α 亚基构成，参与血管生成、铁代谢、葡萄糖能量代谢和细胞增殖及存活的基因转录诱导[33]。有研究发现鱼藤酮或 MPP^+处理的 PD 模型 SH-SY5Y 细胞中 HIF-1α 的蛋白质水平降低，铁铁螯合剂去铁胺可引 HIF-1α 的积累，伴随着 SH-SY5Y 细胞中自噬的增强；当 HIF-1α 基因被抑制时，去铁胺诱导的自噬也相应受到抑制，表明去铁胺在鱼藤酮诱导的 PD 细胞凋亡中的保护作用可能是通过 HIF-1α 积累以及 HIF-1α 介导的自噬诱导[34]。食欲素 A（Orexin-A）是下丘脑神经元分泌的一种神经肽，可在神经病变中发挥保护作用。有研究发现 Orexin-A 作用于经 MPP^+处理 SH-SY5Y 细胞后，不仅诱导 HIF-1α 的产生，同时激活 HIF-1 下游靶标如血管内皮生长因子，减轻细胞损伤，起到神经保护作用[35]。可见，肉苁蓉有效成分可能通过增加 HIF-1 靶基因的表达激活诱导受损细胞自噬，减轻细胞损伤。

越来越多证据支持神经炎症反应参与 PD 的发病机制[36]，而肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor，TNF）通路作为重要的炎症反应通路，介导激活炎性小体，进而激活小胶质细胞，活化的小胶质细胞通过增殖和分泌炎症因子可损伤多巴胺能神经元[37]。Liang 等[38] 用肉苁蓉提取物松果菊苷处理亚急性 PD 小鼠模型后发现，松果菊苷可减少小胶质细胞和星形胶质细胞的活化，降低炎症因子 TNF-α 水平，上调 GDNF 表达，改善 PD 小鼠行为学症状。

通过构建中药-化合物-靶点网络图，根据 degree 值高低进行排序，选择前 5 个关键靶点，分别为 MAPK8、ESR1、SRC、JAK2、AKT1。Liu 等[39] 发现中药提取物可以通过激活丝裂原活化蛋白激酶 8（mitogen-activated protein kinase 8，MAPK8），从而促进抗凋亡蛋白 Bcl-2 磷酸化，进而清除受损线粒体，间接抑制细胞凋亡，最终通过调节自噬、凋亡再平衡而发挥神经保护作用，可能也是肉苁蓉的作用机制之一。Chakrabarti 等[40] 发现雌激素受体（estrogen receptor alpha，ESR）激动剂可通过抑制小胶质细胞活性减轻炎症反应发挥神经保护作用；而另一项研究发现雌激素作用于 ESR 抑制 NADPH 氧化酶（reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase）活性，减少神经炎症标志物，从而减轻神经损伤[41]。由此可以得出肉苁蓉有效成分可能作用于 ESR1 靶点减轻神经炎症反应治疗 PD。与 ESR 相反，类固醇受体辅助活化因子（steroid receptor coactivator，SRC）作为促炎因子会造成 PD 小鼠多巴胺能神经元损伤[42]。丝氨酸/苏氨酸激酶 1（AKT1）属于 AKT 家族，是参与细胞存活和凋亡调控信号转导的中心分子，磷酸化时完全激活[43]。有研究显示在 PD 中，维持 AKT1 中半胱氨酸 296 和 310 的硫醇状态对于 AKT1

激酶活性和防止其被蛋白酶体降解至关重要[44]。可见，上述四个分子均可能是肉苁蓉保护效应的靶点。再利用 AutoDock Vina 将以上 5 个关键靶点与肉苁蓉的 6 个活性成分(β-谷甾醇、花生四烯酸、脱水内酯、丁香树脂二甲醚、槲皮素和枫马京)分别进行分子对接，均成功对接，结合能均小于−5 kcal/mol，提示药物与靶点的结合活性较好。其中槲皮素和 SRC 具有强烈的结合活性，结合能为−9.2 kcal/mol，可从抗神经炎症、抗凋亡角度进一步深入研究肉苁蓉的作用机制。

综上，本研究通过网络药理学及分子对接探讨了临床常用于治疗 PD 的有效药物肉苁蓉作用靶点，发现肉苁蓉通过多组分、多通路、多靶点的协同作用发挥其在 PD 中的疗效，为进一步研究肉苁蓉神经保护作用机理和深入探讨 PD 发病机制提供了依据。另外，本研究的筛选标准与中药各组分的口服吸收度及生物利用度均有一定关系，所以并非对所有有效成分都能进行充分分析，这对我们天然药物的开发也有一定启示作用，即应结合中药成分的吸收、代谢等特点，同时考虑不同给药途径及不同个体或组织器官的分布情况进行深入研究。

参考文献

[1] 中华医学会神经病学分会帕金森病及运动障碍学组，中国医师协会神经内科医师分会帕金森病及运动障碍学组. 中国帕金森病治疗指南 (第四版)[J]. 中华神经科杂志，2020，53(12)：973−986. [Chinese Society of Parkinson's disease and Movement Disorders, Parkinson's Disease and Movement Disorder Section of Neurologist Branch of Chinese Medical Doctor Association. Chinese guidelines for the treatment of Parkinson's disease (fourth edition)[J]. Chin J Neurol, 2020, 53(12): 973−986.]

[2] LI G, MA J, CUI S, et al. Parkinson's disease in China: A forty-year growing track of bedside work[J]. Translational Neurodegeneration, 2019, 8(1): 22.

[3] DENG M, ZHAO J Y, TU P F, et al. Echinacoside rescues the SHSY5Y neuronal cells from TNFα-induced apoptosis[J]. European Journal of Pharmacology, 2004, 505(1-3): 11−18.

[4] 毕萃萃，刘银路，魏芬芬，等. 肉苁蓉的主要化学成分及生物活性研究进展[J]. 药物评价研究，2019，42(9)：1896−1900. [BI C C, LIU Y L, WEI F F, et al. Research progress on main chemical constituents and biological activities of *Cistanche deserticola*[J]. Drug Evaluation Research, 2019, 42(9): 1896−1900.]

[5] 陆艳，张亚杰，阮杰，等. 肉苁蓉颗粒剂对帕金森病大鼠模型黑质纹状体多巴胺能神经元的保护作用研究[J]. 中华中医药学刊，2016，34(12)：2927−2931. [LU Y, ZHANG Y J, RUAN J, et al. Nigrostriatal dopaminergic protection of Cistanche Granule on rat model of Parkinson's disease[J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2016, 34(12): 2927−2931.]

[6] 尹若熙，李刚，俞腾飞，等. 肉苁蓉多糖对东莨菪碱所致学习记忆障碍模型小鼠在突触可塑性方面的保护作用[J]. 中国药理学通报，2014(6)：801−806,807. [YIN R X, LI G, YU T F, et al. Effect of polysaccharide from *Cistanche deserticola* on learning and memory deficits induced by scopolamine under improving synaptic plasticity in mice[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2014(6): 801−806,807.]

[7] 周志锦. 肉苁蓉的研究进展[J]. 中医药信息，1995，12(5)：28−30. [ZHOU Z J. Research progress of *Cistanche deserticola*[J]. Information of Traditional Chinese Medicine, 1995, 12(5): 28−30.]

[8] LIU H, WANG J, ZHOU W, et al. Systems approaches and polypharmacology for drug discovery from herbal medicines: An example using licorice[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2013, 146(3): 773−793.

[9] GRAY M T, WOULFE J M. Striatal blood-brain barrier permeability in Parkinson's disease[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2015, 35(5): 747−750.

[10] 陈文娜，朱爱松，丛培玮，等. 基于网络药理学的二陈汤治疗冠心病分子机制研究[J]. 中草药，2019(2)：441−448. [CHEN W N, ZHU A S, CONG P W, et al. Molecular mechanism of Erchen decoction in treatment of coronary heart disease based on network pharmacology[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2019(2): 441−448.]

[11] TROTT O, OLSON A J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading[J]. Journal of Computational Chemistry, 2010, 31(2): 455−461.

[12] 龚普阳，郭瑜婕，李晓朋，等. 基于网络药理学与分子对接技术的金花清感颗粒防治新型冠状病毒肺炎的潜在药效物质研究[J]. 中草药，2020，51(7)：1685−1693. [GONG P Y, GUO Y J, LI X P, et al. Exploring active compounds of Jinhua Qinggan Granules for prevention of COVID-19 based on network pharmacology and molecular docking[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2020, 51(7): 1685−1693.]

[13] 郑晓珂，刘媛媛，冯卫生，等. 天然苯乙醇苷类化合物研究进展[J]. 中国新药杂志，2011，20(3)：230−234. [ZHENG X K, LIU Y Y, FENG W S, et al. Development in research of natural phenylethanoid glycosides[J]. Chinese Journal of New Drugs, 2011, 20(3): 230−234.]

[14] 赵卿，张鹏，白宇，等. 松果菊苷通过调控 GFRα1/AKT 信号通路抑制 MPP^+诱导的多巴胺能细胞 SH-SY5Y 凋亡[J]. 中成药，2016(6)：1225−1231. [ZHAO Q, ZHANG P, BAI Y, et al. Echinacoside inhibits apoptosis of SH-SY5Y cell through GFRα1/AKT pathway[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2016(6): 1225−1231.]

[15] ZHAO Q, YANG X Y, CAI D F, et al. Echinacoside protects against MPP(+)-induced neuronal apoptosis via ROS/ATF3/CHOP pathway regulation[J]. Neuroscience Bulletin, 2016, 32(4): 349−362.

[16] ZHAO Q, GAO J, LI W, et al. Neurotrophic and neurorescue effects of echinacoside in the subacute MPTP mouse model of Parkinson's disease[J]. Brain research, 2010, 1346: 224−236.

[17] CHENG Y F, CHEN Y P, LI J, et al. Dietary β-sitosterol improves growth performance, meat quality, antioxidant status, and mitochondrial biogenesis of breast muscle in broilers[J]. Animals an Open Access Journal from Mdpi, 2019, 9(3): 71.

[18] SUBRAMANIAM S R, CHESSELET M F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease[J]. Progress

in Neurobiology, 2013, 106-107(3): 17−32.
[19] WANG Z J, LIANG C L, LI G M, et al. Neuroprotective effects of arachidonic acid against oxidative stress on rat hippocampal slices[J]. Chemico-Biological Interactions, 2006, 163(3): 207−217.
[20] 王德杰, 郑傲. 槲皮素对 D-半乳糖致衰老小鼠模型学习记忆及脑内炎症的影响[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2018, 17(9): 691−695. [WANG D J, ZHENG A. Effects of quercetin on learning and memory and cerebral inflammation in the D-galactose-induced aging mice[J]. Chin J Mult Organ Dis Elderly, 2018, 17(9): 691−695.]
[21] WANG Y H, YU H T, PU X P, et al. Myricitrin alleviates methylglyoxal-induced mitochondrial dysfunction and AGEs/RAGE/NF-κB pathway activation in SH-SY5Y cells[J]. Journal of Molecular Neuroscience:MN, 2014, 53(4): 562−570.
[22] BOYINA H K, GEETHAKHRISHNAN S L, PANUGANTI S, et al. In silico and *in vivo* studies on quercetin as potential anti-Parkinson agent[J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2020, 1195: 1−11.
[23] LUO Y, HOFFER A, HOFFER B, et al. Mitochondria: A therapeutic target for Parkinson's disease?[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(9): 20704−20730.
[24] GANGULY G, CHAKRABARTI S, CHATTERJEE U, et al. Proteinopathy, oxidative stress and mitochondrial dysfunction: Cross talk in Alzheimer 's disease and Parkinson's disease[J]. Drug Design, Development and Therapy, 2017, 2017(11): 797−810.
[25] TIMMONS S, COAKLEY M F, MOLONEY A M, et al. Akt signal transduction dysfunction in Parkinson's disease[J]. Neuroscience Letters, 2009, 467(1): 30−35.
[26] 林瑶, 杨莎莎, 刘婷, 等. 肉苁蓉对帕金森病模型大鼠 PI3K、Akt、Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响[J]. 江西中医药大学学报, 2019, 31(1): 83−86. [LIN Y, YANG S S, LIU T, et al. Effects of Herba *Cistanche* on the protein expression of PI3K, Akt, Bcl-2 and Bax in rats model of Parkinson's disease[J]. Journal of Jiangxi University of TCM, 2019, 31(1): 83−86.]
[27] YANG P H, ZHU J X, HUANG Y D, et al. Human basic fibroblast growth factor inhibits Tau phosphorylation via the PI3K/Akt-GSK3β signaling pathway in a 6-Hydroxydopamine-induced model of Parkinson's disease[J]. Neurodegenerative Diseases, 2016, 16(5-6): 357−369.
[28] QIAO C M, SUN M F, JIA X B, et al. Sodium butyrate causes α-synuclein degradation by an Atg5-dependent and PI3K/Akt/mTOR-related autophagy pathway[J]. Experimental Cell Research, 2019, 387(1): 111772.
[29] PINO E, AMAMOTO R, ZHENG L, et al. FOXO3 determines the accumulation of α-synuclein and controls the fate of dopaminergic neurons in the substantia nigra[J]. Human Molecular Genetics, 2014, 23(6): 1435−1452.
[30] BRIGGS C E, WANG Y, KONG B, et al. Midbrain dopamine neurons in Parkinson's disease exhibit a dysregulated miRNA and target-gene network[J]. Brain Research, 2015, 1618: 111−121.
[31] DOXAKIS E. Post-transcriptional regulation of alpha-Synuclein expression by mir-7 and mir-153[J]. Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(17): 12726−12734.
[32] HU Y B, ZHANG Y F, WANG H, et al. MiR-425 deficiency promotes necroptosis and dopaminergic neurodegeneration in Parkinson's disease[J]. Cell Death & Disease, 2019, 10(8): 589.
[33] SCHUMACKER P T. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)[J]. Critical Care Medicine, 2005, 33(5): 423−425.
[34] WU Y C, LI X Q, XIE W J, et al. Neuroprotection of deferoxamine on rotenone-induced injury via accumulation of HIF-1α and induction of autophagy in SH-SY5Y cells[J]. Neurochemistry International, 2010, 57(3): 198−205.
[35] FENG Y, LIU T, LI X Q, et al. Neuroprotection by orexin-A via HIF-1α induction in a cellular model of Parkinson's disease[J]. Neuroscience Letters, 2014, 579: 35−40.
[36] ALAM Q, ALAM M Z, MUSHTAQ G, et al. Inflammatory process in Alzheimer's and Parkinson's diseases: Central role of cytokines[J]. Current Pharmaceutical Design, 2016, 22(5): 541−548.
[37] YANG L, MAO K, YU H, et al. Neuroinflammatory responses and Parkinson' disease: Pathogenic mechanisms and therapeutic targets[J]. Journal of Neuroimmune Pharmacology, 2020, 15(4): 830−837.
[38] LIANG Y, CHEN C, XIA B, et al. Neuroprotective effect of echinacoside in subacute mouse model of Parkinson's disease[J]. BioMed Research International, 2019, 2019: 1−8.
[39] LIU J, LIU W, LU Y, et al. Piperlongumine restores the balance of autophagy and apoptosis by increasing BCL2 phosphorylation in rotenone-induced Parkinson disease models[J]. Autophagy, 2018, 14(5): 845−861.
[40] CHAKRABARTI M, HAQUE A, BANIK N L, et al. Estrogen receptor agonists for attenuation of neuroinflammation and neurodegeneration[J]. Brain Research Bulletin, 2014, 109: 22−31.
[41] LABANDEIRA-GARCIA J L, RODRIGUEZ-PEREZ A I, VALENZUELA R, et al. Menopause and Parkinson's disease. Interaction between estrogens and brain renin-angiotensin system in dopaminergic degeneration[J]. Frontiers in Neuroendocrinology, 2016, 43: 44−59.
[42] YANG H, WANG L, ZANG C, et al. Src inhibition attenuates neuroinflammation and protects dopaminergic neurons in Parkinson's disease models[J]. Frontiers in Neuroscience, 2020, 14: 45.
[43] RAN C, WESTERLUND M, ANVRET A, et al. Genetic studies of the protein kinase AKT1 in Parkinson's disease[J]. Neuroscience Letters, 2011, 501(1): 41−44.
[44] AHMAD F, NIDADAVOLU P, DURGADOSS L, et al. Critical cysteines in Akt1 regulate its activity and proteasomal degradation: Implications for neurodegenerative diseases[J]. Free Radical Biology & Medicine, 2014, 74: 118−128.

徐敬欣，常婧瑶，孔保华，等. 水分添加量对肉粉肠品质特性的影响 [J]. 食品工业科技，2022, 43(9)：23−30. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050205

XU Jingxin, CHANG Jingyao, KONG Baohua , et al. Effects of Water Addition on the Quality Characteristics of Starch-Meat Sausage[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 23−30. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn 1002-0306.2021050205

·研究与探讨·

水分添加量对肉粉肠品质特性的影响

徐敬欣，常婧瑶，孔保华，夏秀芳，刘　骞*

（东北农业大学食品学院，黑龙江哈尔滨 150030）

摘　要：本文探究了不同加工工艺条件下肉粉肠中淀粉糊化度（Degree of Starch Gelatinization，DSG）的变化及对其产品品质特性的影响。结果表明，随着水分添加量的增加，肉粉肠的 DSG 和乳化稳定性显著增加 (P<0.05)，而蒸煮损失显著降低（P<0.05），肉粉肠中水分分布也证实了上述结果。与此同时，随着水分添加量的增加，肉粉肠的弹性、致密性、L^*-值显著增加（P<0.05），硬度显著降低（P<0.05），而脆性、咀嚼性和总体可接受性评分则在水分添加量为 54% 时达到最大（P<0.05）。簇类分析（Hierarchical Cluster Analysis, HCA）的结果表明，54% 的水分添加量对于肉粉肠的品质特性有上调的影响。因此，54% 的水分添加量为肉粉肠加工的最佳水分添加量。

关键词：肉粉肠，水分添加量，品质特性，糊化度

中图分类号：TS251.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1002−0306(2022)09−0023−08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050205

本文网刊：

Effects of Water Addition on the Quality Characteristics of Starch-Meat Sausage

XU Jingxin，CHANG Jingyao，KONG Baohua ，XIA Xiufang，LIU Qian*

（College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China）

Abstract: In this paper, the degree of starch gelatinization (DSG) and its effect on product quality were studied under different processing conditions. The resluts showed that increasing the water addition increased the DSG and emulsion stability of starch-meat sausage (P<0.05) and decreased the cooking loss (P<0.05). The water distribution in starch-meat sausage supported these results. Meanwhile, the springiness, compactness, and L^* (Lightness) of starch-meat sausage increased (P<0.05) with the increase of water addition, and the hardness decreased (P<0.05). The breaking force, chewiness, and overall acceptability score were maximal when the addition of water was 54% (P<0.05). Hierarchical cluster analysis (HCA) asserted that the 54% water addition enhanced the quality characteristics of starch-meat sausage. Therefore, 54% water addition is the best water addition for starch-meat sausage processing.

Key words: starch-meat sausages; water addition; quality characteristics; DSG

肉粉肠是一种具有悠久历史的传统肉制品，在东北、华北地区十分流行，具有风味浓郁、爽口不腻、价格低廉等优点[1]，因此深受消费者青睐。产品中除主料肉糜外，绿豆淀粉在配方中也占有重要比例（通常在 35% 左右[2−3]），其在肉粉肠加工过程中，起到增稠和稳定的作用，同时赋予产品特殊的口感[4−6]。然而，在肉粉肠加工过程中，水分添加量会直接影响热加工过程中绿豆淀粉糊化特性，从而影响产品的最终品质。周国燕等[7] 的研究结果表明，随着水分含量的增加，糊化起始温度、峰值温度增高，糊化焓值显著变化。此外，水分含量的多少直接影响马铃薯淀粉的糊化度（Degree of Starch Gelatinization, DSG）。

收稿日期：2021−05−25

基金项目：黑龙江省省属本科高校中央支持地方高校改革发展资金（优秀青年人才项目）（2020YQ15）；黑龙江省“百千万”工程科技重大专项课题（2019ZX07B03）。

作者简介：徐敬欣（1996−）（ORCID: 0000-0002-3279-7603），女，硕士研究生，研究方向：畜产品加工工程，E-mail: 13114515735@163.com。

*** 通信作者：**刘骞（1981−）（ORCID: 0000-0003-1692-3267），男，博士，教授，研究方向：畜产品加工工程，E-mail: liuqian@neau.edu.cn。

当水分含量较少的时候(低于 50%),马铃薯淀粉糊化不完全,当水分含量提高至 75% 及以上时,淀粉基本糊化完全。因此,水分含量的多少直接影响最终产品的 DSG,继而影响产品的品质特性。此外,裴玉秀[8]研究表明,不同预糊化温度下绿豆淀粉的吸水量以及颗粒体积不同,所形成的凝胶稳定性不同,因此直接影响最终产品的品质。在肉粉肠加工过程中,预糊化工艺能够显著促进淀粉的溶解性,有利于与肉糜形成均一的复合体系。

基于此,本实验将改变肉粉肠的水分添加量(50%、52%、54%、56% 和 58%),探讨不同水分添加量对于肉粉肠 DSG 以及品质特性和感官特性的影响,同时利用簇类分析(hierarchical cluster analysis, HCA)探讨不同样品间各参数的相似性和差异性,以期为肉粉肠类制品的加工提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

干绿豆淀粉 哈尔滨市哈达淀粉有限公司;猪瘦肉、猪脂肪、大葱、鲜姜 市售;猪肠衣(7 路,直径 36~38 mm) 江苏南通宝丰肠衣有限公司;复合磷酸盐、亚硝酸钠、异抗坏血酸钠 厦门市顶为味兴业香料发展有限公司;山梨酸钾 宁波王龙科技股份有限公司;食盐 中盐东兴盐化股份有限公司;香辛料 江苏省泰州市香之源食品有限公司;淀粉葡萄糖苷酶(Amyloglucosidase, AGS)(酶活:3260 U/mL),K-GLUC 试剂盒 爱尔兰威克洛 Megazyme 国际公司。

垣悦-22 绞切两用灌肠机 江苏镇江辛丰垣悦机械厂;自动和面机 广东省广州市道升商用厨具有限公司;BZZT-IV-150 蒸煮桶 杭州艾博机械工程有限公司;TU-1800 紫外可见光分光光度计 北京普析通用仪器有限公司;IT-09A12 加热磁力搅拌器 上海一恒科学仪器有限公司;AQUALAB 4TE 水分活度仪 美国 Decagon Devices 仪器公司;ZE-6000 色差计 日本色电工业株式会社;TA-XT plus 型质构分析仪 英国 Stable Micro System 公司;Mq-20 低场核磁共振分析仪 德国布鲁克公司。

1.2 实验方法

1.2.1 肉粉肠的配方 肉粉肠的配方如表 1 所示。改变肉粉肠加工工艺中的水分添加量,不同的水分添加量分别为主料(瘦猪肉、肥膘和干绿豆淀粉)的 50%、52%、54%、56% 和 58%,测量不同样品的 DSG 及品质特性参数。

1.2.2 肉粉肠的加工工艺流程 原料的选择→绞碎→冷藏→粗斩拌肉糜→预糊化淀粉→混合馅料→灌制→煮制→干燥→糖熏→冷却→成品

1.2.3 肉粉肠的操作要点 原料的选择:选择经卫生检疫合格的瘦猪腿肉和猪背肥膘为原料,剔除可见筋膜并清洗血污等杂质。

绞碎:用刀盘孔径为 3 mm 的绞切两用灌肠机分别将瘦猪肉和脂肪搅碎。

冷藏:将搅碎的原料肉在 4 ℃ 冰箱中冷藏过夜 12 h 左右。

粗斩拌肉糜:将瘦猪肉和猪背膘放入绞切两用灌肠机中,高速斩拌 3 min(肉糜呈粗颗粒)后取出,置于 4 ℃ 冰箱冷藏备用。

预糊化淀粉:将 300 g 干绿豆淀粉溶于部分冷水中,冷水体积为总水分添加量的 1/3,置于自动和面机中,使体系呈均匀分散的悬浊液。然后,将剩余水加热至 95 ℃ 并缓慢加入上述悬浊液中,边加入边搅拌。

混合馅料:将鲜姜和大葱混合打浆备用,持续搅拌预糊化后的淀粉,至其温度降低至 48 ℃ 左右加入备用的猪粗肉糜,加入食盐、葱、姜、香油等香辛料以及异抗坏血酸钠和防腐剂并持续搅拌 10 min。

灌制:用绞切两用灌肠机将肉馅灌入猪肠衣内。灌装时要求均匀,使灌装后的肠可呈扁平状铺于操作台上,联结到所需长度,然后再盘绕起来。

煮制:在 85 ℃ 恒温蒸煮锅中蒸煮,时间 30 min,测定肠体中心温度达到 74 ℃ 时即可。

干燥:将肠体从蒸煮桶中捞出,置于室温中风干,至肠体表面无多余水分并且温度冷却至室温。

糖熏:将白砂糖与潮湿木屑以 1∶1(v/v)在锡纸盒中(长×宽×高=12 cm×12 cm×3 cm)混合均匀,并将其置于烧红的铁锅底部,持续加热铁锅直至锡纸盒内白砂糖化开呈褐色且有烟产生,将干燥后的肉粉肠置于锅中铁架上,盖紧锅盖,熏制 6 min,至肠衣呈金黄色。

冷却:将糖熏后的产品置于晾干架,冷却至室温后进行真空包装。

1.2.4 肉粉肠 DSG 测定 肉粉肠的 DSG 的计算公式如公式(1)所示,根据 Liu 等[9]的方法测量总淀粉含量和糊化淀粉含量。将样品机械再溶解于 80 mmol/L NaOH 溶液中,并用 80 mmol/L 盐酸溶液中和。主要测量步骤包括:a.肉粉肠样品中总淀粉的

表 1 肉粉肠的配方

Table 1 Formula of starch-meat sausages

配料	质量(g)	配料	质量(g)	配料	质量(g)	配料	质量(g)
瘦猪肉	550	复合磷酸盐	2.5	大葱	40	异抗坏血酸钠	0.002
肥膘	150	亚硝酸盐	0.02	鲜姜	20	山梨酸钾	3
干绿豆淀粉	300	味精	5	香油	16		
食盐	48	白砂糖	10	花椒粉	2.85		

机械再溶解；b.肉粉肠样品中糊化淀粉的机械再溶解；c.分别酶解机械再溶解后的样品；d.分别测量酶解产生的 D-葡萄糖含量；e.得出总淀粉含量和糊化淀粉含量，并利用如下公式计算肉粉肠的 DSG。

$$肉粉肠DSG(\%) = \frac{糊化淀粉含量}{总淀粉含量} \times 100 \qquad 式（1）$$

1.2.5　肉粉肠水分含量和水分活度测定　根据 GB 5009.3-2016《食品安全国家标准 食品中水分的测定》方法测定样品的水分含量。

取适量肉糜平铺于水活杯底部，将水活杯放置于水活测定仪中进行水分活度测定，记录测定结束后的数值。

1.2.6　蒸煮损失测定　参考 Álvarez 等[10] 方法略有改动，取 35 g 生肉糜于离心管中，以 3500 r/min 转速于 4 ℃ 离心 5 min，然后置于 85 ℃ 的恒温水浴锅中加热 30 min，模拟蒸煮过程，取出后在室温下倒置冷却 45 min~1 h。蒸煮损失计算公式如下：

$$蒸煮损失(\%) = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100 \qquad 式（2）$$

式中：m_1 为加热前肉糜质量，g；m_2 为加热后肉糜质量，g。

1.2.7　乳化稳定性测定　参考 Colmenero 等[11] 的方法略有改动，将蒸煮后所得液体全部倒入铝盒中，置于 105 ℃ 烘箱加热至恒重，减少的重量即为水分损失（加热前的重量 w_1 减去加热后的重量 w_2），恒重后的铝盒总重 m_3 减去空铝盒的重量 m_4 即为脂肪损失。计算公式表达为：

$$水分损失率(\%) = \frac{w_1 - w_2}{m} \times 100 \qquad 式（3）$$

式中：w_1 为加热前的重量，g；w_2 为加热后的重量，g；m 为生肉糜质量，g。

$$脂肪损失率(\%) = \frac{m_3 - m_4}{m} \times 100 \qquad 式（4）$$

式中：m_3 为恒重后的铝盒总重，g；m_4 为空铝盒的重量，g；m 为生肉糜质量，g。

1.2.8　水分动态分布测定　参考 Aursand 等[12] 的方法略作改动，用圆柱形取样器（直径 18 mm）取 18 mm×18 mm（高×直径）肉粉肠样品置于核磁试管中，使用低场核磁共振分析仪在室温（25 ℃）下测定自旋-自旋弛豫时间 T_2。使用 CONTIN 软件分析弛豫数据，弛豫时间分量表示为 T_{2b}、T_{21} 和 T_{22}，相关面积比例分别表示为 A_{2b}、A_{21} 和 A_{22}。测试参数：质子共振频率为 22 MHz，测量温度为 32 ℃，重复扫描 16 次，重复间隔时间 TR 为 3500 ms，采样间隔 160 μs，回波个数为 5000。每个样品平行测定 6 次，实验重复 3 次。

1.2.9　质构特性测定　分别取长度、粗细均匀的样品进行质构测定。探头型号为 P2，试验参数如下：测试前速度为 1.5 mm/s，测试速度为 1.5 mm/s，测试后速度为 10.0 mm/s，触发力为 15.0 g，样品首次轴向压缩未刺破肠衣，且压缩至原始高度的 15.0%，测定指标包括：硬度、弹性和回复性。第二次轴向压缩刺破肠衣，且压缩至样品的 75.0%。测定指标包括：脆性、咀嚼性和致密性。

1.2.10　颜色测定　根据 Jia 等[13] 所述的方法，用色差计来测定肉粉肠的亮度值（Lightness，L^*-值）、红度值（Redness，a^*-值）和黄度值（Yellowness，b^*-值）。将肉粉肠样品粉碎，并使用 D65 光源和 10°观察仪（直径为 8mm）进行测量，观察仪直径为 8 mm，测量区域为 50 mm。测量之前，使用白色参考板（L^*-值=95.26，a^*-值=−0.89，b^*-值=1.18）进行校准。每组样品测量 3 次平行，每次平行将样品旋转 3 次至不同位置进行测量。

1.2.11　肉粉肠感官评价　感官评价由感官小组（共 16 名成员，包括 8 位女性和 8 位男性）在感官实验室（ISO 8589，2007）完成，评分细则如表 2 所示。肉类实验室的专家通过预备课程对所有小组成员进行了培训，使他们了解样品。根据以下参数，通过感官描述分析对每个肉粉肠进行评估：肉粉肠的内部颜色，肉粉肠的切面均匀度，肉粉肠的弹性，肉粉肠的硬度，肉粉肠的风味强度。此外，小组成员还需要提供每个肉粉肠的总体可接受性（1=低；7=高）。将室温的每组肉粉肠切成片（厚 5~8 mm），并放在随机编码的 3 位数的白板上，然后将所有样品立即交予小组成员。此外，还需向小组成员提供饮用水，避免测试不同样品之间味觉的混淆[14]。

表 2　肉粉肠感官评分细则

Table 2　Sensorial evaluation scores of starch-meat sausages

项目		评分细则	评分
感官剖面（眼睛观察到的）	内部色泽	产品呈浅粉色，切面有光泽	5~7
		产品肉色较差，切面略有光泽	4
		产品呈浅黄色，切面无光泽	1~3
	切面致密性	切面均匀一致，组织致密	5~7
		切面稍不均匀，组织较致密	4
		切面完全不均匀，组织松散	1~3
滋味（在口腔里咀嚼时感受到的质感）	弹性	咀嚼爽滑有弹性	5~7
		咀嚼弹性感稍差	4
		咀嚼无弹性	1~3
	硬度	口感软硬适中	5~7
		口感较软	4
		口感湿软	1~3
气味（嗅觉系统，鼻腔主动去嗅闻；在口里咀嚼时被动嗅闻的气味）	风味	具有强烈的特有风味，有回味	5~7
		具有一定的特有风味，稍有回味	4
		无特有风味，无回味	1~3
总体可接受性		整体接受性非常好	5~7
		整体可接受性良好	4
		整体可接受性一般	1~3

1.3　数据处理

每个试验重复 3 次，结果以平均值±标准差表达。数据统计分析采用 IBM SPSS 25（IBM SPSS 软

件公司, Chicago, IL, USA)软件进行, 差异显著性(P<0.05)分析使用 Tukey HSD 程序。利用 Origin 2018(OriginLab 软件公司, Hampton, MA, USA)软件作图, Rversion4.0.3(MathSoft, Inc. USA)软件进行 HCA 分析, 讨论不同样品间参数的相似性。

2 结果与分析

2.1 水分添加量对肉粉肠 DSG 的影响

肉粉肠作为一种高淀粉含量的肉制品, 在蒸煮过程中, 馅料中的淀粉颗粒发生糊化, 即颗粒吸水溶胀, 淀粉分子间链接键断裂, 扩散出来的淀粉分子与水分子重新结合, 形成无序的非晶态[15]。而在淀粉糊化的过程中, 水分作为食品的重要组成部分, 对于淀粉的糊化特性, 糊化度等有直接的影响[16], 继而对产品的品质形成起到关键性作用。由图 1 可以看出, 随水分添加量的增加, 肉粉肠的 DSG 显著增加(P<0.05)。这是因为, 当体系水分含量过低(50%), 因糊化过程中水分迁移困难, 因此淀粉颗粒只能吸收有限水分, 导致 DSG 较低[17]。而随水分添加量的增加, 发生水合作用的淀粉颗粒增加, 大量结晶体水合破裂, 糊化速率提高, 淀粉糊化度升高。周兵等[18] 发现, 相较于温度, 水分含量对于淀粉的糊化起到更重要的作用, 具体表现为, DSG 随体系水分含量的增加而增加。当水分添加量为 50% 时, 淀粉中的水分含量不足, 淀粉在热加工糊化时, 分子吸水力受阻, 膨胀力低, 导致淀粉糊化不完全, DSG 较小, 糊化焓变值较低[19]。

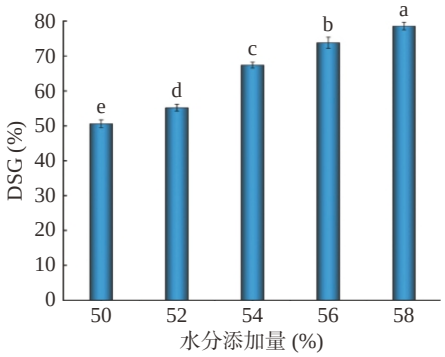


图 1 不同水分添加量对肉粉肠 DSG 的影响

Fig.1 Effect of different water additions on DSG of starch-meat sausages

注: 图中不同的小写字母表示样品间差异显著(P<0.05)。

2.2 水分添加量对肉粉肠水分含量和水分活度的影响

水分活度表示肉粉肠中水分存在的真实状态, 它表达了水分能为化学反应和物理过程利用的有效程度[20], 能够反映供微生物生长所需的自由水的情况[21]。由表 3 可知, 不同水分添加量的肉粉肠其水分活度无显著变化(P>0.05), 但大致呈上升趋势, 且数值均偏高, 表明该体系水分子的活度高, 质子密度高[22], 贮藏稳定性差。同时, 由表可以看出水分含量随水分添加量的增加而显著增加(P<0.05)。这是因为肉粉肠的 DSG 随水分添加量的增加显著增加(P<0.05)(图 1), 即糊化淀粉颗粒增多, 凝胶化的网络结构可承载大量水分子, 提高体系的持水能力。

表 3 不同水分添加量对肉粉肠水分含量和水分活度的影响

Table 3 Effect of different water additions on water content and water activity of starch-meat sausages

水分添加量(%)	水分含量(%)	水分活度
50	69.01±0.24^{d}	0.98±0.01^{a}
52	70.78±0.25^{c}	0.98±0.01^{a}
54	71.59±0.57^{b}	0.99±0.01^{a}
56	73.97±0.20^{a}	0.99±0.01^{a}
58	74.06±0.11^{a}	0.99±0.01^{a}

注: 表中所示的数值为三次重复的平均值±标准偏差; 同一列中小写字母不同表示样品间差异显著(P<0.05); 表4~表8同。

2.3 水分添加量对肉粉肠蒸煮损失和乳化稳定性的影响

蒸煮损失和乳化稳定性是决定肉粉肠品质和感官质量的重要指标, 其中蒸煮损失与加热过程中的水分或脂肪结合能力有关。而乳化稳定性是能够表征肉粉肠中肉蛋白结合水分和脂肪能力的物理指标[23]。由表 4 可知, 随水分添加量的增加, 肉粉肠的蒸煮损失、水分损失以及脂肪损失均呈现下降的趋势, 表明高水分添加量的样品蒸煮损失小、乳化稳定性高。这是因为淀粉在热加工过程中发生糊化, 且水分添加量的增加, 加速了肉粉肠中淀粉的糊化进程。相反地, 图 2 可观察到低水分添加量的样品有细小水塘, 切面疏松不致密, 这与表 4 中该水分添加量下较高的蒸煮损失和较差的乳化稳定性结果一致。

表 4 不同水分添加量对肉粉肠蒸煮损失和乳化稳定性的影响

Table 4 Effect of different water additions on cooking loss and emulsion stability of starch-meat sausages

水分添加量(%)	蒸煮损失(%)	乳化稳定性	
		水分损失(%)	脂肪损失(%)
50	5.36±0.09^{a}	5.44±0.08^{a}	0.54±0.01^{a}
52	4.92±0.05^{b}	4.71±0.08^{b}	0.44±0.01^{ab}
54	4.52±0.35^{c}	4.04±0.03^{c}	0.31±0.03^{b}
56	4.38±0.13^{cd}	2.82±0.03^{d}	0.21±0.04^{bc}
58	4.24±0.67^{cd}	1.76±0.10^{e}	0.11±0.01^{c}

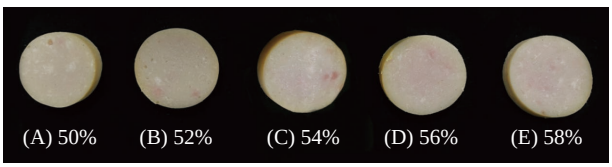


图 2 不同水分添加量对肉粉肠切面的影响

Fig.2 Effect of different water additions on sections of starch-meat sausages

2.4 水分添加量对肉粉肠水分动态分布的影响

LF-NMR(Low-Field Nuclear Magnetic Resonance)能够提供肉粉肠内部不同状态水分的分布以及流动性的相关信息, 通过这些动态信息, 能够更好地

解释影响肉制品食用品质、加工特性等的原因[24]，并且对改善食品的加工条件，提高食品产品的品质等具有重要的意义[21]。由图 3 可看出，肉粉肠的核磁衰减信号被拟合为 3 个峰，其根据水分子自由移动程度不同。其中，T_{2b} 反映与大分子紧密结合的水即结合水，T_{21} 反映位于高度组织化蛋白质结构内部的水即不易流动水，而 T_{22} 为肌原纤维蛋白外部水包括肌浆蛋白部分即自由水[25−27]。表 5 显示不同水分添加量下的肉粉肠的弛豫时间（T_{2b}、T_{21}、T_{22}）和相应的峰面积比（A_{2b}、A_{21}、A_{22}）。由表 5 可以看出，随水分添加量的增加，肉粉肠的 T_{2b} 无明显变化，但 T_{21} 以及 T_{22} 均向弛豫时间变短的方向移动（P<0.05）。表明体系中的水分子自由度逐渐减小，流动性降低。同时，表 5 中的数据显示，A_{2b} 随水分添加量的增加变化不显著（P>0.05），而 A_{21} 随水分添加量的增加而显著增加（P<0.05），A_{22} 则显著降低（P<0.05）。表明水分添加量的增加，对结合水含量无明显影响，但导致越来越多的自由水向不易流动水转变。这与肉糜蒸煮损失和乳化稳定性的结果一致。

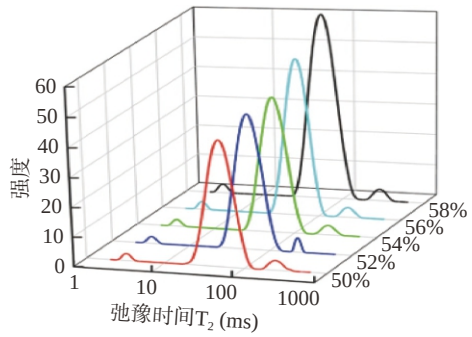


图 3　不同水分添加量对肉粉肠中水分动态分布的影响

Fig.3　Effect of different water additions on water dynamic distribution of starch-meat sausages

2.5　水分添加量对肉粉肠质构特性的影响

质构测定在肉制品研究中得到广泛应用，压缩、剪切等的测定是质构仪测定中重要的测试指标[28]。由表 6 可以看出，随水分添加量的增加，肉粉肠的弹性和回复性均呈现平稳上升的趋势。这与刘安军等[29]的研究结果相同。这是因为水分添加量对香肠的弹性和硬度有直接影响[30]。此外，肉粉肠的硬度随水分添加量的增加而降低。这是因为水分添加量的增加导致水分子之间的作用力增强，影响肌肉蛋白和水的相互作用，因此产品的硬度降低，质地变软，导致弹性发生变化[25]。此外，脆性和咀嚼性均随水分添加量的增加而呈现先上升后下降的趋势（P<0.05），并于水分添加量为 54% 时达到最大值。同时，肉粉肠的致密性随水分添加量的增加而显著增加（P<0.05），直至水分添加量为 56% 时达到最大值，这与图 2 的切面图趋势相同。

2.6　水分添加量对肉粉肠颜色的影响

颜色是评价肉制品的重要指标，具有直观性。同时，颜色也是消费者判断肉制品好坏的主要标准。其变化与肉粉肠的配方密切相关[22]。未改变加工工艺的情况下，肉粉肠切面的常规颜色是浅粉色[3]。表 7 为不同水分添加量下肉粉肠的 L^*-值、a^*-值和 b^*-值，由表可知，肉粉肠的 L^*-值随水分添加量的增加呈现波动上升的趋势，且当水分添加量为 58% 时达到了最大值。这是因为该样品水分添加量高，大量水分子提高了光散射强度，使产品亮度最明显。孙茜茜[31] 的研究结果表明，淀粉颗粒的平均粒径、膨胀度越大，则亮度越高，且破损淀粉含量与亮度呈正相关关系。这是因为水分添加量越高，样品的 DSG 越高，即破损淀粉颗粒的含量越高，而破损颗粒的存在使得体系吸收相对较多的水分，淀粉颗粒易于膨胀，直链淀粉和支链淀粉能够充分伸展，产品呈现较高的亮度。水分添加量为 54% 时肉粉肠的 a^*-值最高。此外，表 7 中数据表明，当水分添加量较低时（50%、52%），肉粉肠样品的 b^*-值偏高，图 2 中也可观察到相同结果。

表 5　不同水分添加量对肉粉肠横向弛豫时间及相应峰面积比例的影响

Table 5　Effect of different water additions on relaxation times and the corresponding peak area proportions of starch-meat sausages

水分添加量(%)	T_{2b}(ms)	T_{21}(ms)	T_{22}(ms)	A_{2b}(%)	A_{21}(%)	A_{22}(%)
50	3.18±0.14^{b}	55.91±0.13^{a}	253.56±0.73^{a}	3.13±0.17^{ab}	80.14±0.39^{e}	16.73±0.23^{a}
52	3.18±0.24^{b}	54.65±0.29^{a}	230.68±0.34^{ab}	3.01±0.06^{ab}	82.24±0.39^{d}	14.65±0.35^{b}
54	3.27±0.10^{ab}	51.00±0.96^{b}	223.94±0.86^{ab}	3.00±0.08^{ab}	84.02±0.42^{c}	12.98±0.34^{c}
56	3.33±0.18^{ab}	46.50±0.88^{c}	210.23±0.96^{b}	2.84±0.09^{b}	85.78±0.29^{b}	11.38±0.34^{d}
58	3.66±0.28^{a}	41.12±0.18^{d}	200.50±0.80^{b}	2.87±0.15^{ab}	86.95±0.41^{a}	10.17±0.38^{e}

表 6　不同水分添加量对肉粉肠质构特性的影响

Table 6　Effect of different water additions on texture characteristics of starch-meat sausages

水分添加量(%)	硬度(g)	回复性(g)	弹性(%)	脆性(g)	咀嚼性(g.sec)	致密性(g.sec)
50	153.63±0.32^{a}	88.01±0.92^{c}	73.89±0.24^{c}	371.52±0.30^{d}	1660.76±9.75^{d}	83.76±1.05^{d}
52	150.38±0.64^{ab}	92.09±0.20^{c}	75.70±0.16^{cd}	467.32±0.15^{b}	1811.27±10.08^{b}	111.85±0.57^{c}
54	140.39±0.91^{b}	107.09±0.29^{b}	77.55±0.94^{bc}	518.10±0.10^{a}	2019.03±8.02^{a}	152.70±0.43^{b}
56	134.83±0.11^{c}	114.89±0.58^{a}	78.54±0.28^{b}	464.48±0.34^{b}	1837.68±8.64^{b}	168.20±0.77^{a}
58	132.72±0.84^{c}	119.84±0.43^{a}	80.96±0.69^{a}	430.52±0.99^{c}	1723.65±10.54^{c}	167.43±0.35^{a}

表 7 不同水分添加量对肉粉肠颜色的影响

Table 7 Effect of different water additions on colors of starch-meat sausages

水分添加量(%)	L^*-值	a^*-值	b^*-值
50	61.55±0.20^{d}	4.15±0.34^{bc}	15.18±0.08^{bc}
52	63.81±0.09^{c}	3.59±0.35^{c}	16.56±0.15^{a}
54	65.69±0.08^{a}	5.21±0.29^{a}	14.78±0.21^{c}
56	64.53±0.11^{b}	5.06±0.26^{ab}	14.60±0.10^{c}
58	66.20±0.08^{a}	5.03±0.28^{ab}	14.47±0.16^{d}

2.7 水分添加量对肉粉肠感官评价的影响

感官评价能够对产品颜色、风味、弹性、硬度等直接评估，其结果能够反映产品被消费者接受的程度。由表 8 可以看出，较低水分添加量(50%)下肉粉肠的内部色泽显著低于其他样品(P<0.05)。这是因为低水分添加量导致肉粉肠中只有少部分淀粉发生糊化，而大量淀粉以生淀粉的形式存在。生淀粉颗粒内部链状结构未打开，无法与肌肉内变性蛋白形成胶体网状结构，导致水分子逃脱，产品持水性差，黏着性弱，使肉组织间形成孔洞，如图 2 的切面状态。肉粉肠弹性和硬度的感官评分趋势与表 6 质构仪测定趋势相同。而不同水分添加量下肉粉肠的风味无显著变化(P>0.05)。此外，肉粉肠的总体可接受性评分随水分添加量的增加呈现先上升后下降的趋势，这是因为低水分添加量下肉粉肠样品颜色较差且切面疏松有孔洞，而高水分添加量下肉粉肠样品虽弹性良好，但口感偏湿软，因此总体可接受性较差。因此整体而言，水分添加量为 54% 的肉粉肠表现出最佳的感官特性。

2.8 HCA 分析

HCA(Hierarchical Cluster Analysis)分析是观察和处理复杂数据矩阵的正确工具。其在数学上将每个变量视为样本描述的多维空间中的一个点[32]。当一个给定的样本作为变量中的一个点时，可以计算该点与所有其他点之间的距离，从而建立一个矩阵来描述所有被调查样本之间的接近度[33]。该分析是根据样品间相似性对样品进行分组的一种简单方法，可以清晰地描述分类实验中不同样品之间的多元性相关程度。HCA 的结果通常表示为热图，可以明确展示不同样本之间的接近度和关系。如图 4 所示，HCA 的结果表明，在聚类 1 组中，低水分添加量(50% 和 52%)对于肉粉肠的 A_{2b}、A_{22}、T_{21}、T_{22}、乳化稳定性(脂肪损失和水分损失)、蒸煮损失、b^*-值均有上调的影响。而 58% 的水分添加量对于肉粉肠的感官特性(风味和总体可接受性)和质构特性(脆性和咀嚼性)均有明显下调的影响。相反地，54% 的水分添加量对于肉粉肠的上述指标均有明显上调的影响。此外，在聚类 2 组中，高水分添加量(54%、56% 和 58%)对于弹性，感官特性(内部色泽和切面致密性)，质构特性(致密性和回复性)以及 DSG 均有上调的影响。因此，上述结果综合表明 54% 的水分添加量制备的肉粉肠样品的品质特性均优于其他两组(56% 和 58%)，是最佳的加工工艺参数。

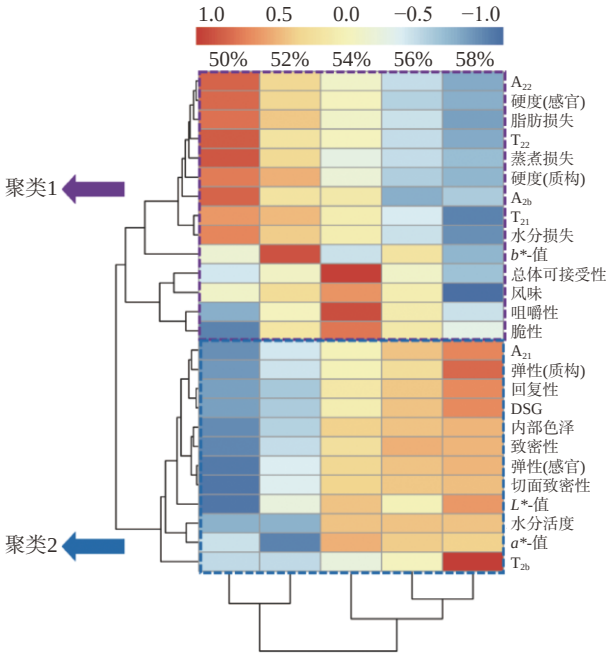


图 4 不同水分添加量的 DSG 与对肉粉肠品质特性指标的 HCA 分析

Fig.4 HCA analysis on DSG and quality characteristic index of starch-meat sausages processed in different water additions

3 结论

本实验主要探讨了 50%、52%、54%、56% 和 58% 的水分添加量对肉粉肠 DSG 和品质特性的影响。研究结果表明，随水分添加量的增加，肉粉肠的水分含量显著上升(P<0.05)，而水分活度无显著变化(P>0.05)。此外，54% 的水分添加量能够在提高肉粉肠 DSG 的同时，降低肉粉肠蒸煮损失。同时，水分添加量的增加提高了产品的弹性，并且 54% 的水分添加量的肉粉肠致密性、硬度、总体可接受性评分高，是规范肉粉肠加工工艺的水分添加量比例。

表 8 不同水分添加量对肉粉肠感官评价的影响

Table 8 Effect of different water additions on sensorial evaluation of starch-meat sausages

水分添加量(%)	内部色泽	切面致密性	弹性	硬度	风味	总体可接受性
50	2.85±0.17^{c}	3.35±0.80^{c}	3.50±0.33^{b}	4.65±0.17^{a}	4.65±0.99^{a}	3.67±0.19^{bc}
52	3.45±0.12^{b}	4.23±0.23^{b}	4.23±0.45^{ab}	4.35±0.07^{a}	4.73±0.25^{a}	3.89±0.07^{b}
54	4.85±0.03^{a}	5.09±0.16^{a}	5.02±0.12^{a}	4.15±0.35^{a}	4.81±0.18^{a}	4.58±0.11^{a}
56	4.95±0.10^{ab}	5.17±0.97^{a}	5.14±0.75^{a}	3.85±0.35^{ab}	4.69±0.82^{a}	3.88±0.12^{b}
58	3.65±0.06^{b}	5.24±0.66^{a}	5.22±0.14^{a}	3.72±0.53^{ab}	4.43±0.19^{a}	3.52±0.39^{c}

参考文献

[1] 代文晶, 肖韦华. 老北京粉肠[J]. 肉类研究, 2008(3): 73. [DAI W J, XIAO W H. Old Beijing starch-meat sausage[J]. Meat Research, 2008(3): 73.]

[2] 朱柏林. 传统粉肠的家庭制作及改进措施[J]. 肉类研究, 1998(4): 3−5. [ZHU B L. Family production and improvement measures of traditional starch-meat sausage[J]. Meat Research, 1998(4): 3−5.]

[3] 孔保华, 秦玉兰. 肉粉肠类的加工[J]. 养殖技术顾问, 2001(3): 44−45. [KONG B H, QIN Y L. Processing of meat starch-meat sausage[J]. Aquaculture Technical Consultant, 2001(3): 44−45.]

[4] GARCÍA-GARCÍA E, TOTOSAUS A. Low-fat sodium-reduced sausages: Effect of the interaction between locust bean gum, potato starch and *κ*-carrageenan by a mixture design approach[J]. Meat Science, 2008, 78(4): 406−413.

[5] 林静, 苑会功, 周英, 等. 小麦抗性淀粉理化特性的研究[J]. 新疆农业科学, 2017, 54(3): 417−422. [LIN J, YUAN H G, ZHOU Y, et al. Study on physicochemical properties of wheat resistant starch[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2017, 54(3): 417−422.]

[6] 杨伟军. 变性淀粉在食品工业中的应用现状与研究进展[J]. 大众科技, 2016, 18(6): 39−42. [YANG W J. Application status of modified stacrh in food in dustry and it sresearch progress[J]. Popular Science & Technology, 2016, 18(6): 39−42.]

[7] 周国燕, 胡琦玮, 李红卫, 等. 水分含量对淀粉糊化和老化特性影响的差示扫描量热法研究[J]. 食品科学, 2009, 30(19): 89−92. [ZHOU G Y, HU Q W, LI H W, et al. DSC study of effects of water content on gelatinization and aging of starch[J]. Food Science, 2009, 30(19): 89−92.]

[8] 裴玉秀. 烹饪中淀粉的糊化[J]. 中国食品, 1999, 8: 27. [PEI Y X. Gelatinization of starch in cooking[J]. China Food, 1999, 8: 27.]

[9] LIU K S, LIU Q. Enzymatic determination of total starch and degree of starch gelatinization in various products[J]. Food Hydrocolloids, 2020: 105639.

[10] ÁLVAREZ D, BARBUT S. Effect of inulin, *β*-glucan and their mixtures on emulsion stability, color and textural parameters of cooked meat batters[J]. Meat Science, 2013, 94(3): 320−327.

[11] COLMENERO F J, AYO M J, CARBALLO J. Physicochemical properties of low sodium frankfurter with added walnut: Effect of transglutaminase combined with caseinate, KCl and dietary fibre as salt replacers[J]. Meat Science, 2005, 69(4): 781−788.

[12] AURSAND I G, GALLART-JORNET L, ERIKSON U, et al. Water distribution in brine salted cod (*Gadus morhua*) and salmon (*Salmo salar*): A low-field LF-NMR study[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(15): 6252−6260.

[13] JIA N, KONG B H, LIU Q, et al. Antioxidant activity of black currant (*Ribes nigrum L.*) extract with aqueous ethanol and its inhibitory effect on lipid and protein oxidation of pork patties during chilled storage[J]. Meat Science, 2012, 91: 533−539.

[14] CHEN Y, JIA X, SUN F, et al. Using a stable pre-emulsified canola oil system that includes porcine plasma protein hydrolysates and oxidized tannic acid to partially replace pork fat in frankfurters [J]. Meat Science, 2019: 160.

[15] 闫喜梅, 胡新中, 李俊俊, 等. 水分含量对燕麦淀粉糊化老化特性影响的研究[J]. 中国粮油学报, 2015, 30(4): 27−32. [YAN X M, HU X Z, LI J J, et al. Study on the effect of water content on the gelatinization and aging properties of oat starch[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2015, 30(4): 27−32.]

[16] HATCHER D W, ANDERSON M J, DESJARDINS R G, et al. Effects of flour particle size and starch damage on processing and quality of white salted noodles[J]. Cereal Chemistry, 2002, 79(1): 64−71.

[17] 陈小聪, 肖满凤, 林莹. 水分对淀粉糊化度及鲜湿米粉品质的影响[J]. 粮食与油脂, 2018, 31(3): 41−44. [CHEN X C, XIAO M F, LI Y. Effect of water addition on starch gelatinization degree and quality of fresh and wet rice flour[J]. Cereals & Oils, 2018, 31(3): 41−44.]

[18] 周兵, 李树文, 张宏玲, 等. 不同淀粉含量饲料制粒后淀粉糊化度、水分、温度以及颗粒质量的变化初探[J]. 饲料广角, 2006, 8: 24−26. [ZHOU B, LI S W, ZHANG H L, et al. A preliminary study on the changes of starch gelatinization degree, moisture, temperature and granule quality after granulation of feed with different starch content[J]. Feed China, 2006, 8: 24−26.]

[19] 刘长姣, 姜爽, 朱珠. DSC 法测定水分含量对玉米淀粉糊化和老化特性的影响[J]. 粮食与油脂, 2018, 31(11): 7−9. [LIU C J, JIANG S, ZHU Z. Effects of water content on gelatinization and aging of corn starch detected by DSC[J]. Cereals & Oils, 2018, 31(11): 7−9.]

[20] 姚江, 胡建程, 谢丰镐. 水分活度对茶叶品质及贮藏过程中品质稳定性作用机理研究[J]. 广东茶业, 1989, 2: 38−41,33. [YAO J, HU J C, XIE F G. Study on the mechanism of the effect of water activity on tea quality and quality stability during storage [J]. Guangdong Tea Industry, 1989, 2: 38−41,33.]

[21] 连风, 赵伟, 杨瑞金. 低水分活度食品的微生物安全研究进展[J]. 食品科学, 2014, 35(19): 333−337. [LIAN F, ZHAO W, YANG R J. Microbiological safety of low-water activity foods[J]. Food Science, 2014, 35(19): 333−337.]

[22] 陈卫江. 核磁共振技术在淀粉糊化回生中的研究与应用[D]. 南昌: 南昌大学, 2007: 17−20. [CHEN W J. Study and application of gelling and retrogradation in starch using NMR[D]. Nanchang: Nanchang University, 2007: 17−20.]

[23] 徐敬欣, 张帅, 常婧瑶, 等. 以多糖为基质的脂肪模拟物替代动物脂肪在法兰克福香肠中的应用[J]. 食品工业科技, 2021, 42(9): 85−93. [XU J X, ZHANG S, CHANG J Y, et al. Application of polysaccharide-based fat mimetics to replace animal fat in frankfurters[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(9): 85−93.]

[24] 夏天兰, 刘登勇, 徐幸莲, 等. 低场核磁共振技术在肉与肉制品水分测定及其相关品质特性中的应用[J]. 食品科学, 2011, 32(21): 253−256. [XIA T L, LIU D Y, XU X L, et al. Application of low-field nuclear magnetic resonance in determining water contents and other related quality characteristics of meat and meat products: A review[J]. Food Science, 2011, 32(21): 253−256.]

[25] ABBASI E, SARTESHNIZI R A, GAVLIGHI H A, et al. Ef-

fect of partial replacement of fat with added water and tragacanth gum (*Astragalus gossypinus* and *Astragalus compactus*) on the physicochemical, texture, oxidative stability, and sensory property of reduced fat emulsion type sausage[J]. Meat Science, 2019, 147: 135−143.

[26] LIN K C, KEETON J T, GILCHRIST C L, et al. Comparisons of carboxymethyl cellulose with differing molecular features in low-fat frankfurters[J]. Journal of Food Science, 1988, 53(6): 1592−1595.

[27] CHEETANGDEE N. Characteristic of sausages as influenced by partial replacement of pork back-fat using pre-emulsified soybean oil stabilized by fish proteins isolate[J]. Agriculture and Natural Resources, 2017, 51(4): 310−318.

[28] 尤文辉, 李红伟, 张杰, 等. 测定因素对火腿肠质构特性值的影响[J]. 食品工业科技, 2006, 4: 60−62. [YOU W H, LI H W, ZHANG J, et al. Effect of determination factors on texture property value of ham sausage[J]. Science and Technology of Food Industry, 2006, 4: 60−62.]

[29] 刘安军, 郭晶, 王子健, 等. 响应面法优化鸡肝肠加工工艺的研究[J]. 现代食品科技, 2013, 29(6): 1288−1292, 1332. [LIU A J, GUO J WANG Z J, et al. Optimization of processing conditions for chicken liver sausage by response surface analysis[J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(6): 1288−1292, 1332.]

[30] 董庆利, 罗欣, 屠康. 熏煮香肠中脂肪、食盐、淀粉和水分含量对其质构的影响[J]. 食品与发酵工业, 2005, 5: 139−142. [DONG Q L, LUO X, TU K. Effects of fat, salt, starch and water content on the texture of smoked and cooked sausage[J]. Food and Fermentation Industries, 2005, 5: 139−142.]

[31] 孙茜茜. 加工工艺及淀粉组成对水晶皮类面点透明性及物性品质影响研究 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2016. [SUN Q Q. Effect of processing techniques and starch composition for the transparency and physical quality of crystal dim sum[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2016.]

[32] TORRES E A F, GARBELOTTI M L, NETO J M M. The application of hierarchical clusters analysis to the study of the composition of foods[J]. Food Chemistry, 2006, 99(3): 622−629.

[33] SUN W Z, ZHAO Q Z, ZHAO H F, et al. Volatile compounds of Cantonese sausage released at different stages of processing and storage[J]. Food Chemistry, 2010, 121(2): 319−325.

张双, 韩荣欣, 王欣, 等. 酸枣仁蛋白的不同蛋白酶酶解产物功能特性及抗氧化活性分析 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 31−39. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021070167
ZHANG Shuang, HAN Rongxin, WANG Xin, et al. Study on the Functional Properties and Antioxidant Activities of Different Enzymatic Hydrolysates of Ziziphi Spinosae Semen Protein[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 31−39. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021070167

· 研究与探讨 ·

酸枣仁蛋白的不同蛋白酶酶解产物功能特性及抗氧化活性分析

张　双[1], 韩荣欣[1], 王　欣[3], 肖凤琴[1], 李　佳[1], 董红影[3], 李光哲[3], 严铭铭[1,2,*]
（1.长春中医药大学吉林省人参科学研究院, 吉林长春 130117;
2.吉林省中药保健食品科技创新中心, 吉林长春 130117;
3.长春中医药大学药学院, 吉林长春 130117）

摘　要: 以酸枣仁为原料，采用碱提酸沉法对酸枣仁蛋白进行提取，用三种不同蛋白酶（碱性蛋白酶、中性蛋白酶和木瓜蛋白酶）对酸枣仁蛋白进行酶解，得到三种酶解物，研究不同酸枣仁蛋白酶解物的功能特性和抗氧化活性。结果表明，与酸枣仁蛋白相比，不同酸枣仁蛋白酶解物的溶解性、持油性、起泡性及其稳定性、乳化性及其稳定性均具有不同程度地提高，其中，木瓜蛋白酶解物的溶解性、持油性、起泡性和乳化性最强，碱性蛋白酶解物的起泡稳定性和乳化稳定性最强；体外抗氧化研究表明，相比于酸枣仁蛋白，不同蛋白酶所得酶解产物的抗氧化活性均明显提高，其中，碱性蛋白酶酶解物的 DPPH 清除能力、羟基自由基清除能力、超氧阴离子清除率和 ABTS 自由基清除能力均高于其他酶解产物，当质量浓度为 2.5 mg/mL 时，DPPH 自由基清除率最高为 95.87%、超氧阴离子自由基率为 44.77%、ABTS 自由基清除率为 90.84%、羟基自由基清除率为 47.77%。本研究表明，酸枣仁蛋白酶解物具有较好的食品加工性能，其抗氧化活性明显增高，可以作为一种潜在的蛋白质资源应用到食品中，为酸枣仁蛋白酶解物在食品行业中的应用提供理论依据。

关键词: 酸枣仁, 蛋白酶解产物, 碱性蛋白酶, 中性蛋白酶, 木瓜蛋白酶, 功能特性, 抗氧化活性
中图分类号: TS201.1　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0031−09
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021070167
本文网刊:

Study on the Functional Properties and Antioxidant Activities of Different Enzymatic Hydrolysates of Ziziphi Spinosae Semen Protein

ZHANG Shuang[1], HAN Rongxin[1], WANG Xin[3], XIAO Fengqin[1], LI Jia[1], DONG Hongying[3], LI Guangzhe[3], YAN Mingming[1,2,*]
（1.Jilin Ginseng Research Institute of Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China;
2.Science and Technology Innovation Center of TCM Health Food of Jilin Province, Changchun 130117, China;
3.College of Pharmacy, Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China）

Abstract: Using Ziziphi Spinosae semen as raw material, Ziziphi Spinosae semen protein was extracted by alkali extraction and acid precipitation method. The Ziziphi Spinosae semen protein was hydrolyzed by three different proteases (alkaline protease, neutral protease and papain). The functional properties and antioxidant activity of enzymatic hydrolysates from Ziziphi Spinosae semen protein were studied. The results showed that the solubility, oil holding capacity, foaming capacity and stability, emulsifying capacity and stability of protein hydrolysates from different Ziziphi Spinosae semen were improved in different degrees compared with protein hydrolysates from Ziziphi Spinosae semen, among them, papain

收稿日期: 2021−07−15
基金项目: 吉林省中药保健食品科技创新中心资助项目（编号: 20180623041Tc）; 吉林省教育厅项目（编号: JJKH20210965KJ）; 长春中医药大学大学生创新创业训练计划支持项目（编号: 202110199030）。
作者简介: 张双（1999−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药有效成分发现、生物转化及健康产品研究与开发, E-mail: 1471370119@qq.com。
*** 通信作者:** 严铭铭（1968−）, 女, 博士, 教授, 研究方向: 具有重要生物活性天然先导结构的发现与研究, E-mail: yanmm595@yahoo.com.cn。

hydrolysate had the strongest solubility, oil holding, foaming and emulsifying properties, and alkaline protease hydrolysate had the strongest foaming and emulsifying stability. *In vitro* antioxidant studies showed that compared with of Ziziphi Spinosae semen protein, the antioxidant activities of enzymatic hydrolysates obtained by different proteases were significantly improved, the alkaline protease DPPH scavenging ability, hydroxyl radical scavenging ability, super oxygen anion clearance and $ABTS^+$ radical scavenging ability were higher than those of other enzymatic hydrolysates, when the mass concentration was 2.5 mg/mL, the highest DPPH radical scavenging rate was 95.83%, the superoxide anion radical scavenging rate was 44.77%, the ABTS radical scavenging rate was 90.84%, and the hydroxyl radical scavenging rate was 44.77%. Therefore, this study shows that the enzymatic hydrolysate of Ziziphi Spinosae semen protein has good food processing performance, and its antioxidant activity is significantly increased, protein sources can be used as a potential protein resource in food, and provides a theoretical basis for the application of Ziziphi Spinosae semen protease hydrolysate in food industry.

Key words: Ziziphi Spinosae semen; protein hydrolysates; alkaline protease; neutral protease; papain; functional characteristics; antioxidant activity

神农本草经记载的酸枣仁, 为鼠李科植物酸枣(*Ziziphus jujube* Mill.)的干燥成熟种子, 是我国临床应用的传统中药, 主产于河北、陕西、辽宁、河南等地。酸枣仁性味酸、甘平微温, 具有养肝、宁心安神、敛汗生津的功效, 主治虚烦不眠, 惊悸怔神, 烦渴虚汗等症[1]。酸枣仁中富含多种有效成分, 主要为黄酮、生物碱、皂苷、挥发油、蛋白质等, 其中, 蛋白质占其干重的 40%, 约含有 18 种人体所需氨基酸。酸枣仁具有良好的食品功能特性, 是理想的功能产品和植物蛋白来源[2]。前期研究发现, 酸枣仁蛋白具有一定的抗氧化、抗疲劳以及增强免疫功能等生物活性[3]。但经实验及文献研究发现, 由于蛋白质复杂的空间结构以及较大的分子质量, 导致酸枣仁蛋白的部分性质较一般(如溶解性、抗氧化性等), 绝大部分不能够被人体摄入利用, 营养价值得不到充分地发挥[4]。相关研究表明, 多肽具有大分子蛋白质和游离氨基酸所不具备的生物学活性, 且更容易被人体吸收, 逐渐成为近年来食品领域的研究热点。

酶解法是国内外生产多肽的主要方法, 是一种酶促降解蛋白达到提取、改性目的的方法, 具有反应条件温和、副产物少等优点, 还可以进一步通过分离纯化得到具有多种理想功能特性和高营养的多肽。随着研究的不断深入, 从不同蛋白酶解产物中分离得到的多肽在人体调节中起到了重要作用, 具有降血压、抗氧化、降胆固醇、降血糖、调节免疫等生理功能, 可以作为潜在的食品添加剂, 提高食品的营养价值, 大大改善了食品的品质[5]。近年来, 关于蛋白水解物的研究已有许多报道, 研究证明水解物都具有较好的功能特性和生物活性。有研究表明, 不同的蛋白酶解产物可产生不同的理化性质、功能特性以及生物活性, 阎震等[6]用多种蛋白酶对牡丹籽蛋白进行酶解处理, 所得的不同蛋白酶解产物理化性质及抗氧化活性均具有差异, 其中, 碱性蛋白酶解产物具有更高的水解度、更小的粒径以及更强的体外抗氧化活性。这是由于不同种类的蛋白酶在蛋白质链中有不同的活性位点和切割位点。

目前, 有关酸枣仁蛋白酶解产物的研究较少, 而不同蛋白酶处理酸枣仁蛋白的研究尚未发现。赵节昌[7]关于酶解酸枣仁蛋白制备抗氧化肽的研究结果表明, 酸枣仁蛋白酶解物具有良好的 DPPH 自由基清除活性, 但对其他的功能特性和抗氧化活性尚无研究。因此, 本研究以酸枣仁蛋白为原料, 采用木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶分别对酸枣仁蛋白进行酶解, 并对不同酸枣仁蛋白酶解产物的功能特性和体外抗氧化活性进行研究, 以期得到具有良好功能特性及抗氧化活性的蛋白酶解产物, 为酸枣仁这种药食同源中药材在食品及保健食品行业中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

酸枣仁药材 长春中医药大学附属医院; 碱性蛋白酶(200 U/mg)、中性蛋白酶(100 U/mg)、木瓜蛋白酶(0.5~2 U/mg) 购于上海源叶生物科技有限公司; 十二烷基硫酸钠(SDS) 美国 sigma 公司; 考马斯亮蓝 R-250、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、2,2-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS) 北京索莱宝科技有限公司; 其他试剂均为分析纯。

HX-400A 型高速中药粉碎机 浙江省永康市溪岸五金药具厂; Y50 型养生破壁机 中山市奥英斯电器有限公司; HH-6 型数显恒温水浴锅 金坛市佳美仪器有限公司; DF-101S 型集热式磁力搅拌器 金坛市医疗器械厂; SCIENTZ-50F 型冷冻干燥机 宁波新芝冻干设备股份有限公司; PowerPac Basic 型蛋白电泳装置 BIO-RAD; UV-1700 型紫外分光光度计、2010A 型高效液相色谱仪 日本岛津(中国)有限公司; S220-K-CN 型台式 pH 计 梅特勒—托利多国际贸易(上海)有限公司; AB265-S 型电子分析天平 梅特勒—托利多国际贸易(上海)有限公司; Centrifuge 5840 R 型高速离心机 德国 eppendorf 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 酸枣仁蛋白的提取 取适量酸枣仁药材, 粉碎后过 60 目筛, 置于 5 倍体积的石油醚中搅拌脱脂

24 h, 在 3000 r/min 室温下离心 10 min 除去石油醚, 沉淀放置在通风橱中干燥, 过 60 目筛。取均一的脱脂酸枣仁粉末 150 g, 按料液比 1∶20(g/mL)加入 3000 mL 蒸馏水溶解, 配制 1 mol/L NaOH 溶液调节 pH10, 在 55 ℃ 恒温水浴锅中搅拌 50 min, 冷却放凉后 4000 r/min 离心20 min, 取上清液进行酸沉, 用 1 mol/L 盐酸溶液调节 pH4, 4 ℃ 静置 2 h, 继续 4000 r/min 离心 10 min, 沉淀加水用养生破壁机复溶, 用 1 mol/L NaOH 溶液调至中性, 装袋透析 48 h, 期间每 2 h 换一次水, −80 ℃冻干得酸枣仁蛋白[8]。

1.2.2　酸枣仁蛋白的酶解　取蒸馏水 100 mL, 加入酸枣仁蛋白 5 g, 溶解制成 5% 的蛋白溶液, 分别在各酶的最适条件下进行酶解, 具体条件见表 1。将蛋白溶液置于 55 ℃ 水浴锅中保温放置, 用 1 mol/L NaOH 溶液、1 mol/L HCl 溶液调节 pH 至酶最适 pH 后, 分别加入不同种类的蛋白酶 0.1 g(酶与底物比为 2%), 酶解过程中每隔 20 min 用 1 mol/L NaOH 溶液维持反应体系的 pH, 酶解时间为 3 h, 结束后沸水灭酶 10 min, 冷却至室温, 8000 r/min 离心 10 min, 取上清液冷冻干燥, −20 ℃ 保存备用[9]。

表 1　不同蛋白酶最适温度和最适 pH
Table 1　Optimum temperature and pH of different proteases

酶种类	最适温度(℃)	最适pH
碱性蛋白酶	55	8.5
中性蛋白酶	50	6.5
木瓜蛋白酶	65	6.0

1.2.3　水解度的测定　总氮含量: 采用 GB 5009.5-2016《食品安全国家标准食品中蛋白质的测定》中的凯氏定氮法进行测定。氨态氮含量: 采用 GB 5009.235-2016《食品安全国家标准食品中氨基酸态氮的测定》中的酸度计法进行测定[10]。称量 5.0 g 试样于 50 mL 烧杯中, 用水分数次洗入 100 mL 容量瓶中, 加水至刻度, 混匀后吸取 20.0 mL 置于 200 mL 烧杯中, 加 60 mL 水,开动磁力搅拌器, 用氢氧化钠标准溶液 [c(NaOH)=0.050 mol/L] 滴定至酸度计指示 pH 为 8.2, 记下消耗氢氧化钠标准滴定溶液的毫升数, 可计算总酸含量。加入 10.0 mL 甲醛溶液, 混匀。再用氢氧化钠标准滴定溶液继续滴定至 pH 为 9.2, 记下消耗氢氧化钠标准滴定溶液的毫升数。同时取 80 mL 水, 先用氢氧化钠标准溶液调节至 pH 为 8.2, 再加入 10.0mL 甲醛溶液, 用氢氧化钠标准滴定溶液滴定至 pH 为 9.2, 做试剂空白试验。

$$\text{水解度(DH，\%)} = \frac{\text{氨态氮含量}}{\text{总氮含量}} \times 100$$

1.2.4　多肽含量的测定　采用福林酚法[11] 对三种蛋白酶解产物中的多肽含量进行测定。配制福林酚试剂甲、试剂乙。分别取样品溶液 1.3 mL, 加水稀释并定容至 100 mL, 得多肽含量大约为 0.14 mg/mL 的供试品溶液, 待测。取 1 mL 样品溶液(约合 20~250 μg 多肽)加入 5 mL 试剂甲混匀, 于 20~25 ℃ 放置 10 min, 再加 0.5 mL 试剂乙(Folin-酚), 立即摇匀, 在 20~25 ℃ 保温 30 min 然后于 500 nm 处比色, 以 1 mL 水代替样品作空白对照。测定后, 可以在标准曲线中查出未知样品的浓度。取 0.2 mL 样品溶液(约含 5~100 μg 多肽)加入 1 mL 试剂甲(选用 0.3~0.5 cm 直径的小试管)混匀, 10 min 后, 加入 0.1 mL 试剂乙, 立即混匀, 30 min 后比色。

1.2.5　SDS-PAGE 电泳分析　十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳使用 12.5% 分离凝胶和 5% 浓缩凝胶, 酸枣仁蛋白或酶解物和上样缓冲液以 1∶1 的比例混合, 混合溶液在 100 ℃ 加热 5 min。待其冷却至室温后, 向凝胶中加入 10 μL 混合溶液上样。用 Bio-Rad 电泳仪进行 SDS-PAGE 电泳[12], 样品在 70 V 下运行 30 min, 在 140 V 下运行 1 h。凝胶在考马斯亮蓝 R250 中染色, 并在脱色溶液(冰醋酸∶甲醇∶水=20∶60∶120)中脱色。最后, 所得凝胶在凝胶成像仪中拍照成像。

1.2.6　溶解性的测定　加蒸馏水于酶解物中配制成 0.1% 的溶液, 分别调节溶液 pH(2~10), 离心 15 min (5000 r/min), 取上清液补足至 1 mL, 用福林酚法分别测定上清液和样品溶液中的多肽含量。

$$\text{溶解度(\%)} = \frac{\text{上清液中多肽含量}}{\text{样品中多肽含量}} \times 100$$

1.2.7　持水性、持油性测定　持水性: 取酸枣仁蛋白酶解产物 0.5 g, 置于 10 mL 离心管中, 加入 10 mL 蒸馏水, 混匀, 放置室温 25 ℃ 下 30 min, 4000 r/min 离心 20 min, 去除上清称量刻度离心管的质量。

$$\text{持水性(g/g)} = \frac{m_2 - m_1}{m_0}$$

式中: m_0: 样品质量(g), m_1: 样品质量+离心管质量(g), m_2: 离心管质量+去除上清液的样品质量。

持油性: 在 10 mL 离心管中加入 0.5 g 酶解物, 3 mL 大豆色拉油, 充分混匀样品与色拉油, 在室温条件下放置 30 min, 4000 r/min 离心 20 min, 弃去上层未被吸附的色拉油, 称量质量。

$$\text{持油力(g/g)} = \frac{m_2 - m_1}{m_0}$$

式中: m_0: 样品质量(g), m_1: 离心管质量+样品质量(g), m_2: 离心管质量+吸油后的样品质量(g)。

1.2.8　起泡性及其泡沫稳定性　称 50 mL 1% 的样品溶液, 分别调 pH(2~10), 记体积 V_0, 置于 10000 r/min 高速分散器中 1 min, 记总体积 V_1, 30 min 后记总体积 V_2。

$$\text{起泡性(\%)} = \frac{V_1 - V_0}{V_0} \times 100$$

$$\text{起泡稳定性(\%)} = \frac{V_2 - V_0}{V_1 - V_0} \times 100$$

1.2.9　乳化性及其稳定性　配制 9 mL 1% 的蛋白及样品溶液, 分别调节 pH(2、4、6、8、10、12), 加入 3 mL

大豆色拉油, 10000 r/min 均质 2 min, 搅打成均一的乳化液, 取 50 mL 于试管中, 加入 5 mL 0.1% SDS 溶液, 设置 500 nm 测吸光值 A_1, 30 min 后测吸光度 A_2[13]。

$$乳化性(EAI，m^2/g)=\frac{2\times2.303\times A_1\times D}{\Phi\times c\times L\times 10000}\times 100$$

$$乳化稳定性(ESI，\%)=\frac{A_1\times\Delta t}{A_1-A_2}\times 100$$

式中: Φ: 油相的体积分数(%); D:稀释倍数; c: 酸枣仁蛋白酶解产物质量浓度(g/mL); t: 时间(min); L: 光程(1 cm); 2.303 表示 ln10。

1.2.10 抗氧化活性的测定

1.2.10.1 DPPH 自由基清除率测定 加蒸馏水于一定质量的酶解物中配制成不同质量浓度的溶液; 分别吸取 1 mL 样品溶液与 DPPH 溶液混匀, 室温下避光反应 30 min, 测定 517 nm 处吸光度; 以 1 mL 蒸馏水代替样品溶液作为空白对照组, 以 0.5 mL 蒸馏水+0.5 mL 95% 乙醇混合溶液代替 DPPH 溶液作为样品对照组[14], 以维生素 C、谷胱甘肽为阳性对照组, 并按下式计算 DPPH 自由基清除率。

$$S(\%)=\frac{A_0-A_1+A_2}{A_0}\times 100$$

式中: S: DPPH 自由基清除率(%); A_0: 空白对照组吸光值; A_1: 样品组吸光值; A_2: 样品对照组吸光值。

1.2.10.2 ABTS 自由基清除率测定 将 5 mL 浓度为 7.4 mmol/L 的 ABTS 溶液与 88 μL 2.6 mmol/L 的过硫酸钾溶液混匀, 静置 12~16 h, 配制成 $ABTS^+$ 储备液。取 $ABTS^+$储备液 0.4 mL, 用 pH7.4 的 PBS 溶液稀释, 使 734 nm 处吸光度为 0.7±0.02, 制成 $ABTS^+$工作液[15]。分别将 200 μL $ABTS^+$工作液与 10 μL 不同浓度的样品溶液混匀, 室温避光反应 6 min, 测定 734 nm 处吸光度值。用 10 μL PBS 溶液代替样品溶液作为空白对照组, 以维生素 C、谷胱甘肽为样品对照组, 按下式计算 ABTS 自由基清除率。

$$S(\%)=\frac{A_0-A_1+A_2}{A_0}\times 100$$

式中: S: ABTS 自由基清除率(%); A_0: 空白对照组吸光值; A_1: 样品组吸光值; A_2: 样品对照组吸光值。

1.2.10.3 超氧阴离子清除率测定 采用邻苯三酚自氧化法[16]。将 5 mL Tris-HCl 缓冲溶液(0.05 mol/L, pH 8.2)和 0.5 mL 不同浓度样品溶液混合, 于 25 ℃ 水浴中反应 20 min, 然后加入在 25 ℃ 下预热 0.5 mL 邻苯三酚溶液(7 mmol/L)。每隔 10 s 在 325 nm 处测定混合物的吸光度, 即为实验组 A_1。以 0.3 mL 蒸馏水代替邻苯三酚溶液作为样品对照组 A_2, 以 0.1 mL 蒸溜水代替样品液作为空白对照组 A_0。并于 420 nm 处测定吸光度值, 蒸馏水调 0。按下式计算超氧阴离子的清除率:

$$S(\%)=\frac{A_0-A_1+A_2}{A_0}\times 100$$

式中: S: 超氧阴离子清除率(%); A_0: 为空白对照组吸光值; A_1: 样品组吸光值; A_2: 样品对照组吸光值。

1.2.10.4 羟基自由基清除率的测定 将 1.0 mL 样品溶液与 $FeSO_4$(1.0 mL, 2 mmol/L)及水杨酸乙醇溶液(1.0 mL, 6 mmol/L)混合。随后, 向溶液中添加 1.0 mL H_2O_2(6 mmol/L), 37 ℃ 水浴反应 1 h 后, 在 510 nm 处立即测定吸光度[17]。1 mL 蒸馏水代替 H_2O_2, 测定吸光度值作为样品对照组; 1 mL 蒸馏水代替样品溶液作为空白对照; 以照维生素 C 代替样品作为样品阳性对照组, 按下式计算羟基自由基的清除率:

$$S(\%)=\frac{A_0-A_1+A_2}{A_0}\times 100$$

式中: S: 羟基自由基清除率, %; A_0: 空白对照组吸光值; A_1: 样品组吸光值; A_2: 样品对照组吸光值。

1.3 数据处理

所有试验平行测定 3 次, 结果取平均值, 使用 Origin 2019 和 SPSS 20.0 软件进行数据处理。

2 结果与分析

2.1 水解度（DH）的测定

酶解法作为常用的蛋白质改性方法, 现已得到广泛地应用, 其中, 蛋白酶种类是影响酶解过程的一个重要因素, 蛋白酶能够将蛋白质水解成为小分子肽类和氨基酸[18]。由于蛋白酶具有底物专一性, 不同种类的蛋白酶, 其酶切位点也不相同, 进而可导致酶解产物的理化性质及生物活性不同[19]。酸枣仁蛋白不同蛋白酶解产物的水解度测定结果如图 1 所示, 不同酸枣仁蛋白酶解产物的水解度随着时间的延长而增大。反应开始的前 3 h 内, 不同酶解产物的水解度增长速率较快, 当反应时间超过 3 h 后, 增长趋势较为平缓, 所以后续实验均采用了 3 h 作为水解的最适时间。实验结果表明, 相比于中性蛋白酶解产物(16.94%)及木瓜蛋白酶解产物(12.89%), 碱性蛋白酶解产物具有更高的水解度(22.91%), 可能是由于碱性蛋白酶是一种内切蛋白酶, 具有更多的催化位点

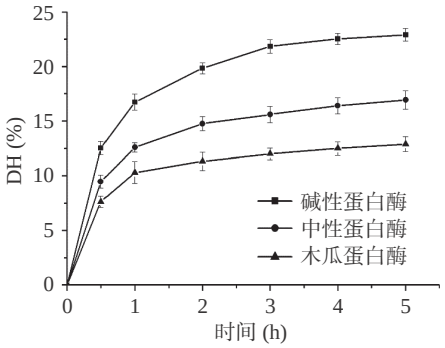


图 1 不同酸枣仁蛋白酶解产物的水解度

Fig.1 Degree of hydrolysis of enzymatic hydrolysates from different Ziziphi Spinosae semen protein

来切断蛋白质中的肽键，使得酶解反应更加完全[20]。

2.2　电泳结果分析

SDS-PAGE 通常用于蛋白质分子量和亚基组成分析。在还原条件下酸枣仁蛋白及其不同酶解产物的电泳图如图 2 所示。结果表明，酸枣仁蛋白主要由 10~40 kDa（15、20、25、35、40 kDa）范围内的五条主要低分子量亚基组成。经不同蛋白酶处理后，不同蛋白酶解物的条带转移到低分子量范围，条带主要分布在 15 kDa 以下，表明酶解后分子量较大的蛋白亚基被降解，产生分子量较小的片段。其中，中性蛋白酶解产物及木瓜蛋白酶解产物在 22 kDa 处仍具有一定的蛋白条带，而碱性蛋白酶解产物中未发现此情况，进一步结合水解度测定结果分析，表明碱性蛋白酶可使水解反应更完全，产生更多具有小分子量的肽段。

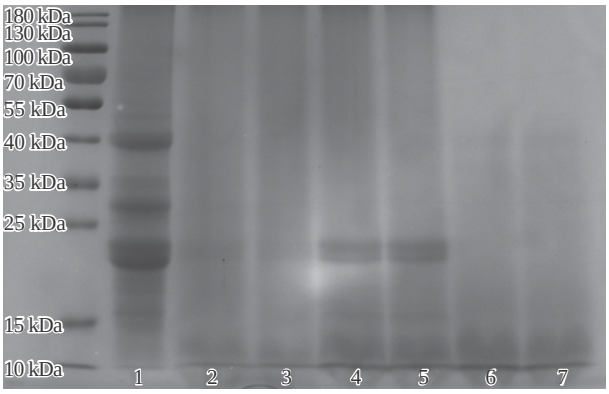


图 2　SDS-PAGE 电泳检测结果

Fig.2　Results of SDS-PAGE electrophoresis

注：泳道 1 为酸枣仁蛋白；泳道 2、3 为木瓜蛋白酶解产物；泳道 4、5 为中性蛋白酶解产物；泳道 6、7 为碱性蛋白酶解产物。

2.3　不同酸枣仁蛋白酶解产物的溶解性

3 种酶解产物在不同 pH 条件下的溶解性由图 3 所示，结果表明，木瓜蛋白酶解产物的溶解度最大，其次是碱性蛋白酶解产物，最后是中性蛋白酶解产物，这可能是由于不同酶解产物其氨基酸序列及所得到的肽段长度存在一定的差异而导致的。3 种酶解物在 pH2~10 范围内的溶解性均高于酸枣仁蛋白，这可能是由于酶解后，肽键断裂形成了部分更小的肽段以及部分亲水性基团，进而导致其溶解性增强[21]。当 pH 为 4 时，木瓜蛋白酶解物、中性蛋白酶解物、碱性蛋白酶解物的溶解度最小，达到了酸枣仁蛋白的等电点，分子聚合，溶解性降低[22]。随着 pH 升高，不同蛋白酶解产物的溶解性逐渐增强。以上研究表明酸枣仁蛋白酶解产物具有很好的溶解性。

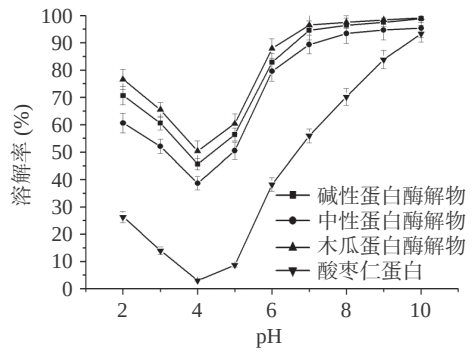


图 3　不同酸枣仁蛋白酶解产物的溶解性

Fig.3　Solubility of hydrolysates from different Ziziphi Spinosae semen protein

2.4　不同酸枣仁蛋白酶解产物的持水性和持油性

3 种不同酸枣仁蛋白酶解产物的持水性和持油性如图 4 所示，相比于酸枣仁蛋白，持水性明显降低，这可能与酶解产物本身的溶解性有较大关系，酶解后溶解性明显增强，导致其对水的吸附能力变差，进而降低了持水性[23]。此外，由图 4 可知，相比于酸枣仁蛋白，不同的酸枣仁蛋白酶解产物持油性均有明显提升，由于不同种类蛋白酶的作用位点不同，酶解获得的多肽片段也不相同，表现出的功能特性存在差异，其中，木瓜蛋白酶的持油性最大，这是由于酶解使得蛋白质的空间结构被破坏，部分亲脂基团外露，影响了木瓜蛋白酶的构象和催化活性，进而影响其与底物的结合和催化，通过疏水作用增强蛋白质与油脂的结合能力，进一步增强了持油能力[24]。

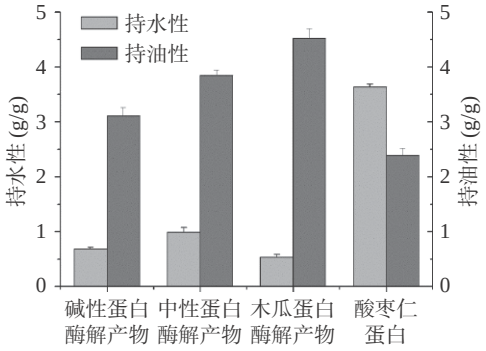


图 4　不同酸枣仁蛋白酶解产物的持水性及持油性

Fig.4　Water and oil holding capacity of enzymatic hydrolysates from different Ziziphi Spinosae semen protein

2.5　不同酸枣仁蛋白酶解产物的起泡性和起泡稳定性

3 种不同酸枣仁蛋白酶解产物的起泡性和起泡稳定性如图 5、图 6 所示，不同酸枣仁蛋白酶解产物的起泡性强弱为：木瓜蛋白酶解产物>碱性蛋白酶解产物>中性蛋白酶解产物。和酸枣仁蛋白相比，酶解产物的起泡性明显提升，因为酶解产物的溶解性明显增强，溶液的分散性增加，进一步增强了其起泡性能[25]。酸枣仁蛋白及其酶解产物在 pH（2~10）范围内，起泡性先减弱后增强，在 pH4 时最低，此时达到了蛋白质的等电点，溶解性较差，分散在溶液中的蛋白质较少，进一步导致其起泡性较差，随着 pH 的逐渐升高，不同酸枣仁蛋白酶解产物的溶解性逐渐增强，其起泡性也随之增强。以上研究结果表明，不同酸枣仁蛋白酶解产物均具有良好起泡性能，可将其添加到泡沫型食品中，增添食品的风味，减少化学起泡剂的使用[26]。

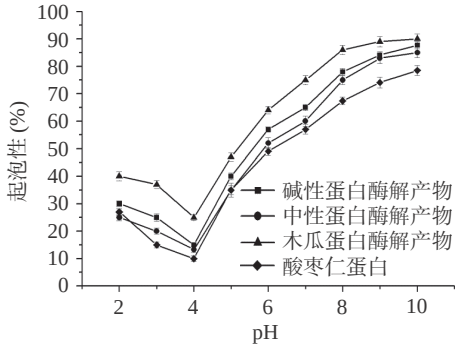


图 5 不同酸枣仁蛋白酶解产物的起泡性

Fig.5 Foaming properties of enzymatic hydrolysates from different Ziziphi Spinosae semen protein

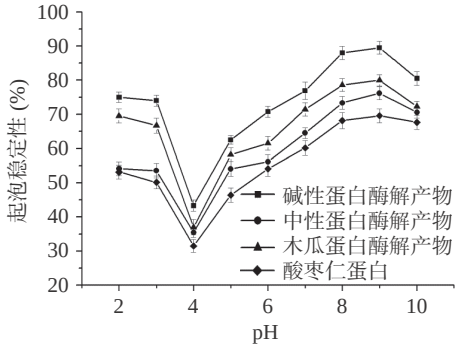


图 6 不同酸枣仁蛋白酶解产物的起泡稳定性

Fig.6 Foaming stability of enzymatic hydrolysates from different Ziziphi Spinosae semen protein

2.6 不同酸枣仁蛋白酶解物的乳化性和乳化稳定性

不同酸枣仁蛋白酶解物的乳化性及其稳定性如图 7、图 8 所示。由图可知，相比于酸枣仁蛋白，木瓜蛋白酶解产物、中性蛋白酶解产物及碱性蛋白酶解物乳化性和乳化稳定性均有明显提升，这可能是由于酶解过程中，蛋白质中的疏水性残基进一步暴露，增强了与油的结合能力，使得蛋白质更快更多的与油水界面吸附，增强了乳化性[27]。研究表明，木瓜蛋白酶解产物的乳化性略高于碱性蛋白酶解产物及中性蛋白酶解产物，这可能与其溶解度有关，溶解度高的酶解产物，溶液中蛋白质分子含量较高，与油水界面接触吸附的能力就越强，导致其乳化性较强[28]，碱性蛋白酶的乳化稳定性强于中性蛋白酶和木瓜蛋白酶解物。以上研究结果表明，酶解后可进一步提高酸枣仁蛋白的乳化性能，所得的酶解产物具有较好的食品功能特性。

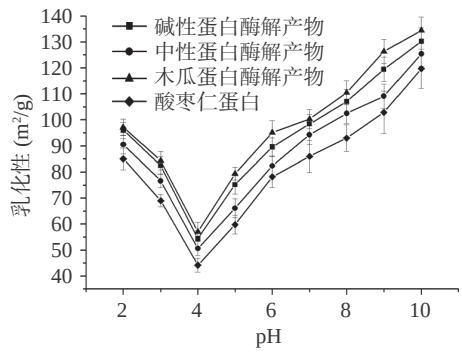


图 7 不同酸枣仁蛋白酶解产物乳化性

Fig.7 Emulsifying properties of different enzymatic hydrolysates from Ziziphi Spinosae semen protein

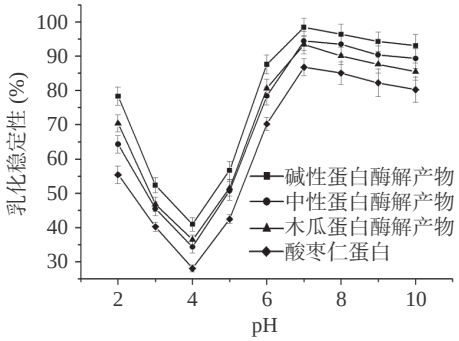


图 8 不同酸枣仁蛋白酶解产物乳化稳定性

Fig.8 Emulsification stability of different enzymatic hydrolysates of Ziziphi Spinosae semen protein

2.7 酸枣仁蛋白酶解物的体外抗氧化活性

2.7.1 DPPH 自由基清除能力 不同酸枣仁蛋白酶解物的 DPPH 自由基清除能力由图 9 所示，当质量浓度在 0.5~2.5 mg/mL 范围内，酸枣仁蛋白及其不同酶解产物的 DPPH 自由基清除能力随浓度不断的增加而不断增强，不同酸枣仁蛋白酶解产物的 DPPH 自由基清除能力均明显高于酸枣仁蛋白。相同质量浓度时，碱性蛋白酶解物的 DPPH 清除能力最强，其次是中性蛋白酶解产物，木瓜蛋白酶解物的清除能力最弱，当浓度为 2.5 mg/mL 时，碱性蛋白酶解产物的清除能力可高达 95.87%，逐渐接近于阳性对照组 V_C 的清除能力，且高于常见的抗氧化肽谷胱甘肽(GSH)的清除能力。这是由于碱性蛋白酶酶解时，碱性蛋白酶解物中的疏水性氨基酸含量较高，脂溶性的 DPPH 与其更好的结合，对 DPPH 的清除能力明显增强[29]。以上研究结果表明酸枣仁蛋白酶解产物具有很强的 DPPH 自由基清除活性。

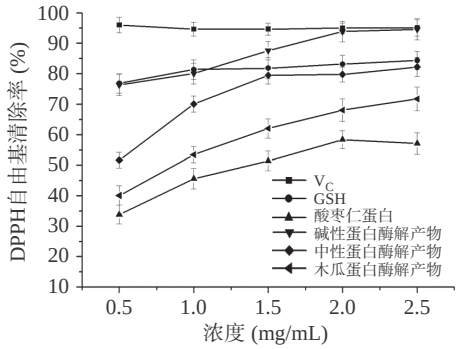


图 9 不同酸枣仁蛋白酶解产物对 DPPH 自由基清除能力

Fig.9 DPPH radical scavenging ability of different enzymolysis hydrolysates of Ziziphi Spinosae semen protein

2.7.2 ABTS 自由基清除能力 不同酸枣仁蛋白酶解物的 ABTS 自由基清除能力如图 10 所示，当质量浓度为 0.5~2.5 mg/mL 范围内时，酸枣仁蛋白及其酶解物对 ABTS 自由基清除活性随质量浓度的增加而增强。结果表明，不同酶解产物的 ABTS 自由基清

除能力均明显增强。在相同质量浓度下，碱性蛋白酶酶解后的蛋白酶解物对 ABTS 自由基清除率明显高于酸性蛋白酶和中性蛋白酶处理的蛋白酶解物。当质量浓度为 2.5 mg/mL 时，对 ABTS 自由基清除率最高达到 90.84%，接近于阳性对照组 V_C 及 GSH 的清除能力，表明碱性蛋白酶解物具有较强的 ABTS 自由基清除能力，可作为一种潜在的抗氧化剂[30]。

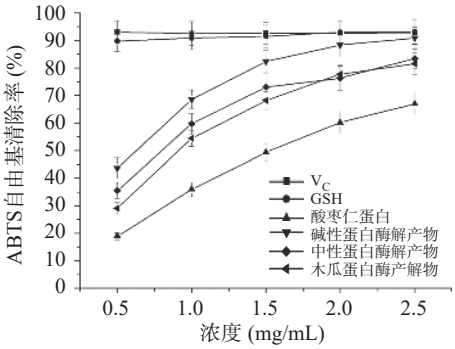


图 10　不同酸枣仁蛋白酶解产物对 ABTS 自由基清除能力

Fig.10　ABTS$^{+\cdot}$ scavenging ability of different enzymatic hydrolysates of Ziziphi Spinosae semen protein

2.7.3　超氧阴离子自由基清除能力　不同酸枣仁蛋白酶解物超氧阴离子自由基清除能力如图 11 所示，当质量浓度为 0.5~2.5 mg/mL 范围时，酸枣仁蛋白及其酶解产物对超氧阴离子的清除活性与样品浓度呈正相关，均在 2.5 mg/mL 时具有最高的清除活性。其中碱性蛋白酶解产物的超氧阴离子自由基清除效果最好，其次是中性蛋白酶，木瓜蛋白酶解产物最差。相比于酸枣仁蛋白，不同酸枣仁蛋白酶解产物的自由基清除活性均具有明显提升，表明酶解处理可明显提高蛋白质的抗氧化性。当质量浓度为 2.5 mg/mL 时，碱性蛋白酶酶解物的超氧阴离子清除率最高为 44.77%，中性蛋白酶解产物超氧阴离子清除率为 38.35%，木瓜蛋白酶解产物超氧阴离子清除率为 20.33%。其中碱性蛋白酶解物清除效果好与其产生大量的疏水性氨基酸与自由基结合从而产生良好的抗氧化效果有关[31]。

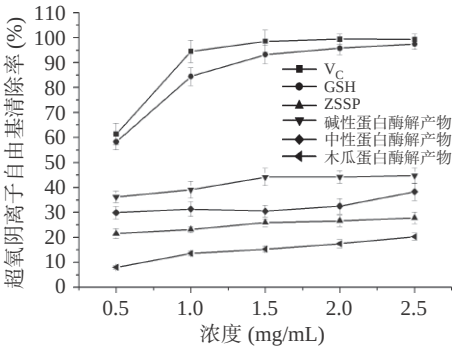


图 11　不同酸枣仁蛋白酶解产物对超氧阴离子的清除活性

Fig.11　$O_2^{-\cdot}$ scavenging activity of different enzymatic hydrolysates of Ziziphi Spinosae semen protein

2.7.4　羟基自由基清除能力　3 种酸枣仁蛋白酶解物的羟基自由基清除能力如图 12 所示，在 0.5~2.5 mg/mL 范围内，羟基自由基的清除能力与不同酸枣仁蛋白酶解产物的质量浓度呈正比关系，即随着质量浓度的增加，羟基自由基的清除能力越强。实验结果表明，酸枣仁蛋白经不同蛋白酶处理后，不同酸枣仁蛋白酶解产物的羟基自由基清除活性明显增强。3 种蛋白酶解产物中，碱性蛋白酶解产物的羟基自由基清除能力最强，为 47.77%；其次是木瓜蛋白酶解产物，为 37.16%，中性蛋白酶解产物的羟基自由基清除能力最差，为 35.04%。以上研究结果表明，不同酸枣仁蛋白酶解产物均具有一定的羟基自由基清除能力，其中碱性蛋白酶解产物效果最好。

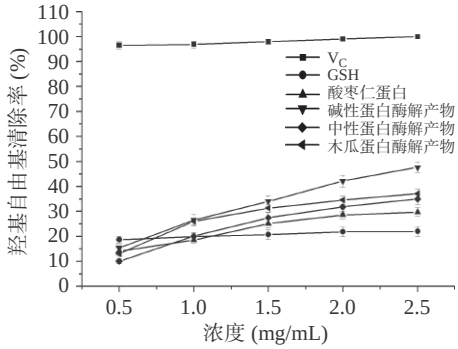


图 12　不同酸枣仁蛋白酶解产物的对羟基自由基的清除能力

Fig.12　·OH scavenging ability of different enzymolysis hydrolysates of Ziziphi Spinosae semen protein

3　结论

本研究以酸枣仁蛋白为原料，采用不同蛋白酶对其进行酶解处理，得到三种不同蛋白酶解产物。并对不同酸枣仁蛋白酶解产物的功能特性及体外抗氧化活性进行比较研究。SDS-PAGE 电泳结果表明，酶解处理后，其分子量分布有所变化，由高分子量分布向低分子量分布转变，其中，碱性蛋白酶解产物的变化最为明显。功能特性研究表明，相比于酸枣仁蛋白，持水性有所降低，不同蛋白酶解产物的溶解性、吸油性、起泡性、乳化性及乳化稳定性均具有不同程度地提高，功能特性在一定温度和 pH 范围内保持良好。体外抗氧化活性结果表明，与酸枣仁蛋白相比，不同酸枣仁蛋白酶解物的体外抗氧化活性均具有不同程度地提升，其中经碱性蛋白酶酶解的产物 DPPH、ABTS、超氧阴离子自由基等清除能力均强于中性蛋白酶解产物及木瓜蛋白酶解产物，表明酶解大大提高了酸枣仁的体外抗氧化能力，以上研究表明所得的酸枣仁蛋白酶解产物具有较好的功能特性以及体外抗氧化活性，可作为一种潜在的抗氧化剂应用于食品及保健食品加工行业中，有助于发挥酸枣仁药材自身最大的利用价值，为酸枣仁蛋白酶解产物的应用提供了一定的理论依据。

参考文献

[1] 袁杨杨，孙从永，徐希明，等. 酸枣仁活性成分药理作用机制的研究进展[J]. 中国药师，2017，20(9)：1622-1627. [YUAN Y Y, SUN C Y, XU X M, et al. Research progress on pharmacological

mechanism of active components from Ziziphi spinosae semen[J]. China Pharm, 2017, 20(9): 1622−1627.]
[2] 谭云龙, 孙晖, 王喜军, 等. 酸枣仁化学成分及其药理作用研究进展[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(1): 186−188. [TAN Y L, SUN H, WANG X J, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of Ziziphi spinosae semen[J]. Shi Zhen, Traditional Chinese Medicine, 2014, 25(1): 186−188.]
[3] ZHANG H Y, SHAO S, YAN M M, et al. Structural, physicochemical and functional properties of Semen Ziziphi spinosae protein[J]. Rsc Advances, 2020, 10: 29555−29566.
[4] 陈丹阳, 韩涛, 杜斌, 等. 酶解蚕豆蛋白制备多肽酒及其抗氧化研究[J]. 中国粮油学报, 2017, 27(12): 22−27. [CHEN D Y, HAN T, DU B, et al. Preparation of polypeptide wine by enzymatic hydrolysis of broad bean protein and its antioxidant activity[J]. Chinese Journal of Cereals and Oils, 2017, 27(12): 22−27.]
[5] 姚余祥, 张九亮, 何慧, 等. 鹰嘴豆江胆固醇肽的制备及活性[J]. 中国粮油学报, 2015, 30(1): 33−38. [YAO Y X, ZHANG J L, HE H, et al. Preparation and activity of chickpea cholesterol peptide[J]. Chinese Journal of Cereals and Oils, 2015, 30(1): 33−38.]
[6] 阎震, 郭淑, 张金宝, 等. 酶解牡丹籽粕蛋白制备抗氧化肽的工艺优化[J]. 食品工业科技, 2018, 39(7): 168−174, 180. [YAN Z, GUO X, ZHANG J B, et al. Optimization of process for preparation of antioxidant peptides by enzymatic hydrolysis of protein prepared from peony seed meal[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(7): 168−174, 180.]
[7] 赵节昌. 酶解酸枣仁蛋白制备抗氧化肽的研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(3): 249−252, 257. [ZHAO J C. Preparation of antioxidant peptides by enzymatic hydrolysis of jujube kernel protein[J]. Food Industry Science and Technology, 2014, 35(3): 249−252, 257.]
[8] 郑志强, 李宝林, 郝利民, 等. 不同蛋白酶对小麦蛋白酶解物抗氧化活性的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(7): 161−166. [ZHENG Z Q, LI B L, HAO L M, et al. Effects of different proteases on antioxidant activity of wheat protein hydrolysates[J]. Food Science, 2017, 38(7): 161−166.]
[9] WANG K D, TIAN Y P, ZHOU N D, et al. Studies on fermentation optimization, stability and application of prolyl aminopeptidase from *Bacillus subtilis*[J]. Process Biochem, 2018, 74(11): 10−20.
[10] 国家食品药品监督管理总局. GB 5009.124-2016. 食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定 [S]. 北京:中国出版社, 2016. [State Food and Drug Administration. GB 5009. 124-2016. National food safety standard. Determination of amino acids in foods[S]. Beijing: China Stadards Press, 2016.]
[11] 高英, 俞玉忠. 福林酚法测定脑蛋白水解物溶液中的多肽含量[J]. 海峡药学, 2004(6): 57−58. [GAO Y, YU Y Z. Determination of polypeptide content in brain protein hydrolysate solution by Folin phenol method[J]. Strait Pharmacy, 2004(6): 57−58.]
[12] 刘颖, 刘丽宅, 于晓红, 等. 限制性酶解乳清蛋白功能特性研究[J]. 食品工业科技, 2017, 38(4): 127−131. [LIU Y, LIU L Z, YU X H, et al. Functional properties of restricted enzymolysis whey protein[J]. Food Industry Technology, 2017, 38(4): 127−131.]
[13] LATORRES J M, RIOS D G, SAGGIOMO G, et al. Functional and antioxidant properties of protein hydrolysates obtained from white shrimp (*Latopenaeus vannamea*)[J]. Journal of Food Science and Technology, 2018, 55(2): 721−729.
[14] 李晓娇, 郜玉钢, 张连学, 等. 奇亚籽化学成分、药理作用及产品开发的研究进展[J]. 粮食与油脂, 2018, 31(5): 13−15. [LI X J, GAO Y G, ZHANG L X, et al. Research progress on chemical composition, pharmacological action and product development of Qiya seed[J]. Food and Oil, 2018, 31(5): 13−15.]
[15] PANDHARE G R, KATKE S D. Studies on preparation of chia seed fortified cookies[J]. Contemporary Research in India, 2018, 8(1): 25−28.
[16] 张丽霞, 顾振新, 周剑忠, 等. 双酶水解麦胚制备抗氧化肽的工艺优化[J]. 江苏农业学报, 2010, 26(3): 601−606. [ZHANG L X, GU Z X, ZHOU J M, et al. Optimization of preparation of antioxidant peptides from wheat germ by double enzyme hydrolysis[J]. Journal of Jiang Su Agriculture, 2010, 26(3): 601−606.]
[17] 陈建双, 李佳欣, 杨洋, 等. 山药水提物提取工艺优化及抗氧化活性分析[J]. 粮食与油脂, 2021, 34(6): 155−159. [CHEN J S, LI J X, YANG Y, et al. Optimization of water extract process from yam and its antioxidant activity analysis[J]. Cereals & Oils, 2021, 34(6): 155−159.]
[18] 盛彩虹, 刘烨, 刘大川, 等. 紫苏分离蛋白功能性研究[J]. 食品科学, 2011, 32(17): 137−140. [SHENG C H, LIU Y, LIU D C, et al. Functional study of *Perilla* protein isolate[J]. Food Science, 2011, 32(17): 137−140.]
[19] 熊拯, 陈敏娥, 张炳亮. 油菜籽粕蛋白质提取工艺及功能性研究[J]. 粮油食品科技, 2013, 21(1): 21−30. [XIONG Z, CHEN M E, ZHANG B L. Study on extraction technology and function of rapeseed protein[J]. Cereals, Oils and Food Science and Technology, 2013, 21(1): 21−30.]
[20] DONG Z Y, LI M Y, TIAN G, et al. Effects of ultrasonic pretreatment on the structure and functionality of chicken bone protein prepared by enzymatic method[J]. Food Chemistry, 2019, 299: 125103.
[21] 范宁宇, 阚欢, 许善午, 等. 中性蛋白酶水解核桃蛋白工艺[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(11): 78−81. [FAN N N, KAN H, XU S N, et al. Hydrolysis of walnut protein by neutral protease[J]. Food Research and Development, 2011, 32(11): 78−81.]
[22] 赵晨煊, 李瑞婷. 文冠果油籽蛋白的分离及其酶解产物抗氧化性研究[J]. 农产品加工, 2020, 20: 20−25. [ZHAO C X, LI R T. Isolation of *Xanthoceras sorbifolia* oleifera protein and study on the antioxidant activity of its enzymatic hydrolysates[J]. Processing of Agricultural Products, 2020, 20: 20−25.]
[23] SARBON N M, BADII F, HOWELL N K. Purification and characterization of antioxidative peptides derived from chicken skin gelatin hydrolysate[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 85: 311−320.
[24] 刘淳, 张海英, 韩涛, 等. Alcalase 碱性蛋白酶酶解蚕豆蛋白的研究[J]. 中国粮油学报, 2011, 26(12): 29−33. [LIU C, ZHANG H Y, HAN T, et al. Study on enzymatic hydrolysis of broad bean protein by Alcalase alkaline protease[J]. Chinese Journal of Cereals and Oils, 2011, 26(12): 29−33.]
[25] 田杰, 柴莎莎, 胡传荣, 何东平. 风味蛋白酶酶解大豆分离

蛋白及对其功能特性影响研究[J]. 中国油脂，2015，40(10)：11−14. ［TIAN J, CHAI S S, HU C R, et al. Enzymatic hydrolysis of soybean protein isolate by flavourzyme and its effect on its functional properties[J]. Chinese Journal of Oil and Fat, 2015, 40(10): 11−14.］

［26］ ZHONG C, SUN L C, YAN L J, et al. Production, optimisation and characterisation of angiotensin converting enzyme inhibitory petides from sea cucumber (*Stichopus japonicus*) gonad[J]. Food Function, 2018, 9(1): 594−603.

［27］ 陈金玉，曲金萍，张坤生，等. 酶解制备苦荞蛋白抗氧化肽及其分离纯化研究[J]. 食品研究与开发，2020，41(12)：14−20. ［CHEN J Y, QU J P, ZHANG K S, et al. Preparation of antioxidant peptides from tartary buckwheat protein by enzymatic hydrolysis and its separation and purification[J]. Food Research and Development, 2020, 41(12): 14−20.］

［28］ DU M, XIE J, GONG B, et al. Extraction, physicochemical characteristics and functional properties of mung bean protein[J]. Food Hydrocolloids, 2017, 21: 131−140.

［29］ 李琴，张海生，许珊，等. 绿豆抗氧化活性肽的制备及其抗氧化活性研究[J]. 江西农业大学学报，2013，35(5)：1063−1069. ［LI Q, ZHANG H S, XU S, et al. Preparation and antioxidant activity of antioxidant peptides from mung bean[J]. Journal of Jiangxi Agricultural University, 2013, 35(5): 1063−1069.］

［30］ 张然，严文慧，齐斌. 核桃蛋白酶解产物的特性研究[J]. 食品科学，2011，32(1)：23−26. ［ZHANG R, YAN W H, QI B. Study on the properties of walnut protein hydrolysate[J]. Food Science, 2011, 32(1): 23−26.］

［31］ SARMADI B H, ISMAIL A. Antioxidant peptides from food proteins a review[J]. Food Science, 2008, 29(11): 72−76.

王家胜, 刘翀, 王婷, 等. 天然马铃薯、木薯和玉米淀粉添加对发酵挂面品质的影响 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 40−47. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021070190
WANG Jiasheng, LIU Chong, WANG Ting, et al. Effect of Native Potato, Cassava and Corn Starches Supplement on the Quality of Dried Fermented Noodles[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 40−47. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021070190

·研究与探讨·

天然马铃薯、木薯和玉米淀粉添加对发酵挂面品质的影响

王家胜, 刘　翀*, 王　婷, 郑学玲
（河南工业大学粮油食品学院, 河南郑州 450001）

摘　要: 为解决市售发酵挂面存在爽滑性差、粘弹性差、蒸煮时间长的问题，本文以单因素实验的方法，研究了马铃薯淀粉、木薯淀粉和玉米淀粉对发酵挂面蒸煮特性、质构特性以及感官评价的影响。结果表明：添加天然薯类和谷物淀粉均可以改善发酵挂面的蒸煮及质构品质，提高感官评价得分，尤其能够缩短最佳蒸煮时间，同时结合质构和感官实验数据分析，添加 10% 木薯淀粉对发酵挂面品质的改善最佳。添加 10% 木薯淀粉后发酵挂面的蒸煮损失和最佳蒸煮时间显著降低（P<0.05），蒸煮损失降低率和最佳蒸煮时间缩短率分别达到 30.18% 和 18.73%，面条的煮后硬度、咀嚼性和回复性显著提高（P<0.05），感官评价得分也得到提升（87.2 分）。本研究对提升发酵挂面品质有一定的实际意义。

关键词: 发酵挂面, 薯类淀粉, 蒸煮特性, 质构特性, 感官评分
中图分类号: TS236　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0040−08
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021070190
本文网刊:

Effect of Native Potato, Cassava and Corn Starches Supplement on the Quality of Dried Fermented Noodles

WANG Jiasheng, LIU Chong*, WANG Ting, ZHENG Xueling
(College of Grain, Oil and Food, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: In order to solve the problems of poor smoothness, poor viscoelasticity and long cooking time in commercial dried fermented noodles, the effects of native potato starch, cassava starch and corn starch on cooking characteristics, texture characteristics and sensory evaluation of dried fermented noodles were studied by single factor experiment. The results showed that the addition of native tubers and cereals starches could improve the cooking and texture quality of dried fermented noodles, increase the sensory evaluation score, especially shorten the optimum cooking time. And combined with texture and sensory experimental data analysis, adding 10% cassava starch had the best improvement on the quality of dried fermented noodle. The cooking loss and optimal cooking time of dried fermented noodle were significantly reduced by adding 10% cassava starch (P<0.05), the reduction rate of cooking loss and the reduction rate of optimal cooking time were 30.18% and 18.73%, respectively, and the hardness, chewiness and resilience of noodles were significantly increased (P<0.05), sensory evaluation score (87.2) was also improved. This study has certain practical significance for improving the quality of dried fermented noodle.

Key words: dried fermented noodles; tuber starch; cooking characteristics; texture characteristics; sensory evaluation

挂面是我国的传统主食之一, 是将面粉、水和盐经过和面、熟化(或称为醒发)、压延、干燥等工序制作而成的面制食品, 因其耐储藏、易煮、食用方式多样而受到人们的喜爱。普通挂面, 无论是采用面絮还

收稿日期: 2021−07−19
基金项目: 河南省科技攻关项目（212102110079）: 活性酵母发酵空心挂面品质提升技术研究。
作者简介: 王家胜（1999−）, 男, 硕士研究生, 研究方向: 淀粉加工理论与技术, E-mail: vjasonwang@126.com。
*** 通信作者:** 刘翀（1978−）, 男, 博士, 副教授, 研究方向: 淀粉加工理论与技术, E-mail: liuachong@haut.edu.cn。

是面带醒发，其醒发时间一般<2 h，面粉自带的微生物无法大量繁殖，属于非发酵类面制食品。空心挂面本名手工银丝油面，外表光滑圆润，内有银丝般的细孔，属于我国的非物质文化遗产，它营养丰富、清汤耐煮、柔软可口，是老幼皆宜的方便食品。空心挂面的横截面具有肉眼可见的独特多孔结构，这是在其制作过程中由于面粉自带的微生物自然发酵产而气形成的[1−3]，属于发酵类面制食品。手工空心挂面的制作需要经过多次手工拉伸、长时间的自然发酵（长达 20 h）等十多道的工序才能制作完成，工艺相当繁琐，导致其产品质量不稳定且产量小，仅局限于手工作坊生产[4−6]。

近年来，市场上出现了利用外加酵母发酵产气，采用现代压延工艺生产的工业化发酵空心挂面，其多孔结构主要是通过切条悬挂后、干燥前的发酵过程形成的[7]。由于其制作工艺简单，产量大，质量稳定，口感独特，且兼具手工空心挂面的营养美味，受到消费者的青睐[8−12]。但目前市售发酵挂面尚存在爽滑性差、粘弹性差、蒸煮时间长等问题。

为了解决发酵挂面生产中存在的问题，有学者针对发酵挂面的加工工艺[4−8]、发酵剂[9−12]进行了研究，此外，Wang 等[13]通过添加碱性盐改善发酵挂面的品质。淀粉是一种面粉品质改良剂[14]，适量的添加可以提升挂面的品质[15−17]，例如，添加马铃薯淀粉、木薯淀粉等可以提升挂面的色泽、弹性、硬度和耐煮性，降低其黏性和蒸煮损失率，所制作的挂面产品不浑汤，更加光亮、Q 弹、劲道和爽滑[18−20]。然而，目前为止，相关研究主要是针对普通挂面进行的，对添加淀粉来改善发酵挂面品质的研究还有待深入研究。

因此，本文拟研究不同类型（薯类和谷物）和添加量的天然淀粉对发酵挂面品质的影响，确定能显著改善发酵挂面品质的天然淀粉类型及添加量，为发酵挂面的品质提升提供支持，对于发酵挂面的工业化生产具有重要的指导意义。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

香雪麦纯富强粉　中粮面业（德州）有限公司；谷朊粉　山东渠风食品科技有限公司；酵母粉　广西丹宝利酵母有限公司；食盐　河南省盐业总公司；马铃薯淀粉　固原雪冠淀粉有限责任公司；木薯淀粉　河南恒瑞淀粉科技股份有限公司；玉米淀粉　成武大地玉米开发有限公司。

JHMZ-200 型针式和面机、JMTD-168/140 型试验面条机　北京东孚久恒仪器技术有限公司；SP-18S 型醒发箱　江苏三麦食品机械有限公司；MJP-250 培养箱　上海精宏实验设备有限公司；SPX-250 型恒温干燥箱　北京市永光明医疗仪器有限公司；DT-1002A 型电子天平　常熟市佳衡天平仪器有限公司；ME104/02 型分析天平　梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司；C22-IH91 型电磁炉　浙江苏泊尔股份有限公司；LG-01 型高速粉碎机　浙江瑞安市百信制药机械有限公司；FXB101-2 型电热鼓风干燥箱　上海树立仪器仪表有限公司；TA.XT PlusC 物性测试仪　英国 Stable Micro Systems 公司。

1.2　实验方法

1.2.1　发酵挂面的制作工艺　取 200.00 g 小麦粉，加入 1% 谷阮粉（以面粉质量为基准，全文同）、1% 酵母粉、不同淀粉（0、5%、10%、15%），用针式和面机搅拌 30 s，加入食盐水（食盐 5%，水 33%）和成面絮，将面絮用保鲜膜包裹在 30 ℃ 培养箱中醒发 30 min 后复合压延四次，将复合压延的面带逐道压延成 1 mm 厚的面带，切成 2 mm 宽、1 mm 厚的面条。将面条置于 35 ℃、湿度 85% 的醒发箱中醒发 2 h，在 35 ℃、湿度 65% 的醒发箱中醒发 10 h，在 25 ℃ 的培养箱中干燥 4 h 后制得实验用发酵挂面。

1.2.2　蒸煮特性测定　参照 LS/T 3212-2014《挂面》[21]稍作改动，取 10 g 挂面于 500 g 沸水中煮制，将电磁炉火力调整为 1400 W 保持水为微沸状态，用计数器计时。从 2 min 时开始用筷子夹取面条，用玻璃板压扁，观察面条是否存在白心，每隔 30 s 夹取一根，当测得面条白心恰好消失时停止计时，该时间则为挂面的最佳蒸煮时间。将煮至上述测得的最佳蒸煮时间后的面条夹出，在冷水中浸拌 30 s，用滤纸包裹面条，静置 5 min，取下滤纸称重，记录挂面煮后重量 m_c。按公式（1）计算挂面的煮后吸水率（CAR）。

$$m_d = m_t - (m_t \times W) \qquad 式（1）$$

$$CAR(\%) = \frac{m_c - m_d}{m_d} \times 100 \qquad 式（2）$$

式中：m_t 为实验时所称取的挂面重量（g）；W 为干挂面水分含量（%），参照 GB 5009.3-2016《食品中水分的测定》[22] 中的直接干燥法测得；m_d 为挂面的干重（g）；m_c 为挂面的煮后重量（g）。

将煮面后锅中的面汤倒入 500 mL 容量瓶中定容，待面汤冷却后，用移液枪吸取 20 mL面汤于干燥至恒重的铝盒中，将加样后的铝盒放置于 105 ℃ 的烘箱中烘干 4 h，待铝盒恒重后称量重量，按公式（3）计算蒸煮损失率（CLR），按公式（4）和公式（5）分别计算蒸煮损失率降低率和最佳蒸煮时间缩短率。

$$CLR(\%) = \frac{25 \times (m_5 - m_4)}{m_t \times (1 - W)} \times 100 \qquad 式（3）$$

$$蒸煮损失降低率(\%) = \frac{对照组蒸煮损失率 - 添加淀粉组蒸煮损失率}{对照组蒸煮损失率} \times 100 \qquad 式（4）$$

$$最佳蒸煮时间缩短率(\%) = \frac{对照组最佳蒸煮时间 - 添加淀粉最佳蒸煮时间}{对照组最佳蒸煮时间} \times 100 \qquad 式（5）$$

式中：m_4 为加样前烘干至恒重的空铝盒重量(g)；m_5 为加样后烘干至恒重的铝盒重量(g)；m_t 为实验所称取的挂面重量(g)；W 为干挂面的含水量(%)。

1.2.3 质构特性测定 参照李阳等[23]的实验方法，稍作改动，取 15 根挂面于盛有 500 g 沸水的锅中，调整电磁炉火力为 1400 W，保持锅中水为微沸状态，煮至所测定样品的最佳蒸煮时间时用筷子夹出，在冷水中涮浸 30 s，将熟面条摆放于放有湿纱布的托盘中，用湿纱布覆盖，保持挂面水润，用 TA.XT Plus 质构仪进行质构测定。

质构曲线分析(TPA)实验探头型号选择 HDP/PFS；测前、测试、测后速度均设定为 0.8 mm/s；压缩程度 75%，负载类型 Auto-5 g；两次压缩之间的时间间隔设置为 2 s。拉伸探头型号选择 A/SPR，选择 Extension 模式，测试参数为：测前速度 2.0 mm/s；测试速度：2.0 mm/s；测后速度：10 mm/s；测试距离：100 mm；触发力 5.0 g。每组样品质构指标测定 7 次，舍去最大最小值，取平均值。

1.2.4 感官评价 5 名感官评价人员对发酵挂面进行感官评价，感官评价打分原则根据 LS/T 3212-2014《挂面》[21]稍作改动，具体评分细则参照表 1，将五人的打分结果取平均数作为样品的最终得分。

表 1 发酵挂面感官评价标准

Table 1 Sensory evaluation criteria of fermented dried noodles

项目	满分(分)	评分标准	得分(分)
色泽	10	面条颜色乳白、奶黄色，光亮	9~10
		面条颜色正常，亮度一般	6~8
		颜色发暗、发灰，亮度差	1~5
表观状态	10	表面结构均匀，光滑，	9~10
		表面结构均匀但有破损，较光滑	6~8
		表面粗糙、变形严重，不光滑	1~5
软硬度	20	咬断力用力适中	17~20
		稍偏硬或偏(适口性)软	12~16
		太硬或太软	1~11
粘弹性	30	不粘牙、有咬劲，富有弹性	25~30
		微粘牙，弹性略低	18~24
		不爽口、粘牙，咬劲差	1~17
爽滑性	20	口感爽滑	17~20
		较爽滑	12~16
		爽滑性差	1~11
食味	10	具有发酵清香味，无异味	9~10
		基本无异味	6~8
		有异味	1~5

1.3 数据处理

利用 SPSS 25.0 软件对试验数据进行单因素方差分析，采用 Duncan、t 检验方法对方差齐和非齐的数据进行多重比较，各组数据间 $P<0.05$ 即存在显著性差异。利用 GraphPad Prism 8 软件作图。实验测试指标均为 3 次平行。

2 结果与分析

2.1 不同淀粉对发酵挂面蒸煮特性的影响

最佳蒸煮时间是面条蒸煮过程中白心消失的时间，反映面条的易煮性[24−25]，对于面条而言，最佳蒸煮时间越短，其方便性越强。图 1A 为发酵挂面的最佳蒸煮时间，同对照组相比，9 个实验组的最佳蒸煮时间均显著缩短($P<0.05$)，其中马铃薯淀粉实验组(10%、15%)最佳蒸煮时间均低于其他实验组，添加 10% 马铃薯淀粉时最佳蒸煮时间最短(236 s)，最佳蒸煮时间缩短比率为 31.66%。在实验的添加范围内，添加马铃薯淀粉组的最佳蒸煮时间随添加量的升高逐渐降低，木薯淀粉和玉米淀粉组则呈现先升高后降低的趋势，但同种淀粉不同添加量下差异不明显。结果表明，马铃薯淀粉对于缩短发酵挂面蒸煮时间的作用最明显。这是因为马铃薯淀粉中直链淀粉含量

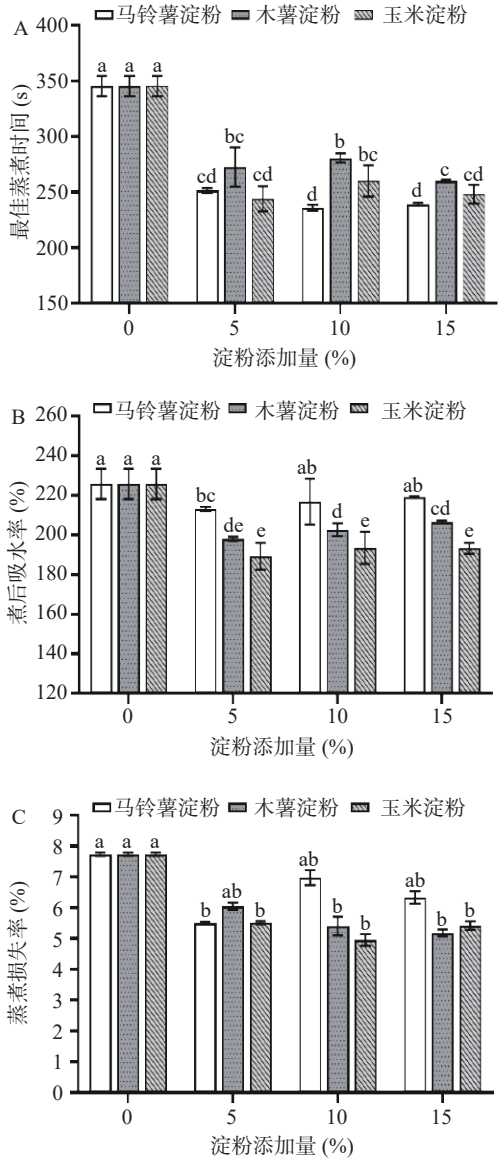


图 1 不同淀粉对发酵挂面蒸煮特性的影响

Fig.1 Effects of different starches on cooking characteristics of fermented dried noodles

注：不同字母表示存在显著差异($P<0.05$)，图 2~图 3 同。

少，糊化温度低造成的[26]，张豫辉[17]研究马铃薯淀粉添加对普通挂面的蒸煮时间影响，发现类似结果。

挂面的煮后吸水率为单位干物质吸水量，是挂面耐煮性的重要指标之一，主要与淀粉糊化和面筋网络的膨胀有关，吸水率过大，表明挂面吸水膨胀变形严重[27]。图 1B 为发酵挂面的煮后吸水率，实验结果表明，添加淀粉后发酵挂面的煮后吸水率均显著低于未添加淀粉时的煮后吸水率（P<0.05），其中添加 5% 玉米淀粉时吸水率最低（189.28%）。在 5%~15% 添加量下，同种淀粉在不同添加量时的煮后吸水率均无显著性差异（P>0.05）。吸水率的变化可能是因为淀粉的添加改变了面粉中原有的蛋白与淀粉的比例，蛋白质与淀粉相比有更强的吸水性，因此面条的煮后吸水率会因添加淀粉而降低[17]。

挂面的蒸煮损失反映蒸煮过程中溶解和脱落到煮面水中的固形物的质量分数[28]，蒸煮损失率过高会导致面汤混浊和面条表面发粘，导致面条品质差。图 1C 为发酵挂面的蒸煮损失率，添加淀粉后发酵挂面的蒸煮损失率明显下降，除了 5% 的木薯淀粉组，10% 和 15% 的马铃薯淀粉组的蒸煮损失率与对照组无显著差异外（P>0.05），其它样品蒸煮损失率均显著低于空白对照组（P<0.05），9 个实验组中，添加 10% 玉米淀粉的实验组蒸煮损失率最低（4.95%），蒸煮损失降低了 35.95%。在 5%~15% 的添加量下，马铃薯淀粉组随添加量的增加，蒸煮损失率从 5.50% 升高到 6.98%再降低到 6.34%，玉米淀粉组的蒸煮损失率随添加量的升高先下降后上升，但无显著性差异（P>0.05）。木薯淀粉组随添加量的升高蒸煮损失率降低，但不存在显著性差异（P>0.05）。通常，蒸煮过程中，面条中的面筋蛋白通过三维网络结构束缚淀粉颗粒，抑制淀粉颗粒溶胀及直链淀粉的泄露溶出，添加淀粉降低挂面的蒸煮损失，可能是由于面条表面淀粉颗粒糊化后产生粘性并且与面条中的面筋蛋白结合，促使形成更加紧密的凝胶网络结构包埋内部淀粉颗粒，从而降低挂面的蒸煮损失[29−30]。

通过蒸煮实验可以看出，玉米淀粉在添加量为 10% 时蒸煮损失降低率达到 35.95%，最佳蒸煮时间缩短率为 24.71%，对蒸煮特性的改善效果最佳；马铃薯淀粉在添加量 5% 时蒸煮损失降低率为 28.91%，最佳蒸煮时间缩短率为 27.17%，对蒸煮特性的改善效果次之；木薯淀粉在添加量为 10% 时蒸煮损失降低率为 30.18%，最佳蒸煮时间缩短率为 18.73%，对蒸煮特性也起到了改善作用。因此还要进一步结合质构和感官实验的数据讨论对发酵挂面品质改善效果最佳的淀粉种类及添加量。

2.2　不同淀粉对发酵挂面质构特性的影响

2.2.1　不同淀粉对 TPA 特性的影响　TPA 实验是模拟口腔咬断、咀嚼和吞咽食物的过程，可对食品的质构特征进行定量，且因其准确和可重复性，被广泛用于评价面条食用品质[31]。TPA 测定通常可获得硬度、粘附性、弹性、回复性、内聚性和咀嚼性等指标，与感官评价有密切关系。例如，硬度与咬断面条所需的力有关；咀嚼性是将面条咀嚼到可以吞咽的状态所需能量的量度；内聚性与食物在破碎前变形的程度有关；粘附性反映面条表面黏性或者爽滑性；弹性和回复性反映面条被咬后回弹的力[32−33]。

图 2 为不同淀粉对发酵挂面 TPA 特性的影响。如图 2A 所示，添加天然淀粉后挂面的煮后硬度均有所增加，且硬度均随添加量增加而先增加后下降，当木薯淀粉和马铃薯淀粉添加量为 10%、玉米淀

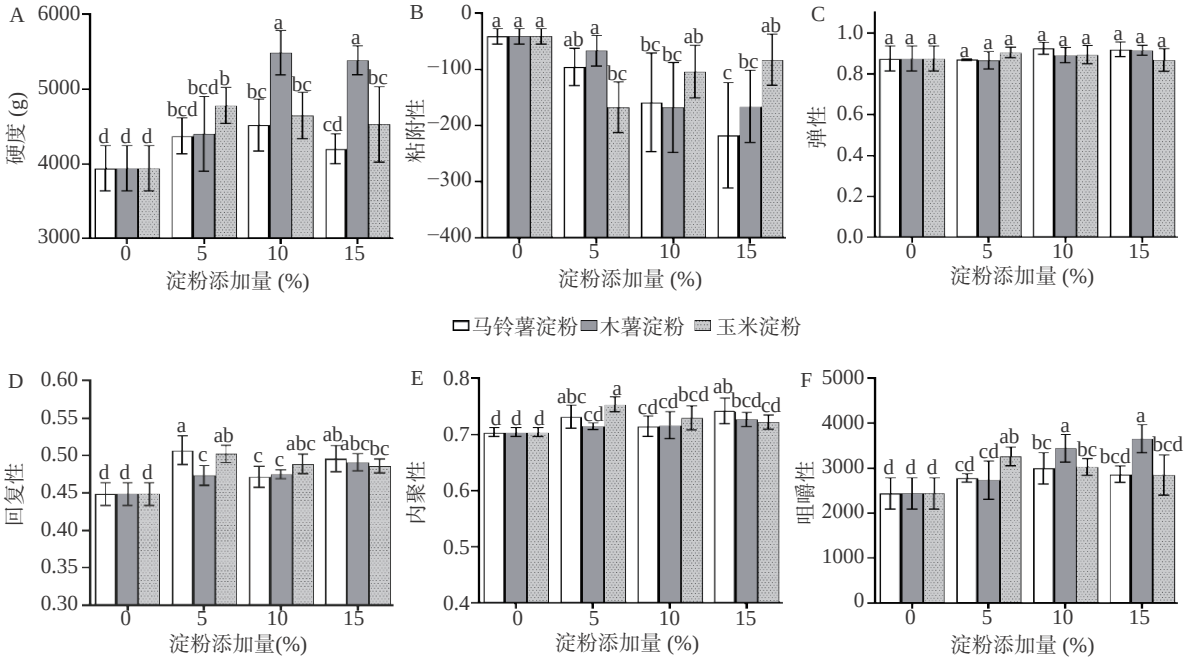


图 2　不同淀粉对发酵挂面 TPA 特性的影响

Fig.2　Effects of different starches on TPA quality properties of fermented dried noodles

粉添加量 5% 时硬度分别达到最高，其中三种添加量下的玉米淀粉、10% 马铃薯淀粉及 10% 和 15% 的木薯淀粉与对照组差异具有显著性（P<0.05），添加 10% 木薯淀粉硬度最大（5484.91 g）。有研究表明，添加淀粉会稀释面筋网络，使面条的硬度降低[34]，而本研究中淀粉增强了面条的煮后硬度，这可能与和面时添加的谷朊粉有关，刘紫鹏等[35] 的研究表明同时添加木薯淀粉和谷朊粉可以提高面条的煮后硬度。

如图 2B 所示，添加淀粉后熟面条的粘附性有降低趋势，对于马铃薯淀粉和木薯淀粉，面条的粘附性随添加量的增加而逐渐降低，相反，对于玉米淀粉，其粘附性随淀粉添加量增加而增加。同一添加量条件下，在低添加量时，玉米淀粉降低粘附性更明显，而在高添加量时，马铃薯淀粉效果更明显。陆启玉等[36] 对非发酵面条的研究表明，淀粉含量的增加会导致面条粘附性降低，本实验结果与其基本一致。

如图 2C 所示，除了添加 5% 木薯淀粉和 15% 玉米淀粉会降低面条弹性外，其它淀粉添加组与对照的弹性差异不明显。Wang 等[13] 的研究表明糊化程度大的淀粉可以提高空心面的弹性，本研究中所用的马铃薯淀粉和木薯淀粉都易发生糊化，而面条弹性的变化并不显著，因此还需分析回复性从而确定淀粉对弹性的影响。如图 2D 所示，添加 3 种淀粉后发酵挂面的回复性均显著提高（P<0.05），木薯和玉米淀粉的添加量对回复性影响不显著（P>0.05），而马铃薯淀粉，添加 10%浓度的回复性显著低于 5% 和 15%（P<0.05）。回复性和弹性均是表征面条弹性的重要指标，结果表明，相比于弹性，回复性更利于区分淀粉添加对发酵面条弹性特征的影响，5% 的马铃薯淀粉对面条弹性改善效果最佳。有研究表明面筋蛋白在水温超过 70 ℃ 时会发生 SH/SS 的交换反应，提高熟面条的弹性，能对质构品质起到提升作用[37]。

如图 2E 所示，淀粉对面条内聚性的影响依赖于淀粉种类和添加量，马铃薯淀粉添加量在 5% 和 15%、玉米淀粉添加量为 5% 时显著提高了面条内聚性（P<0.05），而木薯淀粉在 3 种添加量下对面条内聚性的影响均不显著（P>0.05）。

如图 2F 所示，添加 3 种淀粉均增强了发酵挂面的咀嚼性，但各淀粉添加量的影响不一样，添加马铃薯淀粉后咀嚼性先升后降，在 10% 最大（P<0.05），添加木薯淀粉后咀嚼性逐渐增加，浓度 10% 和 15% 时均显著高于对照（P<0.05），添加 5% 玉米淀粉的面条咀嚼性显著高于对照（P<0.05），但随着玉米淀粉添加量进一步增加，咀嚼性逐渐下降。马铃薯淀粉添加量高于 5%、玉米淀粉添加量高于 10% 时，挂面的质构特性开始变差，这与程红霞[38] 对于普通挂面的研究结果一致。

2.2.2 不同淀粉对拉伸特性的影响 面条的拉伸断裂力通常以面条被拉断时的最大拉伸阻力表示。面条的拉伸断裂力越大，表明面条的筋力越强，抗拉伸性能越好，面条弹性越好[39]。拉断距离代表面条的延展性，拉伸断裂距离越大面条的延伸性越好[40]。如图 3 所示，添加天然淀粉后，发酵挂面的拉伸断裂力和断裂距离均发生不同程度的改变。

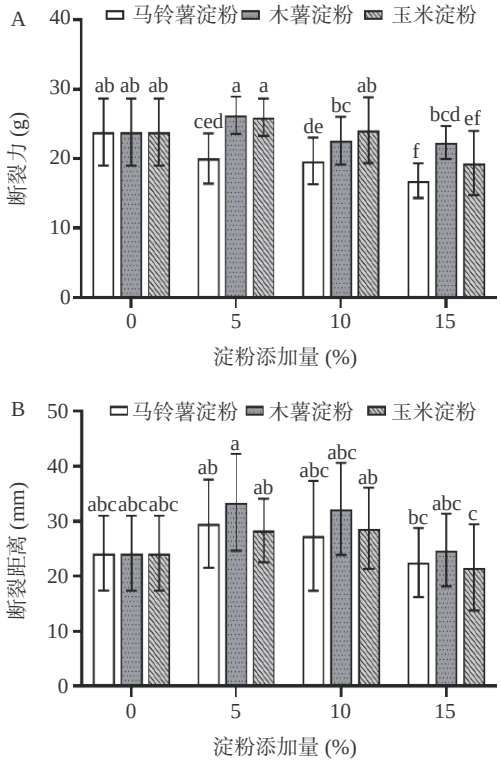


图 3 不同淀粉对发酵挂面拉伸特性的影响

Fig.3 Effect of different starches on tensile properties of fermented dried noodles

如图 3A 所示，马铃薯淀粉对发酵挂面拉伸断裂力的改变同木薯淀粉和玉米淀粉相比更为明显，在实验设置的添加量水平下，马铃薯淀粉实验组的拉伸断裂力均显著低于对照组（P<0.05），并表现出随添加量的升高，拉伸断裂力逐渐降低的趋势；木薯淀粉与玉米淀粉也表现出同样的趋势，但木薯淀粉在实验设置的添加量下与对照组相比无显著性差异（P>0.05），玉米淀粉仅在 15% 添加量时拉伸断裂力显著低于对照组（P<0.05）。

如图 3B 所示，添加天然淀粉后发酵挂面的拉伸断裂距离发生不同程度的增加，但对于所有淀粉，随着添加量增加，拉断距离均有降低的趋势，在 3 种淀粉中，木薯淀粉的影响最明显。添加淀粉后面条的拉伸断裂力减小，这是因为淀粉的添加稀释了面粉中蛋白的比例，弱化了面条中面筋网络结构，对于拉断距离，低浓度的淀粉增加可以提高面条延伸性，但高浓度淀粉添加反而会降低其延伸性，这可能是相对高的淀粉含量会破坏面筋网络的连续结构所致[41]。

2.3 不同淀粉对发酵挂面感官评价的影响

表 2 为不同淀粉对发酵挂面感官评价的影响。由于感官评价的总分是对面条各项指标得分的加和，因此感官评价是对熟挂面的整体特征进行了评价，是挂面品质评价的重要指标，感官评价也是最接近消费

表 2　不同淀粉对发酵挂面感官评价的影响(分)

Table 2　Effects of different starches on sensory evaluation of fermented dried noodles (score)

组别	色泽	表观状态	软硬度	粘弹性	爽滑性	食味	总分
对照组	8.20±0.45^{abcd}	8.20±1.10^{a}	17.20±1.30^{ab}	23.40±2.07^{b}	17.80±1.48^{ab}	8.60±0.55^{a}	83.40±4.28^{a}
PS-5%	7.60±0.55^{d}	9.00±0.71^{a}	16.60±0.89^{ab}	25.20±0.84^{ab}	18.80±0.84^{a}	8.60±0.89^{a}	85.80±1.10^{a}
PS-10%	7.40±0.55^{d}	8.00±0.00^{a}	16.40±0.89^{ab}	23.80±0.45^{ab}	16.00±1.58^{c}	8.20±0.45^{a}	79.80±2.28^{b}
PS-15%	8.80±0.45^{abc}	7.80±1.10^{a}	17.20±1.10^{ab}	25.20±1.79^{ab}	17.20±1.10^{abc}	8.00±1.41^{a}	84.20±3.56^{a}
CS-5%	8.60±0.89^{bcd}	8.80±0.45^{a}	17.00±1.41^{ab}	23.80±2.28^{ab}	17.40±0.89^{abc}	8.20±1.10^{a}	83.80±4.44^{a}
CS-10%	8.00±1.00^{bcd}	9.00±0.00^{a}	18.40±0.89^{a}	26.00±0.00^{a}	17.40±0.55^{ab}	8.40±0.89^{a}	87.20±2.39^{a}
CS-15%	9.00±0.71^{ab}	8.40±0.89^{a}	18.00±1.22^{ab}	24.80±1.79^{ab}	17.80±1.30^{ab}	8.40±0.55^{a}	86.40±5.08^{a}
CoS-5%	8.80±0.84^{abc}	9.20±0.84^{a}	18.20±0.84^{ab}	25.20±2.28^{ab}	17.00±1.73^{bc}	8.60±0.89^{a}	87.00±5.39^{a}
CoS-10%	7.80±0.45^{bc}	8.80±0.84^{a}	16.60±2.19^{ab}	24.40±0.89^{ab}	16.40±0.89^{bc}	8.20±0.45^{a}	82.20±4.32^{a}
CoS-15%	9.60±0.55^{a}	8.60±0.55^{a}	17.40±0.89^{ab}	24.60±1.52^{ab}	16.00±0.71^{c}	7.80±0.45^{a}	84.00±4.00^{a}

注：表中PS为马铃薯淀粉；CS为木薯淀粉；CoS为玉米淀粉。百分数为淀粉添加量。不同字母之间代表差异显著性(P<0.05)。

者的评价指标[42]。

许牡丹等[43]的研究表明，发酵面条质构特性中的弹性、咀嚼性分别与感官评价中的粘弹性、软硬度显著相关，本实验中也存在同样的相关性趋势。由表 2 数据可以看出，在粘弹性上各实验组同对照组相比无显著性差异分(P>0.05)，这与 TPA 实验中弹性的结果一致。木薯淀粉 10%、15% 以及玉米淀粉 5% 这三个实验组在粘弹性得分上都高于对照组，虽然差异并不显著，但与 TPA 实验结果中咀嚼性的趋势相同，这一结果表明木薯淀粉对发酵挂面的质构特性起到了改善作用。

如表 2 所示，除添加 10% 马铃薯淀粉和添加 10% 玉米淀粉的两个实验组外，其余各实验组与未添加淀粉的对照组相比感官得分均不同程度提高，其中添加 10% 木薯淀粉的实验组得分最高为 87.2 分，粘弹性得分显著高于对照组(P<0.05)，爽滑性、软硬度上的得分高于其他组别，与周占富[44]对普通挂面的研究结果一致。这说明添加 10% 木薯淀粉可以对发酵挂面的品质起到优化作用，这一结果与质构实验的结果相吻合，证明添加 10% 木薯淀粉可以改善发酵挂面的质构品质。

3　结论

本研究中的 3 种淀粉的添加均可改善发酵挂面的蒸煮品质，其中玉米淀粉在添加量为 10% 时蒸煮损失率最低(4.95%)，蒸煮损失降低率达到 35.95%，最佳蒸煮时间缩短率为 24.71%，对蒸煮特性的改善效果最佳；对于质构的影响，依赖于淀粉种类和数量，木薯淀粉和马铃薯淀粉均可改善质构品质，其中木薯淀粉添加量在 10% 时能显著提高发酵挂面的煮后硬度、咀嚼性、粘弹性、回复性及拉伸断裂距离；添加不同淀粉对感官得分产生影响，其中添加 10% 木薯淀粉后发酵挂面的感官评价得分提高到 87.2 分。综合蒸煮特性、质构特性和感官评价的实验结果，10% 玉米淀粉和 5% 马铃薯淀粉相比于 10% 木薯淀粉虽能更好的提升发酵挂面的蒸煮品质，但对于硬度、粘附性和咀嚼性的改善效果并不理想，感官得分也低于添加 10% 木薯淀粉组，因此木薯淀粉在 10% 浓度时对发酵挂面的品质提升作用最佳。本文通过研究不同天然淀粉对发酵挂面品质的影响，确定了改善发酵挂面品质的淀粉种类及添加量，为发酵挂面的生产提供了技术支持，但对于淀粉如何改变低水分面团发酵及压延特性，从而改变面条结构和品质的机制尚需进一步研究，以实现对于发酵挂面结构和品质的调控。

参考文献

[1] 林娟. 空心面加工技术的研究 [D]. 西安：陕西科技大学，2013. [LIN J. Study on the processing technology of kongxin noodle[D]. Xi'an: Shaanxi University of Science and Technology, 2013.]

[2] WANG J R, GUO X N, XING J J, et al. Revealing the effect mechanism of NaCl on the rheological properties of dough of Chinese traditional hand-stretched dried noodles[J]. Food Chemistry, 2020: 320.

[3] 王磊鑫，吕莹果，陈洁，等. 发酵拉制面条发酵工艺及品质研究[J]. 河南工业大学学报(自然科学版)，2018，39(6)：36−40,46. [WANG L X, LV Y G, CHEN J, et al. Study on fermentation technology and quality of fermented extended noodle[J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2018, 39(6): 36−40,46.]

[4] LIU S Q. Flavors and food fermentation[M]. Boca Raton: CRC Press, 2012: 26.

[5] COLLAR C, MARTINEZ-ANAYA M A, BARBER C B D. Interactive effects between microbial breadmaking starters and wheat flours on sour dough and bread quality[J]. Cereal Chem, 1994, 12(6): 486−489.

[6] 王文华. 空心挂面生产技术的探讨[J]. 粮食与饲料工业，1994(3)：32−35. [WANG W H. Researches on production on technology of macaroni[J]. Cereal and Feed Industry, 1994(3): 32−35.]

[7] 刘安伟，吕莹果，陈洁. 单形重心设计优化面团发酵剂配比的研究[J]. 河南工业大学学报(自然科学版)，2020，41(1)：39−44. [LIU A W, LV Y G, CHEN J. Optimization of dough starter formulation by simplex centroid design[J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2020, 41(1): 39−44.]

[8] 刘锐，肖晓红，吴桂玲，等. 手工空心挂面的工业化生产线设计[J]. 食品工业，2021，42(11)：96−100. [LIU R, XIAO X H, WU

G L, et al. Design of industrial production line of manual hollow dried noodles[J]. The Food Industry, 2021, 42(11): 96−100.]
[9] 王晓慧, 李玲伊, 韭泽悟, 等. 发酵玉米面条品质评价指标研究[J]. 中国食物与营养, 2012, 18(12): 26−31. [WANG X H, LI L Y, FEI Z W, et al. Study on quality evaluation index of fermented corn noodle[J]. Food and Nutrition in China, 2012, 18(12): 26−31.]
[10] 张蕴华, 汪磊, 陈洁, 等. 酵母种类对空心挂面品质的影响[J]. 食品工业科技, 2021, 42(10): 62−67. [ZHANG Y H, WANG L, CHEN J, et al. Effect of yeast species on quality of empty-inside noodle[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(10): 62−67.]
[11] 刁翠茹, 韩建强, 张玉荣, 等. 传统发酵宫面面团微生物菌群结构研究[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(11): 200−204. [DIAO C R, HAN J Q, ZHANG Y R, et al. Study on microbial community structure of traditional fermented pasta dough[J]. Food Research and Development, 2019, 40(11): 200−204.]
[12] MONTEMURRO M, CODA R, RIZZELLO C G. Recent advances in the use of sourdough biotechnology in pasta making[J]. Foods, 2019, 129(8): 1−21.
[13] WANG J R, GUO X N, YANG Z, et al. Effect of sodium bicarbonate on quality of machine-made kongxin noodles[J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 138: 110670.
[14] 洪秀娟, 沈汪洋, 王展. 改良剂对面条品质影响的研究进展[J]. 粮食与油脂, 2021, 34(2): 11−13,17. [HONG X J, SHEN W Y, WANG Z. Research progress on the effect of improvers on noodle quality[J]. Cereals and Oils, 2021, 34(2): 11−13,17.]
[15] 高国祥, 孙君庚, 阴志刚. 挂面加工品质变化研究进展[J]. 粮食与食品工业, 2019, 26(5): 19−24. [GAO G X, SUN J G, YIN Z G. Research progress on quality change of noodle processing[J]. Cereal and Food Industry, 2019, 26(5): 19−24.]
[16] 王晓曦, 雷宏, 曲艺, 等. 面粉中的淀粉组分对面条蒸煮品质的影响[J]. 河南工业大学学报 (自然科学版), 2010, 31(2): 24−27. [WANG X X, LEI H, QU Y, et al. Effect of starch composition in flour on noodle cooking quality[J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2010, 31(2): 24−27.]
[17] 张豫辉. 淀粉对面条品质的影响研究 [D]. 郑州: 河南工业大学, 2015. [ZHANG Y H. Studies on the influence of different starch on noodle quality[D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2015.]
[18] TAO C S, WANG K J, LIU X J, et al. Effects of potato starch on the properties of wheat dough and the quality of fresh noodles[J]. CyTA-Journal of Food, 2020, 18(1): 427−434.
[19] 邰美丽, 魏晓明, 陈佳佳, 等. 蜡质玉米淀粉对挂面品质特性的影响[J]. 现代食品, 2020(12): 158−162. [HUAN M L, WEI X M, CHEN J J, et al. Effects of adding waxy corn starch on the quality of noodles[J]. Modern Food, 2020(12): 158−162.]
[20] 徐舒简, 李兆丰. 面条制品常用淀粉及其衍生物研究进展[J]. 食品与机械, 2020, 36(6): 208−213, 219. [XU S J, LI Z F. Research progress on starch and its derivatives in noodles[J]. Food and Machinery, 2020, 36(6): 208−213, 219.]
[21] 国家粮食局. LS/T 3212-2014 中华人民共和国粮食行业标准 挂面 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2014. [State Administration of Grain. LS/T 3212-2014 Grain industry standard of the People's Republic of China. Dried noodle[S]. Beijing: China Standards Press, 2014.]
[22] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 5009.3-2016 食品安全国家标准食品中水分的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. [National Health and Family Planning Commission. GB 5009.3-2016 National food safety standard. Determination of moisture in food[S]. Beijing: China Standards Press, 2016.]
[23] 李阳, 孙君庚, 王充, 等. 预糊化对荞麦挂面品质的影响[J]. 农产品加工, 2020(7): 50−53. [LI Y, SUN J G, WANG C, et al. Effect of pre-gelatinization on the quality of buckwheat noodles[J]. Farm Products Processing, 2020(7): 50−53.]
[24] PARK C S, BAIK B K. Cooking time of white salted noodles and its relationship with protein and amylose contents of wheat[J]. Cereal Chemistry Journal, 2004, 81(2): 165−171.
[25] YE X T, SUI Z Q. Physicochemical properties and starch digestibility of Chinese noodles in relation to optimal cooking time[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 84: 428−433.
[26] 章绍兵, 陆启玉. 直链淀粉含量对面粉糊化特性及面条品质的影响[J]. 河南工业大学学报 (自然科学版), 2005(6): 9−12. [ZHANG S B, LU Q Y. Effects of amylose content on flour pasting properties and noodle qualities[J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2005(6): 9−12.]
[27] PHONGTHAI S, DAMICO S, SCHOENLECHNER R, et al. Effects of protein enrichment on the properties of rice flour based gluten-free pasta[J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 80: 378−385.
[28] 田晓红, 谭斌, 吴娜娜, 等. 马铃薯泥和面对挂面品质的影响[J]. 中国食品学报, 2021(8): 193−199. [TIAN X H, TAN B, WU N N, et al. Effect of cooked mashed potato on dry noodle quality[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021(8): 193−199.]
[29] 鲁战会, 李里特. 淀粉的功能特性对面条食用品质的影响与评价[J]. 食品科技, 2002(6): 51−54. [LU Z H, LI L T. Effect of functional properties of starch on noodle quality and its evaluation[J]. Food Science and Technology, 2002(6): 51−54.]
[30] 任素民. 面粉对挂面品质影响研究[J]. 粮食与食品工业, 2018, 25(4): 42−44,48. [REN S M. Study on the effect of flour on dried noodle quality[J]. Cereal and Food Industry, 2018, 25(4): 42−44,48.]
[31] LI M, DHITAL S, WEI Y. Multilevel structure of wheat starch and its relationship to noodle eating qualities[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2017, 16(5): 1042−1055.
[32] DI MONACO R, CAVELLA S, MASI P. Predicting sensory cohesiveness, hardness and springiness of solid foods from instrumental measurements[J]. Journal of Texture Studies, 2008, 39(2): 129−149.
[33] YAO M, LI M, DHITAL S, et al. Texture and digestion of noodles with varied gluten contents and cooking time: The view from protein matrix and inner structure[J]. Food Chemistry, 2020,

315：126230.
［34］陈玉峰. 小麦粉中蛋白质和淀粉含量对面条品质的影响[J]. 粮食与油脂，2020，33(1)：82−85.［CHEN Y F. Effect of protein and starch content in wheat flour on noodle quality[J]. Cereals and Oils，2020，33(1)：82−85.］
［35］刘紫鹏，陆启玉. 添加木薯淀粉和谷朊粉对保湿熟面条品质的影响[J]. 食品工业科技，2017，38(20)：240−244,255.［LIU Z P，LU Q Y. Effect of adding cassava starch and wheat gluten on quality of moisturizing cooked noodles[J]. Science and Technology of Food Industry，2017，38(20)：240−244,255.］
［36］陆启玉，章绍兵. 蛋白质及其组分对面条品质的影响研究[J]. 中国粮油学报，2005，20(3)：13−17.［LU Q Y，ZHANG S B. Study on the effect of protein content and glutenin to gliadin ratio to noodle quality[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association，2005，20(3)：13−17.］
［37］SCHOFIELD J D，BOTTOMLEY R C，TIMMS M F，et al. The effect of heat on wheat gluten and the involvement of sulphydryl-disulphide interchange reactions[J]. Journal of Cereal Science，1983，1(4)：241−253.
［38］程红霞. 添加淀粉和蛋白对挂面力学特性的影响研究 [D]. 镇江：江苏大学，2011.［CHENG H X. Studies on the influence of starch and protein for mechanical properties of noodle[D]. Zhenjiang：Jiangsu University，2011.］
［39］杜巍，魏益民，张国权. 拉伸特性与面条品质关系的研究[J]. 西部粮油科技，2001(2)：21−23.［DU W，WEI Y M，ZHANG G Q. Study on the relation of extensograms and noodle quality[J]. Grain Processing，2001(2)：21−23.］
［40］SIM E，PARK E，MA F Y，et al. Sensory and physicochemical properties of whole wheat salted noodles under different preparations of bran[J]. Journal of Cereal Science，2020，96：103112.
［41］郭大存，周惠明. 添加剂对面条流变特性的影响[J]. 中国粮油学报，1997(3)：16−20.［DONG D C，ZHOU H M. Effects of additives on noodles’ rheological characteristics[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association，1997(3)：16−20.］
［42］LI P H，HUANG C C，YANG M Y，et al. Textural and sensory properties of salted noodles containing purple yam flour[J]. Food Research International，2012，47(2)：223−228.
［43］许牡丹，林娟，陈均志，等. 空心面品质评价方法的研究[J]. 食品科技，2012，37(8)：158−161.［XU M D，LIN J，CHEN J Z，et al. Method in quality evaluation of empty-inside noodles[J]. Food Science and Technology，2012，37(8)：158−161.］
［44］周占富. 面条品质改良剂的种类和作用探析[J]. 江苏调味副食品，2016(1)：3−6.［ZHOU Z F. Discussion on the type and function of noodle quality improvers[J]. Jiangsu Condiment and Subsidiary Food，2016(1)：3−6.］

袁灿, 何莲, 胡金祥, 等. 基于电子舌和电子鼻结合氨基酸分析鱼香肉丝调料风味的差异 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 48−55. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021070282
YUAN Can, HE Lian, HU Jinxiang, et al. The Flavour Difference of Yu-shiang Shredded Pork Seasoning Revealed by Electronic Nose, Electronic Tongue and Automatic Amino Acid Analyzer[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 48−55. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021070282

· 研究与探讨 ·

基于电子舌和电子鼻结合氨基酸分析鱼香肉丝调料风味的差异

袁　灿[1,2], 何　莲[1], 胡金祥[1], 林　丹[1], 乔明锋[1], 蔡雪梅[1], 彭毅秦[1], 易宇文[1,2,*]
(1.四川旅游学院, 四川成都 610100;
2.肉类加工四川省重点实验室, 四川成都 610106)

摘　要: 为实现快速、准确地鉴别鱼香肉丝调料的整体风味信息，本实验以市售不同品牌的鱼香肉丝调料为研究对象，采用电子鼻和电子舌分析不同品牌调料的气味和滋味差异性，并结合氨基酸分析，解析游离氨基酸与电子舌滋味特性之间的相关性。结果表明：电子鼻能够准确区分不同品牌鱼香肉丝调料的气味，样品 B 和 C 的香气相似，其它样品的香气差异明显。电子舌对于不同品牌鱼香肉丝调料的滋味区分较好，样品 D 的酸味较为突出，样品 A 的甜味较为突出，样品 E 在咸味和鲜味较为突出。在样品 E 中，谷氨酸、丙氨酸、丝氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸和组氨酸的味道强度值（TAV) 均大于 1，对鲜味和甜味呈味具有重要的贡献。偏最小二乘法分析（PLS）和 Pearson 相关系数关联性分析表明，电子舌的滋味特性与大部分游离氨基酸呈现正相关，其中酸味和甜味分别与苏氨酸和甘氨酸相关性显著（P<0.05），咸味、鲜味和苦味与谷氨酸相关性极显著（P<0.01）。可利用电子鼻、电子舌和氨基酸分析技术对鱼香肉丝调料鉴别。

关键词: 鱼香肉丝调料, 风味, 电子鼻, 电子舌, 氨基酸分析仪, 差异分析
中图分类号: TS201.2　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0048−08
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021070282
本文网刊:

The Flavour Difference of Yu-shiang Shredded Pork Seasoning Revealed by Electronic Nose, Electronic Tongue and Automatic Amino Acid Analyzer

YUAN Can[1,2], HE Lian[1], HU Jinxiang[1], LIN Dan[1], QIAO Mingfeng[1], CAI Xuemei[1], PENG Yiqin[1], YI Yuwen[1,2,*]
(1.Sichuan Tourism University, Chengdu 610100, China;
2.Meat Processing Key Lab of Sichuan Province, Chengdu 610106, China)

Abstract: In order to identify the overall flavor information of Yu-shiang Shredded Pork Seasoning quickly and accurately, the difference of the smell and taste analysis for different brands Yu-shiang Shredded Pork Seasoning were evaluated by electronic nose and electronic tongue, combined with automatic amino acid analyzer to study the relationship between the free amino acid and E-tongue taste property. This study indicated that the electronic nose could distinguish the different brands of Yu-shiang Shredded Pork Seasoning accurately. The aroma between B and C samples was relatively similar. Moreover, there were significant differences among the aroma of other samples. Electronic tongue could be better to distinguish the taste of various samples. The sour taste of D sample was outstanding, the sweet taste of A sample was highlighted, the salty and umami taste of E sample were prominent. The taste active value of glutamic acid, alanine, valine, phenylalanine and histidine in sample E was higher than 1.0, indicating that it had a great contribution to the umami and

收稿日期: 2021−07−26
基金项目: 四川省科技厅应用基础项目（2019YJ0344）; 四川省教育厅资助项目（18TD0043）; 四川旅游学院校级重点项目（19SCTUZZ11）; 肉类加工四川省重点实验室开放基金（19-R-17）。
作者简介: 袁灿（1987−）, 男, 博士, 讲师, 研究方向: 食品风味化学, E-mail: 389657360@qq.com。
*** 通信作者:** 易宇文（1980−）, 男, 硕士, 研究员, 研究方向: 传统调味品产业化, E-mail: 147684620@qq.com。

sweet taste of Yu-shiang Shredded Pork Seasoning. The analysis of partial least squae and Pearson correlations showed that the E-tongue taste property was positively associated with most free amino acid. The sour and sweet taste were significantly correlated with the concentrations of threonine and glycine respectively (P<0.05). Meanwhile, the significant correlation was found between the salty, umami and bitter taste and the contents of glutamic acid (P<0.01). E-nose, E-tongue and amino acids analysis are available to identify Yu-shiang Shredded Pork Seasoning.

Key words: Yu-shiang Shredded Pork Seasoning; aroma; electronic nose; electronic tongue; amino acid analyzer; variance analysis

鱼香肉丝作为经典川菜之一，以其味道独特、营养丰富而深受大众喜爱[1]。目前，市场上关于鱼香肉丝的调料种类繁多，调料的执行标准、加工工艺等均有所不同，导致调料的风味和品质千差万别[2]。风味作为食品的重要品质之一，由滋味和气味组成[3]。现阶段，对于鱼香肉丝的风味分析研究，多集中在感官评价和气相色谱-质谱联用（GC-MS）分析[4−6]。感官评价受到评鉴人员的主观因素和环境条件主导，使得结果相差较大，且费时费力[7]。GC-MS 检测样品周期较长，只能检测单一挥发性组分，测定结果无法反映样品的整体风味，具有一定的局限性[5−6]。

电子鼻（Electronic nose）和电子舌（Electronic tongue）是模仿人体嗅觉和味觉机理的仿生检测设备，具有检测周期短、样品处理简单、检测灵敏度高、结果可靠等优点，分别能够从气味和滋味方面识别样品中整体风味信息[8−10]。本课题组易宇文分别采用电子鼻和电子舌分析川渝地区不同品牌的鱼香肉丝调料差异性，结果表明电子鼻和电子舌可有效地区分样品[2,4]。与单独使用电子鼻和电子舌相比，电子鼻与电子舌结合使用可以综合评价气味和滋味信息。现阶段，电子鼻与电子舌结合使用已广泛应用于区分奶制品、茶叶、酱油、鸭肉等食品差异性研究[11−17]。目前，电子鼻与电子舌结合使用区分鱼香肉丝调料的差异性相关研究报道鲜少。因此，本文应用电子鼻、电子舌和氨基酸分析技术，从气味和滋味角度对不同品牌鱼香肉丝调料的风味品质进行检测，旨在为鱼香肉丝调料风味评价提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

不同品牌鱼香肉丝调料　购自于京东商城，样品信息见表 1；蔗糖 HPLC>98%　成都植标化纯生物技术有限公司；咖啡因 HPLC>99%　北京盛世康普化工技术研究院；磺基水杨酸　分析纯 AR，成都市科隆化学有限公司；去离子水（自制）。

FOX 4000 型电子鼻　法国 Alpha MOS 公司；Astree 电子舌　法国 Alpha MOS 公司；S-433D 全自动氨基酸分析仪　德国 Sykam 公司。

1.2　实验方法

1.2.1　电子鼻分析　电子鼻的传感器阵列由 18 种金属氧化物传感器组成，分布在主机的 3 个矩阵室，每个矩阵室有 6 根非专一性传感器，对一类或几类物质敏感。准确称量 2.00 g 样品，移至 10 mL 顶空进样瓶中，密封，进行电子鼻测定。顶空加热温度为 70 ℃，加热时间 300 s，载气（空气）流量 150 mL/s，进样量（顶空气体）500 μL，数据采集时间 120 s，数据采集延迟 180 s。不同品牌鱼香肉丝调料测定 8 次重复，取后 5 次稳定的测定结果进行分析。

1.2.2　电子舌分析　电子舌实验采用 Astree 电子舌第六套传感器，该套传感器包括 AHS-Sourcess，PKS，CTS-Saltiness，NMS-umami，CPS，ANS，SCS 共 7 根传感器，选择 Ag/AgCl 作为参比电极。AHS-Sourcess，CTS-Saltiness，NMS-umami 传感器分别对酸、咸、鲜具有专一性识别；对甜味、苦味、涩味等其它滋味须结合标准品实现识别。样品甜和苦味测定，分别以蔗糖和咖啡因作为标准品，分别配制以 0.06 mg/mL 为浓度梯度的 250 mL 蔗糖和咖啡因标准溶液（0~0.30 mg/mL），对不同的样品进行测定。通过传感器获得的数据结合 Alpha MOS 电子舌分析软件，能够获得样品在 0~10 之间的酸、咸、鲜、甜和苦味的相对强度值。利用强度值可对样品在酸、咸、鲜、甜和

表 1　样品信息

Table 1　Information of samples

样品编号	生产厂家	产地	配料
A	饭爷	北京	水、黄豆酱、食用盐、白砂糖、蚝油、鸡粉调味料、调味料酒、味精、鲜味汁（水、食用盐、小麦、食品添加剂（焦糖色，冰乙酸，呈味核苷酸二钠）、白砂糖、食用香精）、羟丙基二淀粉磷酸酯等。
B	秦妈	重庆市	菜籽油、辣椒、豆瓣、酿造食醋、白砂糖、泡姜、大蒜、大葱、食用盐、麦芽糊精、酿造酱油、味精、淀粉、食品添加剂（5′-呈味核苷酸二钠）。
C	好人家	成都市	食用盐、植物油、水、酿造酱油（含焦糖色）、白砂糖、味精、黄酒、香辛料、姜、花椒、八角、白胡椒、食用香精、焦糖色酵母抽提物、食用香料。
D	太太乐	上海市	白砂糖、水、酿造食醋（添加量≥20%）、盐渍辣椒（添加量≥6%）、郫县豆瓣（添加量≥6%）、大蒜、生姜、酿造酱油、淀粉、辣椒粉食用盐。
E	味好美	上海市	白砂糖、酱油粉（酿造酱油、麦芽糊精、食用盐）、味精、蒜粒、姜粉、食用盐、麦芽糊精、酸水解植物蛋白粉、葱屑、食品食品添加剂（硅酸钙、柠檬酸、5′-呈味核苷酸二钠、辣椒红、焦糖色）、泡椒粉（泡椒酱、麦芽糊精、食品添加剂（柠檬酸））、辣椒片、香辛料、食用香精含大豆和含麸质的谷物制品。
F	友加	成都市	辣椒、植物油、白砂糖、酿造食醋、蒜、姜、食用盐、豆瓣（含苯甲酸钠）、味精酿造酱油、山梨酸钾。

苦味维度上进行滋味强度排序。每个样品准确称量 10.00 g, 移至 100 mL 容量瓶, 用去离子水定容至 100 mL, 然后用超声波浸提 30 min, 而后取上清液备用。将 80 mL 滤液移至电子舌专用烧杯进行测定。设定电子舌测定条件为: 数据采集时间为 120 s, 采集周期为 1.0 s, 采集延迟 0 s, 搅拌速度1 r/s。每个样品测定 8 次重复, 取后 5 次的稳定值作为检测结果。

1.2.3 游离氨基酸分析 样品前处理参照周常义等[18]方法, 准确称取 1.00 g 样品于 50 mL 的容量瓶中, 加 0.01 mol/L 的盐酸 40 mL, 旋涡混匀 5 min, 超声处理 20 min 后, 定容。避光静置 2 h 后, 取 5 mL 置于离心器 10000 r/min 离心 4 min, 准确取 1 mL 上清液, 加入 9 mL 1% 磺基水杨酸水溶液, 涡旋 10 min, 避光静置 1 h, 10000 r/min 离心 5 min, 取 5 mL 用 0.22 μm 的水相膜过滤后上机分析。色谱分析条件: 色谱柱为 LCA K07/Li(150 mm×4.6 mm), 进样量为 50 μL, 检测波长为 570 nm、440 nm, 茚三酮流速为 0.25 mL/min, 柠檬酸锂缓冲溶液流动相流速为 0.45 mL/min, 反应器温度为 130 ℃。

1.3 数据处理

电子鼻和电子舌测定样品的数据, 经仪器自带软件直接进行主成分分析(Principal component analysis, PCA), 采用 Unscrambler(10.4 X)软件进行偏最小二乘法分析(Partial least squae analysis, PLS), 使用 SPSS 20.0 软件进行 Pearson 相关性分析, 并使用 Origin2019 作图。

2 结果与分析

2.1 电子鼻对不同品牌鱼香肉丝调料的气味分析

通过电子鼻分析鱼香肉丝调料的气味指纹图谱, 也称气味雷达图, 结果见图 1。图中为不同品牌鱼香肉丝调料对电子鼻 18 个传感器相应信号强度大小, 除 LY2/LG、LY2/G、LY2/AA、LY2/Gh、LY2/gCT1 和 LY2/gCT 传感器信号强度差异不明显, 其余 12 个传感器信号强度差异较为明显, 其中传感器 T30/1、P10/1、P10/2、P40/1、T70/2、PA/2、P30/1、P40/2、P30/2 信号响应强度大小顺序为: D>C=B>A>F>E。表 2 列出 18 个传感器对应敏感物质类型[18], 结合图 1 可知, LY2/LG、LY2/G、LY2/AA、LY2/Gh、LY2/gCT1 和 LY2/gCT 传感器对应敏感类物质如氮氧化合物、硫化物、丙酮、丙烷和丁烷等, 说明样品在以上该类型物质方面差异性不明显, 而剩余的传感器对极性物质、非极性物质(碳氢化合物类、氨、氯)、芳香类(甲苯、二甲苯)、胺类和氯类等物质敏感, 表明样品在以上该类型物质方面差异性显著。

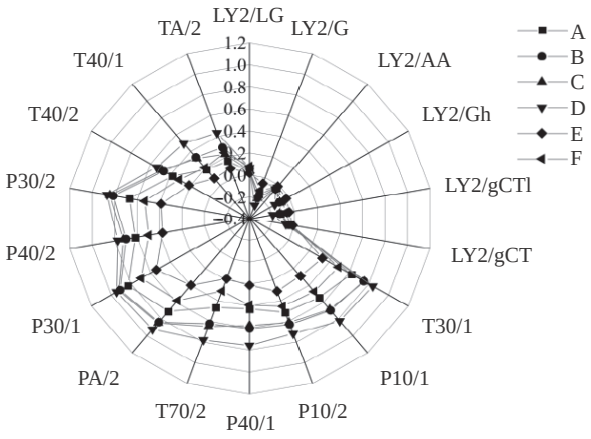


图 1 不同品牌鱼香肉丝调料的电子鼻雷达图

Fig.1 The radar chart of Yu-shiang Shredded Pork Seasoning of different brands

采用 PCA 分析鱼香肉丝调料的香气, 结果如图 2 所示。在图 2 中, 第一主成分(PC1)和第二主成分(PC2)的累积贡献率为 95.3%, 大于 80.0%, 表明主成分可以反映样品香气的整体信息[18−19]。鱼香肉丝调料的香气成分区域无重叠, 说明 PCA 分析法可以对其进行有效区分。PC1 贡献率远大于 PC2, 说明样品在横坐标距离越大, 其差异性越大[7]。样品的横坐标大小排列顺序为 D>C=B>A>F>E, 该顺序与雷达信号响应强度大小顺序相同。同时, 样品 B 和 C 的横坐标分布距离较近, 说明样品 B 和 C 二者的香气较为相似, 其它样品 A、D、F 和 E 的横坐标存在差异, 表明样品 A、D、F 和 E 香气差异性明显。

2.2 电子舌对不同品牌鱼香肉丝调料的滋味分析

图 3 为电子舌分析鱼香肉丝调料的滋味雷达图。由图 3 可见, 电子舌的传感器相对强度值存在明显差异, 表明电子舌可有效地区分不同样品的滋

表 2 传感器对应敏感物质类型

Table 2 Sensitive substance type of each sensor

序号	传感器名称	敏感物质类型	序号	传感器名称	敏感物质类型
1	LY2/LG	氯、氟、氮氧化合物、硫化物	10	P40/1	氟、氯
2	LY2/G	氨、胺类化合物、氮氧化合物	11	T70/2	甲苯、二甲苯、一氧化碳
3	LY2/AA	乙醇、丙酮、氨	12	PA/2	乙醇、氨水、胺类化合物
4	LY2/Gh	氨、胺类化合物	13	P30/1	碳氢化合物、氨、乙醇
5	LY2/gCTI	硫化物	14	P40/2	氯、硫化氢、氟化物
6	LY2/gCT	丙烷、丁烷	15	P30/2	硫化氢、酮
7	T30/1	极性化合物、氯化氢	16	T40/2	氯
8	P10/1	非极性; 碳氢化合物、氨、氯	17	T40/1	氟
9	P10/2	非极性; 甲烷、乙烷	18	TA/2	乙醇

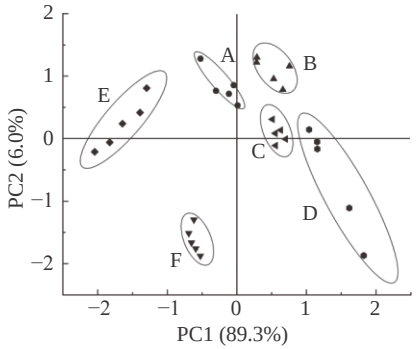


图 2　不同品牌鱼香肉丝调料电子鼻的主成分(PCA)分析二维图

Fig.2　PCA analysis 2D image of E-nose date for different brands Yu-shiang Shredded Pork Seasoning

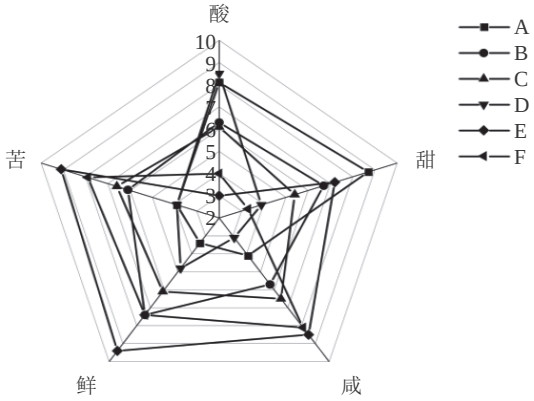


图 3　不同品牌鱼香肉丝调料的电子舌雷达图

Fig.3　The radar chart of Yu-shiang Shredded Pork Seasoning of different brands

味。不同样品的酸、咸、鲜、甜和苦 5 种味觉相对强度值从大到小的顺序为：咸味为 E>F>C>B>A>D，鲜味为 E>B>F>C>D>A，苦味为 E>F>C>B>D>A，酸味为 D>A>B>C>F>E，甜味为 A>E>B>C>D>F，表明不同样品的滋味存在明显差异。样品 E 在咸味、鲜味和苦味贡献较为突出，这可能是由于样品 E 水溶液中含有高浓度的水溶性离子型有机物和无机物等咸味贡献物质，如食用盐，并且可能还含有较高浓度的核苷酸、氨基酸等鲜味贡献物质[5,20]，如味精中谷氨酸钠、5′-呈味核苷酸二钠。样品 D 的酸味较为突出，可能由于样品 D 含有较高浓度的酸味贡献物[21]，如添加食醋(添加量≥20%)。同时，样品 A 的甜味较为突出，可能由于样品 A 含有较高浓度的蔗糖。

电子舌对鱼香肉丝调料滋味进行 PCA 分析，其主成分载荷矩阵如图 4 所示。由图 4 可见，第一主成分(PC1)和第二主成分(PC2)的累积贡献率为 89.3%，大于 80.0%，表明电子舌 PCA 分析能够反映样品滋味的整体信息。样品的数据点相对集中，说明样品的电子舌测定结果的稳定性相对较高，而不同样品的数据点分布于四个象限，表明样品的滋味差异性明显。载荷图是将对第一、二主成分贡献大的影响因子在 PCA 分析的二维图中表示出来，影响因子越靠近样品所在的二维坐标(x，y)，则说明载荷因子对其影响越大。图中鲜味和咸味对样品 E、C 和 F 的识别贡献较大，酸味对样品 A、B 和 D 的识别贡献较大。

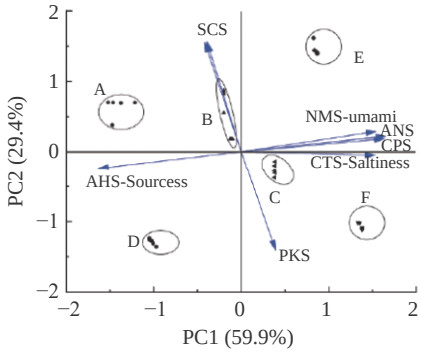


图 4　不同品牌鱼香肉丝调料电子舌的主成分(PCA)分析二维图

Fig.4　PCA analysis 2D image of E-tongue date for different brands Yu-shiang Shredded Pork Seasoning

2.3　不同品牌香肉丝调料游离氨基酸呈味贡献分析

氨基酸是一种重要的呈味物质，与滋味的形成密切相关，可进一步区分不同样品滋味的差异性，结果如表 3 所示。由表 3 可见，鱼香肉丝调料共检测出 21 种氨基酸，其中存在 6 种必需氨基酸，总游离氨基酸总量(TFAA)分布范围为 451.40~3017.30 mg/kg。根据味觉强度可分为鲜味氨基酸(Asp、Glu)、甜味氨基酸(Gly、Ala、Thr、Ser、Pro)、苦味氨基酸(Val、Ile、Leu、Phe、His、Tyr、Lys、Arg)和无味氨基酸(Ps、Cys、Met、β-Ala、HYP、Orn)[18]。不同味型的氨基酸含量排列顺序分别为：鲜味为 E>F>C>B>D>A，甜味为 E>A>B>D>C>F，苦味为 E>D>B>A>C>F。其中氨基酸的鲜味、甜味和苦味含量排列顺序与电子舌相对强度值顺序不同，这可能是由于甜味的呈味物质由蔗糖、麦芽糊精和氨基酸等物质组成，苦味呈味物质由阴阳离子半径之和较大的无机盐和氨基酸组成，进而导致样品的氨基酸含量排列顺序与电子舌不同。苦味氨基酸不具有味觉活性，通常被鲜味和甜味所掩盖[22]，因此，甜味氨基酸和鲜味氨基酸被视为构成鱼香肉丝滋味的主要成分。

味道强度值(Taste active value，TAV)来评价整体滋味的贡献，当 TAV 大于 1 时，该物质被认为对样品呈味贡献较大，当 TAV<1 时，表明物质对样品呈味贡献不明显[22]，样品的氨基酸 TAV 值列于表 3。表中样品中 TAV 大于 1 的氨基酸有谷氨酸、丙氨酸、丝氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、组氨酸和精氨酸，其中所有样品中谷氨酸的 TAV 值最大，表明所有样品的鲜味氨基酸对整体的滋味呈味贡献较大。同样，在甜味氨基酸中，只有样品 E 中丙氨酸和丝氨酸的 TAV 值大于 1，说明除样品 E 以外，样品 A、B、C、D 和 F 中甜味氨基酸对甜味贡献不明显。此外，在苦味氨基酸中，样品 E 的缬氨酸、苯丙氨酸和组氨酸以及样品 B 的精氨酸的 TAV 大于 1，但是，苦味通常被鲜味和甜味所掩盖不具有呈味活性[22]。分析表

表 3 不同鱼香肉丝调料游离氨基酸含量、阈值、呈现特性及 TAV 值

Table 3 The contents, thresholds, taste attributes and TVA of free amino acids in different brands Yu-shiang Shredded Pork Seasoning

呈味		滋味阈值(mg/kg)	游离氨基酸含量(mg/kg)						游离氨基酸的TAV值					
			A	B	C	D	E	F	A	B	C	D	E	F
鲜味	谷氨酸(Glu)	30	49.60	436.7	560.1	62.60	1749.2	1098.00	1.65	14.56	18.67	2.09	58.31	36.60
	天冬氨酸(Asp)	100	5.90	28.60	17.10	61.60	29.00	1.20	0.06	0.29	0.17	0.62	0.29	0.01
	合计		55.50	465.30	577.20	124.20	1778.20	1099.20	–	–	–	–	–	–
甜味	甘氨酸(Gly)	130	116.00	9.70	12.40	10.60	89.30	3.10	0.89	0.07	0.10	0.08	0.69	0.02
	丙氨酸(Ala)	60	34.70	41.40	30.80	29.7	195.20	9.80	0.58	0.69	0.51	0.50	3.25	0.16
	苏氨酸(Thr)	260	14.90	14.5	16.20	14.7	4.70	3.60	0.06	0.06	0.06	0.06	0.02	0.01
	丝氨酸(Ser)	150	27.0	19.4	18.40	25.0	155.30	5.10	0.18	0.13	0.12	0.17	1.04	0.03
	脯氨酸(Pro)	–	42.10	38.60	26.10	29.20	183.40	–	–	–	–	–	–	–
	合计		234.70	123.60	103.90	109.20	627.90	21.60	–	–	–	–	–	–
苦味	缬氨酸(Val)	40	19.60	22.40	26.10	15.30	121.50	4.40	0.49	0.56	0.65	0.38	3.04	0.11
	异亮氨酸(Ile)	90	17.90	13.50	–	18.10	55.50	3.70	0.20	0.15	0.00	0.20	0.62	0.04
	亮氨酸(Leu)	190	32.10	26.60	15.80	30.40	79.90	6.80	0.17	0.14	0.08	0.16	0.42	0.04
	苯丙氨酸(Phe)	90	21.30	16.30	8.70	20.60	109.40	6.80	0.24	0.18	0.10	0.23	1.22	0.08
	组氨酸(His)	20	8.50	3.60	5.10	7.40	38.70	1.70	0.43	0.18	0.26	0.37	1.94	0.09
	酪氨酸(Tyr)	–	13.90	10.50	40.70	9.20	37.60	–	–	–	–	–	–	–
	赖氨酸(Lys)	–	–	20.30	–	25.80	–	11.50	–	–	–	–	–	–
	精氨酸(Arg)	50	18.30	68.50	42.30	47.50	–	7.10	0.37	1.37	0.85	0.95	–	0.14
	合计		131.6	172.16	96.4	174.3	442.6	42.00	–	–	–	–	–	–
无味	磷酸丝氨酸(Ps)	–	3.40	57.40	5.30	3.00	19.50	2.90	–	–	–	–	–	–
	胱氨酸(Cys)	–	–	4.50	–	3.70	26.10	–	–	–	–	–	–	–
	蛋氨酸(Met)	30	4.30	–	4.00	–	1.90	–	0.14	–	0.13	–	–	–
	β-丙氨酸(*β*-Ala)	–	–	–	23.60	22.70	–	–	–	–	–	–	–	–
	鸟氨酸(Orn)	–	4.40	5.40	8.37	14.30	121.10	–	–	–	–	–	–	–
	羟脯氨酸(HYP)		27.70	35.9	27.00	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	合计		39.80	103.20	68.27	43.70	168.60	2.90	–	–	–	–	–	–
总游离氨基酸(TFAA)			461.60	864.26	845.77	451.40	3017.30	1165.70						
呈味氨基酸(DAA)			421.80	761.060	777.50	407.70	2848.70	1162.80						
DAA/TFAA(%)			91.38	88.06	91.93	90.32	94.41	99.75						

明样品 E 的鲜味氨基酸和甜味氨基酸对整体滋味贡献显著。

将游离氨基酸采用归一化法绘制聚类热图，结果如图 5 所示。由图 5 可见，21 种氨基酸可分为 2 个大聚类，其中聚类 1 大部分是由苦味和无味氨基酸组成，聚类 2 大部分则是由甜味和鲜味氨基酸组成。同时，不同调料的聚类可分为 2 个大聚类，其中大聚类 1 为样品 E，聚类 2 由其它 5 种调料组成，说明样品 E 与其它样品的滋味差异明显。

2.4 电子舌滋味特性与游离氨基酸相关性分析

以游离氨基酸为自变量 X，电子舌滋味特性为因变量 Y 进行偏最小二乘法分析(PLS)，其相关性分析结果如图 6 所示。在 PLS 模型中，自变量和因变量之间的距离表明二者之间的相关性，距离越近，正相关性越强[22−23]。图中酸味与苏氨酸和羟脯氨酸相关性密切，鲜味、咸味和苦味与谷氨酸相关性密切，甜味与甘氨酸、丙氨酸和蛋氨酸相关性密切。

为进一步探究不同样品的呈味氨基酸和电子舌滋味特性的相关性，Pearson 相关系数用于确定每一个电子舌滋味特性正相关的呈味氨基酸，一般情况下，相关系数|*r*|在 0.8~1.0 之间表示极强相关，0.6~0.8 之间表示强相关，0.4~0.6 之间表示中等强相关，02~0.4 之间表示弱相关[24−25]。由图 7 可见，电子舌滋味特性与呈味氨基酸呈现相关性。酸味与苏氨酸和精氨酸呈现强相关，其中与苏氨酸相关性显著(P<0.05)。甜味与甘氨酸、丙氨酸、亮氨酸和蛋氨酸呈现强相关，其中与甘氨酸相关性显著(P<0.05)。咸味与谷氨酸、缬氨酸和鸟氨酸呈现强相关，鲜味与谷氨酸、丝氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、胱氨酸和鸟氨酸呈现强相关，苦味与谷氨酸、丝氨酸、缬氨酸、胱氨酸和鸟氨酸呈现强相关，其中咸味、鲜味和苦味均是与谷氨酸相关性极显著(P<0.01)，结果与氨基酸结果不同，这可能是由于调料的原料中含有咸味肽和苦味肽，呈味多肽分解可增加谷氨酸的含量，并且咸味肽也可以呈现出鲜味[26−27]，使得咸味和苦味与谷氨酸相关性显著。

3 结论

本文利用电子鼻、电子舌和氨基酸检测对不同

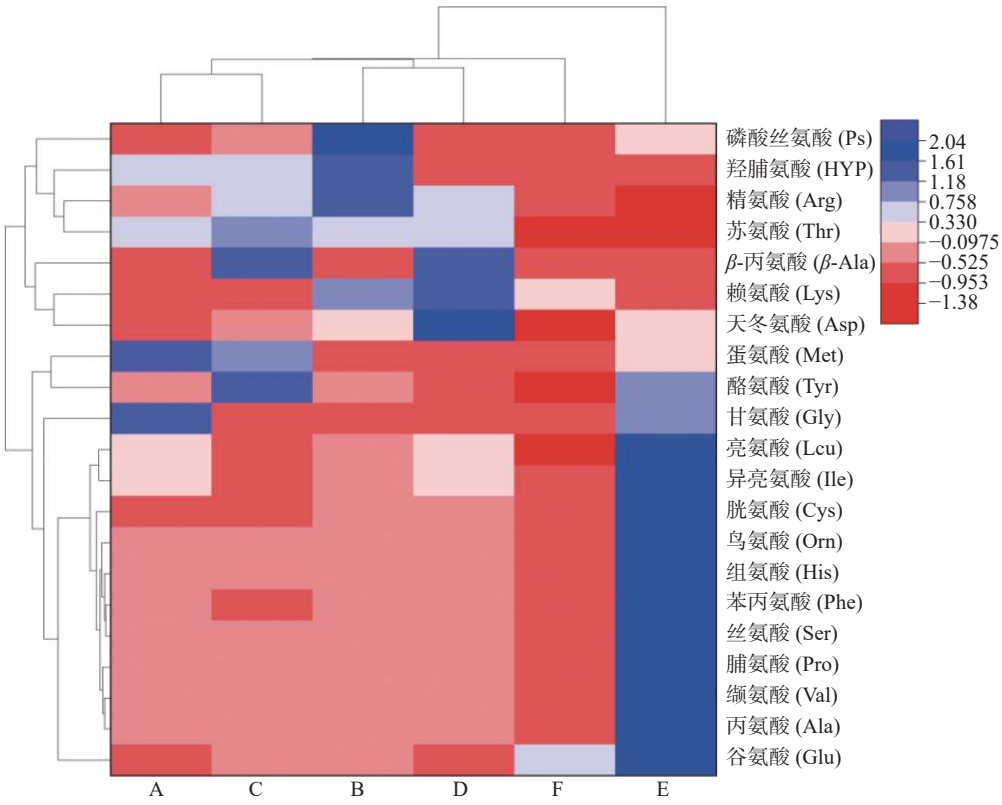


图 5　不同品牌鱼香肉丝调料聚类分析热图

Fig.5　The heat map of cluster analysis for different brands Yu-shiang Shredded Pork Seasoning

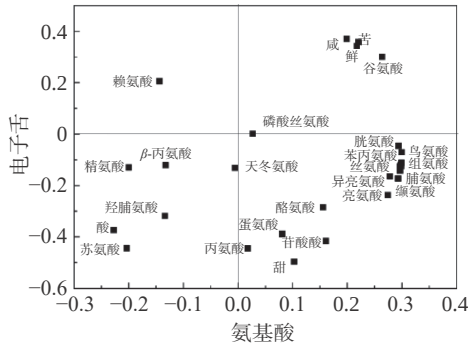


图 6　游离氨基酸与电子舌 PLS 相关性分析

Fig.6　PLS correlational analyses of free amino acids and E-tongue

注：X-expl: 71.4%, 14.8%; Y-expl: 52.3%, 17.9%。

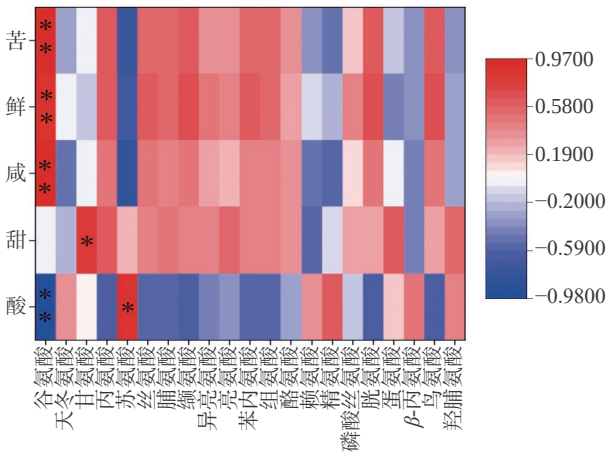


图 7　电子舌和游离氨基酸 Pearson 相关性图

Fig.7　Pearson corrrelation map of E-tongue and free amino acids

注：每个方格表示皮尔逊的相关数值(R)，其中“*”表示相关性显著(P<0.05)，“**”表示相关性极显著(P<0.01)；正(0<r<1)和负(−1<r<0)相关性分别由红色和蓝色表示。

品牌的鱼香肉丝调料进行分析，采用主成分(PCA)、聚类分析、Pearson 相关系数和偏最小二乘法(PLS)对调料风味的差异性进行区分。结果表明：电子鼻中 12 个传感器的响应强度差异性明显，其中碳氢化合物、芳香类、胺类和氯类差异显著。PCA 分析法可以有效地区分不同品牌鱼香肉丝调料的香气，样品 B 和 C 的香气较为相似，其它样品的香气差异明显。

电子舌和氨基酸分析可见，不同品牌鱼香肉丝调料在滋味上存在差异性，其中样品 D 的酸味较为突出，样品 A 的甜味较为突出，样品 E 在咸味和鲜味较为突出。同时，在样品 E 中，鲜味氨基酸和甜味氨基酸对整体滋味贡献显著。不同品牌鱼香肉丝调料的滋味特性与大部分游离氨基酸呈现正相关，其中酸味和甜味分别与苏氨酸和甘氨酸相关性显著(P<0.05)，咸味、鲜味和苦味与谷氨酸相关性极显著(P<0.01)。综上所述，电子鼻、电子舌结合氨基酸检测技术，可凸显样品风味的差异性，为鱼香肉丝调料的风味品质差异性研究提供新思路和理论支持。

参考文献

[1] 董铁有，李素云，朱文学. 典型中华菜肴鱼香肉丝的真空冷冻干燥工艺研究[J]. 干燥技术与设备，2004，2(4)：23−27.
[DONG T Y, LI S Y, ZHU W X. Vacuum freeze drying of typical

Chinese food of Yu-Shiang shredded pork[J]. Drying Technology & Equipment, 2004, 2(4): 23−27.]
[2] 易宇文, 范文教, 乔明锋, 等. 7 种鱼香肉丝调料智能嗅觉识别[J]. 食品与机械, 2017, 33910: 27−30. [YI Y W, FAN W J, QIAO M F, et al. Discrimination of seven Yu-Shiang shredded pork sauces based on electronic nose[J]. Food and Machinery, 2017, 33910: 27−30.]
[3] 熊科, 夏延斌. 菜肴风味和调味研究[J]. 中国食物与营养, 2007, 2: 54−55. [XIONG K, XIA Y B. Study on flavor and seasoning of dishes[J]. Food and Nutrition in China, 2007, 2: 54−55.]
[4] 易宇文, 范文教, 彭毅秦, 等. 鱼香调味汁人工感官评价与电子舌感官分析相关性研究[J]. 食品科技, 2017, 42(11): 290−292. [YI Y W, FAN W J, PENG Y Q, et al. Research on the correlation between electronic tongue analysis and sensory evaluation of spicy garlic sauce[J]. Food Science and Technology, 2017, 42(11): 290−292.]
[5] 贾洪峰, 梁爱华, 秦文, 等. 气质联用法分析鱼香肉丝中的挥发性风味物质[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(3): 121−124. [JIA H F, LIANG A H, QIN W, et al. Determination of volatile flavor compounds in 'YuXiangRouSi' by GC-MS[J]. Food Research and Development, 2011, 32(3): 121−124.]
[6] 张玥琪, 张慧莺, 陈海涛, 等. 鱼香肉丝挥发性风味成分的分离与鉴定[J]. 精细化工, 2014, 31(4): 1220−1224. [ZHANG Y Q, ZHANG H Y, CHEN H T, et al. Analysis of volatile flavor compounds in Yu-Shiang shredded pork[J]. Fine Chemicals, 2014, 31(4): 1220−1224.]
[7] 蓬桂华, 李文馨, 殷勇, 等. 电子鼻和电子舌在分析桑果汁风味上的应用[J]. 食品工业科技, 2020, 41(12): 234−237. [PENG G H, LI W X, SUN X J, et al. Analysis of flavor difference of mulberry juice by e-nose and e-tongue[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(12): 234−237.]
[8] 文攀, 薛长风, 裴志胜, 等. 基于电子舌与电子鼻评价烘培时间对黄秋葵籽风味品质的影响[J]. 食品工业科技, 2018, 39(24): 289−293. [WEN P, XUE C F, PEI Z S, et al. Effect of baking time on flavour quality of okra seed based on electronic tongue and electronic nose[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(24): 289−293.]
[9] 邹光宇, 王万章, 王森森, 等. 电子鼻/舌融合技术的信阳毛尖茶品质检测[J]. 食品科学, 2019, 40(10): 279−284. [ZHOU G Y, WANG W Z, WANG M S, et al. Quality detection of Xinyang Maojian tea using electronic nose and electronic tongue[J]. Food Science, 2019, 40(10): 279−284.]
[10] TAN J Z, XU J. Applications of electronic nose (e-nose) and electronic tongue (e-tongue) in food quality-related properties determination: A review[J]. Artificial Intelligence in Agriculture, 2020, 4: 104−115.
[11] LI X, ZHU J, LI C, et al. Evolution of volatile compounds and spoilage bacteria in smoked bacon during refrigeration using an e-nose and GC-MS combined with partial least squares regression [J]. Molecules, 2018, 23: 3286.
[12] TIAN X, LI Z J, CHAN Y Z, et al. Evaluation by electronic tongue and headspace-GC-IMS analyses of the flavor compounds in dry-cured pork with different salt content[J]. Food Research International, 2020, 137: 109456.
[13] JUANG H Y, HAN S K, MI J K, et al. Comparison of a descriptive analysis and instrumental measurements (electronic nose and electronic tongue) for the sensory profiling of Korean fermented soybean paste (*doenjang*)[J]. Journal of Sensory Studies, 2017, 32(5): 1−11.
[14] 徐宝才, 李聪, 马倩, 等. 基于电子鼻和电子舌分析盐水鸭风味的差异性[J]. 中国食品学报, 2017, 17(12): 279−282. [XU B C, LI C, MA Q, et al. Analysis on the flavor difference of salted duck based on the electronic nose and electronic tongue[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2017, 17(12): 279−282.]
[15] 易宇文, 胡金祥, 刘阳, 等. 电子鼻和电子舌联用技术在评价酱油风味中的应用[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(14): 155−161. [YI Y W, HU J X, LIU Y, et al. Application of electronic nose and electronic tongue in soy sauce flavor differentiation[J]. Food Research and Development, 2019, 40(14): 155−161.]
[16] HONG X H, WANG J. Detection of adulteration in cherry tomato juices based on electronic nose and tongue: Comparison of different data fusion approaches[J]. Journal of Food Engineering, 2014, 126(4): 89−97.
[17] 李双艳, 邓力, 汪孝, 等. 基于电子鼻、电子舌比较分析冷藏方式对小香鸡风味的影响[J]. 肉类研究, 2017, 31(4): 50−55. [LI S Y, DENG L, WANG X, et al. Comparative analysis of the effect of different storage methods on the flavor of small fragrant chicken broth by electronic nose and electronic tongue[J]. Meat Research, 2017, 31(4): 50−55.]
[18] 周常义, 沈会玲, 江锋, 等. 鱼腐乳发酵过程中游离氨基酸含量及抗氧化活性的变化[J]. 中国酿造, 2020, 39(12): 42−45. [ZHOU C Y, SHEN H L, JIANG F, et al. Changes of free amino acid contents and antioxidant activity during fermentation process of fish sufu[J]. China Brewing, 2020, 39(12): 42−45.]
[19] 肖阳, 张玥琪, 郭贝贝, 等. 两种方式加工鱼香肉丝的 SDE-GC-MS 挥发性风味成分对比[J]. 食品科学, 2015, 36(14): 70−73. [XIAO Y, ZHANG Y Q, GUO B B, et al. Comparison of volatile flavor compounds in Yu-Shiang shredded pork processed by two different methods by SDE-GC-MS[J]. Food Science, 2015, 36(14): 70−73.]
[20] 童文烽, 袁继红, 周仁客, 等. 鱼香肉丝在烹饪前后营养成分的评价[J]. 食品工业科技, 2020, 41(10): 306−311. [TONG W F, YUAN J H, ZHOU R K, et al. Evaluation of nutrient composition of fish-flavored pork before and after cooking[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(10): 306−311.]
[21] 张建萍, 解春芝. 不同腐乳酱营养、功能及呈味氨基酸量化表征[J]. 食品科学, 2020, 41(6): 245−250. [ZHANG J P, XIE C Z. Analysis of nutritional and functional components and taste amino acids of different commercial brands of sufu paste[J]. Food Science, 2020, 41(6): 245−250.]
[22] 雷文平, 周辉, 周杏荣, 等. SPME-GC-MS 结合组学技术分析发酵椰奶特征风味与风味物质相关性[J]. 食品与机械, 2019, 35(2): 42−47. [LEI W P. HUANG H, ZHOU X R, et al. Flavor components of fermented coconut milk using omics technology combined with SPME-GC-MS[J]. Food & Machinery, 2019,

35(2)：42−47.］

［23］ 周纲，黄瑞，刘度度，等. 基于改进 K-means 聚类和皮尔逊相关系数户变关系异常诊断 [EB/OL]. 电测与仪表 [2021-6-1]. https://kns.cnki.net/kcms/detail/23.1202.th.20210531.1707.013.html.
［ZHOU G, HUANG R, LIU D D, et al. Abnormal diagnosis of household variable relationship based on improved K-means clustering and Pearson correlation coefficient[EB/OL]. Electrical Measurement & Instrumentation [2021-6-1]. https://kns.cnki.net/kcms/detail/23.1202.th.20210531.1707.013.html.］

［24］ HUANG A, JIANG Z D, TAO M, et al. Targeted and nontargeted metabo; omics analysis for determining the effect of storage time on the metabolites and taste quality of Keemun black tea[J]. Food Chemistry, 2021, 359: 129950.

［25］ OUYANG Q, YANG Y C, WU J Z, et al. Measurement of total free amino acids content in black tea using electronic tongue technology coupled with chemometrics[J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 118: 108768.

［26］ ZHU X P, SUN-WATERHOUSE D X, CHEN J H, et al. Bitter-tasting hydrophobic peptides prepared from soy sauce using aqueous ethanol solutions influence taste sensation[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2019, 7: 1−6.

［27］ ZHAO Y Q, ZHAO X, SUN-WATERHOUSE D X, et al. Two-stage selective enzymatic hydrolysis generates protein hydrolysates rich in Asn-Pro and Ala-His for enhancing taste attributes of soy sauce[J]. Food Chemistry, 2021, 345: 128803.

王立宇, 夏杨毅, 赵鸾. 碱发温度对毛肚胶原蛋白结构的影响 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 56−62. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080119

WANG Liyu, XIA Yangyi, ZHAO Luan. Effect of Temperatures during the Lye Macerating on the Structure of Tripe Collagen[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 56−62. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080119

·研究与探讨·

碱发温度对毛肚胶原蛋白结构的影响

王立宇[1], 夏杨毅[1,2,*], 赵　鸾[1]

（1.西南大学食品科学学院, 重庆 400700;
2.重庆市特色食品工程技术研究中心, 重庆 400700）

摘　要: 本文采用酸酶复合法提取毛肚胶原蛋白为原料，利用紫外分光光度计、荧光分光光度计、红外光谱仪和扫描电镜等，分析 NaOH 涨发温度（40~60 ℃）对毛肚胶原蛋白结构的影响。结果表明，NaOH 涨发会导致毛肚胶原蛋白紫外吸收强度减小；随着涨发温度升高，毛肚胶原蛋白荧光强度逐渐降低，巯基含量逐渐增加，导致胶原蛋白变性程度逐渐加深最终完全变性；当涨发温度高于 60 ℃，毛肚胶原蛋白表面疏水性呈现下降趋势。随着涨发温度的升高，毛肚胶原蛋白微观结构表现为胶原分子收缩，逐渐卷曲，加快凝集，缝隙减小，片状胶原破碎。因此，NaOH 涨发会破坏毛肚胶原蛋白二级结构，表现为断裂、破碎、拉伸、疏松，且不同涨发温度对胶原蛋白结构具有显著影响。

关键词: 毛肚, 胶原蛋白, 温度, 蛋白结构表征
中图分类号: TS251.9　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0056−07
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080119
本文网刊:

Effect of Temperatures during the Lye Macerating on the Structure of Tripe Collagen

WANG Liyu[1], XIA Yangyi[1,2,*], ZHAO Luan[1]

（1.College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400700, China;
2.Chongqing Special Food Programme and Technology Research Center, Chongqing 400700, China）

Abstract: In this paper, acidase compound method was used to extract collagen from tripe. The effects of NaOH rising temperature (40~60 ℃) on collagen structure of tritrium hairy were analyzed by UV spectrophotometer, fluorescence spectrophotometer, infrared spectrometer and scanning electron microscope. The results showed that the the lye macerating of tripe could decrease the UV absorption intensity of collagen in tribolus. With the increase of temperature during the lye macerating of tripe, the fluorescence intensity of collagen decreased and the content of sulfhydryl group increased. It indicated that heating treatment will gradually deepen the degeneration degree of collagen and eventually complete degeneration. When the temperature was 60 ℃, the surface hydrophobicity of tribolus collagen decreased. With the increase of temperature during the lye macerating of tripe, the microstructure of collagen of tripe showed that collagen molecules shrunk, gradually curled, accelerate agglutination, gap decrease and flake collagen was broken. Therefore, NaOH can destroy the secondary structure of collagen in tripe, presenting as fracture, fragmentation, stretching and loosening, and different temperature of hyperplasia has a significant impact on the structure of collagen.

Key words: tripe; collagen; temperature; protein structure characterization

毛肚口感独特, 作为火锅特色菜品发展潜力巨大。新鲜毛肚通常采用食用碱或蛋白酶进行涨发加工, 其中食品级 NaOH 涨发是最适合发制毛肚的方法[1], 经过处理后口感脆嫩化渣。目前, 关于毛肚的

收稿日期: 2021−08−12
基金项目: 梁平区水禽和甜茶特色食品产业化关键技术集成与应用（cstc2020jscx-tpyzxX0010）。
作者简介: 王立宇（1996−）, 男, 硕士研究生, 研究方向: 现代食品加工技术, E-mail: 1258722715@qq.com。
*** 通信作者:** 夏杨毅（1970−）, 男, 博士, 副教授, 研究方向: 现代食品加工技术, E-mail: 2658355128@qq.com。

研究主要集中在涨发过程中的不同工艺和条件优化等方面[2]，其中研究表明涨发温度对毛肚产品品质有很大影响，如碱处理毛肚在 25 ℃ 可以获得最大增重比[3]，碳酸钠处理毛肚在 43 ℃ 时获得最佳感官评价[4]，但是关于毛肚蛋白在涨发过程中的性质变化却鲜有报道。

蛋白质的结构和理化特性对肉制品品质有重要影响，而热处理温度等条件会改变蛋白结构从而影响蛋白质性能。研究表明，不同加工温度处理手段下蛋白的结构存在明显差异[5]，升高加工温度会导致鱼鳞胶原蛋白中无规则卷曲部分占比增大[6]；肌原纤维蛋白二级结构会随温度升高发生改变甚至变性和聚集[7]；升高温度时肌原纤维蛋白的表面疏水性则先增大后减小，蛋白质的变性程度逐渐加深[8]，是导致刺身蛋白结构变化的主要原因[9]。

毛肚富含胶原蛋白，因此胶原蛋白的结构特性对毛肚品质有重要影响[10]。盐渍处理对新鲜毛肚胶原蛋白结构具有显著影响[11]，但涨发条件尤其是涨发温度对毛肚胶原蛋白结构变化研究仍为空白。为进一步探究碱发温度对毛肚胶原蛋白的影响，本文选取毛肚为原料，采用 NaOH 碱发工艺，探究不同涨发温度对胶原蛋白结构的影响，以期为毛肚安全加工和批量生产提供理论依据和科学指导。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

黄牛毛肚　购于重庆市南岸区水产批发市场，低温保藏运输至实验室后立即处理。置于−20 ℃ 贮藏备用，使用前于 4 ℃ 的冰箱中解冻；氯化钠、盐酸、氢氧化钠、甲醇、冰醋酸　重庆市钛新化工有限公司；胃蛋白酶（1∶10000）　范德生物科技有限公司；EDTA、二水磷酸二氢钠、溴酚蓝、四水酒石酸钾钠　上海源叶生物科技有限公司；五水硫酸铜　Aladdin 公司；甘氨酸　Macklin 公司；乙二胺四乙酸　Biosharp 公司；叠氮化钠　成都市科龙化工试剂厂；以上皆为分析纯。尼罗蓝　Adamas 公司；荧光白　上海阿拉丁试剂公司；Tris　biotopped 公司；溴酚蓝　coolaber 公司；牛血清蛋白　Biofroxx 公司；SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒　北京索来宝科技有限公司；考马斯亮蓝 R250　上海拓旸生物科技有限公司。

FA2004 分析天平　上海精密科学仪器有限公司；5810 型台式高速离心机　德国 Eppendorf 公司；SYNERGYH1MG 型全波长酶标仪　美国基因公司；85-2C 磁力搅拌器、HX-HH600A4 光合水浴锅　常州普天仪器制造有限公司；TGL-16 型医用冷冻离心机　四川蜀科仪器有限公司；UV-1900 紫外分光光度仪　上海菁华科技仪器有限公司；F-2500 荧光分光光度计　日本 Hitachi 公司；Spectrun l00 红外光谱仪　美国 PerkinElmer 公司。

1.2　实验方法

1.2.1　涨发温度对毛肚胶原蛋白结构的影响　选取清洗处理后毛肚为原料，在料液比（w/v）为 1∶3.6，食品级 NaOH 溶液浓度为 5 mg/mL，时间为 30 min 条件下，设置不同温度处理组（40、45、50、55、60 ℃），室温为未处理组，研究不同涨发温度对毛肚胶原蛋白结构的影响。

1.2.2　毛肚胶原蛋白的提取　参考曲文娟等[12−14] 的做法，并略作修改。去除新鲜毛肚的表面异物后清洗干净。200 g 毛肚切碎后按照 1∶10（w/v）的固液比添加 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液，浸泡 72 h 除去色素和杂质蛋白。用超纯水洗至中性 pH。按照 1∶10（w/v）的固液比添加 10% 的正丁醇溶液，浸泡 48 h 除去多余的脂肪，用超纯水清洗。按照 1∶10（w/v）的固液比添加含有胃蛋白酶（酶活力 1∶10000）的 0.1 mol/L 醋酸溶液，搅拌 72 h。将滤液收集起来合并后用透析袋（分子截留量为 8000~14000 kDa）透析脱盐 24 h，真空冷冻干燥、封口包装，并将样品置于−20 ℃ 的冰箱中，供测定指标使用。将处理后的胶原溶液调节 pH 至 7.0 左右，透析、真空冷冻干燥。以上所有操作均在低温下进行。

1.2.3　紫外光谱的测定　采用 0.1 mol/L 冰醋酸溶液溶解不同涨发温度处理后冻干的毛肚的胶原蛋白，制备成 0.5 mg/mL 胶原蛋白溶液，测量毛肚的胶原蛋白紫外吸收光谱（190~400 nm）。

1.2.4　红外光谱的测定　参考 Noorzai 等[15] 的方法，略作修改。取 1 mg 经过冷冻干燥后的样品，加入 100 mg KBr 于研钵中研磨均匀，在 500~4000 cm^{-1} 下扫描。利用测试软件对毛肚胶原蛋白的红外光谱进行自动基线校正、平滑、标准化处理后，导出原数据。再利用 Peakfit 4.12 处理，毛肚胶原蛋白酰胺 I 区（1600~1700 cm^{-1}），依次进行相关基线校正、Gaussian 去卷积、二阶导数拟合，分别分析毛肚的胶原蛋白二级结构组成的变化。

1.2.5　荧光光谱的测定　采用 0.1 mol/L 冰醋酸溶液溶解不同涨发温度处理后冻干的毛肚的胶原蛋白，制备成 0.5 mg/mL 胶原蛋白溶液，测量毛肚的胶原蛋白荧光光谱（310~400 nm）。

1.2.6　表面疏水性的测定　采用 0.1 mol/L 冰醋酸溶液溶解制作不同加工温度处理组盐渍毛肚的 1.0 mg/mL 胶原蛋白溶液，取 1 mL 上述胶原溶液和 200 μL 1.0 mg/mL 溴酚蓝溶液加入离心管中，漩涡保持 10 min，离心 10 min（8000×g），取 0.4 mL 离心上清液，加入 3.6 mL 0.1 mol/L 醋酸溶液，振荡混匀，在 595 nm 处测定不同温度处理组胶原溶液的吸光值（$A_{样品}$），同时使用 0.1 mol/L 醋酸溶液作为空白组（$A_{空白}$）。胶原蛋白的表面疏水性采用如下公式计算：

$$溴酚蓝(\mu g) = \frac{A_{空白} - A_{样品}}{A_{空白}}$$

1.2.7　巯基含量的测定　采用 Disimplicio[16] 的方法，略作修改。使用 0.1 mol/L 冰醋酸溶液溶解不同

涨发温度处理组的胶原蛋白，配制 1.0 mg/mL 的蛋白溶液。加入 9.0 mL Tris-甘氨酸溶液（0.086 mol/L Tris, 0.09 mol/L 甘氨酸，4 mmol/L EDTA，pH8.0），离心 15 min（10000×g），取 4.5 mL 上清液加 0.5 mL Ellman 试剂（4 mg 5,5'-二硫基双-2-硝基苯甲酸溶解于 1.0 mL 的 Tris-甘氨酸缓冲液），振荡混匀后，25 ℃条件保持 30 min，同时使用 0.1 mol/L 醋酸溶液作为对照组，在 412 nm 下测定吸光度。公式为：

$$\text{巯基含量(nmoL/mg)} = \frac{A_{412\,nm}}{13600\times\rho}\times\text{稀释倍数}\times10^6$$

式中：13600 为摩尔消光系数（L·cm/mol），ρ 表示胶原质量浓度（mg/mL）。

1.2.8 扫描电镜分析 分别将冻干的毛肚胶原蛋白固定喷金，设置加速电压为 10 V，使用扫描电镜观察毛肚的胶原蛋白微观结构。

1.3 数据处理

采用 Microsoft Excel 2010 进行数据处理；采用 SPSS 19.0 统计分析软件进行方差分析和显著性检验；采用 Origin 2018 进行图像处理。所有试验均做 3 次重复测定，试验数据采用平均值±标准偏差形式表示。

2 结果与分析

2.1 毛肚胶原蛋白的紫外可见光谱分析

如图 1 所示，毛肚胶原蛋白在 228 nm 处出现最大吸收波长，与报道一致[17−18]。不同温度处理组的毛肚胶原蛋白的吸光度强度均低于未处理组，且不同涨发温度毛肚胶原蛋白的吸光度不同。随着加工温度的升高，最大吸收峰强度先降低再升高后又降低，毛肚胶原蛋白 280 nm 附近最大吸收峰波长的变化趋势与 230 nm 波段保持一致。说明不同涨发温度使毛肚胶原骨架发生了明显变化，这是由于蛋白展开过程中一些疏水性残基通过加热产生三重螺旋[19]，胶原氨基酸的残基所处环境发生了改变。

2.2 毛肚胶原蛋白的红外光谱分析

如图 2 及表 1 所示，酰胺 A 区与 N-H 的伸缩振动相关，当 N-H 参与生成氢键时其吸收峰发生蓝移[20]。与未处理组相比，处理组酰胺 A 区最大吸收波长红移。45 ℃处理组红移至 3410.64 cm^{-1}，明显高于其他各处理组。随着加工温度的升高，酰胺 A 区的最大吸收波长先红移后蓝移再红移，说明涨发处理会破坏毛肚胶原蛋白内部的氢键数量，且温度不同、破坏胶原蛋白内部氢键数量不一样[21]。酰胺 I、II 和 III 区的范围能够影响蛋白质的结构，酰胺 I 区与肽链内羰基（C=O）的拉伸振动相关，是研究蛋白质二级结构的重要区带[22]。与未处理组相比，处理组酰胺 I 区最大吸收波长蓝移。酰胺 I 区最大吸收波长随温度升高先升高后降低，与酰胺 A 区变化趋势相反，可能是由于升高涨发温度导致毛肚胶原蛋白内部的氢键平衡状态被破坏[23]。酰胺 II 区与 C-N 拉伸耦合及 N-H 伸缩振动相关，酰胺 III 区参与生成胶原蛋白的三螺旋结构，可以反映胶原蛋白特性[15]。

采用 Peakfit 4.12 处理毛肚胶原蛋白酰胺 I 区（1600~1700 cm^{-1}），依次进行相关基线校正、Gaussian 去卷积、二阶导数拟合，得到不同涨发温度处理后的毛肚胶原蛋白分峰图谱。未处理组含有 11 个峰，不同温度处理组则含有 10 个峰，如图 3 所示。毛肚胶原蛋白二级结构组成的变化如图 4 所示。

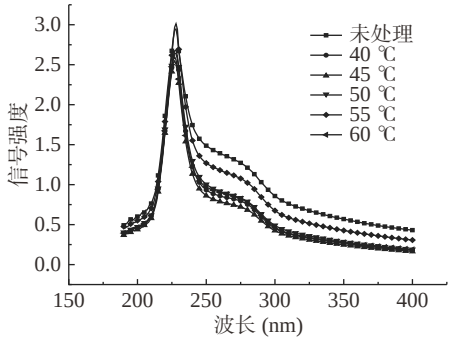


图 1 不同涨发温度处理毛肚胶原蛋白紫外可见光谱图

Fig.1 UV absorbance spectrum of tripe collagen at different temperatures during the lye macerating

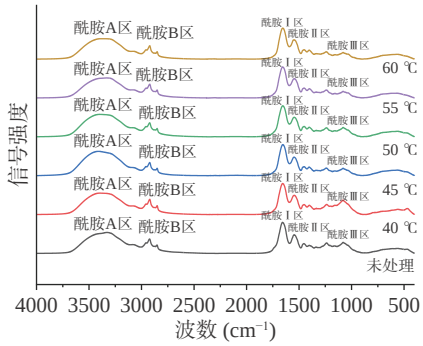


图 2 不同涨发温度处理毛肚胶原蛋白红外光谱图

Fig.2 Infrared spectra of tripe collagen treated at different temperatures during the lye macerating

表 1 不同涨发温度处理毛肚胶原蛋白的酰胺带峰位

Table 1 The amide band peak of tripe collagen at different processing temperatures

处理条件	酰胺A区波数 (cm^{-1})	酰胺B区波数 (cm^{-1})	酰胺I区波数 (cm^{-1})	酰胺II区波数 (cm^{-1})	酰胺 III区波数(cm^{-1})
未处理	3330.50	2923.36	1657.71	1546.06	1237.42
40 ℃	3392.50	2922.03	1656.02	1546.32	1236.83
45 ℃	3410.64	2922.16	1655.38	1546.97	1239.94
50 ℃	3399.75	2922.37	1655.73	1546.13	1238.88
55 ℃	3331.50	2922.18	1656.40	1545.72	1239.89
60 ℃	3390.75	2922.13	1655.47	1546.62	1240.35

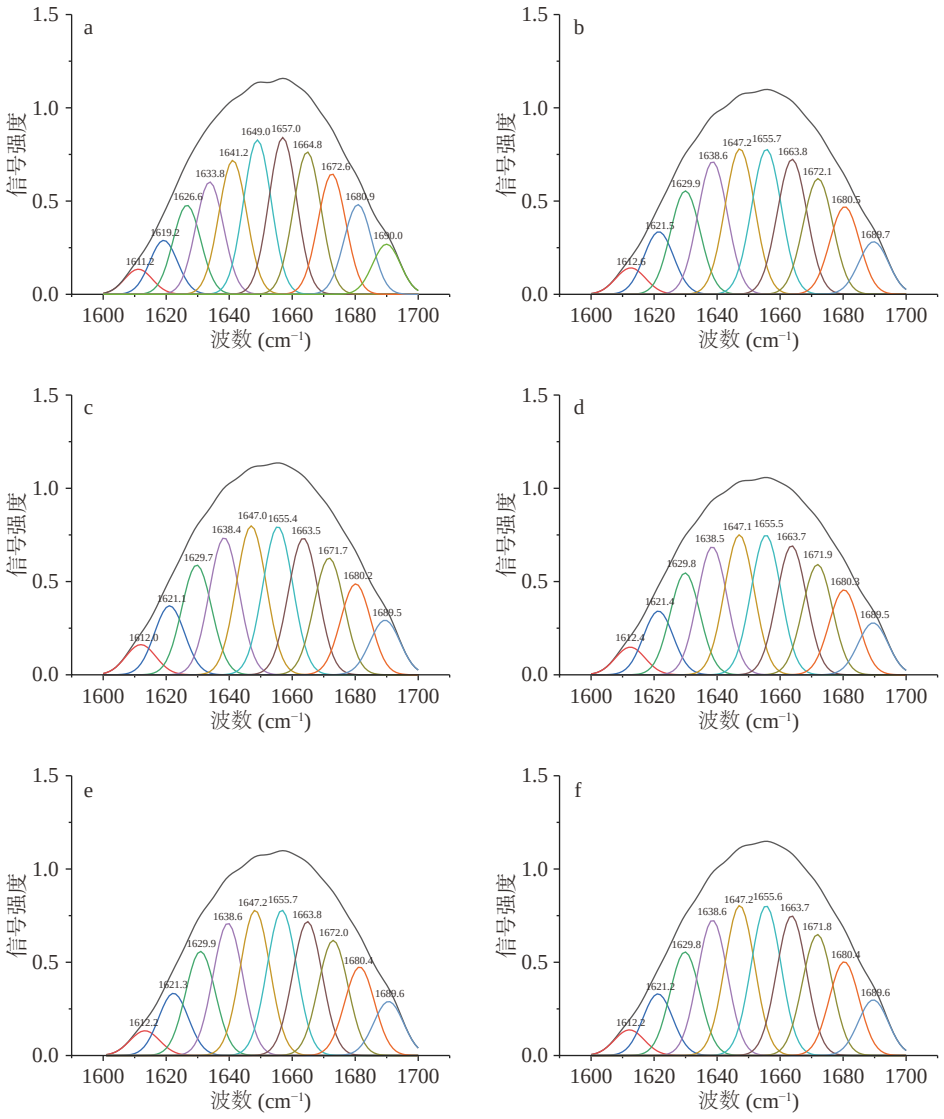


图 3　不同涨发温度处理毛肚胶原蛋白酰胺 I 带拟合图

Fig.3　Fitting diagram of amide I band treated at different temperatures during the lye macerating

注：a.未处理；b. 40 ℃（5 g/L/30 min）处理；c. 45 ℃（5 g/L/30 min）处理；d. 50 ℃（5 g/L/30 min）处理；e. 55 ℃（5 g/L/30 min）处理；f. 60 ℃（5 g/L/30 min）处理。

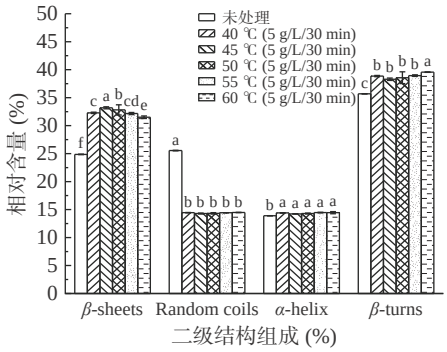


图 4　不同涨发温度处理毛肚胶原蛋白二级结构组成

Fig.4　Composition of secondary structure of tripe collagen treated with different temperatures during the lye macerating

注：不同小写字母表示不同处理组内具有显著性差异（P<0.05）；图 6~图 7 同。

由图 4 可知，不同涨发温度处理组 β-折叠、α-螺旋、β-转角相对含量均高于未处理组（P<0.05），而无规则卷曲相对含量低于未处理组（P<0.05）。在胶原蛋白内部，β-折叠作为一种不稳定的中间产物，在外界条件影响下极易发生转变[24]。在升温初期（40→45 ℃），α-螺旋与 β-折叠相对含量变化趋势相反，可能是由于毛肚胶原蛋白 α-螺旋转变为 β-折叠所导致的[25]。当涨发温度高于 50 ℃ 时胶原蛋白由于亚基不断暴露，胶原蛋白结构松散，α-螺旋结构和无规则卷曲结构含量无明显变化。随着温度升高，β-折叠结构含量先升高后降低，β-转角结构含量先降低后升高，说明二者之间可能存在转化关系。研究表明，胶原蛋白的二级结构中，β-折叠和 α-螺旋易被外界环境影响，一方面 α-螺旋不断转变为 β-折叠，另一方面亚基的降解会导致 α-螺旋相对含量增加[26]；这与本研究得到的结果一致。

2.3　毛肚胶原蛋白的荧光光谱分析

由图 5 可知，与未处理组相比，不同温度处理组的最大发射波长随涨发温度的升高均发生红移，说明胶原蛋白发生变性导致部分芳香族氨基酸暴露在蛋

白溶液中，极性逐渐增加[27]。随着温度的升高，由于胶原蛋白变性加剧，聚集程度加深掩盖了部分暴露在胶原溶液中疏水基团，毛肚胶原溶液表面疏水性降低，胶原溶液的极性减小[8]。随着温度的升高，不同温度处理组的荧光强度逐渐降低，说明胶原蛋白的变性过程中发生了不可逆转的聚集生成大胶原分子，减少了胶原溶液中疏水性氨基酸残基数量，致使荧光强度逐渐降低。

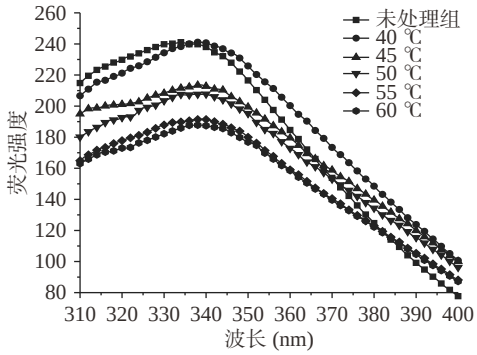


图 5 不同涨发温度处理毛肚胶原蛋白荧光光谱图

Fig.5 Fluorescence spectra of tripe collagen treated at different temperatures during the lye macerating

2.4 毛肚胶原蛋白表面疏水性分析

由图 6 可知，与未处理组相比，处理组的表面疏水性显著降低(P<0.05)。随着加工温度的升高，处理组表面疏水性先显著性升高再显著性降低(P<0.05)。这说明在升温过程中，胶原发生不可逆的变性，聚集程度较深，导致表面疏水性明显降低。此外，随着加工温度的升高，降低了维持胶原结构的作用力，二硫键、氢键、范德华力等作用力受到损害，胶原蛋白发生变性，胶原三级结构发生改变，疏水基团逐渐暴露在胶原溶液中，致使胶原溶液环境的表面疏水性不断升高[28]；当加工温度高于 60 ℃ 时，因胶原蛋白的聚集程度加深掩盖了部分暴露在胶原溶液中疏水基团，毛肚胶原溶液表面疏水性显著降低(P<0.05)。

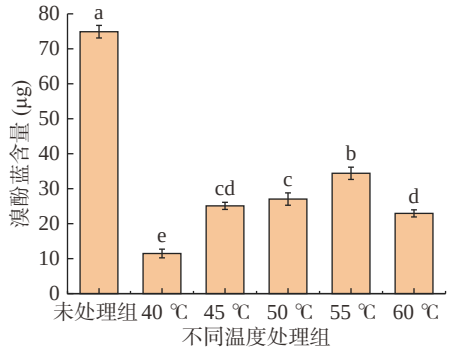


图 6 不同涨发温度处理下胶原表面疏水性

Fig.6 Collagen surface hydrophobicity at different temperatures during the lye macerating

2.5 毛肚胶原蛋白巯基含量分析

由图 7 可知，不同涨发温度处理组胶原溶液中巯基含量随温度升高逐渐增加(P<0.05)，说明升温会导致毛肚胶原蛋白发生变性，胶原蛋白结构展开，暴露出更多巯基[29]。巯基是蛋白中活性最强的功能性基团，分布在蛋白表面的巯基易氧化生成稳定的二硫键，通过测定蛋白活性巯基和总巯基含量可以反映蛋白结构的变化及蛋白间的相互作用。

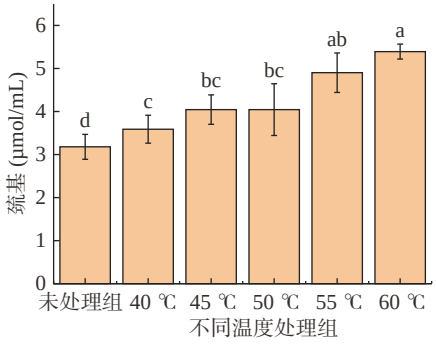


图 7 不同涨发温度处理毛肚胶原蛋白巯基含量

Fig.7 The content of sulfhydryl groups in tripe collagen treated at different temperatures during the lye macerating

2.6 毛肚胶原蛋白的扫描电镜分析

不同涨发温度处理下毛肚胶原蛋白的扫描电镜图谱如图 8 所示。与未处理组相比，不同涨发温度处理组毛肚胶原微观结构发生明显变化，部分胶原由破碎的叶片状向球棒状结构转变，变性的胶原纤维向明胶结构转变，但基本保留了部分碎片状的胶原分子。随着涨发温度的升高，胶原分子开始收缩，逐渐卷曲，加快凝集，缝隙减小，片状胶原破碎。其中，55 ℃ 和 60 ℃ 处理组叶片状胶原破碎效果明显，并且球棒状胶原开始断裂，胶原聚集程度加深，胶原发生不可逆转变性。

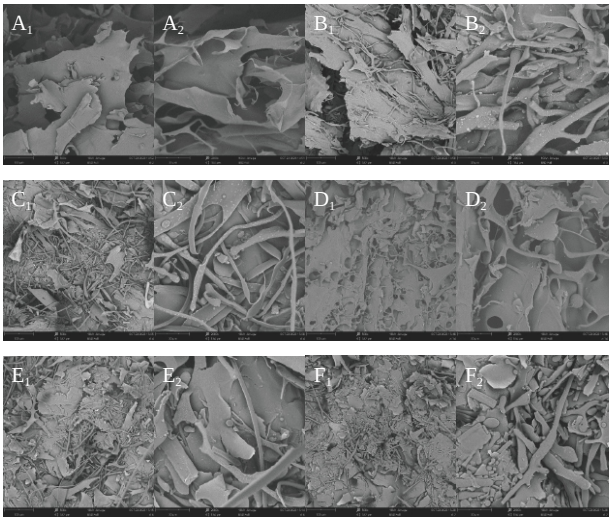


图 8 不同涨发温度处理毛肚胶原蛋白扫描电镜图

Fig.8 Scanning electron microscopy of tripe collagen treated at different temperatures during the lye macerating

注：A_1~F_1：毛肚(500×)；A_2~F_2：毛肚(2000×)；其中，A：未处理组；B：40 ℃(5 g/L/30 min)组；C：45 ℃(5 g/L/30 min)组；D：50 ℃(5 g/L/30 min)组；E：55 ℃(5 g/L/30 min)组；F：60 ℃(5 g/L/30 min)组

3　结论

本文研究不同温度(40~60 ℃)的 NaOH 涨发对毛肚胶原蛋白结构的影响，发现 NaOH 涨发处理会导致毛肚胶原蛋白最大吸收波长发生明显偏移，二级结构被破坏，胶原蛋白与其他分子的相互作用力(如氢键、疏水相互作用力等)发生改变。NaOH 碱发处理对胶原蛋白微观结构的影响显著，胶原分子随温度升高开始收缩并逐渐卷曲，缝隙减小，片状胶原破碎。当温度达到 50 ℃ 时球棒状胶原开始断裂，胶原聚集程度加深，胶原发生不可逆转变性。在今后的研究中可以进一步探究 NaOH 碱发浓度、时间以及各种酶法处理对毛肚胶原蛋白结构和功能特性的影响，为毛肚加工品质形成机理和工业化生产提供理论支持。

参考文献

[1] 李凛, 李璟, 周世一, 等. 5 种不同发制方式对毛肚增重和感官品质的影响[J]. 广东农业科学, 2011, 38(23): 102−103, 113. [LI L, LI J, ZHOU S Y, et al. Effects of 5 different hair treatments on weight gain and sensory quality of hairy belly[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2011, 38(23): 102−103, 113.]

[2] 贾洪锋, 张森, 邓红, 等. 加热对毛肚品质的影响[J]. 食品工业科技, 2017, 38(20): 166−170. [JIA H F, ZHANG M, DENG H, et al. The effect of heating on the quality of hairy belly[J]. Food Industry Science and Technology, 2017, 38(20): 166−170.]

[3] 李凛, 李璟, 周世一, 等. 响应面法优化水发工艺参数改善毛肚感官品质[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(1): 80−84. [LI L, LI J, ZHOU S Y, et al. Response surface methodology to optimize water flood process parameters to improve the sensory quality of tripe[J]. Food Research and Development, 2012, 33(1): 80−84.]

[4] 陈玉茹, 杨静, 黄苏红, 等. 毛肚涨发工艺优化及其水分分布和组织结构变化研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(18): 157−163, 169. [CHEN Y R, YANG J, HUANG S H, et al. Study on optimization of collagen swelling process and its water distribution and tissue structure changes[J]. Food Industry Science and Technology, 2020, 41(18): 157−163, 169.]

[5] 王哲平, 刘淇, 曹荣, 等. 温度对刺参胶原蛋白结构和分子量变化的影响[J]. 渔业科学进展, 2011, 32(6): 80−84. [WANG Z P, LIU Q, CAO R, et al. The effect of temperature on changes in the structure and molecular weight of sea cucumber collagen[J]. Progress in Fishery Sciences, 2011, 32(6): 80−84.]

[6] 李朝阳, 李良玉, 刁静静. pH 和温度对蛋白结构和功能特性影响的研究进展[J]. 科学技术创新, 2019(18): 59−60. [LI C Y, LI L Y, DIAO J J. Research progress on the effects of pH and temperature on protein structure and functional properties[J]. Science and Technology Innovation, 2019(18): 59−60.]

[7] 王正雯, 田宏伟, 周富裕, 等. 加热温度对麻鸭肌原纤维蛋白结构与凝胶特性的影响[J]. 食品科学, 2020, 41(13): 61−68. [WANG Z W, TIAN H W, ZHOU F Y, et al. The effect of heating temperature on the structure and gel properties of myofibrillar protein in ducks[J]. Food Science, 2020, 41(13): 61−68.]

[8] 李清正, 张顺亮, 罗永康, 等. 温度对复合肌原纤维蛋白结构及其表面疏水性的影响[J]. 肉类研究, 2017, 31(2): 6−10. [LI Q Z, ZHANG S L, LUO Y K, et al. The effect of temperature on the structure of composite myofibril protein and its surface hydrophobicity[J]. Meat Research, 2017, 31(2): 6−10.]

[9] 高昕, 刘莲凤, 刘倩, 等. 不同加热温度下刺参肌肉组织与胶原纤维结构的变化[J]. 水产学报, 2012, 36(9): 1465−1472. [GAO X, LIU L F, LIU Q, et al. Changes in the structure of sea cucumber muscle tissue and collagen fibers under different heating temperatures[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(9): 1465−1472.]

[10] 李凛, 李璟, 周世一. 毛肚水发工艺的响应面法优化[J]. 湖北农业科学, 2012, 51(10): 2092−2095. [LI L, LI J, ZHOU S Y, et al. Optimization of the collagen water hair process by response surface methodology[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2012, 51(10): 2092−2095.]

[11] 赵鸾, 夏杨毅, 王立宇, 等. 鲜毛肚和盐渍毛肚胶原蛋白的结构表征 [J/OL]. 食品与发酵工业: 1-9. [2021-09-25]. https://doi. org/10.13995/j. cnki. 11-1802/ts. 026755. ZHAO L, XIA Y Y, WANG L Y, et al. Structural characterization of fresh and salted collagen collagen[J/OL]. Food and Fermentation Industry: 1-9[2021-09-25].https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.026755.]

[12] 曲文娟, 宋雅婷, 张欣欣, 等. 胶原蛋白-壳聚糖膜的制备及其对猪肉的保鲜作用[J]. 现代食品科技, 2020, 36(3): 89−98. [QU W J, SONG Y T, ZHANG X X, et al. Preparation of collagen-chitosan film and its fresh-keeping effect on pork[J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(3): 89−98.]

[13] 庄永亮. 海蜇胶原蛋白理化性质及其胶原肽的护肤活性研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009. [ZHUANG Y L. The physical and chemical properties of jellyfish collagen and the skin care activity of collagen peptides [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2009.]

[14] LI S, YU Q. Extraction and characterization of collagens from yak rumen smooth muscle[J]. Animal Science Journal, 2019, 90(12): 1581−1589.

[15] NOORZAI S, VERBEEK C J R, LAY M C, et al. Collagen extraction from various waste bovine hide sources[J]. Waste and Biomass Valorization, 2020, 11(11): 5687−5698.

[16] DISIMPLICIO P, CHEESEMAN K H, SLATER T F. The reactivity of the sh-group of bovine serum-albumin with free-radicals [J]. Free Radical Research Communications, 1991, 14(4): 253−262.

[17] LI P H, LU W C, CHAN Y J, et al. Extraction and characterization of collagen from sea cucumber (*Holothuria cinerascens*) and its potential application in moisturizing cosmetics[J]. Aquaculture, 2020, 515(15): 734590.

[18] CHEN S, TANG L, HAO G, et al. Effects of alpha(1)/alpha(2) ratios and drying temperatures on the properties of gelatin films prepared from tilapia (*Tilapia zillii*) skins[J]. Food Hydrocolloids, 2016, 52: 573−580.

[19] VASANTHI C, VENKATARAMANUJAM V, DUSHYANTHAN K. Effect of cooking temperature and time on the physico-chemical, histological and sensory properties of female carabeef (buffalo) meat[J]. Meat Science, 2007, 76(2): 274−280.

[20] VIDAL A R, DUARTE L P, SCHMIDT M M, et al. Extraction and characterization of collagen from sheep slaughter by-

products[J]. Waste Management, 2020, 102: 838−846.
[21] 马明思. 兔皮胶原快速明胶化机理及明胶制备过程中胶原结构变化 [D]. 重庆: 西南大学, 2018. [MA M S. The rapid gelatinization mechanism of rabbit skin collagen and the change of collagen structure during the preparation of gelatin[D]. Chongqing: Southwest University, 2018.]
[22] BHUIMBAR M V, BHAGWAT P K, DANDGE P B. Extraction and characterization of acid soluble collagen from fish waste: Development of collagen-chitosan blend as food packaging film[J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2019, 7(2): 102983.
[23] BERISIO R, VITAGLIANO L, MAZZARELLA L, et al. Crystal structure of the collagen triple helix model (Pro-Pro-Gly)(10) (3)[J]. Protein Science, 2002, 11(2): 262−270.
[24] ZIMM B H, BRAGG J K. Theory of the phase transition between helix and random coil in polypeptide chains[J]. Journal of Chemical Physics, 1959, 31(2): 526−535.
[25] PRYSTUPA D A, DONALD A M. Infrared study of gelatin conformations in the gel and sol states[J]. Polymer Gels and Networks, 1996, 4(2): 87−110.
[26] CHYS P, GIELENS C, MEERSMAN F. FTIR 2D correlation spectroscopy of alpha(1) and alpha(2) fractions of an alkali-pretreated gelatin[J]. Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics, 2011, 1814(2): 318−325.
[27] 文鹏程, 余丹丹, 汪昕昕, 等. 不同处理条件对乳铁蛋白构象的影响研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2012(1): 162−165. [WEN P C, YU D D, WANG X X, et al. The effect of different treatment conditions on the conformation of lactoferrin[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2012(1): 162−165.]
[28] VETRI V, LIBRIZZI F, LEONE M, et al. Thermal aggregation of bovine serum albumin at different pH: Comparison with human serum albumin[J]. European Biophysics Journal with Biophysics Letters, 2007, 36(7): 717−725.
[29] 徐永霞, 王瑞, 李学鹏, 等. 热处理对鱼肌原纤维蛋白结构及腥味物质结合能力的影响[J]. 中国食品学报, 2020, 20(9): 131−138. [XU Y X, WANG R, LI X P, et al. Effects of heat treatment on the structure of fish myofibril protein and the binding ability of fishy substances[J]. Chinese Journal of Food Science, 2020, 20(9): 131−138.]

邢宇航, 郑烨宇, 薛璐, 等. 不同品种芒果核中多酚类化合物的鉴定及抗氧化活性分析 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 63−70. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080125

XING Yuhang, ZHENG Yeyu, XUE Lu, et al. Identification and Antioxidant Activity Analysis of Polyphenols in Different Mango Kernels Cultivars[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 63−70. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080125

· 研究与探讨 ·

不同品种芒果核中多酚类化合物的鉴定及抗氧化活性分析

邢宇航[1,2], 郑烨宇[3], 薛　璐[1,2], 陈绵鸿[2], 刘洋洋[2], 周　伟[2], 李如一[2,*], 李积华[2]

（1.华中农业大学食品科学技术学院, 湖北武汉 430070;
2.中国热带农业科学院农产品加工研究所/农业农村部热带作物产品加工重点实验室, 广东湛江 524001;
3.云南农业大学热带作物学院, 云南普洱 665099）

摘　要: 研究不同品种芒果核内所含的多酚类物质及其抗氧活性。对 4 种市售芒果（象牙芒、玉芒、紫花芒和三年芒）核中多酚类物质进行提取、测定以及统计学分析。结果表明：芒果核中含有较为丰富的多酚类物质且具有良好的抗氧化活性，其中紫玉芒核中多酚含量最高，其抗氧化活性最强，其次是象牙芒核和三年芒核，玉芒核最差；4 个品种的芒果核提取物存在较大差异，易于区分，且测定指标之间均呈现正相关，其中总酚和水解单宁与体外抗氧化指标均呈现显著的相关性（$P<0.05$）；通过 UPLC-Tripe TOF-MS/MS 对芒果核中的多酚类化合物进行鉴定，共鉴定出 28 种多酚及其衍生物，包括 2 种酚酸、8 种酚酸酯、10 种酚酸糖苷、7 种黄酮糖苷和 1 种黄酮。研究结果可为合理选择芒果品种提取芒果核中多酚类化合物提供科学依据。

关键词: 芒果核, 多酚类物质, 抗氧化活性, 相关性分析

中图分类号: TS255.1　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0063−08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080125

本文网刊:

Identification and Antioxidant Activity Analysis of Polyphenols in Different Mango Kernels Cultivars

XING Yuhang[1,2], ZHENG Yeyu[3], XUE Lu[1,2], CHEN Mianhong[2], LIU Yangyang[2], ZHOU Wei[2], LI Ruyi[2,*], LI Jihua[2]

（1.College of Food Science & Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;
2.Agricultural Products Processing Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/Key Laboratory of Tropical Crop Products Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Zhanjiang 524001, China;
3.College of Tropical Crops, Yunnan Agricultural University, Pu'er 665099, China）

Abstract: The polyphenols and antioxidant activities of different mango cultivars were studied. Polyphenols from four commercial mango (Ivory, Yu, Zihua and Sannian) mango kernels were extracted, determined and analyzed statistically. The results showed that mango kernel contained abundant polyphenolic compounds and had good antioxidant activity. Among them, the content of polyphenol in Zihua mango kernel was the highest and its antioxidant activity was the strongest, followed by Ivory mango kernel and Sannian mango kernel, and that in Yu mango kernel was the worst. There were great differences in the extracts of mango kernels among the four cultivars, which were easy to distinguish, and there was a positive correlation between the determination indexes. Among them, total phenols and hydrolyzed tannins were

收稿日期: 2021−08−12

基金项目: 海南省自然基金项目（No. 320QN325）; 国家自然科学基金青年科学基金项目（No.32001689）; 广东省自然科学基金面上项目（No.2021A1515010901）; 中国热带农业科学院基本科研业务费专项资金（No.1630122021006）。

作者简介: 邢宇航（1997−）, 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: xingyuhang2022@163.com。

*** 通信作者:** 李如一（1991−）, 女, 博士, 特聘研究员, 研究方向: 天然产物, E-mail: mwlry19901016@163.com。

significantly correlated with *in vitro* antioxidant activities (P<0.05). Compounds in mango kernel were identified by UPLC-Tripe TOF-MS/MS, and 28 polyphenols and their derivatives were identified, including 2 phenolic acids, 8 phenolic esters, 10 phenolic glycosides, 7 flavonoid glycosides and 1 flavonoid. The results can provide scientific basis for reasonable selection of mango cultivars to extract polyphenols from mango kernel.

Key words: mango kernels; polyphenols content; antioxidant activities; correlation analysis

芒果(*Mangifera indica* L.)是著名的热带水果,其果肉肉质滑嫩、含糖量高、富有特殊气味,深受广大消费者的喜爱,被誉为“热带水果之王”,是热带、亚热带的主要经济作物[1]。近年来,世界芒果种植面积和产量都在不断上升,已成为世界五大热带农作物之一[2]。我国的芒果种植主要集中在海南、广东、广西、云南等地区,每年产量约 160 万吨,其果肉大部分用于鲜食、制作果汁、罐头等,而剩余的果皮[3]和果核基本上被当作废弃物,不仅造成环境污染,还会造成资源浪费[4]。此外,芒果核还有较高含量的优质蛋白[5]、脂肪酸[6]、淀粉[7]等具有极高的药用价值,据中国药典理论记载,芒果核具有补肾、祛肾寒的功能[2],这多与所含的多酚类物质有关。

多酚是植物体内天然存在的化合物,具有单个或多个苯环并结合单个或多个羟基的化学结构,参与抵御紫外线或病原体的侵袭,属于植物次级代谢产物[8]。基于提取的多酚类物质普遍存在抗氧化特性,可有效清除氧自由基、保护机体组织免受损伤[9],植物多酚可作为天然抗氧化剂广泛的应用到食品、畜牧和水产等方面[10];也可作为潜在的治疗疾病的药物[11],所表现的抗氧化活性、抗病毒[12]、抗菌[13]等多种生物活性使其成为近年来研究热点[14]。目前,从芒果核中提取多酚并测定其生物活性的研究报道较多,普遍采用的提取方法为乙醇作为有机溶剂以超声[15]、微波[16]等方法辅助提取,并对提取的多酚做了抗氧化活性[17]、抑菌性[18]以及抗癌[11]等生物活性评估。前人所做的研究大部分集中于多酚的提取、抗氧化和生物活性,鲜有探究多酚类物质的具体成分鉴定及多酚与抗氧化之间相关性和主成分的分析。

为了鉴定不同品种芒果核内所含的多酚类物质、抗氧化性以及之间的相关性,本文选取市场上常见的象牙芒(海南)、玉芒(海南)、紫花芒(广西)和三年芒(云南)4 个品种,用超声波辅助乙醇提取多酚并测定 4 种芒果核中的总酚、总黄酮、水解单宁、缩合单宁和体外抗氧化,并通过 UPLC-TripeTOF-MS/MS 鉴定其中的多酚类化合物,用 SPSS25 和 Origin 2019b 对所测指标进行主成分分析和相关性分析。其结果可为后续芒果核内多酚类物质进一步加工研究提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

本试验所使用的芒果　选自市售的象牙芒(产自海南)、玉芒(产自海南)、紫花芒(产自广西)和三年芒(产自云南)4 种芒果,分离表皮、果肉得到其芒果核,芒果核冻干后备用;无水碳酸钠、无水氯化铝、六水合三氯化铁、甲醇、乙醇、氢氧化钠　分析纯,西陇科学股份有限公司;盐酸　广东广试试剂科技有限公司;七水合硫酸亚铁、六氰合铁酸钾、硝酸钠　广州市金华大化试剂有限公司;三氟乙酸　上海麦克林生化科技有限公司;没食子酸、儿茶素、芦丁　上海阿拉丁生化科技股份有限公司;Folin-Ciocalteu(FC)试剂、香草醛　美国 Sigma 公司;1,1-二苯基-2-苦肼基(DPPH)、2,2-联氮-二(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)(ABTS)、TPTZ　北京索莱宝有限公司。

SK2210LHC 型超声波清洗器　上海科导超声仪器有限公司;U-T6A 型紫外可见光分光光度计　屹谱仪器制造(上海)有限公司;Christ/Alpha 2-4 LDplus 型冻干机　德国 Martin Christ 公司;H1-16KR 台式高速冷冻离心机　湖南可成仪器设备有限公司;LABOROTA 400 型旋转蒸发仪　德国 Heidolph 公司;CPA225D 精密分析电子天平　赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;AB ekspert™ ultraLC 110 超高效液相色谱仪、AB Sciex Triple TOF 5600+混合四级杆飞行时间质谱仪　美国 AB SCIEX 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 多酚类物质提取　用乙醇提取方法[19]提取多酚类物质。芒果核冷冻干燥粉碎,后过 60 目筛得样品。称取 1.0 g 样品加入 20 mL 80% 乙醇,混匀后在 25 ℃、超声频率 53 kHz、功率 100 W 条件下超声 30 min,静置过夜后,离心(8000 r/min, 30 min)取上清液,获得芒果核提取物。

1.2.2 总酚含量测定　福林-酚法[20]测定总酚含量。0.1 mL 样品与 2.9 mL 蒸馏水、0.25 mL Folin-Ciocalteu 试剂混合 5 min 后加入 0.75 mL 20% Na_2CO_3 溶液,25 ℃ 避光反应 30 min,于 765 nm 处测其吸光值,用 80% 乙醇溶解没食酸子的 50~400 μg/mL 溶液作为参考标准绘制标准曲线(y=0.0019x+0.0193, R^2=0.9996),没食子酸当量表示总酚含量。

1.2.3 总黄酮含量测定　$AlCl_3$-NaOH-$NaNO_3$ 方法[21]测定总黄酮含量。取 0.5 mL 样品与 0.2 mL 5% $NaNO_2$,25 ℃ 反应 6 min 后,加 0.2 mL 10% $AlCl_3$ 混匀,25 ℃ 反应 6 min,然后加 0.5 mL 4% NaOH 和 5 mL 蒸馏水充分混匀,25 ℃ 反应 15 min,于 510 nm 测定吸光值。用 80% 乙醇溶解芦丁的 100~500 μg/mL 溶液作为参考标准绘制标准曲线(y=0.0011x+0.0026, R^2=0.9923),芦丁当量表示总黄酮含量。

1.2.4 水解单宁含量测定　采用饱和 KIO_3 法测定水解单宁的含量。取 2 mL 样品与 3 mL 饱和 KIO_3

溶液混合反应 15 min，离心（10000 r/min，2 min），取上清液于 550 nm 处测定吸光值。用 80% 乙醇溶解没食子酸的 50~600 μg/mL 溶液作为参考标准绘制标准曲线（y=0.0011x+0.0342，R^2=0.9994），没食子酸当量表示水解单宁含量。

1.2.5　缩合单宁含量测定　香草醛-盐酸方法[22]测定缩合单宁含量。取 0.6 mL 样品与 3.0 mL 香草醛试剂（1% 香草醛甲醇溶液和 8% 盐酸甲醇溶液等体积混合，现配现用），25 ℃ 反应 20 min 后于 500 nm 处测定吸光值。用甲醇溶解儿茶素的 50~600 μg/mL 溶液作为参考标准绘制标准曲线（y=0.0011x+0.0378，R^2=0.9993），儿茶素当量表示缩合单宁含量。

1.2.6　DPPH·清除能力　DPPH·清除能力的测定参照 Chang 等[23]的方法并加以修改。样品溶液与 DPPH 甲醇溶液（0.1 mmol/L）混合（1∶1，v/v），25 ℃ 避光反应 30 min，在 517 nm 处测定吸光值 A。空白组用超纯水代替样品，吸光值为 A_0。以维生素 C 标准品绘制浓度为 0.5~5 μg/mL 的标准曲线（y=12.875x+4.2096，R^2=0.9998）计算样品的 DPPH·清除能力。

$$\text{DPPH·清除率}(\%)=\frac{A_0-A}{A_0}\times 100$$

按样品质量计算：

$$\text{DPPH·清除能力}(\text{mg } V_C/\text{gd.w.})=\frac{[(\text{清除率}-4.2096)/12.875]\times V\times D}{W\times 1000}$$

式中：V 为加入提取液体积，mL；W 为样品质量，g；D 为稀释倍数。

1.2.7　$ABTS^+$·清除能力　$ABTS^+$·清除能力的测定参照杨希娟等[24]的方法并加以修改。将 1.92 g ABTS 和 0.33 g 过硫酸钾溶于纯水中，黑暗放置 12~16 h。取 0.6 mL 样品与 3.4 mL ABTS 溶液混匀反应 6 min，在 734 nm 处测定其吸光值 A。空白组用超纯水代替样品，吸光值为 A_0。以维生素 C 标准品绘制浓度为 5~50 μg/mL 标准曲线（y=1.4303x+1.5861，R^2=0.9989）计算样品的 $ABTS^+$·清除能力，公式参照 DPPH·清除能力。

1.2.8　Fe^{3+}还原力测定　Fe^{3+}还原力的测定参照刘瑞等[25]的方法并加以修改。0.5 mL 样品、1.5 mL PBS（pH=6.6）和 1.5 mL $K_3[Fe(CN)_6]$ 混匀，50 ℃ 水浴 20 min。后加入 1.5 mL 10% 三氯乙酸，离心，取上清液 2.5 mL，并向其中加入 1.5 mL 纯水和 0.3 mL 0.1% $FeCl_3$ 溶液混匀，在 700 nm 处测定其吸光值 A_i。空白组用超纯水代替，吸光值为 A_j。以维生素 C 标准品绘制浓度为 25~400 μg/mL 标准曲线（y=0.0069x+0.049，R^2=0.9977，其中 y=ΔA=A_i−A_j）计算样品的 Fe^{3+}还原力。

1.2.9　总抗氧化能力　总抗氧化能力的测定依据 FRAP 法[23]。乙醇稀释的样品与 FRAP 试剂（包括 A 液：0.3 mol/mL pH=3.6 醋酸缓冲液；B 液：40 mmol/mL 盐酸配置的 10 mmol/mL 的 TPTZ 溶液；C 液：超纯水配置的 20 mmol/L 的 $FeCl_3$ 溶液，上述三种溶液按照 A∶B∶C=10∶1∶1 体积比混合，现配现用）混合后，37 ℃ 水浴反应 5 min，在 593 nm 处测定其吸光值，以 $FeSO_4$ 标品绘制浓度为 0.003125~0.1 μmol/mL 标准曲线（y=9.1101x+0.0313，R^2=0.9993）计算总抗氧化能力，结果表示为 mmol Fe^{2+}/g d.w.。

1.2.10　多酚类化合物鉴定　色谱柱：Waters HSS T3 C_{18} 色谱柱（100 mm×2.1 mm，1.8 μm），柱温：35 ℃，流动相 A：0.05% 甲酸水，流动相 B：乙腈，流速：0.3 mL/min。采用梯度洗脱程序（0~4 min，1%~5% B；4~20 min，5%~15% B；20~30 min，15%~35% B；30~35 min，35%~95% B；35~36 min，95%~1% B；36~40 min，1% B），进样量：3 μL，检测器波长：280 nm。

质谱条件：电喷雾离子源（ESI），并在负离子模式下进行，其主要操作参数如下：以空气为载气，氮气为雾化气和辅助气，相应的载气、雾化气和辅助气压分别为 30、50、50 psi；离子源温度为 550 ℃；雾化电压 5 kV；去簇电压 80 V；碰撞能 35±15 eV。质谱仪的扫描范围为 m/z 50~1500，并采用信息关联数据采集模式（IDA）对质谱数据进行采集。

1.3　数据处理

所有试验数据采用 SPSS25.0 进行显著性和相关性分析，Origin2019b 进行主成分分析并绘图。

2　结果与分析

2.1　不同品种芒果核中总酚、总黄酮、水解单宁和缩合单宁的含量

多酚类物质作为芒果核中重要的生物活性成分，其含量及组成对于芒果核的精深加工及功能性产品的创制具有重要意义[2]。由表 1 可以看出，4 种芒果核提取物中总酚含量在 118.55~193.77 mg GAE/g d.w. 之间；总黄酮的含量 8.23~25.58 mg RT/g d.w.；而水解单宁含量差异不大，在 22.68~27.63 mg GAE/g d.w. 之间；缩合单宁的含量 2.34~23.17 mg CE/g d.w.。总酚和总黄酮含量较文献值[26]测定的均较高，可能是所选取的芒果品种或测定方法存在差异所导致的。在 4 种芒果核提取物中，紫花芒核的总酚、总黄酮、水解单宁和缩合单宁含量均为最高，而玉芒核含量都为最低，其余 2 种芒果，象牙芒核和三年芒核在总酚、总黄酮和水解单宁含量差异不大，而缩合单宁含量相差较大。不同品种之间含量的差异，可能是由于芒果在种植过程土壤酸碱度、水分、气候等条件的不同影响芒果核多酚类物质的积累[27]，具体的机理还需进一步探究。

2.2　芒果核提取物抗氧化活性分析

比较 4 种芒果核中提取物的抗氧化活性的差异，结果如表 2 所示，在 4 种芒果核在 DPPH·清除能力和总抗氧化能力上，象牙芒核和紫花芒核基本上无明显差异，其次是三年芒核和玉芒核。在 $ABTS^+$·清除能力上，紫花芒核提取物的 $ABTS^+$·清除能力最

表 1 不同品种芒果核中总酚、总黄酮、水解单宁和缩合单宁的含量

Table 1 The contents of total phenols, total flavonoids, hydrolyzed tannins and condensed tannins in mango kernels from different cultivars

种类	总酚(mg GAE/g d.w.)	总黄酮(mg RT/g d.w.)	水解单宁(mg GAE/g d.w.)	缩合单宁(mg CE/g d.w.)
象牙芒核	176.70±4.48^{b}	15.24±0.98^{b}	26.72±0.52^{ab}	5.61±0.27^{c}
玉芒核	118.55±5.59^{c}	8.23±0.75^{c}	22.68±0.59^{c}	2.34±0.16^{d}
紫花芒核	193.77±3.65^{a}	25.58±1.91^{a}	27.63±1.32^{ab}	23.17±0.55^{a}
三年芒核	175.02±2.49^{b}	22.69±1.37^{a}	25.23±1.46^{b}	18.40±0.72^{b}

注: GAE为没食子酸, RT为芦丁, CE为儿茶素。同一列不同小写字母表示具有显著差异(P<0.05), 表2同。

表 2 不同芒果核提取物体外抗氧化活性分析

Table 2 Analysis of antioxidant activity of different mango kernel extracts *in vitro*

种类	DPPH·清除能力(mg V_C/g d.w.)	$ABTS^{+}$·清除能力(mg V_C/g d.w.)	Fe^{3+}还原能力(mg V_C/g d.w.)	总抗氧化能力(mmol Fe^{2+}/g d.w.)
象牙芒核	108.17±2.69^{a}	387.07±21.88^{b}	352.62±2.93^{a}	52.55±2.50^{a}
玉芒核	50.15±1.12^{c}	309.69±7.07^{c}	178.41 ±1.44^{d}	35.99±3.31^{c}
紫花芒核	108.66±3.19^{a}	618.17±27.03^{a}	300.65±7.71^{b}	50.29±1.51^{a}
三年芒核	89.64±2.78^{b}	277.98±9.82^{d}	222.54±5.44^{c}	45.35±2.25^{b}

强, 约是其他三种的 2 倍。在 Fe^{3+}还原能力上差异较大, 以象牙芒核最高。总体来说, 紫花芒核和象牙芒核提取物的抗氧化能力都较强, 其次是三年芒核, 玉芒核提取物的抗氧化能力在四种芒果核中是最差的。这也基本上与表 1 所测定的多酚类物质含量相吻合, 可能抗氧化能力的大小, 是由总酚含量高低所决定的。

2.3 相关性分析与主成分分析

多酚类物质可通过酚羟基作为氢供体直接与自由基反应、抑制产生自由基所需的酶活性、螯合诱导自由基产生的金属离子以及与其他物质产生协同抗氧化作用等方式表现抗氧化活性[28], 因此植物提取物中的多酚类物质与其生物活性(如抗氧化活性)间存在一定的相关性[29]。

由表 3 可知, 所测总酚、总黄酮、水解单宁、缩合单宁与抗氧化活性指标之间均呈现正相关, 说明各指标之间存在或强或弱的相关性。其中, 缩合单宁只与 DPPH·清除能力呈现显著相关性(P<0.05), 总黄酮与 DPPH·清除能力和总抗氧化能力分别呈现极显著相关性(P<0.01)和显著相关性(P<0.05), 总酚与 $ABTS^{+}$·清除能力呈现和显著相关性(P<0.05), 与其他 3 种抗氧化活性指标均呈现极显著相关性(P<0.01), 水解单宁与 4 种抗氧化活性指标均均呈现极显著相关性(P<0.01), 以上结果表明总酚和水解单宁的含量对芒果核提取物的抗氧化活性影响较大。

主成分分析见表 4, 由表 4 可知前两个主成分的特征值均大于 1, 其中主成分 1 贡献最大, 达到 76.987%, 当主成分个数达到 2 时, 累积方差贡献率 92.957%, 说明这两个主成分能够反映和解释所测的 8 个指标大部分信息[30]。主特征向量可以反映各个指标对主成分的贡献率[31], 也可从图 1 中可以更明显地观察到各个指标的贡献率。在第一主成分方差贡献率 77%, 所测定 8 个指标均有较大的载荷, 分布成正相关; 第二主分方差贡献率 16%, Fe^{3+}还原力、缩合单宁、总黄酮在第二主成分上有较大的载荷, 其中缩合单宁和总黄酮呈现正相关, 而 Fe^{3+}还原力呈现负相关。从图 1 中可以看出四个样品得分分布图上彼此之间相距较远, 所选品种之间的差异性还是较为明显的。

2.4 UPLC-Tripe TOF-MS/MS 鉴定芒果核中多酚类化合物

利用 UPLC-Tripe TOF-MS/MS 进行芒果核多

表 3 芒果核提取物中总酚、总黄酮、水解单宁、缩合单宁与体外抗氧化活性的相关性分析

Table 3 Correlation analysis of total phenols, total flavonoids, hydrolyzed tannins, condensed tannins and antioxidant activities *in vitro* of mango kernel extracts

	总酚	总黄酮	水解单宁	缩合单宁	DPPH·	$ABTS^{+}$·	Fe^{3+}还原力	总抗氧化能力
总酚	1	0.886**	0.927**	0.767**	0.952**	0.596*	0.723**	0.898**
总黄酮		1	0.748**	0.959**	0.733**	0.540	0.357	0.619*
水解单宁			1	0.630*	0.951**	0.722**	0.844**	0.940**
缩合单宁				1	0.582*	0.561	0.169	0.448
DPPH·					1	0.589*	0.879**	0.978**
$ABTS^{+}$·						1	0.533	0.532
Fe^{3+}还原力							1	0.937**
总抗氧化能力								1

注: **表示极显著, P<0.01; *表示显著, P<0.05。

表 4　芒果核多酚类物质各评价指标主成分分析

Table 4　Principal component analysis of each evaluation index of mango kernels polyphenols

评价指标	主成分	
	1	2
总酚	0.39606	0.0716
总黄酮	0.34011	0.45525
水解单宁	0.39988	−0.09835
缩合单宁	0.2914	0.61036
DPPH·	0.39206	−0.16605
$ABTS^{+}$·	0.29045	0.08844
Fe^{3+}还原力	0.32194	−0.5311
总抗氧化能力	0.3754	−0.29656
特征值	6.159	1.278
方差贡献率(%)	76.987	15.97
累计贡献率(%)	76.987	92.957

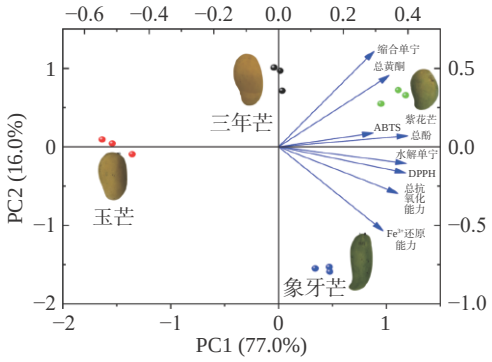


图 1　不同芒果核多酚类物质 PCA 分析的得分图和载荷图

Fig.1　Score chart and load chart of PCA analysis of different mango kernel polyphenols

酚类化合物物质的分析，并将实验数据与文献中已报道的研究结果及质谱数据库(Massbank 和 Metlin)进行比对，对比一级和二级质谱信息得出鉴定结果。4 种芒果核中均含有的多酚类物质鉴定结果如表 5 所示。芒果核多酚中总共鉴定出 28 种多酚及其衍生物，包括 2 种酚酸、8 种酚酸酯、10 种酚酸糖苷、7 种黄酮糖苷和 1 种黄酮。

2.4.1　酚酸的鉴定　芒果核提取物中化合物 1 和 18 的母离子 $[M-H]^-$分别为 m/z 169.0149 和 300.9988，化合物 1 的特征性碎片离子 m/z 125 为母离子失去一个 CO_2 所产生，根据文献鉴定为没食子酸[32]，化合

表 5　芒果核提取物中多酚的鉴定结果

Table 5　Identification of phenolic compounds of mango kernel extracts

编号	保留时间	$[M-H]^-$(m/z)		误差(ppm)	分子式	ESI 二级质谱主要的碎片离子(m/z)	鉴定组分	类别
		测定值	理论值					
1	4.512	169.0149	169.0142	−3.8	$C_7H_6O_5$	125*, 79	没食子酸	酚酸
2	4.656	331.0689	331.0671	−5.4	$C_{13}H_{16}O_{10}$	271*, 169*, 125*	没食子酰葡萄糖	酚酸糖苷
3	5.502	343.0672	343.0671	−0.3	$C_{14}H_{16}O_{10}$	191*, 169*, 125*	没食子酰奎宁酸	酚酸酯
4	7.597	493.1196	493.1199	0.6	$C_{19}H_{26}O_{15}$	313*, 169*, 125*	没食子酰二己糖	酚酸糖苷
5	9.907	423.0940	423.0933	−1.7	$C_{19}H_{20}O_{11}$	333, 303*, 223, 193*, 165	桑橙素-C-葡萄糖苷	黄酮糖苷
6	11.129	483.0798	483.0780	−3.7	$C_{20}H_{20}O_{14}$	331*, 271, 169*, 125	二没食子酰葡萄糖	酚酸糖苷
7	11.658	183.0301	183.0299	−1.1	$C_8H_8O_5$	169*, 124*	没食子酸甲酯	酚酸酯
8	12.544	577.1351	577.1352	0.2	$C_{30}H_{26}O_{12}$	451*, 425*, 407*, 289, 287, 245*, 125	B型原花青素	黄酮
9	13.718	321.0248	321.0252	1.2	$C_{14}H_{10}O_9$	169*, 125*	间双没食子酸	酚酸酯
10	13.991	575.1049	575.1042	−1.2	$C_{26}H_{24}O_{15}$	333, 303*, 193*, 169*, 125	桑橙素-C-(O-没食子酰)-葡萄糖苷	黄酮糖苷
11	18.186	559.1113	559.1053	−3.6	$C_{26}H_{24}O_{14}$	407*, 389*, 317*, 287*, 269, 245, 169*	鸢尾酚酮-3-C-(2-O-没食子酰)-葡萄糖苷	黄酮糖苷
12	19.228	197.0460	197.0455	−2.5	$C_9H_{10}O_5$	169*, 124*	没食子酸乙酯	酚酸酯
13	19.312	421.0767	421.0776	2.1	$C_{19}H_{18}O_{11}$	331*, 301*, 271, 259	芒果苷	黄酮糖苷
14	23.048	635.0889	635.0890	0.2	$C_{27}H_{24}O_{18}$	465*, 313*, 169*, 125	三没食子酰葡萄糖	酚酸糖苷
15	25.515	787.0980	787.0999	2.4	$C_{34}H_{28}O_{22}$	787, 617*, 465*, 295*, 169	四没食子酰葡萄糖	酚酸糖苷
16	25.769	441.0817	441.0827	2.3	$C_{22}H_{18}O_{10}$	289*, 245*, 169, 125	表儿茶素没食子酸酯	酚酸酯
17	26.289	787.1024	787.0999	−3.2	$C_{34}H_{28}O_{22}$	787, 617*, 465*, 295, 169, 125	四没食子酰葡萄糖异构体1	酚酸糖苷
18	26.292	300.9988	300.9989	0.3	$C_{14}H_6O_8$	229*, 145*	鞣花酸	酚酸
19	26.737	463.0860	463.0882	4.8	$C_{21}H_{20}O_{10}$	301*, 300*, 271*, 255, 151*	金丝桃苷	黄酮糖苷
20	26.864	441.0816	441.0827	2.5	$C_{22}H_{18}O_{10}$	289*, 245*, 203, 125	表儿茶素没食子酸酯异构体1	酚酸酯
21	26.952	431.0983	431.0984	0.2	$C_{21}H_{20}O_{10}$	341, 311*, 283*	牡荆素	黄酮糖苷
22	27.032	787.1009	787.0999	−1.3	$C_{21}H_{20}O_{12}$	787, 617*, 465*, 295, 169	四没食子酰葡萄糖异构体2	酚酸糖苷
23	27.262	463.0878	463.0882	0.9	$C_{21}H_{20}O_{12}$	301*, 300*, 271, 255, 151*	异槲皮素	黄酮糖苷
24	27.673	335.0420	335.0409	−1.0	$C_{15}H_{12}O_9$	183*, 168, 124*	二没食子酸甲酯	酚酸酯
25	28.055	441.0811	441.0827	3.6	$C_{22}H_{18}O_{10}$	289*, 245*, 203	表儿茶素没食子酸酯异构体2	酚酸酯
26	28.565	939.1117	939.1109	−0.9	$C_{41}H_{32}O_{26}$	787*, 617*, 465, 169*	五没食子酰葡萄糖	酚酸糖苷
27	29.612	1091.1225	1091.1219	−0.5	$C_{48}H_{36}O_{30}$	787*, 769, 617*, 169*	六没食子酰葡萄糖	酚酸糖苷
28	30.358	1243.1336	1243.1328	−0.6	$C_{55}H_{40}O_{34}$	1091*, 939*, 787*, 169*	七没食子酰葡萄糖	酚酸糖苷

注：*表示主要的定性碎片离子。

物 18 的特征性碎片离子 m/z 229 [M-2CO-H_2O-H]$^-$ 和 145 [M-5CO-H_2O-H]$^-$, 根据文献鉴定为鞣花酸[33]。

2.4.2 酚酸衍生物的鉴定 由于芒果核提取物中大量化合物的碎片离子中有 m/z 169 和 125 或 124 的存在, 此类化合物可鉴定为没食子酸衍生物[34], 因此芒果核提取物中富含没食子酸衍生物。

化合物 2 的母离子 [M-H]$^-$为 m/z 331.0689, 碎片离子 m/z 271 [M-2CH_2O-H]$^-$。碎片离子 m/z 169 和 m/z 125 与没食子酸质谱信息一致, 故化合物 2 被鉴定为没食子酰葡萄糖[34]。

化合物 6 的母离子 [M-H]$^-$为 m/z 483.0798, 碎片离子 m/z 331 [M-$C_7H_4O_4$-H]$^-$失去一个没食子酰基, 其余碎片离子与化合物 2 质谱信息一致, 故化合物 6 被鉴定为二没食子酰葡萄糖[33]。

化合物 14 的母离子 [M-H]$^-$为 m/z 635.0890, 碎片离子 m/z 465 [M-$C_7H_6O_5$-H]$^-$和 m/z 313 [M-$C_7H_6O_5$-$C_7H_4O_4$-H]$^-$, 其余碎片离子与没食子酸质谱信息一致, 故化合物 14 被鉴定为三没食子酰葡萄糖[33]。

化合物 15、17 和 22 的母离子 [M-H]$^-$均为 787.1009 左右, 碎片离子 m/z 617 [M-$C_7H_6O_5$-H]$^-$、m/z 465 [M-$C_7H_6O_5$-$C_7H_4O_4$-H]$^-$和 m/z 295 [M-$C_7H_6O_5$-2$C_7H_4O_4$-H]$^-$, 其余碎片离子与没食子酸质谱信息一致, 因而化合物 15、17 和 22 被鉴定为四没食子酰葡萄糖[33]。

化合物 26、27 和 28 的母离子 [M-H]$^-$分别为 m/z 939.1117、1091.1225 和 1243.1336, 且均有 m/z 787、617 和 169 等碎片离子, 对照文献 [34], 化合物 26、27 和 28 被分别鉴定为五没食子酰葡萄糖、六没食子酰葡萄糖和七没食子酰葡萄糖。

化合物 4 的母离子 [M-H]$^-$为 m/z 493.1199, 碎片离子 m/z 313 [M-$C_6H_{10}O_5$-H_2O-H]$^-$以及碎片离子 m/z 169 和 m/z 125 与没食子酸质谱信息一致, 化合物 4 被鉴定为没食子酰二己糖。

化合物 3 的母离子 [M-H]$^-$为 m/z 343.0672, 碎片离子 m/z 191 [M-$C_7H_4O_4$-H]$^-$、169 [M-$C_7H_{10}O_5$-H]$^-$和 125 [M-$C_7H_{10}O_5$-CO_2-H]$^-$, 此化合物被鉴定为没食子酰基奎宁酸[35]。

化合物 7 和 12 的母离子 [M-H]$^-$分别为 m/z 183.0301 和 197.0460, 碎片离子 m/z 169 分别为 [M7-CH_2-H]$^-$和 [M12-CH_2CH_2-H]$^-$, 故化合物 7 和 12 分别被鉴定为没食子酸甲酯和没食子酸乙酯[34]。

化合物 24 的母离子 [M-H]$^-$为 335.0420, 其碎片离子 m/z 183 [M-$C_7H_4O_4$-H]$^-$为母离子失去一个没食子酰基, 其余碎片离子与化合物 7 质谱信息一致, 故化合物 24 被鉴定为二没食子酸甲酯[32]。

化合物 16、20 和 25 的母离子 [M-H]$^-$均为 441.0817 左右, 碎片离子 m/z 289 [M-$C_7H_4O_4$-H]$^-$、245 [M-$C_7H_4O_4$-CO_2-H]$^-$以及没食子酸的特征碎片离子, 故化合物 16、20 和 25 被鉴定为表儿茶素没食子酸酯[32]。

2.4.3 黄酮及其衍生物的鉴定 化合物 8 的母离子 [M-H]$^-$为 m/z 的母离子 [M-H]$^-$为 m/z 577.1351, 碎片离子 m/z 451 [M-$C_6H_6O_3$-H]$^-$, 425 [M-$C_8H_8O_3$-H]$^-$, 407 [M-$C_8H_8O_3$-H_2O-H]$^-$, 此外 m/z 289 和 287 分别是通过 QM 裂变产生的碎片 [M-H(290-H)]$^-$和 [M-2H(290-2H)]$^-$, 化合物 8 被鉴定为 B 型原花青素[33]。

化合物 5 和 10 的母离子 [M-H]$^-$分别为 m/z 423.0940 和 575.1049, 两者母离子间相差 152 且化合物 10 的碎片离子中含有 m/z 169 和 125 没食子酸的质谱信息, 其余碎片离子两者相同, 与文献值[35]一致, 故化合物 5 和 10 分别被鉴定为桑橙素-C-葡萄糖苷和桑橙素-C-(O-没食子酰)-葡萄糖苷[36]。

化合物 11 的母离子 [M-H]$^-$为 m/z 559.1113, 碎片离子 m/z 407 [M-$C_7H_4O_4$-H]$^-$为母离子失去一个没食子酰基所产生, 389 [M-$C_7H_6O_5$-H]$^-$为母离子失去一个没食子酸所产生; 另外, 碎片离子 m/z 317 [M-$C_7H_4O_4$-$C_3H_6O_3$-H]$^-$和 287 [M-$C_7H_4O_4$-$C_4H_8O_4$-H]$^-$均对应葡萄糖苷部分的损失; 根据已有的文献报道, 化合物 11 被鉴定为鸢尾酚酮-3-C-(2-O-没食子酰)-葡萄糖苷[36]。

化合物 13 的母离子 [M-H]$^-$为 m/z 421.0767, 碎片离子 m/z 259 [M-$C_6H_{10}O_5$-H]$^-$为母离子失去一个己糖苷所产生, 碎片离子 m/z 331[M-$C_3H_6O_3$-H]$^-$和 301[M-$C_4H_8O_4$-H]$^-$均对应糖苷部分的损失, m/z 271 [M-$C_4H_8O_4$-CH_2O-H]$^-$, 参照文献化合物 13 被鉴定为芒果苷[36−37]。

化合物 19 和 23 的母离子 [M-H]$^-$均为 m/z 463.0860 左右, 且碎片离子也是完全一致, 碎片离子 m/z 301[M-$C_6H_{10}O_5$-H]$^-$为母离子失去一个己糖苷所产生和 151 为黄酮类化合物特有的 RDA 碎片, 进一步跟标准品比对后确认化合物 19 和 23 分别为金丝桃苷和异槲皮素[37]。

化合物 21 的母离子 [M-H]$^-$为 431.0983, 碎片离子 m/z 341 [M-$C_3H_6O_3$-H]$^-$和 311 [M-$C_4H_8O_4$-H]$^-$均对应葡萄糖苷部分的损失, m/z 283 [M-$C_4H_8O_4$-CHO-H]$^-$, 并与标准品比对后确认化合物 21 是牡荆素。

3 结论

本研究探索了不同品种芒果核总酚、总黄酮、水解单宁、缩合单宁以及抗氧化活性之间的差异, 并对其多酚类物质进行了鉴定。结果表明: 实验中选取的市售 4 种芒果的芒果核, 紫花芒核在总酚、总黄酮、水解单宁和缩合单宁均为最高, 分别达到 193.77 mg GAE/g d.w.、25.58 mg RT/g d.w.、27.63 mg GAE/g d.w. 和 23.17 mg CE/g d.w.。体外抗氧化实验中, DPPH·清除能力和总抗氧化能力上, 象牙芒核和紫花芒核基本上无明显差异, 其次是三年芒核和玉芒核, 而 $ABTS^{+}$·清除能力上, 紫花芒核提取物的 $ABTS^{+}$·清除能力最强, 约是其他 3 种的 2 倍。在 Fe^{3+}还原能力上差异较大, 以紫花芒核最高。所测 8 个指标之间均呈现正相关, 其中总酚和水解单宁与其他指标均存

呈现较高的显著水平，而所选取的四个品种也存在较大差异，易于区分。通过 UPLC-Tripe TOF-MS/MS 共鉴定出 28 种多酚及其衍生物，包括 2 种酚酸、8 种酚酸酯、10 种酚酸糖苷、7 种黄酮糖苷和 1 种黄酮。总体来说，芒果核中含有较多酚类物质，其含量较高，抗氧化能力也较强。在一定程度上为芒果的副产品加工提供科学理论依据。

参考文献

[1] PANDEY K B, RIZVI S I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2009, 2(5): 270−278.

[2] WABOI M P, SUNIL K, NITIN K, et al. Physicochemical characteristics, bioactive compounds and industrial applications of mango kernel and its products: A review[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2020, 19(5): 2421−2446.

[3] 张影, 夏晓彤, 黄桂莲, 等. 常见热带水果芒果果皮中果胶的提取[J]. 广东化工, 2021, 48(3): 44−45. [ZHANG Y, XIA X T, HUANG G L, et al. Extraction of pectin from mango peel of common tropical fruit[J]. Guangdong Chemical Industry, 2021, 48(3): 44−45.]

[4] 李日旺, 黄国弟, 苏美花, 等. 我国芒果产业现状与发展策略[J]. 南方农业学报, 2013, 44(5): 875−878. [LI R W, HUANG G D, SU M H, et al. Present situation and development strategy of mango industry in China[J]. Journal of Southern Agriculture, 2013, 44(5): 875−878.]

[5] TORRES-LEON C, ROJAS R, CONTRERAS-ESQUIVEL J C, et al. Mango seed: Functional and nutritional properties[J]. Trends in Food Science & Technology, 2016, 55: 109−117.

[6] AUGUSTIN M A, LING E T. Composition of mango seed kernel[J]. Pertanika, 1987, 10(1): 53−59.

[7] WUERSCH P, HOOD L F. Structure of starch from mango seed[J]. Starch/Staerke, 1981, 33(7): 217−221.

[8] 杨巍巍, 邓航, 李娇, 等. 植物多酚化合物抗氧化损伤研究进展[J]. 现代食品, 2020, 22(16): 74−78. [YANG W W, DENG H, LI J, et al. Research progress on antioxidant damage of plant polyphenols[J]. Modern Food, 2020, 22(16): 74−78.]

[9] 康超, 李燕, 段振华, 等. 芒果核酚类物质提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(5): 47−51. [KANG C, LI Y, DUAN Z H, et al. Optimization of extraction process and antioxidant activity of phenolic compounds from mango kernel[J]. Food Research and Development, 2017, 38(5): 47−51.]

[10] LI H, XIA J, YANG L, et al. Plant polyphenols: Antioxidant capacity and application in animal production[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2013, 25(11): 2529−2534.

[11] MIRZA B, CROLEY C R, AHMAD M, et al. Mango (*Mangifera indica* L.): A magnificent plant with cancer preventive and anticancer therapeutic potential[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2021, 61(13): 2125−2151.

[12] WENG W, ZHANG Q, LI S, et al. Research progress in antiviral effect and mechanism of plant polyphenols[J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2020, 35(12): 6236−6240.

[13] FU S L, WU T T, WU C H, et al. Antioxidation and antibacterial mechanisms of plant polyphenols and application in food industry[J]. Food Industry, 2016, 37(6): 242−246.

[14] KITTIPHOOM S. Utilization of mango seed[J]. International Food Research Journal, 2012, 19(4): 1325−1335.

[15] 高云涛, 付艳丽, 李正全, 等. 超声与双水相体系耦合提取芒果核多酚及活性研究[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(9): 164−167. [GAO Y T, FU Y L, LI Z Q, et al. Ultrasonic and aqueous two-phase system coupling extraction of mango polyphenols and activity research[J]. Food and Fermentation Industry, 2009, 35(9): 164−167.]

[16] LUO B F, HUANG Z J, SUN M F, et al. Study on microwave-assisted extraction of mango polyphenol from mango nucleolus[J]. Food Research and Development, 2015, 36(1): 37−39.

[17] CHEN Y J, SHENG Z W, SHI R C, et al. Antioxidant activities of ethanol extracts from three varieties of mango seeds[J]. Food Science, 2011, 32(9): 8−13.

[18] 黄祉健, 阮玉凤, 罗宝芳, 等. 微波辅助提取芒果核多酚及其抑菌活性的研究 [J]. 食品工业科技, 2014, 35(12): 295-298. [HUANG Z J, RUAN Y F, LUO B F, et al. Microwave-assisted extraction of polyphenols from mango seeds and their antibacterial activities [J]. Food Industry Technology, 2014, 35(12) : 295-298.]

[19] 杨郑州, 陆雪梅, 谢晓娜. 芒果多酚含量及抗氧化能力的测定[J]. 安徽农学通报, 2017, 23(11): 142−143, 170. [YANG Z Z, LU X M, XIE X N. Determination of polyphenol content and antioxidant capacity of mango[J]. Anhui Agronomy Bulletin, 2017, 23(11): 142−143, 170.]

[20] 冯晓翎, 曹诗瑜, 徐晓瑜, 等. 11 个鲜食葡萄品种总酚含量和抗氧化活性的评价[J]. 食品工业科技, 2019, 40(6): 68−75. [FENG X L, CAO S Y, XU X Y, et al. Evaluation of total phenol content and antioxidant activity of 11 fresh grape varieties[J]. Food Industry Science and Technology, 2019, 40(6): 68−75.]

[21] 白雪莲, 沈淑雅, 陈怀玉, 等. 微波辅助提取芒果皮黄酮工艺研究[J]. 农产品加工, 2015, 3(6): 29−32. [BAI X L, SHEN S Y, CHEN H Y, et al. Microwave assisted extraction of flavonoids from mango peel[J]. Agricultural Products Processing, 2015, 3(6): 29−32.]

[22] 王瑶. 元宝枫果实成熟过程中主要成分测定及抗氧化能力研究 [D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2019. [WANG Y . Determination of main components and antioxidant capacity of *Acer truncatum* during fruit ripening [D]. Xianyang: Northwest University of Agriculture and Forestry Science and Technology, 2019.]

[23] CHANG X X, YE Y T, PAN J P, et al. Comparative assessment of phytochemical profiles and antioxidant activities in selected five varieties of wampee (*Clausena lansium*) fruits[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2018, 53(12): 2680−2686.

[24] 杨希娟, 党斌, 樊明涛. 溶剂提取对青稞中不同形态多酚组成及抗氧化活性的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(24): 239−248. [YANG X J, DANG B, FAN M T. Effects of solvent extraction on the composition and antioxidant activity of different forms of polyphenols in highland barley[J]. Food Science, 2018, 39(24): 239−248.]

[25] 刘瑞, 于章龙, 孙元琳, 等. 黑小麦芽抗氧化活性成分提取及其抗氧化能力研究[J]. 食品工业, 2021, 42(7): 134−138. [LIU

R, YU Z L, SUN Y L, et al. Extraction of antioxidant active components from black wheat sprouts and their antioxidant capacity[J]. Food Industry, 2021, 42(7): 134−138.]

[26] 张怡评, 杨婷, 洪专, 等. 青钱柳多酚提取工艺及抗氧化活性[J]. 食品工业, 2021, 42(6): 212−216. [ZHANG Y P, YANG T, HONG Z, et al. Polyphenol extraction process and antioxidant activity of *Cyclocarya paliurus*[J]. Food Industry, 2021, 42(6): 212−216.]

[27] 许鹏, 谭德锦, 宋海云, 等. 3 个芒果品种的性状对比试验[J]. 中国热带农业, 2016, 72(5): 55−57. [XU P, TAN D J, SONG H Y, et al. Comparative experiment on characters of three mango varieties[J]. China Tropical Agriculture, 2016, 72(5): 55−57.]

[28] LV Q Z, LONG J T, GONG Z F, et al. Current state of knowledge on the antioxidant effects and mechanisms of action of polyphenolic compounds[J]. Natural Product Communications, 2021, 16(7): 1−13.

[29] 李瑞娟, 梁锦, 王丹, 等. 不同品种猕猴桃汁抗氧化成分及体外抗氧化活性比较 [J/OL]. 食品工业科技: 1−12 [2021-09-16]. https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021050119. [LI R J, LIANG J, WANG D, et al. Comparison of antioxidant components and *in vitro* antioxidant activity of different varieties of kiwifruit juice [J/OL]. Science and Technology of Food Industry: 1−12 [2021-09-16]. https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021050119.]

[30] 杨倩雨, 郑浩, 李志强, 等. 油橄榄果实经济性状随成熟度的变化 [J/OL]. 中国油脂: 1−13 [2021-09-08]. https://doi.org/10.19902/j.cnki.zgyz.1003-7969.210288. [YANG Q Y, ZHENG H, LI Z Q, et al. Changes of economic characters of olive fruit with maturity [J/OL]. Chinese Oil: 1−13 [2021-09-08]. https://doi.org/10.19902/j.cnki.zgyz.1003-7969.210288.]

[31] 王丽艳, 王鑫森, 荆瑞勇, 等. 不同品种亚麻籽营养成分分析与品质综合评价[J]. 食品与机械, 2021, 37(7): 26−32. [WANG L Y, WANG X M, JING R Y, et al. Nutrient composition analysis and quality comprehensive evaluation of different varieties of flaxseed[J]. Food and Machinery, 2021, 37(7): 26−32.]

[32] BALLESTEROS-VIVAS D, ALVAREZ-RIVERA G, JOHANNA M S, et al. An integrated approach for the valorization of mango seed kernel: Efficient extraction solvent selection, phytochemical profiling and antiproliferative activity assessment[J]. Food Research International, 2019: 126.

[33] LIU P Z, LI L L, SUN X T, et al. Characterisation of phenolics in fruit septum of *Juglans regia* Linn. by ultra performance liquid chromatography coupled with orbitrap mass spectrometer[J]. Food Chemistry, 2019, 286: 669−677.

[34] ANAYA-LOYOLA M A, GARCIA-MARIN G, GARCIA-GUTIERREZ D G, et al. A mango (*Mangifera indica* L.) juice by-product reduces gastrointestinal and upper respiratory tract infection symptoms in children[J]. Food Research International, 2020: 136.

[35] MOHSEN E, YOUNIS I Y, FARAG M A. Metabolites profiling of Egyptian *Rosa damascena* Mill. flowers as analyzed via ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry and solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry in relation to its anti-collagenase skin effect[J]. Industrial Crops and Products, 2020: 155.

[36] DORTA E, GONZALEZ M, GLORIA L M, et al. Screening of phenolic compounds in by-product extracts from mangoes (*Mangifera indica* L.) by HPLC-ESI-QTOF-MS and multivariate analysis for use as a food ingredient[J]. Food Research International, 2014, 57: 51−60.

[37] 覃洁萍, 邓家刚, 冯钰锜, 等. 有机质谱分析在芒果苷原料药微量杂质结构鉴定中的应用[J]. 质谱学报, 2008, 29(4): 218−225. [QIN J P, DENG J G, FENG Y K, et al. Application of organic mass spectrometry in the identification of trace impurities in mangiferin API[J]. Journal of Mass Spectrometry, 2008, 29(4): 218−225.]

孙乐常, 赵阿云, 杜瀚, 等. 酸/碱预处理对美洲鳗鲡(*Anguilla rostrata*)鱼骨明胶理化性质与凝胶特性的影响 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 71−78. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080130

SUN Lechang, ZHAO Ayun, DU Han, et al. Effects of Acidic/Alkali Pretreatment on Physicochemical Properties and Gelation Characteristics of Bone Gelatin from American Eel (*Anguilla rostrata*)[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 71−78. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080130

· 研究与探讨 ·

酸/碱预处理对美洲鳗鲡（*Anguilla rostrata*）鱼骨明胶理化性质与凝胶特性的影响

孙乐常[1,2,3], 赵阿云[1,2,3], 杜　瀚[1,4], 翁　凌[1,2,3], 缪　松[1,4], 曹敏杰[1,2,3,*]

（1.集美大学海洋食品与生物工程学院, 福建厦门 361021;
2.海洋食品精深加工关键技术省部共建协同创新中心, 大连工业大学, 辽宁大连 116034;
3.水产品深加工技术国家地方联合工程研究中心, 集美大学, 福建厦门 361021;
4.爱尔兰农业部农业与食品发展局 Teagasc 食品研究中心, 科克 999014）

摘　要: 以美洲鳗鲡（*Anguilla rostrata*）鱼骨为原料，采用酸或碱预处理结合热水浸提制备鱼骨明胶，并通过得率、凝胶强度测定、SDS-PAGE、紫外全波长扫描、红外光谱扫描、动态流变学测定以及扫描电镜等研究鱼骨明胶的理化性质和凝胶特性。结果表明：酸法预处理明胶（AG60）与碱法预处理明胶（BG60）得率分别为 13.6% 和 6.88%，凝胶强度分别为 101.95 g 和 78.74 g。AG60 和 BG60 的羟脯氨酸含量为 3.2 g/100 g 和 2.7 g/100 g。两种明胶均含有 β 和 α_1、α_2 链，其中 AG60 的 α_1+α_2 含量显著高于 BG60。AG60 与 BG60 均具有明胶的特征吸收峰，且无杂蛋白吸收峰。与 BG60 相比，AG60 具有更高的凝胶温度与熔融温度，以及更短的胶凝时间。扫描电镜分析显示，AG60 具有更致密、均一的凝胶网络结构。本研究表明，与碱法预处理相比，酸法预处理制备得到的鳗鱼骨明胶具有更高的得率与更好的凝胶特性。

关键词: 美洲鳗鲡, 鱼骨明胶, 酸预处理, 碱预处理, 凝胶特性

中图分类号: TS254.9　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0071−08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080130

本文网刊:

Effects of Acidic/Alkali Pretreatment on Physicochemical Properties and Gelation Characteristics of Bone Gelatin from American Eel (*Anguilla rostrata*)

SUN Lechang[1,2,3], ZHAO Ayun[1,2,3], DU Han[1,4], WENG Ling[1,2,3], MIAO Song[1,4], CAO Minjie[1,2,3,*]

（1.College of Marine Food and Bioengineering, Jimei University, Xiamen 361021, China;
2.Collaborative Innovation Center of Seafood Deep Processing, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China;
3.National & Local Joint Engineering Research Center of Deep Processing Technology for Aquatic Products, Jimei University, Xiamen 361021;
4.Teagasc Food Research Centre, Ministry of Agriculture, Cork 999014, Ireland）

Abstract: Fish bone gelatins were prepared from *Anguilla rostrata* by acidic or alkali pretreatment combined with hot water extraction. The physicochemical properties and gel properties of fish bone gelatins were investigated via the yield determination, gel strength measurement, SDS-PAGE analysis, ultraviolet full-wavelength scanning, infrared spectrum scanning, dynamic rheology measurement and scanning electron microscopy. As results, the yields of acid pretreated gelatin (AG60) and alkaline pretreated gelatin (BG60) were 13.6% and 6.88%, with the corresponding gel strengths of 101.95 g

收稿日期: 2021−08−12

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项（2018YFD0901004）。

作者简介: 孙乐常（1985−）, 男, 博士, 副教授, 研究方向: 水产品深加工与蛋白质化学, E-mail: sunlechang@163.com。

*** 通信作者:** 曹敏杰（1964−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 水产品深加工与蛋白质化学, E-mail: mjcao@jmu.edu.cn。

and 78.74 g, respectively. The hydroxyproline contents of AG60 and BG60 were 3.2 g/100 g and 2.7 g/100 g. Both gelatins were mainly consisted of β and α_1, α_2 chains, the contents of α_1 and α_2 chains in AG60 was significantly higher than those in BG60. Both AG60 and BG60 possessed the characteristic absorption peak of gelatin without any absorption peaks for other proteins. The AG60 possessed higher gelling temperature and melting temperature, as well as a shorter gelling time. Scanning electron microscopy analysis showed that AG60 showed a more dense and uniform gel network structure as compared with BG60. Present study suggested that the eel bone gelatin prepared by acidic pretreatment had better gel properties than that of gelatin prepared by alkali pretreatment.

Key words: American eel; fish bone gelatin; acidic pretreatment; alkali pretreatment; gelation characteristics

明胶是胶原蛋白的变性产物，由于其独特的功能特性而被广泛应用于食品、制药和化妆品等领域[1]。一般来说，商业明胶主要是以猪、牛等哺乳动物的皮和骨为原料制得。然而哺乳动物来源的明胶存在牛海绵状脑病（TSE）和口蹄疫（FMD）等人畜共患疾病的安全风险以及宗教信仰的使用限制，使其在食品领域中的应用受到一定程度的影响[2]。相比之下，利用水产动物副产物（如：鱼皮、鱼鳞、鱼骨等）制备明胶，不仅具有良好的安全性与接受度，还有利于副产物的高值化利用，具有广阔的市场应用前景。

商业明胶的制备主要包括原料的预处理和提取明胶两部分：在预处理阶段，不仅可以去除样品表面的非胶原蛋白，还可以破坏稳定胶原蛋白结构的共价键，使胶原纤维发生溶胀，促进其溶解，从而提高明胶提取效率[3]。在提取阶段，通过 45 ℃ 以上的水浴加热使胶原蛋白受热水解，导致胶原分子的螺旋结构更多地向无规则线圈转变，产生松散卷曲的明胶多肽链，转化为可溶性明胶[4]。鱼骨和鱼皮作为水产品大规模工业化加工过程中产生的主要副产物，往往残留鱼肉或油脂，且骨骼中含有 40% 左右的无机矿物质，需要进行必要的预处理以提高明胶提取率和纯度。常用的预处理方式主要有酸处理和碱处理，其相应得到的明胶也分别被称为酸法明胶（A 型明胶）和碱法明胶（B 型明胶）。Hao 等[5] 比较了氢氧化钙和醋酸溶液不同预处理对西伯利亚鲟鱼（*Acipenser baeri*）鱼皮明胶的理化特性，发现氢氧化钙和醋酸结合的预处理方式制得的明胶特性最好。Ali 等[6] 发现硫酸/乙酸预处理结合超声波预处理可以有效地提高金鲫鱼（*Probarbus jullieni*）鱼皮明胶的提取效率和凝胶特性。由此可见，酸/碱预处理对明胶的理化特性与凝胶特性具有重要影响。针对鱼骨或鱼皮明胶的提取，目前国内外研究已有较多报道，如：于淑池等[7] 研究了提取工艺对金鲳鱼（*Trachinotus ovatus*）鱼骨明胶性质影响；Muyonga 等[8] 则对比了尼罗河鲈鱼（*Lates niloticus*）鱼皮和鱼骨明胶的理化特性；Mi 等[9] 研究了酶法辅助提取对阿拉斯加狭鳕（*Theragra chalcogramma*）和黄鳍金枪鱼（*Limanda aspera*）鱼骨明胶特性的影响。这些研究主要围绕提取工艺对明胶性质的影响以及不同来源明胶的性质对比等方面，而对比酸和碱处理后鱼骨明胶的差异则鲜有报道。

鳗鲡是我国重要的经济水产养殖品种之一，随着养殖和加工技术的进步，我国已成为世界鳗鱼制品（以烤鳗为主）的出口基地。福建是我国鳗鱼制品的出口大省，2019 年福建省鳗鱼产量 10.14 万吨，占全国鳗鱼养殖总产量的 43.31%，2018 年福建省烤鳗出口量为 2.0 万吨，占当年中国烤鳗出口量的 51.28%[10]。烤鳗在加工过程中会产生大量的副产物，其中鱼骨可占鳗鱼总重的 10%。鳗鱼骨中含有丰富的胶原蛋白，是制备胶原蛋白和明胶的理想原料。

本研究以我国当前主要的鳗鲡养殖品种——美洲鳗鲡（*Anguilla rostrata*）为对象，研究酸/碱预处理对美洲鳗鲡鱼骨明胶理化特性及其凝胶性质的影响，旨在为鳗鱼骨的明胶制备与品质控制提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

美洲鳗鲡鱼骨　福建省汉德（武夷山）食品有限公司提供；十二烷基硫酸钠（SDS）、羟脯氨酸　标准品，美国 Sigma 公司；异丙醇、氢氧化钠、盐酸　国药集团化学试剂有限公司。

HD-E702-100T 高低温交变试验箱　海达仪器有限公司；恒温水浴锅　厦门精艺工业科技有限公司；Alpha 1-4 LD plus 冷冻干燥机　德国 CHRIST 公司；NamoPhotometer 超微量分光光度计　德国 IMPLEN 公司；Mini-PROTEAN 蛋白质电泳装置　美国 Bio-Rad 公司；G:BOX 凝胶成像仪　英国 Syngene 公司；Phenom Pro 台式扫描电子显微镜　荷兰 Phenom World Pr 公司；TA.XTPLUS 质构仪　美国 TA Instruments 仪器；NICOLET 傅里叶红外光谱分析仪　Thermo SCIENTIFIC 公司；DHR-1 流变仪　美国 TA Instruments 仪器公司。

1.2 实验方法

1.2.1 美洲鳗鲡鱼骨明胶的制备

1.2.1.1 美洲鳗鲡鱼骨预处理　鱼骨预处理参考 Bandeira[11] 和 Abedinia[12] 等的方法并做适当修改。将解冻好的美洲鳗鲡鱼骨放置温度为 27 ℃、湿度为 10% 的干燥箱中冷风风干至水分含量低于 10%，用粉碎机粉碎成骨粉，在−20 ℃ 储存备用。在两个烧杯中分别称取 100.0±0.1 g 的鱼骨粉，分别加入料液比为 1∶10（w/v）的浓度为 0.1 mol/L NaOH 溶液和 0.6 mol/L HCl 溶液。在 4 ℃ 下缓慢搅拌处理 24 h，每隔 6 h 更换一次处理液。处理结束后，用蒸馏水反复洗涤鳗鲡鱼骨残渣，直至洗涤水的 pH 呈中性。由于鳗鱼油脂较多，酸或碱处理后用 10% 的异丙醇进

行脱脂处理 24 h，每隔 12 h 更换一次溶液。脱脂结束后用蒸馏水进行冲洗，沥干备用。

1.2.1.2　鱼骨明胶的提取　称取处理好的鳗鲡骨粉于烧杯中，加入料液比为 1∶5(w/v)的蒸馏水，并置于 60 ℃ 水浴锅中提取 4 h[13]。提取结束后，样品用双层绢布过滤，收集滤液，进行真空冷冻干燥。冻干样分别命名为 AG60 和 BG60(G 表示明胶；A 表示酸预处理；B 表示碱预处理)，储存于−20 ℃ 备用。

1.2.2　鱼骨明胶得率测定　参考 Mi 等[9] 的方法，将处理后的鳗鲡鱼骨在 27 ℃ 的烘箱中烘干至水分含量低于 5%，称重，记录前处理鱼骨的干量。冷冻干燥后的明胶进行称重，记录干重。鳗鲡鱼骨明胶提取率的计算公式为：

$$得率(\%)=\frac{明胶(g)}{鱼骨(g)}\times 100$$

1.2.3　羟脯氨酸含量测定　明胶中的羟脯氨酸含量按照 Woessner 等[14] 的方法进行测定。称取 20 mg 的明胶冻干样，加入 3 mL 浓度为 6 mol/L 的盐酸，在 130 ℃ 下水解 4 h，冷却后倒入小烧杯中，滴入甲基红试剂一滴，随后加入 1 mL 柠檬酸缓冲液和 1 mL 绿胺 T，混匀后室温下反应 10 min。加入 1 mL 浓度为 3.5 mol/L 的高氯酸，室温下反应 10 min，加入发色剂 1 mL，在 65 ℃ 水浴反应 20 min，冷却至室温后在 560 nm 下侧吸光值。以羟脯氨酸为标准品，绘制标准曲线进行定量分析。

1.2.4　鱼骨明胶凝胶强度测定　鳗鲡鱼骨明胶凝胶强度的测定参考 Tan 等[15] 的方法并做适当修改。称取鳗鲡鱼骨明胶 0.667 g 置于烧杯中，加入 10 mL 蒸馏水，在 60 ℃ 水浴至充分溶解，制备浓度为 6.67% 的明胶溶液。在 4 ℃ 冰箱内放置 16~18 h 直至形成明胶凝胶。在室温下快速用 TA.XTPLUS 质构仪测定其凝胶强度，采用型号为 p/5 s 的球形探头，设置测试速度为 0.5 mm/s，触发力为 5 gf，当质构仪的探头下压至 6 mm，凝胶对探头的最大反作用力就是凝胶强度(g)。

1.2.5　SDS-PAGE 分析　参照 Laemmli[16] 的方法做适当修改，进行鱼骨明胶 SDS-PAGE 电泳分析。称取适量明胶冻干样溶解于蒸馏水中，配制样品浓度为 2 mg/mL 的明胶溶液，按照样品与缓冲液的比例为 3∶1，将样品 SDS 化。浓缩胶和分离胶丙烯酰胺浓度分别为 4% 和 8%，在 10 mA 电流下进行电泳。待电泳结束后，通过考马斯亮蓝 R-250 染液进行染色，再用 30%(v/v)甲醇和 10%(v/v)乙酸溶液进行脱色，利用凝胶成像仪拍照。

1.2.6　鱼骨明胶紫外全波扫描　使用 Namo Photometer 超微量分光光度计测定鱼骨明胶的紫外-可见光吸收光谱。使用蒸馏水配制浓度为 0.5 mg/mL 的明胶溶液，在 200~400 nm 的范围内进行全波长扫描，蒸馏水为参考。

1.2.7　鱼骨明胶红外光谱扫描　在干燥条件下，取适量分析纯 KBr 研磨压片，作为扫描背景。取 1 mg 鱼骨明胶冻干样和 100 mg KBr 晶体于玛瑙研钵中充分研磨均匀，手动压片，选取均匀度和厚薄适中的样品放入样品室，使用 Nicolet 傅立叶红外光谱分析仪对样品在 500~4000 cm^{-1} 区间内扫描，基数校正后进行吸光度分析[17]。

1.2.8　鱼骨明胶流变学特性分析　明胶的动态流变学分析根据 Tan 等[15] 的方法进行测定。称取鳗鲡鱼骨明胶置于烧杯中，加入蒸馏水，在 60 ℃ 水浴至充分溶解，配制成浓度为 6.67% 的明胶溶液。使用 DHR-1 流变仪测定其流变学特性，测试夹具为 40 mm 铝平板。在进行流变试验之前，首先进行应力扫描，以确定明胶样品的线性粘弹性区域。

1.2.8.1　温度扫描　采用温度扫描测定样品的凝胶温度和熔融温度。取适量样品溶液于流变仪的帕尔帖平板上，调整至夹具间隙后在样品的外边缘用硅油封边，以减少样品在测量中的水分损失。测定程序参数条件为：应变为 0.5%，频率为 1 Hz，扫描速率为 2 ℃/min，温度程序设定为一个循环。冷却扫描，温度范围设置为 40~0 ℃；加热扫描，温度范围设置为 0~40 ℃，平衡时间均为 120 s。每 30 s 采集一个点，记录储能模量和损耗模量随温度扫描的变化曲线。

1.2.8.2　时间扫描　流变仪参数设置：应变为 0.5%，实验温度为 4 ℃，频率为 1 Hz，时间设置 600 s，进行时间扫描，观察样品储能模量和损耗模量的变化情况。

1.2.9　鱼骨明胶扫描电镜分析　使用扫描电镜观察这两种鱼骨明胶凝胶的微观结构。配制浓度为 6.67% 的明胶样品，在 4 ℃ 下静置 18 h 形成明胶凝胶。明胶凝胶切成厚 2~3 μm 的小块。样品在含有 2.5% 戊二醛的 pH7.2、0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲液中固定 12 h。用蒸馏水冲洗 1 h，并使用浓度分别为 50%、70%、80%、90% 和 100% 的乙醇梯度脱水[18]。固定后的明胶凝胶样品直接真空冷冻干燥。将两种方法脱水后的样品固定在电镜样品台上，用离子溅射仪进行喷金，扫描电子显微镜在 10 kV 的加速电压下观察样品微观结构。

1.3　数据处理

所有实验使用三个不同的样品批次进行三次。用 Excel 软件进行数据录入和图表制作，数据以平均值±标准偏差表示。

2　结果与分析

2.1　鱼骨明胶得率、羟脯氨酸含量以及凝胶强度分析

如表 1 所示，在同等提取条件下，美洲鳗鲡鱼骨 AG60 和 BG60 的得率分别为 13.60% 和 6.88%，酸法预处理的明胶得率明显高于碱法预处理。这可能是由于盐酸可以与鱼骨中的无机矿物质主要是羟基磷灰石反应，破坏了胶原蛋白与钙盐的结合，生成可

表 1 鳗鲡鱼骨明胶得率、羟脯氨酸含量以及凝胶强度

Table 1 Yield, hydroxyproline content and gel strength of eel bone gelatin

样品	得率(%)	羟脯氨酸含量(g/100 g)	凝胶强度(g)
AG60	13.60±0.43[a]	3.2±0.02[a]	101.95±4.59[a]
BG60	6.88±0.33[b]	2.7±0.45[b]	78.74±1.16[b]

注: 同列不同字母表示差异显著(P<0.05)。

溶性钙盐, 促进了胶原溶出, 导致 AG60 的得率更高[19]。相比之下, Sockalingam 等[20] 采用酸处理提取的黑罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)鱼头骨明胶得率为 5.75%, 远低于与本研究中酸法预处理的明胶得率。此外, 杜杰等[21] 采用酸法从大目金枪鱼(*Thunnus obesus*)鱼皮中提取的明胶得率为 22.01%, Zhang 等[22] 碱处理提取的罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)鱼皮明胶得率为 18.4%, 鱼皮明胶的得率远高于鱼骨明胶。这可能是由于鱼皮中胶原蛋白含量本就高于鱼骨, 因而相同提取方法下明胶的最终得率也高于鱼骨。

脯氨酸和羟脯氨酸是胶原蛋白和明胶的特征氨基酸, 对稳定胶原蛋白的三螺旋结构与明胶的凝胶特性具有重要影响[23]。以羟脯氨酸标准品制作标准曲线, 所得标准曲线为: y=0.1074x+0.001(R^2=0.998)。如表 1 所示, AG60 和 BG60 的羟脯氨酸含量分别为 3.2 和 2.7 g/100 g, AG60 高于 BG60, 这与得率结果一致。BG60 的羟脯氨酸含量降低可能与碱预处理过程中部分羟脯氨酸的羟基被碱破坏相关。美洲鳗鲡鱼骨明胶的羟脯氨酸含量远低于点纹斑竹鲨鱼皮(*Chiloscyllium punctatum*)(7.6 g/100 g)和黑尖鲨鱼皮(*Carcharhinus limbatus*)(7.28 g/100 g)[18]、商业牛明胶(9.8%±0.61%)和鸡肉皮(11.63%±0.11%)[23]明胶。不同物种明胶的羟脯氨酸含量不同, 这可能与动物生长栖息环境的温度相关, 冷水鱼明胶的羟脯氨酸含量低于温水鱼[24]。

凝胶强度是明胶的重要功能性质之一。鱼骨 AG60 和 BG60 的凝胶强度如表 1 所示, 分别为 101.95±4.59 和 78.74±1.16 g, 均低于商品牛明胶(238.25 g)[23]。明胶凝胶强度与羟脯氨酸的含量相关, 明胶中羟脯氨酸含量越高, 蛋白分子间的交联作用也越强, 形成的凝胶网络结构也越稳固[23]。不同类型鱼明胶的凝胶强度不同, 冷水鱼明胶的凝胶强度通常在 100 g 左右, 而温水鱼明胶的凝胶强度一般高于 200 g, 这可能与不同种类鱼的生活环境及其胶原蛋白中的亚氨基酸含量有关[25]。此外, 明胶分子的蛋白组成被认为在凝胶化过程中也起着重要作用, 在凝胶化过程中, 具有长肽链(含有大量 α 链和 β 链)的明胶能够更有效地排列或自聚集, 形成更稳定的三维网络结构, 从而增强了明胶的凝胶强度[15]。

2.2 鱼骨明胶 SDS-PAGE 分析

鱼骨明胶的蛋白组成及分子量分布如图 1 所示。AG60 和 BG60 的分子量分布较为相似, 均含有明胶的主要条带 α_1、α_2、β 链以及少量低于 100 kDa 的组分。灰度分析结果显示(图 1B), AG60 的 β 和 α 亚基含量较高, 表明酸处理更容易使胶原蛋白溶胀, 有利于明胶提取。在胶原转化为明胶的过程中, 连接胶原链的分子间和分子内作用力被破坏, 进而产生一些较低分子量的蛋白组分[26]。明胶的凝胶强度主要取决于明胶的分子量分布, β 和 α 亚基含量越高明胶的凝胶强度越好[27], 这与表 1 中的结果一致。蔡成魁等[28] 发现适度的碱处理有助于螺旋结构保持一定的松散和解体, 而过度和不足的碱处理都会影响胶原分子结构的分解, 从而影响明胶的产量和质量。结合表 1 和电泳图结果显示, 在同等提取条件下, 碱处理明胶的得率低于酸处理, 推测碱预处理没有使羟基磷灰石与胶原蛋白充分解离。

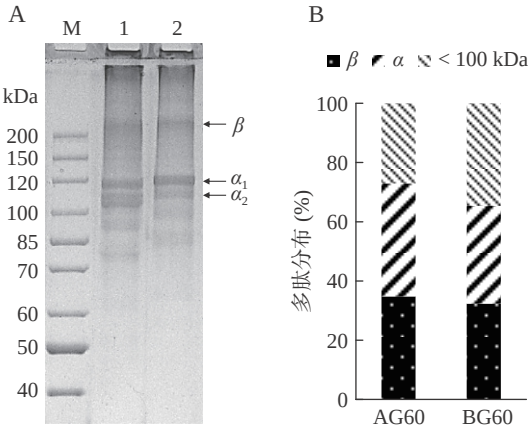


图 1 不同预处理鳗鲡鱼骨明胶 SDS-PAGE(A)和灰度分析(B)

Fig.1 SDS-PAGE (A) and gray scale analysis (B) of eel bone gelatin with different pretreatments

注: M: 标准蛋白 Marker; 1: AG60; 2: BG60。

2.3 鱼骨明胶紫外全波长扫描

已有研究表明由于明胶的芳香族氨基酸含量较少, 蛋白在 280 nm 处没有明显的吸收峰, 其最大吸收峰在 230 nm 附近[7]。如图 2 所示, 两种预处理下的明胶最大吸收峰均出现在 230 nm 处, 这与金鲳鱼(*Trachinotus ovatus*)鱼骨明胶的紫外扫描结果一致[7], 这主要由于明胶的 n→π*和 n→σ*价电子能级跃迁而

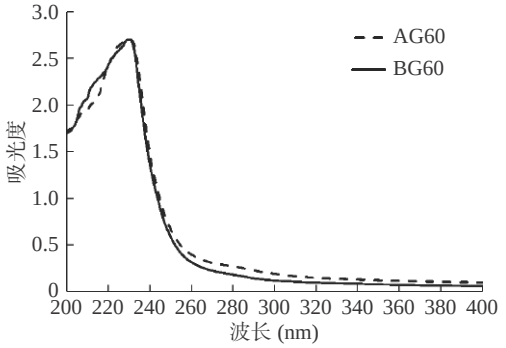


图 2 不同预处理对鳗鲡鱼骨明胶紫外全波长扫描影响

Fig.2 Effects of different pretreatments on UV full wavelength scanning of eel bone gelatin

造成的[29]。AG60 和 BG60 在 280 nm 处均没有吸收峰，表明此样品中没有其他蛋白存在，两种预处理方式都能有效去除非明胶的杂蛋白。

2.4　鱼骨明胶傅里叶红外光谱扫描

不同预处理方式下的美洲鳗鲡鱼骨明胶的红外光谱如图 3 所示，与真鲹鱼鱼骨明胶[15]的红外结果相似。鱼骨明胶的二级结构主要涉及酰胺Ⅰ(1656~1644 cm^{-1})、酰胺Ⅱ(1550~1520 cm^{-1})和酰胺Ⅲ(1300~1200 cm^{-1})，其中酰胺Ⅰ带主要是由多肽骨架 C=O 双键伸缩振动产生，酰胺Ⅱ带是因 N-H 键变形形成的，酰胺Ⅲ带是 C-H 振动的吸收峰，这部分结构与蛋白质的三级螺旋结构有关。鱼骨明胶 AG60 和 BG60 的酰胺Ⅰ峰分别出现在 1640.16、1636.79 cm^{-1}，与 AG60 相比，BG60 酰胺Ⅰ带发生了红移，说明 BG60 中与羰基有关的氢键含量较少[30]。通常，酰胺Ⅲ对应的波数与 1454 cm^{-1} 的比率约为 1.0，揭示胶原蛋白的三螺旋结构[31]。AG60 和 BG60 的酰胺Ⅲ峰分别在 1242.98 和 1244.78 cm^{-1} 处，峰强度都很低，说明在提取过程中，明胶的 α-螺旋结构受到一定程度破坏，导致三螺旋结构丢失[15]。

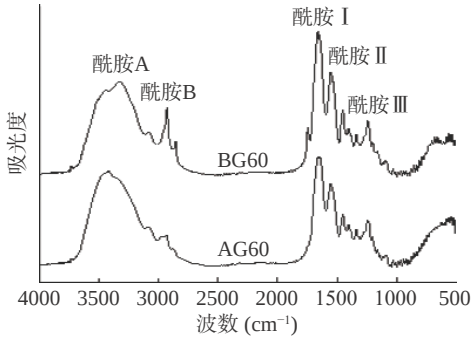


图 3　不同预处理对鳗鲡鱼骨明胶红外光谱扫描影响

Fig.3　Effect of different pretreatment on infrared spectrum scanning of eel bone gelatin

一般情况下，胶原的酰胺 A 带在 3400~3440 cm^{-1} 的波数范围内，是由 N-H 伸缩振动或 O-H 伸缩振动而形成的。当肽键中的 N-H 基团参与氢键的形成时，酰胺 A 带常向低波数移动[32]。由图 3 所示，AG60 和 BG60 的酰胺 A 带分别在 3419.57 和 3325.77 cm^{-1}，BG60 的酰胺 A 带波数较低的现象表明碱处理制备的明胶更容易降解，可以释放更多的游离氨基以增强与其他反应基团的相互作用[33]。AG60 和 BG60 酰胺 B 带分别在 3092.16、2933.06 cm^{-1} 和 2927.54、2855.63 cm^{-1}。酰胺 B 带是由 C-H 对称和非对称拉伸振动引起的，BG60 表现出较低波数，表明肽链之间存在-NH_3 相互作用[12]。

2.5　鱼骨明胶流变学特性分析

2.5.1　温度扫描　明胶的温度扫描过程主要包括三个阶段，分别为降温、恒温和升温。在降温和升温的过程中储能模量(G′)和损耗模量(G″)的交点分别为凝胶点和熔融点。由图 4 可知，AG60 样品在 0~40 ℃ 和 40~0 ℃ 的扫描过程中，G′和 G″相交并出现了两个交点，分别为熔融温度 21.43 ℃ 和凝胶温度 9.00 ℃。在温度扫描的过程中，明胶样品发生了从凝胶到溶液再到凝胶的转变。BG60 的 G′和 G″随温度的变化趋势与 AG60 相似，熔融温度和凝胶温度分别为 18.78 和 6.22 ℃。Tan 等[15]发现黑罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)鱼皮明胶的熔融温和凝胶温度分别为 21.6 和 14.6 ℃。相比之下，美洲鳗鲡鱼骨明胶表现出较低的凝胶温度和熔融温度，这可能与鱼骨和鱼皮中胶原分子间交联程度不同有关。

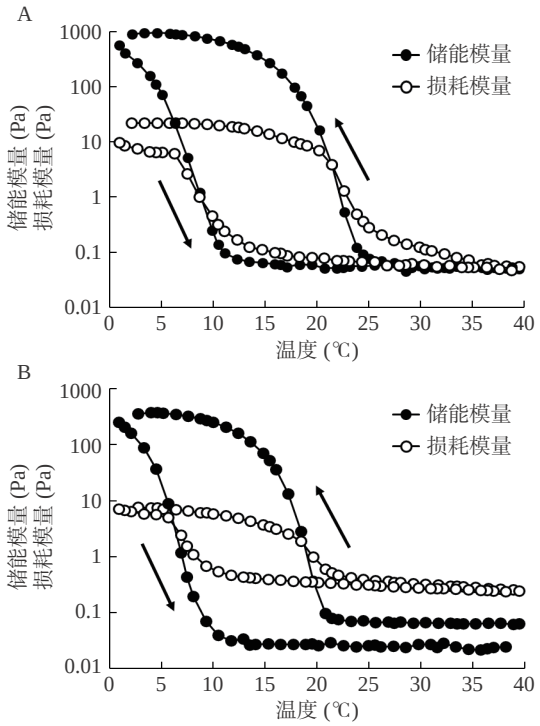


图 4　不同预处理对鳗鲡鱼骨明胶凝胶温度和熔融温度的影响

Fig.4　Effects of different pretreatments on gel temperature and melting temperature of eel bone gelatin

注：A 图为 AG60 温度扫描，B 图为 BG60 温度扫描，↑为降温过程，↓为升温过程。

另一方面，鳗鲡鱼骨 AG60 的熔融温度和凝胶均高于 BG60，这可能是因为 AG60 保留了较完整的亚基结构(图 1)，在凝胶化过程中能形成更多的类胶原螺旋结构，进而使其具有更高的弹性模量与凝胶强度[34]。明胶热稳定性的差异可以归因于每种明胶具有不同含量羟脯氨酸，羟脯氨酸含量越高，凝胶化和熔融温度越高[35]，这与羟脯氨酸含量结果一致。

2.5.2　时间扫描　如图 5 所示，在 32 和 75 s 前，AG60 和 BG60 的储能模量一直低于损耗模量，表明鱼骨明胶呈现溶胶状态。当时间分别延长到 32 s 和 75 s 时，这两种鱼骨明胶的 G′迅速增大，并远远超过 G″，体系由粘性瞬间转变为弹性，形成凝胶。储能模量增加速度越快，明胶分子交联速度就越快，形成明胶凝胶所需的时间就越短。AG60 和 BG60 的形成凝胶所需时间分别为 32.28 s 和 75.82 s，AG60 形成凝胶

的时间较短。明胶中羟脯氨酸的羟基和自由水分子可以形成氢键稳定其螺旋结构，羟脯氨酸含量较高的明胶表现出较好的流变性，具有较高的凝胶强度、熔融和凝胶温度，形成凝胶所需时间更短[23]。

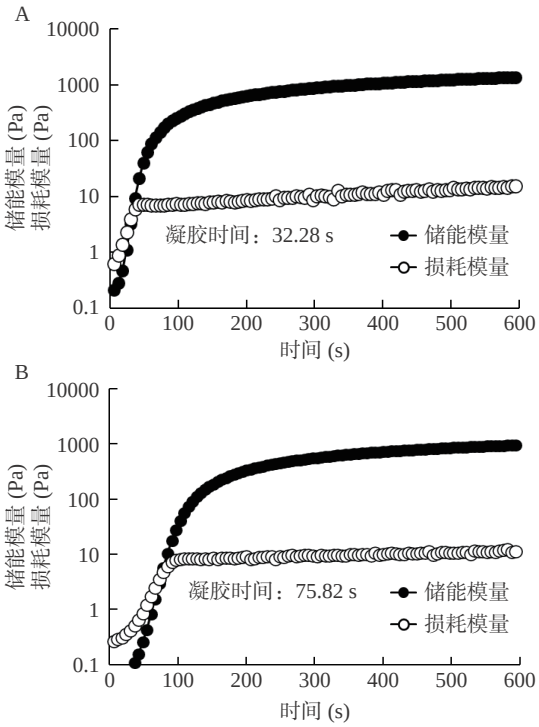


图 5 不同预处理对鳗鲡鱼骨明胶凝胶时间影响

Fig.5 Effects of different pretreatments on gelling time of eel bone gelatin

注：A 图为 AG60 时间扫描，B 图为 BG60 时间扫描。

2.6 鱼骨明胶扫描电镜分析

分别采用乙醇梯度脱水与真空冷冻干燥两种方式处理明胶凝胶样品用于扫描电镜观察，由图 6A~图 6C 可知，乙醇梯度脱水明胶的样品表面微观皱缩严重，观察不到明胶凝胶的网络结构。而采用真空冷冻干燥脱水的样品，在冻干过程中随着水分流失，明胶凝胶的微观结构呈现出不同的网络结构。两种明胶凝胶呈现出不同大小的孔洞结构，AG60(图 6B)的孔洞较小且分布较为均匀。相比之下，BG60(图 6D)形成了大小不均匀的孔洞，且孔壁较厚。凝胶基质中蛋白质分子的排列和结合会直接影响明胶的凝胶特性，其中较高含量的羟脯氨酸更有利于氢键与分子间交联的形成，进而在凝胶过程中能形成更加致密与稳定的凝胶网络结构[36−37]。如表 1 所示，AG60 的羟脯氨酸含量明显高于 BG60，这与明胶凝胶微观结构的结果相一致。

3 结 论

本研究表明，酸法与碱法预处理均能有效去除鳗鱼骨中的杂蛋白，获得高纯度的明胶。两种方法所得的明胶在制备过程中均发生一定程度的蛋白降解，其原有胶原蛋白的三股螺旋结构均受到破坏。与碱法预处理相比，美洲鳗鲡鱼骨经酸法预处理制备明胶的得率更高，所得明胶的羟脯氨酸含量较高，蛋白降解程度较低，螺旋结构破坏较少，且具有更好的凝胶特性。本研究为美洲鳗鲡鱼骨的综合利用提供了新途径，也为鳗鱼骨明胶的制备和品质控制提供了一定的理论参考。

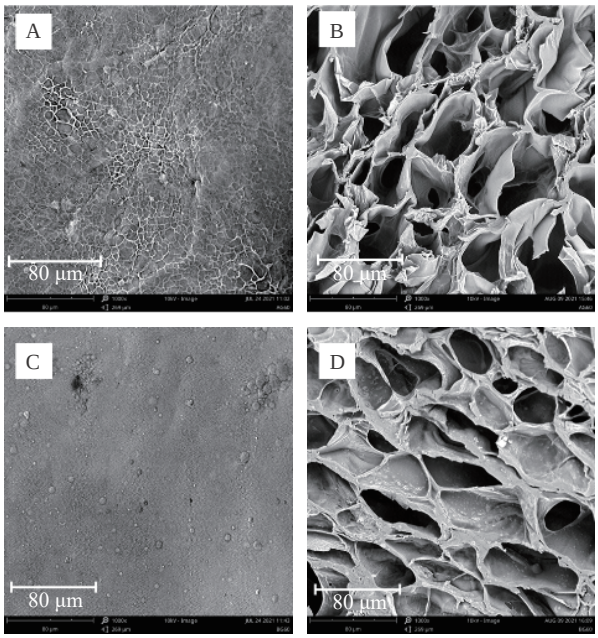


图 6 不同预处理对鳗鲡鱼骨明胶微观结构影响

Fig.6 Effect of different pretreatment on microstructure of eel bone gelatin

注：图 A 为 AG60 凝胶乙醇梯度脱水处理微观结构，图 B 为 AG60 凝胶固定后冻干样微观结构，图 C 为 BG60 凝胶乙醇梯度脱水处理微观结构，图 D 为 BG60 凝胶固定后冻干样微观结构，A、B、C、D 均在 1000×倍镜下观察。

参考文献

[1] KARIM A A, BHAT R. Fish gelatin: Properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins[J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23(3): 563−576.

[2] KIM S K, MENDIS E. Bioactive compounds from marine processing byproducts-A review[J]. Food Research International, 2006, 39(4): 383−393.

[3] BORAN G, REGENSTEIN J M. Optimization of gelatin extraction from silver carp skin[J]. Journal of Food Science, 2009, 74(8): E432−E441.

[4] DJABOUROV M, LECHAIRE J P, GAILL F. Structure and pheology of gelatin and collagen gels[J]. Biorheology, 1993, 30(3-4): 191−205.

[5] HAO S, LI L, YANG X, et al. The characteristics of gelatin extracted from sturgeon (*Acipenser baeri*) skin using various pretreatments[J]. Food Chemistry, 2009, 115(1): 124−128.

[6] ALI A M M, KISHIMURA H, BENJAKUL S. Physicochemical and molecular properties of gelatin from skin of golden carp (*Probarbus jullieni*) as influenced by acid pretreatment and prior-ultrasonication[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 82: 164−172.

[7] 于淑池, 赖卓慧. 金鲳鱼骨明胶的提取工艺及性质研究[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(3): 159−165. [YU Shuchi, LAI Zhuohui. Study on extraction technology and properties of bone gelatin from pomfret[J]. Food Research and Development, 2020, 41(3):

159−165.］

［8］ MUYONGA J H, COLE C, DUODU K G. Extraction and physico-chemical characterisation of nile perch (*Lates niloticus*) skin and bone gelatin[J]. Food Hydrocolloids, 2004, 18(4): 581−592.

［9］ MI H, WANG C, CHEN J, et al. Characteristic and functional properties of gelatin from the bones of alaska pollock (*Theragra chalcogramma*) and yellowfin sole (*Limanda aspera*) with papain-aided process[J]. Journal of Aquatic Food Product Technology, 2019, 28(3): 287−297.

［10］ 葛蕾丹, 王琰婷, 乔雯. 中国烤鳗出口现状与竞争力分析[J]. 对外经贸, 2020(1): 28−30. ［GE Leidan, WANG Yanting, QIAO Wen. Export status and competitiveness analysis of roast eel in China[J]. Foreign Economic Relations Trade, 2020(1): 28−30.］

［11］ BANDEIRA S F, SILVA R S G, MOURA J M, et al. Characterization and film-forming properties of gelatins from whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) skin and bones[J]. Journal of Aquatic Food Product Technology, 2017, 26(4): 447−456.

［12］ ABEDINIA A, ARIFFIN F, HUDA N, et al. Extraction and characterization of gelatin from the feet of Pekin duck (*Anas platyrhynchos* domestica) as affected by acid, alkaline, and enzyme pretreatment[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 98: 586−594.

［13］ LADISLAUS K M. 鱼皮、鱼骨中明胶的提取研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2006. ［LADISLAUS K M. Study on the extraction of gelatin from fish skin and fish bone[D]. Wuxi: Jangnan University, 2006.］

［14］ WOESSNER J F J. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1961, 93: 440−447.

［15］ TAN C, KARIM A A, UTHUMPORN U, et al. Effect of extraction temperature on the physicochemical properties of gelatin from the skin of black tilapia (*Oreochromis mossambicus*)[J]. Journal of Physical Science, 2019, 30(Supp.1): 1−21.

［16］ LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227(5259): 680−685.

［17］ 王珊珊, 卢玉坤, 杨霞, 等. 提取温度与提取时间对真鳕鱼骨明胶理化性质的影响[J]. 食品工业科技, 2013, 34(13): 53−57. ［WANG Shanshan, LU Yukun, YANG Xia, et al. Effect of extraction temperature and time on physicochemical properties of cod bone gelatin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(13): 53−57.］

［18］ KITTIPHATTANABAWON P, BENJAKUL S, VISESSANGUAN W, et al. Comparative study on characteristics of gelatin from the skins of brownbanded bamboo shark and blacktip shark as affected by extraction conditions[J]. Food Hydrocolloids, 2010, 24(2-3): 164−171.

［19］ 郑惠彬. 鱼鳞明胶的提取及其成膜性能的研究 [D]. 厦门: 集美大学, 2014. ［ZHENG Huibin. Extraction and film-forming properties of fish scale gelatin [D]. Xiamen: Jimei University, 2014.］

［20］ SOCKALINGAM K, ABDULLAH H Z. Extraction of high value added gelatin biopolymer from black tilapia (*Oreochromis mossambicus*) head bones [C]// AIP Conference Proceedings. 2015.

［21］ 杜杰, 刘廷薇, 马良, 等. 微波-快速冻融耦合鱼皮明胶理化性质分析[J]. 食品科学, 2021, 42(11): 108−115. ［DU Jie, LIU Tingwei, MA Liang, et al. Analysis of physicochemical properties of microwave-fast freeze-thaw coupled fish skin gelatin[J]. Food Science, 2021, 42(11): 108−115.］

［22］ ZHANG T, SUN R, DING M, et al. Effect of extraction methods on the structural characteristics, functional properties, and emulsion stabilization ability of tilapia skin gelatins[J]. Food Chemistry, 2020, 328(30): 127114.

［23］ AYKIN-DINCER E, KOC A, ERBAS M. Extraction and physicochemical characterization of broiler (*Gallus gallus* domesticus) skin gelatin compared to commercial bovine gelatin[J]. Poultry Science, 2017, 96(11): 4124−4131.

［24］ AKITA M, NISHIKAWA Y, SHIGENOBU Y, et al. Correlation of proline, hydroxyproline and serine content, denaturation temperature and circular dichroism analysis of type I collagen with the physiological temperature of marine teleosts[J]. Food Chemistry, 2020, 329(1): 126775.

［25］ 詹丽, 陈雪岚. 鱼明胶特性及改性对其品质影响的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(23): 385-393. ［ZHAN Li, CHEN Xuelan. Research progress on characteristics of fish gelatin and effects of modification on its quality[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(23): 385-393.］

［26］ TAN C, KARIM A A, UTHUMPORN U, et al. Effect extraction temperature on the emulsifying properties of gelatin from black tilapia (*Oreochromis mossambicus*) skin[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 108(3): 106024.

［27］ KITTIPHATTANABAWON P, BENJAKUL S, SINTHUSAMRAN S, et al. Gelatin from clown featherback skin: Extraction conditions[J]. LWT-Food Science and Technology, 2016, 66: 186−192.

［28］ 蔡成魁, 滕军. 明胶浸灰促进剂对浸灰周期的影响[J]. 明胶科学与技术, 1999(4): 205−208. ［CAI Chengkui, TENG Jun. Effect of gelatin leaching promoter on leaching cycle[J]. The Science and Technology of Gelatin, 1999(4): 205−208.］

［29］ YAN M, LI B, ZHAO X, et al. Characterization of acid-soluble collagen from the skin of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*)[J]. Food Chemistry, 2008, 107(4): 1581−1586.

［30］ 钟朝辉, 李春美, 顾海峰, 等. 温度对鱼鳞胶原蛋白二级结构的影响[J]. 光谱学与光谱分析, 2007(10): 1970−1976. ［ZHONG Chaohui, LI Chunmei, GU Haifeng, et al. Effect of temperature on secondary structure of fish scale collagen[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2007(10): 1970−1976.］

［31］ PLEPIS A, GOISSIS G, Das GUPTA D K. Dielectric and pyroelectric characterization of anionic and native collagen[J]. Polymer Engineering and Science, 1996, 36(24): 2932−2938.

［32］ DOYLE B B, BENDIT E G, BLOUT E R. Infrared spectroscopy of collagen and collagen-like polypeptides[J]. Biopolymers, 1975, 14(5): 937−957.

［33］ LIU Y, XIA L, JIA H, et al. Physiochemical and functional properties of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) skin gelatin extrac-

ted at different temperatures[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2017, 97(15): 5406−5413.

[34] CHIOU B, AVENA-BUSTILLOS R J, SHEY J, et al. Rheological and mechanical properties of cross-linked fish gelatins[J]. Polymer, 2006, 47(18): 6379−6386.

[35] PARK J, CHOE J, KIM H, et al. Effects of various extraction methods on quality characteristics of duck feet gelatin[J]. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 2013, 33(2): 162−169.

[36] BENJAKUL S, OUNGBHO K, VISESSANGUAN W, et al. Characteristics of gelatin from the skins of bigeye snapper, *Priacanthus tayenus* and *Priacanthus macracanthus*[J]. Food Chemistry, 2009, 116(2): 445−451.

[37] 满泽洲, 涂宗财, 王辉, 等. 加工条件对鱼鳞明胶凝胶性能和微观结构的影响[J]. 食品科学, 2013, 34(23): 67−71. [MAN Zezhou, TU Zongcai, WANG Hui, et al. Effect of processing conditions on gel properties and microstructure of fish scale gelatin[J]. Food Science, 2013, 34(23): 67−71.]

高瑞萍, 刘松林, 吴振. UV-C 联合热处理对橙汁品质特性的影响 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 79−86. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080158

GAO Ruiping, LIU Songlin, WU Zhen. Effect of Ultraviolet-C Combined with Heat Treatments on the Quality Properties of Orange Juice[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 79−86. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080158

· 研究与探讨 ·

UV-C 联合热处理对橙汁品质特性的影响

高瑞萍[1,2], 刘松林[1], 吴　振[3,*]

（1.重庆工商大学环境与资源学院, 重庆 400067;
2.中科院新疆生态与地理研究所, 新疆乌鲁木齐 830011;
3.重庆市中药研究院中药健康学重庆市重点实验室, 重庆 400065）

摘　要: 本研究比较短波紫外线（ultraviolet-C，UV-C）联合热（50 ℃）处理与传统巴氏杀菌（P）对鲜榨橙汁安全性、理化特性和营养特性的影响。通过比较 UV-C 与热的不同联合作用方式对橙汁中微生物的影响，得出最佳联合作用方式；并进一步探究最佳联合作用方式对橙汁的理化特性和营养特性的影响。结果发现：UV-C 与热对微生物的灭活具有协同作用，UV-C 与热同时作用为最佳联合方式；UV-C 于 50 ℃ 处理 10~30 min（UH10、UH20、UH30）对橙汁的 pH、可溶性固形物、可滴定酸度以及色泽没有显著性影响（P>0.05）；与 P 相比，UH10、UH20、UH30 使橙汁中的抗坏血酸分别提高 45.59%、38.31% 和 32.57%，多酚含量分别提高 4.78%、19.50% 和 32.35%，类胡萝卜素含量分别提高 46.12%、36.33% 和 30.20%，DPPH 自由基清除率分别提高 8.45%、19.07% 和 26.58%，ABTS 自由基清除率分别提高 11.23%、18.40% 和 22.23%。这说明与传统巴氏杀菌相比，UV-C 联合热处理可以在提高橙汁安全性的同时提高其营养价值。

关键词: UV-C 联合热处理, 橙汁, 安全特性, 理化特性, 营养特性

中图分类号: TS255.36　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0079−08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080158

本文网刊:

Effect of Ultraviolet-C Combined with Heat Treatments on the Quality Properties of Orange Juice

GAO Ruiping[1,2], LIU Songlin[1], WU Zhen[3,*]

（1.College of Environmental and Resources, Chongqing Technology and Business University, Chongqing 400067, China;
2.Xinjiang Institute of Ecology and Geography Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, China;
3.Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing Key Laboratory of Chinese Medicine and Health Science, Chongqing 400065, China）

Abstract: The effects of ultraviolet-C (UV-C) combined with heat (50 ℃) treatments and traditional pasteurization (P) on the safety, physical-chemical properties and nutritional values of freshly squeezed orange juice were compared in the present study. The best combined way was obtained by comparing the effects of different combinations of UV-C and heat on the microorganisms in orange juice. The effects of the best combined ways on the physical-chemical properties and nutritional values of orange juice were further explored. The results showed as follows: UV-C and heat had a synergistic inactivation effect on the microorganisms. The best combined way was UV-C and heat treatment simultaneously. UV-C treatment at 50 ℃ for 10~30 min (UH10, UH20, UH30) had no significant effect on the pH, total soluble solids, titratable acidity and color of orange juice (P>0.05). Compared with P, the levels of ascorbic acid in orange juice treated with UH10, UH20 and UH30 increased by 45.59%, 38.31% and 32.57%, respectively; the level of total phenolic increased by 4.78%, 19.50% and 32.35%, respectively; the carotenoid content increased by 46.12%, 36.33%, 30.20%, respectively; the

收稿日期: 2021−08−16

基金项目: 重庆市教委科技项目（KJQN202100828）; 重庆工商大学高层次人才科研启动项目（2156009）; 重庆市自然科学基金面上项目（cstc2019jcyj-msxmX0001）; 重庆市绩效激励引导专项项目（jxjl20200004）。

作者简介: 高瑞萍（1987−）, 女, 博士, 讲师, 研究方向: 农产品加工与贮藏、非热技术在食品加工中的应用, E-mail: gaorp_113@126.com。

*** 通信作者:** 吴振（1985−）, 男, 博士, 研究员, 研究方向: 食品化学和营养学、天然产物研究与开发, E-mail: wuzhen985@126.com。

scavenging capacities of DPPH radical increased by 8.45%, 19.07%, and 26.58%, respectively; and the scavenging capacities of ABTS radical increased by 11.23%, 18.40%, and 22.23%, respectively. These results indicated that UV-C combined heat treatments could improve the safety of orange juice and increase its nutritional value compared with traditional pasteurization.

Key words: ultraviolet-C combined with heat treatments; orange juice; safety properties; physical-chemical properties; nutritional value

橙汁是最受消费者欢迎的果汁之一，含有丰富的维生素 C、类胡萝卜素、多酚、矿物质等营养物质[1]。研究表明，摄入橙汁能够改善心脏功能，减少氧化应激，调节人体的免疫系统，有效预防肾病、高血压、糖尿病、癌症、痛风等慢性疾病的发生[2−4]。橙汁在加工和贮藏过程中会受到内源酶、微生物等的影响，使其感官、营养发生劣变以及安全性受到威胁。橙汁中的多酚类物质会被多酚氧化酶氧化为醌类物质，而使得橙汁颜色发生改变；橙汁中的果胶甲酯酶通过降解果胶会导致其稳定性变差；同时，由于各种微生物的繁殖会对橙汁的安全性造成威胁[5]。

热加工作为果蔬汁的传统加工方式，能有效杀灭果蔬汁中的内源酶和致病菌，以保证其贮藏稳定性及安全性。然而，热加工不可避免地造成橙汁的色泽、热敏营养素（如抗坏血酸）和香气等感官和营养品质发生劣变[6−9]。近年来，研究发现超高压、超声波、紫外、脉冲电场等非热加工技术不仅能够使果蔬汁具有较好的色泽、稳定性、安全性，还能较好地保持甚至改善其风味及营养价值，因此成为研究热点。其中，通过 200~280 nm 的短波紫外辐照（ultraviolet radiation, UV-C）是一种被 FDA 推荐用来替代果蔬汁热加工的安全、有效的非热技术[10]。UV-C 的辐射能被微生物中的 DNA 吸收，使得相邻嘧啶碱基相互结合在同一条 DNA 链上，阻止 DNA 转录和翻译，从而实现使微生物失活的目的[11]。UV-C 作为一种非热加工技术，具有无毒副产物产生，能降解毒素，不产生异味和能耗低等优势[8]。许多研究报道通过 UV-C 处理西瓜汁、草莓汁、苹果汁、芒果汁等果蔬汁，能使其中的微生物灭活，同时能保留其营养和感官品质[12−13]。但是，由于 UV-C 作为一种食品加工技术，其有效性受到原料的组分、色泽、不溶性悬浮物、流动特性、样品体积以及紫外强度等复杂因素的影响[11]，使其对果蔬汁的灭菌能力具有复杂性。例如 UV-C 在透光率较低的果蔬汁（如橙汁）中穿透力显著降低，从而影响其灭菌能力[14]。此外，由于 UV 辐照不会在食物中残留，因此 UV 辐照后微生物中的 DNA 会修复，影响其灭菌效果[11]。由此可见，当仅应用 UV-C 处理果蔬汁时，达不到理想的灭菌效果，通常需要与其他技术联合应用。

基于 UV-C 技术在果蔬汁中应用的前景及局限性，本研究拟采用 UV-C 联合低温热处理对鲜榨橙汁进行处理，筛选出 UV-C 和热处理的最佳联合方式，并探究 UV-C 联合热处理对橙汁的安全性、理化特性和营养特性的影响规律，为加工高品质的橙汁探索新技术，同时为 UV-C 技术在橙汁加工中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

奉节脐橙　产地为重庆市奉节县；氯化钠、氢氧化钠、无水乙醇　分析纯，重庆川东化工有限公司；正己烷、丙酮、酚酞、碳酸钠、碳酸氢钠、过硫酸钾　分析纯，成都市科龙化工有限公司；PCA 培养基　生化试剂，杭州百思生物技术有限公司；福林酚（分析纯）、抗坏血酸（标准品）　索莱宝生物技术有限公司；2,6-二氯酚靛酚（纯度≥97%）　铂锶钛化工产品有限公司；DPPH、ABTS　分析纯，上海源叶生物技术有限公司。

LLJ-B12N2 榨汁机　广东小熊股份有限公司；LDZX-30KBS 立式压力蒸汽灭菌器　上海申安医疗器械厂；S.SW-CJ-1FD 超净工作台　重庆强文贸易有限公司；BHS-4 数显恒温水浴锅　上海垒固仪器有限公司；GHP-9080 隔水式恒温培养箱　上海齐欣科学仪器有限公司；TD-5 离心机　蜀科仪器有限公司；PHS-3C+ pH 计　成都世纪方舟科技有限公司；CR-400 色差仪　日本柯尼卡美能达公司；WYA-2S 数字阿贝折射仪　上海仪电物理光学仪器有限公司；UV1102 Ⅱ 紫外分光光度计　上海天美科学仪器有限公司；ZW20S19Y（W）紫外灯（功率为 20 W，长度为 589 mm，紫外线强度 75 μW/cm^2）　上海丹启实业股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1　原料预处理及橙汁的制备　将购买的新鲜且大小均匀（果径为 65~75 mm）的奉节脐橙，用流水清洗表面，滤干水后人工去皮。将去皮后的脐橙切成约 4 cm×4 cm×4 cm 的块，榨汁 2 min，用灭菌的单层纱布过滤 2 次以去除果渣，制备得到鲜榨橙汁备用。

准确量取 50 mL 橙汁于 100 mL 的烧杯中，于 70 ℃ 水浴处理 15 min 即为巴氏杀菌（P）。将紫外灯（紫外线强度 75 μW/cm^2）固定于磁力水浴锅上方，调整至离烧杯中橙汁的液面约 15 cm 高度的位置对样品进行处理，橙汁的磁力搅拌转速设置为 300 r/min，具体处理方式及参数见表 1。将制备得到的橙汁转移至灭菌的玻璃瓶中密封，于 4 ℃ 冷藏，进行微生物、理化特性和营养特性测定。

1.2.2　菌落总数、大肠菌群、霉菌和酵母的测定　根据 GB4789.2-2016《食品安全国家标准 食品微生物

表 1　样品的不同处理方式和相应的参数

Table 1　The different processing methods and corresponding parameters of samples

组号	参数	简写表示
1	对照	C
2	50 ℃处理10 min	H
3	UV-C于20 ℃处理10 min	U
4	50 ℃处理10 min→ UV-C于20 ℃处理10 min（先热处理，后紫外处理）	H+U
5	UV-C于20 ℃处理10 min→ 50 ℃处理10 min（先紫外处理，后热处理）	U+H
6	UV-C于50 ℃处理10 min	UH10
7	UV-C于50 ℃处理20 min	UH20
8	UV-C于50 ℃处理30 min	UH30
9	巴氏杀菌（70 ℃处理15 min）	P

注：样品处理过程中均采用磁力搅拌，转速为300 r/min。

学检验 菌落总数测定》对菌落总数进行测定。根据GB4789.3-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠菌群计数》对大肠菌群数进行测定。根据GB4789.15-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 霉菌和酵母计数》对霉菌和酵母数进行测定。

1.2.3　橙汁的理化特性测定

1.2.3.1　pH 测定　参考 Feng 等[15] 的方法，将橙汁于室温放置 30 min 后，将 pH 计电极插入橙汁中测定其 pH。

1.2.3.2　总可溶性固形物含量（total soluble solids, TSS）测定　参考曾小峰等[16] 的方法并加以修改。将橙汁于 5000 r/min 离心 15 min，取一滴上清液于数字阿贝折射仪上，直接进行读数得到橙汁中的总可溶性固形物含量，以°Brix 表示。

1.2.3.3　可滴定酸度（titratable acidity, TA）测定　参考 GB12456-2021《食品安全国家标准 食品中总酸的测定》，采用酸碱指示剂滴定法测定可滴定酸含量。

1.2.3.4　色泽测定　参照王孝荣等[17] 的方法对橙汁的 L^*、a^*、b^*进行测定。其中，L^*代表亮度，其值越大说明橙汁样品的亮度（光泽度）越大；a^*表示红绿色度，其正值的绝对值越大，说明橙汁样品红色的程度大于绿色的程度，其负值的绝对值越大，说明橙汁绿色的程度大于红色的程度；b^*表示黄蓝色度，其正值绝对值越大，说明橙汁样品黄色的程度优于蓝色程度，其负值的绝对值越大，说明橙汁样品蓝色的程度优于黄色程度。色差值 ΔE 由如下公式计算：

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}}$$

式中，ΔL^*为处理后与未处理橙汁的 L^*差值；Δa^*为处理后与未处理橙汁的 a^*差值；Δb^*为处理后与未处理橙汁的 b^*差值；ΔE 为处理后与未处理橙汁的颜色差值，当 $0<\Delta E<2$ 时，说明其色泽无明显肉眼可见的变化[18]。

1.2.4　橙汁的营养成分测定

1.2.4.1　抗坏血酸测定　参考 GB5009.86-2016《食品安全国家标准 食品中抗坏血酸的测定》中的 2,6-二氯靛酚滴定法测定橙汁中抗坏血酸的含量。准确称取 10 mL 橙汁于 100 mL 容量瓶中，加入 20 g/L 的草酸溶液稀释并定容至刻度，准确移取 10 mL 稀释液于锥形瓶中，通过已标定的 2,6-二氯靛酚钠溶液进行滴定，直至溶液呈现粉红色且 15 s 不褪色。

$$m = \frac{(V_1 - V_0) \times T \times A}{V} \times 100$$

式中：m 为橙汁中抗坏血酸的含量（mg/100 mL）；V_1 为滴定样品所消耗 2,6-二氯靛酚溶液的体积（mL）；V_0 为滴定空白所消耗 2,6-二氯靛酚溶液的体积（mL）；T 为 2,6-二氯靛酚溶液的滴定度，即每毫升 2,6-二氯靛酚溶液相当于抗坏血酸的毫克数（mg/mL）；A 为稀释倍数；V 为试样的体积（mL）。

1.2.4.2　总酚测定　总酚含量的测定参考 Chu 等[19] 的方法并做修改。10 mL 橙汁中加入 20 mL 70% 的甲醇溶液（v/v），于 30 ℃ 避光搅拌 60 min，随后将混合液于 4 ℃ 下 7000 r/min 离心 20 min，收集上清液。准确移取 40 μL 上述提取液与 200 μL 福林酚试剂，混合摇匀后于室温下避光反应 1 h，加入 180 μL 7.5% 的 Na_2CO_3 溶液并混匀，于室温下避光反应 15 min 后在 765 nm 处测定吸光值。采用不同浓度（0~100 μg/mL）的没食子酸溶液通过上述步骤反应后测定吸光值，以吸光值为纵坐标、没食子酸浓度为横坐标绘制标准曲线（y=0.0132x+0.043，R^2=0.996）。总酚含量以每 mL 橙汁中含有的没食子酸含量表示，单位 μg GAE/mL。

1.2.4.3　类胡萝卜素测定　参考倪玉洁等[20] 的方法并做修改。准确移取 2 mL 橙汁于 50 mL 离心管中，加入 10 mL 无水乙醇-丙酮-正己烷混合液（1∶1∶1，v/v/v），于室温下 7000 r/min 离心 20 min 进行提取。取 1 mL 上清液，用乙醇-丙酮-正己烷混合液进行稀释后于 450 nm 处测定吸光值。类胡萝卜素的含量表示为 μg/mL。

1.2.5　橙汁的生物活性测定

1.2.5.1　DPPH 自由基清除率　参照 Wahia 等[21] 的方法并加以改进。将橙汁用去离子水稀释 10 倍，准确移取 2 mL 稀释的橙汁与 2 mL 0.2 mmol/L 的 DPPH 溶液混合均匀，于室温下避光反应 30 min，随后于 517 nm 波长处测定其吸光值 A_1；同时测定

2 mL 无水乙醇与 2 mL DPPH 溶液混合液反应后测得的吸光值为 A_0; DPPH 自由基清除率(%)=(A_0−A_1)/A_0×100。

1.2.5.2 ABTS 自由基清除率 参照曾小峰等[16]的方法并加以改进。准确移取 440 μL 140 mmol/L 的过硫酸钾溶液与 25 mL 7 mmol/L 的 ABTS 溶液混合均匀, 于室温避光反应 16 h, 制得 ABTS 自由基储备液溶液。测定时, 用无水乙醇将 ABTS 自由基储备液溶液稀释至 734 nm 处吸光值为 0.70。准确移取 4 mL ABTS 自由基储备液稀释液与 1 mL 稀释 10 倍的橙汁液混合均匀, 于室温下避光静置反应 10 min, 于 734 nm 处测定吸光值 A_m; 用蒸馏水作为对照进行反应后, 测其吸光值为 A_n。ABTS 自由基清除率(%)=(A_n−A_m)/A_n×100。

1.3 数据处理

所有数据重复 3 次, 结果以平均值±SD 表示。数据使用 SPSS 19.0 进行分析, 方差分析采用 Tukey's HSD 进行分析。图表中以不同小写英文字母代表显著性差异(P<0.05 为显著性差异)。

2 结果与分析

2.1 不同处理方式对橙汁安全性的影响

不同处理方式对橙汁中微生物的影响结果如图 1 所示, 未经处理的橙汁中菌落总数、大肠菌群数、霉菌和酵母总数分别为 5.19、2.20 和 3.33 log CFU/mL, 不同的处理方式对微生物的影响不同, 其中巴氏杀菌后橙汁中菌落总数和大肠菌群未检出, 这表明传统热处理能较好的杀灭橙汁中的有害微生物[22]。与未处理的橙汁相比, 通过 50 ℃-10 min(H)、UV-10 min(U)、50 ℃-10 min→UV-10 min(H+U)、UV-10 min→50 ℃-10 min(U+H)、UV-50 ℃-10 min(UH10)、UV-50 ℃-20 min(UH20)、UV-50 ℃-30 min(UH30)和巴氏杀菌(70 ℃-15 min, P)处理后橙汁中菌落总数分别减少 14.07%、7.13%、31.22%、29.87%、38.73%、51.25、84.97% 和 100%; 大肠菌群数分别减少 17.10%、10.59%、44.33%、43.12%、62.18%、81.85%、100% 和 100%; 霉菌和酵母总数分别减少 9.32%、1.54%、17.73%、17.36%、31.18%、45.74%、74.92% 和 100%。

通过比较 C、H 和 U 对微生物影响的结果, 可得出单独的低温处理(H)和 UV-C 处理(U)不能达到有效杀灭橙汁中微生物的作用, 这与 Bhat 等[23]的报道的研究结果一致。许多研究表明, 仅 UV-C 处理草莓汁、芒果汁等深色果蔬汁对微生物的抑制作用较小, 需要与其他技术联合使用以达到较好的灭菌效果[13, 23]。H 和 U 对微生物失活作用显著低于 H+U、U+H、UH10(P<0.05), 这表明 UV-C 和热的不同联合方式处理对橙汁中微生物的灭活作用显著高于单独的低温和 UV-C 处理, 并且显著高于 H 和 U 的简单加和作用, 这表明 UV-C 和热处理对橙汁中微生物的灭活具有协同作用。这与 Gouma 等[24]以及

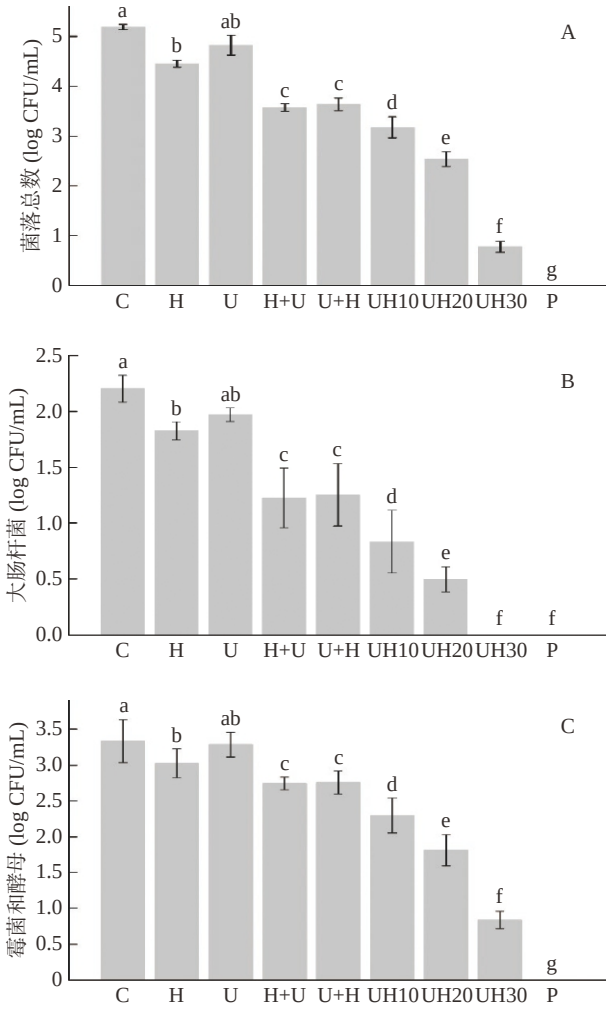


图 1 不同处理方式对橙汁中微生物的影响

Fig.1 Effects of different treatments on the microorganisms of orange juice

注: 不同小写字母表示有显著性差异(P<0.05); 图 2~图 5 同。

Riganakos 等[8]的研究结果一致。对于 UV-C 与热同时作用(UH10、UH20、UH30)对微生物失活的效果而言, 随着处理时间从 10 min 延长至 30 min, 橙汁中微生物的减少均呈现增加趋势。其中 UH20 导致菌落总数、大肠菌群数、霉菌和酵母总数的减少量比 UH10 导致的减少量分别高 12.52%、15.28% 和 14.56%; 而 UH30 导致的减少量比 UH20 导致的减少量分别高 33.72%、22.54% 和 29.18%, 这是由于在 10~20 min 的处理过程中, UV-C 和热对橙汁中的未灭活的微生物也可能产生了不同程度的破坏作用, 促使其在随后的处理过程中更容易被破坏。

基于上述结果, UV-C 与热同时作用(UH10、UH20 和 UH30)对微生物的灭活作用显著高于仅 UV-C 处理(U)、仅热处理(H)、先 UV-C 处理再热处理(U+H)和先热处理再 UV-C 处理(H+U), 因此本研究选择 UV-C 与热同时作用作为最佳的联合方式, 将重点探究该联合作用方式对橙汁的理化特性、主要营养物质及抗氧化活性的影响。

2.2 UV-C 联合热处理对橙汁理化特性的影响

由表 2 的结果可得, 未处理以及不同处理得到

表 2　UV-C 联合热处理对橙汁理化特性的影响

Table 2　Effects of UV-C combined with heat treatments on the physico chemical properties of orange juice

理化特性	C	UH10	UH20	UH30	P
pH	3.84±0.03^a	3.85±0.02^a	3.84±0.03^a	3.87±0.01^a	3.84±0.02^a
TSS（°Brix）	12.31±0.12^a	12.73±0.13^a	12.60±0.28^a	12.34±0.64^a	12.70±0.43^a
TA（%）	0.91±0.01^a	0.92±0.01^a	0.92±0.01^a	0.92±0.01^a	0.92±0.01^a
L^*	94.94±1.14^a	94.87±2.73^a	94.89±2.19^a	94.94+3.45^a	94.95±3.02^a
a^*	−0.53±0.01^a	−0.53±0.05^a	−0.53±0.02^a	−0.57±0.01^a	−0.52±0.02^a
b^*	2.79±0.01^a	2.85±0.04^a	2.81±0.01^a	2.88±0.06^a	2.75±0.04^a
$\triangle E$	–	0.11±0.05^a	0.05±0.00^b	0.10±0.01^a	0.04±0.00^b

注：TSS为总可溶性固形物含量（°Brix）；TA为可滴定酸度（%）；同行不同小写字母表示有显著性差异（P<0.05）。

的橙汁的 pH、总可溶性固形物含量（TSS）、可滴定酸度（TA）没有显著性差异（P>0.05）。这是由于果蔬汁的这些特性由原料的类型、生长条件和成熟度等因素决定，而不受加工条件影响[25]。

色泽是影响消费者对果蔬制品品质评价的首要指标，对其进行探究具有重要意义。由表 2 的结果可得，UV-C 联合热处理对橙汁的 L^*和 a^*没有显著性影响（P>0.05）。Feng 等[15] 研究发现 UV-C 处理后西瓜汁的 a^*值增加，并将原因归结为不稳定的悬浮颗粒发生沉降导致。本研究中橙汁灭菌过程中采用磁力搅拌，该处理有效地防止颗粒发生沉淀。UH10、UH20、UH30 和 P 处理后橙汁的 b^*降低，这可能是由于 UV-C 和热导致对橙汁颜色起主要贡献作用的类胡萝卜素发生了降解[11]。不同处理后橙汁的色泽变化 $\triangle E$ 在 0.04~0.11，均小于 2。由此可见，不同处理导致的橙汁的颜色变化肉眼不可见。该结果与研究报道的 UV-C 处理对胡萝卜汁[9]、菠萝汁[18]、葡萄汁[26] 的色泽没有显著性影响的结果一致。

2.3　UV-C 联合热处理对橙汁的营养特性的影响

2.3.1　UV-C 联合热处理对橙汁中抗坏血酸的影响

抗坏血酸含量通常被认为是衡量果蔬制品营养品质的重要指标，探究加工过程对抗坏血酸含量的影响具有重要的意义。UV-C 联合热处理及巴氏杀菌对橙汁中抗坏血酸含量的影响结果如图 2 所示，所有的处理均导致橙汁中抗坏血酸含量降低，UH10、UH20、UH30 和 P 导致抗坏血酸含量分别减少 8.87%、13.43%、17.03% 和 37.41%。UV-C 联合热处理过程对果蔬汁中抗坏血酸具有一定的负面影响，其中原因可归结为：a.氧气和光的存在对抗坏血酸会产生不利影响[27]，光化学反应形成自由基的过程消耗了抗坏血酸[13]；b.处理过程中酶未完全失活，残留的抗坏血酸氧化酶和过氧化物酶导致抗坏血酸发生氧化降解[28]；c.热导致抗坏血酸降解。随着处理时间的延长，抗坏血酸含量呈现降低趋势，但 UV-C 联合低温热处理对抗坏血酸的影响显著低于传统巴氏杀菌（P<0.05）。这是由于 70 ℃ 高温（巴氏杀菌）导致抗坏血酸的降解程度大于低温（50 ℃）和 UV-C 的联合降解作用。这与 Santhirasegaram 等[13] 报道的结果一致。这表明，UV-C 联合低温热处理能有效保留橙汁中的抗坏血酸。

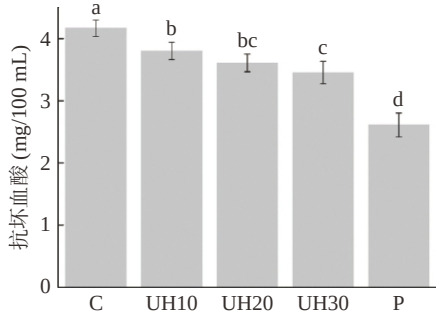


图 2　UV-C 联合热处理对橙汁中抗坏血酸含量的影响

Fig.2　Effects of UV-C combined with heat treatments on the content of ascorbic acid of orange juice

2.3.2　UV-C 联合热处理对橙汁中多酚的影响　酚类化合物是果蔬中重要的抗氧化活性物质，这些物质被认为是非必须此生代谢物，可能是在植物组织正常代谢过程中产生，也可能是在防御外界刺激过程中形成[23]。UV-C 联合热处理对橙汁中总酚含量的影响结果见图 3，与对照相比，UH10、UH20、UH30 和 P 使得橙汁中总酚含量分别增加 12.02%、22.86%、30.03% 和 7.81%。Bhat 等[23] 研究发现通过 UV-C（2.16 J/m^2，25 ℃）对番茄汁处理 15、30 和 60 min 后，总酚含量分别增加了 14.78%、21.54% 和 24.66%。UV-C 联合热处理导致橙汁中总酚含量增加可归结于如下原因：a.紫外线在植物的个体发育中起主要作用，并且还可能诱导次生代谢物的产生[29−30]。UV-C 会刺激自由基的产生，从而触发应激响应，累积植物防御素，导致与防御机制相关的多酚类物质增加[13, 29, 31−32]。b.UV-C 导致多酚氧化酶失活，可以阻止多酚物质受到酶的降解[13]，与热联合对酶失活具有

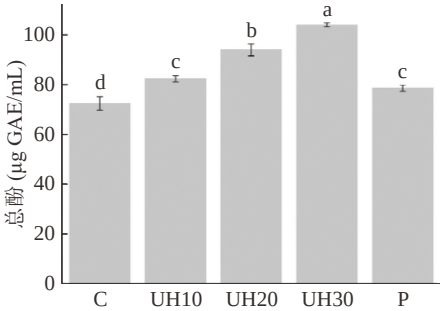


图 3　UV-C 联合热处理对橙汁中总酚含量的影响

Fig.3　Effects of UV-C combined with heat treatments on the content of total phenolic of orange juice

协同作用[33]。c.UV-C 辐照导致细胞壁中复杂的酚类聚合物发生降解，并释放简单的酚类化合物，使其更容易与福林酚试剂发生反应[23,34]。d.UV-C 联合热处理的过程中热会导致一定程度的细胞壁破坏，使得细胞壁中的多酚类物质释放。传统巴氏杀菌(P)处理后总酚含量虽然显著低于 UV-C 联合处理(P<0.05)，但比对照高 7.81%。这与热处理导致多酚氧化酶失活以及导致细胞壁受到破坏有关[35]。由结果可得出，UV-C 联合热处理能显著提高橙汁中的多酚物质的含量，这对于提高橙汁的营养价值具有重要的意义。

2.3.3 UV-C 联合热处理对橙汁中类胡萝卜素的影响 柑橘中富含类胡萝卜素，被认为是膳食中类胡萝卜素的重要来源，同时也是橙汁色泽的主要决定因素[36]，探究加工对橙汁中类胡萝卜素的影响具有重要意义。UV-C 联合热处理对橙汁中类胡萝卜素含量的影响结果见图 4，与对照相比，UH10、UH20、UH30 和 P 使得橙汁中类胡萝卜素含量分别降低 22.00%、27.23%、30.50% 和 46.62%。由结果可得，UV-C 联合热处理以及巴氏杀菌均导致橙汁中类胡萝卜素含量降低。这可能是由于类胡萝卜素的多烯链不稳定，导致其对热和光氧化较为敏感，容易发生降解或异构化[37]。通过比较 UH10、UH20、UH30 和 P 对橙汁中类胡萝卜素含量的影响结果可得，UV-C 联合 50 ℃ 热处理对类胡萝卜素的影响显著低于 70 ℃ 热处理(P<0.05)。这是由于 70 ℃ 高温(巴氏杀菌)导致类胡萝卜素的降解程度大于低温(50 ℃)和 UV-C 的联合降解作用。这与 Santhirasegaram 等[13] 报道的结果一致。由结果可得，与传统巴氏杀菌相比，UV-C 联合热处理能更高的保留橙汁中的类胡萝卜素，这对于保留橙汁的营养价值具有重要的意义。

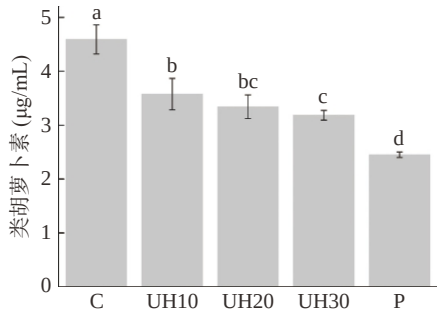


图 4 UV-C 联合热处理对橙汁中类胡萝卜素含量的影响

Fig.4 Effects of UV-C combined with heat treatments on the content of carotenoids of orange juice

2.3.4 UV-C 联合热处理对橙汁抗氧化活性的影响 由图 5 可得，UV-C 联合热处理对橙汁抗氧化活性影响通过清除 DPPH 和 ABTS 自由基来进行评价。UV-C 联合热处理使得橙汁对 DPPH 和 ABTS 自由基清除率显著高于传统巴氏杀菌(P<0.05)。这与 Bhat 等[23, 38] 和高梵等[30] 报道的结果一致。橙汁的抗氧化活性变化与其中的抗坏血酸、多酚、类胡萝卜素等活性组分的变化密切相关。尽管随着处理时间延长，橙汁中抗坏血酸和类胡萝卜素含量呈现降低趋势，但多酚含量呈现增加趋势，且全反式类胡萝卜素可能异构化为活性更高的顺式类胡萝卜素，从而使得橙汁的抗氧化活性提高。由上述结果可得出，与传统的巴氏杀菌相比，UV-C 联合热处理能显著提高橙汁的抗氧化活性。

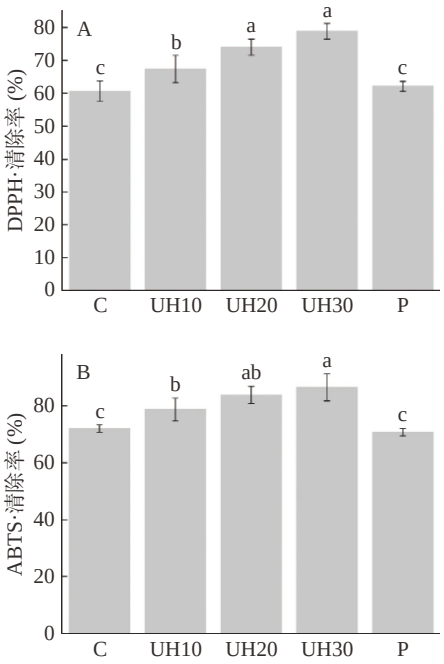


图 5 UV-C 联合热处理对橙汁抗氧化活性的影响

Fig.5 Effects of UV-C combined with heat treatments on the antioxidant activities of orange juice

3 结论

本研究深入探究了 UV-C 联合热处理对橙汁安全性、理化特性及营养特性的影响。热对微生物的失活作用大于 UV-C，但二者对微生物失活具有协同作用。UV-C 联合 50 ℃ 处理 30 min(UH30)后菌落总数、大肠菌群、霉菌和酵母数分别减少 84.97%、100% 和 74.92%，使橙汁的安全性得以提高。UV-C 联合热处理对橙汁的 pH、可溶性固形物含量、可滴定酸度及色泽没有显著性影响(P>0.05)。与传统的巴氏杀菌相比，UV-C 联合 50 ℃ 处理 30 min 能使得橙汁中的抗坏血酸、总酚和类胡萝卜素含量提高 32.57%、32.35% 和 30.20%，DPPH 和 ABTS 自由基清除率分别提高 26.58% 和 22.23%。由此可得，UV-C 联合热处理不仅能提高橙汁安全性，对感官特性没有显著性影响，同时能提高橙汁的营养价值。UV-C 联合热处理既能克服传统高温热处理对橙汁品质特性的破坏，同时也弥补了单独 UV-C 对橙汁灭菌效果不理想的缺陷。由此可得，UV-C 联合热处理是一种具有较好前景的替代传统巴氏杀菌的新兴技术。基于本研究的结果，可将进一步探究 UV-C 联合热处理对多酚及类胡萝卜素单体变化的影响，以及橙汁在贮藏过程中品质特性的变化规律，进一步为该技术在工业中的应用提供全面的理论支撑。

参考文献

[1] RIBEIRO A P D, PEREIRA A G, TODO M C, et al. Pera orange (*Citrus sinensis*) and Moro orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) juices attenuate left ventricular dysfunction and oxidative stress and improve myocardial energy metabolism in acute doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats[J]. Nutrition, 2021, 91-92: 111350.

[2] ZHAO C N, MENG X, LI Y, et al. Fruits for prevention and treatment of cardiovascular diseases[J]. Nutrients, 2017, 9(6): 598.

[3] PONTIFEX M, MALIK M, CONNELL E, et al. *Citrus* polyphenols in brain health and disease: Current perspectives[J]. Frontiers in Neuroscience, 2021, 15: 640648.

[4] GOMES A, RODRIGUES C A L, DIAS P R, et al. Sonoprocessing of freshly squeezed orange juice: Ascorbic acid content, enzyme activity, rheological behavior and cloud stabilization[J]. Food Control, 2021, 131: 108391.

[5] KATARIYA P, ARYA S S, PANDIT A B. Novel, non-thermal hydrodynamic cavitation of orange juice: Effects on physical properties and stability of bioactive compounds[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2020, 62: 102364.

[6] LU Q, PENG Y, ZHU C, et al. Effect of thermal treatment on carotenoids, flavonoids and ascorbic acid in juice of orange cv. Cara Cara[J]. Food Chemistry, 2018, 265: 39−48.

[7] LEE H S, COATES G A. Effect of thermal pasteurization on Valencia orange juice color and pigments[J]. LWT-Food Science and Technology, 2003, 36(1): 153−156.

[8] RIGANAKOS K A, KARABAGIAS I K, GERTZOU I, et al. Comparison of UV-C and thermal treatments for the preservation of carrot juice[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2017, 42: 165−72.

[9] 王可兴, 章肇敏, 任婧楠, 等. 巴氏灭菌对橙汁中键合态香气物质的影响研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(13): 49−52. [WANG K X, ZHANG Z M, REN J N, et al. Study on the effect of pasteurization on the bound aroma compounds in orange juice[J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(13): 49−52.]

[10] GUERRERO-BELTR N J Á, OCHOA-VELASCO C E. 2.15-Ultraviolet-C light technology and systems for preservation of fruit juices and beverages [M]. Innovative Food Processing Technologies, 2021: 210−226.

[11] TAZE B H, AKGUN M P, YILDIZ S, et al. 2.18-UV Processing and storage of liquid and solid foods: Quality, microbial, enzymatic, nutritional, organoleptic, composition and properties effects [M]. Innovative Food Processing Technologies, 2021: 277−305.

[12] 胡顺爽, 郜海燕, 吴伟杰, 等. 响应面法优化草莓鲜榨汁紫外杀菌工艺[J]. 食品科学, 2018, 39(22): 234−241. [HU S S, GAO H Y, WU W J, et al. Optimization of UV sterilization process of strawberry fresh juice by response surface methodology[J]. Food Science, 2018, 39(22): 234−241.]

[13] SANTHIRASEGARAM V, RAZALI Z, GEORGE D S, et al. Comparison of UV-C treatment and thermal pasteurization on quality of Chokanan mango (*Mangifera indica* L.) juice[J]. Food and Bioproducts Processing, 2015, 94: 313−321.

[14] FENOGLIO D, FERRARIO M, SCHENK M, et al. Effect of pilot-scale UV-C light treatment assisted by mild heat on *E. coli, L. plantarum* and *S. cerevisiae* inactivation in clear and turbid fruit juices. Storage study of surviving populations[J]. International Journal of Food Microbiology, 2020, 332: 108767.

[15] FENG M, GHAFOOR K, SEO B, et al. Effects of ultraviolet-C treatment in Teflon®-coil on microbial populations and physico-chemical characteristics of watermelon juice[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2013, 19: 133−139.

[16] 曾小峰, 商桑, 陈爽, 等. 杀菌方式对血橙汁贮藏过程品质及抗氧化活性的影响[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(21): 161−166. [ZENG X F, SHANG S, CHEN S, et al. Effect of sterilization methods on quality and antioxidant activity of blood orange juice during storage[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(21): 161−166.]

[17] 王孝荣, 罗佳丽, 潘年龙, 等. 超高压处理对鲜榨橙汁品质的影响[J]. 食品工业科技, 2012, 33(23): 144−147. [WANG X R, LUO J L, PAN N L, et al. Influence of ultra high pressure on quality of fresh orange juice[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(23): 144−147.]

[18] SHAMSUDIN R, MOHD A N, PUI Y Y, et al. Effect of repetitive ultraviolet irradiation on the physico-chemical properties and microbial stability of pineapple juice[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2014, 23: 114−20.

[19] CHU Y F, SUN J, WU X, et al. Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(23): 6910−6916.

[20] 倪玉洁, 马文霞, 谢倩, 等. 超声辅助提取福橘果皮类胡萝卜素的工艺优化[J]. 食品工业科技, 2020, 41(24): 170−175. [NI Y J, MA W X, XIE Q, et al. Optimization of ultrasonic assisted extraction of carotenoids from Fuju peel[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(24): 170−175.]

[21] WAHIA H, ZHOU C, FAKAYODE O A, et al. Quality attributes optimization of orange juice subjected to multi-frequency thermosonication: *Alicyclobacillus acidoterrestris* spore inactivation and applied spectroscopy ROS characterization[J]. Food Chemistry, 2021, 361: 130108.

[22] FERREIRA T V, MIZUTA A G, MENEZES J L D, et al. Effect of ultraviolet treatment (UV-C) combined with nisin on industrialized orange juice in *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores[J]. LWT- Food Science and Technology, 2020, 133: 109911.

[23] BHAT R. Impact of ultraviolet radiation treatments on the quality of freshly prepared tomato (*Solanum lycopersicum*) juice[J]. Food Chemistry, 2016, 213: 635−640.

[24] GOUMA M, GAY N E, RASO J, et al. Inactivation of spoilage yeasts in apple juice by UV-C light and in combination with mild heat[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2015, 32: 146−155.

[25] GAO R, YE F, WANG Y, et al. The spatial-temporal working pattern of cold ultrasound treatment in improving the sensory, nutritional and safe quality of unpasteurized raw tomato juice[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2019, 56: 240−53.

[26] KAYA Z, UNLUTURK S. Processing of clear and turbid

grape juice by a continuous flow UV system[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2016, 33: 282−288.

[27] AGUILAR K, GARV N A, IBARZ A, et al. Ascorbic acid stability in fruit juices during thermosonication[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2017, 37: 375−381.

[28] DAVEY M W, MONTAGU M V, INZ D, et al. Plant L-ascorbic acid: Chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2000, 80(7): 825−860.

[29] PINTO E P, PERIN E C, SCHOTT I B, et al. The effect of postharvest application of UV-C radiation on the phenolic compounds of conventional and organic grapes (*Vitis labrusca* cv. 'Concord')[J]. Postharvest Biology and Technology, 2016, 120: 84−91.

[30] 高梵, 龙清红, 韩聪, 等. UV-C 处理对鲜切红心萝卜抗氧化活性的影响[J]. 食品科学, 2016, 37(11): 12−17. [GAO F, LONG Q H, HAN C, et al. Effect of UV-C treatment on antioxidant activity of fresh-cut red-fleshed radish[J]. Food Science, 2016, 37(11): 12−17.]

[31] SHENG K, ZHENG H, SHUI S, et al. Comparison of postharvest UV-B and UV-C treatments on table grape: Changes in phenolic compounds and their transcription of biosynthetic genes during storage[J]. Postharvest Biology and Technology, 2018, 138: 74−81.

[32] LIU C, ZHENG H, SHENG K, et al. Effects of postharvest UV-C irradiation on phenolic acids, flavonoids, and key phenylpropanoid pathway genes in tomato fruit[J]. Scientia Horticulturae, 2018, 241: 107−114.

[33] AGUILAR K, IBARZ R, GARV N A, et al. Effect of UV-Vis irradiation on enzymatic activities and the physicochemical properties of nectarine juices from different varieties[J]. LWT-Food Science and Technology, 2016, 65: 969−977.

[34] FALGUERA V, GARVÍN A, GARZA S, et al. Effect of UV-Vis photochemical processing on pear juice from six different varieties[J]. Food and Bioprocess Technology, 2014, 7: 84−92.

[35] KELEBEK H, SELLI S, KADIROĞLU P, et al. Bioactive compounds and antioxidant potential in tomato pastes as affected by hot and cold break process[J]. Food Chemistry, 2017, 220: 31−41.

[36] MELÉNDEZ-MARTÍNEZ A J, BRITTON G, VICARIO I M, et al. The complex carotenoid pattern of orange juices from concentrate[J]. Food Chemistry, 2008, 109(3): 546−553.

[37] SEMITSOGLOU-TSIAPOU S, MEADOR T B, Peng B, et al. Photochemical (UV-vis/H_2O_2) degradation of carotenoids: Kinetics and molecular end products[J]. Chemosphere, 2021, 286: 131697.

[38] BHAT R, AMERAN S B, VOON H C, et al. Quality attributes of starfruit (*Averrhoa carambola* L.) juice treated with ultraviolet radiation[J]. Food Chemistry, 2011, 127(2): 641−614.

李帅, 赵岩岩, 曾英男, 等. 低温等离子体预处理对马铃薯薄层热风干燥特性的影响 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 87−92. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080161

LI Shuai, ZHAO Yanyan, ZENG Yingnan, et al. Effect of Low-temperature Plasma Pretreatment on Hot-air with Thin-layer Drying Characteristics of Potatos[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 87−92. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080161

· 研究与探讨 ·

低温等离子体预处理对马铃薯薄层热风干燥特性的影响

李　帅[1], 赵岩岩[2], 曾英男[1], 谷　雨[1]
（1.吉林农业科技学院食品工程学院, 吉林吉林 132101;
2.河南科技学院食品学院, 河南新乡 453003）

摘　要: 为实现马铃薯高效干燥，缩短干燥时间，提高干燥效率。本文以薄层热风干燥实验为基础，在马铃薯热风干燥前，采用低温等离子体对其预处理，研究马铃薯在不同等离子体预处理时间（20、30、40、50、60 s）、等离子体预处理功率（100、200、300、400、500 W）和干燥温度（50、70、90 ℃）条件下的干燥特性，并将其与未预处理马铃薯相比较。结果表明，等离子体预处理可有效提高马铃薯热风干燥速率，缩短干燥时间。水分有效扩散系数在 3.785×10^{-11}~11.868×10^{-11} m^2/s 之间。当等离子体处理功率为 500 W，处理时间 30 s，热风温度 70 ℃ 时，干燥效果最佳，较对照组干燥时间缩短 35.71%。本研究为马铃薯热风干燥预处理方法的研究提出了新思路，对等离子体技术在新领域的应用进行了探讨，同时为马铃薯高效干燥预处理技术的研究提供新的参考和理论依据。

关键词: 马铃薯, 等离子体, 预处理, 热风干燥, 干燥特性
中图分类号: TS210.4　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0087−06
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080161
本文网刊:

Effect of Low-temperature Plasma Pretreatment on Hot-air with Thin-layer Drying Characteristics of Potatos

LI Shuai[1], ZHAO Yanyan[2], ZENG Yingnan[1], GU Yu[1]
（1.School of Food Engineering, Jilin Institute of Agricuitural Science and Technology, Jilin 132101, China;
2.School of Food Science and Technology, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China）

Abstract: In order to achieve the efficient drying of potatoes, shorten the drying time and improve the drying efficiency. In this study, low-temperature plasma technology was used to pretreat potatos for hot-air with thin-layer drying experiment. Study on different plasma pretreatment time (20, 30, 40, 50, 60 s), plasma pretreatment power (100, 200, 300, 400, 500 W) and drying temperature (50, 70, 90 ℃) conditions of drying characteristics, and compared it with unpretreated potatoes. The research results showed that plasma pretreatment could effectively accelerate the drying rate and shorten the drying time.The effective moisture diffusivity was in the range of 3.785×10^{-11}~11.868×10^{-11} m^2/s. After pretreatment power of 500 W for 30 s at 70 ℃, drying time was shortened by a maximum of 35.71%, compared with the control group. This research put forward new ideas for the research of potato hot-air drying pretreatment methods, discussed the application of plasma technology in new fields, and provided new reference and theoretical basis for the research of potato high-efficiency drying pretreatment technology.

Key words: potato; plasma; pretreatment; hot-air drying; drying characteristics

马铃薯与麦、稻、玉米、高粱并称世界五大粮食作物[1], 富含蛋白质、维生素、碳水化合物及微量元素等多种营养物质, 是重要的粮食、蔬菜、饲料兼用食品原料和工业原料作物, 是目前我国最有发展前景

收稿日期: 2021−08−16
基金项目: 吉林省教育厅科学研究规划项目（JJKH20210419KJ）。
作者简介: 李帅（1986−）, 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食品保藏与物流, E-mail: huajiyuji1986@163.com。

的高产经济作物之一[2]。新收获的马铃薯含水率较高，呼吸作用旺盛，易腐败变质，严重影响马铃薯品质，难于储存[3]。干燥是马铃薯主要的加工方法之一，干燥可以减少马铃薯水分，延长储藏期，增加附加值[2]。

薄层干燥是指干燥物料层表面完全暴露在相同环境条件下的一种气流干燥[4]，是研究深床干燥的基础，也是目前研究谷物干燥特性及确定工艺参数的基本试验方法[5]。热风干燥是通过热空气自然或强制对流循环使被干燥物料表面水分汽化为水蒸气，扩散到空气中的一种干燥方式[6−7]，是目前我国广泛应用的一种干燥技术，其操作简单、设备成本低、应用广泛，但存在干燥效率低、干燥时间长及营养价值损失等缺点[8−11]。因此，研究开发新型高效的干燥技术具有重要意义。

等离子体表面处理技术是通过对气体施加足够的能量使之离化为等离子状态。该技术具有工作效率高、环保和适用性强等优点，在材料科学、食品工业和生物医学等领域得到广泛应用[12]。Bormashenko 等[13−14] 研究发现扁豆和小麦经过冷等离子体处理后，表面接触角显著降低，润湿性改变，易于吸收水分及营养物质。Sera 等[15] 观察到小麦和燕麦经过等离子体处理后，等离子体中活性物质可穿过种子内部的多孔种皮，与种子细胞反应，加速其幼根的生长。童家赟[16] 研究发现空气等离子体可改变穿心莲种皮的通透性，在处理电压为 5.95 kV，处理时间为 10 s 的条件下，等离子体处理促进了穿心莲种子的萌发。Zhang 等[17] 研究发现冷等离子体预处理可在辣椒表面形成微孔，促进水分扩散，提高干燥速率。Zhou 等[18] 采用低温等离子体处理枸杞，结果表明，等离子体预处理可有效缩短 50% 的干燥时间，同时使干枸杞的复水率提高了 7%~16%。Shen[19] 考察了等离子处理对淀粉颗粒的影响，研究发现等离子体处理对颗粒表面造成一定程度的刻蚀，显著降低了淀粉的溶胀力和糊化粘度。Loureiro 等[20] 研究发现采用低温等离子体预处理天竺葵有利于提高其干燥速率，减少干燥时间。Bao 等[21] 研究发现冷等离子体预处理可显著改变枣片的表面形貌，将处理后的枣片后进行热风干燥，其水分扩散系数增大，干燥速度增加。

因此，本文将等离子体技术应用于马铃薯干燥领域中，采用低温等离子体对马铃薯预处理后进行薄层热风干燥，研究了等离子体预处理功率、预处理时间和热风温度对鲜切马铃薯干燥过程的影响，计算了马铃薯干燥过程的水分有效扩散系数，考察低温等离子体预处理对马铃薯热风干燥特性的影响。为马铃薯高效干燥预处理技术的研究提供新的参考和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

供试材料为大西洋马铃薯　购买于吉林省吉林市大润发超市，体积基本一致、无机械损伤、青绿和腐烂。鲜马铃薯的平均含水率为 3.48 g/g(干基)，4 ℃ 贮存。

JA 10002 电子天平　上海精天电子仪器有限公司；DHG-9125A 电热恒温鼓风干燥箱　上海一恒科技有限公司；Tseto410-2 多功能风速仪　德图仪器国际贸易有限公司；JM 20 温度传感器　今明仪器有限公司；HZK-110 分析天平　福州华志科学仪器有限公司；SY-DT02S 低温等离子体处理仪　苏州等离子体科技有限公司(图 1)；多参数调控谷物薄层干燥试验台　长春吉大科学仪器设备有限公司。

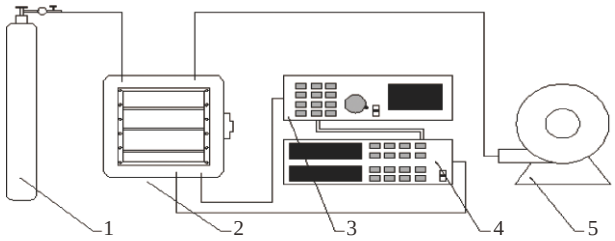


图 1　低温等离子处理仪结构示意图

Fig.1　The structural sketch map of low temperature plasma processor

注：图中 1.供气控制单元；2.真空室；3.等离子发生器；4.匹配器；5.真空泵。

1.2 实验方法

1.2.1　操作步骤　将马铃薯去皮切丁(10 mm×10 mm×10 mm)，洗去表面淀粉，过筛滤掉较小颗粒，沥水后取 900 g 置于低温等离子处理仪中进行等离子体预处理，将处理后的马铃薯丁分 3 组，放入薄层干燥试验台内，在相对湿度 55%±5%，介质表观风速 1.0 m/s 的条件下进行热风干燥，结合预实验结果，选取等离子体预处理时间(20、30、40、50、60 s)；等离子体预处理功率(100、200、300、400、500 W)；干燥温度(50、70、90 ℃)对马铃薯干燥速率的影响。当对其中一个因素进行研究时，其余各因素分别固定为干燥温度 70 ℃、等离子体预处理功率 300 W、等离子体预处理时间 30 s。

1.2.2　含水率的测定　取洁净铝制称量瓶干燥至恒重。称取 2~10 g 试样，放入称量瓶中，加盖，精密称量后，置 101~105 ℃ 干燥箱中，干燥 2 h，冷却称重。再放入 101~105 ℃ 干燥箱中干燥 1 h 左右，取出，冷却 0.5 h 称量[22]。

1.2.3　干基含水率的计算　不同干燥时间的马铃薯的干基含水率按式(1)计算[23]。

$$M_t=\frac{m_t-m_g}{m_g}=\frac{m_t-m_0(1-W_0)}{m_g} \quad \text{式（1）}$$

式中：m_t 为 t 时刻马铃薯质量，g；m_g 为马铃薯干物质质量，g；m_0 为马铃薯初始质量，g；W_0 为马铃薯的初始干基含水率，g/g。

1.2.4　干燥速率(Drying rate，DR)的计算　干燥速率能反映出干燥时间、干燥水分含量和干燥速率之间

的关系，是研究物料干燥特性的一个重要参数，按式（2）计算[24]。

$$DR=\frac{M_{t1}-M_{t2}}{t_2-t_1} \quad \text{式（2）}$$

式中：M_{t1} 为 t_1 时刻的干基含水率，g/g；M_{t2} 为 t_2 时刻的干基含水率，g/g。

1.2.5　水分有效扩散系数（Effective moisture diffusivity，D_{eff}）的计算　干燥过程中物料的水分扩散包含毛细管流动、克努森流动、分子扩散、水动力流动或表面扩散现象[25]。水分在物料中的扩散和传递速率的大小，一般用水分有效扩散系数来表示。在干燥过程中扩散系数是一个动态的量，可以通过简化的菲克（Fick）第二定律计算得到。假设物料中的水分迁移以扩散为主，初始水分分布均匀且水分扩散系数在整个干燥过程中恒定，其水分扩散系数按式（3）计算[26−28]。

$$MR=\frac{M_t-M_e}{M_0-M_e}=\frac{8}{\pi^2}\sum_{n=0}^{\infty}\frac{1}{n^2}\exp\left(-\frac{Dn^2\pi^2t}{L^2}\right) \quad \text{式（3）}$$

式中：MR 为水分比；M_0 为初始干基含水率，%；M_t 为 t 时刻物料的干基含水率，%；M_e 为物料平衡干基含水率，%；L 为薄层干燥物料厚度，m；D 为扩散系数，$m^2\cdot s^{-1}$；n 为正整数；t 为干燥时间，s。

假定马铃薯中的水分迁移以扩散为主，初始水分分布与水分扩散系数在整个干燥过程中恒定，忽略收缩和表面的传质阻力，但恒定水分扩散系数的假设忽略了结构收缩对干燥过程中干燥特性的影响。因此，本文采用斜率法计算水分有效扩散系数，通过测定值（dMR/dt）和理论值（dMR/dF_0）之比获得曲线斜率，按式（4）计算[29]。

$$D_{eff}=\frac{\left(\frac{dMR}{dt}\right)exp}{\left(\frac{dMR}{dF_0}\right)the}L^2 \quad \text{式（4）}$$

式中：D_{eff} 为水分有效扩散系数，$m^2\cdot s^{-1}$；F_0 为傅里叶数，$F_0=D_{eff}\cdot t/r^2$；L 为薄层干燥物料半径，m。

1.3　数据处理

试验数据采用 Origin 9.0 和 SPSS 19.0 软件进行分析，对其进行双变量的线性相关分析，$P<0.05$ 显著线性相关。

2　结果与分析

2.1　等离子体预处理时间对马铃薯热风干燥特性的影响

由图 2 可知，等离子体预处理可有效缩短马铃薯粒的干燥时间，随着等离子体预处理时间的增加，干燥时间先减小后增大。对照组干燥时间为 1.75 h，等离子体处理时间为 30 s 时，干燥时间最短为 1.25 h，较对照组缩短了 28.57%。过长时间的等离子体处理导致马铃薯表面细胞壁的破坏和细胞结构坍塌，阻碍了内部水分的扩散。因此，较长的预处理时间并没有进一步缩短马铃薯的干燥时间。这与 Zhang 等[17] 采用射频等离子体处理青椒干燥的试验结果相一致。

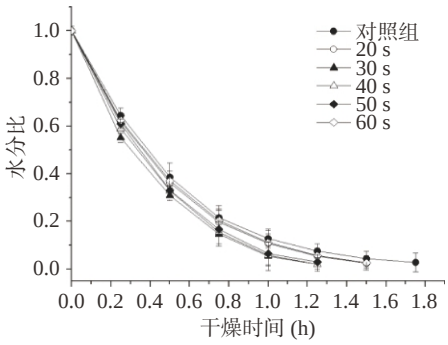


图 2　不同等离子体预处理时间对马铃薯干燥曲线的影响

Fig.2　The effect of different plasma pretreatment time on potato drying curve

由图 3 可知，干燥前期干燥速率增大，后期干燥速率反而减小。同时，等离子处理组较对照组干燥速率大，等离子体处理时间为 30 s 时，干燥速率最大，而后随着处理时间的延长，干燥速率逐渐降低。这是因为干燥前期干燥速率越快，表面结壳现象越严重，从而使干燥后期水分迁移的阻力越大，内部水分来不及扩散到马铃薯表面进行汽化导致的[2]。

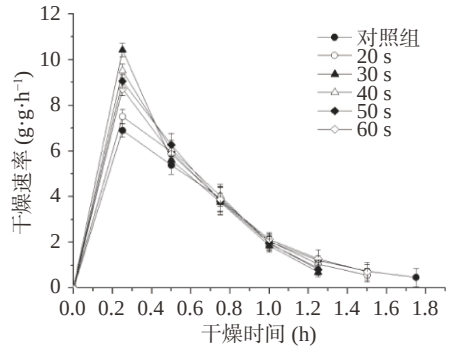


图 3　不同等离子体预处理时间对马铃薯干燥速率曲线的影响

Fig.3　The influence of different plasma pretreatment time on potato drying rate curve

2.2　等离子体预处理功率对马铃薯热风干燥特性的影响

由图 4 可知，等离子体预处理可有效缩短马铃薯的干燥时间，且随着处理功率的增大干燥时间缩

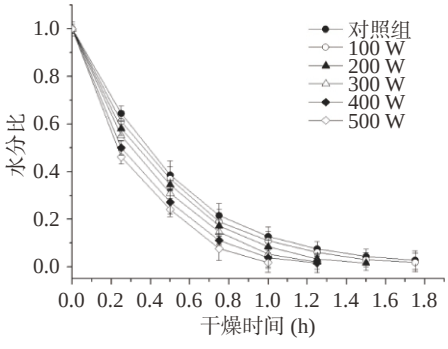


图 4　不同等离子体预处理功率对马铃薯干燥曲线的影响

Fig.4　The effect of different plasma pretreatment power on potato drying curve

短。处理组干燥速率高于对照组，这是由于等离子体产生的高能粒子不断轰击马铃薯表面，对表面产生一定程度的刻蚀作用[30]。较高的等离子体预处理功率使得表面刻蚀程度加剧，使其变的凹凸不平，增大了表面积和表面自由能，降低了水分迁移的阻力，缩短了水分迁移的路径，使水分更容易扩散，从而缩短了干燥时间[31]。

由图 5 可知，干燥速率随着预处理时间的延长先增大后减小。同时，等离子处理组较对照组干燥速率大，等离子体处理功率越大，干燥时间越短。这是由于处理功率的增大，等离子体中高能粒子能量增大，轰击玉米表面的粒子流量密度和活性基团数量也随之增加，各向异性反应离子刻蚀增强，使马铃薯表面发生了更加强烈和密集的刻蚀效应[30]。

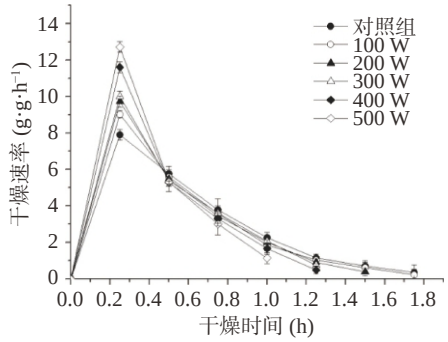


图 5 不同等离子体预处理功率对马铃薯干燥速率曲线的影响

Fig.5 The effect of different plasma pretreatment power on potato drying rate curve

2.3 干燥温度对马铃薯热风干燥特性的影响

由图 6 可知，当干燥温度为 50 、70 和 90 ℃ 时对照组马铃薯干燥时间分别为 3.25、1.75 和 1.25 h；等离子体预处理组的干燥时间分别为 2.5、1.25 和 1.25 h。与对照组相比，预处理组的干燥时间分别缩短了 23.08%、28.57% 和 0。由此可见，等离子体预处理在马铃薯 70 ℃ 时效果更为明显，当温度达 90 ℃ 处理效果不明显。

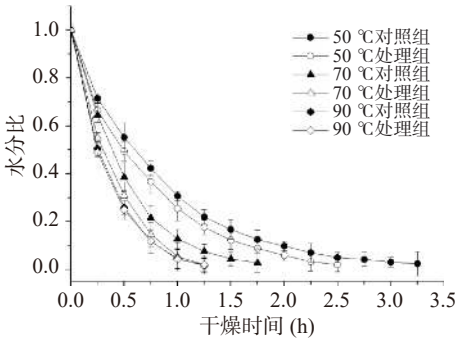


图 6 不同干燥温度对马铃薯干燥曲线的影响

Fig.6 The effect of different drying temperature on potato drying curve

由图 7 可知，当等离子体预处理时间和功率处于恒定时，随着干燥温度的升高，马铃薯干燥时间缩短。这是由于温度越高，提供给马铃薯的能量越多，传热传质效率越高，加速了内部水分子的运动速度，使水分子脱离马铃薯进入到干燥介质的速度加快，干燥的速率越大，干燥的时间也就越短[32]。干燥初期，马铃薯含水率较高，表面和干燥介质之间蒸汽压力梯度较大，且表面水分扩散路径短，脱离速度较快[33]。通过计算，可得热风温度和干燥时间显著线性相关。因此，表层水分先蒸发到干燥介质中。随着干燥的进行，表层和干燥介质之间的蒸汽压力梯度不断降低，水分转为由内部向表层迁移，迁移路径增长，阻力增大，导致干燥速率变缓[34]。

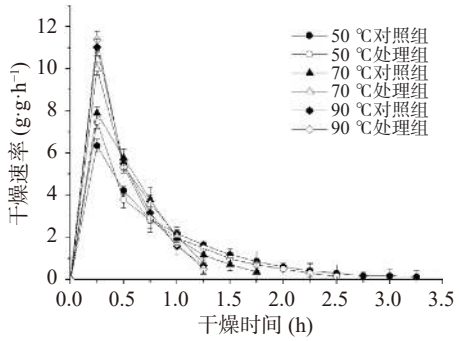


图 7 不同干燥温度对马铃薯干燥速率曲线的影响

Fig.7 The effect of different drying temperature on potato drying rate curve

2.4 各因素对水分有效扩散系数的影响

由表 1 可知，不同等离子体预处理时间条件下，马铃薯热风干燥的水分有效扩散系数在 5.905×10^{-11}~9.425×10^{-11} m^2/s 之间，且等离子体预处理后的马铃薯水分有效扩散系数均高于对照组。随着等离子体处理时间的延长，水分有效扩散系数先增大后减小，这是由于在湿度与气流速度相同的情况下，经过等离子体对马铃薯表面刻蚀，表面水分蒸发加快，表层含水率降低，含水率梯度增大，水分扩散速度加快[33]，这与 Li 等[35] 采用低温等离子体处理玉米籽粒试验结果相一致。

不同等离子体预处理功率条件下，马铃薯热风干燥的水分有效扩散系数在 5.905×10^{-11}~$11.868\times10^{-11}m^2/s$ 之间，随着等离子体预处理功率的增加，水分有效扩散系数增大，这是由于等离子体预处理在马铃薯表面产生刻蚀，形成微孔，随着等离子体预处理功率的增加，马铃薯表面破坏增大，凹陷与裂缝加深且更为密集。这与 Thirumdas[32] 研究结果相结一致，其采用射频低温等离子体预处理对印度香米表面进行处理，通过扫描电子显微镜观察处理后的香米表面，结果显示处理后的香米表面产生裂缝和凹陷，使其吸水速度加快，烹饪时间缩短。

不同干燥温度条件下，马铃薯热风干燥的水分有效扩散系数在 3.785×10^{-11}~$9.530\times10^{-11}m^2/s$ 之间，马铃薯水分有效扩散系数随着干燥温度的升高而增大，且 70 ℃ 时，等离子体预处理后干燥效果最佳。这是由于干燥温度升高，马铃薯内部温度梯度增大，

表 1　等离子预处理对水分有效扩散系数的影响

Table 1　The effect of plasma pretreatment on the effective diffusion coefficient of water

因素		线性回归方程	决定系数R^2	水分有效扩散系数D_{eff}($10^{-11}\cdot m^2\cdot s^{-1}$)
等离子体预处理时间(s)	0	lnMR=−2.0882t+0.0454	0.9992	5.905
	20	lnMR=−2.4506t+0.1303	0.9943	7.150
	30	lnMR=−3.1167t+0.1949	0.9843	9.425
	40	lnMR=−3.1168t+0.2375	0.9796	9.336
	50	lnMR=−2.8496t+0.1761	0.9888	8.411
	60	lnMR=−2.4190t+0.1347	0.9935	7.073
等离子体预处理功率(W)	0	lnMR=−2.0882t+0.0454	0.9992	5.905
	100	lnMR=−2.3051t+0.0707	0.9978	6.572
	200	lnMR=−2.7918t+0.1826	0.9907	8.200
	300	lnMR=−3.1167t+0.1949	0.9843	9.425
	400	lnMR=−3.2727t+0.1363	0.9926	9.580
	500	lnMR=−3.9775t+0.1650	0.9868	11.868
干燥温度(℃)	50(对照组)	lnMR=−1.1538t+0.0326	0.9991	3.785
	50(处理组)	lnMR=−1.5101t+0.0785	0.9921	4.407
	70(对照组)	lnMR=−2.0882t+0.0454	0.9992	5.905
	70(处理组)	lnMR=−3.1167t+0.1949	0.9843	9.425
	90(对照组)	lnMR=−3.2406t+0.1365	0.9927	9.138
	90(处理组)	lnMR=−3.1543t+0.0879	0.9957	9.530

水分子脱离马铃薯表面进入到干燥介质中的速度加快，水分有效扩散系数增大[33]。

3　结论

热风干燥过程中，不同等离子体预处理功率条件下，马铃薯的水分有效扩散系数在 5.905×10^{-11}~11.868×10^{-11} m^2/s 之间，随着等离子体预处理功率的增加，水分有效扩散系数增大；不同等离子体预处理时间条件下，水分有效扩散系数在 5.905×10^{-11}~9.425×10^{-11} m^2/s 之间，随等离子体处理时间的延长，水分有效扩散系数先增大后减小；不同干燥温度条件下，水分有效扩散系数在 3.785×10^{-11}~9.530×10^{-11} m^2/s 之间，随干燥温度的升高而增大。因此，采用低温等离子体技术对鲜切马铃薯进行预处理，并将处理后的马铃薯热风干燥，有效提高了干燥速率，缩短了干燥时间。

参考文献

[1] 张立菲. 黑龙江省马铃薯产业发展研究 [D]. 北京：中国农业科学院，2013. [ZHANG L F. Research on the development of potato industry in Heilongjiang Province[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2013.]

[2] 尹慧敏，聂宇燕，沈瑾，等. 基于 Weibull 分布函数的马铃薯丁薄层热风干燥特性[J]. 农业工程学报，2016，32(17)：252−258. [YIN H M, NIE Y Y, SHEN J, et al. Thin-layer hot air drying characteristics of potato diced based on Weibull distribution function[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2016, 32(17): 252−258.]

[3] 闫晨苗，王玺，段盛林，等. 不同干燥方式对马铃薯全粉糊化特性、风味及薯粉面包品质的影响[J]. 食品工业科技，2020，41(9)：34−41. [YAN C M, WANG X, DUAN S L, et al. Effects of different drying methods on the gelatinization characteristics and flavor of potato flour and the quality of potato flour bread[J]. Food Industry Science and Technology, 2020, 41(9): 34−41.]

[4] 董鹏飞. 粮食红外低温真空干燥实验研究 [D]. 天津：天津科技大学，2012. [DONG P F. Experimental research on infrared low-temperature vacuum drying of grain[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2012.]

[5] 于辅超. 玉米真空薄层干燥工艺的研究 [D]. 长春：吉林大学，2006. [YV F C. Research on the vacuum thin layer drying technology of corn[D]. Changchun: Jilin University, 2006.]

[6] 潘永康，王喜忠，刘相东. 现代干燥技术 [M]. 北京：化学工业出版社，1998. [PAN Y K, WANG X Z, LIU X D. Modern drying technology[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 1998.]

[7] 徐晓秀. 食品热风微波耦合干燥及气味控制研究 [D]. 无锡：江南大学，2018. [XU W X. Research on food hot-air microwave coupled drying and odor control[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2018.]

[8] WANG J, LAW C L, NEMA P K, et al. Pulsed vacuum drying enhances drying kinetics and quality of lemon slices[J]. Journal of Food Engineering, 2018, 224: 129−138.

[9] MÍNGUEZ-MOSQUERA M I, JARÉN-GALÁN M, GARRIDO-FERNÁNDEZ J. Competition between the processes of biosynthesis and degradation of carotenoids during the drying of peppers[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1994, 42(3): 645−648.

[10] DHAYAL M, LEE S Y, PARK S U. Using low-pressure plasma for *Carthamus tinctorium* L. seed surface modification[J]. Vacuum, 2006, 80(5): 499−506.

[11] HEBBAR H U, VISHWANATHAN K H, RAMESH M N. Development of combined infrared and hot air dryer for vegetables[J]. Journal of Food Engineering, 2004, 65(4): 557−563.

[12] 林浩凡. 低温等离子体薄膜沉积对环氧树脂表面电特性影响的研究 [D]. 北京：华北电力大学，2018. [LIN H F. Research on the influence of low-temperature plasma film deposition on the electrical properties of epoxy resin surface[D]. Beijing: North China Electric Power University, 2018.]

[13] BORMASHENKO E, GRYNYOV R, BORMASHENKO Y,

et al. Cold radiofrequency plasma treatment modifies wettability and germination speed of plant seeds[J]. Scientific Reports, 2012, 2: 741.

[14] BORMASHENKO E, SHAPIRA Y, GRYNYOV R, et al. Interaction of cold radiofrequency plasma with seeds of beans (*Phaseolus vulgaris*)[J]. Journal of Experimental Botany, 2015, 66(13): 4013−4021.

[15] SERA B, SPATENKA P, SERY M, et al. Influence of plasma treatment on wheat and oat germination and early growth[J]. IEEE Transactions on Plasma Science, 2010, 38(10): 2963−2968.

[16] 童家赟. 空气等离子体预处理提高穿心莲种子活力的研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2012. [TONG J Y. Air plasma pretreatment to improve the seed vigor of *Andrographis paniculata*[D]. Guangzhou: Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, 2012.]

[17] ZHANG X L, ZHONG C S, MUJUMDAR A S, et al. Cold plasma pretreatment enhances drying kinetics and quality attributes of chili pepper (*Capsicum annuum* L.)[J]. Journal of Food Engineering, 2019, 241: 51−57.

[18] ZHOU Y H, VIDYARTHI S K, ZHONG C S, et al. Cold plasma enhances drying and color, rehydration ratio and polyphenols of wolfberry via microstructure and ultrastructure alteration[J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 134(4): 110173.

[19] SHEN H S, GUO Y, ZHAO J Y, et al. The multi-scale structure and physicochemical properties of mung bean starch modified by ultrasound combined with plasma treatment[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 191: 821−831.

[20] LOUREIRO A, SOUZA F, SANCHES E A, et al. Cold plasma technique as a pretreatment for drying fruits: Evaluation of the excitation frequency on drying process and bioactive compounds[J]. Food Research International, 2019, 9: 1472021.

[21] BAO T, HAO X, SHISHIR M, et al. Cold plasma: An emerging pretreatment technology for the drying of jujube slices[J]. Food Chemistry, 2020, 337: 127783.

[22] 中华人民共和国卫生部. GB5009.3—2010 食品中水分的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2010. [National Health Commission of the Pople's Republic of China. GB5009.3—2010 Determination of moisture in food[S]. Beijing: China Standard Press, 2010.]

[23] 吴文福, 郑先哲, 马中苏. 谷物干燥储藏理论与技术 [M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 2001. [WU W F, ZHENG X Z, MA Z S. Theory and technology of grain dry storage[M]. Changchun: Jilin Science and Technology Press, 2001.]

[24] ABASI S, MINAEI S, KHOSHTAGHAZA M H. Performance of a recirculating dryer equipped with a desiccant wheel[J]. Drying Technology, 2015, 34(8): 863−870.

[25] 张丽丽. 红外干燥蔬菜的试验研究及分析 [D]. 北京: 中国农业大学, 2014. [ZHANG L L. Experimental research and analysis of infrared drying vegetables[D]. Beijing: China Agricultural University, 2014.]

[26] 李兴军, 任强, 张来林, 等. 重量法研究大豆水分吸附速率和有效扩散系数[J]. 食品工业科技, 2015, 36(21): 52−59. [LI X J, REN Q, ZHANG L L, et al. Research on soybean water adsorption rate and effective diffusion coefficient by gravimetric method [J]. Food Industry Science and Technology, 2015, 36(21): 52−59.]

[27] ABBASI S, MINAEI S, KHOSHTAGHAZA M. Investigation of kinetics and energy consumption of thin layer drying of corn[J]. Journal of Agricultural Machinery, 2016, 4(1): 98−107.

[28] SCHÖSSLER K, JÄGER H, KNORR D. Novel contact ultrasound system for the accelerated freeze-drying of vegetables[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2012, 16: 113−120.

[29] KARATHANOS V T, VILLALOBOS G, SARAVACOS G D. Comparison of two methods of estimation of the effective moisture diffusivity from drying data[J]. Journal of Food Science, 1990, 55(1): 218−223.

[30] 李帅. 低温等离子体预处理对玉米籽粒干燥动力学及储藏特性的影响 [D]. 长春: 吉林大学, 2020. [LI S. The effect of low-temperature plasma pretreatment on corn kernel drying kinetics and storage characteristics[D]. Changchun: Jilin University, 2020.]

[31] BARTZ J A, BRECHT J K. Postharvest physiology and pathology of vegetables[M]. Boca Raton: CRC Press, 2002.

[32] THIRUMDAS R, DESHMUKH R, ANNAPURE U S. Effect of low temperature plasma processing on physicochemical properties and cooking quality of basmati rice[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2015, 31: 83−90.

[33] 尹慧敏. 基于主粮化的马铃薯热风干燥工艺与特性研究[D]. 长春: 吉林大学, 2017. [YIN H M. Research on hot-air drying technology and characteristics of potato based on staple food[D]. Changchun: Jilin University, 2017.]

[34] 周碧乾. 天麻产地加工与品质特征的研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2018. [ZHOU B Q. Research on the processing and quality characteristics of gastrodia elata[D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2018.]

[35] LI S, CHEN S S, LIANG Q, et al. Low temperature plasma pretreatment enhances hot-air drying kinetics of corn kernels[J]. Journal of Food Process Engineering, 2019, 42(6): e13195.

张亚兰, 赵建诚, 杨振亚, 等. 不同品种箬竹叶生化成分及抗氧化能力分析 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 93−100. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080246

ZHANG Yalan, ZHAO Jiancheng, YANG Zhenya, et al. Analysis of Biochemical Components and Antioxidant Capacity of *Indocalamus* Leaves of Different Varieties[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 93−100. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080246

· 研究与探讨 ·

不同品种箬竹叶生化成分及抗氧化能力分析

张亚兰[1,2], 赵建诚[1], 杨振亚[1], 石　瑞[2], 李　琴[1], 王衍彬[1], 贺　亮[1,*], 陈永健[3]

（1.国家林业局竹笋工程技术研究中心, 浙江省林业科学研究院, 浙江杭州 310023;
2.南京林业大学轻工与食品学院, 江苏南京 210037;
3.浙江圣氏生物科技有限公司, 浙江湖州 313399）

摘　要: 目的：研究同一地区不同品种箬竹叶资源功能性成分含量及抗氧化能力的差异。方法：以现有的 11 种箬竹叶资源为原料，对其基本营养成分、黄酮、多糖、多酚、挥发油等功能组分进行含量及醇提取物抗氧化能力进行评价，最后对数据进行权重分析并综合评分。结果：同一地区不同品种箬竹叶的基本营养成分含量差异显著，水分、粗蛋白、粗脂肪和灰分四种成分的变异系数，只有粗蛋白的为 13.93%，其他三种变异系数不超过 10%。黄酮、多糖、多酚和挥发油四种功能性成分含量也存在显著差异，其黄酮含量和多酚含量变异系数分别为 34.47% 和 38.04%；多糖和挥发油含量变异系数分别为 28.03% 和 22.36%，较黄酮和多酚含量差异小。其中长节箬竹叶的黄酮（0.68%）和多酚含量最高（0.62%），鬉毛箬竹叶多糖含量最高（0.69%），阔叶箬竹挥发油含量最高（0.64%）。抗氧化能力的结果显示不同箬竹叶的抗氧化能力差异较小，DPPH 自由基、超氧阴离子、羟自由基三种清除率的变异系数均不超过 10%。从四种功能性成分含量及抗氧化能力的权重分析分析结果看，天目箬竹的综合评分最高（0.8108），可作为箬竹叶开发利用的首选材料。本研究的结果，综合功能性成分含量及抗氧化能力的综合评分为箬竹叶的开发选品提供重要参考。

关键词: 不同品种, 箬竹叶, 营养成分, 功能性成分, 抗氧化能力, 权重分析

中图分类号: TS201.4　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0093−08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080246

本文网刊:

Analysis of Biochemical Components and Antioxidant Capacity of *Indocalamus* Leaves of Different Varieties

ZHANG Yalan[1,2], ZHAO Jiancheng[1], YANG Zhenya[1], SHI Rui[2], LI Qin[1], WANG Yanbin[1], HE Liang[1,*], CHEN Yongjian[3]

（1.National Forestry Bureau Bamboo Shoot Engineering Technology Research Center, Zhejiang Academy of Forestry, Hangzhou 310023, China;
2.College of Light Industry and Food, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China;
3.Zhejiang Shengshi Biotechnology Co., Ltd., Huzhou 313399, China）

Abstract: Objective: To study the contents of functional components and antioxidant capacity of different varieties of *Indocalamus* leaves in same area. Methods: Using 11 existing species of *Indocalamus* leaves resources as raw materials, the contents of basic nutrients, flavonoids, polyphenols, polysaccharides, volatile oil and other functional components were evaluated as well as the antioxidant capacity of alcohol extracts. Then the data were analyzed by weight and scored comprehensively. Results: The results showed that there were significant differences among the content of basic nutrients in leaves of different *Indocalamus* varieties in the same area. The coefficient of variation of four components was 13.93% only for crude protein, and the coefficient of variation among the other three was no more than 10%. Same phenomenon was

收稿日期: 2021−08−25

基金项目: 浙江省省属科研院所扶持专项（2022F1065-1）和（2021F1065-3）; 浙江特色箬竹叶高值化绿色加工关键技术及功能品研发（2022SY07）。

作者简介: 张亚兰（1997−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品营养, E-mail: 15623207393@163.com。

*** 通信作者:** 贺亮（1979−）, 男, 博士, 研究员, 研究方向: 食品精深加工, E-mail:kite006@163.com。

found in the four functional components as well. The variation coefficients of flavonoids and polyphenols were calculated for 34.47% and 38.04%, 28.03% and 22.36% were for that of polysaccharide and volatile oil contents, in which the difference was smaller than that of flavonoids and polyphenols. Among them, the contents of flavonoids (0.68%) and polyphenols (0.62%) in the leaves of *Indocalamus* elongatus were the highest. Polysaccharide (0.69%) in leaves of *Indocalamus* barbatus was the highest. And the content of volatile oil (0.64%) in broad-leaved *Indocalamus* broad-leaved was the highest. The antioxidant capacity assay indicated that there was indistinctively difference in antioxidant activity among those *Indocalamus* leaves, and the coefficient of variation among the scavenging rates of DPPH radical, superoxide anion and hydroxyl radical was less than 10%. From the weight analysis containing the content of four functional components and antioxidant activity, the comprehensive score of *Indocalamus* Tianmu was the highest (0.8108), which might be used as the preferred material for the development and utilization of *Indocalamus* leaves. From the above studies, this finding would provide an important information for the utilization of *Indocalamus* leaves.

Key words: different varieties; *Indocalamus* leaves; nutritional composition; functional ingredients; antioxidant activity; weight analysis

箬竹(*Indocalamus*)为禾本科,箬竹属植物[1],箬竹叶片的长、宽度适宜,并含有独特的香气,是千百年来我国端午节粽叶的主要来源。在很长一段时间里,箬竹叶作为粽叶仅为食材包装所使用,用后多被弃为厨余垃圾,很少有人考虑其功能性作用[1]。近几年,人们开始对竹叶的功能性进行研究,箬竹叶营养价值丰富,富含多种微量元素,功能性成分。包括竹叶中多种多样的化学物质和生理能力成分。

研究表明,竹叶提取物中含有大量的酚类、酯类、黄酮、氨基酸及多种微量元素,具有抗氧化能力、抗衰老能力[2],并可以调节人体循环系统和生理功能,还有抗菌、抑菌等功能[3],对人体有重要作用。因此,对竹叶醇提取物进行抗氧化能力研究是有依据,并有研究价值的。目前,除了对竹叶提取物的生理功能有大量研究外,也有研究人员对箬竹叶的各种功能性成分进行了提取及研究,包括氨基酸、粗蛋白、粗脂肪、灰分等营养成分[1] 以及黄酮[4−5]、多糖[6−7]、矿质元素[8]、多酚[9] 等功能性成分。但这些研究是单一的,而且并未对多种箬竹叶的功能性成分差异进行具体分析。因此,本研究对不同品种箬竹叶的生化成分含量和抗氧化能力差异进行了分析。

本研究主要以浙江省林业科学研究院内浙江竹种园的 11 种箬竹资源为对象,不同种箬竹叶的总黄酮、多糖、多酚、挥发油四种功能性成分含量及其抗氧化能力能力差异。先利用国家标准测量其营养成分,再分别用不同的提取方法提取粗产品,即水提(多糖)和醇提(总黄酮、多酚)。利用标准品制备标准曲线,拟合回归方程,求得其含量。其次对其竹叶醇提取物进行 DPPH 自由基、超氧阴离子及羟自由基清除率的比较。最后综合各方面比较 11 种样品的优劣。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

11 种箬竹叶(矮箬竹、髯毛箬竹、阔叶箬竹、长节箬竹、美丽箬竹、长耳箬竹、泡箬竹、华箬竹、天目箬竹、胜利箬竹和米箬竹) 浙江省林业科学研究院竹类植物园; $Al(NO_3)_3$、芦丁、无水葡萄糖、$NaNO_2$、苯酚、Na_2CO_3、$ZnSO_4$、乙酸乙酯、邻苯三酚、$FeSO_4$、没食子酸、DPPH、H_2O_2、正己烷、CH_2Cl_2 分析纯,成都市科隆化学品有限公司; NaOH、浓硫酸 分析纯,杭州化学试剂有限公司(监制); 95% 乙醇 分析纯,杭州汇普化工仪器有限公司; 福林酚试剂、盐酸 优级纯,国药集团化学试剂有限公司。

Sartorius BSA 224S 型电子天平 赛多利斯 Sartorius 科学仪器有限公司; DFT-150 多功能高速中药粉碎机 温州顶历医疗器械有限公司; 真空冷冻干燥机 LABCONCO 公司; heating Bath B-491 水浴锅、Rotavapor R-210 旋转蒸发仪 BUCHI 公司; Centrifuge 5804R 冷冻离心机 Eppendorf 公司; 超声波清洗机 南京赛飞生物科技有限公司; HITACHI U-1900 紫外可见分光光度计 株式会社日立制作所; HH-2K4 二列四孔型水浴锅 巩义市予华仪器有限公司; SHZ-D(Ⅲ)循环水式真空泵 巩义市予华仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品来源及处理 采集的样品全部来源于浙江省林业科学研究院竹类植物园,采集矮箬竹、髯毛箬竹、阔叶箬竹、长节箬竹、美丽箬竹、长耳箬竹、泡箬竹、华箬竹、天目箬竹、胜利箬竹和米箬竹的竹叶,对其水含量进行测定过后,放置在室温下,自然风干。最后使用粉碎机粉碎,装至密封袋中干燥保存。在开始实验前再进行烘干处理,采用绝干样品进行实验,减少实验误差。

1.2.2 竹叶营养成分含量的测定 所有成分的含量检测均采用最近几年公布的国家标准。其中,粗蛋白含量测定采用 GB 5009.5-2016 中的凯氏定氮法; 采用 GB 5009.3-2016 中的直接干燥法测定含水量; 粗脂肪测定采用 GB/T 14772-2008 中的直接滴定法; 参照 GB 5009.4-2016 的方法测定灰分含量。

1.2.3 功能性成分提取及测定

1.2.3.1 多糖提取及含量测定 多糖提取: 综合文献 [10−12] 的方法,采用简单的水提法。将蒸馏水与 11 种样品分别以料液比 1∶20 进行均匀混合,90 ℃水浴水提 2 h。减压过滤,将滤渣丢弃,留下滤液,将

其在 60~70 ℃ 旋蒸仪上加热浓缩汁原体积至 1/3 后结束旋蒸，按体积比 1:4 加入 95% 乙醇进行沉淀 24 h。将上清液(95% 乙醇)倒去少许后分装至 50 mL 离心管，7500 r/min 离心 5 min。放入冷冻干燥机干燥 24 h，得粗多糖。

多糖含量测定：多糖含量参考张倩茹等[13] 的方法改进苯酚-硫酸法进行测定。制备 100 μg/mL 葡萄糖标准溶液，分别取 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1 mL 葡萄糖溶液置于 20 mL 具塞试管中，每支试管加蒸馏水补至 2 mL，在通风橱中加入 1 mL 的 5% 苯酚溶液混匀，然后快速加入 5 mL 浓硫酸混匀。室温静置 10 min，放入 30 ℃水浴加热 20 min。在 490 nm 下(使用上述空白试剂试管调节零点)测定吸光值 ABS，以吸光值为纵坐标，葡萄糖浓度为横坐标，拟合标准曲线为 y=12.354x−0.0032，R^2=0.9994。称取 11 种黄酮样品各 30 mg，将其溶解并定容 10 mL。从每个样品溶液中吸取 0.2 mL 多糖待测液按照相同方法测定吸光度。

1.2.3.2　黄酮提取及含量测定　黄酮提取：参考文献 [4,14] 的方法通过适当调整进行醇提。将 60% 乙醇与 11 种样品分别以料液比 1:30进行均匀混合，65℃ 水浴醇提 2 h。减压过滤，保留滤液，将其 60~65℃ 旋蒸浓缩至原体积 1/4 后分装至 20 mL 离心管，封上封口膜后放入−80℃ 冰箱冷冻 2 h，最后放入冻干机 48 h，得粗黄酮。

黄酮含量测定：参考相关文献 [15−16]，采用 $Al(NO_3)_3$ 络合分光光度法。分别取 200 μg/mL 芦丁标准溶液 0、0.25、0.5、1、2、3、4、5 mL 置于 20 mL 具塞试管中，加 60% 乙醇补至 5 mL，加 1 mL 50 g/L $NaNO_2$ 溶液，室温静置 5 min。加 1.5 mL 100 g/L $Al(NO_3)_3$ 溶液，室温静置 6 min。加 4 mL 200 g/L NaOH 溶液，室温静置 10 min。在 510 nm 下，使用上述空白试剂试管调节零点，记录吸光值，以吸光值为纵坐标，芦丁浓度为横坐标，制作标准曲线为 y=4.9395x−0.0055，R^2=0.9992。分别称取 11 种样品 30 mg，溶解于 20 mL 具塞试管中，利用相同操作测定吸光度。

1.2.3.3　多酚提取及含量测定　多酚提取：参考文献 [12,17−18] 得出的最佳提取条件，采用超声波辅助醇提。将 50% 乙醇与 11 种样品分别以料液比 1:15 进行均匀混合，超声提取 40 min。减压过滤，将滤饼丢弃，留下滤液即多酚待测液。向滤液加入沉淀剂 Zn^{2+}(硫酸锌:样品=0.5:1.6)来形成螯合物沉淀多酚，并使用 7.5% $NaCO_3$ 溶液调节 pH6~6.5。沉淀完后，将溶液分装离心，留下沉淀，加入适量2 mol/L 盐酸转溶，加入 10 mL 乙酸乙酯进行萃取，收集乙酸乙酯层于梨形瓶中。将液体放在 65 ℃ 旋蒸仪上减压蒸馏至浸膏状。将梨形瓶放入 80 ℃ 干燥箱内干燥，得高纯度多酚。

多酚含量测定：采用 Folin-Ciocalteu 比色法[19] 测定，制备 0.234 mg/mL 没食子酸标准溶液，分别取 0、0.1、0.25、0.5、0.75、1 mL 于 20 mL 具塞试管中，加蒸馏水至 2 mL。加入 0.5 mL 福林酚试剂混匀，室温静置 3 min。加入 4 mL 7.5% $NaCO_3$ 溶液，混匀后室温静置 1 h。在 744 nm 下，使用上述空白试剂试管调节零点，测定吸光值 ABS，以吸光值为纵坐标，没食子酸浓度为横坐标，拟合标准曲线为 y=57.875x+0.0076，R^2=0.9997。称取 11 种多酚待测样 30 mg 左右于 20 mL 具塞试管中，按照相同的方法测定吸光度。

1.2.3.4　挥发油提取及含量测定　参考杨萍等[20] 的方法，用同时蒸馏萃取法提取挥发油。分别取不同箬竹叶样品 60 g，放入 1 L 的烧瓶中，以样品:蒸馏水=1:8 加入蒸馏水，连接在同时蒸馏萃取装置左侧样品进样口。在 250 mL 蒸馏瓶中加入 60 mL CH_2Cl_2，连接同时蒸馏萃取装置的右侧萃取剂进样口，65 ℃ 水浴加热左侧装有 CH_2Cl_2 的烧瓶，同时用电热套加热左侧装样品的烧瓶，提取 8 h。将放置 CH_2Cl_2 的烧瓶取下，将中间出口收集装置中的 CH_2Cl_2 于此烧瓶中，使用 45 ℃ 旋转蒸发仪将 CH_2Cl_2 蒸出，将挥发油避光 4 ℃ 保存。挥发油含量(%)=挥发油的质量／箬竹叶样品的质量×100。

1.2.4　竹叶醇提取物　参考刘怡菲[21] 的方法进行，采用超声波辅助乙醇浸提法获得不同品种箬竹叶醇提取物。准确称取 11 种箬竹叶各 10 g 于 500 mL 烧瓶中。加入 30 倍体积的 60% 乙醇溶液，45 ℃ 超声提取 1.5 h，将浸提物进行真空抽滤，收集滤液。将滤液于 55 ℃ 旋转蒸发仪去除大量乙醇后，得箬竹叶醇提取物，保存至 4 ℃ 冰箱中，备用。

1.2.5　抗氧化能力测定

1.2.5.1　DPPH 自由基清除能力　DPPH 自由基清除率参照 Zhang 等[22−23] 的方法，取 DPPH 样品用无水乙醇制备 0.2 mmol/L DPPH 乙醇溶液于 100 mL 棕色容量瓶中，避光保存，用蒸馏水分别将 11 种箬竹叶醇提取物稀释成质量浓度为 0.60 mg/mL，取 2 mL 样品溶液与 3 mL 0.2 mmol/L DPPH 乙醇溶液于 10 mL 具塞试管中，混匀后避光反应 1 h。在 517 nm 下测吸光值，使用无水乙醇调零。DPPH 自由基清除率(%)=[1−(DPPH 样品混合液的吸光值—样品本身的吸光值)／DPPH 乙醇溶液吸光值]×100。

1.2.5.2　超氧阴离子清除能力　采用王紫薇等[24] 的方法，将不同品种箬竹叶醇提取物用蒸馏水分别稀释为 0.50 mg/mL 醇提取物溶液，取 1.0 mL 的醇提取物溶液于 10 mL 具塞试管中，加入 4 mL Tris-HCl 缓冲液，室温反应 20 min，加入 0.3 mL 5 mmol/L 邻苯三酚溶液，充分反应，在 420 nm 下测吸光值，用 1 mL 蒸馏水替代样品作为空白对照组。超氧阴离子清除率(%)=(1−样品混合液的吸光值／空白对照组的吸光值)×100。

1.2.5.3　羟自由基的清除能力　参考王紫薇等[24] 的

方法，将箬竹叶醇提取物用蒸馏水稀释成质量浓度为 0.50 mg/mL 醇提取物溶液，取 1 mL 醇提取物溶液于 20 mL 具塞试管中，加入 1 mL 0.75 mmol/L $FeSO_4$、1.5 mL 磷酸盐缓冲液（pH=7.4）、1.5 mL 7.5 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液以及 1 mL 0.01% H_2O_2 溶液混匀，在 37 ℃ 水浴中反应半小时。在 510 nm 下测吸光值，用 1 mL 蒸馏水替代样品作为空白对照组。计算公式如下：羟自由基清除率(%)=[1−(样品混合溶液吸光值−样品本身吸光值)／空白对照组吸光值)]×100。

1.3 数据处理

对实验数据通过 Excel 以及 SPSS 19.0 整理分析。不同品种的每个成分含量测 3 次，结果取 3 次测定值的平均值，用平均值±标准差(mean±SD)表示。

2 结果与分析

2.1 不同品种箬竹叶营养成分含量差异

不同箬竹叶营养成分含量见表 1，11 种箬竹叶的水分含量在 30%~40% 之间，粗蛋白含量在 20% 左右，粗脂肪含量在 5% 左右，灰分在 13%~16% 之间。不同品种的营养成分含量差异大小，通过变异系数来体现，变异系数没有量纲，可以进行更为客观的比较[25]。同一地区不同品种的各营养成分含量存在显著差异(P<0.05)，四种营养成分的变异系数，只有粗蛋白的为 13.93%，其他三种变异系数不超过 10%。不同箬竹叶的水分含量变异系数是 6.96%，华箬竹的水分含量最高，达 39.86%±0.20%；而矮箬竹的水分含量最低，仅 31.67%±0.23%。不同箬竹叶粗蛋白含量的变异系数是 13.93%，含量最高的是矮箬竹，有 26.12%±0.41%；其次是米箬竹，含有 24.72%±0.49%；而含量最低的是美丽箬竹，仅有 16.68%±0.42%。不同箬竹叶粗脂肪含量的变异系数是 7.53%，含量最高的是胜利箬竹，达到 5.21%±0.06%；其次是阔叶箬竹含有 5.18%±0.08%；而粗脂肪含量最低的是天目箬竹，仅有 4.10%±0.07%。不同品种灰分含量的变异系数是 4.87%，含量最高的是阔叶箬竹，含有 15.17%±0.04%，其次是长节箬竹，含有 15.06%±0.03%；而含量最低的是米箬竹，仅含有 13.15%±0.02%。从表 1 可以看出，11 种箬竹叶的四种基本营养成分中，水分、粗脂肪、灰分这三种成分的含量两两相较差异较小，粗蛋白含量的差异性较大。

2.2 不同品种箬竹叶功能性成分含量差异

不同箬竹叶功能性成分含量见表 2，多酚含量波动最大，在 0.17%~0.62% 范围内；多糖含量在 0.24%~0.69% 之间，黄酮含量在 0.25%~0.68% 之间，也有较大变化幅度；挥发油含量在 0.36%~0.64% 之间，变化幅度较小。不同箬竹叶黄酮含量的变异系数为 34.47%，长节箬竹的黄酮含量最高，为 0.68%±0.07%，其次是阔叶箬竹有 0.67%±0.06%；而黄酮含量最低的泡箬竹，仅有 0.25%±0.03%。含量最高的比含量最低的高出不止 3 倍，可见其含量差异之大。11 个品种中多糖含量最高的是髯毛箬竹，含有 0.69%±0.04%；而含量最低的是米箬竹，仅有 0.24%±0.02%。不同品种多糖含量的变异系数是 28.03%。对于多酚含量的结果，其变异系数是 38.04%，含量最高的是长节箬竹(0.62%±0.09%)，其次是胜利箬竹有 0.54%±0.06%；多酚含量最低的是米箬竹，仅有 0.17%±0.01%。长节箬竹多酚含量是米箬竹的近 4 倍，差异明显。不同品种挥发油含量的变异系数是 22.36%，含量最高的是阔叶箬竹，为 0.64%±0.05%，其次是天目箬竹有 0.59%±0.05%；挥发油含量最低的是胜利箬竹，仅有 0.36%±0.03%。从表中结果也可以看出，同一地区不同品种四种功能性成分中箬竹叶挥发油含量的差异性并不大，相较而言，黄酮、多糖和多酚含量的差异就明显较大。

2.3 不同品种箬竹叶抗氧化能力差异

表 3 表示了同一地区不同箬竹叶抗氧化能力的差异，箬竹叶醇提取物对 DPPH 自由基、超氧阴离子及羟自由基清除率可以表示抗氧化的能力。不同箬

表 1 不同箬竹叶营养成分含量差异

Table 1 Differences of nutrient contents in different *Indocalamus* leaves

竹叶品种	水分		粗蛋白		粗脂肪		灰分	
	含量(%)	变异系数	含量(%)	变异系数	含量(%)	变异系数	含量(%)	变异系数
矮箬竹	31.67±0.23^{j}		26.12±0.41^{a}		4.72±0.06^{c}		13.92±0.02^{g}	
髯毛箬竹	38.12±0.14^{b}		19.25±0.46^{f}		5.03±0.06^{b}		14.83±0.03^{d}	
阔叶箬竹	33.79±0.16^{h}		23.14±0.61^{c}		5.18±0.08^{a}		15.17±0.04^{a}	
长节箬竹	37.24±0.21^{c}		19.05±0.52^{fg}		4.66±0.07^{c}		15.06±0.03^{b}	
美丽箬竹	34.75±0.22^{f}		16.68±0.42^{h}		4.72±0.05^{c}		13.86±0.02^{h}	
长耳箬竹	35.60±0.11^{e}	6.96%	21.67±0.39^{d}	13.93%	4.43±0.07^{d}	7.53%	14.28±0.03^{e}	4.87%
泡箬竹	36.87±0.17^{d}		18.28±0.38^{g}		4.26±0.06^{e}		13.19±0.02^{j}	
华箬竹	39.86±0.20^{a}		20.39±0.44^{e}		4.68±0.08^{c}		13.79±0.04^{i}	
天目箬竹	32.64±0.17^{i}		18.22±0.54^{g}		4.10±0.07^{f}		14.93±0.04^{c}	
胜利箬竹	34.44±0.11^{g}		19.81±0.57^{ef}		5.21±0.06^{a}		14.22±0.03^{f}	
米箬竹	38.37±0.15^{b}		24.72±0.49^{b}		4.44±0.05^{d}		13.15±0.02^{j}	

注：同列不同小写字母者表示差异显著(P<0.05)，表2~表3同。

表 2　不同箬竹叶功能性成分含量差异

Table 2　Differences in contents of functional components in different *Indocalamus* leaves

原料	多糖		黄酮		多酚		挥发油	
	含量(%)	变异系数	含量(%)	变异系数	含量(%)	变异系数	含量(%)	变异系数
矮箬竹	0.58±0.03^{bc}		0.42±0.02^{cd}		0.41±0.06^{c}		0.37±0.02^{c}	
髯毛箬竹	0.69±0.04^{a}		0.38±0.01^{cde}		0.44±0.03^{bc}		0.38±0.03^{c}	
阔叶箬竹	0.46±0.02^{de}		0.67±0.06^{a}		0.51±0.05^{b}		0.64±0.05^{a}	
长节箬竹	0.43±0.03^{ef}		0.68±0.07^{a}		0.62±0.09^{a}		0.47±0.04^{b}	
美丽箬竹	0.52±0.06^{cd}		0.44±0.03^{c}		0.47±0.07^{bc}		0.37±0.03^{c}	
长耳箬竹	0.66±0.05^{a}	28.03%	0.35±0.02^{de}	34.47%	0.51±0.06^{b}	38.04%	0.43±0.05^{bc}	22.36%
泡箬竹	0.46±0.05^{de}		0.25±0.03^{g}		0.20±0.02^{d}		0.39±0.03^{c}	
华箬竹	0.38±0.04^{f}		0.36±0.03^{de}		0.19±0.02^{d}		0.40±0.05^{bc}	
天目箬竹	0.64±0.06^{ab}		0.57±0.06^{b}		0.52±0.05^{b}		0.59±0.05^{a}	
胜利箬竹	0.38±0.04^{f}		0.33±0.03^{ef}		0.54±0.06^{ab}		0.36±0.03^{c}	
米箬竹	0.24±0.02^{g}		0.27±0.03^{fg}		0.17±0.01^{d}		0.39±0.04^{c}	

表 3　不同箬竹叶抗氧化能力差异

Table 3　The difference in antioxidant activity of different *Indocalamus* leaves

竹叶品种	DPPH自由基		超氧阴离子		羟自由基	
	清除率(%)	变异系数	清除率(%)	变异系数	清除率(%)	变异系数
矮箬竹	53.76±0.27^{i}		41.88±0.36^{d}		66.54±0.48^{h}	
髯毛箬竹	59.58±0.39^{e}		42.04±0.33^{d}		73.08±0.62^{c}	
阔叶箬竹	58.22±0.29^{f}		45.40±0.44^{b}		68.23±0.57^{fg}	
长节箬竹	63.02±0.40^{b}		40.15±0.31^{e}		77.24±0.41^{a}	
美丽箬竹	60.34±0.42^{d}		39.09±0.26^{f}		71.26±0.46^{de}	
长耳箬竹	65.07±0.33^{a}	5.70%	38.86±0.24^{f}	7.86%	72.12±0.65^{d}	5.99%
泡箬竹	58.12±0.22^{f}		36.12±0.30^{h}		69.05±0.43^{f}	
华箬竹	56.95±0.35^{g}		43.25±0.37^{c}		67.75±0.55^{g}	
天目箬竹	62.16±0.25^{c}		47.26±0.34^{a}		75.93±0.49^{b}	
胜利箬竹	63.44±0.37^{b}		37.50±0.28^{g}		70.84±0.54^{e}	
米箬竹	55.84±0.32^{h}		42.28±0.19^{d}		62.01±0.52^{i}	

竹叶 DPPH 自由基清除率的范围为 53.76%~65.07%，变异系数为 5.70%，清除率最高的是长耳箬竹，达到 65.07%±0.33%；此外，长节箬竹、胜利箬竹、天目箬竹都有较高的清除率，分别是 63.02%±0.40%、63.44%±0.37%、62.16%±0.25%；清除率最低的是矮箬竹，为 53.76%±0.27%。不同箬竹叶超氧阴离子清除率的范围是 36.12%~47.26%，变异系数为 7.86%，清除率最高的是天目箬竹，达 47.26%±0.34%；其次是阔叶箬竹，达到 45.40%±0.44%；最低的是泡箬竹，清除率为 36.12%±0.30%。箬竹叶羟自由基清除率在 62.01%~77.24%，变异系数为 5.99%，清除率最高的是长节箬竹，达到 77.24%±0.41%；其次是天目箬竹，达到 75.93%±0.49%；最低的是米箬竹，清除率为 62.01%±0.52%。11 种品种中，DPPH 自由基、超氧阴离子、羟自由基三种清除率的变异系数均不超过 10%。相较于功能性成分含量差异，抗氧化能力的差异相对较小，变幅并不大。

2.4　不同箬竹叶权重分析及综合评分

2.4.1　抗氧化能力权重分析　为了方便进行最终的权重分析和综合评分，所以先将抗氧化能力归纳为一组数据。把 DPPH 自由基、超氧阴离子及羟自由基清除率，设为同等重要。每组数据的最大值作为 1，最小值作为 0，然后将所有数据归一化。由于重要程度相同，则公式为 $Y=Y_1\times1/3+Y_2\times1/3+Y_3\times1/3$。

从最终的得值可以看出(表 4)，天目箬竹竹叶醇提取物的抗氧化能力最强，得分达 0.8856；此外长节箬竹、长耳箬竹、髯毛箬竹的竹叶醇提取物的抗氧化能力相对较强，得分分别为 0.7113、0.6182、0.5795；而矮箬竹的抗氧化能力最弱，仅得分 0.0991。

2.4.2　功能性成分及抗氧化能力权重分析　诸多研究[23,26]可以看出，黄酮作为箬竹叶的主要功能性成分，重要性更高。因此，将黄酮含量的重要性设为最高，多糖含量、多酚含量及抗氧化能力次之，挥发油含量的重要性最低。由此，进行权重分析。

2.4.2.1　功能性成分数据归一化　将每组数据的最大值作为 1，将所有数据归一化，见表 5。

2.4.2.2　功能性成分、抗氧化能力权重分析及综合评分　使用 AHP 层次分析法[27−28]确定权重系数，根据箬竹叶功能性成分含量及抗氧化能力在之后工业上的应用，决定其重要程度。将黄酮含量设为重要，多糖含量、多酚含量及抗氧化能力设为比较重要，挥发油含量设为比较不重要。构成两两比较优先判断矩阵(表 6)。

表 4 抗氧化能力数据归一化

Table 4 Normalization of antioxidant activity data

竹叶品种	DPPH自由基清除率Y_1	超氧阴离子清除率Y_2	羟自由基自由基清除率Y_3	抗氧化能力Y
矮箬竹	0.0000	0.0000	0.2974	0.0991
髯毛箬竹	0.5146	0.4971	0.7269	0.5795
阔叶箬竹	0.3943	0.8208	0.4084	0.5412
长节箬竹	0.8187	0.3150	1.0000	0.7113
美丽箬竹	0.5818	0.2129	0.6074	0.4673
长耳箬竹	1.0000	0.1908	0.6638	0.6182
泡箬竹	0.3855	0.4085	0.4622	0.4187
华箬竹	0.2821	0.6137	0.3769	0.4242
天目箬竹	0.7427	1.0000	0.9140	0.8856
胜利箬竹	0.8559	0.0597	0.5798	0.4985
米箬竹	0.1839	0.5202	0.0000	0.2347

注：Y_1、Y_2、Y_3分别代表DPPH自由基、超氧阴离子、羟自由基清除率的归一化结果，Y代表抗氧化能力分析结果。

表 5 功能性成分含量数据归一化

Table 5 Normalization of functional ingredient content data

竹叶品种	黄酮含量A	多糖含量B	多酚含量C	挥发油含量D
矮箬竹	0.3953	0.7556	0.5333	0.0357
髯毛箬竹	0.3023	1	0.6000	0.0714
阔叶箬竹	0.9767	0.4889	0.7556	1.0000
长节箬竹	1	0.4222	1.0000	0.3929
美丽箬竹	0.4419	0.6222	0.6667	0.0357
长耳箬竹	0.2326	0.9333	0.7556	0.2500
泡箬竹	0	0.4889	0.0667	0.1071
华箬竹	0.2558	0.3111	0.0444	0.1429
天目箬竹	0.7442	0.8889	0.7778	0.8214
胜利箬竹	0.186	0.3111	0.8222	0.0000
米箬竹	0.0465	0	0.0000	0.1071

表 6 功能性成分及抗氧化能力优先判断矩阵

Table 6 Functional ingredients and antioxidant activity priority judgment matrix

指标	黄酮含量A	多糖含量B	多酚含量C	抗氧化能力Y	挥发油D
黄酮含量A	1	2	2	2	3
多糖含量B	0.5	1	1	1	2
多酚含量C	0.5	1	1	1	2
抗氧化能力Y	0.5	1	1	1	2
挥发油D	0.3333	0.5	0.5	0.5	1

根据优先判断矩阵使用 SPSS 在线分析系统，计算(计算方式参考李慧敏[29])得出各指标权重系数，黄酮含量 A 为 0.3485，多糖含量 B、多酚含量 C 及抗氧化能力 Y 均为 0.1846，挥发油 D 为 0.0978。经一致性检验得出 CR=0.0022<0.1,表明各指标的优先判断矩阵具有一致性,所得权重系数有效。则其综合评分结果 Z=0.3485×A+0.1846×(B+C+Y)+0.0978×D。

从图 1 可以看出，天目箬竹得分最高，有 0.8108，此外还有两种箬竹叶的评分较高，分别是长节箬竹和阔叶箬竹，分别得分 0.7808 和 0.7678；髯毛箬竹、美丽箬竹、长耳箬竹得分稍低，分别得分 0.5147、0.4817、0.5314；矮箬竹和胜利箬竹相比较得分更低，得分 0.3975 和 0.3661；得分更低的是泡箬竹 0.1903 分和华箬竹 0.2471 分；得分最低的是米箬竹，仅得分 0.0700。从综合评分的结果看出，天目箬竹的得分最高，是最好的加工原材料。尽管天目箬竹叶在功能性成分含量的单项中并不是最高的，但多项综合之后，却是最高的。加上其醇提取物的抗氧化能力是最高的，使其成为加工的首选箬竹叶原料。

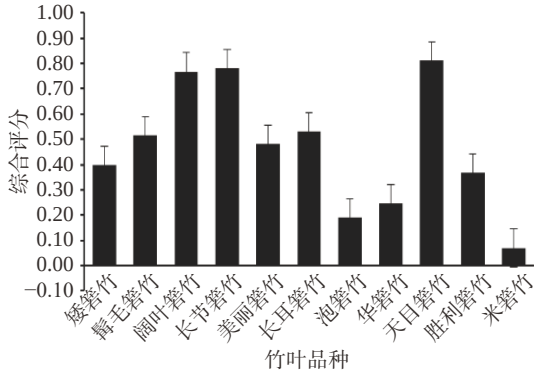


图 1 功能性成分及抗氧化能力权重分析综合评分

Fig.1 Comprehensive score analysis of functional ingredients and antioxidant activity weights

3 结论

研究结果中出现了几种功能性成分单项数据很高的箬竹叶品种，如果进行单独提取某方面的研究，可以选择单项含量较高的品种。比如，黄酮含量最高的是长节箬竹和阔叶箬竹，分别为 0.68±0.07% 和 0.67±0.06%；多糖含量最高的是髯毛箬竹，含有 0.69±0.04%；多酚含量最高的是长节箬竹，含有 0.62±0.09%，明显高于其他品种；挥发油含量最高的阔叶箬竹，含量为 0.64±0.05%。抗氧化能力最强的是天目箬竹，得分 0.8856。

功能性成分含量的单项差异和综合评分的结果可以为箬竹叶的开发选品提供重要参考。阔叶箬竹和长节箬竹这两种的综合评分很可观，仅比天目箬竹的综合评分低 0.043 和 0.030，而且这两种的黄酮含量很高，是非常好的开发原料。从不同箬竹叶的营养成分差异中，可以看出箬竹叶是一种蛋白质提取的有效来源，而粗脂肪的存在无论对于蛋白质提取还是其他功能性成分的提取都是一种阻碍，所以对于箬竹叶的加工，还是需要粗脂肪含量更低的品种。天目箬竹的粗脂肪含量最低，并且最终在功能性成分及抗氧化能力综合评分中得分最高。所以天目箬竹的竹叶是综合开发的最佳选材。

参考文献

[1] 李冬林, 金雅琴, 王文君, 等. 箬竹叶片营养成分分析[J]. 江苏林业科技, 2021, 48(1): 41−45. [LI Donglin, JIN Yaqin, WANG Wenjun, et al. Analysis of nutritional components of *Indocalamus* leaves[J]. Jiangsu Forestry Science and Technology, 2021, 48(1): 41−45.]

[2] NIRMALA C, BISHT M S, BAJWA H K, et al. Bamboo: A

rich source of natural antioxidants and its applications in the food and pharmaceutical industry[J]. Trends in Food Science & Technology, 2018, 77: 91−99.

[3] 张英. 天然功能性添加剂——竹叶提取物[J]. 精细与专用化学品, 2002(7): 20−22. [ZHANG Ying. Natural functional additive-bamboo leaf extract[J]. Fine and Special Chemicals, 2002(7): 20−22.]

[4] 李宇, 罗彩凤, 田碧英. 箬竹叶黄酮的提取及功能饮料的研制[J]. 食品工业, 2014, 35(3): 122−125. [LI Yu, LUO Caifeng, TIAN Biying. Extraction of flavonoids from *Indocalamus* leaves and development of functional beverage[J]. Food Industry, 2014, 35(3): 122−125.]

[5] 苏春花, 王福升, 丁雨龙. 长节箬竹叶总黄酮提取工艺[J]. 林业科技开发, 2010, 24(5): 87−90. [SU Chunhua, WANG Fusheng, DING Yulong. Extraction process of total flavonoids from *Indocalamus longiauritus* leaves[J]. Forestry Science and Technology Development, 2010, 24(5): 87−90.]

[6] 周先泰, 陈蓉, 齐娜. 竹叶多糖提取分离及体外抗氧化自由基的研究[J]. 广州化工, 2021, 49(6): 80−83,111. [ZHOU Xiantai, CHEN Rong, QI Na. Extraction and separation of bamboo leaf polysaccharides and study on antioxidant free radicals *in vitro*[J]. Guangzhou Chemical Industry, 2021, 49(6): 80−83,111.]

[7] 陈致印, 许泽文, 何佳慧, 等. 早竹竹叶多糖的提取及其抑菌作用[J]. 现代化农业, 2017(2): 35−38. [CHEN Zhiyin, XU zewen, HE Jiahui, et al. Extraction of polysaccharide from early bamboo leaves and its antibacterial effect[J]. Modern Agriculture, 2017(2): 35−38.]

[8] 喻谨. 箬竹属竹叶化学成分研究 [D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2014(2): 1−231. [YU Jin. Study on chemical constituents of *Indocalamus* leaves[D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry, 2014(2): 1−231.]

[9] 苏春花, 刘国华, 王福升, 等. 箬竹叶片能力成分含量的季节变化[J]. 应用生态学报, 2011, 22(9): 2471−2476. [SU Chunhua, LIU Guohua, WANG Fusheng, et al. Seasonal variation of active component content in *Indocalamus* leaves[J]. Journal of Applied Ecology, 2011, 22(9): 2471−2476.]

[10] 喻谨, 岳永德, 汤锋, 等. 不同地区竹叶中多糖的提取测定[J]. 生物质化学工程, 2014, 48(3): 40−43. [YU Jin, YUE Yongde, TANG Feng, et al. Extraction and determination of polysaccharides from bamboo leaves in different regions[J]. Biomass Chemical Engineering, 2014, 48(3): 40−43.]

[11] 张航航, 王文渊. 竹叶中多种能力成分同步提取的研究[J]. 食品与发酵科技, 2014, 50(4): 42−45,102. [ZHANG Hanghang, WANG Wenyuan. Study on simultaneous extraction of multiple active components from bamboo leaves[J]. Food and Fermentation Technology, 2014, 50(4): 42−45,102.]

[12] 王文渊, 张航航, 周振华, 等. 从竹叶中同步提取多糖、茶多酚和黄酮的研究[J]. 应用化工, 2014, 43(5): 835−838, 846. [WANG Wenyuan, ZHANG Hanghang, ZHOU Zhenhua, et al. Study on simultaneous extraction of polysaccharides, tea polyphenols and flavonoids from bamboo leaves[J]. Applied Chemical Industry, 2014, 43(5): 835−838, 846.]

[13] 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 Qianru, LING Lei, HE Yuqi, et al. Determination of polysaccharide content of *Blumea balsamifera* by phenol sulfuric acid method[J]. Chinese National and Folk Medicine, 2019, 28(14): 30−32.]

[14] 崔健. 箬竹属植物黄酮类物质与挥发性成分的研究 [D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2011. [CUI Jian. Study on flavonoids and volatile components of *Indocalamus*[D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry, 2011.]

[15] 李水芳, 文瑞芝, 李忠海. 箬竹叶总黄酮含量的测定[J]. 中南林学院学报, 2006(4): 128−131. [LI Shuifang, WEN Ruizhi, LI Zhonghai. Determination of total flavonoids in *Indocalamus* leaves[J]. Journal of Central South Forestry University, 2006(4): 128−131.]

[16] 乐薇, 杨文婷, 吴格格, 等. 箬叶总黄酮提取工艺优化及比较[J]. 北方园艺, 2015(16): 131−134. [LE Wei, YANG Wenting, WU Gege, et al. Optimization and comparison of extraction processes of total flavonoids from *Indocalamus* leaves[J]. Northern Horticulture, 2015(16): 131−134.]

[17] 王保金, 吴长俊, 房兆龙. 竹叶茶多酚超声提取及保鲜效果研究[J]. 广东农业科学, 2013, 40(10): 107−108, 158. [WANG Baojin, WU Changjun, FANG Zhaolong. Study on ultrasonic extraction and preservation of tea polyphenols from bamboo leaves[J]. Guangdong Agricultural Science, 2013, 40(10): 107−108, 158.]

[18] 苏春花, 罗金岳, 王福升. 长节箬竹叶茶多酚微波辅助提取工艺[J]. 林业科技开发, 2011, 25(3): 102−105. [SU Chunhua, LUO Jinyue, WANG Fusheng. Microwave assisted extraction technology of tea polyphenols from *Indocalamus longjieensis* leaves[J]. Forestry Science and Technology Development, 2011, 25(3): 102−105.]

[19] 彭映林, 谢丹, 李媛, 等. 黑茶中茶多酚的提取及其含量测定方法的研究进展[J]. 广东化工, 2019, 46(19): 110−111, 138. [PENG Yinglin, XIE Dan, LI Yuan, et al. Research progress on extraction and content determination of tea polyphenols in black tea[J]. Guangdong Chemical Industry, 2019, 46(19): 110−111, 138.]

[20] 杨萍, 刘洪波, 潘佳佳, 等. 不同季节毛竹竹叶挥发油成分与抑菌效果比较研究[J]. 核农学报, 2015, 29(2): 313−320. [YANG Ping, LIU Hongbo, PAN Jiajia, et al. Comparative study on volatile oil composition and antibacterial effect of Moso bamboo leaves in different seasons[J]. Journal of Nuclear Agriculture, 2015, 29(2): 313−320.]

[21] 刘怡菲. 玉竹不同部位功能性成分测定及其抗氧化能力研究[J]. 辽宁林业科技, 2019(1): 6−9,74. [LIU Yifei. Determination of functional components and antioxidant activity of different parts of *Polygonatum odoratum*[J]. Liaoning Forestry Science and Technology, 2019(1): 6−9,74.]

[22] ZHANG Youwei, ZHANG Hui, WANG Li, et al. Influence of the degree of hydrolysis (DH) on antioxidant properties and radical-scavenging activities of peanut peptides prepared from fermented peanut meal[J]. European Food Research and Technology, 2011, 232(6): 941−950.

[23] 欧阳吾乐, 雷福红, 杨亚晋, 等. 4 种竹叶营养成分分析及其黄酮提取物体外抗氧化能力研究[J]. 天然产物研究与开发,

2019, 31(10): 1669−1674,1830. [OUYANG Wule, LEI Fuhong, YANG Yajin, et al. Analysis of nutritional components of four kinds of bamboo leaves and study on *in vitro* antioxidant activity of flavonoids[J]. Research and Development of Natural Products, 2019, 31(10): 1669−1674,1830.]

[24] 王紫薇, 涂明锋, 叶文峰, 等. 淡竹叶黄酮提取工艺优化及抗氧化性研究[J]. 山东化工, 2020, 49(2): 17−20. [WANG Zi-wei, TU Mingfeng, YE Wenfeng, et al. Optimization of extraction process and antioxidant activity of flavonoids from *Phyllostachys pubescens* leaves[J]. Shandong Chemical Industry, 2020, 49(2): 17−20.]

[25] 张慧君, 袁于舒, 张岩, 等. 不同西瓜品种性状及变异系数的调查分析[J]. 北方园艺, 2021(16): 33−39. [ZHANG Huijun, YUAN Yushu, ZHANG Yan, et al. Investigation and analysis on traits and variation coefficients of different watermelon varieties[J]. Northern Horticulture, 2021(16): 33−39.]

[26] ABEYSINGHE D T, KUMARA K A H, KAUSHALYA K A D, et al. Phytochemical screening, total polyphenol, flavonoid content, *in vitro* antioxidant and antibacterial activities of Sri Lankan varieties of *Murraya koenigii* and *Micromelum minutum* leaves[J]. Heliyon, 2021, 7(7): e07449.

[27] JOELLA A, EGIDIO Q, GOVERDE R M P, et al. A hybrid delphi-AHP multi-criteria analysis of moving block and virtual coupling railway signalling[J]. Transportation Research Part C: Emerging Technologies, 2021, 129: 103250.

[28] YUN C, JIA Y, SHAHBAZ K. The spatial framework for weight sensitivity analysis in AHP-based multi-criteria decision making[J]. Environmental Modelling and Software, 2013, 48: 129−140.

[29] 李慧敏, 郑淘, 曾艺琼, 等. AHP-CRITIC 权重分析法综合优选玉竹全粉改性工艺[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(5): 138−146. [LI Huimin, ZHENG Tao, ZENG Yiqiong, et al. Comprehensive optimization of modified technology of *Polygonatum odoratum* whole powder by AHP-CRITIC weighted evaluation[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(5): 138−146.]

程梦颖, 张海萍, 刘友明, 等. 葡萄糖氧化酶对鲢鱼糜凝胶特性的影响 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 101−107. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080329

CHENG Mengying, ZHANG Haiping, LIU Youming, et al. Effect of Glucose Oxidase on Gel Properties of Surimi from Silver Carp[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 101−107. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080329

·研究与探讨·

葡萄糖氧化酶对鲢鱼糜凝胶特性的影响

程梦颖[1,2], 张海萍[1,2], 刘友明[1,2,*], 熊善柏[1,2]

（1.华中农业大学食品科学技术学院, 湖北武汉 430070;
2.国家大宗淡水鱼加工技术研发中心（武汉）, 湖北武汉 430070）

摘　要: 为了研究葡萄糖氧化酶（GOD）诱导的氧化对鲢鱼糜凝胶特性的影响，以冷冻鲢鱼糜为原料，分析在不同的 GOD 添加量（0、0.1‰、0.3‰、0.5‰、0.7‰、0.9‰）下，鱼糜的弹性模量（G′）、损耗模量（G″）以及鱼糜凝胶的凝胶强度、白度、微观结构、持水性、水分分布状态和蛋白交联等指标的变化情况。结果表明，随着 GOD 添加量的增加，G′和 G″、凝胶强度、白度和持水性先升高后降低，均在添加量为 0.5‰时达到最大值；同时，在 GOD 适量添加范围（0.1‰~0.5‰）内，随着添加量增加，鱼糜凝胶的自由水和结合水含量降低，不易流动水含量升高，且鱼糜凝胶网络结构更致密，而添加过量 GOD（0.7‰~0.9‰）可使鱼糜凝胶孔隙当量直径增大，网络结构被破坏。SDS-PAGE 图谱显示，添加 GOD 可促使蛋白质分子间形成二硫键和非二硫共价键，从而改善鲢鱼糜凝胶特性。

关键词: 鲢鱼, 鱼糜, 葡萄糖氧化酶, 凝胶特性
中图分类号: TS254.1　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0101−07
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080329
本文网刊:

Effect of Glucose Oxidase on Gel Properties of Surimi from Silver Carp

CHENG Mengying[1,2], ZHANG Haiping[1,2], LIU Youming[1,2,*], XIONG Shanbai[1,2]

（1.College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;
2.National R & D Branch Center for Conventional Freshwater Fish Processing (Wuhan), Wuhan 430070, China）

Abstract: To investigate the effects of glucose oxidase (GOD) induced oxidation on the gel properties of silver carp surimi, the changes of elastic modulus (G'), loss modulus (G"), gel strength, whiteness, microstructure, water holding capacity, moisture distribution and protein crosslinking of surimi added with different GOD contents (0, 0.1‰, 0.3‰, 0.5‰, 0.7‰, 0.9‰) were analyzed. The results showed that G', G", gel strength, whiteness and water holding capacity increased firstly and then decreased with the increase of GOD addition, and all of them reached the maximum when the addition was 0.5‰. When GOD addition was in the range of 0.1‰~0.5‰, the free water and bound water content of gelatin decreased, the content of immobile water increased, and the gel network of surimi was denser with the increase of GOD addition. While adding excessive GOD (0.7‰~0.9‰), the pore size of surimi gel increased and gel network was destroyed. As indicated by SDS-PAGE patterns, appropriate addition of GOD could promote the formation of disulfide bonds and non-disulfide covalent bonds between protein molecules, thus the gel properties of silver carp surimi were improved.

Key words: silver carp; surimi; glucose oxidase; gel properties

鱼糜制品是我国发展迅速的淡水鱼加工产品之一, 是一类营养丰富且食用方便的产品[1]。然而, 淡水鱼糜具有凝胶形成能力差, 且在加工过程中易出现凝胶劣化等缺点[2]。目前, 提高淡水鱼糜凝胶特性的

收稿日期: 2021−08−30
基金项目: 国家自然科学基金（31871835）; 财政部和农业部国家现代农业产业技术体系（CARS-45-28）。
作者简介: 程梦颖（1997−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 水产品加工与贮藏, E-mail: 571430381@qq.com。
*** 通信作者:** 刘友明（1975−）, 男, 博士, 副教授, 研究方向: 水产品加工与贮藏, E-mail: lym@mail.hzau.edu.cn。

方法主要有物理处理法(超高压诱导、超声波辅助和微波加热等)和外源添加法(蛋白、多糖和盐类和酶制剂等),其中添加酶制剂因具有反应条件温和、能耗低和针对性强的特点而受到关注[3]。目前在鱼糜制品加工过程中添加的酶制剂主要是转谷氨酰胺酶(TG)[4],它是通过促进蛋白质之间发生交联,从而提高鱼糜的凝胶形成能力[5]。也有研究表明,在革胡子鲶鱼糜中添加脂肪酶能提高其鱼糜凝胶品质[6]。

葡萄糖氧化酶(GOD)是一种安全的(GRAS)食品添加剂,目前在面制品中的应用较多,它可以催化葡萄糖和氧气反应生成葡萄糖内酯和过氧化氢,而过氧化氢将面筋蛋白中的巯基氧化成二硫键,从而形成较好的网络结构。研究表明,适量浓度的羟基自由基会提高肌原纤维蛋白(MP)的凝胶形成能力[7−8]。在鱼糜中,过氧化氢被残留的 Fe^{2+}还原成羟基自由基,从而会对鱼糜蛋白进行氧化。有研究发现,添加适量 GOD 可以显著改善海水鱼糜的凝胶特性及其蛋白结构[9−10],但目前关于 GOD 在淡水鱼糜中的应用鲜有报道。

由于海水鱼资源匮乏,鱼糜制品的加工原料逐渐转为淡水鱼,鲢鱼是目前淡水鱼鱼糜的主要加工原料。本研究以冷冻鲢鱼糜为原料,以不同 GOD 添加量模拟氧化环境,探讨 GOD 对鲢鱼糜凝胶特性的影响,并通过低场核磁、动态流变学分析 GOD 对鲢鱼糜凝胶水分状态以及凝胶形成过程的影响,同时结合扫描电镜观察凝胶微观结构,以期为 GOD 在淡水鱼鱼糜加工中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

冷冻鲢鱼糜(AAA 级) 洪湖市井力水产食品股份有限公司;葡萄糖氧化酶(GOD)酶活为 10000 U/g 上海源叶生物科技有限公司;NaCl、尿素等 均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

AUY220 分析天平 日本岛津公司;HH-6 数显恒温水浴锅 国华电器有限公司;Mutiquick3 食物调理机 博朗电器(德国)公司;722 型分光光度计 上海舜宇恒平精密科学仪器有限公司;FJ-200 高速分散均质机 上海标本模型厂;Ultrascan XE 型色度仪 美国 Hunter Surrey 公司;TA-XTPlus 质构仪 英国 Stable Micro Systems 公司;AVANTI J-26 高速冷冻离心机 美国贝克曼公司;NMI20 核磁共振成像仪 上海纽迈电子科技有限公司;JSM-6390LV 扫描电镜 日本 NTC 公司;AR2000ex 型动态流变仪 美国 TA 仪器公司。

1.2 实验方法

1.2.1 鱼糜凝胶的制备 将冷冻鱼糜于 4 ℃ 解冻后,参考方海砚等[11] 的方法制作鱼糜凝胶,调节鱼糜水分含量至 78%,在食品调理机中预斩 2 min,加入 2% NaCl 和不同添加量 GOD(0、0.1‰、0.3‰、0.5‰、0.7‰、0.9‰),添加量的选择是以预实验结果为参考,其中,添加量为 0 的设为对照组。继续斩拌 4 min,用真空包装机排气后灌入肠衣(直径 25 mm)封口,将鱼肠 40 ℃ 水浴 1 h 后再放入 90 ℃ 水浴下 30 min,经流水冷却 30 min 后置于 4 ℃ 冰箱贮藏过夜。

1.2.2 动态流变学特性测定 参考 XUE 等[12] 的方法稍作修改。采用直径为 40 mm 的平板。参数设定:采用温度扫描模式,间隙为 1000 μm,频率 1 Hz,剪切应力 1 Pa,升温范围 20~90 ℃,升温速率为 2 ℃/min。记录升温过程中弹性模量(G′)、损耗模量(G″)的变化。

1.2.3 鱼糜凝胶强度测定 鱼肠从冰箱中取出后,在室温下平衡 30 min,切成高度 20 mm 的圆柱体,用 TA-XTPlus 质构分析仪进行破断测试。探头为 P/0.25S,压缩距离设置为 15 mm,测前速度 5 mm/s,测试速度 1 mm/s,测后速度 5 mm/s,每个样品至少做 5 个平行,穿刺曲线上的第 1 个峰值即破断力[11]。凝胶强度为破断力与凹陷深度之积。

1.2.4 白度测定 参考 PARK[13] 的方法。将鱼糜凝胶切成厚度 5 mm 左右的圆片,采用色度仪测定样品的 L^*、a^*和 b^*值,测定前用标准白板对色差仪校正。白度(W)计算公式见(1)式:

$$W=100-[(100-L^*)^2+a^{*2}+b^{*2}]^{1/2} \quad \text{式(1)}$$

1.2.5 鱼糜凝胶 pH 的测定 参考关宏等[14] 的方法并稍作修改,称取 2.00 g 鱼糜凝胶,加入 10 倍体积(w/v)的超纯水,使用均质机 6000 r/min 均质 1 min,在 4 ℃ 低温下 4000 r/min 离心 10 min,取上清液,用 pH 计测定。

1.2.6 扫描电镜观察(SEM) 参考乔翠平等[15] 的方法并略作修改,将制备的样品切成 2 mm×2 mm×1 mm 的薄块,用 2.5% 戊二醛固定 2~7 h 后,用乙醇进行梯度洗脱 15 min,再用醋酸异戊酯洗脱 20 min。将处理好的样品经临界点干燥,喷金处理后,然后用扫描电镜观察微观结构,电子束的加速电压为 3 kV。

采用图像分析软件 ImageJ 1.42q 及其插件 FracLac-2.5 Release 1d 对扫描电镜图片进行处理。对扫描电镜图片进行分析前,按照 DÀVILA 等[16] 的方法对扫描电镜图片进行阈值化和二值化处理。分形维数和平均孔隙当量直径参考朱玉安等[17] 的方法进行计算。孔隙当量直径可以直观地反映鱼糜凝胶的孔隙大小;分形维数反映了鱼糜凝胶体系的空间复杂程度,分形维数越大说明体系越复杂,分形维数越小,说明体系的均匀性越好[18]。

1.2.7 持水性测定 采用离心法测定[19],将样品切成厚度约 5 mm 的薄片,称质量记为 M_0,在 4000 r/min 下离心 10 min,离心结束后用滤纸吸去水分,再次称重,记为 M_1。持水性按(2)式计算:

$$\text{持水性}(\%)=\frac{M_1}{M_0}\times 100 \quad \text{式(2)}$$

1.2.8　LF-NMR 弛豫时间 T_2 的测定　将样品在室温下恒温 30 min，切成高度 20 mm 的圆柱并转入核磁管中，采用 CPMG 脉冲序列进行自旋-自旋弛豫时间 T_2、T_2 峰面积比的测定。参数设定：SFI=22 MHz，P90=14 μs，SW=100 kHz，τ=200 μs，NS=8，重复采样等待时间为 4500 ms。检测结束所得 CPMG 指数衰减曲线采用 Multi Exp InvAnalysis软件进行反演，得到 T_2 峰位置和 T_2 峰面积比[20]。

1.2.9　SDS-PAGE 分析　参考张一鸣等[21] 的方法略作修改，取 18 mL 95 ℃ 含有 5% 十二烷基硫酸(SDS，w/v)溶液添加到 2 g 切碎的鱼糜凝胶中，均质后于 85 ℃ 水浴 1 h，在 8000 r/min 下离心 10 min，取上清液将蛋白浓度调整到 2 mg/mL，取 200 μL 样品加入 40 μL 含有(不含有)5% β-巯基乙醇蛋白的上样缓冲液，混合均匀后于沸水浴加热 3 min，进样体积为 10 μL。用 5% 浓缩胶，10% 分离胶。使用 0.125%(w/v)考马斯亮蓝 R-250 进行染色，使用脱色液(50% 甲醇+10% 醋酸+40% 蒸馏水)进行脱色。

1.3　数据处理

每组试验样品做 3 次平行。采用 Origin 2018 进行绘图，使用 SPSS23 进行相关性和显著性分析，显著性水平为 $P<0.05$。

2　结果与分析

2.1　GOD 添加量对鱼糜动态流变学性质的影响

不同 GOD 添加量对升温(20~90 ℃)过程中鲢鱼糜弹性模量 G′和损耗模量 G″的影响如图 1 所示，从图中可以看出，整个凝胶过程主要分为 3 个阶段：凝胶化、凝胶劣化和鱼糕化。在 20~43 ℃ 范围内，添加 GOD 组和对照组的 G′均有小幅度升高，这可能是因为此时肌球蛋白轻链亚基 S1 发生解离，蛋白质分子间发生交联形成了较弱的网络结构；在 43~50 ℃ 范围内，添加 GOD 组和对照组的 G′和 G″均迅速下降到最小值，可能是因为此阶段内源蛋白水解酶活性增加，肌原纤维蛋白开始降解，破坏了凝胶网络结构；在 50~90℃ 范围内，添加 GOD 组和对照组的 G′和 G″先上升后趋于平稳，这是因为鱼糜中肌球蛋白变性聚集，二硫键和疏水相互作用逐步形成，使鱼糜形成不可逆的凝胶网络结构[22−23]。温度在 35~43 ℃ 范围内，GOD 添加量为 0.1‰~0.7‰时，G′和 G″都高于对照组；而在 GOD 添加量为 0.9‰时，G′和 G″都低于对照组。对照组在 90 ℃ 的 G′和 G″分别为 5578 Pa 和 344.6 Pa，而添加 0.5‰ GOD 的鱼糜最终 G′和 G″达到 8151 Pa 和 492.4 Pa，相比对照组来说，分别提高了 46.12% 和 42.89%。通过 G′和 G″的变化可以发现，添加适量的 GOD 可诱导鱼糜蛋白适度氧化，提高鱼糜的 G′和 G″，但是添加过量的 GOD 则会导致蛋白质氧化过度，鱼糜的 G′和 G″降低。

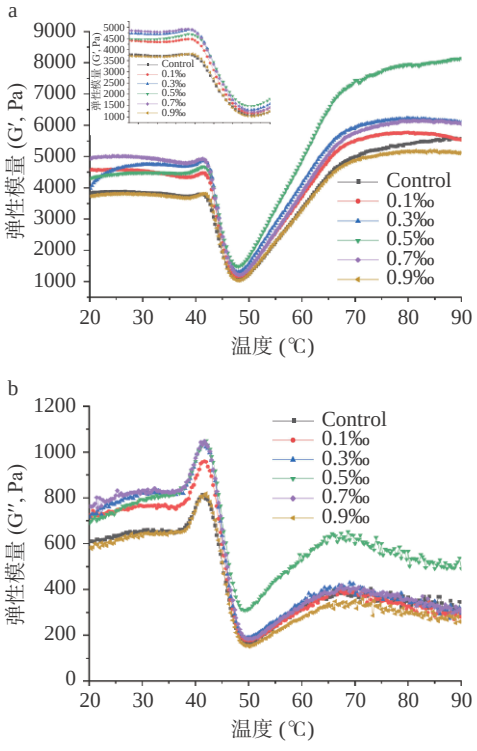


图 1　GOD 添加量对升温过程中鱼糜弹性模量 G′(a)和损耗模量 G″(b)的影响

Fig.1　Effect of GOD addition on the elastic modulus G′ (a) and loss modulus G″ (b) of surimi during heating process

2.2　GOD 添加量对鲢鱼糜凝胶强度的影响

由图 2 可以看出，随着 GOD 添加量的增加，鱼糜凝胶的破断力、凹陷深度以及凝胶强度均呈先增加后降低的趋势，当 GOD 添加量为 0.5‰时，鱼糜凝胶强度达到最高值 771.814 g·cm，且与空白组间差异显著($P<0.05$)。这可能是由于添加 GOD 催化鱼糜中的葡萄糖发生氧化反应生成过氧化氢，而过氧化氢被 Fe^{2+}还原成羟基自由基对鱼糜蛋白进行氧化，添加适量的 GOD 使蛋白质发生适当氧化，促进蛋白质的展开，暴露出分子内的巯基基团，被氧化形成了更多二硫键，从而提高蛋白质凝胶强度[24]。但是添加过量的 GOD 则会产生较多的羟基自由基，导致蛋白质过度氧化及严重变性，无法有序聚集，使鱼糜凝胶形成能力降低，导致凝胶强度下降[25]。付璐璐等[26] 在海水鱼糜中也有类似的发现。

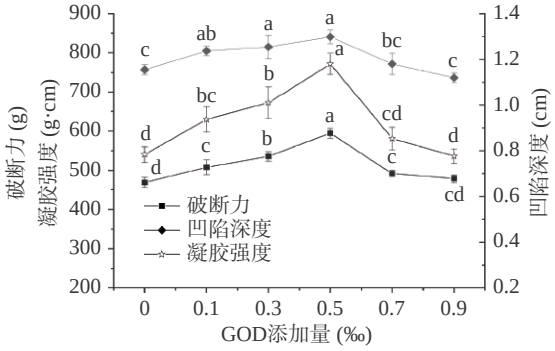


图 2　GOD 添加量对鱼糜凝胶破断力、凹陷深度和凝胶强度的影响

Fig.2　Effect of GOD addition on breaking force, deformation, and gel strength of surimi gel

注：不同字母表示差异显著($P<0.05$)；图 3、图 5 同。

2.3 GOD 添加量对鱼糜凝胶色度的影响

不同 GOD 添加量下鱼糜凝胶的亮度(L^*)、红度值(a^*)、黄度值(b^*)及白度(W)如表 1 所示。随着 GOD 添加量的增加,鱼糜凝胶的亮度 L^*没有显著性变化(P>0.05)。在 GOD 添加量为 0.1~0.3‰时,鱼糜凝胶的白度 W 没有显著变化(P>0.05),在 GOD 添加量为 0.5‰时,鱼糜凝胶白度显著高于对照组(P<0.05),这可能是因为此时形成凝胶网络结构更致密,提高了鱼糜凝胶的持水性,使鱼糜凝胶具有更好的光泽度和透明度[27]。

表 1 GOD 添加量对鱼糜凝胶色度的影响

Table 1 Effect of GOD addition on color of surimi gel

GOD添加量(‰)	L^*	a^*	b^*	W
0	79.45±0.21^{a}	−1.43±0.05^{c}	6.54±0.09^{a}	78.38±0.19^{b}
0.1	79.56±0.40^{a}	−1.37±0.05^{abc}	5.99±0.15^{b}	78.65±0.40^{ab}
0.3	79.67±0.14^{a}	−1.39±0.05^{bc}	5.84±0.20^{b}	78.80±0.17^{ab}
0.5	79.83±0.37^{a}	−1.34±0.02^{ab}	5.91±0.15^{b}	78.94±0.39^{a}
0.7	79.78±0.07^{a}	−1.31±0.03^{a}	5.94±0.05^{b}	78.89±0.08^{ab}
0.9	79.78±0.28^{a}	−1.38±0.00^{abc}	5.98±0.07^{b}	78.87±0.25^{ab}

注:同列不同小写字母表示差异显著(P<0.05);表2、表3同。

2.4 GOD 添加量对鲢鱼糜凝胶 pH 的影响

GOD 添加量对鱼糜凝胶 pH 的影响如图 3 所示,随着 GOD 添加量的增加,鱼糜凝胶的 pH 逐渐降低,但是都保持在 6.8~7.0 左右,与对照组相比,添加了 GOD 的 pH 都显著小于对照组(P<0.05)。可能是因为添加 GOD 催化鱼糜中的葡萄糖发生氧化反应,在生成过氧化氢的同时也生成了葡萄糖内酯,葡萄糖内酯易水解,生成葡萄糖酸,从而导致鱼糜凝胶 pH 降低,OMURA 等[9] 也有类似的结论。有研究发现,pH 由中性向酸性变化时,肌球蛋白中 α-螺旋逐渐减少并转换成其他二级结构,导致其凝胶形成能力增强[28]。

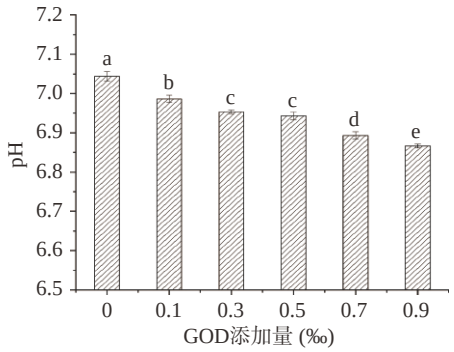


图 3 GOD 添加量对鱼糜凝胶 pH 的影响

Fig.3 Effect of GOD addition on pH of surimi gel

2.5 GOD 添加量对鱼糜凝胶微观结构的影响

图 4 显示了不同 GOD 添加量下鱼糜凝胶微观网络结构,由图 4 可知,添加适量的 GOD 下的鱼糜凝胶相比空白对照组具有更加紧密的网络结构,尤其是添加 0.5‰ GOD 的鱼糜凝胶最为明显,而 GOD 添加量继续增加时,鱼糜凝胶的微观结构逐渐变得粗糙。为了定量分析微观结构的变化,对微观结构图形计算其孔隙当量直径和分形维数,结果见表 2。由表可知,随着 GOD 添加量的增加,孔隙当量直径呈先下降后增加的趋势,并在添加 0.5‰ GOD 时达到最

表 2 不同 GOD 添加量的鱼糜凝胶的孔隙当量直径和分形维数

Table 2 Pore size and fractal dimension of surimi gel with different GOD addition

GOD添加量(‰)	孔隙当量直径(μm)	分形维数
0	1.16±0.11^{ab}	2.80±0.15^{a}
0.1	1.09±0.01^{ab}	2.89±0.01^{a}
0.3	1.09±0.14^{ab}	2.89±0.01^{a}
0.5	0.95±0.02^{b}	2.89±0.01^{a}
0.7	1.25±0.27^{a}	2.89±0.00^{a}
0.9	1.29±0.11^{a}	2.89±0.00^{a}

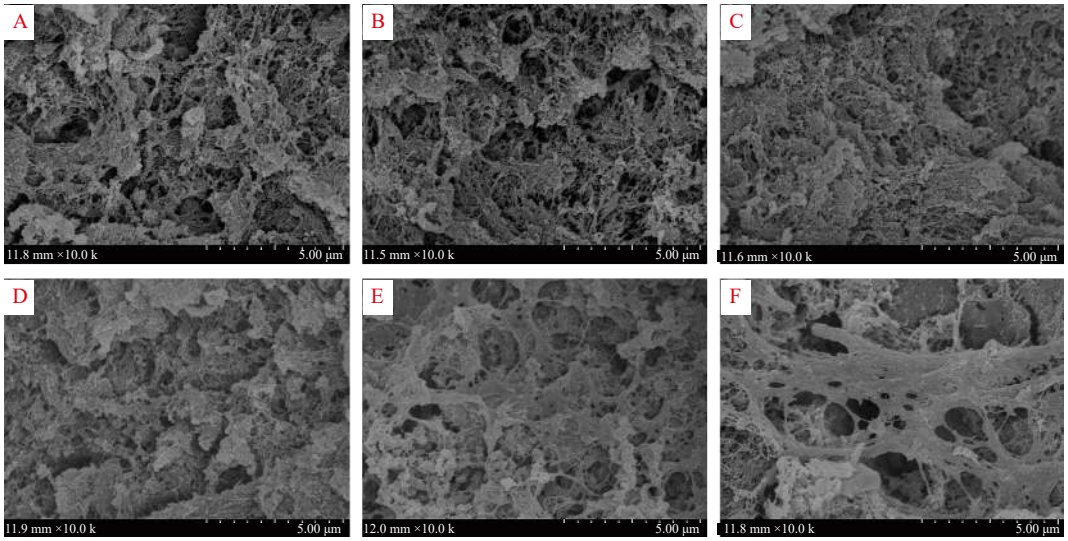


图 4 不同 GOD 添加量的鱼糜凝胶微观结构图(×10 k)

Fig.4 Scaning electron microscopy of silver crap surimi gel with different GOD addition (×10 k)

注:A~F 依次表示 GOD 添加量为 0、0.1‰、0.3‰、0.5‰、0.7‰和 0.9‰的鱼糜凝胶微观结构。

小值，而分形维数则无显著性差异（P>0.05），这可能是因为添加适量的 GOD 诱导氧化鱼糜蛋白发生适当氧化，暴露出更多巯基基团和疏水基团，蛋白分子之间的疏水相互作用增加，氧化巯基形成更多的二硫键，促进良好的凝胶网络结构的形成[29]；而随着 GOD 添加量的进一步增加，蛋白质过度氧化，蛋白质分子内部发生交联和聚集，形成不可溶的聚集体[30]。WANF 等[10] 研究也发现适当添加量的 GOD 会使猪肉的肌原纤维蛋白结构更加致密。

2.6　GOD 添加量对鱼糜持水性的影响

如图 5 所示，GOD 添加量对鱼糜凝胶持水性有显著影响（P<0.05），持水性随着 GOD 添加量的增加呈先增加后降低的趋势，与对照组相比，添加 0.1‰~0.5‰的 GOD 下鱼糜凝胶的持水性显著提高（P<0.05），在 GOD 添加量为 0.5‰时达到最大值 81.35%，过量的 GOD（0.9‰）会导致持水性显著降低（P<0.05），这可能是因为添加适量的 GOD 会使鱼糜蛋白适度氧化，从而形成致密的网络结构，截留更多的自由水，导致鱼糜凝胶持水性增加；而添加过量的 GOD 会使蛋白质过度氧化，破坏鱼糜凝胶内部网络结构，出现一些较大的孔隙，自由水流出，从而使持水性下降，鱼糜的结构稳定性也会降低。李学鹏等[31] 也发现适度氧化能提高草鱼肌原纤维蛋白凝胶的持水性。

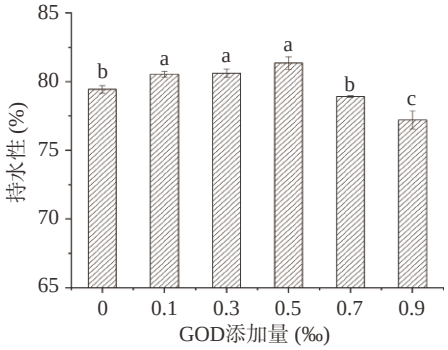


图 5　GOD 添加量对鱼糜凝胶持水性的影响
Fig.5　Effect of GOD addition on water-holding capacity of surimi gel

2.7　GOD 添加量对鱼糜凝胶水分状态的影响

如图 6 所示，在不同弛豫时间出现的峰代表凝胶体系中不同的水分及其含量，鲢鱼糜凝胶中水分状态分布呈 3 种状态，分别是集中在 0~1 ms 的 T_{21}，表征凝胶体系中的与大分子结合的水，是结合水；集中在 40~200 ms 的 T_{22}，是表征鱼糜凝胶网络结构截留在网络结构内部的水，是不易流动水；集中在 400~1200 ms 的 T_{23}，是表征凝胶结构外部的水，即能够自由移动的水，是自由水。表 3 是不同 GOD 添加量的鲢鱼糜凝胶水分子 T_2 弛豫峰面积比例的变化，表示了鱼糜凝胶体系中结合水、不易流动水和自由水的分布情况。由表 3 可知，随着 GOD 添加量的增加（0.1‰~0.5‰），T_{22} 弛豫峰面积比例增加，相对应的 T_{23} 弛豫峰面积比例降低，此时自由水转换成不易流动水；当 GOD 添加量继续增加（0.7‰~0.9‰）时，T_{22} 值降低，T_{23} 值提高，不易流动水逐渐转换成流动水，这可能是由于添加适量的 GOD 诱导鱼糜蛋白发生适当氧化，促进鱼糜凝胶形成更加致密的网络结构，将部分自由水紧紧锁在凝胶网络结构中[32]，提高凝胶持水性；而添加过量的 GOD 会使鱼糜蛋白发生过度氧化，鱼糜凝胶网络结构遭到破坏，孔隙增大，使部分被截留在网络结构中的水分流失，导致鱼糜凝胶的持水性降低，与持水性的变化趋势一致（见图 5）。

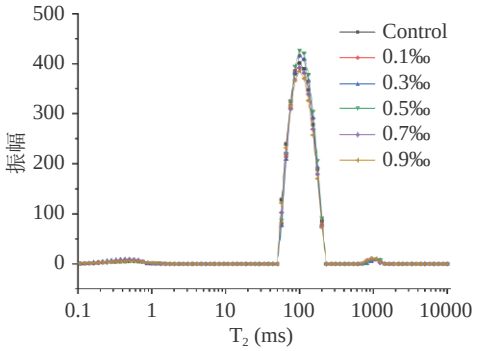


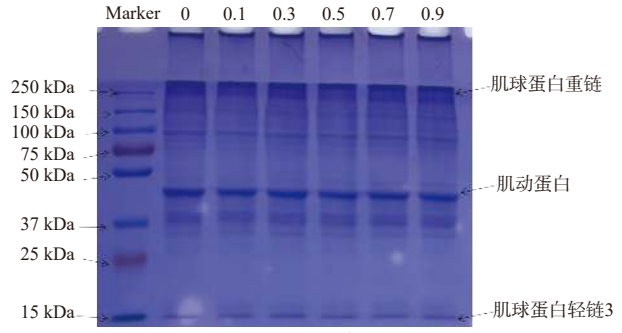
图 6　GOD 添加量对鱼糜凝胶 T_2 弛豫时间的影响
Fig.6　Effect of GOD addition on T_2 relaxation time of surimi gel

表 3　GOD 添加量对鱼糜凝胶水分子 T_2 弛豫峰面积比例的影响
Table 3　Effect of GOD addition on the T_2 peak area fraction of water in surimi gel

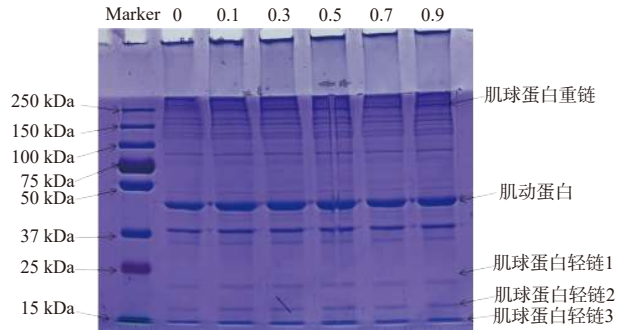
GOD添加量(‰)	峰面积比例(%)		
	T_{21}	T_{22}	T_{23}
0	2.29±0.24^{a}	96.76±0.18^{bc}	0.93±0.12^{abc}
0.1	2.24±0.29^{a}	96.91±0.43^{abc}	0.85±0.14^{bc}
0.3	2.04±0.21^{ab}	97.23±0.22^{ab}	0.73±0.12^{c}
0.5	1.50±0.21^{b}	97.45±0.22^{a}	1.06±0.04^{ab}
0.7	2.25±0.26^{a}	96.66±0.17^{bc}	1.03±0.08^{ab}
0.9	2.34±0.24^{a}	96.50±0.24^{c}	1.16±0.10^{a}

2.8　GOD 添加量对鱼糜蛋白交联的影响

不同 GOD 添加量的鱼糜凝胶蛋白电泳结果如图 7 所示。从图 7 非还原型（A）图谱可以看出，随着 GOD 添加量的增加，肌球蛋白重链条带逐渐加深，并且在分离胶顶端有聚合物的出现，表明 GOD 处理样品会诱导鱼糜蛋白氧化导致蛋白质交联和聚集，形成更多的二硫键，从而提高鱼糜凝胶的凝胶特性，而肌动蛋白以及肌球蛋白轻链条带没有明显变化。从图 7（B）可以看出，添加 β-巯基乙醇后，肌球蛋白重链上方区域的条带变浅，在浓缩胶和分离胶顶端仍有少部分聚集体的存在，这说明 GOD 诱导蛋白氧化形成凝胶的主要方式是二硫键，其他共价键也有一定的影响，这与 LI 等[33] 的结果类似。添加 GOD 诱导鱼糜蛋白氧化，会促进分子间二硫键和非二硫键相互交联，这种分子间作用力对蛋白质聚集和凝胶化起着重要作用[34]。



(A) -β-巯基乙醇



(B) +β-巯基乙醇

图 7　不同 GOD 添加量下鱼糜凝胶的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.7　SDS-PAGE patterns of surimi gel formed by different GOD addition

3　结论

在鲢鱼糜中添加 0.1‰~0.5‰的 GOD 所制备出的鱼糜凝胶比传统鱼糜凝胶具有更好的凝胶强度、白度和持水性，同时也会提高鱼糜凝胶中不易流动水的含量，降低自由水的含量。通过观察鱼糜凝胶微观结构发现，此时形成的鱼糜凝胶网络结构更加致密，孔隙当量直径更小。SDS-PAGE 图谱结果显示，随着 GOD 添加量的增加，肌球蛋白重链条带变强，这表明添加 GOD 可以促进蛋白质交联，形成更加稳定的网络结构。综合来看，在鲢鱼糜中添加 0.5‰的 GOD 可明显改善鲢鱼糜凝胶的凝胶特性，这为 GOD 在淡水鱼鱼糜中的应用提供理论依据。

参考文献

[1] 励建荣, 余永名, 仪淑敏, 等. 鱼糜制品热凝胶形成机理研究进展[J]. 食品工业科技, 2015, 36(23): 380−385. [LI J R, YU Y M, YI S M, et al. Research progress on gel properties of surimi products[J]. Food Industry Science and Technology, 2015, 36(23): 380−385.]

[2] 薛茜, 王芳, 张龙涛. 水产制品凝胶的研究进展[J]. 食品工业, 2020, 41(2): 253−257. [XUE Q, WANG F, ZHANG L T. Research progress of aquatic product gels[J]. Food Industry, 2020, 41(2): 253−257.]

[3] 叶月华, 钱敏, 刘晓艳, 等. 不同外源物质对淡水鱼鱼糜热诱导凝胶特性增效作用的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(12): 285−293. [YE Y H, QIAN M, LIU X Y, et al. The enhancement of different exogenous substances on thermal-induced gel properties of fresh water fish surimi[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(12): 285−293.]

[4] 米红波, 李政翰, 李岩, 等. 外源添加物在鱼糜制品中的应用研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(15): 349−355. [MI H B, LI Z H, LI Y, et al. Research progress of the application of exogenous additives in surimi products[J]. Food Industry Science and Technology, 2019, 40(15): 349−355.]

[5] AN Y Q, XIONG S B, LIU R, et al. The effect of cross-linking degrees on physicochemical properties of surimi gel as affected by MTGase[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2021.

[6] 苏瑞华, 焦熙栋, 范大明, 等. 脂肪酶对革胡子鲶鱼糜凝胶品质的影响[J]. 食品工业科技, 2019, 40(15): 170−177. [SU R H, JIAO X D, FAN D M, et al. Effect of lipase on the gel properties of surimi from catfish[J]. Food Industry Science and Technology, 2019, 40(15): 170−177.]

[7] 方海砚, 苑歆, 刘友明, 等. 羟自由基氧化对鲢鱼肌原纤维蛋白结构的影响[J]. 食品工业科技, 2020, 41(4): 6−12. [FANG H Y, YUAN X, LIU Y M, et al. Effect of hydroxyl radical oxidation on the structure of silver carp myofibrillar protein[J]. Food Industry Science and Technology, 2020, 41(4): 6−12.]

[8] WANG X, XIONG Y L, SATO H, et al. Controlled cross-linking with glucose oxidase for the enhancement of gelling potential of pork myofibrillar protein[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(50): 9523−9531.

[9] OMURA F, TAKAHASHI K, OKAZAKI E, et al. A novel and simple non-thermal procedure for preparing low-pH-induced surimi gel from Alaska pollock (*Theragra chalcogramma*) using glucose oxidase[J]. Food Chemistry, 2020, 321: 126722.

[10] WANF L, FAN D M, FU L L, et al. Protein structural development of threadfin bream (*Nemipterus* spp.) surimi gels induced by glucose oxidase[J]. Food Science and Technology International, 2018, 24(7): 598−606.

[11] 方海砚, 苑歆, 刘友明, 等. 羟自由基氧化对鲢鱼糜凝胶品质的影响[J]. 华中农业大学学报, 2019, 38(6): 9−17. [FANG H Y, YUAN X, LIU Y M, et al. Effect of hydroxyl radical oxidation on gel properties of surimi from silver carp[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2019, 38(6): 9−17.]

[12] XUE S W, YANG H J, YU X B, et al. Applications of high pressure to pre-rigor rabbit muscles affect the water characteristics of myosin gels[J]. Food Chemistry, 2018, 240: 59−66.

[13] PARK J W. Surimi and Surimi Seafood[M]. USA: CRC Press, 2013.

[14] 关宏, 丁玉琴, 尤娟, 等. pH 值对添加 L-精氨酸的草鱼糜凝胶特性的影响[J]. 华中农业大学学报, 2018, 37(5): 110−116. [GUAN H, DING Y Q, YOU J, et al. Effect of pH on gel properties of grass carp surimi added with L-arginine[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2018, 37(5): 110−116.]

[15] 乔翠平, 仪淑敏, 余永名, 等. 漂洗过程中锌离子对鲢鱼鱼糜凝胶特性的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(19): 12−17. [QIAO C P, YI S M, YU Y M, et al. Effect of zinc ions in rinsing solution on gel properties of silver carp surimi[J]. Food Science, 2017, 38(19): 12−17.]

[16] DÀVILA E, PARÉS D. Structure of heat-induced plasma protein gels studied by fractal and lacunarity analysis[J]. Food Hydrocolloids, 2007, 21(2): 147−153.

［17］ 朱玉安, 刘友明, 张秋亮, 等. 加热方式对鱼糜凝胶特性的影响[J]. 食品科学, 2011, 32(23): 107−110. ［ZHU Y A, LIU Y M, ZHANG Q L, et al. Effect of heating methods on gel properties of silver carp fish surimi[J]. Food Science, 2011, 32(23): 107−110.］
［18］ 倪静安. 分形理论及其在食品科学领域中的应用[J]. 无锡轻工大学学报, 2004(2): 104−110. ［NI J A. Fractal theory and it's application to food science[J]. Journal of Wuxi University of Light Industry, 2004(2): 104−110.］
［19］ 鲍佳彤, 宁云霞, 杨淇越, 等. 不同淀粉种类对未漂洗草胡子鲶鱼鱼糜凝胶特性的影响[J]. 肉类研究, 2020, 34(4): 27−33. ［BAO J T, NING Y X, YANG Q Y, et al. Effects of different starch types on gel properties of unrinsed *Clarias gariepinus* surimi[J]. Meat Science, 2020, 34(4): 27−33.］
［20］ 李睿智, 王嵬, 仪淑敏, 等. 白鲢鱼鱼糜凝胶过程中水分及凝胶特性的变化[J]. 现代食品科技, 2016, 32(5): 91−97,198. ［LI R Z, WANG W, YI S M, et al. Changes in water and gel properties of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) surimi during gelation process[J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(5): 91−97,198.］
［21］ 张一鸣, 李思仪, 沈晓溪, 等. 加热方式对混合鱼糜凝胶特性的影响[J]. 食品工业科技, 2021, 42(19): 64−69. ［ZHANG Y M, LI S Y, SHEN X X, et al. Effect of heating method on the characteristics of mixed chyme gel[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(19): 64−69.］
［22］ 米红波, 王聪, 苏情, 等. 变性淀粉对白鲢鱼鱼糜凝胶特性和蛋白构象的影响[J]. 中国食品学报, 2021, 21(1): 72−80. ［MI H B, WANG C, SU Q, et al. Effect of modified starch on gel properties and protein conformation of surimi from silver carp[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(1): 72−80.］
［23］ BUAMARD N, BENJAKUL S. Improvement of gel properties of sardine (*Sardinella albella*) surimi using coconut husk extracts[J]. Food Hydrocolloids, 2015, 51: 146−155.
［24］ YIN T, PARK J W. Effects of nano-scaled fish bone on the gelation properties of Alaska pollock surimi[J]. Food Chemistry, 2014, 150(2): 463−468.
［25］ 赵冰, 张顺亮, 李素, 等. 脂肪氧化对肌原纤维蛋白氧化及其结构和功能性质的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(5): 40−46. ［ZHAO B, ZHANG S L, LI S, et al. Effect of lipid oxidation on myofibrillar protein oxidation, structure and functional characteristics[J]. Food Science, 2018, 39(5): 40−46.］
［26］ 付璐璐, 黄建联, 赵建新, 等. 葡萄糖氧化酶对金线鱼鱼糜凝胶特性的影响[J]. 中国食品学报, 2016, 16(8): 59−64. ［FU L L, HUANG J L, ZHANG J X, et al. The effect of glucose oxidase on gel characteristic of the threadfin bream surimi[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2016, 16(8): 59−64.］
［27］ BAJOVIC B, BOLUMAR T, HEINZ V. Quality considerations with high pressure processing of fresh and value added meat products[J]. Meat Science, 2012, 92(3): 280−289.
［28］ LIU R, ZHAO S M, LIU Y M, et al. Effect of pH on the gel properties and secondary structure of fish myosin[J]. Food Chemistry, 2010, 121(1): 196−202.
［29］ XIONG Y L, BLANCHARD S P, OOIZUMI T, et al. Hydroxyl radical and ferryl-generating systems promote gel network formation of myofibrillar protein[J]. Journal of Food Science, 2010, 75(2): C215−C221.
［30］ JIANG W, HE Y, XIONG S B, et al. Effect of mild ozone oxidation on structural changes of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) myosin[J]. Food and Bioprocess Technology, 2017, 10(2): 1−9.
［31］ 李学鹏, 刘慈坤, 周明言, 等. 羟自由基氧化对草鱼肌原纤维蛋白结构和凝胶性质的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(21): 30−37. ［LI X P, LIU C K, ZHOU M Y, et al. Effect of hydroxyl radical oxidation on structural and gel properties of myofibrillar protein from grass carp[J]. Food Science, 2017, 38(21): 30−37.］
［32］ CHANARAT S, BENJAKUL S. Impact of microbial transglutaminase on gelling properties of Indian mackerel fish protein isolates[J]. Food Chemistry, 2013, 136(2): 929−937.
［33］ LI C, XIONG Y L. Disruption of secondary structure by oxidative stress alters the cross-linking pattern of myosin by microbial transglutaminase[J]. Meat Science, 2015, 108: 97−105.
［34］ CAO Y, XIONG Y L. Chlorogenic acid-mediated gel formation of oxidatively stressed myofibrillar protein[J]. Food Chemistry, 2015, 180: 235−243.

盛金凤, 陈坤, 王雪峰, 等. 不同干燥方式桑叶粉物理特性、氨基酸及挥发性成分分析 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 108−118. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080343
SHENG Jinfeng, CHEN Kun, WANG Xuefeng, et al. Analysis of Physical Properties, Amino Acids and Volatile Aroma Components of Mulberry Leaf Powder by Different Drying Methods[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 108−118. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080343

·研究与探讨·

不同干燥方式桑叶粉物理特性、氨基酸及挥发性成分分析

盛金凤[1,2], 陈　坤[3,+], 王雪峰[1], 叶冬青[1], 零东宁[1], 雷雅雯[1], 何雪梅[1,2,*], 孙　健[1,2,*]
（1.广西农业科学院农产品加工研究所, 广西南宁 530007;
2.广西果蔬贮藏与加工新技术重点实验室, 广西南宁 530007;
3.广西农业科学院玉米研究所, 广西南宁 530007）

摘　要: 对比分析热泵干燥、微波干燥、真空冷冻干燥三种干燥方式对桑叶粉色泽、粉体特性、氨基酸组分及挥发性成分的影响；结果表明真空冷冻干燥 L^*、b^*最大，a^*最小；微波干燥润湿性、持水力和持油力最差，溶解性和堆积密度最强；真空冷冻干燥桑叶粉润湿性、吸湿性、持水力和持油力最强，堆积密度最小；微波干燥桑叶粉总氨基酸、必需氨基酸以及必需氨基酸占比均最高，分别为 11.68 mg/g、3.40 mg/g、29.11%。不同干燥方式的桑叶粉鲜味氨基酸占比和含量差距较大，微波干燥桑叶粉甜味氨基酸、芳香族氨基酸和苦味氨基酸含量与相对含量都高于热泵干燥和真空冷冻干燥组；微波干燥和真空冷冻干燥桑叶粉挥发性成分相似，含量高的主要是醇类、醛类。综合可知真空冷冻干燥的桑叶粉具有较好的物理特性和香气，而微波干燥比较适宜桑叶粉产业化加工。

关键词: 桑叶粉, 干燥方式, 物理特性, 氨基酸, 挥发性成分
中图分类号: TS255.1　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0108−11
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080343
本文网刊:

Analysis of Physical Properties, Amino Acids and Volatile Aroma Components of Mulberry Leaf Powder by Different Drying Methods

SHENG Jinfeng[1,2], CHEN Kun[3,+], WANG Xuefeng[1], YE Dongqing[1], LING Dongning[1], LEI Yawen[1], HE Xuemei[1,2,*], SUN Jian[1,2,*]
（1.Agro-Food Science and Technology Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China;
2.Guangxi Key Laboratory of Fruits and Vegetables Storage-processing Technology, Nanning 530007, China;
3.Maize Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China）

Abstract: The effects of heat pump drying, microwave drying and vacuum freeze drying on the color, powder properties, amino acid components and volatile components in mulberry leaf powder were compared and analyzed. The results showed that L^* and b^*were the highest, while a^* was the lowest of mulberry leaf powder dried by vacuum freeze drying. Wettability, water holding capacity and oil holding capacity of mulberry leaf powder dried by microwave drying were the worst, while solubility and bulk density were the strongest. Meanwhile wettability, hygroscopicity, water holding capacity and oil holding capacity of mulberry leaf powder dried by vacuum freeze drying were the highest , and the lowest bulk density. The

收稿日期: 2021−08−30　　+并列第一作者
基金项目: “八桂学者”工程专项经费（[2016]21）; 广西科技基地和人才专项（桂科 AD19110141）; 广西农业科学院稳定资助科研团队项目（桂农科 2021YT113）; “科技先锋队‘强农富民’‘六个一’专项行动”项目（桂农科盟 202115）。
作者简介: 盛金凤（1987−）, 女, 硕士, 高级工程师, 研究方向: 农产品保鲜与加工, E-mail: shengjinfeng@gxaas.net。
陈坤（1984−）, 男, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 风味化学, E-mail: 41549290@qq.com。
*** 通信作者:** 何雪梅（1981−）, 女, 硕士, 副研究员, 研究方向: 天然产物化学, E-mail: xuemeihe1981@126.com。
孙健（1978−）, 男, 博士, 研究员, 研究方向: 农产品保鲜与加工, E-mail: jiansun@gxaas.net。

content of total amino acids, essential amino acids and proportions of essential amino acids in microwave dried mulberry leaf powder were 11.68 mg/g, 3.40 mg/g and 29.11%. The contents and relative contents of sweet amino acids, aromatic amino acids and bitter amino acids in microwave drying were higher than others. Microwave drying and vacuum freeze drying were similar in the volatile components of mulberry leaf powder, with high content of alcohols and aldehydes. In conclusion, vacuum freeze dried mulberry leaf powder had better physical characteristics and volatile aroma components, while microwave drying was more suitable for industrial processing of mulberry leaf powder.

Key words: mulberry leaf powder; drying methods; physical properties; amino acids; volatile aroma components

桑叶是桑属植物桑(*Morus alba* L.)的叶子，在我国种植栽培历史超过 4000 年[1]，桑叶营养丰富，富含氨基酸、蛋白质、维生素和微量元素等营养成分，同时还含有黄酮、多糖、多酚等，如芸香苷、槲皮素、*β*-谷甾醇及 1-脱氧野尻霉素[2−4]；具有降血压、降血脂、降血糖[5−7]、抗动脉粥样硬化[8]、抗惊厥[9] 和血管扩张[10] 等的作用，被国家卫生健康委员会列为“药食同源”的植物资源。近年来，桑叶生物活性成分在食品和制药行业得到了越来越多关注，桑叶原料的需求大幅增加[11]。桑叶含水量高不耐储藏，因此将新鲜桑叶干燥制备成桑叶粉是桑叶加工的重要环节，既可以作为提取活性成分的原料，同时加工的桑叶粉可以作为辅料添加到其他食品中改善产品的营养、口感和质地等，如开发桑叶饼干、桑叶米乳饮料等[12−13]；因此，开展桑叶粉干燥技术的研究对桑叶资源的综合利用与开发具有重要意义。

国内外针对蔬菜等绿色植物叶子的干燥开展了多方面的研究。郭刚军等[14] 对比分析了阴干、晒干、热风干燥、微波干燥与远红外干燥 6 种干燥方式对辣木叶的影响，得出辣木叶蛋白质、多酚、*β*-胡萝卜素、维生素含量在不同干燥方式样品间存在显著性差异，最后得出 60 ℃ 热风干燥方式较适合于辣木鲜叶的干燥。而冷冻干燥能较好地保持辣木叶中的维生素 C、叶绿素，真空微波干燥能较好地减少酚类物质、多糖类物质等活性成分和抗氧化活性的损失[15]。微波干燥野生荠菜导致荠菜鲜样中的特征醇类化合物含量大大降低，醛类化合物种类和含量总体略有下降，但异戊醛等含量增加；480 W 干燥条件下荠菜挥发性物质保留率高达 93.68%[16]。司金金等[17] 分析了热风干燥、微波干燥、真空冷冻干燥、喷雾干燥等 4 种方式对红薯叶粉物理特性、微观结构和成分含量的影响，得出喷雾干燥的红薯叶粉品质最好，其次为真空冷冻干燥的红薯叶粉。

前人对桑叶的研究主要集中在桑叶功能活性的提取分离及功效评价方面，对桑叶干燥后开发的食用桑叶粉物理特性、氨基酸组分及挥发性成分的研究较少[18]，本课题对比分析了热泵干燥、微波干燥、真空冷冻干燥三种方式对桑叶粉的物理特性及氨基酸组分的影响，并采用 HS-SPME-GC-MS(headspace solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry)分析桑叶粉挥发性成分的差异，为食用桑叶粉加工及下游产品的开发提供理论参考和实践依据。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

桑叶桂桑优 12 号　采自广西壮族自治区蚕业科学研究院资源圃，2020 年 8 月上旬采收，所选桑叶颜色鲜绿，无损伤，无病虫害；玉米胚芽油　中粮集团有限公司；氯化钠、无水乙醇、碳酸钠、茚三酮、丙酮、三氯乙酸、乙酸钠、三乙胺、乙酸、没食子酸　均为分析纯，成都市科隆化学品有限公司；磷酸氢二钠、磷酸二氢钾　分析纯，成都金山化学试剂有限公司；乙腈、甲醇　色谱纯，赛默飞世尔科技(中国)有限公司；Folin-酚　上海源叶生物科技有限公司。

热泵干燥烘房　自制；LGJ-18 冷冻干燥机　北京松源华兴科技发展有限公司；DF-20 中药粉碎机粉碎机　温岭市林大机械有限公司；HSX-150 智能恒温恒温箱　上海南荣实验室有限公司；UV-6100 紫外可见分光度计　上海元析仪器有限公司；SHZ-D3 循环水真空泵　巩义市予华仪器有限公司；WGLL-230BE 电热鼓风干燥机　天津市泰斯特仪器有限公司；G80F20CSL-B8 微波炉　广东格兰仕微波生活电器有限公司；CS-10 精密色差仪　杭州彩谱科技有限公司；HH-2 数显恒温水浴锅　常州普天仪器制造有限公司；3-18KS 高速冷冻离心机　SIGMA；ATX124 精密电子天平　SHIMADZU；Pegasus HRT 4D Plus 全二维气相-高通量高分辨质谱联用仪　美国力可公司；Agilent 1100 高效液相色谱仪　美国安捷伦公司。

1.2　实验方法

1.2.1　干燥方法

1.2.1.1　原料制备　新鲜桑叶清洗后去除叶柄，切成宽度 2~4 cm 的条，经过不同方式干燥后，用高速粉粹机粉碎制粉，过 100 目筛，−20 ℃ 保藏待用。

1.2.1.2　热泵干燥　在前期实验优化的基础上，选择将桑叶平铺在干燥托盘上，厚度控制在 1.0 cm 左右，温度 60 ℃，风速 0.8~1.0 m/s，湿度 50%~60%，干燥至桑叶湿基含水量 5% 时停止干燥，桑叶粉湿基含水量的测定采用 GB 5009.3-2016《食品安全国家标准 食品中水分的测定》中的 105 ℃ 干燥法进行测定。

1.2.1.3　微波干燥　在前期实验优化的基础上，选择将微波设备设置 560 W 的功率，桑叶均匀置于微波盘中，控制桑叶干燥初期微波功率 5.5 W/g，干燥至

桑叶湿基含水量 5% 时停止干燥。

1.2.1.4 真空冷冻干燥 在前期实验优化的基础上，选择将桑叶均匀平铺于不锈钢托盘中，放入−20 ℃冰箱中预冻 4 h，后采用真空冷冻干燥设备干燥；干燥参数为−70 ℃ 干燥 200 min，−40 ℃ 干燥 200 min，−20 ℃ 干燥 200 min，后升温到 40 ℃，干燥至桑叶湿基含水量 5% 时停止干燥。

1.2.2 物理特性分析

1.2.2.1 色泽测定 使用分光测色计进行样品 L^*、a^*、b^*值测量，亮度 L^*、红绿 a^*、黄蓝 b^*，L^*、a^*、b^*值为正数即分别表示色泽偏白、红、黄，反之偏暗、绿、蓝，每组样品平行测量 6 次。

1.2.2.2 叶绿素含量测定 参考 NY/T 3082-2017《水果、蔬菜及其制品中叶绿素含量的测定分光光度法》标准测定[19]。

1.2.2.3 润湿性 参考李明娟等[20] 的方法，在 250 mL 烧杯中加入 100 mL 蒸馏水，称取 0.5 g 桑叶粉样品均匀平铺在水面上，测定粉末全部被水润湿所需的时间(s)，重复测定 3 次。以此来表征润湿性。

1.2.2.4 吸湿性 桑叶粉吸湿性参考 ZHAO 等[21] 的方法并略做改动，将 3 g 桑叶粉均匀平铺于干净的玻璃皿中，然后将玻璃皿置入盛有饱和氯化钠溶液的密闭干燥器中，放置 7 d 后精确称取玻璃皿与样品的质量。

$$吸湿性(\%)=\frac{m_0/(M+m_1)}{1+m_0/M}\times 100 \qquad 式（1）$$

式中：m_0 为桑叶粉吸湿前后质量的改变量(g)，M 为桑叶粉的初始质量(g)，m_1 为干燥后桑叶粉的水分含量(g)。

1.2.2.5 持水力 参考郑慧等[22] 的方法并略做修改，准确称取 1.0 g 桑叶粉于 50 mL 离心管中，加入 25 mL 纯净水，室温条件磁力搅拌 30 min，3000 r/min 离心 20 min，弃去上清液并用滤纸吸干离心管壁残留水分，称质量。平行测定 3 次，取平均值与标准偏差制图。公式如下：

$$持水力(g/g)=\frac{M_1-M_0}{M_0} \qquad 式（2）$$

式中：M_1 为桑叶粉离心后的质量(g)；M_0 为桑叶粉初始质量(g)。

1.2.2.6 持油力 桑叶粉的持油性参照 CAPREZ 等[23] 的方法，称取 0.5 g(精确至 0.001 g)桑叶粉置于 50 mL 离心管中，加入 10 mL 玉米胚芽油，漩涡振荡器震荡充分混合均匀后静置 18 h，2000 r/min 离心 30 min，弃去上清液并用滤纸吸干离心管壁残留油脂后称重。

$$持油力(g/g)=\frac{M_1-M_0}{M_0} \qquad 式（3）$$

式中：M_1 为桑叶粉被油饱和后的质量(g)，M_0 为桑叶粉的初始质量(g)。

1.2.2.7 溶解性 参考 GONG 等[24] 的方法稍作修改，称取 0.5 g 桑叶粉置入离心管中，量取 25 mL 蒸馏水用混匀器与桑叶粉充分振荡 5 min，10000 r/min 离心 10 min，上清液定容至 50 mL。取 10 mL 上清液移到预先称重的铝盒中，105 ℃ 干燥 5 h。继续干燥 2 h 并每小时称重 1 次。

$$溶解度(\%)=\frac{m\times 5\times 100}{M_0} \qquad 式（4）$$

式中：m 为上清液中固形物含量(g)，M_0 为桑叶粉初始质量(g)。

1.2.2.8 堆积密度 参照 SOWBHAGYA 等[25] 的方法，将一定量的桑叶粉装入 10 mL 容量瓶中，振实，直至桑叶粉填充至容量瓶刻度。粉体的堆积密度(do)计算公式如下：

$$do(g/mL)=\frac{M_2-M_1}{10} \qquad 式（5）$$

式中：M_1 为容量瓶质量(g)，M_2 为粉体和容量瓶的总质量(g)。

1.2.3 氨基酸组分分析 参照文献方法[26]。样品前处理方法：精确称取桑叶粉 1.0 g(精确至 0.0001)加入 10 mL 5%(v/v)的三氯乙酸沉淀 2 h。吸取一定的量于 10000 r/min离心 15 min。取一定体积的上清液调 pH 至 2.0 左右定容，用 0.45 μm 微膜过滤至样品杯中上机测定。

高效液相色谱仪：四元泵，自动进样器进样 1 μL，荧光检测器，hypersil ODS C_{18} 4.6×250 mm 柱 OPA 自动衍生，安捷伦色谱工作站。柱温 40 ℃；流速 1.0 mL/min；紫外检测器：0~22.5 min 波长 338 nm，22.5 min 后波长 262 nm；荧光检测器：激发波长 340 nm，发射波长 450 nm；22.5 min 时激发波长 266 nm，发射波长 305 nm。

流动相：A 相：称取 2.0 g 乙酸钠(三个结晶水)倒入 800 mL 毫升烧杯中；加入 500 mL 水搅拌至乙酸钠充分溶解；加入 90 μL 三乙胺并混合；滴加 1%~2% 的醋酸，将 pH 调到 7.20；加入 2.5 mL 四氢呋喃，并混合均匀。

流动相：B 相：称取 2.00 g 乙酸钠(三个结晶水)倒入 200 mL 烧杯中；加入 100 mL 水搅拌至乙酸钠充分溶解；滴加 1%~2% 醋酸将 pH 调到 7.20；后继续加入 200 mL 乙腈和 200 mL 甲醇并摇匀混合。

1.2.4 挥发性成分分析 取 2 g 样品置于 20 mL 顶空瓶中，将老化后的 50/30 μm CAR/PDMS/DVB 萃取头插入样品瓶顶空部分，60 ℃ 恒温吸附 30 min，吸附后的萃取头取出后立即插入气相色谱进样口，250 ℃ 解吸 3 min，并启动仪器采集数据。

色谱柱：DB-Wax(30 m×0.25 mm，0.25 μm)；柱温：初始温度 40 ℃，初始时间 3 min，速率 10 deg/min；最终温度 230 ℃，保持时间 6 min；载气：He；柱流量 1.00 mL/min，进样口温度 250 min，不分流进样。质

谱条件：电子电离（electron ionization，EI）离子源，发射电流 1 mA，电子能 70 eV，界面温度 250 ℃，源温度 200 ℃，检测电压 2000 V。

1.3　数据处理

理化和粉体特性指标进行三次平行测定，运用 Excel 2007 软件进行数据处理，采用 SPSS 22 软件的 Duncan 检验分析进行方差分析，P<0.05 表示差异显著；使用 Origin 9.1 作图。

2　结果与分析

2.1　不同干燥方式对桑叶粉色泽的影响

桑叶在生长过程中颜色随着生长期的延长逐渐呈现出黄绿-青绿-深绿的变化。加工后产品的颜色与消费者的购买欲密切相关，果蔬粉色泽以接近新鲜果蔬本身颜色较为理想[27]。L^*值是指测量样品的亮度，L^*值越高表示样品亮度越高、反之越暗；a^*值代表红绿值，正值偏红，负值偏绿；b^*值表示黄蓝值，正值偏黄，负值偏蓝。由表 1 不同干燥方式的桑叶粉色泽结果可知真空冷冻干燥的桑叶粉 L^*最高为 62.05，其次为热泵干燥组（59.66），微波干燥的桑叶粉 L^*最低，三组桑叶粉 L^*均存在显著性差异（P<0.05）；真空冷冻干燥的桑叶粉 a^*最小为−20.28，而热泵干燥和微波干燥桑叶粉 a^*分别为−16.15 和−16.38；真空冷冻干燥的桑叶粉 b^*最大为 31.55，热泵干燥与微波干燥的桑叶粉 b^*分别为 28.76、27.74；三组桑叶粉 a^*、b^*同样也存在显著性差异（P<0.05）。由以上结果可知，真空冷冻干燥桑叶粉色泽保持最好，这与林羡等[15]研究报道的不同方式干燥辣木叶的色泽结果相似。

表 1　不同干燥方式对桑叶粉色泽的影响
Table 1　Color of mulberry leaf powder by different drying methods

干燥方式	L^*	a^*	b^*
热泵干燥	59.66±0.33^b	−16.15±0.06^c	28.76±0.65^b
微波干燥	57.37±0.22^a	−16.38±0.06^b	27.74±0.44^a
真空冷冻干燥	62.05±0.42^c	−20.28±0.18^a	31.55±0.38^c

注：同列不同字母表示差异显著，P<0.05；表2同。

2.2　不同干燥方式对桑叶粉叶绿素含量的影响

农产品在干制过程中色泽变化的影响因素较多，干燥过程中的酶促和非酶促反应程度不同、叶绿素的降解、维生素 C 的氧化、美拉德反应均会影响产品的色泽[15]。从图 1 可知，不同干燥方式叶绿素 a 含量间存在显著性差异（P<0.05），微波干燥含量最高为 6.06 mg/g，其次为真空冷冻干燥桑叶粉，热泵干燥的桑叶粉叶绿素 a 仅为 4.74 mg/g；叶绿素 b 含量在 1.84~2.05 mg/g 之间，三种干燥方式的桑叶粉叶绿素 b 含量无显著性差异（P>0.05）；三种干燥方式的桑叶粉叶绿素总含量的趋势性与叶绿素 a 整体一致，微波干燥的桑叶粉叶绿素总含量 8.11 mg/g，热泵干燥的桑叶粉叶绿素总含量为 6.58 mg/g，是微波干燥桑叶粉叶绿素总量的 81.13%，由此可知，微波干燥由于干燥时间短，更好地保留了桑叶中叶绿素的含量；真空冷冻干燥避免了高温和与氧气的接触，叶绿素总含量也高于热泵干燥组；热泵干燥过程中长时间的高温导致了叶绿素降解较多从而导致叶绿素含量最低。

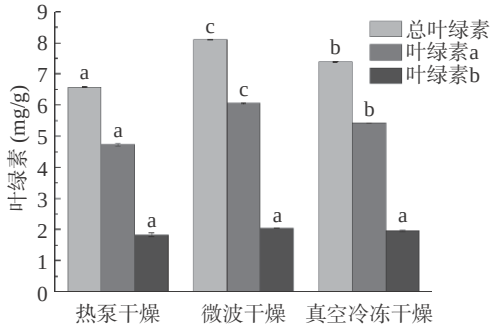


图 1　不同干燥方式对桑叶粉叶绿素含量的影响
Fig.1　Chlorophyll content of mulberry leaf powder by different drying methods

注：不同小写字母表示不同干燥方式同一指标间含量差异显著，P<0.05。

2.3　不同干燥方式桑叶粉物理特性

润湿性即液体在固体表面铺开的能力。粉体在蒸馏水中润湿下沉时间越短，说明产品在水中可较快地扩散，具有良好的冲调溶解性[28]。三种干燥方法中，微波干燥桑叶粉润湿时间为 6.20 s，热泵干燥为 12.55 s，真空冷冻干燥为 12.85 s，后两者润湿性较为接近，而微波干燥桑叶粉的润湿时间仅为其它两种干燥方式的 1/2，这可能与桑叶粉的结构疏密有关，桑叶粉结构紧密，则表面张力小；结构疏松，则张力大。而表面张力越小，润湿性能越好。

吸湿性是评价粉体在贮藏和分销过程中粘结和结块可能性的重要指标[29]。吸湿性是指粉末在贮藏过程中吸收附近范围水分的能力，吸湿性的大小直接决定了该物质的存放期限。表 2 可知不同干燥方式对桑叶粉吸湿性影响不同，真空冷冻干燥桑叶粉吸湿性为 9.42%，其次为微波干燥 8.93%，热泵干燥的桑叶粉吸湿性为 7.89%，三者之间存在显著性差异（P<0.05）；结果与不同方式干燥的红薯叶吸湿性排序有差异[17]，说明不同的干燥方式对不同物料影响并不相同。桑叶粉吸湿性可能与粉体粒径相关，粉体粒径越小，比表面积越大，与周围环境接触的面积越大，吸湿性越好。

高膳食纤维食品一般都具有较高的持水、持油和溶胀的能力，从而起到减弱油腻，增加饱腹感等作用[30]。持水力是桑叶粉保持结构内部水分的关键指标，是指通过物理方式截留水分而阻止水渗出的能力；从结果可知热泵干燥桑叶粉持水力最强为 5.07 g/g，而微波干燥桑叶粉持水力最低为 2.79 g/g。这可能是因为微波干燥过程温度过高，破坏了桑叶粉的内部结构，导致较多膳食纤维长链结构断裂，从而减弱了对水的束缚力。不同干燥方式桑叶粉持油力也不相同。其中，真空冷冻干燥 1.65 g/g 持油力最强，与热

表 2 不同干燥方式桑叶粉粉体特性

Table 2 Powder characteristics of mulberry leaf powder by different drying methods

干燥方式	润湿性(s)	吸湿性(%)	持水力(g/g)	持油力(g/g)	溶解性(%)	堆积密度(g/mL)
热泵干燥	12.55±1.97^{b}	7.89±0.09^{a}	5.07±0.04^{c}	1.12±0.03^{a}	29.35±1.67^{a}	0.56±0.01^{b}
微波干燥	6.20±1.07^{a}	8.93±0.01^{b}	2.79±0.03^{a}	0.84±0.02^{a}	34.70±0.43^{ab}	0.60±0.01^{c}
真空冷冻干燥	12.85±1.55^{b}	9.42±0.08^{c}	4.61±0.07^{b}	1.65±0.28^{b}	32.07±0.62^{a}	0.46±0.01^{a}

泵干燥和微波干燥的桑叶粉持油力有显著性差异(P<0.05)。这应该与干燥温度有关,真空冷冻干燥是低温干燥,而微波干燥由于受热不均局部温度可达 100 ℃ 以上,温度过高使膳食纤维的持油力降低。

溶解性是粉末在水中经过下沉、分散、吸湿完成溶解过程后得到的[31]。不同干燥方式对桑叶粉溶解性有一定的差异,微波干燥桑叶粉溶解性为 34.70%,真空冷冻干燥桑叶粉溶解性为 32.07%,热泵干燥组的溶解性最低为 29.35%。堆积密度是表现桑叶粉内部结构特性的主要品质指标;堆积密度大可节约空间,堆积密度与粉体粒径和表面粗糙度有关相关;SYAMALADEVI 等[32] 研究认为粉末表面光滑和均匀,堆积密度较大,表面光滑均匀减小了分子间的间隙,同体积内分子间隙越小,质量越大,堆积密度越大。从不同干燥方式桑叶粉堆积密度结果看,微波干燥的堆积密度最大为 0.60 g/cm^3,真空冷冻干燥最小为 0.46 g/cm^3。这与司金金等[17] 采用微波干燥和真空冷冻干燥红薯叶粉的堆积密度结果类似。

2.4 不同干燥方式桑叶粉氨基酸组分

氨基酸是构成蛋白质的基本组成单位,也是人体必需的重要营养元素。不同干燥方式桑叶粉中各氨基酸的含量如表 3 所示,从结果可以看出,桑叶粉中含有天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、组氨酸、甘氨酸等 16 种氨基酸(色氨酸未检测),三种干燥方式的桑叶粉中均未检测出蛋氨酸;热泵干燥组桑叶粉氨基酸含量较高的为谷氨酸和天冬氨酸,含量分别为 3.87 和 1.57 mg/g;微波干燥桑叶粉氨基酸含量较高的为谷氨酸、丙氨酸和缬氨酸,含量分别为 3.58、2.46 和 1.34 mg/g;而真空冷冻干燥桑叶粉氨基酸含量较高的为谷氨酸和天冬氨酸,含量分别为 2.57 和 0.89 mg/g。微波干燥桑叶粉总氨基酸含量最高为 11.68 mg/g,其次为热泵干燥组,而真空冷冻干燥桑叶粉总氨基酸含量最低为 5.80 mg/g。干燥方式对不同的物料氨基酸含量的影响不尽相同,热风干燥杏鲍菇中游离氨基酸含量高于微波干燥和冷冻干燥处理的杏鲍菇[33];而真空冷冻干燥的枣花氨基酸则是热风干燥氨基酸含量的 2 倍[34]。桑叶在微波干燥过程中由于微波分子热运动,加速了桑叶中蛋白质的降解;真空冷冻干燥属于低温干燥,在一定程度上防止蛋白质降解产生游离氨基酸因而真空冷冻干燥的必需氨基酸含量最低。微波干燥的桑叶粉必需氨基酸含量和必需氨基酸占比也最高,分别为 3.40 mg/g、29.11%;其次为真空冷冻干燥组,必需氨基酸含量和必需氨基酸占比分别为 1.33 mg/g、22.93%;热泵干燥桑叶粉必需氨基酸含量以及占比都最低分别为 1.09 mg/g、13.90%。由此可知不同干燥方式对桑叶粉氨基酸含量及组成影响差异明显。

表 3 不同干燥方式桑叶粉氨基酸组分

Table 3 Amino acids of mulberry leaf powder by different drying methods

氨基酸组分	含量(mg/g)		
	热泵干燥	微波干燥	真空冷冻干燥
天冬氨酸(Asp)	1.57	0.36	0.89
谷氨酸(Gul)	3.87	3.58	2.57
丝氨酸(Ser)	0.06	0.04	0.04
组氨酸(His)	0.06	0.11	0.00
甘氨酸(Gly)	0.00	0.12	0.04
苏氨酸(Thr)*	0.24	0.43	0.21
精氨酸(Arg)	0.10	0.30	0.10
丙氨酸(Ala)	0.37	2.46	0.5
酪氨酸(Tyr)	0.15	0.49	0.08
半胱氨酸(Cys)	0.18	0.00	0.10
缬氨酸(Val)*	0.39	1.34	0.70
蛋氨酸(Met)*	0.00	0.00	0.00
苯丙氨酸(Phe)*	0.01	0.28	0.15
异亮氨酸(Ile)*	0.17	0.53	0.12
亮氨酸(Leu)*	0.16	0.57	0.08
赖氨酸(Lys)*	0.12	0.25	0.07
脯氨酸(Pro)	0.33	0.82	0.15
EAA总量	1.09	3.40	1.33
AA总量	7.78	11.68	5.80
EAA/AA(%)	13.90	29.11	22.93

注:*为人体必需氨基酸。

2.5 不同干燥方式桑叶粉呈味氨基酸组成

氨基酸不仅具有各种生理功能,也是食物重要的呈味物质来源,其呈现出的鲜、甜、酸、苦及涩等味感形成了食物丰富的味觉层次。鲜味氨基酸是指赖氨酸、谷氨酸、天冬氨酸,甜味氨基酸是指苏氨酸、丝氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、组氨酸,苦味氨基酸包括缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸、精氨酸,芳香族氨基酸包括苯基丙氨酸、酪氨酸、半胱氨酸[35]。谷氨酸是所有呈味氨基酸中鲜味最强的氨基酸,作为食品调味行业中一种重要的鲜味剂,不仅具有较高的营养价值,同时具有预防治疗肝昏迷及保护肝脏的功能[36−37];甘氨酸、丙氨酸是主要的甜味氨基酸,甘氨酸有清香甜味,能有效降低苦味,去除食物中令人不快的口味[38]。由表 4 可知热泵干燥的桑叶粉鲜味氨基酸、甜味氨基酸、芳香族氨基酸、苦味氨

表 4　不同干燥方式桑叶粉呈味氨基酸组成

Table 4　Flavor amino acid composition of mulberry leaf powder dried by different methods

干燥方式	鲜味氨基酸		甜味氨基酸		芳香族氨基酸		苦味氨基酸	
	含量(mg/g)	相对含量(%)	含量(mg/g)	相对含量(%)	含量(mg/g)	相对含量(%)	含量(mg/g)	相对含量(%)
热泵干燥	5.56	71.47	1.06	13.62	0.34	4.37	0.82	10.54
微波干燥	4.19	35.87	3.98	34.08	0.77	6.59	2.46	21.06
真空冷冻干燥	3.53	60.86	0.94	16.21	0.33	5.69	0.95	16.38

基酸含量分别为 5.56、1.06、0.34、0.82 mg/g，相对含量分别为 71.47%、13.62%、4.37%、10.54%；微波干燥干燥的桑叶粉鲜味氨基酸、甜味氨基酸、芳香族氨基酸、苦味氨基酸含量分别为 4.19、3.98、0.77、2.46 mg/g，相对含量分别为 35.87%、34.08%、6.59%、21.06%；真空冷冻干燥的桑叶粉鲜味氨基酸、甜味氨基酸、芳香族氨基酸、苦味氨基酸含量分别为 3.53、0.94、0.33、0.95 mg/g，相对含量分别为 60.86%、16.21%、5.69%、16.38%。三种干燥方式的桑叶粉鲜味氨基酸含量在四种呈味氨基酸中含量均最高，但不同干燥方式的桑叶粉鲜味氨基酸占比和含量差距较大，热泵干燥桑叶粉鲜味氨基酸含量是是微波干燥组的 1.33 倍，但相对含量是微波干燥组的 1.99 倍。三种干燥方式中微波干燥桑叶粉甜味氨基酸、芳香族氨基酸和苦味氨基酸含量与相对含量都高于热泵干燥和真空冷冻干燥组，说明微波干燥过程中蛋白质降解成鲜味氨基酸的量较少。

2.6　不同干燥方式桑叶粉挥发性成分分析

采用 HS-SPME-GC-MS 对不同干燥方式的桑叶粉挥发性成分进行分析，离子流图见图 2~图 4，表 5 为桑叶粉挥发性成分相对含量大于 0.1% 的化合物。热泵干燥桑叶粉共鉴定出 115 种化学物，其中，含有 11 种酯类化学物（1.65%；相对含量，下同）、10 种醇类化学物（2.04%）、10 种醛类化学物（5.63%）、26 种酮类化学物（12.98%）、11 种烷烃类化学物（42.01%），9 种烯烃类化学物（2.04%）、4 种酸类化学物（3.84%）以及 34 种其他化学物（27.58%）。

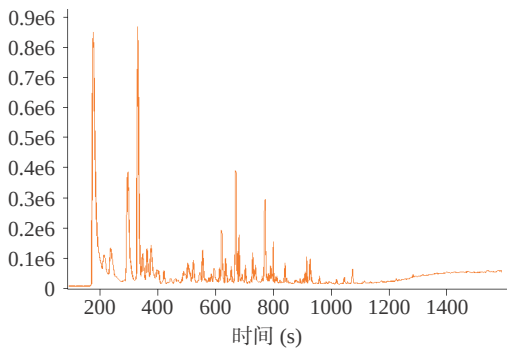


图 2　热泵干燥桑叶粉总离子色谱图

Fig.2　Total ion chromatograms of mulberry leaf powder by hot pump drying

微波干燥桑叶粉共鉴定出 109 种化学物，其中，含有 13 种酯类化学物（1.10%）、17 种醇类化学物（35.23%）、18 种醛类化学物（7.41%）、20 种酮类化学物（27.05%）、9 种烷烃类化学物（13.91%）、7 种烯烃类化学物（0.92%）、8 种酸类化学物（3.47%）、17 种其他化学物（9.37%）。真空冷冻干燥桑叶粉共鉴定出 98 种化学物，其中，9 种酯类化学物（0.82%）、16 种醇类化学物（37.28%）、18 种醛类化学物（23.59%）、13 种酮类化学物（10.94%）、9 种烷烃类化学物（20.63%）、5 种烯烃化学物（0.58%）、6 种酸类化学物（0.44%）、22 种其他化学物（3.73%）。热泵干燥桑叶粉烷烃类和其他化合物相对含量最高，微波干燥桑叶粉醇类、酮类含量较高，而真空冷冻干燥桑叶粉醇类、醛类含量较高，从含量较高的大类化合物结果可知，微波干燥和真空冷冻干燥的桑叶粉挥发性成分更为类似。热泵干燥、微波干燥和真空冷冻干燥桑叶粉鉴定出的化合物总峰面积分别为 7.42×10^7、8.73×10^7 和 1.44×10^8，说明真空冷冻干燥桑叶粉挥发性成分总含量最多，其次为微波干燥桑叶粉，而热泵干燥的桑叶粉挥发性成分含量最

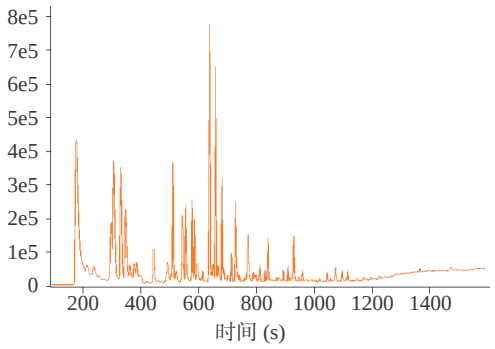


图 3　微波干燥桑叶粉总离子色谱图

Fig.3　Total ion chromatograms of mulberry leaf powder by microwave drying

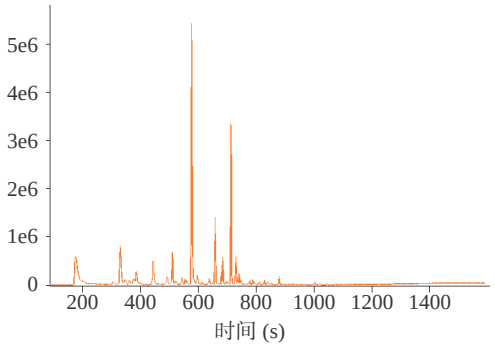


图 4　真空冷冻干燥桑叶粉总离子色谱图

Fig.4　Total ion chromatograms of mulberry leaf powder by vacuum freeze drying

表 5 不同干燥方式桑叶粉挥发性成分分析

Table 5 Volatile aroma components of mulberry leaf powder dried by different methods

分类及序号	出峰时间(s)	化合物名称	CAS	相对含量(%)		
				热泵干燥	微波干燥	真空冷冻干燥
酯类						
1	276.2	乙酸乙酯	141-78-6	−	0.25	−
2	276.5	乙酸戊酯	628-63-7	0.12	0.03	−
3	305.5	二乙基(4-((2E)-3, 7-二甲基-2, 6 -辛二烯基)-3, 5-二(甲氧基甲氧基)苄基)磷酸酯		0.80	−	−
4	592.3	丙酮酸甲酯	600-22-6	0.21	−	−
5	778.0	(Z)-丁酸-3-己烯酯	16491-36-4	−	−	0.44
6	921.8	4-羟基丁酸内酯	96-48-0	0.15	−	−
7	921.9	4-羟基丁酸乙酰酯	591-81-1	−	0.13	−
8	958.6	N-丁基-2-丁酸乙酯		−	0.16	−
9	1018.2	水杨酸甲酯	119-36-8	−	−	0.11
10	1473.3	邻苯二甲酸二丁酯	84-74-2	0.07	0.17	−
醇类						
1	305.5	乙醇	64-17-5	−	17.42	2.03
3	481.9	9 -羟基芳樟醇		0.19	−	0.13
5	510.3	1-戊烯-3-醇	616-25-1	−	8.60	9.13
6	594.4	1-戊醇	71-41-0	0.43	0.48	−
7	651.2	环戊醇	96-41-3	−	−	0.30
8	657.9	顺-2-戊烯醇	1576-95-0	−	6.15	7.89
9	684.2	正丁醇	71-36-3	−	0.32	−
10	684.2	正己醇	111-27-3	−	−	2.47
11	695.0	3-己烯-1-醇	544-12-7	−	−	12.00
12	712.9	叶醇	928-96-1	−	0.62	−
13	729.7	4-叔丁基-6-甲基-5-庚烯-3-醇		−	0.34	−
14	729.7	顺-2-己烯-1-醇	928-94-9	−	−	2.63
15	762.9	1-辛烯-3-醇	3391-86-4	−	0.17	−
16	794.0	2-乙基己醇	104-76-7	0.18	0.18	0.26
17	892.2	2,4-二甲基环己醇	69542-91-2	−	0.14	−
18	925.4	糠醇	98-00-0	0.11	−	−
19	1073.0	苄醇	100-51-6	0.36	0.33	0.08
20	1095.6	苯乙醇	60-12-8	−	0.33	0.08
醛类						
1	236.0	异丁醛	78-84-2	3.12	−	−
2	270.4	丁醛	123-72-8	−	−	0.25
3	285.6	丙二醛		0.22	−	−
4	443.6	己醛	66-25-1	0.21	0.93	2.82
5	491.7	反式-2-戊烯醛	1576-87-0	−	0.61	1.01
7	542.9	庚醛	111-71-7	0.13	1.05	0.48
8	560.1	2-己烯醛	505-57-7	−	−	0.25
9	576.6	反式-2-己烯醛	6728-26-3	−	1.10	14.40
10	596.5	顺式-4-庚烯醛	6728-31-0	−	−	0.627
11	638.1	正辛醛	124-13-0	0.07	0.51	0.13
12	727.1	壬醛	124-19-6	−	0.79	0.43
13	740.5	(E,E)-2,4-己二烯醛	142-83-6	−	0.14	1.36
14	747.2	4-乙基-2-己烯醛	71932-97-3	−	−	0.17
15	787.8	反式-2,4-庚二烯醛	4313-3-5	−	0.63	0.65
16	789.7	3-2-呋喃甲醛	498-60-2	0.67	−	−
17	839.5	苯甲醛	100-52-7	0.61	0.90	0.31
18	879.0	反-2-,顺-6-壬二烯醛	557-48-2	−	−	0.58
19	908.3	2,6,6-三甲基-1-环己烯-1-羧醛	432-25-7	0.11	0.12	0.03
20	925.5	苯乙醛	122-78-1	−	0.34	−
21	926.2	2,3-二氢-2,2,6-三甲基苯甲醛	116-26-7	0.48	−	−

续表 5

分类及序号	出峰时间(s)	化合物名称	CAS	相对含量(%)		
				热泵干燥	微波干燥	真空冷冻干燥
酮类						
1	238.0	丙酮	67-64-1	–	1.42	–
2	241.7	羟基丙酮	116-09-6	5.97	–	–
3	346.0	戊酮	96-22-0	–	–	1.58
4	346.2	2,3-丁二酮	431-03-8	–	8.37	–
5	385.3	1-戊烯-3-酮	1629-58-9	0.73	2.48	7.45
6	420.5	2,3-戊二酮	600-14-6	1.45	0.27	0.13
7	513.0	5-乙基-3, 5-二羟基-辛-7-烯-4-酮		0.17	–	–
9	586.8	1-十一烷基-3-酮	42832-47-3	0.15	–	–
10	619.6	2-甲基四氢呋喃-3-酮	3188-00-9	0.18	–	–
11	637.2	3-羟基-2-丁酮	513-86-0	0.33	10.94	0.86
12	649.3	1-辛烯-3-酮	4312-99-6	0.03	0.26	0.02
13	666.1	2,3-辛二酮	585-25-1	0.53	0.27	0.17
14	666.9	2,2,6-三甲基环己酮	2408-37-9	0.21	0.21	0.06
15	680.1	甲基庚烯酮	110-93-0	0.85	1.54	–
16	687.2	3-羟基-2-戊酮	3142-66-3	–	0.28	–
17	699.8	2-羟基-3-戊酮	5704-20-1	–	0.20	–
18	702.3	4-羟基-4-甲基-2-戊酮	123-42-2	0.63	–	–
19	740.6	2, 6, 6-三甲基-2-环己烯酮	20013-73-4	0.10	–	–
20	743.0	2,5-呋喃二酮	108-31-6	0.22	0.020	–
21	782.8	乙酰氧基-2-丙酮	592-20-1	0.71	–	–
22	868.0	(E, E)-3, 5-十八烷-2-酮	30086-02-3	–	0.24	0.44
23	901.9	5, 5-二甲基-2(5H)-呋喃酮	20019-64-1	0.12		
24	931.8	苯乙酮	98-86-2	0.17	0.14	0.07
25	1114.6	*β*-紫罗酮	79-77-6	0.04	0.13	0.03
烷烃类						
1	228.8	庚烷	142-82-5	0.16	–	–
2	329.9	2,2,4,6,6-五甲基庚烷	13475-82-6	31.55	11.08	15.77
3	361.6	癸烷	124-18-5	2.18	–	0.91
4	375.8	2,2,4,4-四甲基辛烷	62183-79-3	4.93	–	2.50
5	375.9	1-碘庚烷	4282-40-0	–	1.87	–
6	461.0	3, 3, 4, 4-四乙基己烷	5171-86-8	–	0.23	–
7	510.4	3-甲基戊烷	96-14-0	0.63	0.27	–
8	522.8	3-甲基十一烷	1002-43-3	0.66	0.25	0.45
9	553.6	正十三烷	629-50-5	0.92	–	–
10	553.7	正十二烷	112-40-3	–	–	0.58
11	582.2	7, 7-二甲基-四环庚烷	124345-62-6	0.19	0.10	0.08
12	701.6	十六烷	544-76-3	0.62	0.02	
13	702.2	3-甲基-十三烷	6418-41-3	–	–	0.26
14	760.7	3-乙基-2, 6, 10-三甲基十一烷		0.14	–	–
烯烃类						
1	396.0	5-甲基-1-庚烯	13151-04-7	0.42	–	–
2	396.9	3,5,5-三甲基-1-己烯	4316-65-8	–	0.27	–
3	403.4	三环[4.1.0.0 (2, 7)]庚-3-烯(CAS)	35618-58-7	–	0.19	–
4	555.3	柠檬烯	138-86-3	–	–	0.16
5	555.4	右旋萜二烯	5989-27-5	0.51	–	–
6	576.4	7-羟基庚烯-1(CAS)		0.11	–	–
7	613.2	苯乙烯	100-42-5	0.50	0.30	0.25
8	633.6	萜品油烯	586-62-9	0.35	–	–
9	787.8	5-甲基-3-庚烯	61228-09-9	0.10	–	–
酸类						
1	770.1	乙酸	64-19-7	3.48	1.58	0.16
2	928.2	正戊酸	109-52-4	–	1.33	–

续表 5

分类及序号	出峰时间(s)	化合物名称	CAS	相对含量(%)		
				热泵干燥	微波干燥	真空冷冻干燥
3	1044.2	己酸	142-62-1	0.31	0.31	0.19
其他类						
1	213.5	硼烷二甲硫醚	13292-87-0	–	–	0.16
2	213.5	二甲基硫	75-18-3	2.82	1.07	–
3	266.3	2-甲基呋喃	534-22-5	0.10	–	–
4	295.3	丙烯基乙醚	557-31-3	9.62	3.51	–
5	296.1	烯丙基丁基醚	3739-64-8	–	–	0.28
6	317.6	2-甲基-3,4-二氢 -吡喃	13039-50-4	–	–	0.11
7	336.3	3, 5-二甲基-1-庚烯-3-烯异构体		0.14	–	–
9	348.1	N-乙基-N-(2-二甲氨基乙基)-4-(4-二甲氨基磺酰基-2, 6-二氯苯偶氮)-苯胺		–	–	0.50
10	373.0	乙腈	75-05-8	0.53	0.33	0.23
11	403.2	甲苯	108-88-3	0.82	–	0.10
12	458.1	甲基1-甲基-3-丁烯基醚		–	–	0.14
13	493.4	2-呋甲醚	25414-22-6	0.35	–	–
14	496.2	对二甲苯	106-42-3	–	0.82	–
15	496.3	1,2-二甲苯	95-47-6	0.37	–	0.48
16	502.5	间二甲苯	108-38-3	1.84	–	–
17	571.4	吡嗪	290-37-9	0.10	–	–
18	584.6	2-正戊基呋喃	3777-69-3	0.44	2.75	0.58
19	620.5	2-甲基吡嗪	109-08-0	2.86	0.05	–
20	623.2	4-异丙基甲苯	99-87-6	0.26	–	
21	669.3	2,5-二甲基吡嗪	123-32-0	3.95	–	–
22	687.4	N-甲基甲酰胺	123-39-7	–	–	0.10
23	690.8	2,3-二甲基吡嗪	5910-89-4	0.34	–	–
24	704.2	二乙二醇二乙醚	112-36-7	0.46	0.15	0.19
25	704.3	三乙二醇单乙醚	112-50-5	–	–	0.24
26	721.7	2-乙基-6-甲基吡嗪	13925-03-6	0.18	–	–
27	727.3	2-乙基-5-甲基吡嗪	13360-64-0	0.55	–	–
28	735.2	2-乙基呋喃	3208-16-0	–	–	0.26
29	737.1	2,3,5-三甲基吡嗪	14667-55-1	0.56	–	–
30	768.8	2-乙基-3,6-二甲基吡嗪	13360-65-1	0.42	–	–
31	821.7	2-乙酰基呋喃	1192-62-7	0.18	–	–
32	826.3	吡咯	109-97-7	0.10	–	–
33	877.2	二甲基亚砜	67-68-5	0.12	0.07	–
34	928.7	N(1)-丙基-2-氨基丙二酰二胺	138574-43-3	–	0.35	–

注: 表中仅列出相对含量大于0.1%的化合物。

少; 这可能是由于真空冷冻干燥方式干燥温度低且处于真空环境中, 减少了桑叶粉挥发性成分的损失, 而热泵干燥温度高且干燥时间长, 桑叶粉挥发性成分损失最多。

热泵干燥桑叶粉相对含量前五大物质为 2, 2, 4, 6, 6-五甲基庚烷(31.55%)、丙烯基乙醚(9.62%)、羟基丙酮(5.97%)、2, 2, 4, 4-四甲基辛烷(4.93%)、2, 5-二甲基吡嗪(3.95 %), 5 种化合物的总相对含量为 56.02%; 微波干燥桑叶粉相对含量前五大物质为乙醇(17.42%)、2, 2, 4, 6, 6-五甲基庚烷(11.08%)、3-羟基-2-丁酮(10.94%)、1-戊烯-3-醇(8.60%)、2, 3-丁二酮(8.37%), 5 种化合物的总相对含量为 56.41%; 真空冷冻干燥桑叶粉相对含量前五大物质为 2, 2, 4, 6, 6-五甲基庚烷(15.77%)、反式-2-己烯醛(14.40 %), 3-己烯-1-醇(12.00%)、1-戊烯-3-醇(9.13%)、顺-2-戊烯醇(7.89%), 5 种化合物的总相对含量为 59.19%。三种干燥方式的桑叶粉排名前五的共有化合物只有 1 种为 2, 2, 4, 6, 6-五甲基庚烷, 相对含量依次为 31.55%、11.08%、15.77%; 该化合物的峰面积分别为 2.34×10^7、9.66×10^6 和 2.28×10^7。

由以上结果可知, 不同的干燥方式对桑叶挥发性成分影响较大, 桑叶的干燥应根据最终桑叶粉的用途, 在充分考虑挥发性成分的基础上, 选择合适的干燥方式。

3 结论

本文对比分析了热泵干燥、微波干燥、真空冷冻干燥三种干燥方式对桑叶粉物理特性、氨基酸组分的影响, 并采用 HS-SPME-GC-MS 技术分析桑叶粉

挥发性成分；得出不同干燥方式的桑叶粉物理特性、氨基酸组分及挥发性成分都存在显著性差异（P<0.05）；真空冷冻干燥 L^*、b^*最高，a^*最小；微波干燥润湿性、持水力和持油力最差，溶解性和堆积密度最强；真空冷冻干燥桑叶粉润湿性、吸湿性、持水力和持油力最强，堆积密度最小。三种干燥方式中，微波干燥桑叶粉总氨基酸、必需氨基酸以及必需氨基酸占比均为最高，分别为 11.68 mg/g、3.40 mg/g、29.11%。桑叶粉鲜味氨基酸含量在四种呈味氨基酸中含量最高，但不同干燥方式的桑叶粉鲜味氨基酸占比和含量差距较大，热泵干燥桑叶粉鲜味氨基酸含量是微波干燥组的 1.33 倍，但相对含量是微波干燥组的 1.99 倍。三种干燥方式中微波干燥组桑叶粉的甜味氨基酸、芳香族氨基酸和苦味氨基酸含量与相对含量都高于热泵干燥组和真空冷冻干燥组。干燥方式对桑叶粉挥发性物质的种类和含量影响显著（P<0.05），热泵干燥桑叶粉烷烃类和其他化合物相对含量均最高，分别占 42.01% 和 27.58%，微波干燥桑叶粉醇类、酮类含量较高，分别占 35.23% 和 27.05%；而真空冷冻干燥桑叶粉醇类、醛类含量较高，分别占 37.28%、23.59%；由此可知，微波干燥和真空冷冻干燥桑叶粉挥发性成分相似。综合可知，真空冷冻干燥的桑叶粉具有较好的物理特性和香气，而微波干燥比较适宜桑叶粉产业化加工。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (2015 年版): 1 部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 297−298. [National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China(2015): 1[S]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2015: 297−298.]

[2] LEE C Y, SIM S M, CHENG H M. Phenylacetic acids were detected in the plasma and urine of rate administered with low-dose mulberry leaf extract[J]. Nutrition Research, 2008, 28(2): 555−563.

[3] ANDALLU B, VARADACHARYULU N C H. Control of hyperglycem is and retardation of cataract by mulberry (*Monus indica* L.) leaves in strptozotocin diabetic rats[J]. Indian Journal of Experimental Biology, 2002, 40(7): 791−795.

[4] XIA Y J, TAN Z P, WANG L P, et al. Research progress of edible Chinese medicine mulberry[J]. Medicinal Plant, 2013, 4(11): 55−57.

[5] JESZKA S M, FLACZYK E, JESZKA J, et al. Mulberry leaf extract intake reduces hyperglycaemia in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats fed high-fat diet[J]. Journal of Functional Foods, 2014, 8(1): 9−17.

[6] YANG N C, JHOU K Y, TSENG C Y. Antihypertensive effect of mulberry leaf aqueous extract containing γ-aminobutyric acid in spontaneously hypertensive rats[J]. Food Chemistry, 2012, 132(4): 1796−1801.

[7] YANG X L. Hypolipidemic and antioxidant effects of mulberry (*Morus alba* L.) fruit in hyperlipidaemia rats[J]. Food & Chemical Toxicology an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association, 2010, 48(8−9): 2374−2379.

[8] CHAN K C, YANG M Y, LIN M C, et al. Mulberry leaf extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits and in cultured aortic vascular smooth muscle cells[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2013, 61(11): 2780−2788.

[9] GUPTA G, DUA K, KAZMI I, et al. Original article anticonvulsant activity of morusin isolated from morus alba: Modulation of GABA receptor[J]. Biomedicine & Aging Pathology, 2014, 4(1): 29−32.

[10] KUMIATI N F, SURYALI G P, SIGIT J I. Vasodilator effect of ethanolic extract of mulberry leaves (*Morus alba* L.) in rat and rabbit[J]. Procedia Chemistry, 2014, 13(1): 142−146.

[11] SUGIYAMAM, KATSUBET, KOYAMAA, et al. Effect of solar radiation on the functional components of mulberry (*Morus alba* L.) leaves[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2016, 96(11): 3915−3921.

[12] 盛金凤, 雷雅雯, 何雪梅, 等. 桑叶粉对曲奇饼干品质和抗氧化特性的影响[J]. 食品科技, 2020, 45(7): 188−193. [SHENG J F, LEI Y W, HE X M, et al. Effects of mulberry leaf powder on the quality and antioxidant properties of cookies[J]. Food Science and Technology, 2020, 45(7): 188−193.]

[13] 陈柄灿, 曾凡坤. 复合桑叶米乳保健饮料的研制[J]. 食品与机械, 2007, 23(2): 108−110. [CHEN B C, ZENG F K. Preparation of mulberry leaf and rice compound health beverage[J]. Food & Machinery, 2007, 23(2): 108−110.]

[14] 郭刚军, 胡小静, 徐荣, 等. 干燥方式对辣木叶营养、功能成分及氨基酸组成的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(11): 39−45. [GUO G J, HU X J, XU R, et al. Effects of different drying methods on nutritional and functional components and amino acid composition of *Moringa oleifera* leaves[J]. Food Science, 2018, 39(11): 39−45.]

[15] 林美, 徐玉娟, 肖更生, 等. 干燥方式对辣木叶营养活性成分、抗氧化活性及色泽的影响[J]. 热带作物学报, 2018, 39(12): 2465−2472. [LIN X, XU Y J, XIAO G S, et al. Effects of drying methods on bioactive components, antioxidant capacity and color of the leaves of *Moringa oleifera* Lam.[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2018, 39(12): 2465−2472.]

[16] 张丽, 薛妍君, 邓金花, 等. 微波干燥对野生荠菜品质和挥发性物质的影响[J]. 现代食品科技, 2015, 31(8): 226−236. [ZHANG L, XUE Y J, DENG J H, et al. Effect of microwave drying on quality and volatile substances of wild *Capsella bursa-pastoris* L.[J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(8): 226−236.]

[17] 司金金, 辛丹丹, 王晓芬, 等. 干燥方式对红薯叶粉品质特性的影响[J]. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2018, 46(6): 129−136,154. [SI J J, XIN D D, WANG X F, et al. Effect of drying methods on quality characteristics of sweet potato leaf powder[J]. Journal of Northwest A & F University (Nat Sci Ed), 2018, 46(6): 129−136,154.]

[18] 赵慧玲, 王佳燕, 吕慧, 等. 干燥方式对桑叶主要活性成分及抗氧化活性的影响[J]. 食品工业, 2020, 41(8): 191−195. [ZHAO H L, WANG J Y, LV H, et al. Effects of drying methods

on the main active ingredients and the antioxidant activity of mulberry leaves[J]. The Food Industry, 2020, 41(8): 191−195.]
[19] 中国人民共和国农业部. NY/T 3082-2017 水果、蔬菜及其制品中叶绿素含量的测定分光光度法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2017. [Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. NY/T3082-2017 Determination of chlorophyll content in fruits, vegetables and derived products-spectrophotometry method [S]. Beijing: Standards Press of China, 2017: 1−2.]
[20] 李明娟, 张雅媛, 游向荣, 等. 不同干燥技术对核桃粕蛋白粉品质特性及微观结构的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(5): 92−98. [LI M J, ZHANG Y Y, YOU X R, et al. Effects of different drying technologies on the quality characteristics and microstructure of walnut meal protein powder[J]. Food Science, 2021, 42(5): 92−98.]
[21] ZHAO X, YANG Z, GAI G, et al. Effect of superfine grinding on properties of ginger powder[J]. Journal of Food Engineering, 2009, 91(2): 217−222.
[22] 郑惠, 王敏, 吴丹. 超微处理对苦荞麦理化及功能特性影响的研究 [J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(8): 5−9. [ZHENG H, WANG M, WU D. The effect of super micro-milling on physica-l chemistry and functional properties of tartary buckwheat bran[J]. Food and Fermentation Industries, 2006, 32(8): 5−9.]
[23] CAPREZ A, ARRIGONI E, AMADO R, et al. Influence of different types of thermal treatment on the chemical composition and physical properties of wheat bran[J]. Journal of Cereal Science, 1986, 4(3): 233−239.
[24] GONG Z, ZHAGN M, MUJUMDAR A S, et al. Spray drying and agglomeration of instant bayberry powder[J]. Drying Technology, 2007, 26(1): 116−121.
[25] SOWBHAGYA H B, SUMA P F, MAHADEVAMMA S, et al. Spent residue from cumin-a potential source of dietary fiber[J]. Food Chemistry, 2008, 104(3): 1220−1225.
[26] KORÖSA, VARGA Z S, MOLNÁRPERL I. Simultaneous analysis of amino acids and amines as their o-phthalaldehyde-ethanethiol-9-fluorenylmethyl chloroformate derivatives in cheese by high-performance liquid chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2008, 1203(2): 146−152.
[27] 刘华敏, 解新安, 丁年平. 喷雾干燥技术及在果蔬粉加工中的应用进展[J]. 食品工业科技, 2009, 30(2): 304−308. [LIU H M, XIE X A, DING N P. Study progress of spray drying technology and application in the fruit and vegetable powder production[J]. Science and Technology of Food Industry, 2009, 30(2): 304−308.]
[28] 乔小全, 任广跃, 乔梦, 等. 干燥方式对黑枣粉品质特性的影响 [J]. 食品与机械, 2018, 34(8): 189−194. [QIAO X Q, REN G Y, QIAO M, et al. Effects of different drying methods on the powder quality characteristic in Dateplum persimmon[J]. Food & Machinery, 2018, 34(8): 189−194.]
[29] JOSHI M, ADHIKARI B, ALDRED P, et al. Physicochemical and functional properties of lentil protein isolates prepared by different drying methods[J]. Food Chemistry, 2011, 129(4): 1513−1522.
[30] 韩俊娟, 木泰华, 张柏林. 膳食纤维生理功能的研究现状 [J]. 食品科技, 2008, 33(6): 243−245. [HAN J J, MU T H, ZHANG B L. Physiological functions and current research progress of dietary fiber[J]. Food Science and Technology, 2008, 33(6): 243−245.]
[31] WU C, CHEN S, OU T, et al. Mulberry leaf polyphenol extracts reduced hepatic lipid accumulation involving regulation of adenosine monophosphate activated protein kinase and lipogenic enzymes[J]. J Funct Foods, 2013, 5(4): 1620−1632.
[32] SYAMALADEVI R M, INSAN S K, DHAWAN S, et al. Physicochemical properties of encapsulated red raspberry (*Rubus idaeus*) powder: Influence of high-pressure homogenization[J]. Drying Technology, 2012, 30(5): 484−493.
[33] LI X B, FENG T, ZHOU F, et al. Effects of drying methods on the tasty compounds of *Pleurotus eryngii*[J]. Food Chemistry, 2015, 166: 358−364.
[34] 赵金梅, 孙蕊, 巩丽莉, 等. 干燥方式对沙枣花品质和挥发性风味成分的影响 [J]. 食品科学, 2020, 41(22): 265−270. [ZHAO J M, SUN R, GONG L L, et al. Effects of different drying methods on nutritional and volatile aroma components in flowers of *Elaegnus angustifolia*[J]. Food Science, 2020, 41(22): 265−270.]
[35] 侯娜, 赵莉莉, 魏安智, 等. 不同种质花椒氨基酸组成及营养价值评价[J]. 食品科学, 2017, 38(18): 113−118. [HOU N, ZHAO L L, WEI A Z, et al. Amino acid composition and nutritional quality evaluation of different germplasms of Chinese prickly ash (*Zanthoxylum bungeanum* Maxim)[J]. Food Science, 2017, 38(18): 113−118.]
[36] 王曜, 陈舜胜. 野生与养殖克氏原螯虾游离氨基酸的组成及比较研究[J]. 食品科学, 2014, 35(11): 269−273. [WANG Y, CHEN S S. Comparative composition of free amino acids in wild and cultured *Procambarus clarkii*[J]. Food Science, 2014, 35(11): 269−273.]
[37] 李琪, 李广, 张会妮. 兰州百合新鲜鳞片中水解及游离氨基酸分析 [J]. 食品科学, 2012, 33(20): 277−281. [LI Q, LI G, ZHANG H N. Analysis of free and protein-bound amino acids in fresh scales of lily (*Lilium davidii* var *unicolor*) from Lanzhou[J]. Food Science, 2012, 33(20): 277−281.]
[38] 张梅秀, 王锡昌, 刘源. 食品中的呈味肽及其呈味机理研究进展 [J]. 食品科学, 2012, 33(7): 320−326. [ZHANG M X, WANG X C, LIU Y. Research progress in flavor peptides in foods and corresponding taste mechanisms[J]. Food Science, 2012, 33(7): 320−326.]

刘洋, 陈勤操, 刘德春, 等. 茶叶多酚氧化酶三相分离纯化及酶学性质研究 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 119−124. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080075

LIU Yang, CHEN Qincao, LIU Dechun, et al. Purification of Polyphenol Oxidase from Tea Leaf by Three Phase Partitioning and Enzymatic Properties[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 119−124. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080075

· 生物工程 ·

茶叶多酚氧化酶三相分离纯化及酶学性质研究

刘　洋, 陈勤操, 刘德春, 杨　莉, 胡　威, 匡柳青, 刘　勇*, 滕　杰*
（江西农业大学农学院, 江西南昌 330045）

摘　要: 为研究一种快速高效的茶叶多酚氧化酶（polyphenol oxidase, PPO）制备方法，本试验采用三相分离法（three phase partitioning, TPP）获取茶叶 PPO，并研究其酶学特性。结果表明，通过两次三相分离纯化后可获得酶比活力 210.46 U/mg、纯化 15.76 倍、回收率 8.04% 的茶叶 PPO，其最亲和底物为邻苯三酚（K_m=6.82 mmol/L, V_{max}=5.36×10^{-2} OD/min），最适反应温度和 pH 分别为 45 ℃ 和 pH5.5，在 25 ℃ 和 pH4.5~7.0 时具有较好的稳定性。对纯化后茶叶 PPO 抑制作用最显著的化合物为抗坏血酸（IC_{50}=2.42±0.18 mmol/L），其次是草酸和 EDTA，柠檬酸抑制效果最弱，而卤化物无显著影响（P>0.05）。表明三相分离法能够较好的保留茶叶 PPO 活性，且操作简便、耗时短、成本低，有利于工业化应用。

关键词: 茶叶, 三相分离法, 多酚氧化酶, 酶学性质
中图分类号: Q814.1　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0119−06
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080075
本文网刊:

Purification of Polyphenol Oxidase from Tea Leaf by Three Phase Partitioning and Enzymatic Properties

LIU Yang, CHEN Qincao, LIU Dechun, YANG Li, HU Wei, KUANG Liuqing, LIU Yong*, TENG Jie*
（College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China）

Abstract: In order to study a fast and efficient method for obtain polyphenol oxidase (PPO) from tea leaf, three phase partitioning (TPP) were used to purified PPO and then its enzymatic properties were studied. The results showed that PPO from tea leaf was purified with 15.76-fold enrichment in the specific activity of 210.46 U/mg and 8.04% recovery by TPP purification method for the second time. The strongest affinity substrate was pyrogallol (K_m=6.82 mmol/L, V_{max}=5.36×10^{-2} OD/min) for purified tea PPO. The optimum temperature and pH of the enzyme were 45 ℃ and 5.5, respectively. The enzyme had great stability under condition of 25 ℃ and pH4.5~7.0. The most significant inhibitory effect of different compounds on purified tea PPO was ascorbic acid (IC_{50}=2.42±0.18 mmol/L), followed by oxalic acid and EDTA. The inhibitory effect of citric acid was the weakest, while halides had no significant inhibitory effect (P>0.05). This work proves that the TPP method can better retain the tea PPO activity, and easy to operate, time-consuming and low-cost for the purification of tea PPO, which is beneficial to industrial applications.

Key words: tea leaf; three phase partitioning (TPP); polyphenol oxidase (PPO); enzymatic properties

多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO, EC.1.10.3.1)是一类 Cu^{2+}辅基结合酶, 广泛存在于动物、植物、真菌体内和腐烂的植物残渣中[1]。茶叶 PPO 是茶树体内重要的酶类之一, 不仅对茶树生理代谢起重

收稿日期: 2021−08−06
基金项目: 国家自然科学基金（31902082, 31860544）; 江西省柑橘产业技术体系项目（JXARS-07-栽培岗位）; 江西省教育厅项目（GJJ170291）; 江西省重点研发计划一般项目（20202BBFL63031）。
作者简介: 刘洋（1992−）, 女, 博士研究生, 讲师, 研究方向: 茶叶加工及品质化学, E-mail: liuyang@jxau.edu.cn。
*** 通信作者:** 刘勇（1965−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 果树发育生物学研究, E-mail: liuyongjxau@163.com。
滕杰（1988−）, 男, 博士, 副教授, 研究方向: 茶叶加工及功能成分化学, E-mail: tengjie@jxau.edu.cn。

要作用，而且在茶叶加工过程中通过不同程度的抑制或利用 PPO 活性，可将茶叶制作成不同茶类[2]。红茶加工中 PPO 催化黄烷醇类氧化形成醌，醌再经氧化缩合成更复杂的发酵产物如茶黄素、茶红素等茶色素[3−4]，其中，茶黄素对红茶的色香味和品质起到关键作用，同时对人体具有多种营养功效，如抗氧化[5]、抗肿瘤[6]、抑菌[7]、降脂[8] 等。茶黄素在医药及食品行业具有很大的应用前景，然而红茶中茶黄素含量仅有 2~20 g/kg，体外酶促合成茶黄素是其生产的重要途径之一。因此，快速有效的获取茶叶 PPO 具有重要的现实意义。

PPO 的纯化实质是除杂蛋白、纯化目标蛋白的过程，主要方法有沉淀分离法和层析分离法[9]。沉淀分离法常用于茶叶 PPO 的初分离，采用硫酸铵分级沉淀，全过程保持低温。层析分离法则多用于沉淀分离后制备精制茶叶 PPO，主要方法有吸附层析、离子交换层析、凝胶过滤层析和亲和层析等[10]。层析法能获得高纯度的茶叶 PPO，但对仪器设备要求较高、纯化时间长、操作复杂，难以在实际生产中大规模应用。三相分离法（three phase partitioning，TPP）是通过向粗提取液中加入一定比例的盐和有机溶剂使混合液产生明显的分层，使部分蛋白聚集在有机相和水相间的沉淀层，低分子质量色素、膜脂等溶解在有机层，糖类、部分蛋白质溶解在水层，从而达到提取纯化目标物质的方法[11]。研究表明三相纯化分离法适用于番薯过氧化酶[12]、脱脂豆粉脂肪氧合酶[13]、琉璃苣多酚氧化酶[14] 等。此外，三相分离法也可用于分离纯化油性树脂[15]、米糠油[16] 等天然物质，将其应用于天然物质的分离纯化具有广阔前景。

本研究采用三相分离法纯化茶叶多酚氧化酶，并分析其酶学性质，一方面为茶叶多酚氧化酶提取方法的研究提供新的思路；另一方面为体外酶促合成茶黄素的最适反应条件提供理论依据，促进茶叶多酚氧化酶的产业化利用。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

龙井 43 号茶鲜叶（一芽二叶） 采自江西农业大学校园茶叶基地，采摘后立马进行液氮处理并于 −80 ℃ 保存备用；叔丁醇（分析纯） 天津市大茂化学试剂厂；硫酸铵、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、柠檬酸、盐酸、乙酸、抗坏血酸、PVPP、Triton-100、邻苯二酚、愈创木酚、绿原酸、邻苯三酚、没食子酸、叠氮化钠、氯化钠、草酸、碘化钾、脯氨酸、尿素等均为分析纯、牛血清蛋白（标准品）、改良型 BCA 法蛋白质浓度测定试剂盒 生工生物工程（上海）股份有限公司。

5810R 型离心机 德国 Eppendorf 公司；SpectraMax M2 型多功能酶标仪 美国 Molecular Devices 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 茶叶多酚氧化酶粗酶提取 将 20 g 茶鲜叶加入 0.05 mol/L、pH6.8 预冷的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液（含 3% PVPP，30 mmol/L 抗坏血酸，1 mmol/L EDTA，2% Triton-100）中，料液比为 1∶3（v/v），组织匀浆 2 min，置于 4 ℃ 冰箱内浸提 2 h，期间摇动 3~5 次，最后 8000 r/min 离心 15 min 取上清液即为茶叶 PPO 粗酶液。

1.2.2 三相法分离纯化茶叶多酚氧化酶 三相提取法分离纯化茶叶多酚氧化酶参考 ALICI 等[14] 方法进行优化。向一定体积的茶叶多酚氧化酶粗酶液中添加硫酸铵至 15% 饱和浓度，调节 pH 至 6.5，按照 1∶1（v/v）体积加入叔丁醇，磁力搅拌器低速混合 1 min 后静置 1 h，逐渐形成三相体系。将体系以 4000 r/min 离心 10 min，使中间相浓缩成片状蛋白沉淀。除去上层有机相层和下层水相，收集中间沉淀相，用适量体积的 0.05 mol/L、pH6.8 的磷酸氢二钠—柠檬酸缓冲溶液溶解并定容至 20 mL，重复上述操作，再次富集分离后定容至 20 mL，酶蛋白分离纯化过程中均测定其酶活（U）和蛋白质浓度，并计算每次纯化后的回收率。

$$回收率(\%) = 三相纯化后总酶活/粗酶总酶活 \times 100$$

1.2.3 茶叶多酚氧化酶酶活测定 PPO 酶活测定参照 TENG 等[17] 的方法进行优化。取酶液 0.5 mL，加反应混合液 1.5 mL（反应混合液按 0.1 mol/L 的 pH5.6 柠檬酸-磷酸缓冲液∶0.1% 脯氨酸∶1.0% 邻苯二酚=10∶2∶3（v/v/v）进行配制）于离心管中，空白对照反应混合液中的邻苯二酚用缓冲液代替，其他条件相同，37 ℃ 孵育保温 30 min 后，立即加入 1.5 mL 的 6 mol/L 尿素终止反应，4000 r/min 离心 10 min，取 200 μL 上清液用多功能酶标仪在 420 nm 下测 OD 值，酶活性以每克样每分钟 E_{420} 值增加 0.001 为 1 个酶活力单位（U）。

$$酶活性(U) = E_{420}/(0.001 \times m \times t)$$

式中：E_{420} 表示在 420 nm 下测得的 OD 值；m 表示茶叶样本取样量，g；t 表示反应时间，min。

1.2.4 蛋白含量测定 采用改良型 BCA 法蛋白质浓度试剂盒进行蛋白含量的测定，以牛血清蛋白制作标准曲线，在 562 nm 波长处的吸光度为纵坐标，以标准蛋白质量（mg）为横坐标绘制标准曲线，根据标准曲线方程计算出样品中蛋白质含量。以标准蛋白质质量对吸光度进行线性回归得回归方程为：$y=0.0002x+0.0921$，$R^2=0.9903$。

1.2.5 茶叶多酚氧化酶酶动力学测定 酶动力学测定参照 HAN 等[18] 的方法进行。将愈创木酚、邻苯二酚、绿原酸、邻苯三酚、没食子酸分别配制成最终摩尔浓度为 10、20、30、40、50 mmol/L 的溶液，在最适反应体系中测定最大吸收波长处的 OD 值。采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法求出相应的米氏常数 K_m 和最大反应速度 V_{max}，公式如下。

$$\frac{1}{v}=\frac{K_m}{[S]}\cdot V_{max}+\frac{1}{V_{max}}$$

式中：v 表示反应速度，OD/min；K_m 表示米氏常数（测定底物的亲和性），mol/L；[S] 表示反应底物的浓度，mmol/L；V_{max} 表示酶促反应所达到的最大速度，OD/min。

1.2.6　茶叶多酚氧化酶最适温度及耐热性测定　以 0.1 mol/L 的 pH5.6 的柠檬酸—磷酸氢二钠缓冲液配制 1.0% 的邻苯二酚溶液，分别在 25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80 ℃ 的温度下检测 PPO 酶活性。以最适温度下酶活性为 100%，计算其它温度下的相对酶活。

以 0.1 mol/L 的 pH5.6 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液配制 1.0% 的邻苯二酚溶液，分别在 25、35、45、55、65、75 ℃ 的温度条件下处理 0、10、20、30、40、50 和 60 min 后检测 PPO 酶活性，计算其相对酶活。

1.2.7　茶叶多酚氧化酶最适 pH 及酸碱稳定测定　配制 0.05 mol/L 的醋酸钠缓冲溶液（pH3.0、3.5、4.0、4.5、5.0 和 5.5），0.05 mol/L 的磷酸缓冲溶液（pH6.0、6.5、7.0 和 7.5），0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲溶液（pH8.0、8.5 和 9.0）。用 pH 依次为 3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0 的 0.1 mol/L 缓冲液分别配制成含 1.0% 的邻苯二酚溶液，在最适温度下分别检测 PPO 酶活性。以最适 pH 条件下酶活性为 100%，计算其它 pH 下的相对酶活。

将 PPO 酶液孵育在 pH3.0~9.0 不同酸碱度的缓冲液中（4 ℃，12 h），检测 PPO 残留活性。以磷酸缓冲液（0.05 mol/L pH6.8）中蛋白质的活性为原始活性，计算不同 pH 缓冲液处理后的 PPO 残留活性。

1.2.8　化合物对茶叶多酚氧化酶活性的影响　分别配制含有浓度为 0.2、1.0、5.0、10.0 mmol/L 的抗坏血酸、柠檬酸、叠氮化钠、氯化钠、EDTA、草酸、碘化钾溶液。酶反应体系中加入不同浓度化合物的缓冲液，以最高活性条件下的浓度为 100% 计算相对酶活，并计算出半抑制浓度 IC_{50}（mmol/L）分析不同化合物对茶叶 PPO 的抑制或激活作用。

1.3　数据处理

所有实验均设置三次重复，数据用平均值±标准差表示，显著性分析用 SPSS.21 中的 Turkey 检验方法进行分析。

2　结果与分析

2.1　纯化效果分析

茶叶 PPO 的纯化方法较多，如 Triton X-100 萃取法、透析法、硫酸铵沉淀法、琼脂糖凝胶色谱分离法和 Sephadex G-200 凝胶色谱层析法等[19]，各方法在纯化效果上存在差异。三相法提取茶叶 PPO 的纯化效果如表 1 所示，经过第一次三相纯化后，总蛋白质含量较粗酶降低了 95.49%，但酶比活力升高了 269.29%，纯化倍数为 3.69 倍。经过相同处理重复纯化后，酶比活力升至 210.46 U/mg，纯化倍数为 15.76 倍，回收率为 8.04%。与通过亲和色谱法纯化茶叶 PPO 获得纯化倍数为 19.77 倍，其回收率为 2.67% 的试验结果[19] 比较，纯化倍数降低 4.01 倍，但回收率是其 3.01 倍；与离子交换色谱纯化法纯化后获得的 5.11% 回收率和 3.32 倍纯化倍数相比，三相纯化法在纯化倍数和回收率上的效果均优于离子交换色谱纯化法[20]。综合说明通过三相分离法纯化茶叶 PPO 可以得到较高纯度的茶叶 PPO，且提高了茶叶 PPO 的酶比活力。

表 1　三相法提取茶叶多酚氧化酶的纯化效果
Table 1　Purification effect of tea PPO by TPP

步骤	总酶活（U）	总蛋白质（mg）	酶比活力（U/mg）	纯化倍数	回收率（%）
粗酶	34032	2549	13.35	1	100
第一次三相纯化（沉淀层）	5670	115	49.30	3.69	16.67
第二次三相纯化（沉淀层）	2736	13	210.46	15.76	8.04

2.2　底物特异性及酶动力学分析

米氏常数（K_m）值表示酶对底物的亲和力，值越小说明酶对底物的亲和力越大[21]。以不同浓度的愈创木酚、邻苯二酚、绿原酸、邻苯三酚和没食子酸为反应底物，检测三相纯化后茶叶 PPO 的酶活性（表 2），当邻苯三酚为底物时，米氏常数值最小（K_m=6.82 mmol/L），同时反应速度最大（V_{max} =5.36×10^{-2} OD/min），说明 PPO 与邻苯三酚的亲和力最高，其次是邻苯二酚，该结果与勐库大叶茶种 PPO 粗酶液的动力学结果相似[22]。茶叶 PPO 对绿原酸和没食子酸也具有不同程度的催化能力，但对于愈创木酚则表现出不亲和的现象。表明茶叶 PPO 对不同底物的亲和力具有明显差异，主要原因是不同的底物具有单元酚、二元酚、多元酚等类型的区别，同时甲基-CH_3 的数量和位置对底物特异性具有重要影响，通常酶与底物间亲和力的强弱取决于自身同工酶的组成和底物结构[23]。上述结果表明，三相分离法纯化茶叶 PPO 能较好的保留其底物特异性。

表 2　三相法提取茶叶 PPO 的底物特异性及酶动力学
Table 2　Substrate specificity and enzyme kinetics of tea PPO by TPP

底物	波长（nm）	K_m（mmol/L）	V_{max}（×10^{-2} OD/min）
愈创木酚	368	/	/
邻苯二酚	420	9.77	3.68
绿原酸	328	15.09	2.51
邻苯三酚	334	6.82	5.36
没食子酸	420	23.74	1.07

2.3　最适温度及耐热性分析

温度是影响酶促反应最重要的因素之一，以邻苯二酚作为底物分别在 25~80 ℃ 系列温度下反应 10 min，结果如图 1 所示，温度在 35~55 ℃ 之间时，通过三相分离法纯化的茶叶 PPO 相对酶活性较高，

其中, 45 ℃ 时相对酶活达到最高值, 超过 65 ℃ 时酶活性基本丧失。滕杰[24] 在研究茶叶 PPO 同工酶过程中, 发现 PPO1 与 PPO2 的最适反应温度分别为 30 与 40 ℃; 陈盛虎[25] 在对分离出的 3 个 PPO 同工酶的最适反应温度进行分析时发现其最适温度均不一致, 最适温度范围为 20~50 ℃。上述研究的提取方式均为色谱层析法, 最适反应温度与提取条件关系较大[26], 因而在最适反应条件上存在差异。

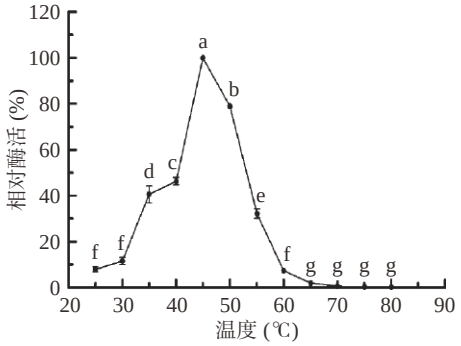


图 1 温度对茶叶多酚氧化酶活性的影响

Fig.1 Effect of temperature on the activity of PPO from tea

注: 不同小写字母表示差异显著(P<0.05); 图 3~图 4 同。

将制备的茶叶 PPO 分别置于 25~75 ℃ 梯度温度下, 每间隔 10 min 检测其相对酶活, 结果如图 2 所示, 茶叶 PPO 在 25 ℃ 处理 1 h 后能保持 50% 以上的酶活, 在 25~45 ℃ 间处理 1 h 后均保留酶活力, 说明在 45 ℃ 以下时, 三相法提取的茶叶 PPO 能表现出较高的稳定性。而随着温度的增加活性呈现显著下降(P<0.05), 特别是 75 ℃ 处理 30 min 后酶活性几乎丧失。研究发现: 龙井 43 号茶树多酚氧化酶粗酶的热稳定性在 40 ℃ 时最高, 其同工酶在 30 ℃ 时热稳定性最高[27], 其结果与本研究结果相似, 因此, 运用三相分离法提取茶叶多酚氧化酶能较好的保留其热稳定性。酶活力的丧失与酶蛋白空间构型的改变有直接关系, 热处理是改变酶蛋白活动中心结构的常见方法[28]。高温能改变 H 键或疏水键, 使酶空间构型发生变化, 活性丧失。茶叶 PPO 在 25~45 ℃ 范围内仍保留酶活力, 说明在此范围内仅有部分 PPO 构型发生改变, 酶活性保留较高。

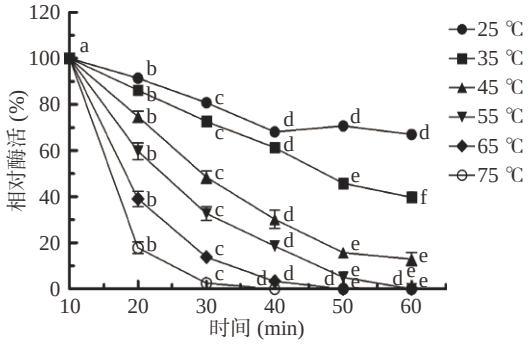


图 2 温度对茶叶多酚氧化酶热稳定性的影响

Fig.2 Effect of temperature on stability of PPO from tea

注: 不同小写字母表示同一温度不同时间差异显著, P<0.05。

2.4 最适 pH 及酸碱稳定性分析

不同 pH 对纯化后茶叶 PPO 酶活性影响如图 3 所示, 茶叶 PPO 出现了 2 个酶活性峰值, 分别是 pH5.5 和 pH7.0, 其中, pH 为 5.5 时相对酶活性高于 pH7.0。虞昕磊[29] 在分离纯化云南大叶种 PPO 时获得两个 PPO 同工酶, 最适 pH 分别为 5.2 和 5.6。TENG 等[17] 纯化分离政和大白茶 PPO 时也获得两个 PPO 同工酶, 最适 pH 分别是 5.5 和 6.0。因此, 推测通过三相纯化法获得茶叶 PPO 具有两个最适 pH 是有同工酶的存在。白毫早鲜叶 PPO 的最适 pH 为 6.0[30]; 福云 6 号茶 PPO 最适 pH 则相对偏碱, 在 pH8.6 时具有一个酶活峰值[31], 这表明不同品种来源的茶叶 PPO 最适 pH 存在差异。当 pH<3.5 和 pH>7.5 时, 茶叶 PPO 酶活几乎失活。

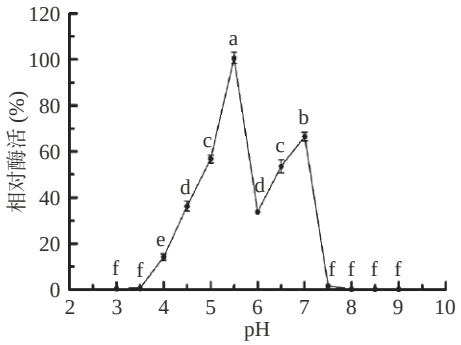


图 3 pH 对茶叶多酚氧化酶活性的影响

Fig.3 Effect of pH on the activity of PPO from tea

三相纯化后的茶叶 PPO 分别置于 pH3.0~9.0 的缓冲液 12 h 后, 残余酶活性如图 4 所示, pH<4.0 时, 茶叶 PPO 的相对酶活不足 20%, 随着 pH 的升高相对酶活显著升高(P<0.05), 当 pH 为 5.5 时表现出峰值, 随着 pH 的增加 pH7.0 又出现一个峰值, 当 pH>7.5 时, 相对酶活显著降低直至完全失活(P<0.05)。PPO 为活性中心中含有 Cu^{2+}的氧化酶, 当体系中 pH 较低时 Cu^{2+}能够被解离出来, 丧失 Cu^{2+}的酶蛋白将失去催化活性, 当 pH 较高时 Cu^{2+}容易被氧化形成铜化物而降低酶活。因此, 选择合适的 pH 对 PPO 酶活性的保持具有重要意义[32−33]。

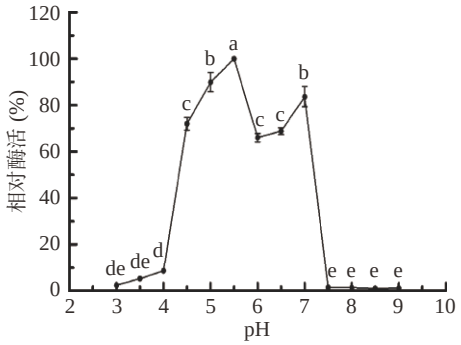


图 4 pH 对茶叶多酚氧化酶稳定性的影响

Fig.4 Effect of pH on stability of PPO from tea

2.5 化合物对茶叶多酚氧化酶活性的影响

化合物对 PPO 酶活性影响作用有两个途径, 一

是作用于活性中心的铜离子，二是作用于底物与酶结合的位点使其不能与酶蛋白结合，从而降低酶催化活力[34]。不同化合物对纯化后茶叶 PPO 酶活性影响通过半抑制浓度（IC_{50}（mmol/L））来表现，半抑制浓度越小则表明此化合物对其活性抑制越大。如表 3 所示，还原剂和螯合剂对茶叶 PPO 有不同程度的抑制作用，而卤化物则没有抑制作用。其中，抗坏血酸对茶叶 PPO 的抑制作用最显著（IC_{50}=2.42±0.18 mmol/L，P<0.05），其次是草酸和 EDTA，柠檬酸抑制效果最弱。研究表明抗坏血酸对凤庆茶叶 PPO[29]（IC_{50}=0.3 mmol/L）、土耳其茶叶 PPO[19]（IC_{50}=0.069 mmol/L）的抑制作用也很明显，抗坏血酸能将邻醌还原为邻酚，从而阻断氧化反应的进一步进行，同时抗坏血酸还能与 Cu^{2+}螯合降低酶活性[35]。EDTA 是一种常见的金属螯合剂，能与大部分金属离子发生反应。从实验结果分析，纯化后茶叶 PPO 对 EDTA 不敏感，并且抑制相关性较低（R^2=0.80），类似现象同样存在于樱桃 PPO[36]、莴苣 PPO[37]，可能原因是 EDTA 虽然是一种金属螯合剂，但螯合铜离子的活性较低[38]。草酸和柠檬酸中的羧基也能与 Cu^{2+}络合，同时还能降低反应体系 pH 从而抑制酶活，本实验草酸对茶 PPO 的抑制作用显著高于柠檬酸（P<0.05），说明三相分离纯化后的茶叶 PPO 对草酸更为敏感。

表 3　不同化合物对茶叶多酚氧化酶活性的影响
Table 3　Effect of different compound on tea PPO activity

类型	化合物名称	IC_{50}（mmol/L）	R^2
还原剂	抗坏血酸	2.42±0.18^{d}	0.91
	EDTA	10.45±0.65^{b}	0.80
螯合剂	柠檬酸	17.47±1.43^{a}	0.96
	草酸	5.99±0.31^{c}	0.92
	氯化钠	ND	/
卤化物	碘化钾	ND	/
	叠氮化钠	ND	/

注：ND：随着化合物浓度增加对酶活性没有抑制作用；小写字母不同表示差异显著（P<0.05）。

3　结论

多酚氧化酶对茶树生理代谢和产品加工品质具有重要作用，科学地利用或抑制 PPO 酶活性对茶叶品质的形成具有积极影响。本实验研究表明，采用三相分离纯化法获得 PPO 酶液，纯化效果较好，酶学性质稳定。纯化后茶叶 PPO 比活力为 210.46 U/mg，纯化倍数达到 15.67 倍。茶叶 PPO 对邻苯三酚亲和力最高，以邻苯二酚为底物时，PPO 的最适温度和最佳 pH 分别为 45 ℃ 和 5.5，同时在 25 ℃ 和 pH4.5~7.0 范围内具有较好的稳定性。在所检测的抑制剂中，抗坏血酸对茶叶 PPO 的抑制效果最好。综合认为在红茶生产中的鲜叶萎凋、发酵或体外酶促转化制备茶黄素时，均需控制好反应条件以保持 PPO 的最佳酶活性，促进酶促氧化过程的高效进行。此外，三相分离纯化法可用于茶叶 PPO 大规模的生产制备，为茶叶多酚氧化酶的分离纯化和产业化应用提供技术支撑。

参考文献

[1] MISHRA B B, GAUTAM S, SHARMA A. Purification and characterisation of polyphenol oxidase (PPO) from eggplant (*Solanum melongena*)[J]. Food Chemistry, 2012, 134(4): 1855−1861.

[2] STODT U W, BLAUTH N, NIEMANN S, et al. Investigation of processes in black tea manufacture through model fermentation (oxidation) experiments[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(31): 7854−7861.

[3] ZENG J, DU G, SHAO X, et al. Recombinant polyphenol oxidases for production of theaflavins from tea polyphenols[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 134: 139−145.

[4] PEREIRA-CARO G, MORENO-ROJAS J M, BRINDANI N, et al. Bioavailability of black tea theaflavins: Absorption, metabolism, and colonic catabolism[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(26): 5365−5374.

[5] SHARMA N, PHAN H T, CHIKAE M, et al. Black tea polyphenol theaflavin as promising antioxidant and potential copper chelator[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2020, 100(7): 3126−3135.

[6] 付亚轩, 孟宪钰, 杨洋, 等. 茶黄素抗肿瘤机制研究进展[J]. 云南中医中药杂志, 2018, 39(4): 87−91. [FU Y X, MENG X J, YANG Y, et al. Research progress of theaflavins' anti-tumor mechanism[J]. Yunnan Journal of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica, 2018, 39(4): 87−91.]

[7] HE H F. Research progress on theaflavins: Efficacy, formation, and preparation[J]. Food Nutrition Research, 2017, 61(1): 1344521.

[8] TAKEMOTO M, TAKEMOTO H. Synthesis of theaflavins and their functions[J]. Molecules, 2018, 23(4): 918.

[9] 张婉蓉. 产多酚氧化酶茶叶内生真菌的筛选及酶的分离纯化 [D]. 福州: 福建师范大学, 2015. [ZHANG W R. Screening for polyphenol oxidase-producing fungi from tea plants and enzyme purification[D]. Fuzhou: Fujian Normal University, 2015.]

[10] 白利涛, 张丽萍. 酶及蛋白质分离纯化技术研究进展[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(14): 8018−8020. [BAI L T, ZHANG L P. Research advance in the separation and purification technology of enzyme and protein[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2012, 40(14): 8018−8020.]

[11] 罗磊, 董金龙, 朱文学, 等. 金银花过氧化物酶的三相分离纯化及酶学性质[J]. 食品科学, 2017, 38(24): 20−27. [LUO L, DONG J L, ZHU W X, et al. Purification of peroxidase from *Lonicera japonica* Thunb. by three phase partitioning and enzymatic properties[J]. Food Science, 2017, 38(24): 20−27.]

[12] 蔡燕, 姜路云, 陈华旺, 等. 三相法分离番薯过氧化物酶[J]. 现代化工, 2019, 39(7): 127−132. [CAI Y, JIANG L Y, CHEN H W, et al. Separation of peroxidase from sweet potato by three-phase partitioning method[J]. Modern Chemical Industry, 2019, 39(7): 127−132.]

[13] 蔡燕, 田丹, 严鑫, 等. 一步法快速从脱脂豆粉中三相分离脂肪氧合酶[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(9): 149−153. [CAI Y, TIAN D, YAN Y, et al. One-step three-phase partitioning of lipoxygenase from defatted soy flours[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(9): 149−153.]

[14] ALICI E H, ARABACI G. Purification of polyphenol oxidase from borage (*Trachystemon orientalis* L.) by using three-phase partitioning and investigation of kinetic properties[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 93(Pt A): 1051−1056.
[15] 陈星星, 宋丽, 谷风林, 等. 三相分离法提取胡椒油树脂的工艺研究[J]. 热带作物学报, 2020, 41(8): 1674−1682. [CHEN X X, SONG L, GU F L, et al. Processing parameters of extracting pepper oleoresin by three phase partitioning[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2020, 41(8): 1674−1682.]
[16] 鞠兴荣, 严梅荣. 三相分离法提取米糠油的初步研究[J]. 中国粮油学报, 2007(6): 125−128. [JU X R, YAN M R. Preliminary study on extraction of rice bran oil by three phase partitioning[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2007(6): 125−128.]
[17] TENG J, GONG Z H, DENG Y L, et al. Purification, characterization and enzymatic synthesis of theaflavins of polyphenol oxidase isozymes from tea leaf (*Camellia sinensis*)[J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 84: 263−270.
[18] HAN Q Y, LIU F, LI M, et al. Comparison of biochemical properties of membrane-bound and soluble polyphenol oxidase from Granny Smith apple (*Malus×domestica* Borkh.)[J]. Food Chemistry, 2019, 289: 657−663.
[19] ÖZTÜRK C, AKSOY M, KÜFREVIOĞLU Ö İ. Purification of tea leaf (*Camellia sinensis*) polyphenol oxidase by using affinity chromatography and investigation of its kinetic properties[J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2020, 14(1): 31−38.
[20] ÜMIT Ü M, YABACI S N, ŞENER A. Extraction, partial purification and characterisation of polyphenol oxidase from tea leaf (*Camellia sinensis*)[J]. GIDA, 2011, 36(3): 137−144.
[21] ŞENER A, ÜNAL M Ü. Purification and characterization of polyphenol oxidase from Akko XIII loquat (*Eriobotrya japonica* cv. Akko XIII)[J]. Food Biotechnology, 2011, 25(1): 30−42.
[22] 伍梦瑶, 黄莹捷, 姚燕妮, 等. 勐库大叶种茶树多酚氧化酶粗酶的酶学性质[J]. 浙江大学学报 (农业与生命科学版), 2017, 43(5): 579−588. [WU M Y, HUANG Y J, YAO Y N, et al. Characterization of crude polyphenol oxidase isolated from *Camellia sinensis* var. *assamica* cv. Mengku[J]. Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Sciences), 2017, 43(5): 579−588.]
[23] 叶彩燕, 刘光, 杜念, 等. 黑芝麻多酚氧化酶的重组蛋白表达及其酶学特性[J]. 生物工程学报, 2022, 38(2): 1−11. [YE C Y, LIU G, DU N, et al. Recombinant expression and enzymatic properties of polyphenol oxidase in black sesame seeds[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(2): 1−11.]
[24] 滕杰. 茶叶多酚氧化酶同工酶分离鉴定及其酶促合成茶黄素研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2015. [TENG J. Isolation and identification of polyphenol oxidase isoenzyme from *Camellia sinensis* and it's the enzymatic synthesis of theaflavins[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2015.]
[25] 陈胜虎. 龙井 43 号茶树多酚氧化酶同工酶的分离纯化与 PPOⅢ-2、PPOⅤ-3 性质研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2016. [CHEN S H. Isolation and purification of polyphenol oxidase isoenzyme from *Camellia sinensis* var. Longjing 43, and enzymatic properties of PPO III-2 and PPO Ⅴ-3[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016.]
[26] 刘辉, 卢扬, 刘永翔, 等. 可溶态和膜结合态马铃薯多酚氧化酶性质对比[J]. 现代食品科技, 2020, 5(36): 51−56,294. [LIU H, LU Y, LIU Y X, et al. Comparison of properties of soluble and membrane bound potato polyphenol oxidase[J]. Modern Food Science & Technology, 2020, 5(36): 51−56,294.]
[27] 陈盛虎, 徐小云, 伍梦瑶, 等. 茶叶多酚氧化酶同工酶热稳定性分析[J]. 湖北农业科学, 2017, 56(1): 95−98. [CHEN S H, XU X Y, WU M Y, et al. Thermal stability analysis on polyphenol oxidase isozymes from *Camellia sinensis*[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2017, 56(1): 95−98.]
[28] WANG F, ZHOU H, CHENG F, et al. Comparison of the characterization and the temperature/pressure stability of soluble and membrane-bound polyphenol oxidase from 'Lijiang' snow peach[J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 146: 111401.
[29] 虞昕磊. 云南大叶种茶树多酚氧化酶的分离纯化与性质研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2015. [YU X L. Isolation, purification and characterization of polyphenol oxidase from *Camellia sinensis* var. *assamica*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2015.]
[30] 孙慕芳, 张洁, 郭桂义. 白毫早鲜叶茶多酚氧化酶酶学特性[J]. 贵州农业科学, 2014, 42(6): 140−143. [SUN M F, ZHANG J, GUO G Y. Features of polyphenol oxidase in baihaozao fresh tea leaves[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2014, 42(6): 140−143.]
[31] 王丽霞, 陆蒸, 林启训, 等. 福云 6 号茶叶茶多酚氧化酶特性的研究[J]. 江苏农业科学, 2008(1): 213−215. [WANG L X, LU Z, LIN Q X, et al. Study on polyphenol oxidase characteristics from tea Fuyun No. 6[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2008(1): 213−215.]
[32] 张书芹. 龙井 43 号多酚氧化酶同工酶质谱鉴定与酶性质研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2014. [ZHANG S Q. Mass spectrum identification and enzymatic properties of polyphenol oxidase isoznzyme from *Camellia sinensis* cv. Longjing 43[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2014.]
[33] 刘琨. 茶叶多酚氧化酶酶学特性及红外对其活力与构象的影响 [D]. 无锡: 江南大学, 2013. [LIU K. Research on the enzyme logical characteristics of polyphenol oxidase from tea and the effect of infraed on its activity and conformation[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2013.]
[34] MAYER A M. Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review[J]. Phytochemistry, 2006, 67(21): 2318−2331.
[35] 邱龙新, 黄浩, 陈清西. 半胱氨酸对马铃薯多酚氧化酶的抑制作用[J]. 食品科学, 2006, 27(4): 37−40. [QIU L X, HUANG H, CHEN Q X. Inhibitory effect on potato polyphenol oxidase activity by L-cysteine[J]. Food Science, 2006, 27(4): 37−40.]
[36] KUMAR V B A, MOHAN T C K, MURUGAN K. Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from Barbados cherry (*Malpighia glabra* L.)[J]. Food Chemistry, 2008, 110(2): 328−333.
[37] GAO Z J, HAN X H, XIAO X G. Purification and characterisation of polyphenol oxidase from red Swiss chard (*Beta vulgaris* subspecies *cicla*) leaves[J]. Food Chemistry, 2009, 117(2): 342−348.
[38] OROZCO P G, MORENO O A, ÁLVAREZ D L, et al. Purification and partial biochemical characterization of polyphenol oxidase from mamey (*Pouteria sapota*)[J]. Phytochemistry, 2011, 72(1): 82−88.

栗学清, 庞鑫, 高慧芳, 等. *Rheinheimera* sp.QH 胞外角蛋白酶 KerQH2 的生物信息学分析 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 125−130. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080111

LI Xueqing, PANG Xin, GAO Huifang, et al. Bioinformatics Analysis of Extracellular Keratinase KerQH2 from *Rheinheimera* sp.QH[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 125−130. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080111

·生物工程·

Rheinheimera sp.QH 胞外角蛋白酶 KerQH2 的生物信息学分析

栗学清[1], 庞　鑫[2], 高慧芳[3], 张廉芸[3], 宋英达[3], 武翠玲[1,*]

(1.长治医学院基础医学部生物化学与分子生物学教研室, 山西长治 046000;
2.长治医学院精神卫生系, 山西长治 046000;
3.长治医学院临床医学系, 山西长治 046000)

摘　要: 目的: 预测海洋菌 *Rheinheimera* sp.QH 分泌的角蛋白酶 KerQH2 的结构特征及与底物的互作位点, 为深入研究 KerQH2 对角蛋白底物的降解机理提供理论依据。方法: 应用生物信息学技术对 KerQH2 的结构特征、作用于角蛋白底物的可能位点及关键氨基酸等进行分析。结果: KerQH2 为 S8 家族丝氨酸蛋白酶, 其分子表面无规则卷曲占比较高, *α*-螺旋与 *β*-折叠占比较低且多位于酶分子内部。KerQH2 具有保守的催化三联体(Asp8、His41 和 Ser197), 催化三联体区域表面静电势为中性。KerQH2 催化结构域中含有大量保守的极性氨基酸及芳香族氨基酸, 与底物结合有关的序列富含 Gly 和 Ala。KerQH2 主要切割疏水性氨基酸 Val(V)/ILe(I) 和极性氨基酸 Cys(C)/Gln(Q) 之间形成的肽键。结论: 角蛋白酶 KerQH2 的特殊结构有助于其降解结构复杂角蛋白分子, 这可能是海洋菌对海洋寡营养环境的一种适应性。

关键词: 角蛋白酶, KerQH2, 海洋菌, *Rheinheimera* sp., 生物信息学
中图分类号: Q936　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0125−06
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080111
本文网刊:

Bioinformatics Analysis of Extracellular Keratinase KerQH2 from *Rheinheimera* sp.QH

LI Xueqing[1], PANG Xin[2], GAO Huifang[3], ZHANG Lianyun[3], SONG Yingda[3], WU Cuiling[1,*]

(1.Department of Biochemistry and Molecular Biology, Changzhi Medical College, Changzhi 046000, China;
2.Department of Mental Health, Changzhi Medical College, Changzhi 046000, China;
3.Department of Clinical Medicine, Changzhi Medical College, Changzhi 046000, China)

Abstract: Objective: To analyze and predict the structural characteristics and the site of interaction with the substrate of keratinase KerQH2 from marine bacteria *Rheinheimera* sp.QH, and to provide theoretical basis for further study on the degradation mechanism of keratin substrate by KerQH2. Methods: The bioinformatics technology was used to analyze the structural characteristics of keratinase KerQH2 and its possible sites and key amino acids on the keratin substrate. Results: KerQH2 was an S8 family serine protease, and the proportion of random coil on the molecular surface of KerQH2 was high; The proportion of *α*-helix and *β*-sheet was low, which were mainly located inside the enzyme molecule. KerQH2 contained a conserved catalytic triad in the order of Asp8, His41, Ser197. The surface electrostatic potential in the catalytic triad area was neutral. The KerQH2 catalytic domain contained a large number of conserved polar amino acids and aromatic amino acids, in addition to the sequences related to substrate binding were rich in Gly and Ala. KerQH2 mainly cut the peptide bond formed between hydrophobic amino acid Val(V)/ILe(I) and polar amino acid Cys(C)/Gln(Q). Conclusion: The

收稿日期: 2021−08−11
基金项目: 山西省自然科学基金项目(201801D221284);长治医学院科学技术带头人(XS202002)。
作者简介: 栗学清(1978−),女,硕士,讲师,研究方向:肿瘤分子生物学,E-mail:xueqing0810@163.com。
*** 通信作者:** 武翠玲(1979−),女,硕士,副教授,研究方向:蛋白酶结构与功能,E-mail:clw928@163.com。

special structure of KerQH2 helps to degrade complex keratins, which may be an adaptation of marine bacteria to marine oligotrophic environment.

Key words: keratinase; KerQH2; marine bacteria; *Rheinheimera* sp.; bioinformatics

角蛋白(keratin)广泛存在于生物体的组织结构中,包括软角蛋白和硬角蛋白两大类[1−3]。其中,纤维化的硬角蛋白在自然界中有多种存在形式,包括动物的毛发、羽毛、指甲、蹄、壳、爪、角和鳞片等。由于角蛋白富含二硫键并且高度交联,使其结构非常稳定,不易被普通蛋白酶水解[4−7]。近年来,随着养殖业的迅速发展,在畜禽产品加工过程中产生大量的毛发和羽毛等角蛋白废弃物,如不加以有效利用,既浪费资源又污染环境[8]。用传统的物理化学法降解角蛋白不仅存在工艺繁琐、条件剧烈、污染严重等问题,且氨基酸破坏严重,产物不均一,利用率低[9−11]。因此,探究高效、环保的角蛋白降解方法具有重要的应用价值。

角蛋白酶是一种特殊的蛋白酶类,能特异性降解角蛋白,在饲料和食品工业、医疗业、美容业、环境治理等方面具有广阔的应用前景[12−13]。如角蛋白酶可以降解羽毛等角蛋白,将其转化为动物蛋白质饲料;羽毛角蛋白中还含有丰富的谷氨酸、天冬氨酸等鲜味氨基酸,可以用来制作新型食品添加剂应用到食品加工业中;角蛋白酶可用于肉制品嫩化、燕窝脱毛以及蚕丝脱胶;角蛋白酶可改善药物在皮肤角质层中的通透性,提高皮肤外用药物的疗效;另外,角蛋白酶还可以用于头发护理品,脱毛膏的制作等[14−15]。目前市售角蛋白酶主要来源于陆地微生物,如 *Bacillus* sp.、*Xanthomonas maltophilia* 和 *Stenotrophomonas* sp.[16−18] 等。有关海洋菌来源的角蛋白酶报道较少,且缺乏系统的研究。海洋菌分泌的蛋白酶具有陆地菌无法比拟的优越性,如对盐、去污剂及有机溶剂等的耐受性比较好,在皮革生产、污水处理等盐离子浓度和有机溶剂浓度较高的工业环境中具有更为实际的应用价值和广阔的应用前景。此外,海洋菌分泌的蛋白酶在较低的温度下仍具有较高的酶活性[19−20],在实际应用中可有效节约成本。因此,探索海洋菌来源的角蛋白酶及其催化机制具有重要的意义。

角蛋白酶 KerQH2 来源于海洋菌 *Rheinheimera* sp.QH,前期研究发现 KerQH2 对羽毛角蛋白具有高效降解能力,且对有机试剂和去污剂具有很强的耐受性,具有潜在的工业应用价值。本文利用生物信息学软件对角蛋白酶 KerQH2 的氨基酸组成特点、结构特征,对不同不可溶角蛋白底物的酶切位点、与底物分子的相互作用及发挥作用的可能关键氨基酸位点进行了预测,以期为深入探究角蛋白酶 KerQH2 高效降解角蛋白的催化机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

Rheinheimera sp.QH 分离自渤海潮间带,将菌株 *Rheinheimera* sp.QH 活化后接种于发酵培养基,20 ℃,200 r/min,培养 96 h,8000×g 离心 10 min,上清即为粗酶液。粗酶液经离子交换层析、SDS-PAGE 纯化后得到角蛋白酶 KerQH2,对 KerQH2 进行质谱鉴定,结果显示 KerQH2 为 S8 家族丝氨酸蛋白酶。

1.2 实验方法

利用相关生物信息学分析软件及在线工具对 KerQH2 氨基酸序列进行分析,表 1 列出分析项目所应用的在线工具及网址。

表 1 生物信息学分析工具

Table 1 Bioinformatics analysis tools

分析项目	分析工具
序列查询	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Protein
结构查询	http://www.rcsb.org/
理化性质	ExPASy:ProtParam(https://web.expasy.org/Protparam/)
亲疏水性	ExPASy:ProtSale(https://web.expasy.org/Protscale/)
多序列比对	MEGA6.0(http://www.megasoftware.net/mega)
切割位点预测	Prosper(https://Prosper.erc.monash.edu.au/home.html)
二级结构预测	PredictProtein(https://www.predictProtein.org/)
三级结构预测	SWISS-MODEL(https://swissmodel.expasy.org/)
可视化处理	Discovery Studio 2016软件
分子对接	Discovery Studio 2016软件
表面静电势分析	PyMol 2.5.0

2 结果与分析

2.1 角蛋白酶 KerQH2 的理化性质分析

通过 ExPASy: ProtParam(https://web.expasy.org/Protparam/)对角蛋白酶 KerQH2 的氨基酸组成及理化性质进行分析(表 2),发现 Gly(11.41%)、Ala(11.98%)、Val(7.79%)与 Ser(10.27%)含量相对较高,Cys(1.33%)与 Trp(1.52%)含量较低,碱性氨基酸(Arg、Lys、His)含量略高于酸性氨基酸(Asp、Glu),等电点 7.18,脂肪指数 70.2,蛋白酶不稳定系数小于 40,稳定性较好。由 ProtScale 的 K-D 预测算法对 KerQH2 的疏水性进行分析,结果显示为亲水性蛋白质。

表 2 角蛋白酶 KerQH2 的氨基酸组成

Table 2 Amino acid composition of keratinase KerQH2

氨基酸	占比(%)	氨基酸	占比(%)	氨基酸	占比(%)	氨基酸	占比(%)
Ala	11.98	Thr	7.22	Pro	3.8	Arg	2.47
Gly	11.41	Leu	5.32	Tyr	3.8	Phe	2.28
Ser	10.27	Gln	4.37	Asp	3.23	His	2.28
Val	7.79	Lys	3.8	Glu	3.04	Trp	1.52
Asn	7.79	Ile	3.8	Met	2.47	Cys	1.33

2.2 角蛋白酶 KerQH2 的二级结构分析

通过 PredictProtein(https://www.predictProtein.

org/)网站对角蛋白酶 KerQH2 的二级结构进行预测，结果显示 KerQH2 中 α-螺旋和 β-折叠总的占比较低(分别为 14.1% 和 23.2%)，无规则卷曲的含量为 62.7%。其中溶剂可及性分析显示 α-螺旋与 β-折叠多分布于酶分子的内部，而无规则卷曲多处于酶分子表面。有研究表明，β-折叠和 α-螺旋等二级结构形式更有利于维持蛋白质结构的稳定性[21−22]，而无规则卷曲则更易于去折叠而使蛋白质构象发生改变[23]，推测该结构特征有助于 KerQH2 对结构复杂角蛋白的降解。此外，前期酶学性质研究发现角蛋白酶 KerQH2 相较于已报道的角蛋白酶在催化性能方面具有的一些优越性，如对有机溶剂 DMSO、氯仿、乙醇的耐受性极好，SDS 对酶具有一定的促进作用等，这些特性可能与其结构特征有一定的相关性。

2.3　角蛋白酶 KerQH2 的底物裂解位点预测

从 UniProt 数据库中选取角蛋白序列 P02451(*Larus novaehollandiae*)、P02450(*Gallus gallus*)、Q9BYR7(*Homo sapiens*)、Q24JX8(*Bos taurus*)、P02445(*Ovis aries*)和 P02447(*Capra hircus*)，利用蛋白酶特异性预测服务器 Prosper (https://Prosper.erc.monash.edu.au/home.html)，对角蛋白酶 KerQH2 的底物裂解位点进行预测[24]。不同类型蛋白酶具有不同的酶切位点，蛋白酶主要包括天冬氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、金属蛋白酶和丝氨酸蛋白酶等类型，角蛋白酶 KerQH2 为 S8 家族丝氨酸蛋白酶，图 1 和表 3 显示了角蛋白酶 KerQH2 对不同来源角蛋白的裂解位点。角蛋白酶 KerQH2 主要切割疏水性氨基酸 Val(V)/ILe(I)和极性氨基酸 Cys(C)/Gln(Q)之间形成的肽键。KerQH2 在底物角蛋白 Q9BYR7、P02445 和 Q24JX8 上的酶切位点更丰富，因此推测 KerQH2 对人、牛和绵羊来源角蛋白的降解效率更高。

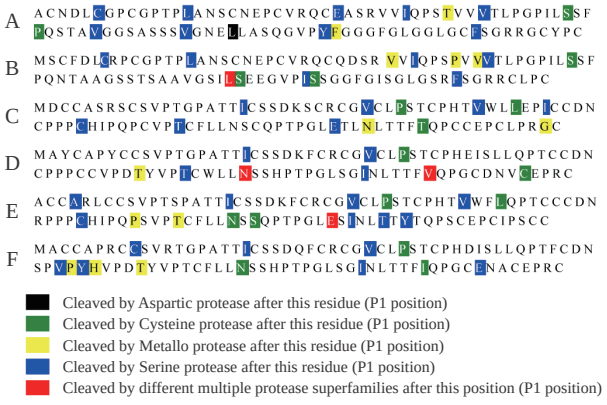


图 1　角蛋白酶 KerQH2 在底物角蛋白上的裂解位点

Fig.1　The cleavage sites of keratinase KerQH2 on the keratin

注：底物角蛋白分别是 A: *Larus novaehollandiae*(P02451)、B: *Gallus gallus*(P02450)、C: *Homo sapiens*(Q9BYR7)、D: *Bos taurus*(Q24JX8)、E: *Ovis aries*(P02445)和 F: *Capra hircus*(P02447)；丝氨酸蛋白酶的裂解位点用蓝色表示。

2.4　多序列比对分析

对 KerQH2 以及从 NCBI 下载的 15 个 *Rheinheimera* 属和 *Bacillus* 属来源的角蛋白酶催化结构域进行多序列比对，结果如图 2 所示，不同来源角蛋白酶由 Asp(D8)、His(H41)和 Ser(S197)构成的催化三联体高度保守。其中，Asp(D8)位于基序 Xaa-Xaa-Asp-Xbb-Gly中(Xaa 为非极性氨基酸，Xbb 为极性氨基酸)，His(H41)位于基序 His-Gly-Thr-Xcc-Xaa-Ala-Gly 中(Xcc 为 His/Ala)，Ser(S197)位于基序 Gly-Thr-Ser-Met-Ala-Xbb-Xaa 中。一些极性氨基酸和芳香族氨基酸也高度保守，如：Asp(17、37)、Thr(43、184、196)、Asn(54、135)、Ser(105、166、183)、Pro(144、177)和 Tyr(147、190)等。这些氨基酸可能在底物结合中发挥着重要作用[25−26]。而大量保守的 Gly 和 Ala，则由于其分子侧链较小，因此赋予了角蛋白酶较大的自由度。此外，还存在一些共有序列如：Ser105-Gly109、Ala132-Ala136 和 Ser142-Ala145 等。上述结构特征，可能在 KerQH2 降解不可溶底物中发挥着重要作用。

表 3　角蛋白酶 KerQH2 对角蛋白的裂解位点

Table 3　Keratinase KerQH2 cleavage sites on the keratin

来源	氨基酸登录号	名称	位点	切割位点	得分
Larus novaehollandiae (Silver gull)	P02451	羽毛角蛋白	33	RVVI|QPST	1.10
			56	STAV|GGSA	1.04
			40	TVVV|TLPG	0.97
			64	SSSV|GNEL	0.94
Gallus gallus (Chicken)	P02450	羽毛角蛋白	41	RVVI|QPSP	1.15
			76	GVPI|SSGG	1.12
			34	RVVI|QPSP	1.10
Homo sapiens (Human)	Q9BYR7	头发角蛋白	19	ATTI|CSSD	1.10
			40	PHTV|WLLE	1.06
			30	RCGV|CLPS	1.03
			46	LEPI|CCDN	1.01
			64	CVPT|CFLL	0.99
Bos taurus (Cattle)	Q24JX8	头发角蛋白	80	LSGI|NLTT	1.23
			19	ATTI|CSSD	1.10
			64	YVPT|CWLL	1.10
			30	RCGV|CLPS	1.03
			86	TTFV|QPGC	1.00
Ovis aries (Sheep)	P02445	羊毛角蛋白	80	LESI|NLTT	1.12
			18	ATTI|CSSD	1.10
			83	INLT|TYTQ	1.07
			29	RCGV|CLPS	1.03
			4	ACCA|RLCC	1.02
			39	PHTV|WFLQ	1.01
Capra hircus (Goat)	P02447	羊毛角蛋白	80	LSGI|NLTT	1.23
			19	ATTI|CSSD	1.10
			30	RCGV|CLPS	1.03
			53	NSPV|PYHV	1.02

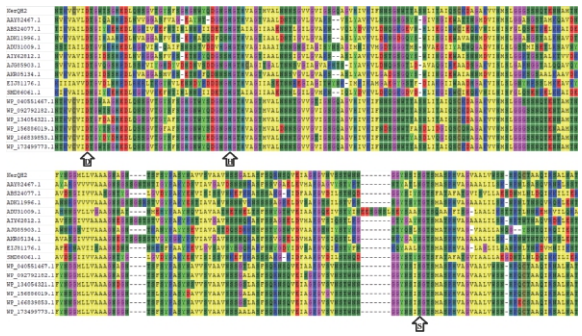


图 2 角蛋白酶的多序列比对分析

Fig.2 Multiple sequences alignment analysis of keratinase protein sequences

注: 箭头所指处为高度保守的催化三联体, 包括 Asp(D8)、His(H41)和 Ser(S197)。

2.5 角蛋白酶 KerQH2 的同源建模及表面静电势分析

利用在线软件 SWISS-MODEL(https://swissmodel.expasy.org/)蛋白质建模数据库, 以枯草杆菌蛋白酶(PDB: 1SCN.1.N, 相似度 45.98%)为模板进行同源建模, 获得角蛋白酶 KerQH2 催化结构域的模型。利用蛋白质分析软件 Discovery Studio 2016 分析其结构, 发现 KerQH2 催化结构域含有 5 个 α-螺旋、8 个 β-折叠, 其中 Asp8、His41 和 Ser197 构成催化三联体。通过 PyMol 2.5.0 软件对 KerQH2 进行表面静电势分析, 结果如图 3 所示, 角蛋白酶 KerQH2 中催化三联体所处空穴多为不带电荷区域, 这与文献报道的来自 *Pyrococcus furiosus*(PMDB ID: PM0075943)的丝氨酸蛋白酶有所不同, 同时研究中还提到蛋白酶的功能多样性及环境适应性与其表面静电势分布有关[27], 因此推测角蛋白酶 KerQH2 催化三联体区域的表面静电势分布可能与其对不可溶角蛋白底物的特异性吸附、降解有关。

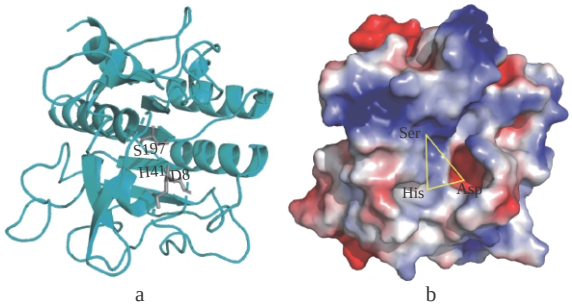


图 3 角蛋白酶 KerQH2 催化结构域的同源模建

Fig.3 Modeled catalytic domain of keratinase KerQH2

注: a: 带状模型(显示了 α-螺旋、β-折叠、无规则卷曲及催化三联体); b: 表面静电势模型(蓝色: 正电荷区域; 红色: 负电荷区域; 灰色: 不带电荷区域)。

2.6 角蛋白酶 KerQH2 与底物 Q9BYR7 的分子对接

以枯草杆菌蛋白酶为模板进行同源建模, 获得角蛋白酶 KerQH2 催化结构域的模型, 以 PDB:6u9w.1.A 为模板进行同源建模, 获得底物 Q9BYR7 的结构模型。通过 Discovery studio 分别生成 KerQH2 及底物 Q9BYR7 的拉氏图, 以评价模型的合理性。如图 4c 中允许区(蓝色区域)和最大允许区(紫色区域)内的氨基酸为合理氨基酸, 不允许区域(空白区域)的氨基酸为不合理氨基酸。从拉氏图可以看出, 超过 90% 的氨基酸残基都落在允许区域和最大允许区域内, KerQH2 与 Q9BYR7 的三维结构模型是可信的, 可以用于进一步研究。

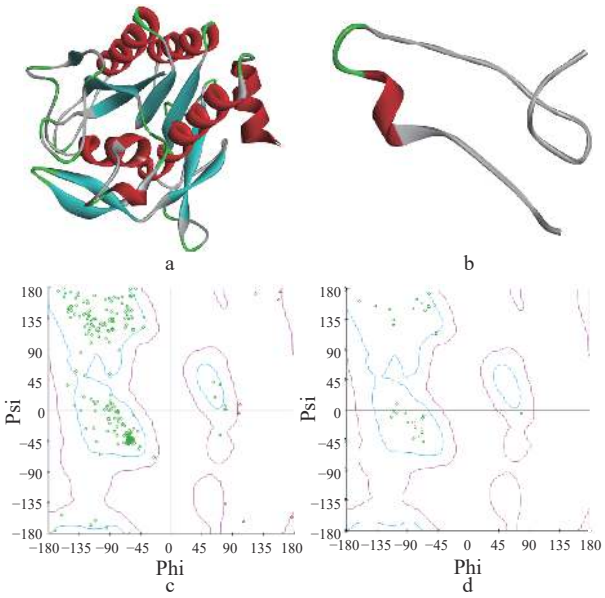


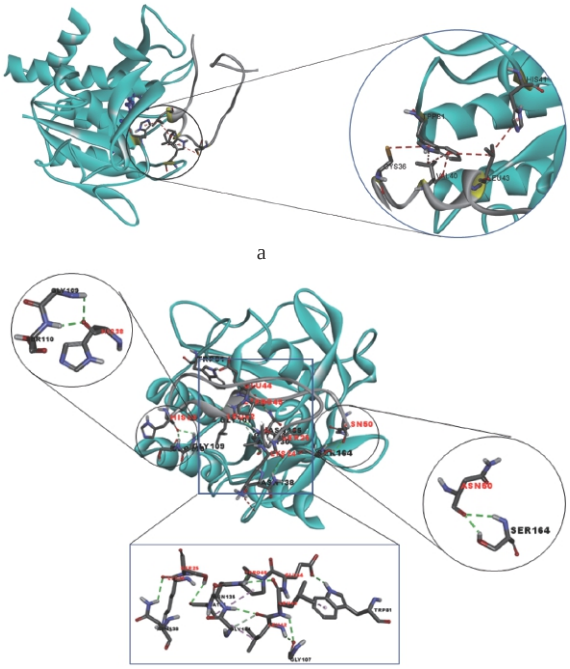
图 4 角蛋白酶 KerQH2 和角蛋白 Q9BYR7 的建模结果及拉氏图

Fig.4 The modeling results and Ramachandran plots of keratinase KerQH2 and keratin Q9BYR7

a: 角蛋白酶 KerQH2 的三维结构; b: 角蛋白 Q9BYR7 的三维结构; c: 角蛋白酶 KerQH2 的拉氏图; d: 角蛋白 Q9BYR7 的拉氏图。

将角蛋白酶 KerQH2 的催化结构域和底物角蛋白 Q9BYR7 同时置于一个 CELL 晶格中, 在 DOCK PROTEINS 模块中进行对接, 欧拉角度设置为 6°。蛋白对接结果显示(图 5), KerQH2 与 Q9BYR7 的 Zdock Score 为 12.14, E-Rdock 为-24.7547, 结合较好。分析对接结果, KerQH2 有 32 个氨基酸残基在理论上能够与 Q9BYR7 的 17 个氨基酸残基发生相互作用, 维持结合稳定性。KerQH2 中互作氨基酸分别为: His41、Phe75、Gly79、Trp81、Thr82、Ser105-Ser111、Gly134-Thr139、Ser142、Tyr143、Val156、Asn157、Leu162-Phe165、Gln167、Val179、Asn180、Ile193、Ser194、Gly195 和 Ser197。Q9BYR7 中互作氨基酸分别为: Lys24、Ser25、Arg27、Cys36、His38-Cys48、Asn50 和 Cys51。KerQH2 与 Q9BYR7 的氨基酸残基形成三组分子间氢键, 其中, Ser164:Asn50 和 Gly109-Ser110:His38 两组氢键单独存在, 位于相互作用面的两侧, 使酶催化结构域的构象发生了轻微改变, “凹”字型的凹陷处向外撑开, 暴露出酶的催化三联体(Asp8、His41 和 Ser197)。而 Gly134:Leu42、Asn135:(Leu42、Leu43、Pro45)、Ala136:Ser25、Asn138:Lys24、Trp81:Glu44 和 Gly107:(Leu42、Leu43)这六个氢键构成一组氢键, 位于相互

作用面中心，使酶-底物复合物结构更加稳定。KerQH2 与 Q9BYR7 形成 His41:Leu43 和 Trp81:(Cys36、Val40、Leu43)两处 Pi 键，维持着酶-底物复合物的稳定性。



a

b

图 5　角蛋白酶 KerQH2 与底物 Q9BYR7 的分子对接

Fig.5　Molecular docking of keratinase KerQH2 with substrate Q9BYR7

注：a：Pi 键；b：氢键。

此外，结合 KerQH2 与底物 Q9BYR7 的分子对接结果进行分析，发现共有序列 Ser105-Gly109、Ala132-Ala136 和 Ser142-Ala145 参与了底物的结合，同时，共有序列中富含的 Gly 和 Ala 不仅增加了结合位点的疏水性，而且减少了侧链空间位阻，更有利于角蛋白酶与底物的结合，与文献中的报道一致[28]。

2.7　系统发育分析

将 KerQH2 的氨基酸序列以及从 NCBI 下载的 15 个 *Rheinheimera* 属和 *Bacillus* 属来源的角蛋白酶氨基酸序列，运用 MEGA 6.0 软件中的邻接法(neighbor-joining, NJ)进行分子系统发育分析，采用默认参数，得到分子进化树(图 6)，可以较为精确地确定其进化地位[29−30]。角蛋白酶 KerQH2 和 *Rheinheimera* 属来源的蛋白 WP173499773.1 分支聚在一起，具有较近的亲缘关系，且不同种属来源的角蛋白酶具有一定的保守性。

3　结论

对海洋菌 *Rheinheimera* sp.QH 分泌的角蛋白酶 KerQH2 的结构特征、角蛋白底物的作用位点及关键氨基酸位点的预测结果表明，角蛋白酶 KerQH2 的特殊结构有助于其降解结构复杂的角蛋白分子，这可能是海洋菌对海洋寡营养环境的一种适应性[31−32]。本研究结果为进一步深入研究 KerQH2 的降解机制

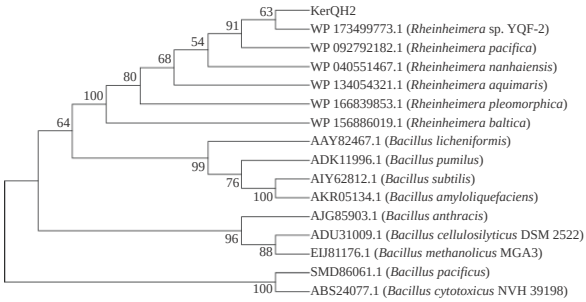


图 6　角蛋白酶 KerQH2 的系统发育分析

Fig.6　Phylogenetic analysis of the keratinase KerQH2

提供了一定的理论依据，为角蛋白酶 KerQH2 的推广和应用奠定了一定的理论基础。后期本团队将针对这些位点，构建一系列突变体，进一步验证这些氨基酸对角蛋白酶 KerQH2 活性的影响。

参考文献

[1] YU J L, YU D W, CHECKLA D M, et al. Human hair keratins[J]. Journal of Investigative Dermatology, 1993, 101(1): 56S−59S.

[2] EHRLICH F, LACHNER J, HERMANN M, et al. Convergent evolution of cysteine-rich keratins in hard skin appendages of terrestrial vertebrates[J]. Molecular Biology and Evolution, 2020, 37(4): 982−993.

[3] LI Q X. Progress in microbial degradation of feather waste[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2717.

[4] VIDMAR B, VODOVNIK M. Microbial keratinases: Enzymes with promising biotechnological applications[J]. Food Technology & Biotechnology, 2018, 56(3): 312−328.

[5] GHAFFAR I, IMTIAZ A, HUSSAIN A, et al. Microbial production and industrial applications of keratinases: An overview[J]. International Microbiology, 2018, 21(4): 163−174.

[6] VERMA A, SINGH H, ANWAR S, et al. Microbial keratinases: Industrial enzymes with waste management potential[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2017, 37(4): 476−491.

[7] ABDEL-NABY M A, EL-REFAI H A, IBRAHIM M H A. Structural characterization, catalytic, kinetic and thermodynamic properties of keratinase from *Bacillus pumilus* FH9[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 105(Pt 1): 973-980.

[8] CHOIŃSKA-PULIT A, ŁABA W, RODZIEWICZ A. Enhancement of pig bristles waste bioconversion by inoculum of keratinolytic bacteria during composting[J]. Waste Management, 2019, 84: 269−276.

[9] LI Z W, LIANG S, KE Y, et al. The feather degradation mechanisms of a new *Streptomyces* sp. isolate SCUT-3[J]. Communications Biology, 2020, 3(1): 191−203.

[10] SHARMA I, KANGO N. Production and characterization of keratinase by *Ochrobactrum intermedium* for feather keratin utilization[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 166: 1046−1056.

[11] SHAVANDI A, SILVA T H, BEKHIT A A, et al. Keratin: Dissolution, extraction and biomedical application[J]. Biomaterials Science, 2017, 5(9): 1699−1735.

[12] NNOLIM N E, UDENIGWE C C, OKOH A I, et al. Microbi-

al keratinase: Next generation green catalyst and prospective applications[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 580164.

[13] UTOMO B, DJALALROSYIDI L E R, PUSPANINGSIH N N T, et al. Cleaning method by keratinase enzyme for improving quality edible bird nest[J]. Journal of Life Science and Biomedicine, 2014, 4(5): 416−420.

[14] ODETALLAH N H, WANG J J, GARLICH J D, et al. Keratinase in starter diets improves growth of broiler chicks[J]. Poultry Science, 2003, 82(4): 664−670.

[15] BRANDELLI A, DAROIT D J, RIFFEL A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 85(6): 1735−1750.

[16] VASILEVA-TONKOVA E, GOUSTEROVA A, NESHEV G. Ecologically safe method for improved feather wastes biodegradation[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2009, 63(8): 1008−1012.

[17] 李雷, 冯红. 两株芽孢杆菌降解羽毛比较及抗氧化肽分离[J]. 应用与环境生物学报, 2018, 24(1): 172−176. [LI L, FENG H. Comparison of feather degradation by two *Bacillus* strains and separation of antioxidant peptides[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2018, 24(1): 172−176.]

[18] LANGE L, HUANG Y, BUSK P K. Microbial decomposition of keratin in nature-a new hypothesis of industrial relevance[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(5): 2083−2096.

[19] ZHANG C, KIM S K. Research and application of marine microbial enzymes: Status and prospects[J]. Marine Drugs, 2010, 8(6): 1920−1934.

[20] BONUGLI-SANTOS R C, DOS SANTOS VASCONCELOS M R, PASSARINI M R, et al. Marine-derived fungi: Diversity of enzymes and biotechnological applications[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 269−283.

[21] JAMIR K, SESHAGIRIRAO K. Fluorescence quenching, structural and unfolding studies of a purified cysteine protease, ZCPG from *Zingiber montanum* rhizome[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 106: 277−283.

[22] 武翠玲, 宋英达, 高慧芳, 等. Salinivibrio sp.YH4 胞外丝氨酸蛋白酶 EYHS 耐盐性及生物信息学分析[J]. 盐湖研究, 2021, 29(1): 105−110. [WU C L, SONG Y D, GAO H F, et al. Salt-tolerance and bioinformatics analysis on the serine protease EYHS secreted by *Salinivibrio* sp. YH4[J]. Journal of Salt Lake Research, 2021, 29(1): 105−110.]

[23] AHMAD S, KUMAR V, RAMANAND K B, et al. Probing protein stability and proteolytic resistance by loop scanning: A comprehensive mutational analysis[J]. Protein Science, 2012, 21(3): 433−446.

[24] EMAMEH R Z, KAZOKAITĖ J, YAKHCHALI B. Bioinformatics analysis of extracellular subtilisin E from *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2021, 4: 1−8.

[25] 蒋少龙, 蔡俊. 角蛋白酶及其应用研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(6): 348−354, 360. [JIANG S L, CAI J. Research progress of keratinase and its application[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(6): 348−354, 360.]

[26] HE H L, GUO J, CHEN X L, et al. Structural and functional characterization of mature forms of metalloprotease E495 from Arctic sea-ice bacterium *Pseudoalteromonas* sp. SM495[J]. PLoS One, 2012, 7(4): e35442.

[27] LASKAR A, RODGER E J, CHATTERJEE A, et al. Modeling and structural analysis of evolutionarily diverse S8 family serine proteases[J]. Bioinformation, 2011, 7(5): 239−245.

[28] FANG Z, ZHANG J, LIU B H, et al. Insight into the substrate specificity of keratinase KerSMD from *Stenotrophomonas maltophilia* by site-directed mutagenesis studies in the S1 pocket[J]. RSC Advances, 2015, 5: 74953−74960.

[29] 李宁, 王柏柯, 杨生保, 等. 21 种植物八氢番茄红素合成酶的生物信息学分析[J]. 新疆农业科学, 2015, 52(12): 2157−2165. [LI N, WANG B K, YANG S B, et al. Bioinformatics analysis of PSY in 21 plant species[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2015, 52(12): 2157−2165.]

[30] 富玉竹, 李欣, 李晔, 等. 16 种微生物蛋白酶的生物信息学分析[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(4): 65−72. [FU Y Z, LI X, LI Y, et al. Bioinformatics analysis of sixteen microbial proteases[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2020, 48(4): 65−72.]

[31] VALENCIA R, GONZÁLEZ V, UNDABARRENA A, et al. An integrative bioinformatic analysis for keratinase detection in marine-derived *Streptomyces*[J]. Marine Drugs, 2021, 19(6): 286.

[32] NGUYEN T T H, MYROLD D D, MUELLER R S. Distributions of extracellular peptidases across prokaryotic genomes reflect phylogeny and habitat[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 413.

张桂容, 冯洁雅, 蔡吉, 等. 四川晒醋固态发酵过程中理化因子与真菌群落结构的动态变化规律 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 131−138. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080149

ZHANG Guirong, FENG Jieya, CAI Ji, et al. Dynamic Changes of Physicochemical Properties and Fungal Community Structure during Solid-state Fermentation of Sichuan Sun Vinegar[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 131−138. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080149

· 生物工程 ·

四川晒醋固态发酵过程中理化因子与真菌群落结构的动态变化规律

张桂容[1], 冯洁雅[1,2], 蔡　吉[1], 附俊杰[1], 李　丽[1,*], 刘　军[1], 温雪瓶[1], 曹　荣[3]

(1.四川轻化工大学生物工程学院, 四川 宜宾 644000;
2.丰谷酒业有限责任公司, 四川 绵阳 621023;
3.四川太源井醋业有限公司, 四川 自贡 643000)

摘　要: 为了探究四川晒醋发酵过程中真菌群落的演替及关键理化因子的变化规律，本文利用国标法和高通量测序技术对醋醅的理化指标和真菌群落进行了解析，同时结合真菌群落和理化因子进行冗余分析，找出影响真菌群落变化的关键理化因子。结果表明，随着发酵的进行，醋醅的 pH 降低，水分、温度基本保持稳定，总酸、氨态氮含量先持续增加后保持稳定，还原糖含量先增加后减少。通过高通量测序结果表明，四川晒醋固态发酵过程中共有 9 个门、299 个属水平的真菌参与演替变化。毕赤酵母属（*Pichia*）和横梗霉属（*Lichtheimia*）为主要优势真菌。经过聚类分析，可将固态发酵过程分为 3 个阶段（第 1 发酵阶段，第 1~8 d；第 2 发酵阶段，第 9~12 d；第 3 发酵阶段，第 14~16 d）。由冗余分析结果可知，氨态氮、总酸是影响真菌群落结构的主要因素，氨态氮、总酸与发酵第 1~8 d 的真菌群落呈负相关，与发酵第 9~16 d 的真菌群落呈正相关。该研究揭示了晒醋固态发酵过程中的真菌群落的多样性和演替规律及其影响因素，为掌握固态发酵过程中真菌的变化规律以及后续与风味物质的关联奠定基础。

关键词: 四川晒醋, 真菌群落, 高通量测序, 理化因子, 冗余分析

中图分类号: TS201.3　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0131−08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080149

本文网刊:

Dynamic Changes of Physicochemical Properties and Fungal Community Structure during Solid-state Fermentation of Sichuan Sun Vinegar

ZHANG Guirong[1], FENG Jieya[1,2], CAI Ji[1], FU Junjie[1], LI Li[1,*], LIU Jun[1], WEN Xueping[1], CAO Rong[3]

(1.College of Bioengineering, Sichuan University of Science & Engineering, Yibin 644000, China;
2.Forgood Distillery Co., Ltd., Mianyang 621023, China;
3.Sichuan Taiyuanjing Vinegar Industry Co., Ltd., Zigong 643000, China)

Abstract: In order to explore the succession of fungal community and key physicochemical properties in the fermentation process of Sichuan sun vinegar, the physicochemical properties and fungal communities of vinegar fermented grains were analyzed by national standard method and high-throughput sequencing technology. At the same time, the redundancy analysis was carried out combined with fungal community and physicochemical properties to find out the key physicochemical properties affecting the change of fungal community. The results showed that with the fermentation, the pH of vinegar fermented grains decreased, the moisture and temperature remained stable, the total acid and ammonia nitrogen content increased first and then remained stable, and the reducing sugar content increased first and then decreased.

收稿日期: 2021−08−16

基金项目: 四川省科技厅重点研发项目（2021YFN0095）。

作者简介: 张桂容（1995−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 微生物发酵, E-mail: 1663232307@qq.com。

*** 通信作者:** 李丽（1982−）, 女, 博士, 教授, 研究方向: 微生物发酵代谢调控, E-mail: li_li821008@163.com。

The results of high-throughput sequencing showed that there were 9 phyla and 299 genera involved in the succession of fungi during the solid-state fermentation of Sichuan sun vinegar. *Pichia* and *Lichtheimia* were the dominant fungi. Through cluster analysis, the solid-state fermentation process could be divided into three stages (the first fermentation stage, days 1~8, the second fermentation stage, days 9~12, the third fermentation stage, days 14~16). The results of redundancy analysis showed that ammonia nitrogen and total acid were the main factors affecting the fungal community. Ammonia nitrogen and total acid were negatively correlated with fermentation days 1~8, and positively correlated with the fungal community at days 9~16 of fermentation. This study revealed the diversity, succession and influencing factors of fungal communities in the solid-state fermentation process of sun vinegar, which laid the foundation for mastering the variation law of fungi in the solid-state fermentation process and the subsequent association with flavor substances.

Key words: Sichuan sun vinegar; fungal community; high-throughput sequencing; physicochemical properties; redundancy analysis

四川晒醋是麸醋的一类，多产于川南地区。四川晒醋是以麸皮为主料，辅以多种中草药制曲为发酵剂，经过固态发酵、晒醅、晒醋液、灭菌等多道工序酿造而成的具有色泽棕褐、醇香回甜、酸味柔和、浓稠等独特风格的食醋[1−2]。晒醋采用传统的生料固态发酵工艺，发酵过程中糖化、酒化、醋化在一个发酵池内同时进行(即三边同池发酵)，多种微生物交相演替，共同构成晒醋的独特风味。因此，研究晒醋发酵过程中的微生物群落，对于晒醋风味形成、工艺改进、产品开发等具有重要意义。

随着二代测序技术的发展，高通量测序技术因其通量高、速度快、准确度高、无需建库、简便高效等特点[3−4] 广泛应用于食醋发酵过程的微生物群落研究中，王宗敏[5] 利用高通量测序技术对镇江香醋的微生物群落进行研究，发现乳杆菌、醋酸杆菌、曲霉属、链格孢霉属在醋酸发酵过程占优势地位；刘廷锐[6] 的研究表明：四川麸醋中的优势细菌也是乳杆菌属、醋杆菌属，并结合理化因子进行 CCA 分析发现酒度、酸度与发酵过程具有一定相关性。ZHU 等[7] 利用高通量测序技术对山西老陈醋醋酸发酵过程的细菌群落的演替进行分析，发现发酵第 0 d 至第 4 d 以泛菌属(*Pantoea*)、片球菌属(*Pediococcus*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、根瘤菌属(*Rhizobium*)为主，发酵第 5~21 d 以乳杆菌属(*Lactobacillus*)为主，发酵第 22~26 d 以醋酸菌属(*Acetobacter*)、*Komagataeibacter* 和 *Kroppenstedtia* 为主。崔宁波[8] 利用高通量测序技术发现生料酿醋发酵过程中以酿酒酵母和黑曲霉为优势真菌。目前，对于四川晒醋的细菌群落已有研究[9]，而对于四川晒醋的真菌群落研究较少。从以往研究来看，真菌是食醋发酵过程中一类重要的微生物，包括酵母菌、曲霉、青霉等，在发酵过程中不仅起着糖化、液化等作用，还与食醋风味、品质等紧密相关。比如：酵母菌不仅能产生醇类、酯类等挥发性风味物质，还能产生四甲基吡嗪的前体物质—乙偶姻[10]。王宗敏[5] 通过 O2PLS 相关性分析发现镇江香醋醋酸发酵过程中真菌与一部分氨基酸和风味物质相关；浙江玫瑰醋发酵过程中红曲霉属、假丝酵母属对醇类、醛类、酯类等风味物质有重要作用[11]。可见真菌在食醋发酵过程中起重要作用。

本文采用 ITS 高通量测序研究了四川晒醋在固态发酵过程中的真菌群落变化规律，并探究了理化因子的变化规律及不同发酵阶段的差异微生物。通过冗余分析探究真菌群落动态演替与理化因子的关系，掌握真菌变化与代谢产物以及产品质量之间的关联，为晒醋的人工调控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料及仪器

样品　采集于四川某晒醋厂。从翻醅车间的固态发酵过程取样，从发酵第 1 d 开始每天定时取样，样品包括第 1 d(F1)、第 2 d(F2)、第 3 d(F3)、第 4 d(F4)、第 5 d(F5)、第 6 d(F6)、第 7 d(F7)、第 8 d(F8)、第 9 d(F9)、第 10 d(F10)、第 11 d(F11)、第 12 d(F12)、第 13 d(F13)、第 14 d(F14)、第 15 d(F15)和第 16 d(F16)的醋醅，共计 16 个样品。固定 10 个取样点，从醋醅表面向下 10~30 cm 处取样，将样品混合均匀，保存于−20 ℃ 冰箱中，采集结束后，运送回实验室，保存于−70 ℃ 冰箱中，待检测；土壤 DNA 提取试剂盒(Omega E.Z.N.A.® Soil DNA Kit)　OMEGA；Agarose、TAE　Invitrogen；Marker　Takara；甲醛溶液、3, 5-二硝基水杨酸、苯酚、亚硫酸钠、酒石酸钾钠、氢氧化钠、甲醛溶液、3, 5-二硝基水杨酸、苯酚　均为分析纯，天津市致远化学试剂有限公司；亚硫酸钠、四水酒石酸钾钠　均为分析纯，成都科隆化学品有限公司。

AT-710 pH 计　京都电子 KEM；MB25 水分测定仪　OHAUS；T6 分光光度计　新世纪，普析通用；NC2000 Nanodrop　Thermo Scientific；DYY-6C 电泳仪　北京六一；BG-gdsAUTO(130)凝胶成像系统　北京百晶；Illumina MiSeq 测序平台　美国 Illumina 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 理化因子检测方法

1.2.1.1 pH 的测定　取 10 g 醋醅，加入 90 mL 去离子水，搅拌均匀，浸泡 30 min 后，过滤，使用 pH 计测定滤液的 pH。

1.2.1.2 温度的测定　使用温度计插入醋醅表层以

下 10 cm 处，测定温度。

1.2.1.3　总酸的测定　称取 10 g 醋醅，用 100 mL 容量瓶定容，浸泡 3 h，过滤醋醅，取 20 mL 的滤液，参照 GB 12456-2021《食品安全国家标准 食品中总酸的测定》中 pH 计电位滴定法测定总酸含量。

1.2.1.4　氨基态氮的测定　参照 GB 5009.235-2016《食品中氨基酸态氮的测定》中酸度计法测定醋醅的氨基态氮含量。

1.2.1.5　水分的测定　取 2 g 左右的醋醅放入水分测定仪中测定醋醅的水分含量。

1.2.1.6　还原糖的测定　称量 5 g 样品，加蒸馏水 50 mL，45 ℃ 水浴 2 h，冷却后定容于 100 mL 容量瓶中，过滤后取滤液，用 DNS 法[12] 测定还原糖含量。

1.2.2　醋醅微生物基因组 DNA 的提取及高通量测序　醋醅总 DNA 采用土壤 DNA 提取试剂盒提取，1% 琼脂糖凝胶电泳检测后，用 NanoDrop 2000 测定 DNA 纯度和含量。通过 PCR 扩增真菌 ITS1(a) 序列，引物为 ITS5F(5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3')、ITS2R(5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3')，PCR 产物经电泳、回收、定量后进行 Illumina MiSeq 测序，测序公司为上海派森诺生物医药科技有限公司(上海，中国)。

1.2.3　高通量测序分析　主要使用 QIIME2 软件对测序数据进行分析。按照 QIIME2 dada2 分析流程进行序列去引物，质量过滤，去噪(denoise)，拼接和去嵌合体等步骤，以 100% 相似度聚类划分为 ASV，并利用 Unite 数据库(Release 8.0，https://unite.ut.ee/)对 ASV 进行分类注释，删除不能注释到门水平的序列，同时结合 NCBI 数据库进行比对注释，并计算香农指数(Shannon Index)、Simpson 指数、Chao 1 指数及文库覆盖率(Coverage)，计算 Bray-Curtis 相异性指数，并对不同样本进行聚类分析。

1.3　数据处理

采用 Excel 软件处理数据，采用 Origin2018 软件绘制折线图、柱状图，并进行真菌样本的聚类分析，采用 SPSS2018 软件进行斯皮尔曼(Spearman)相关性分析。采用派森诺云平台(https://www.genescloud.cn/login)进行主成分分析(PCA)、Lefse 分析(Linear discriminant analysis Effect Size，线性判别分析)，利用 Canon5.0 进行冗余分析。

2　结果与分析

2.1　四川晒醋发酵过程中理化因子结果分析

四川晒醋在固态发酵过程中的理化因子变化规律见图 1 与图 2，在晒醋固态发酵过程中，pH 呈先增加后降低再保持稳定的变化趋势，其 pH 先增加的原因是第 1 d 将醋母液倒入装有麸皮的发酵池后，等待醋母液自然下沉，导致局部 pH 较低(注：取样采用多点取样，由于发酵池较大，较深(发酵池规格：20 m×1.4 m×1 m)，倒入醋母液后，发酵第 1 d 醋母液自然下沉，分布不均匀，所以第 1 d 的 pH 较低)，第 2 d 翻醅后，醋母液与麸皮翻拌均匀使 pH 上升，随着发酵的进行，pH 逐渐降低，第 8 d 之后，pH 基本保持在 4.2 左右。总酸的含量是检验醋醅是否成熟的一个重要指标[13]，随着发酵的进行，总酸的含量先增加后保持稳定。温度是固态发酵中的重要因素，温度过高，不利于低温微生物生长；温度过低，微生物生长缓慢，生产效率低。在发酵过程中，第 2~3 d 温度迅速上升，同时 pH 迅速降低，总酸含量迅速上升，说明微生物迅速生长，使醋醅温度升高，由于每天的翻醅操作，发酵后期的醋醅温度维持在 40 ℃ 左右。

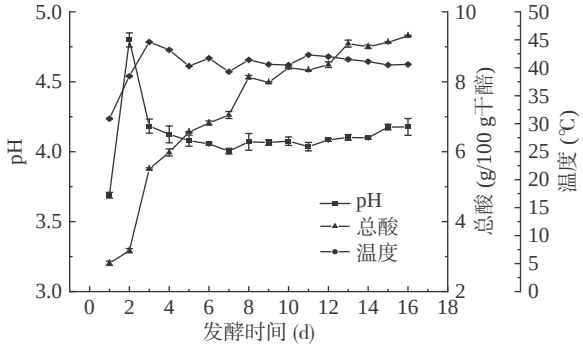


图 1　四川晒醋固态发酵过程中温度、pH、总酸含量动态变化

Fig.1　Dynamic changes of temperature, pH, total acid content in Sichuan sun vinegar during the solid-state fermentation

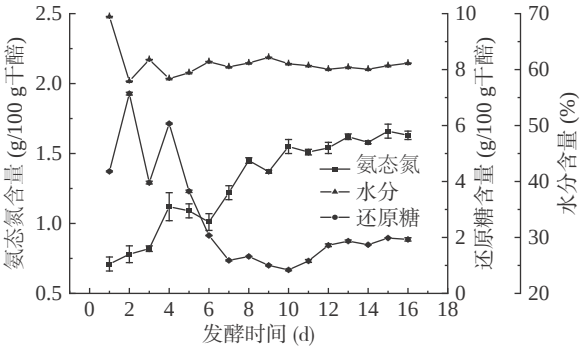


图 2　四川晒醋固态发酵过程中水分、氨态氮、还原糖含量动态变化

Fig.2　Dynamic changes of moisture, ammonia nitrogen and reducing sugar content in Sichuan sun vinegar during the solid-state fermentation

如图 2 所示，经翻醅操作后，醋醅中麸皮与醋母液混合均匀，醋醅的水分含量基本保持在 60% 左右。还原糖含量呈先增加后减少的趋势，说明发酵前期的霉菌等微生物分解淀粉、糊精等大分子物质，产生了大量的还原糖，在发酵后期，还原糖被微生物利用，其含量逐渐降低。氨态氮含量随着发酵时间的延长，呈逐渐上升的趋势，发酵第 1~10 d 增加迅速，发酵第 11~16 d 增加缓慢。在发酵前期，氨态氮含量增长较快，可能与产蛋白酶的微生物生长活跃有关；发酵后期，微生物数量减少，酶活下降以及各种氨基酸参与风味物质的合成，使氨基态氮含量增长缓慢。

2.2 样品的测序结果

醋醅中真菌群落测序深度>10000 条序列, 16 个样本共获得 62101 条序列, 因为 ITS 区域在不同物种间的变异度较大, 测序所得 reads 长度位于 120~400 bp。序列经过过滤和质量控制后, 每个醋醅样本可用的测序序列均在 10000 条以上均达到要求的测序深度。为得到醋醅样本测序结果中的菌群结构和多样性等信息, 本文采用 100% 相似度水平对优化过的 ITS1 序列进行归类, 发现醋醅中的真菌群落可以划分为 1271 个扩增子序列变异(ASVs, amplicon sequence variants)。

2.3 样品间 α 多样性分析

由表 1 可知, 各醋醅样本序列覆盖率均在 0.9999 左右, 表明样本覆盖率高, 测序深度合适; Chao1 指数可以表示群落的丰富度, 其值在 15.90~485.26 之间波动, 说明真菌群落物种较丰富; Shannon 指数和 Simpson 指数值越大, 说明群落物种多样性越高; Shannon 指数/Simpson 指数值越高, 表明群落的多样性越高。Shannon 指数/Simpson 指数在 2.93~6.38 之间变化, 说明醋醅的真菌群落不断发生变化。在发酵第 1 d 至发酵第 12 d, 真菌多样性变化较小; 发酵第 13 d, 其真菌多样性最高, 说明第 13 d 的真菌种类丰富, 随后, 发酵第 14 d 至发酵 16 d 多样性略有降低。

表 1 每个醋醅样本的真菌群落测序情况及 α 多样性统计

Table 1 Statistics of fungal community sequencing and α diversity in each cupei sample

样品名称	序列数（条）	扩增子序列变异(ASVs)	Chao1 指数	Shannon 指数	Simpson 指数	Shannon指数/Simpson指数	覆盖率
F1	62101	16	15.90	0.50	0.15	3.32	0.9999
F2	63152	24	23.65	1.28	0.37	3.49	0.9998
F3	75687	24	24.78	2.09	0.71	2.93	0.9998
F4	65658	35	35.72	1.67	0.50	3.36	0.9999
F5	73841	89	91.63	1.71	0.41	4.16	0.9996
F6	70722	40	42.93	1.91	0.59	3.26	0.9997
F7	63446	38	37.89	1.70	0.46	3.68	0.9998
F8	63979	58	60.26	1.95	0.53	3.71	0.9996
F9	63465	57	58.36	3.09	0.81	3.80	0.9998
F10	65146	71	72.86	3.15	0.82	3.86	0.9998
F11	64585	58	59.31	3.10	0.84	3.68	0.9998
F12	135298	72	79.13	2.82	0.78	3.61	0.9993
F13	76064	479	485.26	5.72	0.90	6.38	0.9988
F14	68013	93	92.79	3.54	0.84	4.19	0.9999
F15	75476	58	59.83	3.68	0.86	4.25	0.9998
F16	73403	59	60.13	4.27	0.90	4.74	0.9999

2.4 四川晒醋醋醅的门水平的真菌群落分析

经过与 Unite 数据库比对分析, 从图 3 中可以发现在分类学上, 翻醅车间的醋醅中的真菌菌群归属于 9 个门, 在固态发酵过程第 1~8 d, 子囊菌门(Ascomycota)占主导地位, 发酵第 9~16 d, 毛霉门(Mucoromycota)丰度增加, 与子囊菌门(Ascomycota)共同作为优势门。子囊菌门(Ascomycota)的相对丰度在发酵过程中整体呈下降趋势, 发酵第 1~8 d 其相对丰度由 99.9% 下降至 93.8%, 发酵第 9 d 其相对丰度迅速下降至 68.9%, 发酵 9~16 d 其相对丰度在 68.9%~23.4% 范围内波动变化。毛霉门(Mucoromycota)在发酵 1~8 d 相对丰度很低(小于 10%), 发酵至 9 d 其相对丰度增加至 28.1%, 随后呈增加趋势, 其相对丰度保持在 50% 左右。担子菌门(Basidiomycota)在发酵第 1~12 d 相对丰度较低, 小于 2%, 在发酵第 13、14 d 其相对丰度最高达 12%~19%, 发酵第 15~16 d 降低至 2%~7%。被孢霉门(Mortierellomycota)的相对丰度较低, 保持在 0%~0.6% 左右; 其余门类含量低(<0.1%)。

2.5 四川晒醋醋醅的属水平的真菌群落分析

经过与 Unite 数据库比对分析, 醋醅样品的真菌群落共 299 个属。将样品中相对丰度位于前 25 位的菌群绘制成微生物群落分布柱形图。从图 4 可以看出, 毕赤酵母属(*Pichia*)和横梗霉属(*Lichtheimia*)的两个属的微生物在固态发酵过程中相对丰度较大。毕赤酵母属(*Pichia*)归属于子囊菌门酵母目, 在整个发酵过程中, 发酵第 1~8 d 相对丰度保持在 90% 以上; 发酵第 9~16 d, 其相对丰度呈波动趋势下降, 在 18%~66% 范围内波动。毕赤酵母属(*Pichia*)可能是由于酸性环境的压力使相对丰度逐渐降低。横梗霉属(*Lichtheimia*)归属于毛霉门, 在发酵前 3 d 相对丰度低, 从第 4 d 到第 8 d 其相对丰度逐渐增加

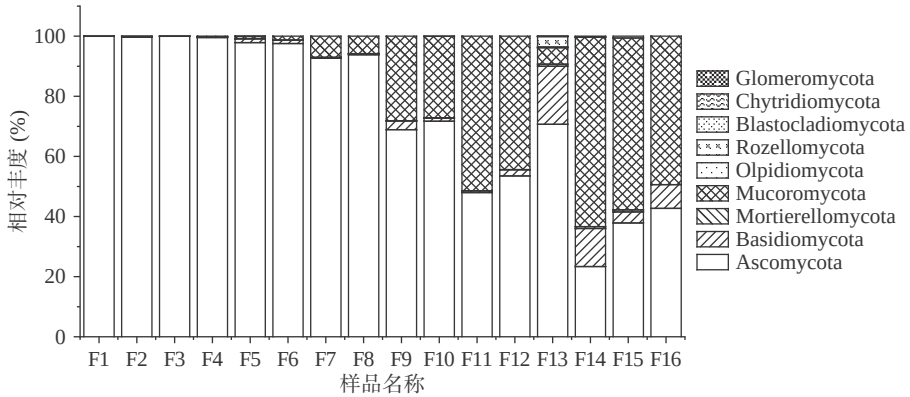


图 3 四川晒醋固态发酵过程中真菌群落在门水平的分布

Fig.3 Distribution of fungal community at phylum level during solid-state fermentation of Sichuan sun vinegar

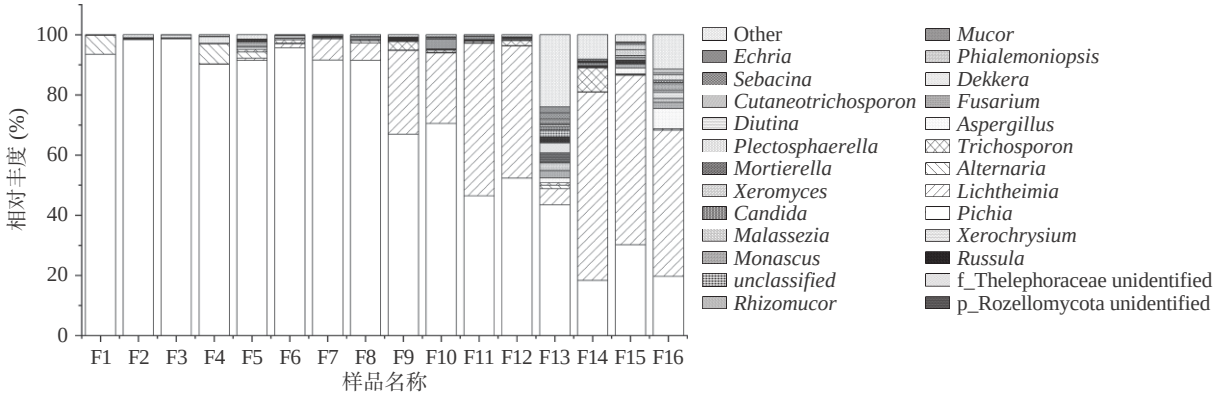


图 4　四川晒醋固态发酵过程中真菌群落在属水平的分布

Fig.4　Distribution of fungal community at genus level during solid-state fermentation of Sichuan sun vinegar

至 7% 左右，第 9~12 d，其相对丰度保持在 27%~50% 范围内，第 13 d 降低至 5%，后期又保持在 48%~62% 范围内。说明横梗霉属（*Lichtheimia*）在发酵过程中，生长较缓慢，翻醅操作使好氧的霉菌丰度呈波动变化。

毕赤酵母属在种水平上主要检测到了克鲁维毕赤酵母（*Pichia kluyveri*）、毛榛毕赤酵母（*Pichia mandshurica*）、膜醭毕赤酵母（*Pichia membranifaciens*）和挪威毕赤酵母（*Pichia norvegensis*），其中，克鲁维毕赤酵母具有产酒精、产酯、耐酸（pH2~4）、耐高温（44 ℃）等优点[14]，毕赤酵母多存在于酒曲和醋曲中[15−16]，在醋醅中比较少见。有研究表明横梗霉菌具有产 α-淀粉酶[17]、葡聚糖酶[18]、木聚糖酶[19]、纤维素酶[20]、蛋白酶[21] 和糖化酶的能力。横梗霉菌能产生各种风味物质，如乙酸、乙醇、苯乙醇和乙酸乙酯等[22]。横梗霉菌属在醋醅中也比较少见，常存在于大曲中[23−24]。酿酒酵母相对丰度很低，可能是因为发酵过程中温度高于酿酒酵母的耐受温度。四川麸醋中的主要真菌是酿酒酵母、覆膜孢酵母、伊萨酵母、黑曲霉等，镇江香醋的主要真菌是曲霉属和链格孢霉属；永春老醋发酵过程中的主要真菌来自于酵母纲[25]；赤水晒醋醋酸发酵阶段优势真菌为曲霉菌属（*Aspergillus*）和丝孢酵母菌属（*Trichosporon*）[26]；可见不同食醋醋酸发酵过程中起主要作用的真菌各有不同，原因可能是曲、原料、环境中存在的微生物差异较大。

在发酵过程中，除了毕赤酵母属（*Pichia*）和横梗霉属（*Lichtheimia*）这两种相对丰度较高的属外，还存在许多相对丰度较低的物种，比如丝孢酵母属（*Trichosporon*）、链格孢霉属（*Alternaria*）、曲霉菌属（*Aspergillus*）和德克酵母属（*Dekkera*），其相对丰度保持在 0.1%~4.0% 之间，且存在于整个发酵过程中，其余属相对丰度小于 0.1%（个别属在发酵某天丰度较高）。

2.6　四川晒醋的真菌群落演替的聚类分析

如图 5 所示，从对样品的聚类结果，可以看出真菌群落的演替呈现一定规律，发酵第 1~8 d 与其他时期有较大差异，并且发酵第 9~12 d 与发酵第 13~16 d 也位于两个不同分支。PCA 分析发现（图 6），前个两主成分可以代表 99.1% 的变量信息，真菌的群落变化主要发生 PCA1 轴。第 13 d 的样品与其他样品的距离较远，从第 13 d 的群落信息来看，检测到许多低丰度的属，与其他样品有较大差别。可能是开放的发酵环境导致样品受到了污染，所以后续分析将第 13 d 样品去除。为了研究四川晒醋固态发酵的不同发酵阶段，根据层次聚类结果，可将四川晒醋固态发酵阶段分为三个阶段，发酵第 1~8 d 为第 1 阶段，发酵第 9~12 d 为第 2 阶段，发酵第 14~16 d 为第 3 阶段。

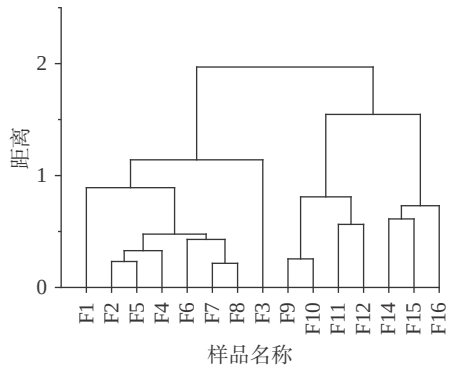


图 5　四川晒醋固态发酵过程中真菌群落聚类分析

Fig.5　Cluster analysis of fungal community during solid-state fermentation of Sichuan sun vinegar

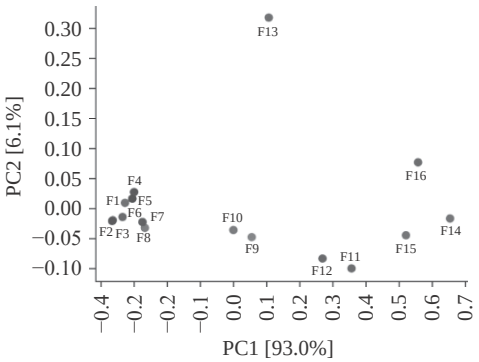


图 6　四川晒醋固态发酵过程中的真菌群落 PCA 分析

Fig.6　PCA analysis of fungal community during solid-state fermentation of Sichuan sun vinegar

2.7 不同发酵阶段标志性真菌分析

线性判别分析效应大小(LEfSe)分析是一种用于发现和解释高维度数据生物标识的分析工具,用于发现不同生物条件或环境下的多组样本中最能解释组间差异的物种特征,以及这些特征对组间差异的影响程度。因此,可以使用 LEfSe 分析鉴定出不同发酵阶段的标志性微生物[27]。由图 7 可知,醋醅发酵第 1 阶段(A)的差异性真菌来自于毕赤酵母科(Pichiaceae)的毕赤酵母属(*Pichia*)和德克酵母属(*Dekkera*)以及格孢菌科(Pleosporaceae)的链格孢属(*Alternaria*);发酵第 2 阶段(B)的差异性真菌有毛霉菌科(Mucoraceae)、毛霉属(*Mucor*)、卷枝毛霉菌(*Mucor circinelloides*);发酵第 3 阶段(C)的差异性真菌有 21 种,来自于毛霉目(Mucorales)、马拉色菌目(Malasseziales)、散囊菌目(Eurotiales)、被孢霉目(Mortierellales),有伞枝横梗霉(*Lichtheimia corymbifera*)、*Lichtheimia ornata*、总状横梗霉(*Lichtheimia ramosa*)、*Malassezia restricta*、微小根毛霉(*Rhizomucor pusillus*)、细曲霉(*Aspergillus gracilis*)、紫红曲霉(*Monascus purpureus*)和 *Mortierella elongata* 等属。

2.8 真菌群落与理化指标之间的相关性分析

对翻醅车间的醋醅样本真菌群落进行去趋势对应分析(DCA),得到最大梯度长度为 1.30,具有线性特征。因此,醋醅环境因子与微生物群落结构间的相关性分析适用线性模型冗余分析(RDA)。从 RDA 分析结果表明(图 8),第一轴和第二轴分别解释微生物群落结构变化的 67.66% 和 7.59%,总解释度为 75.25%,说明真菌群落在属水平上的分布与理化因子关系密切。氨态氮、总酸和还原糖对群落的贡献度较大,氨态氮对真菌群落的解释率为 61.7%(P<0.01),总酸对真菌群落的解释率为 61.4%(P<0.01),还原糖对真菌群落的解释率为 40.9%(P<0.01),温度、水分、pH 的解释率依次减小,且不显著(P>0.05)。

氨态氮与发酵第 1~7 d 的群落呈负相关,其相关性逐渐减小;发酵第 8~16 d 的群落主要集中在氨态氮向量的正方向且逐渐远离原点,说明氨态氮与发酵第 8~16 d 的群落呈正相关,其相关性随着发酵时间延长逐渐增强,说明氨态氮对真菌群落的影响越来越大。

总酸对群落的影响与氨态氮相似。发酵前期产蛋白酶的真菌丰度不高,可能主要由芽孢杆菌等细菌产蛋白酶分解蛋白质,此时氨态氮的含量增长迅速,随着产酸菌的生长,醋醅中总酸含量上升,使不耐酸性的芽孢杆菌相对丰度减少,所以发酵后期主要由产蛋白酶的真菌来分解蛋白质。

还原糖与发酵前 7 d 的真菌群落呈正相关,且相关性呈减小趋势,发酵第 8 d 至第 16 d 的群落主要在向量的负方向且逐渐远离原点,说明发酵前期产淀粉酶、糖化酶等的真菌丰度较高,使还原糖含量增加,后期由于醋醅酸性环境的压力使部分真菌难以生存,相对丰度减小,同时使还原糖与真菌群落的相关性减小。有学者对麸醋的细菌群落、理化指标进行了冗余分析,得到的结果表明,温度是影响细菌群落变化的主要因素[28],说明真菌和细菌群落的影响因素有差异。有研究表明翻醅操作通过影响温度、氧气含量等发酵条件来影响微生物群落的结构[29]。

根据 Spearman 相关系数可知理化指标与各个真菌的相关性,选择了丰度前 15 的真菌进行分析,结果表明(表 2),这 15 种真菌大部分与总酸、氨态氮、还原糖三个指标具有显著相关性(P<0.05),此结果与 RDA 结果相似。与总酸呈显著正相关的真菌有横梗霉菌(*Lichtheimia*)、丝孢酵母属(*Trichosporon*)、曲霉属(*Aspergillus*)、镰刀霉(*Fusarium*)、

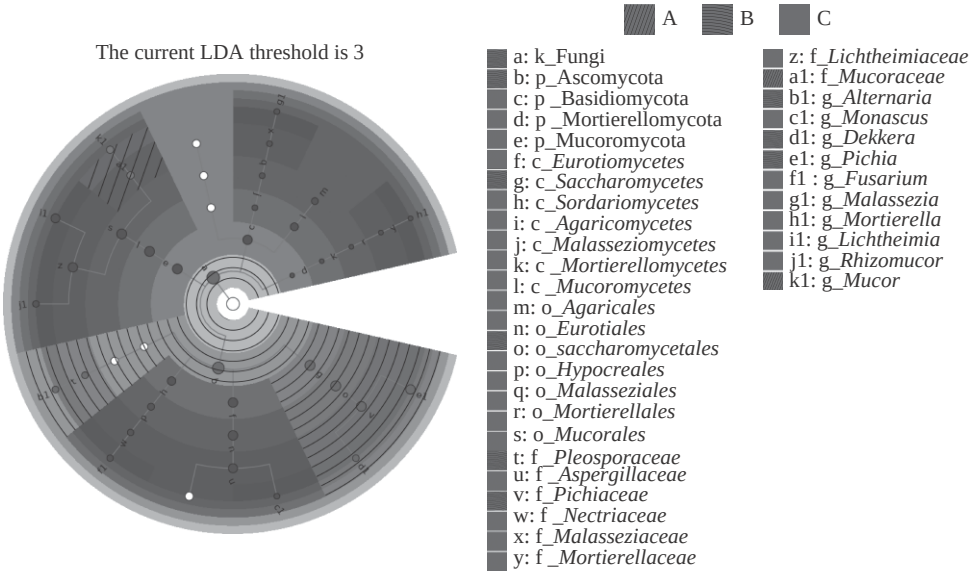


图 7 四川晒醋固态发酵过程中不同阶段的标志性真菌分析

Fig.7 Analysis of symbolic fungi in different stages during solid-state fermentation of Sichuan sun vinegar

注:A 表示发酵第 1 阶段;B 表示发酵第 2 阶段;C 表示发酵第 3 阶段。

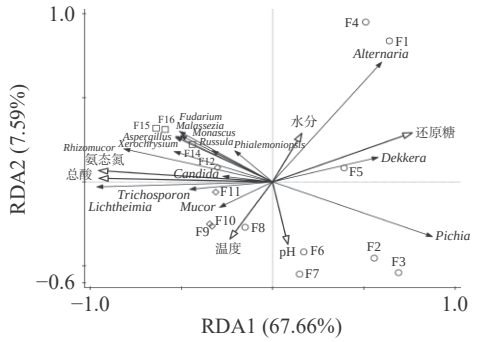


图 8　四川晒醋不同发酵阶段的真菌群落与理化因子的 RDA 相关性分析

Fig.8　Redundancy analysis between fungal community and physicochemical properties in different fermentation stages of Sichuan sun vinegar

表 2　醋醅样品中理化指标与真菌的 Spearman 相关性

Table 2　Spearman correlation coefficients between physicochemical indicators and fungi in cupei samples

真菌	pH	水分	温度	总酸	氨态氮	还原糖
Pichia	−0.093	0.070	−0.125	−0.907**	−0.893**	0.471
Lichtheimia	−0.032	0.020	0.142	0.971**	0.918**	−0.649**
Alternaria	−0.414	0.032	−0.132	−0.579*	−0.479	0.293
Trichosporon	−0.100	−0.148	0.127	0.546*	0.411	−0.468
Aspergillus	0.214	0.015	0.231	0.675**	0.686**	−0.314
Fusarium	0.057	0.153	−0.343	0.530*	0.602*	−0.28
Dekkera	0.025	−0.111	0.433	−0.507	−0.425	0.154
Phialemoniopsis	0.079	−0.105	−0.083	0.457	0.434	−0.276
Mucor	−0.124	0.022	0.379	0.538*	0.553*	−0.696**
Russula	0.398	−0.225	−0.311	0.245	0.247	0.225
Xerochrysium	−0.068	0.031	0.245	0.734**	0.575*	−0.551*
Rhizomucor	0.098	0.178	0.106	0.927**	0.891**	−0.564*
Monascus	0.304	0.214	−0.151	0.734**	0.748**	−0.325
Malassezia	0.317	−0.03	0.141	0.823**	0.789**	−0.164
Candida	−0.094	−0.353	−0.025	0.368	0.232	−0.265

注：*表示显著相关（$P<0.05$）；**表示极显著相关（$P<0.01$）。

毛霉属（*Mucor*）、*Xerochrysium*、根毛霉属（*Rhizomucor*）、红曲霉属（*Monascus*）、马拉色霉菌属（*Malassezia*），呈显著负相关的真菌有毕赤酵母属（*Pichia*）和链格孢属（*Alternaria*）；与氨态氮呈显著正相关的真菌包括横梗霉菌（*Lichtheimia*）、曲霉属（*Aspergillus*）、镰刀霉（*Fusarium*）、毛霉属（*Mucor*）、*Xerochrysium*、根毛霉属（*Rhizomucor*）、红曲霉属（*Monascus*）、马拉色霉菌属（*Malassezia*），呈显著负相关的真菌包括毕赤酵母属（*Pichia*）；与还原糖呈显著负相关的真菌包括横梗霉菌（*Lichtheimia*）、毛霉属（*Mucor*）、*Xerochrysium*、根毛霉属（*Rhizomucor*）。德克酵母属（*Dekkera*）、*Phialemoniopsis*、*Russula*、假丝酵母属（*Candida*）与总酸等理化因子相关性均不显著（$P>0.05$）。不同真菌与理化因子的相关性有较大差异，多种真菌共同作用，理化因子与真菌相互影响，通过控制发酵环境，可以影响真菌群落组成，从而改善食醋风味。

3　结论

本研究利用高通量测序技术对四川晒醋固态发酵过程中真菌的组成和演替规律进行了研究，并分析了发酵过程中理化因子的变化。随着发酵的进行，醋醅的 pH 降低，水分、温度基本保持稳定，总酸、氨态氮含量先持续增加后保持稳定，还原糖含量先增加后减少。真菌群落的多样性和均匀性呈现先稳定后逐渐增加再降低的趋势。根据聚类分析结果，可将发酵过程分为 3 个阶段，且 3 个阶段的标志性真菌不同。毕赤酵母和横梗霉菌是发酵过程中的主要真菌，毕赤酵母属的相对丰度在 18.3%~99.6% 范围内波动，横梗霉菌属的相对丰度在 0.2%~62.5% 范围内变化。此外，冗余分析结果表明，氨态氮、总酸是影响真菌群落的主要因素，氨态氮、总酸与发酵第 1~8 d 的真菌群落呈负相关，与发酵第 9~16 d 的真菌群落呈正相关。本研究发现理化因子对晒醋真菌群落的演替有一定的影响，后续还可以引入更多与真菌生长相关的理化因子，如氧气浓度、酶活等，可能有助于晒醋真菌群落变化的进一步探究。

参考文献

[1] 朱文优，张超，魏琴，等. 四川晒醋烘醅工艺的改良研究[J]. 中国调味品，2012，37(4)：82−84. [ZHU W Y，ZHANG C，WEI Q，et al. Technical innovation in the baking fermented grains processing of Sichuan sun vinegar[J]. China Condiment，2012，37(4)：82−84.]

[2] 周荣清. 四川麸醋生产工艺的特点及发展趋势[J]. 四川食品与发酵，2000(3)：24−28. [ZHOU R Q. Characteristics and development trend of Sichuan bran vinegar production process[J]. Sichuan Food and Fermentation，2000(3)：24−28.]

[3] ZHOU J，HE Z，YANG Y，et al. High-throughput metagenomic technologies for complex microbial community analysis：Open and closed formats[J]. m Bio，2015，6(1)：e02288−02214.

[4] HE G Q，LIU T J，SADIQ F A，et al. Insights into the microbial diversity and community dynamics of Chinese traditional fermented foods from using high-throughput sequencing approaches[J]. Journal of Zhejiang University Science B，2017，18(4)：289−302.

[5] 王宗敏. 镇江香醋醋酸发酵阶段菌群结构变化与风味物质组成之间的相关性研究 [D]. 无锡：江南大学，2016. [WANG Z M. Correlation between structural shifts of microbiota and compositions of flavors during the stage of acetic acid fermentation of Zhenjiang aromatic vinegar[D]. Wuxi：Jiangnan University，2016.]

[6] 刘廷锐. 四川麸醋关键风味物质及其与酿造微生物的相关性研究 [D]. 成都：西华大学，2020. [LIU T R. Study on key flavor substances of Sichuan bran vinegar and their correlation with brewing microorganisms[D]. Chengdu：Xihua University，2020.]

[7] ZHU Y P，ZHANG F F，ZHANG C N，et al. Dynamic microbial succession of Shanxi aged vinegar and its correlation with flavor metabolites during different stages of acetic acid fermentation [J]. Scientific Reports，2018，8(1)：407−424.

[8] 崔宁波. 利用 DNA 高通量测序技术分析生料酿醋过程中的真菌多样性 [D]. 太原：山西大学，2019. [CUI N Y. Analysis of fungal diversity in vinegar brewing with raw materials by DNA high-throughput sequencing[D]. Taiyuan：Shanxi University，2019.]

[9] 冯洁雅，张桂容，蔡吉，等. 基于高通量测序解析四川晒醋固态发酵过程中细菌群落变化[J]. 食品工业科技，2021，42(19)：135−143. [FENG J Y，ZHANG G R，CAI J，et al. Analysis of bacterial community changes in Sichuan sun vinegar solid-state fer-

mentation process based on high-throughput sequencing[J]. Food Industry Technology, 2021, 42(19): 135−143.]
[10] 赵凤琴. 凉州熏醋传统酿造过程主要功能微生物群落演替对四甲基吡嗪的影响 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2016. [ZHAO F Q. The effects of major functional microbial succession on tetramethylpyrazine during the traditional brewing process of Liangzhou fumigated vinegar[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2016.]
[11] 方冠宇. 浙江玫瑰醋搅拌工艺及发酵过程中微生物与风味物质相关性研究 [D]. 杭州: 浙江工商大学, 2018. [FANG G Y. Research on the stirring technology and the correlation between microorganism and flavor substance in Zhejiang rosy vinegar fermentation process[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology and Commerce, 2018.]
[12] 赵东, 牛广杰, 赵旭东, 等. 糟醅中还原糖分析方法的探讨[J]. 酿酒, 2013, 40(2): 88−90. [ZHAO D, NIU G J, ZHAO X D, et al. The research on measuring reducing sugar of grains[J]. Liquor Making, 2013, 40(2): 88−90.]
[13] 杜宏福. 山西老陈醋发酵过程中有机酸产生规律研究 [D]. 天津: 天津科技大学, 2015. [DU H F. The dynamic production of organic acids during Shanxi aged vinegar fermentation process[D]. Tianjin: University of Science and Technology, 2015.]
[14] 冯莉, 陈雪, 李丽, 等. 5 株克鲁维毕赤酵母的酿造学特性[J]. 中国食品学报, 2018, 18(12): 72−79. [FENG L, CHEN X, LI L, et al. The enology characteristics of five strains of *Pichia kluyveri*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(12): 72−79.]
[15] 王晓丹, 陈美竹, 班世栋, 等. 茅台大曲中酵母的分离、鉴定及其功能初探[J]. 食品科学, 2017, 38(4): 51−57. [WANG X D, CHEN M Z, BAN S D, et al. Separation, identification and functional characterization of yeast strains from Moutai-flavor Daqu, a traditional Chinese liquor fermentation starter[J]. Food Science, 2017, 38(4): 51−57.]
[16] LI P, LI S, CHENG L L, et al. Analyzing the relation between the microbial diversity of Daqu and the turbidity spoilage of traditional Chinese vinegar[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(13): 6073−6084.
[17] AGUERO D, ALICE S M, LISBOA G, et al. Production and catalytic properties of amylases from *Lichtheimia ramosa* and *Thermoascus aurantiacus* by solid-state fermentation[J]. The Scientific World Journal, 2016(1): 1−10.
[18] NAYARA F L G, FLAVIAL R D S S, FABIANO A G, et al. Roduction of *β*-glucosidase on solid-state fermentation by *Lichtheimia ramosa* in agroindustrial residues: Characterization and catalytic properties of the enzymatic extract[J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2015, 18(4): 314−319.
[19] MARIA T A Z, ALEJANDRO S H, JOHAN R M, et al. Taxonomic identification of the thermotolerant and fast-growing fungus *Lichtheimia ramosa* H71D and biochemical characterization of the thermophilic xylanase LrXynA[J]. Amb Express, 2017, 7(1): 194.
[20] 苑广伟, 周洁婧, 王欣宇, 等. 一株来源于土壤的横梗霉菌及其产羧甲基纤维素酶性质[J]. 工业微生物, 2021, 51(1): 23−29. [YUAN G W, ZHOU J C, WANG X Y, et al. A *Sporidiobolus pararoseus* XWNRI from siol and its properties of carboxymethy cellulase[J]. Industrial Microbiology, 2021, 51(1): 23−29.]
[21] 李子健, 黄丹, 张曼, 等. 中高温大曲中两株耐热霉菌的分离鉴定及产酶特性比较[J]. 食品与发酵科技, 2020, 56(3): 1−7. [LI Z J, HUANG D, ZHANG M, et al. Isolation and identification of two heat-resistant molds in Daqu at medium-high temperature and comparison of their enzyme production characteristics[J]. Food and Fermentation Sciences & Technology, 2020, 56(3): 1−7.]
[22] CHUNG H, LEE N K, SEO J A, et al. Comparative analysis of nonvolatile and volatile metabolites in *Lichtheimia ramosa* cultivated in different growth media[J]. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, 2016, 81(3): 565−572.
[23] ZHENG X W, YAN Z, NOUT M J. Characterization of the microbial community in different types of Daqu samples as revealed by 16S rRNA and 26S rRNA gene clone libraries[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2015, 31(1): 199−208.
[24] 李荣源, 卢红梅, 秦兴, 等. 高通量测序分析赤水晒醋各生产阶段微生物群落结构变化[J]. 食品科学, 2020, 41(24): 78−86. [LI R Y, LU H M, QIN X, et al. High-throughput sequencing analysis of microbial community structure changes in various production stages of red water sun vinegar[J]. Food Science, 2020, 41(24): 78−86.]
[25] 王俊奇, 黄卫红, 李双彤, 等. 永春老醋不同生产阶段细菌和真菌多样性动态变化特征分析[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(2): 38−44. [WANG J Q, HUANG W H, LI S T, et al. Dynamic changes of bacterial and fungal diversities in Yongchun aged vinegar during production and storage[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(2): 38−44.]
[26] 施思, 彭智辅, 乔宗伟, 等. 浓香型大曲贮藏过程中糖化力发酵力变化及真菌多样性分析[J]. 食品与发酵工业, 2017(5): 81−84. [SHI S, PENG Z F, QIAO Z W, et al. Analysis of the change of saccharifying power and fermenting power for Luzhou-flavor Daqu and their fungal diversity during storage[J]. Food and Fermentation Industries, 2017(5): 81−84.]
[27] 吴晓红, 高生平, 蒋彩云, 等. 榨菜发酵过程中原核微生物群落结构及其理化因子的动态演替[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(1): 27−34. [WU X H, GAO S P, JIANG C Y, et al. Dynamic succession of prokaryotic microbial communities and physicochemical properties during the fermentation of Zhacai[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(1): 27−34.]
[28] ZHU M, CHEN Z, LUO H B, et al. Study of the phase characteristics of Sichuan bran vinegar fermentation based on flavor compounds and core bacteria[J]. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 2020, 79(2): 1−11.
[29] ZHANG Q, FU C, ZHAO C, et al. Monitoring microbial succession and metabolic activity during manual and mechanical solid-state fermentation of Chinese cereal vinegar[J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 133: 109868.

夏俊芳, 潘苗, 奇那尔, 等. 活性氧与蜡样芽孢杆菌菌膜形成的相关性 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 139−147. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080341

XIA Junfang, PAN Miao, QI Naer, et al. The Relationship between Reactive Oxygen Species and *Bacillus cereus* Biofilms Formation[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 139−147. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080341

· 生物工程 ·

活性氧与蜡样芽孢杆菌菌膜形成的相关性

夏俊芳*, 潘　苗, 奇那尔, 玛格撇尔, 古丽娜孜, 武　运

（新疆农业大学食品科学与药学学院, 新疆乌鲁木齐 830052）

摘　要: 为阐明活性氧（ROS）与蜡样芽孢杆菌菌膜形成的相关性，以市售原料奶中分离的蜡样芽孢杆菌分离株为目标菌，以细菌中 NADPH 氧化酶介导产生的 ROS 为主要靶点，用外源 ROS 补充剂过氧化氢 (H_2O_2)、ROS 清除试剂 N-乙酰半胱氨酸（NAC）、NADPH 氧化酶抑制剂二苯基氯化碘盐（DPI）处理蜡样芽孢杆菌，测定分析 ROS 变化与菌膜形成之间的关系。结果表明，0.01 μmol/L H_2O_2、1 μmol/L H_2O_2、100 μmol/L H_2O_2 处理组平均菌膜形成量均显著高于对照组平均菌膜形成量（P<0.05），0.1 μmol/L H_2O_2、10 μmol/L H_2O_2 处理组平均菌膜形成量与对照组平均菌膜形成量相比无显著性差异（P>0.05），随着 H_2O_2 浓度的升高，ROS 逐渐下降。NAC 各处理组平均菌膜形成量均显著高于对照组平均菌膜形成量（P<0.05），随着 NAC 浓度的升高，ROS 逐渐下降。DPI 浓度≤1 μmol/L 时，随着 DPI 浓度的升高，平均菌膜形成量均显著高于对照组平均菌膜形成量（P<0.05），ROS 逐渐下降；DPI 浓度>5 μmol/L 时，随着 DPI 浓度的升高，平均菌膜形成量显著低于对照组平均菌膜形成量（P<0.05），ROS 含量升高。表明在不影响蜡样芽孢杆菌生长和细胞活性的前提下，一定浓度的 H_2O_2、NAC 和 DPI 处理菌株能够诱导 ROS 减少，增强蜡样芽孢杆菌菌膜的形成。激光共聚焦显微镜结果显示，与对照组相比处理组具有更强的染色效果，呈现红色的网络结构，而未经处理组呈现松散的结构和更少的菌膜生物量，这表明 ROS 对蜡样芽孢杆菌菌膜的形成存在抑制作用。

关键词: 蜡样芽孢杆菌, 活性氧, 过氧化氢, N-乙酰半胱氨酸, 氯化二苯碘盐, 菌膜

中图分类号: TS201.3　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0139−09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080341　　本文网刊:

The Relationship between Reactive Oxygen Species and *Bacillus cereus* Biofilms Formation

XIA Junfang*, PAN Miao, QI Naer, MA Gepieer, GULI Nazi, WU Yun

（College of Food Science and Pharmacy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China）

Abstract: In order to clarify the correlation between reactive oxygen species (ROS) and *Bacillus cereus* biofilms, the ROS mediated by NADPH oxidase in the *Bacillus cereus* that were isolated from commercially available raw milk was used as the main target. The relationship between the formation of *Bacillus cereus* biofilms and ROS were analyzed by using supplement hydrogen peroxide (H_2O_2) as exogenous reactive oxygen species (ROS), N-acetylcysteine (NAC) as ROS scavenging agent and diphenyl iodide chloride (DPI) as NADPH oxidase inhibitor. The results showed that the treatment groups of 0.01 μmol/L H_2O_2, 1 μmol/L H_2O_2 and 100 μmol/L H_2O_2 average biofilms were higher than the control group average biofilms (P<0.05). There was no significant difference between the treatment groups of 0.1 μmol/L H_2O_2 and 10 μmol/L H_2O_2 and the control group average biofilms (P>0.05). With the increase of H_2O_2 concentration, ROS gradually decreased. The treatment groups of NAC average biofilms were higher than the control group average biofilms (P<0.05). ROS decreased gradually with the increase of NAC concentration. When DPI concentration≤1 μmol/L, with the increase of DPI concentration, the average biofilms were higher than the control group average biofilms (P<0.05), and ROS gradually decreased. When DPI concentration>5 μmol/L, with the increase of DPI concentration, the average biofilms were lower than the control group average biofilms (P<0.05), and the ROS increased. The results showed that without affecting

收稿日期: 2021−08−30

基金项目: 新疆维吾尔自治区青年自然科学基金（2019D01B13）。

作者简介/通信作者*: 夏俊芳（1986−）, 女, 硕士, 副教授, 主要从事食品微生物安全控制方面的研究, E-mail: junfangxia@126.com。

the growth and activity of *Bacillus cereus*, the reduction of ROS induced by certain concentration of H_2O_2, NAC and DPI enhanced the *Bacillus cereus* biofilms. Confocal laser scanning microscopy showed stronger staining and red network structures in the treated groups compared to the control groups, while the untreated groups showed loose structures and fewer biofilms, suggesting that ROS inhibits the formation of *Bacillus cereus* biofilms.

Key words: *Bacillus cereus*; reactive oxygen species (ROS); hydrogen peroxide (H_2O_2); N-acetylcysteine (NAC); diphenyliodide chloride (DPI); biofilm

蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)是一种常见的革兰氏阳性食源性病原体,广泛分布于各种环境中,并形成耐酸、耐热和耐干燥的孢子[1]。该病原菌会引起全身感染和食物中毒,如腹泻、呕吐、脑膜炎、败血症、眼内炎和牙周炎等[2]。*Bacillus cereus* 经常在生鲜乳及加工乳中被发现且可以附着在加工机械的表面,如阀门、管道和泵等,甚至形成菌膜,菌膜中的病原体对机械作用或常用消毒剂具有较强的抵抗力,会带来严重的健康风险,人体大约 80% 的细菌感染与菌膜有关[3]。在乳品加工线上形成的 *Bacillus cereus* 菌膜会增加该菌反复污染的风险,降低乳制品的质量,导致食品腐败从而引起食品安全问题[4],对乳制品行业造成极大的威胁[5]。如何彻底消除乳品环境中的菌膜已成为一大挑战[6],为此,了解 *Bacillus cereus* 菌膜的形成至关重要,制定合理的方案以消除乳品加工业中 *Bacillus cereus* 菌膜的污染问题。

目前,关于 *Bacillus cereus* 菌膜形成的研究主要集中在内部因素和外部因素两个方面,内部因素如 *Sin R*[7]、*Cod Y*[8]、*Sigma54*(*RpoN*)[9] 基因编码的蛋白质被认为参与 *Bacillus cereus* 菌膜的形成,外部因素包括酸碱度、温度、营养成分和细菌特性等[10−11]。CORCIONIVOSCHI 等[12] 通过对细菌 Noxs 研究综合分析后(Noxs 是可以专一催化产生活性氧(ROS)酶类)提出,Noxs 介导产生的 ROS 可能是细菌的一种重要信号分子,ROS 可能参与食源性致病菌菌膜的形成,细菌菌膜形成中通常会伴随 ROS 的产生,但其对菌膜形成的影响尚无定论,如 SHIVAPRASAD 等[13] 研究发现维生素 C 通过产生 ROS 使大肠杆菌(*Escherichia coli*)EMC17 菌株氧化应激抑制其菌膜形成,菌膜基因表达下调;SUO 等[14] 研究发现超氧化物歧化酶缺失的单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)突变体中 ROS 生成量升高,菌膜形成能力显著下降;WHITE 等[15] 研究发现过氧化氢酶(katA)基因破坏的奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)ROS 水平增加,菌膜生物量减少,但 KULKARNI 等[16] 发现香烟烟雾(ROS 存在)下增加金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)菌膜的形成;VILLA 等[17] 指出持续的外源 ROS 处理增加棕色固氮杆菌(*Azotobacter vinelandii*)野生型菌株(UW136)菌膜形成。WANG 等[18] 研究发现 *Bacillus cereus*(ATCC14579)在黄素腺嘌呤二核苷酸刺激下增大 Nox2 转化率,证实 *Bacillus cereus* 中存在 Noxs 活性,活性部位存在于细胞膜上,因此,ROS 与 *Bacillus cereus* 菌膜的形成和基因调控相关,但 ROS 在 *Bacillus cereus* 代谢或菌膜形成中的确切作用仍不清楚,且多数研究中的菌株并非来源于食品分离菌株,菌株差异性导致研究结果对实际指导的意义有限。

本文以新疆乌鲁木齐夏秋两季市售原料奶中 *Bacillus cereus* 分离株为研究目标,通过外源 H_2O_2、N-乙酰半胱氨酸(NAC)ROS 清除剂、二苯基氯化碘(DPI)NADPH 氧化酶抑制剂处理 *Bacillus cereus*,探讨 ROS 与 *Bacillus cereus* 菌膜形成之间的关系,为后期食品加工、运输过程中 *Bacillus cereus* 菌膜污染的有效控制奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) 菌株 N2、N6,菌株 Y10、Y22、Y34,菌株 L6、L8、L9、L12、L24 根据国标(GB4789.14-2014 食品安全国家标准食品微生物学检验蜡样芽孢杆菌检验)分别从新疆乌鲁木齐零市售新鲜牛乳、羊乳及驴乳分离筛选,菌株甘油管冻存于−80 ℃ 冰箱备用。*Bacillus cereus*(CMCC63303)(BC) 上海理工大学医疗器械与食品学院微生物实验室;营养琼脂培养基、LB 肉汤培养基 北京陆桥生物技术有限公司;0.1% 结晶紫 分析纯,广东光华科技股份有限公司;NAC(N-乙酰半胱氨酸) 上海源叶生物科技有限公司;碘化丙啶(PI)试剂、二苯基氯化碘盐(DPI) 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴化物(MTT) 贝奥替米生物技术公司(中国上海);95% 乙醇 成都市科隆化学品有限公司;过氧化氢(H_2O_2)、2.7 二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA) 上海阿拉丁生化科技股份有限公司;二甲基亚砜(DMSO) 天津市恒兴化学试剂制造有限公司。

HR40-IIA2 生物安全柜 青岛海尔特种电器有限公司;Tu-1810APC 分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司;LE2002E/02 电子天平 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;LDZX-50KBS 型高压灭菌锅 上海早安医疗器械厂产品;THZ-98AB 恒温培养振荡箱、DHP-9082 电热恒温培养箱 上海一恒科学仪器有限公司;MX-E 涡旋振荡器 大龙兴创实验仪器北京有限公司;PHS-3C 数显台式酸度计 上海浦春计量仪器有限公司;Tecan 多功能酶标仪(Spark) 奥地利 Tecan Austria GmbH 公司;生物激光共聚焦显微镜(TCS SP8) 德国徕卡公司。

1.2　实验方法

1.2.1　奶源 *Bacillus cereus* 菌株的活化培养　将甘油管冻存的 *Bacillus cereus* 菌株进行活化，以 0.1% 接种量分别接入 10 mL LB 液体培养基，30 ℃、150 r/min 条件下培养 18 h 后，用新鲜 LB 培养基将菌液稀释至 OD_{600} 为 0.3，于 4 ℃ 冰箱中贮存备用。

1.2.2　细菌活力及细胞活性测定　将 OD_{600} 为 0.3 的 *Bacillus cereus* 菌液接入 96 孔细胞培养板每孔 100 μL，30 ℃ 培养 24 h 后测量细菌浓度（OD_{600}）为细菌活力值，然后向每孔添加 20 μL 0.5 mg/mL MTT 密封后 30 ℃ 反应 4 h 离心（4000 r/min，10 min）弃上层液体，再向每孔加 150 μL 二甲亚砜（DMSO），震荡溶解蓝色结晶，在 570 nm 波长下测量各孔光密度，以所有菌株细胞活性（MTT）均值绘图。

1.2.3　菌膜测定　采用 96 孔结晶紫染色法[19] 测定菌膜含量，将 OD_{600} 为 0.3 的 *Bacillus cereus* 菌液接入 96 孔细胞培养板，每孔 100 μL，平行接种 5 个孔，以相同条件的无菌 LB 液体培养基作为阴性对照，30 ℃ 下培养 24 h 后移除菌液，用无菌蒸馏水洗涤 3 次，室温静置 30 min，然后向每孔中加入 100 μL 0.1% 结晶紫溶液，染色 30 min 后弃去结晶紫溶液，用无菌蒸馏水洗涤 3 次并室温静置干燥，再向每孔加入 110 μL 95% 乙醇溶液，脱色 45 min 后用酶标仪测定 570 nm 波长下吸光值，根据 OD_{570} 值的大小衡量菌膜的形成量，分别进行 3 次独立重复试验。按照 STEPANOVIC 等[20] 的菌膜划分标准，以空白对照（空白孔）平均吸光值加上 3 倍标准差为界定值（ODc），将菌株的菌膜形成能力划分为 4 个等级：$OD_{570} \leqslant ODc$，菌膜阴性；$OD_c < OD_{570} \leqslant 2OD_c$，菌膜形成能力较弱；$2OD_c < OD_{570} \leqslant 4OD_c$，菌膜形成能力中等；$4OD_c < OD_{570}$，菌膜形成能力较强。

1.2.4　ROS 测定　采用 DCFH-DA（2，7 二氯荧光素二乙酸酯）法进行 ROS 测量[19]，向形成菌膜的 96 孔板中加入 10 μmol/L 的 DCFH-DA，30 ℃ 避光培养 30 min 后用酶标仪检测每孔的荧光值（激发光波长 488 nm，发射光波长 530 nm），以所有菌株 ROS 的均值绘图。

1.2.5　H_2O_2 对 *Bacillus cereus* 菌膜形成的影响　将 H_2O_2 加入 OD_{600} 为 0.3 的 *Bacillus cereus* 菌液中，使 H_2O_2 终浓度为 0、0.01、0.1、1、10、100 μmol/L，混匀后，分别取 100 μL 加入 96 孔细胞培养板中，设 5 个平行，密封后静置于 30 ℃ 培养箱，24 h 培养后按照 1.2.2、1.2.3、1.2.4 进行细菌活力及细胞活性测定、菌膜测定、ROS 测定。

1.2.6　N-乙酰半胱氨酸（NAC）对 *Bacillus cereus* 菌膜形成的影响　将 NAC 加入 OD_{600} 为 0.3 的 *Bacillus cereus* 菌液中，使 NAC 终浓度为 0、0.0001、0.001、0.01、0.1、1 mmol/L，混匀后，分别取 100 μL 加入 96 孔细胞培养板中，设 5 个平行，密封后静置于 30 ℃ 培养箱，24 h 培养后按照 1.2.2、1.2.3、1.2.4 进行细菌活力及细胞活性测定、菌膜测定、ROS 测定。

1.2.7　二苯基氯化碘盐（DPI）对 *Bacillus cereus* 菌膜形成的影响　将 DPI 加入 OD_{600} 为 0.3 的 *Bacillus cereus* 菌液中，使 DPI 终浓度为 0、0.05、0.1、0.5、1、5、10 μmol/L，混匀后，分别取 100 μL 加入 96 孔细胞培养板中，设 5 个平行，密封后静置于 30 ℃ 培养箱，24 h 后培养后按照 1.2.2、1.2.3、1.2.4 进行细菌活力及细胞活性测定、菌膜测定、ROS 测定。

1.2.8　激光共聚焦显微镜测定菌膜形成　将 1 mL OD_{600} 为 0.3 的 *Bacillus cereus*（CMCC63303）菌液接入 12 孔细胞培养板中作为对照组，分别添加终浓度为 0.01、0.1、1、10、100 μmol/L H_2O_2，终浓度为 0.0001、0.001、0.01、0.1、1 mmol/L NAC，终浓度为 0.05、0.1、0.5、1、5、10 μmol/L DPI 为处理组，置于 30 ℃ 培养箱，24 h 培养后用无菌蒸馏水洗涤 3 次，室温静置 45 min 后用碘化丙啶（PI）荧光染液封片，然后用激光共聚焦显微镜观察菌膜形成。

1.3　数据处理

实验重复三次，采用 Statistix 8.1（分析软件，St Paul，MN）软件包中 Linear Models 程序对数据进行统计分析，采用 Dun 检验进行多重比较确定差异显著性，应用 Excel 2016 和 Adobe illustrator 2020 制作图表。

2　结果与分析

2.1　H_2O_2 对 *Bacillus cereus* 生长及菌膜形成的影响

由图 1 可知，随着 H_2O_2 浓度的升高，细菌活力逐渐下降，所有 H_2O_2 处理组（0.01、0.1、1、10、100 μmol/L）*Bacillus cereus* 活力显著低于对照组细菌活力（$P<0.05$）。由图 1 细胞活性变化趋势可知，当 H_2O_2 浓度 ≥ 1 μmol/L 时，*Bacillus cereus* 细胞活性显著高于 H_2O_2 低浓度处理组（0.01、0.1 μmol/L）细胞活性（$P<0.05$），表明较高浓度的 H_2O_2 对细胞活性有一定的促进作用。

由图 2 可知，0.01、1、100 μmol/L H_2O_2 处理组平均菌膜形成量均高于对照组平均水平（$P<0.05$）。0.01 μmol/L H_2O_2 处理时，Y10、Y22、Y34 菌株形成较强菌膜，BC、N6、L9、L12、L24 菌株形成中等菌膜，N2、L6、L8 菌株形成较弱菌膜；1 μmol/L H_2O_2 处理时，BC、N2、N6、Y10、L24 菌株形成较强菌膜，Y22、Y34、L6、L9、L12 菌株形成中等菌膜，L8 菌株形成较弱菌膜；100 μmol/L H_2O_2 处理时，BC、N2、N6、Y10、Y22、Y34、L8、L12、L24 菌株形成较强菌膜，L6、L9 形成中等菌膜。

由图 2 可知，0.1、10 μmol/L H_2O_2 处理组平均菌膜形成量与对照组平均菌膜水平无显著性差异（$P>0.05$）。0.1 μmol/L H_2O_2 处理时，BC、N6、Y10、Y22、Y34、L12、L24 菌株形成中等菌膜，N2、L6、L8、L9 形成较弱菌膜；10 μmol/L H_2O_2 处理时，BC、Y10、Y22、Y34、L24 菌株形成中等菌膜，N2、N6、L6、L8、L9、L12 菌株形成较弱菌膜；对照组 N2、

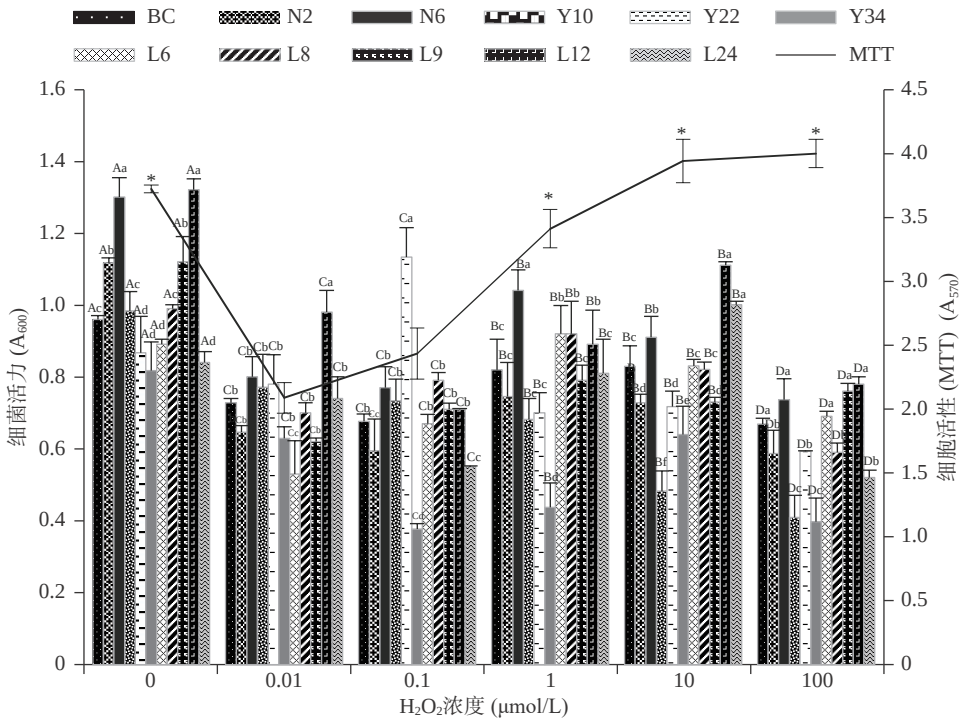


图 1 不同 H_2O_2 浓度对蜡样芽孢杆菌活力和细胞活性的影响

Fig.1 Effect of different H_2O_2 concentration on vigor and viability of *Bacillus cereus*

注: 不同大写字母表示不同处理组间差异显著(P<0.05); 不同小写字母表示同一处理组间差异显著(P<0.05); *表示 P<0.05; **表示 P<0.01; 图 2~图 6 同。

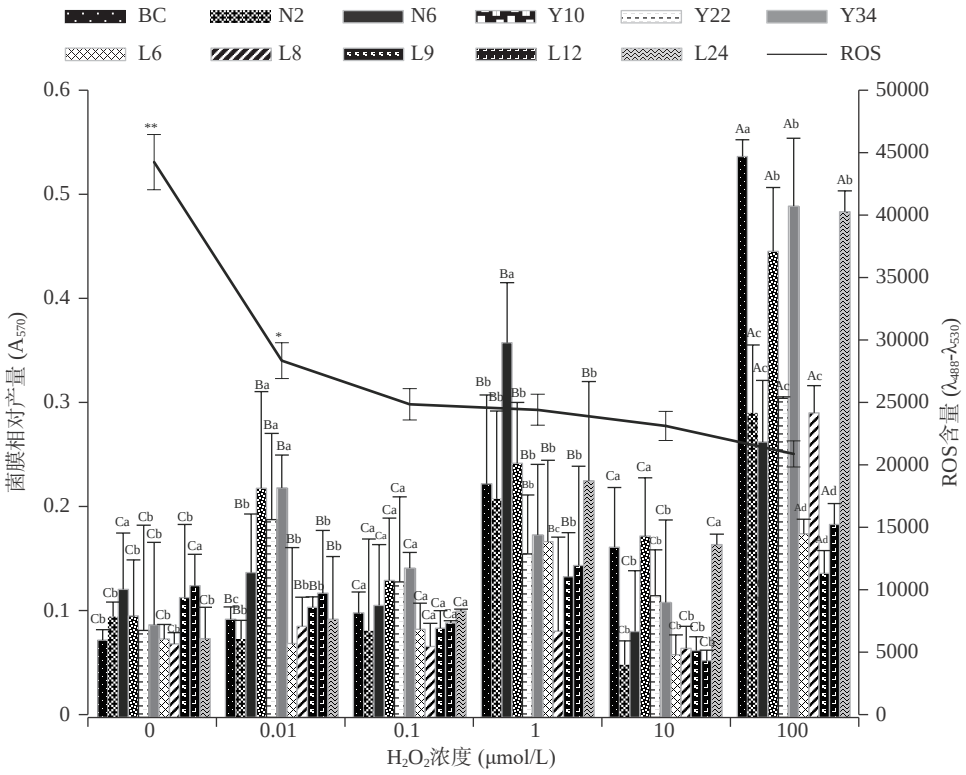


图 2 不同 H_2O_2 浓度对蜡样芽孢杆菌 ROS 产生及菌膜形成的影响

Fig.2 Effect of different H_2O_2 concentration on ROS production and biofilms formation of *Bacillus cereus*

N6、Y10、L9、L12 菌株形成中等菌膜, BC、Y22、Y34、L6、L8、L24 菌株均形成较弱菌膜。可见部分浓度 H_2O_2 处理促进 *Bacillus cereus* 菌膜形成。

由图 2 ROS 变化趋势可知, 随着 H_2O_2 浓度的升高, ROS 逐渐下降。尽管外源补充 H_2O_2 但 ROS 水平并未提高, 这可能是因为 *Bacillus cereus* 对这种外源氧化压力作出应答且菌体本身也在不断产生和消耗 ROS, 因此, 即使外源补充 100 μmol/L H_2O_2,

ROS 含量仍呈下降趋势。这与 REDER 等[21] 的研究发现一致，枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）菌膜相关基因突变株经百草枯和 H_2O_2 等超氧化物生成剂处理后 ROS 含量显著减少（P<0.05）。结果表明：伴随着 ROS 含量的降低，*Bacillus cereus* 菌膜形成量增强，因此，*Bacillus cereus* 菌膜形成与 ROS 的减少相关。

2.2　NAC 对 *Bacillus cereus* 生长及菌膜形成的影响

由图 3 可知，与对照组相比，NAC 各处理组 *Bacillus cereus* 活力显著低于对照组细菌活力（P<0.05），各处理组间细菌活力无显著差异（P>0.05）。NAC 各处理组细胞活性与对照组相比无显著性差异（P>0.05），表明 NAC 处理浓度对 *Bacillus cereus* 的生长和细胞活性的影响不大。这与 GUO 等[22] 研究发现 NAC 处理组浓度对单核细胞增生李斯特氏菌（*Listeria monocytogenes*）的生长和生存能力没有影响的结果一致。

由图 4 可知，NAC 各处理组平均菌膜形成量均显著高于对照组平均菌膜形成量（P<0.05）。各处理组间相比，0.0001 mmol/L NAC 处理组及 0.001 mmol/L NAC 处理组平均菌膜形成量最高，0.01 mmol/L NAC 处理组平均菌膜形成量最低。

当 0.0001 mmol/L NAC 处理时，Y22、Y34 菌株形成较强菌膜；0.001 mmol/L NAC 处理时，N6、Y22、L12 菌株形成较强菌膜；0.1 mmol/L NAC 处理时，Y22 菌株形成较强菌膜；1 mmol/L NAC 处理时，Y10 菌株形成较强菌膜；0.01 mmol/L NAC 处理时，L9、L24 菌株形成较弱菌膜，其他 9 株菌均形成中等菌膜；对照组 N2、N6、Y10、L9、L12 菌株形成中等菌膜，BC、Y22、Y34、L6、L8、L24 菌株均形成较弱菌膜。

由图 4 可知，随 NAC 浓度的升高，ROS 逐渐下降。这是因为 NAC 是 ROS 的清除剂，随着 NAC 浓度的增大，ROS 含量逐渐减小，但 *Bacillus cereus* 菌膜形成量增大。这与 GUERINI 等[23]研究发现铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）菌膜随 NAC 浓度（0.5~4.0 mg/mL）增加而增加的结果一致。结果表明，*Bacillus cereus* 菌膜形成与 ROS 的减少相关。

2.3　DPI 对 *Bacillus cereus* 生长及菌膜形成的影响

由图 5 可知，随着 DPI 浓度的升高，细菌活力逐渐下降，所有 DPI 处理组（0.05、0.1、0.5、1、5、10 μmol/L）*Bacillus cereus* 活力显著低于对照组细菌活力（P<0.05）。由图 5 细胞活性变化趋势知，随着 DPI 浓度的升高，细胞活性也逐渐减弱，当 DPI 浓度大于 1 μmol/L 时，*Bacillus cereus* 细胞活性显著低于对照组（P<0.05）但仍有细胞活性。

由图 6 可知，当 DPI 浓度 ≤1 μmol/L 时，随着 DPI 浓度的升高，平均菌膜形成量均高于对照组平均菌膜水平（P<0.05）。其中，0.1 μmol/L DPI 处理组及 1 μmol/L DPI 处理组平均菌膜形成量最高，显著高于 0.05 μmol/L DPI 处理组及 0.5 μmol/L DPI 平均菌膜形成量（P<0.05）。0.1 μmol/L DPI 处理时，N6、L9、L12 菌株形成较强菌膜；1 μmol/L DPI 处理时，N6 菌株形成较强菌膜，其他菌株均形成中等菌膜；0.05 μmol/L DPI 处理时，Y34 菌株形成较弱菌膜，其他菌株均形成中等菌膜；0.5 μmol/L DPI 处理时，BC、Y34、L24 菌株形成较弱菌膜，其他菌株均形成中等菌膜。

当 DPI 浓度>5 μmol/L 时，随着 DPI 浓度的升

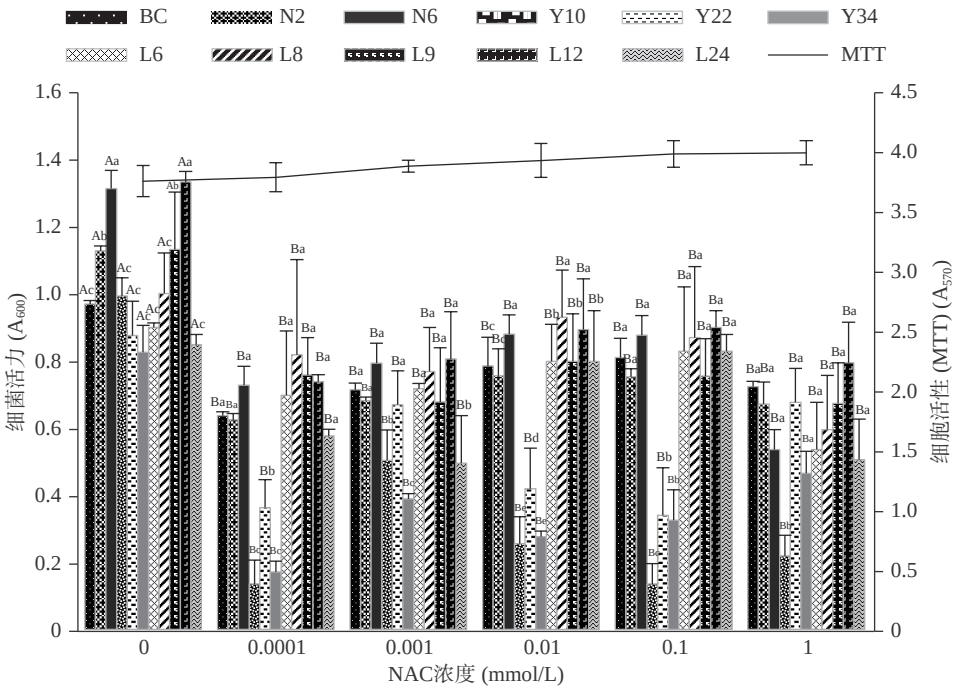


图 3　不同 NAC 浓度对蜡样芽孢杆菌活力和细胞活力的影响

Fig.3　Effect of different NAC concentration on vigor and viability of *Bacillus cereus*

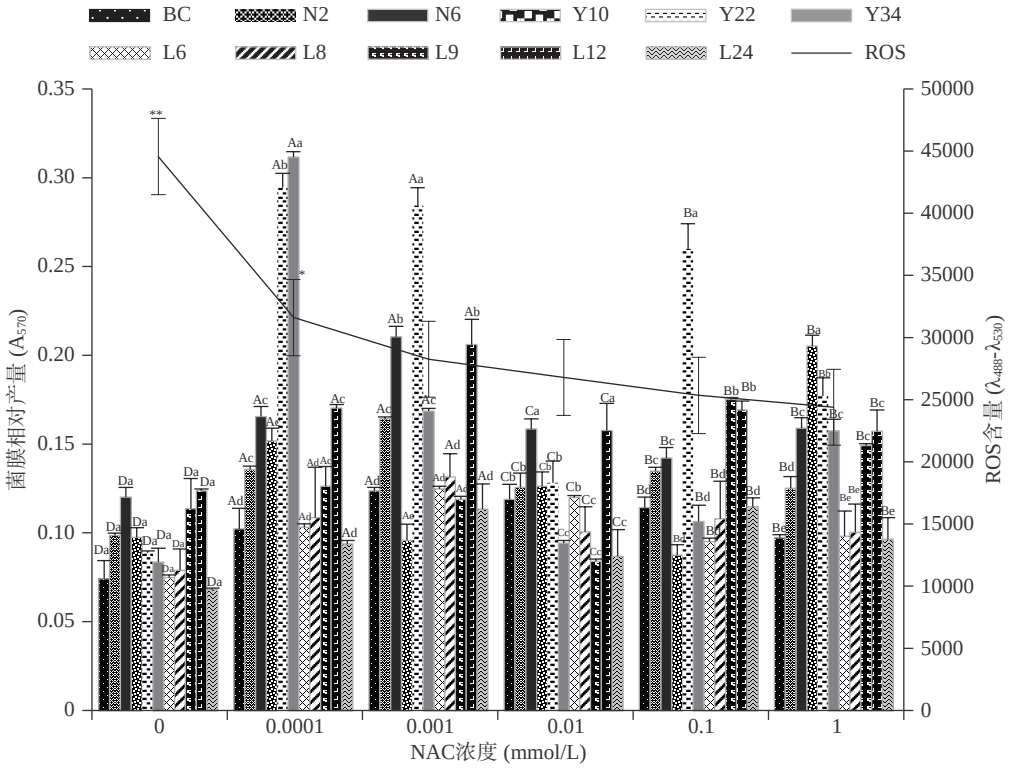


图 4 不同 NAC 浓度对蜡样芽孢杆菌 ROS 产生及菌膜形成的影响

Fig.4 Effect of different NAC concentration on ROS production and biofilms formation of *Bacillus cereus*

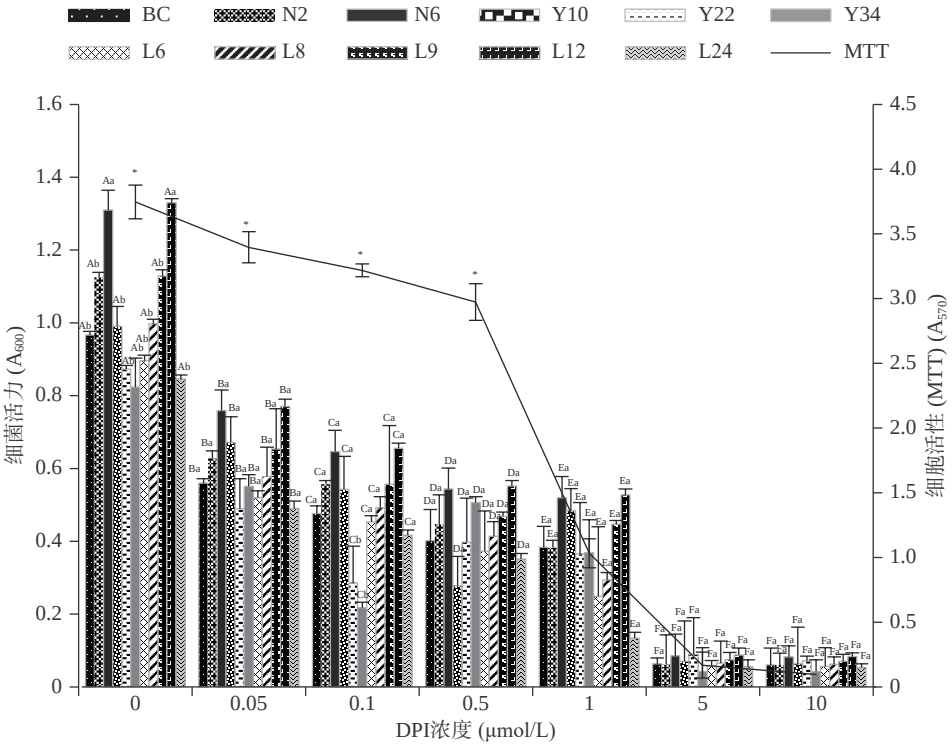


图 5 不同 DPI 浓度对蜡样芽孢杆菌活力和细胞活力的影响

Fig.5 Effect of different DPI concentration on vigor and viability of *Bacillus cereus*

高，平均菌膜形成量低于对照组平均菌膜水平（P<0.05）。5 μmol/L DPI 处理组平均菌膜形成量显著高于 10 μmol/L DPI 处理组平均菌膜形成量（P<0.05）。5 μmol/L DPI 处理时，N6、Y10、L9、L12 菌株形成中等菌膜，其他菌株均形成较弱菌膜；10 μmol/L DPI 处理时，N6、L9、L12 菌株形成中等菌膜，其他菌株均形成较弱菌膜；对照组 N2、N6、Y10、L9、L12 菌株形成中等菌膜，其他菌株 BC、Y22、Y34、L6、L8、L24 形成较弱菌膜。

由图 6 ROS 变化趋势可知，随着 DPI 浓度的升高，ROS 的产生水平呈 U 型趋势。这是因为 DPI 是一种 NADPH 氧化酶抑制剂，抑制 ROS 产生，当 DPI

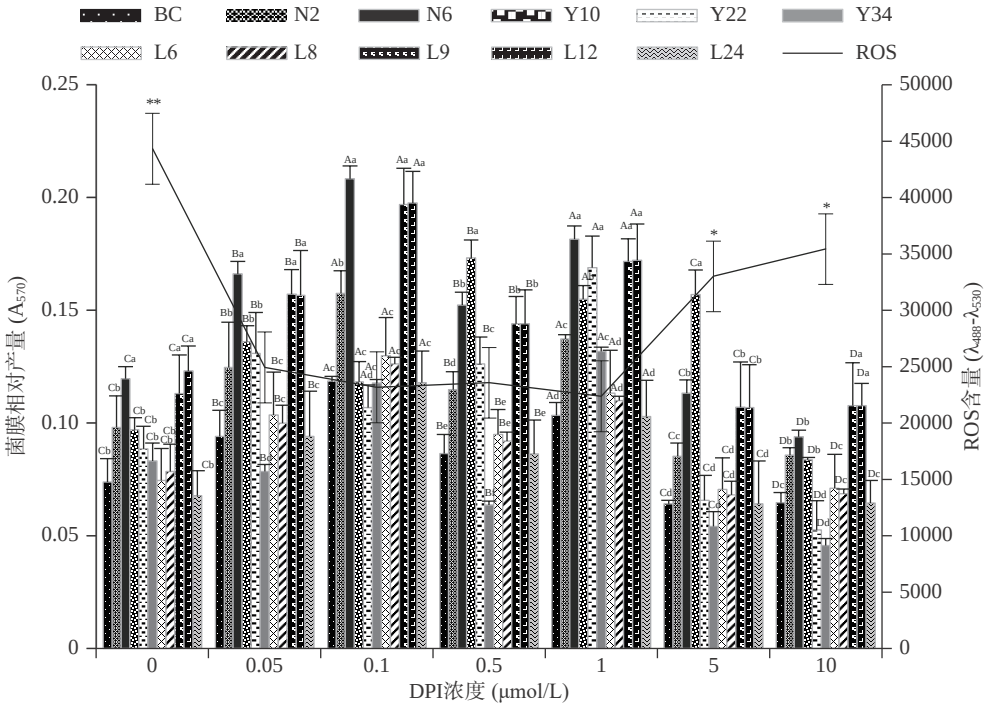


图 6　不同 DPI 浓度对蜡样芽孢杆菌 ROS 产生及菌膜形成的影响

Fig.6　Effect of different DPI concentration on ROS production and biofilms formation of *Bacillus cereus*

浓度≤1 μmol/L 时，随着 DPI 浓度的升高，ROS 逐渐下降；当 DPI 浓度>5 μmol/L 时，随着 DPI 浓度的升高，ROS 含量升高。结果表明：ROS 产生和菌膜形成的趋势相反，即低浓度 DPI 处理伴随 ROS 的降低，*Bacillus cereus* 菌膜形成量的增加，高浓度 DPI 处理伴随 ROS 含量的升高，*Bacillus cereus* 菌膜形成量的减少，因此，*Bacillus cereus* 菌膜形成与 ROS 的减少相关。

2.4　激光共聚焦显微镜测定菌膜形成

由图 7A 可知，0.01 μmol/L H_2O_2、1 μmol/L H_2O_2、100 μmol/L H_2O_2 处理组与对照组相比具有更强的染色效果，菌膜呈现红色的网络结构，而未经处理组（对照组）呈现松散的结构和更少的菌膜生物量，与图 2 定量菌膜形成结果一致。由图 7B 可知，NAC 各处理组与对照组相比具有更强的染色，各处理组菌膜呈现红色的网络结构，而对照组显示松散的结构和较少的菌膜生物量，与图 4 定量菌膜形成结果一致。由图 7C 可知，低浓度各处理组（DPI≤1 μmol/L）与对照相比具有更亮的染色，呈现红色的网络结构，高浓度处理组（DPI>5 μmol/L）随着 DPI 浓度的升高，红

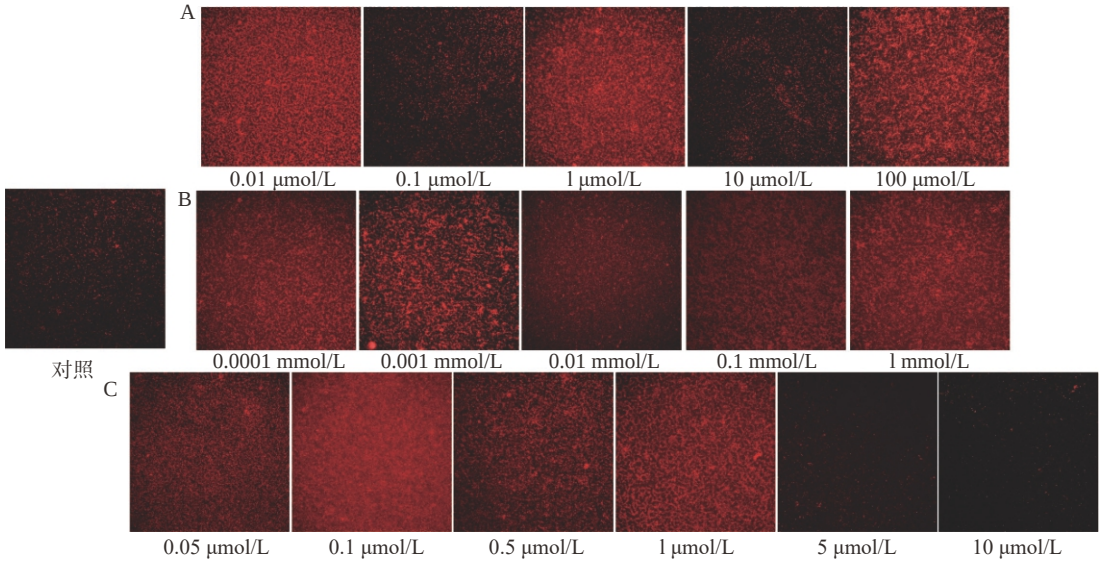


图 7　共聚焦显微镜下观察不同浓度（H_2O_2、NAC、DPI）对蜡样芽孢杆菌菌膜形成的影响

Fig.7　Effect of different concentrations (H_2O_2, NAC, DPI) on the formation of *Bacillus cereus* biofilms observed under confocal microscope

注：A：H_2O_2；B：NAC；C：DPI。

色信号越来越弱，当 10 μmol/L DPI 浓度处理时，视野中红色信号极少，表明低浓度的 DPI 处理对 *Bacillus cereus* 菌膜形成起促进作用，高浓度 DPI 处理对 *Bacillus cereus* 菌膜形成起抑制作用，与图 6 定量菌膜形成结果一致。因此，综合以上结果，本研究得到 *Bacillus cereus* 菌膜形成与 ROS 减少相关的结论，这与 HAJ 等[24] 发现金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）菌膜的形成依赖于 ROS 诱导量减少有关的研究结果一致。

3 结论与讨论

ROS 包括羟基自由基（OH）、原子氧（O）、过氧化氢（H_2O_2）、单线态氧（$^1O_2$）和臭氧（O_3）等，ROS 的累积超过允许水平会对各种大分子（DNA、蛋白质和脂质）造成损害，最终导致细胞死亡[25]，ROS 在生物体中的作用不是单一的、绝对的，细菌往往会通过某些途径主动生成较低水平的 ROS，这些 ROS 在细菌中起到信号或是调节的作用，激发细菌某些特殊机制，如进入防御状态、辅助细菌入侵宿主细胞、抑制环境中其他竞争者等[26]。CAP 等[27] 研究发现一定水平的 ROS 诱导会保护机体免受压力机制，引起菌体对压力适应性反应，ROS 可能是作为诱导细菌群落分化和信号传递的信号分子，ROS 诱导遗传变异促进特定菌膜区域的细胞死亡，以部分细胞的死亡增加同一群体中其他细胞的存活。

因此，ROS 作为一种信号分子，探究其在细菌及其菌膜形成中的具体作用，有利于研发新型高效的抑菌剂和杀菌剂。本研究从不同奶源 *Bacillus cereus* 分离株的菌膜形成分析入手，以一定浓度的 H_2O_2、NAC、DPI 处理待测菌株，采用 96 孔结晶紫定量测定及激光共聚焦显微镜观察菌膜形成情况，实验中测试了细菌细胞活力，以排除试剂对细菌活性的影响，发现 ROS 是 *Bacillus cereus* 菌膜形成的潜在信号分子，随着 ROS 的减少，*Bacillus cereus* 菌膜形成量增加。在未来的研究中，还需进一步剖析外源 ROS 和内源 ROS 在调节菌膜形成中是否发挥不同的作用，并检测可疑 NADPH 氧化酶的敲除和过表达是否改变 *Bacillus cereus* 的 ROS 产生和菌膜形成，这将有助于理解 *Bacillus cereus* 与 ROS 相关的菌膜形成机制。

参考文献

[1] STENFORS ARNESEN L P, FAGERLUND A, GRANUM P E. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins[J]. Fems Microbiology Reviews, 2008, 32(4): 579−606.

[2] BAJPAI V K, PARK I, KHAN I, et al. (−)-Tetrahydroberberrubine acetate accelerates antioxidant potential andinhibits food associated *Bacillus cereus* in rice[J]. Food Chemistry, 2021, 339: 127908.

[3] LUO X R, ZHANG B P, LU Y H, et al. Advances in application of ultraviolet irradiation for biofilm control in water and wastewater infrastructure[J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 421: 126682.

[4] LV R, ZOU M, CHEN W J, et al. Ultrasound: Enhance the detachment of exosporium and decrease the hydrophobicity of *Bacillus cereus* spores[J]. LWT, 2019, 116: 108473.

[5] PORCELLATO D, SKEIE S B, MELLEGARD H, et al. Characterization of *Bacillus cereus* sensulato isolates from milk for consumption, phylogenetic identity, potential for spoilage and disease [J]. Food Microbiol, 2021, 93: 103604.

[6] KUMARI S, SARKAR P K. *Bacillus cereus* hazard and control in industrial dairy processing environment[J]. Food Control, 2016, 69: 20−29.

[7] FAGERLUND A, DUBOIS T, ØKSTAD O A, et al. SinR controls enterotoxin expression in *Bacillus thuringiensis* biofilms[J]. PLoS ONE, 2014, 9: e87532.

[8] LINDBACK T, MOLS M, BASSET C, et al. CodY, a pleiotropic regulator, influences multicellular behavior and efficient production of virulence factors in *Bacillus cereus*[J]. Environ Microbiol, 2012, 14: 2233−2246.

[9] HAYRAPETYAN H, TEMPELAARS M, NIEROPGROOT M, et al. *Bacilluscereus* ATCC 14579 RpoN (Sigma 54) is a pleiotropic regulator of growth, carbohydrate metabolism, motility, biofilm formation and toxin production[J]. PLoS One, 2015, 10: 134872.

[10] KWON M, HUSSAIN M S, OH D H, et al. Biofilm formation of *Bacillus cereus* under food-processing-related conditions[J]. Food Sci Biotechnol, 2017, 26(4): 1103−1111.

[11] 夏俊芳, 卢岩, 古丽娜孜, 等. 四种不同接触表面蜡样芽孢杆菌菌膜形成的影响分析[J]. 食品工业科技, 2018, 10(38): 159−163. [XIA J F, LU Y, GU L N Z, et al. Effects of four kinds of contact surfaceson formation of *Bacillus cereus* biofilm[J]. Food Industry Technology, 2018, 10(38): 159−163.]

[12] CORCIONIVOSCHI N, ALVAREZ L A, SHARP T H, et al. Mucosal reactive oxygen species decrease virulence by disrupting *Campylobacter jejuni* phosphotyrosine signaling[J]. Cell Host & Microbe, 2012, 12(1): 47−59.

[13] SHIVAPRASAD D P, TANEJA N K, LAKRA A, et al. *In vitro* and in situ abrogation of biofilm formation in *E. coli* by vitamin C through ROS generation, disruption of quorum sensing and exopolysaccharide production[J]. Food Chem, 2021, 341: 128171.

[14] SUO Y J, HUANG Y Y, LIU Y H, et al. The expression of superoxide dismutase (SOD) and a putative ABC transporter permease is inversely correlated during biofilm formation in *Listeria monocytogenes* 4b G[J]. Plos One, 2012, 7(10): e48467.

[15] WHITE A N, LEARMAN B S, BRAUER A L, et al. Catalase activity is critical for proteus mirabilis biofilm development, extracellular polymeric substance composition, and dissemination during catheter-associated urinary tract infection[J]. Infection and Immunity, 2021, 89(10): e0017721.

[16] KULKARNI R, ANTALA S, WANG A, et al. Cigarette smoke increases *Staphylococcus aureus* biofilm formation via oxidative stress[J]. Infect Immun, 2012, 80(11): 3804−3811.

[17] VILLA F, REMELLI W, FORLANI F, et al. Effects of chronic sub-lethal oxidative stress on biofilm formation by azotobac-

ter vinelandii[J]. Biofouling, 2012, 28(8): 823−833.

[18] WANG L, CHONG H Q, JIANG R R. Comparison of alkyl hydroperoxide reductase and two water-forming NADH oxidases from *Bacillus cereus* ATCC 14579[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 96: 1265−1273.

[19] 张超, 陈国薇, 杨玉萍, 等. 活性氧调节单核细胞增生李斯特菌菌膜形成[J]. 食品科学, 2013, 34(23): 189−192. [ZHANG C, CHEN G W, YANG Y P, et al. Reactive oxygen species (ROS) regulates *Listeria monocytogenes* biofilm formation[J]. Food Science, 2013, 34(23): 189−192.]

[20] STEPANOVIC S, VUKOVIC D, DAKIC I, et al. A modified microtiter-plate test for quantification of *Staphylococcal* biofilm formation[J]. Journal of Microbiological Methods, 2000, 40: 175−179.

[21] REDER A, HOPER D, GERTH U, et al. Contributions of individual sigma B dependent general stress genes to oxidative stress resistance of *Bacillus subtilis*[J]. J Bacteriol, 2012, 194: 3601−3610.

[22] GUO L, ZHANG C, CHEN G W, et al. Reactive oxygen species inhibit biofilm formation of *Listeria monocytogenes*[J]. Microbial Pathogenesis, 2019, 127: 183−189.

[23] GUERINI M, PERUGINI P, GRISOLI P. Evaluation of the effectiveness of N-Acetylcysteine (NAC) and N-acetylcysteine-cyclodextrins multi-composite in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation[J]. Applied Science, 2020, 10: 3466.

[24] HAJ C, LICHTENBERG M, NIELSEN K L, et al. Catalase protects biofilm of *Staphylococcus aureus* against daptomycin activity[J]. Antibiotics, 2021, 10: 511.

[25] PAUL P, CHAKRABORTY P, CHATTERJEE A, et al. 1,4-Naphthoquinone accumulates reactive oxygen species in *Staphylococcus aureus*: A promising approach towards effective management of biofilm threat[J]. Archives of Microbiology, 2021, 203: 1183−1193.

[26] 刘武康, 吴淑燕, 陈国薇, 等. 细菌产生的活性氧及其功能[J]. 微生物学杂志, 2016, 36(1): 89−95. [LIU W K, WU S Y, CHEN G W, et al. The reactive oxygen species generated by bacteria and its functions[J]. Journal of Microbiology, 2016, 36(1): 89−95.]

[27] CAP M, VACHOVA L, PALKOVA Z. Reactive oxygen species in the signaling and adaptation ofmulticellular microbial communities[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2012, 13: 976753.

陈伟玲, 陈邦栋, 廖惠青, 等. 皮蛋清抗氧化肽制备工艺优化及体外抗氧化性 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 148−155. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021040198

CHEN Weiling, CHEN Bangdong, LIAO Huiqing, et al. Optimization of the Preparation Process of Antioxidant Peptide from Preserved Egg White and Its *in Vitro* Antioxidant Activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 148−155. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021040198

· 工艺技术 ·

皮蛋清抗氧化肽制备工艺优化及体外抗氧化性

陈伟玲, 陈邦栋, 廖惠青, 覃海桑, 梁文静

（贺州学院食品与生物工程学院, 广西贺州 542899）

摘　要: 以清料法腌制成熟的皮蛋清为原料，在单因素实验基础上，以物料比（皮蛋清与蒸馏水质量比）、酶解时间和酶添加量为考察因素，以水解度和 DPPH 自由基清除率为响应值，利用响应面试验优化设计得出皮蛋清抗氧化性多肽制备的最佳工艺参数：物料比 1∶10.4 g/mL、酶解时间 4.1 h、酶添加量 0.57%，该条件下的水解度为 11.23%，DPPH 自由基清除率为 89.76%，最佳工艺下的酶解液具备一定的抗氧化性。当酶解液浓度为 10.4 mg/mL 时还原力、超氧阴离子自由基（$O_2^{-}\cdot$）清除率和羟基自由基（·OH）清除率分别为 0.599、66.78% 和 79.63%。

关键词: 皮蛋清, 多肽, 水解度, 抗氧化

中图分类号: TS253.4　　**文献标识码:** B　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0148−08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021040198

本文网刊:

Optimization of the Preparation Process of Antioxidant Peptide from Preserved Egg White and Its *in Vitro* Antioxidant Activity

CHEN Weiling, CHEN Bangdong, LIAO Huiqing, QIN Haisang, LIANG Wenjing

（College of Food and Bioengineering, Hezhou University, Hezhou 542899, China）

Abstract: The mature preserved egg white pickled by the clearing method was utilized as the raw material. The solid to liquid ratio, hydrolysis time, and the addition of enzyme were set as the inspection factors, and the degree of hydrolysis and the DPPH free radical scavenging rate were set as response values. The optimal process parameters for the preparation of antioxidant peptides from preserved egg whites were derived using response surface testing optimization design as follows: Solid to liquid ratio was 1∶10.4 g/mL, hydrolysis time was 4.1 h and the addition of enzyme was 0.57%. The degree of hydrolysis was 11.23% and scavenging capacity of DPPH free radical was 89.76% at this time. The hydrolysate under the optimal process possessed certain antioxidant capacity. And the reducing power, superoxide anion radical ($O_2^{-}\cdot$) scavenging rate and hydroxyl radical (·OH) scavenging rate were 0.599, 66.78% and 79.63%, respectively, when the enzyme digest concentration was 10.4 mg/mL.

Key words: preserved egg white; peptide; degree of hydrolysis; antioxidation

皮蛋是我国传统名特产蛋制品, 常使用清料法制备, 即使用腌制液浸泡新鲜鸭蛋 28~42 d 以获得皮蛋。皮蛋具有风味独特、蛋清棕褐透亮、蛋黄色层分明等优点[1]。常见的腌制皮蛋方法有包埋法、浸渍法等, 主要是利用氢氧化钠作用于蛋内蛋白质, 使其发生变性生成凝胶态[2−4]。自由基能使人体内正常细胞受损, 导致机体损伤而出现衰老、癌症等疾病的发生。利用绿色、天然、健康的材料制备抗氧化活性物质清除自由基是目前研究的主流, 比如姜黄素[5]、茶多酚[6]、花青素[7] 和抗氧化性多肽等。有研究发现, 抗氧化性多肽能够清除部分体内自由基, 保护机体免受自由基的影响, 维持细胞的正常结构和功能, 如猴

收稿日期: 2021−04−26

基金项目: 广西中青年基础能力提升项目（2020KY18019）。

作者简介: 陈伟玲（1984−）, 女, 硕士, 实验师, 研究方向: 畜禽产品加工, E-mail: 415179823@qq.com。

头菇多肽[8]、核桃多肽[9]、蚕豆多肽[10] 等。对新鲜蛋制品中多肽制备及活性鉴定已有大量研究，比如：利用碱性蛋白酶、胰蛋白酶、中性蛋白酶处理新鲜鸡蛋清或鸭蛋清，制备具有抗氧化性的功能多肽[11−14]。然而，针对皮蛋清的综合利用和功能活性的开发研究较少。

本文利用清料法腌制成熟的皮蛋清为原料，采用风味蛋白酶水解技术，通过响应面优化以确定皮蛋清抗氧化性多肽的最佳制备工艺参数，并测定了多肽的抗氧化活性，旨在为皮蛋的功能性研究提供理论依据和数据支持，为皮蛋清的进一步开发利用提供研究背景。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

新鲜鸭蛋　购于广西贺州市平桂区农户；氢氧化钠(NaOH)、盐酸(HCl)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、邻苯三酚、乙醇、甲醛、H_2O_2、水杨酸、铁氰化钾、硫酸西　分析纯，百灵威公司；风味蛋白酶(50000 U/g)、维生素 C(V_C)　美国 sigma 公司。

HH-4 数显恒温水浴锅　常州澳华仪器有限公司；UV-2600 紫外分光光度计　日本岛津；5804R 高速冷冻离心机　德国艾本德仪器公司；Alpha1-2 真空冷冻干燥机　德国 Martin Christ 公司；KJELTEC 8200 凯氏定氮仪　丹麦福斯公司。

1.2　实验方法

1.2.1　皮蛋清的制备　蛋重 65~75 g 鸭蛋数枚，流水清洗干净表面脏物，自然晾干备用。按 1∶1.5(w/v)比例配制腌制液，比例如下，NaOH 4.5%、NaCl 3.5%、$CuSO_4$ 0.1%、$ZnSO_4$ 0.1%、红茶末 0.1%。将晾干后的鸭蛋浸入腌制液中，浸泡四周后出缸，流动水清洗表面后用液体石蜡包裹皮蛋，后熟两周[15]。取完整无变质的皮蛋数枚，去掉蛋壳和蛋黄，收集蛋清备用。

1.2.2　皮蛋清抗氧化多肽的酶解工艺　将皮蛋清和蒸馏水按一定比例混合后，添加适量风味蛋白酶，调节 pH，置于恒温水浴锅中进行酶解反应，反应结束后沸水中灭酶 10 min，过 0.45 μm 微滤膜后得到皮蛋清抗氧化肽粗提液，55 ℃ 下旋蒸除去多余水分，冷冻干燥后得到多肽粉并置于−18 ℃ 下保存[16]。

1.2.3　皮蛋清抗氧化肽制备单因素实验　选取酶解温度(40、45、50、55、60 ℃)、酶解时间(2.5、3、3.5、4、4.5 h)、物料比(1∶4、1∶6、1∶8、1∶10、1∶12 g/mL)、pH(5.0、5.5、6.0、6.5、7.0)和酶添加量(0.4%、0.6%、0.8%、1.0%、1.2 %)为单因素。固定酶解参数为：反应温度 50 ℃，酶解时间 4 h，物料比 1∶10 g/mL，pH6.0，酶添加量 0.6%，分别改变其中一个单因素进行实验，测定水解度和 DPPH 自由基清除率，得出最佳反应参数。

1.2.4　响应面优化试验　在单因素实验结果的基础上，选取三因素三水平试验设计，以物料比(X_1)、酶解时间(X_2)、酶用量(X_3)为考察因素，水平设置如表 1，以水解度(Y_1)和 DPPH 自由基清除率(Y_2)为响应值，得出酶解最佳工艺组合参数。

表 1　响应面试验因素水平设计

Table 1　Factors and levels design of response surface methodology

因素	水平		
	−1	0	1
X_1 物料比(g/mL)	1∶8	1∶10	1∶12
X_2 酶解时间(h)	3.5	4	4.5
X_3 酶用量(%)	0.4	0.6	0.8

1.2.5　水解度的测定　酶解液水解度的测定采用甲醛滴定法[17] 进行，具体如下：称取 5.00 g 水解样品于 100 mL 容量瓶中，加水至刻度，混匀。静置备用。吸取上述稀释液 20 mL 置于 200 mL 烧杯中，加水 60 mL，用氢氧化钠标准滴定溶液(0.05 mol/L)滴定至 pH8.2，记录消耗氢氧化钠标准滴定溶液的体积。向上述溶液中准确加入 10 mL 中性甲醛溶液，混匀。再用氢氧化钠标准滴定溶液继续滴定至 pH9.2，记录加入甲醛滴定所消耗氢氧化钠标准滴定溶液的体积。同时制作试剂空白实验。水解样品中氨基氮的含量计算公式：

$$X=\frac{(V_1-V_2)\times C\times 0.014}{5\times(V_3/100)} \qquad 式（1）$$

式中：X 试样中氨基酸态氮的含量，g/100 g；V_1 测试试样稀释液加入甲醛后消耗标准碱液的体积，mL；V_2 测定空白试样消耗标准碱液的体积，mL；V_3 稀释液的体积，mL；C 氢氧化钠的浓度，mol/L；0.014，与 1 mL 氢氧化钠标准滴定溶液(1.0 mol/L)相当的氮的质量。

取 1.00 mL 水解液进行湿法消化处理，凯氏定氮仪定氮，DH 的结果计算公式如下：

$$DH=\left(\frac{m_1}{6.32\cdot m_2}-0.33\right)/7.8\times 100 \qquad 式（2）$$

式中：DH 为蛋白质水解度，%；m_1 为测定出的-NH_2 含量，g/mL；m_2 为蛋白质的 N 含量，g/mL。

1.2.6　DPPH 自由基清除率　DPPH 自由基清除率的测定根据文献 [18] 进行，具体如下：称取适量冷冻干燥粉末溶于蒸馏水中，调整浓度为 10 mg/mL，取 2 mL 溶解液，加入 2 mL 1.32×10^{-5} mol/L 的 DPPH 乙醇溶液，充分混匀，置于 517 nm 下测定吸光度，以未加入样品的 DPPH 乙醇溶液作空白。DPPH 自由基清除公式计算如下：

$$清除率(\%)=\left(\frac{A_0-A_1}{A_0}\right)\times 100 \qquad 式（3）$$

式中，A_0 表示空白对照吸光度，A_1 表示样品吸光度。

1.2.7 还原力的测定 还原力的测定参考 OYAIZU 等[19] 建立的方法，具体如下：取不同含量酶解液，加入 2 mL 0.2 mol/L 磷酸缓冲液（pH6.6）和 2 mL 1% 的铁氰化钾溶液，50 ℃ 保温 20 min 后再加入 2 mL 10% 的三氯乙酸溶液，混合后以 3000 r/min 离心 10 min，取上清液 2 mL，加入 2 mL 蒸馏水以及 0.4 mL 0.1% 的三氯乙酸溶液，室温反应 10 min 后，测定其在 700 nm 处的吸光值，以 V_C 作阳性对照。

1.2.8 O_2^-·清除率的测定 取 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液（pH8.2）4.5 mL，置于 25 ℃ 水浴中预热 20 min，分别加入不同含量酶解液和 0.4 mL 25 mmol/L 邻苯三酚溶液，混匀后于 25 ℃ 水浴中反应 5 min，加入 1 mL 8 mol/L HCl 终止反应，于 299 nm处测定吸光度（A_i），空白对照组以相同体积的蒸馏水代替样液（A_0），以维生素 C 作阳性对照，清除率计算如式[20]。

$$清除率(\%)=\frac{A_0-A_i}{A_0}\times 100 \qquad 式（4）$$

1.2.9 ·OH 清除率的测定 采用 Fenton 反应，利用 H_2O_2 与 Fe^{2+}混合产生·OH，在该体系中加入水杨酸捕捉羟基自由基并产生有色物质，该物质在 510 nm 处有最大吸收[21]。加入不同含量酶解液，2 mL 6 mmol/L $FeSO_4$，2 mL 9 mmol/L 水杨酸，2 mL 6 mmol/L H_2O_2 混匀，37 ℃ 水浴中加热 30 min，于 510 nm 处测定样品吸光度（A_i），将体系中的样品改为加入 4 mL 蒸馏水，测定空白对照吸光度（A_0），向体系中加入 2 mL 蒸馏水代替 6 mmol/L H_2O_2 时，测定样品本底吸光度（A_j），其中每个质量的样品浓度做 3 个平行，以维生素 C 作阳性对照。

$$清除率(\%)=\left(1-\frac{A_i-A_j}{A_0}\right)\times 100 \qquad 式（5）$$

1.3 数据处理

采用 Origin 8.5、Design Expert 8.0 软件对本试验数据进行统计分析，每组数据进行 3 次，并表示为平均值±标准差。

2 结果与讨论

2.1 单因素实验

2.1.1 酶解温度对水解度和 DPPH 自由基清除率的影响 图 1 反映的是温度对水解度和 DPPH 自由基清除率的影响，二者均随温度的增加呈先上升后下降的趋势，均在 50 ℃ 时取得最大值。这是因为在一定范围内，随着温度的升高，蛋白酶活性提高，蛋白质水解度增加，而温度的进一步升高会使蛋白酶失活，因此在温度大于 50 ℃ 时，水解度和 DPPH 自由基清除率降低。综合以上水解度和 DPPH 自由基清除率的结果，发现蛋白酶的最适水解温度为 50 ℃，故选择酶解温度 50 ℃ 进行后续实验。

2.1.2 酶解 pH 对水解度和 DPPH 自由基清除率的影响 图 2 反映酶解液 pH 对水解度和 DPPH 自由基清除率的影响，在 pH6.0 时水解度和 DPPH 自由基均取得最大值。在不同 pH 下的 DPPH 自由基清除率不同。这是因为 pH 过高或过低会造成蛋白酶失活或导致蛋白酶结构被破坏，造成蛋白酶酶解效率下降，水解度和 DPPH 自由基清除率下降。综上所述，试验中蛋白酶的最适 pH 为 6.0，故选择 pH6.0 进行后续实验。

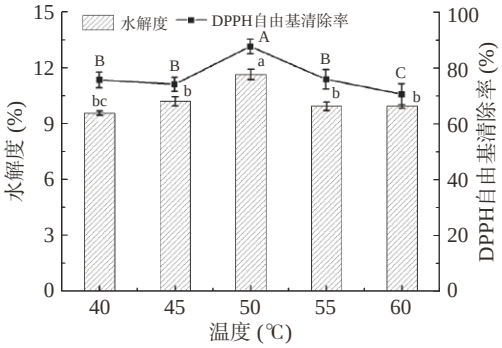


图 1 酶解温度对皮蛋清水解度和 DPPH 自由基清除率的影响

Fig.1 Effects of hydrolysis temperature on the DH and DPPH free radical scavenging rate

注：不同字母表示同一指标不同处理间差异显著（$P<0.05$）；图 2~图 5 同。

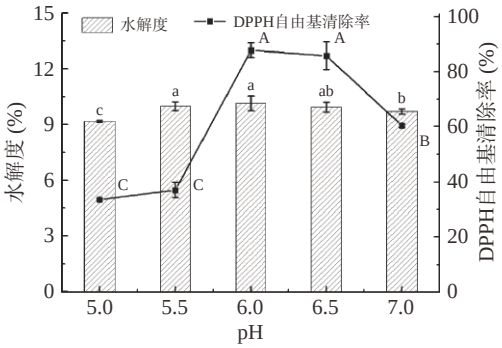


图 2 酶解 pH 对皮蛋清水解度和 DPPH 自由基清除率的影响

Fig.2 Effects of hydrolysis pH on the DH and DPPH free radical scavenging rate

2.1.3 酶解时间对水解度和 DPPH 自由基清除率的影响 酶解时间对水解度和 DPPH 自由基清除率的影响如图 3 所示，随酶解时间的延长，水解度和

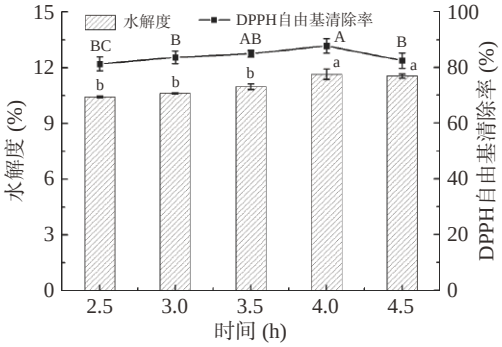


图 3 酶解时间对皮蛋清水解度和 DPPH 自由基清除率的影响

Fig.3 Effects of hydrysis time on the DH and DPPH free radical scavenging rate

DPPH 自由基清除率均呈先上升后下降的趋势，在酶解 4 h 时水解度和 DPPH 自由基清除率达到最大值，但 DPPH 自由基清除率在 4~4.5 h 时下降。这可能是由于随着酶解时间的延长，酶解程度逐渐加深，而酶解时间过长，会导致皮蛋清酶解过度，造成抗氧化活性肽的降解或生成低活性的氨基酸，使得 DPPH 自由基清除率降低[22]。综上所述，选择酶解时间为 4 h 进行后续实验。

2.1.4　物料比对水解度和 DPPH 自由基清除率的影响　物料比对水解度和 DPPH 自由基清除率的影响结果如图 4 所示。由图 4 可知，随着物料比的增大，DPPH 自由基清除率呈先增加后降低的趋势，与水解度均在物料比 1∶10 g/mL 时取得最大值。这是因为随着物料比的增加，皮蛋清与蛋白酶接触充分，从而酶解效率提高，而随着物料比的进一步增加，底物与蛋白酶被稀释，接触机率减少，导致酶解不完全[23]。综上所述，选择物料比为 1∶10 g/mL 进行后续实验。

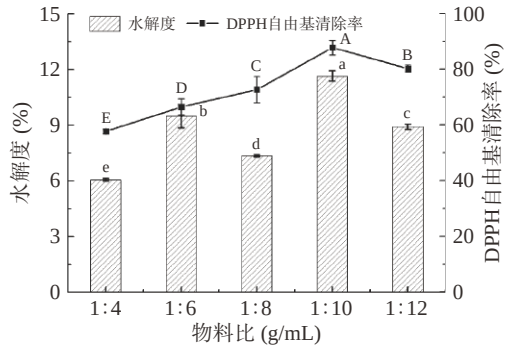


图 4　酶解物料比对皮蛋清水解度和 DPPH 自由基清除率的影响

Fig.4　Effects of solid to liquid ratio on the DH and DPPH free radical scavenging rate

2.1.5　酶用量对水解度和 DPPH 自由基清除率的影响　酶用量对水解度和 DPPH 自由基清除率的影响如图 5 所示。由图 5 可知，酶添加量为 0.6% 时，水解度和 DPPH 自由基清除率取得最大值。当酶添加量为 0.6% 时，DPPH 自由基清除率显著高于其它组别(P<0.05)，酶添加量大于 0.6% 时，DPPH 自由基清除率差异不显著(P>0.05)；酶添加量为 0.4% 和 0.6% 组的水解度无显著差异(P>0.05)，但显著高于酶添加量 0.8%、1.0% 和 1.2% 组别的水解度(P<0.05)，而酶添加量 0.8%、1.0% 和 1.2% 组别的水解度无显著差异(P>0.05)。这是因为随着酶用量的增加，皮蛋清与蛋白酶接触更充分，而随着蛋白酶用量的增加，会使皮蛋清水解过度。蛋白酶用量超过了与皮蛋清充分反应所需量时，皮蛋清不会发生更为强烈的水解，同时水解产生的活性肽及活性官能团并不会增多[24]。综上所述，选择酶用量为 0.6% 进行后续实验。

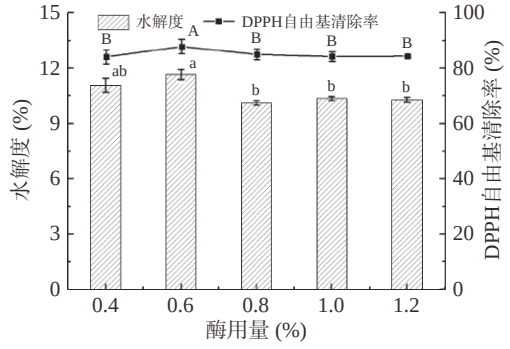


图 5　酶用量对皮蛋清水解度和 DPPH 自由基清除率的影响

Fig.5　Effects of the addition of enzyme on the DH and DPPH free radical scavenging rate

2.2　响应面优化设计试验结果

因蛋白酶需在特定 pH 和温度下发挥作用，实验发现风味蛋白酶的最适酶解环境为 pH6.0 和温度 50 ℃，故选择酶解时间、酶用量以及物料比作为响应面优化因素。在单因素基础上进行了三因素三水平响应面优化设计，设计方案、结果和方差分析如表 2~表 4 所示。采用 Design Expert 8.0 对酶解时间、酶用量和物料比进行多元回归拟合，得出回归方程为：

$$Y_1=-51.40357+2.92938X_1+18.3175X_2+34.475X_3-0.1775X_1X_2-0.3125X_1X_3-2.05X_2X_3-0.097813X_1^2-1.865X_2^2-19.71875X_3^2;$$

$$Y_2=-179.88975+20.38X_1+58.1995X_2+148.16425X_3-0.1325X_1X_2-3.36875X_1X_3-1.6X_2X_3-0.85338X_1^2-6.764X_2^2-95.525X_3^2。$$

表 3 与表 4 结果显示拟合的二次回归方程极显著，其中，水解度 Y_1 的决定系数 R^2=0.9762，F=31.92，P<0.0001，Y_2 的决定系数 R^2=0.9905，F=81.27，P<0.0001，模型拟合度高，证明所建立模型可行性高。其中，一次项 X_1 和 X_2、交互项中 X_1X_2 和 X_2X_3、二次项 X_1^2、X_2^2、X_3^2 对水解度影响具有显著性(P<0.05)，且对水解度影响较高的因素依次为：酶解

表 2　Box-Behnken 试验方案及结果

Table 2　Experimental design and results for Box-Behnken analysis

试验号	因素			响应值	
	X_1 物料比	X_2 酶解时间	X_3 酶用量	Y_1(%)	Y_2(%)
1	1	0	−1	10.52	85.84
2	1	−1	0	10.38	84.03
3	1	1	0	10.44	85.79
4	1	0	1	10.11	79.92
5	0	1	1	9.83	82.81
6	0	−1	−1	9.71	82.93
7	0	1	−1	10.49	84.83
8	0	−1	1	9.87	81.55
9	−1	0	1	9.83	79.49
10	−1	−1	0	9.95	80.82
11	−1	1	0	10.72	83.11
12	−1	0	−1	9.74	80.00
13	0	0	0	11.34	89.32
14	0	0	0	11.17	89.02
15	0	0	0	11.28	88.62
16	0	0	0	11.22	88.45
17	0	0	0	11.14	88.52

表 3 水解度回归方程方差分析

Table 3 Analysis of variances for the developed regression equation for degree of hydrolysis

差异来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	5.54	9	0.62	31.92	<0.0001	**
X_1	0.18	1	0.18	9.49	0.0178	*
X_2	0.31	1	0.31	15.96	0.0052	**
X_3	0.084	1	0.084	4.36	0.0752	
X_1X_2	0.13	1	0.063	6.54	0.0377	*
X_1X_3	0.063	1	0.17	3.24	0.1148	
X_2X_3	0.17	1	0.64	8.72	0.0213	*
X_1^2	0.64	1	0.92	33.43	0.0007	**
X_2^2	0.92	1	2.62	47.47	0.0002	**
X_3^2	2.62	1	0.019	135.85	<0.0001	**
残差	0.13	7	0.036			
失拟项	0.11	3	0.0017		0.0669	
绝对误差	0.026	4				
总误差	5.67	16				

注: *表示显著(P<0.05), **表示极显著(P<0.01); 表4同。

表 4 DPPH 自由基清除率回归方程方差分析

Table 4 Analysis of variances for the developed regression equation for scavenging capacity of DPPH free radical

差异来源	自由度	平方和	均方	F	P	显著性
模型	179.80	9	19.98	81.27	<0.0001	**
X_1	18.54	1	18.54	75.44	<0.0001	**
X_2	6.50	1	6.50	26.43	0.0013	**
X_3	12.13	1	12.13	49.34	0.0002	**
X_1X_2	0.07	1	0.070	0.29	0.6095	
X_1X_3	7.26	1	7.26	29.55	0.0010	**
X_2X_3	0.10	1	0.10	0.42	0.5392	
X_1^2	49.06	1	49.06	199.58	<0.0001	**
X_2^2	12.04	1	12.04	48.98	0.0002	**
X_3^2	61.47	1	61.47	250.08	<0.0001	**
残差	1.72	7	0.25			
失拟项	1.28	3	0.43	3.89	0.1111	
绝对误差	0.44	4	0.11			
总误差	181.52	16				

时间(X_2)、物料比(X_1)和酶用量(X_3)。而一次项 X_1、X_2 和 X_3、交互项中 X_1X_3 和二次项 X_1^2、X_2^2、X_3^2 对 DPPH 自由基清除率影响具有显著性(P<0.05), 且对于 DPPH 自由基清除率影响较高的因素依次为: 物料比(X_1)>酶用量(X_3)>酶解时间。

2.3 响应面分析

响应面分析图可用于评价各项指标对水解度和 DPPH 自由基清除率的影响, 其中, 响应曲面坡度可用于反映各单因素对响应值的影响[25−26]。三维曲面图的弧度可以说明因素对响应指标的影响程度, 弧度越大, 影响越大[27]。图 6 与图 7 反映的是试验范围内两因素的交互作用, 水解度响应面试验中(图 6)显示酶用量对物料比和酶解时间的交互作用显著(图 6a、图 6b), DPPH 自由基清除率响应面试验(图 7)显示物料比和酶用量的交互作用显著(图 7b), 与表 2 和表 3 中的方差分析一致。

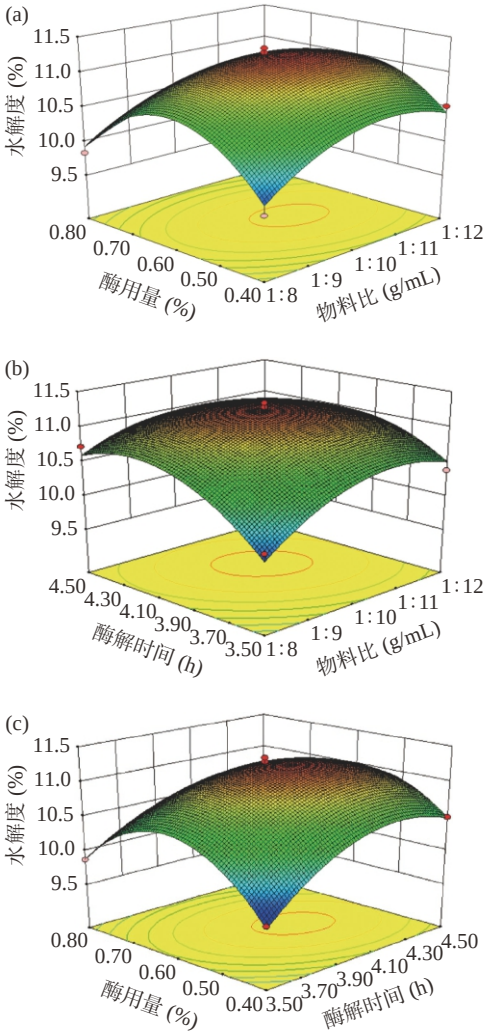


图 6 水解度响应面的 3D 图

Fig.6 3D Plot of degree of hydrolysis with response surface

2.4 皮蛋清抗氧化多肽制备工艺优化及验证

经响应面法优化工艺, 采用 Design Expert 8.0 软件和回归方程分析可知皮蛋清抗氧化肽制备最佳工艺为: 物料比 1∶10.43、酶添加量 0.57%、酶解时间 4.11 h, 为方便实际生产, 对最佳工艺参数进行了整合, 设置为: 物料比 1∶10.4、酶添加量 0.57%、酶解时间 4.1 h, 以此条件进行验证实验, 重复 5 次, 得到水解度为 11.23%, 与预测值(11.50%)相差 0.27%, DPPH 自由基清除率为 89.76%, 与预测值(90.73%)相差 0.97%, 误差较小, 此条件下可行。

2.5 皮蛋清酶解液的体外抗氧化性分析

在最优酶解工艺条件酶解皮蛋清获得酶解液, 对酶解液的体外抗氧化性进行了测定, 包括还原力、O_2^-·清除率和·OH 清除率。

2.5.1 还原力分析 能够提供电子的抗氧化性物质具有还原力, 其作用机理是能将三价铁离子还原为二价铁离子, 而二者进一步反应生成普鲁士蓝, 并在 700 nm 处有最大吸收峰, 吸光值越大, 抗氧化能力越强[28]。经风味蛋白酶水解后的皮蛋清还原力如图 8 所示, 在测试的浓度范围内, 酶解液的还原力随样品

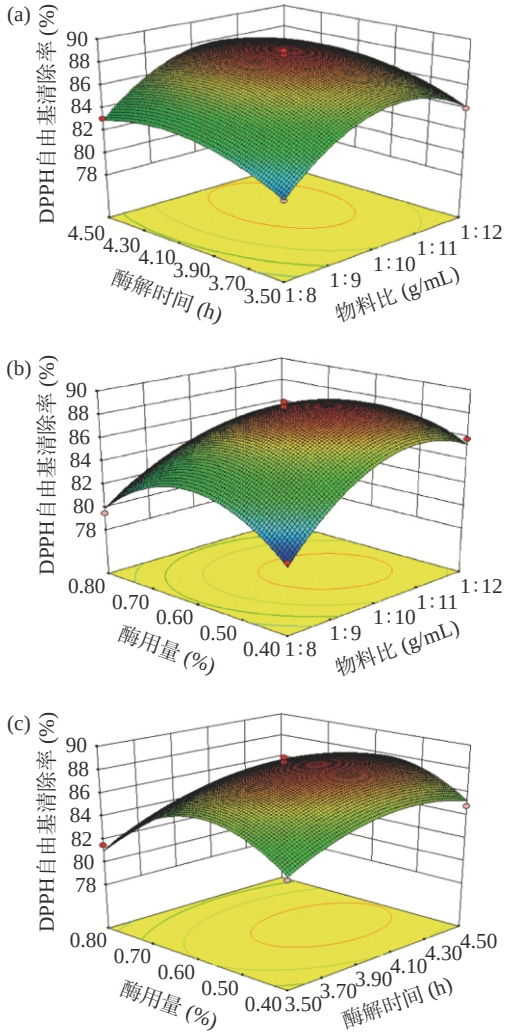


图 7　DPPH 自由基清除率响应面 3D 图

Fig.7　3D Plot of scavenging capacity of DPPH free radical

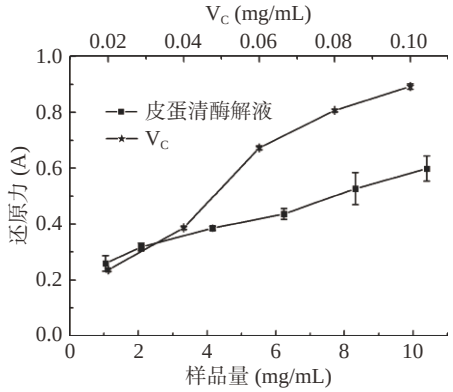


图 8　皮蛋清酶解液还原力

Fig.8　Reducing power for enzymatic hydrolysate of preserved egg white

量的升高而逐渐增加，但与 V_C 的还原力相比，酶解液的还原力较低，可能是酶解液中具有还原性的多肽含量较低。杨瑾等[14] 利用碱性蛋白酶酶解鸭蛋清，发现样品含量为 5 mg/mL 时，其还原力为 0.56~0.65，而本实验在添加 1 mL 酶解液（10.4 mg/mL）时的还原为 0.599±0.045。说明利用风味蛋白酶水解后的皮蛋清多肽还原力低于碱性蛋白酶水解的新鲜鸭蛋清酶解液，可能是因为皮蛋经过腌制后，蛋清内蛋白质被碱水解，部分具有抗氧化性的结构或官能团被破坏。

2.5.2　O_2^-·清除率分析　O_2^-·能发生歧化反应产生·OH 和过氧化氢而对各种酶的活性有影响，破坏细胞膜和 DNA 结构，导致正常机体的细胞功能受损[24]。皮蛋清酶解液的 O_2^-·清除能力变化如图 9 所示，随着样品量的增加清除能力明显增强，当样品添加量为 10.4 mg/mL 时，清除率为 66.78%±2.71%。与 V_C 清除率相比，酶解液清除率较低。分析酶解液与 V_C 的 IC_{50} 值可知，酶解液的清除 O_2^-·的 IC_{50} 值为 7.98 mg/mL，V_C的 IC_{50} 值为 0.073 mg/mL。与碱性蛋白酶水解新鲜鸭蛋清酶解液的 O_2^-·清除率相比，风味蛋白酶处理后的皮蛋清水解液清除率较低[29]。可能是不同蛋白酶水解方式和作用位点不同，且皮蛋清经过长时间碱浸泡，蛋白质已提前水解。

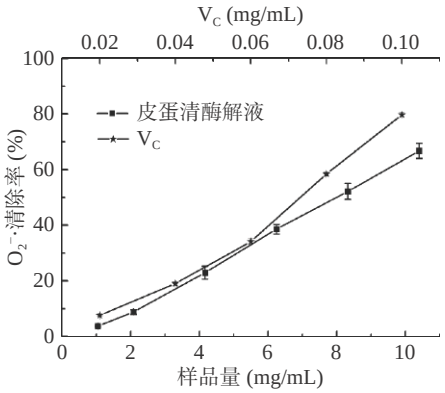


图 9　蛋清酶解液 O_2^-·清除率

Fig.9　Scavenging capacity of preserved egg white hydrolysis on O_2^-·

2.5.3　·OH 清除率分析　由图 10 可知，在测定的梯度范围内，随着皮蛋清酶解液和 V_C 含量的增加，二者的·OH 清除能力明显增加。与 V_C的清除率相比，蛋清酶解液的清除率较低，当酶解液加入量为 10.4 mg/mL 时，其清除率为 79.63%±2.67%。分析酶解液与 V_C 的 IC_{50} 值可知，酶解液的清除·OH 的 IC_{50} 值为 4.63 mg/mL，V_C 的 IC_{50} 值为 0.053 mg/mL。同时，皮蛋清酶解液与碱性蛋白酶处理新鲜鸡蛋清或

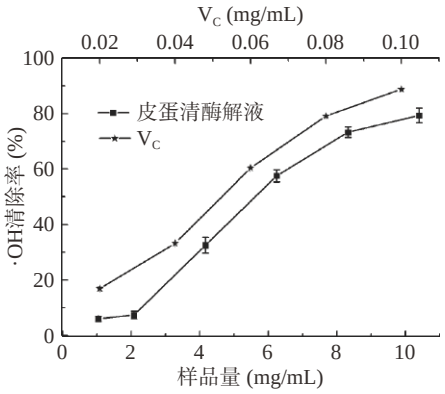


图 10　蛋清酶解液·OH 清除率

Fig.10　Scavenging capacity of preserved egg white hydrolysis on ·OH

鸭蛋清得到的酶解液相比，清除·OH 的能力并无显著差异[30−31]。

3 结论

利用风味蛋白酶水解皮蛋清制备抗氧化性多肽，在单因素实验的基础上，以水解度和 DPPH 自由基清除率为响应值对物料比、酶解时间和酶用量为进行响应面优化试验设计，得出最佳水解条件为：物料比 1∶10.4、酶解时间 4.1 h 和酶用量 0.57%。最佳水解条件下的水解度为 11.23%，DPPH 自由基清除率为 89.76%。抗氧化性实验分析显示皮蛋清酶解液具有一定的抗氧化性。本文仅对利用风味蛋白酶水解皮蛋清制备抗氧化性多肽工艺及抗氧化性进行了研究，但其功能特性和结构特性等其他方面有待进一步深探。

参考文献

[1] 赵燕, 徐明生, 涂勇刚. 皮蛋加工相关机理研究进展[J]. 食品科学, 2010, 31(17): 472−475. [ZHAO Yan, XU Mingsheng, TU Yonggang. Research progress in mechanisms of preserved egg processing[J]. Food Science, 2010, 31(17): 472−475.]

[2] 周黎, 张雅玮, 刘玮, 等. 低钠盐对皮蛋的钠钾含量、硬度及蛋白质二级结构的影响[J]. 食品工业科技, 2016, 37(12): 139−143. [ZHOU Li, ZHANG Yawei, LIU Wei, et al. Effects of low sodium salt on the sodium and potassium content, hardness and protein secondary structure of preserved eggs[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(12): 139−143.]

[3] 蒋爱民, 南庆贤. 畜产食品工艺学 (第二版)[M]. 北京: 中国农业出版社, 2010: 286−287. [JIANG Aimin, NAN Qingxian. Science and technology of meat, poultry and dairy product processing (Second Edition)[M]. Beijing: Chian Agriculture Press, 2010: 286−287.]

[4] 涂勇刚, 赵燕, 徐明生, 等. 皮蛋加工过程中流变与凝胶特性的变化规律[J]. 食品科学, 2012, 33(19): 21−24. [TU Yonggang, ZHAO Yan, XU Mingsheng, et al. Variations in rheological and gel properties of preserved eggs during processing[J]. Food Science, 2012, 33(19): 21−24.]

[5] ALISI I O, UZAIRU A, ABECHI S E. Molecular design of curcumin analogues with potent antioxidant properties and thermodynamic evaluation of their mechanism of free radical scavenge[J]. Bulletin of the National Research Centre, 2020, 44(1): 137.

[6] 邓凤君, 曾娅玲, 龚勇珍, 等. 茶多酚对脊髓损伤大鼠急性期氧自由基与炎症因子的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2019, 39(9): 1079−1083. [DENG Fengjun, ZENG Yaling, GONG Yongzhen, et al. Effects of tea polyphenols on oxygen free radicals and inflammatory factors in acute phase of rats with spinal cord injury[J]. Journal of Hunan University of Chinese Medicine, 2019, 39(9): 1079−1083.]

[7] NAGAOKA S I, BANDOH Y, NAGASHIMA U, et al. Correlation among singlet-oxygen quenching, free-radical scavenging, and excited-state intramolecular-proton-transfer activities in hydroxyflavones, anthocyanidins, and 1-hydroxyanthraquinones[J]. Journal of Physical Chemistry A, 2017, 121(42): 8069−8079.

[8] SANGTITANU T, SANGTANOO P, SRIMONGKOL P, et al. Peptides obtained from edible mushrooms: *Hericium erinaceus* offers the ability to scavenge free radicals and induce apoptosis in lung cancer cells in humans[J]. Food & Function, 2020(11): 4927−4939.

[9] WU S, HE Z, WANG Q, et al. Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of peptides of Chinese pecan (*Carya cathayensis*) and analysis of their antioxidant capacities and structures[J]. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2021, 27(2): 1239−1251.

[10] KUERBAN A, AL-GHAFARI A B, ALGHAMADI S A, et al. Potential antiglycation, antioxidant and antiproliferative activities of *Vicia faba* peptides[J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2020, 14(4): 2155−2162.

[11] 吴烨婷, 黄慧娜, 施宝珠, 等. 蛋清酶解多肽的制备及其清除自由基活性[J]. 食品工业科技, 2018, 39(11): 90−98. [WU Yeting, HUANG Huina, SHI Baozhu, et al. Preparation and scavenging free radical activity of enzymolysis polypeptide from albumen[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(11): 90−98.]

[12] 王倩, 贺萍, 刘琪, 等. 鸭蛋卵清蛋白多肽的酶解条件优化及生物活性[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 39(9): 89−98. [WANG Qian, HE Ping, LIU Qi, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis conditions of ovalbumin from duck eggs and biological activity of the resulting peptide[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2018, 39(9): 89−98.]

[13] 次顿, 池福敏, 罗章, 等. 胃蛋白酶水解藏鸡蛋卵白蛋白制备酶解多肽的工艺优化[J]. 高原农业, 2018, 2(1): 44−49. [CI Dun, CHI Fumin, LUO Zhang, et al. Optimized process to prepare polypeptides by protease hydrolysis of tibetan egg ovalbumins using pepsin[J]. Journal of Plateau Agriculture, 2018, 2(1): 44−49.]

[14] 杨瑾, 唐传核. 鸡蛋清蛋白水解物的抗氧化性研究[J]. 现代食品科技, 2011, 27(12): 1446−1450. [YANG Jin, TANG Chuanhe. Antioxidant properties of chicken egg white protein hydrolysates[J]. Modern Food Science and Technology, 2011, 27(12): 1446−1450.]

[15] ZHAO Y, CAO D, SHAO Y, et al. Changes in physicochemical properties, microstructures, molecular forces and gastric digestive properties of preserved egg white during pickling with the regulation of different metal compounds[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 98(Jan.): 105281.1−105281.10.

[16] AI M, TANG T, ZHOU L, et al. Effects of different proteases on the emulsifying capacity, rheological and structure characteristics of preserved egg white hydrolysates[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 87: 933−942.

[17] 赵新淮, 冯志彪. 蛋白质水解物水解度的测定[J]. 食品科学, 1994, 15(11): 65−67. [ZHAO Xinhuai, FENG Zhibiao. Determination of the degree of hydrolysis of protein hydrolysates[J]. Food Science, 1994, 15(11): 65−67.]

[18] NEVIN K G, RAJAMOHAN T. Beneficial effects of virgin coconut oil on lipid parameters and *in vitro* LDL oxidation[J]. Clinical Biochemistry, 2004, 37(9): 830.

[19] OYAIZU M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine[J]. Japan Journal of Nutrition, 1986, 44: 307−315.

［20］ 郭雪峰, 岳永德, 汤锋, 等. 用清除超氧阴离子自由基法评价竹叶提取物抗氧化能力[J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 28(8): 1823−1826. ［GUO Xuefeng, YUE Yongde, TANG Feng, et al. Detection of antioxidative capacity of bamboo leaf extract by scavenging superoxide anion free radical[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2008, 28(8): 1823−1826.］

［21］ SIDDHURAJU P. The antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of phenolics of raw and dry heated moth bean (*Vigna aconitifolia*) (Jacq.) Marechal seed extracts[J]. Food Chemistry, 2006, 99(1): 149−157.

［22］ 王宁宁, 冯美琴, 孙健. 响应面法优化发酵香肠的低钠复合盐配方[J]. 食品工业科技, 2021, 42(22): 170−178. ［WANG Ningning, FENG Meiqin, SUN Jian. Optimization of low-sodium compound salt formula for fermented sausages by response surface methodology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(22): 170−178.］

［23］ 揣欣欣, 郭冰洁, 刘露露, 等. 响应面法优化鹿骨多肽酶解工艺及其体外抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2021, 42(13): 133−140. ［CHUAI Xinxin, GUO Bingjie, LIU Lulu, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis of deer bone polypeptide by response surface method and its antioxidant activity *in vitro*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(13): 133−140.］

［24］ 由德林. 酶工程原理 [M]. 北京: 科学出版社, 2011: 31−32. ［YOU Delin. Principles of enzyme engineering[M]. Beijing: China Science Publishing & Media Ltd (CSPM), 2011: 31−32.］

［25］ 郭宏垚, 李冬, 雷雄, 等. 花椒多酚提取工艺响应面优化及动力学分析[J]. 食品科学, 2018, 39(2): 247−253. ［GUO Hongyao, LI Dong, LEI Xiong, et al. Optimization by response surface methodology and kinetics of extraction of polyphenols from chinese prickly ash[J]. Food Science, 2018, 39(2): 247−253.］

［26］ 徐燕燕, 孙杰, 陈雅卉, 等. 莲藕多酚浸提工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2016, 32(2): 128−132. ［XU Yanyan, SUN Jie, CHEN Yahui, et al. Study on extraction technology and antioxidant activity of polyphenols from lotus root[J]. Food & Machinery, 2016, 32(2): 128−132.］

［27］ 陶文斌, 吴燕燕, 李春生, 等. 响应面法优化腌制大黄鱼的低钠复合咸味剂配方[J]. 食品工业科技, 2019, 40(19): 136−144. ［TAO Wenbin, WU Yanyan, LI Chunsheng, et al. Optimization of low-sodium compound salty agent formula for pickled *Larimichthys crocea* fillets by response surface methodology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(19): 136−144.］

［28］ 宁诗文, 崔珊珊, 尚宏丽. 响应面法优化大黄花鱼肉蛋白水解工艺及多肽抗氧化性研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(13): 219, 220−225, 226. ［NING Shiwen, CUI Shanshan, SHANG Hongli. Optimization of the protein hydrolysis process by response surface method and the antioxidant properties of polypeptides in large yellow croaker[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(13): 219, 220−225, 226.］

［29］ UDENIGWE C C, LU Y L, HAN C H, et al. Flaxseed protein-derived peptide fractions: Antioxidant properties and inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in murine macrophages[J]. Food Chemistry, 2009, 116(1): 277−284.

［30］ 金嫘, 王晶, 李新华. Alcalase 碱性蛋白酶酶解蛋清制备抗氧化活性肽[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(6): 59−62. ［JING Lei, WANG Jing, LI Xinhua. Study on the anti-oxidative activity of peptide from egg white hydrolysised by alcalase[J]. Food Research and Development, 2009, 30(6): 59−62.］

［31］ 吴晖, 任尧, 李晓凤. 鸭蛋清蛋白多肽体外抗氧化活性的研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(7): 91−95. ［WU Hui, REN Yao, LI Xiaofeng. Study on the antioxidant activity of peptide by enzymatic hydrolysis of duck egg white protein[J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 32(7): 91−95.］

郭杰, 郝楠, 陶蕾, 等. 响应面优化超声波提取冬凌草甲素工艺及其抗肿瘤活性研究 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 156−163. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021070150

GUO Jie, HAO Nan, TAO Lei, et al. Optimization of Ultrasonic Extraction of Oridonin by Response Surface Methodology and Its Antitumor Activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 156−163. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021070150

· 工艺技术 ·

响应面优化超声波提取冬凌草甲素工艺及其抗肿瘤活性研究

郭　杰[1,*], 郝　楠[1], 陶　蕾[1], 王吉鸿[1], 陈彦亮[2], 王广宇[2]
（1.兰州职业技术学院生物工程系, 甘肃兰州 730070;
2.河南省中药材生产技术推广中心, 河南郑州 450000）

摘　要: 目的：应用单因素实验和响应面法优化超声波提取冬凌草甲素工艺并探索冬凌草甲素的体外抗肿瘤活性。方法：通过单因素实验确定料液比、超声时间和超声功率的参数范围，经响应面法优化提取工艺；体外培养肿瘤细胞 HepG2，经过对 HepG2 细胞存活率和凋亡蛋白 Caspase-3 和 Caspase-9 表达的研究，探讨冬凌草甲素的抗肿瘤活性。结果：超声波提取冬凌草甲素最佳工艺条件是：超声功率 190 W，料液比 1∶18 g/mL 时对冬凌草甲素进行 1.5 h 的提取，实现（4.122%±0.102%）的最大得率。体外抗肿瘤实验证实冬凌草甲素可以大幅降低 HepG2 细胞的存活率，增加 Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白的表达，当冬凌草甲素浓度超过 8 μmol/L 之后，对肝癌细胞存活率和凋亡蛋白的影响具有统计学意义（P<0.05）。结论：通过响应面法优化超声波提取冬凌草甲素的工艺实现了 4.122% 的最大得率，经体外药理实验证实，冬凌草甲素通过线粒体介导的内源性途径促进细胞凋亡，降低肿瘤细胞的存活率，从而达到抑制肿瘤细胞的目的。

关键词: 响应面法, 超声波, 冬凌草, 冬凌草甲素, 抗肿瘤活性
中图分类号: TS201.1　　**文献标识码:** B　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0156−08
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021070150
本文网刊:

Optimization of Ultrasonic Extraction of Oridonin by Response Surface Methodology and Its Antitumor Activity

GUO Jie[1,*], HAO Nan[1], TAO Lei[1], WANG Jihong[1], CHEN Yanliang[2], WANG Guangyu[2]
（1.Lanzhou Vocational Technical College, Bioengineering Department, Lanzhou 730070, China;
2.Henan Province Traditional Chinese Medicinal Materials Production Technology Promotion Center, Zhengzhou 450000, China）

Abstract: Objective: Single factor experiment and response surface methodology were used to optimize the ultrasonic extraction of oridonin from *Rabdosiaru bescens* and the antitumor effect *in vitro* was studied. Methods: Three key factors including solid-liquid ratio, ultrasonic time, ultrasonic power were selected by one-factor-at-a-time experiments. HepG2 cells were cultured *in vitro*. The antitumor activity of oridonin was investigated by studying the survival rate of HepG2 cells and the expression of apoptotic proteins caspase-3 and caspase-9. Results: The optimum conditions of ultrasonic extraction of oridonin from *Rabdosiaru bescens* were as follows: Solid-liquid ratio was 1∶18 g/mL, ultrasonic time was 1.5 h at 190 W ultrasonic power, the extraction yield of oridonin reached 4.122%±0.102%. *In vitro*, oridonin could significantly reduced the survival rate of HepG2 cells and increased the expression of caspase-3 and caspase-9. And when the concentration of oridonin exceeds 8 μmol/L, the survival rate and apoptotic protein of hepatoma cells were significantly affected (P<0.05). Conclusion: The maximum extraction yield of oridonin reached 4.122% by response surface methodology of ultrasonic

收稿日期: 2021−07−15
基金项目: 甘肃省高等学校博士基金项目（冬凌草植物资源高值开发利用技术）; 国家自然科学基金资助项目（51873175）; 2022 年度兰州职业技术学院校内项目（冬凌草有效成分的提取及其相关产品研发）。
*** 通信作者:** 郭杰（1988−）, 女, 博士研究生, 讲师, 研究方向: 植物资源开发利用, E-mail: crystal_g@foxmail.com。

extraction. *In vitro* pharmacological experiments confirmed that oridonin promoted cell apoptosis and reduced the survival rate of tumor cells through mitochondrial mediated endogenous pathway, and achieved the purpose of inhibiting tumor cells.

Key words: response surface methodology; ultrasonic; *Rabdosia rubescens*; oridonin; antitumor activity

当今，恶性肿瘤因其高死亡率、低治愈率，严重威胁着人类的健康。据世界卫生组织统计，世界范围内仅 2020 年新出现的恶性肿瘤患者便高达 1929 万例，其中，我国占 23.69%（457 万例），位居全球第一，其治疗已成为当今生命科学领域面对的重大难题之一[1−3]。由于现阶段的治疗手段存在损伤正常的机体组织，导致患者出现免疫力降低、肝肾功能受损或骨髓抑制等不良反应[4−6]。所以寻找一种高效、绿色、安全的肿瘤治疗药物已成为国内外学者的研究热点。冬凌草（*Rabdosia rubescens*）为唇形科香茶菜属碎米桠的干燥地上部分，资源在我国甘肃、陕西、河南等黄河流域均有广泛分布，最早收载于《救荒本草》，现被收载于《中国药典》[7]。中医认为冬凌草味苦、甘，性微寒，具有清热解毒、活血止痛、消炎抑菌和抑制肿瘤等功效，用于治疗咽喉肿痛、扁桃体炎、蛇虫咬伤等病症，并对食管癌、肝癌、肺癌、前列腺癌、膀胱癌等多种癌症疗效显著[8]。现代临床实验证明，冬凌草通过诱导细胞凋亡、调控癌细胞周期、改变生物膜的通透性等方式实现肿瘤抑制的效果[9]。

冬凌草作为中医传统治疗肿瘤的药物，其有效成分的开发利用有望为现有的天然活性抗肿瘤药物研究提供方向，近来年的研究发现，冬凌草中的有效成分——冬凌草甲素，因其具有抗肿瘤、抗菌抗炎、镇痛等药理作用成为当今抗肿瘤药物的研究热点[10]。目前，冬凌草甲素的提取方法主要为索氏提取法、热回流提取法和溶液浸提法等，这些方法存在提取时间长、效率低、能耗大等缺点[11−12]。超声辅助提取法因其具有操作简单、价格低廉且能有效提高提取效率、缩短提取时间、降低能耗等优点，广泛应用于各种生物活性物质的提取纯化[13−14]。近期针对冬凌草甲素的研究集中于冬凌草甲素的药理作用，对其高效提取方法鲜有研究[15−16]。

本研究立足于冬凌草，采用超声波法辅助提取冬凌草甲素，以克服传统浸提法成本高、分离时间长、能耗大等缺点。通过单因素确定工艺参数范围，经响应面法优化提取工艺研究冬凌草甲素高效绿色提取体系，并经过对 HepG2 细胞存活率和凋亡蛋白 Caspase-3 和 Caspase-9 表达的研究，初步研究冬凌草甲素的体外抗肿瘤活性，以期为天然抗癌物质的研发提取提供理论技术支持。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

冬凌草　由三门峡广宇生物制药有限公司提供，由河南农业大学农学院中药材系高致明教授鉴定为正品，自然晾干，干燥密封保存；人肝癌细胞系 HepG2　购自中国典型培养物保藏中心（Chian Center for Type Cuture Collection, CCTCC）；冬凌草甲素对照品（批号 E1526003，纯度 ≥ 98%）　上海阿拉丁生物科技股份有限公司；Cell counting Kit-8（CCK-8）试剂盒（批号 202001003）、总蛋白提取试剂盒（批号 201908002）、Caspase-3（批号 202005007）和 Caspase-9 检测试剂盒（批号 202002010）　北京索莱宝科技有限公司；多克隆抗体 Caspase-3（批号 2019012006）、*β*-actin（批号 201806015）　武汉三鹰生物技术有限公司；甲醇　色谱纯，天京永大化学试剂有限公司；其余试剂均为国产分析纯。

KQ-250DE 超声波清洗机　昆山超声波仪器有限公司；GL21M 离心机　凯达科学仪器有限公司；RE-52AA 旋转蒸发器　南北仪器有限公司；TY-100L 中药粉碎机　济南天宇专用设备有限公司；Agilent 1290 高效液相色谱仪　美国安捷伦公司；X-mark 酶标仪　美国 BioRad 公司；二氧化碳培养箱　美国 Shellab 公司；HX-ZD-100A 振荡仪　华熙昕瑞分析仪器有限公司；DYCZ-24DN 电泳仪　北京六一仪器厂。

1.2　实验方法

1.2.1　冬凌草甲素的提取　将冬凌草粉碎，过 40 目筛，根据冬凌草甲素的性质，依照“相似相容”原理，选择有机溶剂乙醇作为萃取剂，结合以往文献采用 95% 的乙醇作为冬凌草甲素的萃取剂[17−18]。称取 1.0 g 冬凌草粉末与 95% 乙醇混合后在超声作用下提取冬凌草甲素。在一定的超声条件下处理一定的时间，离心，收集上清液，旋转蒸发仪浓缩，挥发多余乙醇，吸取 1 mL 用甲醇定容至 100 mL，用 0.22 μm 滤膜过滤，高效液相测定峰面积。

1.2.2　单因素实验

1.2.2.1　料液比对冬凌草甲素得率的影响　按 1.2.1 的实验步骤，设置不同的料液比（1∶10、1∶15、1∶20、1∶25、1∶30 g/mL）在超声功率为 200 W，超声时间 1 h 条件下萃取冬凌草甲素，每次试验重复 3 次，取平均值计算冬凌草甲素得率。

1.2.2.2　超声功率对冬凌草甲素得率的影响　按 1.2.1 的实验步骤，设置不同的超声功率（80、120、160、200、240 W），在料液比为 1∶20 g/mL，超声时间 1 h 条件下萃取冬凌草甲素，每次试验重复 3 次，取平均值计算冬凌草甲素得率。

1.2.2.3　超声时间对冬凌草甲素得率的影响　按 1.2.1 的实验步骤，设置不同的超声时间（0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h），在料液比为 1∶20 g/mL，超声功率 200 W 条件下萃取冬凌草甲素，每次试验重复 3 次，

取平均值计算冬凌草甲素得率。

1.2.3 响应面试验 通过单因素实验确定参数范围，以冬凌草甲素得率为指标，利用 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理进行试验设计，优化料液比、超声功率及超声时间的工艺参数，评价影响冬凌草甲素得率因素的主效应、相互效应及因素的二次效应关系，试验因素与水平设计见表 1。

表 1 Box-Behnken 设计变量水平

Table 1 The levels of variables for the construction of Box-Behnken design (BBD)

变量	水平		
	−1	0	1
A 料液比(g/mL)	1∶15	1∶20	1∶25
B 超声时间(h)	1	1.5	2
C 超声功率(W)	160	200	240

试验数据利用完全二次多项式方程进行多元线性回归拟合，计算冬凌草甲素得率和各实验因素之间的函数关系。

$$Y = A_0 + \sum_{i=1}^{3} A_i X_i + \sum_{i=1}^{3} A_{ii} X_i X_i + \sum_{i=1}^{2} \sum_{j=i+1}^{3} A_{ij} X_i X_j$$

式中，Y 为预测的响应值，即冬凌草甲素得率；A_0 是常数，A_i 是线性系数，A_{ii} 是二次方系数，A_{ij} 是交互作用回归系数；X_i 是自变量。

1.2.4 冬凌草甲素含量测定

1.2.4.1 色谱条件 Zorbax SB C_{18} 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)，流动相：甲醇-水(50∶50)，流速：1.0 mL/min，柱温：35 ℃，进样体积：10 μL，检测波长：210 nm，冬凌草甲素保留时间 14.76 min。

1.2.4.2 标准曲线绘制 冬凌草甲素标准品，95% 乙醇溶解，分别配制 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 mg/mL 的标准溶液。按 1.2.4.1 的色谱条件，经高效液相测定冬凌草甲素的色谱峰面积。标准曲线的 X 轴与 Y 轴分别为对照品质量浓度及峰面积，得回归式：Y=23.153X−31.569。其中，相关系数 R^2=0.9996，表明该曲线在 0.1~0.8 mg/mL 范围内线性关系良好，适用于冬凌草提取液中冬凌草甲素质量浓度的计算。

1.2.4.3 冬凌草甲素得率测定 将 1.2.2 和 1.2.3 中制备的冬凌草甲素提取液体，经高效液相测定峰面积，并按如下公式计算冬凌草甲素的得率。

$$Y(\%) = \frac{CNV}{1000\ W} \times 100$$

式中，Y 表示冬凌草甲素得率(%)；C 为冬凌草甲素浓度(mg/mL)；N 为测定时的稀释倍数；V 为提取液母液体积(mL)；W 为冬凌草原料质量(g)。

1.2.5 冬凌草甲素抗肿瘤实验

1.2.5.1 冬凌草甲素对肝癌细胞存活率的影响 将长势良好的人肝癌细胞系 HepG2 以 10^4 个/mL 细胞密度接种于 96 孔板，适应生长 12 h 后，弃去原培养基，加入无血清培养基 0.9 mL，分别加入 40、80、120、160、200 μmol/L 冬凌草甲素溶液 0.1 mL，配成终浓度为 4、8、12、16、20 μmol/L 冬凌草甲素溶液(冬凌草甲素分子量为 364.44，HPLC 测定的提取液中冬凌草甲素量 0.412 mg/mL，将提取液稀释 56.5 倍配置 20 μmol/L 冬凌草甲素母液)，作用 24 h 后，将 10 μL CCK-8 检测液逐一加入各孔，1 h 后酶标仪 450 nm 波长测其 OD 值，计算细胞存活率。

$$S(\%) = \frac{As - Ab}{Ac - Ab} \times 100$$

式中，S 表示细胞存活率(%)；As 为试验孔的吸光度(含细胞、培养基、CCK-8 和药物溶液)；Ac 为对照孔的吸光度(含细胞、培养基和 CCK-8 溶液)；Ab 为空白孔的吸光度(含培养基和 CCK-8 溶液)。

1.2.5.2 冬凌草甲素对肝癌细胞胞内凋亡蛋白的影响 5×10^5/mL HepG2 细胞接种于 6 孔板，贴壁培养 12 h，弃去原培养基，加入无血清培养基 2.7 mL，分别加入 40、80、120、160、200 μmol/L 冬凌草甲素溶液 0.3 mL，配成终浓度为 4、8、12、16、20 μmol/L 冬凌草甲素溶液。37 °C 含 5% CO_2 浓度的 CO_2 培养箱中培养 24 h 后，细胞刮板刮下，离心收集细胞，使用细胞裂解液在冰浴条件振荡裂解，细胞裂解液使用总蛋白提取试剂盒测定蛋白含量，Capase-3 和 Capase-9 活性严格按照 Capase-3 和 Capase-9 活性测定试剂盒执行。

Western blotting 检测 Capase-3 凋亡蛋白表达水平，取长势良好的 HepG2 细胞，D-hank`s 清洗后加入细胞裂解液，依总蛋白提取试剂盒操作指导提取总蛋白。蛋白变性后取等量各组总蛋白上样进行 SDS-PAGE 电泳。待电泳前端溴酚蓝至分离胶下缘时停止电泳，进行 1 h 转膜。将完成转膜的 PVDF 膜以含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液室温下封闭 2 h。将封闭好的 PVDF 膜与一抗(Caspase-3, 1∶1000; β-actin, 1∶1000)于 4 ℃ 孵育过夜。次日取出后用 TBST 洗膜 3 次，加入二抗(1:1000)室温下置于摇床平缓晃动，孵育 1 h。结束后以 TBST 洗膜 3 次后加入显色液覆盖整张膜，进行显色反应。

1.3 数据处理

所有数据均表示为平均值±标准差，运用 Origin 9.0 绘制实验数据相关图片，采用 SPSS 18.0 和 Design-Expert 8.0 数据处理系统进行统计分析。P<0.05 或 P<0.01 表示差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 料液比对冬凌草甲素得率的影响 如图 1 所示，在 1∶10~1∶20 g/mL 的料液比范围内，冬凌草甲素得率逐渐升高，在料液比为 1∶20 g/mL 时冬凌草甲素得率达到最高，之后得率不再随料液比的增加而增加。此现象可能是由于溶质和萃取剂的接触面积

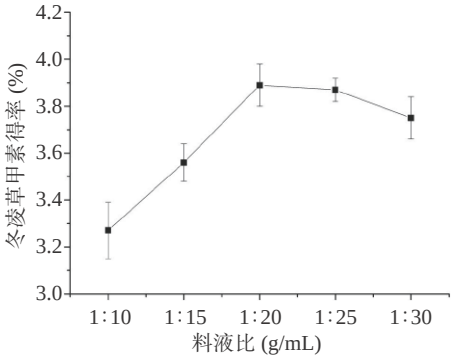


图 1　料液比对冬凌草甲素得率的影响

Fig.1　Effect of liquid to solid ratio on yield of oridonin

随着液料比的增加而扩大，更有利于冬凌草甲素的萃取[19−20]；但料液比超过 1∶20 g/mL 后，溶质已经达到了溶解平衡，所以得率不再增加，考虑到提取成本，液料比选择 1∶20 g/mL 作为冬凌草甲素提取的最佳提取参数。

2.1.2　超声功率对冬凌草甲素得率的影响　如图 2 所示。超声功率在 80~200 W 范围内，冬凌草甲素得率随超声功率的升高而增加，此后继续增加超声功率，冬凌草甲素得率增高不明显，考虑到提取成本，超声功率为 200 W 作为冬凌草甲素提取的最佳提取参数。

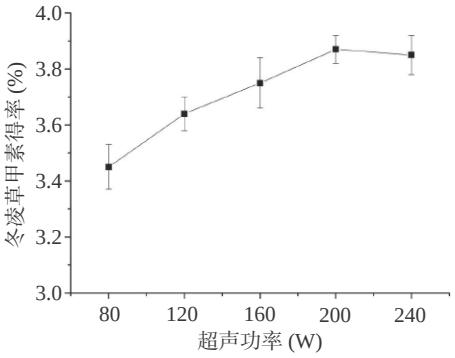


图 2　超声功率对冬凌草甲素得率的影响

Fig.2　Effect of ultrasonic power on the yield of oridonin

2.1.3　超声时间对冬凌草甲素得率的影响　超声时间对冬凌草甲素得率的影响见图 3，提取时间在 1.0 h 以内，冬凌草甲素得率随提取时间的增长急速增加；在提取时间 1.0~1.5 h 范围内，冬凌草甲素得率随提取时间的延长缓慢增加；提取时间超过 1.5 h 以后增加趋势不明显。其原因可能是冬凌草甲素随着提取时间的延长，部分冬凌草甲素氧化分解[21]，所以在时间超过 1.5 h 后冬凌草甲素得率会略有所下降。因此，选择 1.5 h 为冬凌草甲素最佳的超声时间。

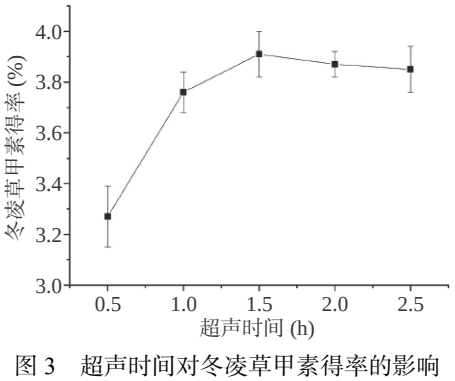


图 3　超声时间对冬凌草甲素得率的影响

Fig.3　Effect of ultrasonic time on the yield of oridonin

2.2　响应面法试验结果

2.2.1　响应面试验设计与结果分析　表 2 显示了 Box-Behnken 试验设计 17 个 3 因素和 3 水平的结果。使用 SAS 数据分析软件对数据进行分析，冬凌草甲素得率和试验变量采用以下二次多项式方程得出：

$$Y=4.08-0.23A+0.048B-0.16C+0.12AB+0.15AC-0.085BC-0.29A^2-0.23B^2-0.43C^2$$

式中，Y 为冬凌草甲素得率，A 为料液比，B 为超声时间，C 为超声功率。

表 2　Box-Behnken 试验设计及结果

Table 2　Box-Behnken design and results

试验号	A 料液比	B 超声时间	C 超声功率	得率(%)
1	0	0	0	4.05±0.06
2	1	−1	0	3.21±0.08
3	1	1	0	3.63±0.05
4	−1	1	0	3.66±0.09
5	0	0	0	4.12±0.10
6	1	0	−1	3.03±0.06
7	0	1	1	3.16±0.07
8	1	0	1	3.07±0.12
9	−1	0	−1	3.96±0.05
10	−1	0	1	3.39±0.09
11	0	0	0	3.91±0.08
12	−1	−1	0	3.74±0.07
13	0	1	−1	3.71±0.07
14	0	0	0	4.30±0.06
15	0	−1	1	3.31±0.11
16	0	−1	−1	3.52±0.06
17	0	0	−1	4.01±0.08

经 Design-Expert 8.0 软件 ANOVA 法分析响应表面二次多项式模型的显著性。实验方差结果分析如表 3 所示，回归模型的拟合极显著（$P<0.01$），实验

表 3　回归模型的方差分析结果

Table 3　The results of variance analysis of regression model

模型系数	系数估计	自由度	标准误差	F值	P值	显著性
常数项	2.30	9	0.26	10.82	0.0024	**
A	0.41	1	0.41	17.30	0.0042	**
B	0.018	1	0.018	0.76	0.4114	
C	0.21	1	0.21	8.79	0.0210	*
AB	0.062	1	0.062	2.64	0.1482	
AC	0.093	1	0.093	3.93	0.0878	
BC	0.029	1	0.029	1.22	0.3057	
A^2	0.36	1	0.36	15.07	0.0060	**
B^2	0.22	1	0.22	9.29	0.0186	*
C^2	0.76	1	0.76	32.30	0.0007	**
残差	0.17	7	0.024			
失拟项	0.077	3	0.026	1.17	0.4256	不显著
純误差	0.088	4	0.022			
总和	2.47	16				

注：*表示显著（$P<0.05$）；**表示极显著（$P<0.01$）。

复相关系数(R^2)是 0.9329 和校正测定系数(R^2_{adj})是 0.8467, 失拟项不显著(P>0.05), 以上结果均表明模型拟合程度高可靠性强, 观察值和预测值之间的相关性良好, 在实验变量范围内具有很高的显著性, 可用该模型来分析和预测冬凌草甲素的提取条件, 此外, 低变异系数(CV)为 4.23% 表示模型的精度高。以上结果证实选用试验方法的准确性, 可以用此回归方程对试验结果进行分析和预测。表 3 结果显示, 所选各因素水平范围内, 一次项 A 达到极显著水平(P<0.01), C 达到了显著水平(P<0.05), 表明料液比对冬凌草甲素得率的影响最大, 要得到良好的响应值必须严格控制好料液比。各项因素对冬凌草甲素的影响大小顺序是: 料液比(A)>超声功率(C)>超声时间(B)。

根据多元回归方程做出不同处理因素对冬凌草甲素得率影响相应三维响应面和二维等高线如图 4 所示。三维响应面阐释了当其他因素保持在零水平不变时, 因变量之间的关系和两个测试变量之间的相互作用[22−23], 二维等值线图的形状反映了变量之间的交互效应, 圆图表示试验参数相互作用影响不显著, 而椭圆轮廓图表示试验参数相互作用影响显著[24−25]。图 4B 呈现出料液比和超声功率间显著的交互作用, 由此可知, 冬凌草甲素得率与料液比、超声功率密切相关; 图 4C 显示, 等高线在超声功率轴向分布密集且呈陡然变化趋势, 但其在超声时间轴向分布稀疏且变化趋势较为缓和, 该结果提示, 冬凌草甲素得率受超声功率的影响大于超声时间的影响。以上结果均可支持方差分析结果。

2.2.2 最优工艺条件及验证实验 利用 Design-Expert 8.0 软件分析优化冬凌草甲素提取的最佳条件: 料液比为 1∶17.73 g/mL, 超声时间为 1.51 h, 超声功率为 189.06 W。最佳条件下, 冬凌草甲素预测最高得率为 4.154%。为检验预测结果的可靠性, 兼顾实际操作的便利性, 将上述最佳提取条件修正为, 料液比为 1∶18 g/mL, 超声时间为 1.5 h, 超声功率为 190 W 进行重复实验。3 次平行实验实际测得冬凌草甲素得率为(4.122%±0.102%), 证实了预测值和实验值之间的良好相关性, 表明该模型适用于冬凌草甲素的提取。

2.3 冬凌草甲素抗肿瘤作用

2.3.1 冬凌草甲素对肝癌细胞存活率的影响 冬凌草甲素对肝癌细胞存活率的影响如图 5 所示。冬凌草甲素处理组 HepG2 细胞存活率较空白对照组明显下降, 其中, 当冬凌草甲素浓度超过 8 μmol/L 之后, 对肝癌细胞的存活率抑制与对照组相比差异显著(P<0.05), 在 4~20 μmol/L 的范围内具有剂量依赖性, 当浓度达到 20 μmol/L 时, HepG2 细胞存活率低至 60.72%。

2.3.2 凌草甲素对肝癌细胞胞内凋亡蛋白的影响 冬凌草甲素对肝癌细胞 HepG2 Caspase-3 和 Caspase-9 活性的影响如图 6 所示。与空白对照组相比, 冬凌草甲素组细胞 Caspase-3 和 Caspase-9 活性明显上升, 说明冬凌草甲素通过激活 Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白表达, 启动细胞凋亡程序。其中, 冬凌草甲素浓度达到 8 μmol/L 以后肝癌细胞 HepG2 的 Caspase-3 和 Caspase-9 活性显著上升(P<0.05), 且表现出良好的剂量依赖性。

应用 Western-Blot 技术分析检测冬凌草甲素对肝癌细胞 HepG2 Caspase-3 蛋白表达的影响(如图 7)。灰度扫描定量分析结果显示, 经不同浓度冬凌草甲素处理后 Caspase-3 蛋白表达的变化。不同浓度冬凌草甲素处理 24 h 后, 与对照组相比, 加入冬凌草甲素处理后, Caspase-3 的表达量随冬凌草甲素浓度的增加显著增加, 呈现出一定的剂量依赖性; 当冬凌草甲素浓度大于 8 μmol/L 后, Caspase-3 的表达较对照组极显著升高(P<0.01), 说明冬凌草甲素作

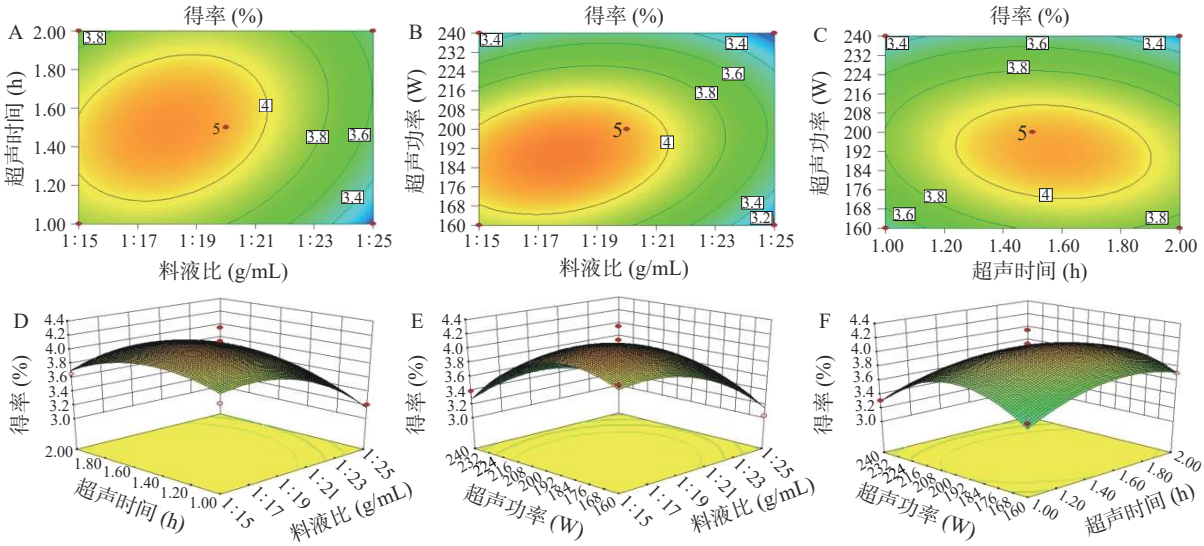


图 4 不同处理因素交互作用对冬凌草甲素得率的响应面和等高线图

Fig.4 Response surface plots and contour plots of the interactive effects on the yield of oridonin

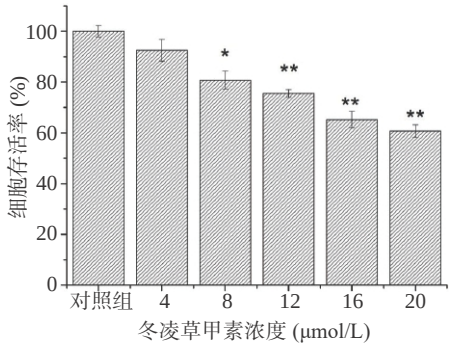


图 5　冬凌草甲素对 HepG2 细胞存活率的影响

Fig.5　Effect of oridonin on HepG2 cells viability

注：*表示与对照组相比差异显著，P<0.05；**表示与对照组相比，差异极显著，P<0.01（n=5）；图 6~图 7 同。

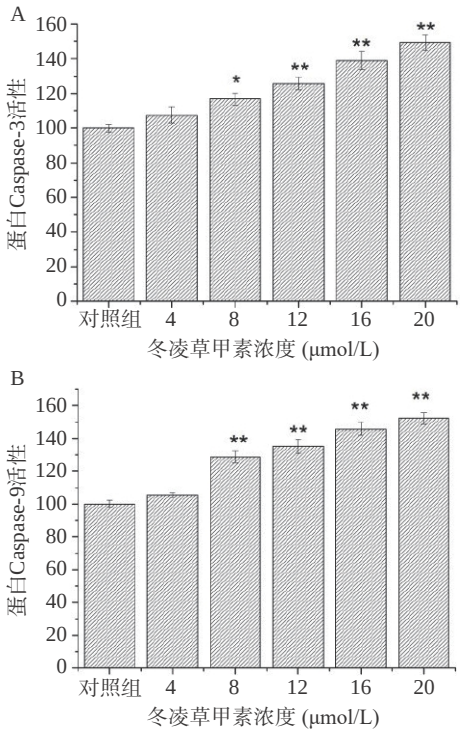


图 6　冬凌草甲素对 HepG2 细胞 Caspase-3（A）和 Caspase-9（B）活性的影响

Fig.6　Effect of oridonin on Caspase-3（A）and Caspase-9（B）activity

用 24 h 在一定浓度时可以激活 Caspase-3 的表达。

上述实验结果显示，冬凌草甲素作用于 HepG2 细胞后，通过增加 Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白表达，启动细胞凋亡程序，降低细胞存活率，暗示此时 HepG2 细胞因细胞凋亡程序的启动引起细胞数目的下降，说明冬凌草甲素能通过促进线粒体途径介导的内源性途径促进细胞凋亡，降低细胞存活率，从而达到抑制癌细胞的目的。

3　讨论与结论

冬凌草甲素是中草药植物冬凌草的主要有效成分，现代药理学证实，冬凌草甲素因具有多种生物活性而受到广泛关注。冬凌草甲素常用的提取方法研究集中于热回流提取法、渗漉法、索氏提取法等，由于冬凌草甲素为热敏成分，这些提取方法存在提取时

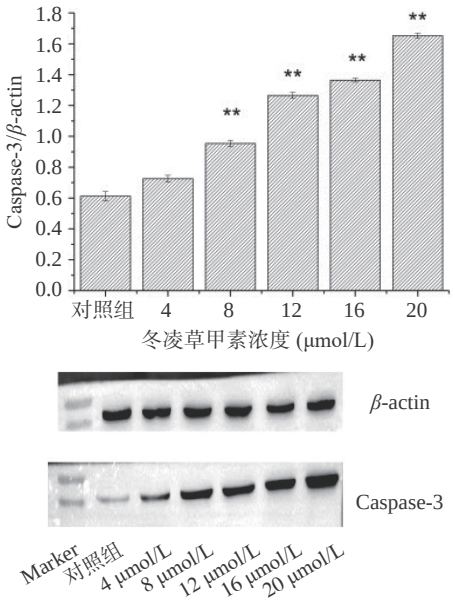


图 7　冬凌草甲素对 HepG2 细胞 Caspase-3 表达量的影响

Fig.7　Effect of oridonin on Caspase-3 expression in HepG2 cells

间长、提取效率低，降低生物活性等缺点。所以积极寻找更加适合提取冬凌草甲素的方法，可以更好地促进我国冬凌草植物资源的高值化利用。超声辅助提取法因其具有操作简单、价格低廉并且能有效提高提取效率、缩短提取时间、降低能耗等优点[26]，可克服传统浸提法分离时间长、易失活、能耗大等缺点而被广泛应用于生物活性物质的提取。本研究利用响应面法优化提取冬凌草甲素的工艺参数，料液比为 1∶18 g/mL，超声时间为 1.5 h，超声功率为 190 W 的条件下，冬凌草甲素得率达到 4.122%。

冬凌草甲素的抗肿瘤活性是通过诱导癌细胞凋亡、调整细胞周期、改变生物膜的通透性等方面实现的。现已证实天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白水解酶（Caspase）家族在细胞凋亡发生过程中起着十分重要的作用[27]。其中，Capase-3 是触发细胞凋亡级联反应的核心蛋白酶，是所有细胞凋亡信号传导的共同通路蛋白，其过量表达就会导致细胞凋亡[28−29]。许多的细胞凋亡通路都是经过线粒体完成的，所以线粒体也称之为“自杀武器储存库”[30−31]。大量文献报道在线粒体凋亡途径中，首先破坏了线粒体的氧化呼吸链，继而引起电子解偶联反应，产生大量的自由基，最终触发 ATP 损失和细胞色素 C 释放，最终激活凋亡蛋白 Caspase-9 介导的细胞凋亡[30,32−34]。体外细胞实验证实，冬凌草甲素可以大幅降低 HepG2 细胞的存活率，增加 Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白表达，通过促进线粒体途径介导的内源性途径促进癌细胞凋亡，从而达到抑制癌细胞数目的目的。

参考文献

[1] DODELZON K, STARIKOV A, REICHMAN M, et al. Breast cancer in women under age 40: A decade of trend analysis at a single institution[J]. Clinical Imaging, 2021, 78: 165−170.

[2] WANG H, WANG Z, WEI C, et al. Anticancer potential of indirubins in medicinal chemistry: Biological activity, structural modification, and structure-activity relationship[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2021, 223: 113652.

[3] LIU X, XU J, ZHOU J, et al. Oridonin and its derivatives for cancer treatment and overcoming therapeutic resistance[J]. Genes & Diseases, 2021, 8: 448−462.

[4] LI N, WANG C, GEORGIEV M, et al. Advances in dietary polysaccharides as anticancer agents: Structure-activity relationship[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 111: 360−377.

[5] LUO D, YI Y, PENG K, et al. Oridonin derivatives as potential anticancer drug candidates triggering apoptosis through mitochondrial pathway in the liver cancer cells[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2019, 178: 365−379.

[6] 张亚男, 张子旸, 刘海英, 等. 冬凌草甲素对人宫颈癌 HeLa 细胞线粒体凋亡途径的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2021, 31(1): 1−7. [ZHANG Y N, ZHANG Z Y, LIU H Y, et al. Effects of oridonin on mitochondrial apoptotic pathway of human cervical carcinoma HeLa cells[J]. China Journal of Modern Medicine, 2021, 31(1): 1−7.]

[7] 张婉晴, 夏小婧. 冬凌草化学成分及药理作用研究进展[J]. 云南化工, 2020, 47(10): 18−22. [ZHANG W Q, XIA X J. Advances in studies on chemical components and pharmacological effects of oridonium[J]. Yunnan Chemical Technology, 2020, 47(10): 18−22.]

[8] 陈川川, 刘越, 郭凤仙, 等. 冬凌草生物学研究进展[J]. 湖北农业科学, 2016, 55(19): 4901−4906. [CHEN C C, LIU Y, GUO F X, et al. Progress of biological research for *Rabdosiaru bescens*[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2016, 55(19): 4901−4906.]

[9] 郭琳, 程永现, 白明, 等. 冬凌草现代研究分析[J]. 中医学报, 2015, 30(3): 412−414. [GUO L, CHENG Y X, BAI M, et al. Modern study analysis on *Rabdosiaru bescens*[J]. China Journal of Chinese Medicine, 2015, 30(3): 412−414.]

[10] 王佐, 王璐, 陈忠正, 等. 冬凌草甲素诱导小鼠肝癌细胞醌还原酶活性及其机理研究[J]. 食品科学, 2017, 38(7): 193−200. [WANG Z, WANG L, CHEN Z Z, et al. Oridonin-induced quinine reductase activity and its mechanism in mouse hepatoma Hepa1c1c7 Cells[J]. Food Science, 2017, 38(7): 193−200.]

[11] YANG Y C, WANG C S, CHI M, et al. A green approach for the extraction and characterization of oridonin and ursolic and oleanolic acids from *Rabdosiaru bescens* and its kinetic behavior[J]. Food Chemistry, 2020, 319: 126582.

[12] 李菲, 刘克, 马秀丽, 等. 冬凌草甲素超声提取与纯化工艺[J]. 中成药, 2016, 38(12): 2710−2712. [LI F, LIU K, MA X L, et al. Ultrasonic extraction and purification of oridonin[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2016, 38(12): 2710−2712.]

[13] HU J L, NIE S P, LI C, et al. Ultrasonic irradiation induces degradation and improves prebiotic properties of polysaccharide from seeds of *Plantago asiatica* L. during *in vitro* fermentation by human fecal microbiota[J]. Food Hydrocoll, 2018, 76: 60−66.

[14] YAN J K, WANG Y Y, MA H, et al. Ultrasonic effects on the degradation kinetics, preliminary characterization and antioxidant activities of polysaccharides from *Phellinus linteus* mycelia[J]. Ultrason Sonochem, 2016, 29: 251−25.

[15] 李春雨, 王琪, 申珅, 等. 冬凌草甲素对人黑色素瘤 A375 细胞侵袭和转移的影响及机制研究[J]. 中草药, 2018, 49(3): 658−662. [LI C Y, WANG Q, SHEN S, et al. Effects and mechanism of oridonin on invasion and migration abilities of human melanoma A375 cells[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2018, 49(3): 658−662.]

[16] RYU D, KOH E. Application of response surface methodology to acidified water extraction of black soybeans for improving anthocyanin content, total phenols content and antioxidant activity [J]. Food Chemistry, 2018, 261: 260−266.

[17] 荆绮, 倪慧艳, 王娟, 等. 正交试验优化冬凌草冷浸提取工艺[J]. 实用药物与临床, 2017, 20(8): 941−944. [JING Q, NI H Y, WANG J, et al. Optimization of cold-soaked extraction process for *Rabdosiaru bescens* by orthogonal test[J]. Practical Pharmacy and Clinical Remedies, 2017, 20(8): 941−944.]

[18] LING M, XIA G, ZHI Y. Static and dynamic studies of adsorption by four macroporous resins to enrich oridonin from *Rabdosiaru bescens*[J]. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2021, 32: 151−158.

[19] HADSA J, HAMMI K M, CERF D L, et al. Characterization, antioxidant and antiglycation properties of polysaccharides extracted from the medicinal halophyte *Carpobrotus edulis* L.[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 107: 833−842.

[20] HUANG Y L, GUO J, ZHANG J. Physicochemical and antioxidant properties of *Potentilla anserina* L. polysaccharides affected by ultrasonication[J]. Applied Sciences, 2020, 10: 2−16.

[21] BALASUBRAMANIAN B, ILAVENIL S, ALDHABI N A, et al. Isolation and characterization of *Aspergillus* sp. for the production of extracellular polysaccharides by response surface methodology[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2019, 26: 449−454.

[22] XUE H Y, LI J R, LIU Y G, et al. Optimization of the ultrafiltration-assisted extraction of Chinese yam polysaccharide using response surface methodology and its biological activity[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 121: 1186−1193.

[23] FENG Y N, ZHANG X F. Polysaccharide extracted from *Huperzia serrata* using response surface methodology and its biological activity[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 157: 267−275.

[24] 郭杰, 陶蕾, 王吉鸿, 等. 响应面试验优化超声波辅助双水相提取蕨麻多糖[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(14): 152−160. [GUO J, TAO L, WANG J H, et al. Optimization of ultrasonic-assisted aqueous two-phase extraction of polysaccharides from *Potentilla anserina* L. using response surface methodology[J]. Food and Fermentation Industry, 2021, 47(14): 152−160.]

[25] 宋思圆, 苏平, 王丽娟, 等. 响应面试验优化超声提取黄秋葵花果胶多糖工艺及其体外抗氧化活性[J]. 食品科学, 2017, 38(2): 283−389. [SONG S Y, SU P, WANG L J, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction by response surface methodology and antioxidant activities of pectic polysaccharide from okra flowers[J]. Food Science, 2017, 38(2): 283−389.]

[26] HUANG H, XU Q, BELWAL T, et al. Ultrasonic impact on

viscosity and extraction efficiency of polyethylene glycol: A greener approach for anthocyanins recovery from purple sweet potato[J]. Food Chemistry, 2019, 293: 59−67.

[27] OGEMDI F E, AFRODITI C, DIMITRIS C. Properties of protein isolates extracted by ultrasonication from soybean residue (okara)[J]. Food Chemistry, 2022, 368: 130837.

[28] BING S J, HA D, KIM M J, et al. Geraniin down regulates gamma radiation-induced apoptosis by suppressing DNA damage [J]. Food and Chemical Toxicology, 2013, 57: 147−153.

[29] KAM W W, BANATI B B. Effects of ionizing radiation on mitochondria[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2013, 65: 607−619.

[30] JIANG H J, FANG J S, XING J G, et al. Tilianin mediates neuroprotection against ischemic injury by attenuating CaMKII-dependent mitochondrion-mediated apoptosis and MAPK/NF-κB signaling[J]. Life Sciences, 2019, 216: 233−245.

[31] MAYA M A, RAMIREZ A R R, QUEZADA H, et al. Palmitoyl-CoA effect on cytochrome c release, a key process of apoptosis, from liver mitochondria of rat with sucrose diet-induced obesity[J]. Food and Chemical Toxicology, 2021, 154: 112351.

[32] HAN C, XU X, ZHANG C, et al. Cytochrome c light-up graphene oxide nanosensor for the targetedself-monitoring of mitochondria-mediated tumor cell death[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2021, 173: 112791.

[33] YU X L, YIN H, PENG H, et al. OPFRs and BFRs induced A549 cell apoptosis by caspase-dependent mitochondrial pathway [J]. Chemosphere, 2019, 221: 693−702.

[34] ANSRI M Y, BALL H C, WASE S J, et al. Lysosomal dysfunction in osteoarthritis and aged cartilage triggers apoptosis in chondrocytes through BAX mediated release of Cytochrome c[J]. Osteoarthritis and Cartilage, 2021, 29: 100−112.

翟晓娜, 汪涛, 梁亮, 等. 菜籽粕蛋白的碱溶酸沉工艺优化及其活性研究 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 164−171. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080100

ZHAI Xiaona, WANG Tao, LIANG Liang, et al. Study on Optimization and Activities of Rapeseed Meal Protein by Alkali-extraction and Acid-precipitation[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 164−171. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080100

· 工艺技术 ·

菜籽粕蛋白的碱溶酸沉工艺优化及其活性研究

翟晓娜, 汪　涛, 梁　亮, 师建芳, 谢奇珍, 孙　昊, 裴海生*

（农业农村部规划设计研究院, 农业农村部农产品产后处理重点实验室, 北京 100121）

摘　要: 本文以菜籽饼粕为原料，采用单因素及响应面实验优化菜籽蛋白的碱溶酸沉工艺，以提高蛋白质的溶出效果，同时降低硫苷的溶出量，并对其活性进行探究。结果表明，当脱脂菜籽粕以 1∶40 g/mL 的料液比在 pH13.1、46 ℃的环境中浸提 82 min 后其蛋白质溶出率较高（平均 8.78%）且硫苷溶出率相对较小（平均 1.65%），并优选 pH4.0 的酸沉工艺；酸沉环节中的沉淀与上清液分别经真空冷冻干燥和喷雾干燥处理后即可得到菜籽粕酸沉蛋白和菜籽粕酸溶蛋白提取物两种产物。SDS-PAGE 结果表明：两种提取物的主要蛋白成分分别为菜籽球蛋白（分子量在 31 kDa、14~22 kDa）与菜籽白蛋白（<14.4 kDa），其中，菜籽粕酸沉蛋白提取物的粗蛋白含量可达（78.10%±0.53%）；此外，两者均具有 ABTS 自由基清除能力，EC_{50} 值分别为 1.372、0.438 mg/mL 及一定的金黄色葡萄球菌生长抑制能力。本实验为拓宽菜籽粕蛋白提取物的应用提供了一定基础。

关键词: 菜籽粕蛋白, 蛋白质含量, 硫苷, 抗氧化, 抑菌性

中图分类号: TS209　　**文献标识码:** B　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0164−08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080100

本文网刊:

Study on Optimization and Activities of Rapeseed Meal Protein by Alkali-extraction and Acid-precipitation

ZHAI Xiaona, WANG Tao, LIANG Liang, SHI Jianfang, XIE Qizhen, SUN Hao, PEI Haisheng*

（Key Laboratory of Agro-Products Postharvest Handing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Academy of Agricultural Planning and Engineering, MARA, Beijing 100121, China）

Abstract: The aim of the study was to improve the yield of rapeseed meal protein and reduce the content of glucosinolate by optimizing the alkali-extraction and acid-precipitation process, and the bioactivities were also explored. And single factor experiment and response surface analysis were used. The results showed that the optimal conditions were as follows, solid-liquid ratio 1∶40 g/mL, pH13.1, temperature 46 ℃ and extraction time 82 min. Under these conditions, the average yield of protein and glucosinolate content were 8.78% and 1.65%. And then pH4.0 was used for protein precipitation, while the sediments and supernatant were processed by vacuum freeze-drying and spray-drying respectively and correspondingly two sorts of protein extractions, rapeseed meal precipitated protein and rapeseed meal acid soluble protein. Furthermore, SDS-PAGE analysis showed that their main components were cruciferin (Mw 31 kDa、14~22 kDa) and napin (Mw<14.4 kDa), respectively. And the crude protein of rapeseed meal precipitated protein (78.10%±0.53%). What's more, both two protein extraction processed the ability of scavenging ABTS free radicals and inhibiting effects on *S. aureus*, and the EC_{50} of the two extractions were 1.372 mg/mL and 0.438 mg/mL. Overall, this study might provide a theoretical basis for expending the application of rapeseed meal protein in the future.

Key words: rapeseed meal protein; protein content; glucosinolate; antioxidant; antimicrobial activity

收稿日期: 2021−08−09

基金项目: 农业农村部规划设计研究院自主研发项目 (ZZYFXKZ201903)。

作者简介: 翟晓娜（1989−）, 女, 博士, 工程师, 研究方向: 农产品精深加工, E-mail: zhaixiaona907@163.com。

*** 通信作者:** 裴海生（1981−）, 男, 博士, 高级工程师, 研究方向: 生物质资源综合利用, E-mail: peihaisheng2001@163.com。

油菜籽是继大豆和棕榈之后的世界第三大植物油原料，饼粕作为其主要加工副产物，占比高达60%~65%，产量巨大。长期以来，菜籽粕绝大部分被用作饲料，附加值较低，但其蛋白质含量可高达30%~45%，且氨基酸组成合理，含有丰富的含硫氨基酸及一定量的赖氨酸，是一种优质的植物蛋白资源，利用前景广阔[1]。自 2010 年以来，已有 Burcon 及 DSM 等公司生产的菜籽蛋白先后被 FDA（U.S. Food and Drug Administration）、EFSA（European Food Safety Authority）批准公认安全的（generally regarded as safe, GRAS）及食品新资源原料，菜籽蛋白正逐步从动物转向人类营养市场。我国作为油菜籽的生产大国，高附加值利用菜籽粕蛋白对提高油菜籽产业价值链意义重大。

油菜籽中的蛋白质主要包括菜籽球蛋白（cruciferin）、菜籽白蛋白（napin）及少量的油质蛋白，其中，菜籽球蛋白的平均分子量约为 300~360 kDa、菜籽白蛋白的平均分子量约为 14 kDa，分别具有良好的凝胶特性、成膜特性及一定的生物活性，应用前景良好[2−3]。目前，菜籽粕蛋白的制备方法包括：pH 分段控制法[4−5]、盐溶法[6]、酶解法[7] 及静电分离法[8] 等，其中，pH 分段控制法中的碱溶酸沉法是工业化生产最常用的方法，但仍存在目标蛋白选择性差且多关注酸沉淀蛋白的问题。同时，在菜籽饼粕蛋白的提取过程中，提高其得率的同时尽可能降低其抗营养物质（如硫苷等）的含量是非常有必要的。因此，本实验以浙江压榨菜籽饼粕为原料，以蛋白质和硫苷溶出率、蛋白质沉淀率为主要考察指标，通过单因素与响应面分析对菜籽饼粕蛋白的碱溶酸沉工艺进行优化，并对菜籽粕酸沉淀蛋白及酸溶解蛋白提取物进行分析研究，旨在为拓宽菜籽粕蛋白提取物的应用提供理论基础。

1　材料与方法

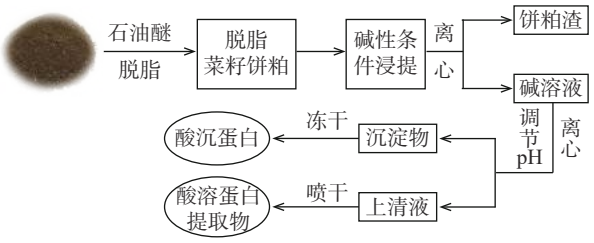
1.1　材料与仪器

压榨菜籽饼粕　购置于浙江嘉兴；BSA、$PBCl_2$ Sigma；黑芥子硫苷酸钾一水　上海源叶生物科技有限公司；考马斯亮蓝 G-250、ABTS 自由基试剂盒、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒、预染蛋白 Marker（14.4~97.4 kDa）　北京索莱宝科技有限公司；羧甲基纤维素钠、HCl、NaOH、乙醇等　均为分析纯，阿拉丁试剂（上海）有限公司；金黄色葡萄球菌（*S. aureus*）、大肠杆菌（*E.coli*）、黄青霉（*P.chrysogenum*）　中国科学院。

UV-1780 型紫外可见分光光度计　岛津仪器（苏州）有限公司；HWS-26 型电热恒温水浴锅　苏州江东精密仪器有限公司；AR223CN 型电子天平　奥豪斯（常州）仪器有限公司；TGL-24M 高速冷冻离心机　湖南平凡科技有限公司；KN680 全自动凯氏定氮仪　山东海能科学仪器有限公司；YC-1800 实验型喷雾干燥机　上海雅程仪器设备有限公司；DYZC-MINI4 型电泳仪、WD-9143B 凝胶成像系统　北京六一生物科技有限公司；BCN-1360 型生物洁净工作台　北京东联哈尔仪器制造有限公司；XSP-SM4 型双目生物显微镜　上海谱骞光学仪器有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　菜籽饼粕蛋白碱溶酸沉工艺



1.2.2　脱脂榨菜籽饼粕的制备　将菜籽饼粕粉碎过 60 目筛，以筛下饼粕粉为原料，石油醚为溶剂，按料液比 1∶10 g∶mL 在 60~90 ℃ 下回流提取 4 h 后，自然干燥得脱脂菜籽饼粕，备用[9]。

1.2.3　菜籽饼粕蛋白碱溶工艺优化　实验过程中，脱脂菜籽饼粕与已调节好 pH 的碱溶液按一定比例混合均匀，恒温反应一定时间后，4 ℃ 条件下以 5000 r/min 离心 15 min，然后取碱溶液测定其中蛋白质和硫苷含量。

1.2.3.1　单因素实验　以碱溶过程中菜籽饼粕中蛋白质和硫苷溶出量为测量指标，依次考察碱溶 pH、碱溶时间、提取温度及料液比各因素的影响，单因素基础条件为：碱溶 pH13.0，碱溶时间 60 min，提取温度 45 ℃，料液比 1∶40 g/mL。各因素的水平梯度为，碱溶 pH：12.0、12.5、13.0、13.5、14.0；碱溶时间：40、60、80、100、120 min；提取温度：35、45、55、65、75 ℃；料液比：1∶20、1∶30、1∶40、1∶50、1∶60 g/mL。

1.2.3.2　响应面优化试验　在单因素实验的基础上，确定料液比为 1:40 g/mL，利用响应面分析法对 pH、时间、温度 3 个因素进一步优化。根据 Box-Behnken 试验设计原理，选取 pH（X_1）、时间（X_2）及温度（X_3）为自变量，以蛋白质溶出率为响应值 1（Y_1），硫苷溶出率为响应值 2（Y_2）进行三因素三水平二指标的响应面分析，优化菜籽饼粕蛋白碱溶工艺条件，试验因素与水平设计见表 1。

表 1　响应面试验设计因素与水平
Table 1　Factors and levels of Box-Behnken design

水平	因素		
	X_1：pH	X_2：时间（min）	X_3：温度（℃）
−1	12.5	60	45
0	13	80	55
1	13.5	100	65

1.2.3.3　蛋白质溶出率测定　采用考马斯亮蓝法测定不同碱溶条件下菜籽饼粕蛋白的溶出含量，具体参

照罗群[10]的实验方法，并做适当修改，得到蛋白质浓度的标曲为：Y=0.0069x+0.0598，R^2=0.9988（X 表示 BSA 当量（mg）、Y 表示溶液吸光度）。

$$蛋白质溶出率(\%)=\frac{碱溶液中BSA当量}{脱脂菜籽饼粕质量}\times 100$$

1.2.3.4 硫苷溶出率测定 参照王宁惠[11]和赵冬吉[12]的方法，利用氯化钯法对菜籽饼粕及其碱溶液中硫苷含量进行测定。精确称取黑芥子硫苷酸钾—水标准品 0.02 g，用去离子水溶解后定容于 10 mL 容量瓶中配成 4.8139 μmol/mL 标准液，稀释至所需浓度，取 2 mL 不同浓度标准液与 3.0 mL 0.1% CMC 混合，再加入 4.0 mmol/L $PbCl_2$ 溶液 2 mL，于室温反应 1 h 后测定其 520 nm 的吸光值，以 $PbCl_2$、羧甲基纤维素钠空白溶液作参比溶液制作标准曲线。得到黑芥子硫苷酸钾—水的标曲为：Y=0.555718x−0.00357，R^2=0.999（X 表示黑芥子硫苷酸钾—水浓度（μmol/mL）、Y 表示溶液吸光度）。

准确称取粉碎菜籽饼粕 0.1 g 于 10 mL 试管中，沸水浴锅干蒸 10 min 后加入 8 mL 的 90 ℃ 热水混匀，再在沸水浴中反应 40 min，冷却静置后添加去离子水至 10 mL 摇匀并过滤，取 2 mL 过滤液按上述操作测定菜籽饼粕中硫苷含量；取菜籽饼粕碱溶液 2 mL 按上述操作测定其硫苷含量。以碱溶液中硫苷含量与菜籽饼粕中硫苷含量的比例为硫苷溶出率。

1.2.4 菜籽饼粕蛋白酸沉条件优化 在上述实验基础上，冷冻离心收集上清液后，优化菜籽蛋白沉淀 pH（1.0、2.0、3.0、4.0、4.2、4.4、4.6、4.8、5.0），4 ℃ 条件下以 6000 r/min 离心 10 min 后离心收集沉淀，真空冷冻干燥得菜籽饼粕酸沉蛋白，并计算其得率[9]；同时上清液经喷雾干燥得到酸溶蛋白提取物。采用凯氏定氮法测定菜籽饼粕碱溶液、酸沉蛋白、酸溶蛋白提取物的粗蛋白含量，其中，蛋白质换算系数为 6.25[13]。

$$酸沉蛋白得率(\%)=\frac{酸沉淀冻干蛋白样品质量}{脱脂饼粕的重量}\times 100$$

1.2.5 菜籽饼粕蛋白提取物特征分析

1.2.5.1 SDS-PAGE 凝胶电泳测定蛋白质分子质量分布 采用电泳仪进行 SDS-PAGE 凝胶电泳，按照 WANG 等[14]的方法，并作适当修改，具体方法如下：将菜籽饼粕碱溶液、酸沉淀蛋白、酸溶蛋白提取物分别（粗蛋白含量 5 mg/mL，溶剂 pH 约为 12.0 的水溶液）与缓冲液（0.125 mol/L Tris-HCl（pH6.8）含 1% SDS、2% β-巯基乙醇、5% 甘油及 0.025% 溴酚蓝）按 1∶1 体积比混合后煮沸约 5 min，上样 10 μL，80 V 电泳 1 h 后，转为 120 V 继续电泳约 2 h，电泳选用 12% 的分离胶和 5% 的浓缩胶，电泳结束后将凝胶置于 40% 甲醇与考马斯亮蓝-G250 进行染色处理 30 min 后，于 45% 甲醇和 10% 乙酸溶液中脱色，待胶片背景蓝色呈透明状后进行凝胶电泳成像。

1.2.5.2 菜籽粕蛋白提取物清除 ABTS 自由基的能力 采用 ABTS 自由基清除能力检测试剂盒对菜籽粕酸沉蛋白及酸溶蛋白提取物的抗氧化能力进行测定。本实验在 405 nm 下测定样品的吸光值，其中，样品的吸光值记为 $A_{样品}$，以蒸馏水为空白吸光值记为 $A_{空白}$，试剂本底的照吸光值记为 $A_{对照}$。

$$ABTS自由基消除能力(\%)=\frac{A_{空白}-(A_{样品}-A_{对照})}{A_{空白}}\times 100$$

1.2.5.3 菜籽粕蛋白质提取物抑菌特性探究 采用牛津杯抑菌圈法研究菜籽粕酸沉蛋白及酸溶蛋白提取物对金黄色葡萄球菌（*S.aureus*）、大肠杆菌（*E.coli*）、黄青霉菌（*P.chrysogenum*）的抗菌特性[15]。

首先将 *S.aureus*、*E.coli* 于 LB 琼脂培养基中活化 24 h，挑取单菌落接种于 100 mL LB 液体培养基，于 37 ℃、150 r/min 培养 24 h 后，将菌体浓度调整至约为 1.0×10^7 CFU/mL 的菌悬液备用。*P.chrysogenum* 接种到 PDA 培养基上 28 ℃ 培养 48 h 后，用含有 0.1% 吐温 80 的无菌水制备其孢子悬浮液，并将孢子悬浮液浓度调整为 1.0×10^7 孢子/mL。

分别吸取上述制备的 *S.aureus*、*E.coli* 菌悬液、*P.chrysogenum* 孢子悬浮液 0.02 mL 接种到 LB 琼脂培养基及 PDA 培养基上并涂布均匀后，分布在牛津杯中加入 0.05 mL 酸沉淀蛋白溶液与酸溶蛋白提取物溶液，并以无菌 PBS 为对照，*S.aureus*、*E.coli* 培养 24 h，*P.chrysogenum* 培养 48 h 后，观察其抑菌效果。

1.3 数据分析

研究中实验均重复 3 次，结果表示为平均值±标准差（SD），采用 Design Expert 8.0.6、Origin 2017 和 SPSS 20 对实验数据进行处理和分析。

2 结果与分析

2.1 菜籽饼粕蛋白碱溶条件单因素实验

2.1.1 碱溶 pH 对碱溶液中蛋白质和硫苷溶出效果的影响 菜籽饼粕蛋白质的提取受到环境 pH 的影响显著（$P<0.05$），且一般高强度碱溶浸提工艺更有利于氮物质的溶出[9]。如图 1 所示，碱溶液中蛋白质的溶出率随 pH 的增加而增大，并在 pH 为 13.0 条件下发生显著增高（$P<0.05$），且在 pH13.5 时达到最大（约为 8.78%）而后降低，这可能与饼粕中蛋白质与植酸类物质的结合稳定性受 pH 影响有关，即植酸可与菜籽蛋白中的赖氨酸（pKa=10.53）、精氨酸（pKa=12.48）分别通过-NH_2、-CN_3H_4 发生相互作用，随着碱溶阶段 pH 的增大，蛋白-植酸复合物的稳定性会逐渐下降，进而提高蛋白质的溶出效果[16]。FETZER 等[17]的研究也表明弱碱性浸提环境对菜籽粕蛋白的提取效果无显著影响，只有当 pH 增加至 11.0 后，蛋白质提取率才会明显提升约 9%~12%。从图 1 可看出，碱溶液中硫苷的含量随 pH 的增大表现出先降低后增高的趋势，并在 pH13.0 时达到最低，为（1.15%±0.01%），与 ZHANG 等[9]研究发现的硫苷在中高强

度碱环境浸提过程中会随 pH 的增加出现降低的结果相吻合，这主要与硫苷在较强碱性条件下会转化为 3-丁烯腈及硫葡糖等小分子有关[18]。另外，实验中可发现在相对较弱的碱性浸提环境中，蛋白质和硫苷的溶出比例成反比，以蛋白质溶出最大化同时尽可能降低硫苷的溶出率，本实验优选 pH13.0 进行下一步实验。此外，本研究 pH 与以往文献优化 pH 相比较高，主要是因为本实验以物料混合前水溶液 pH 为优化值[9,17,19]。

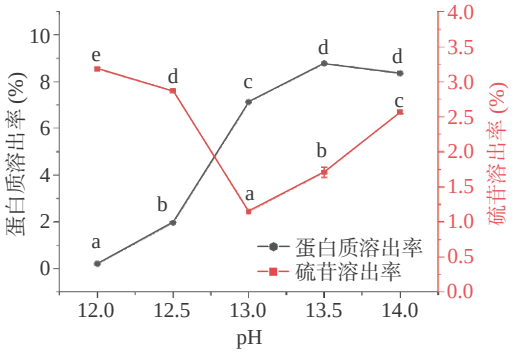


图 1　碱溶 pH 对蛋白及硫苷溶出的影响

Fig.1　Effects of alkali pH on the protein and glucosinolates content

注：同一指标不同小写字母表示差异显著（P<0.05）；图 2~图 4 同。

2.1.2　碱溶时间对碱溶液中蛋白质和硫苷溶出率的影响　由图 2 可以看出，菜籽饼粕碱溶液中的蛋白质溶出率与硫苷溶出率变化规律一致，均随着浸提时间的延长表现出先增加后持平或缓慢下降的趋势，并在浸提时间为 80 min 时达到最大，此时碱溶液中蛋白质和硫苷的溶出率分别为（7.86%±0.09%）和（1.16%±0.01%）。对比以往研究也可发现，当碱溶浸提至一定时间后，浸提时间的延长对有效物质的溶出已无明显作用，多次短时浸提可能在实际操作过程中更有利于提高生产效率[17]。本实验优选 80 min 进行下一步实验。

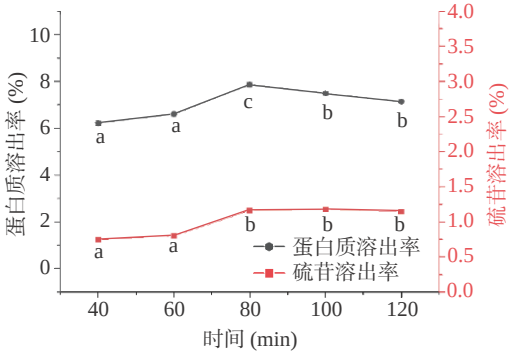


图 2　提取时间对蛋白及硫苷溶出的影响

Fig.2　Effects of extraction time on the protein and glucosinolates content

2.1.3　碱溶温度对碱溶液中蛋白质和硫苷溶出率的影响　图 3 显示，碱溶浸提温度的提高有利于饼粕中蛋白质和硫苷的溶出，且对硫苷溶出的影响较大。其中，当浸提温度升高至 65、75 ℃ 时蛋白质溶出率分别为（9.77%±0.01%）、（9.80%±0.01%），虽略有提高但已无显著性差异（P>0.05），而硫苷的溶出率则显著增加（P<0.05）。浸提温度有利于蛋白质溶出的这一现象与罗群等[20] 的研究一致，但与 FETZER 等[17] 研究发现的常温更有利于蛋白质溶出的现象有出入，这可能与实验中菜籽饼粕的制备方式有关。本实验基于最大化提高蛋白质提取效率的同时降低硫苷溶出的原则，优选 55 ℃ 进行料液比单因素实验优选。

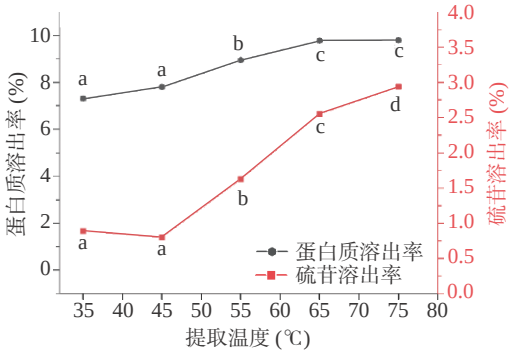


图 3　提取温度对蛋白及硫苷溶出的影响

Fig.3　Effects of extraction temperature on the protein and glucosinolates content

2.1.4　料液比对碱溶液中蛋白质和硫苷溶出率的影响　增大物料与溶剂的接触面积一定程度上有利于目标物质提取效率的提高。以往研究通常选用 1∶5~1∶20 的料液比（g/mL）进行研究，并发现料液比并不会显著提高蛋白质的提取效率[21,17]，基于此，本研究以 1∶20 为料液比起始值，料液比对菜籽饼粕碱溶条件下蛋白质和硫苷溶出率的影响如图 4 所示：当料液比在 1∶20~1∶40 g/mL 范围内时，随着料液比的增加，碱溶液中蛋白质的溶出率逐步增大并在 1∶40 g/mL 达到最大（9.77%±0.01%），相比较而言，硫苷的溶出率受料液比的影响较小，整体趋势相对平缓；当料液比>1∶40 g/mL 后，料液比的增加对蛋白质和硫苷的溶出均无明显影响。综合实际生产节水，优选 1∶40 g/mL 的料液比。

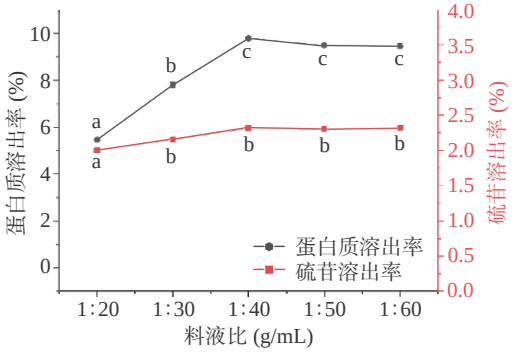


图 4　料液比对蛋白及硫苷溶出的影响

Fig.4　Effects of the ratio of material to solvent on the protein and glucosinolates content

2.2 菜籽饼粕蛋白碱溶条件响应面试验结果分析

2.2.1 响应面试验设计与结果 在单因素实验结果的基础上确定料液比为 1∶40 g/mL，以 pH(X_1)、浸提时间(X_2)和浸提温度(X_3)3 因素为自变量，以蛋白质溶出率为响应值(Y_1)、硫苷溶出率为响应值(Y_2)，采用响应面法进行三因素三水平的试验设计，共包括 17 组试验方案。试验方案及结果见表 2。

表 2 响应面试验设计与结果

Table 2 Design and results of response surface experiment

试验号	X_1 pH	X_2 浸提时间	X_3 浸提温度	Y_1 蛋白质溶出率(%)	Y_2 硫苷溶出率(%)
1	−1	−1	0	4.59	3.46
2	1	0	−1	9.32	3.03
3	0	−1	1	8.44	2.14
4	−1	0	1	5.26	3.81
5	−1	0	−1	3.67	3.38
6	1	−1	0	9.46	3.22
7	0	0	0	8.17	1.79
8	0	0	0	8.09	1.67
9	0	0	0	8.28	1.84
10	0	1	1	8.90	2.39
11	1	0	1	9.54	3.56
12	−1	1	0	5.08	3.78
13	0	−1	−1	7.24	1.29
14	1	1	0	9.54	3.45
15	0	0	0	8.24	1.75
16	0	0	0	8.14	1.68
17	0	1	−1	7.98	1.52

2.2.2 模型建立与方差分析 利用 Design Expert 8.0.6 软件对结果进行方差分析(见表 3，表 4)，对拟合回归方程进行方差分析和显著性检验，将数据进行多元回归拟合，得到蛋白质溶出率(Y_1)与 pH(X_1)、浸提时间(X_2)和浸提温度(X_3)的二次响应面回归方程为：

$$Y_1=8.19+2.41X_1+0.22X_2+0.49X_3-0.10X_1X_2-0.34X_1X_3-0.071X_2X_3-1.10X_1^2+0.086X_2^2-0.13X_3^2$$

硫苷溶出率(Y_2)与 pH(X_1)、浸提时间(X_2)和浸提温度(X_3)的二次响应面回归方程为：

表 3 蛋白质溶出率回归方程的方差分析

Table 3 Analysis of variance for protein yield's regression equation

来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	54.46	9	6.05	326.63	<0.0001	**
X_1	46.31	1	46.31	2499.55	<0.0001	**
X_2	0.40	1	0.40	21.54	0.0024	**
X_3	1.93	1	1.93	104.42	<0.0001	**
X_1X_2	0.043	1	0.043	2.32	0.1715	
X_1X_3	0.46	1	0.46	24.88	0.0016	**
X_2X_3	0.020	1	0.020	1.10	0.3299	
X_1^2	5.14	1	5.14	277.49	<0.0001	**
X_2^2	0.031	1	0.031	1.67	0.2377	
X_3^2	0.074	1	0.074	4.00	0.0855	
残差	0.13	7	0.019			
失拟项	0.11	3	0.036	6.56	0.0504	不显著

R^2=0.9976 R^2_{adj}=0.9946 CV=1.78%

注："*"表示差异显著(P<0.05)；"**"表示差异极显著(P<0.01)；表4同。

表 4 硫苷溶出率回归方程的方差分析

Table 4 Analysis of variance for glucosinolate content's regression equation

来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	13.09	9	1.45	107.71	<0.0001	**
X_1	0.18	1	0.18	12.99	0.0087	**
X_2	0.14	1	0.14	10.01	0.0158	*
X_3	0.89	1	0.89	65.78	<0.0001	**
X_1X_2	1.845E-003	1	1.845E-003	0.14	0.7226	
X_1X_3	2.545E-003	1	2.545E-003	0.19	0.6773	
X_2X_3	3.296E-004	1	3.296E-004	0.024	0.8803	
X_1^2	11.72	1	11.72	868.33	<0.0001	**
X_2^2	0.016	1	0.016	1.19	0.3110	
X_3^2	3.456E-003	1	3.456E-003	0.26	0.6284	
残差	0.095	7	0.014			
失拟项	0.073	3	0.024	4.57	0.0882	不显著

R^2=0.9928 R^2_{adj}=0.9836 CV=4.51%

$$Y_2=1.75-0.15X_1+0.13X_2+0.33X_3-0.021X_1X_2+0.025X_1X_3+0.00907X_2X_3+1.67X_1^2+0.062X_2^2+0.029X_3^2$$

由表 3、表 4 可知，两模型的 P 值均<0.0001，表明模型拟合效果显著，能很好地反映变量与响应变量之间的关系；两回归模型的失拟项分别为 0.0504、0.0882，即失拟不显著，并且多元决定系数分别为 R^2=0.9976、R^2=0.9928，拟合效果较好。另外，回归方程一次项系数绝对值的大小，决定了各因素对响应值影响的主次顺序，可看出，浸提 pH 是影响菜籽饼粕碱溶蛋白质溶出的关键因素(P<0.0001)，其次浸提时间(P=0.0024)与温度(P<0.0001)；就硫苷溶出率而言，各因素的影响大小为浸提温度(P<0.0001)>浸提 pH(P=0.0087)>浸提时间(P=0.0158)。

2.2.3 响应面分析 在模型分析的基础上，图 5 展示了交互因素对菜籽粕蛋白质碱溶浸提工艺的影响效果，结合拟合方程，碱性条件下的蛋白质与硫苷溶出率均受浸提 pH 与浸提温度的交互影响较大，其中，浸提 pH 与浸提温度的交互作用可显著影响蛋白质的溶出效果(P=0.0016)。以蛋白质溶出率最大且硫苷溶出率最低，分析优化得到脱脂菜籽饼粕蛋白质碱溶优化的提取条件为 pH13.16，浸提时间 82.07 min，浸提温度 45.71 ℃，该条件下理论蛋白质溶出率为 8.42%、硫苷溶出率为 1.60%。经修正确定最终工艺参数为 pH13.1，浸提时间 82 min，浸提温度 46 ℃，液料比 1∶40 g/mL，此条件下进行 3 次平行试验，得到蛋白质溶出率平均值为 8.78%、硫苷溶出率平均值为 1.65%，与理论值相比，实验值和预测值具有良好的相关性，说明该响应面模型和最优化条件是有效的。

2.3 菜籽饼粕蛋白酸沉最优条件

菜籽蛋白等电点宽泛，约为 3~9[22]，碱溶酸沉工艺中酸沉条件的选择会直接影响蛋白的回收率及其

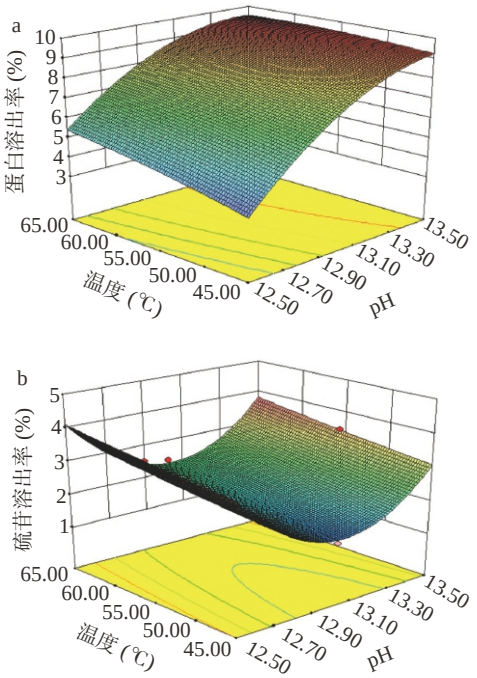


图 5　交互因素对蛋白和硫苷溶出率的影响

Fig.5　Effects of the interaction of various factors on the protein yield and glucosinolates content

物化性质[2,23]，前期有研究发现菜籽蛋白在 pH4.5~5.5 间回收率最高[23]，AKBARI 等[24] 则表明 pH4.0 酸沉条件下获得的蛋白质与 pH4.5 酸沉条件下的蛋白质纯度更高。本实验在碱溶工艺条件优化的基础上，以酸沉蛋白得率最高为指标，对菜籽粕蛋白的最佳酸沉条件（pH 条件设置 1、2、3、4、4.2、4.4、4.6、4.8、5）进行筛选，结果如图 6 所示，碱溶液中的蛋白质的沉淀率在 pH1~5 的范围内随着 pH 的增大呈现先增大后减小的趋势，并在 pH4 时酸沉条件下沉淀率最大，约为 10.48%，该变化趋势与 ZHANG 等的[9] 研究结果相一致，这主要与菜籽蛋白的各组成成分不同的等电点值相关。

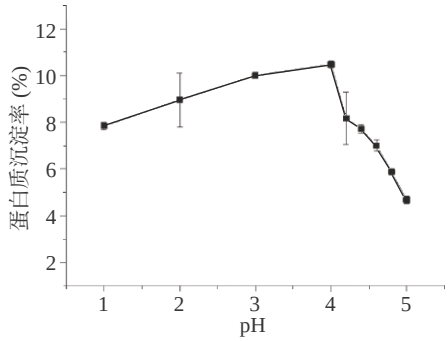


图 6　酸沉 pH 对蛋白制备的影响

Fig.6　Effects of acid precipitation pH on rapeseed protein

2.4　菜籽饼粕蛋白提取物 SDS-PAGE 分析

图 7 为菜籽饼粕碱溶液、菜籽饼粕酸沉蛋白和菜籽饼粕酸溶蛋白提取物的 SDS-PAGE 图。前期研究表明，菜籽蛋白主要包含有 11/12S 球蛋白，该蛋白可降解为 6 个亚基，每个亚基由 α-（约 30~40 kDa）和 β-（约 20 kDa）两条多肽链以二硫键链接组成；以及 N1.7/2S 白蛋白，其由两条不同分子量（10~12 kDa 与 3~6 kDa）的肽链组成[25−26]。从图 7 可以看出，碱溶液样品中的蛋白条带主要集中分布<41 kDa 以下，其中，低分子量蛋白相对较多，这与其蛋白含量及一定程度的水解有关[27]。对比分析酸沉蛋白与酸溶蛋白提取物中的蛋白条带可发现，酸沉蛋白的条带在 31 、14~22 及<14.4 kDa 间均有分布，即含有一定的球蛋白及白蛋白，表示蛋白种类及水解物相对较多；相比而言，酸溶蛋白提取物则主要为白蛋白（14.4 kDa）及小分子水解物[28]。进一步分析，菜籽饼粕酸沉蛋白与酸溶蛋白提取物中的粗蛋白含量分别为（78.10%±0.53%）、（15.25%±0.17%）。

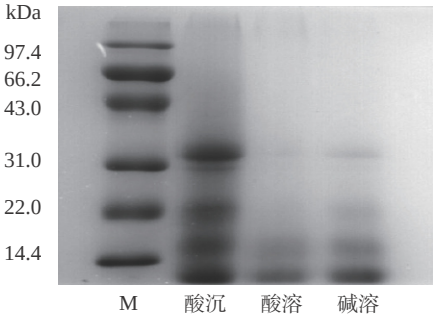


图 7　菜籽粕蛋白提取物的 SDS-PAGE 图谱

Fig.7　SDS-PAGE of rapeseed meal protein extracts

2.5　菜籽饼粕蛋白提取物的活性

2.5.1　菜籽饼粕蛋白清除 ABTS 自由基的活性　菜籽蛋白及其水解物已被报道具有一定的生物活性，如增强免疫、抗氧化活性及抑菌等[1]。实验选取 ABTS 阳离子自由基为对象，对菜籽饼粕蛋白提取物的体外抗氧化活性进行了测定，结果表明同等粗蛋白含量的

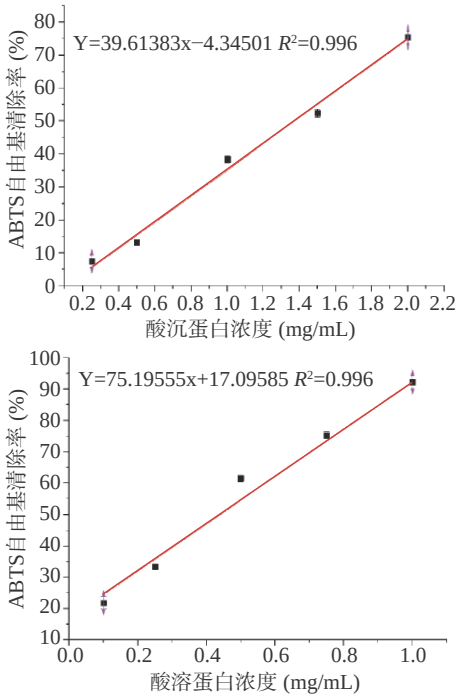


图 8　菜籽粕蛋白提取物的 ABTS 自由基清除能力

Fig.8　ABTS free radical scavenging ability of rapeseed protein extracts

菜籽粕酸溶蛋白提取物其自由基清除率与酸沉蛋白相比更高，两者的 EC_{50} 值分别为 0.438、1.372 mg/mL（如图 8 所示），推测一是主要与两者的蛋白组成种类有关，其中，酸溶蛋白中多为分子量较小的白蛋白与其蛋白质水解物，在自由基体系中暴露的疏水性基团较多，更易与 ABTS 接触发生氢原子转移[4,29]；二是可能与提取物中其他组分如多糖等有关。

2.5.2 菜籽饼粕蛋白的抑菌能力 进一步对两种蛋白提取物的抑菌性进行了分析，其中，两者均表现出一定的抑制金黄色葡萄球菌生长的能力（图 9），且酸沉淀蛋白发挥作用的浓度低于酸溶蛋白提取物，即酸沉蛋白具有较强的抑制金黄色葡萄球菌生长的能力，如图 9a 所示，10 mg/mL 与 5 mg/mL 酸沉蛋白的抑菌圈直径分别约为 15.23 mm 与 11.02 mm，这与 DUAN 等[30] 发现菜籽球蛋白与菜籽白蛋白相比更易获得抗菌肽相一致；此外，两者对大肠杆菌及黄青霉的生长几乎无抑制能力。

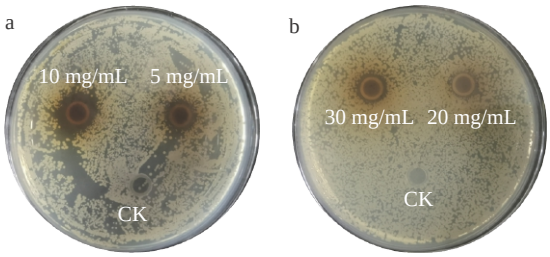


图 9 菜籽粕蛋白提取物对金黄色葡萄球菌的抑制作用

Fig.9 Inhibition of rapeseed protein extracts on *S.aureus*

注：a：酸沉蛋白；b：酸溶蛋白提取物。

3 结论

菜籽饼粕富含蛋白质，本文对菜籽饼粕蛋白的碱溶酸沉工艺进行了系统优化，结果表明：菜籽饼粕经脱脂处理后，在 pH13.1 的条件下以 1∶40 g/mL 的料液比、46 ℃ 条件下浸提 82 min 后，其蛋白质溶出率可达 8.78% 且硫苷溶出率相对较低为 1.65%；进一步，调节菜籽饼粕蛋白碱提取液的 pH 至 4.0，冷冻离心后，分别对其沉淀物及上清液进行冻干和喷雾干燥处理，可得到菜籽饼粕酸沉蛋白与酸溶蛋白提取物，SDS-PAGE 结果显示：酸沉蛋白分子量在 31、14~22 及<14.4 kDa 间均有分布，主要为菜籽球蛋白；菜籽饼粕酸溶蛋白提取物的分子量主要分布在<14.4 kDa 左右，主要为菜籽白蛋白；且两种不同提取物的粗蛋白含量分别为(78.10%±0.53%)与(15.25%±0.17%)。此外，两者都表现出了一定的体外 ABTS 自由基清除及抑制金黄色葡萄球菌生长的能力。本实验为菜籽饼粕蛋白的开发利用提供了一定的理论支撑，进一步可对菜籽饼粕蛋白提取物的结构及其加工特性进行研究。

参考文献

[1] CHMIELEWSKA A, KOZOWSKA M, RACHWA D, et al. Canola/rapeseed protein-nutritional value, functionality and food application: A review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2020(77): 1−21.

[2] 翟晓娜, 师建芳, 赵慧凝, 等. 菜籽饼粕蛋白的提取、功能特性及其在食品中应用的研究进展[J]. 食品工业科技, 2021, 42(12): 389−397. [ZHAI Xiaona, SHI Jianfang, ZHAO Huining, et al. Extraction, functional properties and food applications of rapeseed meal protein isolates[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(12): 389−397.]

[3] RAHMAN M, BROWNE J J, CRU GTR N J V, et al. In silico, molecular docking and *in vitro* antimicrobial activity of the major rapeseed seed storage proteins[J]. Frontiers in Pharmacology, 2020, 11: 1−23.

[4] WONG F C, XIAO J B, WANG S Y, et al. Advances on the antioxidant peptides from edible plant sources[J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 99: 44−57.

[5] WANASUNDARA J P D, MCINTOSH T C, PERERA S P, et al. Canola/rapeseed protein-functionality and nutrition[J]. Oilseeds & Fats Crops and Lipids, 2016, 23(4): D407.

[6] NADATHUR S R, WANASUNDARA J P D, SCANLIN L. Sustainable protein sources[M]. London: Academic Press, 2016: 285−304.

[7] SARI Y W, BRUINS M E, SANDERS J P M. Enzyme assisted protein extraction from rapeseed, soybean, and microalgae meals[J]. Industrial Crops & Products, 2013, 43: 78−83.

[8] KDIDIA S, VACA-MEDINA G, PEYDECASTAING J, et al. Electrostatic separation for sustainable production of rapeseed oil cake protein concentrate: Effect of mechanical disruption on protein and lignocellulosic fiber separation[J]. Powder Technology, 2019, 344: 10−16.

[9] ZHANG Z Y, HE S D, LIU H Y, et al. Effect of pH regulation on the components and functional properties of proteins isolated from cold-pressed rapeseed meal through alkaline extraction and acid precipitation[J]. Food Chemistry, 2020, 327: 126998.

[10] 罗群. 考马斯亮蓝法快速测定菜籽粕中可溶性蛋白质的含量[J]. 成都大学学报(自然科学版), 2014, 33(2): 125−126. [LUO Qun. Rapid determination of soluble protein content in rapeseed meal by Coomassie brilliant blue method[J]. Journal of Chengdu University (Natural Science Edition), 2014, 33(2): 125−126.]

[11] 王宁惠. 油菜籽(饼粕)中硫代葡萄糖甙总量速测方法-氯化钯法[J]. 青海农林科技, 2009(3): 58−59. [WANG Ninghui. A quantitative analysis method of glucosinolates in rapeseed meal[J]. Science and Technology of Qinghai Agriculture and Forestry, 2009(3): 58−59.]

[12] 赵冬吉. 西兰花无麸质海绵蛋糕制备及其抗氧化性研究[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(5): 162−167. [ZHAO Dongji. Preparation and antioxidant activities of broccoli gluten-free sponge cake[J]. Food Research and Development, 2019, 40(5): 162−167.]

[13] FETZER A, HERGELLNER T, EISNER P. Rapeseed protein concentrates for non-food applications prepared from prepressed and cold-pressed press cake via acidic precipitation and ultrafiltration[J]. Industrial Crops & Products, 2019, 132: 396−406.

[14] WANG Z G, ZHANG C, ZHANG T, et al. Effects of acylation and glycation treatments on physicochemical and gelation prop-

erties of rapeseed protein isolate[J]. RSC Advances, 2018, 8(70): 40395−40406.

[15] 汪涛, 梁亮, 李旭锐, 等. 低共熔溶剂提取核桃青皮多酚工艺优化及其抑菌活性[J]. 农业工程学报, 2021, 37(5): 317−323. [WANG Tao, LIANG Liang, LI Xurui, et al. Optimization of the technology for deep eutectic solvents extraction and antibacterial of walnut green husk polyphenols[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2021, 37(5): 317−323.]

[16] TZENG Y M, DISOSADY L L, RUBINL J. Production of canola protein materials by alkaline extraction, precipitation, and membrane processing[J]. Journal of Food Science, 1990, 55(4): 1147−1151.

[17] FETZER A, HERFELLNER T, STÄBLER A, et al. Influence of process conditions during aqueous protein extraction upon yield from pre-pressed and cold-pressed rapeseed press cake[J]. Industrial Crops and Products, 2018, 112: 236−246.

[18] TAN S H, MAILER R J, BLANCHARD C L, et al. Extraction and characterization of protein fractions from Australian canola meals[J]. Food Research International, 2011, 44(4): 1075−1082.

[19] ÖSTBRING K, TULLERG C, BURRI S, et al. Protein recovery from rapeseed press cake: Varietal and processing condition effects on yield, emulsifying capacity and antioxidant activity of the protein rich extract.[J]. Foods (Basel, Switzerland), 2019, 8(12): 627.

[20] 罗群, 张宏. 菜籽蛋白提取工艺的优化及其对 DPPH 自由基的清除作用[J]. 北方园艺, 2014(14): 136−139. [LUO Qun, ZHANG Hong. Optimization of protein extraction process and scavenging function of DPPH radical from rapeseed meal[J]. Northern Horticulture, 2014(14): 136−139.]

[21] GERZHOVA A, MONDOR M, BENALI M, et al. Study of total dry matter and protein extraction from canola meal as affected by the pH, salt addition and use of zeta-potential/turbidimetry analysis to optimize the extraction conditions[J]. Food Chemistry, 2016, 201(15): 243−252.

[22] WANASUNDARA J P D, ABETSEKARA S J, MCINTOSH T C, et al. Solubility differences of major storage proteins of Brassicaceae oilseeds[J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 2012, 89(5): 869−881.

[23] GHODSVAI A, KHODAPARAST M H H, VOSOUGHI M, et al. Preparation of canola protein materials using membrane technology and evaluation of meals functional properties[J]. Food Research International, 2005, 38(2): 223−231.

[24] AKBARI A, WU J P. An integrated method of isolating napin and cruciferin from defatted canola meal[J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 64(1): 308−315.

[25] MORGANE C, JENNIFER R, CARRÉ P, et al. Value of hydroalcoholic treatment of rapeseed for oil extraction and protein enrichment[J]. Oilseeds & Fats Crops and Lipids, 2018, 26 (1).

[26] QU W, ZHANG X, HAN X, et al. Structure and functional characteristics of rapeseed protein isolate-dextran conjugates[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 82: 329−337.

[27] KASPRZAK M M, HOUDIJK J G M, LIDDELL S, et al. Rapeseed napin and cruciferin are readily digested by poultry[J]. Journal of Animal Physiology & Animal Nutrition, 2017, 101(4): 658−666.

[28] DANIELA V D H, MÜLLER K, BAFER-MITTERMAIER S, et al. Rapeseed proteins–production methods and possible application ranges[J]. OCL, 2014, 21(1): D104.

[29] 张文敏, 张健, 周浩纯, 等. 亚麻籽粕制备小分子抗氧化活性肽[J]. 食品科学, 2020(8): 36−44. [ZHANG Wenmin, ZHANG Jian, ZHOU Haochun, et al. Preparation of small molecular antioxidant peptides from flaxseed meal[J]. Food Science, 2020(8): 36−44.]

[30] DUAN X J, ZHANG M, CHEN F S. Prediction and analysis of antimicrobial peptides from rapeseed protein using in silico approach[J]. Journal of Food Biochemistry, 2021(9): e13598.

施建斌, 隋勇, 蔡沙, 等. 挤压处理荞麦对面团特性和面条品质的影响 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 172−177. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080102

SHI Jianbin, SUI Yong, CAI Sha, et al. Effect of Extruded Buckwheat Powder on Dough Characteristic and Noodle Quality[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 172−177. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080102

· 工艺技术 ·

挤压处理荞麦对面团特性和面条品质的影响

施建斌[1], 隋　勇[1], 蔡　沙[1], 何建军[1], 熊　添[1], 范传会[1], 陈学玲[1], 家志文[1], 王少华[1],
蔡　芳[1], 蒋修军[2], 梅　新[1,*]

(1.湖北省农业科学院农产品加工与核农技术研究所, 湖北武汉 430064;
2.湖北金银丰食品有限公司, 湖北随州 441300)

摘　要: 为明确挤压荞麦对混合粉面团特性和面条品质的影响, 系统研究了挤压荞麦添加对混合粉溶剂保持力(solvent retention capacity, SRC)、糊化特性、热机械特性、面条蒸煮特性和质构特性等的影响。结果表明, 蔗糖、碳酸钠和乳酸的 SRC 随挤压荞麦粉添加量的增加而显著增加(P<0.05)。混合粉的峰值粘度、谷值粘度、衰减值、最终粘度和回生值均随着荞麦粉添加量的增加而显著降低(P<0.05)。面团的吸水率、弱化度 C_1-C_2 随挤压荞麦粉添加量的增加而显著增加(P<0.05)。然而, 糊化特性 C_3-C_2 值和回生值 C_5-C_4、形成时间和稳定时间都随挤压荞麦添加量的增加而减小。随挤压荞麦粉添加量的增加, 面条的蒸煮吸水率减小, 剪切力、拉伸强度、硬度和咀嚼性等增加。

关键词: 荞麦, 挤压处理, 溶剂保持力, 热机械特性, 面条品质
中图分类号: TS232　　**文献标识码:** B　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0172−06
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080102
本文网刊:

Effect of Extruded Buckwheat Powder on Dough Characteristic and Noodle Quality

SHI Jianbin[1], SUI Yong[1], CAI Sha[1], HE Jianjun[1], XIONG Tian[1], FAN Chuanhui[1], CHEN Xueling[1], JIA Zhiwen[1], WANG Shaohua[1], CAI Fang[1], JIANG Xiujun[2], MEI Xin[1,*]

(1.Institute of Agro-Product Processing and Nuclear-Agricultural Technology, Hubei Academy of Agricultural Science, Wuhan 430064, China;
2.Hubei Jinyinfeng Food Co., Ltd., Suizhou 441300, China)

Abstract: To clarify the effects of extruded buckwheat on the dough properties and noodle quality of buckwheat-wheat flour, the solvent retention capacity (SRC), gelatinization, thermo-mechanical properties, cooking characteristics, texture characteristics were comprehensively studied. The results showed that sucrose, sodium carbonate and lactic acid SRC significantly increased with the addition of buckwheat flour (P<0.05). However, peak viscosity, minimum viscosity, breakdown value, final viscosity and setback value decreased significantly (P<0.05). The water absorption, weakening degree C_1-C_2 of dough increased significantly with the addition of extruded buckwheat. However, the gelatinization characteristic C_3-C_2 value, setback C_5-C_4 value, develoment and stability time decreased with the addition of extruded buckwheat. Cooking water absorption of noodle decreased with the addition of extruded buckwheat. However, the shear force, tensile strength, hardness and chewiness increased with the addition of extruded buckwheat.

Key words: buckwheat; extrusion treatment; solvent retention capacity; thermal mechanical characteristics; noodle properties

收稿日期: 2021−08−11
基金项目: 湖北省重点研发计划项目(2020BBB064)。
作者简介: 施建斌(1984−), 男, 博士, 副研究员, 主要从事粮食加工及副产物加工利用方面的研究, E-mail: shijianbin1022@126.com。
*** 通信作者:** 梅新(1978−), 男, 博士, 研究员, 主要从事粮食加工及副产物加工利用方面的研究, E-mail: meixin0898@163.com。

荞麦起源于中国，现在主要在亚洲、欧洲和美洲种植[1]，在小麦产量较低时，荞麦是亚洲和欧洲部分国家的主要粮食作物。根据世界粮农组织的数据，2020 年全球荞麦产量为 161 万吨，种植面积为 167 万公顷；我国荞麦产量为 43 万吨，种植面积为 50 万公顷。荞麦营养成分与小麦相似，淀粉（58.3%~73.5%）、蛋白（10%~14.5%）、膳食纤维（9.3%~10.9%）和脂肪（2.0%~2.6%）是其主要成分[2−4]。除此之外，荞麦中还含有多酚类物质，主要为儿茶素、槲皮素、芦丁、金丝桃苷等，具有很好的抗氧化、抗肿瘤、降压和消炎等作用[5−6]。近年来越来越多的研究将荞麦制备成为全谷物的食物，并发现其可改善产品的营养特性。JIA 等[7] 发现荞麦的添加能够降低面条还原糖的释放水平。WOLTER 等[8] 对比荞麦、燕麦、藜麦、高粱、画眉草粉制备的全谷物面包体外消化特性和血糖指数发现，全谷物能降低总可利用碳水化合物、水解指数、血糖指数和血糖负荷，其中，荞麦的各项指标分别为 1171 mg/4 g、73、80 和 8。荞麦添加量的增加能降低米粉预测血糖指数和快速消化淀粉的含量，提高抗性淀粉含量[9]。

面条是我国传统主食，是荞麦全谷物主食化的重要载体。但是，由于荞麦蛋白质主要由水溶性的清蛋白和盐溶性的球蛋白和谷蛋白组成，麦粉无法形成与小麦粉相似的面筋网络结构，和面后不能形成紧密的可以膨胀的有黏弹性的面筋网络结构，过量的荞麦粉导致面团的弹性、韧性和延伸性下降，从而导致面条品质变差[10−11]，荞麦粉在小麦粉中加入比例较高（10%~30%）时，面条的蒸煮断条率和损失率较高[12−14]。为了提高荞麦面条品质，可以通过预糊化对荞麦原料进行处理以提升面条的加工品质和口感。原料通过预糊化处理后，淀粉分子氢键被打断，胶束结构被破坏，荞麦粉的吸水性、膨胀性和凝胶增加，预糊化后的淀粉能够促进各组分之间的粘附，提升面团的强度[10, 15]。CHENG 等[16] 认为荞麦挤压处理后破坏了淀粉的形态和结晶结构，可以诱导形成淀粉网络，在制备面条、面包、即食早餐麦片等方面潜力巨大。陈媛媛等[17] 发现随着糊粉的添加量的增加，面团的吸水率、形成时间和弱化度显著增加，面团的稳定时间显著降低；面条硬度值显著提高，弹性和胶黏性显著降低。而挤压处理后的荞麦粉添加对小麦粉面团特性和面条品质的影响还不明确，因此，本文采用挤压膨化工艺对荞麦进行处理，研究挤压处理后的荞麦粉添加对面团特性和面条品质的影响。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

五得利高筋小麦粉　五得利面粉集团公司，经测定面粉中淀粉 59.37%、蛋白 10.43%、脂肪 0.93%、灰分含量 0.32%；去壳荞麦米　五常彩桥米业有限公司；乳酸、蔗糖、碳酸钠　分析纯，国药集团化学试剂有限公司。

DS-32 双螺杆挤压膨化机　济南赛信机械有限公司；FC1-220 型电动压面机　武汉丰创机械设备有限公司；TA-XTPlus 质构仪　英国 Stable Micro System；RAV 4500 快速粘度测定仪　瑞典波通科技公司；Mixolab 2 混合试验仪　法国肖邦技术公司；和面机、粉碎机、电磁炉等为实验室常规仪器设备。

1.2　实验方法

1.2.1　荞麦挤压预处理　荞麦经过常规粉碎后过 60 目筛网，通过挤压膨化机进行挤压处理，挤压原料的水分为 14%，挤压膨化机一区、二区和三区的温度分别为 50、120 和 160 ℃。挤压处理后的样品经粉碎后过 80 目筛网备用；经过测定挤压后荞麦中淀粉、蛋白、脂肪、灰分、水分含量分别为 60.98%、12.41%、2.43%、1.77%、11.5%，糊化度为 85.32%。

1.2.2　荞麦面条制备　称取不同质量的挤压荞麦粉与面粉混合，制成含有 0%、4%、8%、12%、16%、20% 荞麦粉的混合粉。在混合粉中加入适量水，和面 8~10 min，熟化 30 min。熟化结束后先后用压面机在压辊轧距间隙 3 mm 和 2 mm 处压片，压片—合片—压片，反复 5 次，最后在压辊轧距间隙 2.0 mm 处压片然后切成直径 2.0 mm 圆面条，室温晾干备用。

1.2.3　混合粉溶剂保持能力（SRC, solvent retention capacity）　参照 GB/T 35866-2018 粮油检验 小麦粉溶剂保持力的测定 中的方法进行测定。基本操作如下：准确称量的 5.000 g 混合粉（m）于已称重的离心管（m_1）中并加入 25.00 g 溶液（去离子水、50% 蔗糖溶液（质量分数）、5% 碳酸钠溶液（质量分数）、5% 乳酸溶液（质量分数）），剧烈摇动使其混合均匀，置于试管架上膨胀 20 min，期间在 5、10、15、20 min 时快速摇动 5 s。最后一次摇动后，在 1000 g 离心力下离心 15 min，弃上清液后将试管倒立 10 min 称重（m_2），测定之前测定混合粉水分 M_1，按照式（1）计算 SRC：

$$SRC(\%)=\left(\frac{m_2-m_1}{m}\times\frac{100-14}{100-M_1}-1\right)\times100 \qquad 式（1）$$

1.2.4　混合粉糊化特性测定　参照 GB/T 24853-2010 小麦、黑麦及其粉类和淀粉糊化特性测定 快速粘度仪法中的方法进行测定。基本操作如下：称取 2.5 g 混合粉（湿基水分质量分数 14%），加 25 mL 去离子水，0~20 s 在 960 r/min 条件下从室温加热至 25 ℃，然后在 160 r/min 条件下恒温 60 s，在 840 s 内逐渐升温至 95 ℃ 后恒温 600 s，570 s 内降温至 50 ℃ 后恒温 570 s，根据糊化曲线计算峰值黏度、谷值黏度、衰减值、最终黏度、回生值。

1.2.5　混合粉热机械特性测定　采用 Mixolab 2 对混合粉的热机械特性进行测定，试验协议为 Chopin$^+$，搅拌刀转速为 80 r/min，面团质量为 75 g，水箱温度为 30 ℃，目标扭矩为（1.1±0.05）N·m。运行过程中温度设置分为三个阶段，第一阶段（恒温阶

段), 30 ℃ 保持 8 min; 第二阶段(升温阶段), 以 4 ℃/min 升温到 90 ℃, 并在此温度下保持 10 min; 第三阶段(降温阶段), 以 4 ℃/min 从 90 ℃ 降温到 50 ℃, 并在此温度下保持 5 min。

1.2.6 荞麦面条蒸煮特性测定 对荞麦面条最佳蒸煮时间、蒸煮断条率、蒸煮吸水率和蒸煮损失率按照如下的方法进行测定:

最佳蒸煮时间: 取 20 根长 20 cm 的面条, 放入沸腾的蒸馏水中煮一段时间后每隔半分钟挑起一根面条, 用刀切开, 直至面条中间的白芯全部消失, 记录时间, 即为面条的最佳蒸煮时间。

蒸煮断条率: 取 40 根 20 cm 的面条置于 1 L 沸水中, 在最佳蒸煮时间下煮制, 结束后用竹筷将面条轻轻挑出, 计算断裂面条数量, 按照式(2)计算面条蒸煮断条率。

$$断条率(\%)=\frac{断条数}{煮制总根数}\times 100 \qquad 式(2)$$

蒸煮吸水率和蒸煮损失率: 取 20 g 面条并计算其干重 W_1, 置于 1 L 沸水中, 在最佳蒸煮时间下煮制, 结束用漏勺将面条捞出沥水后称重 W_2, 然后将其放入烘箱中烘到恒重 W_3, 分别按式(3)和(4)计算蒸煮吸水率和蒸煮损失率:

$$蒸煮吸水率(\%)=\frac{W_2-W_1}{W_1}\times 100 \qquad 式(3)$$

$$蒸煮损失率(\%)=\frac{W_1-W_3}{W_1}\times 100 \qquad 式(4)$$

1.2.7 面条质构特性分析 面条在最佳蒸煮时间下蒸煮后, 过凉水 10 s, 采用以下几种方式对面条质构进行分析:

TPA 测定: 探头型号: P36/R。参数设定: 模式: 压缩; 测试前运行速度: 1 mm/s; 测试速度: 5 mm/s; 测试结束返回速度: 5 mm/s; 压缩程度: 75%; 触发形式: 自动−5 g。每次把 3 根面条水平放置于载物台上对每个试样作 6 次平行实验。

剪切力测定: 探头型号: A/LKB-F。参数设定: 模式: 压缩; 测试前运行速度: 2 mm/s; 测试速度: 0.8 mm/s; 测试结束返回速度: 0.8 mm/s; 压缩程度: 90%; 触发形式: 自动−3 g。每次把 3 根面条水平放置于载物台上, 面条之间要有一定的间隔。对每个试样作 6 次平行实验。

拉伸强度测定: 探头型号: Code A/SPR。参数设定: 模式: 拉伸; 测试前速度: 2 mm/s; 测试速度: 2 mm/s; 测试结束返回速度: 10 mm/s; 触发距离: 100 mm; 触发形式: Auto-0.5 g。每次将一根面条缠绕固定在两个平行的摩擦轮之间(面条在被拉的过程中不能够松动), 上面的轮子匀速的向上拉伸面条, 直至面条断裂。对每个试样作 6 次平行实验。

1.3 数据处理

试验重复 3 次, 结果用平均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 列表或采用 Origin 2018 对所得数据进行作图处理。用 SPSS 通过一元方差分析(One-Way ANOVA)进行多个组间平均数的比较, 如果组间存在显著性差异($P<0.05$), 则采用 Duncan 检验进行组间多重比较。

2 结果与分析

2.1 挤压荞麦粉添加对混合粉溶剂保持力的影响

挤压荞麦粉添加对混合粉溶剂保持力的影响见表 1。从表中能看出随着荞麦粉添加量的增加, 蔗糖、碳酸钠和乳酸 SRC 显著增加($P<0.05$), 添加量为 20% 时最大, 分别为 182.66%、223.02% 和 177.99%; 水 SRC 在挤压荞麦粉添加量为 16% 时最大为 102.62%, 但是与添加量为 20% 时没有显著性差异($P>0.05$)。荞麦中含有较多的膳食纤维, 通过挤压可以提升可溶性膳食纤维的含量; 此外, 挤压过程中淀粉发生糊化, 淀粉发生破裂。因此, 将挤压后的荞麦粉添加到小麦粉将会增加戊聚糖(如, 聚阿拉伯糖木糖), 同时糊化后的淀粉将会增加混合粉中破损淀粉含量但是也起到胶黏剂的作用, 有利于面筋网络的溶胀和形成, 提升混合粉蔗糖、碳酸钠和乳酸 SRC[18−19]。而小麦-荞麦混粉作为一个复杂的混合体系, 淀粉含量、膳食纤维含量、蛋白含量和组成都将对水 SRC 具有影响, 因此, 水 SRC 随添加量的增加规律性不强[20]。有研究认为 SRC 值反映面条的力学特性[21], 乳酸 SRC 与弹性模量、断裂位移、断裂应力、硬度、咀嚼性之间均呈显著正相关, 与蒸煮损失率呈极显著负相关; 蔗糖 SRC 与断裂应力、咀嚼性、蒸煮损失率之间均呈显著相关; 碳酸氢钠 SRC 与内聚性、弹性、面条吸水率之间均呈显著或极显著相关; 水 SRC 与挂面品质指标之间相关性均不显著。

表 1 挤压荞麦粉添加对混合粉溶剂保持力的影响(%)
Table 1 Effect of extruded buckwheat addition on SRC for mixed powder (%)

添加量(%)	水SRC	蔗糖SRC	碳酸钠SRC	乳酸SRC
0	68.26±5.73^{c}	96.58±0.34^{f}	94.16±1.24^{f}	98.73±5.93^{f}
4	84.59±6.56^{b}	122.23±3.75^{e}	108.69±1.97^{e}	133.78±2.43^{e}
8	67.27±0.85^{c}	144.69±6.97^{d}	137.31±2.13^{d}	143.15±3.60^{d}
12	68.18±4.05^{c}	156.86±3.75^{c}	169.38±8.51^{c}	153.98±0.48^{c}
16	102.62±10.86^{a}	167.69±0.51^{b}	201.67±0.73^{b}	165.62±1.76^{b}
20	95.07±2.77^{ab}	182.66±0.31^{a}	223.02±2.55^{a}	177.99±5.38^{a}

注: 同列不同小写字母表示差异显著, $P<0.05$; 表2~表5同。

2.2 挤压荞麦粉添加对混合粉糊化特性的影响

挤压荞麦粉添加对混合粉糊化特性的影响见表 2。从表中可以看出, 随着挤压荞麦粉添加量的增加, 峰值粘度、谷值粘度、衰减值、最终粘度、回生值和峰值时间都呈下降趋势。峰值粘度、谷值粘度和最终粘度在添加量为 20% 时仅为小麦粉的 49.88%、52.11% 和 50.60%。糊化是淀粉加热后, 淀粉颗粒开始破坏、晶体结构消失、并形成具有黏性的糊状物的过程。荞麦在挤压过程中通过高温、高压、高剪切力的作用使淀粉糊化, 再次加热过程中不会发生吸水溶

表 2　挤压荞麦粉添加对混合粉糊化特性的影响

Table 2　Effect of extruded buckwheat addition on pasting properties for mixed powder

添加量(%)	峰值粘度(cP)	谷值粘度(cP)	衰减值(cP)	最终粘度(cP)	回生值(cP)	峰值时间(min)
0	270.67±5.51^{a}	236.67±8.33^{a}	34.00±3.00^{a}	471.00±11.53^{a}	234.33±3.21^{a}	9.27±0.12^{a}
4	222.33±5.03^{b}	197.00±5.00^{b}	25.33±0.58^{b}	396.67±8.50^{b}	199.67±3.51^{b}	9.25±0.04^{a}
8	190.00±4.58^{c}	169.00±4.36^{c}	21.00±1.00^{c}	339.00±9.64^{c}	170.00±5.29^{c}	9.09±0.03^{b}
12	177.67±3.79^{d}	159.67±5.69^{d}	18.00±2.00^{cd}	309.33±4.04^{d}	149.67±2.08^{d}	9.02±0.04^{b}
16	153.33±2.08^{e}	138.33±3.51^{e}	15.00±1.73^{d}	270.67±5.13^{e}	132.33±2.08^{e}	8.93±0.00^{c}
20	135.00±1.73^{f}	123.33±0.58^{f}	11.67±1.53^{e}	238.33±3.79^{f}	115.00±3.46^{f}	8.85±0.04^{c}

胀，因此各糊化指标有所下降[22]。添加挤压荞麦粉后混合粉衰减值和回生值显著降低(P<0.05)，添加量为 20% 时分别为 11.67 cP 和 115.00 cP。衰减值反映了淀粉颗粒在加热过程中的稳定性，数值越大说明越不稳定；而回生值反映了淀粉降温过程中老化的程度，数值越大表明其越易回生[23]，说明挤压膨化荞麦粉替代部分小麦粉使得面团中淀粉在糊化过程中更加稳定，不易回生。

2.3　挤压荞麦粉添加对混合粉面团热机械特性的影响

挤压荞麦粉添加对混合粉面团热机械特性的影响见表 3。从表中可以看出，随着挤压荞麦粉添加量的增加，面团的吸水率增加，未添加时吸水率为 56.80%，添加量为 20% 时吸水率为 65.00%。面团的形成时间和稳定时间都随着挤压荞麦粉添加量的增加而减小，添加量范围为 0%~8% 时，形成时间和稳定时间显著降低(P<0.05)，分别降低了 74.25% 和 60.81%；之后随着添加量的增加下降幅度降低，在添加量为 20% 时最低，分别为 0.72 min 和 1.09 min。面团吸水率的增加主要因为荞麦在挤压过程中淀粉发生糊化，随着荞麦粉添加量的增加面团吸水率增加。有研究发现在小麦粉中添加生荞麦粉，面团的吸水率随着添加量增加缓慢下降，添加量为 20% 时吸水率与空白相比降低 1.6%[24]，而荞麦通过挤压处理后吸水率从 55.6% 增加到 114.5%[25]。虽然挤压荞麦粉的添加能够提高面团的吸水率，但是会导致面筋蛋白的稀释，造成面团形成时间和稳定时间大大降低，这与前人研究结论相似[26]。这种荞麦粉添加对面团的弱化作用也表现在面团的弱化度 C_1-C_2 值上，随着挤压荞麦粉添加量的增加弱化度 C_1-C_2 值从 0.68 N·m 增加到 0.97 N·m。淀粉糊化特性 C_3-C_2 值和回生特性 C_5-C_4 值都随着挤压荞麦粉添加量的增加而减小，表明面团中淀粉的糊化特性降低、不易回生，这与混合粉糊化特性的结果一致。挤压膨化处理后淀粉的糊化导致吸水膨胀后摩擦力减小，扭矩减小；同时因糊化导致的面团高吸水率能够减缓水分迁移速度和淀粉重新排列缔合能力[27]。添加挤压荞麦粉面团的指数剖面图见图 1。从图中可以看出，随着挤压荞麦粉添加量的增加，面团的吸水指数、面筋指数增加；而混合指数、粘度指数、淀粉酶指数和回生指数下降。这说明添加荞麦粉后面团吸水率增加、面筋网络耐热能力增加，面团稳定性、粘度、酶活降低，而产品不易回生，货架期较长[28]。

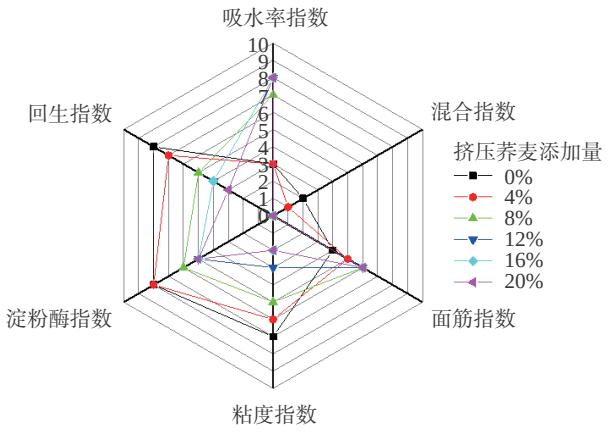


图 1　不同挤压荞麦添加的混合粉面团指数

Fig.1　Index profile of dough with different extruded buckwheat addition

2.4　挤压荞麦粉添加对面条蒸煮特性的影响

挤压荞麦粉添加对面条蒸煮特性的影响见表 4。从表中可以看出，随着荞麦添加量的增加，蒸煮时间变化不大，断条率小于 5%。蒸煮吸水率随着荞麦添加量的增加总体呈减小的趋势，添加量为 16% 时最小为 148.36%，而蒸煮损失率呈现先增加后减小再增加的趋势，添加量 12% 时蒸煮损失率最大为 9.46%。

表 3　挤压荞麦粉添加对混合粉面团热机械特性的影响

Table 3　Effect of extruded buckwheat addition on thermomechanical characteristic for dough

添加量(%)	吸水率(%)	形成时间(min)	稳定时间(min)	C_1-C_2(N·m)	C_3-C_2(N·m)	C_5-C_4(N·m)
0	56.80±0.35^{e}	3.34±0.18^{a}	5.87±0.23^{a}	0.68±0.01^{f}	1.47±0.01^{a}	1.13±0.04^{a}
4	57.00±0.00^{e}	1.36±0.07^{b}	3.57±0.14^{b}	0.81±0.01^{e}	1.39±0.01^{b}	0.94±0.02^{b}
8	60.90±0.00^{d}	0.86±0.06^{c}	2.30±0.09^{c}	0.84±0.02^{d}	1.28±0.02^{c}	0.70±0.03^{c}
12	62.57±0.23^{c}	0.81±0.05^{c}	2.07±0.06^{c}	0.88±0.01^{c}	1.14±0.01^{d}	0.59±0.02^{d}
16	64.00±0.00^{b}	0.72±0.06^{c}	1.57±0.15^{d}	0.93±0.02^{b}	0.98±0.00^{e}	0.55±0.01^{e}
20	65.00±0.00^{a}	0.72±0.02^{c}	1.09±0.01^{e}	0.97±0.02^{a}	0.86±0.01^{f}	0.53±0.01^{e}

表 4 挤压荞麦粉添加对面条蒸煮特性的影响

Table 4 Effect of extruded buckwheat addition on cooking properties of noodle

添加量(%)	蒸煮时间(min)	断条率(%)	蒸煮吸水率(%)	蒸煮损失率(%)
0	5	0.25	188.45±8.04^{a}	3.22±0.45^{d}
4	5	2.5	175.12±2.41^{bc}	5.57±0.38^{c}
8	5.5	5	183.31±10.51^{ab}	8.17±1.37^{ab}
12	6	0	170.98±1.15^{c}	9.46±1.03^{a}
16	5	0	148.36±3.75^{d}	2.45±1.25^{d}
20	5.5	0	149.72±4.51^{d}	6.51±1.78^{c}

表 5 挤压荞麦粉添加对面条质构特性的影响

Table 5 Effect of extruded buckwheat addition on textural properties of noodle

添加量(%)	剪切力(g)	拉伸强度(g)	拉伸距离(mm)	硬度(g)	黏性(g•s)	回复性	弹性	咀嚼性(g)
0	144.66±12.21^{d}	25.56±3.87^{b}	54.02±9.86^{ab}	3766.31±304.54^{d}	−16.99±1.32^{c}	53.03±1.50^{a}	87.39±4.96^{a}	2525.76±76.58^{e}
4	157.04±4.72^{cd}	27.30±2.01^{b}	50.72±11.65^{b}	4071.82±449.87^{d}	−20.3±0.62^{bc}	45.34±1.41^{b}	89.60±0.41^{a}	2803.37±298.04^{d}
8	169.39±9.18^{c}	27.24±1.09^{b}	51.94±6.96^{b}	4741.53±182.25^{c}	−30.63±2.42^{a}	34.52±0.25^{d}	89.14±0.31^{a}	2871.73±105.38^{d}
12	213.41±6.92^{b}	32.05±2.00^{a}	51.48±3.70^{b}	5553.86±239.80^{b}	−31.2±3.85^{a}	39.35±0.43^{c}	88.57±0.17^{a}	3558.62±51.59^{c}
16	222.60±1.86^{b}	34.24±0.24^{a}	62.36±2.52^{ab}	5647.23±147.23^{b}	−23.96±0.79^{b}	45.74±1.93^{b}	88.89±0.25^{a}	4198.20±210.84^{b}
20	287.64±10.77^{a}	31.60±1.87^{a}	64.44±2.31^{a}	6385.79±220.11^{a}	−30.55±5.67^{a}	47.25±1.52^{b}	89.86±0.67^{a}	4635.59±177.89^{a}

添加生荞麦粉制成的面条，其蒸煮吸水率、断条率、蒸煮损失率增加[28]，这主要是因为荞麦的添加会破坏小麦粉面筋网络结构的形成，淀粉颗粒容易溶出，蒸煮特性降低。但是，在对混合粉溶剂保持力和热机械特性的研究中发现，随着荞麦粉添加量的增加吸水率增加，但是面条蒸煮特性表明随着荞麦粉添加量的增加蒸煮吸水率减小，这可能是蒸煮过程中面条外层已经糊化的荞麦粉快速吸水形成了阻水层从而抑制了面条在后续蒸煮过程中的吸水，这与前人认为糊化后的淀粉可以形成稳定、均匀和致密凝胶网络的观点相同[16, 29]。

2.5 挤压荞麦粉添加对面条质构特性的影响

挤压荞麦粉添加对面条质构特性的影响见表 5。从表中可以看出，熟面条剪切力、硬度和咀嚼性随着挤压荞麦粉添加量的增加呈现增加的趋势。面条的拉伸强度随着荞麦添加量的增加先增加后减小，拉伸强度在添加量为 16% 时最大为 34.24 g；而拉伸距离随着添加量的增加先减小后增加，添加量 4% 时拉伸距离最小为 50.72 mm。面条黏性随着添加量的增加呈现先增加后减小的趋势，回复性先减小后增加，而弹性之间没有显著性差异（P>0.05）。WANG 等[30]通过在小麦粉中添加经过挤压处理具有不同粘度的荞麦粉发现，面条的硬度、回复性、黏性、咀嚼性相对于添加生荞麦粉制备的面条显著升高，这与本研究结果基本相同。

3 结论

在小麦中添加挤压处理的荞麦后，随着添加量的增加混合粉的蔗糖、碳酸钠和乳酸 SRC 显著增加（P<0.05）；峰值粘度、谷值粘度、衰减值、最终粘度和回生值显著减小（P<0.05）；混和粉面团吸水率显著增加（P<0.05），从 56.80% 增加到 65.00%；糊化特性 C_3-C_2 值、回生值 C_5-C_4、形成时间和稳定时间都随挤压荞麦添加量的增加而减小；弱化度 C_1-C_2 值随挤压荞麦添加量的增加而显著增加（P<0.05）。面团剖面图显示添加荞麦粉后面团吸水率增加、面筋网络耐热能增加，面团稳定性、粘度、酶活降低，而产品不易回生。随挤压荞麦粉添加量的增加面条的蒸煮吸水率减小、剪切力、拉伸强度、硬度和咀嚼性增加。

参考文献

[1] GAO L C, WANG H L WAN C X, et al. Structural, pasting and thermal properties of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) starches affected by molecular structure[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 156: 120−126.

[2] ZHU F. Buckwheat proteins and peptides: Biological functions and food applications[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 110: 155−167.

[3] RAGUINDIN P, ADAM I O, STOYANOV J, et al. A systematic review of phytochemicals in oat and buckwheat[J]. Food Chemistry, 2021, 338: 127982.

[4] CAI Y, CORKE H, WANG D, et al. Buckwheat: Overview[Z]. Oxford: Academic Press, 2016307-315.

[5] MARTÍN-GARCÍA B, VERARDO V, DIAZ D C E, et al. Air classification as a useful technology to obtain phenolics-enriched buckwheat flour fractions[J]. LWT, 2021, 150: 111893.

[6] PARK B, KIM J, LEE K, et al. Flavonoids in common and tartary buckwheat hull extracts and antioxidant activity of the extracts against lipids in mayonnaise[J]. Journal of Food Science and Technology, 2019, 56(5): 2712−2720.

[7] JIA B, YAO Y J, LIU J F, et al. Physical properties and *in vitro* starch digestibility of noodles substituted with tartary buckwheat flour[J]. Starch-Stärke, 2019, 71: 1800314.

[8] WOLTER A, HAGER ANNA-SOPHIE, ZANNINI E, et al. *In vitro* starch digestibility and predicted glycaemic indexes of buckwheat, oat, quinoa, sorghum, teff and commercial gluten-free bread[J]. Journal of Cereal Science, 2013, 58(3): 431−436.

［9］ FU M X, SUN X Y, WU D, et al. Effect of partial substitution of buckwheat on cooking characteristics, nutritional composition, and *in vitro* starch digestibility of extruded gluten-free rice noodles［J］. LWT, 2020, 126: 109332.
［10］ 高海燕, 祝海洋, 闫利纳, 等. 复合改良剂在荞麦面条中的应用研究［J］. 食品工业, 2012, 33(1): 68−70. ［GAO Haiyan, ZHU Haiyang, YAN Lina, et al. Application of composite improvers in buckwheat noodles［J］. Food Industry, 2012, 33(1): 68−70.］
［11］ 高国祥, 孙君庚, 阴志刚. 荞麦粉对荞麦挂面品质影响［J］. 食品工业, 2020, 41(2): 194−197. ［GAO Guoxiang, SUN Jungeng, YIN Zhigang. The effect of buckwheat flour on buckwheat noodles quality［J］. Food Industry, 2020, 41(2): 194−197.］
［12］ OBADI M, CHEN Y, QI Y J, et al. Effects of different pregelatinized starch on the processing quality of high value-added Tartary buckwheat noodles［J］. Journal of Food Measurement and Characterization, 2020, 14(6): 3462−3472.
［13］ SEDEJ I, SAKAČ M, MANDIĆ A, et al. Quality assessment of gluten-free crackers based on buckwheat flour［J］. LWT-Food Science and Technology, 2011, 44(3): 694−699.
［14］ GUO X, YAO H. Fractionation and characterization of tartary buckwheat flour proteins［J］. Food Chemistry, 2006, 98(1): 90−94.
［15］ SUN X J, LI W H, HU Y Y, et al. Comparison of pregelatinization methods on physicochemical, functional and structural properties of tartary buckwheat flour and noodle quality［J］. Journal of Cereal Science, 2018, 80: 63−71.
［16］ CHENG W W GAO L, WU D, et al. Effect of improved extrusion cooking technology on structure, physiochemical and nutritional characteristics of physically modified buckwheat flour: Its potential use as food ingredients［J］. LWT, 2020, 133: 109872.
［17］ 陈媛媛, 李华. 小麦糊粉对面团特性及面条品质的影响［J］. 粮食与油脂, 2021, 34(5): 43−46. ［CHEN Yuanyuan, LI Hua. Effect of wheat aleurone on dough characteristics and noodle quality［J］. Cereals & Oils, 2021, 34(5): 43−46.］
［18］ DUYVEJONCK A, LAGRAIN B, PAREYT B, et al. Relative contribution of wheat flour constituents to solvent retention capacity profiles of European wheats［J］. Journal of Cereal Science, 2011, 53(3): 312−318.
［19］ ZHANG K L, LI X P, MA Z, et al. Solvent retention capacity of oat flour: Relationship with oat β-glucan content and molecular weight［J］. Food Hydrocolloids, 2019, 93: 19−23.
［20］ JEON S, BAIK B, KWEON M. Solvent retention capacity application to assess soft wheat flour quality for making white-salted noodles［J］. Cereal Chemistry, 2019, 96(3): 497−507.
［21］ 姜松, 贾丹凤, 伍娟. 小麦粉溶剂保持力特性与挂面力学质地的关系［J］. 食品科学, 2016, 37(19): 112−116. ［JIANG Song, JIA Danfeng, WU Juan. Relationships between solvent retention capacity of wheat flour and mechanical properties of dried noodles［J］. Food Science, 2016, 37(19): 112−116.］
［22］ 徐斌, 孙伊琳, 刘淑一, 等. 预糊化处理对高含量燕麦挂面品质的影响［J］. 现代食品科技, 2019, 35(6): 139−144. ［XU Bin, SUN Yilin, LIU Shuyi, et al. Effect of pregelatinization on the quality of noodles with a high oat flour content［J］. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(6): 139−144.］
［23］ 王军, 程晶晶, 王周利, 等. 黑小豆超微全粉对面团流变学特性及馒头品质的影响［J］. 中国食品学报, 2019, 19(1): 103−110. ［WANG Jun, CHENG Jingjing, WANG Zhouli, et al. Effect of superfine grinded whole black kidney bean powder on rheological properties of flour dough and quality of steamed bread［J］. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(1): 103−110.］
［24］ 田海娟, 朱珠, 高筠鹏, 等. 荞麦粉对面团特性及面包品质的影响［J］. 粮食与油脂, 2018, 31(12): 25−27. ［TIAN Haijuan, ZHU Zhu, GAO Yunpeng, et al. Effect of buckwheat flour on dough properties and bread quality［J］. Cereals & Oils, 2018, 31(12): 25−27.］
［25］ 孙晓静, 彭飞, 许妍妍, 等. 挤压预糊化对苦荞面团流变学性质及芦丁降解的影响［J］. 中国粮油学报, 2017, 32(6): 46−51. ［SUN Xiaojing, PENG Fei, XU Yanyan, et al. Effect of extrusive pre-gelatinization on the rheological properties and rutin degradation of tartary buckwheat dough［J］. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2017, 32(6): 46−51.］
［26］ 胡云峰, 苏利, 路敏, 等. 荞麦粉对面团流变学特性和馒头品质的影响研究［J］. 粮食与油脂, 2016, 29(4): 52−55. ［HU Yunfeng, SU Li, LU Min, et al. Study on the effects of buckwheat flour on paste rheological characteristic and steamed bread quality［J］. Journal of Cereals & Oils, 2016, 29(4): 52−55.］
［27］ 吉梦莹, 周星杰, 栾广忠, 等. 添加挤压膨化燕麦粉对小麦面团性质及面包品质的影响［J］. 食品工业, 2017, 38(11): 91−95. ［JI Mengying, ZHOU Xingjie, LUAN Guangzhong, et al. Effect of the addition of extruded oat flours on the properties of wheat-oat-dough and quality of bread［J］. Food Industry, 2017, 38(11): 91−95.］
［28］ 周小理, 马思佳, 朱思怡, 等. 苦荞-小麦混合粉面团特性及其鲜湿面条的研制［J］. 现代食品科技, 2021, 37(8): 168−175. ［ZHOU Xiaoli, MA Sijia, ZHU Siyi, et al. Characteristics of tartary buckwheat flour dough and development of fresh and wet noodles［J］. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(8): 168−175.］
［29］ ZHANG H, MENG Y J, LIU X L, et al. Effect of extruded mung bean flour on dough rheology and quality of Chinese noodles［J］. Cereal Chemistry, 2019, 96(5): 836−846.
［30］ WANG R B, LI M, CHEN S Q, et al. Effects of flour dynamic viscosity on the quality properties of buckwheat noodles［J］. Carbohydrate Polymers, 2019, 207: 815−823.

冼丽清, 李珊, 冯彬, 等. 凌云白毫茶多糖超声波提取工艺优化及其抗氧化效果 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 178−184. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080117

XIAN Liqing, LI Shan, FENG Bin, et al. Optimization of Ultrasonic Extraction of Polysaccharides in Lingyun Pekoe and Its Antioxidant Activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 178−184. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080117

· 工艺技术 ·

凌云白毫茶多糖超声波提取工艺优化及其抗氧化效果

冼丽清[1,2], 李　珊[1,3,*], 冯　彬[1,3], 梁　俭[1,3], 刘晓凤[1,3]

（1.桂西区域生态环境分析和污染控制重点实验室, 广西百色 533000;
2.百色学院材料科学与工程学院, 广西百色 533000;
3.百色学院化学与环境工程学院, 广西百色 533000）

摘　要: 以凌云白毫为原料，优化茶多糖提取工艺，并探讨茶多糖的抗氧化效果。以茶多糖得率为响应值，在单因素实验的基础上采用 Box-Bohnken 法优化茶多糖超声波辅助热水浸提工艺。考察茶多糖对羟基自由基（·OH）、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基（DPPH·）的清除率及对油脂自氧化反应的抑制情况，评价其抗氧化效果。实验结果表明，茶多糖的最佳提取工艺为：液料比 69∶1 mL/g、提取温度 52 ℃、超声时间 21 min、超声功率 180 W，实测茶多糖平均得率为（4.84%±0.04%），接近模型预测值 5.06%（<5%）。抗氧化效果测试结果表明，茶多糖清除·OH、DPPH·的 IC_{50} 分别为 0.262、0.438 mg/mL，且其抗氧化能力与浓度成正向关系。同时，茶多糖可抑制油脂的自氧化反应，延长油脂在常温常压环境中的保存时间。凌云白毫茶中茶多糖的含量较为丰富，且具有良好的抗氧化效果，可为凌云白毫在国内外的深度推广提供数据支撑。

关键词: 凌云白毫, 茶多糖, 超声波辅助提取, Box-Bohnken 法, 抗氧化效果

中图分类号: TS201.1　　**文献标识码:** B　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0178−07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080117　　本文网刊:

Optimization of Ultrasonic Extraction of Polysaccharides in Lingyun Pekoe and Its Antioxidant Activity

XIAN Liqing[1,2], LI Shan[1,3,*], FENG Bin[1,3], LIANG Jian[1,3], LIU Xiaofeng[1,3]

（1.Key Laboratory of Regional Ecological Environment Analysis and Pollution Control of West Guangxi, Baise 533000, China;
2.School of Materials Science and Engineering, Baise University, Baise 533000, China;
3.School of Chemistry and Environment Engineering, Baise University, Baise 533000, China）

Abstract: Lingyun pekoe as starting material, studies were carried out to optimize the extracting technology of polysaccharides, and investigate its antioxidant activity. Extracting yield of polysaccharides as the index, the extraction conditions were optimized by Box-Bohnken method based on the results of single-factor experiments. The antioxidant activities were evaluated by the determination of hydroxyl radical (·OH), 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH·), and inhibition effect on auto-oxidation of grease. Experimental results showed that, the optimal extraction conditions were obtained as follows: liquid-material ratio 69∶1 mL/g, temperature 52 ℃, ultrasonic time 21 min, ultrasonic power 180 W. Under the optimal conditions, an average extraction yield (4.84%±0.04%) was obtained, which was similar with the expected yield 5.06% (<5%) of regressive equation. The IC_{50} of polysaccharides for eliminating ·OH, DPPH· were 0.262,

收稿日期: 2021−08−11

基金项目: 广西一流学科建设项目-农业资源与环境; 国家级大学生创新创业训练项目（202110609005）; 广西自然科学基金项目（2017GXNSFBA198225）; 国家自然科学基金（21901009）; 广西高校重点学科—材料物理与化学（080501）。

作者简介: 冼丽清（1995−）, 女, 本科, 助理实验师, 研究方向: 天然产物化学, E-mail: 798402711@qq.com。

*** 通信作者:** 李珊（1982−）, 男, 博士, 讲师, 研究方向: 天然产物化学, 有机合成化学, E-mail: lishan0914@163.com。

0.438 mg/mL, and a better clearance result would be obtained with higher concentration. Moreover, polysaccharides could prolong the storage time of grease in normal circumstance for inhibiting the auto-oxidation. The studies mentioned above indicated that polysaccharides were plentiful in Lingyun poeke, and had a good antioxidant activity, providing data support for promoting in home and abroad.

Key words: Lingyun pekoe; polysaccharides; ultrasonic-assisted extraction; Box-Bohnken method; antioxidant activity

茶叶中含有丰富的生物活性物质，如黄酮[1]、多酚[2]、生物碱[3]、茶多糖等。其中，茶多糖是一种包含单糖链、蛋白质及矿物质元素等物质的复合物[4]。医学及生理学试验证实，茶多糖具有广泛的生理活性，如抗氧化、抗过敏、抗肿瘤、降血脂、降血压、抑菌消炎、调节机体免疫力等[5]，尤其在治疗糖尿病方面具有特殊的疗效[6]。茶多糖已被认定为茶叶中茶多酚之外的另一极具开发价值的天然产物。凌云白毫为百色凌云、乐业地区特产的乔木类大叶茶种，因芽、叶被满白色绒毛而得名，为当地脱贫攻坚的关键经济作物[7]。受限于当地不发达的地方经济，凌云白毫作为当地的名片产品，其生物活性物质如茶多糖的含量及性质研究尚未系统开展，导致评估凌云白毫的生理功能缺乏具体数据支撑，推广乏力。

热水浸提法是提取多糖类物质的常用方法，可最大程度地保留其物质结构及生物活性的完整性，但也存在耗时长、提取效率低等缺点。为提高提取效率，酶解提取、微波辅助提取、超临界萃取提取、亚临界水萃取提取、超声波辅助提取等提取方法相继被发展出来[8]。各种提取方法中，酶解提取受限条件多，酶的活性难以完全发挥，微波辅助提取产生的瞬时高温对产物的生物活性有较大影响，超临界萃取提取、亚临界水萃取提取需要使用专门的设备，成本高昂。超声波辅助提取则主要通过超声波的机械效应、空化效应及热效应提高小分子物质在介质中的穿透能力，提高其得率的同时对分子结构的破坏性较小，并且操作简便[9]。刘小辰等[10] 比较了热水浸提、酸辅助提取、碱辅助提取、酶解提取、高压热水浸提、超声波辅助热水浸提等 6 种方法对香蕉皮粗多糖提取率的影响，结果显示超声波辅助热水浸提法提取物中多糖含量最高。此外，超声波也经常联用其它技术用于植物活性成分的提取以期发挥更加优越的提取性能[11]。

因此，本文采用超声波辅助热水浸提法提取凌云白毫中的茶多糖，优化提取工艺，并初步探讨多糖类物质的抗氧化效果，填补凌云白毫中茶多糖提取工艺及生物活性研究的空白，并依据所得数据评估茶多糖的含量及其对机体的保健效果，推动凌云白毫在国内的深入推广。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

凌云白毫　有机绿茶，广西浪伏茶业有限公司；玉米油　鲁花玉米胚芽油（物理压榨，单烯脂肪酸+多烯脂肪酸>85%），购于百色市盛辉超市；葡萄糖、苯酚、30% 过氧化氢、抗坏血酸（V_C）、1,1-二苯基-2-苦基肼自由基（DPPH 自由基）　均为分析纯，上海麦克林生化科技有限公司。

BSA123-CW 电子分析天平　赛多利斯科学仪器（北京）有限公司；820DP 高功率数控超声波清洗器　深圳市光点超声波设备有限公司；UV-27000 岛津紫外可见分光光度计　岛津企业管理（中国）有限公司；SHA-C 水浴恒温振荡器　常州市亿能实验仪器厂。

1.2　实验方法

1.2.1　凌云白毫中茶多糖的提取　市售凌云白毫 50 g，60 ℃ 干燥至恒重（前后质量差<0.01 g），粉碎，过筛（d=0.42 mm），得茶粉原料。称取 1.000 g 茶粉原料，按比例混合纯水，在设定的提取温度、超声时间、超声功率等条件下进行提取，反复 2 次，合并提取液。Sevage 法除蛋白，体系浓缩至 50 mL，过滤。滤液转移至 100 mL 容量瓶中，纯水定容，即为多糖提取液[12]。

1.2.2　单因素实验　称取 1.000 g 茶粉原料，固定基准提取条件：液料比 60∶1 mL/g、提取温度 50 ℃、超声时间 20 min、超声功率 150 W[13]。在上述基准提取条件下开展单因素实验，依次考察液料比（50∶1、60∶1、70∶1、80∶1、90∶1 mL/g）、提取温度（40、50、60、70、80 ℃）、超声时间（10、15、20、25、30 min）及超声功率（100、150、200、250、300 W）等因素对茶多糖提取效果的影响。

1.2.3　Box-Bohnken 法优化茶多糖提取工艺　依据单因素实验所得结果，选取其中的显著因素为自变量，茶多糖得率为响应值，利用响应面法中的 Box-Bohnken 法优化各因素的水平组合[14−15]，因素水平表如表 1 所示。

表 1　响应面试验因素水平表

Table 1　Factors and levels of response surface experiment

水平	因素			
	A 液料比（mL/g）	B 提取温度（℃）	C 超声时间（min）	D 超声功率（W）
−1	50∶1	50	15	150
0	60∶1	60	20	200
1	70∶1	70	25	250

1.2.4　葡萄糖标准品回归方程的建立及茶多糖得率的计算　移取浓度为 0.1000 mg/mL 葡萄糖标准品溶液 0、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00 mL 至具塞试管中，加纯水稀释至 2.00 mL。振荡过程中，添加 5.0%

苯酚水溶液 1.00 mL、浓硫酸 5.00 mL(分批加入),50 ℃ 恒温振荡 10 min,在 489 nm 处测定体系吸光度 A[16]。以吸光度 A 对葡萄糖标准品溶液浓度 c 进行线性回归,得葡萄糖标准品回归方程:A=17.61c+0.0899,R^2=0.9980。按上述方法测定多糖提取液吸光度 A_a,带入葡萄糖标准品回归方程求得多糖浓度 c_a,按下式计算茶多糖得率:

$$茶多糖得率(\%)=\frac{c_aDV}{m}\times 100$$

式中:c_a 为经计算所得茶多糖浓度,mg/mL;D 为茶多糖稀释倍数;V 为茶多糖提取液体积,mL;m 为茶粉原料质量,mg。

1.2.5 茶多糖的纯化及体外抗氧化效果测定

1.2.5.1 茶多糖的纯化 混合多批次茶多糖提取液,浓缩至 100 mL,过滤。滤液混合 4 倍量无水乙醇并于 4 ℃ 冷藏 24 h,可见容器底部有白色丝状沉淀。抽滤,固体用丙酮-纯水反复冲洗至洗液无色。固体用少量水溶解,DEAE 纤维素-52 柱层析纯化(层析柱 1.5 cm×25 cm;纯水为洗脱剂,5 mL/min)。洗脱液浓缩,快速冷冻,减压抽干得灰白色固体,即为茶多糖测试品[17]。称取一定量测试品茶多糖,配制浓度分别为 0.2、0.3、0.5、0.8、1.2 mg/mL 茶多糖待测液。

1.2.5.2 茶多糖对羟基自由基(·OH)清除效果的测定 取 5 支洁净试管,分别加入不同浓度多糖待测液 2.00 mL,8.000 mmol/L 硫酸亚铁溶液 2.00 mL、1.0% 过氧化氢溶液 2.00 mL。振荡均匀后,继续加入 7.000 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液 2.00 mL。上述 5 个反应体系 25 ℃ 继续振荡 60 min,于 510 nm 处测定体系吸光度 A_{x1}[18−19],按下式计算茶多糖对·OH 的清除率:

$$\tau(\%)=\left(1-\frac{A_{x1}-A_{p1}}{A_{01}}\right)\times 100$$

式中:A_{x1} 为标准测试组测定体系吸光度;A_{p1} 为对照组(以纯水取代过氧化氢溶液)测定体系吸光度;A_{01} 为空白组(以纯水取代多糖待测液)测定体系吸光度。

1.2.5.3 茶多糖对 DPPH·清除效果的测定 取 5 支洁净试管,分别加入不同浓度多糖待测液 2.00 mL、0.2000 mmol/L DPPH-乙醇溶液 2.00 mL。上述 5 个反应体系置于黑暗环境中 25 ℃ 振荡 30 min,于 517 nm 处测定体系吸光度 A_{x2}[20−21],按下式计算茶多糖对 DPPH 自由基的清除率:

$$\tau(\%)=\left(1-\frac{A_{x2}-A_{p2}}{A_{02}}\right)\times 100$$

式中:A_{x2} 为标准测试组测定体系吸光度;A_{p2} 为对照组(以无水乙醇取代 DPPH-乙醇溶液)测定体系吸光度;A_{02} 为空白组(以纯水取代多糖待测液)测定体系吸光度。

1.2.5.4 茶多糖对油脂(玉米油为例)的抗氧化效果的测定 称取一定质量的纯品茶多糖,混合至玉米油中,使茶多糖在测试样品中的质量分数分别为 0、0.02%、0.05%。以 Schall 烘箱法[22]考察茶多糖对玉米油的抗氧化效果,每隔 2 d 取样一次并按照国标 GB 5009.227-2016[23]中的滴定法测定油体样品中的过氧化值(POV)。V_C 作为对照,根据 POV 值的波动幅度衡量茶多糖对油脂的抗氧化效果。

1.3 数据处理

本文利用 origin 9.0 软件对数据作图处理;利用 SPSS 17.0 进行单因素方差分析(P<0.05 表示差异显著,P<0.01 表示差异极显著)及 IC_{50} 的计算;利用 Design-Expert 8.5 软件中的 Box-Bohnken 法优化试验方案并处理数据。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 液料比对茶多糖提取效果的影响 图 1 展示,当液料比<60∶1 mL/g 时,茶多糖得率随液料比的增加而迅速升高。当液料比>60∶1 mL/g 时,茶多糖得率略微升高后处于平衡状态。提高溶剂用量可增大体系扩散压并促进茶多糖的溶出。当茶多糖完全溶出或浓度达到平衡时,得率不再发生显著变化(P>0.05),而过高的溶剂用量将增加体系的杂质含量及提取成本[24]。所得数据经单因素方差分析得 P=0.032<0.05,差异性显著,表明考察范围内液料比对茶多糖提取具有显著的影响效果,并选用液料比 50∶1、60∶1、70∶1 mL/g进行后续优化试验。

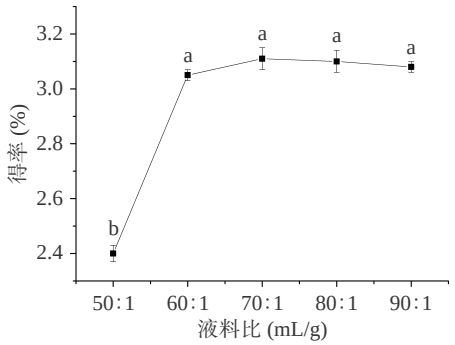


图 1 液料比对茶多糖提取效果的影响

Fig.1 The effect of liquid-material ratio on extraction of tea polysaccharides

注:不同小写字母表示差异显著(P<0.05);图 2~图 4 同。

2.1.2 提取温度对茶多糖提取效果的影响 图 2 展示,当提取温度<60 ℃ 时,茶多糖得率随体系温度的升高而升高,当体系温度为 60 ℃ 时的峰值 3.72%。继续提高体系温度,茶多糖得率显著下降(P<0.05)。茶多糖分子的运动活性随体系温度的升高而增强,但长时间在高温环境中多糖的分子结构易降解并失去生物活性,得率下降[25]。所得数据经单因素方差分析得 P=0.007<0.01,差异性极显著,表明考察范围内提取温度对茶多糖提取具有极显著的影响效果,并选用提取温度 50、60、70 ℃ 进行后续优化试验。

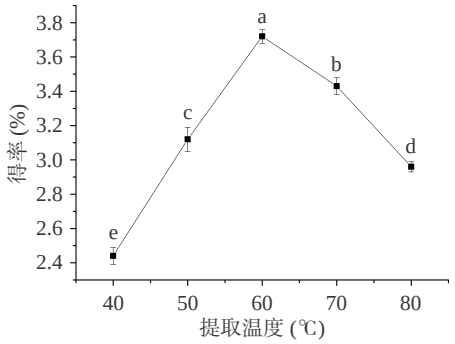


图 2　提取温度对茶多糖提取效果的影响

Fig.2　The effect of temperature on extraction of tea polysaccharides

2.1.3　超声时间对茶多糖提取效果的影响　如图 3 所示，当超声时间<25 min 时，茶多糖得率随超声时间的延长而升高，但增速逐渐减慢，当超声时间为 25 min 时的峰值 3.17%。继续延长超声时间，茶多糖得率下降。延长超声时间可使植物细胞壁被超声波充分破碎，但多糖的分子结构长时间在超声波机械震荡作用下易被破坏，得率下降[26]。所得数据经单因素方差分析得 P=0.044<0.05，差异性显著，表明考察范围内超声时间对茶多糖提取具有显著的影响效果，并选用超声时间 15、20、25 min 进行后续优化试验。

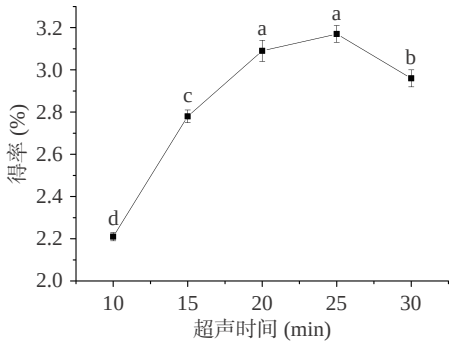


图 3　超声时间对茶多糖提取效果的影响

Fig.3　The effect of ultrasonic time on extraction of tea polysaccharides

2.1.4　超声功率对茶多糖提取效果的影响　如图 4 所示，当超声功率<200 W 时，茶多糖得率随超声功率的增加而升高，当超声功率为 200 W 时的峰值 3.42%。继续增加超声功率，茶多糖得率下降。超声波通过机械作用破碎植物细胞壁，加速多糖的溶出。过高的超声功率将引发体系较为剧烈的空化作用，致使多糖分子失活降解，得率下降[27]。所得数据经单因素方差分析得 P=0.027<0.05，差异性显著，表明考察范围内超声功率对茶多糖提取具有显著的影响效果，并选用超声功率 150、200、250 W 进行后续优化试验。

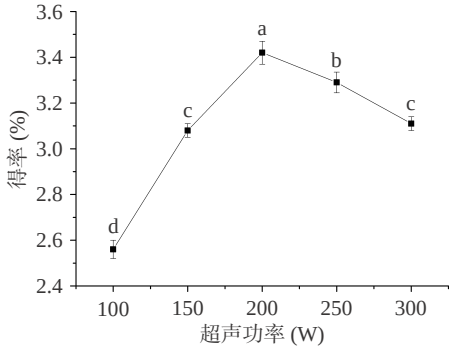


图 4　超声功率对茶多糖提取效果的影响

Fig.4　The effect of ultrasonic power on extraction of tea polysaccharides

2.2　Box-Bohnken 法优化茶多糖提取工艺

2.2.1　Box-Bohnken 法优化提取试验方案　各考察因素 A 液料比(mL/g)、B 提取温度(℃)、C 超声时间(min)及 D 超声功率(W)为自变量，茶多糖得率(%)为响应值，利用 Box-Bohnken 法优化提取试验方案，确定 29 个试验点。试验方案及结果如表 2 所示。

表 2　Box-Bohnken 法建立提取试验方案

Table 2　Extraction scheme designed by Box-Bohnken method

试验号	A	B	C	D	得率(%)
1	−1	0	0	−1	3.77
2	−1	−1	0	0	3.31
3	1	0	−1	0	4.02
4	0	−1	0	−1	4.55
5	0	0	0	0	4.85
6	−1	0	1	0	3.54
7	0	−1	0	1	3.98
8	1	−1	0	0	4.78
9	0	−1	−1	0	4.14
10	0	0	−1	−1	4.21
11	0	0	0	0	4.62
12	0	1	1	0	3.68
13	1	0	1	0	4.69
14	0	−1	1	0	4.21
15	0	1	−1	0	3.31
16	0	0	−1	1	3.53
17	0	1	0	1	3.82
18	0	0	1	1	4.23
19	0	0	0	0	4.72
20	−1	0	−1	0	3.10
21	0	0	1	−1	4.32
22	0	1	0	−1	3.86
23	−1	0	0	1	3.40
24	1	0	0	1	4.44
25	0	0	0	0	4.76
26	0	0	0	0	4.76
27	1	1	0	0	3.38
28	−1	1	0	0	3.86
29	1	0	0	−1	4.60

2.2.2　回归方程的建立及显著性检验　以 Box-Bohnken 法对表 2 所得数据进行分析，获得茶多糖得率(%)与各考察因素：液料比(A)、提取温度(B)、超声时间(C)及超声功率(D)的回归方程：

茶多糖得率(%)=−47.64867+0.83778A+0.73370B+0.47527C−4.90000×10^{-4}D−4.87500×10^{-3}AB+1.15000×10^{-3}AC+1.05000×10^{-4}AD+1.50000×10^{-3}BC+2.65000×10^{-4}BD+5.90000×10^{-4}CD−4.56833×$10^{-3}$$A^2$−4.58083×$10^{-3}$$B^2$−0.017823$C^2$−9.17333×$10^{-5}$$D^2$

采用方差分析法对所得回归方程进行显著性检验[28−29]，结果见表 3。该方程 P<0.0001，极显著；失

拟项 P=0.0992>0.05, 不显著, 说明所得方程可良好匹配试验操作。决定系数 R^2=0.9622, 调整决定系数 R_{Adj}^2=0.9244, 说明因素选取合理, 误差主要由随机误差产生并且可控, 所得回归方程可用于试验预测茶多糖得率随因素、水平变化的趋势及幅度。

表 3 回归方程方差分析表

Table 3 Variance analysis of regression equation

来源	平方和	自由度	均方	F	P
方程	7.65	14	0.55	25.46	<0.0001**
A	2.03	1	2.03	94.44	<0.0001**
B	0.78	1	0.78	36.39	<0.0001**
C	0.46	1	0.46	21.64	0.0004**
D	0.30	1	0.30	14.18	0.0021**
AB	0.95	1	0.95	44.33	<0.0001**
AC	0.013	1	0.013	0.62	0.4454
AD	0.011	1	0.011	0.51	0.4852
BC	0.022	1	0.022	1.05	0.3231
BD	0.070	1	0.070	3.27	0.0919
CD	0.087	1	0.087	4.06	0.0636
A^2	1.35	1	1.35	63.12	<0.0001**
B^2	1.36	1	1.36	63.47	<0.0001**
C^2	1.29	1	1.29	60.05	<0.0001**
D^2	0.34	1	0.34	15.91	0.0013**
残差	0.30	14	0.021		
失拟项	0.27	10	0.027	3.94	0.0992
纯误差	0.028	4	6.920×10^{-3}		
总计	7.95	28			

注: P<0.01, 极显著“**”; P<0.05, 显著“*”。

回归方程一次项液料比(A)、提取温度(B)、超声时间(C)及超声功率(D)对茶多糖得率的影响均极显著(P<0.01), 根据 F 值大小, 可知其显著性顺序为液料比>提取温度>超声时间>超声功率。交互项中交互作用 AB 的影响效果为极显著水平(P<0.0001), 其它交互作用的影响不显著(P>0.05)。二次项 A^2、B^2、C^2、D^2 的影响均极显著, 其显著性顺序为 $B^2\approx A^2>C^2>>D^2$。

2.2.3 交互作用的响应面分析 如图 5 所示, 交互作用的显著程度与响应面的曲面曲率、等高线中心椭圆率成正比[30]。交互作用 AB 可见一显著的下滑曲面, 且中心椭圆率最高。其它交互作用各方向曲面下滑平缓, 等高线中心椭圆率较低甚至偏圆形。以上结果说明交互作用 AB 的影响效果显著高于其它交互作用, 此结果与方差分析结果一致。

2.2.4 最佳提取工艺的获取及稳定性验证 对回归方程进行最优化处理, 获得茶多糖提取工艺的最佳条件: 液料比 68.51∶1 mL/g、提取温度 52.19 ℃、超声时间 20.70 min、超声功率 178.46 W, 茶多糖得率可达 5.06%。根据试验操作可达水平, 将上述条件调整为: 液料比 69∶1 mL/g、提取温度 52 ℃、超声时间 21 min、超声功率 180 W。在此条件下, 平行实验 5 次, 实测茶多糖平均得率为(4.84%±0.04%), 与模型预测值相近(<5%), 说明该条件具有良好的稳定性, 可用于茶多糖的提取。此外, 根据茶多糖得率可知凌云白毫茶多糖含量较为丰富, 高于国内著名绿茶品牌西湖龙井(3.10%)及信阳毛尖(1.84%)[31]。

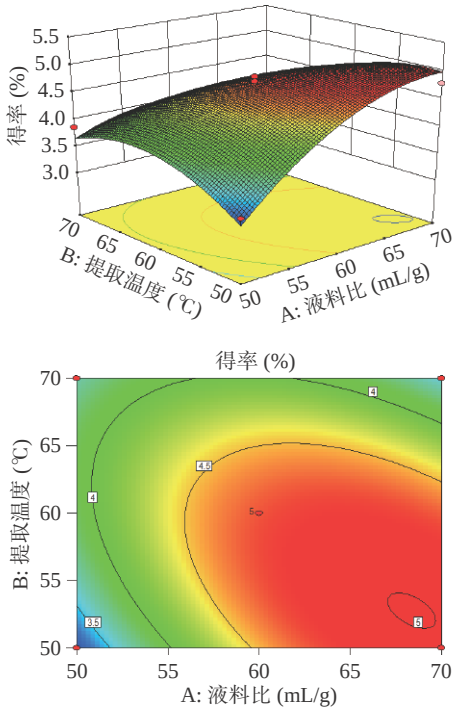


图 5 交互作用 AB 对茶多糖提取效果的影响

Fig.5 The effect of interactive AB on extraction of tea polysaccharides

2.3 茶多糖体外抗氧化效果

2.3.1 茶多糖对·OH 的清除效果 如图 6 所示, 凌云白毫茶多糖对·OH 具有良好的清除效果, 其清除能力随茶多糖浓度的升高而增强, 并且高浓度条件下有进一步增强的趋势。当茶多糖浓度为 1.2 mg/mL 时, 对·OH 的清除率为 82%。经 SPSS17.0 软件分析, 凌云白毫茶多糖清除·OH 的 IC_{50} 为 0.262 mg/mL, 低于 V_C(IC_{50}=0.027 mg/mL)对·OH 的清除能力。

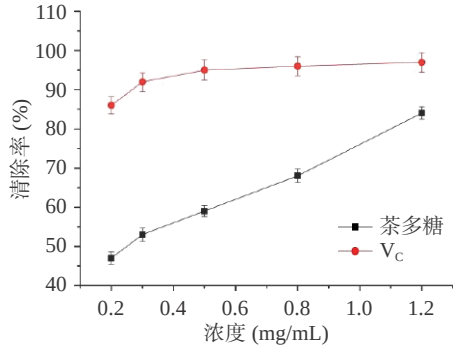


图 6 茶多糖对·OH 的清除效果

Fig.6 The clearance effect of tea polysaccharides on ·OH

2.3.2 茶多糖对 DPPH·的清除效果 如图 7 所示, 茶多糖对 DPPH·具有较强的清除效果, 其清除能力随茶多糖浓度的增加而逐渐增强, 但增速减慢并趋近平衡。当茶多糖浓度为 1.2 mg/mL 时, 对 DPPH·的清除率为 69%。经 SPSS 17.0 软件分析, 凌云白毫

茶多糖清除 DPPH·的 IC_{50} 为 0.438 mg/mL[32]，明显低于 V_C(IC_{50}=0.072)对 DPPH·的清除能力。

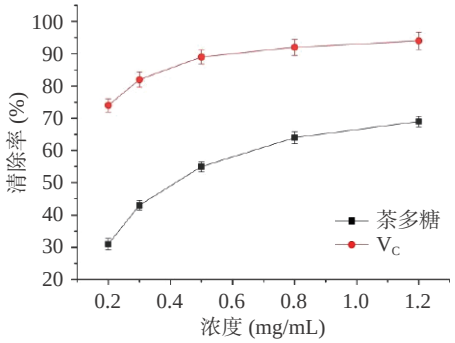


图 7　茶多糖对 DPPH 自由基的清除效果

Fig.7　The clearance effect of tea polysaccharides on DPPH radical

2.3.3　茶多糖对玉米油的抗氧化效果　玉米油富含不饱和脂肪酸，长期暴露在空气中易发生自氧化反应，导致油体酸败变质[33]。图 8 展示，茶多糖对油脂具有良好的抗氧化效果，添加过茶多糖的油体样品的 POV 值较空白样品均有一定程度的下降，并且下降幅度与茶多糖添加量表现出明显的量效关系。茶多糖添加量为 0.05% 时，其抗氧化效果强于 0.02% V_C；添加量相同时，其抗氧化效果低于 V_C。

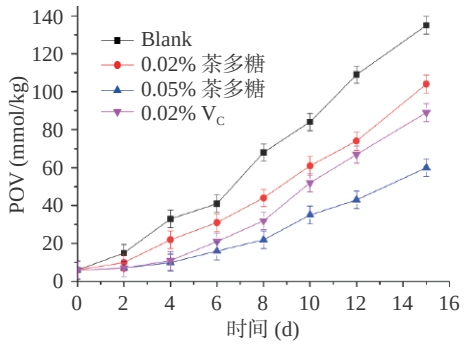


图 8　茶多糖对油脂的抗氧化效果

Fig.8　The antioxidant activity of tea polysaccharides on grease

3　结论

本文采用超声波辅助方式提取凌云白毫茶多糖，并利用 Box-Bohnken 法优化试验方案，获得该工艺的回归方程。方差分析表明，回归方程极显著，与试验操作拟合程度高。对回归方程进行最优化处理获得茶多糖提取工艺的最佳条件：液料比 69∶1 mL/g、提取温度 52 ℃、超声时间 21 min、超声功率 180 W。最佳条件下，实测茶多糖平均得率为 4.84%，与回归方程预测值 5.06% 相当(<5%)，说明所得工艺条件具有一定的实用价值，可用于茶多糖的提取。凌云白毫茶多糖对常见自由基如·OH、DPPH·均具有一定的清除效果，其中，对 DPPH·的清除能力(IC_{50}=0.438 mg/mL)强于著名绿茶品牌西湖龙井(IC_{50}=0.489 mg/mL)和信阳毛尖(IC_{50}=0.443 mg/mL)。此外，茶多糖可抑制油脂的自氧化反应，延长油脂在常温常压环境中的存储时间。抗氧化性试验结果表明凌云白毫茶多糖具有良好的抗氧化效果，并且抗氧化能力与茶多糖浓度成正向关系。凌云白毫茶多糖含量丰富，经常饮用对于维护人体正常的生命活动具有积极效果。茶多糖也可作为一种天然抗氧化剂，具有一定的开发价值。以上结果可为凌云白毫在国内外的深度推广及产品开发提供理论依据和数据参考。

参考文献

[1] 王丽丽, 林清霞, 宋振硕, 等. 分光光度法测定茶叶中总黄酮含量[J]. 茶叶学报, 2021, 62(1): 1−6. [WANG L L, LIN Q X, SONG Z S, et al. Spectrophotometric determination of total flavonoids in tea[J]. Acta Tea Sinica, 2021, 62(1): 1−6.]

[2] 刘姣姣. 茶多酚的提取和应用研究进展[J]. 福建茶叶, 2021, 43(6): 17−18. [LIU J J. Research progress on extraction and application of tea polyphenols[J]. Tea in Fujian, 2021, 43(6): 17−18.]

[3] 陈然, 孟庆佳, 刘海新, 等. 不同种类茶叶多酚及生物碱含量特点分析[J]. 食品科技, 2018, 43(5): 72−76. [CHEN R, MENG Q J, LIU H X, et al. Characteristics of polyphenols and alkaloids components in different kinds of tea[J]. Food Science and Technology, 2018, 43(5): 72−76.]

[4] 艾于杰. 抗氧化活性茶多糖构效关系研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2019. [AI Y J. Study on the structure-activity relationship of antioxidant tea polysaccharides[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2019.]

[5] ZHOU Y, YAO Q F, ZHANG T, et al. Antibacterial activity and mechanism of green tea polysaccharide conjugates against *Escherichia coli*[J]. Industrial Crops and Products, 2020, 152(C): 112464−112472.

[6] 刘丹奇, 任发政, 李景明, 等. 几种茶多糖降血糖活性的研究[J]. 茶叶科学, 2019, 39(6): 652−660. [LIU D Q, REN F Z, LI J M, et al. Comparative study on the structure and hypoglycemic activity of several tea polysaccharides[J]. Journal of Tea Science, 2019, 39(6): 652−660.]

[7] 南国有佳木——记国家地理标志产品凌云白毫茶 [J]. 标准生活, 2017(7): 92−96. [A tree with great application value in south china — Lingyun pekoe[J]. Standard Life, 2017(7): 92−96.]

[8] 马慧敏, 柯钦豪, 曹琴, 等. 茶多糖的提取方法研究进展[J]. 湖北科技学院学报 (医学版), 2019, 33(6): 550−552. [MA H M, KE Q H, CAO Q, et al. Research progress on extraction methods of tea polysaccharides[J]. Journal of Hubei University of Science and Technology (Medical Edition), 2019, 33(6): 550−552.]

[9] 王曼宇, 刘乃新, 张福顺. 植物源性多糖提取及生物活性研究进展[J]. 中国农学通报, 2021, 37(29): 34−41. [WANG M Y, LIU N X, ZHANG F S. Extraction and bioactivity of plant derived polysaccharides: A review[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2021, 37(29): 34−41.]

[10] 刘小辰, 林海龙. 提取方法对香蕉皮粗多糖的组成、性质及结构的影响[J]. 中国酿造, 2021, 40(7): 204−208. [LIU X C, LIN H L. Effects of extraction methods on the composition, properties and structure of banana peel crude polysaccharides[J]. China Brewing, 2021, 40(7): 204−208.]

[11] 刘星宇, 廖艺超, 王壹, 等. 超声波联用技术在植物活性成分提取中的应用研究进展 [J/OL]. 食品与发酵工业: 1−11 [2022-

02-10]. DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.029505. [LIU X Y, LIAO Y C, WANG Y, et al. Research progress on application of ultrasound hyphenated technique in extraction of active phytochemicals[J/OL]. Food and Fermentation Industries: 1−11[2022-02-10]. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.029505.]

[12] 李刚刚, 孙静, 伏衡一, 等. 兰州百合鳞茎多糖超声波辅助提取工艺优化及稳定性研究[J]. 食品与机械, 2020, 36(3): 190−193. [LI G G, SUN J, FU H Y, et al. Research on ultrasonic-assisted extraction process and stability of polysaccharides from *Lilium davidii* var bulb[J]. Food & Machinery, 2020, 36(3): 190−193.]

[13] 杨燕敏, 郑振佳, 高琳, 等. 红枣多糖超声波提取、结构表征及抗氧化活性评价[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(5): 120−126. [YANG Y M, ZHENG Z J, GAO L, et al. Ultrasonic extraction of jujube polysaccharide and its structure and antioxidant activity characterization[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(5): 120−126.]

[14] ZHANG H J, LI H Z, ZHANG Z J, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from *Perilla* seed meal by response surface methodology: Characterization and *in vitro* antioxidant activities[J]. Journal of Food Science, 2021, 86(2): 306−318.

[15] MIAO J N, SHI W, ZHANG J Q, et al. Response surface methodology for the fermentation of polysaccharides from *Auricularia auricula* using *Trichoderma viride* and their antioxidant activities[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020 (155): 393−402.

[16] 李珊, 梁俭, 冯群, 等. 桂七青芒果皮多糖提取工艺的响应面优化及其体外抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2019, 40(4): 220−225, 231. [LI S, LIANG J, FENG Q, et al. Optimization of polysaccharides from Guiqi-mango peels by response surface methodology and its antioxidant activity *in vitro*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(4): 220−225, 231.]

[17] WU Y T, HUO Y F, XU Y Y, et al. Purification, characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Porphyra haitanensis*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 165(B): 2116−2125.

[18] XIA Y G, HUANG Y X, LIANG J, et al. Comparable studies of two polysaccharides from leaves of *Acanthopanax senticosus*: Structure and antioxidation[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 147: 350−362.

[19] WU, D T, LIU W, HAN Q H, et al. Extraction optimization, structural characterization, and antioxidant activities of polysaccharides from *Cassia* seed (*Cassia obtusifolia*)[J]. Molecules, 2019, 24(15): 2817−2832.

[20] XU G Y, LIAO A M, HUANG J H, et al. Evaluation of structural, functional, and anti-oxidant potential of differentially extracted polysaccharides from potatoes peels[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 120: 778−785.

[21] LI Y, ZHU C P, ZHAI X C, et al. Optimization of enzyme assisted extraction of polysaccharides from pomegranate peel by response surface methodology and their anti-oxidant potential[J]. Chinese Herbal Medicines, 2018, 10(4): 416−423.

[22] 周丽明, 张勇. 茶籽多糖羧甲基化修饰及其对油脂抗氧化作用研究[J]. 中国油脂, 2020, 45(7): 45−49, 72. [ZHOU L M, ZHANG Y. Carboxymethylation modification of *Camellia oleifera* seed polysaccharides and its antioxidant effect on oils and fats[J]. China Oils and Fats, 2020, 45(7): 45−49, 72.]

[23] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品中过氧化值的测定: GB 5009.227-2016[S]. 北京: 中国标准出版社: 2016-8-31. [National Health Commission of the People's Republic of China. Determination of peroxide value in food: GB 5009.227-2016[S]. Beijing: China Stanard Press, 2016-8-31.]

[24] 吴玉柱, 崔维建, 李妍. 超声波辅助提取玉木耳多糖及其抗氧化活性分析[J]. 食品工业科技, 2020, 41(23): 142−148. [WU Y Z, CUI W J, LI Y. Ultrasound assisted extraction of polysaccharides from *Auricularia cornea* ehrenb and its antioxidant activity analysis[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(23): 142−148.]

[25] 毛月东, 金青. 响应面优化海风藤多糖提取工艺及其抗氧化活性研究[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(8): 171−176. [MAO Y D, JIN Q. Extraction optimization of polysaccharides from caulis piperis kadsurae by response surface method and evaluated antioxidant activity[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2021, 49(8): 171−176.]

[26] 付丽娜, 宋旭鸽, 曾静, 等. 海南柠檬皮多糖的提取工艺及体外抗氧化活性研究[J]. 食品与药品, 2021, 23(2): 120−124. [FU L N, SONG X G, ZENG J, et al. Extraction process and *in vitro* antioxidant activity of polysaccharide from Hainan Lemon peel[J]. Food and Drug, 2021, 23(2): 120−124.]

[27] 王锋, 刘晓鹏, 王应玲, 等. 猴头菇菌丝体多糖的超声辅助提取工艺研究[J]. 化学研究与应用, 2020, 32(11): 1984−1990. [WANG F, LIU X P, WANG Y L. et al. Ultrasound-assisted extraction for polysaccharides from mycelium of *Hericium erinaceus*[J]. Chemical Research and Application, 2020, 32(11): 1984−1990.]

[28] SHEN Q R, LIAN L, YU H Y, et al. Extraction optimization of polysaccharides from *Rhizoma polygonati* by response surface methodology and content determination[J]. Medicinal Plant, 2020, 11(6): 62−66.

[29] BIAN C, WANG Z Y, SHI J. Extraction optimization, structural characterization, and anticoagulant activity of acidic polysaccharides from *Auricularia auricula-judae*[J]. Molecules, 2020, 25(3): 710−723.

[30] LIU Z Q, ZHANG Y Y, LUAN H, et al. Optimization of extraction process and activity *in vitro* for polysaccharide from *Oenothera erythrosepala* root polysaccharide[J]. Botanical Research, 2020, 9(2): 83−95.

[31] 练珊珊, 陈佳, 吕立堂. 15 个茶树品种多糖、纤维素、木质素含量的分析[J]. 广东茶叶, 2021(1): 15−20. [LIAN S S, CHEN J, LYU L T. Analysis of the content of polysaccharides, cellulose, and lignin in 15 tea varieties[J]. Tea in Guangdong, 2021(1): 15−20.]

[32] 金亮, 李小白, 丁华侨, 等. 不同种类茶叶抗氧化活性及茶汤颜色参数比较[J]. 中国食品学报, 2016, 16(2): 242−250. [JIN L, LI X B, DING H Q, et al. Comparison on antioxidant activity and color parameters for different types of tea[J]. Journal of Chinese Institute of Food Scinece and Technology, 2016, 16(2): 242−250.]

[33] 王丹. 天然抗氧化剂的作用机制及其在食用油脂储存中的研究进展[J]. 现代食品, 2020(9): 65−67. [WANG D. The mechanism of natural antioxidants and its research progress in edible oil storage[J]. Modern Food, 2020(9): 65−67.]

徐媛，王璐，冷艳，等. 藜蒿黄酮微胶囊工艺优化及释放动力学研究 [J]. 食品工业科技，2022, 43(9)：185−193. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080120

XU Yuan, WANG Lu, LENG Yan, et al. Optimization of Microencapsulation Technology and Its Release Kinetics of *Artemisia selengensis* Flavonoids[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 185−193. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080120

·工艺技术·

藜蒿黄酮微胶囊工艺优化及释放动力学研究

徐　媛，王　璐，冷　艳，曹新华

（江汉大学生命科学学院，湖北武汉 430056）

摘　要：为探究藜蒿黄酮微胶囊最佳制备工艺及其释放性能，采用分子包埋法以藜蒿黄酮为芯材、β-环糊精为壁材制备藜蒿黄酮微胶囊并通过单因素及响应曲面法优化微胶囊制备工艺；通过测定微胶囊在不同温度和相对湿度下的黄酮保留率，并引用 Avrami's 方程对各条件下微胶囊的释放动力学进行拟合，并对其释放速率常数与释放机理参数进行分析。结果表明，藜蒿黄酮微胶囊的最佳制备工艺参数为包埋时间 65 min，包埋温度 55 ℃，芯壁比为 1∶3 (g/g)，在此条件下，藜蒿黄酮微胶囊的包埋率为 89.52%；微胶囊在 4、25、45 ℃ 和相对湿度为 50%、70%、90% 时，其释放动力学介于扩散限制动力学与一级释放动力学之间；释放速率常数随着温度和湿度的升高而增加，低温干燥条件将更有利于藜蒿黄酮微胶囊的保存与缓释。研究结果为藜蒿黄酮类化合物及其功能食品的研发提供了理论依据。

关键词：藜蒿，黄酮，微胶囊，工艺优化，释放动力学

中图分类号：TS202.3　　**文献标识码：**B　　**文章编号：**1002−0306(2022)09−0185−09

DOI： 10.13386/j.issn1002-0306.2021080120　　本文网刊：

Optimization of Microencapsulation Technology and Its Release Kinetics of *Artemisia selengensis* Flavonoids

XU Yuan，WANG Lu，LENG Yan，CAO Xinhua

（College of Life Sciences, Jianghan University, Wuhan 430056, China）

Abstract: In order to explore the best preparation technology and release performance of *Artemisia selengensis* flavonoids microcapsules, the molecular embedding method was used with *Artemisia selengensis* flavonoids as the core material, β-Cyclodextrin as the wall material, and the preparation technology of microcapsules was optimized by single factor and response surface methodology. By measuring the retention rate of flavonoids in microcapsules at different temperatures and relative humidity, Avrami's formula was used to fit the release kinetics of microcapsules under different conditions. Meanwhile, the release rate constant and release mechanism parameters were analyzed. The results showed that the optimal preparation parameters of *Artemisia selengensis* flavonoids microcapsule were as follows: Embedding time 65 min, embedding temperature 55 ℃, core/wall material quality ratio 1∶3 (g/g), the embedding rate of microcapsule could reach 89.52%. The release kinetics of microcapsules was between diffusion limited kinetics and first-order kinetics under the conditions of 4, 25, 45 ℃ and 50%, 70%, 90% relative humidity. In addition, the release rate constant increased with the increase of temperature and humidity. Therefore, low temperature and humidity will be more conducive to the preservation and sustained release of *Artemisia selengensis* flavonoids microcapsules. The results provide the theoretical basis for the research and development of *Artemisia selengensis* flavonoids and related functional food.

Key words: *Artemisia selengensis*; flavonoids; microcapsules; technology optimization; release kinetics

藜蒿（*Artemisia selengensis* Turcz.）为菊科蒿属多年生草本植物，别名香艾蒿，芦蒿，蒌蒿等[1]。藜蒿香气馥郁，味道鲜美，食用价值极高。国内外研究发现藜蒿根茎中富含黄酮、多酚、萜类及多糖等活性成

收稿日期：2021−08−12

基金项目：湖北省教育厅科学研究计划指导性项目（B2019245）。

作者简介：徐媛（1986−），女，博士，讲师，研究方向：食品科学，E-mail: xuyuan0804@163.com。

分, 具有重要的药理和营养功能, 可用于医药、食品等领域[2−4]。黄酮类化合物具有抗氧化、抗肿瘤、预防心血管和防治呼吸系统疾病等作用, 尤其对甲型流感病毒 H1N1 具有较好的抑制作用[5−6]; 其降解产物脱氨基酪氨酸(Deaminotyrosine, DAT)是开启人体免疫保护和增强病毒抵御免疫反应的关键因子, 研究表明, 黄酮类化合物对包膜 RNA 病毒如拉沙病毒等的感染途径均有阻断作用, 具有广谱抗病毒活性。因此, 黄酮类化合物可为免疫力低下或病毒易感人群提供有效的功能保障[7]。

然而, 黄酮类化合物难溶于水, 稳定性差, 易受氧气、pH 和温度等影响而失去生物活性, 严重限制其应用性和持效性[8−9]。微胶囊技术正是解决这一问题的有效途径, 利用聚合物壁材包裹形成微型包埋物, 使活性成分免受外界环境的影响, 在提高芯材稳定性的同时达到组分控制释放的功能[10−12]。β-环糊精(β-cyclodextrin, CD)是由 7 个 D-葡萄糖分子以 α-1,4-糖苷键连接而成的圆台状环化物, 其表面由多羟基形成亲水区, 内部中空部位由疏水的 C-H 键和环氧基形成疏水区, 疏水中心可与大小形状合适的疏水物质包接形成络合物以完成包埋[13−15]。利用 β-环糊精包裹藜蒿黄酮形成微胶囊的技术, 可以拓展黄酮类化合物在食品工业中的实际应用范围。

近年来, 藜蒿中黄酮类化合物的研究进展主要集中在提纯工艺的优化、结构鉴定及抗氧化能力等方面[16−18]; 而如何通过微胶囊技术提高其贮藏稳定性以优化藜蒿黄酮类功能性产品的实际应用是亟待解决的问题, 然而, 目前对藜蒿黄酮化合物的微胶囊制备及其工艺优化未有报道。在食品工业实际产品开发过程中, 微胶囊中芯材的释放性能对功能性食品的贮藏稳定性有及其重要的作用[19−20]; 且芯材的释放性能与及其动力学会随贮藏环境的变化呈现不同情况[21−22]。

现阶段黄酮微胶囊化研究主要集中在制备工艺及部分功能活性, 有关黄酮微胶囊的释放动力学及释放性能的研究鲜少报道。因此, 本研究以 β-环糊精为壁材, 采用分子包埋法进行藜蒿黄酮微胶囊制备, 通过控制芯壁比、包埋时间和包埋温度对藜蒿黄酮微胶囊包埋率进行研究, 利用响应面法对微胶囊工艺参数进行优化, 并进一步对藜蒿黄酮微胶囊在贮藏期间的释放动力学进行探讨, 从而为藜蒿黄酮类化合物的开发应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜藜蒿 采自武汉市荷香源农业发展有限公司; 芦丁标品 纯度≥98%, 购于中国药品生物制品鉴定所; β-环糊精 分析纯, 购于天津博迪化工股份有限公司; 亚硝酸钠、无水乙醇、硝酸铝、氢氧化钠 分析纯, 购于上海化学试剂有限公司。

RE52-99 型旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; UV-1700 SPC 型紫外可见分光光度计 日本 SHIMADZU 公司; SHA-B 恒温振荡器 常州电器有限公司; HWS-1000F 恒温恒湿培养箱 上海丙林电子科技有限公司; DHG-9140A 电热恒温干燥箱 宏华仪器设备有限公司; GT-100 高通量组织研磨仪 北京格瑞德曼仪器设备有限公司; DZF-6050 真空干燥箱 上海一恒仪器有限公司; HJ-3 数显恒温磁力搅拌器 常州国华电器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 藜蒿中黄酮类化合物的提取 新鲜藜蒿根茎置于电热恒温干燥箱(60 ℃)内恒温干燥处理, 每隔 1 h 称重直至恒重, 在 1200 r/min 下研磨 1 min, 密封保存于棕色瓶中。精确称取 1.00 g 藜蒿粉末, 以 50 mL 70% 乙醇为提取溶剂, 在 180 r/min、50 ℃ 下恒温振荡提取 2 h, 获得提取液[23−24]。相同条件重复提取 2 次, 合并提取液并抽滤、浓缩, 真空干燥即得藜蒿黄酮提取物。

1.2.2 藜蒿黄酮微胶囊的制备 按一定芯材壁材质量比例(芯壁比)准确称量 β-环糊精溶于 40 ℃ 蒸馏水, 制成饱和溶液。根据芯壁比取一定质量藜蒿黄酮溶于 5 mL 无水乙醇溶液, 用滴管缓慢滴加适量藜蒿总黄酮提取液到 β-环糊精饱和溶液中, 在设定温度下用磁力搅拌器搅拌一定时间后, 冷却至室温, 即得藜蒿总黄酮微胶囊混悬液[25−26]。放置于 4 ℃ 下平衡 12 h, 过滤分离产物, 将下层湿浆在 0.04 Mpa, 50 ℃ 条件下恒温加热真空干燥 4 h, 即得藜蒿黄酮微胶囊产品。

1.2.3 黄酮微胶囊的制备工艺优化设计

1.2.3.1 单因素实验 按 1.2.2 工艺方法操作, 制备藜蒿黄酮类化合物微胶囊。分别以芯壁比(m/m)(1∶1、1∶2、1∶4、1∶6、1∶8 g/g)、包埋时间(30、40、50、60、70 min)和包埋温度(30、40、50、60、70、80 ℃)为单因素进行实验, 在考察单因素对藜蒿黄酮微胶囊包埋率的影响时, 其它各变量固定取值分别为芯壁比 1∶4 g/g、包埋时间 60 min、包埋温度 60 ℃。

1.2.3.2 Box-Behnken 响应曲面法优化藜蒿黄酮微胶囊制备工艺 根据单因素实验结果, 利用 Minitab 16 软件进行响应曲面试验设计与分析, 选择包埋时间(A)、包埋温度(B)、芯壁比(C)进行三因素三水平的 Box-Behnken 试验, 以藜蒿黄酮微胶囊包埋率为响应值, 确定微胶囊制备的最佳工艺条件。响应曲面优化试验因素及水平见表 1。

表 1 响应面试验因素与水平

Table 1 Factors and levels of response surface experiments

因素	编码	水平		
		−1	0	1
包埋时间(min)	A	50	60	70
包埋温度(℃)	B	40	50	60
芯壁比(g/g)	C	1∶2	1∶4	1∶6

1.2.4　藜蒿黄酮微胶囊释放动力学的分析方法　Avrami's 方程可用于气固及液固释放动力学，多数研究表明微胶囊释放动力学符合 Avrami's 方程[27−28]，假设藜蒿黄酮微胶囊也符合此方程，其释放速率常数 k 和释放机理参数 n 可由下式计算得出：

$$\text{Avrami's公式：}\ R = \exp[-(kt)^n] \qquad \text{式（1）}$$

对公式两边取对数可得：

$$\ln(-\ln R) = n\ln k + n\ln t \qquad \text{式（2）}$$

公式（1）、（2）中，R 为芯材残留量，即黄酮在释放后的保留率，%；k 为释放速率常数；n 为释放机理参数；t 为贮藏时间，d。

释放动力学分析实验主要考察不同环境温度和相对湿度对藜蒿黄酮微胶囊释放动力学的影响。温度效应实验模拟常见食品贮藏温度 4、25 和 45 ℃（低温、常温、高温），选择在恒温恒湿箱中保持相对湿度 50% 条件下贮藏 18 d，定期测定藜蒿黄酮微胶囊的保留率；湿度效应实验则模拟在 25 ℃ 室温环境中且相对湿度分别为 50%、70% 和 90%（低湿、中湿、高湿）条件下，研究藜蒿黄酮微胶囊在 18 d 贮藏过程中的保留率以分析其释放行为[29−30]。

以 lnt 为横坐标，ln（−lnR）为纵坐标做线性回归方程，计算可得释放速率常数 k 和释放机理参数 n。根据扩散动力学理论，当 n=0.54 时说明释放属于扩散限制反应动力学；当 n=1 时代表释放过程遵循一级反应释放动力学[31]。

1.2.5　藜蒿中黄酮类化合物的测定

1.2.5.1　黄酮标准曲线的绘制　精确称取真空干燥恒重的芦丁标准品 25 mg，用 95% 乙醇溶解并定容至 100 mL 容量瓶中，摇匀得 0.25 mg/mL 的芦丁标准溶液。分别精确吸取 0、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8 mL 于 10 mL 容量瓶中，加入 5% $NaNO_2$ 溶液 0.3 mL，摇匀后静置 6 min，再加入 10% 的 $Al(NO_3)_3$ 溶液 0.3 mL，静置 6 min，再加入 4% NaOH 溶液 4 mL，并用无水乙醇定容至 10 mL 后，摇匀静置 15 min。选定 510 nm 为黄酮类化合物测定波长，测定各浓度标准液的吸光值 A[32]。以吸光值为纵坐标，芦丁浓度 C（mg/mL）为横坐标绘制标准曲线为 A=11.35C−0.004，R^2=0.9993。

1.2.5.2　藜蒿中黄酮类化合物的含量测定　精确量取藜蒿黄酮提取液 2 mL，按照 1.2.5.1 方法处理黄酮提取液后，测定各条件下溶液吸光值，并根据标准回归曲线计算藜蒿总黄酮含量。计算得藜蒿黄酮提取液中总黄酮含量为 153 mg/g。

1.2.6　微胶囊包埋率测定　微胶囊表面藜蒿黄酮含量测定：精密称取 0.25 g 藜蒿黄酮微胶囊产品，少量多次加入无水乙醇，充分振荡、洗涤以洗掉微胶囊表面黄酮，静置溶液并过滤[33]。将上清液用无水乙醇定容至 25 mL，按照黄酮含量测定方法测定微胶囊表面黄酮质量 m（g）。

微胶囊产品藜蒿黄酮总量测定：精密称取 0.25 g 藜蒿黄酮微胶囊产品，用适量蒸馏水完全溶解后，加入无水乙醇，充分振荡、静置并过滤，将上清液用无水乙醇定容至 25 mL 测定总黄酮含量 M（g）。

$$\text{包埋率} = (1 - m/M) \times 100 \qquad \text{式（3）}$$

1.2.7　藜蒿黄酮微胶囊中黄酮保留率的测定　根据 1.2.4 的温度效应实验和湿度效应实验设定温湿度参数，分别称取藜蒿黄酮微胶囊产品（总黄酮质量 M，表面黄酮质量 m）置于恒温恒湿培养箱中贮藏 18 d，间隔 3 d 测定微胶囊产品表面的黄酮质量 m_1，按公式（4）计算藜蒿黄酮微胶囊中黄酮保留率[34]。

$$\text{保留率} = (M - m_1)/(M - m) \times 100 \qquad \text{式（4）}$$

1.3　数据处理

各样品黄酮含量测定均重复三次并求平均值。所有数据通过 SPSS 19.0 软件进行显著性分析，水平为 0.05。

2　结果与分析

2.1　单因素实验

2.1.1　芯壁比对藜蒿黄酮微胶囊化的影响　从图 1 中可以看出，当加入的藜蒿黄酮含量与 β-环糊精含量为 1∶8 g/g 时，较小的芯壁比值会导致壁材 β-环糊精与芯材黄酮类化合物不能充分接触，微胶囊化效率即包埋率较低；继续增大芯材所占比例，微胶囊包埋率会逐渐增加，且当比值达到 1∶4 g/g 时，总黄酮的包埋率达到最大值；然而若继续增大黄酮含量以提高芯壁比值，就会造成单位壁材的包埋量过大而超过 β-环糊精的包裹限度，使芯材附着在壁材的表面，而降低了 β-环糊精对总黄酮的包覆效果，从而导致藜蒿总黄酮微胶囊产品的制备效率降低。因此，选择芯壁比 1∶2~1∶6 g/g 进行后续试验。

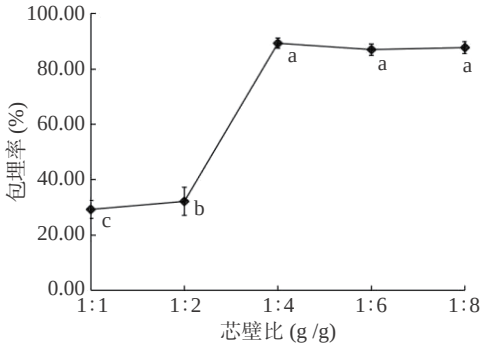


图 1　芯壁比对包埋率的影响

Fig.1　Effect of the core-wall ratio on the rate of embedding

注：不同小写字母表示差异显著（P<0.05）；图 2~图 3 同。

2.1.2　包埋时间对藜蒿总黄酮微胶囊化的影响　理论上，微胶囊化的效率会随着制备过程中搅拌时间的增加而提高。但从图 2 中可以看出，微胶囊化时间为 30~60 min 时，包埋率随时间延长呈上升趋势，但包埋时间超过 60 min 后，微胶囊化效率随着时间的延长而呈逐渐下降的趋势，可见藜蒿总黄酮的微胶囊

化效率并不是简单地随着包埋时间的增加而与之成正相关。这可能是由于在微胶囊化过程中，随着包埋时间的延长，黄酮类分子进入 β-环糊精分子的空腔结构内越多，随着 β-环糊精的内部空腔被芯材逐渐占据，壁材对黄酮的包埋能力逐渐饱和，继续延长包埋的搅拌时间可能会破坏已经形成的微胶囊包合物，从而将导致包埋率下降[35]。因此选择包埋时间 50~70 min 进行后续试验。

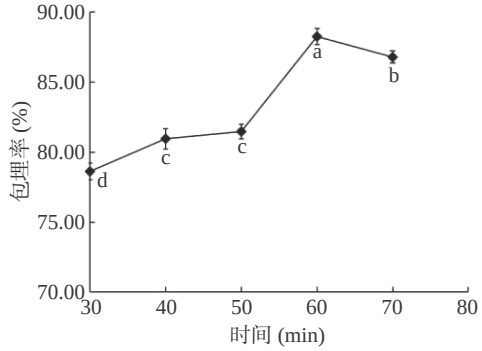


图 2 包埋时间对包埋率的影响

Fig.2 Effect of embedding time on the rate of embedding

2.1.3 包埋温度对藜蒿总黄酮微胶囊化的影响 由图 3 可以看出，在 30~50 ℃ 范围内随着包埋温度的升高，黄酮的包埋率有所增加，但升高幅度较为平缓；而当制备温度超过 50 ℃ 后，藜蒿总黄酮的微胶囊化效率开始下降。这主要是由于在微胶囊制备开始时，提高包埋温度有利于 β-环糊精在水溶液中的溶解，因此，能提供大量溶解的分子状态的 β-环糊精包埋住黄酮类分子而形成微胶囊。然而若继续升高包埋温度，壁材可能会发生热降解从而影响黄酮的微胶囊化效率，且由于包埋制备反应为放热反应[36]，当包埋温度增加过高时就可能会对黄酮微胶囊的形成造成一定的阻碍，因此，藜蒿中黄酮类化合物在 50 ℃ 条件下会有较高且稳定的包埋率，故选择包埋温度 40~60 ℃ 进行后续试验。

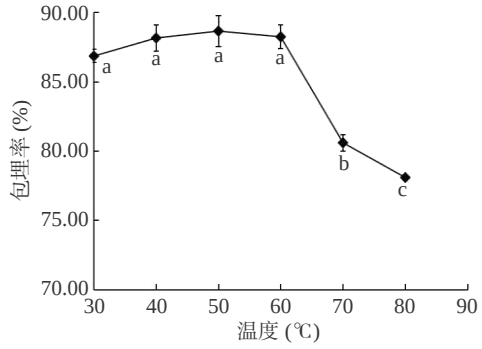


图 3 包埋温度对包埋率的影响

Fig.3 Effect of embedding temperature on the rate of embedding

2.2 响应曲面法优化藜蒿黄酮微胶囊制备工艺

2.2.1 响应曲面设计方案及结果 在单因素实验的基础上，选出影响黄酮微胶囊化包埋率的包埋时间（A）、包埋温度（B）和芯壁比（C）3 个主要因素，运用 Minitab 16 软件进行响应曲面（RSM）的试验设计，以表 1 的因素水平设计得到 15 组试验。该试验设计方案及其响应值包埋率结果见表 2。

表 2 响应曲面设计方案及结果

Table 2 Design and results of response surface experiments

试验编号	A 包埋时间	B 包埋温度	C 芯壁比	包埋率(%)
1	0	−1	−1	76.63
2	0	0	0	88.67
3	0	0	0	88.68
4	0	1	1	77.39
5	0	−1	1	79.62
6	−1	−1	0	75.33
7	1	0	−1	84.54
8	1	1	0	86.79
9	−1	1	0	78.62
10	−1	0	1	84.69
11	0	1	−1	85.82
12	1	0	1	81.94
13	1	−1	0	73.53
14	−1	0	−1	75.87
15	0	0	0	88.66

2.2.2 回归模型的建立及显著性分析 应用 Minitab 16 软件，以包埋时间、包埋温度、芯壁比为响应变量，并以微胶囊后的黄酮包埋率为响应值，对表 2 中的数据进行多元回归拟合，获得藜蒿总黄酮包埋率对芯壁比、包埋时间和包埋温度的二次多项回归方程：$Y=0.886687+0.0139A+0.0294B+0.0024C-0.0396A^2-0.0614B^2-0.0267C^2+0.0249AB-0.0313AC-0.0285BC$，对该模型进行显著性检验及方差分析结果见表 3。

表 3 回归方程方差分析

Table 3 Regression equation analysis of variance

项目	平方和	自由度	均方	*F*值	*P*值
模型	0.038038	9	0.004226	156.54	0.026*
A 包埋时间	0.001557	1	0.001557	2.41	0.181
B 包埋温度	0.006913	1	0.006913	10.69	0.022*
C 芯壁比	0.000046	1	0.000046	0.07	0.801
A^2	0.004149	1	0.005797	8.97	0.030*
B^2	0.013078	1	0.013914	21.52	0.006**
C^2	0.002622	1	0.002622	4.06	0.100
AB	0.002483	1	0.002483	3.84	0.107
AC	0.003934	1	0.003934	6.08	0.037*
BC	0.003258	1	0.003258	5.04	0.045*
残差	0.003233	5	0.000647		
失拟项	0.003233	3	0.001078	0.5356	0.7517

注：*表示差异显著$P<0.05$；**表示差异显著$P<0.01$。

由表 3 可知，模型的 *F* 值为 156.54 证明模型是显著的，失拟值为 0.7517>0.05，表明失拟不显著。模型决定系数 $R^2=0.9771$，表明总黄酮包埋率的实际值与预测值间具有较好拟合度，模型校正决定系数 $R^2_{Adj}=0.9217$，说明该模型能解释约 92.17% 包埋率的变化，因此，可以较好分析和预测藜蒿中总黄酮的微胶囊化工艺。*F* 值的大小可反映各实验变量对响

应值的影响力，从表 3 可得出各制备因素对藜蒿中总黄酮微胶囊化效率的影响大小顺序为：包埋温度(B)>包埋时间(A)>芯壁比(C)。

回归模型的一次项 B 显著($P<0.05$)，二次项 A^2 显著($P<0.05$)、B^2 极显著($P<0.01$)，交互项 AC、BC 显著($P<0.05$)，AB 不显著($P>0.05$)，说明不同的微胶囊化工艺与藜蒿黄酮包埋率不是简单的线性关系。

2.2.3　响应曲面分析及优化　如图 4~图 6 所示，分别为两因素交互作用的响应曲面及其等高线。表示了当包埋时间、包埋温度和芯壁比 3 个因素中任意一个变量为零水平时，其余 2 个变量对藜蒿黄酮微胶囊包埋率的影响。

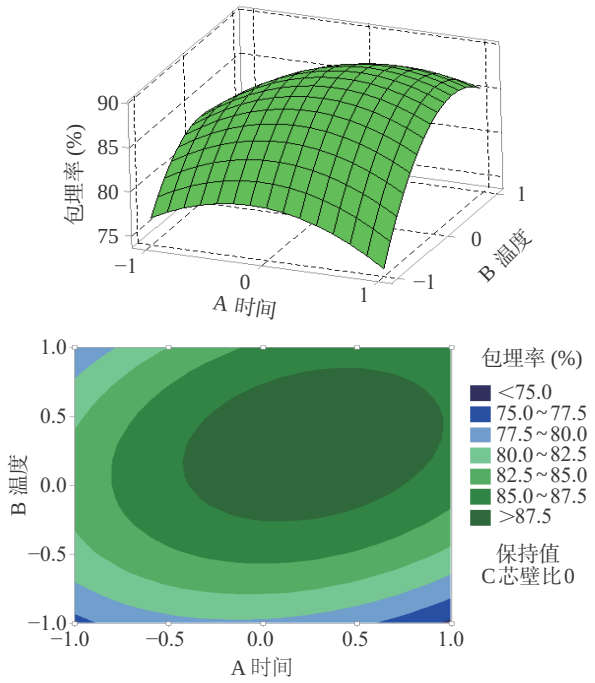


图 4　包埋时间和包埋温度交互项的响应曲面和等高线图

Fig.4　Response surface and contour plots for the effect of the interaction of embedding time and embedding temperature

以上所示相应的响应曲面及其等高线图是根据回归分析结果做出的。由图可以确定，包埋温度、包埋时间及芯壁比 3 个因素对藜蒿总黄酮包埋率的影响。由图可知，包埋温度相较于包埋时间、芯壁比的曲线较为陡峭，说明包埋温度对于黄酮包埋率的影响较显著些；包埋温度固定时，包埋时间的曲线比芯壁比的陡峭，再一次验证藜蒿黄酮微胶囊化过程中，包埋温度的影响最大，包埋时间其次，芯壁比的影响最小。

由响应面的最高点和等高线圆心分布可看出，在所选范围内藜蒿总黄酮的包埋率存在极值。等高线的形状反映了因素间交互影响的大小。当等高线呈圆形时，两因素间的交互作用相对较弱；而当等高线趋于椭圆形时则表明两因素间的交互作用相对较强。由等高线的形状看出，包埋时间和芯壁比以及包埋温度和芯壁比的交互作用显著，包埋时间和包埋温度的交互作用不显著，与表 3 结果相统一。根据试

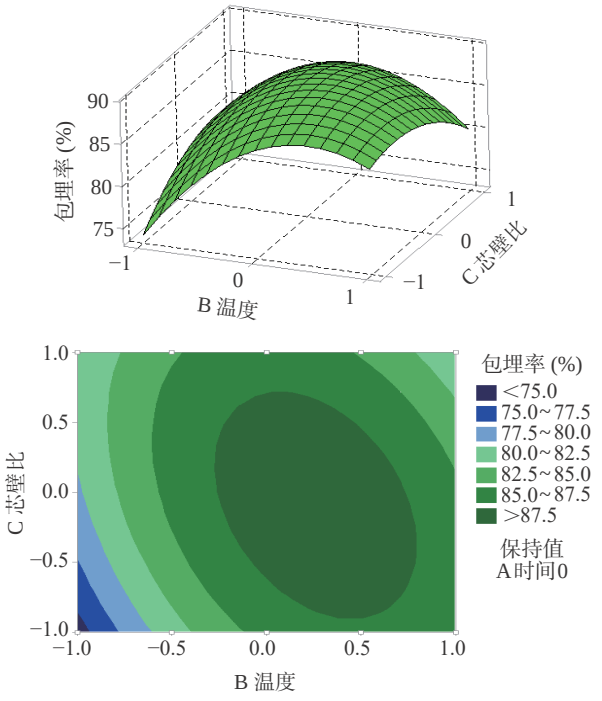


图 5　包埋温度和芯壁比交互项的响应面和等高线图

Fig.5　Response surface and contour plots for the effect of the interaction of embedding temperature and core-to-wall material ratio

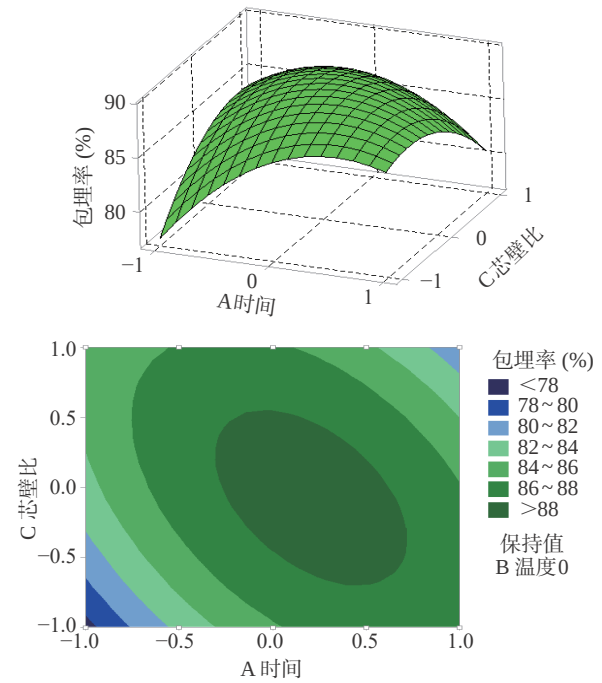


图 6　芯壁比和包埋时间交互项的响应曲面和等高线图

Fig.6　Response surface and contour plots for the effect of the interaction of core-to-wall material ratio and embedding time

验所设定的参数范围，采用 Minitab 16 软件处理可以得到藜蒿黄酮包埋率最大为 89.66%，所对应的最佳工艺参数为：包埋时间为 65.35 min，包埋温度为 54.74 ℃，芯壁比为 1∶2.96 (g/g)。

2.2.4　藜蒿黄酮微胶囊化工艺条件的确定　对响应曲面法所得结果的可靠性进行检验，并考虑其可操作

性，将微胶囊化工艺调整为：包埋时间 65 min，包埋温度 55 ℃，芯壁比为 1∶3（g/g）。在此条件下进行 3 次验证性实验，得到藜蒿黄酮类化合物的平均包埋率为 89.52%，与预测值 89.66% 相比，相对偏差为 0.11%。说明了响应曲面分析法可得到最佳工艺的包埋效果，从而验证了该回归模型是合理的。

2.3 藜蒿黄酮微胶囊在贮藏过程中的释放动力学

2.3.1 温度对藜蒿黄酮微胶囊中黄酮保留率的影响

从图 7 可知，黄酮保留率随着贮藏时间的延长呈下降趋势；在同一贮藏时间下，温度越高，藜蒿黄酮微胶囊的保留率越低。贮藏 18 d 后，4 ℃ 下微胶囊中黄酮保留率最高，达 98.14%；同一时间下 25 和 45 ℃ 的黄酮保留率仅为 89.35% 和 73.82%。由实验结果可知，随着贮藏时间的延长，藜蒿黄酮微胶囊的芯材逐渐释放，黄酮保留率逐渐减少，当产品贮藏温度逐渐升高时，芯材的释放速率加快。温度升高促使微胶囊壁材形成的包膜破损，膜壁空隙增大，黄酮释放受到的阻力变小，释放速率加快[37]；另外，高温将导致芯材的分子活化能增大，分子热运动加快，从而加速释放[38]。因此，藜蒿黄酮微胶囊的贮存过程应尽量避免高温。

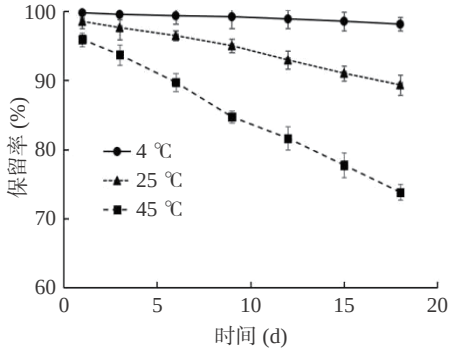


图 7 不同温度下微胶囊的黄酮保留率

Fig.7 Flavonoids retention rate of the microcapsules at different temperatures

2.3.2 Avrami's 公式对不同温度下藜蒿黄酮微胶囊的释放动力学分析

Avrami's 公式对不同温度下黄酮微胶囊释放动力学的拟合曲线见图 8。由表 4 可知，藜蒿黄酮微胶囊在各温度下各回归方程的 R^2 均在 0.95 以上，表明 Avrami's 公式对不同温度下黄酮释放过程的拟合性较好，因此采用 Avrami's 公式进行黄酮芯材释放动力学分析是切实可行的[39]。4、25、45 ℃ 下释放机理参数分别为 0.7113、0.7105 和 0.7049，均在 0.54~1.00 之间，表明藜蒿黄酮微胶囊的释放反应动力学介于扩散限制动力学与一级反应动力学之间。对比不同温度条件下的释放速率常数 k 发现，随着温度升高释放速率常数增大明显。说明不同温度下藜蒿黄酮微胶囊的释放过程为非稳态、非恒速过程[40−41]，低温贮藏（4 ℃）将有效稳定微胶囊的释放。

2.3.3 湿度对藜蒿黄酮微胶囊中黄酮保留率的影响

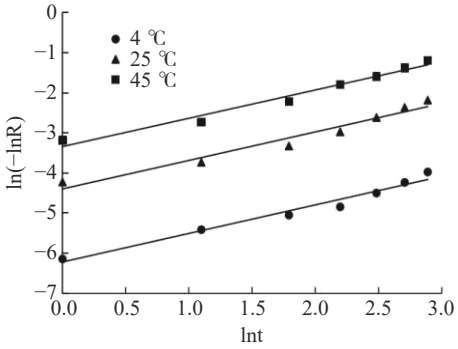


图 8 藜蒿黄酮微胶囊在不同温度下释放动力学的 Avrami's 分析

Fig.8 Avrami's analysis of release kinetics of *Artemisia selengensis* flavonoids microcapsules at different temperatures

表 4 不同温度下的黄酮释放机理参数及释放速率常数

Table 4 Release mechanism parameters and release rate constants of flavonoids at different temperatures

温度（℃）	回归方程	n	k	R^2
4	y=0.7113x−6.2198	0.7113	1.59×10^{-4}	0.9713
25	y=0.7105x−4.3980	0.7105	2.05×10^{-3}	0.9576
45	y=0.7049x−3.3411	0.7049	8.74×10^{-3}	0.9725

注：n：释放机理参数；k：释放速率常数；表5同。

从图 9 可知，黄酮保留率随着相对湿度增大而迅速下降。贮藏 18 d 后，50% RH 条件下黄酮保留率达到 89.35%，而 90% RH 条件下黄酮保留率仅为 56.26%。同一贮藏时间下，相对湿度越大，黄酮保留率越低。表明藜蒿黄酮微胶囊在相对湿度较低条件下释放较为缓慢，而相对湿度较高的贮藏环境会显著增加其释放速率。壁材 *β*-环状糊精外部亲水，相对湿度增加将导致水分子经微胶囊表面微孔进入内部，从而使壁材机械强度与致密性发生改变，从而破坏壁材对芯材的保护作用，加速黄酮的渗透与释放[42]。与图 7 对比可知，高湿条件对黄酮微胶囊的破坏程度明显高于高温条件下芯材的释放率，故在贮藏时，应尽量保持较低的环境湿度。

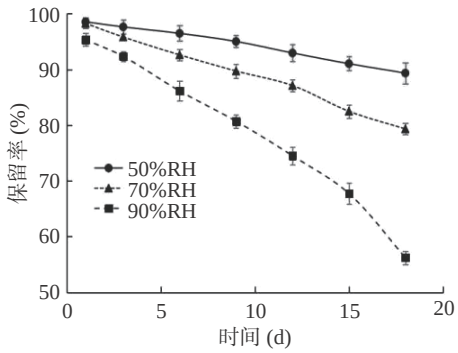


图 9 不同湿度下微胶囊的黄酮保留率

Fig.9 Flavonoids retention rate of the microcapsules at different relative humidity

2.3.4 Avrami's 公式对不同湿度下藜蒿黄酮微胶囊的释放动力学分析

Avrami's 公式对不同湿度下黄

酮微胶囊释放动力学的拟合曲线见图 10。由表 5 可知，藜蒿黄酮微胶囊在 RH 50%、70%、90% 条件下，各回归方程的 R^2 均在 0.95 以上，表明 Avrami's 公式对不同湿度下黄酮释放过程的拟合性较好。各湿度下藜蒿黄酮微胶囊释放机理参数 n 分别为 0.7105、0.8823 和 0.8400，均在 0.54~1.00 之间，说明其释放反应动力学介于扩散限制动力学与一级反应动力学之间。随着相对湿度增加，微胶囊的释放速率常数 k 迅速增加，RH 为 90% 的 k 值比 RH 为 50% 的 k 值高出约 10 倍；且与不同温度条件下释放动力学相比，高湿贮藏条件下的 k 值明显高于高温条件下的 k 值，与前面讨论一致，说明藜蒿黄酮微胶囊产品对相对湿度更为敏感，干燥环境将有利于微胶囊的贮藏。

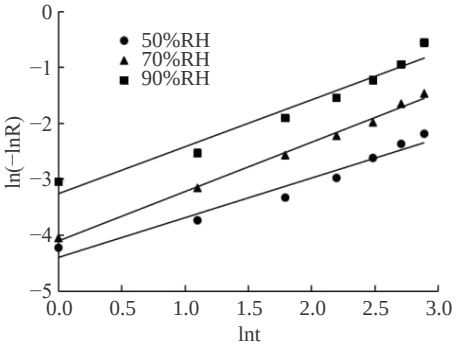


图 10　藜蒿黄酮微胶囊在不同湿度下释放动力学的 Avrami's 分析

Fig.10　Avrami's analysis of release kinetics of *Artemisia selengensis* flavonoids microcapsules at different humidity

表 5　不同湿度下的黄酮释放机理参数及释放速率常数

Table 5　Release mechanism parameters and release rate constants of flavonoids at different humidity

湿度(%)	回归方程	n	k	R^2
50	y=0.7105x−4.398	0.7105	2.05×10^{-3}	0.9576
70	y=0.8832x−4.103	0.8823	9.60×10^{-3}	0.9948
90	y=0.8400x−3.2573	0.8400	2.07×10^{-2}	0.9561

3　结论

采用分子包埋法以 β-环糊精为壁材制备藜蒿黄酮微胶囊。通过研究包埋时间、包埋温度和芯壁比对藜蒿黄酮微胶囊包埋率的影响，设计响应曲面试验优化微胶囊制备工艺，得出包埋温度对微胶囊化效率影响最大，在包埋时间 65 min，包埋温度 55 ℃，芯壁比为 1:3（g/g）条件下包埋效果最优，得到藜蒿黄酮微胶囊的平均包埋率为 89.52%。

运用 Avrami's 公式分析不同温度与相对湿度下藜蒿黄酮微胶囊的释放性能。研究表明，随着贮藏温度和相对湿度的增加，藜蒿黄酮微胶囊的释放速率均显著增加；与温度相比，高湿环境更能加速藜蒿黄酮微胶囊的释放。藜蒿黄酮微胶囊在 4、25、45 ℃ 和相对湿度 50%、70%、90% 时，其释放机理参数介于 0.54~1.00 之间，表明其释放动力学介于扩散限制动力学与一级释放动力学之间。低温低湿环境下藜蒿黄酮微胶囊能实现芯材的缓慢释放，有利于提高藜蒿黄酮的贮藏稳定性与维持其功能活性。藜蒿黄酮微胶囊的释放性能受到多因素的综合影响，因此有待进一步研究实际应用中藜蒿黄酮微胶囊的稳定性与缓释性能。

参考文献

[1] 谢星，涂宗财，王辉，等. 野生和种植藜蒿不同部位提取物的抗氧化活性和酶抑制活性[J]. 中国食品学报，2020，20(3)：58−65. [XIE X, TU Z C, WANG H, et al. Antioxidant activity and enzyme inhibitory activity of extracts from different parts of wild and cultivated *Artemisia selengensis*[J]. Chinese Journal of Food, 2020, 20(3): 58−65.]

[2] 黄小芮，何聪芬. 藜蒿主要化学成分及活性研究进展[J]. 中国野生植物资源，2020，39(8)：42−49. [HUANG X R, HE C F. Research progress on main chemical components and activities of *Artemisia selengensis*[J]. China Wild Plant Resources, 2020, 39(8): 42−49.]

[3] WANG J, HAN J Z, LU Z X, et al. Preliminary structure, antioxidant and immunostimulatory activities of a polysaccharide fraction from *Artemisia selengensis* Turcz[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 143: 842−849.

[4] SHU W, XING X, LU Z Y, et al. Inhibition mechanism of α-glucosidase inhibitors screened from *Artemisia selengensis* Turcz root[J]. Industrial Crops and Products, 2020, 143: 111941.

[5] 丰茂秀，崔清华，刘苗苗，等. 黄酮类化合物抗甲型流感病毒活性研究进展[J]. 中华中医药学刊，2021，39(3)：151−155. [FENG M X, CUI Q H, LIU M M, et al. Research progress on the activity of flavonoids against influenza a virus[J]. Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine, 2021, 39(3): 151−155.]

[6] VACLAV Z, KATERINA R, MILAN K, et al. Unraveling the anti-influenza effect of flavonoids: Experimental validation of luteolin and its congeners as potent influenza endonuclease inhibitors[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2020, 208: 112754.

[7] AHLEY L S, GEORGE P C, GERARD E K, et al. The microbial metabolite desaminotyrosine protects from influenza through type I interferon[J]. Science, 2017, 357: 498−502.

[8] 孟橘，魏冰，邱立明，等. 不同制油工艺对油茶籽油主要微量成分及氧化稳定性的影响[J]. 中国油脂，2021，46(7)：20−22,26. [MENG J, WEI B, QIU L M, et al. Effects of different oil preparation processes on main trace components and oxidation stability of *Camellia oleifera* seed oil[J]. China Oil, 2021, 46(7): 20−22,26.]

[9] YU F, WANNING L, OLUGBENGA P S. Towards innovative food processing of flavonoid compounds: Insights into stability and bioactivity[J]. LWT, 2021, 150: 111968.

[10] 聂吉语，姜子涛，李荣，等. 迷迭香黄酮的微波提取及其 β-环糊精钾金属有机骨架材料包结物稳定性研究[J]. 食品工业科技，2019，40(1)：187−194,201. [NIE J Y, JIANG Z T, LI R, et al. Microwave extraction of flavonoids from rosemary and its application β-study on the stability of inclusion complex of cyclodextrin potassium metal organic framework material[J]. Food Industry Science and Technology, 2019, 40(1): 187−194,201.]

[11] YAN H, YAN L, WENLIN Z, et al. Physical stability and antioxidant activity of citrus flavonoids in Arabic gum-stabilized mi-

crocapsules: Modulation of whey protein concentrate[J]. Food Hydrocolloids, 2018(77): 588−597.
[12] 纪秀凤, 吕长鑫, 芦宇, 等. 红树莓籽黄酮微胶囊工艺优化及其体外模拟胃肠消化[J]. 食品工业科技, 2019, 40(5): 182−187. [JI X F, LYU C X, LU Y, et al. Process optimization and *in vitro* simulated gastrointestinal digestion of flavonoids from mangrove seeds[J]. Food Industry Science and Technology, 2019, 40(5): 182−187.]
[13] 杨俊鹏, 熊国玺, 王昊, 等. 利用微胶囊双水相技术萃取莳萝精油[J]. 食品工业, 2021, 42(3): 206−208. [YANG J P, XIONG G X, WANG H, et al. Extraction of dill essential oil by microcapsule aqueous two-phase technology[J]. Food Industry, 2021, 42(3): 206−208.]
[14] 蔡晨晨, 马瑞佳, 刘涛, 等. 百里香精油微胶囊复合涂膜在芒果保鲜中的应用[J]. 食品工业科技, 2021, 42(10): 275−280. [CAI C C, MA R J, LIU T, et al. Application of thymus oil microcapsule composite coating in mango preservation[J]. Food Industry Science and Technology, 2021, 42(10): 275−280.]
[15] 唐婷范, 黄芳丽, 梁杰婷, 等. 葛根素微胶囊的制备及其性质研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(8): 179−185. [TANG T F, HUANG F L, LIANG J T, et al. Preparation and properties of puerarin microcapsules[J]. Food Industry Science and Technology, 2021, 42(8): 179−185.]
[16] LI Y Z, WAN Y, LI R Y, et al. Solvent extraction of caffeoylquinic acids from *Artemisia selengensis* Turcz leaves and their *in vitro* inhibitory activities on xanthine oxidase[J]. Industrial Crops and Products, 2018, 118: 296−301.
[17] ZHANG L, TU Z C, WANG H, et al. Antioxidant activity and phenolic acids profiles of *Artemisia selengensis* Turcz extracted with various methods by HPLC-QTOF-MS/MS[J]. Food Biochemistry, 2016, 40(4): 603−612.
[18] ZHANG L, TU Z C, WANG H, et al. Metabolic profiling of antioxidants constituents in *Artemisia selengensis* leaves[J]. Food Chemistry, 2015, 186: 123−132.
[19] 万良钰, 肖玉, 赵婕, 等. 薏米糠油微胶囊的释放动力学研究[J]. 食品科技, 2018, 43(1): 192−196. [WAN L Y, XIAO Y, ZHAO J, et al. Exploration the release kinetics of adlay bran oil microcapsules[J]. Food Science and Technology, 2018, 43(1): 192−196.]
[20] WANG P P, LUO Z G, PENG X C. Encapsulation of vitamin E and soy isoflavone using spiral dextrin: Comparative structural characterization, release kinetics, and antioxidant capacity during simulated gastrointestinal tract[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(40): 10598−10607.
[21] MATSHETSHE K I, PARANI S, MANKI S M, et al. Preparation, characterization and *in vitro* release study of *β*-cyclodextrin/chitosan nanoparticles loaded *Cinnamomum zeylanicum* essential oil [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 118: 676−682.
[22] LI D H, WU H J, HUANG W, et al. Microcapsule of sweet orange essential oil encapsulated in beta-cyclodextrin improves the release behaviors *in vitro* and *in vivo*[J]. European Journal of Lipid Science and Technology, 2018, 120(9): 1700521.
[23] 时桂芹, 沈佳鑫, 孙新成, 等. 芍药种皮黄酮类化合物的超声辅助提取工艺优化及抗氧化活性分析[J]. 中国食品添加剂, 2021, 32(2): 26−34. [SHI G Q, SHEN J X, SUN X C, et al. Optimization of ultrasonic assisted extraction process and antioxidant activity analysis of flavonoids from *Paeonia lactiflora* seed coat[J]. China Food Additives, 2021, 32(2): 26−34.]
[24] 佘迪, 崔娅娟, 张俊丰, 等. 响应面优化金花葵根部黄酮提取工艺及抗氧化性研究[J]. 中国食品添加剂, 2020, 31(11): 1−9. [SHE D, CUI Y J, ZHANG J F, et al. Response surface methodology optimization of flavone extraction process and antioxidant activity in the root of Jinhua sunflower[J]. China Food Additives, 2020, 31(11): 1−9.]
[25] MUDASIR A, BISMA A, ASIR G, et al. Microencapsulation of saffron anthocyanins using *β* glucan and *β* cyclodextrin: Microcapsule characterization, release behaviour & antioxidant potential during *in vitro* digestion[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 109: 435−442.
[26] 李秀, 马利, 张圣卓, 等. 枸杞叶黄酮微胶囊的制备及其贮藏稳定性研究[J]. 中国食品添加剂, 2020, 31(6): 10−18. [LI X, MA L, ZHANG S Z, et al. Preparation and storage stability of *Lycium barbarum* leaf flavonoids microcapsules[J]. China Food Additives, 2020, 31(6): 10−18.]
[27] HANCOCK J D, SHARP J H. Method of comparing solid-state kinetic data and its application to the decomposition of kaolinite, brucite, and $BaCO_3$[J]. Journal of the American Ceramic Society, 1972, 55(2): 74−77.
[28] USHA R, POTHAKAMUR Y, GUSTAVO V, et al. Fundamental aspects of controlled release in foods[J]. Trends in Food Science & Technology, 1995(12): 394−406.
[29] NEOH T L, YOSHII H, FURUTA T. Encapsulation and release characteristics of carbon dioxide in alpha-cyclodextrin[J]. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 2006, 56(1-2): 125−133.
[30] RUKTANONCHAI U R, SRIINUANCHAI W, SAESOO S, et al. Encapsulation of citral isomers in extracted lemongrass oil with cyclodextrins: Molecular modeling and physicochemical characterizations[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2011, 75(12): 2340−2345.
[31] HAO Y, CHEN X W, JIN Y, et al. Optimization and characterization of 1,8-cineole/hydroxypropyl-*β*-cyclodextrin inclusion complex and study of its release kinetics[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 110: 106159.
[32] 黄珊, 刘嘉, 李贵华, 等. 壁材对方竹叶黄酮微胶囊结构及抗氧化性能的影响 [J/OL]. 食品工业科技: 1−12 [2021-07-28]. https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021020043. [HUANG S, LIU J, LI G H, et al. Effects of wall materials on the structure and antioxidant properties of bamboo leaf flavonoids microcapsules [J/OL]. Food Industry Science and Technology: 1−12 [2021-07-28]. https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021020043.]
[33] LYU Y, YANG F, LI X Y, et al. Formation of heat-resistant nanocapsules of jasmine essential oil via gelatin/gum arabic based complex coacervation[J]. Food Hydrocolloids, 2014, 35(1): 305−314.

［34］ 高传忠，刘成祥，寇兴然，等. 牡丹籽油微胶囊的释放动力学和氧化稳定性研究[J]. 中国油脂，2017，42(7)：40−44. ［GAO C Z, LIU C X, KOU X R, et al. Study on release kinetics and oxidation stability of peony seed oil microcapsules[J]. China Oil, 2017, 42(7): 40−44. ］

［35］ 孙亚利，周文美，黄永光，等. 以聚合乳清蛋白为壁材的苦荞黄酮微胶囊化及其品质分析[J]. 食品科学，2020，41(12)：259−266. ［SUN Y L, ZHOU W M, HUANG Y G, et al. Microencapsulation and quality analysis of tartary buckwheat flavonoids with polymerized whey protein as wall material[J]. Food Science, 2020, 41(12): 259−266. ］

［36］ NATTAPONG K, JOE M R, SUTHAT S, et al. Properties and kinetics of the *in vitro* release of anthocyanin-rich microcapsules produced through spray and freeze-drying complex coacervated double emulsions[J]. Food Chemistry, 2021, 340: 127950.

［37］ CHUN J Y, YOU S K, LEE M Y, et al. Characterization of beta-cyclodextrin self-aggregates for eugenol encapsulation[J]. International Journal of Food Engineering, 2021, 8(2): 17.

［38］ 史光宇. 青楷槭翅果油微波提取及多孔淀粉基缓释微胶囊制备工艺研究 [D]. 哈尔滨：东北林业大学，2021. ［SHI G Y. Study on microwave extraction of *Acer truncatum* Samara oil and preparation of porous starch based sustained-release microcapsules[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2021. ］

［39］ 常馨月，罗惟，陈程莉，等. 奇亚籽油微胶囊贮藏稳定性及缓释动力学[J]. 食品与发酵工业，2020，46(9)：108−114. ［CHANG X Y, LUO W, CHEN C L, et al. Storage stability and sustained release kinetics of Qiya seed oil microcapsules[J]. Food and Fermentation Industry, 2020, 46(9): 108−114. ］

［40］ REN X, YUE S, XIANG H, et al. Inclusion complexes of eucalyptus essential oil with *β*-cyclodextrin: Preparation, characterization and controlled release[J]. J Porous Mater, 2018, 25: 1577−1586.

［41］ DASH S, MURTHY P N, NATH L, et al. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems[J]. Acta Pol Pharm, 2010, 67(3): 217−223.

［42］ PAULO C, JOSE M S L. Modeling and comparison of dissolution profiles[J]. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2001, 13(2): 123−133.

高然, 苏赟, 陈俊德, 等. 硫酸软骨素螯合锌的制备、表征及体外生物活性 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 194−202. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080253

GAO Ran, SU Yun, CHEN Junde, et al. Preparation, Characterization and *in Vitro* Bioactivity of Chondroitin Sulfate Chelated Zinc[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 194−202. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080253

· 工艺技术 ·

硫酸软骨素螯合锌的制备、表征及体外生物活性

高　然[1], 苏　赟[2], 陈俊德[1,*], 郑美华[1]

（1.自然资源部第三海洋研究所, 自然资源部海洋生物资源开发利用工程技术创新中心, 福建厦门 361001;
2.集美大学水产学院, 福建厦门 361021）

摘　要: 本研究利用正交试验优化硫酸软骨素螯合锌制备工艺条件。选用硫酸软骨素与硫酸锌为原料，以锌螯合率为指标，通过单因素实验及正交试验考察 pH、反应时间、硫酸软骨素与七水合硫酸锌质量比、反应温度对锌螯合率的影响。采用紫外光谱分析、傅里叶红外光谱分析、扫描电镜分析、热重分析、X 射线衍射分析等方法对硫酸软骨素螯合锌进行结构表征。利用体外模拟胃肠消化吸收方法测定硫酸软骨素螯合锌中锌离子的生物利用率。结果表明：硫酸软骨素螯合锌的最佳制备工艺条件为 pH4，反应时间 1 h，硫酸软骨素与七水合硫酸锌质量比 1:1，反应温度 30 ℃，此条件下锌螯合率为（80.6%±1.31%）。紫外光谱分析结合红外光谱分析显示，锌离子与硫酸软骨素的羟基、羧基、磺酸基结合，形成硫酸软骨素螯合锌螯合物；扫描电镜分析及 X 射线衍射分析表明硫酸软骨素螯合锌的微观形貌为具有晶体结构的微颗粒；热重分析证明硫酸软骨素螯合锌的热稳定性优于硫酸软骨素。体外模拟消化吸收分析结果表明：硫酸软骨素螯合锌中锌离子在胃肠道中的溶解率与透过率均高于无机锌盐，硫酸软骨素螯合锌具有更好的生物利用率。该研究结果可为开发新型补锌剂提供研究思路和理论依据。

关键词: 硫酸软骨素, 锌, 螯合物, 工艺优化, 结构表征, 生物利用率

中图分类号: TS254.2　　**文献标识码:** B　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0194−09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080253

本文网刊:

Preparation, Characterization and *in Vitro* Bioactivity of Chondroitin Sulfate Chelated Zinc

GAO Ran[1], SU Yun[2], CHEN Junde[1,*], ZHENG Meihua[1]

（1.Technical Innovation Center for Utilization of Marine Biological Resources, Third Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resources, Xiamen 361001, China;
2.Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China）

Abstract: In this paper, the preparation process condition of chondroitin sulfate chelated zinc was optimized by orthogonal test. Chondroitin sulfate and zinc sulfate were selected as the raw materials, chelating rate of zinc as evaluation index, the effects of pH, reaction time, mass ratio of chondroitin sulfate to zinc sulfate heptahydrate, and reaction temperature on chelating rate of zinc were investigated by single factor test and orthogonal test. The structural characterization of chondroitin sulfate chelated zinc was analyzed by UV spectroscopy, fourier transform infrared spectroscopy, scanning electron microscopy, thermogravimetric and X-ray diffraction analysis. The bioavailability of zinc irons in chondroitin sulfate chelated zinc was determined by *in vitro* simulated gastrointestinal digestion and absorption. The results showed that optimal preparation conditions of chondroitin sulfate chelated zinc were as follows: pH4, reaction time was 1 h, mass ratio

收稿日期: 2021−08−25

基金项目: 海洋三所基本科研业务费（海三科 2019016）;“十三五”海洋经济创新发展区域示范项目（Bhsfs008-1）。

作者简介: 高然（1986−）, 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 海洋生物资源开发, E-mail: gaoranlovely@126.com。

*** 通信作者:** 陈俊德（1979−）, 男, 博士, 研究员, 研究方向: 海洋生物资源开发, E-mail: jdchen@tio.org.cn。

was 1∶1, and reaction temperature was 30 ℃. Under these conditions, chelating rate of zinc was (80.6%±1.31%). UV spectrum combined with Fourier infrared spectrum analysis showed that chondroitin sulfate chelated zinc was formed by zinc ions combine with hydroxyl, carboxyl, sulfonic groups in chondroitin sulfate. Scanning electron microscopy and X-ray diffraction analysis showed that the micromorphology of chondroitin sulfate chelated zinc was microparticles with crystal structure. Thermogravimetric analysis proved that thermal stability of chondroitin sulfate chelated zinc was better than that of chondroitin sulfate. *In vitro* simulated gastrointestinal digestion and absorption analysis showed that the bioavailability of chondroitin sulfate chelated zinc was better than that of inorganic zinc salt. The research results would provide theoretical basis and technical support for the development of new zinc supplements.

Key words: chondroitin sulfate; zinc; chelate; process optimization; structural characterization; bioavailability

锌是人体必需微量元素之一，以二价阳离子形式存在于皮肤、肌肉和骨骼中。锌作为人体抗氧化酶、DNA 聚合酶和其他基质金属蛋白酶等体内多种酶的主要组成成分和酶促因子，可人体调节碳水化合物、脂肪及蛋白质的代谢活动，对人体的维生素代谢、细胞免疫及生长发育等方面具有重要作用[1−2]。缺锌易引发人体多种生物学功能降低，如生长功能下降、免疫系统受损、内分泌系统失衡等[3−4]。目前，市面上常见的补锌剂多为硫酸锌和葡萄糖酸锌，此类产品以锌离子形式进入人体后，一方面胃酸的分泌影响锌离子的吸收，一方面在消化道中，锌离子几乎不能穿过肠道粘膜[5]，导致人体对锌离子的吸收率和利用度较低[6]。

硫酸软骨素（Chondroitin Sulfate, CS）是一种以蛋白聚糖形式存在的线性糖胺聚糖，分子结构中主要的活性基团为羧基和磺酸基团[7−9]，可与锌离子发生络合反应形成硫酸软骨素锌螯合物[10−12]。硫酸软骨素锌螯合物以有机结合态穿过小肠粘膜屏障，可有效降低游离锌离子对胃肠道粘膜的刺激[13]。当释放锌离子后，CS 配体还可继续发挥其生物活性。

市场上现有的以 CS 和锌为主要成分的补锌剂产品，只是将 CS 和无机锌盐进行简单混合，并没有形成真正意义上的硫酸软骨素锌配位化合物，无法避免胃肠环境对锌离子的干扰。本研究以硫酸软骨素和硫酸锌为原料，采用生物螯合技术，将游离锌离子以共价键形式结合到硫酸软骨素上，形成结构更稳定的硫酸软骨素螯合锌制品。硫酸软骨素螯合锌作为一种既可补充锌离子，同时又具有多种生物活性的新型多糖补锌剂，市场上未见相关产品。本论文采用正交试验法优化硫酸软骨素螯合锌的制备工艺，并分析其结构特征和体外消化吸收特性，为新型补锌剂的开发提供研究思路。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

鲨鱼源硫酸软骨素（含量 90%）　实验室自制；七水合硫酸锌、氢氧化钠　均为分析纯，国药集团化学试剂有限公司；浓硫酸、浓硝酸、浓盐酸、无水乙醇、溴化钾　均为分析纯，西陇科学股份有限公司；高氯酸　优级纯，天津政成化学制品有限公司；锌单元素标准液（1000 Ug/mL）　国家有色金属及电子材料分析测试中心；人工胃液（无菌）、人工肠液（无菌）　福州飞净生物科技有限公司；透析袋（3500 Da）　苏州达麦迪生物医学科技有限回公司。

Neofuge 15R 高速冷冻离心机　上海力申科学仪器有限公司；SG2 便携式 pH 计　梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司；DSHZ-300A 水浴恒温振荡器　苏州培英实验设备有限公司；LyoBeta 25 冷冻干燥机　泰事达机电设备（上海）有限公司；UV1780 紫外可见分光光度计、AA-6880 原子分光光度计　日本岛津仪器公司；Tensor27 &Tensor37 红外光谱仪　布鲁克光谱仪器公司；TGA2（SF）热重分析仪　梅特勒-托利多中国；Nano ZS90 Zeta 电位分析仪　英国马尔文仪器有限公司；PA Nalytical X 射线衍射仪　荷兰帕纳科公司。

1.2　实验方法

1.2.1　硫酸软骨素螯合锌的制备　将硫酸软骨素溶于 50 mL 蒸馏水中，调节螯合反应温度、pH，条件稳定后加入 5 g 七水合硫酸锌进行螯合，10000 r/min，4 ℃ 下离心 10 min 去除沉淀，取上清液。在 4 ℃ 条件下，向上清液中加入 3 倍体积的无水乙醇进行醇沉处理，醇沉时间为 2 h，取醇沉样将其冷冻干燥即得硫酸软骨素螯合锌样品[14]。

1.2.2　单因素实验

1.2.2.1　pH 对锌螯合率的影响　称取硫酸软骨素、七水合硫酸锌，使反应体系中七水合硫酸锌的质量分数为 10%，硫酸软骨素与七水合硫酸锌的质量比 1∶1，设定反应温度 50 ℃，调节 pH（3、4、5、6、7），反应时间 2 h，得硫酸软骨素螯合锌溶液，经乙醇醇沉、冷冻干燥，制得硫酸软骨素螯合锌固体样品，并测定样品锌螯合率。

1.2.2.2　反应时间对锌螯合率的影响　称取硫酸软骨素、七水合硫酸锌，使反应体系中七水合硫酸锌的质量分数 10%，硫酸软骨素与七水合硫酸锌的质量比 1∶1，设定反应温度 50 ℃，pH4，分别反应 0.5、1、2、4 和 6 h，得硫酸软骨素螯合锌溶液，经乙醇醇沉、冷冻干燥，制得硫酸软骨素螯合锌固体样品，测定样品锌螯合率。

1.2.2.3　硫酸软骨素与七水合硫酸锌质量比对锌螯合率的影响　称取硫酸软骨素、七水合硫酸锌，使反应体系中七水合硫酸锌的质量分数 10%，硫酸软骨

素(m_1)与七水合硫酸锌(m_2)的质量比分别为 0.1∶1、0.5∶1、1∶1、2∶1 和 5∶1，设定反应温度 50 ℃，pH4，反应时间 2 h，得硫酸软骨素螯合锌溶液，经乙醇醇沉、冷冻干燥，制得硫酸软骨素螯合锌固体样品，测定样品锌螯合率。

1.2.2.4 反应温度对锌螯合率的影响 称取硫酸软骨素、七水合硫酸锌，使反应体系中七水合硫酸锌的质量分数 10%，硫酸软骨素与七水合硫酸锌的质量比 1∶1，设定反应温度(20、30、40、50、60 ℃)，pH4，反应时间 2 h，得硫酸软骨素螯合锌溶液，经乙醇醇沉、冷冻干燥，制得硫酸软骨素螯合锌固体样品，测定样品锌螯合率。

1.2.3 正交试验 根据单因素实验结果，设定七水合硫酸锌质量分数 10%，选取 pH、反应时间(h)、硫酸软骨素与七水合硫酸锌的质量比(m_1∶m_2)、反应温度(℃)为试验考察因素，锌的螯合率为考察指标，设计 4 因素 3 水平 $L_9(3^4)$的正交试验确定硫酸软骨素螯合锌的最佳螯合工艺。试验因素及水平见表 1。

表 1 正交试验因素及水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment

水平	因素			
	A pH	B 反应时间(h)	C 硫酸软骨素与七水合硫酸锌质量比	D 反应温度(℃)
1	3	1	0.5∶1	20
2	4	2	1∶1	30
3	5	4	2∶1	40

1.2.4 锌螯合率的测定 参照 GB 5009.14-2017《食品中锌的测定》中火焰原子吸收法测定单因素实验及正交试验中硫酸软骨素螯合锌样品中锌的含量。按照公式(1)计算锌的螯合率。

$$X(\%)=\left(\frac{M}{M_0}\right)\times 100 \qquad 式（1）$$

式中：X 为锌螯合率(%)，M 为螯合物中锌的含量(g)，M_0 为反应体系中锌的总含量(g)。

1.2.5 硫酸软骨素螯合锌结构表征

1.2.5.1 紫外光谱分析 分别称取硫酸软骨素螯合锌冻干样品、硫酸软骨素样品和硫酸锌样品溶于蒸馏水中，配成 1 mg/mL 溶液，用紫外-可见光分光光度计在 200~600 nm 波长范围内进行紫外光谱扫描[15]。

1.2.5.2 红外光谱分析 采用溴化钾压片法，按照 1:100 比例分别将硫酸软骨素螯合锌冻干样品、硫酸软骨素样品和硫酸锌样品与溴化钾研磨均匀，制成半透明状薄片，溴化钾做测试对照，在 400~4000 cm^{-1} 范围内进行红外光谱扫描[16]。

1.2.5.3 扫描电镜分析 分别将硫酸软骨素螯合锌冻干样品和硫酸软骨素样品用导电胶粘结在铝制样品座上，放置于真空镀膜机内，样品表面喷金镀膜，在扫描电镜下观察样品微观形态并照相。放大倍数为 3000 倍和 24000 倍[16]。

1.2.5.4 热重分析 分别称取硫酸软骨素样品和硫酸软骨素螯合锌样品，温度由 30 ℃ 升至 600 ℃，以 10 ℃/min 的速率升温，在氮气通量为 50 mL/min 环境下进行热重分析。以温度为 X 轴，以质量损失率(某一温度下质量损失后样品的实测质量与样品总质量的比值)为 Y 轴，绘制热重变化曲线[17]。

1.2.5.5 X 射线衍射分析 将硫酸软骨素螯合锌样品、硫酸软骨素样品和硫酸锌样品分别用玛瑙研钵研至无颗粒感为佳，装入制样框，插入样品台，设置 CuKα 射线，在 5~80°衍射角度范围内进行连续扫描，确定结构信息[18]。

1.2.6 硫酸软骨素螯合锌生物利用率

1.2.6.1 体外模拟胃肠道消化吸收 模拟胃消化：分别取 10 mg/mL 的硫酸软骨素螯合锌和硫酸锌溶液，用 1 mol/L 盐酸调节溶液 pH 到 2，向溶液中加入 5 mL 模拟胃液，放置于 37 ℃ 水浴中振荡 2 h，反应结束后，将溶液置于 100 ℃ 水浴中 10 min 灭酶。模拟肠吸收：取胃消化液，用 0.1 mol/L 氢氧化钠调节 pH 到 7，向溶液中加入 5 mL 模拟肠液，将混合溶液装入透析袋中(3500 Da)，放置于 37 ℃ 水浴中震荡 2 h，反应结束后，将溶液置于 100 ℃ 水浴中 10 min 灭酶[19]。

1.2.6.2 锌离子溶解率的测定 分别测定模拟胃消化溶液和模拟肠吸收溶液中锌离子的溶解率。取两种溶液 10000 r/min 离心 10 min，采用 1.2.4 中锌含量测定方法，分别测定上清液中锌离子的含量和溶液中总锌离子的含量。按照公式(2)计算锌离子溶解率。

$$锌离子溶解率(\%)=\left(\frac{C_1}{C_2}\right)\times 100 \qquad 式（2）$$

式中：C_1 为上清液中锌离子的浓度(mg/mL)，C_2 为溶液中锌离子的浓度(mg/mL)。

1.2.6.3 锌离子透过率的测定 测定模拟肠吸收溶液中锌离子的透过率。模拟膜吸收结束后，分别测定透析袋外的溶液中锌离子的含量和溶液中总锌离子的含量。按照公式(3)计算锌离子透过率。

$$锌离子透过率(\%)=\left(\frac{C_1}{C_2}\right)\times 100 \qquad 式（3）$$

式中：C_1 为透析袋外锌离子的浓度(mg/mL)，C_2 为溶液中锌离子的浓度(mg/mL)。

1.3 数据处理

文中单因素实验数据及正交试验数据均进行三次平行实验(n=3)，取平均值 $\overline{X}$，数据表示为 $\overline{X}\pm S$(S：标准差)。采用 SPSS 软件进行方差分析(ANOVA)，不同字母代表差异显著($P<0.05$)，用 Origin 9.1 软件完成作图。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 pH 对锌螯合率的影响 由图 1 可知，随着 pH 增大，锌螯合率先上升后下降，pH4 时锌螯合率

最高(78.68%±1.04%)。pH 小于 4 时，体系中存在大量氢离子，氢离子与锌离子争夺供电基团[20]，不利于螯合反应进行；pH 大于 4 时，锌离子的螯合能力减弱，优先与体系中的氢氧根离子形成氢氧化锌沉淀，使得锌离子不能充分与硫酸软骨素进行螯合反应[21]。测定硫酸软骨素螯合锌在不同 pH 时的电位值，pH3(ζ=20.5 mV)>pH4(ζ=15.8 mV)>pH5(ζ=−7.3 mV)>pH6(ζ=−16.7 mV)>pH7(ζ=−23.6 mV)，推测螯合物的等电点(PI)[22] 位于 4 附近，此时，锌离子与硫酸软骨素形成螯合物后更有利于聚集反应发生。因此，在后续实验中选择反应 pH 为 4。

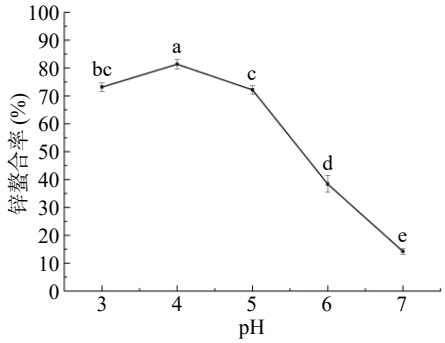


图 1　pH 对锌螯合率的影响

Fig.1　Effect of pH on the chelation rate of zinc

注：不同字母表示差异显著(P<0.05)；图 2~图 4，图 10 同。

2.1.2　反应时间对锌螯合率的影响　由图 2 可知，在 0.5~2 h 范围，随着反应时间增加，硫酸软骨素与锌离子的结合更为充分，锌螯合率显著上升(P<0.05)，反应时间为 2 h 时，锌螯合率达到最高(71.39%±0.81%)，当反应时间继续增加时，锌螯合率呈现下降态势。其主要原因是，在酸性的反应体系中，若反应时间过长，反应体系稳定性降低，极易引起螯合物中的糖苷结构断裂[23] 或硫酸基水解[24]，影响螯合物的结构稳定性，导致锌螯合率降低[25−26]。因此，在后续实验中选择反应时间为 2 h。

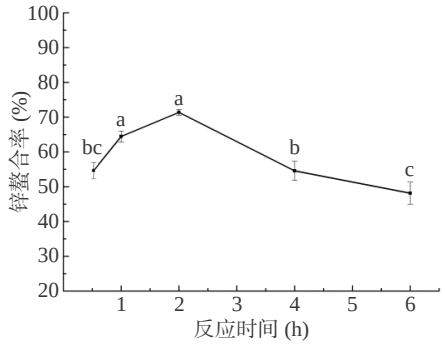


图 2　反应时间对锌螯合率的影响

Fig.2　Effect of reaction time on the chelation rate of zinc

2.1.3　硫酸软骨素与七水合硫酸锌质量比对锌螯合率的影响　由图 3 可知，硫酸软骨素与七水合硫酸锌质量比在 0.1∶1~1∶1 范围内时，锌螯合率呈现增大趋势，在比值为 1∶1 时，锌螯合率最高(78.73%±1.55%)，在比值大于 1∶1 时，锌螯合率呈现下降趋势。增加硫酸软骨素在体系中的占比，可以增加反应物的接触几率，更易形成环状螯合结构，提高螯合率，但硫酸软骨素与锌离子结合的位点有限[27]，加入过多硫酸软骨素不仅使螯合液过于黏稠，不利于反应进行，同时也会影响螯合物形成环状结构，降低螯合率[28]。在质量比为 1∶1 时，与锌离子作用的硫酸软骨素结合位点达到饱和状态。因此，在后续实验中选择硫酸软骨素与七水合硫酸锌质量比为 1∶1。

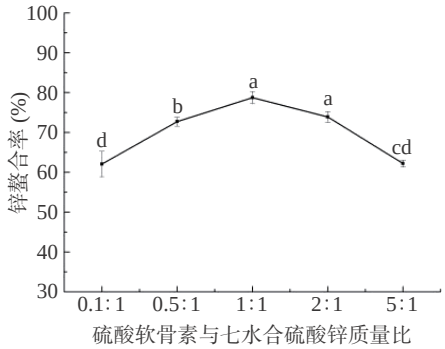


图 3　质量比对锌螯合率的影响

Fig.3　Effect of mass ratio on the chelation rate of zinc

2.1.4　反应温度对锌螯合率的影响　由图 4 可知，反应温度对锌螯合率的影响较为显著。锌螯合率随着反应温度的升高呈现先升后降的趋势。反应体系在较低温度范围(20~30 ℃)时，锌螯合率呈现升高态势。其主要原因可能是，从动力学角度分析，升高温度有利于分子间运动，增加硫酸软骨素与锌离子的结合几率，有利于螯合反应的进行[29]。从空间结构角度讲，在相对适宜的温度范围内，糖链结构较为舒展，与锌离子的结合位点暴露的较多[30]。反应温度为 30 ℃时，锌螯合率最高(75.74%±3.71%)。由于螯合反应为放热反应，当反应温度继续升高时，阻碍了螯合反应的进行。同时温度过高，致使硫酸软骨素结构稳定性变差，分子间易发生聚团现象，导致与锌离子的结合位点减少[31]，锌螯合率降低。因此，在后续实验中选择反应温度为 30 ℃。

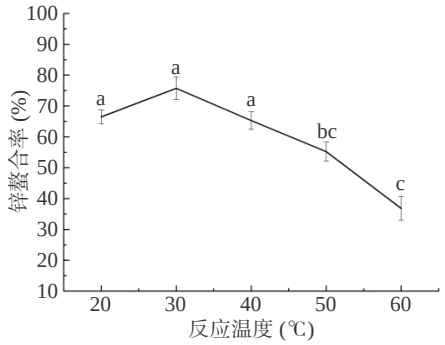


图 4　反应温度对锌螯合率的影响

Fig.4　Effect of reaction temperature on the chelation rate of zinc

2.2　正交试验设计

正交试验结果和方差分析结果如表 2 和表 3 所示。由表 2 可知，4 因素对锌螯合率的影响大小的顺

序依次为 C>D>A>B, 即硫酸软骨素与七水合硫酸锌质量比影响最大, 其次是反应温度, pH 次之, 反应时间的影响最小[32]。通过比较各因素的均值大小确定最佳反应组合 $A_2B_1C_2D_2$, 即 pH4, 反应时间 1 h, 硫酸软骨素与七水合硫酸锌质量比 1∶1, 反应温度 30 ℃。由表 3 可知, 4 因素中质量比对锌螯合率的影响显著(P<0.05), 而 pH、时间及温度对锌螯合率的影响不显著(P>0.05)。选取正交试验最佳工艺 $A_2B_1C_2D_2$, 在此实验条件下开展验证实验, 所得锌螯合率为(80.6%±1.31%), 优于所有正交试验及单因素实验结果, 验证实验成功。

表 2 正交实验设计及结果

Table 2 Orthogonal design and results

试验号	因素				锌螯合率(%)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	65.99±2.43
2	1	2	2	2	75.99±0.95
3	1	3	3	3	54.75±1.21
4	2	1	2	3	73.66±0.55
5	2	2	3	1	64.10±1.59
6	2	3	1	2	72.13±2.02
7	3	1	3	2	70.17±3.01
8	3	2	1	3	64.35±1.66
9	3	3	2	1	75.33±1.95
k_1	65.58	69.94	67.49	68.47	
k_2	69.96	68.15	74.99	72.76	
k_3	69.95	67.40	63.01	64.25	
极差(R)	4.39	2.54	11.99	8.51	
最佳反应组合: $A_2B_1C_2D_2$					

表 3 正交试验方差分析结果

Table 3 Orthogonal test results of variance analysis

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	显著性
A	38.369	2	19.184	0.407	
B	10.203	2	5.101	0.108	
C	220.080	2	110.04	2.333	*
D	108.633	2	54.316	1.152	
误差	377.28	8			

注: “*”表示差异显著(P<0.05)。

2.3 硫酸软骨素螯合锌结构表征

2.3.1 紫外光谱分析 如图 5 所示, 硫酸软骨素的最强吸收峰在 204 nm, 该峰为多糖的特征吸收峰, 是多糖中的发色基团发生电子跃迁引起[33], 硫酸软骨素螯合锌的多糖特征吸收峰出现在 212 nm。吸收峰蓝移是由于锌离子结合在氧原子和氮原子上导致了 n→π* 跃迁[34]。同时, 硫酸软骨素在 255 nm 处出现一弱吸收峰, 与锌离子螯合之后, 吸收峰蓝移至 260 nm。这是锌离子与多糖分子中的发色基团结合后, 基团偏振的结果[35]。此外, 硫酸软骨素螯合锌的吸光度明显强于硫酸软骨素, 原因可能是锌离子结合后导致的电荷转移[36]。硫酸锌在 200~600 nm 近紫外-可见光区未显示特征吸收。紫外光谱表明锌离子与硫酸软骨素结合形成了螯合物, 吸收峰的蓝移及强度变化表明

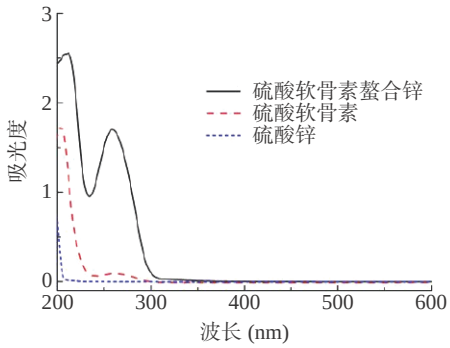


图 5 硫酸软骨素螯合锌及硫酸软骨素和硫酸锌的紫外光谱图

Fig.5 UV spectra of chondroitin sulfate chelated zinc, chondroitin sulfate and zinc sulfate

发色基团与锌离子螯合过程中发生了极化变化。

2.3.2 红外光谱分析 为进一步研究分子结构的变化, 采用红外光谱研究了分子振动和不同原子间的极性键, 如图 6 所示。硫酸软骨素螯合锌的红外光谱在参数和形状上与硫酸软骨素类似。3591.08 cm^{-1} 处为硫酸软骨素羟基的伸缩振动峰, 与锌螯合后, 该峰红移至 3556.30 cm^{-1}, 这是由于感应效应或偶极场效应改变了羟基的电子云密度[37], 与 Wang 等[38] 的报道一致。1658.35 和 1425.74 cm^{-1} 处为硫酸软骨素羧基中羰基的特征伸缩振动峰, 与锌螯合后, 该峰分别红移至 1647.04 和 1418.18 cm^{-1}, 说明羧基参与了螯合物的形成[39]; 1256.78 和 1043.61 cm^{-1} 处为硫酸软骨素磺酸基的非对称拉伸振动峰和对称拉伸振动峰, 与锌螯合后, 该峰分别移动至 1239.53 和 1114.16 cm^{-1}, 说明磺酸基参与了螯合反应[40]。硫酸软骨素螯合锌图谱的指纹区 617.02 cm^{-1} 处有一弱吸收峰, 推测为 Zn-O 的弯曲振动峰。红外光谱结果表明, 锌离子与硫酸软骨素成功配位, 这种吸收峰的位移和强度变化, 可能是 Zn-O 键形成和配合物物理吸附的结果[41]。

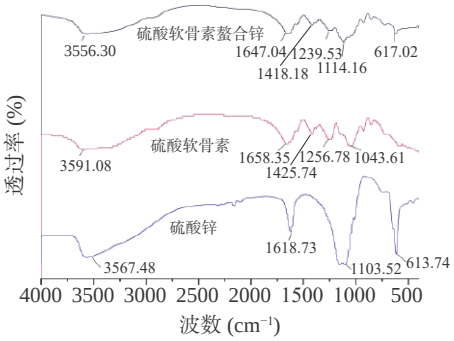
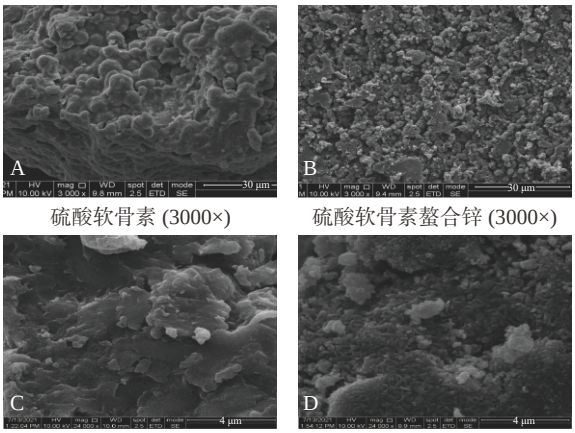


图 6 硫酸软骨素螯合锌及硫酸软骨素和硫酸锌的红外光谱图

Fig.6 FTIR spectra of chondroitin sulfate chelated zinc, chondroitin sulfate and zinc sulfate

2.3.3 扫描电镜分析 采用扫描电镜观察硫酸软骨素及硫酸软骨素螯合锌的微观形貌结构差异, 如图 7 所示。放大 3000 倍可以看到, 如图 7A、图 7B 所

示。二者都为不规则颗粒体，硫酸软骨素表面光滑，呈现层状结构；硫酸软骨素螯合锌表面较粗糙，呈现颗粒的凹凸状态。放大 24000 倍可看到，如图 7C、图 7D 所示。硫酸软骨素的结构松散，有许多不规则尺寸空腔，与报道的多糖表面形态一致[42]；硫酸软骨素螯合锌则呈现颗粒状的紧密结构，主要原因可能是锌与硫酸软骨素之间形成配位键改变了内部结构，导致结构致密[43]。由此推测，硫酸软骨素螯合锌与硫酸软骨素的形貌区别是由于锌离子与硫酸软骨素发生了螯合反应，形成了硫酸软骨素螯合锌的微颗粒导致的。



硫酸软骨素 (3000×)　硫酸软骨素螯合锌 (3000×)

硫酸软骨素 (24000×)　硫酸软骨素螯合锌 (24000×)

图 7　硫酸软骨素螯合锌及硫酸软骨素的扫描电镜图

Fig.7　SEM spectra of chondroitin sulfate chelated zinc and chondroitin sulfate

2.3.4　热重分析　利用热重分析法分析热稳定性差异，如图 8A、图 8B 所示。根据热重分析的结果，硫酸软骨素及硫酸软骨素螯合锌的失重均分为三个阶段。第一阶段 30~150 ℃，质量损失是失水所致。硫酸软骨素质量损失率 15.39%；相比之下，硫酸软骨素螯合锌质量损失率 18.69%，说明硫酸软骨素螯合锌分子中的结晶水散失率大于硫酸软骨素。第二阶段 150~300 ℃，主要是由样品化学键和基本结构的热降解[44]引发的。此阶段，硫酸软骨素质量损失率 29.55%；相比之下，硫酸软骨素螯合锌质量损失率 18.26%，原因可能是硫酸软骨素与锌离子形成了配位键，破坏化学键需要更多能量[45]。第三阶段 300~600 ℃，硫酸软骨素质量损失率 15.59%，推测是多糖已经碳化，从而导致失重缓慢[46]；相比之下，硫酸软骨素螯合锌质量损失率 20.68%，并在 504.17 ℃ 时失重迅速，可能是由于硫酸软骨素螯合锌出现结晶度，熔点向更高温度移动[47]。以上结果表明，硫酸软骨素和硫酸软骨素螯合锌的热力学性能有很大不同，与硫酸软骨素相比，硫酸软骨素螯合锌是一种更稳定的物质，这与 Zhang 等[48]对多糖锌螯合物的热稳定性研究结果一致。

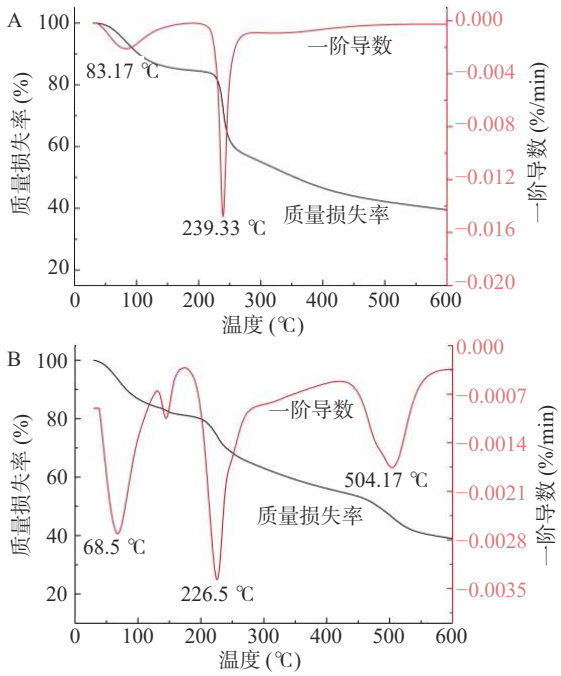


图 8　硫酸软骨素(A)及硫酸软骨素螯合锌(B)的热重曲线图

Fig.8　Thermogravimetric curve of chondroitin sulfate(A) and chondroitin sulfate chelated zinc(B)

2.3.5　X 射线衍射分析　通过 X 射线衍射分析反映物质的晶体结构信息，如图 9 所示。硫酸锌有明显的结晶衍射峰，分别在 17.92°、20.22°、22.09°等三处有强衍射峰，并且出现多个小峰。硫酸软骨素为非晶态结构，不具有周期性结构，只能观察到衍射值最大所对应的漫反射区[49]，呈现“馒头”状。硫酸软骨素螯合锌与硫酸软骨素有着显著差别，在“馒头”峰区域 19.56°、27.11°等两处出现明显的尖峰，说明硫酸软骨素与锌螯合后，在空间结构上产生新的相互作用力，形成了有序晶体结构[39]。硫酸软骨素螯合锌并不包含硫酸锌的特征衍射峰，说明锌与硫酸软骨素螯合后广泛分布于糖链中。

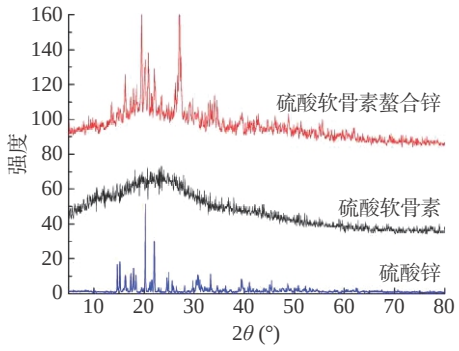


图 9　硫酸软骨素、硫酸锌及硫酸软骨素螯合锌的 X 射线衍射图

Fig.9　X-ray diffraction pattern of chondroitin sulfate, zinc sulfate and chondroitin sulfate chelated zinc

2.4　硫酸软骨素螯合锌生物利用率分析

以硫酸锌作为参照，评价硫酸软骨素螯合锌在胃肠道环境中的生物利用率，如图 10 所示。硫酸软骨素螯合锌和硫酸锌在胃消化阶段的锌溶解率分别为(94.86%±1.02%)、(91.53%±0.87%)。当转移至肠

消化阶段时，二者的锌溶解率分别为（63.01%±2.56%）、（39.83%±1.41%），锌透过率分别为（33.86%±1.68%）、（16.39%±2.42%）。在胃消化阶段，酸性环境有利于锌离子的释放和溶解[50]，硫酸软骨素螯合锌和硫酸锌均有较好的溶解性。在肠消化阶段，硫酸锌的锌溶解率及锌透过率均不及硫酸软骨素螯合锌，这是由于在肠液较高的 pH 环境中，硫酸锌易形成不溶性的锌化合物[51]，而肠道无法吸收。硫酸软骨素螯合锌因其较稳定的配位键，在胃肠环境中的溶解性和稳定性比硫酸锌有明显优势，并能以螯合物分子的形式透过肠道屏障[13]，比硫酸锌更易被胃肠消化吸收，生物利用率更高，与 Yonekura 等[52] 研究壳聚糖可提高体内锌生物利用度的结果一致。

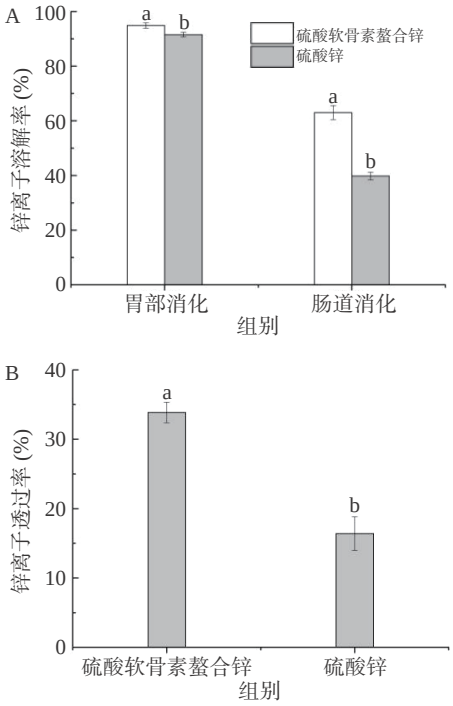


图 10 体外模拟实验中硫酸软骨素螯合锌与硫酸锌的生物利用率

Fig.10 Comparison of bioavailability between chondroitin sulfate chelated zinc and zinc sulfate *in vitro* simulation experiment

注：A：溶解率比较；B：透过率比较；不同小写字母表示同组别内不同指标差异显著（$P<0.05$）。

3 结论

本研究以硫酸软骨素和硫酸锌为原料，利用螯合反应制备了一种新型补锌剂硫酸软骨素螯合锌。通过单因素实验及正交试验确定硫酸软骨素螯合锌的最佳制备条件为：pH4，反应时间 1 h，硫酸软骨素与七水合硫酸锌质量比 1∶1，反应温度 30 ℃，此条件下锌螯合率为 80.6%±1.31%，硫酸软骨素表现出良好的锌螯合能力。紫外光谱证实锌离子可以有效地与硫酸软骨素结合，红外光谱进一步证明锌离子与硫酸软骨素螯合形成了 Zn-O，螯合位点为羟基氧、羧基氧、磺酸基氧。扫描电镜、热重分析及 X 射线衍射分析结果表明，与锌离子螯合，导致硫酸软骨素的结构发生变化，形成了更为稳定的晶体结构和微颗粒的聚集。体外模拟消化吸收实验证明，硫酸软骨素螯合锌在胃肠中的溶解率与透过率均优于硫酸锌，具有良好的生物利用率。硫酸软骨素与锌离子的有效结合，不仅保留了硫酸软骨素所具有的生物学功能，又有补锌功效，有望开发成一种具有多种保健功能的生物多糖型补锌剂。

参考文献

[1] 陈莉，温天莲，彭惠. 锌元素的生物学作用及其临床应用[J]. 中国临床康复，2004(6)：1056. [CHEN L, WEN T L, PENG H. Biological function and clinical application of zinc[J]. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation, 2004(6): 1056.]

[2] 郑英敏，袁杨，苏东晓，等. 大豆多肽-锌螯合物的制备工艺优化及其结构表征[J]. 食品工业科技，2020，41(14)：160−165. [ZHENG Y M, YUAN Y, SU D X, et al. Preparation process optimization of soy peptides-zinc chelate and its structural characterization[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(14): 160−165.]

[3] KOGN S, SOOD A, GARNICK M S. Zinc and wound healing: A review of zinc physiology and clinical applications[J]. Wounds:A Compendium of Clinical Research and Practice, 2017, 29(4): 102−106.

[4] CHEN G, TANG Z, QIAO L, et al. Effects of zinc-bearing clinoptilolite on growth performance, antioxidant function and genes expression of broiler chickens[J]. Journal of the Chinese Cereals and Olis Association, 2015, 30(2): 74−79.

[5] SANDETEAD H H. Zinc: Growth, development, and function[J]. The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine, 2000(13): 41−49.

[6] HUANG T C, CHANG W T, HU Y C, et al. Zinc protects articular chondrocytes through changes in nrf2-mediated antioxidants, cytokines and matrix metalloproteinases[J]. Nutrients, 2018, 10(4): 471.

[7] 李晨，陈复生，布冠好. 肽锌螯合物研究进展[J]. 食品工业，2020，41(2)：217−220. [LI C, CHEN F S, BU G H. Research progress of zinc-chelating peptide[J]. The Food Industry, 2020, 41(2): 217−220.]

[8] WANG T, ZHANG S L, REN S Y, et al. Structural characterization and proliferation activity of chondroitin sulfate from the sturgeon *Acipenser schrenckii*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020(164): 3005−3011.

[9] SENRA L E, BEIROA C P, ÁIVAREZ L M, et al. Impact of prevalence ratios of chondroitin sulfate (cs)-4 and-6 isomers derived from marine sources in cell proliferation and chondrogenic differentiation processes[J]. Marine Drugs, 2020, 18(2): 94−108.

[10] TANG Y, CUI Y D, AGOSTINI A D, et al. Biological mechanisms of glycanand glycosaminoglycan-based nutraceuticals[J]. Progress in Molecular Biology and Translational Science, 2019(163): 445−469.

[11] VASCONCELOS A A, POMIN V H. The sea as a rich source of structurally unique glycosaminoglycans and mimetics[J]. Microorganisms, 2017, 5(3): 51−69.

[12] TAWFIK S M, HEFNI H H. Synthesis and oantimicrobial

activity of polysaccharide alginate derived cationic suractant-metal(II) complexs[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016(82): 562−572.

[13] OLLIG J, KLOUBERT V, HAASE H, et al. Parament influencing zinc in experimental systems *in vivo* and *in vitro*[J]. Metals, 2016, 6(3): 71.

[14] RAJAEE E, MOWLA K, GHORBANI A. The relationship between serum zinc levels and rheumatoid arthritis activity[J]. Frontiers in Biology, 2018, 13(1): 51−55.

[15] 胡爱军, 李杨, 郑捷, 等. 鹰嘴豆非淀粉多糖的分离纯化及结构表征[J]. 食品科学, 2019, 40(8): 22−26. [HU A J, LI Y, ZHENG J, et al. Separation, purification and structural analysis of non-starch polysaccharides from chickpea seeds[J]. Food Science, 2019, 40(8): 22−26.]

[16] 高然, 陈俊德, 李剑瑛, 等. 鱿鱼黑色素没法制备工艺及理化特征分析[J]. 食品工业科技, 2019, 40(18): 14−24,27. [GAO R, CHEN J D, LI J Y, et al. Optimization of enzymolysis preparation process and physicochemical properties of squid melanin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(18): 14−24, 27.]

[17] 韦志, 阮心眉, 戴涛涛, 等. 碱提砂仁多糖的结构表征及其抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(24): 87−93. [WEI Z, RUAN X M, DAI T T, et al. Study on structure characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Amomum villosum* extracted with alkaline solution[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(24): 87−93.]

[18] 赵姝雯. 金针菇锌多糖的制备、结构分析及其生物活性研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2016. [ZHAO S W. Preparation, characterization, antioxidant and antiinflammatory effect of the chelate of flammulina velutipes polysaccharide with Zn[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2016.]

[19] 杨雪. 枸杞多糖纳米硒体外消化吸收特性及抗疲劳活性研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2021. [YANG X. Study on simulated digestion and absorption *in vitro* and anti-fatigue activity of selenium nanopariticles stabilized by *Lycium barbarum* polysaccharide[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2021.]

[20] LIN J P, CAI X X, TANG M R, et al. Preparation and evaluation of the chelating nanocomposite fabricated with marine algae *Schizochytrium* sp. protein hydrolysate and calcium[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2015, 63(44): 9704−9714.

[21] ZHANG Z R, ZHOU F B, LIU X L, et al. Particulate nanocomposite from oyster (*Crassoatrea rivularis*) hydrolysate via zinc chelation improves zinc solubilitty and peptide activity[J]. Food Chemistry, 2018, 258: 269−277.

[22] DING Z Y, KANG L, LIU J F, et al. Preparation of pH-responsive metal chelate affinity polymer for adsorption and desorption of insulin[J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2017, 92(7): 1590−1595.

[23] 史敏娟, 熊双丽, 王莹莹, 等. 低分子量质量硫酸软骨素的制备及其性质[J]. 精细化工, 2012, 29(11): 1087−1092. [SHI M J, XIONG S L, WANG Y Y, et al. Preparation and properties of low molecular weight chondroitin sulfate[J]. Fine Chemicals, 2012, 29(11): 1087−1092.]

[24] 张莲, 王金鹏, 孔子青, 等. 硫酸软骨素的降解及其降解产物抗氧化活性的测定[J]. 食品工业科技, 2011(12): 180−183. [ZHANG L, WANG J P, KONG Z Q, et al. Degradation of chondroitin sulfate and antioxidation of its degraded products[J]. Science and Technology of Food Industry, 2011(12): 180−183.]

[25] 陈义勇, 张阳. 杏鲍菇多糖羧甲基化修饰工艺及其抗氧化活性 [J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(7): 119-127. [CHEN Y Y, ZHANG Y. Carboxymethylation and antioxidant activities of *Pleyrotus eryngii* polysaccharide[J]. Food and Fermentation Industries, 2016, 42(7): 119-127.]

[26] XU B, DAI Y, HONG J, et al. Optimization of chelating process of polysaccharides of *Lyophyllum decastes* with zinc and its antioxidant activity[J]. Current Research in Biotechnology, 2020(9): 26−34.

[27] 唐顺博. 鱼鳞胶原肽亚铁螯合物的制备及性质研究 [D]. 南昌: 江西师范大学, 2020. [TANG S B. Preparation and properties of ferrous chelate of fish scale collagen peptide[D]. Nanchang: Jiangxi Normal University, 2020.]

[28] HE H, AN F P, TENG H, et al. Preparation and characterisation of a novel agar oliosaccharide-iron(Ⅲ) complex[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2018, 54(1): 1−13.

[29] ZHANG Y J, DING X J, LI M Q. Preparation, characterization and *in vitro* stability of iron-chelating peptides from mung beans[J]. Food Chemistry, 2021(349): 1−8.

[30] 崔洁芬, 杜春影, 迟永洲, 等. 浒苔多糖铁的制备工艺优化及其结构表征[J]. 食品工业科技, 2018, 39(5): 161−170. [CUI J F, DU C Y, CHI Y Z, et al. Optimization of preparation process of *Entermorpha prolifera* polysaccharide-iron and its structure characterization[J]. Science and Technology of Food Indystry, 2018, 39(5): 161−170.]

[31] 李晨, 陈复生, 布冠好. 正交试验优化花生肽螯合锌的制备工艺[J]. 粮食与油脂, 2020, 33(4): 71−74. [LI C, CHEN F S, BU G H. Optimization of preparation process of peanut peptide chelated zinc by orthogonal tests[J]. Cereals & Oils, 2020, 33(4): 71−74.]

[32] 唐秋实, 杨雅兰, 刘学铭, 等. 金针菇多糖螯合钙的制备工艺研究 [J]. 食品科技, 2019, 44(1): 160−165. [TANG Q S, YANG Y L, LIU X M, et al. Preparation of the *Flammulina velutipes* polysaccharides chelated with calcium[J]. Food Science and Technology, 2019, 44(1): 160−165.]

[33] ZHANG M, ZHAO H, SHEN Y, et al. Preparation, characterizaton and antioxidant activity evaluation *in vitro* of *Fritillaria usseriensis* polysaccharide-zinc conplex[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020(146): 462−474.

[34] FU T, ZHANG S, SHENG Y N, et al. Isolation and characterization of zinc-binding peptides from mung bean protein hydrolasates[J]. European Food Research and Technology, 2020(246): 113−124.

[35] CAI X X, LIN J P, WANG S Y. Novel peptide with specific calcium-binding capacity from *Schizochytrium* sp. protein hydrolysates and calcium bioavailability in Caco-2ells[J]. Marine Drugs, 2017, 15(1): 3.

[36] WANG R C, HE S H, XUAN Y F, et al. Preparation and characterization of whey protein hydrolasate-zn complexes[J].

Journal of Food Measurement and Characterization, 2020(14): 254−261.

[37] ZHU K X, WANG X P, GUO X N. Isolation and characterization of zinc-chelating peptides from wheat germ protein hydrolysates[J]. Journal of Functional Foods, 2015(12): 23−32.

[38] WANG P P, HUANG Q, CHEN C, et al. The chemical structure and biological activities of a novel polysaccharide obtained from *Fructus Mori* and its zinc derivative[J]. Journal of Functinal Foods, 2019(54): 64−73.

[39] WANG L, DING Y Y, ZHANG X X, et al. Isolation of a novel calcium-binding peptide from wheat germ protein hydrolysates and the prediction for its mechanism of combination[J]. Food Chemistry, 2018(239): 416−426.

[40] 李思敬. 硫酸软骨素镁的合成及其抗骨关炎作用的研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2020. [LI S J. Synthesis of chondroitin sulfate magnesium and its anti-osteoarthritis effects[D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2020.]

[41] MENG K K, CHEN L, XIA G H, et al. Effects of zinc sulfate and zinc lactate on the properties of tilapia (*Oreochromis Niloticus*) skin collagen peptide chelate zinc[J]. Food Chemistry, 2021(347): 129043.

[42] LIAO W Z, LU Y J, FU J N, et al. Preparation and characterization of *Dictyophora indusiata* polysaccharide-zinc complex and its augmented antiproliferative activity on human cancer cells[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(29): 6525−6534.

[43] WANG L, LI X Y. Preparation, physicochemical property and *in vitro* antioxidant activity of zinc-*Hohenbuehelia* serotina polysaccharides complex[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019(121): 862−869.

[44] WANG X Q, ZHANG Z, XU H Y, et al. Preparation of sheep bone collagen peptide-calcium chelate using enzymolysis-fermentation methodology and its structural characterization and stability analysis[J]. Royal Scoety of Chemistry Advances, 2020(10): 11624−11633.

[45] 景永帅, 张瑞娟, 吴兰芳, 等. 北沙参多糖铁配合物的制备、结构特征及生物活性[J]. 食品科学, 2018, 39(24): 65−70. [JING Y S, ZHANG R J, WU L F, et al. Preparation, structural characteristics and bioactivity of polysacchride-iron complex from *Radix glehniae*[J]. Food Science, 2018, 39(24): 65−70.]

[46] ZHANG H R, ZHAO L Y, SHEN Q S, et al. Preparation of cattle collagen peptides-calcium chelate and its structural characterization and stability[J]. LWT Food and Technology, 2021, 144(12): 111264.

[47] ABDELMEGEED A I. Biofabrication and structural characterization of cd-nanoparticles using *Morings oleifera* extract[J]. Journal of Electronic Materials, 2020, 49(4): 3417−3426.

[48] ZHANG Y, KHAN M Z H, YUAN T T, et al. Preparation and characterization of *D. opposita* thunb polysaccharide-zinc inclusion complex and evaluation of anti-diabetic activities[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019(121): 1029−1036.

[49] ZHAO S W, LI B, CHEN G T, et al. Preparation, characterization, and anti-inflammatory effect of the chelate of *Flammulina velutipes* polysaccharide with Zn[J]. Food and Agricultural Immunology, 2017, 28(1): 162−177.

[50] CHENG C, HUANG D C, ZHAO L Y, et al. Preparation and *in vitro* absorption studies of a novel polysaccharide-iron (Ⅲ) complex from *Flammulina velutipes*[J]. International Jouanal of Biological Macromolecules, 2019(132): 801−810.

[51] WANG L L, WANG L L, SU C Y, et al. Characterization and degestion features of a novel polysaccharide-Fe (Ⅲ) complex as an iron supplement[J]. Carbohydate Polymers, 2020, 249(41): 116812.

[52] YONEKURA L, SUZUKI H. Some polysaccharides improve zinc bioavailability in rats fed a phytic acid-containing diet[J]. Nutrition Research, 2003, 23(3): 343−355.

刘赵, 顾佳丽, 钱程, 等. 基于模糊数学感官和响应面法研制豆渣麻花及品质分析 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 203−211. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090071

LIU Zhao, GU Jiali, QIAN Cheng, et al. Development and Quality Analysis of Okara Fried Dough Twist Based on Fuzzy Mathematics Sensory and Response Surface Methodology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 203−211. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090071

· 工艺技术 ·

基于模糊数学感官和响应面法研制豆渣麻花及品质分析

刘　赵, 顾佳丽, 钱　程, 施林懿, 曹仲文*
（扬州大学旅游烹饪学院, 江苏扬州 225127）

摘　要: 本文以豆渣粉和中筋粉为主要原料，辅以泡打粉、植物油、蔗糖、全蛋液进行豆渣麻花的研制。在单因素实验的基础上，利用模糊数学感官评价法和响应面优化法对影响豆渣麻花感官品质的蔗糖添加量、植物油添加量、豆渣粉添加量进行优化，并对最后成品的营养成分、理化指标和微生物指标进行相关测定。豆渣麻花的最佳工艺配方为：豆渣粉添加量 14%（豆渣在复合粉中的占比）、蔗糖添加量为 24%、植物油添加量为 8%、泡打粉添加量为 1.2%、全蛋液添加量为 44%（以中筋粉和豆渣粉所组成的复合粉总质量 100 g 计）。使用此配方制成的豆渣麻花蛋白质含量为（12.4%±0.8%）、脂肪含量为（25.5%±2.2%）、膳食纤维含量为（4.31%±0.38%）、模糊感官综合评分（89.73±0.35）。质构特性测定结果为：硬度（40.98±5.7）N、破裂力（32.38±8.13）N、咀嚼性（0.47±0.12）。结果表明最优配方制成的豆渣麻花不仅色香味形质俱佳，而且蛋白质和膳食纤维含量丰富。

关键词: 豆渣, 麻花, 模糊数学感官评价法, 响应面法, 品质分析
中图分类号: TS213.2　　**文献标识码:** B　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0203−09
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090071
本文网刊:

Development and Quality Analysis of Okara Fried Dough Twist Based on Fuzzy Mathematics Sensory and Response Surface Methodology

LIU Zhao, GU Jiali, QIAN Cheng, SHI Linyi, CAO Zhongwen *
（College of Tourism and Cooking, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China）

Abstract: In this paper, soybean dregs powder and all-purpose flour were used as the main raw materials, supplemented with baking powder, vegetable oil, sucrose, and whole egg liquid to develop the okara fried dough twist. On the basis of single-factor experiments, the fuzzy mathematical sensory evaluation method and response surface optimization method were used to optimize the addition of sucrose, vegetable oil, and soybean dregs powder that affect the sensory quality of okara fried dough twist. And related determinations were made on the nutritional components, physical and chemical indicators and microbiological indicators of the final product. The best recipe for okara fried dough twist were: bean dregs powder at 14% (the proportion of bean dregs in the compound powder), sucrose at 24%, vegetable oil at 8%, baking powder at 1.2%, whole egg liquid addition amount was 44% (based on the total mass of 100 g composite powder composed of all-purpose flour and bean dregs powder). The okara fried dough twist made with this formula had a protein content of (12.4%±0.8%), a fat content of (25.5%±2.2%), a dietary fiber content of (4.31%±0.38%), and sensory score of (89.73±0.35). The texture measurement data were: hardness (40.98±5.7) N, breaking force (32.38±8.13) N, chewiness (0.47±0.12). The results show that the okara fried dough twist made with the optimal formula not only has good color, flavor, and quality, but also has rich protein and dietary fiber content.

Key words: okara; fried dough twist; fuzzy mathematical sensory evaluation method; response surface method; quality analysis

收稿日期: 2021−09−06
基金项目: 扬州大学大学生科创项目（X20210930）。
作者简介: 刘赵（1996−）, 男, 硕士, 研究方向: 食品加工技术, E-mail: lz10010@126.com。
* **通信作者:** 曹仲文（1973−）男, 博士, 副教授, 研究方向: 轻工技术与工程及传统烹饪产业化研究, E-mail: caozhongwen@126.com。

大豆又称黄豆，为蝶形花科一年生草本植物。据文献记录和考古资料，中国先民在五千多年前已经开始栽培大豆，是世界上最早种植大豆的国家[1]。据资料显示，2018 年我国食品行业大豆用量为 1260t[2]。如果按每加工 1 kg 大豆产生 2 kg 湿豆渣计算，目前我国每年的湿豆渣产量在 2500 万吨以上。由于其水分含量高、易腐烂、口感粗糙等问题，目前主要作为肥料或者饲料使用，还有一部分被直接丢弃造成了巨大的经济损失和严重的环境污染[3]。研究表明，豆渣富含膳食纤维(约占干基的 60.25% 左右)、蛋白质(约占干基的 18.18%)等营养成分和大豆异黄酮、大豆皂苷等功能性成分，有促进排便预防结肠癌、降低血浆中胆固醇含量、控制心血管病以及减肥的功效[4−7]。将豆渣应用到食品中不仅能提高产品的营养价值，还能降低“富贵病”的发病风险[8]。

麻花是中国传统油炸面食小吃之一，外形呈铰链形，又称“铰链棒”。其外形独特，色泽金黄，口感香脆，有甜、咸两种口味，深受广大人民喜爱[9]。发展至今，麻花的种类已十分繁多，但是普遍具有脂肪含量高而蛋白质和膳食纤维含量相对较少的特点，与现今所提倡的低脂、高膳食纤维的健康饮食理念不符。目前，国内外已有不少研究者利用豆渣开发出具有营养保健功能的食品。如：Lee 等[10] 用处理后的豆渣粉代替部分面粉制作出的饼干具有更高的膳食纤维含量和抗氧化成分且饼干的血糖生成指数明显降低；Voss 等[11] 利用豆渣开发出的新型保健饮料可有效预防便秘的发生；张雅娜等[12]、田俊等[13]、崔少宁等[14] 研制出了豆渣蛋糕、豆渣桃酥、豆渣丸子等富含膳食纤维的豆渣新产品。

然而，以豆渣为主要原料进行麻花的研究还未见报道。因此，本文在传统麻花的制作基础上通过模糊数学感官评价法和响应面优化法进行豆渣麻花的研制，并对豆渣麻花的营养成分、质构、色泽等品质进行测定与分析。以期为豆渣产品的开发和豆渣的高值利用提供一定的理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

湿豆渣　扬州大学扬子津东区餐厅；蔗糖、中筋粉、葵花子调和油、无铝双效泡打粉、鸡蛋等　天猫超市购买；糯米小麻花、椒盐小麻花、十八街麻花、陈昌银麻花、葱油咸味麻花　京东超市；盐酸、硫酸、石油醚、无水乙醚、硫酸铜、硫酸钾、硼酸、甲基红、溴甲酚绿、亚甲基蓝、氢氧化钠、乙醇、丙酮、重铬酸钾、三羟甲基甲烷、2-(N-吗啉代)乙烷磺酸、冰乙酸　分析纯，国药集团化学试剂有限公司；α-淀粉酶 (2000 U/g)、蛋白酶 (200 U/mg)、淀粉葡萄糖苷酶液 (10 万 U/mL)　上海麦克林生化科技有限公司；

欧式 102V 恒温油炸炉　道升有限公司；DHG-9240 型恒温鼓风干燥机、生化培养箱　上海精宏实验设备有限公司；RHP-600 高速多功能粉碎机　浙江荣浩工贸有限公司；TMS-Pro 物性测定仪　美国 FTC 公司；BS210S 电子天平　北京赛多斯仪器系统有限公司；NH310 高品质便携式电脑色差仪　深圳市三恩时科技有限公司；YXQ-50G 高压灭菌锅　上海楚工实业有限公司；SE-A6 全自动脂肪测定仪　济南阿尔瓦仪器有限公司；KDN-20C 消化炉、KDN-1000 自动凯氏定氮仪　上海昕瑞仪器仪表有限公司；HH-4A 恒温水浴锅　国华电器有限公司；TNX 1200-20 马弗炉　上海北向实业有限公司；HD-3A 型智能水分活度测量仪　无锡市华科仪器仪表有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1　豆渣粉制作工艺　挑选无霉变、无杂质、无不良气味的新鲜大豆渣均匀的铺放于托盘内(厚度应在 0.3 cm 以下)，在 70 ℃ 的恒温鼓风干燥箱中烘干。冷却至室温后置于高速粉碎机(2500 r/min)粉碎成粉末，再经 40 目钢筛筛去径粒过大的豆渣颗粒。

1.2.2　麻花制作工艺　取中筋粉、豆渣粉、泡打粉、植物油，按配方精准称重后揉擦均匀。再将称好的鸡蛋液和与蔗糖混合液搅打至蔗糖完全融化为止。最后，将鸡蛋混合液少量多次的加入揉擦好的混合粉中，揉成均匀光滑的面团盖上保鲜膜醒发 50 min，以确保豆渣粉和面粉充分吸水形成质地均匀的面团。将醒发好的面团擀成 1 cm 厚 10 cm 宽的长方形，再改刀切成重 9 g 左右的面坯，面坯揉搓成直径 0.3 cm 长度 60 cm 的长条，长条上劲自然缠绕成绳子状收口刷油后即成生坯。待恒温油炸炉的油温达到 160 ℃ 时将生坯放入，炸制 5 min 色呈金黄色后捞出，冷却至室温。

1.2.3　单因素实验　经预实验后选定对豆渣麻花品质影响较大的三个因素进行单因素实验，即蔗糖、植物油和豆渣粉。

1.2.3.1　蔗糖添加量优选　中筋粉 90 g、豆渣粉 10 g、泡打粉 1.2 g、植物油 6 g(8%)、全蛋液 44 g 为基础配方，研究质量分数为 18%、21%、24%、27%、30% 的蔗糖添加量(以中筋粉和豆渣粉的总质量 100 g 计)对豆渣麻花模糊感官综合评分的影响。

1.2.3.2　植物油添加量优选　以中筋粉 90 g、豆渣粉 10 g、泡打粉 1.2 g、蔗糖 20 g、全蛋液 44 g 为基础配方，研究质量分数为 4%、6%、8%、10%、12% 的植物油添加量(以中筋粉和豆渣粉的总质量 100 g 计)对豆渣麻花模糊感官综合评分的影响。

1.2.3.3　豆渣粉添加量优选　以中筋粉和豆渣粉总质量为 100 g、泡打粉 1.2 g、植物油 6 g、蔗糖 20 g、全蛋液 44 g 为基础配方，研究 7.5%、10.0%、12.5%、15.0%、17.5% 的豆渣添加量(豆渣粉在复合粉(中筋粉加豆渣粉)中的占比)对豆渣麻花模糊感官综合评分的影响。

1.2.4　响应面优化试验　在单因素实验的基础上，使

用 Box-Behnken 试验设计，以蔗糖添加量(A)、植物油添加量(B)、豆渣粉添加量(C)为自变量，豆渣麻花的模糊感官综合评分为响应值(Y)，用−1、0、1 分别表示上述各变量的变化水平，采用软件 Design Expert V13 建立 3 因素 3 水平的试验。设计因素和水平编码见表 1。

表 1　Box-Behnken 试验因素与水平编码

Table 1　Factors and coded levels of Box-Behnken design

因素	水平		
	−1	0	1
A 蔗糖添加量(%)	21	24	27
B 植物油添加量(%)	6	8	10
C 豆渣粉添加量(%)	10.0	12.5	15.0

1.2.5　感官评定　参考吕新河[15]的方法并稍作修改，感官评价组成员由 10 名学习过食品感官评价课程的学生组成，男女各 5 名。模糊数学感官评价标准参考张芝[16]和李小月等[17]稍作修改，从口感及质地、色泽及形态、气味与甜度以及可接受度四个方面对豆渣麻花进行评分，具体见表 2。

1.2.6　模糊数学模型的建立　参考杨雪欣等[18]的方法稍作修改，评定因素集的确立：影响麻花品质的因素集 U={口感及质地 u1，色泽及形态 u2，气味与甜度 u3，可接受度 u4}；评语集的确定：评语集 V={很好 v1，较好 v2，一般 v3，较差 v4，差 v5}，以 100 分为满分、81~100 分为很好、61~80 分较好、41~60 分为一般、21~40 分较差、0~20 分为差。

权重集的确定：由 10 位感官评定员对麻花的口感及质地、色泽及形态、气味与甜度、可接受度 4 个方面在整体感官评价中的重要程度进行评分，每个感官因素满分为 10 分，各感官因素的权重比等于各感官因素总得分除以总分 100 分；

模糊综合评价集：根据模糊变换原理 Y=R*A，其中，R 为权重集、A 为模糊矩阵。

1.2.7　营养指标的测定　蛋白质含量的测定参考 GB 5009.05-2016《食品中蛋白质的测定》[19]，采用全自动凯氏定氮仪；脂肪含量的测定参考 GB 5009.6-2016《食品中脂肪的测定》[20]，采用全自动脂肪测定仪；膳食纤维的测定参考 GB 5009.88-2014《食品中膳食纤维的测定》[21]。

1.2.8　理化指标的测定　水分含量和水分活度的测定参考 GB 5009.3-2016《食品中水分的测定》[22]，使用智能型水分活度仪测定水分活度；灰分含量的测定参考 GB 5009.4-2016《食品中灰分的测定》[23]。

1.2.9　色泽的测定　参考朱文政等[24]的方法稍作修改，普通麻花和豆渣麻花各随机挑选 3 根，分别在麻花表面的不同部位进行测定 5 次，结果取其平均值。每换一个样品色差仪需经标准白板校正，测定时色差仪的测试孔垂直于样品表面且与样品表面紧贴。

1.2.10　质构测定　参考 Yang 等[25]的方法稍作修改，随机挑选 3 根完整的豆渣麻花，每根取直径 0.5 cm 长 1 cm 的圆柱状单股，在 ATP 模式下使用 TA4/100 探头，触发力 1 N，测试速度 30 mm/min，返回速度 30 mm/min，压缩形变量 30% 的条件下进行测定，测定结果取其平均值。

1.2.11　微生物指标的测定　菌落总数的测定参考 GB 4789.2-2016《食品微生物学检验菌落总数测定》[26]；大肠菌群的测定参考 GB 4789.3-2016《食品微生物学检验大肠菌群计数》[27]；沙门氏菌的测定参考 GB 4789.4-2016《食品微生物学检验沙门氏菌检验》[28]。金黄色葡萄球菌的测定参考 GB 4789.10-2016《食品微生物学检验金黄色葡萄球菌检验》[29]。

1.3　数据处理

使用 Excel、Origin2018 进行数据处理和折线图的制作，利用 Design Expert 13 进行响应面分析。数据用平均值±标准差表示。

2　结果和分析

2.1　权重集结果

10 位感官评定员对麻花的口感及质地、色泽及形态、气味与甜度、可接受度 4 个方面在整体感官评价中重要程度的评分结果见表 3。从表 3 可知，不同的感官因素在整体感官评价中的重要程度有很大差异，口感及质地>色泽及形态>气味与甜度>可接受度，故权重集 R={口感及质地，色泽及形态，气味与甜度，可接受度}=(0.41，0.25，0.215，0.125)。

表 2　模糊数学感官评价标准

Table 2　Fuzzy mathematical sensory evaluation standard

评语集(分)	口感及质地	色泽及形态	气味与甜度	可接受度
很好(81~100)	口感酥脆，质地均匀，咀嚼性强	表面油润光亮，色呈均匀的金黄色，形态规则、完整	香气浓郁，甜度适中	非常喜欢
较好(61~80)	口感较酥脆，质地均匀，咀嚼性较好	表面油润，色呈金黄色，形态较为规则、完整，外表稍显不光滑	香味较为浓郁，稍偏甜或稍偏淡	喜欢
一般(41~60)	口感酥脆度一般，质地稍软，咀嚼性一般	表面油润度较低，呈淡黄色，形态一般，外表不光滑	香味一般，偏甜或偏淡	较好，可以接受
较差(21~40)	硬度不适，酥脆度和咀嚼性较差	表面光泽度较差，色泽偏白或偏暗，形态规则度和完整度较差	无香味，过甜或稍苦	不太接受
差(0~20)	口感硬或过软，咀嚼性很差	表面无光泽，颜色发白或发黑，形态不规则、不完整	有焦糊味，发苦	不接受

表 3 麻花感官质量因素的权重分布情况

Table 3 The weight distribution of fried dough twist sensory quality factors

编号	口感及质地	色泽及形态	气味与甜度	可接受度
1	3.5	2	2	0.5
2	5	3	3	2
3	4.5	3	2	1.5
4	4	2	1.5	1
5	3.5	3	2.5	1.5
6	4	1.5	2	0.5
7	3	3	1.5	1
8	3.5	2	2.5	1
9	5	2.5	1.5	1.5
10	5	3	3	2
总得分	41	25	21.5	12.5

2.2 单因素实验结果

2.2.1 蔗糖添加量对豆渣麻花模糊感官综合评分的影响 蔗糖是面点中不可或缺的辅料之一，主要起到三个作用：一是改进成品组织状态使成品酥脆；二是增加甜味；三是在加热过程中糖自身会发生的焦糖化反应使成品呈现出诱人的色泽[30]。从图 1 可以看出，蔗糖添加量为 18% 时，麻花的甜度偏淡，口感发硬。蔗糖添加量为 30% 时，麻花甜度过高，成品发软发黑。当蔗糖添加量为 24% 时，成品甜度适宜、色泽金黄、口感酥脆，麻花的模糊感官综合评分最高，因此选择 24% 作为蔗糖的最佳添加量。

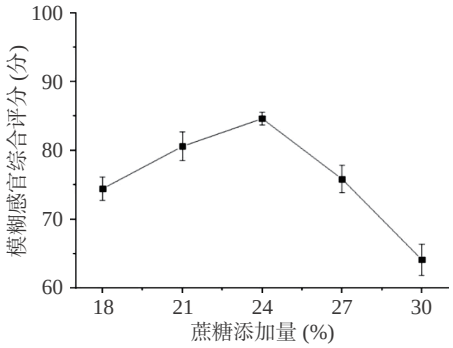


图 1 蔗糖添加量对豆渣麻花模糊感官综合评分的影响

Fig.1 The effect of sucrose addition on fuzzy sensory comprehensive score of okara fried dough twist

2.2.2 植物油添加量对豆渣麻花模糊感官综合评分的影响 油脂具有良好的疏水性和乳化性，可减少面团中面筋网络的形成，是赋予麻花酥松度的重要因素之一[31]。从图 2 可以看出随着植物油添加量的增加，麻花的模糊感官综合评分呈先上升后下降的趋势。当植物油添加量达到 8% 时，麻花吃口酥脆、外表金黄油润、香气浓郁，麻花的模糊感官评分达到最高值。当植物油添加量小于 6% 时不足以阻隔面筋网络的生成，成品酥性不够，表面无光泽。而当植物油添加量大于 10% 时面团中有足够的油脂在淀粉和面筋蛋白间形成隔膜[32]，阻碍两者相结合使麻花质地偏酥软，吃后略感发腻。因此，选择植物油添加量为 8%。

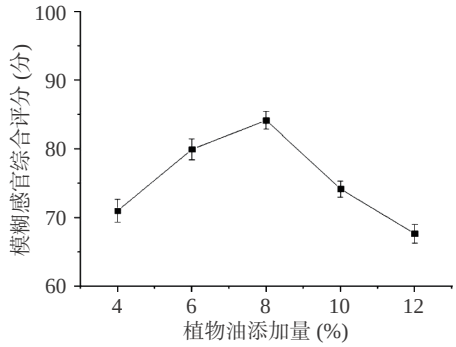


图 2 植物油添加量对豆渣麻花模糊感官综合评分的影响

Fig.2 The effect of vegetable oil addition on fuzzy sensory comprehensive score of okara fried dough twist

2.2.3 豆渣粉添加量对豆渣麻花模糊感官综合评分的影响 豆渣富含膳食纤维和蛋白质，添加量的多少直接关系着麻花的最终品质。从图 3 可以看出随着豆渣粉添加量的增加模糊感官综合评分先升高后下降。添加量为 12.5% 时，麻花豆香味四溢、成品色泽佳、口感酥脆，此时豆渣麻花的模糊感官综合评分达到最高值。当豆渣粉继续增加时，麻花的硬度随之升高，颜色加深，粗糙的口感也愈发明显。硬度增加是麻花中膳食纤维比重增大的缘故[33]，同时，豆渣中含有丰富的氨基酸和蛋白质在高温条件下与糖类发生美拉德反应生成大量拟黑素使成品颜色变暗[34]。因此，豆渣粉的添加量应选择 12.5% 为宜。

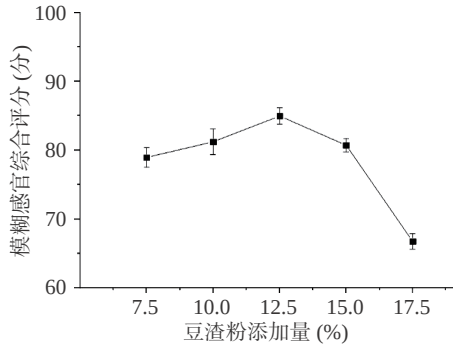


图 3 豆渣粉添加量对豆渣麻花模糊感官综合评分的影响

Fig.3 The effect of soybean dregs powder addition on fuzzy sensory comprehensive score of okara fried dough twist

2.3 响应面优化实验

2.3.1 模糊感官矩阵的建立和模糊关系综合评价集的计算结果 依照试验设计让 10 位拥有专业背景的感官评定员对响应面优化试验的 17 组实验成品进行感官评价，然后统计评价结果获得各实验组的模糊感官矩阵 A，再通过模糊原理变换公式：Y=R×A 计算得到模糊关系综合评价集。以响应面优化试验的第 1 组为例，感官评定果见表 4。

由表 4 可知，有 1 位感官评定员认为实验组 1 的豆渣麻花口感及质地一般，5 位认为较好，4 人认为很好，无较差和差评价。将实验组 1 各个感官因素不同等级的票数除以总人数，即为实验组的模糊感官矩阵 A_1。

表 4　实验组 1 的感官评定结果

Table 4　Sensory evaluation results of experimental group 1

编号	等级	口感及质地	色泽及形态	气味与甜度	可接受度
1	很好	4	0	2	0
	较好	5	6	2	5
	一般	1	4	6	5
	较差	0	0	0	0
	差	0	0	0	0

$$A_1=\begin{vmatrix} 0.4 & 0.5 & 0.1 & 0 & 0 \\ 0 & 0.6 & 0.4 & 0 & 0 \\ 0.2 & 0.2 & 0.6 & 0 & 0 \\ 0 & 0.5 & 0.5 & 0 & 0 \end{vmatrix}$$

根据模糊原理变换公式：Y=R×A，可计算出实验组 1 的模糊关系综合评价集为：

$$Y_1=(0.41,0.25,0.215,0.125)\times \begin{vmatrix} 0.4 & 0.5 & 0.1 & 0 & 0 \\ 0 & 0.6 & 0.4 & 0 & 0 \\ 0.2 & 0.2 & 0.6 & 0 & 0 \\ 0 & 0.5 & 0.5 & 0 & 0 \end{vmatrix} = (0.207,0.4605,0.3325,0,0)$$

同理，可知实验组 2~17 的模糊关系综合评价集。

2.3.2　响应面优化试验结果　感官评价一共分为 5 个等级：很好、较好、一般、较差、差，分别对应：100 分、80 分、60 分、40 分、20 分。模糊感官综合评分等于模糊关系综合评价集乘以对应的各等级分值，然后相加即为模糊感官综合评分。由此，可知实验组 1 的模糊感官综合评分是 77.49 分，其余组的模糊感官综合评分同理可得，具体见表 5。

表 5　响应面试验设计方案及结果

Table 5　Design and results of response surface analysis

试验号	因素			模糊感官综合评分（分）
	A	B	C	
1	−1	1	0	77.49
2	0	−1	1	77.75
3	0	0	0	92.99
4	1	0	−1	81.13
5	0	1	1	83.35
6	1	1	0	80.17
7	−1	0	1	78.53
8	0	0	0	93.96
9	−1	0	−1	85.96
10	0	0	0	91.14
11	0	0	0	91.39
12	1	−1	0	79.06
13	0	1	−1	79.31
14	−1	−1	0	85.96
15	1	0	1	78.29
16	0	0	0	91.86
17	0	−1	−1	88.43

2.3.3　模型的建立及显著性分析　将表 5 的实验数据通过 Design-Expert 13.0 的 Box-Behnken 进行多元回归拟合，得到以模糊感官综合评分 Y 与蔗糖添加量 A、植物油添加量 B、豆渣粉添加量 C 的二元多次回归模型，即 $Y=92.27-1.16A-1.36B-2.11C+2.39AB+1.15AC+3.68BC-6.42A^2-5.18B^2-4.88C^2$。

从表 6 回归模型方差分析结果可以看出，F 值为 48.72，P 值<0.0001，表明该模型具有极显著性。而失拟项不显著（F=0.8535，P=0.5332），说明该回归方程对实验数据拟合度较好，能用于豆渣麻花配方的工艺优化。模型相关系数 R^2=0.9843，表明豆渣麻花模糊感官综合评分的变化有 98.43% 来源于蔗糖、植物油和豆渣粉的添加量，说明蔗糖、植物油、豆渣粉对模糊感官综合评分有显著影响。由模型回归方程系数的显著性表明 3 个因素对豆渣麻花模糊感官综合评分影响的重要程度为 C>B>A，即豆渣粉添加量>植物油添加量>蔗糖添加量，其中蔗糖添加量、植物油的添加量对豆渣麻花模糊感官综合评分的影响显著（P<0.05），豆渣粉添加量对豆渣麻花模糊感官综合评分的影响极其显著（P<0.01），交互项 AC 对麻花模糊感官综合评分的影响不显著（P>0.05），交互项 AB、BC 以及二次项 A^2、B^2、C^2 对豆渣麻花模糊感官综合评分的影响均极显著（P<0.01）。

表 6　回归模型方差分析结果

Table 6　Analysis of variance results of regression model

来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	574.70	9	63.86	48.72	<0.0001	**
A	10.79	1	10.79	8.23	0.0240	*
B	14.80	1	14.80	11.29	0.0121	*
C	35.74	1	35.74	27.27	0.0012	**
AB	22.94	1	22.94	17.51	0.0041	**
AC	5.27	1	5.27	4.02	0.0850	
BC	54.17	1	54.17	41.33	0.0004	**
A^2	173.29	1	173.29	132.21	<0.0001	**
B^2	113.10	1	113.10	76.36	<0.0001	**
C^2	100.08	1	100.08	76.36	<0.0001	**
残差	9.17	7	1.31			
失拟项	3.58	3	1.19	0.8535	0.5332	
纯误差	5.59	4	1.40			
总变异	583.87	16				
R^2	0.9843					

注：*表示差异显著，P<0.05；**表示差异极显著，P<0.01。

2.3.4　响应面交互作用分析　响应曲面弯曲的程度和等高线的形状能反映出各因素不同的添加量对豆渣麻花模糊感官综合评分的影响，曲面弯曲的幅度越大说明影响越显著，等高线图如呈椭圆形表明两因素之间交互作用明显，呈圆形则表明两因素间交互作用不明显[35]。

由图 4 可知，当豆渣粉添加量固定不变时，随着蔗糖和植物油添加量的增多，豆渣麻花的模糊感官综合评分呈现先上升后下降的趋势，其中植物油添加量对豆渣麻花模糊感官综合评分影响稍大一些。响应曲面呈凸起状且投射的等高线为椭圆形，表明蔗糖添加量和植物油添加量两者交互作用明显且有极大值。

由图 5 可知，当植物油添加量固定时，随着蔗糖和豆渣粉添加量的增多，豆渣麻花的模糊感官综合评分呈现先增加后下降的趋势，其中豆渣粉添加量对豆渣麻花模糊感官综合评分的影响较大，相应的等高线

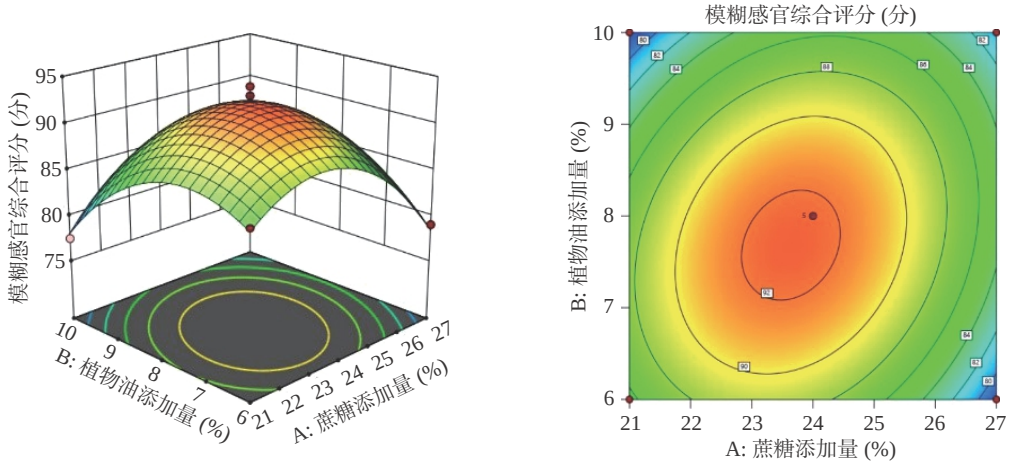


图 4　蔗糖和植物油添加量交互对豆渣麻花模糊感官综合评分影响的响应面与等高线

Fig.4　Response surface and contour lines of the interaction of sucrose and vegetable oil addition on the fuzzy sensory comprehensive score of okara fried dough twist

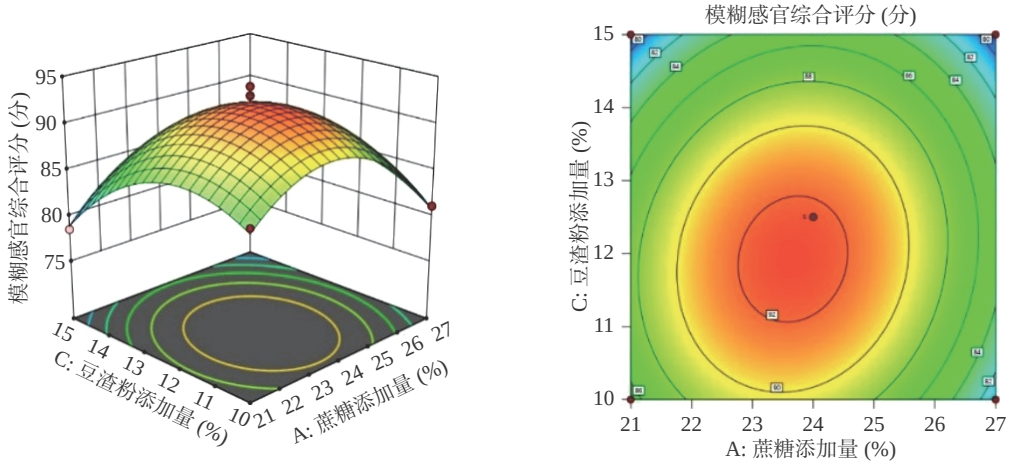


图 5　蔗糖和豆渣粉添加量交互对豆渣麻花模糊感官综合评分影响的响应面与等高线

Fig.5　Response surface and contour lines of the interaction of sucrose and soybean dregs powder addition on the fuzzy sensory comprehensive score of okara fried dough twist

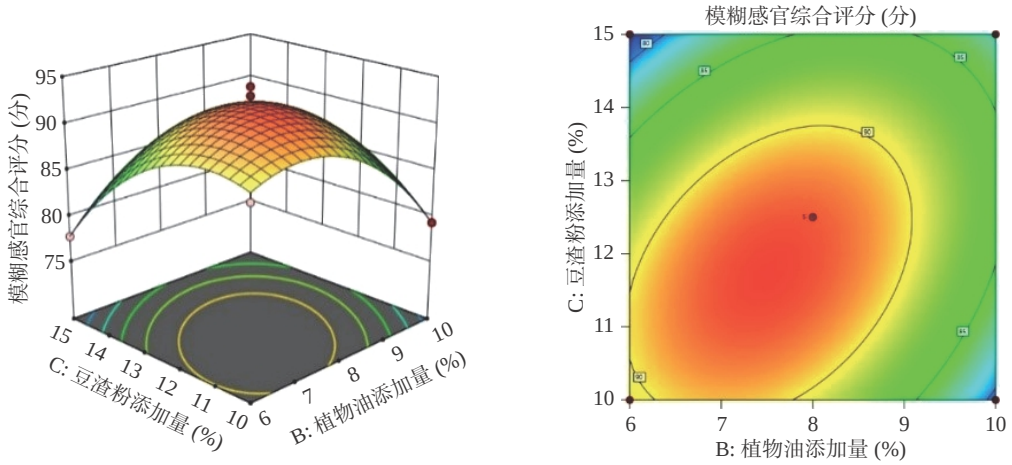


图 6　植物油和豆渣粉添加量交互对豆渣麻花模糊感官综合评分影响的响应面与等高线

Fig.6　Response surface and contour lines of the interaction of vegetable oil and soybean dreg powder addition on the fuzzy sensory comprehensive score of okara fried dough twist

趋于圆形，表明两者交互作用不显著。

由图 6 可知，在蔗糖添加量不变时，随着植物油和豆渣粉添加量的增多，豆渣麻花模糊感官综合评分呈先升高后降低的趋势。响应面呈突状且下方的等高线呈椭圆形，说明植物油和豆渣粉添加量对豆渣麻花模糊感官综合评分的影响较强，交互作用显著。

2.3.5　最优工艺配方确定及验证实验　利用 Design-Expert 13 中的“Optimization”模块，以豆渣粉添加量

和模糊感官综合评分最大为目标，得到豆渣麻花的最优配方：蔗糖 23.923%、植物油 8.137%、豆渣粉 13.952%，模糊感官综合评分预测为 89.428 分。

为了生产实践的便利性，将豆渣麻花的最优配方修改为蔗糖 24%、植物油 8%、豆渣粉添加量 14%、泡打粉 1.2%、全蛋液 44%，并进行 3 组平行实验进行验证，取其平均值得到豆渣麻花的模糊感官综合评分为（89.73±0.35）分，与模型预测值接近，说明该模型具有较高的可靠性和实用价值。

2.4　指标测定结果

2.4.1　麻花营养指标的测定　如表 7 所示，通过调查市场上所出售的 5 个不同品牌的麻花产品发现，其蛋白质含量在（6.8±1.3）g/100 g、脂肪含量在（33.2±5.3）g/100 g、膳食纤维含量在（0.39±0.03）g/100 g 左右，而按照最佳工艺配方制作的豆渣麻花，其蛋白质含量约为市售麻花的 1.8 倍，膳食纤维含量约为市售麻花的 11 倍，脂肪含量较市售麻花降低了 23%，因此所开发的豆渣麻花具有较高的营养价值和保健功能。

表 7　麻花中营养指标测定结果

Table 7　Determination results of nutritional indicators of fried dough twists

品牌	名称	蛋白质（g/100 g）	脂肪（g/100 g）	总膳食纤维（g/100 g）
良品铺子	糯米小麻花	6.2	26.7	0.41
比比赞	椒盐味小麻花	5.4	38.2	0.37
天津桂发祥	十八街麻花	7.3	38.0	0.35
瓷器口陈麻花	陈昌银麻花	6.3	28.5	0.39
众望	葱油咸味麻花	8.8	34.4	0.42
平均值		6.8±1.3	33.2±5.3	0.39±0.03
豆渣麻花	样品1	11.6	27.8	3.95
	样品2	13.2	23.5	4.71
	样品3	12.4	25.2	4.27
平均值		12.4±0.8	25.5±2.2	4.31±0.38

2.4.2　豆渣麻花理化指标的测定　理化指标可客观的反映出产品品质的好坏，因此选取水分、水分活度、灰分、色差、质构 5 个指标对其进行测定，结果见表 8、表 9、表 10。

表 8　豆渣麻花中水分、水分活度和灰分含量测定结果

Table 8　Determination results of moisture, water activity and ash content of okara fried dough twist

项目	限量标准	测定结果
水分(%)	≤8	5.36
水分活度(A_W)		0.635
灰分(%)		1.2

表 9　豆渣麻花色差测定结果

Table 9　Determination result of color difference of okara fried dough twist

项目	L^*	a^*	b^*
豆渣麻花	46.80±1.53	19.23±0.52	30.88±0.77
对照样品	56.86±1.44	15.17±0.65	35.22±0.51

表 10　豆渣麻花的质构测定结果

Table 10　Determination results of texture of okara fried dough twist

项目	硬度(N)	破裂力(N)	内聚性	弹性	咀嚼性
豆渣麻花	40.98±5.70	32.38±8.13	0.03±0.01	0.31±0.02	0.47±0.12
对照样品	73.94±9.55	61.62±6.76	0.03±0.02	0.43±0.03	0.74±0.19

从表 8 可以看出豆渣麻花符合地方标准 DBS50/012-2014《麻花》[36] 中关于水分含量的要求。

由表 9 可知，由于豆渣粉中的蛋白质含量约为中筋粉的 2 倍[37−38]，因此，同样的成熟条件下豆渣粉产生的美拉德反应和焦糖化反应相对中筋粉更加强烈，所以豆渣麻花的色泽较对照样品（即最优配方中的豆渣粉换成中筋粉其余不变）显稍暗、微红，与 Gallagher 等[39] 和 O'Brien 等[40] 的研究结论一致。即：在相同的成熟条件下蛋白质含量与 L^* 值呈负相关。

由表 10 的硬度、破裂力、咀嚼性的数据对比可知，豆渣麻花与对照样品相比更加酥脆，说明添加适量的豆渣不仅不会损害麻花的口感还能提高麻花的酥脆性。

2.4.3　豆渣麻花的微生物指标测定　由表 11 可知，豆渣麻花的微生物指标符合地方标准 DBS50/012-2014《麻花》[36] 中关于菌落总数、大肠菌群和霉菌的要求以及 GB 29921-2013《食品中致病菌限量》[41] 中对于熟制粮食制品（含焙烤类）关于沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的限量标准。

表 11　豆渣麻花的微生物指标测定结果

Table 11　Determination results of microbial indicators of okara fried dough twist

项目	限量标准	测定结果
菌落总数(CFU/g)	≤1500	55
大肠菌群(MPN/g)	≤3.0	0
霉菌计数(CFU/g)	≤100	20
沙门氏菌	0	0
金黄色葡萄球菌(CFU/g)	≤100	13

3　结论

本文基于传统麻花制作工艺和现代化烹饪技术，进行豆渣麻花的研制。以模糊感官综合评分为响应值，通过单因素实验和响应面优化试验对影响豆渣麻花感官品质的蔗糖、植物油、豆渣粉三个因素进行优化，得到豆渣麻花的最佳配方为：豆渣粉 14%、蔗糖添加量 24%、植物油添加量 8%、泡打粉添加量 1.2%、全蛋液添加量 44%（以中筋粉和豆渣粉总质量 100 g 计），使用此配方制成的麻花色香味形质俱佳且营养丰富。

此外，研究证明了添加适量豆渣不仅能提高麻花中蛋白质和膳食纤维的含量，而且能使麻花更加酥脆，然而其提升麻花酥脆度的机制尚不清楚。接下来将探究不同的豆渣添加量对麻花面团性质及成品质构的影响，进而为豆渣麻花的大规模生产提供依据。

参考文献

[1] 朱秋广, 高晨光, 初敬华. 大豆的栽培历史及利用价值的研究[J]. 白城师范高等专科学校学报, 1999(4): 53−55. [ZHU G Q, GAO C G, CHU J H. Research on the cultivation history and utilization value of soybean[J]. Journal of Baicheng Teachers College, 1999(4): 53−55.]

[2] 徐玉环, 吴月芳. 2019 大豆食品重点加工企业调研报告[J]. 大豆科技, 2019(6): 37−40. [XU Y H, WU Y F. 2019 Research report on key soybean food processing enterprises[J]. Soybean Technology, 2019(6): 37−40.]

[3] 姜慧燕, 邹礼根, 翁丽萍, 等. 豆渣营养成分分析及蛋白质营养价值评价[J]. 食品工业, 2020(6): 325−328. [JIANG H Y, ZHOU L G, WENG L P. Analysis of nutrient components of bean dregs and evaluation of protein nutritional value[J]. Food Industry, 2020(6): 325−328.]

[4] LEVI F, PASCHE C, LUCCHINI F, et al. Dietary fiber and the risk of colorectal cancer[J]. European Journal of Cancer, 2001, 37(16): 2091−2096.

[5] FUKUDA M, SUGIHARA Y, ITOU M, et al. Effects of feeding with okara on plasma and liver lipid levels in rats[J]. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, 2007, 53(4): 195−199.

[6] PÉREZ L E, CELA D, COSTABILE A, et al. *In vitro* fermentability and prebiotic potential of soyabean okara by human faecal microbiota[J]. British Journal of Nutrition, 2016, 116(6): 1116−1124.

[7] ELLEUCH M, BEDIGIAN D, ROISEUX O, et al. Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review[J]. Food Chemistry, 2010, 124(2): 411−421.

[8] 喻远东, 张喻. 豆渣的价值及加工利用分析探讨[J]. 粮食科技与经济, 2018, 43(6): 114−11. [YU Y D, ZHANG Y. Analysis and discussion on the value and processing and utilization of bean dregs[J]. Food Science and Technology and Economy, 2018, 43(6): 114−11.]

[9] 张国治. 油炸食品生产技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005. [ZHANG G Z. Fried food production technology[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005.]

[10] LEE D P S, GANA X, KIM J E. Incorporation of biovalorised okara in biscuits: Improvements of nutritional, antioxidant, physical, and sensory properties[J]. LWT, 2020, 134: 109902.

[11] VOSS G B, MONTERIO M J P, JAUREGI P, et al. Functional characterisation and sensory evaluation of a novel symbiotic okara beverage[J]. Food Chemistry, 2021, 340: 127793.

[12] 张雅娜, 张春华, 周媛媛, 等. 紫薯皮豆渣膳食纤维蛋糕配方的研究[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(22): 139−145. [ZHANG Y N, ZHANG C H, ZHOU Y Y, et al. Study on the recipe of dietary fiber cake with purple sweet potato skin and bean dregs[J]. Food Research and Development, 2020, 41(22): 139−145.]

[13] 田俊, 项健. 豆渣桃酥的工艺配方研究[J]. 现代食品, 2020(21): 82−84. [TIAN J, XIANG J. Study on the recipe of soybean dregs and peach crisp[J]. Modern Food, 2020(21): 82−84.]

[14] 崔少宁, 付双超, 逄小凯. 紫薯豆渣丸子的研制[J]. 粮食与油脂, 2020, 33(9): 53−56. [CUI X N, FU S C, FENG X K. Development of purple sweet potato okara balls[J]. Cereals & Fats, 2020, 33(9): 53−56.]

[15] 吕新河. 模糊评定法结合混料设计优化全蛋糊配方[J]. 美食研究, 2018, 35(1): 24−27. [LYU X H. Fuzzy evaluation method combined with mixture design to optimize the formula of whole egg paste[J]. Food Research, 2018, 35(1): 24−27.]

[16] 张芝. 小麻花制作工艺及优化设计[J]. 现代食品, 2019, 4(10): 74−77. [ZHANG Z. Small twist production technology and optimized design[J]. Modern Food, 2019, 4(10): 74−77.]

[17] 李小月, 郑建仙. 基于美拉德反应优化传统麻花工艺的研究[J]. 食品工业, 2017, 38(3): 113−118. [LI X Y, ZHENG J X. Research on optimization of traditional twist technology based on Maillard reaction[J]. Food Industry, 2017, 38(3): 113−118.]

[18] 杨雪欣, 陈可靖. 基于模糊数学评价法优化蛋清糊配方设计[J]. 食品工业科技, 2021, 42(16): 147−153. [YANG X X, CHEN K J. Optimizing egg white paste formula design based on fuzzy mathematics evaluation method[J]. Food Industry Science and Technology, 2021, 42(16): 147−153.]

[19] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品中蛋白质的测定: GB 5009.5—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. [National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, State Food and Drug Administration. Determination of protein in food: GB 5009.5—2016[S]. Beijing: China Standard Press, 2016.]

[20] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品中脂肪的测定: GB 5009.6—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. [National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, State Food and Drug Administration. Determination of fat in food: GB 5009.6—2016[S]. Beijing: China Standard Press, 2016.]

[21] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品中膳食纤维的测定: GB 5009.88—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015. [National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. Determination of dietary fiber in food: GB 5009.88—2014[S]. Beijing: China Standard Press, 2015.]

[22] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品中水分的测定: GB 5009.5—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. [National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. Determination of moisture in food: GB 5009.5-2016[S]. Beijing: China Standard Press, 2016.]

[23] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品中灰分的测定: GB 5009.4—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. [National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. Determination of ash in Food: GB 5009.4 —2016[S]. Beijing: China Standard Press, 2016.]

[24] 朱文政, 徐艳, 刘薇, 等. 烹制时间对狮子头营养品质和挥发性风味物质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(4): 208−214. [ZHU W Z, XU Y, LIU W, et al. The effect of cooking time on the nutritional quality and volatile flavor compounds of lion head[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(4): 208−214.]

[25] YANG H J, LI L, YIN Y P, et al. Effect of ground ginger on dough and biscuit characteristics and acrylamide content[J]. Food Science and Biotechnology, 2019, 28(5): 1359−1366.

［26］ 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会，国家食品药品监督管理总局. 食品中食品微生物学检验菌落总数测定的测定：GB 4789.2—2016[S]. 北京：中国标准出版社，2016.［National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, State Food and Drug Administration. Microbiological examination of food in food, determination of the total number of colonies: GB 4789.2 —2016 [S]. Beijing: China Standard Press, 2016.］

［27］ 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会，国家食品药品监督管理总局. 食品中食品微生物学检验大肠菌群计数：GB 4789.3—2016[S]. 北京：中国标准出版社，2016.［National Health and Family Planning Commission of the People ’s Republic of China, State Food and Drug Administration. Microbiological examination of food in food, coliform count: GB 4789.3 —2016 [S]. Beijing: China Standard Press, 2016.］

［28］ 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会，国家食品药品监督管理总局. 食品中食品微生物学检验沙门氏菌检验：GB 4789.4—2016[S]. 北京：中国标准出版社，2016.［National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, State Food and Drug Administration. Microbiological examination of food in food, *Salmonella* examination: GB 4789.4 —2016 [S]. Beijing: China Standard Press, 2016.］

［29］ 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会，国家食品药品监督管理总局. 食品中食品微生物学检验金黄色葡萄球菌检验：GB 4789.10-2016[S]. 北京：中国标准出版社，2016.［National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, State Food and Drug Administration. Microbiological examination of food in food, *Staphylococcus aureus* examination: GB 4789.10-2016 [S]. Beijing: China Standard Press, 2016.］

［30］ 吴丽萍，金雅娴，金晶. 荞麦饼干品质改良工艺优化及品质分析[J]. 食品工业，2017，38(11)：79−83.［WU L P, JIN Y X, JIN J. Quality improvement process optimization and quality analysis of buckwheat biscuits[J]. Food Industry, 2017, 38(11): 79−83.］

［31］ 王妍，张丽，牛珺，等. 响应面试验优化牛肝荞麦复合营养酥性饼干的制备工艺[J]. 食品与发酵科技，2017，53(2)：74−81.［WANG Y, ZHANG L, NIU J, et al. Response surface experiment to optimize the preparation process of beef liver and buckwheat compound nutrient crisp biscuits[J]. Food and Fermentation Science & Technology, 2017, 53(2): 74−81.］

［32］ GHOTRA B S, DYAL S D, NARINE S S. Lipid shortenings: A review[J]. Food Research International, 2002, 35(10): 1015−1048.

［33］ SUDHA M L, VETRIMANI R, et al. Influence of fibre from different cereals on the rheological characteristics of wheat flour dough and on biscuit quality[J]. Food Chemistry, 2007, 100(4): 1365−1370.

［34］ FUSTIER P, CASTAIGNE F, TURGEON S L, et al. Semi-sweet biscuit making potential of soft wheat flour patent, middle-cut and clear mill streams made with native and reconstituted flours[J]. Journal of Cereal Science, 2007, 46(2): 119−131.

［35］ 惠小洋，龙海霞，郭列娥，等. 响应面试验优化牛皮膨化食品的制备工艺[J]. 食品与发酵科技，2018，204(2)：34−39，95.［HUI X Y, LONG H X, GUO L E, et al. Response surface test to optimize the preparation process of puffed cowhide food[J]. Food and Fermentation Science & Technology, 2018, 204(2): 34−39, 95.］

［36］ 食品安全地方标准麻花 DBS50/012-2014[S]. 重庆：重庆市卫生和计划生育委员会，2014.［Local food safety standard, twist DBS50/012-2014[S]. Chongqing: Chongqing Municipal Health and Family Planning Commission, 2014.］

［37］ 陈晓柯，常虹，郭卫芸，等. 豆渣的综合利用现状及其研究进展[J]. 河南农业科学，2015，44(12)：1−5.［CHEN X K, CHANG H, GUO W Y, et al. Current status and research progress of comprehensive utilization of bean dregs[J]. Henan Agricultural Science, 2015, 44(12): 1−5.］

［38］ 佚名. 面粉的种类[J]. 粮食加工，2019，44(4)：64.［ANONYMOUS. Types of flour[J]. Grain Processing, 2019, 44(4): 64.］

［39］ GALLAGHER E, KENNY S, ARENDT E K. Impact of dairy protein powders on biscuit quality[J]. European Food Research and Technology, 2005, 221(3-4): 237−243.

［40］ O'BRIEN CM, CHAPMAN D, NEVLLE D P, et al. Effect of varying the microencapsulation process on the functionality of hydrogenated vegetable fat in short dough biscuits[J]. Food Research International, 2003, 36(3): 215−221.

［41］ 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品中致病微生物限量：GB 29921—2013[S]. 北京：中国标准出版社，2013.［National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. Limits of pathogenic microorganisms in food: GB 29921—2013[S]. Beijing: China Standard Press, 2013.］

叶灏铎, 苗建银, 李龙星, 等. 勐库大叶茶蛋白降血脂肽的酶解制备及活性分析 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 212−221. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090085

YE Haoduo , MIAO Jianyin , LI Longxing, et al. Preparation and Activity of Hypolipidemic Peptides from Mengku-dayecha Protein by Enzymatic Hydrolysis[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 212−221. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090085

· 工艺技术 ·

勐库大叶茶蛋白降血脂肽的酶解制备及活性分析

叶灏铎[1], 苗建银[1,*], 李龙星[1], 黄嘉芹[1], 刘本英[2], 孙云南[2], 邹　琴[3], 曹　庸[1]

（1.华南农业大学食品学院广东省功能食品活性物重点实验室, 广东广州 510642;
2.云南省农业科学院茶叶研究所云南省茶学重点实验室, 云南勐海 666201;
3.广东科贸职业学院食品与生物工程学院, 广东广州 510000）

摘　要: 以碱提酸沉法提取的勐库大叶茶蛋白为研究对象，以牛磺胆酸钠结合能力为考察指标，通过单因素实验和响应面分析法优化勐库大叶茶蛋白降血脂肽的制备工艺，并对最优工艺条件下的酶解物进行降血脂活性评价和氨基酸组成分析。结果表明，勐库大叶茶蛋白降血脂肽的最佳制备条件为胃蛋白酶酶解 3 h、pH2.1、底物浓度 2.7%、酶底比 0.3%、温度 37 ℃，此条件下酶解物的牛磺胆酸钠结合率为（70.92%±0.12%）。活性评价结果表明，茶叶蛋白酶解物在牛磺胆酸钠结合能力（EC_{50}=6.466 mg/mL）、胰脂肪酶抑制作用（IC_{50}=0.310 mg/mL）和胆固醇酯酶抑制作用（IC_{50}=1.557 mg/mL）三个体外降血脂活性评价指标方面均表现出良好的活性。氨基酸分析表明，所得勐库大叶茶蛋白降血脂肽含有丰富的必需氨基酸（34.35%）、疏水性氨基酸（31.94%）和酸性氨基酸（41.06%）。

关键词: 勐库大叶茶蛋白, 酶解, 降血脂肽, 响应面优化, 降血脂活性, 氨基酸组成

中图分类号: TS201.1　　**文献标识码:** B　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0212−10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090085　　本文网刊:

Preparation and Activity of Hypolipidemic Peptides from Mengku-dayecha Protein by Enzymatic Hydrolysis

YE Haoduo [1], MIAO Jianyin [1,*], LI Longxing[1], HUANG Jiaqin[1], LIU Benying[2], SUN Yunnan[2], ZOU Qin[3], CAO Yong[1]

（1.College of Food Science, South China Agricultural University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Nutraceuticals and Functional Foods, Guangzhou 510642, China;
2.Tea Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Yunnan Provincial Key Laboratory of Tea Science, Menghai 666201, China;
3.School of Food Science and Biological Engineering, Guangdong Polytechnic of Science and Trade, Guangzhou 510000, China）

Abstract: Taking the Mengku-dayecha protein extracted by alkaline extraction and acid precipitation method as the research object, taking the binding capacity of sodium taurocholate as the inspection index, the preparation process of Mengku-dayecha protein hypolipidemic peptides was optimized through single factor experiment and response surface analysis, and the optimal technology was determined. Under the conditions, the enzymatic hydrolysate was evaluated for lipid-lowering activity and amino acid composition analysis. The results showed that the best preparation conditions for Mengku-dayecha protein hypolipidemic peptides were pepsin hydrolysis for 3 h, pH2.1, substrate concentration 2.7%,

收稿日期: 2021−09−07

基金项目: 云南省茶学重点实验室开放基金（2020YNCX002）; 广州市农村科技特派员项目（GZKTP 201931）。

作者简介: 叶灏铎（1998−）, 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品新原料与功能性食品, E-mail: yehaoduo@163.com。

*** 通信作者:** 苗建银（1981−）, 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品科学, E-mail: miaojy8181@scau.edu.cn。

enzyme substrate ratio 0.3%, and temperature 37 ℃. Under these conditions, the binding capacity of sodium taurocholate was (70.92%±0.12%). The activity evaluation results showed that the tea protein hydrolysate showed good activity in three *in vitro* evaluation indicators of lipid-lowering activity: The binding capacity of sodium taurocholate (EC_{50}=6.466 mg/mL), the inhibition of pancreatic lipase (IC_{50}=0.310 mg/mL) and the inhibition of cholesterol esterase (IC_{50}=1.557 mg/mL). Amino acid analysis showed that the obtained *Mengku-dayecha* protein hypolipidemic peptides was rich in essential amino acids (34.35%), hydrophobic amino acids (31.94%) and acidic amino acids (41.06%).

Key words: Mengku-dayecha protein; enzymatic hydrolysis; hypolipidemic peptides; response surface optimization; hypolipidemic activity; amino acid composition

高脂血症，尤其是高胆固醇血症是心脏病和缺血性心脏病最主要的危险因素之一[1]。高脂血症是由于体内脂质代谢或转运异常导致的一种慢性疾病，主要表现为体内甘油三酯或胆固醇水平过高[2]。近年来，随着人们生活水平的提高和饮食习惯的改变，高脂血症患者比例急剧上升，中国成人血脂异常总体患病率高达 41.90%[3]，已经成为现代社会高发病率之一的疾病[4−5]。传统的降血脂药物如他汀类[6]、贝特类等，价格昂贵、服用周期长，且往往具有一定的临床副作用[7]。从天然产物中开发出安全有效的降血脂活性成分成为当下的研究热点[8]，如火麻籽降脂肽[9]，驼乳蛋白降脂肽[10] 和可可种子蛋白降脂肽[11] 等。

茶叶在我国具有丰富的原料资源，饮茶以及茶文化也有数千年的历史[12]。茶叶中含有大量有益于人体健康的物质[13]，长期饮用有助于延缓衰老，降低血压血脂。近年来不断扩大的茶饮料加工过程中产生大量茶渣废弃物[14]，废弃的茶渣中还含有 18%~20% 的粗蛋白[15]，茶叶蛋白质有比较合理的氨基酸组成，是优质的植物蛋白[16]，作为营养和功能性成分在食品工业中有良好的应用前景[17]。但目前关于茶叶蛋白肽的深度开发和研究较少，若能对茶渣中存留的蛋白等营养物质进行高值化利用开发，将创造巨大的经济效益和社会效益[18]。勐库大叶茶是原产于云南省双江县勐库镇的有性系国家良种，是云南大叶种的代表性品种，其具有生长力强、芽叶生育力强和持嫩性强等特点，并且茶叶内含物质丰富，萌发期早、产量高，可大量采集和加工，是目前云南茶叶加工中的主要资源品种[19−20]。目前，对勐库大叶种茶的研究大多集中于茶叶加工[21]、茶叶水浸出物[22] 以及茶叶中的多酚氧化酶[23] 等，而对茶叶或茶渣中含量较高的蛋白资源研究较少，这在一定程度上造成了资源的浪费。茶叶中优质的植物蛋白可以进一步开发制备成功能性多肽，值得深入研究。

本研究以勐库大叶茶为原料，通过碱提酸沉获得茶叶蛋白，以胆酸盐结合率为指标，采用酶解法制备茶叶蛋白降血脂肽，并对其进行降血脂活性检测和氨基酸组成分析。本研究有助于茶叶蛋白资源的高值化利用，为相关健康食品的开发提供新思路。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

勐库大叶茶冻干茶叶　云南省茶学重点实验室提供；胃蛋白酶（3×10^6 U/mg）、中性蛋白酶（1×10^5 U/g）、胰蛋白酶（2.5×10^5 U/g）、木瓜蛋白酶（2×10^5 U/g）　南宁庞博生物工程有限公司；牛磺胆酸钠（STC）、猪胰脂肪酶（90 U/mg）、对硝基苯基月桂酸酯（pNP 月桂酸酯）、对硝基苯基丁酸酯（PNPB）　上海麦克林生化有限公司；胆固醇酯酶（150 U/mg）　上海源叶生物科技有限公司；其他化学品和试剂均为分析纯。

AL104 电子天平　梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司；PHS-3C 台式 pH 计　上海佑科仪器有限公司；HH-4 数显恒温水浴锅　金坛市华城海龙实验仪器厂；L530 台式低速自动平衡离心机　湖南湘仪实验室仪器开发有限公司；2300 多功能酶标仪　PerkinElmer 公司；FD-1 型冷冻干燥机　海门市其林贝尔仪器制造有限公司；DH5000BII 电热恒温培养箱　天津泰斯特仪器有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　勐库大叶茶蛋白的提取　基于碱提酸沉的原理，参考王忠英[24] 的方法进行勐库大叶茶蛋白的提取。勐库大叶茶叶粉碎后过 20 目筛，称取一定量粉碎的茶叶，以固液比 1∶40（g∶mL）加入 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液，45 ℃ 下水浴 4 h 后过滤，并以 4000 r/min 离心 20 min，收集上清液并用 1 mol/L HCl 调节 pH 至 4.5，静置 20 min 后，再以 4000 r/min 离心 20 min。弃去上清，收集蛋白沉淀，冷冻干燥后即得勐库大叶茶蛋白粗提物。

1.2.2　勐库大叶茶蛋白肽的制备　参考郑天芝[25] 的方法进行茶叶蛋白肽的制备，将一定量的勐库大叶茶蛋白粗提物加入适量蒸馏水配成溶液，调节 pH 后加入一定量的酶，一定温度下恒温水浴酶解一定时间后于沸水中灭酶 10 min，冷却至室温，4000 r/min 离心 20 min，收集上清液即为含有多肽的酶解液。

1.2.3　单因素实验

1.2.3.1　蛋白酶的筛选　选取实验室常用的 4 种蛋白酶分别在其最适条件下对勐库大叶茶蛋白进行酶解，胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、胃蛋白酶和中性蛋白酶四种蛋白酶的 pH 和温度分别为 8.0、37 ℃；6.5、55 ℃；1.5、37 ℃；和 7.0、45 ℃。在底物浓度为 3%，酶底比为 0.3% 的条件下，酶解 3 h，灭酶，离心，取上清酶解液测定胆酸盐结合率，选择最优的蛋白酶。

1.2.3.2 酶解时间对酶解物活性的影响 在底物浓度为 3%, 酶底比为 0.3%, pH1.5, 37 ℃ 条件下, 用胃蛋白酶进行酶解, 以牛磺胆酸钠结合能力为指标, 考察酶解时间(1、2、3、4、5 h), 对酶解液活性的影响并确定最佳酶解时间条件。

1.2.3.3 酶解温度对酶解物活性的影响 在底物浓度为 3%, 酶底比为 0.3%, pH1.5 条件下, 用胃蛋白酶酶解 3 h, 以牛磺胆酸钠结合能力为指标, 考察酶解温度(32、37、42、47、52 ℃), 对酶解液活性的影响并确定最佳酶解温度条件。

1.2.3.4 pH 对酶解物活性的影响 在底物浓度为 3%, 酶底比为 0.3%, 37 ℃ 条件下, 用胃蛋白酶酶解 3 h, 以牛磺胆酸钠结合能力为指标, 考察 pH(1.0、1.5、2.0、2.5、3.0), 对酶解液活性的影响并确定最佳 pH 条件。

1.2.3.5 酶底比对酶解物活性的影响 在底物浓度为 3%, pH1.5, 37 ℃ 条件下, 用胃蛋白酶酶解 3 h, 以牛磺胆酸钠结合能力为指标, 考察酶底比(0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%), 对酶解液活性的影响并确定最佳酶底比条件。

1.2.3.6 底物浓度对酶解物活性的影响 在酶底比为 0.3%, pH1.5, 37 ℃ 条件下, 用胃蛋白酶酶解 3 h, 以牛磺胆酸钠结合能力为指标, 考察底物浓度(1%、2%、3%、4%、5%), 对酶解液活性的影响并确定最佳底物浓度条件。

1.2.4 响应面优化试验 在单因素实验基础上, 以 pH、底物浓度和酶底比为自变量, 以胆酸盐结合率为响应值, 设计三因素三水平的响应面试验。响应面实验设计见表 1。

表 1 响应面试验因素与水平设计

Table 1 Factors and levels of response surface experiment

因素	水平		
	−1	0	1
A pH	1.5	2.0	2.5
B 底物浓度(%)	2	3	4
C 酶底比(%)	0.2	0.3	0.4

1.2.5 胆酸盐结合率的测定 参考李成龙[26] 的方法检测体外胆酸盐结合能力, 并略有修改。将 1 mL 待测样品转移至带塞离心管中。每管加入 1 mL 0.01 mol/L HCl 溶液以模拟人体胃酸环境, 37 ℃ 振荡水浴孵育 1 h。之后, 用 0.1 mol/L NaOH 溶液调 pH 至 6.3 后加入 5 mL 配制好的牛磺胆酸钠(STC)标准溶液(1 mmol/L), 5 mL 磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L, pH6.3)添加到空白管中。37 ℃ 恒温振荡 1 h 后, 以 4000 r/min 离心 20 min, 然后将 2.5 mL 上清液转移至新的离心管中, 加入 7.5 mL 60% 硫酸溶液, 在 70 ℃ 下孵育 30 min 后冷却至室温。最后在 387 nm 波长处测量每个样品的吸光度。每个样品重复分析三次, 通过胆酸盐标准曲线测定数值, 标准曲线由溶液浓度为 1 mmol/L, 体积分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL 的牛磺胆酸钠溶液制定。使用下式计算胆酸盐结合率:

$$胆酸盐结合率(\%)=\frac{C_0-C_1}{C_0}\times 100 \qquad 式(1)$$

式中: C_0 是胆酸盐空白(不含肽)的浓度, μmol/mL; C_1 是添加肽后上清液中胆酸盐的浓度, μmol/mL。

1.2.6 勐库大叶茶蛋白肽降血脂活性分析

1.2.6.1 勐库大叶茶蛋白肽对胆酸盐的吸附能力 通过最优工艺条件得到的酶解液, 冷冻干燥后, 用磷酸缓冲溶液配制成不同浓度的样品溶液(0.25、0.5、1、2、4 mg/mL), 分别测定胆酸盐结合率, 并测定 EC_{50} 值, 即胆酸盐结合率达到 50% 时的多肽浓度。

1.2.6.2 勐库大叶茶蛋白肽对胰脂肪酶的抑制作用 参照万林[27] 的方法并略作修改, 检测勐库大叶茶蛋白酶解物对胰脂肪酶的抑制作用。Ⅱ型猪胰脂肪酶用一级水配制成 5 mg/mL, 取一定量的反应底物对硝基苯基月桂酸酯(pNP 月桂酸酯)溶解于含 1% Triton X-100 的 0.05 mol/L 醋酸钠水溶液中, 配成 0.1%(w/v)的 pNP 月桂酸酯溶液, 将配好的溶液置于热水中加速溶解, 完全混匀溶解后室温冷却备用。酶解物用 Tris-HCl 缓冲溶液(0.1 mol/L, pH8.2)配置成浓度为 0.25、0.5、1、2、4 mg/mL 的溶液。于离心管中加入 250 μL 的反应底物, 100 μL 样品溶液和 200 μL 反应缓冲液, 最后加入 150 μL 脂肪酶溶液启动反应。置于 37 ℃ 反应 2 h 后 10000 r/min离心 1 min, 在 420 nm 波长下测上清液的吸光值。空白对照将样品换成缓冲溶液, 样品对照将脂肪酶溶液换成反应缓冲液。计算脂肪酶抑制率, 并求出 IC_{50} 值, 按以下公式计算:

$$胰脂肪酶抑制率(\%)=\left(1-\frac{A_1-A_2}{A_0}\right)\times 100 \qquad 式(2)$$

式中: A_1 为样品上清液的吸光值; A_2 为样品对照上清液的吸光值; A_0 为空白上清液的吸光值。

1.2.6.3 勐库大叶茶蛋白肽对胆固醇酯酶的抑制作用 参照苏建辉等[28] 的方法并略做修改, 检测勐库大叶茶蛋白酶解物对胆固醇酯酶的抑制作用。猪胰腺胆固醇酯酶用一级水配制成 4.2 μg/mL, 所有的反应在含有 NaCl(0.1 mol/L)、对硝基苯基丁酸酯 PNPB(0.2 mmol/L)和牛磺胆酸钠 STC(5.16 mmol/L)的磷酸钠缓冲液(0.1 mol/L, pH7.0)中进行。于离心管中加入 10 μL 反应底物 PNPB(0.2 mmol/L), 25 μL 的样品溶液和 1 mL 缓冲液, 最后加入 50 μL 胆固醇酯酶溶液启动反应, 25 ℃ 反应 5 min, 在 405 nm 处测量吸光值。空白管用一级水代替样品溶液, 空白对照管用一级水代替酶液和样品溶液, 背景对照管用一级水代替酶液。计算胆固醇酯酶抑制率, 并求 IC_{50} 值, 按下式计算:

$$胆固醇酯酶抑制率(\%)=\left(1-\frac{C-D}{A-B}\right)\times 100 \quad 式（3）$$

式中：A 为空白管的吸光值；B 为空白对照管的吸光值；C 为样品管的吸光值；D 为背景对照管的吸光值。

1.2.7　氨基酸组成测定　采用 GB 5009.124—2016《食品中氨基酸的测定》，测定最优酶解物中的氨基酸组成[29]。

1.3　数据处理

所有实验至少进行三次重复。使用 SPSS 21.0 软件对数据进行分析，结果以平均值±标准差（SD）表示。采用 Design Expert 8.0.6.1 软件进行响应面优化实验设计和分析。采用单因素方差分析（ANOVA）分析样品间差异的显著性（P<0.05）。

2　结果与分析

2.1　单因素实验

2.1.1　蛋白酶的筛选　由于不同的蛋白酶具有不同的特异性，为了获得具有较好生物活性的蛋白质水解物和多肽，应考虑酶的选择和加工条件[30]。本研究分别采用胃蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶和中性蛋白酶从勐库大叶茶蛋白中制备蛋白质水解物，结果如图 1 所示。胃蛋白酶水解物与其他蛋白酶水解物相比具有最高的胆酸盐结合能力，其结合牛磺胆酸钠的能力为（65.91%±1.21%）。可能是由于其酶切位点更有利于降血脂水解物的生成[2]，制备豆清夜肽[31] 和鹰嘴豆肽[32] 时，也都采用了胃蛋白酶进行酶解，可见胃蛋白酶比较适宜酶解植物蛋白。因此，后续实验将采用胃蛋白酶进行蛋白质水解物的制备。

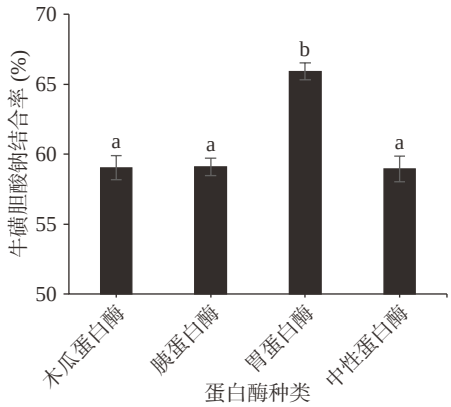


图 1　蛋白酶种类对酶解物牛磺胆酸钠结合率的影响

Fig.1　Effect of protease types on the binding rate of sodium taurocholate

注：不同字母表示差异显著，P<0.05；图 2~图 6、图 8~图 10 同。

2.1.2　酶解时间对酶解物活性的影响　不同酶解时间对酶解物活性的影响如图 2 所示。从图中可以看出，勐库大叶茶蛋白水解物结合牛磺胆酸钠的能力随着酶解时间的延长出现先升后降趋势，酶解 3 h 得到的酶解液活性最强，牛磺胆酸钠结合率为（66.46%±0.29%）。这可能是因为随着反应的进行，酶解逐渐彻底，多肽含量增加，多肽与蛋白质出现竞争性抑制

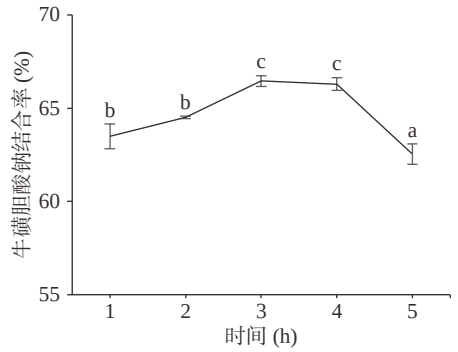


图 2　酶解时间对酶解物牛磺胆酸钠结合率的影响

Fig.2　Effect of enzymatic hydrolysis time on the binding rate of sodium taurocholate

作用，而酶活力可能随着体系的改变而降低[31]。4 h 酶解物的牛磺胆酸钠结合能力与 3 h 接近，但无显著性差异（P>0.05），考虑到酶解时间过长会增加能耗，因此，确定最佳酶解时间为 3 h。

2.1.3　酶解温度对酶解物活性的影响　如图 3 所示，当温度达到 37 ℃ 时，酶解物结合牛磺胆酸钠的能力达到最高值（68.10%±0.36%），随后逐渐下降。这可能是由于受到酶活力的影响，胃蛋白酶的最适水解温度为 35~45 ℃，在此范围内的酶活力最高。此外，温度的升高可以使分子的热运动加快，溶剂的溶解能力也会随之增大，从而达到良好的溶质扩散和溶剂渗透效果，产出高活性的酶解物。但温度过高也会导致酶活力下降甚至失活，影响酶解效果[2,33]。因此，确定最佳酶解温度为 37 ℃。

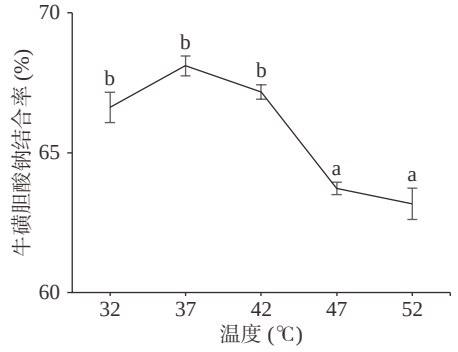


图 3　酶解温度对酶解物牛磺胆酸钠结合率的影响

Fig.3　Effect of enzymatic hydrolysis temperature on the binding rate of sodium taurocholate

2.1.4　pH 对酶解物活性的影响　如图 4 所示，不同 pH 对应的酶解效果有显著差异（P<0.05）。酶解物的牛磺胆酸钠结合能力随着 pH 升高，先增大后减小，在 pH2.0 时酶解效果最好，牛磺胆酸钠结合率达到（70.06%±0.32%）。pH 也是影响酶活力的重要因素之一，胃蛋白酶在 pH1.0~2.0 之间，酶活力较高，而过酸过碱都会影响酶活力，从而降低酶解效果[34]。因此，确定最佳 pH 为 2.0。

2.1.5　酶底比对酶解物活性的影响　如图 5 所示，随着酶底比的增加，酶解物结合牛磺胆酸钠的能力呈现先增大后减小的趋势，在酶底比 0.3% 时，酶解物活

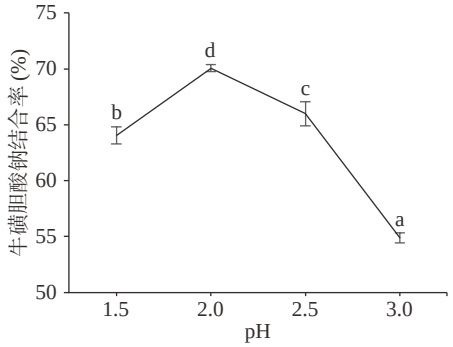


图 4　pH 对酶解物牛磺胆酸钠结合率的影响

Fig.4　Effect of pH on the binding rate of sodium taurocholate

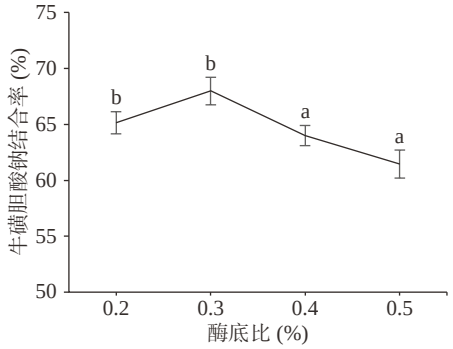


图 5　酶底比对酶解物牛磺胆酸钠结合率的影响

Fig.5　Effect of enzyme to substrate ratio on the binding rate of sodium taurocholate

性最好，结合能力达到(67.09%±1.23%)。酶的添加量较低时，可能会导致酶与底物的结合能力变差，而较高的酶比例又会使蛋白过度水解，生成活性较差的酶解物，导致与牛磺胆酸钠的结合能力下降，且过高的加酶量也会造成资源浪费[35]。因此，确定适宜的酶底比为 0.3%。

2.1.6　底物浓度对酶解物活性的影响　由图 6 可知，底物浓度为 3% 时，酶解物结合牛磺胆酸钠的能力达到最高，结合率为(67.01%±0.41%)，而增大底物浓度，酶解物的活性却反而下降，这一现象可能是因为过高的底物浓度影响了底物与酶的接触面积，从而影响酶解效果，使酶解物与牛磺胆酸钠的结合能力减小[36]。因此，确定适宜的底物浓度为 3%。

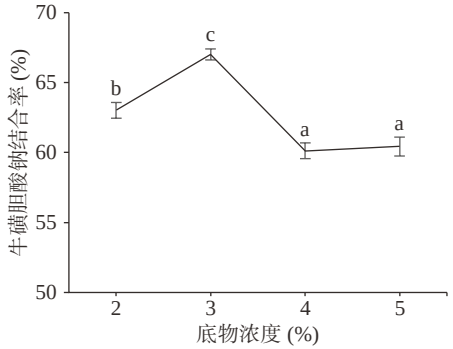


图 6　底物浓度对酶解物牛磺胆酸钠结合率的影响

Fig.6　Effect of substrate concentration on the binding rate of sodium taurocholate

2.2　响应面优化试验

基于单因素实验，以 pH(A)、底物浓度(B)和酶底比(C)三个因素为自变量，以牛磺胆酸钠结合率为活性指标，设计并进行三因素三水平试验。响应面试验结果如表 2 所示。

表 2　响应面设计方案及结果

Table 2　The design and results of the response surface experiment

试验号	因素			牛磺胆酸钠结合率(%)
	A pH	B 底物浓度	C 酶底比	
1	0	−1	1	65.83±0.12
2	−1	0	1	66.07±0.10
3	0	0	0	69.75±0.20
4	0	0	0	70.45±0.08
5	0	0	0	67.71±0.27
6	0	0	0	70.61±0.08
7	−1	1	0	56.32±0.25
8	−1	−1	0	63.00±0.10
9	1	1	0	59.11±0.39
10	−1	0	−1	58.40±0.47
11	1	−1	0	67.62±0.44
12	1	0	−1	65.56±0.15
13	0	1	−1	60.14±0.14
14	0	−1	−1	63.18±0.21
15	0	1	1	65.22±0.09
16	0	0	0	70.06±0.20
17	0	0	1	69.11±0.17

采用 Design Expert 8.0.6.1 软件对表 2 中的数据进行多元回归拟合，得到三个影响因素与响应值牛磺胆酸钠结合率(Y)之间的二次多项回归方程：

$$Y=69.72+2.20A-2.35B+2.37C-0.46AB-1.03AC+0.61BC-3.51A^2-4.70B^2-1.43C^2$$

对回归模型及方程进行显著性检验，如表 3 所示，该模型的 F 值为 9.54，P=0.0036<0.01，表明建立的回归模型存在极显著差异[37]，失拟项 F 值为 4.66，P=0.0857>0.05，差异不显著说明由实验操作等偶然

表 3　回归模型显著性检验

Table 3　Analysis of variance for response surface quadratic model

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值(Prob>F)	显著性
模型	301.95	9	33.55	9.54	0.0036	**
A pH	38.76	1	38.76	11.01	0.0128	*
B 底物浓度	44.38	1	44.38	12.61	0.0093	**
C 酶底比	44.89	1	44.89	12.76	0.0091	**
AB	0.84	1	0.84	0.24	0.6409	
AC	4.24	1	4.24	1.21	0.3084	
BC	1.48	1	1.48	0.42	0.5378	
A^2	51.73	1	51.73	14.70	0.0064	**
B^2	92.92	1	92.92	26.41	0.0013	**
C^2	8.56	1	8.56	2.43	0.1628	
残差	24.63	7	3.52			
失拟项	19.15	3	6.38	4.66	0.0857	不显著
纯误差	5.48	4	1.37			
总和	326.58	16				

注：P<0.05，显著，显著性标为*；P<0.01，极显著，显著性标为**；P>0.05，不显著。

因素对试验结果的影响较小[38]，变异系数 CV 值为 2.88%<10%，说明实验结果较为可靠[2]。综上，本次实验稳定性良好，建立的回归模型有较好的拟合度，可用于观察勐库大叶茶蛋白酶解产物随实验条件变化而变化的规律，分析和预测酶解物具有最高胆酸盐结合能力时的最优工艺条件[39]。

显著性检验表 3 中的 F 值、P 值，可以反映出各个因素对酶解物结合胆酸盐能力的影响，F 值越大，则该因素影响效果越强[40]，从表中可以看出，三个变量 pH、底物浓度和酶底比对酶解物结合胆酸盐能力都有显著性影响，其中，底物浓度和酶底比呈现极显著性影响（P<0.01），据此可推测三个因素对酶解物胆酸盐结合能力的影响程度依次为：酶底比>底物浓度>pH。

两个因素之间的交互作用可以通过响应等高线图与曲面图反映出[41]。如图 7 所示，三个因素两两之间形成的图形，其形状都趋向椭圆，且其轴线与坐标轴之间都能形成一个明显的角度，即说明三个因素之间都存在较强的相互作用[42]。由图 7 可以看出，随着 pH、底物浓度和酶底比的增大，胆酸盐结合率呈先上升后下降趋势，即说明具有极大值。随着底物浓度和酶底比的变化，图中响应面的陡峭程度起伏较大，说明底物浓度和酶底比对胆酸盐结合率的影响大于 pH，与表 3 中方差分析结论一致[43]。

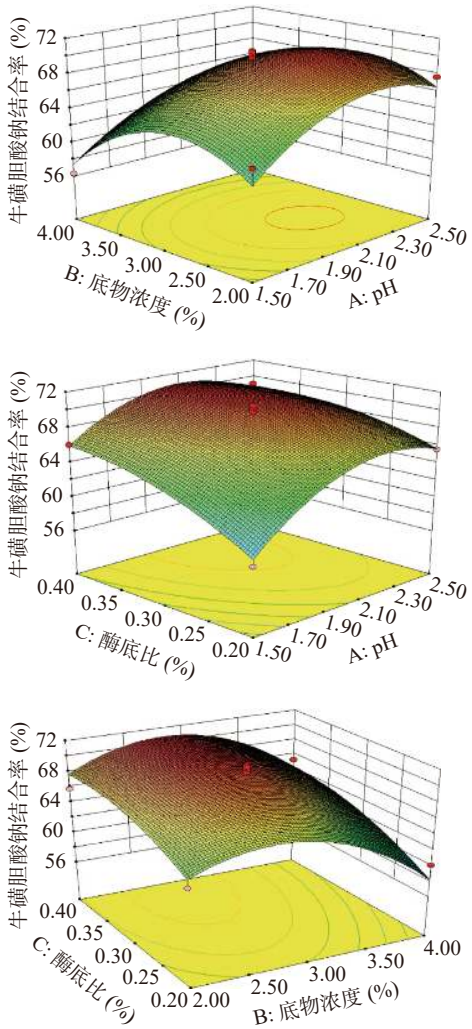


图 7　pH、底物浓度、酶底比交互作用对牛磺胆酸钠结合率的影响

Fig.7　Effect of the interaction of pH, substrate concentration and enzyme to substrate ratio on the binding rate of sodium taurocholate

通过软件分析及预测，得出胃蛋白酶酶解勐库大叶茶蛋白制备降血脂肽的最佳工艺条件：pH2.13、底物浓度 2.73%、酶底比 0.33%。在此条件下，软件预测酶解物与牛磺胆酸钠的结合率为 70.79%。对预测的最优条件进行实验验证，设置条件参数为 pH2.1、底物浓度 2.7%、酶底比 0.3%、温度 37 ℃，酶解时间 3 h，得到的酶解产物与牛磺胆酸钠的实际结合率为（70.92%±0.12%），与软件预测值相接近，相对误差为（0.18%±0.14%）。说明该响应面模型具有可行性，软件的分析预测具有一定的准确性。

2.3　勐库大叶茶蛋白肽降血脂活性分析

2.3.1　茶叶蛋白肽对胆酸盐的吸附能力　胆汁酸是胆汁的主要成分，是胆固醇在肝脏代谢分解的产物，也是人体清除胆固醇的主要途径，而体内大部分胆汁酸是以胆酸盐的形式存在，因此，具有一定的胆酸盐结合能力的物质可被鉴定为具有一定的降脂活性[44]。胆酸盐大部分是以钠盐的形式存在，且据报道，牛磺胆酸钠（STC）是一种较难结合的共轭胆酸盐[45]。因此，以牛磺胆酸钠结合能力作为评价指标具有一定的代表性。

如图 8 所示，勐库大叶茶蛋白肽结合牛磺胆酸钠的能力，随着浓度升高而增大，即胆酸盐吸附能力与肽浓度呈依赖关系。在样品浓度为 4 mg/mL 时，牛磺胆酸钠的结合率达到了（45.15%±1.64%），活性高于汉麻降脂肽[46]（100 mg/mL 时为 28.1%）和卵形鲳鲹蛋白水解物[30]（100 mg/mL 时为 30.07%）。通过 SPSS 软件计算得到此条件下勐库大叶茶蛋白肽吸附胆酸盐能力的 EC_{50}，如表 4 所示为 6.466 mg/mL。由此可见，勐库大叶茶蛋白肽具有显著的胆酸盐结合能力，其原因可能和胆酸盐与活性肽之间的结合力以及氨基酸的疏水性等因素相关[47]，具体活性关系还需后续进一步分离纯化后进行深入研究。

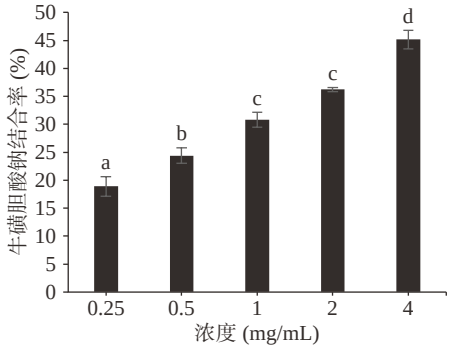


图 8　不同样品浓度的牛磺胆酸钠结合率

Fig.8　Binding rate of sodium taurocholate at different sample concentrations

表 4 勐库大叶茶蛋白肽降血脂活性评价

Table 4 Evaluation of lipid-lowering activity of peptide from Mengku-dayecha protein

活性指标	EC_{50}/IC_{50}(mg/mL)
牛磺胆酸钠结合能力	6.466
胰脂肪酶抑制作用	0.310
胆固醇酯酶抑制作用	1.557

2.3.2 茶叶蛋白肽对胰脂肪酶的抑制作用 胰腺腺泡细胞产生的胰脂肪酶(PL),负责将膳食三酰甘油水解为二酰甘油、单酰甘油、甘油和脂肪酸阴离子[48],抑制胰腺脂肪酶的活性可以有效降低小肠对脂肪的吸收效率,从而达到降脂的目的[49]。勐库大叶茶蛋白肽抑制胰脂肪酶的能力如图 9 所示。在 0.5 mg/mL 时,胰脂肪酶抑制率已超过 50%,当浓度为 4 mg/mL 时,抑制率达到(74.33%±1.45%),通过软件计算得样品抑制胰脂肪酶活性的 IC_{50},如表 4 所示为 0.310 mg/mL,活性优于猴头菇多肽[50](IC_{50}: 2.750 mg/mL)和驼乳蛋白水解物[51](IC_{50}: 20.465 mg/mL)。可以看出,勐库大叶茶蛋白肽具有较强的抑制胰脂肪酶作用,其原因可能是茶叶蛋白肽能够阻止胰脂肪酶电子分布的改变,使酶的催化中心无法暴露,不能与底物结合,从而达到抑制酶活性的作用[52]。

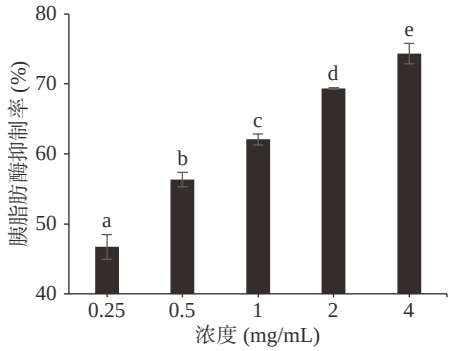


图 9 不同样品浓度的胰脂肪酶抑制作用

Fig.9 Inhibition of pancreatic lipase at different sample concentrations

2.3.3 茶叶蛋白肽对胆固醇酯酶的抑制作用 胰腺胆固醇酯酶是 α/β 水解酶家族中的一员,是一种胆盐激活的脂肪酶,它能催化膳食胆固醇酯在小肠的管腔内水解成游离胆固醇[53]。抑制胰胆固醇酯酶的活性可以使饮食中的血清胆固醇水平以合理的速度下降。因此,它被认为是治疗胆固醇相关疾病的重要靶点[54]。如图 10 所示,勐库大叶茶蛋白肽抑制胰胆固醇酯酶的能力与样品浓度呈剂量依赖关系,其抑制胆固醇酯酶活性的 IC_{50} 如表 4 所示为 1.557 mg/mL,远低于六堡茶茶褐素[55](IC_{50}: 57.20 mg/mL)和亚麻籽肽[56](IC_{50}: 4.57 mg/mL)。这可能是勐库大叶茶蛋白肽中的酸性氨基酸与酶形成了相互作用[57]。综上所述,酶解制备的勐库大叶茶蛋白肽展现出了潜在的降血脂能力,后续将通过进一步分离纯化得到降血脂活性更强的单体。

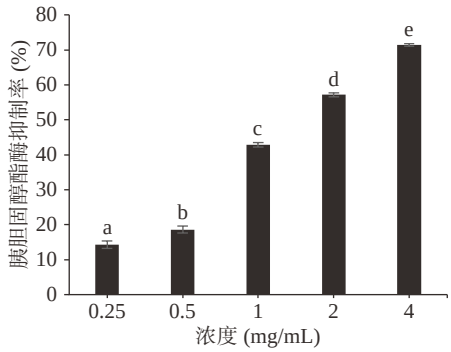


图 10 不同样品浓度的胰胆固醇酯酶抑制作用

Fig.10 Inhibition of pancreatic cholesterol esterase at different sample concentrations

2.4 氨基酸组成分析

勐库大叶茶蛋白肽的氨基酸组成如表 5 所示,必需氨基酸的含量占总氨基酸的 34.35%,疏水性氨基酸的比例高达 31.94%,酸性氨基酸的含量很高,达到了 41.06%。许多研究表明,疏水性氨基酸在降低胆固醇的活性中起重要作用,尤其是影响胆酸盐的结合能力[58],疏水性氨基酸和胆汁酸之间的相互作用,会形成不溶性复合物,并以粪便形式排出体外,这是人体清除胆固醇的主要途径[59]。本研究中酶解物活性肽展现出了良好的胆酸盐结合能力,丰富的疏水性氨基酸可能发挥了重要作用。研究表明,酸性氨基酸的存在也有助于降血脂作用的发挥[60],本研究中酸性氨基酸天冬氨酸和谷氨酸的含量占比最大,分别达到

表 5 勐库大叶茶蛋白酶解物的氨基酸组成

Table 5 Amino acid composition of hydrolysate from Mengku-dayecha protein

氨基酸	含量(%)
天冬氨酸(Asp)	11.50
苏氨酸(Thr)*	4.21
丝氨酸(Ser)	4.82
谷氨酸(Glu)	29.56
甘氨酸(Gly)#	4.42
丙氨酸(Ala)#	4.60
半胱氨酸(Cys)	1.02
缬氨酸(Val)*#	5.98
蛋氨酸(Met)*#	0.91
异亮氨酸(Ile)*#	3.53
亮氨酸(Leu)*#	5.95
酪氨酸(Tyr)	3.05
苯丙氨酸(Phe)*#	3.46
组氨酸(His)*	3.83
赖氨酸(Lys)*	6.49
精氨酸(Arg)	3.57
脯氨酸(Pro)#	3.08
必需氨基酸(EAA)	34.35
疏水性氨基酸(HAA)	31.94
酸性氨基酸(AAA)	41.06

注: *EAA: 必需氨基酸 (Thr, Val, Met, Ile, Leu, Phe, Lys, His); #HAA: 疏水性氨基酸 (Ala, Val, Ile, Leu, Phe, Gly, Pro, Met); AAA: 酸性氨基酸 (Asp, Glu)。

了 11.50% 和 29.56%。另外，低比例的 Met/Gly 也会对降低胆固醇作用产生影响[59]，本研究中 Met/Gly 的比值约为 1∶5，这可能也对茶叶蛋白肽的降血脂作用起到了积极作用。综上，本研究中的勐库大叶茶蛋白酶解物活性肽在多个方面都展现出了具有潜在的降血脂作用，其具体的多肽组成和氨基酸序列分析有待进一步深入研究。

3　结论

本研究以勐库大叶茶蛋白为原料，以牛磺胆酸钠结合率为主要指标，通过单因素实验和响应面试验，获得酶解勐库大叶茶蛋白制备降血脂肽的最佳工艺条件。结果表明：在 pH2.1、底物浓度 2.7%、酶底比 0.3%、温度 37 ℃ 条件下，用胃蛋白酶酶解 3 h 得到的酶解物，其牛磺胆酸钠结合率为（70.92%±0.12%），与软件预测值 70.79% 的相对误差仅为（0.18%±0.14%），说明该模型可以较准确地描述与预测水解勐库大叶茶蛋白的最优工艺条件。

对最优酶解物活性肽进行降血脂活性评价，发现其具有较强的牛磺胆酸钠结合能力（EC_{50}=6.466 mg/mL），有利于机体分解代谢胆固醇并排出。勐库茶叶蛋白肽同时具有较好的胰脂肪酶抑制作用（IC_{50}=0.310 mg/mL）和胆固醇酯酶抑制作用（IC_{50}=1.557 mg/mL），有利于抑制机体对脂肪和胆固醇的吸收利用。对茶叶蛋白肽进行氨基酸组成分析，发现其中含量丰富的必需氨基酸（34.35%）、疏水性氨基酸（31.94%）和酸性氨基酸（41.06%），都在降血脂活性中发挥着重要作用。

本研究为茶叶蛋白资源的开发利用提供了新思路，为大叶茶蛋白肽的降血脂作用研究提供了前期理论依据。后续将对茶叶蛋白降血脂肽进一步分离纯化，并在细胞及动物水平上深入探讨其具体作用机制。

参考文献

[1] NAGAOKA S. Structure-function properties of hypolipidemic peptides[J]. Journal of Food Biochemistry, 2019, 43(1): e12539.

[2] 侯珮琳, 赵肖通, 张彦青, 等. 绿豆蛋白降血脂水解物的制备及纯化工艺[J]. 食品工业科技, 2020, 41(9): 186−192,199. [HOU P L, ZHAO X T, ZHANG Y Q, et al. Preparation and purification of hydrolysate of mung bean protein for reducing blood lipids[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(9): 186−192,199.]

[3] 赵旺, 叶平, 胡大一, 等. 根据《中国成人血脂异常防治指南(2016 年修订版)》再分析 DYSIS-China 横断面调查[J]. 中国心血管杂志, 2020, 25(1): 55−61. [ZHAO W, YE P, HU D Y, et al. Re-analysis of DYSIS-China cross-sectional survey according to "Chinese guidelines for the prevention and treatment of dyslipidemia in adults (2016 revision)"[J]. Chinese Journal of Cardiovascular Medicine, 2020, 25(1): 55−61.]

[4] NTAIOS G, MILIONIS H. Low-density lipoprotein cholesterol lowering for the prevention of cardiovascular outcomes in patients with ischemic stroke[J]. International Journal of Stroke, 2019, 14(5): 476−482.

[5] KHLIFI R, LAHMAR A, DHAOUEFI Z, et al. Assessment of hypolipidemic, anti-inflammatory and antioxidant properties of medicinal plant *Erica multiflora* in triton WR-1339-induced hyperlipidemia and liver function repair in rats: A comparison with fenofibrate[J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2019, 107: 104404.

[6] PINAL-FERNANDEZ I, CASAL-DOMINGUEZ M, MAMMEN A L. Statins: Pros and cons[J]. Medicina Clínica (English Edition), 2018, 150(10): 398−402.

[7] 杨玉英, 王伟, 张玉, 等. 天然蛋白源降血脂活性肽的研究进展[J]. 浙江农业科学, 2013(9): 1157−1162. [YANG Y Y, WANG W, ZHANG Y, et al. Research progress of hypolipidemic active peptide derived from natural protein[J]. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 2013(9): 1157−1162.]

[8] 曹静雯, 王磊, 刘霞, 等. 罗格列酮对血脂异常大鼠氧化应激及炎症反应的影响[J]. 现代生物医学进展, 2019, 19(24): 4633−4636. [CAO J W, WANG L, LIU X, et al. Effects of rosiglitazone on oxidative stress and inflammatory response in rats with dyslipidemia[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2019, 19(24): 4633−4636.]

[9] 魏连会, 宋淑敏, 董艳, 等. 火麻籽多肽对高脂饮食喂养大鼠血脂的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(11): 161−167. [WEI L H, SONG S M, DONG Y, et al. Effect of hemp seed peptide on blood lipids in high-fat diet fed rats[J]. Food Science, 2021, 42(11): 161−167.]

[10] MUDGIL P, KAMAL H, YUEN G C, et al. Characterization and identification of novel antidiabetic and anti-obesity peptides from camel milk protein hydrolysates[J]. Food Chemistry, 2018, 259: 46−54.

[11] CORONADO-CACERES L J, RABADAN-CHAVEZ G, MOJICA L, et al. Cocoa (*Theobroma cacao* L.) seed proteins' anti-obesity potential through lipase inhibition using in silico, *in vitro* and *in vivo* models[J]. Foods, 2020, 9(10): 1359−1359.

[12] 肖莹. 茶叶功能食品的开发及发展探讨[J]. 福建茶叶, 2018, 40(8): 25−26. [XIAO Y. Discussion on the development and development of tea functional food[J]. Tea in Fujian, 2018, 40(8): 25−26.]

[13] 杨方慧, 杨毅坚, 张艳梅, 等. 大叶种茶功能成分研究及提取开发现状[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(11): 10−13. [YANG F H, YANG Y J, ZHANG Y M, et al. Study on the functional components of large-leaf tea and its extraction and development status[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2018, 46(11): 10−13.]

[14] 梁杰, 汪秀妹, 杨艺伟, 等. 茶渣蛋白的提取及酶解产物抗氧化性质研究[J]. 食品科技, 2020, 45(9): 214−220. [LIANG J, WANG X M, YANG Y W, et al. Extraction of tea residue protein and antioxidant activity of enzymatic hydrolysates[J]. Food Science and Technology, 2020, 45(9): 214−220.]

[15] 靳伟刚, 张洋, 罗鋆琳, 等. 茶渣资源的开发与利用——茶渣中茶叶蛋白的酶法提取和酶法水解[J]. 中国食品添加剂, 2011(4): 54−58. [JIN W G, ZHANG Y, LUO Y L, et al. Development and utilization of tea residue as a resource-Extraction and hydrolysis of teaprotein from tea residue by enzyme complex[J].

China Food Additives, 2011(4): 54−58.]
[16] 李永富. 茶渣蛋白和茶渣多肽的制备及性质的初步研究[D]. 上海: 上海师范大学, 2015. [LI Y F. Tea-leaf protein and dross polypeptide preparation and properties of a preliminary study[D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2015.]
[17] ZHOU J, YU Y, DING L, et al. Matcha green tea alleviates non-alcoholic fatty liver disease in high-fat diet-induced obese mice by regulating lipid metabolism and inflammatory responses[J]. Nutrients, 2021, 13(6): 1950.
[18] 刘仲华. 中国茶叶深加工产业发展历程与趋势[J]. 茶叶科学, 2019, 39(2): 115−122. [LIU Z H. The development process and trend of Chinese tea comprehensive processing industry[J]. Journal of Tea Science, 2019, 39(2): 115−122.]
[19] 徐礼羿, 王丽鸳, 苏静静, 等. 云南双江勐库大叶种茶树基因型和种群结构分析[J]. 植物遗传资源学报, 2019, 20(4): 1052−1064. [XU L Y, WANG L Y, SU J J, et al. Genotyping and genetic structure analysis for 235 tea plant (*Camellia sinensis* var. *assamica* 'Mengku-dayecha') in Shuangjiang of Yunnan Province[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2019, 20(4): 1052−1064.]
[20] 莫非, 段兆顺. 打开勐库大叶种的密码[J]. 普洱, 2018(6): 44−48. [MO F, DUAN Z S. Open the password of big leaf seed Mengku[J]. Pu-erh, 2018(6): 44−48.]
[21] 王艳艳. 浅述云南勐库大叶种白茶加工工艺[J]. 中国茶叶, 2019, 41(10): 38−39. [WANG Y Y. Brief introduction to the processing technology of large leaf white tea in Mengku, Yunnan [J]. China Tea, 2019, 41(10): 38−39.]
[22] 白玉艳, 赵艳, 王白娟. 云南勐库大叶种普洱茶水浸出物含量的研究[J]. 食品工业, 2013, 34(6): 14−16. [BAI Y Y, ZHAO Y, WANG B J. The research of the contents of extractive water in Yunnan Mengku large-leaved Pu'er tea[J]. The Food Industry, 2013, 34(6): 14−16.]
[23] 伍梦瑶, 黄莹捷, 姚燕妮, 等. 勐库大叶种茶树多酚氧化酶粗酶的酶学性质[J]. 浙江大学学报 (农业与生命科学版), 2017, 43(5): 579−588. [WU M Y, HUANG Y J, YAO Y Y, et al. Characterization of crude polyphenol oxidase isolated from *Camellia sinensis* var. *assamica* cv. Mengku[J]. Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences), 2017, 43(5): 579−588.]
[24] 王忠英. 茶叶中蛋白的提取及理化性质的研究 [D]. 杭州: 浙江工商大学, 2006. [WANG Z Y. Study on extraction of tea protein and its physical and chemical properties[D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2006.]
[25] 郑天芝. 茶渣多肽的制备及其活性研究 [D]. 广州: 华南农业大学, 2018. [ZHENG T Z. Study on preparation and activity of tea-residue polypeptide[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2018.]
[26] 李成龙. 发酵酸肉降血脂肽的分离纯化、特性研究及其对血管内皮细胞的影响 [D]. 重庆: 西南大学, 2016. [LI C L. Purification of blood lipid lowering peptides from fermented sour meat and studying of physicochemical properties and its effects on vascular endothelial cells[D]. Chongqing: Southwest University, 2016.]
[27] 万林. 首乌藤活性成分的提取及减肥降脂活性的研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2019. [WANG L. Study on extraction of active ingredients from *Caulis Polygoni Multiflori* and their weight loss and lipid-lowering activity[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2019.]
[28] 苏建辉, 马朝阳, 杨鹿, 等. 槲皮素、EGCG 对胆固醇酯酶活性和胆固醇胶束抑制作用研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(11): 346−349. [SU J H, MA Z Y, YANG L, et al. Inhibition of pancreatic cholesterol esterase activities and cholesterol micelle of EGCG and quercetin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(11): 346−349.]
[29] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准食品中氨基酸的测定: GB 5009.124-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. [The State Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, the State Food and Drug Administration. National standard for food safety-determination of amino acids in food: GB 5009.124-2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.]
[30] PENG W, DEKE C, HUA C, et al. Hypolipidemic effects of protein hydrolysates from *Trachinotus ovatus* and identification of peptides implied in bile acid-binding activity using LC-ESI-Q-TOF-MS/MS[J]. RSC Advances, 2020, 10(34): 20098−20109.
[31] 尹乐斌, 刘丹, 廖聪, 等. 酶解豆清液制备抗氧化肽[J]. 食品工业, 2021, 42(5): 177−181. [YIN L B, LIU D, LIAO C, et al. Preparation of antioxidant peptides by enzymatic hydrolysis of soybean wastewater[J]. The Food Industry, 2021, 42(5): 177−181.]
[32] ACEVEDO M K A, GONZALEZDE M E. Comparison of five chickpea varieties, optimization of hydrolysates production and evaluation of biomarkers for type 2 diabetes[J]. Food Research International, 2021, 147: 110572.
[33] 屠瀚超, 阳晓晶, 罗松明. 响应面优化酶解法制备岩豆抗氧化肽工艺[J]. 中国油脂, 2020, 45(6): 36−40. [TU H C, YANG X J, LUO S M. Optimization of enzymolysis production of *Millettia dielsiana* antioxidant peptide by response surface methodology[J]. China Oils and Fats, 2020, 45(6): 36−40.]
[34] 黄文, 余可楠, 廖婉雯, 等. 响应面法优化罗非鱼鳞钙结合肽酶解工艺及其特性表征[J]. 食品工业科技, 2021: 1−14. [HUANG W, YU K N, LIAO W W, et al. Optimization of enzymatic hydrolysisof tilapia scale calcium bindingpeptides by response surface methodology and its structural characterization[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021: 1−14.]
[35] ERIC K, ZHANG X M, NICOLE M, et al. Effect of substrate type on sensory characteristics and antioxidant capacity of sunflower Maillard reaction products[J]. European Food Research and Technology, 2015, 240(5): 939−960.
[36] 刘东伟, 袁玮琼, 柳梅, 等. 核桃粕蛋白抑菌肽的制备工艺及纯化[J]. 食品工业科技, 2021, 42(2): 185−191. [LIU D W, YUAN W Q, LIU M, et al. Preparation and isolation of antibacterial peptides from wulnut dregs protein[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(2): 185−191.]
[37] 李积华, 郑为完, 张斌, 等. 绿豆蛋白的酶法水解——工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2007(3): 69−73. [LI J H, ZHENG W W, ZHANG B, et al. Study on the enzymatical hydrosis of mung bean protein[J]. Food Research and Development, 2007(3): 69−73.]
[38] 杨娜, 赵雨晴, 张帅, 等. 响应面法优化提取白附子美白成

分的工艺研究[J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版), 2019, 35(4): 392−395. [YANG N, ZHAO Y Q, ZHANG S, et al. Study on optimizing of extraction technology of whitening components from *Typhonii Rhizoma* by response surface methodology[J]. Journal of Harbin University of Commerce (Natural Sciences Edition), 2019, 35(4): 392−395.]

[39] 李莉, 张赛, 何强, 等. 响应面法在试验设计与优化中的应用[J]. 实验室研究与探索, 2015, 34(8): 41−45. [LI L, ZHANG S, HE Q, et al. Application of response surface methodology in experiment design and optimization[J]. Research and Exploration in Laboratory, 2015, 34(8): 41−45.]

[40] 赵丛枝, 寇天舒, 张子德. 发酵型无花果果酒加工工艺的研究[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(13): 79−82. [ZHAO C Z, KOU T S, ZHANG Z D. Study on the processing technology of fermented wind of fig fruit[J]. Food Research and Development, 2014, 35(13): 79−82.]

[41] 冯结铧, 娄华, 钟先锋, 等. 响应面分析法优化亚麻籽粕水解工艺研究[J]. 中国调味品, 2019, 44(8): 99−104. [FENG J H, LOU H, ZHONG X F, et al. Study on optimization of flaxseed meal hydrolysis process by response surface methodology[J]. China Condiment, 2019, 44(8): 99−104.]

[42] 张泽志, 韩春亮, 李成未. 响应面法在试验设计与优化中的应用[J]. 河南教育学院学报(自然科学版), 2011, 20(4): 34−37. [ZHANG Z Z, HAN C L, LI C W. Application of response surface method in experimental designand optimization[J]. Journal of Henan Institute of Education (Natural Science Edition), 2011, 20(4): 34−37.]

[43] 衣美艳, 侯虎, 毛毛, 等. 响应面优化庸鲽鱼骨酶解条件及其酶解物氨基酸组成分析[J]. 食品工业科技, 2019, 40(22): 175−180. [YI M Y, HOU H, MAO M, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis conditions by response surface and analysis of amino acid composition of enzymatic hydrolysate from *Hippoglossus hippoglossus* bone[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(22): 175−180.]

[44] XUE Z H, GAO X D, JIA Y N, et al. Structure characterization of high molecular weight soluble dietary fiber from mushroom *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler and its interaction mechanism with pancreatic lipase and bile salts[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 153: 1281−1290.

[45] 周小理, 黄琳, 周一鸣. 苦荞水溶性蛋白体外吸附胆酸盐能力的研究[J]. 食品科学, 2011, 32(23): 77−81. [ZHOU X L, HUANG L, ZHOU Y M. *In vitro* binding of bile salts by water-soluble proteins from tartary buckwheat grains[J]. Food Science, 2011, 32(23): 77−81.]

[46] 宋淑敏, 魏连会, 董艳, 等. 汉麻降脂肽氨基酸序列分析[J]. 中国粮油学报, 2021, 36(3): 51−58. [SONG S M, WEI L H, DONG Y, et al. Analysis of amino acid sequence of Hanma lipid-lowering peptide[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2021, 36(3): 51−58.]

[47] JAURICQUE U K, HUI Z, PIERRE C I. *In vitro* binding capacity of bile acids by defatted corn protein hydrolysate[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2011, 12(2): 1066−1080.

[48] RAHUL B B, KAMLESH K B. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: Unexplored potential[J]. Drug Discovery Today, 2007, 12(19): 879−889.

[49] SABIKA J, HINA K, PRITI M, et al. Camel whey protein hydrolysates displayed enhanced cholesteryl esterase and lipase inhibitory, anti-hypertensive and anti-haemolytic properties[J]. LWT-Food Science and Technology, 2018, 98: 212−218.

[50] 同政泉, 刘婷婷, 张闪闪, 等. 猴头菇多肽的制备及体外抗氧化、降血脂活性研究[J]. 吉林农业大学学报, 2021: 1−8. [TONG Z Q, LIU T T, ZHANG S S, et al. Preparation of *Hericium erinaceus* polypeptides and their antioxidationand hypolipidemic activity *in vitro*[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2021: 1−8.]

[51] BABA W N, MUDGIL P, BABY B, et al. New insights into the cholesterol esterase- and lipase-inhibiting potential of bioactive peptides from camel whey hydrolysates: Identification, characterization, and molecular interaction[J]. Journal of Dairy Science, 2021, 104(7): 7393−7405.

[52] BRADY L, BRZOZOWSKI A M, DEREWENDA Z S, et al. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase[J]. Nature, 1990, 343(6260): 767−770.

[53] HARBINDER S, JATINDER V S, MANISH K G, et al. Benzoflavones as cholesterol esterase inhibitors: Synthesis, biological evaluation and docking studies[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2017, 27(4): 850−854.

[54] SALIHA A, TÜLIN Ş, ÜMMÜHAN Ö Ö, et al. Synthesis, spectroscopic characterizations, enzyme inhibition, molecular docking study and DFT calculations of new Schiff bases of sulfa drugs[J]. Journal of Molecular Structure, 2019, 1185: 416−424.

[55] 龚受基, 滕翠琴, 梁东姨, 等. 六堡茶茶褐素体外降脂功效研究[J]. 茶叶科学, 2020, 40(4): 536−543. [GONG S J, TENG C Q, LIANG D Y, et al. *In vitro* study on hypolipidemic effectsof theabrownins in Liupao tea[J]. Journal of Tea Science, 2020, 40(4): 536−543.]

[56] 刘晓静. 亚麻籽肽降胆固醇作用的研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2020. [LIU X J. Study on the cholesterol-lowering effect of flaxseed peptide[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2020.]

[57] 龚受基, 蒙彦妃, 曹惠怡, 等. 凡纳滨对虾蛋白体外降脂作用分析[J]. 食品工业科技, 2020, 41(11): 316−321. [GONG S J, MENG Y F, CAO H Y, et al. Hypolipidemic effects of protein from *Penaeus vannamei in vitro*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(11): 316−321.]

[58] ISABEL M P, M L M, M C G. Isolation and identification by high resolution liquid chromatography tandem mass spectrometry of novel peptides with multifunctional lipid-lowering capacity[J]. Food Research International, 2018, 111: 77−86.

[59] HERRERA C F, RUIZ R J C, BETANCUR A D, et al. The hypolipidemic effect and antithrombotic activity of *Mucuna pruriens* protein hydrolysates[J]. Food & Function, 2016, 7(1): 434−44.

[60] HUIJUAN Z, WALLACE H Y, HUI Z. Concentration-dependent displacement of cholesterol in micelles by hydrophobic rice bran protein hydrolysates[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2012, 92(7): 1395−1401.

顾赛麒, 周琳卉, 王苏宁, 等. 多元复合流体凝胶的制备及其特性研究 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 222−231. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090149

GU Saiqi, ZHOU Linhui, WANG Suning, et al. Preparation and Characterization of Multiple Composite Fluid Gel[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 222−231. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090149

· 工艺技术 ·

多元复合流体凝胶的制备及其特性研究

顾赛麒, 周琳卉, 王苏宁, 周绪霞, 丁玉庭*

（浙江工业大学食品科学与工程学院, 浙江杭州 310014）

摘　要: 本研究以不同工艺条件下制备的复合流体凝胶为研究对象，综合考察凝胶强度、质量损失率和感官评定结果，在确定各因素的较优作用水平基础上，运用五因素四水平正交试验，确定多元复合凝胶最优制备工艺：乙酰化二淀粉磷酸酯、水解明胶和大豆油的添加量分别为 6.5%、5.5% 和 8%，pH6.5，氯化钙浓度 0.35 mol/L。基于综合评分结果，从正交组中筛选出中间组和最低组，并与最优组的各项凝胶特性指标结果进行比较。差示扫描量热结果显示，最优组持水性最好，非冻结水含量达 50.33%，较中间组和最低组分别提高 5.93% 和 12.75%；最优组最终固体残留物含量最高，达 14.51%，表明其稳定性最好；最优组样品中分子作用力统一呈疏水作用力>氢键>静电作用力趋势；傅里叶红外光谱结果与分子作用力结果相互印证，均说明最优组氢键较中间组和最低组更强。综上，优化后的复合流体凝胶流变特性良好，内部结构更稳定，因此，在食品流体凝胶应用方面具有较大潜力。

关键词: 流体凝胶, 凝胶特性, 工艺优化, 稳定性, 分子作用力

中图分类号: S986.1　　**文献标识码:** B　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0222−10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090149

本文网刊:

Preparation and Characterization of Multiple Composite Fluid Gel

GU Saiqi, ZHOU Linhui, WANG Suning, ZHOUXuxia, DING Yuting*

（College of Food Science and Technology, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China）

Abstract: The composite fluid gels prepared by different process were taken as the research object in this study. The gel strength, mass loss rate and sensory evaluation results were comprehensively investigated to determine the optimal level of each factor. On this basis, the orthogonal test of five factors and four levels was used to determine the optimal preparation process of the multiple composite gel: The addition of acetylated distarch phosphate, hydrolyzed gelatin and soybean oil were 6.5%, 5.5% and 8% respectively, pH6.5 and calcium chloride concentration 0.35 mol/L. According to the results of the comprehensive scores, the intermediate group and the lowest group were selected from the orthogonal group, and the results of each gel characteristic index of above two groups were compared with those of the optimal group. The results of differential scanning calorimetry showed that the water holding capacity of the optimal group was the best, and the content of unfrozen water was 50.33%, which was 5.93% and 12.75% higher than that of the middle group and the lowest group, respectively; the final solid residue content of the optimal group was the highest, up to 14.51%, indicating that its thermal stability was the best; the molecular forces in the optimal group showed the trend of hydrophobic force>hydrogen bond>electrostatic force; the results of Fourier transform infrared spectroscopy and molecular force confirmed each other, which showed that the hydrogen bond of the optimal group was stronger than that of the middle group and the lowest group. In summary, the optimized composite fluid gel has great potential in food fluid gel applications, which has excellent rheological properties and a more stable internal structure.

Key words: fluid gel; gel characteristics; process optimization; stability; molecular force

收稿日期: 2021−09−10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31601500、31671880)。

作者简介: 顾赛麒（1984−）, 男, 博士, 讲师, 研究方向: 食品新产品研发, E-mail: gusaiqi@126.com。

*** 通信作者:** 丁玉庭（1963−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品加工、储藏与质量安全控制, E-mail: dingyt@zjut.edu.cn。

流体凝胶（fluid gel）是指一类具有流动性、分散在非凝胶连续相（通常是水）中的胶凝颗粒悬浮液[1]，具有微观结构可调控的特点，目前已作为药物或益生菌的缓释载体得到商业化应用，同时，其也作为理想的脂肪替代物，在低能量食品市场中应用潜力巨大[2]。常见的流体凝胶一般为多糖和蛋白的共混体系，向其中添加少量油脂可赋予体系更好的润滑感与稳定性。多糖-蛋白-油脂复合体系经不同程度的剪切力作用，其内部微结构发生重排，从而获得具有不同流变特性的流体凝胶[3]。

多糖、蛋白、油脂是制备流体凝胶的三大类基料组分。变性淀粉中的乙酰化二淀粉磷酸酯（acetylated distarch phosphate, ADSP）具有抗热、抗酸、抗老化等特点，与蛋白质等大分子复合时，可吸附在颗粒上形成一个厚的吸附层，且保持足够的构象自由避免聚集，从而改善体系结构和稳定性[4]。水解明胶（hydrolysate gelatin, HG）拥有蛋白水解物的多种功能特性（如抗氧化及抗菌活性等）[5]。Hu 等[6] 发现水解蛋白可阻止多糖链内分子结合和氢键的形成，可有效抑制淀粉多糖回生。Sunisa 等[7] 的研究表明水解明胶可减少蛋白质链之间的相互作用，增加网络体系的自由体积。大豆油（soybean oil, SO）为产量最大的植物油之一，在凝胶剂作用下可以发生结构化，有助于流体凝胶内部形成稳定的三维网络结构。目前，添加油脂的复合凝胶已作为脂肪替代物在奶酪方面成功应用，产品稳定性显著提高[8]。

流体凝胶自身流动性主要取决于静电和疏水相互作用，该作用可通过调节 pH 及离子强度来实现[9]。Lopez 等[10] 发现中性偏酸性条件下体系内电荷密度降低促进了链间结合，从而有利于凝胶的形成；碱性条件下，氢氧根离子对变性淀粉有增溶作用，因此体现为抑制作用。Wang 等[11] 发现钙离子可与多糖形成钙桥，促进凝胶的形成。此外，多糖-蛋白凝胶形成过程中常伴随静电相互作用，适当盐离子的加入能够屏蔽静电现象，以调整流体凝胶的流变特性。Basse 等[12] 发现离子浓度为 0.5 mol/L 时，对凝胶形成和凝胶弹性的促进作用远大于 0.8 mol/L。因此，流体凝胶具有丰富的机械性能及流变学行为，可广泛应用于医药、食品、化工等领域。

本文采用魔芋胶、乙酰化二淀粉磷酸酯、水解明胶和大豆油为主要基料，以不同 pH、氯化钙浓度等条件制备复合流体凝胶（KGM-ADSP-HG-SO, KAHS），基于正交试验确定其最优制备工艺，并对三种不同水平的复合流体凝胶自身特性进行比较分析，旨在为研发新型流体凝胶的制备工艺提供方法借鉴。

1　材料及方法

1.1　材料与仪器

魔芋胶（食品级）　湖北强森魔芋科技有限公司；乙酰化二淀粉磷酸酯（食品级）　临沂市富兴变性淀粉厂；大豆油（食品级）　益海嘉里食品营销有限公司；无水柠檬酸钠（食品级）　北京鼎国昌盛生物科技有限责任公司；骨胶原蛋白肽（食品级，2000 Da）　包头东宝生物技术股份有限公司；分子蒸馏单甘酯　陕西晨明生物科技有限公司；磷酸、十二烷基硫酸钠（SDS）、尿素　均为分析纯，北京鼎国昌盛生物科技有限责任公司。

FA25 高速分散机　上海 Fluko 流体机械制备有限公司；UV762 紫外可见分光光度计　上海仪电分析仪器有限公司；CR21G Ⅱ 高速离心机　日本日立公司；TA-XT Plus 质构仪　英国 Stable Micro System 公司；Ultra Scan 色差仪　美国 Hunter Lab 公司；MCR302 流变仪　奥地利安东帕有限公司；TG209F1 热重仪　德国 NETISCH；Q100 型差示扫描量热仪　美国 TA 公司；PHS-3 C pH 计　上海精密科学仪器有限公司；DHG-9070 型电热恒温鼓风干燥箱　上海一恒科技有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　多元复合流体凝胶的制备　分子蒸馏单甘酯与大豆油按质量比 1∶20 混合，高温加热至完全溶解作为油相备用；称取各物料并将其分散于一定浓度的氯化钙溶液中，使用 0.1 mol/L 盐酸溶液调节 pH，搅拌形成均匀水相。将油水两相混合低速剪切 3 min，后于 90 ℃ 水浴加热；待完全水合后于 2000 r/min 剪切 20 min，静置冷却至室温后重复剪切 20 min，最终制得样品，并于 4 ℃ 冷藏保存。

1.2.2　单因素实验　采用单因素实验设计，依次考察不同基料添加量对制备流体凝胶的影响，保持 pH 6.5，氯化钙浓度 0.2 mol/L：保持魔芋胶 4%，水解明胶 6%，大豆油 8% 不变，考察不同乙酰化二淀粉磷酸酯添加量（0、2%、4%、6%、8%、10%）对凝胶特性的影响；保持魔芋胶 4%，乙酰化二淀粉磷酸酯 6%，大豆油 8% 不变，考察不同水解明胶添加量（0、2%、4%、6%、8%、10%）对凝胶特性的影响；保持魔芋胶 4%，乙酰化二淀粉磷酸酯 6%，水解明胶 6% 不变，考察不同大豆油添加量（0、2%、4%、6%、8%、10%）对凝胶特性的影响；

保持魔芋胶 4%，乙酰化二淀粉磷酸酯 6%，水解明胶 6%，大豆油 8%，氯化钙浓度为 0.2 mol/L 不变，考察不同 pH（3、4、5、6、7、8、9、10）对凝胶特性的影响；保持魔芋胶 4%，乙酰化二淀粉磷酸酯 6%，水解明胶 6%，大豆油 8%，pH6.5 不变，考察不同氯化钙浓度（0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 mol/L）对凝胶特性的影响。

1.2.3　正交试验　根据单因素实验结果，按表 1 设计进行正交试验。为消除不同指标间的量纲差异，同时对凝胶强度、质量损失率与感官评定指标进行离差标准化（min-max normalization, MMN），将三者标准化后的数值分别乘以各自权重系数（0.4、0.3 和 0.3，由学校和企业专家共同开会讨论决定）后进行加和，其和值即为综合评分（Y）。

表 1 正交试验因素与水平

Table 1 Factors and level tables of orthogonal experiment

水平	因素				
	A 乙酰化二淀粉磷酸酯添加量(%)	B 水解明胶添加量(%)	C 大豆油添加量(%)	D pH	E 氯化钙浓度(mol/L)
1	5.0	5.0	7.0	5.5	0.30
2	5.5	5.5	7.5	6	0.35
3	6.0	6.0	8.0	6.5	0.40
4	6.5	6.5	8.5	7.0	0.45

1.2.4 质构特性及凝胶强度测定 将上述流体凝胶置于直径 6 cm、高度 10 cm 的圆柱型孔板中,样品表面均匀且高度保持一致,置于室温下平衡 30 min 后,使用质构仪测定。质构测定采用 TPA 模式,参数设定如下:探头 P/0.5,测定前、中、后速度均为 1 mm/s,触发力 5 g,应变 50%,进行两次压缩,两次压缩时间间隔为 4 s,每个样品重复测定 6 次;凝胶强度测定选择相同模式,参数设定如下:探头:P/5S,测试前中后速度均为 1 mm/s,触发力 5 g,应变 50%,每个样品平行测定 15 次。

1.2.5 感官评定 评定方法依据于学萍等[13]、潘治利等[14]的感官评定法并稍作修改,邀请 15 位感官评定经验丰富食品专业人员(7 男 8 女,平均年龄 23 岁)对流体凝胶的挤出流畅性、组织状态、色泽和涂抹性进行综合评分,感官评分标准见表 2。

表 2 感官评分标准

Table 2 Sensory evaluation criteria

评价指标	评价标准	评分范围(分)
挤出流畅性(20分)	能流畅连续挤出	15~20
	挤出流畅性良好	8~14
	挤出困难	1~7
组织状态(40分)	组织状态均匀,光滑,无气泡,无塌陷	27~40
	组织状态较均匀,稍光滑,稍有气泡,稍塌陷	14~26
	组织状态不均匀,粗糙,气泡很多,塌陷厉害	1~13
色泽(20分)	颜色均匀一致,表面光泽度好	15~20
	颜色基本均匀一致,表面光泽度较好	8~14
	颜色不均匀,表面光泽度差	1~7
涂抹性(20分)	易涂抹,涂层连贯均匀	15~20
	较易涂抹,涂层稍不均匀或者不连贯	8~14
	难涂抹,涂层不均匀,不连贯	1~7

1.2.6 动态流变特性 采用 MCR302 流变仪测量流体凝胶的剪切流变性。药匙取 20 mL 流体凝胶均匀分散于平板上。缓慢降低上板(直径 75 mm),两个平行板间隙闭合至 1 mm。动态振荡模式实验:先进行应变扫描,应变扫描范围为 0.1%~100%,固定频率 1 Hz,以此确定线性粘弹区。25 ℃ 恒温下,确定 1% 应变后,进行动态频率扫描,频率扫描范围为 0.1~100 Hz,测定储能模量(G')和损耗模量(G")频率函数曲线。

1.2.7 质量损失率 称取 5 g 流体凝胶置于离心管中,于 4 ℃、10000 r/min 条件下离心 20 min 后,弃去上清液,分别对空离心管、离心前后带凝胶的离心管进行称重,分别记其质量为 m_1、m_2 和 m_3,凝胶质量损失率按式(1)进行计算:

$$质量损失率(\%) = (m_2 - m_3)/(m_2 - m_1) \times 100 \quad 式(1)$$

1.2.8 差示扫描量热分析 称取 20 mg 流体凝胶,放入 40 μL 氧化铝坩埚底部后密封,在流速为 20 mL/min 氮气保护下,将坩埚置于差示扫描量热仪中进行测定,测定温度范围为−50~60 ℃,升温速率为 10 ℃/min,进行差示扫描量热法(differential scanning calorimeter, DSC)分析。水分形态分析[15]:可冻结水(W_f)含量通过样品在 0 ℃ 附近的焓变(ΔH)计算得出,见公式(2)。非冻结水含量(W_{nf})由总水分含量(EWC)减去可冻结水含量(Wf)可得,见公式(3),EWC 按 GB 5009.3-2016《食品中水分的测定》的方法进行测定。

$$W_f(\%) = \frac{\Delta H}{\Delta H_0} \times 100 \quad 式(2)$$

$$W_{nf}(\%) = EWC - W_f \quad 式(3)$$

其中:ΔH 为复合凝胶 DSC 测得吸热峰面积计算的单位质量焓变(J/g);ΔH_0 为纯水的单位质量焓变(J/g),334.00 J/g。

1.2.9 热稳定性 称取 20 mg 样品于热重分析仪中,采用高纯氮气为载气,气体流量为 30 mL/min,以 10 ℃/min 的速度将样品从 25 ℃ 加热至 600 ℃,对样品进行热重(thermogravimetry, TG)和热重微分(thermogravimetric differential, DTG)测定。

1.2.10 分子相互作用力 参考金杨等[16]的方法,并加以调整。将试验样品分别与纯水、0.6 mol/L 氯化钠、0.6 mol/L 脲、0.6 mol/L 十二烷基硫酸钠溶液以 1∶10(wt%)混合搅拌。室温静置平衡 30 min 后采用 1.2.4 质构测定方法,测定实验组与对照组(纯水组)之间凝胶硬度变化,通过凝胶硬度变化值表征静电作用力、氢键、疏水相互作用大小。

1.2.11 傅里叶变换红外光谱 采用傅里叶变换红外光谱(fourier transform infrared spectrometer, FTIR)对复合凝胶进行分析。分别称取 2 mg 冷冻干燥后的凝胶粉末与 200 mg 溴化钾混匀、研磨、压片进行全波段扫描。FTIR 测试条件:波长 4000~400 cm^{-1},分辨率 4 cm^{-1},温度 25 ℃,扫描 32 次。

1.3 数据处理

运用 SPSS 22.0 软件和 Origin 2018 软件进行

数据处理和作图，采用多重比较法中的最小显著差法（least significant difference，LSD），且 $P<0.05$ 判定为显著性差异。

2　结果与分析

2.1　单因素实验结果

2.1.1　基料组分对多元复合流体凝胶质构特性的影响　物料不同添加量对复合流体凝胶质构特性的影响如表 3 所示。随着乙酰化二淀粉磷酸酯的增加，凝胶硬度、粘着性总体呈上升趋势，添加量最大与添加量为 0% 时相比，凝胶硬度和粘度增幅分别为 194.70%、225.81%。由于乙酰化二淀粉磷酸酯具有磷酸酯基团，增大了淀粉膨润率使之充分吸收水分，支撑凝胶体系，从而提高凝胶的质构特性[17]。相比添加量为 0 时，当水解明胶添加量为 10% 时，凝胶硬度、粘着性、内聚性及胶着性均呈下降趋势，凝胶硬度和粘着性降幅较大，分别达 25.84%、42.90%，这可能与水解明胶肽链的静电相互作用和空间排斥力不平衡有关。随着水解明胶添加量的增加，凝胶弹性变化不显著（$P>0.05$），表明水解明胶添加量对凝胶弹性指标影响较小。上述结果与王煜桐等[18] 和 Mirzapour 等[19] 报道的凝胶质构特性随水解明胶添加量变化的趋势一致。粘着性随大豆油的增加显著下降（$P<0.05$），凝胶硬度则先上升后下降。当大豆油含量为 8% 时，凝胶硬度达到最大值（93.49 g）。可能是大豆油与凝胶基质相互作用充当活性填充剂，减少了凝胶基质内颗粒的间隙，提高了蛋白凝胶的硬度，但高浓度大豆油（10%）会导致硬度下降，可能是由于油滴的聚集行为破坏了凝胶网络结构。Jiao 等[20] 研究发现添加 3% 鱼油，鱼糜凝胶硬度有所增加，而进一步添加则会导致凝胶硬度降低。

2.1.2　基料组分对多元复合流体凝胶感官评价的影响　由表 4 可知，随着乙酰化二淀粉磷酸酯添加量的增加，流体凝胶的挤出流畅性、组织状态和涂抹性得分均先上升后下降，可能是凝胶分子间交联作用增大，促使凝胶硬度增强（表 3）。当乙酰化二淀粉磷酸酯添加量大于 8% 时，复合凝胶挤出困难且表面粗糙，添加量为 6% 时，流体凝胶组织状态最好，总体感官得分最高。增加水解明胶添加量，凝胶挤出流畅性和涂抹性增强，组织状态及感官总分先增加后减小。综合考虑，为避免水解明胶对复合凝胶破坏性过大并同时改善复合凝胶流动性，应控制其添加量约为 6%。不同大豆油添加量对流体凝胶的挤出流畅性、色泽和涂抹性差异并不显著，但对组织状态评分呈显著差异。组织状态评分先上升后下降，可能是由于适量的大豆油可增强凝胶强度，但过量的大豆油会从网络孔隙中流出，导致凝胶表面析油严重，塌陷程度变大，组织状态均一性变差[21]。表 3 中凝胶性能变化趋势也印证了上述观点。因此，大豆油添加量为 8% 左右，可有效缓解大豆油析油和组织状态均一性较差的现象，且具有总体最佳感官体验。

2.1.3　基料组分对多元复合流体凝胶流变特性的影响　多元复合流体凝胶动态流变特性须在线性粘弹区内进行测定。线性粘弹区是指复合模量 G'不随应变而变化的区域[22]。由应变扫描曲线（图 1）可知，选取应变为 1% 能确保所施加的应变不会破坏凝胶网络结构。动态流变学考察了不同样品的变化趋势，储能模量 G'表示形变可逆且贮存能量的弹性性质，损耗模量 G"表示形变不可逆而能量损耗的粘性性质[23]。分析图 1 可知，各组样品 G'均大于 G"，即体系以弹性性能为主。G'和 G"均随频率增加而增大，且呈频

表 3　添加不同基料组分制得多元复合流体凝胶质构特性

Table 3　Determination of the texture index of multiple composite fluid gel prepared by adding different base components

基料组分	添加量(%)	硬度(g)	粘着性(g·s)	弹性	内聚性	胶着性(g)
乙酰化二淀粉磷酸酯	0	37.57±3.52^{e}	−135.54±11.79^{a}	0.91±0.03^{a}	0.63±0.06^{a}	23.51±1.78^{d}
	2	39.00±1.89^{e}	−140.33±18.99^{a}	0.89±0.02^{abc}	0.59±0.01^{ab}	22.89±1.09^{d}
	4	57.55±3.32^{d}	−177.35±5.94^{b}	0.86±0.03^{c}	0.53±0.03^{bc}	30.78±2.41^{c}
	6	78.50±3.37^{c}	−238.36±22.43^{c}	0.86±0.05^{bc}	0.54±0.04^{bc}	42.63±3.60^{b}
	8	86.23±5.61^{b}	−294.35±27.85^{d}	0.91±0.03^{ab}	0.50±0.02^{cd}	43.18±4.16^{b}
	10	110.72±2.01^{a}	−441.60±12.13^{e}	0.92±0.02^{a}	0.46±0.04^{d}	51.92±4.04^{a}
水解明胶	0	65.41±2.81^{a}	−320.58±34.6^{d}	0.91±0.04^{a}	0.48±0.03^{a}	48.48±2.61^{a}
	2	62.51±0.31^{b}	−250.02±6.42^{c}	0.90±0.01^{a}	0.45±0.02^{ab}	42.35±1.60^{b}
	4	57.51±1.11^{c}	−220.92±14.39^{bc}	0.90±0.02^{a}	0.44±0.01^{bc}	40.01±0.73^{b}
	6	56.51±1.51^{c}	−199.91±8.65^{ab}	0.91±0.03^{a}	0.40±0.00^{cd}	39.75±2.34^{b}
	8	51.91±1.81^{d}	−189.35±14.69^{ab}	0.91±0.01^{a}	0.39±0.03^{d}	39.59±3.36^{b}
	10	48.51±1.21^{e}	−183.05±6.58^{a}	0.90±0.01^{a}	0.39±0.01^{d}	39.33±0.22^{b}
大豆油	0	75.38±4.10^{b}	−336.58±22.97^{d}	0.75±0.02^{b}	0.59±0.03^{a}	44.29±1.79^{a}
	2	87.95±6.84^{a}	−325.65±9.81^{cd}	0.71±0.02^{b}	0.52±0.02^{bc}	45.51±3.30^{a}
	4	92.62±4.42^{a}	−318.1±9.96^{bcd}	0.72±0.05^{b}	0.51±0.01^{bc}	46.01±1.76^{a}
	6	92.76±4.02^{a}	−296.14±26.07^{bc}	0.72±0.05^{b}	0.51±0.01^{bc}	46.35±0.84^{a}
	8	93.49±1.36^{a}	−285.54±5.74^{b}	0.71±0.02^{b}	0.49±0.05^{c}	42.43±3.98^{a}
	10	80.97±1.78^{b}	−246.98±22.13^{a}	0.83±0.01^{a}	0.55±0.03^{ab}	43.91±2.67^{a}

注：同列同一处理不同小写字母表示差异显著（$P<0.05$）；表4同。

表 4 添加不同基料组分制得多元复合流体凝胶感官评价结果(分)

Table 4 Sensory evaluation results of multiple composite fluid gel prepared by adding different base components (score)

基料组分	添加量(%)	挤出流畅性	组织状态	色泽	涂抹性	感官总分
乙酰化二淀粉磷酸酯	0	17.5±1.0^{a}	20.7±2.3^{c}	16.3±1.2^{a}	16.8±0.8^{c}	71.3±2.1^{b}
	2	17.3±1.4^{a}	20.7±2.0^{c}	17.2±1.5^{a}	18.2±0.8^{a}	73.3±2.4^{b}
	4	18.0±0.6^{a}	25.7±2.0^{b}	17.2±0.8^{a}	17.8±1.2^{a}	78.7±1.6^{b}
	6	12.0±0.8^{b}	27.5±0.8^{a}	17.5±1.0^{a}	17.3±1.0^{bc}	79.7±1.5^{a}
	8	12.0±2.5^{b}	14.3±1.4^{d}	17.3±0.8^{b}	13.2±1.9^{d}	56.8±4.3^{c}
	10	9.7±2.2^{c}	9.3±2.3^{e}	17.2±0.8^{c}	10.8±1.9^{e}	47.0±3.7^{d}
水解明胶	0	17.3±1.0^{b}	21.2±1.7^{c}	17.3±0.5^{a}	16.8±0.8^{c}	72.7±3.0^{c}
	2	17.3±0.5^{b}	22.8±1.6^{b}	17.7±0.5^{a}	17.3±0.8^{c}	75.2±1.5^{b}
	4	17.7±0.5^{ab}	24.2±0.8^{a}	17.8±1.2^{a}	17.7±0.8^{bc}	77.3±1.9^{b}
	6	18.0±0.6^{ab}	24.0±1.1^{a}	18.0±0.6^{a}	18.2±0.8^{ab}	78.2±1.9^{a}
	8	18.0±0.9^{ab}	20.2±1.5^{cd}	17.5±1.0^{a}	18.5±0.5^{ab}	74.2±1.9^{bc}
	10	18.5±0.8^{a}	18.8±0.8^{d}	18.2±0.8^{a}	18.7±0.5^{a}	74.2±1.2^{bc}
大豆油	0	18.2±0.8^{a}	18.2±0.8^{c}	18.2±1.2^{a}	18.3±0.5^{ab}	72.8±1.8^{c}
	2	18.3±0.5^{a}	19.3±1.0^{c}	18.5±0.8^{a}	18.5±0.5^{a}	74.7±2.0^{b}
	4	18.2±0.8^{a}	21.0±1.7^{b}	18.5±0.5^{a}	18.0±0.6^{ab}	75.7±2.3^{ab}
	6	18.3±0.5^{a}	21.7±0.b^{ab}	18.2±0.8^{a}	18.2±0.8^{ab}	76.3±1.0^{ab}
	8	18.5±0.5^{a}	22.8±0.8^{a}	18.2±0.8^{a}	17.8±0.4^{ab}	77.3±1.0^{a}
	10	17.7±1.0^{a}	19.3±1.0^{c}	18.3±0.5^{a}	17.7±0.5^{b}	73.0±1.3^{c}

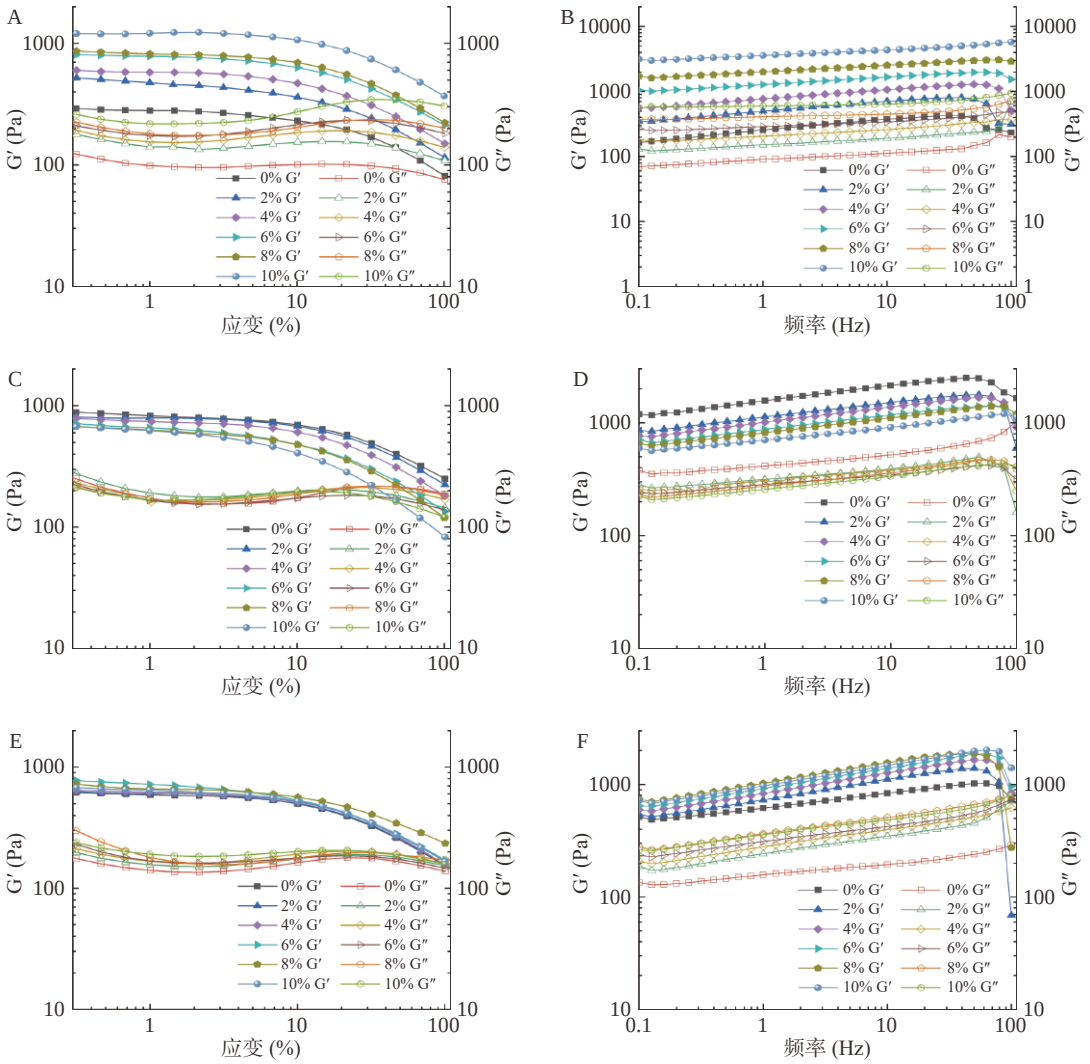


图 1 添加不同基料组分制得多元复合流体凝胶动态流变特性

Fig.1 Dynamic rheological properties of multiple composite fluid gel prepared by adding different base components

注: A、C、E 和 B、D、F 分别为添加乙酰化二淀粉磷酸酯、水解明胶及大豆油后模量的变化。

率依赖性，说明体系具有典型的弱凝胶特性。G'和 G"随乙酰化二淀粉磷酸酯添加量增加而增大，当添加量为 10% 时，G'和 G"达到最大值（图 1B）。说明该流体凝胶在乙酰化二淀粉磷酸酯作用下，分子间网络交联程度显著增加。这与修琳等[24] 研究的多糖蛋白凝胶储能与损耗模量均随淀粉增加而增加的趋势相似。随水解明胶的添加，G'和 G"均呈下降趋势。水解明胶添加量为 10% 时，流动性最强，G'和 G"则降至最低值（图 1D）。张炜杰等[25] 发现水解明胶的小分子链起润滑作用，减少了分子间流动时的摩擦力，宏观表现为粘度降低，流动性增加。由图 1F 可知，大豆油添加量为 8% 时，G'和 G"最大；当添加量大于 8%，G'和 G"开始下降，可能是复合凝胶大分子间相分离，形成不同相的浓度差，导致体系结构和性质出现差异。这与凝胶质构特性变化（表 3）相呼应。Wu 等[26] 发现复合凝胶中添加的油脂可作为活性填充剂能与基质作用，能增强储能模量及凝胶强度。三种基料物质随着频率增加，储能模量与损耗模量始终呈缓慢增加的变化趋势，说明该凝胶体系稳定性较强。由图 1B 可知，在频率接近 100 Hz 时，乙酰化二淀粉磷酸酯组的模量变化最小，说明该淀粉对体系稳定性可能有一定的促进作用。

2.1.4　pH 和氯化钙浓度对多元复合流体凝胶稳定性的影响　质量损失率和凝胶强度能反映凝胶稳定性及凝胶性能，可直观地评价凝胶品质和质量。凝胶质量损失率与其结构有关，凝胶强度越强结构越稳定，质量损失率越低。由图 2A 可知，凝胶强度随 pH 升高先增加后减小，当 pH 为 6 时，凝胶强度最大（98.23 g）。由于 pH 靠近水解凝胶等电点时，分子间静电斥力降低且氢键生成，促使凝胶网络的形成和成长；反之，当 pH 远离其等电点时，分子链展开，分子相互靠近较困难，凝胶强度减弱[27]。观察图 2A 可知，复合流体凝胶质量损失率与凝胶强度呈负相关，凝胶强度越强，质量损失率越小。质量损失主要是由于析油现象，大豆油填充于凝胶网络结构中，当凝胶三维网络结构越紧密，凝胶强度越强，对大豆油的束缚力也越强，从而降低了复合流体凝胶的质量损失率。

图 2B 显示，不同氯化钙浓度影响下，复合流体凝胶的凝胶强度和质量损失率均有一定的差异。随着盐浓度的增加，凝胶强度呈先上升后下降的趋势，质量损失率变化趋势与之相反。当氯化钙浓度为 0.4 mol/L 时，凝胶强度升至最大值（118.31 g），质量损失率降至最小值（1.4%）。Cao 等[28] 发现由于钙离子对多糖-蛋白凝胶中的带电物质能产生静电屏蔽效应。因此，适当添加钙离子能显著提高凝胶强度（P<0.05），但过量盐离子将中和体系的负电荷，使凝胶之间斥力减弱，形成的网络节点数也随之减少，凝胶强度降低[29]。适量钙离子可使多糖凝胶体系孔径变小、孔径数量增加，提高体系持水性和凝胶强度，但过量钙离子则导致凝胶相分离[30]。

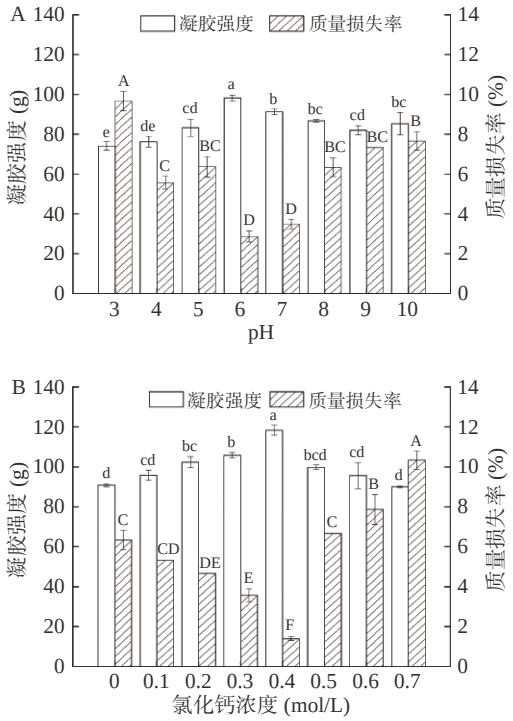


图 2　不同 pH 和氯化钙浓度对多元复合流体凝胶强度和质量损失率的影响

Fig.2　Effects of different pH and calcium chloride concentration on gel strength and mass loss rate of multiple composite fluid gels

注：A 为 pH；B 为氯化钙浓度；不同字母表示各组间差异显著（P<0.05）。

2.2　正交试验确定最优配方工艺

根据单因素实验结果，选择乙酰化二淀粉磷酸酯、水解明胶及大豆油添加量，氯化钙浓度及 pH 作为考察对象，采用 5 因素 4 水平方法，以综合评分（Y）为指标，按照 $L_{16}(4^5)$ 正交表进行正交试验，正交试验结果见表 5，方差分析结果见表 6。由表 5 可知，复合凝胶为 KAHS-5 组和 KAHS-14 组综合评分较高，分别为 0.76 和 0.83。经离差标准化分析可知，各因素对粘弹性流体凝胶影响程度依次为 B>A>E>C>D，且 D 为不显著因素，理论最佳配方为 $A_4B_2C_3D_3E_2$，即乙酰化二淀粉磷酸酯 6.5%、水解明胶 5.5%、大豆油 8%、pH6.5、氯化钙 0.35 mol/L。经外部重复试验验证三次后，其综合评分高达 0.98±0.01，故可将其定义为“最优组”，记为 KAHS-S-H。观察表 5，基于综合评分高低，从中进一步筛选出综合评分最低的 KAHS-4 组（为 0.01），以及综合评分居中的 KAHS-7 组（为 0.57），将其分别定义为“最低组”和“中间组”，依次记为 KAHS-4-L 和 KAHS-7-M。本研究后续对三组不同配方复合凝胶（最低组、中间组和最优组）的热稳定性进行比较分析，并初步探讨其内在机制。

2.3　不同综合评分等级的多元复合流体凝胶热稳定性分析

图 3A 为复合流体凝胶差示扫描量热图，各组凝

表 5 正交试验结果

Table 5 The results of orthogonal test

试验号	因素					指标			
	A 乙酰化二淀粉磷酸酯	B 水解明胶	C 大豆油	D pH	E 氯化钙	凝胶强度(g)	质量损失率(%)	感官总分(分)	综合评分(Y)
1	1	1	1	1	1	73.82	5.55	77.5	0.48
2	1	2	2	2	2	80.89	4.89	79.3	0.75
3	1	3	3	3	3	71.99	5.33	74.8	0.36
4	1	4	4	4	4	62.33	6.44	73.0	0.01
5	2	1	2	3	4	81.80	4.00	77.3	0.76
6	2	2	1	4	3	77.49	4.00	76.2	0.64
7	2	3	4	1	2	79.70	5.55	77.3	0.57
8	2	4	3	2	1	78.90	5.11	76.3	0.55
9	3	1	3	4	2	76.41	4.00	74.5	0.55
10	3	2	4	3	1	75.00	5.78	77.5	0.48
11	3	3	1	2	4	69.68	4.44	75.3	0.44
12	3	4	2	1	3	65.47	5.78	72.8	0.12
13	4	1	4	2	3	71.89	5.11	76.8	0.47
14	4	2	3	1	4	88.47	4.89	78.7	0.83
15	4	3	2	4	1	78.43	4.22	76.0	0.62
16	4	4	1	3	2	79.36	3.56	75.5	0.68
K_1	1.60	2.26	2.25	2.00	2.14				
K_2	2.52	2.70	2.25	2.21	2.54				
K_3	1.58	1.98	2.29	2.28	1.59				
K_4	2.61	1.37	1.52	1.82	2.04				
R	1.03	1.33	0.76	0.46	0.96				
最优水平	A_4	B_2	C_3	D_3	E_2				
最优配方(S)	$A_4B_2C_3D_3E_2$								

表 6 基于综合评分的正交试验方差分析

Table 6 The variance analysis of orthogonal test based on comprehensive score

方差来源	III型平方和	自由度	均方	F	显著性
校正模型	280.001[a]	15	18.667	11.030	0.000*
截距	341436.658	1	341436.658	201742.511	0.000*
A	93.958	3	31.319	18.505	0.000*
B	78.046	3	26.015	15.371	0.000*
C	54.815	3	18.272	10.796	0.000*
D	8.127	3	2.709	1.601	0.209
E	45.056	3	15.019	8.874	0.000*
误差	54.158	32	1.692		
总计	341770.818	48			
校正的总计	334.159	47			

注: *表示显著(P<0.05); a: R^2=0.838(调整R^2=0.762)。

胶样品的谱峰反映其热焓变化。复合凝胶最低组(KAHS-4-L)、中间组(KAHS-7-M)和最优组(KAHS-S-H)谱图相似,−20~0 ℃之间均有一个较宽的吸收峰,表明复合凝胶中可冻结水在升温过程中发生了焓变,故可知体系中可冻结水和非冻结水含量。通过分析焓变可知,三组复合凝胶中最优组可冻结水含量最低(8.22%),非冻结水含量最高(50.33%)。

图 3B 结果显示,最低组、中间组、最优组三组热解最终固体残留物分别为 13.41%、13.66%、14.51%,且最优组热重曲线总体位于其他两组上方,表明最优组凝胶热稳定性最好。DTG 曲线显示(图 3C),三组样品均出现 3 个明显的失重峰,表明其热分解主要分为三阶段:第一阶段(30~200 ℃),此阶段凝胶体系开始失去自由水和中间水,由于最优组的自由水与亲水基团紧密结合,形成的非冻结结合水使结构更稳定,故第一阶段最优组失重速率小于其他两组;第二个阶段(200~300 ℃),主要失去非冻结水,体系中亲水基团的结合水脱除及凝胶侧链上的氢键受热断裂分解;最后阶段(300~600 ℃),主要是凝胶体系大分子链的分解。凝胶体系热稳定性与分子作用力有关,根据图 3 结果推测,最优组凝胶分子作用力可能显著强于另外两组。

由表 7 可知,三组复合凝胶的熔融峰起点均小于 0 ℃。根据“三态水”模型可知,当复合凝胶达到溶胀平衡时,可冻结中间水含量较低,其熔融峰被自由水掩盖、叠加[31]。同时,复合凝胶吸收峰温度有所偏移,且吸收峰温度最优组<中间组<最低组,即最优组冰点温度最低。结合焓变结果可知,最优组中水分子有生成更多氢键的可能,以形成类似“笼形”的“聚集体”,增强凝胶网络与水分子之间作用力,将更多水分子禁锢在复合凝胶网络中,使不易流动的水流动性变差、冰点下降,吸热峰的峰值向低温区移动。综上分析,最优组持水能力比最低组和中间组强。

2.4 不同综合评分等级的多元复合流体凝胶分子间作用力分析

复合流体凝胶需要一定分子间作用力来维持凝胶内部结构,作用力类型可能为静电作用、氢键、疏水作用等。本研究通过添加对凝胶有不同破坏作用的试剂来确定分子间作用力类型。氯化钠主要削弱静电作用,但对氢键作用无影响;脲则破坏氢键作用,

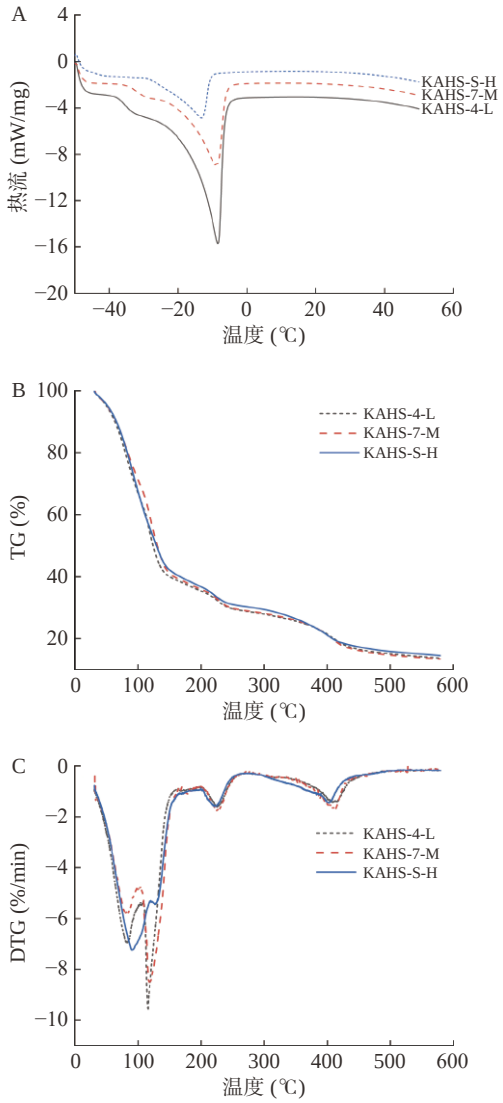


图 3　不同综合评分等级的多元复合流体凝胶热稳定性分析结果

Fig.3　Thermal stability analysis results of multiple composite fluid gels with different comprehensive scoring grades

表 7　不同综合评分等级的多元复合流体凝胶水分分布状态

Table 7　Moisture distribution of multiple composite fluid gels with different comprehensive scoring grades

指标	KAHS-4-L	KAHS-7-M	KAHS-S-H
θ_0(℃)	−16.54±0.28^a	−18.15±0.06^b	−24.27±0.57^c
θ_t(℃)	−8.63±0.17^a	−9.00±0.28^a	−13.25±0.11^b
Δθ(℃)	7.91±0.33^c	9.15±0.29^b	11.02±0.58^a
ΔH_0(J/g)	334.00	334.00	334.00
ΔH(J/g)	46.13±1.43^a	36.88±0.62^b	27.46±0.85^c
EWC(%)	58.45±2.23^a	58.55±1.56^a	58.55±2.5^a
W_f(%)	13.81±0.43^a	11.04±0.27^b	8.22±0.24^c
W_{nf}(%)	44.64±2.27^b	47.51±1.58^{ab}	50.33±2.51^a

注：θ_0为开始熔化的温度；θ_t为峰值温度；同行不同字母表示各组间差异显著(P<0.05)。

且不会削弱静电作用；SDS 则破坏疏水作用。通过以上破坏力间接判断分子间作用力大小[32]。图 4A 反映不同试剂作用后，与对照组相比凝胶硬度的变化值来表征相互作用力大小。各组凝胶分子间作用力

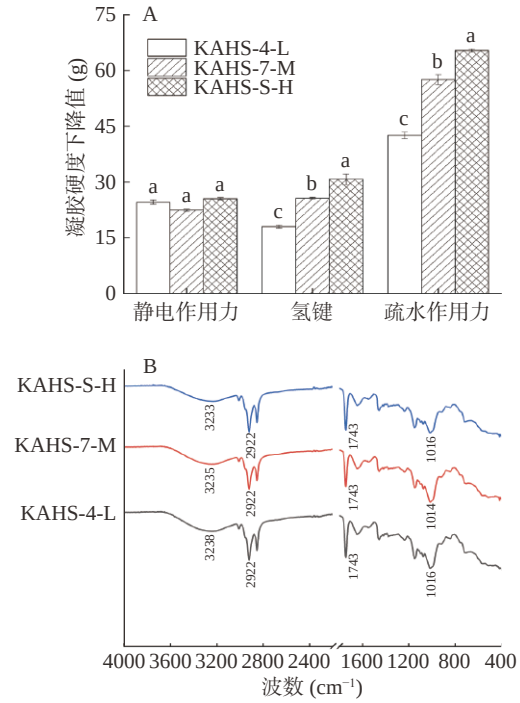


图 4　不同综合评分等级的多元复合流体凝胶分子间作用力分析结果

Fig.4　Intermolecular force analysis results of multiple composite fluid gels with different comprehensive scoring grades

注：不同小写字母表示同一指标差异显著(P<0.05)。

主要是疏水作用力，氢键和静电作用力相对较弱，说明疏水作用力是凝胶体系中维持网络结构的主要因素，且最优组疏水作用力最高。一方面，可能因为复合凝胶暴露大量疏水性氨基酸残基，显著增强了分子间疏水相互作用；另一方面，疏水作用力是维持魔芋胶三维结构的主要作用力，90 ℃ 热诱导后，疏水作用力提高[33]。李晓飞等[34]研究发现的温度降低会使凝胶体系疏水作用力减弱，侧面印证了此观点。同时，最优组氢键比其他两组强。综上所述，最优组分子作用力相对最强，与上述结论中最优组热稳定性较强的现象相呼应。

FTIR 是用于研究分子结构的常用手段，根据光谱图中振动谱带的强度、宽度和出峰位置等信息，可从分子水平分析高聚物的构象变化。观察图 4B 可知，最低组、中间组、最优组三组凝胶样品具有相似的红外光谱，表明三组复合凝胶均没有生成新官能团，最低组、中间组、最优组分别在 3238.48、3235.55、3233.12 cm^{-1} 附近出现较大峰，且凝胶发生红移，分子间 O-H 氢键伸缩振动，与分子内和分子间的氢键作用有关。O-H 氢键伸缩振动向低波数方向移动，分子间键能增强[35]，表明最优组氢键大于其他两组，这与分子作用力结论相互印证。

3　结论

本研究创制了一种新型多元流体凝胶体系。随着乙酰化二淀粉磷酸酯和大豆油添加量的升高，该流体凝胶的硬度、储能模量及损耗模量呈递增趋势，表

明加入乙酰化二淀粉磷酸酯和大豆油能够增强复合凝胶相互作用力和网络结构。然而，随着水解明胶添加量的升高，上述指标呈相反趋势。通过正交试验确定了复合凝胶的最优工艺配方：6.5% 乙酰化二淀粉磷酸酯、5.5% 水解明胶和 8% 大豆油，保持 pH 及氯化钙浓度分别为 6.5、0.35 mol/L。热重及差示扫描量热结果显示，最优组复合凝胶的热稳定及持水性最佳，凝胶分子间作用力主要为疏水作用力，其次为氢键和静电作用力，且最优组复合凝胶的氢键和疏水作用力最强。傅里叶红外光谱结果同样表明，最优组复合凝胶的氢键键能高于最低组和中间组。为制备新型多元流体凝胶提供了基础研究。

参考文献

[1] FERNANDEZ F I, DOUAIRE M, NORTON I T. Rheology and tribological properties of Ca-alginate fluid gels produced by diffusion-controlled method[J]. Food Hydrocolloids, 2013, 32(1): 115−122.

[2] SMANIOTTO F, ZAFEIRI I, PROSAPIO V, et al. Understanding the encapsulation and release of small molecular weight model actives from alginate fluid gels[J]. Food Structure, 2021, 27(6): 100179.

[3] GHEBREMEDHIN M, SEIFFERT S, VILGIS T A. Physics of agarose fluid gels: Rheological properties and microstructure[J]. Current Research in Food Science, 2021, 4(2): 436−448.

[4] YU B, ZHENG L, CUI B, et al. The effects of acetylated distarch phosphate from tapioca starch on rheological properties and microstructure of acid-induced casein gel[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 159: 1132−1139.

[5] CAO W, SHI L, HAO G, et al. Effect of molecular weight on the emulsion properties of microfluidized gelatin hydrolysates[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 111: 106267.

[6] HU Y, HE C, ZHANG M, et al. Inhibition from whey protein hydrolysate on the retrogradation of gelatinized rice starch[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 108: 105840.

[7] NUANMANO S, PRODPRAN T, BENJAKUL S. Potential use of gelatin hydrolysate as plasticizer in fish myofibrillar protein film[J]. Food Hydrocolloids, 2015, 47: 61−68.

[8] TARTE R, PAULUS J S, ACEVEDO N C, et al. High-oleic and conventional soybean oil oleogels structured with rice bran wax as alternatives to pork fat in mechanically separated chicken-based bologna sausage[J]. LWT, 2020, 131: 109659.

[9] 朱科学, 赵书凡, 朱红英, 等. 苦丁茶冬青多糖流变学特性研究[J]. 食品工业科技, 2017, 38(22): 61−65. [ZHU K X, ZHAO S F, ZHU H Y, et al. Rheological properties of polysaccharide isolated from llex kudingcha C. J. Tseng[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(22): 61−65.]

[10] LOPEZ G, RICHTERING W. Oscillatory rheology of carboxymethyl cellulose gels: Influence of concentration and pH[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 267: 118117.

[11] WANG W, JIANG L, REN Y, et al. Gelling mechanism and interactions of polysaccharides from mesonablumes: Role of urea and calcium ions[J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 212: 270−276.

[12] BASSE B, BOSC V, SAITER J M, et al. Combined effects of ionic strength and enzymatic pre-treatment in thermal gelation of peanut proteins extracts[J]. Food Research International, 2020, 137: 109362.

[13] 于学萍, 童群义. 乙酰化二淀粉磷酸酯对豪猪肝酱稳定性的影响研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(1): 288−292. [YU X P, TONG Q Y. Effect of acetylated distarch phosphate on stability of porcupine liver sauce[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(1): 288−292.]

[14] 潘治利, 张垚, 艾志录, 等. 马铃薯淀粉糊化和凝胶特性与马铃薯粉品质的关系[J]. 食品科学, 2017, 38(5): 197−201. [PAN Z L, ZHANG Y, AI Z L, et al. Relationship between gelatinization and gelling properties of potato starch and potato noodles[J]. Food Science, 2017, 38(5): 197−201.]

[15] YOSHIKO I, XU X, TADASHI T, et al. Enzymatically depolymerized alginate oligomers that cause cytotoxic cytokine production in human mononuclear cells[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2003, 67(2): 258−263.

[16] 金杨, 刘丽莎, 张小飞, 等. 凝固温度对填充豆腐凝胶特性及分子间作用力的影响[J]. 食品科学, 2020, 41(23): 49−55. [JIN Y, LIU L S, ZHANG X F, et al. Effect of coagulation temperature on gelling properties and chemical forces of Tofu coagulated with glucono-δ-lactone[J]. Food Science, 2020, 41(23): 49−55.]

[17] 吴香, 李新福, 李聪, 等. 变性淀粉对肌原纤维蛋白凝胶特性的影响[J]. 食品科学, 2020, 41(2): 22−28. [WU X, LI X F, LI C, et al. Effect of different modified starches on gel properties of myofibrillar protein[J]. Food Science, 2020, 41(2): 22−28.]

[18] 王煜桐, 马洪梅. 水解明胶对明胶凝冻强度的影响探究[J]. 明胶科学与技术, 2014, 34(1): 43−44. [WANG Y T, MA H M. Effect of hydrolyzed gelatin on gelatin gel strength[J]. The Science and Technology of Gelatin, 2014, 34(1): 43−44.]

[19] MIRZAPOUR-KOUHDASHT A, MOOSAVI-NASAB M, KRISHNASWAMK K, et al. Optimization of gelatin production from barred mackerel by-products: Characterization and hydrolysis using native and commercial proteases[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 108: 105970.

[20] JIAOX D, CAO H W, FAN D M, et al. Effects of fish oil incorporation on the gelling properties of silver carp surimi gel subjected to microwave heating combined with conduction heating treatment[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 94: 164−173.

[21] WANG X, FENG Y, FENG T, et al. Modulation effect of glycerol on plasticization and water distribution of vacuum-dried calcium alginate gel beads encapsulating peppermint oil/β-cyclodextrin complex[J]. Food Bioscience, 2021, 41(7): 100968.

[22] 周凤娟, 许时婴, 杨瑞金, 等. 可溶性丝素蛋白的流变性质和胶凝性质[J]. 食品科学, 2007, 28(12): 58−62. [ZHOU F J, XU S Y, YANG R J, et al. Rheological properties and gel properties of soluble silk fibroin from sikl waste[J]. Food Science, 2007, 28(12): 58−62.]

[23] CHEN D, FANG F, FEDERICI E, et al. Rheology, microstructure and phase behavior of potato starch-protein fibril mixed gel[J]. Carbohydr Polym, 2020, 239: 116247.

[24] 修琳, 张淼, 许秀颖, 等. 绿豆蛋白对荞麦淀粉糊化和流变

特性的影响[J]. 食品科学，2020，41(16)：57−61. [XIU L, ZHANG M, XU X Y, et al. Effect of mung bean protein on gelatinization and rheological properties of buckwheat starch[J]. Food Science, 2020, 41(16): 57−61.]

[25] 张炜杰，丁丁. 水解明胶对明胶流变性能的影响[J]. 明胶科学与技术，2014，34(3)：141−146. [ZHANG W J, DING D. Effect of hydrolyzed gelatin on rheological properties of gelatin[J]. The Science and Technology of Gelatin, 2014, 34(3): 141−146.]

[26] WU M, XIONG Y L, CHEN J. Rheology and microstructure of myofibrillar protein–plant lipid composite gels: Effect of emulsion droplet size and membrane type[J]. Journal of Food Engineering, 2011, 106(4): 318−324.

[27] 满泽洲，涂宗财，王辉，等. 加工条件对鱼鳞明胶凝胶性能和微观结构的影响[J]. 食品科学，2013，34(23)：67−71. [MAN Z Z, TU Z C, WANG H, et al. Effects of processing conditions on gel performance and microstructure of fish scale gelatin[J]. Food Science, 2013, 34(23): 67−71.]

[28] CAO L, LU W, GE J, et al. Modulation of oligoguluronate on the microstructure and properties of Ca-dependent soy protein gels [J]. Carbohydr Polym, 2020, 250: 116920.

[29] YANG J, SHEN M, WU T, et al. Role of salt ions and molecular weights on the formation of mesona chinensis polysaccharide-chitosan polyelectrolyte complex hydrogel[J]. Food Chemistry, 2020, 333: 127493.

[30] 王撼辰，丑述睿，崔慧军，等. 钙离子添加量对苹果果胶-苹果多酚复配物体系流变、凝胶及质构特性的影响[J]. 食品科学，2019，40(24)：46−52. [WANG H C, NIU S R, CUI H J, et al. Impacts of Calcium ion addition on rheological, gel and textural properties of apple pectin-apple polyphenol compound[J]. Food Science, 2019, 40(24): 46−52.]

[31] BABA T, SAKAMOTO R, SHIBUKAWA M, et al. Solute retention and the states of water in polyethylene glycol and poly (vinyl alcohol) gels[J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1040 (1): 45−51.

[32] 任仙娥，李春枝，杨锋，等. 涡流空化改善大豆分离蛋白溶解性的分子间作用机制[J]. 食品科学，2020，41(3)：93−98. [REN X E, LI C Z, YANG F, et al. Intermolecular interaction mechanism for improvement in solubility of soy protein isolate by swirling cavitation[J]. Food Science, 2020, 41(3): 93−98.]

[33] CHEN J, LI J, LI B. Identification of molecular driving forces involved in the gelation of konjac glucomannan: Effect of degree of deacetylation on hydrophobic association[J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 86(2): 865−871.

[34] 李晓飞，李培源，李安琪，等. 黄原胶添加对碱法诱导魔芋胶凝胶特性及凝胶机制的影响[J]. 中国农业科学，2020，53(14)：2941−2955. [LI X F, LI P Y, LI A Q, et al. Effects of xanthan addition on the gel properties and gel mechanism of alkaline-induced konjac glucomannan gels[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2020, 53 (14): 2941−2955.]

[35] JIANG W X, QI J R, LIAO J S, et al. Acid/ethanol induced pectin gelling and its application in emulsion gel[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 118(1): 106774.

侯钰柯，陆逸峰，蒋宇飞，等. 肉杂鸡鸡骨架酶解工艺优化及其分析评价 [J]. 食品工业科技，2022, 43(9)：232−242. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100097

HOU Yuke, LU Yifeng, JIANG Yufei, et al. Optimization and Evaluation of Enzymatic Hydrolysis Process of Hybrid Broilers Skeleton[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 232−242. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100097

· 工艺技术 ·

肉杂鸡鸡骨架酶解工艺优化及其分析评价

侯钰柯[1,2]，陆逸峰[1,2]，蒋宇飞[3]，康明丽[4]，韩敏义[1,2,3,*]，徐幸莲[1,2]

（1.南京农业大学食品科技学院，江苏南京 210095；
2.农业部肉品加工重点实验室，江苏省肉类生产与加工质量安全控制协同创新中心，江苏南京 210095；
3.温氏食品集团股份有限公司，广东云浮 527400；
4.河北科技大学食品与生物学院，河北石家庄 050018）

摘　要：以肉杂鸡鸡骨架为原料，测定其基本成分和氨基酸组成，对蛋白质进行营养评价，发现鸡骨架是进行酶解的良好原料。从碱性蛋白酶、风味蛋白酶、胰酶和复合蛋白酶中筛选出鸡骨架酶解的最佳用酶，利用单因素实验和响应面法优化了鸡骨架酶解的工艺条件。结果表明：在温度 50 ℃、pH7.0、酶添加量 7000 U/g 的条件下酶解 4 h，酶解效率最高，水解度和氮回收率分别为（33.54%±0.02%）和（96.20%±0.03%），与响应面优化试验回归模型的预测值基本一致。在此基础上制备鸡骨架酶解液，对酶解液氨基酸含量和肽的分子量分布进行检测，发现分子量<1000 Da 的肽段占比最高，达到 83.25%；必需氨基酸含量高，占氨基酸总量的 54.27%，营养价值高，且含有丰富的鲜味氨基酸。由氨基酸滋味活性值（Taste activity value, TAV）可知酶解前的样品味感以甜味、鲜味为主，酶解后以苦味、鲜味为主。该研究可为鸡骨架的高值化利用提供理论依据和数据支持。

关键词：鸡骨架，营养成分，酶解，响应面法，肽分子量分布，氨基酸评价

中图分类号：TS251.9　　**文献标识码：**B　　**文章编号：**1002−0306(2022)09−0232−11

DOI： 10.13386/j.issn1002-0306.2021100097

本文网刊：

Optimization and Evaluation of Enzymatic Hydrolysis Process of Hybrid Broilers Skeleton

HOU Yuke[1,2]，LU Yifeng[1,2]，JIANG Yufei[3]，KANG Mingli[4]，HAN Minyi[1,2,3,*]，XU Xinglian[1,2]

（1.College of Food Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China；
2.Key Laboratory of Meat Products Processing, Ministry of Agriculture, Jiangsu Collaborative Innovation Center of Meat Production and Processing, Quality and Safety Control, Nanjing 210095, China；
3.Wens Food Group Co., Ltd., Yunfu 527400, China；
4.College of Food Science and Biology, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China）

Abstract: The basic composition and amino acid composition of hybrid broilers skeleton were determined, and the nutritional evaluation of protein was carried out. Hybrid broilers skeleton was found to be a good raw material for enzymatic hydrolysis. The optimum enzyme for hybrid broilers skeleton enzymatic hydrolysis was selected from alkaline protease, flavor protease, trypsin and compound protease. The single factor test and response surface methodology were used to optimize the technological conditions of chicken skeleton enzymatic hydrolysis. The results revealed that under the conditions of temperature 50 ℃, pH7.0 and enzyme dosage 7000 U/g for 4 h, the hydrolysis degree and nitrogen recovery were (33.54%±0.02%) and (96.20%±0.03%), respectively, which were basically consistent with the predicted values of the

收稿日期：2021−10−13

基金项目：国家重点研发计划资助（2019YFC1606200）；温氏股份科技重大专项（WENS-2020-1-ZDZX-007）；国家自然科学基金：肌原纤维蛋白糖基化对类 PSE 肉凝胶品质改善机理研究（31571854）。

作者简介：侯钰柯（1998−），女，硕士研究生，研究方向：肉品加工与质量控制，E-mail: h13949090361@163.com。

*** 通信作者：**韩敏义（1975−），男，博士，副研究员，研究方向：肉品加工与质量控制，E-mail: myhan@njau.edu.cn。

regression model of response surface optimization test. On this basis, the chicken skeleton hydrolysate was prepared, and the amino acid content and molecular weight distribution of peptide were detected. The proportion of peptides with molecular weight <1000 Da was the highest, reaching 83.25%. The content of essential amino acids was high, accounting for 54.27% of the total amino acids, with high nutritional value, and rich in umami amino acids. According to the TAV value of amino acid, the taste perception of samples before enzymatic hydrolysis was mainly sweet and umami, while after enzymatic hydrolysis, it was mainly bitter and umami. This investigation could provide theoretical references and data support for the high value utilization of chicken skeleton.

Key words: hybrid broilers skeleton; nutritional ingredient; enzymatic hydrolysis; response surface method; molecular weight distribution of peptide; amino acid evaluation

近年来，我国肉类消费量呈不断增长趋势，鸡肉作为人们日常饮食的重要组成部分，因其滋味鲜美、营养丰富在全球食品市场上占据重要地位。根据美国农业部（USDA）的数据，2020 年全球肉鸡总产量达到 1.01 亿吨[1]，鸡肉产量增加的同时也产生了大量的副产物——鸡骨架。鸡骨架是分割鸡肉生产的主要副产物，由鸡骨、鸡肉和鸡皮组成，新鲜鸡骨架中水分含量约 65%、蛋白质 16%、脂肪 14%，同时呈味氨基酸含量高于鸡肉，有较高的营养价值，具有作为风味基料的潜力[2]。

近年来陆续有研究学者以畜禽骨架为原料，通过酶解反应制备热反应鸡肉香精的前体物质。赵永珍等[3] 利用风味蛋白酶和复合蛋白酶复合水解，探究了酶解液的最佳工艺参数和不同酶解液对美拉德反应的影响。郑红[4] 研究了酶种类和酶解工艺对鸡骨架蛋白水解度和风味的影响。刘贺等[5] 对酶解工艺进行了优化，并对酶解液的游离氨基酸含量进行了测定。这些通过酶解反应制备的鸡肉香精的前体物质被广泛应用于调味品、速冻食品和方便面等食品工业化加香产品的生产中[6]。肉杂鸡是优秀的肉鸡和生产性能先进的蛋鸡杂交产生的，生长速度快、抗病力强、肉质好，有不可替代的特点和优势。有研究将其与进口商品肉鸡和淘汰蛋鸡相比，发现肉杂鸡具有更优质的蛋白质（22.36 g/100 g）、更高的微量元素（6.83 mg/100 g）、必需氨基酸含量（36.26 g/100 g）和胶原蛋白含量（3.14 mg/g）以及更低的肌内脂肪含量（1.12 g/100 g），表现出了较强的优势[7]，顺应了部分消费和食品加工的需求，当前在鸡肉占比中，肉杂鸡比重持续增加。目前，用于酶解制备热反应鸡肉香精前体物质的原料大多为白羽肉鸡[8–10]，对于肉杂鸡的报道较少。

本文以肉杂鸡鸡骨架为原料，分析了肉杂鸡鸡骨架的基本营养成分和游离氨基酸含量，根据 FAO/WHO 推荐成人模式，以氨基酸评分标准模式（AAS）为参考量，对肉杂鸡鸡骨架蛋白质进行营养评价。以氮回收率和水解度为指标，从碱性蛋白酶、风味蛋白酶、胰酶和复合蛋白酶四种酶中筛选出酶解鸡骨架的最佳用酶，通过单因素实验和响应面法优化酶解条件，对最优酶解条件的氨基酸组成和肽分子量分布进行分析，采用氨基酸 TAV 值分析酶解前后味感，为鸡骨架酶解深加工利用提供理论参考。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

肉杂鸡鸡骨架　取自新兴县温氏佳丰食品有限公司鸡肉分割生产线，品种为 818 肉杂鸡，日龄 52 d 左右，母鸡，宰后成熟时间约 1~2 h；胰酶、碱性蛋白酶、风味蛋白酶、复合蛋白酶（几种酶的最适 pH、温度和酶活力见表 1）　金克隆生物技术有限公司；氢氧化钠、盐酸、浓硫酸、溴甲酚绿、甲基红、甲醛、三乙胺、甲醇、异硫氰酸苯酯　分析纯，上海麦克林生化科技有限公司；细胞色素 C（MW12384）、抑肽酶（MW6500）、杆菌肽（MW1422）、乙氨酸—乙氨酸—酪氨酸—精氨酸（MW451）、乙氨酸—乙氨酸—乙氨酸（MW189）　标准品，Sigma 公司。

表 1　不同蛋白酶最适 pH 和温度

Table 1　Optimal pH and temperature of various proteases

酶的种类	最适pH	最适温度（℃）	酶活力（U/g）
EZ0770 胰酶	8.0	50	4000
EZ1370 碱性蛋白酶	10.5	50	20000
EZ0420 风味蛋白酶	7.0	50	30000
EZ1330 复合蛋白酶	7.5	50	10000

FOSS Kjeltec8400 凯氏定氮仪　丹麦福斯集团公司；CHJR-100 绞肉机　诸城市春晖机械有限公司；HWS-26 电热恒温水浴锅　上海齐欣科学仪器有限公司；S2-Food Kit 型 pH 计　瑞士梅特勒托得多公司；PD500 高速均质机　普律玛仪器（上海）有限公司；UGC-24C 氮吹仪　北京优晟联合科技有限公司；LC-20AT 高效液相色谱仪　岛津公司；E-816ECE 索氏抽提装置　瑞士步琪有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　鸡骨架营养成分测定　含水量：参照 GB 5009.3-2016《食品中水分的测定》；总蛋白：参照 GB 5009.5-2016《食品中蛋白质的测定》；脂肪：参照 GB 5009.6-2016《食品中脂肪的测定》；灰分：参照 GB 5009.4-2016《食品中灰分的测定》；钙：参照 GB 5009.92-2016《食品中钙的测定》；游离氨基酸：参照 GB 5009.124-2016《食品中氨基酸的测定》。

1.2.2　酶解液的制备　参考张恒等[8] 的方法并做适当修改。将鸡骨架洗净、沥干后剪去大体积脂肪块，冲洗 3 次以去除表面杂质，绞碎成鸡骨泥，加入一定

量的去离子水调节蛋白浓度为 5%(蛋白质浓度用凯氏定氮法测量),用匀浆机匀浆(10000 r/min, 20 s×3),在 90 ℃ 条件下加热预处理 10 min,加入酶,调节 pH,置于恒温水浴中酶解。酶解过程中不断调节 pH,酶解结束后沸水浴 10 min 灭酶,冷却至室温后离心(3580 r/min, 10 min),上清液即为酶解液,放置 10 min 后撇去浮油(目的是去除部分脂肪),测定水解度和氮回收率。

1.2.3 蛋白酶制剂的筛选 根据前期预实验结果,在酶解程度较为完全的情况下,将四种酶分别在各自最适 pH 和温度下加入 6000 U/g 酶酶解 4 h,以水解度和氮回收率为评价指标,确定最佳酶。

1.2.4 酶解工艺优化

1.2.4.1 酶解温度 鸡骨架底物浓度为 5%,酶添加量为 6000 U/g,pH 调为 7.0,分别在 40、45、50、55、60 ℃ 条件下水解,恒温反应 4 h 后,测定水解度及氮回收率,探讨温度对风味蛋白酶酶解效果的影响。

1.2.4.2 酶解 pH 用选定的最佳温度,其他条件不变,pH 分别在 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 条件下酶解 4 h,测定水解度及氮回收率,探讨 pH 对风味蛋白酶酶解效果的影响。

1.2.4.3 酶添加量 用选定的最佳温度和 pH,其他条件不变,酶添加量分别在 2000、4000、6000、8000、10000 U/g 条件下酶解 4 h,测定水解度及氮回收率,探讨酶添加量对风味蛋白酶酶解效果的影响。

1.2.4.4 酶解时间 用选定的最佳温度、pH、酶添加量,其他条件不变,酶解时间分别为 2、3、4、5、6 h,测定水解度及氮回收率,探讨酶解时间对风味蛋白酶酶解效果的影响。

1.2.5 响应曲面法试验设计 根据 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理,综合单因素的实验结果,以水解度(Y_1)和氮回收率(Y_2)为响应值,选取温度(A)、pH(B)、酶解时间(C)、酶添加量(D)4 个因素。利用统计软件 Design Expert 8.0.6 对试验数据进行回归分析,获得二次多元回归模型,对模型进行方差分析,用模型对鸡骨架酶解的水解度和氮回收率进行分析和预测,得出最佳的酶解条件。响应面设计中因素及水平见表 2。

表 2 响应面设计因素及水平

Table 2 Response surface design factors and levels

因素	水平		
	−1	0	1
A 温度(℃)	45	50	55
B pH	6.0	7.0	8.0
C 酶解时间(h)	3	4	5
D 酶添加量(U/g)	6000	8000	10000

1.2.6 水解度(DH)的测定

1.2.6.1 氨基态氮的测定 参考徐兆刚[11] 的方法。在烧杯中加入 5 mL 酶解液和 25 mL 蒸馏水,开动磁力搅拌器,用 NaOH 标准溶液将 pH 调至 8.2,加入 10 mL 甲醛溶液后将 pH 调至 9.2,记录 pH 从 8.2 到 9.2 加入 NaOH 的体积。同时取 30 mL 水做空白试验。氨基态氮计算公式如下:

$$X=\frac{(V_1-V_2)\times C\times 0.014\times 100}{5}$$

式中:X 为样品氨基态氮的含量(g/100 mL);V_1 为样品加入甲醛后消耗氢氧化钠标准液的体积(mL);V_2 为空白实验加入甲醛后消耗氢氧化钠标准液的体积(mL);C 为氢氧化钠标准液的浓度(mol/L),取值为 0.05 mol/L;5 是酶解液的取用量(mL);0.014 是氮的毫克当量。

1.2.6.2 水解度的测定 酶切断蛋白质肽键使其成为小分子肽的情况可用水解度(DH)表示。参考田刚[12] 的方法,采用甲醛滴定法,计算公式如下:

$$\text{水解度}(\%)=\frac{(\text{水解产物中氨基态氮}-\text{水解前溶液中氨基态氮})}{\text{水解前溶液中总氮}}\times 100$$

1.2.7 氮回收率的测定 取 10 mL 酶解液,用凯氏定氮法消化、定氮,测得酶解液中的氮含量,氮回收率(Nitrogen recovery, NR)计算公式如下[13]:

$$\text{氮回收率}(\%)=\frac{\text{酶解液总氮}}{\text{原料总氮}}\times 100$$

1.2.8 氨基酸分析 参考姚佳等[14] 的方法并做适当修改。取 10 μL 样品放置于离心管中,氮吹仪 45 ℃ 流下吹干,加入 10 μL 干燥剂(200 μL 甲醇、200 μL 水、100 μL 三乙胺),氮气流吹干,加入 20 μL 衍生剂(100 μL 水、700 μL 甲醇、100 μL 三乙胺、100 μL 异硫氰酸苯酯)密闭衍生 30 min,氮气流下吹干,加入稀释剂(pH7.4 的磷酸氢二钠溶液)200 μL,上机测定。其中,酶解前鸡骨架泥匀浆处理后离心(3580 r/min, 10 min)取上清液,酶解后酶解液离心取上清液进行测定。

1.2.9 肽分子量测定 采用 LC-20AT 高效液相色谱仪(配 2487 紫外检测器和 Empower 工作站 GPC 软件)测定酶解液的肽分子量分布[14−15]。酶解液经过 0.22 μm 滤膜过滤,注入配备 TSKgel 凝胶色谱柱(2000 SWXL 300 mm×7.8 mm)的高效液相色谱进行分离。流动相:乙腈:水:三氟乙酸=40:60:0.1(v:v:v),流速 0.5 mL/min,柱温 30 ℃,进样量 10 μL,检测波长为 220 nm。以细胞色素 C(MW12384),抑肽酶(Mw6500),杆菌肽(MW1422),乙氨酸—乙氨酸—酪氨酸—精氨酸(MW451),乙氨酸—乙氨酸—乙氨酸(MW189)为标准品绘制分子量标准曲线,以洗脱体积 x 为横坐标,相对分子质量的对数 y 为纵坐标,绘制相对分子质量校正曲线并得到方程 $y=-0.239x+7.01$,$R^2=0.987$。

1.3 数据处理

数据用平均值±标准差表示(n=3),用 IBM SPSS Statistics 25 软件(IBM, USA)进行单因素方差分析

（ANOVA），用 Duncan's 方法进行多重比较，显著水平设为 $P<0.05$。响应曲面试验用 Design-Expert 8.0.6（Stat-Ease, USA）软件进行设计和结果统计分析，用 Origin 2018（OriginLab Co, Northampton, MA, USA）软件绘图。

2　结果与分析

2.1　基本化学组成分析

鸡骨架基本化学成分见表 3，由表可知，鸡骨架中含有丰富的蛋白质，含量达到 17.02 g/100 g，脂肪含量为 16.04 g/100 g，高于文献报道白羽肉鸡中的含量（10.41 g/100 g）[2]，灰分含量较低，为 3.01 g/100 g，蛋白质含量比鸭骨架（15.23 g/100 g）含量高，且灰分含量低于鸭骨架（8.62 g/100 g）[16]，相较于鸭骨架而言是进行酶解的良好原料。

表 3　鸡骨架基本化学成分

Table 3　Basic chemical constituents of chicken skeleton

基本成分	含量（g/100 g）
水分	64.98±0.64
蛋白质	17.02±0.02
脂肪	16.04±0.25
灰分	3.01±0.06
钙	0.85±0.034

鸡骨架氨基酸组成见表 4（色氨酸未检出），蛋白质中的氨基酸含量，尤其是必需氨基酸是反映蛋白质质量的重要指标，由表 4 可知，鸡骨架中必需氨基酸含量高达 35.26%，鲜味氨基酸含量高达 21.83%，可见鸡骨架是优质的蛋白质，氨基酸的组成和比例较为合理，综合了鸡骨和鸡骨肉的特点，这也是鸡骨架味道鲜美的原因之一。

表 4　鸡骨架氨基酸组成

Table 4　Amino acid composition of chicken skeleton

氨基酸种类	游离氨基酸（mg/100 g）	占总氨基酸比例（%）
天冬氨酸（Asp）	978.97±11.30	6.98
谷氨酸（Glu）	2081.05±18.91	14.85
丝氨酸（Ser）	580.26±12.65	4.14
甘氨酸（Gly）	1610.30±117.92	11.49
组氨酸（His）*	476.53±8.07	3.40
精氨酸（Arg）	1130.45±42.48	8.06
苏氨酸（Thr）*	532.81±12.68	3.80
丙氨酸（Ala）	1048.96±52.98	7.48
脯氨酸（Pro）	1217.09±67.78	8.68
酪氨酸（Tyr）	361.67±4.44	2.58
缬氨酸（Val）*	591.90±15.43	4.22
蛋氨酸（Met）*	300.15±3.29	2.14
半胱氨酸（Cys）	66.87±15.25	0.48
异亮氨酸（Ile）*	522.28±1.82	3.73
亮氨酸（Leu）*	995.54±16.37	7.10
苯丙氨酸（Phe）*	500.07±13.32	3.57
赖氨酸（Lys）*	1022.71±11.95	7.30
必需氨基酸	4941.99±61.02	35.26
鲜味氨基酸	3060.02±35.75	21.83
含硫氨基酸	367.02±12.28	2.62
总量	14017.63±342.57	

注：*表示必需氨基酸；鲜味氨基酸含量是指天冬氨酸和谷氨酸；含硫氨基酸含量是指半胱氨酸和蛋氨酸。

肉杂鸡鸡骨架蛋白质营养评价见表 5，由表可知，当以氨基酸评分标准模式（AAS）为参考量时，蛋氨酸和半胱氨酸是第一限制氨基酸，异亮氨酸、苏氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸+酪氨酸的氨基酸分接近 FAO/WHO 推荐成人模式，赖氨酸含量显著高于评分标准模式，赖氨酸是长期摄入谷物类食品人群的第一类限制性氨基酸，作为必需氨基酸之一，既可以增强人体免疫力，又能促进发育。鸡骨架与缺乏赖氨酸的食物搭配食用可促进氨基酸的摄入均衡[17]。另外，鸡骨架中胶原蛋白含量高达 35%~45%，此外，还有肌球蛋白、酶类、磷蛋白等多种蛋白质[16]，是进行酶解的良好原料。

表 5　鸡骨架蛋白质营养评价

Table 5　Nutritional evaluation of chicken skeleton protein

氨基酸（$mg \cdot g^{-1}$）	FAO/WHO推荐成人模式	组成	氨基酸评分标准模式（AAS）
赖氨酸（Lys）	55	72.59	1.33
蛋氨酸（Met）+半胱氨酸（Cys）	35	26.06	0.63
缬氨酸（Val）	50	42.01	0.84
苯丙氨酸（Phe）+酪氨酸（Tyr）	60	61.17	1.02
亮氨酸（Leu）	70	70.67	1.01
异亮氨酸（Ile）	40	37.07	0.93
苏氨酸（Thr）	40	37.82	0.95
总计	360	352.6	
占总量（%）	36	35.26	

注：AAS指Amino acid score，即氨基酸分；划线的数据为鸡骨架蛋白的氨基酸分；即鸡骨架蛋白的第一限制性氨基酸的含量与参考蛋白中该氨基酸含量的比值。

2.2　蛋白酶制剂的筛选

不同酶的酶切位点不同，产生的氨基酸种类不同，对酶解液的风味、水解度、物理化学特性有很重要的影响[4]，因此，选择合适的蛋白酶对鸡骨架进行酶解至关重要。本试验选取了具有代表性的四种酶：风味蛋白酶、胰酶、复合蛋白酶和碱性蛋白酶。由图 1 可知，四种蛋白酶分别在其最适条件下酶解，水解度由大到小分别是：风味蛋白酶>胰酶>复合蛋白酶>碱性蛋白酶，其中，风味蛋白酶的水解度显著高于其他三种酶类（$P<0.05$），达到 32.14%，熊善柏等[18]用 6 种酶对乌鸡蛋白质进行酶解测定水解度，也得到了同样的结论。氮回收率由大到小分别是：胰酶>风味蛋白酶>碱性蛋白酶>复合蛋白酶，胰酶的氮回收率最高，为 90.94%；用胰酶水解后，氮回收率最高，但是水解液浑浊，苦味重，不利于后处理。风味蛋白酶具有外切酶和内切酶两种活性，能较大程度地将具有暴露在外部的疏水基团降解为氨基酸，同时使一些风味前体物发生水解，提高酶解液的风味[19]。CHIANG 等[20]研究了酶解处理对牛骨提取物化性质的影响，发现在不添加其他酶的情况下，风味蛋白酶可以增加低分子

量肽的含量，降低粘度，改善酶解液的风味。本实验用风味蛋白酶水解后，水解液较澄清，有良好的鸡肉香味。综合考虑，选择风味蛋白酶为后续实验用酶。

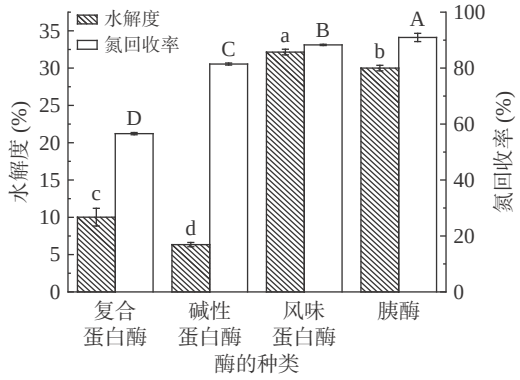


图 1 不同蛋白酶酶解对酶解液水解度和氮回收率的影响

Fig.1 Effects of different proteases on hydrolysis degree and nitrogen recovery of hydrolysate

注：不同字母表示同一指标各组间差异显著（P<0.05）；图 2~图 5 同。

2.3 酶解工艺优化

2.3.1 酶解温度 在酶解过程中，温度主要从两个方面影响酶解效率。一方面，酶的本质是蛋白质，空间结构受温度影响，引起活性变化，温度过高，酶变性，稳定性下降，进而导致酶解效率降低。另一方面，升高温度使底物转变成产物的速度加快，提高酶解效率。本文分别在 40、45、50、55、60 ℃ 条件下进行水解，测定水解度和氮回收率，结果如图 2 所示。

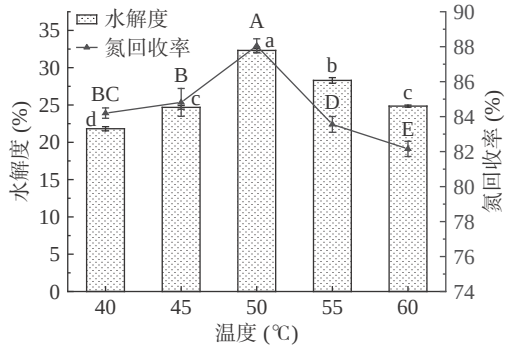


图 2 不同温度对水解度和氮回收率的影响

Fig.2 Effect of different temperature on degree of hydrolysis and nitrogen recovery

由结果可知，温度在 50 ℃ 时有最高的水解度和氮回收率，分别是 32.31% 和 88.05%。可能是由于反应初期，酶促反应速率随着温度的升高而增加，50 ℃ 后，风味蛋白酶的酶蛋白变性导致酶活力丧失，酶促反应受到抑制，故用风味蛋白酶酶解鸡骨架时，选择 50 ℃ 较为适宜。

2.3.2 酶解 pH pH 对酶的活性具有很大的影响，根据以往的研究，pH 主要从三个方面影响酶的活性[21]：一是过酸或过碱都能使酶失活，影响酶活力稳定性；二是酸或碱对底物的解离状态产生影响，使得酶与底物不能结合或结合后不能生成产物；三是氢离子和氢氧根离子通过结合或催化基团的解离状态控制了酶的活性中心，分别使得底物不能与酶结合或底物不能被酶催化生成产物。本研究分别在 pH 为 5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0 的条件下对鸡骨架进行酶解，测定其水解度和氮回收率，结果如图 3 所示。

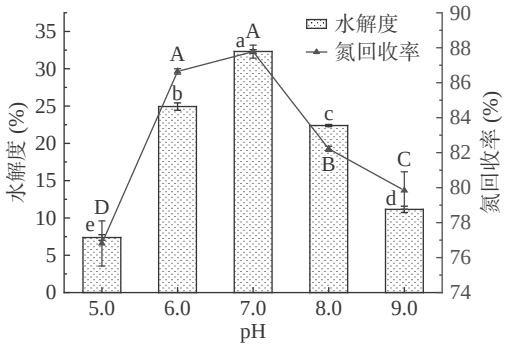


图 3 不同 pH 对水解度和氮回收率的影响

Fig.3 Effect of different pH on degree of hydrolysis and nitrogen recovery

由图 3 可知，初始 pH 与水解度和氮回收率的关系图类似钟型。在 pH 为 7.0 时，水解效果最好，水解度和氮回收率分别达到 32.23% 和 87.78%，与 pH7.0 相比，初始 pH 处于两个极端时的水解度和氮回收率均显著降低（P<0.05）。主要原因可能是风味蛋白酶的最适 pH 在 7.0 左右，pH 过高或过低引起空间构象的改变导致酶失活，同时影响酶与底物的结合。因此，在对鸡骨架进行酶解时，调整体系 pH 为 7.0 时酶解效果较好。

2.3.3 酶添加量 当底物浓度一定时，酶添加量越大，酶解速率越高，水解度和氮回收率也就越高。但是当酶添加量达到一定程度时，酶与底物充分结合达到饱和，水解程度平缓，同时可能由于酶作为蛋白质自身发生水解，酶活力降低。酶添加量过高时，肽链进一步被水解，释放出具有苦味的小肽[22]，因此，选择合适的酶添加量至关重要。分别在酶添加量为 2000、4000、6000、8000 和 10000 U/g 时对鸡骨架进行酶解，结果如图 4 所示。

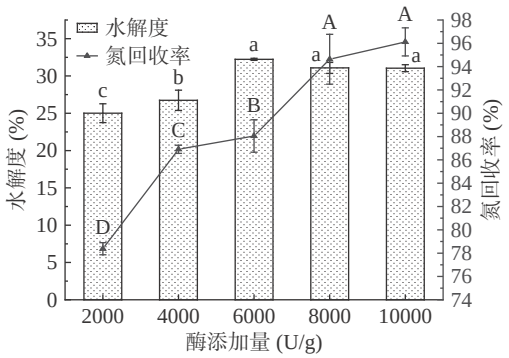


图 4 不同酶添加量对水解度和氮回收率的影响

Fig.4 Effects of different enzyme dosage on degree of hydrolysis and nitrogen recovery

由图 4 可知，随着酶添加量的增加，氮回收率逐渐增加，到 8000 U/g 时增加量趋于平缓，氮回收率和水解度与 10000 U/g 时无显著性差异（P>0.05），可能

是因为酶添加量的增加导致更多的酶作用于蛋白质，产生了更多的肽链[23]。当酶添加量大于 6000 U/g 时，水解度略有降低，但与 6000 U/g 无显著差异（$P>0.05$），考虑到成本问题，选择酶添加量为 8000 U/g。

2.3.4　酶解时间　酶解时间与产量、能耗以及设备利用率密切相关，本试验探讨了在 2、3、4、5 和 6 h 的酶解过程中，水解度和氮回收率的变化，试验结果见图 5。

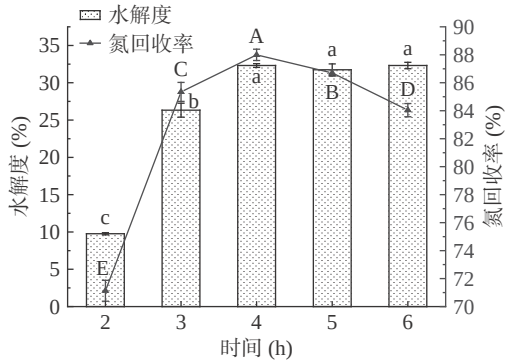


图 5　不同时间对水解度和氮回收率的影响

Fig.5　Effect of different time on degree of hydrolysis and nitrogen recovery

如图 5 所示，在 2~6 h 内，氮回收率先增大后减小，在 4 h 达到最大，为 88%。水解度在 2~4 h 呈上升趋势，之后变化不大，可能是由于随着时间的延长，底物与酶结合较充分，呈现饱和状态，随着时间的延长，底物被消耗，酶分子的有效含量降低，酶解速率降低，使得水解度呈现缓慢上升趋势。综合考虑，鸡骨架酶解时间选择 4 h 较为合适。

2.4　响应面试验结果及分析

2.4.1　回归模型的建立和方差分析　利用 Design Expert 软件对温度、pH、酶添加量、酶解时间进行四因素三水平 BoxBehnken 试验，响应面试验设计及结果如表 6 所示。对实验结果进行方差分析，对数据进行多元回归拟合，得到水解度（Y_1）与氮回收率（Y_2）对温度（A）、pH（B）、酶解时间（C）、酶添加量（D）的二次响应曲面回归方程如下：

$$Y_1=0.33+0.018A-0.026B+0.026C-0.023D-2.574\times10^{-3}AB+8.730\times10^{-3}AC-4.686\times10^{-3}AD-0.021BC-0.020BD-8.764\times10^{-3}CD-0.042A^2-0.096B^2-0.049C^2-0.032D^2$$

$$Y_2=0.95-2.105\times10^{-3}A-0.026B-0.020C-0.058D-7.018\times10^{-4}AB+2.983\times10^{-3}AC+3.597\times10^{-3}AD-0.036BC-0.060BD-0.015CD-0.060A^2-0.099B^2-0.11C^2-0.062D^2$$

酶解产物对水解度的回归方程方差分析见表 7。结果显示，模型整体 $P<0.0001$，说明该模型极显著。根据回归方程中一次项的均方可知，影响酶解过程中产物对水解度的因素重要性排序为：酶解时间（C）>pH（B）>酶添加量（D）>温度（A），且这四个因素均对模型具有极显著影响（$P<0.01$）。失拟项 $P=0.2281>0.05$，失拟不显著，表明未知因素对试验结果的影响较小，残差主要来自于随机误差。模型的调整确定系

表 6　响应曲面试验设计与结果

Table 6　Design and experimental results of response surface methodology(RSM)

试验号	编码				Y_1水解度（%）	Y_2氮回收率（%）
	A 温度	B pH	C 酶解时间	D 酶添加量		
1	0	−1	0	−1	25.30±0.05	80.71±0.01
2	−1	0	0	1	22.18±0.05	79.44±0.00
3	−1	0	1	0	23.03±0.04	74.40±0.00
4	0	0	−1	1	20.84±0.01	74.16±0.01
5	1	1	0	0	20.12±0.00	78.60±0.01
6	0	1	−1	0	15.55±0.01	76.56±0.01
7	1	0	1	0	28.98±0.00	76.07±0.01
8	0	0	0	0	34.07±0.01	93.19±0.02
9	0	−1	−1	0	15.31±0.00	74.82±0.00
10	0	−1	0	1	23.12±0.01	80.79±0.01
11	0	0	1	−1	31.94±0.01	86.21±0.02
12	0	0	0	0	32.57±0.03	93.47±0.01
13	0	−1	1	0	23.70±0.01	75.95±0.01
14	0	0	−1	−1	23.79±0.02	85.33±0.01
15	0	0	0	0	30.82±0.01	97.12±0.03
16	−1	0	−1	0	19.77±0.00	78.63±0.01
17	0	1	0	−1	20.35±0.01	88.25±0.01
18	1	0	−1	0	22.23±0.01	79.11±0.01
19	1	−1	0	0	23.52±0.01	84.21±0.01
20	1	0	0	1	23.87±0.01	75.75±0.01
21	−1	1	0	0	16.66±0.01	76.67±0.02
22	0	0	0	0	32.82±0.03	96.00±0.03
23	0	1	1	0	15.72±0.01	63.44±0.01
24	−1	−1	0	0	19.03±0.01	82.00±0.01
25	0	0	0	0	33.57±0.04	95.32±0.01
26	1	0	0	0	28.25±0.01	83.65±0.01
27	0	1	0	1	10.66±0.00	64.19±0.01
28	0	0	1	1	25.49±0.01	68.99±0.01
29	−1	0	0	−1	24.69±0.01	88.77±0.02

表 7　水解度试验结果方差分析

Table 7　ANOVA of hydrolysis degree test results

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	0.099	14	7.101×10^{-3}	24.49	<0.0001**
A-温度	3.896×10^{-3}	1	3.896×10^{-3}	13.43	0.0025**
B-pH	7.805×10^{-3}	1	7.805×10^{-3}	26.91	0.0001**
C-酶解时间	8.201×10^{-3}	1	8.201×10^{-3}	28.28	0.0001**
D-酶添加量	6.471×10^{-3}	1	6.471×10^{-3}	22.31	0.0003**
AB	2.650×10^{-5}	1	2.650×10^{-5}	0.091	0.7669
AC	3.049×10^{-4}	1	3.049×10^{-4}	1.05	0.3226
AD	8.784×10^{-5}	1	8.784×10^{-5}	0.30	0.5907
BC	1.692×10^{-3}	1	1.692×10^{-3}	5.84	0.0300*
BD	1.523×10^{-3}	1	1.523×10^{-3}	5.25	0.0380*
CD	3.072×10^{-4}	1	3.072×10^{-4}	1.06	0.3208
A^2	0.011	1	0.011	38.92	<0.0001**
B^2	0.060	1	0.060	206.87	<0.0001**
C^2	0.016	1	0.016	54.07	<0.0001**
D^2	6.589×10^{-3}	1	6.589×10^{-3}	22.72	0.0003**
残差	4.060×10^{-3}	14	2.900×10^{-4}		
失拟	3.443×10^{-3}	10	3.443×10^{-4}	2.23	0.2281
纯误差	$6.169\text{E}\times10^{-4}$	4	1.542×10^{-4}		
总变异	0.10	28			

注：*表示差异显著（$P<0.05$）；**表示差异极显著（$P<0.01$）；表8同。

数 R^2_{Adj}=0.9215，说明该模型能够解释 92.15% 的响应值变化。因此，该模型拟合程度良好，可以用此模型对鸡骨架酶解的水解度进行分析和预测。

图 6 能比较直观的表示出当固定 1 个因素为中心点水平时，其他各因素交互作用对水解度的影响，由图中可以看出，当固定一个因素，随着另一因素水平的升高，响应值均是先增大后减小，在中间出现极大值，与单因素实验结果一致。

酶解产物对氮回收率的回归方程方差分析见表 8。结果显示模型整体 P<0.0001，说明该模型极显著。根据回归方程中一次项的均方可知，影响酶解过程中产物对水解度的因素重要性排序为：酶添加量(D)>pH(B)>酶解时间(C)>温度(A)，且酶解时间对模型具有显著影响(P<0.05)，pH 和酶添加量对模型具有极显著影响(P<0.01)。失拟项 P=0.1949>0.05，失拟不显著，表明未知因素对试验结果的影响较小，残差主要来自于随机误差。模型的调整确定系数 R^2_{Adj}=0.9249，说明该模型能够解释 92.49% 的响应值变化。因此，该模型拟合程度良好，可以用此模型对鸡骨架酶解的氮回收率进行分析和预测。

表 8　氮回收率试验结果方差分析

Table 8　ANOVA of nitrogen recovery test results

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	0.21	14	0.015	25.65	<0.0001**
A-温度	5.319×10^{-5}	1	5.319×10^{-5}	0.092	0.7667
B-pH	7.893×10^{-3}	1	7.893×10^{-3}	13.58	0.0024**
C-酶解时间	4.623×10^{-3}	1	4.623×10^{-3}	7.96	0.0136*
D-酶添加量	0.040	1	0.040	69.45	<0.0001**
AB	1.970×10^{-6}	1	1.970×10^{-6}	3.390×10^{-3}	0.9544
AC	3.558×10^{-5}	1	3.558×10^{-5}	0.061	0.8082
AD	5.174×10^{-5}	1	5.174×10^{-5}	0.089	0.7698
BC	5.073×10^{-3}	1	5.073×10^{-3}	8.73	0.0104*
BD	0.015	1	0.015	25.06	0.0002**
CD	9.137×10^{-4}	1	9.137×10^{-4}	1.57	0.2304
A^2	0.024	1	0.024	40.77	<0.0001**
B^2	0.064	1	0.064	110.15	<0.0001**
C^2	0.086	1	0.086	147.54	<0.0001**
D^2	0.025	1	0.025	42.58	<0.0001**
残差	8.136×10^{-3}	14	5.811×10^{-4}		
失拟	7.016×10^{-3}	10	7.016×10^{-4}	2.51	0.1949
纯误差	1.120×10^{-3}	4	2.800×10^{-4}		
总变异	0.22	28			

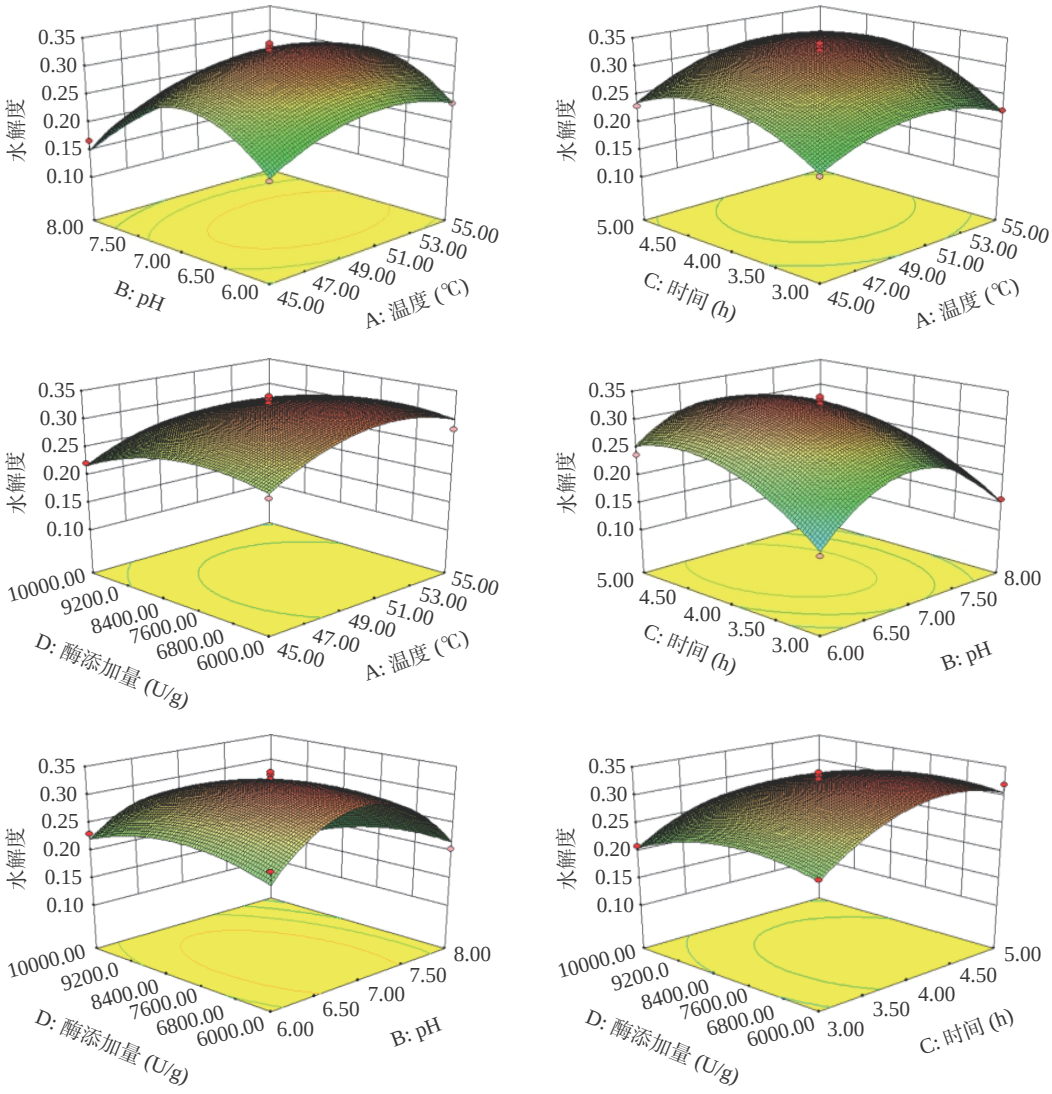


图 6　水解度模型中各因素交互响应面图

Fig.6　Interaction response surface diagram of various factors in hydrolysis degree model

图 7 能比较直观的表示出当固定 1 个因素为中心点水平时，其他各因素交互作用对氮回收率的影响，由图中可以看出，当固定一个因素，随着另一因素水平的升高，响应值均是先增大后减小，在中间出现极大值，与单因素实验结果一致。

2.4.2　工艺优化与结果验证　结合响应曲面进行优化分析，以水解度和氮回收率作为响应值，响应值最大时，拟合得到鸡骨架酶解的最优酶解工艺为 pH6.93，温度 50.55 ℃，酶添加量 7179.42 U/g，时间 4.09 h，在此条件下，酶解水解度和氮回收率的预测值为 33.69% 和 96%。为方便操作，将其修正为 pH7.0，温度 50 ℃，酶添加量 7000 U/g，时间 4 h，得出实验结果为水解度（33.54%±0.02%），氮回收率（96.20%±0.03%），与预测值接近，表明预测值与实际值拟合较好，模型可行。

2.5　氨基酸组成分析

酶解液中的游离氨基酸能赋予食物特定的味感，为美拉德反应制备热反应型肉类香精提供丰富的底物。根据前面实验优化得出的条件，将风味蛋白酶在 50 ℃ 条件下酶解 4 h，对酶解液进行氨基酸分析，结果见表 9。蛋白质和氨基酸的含量是评判食品营养价值的高低重要的指标，特别是人体必需的氨基酸的含量和组成。酶解前必需氨基酸含量达到 92.20 mg/100 mL，酶解后必需氨基酸含量达到 694.30 mg/100 mL，酶解后必需氨基酸含量显著增加（P<0.05），是酶解前的 7.04 倍。含硫氨基酸是产生肉香味的主要来源[24]，酶解液前样品中不存在含硫氨基酸，酶解后比酶解前显著增加（P<0.05），为 67.72 mg/100 mL。氨基酸作为食品中一种重要的呈味物质，其中鲜味氨基酸对产品的鲜味有主要作用，由表 9 可以看出，酶解液中鲜味氨基酸含量达到 229.16 mg/100 mL，而酶解前鲜味氨基酸含量仅为 19.40 mg/100 mL，反应后其含量显著增加（P<0.05），使鲜味增加。酶解液的氨基酸组成丰富，为之后的美拉德反应提供了丰富的风味基料。

YANG 等[25] 根据氨基酸的呈味特性将氨基酸分为 4 种：鲜味、甜味、苦味和无味。鲜味氨基酸：Asp、Glu；甜味氨基酸：Ser、Gly、Thr、Ala、Pro；苦味

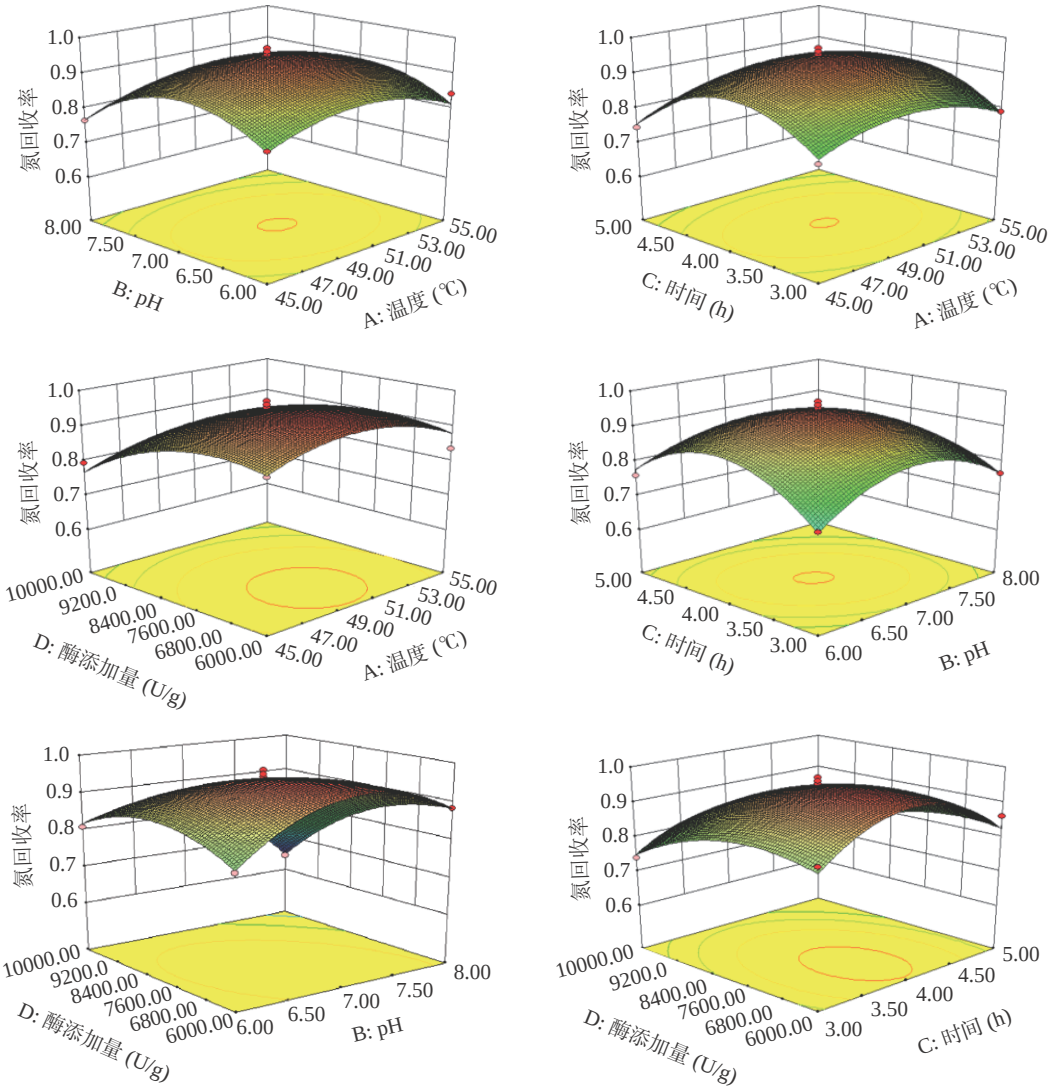


图 7　氮回收率模型中各因素交互响应面图

Fig.7　Interaction response surface diagram of various factors in nitrogen recovery model

表 9 酶解前后样品氨基酸组成

Table 9 Amino acid composition of samples before and after enzymatic hydrolysis

氨基酸名称	酶解前		酶解后	
	游离氨基酸（mg/100 mL）	占总氨基酸比例(%)	游离氨基酸（mg/100 mL）	占总氨基酸比例(%)
天冬氨酸(Asp)	8.17±0.15	4.80	65.57±5.10*	5.13
谷氨酸(Glu)	11.23±8.26	6.61	163.59±5.56*	12.79
丝氨酸(Ser)	6.60±0.10	3.88	9.14±1.48*	0.71
甘氨酸(Gly)	18.00±1.00	10.59	42.53±6.58*	3.32
组氨酸(His)	Nd	0.00	45.31±5.03*	3.54
精氨酸(Arg)	Nd	0.00	32.19±6.98*	2.52
苏氨酸(Thr)	6.63±0.06	3.90	66.35±5.52*	5.19
丙氨酸(Ala)	19.33±0.58	11.37	124.54±5.06*	9.73
脯氨酸(Pro)	Nd	0.00	55.24±5.02*	4.32
酪氨酸(Tyr)	Nd	0.00	72.23±6.93*	5.65
缬氨酸(Val)	Nd	0.00	87.68±6.82*	6.85
蛋氨酸(Met)	Nd	0.00	47.65±6.78*	3.72
半胱氨酸(Cys)	Nd	0.00	20.07±0.12*	1.57
异亮氨酸(Ile)	9.23±0.06	5.43	95.76±5.17*	7.48
亮氨酸(Leu)	19.33±0.58	9.61	139.99±1.00*	10.94
苯丙氨酸(Phe)	Nd	0.00	75.28±5.02*	5.88
赖氨酸(Lys)	60.00±10.00	35.29	136.28±5.47*	10.65
总量	155.53±5.14		1279.41±92.65*	
必需氨基酸	92.20±10.69		694.30±26.71*	
鲜味氨基酸	19.40±8.41		229.16±10.10*	
含硫氨基酸	Nd		67.72±6.87*	
甜味氨基酸	50.57±1.74		297.81±20.36*	
苦味氨基酸	25.57±0.64		523.86±16.13*	
无味氨基酸	60.00±10.00		228.58±2.46*	

注: Nd表示未检出; *表示差异显著(P<0.05)。

氨基酸: Val、Met、Ile、Leu、Phe、His、Arg; 无味氨基酸: Cys、Tyr、Lys。采用 TAV[26] 评价呈味物质呈味贡献, 从表 10 可以看出, 反应前后鲜味、苦味和甜味氨基酸对味感都有一定的贡献, 酶解前的样品味感以甜味为主, 甜味 TAV 值为 0.53, 其次是鲜味, 仅次于甜味, 达到 0.45。酶解后苦味氨基酸含量增加, TAV 值最高, 对苦味贡献最大的是组氨酸, 鲜味氨基酸含量也较高。酶解前后 TAV 值最高的都是谷氨酸, 分别为 0.37 和 5.45, 是主要的呈味贡献游离氨基酸。

2.6 肽分子量分布

肽分子量分布是 Maillard 反应的重要表征指标之一, 酶解液的营养特性, 呈味特性与其所含的小分子肽具有密切关系[27], 因此, 探究酶解液的肽分子量分布对了解其组成和分布具有重要意义。目前, 常用的表征肽分子量分布的方法有十二烷基硫酸钠—聚丙稀酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和凝胶色谱, 但是, SDS-PAGE 反映的是蛋白质亚基的分子信息, 用凝胶色谱法能较为完整的表征肽分子量分布[28]。

研究表明, 分子质量低于 1000 Da 的二肽、三肽等寡肽有更高的营养价值, 可以直接被人体吸收[29]。TOELSTEDE 等[30] 提出寡肽能更好的与呈味物质发生协同作用, 赋予肉品滋味, 使口感适宜。刘建彬[31] 利用超滤、凝胶色谱对鸡肉肽中具有美拉德反应活性的肽进行分离纯化, 结果表明, <1000 Da 肽段的美拉德反应活性最强。因此, 分子量<1000 Da 含量较高的酶解液可能具有更多的呈味物质[32]。TOELSTEDE[30] 的研究也发现分子量在 200~1000 Da 的寡肽有独特的增味作用。风味蛋白酶酶解液的凝胶色谱图见图 8, 肽分子量分布情况见表 11, <1000 Da 的分子量占比例最大, 达到 83.25%, 表明水解程度较高, 酶解效果好, 为之后的美拉德反应提供丰富的物质基础。

表 10 酶解前后游离氨基酸 TAV 值

Table 10 TAV values of free amino acids before and after enzymatic hydrolysis

呈味特性	游离氨基酸	阈值(mg/g)	TAV	
			酶解前	酶解后
鲜味	天冬氨酸(Asp)	1.0	0.08	0.66
	谷氨酸(Glu)	0.3	0.37	5.45
总和			0.45	6.11
甜味	苏氨酸(Thr)	2.6	0.03	0.26
	丝氨酸(Ser)	1.5	0.04	0.06
	甘氨酸(Gly)	1.3	0.14	0.33
	丙氨酸(Ala)	0.6	0.32	2.08
	脯氨酸(Pro)	3.0	0	0.18
总和			0.53	2.91
苦味	缬氨酸(Val)	0.4	0	2.19
	蛋氨酸(Met)	0.3	0	1.59
	异亮氨酸(Ile)	0.9	0.10	1.06
	亮氨酸(Leu)	1.9	0.10	0.74
	苯丙氨酸(Phe)	0.9	0	0.84
	组氨酸(His)	0.2	0	2.27
	精氨酸(Arg)	0.5	0	0.64
总和			0.20	9.33

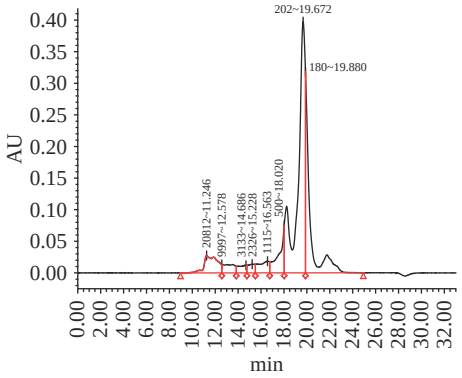


图 8 酶解液的凝胶色谱图

Fig.8 The gel chromatogram of the hydrolysate

3 结论

本试验采用风味蛋白酶对肉杂鸡鸡骨架进行酶解, 考察其对酶解液氮回收率和水解度的影响。结果表明在 50 ℃, pH 为 7, 酶添加量为 7000 U/g 时酶解 4 h, 水解度和氮回收率均最高, 分别为(33.54%±0.02%)和(96.20%±0.03%)。在此条件下制备鸡骨架酶解液, 对酶解液肽的分子量分布和氨基酸含量进行检

表 11　酶解液肽分子量分布

Table 11　Molecular weight distribution of peptide in enzymatic hydrolysate

分子量(Da)	肽分子量分布(%)
>10000	6.43±0.42
10000~5000	2.96±0.01
5000~3000	1.91±0.01
3000~2000	1.81±0.01
2000~1000	3.64±0.02
1000~500	6.75±0.04
500~180	52.38±0.26
<180	24.12±0.13
合计	
>5000	9.39±0.42
1000~5000	7.36±0.04
<1000	83.25±0.38

注：分子量10000、5000、3000、2000、1000、500和180 Da相对应的保留时间分别为12.578、14.686、15.228、16.563、18.020、19.672和19.880 min。

测，发现分子量<1000 Da 的肽段占比最高，达到83.25%，表明水解程度较高，酶解效果好。酶解液中必需氨基酸含量高，占氨基酸总量的 54.27%，营养价值高，且含有丰富的鲜味氨基酸，风味鲜美。该研究可以为鸡骨架的高值化利用提供基础。

参考文献

[1] United States Department of Agriculture. Livestock and poultry: World markets and trade[R]. Washington: USDA, 2021.

[2] 曾晓房. 鸡骨架酶解及其产物制备鸡肉香精研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2007. [ZENG X F. Enzymatic hydrolysis characteristics of chicken bone and chicken process flavor preparation of its hydrolysate[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2007.]

[3] 赵永珍, 张慜, 陈志雄. 酶解鸡骨架制备热反应底物的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2013, 32(1): 56−61. [ZHAO Y Z, ZHANG M, CHEN Z X. Sudy on enzymatic hydrolysis of chicken bone as substrate of maillard reaction[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2013, 32(1): 56−61.]

[4] 郑红. 组合酶水解鸡骨架蛋白的工艺条件研究[J]. 农产品加工 (学刊), 2011(12): 63−65, 88. [ZHENG H. Hydrolysis technology of chicken bone by combination of enzymes hydrolysis[J]. Agricultural Processing (Journal), 2011(12): 63−65, 88.]

[5] 刘贺, 肖隽霏, 周晨晨, 等. 热反应骨汤风味猪肉香精酶解工艺的优化[J]. 食品科技, 2021, 46(2): 272−280. [LIU H, XIAO J F, ZHOU C C, et al. Enzymatic hydrolysis process optimization of spararib soup flavor pork flavoring[J]. Food Science and Technology, 2021, 46(2): 272−280.]

[6] 李耀, 刘湾, 徐义斌. 纯鸡肉膏在肉制品、调味品及方便食品中的应用[J]. 中国调味品, 2016, 41(7): 147−149. [LI Y, LIU W, XU Y B. Application of pure chicken paste in meat product, condiment and fast food[J]. China Condiment, 2016, 41(7): 147−149.]

[7] CHEN Y, QIAO Y, XIAO Y, et al. Differences in physicochemical and nutritional properties of breast and thigh meat from crossbred chickens, commercial broilers, and spent hens[J]. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2016, 29(6): 855−864.

[8] 张恒, 邬应龙. 鸡骨的酶解及酶解液的电泳分析[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(9): 102−105. [ZHANG H, WU Y L. Enzymolysis of chicken bone and electrophoretic analysis of enzymolysis solution[J]. Food and Fermentation Industries, 2010, 36(9): 102−105.]

[9] 许丹. 鸡骨蛋白酶解液美拉德产物的制备及其抗氧化性研究 [D]. 杭州: 浙江工业大学, 2016. [XU D. Preparation and antioxidant activity of maillard products from proteolytic solution of chicken bone[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2016.]

[10] 万婕, 张慜, 刘亚萍. 超声波对鸡骨蛋白酶解产物的影响及机理研究[J]. 食品与生物技术学报, 2020, 39(1): 46−53. [WAN J, ZHANG M, LIU Y P. Effect of ultrasonic-assisted enzymatic hydrolysis on hydrolysate from chicken bone and study on its mechanism[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2020, 39(1): 46−53.]

[11] 徐兆刚. 河蚌抗氧化肽的制备及其特性研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2016. [XU Z G. Research on the preparation and properties of antioxidant peptides from mussel[D]. Changchun: Jilin University, 2016.]

[12] 田刚. 鸡骨蛋白粉的超声波辅助酶法制备及特性研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2018. [TIAN G. Study on preparation and characteristics of chicken bone protein powder by ultrasonic assisted enzyr natic method[D]. Changchun: Jilin University, 2018.]

[13] 赵培城, 唐连祥, 袁剑, 等. 超声辅助酶解鲣加工副产物制备蛋白胨[J]. 水产学报, 2017, 41(6): 919−927. [ZHAO P C, TANG L X, YUAN J, et al. Preparation of peptone by ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis of bonito by-products[J]. Journal of Fisheries, 2017, 41(6): 919−927.]

[14] 姚佳, 陈开琴, 何志云, 等. 野生甜茶中氨基酸成分分析及营养评价[J]. 生物化工, 2021, 7(4): 78−81. [YAO J, CHEN K Q, HE Z Y, et al. Amino acid analysis and nutritional evaluation for wild sweet tea[J]. Biological Chemical Engineering, 2021, 7(4): 78−81.]

[15] CHIANG J H, EYRES G T, SILCOCK P J, et al. Changes in the physicochemical properties and flavour compounds of beef bone hydrolysates after Maillard reaction[J]. Food Research International, 2019, 123: 642−649.

[16] KIJOWSKI J, NIEWIAROWICZ A. A method of protein extraction from chicken bone residue and the chemical and electrophoretic characteristics of the extract[J]. International Journal of Food Science & Technology, 1985, 20(1): 43−49.

[17] 王淑慧. 鸭骨架酶解及其产物制备鸭肉香精的研究 [D]. 宁波: 宁波大学, 2013. [WANG S H. Enzymatic hydrolysis characteristics of duck bone and duck flavor preparation of its hydrolysate[D]. Ningbo: Ningbo University, 2013.]

[18] 熊善柏, 王启明, 赵山. 乌鸡肉蛋白质分步酶解工艺与水解液澄清方法研究[J]. 食品工业科技, 2000(4): 17−19. [XIONG S B, WANG Q M, ZHAO S. Study on the enzymatic hydrolysis process and hydrolysate clarification method of black chicken protein[J]. Science and Technology of Food Industry, 2000(4): 17−19.]

[19] 姜淼, 李欣怡, 宋志远, 等. 酶法联合 Plastein 反应制备海参肠调味料[J]. 中国调味品, 2020, 45(4): 107−114. [JIANG M, LI

X Y, SONG Z Y, et al. Preparation of sea cucumber intestinal seasoning by enzymatic hydrolysis coupled with plastein reaction [J]. China Condiment, 2020, 45(4): 107−114.]

[20] CHIANG J H, LOVEDAY S M, HARDACRE A K, et al. Effects of enzymatic hydrolysis treatments on the physicochemical properties of beef bone extract using endo- and exoproteases[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2019, 54(1): 111−120.

[21] 王尚豪. 酶法制备热反应虾味香精的研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2012. [WANG S H. Study on the thermal reaction shrimp flavoring with enzymolysis method[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2012.]

[22] 侯钰柯, 石金明, 曾宪明, 等. 类蛋白反应及其在肉类中的应用[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(8): 261−267. [HOU Y K, SHI J M, ZENG X M, et al. Plastein reactions and its application in meat[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(8): 261−267.]

[23] 丁小燕, 张雯, 陈延锋, 等. 复合风味蛋白酶水解鸡骨泥工艺条件的研究[J]. 中国食品学报, 2006(1): 88−92. [DING X Y, ZHANG W, CHEN Y F, et al. Study on hydrolysis process of chicken bone mud by compound flavoring protease[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2006(1): 88−92.]

[24] GOH K M, LAI O M, ABAS F, et al. Effects of sonication on the extraction of free-amino acids from moromi and application to the laboratory scale rapid fermentation of soy sauce[J]. Food Chemistry, 2017, 215: 200−208.

[25] YANG J H, LIN H C, MAU J L. Non-volatile taste components of several commercial mushrooms[J]. Food Chemistry, 2001, 72(4): 465−471.

[26] 田霄艳, 郑斐庭, 冯涛, 等. 大豆蛋白水解物苦味评价方法研究[J]. 食品科学, 2021: 1−18. [TIAN A Y, FENG F T, FENG T, et al. Study on bitter evaluation method of soybean protein hydrolysate[J]. Food Science, 2021: 1−18.]

[27] OGASAWARA M, KATSUMATA T, EGI M. Taste properties of Maillard-reaction products prepared from 1000 to 5000 Da peptide[J]. Food Chemistry, 2006, 99: 600−604.

[28] BLACKSHEAR P J. Systems for polyacrylamide gel electrophoresis[J]. Methods in Enzymology, 1984, 104: 237−255.

[29] MAEBUCHI M, SAMOTO M, KOHNO M, et al. Improvement in the intestinal absorption of soy protein by enzymatic digestion to oligopeptide in healthy adult men[J]. Food Science and Technology Research, 2007, 13(1): 45−53.

[30] TOELSTEDE S, DUNKEL A, HOFMANN T. A series of kokumi peptides impart the long-lasting mouthfulness of matured Gouda cheese[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(4): 1440−1448.

[31] 刘建彬. 鸡肉肽参与美拉德反应的机理及其反应产物风味特性研究 [D]. 北京: 北京工商大学, 2015. [LIU J B. The mechanism of chicken peptide in flavor generation via maillard reaction[D]. Beijing: Beijing Technology and Business University, 2015.]

[32] 唐霄, 孙杨赢, 江雪婷, 等. 不同蛋白酶制备鹅肉呈味肽的对比分析[J]. 食品科学, 2019, 40(22): 141−146. [TANG X, SUN Y Y, JIANG X T, et al. Comparative analysis of flavor peptides prepared by enzymatic hydrolysis of goose meat with different proteases[J]. Food Science, 2019, 40(22): 141−146.]

罗爱国, 庆祎帆, 胡变芳, 等. 纳米二氧化硅改性藻多糖与壳聚糖复合膜的性能研究 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 243−250. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080137

LUO Aiguo, QING Yifan, HU Bianfang, et al. Properties of Nano-silica Modified *Spirulina platensis* Polysaccharide and Chitosan Composite Film[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 243−250. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080137

· 包装与机械 ·

纳米二氧化硅改性藻多糖与壳聚糖复合膜的性能研究

罗爱国[1], 庆祎帆[1,+], 胡变芳[1,*], 赵红梅[1], 田艳花[2], 杨兆艳[2], 郝建伟[1], 时晓丽[1], 杨博雯[1]

（1.晋中学院生物科学与技术系, 山西晋中 030619;
2.山西药科职业学院食品工程系, 山西太原 030031）

摘　要: 为开发具有良好性能的藻多糖-壳聚糖复合膜（PSP/CH-film），本研究将纳米 SiO_2 与 PSP/CH-film 进一步复合，制备成纳米 SiO_2 改性藻多糖-壳聚糖复合膜（SiO_2/PSP/CH-film），研究不同质量含量和不同粒子直径的纳米 SiO_2 对 SiO_2/PSP/CH-film 的结构、物理性能、机械性能、抑菌性和生物降解能力的影响。结果表明：纳米 SiO_2、壳聚糖及藻多糖有很好的相容性，SiO_2/PSP/CH-film 表面光滑平整。添加质量含量为 0.05%~0.15%，粒径为 30 nm 的纳米 SiO_2 可以改善 SiO_2/PSP/CH-film 的抗拉强度和抑菌性，增大了膜厚度、溶胀度及不透明度，但延缓了其生物降解性，降低了断裂伸长率。当纳米 SiO_2 质量含量为 0.1%，粒径尺寸为 30 nm 时，SiO_2/PSP/CH-film 展现出优良的抑菌性和抗拉强度，对延长食品货架期和提高膜的耐用性有良好效果。当纳米 SiO_2 质量含量一定，添加粒径为 500 nm 的纳米 SiO_2 时，仅有断裂伸长率随着粒径的增大而增高。可见，纳米 SiO_2 作为良好的改性材料能够很好地分散在藻多糖复合膜共混体系中，增强其网状结构，提高复合膜的综合性能。

关键词: 纳米 SiO_2, 螺旋藻多糖, 复合膜, 物理性能, 机械性能, 生物降解性

中图分类号: TS206.4　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0243−08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080137

本文网刊:

Properties of Nano-silica Modified *Spirulina platensis* Polysaccharide and Chitosan Composite Film

LUO Aiguo[1], QING Yifan[1,+], HU Bianfang[1,*], ZHAO Hongmei[1], TIAN Yanhua[2], YANG Zhaoyan[2], HAO Jianwei[1], SHI Xiaoli[1], YANG Bowen[1]

（1.Department of Biological Science and Technology, Jinzhong University, Jinzhong 030619, China;
2.Department of Food Engineering, Shanxi Pharmaceutical College, Taiyuan 030031, China）

Abstract: To develop the polysaccharides from *Spirulina platensis*-chitosan composite film (PSP/CH-film) with good performance, nano-SiO_2 modified SiO_2/polysaccharides from *Spirulina platensis*-chitosan composite film (SiO_2/PSP/CH-film) was developed. The effect of different mass concentrations and different particle diameters of nano-SiO_2 on the structure, physical properties, mechanical properties, bacteriologists and biodegradability of SiO_2/PSP/CH-film were explored. The results showed that: Nano-SiO_2 had good compatibility with chitosan and polysaccharides from *Spirulina platensis*, and the surface of SiO_2/PSP/CH-film was smooth and flat. The addition of nano-SiO_2 with a mass concentration of 0.05%~0.15% and the particle size of 30 nm improved the tensile strength and antibacterial properties of SiO_2/PSP/CH-film, increased the thickness, swelling degree and opacity, but it delayed the biodegradability and decreased the elongation

收稿日期: 2021−08−12　　+并列第一作者

基金项目: 2020 年度山西省高等学校科技创新项目（2020L0589）; 山西省科技厅应用基础研究计划面上自然科学基金项目（201901D111302）; 山西省省筹资金回国留学人员科研项目（2020-146）资助。

作者简介: 罗爱国（1980−）, 男, 博士, 副教授, 研究方向: 植物活性成分开发及利用, E-mail: lag@jzxy.edu.cn。
庆祎帆（1998−）, 女, 本科, 研究方向: 生物基食品包装材料开发, E-mail: qingyifan2020@163.com。

*** 通信作者:** 胡变芳（1979−）, 女, 博士, 教授, 研究方向: 植物资源开发及利用, E-mail: 83661494@qq.com。

at break. When the mass concentration of nano-SiO_2 was 0.1% and the particle size was 30 nm, the SiO_2/PSP/CH-film exhibited excellent antibacterial properties and tensile strength, which was beneficial to prolong the shelf life of food and improving the actual durability of the film. When the mass concentration of nano-SiO_2 was constant and nano-SiO_2 with a particle size of 500 nm was added, only the elongation at break increased with the increase of the particle size. Therefore, nano-SiO_2, as a good modified material, could be well dispersed in the blending system of PSP/CH-film, improved network structure and comprehensive performance of the composite film.

Key words: nano-SiO_2; *Spirulina platensis* polysaccharide; composite film; physical properties; mechanical properties; biodegradability

食品包装膜在食品的运输、贮藏中扮演着极其重要的角色，为人们的生活带来了极大的便利。现如今，在食品包装领域，大多是以石化为原料制成的聚乙烯，聚氯乙烯等作为食品包装膜，这类产品因其价格低廉、轻便美观而得到广泛应用。但是，利用这些材料制备的食品包装膜不仅会消耗石油资源，而且其中含有的害物质，会使人体致癌，同时，在使用后不易被降解，也会造成白色污染。因此，随着人们对食品安全、低碳生活、保护环境的关注度日益重视，利用可再生资源开发安全、可生物降解的包装材料是当前研究热点[1]。研究者们发现，以纤维素及衍生物、多糖、脂质、蛋白质等可再生资源为原料制成的绿色可食性膜具有生物可降解性，废弃后也可被土壤微生物分解，解决了包装废弃物的污染问题[2−3]。壳聚糖(Chitosan, CH)作为可再生生物资源，是虾、蟹、昆虫等节肢动物外壳的重要组成部分甲壳素的脱乙酰产物[4]，其来源丰富、成本低廉、可生物降解、无毒害和具有可再生性，目前已被广泛应用于食品添加剂、医药、饲料、环保、化妆品等多个领域[5−6]。石彬等[7]研究了不同壳聚糖复合膜和不同剂量辐照保鲜技术对贵长猕猴桃的保鲜效果，发现壳聚糖复合膜在短期内保鲜效果较好。但纯壳聚糖膜因机械性能、阻光性及抑菌性等问题，大大限制了其作为食品包装材料的广泛应用[8]。目前，研究领域主要通过复合活性材料、改性剂等，开发性能优良的复合膜，以拓宽食品包装材料壳聚糖膜的应用。

钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)属于蓝藻门螺旋藻属，其中，富含丰富的藻蓝蛋白、多糖等活性物质，同时具有易培养、成本低、占地面积小、生长速度快等优势，因此可以实现大规模工业化养殖[9−11]。钝顶螺旋藻多糖(polysaccharides from *Spirulina platensis*, PSP)具有抗肿瘤、抗氧化等多种生物活性，所以将 PSP 与 CH 等活性物质共混可赋予复合膜更优的性能，例如：抗菌性和保鲜性等[12−13]。Tavassolik 等[14]研究发现食用薄膜可在水果周围形成保护层，发挥其抗氧化、抗菌的作用，使其避免水分流失、组织软化和微生物污染。孙彦峰等[15]发现绿球藻多糖提取和壳聚糖-绿球藻多糖复合膜有良好的阻湿性、抗氧化性和保鲜性，再一次印证了藻多糖与壳聚糖复合可赋予复合膜更佳的性能。

然而，目前关于可食性多糖类膜的研究基本集中在简单的材料组合、共混和配比上，并且存在机械性能较弱、耐候性较差等缺陷。因此，深入研究基材的改性，拓宽可食性膜研究与应用的重要性不容忽视。当前可增强复合材料理化性质的改性材料种类繁多，而其中颇受欢迎的便是被称为“环境友好型材料”的纳米二氧化硅(SiO_2)。纳米 SiO_2 具有较大的比表面积、力学强度和耐老化性，表面因含有大量的活性硅羟基，所以其广泛应用于涂料、塑料、包装材料、橡胶中的改性粘结剂[16−17]。对无机纳米粒子通过涂覆、包覆和吸附等方法进行表面改性，将其添入其它材料中可以增强复合材料的理化性能[18−20]。基于纳米改性的保鲜膜技术在杨梅、马蹄和鲜切荸荠中已经得到研究证明，改性膜材料也可展现出强 CO_2 阻隔、抗菌、低透氧等有利于食品保鲜的许多性质[21−22]。

基于此，本研究以期利用 SiO_2 改善藻多糖-壳聚糖复合膜的理化性质，探究不同质量含量、粒子直径的纳米 SiO_2 对改性复合膜各性能的影响，旨在开发性能优异的复合包装膜，提高复合膜的耐用性，为包装领域提供环保型复合新材料。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

钝顶螺旋藻多糖(PSP，含量≥98%)　西安优硕生物科技有限公司；壳聚糖(CH，脱乙酰度：90%)　山东陆海蓝圣生物科技有限公司；30、50、500 nm 粒径的纳米 SiO_2 粉末　上海麦克林生化有限公司；大肠杆菌(ATCC 25922)　中国普通微生物菌种保藏管理中心；牛肉膏蛋白胨(成分含量≥99%)　北京鸿润宝顺科技有限公司；其他试剂均为分析纯；所用水为超纯水。

UV-1100 紫外/可见分光光度计　上海美析仪器有限公司；91531 螺旋测微仪　世达工具(上海)有限公司；UTM2502 电子万能试验机　深圳三思纵横科技股份有限公司；WQF-510A 傅里叶变幻红外吸收光谱仪　上海精学科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1　螺旋藻多糖-壳聚糖复合膜(PSP/CH-film)的制备　复合膜的制备按照 Ubonrat 等[23]的方法，并做部分修改。壳聚糖溶液：100 mL 1% 的乙酸溶液以 60 ℃，1200 r/min 水浴磁力搅拌 30 min 溶解 2 g

壳聚糖和 1 g 甘油。藻多糖溶液 5 g/L：100 mL 60 ℃的蒸馏水溶解 5 g 螺旋藻多糖并在热水浴中持续搅拌，将此溶液进行抽滤后贮存于试剂瓶中备用，每次使用时取 1 mL 并用超纯水将其稀释至 10 mL。藻多糖-壳聚糖复合溶液：以 0.2 g 明矾加入 10 mL 藻多糖液和 90 mL 壳聚糖液的共混液并持续水浴搅拌至均匀，然后置于超声波清洗机除气泡。PSP/CH-film 制备：分别取 45 mL 上述壳聚糖溶液、藻多糖-壳聚糖溶液缓慢倒入 15 cm×7.5 cm 玻璃成膜模具，水平放置，60 ℃ 水浴干燥 2.5 h 得到成膜，制备成壳聚糖膜（CH-film）、螺旋藻多糖-壳聚糖复合膜（PSP/CH-film）。揭膜后将其置于 5 ℃ 冰箱中，平衡 48 h，测定膜的各项性能指标。

1.2.2　纳米二氧化硅改性藻多糖-壳聚糖复合膜（SiO_2/PSP/CH-film）的制备　以 1.2.1 中藻多糖-壳聚糖复合液为基体，向其中加入整体混合液的不同质量含量和粒径的纳米 SiO_2，以 40 ℃，800 r/min 磁力搅拌 30 min。将改性复合膜液定量 45 mL 趁热倒在已预热的 15 cm×7.5 cm 自制玻璃成膜模具上，水平置于 60 ℃ 水浴锅上干燥 2.5 h 得到成膜。揭膜后将其置于 5 ℃ 冰箱中，平衡 48 h，测定膜的各项性能指标。在考察 SiO_2 质量含量对复合膜性能影响时，采用粒径为 30 nm，质量含量分别为 0.05%、0.1% 及 0.15%；在考察 SiO_2 粒径大小对复合膜性能影响时，采用质量含量为 0.1%，粒径大小分别为 30、50 及 500 nm。

1.2.3　PSP/CH-film 与 SiO_2/PSP/CH-film 的红外光谱扫描　将 PSP/CH-film 与 0.1% 的 30 nm SiO_2/PSP/CH-film 样品裁剪为适宜大小，平铺于傅立叶变换红外光谱仪样品架上进行扫描模式与透射模式的分析。扫描波数，500~4000 cm^{-1}；扫描次数，8 次；分辨率，2 cm^{-1}。

1.2.4　PSP/CH-film 与 SiO_2/PSP/CH-film 的物理性能测定

1.2.4.1　膜的厚度、密度测定　采用孙彦峰等[15]的方法。选择平整、均质、干燥、大小相同的复合膜和改性膜各 3 个，取各膜四角及中心 5 个点分别测厚度，取均值。将各膜切割为 2 cm×2 cm 的大小，电子天平称重，计算各膜的密度见公式：

$$\rho = \frac{m}{s \times d}$$

式中：ρ 为密度，g/cm^3；m 为样品膜的质量，g；s 为样品膜的面积，cm^2；d 为样品膜的厚度，cm。

1.2.4.2　膜的不透明度测定　采用 Park 等[24]的方法并做修改。取平整、均质的 PSP/CH-film 与 SiO_2/PSP/CH-film 各 3 个，将膜裁剪成 4.5 cm×0.8 cm 的条状，使其垂直紧贴比色皿内壁且不留气泡。选定不贴膜的比色皿为空白对照。紫外/可见分光光度计设定波长为 600 nm。计算各膜的不透明度见公式：

$$O = \frac{Abs_{600}}{d}$$

式中：O 为不透明度，μm^{-1}；Abs_{600} 为 600 nm 处膜的吸光值；d 为膜的厚度，μm。

1.2.4.3　膜的吸水性能测定　采用 Pornpimon 等[25]的方法并稍作修改。将 PSP/CH-film 与 SiO_2/PSP/CH-film 切割为 2 cm×2 cm 的 4 个正方块。放入 85 ℃ 电热恒温鼓风干燥箱使其恒重 w_i，接下来放置于超纯水中室温 30 min。滤纸擦去表面水分，分别放于电子天平上称重取平均值 w_f。计算各膜的溶胀度见公式：

$$SI = \frac{w_f - w_i}{w_i} \times 100$$

式中：SI 为溶胀度，%；w_i 为膜吸水前的质量，g；w_f 为膜吸水后的质量，g。

1.2.5　PSP/CH-film 与 SiO_2/PSP/CH-film 的机械性能测定　采用 GB/T1040.3-2006《塑料拉伸性能的测定第 3 部分：薄膜和薄片的条件》方法对各膜的机械性能进行测定[26]。测定前将复合膜置于冰箱中平衡 2 d，裁剪膜为 1 cm×15 cm 的条状，用电子万能试验机测定膜的抗拉强度、断裂伸长率，膜样品测定重复 3 次，记录膜断裂时的最大长度与最大拉力。设定电子万能试验机参数：原始标距 100 mm，试验速度 50 mm/min。计算拉伸强度与断裂伸长率公式分别如下：

$$TS = \frac{F_{max}}{bd} \times 100$$

式中：TS 为抗拉强度，MPa；F_{max} 为膜断裂时的最大拉力，N；b 为膜的宽度，cm；d 为膜的厚度，cm。

$$EB = \frac{L - L_0}{L_0} \times 100$$

式中：EB 为断裂伸长率，%；L 为膜断裂时的最大长度，cm；L_0 为膜的初始长度，cm。

1.2.6　PSP/CH-film 与 SiO_2/PSP/CH-film 的生物降解性能测定　选择均质干燥的 PSP/CH-film 与 SiO_2/PSP/CH-film 分别切割为 3 cm×3 cm 正方块，放置于 85 ℃ 电热恒温鼓风干燥机使其恒重，记为 m_0。选择草坪等距离挖坑，各膜分别埋入土中，并做好标记。分别在第 3、6、9 d 挖出各膜观察降解情况，第 10 d 时全部取出并小心用水冲洗灰土，再次将各膜放入 85 ℃ 电热恒温鼓风干燥箱使其恒重 m。计算各膜的失重率见公式：

$$W = \frac{m_0 - m}{m_0} \times 100$$

式中：W 为失重率，%；m_0 为各膜土埋前的质量，g；m 为各膜土埋降解后的质量，g。

1.2.7　PSP/CH-film 与 SiO_2/PSP/CH-film 的抑菌性能测定　复合膜的抑菌活性测定方法参考陈桂芸等[27]的方法并稍作修改。将融化良好的牛肉膏蛋白胨培养基倒入培养皿并冷却到凝固，加入 0.1 mL

10 倍稀释法制备的大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌悬液,均匀涂布并制平板。裁剪各膜的直径为 0.8 cm 并紧贴于平板中央,倒置于 37 ℃ 的培养箱中 24 h。根据抑菌圈直径大小判断抑菌效果。

1.3 数据处理

所有试验做三组重复,数据用 Mean±SE 形式,分析处理采用 DPS 9.01 进行 Duncan's 新复极差法方差分析,$P<0.05$,有显著性差异。作图采用 Microsoft Office 2016。

2 结果与分析

2.1 外观结构观察

如图 1 所示,壳聚糖膜呈现无色透明状;PSP/CH-film 由于有藻多糖的加入,藻多糖去色不够完全,所以导致其呈现淡绿色状;在 PSP/CH-film 基础上添加质量含量为 0.1%、粒径为 30 nm 的 SiO_2,制备出的 SiO_2/PSP/CH-film 呈现较透明的灰绿色状,外观上与 PSP/CH-film 无明显差异。各类膜质地均匀,质感柔软光滑。

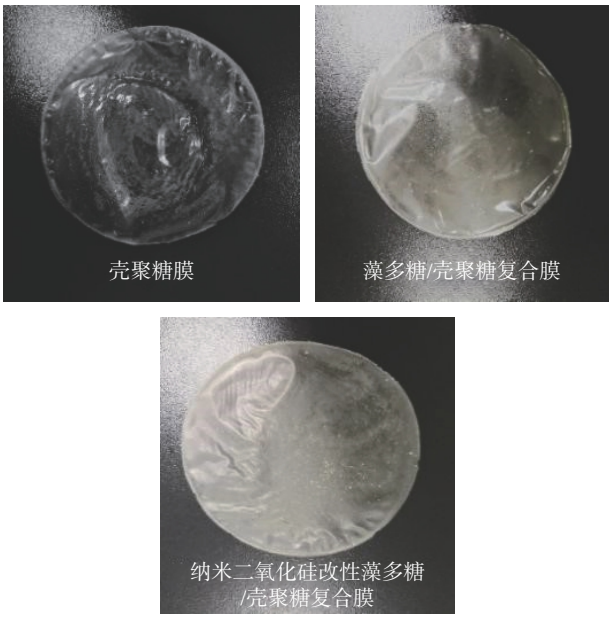


图 1 CH-film、PSP/CH-film、SiO_2/PSP/CH-film 的外观

Fig.1 Appearance of CH-film, PSP/CH-film and SiO_2/PSP/CH-film

2.2 傅里叶红外光谱分析

傅里叶红外光谱分析可以反映高分子聚合物之间的相容性及各组分的特征基团间相互作用[28]。PSP/CH-film 与质量含量为 0.1% 的 30 nm 粒径的 SiO_2 制备的 SiO_2/PSP/CH-film 傅里叶红外光谱分析如图 2 所示。PSP/CH-film 在 3500~3700 cm^{-1} 处有着强吸收峰,这是由于藻多糖中-OH 与壳聚糖中-NH_2 相互作用,缔合成氢键[29]。随着 SiO_2 的加入,SiO_2/PSP/CH-film 在此处也有较强的吸收峰,这说明 SiO_2 的游离-OH 与 PSP/CH-film 中游离-OH 结合成氢键,两者具有较好的相容性[30]。1723.61 cm^{-1} 的吸收峰是羧基的伸缩振动峰,PSP/CH-film 与 SiO_2/PSP/CH-film 在 2251.49 cm^{-1} 和 1723.61 cm^{-1} 两处的峰值强度几乎相同,且无新吸收峰出现,吸收峰归因于藻多糖和壳聚糖在聚集状态下的晶体结构。表明 SiO_2/PSP/CH-film 复合过程中形成一定的氢键,各基团间有良好的相容性和协同性。

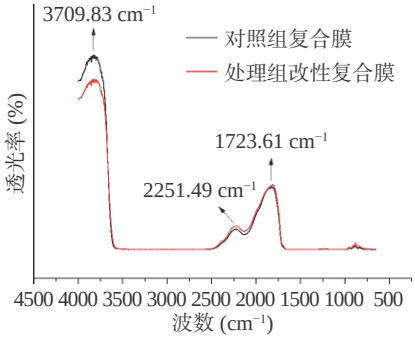


图 2 PSP/CH-film 与 SiO_2/PSP/CH-film 的红外分析图谱

Fig.2 IR of PSP/CH-film and SiO_2/PSP/CH-film

2.3 SiO_2 添加量对复合膜性能的影响

2.3.1 SiO_2 添加量对复合膜物理性能的影响 由表 1 可以看出,改性剂纳米粒子 30 nm SiO_2 的添加对改性膜的厚度、密度、不透明度、溶胀度有显著影响($P<0.05$)。这可能是由于小粒径的 SiO_2 可以更均匀分散于藻多糖和壳聚糖基质的网络结构中,填补了分子之间的间隙,使膜的结构更为紧密,并且小粒径分子更易团聚,从而导致改性膜的厚度增加[31]。同时 SiO_2 添加量达到阈值后,部分 SiO_2 已不能继续与壳聚糖和藻多糖相容形成致密网状结构,独立分散在各分子间,使得膜变得蓬松。由于膜的厚度的增加,膜的体积增大,所以密度随 SiO_2 的增加而减少。此外,改性膜的厚度增大,降低了可见光的透过率,并且 SiO_2 自身呈白色,所以 SiO_2 的添入使得 SiO_2/PSP/CH-film 颜色逐渐灰化,最终导致透明度逐渐降低。由于纳米 SiO_2 表面存在较多的活性硅基团,具有良好的亲水性,同时,可能由于纳米 SiO_2 与壳聚糖和藻多糖之间形成分子间氢键,破坏原有分子间的定向结构,导致水分子更易进入膜中,并且 SiO_2 中的羟基可以使

表 1 不同纳米 SiO_2 添加量对复合膜厚度、密度、不透明度和溶胀度的影响

Table 1 The effect of different nano-SiO_2 additions on the thickness, density, opacity and swelling degree of the composite films

样品	厚度(μm)	密度(g/cm³)	不透明度(μm⁻¹)	溶胀度(%)
PSP/CH-film	250±29^c	4.85±0.108^a	4.21±0.070^c	365.53±8.467^d
0.05%的30 nm SiO_2/PSP/CH-film	410±31^b	3.46±0.164^b	4.27±0.086^c	2195.89±20.897^b
0.1%的30 nm SiO_2/PSP/CH-film	567±27^a	3.00±0.162^b	6.00±0.102^b	2714.15±47.410^a
0.15%的30 nm SiO_2/PSP/CH-film	610±6^a	2.90±0.224^b	9.98±0.434^a	2015.97±23.005^c

注:同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$);表2~表5同。

得复合膜的吸水率增加[32]，促进了膜的溶胀。但过量的 SiO_2 与藻多糖和壳聚糖结合不完全，分子间氢键减少，独立的纳米 SiO_2 具有强疏水性，所以当纳米 SiO_2 添加量为 0.15% 时溶胀度下降。

2.3.2　SiO_2 添加量对复合膜机械性能的影响　复合膜的机械性能主要包括抗拉强度和断裂伸长率，良好的机械性能有助于抵抗流动过程中的压力，延长膜的使用期[33]。其中，抗拉强度反映了膜的力学强度，而断裂伸长率是反映膜的柔韧性[34]。从表 2 可以看出，当 SiO_2 添加量为 0.1% 时，SiO_2/PSP/CH-film 的抗拉强度最高。随着 SiO_2 的添加量持续增加到 0.15% 时，抗拉强度下降到了 6.3 MPa，但是仍高于对照组。Rhim 等[35] 的研究也证明，通过纳米粘土的改性作用提升了壳聚糖薄膜的抗拉强度和阻隔性能。SiO_2/PSP/CH-film 的抗拉强度显著提高，表明改性膜中纳米 SiO_2 颗粒表面高活性硅羟基与藻多糖和壳聚糖的羧基形成氢键，增强了分子间相互作用，三者在水浴中不断搅拌溶解，加速藻多糖-壳聚糖与纳米 SiO_2 颗粒的分子间的聚合作用，使得分子链相互交织形成彼此强有力的网络结构，提高了膜的力学性能，进而达到改善膜机械性能的目的。膜的力学性能主要是由分子力来决定的，所以即使密度减小，但是抗拉强度在增大。但当添加量过大时，SiO_2 团聚率升高，导致共混液分散不均匀，进而导致改性复合膜的拉伸强度下降。同时，随着纳米 SiO_2 含量的增加，SiO_2/PSP/CH-film 的断裂伸长率下降，此结果与 Tang 等[36] 采用纳米 SiO_2 对淀粉/聚乙烯醇共混膜性能的研究结果一致，可能是由于改性复合膜中的网络结构在外力作用下分子延展性弱，从而导致改性膜的断裂伸长率下降。

表 2　不同纳米 SiO_2 添加量对复合膜机械性能的影响

Table 2　The effect of different nano-SiO_2 additions on the mechanical properties of composite films

样品	抗拉强度(MPa)	断裂伸长率(%)
PSP/CH-film	5.64±1.04^{d}	12.37±4.73^{a}
0.05%的30 nm SiO_2/PSP/CH-film	5.70±0.73^{c}	5.34±1.25^{b}
0.1%的30 nm SiO_2/PSP/CH-film	7.65±0.52^{a}	2.78±0.22^{c}
0.15%的30 nm SiO_2/PSP/CH-film	6.30±0.15^{b}	3.82±1.01^{c}

2.3.3　SiO_2 添加量对复合膜生物降解性能和抑菌性能的影响　SiO_2/PSP/CH-film 的生物降解性能和抑菌性结果如表 3 所示，由表中可以看出，SiO_2/PSP/CH-film 的失重率显著小于 PSP/CH-film 的失重率（P<0.05）。并且随着 SiO_2 添加量的增加，SiO_2/PSP/CH-film 的失重率逐渐降低。这表明纳米 SiO_2 可以减缓薄膜的生物降解性，纳米 SiO_2 作为一种无机刚性纳米材料，其自身性能稳定且耐老化性强，此外，添加纳米 SiO_2 增加了藻多糖和壳聚糖之间的混溶性和相容性，并可以形成致密网状结构，从而降低了微生物的渗透速度。此结果与 Yao 等[30] 和 Tang 等[36] 对 SiO_2 改性膜的研究结果相一致。

表 3　不同纳米 SiO_2 添加量对复合膜失重率、抑菌性的影响

Table 3　The effect of different nano-SiO_2 additions on the weight loss and antibacterial property rate of composite films

样品	失重率(%)	抑菌直径(cm)
PSP/CH-film	78.21±1.49^{a}	1.61±0.06^{a}
0.05%的30 nm SiO_2/PSP/CH-film	69.42±0.55^{b}	1.65±0.07^{a}
0.1%的30 nm SiO_2/PSP/CH-film	63.63±1.31^{c}	1.70±0.03^{a}
0.15%的30 nm SiO_2/PSP/CH-film	59.39±0.70^{d}	1.90±0.13^{a}

食品的腐败变质主要是因为微生物的繁殖所导致的，所以衡量膜的抑菌性能是极其重要的[37]。由表 3 可知，SiO_2/PSP/CH-film 的抑菌圈直径随着纳米 SiO_2 添加量的增加而增大，即表明抑菌活性在增强，与 PSP/CH-film 有差异但并不显著（P>0.05）。因为壳聚糖分子结构中的氨基基团可通过静电力粘附在细胞膜上，使壳聚糖对细菌外膜产生干扰从而起到抑菌作用，并且藻多糖也有较好的抗氧化性，因此，壳聚糖和藻多糖在膜中起到了主要的抑菌作用，SiO_2/PSP/CH-film 与 PSP/CH-film 均有良好的抑菌性。此外，SiO_2 的添加可能进一步破坏了细菌外膜[38−39]，使细菌的 DNA 和脂质等遭到氧自由基的攻击，导致细菌死亡[40]。所以 SiO_2/PSP/CH-film 的抑菌性略优于 PSP/CH-film。

2.4　粒径对复合膜性能的影响

2.4.1　粒径对复合膜物理性能的影响　为进一步研究在添加相同质量含量的前提下，不同粒径的纳米 SiO_2 对 PSP/CH-film 改性的影响。选择质量含量为 0.1%，但粒子直径分别为 50 和 500 nm 的纳米 SiO_2 粉末制备的改性复合膜，进而与 30 nm 改性膜比较物理性能和机械性能。不同粒径的纳米 SiO_2 复合膜各物理性能如表 4 所示。由表 4 可知，随着纳米 SiO_2 粒径尺寸的增大，SiO_2/PSP/CH-film 的厚度、密度、和溶胀度随之降低，但是不透明度与纳米 SiO_2 粒径大小呈正相关关系。由于小颗粒容易团聚[41]，且小颗粒更容易分散在壳聚糖基质结构中形成致密网络结构，所以小粒径的改性膜密度较大。同时，随着纳米 SiO_2 粒径的增大粒子表面由比较粗糙逐渐变为形状规整的球形且比表面积下降[42]，因此，SiO_2/PSP/CH-film 的厚度随纳米 SiO_2 粒径尺寸的增大而减小。改性膜的不透明度呈现出显著的升高趋势（P<

表 4　不同粒径纳米 SiO_2 对复合膜物理性能的影响

Table 4　The effect of nano-SiO_2 with different particle size on the physical properties of composite films

样品	厚度(μm)	密度(g/cm^3)	溶胀度(%)	不透明度(μm^{-1})
30 nm 的SiO_2/PSP/CH-film	567±27^{a}	3.46±0.16^{a}	2714.15±47.41^{a}	5.99±0.10^{c}
50 nm 的SiO_2/PSP/CH-film	570±12^{a}	3.10±0.24^{a}	2103.32±36.97^{b}	11.83±0.30^{b}
500 nm 的SiO_2/PSP/CH-film	460±32^{b}	1.02±0.16^{b}	834.63±30.53^{c}	21.72±1.09^{a}

0.05)，可能是由于大粒径的 SiO_2 在改性膜中逐渐形成一定的连续相，因此，对可见光的透过率逐渐下降，也从侧面反映出纳米 SiO_2 在改性膜中有较好的分散与分布程度。Rahman 等[43] 认为随着粒子粒径的增大，SiO_2 表面的羟基数量虽然增加，但 SiO_2 的比表面积和表面 Si-OH 浓度下降。因此，复合薄膜的吸水率减小，所以溶胀度也随之降低。

2.4.2 粒径对复合膜机械性能、降解性能及抑菌性的影响 不同粒径纳米 SiO_2 对复合膜机械性能和失重率、抑菌性的影响见表 5。由表 5 可以看出，随着纳米 SiO_2 粒径的增大，复合膜的抗拉强度显著降低($P<0.05$)，断裂伸长率增大但变化不显著($P>0.05$)。可能是由于当纳米 SiO_2 粒子的粒径小于 30 nm 时，其表面的 Si-OH 主要以孤立的形式存在[44]，孤立的 Si-OH 小粒径纳米 SiO_2 容易与壳聚糖和藻多糖之间形成网络结构，并且其比表面积大，表面粗糙也可能增加了摩擦力，所以 30 nm 的纳米 SiO_2 复合膜抗拉强度较大。纳米 SiO_2 是一种的高刚度的粘结剂，随着粒径的增大，其表面变为形状规整的球形，柔韧度提高，所以 500 nm 的纳米 SiO_2 复合膜的断裂伸长率升高。当 SiO_2 粒子尺寸大于 60 nm 时，大部分的 Si-OH 是以主要以氢键的方式结合[45]，抗老化性能好，所以 500 nm 的纳米 SiO_2 复合膜失重率显著降低($P<0.05$)，说明此时复合膜的降解速率降低。此外，抑菌结果表明，不同粒径(30、50、500 nm)的纳米 SiO_2 对改性膜抑菌性无显著性影响($P>0.05$)。

表 5 不同粒径的纳米 SiO_2 对复合膜机械性能、失重率和抑菌性的影响

Table 5 The effect of nano-SiO_2 with different particle size on the mechanical properties, weight loss rate and antibacterial activity of composite films

样品	抗拉强度 (MPa)	断裂伸长率 (%)	失重率 (%)	抑菌直径 (cm)
30 nm 的SiO_2/PSP/CH-film	7.65±0.52^a	2.78±0.22^b	63.63±1.31^a	1.68±0.05^a
50 nm 的SiO_2/PSP/CH-film	5.63±0.40^b	3.96±1.43^{ab}	60.71±0.27^{ab}	1.70±0.04^a
500 nm的SiO_2/PSP/CH-film	2.40±0.37^c	5.30±1.68^a	56.01±0.90^b	1.71±0.08^a

3 结论

本文研究了纳米 SiO_2 对 PSP/CH-film 的影响，通过傅里叶红外光谱分析对 SiO_2/PSP/CH-film 进行表征，结果表明：SiO_2/PSP/CH-film 中 SiO_2 与壳聚糖和藻多糖间发生了氢键的相互作用，具有较好的相容性和协同作用。通过 SiO_2 的改性，可以提高 SiO_2/PSP/CH-film 的抗拉强度和抑菌性，也增加了厚度、溶胀度和不透明度，但同时也延缓了其生物降解性，降低了断裂伸长率。当纳米 SiO_2 质量含量为 0.1%，粒径尺寸为 30 nm 时，制备的 SiO_2/PSP/CH-film 有较好的抑菌性和抗拉强度，可提高膜的实际耐用性。此外，为进一步考察不同粒子直径的纳米 SiO_2 对 SiO_2/PSP/CH 改性复合膜的影响，发现添加粒径为 500 nm 的 SiO_2/PSP/CH-film，尽管厚度变薄，但大粒径的 SiO_2/PSP/CH-film 与小粒径的 SiO_2/PSP/CH-film 相比，断裂伸长率增大。因此，优化 SiO_2/PSP/CH-film 的制备工艺，使其更充分展现优良性能的研究有待更深入的思考与探索。上述研究结果也可为 SiO_2 在可食用膜和保鲜领域的应用提供理论依据。

参考文献

[1] 肖玮, 孙智慧, 刘佳, 等. 生物降解食品包装材料的研究进展[J]. 食品工业, 2018, 39(1): 216−218. [XIAO Wei, SUN Zhihui, LIU Jia, et al. Reviewed of biodegradable food packaging materials [J]. The Food Industry, 2018, 39(1): 216−218.]

[2] 马胜亮, 刘文良, 胡亮. 可食性绿色包装膜的研究进展[J]. 包装工程, 2020, 41(23): 90−97. [MA Shengliang, LIU Wenliang, HU Liang. Research progress on edible green packaging film[J]. Packaging Engineering, 2020, 41(23): 90−97.]

[3] WU Si, WANG Wenqi, YAN Kun, et al. Electrochemical writing on edible polysaccharide films for intelligent food packaging[J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 186: 236−242.

[4] 彭勇. 可食性壳聚糖活性包装膜成膜组分研究 [D]. 上海: 上海交通大学, 2014. [PENG Yong. Study on the critical components of active chitosan-based edible packaging films[D]. Shanghai: Shanghai Jiaotong University, 2014.]

[5] 陈红, 李彩云, 李侠, 等. 壳聚糖/微晶甾醇可食性复合膜的制备、性能及结构表征[J]. 食品科学, 2017, 38(9): 91−98. [CHEN Hong, LI Caiyun, Li Xia, et al. Preparation, properties and structural characterization of chitosan/microcrystalline sterol composite edible films[J]. Food Science, 2017, 38(9): 91−98.]

[6] 刘晨霞, 乔勇进, 康慧芳, 等. 低温结合壳聚糖涂膜对夏黑葡萄贮藏品质的影响[J]. 上海农业学报, 2021, 37(2): 109−115. [LIU Chenxia, QIAO Yongjin, KANG Huifang, et al. Effects of chitosan coating on the storage quality of ‘Summer Black’ grape during cold storage[J]. Acta Agriculturae Shanghai, 2021, 37(2): 109−115.]

[7] 石彬, 李咏富, 龙明秀, 等. 壳聚糖复合膜与辐照保鲜技术对贵长猕猴桃保鲜效果的研究[J]. 中国酿造, 2020, 39(4): 171−175. [SHI Bin, LI Yongfu, LONG Mingxiu, et al. Effect of chitosan composite film and irradiation on Guichang kiwifruit preservation[J]. China Brewing, 2020, 39(4): 171−175.]

[8] 李莹, 杨欣悦, 王雪羽, 等. 壳聚糖基复合膜的成膜机理和特性研究进展 [J/OL]. 食品工业科技: 1−14 [2021−08−09]. https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021040015. [LI Ying, YANG Xinyue, WANG Xueyu, et al. Research progress on the film-forming mechanism and characteristics of chitosan-based composite membranes[J/OL]. Science and Technology of Food Industry: 1−14 [2021−08−09]. https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021040015.]

[9] THENGODKAR R, RAVINDRA M, SIVAKAMI S. et al. Degradation of chlorpyrifos by an alkaline phosphatase from the cyanobacterium *Spirulina platensis*[J]. Biodegradation, 2010, 21(4): 637−644.

[10] JUAREZ-OROPEZA M A, MASCHER D, TORRES-DURAN P V, et al. Effects of dietary *Spirulina* on vascular reactivity[J].

Journal of Medicinal Food, 2009, 12(1): 15−20.
[11] 何善生, 王力, 李健, 等. 螺旋藻研究进展[J]. 食品工业, 2017, 12(38): 263−268. [HE Shansheng, WANG Li, Li Jian, et al. Advances in *Spirulina* research[J]. The Food Industry, 2017, 12(38): 263−268.]
[12] 杜玲. 钝顶螺旋藻两个生态种多糖的抗菌、抗肿瘤活性及其机理的研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2010. [DU Ling. Studies on the effects of polysaccharide from *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* of two different ecogeographic species on antibacteria, antitumor and its mechanism[D]. Huhhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2010.]
[13] 赵飞艳, 敖长金, 杜玲, 等. 钝顶螺旋藻粗多糖抗氧化作用的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2010(17): 14−16. [ZHAO Feiyan, AO Changjin, DU Ling, et al. The anti-oxidative effect of *Spirulina* (*Arthrospira*) *patensis* polysaccharide *in vitro*[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2010(17): 14−16.]
[14] TAVASSOLIK E, GAMAGE M V, DUMEE L F, et al. Edible films and coatings for shelf life extension of mango: A review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2020.
[15] 孙彦峰, 罗爱国, 冯佳, 等. 壳聚糖/绿球藻多糖复合膜的制备及性能研究[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(5): 170−176. [SUN Yanfeng, LUO Aiguo, FENG Jia, et al. Preparation and properties of chitosan/*Chlorococcum* sp. GD polysaccharide composite films[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(5): 170−176.]
[16] 何淑婷, 刘宝春. 纳米二氧化硅改性及其应用研究进展[J]. 材料研究与应用, 2016, 10(2): 72−74. [HE Shuting, LIU Baochun. The research progress of modification and application of nano silica[J]. Materials Research and Application, 2016, 10(2): 72−74.]
[17] ZHENG Peng, KONG Lingxue, LI Sidong. et al. Self-assembled natural rubber/silica nanocomposites: Its preparation and characterization[J]. Composites Science and Technology, 2007, 67(15): 3130−3139.
[18] 王雅妮, 丁洁, 徐赵萌, 等. 食品保鲜膜的改性及其研究进展[J]. 包装工程, 2021, 42(1): 1−7. [WANG Yani, DING Jie, XU Zhaomeng, et al. Modification and research progress of food preservation films[J]. Packaging Engineering, 2021, 42(1): 1−7.]
[19] 罗自生, 李栋栋, 叶轻飏. 纳米二氧化硅改性 LDPE 膜对草莓生理和品质的影响[J]. 核农学报, 2014, 28(7): 1232−1239. [LUO Zisheng, LI Dongdong, YE Qingyang. Effect of nano-SiO_2 modified LDPE film on physiology and quality of strawberry[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2014, 28(7): 1232−1239.]
[20] 张丽霞, 周剑忠, 黄开红, 等. 壳聚糖添加纳米 SiO_x 复合涂膜保鲜草莓的效果[J]. 江苏农业学报, 2010, 26(1): 152−156. [ZHANG Lixia, ZHOU Jianzhong, HUANG Kaihong, et al. Effects of the coating composite of chitosan and nano-SiO_x on postharvest quality and physiology of strawberry[J]. Jiangsu J of Agr Sci, 2010, 26(1): 152−156.]
[21] WANGK T, PENG J, SHANGH T, et al. A combination of hot air treatment and nano-packing reduces fruit decay and maintains quality in postharvest Chinese bayberries[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2010, 90(14): 2427−2432.
[22] 徐庭巧, 罗自生, 解静. 纳米 SiO_x/壳聚糖复合物对鲜切荸荠品质和生理的影响[J]. 中国食品学报, 2011, 11(4): 123−128. [XU Tingqiao, LUO Zisheng, XIE Jing. Effects of nano-SiO_x/chitosan complex (NSCC) on the shelf life and quality of fresh-cut chinese water chestnut[J]. Journal of China Institute of Food Science and Technology, 2011, 11(4): 123−128.]
[23] UBONRAT S, WARANYA V. Improving functional properties of chitosan films as active food packaging by incorporating with propolis[J]. Food Hydrocolloids, 2016, 61: 695−702.
[24] PARK P J, JE J Y, KIM S K. Free radical scavenging activities of differently deacetylated chitosans using an ESR spectrometer [J]. Carbohydrate Polymers, 2004, 55(1): 17−22.
[25] PORNPIMON M, SAKAMON D. Effects of drying methods and conditions on release characteristics of edible chitosan films enriched with Indian gooseberry extract[J]. Food Chemistry, 2009, 118(3): 594−601.
[26] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 1040.3-2006 塑料拉伸性能的测定第 3 部分: 薄膜和薄片的试验条件 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2007. [General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. GB/T 1040.3-2006 Plastics-Determination of tensile properties-Part 3: Test conditions for films and sheets[S]. Beijing, China Quality and Standards Publishing & Media Co., Ltd., 2007.]
[27] 陈桂芸, 曲亮璠, 赵宇, 等. 抗菌性玉米醇溶蛋白/壳聚糖复合膜的制备与性质[J]. 食品科学, 2017, 38(15): 58−62. [CHEN Guiyun, QU Liangpan, ZHAO Yu, et al. Preparation and properties of antibacterial zein/chitosan composite film[J]. Food Science, 2017, 38(15): 58−62.]
[28] LIN H, KANG S G, DAY D E. et al. The effect of fiber annealing on the properties of an optically transparent PMMA composite[J]. Composites Science and Technology, 1994, 50(3): 367−372.
[29] XU Y X, KIM K M, HANNA M A, et al. Chitosan-starch composite film: Preparation and characterization[J]. Industrial Crops and Products, 2005, 21(2): 185−192.
[30] YAO Kunhua, CAI Jie, LIU Miao, et al. Structure and properties of starch/PVA/nano-SiO_2 hybrid films[J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 86(4): 1784−1789.
[31] XING Yage, YANG Hua, GUO Xunlian, et al. Effect of chitosan/nano-TiO_2 composite coatings on the postharvest quality and physicochemical characteristics of mango fruits[J]. Scientia Horticulturae, 2020, 263: 109135.
[32] 贾延江, 安源程, 张燕, 等. 纳米胶体二氧化硅改性 Kapton 型聚酰亚胺薄膜的制备及性能研究[J]. 绝缘材料, 2021, 11: 100−107. [JIA Yanjiang, AN Yuancheng, ZHANG Yan, et al. Preparation and properties of Kapton-type polyimide films modified with colloidal silica fillers[J]. Insulating Materials, 2021, 11: 100−107.]
[33] 孙宛茹, 贾仕奎, 孙垚垚, 等. 多糖类可食性膜的改性与应用研究进展[J]. 现代化工, 2018, 38(6): 52−55. [SUN Wanru, JIA Shikui, SUN Yaoyao, et al. Progress on modification and application of polysaccharide edible film[J]. Modern Chemical Industry,

2018, 38(6): 52−55.]

[34] 吴佳. 普鲁兰壳聚糖复合可食用膜的性质研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2012. [WU Jia. Characterization of Pullulan-chitosan blend film[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2012.]

[35] RHIM J W, WANG Longfeng. Mechanical and water barrier properties of agar/k-carrageenan/konjac glucomannan ternary blend biohydrogel films[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 96(1): 71−81.

[36] TANG Shangwen, ZOU Peng, XIONG Hanguo, et al. Effect of nano-SiO_2 on the performance of starch/polyvinyl alcohol blend films[J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 72(3): 521−526.

[37] 李帅, 钟耕辉, 刘玉梅. 多糖类可食性膜研究进展[J]. 食品科学, 2018, 39(3): 309−316. [LI Shuai, ZHONG Genghui, LIU Yumei. Progress in edible films prepared with polysaccharides[J]. Food Science, 2018, 39(3): 309−316.]

[38] QIAN Tingting, SU Haijia, Tan Tianwei. The bactericidal and mildew-proof activity of a TiO_2-chitosan composite[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology A Chemistry, 2011, 218(1): 130−136.

[39] HAJIPOUR M J, FROMM K M, ASHKARRAN A A, et al. Antibacterial properties of nanoparticles[J]. Trends in Biotechnology, 2012, 30(10): 499−511.

[40] PHAM T D, LEE B K. Cu doped TiO_2/GF for photocatalytic disinfection of *Escherichia coli* in bioaerosols under visible light irradiation: Application and mechanism[J]. Applied Surface Science, 2014, 296: 15−23.

[41] 冯江波, 王景平, 苑慧莹, 等. 不同粒径 PANI/SiO_2 对环氧涂层防腐性能的影响 [J/OL]. 材料导报, 2021. DOI:10.11896/cldb.20090290. [FENG Jiangbo, WANG Jingping, YUAN Huiying, et al. Effect of PANI/SiO_2 particle size on anti-corrosion properties of epoxy coating[J/OL]. Materials Reports, 2021. DOI:10.11896/cldb.20090290.]

[42] 杨威, 徐本梁, 严顺洪, 等. 纳米二氧化硅粒径尺寸调控及其对表面化学修饰的影响研究[J]. 硅酸盐通报, 2020, 39(7): 2321−2325. [YANG Wei, XU Benliang, YAN Shunhong, et al. Regulation of nano SiO_2 and the effect of particle size on surface modification[J]. Bulletin of the Chinese Ceramic Society, 2020, 39(7): 2321−2325.]

[43] RAHMAN I A, VEJAYAKUMARAN P, SIPAUT C S, et al. Size-dependent physicochemical and optical properties of silica nanoparticles[J]. Materials Chemistry and Physics, 2009, 114(1): 328−332.

[44] KAMIYA H, MITSUI M, TAKANO H, et al. Influence of particle diameter on surface silanol structure, hydration forces, and aggregation behavior of alkoxide-derived silica particles[J]. Journal of the American Ceramic Society, 2000, 83(2): 287−293.

[45] 黄静, 赵琦, 卓坚锐, 等. 交联 PVA/SiO_2 复合膜的制备及性能 [J]. 塑料, 2010(1): 17−18, 51. [HUANG Jing, ZHAO Qi, ZHUO Jianrui, et al. Synthesis and properties of crosslinked PVA/SiO_2 composite film[J]. Plastics, 2010(1): 17−18, 51.]

岳翠男, 秦丹丹, 李文金, 等. 基于 HS-SPME-GC-MS 和 OAV 鉴定浮梁红茶关键呈香物质 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 251−258. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021070342

YUE Cuinan, QIN Dandan, LI Wenjin, et al. Identification of Key Aroma Components in Fuliang Black Tea Based on HS-SPME-GC-MS and OAV[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 251−258. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021070342

· 分析检测 ·

基于 HS-SPME-GC-MS 和 OAV 鉴定浮梁红茶关键呈香物质

岳翠男[1,2,3], 秦丹丹[4], 李文金[1,2,3,*], 吴华玲[4,*], 蔡海兰[1,2,3], 李　琛[1,2,3], 杨普香[1,2,3]

（1.江西省蚕桑茶叶研究所, 江西南昌 330043;
2.江西省茶叶质量与安全控制重点实验室, 江西南昌 330043;
3.江西省经济作物研究所, 江西南昌 330043;
4.广东省农业科学院茶叶研究所, 广东广州 510640）

摘　要: 为探讨浮梁红茶的挥发性香气成分组成，从中筛选其关键呈香物质。本研究采用顶空固相微萃取-气质联用（headspace-solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry，HS-SPME-GC-MS）鉴定浮梁红茶的挥发性成分，通过香气活度值（odor activity value，OAV）与主成分分析（principal component analysis，PCA）相结合筛选其关键呈香物质。结果表明，在浮梁红茶中分离鉴定出 73 种挥发性成分，包括醇类 16 种、酯类 12 种、碳氢化合物 11 种、酮类 10 种、醛类 9 种、酸类 6 种、杂环类 6 种和酚类及其衍生物 3 种，醇类种类和相对含量均为最高，其中，44 种挥发性成分在 3 个浮梁红茶样品之间无显著性差异（$P>0.05$），29 种有显著性差异（$P<0.05$）。挥发性成分中有 15 种的 OAV 不小于 1，最终筛选出柠檬醛、苯甲醇、香叶醇、α-紫罗酮、反式-橙花叔醇、香叶基丙酮、苯乙醇、水杨酸甲酯、正己醛、芳樟醇和 2-甲基吡嗪等 11 种化合物为浮梁红茶的关键呈香物质。本研究结果为解析浮红的特征性风味品质、明确其香气物质前体与品质定向调控提供了理论基础。

关键词: 浮梁工夫红茶, 香气, GC-MS, OAV, 风味, 挥发性成分

中图分类号: TS272.4　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0251−08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021070342

本文网刊:

Identification of Key Aroma Components in Fuliang Black Tea Based on HS-SPME-GC-MS and OAV

YUE Cuinan[1,2,3], QIN Dandan[4], LI Wenjin[1,2,3,*], WU Hualing[4,*], CAI Hailan[1,2,3], LI Chen[1,2,3], YANG Puxiang[1,2,3]

（1.Jiangxi Sericulture and Tea Research Institute, Nanchang 330043, China;
2.Jiangxi Key Laboratory of Tea Quality and Safety Control, Nanchang 330043, China;
3.Jiangxi Economic Crops Research Institute, Nanchang 330043, China;
4.Tea Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Science, Guangzhou 510640, China）

Abstract: In order to study the composition of volatile aroma components in Fuliang black tea and screen the key aroma components, in this study, headspace-solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS) was performed to identify the volatile components of Fuliang black tea, and the key aroma components were selected by the odor activity value (OAV) and principal component analysis (PCA). The 73 kinds of volatile components were isolated and identified in Fuliang black tea, including 16 alcohols, 12 esters, 11 hydrocarbons, 10 ketones, 9 aldehydes, 6

收稿日期: 2021−07−28

基金项目: 江西省现代农业产业技术体系建设专项（JXARS-02）; 国家现代农业产业技术体系建设专项（CARS-19）; 江西省茶叶质量与安全控制重点实验室茶叶加工课题（20192BCD40007）; 江西省重点研发计划项目（20202BBF63004）。

作者简介: 岳翠男（1990−）, 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 茶叶化学, E-mail: 1207199622@qq.com。

*** 通信作者:** 李文金（1967−）, 男, 本科, 研究员, 研究方向: 茶产业生产技术, E-mail: 779029783@qq.com。
吴华玲（1981−）, 女, 博士, 研究员, 研究方向: 茶树生物化学及信息学, E-mail: wuhualing@163.com。

acids, 6 heterocycles and 3 phenols and their derivatives. The kinds and relative contents of alcohols were the highest, among which 44 kinds of volatile components had no significant difference among the three Fuliang black tea samples (P>0.05), and 29 kinds had significant difference (P<0.05). The OAV of 15 volatile components was not less than 1. Finally, 11 compounds were selected as the key aroma components of Fuliang black tea, including citral, benzyl alcohol, geraniol, α-lonone, trans-nerolidol, geranylacetone, phenylethanol, methyl salicylate, hexanal, linalool and 2-methylpyrazine. The results of this study provided a theoretical basis for analyzing the characteristic flavor quality of Fuliang black tea, clarifying its aroma precursors and quality oriented control.

Key words: Fuliang congou black tea; aroma; GC-MS; OAV; flavor; volatile components

浮梁产茶历史悠久，南北朝时期就已成为南方茶叶主要集散地，唐代诗人白居易的《琵琶行》中写有“商人重利轻别离，前月浮梁买茶去”，素有“古茶市”之称[1]。浮梁工夫红茶，又“浮梁红茶”，创制于清道光年间，简称“浮红”，其品质特征干茶紧细，有锋苗，茶汤红亮，香气呈甜香，时有玫瑰花香，芬芳馥郁持久，滋味鲜爽醇厚，回甘显，叶底红铜色，嫩匀整[2]。因其独特风味品质特征，同祁红与斯里兰卡、大吉岭红茶统称为世界三大高香茶，并在 1915 年的巴拿马“万国博览会”上荣获金质奖章和奖状，足见其独特品质与国际地位[3]。茶叶特征性风味品质来源于其非挥发性与挥发性代谢物组分[4]。前期，蔡海兰等[5]对浮梁红茶的滋味物质基础与品质评价进行了探讨。而关于浮梁红茶的挥发性香气组分与关键呈香物质尚无研究，因此，研究浮梁红茶的挥发性香气组分对解析浮红的特征性风味品质与品质定向调控具有重要意义。

香气是决定茶叶品质的重要因素之一，对茶叶风味、评判等级以及消费者导向等都具有十分重要的作用。茶香是不同的挥发性物质通过不同浓度组合，对嗅觉神经综合作用所形成的特有香型[6]。在茶叶的挥发性成分中存在少量关键呈香成分，对茶叶的风味品质具有重要影响[6]。目前，在众多挥发性物质检测方法中，HS-SPME-GC-MS 具有简单、快速、分析成本低及接近真实茶香等优势，在茶叶挥发性成分检测中广泛运用[7]。OAV 是挥发性物质浓度与其对应介质中气味阈值的比值，其值越大，说明该物质对呈香越重要，是关键呈香成分分析的重要手段，此方法可通过理论值的计算来表征挥发性物质香气的贡献度[8]。多元统计分析方法中 PCA 能将重复和交互的变量进行简化，用最关键的变量来解决复杂的问题[9]。基于此，本研究拟采用 HS-SPME-GC-MS 来定性与定量浮梁红茶的挥发性组分，运用 OAV 与 PCA 方法相结合筛选浮红的关键呈香挥发性物质，以期为解析浮红的特征性风味品质与明确其香气物质前体提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

3 份具有代表性的市售浮梁红茶成品　分别购买于浮梁县 3 个不同的乡镇，其中，浮红 1 生产于瑶里镇，样品标准为一芽一、二叶，生产时间为 2019 年 4 月上旬；浮红 2 生产于西湖乡，样品标准为一芽二叶，生产时间为 2019 年 4 月中旬；浮红 3 生产于江村乡，样品标准为一芽二、三叶，生产时间为 2019 年 4 月中旬；茶树品种均为浮梁槠叶群体种；各浮梁红茶样品的加工工艺流程为：鲜叶→萎凋→揉捻→发酵→干燥→提香→包装；采购的每个样品采用统一规格的茶叶专用铝箔袋包装，存放于−4 ℃ 冰箱，用于挥发性成分检测；癸酸乙酯（99%）　Sigma 公司。

Agilent 7890B-5977B_PAL RSI 120 气相色谱-质谱联用仪、DB-WAX 色谱柱（30 m×0.25 mm×0.25 μm）　安捷伦科技（中国）有限公司；固相微萃取装置 SPME AllowCond、老化装置 Fiber Conditioning Station、样品加热箱 Agitator　瑞士思特斯分析仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1　顶空固相微萃取　将 3 份茶样进行粉碎，分别称取 1.5 g 粉碎后的茶样，放入 20 mL 顶空进样瓶中，在进样瓶中加入 20 μL 癸酸乙酯（浓度为 0.02 mg/mL），加入 5 mL 沸腾的蒸馏水。将上述进样瓶在 60 ℃ 恒温条件下振荡 15 min，振荡器速度控制为 450 r/min（时间为 5 s 开，2 s 关），使用 50/30 μm DVB/CAR/PDMS 萃取头（Sigma 公司）萃取，萃取头萃取前先在 Fiber Conditioning Station 中老化 2 h，采样前后分别在 Fiber Conditioning Station 中加热解吸去杂 10 min，将萃取头插入进样瓶顶空部分，萃取 60 min，在 250 ℃ 下解析 5 min，最后采用 GC-MS 鉴定[10]。每个样品采用 3 次重复。

1.2.2　色谱与质谱条件　GC-MS 设备为 Agilent 7890B-5977B（GC-MS）PAL RSI 120。色谱条件：采用 DB-WAX 毛细管柱（30 m×0.25 mm×0.25 μm，Agilent J&W Scientific, Folsom, CA, USA），载气使用高纯氦气（纯度大于 99.999%），进样口温度为 260 ℃，恒流流速为 1.0 mL/min，不分流进样，溶剂延迟为 1.5 min。程序升温以 40 ℃ 保持 3 min，以 4 ℃/min 升至 220 ℃，保持 10 min。质谱条件：电子轰击离子源（EI），离子源温度为 230 ℃，质谱接口温度为 280 ℃，四极杆温度为 150 ℃，检测器电压为 901 V，电子能量为 70 eV，扫描方式使用全扫描模式（SCAN），质量扫描范围为 20~650 m/z。

1.2.3　挥发性成分定性　将 GC-MS 分析得到的各

色谱峰的质谱图在鹿明生物自主研发的 LUG 数据库 Lumingbio 进行相似度比对，结合标准质谱图和保留时间对各峰进行确认，以比对相似度大于 90% 作为鉴定标准，获得定性挥发性化合物[10]。

1.2.4　挥发性成分定量　采用内标癸酸乙酯定量香气成分，每个挥发性成分的含量按照公式（1）计算：

$$W_i = (S_i M_{is})/(S_{is} M_i)$$　　式（1）

式中：W_i 表示每个挥发性成分的含量（μg/kg）；S_i 表示挥发性成分的峰面积；M_{is} 表示内标癸酸乙酯的质量（μg/kg）；S_{is} 表示内标癸酸乙酯的峰面积；M_i 表示样品的质量（kg）[11−12]。

1.2.5　气味活度值计算　OAV 为挥发性化合物质量浓度与该物质嗅觉阈值的比值，按公式（2）计算：

$$O_i = W_i/Q_i$$　　式（2）

式中：O_i 表示挥发性成分的气味活度值；W_i 表示每个挥发性成分的含量（μg/kg）；Q_i 表示每个挥发性成分在参考文献中的气味阈值（μg/kg）[13−14]。

1.3　数据处理

挥发性成分百分比图采用 Origin 2018 制作；采用 SPSS 19.0 进行 LSD 方差分析，采用 The Unscrambler Version 9.7 进行主成分分析。

2　结果与分析

2.1　浮梁红茶挥发性物质组分分析

浮梁红茶的挥发性组分总离子流图见图 1，其挥发性成分定性定量及香气类型描述见表 1。浮梁红茶挥发性成分总量为 6268.60~9123.38 μg/kg，均值为 7899.32 μg/kg，其中样品浮红 2 的挥发性成分含量最高，浮红 1 的最低。在浮梁红茶中共检测到 73 种挥发性成分，包括醇类 16 种、酯类 12 种、碳氢化合物 11 种、酮类 10 种、醛类 9 种、酸类 6 种、杂环类 6 种和酚类及其衍生物 3 种。差异性分析显示在检测到的挥发性化合物中 44 种无显著性差异（P>0.05），29 种在部分样品之间存在显著性差异（P<0.05），说明此 44 种无显著性差异的挥发性成分为浮红的基本香气成分，如芳樟醇、2-呋喃甲醇、Z-3-己烯-1-醇、水杨酸甲酯、2-甲基吡嗪等，以酸类、酮类、酯类和杂环类居多；存在显著性差异的 29 种挥发性成分是让浮红产生品质差异（花香、甜香、蜜香、木香等）的主要原因，如香叶醇、橙花醇、苯乙醇、苯乙醛、α-紫罗酮等，以醇类和醛类居多。

从浮红挥发性成分含量上来看，含量较高的成分为香叶醇、苯乙醇、水杨酸甲酯、苯甲醇、反式芳樟醇氧化物（呋喃型）、己酸、芳樟醇、二氢芳樟醇、α-紫罗酮、苯甲醛、罗勒烯、苯乙醛、2-呋喃甲醇和香叶基丙酮，其中，香叶醇含量为 1631.0~2937.8 μg/kg，均值为 2444.84 μg/kg；苯乙醇含量为 906.46~1740.25 μg/kg，均值为 1308.7 μg/kg；水杨酸甲酯含量为 705.74~967.18 μg/kg，均值为 843.79 μg/kg，这

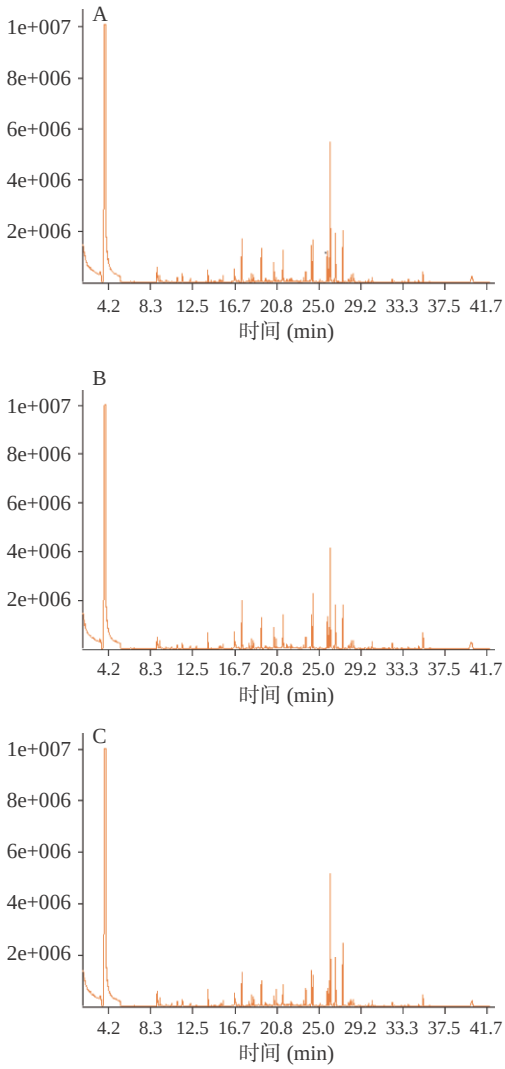


图 1　3 份浮梁红茶挥发性成分总离子流图

Fig.1　Total ion flow diagram of volatile components in three Fuliang black teas

注：A：浮红 1，B：浮红 2，C：浮红 3。

些成分的香型均为典型的甜香、花香、果香、蜜香等。竹尾忠一对中国工夫红茶香气特征进行研究，表明闽红与祁红的香叶醇含量高，两广地区红茶芳樟醇及其氧化物含量较高，把红茶分为三种类型，第一种是以芳樟醇及其氧化物为主，第二种是中间型，以芳樟醇和香叶醇为主，第三种类型是以香叶醇为主[15]。由此来看，浮红与闽红和祁红在高挥发性成分含量上相似，均以香叶醇为主，在分类属于第三种类型，在香气上均有较强的甜香、花香[2]。

从挥发性成分香气类型描述上来看，对浮红香气风味品质呈正贡献（甜香、花香、果香、清香、焙烤香等）的有 57 种、对香气风味品质有负贡献的（苦辣气味、刺激臭味、苦杏仁味、青气、粗老气、酸味）有 16 种，以刺激性酸味的酸类物质为主。这些呈负贡献的物质在浮梁红茶中含量相比与正贡献成分的含量和数量明显较少，这可能是浮梁红茶香气整体呈甜香、花香且馥郁持久的重要原因，但在浮红加工过程中，应最大可能地降低这些负贡献物质的含量，增加

表 1 浮梁红茶的挥发性物质及定量结果(μg/kg)

Table 1 Volatile compounds and quantitative results of Fuliang black tea (μg/kg)

类型	挥发性化合物	香气类型描述[4,15-18]	浮红1	浮红2	浮红3	平均值
醇类(16种)	α-松油醇	木香	10.06±2.59^{a}	14.93±3.00^{a}	13.27±3.47^{a}	12.75
	二氢芳樟醇	清香	122.77±31.70^{b}	293.97±62.64^{a}	60.04±15.38^{b}	158.93
	反式-橙花叔醇	清香、果香	12.55±3.23^{b}	21.08±4.62^{a}	17.44±4.30^{a}	17.02
	正己醇	绿叶清香	5.75±1.42^{a}	8.47±1.65^{a}	8.81±2.04^{a}	7.68
	橙花醇	玫瑰香、苹果香	22.03±5.68^{b}	42.98±8.59^{a}	43.29±11.43^{a}	36.10
	糠醇	有苦感味道	5.12±1.30^{b}	4.44±1.04^{b}	11.22±3.08^{a}	6.93
	2-呋喃甲醇	具有特殊的苦辣气味	135.74±35.94^{a}	126.76±27.42^{a}	116.65±30.14^{a}	126.38
	2-壬基醇	玫瑰香、脂肪气息	1.07±0.27^{a}	2.28±0.44^{a}	0.87±0.25^{a}	1.41
	(Z)-2-戊烯-1-醇	刺激臭味	9.09±2.25^{a}	7.68±1.67^{a}	12.00±3.36^{a}	9.59
	(Z)-3-己烯-1-醇	嫩叶的清爽和清香气	29.44±7.56^{a}	20.54±4.33^{a}	34.57±9.49^{a}	28.18
	苯甲醇	芳香、果香	493.85±128.17^{b}	683.74±137.80^{a}	611.57±150.50^{a}	596.39
	雪松醇	木香、檀香、玫瑰香	4.00±0.88^{a}	4.35±1.00^{a}	3.50±0.97^{a}	3.95
	香叶醇	玫瑰花香、甜香	1631.00±415.79^{b}	2937.80±558.12^{a}	2765.72±729.13^{a}	2444.84
	芳樟醇	甜香、花香、木香	215.47±58.61^{a}	221.72±45.74^{a}	279.38±74.95^{a}	238.86
	苯乙醇	玫瑰花香、蜜香	906.46±235.49^{b}	1740.25±348.62^{a}	1279.38±319.01^{b}	1308.70
	反式芳樟醇氧化物	花香、木香、铃兰香	420.54±111.64^{a}	357.82±76.02^{b}	433.88±111.94^{a}	404.08
醛类(9种)	β-环柠檬醛	青气	10.74±0.58^{b}	16.38±0.93^{a}	11.80±0.81^{b}	12.97
	苯乙醛	花香	93.78±24.20^{b}	183.25±38.55^{a}	103.95±23.27^{b}	126.99
	(E,E)-2,4-庚二烯醛	油臭气、粗老气	11.19±2.81^{b}	17.64±3.39^{a}	8.50±2.05^{b}	12.44
	3-糠醛	苦杏仁味	35.87±9.01^{a}	33.55±6.86^{a}	38.41±10.00^{a}	35.94
	苯甲醛	苦杏仁味、坚果香	115.21±29.85^{b}	167.78±35.26^{a}	120.44±29.68^{b}	134.48
	2,5-二甲基苯甲醛	苦杏仁香	2.36±0.56^{a}	4.76±0.85^{a}	3.17±0.79^{a}	3.43
	α-亚乙基-苯乙醛	花香、蜜糖	10.69±3.38^{a}	11.72±2.28^{a}	10.29±2.65^{a}	10.90
	柠檬醛	柠檬香、柑橘香	46.65±12.55^{b}	85.31±16.92^{a}	70.99±17.02^{ab}	67.65
	正己醛	木香、清香、水果香	8.70±2.21^{ab}	10.57±2.40^{a}	6.34±1.57^{b}	8.54
酸类(6种)	反式-3-己烯酸	乙酸气味	69.55±13.84^{c}	95.57±24.57^{b}	121.05±39.16^{a}	95.39
	苯甲酸	刺激性安息香味	7.18±1.58^{a}	10.37±2.42^{a}	8.24±2.30^{a}	8.60
	异戊酸	刺激性酸败味	26.56±7.01^{a}	33.76±7.14^{a}	33.25±8.44^{a}	31.19
	富马酸	水果酸味	3.21±0.80^{a}	4.26±0.80^{a}	3.35±0.79^{a}	3.61
	己酸	椰肉油刺激气味	212.64±50.98^{a}	253.41±54.39^{a}	256.13±68.98^{a}	240.73
	正戊酸	发酵味的酸气	15.10±3.79^{b}	20.34±4.50^{a}	12.50±3.12^{b}	15.98
酮类(10种)	α-紫罗酮	木香、紫罗兰香气	89.41±22.87^{b}	163.25±31.08^{a}	154.18±40.32^{a}	135.61
	β-紫罗酮	木香	32.28±8.82^{b}	61.90±12.95^{a}	44.95±10.81^{ab}	46.38
	呋喃酮	水果和焦糖香气	1.20±0.26^{a}	0.38±0.14^{b}	0.94±0.29^{a}	0.84
	2(5H)-呋喃酮	–	7.69±1.97^{b}	7.61±1.57^{b}	14.73±3.84^{a}	10.01
	2-环戊烯酮	烟草香味	2.13±0.55^{a}	2.79±0.42^{a}	1.88±0.56^{a}	2.27
	茉莉酮	花香	12.73±3.11^{a}	14.85±3.13^{a}	9.31±2.28^{a}	12.30
	2-庚酮	有类似梨的水果香味	1.27±0.29^{a}	1.37±0.34^{a}	1.06±0.29^{a}	1.23
	植酮	果香味	4.17±0.74^{a}	4.51±1.13^{a}	2.77±0.89^{a}	3.82
	羟基丙酮	令人愉快的花香	6.43±1.60^{a}	6.93±1.40^{a}	7.09±1.92^{a}	6.82
	香叶基丙酮	清香、花香	17.57±5.23^{b}	153.68±59.20^{a}	162.68±41.74^{a}	111.31
碳氢化合物(11种)	1-甲基萘	不愉悦的花香	6.34±1.53^{a}	10.30±1.94^{a}	7.83±1.87^{a}	8.16
	奥苷菊环	具有清香的气味	19.93±5.00^{b}	41.60±7.85^{a}	27.36±6.75^{b}	29.63
	2,3,6-三甲基萘	甜花香	1.64±0.37^{a}	1.99±0.41^{a}	1.29±0.36^{a}	1.64
	β-水芹烯	水果香	20.47±5.66^{b}	20.87±4.21^{b}	32.71±7.98^{a}	24.68
	罗勒烯	草香、花香	88.23±24.47^{b}	154.6±30.19^{a}	141.78±35.41^{a}	128.20
	β-柏木烯	花香、木香	0.85±0.21^{a}	0.89±0.21^{a}	0.75±0.18^{a}	0.83
	双戊烯	有愉悦的柠檬香味	27.14±9.02^{a}	30.79±6.82^{a}	27.04±6.67^{a}	28.32
	α-柏木萜烯	杉木香气	7.22±1.87^{a}	8.71±1.74^{a}	7.62±1.76^{a}	7.85
	顺-菖蒲烯	清新的气味	13.15±3.27^{b}	19.72±4.04^{a}	20.37±4.55^{a}	17.75
	3,5-二羟基甲苯	麝香、薰衣草气息	0.11±0.05^{a}	0.18±0.03^{a}	0.19±0.06^{a}	0.16
	1-十六烯	烟叶焙烤气味	35.95±9.28^{a}	45.66±9.29^{a}	33.59±7.75^{a}	38.40
酯类(12种)	(R)-3-羟基-γ-丁内酯	–	3.79±0.75^{b}	2.36±0.51^{b}	8.95±2.52^{a}	5.03

续表 1

类型	挥发性化合物	香气类型描述[4,15-18]	浮红1	浮红2	浮红3	平均值
	二氢猕猴桃内酯	甜香、奶香	22.85±5.47^{b}	41.6±11.24^{a}	20.9±6.45^{b}	28.45
	3-己烯酸乙酯	清香、水果香气	25.60±7.34^{a}	13.51±3.04^{b}	13.84±5.34^{b}	17.65
	乙酰基丙酮甲酯	–	13.57±3.18^{a}	17.26±3.94^{a}	13.86±3.70^{a}	14.90
	苯乙酸甲酯	甜味	2.82±0.76^{a}	5.36±1.05^{a}	3.45±0.82^{a}	3.88
	丁酸二甲基苄基原酯	有洋李似香气	4.87±1.36^{a}	9.82±1.92^{a}	7.28±1.72^{a}	7.32
	庚酸乙酯	菠萝香	4.50±1.36^{a}	5.29±1.26^{a}	5.90±2.11^{a}	5.23
	棕榈酸乙酯	奶油香气	19.01±3.94^{a}	23.87±7.28^{a}	44.82±23.36^{a}	29.23
	棕榈酸甲酯	愉快的水果香	9.66±1.69^{a}	8.10±1.98^{a}	8.95±2.92^{a}	8.90
	(Z)-己酸-3-己烯酯	水果青香	43.76±11.17^{a}	29.40±5.49^{a}	43.48±11.48^{a}	38.88
	正己酸乙酯	水果香气味	11.35±3.39^{a}	10.50±2.35^{a}	15.24±6.03^{a}	12.36
	水杨酸甲酯	冬青香、清香、花香	967.18±255.43^{a}	705.74±137.10^{a}	858.45±231.57^{a}	843.79
	5-甲基-2-乙酰基呋喃	坚果、烤香等甜香味	3.07±0.81^{b}	5.66±1.05^{a}	3.22±0.78^{b}	3.98
	2-乙氧基四氢呋喃	–	4.25±1.25^{a}	4.02±0.85^{a}	7.66±2.87^{a}	5.31
杂环类(6种)	2-乙酰基呋喃	甜的焦糖似香气	3.55±0.82^{a}	4.23±0.95^{a}	4.13±1.10^{a}	3.97
	2-正戊基呋喃	豆香、果香、清香	8.31±2.13^{a}	12.25±2.70^{a}	8.71±2.48^{a}	9.76
	2-乙酰基吡咯	呈烤面包香气	14.91±3.75^{a}	12.07±2.43^{a}	18.07±4.79^{a}	15.02
	2-甲基吡嗪	坚果等烘烤食品味	3.30±0.79^{a}	4.13±0.87^{a}	2.88±0.77^{a}	3.44
	对甲酚	烟熏、草药气味	1.55±0.39^{a}	2.64±0.65^{a}	1.88±0.45^{a}	2.02
酚类及其衍生物(3种)	苯酚	酚味	8.98±2.06^{a}	12.81±2.52^{a}	12.46±3.20^{a}	11.42
	百里酚	烟熏、药香气味	1.44±0.32^{a}	2.70±0.52^{a}	1.73±0.45^{a}	1.96
总量	–	–	6268.60	9123.38	8305.98	7899.32

注：同行不同字母表示差异显著(P<0.05)。

正贡献物质的含量。

2.2　浮梁红茶挥发性物质种类分析

浮梁红茶挥发性成分的种类占比见图 2，共分为 8 类，此 8 类共同构成了浮红的香气特征，其中以醇类含量最高，占挥发性成分的 64%~71%，其次为酯类，占挥发性成分的 10%~18%，依次为醛类(5%~6%)、酸类(5%)、酮类(3%~5%)、碳氢化合物类(4%)、酚类及其衍生物(0~1%)和杂环类(0~1%)。肖作兵等[19]在坦洋工夫红茶、宜昌工夫红茶、祁门工夫红茶、滇红工夫红茶中共检测到挥发性成分 75~77 种，4 种工夫红茶醇类物质含量最高，其次是醛类、酯类。尹鹏等[20]在信阳红中检测到 88 种挥发性成分，醇类含量最高，其次为醛类、酯类、酮类。与此相比，浮红也以醇类含量最高，不同

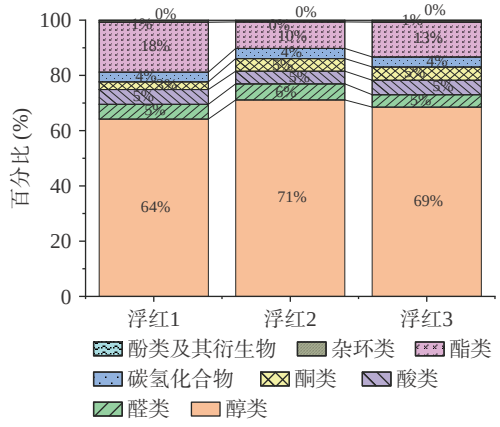


图 2　浮梁红茶的挥发性组分种类

Fig.2　Types of volatile components in Fuliang black tea

的是，浮红的酯类含量比醛类、酸类和酮类的含量都高，这可能是浮红特征性香气与其他工夫红茶香气产生差异的主要原因。不同浮红样品之间存在部分差异，浮红 2 在 3 个样品中醇类含量占比最高，酯类含量占比最低；浮红 1 在 3 个样品中酯类含量占比最高，醇类含量占比最低，浮红 3 介于两者之间。3 个样品来源于不同的乡镇，但品种与加工工艺相同，由此来看，浮梁县不同区域的地理微环境可对浮红香气物质种类和含量产生一定的影响，进而影响其品质特征，进一步需扩大样本并结合分子感官科学技术探讨其差异机理。

2.3　浮梁红茶挥发性物质的 OAV 分析

挥发性物质对工夫红茶特征风味的贡献不仅与该物质在茶汤中的质量浓度有关，其阈值也是非常重要的参考依据[21]。OAV 是香气化合物质量浓度与阈值的比值，可以表明单一挥发性物质对风味的贡献度。一般认为 OAV 不小于 1 的化合物为呈香的重要物质[22]。通过对 73 种挥发性成分中已明确阈值的查询与计算，发现其中 15 种挥发性成分的 OAV 不小于 1，结果见表 2。15 种挥发性成分的 OAV 在 10 以上的由高到低依次为香叶醇、α-紫罗酮、芳樟醇、苯乙醛和水杨酸甲酯；OAV 在 1 到 10 之间的由高到低依次为苯甲醇、香叶基丙酮、反式芳樟醇氧化物(呋喃型)、柠檬醛、2-甲基吡嗪和 2-正戊基呋喃；OAV 在部分样品中 OAV 不小于 1 的由高到低依次为香叶基丙酮、二氢芳樟醇、苯乙醇、反式-橙花叔醇和正己醛。

香叶醇在浮红中含量最高，其阈值相对较低

表 2 浮梁红茶中主要香气化合物的阈值与气味活度值

Table 2 Threshold values and OAV of main aroma compounds in Fuliang black tea

序号	挥发性成分	阈值(μg/kg)[16,19-20,29]	浮红1	浮红2	浮红3
1	2-正戊基呋喃	6	1.39	2.04	1.45
2	2-甲基吡嗪	1.8	1.83	2.29	1.60
3	二氢芳樟醇	110	1.12	2.67	0.55
4	反式-橙花叔醇	15	0.84	1.41	1.16
5	苯甲醇	100	4.94	6.84	6.12
6	香叶醇	40	40.78	73.45	69.14
7	芳樟醇	6	35.91	36.95	46.56
8	苯乙醇	1000	0.91	1.74	1.28
9	反式芳樟醇氧化物(呋喃型)	190	2.21	1.88	2.28
10	苯乙醛	4	23.45	45.81	25.99
11	柠檬醛	32	1.46	2.67	2.22
12	正己醛	10	0.87	1.06	0.63
13	α-紫罗酮	2.6	34.39	62.79	59.30
14	香叶基丙酮	60	0.29	2.56	2.71
15	水杨酸甲酯	40	24.18	17.64	21.46

(40 μg/kg),所以其 OAV 最高,前人研究结果表明香叶醇是祁门红茶、大吉岭红茶、信阳红、滇红及安吉红茶的重要香气成分[6,23−24];α-紫罗酮在浮红中含量中等,但其阈值极低(2.6 μg/kg),所以 OAV 相对较高,α-紫罗酮在 Kangra 正统红茶、碧螺春和青砖茶中均是重要香气成分[6];芳樟醇、苯乙醛和水杨酸甲酯均是信阳红、滇红的重要香气成分[6]。2-正戊基呋喃、柠檬醛、二氢芳樟醇、正己醛在其他工夫红茶中的 OAV 小于 1[20],但在浮红中 OAV 大于 1。此外这些重要香气成分来源于不同的香气前体,其中香叶醇、水杨酸甲酯、苯甲醇、反式芳樟醇氧化物(呋喃型)和苯乙醇的香气前体物质为糖苷;芳樟醇的香气前体物质为糖苷和类胡萝卜素;α-紫罗酮、香叶基丙酮、反式-橙花叔醇的香气前体物质为类胡萝卜素;苯乙醛和 2-甲基吡嗪来源于美拉德反应[25−27]。

因 OAV 是单一物质在水溶液中人们能够识别到的最低浓度,但在茶汤中存在大量的代谢产物,物质之间存在复杂的协同、加和、抑制等交互作用[28]。因此在筛选关键呈香物质时,需进一步结合多元统计分析方法,明确各重要挥发性成分的贡献度。

2.4 浮梁红茶关键呈香物质分析

在分子感官科学中建立的变量之间往往有一定的相关关系,当两个变量之间有一定相关关系时,可以解释为这两个变量反映此问题的信息有一定的重叠[30]。主成分分析是对于原先提出的所有变量,将重复或交互的变量删去多余,建立尽可能少的新变量,使得这些新变量是两两不相关的,而且这些新变量在反映问题的信息方面尽可能保持原有的信息[31]。因此主成分分析能够应用在分子感官科学中筛选关键风味物质。

对浮红中 15 种香气活度值大于 1 的挥发性成分进行主成分分析,结果见图 3 和图 4,主成分分析中提取了前 2 个主成分,累计贡献率达到 100%,其中主成分 1 的累计贡献率达到 94%,主成分 2 的累计贡献率为 6%。在图 3 中,大椭圆(R^2=1.0)表示 100% 的解释方差,小椭圆(R^2=0.5)表示 50% 的解释方差,如有成分处于小椭圆之内,说明此成分不能被主成分解释[28]。15 个挥发性成分均在大椭圆的边缘,表示能够 100% 解释,表明这些成分对浮红的香气均有贡献。以各主成分中载荷值在 0.9 以上的香气成分作为浮梁红茶的关键呈香物质(图 4),按照载荷值大小依次为柠檬醛、苯甲醇、香叶醇、α-紫罗酮、反式-橙花叔醇、香叶基丙酮、苯乙醇、水杨酸甲酯、正己醛、芳樟醇和 2-甲基吡嗪等 11 种,其中香叶醇、芳樟醇、苯乙醇的香气类型主要为甜香,玫瑰花香等,柠檬醛、正己醛、α-紫罗酮、香叶基丙酮和水杨酸甲酯的香气类型为果香、木香等,2-甲基吡嗪为典型的焙烤香。此结论与浮红的香气特征描述(香气芬芳馥郁持久,有明显的甜香,有时带有玫瑰花香[2])相近。

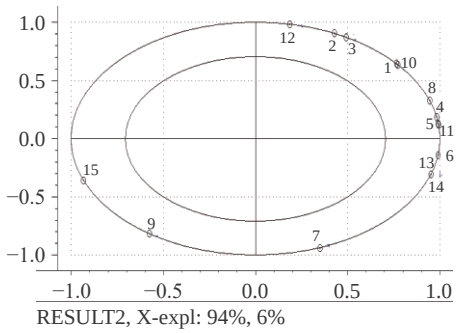


图 3 浮梁红茶主要香气成分主成分分析载荷图

Fig.3 Load chart of PCA of main aroma components in Fuliang black tea

注:图中香气成分序号与表 2 中对应。

3 结论

采用 HS-SPME-GC-MS 方法从选用的浮梁红茶样品中共鉴定到 73 种挥发性成分,总量均值为

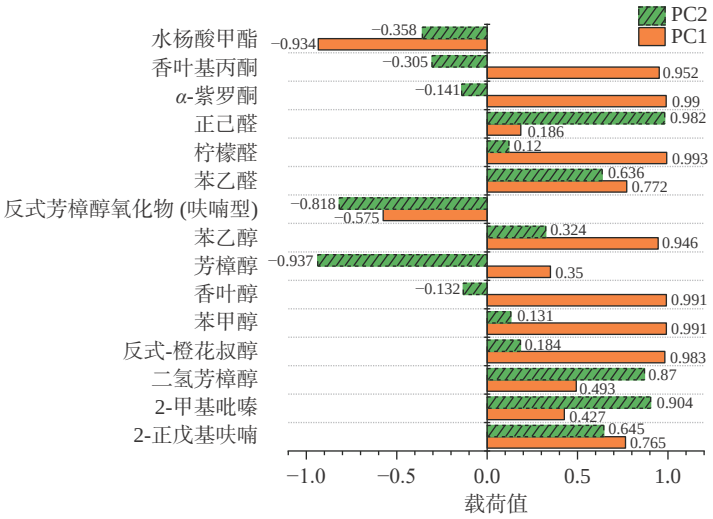


图 4　浮梁红茶主要香气成分主成分分析的载荷值

Fig.4　Load value of PCA of main aroma components in Fuliang black tea

7899.32 μg/kg，以醇类含量最高，其次为酯类、醛类、酸类、酮类、碳氢化合物类、酚类及其衍生物和杂环类，其中，29 种成分在样品之间存在显著性差异（P<0.05）。挥发性成分中对浮梁红茶香气风味呈正相关的有 57 种、有负相关的有 16 种，以刺激性的酸类物质为主。15 种挥发性成分的 OAV 大于 1，以香叶醇、α-紫罗酮和芳樟醇的最高。使用 OAV 与 PCA 综合筛选出柠檬醛、苯甲醇、香叶醇、α-紫罗酮、反式-橙花叔醇、香叶基丙酮、苯乙醇、水杨酸甲酯、正己醛、芳樟醇和 2-甲基吡嗪等 11 种为浮梁红茶的关键呈香物质。本研究初步明确了浮梁红茶的挥发性香气组分与关键呈香物质，后续将进一步使用分子感官科学与代谢组学相结合解析浮梁红茶的特征性风味品质及其香气物质前体。

参考文献

[1] 陈荣冰. 千年茶都江西浮梁[J]. 茶道，2021，5：93−94. [CHEN R B. Jiangxi Fuliang, the millennium tea capital[J]. Tea Ceremony, 2021, 5: 93−94.]

[2] 贯立娟. 浅谈浮梁工夫红茶与英德工夫红茶的差异[J]. 福建茶叶，2020，42(8)：17−18. [GUAN L J. On the differences between Fuliang Gongfu black tea and Yingde Gongfu black tea[J]. Fujian Tea, 2020, 42(8): 17−18.]

[3] 倪艳翔. 浮梁红茶的挖掘与开发探讨[J]. 农业考古，2014，5：274−277. [NI Y X. Exploration and development of Fuliang black tea[J]. Agricultural Archaeology, 2014, 5: 274−277.]

[4] YUE C N, YANG P X, QIN D D, et al. Identification of volatile components and analysis of aroma characteristics of Jiangxi Congou black tea[J]. International Journal of Food Properties, 2020, 23(1): 2160−2173.

[5] 蔡海兰，杨普香，朱凤新，等. 基于主成分和聚类分析的浮梁红茶品质评价[J]. 食品研究与开发，2019，40(16)：100−104. [CAI H L, YANG P X, ZHU F X, et al. Comprehensive evaluation of Fuliang black tea quality based on principal component and cluster analysis[J]. Food Research and Development, 2019, 40(16): 100−104.]

[6] 王梦琪，朱荫，张悦，等. 茶叶挥发性成分中关键呈香成分研究进展[J]. 食品科学，2019，40(23)：341−349. [WANG M Q, ZHU Y, ZHANG Y, et al. A review of recent research on key aroma compounds in tea[J]. Food Science, 2019, 40(23): 341−349.]

[7] 汤莎莎，芦晨阳，周君，等. 基于电子鼻和 HS-SPME-GC-MS 技术解析乌牛早茶的挥发性风味物质[J]. 食品工业科技，2018，39(14)：223−230. [TANG S S, LU C Y, ZHOU J, et al. Volatile flavor compounds of different Wuniuzao leaves and different heating temperatures based on electronic nose and GC-MS[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(14): 223−230.]

[8] ZHU Y, LYU H P, SHAO C Y, et al. Identification of key odorants responsible for chestnut-like aroma quality of green teas[J]. Food Research International, 2018, 108(5): 74−82.

[9] 朱涔铭，郝正祺，郭顺堂. 不同菌种发酵所得酸豆乳风味物质的主成分分析[J]. 食品安全质量检测学报，2020，11(17)：5971−5981. [ZHU J M, HAO Z Q, GUO S T, et al. Principal component analysis of flavoring substances in fermented soymilk with different strains[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2020, 11(17): 5971−5981.]

[10] 岳翠男，秦丹丹，蔡海兰，等. QDA 和 GC-MS 结合 PLSR 分析宁红茶中的风味物质[J]. 食品与发酵工业，2021，47(7)：225−231. [YUE C N, QIN D D, CAI H L, et al. Flavor compounds in Ning black tea by QDA and GC-MS combined with PLSR[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(7): 225−231.]

[11] ZHANG W J, CAO J X, LI Z G, et al. HS-SPME and GC/MS volatile component analysis of Yinghong No. 9 dark tea during the pile fermentation process[J]. Food Chemistry, 2021, 357: 129654.

[12] MA C Y, LI J X, CHEN W, et al. Study of the aroma formation and transformation during the manufacturing process of oolong tea by solid-phase micro-extraction and gas chromatography-mass spectrometry combined with chemometrics[J]. Food Research International, 2018, 108: 413−422.

[13] LIAO X L, YAN J N, WANG B, et al. Identification of key odorants responsible for cooked corn-like aroma of green teas made by tea cultivar 'Zhonghuang 1'[J]. Food Research International, 2020, 136: 109355.

[14] YANG P, SONG H L, LIN Y P, et al. Differences of characteristic aroma compounds in Rougui tea leaves with different roasting temperatures analyzed by switchable GC-O-MS and GC×GC-O-MS and sensory evaluation[J]. Food & Function, 2021, 12: 4797−4807.

[15] 宛晓春. 茶叶生物化学 [M]. 第 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2003. [WAN X C. Tea biochemistry[M]. 3rd Edition. Beijing: China Agricultural Press, 2003.]

[16] MAO S H, LU C Q, LI M F, et al. Identification of key aromatic compounds in Congou black tea by partial least-square regression with variable importance of projection scores and gas chromatography-mass spectrometry/gas chromatography-olfactometry[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2018, 98(14): 5278−5286.

[17] SCHUH C, SCHIEBERLE P. Characterization of the key aroma compounds in the beverage prepared from Darjeeling black tea: Quantitative differences between tea leaves and infusion[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(3): 916−924.

[18] XU S S, ZENG X S, WU H T, et al. Characterizing volatile metabolites in raw Pu'er tea stored in wet-hot or dry-cold environments by performing metabolomic analysis and using the molecular sensory science approach[J]. Food Chemistry, 2021, 350: 129186.

[19] 肖作兵, 王红玲, 牛云蔚, 等. 基于 OAV 和 AEDA 对工夫红茶的 PLSR 分析 [J]. 食品科学, 2018, 39(10): 242−249. [XIAO Z B, WANG H L, NIU Y W, et al. Analysis of aroma components in four Chinese Congou black teas by odor active values and aroma extract dilution analysis coupled with partial least squares regression[J]. Food Science, 2018, 39(10): 242−249.]

[20] 尹鹏, 王子浩, 刘盼盼, 等. 信阳红茶香气成分分析[J]. 食品工业, 2019, 40(3): 287−291. [YIN P, WANG Z H, LIU P P, et al. Analysis of aroma constituents in Xinyang black tea[J]. Food Industry, 2019, 40(3): 287−291.]

[21] CHEN X H, CHEN D J, JIANG H, et al. Aroma characterization of Hanzhong black tea (*Camellia sinensis*) using solid phase extraction coupled with gas chromatography–mass spectrometry and olfactometry and sensory analysis[J]. Food Chemistry, 2019, 274: 130−136.

[22] Al-DALALI S, ZHENG F P, SUN B G, et al. Characterization and comparison of aroma profiles and aroma-active compounds between traditional and modern Sichuan vinegars by molecular sensory science[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(18): 5154−5167.

[23] RYOKO B, MAKI N, KENJI K. Identification of the potent odorants contributing to the characteristic aroma of Darjeeling black tea infusion[J]. Japanese Society for Food Science and Technology, 2017, 6(64): 294−301.

[24] PANG X L, QIN Z H, ZHAO L, et al. Development of regression model to differentiate quality of black tea (Dianhong): Correlate aroma properties with instrumental data using multiple linear regression analysis[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2012, 47(11): 2372−2379.

[25] HO C T, ZHENG X, LI S M. Tea aroma formation[J]. Food Science and Human Wellness, 2015, 4: 9−27.

[26] WANG K B, WANG Y, LIU Z H, et al. Comparison of catechins and volatile compounds among different types of tea using high performance liquid chromatograph and gas chromatograph mass spectrometer[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2011, 46(7): 1406−1412.

[27] SCHAMBERGER G P, LABUZA T P. Effect of green tea flavonoids on Maillard browning in UHT milk[J]. LWT-Food Science and Technology, 2007, 40(8): 1410−1417.

[28] WANG Z H, YUE C N, TONG H R. Analysis of taste characteristics and identification of key chemical components of fifteen Chinese yellow tea samples[J]. Journal of Food Science and Technology, 2021, 58: 1378−1388.

[29] JOSHI R, GULATI A. Fractionation and identification of minor and aroma-active constituents in Kangra orthodox black tea [J]. Food Chemistry, 2015, 167: 290−298.

[30] LI H, QIN D, WU Z, et al. Characterization of key aroma compounds in Chinese Guojing sesame-flavor Baijiu by means of molecular sensory science[J]. Food Chemistry, 2019, 284: 100−107.

[31] ZHANG K, YANG J, QIAO Z, et al. Assessment of β-glucans, phenols, flavor and volatile profiles of hulless barley wine originating from highland areas of China[J]. Food Chemistry, 2019, 293: 32−34.

赵萍, 陈小华, 刘俊霞, 等. 大鲵肉冷藏过程中理化指标及挥发性成分的变化 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 259−267. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080108

ZHAO Ping, CHEN Xiaohua, LIU Junxia, et al. Analysis of Physicochemical Indexes and Volatile Components of Giant Salamander Meat during Cold Storage[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 259−267. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080108

· 分析检测 ·

大鲵肉冷藏过程中理化指标及挥发性成分的变化

赵　萍[1], 陈小华[1,2,+], 刘俊霞[1], 王景华[3], 金文刚[1,2,*], 陈德经[1,2], 姜鹏飞[4,*]

（1.陕西理工大学生物科学与工程学院, 陕西汉中 723001;
2.陕西理工大学陕西省资源生物重点实验室, 陕西汉中 723001;
3.汉中市科技资源统筹中心, 陕西汉中 723001;
4.大连工业大学国家海洋食品工程技术研究中心, 辽宁大连 116034）

摘　要: 为探讨大鲵肉冷藏期间理化指标及挥发性成分的变化，对冷藏过程（4 ℃，0~8 d）中大鲵肉定期进行感官评价、挥发性盐基氮（total volatile basic nitrogen，TVB-N）值和菌落总数测定，并采用顶空固相微萃取结合气相色谱-质谱联用技术（headspace solid phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry，HS-SPME-GC-MS）分析大鲵肉挥发性成分的变化。结果表明，随着冷藏时间的延长，大鲵肉感官品质逐渐下降，而 TVB-N 值和菌落数呈上升趋势。其中，大鲵肉在第 5 d 感官上不可接受，TVB-N 值在第 7 d 超过可接受上限（30 mg/100 g），菌落总数在第 6 d 超过可接受上限 (6 lg CFU/g)。不同冷藏时间大鲵肉共检测出 7 类 58 种挥发性物质，其中，醇类（14 种）、酯类（12 种）相对含量较高。随着冷藏时间的延长醇类含量呈下降趋势，而酯类含量呈增加趋势，其他类化合物在冷藏过程中呈波动趋势。聚类分析将不同冷藏时间大鲵肉聚为 4 类，即前 4 d、第 5 d、第 6 d 和第 7 d、第 8 d。相关性分析表明，己酸己酯、2-甲基丁酸乙酯、2-庚酮、2，3-丁二酮、芳樟醇可作为大鲵肉冷藏期间腐败变质的潜在标记物。该研究为大鲵肉冷藏期间新鲜度评价及其品质控制提供了参考。

关键词: 大鲵肉, 冷藏, 理化指标, 顶空固相微萃取气相色谱-质谱, 相关性分析

中图分类号: TS254.4　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0259−09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080108

本文网刊:

Analysis of Physicochemical Indexes and Volatile Components of Giant Salamander Meat during Cold Storage

ZHAO Ping[1], CHEN Xiaohua[1,2,+], LIU Junxia[1], WANG Jinghua[3], JIN Wengang[1,2,*], CHEN Dejing[1,2], JIANG Pengfei[4,*]

（1.School of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723001, China;
2.Key Laboratory of Bio-resources of Shaanxi Province, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723001, China;
3.Hanzhong Science and Technology Resources Co-ordination Center, Hanzhong 723001, China;
4.National Engineering Research Center of Seafood, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China）

Abstract: In order to explore the changes of physicochemical indexes and volatile components of giant salamander meat during cold storage (4 ℃, 0~8 d), the sensory evaluation, total volatile basic nitrogen (TVB-N) value and total bacterial

收稿日期: 2021−08−11　　+并列第一作者

基金项目: 陕西省科技厅重点实验室后补助项目（2015SZS-15-01）; 陕西理工大学校级重点科研项目（SLG2106）; 陕西省三秦学者创新团队支持计划（陕组 [2018]34 号）。

作者简介: 赵萍（1996−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学, E-mail: 2026170152@qq.com。
陈小华（1979−）, 男, 博士, 讲师, 研究方向: 食品风味化学, E-mail: chenxiaohua@snut.edu.cn。

*** 通信作者:** 金文刚（1981−）, 男, 博士, 副教授, 研究方向: 水产品加工及贮藏工程, E-mail: jinwengangchina@gmail.com。
姜鹏飞（1986−）, 男, 硕士, 高级工程师, 研究方向: 水产品加工及贮藏, E-mail: 67118948@qq.com。

count of giant salamander meat during cold storage were regularly determined, and headspace solid phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS) was used to analyze the changes of volatile components in giant salamander meat. The results showed that the sensory quality of giant salamander meat decreased gradually with the extension of refrigeration time, while TVB-N and total bacterial count increased. Among them, the sensory quality of giant salamander meat was not acceptable on the 5th day, the TVB-N value exceeded the upper acceptable limit (30 mg/100 g) on the 7th day, and the total bacterial count exceeded the upper acceptable limit (6 lg CFU/g) on the 6th day. A total of 58 volatile substances in 7 categories were detected in giant salamander meat at different refrigerating times. Among them, the contents of 14 alcohols and 12 esters were relatively higher. With the extension of refrigeration time, the alcohol content decreased, while the ester content increased, and other compounds fluctuated slightly during refrigeration storage. Cluster analysis showed that the giant salamander meat with different refrigeration time could be clustered into four categories, namely, 0~4 d, 5 d, 6~7 d, and 8 d. Correlation analysis showed that hexyl caproate, ethyl 2-methylbutyrate, 2-heptanone, 2, 3-butanedione and linalool could be used as potential markers of corruption and deterioration of giant salamander meat during cold storage. This study provides a reference for the freshness evaluation and quality control of giant salamander meat during cold storage.

Key words: giant salamander meat; cold storage; physicochemical indexes; headspace solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry; correlation analysis

大鲵(*Andrias davidianus*),属于两栖纲,有尾目,隐鳃鲵科,是现存个体最大的两栖动物[1]。大鲵作为我国人工养殖技术较为成熟的重点水生动物品种之一,目前已在陕西汉中、湖南张家界、河南洛阳、重庆等省市实现了规模化人工养殖[2]。大鲵肌肉中含有丰富的蛋白质,必需氨基酸含量高而全面,富含人体常缺乏的赖氨酸,且脂肪含量低,脂肪中不饱和脂肪酸含量高[3−5],较符合人体需求模式,是人体良好的营养来源[6]。目前,在新冠疫情的影响下,商品鲵滞销给养殖企业和农户造成了巨大的损失[7],大鲵深加工和开发利用成为大鲵产业面临的主要问题。近年来,研究人员已在大鲵营养价值评价[4]、生物活性成分制备[8]、挥发性气味分析[9]、贮藏保鲜[10]、产品开发[11−12] 等方面进行了较多研究。

大鲵活体宰杀处理程序复杂,分割鲜肉及其速冻产品的上市,不仅消除了消费者处理大鲵的畏难情绪,而且有利于延长产业链扩大销售范围[9]。但水产品富含不饱和脂肪酸极易氧化酸败,同时,水分含量较高,营养成分丰富,容易滋生微生物而导致腐败变质,产生不良腐败气味,引起品质劣变。HS-SPME-GS-MS 技术中 SPME 集采样、萃取、浓缩、进样于一体,可以萃取食品中的挥发性物质,具有成本低、操作方便等优点[13],被广泛的用于水产品贮藏过程中挥发性成分的测定。Zhao 等[14] 对−2 ℃ 和 0 ℃ 贮藏的大菱鲆挥发性气味和 TVB-N 值进行了研究,发现−2 ℃ 能延缓 TVB-N 值的增加,更好的维持新鲜大菱鲆风味化合物,降低醋酸等腐败化合物含量。贾哲等[15] 利用电子鼻及 HS-SPME-GC-MS 联用技术对冷藏过程中双斑东方鲀挥发性物质的种类和相对含量进行分析,发现 1-辛烯-3-醇、己醛、辛醛、壬醛和 2,3-辛二酮是双斑东方鲀在冷藏过程中的关键挥发性物质。

课题组前期已利用 HS-SPME-GC-MS 和气相离子迁移色谱分析了大鲵肉不同部位以及胶原蛋白的挥发性气味成分[9,16−17]。目前,在大鲵肉贮藏方面研究主要集中在采用不同包装方式[10]、贮藏方式[18]、冻结方式[19] 来延长大鲵肉的保质期,而大鲵肉低温贮藏过程中挥发性成分的变化及其与理化品质指标的关联性,还鲜见报道。本研究以托盘包装大鲵冷鲜肉为研究对象,在感官评分、TVB-N 值、菌落总数的基础上,采用 HS-SPME-GC-MS 技术对冷藏过程中挥发性成分变化进行研究,通过理化指标和相关性分析探究冷藏过程中大鲵肉腐败变质的潜在标记物,为指导大鲵冷鲜肉销售以及品质控制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

鲜活健康子二代大鲵 3 尾(2.5±0.36 kg) 购自汉中市龙头山大鲵养殖基地;妙洁保鲜膜(材质为聚乙烯,温度范围:−60~100 ℃) 购自当地超市;三氯乙酸 阿拉丁公司;甲基红、亚甲基蓝 北京鼎国生物技术有限责任公司;氧化镁 天津市百世化工有限公司;硼酸 天津市福晨化学试剂厂;盐酸 杭州汇普化工仪器有限公司;平板计数琼脂 北京奥博星生物技术有限责任公司。

AD18 型分散均质机 上海昂尼仪器仪表有限公司;SW-CJ-IFD 型洁净工作台 上海博迅实业公司;FA3204B 型电子天平 上海精科天美科学仪器有限公司;COHS-250 型生化培养箱 常州金坛良友仪器有限公司;Trace GC Ultra 型气相色谱和 ITQ900 型质谱 美国 Thermo 公司;Intert Cap-purWax 型气相色谱柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm) 日本岛津公司;手动固相微萃取头(50/30 μm DVB/CAR/PDMS) 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 大鲵肉样品制备 鲜活大鲵经放血、热烫、刮黏液、去内脏和清洗等工序,获得大鲵胴体,用聚乙烯袋 20 min 内运回实验室,去头、皮、四肢、尾,并切成 5.0 cm×2.0 cm×0.5 cm 左右的肉块,放入黑色托盘(23 cm×15.5 cm×3 cm)中并用保鲜膜密封,置于

4 ℃ 冷藏分别于 0、1、2、3、4、5、6、7 和 8 d 定期取样进行理化指标与挥发性成分测定。

1.2.2　感官评价　通过感官方法进行大鲵肉品质评价，评价人员的招募、筛选、培训参考 GB/T 16291.2-2010《感官分析选拔、培训和管理评价员一般导则》，由在读食品专业学生志愿者组成。评分前进行感官评价、肉品质评价能力等培训、经初筛和复筛后确定 10 名年龄 21~22 岁食品专业本科生（5 男，5 女），在食品感官评价实验室内进行（室温 25±1 ℃），并参照 GB/T37062-2018，取适量试样置于洁净的白色瓷盘中，对大鲵肉进行感官评价，每个项目采用 10 分制原则，总分 60 分，评价人员在整个评价和打分过程中互不干扰，参考 Jin 等[12] 的方法，制定感官评价标准（见表 1）。

表 1　感官评价标准

Table 1　Sensory evaluation criteria

评价指标	描述	评分
色泽	色泽均匀，呈白色，具有大鲵鲜肉固有的色泽，有光泽	8~10
	色泽良好，呈微红色，少量光泽	4~7
	色泽不均匀，呈淡黄色，无光泽	0~3
黏度	外表微干，不黏手，新切面微干不粘手	8~10
	外表微湿润，微粘手，新切面微湿润不粘手	4~7
	外表湿润，粘手，新切面微湿润粘手	0~3
气味	有大鲵肉固有的气味，且气味浓郁，无异味	8~10
	有大鲵肉固有的气味，无异味	4~7
	有异味	0~3
弹性	切面肉质致密，指压后凹陷可以迅速恢复原状	8~10
	切面肉质略疏松，指压后凹陷	4~7
	切面肉质疏散，指压后凹陷	0~3
煮沸后肉汤	肉汤澄清透明，脂肪团聚于表面，具有浓郁香味	8~10
	肉汤偏白色，脂肪团聚于表面，具有香味	4~7
	肉汤偏淡黄色，脂肪团聚于表面，有异味	0~3
可接受度	完全可接受	8~10
	基本可接受	4~7
	不可接受	0~3

1.2.3　TVB-N 值的测定　按食品安全国家标准 GB5009.228-2016《食品中挥发性盐基氮的测定》半微量定氮法测定大鲵肉冷藏过程中挥发性盐基氮含量。

1.2.4　菌落总数的测定　按食品安全国家标准 GB4789.2-2016《食品微生物学检验》菌落总数标准测定大鲵肉在冷藏过程中的菌落总数。

1.2.5　HS-SPME-GC-MS 分析

1.2.5.1　样品前处理　在不同的时间内（0~8 d）定时取出样品将其切成小于 1 cm×1 cm 的小块，密闭置于 50 mL 血清瓶中，并放在 4 ℃ 的冰箱中备用。

1.2.5.2　顶空固相微萃取　将装有大鲵肉样的血清瓶置于 50 ℃ 水浴锅中，并使用萃取固定装置固定于水浴锅中央，水浴 30 min。将 SPME 针头插入顶空瓶中，调整针头长度，使萃取头距离样品表面约 1 cm 距离，静置萃取 60 min 后取出萃取头，迅速将其插入 GC 进样口中，热解析 3.0 min 后进行分析。

1.2.5.3　GC-MS 分析　GC 条件：色谱柱不分流模式进样，初始温度为 40 ℃，保持 5 min，然后以 3 ℃/min 升至 220 ℃，保持 5 min，载气为氦气（纯度=99.999%），流量为 1 mL/min，进样口温度 200 ℃。

MS 条件：电子轰击离子源（EI），全扫描模式，传输线和离子源的温度均为 230 ℃，电子能量 70 eV，质谱扫描范围 40~400 m/z。通过系统自带的 NIST 08 质谱数据库进行挥发性化合物的定性确认，取匹配度大于 80% 的化合物。

1.2.5.4　挥发性成分评价　参考辛茜等[16] 的方法，采用相对气味活度值（ROAV，relative odor activity value）确定各挥发性化合物对气味的贡献，当 ROAV ≥ 1 时，挥发性化合物对样品气味具有贡献作用；当 1>ROAV ≥ 0.01，具有重要修饰作用；当 ROAV<0.01 时，仍有辅助作用。ROAV 按下式计算：

$$ROAV \approx \frac{CA}{Cstan} \times \frac{Tstan}{TA} \times 100$$

式中：CA、TA 为物质 A 所对应的相对百分含量（%）和感觉阈值（μg/kg）；Cstan、Tstan 为对样品风味贡献最大组分（苯乙醇）的相对百分含量（%）和感觉阈值（μg/kg）。

1.3　数据处理

用 Excel 对原始数据进行处理、汇总；采用 SPSS 25 进行显著性分析，多重比较采用邓肯法，P<0.05，表示差异显著；利用 origin 2021 绘图并进行 Pearson 相关性分析。

2　结果与分析

2.1　大鲵肉冷藏过程中感官品质的变化

感官评分是评价水产原料新鲜度的常用方法，它主要通过人的视觉、触觉、味觉、嗅觉、听觉来感知食品特性[20]。图 1 显示冷藏过程中大鲵肉的各感官特性评分均呈下降的趋势，其中，前 4 d 有相对较高的感官评分，从第 5 d 开始感官评分低于 30 分且大鲵肉的感官特征开始出现不可接受，表现为大鲵肉色泽不均匀，由白色变为微红色，光泽度下降、外表

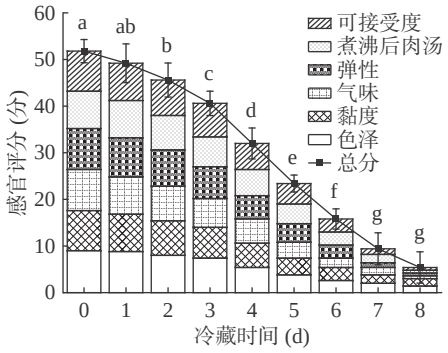


图 1　不同冷藏时间大鲵肉的感官评价

Fig.1　Sensory evaluation of giant salamander meat at different cold storage time

注：不同小写字母表示差异显著（P<0.05）；图 2~图 3 同。

湿润，不粘手，切面微湿润，肉质略疏松、弹性变差、肉汤呈乳白色，无异味。第 6、7、8 d 感官评分较冷藏前期大幅降低，表明大鲵肉已失去食用价值。在贮藏前期，温度较低，微生物的繁殖速度较慢，随着时间的延长，优势菌群大量繁殖，导致大鲵肉品质的下降；同时，水产品在贮藏过程中蛋白质等含氮物质易被分解，从而产生了水产品腐败的特征臭味，导致后期感官评定分值快速降低[21]。

2.2 大鲵肉冷藏期间 TVB-N 值的变化

TVB-N 值是由具有挥发性的氨、伯胺、仲胺及叔胺等低级碱性含氮化合物组成，此类物质是食品在酶和微生物的作用下，蛋白质及非蛋白的含氮化合物降解产生[22]。通常 TVB-N 值 5~10 mg/100 g 判定为优良新鲜；15~25 mg/100 g 为新鲜；30~40 mg/100 g 为早期腐败；≥50 mg/100 g 定义为腐败[23]。图 2 显示，随着冷藏时间的延长，TVB-N 值呈增加趋势，在 0~4 d TVB-N 值由 6.61 mg/100 g 增加到 12 mg/100 g 增长缓慢，在 4~8 d TVB-N 值由 12 mg/100 g 增加到 47.8 mg/100 g 增长显著(P<0.05)，从第 7 d(31.6 mg/100 g)开始腐败。据此可以判定 4 ℃ 条件下大鲵肉 0~6 d 内相对新鲜，但仍需结合多个指标综合判断货架期。

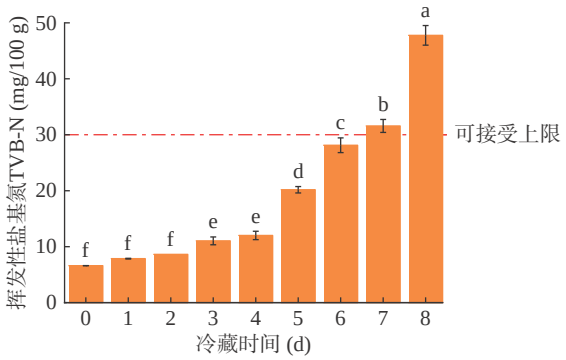


图 2 大鲵肉在冷藏期间 TVB-N 值的变化

Fig.2 Changes of TVB-N value of giant salamander meat during cold storage

2.3 大鲵肉冷藏期间菌落总数的变化

微生物指标是衡量水产品腐败的主要指标之一，可用来预测食品的保质期。如图 3 所示，随着冷藏时间的延长，菌落总数呈上升的趋势，在 0~1 d 菌落总数由 1.60 lg CFU/g 增长到 1.75 lg CFU/g 增长不显著(P>0.05)，2~8 d 由 2.4 lg CFU/g 增长到 8.41 lg CFU/g 增长显著(P<0.05)。通常水产品菌落形成单位(CFU)≤10^5/g 被认为是一级鲜度，≤5×10^5/g 为二级鲜度，超过 10^6/g 通常表示肉已经严重腐败变质[10]。托盘包装大鲵肉在 4 ℃ 贮藏条件下，0~1 d 为一级鲜度，2~5 d 为二级鲜度，6~8 d 其值由 6.43 lg CFU/g 增加到 8.41 lg CFU/g 已经超出了可食用水产品的微生物阈值。依据肉制品微生物限量标准，4 ℃ 冷藏条件下大鲵肉的货架期为 5 d。由感官评价可知，5 d 时大鲵肉的感官品质出现了明显变化，在感官上不可接受，由此可以推断，微生物评价可以作为大鲵肉腐败评价指标，但不适合作为单一指标判定大鲵肉的货架期。在冷藏初期，菌落总数增长速率较慢，主要是由于低温和 pH 的降低抑制了大鲵肉中微生物的生长繁殖；随着贮藏时间的延长，微生物的增长速率逐渐加快，主要是由于腐败菌对蛋白质和氨基酸等营养物质的利用，从而促进自身的生长繁殖[24]。

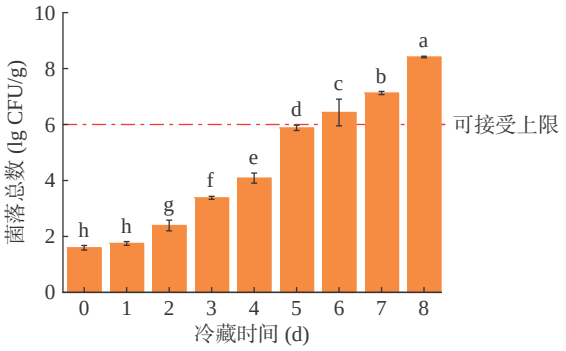


图 3 大鲵肉在冷藏过程中菌落总数的变化

Fig.3 Changes of total number of colonies in meat of giant salamander during cold storage

2.4 大鲵肉冷藏过程中挥发性气味分析

利用 HS-SPME-GC-MS 对冷藏 8 d 的大鲵肉挥发性气味进行分析，得到不同冷藏时间的总离子流图，经过 NIST 08 质谱数据库检索，在大鲵肉中共检测出 58 种化合物，其中，醇类 14 种、酯类 12 种、酸类 9 种、酮类 6 种、烯烃类 6 种、醛类 5 种、其他化合物 6 种，如表 2 所示，并绘制各类化合物随时间变化的趋势图，如图 4 所示。

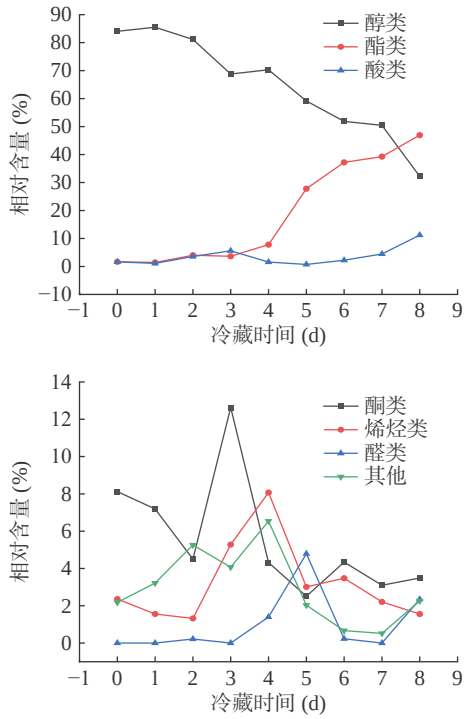


图 4 不同冷藏时间大鲵肉中各类挥发性化合物的相对含量变化

Fig.4 Changes of relative contents of volatile compounds in giant salamander meat at different cold storage time

表 2　不同冷藏时间大鲵肉挥发性化合物组成及相对含量

Table 2　Composition and relative contents of volatile compounds in giant salamander meat at different cold storage time

序号	化合物名称	气味特征[16,25]	阈值（μg/kg）	相对含量(%)								
				0 d	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d
1	正丁醇	酒香	500	–	–	–	–	–	6.01	–	–	–
2	叶醇	青香、绿叶香	–	3.44	5.72	3.17	6.70	3.53	1.85	7.86	5.11	4.17
3	1-辛烯-3-醇	蘑菇味	1	5.53	1.51	2.17	1.32	13.05	3.41	1.90	1.04	1.17
4	2-茨醇	樟脑气味	–	–	–	–	–	4.52	–	0.86	0.51	0.81
5	辛醇	土腥味	110	48.14	31.69	47.02	8.84	15.57	12.18	12.64	17.8	1.96
6	2-乙基己醇	令人愉快的脂肪和水果味	270000	0.75	–	–	24.32	–	–	–	–	–
7	芳樟醇	薰衣草气味	6	1.49	1.00	0.75	2.66	3.96	3.41	3.30	4.61	6.82
8	顺-2-已烯-1-醇	–	–	1.76	–	0.75	0.90	1.00	–	0.65	–	–
9	α-松油醇	樟脑气味	300	–	–	–	0.24	1.02	0.08	0.28	–	0.03
10	异丁醇	有特殊气味	7000	–	0.39	–	–	–	–	–	0.16	0.50
11	苯甲醇	稍有芳香味	10000	–	–	5.74	4.08	–	–	–	–	–
12	苯乙醇	玫瑰、丁香香味	3.17	22.95	37.50	9.53	8.04	27.63	14.95	9.31	9.32	15.24
13	1-壬醇	略有玫瑰香味	50	–	7.70	11.98	11.68	–	17.28	15.05	11.74	–
14	芳樟醇氧化物IV	樟脑等弱木香	–	–	–	–	–	–	–	–	0.15	1.52
	醇类(14种)			84.07	85.51	81.13	68.78	70.30	59.16	51.85	50.43	32.21
15	2-甲基丁酸乙酯	具有强烈苹果和菠萝味	0.1-0.3	–	–	–	–	–	–	–	–	2.18
16	乙酸丁香酚酯	柔和的丁香似香气	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.01
17	反式-2-己烯酸乙酯	–	–	–	–	–	–	–	5.88	7.94	23.62	19.46
18	辛酸乙酯	白兰地酒香味	–	–	–	–	–	–	14.20	15.19	6.38	0.49
19	(Z)-己酸-3-己烯酯	梨似香味	–	–	–	–	–	–	–	–	4.11	18.23
20	乙酸香茅酯	熏衣草香气	–	–	–	–	–	–	1.72	7.45	1.04	–
21	己酸己酯	青香、药草香及热带水果、浆果香韵	1	–	–	–	–	–	2.72	3.86	3.04	4.32
22	乙酸芳樟酯	香柠檬香气	110.90	–	–	–	–	–	–	0.29	–	–
23	异丁酸丁酯	苹果和菠萝香味	80	–	–	–	–	–	–	–	0.05	0.08
24	亚油酸甲酯	–	–	–	–	0.36	0.99	0.73	0.16	0.25	0.18	0.28
25	(E)-2-己基-丁烯酸甲酯	–	–	–	–	–	–	–	–	0.74	0.18	0.98
26	2-(E)-苯甲酸叶醇酯	–	–	1.65	1.42	3.66	2.65	7.06	3.10	1.47	0.67	0.90
	酯类(12种)			1.65	1.42	4.02	3.65	7.79	27.78	37.19	39.27	46.94
27	乳酸	无气味	–	–	–	–	–	–	–	–	0.94	–
28	丙酮酸	酸味	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.60
29	醋酸	刺激性气味	22000	–	0.16	–	0.89	–	0.55	1.99	0.93	3.19
30	己酸	汗臭味	80000	–	–	0.46	0.38	–	–	–	–	–
31	正戊酸	特殊臭味	3000	0.92	0.80	1.18	1.34	1.57	–	–	2.43	7.37
32	庚酸	微有腐败的脂肪气味	640	–	0.12	–	0.14	–	–	0.24	0.17	–
33	壬酸	微有特殊气味	3000	0.44	–	1.91	2.84	–	–	–	–	–
34	癸酸	难闻的气味	10000	0.27	–	–	–	–	–	–	–	0.03
35	油酸	猪油气味	–	–	–	–	–	–	0.18	–	–	–
	酸类(9种)			1.63	1.08	3.55	5.59	1.57	0.73	2.23	4.47	11.19
36	2,3-丁二酮	酯的气味，经稀释则有黄油香味	4	–	–	–	–	–	–	–	0.06	0.82
37	甲基庚烯酮	胡椒、蘑菇气味	50	3.00	1.40	1.82	2.46	2.99	–	–	–	–
38	6-甲基-3,5-庚二烯-2-酮	–	–	–	2.88	–	8.66	–	–	–	–	–
39	2-庚酮	果香	10	–	–	–	0.42	–	2.16	3.75	2.80	2.35
40	香叶基丙酮	玉兰、植物香	60	4.66	2.91	2.68	1.09	1.33	0.35	0.58	0.25	0.32
41	环戊酮	薄荷气味	–	0.46	–	–	–	–	–	–	–	–
	酮类(6种)			8.12	7.19	4.50	12.63	4.32	2.51	4.34	3.10	3.49
42	(+)-4-蒈烯	–	–	–	–	–	–	–	–	0.28	–	–
43	2-甲基-1-戊烯	不愉快的气味	–	–	–	–	–	3.26	–	0.51	–	–
44	(E)-β-金合欢烯	青香、花香并伴有香脂香	–	–	1.56	1.32	3.78	–	0.99	2.01	1.17	–
45	反-2-辛烯	–	–	2.05	–	–	1.50	4.81	2.02	–	1.04	1.41
46	α-古巴烯	–	–	0.31	–	–	–	–	–	–	–	0.15
47	法尼烯异构体	–	–	–	–	–	–	–	–	0.68	–	–

续表 2

序号	化合物名称	气味特征[16,25]	阈值(μg/kg)	相对含量(%)								
				0 d	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d
	烯烃类(6种)			2.36	1.56	1.32	5.28	8.07	3.01	3.48	2.21	1.56
48	乙醛	刺激、酸败味	210	–	–	–	–	–	–	–	–	0.02
49	3-甲基-2-丁烯醛	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	2.14
50	十二醛	似紫罗兰的强烈而又持久的香气	1.07	–	–	–	–	–	4.16	–	–	–
51	十一醛	酯香、甜橙香	5	–	–	0.22	–	1.40	0.63	–	–	–
52	癸醛	新鲜的油脂香, 稀薄时则有果味香	0.1	–	–	–	–	–	–	0.23	–	0.19
	醛类(5种)			0.00	0.00	0.22	0.00	1.40	4.79	0.23	0.00	2.35
53	P-甲酚	-	-	–	0.70	0.21	–	0.73	0.56	–	0.12	0.34
54	苯酚	特殊臭味和燃烧味, 极稀的溶液具有甜味	5900	0.98	0.49	1.30	3.38	5.14	0.41	0.67	0.39	1.65
55	二丁醚	似水果的气味, 微有刺激性	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.27
56	异喹啉	似茴香油的气味	–	–	–	2.81	–	–	–	–	–	–
57	苯并噻唑	炖肉味、肉汤味以及烧烤味	350	–	–	0.27	–	–	–	–	–	–
58	吲哚	强烈粪便气味, 高度稀释的溶液, 可以作为香料使用	140	1.20	2.03	0.68	0.69	0.67	1.06	–	–	–
	其他(6种)			2.18	3.22	5.26	4.07	6.54	2.03	0.67	0.52	2.26

注: 在挥发性气味、阈值中“-”表示未查询到; 在相对含量中“–”表示未检出。

醇类物质的产生与氨基酸代谢、脂肪降解氧化、甲基酮还原以及微生物生长繁殖密切相关[26]。由图 4 可知, 醇类物质的含量随冷藏时间的延长呈下降的趋势, 由 0 d 的 84.07% 下降至 8 d 的 32.21%, 在 7 d 及之前其相对含量占有绝对的优势。其中, 辛醇、苯乙醇、1-辛烯-3-醇、芳樟醇、1-壬醇的相对含量较高且阈值相对较低对大鲵肉的挥发性气味贡献较大。辛醇随着冷藏时间的延长其相对含量总体呈下降的趋势, 可能与脂肪氧合酶活性下降[27] 和微生物的活动有关[28], 辛茜等[16] 研究指出辛醇是新鲜大鲵肉腥味的主要成分之一。苯乙醇具有玫瑰、丁香的气味, 在整个冷藏中相对含量较高。1-辛烯-3-醇具有蘑菇味, 在 4 d 相对含量较高为 13.05%, 其次为 0 d (5.53%), 其余时间相对含量均低于 4%, 是由亚油酸的氢过氧化物降解产生, 普遍存在于淡水和海水鱼中挥发性气味较重的醇类[29]。芳樟醇呈薰衣草气味, 随着冷藏时间的延长其含量呈先下降后增加的趋势。2-乙基己醇、异丁醇、苯甲醇、α-松油醇阈值相对较大, 相对含量较低, 对大鲵肉的挥发性气味贡献较小。

酯类物质作为肉品气味的重要来源, 一般是由酸和醇酯化作用缩合而成[30]。由图 4 及表 2 可知, 酯类物质的含量和种类随着冷藏时间的延长呈增加趋势, 相对含量在 0~4 d 由 1.65% 增加到 7.79%, 增长缓慢, 在 4~8 d 由 7.79% 增加到 46.94%, 增长迅速, 其相对含量的变化趋势与醇类物质的变化趋势相反; 物质种类在 5 d 之前小于 2 种, 从第 5 d 开始明显增加到 6 种, 第 8 d 最多达到 10 种。以反式-2-己烯酸乙酯、辛酸乙酯、(*Z*)-己酸-3-己烯酯、乙酸香茅酯相对含量占比较高, 而乙酸芳樟酯、异丁酸丁酯、亚油酸甲酯、(*E*)-2-己基-丁烯酸甲酯、乙酸丁香酚酯的相对含量小于 1%。除亚油酸甲酯、2-(*E*)-苯甲酸叶醇酯外, 其他酯类化合物均是从第 5 d 开始检出, 酯类化合物的变化与水产品内源酶、微生物代谢与及一些醇和酸的含量有关[27]。2-甲基丁酸乙酯、反式-2-己烯酸乙酯、辛酸乙酯在冷藏后期被检出且相对含量较高, Casaburi 等[31] 指出该类乙酯类化合物主要与假单胞菌属的活动有关, 同时也有实验结果表明, 大鲵肉在冷藏中后期(4、6、8 d)的主要菌属为假单胞菌属[32]。己酸己酯具有果香味, 从 5 d 开始检出, 第 8 d 达到最大值 4.32%, 阈值较低, 对大鲵肉冷藏后期的挥发性气味贡献较大, 周才琼等[33] 指出己酸己酯等 n-己酸己酯类化合物, 属于酸肉发酵过程中的挥发性气味, 其在冷藏后期明显增加, 表明大鲵肉品质的明显下降。

酸类物质在整个冷藏过程中呈波动上升趋势, 波动范围在 0.73%~11.19% 之间, 在所有酸类化合物中醋酸、正戊酸、壬酸所占比例较高, 其余酸类化合物的相对含量均低于 1%, 酸类化合物阈值较高, 对挥发性气味的贡献不大。醋酸在 8 d 的相对含量最高为 3.19%, 研究表明醋酸的产生主要是由于热球杆菌和乳酸菌的代谢活动[34], 醋酸含量的积累表明大鲵肉品质的下降[35]。己酸、癸酸、壬酸等是酯类物质形成的重要反应物, 在冷藏前期被检出。酸类物质含量在冷藏过程中呈波动变化, 说明脂肪氧化、酮类物质合成、醛类物质生成都处于动态变化过程中[33]。

酮类主要是由不饱和脂肪酸氧化、微生物作用或氨基酸降解产生, 对腥味起到增强作用[36]。酮类在冷藏过程中呈波动的趋势, 冷藏前期波动较大且相对含量较冷藏后期高, 其中, 香叶基丙酮的相对含量随着冷藏时间的延长呈降低的趋势, 2,3-丁二酮、2-庚酮在冷藏后期被检出, 其相对含量不高, 但阈值较低对冷藏后期大鲵肉的挥发性气味有重要影响, 其中,

2,3-丁二酮的积累与肉中糖原和脂肪酸分解代谢有关[34]。而甲基庚烯酮、6-甲基-3,5-庚二烯-2-酮、环戊酮主要在冷藏前期被检出，该类物质对冷藏前期的大鲵肉挥发性气味有一定的作用。

烃类物质主要由脂肪酸烷氧自由基的均裂产生，阈值较高，对肉品风味贡献不大，但有助于提高其整体风味效果[36]。烯烃类物质含量在冷藏过程中呈波动的趋势，在第 4 d 含量最高为 8.07%。其中，2-甲基-1-戊烯、(*E*)-*β*-金合欢烯、反-2-辛烯的相对含量较高。醛类物质是脂肪氧化的主要产物[27]，其在冷藏前期变化不大，在第 5 d 大幅增加达到 4.79%。乙醛、3-甲基-2-丁烯醛为低级醛，在第 8 d 检出，而癸醛、十一醛、十二醛为高级醛呈水果香[37]，该类物质主要在冷藏中后期检出，相对含量不高，阈值较低，但对冷藏中后期大鲵肉的挥发性气味有重要作用。其他化合物的占比较小，在 0.52%~6.54% 之间，其中，苯酚和异喹啉的相对含量较高。*P*-甲酚在冷藏过程中含量较低且波动范围较小，苯酚在第 4 d 相对含量最大为 5.14%，辛茜等[16] 在新鲜大鲵肉中鉴定出几种苯酚类物质，因此，P-甲酚、苯酚可能为大鲵肉固有的挥发性物质，它的波动可能与酚类物质的形成过程有关。

2.5　大鲵肉冷藏过程中挥发性化合物聚类和累积分析

聚类分析是将样品按照其特性相似程度逐渐聚合在一起，相似度最大的优先聚合在一起。对大鲵肉冷藏过程中挥发性成分的 ROAV 值进行聚类分析，结果如图 5(a)所示。同时，将表 2 挥发性物质的相对含量进行累积统计分析如图 5(b)所示。由图 5 可知，当类间距为 0.25 时，不同冷藏时间的大鲵肉可聚为 4 类。0~4 d 聚为第一类，在此阶段 A、C 类化合物增加较缓慢，B 类化合物大幅降低，但 B 类化合物的比例仍占绝对优势。第 5 d 聚为第二类，此阶段 A 类化合物明显增加，B、C 类化合物明显下降，但 A、B 两类化合物占绝对优势。第 6、7 d 聚为第三类，第 8 d 聚为第四类，该阶段(6~8 d)三类化合物的波动范围较小，以 A 类化合物占绝对优势，但两个聚类中三类化合物的的变化趋势相反。本研究中大鲵肉感官评价结果第 7~8 d 没有显著差异(P>0.05)，与聚类结果不一致，可能是因为感官评分是色泽、气味、弹性、粘性和可接受度等的综合评价，而聚类分析是根据挥发性成分的相对贡献大小进行分析。

2.6　感官评分、TVB-N 值、菌落总数和挥发性成分相关性分析

选择图 5(b)中 A 类化合物经计算 ROAV 值≥1 的挥发性化合物与 TVB-N 值、菌落总数、感官评价总分进行 Pearson 相关性分析，结果如图 6 所示。由图可知，TVB-N 值与菌落总数、己酸己酯、芳樟醇、2,3-丁二酮呈极显著的正相关，与 2-庚酮、2-甲基丁酸乙酯呈显著正相关。菌落总数与己酸己酯、芳樟醇呈极显著的正相关，与 2-庚酮呈显著正相关。

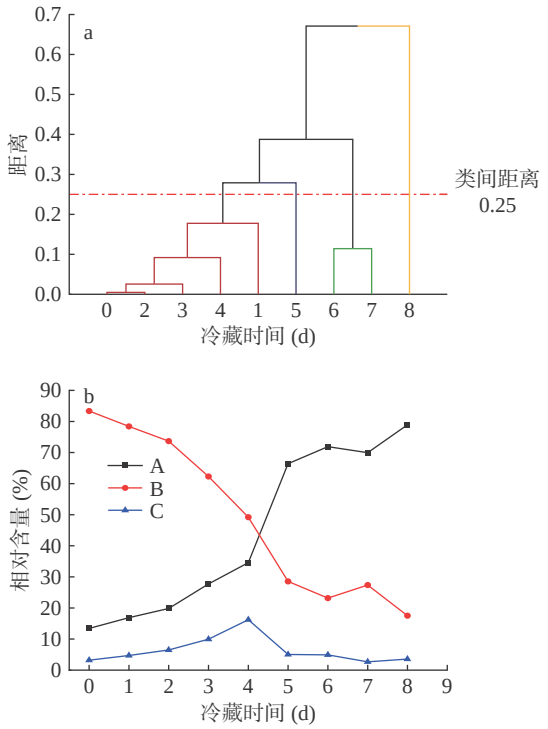


图 5　不同冷藏时间大鲵肉中挥发性化合物聚类分析(a)和相对含量累积分析(b)

Fig.5　Cluster analysis (a) and cumulative analysis of relative content (b) of volatile compounds in meat of giant salamander at different cold storage time

注：A(在冷藏中后期(4~8 d)较前期增加的化合物)：表 2 中编号除 B 类、C 类以外的 35 种化合物；B(在冷藏中后期减少的化合物)：表 2 中编号为 5、6、8、11、12、30、33、37、38、40、41、56、57、58 的 14 种化合物；C(波动变化的化合物)：编号为 10、26、32、34、43、44、46、53、54 的 9 种化合物。

己酸己酯与 2-庚酮呈极显著的正相关，与芳樟醇、癸醛呈显著的正相关。芳樟醇与 2-庚酮呈显著的正相关，2-庚酮与癸醛呈显著的正相关，2-甲基丁酸乙酯与 2,3-丁二酮呈极显著的正相关，十一醛只与 1-辛烯-3-醇呈显著的正相关，十二醛与其他化合物和指标无明显的相关性。感官评分与 TVB-N 值、菌落总数、己酸己酯、芳樟醇呈极显著的负相关，与 2-庚酮呈显著的负相关。综上，可将己酸己酯、芳樟醇、2-庚酮、2-甲基丁酸乙酯、2,3-丁二酮作为大鲵肉冷藏期间腐败变质的潜在标记物。

3　结论

通过对大鲵肉冷藏期间的感官品质、TVB-N 值和菌落总数进行测定，明确了托盘包装大鲵肉在 4 d 内具有较好的新鲜度，第 5 d 及以后逐渐腐败；采用 HS-SPME-GC-MS 技术从不同冷藏时间大鲵肉中共检测出 58 种挥发性成分，其中，醇类(14 种)、酯类(12 种)的相对含量和种类在整个冷藏过程中占有优势，随着冷藏时间的延长，醇类相对含量呈下降趋势，而酯类相对含量呈增加趋势，其他各类化合物在冷藏过程中呈波动的趋势；经挥发性成分的 ROAV 值聚类分析和相对含量累积分析，可以将 0~4 d 聚为第一类、5 d 聚为第二类、6~7 d 聚为第三类、8 d 聚为第

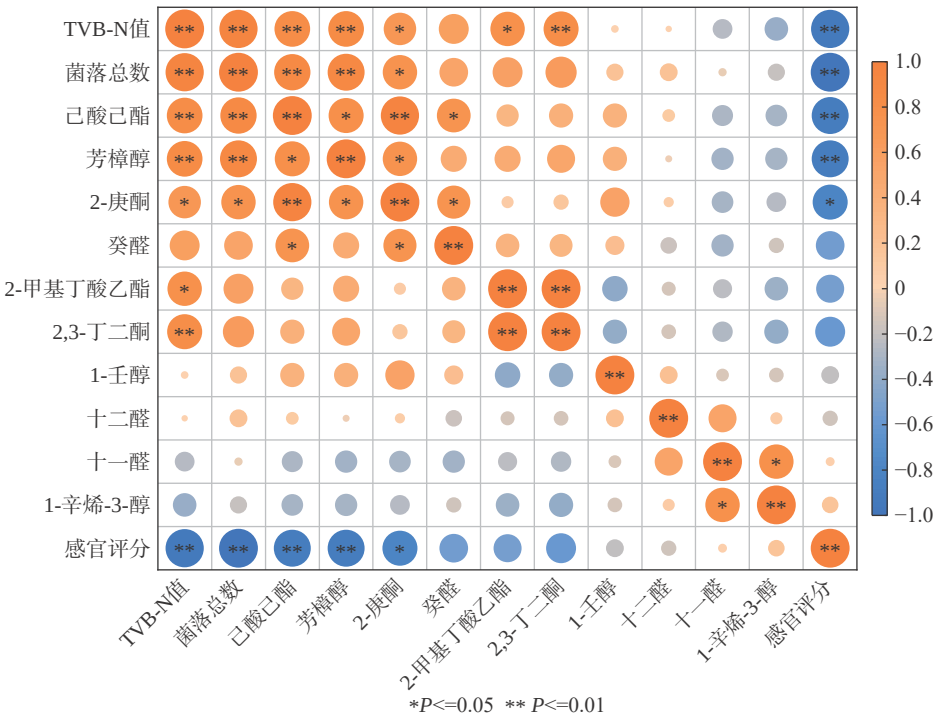


图 6 感官评分、TVB-N 值、菌落总数和挥发性成分相关性分析

Fig.6 Correlation analysis between sensory score, TVB-N value, total bacterial count, and volatile components

四类；将理化指标与 ROAV 值≥1 且在冷藏中后期呈增加趋势的挥发性物质进行相关性分析，表明己酸己酯、2-甲基丁酸乙酯、2-庚酮、2,3-丁二酮、芳樟醇可能为大鲵肉冷藏期间腐败变质的潜在标记物。今后还需对大鲵肉不同冷藏时间下特征性气味标记物进行验证，通过建立气味标记物与理化品质指标相关性较强的预测模型，以期为大鲵肉冷藏期间新鲜度评价及品质控制提供支撑。

参考文献

[1] 王文博, 刘品, 窦玲玲, 等. 中国大鲵研究概况[J]. 水生生物学报, 2021, 45(2): 464−472. [WANG W B, LIU P, DOU L L, et al. A survey of Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*)[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2021, 45(2): 464−472.]

[2] HE D, ZHU W, ZENG W, et al. Nutritional and medicinal characteristics of Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*) for applications in healthcare industry by artificial cultivation: A review[J]. Food Science and Human Wellness, 2018, 7(1): 1−10.

[3] 李莉, 王锡昌, 刘源. 中国养殖大鲵的食用、药用价值及其开发利用研究进展[J]. 食品工业科技, 2012, 33(9): 454−458. [LI L, WANG X C, LIU Y. Edible value, medical value and research progress in exploitation and utilization of the farmed breeding Chinese gaint salamander (*Andrias davidianus*)[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(9): 454−458.]

[4] 倪冬冬. 养殖大鲵肉品质研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2017. [NI D D. Study on the meat quality characteristics of farmed Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*)[D]. Chongqing: Southwest University, 2017.]

[5] 艾为明, 陈少波, 曾国权, 等. 人工模拟生态养殖子二代大鲵肌肉营养成分分析[J]. 水生态学杂志, 2008, 29(6): 120−123. [AI W M, CHEN S B, ZENG G Q, et al. Nutritional components of the muscle of the artificial breeding Chinese giant salamander in simulated ecological condition[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2008, 29(6): 120−123.]

[6] 耿敬章, 李新生, 党娅. 中国大鲵营养成分和功能因子研究进展[J]. 氨基酸和生物资源, 2013, 35(2): 9−12. [GENG J Z, LI X S, DANG Y. Progress on nutrition and functional factors in Chinese giant salamander[J]. Amino Acids & Bictic Resources, 2013, 35(2): 9−12.]

[7] 金文刚, 别玲玲, 裴金金, 等. 基于 GC-IMS 技术分析炖煮过程中大鲵头汤挥发性风味物质[J]. 食品工业科技, 2021, 42(19): 307−313. [JIN W G, BIE L L, PEI J J, et al. Volatile flavor compounds of giant salamander (*Andrias davidianus*) head soup during stewing based on GC-IMS Technology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(19): 307−313.]

[8] LUO J, YANG X, CAO Y, et al. Structural characterization and *in vitro* immunogenicity evaluation of amphibian-derived collagen type II from the cartilage of Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*)[J]. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2020, 31(15): 1941−1960.

[9] 金文刚, 赵萍, 金晶, 等. 基于气相-离子迁移色谱分析大鲵不同可食部位挥发性成分指纹差异 [J]. 食品科学, 2022, 42(2): 303-309. 034.html. [JIN W G, ZHAO P, JIN J, et al. Volatile component fingerprint analysis of giant salamander (*Andrias davidiauns*) from different edible parts based on gas chromatography-ion mobility spectroscopy[J]. Food Science, 2022, 42(2): 303-309.]

[10] HU Y, LI N, CHEN J, et al. Effect of chlorine dioxide on quality of giant salamander cutting meats in small modified atmosphere packaging[J]. Advance Journal of Food Science and Technology, 2016, 10(4): 302−308.

[11] JIN W, CHEN X, GENG J, et al. Quality characteristics and moisture mobility of giant salamander (*Andrias davidianus*) jerky during roasting process[J]. Journal of Food Quality, 2021, 2021: 1−11.

［12］ JIN W, PEI J, CHEN D, et al. Influence of frying methods on quality characteristics and volatile flavor compounds of giant salamander (*Andrias davidianus*) meatballs[J]. Journal of Food Quality, 2021, 2021: 8450072.
［13］ LEDUC F, TOURNAYRE P, KONDJOYAN N, et al. Evolution of volatile odorous compounds during the storage of European seabass (*Dicentrarchus labrax*)[J]. Food Chemistry, 2012, 131(4): 1304−1311.
［14］ ZHAO H, YIN Y, LIU Y, et al. Flavor quality changes of Turbot (*Psetta maxima*) stored at −2 and 0 ℃[J]. Key Engineering Materials, 2020, 841: 317−321.
［15］ 贾哲, 陈晓婷, 潘南, 等. 双斑东方鲀在冷藏保鲜过程中挥发性风味物质的变化[J]. 食品科学, 2021, 42(20): 188−196. ［JIA Z, CHEN X T, PAN N, et al. Changes of volatile flavor compounds in *Takifugu bimaculatus* during refrigeration storage[J]. Food Science, 2021, 42(20): 188−196.］
［16］ 辛茜, 陈德经, 陈小华, 等. 顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用分析大鲵不同部位挥发性成分[J]. 食品科学, 2019, 40(20): 249−254. ［XIN X, CHEN D J, CHEN X H, et al. Analysis of volatile components in different parts of giant salamander by headspace solid phase microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry[J]. Food Science, 2019, 40(20): 249−254.］
［17］ CHEN X, JIN W, CHEN D, et al. Collagens made from giant salamander (*Andrias davidianus*) skin and their odorants[J]. Food Chmeistry, 2021, 361(6): 130061.
［18］ 刘欢, 马翼飞, 单钱艺, 等. 冰藏和微冻贮藏对大鲵肌肉品质的影响 [J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(23): 199-204. ［LIU H, MA Y F, SHAN Q Y, et al. Effects of ice and micro-frozen storage on the quality of *Andrias davidianus*[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(23): 199-204.］
［19］ 杨慧, 陈德经, 陈海涛, 等. 不同冻结方式对大鲵肉品质的影响[J]. 食品科技, 2019, 44(5): 121−127. ［YANG H, CHEN D J, CHEN H T, et al. Effects of different freezing methods on the quality of Chinese giant salamander meat[J]. Food Science and Technology, 2019, 44(5): 121−127.］
［20］ 王美婧. 短期冷藏过程中乌鳢肌原纤维蛋白变化及其应用研究 [D]. 杭州: 浙江工商大学, 2020. ［WANG M J. Changes of myofirillar protein in snakehead during short-term refrigeration and its application[D]. Hangzhou: Zhejing Gongshang University, 2020.］
［21］ LI X, LI J, ZHU J, et al. Postmortem changes in yellow grouper (*Epinephelus awoara*) fillets stored under vacuum packaging at 0 °C[J]. Food Chemistry, 2011, 126(3): 896−901.
［22］ GRAM L, HUSS H. Microbiological spoilage of fish and fish products[J]. International Journal of Food Microbiology, 1996, 33(1): 121−37.
［23］ FAN W, CHI Y, ZHANG S. The use of a tea polyphenol dip to extend the shelf life of silver carp (*Hypophthalmicthys molitrix*) during storage in ice[J]. Food Chemistry, 2007, 108: 148−153.
［24］ 赵巧灵. 金枪鱼在冷藏过程中鲜度变化及差异蛋白质组学研究 [D]. 杭州: 浙江工商大学, 2015. ［ZHAO Q L. Freshness variation and differential proteome analysis of tuna (*Thunnus obesus*) during refrigerated storage[D]. Hangzhou: Zhejing Gongshang University, 2015.］
［25］ 孙宝国. 食用调香术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2003. ［SUN B G. Edible fragrance adjustment[M]. Beijing: Chemical Industrial Press, 2003.］
［26］ TOLDRA F, FLORES M. The role of muscle proteases and lipases in flavor development during the processing of dry-cured ham[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1998, 38(4): 331−352.
［27］ 张晶晶, 梁萍, 施文正, 等. 不同冷藏期鲳鱼及草鱼气味变化分析[J]. 食品科学, 2016, 37(20): 31−36. ［ZHANG J J, LIANG P, SHI W Z, et al. Changes in volatile compounds of pomfret and grass carp during different storage periods[J]. Food Science, 2016, 37(20): 31−36.］
［28］ BAI J, BAKER S, SCHNEIDER G, et al. Aroma profile characterization of Mahi-Mahi and Tuna for determining spoilage using purge and trap gas chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Food Science, 2019, 84(3): 1−9.
［29］ 陈俊卿, 王锡昌. 顶空固相微萃取-气相色谱-质谱法分析白鲢鱼中的挥发性成分[J]. 质谱学报, 2005(2): 76−80. ［CHEN J Q, WANG X C. Analysis of odors from silver carp by headspace-solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry [J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2005(2): 76−80.］
［30］ 陈桂平. 草鱼低温贮藏期间质构及风味物质变化研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2014. ［CHEN G P. Study on changes of texture and flavor compounds in grass carp during low temperature storage[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2014.］
［31］ CASABURI A, PIOMBINO P, NYCHAS G, et al. Bacterial populations and the volatilome associated to meat spoilage[J]. Food Microbiology, 2015, 45(Part A): 83−102.
［32］ SHI Y, LI D, KONG Y, et al. Enhanced antibacterial efficacy and mechanism of octyl gallate/beta-cyclodextrins against *Pseudominas fluoresces* and *Vibrio parahaemolyticus* and incorporated electrospun nanofibers for Chinese giant salamander fillets preservation[J]. International Journal of Food Microbiology, 2022, 361: 109460.
［33］ 周才琼, 代小容, 杜木英. 酸肉发酵过程中挥发性风味物质形成的研究[J]. 食品科学, 2010, 31(7): 98−104. ［ZHOU C Q, DAI X R, DU M Y. Formation of volatile flavor components during sour meat processing[J]. Food Science, 2010, 31(7): 98−104.］
［34］ JOFFRAUD J, LEROI F, ROY C, et al. Characterisation of volatile compounds produced by bacteria isolated from the spoilage flora of cold-smoked salmon[J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 66(3): 175−184.
［35］ WIERDA R, FLETCHER G, XU L, et al. Analysis of volatile compounds as spoilage indicators in fresh king salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) during storage using SPME-GC-MS[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(22): 8480−8490.
［36］ 王建辉, 杨晶, 刘永乐, 等. 不同贮藏条件下草鱼肌肉挥发性成分的变化分析[J]. 现代食品科技, 2014, 30(9): 297−303. ［WANG J H, YANG J, LIU Y L, et al. Variation in volatile components of grass carp muscle under different storage conditions[J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(9): 297−303.］
［37］ VARLET V, PROST C, SEROT T. Volatile aldehydes in smoked fish: Analysis methods, occurence and mechanisms of formation[J]. Food Chemistry, 2007, 105(4): 1536−1556.

李凤华, 李作华, 杨丽, 等. 药食同源中药材中 16 种真菌毒素的测定与分析 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 268−275. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080109

LI Fenghua, LI Zuohua, YANG Li, et al. Determination and Analysis of 16 Mycotoxins in Medicinal and Edible Traditional Chinese Medicine [J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 268−275. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080109

· 分析检测 ·

药食同源中药材中 16 种真菌毒素的测定与分析

李凤华[1], 李作华[2], 杨　丽[2], 员永春[2], 王素香[2], 王爱香[3], 李　蔚[1,*], 郑凤家[1]

（1.山东省疾病预防控制中心, 山东济南 250014;
2.山东质安信技术服务有限公司, 山东济南 250000;
3.奥迈检测有限公司, 山东菏泽 274000）

摘　要: 目的：建立同位素标记-超高效液相色谱-串联质谱法（UPLC-MS/MS）测定药食同源中药材中 16 种真菌毒素的分析方法，并利用该方法对市售的 483 份药食同源样品进行检测分析。方法：样品用乙腈-水（50/50，V/V）提取，MycoSpin™ 400 多毒素净化柱净化，经 Acquity UPLC BEH C_{18} 色谱柱 (100 mm×2.1 mm，1.7 μm) 分离，质谱采用电喷雾电离源（ESI），多反应监测模式（MRM）进行检测分析，同位素内标法进行定量。结果：16 种真菌毒素标准曲线线性关系良好（R>0.998），方法的检出限在 0.1~4.0 μg/kg 之间，高、中、低 3 个不同浓度加标回收率为 83.4%~102.3%，相对标准偏差（RSD，n=6）为 2.08%~13.6%。483 份样品中，共检出 10 种真菌毒素，其余 6 种真菌毒素均未检出，检出率最高的毒素化合物为玉米赤霉烯酮（ZEN），阳性样品中平均含量为 71.2 μg/kg，并且有 3.11% 样品超过国家食品安全标准规定的参考限量。结论：该方法采用同位素稀释，多毒素净化柱对样品进行净化，降低了药食同源样品中基质干扰，方法准确、快速，满足测定方法的要求，可用于大批量样品中真菌毒素的多残留检测分析。

关键词: 药食同源, 中药材, 真菌毒素, 超高效液相色谱-串联质谱法 (UPLC-MS/MS), 同位素标记
中图分类号: R155.5　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0268−08
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080109
本文网刊:

Determination and Analysis of 16 Mycotoxins in Medicinal and Edible Traditional Chinese Medicine

LI Fenghua[1], LI Zuohua[2], YANG Li[2], YUAN Yongchun[2], WANG Suxiang[2], WANG Aixiang[3], LI Wei[1,*], ZHENG Fengjia[1]

（1.Shandong Center for Disease Control and Prevention, Jinan 250014, China;
2.Shandong Quality & Security Trust Technical Services Co., Ltd., Jinan 250000, China;
3.All Mine Testing Co., Ltd., Heze 274000, China）

Abstract: Objective: An analytical method was established for the determination of 16 mycotoxins in traditional Chinese medicines (TCM) by isotope labeling-ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS), and 483 medicinal and edible homologous samples from the markets were detected using this method. Method: The samples were extracted with acetonitrile-water (50/50, V/V), and then purified by the MycoSpin™ 400 multifunction clean-up columns. Then the samples were detected and confirmed by UPLC-MS/MS, and quantified by isotope labeled internal standards. Rapid separation of 16 mycotoxins was successfully achieved on an Acquity UPLC BEH C_{18} column(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) with gradient elution. Simultaneous acquisition was performed in multiple reaction

收稿日期: 2021−08−11
基金项目: 山东省中医药科技发展计划项目（2015-316;2020Q043）; 国家自然科学基金（21705095）。
作者简介: 李凤华（1978−）, 女, 硕士, 副主任技师, 研究方向: 食品安全, E-mail: sdlfh@126.com。
*** 通信作者:** 李蔚（1971−）, 女, 硕士, 主任技师, 研究方向: 食品卫生检验, E-mail: lweiwei@126.com。

monitoring (MRM) mode with electrospray ionization (ESI) source operated in both positive and negative ionization modes. Result: The established method provided good linearities for the 16 mycotoxins within their respective linear ranges with high correlation coefficients (R>0.998), and the detection limits of this method were 0.1~4.0 μg/kg. The average recoveries of the 16 mycotoxins ranged from 83.4% to 102.3% at the three spiked levels, and the relative standard deviations (RSD, n=6) were in the range of 2.08%~13.6%. In the detection of 483 actual samples, 10 mycotoxins were detected, and the other 6 mycotoxins were not detected. The toxin compound with the highest detection rate was zearalenone (ZEN), with an average content of positive samples 71.2 μg/kg, and 3.11% of the samples exceeded the reference limit specified in the national food safety standard. Conclusion: This method used isotope dilution and multifunction clean-up columns to purify the samples, which reduced the matrix interference in the medicinal and edible homologous samples. The detection limits could meet the requirement of methods. The method was accurate and rapid, and could be used for the detection and analysis of multi residues of mycotoxins in a large number of samples.

Key words: medicine and food homology; traditional Chinese medicine (TCM); mycotoxins; ultra performance-liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS); isotope labeling

真菌毒素是一类由产毒真菌在一定环境条件下产生的具有毒性作用的次级代谢产物，目前已知的真菌毒素有 300 余种[1−2]，其中常见的易对人体产生危害的真菌毒素有：黄曲霉毒素、单端孢霉烯族类毒素、玉米赤霉烯酮、伏马毒素和赭曲霉毒素等。部分真菌毒素已被证实具有致癌、致畸、致突变作用，对人类健康造成很大威胁[3−5]。中药是我国医药学发展的民族瑰宝，随着国际社会对中医药价值的普遍认可，中药材的质量安全也备受关注。由于中药材在种植、采集、加工、储藏和运输过程中，诸多条件的变化如干燥不及时、贮存不当、加工制备处理不善等均易使其受到真菌污染，产生有毒的真菌毒素，不仅使其功效成分受到影响，进而可能影响中药的质量和疗效，甚至还会对用药者的健康造成一定的威胁[6−8]。尤其药食同源中药材由于其使用量及使用范围更加广泛，其质量安全备受重视。随着真菌毒素风险评估工作的深入，很多国家和地区开始对部分真菌毒素的含量进行了强制性规定，并制定了严格的限量标准[9−13]。

目前，国内外检测真菌毒素的方法主要有酶联免疫吸附（ELISA）法[14−16]、薄层色谱（TLC）法[17]、高效液相色谱（LC）法[18−21]、气相色谱（GC）法[22]、气相色谱串联质谱（GC-MS）法[23] 和液相色谱串联质谱（LC-MS/MS）法[24−29] 等。由于真菌毒素的种类较多，且药食同源中药材基质比较复杂，同一样品可能污染多种真菌毒素，因此，建立同时测定多种毒素且准确可靠的方法非常必要，超高效液相色谱-串联质谱法检测真菌毒素的技术日渐成熟，应用广泛，能够满足检测需求。目前，大部分检测方法主要针对单类型目标物，而针对中药材中多种真菌毒素同时检测的方法 SN/T 4604-2016 适用范围窄，且多功能免疫亲和柱前处理操作复杂，定量方法采用外标法[30−33]，不能满足同时检测复杂基质中多组分目标物的快速检测要求。

本研究拟采用新型的多真菌毒素快速净化柱，通过优化液相色谱-质谱条件，建立药食同源中药材中 16 种真菌毒素液相色谱-串联质谱检测方法，同位素内标法定量，以期建立能够校正基质效应，选择性好，灵敏度高，快捷、简便、高效，适用于大批量样品的快速测定方法。并拟采用该方法对采集的 483 份样品进行调查分析，为药食同源中药材中真菌毒素的安全风险评价监测提供技术支持。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

药食同源中药材，采集市售药食同源样品共 483 份，按种类分：果实种子类药材 340 份，根及根茎类 95 份，动物类 32 份，藻菌类 16 份　均购自济南市大型药店；乙腈、甲醇、甲酸、氨水、乙酸　色谱纯，德国 Merck 公司；试验用水　Millipore 纯水机制取超纯水；标准品：脱氧雪腐镰刀菌烯醇（DON，100.0 μg/mL）、雪腐镰刀菌烯醇（NIV，100.1 μg/mL）、黄曲霉毒素混合标准溶液（AFB_1：2.02 μg/mL、AFB_2：0.500 μg/mL、AFG_1：2.02 μg/mL、AFG_2：0.503 μg/mL）、HT-2 毒素（HT-2，100.4 μg/mL）、T-2 毒素（T-2，100.1 μg/mL）、伏马毒素 B_1（FB_1，50.0 μg/mL）、伏马毒素 B_2（FB_2，50.2 μg/mL）、伏马毒素 B_3（FB_3，50.2 μg/mL）、玉米赤霉烯酮（ZEN，100.0 μg/mL）、赭曲霉毒素 A（OTA，10.04 μg/mL）、3-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇（3-ADON，100.0 μg/mL）、15-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇（15-ADON，100.1 μg/mL）、Fus X 毒素（FuX，100.3 μg/mL）、$^{13}C_{15}$-脱氧雪腐镰刀菌烯醇（$^{13}C_{15}$-DON，25.0 μg/mL）、$^{13}C_{15}$-雪腐镰刀菌烯醇（$^{13}C_{15}$-NIV，25.12 μg/mL）、$^{13}C_{17}$-黄曲霉毒素 B_1（$^{13}C_{17}$-AFB_1，0.501 μg/mL）、$^{13}C_{17}$-黄曲霉毒素 B_2（$^{13}C_{17}$-AFB_2，0.502 μg/mL）、$^{13}C_{17}$-黄曲霉毒素 G_1（$^{13}C_{17}$-AFG_1，0.501 μg/mL）、$^{13}C_{17}$-黄曲霉毒素-G_2（$^{13}C_{17}$-AFG_2，0.501 μg/mL）、$^{13}C_{24}$-T-2 毒素（$^{13}C_{24}$-T-2，25.2 μg/mL）、$^{13}C_{22}$-HT-2 毒素（$^{13}C_{22}$-HT-2，25.5 μg/mL）、$^{13}C_{34}$-伏马毒素 B_1（$^{13}C_{34}$-FB_1，25.2 μg/mL）、$^{13}C_{34}$-伏马毒素 B_2（$^{13}C_{34}$-FB_2，10.10 μg/mL）、$^{13}C_{34}$-伏马毒素 B_3（$^{13}C_{34}$-FB_3，10.02 μg/mL）、$^{13}C_{18}$-玉米赤霉烯酮（$^{13}C_{18}$-ZEN，25.2 μg/mL）、$^{13}C_{20}$-赭曲霉毒素

A($^{13}C_{20}$-OTA, 10.04 μg/mL)、$^{13}C_{17}$-3-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇($^{13}C_{17}$-3ADON, 25.0 μg/mL)、$^{13}C_{17}$-15-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇($^{13}C_{17}$-15ADON, 10.3 μg/mL) 均购自 Romer Biopure 公司。

Acquity UPLC I CLASS 超高效液相色谱仪、XEVO-TQS 串联质谱仪, 配有电喷雾离子源(ESI) 美国 Waters 公司; VORTEX GENIE2 涡旋混匀器 美国 Scientific Industries 公司; Millipore—Q 超纯水系统 美国 Millipore 公司; CR21N 型高速冷冻离心机 日本 Hitachi 公司; Multi Reax(EU)振荡混匀器 德国 heidolph 公司, MycoSpin™ 400 多毒素净化柱 美国 Romer Labs 公司; ZM 200 超离心粉碎研磨仪 德国 Retsch 公司; KQ5200E 超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 混合标准溶液的配制 准确移取标准溶液适量, 用乙腈稀释并定容, 配制成 DON、3-ADON、15-ADON、NIV、T-2、HT-2、ZEN、FuX 浓度为 2 μg/mL, AFB_1、AFG_1 为 0.8 μg/mL, AFB_2、AFG_2 为 0.2 μg/mL, FB_1、FB_2、FB_3、OTA 为 1.0 μg/mL 的混合标准溶液, 用于添加回收实验和制备标准系列溶液, −20 ℃ 避光条件下保存。

混合同位素内标溶液配制: 分别准确移取各同位素标准溶液, 用乙腈-水(10/90, V/V)溶液稀释并定容至 25.0 mL, 配制成$^{13}C_{15}$-DON、$^{13}C_{15}$-NIV、$^{13}C_{18}$-ZEN、$^{13}C_{17}$-3ADON、$^{13}C_{17}$-15ADON 浓度为 250 ng/mL, $^{13}C_{17}$-AFB_1、$^{13}C_{17}$-AFB_2、$^{13}C_{17}$-AFG_1、$^{13}C_{17}$-AFG_2 为 10.0 ng/mL, $^{13}C_{34}$-FB_1、$^{13}C_{34}$-FB_2、$^{13}C_{34}$-FB_3、$^{13}C_{22}$-HT-2 浓度为 100 ng/mL, $^{13}C_{24}$-T-2 为 50 ng/mL, $^{13}C_{20}$-OTA 浓度为 20 ng/mL 的内标混合溶液, −20 ℃ 避光条件下保存。

1.2.2 样品前处理 分别将样品用超离心粉碎研磨仪粉碎均匀(50 目过筛), 称取 2.0 g(精确至 0.01 g)粉碎后样品于 50 mL 离心管中, 准确加入 10 mL 乙腈-水(50∶50, V/V), 涡旋混匀后, 浸泡 60 min, 室温下超声提取 30 min, 10000 r/min 室温下离心 5 min, 吸取 1.0 mL 上清液, 加入 50 μL 乙酸, 再加 100 μL 内标溶液, 混合均匀, 将混合液倒入 MycoSpin™ 400 多毒素净化柱中, 涡旋 2 min, 使溶液与净化材料充分混匀, 打开净化柱底部出液口, 置于配套收集管中, 收集液于 10000 r/min 离心 1 min, 取上清液过 0.22 μm 滤膜, 上机检测。

1.2.3 色谱条件 Acquity UPLC BEH C_{18} 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm, 美国 Waters 公司); 柱温 40 ℃; 流速 0.3 mL/min; 进样量为 2 μL; ESI^-模式: 流动相 A: 0.2% 氨水溶液, 流动相 B: 乙腈, 梯度洗脱程序: 0 min, 流动相 B: 2%; 0~4.0 min, 流动相 B: 2%~20%; 4.0~5.5 min, 流动相 B: 20%; 5.5~5.6 min, 流动相 B: 20%~100%; 5.6~6.2 min, 流动相 B: 100%; 6.2~6.5 min, 流动相 B: 100%~2%。ESI^+模式: 流动相 A: 0.1% 甲酸水溶液, 流动相 B: 乙腈+甲醇(50/50, V/V), 梯度洗脱程序: 0 min, 流动相 B: 10%; 0~1.0 min, 流动相 B: 10%~30%; 1.0~3.0 min, 流动相 B: 30%~40%; 3.0~5.0 min, 流动相 B: 40%~70%; 5.0~7.0 min, 流动相 B: 70%; 7.0~7.2 min, 流动相 B: 70%~100%; 7.2~7.7 min, 流动相 B: 100%; 7.7~8.0 min, 流动相 B: 100%~10%。

1.2.4 质谱条件 检测方式为多反应监测(MRM); ESI 扫描方式为正、负离子扫描。离子源温度为 150 ℃, 去溶剂气温度: 400 ℃; 锥孔反吹气流速: 150 L/h; 去溶剂气流速: 800 L/h; ESI^+模式下毛细管电压为 3.5 kV, ESI^-模式下毛细管电压为 2.0 kV; 16 种真菌毒素及内标的部分质谱参数见表 1。

表 1 16 种真菌毒素及对应的同位素内标的质谱优化参数
Table 1 Optimized mass spectrometry parameters of 16 mycotoxins and their corresponding isotopic internal standards

化合物	保留时间(min)	ESI模式	母离子(m/z)	子离子(m/z)	锥孔电压(V)	碰撞能量(eV)
AFB_1	4.39	ESI^+	313	285*, 241	37	22, 34
AFB_2	4.09	ESI^+	315	287*, 259	42	24, 28
AFG_1	3.90	ESI^+	329	243*, 200	36	26, 40
AFG_2	3.54	ESI^+	331	313*, 245	36	26, 28
FB_1	5.57	ESI^+	722	334*, 352	42	38, 38
FB_2	6.70	ESI^+	706	336*, 318	40	36, 34
FB_3	6.17	ESI^+	706	336*, 318	40	36, 34
HT-2	5.21	ESI^+	425	263*, 245	15	12, 12
T-2	5.77	ESI^+	484	305*, 185	15	12, 20
OTA	5.99	ESI^+	404	239*, 221	44	22, 34
DON	3.24	ESI^-	295	265*, 138	24	12, 12
NIV	2.50	ESI^-	311	281*, 191	15	10, 20
ZEN	5.53	ESI^-	317	175*, 131	16	22, 28
FuX	4.22	ESI^-	353	263*, 187	18	10, 22
3-ADON	5.52	ESI^-	337	307*, 173	17	10, 10
15-ADON	5.47	ESI^-	337	150*, 219	36	22, 10
$^{13}C_{17}$-AFB_1	4.39	ESI^+	330	301	37	20
$^{13}C_{17}$-AFB_2	4.09	ESI^+	332	303	42	24
$^{13}C_{17}$-AFG_1	3.90	ESI^+	346	257	36	28
$^{13}C_{17}$-AFG_2	3.54	ESI^+	348	330	36	24
$^{13}C_{34}$-FB_1	5.57	ESI^+	756	356	42	38
$^{13}C_{34}$-FB_2	6.70	ESI^+	740	358	40	32
$^{13}C_{34}$-FB_3	6.17	ESI^+	740	358	40	32
$^{13}C_{22}$-HT-2	5.21	ESI^+	447	278	15	13
$^{13}C_{24}$-T-2	5.77	ESI^+	508	322	15	15
$^{13}C_{20}$-OTA	5.99	ESI^+	424	250	50	22
$^{13}C_{15}$-NIV	2.50	ESI^-	326	295	15	12
$^{13}C_{15}$-DON	3.24	ESI^-	310	279	16	10
$^{13}C_{17}$-3ADON	5.52	ESI^-	354	323	17	8
$^{13}C_{17}$-15ADON	5.47	ESI^-	354	158	18	22
$^{13}C_{18}$-ZEN	5.53	ESI^-	335	185	16	24

注: *为定量离子。

1.2.5 方法学考察

1.2.5.1 线性关系、检出限与定量限的考察 准确吸

取 16 种真菌毒素混合标准溶液适量，用乙腈-水（10/90, V/V）溶液配制成系列梯度混合标液（AFB_1、AFG_1 为 0.32、0.8、2、4、8、20、40、80 ng/mL；AFB_2、AFG_2 为 0.08、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10、20 ng/mL；FB_1、FB_2、FB_3、OTA 为 0.4、1.0、2.5、5.0、10、25、50、100 ng/mL；其余毒素浓度为 0.8、2.0、5.0、10、20、50、100、200 ng/mL），取 1.0 mL 混合标液，加入 50 μL 乙酸，100 μL 混合同位素内标溶液，涡旋混匀后过 0.22 μm 滤膜，上机检测。以不同浓度的各目标物的峰面积与其内标峰面积比值对应相应的质量浓度进行线性回归，绘制标准曲线。按照三倍信噪比（3 S/N）计算检出限，10 倍信噪比（10 S/N）为定量限。

1.2.5.2　加标回收率、精密度试验　选择杏仁、山药、鸡内金、茯苓 4 种基质空白样品，分别加入低、中、高三个水平的混合标准溶液，每个加标水平进行 6 次平行测定，按照 1.2.2 方法进行前处理，液相色谱质谱联用仪分析，根据测定结果计算三个加标水平下的回收率及其相对标准偏差，以验证该方法的准确性。

1.3　数据处理

采用内标法进行定量，应用 Waters Masslynx 仪器配置工作站系统进行数据采集处理，并使用 Excel 2010 进行数据分析。

2　结果与分析

2.1　质谱条件的优化

将 16 种真菌毒素以及 15 种同位素内标分别用乙腈-水（10/90, V/V）稀释配制成适宜浓度的标准溶液（50~100 ng/mL），用流动注射泵直接注入质谱仪，根据各目标化合物分子的化学电离性质，DON、3-ADON、15-ADON、NIV、ZEN、FuX 采用负离子模式，AFB_1、AFB_2、AFG_1、AFG_2、FB_1、FB_2、FB_3、HT-2、T-2、OTA 采用正离子模式，对各化合物及其内标的母离子、子离子、锥孔电压、碰撞能量等质谱参数进行优化。优化后的质谱条件见表 1。由于正负离子同时扫描会降低方法的灵敏度，本方法采用正、负离子检测模式分别对目标化合物进行测定。

2.2　色谱分离条件的优化

优化质谱条件后，进行液相色谱分离条件的优化。流动相的组成和配比会影响目标化合物的色谱行为，以及其离子化效率和检测灵敏度。经查阅文献以及根据各个化合物的分子结构特征，本实验比较了甲酸、氨水等溶剂的加入情况及乙腈、甲醇流动相系统的组成，结果发现，在负离子模式下，流动相有机相采用乙腈，水相中加入 0.2% 氨水后，有利于化合物的离子化，并可以得到较高的检测灵敏度和更好的分离度。故最终确定了乙腈-0.2% 氨水作为流动相。在正离子模式下，流动相水相中加入 0.1% 甲酸，有机相采用甲醇-乙腈（1+1）条件下，各目标化合物分离度和灵敏度均更好。并通过优化梯度洗脱，各目标化合物达到较好的分离，色谱峰峰形良好。图 1 为

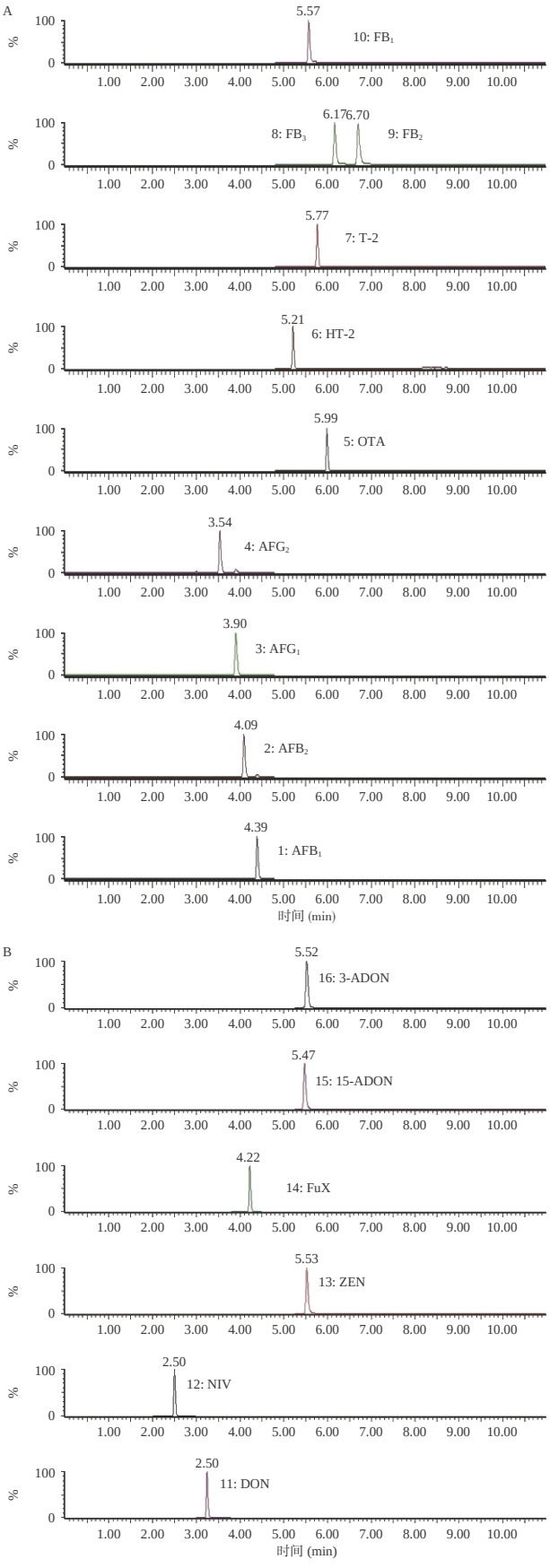


图 1　16 种真菌毒素标准溶液及其内标离子流图

Fig.1　Total ion chromatogram of 16 mycotoxins standard solutions and their internal standards

注：（A）正离子模式，（B）负离子模式，1~16 分别为：AFB_1、AFB_2、AFG_1、AFG_2、OTA、HT-2、T-2、FB_3、FB_2、FB_1、DON、NIV、ZEN、FuX、15-ADON、3-ADON。

16 种真菌毒素标准溶液及其内标离子流图。

2.3 样品净化条件的优化

药食同源中药材基质比较复杂，为了能够更好的去除干扰物，降低基质效应，本实验对样品的净化条件进行了优化，由于多毒素免疫亲和柱前处理复杂，耗时较长，可测的毒素种类不能覆盖待测的 16 种毒素，本实验以鸡内金提取液配制基质标准溶液只针对 Mycosep226 净化柱、Oasis HLB 柱和 MycoSpin™ 400 多毒素净化柱进行了比较，结果如图 2 所示。Mycosep226 净化柱和 Oasis HLB 柱净化效果不理想，对 ZEN、伏马毒素等的回收率较低。因此本实验采用 MycoSpin™ 400 多毒素净化柱对样品进行净化，可以降低药食同源中药材复杂基质对毒素检测的干扰，达到净化效果。

2.4 定量方法的确定

应用 UPLC-MS/MS 对复杂基质样品中目标化合物进行分析时，为了校正样品净化过程和离子化过程的损失以及减少基质效应，保证定量结果的准确可靠，通常采用基质匹配溶液加标法或空白溶剂内标法进行定量测定。由于药食同源中药材基质多种多样，而本文拟建立适用性更高的多种毒素同时测定的方法，因此，选择应用空白溶剂内标法进行定量检测。在内标化合物的选择上主要考虑目标化合物的结构、性质尽可能相似，除 FuX 外，本研究使用各个化合物的稳定性同位素 [^{13}C] 作为指示内标，由于 FuX 难以找到同位素内标，因此，使用性质接近的 $^{13}C_{15}$-DON 作为其内标物进行检测。

2.5 工作曲线和检出限、定量限

本方法所确定的实验条件下，用乙腈-水（10/90，V/V）溶液配制系列浓度的真菌毒素标准溶液并分别进行测定，以相应真菌毒素的浓度为横坐标（X），目标物的峰面积与同位素内标的峰面积之比为纵坐标绘制工作曲线。结果表明，在一定的浓度范围内，各化合物呈良好的线性关系（R>0.998），线性回归方程、相关系数见表 2，并以 3 倍信噪比（3 S/N）和 10 倍信噪比（10 S/N）计算检出限和定量限，各真菌毒素的检出限在 0.1~4.0 μg/kg 之间，定量限为 0.3~10.0 μg/kg。

2.6 精密度与回收率试验

分别称取一定质量的不同基质的空白样品杏仁（果实种子类）、山药（根及根茎类）、鸡内金（动物

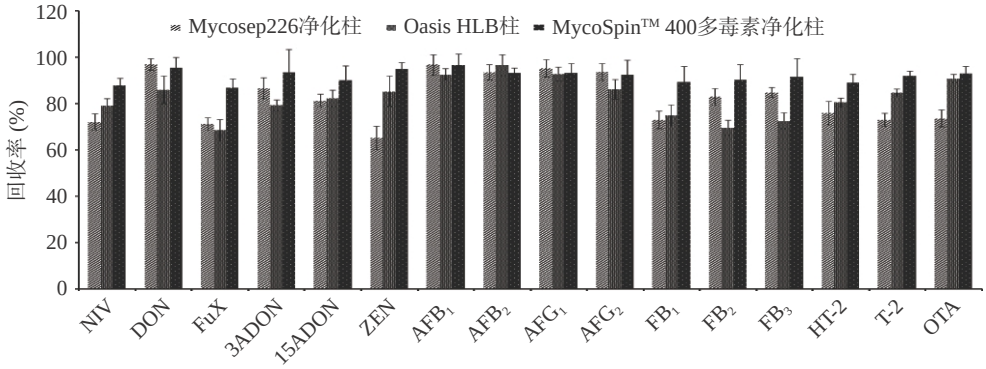


图 2 不同净化方式对回收率的影响

Fig.2 Effect of different purification methods on recovery

表 2 16 种真菌毒素的线性方程、相关系数、线性范围、检出限和定量限

Table 2 Linear equations, correlation coefficients, linear ranges, detection limits and quantification limits of 16 mycotoxins

化合物	回归方程	相关系数	线性范围（ng/mL）	检出限（μg/kg）	定量限（μg/kg）
NIV	Y=0.87017X+0.05828	0.9996	0.8~200	1.0	3.0
DON	Y=0.72452X+0.09469	0.9993	0.8~200	1.0	3.0
FuX	Y=0.52496X+0.001116	0.9987	0.8~200	1.0	3.0
3-ADON	Y=0.90041X+0.09749	0.9999	0.8~200	2.0	5.0
15-ADON	Y=0.41902X−0.16736	0.9980	0.8~200	2.0	5.0
ZEN	Y=0.83662X+0.17959	0.9999	0.8~200	1.0	3.0
AFB_1	Y=0.55309X−0.04670	0.9993	0.32~80	0.1	0.3
AFB_2	Y=0.70547X+0.001443	0.9998	0.08~20	0.1	0.3
AFG_1	Y=0.57448X−0.001124	0.9994	0.32~80	0.1	0.3
AFG_2	Y=0.54956X−0.002338	0.9995	0.08~20	0.1	0.3
HT-2	Y=0.74764X−0.21247	0.9991	0.8~200	4.0	10.0
T-2	Y=1.41774X+0.27895	0.9994	0.8~200	1.0	3.0
OTA	Y=0.64432X+0.001528	0.9990	0.4~100	0.5	1.5
FB_1	Y=0.53930X+0.55478	0.9988	0.4~100	4.0	10.0
FB_2	Y=0.39603X+0.53130	0.9991	0.4~100	4.0	10.0
FB_3	Y=0.28763X+0.43231	0.9993	0.4~100	4.0	10.0

表 3　精密度及回收率试验结果(n=6)

Table 3　Results of test for precision and recovery(n=6)

化合物	加入量(μg/L)	杏仁		山药		鸡内金		茯苓	
		回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)
NIV	10	94.4	10.2	92.4	7.02	93.2	10.4	94.3	9.23
	50	96.6	6.45	93.9	10.0	96.4	6.42	94.8	6.35
	200	97.1	6.61	93.9	8.24	97.5	3.44	93.4	7.33
DON	10	102.3	9.82	93.6	5.52	96.6	4.78	93.5	9.48
	50	96.6	6.69	99.9	4.92	101.0	2.30	96.6	6.91
	200	97.0	5.19	101.1	2.89	99.2	4.32	93.3	8.16
FuX	10	96.2	13.6	83.7	4.95	101.2	12.3	92.3	8.98
	50	88.3	10.1	92.8	9.34	98.2	3.53	101.0	2.74
	200	95.7	6.23	87.6	7.10	88.1	6.72	90.5	10.8
3ADON	10	96.7	11.7	94.5	6.24	95.8	10.2	92.2	9.44
	50	96.5	6.23	100.9	2.08	97.5	4.70	99.1	3.20
	200	96.1	5.14	92.0	11.4	94.8	7.99	98.3	6.36
15ADON	10	95.8	13.4	83.4	6.89	102.0	8.45	90.9	9.70
	50	95.2	5.74	93.0	9.74	94.2	9.94	94.2	9.64
	200	98.8	6.12	96.0	9.88	93.6	8.75	93.0	11.2
ZEN	10	92.2	10.1	95.4	9.63	97.8	5.16	92.2	9.12
	50	101.2	5.05	97.7	4.38	91.8	9.55	98.6	2.68
	200	96.6	3.75	95.8	5.47	97.5	3.16	93.3	10.2
AFB_1	4	94.8	9.29	95.5	6.98	95.8	5.53	95.7	7.86
	20	96.0	8.39	97.0	5.09	92.9	6.54	94.7	6.60
	80	99.3	2.40	96.1	6.30	96.7	5.69	94.1	7.79
AFB_2	1	98.0	12.3	93.7	8.72	93.5	8.02	93.0	9.55
	5	98.6	4.66	96.6	6.38	97.7	3.37	94.6	6.48
	20	93.8	10.8	94.6	9.74	94.8	9.11	91.7	9.61
AFG_1	4	94.2	13.5	95.8	6.83	93.5	8.67	95.9	5.64
	20	94.6	10.5	94.4	8.34	92.7	8.50	94.8	6.37
	80	95.3	8.10	97.3	4.49	97.4	4.15	95.0	7.99
AFG_2	1	90.3	11.4	91.5	9.52	92.8	7.93	92.8	8.76
	5	96.8	6.45	95.8	5.92	97.2	3.27	94.6	7.42
	20	94.8	8.71	94.9	8.06	97.8	7.24	94.8	8.25
FB_1	5	95.3	9.64	94.2	7.00	98.4	3.16	94.4	6.96
	25	91.9	10.8	95.3	5.65	93.5	10.3	94.5	7.31
	100	92.2	8.03	96.6	7.93	94.7	7.26	94.9	8.94
FB_2	5	92.8	10.9	94.4	6.89	93.2	7.51	91.9	7.08
	25	94.2	10.2	96.8	8.66	93.9	11.9	95.8	7.34
	100	92.2	11.0	93.8	10.7	90.1	12.4	92.2	10.3
FB_3	5	93.2	9.06	92.7	7.95	93.9	6.53	98.2	3.51
	25	93.1	9.44	95.6	7.19	89.6	8.22	96.4	7.19
	100	94.5	7.38	95.8	7.06	90.9	10.0	100.5	3.75
HT-2	10	93.6	8.06	96.6	6.51	94.4	9.42	93.8	8.44
	50	98.5	4.27	101.5	2.16	93.8	8.42	92.2	8.94
	200	99.1	3.85	101.4	3.31	89.4	9.14	93.9	8.79
T-2	10	93.1	7.31	95.4	7.04	92.6	10.5	93.8	11.6
	50	97.2	6.44	102.0	4.26	91.2	9.04	95.9	6.33
	200	95.9	9.84	97.8	4.65	92.4	5.85	93.5	4.87
OTA	5	95.3	12.4	100.5	2.66	92.8	7.81	95.4	7.48
	25	99.7	4.31	95.6	8.70	96.7	7.41	95.1	6.74
	100	98.6	8.92	92.5	9.05	94.3	8.15	98.4	9.59

类)、茯苓(藻菌类)，添加 3 个浓度水平真菌毒素混合标准溶液，按实验方法进行处理测定，每个添加水平平行测定 6 份，考察方法的回收率与重现性，结果见表 3。不同基质样品 16 种真菌毒素的加标回收率范围为 83.4%~102.3%，相对标准偏差(RSD，n=6)为 2.08%~13.6%。说明方法回收率与精密度良好。

2.7　实际样品的检测

利用已建立的方法，采集市售药食同源样品 483 份，包括果实种子类药材 340 份，根及根茎类药材 95 份，动物类药材 32 份，藻菌类药材 16 份，其中，阳性样品中检出各种真菌毒素的平均值及检出率见表 4，共检出阳性样品 77 份，检出率 15.9%，其中，果实种子类药材检出率为 16.8%，动物类药材检出率 34.4%，根及根茎类检出率 9.47%。检出毒素种类最多的是薏苡仁，其中，一份薏苡仁样品检出 6 种毒素，两份检出 5 种毒素；其次是鸡内金，有六份样品检出 4 种毒素。毒素检出率较高的药材分别是枳椇子(4/4，检出批次/总批次)、薏苡仁(10/11)、鸡内金

表 4 真菌毒素平均值及检出率

Table 4 Mean values and detection rates of mycotoxins

指标	DON	ZEN	AFB_1	AFB_2	AFG_1	OTA	FB_1	FB_2	FB_3	NIV
平均值(μg/kg)	52.9	71.2	9.9	3.9	0.9	4.5	189.5	45.5	21.5	109.1
检出率(%)	4.8	7.9	2.1	0.4	0.2	0.4	5.8	5.6	3.9	2.7

注: 平均值: 阳性样品中毒素的平均值。

(11/13)、大麦芽(7/14)和桃仁(4/9), 其中, 在枳椇子和鸡内金的阳性样品中均检出玉米赤霉烯酮(ZEN)。

3 结论

本文建立了同位素标记-超高效液相色谱/质谱法检测药食同源中药材中 16 种真菌毒素的检测方法。通过优化样品前处理方法、色谱条件和质谱条件, 目标化合物分离度及线性关系良好, 而且方法操作简单, 准确、可靠, 适用于药食同源中药材中多真菌毒素的检测, 并利用此方法对市售 483 份药材进行了检测, 为药食同源中药材中真菌毒素污染状况调查提供了数据支持。但是, 由于具体到每种药材的样品数量较少, 覆盖面欠缺, 为了研究具体药材的污染情况, 下一步需要针对具体的药材加大采样量, 得到更加全面、有代表性的数据结果。

参考文献

[1] 李雅静, 秦曙, 杨艳梅, 等. 中国谷物真菌毒素污染研究现状[J]. 中国粮油学报, 2020, 35(3): 186−194. [LI Yajing, QIN Shu, YANG Yanmei, et al. Research status of mycotoxin contamination in grains in China[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2020, 35(3): 186−194.]

[2] KIM D H, HONG S Y, KANG J W, et al. Simultaneous determination of multi-mycotoxins in cereal grains collected from South Korea by LC/MS/MS[J]. Toxins, 2017, 9(3): 106.

[3] COLLI L D, ELLIOTT C, FINNAN J, et al. Determination of 42 mycotoxins in oats using a mechanically assisted QuEChERS sample preparation and UHPLC-MS/MS detection[J]. Journal of Chromatography B, 2020, 1150: 122187.

[4] 王晓红, 豆金彦, 肖正国. 不同储藏条件下薏苡仁中真菌毒素含量变化的研究[J]. 西部中医药, 2018, 31(8): 20−23. [WANG Xiaohong, DOU Jinyan, XIAO Zhengguo. Study on the content changes of fungal toxin in YiYiRen under different storage conditions[J]. Western Journal of Traditional Chinese Medicine, 2018, 31(8): 20−23.]

[5] MATUMBA L, NAMAUMBO S, NGOMA T, et al. Five keys to prevention and control of mycotoxins in grains: A proposal[J]. Global Food Security, 2021, 30: 100562.

[6] 王少敏, 黄晓静, 毛丹, 等. QuEChERS-超高效液相色谱串联质谱法同时测定中药瓜蒌皮中 22 种真菌毒素[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(22): 5843−5850. [WANG Shaomin, HUANG Xiaojing, MAO Dan, et al. Simultaneous determination of 22 kinds of mycotoxins in *Trichosanthis pericarpium* by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2018, 9(22): 5843−5850.]

[7] FELIPE P T, RATCHANEEWAN K A, VERONIKA N, et al. Mycotoxins, phytoestrogens and other secondary metabolites in austrian pastures: Occurrences, contamination levels and implications of geo-climatic factors[J]. Toxins, 2021, 13(7): 460.

[8] 张鑫, 王福, 陈鸿平, 等. 中药材真菌及真菌毒素污染研究现状[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2015, 17(11): 2381−2388. [ZHANG Xin, WANG Fu, CHEN Hongping, et al. Research progress on fungi and mycotoxin infection of Chinese medicinal materials[J]. World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica, 2015, 17(11): 2381−2388.]

[9] FAO/WHO. Codex general standard for contaminants and toxins in food and feed: CODEX STAN 193-1995[EB/OL]. (2011-09-21) [2021-10-10]. http://down.foodmate.net/standard/sort/11/3329.html.

[10] Commission of the European Communities. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs: (EC) No 1881/2006 [EB/OL]. (2007-01-08) [2021-10-10]. http://law.foodmate.net/show-169747.html.

[11] Commission of the European Communities. A mending regulation (EC) No 1881/2006 as regards the maximum level of ochratoxin A in *Capsicum* spp. spices[EB/OL]. (2015-08-03) [2021-10-10]. http://law.foodmate.net/show-186931.html

[12] FDA. Guidance for industry: Action levels for poisonous or deleterious substances in human food and animal feed[EB/OL]. (2000-07-31) [2021-10-10]. https://www.regulations.gov/document/FDA-2020-D-1956-0001

[13] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. GB 2761-2017 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2017. [National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, China Food and Drug Administration. GB 2761-2017 National food safety standard: Limits of mycotoxins in foods[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017.]

[14] 王彤颖, 陈媛媛, 高璇, 等. 中药材中黄曲霉毒素 B1 免疫学快速检测方法研究[J]. 现代医药卫生, 2017, 33(2): 177−179. [WANG Tongying, CHEN Yuanyuan, GAO Xuan, et al. Study on rapid immunological detection method for determining AFB1 in traditional Chinese medicines[J]. Journal of Modern Medicine & Health, 2017, 33(2): 177−179.]

[15] TANSAKUL N, JALA P, LAOPIEM S, et al. Co-occurrence of five *Fusarium* toxins in corn-dried distiller's grains with solubles in Thailand and comparison of ELISA and LC-MS/MS for fumonisin analysis[J]. Mycotoxin Research, 2013, 29(4): 255−260.

[16] 柯颖, 徐昕怡, 洪小栩. ELISA 法检测中药材及中药饮片真菌毒素的探讨[J]. 中国合理用药探索, 2020, 17(4): 17−21. [KE Ying, XU Xinyi, HONG Xiaoxu. Discussion on the application of ELISA detection for mycotoxins in traditional Chinese medicine and Chinese herbal pieces[J]. Chinese Journal of Rational Drug Use,

2020, 17(4): 17−21.]
[17] TEIXEIRA T R, HOELTZ M, EINLOFT T C, et al. Determination of ochratoxin A in wine from the southern region of Brazi by thin layer chromatography with a charge-coupled detector[J]. Food Additives & Contaminants: Part B, 2011, 4(4): 289−293.
[18] ZHAO X, YUAN Y, ZHANG X, et al. Identification of ochratoxin A in Chinese spices using HPLC fluorescent detectors with immunoaffinity column cleanup[J]. Food Control, 2014, 46: 332−337.
[19] 刘柱, 陈万勤, 沈潇水, 等. 多功能柱净化-柱后光化学衍生-高效液相色谱法同时检测玉米和花生中 9 种真菌毒素[J]. 分析科学学报, 2014, 30(2): 168−172. [LIU Zhu, CHEN Wanqin, SHEN Xiaoshui, et al. Simultaneous determination of mycotoxins in corn and peanut samples by multifunctional column clean-up and high performance liquid chromatography coupled with post-column photochemical derivatization[J]. Journal of Analytical Science, 2014, 30(2): 168−172.]
[20] ZHANG Yingyue, PEI Fei, FANG Yong, et al. Comparison of concentration and health risks of 9 Fusarium mycotoxins in commercial whole wheat flour and refined wheat flour by multi-IAC-HPLC[J]. Food Chemistry, 2019, 275: 763−769.
[21] 邵亮亮, 应美蓉, 杜京霖, 等. 复合免疫亲和柱净化高效液相色谱法同时测定小麦中的 4 种真菌毒素[J]. 食品科技, 2021, 46(2): 328−334. [SHAO Liangliang, YING Meirong, DU Jinglin, et al. Simultaneous determination of four mycotoxins in wheat by high performance liquid chromatography with combination immunoaffinity column purification[J]. Food Science and Technology, 2021, 46(2): 328−334.]
[22] 张正炜, 成玮, 沈慧梅, 等. 小麦粉中脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)毒素的气相色谱法检测及毒素污染去除分析[J]. 农药科学与管理, 2018, 39(4): 44−50. [ZHANG Zhengwei, CHENG Wei, SHEN Huimei, et al. Determination of deoxynivalenol(DON) toxins in wheat flour by gas chromatography and analysis of toxin pollution removal[J]. Pesticide Science and Administration, 2018, 39(4): 44−50.]
[23] 林缨, 陈佳, 吴弼东, 等. 固相萃取-气相色谱-串联质谱法检测粮食作物中的 T-2 与 HT-2 毒素[J]. 军事医学, 2013, 37(5): 381−384. [LIN Ying, CHEN Jia, WU Bidong, et al. Determination of T-2 and HT-2 toxins in cereal grains by solid phase extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Military Medical Sciences, 2013, 37(5): 381−384.]
[24] 范妙璇, 董娇娇, 王京辉, 等. QuEChERS-超高效液相-三重四极杆串联质谱测定白芨根中 16 种真菌毒素[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(19): 3770−3775. [FAN Miaoxuan, DONG Jiaojiao, WANG Jinghui, et al. Simultaneous determination of sixteen mycotoxins contaminants in cogon rootstalk by QuEChERS-UPLC-QqQ mass spectrometry[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2017, 42(19): 3770−3775.]
[25] 王少敏, 杜春晓, 刘贤贤, 等. QuEChERS-超高效液相色谱串联质谱法同时测定三七中 26 种真菌毒素[J]. 世界中医药, 2019, 14(4): 798−804. [WANG Shaomin, DU Chunxiao, LIU Xianxian, et al. Simultaneous determination of 26 mycotoxins in *Notoginseng Radix* et *Rhizoma* by QuEChERS-ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. World Chinese Medicine, 2019, 14(4): 798−804.]
[26] JIANG D, WEI D, Wang L, et al. Multiwalled carbon nanotube for one-step cleanup of 21 mycotoxins in corn and wheat prior to ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis[J]. Toxins, 2018, 10(10): 409−425.
[27] YAN Pianpian, LIU Zhezhe, LIU Shiqiao, et al. Natural occurrence of deoxynivalenol and its acetylated derivatives in Chinese maize and wheat collected in 2017[J]. Toxins, 2020, 12(3): 200.
[28] RAUSCH A K, BROCKMEYER R, SCHWERDTLE T. Development and validation of a QuEChERS-based liquid chromatography tandem mass spectrometry multi-method for the determination of 38 native and modified mycotoxins in cereals[J]. Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68: 4657−4669.
[29] 胡佳哲, 吴凤丹, 陈俏, 等. 同位素标记-高效液相色谱-串联质谱法测定中药材中 8 种真菌毒素[J]. 中国卫生检验杂志, 2020, 30(5): 513−517. [HU Jiazhe, WU Fengdan, CHEN Qiao, et al. Determination of 8 mycotoxins in Chinese medical materials by isotope labeling-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2020, 30(5): 513−517.]
[30] WU Yu, YE Jin, XUAN Zhihong, et al. Development and validation of a rapid and efficient method for simultaneous determination of mycotoxins in coix seed using one-step extraction and UHPLC-HRMS[J]. Food Additives & Contaminants: Part A, 2021, 38(1): 148−159.
[31] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SN/T 4604-2016 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准 进出口中药材中真菌毒素的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2017. [General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. SN/T 4604-2016 Entry-exit inspection and quarantine industry standard of the People's Republic of China. Determination of mycotoxins in Chinese herbal medicine for import and export[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017.]
[32] 郑润生, 肖启衍, 邱薇, 等. 10 种中药材和 3 种食品污染赭曲霉毒素 A 的 LC-MS/MS 检测研究[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(2): 289−294. [ZHENG Runsheng, XIAO Qiyan, QIU Wei, et al. Determination of contaminant ochratoxin A in 10 traditional Chinese medicines and 3 food samples by LC-MS/MS[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2015, 35(2): 289−294.]
[33] 毛丹, 叶林链, 王少敏, 等. LC-MS/MS 法同时测定中药肉豆蔻中 12 种真菌毒素[J]. 中国药师, 2020, 23(7): 1311−1315. [MAO Dan, YE Linlian, WANG Shaomin, et al. Simultaneous determination of 12 mycotoxins in myristicae semen by LC-MS/MS [J]. China Pharmacist, 2020, 23(7): 1311−1315.]

郭丽, 胡晓俊, 胡文娇, 等. 金桂绿茶与金桂花的挥发性成分和香气特征比较 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 276−283. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080138

GUO Li, HU Xiaojun, HU Wenjiao, et al. Volatile Cmpounds and Aroma Characteristics of Jingui Green Tea and Jingui Flowers[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 276−283. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080138

· 分析检测 ·

金桂绿茶与金桂花的挥发性成分和香气特征比较

郭　丽[1], 胡晓俊[2], 胡文娇[2], 张　悦[1], 朱　荫[1], 戴伟东[1], 胡善树[2,*], 林　智[1,*]

（1.中国农业科学院茶叶研究所, 浙江杭州 310008;
2.三门绿毫茶叶专业合作社, 浙江三门 317103）

摘　要: 为探明金桂绿茶（JGT）与金桂花（JG）的香气化学特征差异，采用感官审评法和 GC-MS 法分析金桂花和丹桂花（DG）的香气品质及挥发性成分，再以金桂花窨制茶叶，开展金桂绿茶的香气品质化学研究（金桂花与原料绿茶为对照）。结果表明金桂花香气品质优于丹桂花，挥发性成分总量较丹桂花高 22.7%，较适于窨制桂花茶。金桂绿茶的清香、花香特征略逊金桂花，优于原料绿茶（GT）；窨制中吸附了金桂花的芳樟醇、α-衣兰烯、1,1,5-三甲基-6-亚丁烯基-4-环己烯、(Z)-吡喃型芳樟醇氧化物 1、α-紫罗酮、二氢-β-紫罗兰醇、γ-癸内酯和 4-羟基-β-紫罗酮等 8 个成分以及 3,4-二甲基苯胺、红没药烯环氧化物、异戊酸香叶酯、紫罗烯、二氢-β-紫罗兰酮和乙酸植醇酯等 6 个新成分，保留了原料绿茶的 10 个挥发性成分，但挥发性成分总量仍较金桂花低 60.4%。综合可见，金桂绿茶不仅保留了原料绿茶和金桂花的部分香气成分，还吸附了窨制过程中产生的新成分，故本研究结果可为花茶工艺优化及品质提升提供理论参考。

关键词: 桂花, 金桂, 丹桂, 绿茶, 金桂绿茶, 挥发性成分

中图分类号: TS272.5　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0276−08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080138

本文网刊:

Volatile Cmpounds and Aroma Characteristics of Jingui Green Tea and Jingui Flowers

GUO Li[1], HU Xiaojun[2], HU Wenjiao[2], ZHANG Yue[1], ZHU Yin[1], DAI Weidong[1], HU Shanshu[2,*], LIN Zhi[1,*]

（1.Tea Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310008, China;
2.Sanmen Lyuhao Tea Specialized Cooperatives, Sanmen 317103, China）

Abstract: To investigate the differences of aroma characteristics between Jingui green tea (JGT) and Jingui flowers, Jingui (JG) and Dangui (DG) flowers were analyzed the aroma quality and volatile compounds by the method of sense evaluation and GC-MS, respectively. JG flowers were selected to scent green tea and the aroma quality and chemical characteristics of Jingui green tea were further researched. The results showed that JG showed a more excellent aroma quality than that of DG, and its total content of volatile components was 22.7% higher than DG, so JG flowers was used to make flower tea and acted as a control like green tea (GT). Comparing the aroma characteristics of JGT, JG and GT, the fragrance and floral characteristics of JGT were slightly inferior to those of JG and higher than that of GT. JGT absorbed 8 ingredients such as linalool, α-ylangene, megastigma-4,6(E),8(E)-triene, cis-pyranoid linalool oxide 1, α-ionone, 2,6,6-tetramethyl-1-cyclohexene-1-propanol, γ-decalactone and 4-hydroxy-β-ionone from JG and 6 new components such as 3,4-dimethylaniline, trans-Z-α-bisabolene epoxide, geranyl isovalerate, 1,2,3,4-tetrahydro-1,1,6-trimethyl-naphthalene, dihydro-beta-ionone and phytol

收稿日期: 2021−08−12

基金项目: 中国农业科学院科技创新工程（CAAS-ASTIP-2014-TRICAAS）; 国家茶叶产业技术体系（CARS-19）。

作者简介: 郭丽（1981−）, 女, 博士, 高级农艺师, 研究方向: 茶叶加工与质量控制, E-mail: guoli@tricaas.com。

*** 通信作者:** 胡善树（1956−）, 男, 高级技师, 研究方向: 茶叶加工技术, E-mail: 390582395@qq.com。

林智（1965−）, 男, 博士, 研究员, 研究方向: 茶叶加工与品质化学, E-mail: Linz@tricaas.com。

acetate formed during green tea scenting, and kept 10 common volatile components with green tea (control), but its volatile components was still 60.4% lower than that of JG. In summary, JGT obtained the parts of aroma components from JG and GT, and formed its unique components by scenting technology, so it was beneficial for technology optimization and quality improvement of flower tea.

Key words: *Osmanthus fragrans*; Jingui; Dangui; green tea; Jingui green tea; volatile compound

花茶又称熏花茶、香花茶、香片等，属再加工茶类，由毛茶加工的茶坯与茶用香花的鲜花拼和窨制而成。目前，我国花茶产销量较大的品类主要有茉莉花茶、桂花茶等。桂花茶产量虽不及茉莉花茶，但作为花源的桂花树是常见的绿化植物，具有一定的绿化、美化、香化作用[1]，遍植中国多个省市，为加工桂花茶提供了充足的、价廉的鲜花来源。

桂花的香气质量受桂花品种、花期、生长环境等多种因素的影响明显。研究表明不同品种桂花的香气成分构成存在较大差异[2−4]，主要表现在呈香组分的构成及配比上。β-紫罗酮、顺式-呋喃型芳樟醇氧化物、反式-呋喃型芳樟醇氧化物及芳樟醇为桂花共有组分，(E)-2-己烯醛、(Z)-3-己烯醇、己醛等仅在个别品种中的含量较高[5]。即便是同一品种，桂花所处花期不同，释放香气成分的能力也大不相同[6]。桂花香气化合物的释放与积累，与遗传因素有关[7]，也受生长环境的影响[3]。这些因素影响桂花开花吐香，进而影响其在茶叶上的附香效果，产生不同层次的桂花香。研究发现，1-辛烯-3-醇、正戊酸叶醇酯、丁酸苯乙酯等易吸附在红茶，使红茶附上桂花香[8]，但绿茶与红茶吸附香气成分的能力有一定的差异[9]，其吸附的香气化合物尚不明确。

目前，市场上桂花窨制而成的花茶产品以桂花绿茶、桂花红茶、桂花乌龙等较为常见[10]，香气质量颇佳。然而，并非所有桂花都能窨制出高品质的花茶，制茶师往往选择金桂花作为花源，其中缘由至今尚未明晰。同时，桂花茶的相关研究取得一定的进展，可桂花茶与所用桂花的挥发性成分差异化合物仍未查明。因此，本研究选择种植较广泛的金桂和丹桂树种作为研究对象，比较金桂与丹桂鲜花的挥发性组分差异，查明金桂花在呈香组分上的独特性；再用其窨制绿茶，分析金桂绿茶和金桂花的香气化学特征及二者的差异化合物，探明窨制工艺对桂花茶香气特征的促成作用，旨在为花茶加工工艺的优化及新产品的研发提供技术参考。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

桂花　于 2020 年 9 月 30 日采摘盛花期的金桂花和丹桂花并剔除杂物（浙江三门）；原料绿茶（2020 年 4 月）　由一芽一二叶标准鲜叶按绿茶工艺制成（浙江三门）；癸酸乙酯（色谱纯）、无水硫酸钠（分析纯）　上海源叶生物科技有限公司；二氯甲烷、乙醇（色谱纯）　上海麦克林生化科技有限公司。

5810R 离心机　Thermo 公司；FD5-10 冷冻干燥机　GOLD-SIM 公司；MTH-100 恒温混匀仪、NDK200-2N 氮吹仪　杭州米欧仪器有限公司；8890A 气相色谱仪、5977a 质谱仪　Agilent 公司；6CHX 提香机　福建佳友茶叶机械智能科技股份有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　桂花干制　新鲜的金桂花和丹桂花朵采用真空冷冻干燥方式固样，干燥至恒重后分别记作金桂花和丹桂花。

1.2.2　金桂绿茶的加工　金桂绿茶的加工工艺流程如图 1 所示。原料绿茶复焙后，冷却至室温，再与鲜金桂花拌和窨制（单窨法）。窨制 4 h 后进行通花 5 min，续窨 4 h。将桂花与茶叶分离后，再将窨制好的茶样真空冻干，即得金桂绿茶。

1.2.3　香气品质评价　桂花采用 GH/T 1117—2015（桂花茶）方法进行感官品质分析，绿茶和金桂绿茶由 5 名高级评茶员采用 GB/T 23776—2018 方法（茶叶感官审评法）进行感官品质分析，香气因子总分均为 100 分。

1.2.4　挥发性成分测定　挥发性成分的制备：参照文献 [11] 的方法并进行改良。将 0.3 g 磨碎茶样放于具塞玻璃离心管，加入 8 mL 二氯甲烷和 10 μL 的 4.25 μg/mL 癸酸乙酯（内标）、混匀，避光振荡提取

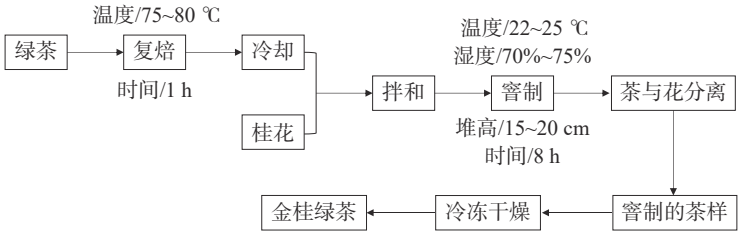


图 1　金桂绿茶的工艺流程

Fig.1　Process flow of Jingui green tea

14 h(转速为 300 r/min)。再加入 0.8 g 无水硫酸钠,涡旋混匀;在 1200×g 下离心 15 min,取上清液到另一个离心管,氮气吹干浓缩至 800 μL,经 0.22 μm 针式过滤膜后进气相色谱-质谱联用仪分析。每个样品设 3 次重复。

气相色谱-质谱的分析条件:色谱柱为 DB-5(30 m×0.25 mm×0.25 μm),不分流进样,进样量为 1 μL,进样口温度 280 ℃,载气 N_2(纯度>99.999%)的流速为 1 mL/min。柱温箱升温程序:初始温度 50 ℃,保持 5 min;以 3 ℃/min 速率升至 210 ℃ 并保持 3 min;最后以 15 ℃/min 速率升至 330 ℃,保持 5 min。溶剂延迟 5 min,离子源温度 260 ℃,扫描范围为 40~500 m/z。

1.2.5 茶样中挥发性成分的 OAV 分析 OAV 是指挥发性成分在茶样中含量与其阈值的比。OAV=茶样中挥发性化合物的浓度(Ci)/挥发性化合物在乙醇溶液中的嗅觉阈值(Oi),其中,Ci 和 Oi 的单位为 μg/g。

1.3 数据处理

茶样挥发性成分的定性分析依据 NIST14 数据库和相关文献,定量分析采用内标法即以内标癸酸乙酯的添加量来计算茶样中挥发性成分的含量。每个样品数据表示为均值±偏差,运用 IBM SPSS 20.0 进行 T-test 测验,比较两种桂花挥发性成分的差异。

2 结果与分析

2.1 金桂花与丹桂花的香气质量及挥发性成分比较

两种供试桂花的香气评分均在 90 分以上,说明二者的香气质量较佳(表 1),但他们的香气特征存在明显差异。金桂花的香气偏清香、持久性较佳,丹桂花的香气偏甜、花香显,因而二者得分相近。

表 1 金桂花和丹桂花的香气感官品质

Table 1 Aroma sensory quality of Jingui and Dangui flowers

茶样	香气评语	香气评分
金桂花	清甜、浓而长	92.3±0.3
丹桂花	甜香、浓郁	91.5±0.2

金桂花与丹桂花的挥发性组分构成及含量差异较为明显(表 2 和表 3),醇类化合物含量最高,其次是酸类化合物,较低的是醛类和烃类化合物。金桂花中检出 40 个挥发性成分,比丹桂花多了 11 个。金桂花中醇类化合物种类较丹桂花多 9 个,占比也较大,达到 59.8%;酮类化合物有 5 个,比含氮类化合物多 4 个,但酮类、含氮类化合物占比与丹桂花相同;酯类化合物的种类及占比胜于丹桂花,且占比(7.5%)超出酮类化合物(占比为 6.9%);烃类化合物仅 2 个,占比最小,仅为 0.8%。T-test 分析表明,醇类、酮类、酯类、醛类、烃类和含氮类化合物在两种桂花中的含量差异达到显著水平(P<0.05)。金桂花中醇类、酮类、酯类和含氮类化合物的含量分别比丹桂花高了 34.2%、22.2%、109.0% 和 22.9%,酸类、醛类、烃类化合物的含量均较丹桂花低,但金桂花的挥发性组分总量较丹桂花高了 22.7%。

目前,桂花各种群的鲜花均已在茶叶窨制上应用[8,12],生产上选择较多的是金桂花,这与桂花的香气化学基础有关[13−15]。金桂花的挥发性成分总量较丹

表 2 金桂花与丹桂花的挥发性成分

Table 2 Volatile components of Jingui and Dangui flowers

化合物中文名	化合物英文名	分子式	金桂花(μg/g)	丹桂花(μg/g)
(E)-呋喃型芳樟醇氧化物1	trans-Furanoid-linalool oxide 1	$C_{10}H_{18}O_2$	15.59±0.89	1.55±0.11
(E)-呋喃型芳樟醇氧化物2	trans-Furanoid-linalool oxide 2	$C_{10}H_{18}O_2$	31.19±1.44	5.65±0.39
芳樟醇	Linalool	$C_{10}H_{18}O$	9.41±0.33	3.15±0.05
2,3-蒎烷二醇	2,3-Pinanediol	$C_{10}H_{18}O_2$	ND	3.22±0.06
(Z)-呋喃型芳樟醇氧化物1	cis-Furan linalool oxide1	$C_{10}H_{18}O_2$	6.40±0.33	0.76±0.04
(Z)--呋喃型芳樟醇氧化物2	cis-Furan linalool oxide2	$C_{10}H_{18}O_2$	14.71±0.70	4.51±0.14
(E)-吡喃型芳樟醇氧化物1	trans-Pyranoid linalool oxide1	$C_{10}H_{18}O_2$	4.76±0.19	ND
(E)-吡喃型芳樟醇氧化物2	trans-Pyranoid linalool oxide2	$C_{10}H_{18}O_2$	5.39±0.23	ND
香叶醇	Geraniol	$C_{10}H_{18}O$	0.86±0.04	9.24±0.32
环芳樟醇氧化物1	Epoxy-linalooloxide 1	$C_{10}H_{18}O_3$	1.30±0.09	ND
环芳樟醇氧化物2	Epoxy-linalooloxide 2	$C_{10}H_{18}O_3$	2.59±0.15	ND
紫丁香醇A	Lilac alcohol A	$C_{10}H_{18}O_2$	0.91±0.06	0.91±0.03
紫丁香醇B	Lilac alcohol B	$C_{10}H_{18}O_2$	1.03±0.05	2.06±1.01
2,6-二甲基-2,7-辛二烯-1,6-二醇	2,7-Octadiene-1,6-diol, 2,6-dimethyl-	$C_{10}H_{18}O_2$	1.50±0.30	2.65±0.18
对甲氧基苯乙醇	2-(4-Methoxyphenyl)ethanol	$C_9H_{12}O_2$	33.05±5.06	ND
(Z)-吡喃型芳樟醇氧化物1	cis- Pyranoid linalool oxide 1	$C_{10}H_{18}O_2$	266.25±14.57	241.29±9.67
(Z)-吡喃型芳樟醇氧化物2	cis- Pyranoid linalool oxide 2	$C_{10}H_{18}O_2$	134.70±6.24	125.65±5.18
对羟基苯乙醇	Benzeneethanol, 4-hydroxy-	$C_8H_{10}O_2$	1.60±0.12	8.17±0.03
二氢-β-紫罗兰醇	1-Cyclohexene-1-propanol,α,2,6,6-tetramethyl-	$C_{13}H_{24}O$	1.18±0.03	ND
紫丁香醇氧化物	lilac alcohol epoxide	$C_{10}H_{18}O_2$	12.53±1.21	ND
3-环氧-α-紫罗醇	3-Oxo-α-ionol	$C_{13}H_{18}O$	1.13±0.14	ND

续表 2

化合物中文名	化合物英文名	分子式	金桂花(μg/g)	丹桂花(μg/g)
3-羟基-5,6-环氧-β-紫罗兰醇	6-(3-Hydroxy-but-1-enyl)-1,5,5-trimethyl-7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-2-ol	$C_{13}H_{22}O_3$	1.09±0.05	ND
二氢-3-环氧-紫罗兰醇	Dihydro-3-oxo-β-ionol	$C_{13}H_{24}O$	1.52±0.45	ND
3,7-二甲基-2,6-辛二酸	2,6-Octadienoic acid, 3,7-dimethyl-, (E)-	$C_{10}H_{16}O_2$	ND	29.49±1.20
十六烷酸	n-Hexadecanoic acid	$C_{18}H_{32}O_2$	114.37±5.35	48.63±2.15
亚油酸	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	$C_{18}H_{32}O_2$	10.29±0.87	103.81±4.00
亚麻酸	9,12,15-Octadecatrienoic acid, (Z,Z,Z)-	$C_{18}H_{30}O_2$	34.80±2.67	1.21±0.04
十八烷酸	Octadecanoic acid	$C_{18}H_{36}O_2$	10.39±0.72	ND
α-紫罗酮	α-Ionone	$C_{13}H_{20}O$	4.34±0.29	ND
β-紫罗酮	β-Ionone	$C_{13}H_{20}O$	44.26±1.65	37.83±0.69
4-羟基-β-紫罗酮	4-Hydroxy-β-ionone	$C_{13}H_{20}O_2$	1.68±0.09	3.74±0.14
4-羟基-3,5,5-三甲基-4-(3-氧代-1-丁烯基)-2-环已烯-1-酮	2-Cyclohexen-1-one, 4-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-(3-oxo-1-butenyl)-	$C_{13}H_{18}O_3$	4.00±0.28	5.48±0.37
六氢金合欢烯酰丙酮	Hexahydrofarnesyl acetone	$C_{18}H_{36}O$	8.79±0.32	4.58±0.04
四氢猕猴桃内酯	Tetrahydroactinidiolide	$C_{11}H_{18}O_2$	ND	1.78±0.05
γ-癸内酯	γ-Decalactone	$C_{10}H_8O_2$	24.54±0.77	17.49±0.24
甲酸橙花醇酯	Formic acid, 3,7,11-trimethyl-1,6,10-dodecatrien-3-yl ester	$C_{16}H_{26}O_2$	6.74±0.40	ND
十六烷酸甲酯	Hexadecanoic acid, methyl ester	$C_{17}H_{34}O_2$	17.55±0.77	15.52±0.26
亚麻酸甲酯	9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z)-	$C_{19}H_{32}O_2$	2.05±0.31	ND
E-8-甲基-9-十四碳烯-1-醇乙酸酯	E-8-Methyl-9-tetradecen-1-ol acetate	$C_{16}H_{30}O_2$	18.10±1.18	ND
壬醛	Nonanal	$C_9H_{18}O$	12.07±0.47	12.96±0.01
β-环柠檬醛	β-Cyclocitral	$C_{10}H_{16}O$	ND	5.04±0.08
α-衣兰烯	α-ylangene	$C_{15}H_{24}$	2.85±0.09	0.56±0.07
紫罗烯	Naphthalene, 1,2,3,4-tetrahydro-1,1,6-trimethyl-	$C_{13}H_{18}$	ND	12.56±0.18
1,1,5-三甲基-6-亚丁烯基-4-环已烯	Megastigma-4,6(E),8(E)-triene	$C_{13}H_{20}$	4.68±1.10	ND
N-甲基吡咯烷酮	2-Pyrrolidinone, 1-methyl-	C_5H_9NO	48.07±1.87	39.10±1.04

注：ND表示未检测出；(Z)-呋喃型芳樟醇氧化物1和氧化物2为异构体(由于分析条件限制，不能进一步明确结构)，其他化合物也是如此。

表 3　桂花中挥发性组分的构成及占比

Table 3　The volatile composition and proportion of Guihua

化合物种类	金桂花			丹桂花			显著性
	种类(个)	占比(%)	含量(μg/g)	种类(个)	占比(%)	含量(μg/g)	
醇类	22	59.8	548.69±33.26	13	54.7	408.81±18.10	P<0.05
酸类	4	18.5	169.85±9.14	4	24.5	183.14±8.57	P>0.05
酮类	5	6.9	63.07±3.19	4	6.9	51.62±1.19	P<0.05
酯类	5	7.5	68.99±4.16	3	4.4	33.01±0.61	P<0.05
醛类	1	1.3	12.07±0.58	2	2.4	18.00±0.11	P<0.05
烃类	2	0.8	7.52±1.20	2	1.8	13.13±0.28	P<0.05
含氮类	1	5.2	48.07±2.29	1	5.2	39.10±1.27	P<0.05

注：P<0.05和P>0.05分别表示差异显著和不显著。

桂花高，与丹桂花共有 25 个挥发性成分；这些共有挥发性成分在金桂花和丹桂花中的占比分别达 89.3% 和 93.0%，且亚油酸、壬醛、(Z)-呋喃型芳樟醇氧化物 2、(E)-呋喃型芳樟醇氧化物 1、十六烷酸甲酯、γ-癸内酯、(E)-呋喃型芳樟醇氧化物 2、亚麻酸、β-紫罗酮、N-甲基吡咯烷酮、十六烷酸、(Z)-吡喃型芳樟醇氧化物 2、(Z)-吡喃型芳樟醇氧化物 1 等共有成分在金桂花中的含量高于 10 μg/g，而在丹桂花中(Z)-呋喃型芳樟醇氧化物 2、(E)-呋喃型芳樟醇氧化物 1、(E)-呋喃型芳樟醇氧化物 2 和亚麻酸等含量低于 10 μg/g。由此可见，金桂花在香气品质、挥发性成分种类及含量上优于丹桂花，具有较强的释香能力[16]，在窨制过程中更易使茶叶吸附花香，用来窨制茶叶更具优势。

2.2　金桂绿茶的香气特征成分

2.2.1　金桂绿茶的香气组分构成及含量　金桂花的花香与原料绿茶的茶香融合效果较好，金桂绿茶的香气感官评分在 90 分以上。分析金桂绿茶、金桂花、原料绿茶的挥发性成分，共检测到 58 个化合物，包括 26 个醇类、4 个酸类、6 个酮类、12 个酯类、2 个醛类、5 个烃类、2 个含氮类和 1 个酚类化物(表 4)。金桂绿茶与原料绿茶的挥发性组分构成相同(图 2a)，比金桂花多了酚类化合物；酯类、烃类、含氮类化合物种类较金桂花、原料绿茶多；金桂绿茶的挥发性成

表 4 不同茶样的挥发性成分含量

Table 4 Volatile compounds of different tea samples

化合物中文名	化合物英文名	分子式	金桂绿茶（μg/g）	原料绿茶（μg/g）	金桂花（μg/g）
(E)-呋喃型芳樟醇氧化物1	trans-Furanoid-linalool oxide 1	$C_{10}H_{18}O_2$	3.67±0.04	0.26±0.01	15.59±0.89
(E)-呋喃型芳樟醇氧化物2	trans-Furanoid-linalool oxide 2	$C_{10}H_{18}O_2$	5.88±0.05	0.28±0.00	31.19±1.44
芳樟醇	Linalool	$C_{10}H_{18}O$	1.51±0.02	ND	9.41±0.33
(Z)-呋喃型芳樟醇氧化物1	cis-Furan linalool oxide1	$C_{10}H_{18}O_2$	1.48±0.01	0.05±0.01	6.40±0.33
(Z)--呋喃型芳樟醇氧化物2	cis-Furan linalool oxide2	$C_{10}H_{18}O_2$	3.10±0.03	0.22±0.00	14.71±0.70
2,6-二甲基-3,7-辛二烯-2,6-二醇	3,7-Octadiene-2,6-diol, 2,6-dimethyl-	$C_{10}H_{18}O_2$	1.42±0.09	0.45±0.02	ND
(E)-吡喃型芳樟醇氧化物1	trans-Pyranoid linalool oxide1	$C_{10}H_{18}O_2$	ND	ND	4.76±0.19
(E)-吡喃型芳樟醇氧化物2	trans-Pyranoid linalool oxide2	$C_{10}H_{18}O_2$	ND	ND	5.39±0.23
香叶醇	Geraniol	$C_{10}H_{18}O$	0.42±0.09	0.29±0.03	0.86±0.04
环芳樟醇氧化物1	Epoxy-linalooloxide 1	$C_{10}H_{18}O_3$	ND	ND	1.30±0.09
环芳樟醇氧化物2	Epoxy-linalooloxide 2	$C_{10}H_{18}O_3$	ND	ND	2.59±0.15
紫丁香醇A	Lilac alcohol A	$C_{10}H_{18}O_2$	ND	ND	0.91±0.06
紫丁香醇B	Lilac alcohol B	$C_{10}H_{18}O_2$	ND	ND	1.03±0.05
2,6-二甲基-2,7-辛二烯-1,6-二醇	2,7-Octadiene-1,6-diol, 2,6-dimethyl-	$C_{10}H_{18}O_2$	ND	ND	1.50±0.30
对甲氧基苯乙醇	2-(4-Methoxyphenyl)ethanol	$C_9H_{12}O_2$	ND	ND	33.05±5.06
(Z)-吡喃型芳樟醇氧化物1	cis- Pyranoid linalool oxide 1	$C_{10}H_{18}O_2$	1.51±0.06		266.25±14.57
(Z)-吡喃型芳樟醇氧化物2	cis- Pyranoid linalool oxide 2	$C_{10}H_{18}O_2$	1.18±0.02	0.21±0.01	134.70±6.24
对羟基苯乙醇	Benzeneethanol, 4-hydroxy-	$C_8H_{10}O_2$	ND	ND	1.60±0.12
二氢-β-紫罗兰醇	1-Cyclohexene-1-propanol,α,2,6,6-tetramethyl-	$C_{13}H_{24}O$	0.81±0.08	ND	1.18±0.03
紫丁香醇氧化物	lilac alcohol epoxide	$C_{10}H_{18}O_2$	ND	0.52±0.03	12.53±1.21
3-环氧-α-紫罗醇	3-Oxo-α-ionol	$C_{13}H_{18}O$	ND	ND	1.13±0.14
3-羟基-5,6-环氧-β-紫罗兰醇	6-(3-Hydroxy-but-1-enyl)-1,5,5-trimethyl-7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-2-ol	$C_{13}H_{22}O_3$	2.14±0.01	3.34±0.02	1.09±0.05
二氢-3-环氧-紫罗兰醇	Dihydro-3-oxo-β-ionol	$C_{13}H_{24}O$	ND	ND	1.52±0.45
植醇	Phytol	$C_{20}H_{42}O_3$	188.69±3.66	139.87±0.90	ND
12-甲基-E,E-2,13-十八碳二烯-1-醇	12-Methyl-E,E-2,13-octadecadien-1-ol	$C_{19}H_{36}O$	0.41±0.06	0.40±0.03	ND
十六烷酸	n-Hexadecanoic acid	$C_{18}H_{32}O_2$	24.75±0.61	4.67±0.40	114.37±5.35
亚油酸	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	$C_{18}H_{32}O_2$	3.48±0.41	1.63±0.22	10.29±0.87
亚麻酸	9,12,15-Octadecatrienoic acid, (Z,Z,Z)-	$C_{18}H_{30}O_2$	10.13±0.89	0.52±0.05	34.80±2.67
十八烷酸	Octadecanoic acid	$C_{18}H_{36}O_2$	ND	ND	10.39±0.72
α-紫罗酮	α-Ionone	$C_{13}H_{20}O$	1.63±0.07	ND	4.34±0.29
二氢-β-紫罗兰酮	Dihydro-β-ionone	$C_{13}H_{22}O$	4.20±0.10	ND	ND
β-紫罗酮	β-Ionone	$C_{13}H_{20}O$	41.93±0.34	0.47±0.02	44.26±1.65
4-羟基-β-紫罗酮	4-Hydroxy-β-ionone	$C_{13}H_{20}O_2$	0.61±0.17	ND	1.68±0.09
4-羟基-3,5,5-三甲基-4-(3-氧代-1-丁烯基)-2-环已烯-1-酮	2-Cyclohexen-1-one, 4-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-(3-oxo-1-butenyl)-	$C_{13}H_{18}O_3$	0.44±0.14	0.22±0.02	4.00±0.28
六氢金合欢烯酰丙酮	Hexahydrofarnesyl acetone	$C_{18}H_{36}O$	ND	ND	8.79±0.32
2-乙基丁酸烯丙酯	Allyl 2-ethyl butyrate	$C_9H_{16}O_2$	ND	0.34±0.01	ND
异戊酸香叶酯	Geranyl isovalerate	$C_{15}H_{26}O_2$	0.22±0.08	ND	ND
γ-癸内酯	γ-Decalactone	$C_{10}H_8O_2$	0.97±0.19	ND	24.54±0.77
甲酸橙花醇酯	Formic acid, 3,7,11-trimethyl-1,6,10-dodecatrien-3-yl ester	$C_{16}H_{26}O_2$	ND	ND	6.74±0.40
二氢猕猴桃内酯	Dihydroactinidiolide	$C_{11}H_{16}O_2$	0.81±0.04	0.89±0.05	ND
磷酸二壬酯	Phosphoric acid, dinonyl ethyl ester	$C_{20}H_{43}O_4P$	1.53±0.01	2.09±0.08	ND
乙酸植基酯	Phytyl Acetate	$C_{22}H_{42}O_2$	6.65±0.06	ND	ND
Z-6-十四烯-1-醇乙酸酯	Z-6-Tetradecen-1-ol acetate	$C_{16}H_{30}O_2$	ND	1.32±0.08	ND
十六烷酸甲酯	Hexadecanoic acid, methyl ester	$C_{17}H_{34}O_2$	5.10±0.09	6.04±0.13	17.55±0.77
亚油酸甲酯	9,12-Octadecadienoic acid, methyl ester, (E,E)-	$C_{19}H_{33}O_2$	2.82±0.05	0.77±0.02	ND
亚麻酸甲酯	9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z)-	$C_{19}H_{32}O_2$	0.25±0.01	1.81±0.06	2.05±0.31
E-8-甲基-9-十四碳烯-1-醇乙酸酯	E-8-Methyl-9-tetradecen-1-ol acetate	$C_{16}H_{30}O_2$	ND	ND	18.10±1.18
壬醛	Nonanal	$C_9H_{18}O$	0.44±0.02	0.67±0.06	12.07±0.47
β-环柠檬醛	β-Cyclocitral	$C_{10}H_{16}O$	0.32±0.01	0.16±0.00	ND
红没药烯环氧化物	trans-Z-α-Bisabolene epoxide	$C_{15}H_{24}O$	0.27±0.07	ND	ND

续表 4

化合物中文名	化合物英文名	分子式	金桂绿茶（μg/g）	原料绿茶（μg/g）	金桂花（μg/g）
α-衣兰烯	α-ylangene	$C_{15}H_{24}$	0.24±0.07	ND	2.85±0.09
1,1,6-三甲基-1,2-二氢萘	Naphthalene, 1,2-dihydro-1,1,6-trimethyl-	$C_{13}H_{16}$	0.37±0.06	0.50±0.04	ND
紫罗烯	Naphthalene, 1,2,3,4-tetrahydro-1,1,6-trimethyl-	$C_{13}H_{18}$	1.07±0.18	ND	ND
1,1,5-三甲基-6-亚丁烯基-4-环己烯	Megastigma-4,6(E),8(E)-triene	$C_{13}H_{20}$	0.18±0.01	ND	4.68±1.10
3,4-二甲基-3-吡咯啉-2-酮	3,4-Dimethyl-3-pyrrolin-2-one	C_6H_9NO	1.67±0.04	1.20±0.02	ND
N-甲基吡咯烷酮	2-Pyrrolidinone, 1-methyl-	C_5H_9NO	0.32±0.03	13.96±0.64	48.07±1.87
3,4-二甲基苯胺	Benzenamine, 3,4-dimethyl-	$C_6H_{11}N$	3.41±0.19	ND	ND
丁羟基甲苯	Butylated Hydroxytoluene	$C_{15}H_{24}O$	12.62±0.23	3.31±0.08	ND

注：ND表示未检测出。

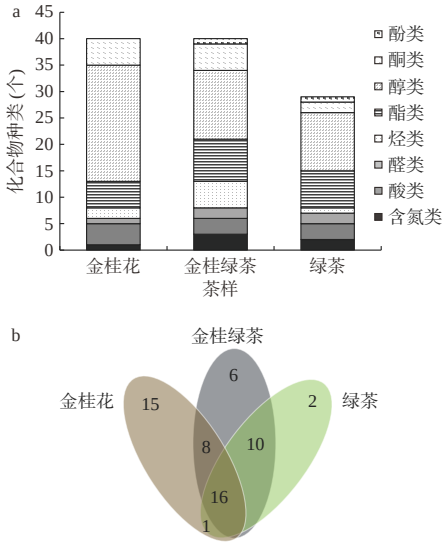


图 2　不同茶样中挥发性成分分布

Fig.2　The volatile distribution of different tea samples

分总量比金桂花低 60.4%，较原料绿茶高 74.6%。

金桂绿茶挥发性成分中植醇含量最高，其次是 β-紫罗酮和十六烷酸。这三种化合物分别由叶绿素、类胡萝卜素、脂肪酸衍生而成[16]，均是脂类代谢产物，在金桂绿茶中的含量明显高于原料绿茶，说明花茶工艺促进了脂类化合物的降解，但不同化合物对加工工艺的响应程度有差异[17]。十六烷酸，又名软脂酸、棕榈酸，在原料绿茶中含量远低于金桂花及金桂绿茶，因而推测，金桂绿茶的十六烷酸主要是通过窨制工艺从金桂花中获得的，但在茉莉花茶窨制过程样中未检到十六烷酸[18−19]，可能与挥发性提取方法有关。

由表 4 可知，金桂绿茶所含植醇、β-紫罗酮、十六烷酸、丁羟基甲苯、亚麻酸、乙酸植醇酯、(E)-呋喃型芳樟醇氧化物 2、十六烷酸甲酯等化合物的含量较高，而在原料绿茶中含量较高的挥发性成分却是植醇、N-甲基吡咯烷酮和十六烷酸甲酯，说明窨制工艺明显改变了原料绿茶挥发性成分的组成特征[20−22]，为其引入了金桂花挥发性成分，有助于金桂绿茶花香特征的形成。为更好地解析金桂绿茶的香气化学基础，将其挥发性成分划分为四个类型：类型Ⅰ：金桂绿茶及金桂花和原料绿茶中三者均有的成分；类型Ⅱ：金桂绿茶与金桂花两者的共有成分；类型Ⅲ：金桂绿茶与原料绿茶两者共有成分；类型Ⅳ：金桂绿茶中存在而金桂花和原料绿茶中均没有的成分，即窨制工艺产生的新成分。

2.2.2　金桂绿茶、金桂花与原料绿茶共有的挥发性成分　金桂绿茶、金桂花及原料绿茶共有的挥发性成分有 16 种（表 4 和图 2b），分别是 N-甲基吡咯烷酮、(E)-呋喃型芳樟醇氧化物 1、(E)-呋喃型芳樟醇氧化物 2、壬醛、(Z)-呋喃型芳樟醇氧化物 1、(Z)-呋喃型芳樟醇氧化物 2、香叶醇、(Z)-吡喃型芳樟醇氧化物 2、β-紫罗酮、3-羟基-5,6-环氧-β-紫罗兰醇、1-羟基-4-酮-2-紫罗兰酮、十六烷酸甲酯、十六烷酸、亚麻酸甲酯、亚油酸和亚麻酸。这 16 种化合物在金桂绿茶中的含量达 104.71 μg/g，较金桂花（264.42 μg/g）低了 60.4%，比原料绿茶（59.97 μg/g）高了 74.6%，说明金桂花通过吸附-解吸附作用将部分挥发性成分传于原料绿茶，有助于原料绿茶着上花香；N-甲基吡咯烷酮、(E)-呋喃型芳樟醇氧化物 2、(Z)-吡喃型芳樟醇氧化物 2、β-紫罗酮、十六烷酸、亚麻酸等的含量较高。但是，N-甲基吡咯烷酮、壬醛、3-羟基-5,6-环氧-β-紫罗兰醇和十六烷酸甲酯在金桂绿茶中的含量低于原料绿茶，且 N-甲基吡咯烷酮的下降幅度较大。由此可见，金桂绿茶、金桂花及原料绿茶共有挥发性成分的含量存在明显差异。

2.2.3　金桂绿茶与金桂花共有的挥发性成分　金桂绿茶与金桂花及原料绿茶共有的 16 种挥发性成分除外，其与金桂花存在 8 个共有挥发性成分（图 2b），分别是芳樟醇、α-衣兰烯、1,1,5-三甲基-6-亚丁烯基-4-环己烯、(Z)-吡喃型芳樟醇氧化物 1、α-紫罗酮、二氢-β-紫罗兰醇、γ-癸内酯和 4-羟基-β-紫罗酮（表 5）。茶类、花类及窨制工艺的不同，原料茶吸附的挥发性成分也有差异[27−28]。原料绿茶从金桂花上吸附的这些挥发性成分有别于原料红茶[8]，其含量占金桂绿茶挥发性成分总量的 2.0%；α-紫罗酮的含量较高，但远低于具有花香气息的 β-紫罗酮[16]；二氢-β-紫罗兰醇、γ-癸内酯和 4-羟基-β-紫罗酮也是类胡萝卜素的降解产物，但他们含量均低于 1 μg/g。芳樟醇、α-紫罗酮、γ-癸内酯的 OAV 值大于 1（表 5），为

表 5 原料绿茶窨制中吸附的呈香新成分

Table 5 New aroma compounds produced during green tea material

化合物名称	含量(μg/g)	阈值(μg/g)	OAV值	气味特征描述
芳樟醇	1.51	1.08	>1	花香、熏衣草香[23]
α-衣兰烯	0.24	NF	ND	清鲜花香
1,1,5-三甲基-6-亚丁烯基-4-环己烯	0.18	NF	ND	NF
(Z)-吡喃型芳樟醇氧化物1	1.51	50.80	<1	花香[23]
α-紫罗酮	1.63	0.11	>1	紫罗兰香[23]
二氢-β-紫罗兰醇	0.81	NF	ND	木香、花香
γ-癸内酯	0.97	0.08	>1	桃子香、脂香[24]
4-羟基-β-紫罗酮	0.61	NF	ND	果香[25]
3,4-二甲基苯胺	3.41	NF	ND	NF
红没药烯环氧化物	0.27	NF	ND	NF
异戊酸香叶酯	0.22	NF	ND	似苹果、香蕉的果香
紫罗烯	1.07	NF	ND	NF
二氢-β-紫罗兰酮	4.20	1.00	>1	木香、花香、果香[26]
乙酸植基酯	6.65	NF	ND	NF

注: NF、ND分别表示“未找到”和“未检出”。

金桂绿茶香气特征呈现的重要成分。

2.2.4 金桂绿茶与原料绿茶共有的挥发性成分 金桂绿茶与原料绿茶的共有挥发性成分有 10 个(图 2),其中,植醇、丁羟基甲苯、亚油酸甲酯等化合物的含量较高。植醇是茶样中含量最高的醇类化合物,在金桂绿茶中的含量达(188.69±3.66)μg/g,比原料绿茶的高 34.9%,说明窨制中叶绿素发生了降解反应[29]。丁羟基甲苯是茶样中检出的唯一挥发性酚类化合物,在金桂绿茶中的含量为 12.62 μg/g,比原料绿茶高 281.4%。亚油酸甲酯在金桂绿茶中的含量也高于原料绿茶,但其含量比十六烷酸甲酯低了 44.7%。

2.2.5 窨制工艺新生成的成分 与金桂花、原料绿茶对比发现,金桂绿茶中存在而原料中不存在的挥发性成分如 3,4-二甲基苯胺、红没药烯环氧化物、异戊酸香叶酯、紫罗烯、二氢-β-紫罗兰酮和乙酸植基酯等(表 5),说明金桂绿茶不是金桂花与原料绿茶的简单混和物[30]。这些新成分是窨制中形成的,占金桂绿茶挥发性成分总量的 4.2%。乙酸植基酯的含量较高,达到 6.65 μg/g,为叶绿素衍生物,说明原料绿茶窨制过程中叶绿素降解明显;二氢-β-紫罗兰酮为类胡萝卜素的降解产物,仅在金桂绿茶检出,含量低于乙酸植基酯,达到 4.20 μg/g,但尚不能确定其来源。异戊酸香叶酯、二氢-β-紫罗兰酮具有花香或果香特征,并且二氢-β-紫罗兰酮的 OAV 值大于 1,对金桂绿茶的香气特征呈现起支撑作用。

3 结论

金桂花在挥发性成分的含量与种类上比丹桂花更有优势,更适于用作花茶的香源。由金桂花窨制而成的金桂绿茶具有清香、花香等特征,挥发性成分的组成特征与金桂花、原料绿茶的差异明显。原料绿茶在窨制中吸附的 14 个新成分中异戊酸香叶酯、二氢-β-紫罗兰酮、芳樟醇、α-衣兰烯、(Z)-吡喃型芳樟醇氧化物 1、α-紫罗酮、二氢-β-紫罗兰醇、γ-癸内酯和 4-羟基-β-紫罗酮具有花香或果香特征,是金桂绿茶独特香气品质形成的重要物质基础。

参考文献

[1] 狄飞达, 张驰松, 郑亭, 等. 桂花功能性成分提取及加工应用进展[J]. 农产品加工, 2019, 491(21): 81−83. [DI Feida, ZHANG Chisong, ZHENG Ting, et al. Research progress on active ingredients and extraction technologies of *Osmanthus fragrans*[J]. Farm Products Processing, 2019, 491(21): 81−83.]

[2] CAI X, MAI R Z, ZOU J J, et al. Analysis of aroma-active compounds in three sweet osmanthus (*Osmanthus fragrans*) cultivars by GC-olfactometry and GC-MS[J]. Journal of Zhejiang University-Science B (Biomedicine and Biotechnology), 2014, 15(7): 638−648.

[3] FU J X, HOU D, ZHANG C, et al. The emission of the floral scent of four *Osmanthus fragrans* cultivars in response to different temperatures[J]. Molecules, 2017, 22(3): 430.

[4] 夏科, 蒋柏生, 赵志国, 等. 桂林地区不同桂花品种花香成分比较分析[J]. 广西植物, 2018, 38(11): 1493−1504. [XIA Ke, JIANG Baisheng, ZHAO Zhiguo, et al. Comparative analysis of aromatic components from different cultivars of *Osmanthus fragrans* in Guilin[J]. Guihaia, 2018, 38(11): 1493−1504.]

[5] XIN H P, WU B H, ZHANG H H, et al. Characterization of volatile compounds in flowers from four groups of sweet osmanthus (*Osmanthus fragrans*) cultivars[J]. Canadian Journal of Plant Science, 2013, 93: 923−931.

[6] 邹晶晶, 蔡璇, 曾祥玲, 等. 桂花不同品种开花过程中香气活性物质的变化[J]. 园艺学报, 2017, 44(8): 1517−1534. [ZOU Jingjing, CAI Xuan, ZENG Xiangling, et al. Changes of aroma-active compounds in different cultivars of *Osmanthus fragrans* during flowering[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2017, 44(8): 1517−1534.]

[7] ZENG X L, LIU C, ZHENG R R, et al. Emission and accumulation of monoterpene and the key terpene synthase (TPS) associated with monoterpene biosynthesis in *Osmanthus fragrans* Lour[J]. Frontier Plant Science, 2016, 6: 1232.

[8] 陈慧敏, 石知钢, 邸太妹, 等. 桂花红茶窨制技术及香气成分 HS-SPME/GC-O-MS 分析[J]. 现代食品科技, 2018, 34(11): 243−

254. ［CHEN Huimin, SHI Zhigang, DI Taimei, et al. The scenting technology and aroma analysis by HS-SPME/GC-O-MS for osmanthus black tea[J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(11): 243−254.］
［9］赵国飞. 茉莉红茶窨制工艺及其品质特性研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2016: 77−87. ［ZHAO Guofei. Research on the scenting technology and quality characteristic of jasmine black tea[D]. Chongqing: Southwest University, 2016: 77−87.］
［10］李双伶. 特种花茶窨制的花香吸附及技术优化研究 [D]. 成都: 四川农业大学, 2009: 13−20. ［LI Shuangling. The research on the aroma adsorption and technical optimization of characteristic scented tea[D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2009: 13−20.］
［11］CHEN S, LIU H H, ZHAO X M, et al. Non-targeted metabolomics analysis reveals dynamic changes of volatile and non-volatile metabolites during oolong tea manufacture[J]. Food Research International, 2020, 128: 108778.
［12］陈学林. 不同品种桂花鲜花与桂花花茶品质关系的研究[J]. 食品研究与开发, 2005, 26(5): 40−42. ［CHEN Xuelin. Study of the relationships between different kinds of sweet-scented osmanthus fresh flowers and osmanthus tea[J]. Food Research and Development, 2005, 26(5): 40−42.］
［13］金荷仙, 郑华, 金幼菊, 等. 杭州满陇桂雨公园 4 个桂花品种香气组分的研究[J]. 林业科学研究, 2006, 19(5): 612−615. ［JIN Hexian, ZHENG Hua, JIN Youju, et al. research on major volatile components of 4 osmanthus fragrance cultivars in Hangzhou Manlong Guiyu Park[J]. Forest Research, 2006, 19(5): 612−615.］
［14］施婷婷, 杨秀莲, 王良桂. 3 个桂花品种花香组分动态特征及花被片结构解剖学观测[J]. 南京林业大学学报 (自然科学版), 2020, 44(4): 12−20. ［SHI Tingting, YANG Xiulian, WANG Lianggui. Dynamic characteristics of floral components and anatomical observation of petals in three cultivars of *Osmanthus fragrans*[J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 2020, 44(4): 12−20.］
［15］蔡宙霏. 4 个桂花品种群释放 VOCs 成分及其光合特性的研究 [D]. 杭州: 浙江农林大学, 2017: 17−27. ［CAI Zhoufei. The research of volatile organic compounds release from four *Osmanthus fragrans* cultivar groups and photosynthetic characteristics [D]. Hangzhou: Zhejiang Agriculture and Forestry University, 2017: 17−27.］
［16］宛晓春. 茶叶生物化学 (第三版)[M]. 中国农业出版社. 2007: 289−290. ［WAN Xiaochun. Tea biochemistry (The third edition)[M]. China Agricultural Machinery Press, 2007: 289−290.］
［17］郭丽, 吕海鹏, 陈明杰, 等. 福建乌龙茶脂肪酸含量及差异性分析[J]. 茶叶科学, 2019, 39(5): 611−618. ［GUO Li, LYU Haipeng, CHEN Mingjie, et al. Analysis of fatty acid compositions and contents in oolong tea from Fujian Province[J]. Journal of Tea Science, 2019, 39(5): 611−618.］
［18］安会敏, 欧行畅, 熊一帆, 等. 茉莉花茶挥发性成分在窨制过程中的变化研究[J]. 茶叶通讯, 2020, 47(1): 67−74. ［AN Huimin, OU Xingchang, XIONG Yifan, et al. Study on the changes of volatile components in jasmine tea during the scenting process[J]. Journal of Tea Communication, 2020, 47(1): 67−74.］
［19］WANG S Y, ZHAO F, WU W X, et al. Comparison of volatiles in different jasmine tea grade samples using electronic nose and automatic thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry followed by multivariate statistical analysis[J]. Molecules, 2020, 25(2): 380.
［20］姚珊珊, 郭雯飞. 桂花龙井茶和柚子花茶的香气成分[J]. 茶叶, 2005, 31(4): 228−232. ［YAO Shanshan, GUO Wenfei. Volatiles in osmanthus scented longjing tea and citrus flower scented green tea[J]. Journal of Tea, 2005, 31(4): 228−232.］
［21］马静. 茉莉花茶窨制过程香气及其它理化因子变化规律的研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2001: 21−24. ［MA Jing. Study on changes of aroma and other physical and chemical factors during scenting processes of jasmine tea[J]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Science, 2001: 21−24］
［22］安会敏, 欧行畅, 熊一帆, 等. 茉莉花茶特征香气成分研究[J]. 茶叶科学, 2020, 40(2): 225−237. ［AN Huimin, OU Xingchang, XIONG Yifan, et al. Study on the characteristic aroma components of jasmine tea[J]. Journal of Tea Science, 2020, 40(2): 225−237.］
［23］CHEN M J, GUO L, ZHOU H W, et al. Absolute quantitative volatile measurement from fresh tea leaves and the derived teas revealed contributions of postharvest synthesis of endogenous volatiles for the aroma quality of made teas[J]. Appl Sci, 2021, 11(2): 613.
［24］王玲, 尹克林. ‘达赛莱克特’草莓果实发育成熟过程中香气物质的变化及其特征成分的确定[J]. 果树学报, 2018, 35(4): 433−441. ［WANG Ling, YIN Kelin. Changes in aroma of ‘Darselect’ strawberry during development and characterization of the key aroma components[J]. Journal of Fruit Science, 2018, 35(4): 433−441.］
［25］XU X D, XU R, JIA Q, et al. Identification of dihydro-*β*-ionone as a key aroma compound in addition to C8 ketones and alcohols in *Volvariella volvacea* mushroom[J]. Food Chemistry, 2019, 293: 333−339.
［26］MORE G P, BHAT S V. Facile lipase catalysed syntheses of (S)-(+)-4-hydroxy-*β*-ionone and (S)-(+)-4-hydroxy-*β*-damascone: Chiral flavorants and synthons[J]. Tetrahedron Letters, 2013, 54(32): 4148−4149.
［27］卢健, 王东, 朱建杰, 等. 茉莉花茶隔离窨制中主要影响因子对挥发性组分的影响[J]. 中国食品学报, 2019, 19(1): 71−80. ［LU Jian, WANG Dong, ZHU Jianjie, et al. Effects of main factors on the volatile compounds of jasmine scented tea during the isolated scenting process[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(1): 71−80.］
［28］陆修闽, 刘用敏, 王镇民, 等. 茉莉花茶增湿窨制新工艺的效果[J]. 茶叶科学, 1993, 13(2): 69−74. ［LU Xiumin, LIU Yongmin, WANG Zhenmin, et al. A new scenting technology for jasmine tea[J]. Journal of Tea Science, 1993, 13(2): 69−74.］
［29］张伟, 王文欣. 蜡梅花茶窨制研究[J]. 信阳师范学院学报 (自然科学版), 2012, 25(3): 309−313. ［ZHANG Wei, WANG Wenxin. Study on chimonanthus tea scenting[J]. Journal of Xinyang Normal University (Natural Sciences Edition), 2012, 25(3): 309−313.］
［30］HU C D, LIANG Y Z, GUO F Q, et al. Determination of essential oil composition from *Osmanthus fragrans* tea by GC-MS combined with a chemometric resolution method[J]. Molecules, 2010, 15: 3683−3693.

刘国敏,覃维治,韦荣昌,等. 不同品种 (系) 马铃薯挥发性风味物质对比分析 [J]. 食品工业科技,2022,43(9):284−292. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080141

LIU Guomin, QIN Weizhi, WEI Rongchang, et al. Comparative Analysis of Volatile Flavor Compounds in Different Varieties (Lines) of Potatoes[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 284−292. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080141

· 分析检测 ·

不同品种 (系) 马铃薯挥发性风味物质对比分析

刘国敏[1],覃维治[1],韦荣昌[1],易若兰[1],廖玉娇[1],郑　虚[1],车江旅[2,*]

(1.广西壮族自治区农业科学院经济作物研究所,广西南宁 530007;
2.广西壮族自治区农业科学院,广西南宁 530007)

摘　要: 为探究不同品种（系）马铃薯挥发性风味物质，采用固相微萃取和气相色谱-质谱联用技术对蒸制 35 min 熟化的普通马铃薯品种（系）桂农薯 1 号、费乌瑞它、品系 25 号和 46 号以及特色品种桂彩薯 1 号 5 个马铃薯品种（系）进行挥发性风味物质萃取和分离鉴定，并利用相对气味活度值（ROAV）进行主成分分析，建立风味品质综合评价模型，结果表明：桂农薯 1 号和 46 号的检出物质种类最多，有 32 种，费乌瑞它 27 种，25 号 17 种，均表现为醛类物质种类最多，占总检出物比例也最高，桂彩薯 1 号检出物质有 21 种，其中，烃类物质种类最多，酯类物质占总检出物比例最高，醛类其次；46 号的关键性风味物质（ROAV≥1）种类最多，达 18 种，桂农薯 1 号和费乌瑞它有 14 种，桂彩薯 1 号和 25 号只有 6 种，5 个马铃薯品种（系）共同的关键性香气物质有 4 种，为正辛醛、壬醛、正癸醛、2-戊基呋喃；主成分分析结果表明，马铃薯评价体系可由两个主成分来表征，不同马铃薯品种风味品质综合排名由高到低依次为 46 号、桂农薯 1 号、费乌瑞它、桂彩薯 1 号和 25 号。综合分析认为，醛类物质是蒸马铃薯的主体风味物质，5 个马铃薯品种（系）中 46 号整体风味最佳。

关键词: 马铃薯,挥发性风味物质,主成分分析,相对气味活度值

中图分类号: TS215　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0284−09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080141

本文网刊:

Comparative Analysis of Volatile Flavor Compounds in Different Varieties (Lines) of Potatoes

LIU Guomin[1], QIN Weizhi[1], WEI Rongchang[1], YI Ruolan[1], LIAO Yujiao[1], ZHENG Xu[1], CHE Jianglü[2,*]

(1.Cash Crops Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China;
2.Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China)

Abstract: To explore the volatile flavor compounds in different varieties (lines) of potatoes, volatile flavor substances were extracted, separated and identified by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry in 5 potato varieties (lines) common potato varieties (lines) GuiNongshu No. 1, Favorita, strains 25 and 46, and characteristic variety GuiCaishu No. 1, which were steamed for 35 min and matured, and the relative odor activity value (ROAV) was used for principal component analysis to establish the comprehensive evaluation model of flavor quality. The results showed that: GuiNongshu No. 1 and 46 had the most types of detected substances, with 32 species, Favorita had 27 species, and strains 25 had 17 species, all showed the most types of aldehydes, accounting for the total proportion of detected substances was also the highest. There were 21 kinds of detected substances in GuiCaishu No. 1, among which hydrocarbon substances were the largest, ester substances accounted for the highest proportion of total detected substances, followed by aldehydes;

收稿日期: 2021−08−16

基金项目: 广西农业科学院基本科研业务专项（桂农科 2021JM66）;国家现代农业产业技术体系广西薯类创新团队建设专项资助项目 (nycytxgxcxtd-03-11-01);广西农业科学院基本科研业务专项稳定资助科研团队项目 (桂农科 2021YT059);广西桂平特色作物试验站（TS202131）。

作者简介: 刘国敏（1989−）,女,硕士,助理研究员,研究方向:马铃薯栽培与育种研究,E-mail: 1158593947@qq.com。

*** 通信作者:** 车江旅（1977−）,男,硕士,副研究员,研究方向:蔬菜新品种选育与栽培技术研究,E-mail: 327019989@qq.com。

The key flavor substance (ROA ≥ 1) of 46 was the most, up to 18 species, GuiNongshu No. 1 and Favorita had 14 species, GuiCaishu No. 1 and 25 had only 6 species, and the common key aroma substances to 5 potato varieties (lines) were four types, which were n-octanal, nonanal, n-decanal, and 2-pentylfuran; the principal component analysis results showed that the potato evaluation system could be characterized by two principal components, and the comprehensive ranking of flavor quality of different potato varieties from high to low was 46, GuiNongshu No. 1, Favorita, GuiCaishu No. 1 and 25. Comprehensive analysis shows that aldehydes are the main flavor substances of steamed potatoes, and 46 of the 5 potato varieties (lines) has the best overall flavor.

Key words: potato; volatile flavor compounds; principal component analysis; relative odor activity value

马铃薯又称土豆、洋芋，是一种菜粮两用的经济作物，2015 年被农业部列为继小麦、玉米、水稻之后的第四大主粮作物[1]，被誉为 21 世纪最有发展前景的经济作物之一[2]，也被称为地球未来的粮食[3]。孙君茂等[4] 研究认为，马铃薯与稻米、小麦、玉米的营养当量折算比为 2.5∶1，反映出马铃薯的整体营养价值和对人体营养素需求的满足程度均较高[5]。马铃薯富含膳食纤维、蛋白质、维生素等人体必需物质，还含有禾谷类粮食不具有的胡萝卜素和抗坏血酸，从营养角度来看，马铃薯可称为“十全十美的食物”[6]。目前，对马铃薯的研究仍集中在生产加工和营养品质方面，对马铃薯风味尤其是对蒸马铃薯风味的研究相对较少。目前，马铃薯中的挥发性风味物质共检出 300 多种[7]，烹饪方式、栽培条件、贮藏时间等均可对马铃薯风味产生影响[8]。另外，马铃薯的风味具有基因特异性，不同的栽培品种，风味会有变化[9−10]。而与欧美等国家不同，我国马铃薯现如今仍以鲜食为主[11]，风味品质是决定某个马铃薯品种能否持久被市场接受的主要因素之一[12]，分析研究马铃薯挥发性风味物质，对新品种的选育和推广具有重要意义，对推动广西马铃薯产业的可持续发展至关重要。

广西是典型的马铃薯南方冬作区，马铃薯产业已成为广西农业的支柱产业之一。马铃薯风味的研究对提升广西马铃薯市场竞争力至关重要。本研究以广西农业科学院经济作物研究所选育品种桂农薯 1 号和桂彩薯 1 号、品系 46 号和 25 号及我国主栽品种费乌瑞它为试验材料，利用固相微萃取和气相色谱质谱联用技术测定 5 个不同品种(系)蒸熟马铃薯泥的挥发性风味物质，并对其进行主成分分析，分析不同马铃薯栽培品种(系)的风味差异，为以后的马铃薯品质评价、品种选育提供理论参考。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

试验所用材料　均来自广西农业科学院经济作物研究所，供试的马铃薯品种(系)有 5 个，分别为桂农薯 1 号(黄皮黄肉)、桂彩薯 1 号(紫皮紫肉)、费乌瑞它(黄皮黄肉)、25 号(黄皮黄肉)、46 号(黄皮白肉)，供试材料均种植于广西农科院里建基地，田间管理按当地生产技术标准进行。

50/30 μm DVB/CAR/PDMS （57298-U） 萃取头、SPME 手动进样手柄　美国安捷伦科技有限公司；QP2010 Ultra GC-MS 仪器　日本岛津公司；DB-WAX 毛细管柱（30 m×250 μm, 0.25 μm）　美国 Agilent 公司；DK-S28 恒温水浴锅　上海精宏。

1.2　实验方法

1.2.1　样品制备　每个品种分别选取 2~3 个新鲜马铃薯(每个约 100 g)，用蒸锅隔水蒸 35 min。将熟化的马铃薯捣碎成泥状混合均匀，取 3 g 混合样放入 15 mL 萃取瓶中，密封待用。

1.2.2　固相微萃取和气相色谱仪分析　固相微萃取：Gerstel 全自动样品前处理平台；加热温度 80 ℃，平衡时间：20 min，吸附时间 60 min，解析时间 15 min。

气相色谱条件：TG-5SILMS 色谱柱（60 m×0.25 mm×0.25 μm）；载气为氦气，恒流模式：2.0 mL/min；进样口温度：270 ℃；进样方式为不分流进样。

柱箱升温程序：40 ℃ 保持 5 min，以 15 ℃/min 升到 280 ℃ 保持 5 min，以 15 ℃/min 升到 205 ℃ 保持 5 min。

质谱条件：电离方式为 EI，电子能量为 70 eV，离子源温度为 230 ℃，四级杆温度：150 ℃，辅助加热：280 ℃。质量扫描范围 29~550 m/z，阈值 150。

1.2.3　定性方法与相对含量计算方法　原始数据初步通过与 NIST 谱库进行匹配定性，每个峰使用软件自动确定的背景校正和分辨率，选择匹配度大于 80% 作为物质鉴定依据[13]。采用峰面积归一化法定量，确定各挥发成分在各不同马铃薯品种中的相对含量[14]。

1.2.4　ROAV 测定　利用 ROAV 定义对样品风味贡献最大的挥发性风味物质，即 $ROAV_{max}$=100，其他香气成分 ROAV 值计算公式为：

$$ROAV = \frac{C}{C_{max}} \times \frac{T_{max}}{T} \times 100$$

式中：T 为各挥发性风味物质相应的阈值，T_{max} 为贡献最大组分对应的阈值；C 为各挥发性风味物质的相对含量，C_{max} 为贡献最大组分的相对含量[15]。

1.2.5　挥发性风味物质主成分分析评价　对不同马铃薯品种(系)挥发性组分进行主成分分析，确定主体挥发性成分，并构建风味品质综合评价模型[16]，计算综合得分。

1.3 数据处理

用 Excel 2013 输入数据和制作图表，用 SPSS 20.0 进行主成分分析，制作主成分分析得分图及载荷图。

2 结果与分析

2.1 不同品种（系）马铃薯挥发性组分比较

不同品种(系)马铃薯挥发性风味物质相对含量和数量见表 1、表 2。经过检测分析，5 个马铃薯品种共检出 57 种挥发性风味物质，其中，醛类 23 种、醇类 9 种、酮类 5 种、酯类 6 种、烃类 11 种、呋喃类 1 种、酚类 2 种。不同品种(系)马铃薯挥发性风味物质数量和相对含量均有一定的差异，桂农薯 1 号共检出 32 种风味物质，桂彩薯 1 号 21 种、费乌瑞它 27 种、25 号 17 种、46 号 32 种。除桂彩薯 1 号之外，其他 4 个品种均表现为醛类物质种类最多，相对含量也最高，且阈值较低，对整体风味影响较大。桂彩薯 1 号表现为烃类物质种类最多，酯类物质相对含量最高，其中，烃类物质主要来源于脂肪酸烷氧自由基的均裂，阈值较高对整体风味影响较小；酯类物质主要来源于马铃薯泥中醇类和羧酸类化合物发生的酯化反应，使得蒸马铃薯具有独特的芳香气味。不同马铃薯品种(系)共有的挥发性风味物质有 8 种，分别是正辛醛、壬醛、正癸醛、2-乙基己醇、(1-羟基-2,4,4-三甲基-3-基)2-甲基丙酸酯、丙酸-2-甲基-3-羟基-2,4,4-三甲基戊酯、十四烷、2-戊基呋喃。

2.1.1 醛类物质分析 醛类物质是脂类降解的主要产物，不同品种(系)马铃薯中醛类物质对比分析发现，46 号马铃薯检出的醛类物质种类最多(21 种)，其次分别是桂农薯 1 号(17 种)、费乌瑞它(12 种)，桂彩薯 1 号和 25 号最少，均只有 5 种(表 2 所示)。从占总检出物的比例来看，费乌瑞它最高(71.44%)，其次分别是 46 号(69.66%)、桂农薯 1 号(69.36%)、25 号(55.73%)、桂彩薯 1 号(36.23%)。其中，正辛醛、壬醛和正葵醛是 5 种马铃薯品种(系)共同检出的醛类物质；桂农薯 1 号检出的醛类物质中正己醛、2-庚烯醛、壬醛相对含量较高；正己醛、2 庚烯醛具有青草香，主要来源于亚油酸的氧化和 Strecker 反应。壬醛有玫瑰柑橘香味，是油酸的氧化产物。桂彩薯 1 号中壬醛、3-甲硫基丙醛、苯乙醛相对含量较高。3-甲硫基丙醛有醇厚的酱香、红烧肉香味，主要来源于 Strecker 降解反应。苯乙醛有杏仁香，主要来源于脂质的降解。费乌瑞它中苯甲醛、正己醛、壬醛相对含量较高。25 号中壬醛、3-甲硫基丙醛、正辛醛相对含量较高。正辛醛有玫瑰和橙皮香味；46 号中正己醛、2-庚烯醛、正癸醛相对含量较高。

2.1.2 醇类物质分析 由表 1、2 不同品种(系)马铃薯中检出的醇类物质可以看出，桂农薯 1 号检出的醇类物质最多(6 种)，其次分别是 46 号(4 种)、费乌瑞它(3 种)，桂彩薯 1 号和 25 号最少，均只有 2 种。从占总检出物的比例可以看出，桂农薯 1 号最高(9.22%)，其次分别是 46 号(5.44%)、费乌瑞它(4.69%)、桂彩薯 1 号(4.07)和 25 号(2.23%)。其中，2-乙基己醇是 5 种马铃薯品种(系)共同检出的醇类物质。

2.1.3 酮类物质分析 由表 1、2 不同品种(系)马铃薯检出的酮类物质可以看出，桂农薯 1 号、25 号、46 号检出 1 种酮类化合物，桂彩薯 1 号、费乌瑞它检出 2 种酮类化合物。从占总检出物比例可以看出，桂彩薯 1 号最高(3.73%)，其次分别是费乌瑞它(2.68%)、25 号(2.65%)、桂农薯 1 号(2.13%)、46 号(0.59%)。5 种马铃薯品种(系)未检出共同的酮类物质。

2.1.4 呋喃类物质分析 由表 1、2 可以看出，不同品种(系)马铃薯均检出同一种呋喃类物质，2-戊基呋喃，占总检出物质的比例表现为 46 号最高(18.26%)，其次是桂农薯 1 号(10.93%)、费乌瑞它(3.06%)、桂彩薯 1 号(2.48%)、25 号(2.12%)。

2.1.5 酚类物质分析 从表 1、2 可以看出，桂农薯 1 号、费乌瑞它、46 号马铃薯品种(系)均未检出酚类物质，桂彩薯 1 号检出 1 种，占总检出物的 2.68%；25 号检出 1 种，占总检出物的 0.41%。

2.1.6 酯类物质分析 由表 1、2 不同品种(系)马铃薯检出的酯类物质可以看出，桂农薯 1 号、桂彩薯 1 号、费乌瑞它均检出 4 种酯类化合物，25 号马铃薯检出 3 种酯类化合物，46 号马铃薯检出 2 种酯类化合物。从占总检出物的比例可以看出，桂彩薯 1 号最高(40.71%)、其次是 25 号(23.35%)、费乌瑞它(10.89%)、桂农薯 1 号(5.56%)、46 号(1.93%)。(1-羟基-2,4,4-三甲基戊-3-基)2-甲基丙酸酯和丙酸-2-甲基-3-羟基-2,4,4-三甲基戊酯为 5 个马铃薯品种(系)共同检出的酯类化合物，且在 5 个马铃薯品种(系)所检出的酯类化合物中丙酸-2-甲基-3-羟基-2,4,4-三甲基戊酯的相对含量均最高，具体表现为桂彩薯 1 号(24.65%)>25 号(15.81%)>费乌瑞它(7.23%)>桂农薯 1 号(3.68%)>46 号(1.64%)。

2.1.7 烃类物质分析 由表 1、2 不同品种(系)马铃薯检出的烃类物质可以看出，桂彩薯 1 号检出的烃类化合物种类最多(6 种)，其次是费乌瑞它(5 种)、25 号(4 种)，桂农薯 1 号和 46 号最少，均只检出 3 种。从占总检出物的比例可以看出，25 号最高(13.52%)，其次分别是桂彩薯 1 号(10.78%)、费乌瑞它(7.81%)、46 号(4.13%)、桂农薯 1 号(2.81%)。其中，十四烷为 5 种马铃薯品种(系)共同检出物。

2.2 不同品种（系）马铃薯挥发性风味物质 ROAV 分析

不同品种(系)马铃薯检测出了多种挥发性风味物质，但是只有其中一部分对马铃薯的整体风味有贡献，剩下的部分物质对马铃薯整体风味的呈现只起到

表 1　不同品种(系)马铃薯挥发性风味物质相对含量

Table 1　Relative content of volatile flavor substances in different varieties (lines) of potatoes

种类	物质名称	品种				
		桂农薯1号(%)	桂彩薯1号(%)	费乌瑞它(%)	25号(%)	46号(%)
醛类	正己醛	42.33	—	19.51	—	26.21
	庚醛	0.90	—	1.09	—	0.58
	2-庚烯醛	7.78	—	2.00	—	10.39
	苯甲醛	0.09	—	24.55	—	0.32
	正辛醛	1.68	1.86	1.92	5.11	1.39
	反, 反-2,4-庚二烯醛	0.50	—	—	—	1.10
	壬醛	5.93	19.10	9.32	26.08	4.28
	反式-2-壬烯醛	0.33	—	0.32	—	—
	4-乙基苯甲醛	0.23	—	—	—	0.82
	正癸醛	5.37	2.31	3.45	2.97	6.09
	(E, E)-2,4-壬二烯醛	0.54	—	—	—	0.85
	反式-2-癸烯醛	0.14	—	—	—	0.20
	(E, E)-2,4-癸二烯醛	1.61	—	—	—	3.25
	十一醛	0.22	—	0.25	—	0.36
	2-十一烯醛	1.22	—	—	—	1.62
	十二醛	0.12	—	—	—	—
	2-十二烯醛	0.37	—	—	—	0.64
	3-甲硫基丙醛	—	7.34	6.93	18.69	0.79
	5-乙基-1-环戊烯-1-甲醛	—	—	—	—	3.08
	苯乙醛	—	5.62	—	2.88	0.81
	反-2-辛烯醛	—	—	1.10	—	5.74
	顺-6-壬烯醛	—	—	—	—	0.59
	2,4-癸二烯醛	—	—	0.47	—	0.55
醇类	3-甲硫基丙醇	1.30	—	—	—	—
	蘑菇醇	1.79	—	—	—	4.37
	2-乙基己醇	0.55	1.70	2.71	1.11	0.17
	反-2-辛烯醇	3.94	—	—	—	—
	正壬醇	0.32	—	—	—	—
	L-薄荷醇	1.32	—	—	—	0.14
	1-戊醇	—	—	—	—	0.76
	2-异丙基-5-甲基环己醇	—	2.37	1.33	1.12	—
	正辛醇	—	—	0.65	—	—
酮类	3-丁基环己酮	—	—	—	—	0.59
	胡薄荷酮	2.13	2.40	—	2.65	—
	(-)-薄荷酮	—	—	2.06	—	—
	异薄荷酮	—	—	0.62	—	—
	左旋薄荷酮	—	1.33	—	—	—
酯类	乙酸薄荷酯	0.26	—	0.53	—	—
	(1-羟基-2,4,4-三甲基戊-3-基)2-甲基丙酸酯	0.97	10.74	2.53	4.74	0.29
	丙酸-2-甲基-3-羟基-2,4,4-三甲基戊酯	3.68	24.65	7.23	15.81	1.64
	2,4,4-三甲基戊烷-1,3-二基双(2-甲基丙酸酯)	0.65	4.42	—	2.80	—
	1-[2-(异丁氧基)-1-甲基乙基]-2,2-二甲基丙基-2-甲基丙酸酯	—	—	0.60	—	—
	邻苯二甲酸二异丁酯	—	0.90	—	—	—
烃类	(1E)-1-亚乙基八氢-1H-茚	1.62	—	0.32	—	—
	十四烷	1.01	3.16	1.05	3.14	0.21
	正十九烷	0.18	—	0.53	—	—
	正十五烷	—	3.44	1.41	5.96	0.32
	巴伦西亚橘烯	—	—	—	1.58	—
	正十六烷	—	1.83	—	2.84	—
	反式角鲨烯	—	—	4.50	—	—
	4-甲基辛烷	—	0.38	—	—	—
	2,6,10-三甲基十四烷	—	0.67	—	—	—

续表 1

种类	物质名称	品种				
		桂农薯1号(%)	桂彩薯1号(%)	费乌瑞它(%)	25号(%)	46号(%)
	正二十烷	—	0.65	—	—	—
	4-乙基-3-壬烯-5-炔	—	—	—	—	3.60
呋喃	2-戊基呋喃	10.93	2.48	3.06	2.12	18.26
酚类	2,5-二叔丁基苯酚	—	—	—	0.41	—
	2, 6-二叔丁基-4-甲基苯酚	—	2.68	—	—	—

注: “—”代表未检出; 表2同。

表 2 不同品种(系)马铃薯挥发性风味物质成分种类及占总量的百分比

Table 2 Types and percentages of volatile flavor components in different varieties (lines) of potatoes

挥发性成分	桂农薯1号		桂彩薯1号		费乌瑞它		25号		46号	
	种类(种)	占比(%)	种类(种)	占比(%)	种类(种)	占比(%)	种类(种)	占比(%)	种类(种)	占比(%)
醛类	17	69.36	5	36.23	12	71.44	5	55.73	21	69.66
醇类	6	9.22	2	4.07	3	4.69	2	2.23	4	5.44
酮类	1	2.13	2	3.73	2	2.68	1	2.65	1	0.59
酯类	4	5.56	4	40.71	4	10.89	3	23.35	2	1.93
烃类	3	2.81	6	10.78	5	7.81	4	13.52	3	4.13
呋喃	1	10.93	1	2.48	1	3.06	1	2.12	1	18.26
酚类	—	—	1	2.68	—	—	1	0.41	—	—
合计	32	100	21	100	27	100	17	100	32	100

修饰和协同作用。挥发性风味物质对马铃薯风味特征的贡献由其相对含量和香气阈值决定, 香气阈值是一种气味最小可嗅值, 所以风味物质相对含量的高低并不能说明其对马铃薯风味的贡献大小[17]。因此, 本文结合各风味物质的阈值, 进行了 ROAV 分析。ROAV≥1 的物质对样品香气贡献较大, 为关键性香气化合物, 并且 ROAV 值越大的组分对样品总体风味的贡献也越大, 0.1≤ROAV<1 的物质对马铃薯泥香气有重要修饰作用, 一般认为 ROAV<0.1 的物质对样品风味贡献较小。本文中, 桂农薯 1 号、46 号中的正己醛含量最高, 对样品的香气贡献最大, 定义正己醛为 $ROAV_{max}$=100; 桂彩薯 1 号、25 号中壬醛含量最高, 对样品香气贡献最大, 定义壬醛为 $ROAV_{max}$=100; 费乌瑞它中苯甲醛含量最高, 对样品香气贡献最大, 定义苯甲醛为 $ROAV_{max}$=100。由表 3 可以看出, 桂农薯 1 号马铃薯泥检出物中, 有 14 种关键性香气物质, 桂彩薯 1 号有 6 种、费乌瑞它 14 种、25 号有 6 种、46 号有 18 种。其中, 正辛醛、壬醛、正癸醛、2-戊基呋喃阈值较低, 对 5 个马铃薯品种香气均有重要贡献(ROAV≥1), 是共有的关键性香气物质。正己醛、庚醛、2-庚烯醛对桂农薯 1 号、费乌瑞它、46 号整体风味影响较大, 使其具有独特的水果香气。反, 反-2, 4-庚二烯醛、(E, E)-2, 4-壬二烯醛、反式-2-癸烯醛、(E, E)-2, 4-癸二烯醛、2-十一烯醛、蘑菇醇阈值较低, 对桂农薯 1 号和 46 号整体风味影响较大, 使其风味特征与其他 3 个品种存在差异。苯甲醛、正辛醇是费乌瑞它特有的关键性香气物质, 赋予了其杏仁香和油脂香味, 对费乌瑞它风味特征的形成有重要贡献。3-甲硫基丙醛阈值较低, 相对含量较高, ROAV 值较大, 对桂彩薯 1 号、费乌瑞它、25 号、46 号香气有较大贡献, 是这 4 个品种共有的关键性香气物质。

2.3 主成分分析

2.3.1 不同品种(系)马铃薯挥发性风味物质主成分分析 为进一步研究挥发性风味物质对马铃薯风味的影响, 选取 22 种 ROAV≥0.1 对马铃薯风味有贡献的物质进行主成分分析, 提取出特征值大于 1 的 4 个主成分(表 4)。第 1 主成分贡献率为 58.619%, 第 2 主成分贡献率为 20.997%, 累计贡献率达到 79.616%, 可以解释原始数据的大部分信息, 因此只选择前两个主成分进行分析。前两个主成分得分图如图 1 所示, 不同品种马铃薯区分效果较好, 将得分图分为 4 个象限, 可以看出 25 号和桂彩薯 1 号均分布于第三象限, 有较好的聚集性, 说明这两个马铃薯品种风味特征相近, 其与费乌瑞它、桂农薯 1 号、46 号没有较好的聚集, 表明不同马铃薯品种风味特征存在一定的差异。各主成分载荷值代表主成分对该类物质反映程度, 可用于风味数据分析[32]。由表 5 和图 2 可以看出, 决定第 1 主成分的主要是 2-庚烯醛、正癸醛、2-十一烯醛、反式-2-癸烯醛、(E, E)-2,4-壬二烯醛、2-正戊基呋喃、壬醛、十一醛、反, 反-2,4-庚

表 4 主成分特征值及贡献率

Table 4 Principal component eigenvalues and contribution rate

主成分	特征值	贡献率(%)	累计贡献率(%)
1	12.896	58.619	58.619
2	4.619	20.997	79.616
3	3.431	15.594	95.210
4	1.054	4.790	100.000

表 3　不同品种(系)马铃薯挥发性风味物质的香气阈值及 ROAV 值

Table 3　Aroma threshold and ROAV value of volatile flavor compounds in different varieties (lines) of potatoes

物质名称	阈值(μg/kg)[18-24]	ROAV(相对气味活度值)					风味特征描述[25-31]
		桂农薯1号	桂彩薯1号	费乌瑞它	25号	46号	
正己醛	4.50	100.00	—	6181.03	—	100.00	呈苹果香
庚醛	3.00	3.19	—	517.99	—	3.32	呈水果香味
2-庚烯醛	13.00	6.36	—	219.33	—	13.72	呈青草香
苯甲醛	350.00	<0.01	—	100.00	—	0.02	有杏仁香味道
正辛醛	0.70	25.51	24.55	3910.38	27.96	34.09	有玫瑰和橙皮香味
反,反-2,4-庚二烯醛	0.10	53.15	—	—	—	188.87	脂肪、水果和香辛料香
壬醛	1.00	63.04	100.00	13287.15	100.00	73.49	有玫瑰、柑橘香味
反式-2-壬烯醛	0.08	43.85	—	5702.64	—	—	呈鸡和烤猪肉香
4-乙基苯甲醛	350.00	<0.01	—	—	—	0.04	甜杏仁味
正癸醛	1.00	57.08	21.34	4918.53	11.38	104.57	脂肪香
(E, E)-2,4-壬二烯醛	0.09	63.78	—	—	—	162.16	脂肪香、鸡汤香味
反式-2-癸烯醛	0.30	4.96	—	—	—	11.45	呈鸡和橙子香味
(E, E)-2,4-癸二烯醛	0.07	244.49	—	—	—	797.18	有鸡肉香
十一醛	5.00	0.47	—	71.28	—	1.24	有玫瑰香
2-十一烯醛	5.00	2.59	—	—	—	5.56	脂肪香
十二醛	2.00	0.64	—	—	—	—	脂肪香
3-甲硫基丙醛	0.20	—	339.11	49399.12	357.91	67.82	肉类香味
苯乙醛	4.00	—	12.98	—	2.76	3.48	有杏仁、樱桃香
反-2-辛烯醛	3.00	—	—	522.74	—	32.85	花香
2,4-癸二烯醛	0.07	—	—	9572.29	—	134.91	脂肪香
蘑菇醇	1.00	19.03	—	—	—	75.03	清新蘑菇味
2-乙基己醇	270000.00	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	甜味和淡淡的花香
正壬醇	50.00	0.07	—	—	—	—	玫瑰香
1-戊醇	4000.00	—	—	—	—	<0.01	
正辛醇	120.00	—	—	7.72	—	—	油脂香味、柑橘气息
正十六烷	300000.00	—	<0.01	—	<0.01	—	
正二十烷	2040.00	—	<0.01	—	—	—	
2-戊基呋喃	6.00	19.36	3.82	727.09	1.35	52.25	有豆香果香味

注：表中未列出的检出物质均为无法查到该物质阈值。

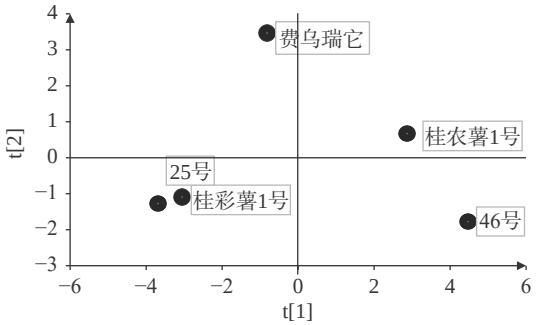


图 1　不同品种(系)马铃薯主成分分析得分图

Fig.1　Principal component analysis score chart in different varieties (lines) of potatoes

二烯醛、蘑菇醇；决定第 2 主成分的主要是正辛醇、苯甲醛。

2.3.2　挥发性风味物质综合评价模型的建立　根据 2 个主成分 22 类物质各自的特征向量，可以得到各个主成分的得分，分别用 F_1、F_2 表示，F 表示综合得分，得到马铃薯挥发性风味物质的线性关系式，分别为：

$$F_1=0.243X_1+0.175X_2+0.275X_3-0.023X_4-0.185X_5+0.253X_6-0.258X_7+0.082X_8+0.271X_9+0.262X_{10}+0.263X_{11}+0.124X_{12}+0.253X_{13}+0.264X_{14}+0.124X_{15}-0.238X_{16}-0.195X_{17}+0.195X_{18}+0.151X_{19}+0.250X_{20}-0.026X_{21}+0.262X_{22}$$

$$F_2=0.149X_1+0.361X_2-0.071X_3+0.419X_4-0.114X_5-0.180X_6-0.148X_7+0.405X_8-0.051X_9-0.156X_{10}-0.148X_{11}+0.081X_{12}+0.127X_{13}-0.141X_{14}+0.081X_{15}-0.067X_{16}-0.253X_{17}-0.138X_{18}+0.126X_{19}-0.185X_{20}+0.420X_{21}-0.151X_{22}$$

(X_1、X_2……X_{22} 为 22 种挥发性风味物质标准化之后的数值)

将 2 个主成分的贡献率作为加权系数，对主成分得分进行加权平均，建立综合评价模型：$F=0.586F_1+0.210F_2$。综合得分越高表明香气品质越好。根据不同主成分综合得分，不同品种(系)马铃薯香气品质从高到低综合排名依次为 46 号、桂农薯 1 号、费乌瑞它、桂彩薯 1 号、25 号(表 6)。

3　讨论与结论

不同品种(系)马铃薯检出物中，占总检出物比例

表 5 主成分载荷矩阵和特征向量

Table 5 Principal component loading matrix and eigenvector

主成分物质	主成分1		主成分2	
	载荷	特征向量	载荷	特征向量
正己醛	0.874	0.243	0.320	0.149
庚醛	0.627	0.175	0.777	0.361
2-庚烯醛	0.986	0.275	−0.152	−0.071
苯甲醛	−0.081	−0.023	0.901	0.419
正辛醛	−0.665	−0.185	−0.244	−0.114
反,反-2,4-庚二烯醛	0.909	0.253	−0.386	−0.180
壬醛	−0.926	−0.258	−0.317	−0.148
反式-2-壬烯醛	0.296	0.082	0.871	0.405
正癸醛	0.972	0.271	−0.110	−0.051
(E, E)-2,4-壬二烯醛	0.941	0.262	−0.336	−0.156
反式-2-癸烯醛	0.945	0.263	−0.317	−0.148
(E, E)-2,4-癸二烯醛	0.446	0.124	0.175	0.081
十一醛	0.910	0.253	0.274	0.127
2-十一烯醛	0.946	0.264	−0.302	−0.141
十二醛	0.446	0.124	0.175	0.081
3-甲硫基丙醛	−0.856	−0.238	−0.143	−0.067
苯乙醛	−0.700	−0.195	−0.544	−0.253
反-2-辛烯醛	0.700	0.195	−0.297	−0.138
2,4-癸二烯醛	0.542	0.151	0.272	0.126
蘑菇醇	0.896	0.250	−0.397	−0.185
正辛醇	−0.092	−0.026	0.903	0.420
2-正戊基呋喃	0.940	0.262	−0.325	−0.151

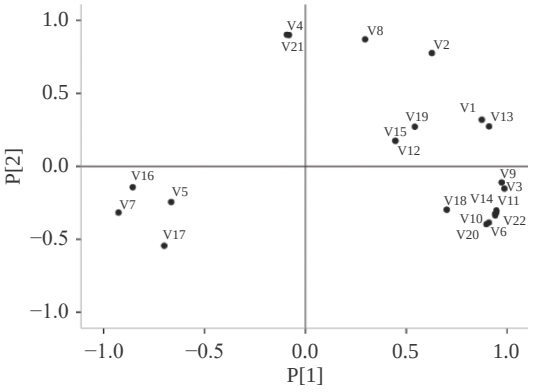


图 2 不同品种(系)马铃薯主成分分析载荷图

Fig.2 Principal component analysis load diagram in different varieties(lines)of potatoes

注: V1 为正己醛, V2 为庚醛, V3 为 2-庚烯醛, V4 苯甲醛, V5 为正辛醛, V6 为反, 反-2,4-庚二烯醛, V7 为壬醛, V8 为反式-2-壬烯醛, V9 为正癸醛, V10 为(E,E)-2,4-壬二烯醛, V11 为反式-2-癸烯醛, V12 为(E,E)-2,4-癸二烯醛, V13 为十一醛, V14 为 2-十一醛, V15 为十二醛, V16 为 3-甲硫基丙醛, V17 为苯乙醛, V18 为反-2-辛烯醛, V19 为 2,4-癸二烯醛, V20 为蘑菇醇, V21 正辛醇, V22 为 2-正戊基呋喃。

较高的物质分别是, 桂农薯 1 号中的正己醛(42.33%)、2-戊基呋喃(10.93%), 桂彩薯 1 号中的丙酸-2-甲基-3-羟基-2,4,4-三甲基戊酯(24.65%)、壬醛(19.1%), 费乌瑞它中的苯甲醛(24.55%)、正己醛(19.51%), 25 号中的壬醛(26.08%)、3-甲硫基丙醛(18.69%), 46 号中的正己醛(26.21%)、2-正戊基呋喃(18.26%), 说明醛类物质对马铃薯风味的呈现至关重要, 其中, 正己醛、壬醛、3-甲硫基丙醛占比较高且阈值相对较低, 对马铃薯香气贡献较大。Morris 等[33] 研究表明己醛与香味强度呈负相关, 但与特征风味呈正相关, 对蒸煮马铃薯芳香差异有重要作用。壬醛有强烈的脂肪气息, 稀释时具有橙子及玫瑰香韵[34]。甲硫基丙醛是马铃薯的特征风味物质[35], 在适度的稀释浓度下有马铃薯的香气[36]。2-戊基呋喃在桂农薯 1 号和 46 号中占比较高, 并且是 5 个品种(系)的共同检出物, 它的阈值相对较低, ROAV 值均大于 1, 是重要的关键性风味物质, 可使马铃薯呈现豆香、果香味, 对马铃薯整体风味有贡献作用。2-戊基呋喃是美拉德反应的产物, 龚兴旺等[37] 研究认为 2-戊基呋喃对蒸煮马铃薯风味有潜在的影响, 是蒸马铃薯的主要芳香物质。李凯峰等[38] 研究认为, 2-甲基呋喃有香草味, 与风味强度呈正相关, 是品种间主要的差异挥发性化合物。杨妍等[39] 研究认为呋喃类化合物可能是由马铃薯细胞中还原糖降解产生的, 对马铃薯香气形成起到不可忽视的作用。这与本研究结果相似。

表 6 标准化后主成分综合得分

Table 6 Principal component composite score after normalization

品种	得分			排序
	F_1	F_2	F	
桂农薯1号	2.864	0.673	1.820	2
桂彩薯1号	−3.062	−1.097	−2.025	4
费乌瑞它	−0.809	3.472	0.255	3
25号	−3.690	−1.274	−2.431	5
46号	4.477	−1.774	2.252	1

本文对 ROAV 值进行分析表明, 46 号马铃薯的关键风味物质(ROAV≥1)种类最多, 多达 18 种, 其次是桂农薯 1 号和费乌瑞它(14 种), 桂彩薯 1 号和 25 号均只有 6 种。5 个不同品种(系)的所有检出物中, 醛类物质相对阈值较低, 是蒸马铃薯的关键性香气物质, 对马铃薯总体风味贡献最大, 是马铃薯风味成分中最重要的一类化合物, 使马铃薯呈现脂肪香和果香味。

特色品种桂彩薯 1 号检出物中烃类物质种类最多(6 种), 酯类物质占比最大(40.71%), 其次是醛类物质(36.23%), 这与其他 4 个普通品种(系)明显不同, 有研究表明[40] 烃类、酯类物质对整体风味虽未起到决定性作用, 但有可能会对马铃薯的整体香气起到提升或降低的作用。王榛等[41] 认为, 酯类物质是最重要的香味物质, 由于其阈值较低, 能产生强烈的果香味。本文中, 除 46 号马铃薯之外, 其他 4 个品种(系)的检出物中酯类物质占比均较高, 所以酯类物质对马铃薯整体风味的影响也不可小觑, 具体作用机制有待进一步研究。Wang 等[42] 研究认为, 花青素和类胡萝卜素的分解物可能对蒸煮之后的马铃薯风味产生负

面影响。这可能也是本研究中富含花青素的桂彩薯 1 号风味表现一般的重要原因。

本文通过对 ROAV ≥ 0.1 的 22 种挥发性风味物质进行主成分分析，找出 2 个主成分代表了 79.616% 的样品信息，可以说明不同马铃薯品种(系)之间的差异，2 个主成分指向了 9 种醛类物质，2 种醇类物质，1 种呋喃类物质，风味品质从高到低综合排名依次为 46 号、桂农薯 1 号、费乌瑞它、桂彩薯 1 号、25 号。

结果表明，醛类物质是蒸马铃薯的主体风味物质，5 个马铃薯品种(系)中 46 号整体风味最佳。为新品种(系)的市场推广提供了技术支撑，为选育风味品质较佳的马铃薯新品种提供了理论基础。

参考文献

[1] AKYOL H, RICIPUTI Y, CAPANOGLU E, et al. Phenolic com-pounds in the potato and its byproducts: An overview[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(6): 835.

[2] 李靓. 6 个彩色马铃薯新品系的细胞学、重要性状及 SSR 遗传差异分析 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2021. [LI L. Cytology, important characteristics and SSR genetic difference analysis of 6 new colored potato strains[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2021.]

[3] 李明朝. 马铃薯主食产业化的南阳探索[J]. 农村. 农业. 农民 (B 版), 2017(4): 52−53. [LI M Z. Nanyang exploration of the industrialization of potato staple food[J]. Country Agriculture Farmers (B), 2017(4): 52−53.]

[4] 孙君茂, 徐海泉, 王小虎. 马铃薯与稻米、小麦、玉米营养当量折算研究[J]. 营养学报, 2016, 38(5): 448−450,455. [SUN J M, XU H Q, WANG X H. Study on the conversion of potato, rice, wheat and corn nutrition equivalent[J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2016, 38(5): 448−450,455.]

[5] 徐海泉, 卢世军, 周琳, 等. 以营养当量评价食物营养价值的方法学研究[J]. 营养学报, 2016, 38: 341−344. [XU H Q, LU S J, ZHOU L, et al. Methodological research on evaluating the nutritional value of food by nutritional equivalent[J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2016, 38: 341−344.]

[6] 唐金蕾. 外源绿原酸处理对鲜切马铃薯褐变抑制作用研究 [D]. 天津: 天津科技大学, 2020. [TANG J L. Study on the inhibitory effect of exogenous chlorogenic acid treatment on browning of fresh-cut potato[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2020.]

[7] JANSKY S H. Potato flavor[J]. American Journal of Potato Research, 2010, 87(2): 209−217.

[8] DUCKHAM S C, DODSON A T, BAKKER J, AMES J M. Effect of cultivar and storage time on the volatile flavor components of baked potato[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(20): 5640−5648.

[9] ORUNA-CONCHA M J, BAKKER J, AMES J M. Comparison of the volatile components of eight cultivars of potato after microwave baking[J]. LWT-Food Science and Technology, 2002, 35(1): 80−86.

[10] ORUNA-CONCHA M J, BAKKER J, AMES J M. Comparison of the volatile components of two cultivars of potato cooked by boiling, conventional baking and microwave baking[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2002, 82(9): 1080−1087.

[11] 王颖. 5 个马铃薯新品种的细胞学、主要性状及 SSR 分析 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2020. [WANG Y. Cytogenetics, main characteristics and SSR analysis of 5 new potato varieties[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2020.]

[12] 邹婷婷, 何天鹏, 宋焕禄, 等. 香气对饱腹感和味觉影响的研究进展[J]. 食品科学, 2017, 38(17): 306−311. [ZOU T T, HE T P, SONG H L, et al. Recent progress in the effect of aroma on satiety and taste[J]. Food Science, 2017, 38(17): 306−311.]

[13] HU W, ZHANG L, LI P, et al. Characterization of volatile components in four vegetable oils by headspace two-dimensional comprehensive chromatography time-of-flight mass spectrometry [J]. Talanta, 2014, 129: 629−635.

[14] 程超, 杜芬妮, 李伟, 等. 基于 9 种风味物质的利川红 SPME 优化及 PLS-DA 风味识别[J]. 食品科学, 2021, 42(6): 215−222. [CHENG C, DU F N, LI W, et al. Optimization of solid phase microextraction for GC-MS analysis of nine flavor compounds in Lichuanhong tea and flavor discrimination by partial least squares-discriminant analysis[J]. Food Science, 2021, 42(6): 215−222.]

[15] 刘登勇, 周光宏, 徐幸莲. 确定食品关键风味化合物的一种新方法：“ROAV”法[J]. 食品科学, 2008(7): 370−374. [LIU D Y, ZHOU G H, XU X L. “ROAV” method: A new method for determining key odor compounds of rugao ham[J]. Food Science, 2008(7): 370−374.]

[16] 马琦, 伯继芳, 冯莉, 等. GC-MS 结合电子鼻分析干燥方式对杏鲍菇挥发性风味成分的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(14): 276−282. [MA Q, BO J F, FENG L, et al. Effect of drying method on volatile components of *Pleurotus eryngii* analyzed by combined use of GC-MS and electronic nose[J]. Food Science, 2019, 40(14): 276−282.]

[17] 范晓文. 真菌联合细菌发酵改性豆渣风味及食用品质研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2021. [FAN X W. Study on flavor and edible quality of soybean dregs modified by fungus and bacteria fermentation[D]. Chongqing: Southwest University, 2021.]

[18] 孙宝国. 食用菌调香术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2003, 25−27. [SUN B G. Edible mushroom fragrance[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2003, 25−27.]

[19] 唐静, 张迎阳, 吴海舟, 等. 顶空吹扫捕集-气相色谱-质谱法分离鉴定强化高温火腿中的挥发性风味物质[J]. 食品科学, 2014, 35(8): 115−120. [TANG J, ZHANG Y Y, WU H Z, et al. Separation and identification of volatile flavors of high-temperature intensified ham by gas chromatography-mass spectrometry coupled with head space purge and trap[J]. Food Science, 2014, 35(8): 115−120.]

[20] (荷) 海默特 Gemert. 化合物香味阈值汇编 [M]. 北京: 科学出版社, 2015. [(Holland) Heimert Gemert. Compilation of compound fragrance threshold[M]. Beijing: Science Press, 2015.]

[21] 张文文, 吴玉森, 陈毓谨, 等. 3 种巨峰系葡萄的香气特征[J]. 上海交通大学学报 (农业科学版), 2018, 36(5): 51−59,66. [ZHANG W W, WU Y S, CHEN Y J, et al. Aroma characteristics of three kyoho grapevine series[J]. Journal of Shanghai Jiaotong

University (Agricultural Science), 2018, 36(5): 51−59,66.]
[22] 赵宁, 魏新元, 樊明涛, 等. SPME-GC-MS 结合电子鼻技术分析不同品种猕猴桃酒香气物质[J]. 食品科学, 2019, 40(22): 249−255. [ZHAO J, WEI X Y, FAN M T, et al. Analysis of volatile components of kiwifruit wines made from different cultivars using solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry combined with electronic nose[J]. Food Science, 2019, 40(22): 249−255.]
[23] 蒋彰. 黍米黄酒关键风味物质研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2021. [JIANG Z. Study on the key aroma compounds of millet wine[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021.]
[24] POLLNER G, SCHIEBERLE P. Characterization of the key odorantsin commercial cold-pressed oils from unpeeled and peeled rapeseeds by the sensomics approach[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(3): 627−636.
[25] 王玺, 闫晨苗, 李铁梅, 等. 马铃薯粉粒度对面包风味及品质的影响[J]. 食品工业, 2020, 41(12): 137−141. [WANG X, YAN C M, LI T M, et al. Effect of potato flour mesh size on the flavor and quality of bread[J]. The Food Industry, 2020, 41(12): 137−141.]
[26] CHEN Q, SONG J, BI J, et al. Characterization of volatile profile from ten different varieties of Chinese jujubes by HSSPME/GC-MS coupled with E-nose[J]. Food Research International, 2018, 105(3): 605−615.
[27] 黄欢. 超高压处理对鲜切马铃薯质地及风味品质的影响 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2020. [HUANG H. Effects of ultra-high pressure treatment on texture and flavor quality of fresh-cut potatoes[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2020.]
[28] LI H B, KANG X F, WANG S, et al. Early detection and monitoring for Aspergillus flavus contamination in maize kernels[J]. Food Control, 2021, 121: 107636.
[29] FENG T, YANG M Y, MA B W, et al. Volatile profiles of two genotype Agaricusbisporus species at different growth stages[J]. Food Research International, 2020, 140: 109761.
[30] 刘政海, 董志刚, 李晓梅, 等. 黄土高原地区干红葡萄酒香气组分分析[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(24): 204−209. [LIU Z H, DONG Z G, LI X M, et al. Aroma components of dry red wine brewed by different grape varieties in Loess Plateau[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(24): 204−209.]
[31] 张薇薇, 张秀玲. 基于主成分分析和聚类分析的苹果香气成分比较及品种分类研究[J]. 食品工业科技, 2018, 39(17): 217−224. [ZHANG W W, ZHANG X L. Comparative on apple aroma components and variety classification study based on principal component analysis and cluster analysis[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(17): 217−224.]
[32] 沈静, 杜若曦, 魏婷, 等. 干制方式对鲜食枣脆片香气品质的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(18): 131−137. [SHEN J, DU R X, WEI T, et al. Effect of drying methods on aroma components of jujube fruits (*Ziziphus jujube* mill. cv. dongzao)[J]. Food Science, 2017, 38(18): 131−137.]
[33] MORRIS W L, SHEPHERD HEPHERD T, VERRALL S R, et al. Rela-tionships between volatile and non-volatile metabolites and attributesof processed potato flavor[J]. Phytochemistry, 2010, 71(15): 1765−1773.
[34] 林翔云. 香料香精辞典 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2007. [LIN X Y. Fragrance and fragrance dictionary[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2007.]
[35] MUTTI B, GROSCH W. Potent odorants of boiled potatoes [J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2015, 43(5): 302−306.
[36] JOSEPHSON D B, LINDSAY R C. C4-heptenal: An influential volatile compound in boiled potato flavor[J]. Journal of Food Science, 2010, 52(2): 328−331.
[37] 龚兴旺, 肖继坪, 王婷婷, 等. 马铃薯芳香物质的初步研究 [J]. 西南农业学报, 2019, 32(3): 516−521. [GONG X W, XIAO J P, WANG T T, et al. Primary research on aroma compounds of potato[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2019, 32(3): 516−521.]
[38] 李凯峰, 尹玉和, 王琼, 等. 不同马铃薯品种挥发性风味成分及代谢产物相关性分析[J]. 中国农业科学, 2021, 54(4): 792−803. [LI K F, YIN Y H, WANG Q, et al. Correlation analysis of volatile flavor components and metabolites among potato varieties[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2021, 54(4): 792−803.]
[39] 杨妍, 马晓军, 王黎瑾. 马铃薯泥挥发性风味物质研究[J]. 食品科技, 2007(2): 100−105. [YANG Y, MA X J, WANG L J. Research on volatile compounds of potato puree[J]. Food Science and Technology, 2007(2): 100−105.]
[40] NURSTEN H E, SHEEN M R. Volatile flavor components of cooked potatoes[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2010, 25(6): 643−663.
[41] 王榛, 陈雷, 潘超, 等. 不同熟化方法对紫色马铃薯挥发性风味物质形成的影响[J]. 中国粮油学报, 2017, 32(6): 128−133. [WANG Z, CHEN L, PAN C, et al. The effect of different cooking methods on volatile compounds of purple potato[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2017, 32(6): 128−133.]
[42] WANG Yan, S J Kays. Contribution of volatile compounds to the characteristic aroma of baked 'Jewel' sweet potatoes[J]. Journal of the American Society for Horticultural Sience, 2000, 125(5): 638−643.

郭晶, 张佰良, 王嘉豪, 等. 广东省不同产地不同品种花生的营养成分研究 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 293−300. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080156
GUO Jing, ZHANG Bailiang, WANG Jiahao, et al. Study on Nutrient Components of Different Peanut Varieties in Different Producing Areas in Guangdong Province[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 293−300. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080156

· 分析检测 ·

广东省不同产地不同品种花生的营养成分研究

郭　晶[1], 张佰良[1], 王嘉豪[1], 黄锆铨[1], 曾晓房[1,2,3,4], 白卫东[1,2,3,4], 谢永平[5], 杨　娟[1,2,3,4,*]
（1.仲恺农业工程学院轻工食品学院, 广东广州 510225;
2.仲恺农业工程学院 广东省岭南特色食品科学与技术重点实验室, 广东广州 510225;
3.仲恺农业工程学院, 现代农业研究院, 广东广州 510225;
4.农业农村部岭南特色食品绿色加工与智能制造重点实验室, 广东广州 510225;
5.汕头市农业科学研究所, 广东汕头 515000）

摘　要: 本研究通过测定花生的营养成分，对广东省阳江、广州、湛江、韶关四个地区的汕油红 3 号、汕油红 4 号、湛油 75、汕油 121、汕油黑 620、汕油黑 1 号这六个不同品种进行分析比较。结果表明：花生米球度基本达到 50% 以上，水分 5% 以上，脂肪 40% 以上，总糖 5% 以上，蛋白质 20% 以上，矿物质 2% 以上；总不饱和脂肪酸含量达到 70% 以上，必需氨基酸达到 16% 以上。另外，同品种花生在不同地区种植后得到的营养物质占比存在一定的差异，如汕油 121 在广州得到最高占比的脂肪含量达 55.64%，而在阳江、湛江、韶关等含量为 52.18%、44.86%、49.81%。而同一地区不同品种也具有较大差异，如在阳江地区汕油红 4 脂肪含量最高达 54.35%，而汕油黑 1 最低仅为 49.95%。并对花生致敏蛋白含量进行分析得到，在广东四个不同地区，湛江地区湛油 75 的 Ara h3 致敏蛋白含量最多，阳江地区 Ara h2 致敏蛋白含量较少，其他无较大差异。不同地区不同品种营养成分研究为后续广东省花生研究提供了一定的依据。

关键词: 花生, 脂肪酸, 氨基酸, 致敏蛋白
中图分类号: TS210.1　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0293−08
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080156
本文网刊:

Study on Nutrient Components of Different Peanut Varieties in Different Producing Areas in Guangdong Province

GUO Jing[1], ZHANG Bailiang[1], WANG Jiahao[1], HUANG Gaoquan[1], ZENG Xiaofang[1,2,3,4], BAI Weidong[1,2,3,4], XIE Yongping[5], YANG Juan[1,2,3,4,*]
（1.College of Light Industry and Food Technology, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China;
2.Guangdong Provincial Key Laboratory of Lingnan Specialty Food Science and Technology, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China;
3.Academy of Contemporary Agricultural Engineering Innovations, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China;
4.Key Laboratory of Green Processing and Intelligent Manufacturing of Lingnan Specialty Food, Ministry of Agriculture, Guangzhou 510225, China;
5.Shantou Institute of Agricultural Sciences, Shantou 515000, China）

收稿日期: 2021−08−16
基金项目: 广东省农业农村厅项目（2020KJ136）; 国家自然科学基金, 青年基金（No. 31901814）; 基础研究计划基础与应用基础研究项目（202102020484）。
作者简介: 郭晶（1999−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品化学, E-mail: jing1265588276@qq.com。
*** 通信作者:** 杨娟（1989−）, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 小分子肽的滋味, E-mail: yangjuan-sky@163.com.cn。

Abstract: In this study, by measuring the nutrient components of peanuts, the results of six different varieties Shanyouhong 3, Shanyouhong 4, Zhanyou 75, Shanyou 121, Shanyouhei 620, Shanyouhei 1 were analyzed and compared. The results showed that the sphericity of peanuts basically reached more than 50%, the water content was more than 5%, the fat was more than 40%, the total sugar was more than 5%, the protein was more than 20%, and the mineral content was more than 2%; the content of total unsaturated fatty acid was more than 70%, the essential amino acids reached more than 16%. In addition, the proportion of nutrients obtained by the same variety of peanuts after planting in different regions was different. For example, the fat content of Shanyou 121 in Guangzhou was 55.64%, while that in Yangjiang, Zhanjiang and Shaoguan was 52.18%, 44.86% and 49.81%, respectively. However, different varieties in the same area also had great differences. For example, in Yangjiang area, the fat content of Shanyouhong 4 was the highest of 54.35%, while the lowest of Shanyouhei 1 was only 49.95%. The analysis of peanut allergenic protein content showed that in four different regions of Guangdong, Zhanyou 75 in Zhanjiang area had the most allergenic protein content of Ara h3, and the content of Ara h2 allergenic protein in Yangjiang area was less, and there was no significant difference in other areas. The research on the nutritional components of different varieties in different regions provides a certain basis for the follow-up research on peanuts in Guangdong Province.

Key words: peanut; fatty acid; amino acid; allergenic protein

花生(peanut),原名落花生(*Arachis hypogaea* Linn.),是中国产量丰富、食用广泛的一种坚果。花生作为重要的油料作物,种植地区广泛。其中,广东省不仅是花生种植大省,还是花生种植强省,广东省各市均有花生的种植,且不同地区种植的花生品种存在差异[1]。目前,国内对广东省不同地区的花生还未系统的比较分析,主要研究仍集中在花生生产育种及病虫防控方面。

花生一般营养成分主要包括蛋白质(约 27.6%)、脂肪(约 52.1%)、总碳水化合物(约 13.3%)和灰分(约 2.44%)等[2]。此外,花生油中含有的脂肪酸主要由酸、亚油酸等不饱和脂肪酸组成,其中,亚油酸是人体必需脂肪酸,对人体生理机能调节等有一定的作用[3]。花生蛋白含有人体必需氨基酸,并有一定的功能和滋味特性[4]。尽管花生营养价值极高,但同样存在着一些抗营养因子,花生中最主要的抗营养因子是能引起人体发生过敏反应的致敏蛋白[5−7]。花生中主要的致敏蛋白有 13 种,Ara h1、Ara h2 和 Ara h3 是致敏性最强的致敏蛋白,其中,Ara h1 占花生蛋白总量的 12%~16%[8−10],过敏反应非常强,不容易被破坏。Ara h2 占花生蛋白总量的 5.9%~9.3%[11],加热可以提高其抑制蛋白活性[12−14]。Ara h3 在适宜的离子强度下,被水解为酸性或者碱性片段后,仍然可以导致机体发生过敏反应。目前市面上的花生类商品数不胜数,但还未得到从田地种植到工业生产的一定联系。因此,为了合理的根据不同工业对花生品质及营养品质的要求,并结合花生致敏蛋白含量分析,综合比较广东省不同地区不同品种花生的品质,为工业发展作出种植选择。

因此,本研究的主要目的是对广东省不同地区的花生营养成分进行系统比较,通过测定广东省产量丰富的四个地区不同品种花生的营养指标。对不同地区以及不同品种的花生进行比较,为食品加工、目的化种植等方面的研究提供一定的依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

花生:产于广东省阳江、广州、湛江、韶关,主要品种见表 1,2020 年 9 月采收;甲醇、石油醚(60~90 ℃)、硫酸钾、硼酸、溴甲酚绿、三氯乙酸、苯、冰乙酸、无水乙醇、酚酞指示剂、0.1 mol/L 盐酸标准溶液、硫酸铜、亚甲蓝、酒石酸钾钠、过硫酸胺、Tris 碱、氢氧化钠、十二烷基磺酸钠、乙酸锌、冰乙酸、甘氨酸、亚铁氰化钾　分析纯,天津市永达化学试剂有限公司;四甲基乙二胺、丙烯酰胺 30%、Tris-HCl 缓冲液(pH7.4)、14.4~116 kDa 蛋白质分子量标准、2X 上样缓冲液、10% SDS、1.0 mol/L Tris-HCl 溶液(pH6.8)、1.5 mol/L Tris-HCl 溶液(pH8.8)、考马斯亮蓝　分析纯,上海碧云天生物技术有限公司。

FA2204B 型电子天平　上海精密科学仪器有限公司;PHS-3C pH 计　上海雷磁创益仪器仪表有限公司;K1100 自动凯氏定氮仪　海能仪器;007820 气相色谱仪、1260 高效液相色谱仪　安捷伦公司;TU-1901 紫外可见分光光度计　北京普析通用仪器有限责任公司;HN-S2 恒温水浴锅　常州国宇仪器制造有限公司;5810R 多功能台式离心机　德国艾本德公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品来源及处理方法　花生来源于广东省阳江、广州、湛江、韶关四个地区,主要处理方式分为两种类型,第一种是在物理性质测定时,按照实验方

表 1　花生名称及其简称

Table 1　Names of peanuts and their abbreviations

广州	简称	阳江	简称	湛江	简称	韶关	简称
汕油红3号	G3	汕油红3号	Y3	汕油红3号	Z3	汕油红3号	S3
汕油红4号	G4	汕油红4号	Y4	汕油红4号	Z4	汕油红4号	S4
湛油75	G75	湛油75	Y75	湛油75	Z75	湛油75	S75
汕油121	G121	汕油121	Y121	汕油121	Z121	汕油121	S121
汕油黑620	G620	汕油黑620	Y620	汕油黑620	Z620	汕油黑620	S620
汕油黑1号	G1	汕油黑1号	Y1	汕油黑1号	Z1	汕油黑1号	S1

法进行处理；第二种是在测定其他理化指标时，脱壳处理之后，再进行其他指标测定。

1.2.2　物理性质的测定　对花生荚果和花生仁进行三轴（长、宽、高）尺寸的测量，并计算米球度[15]。

$$Sq = (LWH)^{1/3}/L \times 100$$

式中：Sq 为花生米球度，%；L、W、H 分别为花生长度、宽度及厚度，mm。

1.2.3　基本营养指标测定　基本营养指标根据国标方法进行测定，其中，水分根据 GB/T 14489.1-2008 测定；油脂测定根据 GB 5009.6-2016 第一法索氏抽提法测定；总糖根据 GB 5009.8-2016 测定；蛋白质根据凯氏定氮法[16] 测定；灰分根据 GB 5009.4-2016 第一法食品中总灰分测定。

1.2.4　花生脂肪酸组成　脂肪酸的甲酯化：将花生低温干燥后，取 500 mg 左右研磨后放入 10 mL 具塞试管中，添加苯和石油醚溶液 2 mL 静置提取 15 min，加入 2 mL NaOH-CH_2ON（0.5 mol/L）溶液，摇匀，50 ℃ 下水浴 15 min，再加入蒸馏水沿墙做有机层上升到试管。取上清液 1 μL 做气相色谱仪分析[17]。气相色谱条件：进样口温度为 260 ℃；进样量为 1 μL；不分流进样；以氮气（99.999%）作为载气；流量为 10 mL/min；检测器温度为 250 ℃；柱箱的升温程序为：起始温度 60 ℃，保持 1 min，以 20 ℃/min 升至 160 ℃，保持 2 min，再以 4 ℃/min 升至 200 ℃ 并保持 10 min，最后以 2 ℃/min 升至 240 ℃ 并保持 10 min。

1.2.5　氨基酸测定　称取样品，按照袁贝等[18] 的方法进行前处理，10000 r/min 离心 10 min，用 0.22 μm 水系滤膜过滤。采用 Agilent 自动在线衍生的方法，用高效液相色谱仪分析[18]，以 pH8.2 10 mmol/L Na_2HPO_4 和 10 mmol/L $Na_2B_4O_7$ 溶液为流动相 A，以乙腈：甲醇：水=45∶45∶10 为流动相 B，在波长 338 nm；柱温 40 ℃，流速 1 mL/min 条件下梯度洗脱。

1.2.6　致敏蛋白 SDS-PAGE 分析　花生脱脂：去皮去红衣，研磨成细粉。花生粉末取 6.00 g。m（花生粉末）：m（石油醚溶液）=1∶5 混合、4 ℃ 下搅拌 2 h，同温度下 8000 r/min 离心 20 min，弃上清液，收集沉淀。重复 2 次，将沉淀干燥后过 0.25 mm 孔径筛，4 ℃ 冷藏备用。花生蛋白浸提：将脱脂花生粉末与 Tris-HCl 缓冲液（pH7.4）按质量体积比 1∶10 混合，于 4 ℃ 磁力搅拌 24 h。后将花生蛋白浓浆在 4 ℃ 下 15000 r/min 离心 15 min，收集上清液，随后取上清液进行 SDS-PAGE 分析[11,19]。

1.3　数据处理

除了 SDS-PAGE 凝胶电泳实验外，本研究中的实验均采取三次平行实验测定。使用 SPSS 26.0 软件中的显著性差异分析实验数据，并使用 Origin 2018 软件进行作图。

2　结果与分析

2.1　花生物理性质分析

如图 1 为阳江、广州、湛江、韶关四个不同地区六种花生的外观轮廓。由图 1 可得，阳江、广州和韶关地区的花生均比湛江的花生更饱满圆润。如表 2 所示，对随机选取的 50 粒花生进行重量分析，花生的果重达到 50.33~99.30 g、仁重基本达到 21.60~75.03 g。不同地区的差异较为明显，但无法完全体现花生的饱满程度，因此，进一步对其米球度进行分析。

通过计算花生的三维数据，得到花生米球度达到 47.12%~67.35%，而米球度越高说明花生颗粒更加饱满。果实在生长发育过程中受到外界很多因素的影响，即便是同一植株也会有差异。整体而言，在阳江和韶关的六个品种，均高于广州地区，而与湛江地区相比较，除了 1 号米球度略高外，其余品种米球度也均低于阳江和韶关地区。

因此，认为其中 Y121 和 S4 两个品种的米球度分别达到 65.64%、67.35%，更加适合作为商品直接销售。而在广州、湛江颗粒最饱满的两个品种分别是 G4、Z1，米球度达到 59.79%、59.46%，均高于广

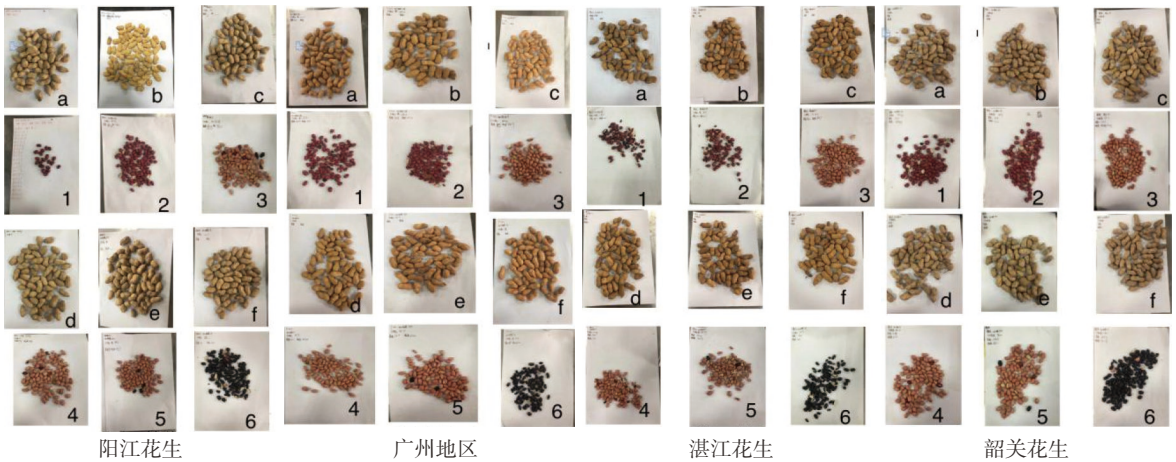


图 1　不同地区的六种花生外观图

Fig.1　Appearance map of six kinds of peanuts in different regions

注：a、b、c、d、e、f 分别表示不同地区 1、3、4、75、121、620 六种花生；1、2、3、4、5、6 分别表示上述 1、3、4、75、121、620 六种花生的种子。

表 2 不同地区的花生物理性质测定(n=3)

Table 2 Determination of physical properties of peanuts in different regions(n=3)

种类	果重(g)	仁重(g)	壳重(g)	长(mm)	宽(mm)	高(mm)	米球度(%)
Y3	73.40±1.21^{a}	46.83±0.75^{ab}	26.56±0.49^{a}	12.38±1.87^{b}	6.41±1.41^{a}	5.75±1.19^{ab}	59.46±8.76^{b}
Y4	78.47±1.46^{b}	48.13±1.20^{abc}	30.31±1.14^{b}	10.64±1.57^{a}	6.13±1.23^{a}	5.13±1.03^{ab}	62.20±10.72^{b}
Y75	76.23±2.75^{ab}	45.67±2.52^{a}	30.47±0.40^{b}	13.00±2.59^{b}	5.67±1.15^{a}	5.63±1.00^{ab}	58.56±13.47^{b}
Y121	94.13±2.33^{d}	53.50±3.52^{d}	39.73±3.77^{c}	16.71±2.87^{c}	10.18±1.78^{b}	7.63±1.76^{c}	65.64±10.77^{b}
Y620	82.07±1.97^{c}	50.87±1.75^{cd}	31.20±2.36^{b}	13.25±2.03^{b}	6.13±1014^{a}	5.88±1.17^{b}	59.02±7.66^{b}
Y1	82.83±1.20^{c}	50.57±0.95^{bcd}	32.27±1.17^{b}	14.88±2.83^{c}	5.72±1.08^{a}	5.42±0.99^{a}	52.99±8.75^{a}
G3	67.63±1.35^{bc}	48.13±0.68^{d}	19.40±0.72^{a}	13.39±1.54^{ab}	6.07±1.12^{a}	5.31±1.12^{ab}	57.28±5.84^{cd}
G4	68.97±2.11^{c}	48.10±1.30^{d}	19.87±3.20^{a}	12.88±1.54^{a}	6.36±0.91^{a}	5.35±0.76^{b}	59.79±8.04^{d}
G75	64.80±1.23^{ab}	44.37±0.68^{c}	19.43±1.88^{a}	15.00±1.65^{c}	6.06±1.21^{a}	5.36±0.92^{b}	52.46±6.62^{bc}
G121	62.60±0.89^{a}	40.10±1.37^{b}	21.50±1.11^{a}	14.85±1.54^{c}	5.00±0.91^{a}	4.81±0.82^{a}	47.12±5.67^{a}
G620	66.63±3.07^{bc}	45.97±1.27^{c}	20.67±3.53^{a}	14.00±1.43^{bc}	5.61±1.35^{a}	5.00±1.11^{ab}	52.47±7.42^{bc}
G1	64.40±2.55^{ab}	22.87±1.10^{a}	41.53±1.80^{b}	13.71±2.21^{bc}	5.43±0.88^{a}	5.00±1.08^{ab}	52.14±8.00^{ab}
Z3	50.33±1.36^{a}	21.60±0.62^{a}	28.53±1.82^{b}	10.78±2.38^{a}	4.67±1.75^{a}	3.80±1.60^{a}	53.73±9.90^{ab}
Z4	60.53±1.16^{b}	33.63±0.95^{b}	26.75±1.15^{b}	12.19±2.48^{ab}	5.53±1.00^{a}	4.88±1.09^{ab}	56.52±8.91^{ab}
Z75	77.50±0.75^{e}	47.70±0.95^{e}	28.95±1.49^{b}	14.64±1.15^{cd}	6.06±1.41^{a}	6.06±1.37^{b}	48.14±8.17^{a}
Z121	62.37±0.50^{b}	40.53±2.00^{c}	21.65±1.72^{a}	14.12±2.68^{cd}	5.17±1.29^{a}	4.56±1.30^{a}	55.16±6.04^{ab}
Z620	66.50±1.35^{c}	33.33±1.36^{b}	33.00±2.70^{c}	13.33±1.60^{bc}	5.72±0.97^{a}	4.92±0.75^{b}	52.04±8.76^{ab}
Z1	69.43±1.40^{d}	42.70±0.44^{d}	26.44±1.39^{b}	14.78±2.02^{d}	6.28±1.17^{a}	5.67±1.15^{b}	59.46±8.76^{b}
S3	79.10±2.21^{a}	58.27±1.40^{a}	20.53±0.80^{a}	15.43±2.44^{c}	9.83±1.37^{c}	6.57±1.51^{c}	64.55±6.17^{c}
S4	82.00±1.15^{b}	60.50±0.72^{a}	20.90±1.23^{a}	13.29±1.28^{a}	7.43±1.19^{b}	6.87±1.24^{c}	67.35±8.95^{c}
S75	97.73±1.38^{c}	74.67±2.06^{c}	22.87±1.90^{a}	13.89±1.56^{a}	5.94±1.14^{ab}	5.14±1.91^{a}	54.49±7.28^{a}
S121	97.50±1.35^{c}	65.20±1.51^{b}	31.73±0.56^{b}	15.21±2.04^{bc}	6.82±1.02^{ab}	6.13±1.39^{bc}	55.18±8.06^{ab}
S620	99.30±0.89^{c}	68.33±2.87^{b}	30.67±2.95^{b}	13.57±1.67^{ab}	5.00±1.54^{a}	6.00±0.70^{ab}	60.32±6.08^{b}
S1	98.53±0.60^{c}	75.03±1.85^{c}	23.16±2.45^{a}	13.75±1.74^{ab}	5.78±1.07^{ab}	4.88±0.97^{a}	53.90±7.01^{a}

注: 同列不同小写字母表示同一地区不同品种之间差异显著(P<0.05); 相同字母表示差异不显著(P>0.05); 表3同。

州湛江两地其他品种。而其他品种由于形状外观等问题更加适合作为食品加工原料。

2.2 花生基本营养指标

如表 3 所示, 所检测花生样本的水分含量为 5.32~7.36 g/100 g、脂肪 42.28~55.64 g/100 g、总糖为 5.92~17.13 g/100 g、蛋白质 18.44~27.91 g/100 g、灰分在 2.24~3.89 g/100 g 之间, 其结果基本与李小钰的花生营养物质含量一致[2]。由于不同地区种植的花生, 其营养物质占比存在差异, 如 G4 总糖最高, 占比为 17.13%; S75 蛋白质最高, 达 27.91%; G75 矿物质最高, 达 3.89%; G121 的脂肪含量最高达到 55.64%。

值得注意的是, 同种品种的花生在不同地区种植后得到的营养物质占比存在差异, 如 G121 在广州得到最高占比的脂肪含量达 55.64%, 在阳江、湛江、韶关等地仅为广州的 93.78%、80.63%、89.52%。S75 品种在汕头种植得到蛋白最高达到 27.91%, 而在广州则明显低于汕头, 仅为其占比的 74.45%, 在阳江、湛江等地也仅汕头占 75.99%、86.46%。而同一地区中不同品种也具有较大差异, 如在阳江地区 Y4 脂肪含量最高达到 54.35%, 而 Y1 最低仅为 49.95%。在广州地区 G121 脂肪含量最高为 55.64%, 最低为 47.82%。湛江地区 Z1 脂肪含量最高为 50.68%, Z75 最低为 42.28%。在韶关地区 S620 脂肪含量最高达到 50.95%, S75 最低为 47.66%。因此, 同一品种在不同地区以及同一地区的不同品种之间均有较大差异, 认为可以根据具体不同的食品工业生产需求, 于某一地区特定种植花生品种。但是如 Y620、G620、Z1、S1 不仅脂肪含量丰富, 其蛋白含量也相当丰富。这些品种就适合大规模种植, 为后续食品工业加工提供产业需求。

2.3 花生脂肪酸组成分析

脂肪酸是花生油重要的功能性组分, 以及香气的重要前体物, 对花生的品质具有重要的影响, 因此, 对样品中主要的脂肪酸进行了测定。如表 4 所示, 不同样品中棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、花生酸、花生四烯酸、山嵛酸、木蜡酸的含量分别为: 8.98%~15.40%、2.70%~4.88%、37.46%~56.44%、22.18%~38.73%、1.08%~2.14%、0.72%~1.19%、1.63%~3.13%、0.003%~1.71%, 其结果基本与迟晓元等[20] 得到的花生脂肪酸含量一致。其中, 不饱和脂肪酸占比范围为 70.45%~82.40%, 主要以油酸和亚油酸为主。不饱和脂肪酸含量越高, 则认为该品种营养品质越高。由于不同品种在同一地区种植存在差异, 韶关地区 S4 总不饱和脂肪酸含量最高, 达 82.40%, Y1 总不饱和脂肪酸达 79.55%, G620 达 78.35%, Z75 达 82.06%。除此之外, 同一品种在不同地区的不饱和脂肪酸含量也存在差异, 如 S4 品种在韶关最高达到 82.40%, 而在阳江、广州、湛江等地仅为韶关的 93.20%、93.53%、93.26%。此结果的产生可能主要是由于产地不同导致的, 不同地区的土壤环境有一定差异。综合评价脂肪酸指标, 认为 Y1、G620、Z75、S4 四个品种具有更

表 3　不同地区的花生主要营养指标含量测定(n=3)

Table 3　Determination of main nutrient indexes of peanuts in different areas(n=3)

种类	总重(g)	水分(g/100 g)	脂肪(g/100 g)	总糖(g/100 g)	蛋白质(g/100 g)	灰分(g/100 g)
Y3	73.40±1.21^{a}	6.11±0.0497^{d}	51.27±0.0050^{b}	8.20±0.49^{a}	19.16±0.0022^{b}	2.54±0.0005^{b}
Y4	78.47±1.46^{b}	6.00±0.0543^{c}	54.35±0.0048^{d}	9.13±0.33^{ab}	19.08±0.0015^{b}	2.57±0.0003^{bc}
Y75	76.23±2.75^{ab}	5.80±0.0140^{ab}	52.29±0.0004^{bc}	10.36±1.21^{bcd}	21.21±0.0014^{d}	2.71±0.0003^{c}
Y121	94.13±2.33^{d}	6.07±0.0815^{d}	52.18±0.0063^{bc}	9.26±0.11^{abc}	20.69±0.0022^{c}	2.24±0.0018^{a}
Y620	82.07±1.97^{c}	5.72±0.0232^{a}	53.06±0.0017^{c}	10.98±1.02^{d}	22.03±0.0004^{e}	2.51±0.0013^{b}
Y1	82.83±1.20^{c}	5.85±0.0172^{b}	49.95±0.0037^{a}	10.54±0.54^{cd}	18.44±0.0021^{a}	3.31±0.0005^{d}
G3	67.63±1.35^{bc}	5.59±0.0195^{b}	47.82±0.0067^{a}	10.22±0.14^{b}	20.40±0.0003^{b}	3.03±0.0031^{a}
G4	68.97±2.11^{c}	5.82±0.0268^{d}	50.63±0.0019^{b}	17.13±1.18^{d}	20.55±0.0005^{bc}	2.91±0.0007^{a}
G75	64.80±1.23^{ab}	5.95±0.0226^{e}	54.76±0.0031^{c}	11.59±0.28^{bc}	20.78±0.0003^{c}	3.89±0.0020^{d}
G121	62.60±0.89^{a}	5.32±0.0261^{a}	55.64±0.0029^{c}	11.69±1.04^{bc}	19.14±0.0014^{a}	3.19±0.0018^{ab}
G620	66.63±3.07^{bc}	5.72±0.0179^{c}	55.28±0.0028^{c}	12.22±1.23^{c}	21.05±0.0006^{d}	3.49±0.0004^{bc}
G1	64.40±2.55^{ab}	5.80±0.0493^{d}	49.96±.0.0004^{b}	8.20±0.09^{a}	19.16±0.0021^{a}	3.69±0.0007^{cd}
Z3	50.33±1.36^{a}	7.20±0.0155^{d}	47.52±0.0147^{cd}	10.51±0.36^{c}	21.33±0.0002^{a}	2.99±0.0016^{c}
Z4	60.53±1.16^{b}	7.36±0.0244^{e}	49.05±.0005de	12.19±1.16^{d}	24.12±0.0003^{c}	2.58±0.0004^{a}
Z75	77.50±0.75^{e}	6.51±0.0555^{a}	42.28±0.0034^{a}	5.92±0.32^{a}	24.13±0.0002^{c}	2.97±0.0027^{bc}
Z121	62.37±0.50^{b}	6.62±0.1040^{b}	44.86±0.0034^{b}	9.89±0.55^{c}	23.82±0.0003^{b}	2.65±0.0003^{ab}
Z620	66.50±1.35^{c}	6.71±0.0281^{b}	45.62±0.0057^{bc}	8.54±0.50^{b}	25.37±0.0002^{d}	2.94±0.0008^{bc}
Z1	69.43±1.40^{d}	6.81±0.0330^{c}	50.68±0.0107^{e}	7.93±0.28^{b}	24.17±0.0001^{c}	3.11±0.0008^{c}
S3	79.10±2.21^{a}	6.21±0.0761^{a}	50.86±0.0104^{b}	7.71±1.05^{a}	23.49±0.0022^{c}	3.61±0.0006^{b}
S4	82.00±1.15^{b}	7.36±0.0491^{d}	50.73±0.0055^{b}	6.24±0.52^{a}	22.59±0.0012^{a}	2.89±0.0012^{a}
S75	97.73±1.38^{c}	6.24±0.1726^{a}	47.66±0.0088^{a}	15.15±1.28^{b}	27.91±0.0017^{e}	3.60±0.0024^{b}
S121	97.50±1.35^{c}	6.97±0.1198^{c}	49.81±0.0081^{ab}	16.36±0.43^{b}	23.03±0.0013^{b}	2.79±0.0032^{a}
S620	99.30±0.89^{c}	6.57±0.0505^{b}	50.95±0.0132^{b}	7.19±0.22^{a}	23.04±0.0004^{b}	2.63±0.0024^{a}
S1	98.53±0.60^{c}	6.81±0.0837^{c}	50.24±0.0069^{b}	6.78±0.59^{a}	26.10±0.0007^{d}	3.32±0.0011^{b}

表 4　不同地区的花生脂肪酸含量分析(%)

Table 4　Analysis of fatty acid content of peanuts in different areas (%)

种类	棕榈酸	硬脂酸	油酸	亚油酸	花生酸	花生四烯酸	山嵛酸	木蜡酸	总不饱和脂肪酸
Y3	9.64±0.0009	3.50±0.0001	53.46±0.0003	23.53±0.0007	1.54±0.0001	1.12±0.0000	2.54±0.0002	1.69±0.0002	78.11
Y4	11.14±0.0004	4.35±0.0004	41.37±0.0025	34.71±0.0002	1.84±0.0003	0.72±0.0008	2.52±0.0007	1.19±0.0005	76.80
Y75	9.63±0.0004	3.47±0.0013	55.96±0.0018	22.18±0.0008	1.56±0.0008	1.16±0.0004	2.57±0.0009	1.64±0.0006	79.30
Y121	10.29±0.0007	3.32±0.0003	47.95±0.0035	30.22±0.0021	1.51±0.0001	0.93±0.0001	2.67±0.0002	1.54±0.0003	79.10
Y620	10.34±0.0012	3.19±0.0004	43.90±0.0003	32.24±0.0006	1.48±0.0003	0.96±0.006	2.42±0.0002	1.43±0.0003	77.10
Y1	9.95±0.0001	3.73±0.0002	49.14±0.0004	29.56±0.0003	1.67±0.0003	0.85±0.0002	2.63±0.0004	1.35±0.0004	79.55
G3	11.30±0.0006	3.63±0.0002	43.45±0.0077	31.07±0.0089	1.63±0.0001	1.19±0.0001	2.65±0.0001	0.004±0.0000	75.71
G4	8.98±0.0005	3.09±0.0001	53.53±0.0004	22.50±0.0006	1.40±0.0002	1.04±0.0002	2.34±0.0007	1.43±0.0001	77.07
G75	10.97±0.0021	2.88±0.0003	38.71±0.0012	31.01±0.0009	1.08±0.0002	0.73±0.0002	1.63±0.0003	0.87±0.0003	70.45
G121	10.19±0.0012	2.78±0.0003	37.52±0.0004	32.40±0.0004	1.29±0.0001	0.83±0.0001	2.13±0.0002	0.003±0.0001	70.75
G620	12.04±0.0006	3.38±0.0002	44.39±0.0002	33.20±0.0011	1.41±0.0002	0.76±0.0001	2.16±0.0002	1.08±0.0001	78.35
G1	12.20±0.0000	3.68±0.0000	37.72±0.0003	37.76±0.0002	1.72±0.0000	0.77±0.0001	2.79±0.0001	1.44±0.0001	76.25
Z3	9.91±0.0001	2.70±0.0003	53.93±0.0003	23.87±0.0008	1.32±0.0000	1.16±0.0001	2.66±0.0002	1.71±0.0001	78.96
Z4	12.82±0.0007	3.57±0.0003	37.46±0.0019	38.73±0.0016	1.55±0.0025	0.66±0.0002	2.31±0.0005	1.03±0.0004	76.85
Z75	9.91±0.0007	3.18±0.0009	55.91±0.0003	25.16±0.0002	1.38±0.0006	0.99±0.0001	2.21±0.0001	0.003±0.0000	82.06
Z121	11.51±0.0005	2.86±0.0001	41.74±0.0002	35.85±0.0016	1.33±0.0002	0.92±0.0000	2.49±0.0001	1.29±0.0001	78.51
Z620	11.31±0.0005	3.12±0.0001	45.05±0.0002	30.62±0.0003	1.53±0.0004	0.94±0.0002	3.01±0.0003	1.52±0.0002	76.59
Z1	11.60±0.0005	2.85±0.0001	43.23±0.0001	34.44±0.0009	1.39±0.0001	0.95±0.0000	2.68±0.0002	1.58±0.0003	78.62
S3	11.77±0.0004	2.93±0.0000	43.02±0.0001	36.90±0.0003	1.38±0.0001	0.97±0.0013	2.65±0.0000	0.007±0.0000	80.89
S4	10.09±0.0003	3.32±0.0001	56.44±0.0006	24.84±0.0009	1.46±0.0005	1.12±0.0004	2.38±0.0009	0.005±0.0000	82.40
S75	11.56±0.0005	2.99±0.0001	43.70±0.0001	36.67±0.0007	1.37±0.0001	0.93±0.0001	2.43±0.0002	0.003±0.0001	81.30
S121	11.49±0.0000	3.23±0.0000	44.29±0.0001	35.97±0.0001	1.43±0.0000	0.90±0.0001	2.39±0.0000	0.004±0.0000	81.16
S620	10.91±0.0010	3.73±0.0002	46.17±0.0011	32.81±0.0011	1.50±0.0004	0.81±0.0001	2.37±0.0006	1.21±0.0004	79.79
S1	15.40±0.0033	4.88±0.0105	48.61±0.010	22.74±0.0013	2.14±0.0004	0.87±0.0002	3.13±0.0006	1.61±0.0003	72.22

高的营养品质, 满足对于花生油品质要求的市场需求。

2.4　花生氨基酸组成分析

花生中总蛋白含量最高高达 27%, 且含有人体所需的必需氨基酸, 是优质植物蛋白之一[21−24]。其中游离氨基酸作为花生滋味和营养的重要组成, 其含量和占比的差异对于花生的风味和营养均有重要的影响[25−27]。如表 5 所示, 不同样品中, 总必需氨基酸占比范围为 16.06%~30.95%, 以 Y3 样品总必需氨基酸占比最高(30.95%), 暗示其具有最高的营养特性。总鲜味氨基酸占比范围为 28.18%~40.79%, 总

表 5　不同地区的六种花生氨基酸分析

Table 5　Analysis of amino acids of six kinds of peanuts in different regions

氨基酸 (mg/100 g)	种类																							
	Y3	Y4	Y75	Y121	Y620	Y1	G3	G4	G75	G121	G620	G1	Z3	Z4	Z75	Z121	Z620	Z1	S3	S4	S75	S121	S620	S1
天冬氨酸	4.4±0.02	0.02±0.05	3.34±0.02	0.06±0.14	4.04±0.02	0.02±0.15	14.72±2.31	13.91±1.16	12.46±0.21	10.79±0.05	10.76±0	11.89±0.15	3.45±0.06	0.06±0.11	3.65±0.18	0.11±0.24	3.02±0.12	0.18±0.14	1.03±0.02	1.15±0.01	0.88±0.01	1.42±0.02	0.71±0.03	4.13±0.04
谷氨酸	36.34±0.13	38.80±0.72	38.88±0.17	33.52±0.19	40.21±0.23	38.52±0.04	17.31±0.26	17.71±0.14	18.9±0.01	19.81±0.26	19.69±0.30	22.14±0.17	34.71±0.02	32.50±0.33	32.5±0.35	27.81±0.25	27.77±0.25	25.39±0.23	38.09±0.41	38.78±0.11	27.92±0.12	39.37±0.31	29.16±0.01	23.55±0.12
丝氨酸	7.16±0.07	0.17±0.07	7.72±0.13	0.07±0.01	9.5±0.08	0.13±0.01	6.08±1.12	13.04±0.39	5.67±0.27	9.16±0.11	8.85±0.03	9.69±0.01	7.02±0.04	0.04±0	7.58±0.06	0.1±0	12.23±0.19	0.06±0	7.75±0.10	8.27±0.01	7.59±0.04	8.77±0.03	7.28±0.02	6.69±0.05
组氨酸	6.49±0.02	0.02±0	6.21±0	0±0.10	6.95±0.07	0±0.1	3.11±1.16	2.45±0.25	4.07±0.07	3.56±0.01	3.54±0.01	3.08±0.02	7.24±0.06	0.06±0.06	8.13±0.02	0.06±0.04	6.19±0.10	0.02±0.77	1.86±1.05	1.79±0.20	2.63±0.17	3.45±0.14	3.54±0.34	3.1±0.92
甘氨酸	7.55±0.19	0.19±0.07	7.46±0.13	0.07±0.01	7.51±0.16	0.13±0.02	7.73±0.67	7.62±0.23	7.68±0.14	6.77±0.02	6.7±0.02	6.28±0.02	14.4±0.04	0.04±0.09	13.4±0.18	0.09±0.11	10.82±0.10	0.18±0.09	5.3±0.08	6.24±0.03	7.11±0.05	6.52±0.10	6.15±0.01	9.89±0.06
苏氨酸	6.09±0.08	0.08±0.02	0.13±0.06	0.02±0	6.9±0.04	0.06±0.04	2.28±0.24	0.53±0.11	1.14±0.04	0.9±0	0.95±0.01	1.33±0.03	0.9±0.01	0.01±0.01	1.15±0.01	0.01±0.01	0.35±0.02	0.01±0.01	3.64±0.05	3.68±0	1.94±0.02	2.33±0	2.11±0.02	3.27±0.01
精氨酸	0.73±0.03	0.03±0.46	8.03±0.01	0.46±0.32	1.08±0.04	0.01±0.03	5.85±0.86	6.15±0.05	10.41±0.16	7.58±0.03	7.57±0.04	6.1±0.01	0.75±0.03	0.03±0	0.86±0.07	0±0.03	1.9±0	0.07±0.02	3.65±0.17	4.13±0.01	5.19±0.05	1.3±2.42	4.19±0.13	3.14±0.08
丙氨酸	1.84±0.22	0.22±0.05	2.29±0.12	0.05±0.40	2.05±0.23	0.12±0.04	4.07±0.37	3.46±2.01	6.23±0.19	3.99±0.06	4.56±0.05	6.36±0.07	3.97±0.05	0.05±0	3.35±0.42	0.28±0.28	4.03±0.49	0.42±0.14	4.34±0.07	4.39±0.01	7.88±0.04	6.08±0.04	5.44±0.04	7.67±0.05
酪氨酸	5.76±0.46	0.46±0.19	6.04±0.02	0.19±0.40	3.78±0.23	0.02±0.04	6.02±0.60	7.42±1.26	5.15±0.08	3.59±0.08	3.53±0.06	3.95±0.02	5.94±0.06	0.06±0.05	5.76±0.07	0.05±0.06	6.82±0.01	0.07±0	4.32±0.16	5.12±0.04	5.53±0.32	3.24±0.10	3.97±0.12	5.23±0.15
半胱氨酸	0.44±0	0±0	0.48±0.01	0.03±0	0.78±0.02	0.01±0.01	0±0.03	0.27±0.07	0.78±0.01	0.4±0.01	0.89±0.01	0	0.44±0.01	0.01±0.03	0.86±0.01	0.03±0.01	0.5±0.01	0.01±0.01	5.41±0.06	4.81±0.41	2.24±0.02	4.77±0.04	3.38±0.01	0.97±0.01
甲硫氨酸	3.46±0.05	0.05±0.01	2.49±0.10	0.1±0	2.23±0.69	0.1±0.01	9.67±0.13	6.16±0.67	9.17±0.15	7.73±0.05	7.78±0.01	8.58±0.05	2.75±0.08	0.08±0.17	4.91±0.11	0.17±0.16	5.11±0.14	0.11±0.23	9.67±0.08	6.16±0.03	9.17±0.01	7.73±0.04	7.78±0.03	8.58±0.40
苯丙氨酸	3.17±0.01	0.01±0	1.53±0.01	0±0.01	1.39±0.02	0.01±0.01	1.69±0.07	1.42±0.70	1.96±0.11	1.93±0.14	2.04±0.01	2.35±0.04	1.66±0.08	0.08±0.02	1.68±0.01	0.02±0.03	1.13±0.01	0.01±0.03	1.52±0.11	1.5±0.03	1.79±0.01	1.45±0.02	1.48±0.02	2.34±0
异亮氨酸	2.3±0.12	0.12±0.01	3.03±0.12	0.01±0.01	2.59±0.13	0.12±0.08	5.91±0.04	8.37±0.35	4.75±0.12	5.05±0.03	5.05±0.00	3.63±0.02	2.52±0.05	0.05±0.12	3.99±0.11	0.12±0.13	6.64±0.04	0.11±0.04	2.65±0.49	3.43±0.04	6.23±0.09	2.04±0.12	3.69±0.05	3.42±0.10
亮氨酸	4.26±0.01	0.01±0.03	3.98±0.06	0.03±0.03	3.81±0.05	0.06±0.07	2.11±0	2.23±0.16	2.27±0.13	2.24±0.02	2.25±0.01	2.31±0.02	2.43±0.05	0.05±0.07	2.53±0.03	0.07±0.04	2.29±0.02	0.03±0.01	1.24±0.17	1.58±0.01	1.92±0.02	1.49±0.02	1.37±0	1.59±0.02
赖氨酸	3.27±0.02	0.02±0.01	2.98±0.01	0.01±0.01	3.08±0.02	0.01±0.02	1.75±0.04	1.8±0.02	2.13±0.02	2.19±0.01	2.19±0	2.06±0	6.51±0.01	0.01±0.06	5.44±0.04	0.06±0.05	4.67±0.05	0.04±0.03	1.97±0.02	2.12±0	2.74±0	2.33±0.02	2.1±0	2.38±0.02
脯氨酸	2.17±0.58	0.58±0.06	1.85±0.12	0.06±0.98	2.06±0.12	0.12±2.69	3.07±0.93	4.26±1.23	3.56±0.09	5.23±0.14	3.59±0.07	5.13±0.12	2.77±0.35	0.35±0.02	2.19±0.39	0.2±0.07	3.01±0.26	0.39±0.03	5.18±0.64	4.45±0.36	5.34±0.40	5.27±1.62	4.95±0.02	3.45±0.49
总氨基酸	95.43	96.44	97.96	89.04	98.57	98.96	91.37	96.80	96.33	90.92	89.94	94.88	97.46	97.98	96.48	98.73	96.56	88.97	97.62	97.6	96.1	97.56	87.3	89.4
必需氨基酸	30.95	22.50	27.88	27.16	28.25	21.19	18.26	18.37	16.06	17.56	18.27	15.65	19.21	20.05	20.09	20.69	16.55	24.54	20.10	21.38	22.30	18.13	19.28	21.81
鲜味氨基酸	32.03	31.62	31.36	30.6	30.45	34.03	32.03	31.62	31.36	30.6	30.45	34.03	38.16	36.15	30.79	31.5	33.82	28.18	39.12	39.93	28.8	40.79	29.87	27.68
甜味氨基酸	32.90	35.07	33.45	33.78	32.43	37.37	32.90	35.07	33.45	33.78	32.43	37.37	31.81	32.58	35.55	35.76	34.62	35.08	35.88	33.19	39.03	36.7	33.71	39.55

甜味氨基酸占比范围为 31.81%~39.55%，以 S121 样品总鲜味氨基酸占比最高(40.79%)，以 S1 样品总甜味氨基酸占比最高(39.55%)，暗示其具有最高的呈味特性。因此认为，Y3 具有最高营养品质，S121 和 S1 具有最高呈味特性，满足对于花生不同氨基酸的市场需求。

2.5　花生蛋白 SDS-PAGE 分析

如图 2 所示，主要过敏原蛋白 Ara h1 位于约 64 kDa 处，Ara h2 约位于 17 kDa 处，Ara h3 位于约 60 kDa 处，Ara h4 约位于 37 kDa 处，此分子量分布结果与隗啸南等[14] 研究花生过敏原蛋白得到不同致敏蛋白分子量的结果一致。其中，根据实验比较得到，在四个地区中，六个品种中 Ara h1 含量皆大于其他致敏蛋白含量，此致敏蛋白含量与王烁等[9] 在研究

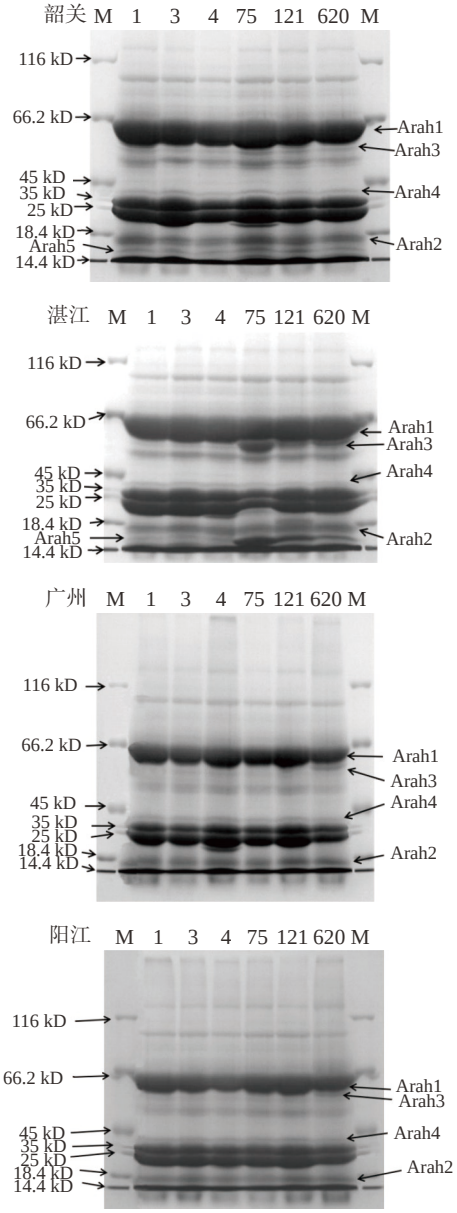


图 2　不同地区花生致敏蛋白 SDS-PAGE 分析

Fig.2　SDS-PAGE analysis of peanut allergenic protein in different regions

注：M、1、3、4、75、121、620 分别为蛋白 Marker 以及同一产地不同的花生品种名称。

不同加工方式对花生致敏性的影响实验得到 Ara h1 占花生蛋白总量的 12%~16% 的结果相同。通过电泳结果，Ara h1 致敏蛋白无论在哪一个地区含量均为最多，另外，可以明显看到阳江地区的 Ara h2 条带相较于其他地区 Ara h2 条带浅，因此认为阳江地区 Ara h2 含量较少。而根据 Ara h3 蛋白能得到湛江地区 75 泳道的含量最多，说明 Z75 的 Ara h3 致敏蛋白含量最多。其他致敏蛋白四个地区均含有，但是并无较大颜色区别。此现象的产生可能是因为花生中致敏蛋白含量与其品种、地区等有一定的关系。由于通过电泳无法完全比较花生中致敏蛋白的区别，而目前花生致敏蛋白存在，但是通过研究发现可以通过一些方法降低或者消除致敏蛋白含量，因此认为花生脱敏在食品工业生产中尤为重要，目前根据张雅君等[28] 得到的脱敏方法，主要有物理方法：热加工、机械研磨、高温加压处理；酶处理；分子生物学处理等。根据食品行业要求，可根据脱敏方法进一步对花生进行利用。

3　结论

本研究主要对广东产量丰富的广州、韶关、阳江、湛江四个地区的六个不同品种花生的营养物质进行分析，为后续广东地区花生的种植以及食品行业不同市场需求研究提供了新的思路和数据。如 Y121、G4、Z1、S4 相较于适合直接售卖来种植的品种。Y4、G121、Z1、S620 更适合作为油料作物种植。除此之外，餐桌上食品的营养安全与种植地区有着至关重要的关系，有目的性的种植花生，实现农业现代化，不仅能从种植到加工的最大资源利用、减少资源浪费，更对后续不同产地花生营养特性的研究有一定的意义。

参考文献

[1] 李少雄，洪彦彬，陈小平，等. 广东花生生产、育种和种业现状与发展对策[J]. 广东农业科学，2020，47(11)：78−83. [LI S X, HONG Y B, CHEN X P, et al. The current situation and development strategies of peanut production, breeding and seed industry in Guangdong[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2020, 47(11): 78−83.]

[2] 李小钰. 辽宁省主栽花生蛋白性质分析及应用研究 [D]. 沈阳：沈阳农业大学，2019：2−20. [LI X Y. Analysis and application research on protein properties of main peanut planted in Liaoning Province[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2019: 2−20.]

[3] 郭建斌，李威涛，丁膺宾，等. 花生籽仁不同发育时期不同部位主要营养成分变化[J]. 中国油料作物学报，2020，42(6)：1051−1057. [GUO J B, LI W T, DING Y B, et al. Changes in the main nutrient components of peanut kernels at different developmental stages[J]. Chinese Journal of Oil Crops, 2020, 42(6): 1051−1057.]

[4] 叶林. 花生蛋白质氧化作用及其对花生乳饮料稳定性影响研究 [D]. 广州：华南理工大学，2014：1−20. [YE L. Peanut protein oxidation and its effect on the stability of peanut milk beverage[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2014: 1−20.]

[5] 刘胜男，孟继秋，曹金博，等. 花生中致敏蛋白的检测方法研

究进展[J]. 农产品加工 (上半月), 2019(3): 71−74, 78. [LIU S N, MENG J Q, CAO J B, et al. Research progress in detection methods of allergenic proteins in peanuts[J]. Agricultural Products Processing (First Half of the Month), 2019(3): 71−74, 78.]

[6] KROGHSBO S, RIGBY N M, JOHNSON P L F, et al. Assessment of the sensitizing potential of processed peanut proteins in Brown Norway rats: Roasting does not enhance allergenicity[J]. PLoS ONE, 2014, 9(5): e96475.

[7] CHUNG S Y, BUTTS C L, MALEKI S J, et al. Linking peanut allergenicity to the processes of maturation, curing, and roasting[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2003, 51(15): 4273.

[8] 田阳, 饶欢, 薛文通. 花生致敏原 Ara h 1 的重组表达与纯化[J]. 中国食品学报, 2020, 20(8): 20−28. [TIAN Y, RAO H, XUE W T. Recombinant expression and purification of peanut allergen Ara h 1[J]. Chinese Journal of Food Science, 2020, 20(8): 20−28.]

[9] 王烁, 孙晓东, 钮冰, 等. 不同加工方式对花生致敏性的影响[J]. 食品科技, 2020, 45(4): 49−55. [WANG S, SUN X D, NIU B, et al. The effect of different processing methods on the allergenicity of peanuts[J]. Food Science and Technology, 2020, 45(4): 49−55.]

[10] BLANC F, VISSERS Y M, ADEL-PATIENT K, et al. Boiling peanut Ara h 1 results in the formation of aggregates with reduced allergenicity[J]. Molecular Nutrition and Food Research, 2011, 55(12): 1887−1894.

[11] 蒋栋磊, 葛攀玮, 朱丽, 等. 花生过敏原蛋白 Ara h2 的分离纯化研究[J]. 扬州大学学报 (农业与生命科学版), 2017, 38(3): 116−120. [JIANG D L, GE P W, ZHU L, et al. Study on the separation and purification of peanut allergen protein Ara h2[J]. Journal of Yangzhou University (Agriculture and Life Sciences Edition), 2017, 38(3): 116−120.]

[12] 饶欢, 田阳, 陶莎, 等. 加工方式对花生致敏性的影响及其致敏性评价研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36(23): 283−287. [RAO H, TIAN Y, TAO S, et al. Effects of processing methods on peanut sensitization and research progress in sensitization evaluation[J]. Food Science, 2015, 36(23): 283−287.]

[13] 田阳, 饶欢, 陶莎, 等. 花生致敏蛋白 Ara h1 和 Ara h2 纯化鉴定方法研究进展[J]. 粮食与油脂, 2016, 29(7): 1−4. [TIAN Y, RAO H, TAO S, et al. Research progress in purification and identification methods of peanut allergenic proteins Ara h1 and Ara h2[J]. Food and Oils, 2016, 29(7): 1−4.]

[14] 隗啸南, 高金燕, 李欣, 等. 花生过敏原蛋白分离纯化方法研究进展[J]. 食品科学, 2011, 32(17): 371−375. [KUI X N, GAO J Y, LI X, et al. Research progress in separation and purification of peanut allergen protein[J]. Food Science, 2011, 32(17): 371−375.]

[15] 刘明国, 曹磊. 花生基本物理特性试验研究[J]. 农业科技与装备, 2011(6): 70−73. [LIU M G, CAO L. Experimental study on basic physical characteristics of peanut[J]. Agricultural Science and Technology and Equipment, 2011(6): 70−73.]

[16] 赵谋明, 董红竹, 郑淋, 等. 不同蛋白酶水解高温花生粕和低温花生粕及其水解产物抗氧化活性的对比研究[J]. 现代食品科技, 2016, 32(4): 40−45. [ZHAO M M, DONG H Z, ZHENG L, et al. Comparative study on the antioxidant activity of different protease hydrolyzed high-temperature peanut meal and low-temperature peanut meal and their hydrolysates[J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(4): 40−45.]

[17] GB 5413.27-2010 食品安全国家标准 婴幼儿食品和乳品中脂肪酸的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2010. [GB 5413.27-2010 National food safety standard-Determination of fatty acids in infant food and dairy[S]. Beijing: China Standard Press, 2010.]

[18] 袁贝, 邵亮亮, 张迪骏, 等. 储藏条件对花生的氨基酸和脂肪酸组成及风味的变化影响[J]. 食品工业科技, 2016, 37(8): 318−322. [YUAN B, SHAO L L, ZHANG D J, et al. The effect of storage conditions on the amino acid and fatty acid composition and flavor changes of peanuts[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(8): 318−322.]

[19] MASUYAMA K, YAMAMOTO K, ITO K, et al. Simplified methods for purification of peanut allergenic proteins: Ara h 1, Ara h 2, and Ara h 3[J]. Food Science & Technology Research, 2014, 20(4): 875−881.

[20] 迟晓元, 郝翠翠, 潘丽娟, 等. 不同花生品种脂肪酸组成及其积累规律的研究[J]. 花生学报, 2016, 45(3): 32−36. [CHI X Y, HAO C C, PAN L J, et al. Study on fatty acid composition and accumulation law of different peanut varieties[J]. Journal of Peanut Journal, 2016, 45(3): 32−36.]

[21] 邹莉芳, 沈以红, 黄先智, 等. 食品功能性成分降血脂作用机理研究进展[J]. 食品科学, 2016, 37(5): 239−244. [ZOU L F, SHEN Y H, HUANG X Z, et al. Progress in the research on the mechanism of food functional ingredients in lowering blood lipids[J]. Food Science, 2016, 37(5): 239−244.]

[22] 林杰. 不饱和脂肪酸的生理功能及其应用进展[J]. 广东化工, 2013, 40(6): 92−93. [LIN J. The physiological functions of unsaturated fatty acids and their application progress[J]. Guangdong Chemical Industry, 2013, 40(6): 92−93.]

[23] 李资政, 裴志胜, 冯素萍, 等. 不同压榨方式对高油酸花生分离蛋白的影响[J]. 食品科技, 2020, 45(10): 190−196.14. [LI Z Z, PEI Z S, FENG S P, et al. The effect of different pressing methods on high oleic peanut protein isolate[J]. Food Science and Technology, 2020, 45(10): 190−196.14.]

[24] FARMER, LINDA J. The role of nutrients in meat flavour formation[J]. Proceedings of the Nutrition Society, 1994, 53(2): 327−333.

[25] SCHLICHTHERLE-CERNY H, AMADO R. Analysis of taste-active compounds in anenzymatichy drolysate of deamidated wheat gluten[J]. Journal of Agriculturaland Food Chemistry, 2002, 50(6): 1515−1522.

[26] HAN F L, XU Y. Identification of low molecular weight peptides in Chinese rice wine (Huang Jiu) by UPLC-ESI-MS/MS[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2011, 117(2): 238−250.

[27] AMURA M, NAKATSUKA T, TADA M, et al. The relationship between taste and primary structure of "delicious peptide" (Lys-Gly-Asp-Glu-Glu-Ser-Leu-Ala) from beef soup[J]. Agricultural & Biological Chemistry, 1989, 53(2): 319−325.

[28] 张雅君, 张浩, 杨选, 等. 花生主要致敏物质及其脱敏方法研究进展[J]. 食品科学, 2014, 35(17): 312−318. [ZHANG Y J, ZHANG H, YANG X, et al. Research progress in peanut main allergens and desensitization methods[J]. Food Science, 2014, 35(17): 312−318.]

李朔, 张璨, 马玲, 等. QuEChERS 结合超高效液相色谱-串联质谱法同步测定鱼肉制品中 24 种磺胺类抗生素 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 301−308. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080276

LI Shuo, ZHANG Can, MA Ling, et al. Simultaneous Determination of 24 Sulfonamide Antibiotics in Fish Products by QuEChERS with Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 301−308. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080276

· 分析检测 ·

QuEChERS 结合超高效液相色谱-串联质谱法同步测定鱼肉制品中 24 种磺胺类抗生素

李　朔[1],张　璨[2],马　玲[2],王　可[1,2,*],杨莉丽[1],花中霞[2],张梦妍[2]
（1.河北师范大学化学与材料科学学院,河北石家庄 050024;
2.石家庄市疾病预防控制中心,石家庄市化学毒物检测及风险预警技术
创新中心,河北石家庄 050011）

摘　要: 采用 QuEChERS 结合超高效液相色谱-串联质谱（ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry，UPLC-MS/MS）法建立了同时测定鱼肉制品中磺胺二甲嘧啶、磺胺脒、结晶磺胺等 24 种磺胺类抗生素的分析方法。通过对色谱、质谱条件和 QuEChERS 前处理技术的优化，确定了最佳的实验条件。样品采用乙腈超声提取，上清液经 C_{18} 和无水硫酸镁净化，过 0.20 μm 滤膜后经 UPLC-MS/MS 检测。以乙腈−0.1% 甲酸水溶液为流动相，经 Eclipse XDB-C_{18} 色谱柱（4.6 mm × 100 mm，1.8 μm）进行分离，在电喷雾电离源（electrospray ionization source，ESI）正离子模式下，进行多反应监测（multiple reaction monitoring，MRM），基质匹配外标法定量。结果表明，在各自线性范围内 24 种磺胺类抗生素具有良好的线性关系，相关系数（r）大于 0.999，在 5、10、50 μg/kg 3 个加标浓度水平下的平均加标回收率为 80.0%~116.4%，相对标准偏差（relative standard deviation，RSD）为 0.8%~9.4%（n=7）。方法检出限为 0.01~0.48 μg/kg，定量限为 0.02~1.59 μg/kg，所测样品均未检出磺胺类抗生素。该方法简单快速、选择性好、灵敏度高，适用于鱼肉制品中 24 种磺胺类抗生素的高通量检测。

关键词: 鱼肉制品,超高效液相色谱-串联质谱,磺胺类抗生素,QuEChERS
中图分类号: TS254.7　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0301−08
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080276
本文网刊:

Simultaneous Determination of 24 Sulfonamide Antibiotics in Fish Products by QuEChERS with Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

LI Shuo[1], ZHANG Can[2], MA Ling[2], WANG Ke[1,2,*], YANG Lili[1], HUA Zhongxia[2], ZHANG Mengyan[2]
（1.College of Chemistry and Materials Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050024, China;
2.Shijiazhuang Center for Disease Control and Prevention, Shijiazhuang Technology Innovation Center for Chemical Poison Detection and Risk Early Warning, Shijiazhuang 050011, China）

Abstract: A method for the simultaneous determination of 24 sulfonamide antibiotics including sulfamethazine, sulfaguanidine, sulfanilamide and so on in fish products was established by QuEChERS coupled with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry(UPLC-MS/MS). The optimal experimental conditions were determined by optimizing the chromatographic and mass spectrometric conditions and the QuEChERS pre-treatment technique. The samples were extracted by acetonitrile under ultrasonication, and then purified by C_{18} and anhydrous $MgSO_4$. The solvent was detected by UPLC-MS/MS after filtering through 0.20 μm microporous membrane. The separation was performed on an Eclipse XDB-C_{18} column (4.6 mm × 100 mm, 1.8 μm) using acetonitrile −0.1% formic acid aqueous solution as the

收稿日期: 2021−08−25
基金项目: 国家自然科学基金项目（81903322）;石家庄市科学技术研究与发展指导计划项目（191460733）。
作者简介: 李朔（1996−）,女,硕士研究生,研究方向:食品中兽药残留检测,E-mail:358881341@qq.com。
*** 通信作者:** 王可（1981−）,男,博士,主任技师,研究方向:食品安全与毒物检测,E-mail:wkecdc@163.com。

mobile phase, and determined with positive ion mode of electrospray ionization (ESI) under multiple reaction monitoring (MRM). Then the matrix matching external standard method was used for quantitative analysis. The results indicated that the 24 sulfonamide antibiotics showed good linearity in the respective linear range with the correlation coefficients (r) higher than 0.999. The average recoveries at three spiked levels of 5, 10 and 50 μg/kg ranged from 80.0% to 116.4% with the relative standard deviation (RSD) of 0.8%~9.4% (n=7). Moreover, the limits of detection (LOD) were 0.01~0.48 μg/kg and the limits of quantification (LOQ) were 0.02~1.59 μg/kg. The method was simple, rapid, selective and sensitive for the high-throughput detection of 24 sulfonamide antibiotics in fish products.

Key words: fish products; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; sulfonamide antibiotics; QuEChERS

磺胺类抗生素是一类具有对位氨基苯磺酰胺结构的抗生素总称[1−2], 具有较强的抗菌能力, 被广泛应用于预防和控制水产养殖过程中的各种动物疾病, 除此之外, 还被认为是一种饲料添加剂以促进水产养殖动物生长[3−4]。其作用原理是通过竞争性阻抑叶酸循环过程中的对氨基苯甲酸来达到减少和杀灭细菌核蛋白的目的[5]。此类人工合成的抗生素具有价格低、抗菌范围广、高效、不易分解[6] 等特点, 但其在动物体内具有作用时间较长、较慢代谢速率等问题, 一部分会在动物体内残留, 另一部分会随排泄物以原型或代谢物的形式排出体外[7−8]。过量使用磺胺类抗生素会对环境造成一定程度的污染, 进而通过食物链在人体内蓄积从而对人体健康造成潜在威胁[9]。磺胺类抗生素长期存在于人类体内会引起急性或慢性中毒, 还会影响机体的泌尿、免疫系统, 破坏人体的造血系统或产生耐药性等[10−11]。针对动物组织及牛奶中的磺胺类抗生素, 欧盟规定其最大残留量为 100 μg/kg[12]。我国国家标准 GB 31650-2019 制订了在动物性食品中磺胺二甲嘧啶的限量为 25~100 μg/kg, 其他磺胺类抗生素残留总和为 100 μg/kg[13]。

目前, 对鱼肉中磺胺类抗生素的检测多为其中一种或几种, 同时对 20 种以上磺胺类抗生素的检测报道较少。而且与文献报道的检测鱼肉中磺胺类抗生素的液液萃取法[14]、加速溶剂萃取法[4]、固相萃取法[15−17] 等前处理技术相比, QuEChERS 法具有操作简便、无需昂贵的仪器、试验成本低、应用范围广等优点。近年来, 磺胺类抗生素的检测方法主要有高效液相色谱法(HPLC)[18−20]、液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)[21−24]、毛细管电泳法[24−25] 等。其中, 液相色谱-串联质谱法具有灵敏度高、准确度好、能同时分析多种痕量物质等优点[26], 适用于多种磺胺类抗生素的检测。如: HOFF 等[27] 基于液相色谱-串联质谱技术发展了一种测定牛肝中 6 种磺胺类抗生素的新方法; WANG 等[28] 建立了超高效液相色谱-串联质谱法分析了畜禽粪便中 17 种磺胺类抗生素; MARTINS 等[29] 发展了液相色谱串联质谱法测定牛奶中 11 种磺胺类抗生素的检测新方法。

鱼作为营养丰富、价格低廉的水产品之一, 其组织中磺胺类抗生素的残留检测方法已有报道, 而关于基质更加复杂的鱼肉制品中磺胺类抗生素的检测却鲜有报道, 因此本文开展鱼肉制品中磺胺类抗生素的检测研究, 对完善食品安全监测体系具有重要意义。为此, 本研究通过优化 QuEChERS 前处理方法、色谱和质谱条件, 开发了超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)测定鱼肉制品中 24 种磺胺类抗生素的检测方法, 为开展鱼肉制品中磺胺类抗生素的残留监测及风险评估提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

磺胺脒　纯度>99.0%, 美国 International Laboratory 公司; 其余磺胺类抗生素标准品　纯度>97.0%, 德国 Dr. Ehrenstorfer Gmb H 公司; 甲酸、乙酸铵　色谱纯, 美国 Dikma 公司; 甲醇　色谱纯, 美国 Fisher 公司; 乙腈　色谱纯, 德国 Merck 公司; N-丙基乙二胺(PSA)　美国 Dikma 公司; C_{18}(40~50 μm)　美国 Welch 公司; 无水硫酸镁、氯化钠　分析纯, 天津永大化学试剂有限公司; ZORBAX Eclispse XDB-C_{18}(4.6×100 mm, 1.8 μm)、ZORBAX SB-Aq(2.1×150 mm, 3.5 μm)、ZORBAX Eclispse Plus C_{18}(2.1×100 mm, 1.8 μm)　美国 Agilent 公司; 鱼肉罐头、鱼豆腐、鱼肠、鱼丸和鱼皮等鱼肉制品　当地超市。

AB SCIEX Exion 超高效液相色谱仪、TRIPLE QUAD 5500 三重四级杆串联质谱仪(配电喷雾源(ESI)及 AB SCIEX 数据处理软件)　美国 AB SCIEX 公司; EVAP-12 氮吹仪　美国 Organomation 公司; VXMNAL 涡旋振荡器　美国 OHAUS 公司; T-460/H 超声清洗器　德国 Elma 公司; Milli-Q 超纯水机　美国 Millipore 公司; CR21N 高速冷冻离心机　日本日立公司; AE240(精度 1/10^5)电子天平　瑞士 Mettler Toledo 公司; GM 200 研磨机　德国 Retsch 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液的配制　称取适量的磺胺类抗生素标准品采用乙腈溶解, 配制成 1 g/L 的单一标准储备液, 于−20 ℃ 冰箱中密封储存。取适量的各标准储备液, 以乙腈定容, 得到 1 mg/L 的混合标准溶液[30]。采用鱼肉罐头空白溶液逐级稀释配成各标准物质浓度均为 0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、50、100 μg/L 的系列混合标准工作溶液。

1.2.2 样品前处理　准确称取粉碎后的样品 1.0 g

(精确至 0.01 g), 放入 50 mL 离心管中, 加入超纯水 2 mL 和乙腈 10 mL, 充分涡旋混匀, 超声 5 min 后加入 NaCl 1.5 g, 涡旋 30 s, 以 8000 r/min 在 4 ℃ 下离心 5 min。移取 7.5 mL 上清液至盛有 C_{18} 0.3 g 和无水 $MgSO_4$ 0.4 g 的离心管中, 涡旋混匀 30 s, 以 8000 r/min 离心 5 min, 取上层乙腈 5 mL, 在 40 ℃ 下氮吹浓缩至近干, 用 1.0 mL 初始流动相复溶, 经 0.20 μm 滤膜过滤, 供 UPLC-MS/MS 测定。

1.2.3　液相色谱条件　ZORBAX Eclipse XDB-C_{18} 色谱柱(4.6 mm × 100 mm, 1.8 μm); 柱温: 40 ℃; 流速: 0.3 mL/min; 进样量: 2 μL; 流动相: A 为 0.1% 甲酸水溶液, B 为乙腈; 梯度洗脱程序: 0.0~7.5 min, 21% B; 7.5~7.6 min, 21%~40% B; 7.6~11.0 min, 40% B; 11.0~11.1 min, 40%~75% B; 11.1~15.0min, 75% B; 15.1~18.0min, 21% B。

1.2.4　质谱条件　离子源: 电喷雾电离源(ESI); 扫描方式: 正离子扫描; 检测方式: 多反应监测(MRM); 离子化电压: 5500 V; 离子源温度: 550 ℃; 气帘气: 40 psi; 喷雾气: 50 psi; 辅助气: 50 psi。24 种磺胺类抗生素的详细质谱参数见表 1。

表 1　24 种磺胺类抗生素的质谱参数
Table 1　Mass spectrometric (MS) parameters for 24 sulfonamides

序号	磺胺类抗生素	保留时间 (min)	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	去簇电压 (V)	碰撞能 (eV)
1	磺胺脒	3.36	215.2	156.0*/108.1	58.1/71.2	20.3/30.9
2	结晶磺胺	3.99	173.0	93.0*/108.1	136.2/106.9	30.2/22.0
3	磺胺二甲基异嘧啶	4.00	279.2	124.2*/186.0	81.8/78.1	27.5/23.0
4	甲氧苄啶	4.46	291.2	230.1*/261.1	77.0/60.3	31.5/34.8
5	磺胺醋酰	5.26	215.1	92.0*/156.1	103.9.116.0	29.0/14.6
6	磺胺噻唑	5.51	256.1	156.1*/108.2	83.8/83.8	21.0/31.8
7	磺胺嘧啶	5.64	251.1	156.2*/108.0	59.7/48.9	22.0/33.0
8	磺胺吡啶	6.24	250.1	156.0*/184.2	73.3/82.1	23.0/23.9
9	磺胺甲基嘧啶	7.10	265.1	156.1*/172.0	40.3/61.1	23.1/23.0
10	磺胺二甲恶唑	7.18	268.2	156.2*/108.0	88.0/81.0	23.7/33.4
11	磺胺甲噻二唑	8.23	271.0	156.0*/108.2	49.2/45.1	20.8/31.3
12	磺胺甲氧哒嗪	8.61	279.2	124.1*/186.2	85.1/77.0	32.1/24.1
13	磺胺二甲嘧啶	8.79	281.0	156.2*/92.1	83.2/77.9	24.0/37.9
14	磺胺对甲氧嘧啶	9.10	281.1	156.1*/108.2	55.0/61.1	24.9/33.2
15	磺胺间甲氧嘧啶	11.26	281.1	156.2*/108.2	56.9/18.1	24.2/35.1
16	磺胺氯达嗪	12.17	285.1	156.2*/108.1	82.0/83.1	21.6/34.0
17	周效磺胺	12.58	311.1	156.0*/108.1	82.1/73.1	24.1/33.0
18	磺胺甲恶唑	12.62	254.1	156.1*/108.2	106.9/84.9	22.3/31.9
19	磺胺二甲异唑	13.04	268.0	156.2*/113.0	87.7/100.2	19.6/21.8
20	苯甲酰磺胺	13.98	277.1	156.1*/92.0	72.9/76.9	17.8/38.8
21	磺胺喹恶啉	14.18	301.1	156.0*/92.1	38.0/47.9	23.2/39.7
22	磺胺地索辛	14.25	371.2	156.2*/108.1	55.0/39.8	27.4/37.9
23	磺胺苯吡唑	14.58	315.2	156.2*/108.2	90.1/93.5	27.7/38.1
24	磺胺硝苯	15.16	336.3	156.2*/294.0	155.2/153.8	17.1/16.9

注: *为定量离子。

1.3　数据处理

采用 Analyst 软件 1.6.3 控制仪器、采集数据, MultiQuant 3.0.2 软件进行数据处理和标准曲线建立。回收率及信噪比采用 Microsoft Office Excel 2007 软件计算。提取剂优化和净化剂优化中的回收率的计算均采用两个平行样品取平均值计算, 各个条件下回收率的比较采用 Origin 2018 软件进行分析。精密度选择低、中、高三个浓度, 每个浓度梯度取连续采集 7 针数据的峰面积进行相对标准偏差 RSD 值的计算。

2　结果与分析

2.1　质谱条件优化

磺胺类抗生素的结构中含有氨基, 容易结合 H^+, 因此, 采用正离子模式, 以针泵连续进样, 首先得到 24 种磺胺类化合物的各个母离子, 分别对其单标标准溶液(50 ng/mL)进行一级质谱扫描(Q1 MS)得到其母离子, 然后对其进行子离子全扫描, 选择出两个响应信号较强的碎片离子, 其中响应值较高的为定量离子, 另一个为定性离子, 再将母离子和这两个碎片离子组成检测离子对, 在 MRM 模式下优化去簇电压(DP)和碰撞能(CE), 优化结果如表 1 所示。

2.2　色谱条件优化

2.2.1　色谱柱选择　比较了 ZORBAX Eclispse XDB-C_{18}(4.6 mm×100 mm, 1.8 μm)、ZORBAX SB-Aq(2.1 mm×150 mm, 3.5 μm)、ZORBAX Eclispse Plus C_{18}(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)3 款色谱柱对 24 种目标物的分离效果。实验结果显示, 24 种磺胺类抗生素在 ZORBAX Eclispse Plus C_{18} 和 ZORBAX SB-Aq 色谱柱上分离度较差; 相比而言, 在 ZORBAX Eclispse XDB-C_{18} 色谱柱上具有较好的分离效果且峰形尖锐, 因此, 选择 ZORBAX Eclispse XDB-C_{18} 色谱柱分离 24 种磺胺类抗生素。

2.2.2　流动相优化　流动相对目标物的保留时间和峰形存在一定的影响。考察了有机相为甲醇、乙腈, 水相为水、0.1% 甲酸水和 2 mmol/L 乙酸铵溶液(含 0.1% 甲酸)时的色谱分离效果。试验结果显示, 乙腈相对于甲醇而言具有较好的分离度。当有机相和水相分别为乙腈、纯水时, 24 种目标物的出现分裂缝且峰形较宽; 加入甲酸后, 峰形改善且分裂峰减少; 而引入乙酸铵后导致磺胺硝苯的响应降低, 因此, 乙腈-0.1% 甲酸水为最优流动相。图 1 为 24 种磺胺类抗生素的总离子流色谱图(TIC)。

2.3　前处理方法优化

2.3.1　提取剂的优化　由于样品基质的复杂性, 提取剂应满足既能很好地溶解目标化合物, 又能减少对杂质的萃取。乙腈和丙酮是 QuEChERS 法常用的提取剂, 此外酸化乙腈对许多分析物具有良好的萃取效率[31], 因此, 本实验考察了 3 种提取剂(乙腈、0.5% 酸化乙腈和丙酮)对 24 种磺胺类抗生素的提取效率。由图 2 可知, 相比于其他两种提取剂, 乙腈对 24 种磺胺类抗生素的回收率均能达到 75.5% 以上, 而且乙腈可以很好地分离蛋白质和脂肪, 降低杂质的

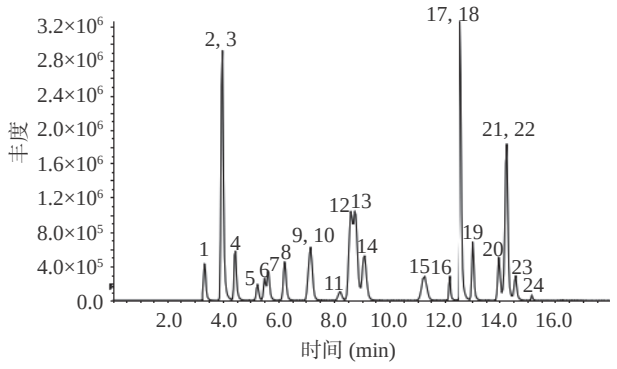


图 1 24 种磺胺类抗生素标准品的总离子流色谱图(50 μg/L)

Fig.1 Total ion chromatograms of 24 kinds of sulfonamides standards (50 μg/L)

注: 1.磺胺脒; 2.结晶磺胺; 3.磺胺二甲基异嘧啶; 4.甲氧苄啶; 5.磺胺醋酰; 6.磺胺噻唑; 7.磺胺嘧啶; 8.磺胺吡啶; 9.磺胺甲基嘧啶; 10.磺胺二甲恶唑; 11.磺胺甲噻二唑; 12.磺胺甲氧哒嗪; 13.磺胺二甲嘧啶; 14.磺胺对甲氧嘧啶; 15.磺胺间甲氧嘧啶; 16.磺胺氯达嗪; 17.周效磺胺; 18.磺胺甲恶唑; 19.磺胺二甲异唑; 20.苯甲酰磺胺; 21.磺胺喹恶啉; 22.磺胺地索辛; 23.磺胺苯吡唑; 24.磺胺硝苯。

干扰, 因此, 最终选择乙腈作为提取剂。

2.3.2 净化剂的优化 QuEChERS 法是利用吸附剂填料与基质中的杂质相互作用, 吸附杂质从而达到除杂净化的目的, 其操作简便、效率高、试验成本低。QuEChERS 法常用的净化剂有 PSA、C_{18}、石墨化碳黑等。PSA 可用于去除脂肪酸、糖类、有机酸和脂类等一些杂质, 而 C_{18} 能有效去除脂类[32]。本文比较了 0.3 g PSA、0.3 g C_{18}、0.3 g 无水 $MgSO_4$+0.3 g PSA、0.3 g 无水 $MgSO_4$+0.3 g C_{18} 对样品的净化效果(见图 3)。试验数据显示, 以 PSA 或无水 $MgSO_4$+PSA 作为净化剂净化时, 15 种磺胺类抗生素的回收率低于 70.0%, 特别是苯甲酰磺胺的回收率为 7.3%, 可能由于 PSA 对苯甲酰磺胺有较强的吸附作用。而以 C_{18} 为净化剂时, 24 种磺胺类抗生素的回收率整体较高, 且无水 $MgSO_4$ 的加入能使 24 种目标物的回收率达到 78% 以上。在上述基础上, 进一步优化了 C_{18} 和无水 $MgSO_4$ 的用量, 当无水 $MgSO_4$ 为 0.3 g 时, 比较了 C_{18} 为 0.2、0.3、0.4 g 时对目标物回收率的影响。结果显示, 相比于其它用量, 当 C_{18} 为 0.3 g 时, 24 种磺胺类抗生素回收率较好, 在 79.0%~112.8% 之间。固定 C_{18} 用量为 0.3 g, 考察了 0.2、0.3、0.4、0.5 g 无水 $MgSO_4$ 对目标物回收率的影响。随无水 $MgSO_4$ 用量的增加, 24 种磺胺类抗生素的回收率出现先升高再降低的趋势, 当加入无水 $MgSO_4$ 0.4 g 时, 24 种目标物的回收率最好。综合上述结果, 选择 0.3 g C_{18} 和 0.4 g 无水 $MgSO_4$ 作为净化剂, 24 种磺胺类抗生素的回收率能达到 84.2%~110.5% 之间。

2.4 基质效应

标准曲线分别以基质空白和溶剂配制, 根据基质效应计算公式: 基质效应=基质标准曲线斜率/溶剂标准曲线斜率×100[33], 当基质效应计算值在 80.0%~120.0% 时, 可认为基质效应较弱, 可忽略。结果表明, 磺胺脒、磺胺二甲基异嘧啶、甲氧苄啶、磺胺醋酰、磺胺地索辛、磺胺苯吡唑的基质效应为 41.5%~77.6%, 具有明显的基质抑制作用, 而

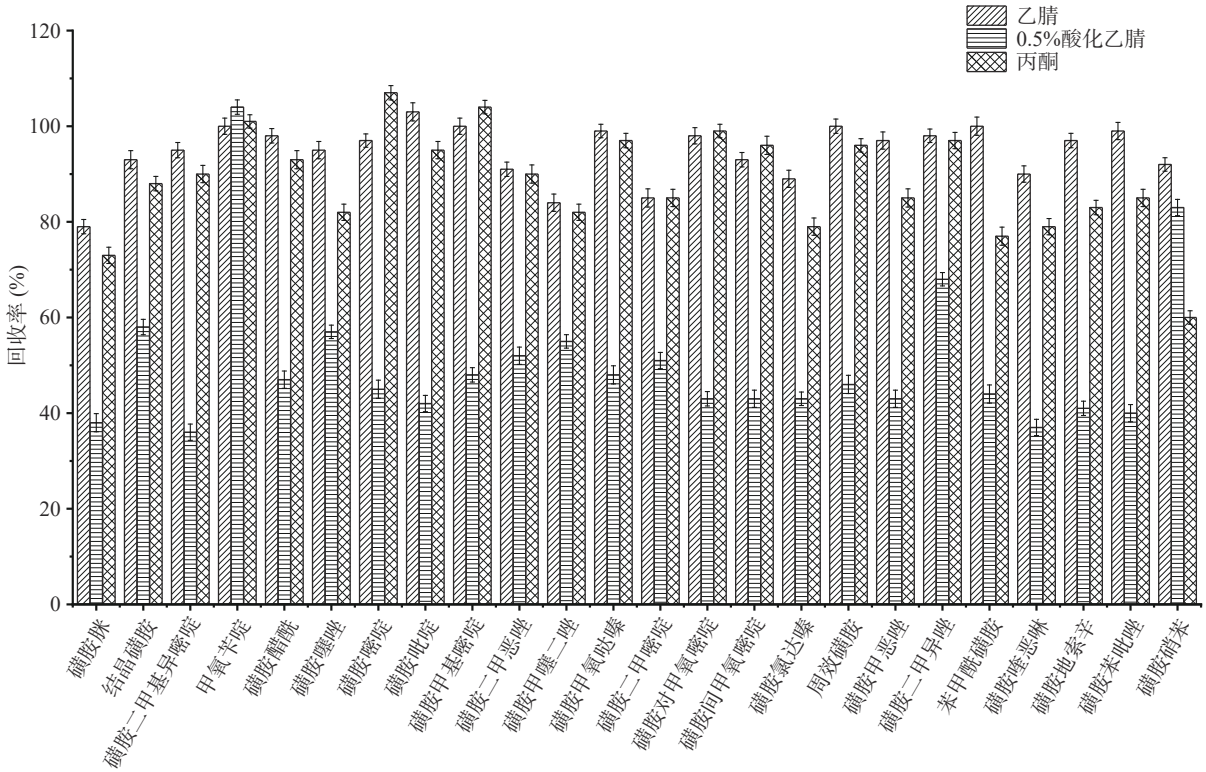


图 2 不同提取剂对 24 种磺胺类抗生素回收率的影响

Fig.2 Effect of different extractant on the recoveries of 24 sulfonamide antibiotics

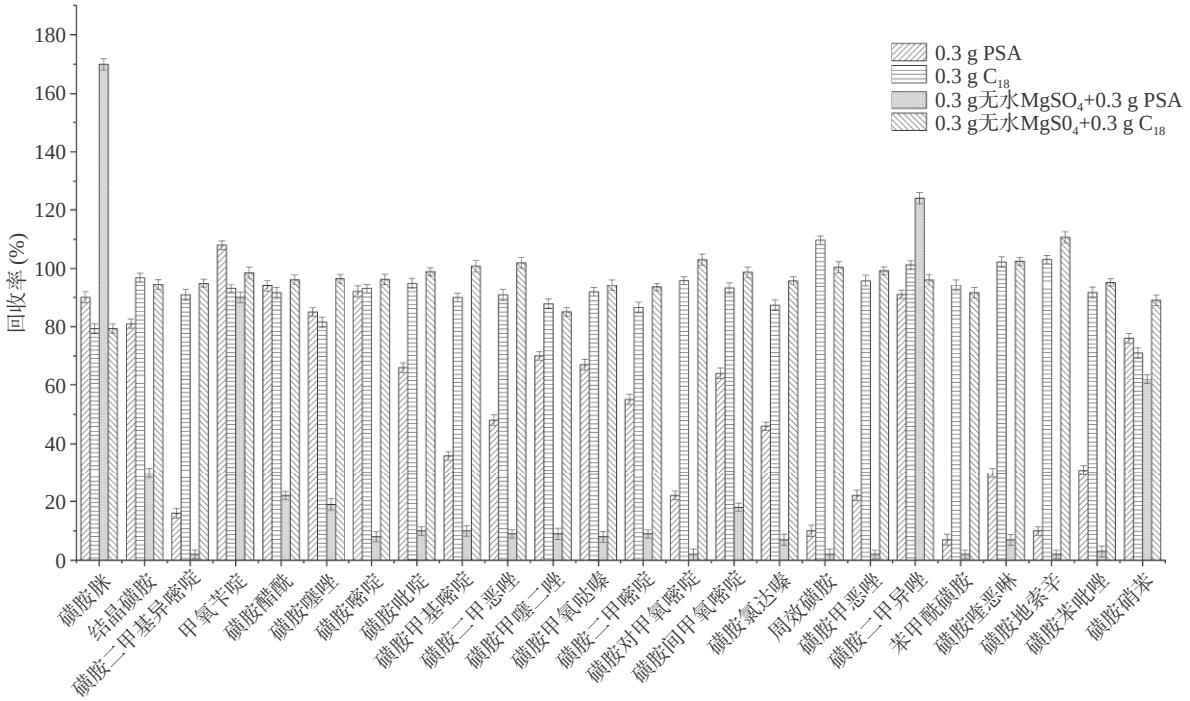


图 3　不同净化剂对 24 种磺胺类抗生素回收率的影响

Fig.3　Effect of different purification on the recoveries of 24 sulfonamide antibiotics

其它 17 种磺胺类抗生素的基质效应在 82.0%~100.9% 之间, 基质效应较弱。为了能精准的定量分析, 标准曲线采用基质空白提取液配制, 以减少因基质效应引起的误差。

2.5　方法学验证

2.5.1　标准曲线、检出限和定量限　在优化的色谱

表 2　24 种磺胺类抗生素的线性范围、线性回归方程、相关系数、检出限和定量限

Table 2　Linear ranges, regression equations, correlation coefficients, limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) for detection of 24 kinds of sulfonamides

磺胺类抗生素	线性范围(μg/L)	线性方程	相关系数(r)	LOD(μg/kg)	LOQ(μg/kg)
磺胺脒	0.5~100	Y=38706.0X+1285.6	0.9999	0.48	1.59
结晶磺胺	0.1~100	Y=50961.8X+429.2	0.9998	0.07	0.22
磺胺二甲基异嘧啶	0.1~100	Y=297084.0X+227232.0	0.9997	0.01	0.03
甲氧苄啶	0.5~100	Y=143071.0X+114250.0	0.9991	0.46	1.54
磺胺醋酰	0.1~100	Y=31022.4X+16145.0	0.9991	0.13	0.44
磺胺噻唑	0.1~100	Y=158857.0X+18768.8	0.9991	0.02	0.08
磺胺嘧啶	0.1~100	Y=162054.0X+55211.6	0.9999	0.01	0.02
磺胺吡啶	0.1~100	Y=240612.0X+145528.0	0.9998	0.01	0.03
磺胺甲基嘧啶	0.1~100	Y=171866.0X+89013.4	0.9993	0.01	0.02
磺胺二甲恶唑	0.1~100	Y=176961.0X+10432.8	0.9995	0.02	0.07
磺胺甲噻二唑	0.1~100	Y=87403.6X+668.0	0.9995	0.05	0.15
磺胺甲氧哒嗪	0.1~100	Y=108254.0X+94216.9	0.9996	0.03	0.09
磺胺二甲嘧啶	0.1~100	Y=148426.0X+103685.0	0.9991	0.01	0.03
磺胺对甲氧嘧啶	0.1~100	Y=137057.0X+11984.6	0.9992	0.04	0.13
磺胺间甲氧嘧啶	0.1~100	Y=84598.9X+17802.8	0.9999	0.02	0.08
磺胺氯达嗪	0.1~100	Y=94606.8X+19310.5	0.9997	0.08	0.28
周效磺胺	0.1~100	Y=596140.0X+619509.0	0.9991	0.01	0.02
磺胺甲恶唑	0.1~100	Y=147442.0X+60190.4	0.9991	0.02	0.05
磺胺二甲异唑	0.1~100	Y=128310.0X+9993.8	0.9993	0.01	0.02
苯甲酰磺胺	0.1~100	Y=263456.0X+170164.0	0.9990	0.01	0.02
磺胺喹恶啉	0.1~100	Y=119085.0X+80723.1	0.9996	0.02	0.07
磺胺地索辛	0.1~100	Y=500130.0X+575174.0	0.9992	0.01	0.04
磺胺苯吡唑	0.2~100	Y=65902.4X+52926.6	0.9994	0.26	0.86
磺胺硝苯	0.5~100	Y=11686.6X+2465.5	0.9998	0.40	1.33

和质谱条件下测定前述 1.2 部分配制基质匹配标准工作液，标准曲线的横坐标为各目标化合物的浓度，纵坐标为定量离子对峰面积，得到线性回归方程及相关系数（r），检出限（LOD）和定量限（LOQ）分别以 3 倍和 10 倍的信噪比计算，见表 2。这 24 种磺胺类抗生素的相关系数（r）均在 0.999 以上，线性关系良好，LOD 和 LOQ 分别为 0.01~0.48 μg/kg 和 0.02~1.59 μg/kg，能够满足定量分析的要求。

2.5.2 加标回收率和精密度 在 3 个加标浓度分别为 5、10 和 50 μg/kg 下对空白样品进行加标回收实验，结果列于表 3。24 种待测物的平均回收率在 80.0%~116.4% 范围内，相对标准偏差（RSD）为 0.8%~9.4%，适用于鱼肉制品中 24 种磺胺类抗生素残留的同步快速检测。

表 3 24 种磺胺类抗生素的加标回收率及相对标准偏差（n=7）

Table 3 Spiked recoveries and RSD of 24 sulfonamides (n=7)

磺胺类抗生素	加标水平（μg/kg）					
	5		10		50	
	回收率（%）	RSD（%）	回收率（%）	RSD（%）	回收率（%）	RSD（%）
磺胺脒	82.4	9.1	83.9	6.3	109.3	4.3
结晶磺胺	84.0	7.2	81.0	6.6	94.5	1.8
磺胺二甲基异嘧啶	81.3	4.4	85.0	4.8	108.7	1.9
甲氧苄啶	88.9	4.6	87.5	4.4	103.2	2.5
磺胺醋酰	83.8	7.7	80.4	3.7	104.1	2.1
磺胺噻唑	83.1	3.9	83.0	3.1	93.2	3.5
磺胺嘧啶	83.2	4.5	94.6	3.0	114.0	2.3
磺胺吡啶	83.9	4.4	87.9	3.8	92.6	4.2
磺胺甲基嘧啶	80.4	1.7	81.8	5.7	101.6	2.7
磺胺二甲恶唑	85.7	3.1	93.3	7.1	103.6	5.4
磺胺甲噻二唑	80.7	2.2	81.0	4.1	86.5	4.8
磺胺甲氧哒嗪	80.2	2.6	84.2	7.6	116.4	6.3
磺胺二甲嘧啶	83.3	2.7	85.2	5.8	105.8	3.0
磺胺对甲氧嘧啶	81.6	4.2	89.5	6.4	100.8	3.8
磺胺间甲氧嘧啶	84.6	7.8	96.9	4.6	101.8	3.5
磺胺氯达嗪	80.0	6.1	81.1	9.4	100.9	3.3
周效磺胺	83.6	7.5	84.0	5.4	109.2	1.4
磺胺甲恶唑	85.2	5.9	88.4	4.2	107.3	1.7
磺胺二甲异唑	94.0	2.7	98.0	1.2	112.9	2.5
苯甲酰磺胺	81.8	4.8	84.2	0.8	101.0	2.7
磺胺喹恶啉	88.6	7.9	95.4	4.3	113.0	4.8
磺胺地索辛	85.2	6.3	99.0	7.0	114.0	6.0
磺胺苯吡唑	84.5	4.2	87.1	7.4	90.3	5.6
磺胺硝苯	91.0	6.2	89.4	6.2	106.3	2.4

2.6 实际样品测定

在市内超市采集 4 份鱼罐头、2 份鱼肠、5 份鱼豆腐、4 份鱼丸、1 份鱼皮等 16 份实际样品，利用本文所建立的超高效液相色谱-串联质谱法对上述样品中 24 种磺胺类抗生素残留进行检测，16 份实际样品均未检出磺胺类抗生素。

3 结论

采用 QuEChERS 前处理技术，首次建立了鱼肉制品中 24 种磺胺类抗生素的超高效液相色谱-串联质谱法检测新方法。24 种目标物在各自线性范围内具有良好的线性关系，相关系数均大于 0.999，在 3 个加标浓度水平下的平均加标回收率为 80.0%~116.4%，相对标准偏差（RSD）为 0.8%~9.4%，检出限和定量限分别为 0.01~0.48 μg/kg 和 0.02~1.59 μg/kg。本方法前处理简便、准确度和精密度高、灵敏度好，适用于鱼肉制品中 24 种磺胺类抗生素的同步快速检测，为开展鱼肉制品中磺胺类抗生素的监测提供了技术支持，进一步保障了鱼肉制品的质量。

参考文献

[1] 张婧, 吴剑平, 贡松松, 等. 超高效液相色谱-四级杆-静电场轨道肼高分辨质谱同时快速筛查与确证猪粪中 33 种磺胺类及四环素类药物[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2019(6): 28−32. [ZHANG J, WU J P, GONG S S, et al. Simultaneous rapid screening and confirmation of 33 sulfonamides and tetracyclines in swine manure by ultra performance liquid chromatography-quadruple rod-electrostatic field orbital hydrazine high resolution mass spectrometry[J]. Shanghai J Animal Husbandry Veterinary Med, 2019(6): 28−32.]

[2] 王乐, 李海琴, 王美玲, 等. 基于纳米金-适体结构的智能手机补色波长法检测磺胺二甲嘧啶[J]. 分析测试学报, 2018, 37(8): 967−971. [WANG L, LI H Q, WANG M L, et al. Rapid detection of sulfadimethoxine using a smartphone digital colorimetric method based on aptamer/aunps structure[J]. Instrum Anal, 2018, 37(8): 967−971.]

[3] CHEN Y, XIA S, HAN X, et al. Simultaneous determination of malachite green, chloramphenicols, sulfonamides, and fluoroquinolones residues in fish by liquid chromatography-mass spectrometry[J]. J Anal Methods Chem, 2020, 2020: 3725618.

[4] 赵巧灵, 张薇英, 汤海凤, 等. 快速溶剂萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定养殖鱼肌肉中 19 种磺胺类药物残留[J]. 食品科技, 2019, 44(12): 335−341. [ZHAO Q L, ZHANG W Y, TANG H F, et al. Determination of 19 sulfonamides residues in cultured fish muscle with accelerated solvent extraction by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food Sci Technol, 2019, 44(12): 335−341.]

[5] 李丹, 沈昕, 张玉洁, 等. 高效液相色谱法测定鸡肉中 5 种磺胺类药物及乙氧酰胺苯甲酯增效剂残留量[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(1): 202−208. [LI D, SHEN X, ZHANG Y J, et al. Determination of 5 kinds of sulfonamides and ethopabate residusin chicken by high performance liquid chromatography[J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(1): 202−208.]

[6] 刘桂英, 宋广军, 王召会, 等. 固相萃取-超高效液相色谱串联质谱法测定水产品中磺胺类药物残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(8): 2240−2246. [LIU G Y, SONG G J, WANG Z H, et al. Determination of sulfonamide drugs residues in aquatic product by solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(8): 2240−2246.]

[7] 高振刚, 梁延鹏, 曾鸿鹄, 等. 固相萃取-超高效液相色谱-三重四极杆质谱法测定水中 15 种抗生素残留[J]. 分析试验室, 2021, 40(8): 875−880. [GAO Z G, LIANG Y P, ZENG H H, et al. Detection of 15 antibiotics in water by solid phase extraction-ultra-

high performance liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry[J]. Chin J Anal Lab, 2021, 40(8): 875−880.]
[8] 宋焕杰, 谢卫民, 王俊, 等. SPE-UPLC-MS/MS 同时测定水环境中 4 大类 15 种抗生素 [J]. 分析试验室, 2022, 41(1):50-54. [SONG H J, XIE W M, WANG J, et al. SPE-UPLC-MS/MS simultaneous determination of 15 antibiotics in four categories in water environment[J]. Chin J Anal Lab, 2022, 41(1):50-54..]
[9] ZHOU X, CHEN W Q, DING Y Q, et al. Rapid determination of sulfonamides in chicken using two-dimensional online cleanup mode with three columns coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2019, 1114−1115: 110−118.
[10] DI X, WANG X, LIU Y, et al. Microwave assisted extraction in combination with solid phase purification and switchable hydrophilicity solvent-based homogeneous liquid-liquid microextraction for the determination of sulfonamides in chicken meat[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2019, 1118−1119: 109−115.
[11] 高洁, 陈达炜, 丁宇琦, 等. 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定畜产品中残留的 22 种磺胺类药物[J]. 中国食品卫生杂志, 2018, 30(1): 28−34. [GAO J, CHEN D W, DING Y Q, et al. Determination of 22 sulfonamides in livestock products by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with solid phase extraction[J]. Chin J Food Hyg, 2018, 30(1): 28−34.]
[12] SAXENA S K, RANGASAMY R, KRISHNAN A A, et al. Simultaneous determination of multi-residue and multi-class antibiotics in aquaculture shrimps by UPLC-MS/MS[J]. Food Chem, 2018, 260: 336−343.
[13] 国家市场监督管理总局. GB/T 31650—2019 食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量 [S]. 北京: 中国农业出版社, 2019. [State Administration of Market Supervision. GB/T 31650—2019 National food safety standard. Maximum residue limits for veterinary drugs in food[S]. Beijing: China Agriculture Press, 2019.]
[14] GUIDI L R, SANTOS F A, RIBEIRO A C, et al. A simple, fast and sensitive screening LC-ESI-MS/MS method for antibiotics in fish[J]. Talanta, 2017, 163: 85−93.
[15] HELA W , BRANDTNER M , WIDEK R , et al. Determination of sulfonamides in animal tissues using cation exchange reversed phase sorbent for sample cleanup and HPLC-DAD for detection[J]. Food Chemistry, 2003, 83(4): 601−608.
[16] 张林田, 陆奕娜, 黄学泓, 等. 通过式净化-高效液相色谱-串联质谱法测定动物源性食品中 42 种兽药残留[J]. 分析科学学报, 2020, 36(1): 81−87. [ZHANG L T, LU Y N, HUANG X H, et al. Determination of 42 kinds of veterinary drug residues in animal-derived products by passing purification-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Anal Sci, 2020, 36(1): 81−87.]
[17] 区敏霞. 高效液相色谱同时测定水产品中 7 种磺胺类药物残留的方法改进[J]. 食品安全导刊, 2017(21): 133−135. [QU M X. Improved method for simultaneous determination of 7 sulfonamides residues in aquatic products by high performance liquid chromatography[J]. Chin Food Saf Mag, 2017(21): 133−135.]
[18] ZHANG Y, LIAO W, DAI Y, et al. Covalent organic framework Schiff base network-1-based pipette tip solid phase extraction of sulfonamides from milk and honey[J]. J Chromatogr A, 2020, 1634: 461665.
[19] 李清雪, 孙王茹, 汪庆. SPE-HPLC 测定水中 β-内酰胺类、喹诺酮类、磺胺类抗生素[J]. 中国给水排水, 2019, 35(18): 118−122. [LI Q X, SUN W R, WANG Q. Determination of β-lactams, quinolones and sulfonamides antibiotics in water by SPE-HPLC[J]. Chin Water & Wastewater, 2019, 35(18): 118−122.]
[20] HERRERA-HERRERA A V, HERNANDEZ-BORGES J, AFONSO M M, et al. Comparison between magnetic and non magnetic multi-walled carbon nanotubes-dispersive solid-phase extraction combined with ultra-high performance liquid chromatography for the determination of sulfonamide antibiotics in water samples[J]. Talanta, 2013, 116: 695−703.
[21] MA J, FAN S, SUN L, et al. Rapid analysis of fifteen sulfonamide residues in pork and fish samples by automated on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food Science and Human Wellness, 2020, 9(4): 363−369.
[22] ABAFE O A, GATYENI P, MATIKA L. A multi-class multi-residue method for the analysis of polyether ionophores, tetracyclines and sulfonamides in multi-matrices of animal and aquaculture fish tissues by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2020, 37(3): 438−450.
[23] 庞昕瑞, 曾鸿鹄, 梁延鹏, 等. 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定地表水中 10 种磺胺类抗生素残留[J]. 分析科学学报, 2019, 35(4): 461−466. [PANG X R, ZENG H H, LIANG Y P, et al. Determination of 10 sulfonamide antibiotic residues in surface water by solid phase extraction-ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Anal Sci, 2019, 35(4): 461−466.]
[24] XU X, XU X, HAN M, et al. Development of a modified QuEChERS method based on magnetic multiwalled carbon nanotubes for the simultaneous determination of veterinary drugs, pesticides and mycotoxins in eggs by UPLC-MS/MS[J]. Food Chem, 2019, 276: 419−426.
[25] 谭韬, 刘应杰, 唐倩, 等. 毛细管电泳对水体中多类抗生素的同时分离检测[J]. 重庆医学, 2018, 47(35): 4530−4533. [TAN T, LIU Y J, TANG Q, et al. Simultaneous separation and detection of multiple classes of antibiotics in water by capillary electrophoresis[J]. Chongqing Med, 2018, 47(35): 4530−4533.]
[26] WEN Y, LI J, ZHANG W, et al. Dispersive liquid-liquid microextraction coupled with capillary electrophoresis for simultaneous determination of sulfonamides with the aid of experimental design[J]. Electrophoresis, 2011, 32(16): 2131−2138.
[27] HOFF R. Analysis of sulfonamide residues in bovine liver by liquid chromatography-tandem mass spectrometry without chemical extraction or clean-up procedures[J]. Anal Biochem, 2020, 611: 114011.
[28] WANG J, XU J, JI X, et al. Determination of veterinary drug/pesticide residues in livestock and poultry excrement using selective accelerated solvent extraction and magnetic material purification combined with ultra-high-performance liquid chromatogra-

phy-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2020, 1617.

[29] MARTINS M T, BARRETO F, HOFF R B, et al. Multiclass and multi-residue determination of antibiotics in bovine milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Combining efficiency of milk control and simplicity of routine analysis[J]. International Dairy Journal, 2016, 59: 44−51.

[30] 吴利军, 何斌, 周源, 等. 固相萃取-高效液相色谱法同时检测奶牛粪污中 5 种磺胺类抗生素[J]. 中国兽药杂志, 2020, 54(10): 24−29. [WU L J, HE B, ZHOU Y, et al. Simultaneous determination of five sulfonamide antibiotics in excrement and sewage of dairy farm using solid phase extraction and high performance liquid chromatograph[J]. Chin J Veterinary Drug, 2020, 54(10): 24−29.]

[31] WANG K, ZHAO L, ZHANG C, et al. Determination of 12 insect growth regulator residues in foods of different matrixes by modified QuEChERS and UPLC-MS/MS[J]. RSC Advances, 2021, 11(20): 12162−12171.

[32] 扈斌, 谢瑜杰, 蒋康丽, 等. QuEChERS 结合高效液相色谱三重四极杆串联质谱法测定花椒中 191 种农药残留[J]. 分析试验室, 2021, 40(10): 1154−1165. [HU B, XIE Y J, JIANG K L, et al. Quechers combined with high performance liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry for the determination of 191 pesticide residues in zanthoxylum bungeanum maxim[J]. ChinJ Anal Lab, 2021, 40(10): 1154−1165.]

[33] 童兰艳, 肖昭竞, 李根容, 等. 超高效液相色谱-三重四极杆质谱法测定化妆品中 14 种美白活性成分[J]. 分析试验室, 2022, 41(1): 96−102. [TONG L Y, XIAO Z J, LI G R, et al. Determination of 14 whitening active components in cosmetics by ultra-high performance liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry[J]. Chin J Anal Lab, 2022, 41(1): 96−102.]

张令文, 胡新月, 王雪菲, 等. 小麦粉品质特性与挂糊油炸猪肉片外壳品质的相关性分析 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 309−315. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080284
ZHANG Lingwen, HU Xinyue, WANG Xuefei, et al. Analysis of Correlations between Quality Characteristics of Wheat Flour and Edible Quality of Crusts from Deep-fried and Battered Pork Slices[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 309−315. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080284

· 分析检测 ·

小麦粉品质特性与挂糊油炸猪肉片外壳品质的相关性分析

张令文[1], 胡新月[1], 王雪菲[2], 李欣欣[1], 计红芳[1,*], 毕继才[1], 高海燕[1]
(1.河南科技学院食品学院, 河南新乡 453003;
2.信阳农林学院食品学院, 河南信阳 464399)

摘　要: 本文以 12 个品种小麦粉为研究对象，研究了小麦粉的蛋白质、粉质和拉伸特性等品质指标，及其挂糊油炸猪肉片外壳品质，并分析了小麦粉的品质特性与挂糊油炸猪肉片外壳（CDBPS）品质指标间的相关关系。结果表明，参试小麦粉蛋白及其组分含量在不同品种间存在较大差异，其中总蛋白和湿面筋含量变异系数分别为 15.14% 和 16.56%，球蛋白变异系数高达 62.81%。粉质参数中形成时间、稳定时间、弱化度和粉质质量指数变异系数等均较大，拉伸特性各指标变异系数均大于 20%。挂糊油炸猪肉片外壳含油量与总蛋白含量、面筋指数、麦醇溶蛋白含量，粉质参数的吸水率，拉伸特性的拉伸曲线面积、拉伸阻力和延伸度均具有极显著负相关关系（P<0.01），相关系数分别为−0.739、−0.833、−0.833、−0.797、−0.736、−0.709、−0.722。外壳硬度和易碎性均与总蛋白、麦醇溶蛋白、吸水率、拉伸曲线面积和拉伸阻力呈极显著正相关（P<0.01）。此外，外壳色度与湿面筋、面筋指数、麦醇溶蛋白和拉伸曲线面积也存在多种相关性。本研究可为挂糊油炸肉品糊粉小麦专用粉选择提供一定的科学依据。

关键词: 小麦粉, 挂糊油炸猪肉片, 外壳, 品质, 粉质特性, 拉伸特性
中图分类号: TS202.1　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0309−07
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080284
本文网刊:

Analysis of Correlations between Quality Characteristics of Wheat Flour and Edible Quality of Crusts from Deep-fried and Battered Pork Slices

ZHANG Lingwen[1], HU Xinyue[1], WANG Xuefei[2], LI Xinxin[1], JI Hongfang[1,*], BI Jicai[1], GAO Haiyan[1]
(1.School of Food Science, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003;
2.Food College, Xinyang Agriculture and Forestry University, Xinyang 464399)

Abstract: Flours obtained from 12 different wheat cultivars were employed as materials, the characteristics of protein, the farinographic and tensile properties of wheat flour were measured. Simultaneously, the quality of crusts from deep-fried and battered pork slices (CDBPS) containing wheat flour was explored. Subsequently, the correlations between properties of different wheat flour and quality of CDBPS were analyzed. Result indicated that, the contents of protein and its main fraction in wheat flour were significantly different among different test cultivars. The coefficient of variation of total protein and wet gluten content was 15.14% and 16.56%, respectively, while that of globulin reached 62.81%. The variation coefficients of formation time, dough stability time, weakening degree and farinogram quality number were much larger, and those of each index of extensograph properties was more than 20%. Significantly negative correlations were observed between oil content of CDBPS and total content of protein, gluten index, content of gliadin, water absorption, tensile curve

收稿日期: 2021−08−26
基金项目: 河南省科技攻关项目-重点研发与推广专项（212102110084）; 国家自然科学基金项目（U1504329）; 河南省高层次人才国际化培养资助项目（2020-16）; 河南省高等学校青年骨干教师项目（2017GGJS124）; 新乡市重大科技专项（ZD2020003）。
作者简介: 张令文（1977−）, 男, 博士, 副教授, 主要从事传统食品技术与理论方面的研究, E-mail: lingwen2008@163.com。
*** 通信作者:** 计红芳（1978−）, 女, 博士, 副教授, 主要从事传统食品技术与理论方面的研究, E-mail: jhf300@126.com。

area, tensile resistance, and extensibility (r=−0.739, −0.833, −0.833, −0.797, −0.736, −0.709 and −0.722, respectively, P<0.01). Both the hardness and gradient of CDBPS were positively correlated to the total content of protein and gliadin, water absorption, tensile curve area and tensile resistance (P<0.01). In addition, some correlations among color value of CDBPS and wet gluten, gluten index, gliadin content and tensile curve area were observed. This paper could provide some scientific basis for the selection of special-purpose flour for the batter of CDBPS.

Key words: wheat flour; deep-fried and battered pork slices; crusts; quality; farinographic properties; tensile properties

挂糊油炸肉类制品具有外壳金黄、酥脆、内部肉嫩的特点，深受消费者的喜爱[1−3]。该类制品的外壳品质主要受糊粉成分[4−6]、炸制条件（加热方式、油温、油炸时间和油炸用油等）等因素的影响[7−9]。糊粉的常见成分主要由小麦粉、各种淀粉、膨松剂和食盐等构成[1−2]。国内外学者开展了一些关于蛋白质和淀粉等成分对挂糊油炸肉类制品外壳品质影响的研究[10−13]。戴一朋等[10] 研究了甲基纤维素对面糊流变性能及油炸挂糊肉片油脂渗透的影响，结果发现，甲基纤维素能有效地改善面糊的流变性能以及降低油炸挂糊食品的脂肪含量；张令文等[13] 研究表明，小麦面筋蛋白添加量在 7.5% 时，挂糊油炸猪肉片外壳具有较好的食用品质。现有文献显示，小麦蛋白既能够改善油炸挂糊鸡块外壳的色泽和质构[14]，还可降低油炸挂糊鸡块外壳和挂糊油炸鱿鱼圈外壳的含油量[14−15]。小麦蛋白的组分如麦谷蛋白和麦醇溶蛋白，其比例对挂糊油炸猪肉片外壳的色泽、含水量、含油率和质构等品质也有影响[16]。另外，淀粉以及改性淀粉作为糊的组分，能够影响糊的黏度和挂糊油炸肉品外壳的水分含量、含油量和硬度、脆度等质构品质[17]。

小麦粉作为糊成分中最常用的原料，能够对糊的黏度和制品外壳色泽等食用品质产生重要影响[18−19]。然而，有关小麦粉的蛋白、粉质和拉伸特性等品质性状对挂糊油炸肉类制品外壳色度、含油量和质构等品质的影响研究鲜见报道。本文以 12 个品种小麦粉为研究对象，考察小麦粉的蛋白质及其组分含量、粉质和拉伸特性等品质性状及挂糊油炸猪肉片外壳品质，分析小麦蛋白及组分、小麦粉流变学参数与制品外壳品质的相关关系，以期为挂糊油炸肉类制品小麦专用粉的开发提供一定的试验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

12 个品种小麦　周麦 18Ⅱ、百农 307、百农 201、豫保 1 号、郑麦 103、百农 207、百农 418、西农 979、百农 4199、师栾 02-1、新麦 26、百农 AK58，均来自河南新乡延津小麦产区（2018 年产）；玉米胚芽油　益海嘉里食品营销有限公司；食用盐　山东肥城精制盐厂有限公司；无铝泡打粉　郑州君发科技有限公司；猪腿肉　新乡胖东来生活超市；乳酸、溴酚蓝、碘化钾　均为分析纯，天津市科密欧化学试剂有限公司；十二烷基磺酸钠、考马斯亮蓝　天津市光复精细化工研究所；牛血清蛋白　分析纯，上海麦克林生化科技有限公司；其它试剂未加说明皆为国产分析纯。

EF-101 不锈钢单缸电炸炉　广州威而宝有限公司；B811 全自动脂肪测定仪　瑞士布奇公司；LRMM-8040-3-D 型实验磨粉机　江苏无锡锡粮机械公司；HM4400 多功能搅拌器　Caple 公司；820604 型粉质仪　德国 Brabender 公司；Extensograph®-E 型电子式拉伸仪　德国 Brabender 公司；CR400 色差仪　柯尼卡美能达控股株式会社；TA.XT2i 物性测定仪　英国 Stable Micro Systems 公司；XW-80A 漩涡混合器　江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司；SHA-C 水浴恒温振荡器　常州国华电器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 小麦粉的制备　12 种小麦种子经润麦后利用实验磨粉机磨粉，出粉率 60% 左右。磨粉机主要参数：每对磨辊两端弹簧长度为 52 mm，筛链的链中心到每边的偏心距为 1.25 cm，磨辊轧距为 0.1 mm。

1.2.2 小麦粉的品质分析

1.2.2.1 小麦粉的蛋白品质　蛋白含量参照 GB/T 5009.5-2010 凯氏定氮法，蛋白质的换算系数取 5.7；SDS 沉降值采用 NY/T 1095-2006 小麦沉淀值测定 Zeleny 法测定；湿面筋含量测定采用 GB/T 5506.2-2008 小麦和小麦粉面筋含量第 2 部分：仪器法测定湿面筋测定；面筋指数采用 SB/T 10248-1995 小麦粉湿面筋质量测定方法-面筋指数法测定。

小麦粉中蛋白质各组分的测定参考刘锐等[20]、赵清宇[21] 的方法。小麦粉中蛋白质各组分的提取方法如下：a.清蛋白：称取 1.00 g 试样于 50 mL 离心管中，加 10 mL 蒸馏水，用漩涡混匀器振荡混匀后将离心管转移至 45 ℃ 水浴振荡器中，振荡（100 r/min）提取 30 min。提取后离心（5000 r/min）20 min，将上清液移入凯氏管中。用蒸馏水如上法洗涤残渣 2 次，每次加水 10 mL，离心 10 min；第 1 次振荡 20 min，第 2 次振荡 10 min；上清液并入提取液中；b.球蛋白：向 a.得到的残渣中加入 10 mL 10% 氯化钠溶液，同前提取离心操作，并用氯化钠溶液洗涤残渣 2 次，提取液移入凯氏管中。c.麦醇溶蛋白：向 a.得到的残渣中加入 10 mL 75% 的乙醇，同前提取离心操作，并用氯化钠溶液洗涤残渣 2 次，提取液移入凯氏管中。d.麦谷蛋白：向 a.得到的残渣中加入 10 mL 0.2% 的氢氧化钠溶液，同前提取离心操作，并用 0.2% 氢氧化钠溶液洗涤残渣 2 次，提取液移入凯氏管中。后续测定与蛋白含量测定步骤相同。

1.2.2.2 小麦粉的粉质特性分析　利用粉质仪参考 GB/T 14614-2006 小麦粉面团的物理特性吸水量和

流变学特性的测定粉质仪法测定。主要测定条件为：慢搅拌叶片转速 63 r/min，扭力矩 9.9 mN·m/FU。

1.2.2.3　小麦粉的拉伸特性分析　利用拉伸仪参考 GB/T 14615-2006 小麦粉面团的物理特性流变学特性的测定拉伸仪法测定。主要测定条件为：搓球装置转速 83 r/min，面团辊转速 15 r/min，拉伸钩速度 14.5 mm/s。

1.2.3　挂糊油炸猪肉片外壳制备及其品质分析

1.2.3.1　挂糊油炸猪肉片外壳制备　参考张令文等[13]的方法制备挂糊油炸猪肉片外壳。首先，取小麦粉 150 g，用搅拌器将其与 100 g 小麦淀粉、2.5 g 泡打粉和 3.75 g 食盐搅拌均匀后，加入 325 mL 饮用水，用多功能搅拌器 1 档再次搅拌 3 min 后得糊。随后，将猪肉片（3 cm× 2 cm× 0.6 cm）转移至铝盒中，移取 5 mL 上一步制得的糊于不锈钢纱网上，放置 2 min 后转移至 180 ℃ 玉米胚芽油中初次油炸 100 s 后取出，待油温升至 200 ℃ 后再次油炸 60 s。最后，待样品预冷至室温后，迅速分离，得挂糊油炸猪肉片外壳。

1.2.3.2　挂糊油炸猪肉片外壳品质分析　a.表观色度：使用色差仪测定样品的 L^*、a^*和 b^*值；b.含水量：参考 GB 5009.3-2016 食品安全国家标准 食品中水分的测定进行；c.含油量：参考 GB 5009.6-2016 食品安全国家标准 食品中脂肪的测定测定；d.质构：使用质构仪参考李春红等[22]方法并进行修改，测定条件为：试验动作，返回起点，选择 1 mm/s 为测前、测中、测后速度；感应力 Auto-5 g；测试距离 20 mm；数据采集速率为 400 pps。

1.3　数据处理

实验中每组数据均重复 3 次，结果以平均值±标准差表示。采用 Microsoft Excel 2016 进行数据处理、SPSS19.0（IBM 公司）进行统计分析，差异显著性分析采用 LSD 检验法，显著性水平选取 P<0.05、极显著水平选取 P<0.01。

2　结果与分析

2.1　不同品种小麦粉的品质分析

2.1.1　小麦粉的蛋白品质　12 种小麦粉的蛋白品质如表 1 所示。实验范围内小麦粉的总蛋白含量为 8.16%~14.00%，湿面筋含量为 19.00%~39.10%，面筋指数为 65.75%~99.69%；总蛋白质平均含量为 11.40%，湿面筋平均含量为 29.79%，SDS 沉降值平均为 58.77 mL。

表 1　不同品种小麦粉的蛋白品质

Table 1　The protein quality of flour from different wheat cultivars

指标	平均值	标准差	变幅	极差	变异系数(%)
总蛋白含量(%)	11.40	1.73	8.16~14.00	5.84	15.14
清蛋白含量(%)	3.07	0.54	2.08~3.93	1.86	17.69
球蛋白含量(%)	0.97	0.61	0.22~2.53	2.31	62.81
麦醇溶蛋白含量(%)	3.48	0.47	2.79~4.44	1.65	13.44
麦谷蛋白含量(%)	3.74	0.35	3.06~4.18	1.12	9.28
湿面筋含量(%)	29.79	4.93	19.00~39.10	20.10	16.56
面筋指数(%)	88.37	9.94	65.75~99.69	33.94	11.25
SDS沉降值(mL)	58.77	15.30	36.00~81.60	45.60	26.03

依据 GB/T 17320-2013 小麦品种品质分类小麦粉的品质指标标准对参试小麦粉进行评价，除豫保 1 号和郑麦 103 制备的小麦粉外，其余样品属于中高筋粉。总蛋白和湿面筋含量的变异系数较大，其值分别为 15.14% 和 16.56%，表明参试小麦粉中蛋白质存在较大的差异[23]。从总蛋白、湿面筋含量、面筋指数及 SDS 沉降值来看，12 种小麦粉品种间个体差异较大，本次实验所选取的原料比较有代表性；同时也表明，不同品种小麦粉之间的差异，不利于食品加工企业对挂糊油炸猪肉片品质的控制。

12 种小麦粉的不同蛋白组分变异系数均较大，其中，球蛋白变异系数最大，为 62.81%；麦醇溶蛋白的变异系数也较大（13.44%）；麦谷蛋白变异系数最小（仅为 9.28%）（表 1）。此外，本文参试样品蛋白质各组分含量与张媛等[24]的研究结果相似。

2.1.2　小麦粉的粉质特性　粉质曲线与小麦粉内在质量关系密切，可作为小麦原料品质评估的重要参数[25−26]。粉质特性中吸水率较大的小麦粉品质相对较好，形成时间越长则面团弹性越强，稳定时间越长则面筋强度越大，弱化度大则面粉筋力弱[27]。除吸水率外，形成时间、稳定时间、弱化度和粉质质量指数的变异系数均较大；其中，形成时间变异系数最大，弱化度变异系数较小，但仍高达 78.99%（表 2）。由表可知，参试的 12 种小麦粉粉质特性差异较大，不利于餐饮行业和食品加工企业对挂糊油炸制品品质的控制。

表 2　不同品种小麦粉的粉质特性

Table 2　Farinographic properties of flour from different wheat cultivars

指标	平均值	标准差	变幅	极差	变异系数(%)
吸水率(%)	58.09	5.78	48.10~70.70	22.60	9.96
形成时间(min)	5.25	7.18	1.40~28.50	27.10	136.74
稳定时间(min)	7.88	6.95	1.70~25.20	23.50	88.24
弱化度(BU)	64.25	50.75	5.00~171.00	166.00	78.99

2.1.3　小麦粉的拉伸特性　拉伸特性参数中，面团的拉伸曲线面积、拉伸阻力、延伸度，拉伸比例分别为：27.00~250.00 cm^2、165.00~569.00 BU、97.00~206.00 mm、1.10~3.40。拉伸特性各参数的变异系数均大于 20%；其中，拉伸曲线面积变异系数高达 72.09%（表 3）。可见参试小麦粉的加工品质存在差异[28−29]，所选样品具有代表性。

2.2　不同品种小麦粉制作的挂糊油炸猪肉片外壳品质

不同品种小麦粉对挂糊油炸猪肉片外壳亮度、红度和黄度影响不同，其中对 a^*值影响最大，变异系数高达 39.17%；对 L^*值影响最小，变异系数仅为

表 3 不同品种小麦粉的拉伸特性

Table 3 Tensile properties of flour from different wheat cultivars

指标	平均值	标准差	变幅	极差	变异系数(%)
拉伸曲线面积(cm^2)	92.67	66.80	27.00~250.00	223.00	72.09
拉伸阻力(BU)	321.96	122.57	165.00~569.00	404.00	38.07
延伸度(mm)	141.83	31.95	97.00~206.00	109.00	22.53
拉伸比例	2.26	0.63	1.10~3.40	2.30	27.95

6.42%。含不同品种小麦粉的挂糊油炸猪肉片外壳含水量和含油量分别为 8.50%~19.52%、13.97%~33.48%, 变异系数均大于 20%。不同品种小麦粉对外壳质构参数的影响均较大, 硬度和易碎性变异系数分别为 26.07%、26.44%, 均超过 20%; 对脆性影响相对较小, 变异系数为 13.06%(表 4)。可以看出, 12 种小麦粉制备的挂糊油炸猪肉片外壳品质差别较大, 在加工挂糊油炸肉类制品时, 应考虑选择适宜的小麦粉。

2.3 小麦粉品质特性与挂糊油炸猪肉片外壳品质的相关性

2.3.1 小麦粉的蛋白品质与挂糊油炸猪肉片外壳品质的相关分析 不同品种小麦粉的蛋白品质与挂糊油炸猪肉片外壳品质间的相关性分析结果见表 5。总蛋白含量与含油量呈极显著负相关(r=−0.739, P<0.01), 与 a^*值、b^*值、硬度和易碎性均具有正相关关系。杨念[30]研究小麦粉理化性质与油条品质的关系时发现, 小麦粉蛋白含量与速冻油条含油率呈负相关(r=−0.507, P<0.05); 吴欣[31]研究报道小麦蛋白含量与油条硬度相关具有正相关关系, 相关系数为 0.477。可以看出, 上述两位学者的研究报道与本文研究结果类似。

小麦蛋白的组成中, 麦醇溶蛋白与 L^*值呈显著负相关(P<0.05), 而与 b^*值呈极显著正相关(P<0.01); 麦醇溶蛋白和球蛋白均与 a^*值、易碎性和硬度呈正相关关系, 与含油量呈显著负相关关系(相关系数分别为−0.833、−0.612, P<0.05)。张媛[32]研究发现, 小麦粉麦醇溶蛋白和球蛋白与油条含油率的相关系数分别为−0.263、−0.624, 与本文研究结果类似。此外, 麦谷蛋白与外壳的易碎性和硬度均呈显著正相关, 而张媛[32]报道麦谷蛋白与油条的硬度呈显著负相关(r=−0.802, P<0.05), 这可能与小麦粉来源、油条与挂糊油炸猪肉片外壳的加工方式等不同有关。

湿面筋含量与外壳 a^*和 b^*值、硬度均具有正相关关系, 相关系数分别为 0.736(P<0.01)、0.660(P<0.05)和 0.613(P<0.05), 而与 L^*值呈显著负相关(r=−0.697, P<0.05)。陈丽等[33]研究发现, 小麦粉湿面筋含量与油条硬度的相关关系 r 值为 0.571, 与本文研究结果类似。面筋指数与 L^*值和含油量均呈负

表 4 含不同品种小麦粉的挂糊油炸猪肉片外壳品质

Table 4 Quality of crusts from deep-fried and battered pork slices containing flour from different wheat cultivars

指标	平均值	标准差	变幅	极差	变异系数(%)
L^*	51.99	3.34	45.39~58.05	12.66	6.42
a^*	6.79	2.66	3.46~10.65	7.19	39.17
b^*	19.68	2.10	16.68~24.60	7.92	10.69
含水量(%)	12.49	2.93	8.50~19.52	11.02	23.46
含油量(%)	23.56	5.40	13.97~33.48	19.51	22.91
易碎性(g/s)	1213.75	320.89	809.49~2042.72	1233.23	26.44
硬度(g)	9682.34	2524.54	6460.87~15793.49	9332.62	26.07
脆性(mm)	8.08	1.06	5.97~9.48	3.51	13.06

表 5 小麦粉蛋白品质与挂糊油炸猪肉片外壳品质的相关性

Table 5 Correlation between characteristics of flour protein from different wheat cultivars and quality of crust from deep-fried and battered pork slices

指标	湿面筋	面筋指数	沉降值	总蛋白	清蛋白	球蛋白	麦醇溶蛋白	麦谷蛋白
L^*	−0.697*	−0.589*	−0.651*	−0.567	0.433	−0.485	−0.637*	−0.289
a^*	0.736**	0.723**	0.749**	0.676*	−0.522	0.651*	0.783**	0.507
b^*	0.660*	0.586*	0.529	0.588*	−0.400	0.428	0.756**	0.519
含水量	−0.342	0.003	−0.208	−0.055	−0.076	0.012	0.031	0.109
含油量	−0.539	−0.833**	−0.695*	−0.739**	0.581*	−0.612*	−0.833**	−0.545
易碎性	0.534	0.780**	0.666*	0.766**	−0.610*	0.681*	0.828**	0.670*
硬度	0.613*	0.674*	0.610*	0.806**	−0.569	0.696*	0.783**	0.605*
脆性	−0.101	0.129	−0.127	0.073	−0.193	0.104	0.209	0.014

注: *表示相关性显著(P<0.05); **表示相关性极显著(P<0.01); 表6~表7同。

相关，相关系数分别为−0.589（P<0.05）和−0.833（P<0.01）；与 a^*值、b^*值、易碎性和硬度呈正相关。沉降值与 L^*值和含油量呈显著负相关（P<0.05），而与 a^*值、易碎性和硬度呈正相关（表 5）。

2.3.2　小麦粉粉质特性与挂糊油炸猪肉片外壳品质相关分析　挂糊油炸猪肉片外壳 L^*值与粉质参数中的面团稳定时间呈极显著负相关（r=−0.792，P<0.01），与弱化度呈极显著正相关（r=0.722，P<0.01）；而 a^*值与稳定时间呈显著正相关（r=0.604，P<0.05），与弱化度呈显著负相关（r=−0.616，P<0.05）（表 6）。

表 6　小麦粉的粉质特性与挂糊油炸猪肉片外壳品质的相关分析

Table 6　Correlation between farinographic properties of flour and quality of crust from deep-fried and battered pork slices

指标	吸水率	形成时间	稳定时间	弱化度
L^*	−0.410	−0.091	−0.792**	0.722**
a^*	0.447	0.385	0.604*	−0.616*
b^*	0.210	0.275	0.476	−0.544
含水量	0.184	0.403	−0.404	0.311
含油量	−0.797**	−0.553	−0.644*	0.637*
易碎性	0.773**	0.734**	0.576	−0.500
硬度	0.775**	0.683*	0.676*	−0.416
脆性	0.104	0.214	0.024	0.058

含油量与吸水率、稳定时间均呈负相关关系，相关系数分别为−0.797、−0.644；而与弱化度呈显著正相关（r=0.637，P<0.05）。此外，外壳易碎性和硬度均与吸水率、形成时间呈正相关关系（表 6）。

2.3.3　小麦粉拉伸特性与挂糊油炸猪肉片外壳品质相关分析　小麦粉的拉伸参数与挂糊油炸猪肉片外壳品质间存在多种相关性（表 7）。拉伸曲线面积和拉伸阻力均与 L^*值和含油量呈负相关关系，而均与色度 a^*值、质构参数的硬度和易碎性呈正相关。陈丽等[33]研究小麦粉拉伸特性与油条质构关系时，也得到类似的结果，拉伸阻力与油条硬度呈显著正相关（r=0.887，P<0.05）。面团的延伸度与外壳含油量呈极显著负相关（r=−0.722，P<0.01），而与易碎性和硬度具有正相关关系，相关系数分别为 0.863、0.632。此外，拉伸比例与外壳 L^*值具有极显著负相关（r=−0.797，P<0.01），与含水量具有显著负相关关系（r=−0.589，P<0.05），而与 a^*值呈显著正相关（r=0.700，P<0.05）。

表 7　小麦粉拉伸特性与挂糊油炸猪肉片外壳品质相关分析

Table 7　Correlation between tensile properties of flour and quality of crust from deep-fried and battered pork slices

指标	拉伸曲线面积	拉伸阻力	延伸度	拉伸比例
L^*	−0.627*	−0.801**	−0.278	−0.797**
a^*	0.729**	0.822**	0.471	0.700*
b^*	0.582*	0.558	0.487	0.330
含水量	−0.094	−0.334	0.264	−0.589*
含油量	−0.736**	−0.709**	−0.722**	−0.387
易碎性	0.836**	0.734**	0.863**	0.317
硬度	0.834**	0.798**	0.632*	0.535
脆性	0.036	−0.153	0.205	−0.379

3　结论

小麦粉作为挂糊油炸肉品糊成分的最常用原料，其品质特性对挂糊油炸肉品外壳品质有影响。不同品种小麦粉对挂糊油炸猪肉片外壳色度、吸油率和质构品质影响不同。试验结果表明，小麦粉总蛋白、麦醇溶蛋白含量，粉质参数的吸水率，拉伸特性的拉伸曲线面积和拉伸阻力均与挂糊油炸猪肉片外壳的含油量呈极显著负相关（P<0.01），而与外壳硬度和易碎性具有极显著正相关关系（P<0.01）。此外，外壳色度与麦醇溶蛋白、湿面筋、面筋指数和拉伸曲线面积也具有不同相关性。小麦粉的蛋白品质、粉质特性和拉伸参数与挂糊油炸猪肉片外壳品质间存在多种相关关系。餐饮和食品加工企业可通过调控小麦粉蛋白质及其组分-麦醇溶蛋白含量，以及配粉的拉伸特性等小麦粉品质特性来改善挂糊油炸肉品的外壳品质。

参考文献

[1] 计红芳，张令文，王方，等. 糊的组成成分对挂糊油炸肉制品品质影响的研究进展[J]. 食品工业科技，2017，38(4)：384−389. [JI H F, ZHANG L W, WANG F, et al. Research progress of effects of batter composition on edible quality of deep-fat-fried battered meat product[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(4): 384−389.]

[2] 张令文，杨铭铎，计红芳，等. 淀粉对油炸挂糊猪肉片品质的影响[J]. 食品工业科技，2013，34(8)：114−117. [ZHANG L W, YANG M D, JI H F, et al. Effect of starches on the quality of deep-fried battered pork slices[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(8): 114−117.]

[3] JEONG S, KWAK J, LEE S. Machine learning workflow for the oil uptake prediction of rice flour in a batter-coated fried system[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2021: 102796.

[4] SABANIS D, TZIA C. Effect of rice, corn and soy flour addition on characteristics of bread produced from different wheat cultivars[J]. Food and Bioprocess Technology, 2009, 2: 68−79.

[5] NASIRI F D, MOHEBBI M, YAZDI F T, et al. Effects of soy and corn flour addition on batter rheology and quality of deep fat-fried shrimp nuggets[J]. Food Bioprocess Technology, 2012, 5(4): 1238−1245.

[6] 吴鹏，高子武，还传明，等. 炸糊配方对速食鸡块得率及质构的影响[J]. 美食研究，2020，37(4)：51−56. [WU P, GAO Z W, HUAN C M, et al. Effect of frying paste formula on yield and texture of instant chicken nuggets[J]. Journal of Researches on Dietetic Science and Culture, 2020, 37(4): 51−56.]

[7] DIAMANTE L M, PRESSWOOD H A, Savage G P, et al. Vacuum fried gold kiwifruit: Effects of frying process and pretreatment on the physico-chemical and nutritional qualities[J]. International Food Research Journal, 2011, 18: 632−638.

[8] 张令文，鄂正博，计红芳，等. 远红外辅助油炸对挂糊油炸猪

肉片食用品质的影响[J]. 湖北农业科学, 2014, 53(2): 404−406. [ZHANG L W, E Z B, JI H F, et al. Effect of far-infrared assisted frying on edible quality of battered and fried pork slices[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2014, 53(2): 404−406.]
[9] 姜万舟, 汪倩, 王瑞花, 等. 挂糊鳙鱼块油炸工艺优化及不同工艺对非挥发性呈味物质的影响[J]. 食品工业科技, 2016, 37(7): 182−187. [JIANG W Z, WANG Q, WANG R H, et al. Process optimization and analysis of non-volatile flavor compounds of deep-frying coated *Aristichthys nobilis*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(7): 182−187.]
[10] 戴一朋, 章海风, 凌晓冬, 等. 甲基纤维素对面糊流变性能及油炸挂糊肉片油脂渗透的影响[J]. 食品工业科技, 2021, 42(22): 79−85. [DAI Y P, ZHANG H F, LING X D, et al. Effect of methylcellulose on rheological properties of batter and oil permeation of fried pork slices[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(22): 79−85.]
[11] SALVADOR A, SANZ T, FISZMAN S M. Rheological properties of batters for coating products-effect of addition of corn flour and salt[J]. Food Science and Technology International, 2003, 9: 23−27.
[12] CHING L W, ZULKIPLI N A M, MUHAMAD I I, et al. Dietary management for healthier batter formulations[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 113: 411−422.
[13] 张令文, 王方, 计红芳, 等. 小麦面筋蛋白对挂糊油炸猪肉片外壳食用品质的影响[J]. 中国粮油学报, 2018, 33(9): 13−18. [ZHANG L W, WANG F, JI H F, et al. Effect of wheat gluten protein on the edible quality of crusts from deep-fried battered pork slices[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2018, 33(9): 13−18.]
[14] DOGAN S F, SAHIN S, SUMNU G. Effects of soy and rice flour addition on batter rheology and quality of deep fat-fried chicken nuggets[J]. Journal of Food Engineering, 2005, 71: 127−132.
[15] ZENG H, CHEN J, ZHAO J, et al. Reduction of the fat content of battered and breaded fish balls during deep-fat frying using fermented bamboo shoot dietary fiber[J]. LWT-Food Science and Technology, 2016, 73: 425−431.
[16] 张令文, 王雪菲, 琚星, 等. 麦谷蛋白/麦醇溶蛋白对挂糊油炸猪肉片外壳食用品质的影响[J]. 食品工业科技, 2020, 41(9): 14−19. [ZHANG L W, WANG X F, JU X, et al. Effect of glutenin-gliadin ratio on the edible quality of crusts from deep-fried battered pork slices[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(9): 14−19.]
[17] ZHANG L, YANG M, JI H, et al. Some physicochemical properties of starches and their influence on color, texture, and oil content in crusts using a deep-fat-fried model[J]. CyTA Journal of Food, 2014, 12(4): 347−354.
[18] AMBOON W, TULYATHAN V, TATTIYAKUL J. Effect of hydroxypropyl methylcellulose on rheological properties, coating pick-up, and oil content of rice flour-based batters[J]. Food and Bioprocess Technology, 2012, 5(2): 601−608.
[19] RAHIMI J, NGADI M O. Surface ruptures of fried batters as influenced by batter formulations[J]. Journal of Food Engineering, 2015, 152: 50−56.
[20] 刘锐, 魏益民, 张波, 等. 面条制作过程中蛋白质组成的变化[J]. 中国食品学报, 2013, 13(11): 198−204. [LIU R, WEI Y M, ZHANG B, et al. Changes of protein composition in the noodle processing and cooking[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2013, 13(11): 198−204.]
[21] 赵清宇. 小麦蛋白特性对面条品质的影响 [D]. 郑州: 河南工业大学, 2012. [ZHAO Q Y. The influence of protein characteristics on noodles quality[D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2012.]
[22] 李春红, 潘家荣, 张波. 物性测试仪对休闲食品酥脆性的测量[J]. 现代科学仪器, 2008, 6: 59−62. [LI C H, PAN J R, ZHANG B. The crispness measurements to snack foods using texture analyzer[J]. Modern Scientific Instruments, 2008, 6: 59−62.]
[23] 冷越, 唐梦琦, 周梦舟, 等. 小麦粉品质与调味面制品品质的相关性分析[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(16): 109−114. [LENG Y, TANG M Q, ZHOU M Z, et al. Correlation between wheat flour quality and seasoning flour products quality[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(16): 109−114.]
[24] 张媛, 宣以峰, 陈婷婷, 等. 小麦蛋白和淀粉特性与油条品质的相关性研究[J]. 食品科技, 2016, 41(6): 178−182. [ZHANG Y, XUAN Y F, CHEN T T, et al. Correlation of wheat protein, starch properties and deep-fried dough sticks quality[J]. Food Science and Technology, 2016, 41(6): 178−182.]
[25] 付一山. 面粉企业质量与工艺控制的一些思考[J]. 现代面粉工业, 2011, 5: 39−41. [FU Y S. Some thoughts on quality and process control of flour enterprises[J]. Modern Flour Milling Industry, 2011, 5: 39−41.]
[26] 黄亚伟, 杨壮. 小麦粉质特性的可见/近红外光谱快速测定研究[J]. 中国粮油学报, 2016, 31(3): 120−123. [HUANG Y W, YANG Z. Rapid determination of flour farinograph parameters using visible/near infrared spectroscopy[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2016, 31(3): 120−123.]
[27] 潘治利, 田萍萍, 黄忠民, 等. 不同品种小麦粉的粉质特性对速冻熟制面条品质的影响[J]. 农业工程学报, 2017, 33(3): 307−314. [PAN Z L, TIAN P P, HUANG Z M, et al. Effects of flour characteristics of different wheat cultivars on quality of frozen cooked noodles[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2017, 33(3): 307−314.]
[28] 张智勇, 王春, 孙辉, 等. 小麦粉理化特性与面条评分相关性的研究[J]. 中国粮油学报, 2012, 27(9): 10−15. [ZHANG Z Y, WANG C, SUN H, et al. Study on the correlation between noodle quality and the physico-chemical properties of wheat flour[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2012, 27(9): 10−15.]
[29] 潘治利, 罗元奇, 艾志录, 等. 不同小麦品种醇溶蛋白的组成与速冻水饺面皮质构特性的关系[J]. 农业工程学报, 2017, 32(4): 242−248. [PAN Z L, LUO Y Q, AI Z L, et al. Relationship between composition of gliadin and texture properties of quick-frozen dumpling skins based on different wheat varieties[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2017, 32(4): 242−248.]
[30] 杨念. 发酵型速冻油条的制作及冻藏过程中品质变化与改良的研究 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2017. [YANG N. Production,

quality changes and improvement of fermented frozen bread stick in frozen storage[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2017. ］

［31］吴欣. 小麦蛋白质及其组分对油条品质的影响研究 [D]. 合肥: 合肥工业大学, 2014. ［WU X. Study on the effect of wheat protein content and glutenin-to-gliadin ratio to you-tiao's quality[D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2014. ］

［32］张媛. 小麦蛋白和淀粉加工性质变化及其对油条品质的影响 [D]. 合肥: 合肥工业大学, 2016. ［ZHANG Y. Changes of wheat protein and starch during the processing in relation to the you-tiao's quality[D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2016. ］

［33］陈丽, 张媛, 宣以锋, 等. 五个品种小麦的品质分析与加工油条质构特性的相关性研究［J］. 食品科技 , 2015, 40(4): 209−214. ［CHEN L, ZHANG Y, XUAN Y F, et al. Effect of wheat grain and their flour from 5 varieties on the texture of fried bread stick［J］. Food Science and Technology, 2015, 40(4): 209−214. ］

乔明锋, 蔡雪梅, 魏宇, 等. 基于化学分析和智能感官方法对不同产地川醋特征风味物质的比较分析 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 316−326. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080308

QIAO Mingfeng, CAI Xuemei, WEI Yu, et al. Evaluation of the Flavor Characteristics of Vinegar from Different Sichuan Regions Based on Chemical Analysis and Intelligent Sensory[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 316−326. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080308

· 分析检测 ·

基于化学分析和智能感官方法对不同产地川醋特征风味物质的比较分析

乔明锋[1], 蔡雪梅[1], 魏　宇[1,2], 易宇文[1], 刘　阳[1], 邓　静[1], 吴华昌[1,*]

（1.烹饪科学四川省高等学校重点实验室, 四川旅游学院, 四川 成都 610100;
2.数字媒体艺术四川省重点实验室, 四川音乐学院, 四川 成都 610041）

摘　要: 研究通过化学分子分析和智能感官等方法对四川不同产地晒醋品质进行比较分析。采用氨基酸自动分析仪、高效液相色谱（HPLC）、固相微萃取气相色谱与质谱联用（SPME-GC-MS）等化学分析方法对样品氨基酸、有机酸、挥发性有机物（VOCs）的种类和含量进行测定分析。通过感官评价，利用电子鼻、电子舌等智能感官结合主成分分析（PCA）和聚类分析（CA）进行表征。结果表明，四种川醋 pH3.08~3.29，总酸度 16.40%~18.07%，色泽中 a^*和 b^*有显著差异（$P<0.05$）；共检出 17 种氨基酸，其中，丙氨酸和谷氨酸含量最高；测定乙酸、酒石酸等 9 种有机酸，总含量在 22.44~70.06 mg/mL，其中，乙酸和乳酸占总有机酸的 50% 以上，自贡醋样品的有机酸含量最高（70.06 mg/mL）；共检出 150 多种挥发性有机化合物，其中，酸类（21.56%~44.34%）含量最丰富，眉山醋样中酯类和苯二氮类化合物等种类和相对含量较高；电子鼻、电子舌 PCA 的前两个主成分之和超过累计方差的 98%，电子鼻 CA 分析显示自贡和眉山醋样差异较大，可能与其感官评价中的涩味及挥发性有机物中酮类、杂环类等的数量有关，电子舌 CA 分析显示自贡与眉山和南充醋样差异较大，则可能是由 pH、总氨基酸、必需氨基酸、有机酸和总酸的差异引起的。通过化学分析、感官分析、智能感官评价结合化学计量法，可以用来表征样品因原料、工艺、配方等因素引起差异的相关性。本研究为建立可靠的中国食醋风味表征提供实用参考，为食醋质量和真实性评价提供了有效依据。

关键词: 风味物质, 化学分析, 智能感官, 化学计量学, 醋, 不同产地

中图分类号: TS264.2　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0316−11

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080308

本文网刊:

Evaluation of the Flavor Characteristics of Vinegar from Different Sichuan Regions Based on Chemical Analysis and Intelligent Sensory

QIAO Mingfeng[1], CAI Xuemei[1], WEI Yu[1,2], YI Yuwen[1], LIU Yang[1], DENG Jing[1], WU Huachang[1,*]

（1.Cuisine Science Key Laboratory of Sichuan Province, Sichuan Tourism University, Chengdu 610100, China;
2.Digital Media Art Key Laboratory of Sichuan Province, Sichuan Conservatory of Music, Chengdu 610041, China）

Abstract: The objective of this study was to compare and analyze the quality of four kinds of traditional vinegar from Sichuan Province. Through chemical analysis methods such as automatic amino acid analyzer, high-phase liquid chromatography (HPLC) and solid-phase microextraction gas-phase-mass-spectrometry (SPME-GC-MS) technologies were used to determine and analyze the types and contents of amino acids, organic acids, and volatile organic compounds (VOCs). Finally, in addition to sensory analysis, intelligent sensory such as electronic nose and electronic tongue combined with principal component analysis (PCA) and cluster analysis (CA) were used for characterization. The results showed that:

收稿日期: 2021−08−27

基金项目: 四川省科技厅应用基础研究项目（2021YJ0275）; 数字媒体艺术四川省重点实验室开放基金（20DMAKL07）; 固态发酵资源利用四川省重点实验室开放基金（2019GTY005）。

作者简介: 乔明锋（1985−）, 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 食品化学, E-mail: mfqiao@163.com。

*** 通信作者:** 吴华昌（1970−）, 男, 硕士, 教授, 研究方向: 传统食品发酵, E-mail: 694549215@qq.com。

The pH and total acid ranges of the Sichuan vinegar samples were from 3.08 to 3.29, and 16.40% to 18.07%, respectively. The color parameter a^* and b^* values were tested to be significantly different (P<0.05). A total of 17 kinds of amino acids were detected, of which alanine and glutamic acid had the highest content. Among 9 organic acids tested, including acetic acid and tartaric acid, the total organic acid content was 22.44~70.06 mg/mL, of which acetic acid and lactic acid accounted for more than 50% of the total organic acids, and Zigong vinegar had the highest organic acid content (70.06 mg/mL). More than 150 volatile organic compounds were detected in the experiment, of which acids (21.56%~44.34%) were the most abundant. It was found that the types and relative contents of unique flavor substances in traditional Chinese vinegar, such as esters and benzodiazepines, were found in Meishan vinegar, and it was significantly higher than Zigong and Nanchong vinegar samples. The sum of the first two principal components of PCA of electronic nose and electronic tongue was more than 98% of the cumulative variance. The difference of CA analysis between Zigong vinegar and Meishan vinegar was mainly due to the degree of astringency in sensory evaluation and the number of ketones and heterocycles in volatile organic compounds. The difference of CA of electronic tongue was mainly caused by the difference of pH, total amino acid, essential amino acid, organic acid and total acid between Zigong, Meishan and Nanchong vinegar. Chemical analysis, sensory evaluation and intelligent sensory combined with chemometric method can be used to characterize the correlation of four Sichuan vinegar samples due to differences in raw materials, processes, formulas, etc. This article can provide a practical reference for establishing a reliable characterization of Chinese vinegar, provide an effective tool for the evaluation of vinegar quality and authenticity, and help to understand the relationship between the internal and external quality characteristics of vinegar.

Key words: flavor characteristics; chemical analysis; intelligent sensory evaluation; chemometrics; vinegars; different regions

Vinegar is consumed worldwide not only as a condiment, but also as ingredient and a preservation product for a wide range of foods, especially in the Chinese diet, which is produced from alcoholic and subsequent acetic fermentation of any cereals or fruits rich in carbohydrates, containing approximately 5%~20% of acetic acid[1−2]. Chinese vinegar has a history of more than 3000 years, with a strong regional characteristic, for example, Shanxi Province is famous for mature vinegars and Jiangsu Province for aromatic vinegars, and a large amount of vinegar is produced and consumed every year in China[3−4]. Due to the diversity commercially available of vinegar types on the market and the increase on demand, the quality assessment of vinegars has been more and more attracting the attention of people and it has been considered necessary to develop reliable analytical methodologies to establish criteria for determining quality and origin.

As known, the quality of food is the result of a harmonious equilibrium among parameters having a different origin: Chemical, physical, biological, and organoleptic. Flavor is the most important parameters in the assessment of vinegar character and quality, which depends on the raw materials (rice, sticky rice, wheat bran, sugar, salt, and so on), the constituents formed during the fermentation, bacteria and environmental climate, especially in natural fermentation[5]. Traditionally, sensory and instrumental techniques are used to describe the flavor of vinegar[6−7]. However, sensory analysis requires panels of trained technicians, and low-cost experimental methods such as destructive mechanical tests and other conventional physicochemical measurements are specific for a particular quality index, instead of providing comprehensive quality information[8]. On the other hand, high-end instrumental techniques such as high performance liquid chromatography (HPLC), gas chromatography with mass spectrometry (GC-MS), could provide information on the chemical compositions of the sample[9−10]. Nevertheless, these analytical techniques often require laborious and time-consuming sample preparation, as well as skilled personnel to operate the equipment and interpret the analytical results[11−12].

There were many researches about determination and analysis of components in vinegars. The main organic components of vinegar were identified and quantified by HPLC and high resolution ^{1}H NMR spectroscopy[13−14]. Many analytical methods had been used to characterize the aroma profiles and the aroma-active compounds in vinegar samples, such as supercritical fluid extraction (SFE), solvent-assisted, flavor evaporation (SAFE), headspace stir bar sorptive extraction (HSSE) and solid-phase micro-extraction (SPME), the aroma extract dilution assay (AEDA), gas chromatography-olfactometry (GC-O)[15−20]. Moreover, sensory analysis and various chemical analysis methods, intelligent sensory evaluation instruments are employed to discriminate many

different kinds of food, such as electronic nose (e-nose) and electronic tongue (e-tongue), which offer a fast, comprehensive, and easy-to-handle alternative to assess food quality[21−22]. Compared to the information from a single sensory organ, simultaneous application of e-noses and e-tongues may increase the amount of information extracted from a sample, which will be a very promising technique for characterizing vinegar. However, according to the knowledge, few studies have been reported about the flavor characterization of Chinese vinegars using e-nose, e-tongue, HPLC, SPME-GC-MS and other analytical instruments simultaneously.

In this work, e-nose, e-tongue, HPLC, solid-phase microextraction, and gas chromatography with mass spectrometry (SPME-GC-MS), automatic amino acid analyzer and other analytical instruments were simultaneously applied to identify and quantify the flavor quality of four Chinese vinegars in Sichuan, combined with multivariate analysis tools, such as PCA and cluster analysis (CA), providing method reference for qualitative and quantitative comprehensive analysis of the quality of vinegar.

1 Materials and methods

1.1 Materials and instruments

Four famous commercial Chinese vinegars Sichuan Province, known as the "land of plenty" and the origin for a rich and diverse cuisine, were purchased from a local market in Chengdu, China, and they were all produced by solid state fermentation for three years. Table 1 lists the name, raw materials, and production area which were copied from the vinegar bottle labels; 9 organic acids: Oxalic acid, tartaric acid, pyruvic acid, malic acid, lactic acid, acetic acid, citric acid, succinic acid and n-propionic acid Aladdin Biochemical Technology Co., Ltd.; All the other chemicals used were at least of analytical grade.

DC-P3 Automatic Chromatic Meter Xingguang Instruments Co., Ltd., China; PHSJ-3F pH Meter Shanghaileici Instruments Co., Ltd., China; L-8900 High-Speed Amino Acid Analyzer Hitachi Instruments Co., Ltd., Japan; Waters 2695 High Performance Liquid Chromatography Waters & Milford Instruments Co., Ltd., USA;57330U Supelco Solid Phase Microextraction Sampler (with Manual Injection Handle), 57318 CAR/PDMS Fibre (75 mm) Supelco Inc., USA; SQ680 Gas Chromatography and Mass Spectrometer PerkinElmer Inc., USA; FOX 4000 Electronic, α-Astree Electronic Tongue Alpha Nose MOS, France; Other commonly used laboratory equipment.

1.2 Experimental methods

1.2.1 Sample pretreatment All sample vinegars were kept in a refrigerator at 4 ℃.

1.2.2 Analysis of physico-chemical properties Total acid: 10 mL of vinegar was mixed with 20 mL of distilled water and the mixture was titrated up to pH8.2 by using 0.1 mol/L NaOH. Total acid was expressed as acetic acid equivalent[23] (titratable acid by titration with 0.1 mol/L NaOH to phenolphthalein end point).

Total sugar: The total sugar content was done by anthrone-sulfuric acid colorimetry method according to the method of CHEN et al[24].

pH measurement: The sample pH was measured using a pH meter acoording to GB 5009.237-2016 National standard for food safety determination of pH value of food.

Color measurement: Surface color was measured with an automatic chromatic meter and prior to analysis, the instrument calibrated against a standard white reference tile (GSB A67002-86). The color results were expressed in terms of CIE *LAB* scale parameters L^*, a^* and b^* representing lightness, red-green and yellow-blue, respectively. All analyses were carried out in triplicate.

1.2.3 Amino acids analysis The free amino acid (FAA) contents were analyzed using an L-8900 High-Speed Amino Acid Analyzer according to GONG et al[25], with a modification. Briefly, after centrifuging at 10000 r/min for 10 min, all the centrifuged samples of were deproteinized with 10% trichloroacetic acid, and then all of free amino acids were quantitated using O-phthalaldehyde (OPA)/9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC) derivatives with an L-8900 High-Speed Amino Acid Analyzer according to the previous description.

Table 1 The details of the vinegar samples utilized in the experiment

Sample	Name	Raw materials	Production area
1	Taiyuanjing	water, bran, rice, vinegar koji, caramel	Zigong
2	Langzhou	water, bran, rice, vinegar koji, wheat, sugar, salt	Nanchong
3	Qianhe	water, glutinous rice, wheat, sorghum, corn, buckwheat, sugar, salt	Meishan
4	Baoning	water, bran, rice, glutinous rice , wheat, corn	Nanchong

1.2.4 Organic acids analysis HPLC Sample: All vinegar samples were centrifuged at 10000 r/min for 10 min , and then were filtered through a 0.22 μm membrane prior to HPLC analysis[26].

The reference value of 9 organic acids (oxalic acid, tartaric acid, pyruvic acid, malic acid, lactic acid, acetic acid, citric acid, succinic acid and n-propionic acid) was determined by HPLC according to the method of LU, et al[27]. Briefly, appropriate amount of each standard product was weighed and dissolved in water to prepare standard reserve solution. The concentrations were 2.00 mg/mL (lacticacid) , 2.00 mg/mL (n-propionic acid), 2.20 mg/mL (citric acid), 2.00 mg/mL (acetic acid), 2.00 mg/mL (malic acid), 2.00 mg/mL (tartaric acid), 0.85 mg/mL (pyruvate), 0.80 mg/mL (oxalic acid) and 4.00 mg/mL (succinic acid). Stored in a refrigerator at 4 ℃, when used, the standard mixed working solution with appropriate concentration was diluted step by step with the mobile phase. A mixture of different concentrations of standard solution is used to make a standard curve for the determination of actual samples.

The HPLC conditions were as follows: The instrument was equipped with a 717+ automatic injector with 20 μL once, and a 2996 Photodiode Array detector (PDA) UV at 210 nm. Separation was achieved using an Agilent Zorbax SB-C_{18} column (5 μm, 4.6 mm×250 mm) at 25 ℃.

The mobile phase was 20 mmol/L NaH_2PO_4 (0.01 mol/L potassium dihydrogen phosphate solution was used with pH of 2.60), with a flow rate of 1.00 mL/min. The running time was set as 8 min. The settings were based on several trials and previous similar studies[28]. All organic acids were recorded on a computer-based data system with standard substance. Each organic acid was quantified by the calibration curve of the authentic standards.

1.2.5 SPME-GC-MS analysis The SPME conditions: Added 2 mL vinegar sample each time and put it into 15 mL sample bottle. After that, 2.5 g sodium chloride was added, the cap was tightened, and placed in a constant temperature water bath at 50 ℃ for balancing for 10 min. The fiber head was pushed out about 1.5 cm away from the liquid level, and the headspace adsorption lasted for 40 min. The stirring speed was 250 r/min. After the extraction operation was completed, the fiber head should be rotated first, then the extraction head should be slowly removed, and then the extraction head should be carefully placed into the sampling port of the gas chromatography equipment, and the fiber head should be pushed out to the specified length for desorption, and the desorption should be completed within 5 min[29].

The GC conditions were as follows: Chromatographic column: Elite-5 MS (30 m×0.25 mm×0.25 μm); Inlet temperature: 250 ℃; Heating procedure: Hold at 40 ℃ for 3 min, rise to 140 ℃ at 6 ℃/min, hold for 4 min, rise to 250 ℃ at 20 ℃/min, hold for 2 min; Carrier helium (99.999%), flow rate 1 mL/min, split ratio was 5∶1.

The MS conditions were as follows: Electron ionization with ion source, 70 eV of electron energy, full-scan scanning mode, a scanning mass (m/z) range of 35~400 amu, the scanning delay was 1.1 min; ion source temperatures of 200 ℃ and transmission line temperatures of 250 ℃.

Identifications were achieved by matching both the retention indices and the mass spectra of reference standards. For the compounds with which no reference standard was available, tentative identification was made through comparing the mass spectra with those of the known compounds from the standard NIST 2011 library and comparing the retention indices sourced from NIST Standard Reference Database.

1.2.6 E-nose analysis Flavor analysis was performed with a Fox 4000 electronic nose with three metal oxide sensors chambers equipped with 18 sensors (LY2/AA, LY2/G, LY2/g CT, LY2/g CTl, LY2/Gh, LY2/LG, P10/1, P10/2, P30/1,P30/2, P40/1, P40/2, PA2,T30/1, T40/2, T70/2, T40/1, TA2) , and the carrier gas was TOC grade synthetic air (P=5 psi). Prior to detection, each sample (5 g) was placed in a 10 mL airtight glass vial for 5 min at 50 ℃ (headspace-generation time and temperature), and the measurement phase lasted for 120 s, which was long enough for the sensors to reach stable signal values, and after each measurement, zero gas (air filtered by active carbon) was pumped into the sample gas path from the other port of the instrument for 180 s (flush time). The signal data from the sensors were collected by the computer once per second during the measurements, and when the measurement process completed, the acquired data were stored. Each test was repeated 5 times.

1.2.7 E-tongue analysis Taste analysis was performed with α-Astree e-tongue consisting of an array of seven liquid cross-sensitive electrodes or sensors named ZZ, BA, BB, CA, GA, HA, and JB,

respectively, a 16-position autosampler, and associated interface electronic module. 80 mL of each sample was injected into a 120 mL beaker for detection. The measuring time was set to 120 s for each sample, and the sensors were rinsed for 10 s using ultrapure water to reach stable potential readings before detecting the next sample. Four replicated measurements were run on each sample. The first three measurement cycles were discarded due to instability, and only the fourth stable sensor responses were obtained to be the original data from the sample.

1.2.8 Sensory evaluation Table 2 was a reference brewing vinegar (GB/T 18187-2000 Brewed vinegar) of the vinegar on the sensory index of the vinegar sensory scoring criteria, with modification. Briefly, sensory evaluation of the vinegar was conducted by a panel of 5 judges with rich experiences on vinegar descriptive analysis. A total of 9 descriptors of appearance (color and clarity), aroma (ester, burnt and vinegar), taste/flavor (sweet, sour and umami) and mouth-feel (astringency) were selected by the panel. Intensity ratings were scored on a scale from 0 to 10.

1.3 Statistical analyses

All tests were conducted according to a completely randomized design and the experiments were performed at least in three replicates. Analysis of variance (ANOVA) was used to search for significant differences between mean values of the different results, and the results were presented as means±SD. Furthermore, principal component analysis (PCA) and cluster analysis (CA) were carried out with the aim of highlighting the main contributors to the variance amongst samples. Statistical analyzes were carried out using the software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), version 18.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) and Origin 9.1 (Origin Lab Corporation, Northampton, MA, USA).

2 Results and discussion

2.1 Physicochemical properties

Table 3 showed physicochemical properties of the four vinegar samples, and a wide variability was observed in the values, indicating remarkable differences (P<0.05) in vinegar qualities. In this study, total sugar values of the vinegars varied in a wide range (from 0.40 to 0.92 g/100 g), representing a high variability. Compared with Shanxi aged vinegar, the total acid of fresh vinegar could reach 0.76 g/100 g, and that of eight-years vinegar could even reach 5.72 g/100 g[26]. Therefore, the main reasons for the change of total acid content may be raw materials, fermentation microorganisms and storage time[31].

In addition, total acid levels of the vinegar samples were generally correlated with their pH, varying from 16.40% to 18.07%, in conformity with Codex Alimentarius Commission (CAC). The pH of the vinegar samples varied from 3.08 to 3.29, in accordance with the previous studies[4]. In general, other traditional vinegars had higher pH, for example, Shanxi aged vinegar from 3.67 to 3.88[26] and that of Zhenjiang vinegar from 3.35 to 3.97[32]. Color was an important factor affecting consumer perception when buying vinegar, and color properties (L^*, a^* and b^*) of the vinegar samples were shown in Table 3, too. L^*, indicating the brightness, ranged from −12.08 to −15.51. Both a^* and b^* of the samples were almost variable among the samples, indicating that color properties of the vinegar were very different from each other.

2.2 Amino acids and organic acids assay

In addition to acetic acid, vinegar is also rich in organic acids, amino acids, mineral substances, and so on, playing a role on its organoleptic properties. Table 4 showed amino acids contents of the vinegar samples. In general, Ala, Glu, Ser, Gly, Val, Leu, Pro and Lys were the most abundant amino acids present in the vinegars. While, Cys and His, of which quantities

Table 2 Sensory evaluation rules of the vinegar

Sensory characteristics	Scoring item	Method[30]	score
Appearance	color	pour into the colorimetric tube, observe under a white background	from 0 to10 0: none; 1~2: very weak; 3~4: ordinary; 5~6: moderate; 7~8: strong; 9~10: very strong
	clarity	pour colorimetric tube to observe the presence of suspended solids and impurities	
Aroma (Flavor)	ester burnt vinegar	pour into the bottle with a soft shaking its aroma	
Taster	sweet sour umami	dropper take a little into the tongue and coated with mouth to identify the taste	
Mouth-feel	astringency		

Table 3　Physicochemical properties of four Chinese vinegars in Sichuan

Index	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
Total sugar (g/100 g)	0.92±0.04^{a}	0.45±0.01^{c}	0.40±0.01^{c}	0.65±0.02^{b}
Total acid (%)	18.07±0.96^{a}	17.62±0.82^{a}	16.40±0.76^{b}	16.57±0.75^{b}
pH	3.29±0.06^{a}	3.15±0.05^{b}	3.08±0.05^{b}	3.15±0.04^{b}
L^{*}	−15.51±0.22^{a}	−13.67±0.39^{b}	−12.08±0.87^{b}	−15.03±0.34^{a}
a^{*}	1.55±0.15^{c}	1.09±0.10^{d}	6.64±0.21^{a}	2.42±0.16^{b}
b^{*}	-1.32±0.19^{b}	1.18±0.21^{c}	3.33±0.40^{a}	-0.86±0.19^{d}

Note: Different lowercase letters in the same line indicate significant differences (P<0.05). Table 4~Table 5 were the same.

Table 4　The amino acids content of four Chinese vinegars in Sichuan (mg/100 mL)

	Amino acids	Taste threshold[33]	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
MSG-like AA	Asp	100	98.56±0.73^{a}	26.19±0.38^{d}	51.74±0.48^{c}	60.75±0.57^{b}
	Glu	30	129.12±1.04^{c}	119.13±1.29^{d}	142.67±0.90^{b}	161.74±1.12^{a}
	Lys*	50	103.06±1.37^{a}	16.37±0.21^{d}	49.38±0.77^{c}	54.82±0.77^{b}
Total	/	/	330.74	161.69	243.79	277.31
Sweet AA	Pro	300	183.55±1.43^{a}	71.92±0.68^{c}	66.09±0.76^{d}	112.21±0.96^{b}
	Thr*	260	69.51±0.70^{b}	45.06±0.41^{c}	36.92±0.41^{d}	74.36±0.62^{a}
	Ser	150	107.64±0.63^{a}	63.55±1.24^{c}	53.87±0.75^{d}	92.42±1.12^{b}
	Gly	130	103.92±1.09^{a}	56.92±1.22^{c}	41.96±1.00^{d}	82.73±0.93^{b}
	Ala	60	385.04±0.92^{a}	217.35±1.24^{c}	113.02±0.76^{d}	254.41±1.08^{b}
	His*	20	20.64±0.23^{a}	2.80±0.04^{d}	18.82±0.20^{b}	8.79±0.11^{c}
Total	/	/	870.3	457.6	330.68	624.92
Bitter AA	Val*	40	173.60±1.29^{a}	98.38±1.33^{c}	72.16±1.08^{d}	134.32±0.91^{b}
	Met*	30	32.83±0.33^{b}	31.96±0.54^{c}	23.52±0.27^{d}	41.68±0.40^{a}
	Ile*	90	98.54±0.90^{b}	72.67±0.44^{c}	44.98±0.65^{d}	105.48±0.88^{a}
	Leu*	190	225.39±1.92^{a}	159.74±1.67^{c}	106.41±1.13^{d}	218.58±1.63^{b}
	Phe*	90	81.96±0.84^{a}	48.00±0.62^{c}	60.24±0.60^{b}	80.94±0.84^{a}
Total	/	/	612.32	410.75	307.31	581
Tasteless AA	Cys	/	6.87±0.26^{b}	8.99±0.39^{a}	3.34±0.23^{c}	7.50±0.34^{b}
	Tyr	/	33.37±0.53^{a}	19.48±0.32^{b}	18.69±0.39^{c}	32.80±0.67^{a}
	Arg	/	89.20±0.96^{a}	39.84±0.51^{c}	24.91±0.39^{d}	54.55±0.71^{b}
	Pro	/	183.55±1.43^{a}	71.92±0.68^{c}	66.09±0.76^{d}	112.21±0.96^{b}
Total	/	/	312.99	140.23	88.12	207.06
Essential AA	/	/	805.53	474.98	412.43	718.97
Total AA	/	/	2126.35	1170.27	969.9	1690.29

Note: * represents the essential amino acids.

were always lower than 20.00 mg/100 mL, were the amino acids with the lowest amounts among the other amino acids tested. It attracted attention grabbing that the sample 1 was the richest one in terms of the amounts of a group of amino acids, namely Asp, Gly, Ala, Val, Lys, Arg, and Pro. In addition, it could note that the content of Glu, Lys, Ala, Val, Met and Leu in the four samples exceeded the known sensory threshold, which would give the vinegar umami, sweet, bitter and other tastes. The contents of total AA and essential AA (ranged from 969.9 mg/100 mL to 2126.35 mg/100 mL, from 412.43 mg/100 mL to 805.53 mg/100 mL, respectively) in four samples of Sichuan vinegar were significantly higher than sample in Zhenjiang vinegar (ranged from 871.04 to 1082.26 mg/100 mL, from 39.38 to 40.65 mg/100 mL, respectively)[30]. Many amino acids are the intermediates of some volatile compounds that can influence vinegar quality, while others such as L-arginine and L-histidine are precursors of harmful substances such as ethyl carbamate and histamine, respectively.

Organic acids are vital compounds of vinegars because they greatly contribute to sensory quality and functional activity, and the content of organic acids is variable and depends on several factors, mainly raw materials, techniques of processing and microbiological growth. The organic acids content of samples were determined by HPLC as the same method of 9 authentic standards (Fig.1), and the statistical values were shown in Table 5. First, it was evident that almost all of the measured organic acids were significantly above known sensory thresholds. Different organic acids had different flavor descriptions, which could prove that Sichuan vinegar had rich flavor levels. In vinegars, the most abundant organic acids were acetic acid and lactic acid, which aggregately accounted for more than 50% of the total acids. Additionally, tartaric acid, malic acid, citric

Table 5 The organic acids content ,flavor profile and flavor threshold of four Chinese vinegars in Sichuan (mg/mL)

Organic acids	Description of flavor profile	Flavor threshol	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
Lactic acid	slightly astringent, mild acid	0.19	22.06±0.40^{a}	10.73±0.09^{c}	5.69±0.07^{d}	20.52±0.23^{b}
N-propionic acid	/	/	18.20±0.33^{a}	1.95±0.04^{d}	2.75±0.07^{c}	4.88±0.15^{b}
Citric acid	refreshing, fresh sour taste	0.40	12.09±0.11^{a}	2.88±0.08^{c}	2.73±0.03^{d}	4.68±0.04^{b}
Acetic acid	pungent sour taste	0.18	11.75±0.14^{a}	8.86±0.05^{c}	9.23±0.10^{b}	6.22±0.04^{d}
Malic acid	pleasant sour taste	0.49	2.41±0.09^{a}	1.37±0.06^{c}	1.12±0.03^{d}	2.08±0.07^{b}
Tartaric acid	slightly astringent, strong sour taste	0.47	1.52±0.07^{a}	0.56±0.04^{c}	0.43±0.01^{d}	0.76±0.02^{b}
Pyruvic acid	sour, salty	0.31	0.77±0.02^{a}	0.14±0.01^{c}	0.11±0.01^{d}	0.22±0.01^{b}
Oxalic acid	an astringent taste of acid	0.24	0.59±0.04^{a}	0.43±0.02^{b}	0.28±0.01^{d}	0.36±0.01^{c}
Succinic acid	contains a sour, salty, bitter taste	0.23	0.67±0.02^{a}	0.13±0.01^{c}	0.10±0.01^{d}	0.41±0.01^{b}
Total (9)	/	/	70.06	27.05	22.44	40.13

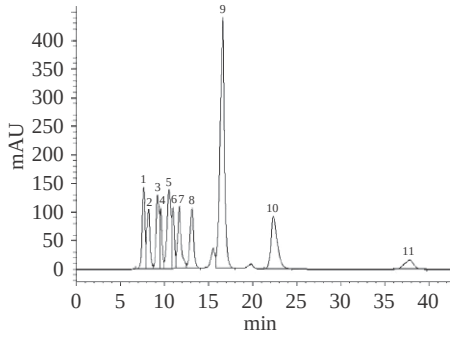


Fig.1 HPLC chromatogram of different organicacids standard solution

Note: 1. n-propionic acid; 2.oxalic acid; 3.tartaric acid; 4.pyruvic acid; 5.malic acid; 6.α-ketoglutaric acid; 7.lactic acid; 8.acetic acid; 9.citric acid; 10.fumaric acid; 11.succinic acid.

acid and propionic acid were major organic acids in the vinegars samples, comprising 28~49 g/L of the total quantified acids. The total organic acid content in different samples of vinegar was very different. Quantities of total organic acids of the vinegars ranged from 22.44 mg/mL to 70.06 mg/mL, and it was attention grabbing that the sample1 was the richest one in terms of the amounts of a group of all organic acids. In fact, even the same place of vinegar, organic acid content would be very different. For example, in 16 samples of Chishui vinegar, the content of total organic acids varied greatly from 34.69 mg/mL to 108.03 mg/mL[28].

2.3 Volatile organic compounds (VOCs) assay

Aroma is important quality criteria for vinegar samples, and the volatile organic compounds (VOCs) identification responsible for their aroma is considered to be a key factor for quality and authentication control. These compounds were grouped according to their chemical structure as esters, alcohols, acids, aldehydes, ketones, heterocyclic, benzodiazepines and others. For all the compounds detected, the mean relative areas percentages and the number of the volatiles in each class of different vinegar samples were demonstrated in Fig.2.

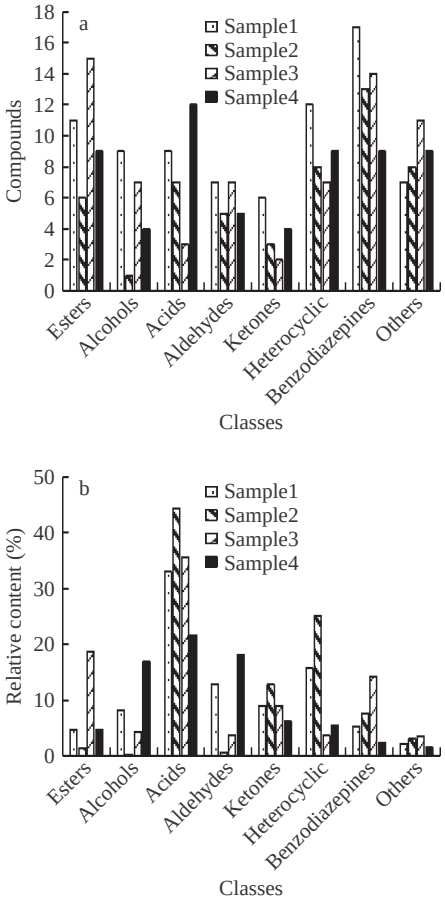


Fig.2 Substance classification statistics of flavor counpounds(a) and relative content(b) in vinegar samples

In total, more than 150 VOCs were isolated and identified in the four commercial Chinese vinegars in Sichuan. And most of these compounds have been found in vinegars previously[20,25]. Table 6 showed the identification results of 26 main volatile flavor components in four kinds of vinegar by SPME-GC-MS.

Acids and esters still had the most abundant volatile flavor compounds in the four samples, accounting for 21.56%~44.34% and 4.64%~29.47%, respectively. In terms of specific volatile compounds, glacial acetic acid (19.65%~38.00%), 2-methyl-3-heptanone (4.18%~8.98%), 2-pentadecyl-1,3-

Table 6　The relative content of volatile flavor compounds (>1.00%) in sample vinegar

Compounds	Relative content (%)			
	Sample1	Sample2	Sample3	Sample4
Total esters (4/24)	29.47	24.79	23.34	4.64
Ethyl acetate	2.15		5.95	3.02
3-methylbutyl 2-hydroxypropanoate			3.83	
Isoamyl acetate			4.73	
Phenethyl acetate	0.72	0.25	2.84	0.35
Total alcohols (4/14)	8.14	0.02	4.26	16.88
2,3-Butanediol	4.36		1.15	13.99
Phenethyl alcoho	2.79			2.02
(R,R)-2,3-Butanediol			1.69	
Furfuryl alcohol			1.01	0.73
Total acids (5/20)	33.08	44.34	35.62	21.56
Glacial acetic acid	26.45	38.00	35.43	19.65
Butanedioic acid, monopropargyl ester	5.38			
3-chloro-2,2-dimethyl-Propanoic acid		2.59		
L-(-)-3-Phenyllactic acid	0.01	1.35		
3-methyl-4-oxo-Pentanoic acid		1.35		
Total aldehydes (1/10)	12.87	0.6	3.77	18.08
Furfura	12.2		2.76	16.52
Total ketones (3/8)	9.05	12.78	9.03	6.22
2-methyl-3-Heptanone	7	7.12	8.98	4.18
2-Hydroxy-2-butanone	0.83	3.84		1.94
3-Hydroxy-2-butanone	0.75	1.82		0.08
Total heterocyclic (6/22)	15.72	25.07	3.68	5.45
3,5-dimethyl-1H-Pyrazole-1-methanol,		12.95		
2-Pentadecyl-1,3-dioxepane	6.63	9.35	2.68	1.44
Tetramethylpyrazine	3.7			0.47
2,3,5-Trimethylpyrazine	2		0.08	
2-pentadecyl-1,3-Dioxepane,		0.36		1.07
2,4,5-trimethyl-1,3-oxazole	1.01			
Total benzodiazepines (3/30)	5.28	7.64	14.28	2.33
Isobutylbenzene			9.4	
1,2,3,5-tetramethyl-Benzene,	2.41	2.27		
1,2,3,4-tetramethyl-Benzene,		1.76		
Total others (3/23)	2.13	3.15	3.61	1.56
ethyl-Hydrazine,		1.51	1.94	
methoxy-phenyl-Oxime-,	1.54		0.14	0.43
1,2,3,4-tetramethyl-5-methylene-1,3-Cyclopentadiene,		0.91	1.1	
Total compounds (26/151)	90.95	93.72	91.01	76.72

dioxepane (1.44%~9.35%), the three compounds, had high relative content and were all contained in the four samples of vinegar, which may be the important components of aromatic substances in Sichuan vinegar.

In terms of the unique volatile flavors that make up the samples, butanedioic acid, monopropargyl ester (5.38%), 2,4,5-trimethyl-1,3-oxazole (1.01%) in sample1 were unique in terms of their unique volatile flavors. And the relative content was more than 1.00%, it was very likely to constitute the unique flavor of aromatic substances. Similarly, four compounds in Sample2 (3,5-dimethyl-1H-Pyrazole-1-methanol, 3-chloro-2, 2-dimethyl-Propanoic acid, 3-methyl-4-oxo-Pentanoic acid, 1,2,3,4-tetramethyl-benzene) and Sample3 contained isobutylbenzene (9.4%), isoamyl acetate (4.73%), 3-methylbutyl 2-hydroxypropanoate (3.83%), (R,R)-2,3-butanediol (1.69%) were likely to be unique aromatic substances.

2.4　E-nose and e-tongue assay

The characterization and discrimination of food have been widely investigated with chemometric tools, such as principal component analysis (PCA) and cluster analysis (CA)[34]. The PCA results of the vinegars data obtained from e-nose and e-tongue were shown in Fig.3 (b) and Fig.4 (b) .The first two principal components were kept because they totaled more than 98% of the variance in the data set (PC1 and PC2 accounted for 99.933 and 98.155 of e-nose and e-tongue, respectively). The PCA results were redrawn in two or three groups, and it was evident that sample 1 and 2 obviously differed from the other two vinegars detected by e-nose and e-tongue.

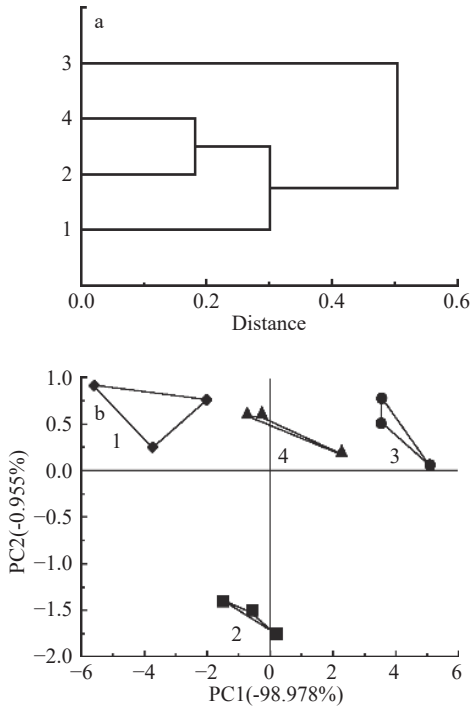


Fig.3 CA (a) and PCA (b) results of the vinegars data obtained from e-nose

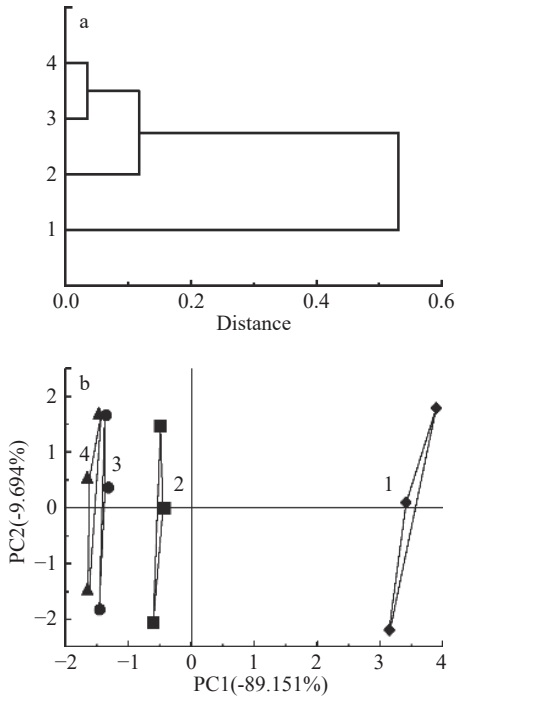


Fig.4 CA (a) and PCA (b) results of the vinegars data obtained from e-tongue

As mentioned above, vinegars contained a large amount of components, such as esters, alcohols, aldehydes, phenol, glucose and aminophenol, though main ingredients were water and acetic acid, and all the components contributed to smell, taste and the responses of the e-nose and e-tongue. Traditionally, Chinese vinegars had a strong regional characteristic. Although the production areas of the four vinegars samples were in the same province, good separation could still be seen by CA in Fig.3 (a) and Fig.4 (a), although there were more or less overlaps.

It noticed that there was a slight discrepancy between the e-nose and e-tongue in the dendrogram, the difference was mainly due to the differences in the samples of different Sichuan vinegars. From Fig.3 (a), it was known that the difference in the CA analysis of the e-nose was mainly due to the great difference between sample1 and sample 3. Through the analysis of Fig.3 (a) and Fig.5, it could be known that it may be related to the astringent in the sensory evaluation and the number of ketones, heterocycli, and other in VOCs. Similarly, as shown in Fig.4(a), the difference of electronic tongue CA analysis mainly lied in the great difference between sample 1 and sample 3 and sample 4, which may related to the pH of the sample, total amino acids, essential amino acids, organic acid, and total acid.

2.5 Results and analysis of sensory evaluation

A quantitative description analysis was carried on the indicators of vinegar based on Table 2, in order

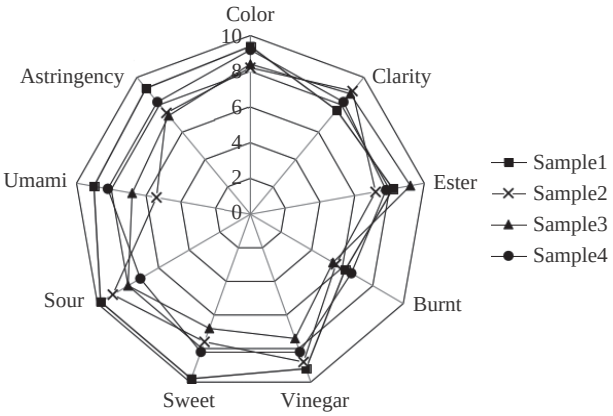


Fig.5 Results of sensory evaluation for 4 vinegar samples

to express the sensory results of all vinegar groups more clearly. Based on the sensory quantitative analysis results of the 4 samples, a radar graph was made, as shown in Fig.5.

As shown in Fig.5, the color score of the four sample vinegars showed a correlation with L^*. The smaller L^*, the higher the color score. It could be that the sensory color score was related to the brightness of the vinegar color. Up to a point, the darker the vinegar, the higher the score. Burnt score of vinegar were basically similar, but there were distinct differences in tastes (sweet, sour, umami) and aroma (vinegar and ester). Sweet score were as follows: Sample 1 (9.80±0.45)>sample 2 (8.20±0.55)>sample 3 (7.6±0.45)>sample 4 (6.8±0.45), which were consistent with the content of total sugar and sweet amino acid. Similarly, the order of umami score was consistent

with MSG-like amino acid. In contrast, Sour score was not entirely determined by the total amount of organic acids. This may be caused by different sensory thresholds for different acids[35]. In terms of flavor, there was no obvious trend in the score of esters and vinegar. This may be because it depends not only on the amount of species and relative content in the flavor of the sample vinegar, but also on the effect of the threshold and combined effect of other compounds such as different esters and acids[33].

3 Conclusions

There were significant differences in the technical formula and testing and evaluation indicators of traditional vinegar in China. In this paper, for the four Sichuan vinegar samples produced in Sichuan, physical and chemical testing, chromatographic analysis, sensory evaluation, intelligent sensory, chemometrics and other analytical methods are used to determine the total sugar, total acidity, pH, L^*, a^*, b^*, amino acids, organic acids, and volatile flavor substances of the four Sichuan vinegar samples were analyzed and compared.

The experimental results showed that compared with Shanxi aged vinegar and Zhenjiang vinegar, the color index and total sugar of the four Sichuan vinegar samples did not change much. The content of total acid, total amino acid and essential amino acid was generally higher, while pH was just the opposite. Compared with Chishui vinegar, the total organic acid content of Sichuan vinegar samples was smaller. Regarding the content of VOCs, 26 major compounds (relative content>1.00%) were identified from 151 VOCs. Among samples, three organic compounds may be considered as common components that constitute the aroma of Sichuan vinegar. Samples 1, 2, and 3 had 2, 4, and 4 VOCs, respectively, which could be considered as their unique flavor substances. Sensory evaluation method and intelligent sensory combined with chemometric method could be used to characterize the correlation of four Sichuan vinegar samples due to differences in raw materials, processes, formulas, etc. This article would provide a practical reference for establishing a reliable characterization of Chinese vinegar, provide an effective tool for the evaluation of vinegar quality and authenticity, and help to understand the relationship between the internal and external quality characteristics of vinegar.

The differences in the characteristic flavors of vinegar from in Sichuan were compared, but this article did not make a specific and in-depth study on the reasons for the differences. In the study of volatile flavors, the qualitative, quantitative, and description of flavors at the molecular level have not been able to conduct a comprehensive and in-depth analysis of the flavors of vinegar. In future research, systematic molecular sensory technology can be used to conduct detailed research on the specific factors that cause the difference in characteristic flavor substances of Sichuan vinegar.

参考文献

[1] YIN Y, YU H, ZHANG H. A feature extraction method based on wavelet packet analysis for discrimination of Chinese vinegars using a gas sensors array[J]. Sensors and Actuators B:Chemical, 2008, 134(2): 1005−1009.

[2] XIAO Z, DAI S, NIU Y, et al. Discrimination of Chinese vinegars based on headspace solid-phase microextraction-gas chromatography mass spectrometry of volatile compounds and multivariate analysis[J]. Journal of Food Science, 2011, 76(8): C1125−C1135.

[3] JIANG Y J, HUANG B W, LI T, et al. Optimization of production process and flavor analysis of rose vinegar by fed fermentation[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2019, 35(15): 304−311.

[4] WU J J, MA Y K, ZHANG F F, et al. Biodiversity of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in the fermentation of "Shanxi aged vinegar", a traditional Chinese vinegar[J]. Food Microbiology, 2012, 30(1): 289−297.

[5] PIZARRO C, ESTEBAN-DÍEZ I, SÁENZ-GONZÁLEZ C, et al. Vinegar classification based on feature extraction and selection from headspace solid-phase microextraction/gas chromatography volatile analyses: A feasibility study[J]. Analytica Chimica Acta, 2008, 608(1): 38−47.

[6] DEL SIGNORE A. Chemometric analysis and volatile compounds of traditional balsamic vinegars from Modena[J]. Journal of Food Engineering, 2001, 50(2): 77−90.

[7] CALLEJÓN R M, TESFAYE W, TORIJA M J, et al. Volatile compounds in red wine vinegars obtained by submerged and surface acetification in different woods[J]. Food Chemistry, 2009, 113(4): 1252−1259.

[8] BEULLENS K, KIRSANOV D, IRUDAYARAJ J, et al. The electronic tongue and ATR-FTIR for rapid detection of sugars and acids in tomatoes[J]. Sensors and Actuators B:Chemical, 2006, 116(1-2): 107−115.

[9] PROESTOS C, SERELI D, KOMAITIS M. Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS[J]. Food Chemistry, 2006, 95(1): 44−52.

[10] MAYR C M, CAPONE D L, PARDON K H, et al. Quantitative analysis by GC-MS/MS of 18 aroma compounds related to oxidative off-flavor in wines[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(13): 3394−3401.

[11] CHEN Q, ZHANG D, PAN W, et al. Recent developments of green analytical techniques in analysis of tea's quality and nutrition[J]. Trends in Food Science & Technology, 2015, 43(1):

63−82.
[12] GLISZCZYŃSKA-ŚWIGŁO A, CHMIELEWSKI J. Electronic nose as a tool for monitoring the authenticity of food. A review[J]. Food Analytical Methods, 2017, 10(6): 1800−1816.
[13] CALIGIANI A, ACQUOTTI D, PALLA G, et al. Identification and quantification of the main organic components of vinegars by high resolution 1H NMR spectroscopy[J]. Anal Chim Acta 2007, 585: 110-119.
[14] WANG R D, WANG Y P, LI N, et al. Determination of organic acids in six kinds of vinegar by high performance liquid chromatography[J]. China Condiment, 2016, 41(9): 118−122.
[15] AL-DALALI S, ZHENG F, SUN B, et al. Characterization and comparison of aroma profiles and aroma-active compounds between traditional and modern Sichuan vinegars by molecular sensory science[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(18): 5154−5167.
[16] LI P H, ZHENG W W, WANG C, et al. Determination of aroma components in four famous Chinese vinegars by HS-SPME-GC-MS[J]. China Brewing, 2018, 37(4): 164−168.
[17] AL-DALALI S, ZHENG F, SUN B, et al. Effects of different brewing processes on the volatile flavor profiles of Chinese vinegar determined by HS-SPME-AEDA with GC-MS and GC-O[J]. LWT, 2020, 133: 109969.
[18] ZHAO Y, WEI W, TANG L, et al. Characterization of aroma and bacteria profiles of Sichuan industrial paocai by HS-SPME-GC-O-MS and 16S rRNA amplicon sequencing[J]. Food Research International, 2021, 149: 110667.
[19] LI H, HAN J X, LI T, et al. Comparative analysis and determination of volatile compounds in Chinese four famous vinegars[J]. China Condiment, 2017, 42(4): 154−158.
[20] ZHOU Z, LIU S, KONG X, et al. Elucidation of the aroma compositions of Zhenjiang aromatic vinegar using comprehensive two dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry and gas chromatography-olfactometry[J]. Journal of Chromatography A, 2017, 1487: 218−226.
[21] CETÓ X, PÉREZ S. Voltammetric electronic tongue for vinegar fingerprinting[J]. Talanta, 2020, 219: 121253.
[22] KUANG G L, WANG X Y, LI S, et al. Identification of flavor compounds in Hengshun vinegar at different aging stages based on electronic nose and gas chromatography-mass spectrometry[J]. Food Science, 2020, 41(12): 228−233.
[23] MAESTRE O, SANTOS-DUEÑAS I M, PEINADO R, et al. Changes in amino acid composition during wine vinegar production in a fully automatic pilot acetator[J]. Process Biochemistry, 2008, 43(8): 803−807.
[24] CHEN T, GUI Q, SHI J J, et al. Analysis of variation of main components during aging process of Shanxi aged vinegar[J]. Acetic Acid Bacteria, 2013, 2(s1): 6,33−34.
[25] GONG M, ZHOU Z, YU Y, et al. Investigation of the 5-hydroxymethylfurfural and furfural content of Chinese traditional fermented vinegars from different regions and its correlation with the saccharide and amino acid content[J]. LWT, 2020, 124: 109175.
[26] FANG G Y, WU G Z, JIANG Y J, et al. Production of Zhejiang rose vinegar by pneumatic agitation and its effect on product flavor[J]. Food Science, 2019, 40(18): 161−172.
[27] LU Y, ZHANG J, XIANG L P, et al. Simultaneous determination of nine organic acids in Chishui suntan vinegar by HPLC[J]. Modern Food, 2020(13): 149−153,160.
[28] LIU F, HE Y. Application of successive projections algorithm for variable selection to determine organic acids of plum vinegar[J]. Food Chemistry, 2009, 115(4): 1430−1436.
[29] MA M. Research on intelligent sensory characterization method of Zhenjiang vinegar flavor[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2019, 13.
[30] WANG Z, LI T, LIU F, et al. Effects of ultrasonic treatment on the maturation of Zhenjiang vinegar[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2017, 39: 272−280.
[31] WANG W X, LIU L, JIANG X, et al. Quality change law of vinegar during automatic mechanical fermentation[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2019, 35(18): 273−281.
[32] GONG M, ZHOU Z, LIU S, et al. Dynamic changes in physico-chemical attributes and volatile compounds during fermentation of Zhenjiang vinegars made with glutinous and non-glutinous japonica rice[J]. Journal of Cereal Science, 2021, 100: 103246.
[33] ZHENG Y, CHENG C, LIU J, et al. Analysis of flavor components of traditional Chinese solid state fermentation vinegar[J]. Chinese Journal of Food Science, 2020, 20(8): 237−247.
[34] YIN Y, ZHAO Y Z, YU H C, et al. Feature selection of electronic nose signal for vinegar discrimination based on multivariable analysis[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2018, 34(15): 290−297.
[35] WU Y N, LI L J, LIU X J, et al. Review on main organic acids composition and flavor characteristics of Traditional vinegar[J]. China Condiment, 2021, 46(1): 161−165.

罗冬兰, 瞿光凡, 曹森, 等. 采前水杨酸结合采后 1-MCP 处理对李果实贮藏期品质及抗氧化能力的影响 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 327−333. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021040021
LUO Donglan, QU Guangfan, CAO Sen, et al. Effect of Preharvest Salicylic Acid Combined with Postharvest 1-MCP Treatment on Quality and Antioxidant Ability of Plum Fruit during Storage[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 327−333. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021040021

· 贮运保鲜 ·

采前水杨酸结合采后 1-MCP 处理对李果实贮藏期品质及抗氧化能力的影响

罗冬兰[1], 瞿光凡[2], 曹　森[2], 朱　婷[2], 陈仁菊[2], 肖　倩[2], 张　迪[2], 巴良杰[2,*]
(1.贵阳学院生物与环境工程学院, 贵州 贵阳 550005;
2.贵阳学院食品与制药工程学院, 贵州 贵阳 550005)

摘　要: 探究采前水杨酸（Salicylic acid，SA）结合采后 1-MCP（1-methylcyclopropene）处理对李子采后保鲜效果的影响。以李子为试材，研究采前 SA（1.0 mmol/L）结合采后 1-MCP 处理（1 μL/L）对李子贮藏期间腐烂率、失重率、硬度、丙二醛、可溶性固形物、可滴定酸、V_C 含量、H_2O_2 含量、$O_2^{-\cdot}$ 产生速率以及活性氧代谢相关的过氧化物酶、超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性等指标的影响。试验结果表明：采前 SA 结合采后 1-MCP 处理能够有效抑制李子贮藏期腐烂率、失重率的发生，保持较好的果实硬度、可溶性固形物、可滴定酸和 V_C 含量，抑制丙二醛和 H_2O_2 含量的增加，提高过氧化物酶、超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的活性，降低 $O_2^{-\cdot}$ 产生速率。在贮藏末期 60 d 时，CK、SA、1-MCP、SA+1-MCP 四个处理组的腐烂率分别为 11.6%、7.7%、9.1% 和 5.3%，SA+1-MCP 处理较好地保持了李果实的贮藏品质。上述结果表明：采前 SA 结合采后 1-MCP 可以延缓李子的衰老过程，较好地保持李子的贮藏品质，为李子采后贮藏保鲜技术的应用研究提供理论依据。

关键词: 李子, 1-MCP, 水杨酸, 贮藏, 品质
中图分类号: TS255.3　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0327−07
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021040021
本文网刊:

Effect of Preharvest Salicylic Acid Combined with Postharvest 1-MCP Treatment on Quality and Antioxidant Ability of Plum Fruit during Storage

LUO Donglan[1], QU Guangfan[2], CAO Sen[2], ZHU Ting[2], CHEN Renju[2], XIAO Qian[2], ZHANG Di[2], BA Liangjie[2,*]

(1.College of Biology and Engineering of Environment, Guiyang University, Guiyang 550005, China;
2.Food and Phrmaceutical Engineering Institute, Guiyang University, Guiyang 550005, China)

Abstract: The effect of preharvest salicylic acid combined with postharvest 1-MCP treatment on plum during postharvest storage was investigated. In this experiment, plum were treated with preharvest salicylic acid 1.0 mmol/L, and then were fumigated with 1 μL/L 1-MCP. To reveal the mechanism, rot ratio, water loss ratio, malondialdehyde content, total soluble solids content, titratable acid content, V_C content, the production rate of $O_2^{-\cdot}$, H_2O_2 content, peroxidase, superoxide dismutase, catalase of activity were measured. The results showed that, preharvest salicylic acid combined with postharvest 1-MCP treatment could effectively inhibit rot ratio and water loss ratio, maintain hardness and total soluble solids and titratable acid and V_C content, delay the increase of malondialdehyde content, H_2O_2 content and the production rate of $O_2^{-\cdot}$. The activities of peroxidase, superoxide dismutase, catalase were significantly provided. At the end of storage 60 days, the rot ratio of CK, SA, 1-MCP, SA+1-MCP four treatment groups were 11.6%, 7.7%, 9.1% and 5.3%, respectively, SA+1-

收稿日期: 2021−04−02
基金项目: 贵阳市科技计划项目（编号: 筑科合同 [2020]37-1 号）; 受贵阳学院科研资金资助 [GYU-KY-(2022)] 资助。
作者简介: 罗冬兰（1991−）, 女, 硕士, 讲师, 主要从事农产品贮藏与加工方面的研究, E-mail: luodonglan1991@163.com。
*** 通信作者:** 巴良杰（1988−）, 男, 博士, 副教授, 主要从事食品科学方面的研究, E-mail: baliangjie@163.com。

MCP treatment maintained better storage quality of plum fruit. These results indicated that preharvest salicylic acid combined with postharvest 1-MCP treatment could maintain the storage quality and delay plum fruit senescence. The above results will provide a theoretical basis for the application of the postharvest storage and preservation technology of plum.

Key words: plum; 1-MCP; salicylic acid; storage; quality

李子(*Prunus salicina* Lindl.),属于蔷薇科、李属植物,因其果肉富含多种营养物质,如蛋白质、维生素 C、有机酸、钙及多种微量元素,且价格低廉,深受消费者欢迎[1]。贵州李子果实一般于高温多雨的夏季采收,果实采收后呼吸作用较强,且贵州山区交通不便,运输过程中极易造成果皮机械伤,从而促进病害侵染果实,这些都加速了李子果实的衰老速度[2−3]。因此,研究李子采后高效、简便、成本低的贮藏保鲜技术是李子产业发展面临的重大问题之一。

1-MCP(1-methylcyclopropene, 1-MCP)是乙烯合成的抑制剂,可特异性地抑制乙烯与受体蛋白的结合,从而抑制果实体内乙烯的作用[4],延缓果实采后的衰老进程,其已经广泛应用于蓝莓[5]、猕猴桃[6]、李子[7]、百香果[8]、梨[9] 等果实的贮藏保鲜。水杨酸(Salicylic acid, SA)是植物体内的激素,参与植物的抗逆反应,对植物的生长发育、成熟衰老等都有调控作用[4],研究表明 SA 处理可以有效延缓桃[10]、梨[11]、杏[12]、甜瓜[13] 等果实采后衰老过程,延长贮藏期。对杏果[14]、芒果[15]、哈密瓜[16] 等果实进行采前喷施 SA 处理均可有效地延缓果实衰老过程,保持较好地贮藏品质。但是,关于采前 SA 是否延缓李子采后衰老过程的报道较少,且采前 SA 结合采后 1-MCP 处理是否影响李子果实活性氧代谢及衰老过程,目前尚不清晰。

本研究拟通过以李子为试材,研究采前 SA 结合采后 1-MCP 处理对李子贮藏期间腐烂率、失重率、硬度、丙二醛、可溶性固形物、可滴定酸、V_C 含量、H_2O_2 含量、$O_2^{-}\cdot$ 产生速率以及活性氧代谢相关的过氧化物酶、超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性等品质指标的影响,探究不同处理方式对李子贮藏期果实品质的影响,以期为李子采后贮藏保鲜提供新的理论依据和新的研究思路。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

供试李子 品种为“青脆李”,八成熟,采收于贵州省贵阳市李子种植基地;1-MCP 美国陶氏益农公司;PE 保鲜膜(0.02 mm) 国家农产品保鲜工程技术研究中心;水杨酸 天津市光复精细化工研究所。

保鲜冷库(±0.5 ℃) 国家农产品保鲜工程技术研究中心;TAXT Plus 质构仪 英国 SMS 公司;UV-2550 紫外分光光度计 日本岛津公司;PAL-1 型迷你数显折射计 日本 ATAGO 公司;pH S-25 型数显酸度计 上海虹益仪器仪表有限公司;TGL-16A 型台式高速冷冻离心机 长沙平凡仪器仪表有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品前处理 李实验在贵阳市李子种植基地进行,在李果实坐果期、膨大期、采收前 2 d 采用 1.0 mmol/L 水杨酸(通过预实验筛选)进行喷施,以李子表面均着药液、开始滴液即可,以喷施清水处理作为对照(CK),总共处理约 300 kg 李子。李子采后立刻运至贵阳学院农产品贮藏保鲜实验室,挑选大小一致、无机械伤、无病虫害、颜色一致的李子用于贮藏实验。

本研究分为四个处理组:CK,采前清水喷施,采后 22 ℃ 条件下 0 μL/L 的 1-MCP 熏蒸 20 h;SA,采前 1.0 mmol/L 的水杨酸喷施,采后 22 ℃ 条件下 0 μL/L 的 1-MCP 熏蒸 20 h;1-MCP,采前清水喷施,采后 22 ℃ 条件下 1 μL/L(通过预实验筛选出最佳浓度)的 1-MCP 熏蒸 20 h;SA+1-MCP,采前 1.0 mmol/L 的水杨酸喷施,采后 22 ℃ 条件下 1 μL/L 的 1-MCP 熏蒸 20 h。将处理完的李子果实于 0 ℃ 条件下贮藏 60 d,果实贮藏期每隔 15 d 对四个处理组李子样品进行观察、取样和指标测定。

1.2.2 腐烂率的测定 选取 100 个果实,采用计数法测定李果实的腐烂率(以果实表面有果皮破裂、凹陷、流水和长霉为标准判定为腐烂果),计算公式为:

$$\text{腐烂率}(\%) = \text{腐烂果数量}/\text{总数量} \times 100$$

1.2.3 失重率的测定 选取 100 个果实,采用称重法[2],单位以 % 计。

1.2.4 硬度的测定 在李果实中部对称的两面,用 TA.XT.Plus 质构仪打孔测定果肉硬度,每个果子测两次,取平均值,计为去皮硬度,单位以 $kg\cdot cm^{-2}$ 计。

1.2.5 丙二醛 参照曹建康等[17] 的方法并稍作修改,以硫代巴比妥酸法测定李果实的丙二醛含量,单位以 nmol/g 计。

1.2.6 可溶性固形物 参照曹建康等[17] 用迷你数显折射计测定李果实的可溶性固形物含量,单位以 % 计。

1.2.7 可滴定酸 参照曹建康等[17] 用数显酸度计测定李果实的可滴定酸含量,单位以 % 计。

1.2.8 V_C 含量 参照曹建康等[17] 用 2,6-二氯酚靛酚法测定李果实的 V_C 含量,单位以 mg/100 g 计。

1.2.9 SOD、CAT 和 POD 活性的测定 参照司敏等[18] 用紫外分光光度计法测定测定李果实的抗氧化酶活性,单位以 U/mg 计。

1.2.10 超氧阴离子($O_2^{-}\cdot$)产生速率和过氧化氢含量的测定 参照 HUAN 等[19] 的方法进行测定,单位分

别以 nmol/(min·g)和 nmol/g 计。

1.3　数据处理

各指标测定设 3 次重复，结果以平均值±标准偏差表示。数据结果采用 Excel 2016 软件进行统计处理，差异显著分析采用 SPSS 22.0 软件，在 0.05 水平上进行显著检验(P<0.05)。采用 Excel 2016 进行作图。

2　结果与分析

2.1　采前 SA 结合采后 1-MCP 处理对李子贮藏品质的影响

2.1.1　采前 SA 结合采后 1-MCP 处理对李子贮藏期腐烂率、失重率和硬度的影响　腐烂率通常是衡量果实贮藏品质的重要指标。如图 1 所示，在贮藏期 0~15 d，四个处理组的李果实未发生腐烂现象。在贮藏末期 60 d 时，CK、SA、1-MCP、SA+1-MCP 四个处理组的腐烂率分别为 11.6%、7.7%、9.1% 和 5.3%，四个处理组差异显著(P<0.05)。由上可知，SA 和 1-MCP 处理可以有效抑制李子贮藏期腐烂率的增加，其中，SA+1-MCP 复合处理效果最好，这与 SA 结合 1-MCP 处理在葡萄上的结果相一致，进一步证实了 SA 和 1-MCP 处理可以有效抑制果实采后贮藏期腐烂率的发生[20]。

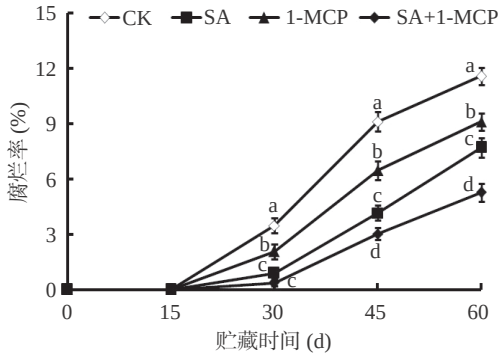


图 1　采前 SA 结合采后 1-MCP 处理对李子腐烂率的影响

Fig.1　Effects of preharvest SA sprays combined with postharvest 1-MCP treatment on rot ratio of plum fruits

注：不同小写字母表示相同贮藏时间不同处理组间差异显著(P<0.05)；图 2~图 12 同。

果实贮藏过程由于呼吸、蒸腾等代谢活动会消耗果实自身的有机物，造成质量减少，失重率增加[17]。如果贮藏过程中，失重率过大，会影响果实的销售效益，因此，需要在贮藏过程中要抑制果实失重率的增加。如图 2 所示，李子果实的失重率随着贮藏期的延长而不断增加。在贮藏末期 60 d，CK 处理组的失重率为 6.1%，而 SA、1-MCP、SA+1-MCP 三个处理组的失重率比 CK 处理组降低了 32.6%、29.9%、46.2%，三个处理组显著减缓了果实贮藏期失重率的增加(P<0.05)，且 SA+1-MCP 复合处理效果最佳。由上表明，SA 结合 1-MCP 处理可以有效降低李子贮藏期失重率的增加，较好地保持贮藏期果实的销售品质。

随着李子果实衰老程度的增加，果实硬度逐渐

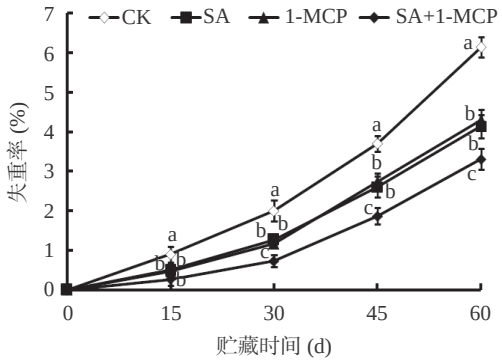


图 2　采前 SA 结合采后 1-MCP 处理对李子失重率的影响

Fig.2　Effects of preharvest SA sprays combined with postharvest 1-MCP treatment on water loss of plum fruits

下降[2]。通过测量果实硬度大小，可以有效衡量果实的衰老程度。如图 3 所示，随着李子贮藏期的延长，果实硬度呈总体下降趋势。在贮藏期 0~15 d，果实硬度大小呈缓慢下降趋势；而在贮藏期 15~60 d，果实硬度迅速降低。在贮藏末期 60 d，CK、SA、1-MCP 和 SA+1-MCP 处理组果实的硬度大小分别为：2.5、3.1、3.4、3.8 kg/cm^2，处理组的硬度显著高于 CK 对照组(P<0.05)，尤其是 SA+1-MCP 处理组比 CK 组硬度提高了 52.0%。综上，SA 结合 1-MCP 处理可以有效保持贮藏期果实的硬度，保持较好地贮藏品质。在细胞壁相关酶的作用，果实中果胶质和纤维素逐渐被降解，导致硬度逐渐降低，研究表明水杨酸处理可以通过抑制细胞壁相关酶活性，从而延缓果实硬度下降[20−21]。

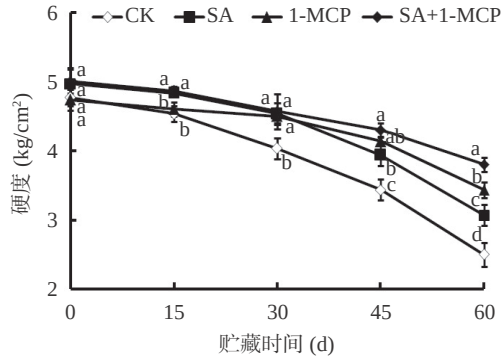


图 3　采前 SA 结合采后 1-MCP 处理对李子硬度的影响

Fig.3　Effects of preharvest SA sprays combined with postharvest 1-MCP treatment on firmness of plum fruits

2.1.2　采前 SA 结合采后 1-MCP 处理对李子贮藏期丙二醛的影响　果实采后贮藏过程中，遭受外界胁迫伤害时，果实细胞会应激产生一定的羟基自由基和超氧阴离子，进而诱发膜脂中不饱和脂肪酸发生过氧化反应，产生脂质自由基；当细胞内脂质自由基的不断积累会引发膜脂的过氧化作用，从而导致细胞膜透性程度增加，加速细胞死亡[22]。通过测定果实丙二醛含量的大小，可以衡量膜脂的过氧化程度。如图 4 所示，果实中丙二醛的含量随着贮藏期的延长不断增加。在贮藏末期 60 d，CK 处理的丙二醛含量要显著

高于三个处理组(P<0.05)，且 SA+1-MCP 复合处理的丙二醛含量最低。SA 结合 1-MCP 处理可以有效抑制果实贮藏期丙二醛含量的增加，延缓果实衰老进程。果实组织内活性氧累积后可与不饱和脂肪酸反应导致细胞组织渗漏，MDA 是膜脂过氧化反应过程中最重要的产物之一，SA 和 1-MCP 处理处理可以有效提高体内活性代谢酶活性，降低活性氧和 MDA 的累积[23−26]。

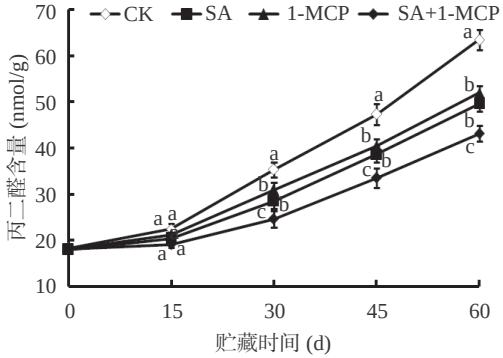


图 4 采前 SA 结合采后 1-MCP 处理对李子丙二醛含量的影响

Fig.4 Effects of preharvest SA sprays combined with postharvest 1-MCP treatment on malondialdehyde content of plum fruits

2.1.3 采前 SA 结合采后 1-MCP 处理对李子贮藏期可滴定酸含量、可溶性固形物含量和 V_C 含量的影响

果实可滴定酸含量的大小直接影响果实的口感风味[27]。从图 5 可以得出，李子果实的可滴定酸含量随着贮藏期的延长而不断降低。在贮藏末期 60 d，四个处理组的可滴定酸含量下降到最低值，CK 组为 0.44%，SA、1-MCP、SA+1-MCP 三个处理组分别比 CK 组提高了 29.3%、16.5%、42.9%，显著性高于 CK 组(P<0.05)。由此可以说明，SA 和 1-MCP 处理可以较好地保持果实贮藏期果实的可滴定酸含量，保持较好地风味品质，其中，SA+1-MCP 处理组效果最好。果实可溶性固形物含量大小可以衡量果实的采收期和耐贮性[27]。如图 6 所示，在贮藏期 0~15 d，四

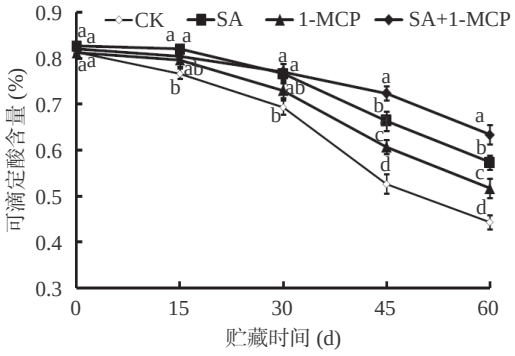


图 5 采前 SA 结合采后 1-MCP 处理对李子可滴定酸含量的影响

Fig.5 Effects of preharvest SA sprays combined with postharvest 1-MCP treatment on titratable acid content of plum fruits

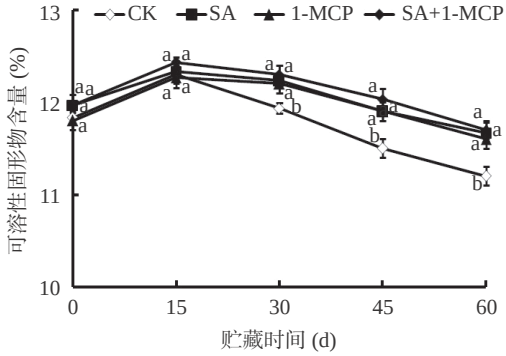


图 6 采前 SA 结合采后 1-MCP 处理对李子可溶性固形物含量的影响

Fig.6 Effects of preharvest SA sprays combined with postharvest 1-MCP treatment on total soluble solids content of plum fruits

个处理组的可溶性固形物含量呈缓慢上升趋势，可能是果实采后贮藏期后熟现象。在贮藏期 15~60 d，果实从完全成熟转向衰老过程，由于自身生命代谢的逐渐消耗，可溶性固形物含量逐渐降低。在贮藏末期 60 d，SA、1-MCP、SA+1-MCP 三个处理组的可溶性固形物含量显著高于 CK 对照组(P<0.05)，但三个处理组之间差异不显著(P>0.05)。由此可知，SA 和 1-MCP 处理可以较好地保持果实贮藏期果实的可溶性固形物含量。水杨酸和 1-MCP 处理可以有效延缓果实呼吸作用，进而减少体内糖、酸等底物的代谢消耗，从而保持较好地营养贮藏品质[13,28]。

果蔬贮藏期的 V_C 含量，可以作为果蔬贮藏品质的重要的评价指标之一[27]。如图 7 所示，随着果实贮藏期的延长，果实 V_C 含量逐渐降低。在贮藏第 60 d，CK、SA、1-MCP、SA+1-MCP 四个处理组的 V_C 含量与初始值相比，分别降低了 38.8%、27.4%、32.5%、20.8%，四个处理组的李子 V_C 含量保持效果依次为：CK<1-MCP<SA<SA+1-MCP。综上，SA 结合 1-MCP 处理可以有效地保持贮藏期果实的 V_C 含量，较好地保持贮藏营养品质。SA 和 1-MCP 处理可以降低自身代谢活动，减少 V_C 含量的消耗与降解，从而保持贮藏期果实较高的 V_C 含量[13]。

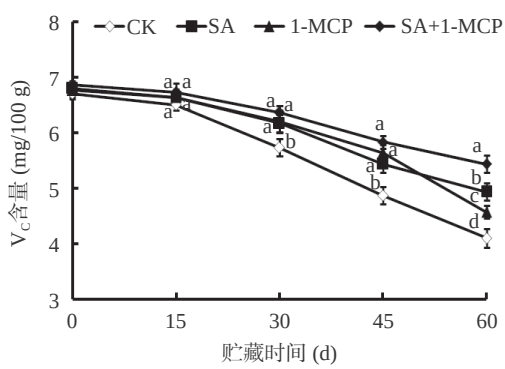


图 7 采前 SA 结合采后 1-MCP 处理对李子 V_C 含量的影响

Fig.7 Effects of preharvest SA sprays combined with postharvest 1-MCP treatment on V_C content of plum fruits

2.2　采前 SA 结合采后 1-MCP 处理对李子贮藏期活性氧及清除系统的影响

2.2.1　采前 SA 结合采后 1-MCP 处理对李子贮藏期活性氧相关酶活性的影响　随着果实贮藏期的延长，果实衰老程度逐渐增加，组织细胞内活性氧代谢失去平衡，造成组织体内自由基过量累积，进而加剧脂质过氧化作用，引起细胞质膜系统的损伤[17]。POD、SOD 和 CAT 是活性氧代谢的主要酶，在体内活性氧代谢平衡过程中有着重要作用，这些酶相互协调及时清除体内过多的自由基，减少活性氧对细胞的毒害作用[29]。如图 8~图 10 所示，随着李子贮藏期的延长，活性氧代谢的相关酶 POD、SOD 和 CAT 的活性都呈现先增加后降低的趋势。四个处理组的 POD 酶活性在贮藏期 45 d 时达到最大值，且 SA、1-MCP、SA+1-MCP 三个处理组的酶活性分别比 CK 组提高了 32.7%、28.6%、37.8%(图 8)，三个处理组的 POD 酶活性显著性高于 CK 组(P<0.05)。与 POD 酶活性变化相似，SOD 酶活性随着贮藏期的延长也逐渐增加，且在贮藏期 45 d 达到最大值(图 9)，与 CK 组相比，SA、1-MCP、SA+1-MCP 三个处理组 SOD 酶活性显著性提高了 17.0%、17.4%、20.0%(P<0.05)。CAT 酶活性在贮藏期 0~15 d 呈上升趋势，在贮藏期 15~60 d 呈下降趋势，贮藏期 15 d 时酶活性达到最大值(图 10)。在贮藏期 15 d，CK、SA、1-MCP、SA+1-MCP 四个处理组 CAT 酶活性大小依次为：CK<1-MCP<SA<SA+1-MCP，四个处理组之间差异显著(P<0.05)。综上可知，SA 和 1-MCP 处理可以显著提高李子果实贮藏期活性氧代谢的酶 POD、SOD 和 CAT 的活性(P<0.05)，有利于维持果实体内代谢平衡，保持较好地贮藏品质，其中，SA+1-MCP 处理效果最优。在香蕉[30]、樱桃[31]、蓝莓[5] 采后贮藏上的研究也进一步证实 SA 和 1-MCP 处理可以有效提高果实贮藏期活性氧代谢酶的活性，延缓果实的衰老进程。

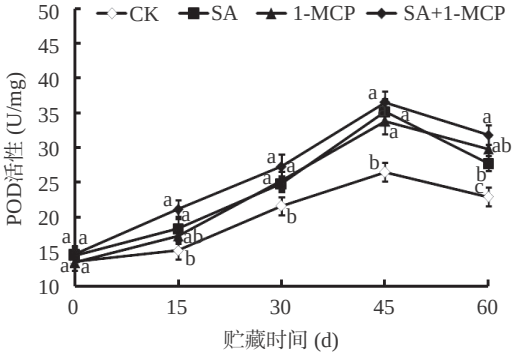


图 8　采前 SA 结合采后 1-MCP 处理对李子 POD 活性的影响

Fig.8　Effects of preharvest SA sprays combined with postharvest 1-MCP treatment on POD activity of plum fruits

2.2.2　采前 SA 结合采后 1-MCP 处理对李子贮藏期 O_2^{-}·产生速率和 H_2O_2 含量的影响　随着果实衰老程度增加，果实体内活性氧代谢平衡机制遭到破坏，体内 O_2^{-}·和 H_2O_2 含量的累积，加速果实衰老。如图 11~图 12 所示，随着贮藏期延长，李子果实体内 O_2^{-}·产生速率和 H_2O_2 含量逐渐增加，而 SA 和 1-MCP 处理显著抑制了 O_2^{-}·的产生速率和 H_2O_2 含量的累积(P<0.05)。在贮藏末期 60 d，CK 组的 O_2^{-}·产生速率增加至 1.11 nmol/(min·g)，而 SA、1-MCP、SA+1-MCP 处理组分别有效降低了 17.8%、17.2%、33.1%

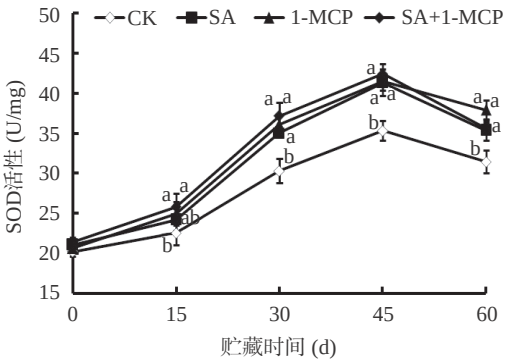


图 9　采前 SA 结合采后 1-MCP 处理对李子 SOD 活性的影响

Fig.9　Effects of preharvest SA sprays combined with postharvest 1-MCP treatment on SOD activity of plum fruits

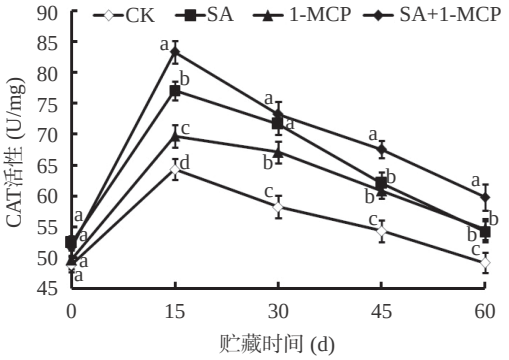


图 10　采前 SA 结合采后 1-MCP 处理对李子 CAT 活性的影响

Fig.10　Effects of preharvest SA sprays combined with postharvest 1-MCP treatment on CAT activity of plum fruits

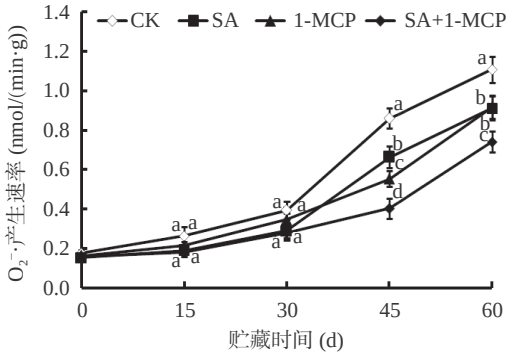


图 11　采前 SA 结合采后 1-MCP 处理对李子 O_2^{-}·产生速率的影响

Fig.11　Effects of preharvest SA sprays combined with postharvest 1-MCP treatment on the production rate of O_2^{-}· of plum fruits

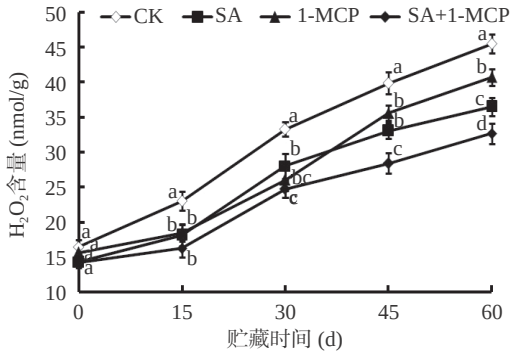


图 12 采前 SA 结合采后 1-MCP 处理对李子 H_2O_2 含量的影响

Fig.12 Effects of preharvest SA sprays combined with postharvest 1-MCP treatment on H_2O_2 content of plum fruits

(图 11), 且三个处理显著性低于 CK 对照组(P<0.05)。CK、SA、1-MCP 和 SA+1-MCP 处理组的 H_2O_2 含量在贮藏期 60 d 时均达到最大值, 依次为: 45.5、36.5、40.7、32.7 nmol/g, 且四个处理组差异显著(P<0.05)。由上可知, SA 和 1-MCP 处理显著降低了李果实贮藏期 O_2^{-}·产生速率和 H_2O_2 含量的累积, 延缓果实的衰老进程, 其中 SA+1-MCP 处理效果最佳。SOD、CAT 和 POD 是活性氧代谢相关的重要酶, SOD 能催化体内的歧化反应, 使超氧阴离子自由基转化为 H_2O_2 和 O_2, H_2O_2 再被 CAT 和 POD 清除, SA+1-MCP 处理通过显著提高果实中的 SOD、CAT 和 POD 酶活性, 进而降低 O_2^{-}·产生速率和 H_2O_2 含量[31−32]。

3 结论

李子采后 1-MCP 处理可以有效降低果实的呼吸作用, 延缓 TSS 含量的降低, 保持较好的贮藏品质[7]。SA 处理可以有效提高贮藏期果实的活性氧代谢酶活性, 降低果实体内 O_2^{-}·产生速率和 H_2O_2 含量, 延缓果实的衰老[30,32], 但 SA 在李子采后贮藏上的研究机制还不是很明确。因此, 本研究对李子进行采前 SA 处理并结合采后 1-MCP 处理, 研究表明: 采前 SA 结合采后 1-MCP 处理能够有效抑制李子果实贮藏期腐烂率、失重率的发生, 保持较好的果实硬度、可溶性固形物、可滴定酸和 V_C 含量, 抑制丙二醛和 H_2O_2 含量的累积, 提高 CAT、POD 和 SOD 酶的活性, 降低 O_2^{-}·产生速率, 保持较好的贮藏品质, 为李子采后贮藏保鲜技术的应用研究提供理论依据。但是, SA 结合采后 1-MCP 处理延缓李子果实衰老过程可能还涉及抗病性和苯丙烷代谢等机理, 还需要进一步深入研究。

参考文献

[1] 王艳颖, 胡文忠, 田密霞, 等. 贮前氯化钙处理对李果实冷害及生理生化的影响[J]. 食品工业科技, 2011, 32(9): 310−313,387. [WANG Y Y, HU W Z, TIAN M X, et al. Effect of prestorage calcium chloride treatment on chilling injury and physiology and biochemistry in plum fruit[J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 32(9): 310−313,387.]

[2] 巴良杰, 罗冬兰, 吉宁, 等. 生物保鲜纸对李子贮藏期品质的影响[J]. 食品与机械, 2020, 36(7): 140−143,226. [BA L J, LUO D L, JI N, et al. Effect of biological preservative paper on the storage quality of plum fruit[J]. Food and Machinery, 2020, 36(7): 140−143,226.]

[3] 罗冬兰, 林明俊, 尤勇刚, 等. 李子贮藏保鲜技术研究进展[J]. 南方农业, 2018, 12(34): 56−58. [LUO D L, LIN M J, YOU Y G, et al. Research progress of plum storage technology[J]. South China Agriculture, 2018, 12(34): 56−58.]

[4] WATKINS C B. The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruits and vegetables[J]. Biotechnology Advances, 2006, 24(4): 389−409.

[5] 巴良杰, 罗冬兰, 曹森, 等. 1-MCP 结合^{60}Co-γ 辐照对蓝莓贮藏期品质的影响[J]. 北方园艺, 2019(8): 118−124. [BA L J, LUO D L, CAO S, et al. Effects of 1-MCP combined with ^{60}Co-γ irradiation on the quality of blueberry during storage[J]. Northern Horticulture, 2019(8): 118−124.]

[6] DENG L, JIANG C Z, MU W, et al. Influence of 1-MCP treatments on eating quality and consumer preferences of 'Qinmei' kiwifruit during shelf life[J]. Journal of Food Science and Technology, 2015, 52(1): 335−342.

[7] 王荣花, 轩海波, STREIF F. 常温贮藏条件下 1-MCP 处理对欧洲李子采后生理及品质的影响[J]. 北方园艺, 2011(13): 156−158. [WANG R H, XUAN H B, STREIF F. Effect of 1-MCP on ripening and quality of european plum during ambient air storage[J]. Northern Horticulture, 2011(13): 156−158.]

[8] 孟祥春, 黄泽鹏, 凡超, 等. 1-MCP 对黄金百香果贮藏品质及风味变化的影响[J]. 食品工业科技, 2021, 42(8): 277−281. [MENG X C, HUANG Z P, FAN C, et al. Effect of 1-MCP on storage quality and volatiles variations in gold passion fruit[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(8): 277−281.]

[9] 闫子茹, 岳盈肖, 赵江丽, 等. 基于电子鼻分析 1-MCP 对'香红'梨后熟进程的影响[J]. 食品工业科技, 2021, 42(4): 271−275, 281. [YAN Z R, YUE Y X, ZHAO J L, et al. Effect of 1-MCP on the ripening process of 'Xianghong' pears based on the rlectronic nose analysis[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(4): 271−275, 281.]

[10] ASGHARI M, AGHDAM M S. Impact of salicylic acid on post-harvest physiology of horticultural crops[J]. Trends in Food Science and Technology, 2010, 21(10): 502−509.

[11] TIAN S, WAN Y, QIN G, et al. Induction of defense responses against alternaria rot by different elicitors in harvested pear fruit[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 70(6): 729−734.

[12] 郭科燕, 左宝莉, 贾盼盼, 等. 水杨酸处理对杏果实贮藏品质的影响[J]. 食品工业科技, 2012, 33(15): 335−337. [GUO K Y, ZUO B L, JIA P P, et al. Effect of salicylic acid treatment on storage quality of apricot fruits[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(15): 335−337.]

[13] 尚琪, 王婷, 李欣, 等. 采前乙酰水杨酸与采后 1-MCP 处理对厚皮甜瓜冷藏品质及抗氧化能力的影响[J]. 食品科学, 2016, 37(20): 247−252. [SHANG Q, WANG T, LI X, et al. Effect of

preharvest acetylsalicylic acid and postharvest 1-MCP treatments on quality and antioxidant ability of muskmelon fruit during cool storage[J]. Food Science, 2016, 37(20): 247−252.]
[14] 赵亚婷, 朱璇, 马玄, 等. 采前水杨酸处理对杏果实抗病性及苯丙烷代谢的诱导[J]. 食品科学, 2015, 36(2): 216−220. [ZHAO Y T, ZHU X, MA X, et al. Induction of disease resistance and phenylpropanoid metabolism in apricot fruits by pe-harvest salicylic acid treatment[J]. Food Science, 2015, 36(2): 216−220.]
[15] 弓德强, 高兆银, 李敏, 等. 采前水杨酸处理对芒果采后品质及抗病性的影响[J]. 山东农业科学, 2019, 51(8): 91−96. [GONG D Q, GAO Z Y, LI M, et al. Effects of pre-harvest salicylic acid spraying on postharvest quality and disease resistance of mango fruit[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2019, 51(8): 91−96.]
[16] 王斌, 白小东, 张静荣, 等. 乙酰水杨酸采前处理诱导哈密瓜果实的采后抗病性[J]. 果树学报, 2018, 35(2): 222−230. [WANG B, BAI X D, ZHANG J R, et al. The induction of pre-harvest acetylsalicylic acid treatment on postharvest resistance of Hami melon fruit[J]. Journal of Fruit Science, 2018, 35(2): 222−230.]
[17] 曹建康, 姜微波, 赵玉梅. 果蔬采后生理生化实验指导 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2013: 10−150. [CAO J K, JIANG W B, ZHAO Y M. Physiological and biochemical experiment guidance for fruits and vegetables after harvest[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2013: 10−150.]
[18] 司敏, 伍利芬, 薛华丽, 等. 采前赤霉素处理对李果实采后冷害的抑制及部分机理研究[J]. 中国果树, 2018(4): 4−9. [SI M, WU L F, XUE H L, et al. Controlling chilling injury of plum with preharvest GA3 in postharvest and its partial mechanism[J]. China Fruits, 2018(4): 4−9.]
[19] HUAN C, HAN S, JIANG L, et al. Postharvest hot air and hot water treatments affect the antioxidant system in peach fruit during refrigerated storage[J]. Postharvest Biology and Technology, 2017, 126: 1−14.
[20] 何庆, 张健, 吴斌, 等. 采前水杨酸喷施对红地球葡萄采后品质的影响[J]. 保鲜与加工, 2020, 20(4): 50−56. [HE Q, ZHANG J, WU B, et al. Effects of pre-harvest salicylic acid spraying on post-harvest quality of red globe grape[J]. Storage and Process, 2020, 20(4): 50−56.]
[21] GE Y H, DUAN B, LI C Y, et al. Application of sodium silicate retards apple softening by suppressing the activity of enzymes related to cell wall degradation[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2019, 99(4): 1828−1833.
[22] GE Y H, ZHANG J H, LI C Y, et al. Trisodium phosphate delays softening of jujube fruit by inhibiting cell wall-degrading enzyme activities during ambient storage[J]. Scientia Horticulturae, 2020, 262: 109059.
[23] CAO J K, YAN J Q, ZHAO Y M, et al. Effects of four preharvestfoliar sprays with β-aminobutyric acid or salicylic acid on the incidence of post-harvest disease and induced defence responses in jujube fruit after storage[J]. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 2013, 88(3): 338−344.
[24] 张帆, 王友升, 刘晓艳, 等. 采前水杨酸处理对树莓果实贮藏效果及抗氧化能力的影响[J]. 食品科学, 2010, 31(10): 308−312. [ZHANG F, WANG Y S, LIU X Y, et al. Effect of preharvest salicylic acid spray treatment on fruit quality and antioxidant capacity of raspberry during post-harvest[J]. Food Science, 2010, 31(10): 308−312.]
[25] 田敏, 饶龙兵, 李纪元. 植物细胞中的活性氧及其生理作用[J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(2): 235−241. [TIAN M, RAO L B, LI J Y. Reactive oxygen species (ROS) and its physiological functions in plant cells[J]. Plant Physiogy Communications, 2005, 41(2): 235−241.]
[26] KANT K, ARORA A, SINGH V P. Salicylic acid influences biochemical characteristics of harvested tomato during ripening[J]. Indian Journal of Plant Physiology, 2016, 21(1): 50−55.
[27] 张秀玲. 果蔬采后生理与贮运学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2018: 10−150. [ZHANG X L. Postharvest physiology and storage and transportation of fruits and vegetables[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2018: 10−150.]
[28] 吴芳, 周江, 朱尤可, 等. 水杨酸和 1-甲基环丙烯处理对赛买提杏冷藏后货架期品质的影响[J]. 食品科技, 2016, 41(3): 52−57. [WU F, ZHOU J, ZHU Y K, et al. Effect of SA and 1-MCP treatment on quality of the colded apricot fruits during shelf-life[J]. Food Science and Technology, 2016, 41(3): 52−57.]
[29] ZANG Y, JIN P, HUANG Y P, et al. Effect of hot water combined with glycine betaine alleviates chilling injury in cold-stored loquat fruit[J]. Postharvest Biology and Technology, 2016, 118: 141−147.
[30] 胡会刚, 莫亿伟, 谢江辉, 等. 水杨酸提高香蕉采后果实抗氧化能力和保鲜效果研究[J]. 食品科学, 2009, 30(2): 254−259. [HU H G, MO Y W, XIE J H, et al. Effect of salicylic acid on anti-oxidation capacity and preservation of post-harvested banana fruits[J]. Food Science, 2009, 30(2): 254−259.]
[31] GIMENZ M J, VALERED J M, VALERO D, et al. Quality and antioxidant properties on sweet cherries as affected by preharvest salicylic and acetylsalicylic acids treatments[J]. Food Chemistry, 2014, 160: 226−232.
[32] FAWBUSH F, NOCK J F, WATKINS C B. Antioxidant contents and activity of 1-methylcyclopropene treated ‘Empire’ apples in air and controlled atmosphere storage[J]. Postharvest Biology and Technology, 2009, 52: 30−37.

王雪, 李乾, 刘彩红, 等. NO 熏蒸处理对冷藏枸杞鲜果细胞壁代谢的影响 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 334−340. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080143

WANG Xue, LI Qian, LIU Caihong, et al. Effects of NO Fumigation on Cell Wall Metabolism in *Lycium barbarum* Fresh Fruit under Cold Storage[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 334−340. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080143

· 贮运保鲜 ·

NO 熏蒸处理对冷藏枸杞鲜果细胞壁代谢的影响

王　雪[1], 李　乾[1], 刘彩红[1], 古丽丹·塔勒达吾[1], 刘凤兰[2], 冯作山[1], 王　静[1,*]

（1.新疆农业大学食品科学与药学学院, 新疆果品采后科学与技术重点实验室, 新疆乌鲁木齐 830052;
2.新疆林业科学院经济林研究所, 新疆乌鲁木齐 830063）

摘　要: 为了探明 NO 熏蒸处理对冷藏枸杞鲜果细胞壁代谢的影响，本文以“宁杞七号”枸杞鲜果为试材，采用 300 μL/L（0 μL/L NO 为对照）的 NO 气体对“宁杞七号”熏蒸处理 3 h，于 3±0.5 ℃ 条件下贮藏 36 d，定期测定果实腐烂率、硬度、细胞壁代谢相关酶活力。结果表明：300 μL/L NO 处理抑制枸杞鲜果多聚半乳糖醛酸酶（polygalacturonase, PG）、*β*-半乳糖苷酶（*β*-galactosidase, *β*-Gal）、纤维素酶（cellulase, Cx）和 *β*-葡萄糖苷酶（*β*-glucosidase, *β*-glu）活性上升，使枸杞鲜果维持较高的原果胶含量，降低可溶性果胶含量上升速率；缓解果实硬度下降和腐烂率上升。说明 NO 处理可通过降低枸杞鲜果采后细胞壁代谢，缓解软化速率，减轻腐烂。

关键词: NO 熏蒸, 枸杞鲜果, 细胞壁代谢, 腐烂率
中图分类号: TS255.3　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0334−07
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080143
本文网刊:

Effects of NO Fumigation on Cell Wall Metabolism in *Lycium barbarum* Fresh Fruit under Cold Storage

WANG Xue[1], LI Qian[1], LIU Caihong[1], GULIDAN·Taledawu [1], LIU Fenglan[2], FENG Zuoshan[1], WANG Jing[1,*]

（1.College of Food Science and Pharmacy, Xinjiang Agricultural University, Key Laboratory of Fruit Postharvest Science and Technology in Xinjiang, Urumqi 830052, China;
2.Institute of Economic Forestry, Xinjiang Academy of Forestry Sciences, Urumqi 830063, China）

Abstract: To explore the effect of NO fumigation on cell wall metabolism in *Lycium barbarum* fresh fruit under cold storage, “Ningqi No. 7” fresh *Lycium barbarum* fruit was used as the test material, and fumigated with 300 μL/L (0 μL/L NO as control) NO gas for 3 h, and stored at 3±0.5 ℃ for 36 d. The rotting rate, hardness and enzyme activities related to cell wall metabolism were determined regularly.The results showed that 300 μL/L NO treatment inhibited the increase of polygalacturonase (PG), *β*-galactosidase (*β*-Gal), cellulase (Cx) and *β*-glucosidase (*β*-glu) activities; maintained high content of protopectin in the fresh fruit; reduced the rising rate of soluble pectin content; and alleviated the decline of fruit hardness and the increase of decay rate. It showed that NO treatment mitigated the rate of softening and inhibited the rot decay by decreasing the cell wall metabolism of postharvest *Lycium barbarum* fresh fruit.

Key words: NO fumigation; *Lycium barbarum* fresh fruit; cell wall metabolism; rot rate

枸杞（*Lycium barbarum* L.）属于茄科（Solanaceae）枸杞属（*Lycium Linn.*），是多年生双子叶落叶灌木[1−2]。目前，我国是全球枸杞产品生产和消费的最主要地区[3]。枸杞含有多种活性物质，具有降血

收稿日期: 2021−08−16
基金项目: 自治区林业改革与发展补助资金项目（XJLG201903）。
作者简介: 王雪（1998−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 果蔬贮藏及物流运输, E-mail: 1791814140@qq.com。
*** 通信作者:** 王静（1978−）, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 果蔬采后保鲜加工, E-mail: wsj770903@163.com。

糖、抗衰老、增强免疫力、保护细胞等作用，是药食两用的进补佳品[4−5]。但是由于采后的枸杞仍然进行着正常的以呼吸为主导的新陈代谢活动，在果实成熟至衰老的生命历程中呼吸速率不断变化并出现呼吸高峰[6]，因此采后枸杞的贮藏品质、抗病性等受到不同程度的影响[7]。有研究称采后枸杞鲜果常温下放置 2~3 d 便开始出现衰老软化现象，导致果实品质降低[8]。因此找到一个经济有效的延长枸杞鲜果贮藏期，提高贮藏品质的保鲜方法显得尤为重要。

目前关于枸杞鲜果保鲜的研究报道主要集中于水杨酸处理[9]、水杨酸结合气调处理[10]、壳聚糖涂膜处理[11−13] 及保鲜膜处理[14] 等，但采用 NO 熏蒸枸杞鲜果保鲜的研究报道尚不多见。NO 是一种小分子气体，适宜浓度的 NO 具有延缓果蔬组织成熟衰老、减轻冷害症状和控制采后病害等作用，近年来已广泛应用于芒果、李、甜瓜、莲雾、桃、草莓等果蔬保鲜中。有研究报道，NO 处理采后果蔬能较好地维持其硬度，保持果蔬较好的贮藏品质[15−17]。另有研究显示，NO 熏蒸处理有效维持甜瓜果实采后硬度、减缓可溶性果胶质量分数的上升，降低多聚半乳糖醛酸酶、果胶甲酯酶、纤维素酶的活力[18]。NO 处理延缓贮藏过程中的采后枇杷[19]、莲雾[20]、草莓[21] 和番木瓜[22] 细胞壁解聚进程，抑制果实细胞壁代谢相关酶活力，减慢原果胶和半纤维素分解速率，对保持果实的品质产生积极作用。但 NO 熏蒸枸杞鲜果对细胞壁代谢影响的研究尚未见相关报道。

因此本试验选用产自新疆博乐市的“宁杞七号”枸杞鲜果为试材，采用 300 μL/L 的外源 NO 气体熏蒸枸杞，探究经 NO 熏蒸枸杞鲜果软化与细胞壁的关系，以期为外源 NO 熏蒸在抑制枸杞鲜果软化方面的应用提供理论参考。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

“宁杞七号”枸杞　2019 年 7 月 3 日采摘自新疆博乐市精河县托里乡，带果柄和萼片采摘，在当地 3±0.5 ℃ 冷库中预冷 24 h，装框运送至新疆农业大学 3±0.5 ℃ 冷库，挑选无腐烂、发霉及遭受机械损伤的枸杞鲜果 16 kg 作为试验原料（处理和对照各 8 kg）；3,5-二硝基水杨酸　上海科峰实验有限公司；结晶酚　天津市风船化学试剂科技有限公司；亚硫酸钠、p-硝基苯酚　天津市致远化学试剂有限公司；羧甲基纤维素钠　天津市光复精细化工研究所；一水合柠檬酸、二水合柠檬酸钠　国药集团化学试剂有限公司；水杨苷　上海素培生物科技中心；碳酸钠　天津市北联精细化学品开发有限公司；p-硝基苯-β-吡喃半乳糖苷　索莱宝公司；咔唑　上海化学试剂有限公司；无水乙醇　天津市鑫铂特化工有限公司；所有试剂均为分析纯。

D3024R 冷冻离心机　上海珂淮仪器有限公司；PTT-A+200 电子天平　福州华志科学仪器有限公司；DZKW-S-4 电热恒温水浴锅、FL-1 可调式封闭电炉　北京市永光明医疗仪器有限公司；752 N 紫外可见分光光度计　上海仪电分析仪器有限公司；TA.XT Plus 质构仪　英国 SMS 公司。

1.2　实验方法

1.2.1　枸杞鲜果的处理方法　样品处理前一晚使用酒精对熏蒸罐进行密闭消毒 12 h，并于熏蒸前 4 h 打开熏蒸罐散去酒精气味。待酒精气味散去之后进行抽真空处理，在体积为 26 L 的熏蒸罐内注入 NO 纯度为 99.9% 的标准气体，使用 300 μL/L NO 室温熏蒸 3 h，每罐处理枸杞鲜果 2 kg。处理后的枸杞使用带孔塑料筐盛装，每框约 2 kg（不超过塑料筐的三分之一），并在上方覆盖报纸，立即放置 3 ℃ 低温冷库进行贮藏，每 6 d 取样一次，共取 7 次样。

1.2.2　腐烂率的测定　采用观察法，当果实表面发生腐烂或有肉眼可见的腐烂菌斑即视为腐烂果。随机取 100 枚枸杞鲜果，数出所有发霉腐烂果实个数，计算腐烂率。

$$\text{腐烂率}(\%)=\frac{\text{腐烂果实个数}}{\text{枸杞数量}}\times 100$$

1.2.3　硬度的测定　随机取 50 枚果实，使用 TA.XT plus 质构仪测定枸杞硬度。测试方法：去果实赤道部相对两面的皮，全质构分析 TPA；探头：P/36 R 柱形探头；测试目标模式：应变；压缩程度：70%；测前速：2 mm/s；测中速：1 mm/s；测后速：1 mm/s；单位：N。

1.2.4　果胶物质含量的测定　采用咔唑比色法[23] 测定果胶物质含量，内容稍作改动。将 20 g 枸杞鲜果打浆，从中称取 1 g 直接倒入 10 mL 离心管中，添加 95% 乙醇约至离心管 8 mL 处，将其放于沸水浴中加热 1 h，同时在加热过程中及时补加 95% 乙醇。取出冷却至室温，于 25 ℃、8000 r/min 条件下离心 30 min，留沉淀，加 95% 乙醇约离心管 8 mL 处，以上步骤重复 4 次。然后将沉淀放入原试管中，加入 20 mL 蒸馏水，在 50 ℃ 水浴中保温 30 min，以溶解果胶。取出冷却至室温后，将上清液移入 100 mL 容量瓶中，用少量水洗涤沉淀，离心后，一并将上清液移入到容量瓶中，加蒸馏水至刻度，此溶液即为可溶性果胶。

经蒸馏水洗涤后的沉淀物，仍保留在原刻度离心管中，再向离心管中加入 0.5 mol/L 硫酸溶液 5 mL，沸水浴中加热 1 h 以水解原果胶。取出冷却至室温后，25 ℃、8000 r/min 条件下离心 15 min。上清液倒入 100 mL 容量瓶中，蒸馏水定容，此为原果胶测定液。

取 25 mL 刻度试管，加入 1 mL 原果胶提取液/1 mL 可溶性果胶提取液（称取 10.5 g NaCl，用 50 mmol/L、pH5.5 乙酸-乙酸钠缓冲溶液溶解，稀释至 100 mL，摇匀）和 6 mL 浓硫酸，沸水浴 20 min，冷却至室温，加入 0.2 mL 咔唑乙醇溶液（1.5 g/L）（称取 0.15 g 咔唑加入无水乙醇溶解并稀释至 100 mL），

暗处反应 30 min, 于 530 nm 处测定反应液吸光度值。

$$半乳糖醛酸含量(\%)=\frac{m'\times V}{Vs\times m\times 10^6}\times 100$$

果胶 = 原果胶(%) + 可溶性果胶(%)

式中, m′—从标准曲线(y=0.0028X-0.0009)查得的半乳糖醛酸质量, μg; V—样品提取液总体积, mL; Vs—测定时所取样品提取液体积, mL; m—样品质量, g。

1.2.5 多聚半乳糖醛酸酶活力的测定 采用比色法[23]测定多聚半乳糖醛酸酶(PG)活力, 内容稍作改动。将 20 g 枸杞鲜果打浆, 从中称取 10 g 与 95% 的预冷乙醇一起加入离心管中, 摇匀, 低温静置。10 min 后离心 20 min(12000 r/min、4 ℃), 留沉淀, 加入 80% 预冷的乙醇, 重复上述操作。留沉淀加入 8 mL 提取缓冲液, 4 ℃ 条件下静置 20 min, 离心, 上清液为 PG 提取液。

剩余步骤严格按照曹建康 PG 活力测定进行。

$$多聚半乳糖醛酸酶活性[\mu g/(h\cdot g)]=\frac{m'\times V\times 1.08\times 1000}{Vs\times t\times m}$$

式中, m′—从标准曲线(y=0.5075X+0.0046)查得的葡萄糖质量, mg; V—样品提取液总体积, mL; Vs—测定时所取样品提取液体积, mL; t—酶促反应时间, h; m—样品质量, g; 1.08—葡萄糖换算成半乳糖醛酸的系数(194/180)。

1.2.6 β-半乳糖苷酶活力的测定 采用曹建康等[23]的测定方法测定 β-半乳糖苷酶(β-Gal)活力。取 0.5 mL p-硝基苯-β-吡喃半乳糖苷溶液(5 mmol/L)和 0.5 mL 酶提取液于试管中, 在 37 ℃ 水浴中保温 30 min。取出后立即向试管中加入 2 mL 碳酸钠溶液(1 mol/L)以终止酶促反应, 充分摇匀冷却, 于波长 400 nm 处测定混合液的吸光值。

$$\beta\text{-半乳糖苷酶活性}[\mu mol/(h\cdot g)]=\frac{m'\times V}{Vs\times t\times m}$$

式中, m′—从标准曲线(y=0.18X+0.0114)查得的 p-硝基苯酚物质的量, μmol; V—样品提取液总体积, mL; Vs—测定时所取样品提取液体积, mL; t—酶促反应时间, h; m—样品质量, g。

1.2.7 纤维素酶活力的测定 采用曹建康等[23]的测定方法测定纤维素酶(Cx)活力。两支 25 mL 试管中均加入 1.5 mL 羧甲基纤维素钠溶液(10 g/L)和 0.5 mL 酶提取液, 但其中一支试管中的酶提取液须经过沸水煮 5 min 处理。恒温水浴(37 ℃)1 h 后直接加入 3,5-二硝基水杨酸 1.5 mL, 沸水煮 5 min, 冷水中快速冷却至室温, 加蒸馏水至 25 mL 处。540 nm 处测定前充分摇匀。

$$纤维素酶活性[\mu g/(h\cdot g)]=\frac{m'\times V\times 1000}{Vs\times t\times m}$$

式中, m′—从标准曲线(y=0.5075X+0.0046)查得的葡萄糖质量, mg; V—样品提取液总体积, mL; Vs—测定时所取样品提取液体积, mL; t—酶促反应时间, h; m—样品质量, g。

1.2.8 β-葡萄糖苷酶活力的测定 采用水杨苷水解法[23]测定 β-葡萄糖苷酶(β-Glu)活力, 内容稍作改动。将 20 g 枸杞鲜果打浆, 从中称取 10 g 与 95% 的预冷乙醇一起加入离心管中, 充分摇匀, 低温放置 10 min, 然后在 4 ℃、12000 r/min 条件下离心 20 min。留沉淀, 加入 10 mL 提前预冷的 80% 乙醇, 振荡, 低温放置 10 min, 4 ℃、12000 r/min 条件下离心 20 min。留沉淀, 加入 5 mL 提前预冷的缓冲液, 低温放置 20 min, 同等条件下离心 20 min, 收集上清液, 4 ℃ 保存备用。

取 1.5 mL 水杨苷溶液(10 g/L)和 0.5 mL 酶提取液于 25 mL 具塞刻度试管中, 在 37 ℃ 水浴中保温 1 h。取出后, 立即向试管中加入 1.5 mL DNS 试剂以终止酶促反应, 充分摇匀。然后在沸水浴中煮沸 5 min, 取出冷却后, 用蒸馏水稀释至 25 mL, 充分混匀, 在波长 540 nm 处测定。

$$\beta\text{-葡萄糖苷酶}[\mu g/(h\cdot g)]=\frac{m'\times V\times 1000}{Vs\times t\times m}$$

式中, m′—从标准曲线(y=0.5075X+0.0046)查得的葡萄糖质量, mg; V—样品提取液总体积, mL; Vs—测定时所取样品提取液体积, mL; t—酶促反应时间, h; m—样品质量, g。

1.3 数据处理

以上试验均设定 3 个重复。试验数据由 Excel 2010 进行整理, SPSS 19.0 对试验数据进行分析, $P<0.05$、$P<0.01$ 分别表示差异显著、极显著, 并用 Origin 2018 进行作图。

2 结果与分析

2.1 NO 熏蒸对冷藏枸杞鲜果腐烂率的影响

如图 1 所示, 在贮藏期间, 果实的腐烂率呈上升趋势, 对照组和处理组果实分别在第 12 d 和 24 d 开始出现明显腐烂, 且 NO 处理组的腐烂率极显著($P<0.01$)低于对照组, 贮藏第 36 d 时对照组和 NO 处理

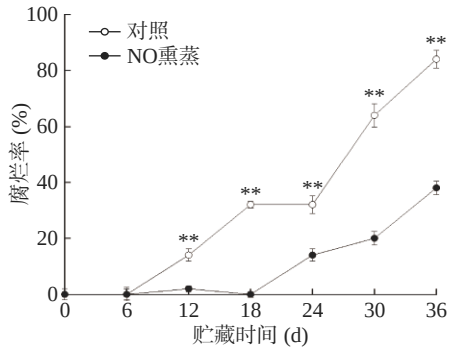


图 1 NO 熏蒸对冷藏枸杞鲜果腐烂率的影响

Fig.1 Effect of NO fumigation on rotting rate of postharvest of *Lycium barbarum* fruit during cold storage

注: *表示两处理间差异显著 $P<0.05$, **表示两处理间差异极显著 $P<0.01$; 图 2~图 8 同。

组腐烂率分别为 84.0% 和 38.0%，对照组腐烂率是 NO 处理组的 2.21 倍。说明 NO 熏蒸可以延缓果实腐烂的发生，后期可以抑制腐烂率的上升。

2.2　NO 熏蒸对冷藏枸杞鲜果硬度的影响

枸杞果实硬度下降通常表现为口感发粘，果实从坚挺状态变为松散状态，导致软化。软化程度较高必然引起微生物侵染，造成腐烂。由图 2 可知，贮藏 0~6 d，两组的枸杞硬度均呈现急速下降趋势，其中对照组果实硬度下降速度较快；贮藏 6~36 d，对照组果实硬度快速下降，NO 处理组呈现小幅度波动且在第 36 d 极显著（$P<0.01$）上升，究其原因可能是因为纤维素对细胞壁骨架起到了重要的支撑作用，延缓了果实软化；但自贮藏开始至结束，NO 处理组硬度一直高于对照组枸杞，处理组和对照组枸杞硬度较起始点分别下降 0.3 N 和 5.2 N，同时处理组的腐烂率极显著（$P<0.01$）低于对照组，该结论与郭芹等[24] 研究结果相似。说明 NO 熏蒸可以显著抑制贮藏期间枸杞鲜果硬度下降，降低腐烂。

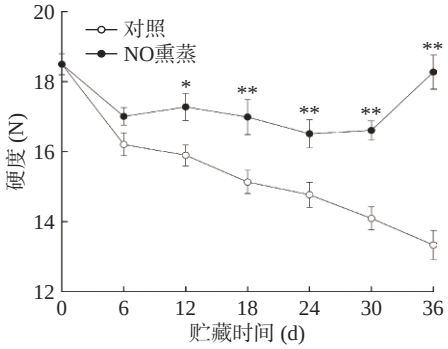


图 2　NO 熏蒸对冷藏枸杞鲜果硬度的影响

Fig.2　Effect of NO fumigation on firmness of postharvest of *Lycium barbarum* fruit during cold storage

2.3　NO 处理对冷藏枸杞鲜果细胞壁代谢的影响

2.3.1　果胶物质含量

2.3.1.1　NO 熏蒸处理对冷藏枸杞鲜果原果胶含量的影响　果胶类物质存在于胞间，起粘合联结作用，果实成熟软化时发生明显变化，其结构改变也是导致果实硬度发生变化的主要原因[25−27]，原果胶为非水溶性物质，含量越高，果实越坚挺。由图 3 可知，在整个贮藏过程中，对照组枸杞原果胶含量大致呈先上升后下降趋势，贮藏 36 d 原果胶含量较第 0 d 低 8.99%；与对照组相比，NO 处理组枸杞原果胶含量变化幅度较小，且处理组枸杞原果胶含量始终高于对照组；贮藏第 6 d，处理组枸杞原果胶含量达到最高值；6~12 d，原果胶含量有所下降；12~36 d，原果胶含量基本没有变化；贮藏第 36 d 原果胶含量仅仅比贮藏第 12 d 低 8.77%，较贮藏第 0 d 高 18.77%。由此说明，NO 熏蒸可有效保持冷藏枸杞鲜果原果胶含量，防止果实软化。

2.3.1.2　NO 熏蒸处理对冷藏枸杞鲜果可溶性果胶含量的影响　细胞壁中可溶性果胶为水溶性物质，其含

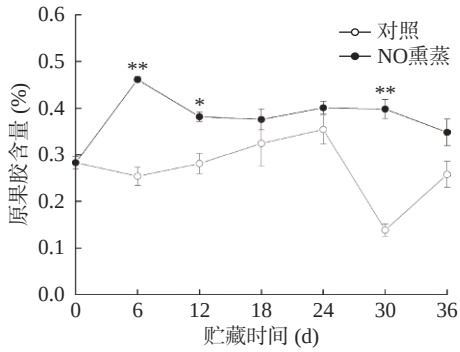


图 3　NO 熏蒸对冷藏枸杞鲜果原果胶含量的影响

Fig.3　Effect of NO fumigation on the content of protopectin of postharvest of *Lycium barbarum* fruit during cold storage

量上升是果实软化的主要原因之一[28]。由图 4 可知，整个贮藏过程中对照组枸杞中可溶性果胶含量一直高于处理组；在贮藏第 36 d 效果极显著（$P<0.01$），且处理组枸杞可溶性果胶含量比对照组低 51.3%，究其原因可能是 NO 气体熏蒸可抑制枸杞果实细胞壁中原果胶的降解，延缓可溶性果胶的生成，从而维持果实细胞壁结构完整性，延缓果实硬度下降速度，这与 NO 抑制木瓜软化结论相似[22]。由此说明，NO 熏蒸可以抑制枸杞中可溶性果胶含量上升速率，维持枸杞鲜果贮藏过程中的质地。

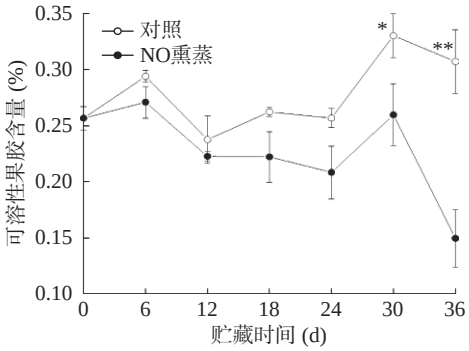


图 4　NO 熏蒸对冷藏枸杞鲜果可溶性果胶含量的影响

Fig.4　Effect of NO fumigation on soluble pectin content of postharvest of *Lycium barbarum* fruit during cold storage

2.3.2　细胞壁代谢相关酶

2.3.2.1　NO 熏蒸处理对冷藏枸杞鲜果多聚半乳糖醛酸酶（PG）活力的影响　果胶类物质中的原果胶向可溶性果胶的转化速度与果胶酶类活性密不可分。由图 5 可知，贮藏 0~36 d，两组枸杞鲜果 PG 活力均大致呈下降趋势，且处理组枸杞 PG 活力始终低于对照组。贮藏 0~12 d，对照组与处理组鲜果 PG 活力迅速下降，第 12 d 时分别比贮藏第 0 d 时低 43.37% 和 45.80%。自 12 d 至贮藏结束，两组枸杞鲜果均在贮藏第 18 d 和 30 d 出现酶活力高峰，且对照组分别高于处理组 8.2%（$P>0.05$）和 26.94%（$P<0.01$）。贮藏第 30 d，两组枸杞均出现酶活力高峰，其中对照组 PG 活力极显著高于处理组（$P<0.01$），同期对照组原果胶含量出现较低值，并极显著低于处理组（$P<0.01$）（图 3）；说明 NO 处理可能通过降低果实 PG 基因的

表达[29], 抑制冷藏枸杞鲜果 PG 活力上升, 缓解果实中原果胶向可溶性果胶的转化速率, 降低腐烂。

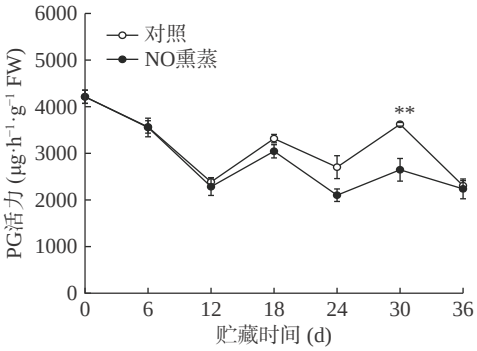


图 5 NO 熏蒸对冷藏枸杞鲜果 PG 活力的影响

Fig.5 Effect of NO fumigation on PG activity of postharvest of *Lycium barbarum* fruit during cold storage

2.3.2.2 NO 熏蒸处理对冷藏枸杞鲜果 β-半乳糖苷酶(β-Gal)活力的影响 β-Gal 可以使果胶降解或溶解, 由图 6 可知, 在整个贮藏过程中, 两组枸杞鲜果的 β-Gal 活力大致呈下降趋势, 且处理组 β-Gal 活力始终低于对照组。贮藏 18~36 d, 处理组枸杞鲜果 β-Gal 活力低于对照组, 且后期表现更加明显。贮藏结束时, 处理组 β-Gal 活力极显著低于对照组(P<0.01), 该现象与果实原果胶和可溶性果胶变化趋势相对应(图 3~图 4)。表明 NO 熏蒸降低了 β-Gal 活力, 抑制原果胶物质的转化速度, 缓解细胞壁结构发生变化, 对降低腐烂有一定的作用。

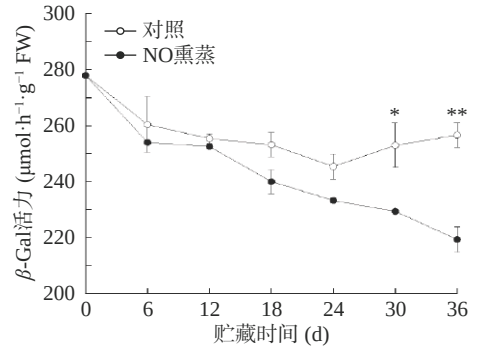


图 6 NO 熏蒸对冷藏枸杞鲜果 β-Gal 活力的影响

Fig.6 Effect of NO fumigation on the activity of β-gal of postharvest of *Lycium barbarum* fruit during cold storage

2.3.2.3 NO 熏蒸处理对冷藏枸杞鲜果纤维素酶(Cx)活力的影响 果蔬采后硬度下降导致软化现象主要与其品种、呼吸强度、细胞壁代谢、糖代谢等多种因素相关[29−33]。有研究报道, 细胞壁总体结构的改变是果实软化的重要原因之一[34]。细胞壁是一种“纤维素-半纤维素-果胶”组成的稳定结构[22]。纤维素对细胞壁骨架起到了重要地支撑作用, 纤维素结构变化导致植物细胞壁变薄, 硬度下降, 果实软化[35−37]。Cx 可降解细胞壁中的纤维素, 破坏细胞壁结构。由图 7 可知, 对照组与处理组枸杞 Cx 活力变化趋势基本一致, 呈现“降-升-降-升”的趋势。其中贮藏 12~36 d 处理组 Cx 显著低于对照组(除 24 d 之外)。两组枸杞 Cx 酶活力均在第 18 d 达到高峰, 且对照组酶活力显著高于处理组(P<0.05); 贮藏 18~36 d, 两组鲜果酶活力先快速下降又迅速升高, 在贮藏末期(30~36 d)对照组枸杞 Cx 活力极显著高于处理组(P<0.01), 与朱树华使用 NO 处理草莓结果相似[38], 可能是因为 NO 通过影响 Cx 的 pH, 从而引起 Cx 构象和和生理功能发生改变[39]。由此说明, NO 熏蒸对于抑制冷藏枸杞鲜果 Cx 活力上升具有一定效果。

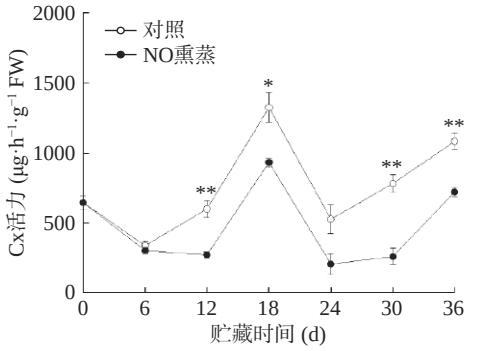


图 7 NO 熏蒸对冷藏枸杞鲜果 Cx 活力的影响

Fig.7 Effect of NO fumigation on Cx activity of postharvest of *Lycium barbarum* fruit during cold storage

2.3.2.4 NO 熏蒸处理对冷藏枸杞鲜果 β-葡萄糖苷酶(β-Glu)活力的影响 β-Glu 属于纤维素酶类, 对果实细胞壁的降解与稳定产生重要影响[23−24]。Cx 和 β-Glu 参与细胞壁中纤维素糖化, 最终将纤维素水解成葡萄糖, 细胞壁结构瓦解, 果实软化, 腐烂发生。由图 8 可知, 对照组枸杞鲜果呈先上升后下降的趋势, 其中在藏第 30 d 出现活力高峰。相较于对照组, 处理组酶 β-Glu 活力上升趋势更缓慢, 且在第 12、18 和 30 d 显著低于对照(P<0.05)。说明, NO 熏蒸在不同贮藏时期抑制 β-Glu 活力的上升作用表现不同。

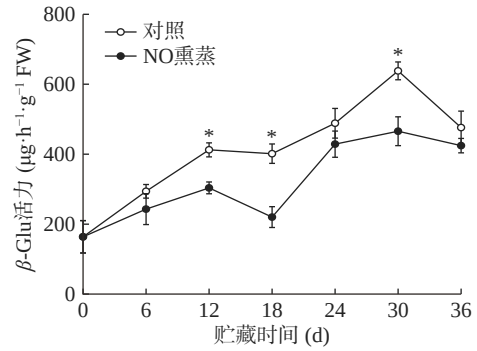


图 8 NO 熏蒸对冷藏枸杞鲜果 β-Glu 活力的影响

Fig.8 Effect of NO fumigation on the activity of β-Glu of postharvest of *Lycium barbarum* fruit during cold storage

3 结论

本试验研究结果表明, 在 3±0.5 ℃ 的贮藏条件下, 外源 NO 熏蒸处理可通过抑制枸杞鲜果 PG、β-Glu、β-Gal 和 Cx 活力, 维持较高的原果胶含量, 保持果实细胞壁结构完整性, 显著(P<0.05)延缓了硬度

的下降，抑制果实腐烂率的上升。说明 NO 熏蒸在抑制果实细胞壁代谢相关酶活力，保持果实品质，延缓果实成熟软化方面发挥着重要的作用。本研究结果将为外源 NO 熏蒸在枸杞鲜果保鲜方面的应用提供理论参考。

参考文献

[1] 宋延静，龚骏. 施用生物质炭对土壤生态系统功能的影响[J]. 鲁东大学学报(自然科学版)，2010，26(4)：361−365. [SONG Yanjing, GONG Jun. Effects of biochar application on soil ecosystem functions[J]. Journal of Ludong University (Natural Science Edition), 2010, 26(4): 361−365.]

[2] LUO Y, DURENKAMP M, NOBILI M, et al. Short term soil priming effects and the mineralisation of biochar following its incorporation to soils of different pH[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2011, 43(11): 2304−2314.

[3] 曹林，张爱玲. 我国枸杞产业发展的现状阶段与趋势分析[J]. 林业资源管理，2015(2)：4−8,30. [CAO Lin, ZHANG Ailing. Study on present situation, development stages and trends of Chinese wolfberry industry[J]. Forest Resources Management, 2015(2): 4−8, 30.]

[4] 刘彤. 枸杞多糖药理作用与临床应用[J]. 人人健康，2020(6)：210. [LIU Tong. The pharmacological effect and clinical application of polysaccharides[J]. Health for Everyone, 2020(6): 210.]

[5] DOMENICO M, ANA J G, JORDI M, et al. Chemoprotective effect of carotenoids from *Lycium barbarum* L. on SH-SY5Y neuroblastoma cells treated with beauvericin[J]. Food and Chemical Toxicology, 2020: 141.

[6] 葛玉萍，曹有龙，许兴，等. 枸杞鲜果采后品质变化初探[J]. 北方园艺，2008(5)：227−229. [GE Yuping, CAO Youlong, XU Xing, et al. Research on quality change of after picks to Chinese matrimony-vine fresh fruit[J]. Northern Horticulture, 2008(5): 227−229.]

[7] 王瑞庆，冯建华，魏雯雯，等. 1-MCP 处理和气调包装对枸杞鲜果低温贮藏品质的影响[J]. 农业工程学报，2012，28(19)：287−292. [WANG Ruiqing, FENG Jianhua, WEI Wenwen, et al. Effect of 1-methylcyclopropene and modified atmosphere packaging on quality retention during cold-temperature storage of *Lycium barbarum* fruit[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2012, 28(19): 287−292.]

[8] 徐桂花，魏宁霞，梁军. 枸杞保鲜面工艺及保鲜技术研究[J]. 农业机械，2012(15)：66−68. [XU Guihua, WEI Ningxia, LIANG Jun. Research on the preservation surface technology and preservation technology[J]. Farm Machinery, 2012(15): 66−68.]

[9] 李晓莺，张曦燕，闫亚美，等. 不同浓度水杨酸处理对枸杞鲜果采后生理及贮藏保鲜效果的影响[J]. 江苏农业科学，2020，48(2)：201−209. [LI Xiaoying, ZHANG Xiyan, YAN Yamei, et al. The effects of different concentrations of salicylic acid on postharvest physiology and storage of *Lycium barbarum* L.[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2020, 48(2): 201−209.]

[10] 向文娟，王孝雯，孙大文. 水杨酸结合气调保鲜对宁夏枸杞贮藏品质的影响[J/OL]. 食品科学：1−15[2021-06-07]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20210430.1514.020.html. [XIANG Wenjuan, WANG Xiaowen, SUN Dawen. Effects of salicylic acid treatment combined with modified atmosphere packaging on the quality of wolfberries during the storage[J/OL]. Food Science: 1−15[2021-06-07]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20210430.1514.020.html.]

[11] 李世瑶，段月，刘敦华，等. 壳聚糖涂膜对不同成熟度枸杞品质的影响[J]. 北方园艺，2016(24)：128−132. [LI Shiyao, YIN Yue, LIU Dunhua, et al. Effect chitosan coating on quality of different maturity *Lycium barbarum*[J]. Northern Horticulture, 2016(24): 128−132.]

[12] 禄璐，张曦燕，李晓莺，等. 壳聚糖-山梨酸钾复合涂膜对鲜果枸杞保鲜品质的影响[J]. 食品工业科技，2017，38(9)：257−260. [LU Lu, ZHANG Xiyan, LI Xiaoying, et al. Effect of chitosan-potassium sorbate compound liquid gilm coating on preservation of fresh wolfberry[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(9): 257−260.]

[13] 李晓莺，何军，葛玉萍，等. 壳聚糖涂膜对枸杞鲜果常温保鲜的研究[J]. 安徽农业科学，2009，37(14)：6597−6598. [LI Xiaoying, HE Jun, GE Yuping, et al. Study on the preservation of fresh Chinese wolfberry fruit at room temperature by chitosan coating[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2009, 37(14): 6597−6598.]

[14] 葛玉萍，曹有龙，许兴，等. 不同厚度保鲜膜对枸杞果实品质的影响[J]. 安徽农业科学，2008(20)：8805−8806, 8857. [GE Yuping, CAO Yulong, XU Xing, et al. Effect of thickness of preservative film on quality of wolfberry (*Lycium bararum* L.) fresh fruits[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2008(20): 8805−8806, 8857.]

[15] 林晨. 一氧化氮和自发气调对冷藏茭白品质和生理代谢的影响 [D]. 扬州：扬州大学，2017. [LIN Chen. Effects of nitric oxide and spontaneous gas modulation on the quality and physiological metabolism of frozen water bamboo[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2017.]

[16] 朱丽琴，李斌，张伟，等. NO 对采后李果实保鲜效果的影响[J]. 江西农业大学学报，2013，35(6)：1157−1161. [ZHU Liqin, LI Bin, ZHANG Wei, et al. Effect of nitric oxide on the preservation of postharvest plums[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2013, 35(6): 1157−1161.]

[17] 尹国胜，任艳芳，何俊瑜，等. NO 对延长芒果货架期的影响研究[J]. 中国农学通报，2011，27(26)：114−118. [YIN Guosheng, REN Yanfang, HE Junyu, et al. Effect of nitric oxide treatment on extending the postharvest life of *Mangifera indica*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2011, 27(26): 114−118.]

[18] 石玲，吴斌，敬媛媛，等. 一氧化氮熏蒸处理对甜瓜采后细胞壁代谢及黑斑病控制的影响[J]. 食品科学，2019，40(23)：239−245. [SHI Ling, WU Bin, JING Yuanyuan, et al. Effects of nitric oxide fumigation on cell wall metabolism and black spot control of postharvest melon[J]. Food Science, 2019, 40(23): 239−245.]

[19] 陈发河，张美姿，吴光斌. NO 处理延缓采后枇杷果实木质化劣变及其与能量代谢的关系[J]. 中国农业科学，2014，47(12)：2425−2434. [CHEN Fahe, ZHANG Meizi, WU Guangbin. Study of lignification's delaying and its relationship with energy metabolism in loquat fruits after nitric oxide fumigation[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2014, 47(12): 2425−2434.]

[20] 高维亚, 吴光斌, 陈发河. NO 处理对采后莲雾果实絮状绵软进程的影响[J]. 食品科学, 2016, 37(18): 208−215. [GAO Weiya, WU Guangbin, CHEN Fahe. Effects of exogenous nitric oxide fumigation on cottony softening of postharvest wax apple (*Syzygium sam arangense* Merr. *Perry*) fruit[J]. Food Science, 2016, 37(18): 208−215.]

[21] ZHANG C, JING Y S, LI Q Z. Cooperative effects of hydrogen sulfide and nitric oxide on delaying softening and decay of strawberry[J]. International Journal of Agricultural& Biological Engineering, 2014, 7(6): 114−122.

[22] LI X P, WU B, GUO Q, et al. Effects of nitric oxide on postharvest quality and soluble sugar content in papaya fruit during ripening[J]. Journal of Food Processing & Preservation, 2014, 38(1): 591−599.

[23] 曹建康. 果蔬采后生理生化实验指导 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2013. [CAO Jiankang. Experimental guidance of postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables[M]. China Light Industry Press, 2013.]

[24] 郭芹, 吴斌, 王吉德, 等. NO 处理对番木瓜采后贮藏性的影响[J]. 食品科学,2011,32(4): 227−231. [GUO Qin, WU Bin, WANG Jide, et al. Effects of nitric oxide fumigation on storage characteristics of postharvest papaya[J]. Food Science, 2011, 32(4): 227−231.]

[25] 茅林春, 张上隆. 间歇低温胁迫对桃果实细胞壁代谢的影响[J]. 植物生理学报,2001(2): 151−155. [MAO Linchun, ZHANG Shanglong. Influence of intermittent low temperature stress on cell wall metabolism in peaches[J]. Physiology and Molecular Biology of Plants, 2001(2): 151−155.]

[26] KNEE M. Metabolism of polymethylgalaeturonate in apple fruitcortical tissue during ripening[J]. Phytochemistry, 1978, 17: 1261−1264.

[27] REDGWELL R J. Cell wall synthesis in kiwifruit following postharvest ethylene treatment[J]. Phytochemistry, 1996, 41: 407−413.

[28] 殷健东. 1-MCP 和乙烯对水蜜桃采后冷害发生的生理调控机制研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2018. [YIN Jiandong. Physiological regulation mechanism of 1-MCP and ethylene on chilling injury of peach[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2018.]

[29] 徐海山, 丁胜华, 周辉, 等. 采后果蔬软化机制及调控方法研究进展[J]. 激光生物学报, 2019, 28(6): 504−512, 517. [XU Haishan, DING Shenghua, ZHOU Hui, et al. Advances in mechanism and regulation methods of postharvest fruits and vegetable softening[J]. Acta Laser Biology Sinica, 2019, 28(6): 504−512, 517.]

[30] 张强, 代文婷, 李冀新, 等. 糖代谢对甜瓜果实后熟软化的影响[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(1): 112−117. [ZHANG Qiang, DAI Wenting, LI Jixin, et al. Effects of sugar metabolism on post-ripening and softening of melon fruits[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(1): 112−117.]

[31] MONIKA S C, MONIKA C, PIOTR M P, et al. Tailored nanocellulose structure depending on the origin. example of apple parenchyma and carrot root celluloses[J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 210(1): 186−195.

[32] BELAY Z A, CALEB O J, OPARA U L. Enzyme kinetics modelling approach to evaluate the impact of high CO_2 and super-atmospheric O_2 concentrations on respiration rate of pomegranate arils[J]. CyTA-Journal of Food, 2017: 608−616.

[33] BRUMMELL D A. Cell wall disassembly in ripening fruit[J]. Functional Plant Biology, 2006, 33(2): 103−109.

[34] 李伟明, 陈晶晶, 段雅婕, 等. 番荔枝果实后熟过程多糖代谢与果实软化和采后裂果的关系[J]. 植物生理学报, 2018, 54(11): 1727−1736. [LI Weiming, CHEN Jingjing, DUAN Yajie, et al. The relationship between polysaccharide metabolism and fruit softening and fruit fracturing after ripening of panchi fruit[J]. Plant Physiology Journal, 2018, 54(11): 1727−1736.]

[35] PRASANNA V, PRABHA T N, THARANATHAN R N. Fruit ripening phenomena-an overview[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2007, 47(1): 1−19.

[36] 孙振. 一氧化氮调控桃果实山梨醇脱氢酶活性的分子机理 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2012. [SUN Zhen. Regulation mechanism of nitric oxide on sorbitol dehydrogenase activity in peach fruit[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2012.]

[37] 茅林春, 应铁进, 张上隆. 桃果实絮败与果胶质变化和细胞壁结构的关系[J]. 植物生理学报, 1999(2): 121−126. [MAO Linchun, YING Tiejin, ZHANG Shanglong. Changes of pectic substances and cell wall structure associated with the development of woolliness in peaches[J]. Physiology and Molecular Biology of Plants, 1999(2): 121−126.]

[38] 朱树华. 一氧化氮对草莓和肥城桃果实成熟衰老的调控机理研究 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2006. [ZHU Shuhua. Regulation mechanism of nitric oxide on the ripening and senescence in fruit of strawberry and ‘Feicheng’ peach[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2006.]

[39] 何俊瑜, 任艳芳, 陈元有, 等. 一氧化氮对常温贮藏下芒果果实软化和细胞壁代谢的影响[J]. 食品工业科技, 2018, 39(17): 269−275. [HE Junyu, REN Yanfang, CHEN Yuanyou, et al. Effect of nitric oxide on softening and cell wall metabolism of postharvest mango[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(17): 269−275.]

曹伟峰, 张悦妍, 向情儒, 等. 基于 HS-SPME-GC-MS 和 GC-IMS 结合电子鼻分析真空冷却对酱牛肉风味的影响 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 341−348. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080267

CAO Weifeng , ZHANG Yueyan , XIANG Qingru, et al. Analysis of the Effect of Vacuum Cooling on the Flavor of Sauce Beef Based on HS-SPME-GC-MS and GC-IMS Combined with Electronic Nose[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 341−348. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080267

· 贮运保鲜 ·

基于 HS-SPME-GC-MS 和 GC-IMS 结合电子鼻分析真空冷却对酱牛肉风味的影响

曹伟峰[1], 张悦妍[2], 向情儒[2], 冯　涛[2,*]

（1.无锡市真正老陆稿荐肉庄有限公司, 江苏无锡 214016;
2.上海应用技术大学香精香料技术与工程学院, 上海 201418）

摘　要: 为研究真空冷却对酱牛肉挥发性成分的影响，本文以“陆稿荐”酱牛肉为研究对象，采用顶空固相微萃取-色谱-质谱联用技术（HS-SPME-GC-MS）、气相色谱-离子迁移谱（gas chromatography-ion mobility spectrometry, GC-IMS）和快速气相色谱电子鼻对经真空冷却和自然冷却“陆稿荐”酱牛肉中的挥发性成分进行定性定量分析。结果表明，采用两种不同冷却方式处理的酱牛肉中共检测到 92 种挥发性风味化合物，包括酯类 19 种，醇类 20 种，酮类 13 种、醛类 11 种、酸类 8 种、烃类 12 种及其他类（醚类 3 种、酚类 2 种、杂环类 4 种）化合物，且两种酱牛肉中挥发性成分种类及相对含量有明显差异。电子鼻检测结果显示两种酱牛肉可以根据气味的差异被很好地区分，可以辅助 SPME-GC-MS 对酱牛肉中挥发性成分进行分析。本文结果可以为肉制品真空冷却技术提供一定的科学理论依据。

关键词: 酱牛肉, 风味, 顶空固相微萃取-色谱-质谱联用, 气相色谱-离子迁移谱, 电子鼻, 挥发性化合物

中图分类号: TS251.6+1　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0341−08　　**本文网刊:**

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080267

Analysis of the Effect of Vacuum Cooling on the Flavor of Sauce Beef Based on HS-SPME-GC-MS and GC-IMS Combined with Electronic Nose

CAO Weifeng [1], ZHANG Yueyan [2], XIANG Qingru[2], FENG Tao [2,*]

（1.Wuxi Zhenzheng Laolu Meat Co., Ltd., Wuxi 214016, China;
2.School of Perfume and Aroma Technology, Shanghai Institute of Technology, Shanghai 201418, China）

Abstract: In order to study the effect of vacuum cooling on the volatile components of beef seasoned with soysauce, the volatile components of beef with and without vacuum cooling were qualitatively and quantitatively analyzed by HS-SPME-GC-MS (headspace solid phase microextraction-chromatography-mass spectrometry), GC-IMS (gas chromatography-ion mobility spectrometrygas chromatography-ion mobility spectrometry) and gas phase electronic nose. The results showed that a total of 92 volatile flavor compounds were detected in beef seasoned with soy sauce treated by two different cooling methods, including 19 esters, 20 alcohols, 13 ketones, 11 aldehydes, 8 acids, 12 hydrocarbons and other compounds (3 ethers, 2 phenols and 4 heterocycles). There were significant differences in volatile components and relative percentage content between the two kinds of beef seasoned with soy sauce. The results of gas phase electronic nose test showed that the two kinds of beef seasoned with soy sauce could be well distinguished according to the difference of odor, which could assist the analysis of volatile components of SPME-GC-MS. The experimental results can provide some scientific and theoretical basis for vacuum cooling technology of meat products.

收稿日期: 2021−08−25

作者简介: 曹伟峰（1977−）, 男, 本科, 工程师, 研究方向: 肉制品加工, E-mail: 51586066@qq.com。

*** 通信作者:** 冯涛（1978−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 淀粉科学与风味化学, E-mail: fengtao@sit.edu.cn。

Key words: beef seasoned with soy sauce; flavor; headspace solid phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS); gas chromatography-ion mobility spectrometry (GC-IMS); electronic nose (E-nose); volatile compounds

酱牛肉是我国传统特色的肉制品，其历史悠久，风味浓厚，有较高的营养价值，含有丰富的氨基酸、蛋白质等，深受人们的喜爱[1]。“陆稿荐”酱牛肉传承至今已有 140 余年的历史，以产品真材实料、风味独特、品质上乘和经营尚德诚信、勤勉创新、技艺专精久负盛名。酱牛肉的制作主要是解冻、分割、静腌、卤制、真空冷却等过程，其中，真空冷却至关重要。目前国内外酱牛肉主要通过真空冷却、自然冷却、高温冷却等多种冷却方式进行冷却。酱牛肉在自然冷却过程中，由于耗时长、降温速度慢等问题，可能会造成风味成分的损失，对其风味品质产生影响[2]。真空冷却技术作为高温食品快速冷却的高新技术之一，受到人们的广泛关注，与传统冷却技术相比其具有效率高、无残留、无污染等特点[3]。真空冷却技术最早用于蔬菜、鲜花的保藏，后广泛用于其他食品的加工生产，其目的在于延长食品货架期[4]。田欢等[5] 的研究表明真空冷却的酱牛肉冷却速率较快，肉质颜色鲜艳。马志英等[6] 的研究表明真空冷却肉制品不仅可以通过减少肉制品中微生物的增殖，提高肉制品质量，而且真空冷却肉制品的速度比自然冷却提高了 20 倍以上。

风味是衡量肉制品品质及整体可接受性的重要指标之一。对于酱牛肉风味品质的研究，大部分集中于对不同检测方法、不同品种酱牛肉的研究，而对于真空冷却技术的研究通常集中于食品保质期和质量安全方面[5]，对于真空冷却处理酱牛肉的风味研究较为少见。本研究通过顶空固相微萃取-色谱-质谱联用技术（HS-SPME-GC-MS）、气相色谱-离子迁移谱（gas chromatography-ion mobility spectrometry，GC-IMS）和快速气相色谱电子鼻等对自然冷却和真空冷却后的酱牛肉风味进行分析，为真空冷却调理肉制品提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

真正“陆稿荐”真空冷却酱牛肉、真正“陆稿荐”自然冷却酱牛肉　江苏省无锡市真正老陆稿荐肉庄有限公司，于 0~4 ℃ 保存。

VCH-200 L 低温型熟食品真空速冷机　江苏真正老陆稿荐肉庄有限公司；216 G 绞肉机　广东省佛山 HATTIECS；20 mL 顶空瓶；50/30 μm DVB/CAR SPME 萃取头　上海安谱实验科技股份有限公司；7890A/5975C 气相色谱质谱联用仪　美国安捷伦科技公司；Heracles II 快速气相色谱电子鼻　法国 Alpha M.O.S 公司。

1.2 实验方法

1.2.1　真空冷却条件　参考文献 [5] 并加以改进，工作水温 ≤25 ℃，室内环境温度 ≤35 ℃，工作水压 2 kg，真空箱容积 1.3 m^3 左右，冷却终温 10 ℃，冷却 25 min。

1.2.2　样品前处理　酱牛肉去除表面冻卤和筋腱后，用实验室绞肉机搅碎至颗粒状，进行样品测定前称取 1 g 样品于 20 mL 顶空进样瓶中。

1.2.3　气相色谱质谱检测条件　SPME 条件：30/50 CAR/DVB/PDMS 萃取头在 250 ℃ 老化 0.5 h，取 3.0 g 酱牛肉于 20 mL 顶空进样瓶中，于 60 ℃ 水浴中吸附 40 min，然后进行 GC-MS 分析。

GC 条件：色谱柱为 DB-WAX（UI）毛细管色谱柱，载气为氦气，流速为 1.0 mL/min，进样口温度 250 ℃，不分流。柱升温程序：起始温度为 40 ℃，以 3 ℃/min 升至 130 ℃，保持 3 min；再以 5 ℃/min 升至 220 ℃，保持 5 min。

MS 条件：电子轰击离子源（electron impact ionsource，EI），电子能量 70 eV，离子源温度 200 ℃，溶剂延迟时间 5 min，全扫描模式，扫描质量范围为 35~500 u。

定性与定量方法：挥发性物质鉴定结果以 NIST 11 谱库检索为准，保留匹配度大于 60 的成分；按峰面积归一化法计算各挥发性成分相对含量。

1.2.4　气相离子迁移色谱仪分析　顶空进样条件：准确称取 1 g 酱牛肉和酱排骨，装入 20 mL 顶空进样瓶中密封。在 80 ℃ 条件下孵育 15 min，孵化转速为 500 r/min；进样温度 85 ℃；进样体积为 500 μL。

GC 条件：色谱柱类型：MXT-5，柱长 15 m，内径 0.53 mm，膜厚 1.0 μm；柱温 60 ℃；分析时间 20 min；载气：N_2（纯度 ≥99.999%）；载气流速：0~2 min，2 mL/min；2~10 min，10 mL/min；10~20 min，100 mL/min。

IMS 条件：漂移管长度：5 cm；管内线性电压 400 V/cm；漂移气：N_2（纯度 ≥99.999%）；流速：150 mL/min；IMS 温度：45 ℃。

1.2.5　气相电子鼻检测条件　本实验使用全自动超快速气相色谱电子鼻 Heracles Ⅱ对两种酱牛肉进行检测。检测参数如表 1 所示。电子鼻的气相部分含有两根平行不同极性的色谱柱，其中，FID1 是高极性色谱柱，FID2 是中极性色谱柱。每个样品重复 3 次。

1.3 数据处理

采用 Microsoft Excel 2016 对数据进行分析；利用仪器自带 Laboratory Analytical Viewer、Gallery Plot 和 PCA 等程序对酱牛肉挥发性物质进行分析，所有实验重复三次。

表 1　气相电子鼻检测参数

Table 1　Detection parameters of gas-phase electronic nose

序号	参数	条件
1	样品瓶	20 mL
2	样品量	3 g
3	孵化温度	60 ℃
4	孵化时间	20 min
5	孵化炉转速	500 r/min
6	进样体积	5000 μL
7	进样速度	125 μL/s
8	进样口温度	200 ℃
9	进样持续时间	45 s
10	捕集阱初始温度	50 ℃
11	捕集阱分流速率	10 mL/min
12	捕集持续时间	50 s
13	柱温的初始温度	50 ℃
14	柱温的程序升温方式	1 ℃/s升至80 ℃，再以3 ℃/s升至250 ℃，保持21 s
15	采集时间	110 s
16	检测器温度	260 ℃
17	FID增益	12

2　结果与分析

2.1　酱牛肉挥发性风味物质分析

由表 2 可知，在真空冷却和自然冷却的酱牛肉中共检测到 92 种挥发性风味化合物，包括酯类 19 种、醇类 20 种、醚类 3 种、酮类 13 种、醛类 11 种、烃类 12 种、酸类 8 种、酚类 2 种和杂环类化合物 4 种，其中，自然冷却的酱牛肉中共检测到 76 种，真空冷却的酱牛肉中共检测到 68 种，共有化合物有 54 种。经不同冷却方式的酱牛肉挥发性成分种类及含量均有明显变化。在自然冷却的酱牛肉中，醇类和酯类物质相对含量最高，分别为 52.84% 和 11.86%，而在真空冷却的酱牛肉中，相对含量最高的是醇类和酮类物质，分别为 39.78% 和 30.53%。说明真空冷却的酱牛肉与自然冷却相比其新鲜度具有一定的优势，因为醛酮类物质可以反映熟肉的新鲜程度[7]。

2.1.1　酯类挥发性化学物质含量分析　酯类化合物是一类重要的香气化合物，大部分具有果香、花香、蜜香等气味[8−9]。在自然冷却的酱牛肉中，酯类化合物中相对含量最高的物质是乙酸乙酯，其相对含量为 6.63%，乙酸乙酯具有清新果香、酒香气味[10]。其次是乙酸己酯，其相对含量为 1.22%，具有果味、甜味香气[11]。在真空冷却的酱牛肉中，相对含量最高的酯类化合物是乙酸己酯，相对含量为 4.22%，其次为丙酸己酯，其相对含量为 1.21%，具有甜果味气息。产生这个结果的原因可能与氧气对风味物质的影响有关，真空冷却的酱牛肉冷却速度快，与氧气接触时间短，避免了大部分酯化反应的发生。据此结果可以判断，真空冷却的酱牛肉在甜香味上略胜于自然冷却的酱牛肉，从而为真空冷却酱牛肉在选择酱汁上提供了一定的理论指导。

表 2　HS-SPME-GC-MS 测得的挥发性化合物

Table 2　Volatile compounds detected by HS-SPME-GC-MS

化合物种类	序号	中文名称	英文名称	保留时间(min)	相对含量(%)	
					自然冷却	真空冷却
酯类	1	乙酸乙酯	Ethyl acetate	6.5539	6.63	−
	2	丙酸乙酯	Ethyl propionate	8.0128	0.91	0.59
	3	丁酸乙酯	Ethyl butyrate	10.2135	0.15	−
	4	乙酸丁酯	Butyl acetate	11.3788	0.32	−
	5	乙酸异戊酯	Isoamyl acetate	13.1509	0.74	−
	6	乙酸戊酯	Pentyl acetate	15.2022	0.33	0.83
	7	丙酸异戊酯	Isoamyl propionate	15.8715	0.10	−
	8	丁酸癸酯	Butanoic acid, decylester	17.0994	0.18	−
	9	正己酸乙酯	Ethyl caproate	17.7591	0.62	−
	10	乙酸己酯	Hexyl acetate	19.4396	1.22	4.22
	11	1-辛烯-3-醇乙酸酯	1-Octen-3-yl-acetate	24.0044	0.08	0.26
	12	己酸己酯	Hexyl hexanoate	34.2226	0.21	0.23
	13	4-羟基丁酸内酯	4-Hydroxybutyric acid gamma-lactone	35.0894	0.16	−
	14	乙酸苄酯	Benzyl acetate	38.8838	0.04	−
	15	水杨酸甲酯	Methyl salicylate	40.4729	0.17	0.12
	16	丙酸戊酯	Propanoic acid, pentyl ester	15.8329	−	0.55
	17	丁酸丁酯	Butyl butyrate	17.0656	−	0.11
	18	丙酸己酯	Hexyl propionate	22.3287	−	1.21
	19	乙酸庚酯	Acetic acid, heptyl ester	23.8263	−	0.24
	小计				11.86	8.5
醇类	1	乙醇	Ethanol	7.5458	7.54	0.70
	2	异戊醇	3-Methyl-1-butanol	13.1218	15.59	2.61
	3	异丁醇	2-Methyl-1-propanol	12.4044	0.75	0.27

续表 2

化合物种类	序号	中文名称	英文名称	保留时间(min)	相对含量(%)	
					自然冷却	真空冷却
	4	2-十二烯醛醇	2-Dodecenal	17.9999	0.33	–
	5	正戊醇	1-Pentanol	18.6499	0.76	2.15
	6	正己醇	1-Hexanol	23.0993	10.43	15.98
	7	L-2-辛醇	L(-)-2-Octanol	25.9066	0.22	–
	8	1-辛烯-3-醇	1-Octen-3-ol	27.1682	7.75	11.55
	9	庚醇	n-heptanol	27.4426	1.59	1.90
	10	2-乙基己醇	2-Ethylhexanol	28.8584	0.33	0.18
	11	芳樟醇	Linalool	31.1938	0.70	0.48
	12	正辛醇	1-Octanol	31.7716	0.90	1.43
	13	4-萜烯醇	Terpinen-4-ol	33.9866	0.24	0.16
	14	反式-2-壬烯-1-醇	trans-2-Nonen-1-ol	34.4971	0.76	–
	15	1-壬醇	1-Nonanol	36.3558	0.59	–
	16	2-茨醇	Borneol	38.0508	0.06	–
	17	3-甲硫基丙醇	3-Methylthiopropanol	38.5371	0.54	0.17
	18	苄醇	Benzyl alcohol	43.3958	0.13	0.14
	19	苯乙醇	Phenylethyl Alcohol	44.3588	3.63	0.70
	20	反式-2-癸烯醇	2-Decen-1-ol, (E)-	34.5018	–	1.36
	小计				52.84	39.78
醚类	1	二丁醚	n-Butyl ether	8.2055	0.63	–
	2	二乙二醇乙醚	2(2-Ethoxyethoxy)ethanol	34.8149	0.14	0.21
	3	茴香脑	cis-Anethol	41.956	2.53	2.60
	小计				3.3	2.81
酮类	1	2,3-丁二酮	2,3-Butanedione	8.4367	2.33	3.90
	2	2-庚酮	2-Heptanone	15.6404	1.13	1.79
	3	3-辛酮	3-Octanone	18.6885	1.25	–
	4	仲辛酮	2-Octanone	20.0367	0.12	0.23
	5	3-羟基-2-丁酮	3-Hydroxy-2-butanone	20.186	2.76	21.19
	6	1-庚烯-3-酮	1-Hepten-3-one	20.7059	0.30	0.27
	7	甲基庚烯酮	6-Methyl-5-hepten-2-one	22.3047	0.21	–
	8	2-壬酮	2-Nonanone	24.5487	0.25	0.52
	9	beta-紫罗酮	beta-ionone	45.0955	0.15	0.12
	10	2-戊酮	2-Pentanone	8.5184	–	0.97
	11	3-己酮	3-Hexanone	10.8538	–	0.86
	12	2,3-庚烷二酮	2,3-HEPTANEDIONE	14.1716	–	0.53
	13	甲基壬基甲酮	2-Undecanone	33.6687	–	0.15
	小计				8.5	30.53
烃类	1	2-蒎烯	.alpha.-Pinene	9.7897	0.09	0.13
	2	甲苯	Toluene	10.3628	0.88	0.52
	3	十二烷	Dodecane	11.552	1.75	0.82
	4	间二甲苯	m-Xylene	13.5263	3.05	0.31
	5	右旋萜二烯	(+)-Dipentene	16.0929	1.49	1.66
	6	苯乙烯	Styrene	18.7607	0.63	2.49
	7	十四烷	Tetradecane	24.8954	0.30	0.63
	8	十五烷	Pentadecane	29.1279	0.36	0.50
	9	4-甲基噻唑	4-Methylthiazole	35.4311	0.54	–
	10	萘	Naphthalene	39.3171	0.04	0.07
	11	苯	Benzene	7.6661	–	0.20
	12	月桂烯	Myrcene	14.5472	–	0.23
	小计				9.13	7.56
醛类	1	己醛	Hexanal	11.6965	1.57	0.97
	2	异戊醛	Isovaleraldehyde	7.1317	0.98	0.42
	3	2-己烯醛	2-Hexenal	17.1716	0.14	–
	4	壬醛	1-Nonanal	24.693	0.39	1.07
	5	反-2-辛烯醛	(E)-2-Octenal	26.2869	0.63	0.75

续表 2

化合物种类	序号	中文名称	英文名称	保留时间(min)	相对含量(%)	
					自然冷却	真空冷却
	6	苯甲醛	Benzaldehyde	30.2596	0.85	0.86
	7	苯乙醛	Phenylacetaldehyde	35.5852	0.58	0.69
	8	反式肉桂醛	trans-Cinnamaldehyde	42.1342	0.20	–
	9	反式-2-壬烯醛	(2E)-2-Nonenal	30.7362	–	0.55
	10	柠檬醛	Citral	38.9752	–	0.03
	11	肉桂醛	Cinnamaldehyde	47.4838	–	0.12
	小计				5.34	5.46
酸类	1	乙酸	Acetic acid	27.0719	3.70	–
	2	丙酸	Propanoic acid	30.7797	0.51	–
	3	异丁酸	Isobutyric acid	32.1424	0.95	–
	4	丁酸	Butyric Acid	34.9497	0.46	–
	5	异戊酸	Isovaleric acid	36.6688	3.50	0.81
	6	正戊酸	Valeric acid	39.1293	0.17	0.16
	7	己酸	Hexanoic acid	42.4326	0.58	0.77
	8	辛酸	Octanoic acid	47.7246	–	0.15
	小计				9.87	1.89
酚类	1	苯酚	Phenol	46.5498	0.09	0.08
	2	2,6-二叔丁基对甲酚（抗氧化剂BHT）	Butylated Hydroxytoluene	44.2191	–	0.03
	小计				0.09	0.11
杂环类	1	2-正丁基呋喃	2-Butylfuran	13.4542	0.12	0.25
	2	2-正戊基呋喃	2-Pentylfuran	17.5327	1.33	2.25
	3	2,5-二甲基吡嗪	2,5-Dimethyl pyrazine	21.8425	0.28	0.49
	4	2-乙酰基吡咯	2-Acetyl pyrrole	45.8468	0.14	0.22
	小计				1.87	3.21

注：表中"–"表示该物质未被检测到。

2.1.2　醇类挥发性化学物质含量分析　醇类化合物主要来源于脂肪氧化和 Strecker 反应，在两种处理方式的酱牛肉中相对含量高于其他类物质[12]。在自然冷却的酱牛肉中，相对含量最高的醇类化合物为异戊醇，其相对含量为 15.59%，略带刺激性气味；其次是正己醇，相对含量为 10.43%，具有淡青嫩叶气息，略带酒香、果香和脂肪气息等风味特征[13]。在经真空冷却的酱牛肉中，相对含量最高的分别为正己醇和 1-辛烯-3-醇，相对含量分别为 15.98% 和 11.55%，1-辛烯-3-醇属于不饱和醇，对香气有重要贡献，具有强烈的药草香韵，近似于玫瑰、薰衣草和干草的香气[14]。造成这种差异的原因可能是真空冷却的酱牛肉冷却速度比自然冷却快，减少了酱牛肉与氧气接触的时间。据此结果可以说明，真空冷却的酱牛肉在一定程度上减少了刺激性气味，增加了药草香味和果香味。

2.1.3　酮类挥发性化学物质含量分析　酮类化合物是由脂肪氧化和美拉德反应产生，具有清香、奶油及果香等令人愉快的气味[15]。氨基酸与还原糖之间发生的美拉德反应对气味的产生有重要贡献；脂肪自动氧化会产生不受欢迎的风味化合物，并导致酸败，但同时脂肪也可以作为一些芳香化合物的良好溶剂，或者作为风味形成反应的一部分，从而影响肉制品中风味的释放。在真空冷却的酱牛肉中，酮类化合物的相对含量占总挥发性化合物的 30.53%，仅次于醇类化合物，而自然冷却的酱牛肉中酮类化合物的相对含量明显较低。在真空冷却的酱牛肉中含量最高的 3-羟基-2-丁酮，在自然冷却的酱牛肉中相对含量仅为 2.76%。3-羟基-2-丁酮具有甜味和奶油气味，造成这种差异的原因可能是因为在自然冷却酱牛肉的过程中，冷却时间较长，酮类物质作为底物被消耗了。

2.1.4　烃类挥发性化学物质含量分析　烃类化合物主要由脂肪酸中烷氧自由基均裂产生，是在熟牛肉和生牛肉中发现的做多的一类挥发性化合物，但是这类化合物阈值较低，对肉制品风味贡献并不大[16]。目前在牛肉中检测到大约 200 种烃类化合物种类，但在其他肉类中发现的烃类化合物种类要少得多。本实验在自然冷却的酱牛肉中检测到相对含量为 3.05% 的间二甲苯，有类似甲苯的气味，会使人产生不好的感受，而其在真空冷却的酱牛肉中其相对含量很低，仅为 0.31%。月桂烯和苯具有香料、香脂气息，仅在真空冷却酱牛肉中检测到可能是因为真空冷却处理使酱牛肉在腌制过程中的香辛料气味在一定程度上得以更好地保留。

2.1.5　醛类挥发性化学物质含量分析　醛类化合物属氢过氧化物降解产物，阈值较低，对风味贡献比较大，尤其是短链醛对风味的贡献巨大[17]。但在本实验

中两种处理方式的酱牛肉中醛类化合物的相对含量均不高，可能是因为醛类化合物大多具有较强的挥发性，在样品前处理及顶空固相微萃取操作中有一定程度的风味损失。在自然冷却的酱牛肉中己醛的相对含量最高，为 1.57%，具有水果、鲜草气味。在真空冷却酱牛肉中相对含量最高的是壬醛，为 1.07%，具有非常明显的果香味和脂肪香味[18]。

2.1.6 酸类挥发性化学物质含量分析 酸类物质可能是甘油三酯和磷脂的水解产物，也可能由醇和醛氧化产生。在自然冷却的酱牛肉中，乙酸是相对含量最高的酸类物质，达到 3.70%。乙酸属于低级饱和酸，具有强烈刺激性气味[19]，也是人们不期望的气味，而在经真空冷却的酱牛肉中，乙酸未被检测到。

2.1.7 醚类、酚类、杂环类挥发性化学物质含量分析

在两种处理方式加工的酱牛肉中，检测到醚类 3 种、酚类 2 种、杂环类化合物 4 种。在自然冷却的酱牛肉中，醚类化合物检测到 3 种分别为二丁醚 0.63%、二乙二醇乙醚 0.14%、茴香脑 2.53%；在真空冷却酱牛肉中二乙二醇乙醚 0.21%、茴香脑 2.60%，二丁醚未被检测到，这可能是因为本身含量较少，在加工及前期处理过程中导致的风味损失。在两种酱牛肉中共检测到酚类化合物两种，其中，抗氧化剂 BHT 在真空冷却酱牛肉中相对含量为 0.03%，而在自然冷却的酱牛肉中未被检测到，这可能是因为制作酱牛肉时添加的抗氧化剂在自然冷却过程中与空气接触时间较长被氧化造成的，说明真空冷却技术处理酱牛肉在一定程度上可以降低氧化速率，延长酱牛肉保质期。杂环类化合物如吡嗪类、呋喃类、噁唑类等是由糖类与氨基酸发生美拉德反应所致，这类反应对肉类风味的形成起着至关重要的作用。吡嗪衍生物相对含量较少，但它们是一类存在于多种食物中的重要风味化合物，具有较强的感官特性，烷基吡嗪是由糖分解，α-β-丁二酮与氨基酸的 Strecker 降解反应形成氨基酮，氨基酮自身缩合和氧化形成[20]。烷基吡嗪是许多加热食品中经常出现的挥发物，但双环吡嗪是牛肉和烤牛肉中特有的香气化合物。在本实验中，自然冷却酱牛肉中 2,5-二甲基吡嗪的相对含量为 0.28%，在真空冷却酱牛肉中其相对含量为 0.49%，2,5-二甲基吡嗪具有烤牛肉香味，这可能是因为真空冷却技术在一定程度上能够比自然冷却保留酱牛肉更多的特征挥发性化合物。

2.2 两种酱牛肉的气相-离子迁移谱分析

2.2.1 两种酱牛肉中挥发性化合物指纹图谱分析

为了解析自然冷却的酱牛肉和真空冷却的酱牛肉之间挥发性化合物差异，采用仪器配套的 Gallery Plot 插件生成指纹图谱，见图 1。

图 1 中的横向指示不同冷却方法处理的 3 个平行酱牛肉样品（从上到下分别是真空冷却的酱牛肉、自然冷却的酱牛肉），纵向指示不同冷却方式的酱牛肉中同一挥发性化合物（颜色越深，化合物含量与

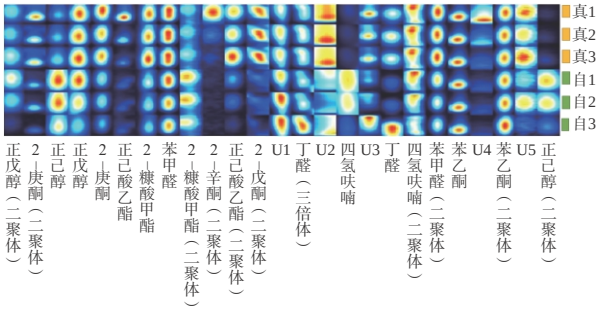


图 1 不同冷却方法处理的酱牛肉中挥发性有机物的指纹图谱

Fig.1 Fingerprint of volatile organic compounds in sauce beef treated with different cooling methods

大）[21−22]。从图 1 的横纵向差异对比可见，不同冷却方法冷却的酱牛肉样品挥发性有机物存在较大的差异。其中，真空冷却的酱牛肉酮类物质含量增加，包括 2-庚酮和 2-戊酮；酯类物质含量增加，包括 2-糠酸甲酯、正己酸乙酯等；苯甲醛含量增加；正己醇和四氢呋喃含量明显降低了。说明真空冷却增加了酱牛肉的甜香味和果香，降低了香精香料的损失，减少了刺激性味道的产生，这与前面不同冷却方式处理酱牛肉的 GC-MS 结果大致对应。

2.2.2 两种酱牛肉挥发性有机物主成分分析 将两种酱牛肉的 GC-IMS 挥发性成分数据进行主成分分析（PCA），结果见图 2。由图 2 所示，根据 PCA 结果，两个主成分的贡献率（PC1 为 68%；PC2 为 19%）占方差的 87%，能反映出样品的总体特征[23−24]。真空冷却酱牛肉样品和自然冷却酱牛肉样品风味物质图谱相对集合，提示 GC-IMS 联合 PCA 分析可以对真空冷却酱牛肉和自然冷却酱牛肉进行分类。真空冷却的酱牛肉和自然冷却的酱牛肉在第一主成分和第二主成分上有明显差异，表明两种酱牛肉的味道差异较大，能够很好的区分出来，与图 1 不同冷却方法处理酱肉食品的指纹图谱成分变化规律结果大致对应。本文采用 GC-IMS 对真空冷却和自然冷却酱牛肉风味物质进行分析，结果具有可行性。

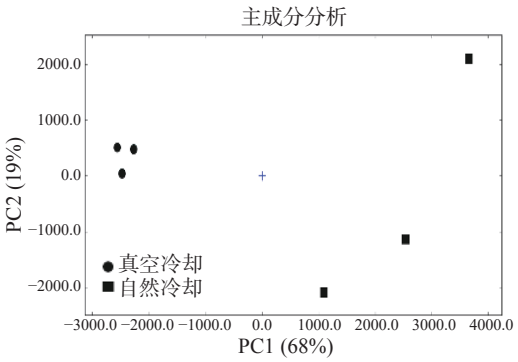


图 2 两种酱牛肉中挥发性有机物的主成分分析图

Fig.2 Principal component analysis of volatile organic compounds in two kinds of sauce beef

2.3 两种酱牛肉挥发性物质的电子鼻分析

2.3.1 雷达特征图谱分析 根据图 3 气相电子鼻雷

达图谱中峰的数量和大小，可以看到不同冷却方式处理的酱牛肉挥发性成分种类和含量分布情况。从两张雷达图中可以看到两种酱牛肉的整体风味轮廓大致相同，一些未重合的峰可能是只在一种酱牛肉中检测到的风味化合物。出峰面积不同可能是因为真空冷却处理增强了酱牛肉中的某些特征风味物质或者降低了一些因氧化而产生的酸败刺激性气味。这与 HS-SPME-GC-MS 挥发性化合物分析结果基本一致。

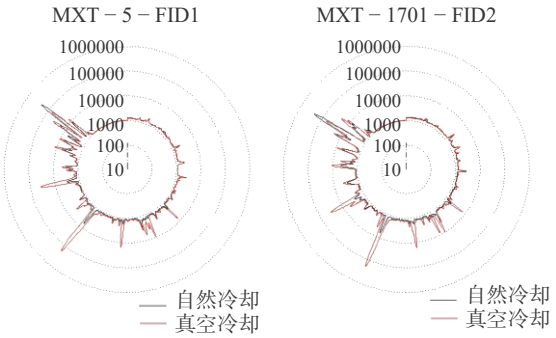


图 3　电子鼻雷达特征图谱

Fig.3　Characteristic radar spectrum of electronic nose

注：左：高极性柱；右：中极性柱

2.3.2　电子鼻的主成分分析　将本实验电子鼻数据做主成分分析，如图 4 所示。第一主成分的方差贡献率为 95.713%，第二主成分的方差贡献率为 4.128%，两个主成分的贡献率之和达到 99.841%，能够很好地反映样品实际情况。同时，识别指数（discrimination index，DI）是用来表征样品之间区分度大小的一种判断方法，有效范围在 80~100，且值越高说明得到的数据效果越好[25]。在本实验 PCA 分析中，识别指数达到 99，说明自然冷却的酱牛肉和真空冷却的酱牛肉可以很好地区分出来，且效果较佳。在主成分分析中，样品之间相对距离越远，表明样品间气味差异越大[26]，从图中可以看出两种冷却方式处理的酱牛肉之间距离较远，在第一主成分方向显示出明显的分离，表明两种酱牛肉气味差异较为显著，可以被很好地区分。

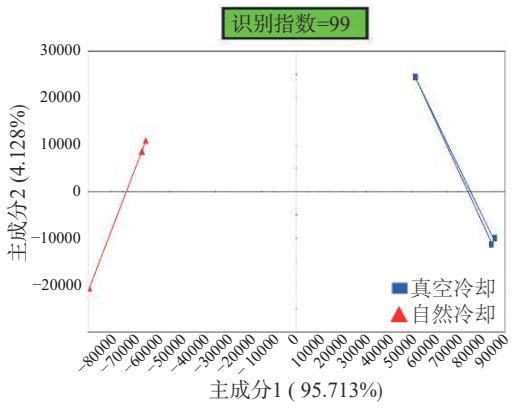


图 4　PCA 分析

Fig.4　PCA analysis

3　结论

本实验采用 HS-SPME-GC-MS 和气相电子鼻对自然冷却和真空冷却的酱牛肉中挥发性化合物进行了分析，两种酱牛肉中共检测到 92 种挥发性风味化合物，其中，自然冷却的酱牛肉中共检测到 76 种，真空冷却的酱牛肉中共检测到 68 种，包括酯类、醇类、醚类、酮类、醛类、烃类、酸类、酚类和杂环类化合物。结果表明，真空冷却能够在一定程度上减少酱牛肉在自然冷却过程中产生的一些具有刺激性气味的化合物，如乙酸、异戊醇等，同时增加了甜香味。真空冷却的酱牛肉在保留香辛料气味方面比自然冷却的酱牛肉更有优势，且两种不同冷却方式处理的酱牛肉气味存在差别，可以通过快速气相色谱电子鼻进行快速鉴别。本研究为真空冷却调理肉制品研究提供了一定的理论基础。

参考文献

[1] 綦艳梅. 酱牛肉调味汁的研制及应用[J]. 中国调味品，2019(44)：132−135. [QI Y M. Development and application of sauced beef seasoning[J]. China Condiment, 2019(44): 132−135.]

[2] 周峤，蔡华珍，杜庆飞，等. 真空冷却协同天然保鲜剂对卤牛肉杀菌效果和品质的影响[J]. 食品工业，2018，39(12)：171−176. [ZHOU Q, CAI H Z, DU Q F, et al. Effect of vacuum cooling combined with natural preservative on sterilization and quality of braised beef[J]. Food Industry, 2018, 39(12): 171−176.]

[3] 魏东旭，邹同华，汪伟，等. 真空冷却在肉类食品工业的研究现状[J]. 冷藏技术，2016(4)：12−16. [WEI D X, ZOU T H, WANG W, et al. Research status of vacuum cooling in meat industry[J]. Refrigeration Technology, 2016(4): 12−16.]

[4] 孙企达. 食品真空冷却保鲜[J]. 真空，2019，56(3)：52−56. [SUN Q D. Preservation of food by vacuum cooling[J]. Vacuum, 2019, 56(3): 52−56.]

[5] 田欢，黄峰，李侠，等. 冷却方式对酱牛肉品质的影响[J]. 肉类研究，2021，35(1)：53−58. [TIAN H, HUANG F, LI X, et al. Effect of cooling methods on quality of sauced beef[J]. Meat Research, 2021, 35(1): 53−58.]

[6] 马志英. 真空冷却技术在熟肉制品工业化生产中的应用研究[J]. 食品科学，2003，24(10)：110−113. [MA Z Y. Study on application of vacuum cooling technology on cooked meat products[J]. Food Science, 2003, 24(10): 110−113.]

[7] 邓海莲，胡蝶，邹婷婷，等. 酶解对鸡骨素美拉德反应挥发性风味成分的影响[J]. 食品工业科技，2018，39(16)：236−242. [DENG H L, HU D, ZOU T T, et al. Effects of enzymatic hydrolysis on the volatile components of maillard reaction from chicken bone extracts[J]. Food Industry Science and Technology, 2018, 39(16): 236−242.]

[8] 蒋立文，谢艳华，李跑，等. HS-SPME/GC-MS 和电子感官技术分析毛霉型豆豉发酵过程中风味品质[J]. 核农学报，2020，34(7)：1497−1506. [JIANG L W, XIE Y H, LI P, et al. Analysis of flavor quality of mucor-type fermented soybean by HS-SPME/GC-MS and electronic sensory technology[J]. Journal of Nuclear Agronomy, 2020, 34(7): 1497−1506.]

[9] ZHAN H, HAYAT K, CUI P, et al. Characterization of flavor

active non-volatile compounds in chicken broth and correlated contributing constituent compounds in muscle through sensory evaluation and partial least square regression analysis[J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 118: 108786.

[10] FAN S, TANG K, XU Y, et al. Characterization of the potent odorants in Tibetan Qingke Jiu by sensory analysis, aroma extract dilution analysis, quantitative analysis and odor activity values[J]. Food Res Int, 2020, 137: 109349.

[11] 张卜升, 高杏, 闫昕, 等. 基于 GC-IMS 技术分析石榴果酒酿制过程中挥发性风味成分的变化[J]. 食品与发酵工业, 2020: 1−12. [ZHANG B S, GAO X, YAN X, et al. The changes of volatile flavor components during the brewing process of pomegranate wine based on GC-IMS[J]. Food and Fermentation Industries, 2020: 1−12.]

[12] 王鹤潼, 潘泓杉, 王朝, 等. 不同品种金针菇特征挥发性物质的差异分析[J]. 食品科学, 2020, 42(2): 1−12. [WANG H T, PAN H S, WANG C, et al. Analysis of the difference of volatile substances among different flammulina velutipes varieties[J]. Food Science, 2020, 42(2): 1−12.]

[13] 李娟, 韩东, 米思, 等. 基于 HS-SPME-GC-MS 法优化酱牛肉中挥发性风味物质萃取条件[J]. 食品工业科技, 2018, 39(15): 266−273. [LI J, HAN D, MI S, et al. Optimization of extraction conditions of volatile flavor compounds in sauce beef based on HS-SPME-GC-MS[J]. Food Industry Science and Technology, 2018, 39(15): 266−273.]

[14] ZHUANG J, XIAO Q, FENG T, et al. Comparative flavor profile analysis of four different varieties of *Boletus* mushrooms by instrumental and sensory techniques[J]. Food Res Int, 2020, 136: 109485.

[15] JO Y, AN K A, ARSHAD M S, et al. Effects of e-beam irradiation on amino acids, fatty acids, and volatiles of smoked duck meat during storage[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2018, 47: 101−109.

[16] 王军喜, 叶俊杰, 赵文红, 等. HS-SPME-GC-MS 结合 OAV 分析酱油鸡特征风味活性物质的研究[J]. 中国调味品, 2020, 45(9): 160−164,177. [WANG J X, YE J J, ZHAO W H, et al. Study on the analysis of characteristic flavor active substances in soy sauce chicken by HS-SPME-GC-MS combined with OAV[J]. Chinese Flavoring, 2020, 45(9): 160−164,177.]

[17] 付丽, 刘旖旎, 高雪琴, 等. HS-SPME 与 GC-MS 协同法分析不同杀菌条件下酱牛肉中的挥发性风味物质[J]. 现代牧业, 2020, 4(2): 18−23. [FU L, LIU Y N, GAO X Q, et al. Analysis of volatile flavor compounds in sauce beef under different sterilization conditions by HS-SPME and GC-MS[J]. Modern Animal Husbandry, 2020, 4(2): 18−23.]

[18] RASINSKA E, RUTKOWSKA J, CZARNIECKASKUBINA E, et al. Effects of cooking methods on changes in fatty acids contents, lipid oxidation and volatile compounds of rabbit meat[J]. LWT, 2019, 110: 64−70.

[19] 王姣, 许凌云, 张晋华, 等. 不同成熟时间切达奶酪中挥发性香气成分及其电子鼻判别分析[J]. 食品科学, 2020, 41(20): 175−183. [WANG J, XU L Y, ZHANG J H, et al. Discriminant analysis of volatile aroma components in cheddar cheese at different mature times and their electronic noses[J]. Food Science, 2020, 41(20): 175−183.]

[20] 贾潇, 周琦, 杨旖旎. 3 种坚果油的挥发性成分提取及关键风味成分分析[J]. 中国油脂, 2020, 45(7): 35−41. [JIA X, ZHOU Q, YANG Y N. Extraction of volatile components and analysis of key flavor components of three nut oils[J]. Chinese Journal of Oils and Fats, 2020, 45(7): 35−41.]

[21] 冯涛, 孙嘉卿, 张灿, 等. 结合 GC-MS 和 GC-IMS 分析不同处理方式下青豆的挥发性风味物质[J]. 粮油食品科技, 2021, 29(1): 10−19. [FENG T, SUN J Q, ZHANG C, et al. Analysis of volatile flavor compounds in green beans under different treatments by GC-MS and GC-IMS[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2021, 29(1): 10−19.]

[22] 孙达锋, 胡小松, 张沙沙. 电子鼻结合气相-离子迁移谱联用技术分析兰茂牛肝菌气调贮藏期间挥发性风味物质的变化[J]. 食品工业科技, 2017, 42(21): 111−117. [SUN D F, HU X S, ZHANG S S. Changes in volatile compounds of *Lanmaoa asiatica* during controlled atmosphere storage using electronic nose combined with gas chromatography-ion mobility spectroscopy[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 42(21): 111−117.]

[23] 金文刚, 别玲玲, 裴金金, 等. 基于 GC-IMS 技术分析炖煮过程中大鲵头汤挥发性风味物质[J]. 食品工业科技, 2017, 42(19): 307−313. [JIN W G, BIE L L, PEI J J, et al. Volatile flavor compounds of giant salamander (*Andrias davidianus*) head soup during stewing based on GC-IMS technology[J]. Chinese Materia Medica, 2017, 42(19): 307−313.]

[24] 唐忠盛. 荔枝酒加工过程中香气成分变化规律及特征香气研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2019. [TANG Z S. The evolution of aroma compounds during the process and characteristic aroma compound of Litchi wine[D]. Guangzhou: South China University University of Technology, 2019.]

[25] 申慧珊, 张国权, 夏天雨, 等. 电子舌技术对市售不同品牌方便面调料的滋味识别[J]. 中国调味品, 2018, 43(9): 134−139, 159. [SHEN H S, ZHANG G Q, XIA T Y, et al. Taste recognition of different brands of instant noodle seasonings by electronic tongue technology[J]. Chinese Seasoning, 2018, 43(9): 134−139, 159.]

[26] 何家俊, 邓全富, 张环, 等. 电子鼻在牙膏风味评价中的应用探讨[J]. 口腔护理用品工业, 2020, 30(4): 13−15. [HE J J, DENG Q F, ZHANG H, et al. Application of electronic nose in toothpaste flavor evaluation[J]. Oral Care Products Industry, 2020, 30(4): 13−15.]

王军萍, 宋留丽, 郁志芳. 2,4-表油菜素内酯处理对不同温度贮藏中小白菜品质和生理生化的影响 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 349−358. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080358
WANG Junping, SONG Liuli, YU Zhifang. Effects of 2,4-Epibrassinolide Treatment on Quality, Physiology and Biochemistry of Pakchoi (*Brassica chinensis* L.) during Storage at Different Temperatures[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 349−358. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080358

· 贮运保鲜 ·

2,4-表油菜素内酯处理对不同温度贮藏中小白菜品质和生理生化的影响

王军萍[1], 宋留丽[1,2], 郁志芳[1,*]
(1.南京农业大学食品科技学院, 江苏南京 210095;
2.安徽师范大学生命科学学院, 安徽芜湖 241003)

摘　要: 以‘上海青’小白菜为试验材料，采用 1.0 mg/L 的 2,4-表油菜素内酯（2,4-epibrassinolide, EBR）溶液进行采后喷洒处理，分别于 2 ℃ 和 20 ℃ 下贮藏，研究 EBR 处理对贮藏期间小白菜品质和生理生化的影响。结果显示，EBR 处理能抑制 2 ℃ 和 20 ℃ 贮藏期间小白菜的 L^* 上升和色调角 H 下降，减缓总叶绿素、叶绿素 a 和叶绿素 b 含量的减少，贮藏结束时小白菜总叶绿素含量分别比对照高 5.57% 和 46.25%。EBR 处理有效地抑制了小白菜在 2 ℃ 和 20 ℃ 贮藏期间叶绿素降解相关酶（叶绿素酶、脱镁螯合酶和脱镁叶绿素水解酶）活性的上升，贮藏结束时三种酶活性均低于对照 28% 以上。EBR 处理减弱了 2 ℃ 和 20 ℃ 贮藏期间小白菜的呼吸强度，抑制其抗氧化酶（超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和抗坏血酸过氧化物酶）活性的下降，降低了膜脂过氧化酶（过氧化物酶和脂氧合酶）活性，并抑制超氧阴离子、过氧化氢和丙二醛含量的上升，贮藏结束时两温度下 EBR 处理小白菜丙二醛含量分别较对照降低了 8.91% 和 19.18%。结果表明，小白菜 2 ℃ 贮藏较 20 ℃ 贮藏更能维持其较好的品质和生理生化指标；1.0 mg/L EBR 处理可以有效延缓 2 ℃ 和 20 ℃ 贮藏期间小白菜黄化，减少品质和生理的下降，其中对 20 ℃ 贮藏条件小白菜各指标的影响更为明显。

关键词: 小白菜, 2,4-表油菜素内酯, 品质, 生理生化, 不同温度, 贮藏
中图分类号: TS255.3　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0349−10
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080358
本文网刊:

Effects of 2,4-Epibrassinolide Treatment on Quality, Physiology and Biochemistry of Pakchoi (*Brassica chinensis* L.) during Storage at Different Temperatures

WANG Junping[1], SONG Liuli[1,2], YU Zhifang[1,*]
(1.College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;
2.College of Life Science, Anhui Normal University, Wuhu 241003, China)

Abstract: ‘Shanghaiqing’ was sprayed with 1.0 mg/L EBR solution and stored at 20 ℃ and 2 ℃ respectively to study the effects of EBR on the quality, physiology and biochemistry of pakchoi after postharvest. The results showed that EBR treatment could inhibit the increase of L^* and the decrease of hue angle H of pakchoi during storage at 2 ℃ and 20 ℃, and slow down the decrease of total chlorophyll, chlorophyll a and chlorophyll b content. At the end of storage, the total chlorophyll content of pakchoi was 5.57% and 46.25% higher than that of the control at 2 ℃ and 20 ℃ respectively. EBR treatment significantly inhibited the increase of chlorophyll degradation related enzymes (chlorophyllase, Mg-dechelatase and pheophytin pheophorbide hydrolase) of pakchoi during storage at 2 ℃ and 20 ℃, the activities of the three enzymes were more than 28% lower than those of the control at the end of storage. EBR treatment weakened the respiratory intensity

收稿日期: 2021−08−31
基金项目: 江苏省重点研发计划现代农业项目（BE2018382）资助。
作者简介: 王军萍（1996−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 农产品加工与贮藏, E-mail: 2019108061@njau.edu.cn。
*** 通信作者:** 郁志芳（1960−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 农产品加工与贮藏, E-mail: yuzhifang@njau.edu.cn。

of pakchoi, inhibited the decrease of the activities of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase and ascorbate peroxidase), decreased the activity of membrane lipid peroxidase (peroxidase and lipoxygenase), and inhibited the increase of superoxide anion, hydrogen peroxide and malondialdehyde content of pakchoi during storage at 2 ℃ and 20 ℃. At the end of storage, the malondialdehyde content of EBR treatment decreased by 8.91% and 19.18%, respectively, compared with the control. The results showed that pakchoi stored at 2 ℃ could maintain better quality and physiological and biochemical indexes than storage at 20 ℃. 1.0 mg/L EBR treatment could effectively delay the yellowing of pakchoi during storage at 2 ℃ and 20 ℃, and reduce the decline of quality and physiology, among them, the effect on the indexes of pakchoi stored at 20 ℃ was more obvious.

Key words: pakchoi; 2,4-epibrassinolide (EBR); quality; physiology and biochemistry; different temperatures; storage

小白菜(*Brassica chinensis* L.)为十字花科芸薹属绿叶蔬菜,其含水量高、组织脆嫩、呼吸旺盛、水分蒸发快,贮藏期间易发生萎蔫、黄化等情况,品质劣变迅速,贮藏时间短。其中,黄化是小白菜采后衰老过程中最为显著的外在表现,这一现象主要是源于叶绿素的快速降解。叶绿素降解的主要途径是脱镁叶绿酸 a 单加氧酶(Pheophorbide a monooxygenase, PaO)途径[1] 和氧化漂白途径[2]。参与 PaO 途径的主要酶有叶绿素酶(chlorophyllase, CLH)、脱镁螯合酶(Mg-dechelatase, MDCase)和脱镁叶绿素水解酶(pheophytin pheophorbide hydrolase, PPH)[3]。过氧化物酶(peroxidase, POD)和脂氧合酶(lipoxygenase, LOX)是氧化漂白途径中的主要酶,参与活性氧的生成。果蔬在衰老或受到胁迫时,大量自由基在叶绿体、线粒体和过氧化物酶体中产生,如超氧阴离子(superoxide anion, $O_2^{\cdot-}$)和过氧化氢(hydrogen peroxide, H_2O_2)[4]。自由基会直接攻击 DNA、蛋白质和脂类,引发氧化应激,造成细胞膜脂过氧化,生成丙二醛(malondialdehyde, MDA)[5]。MDA 的积累增加了细胞膜的通透性,不仅会造成叶绿体和线粒体等细胞器的损伤,而且加大了叶绿素降解酶与叶绿素相互接触的机会,最终加速叶绿素的降解[6]。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)和抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)等抗氧化酶能清除活性氧,减轻其对细胞的损伤。

目前,延缓小白菜叶绿素降解、维持其品质的主要方法有采后的 1-甲基环丙烯[7] 和硫化氢[8] 处理,贮前真空预冷[9]、贮藏期间的光照处理[10]、超声波和气调贮藏[11] 等。油菜素内酯(brassinolide, BR)作为一种天然的甾体类植物激素,具有安全、无害、高效、附加成本低等优点[12]。2,4-表油菜素内酯(2,4-epibrassinolide, EBR)是其中的一种人工合成类似物,近年来在园艺产品中得到了一定的研究。EBR 通过诱导乌菜抗氧化酶活性减缓其品质下降,延长贮藏时间[13]。EBR 可以抑制黄花菜体内 H_2O_2 的积累,减轻膜脂过氧化作用,保持膜的完整性,进而延缓果实的衰老进程[14]。研究还表明,低浓度 EBR 通过抑制乙烯合成途径中相关酶以及叶绿素降解酶的活性,有效抑制了西兰花叶绿素的降解和黄化,而高浓度处理则促进黄化[15]。然而,目前有关采后 EBR 处理对小白菜保鲜效果的研究还未见报道。

本文以‘上海青’为材料,研究采后 EBR 处理对 2 ℃ 和 20 ℃ 贮藏条件下小白菜品质和生理生化的影响,探讨 EBR 处理对不同温度下小白菜的保鲜效果和调控机制,旨在为绿色果蔬在实际生产中的贮藏保鲜应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

小白菜　品种为南京地产‘上海青’,于 2020 年 11 月 1 日购自江苏南京众彩批发市场,1 h 内运回实验室。挑选成熟度一致、大小相近、无黄叶、无机械损伤的小白菜用于实验;2,4-表油菜素内酯(EBR,纯度≥95%)、氮蓝四唑(NBT)　上海瑞永生物科技有限公司;无水乙醇、氢氧化钠、磷酸氢二钠、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、氯化钾、甲醇、磷酸二氢钠　华大;碳酸钙、氯化羟胺、乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na_2)　西陇科学股份有限公司;三氯乙酸、硫代巴比妥酸(TBA)、乙酸钠、愈创木酚、对氨基苯磺酸、H_2O_2　沪试;硼酸、硼酸钠　上海凌峰化学试剂有限公司;吐温-20、蛋氨酸(Met)　北京索莱宝科技有限公司;亚油酸钠、核黄素、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、正己烷、ASA、Triton X-100、α-萘胺　麦克林;三羟甲基氨基甲烷(Tris)　北京博奥拓科技有限公司;叶绿素 ab 混合物(10%,BR)　上海源叶生物科技有限公司;以上试剂无特殊说明均为分析纯。

DJ300 精密电子天平　北京赛多利斯系统有限公司;CR-400 CHROMA METER 色差仪　日本柯尼卡美能达有限公司;Dansensor CheckMate3 台式顶空分析仪　丹麦 PBI Dansensor 公司;Alpha-1860A 紫外可见分光光度计　上海谱元仪器有限公司;H1750R 台式高速冷冻离心机　湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;HH-6 数显恒温水浴锅　常州国华电器有限公司;XW-80A 微型涡旋混合仪　上海沪西仪器厂有限公司;A11 分析用研磨机　德国 IKA;FE30 实验室电导率仪　梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;4000LX 日光灯　日本松下电器(中国)有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1　样品处理与贮藏　将挑选好的小白菜随机分成两组,一组以 1.0 mg/L 的 EBR 溶液以 100 mL/kg 的

量对小白菜进行喷洒处理，另一组作为对照（control，CK），用等量的蒸馏水进行喷洒处理。处理完成后，将小白菜表面水分晾干，用样品筐进行分装，并用黑色聚乙烯薄膜袋挽口套装，分别置于 2 ℃ 和 20 ℃ 条件下贮藏。贮藏期间，2 ℃ 下的小白菜在第 0、3、7、12、18 d 取样，20 ℃ 下的小白菜在第 0、1、3、5、7 d 取样。取样部位为小白菜由外向内第二层叶片，并避开主叶脉与叶片边缘。同时，用液氮速冻部分样品，置于−20 ℃ 冰箱。每个取样点设置三个生物学重复。

1.2.2　色差和叶绿素含量　色差利用手持式 CR-400 色差仪对样品的 L^*、C^*、H 值进行测定。每个处理选取 15 颗小白菜，每颗小白菜选取两个叶片，每个叶片选择中上部对称的两个点进行测定，并计算平均值。

叶绿素含量参考刘红艳[16] 的方法并略加改动。称取 0.5 g 样品，加入 0.1 g 碳酸钙粉末及 10 mL 体积分数为 95% 的乙醇，充分研磨，避光浸提至组织变白，在 4 ℃、12000×g 下离心 20 min，取上清液并定容，测定上清液在 470、649、665 nm 处的吸光值。按下列公式计算，最终结果表示为 mg/g。

$$Ca(叶绿素a) = 13.95A_{665\,nm} - 6.88A_{649\,nm}$$

$$Cb(叶绿素b) = 24.96A_{649\,nm} - 7.32A_{665\,nm}$$

$$Cchl(总叶绿素) = \frac{(Ca+Cb)\times V}{m\times 1000}$$

式中，Ca 表示叶绿素 a 浓度，mg/g；Cb 表示叶绿素 b 浓度，mg/g；Cchl 表示总叶绿素含量，mg/g；$A_{665\,nm}$ 表示在 665 nm 处的吸光值；$A_{649\,nm}$ 表示在 649 nm 处的吸光值；V 表示提取液总体积，mL；m 表示样品质量，g。

1.2.3　呼吸强度　采用台式顶空分析仪测定呼吸强度。挑选 3 颗大小均一的小白菜，放入 3 L 的密闭玻璃罐中在 20 ℃ 条件下放置 2 h，各处理及平行样品的质量基本保持相近。按下列公式计算，最终结果表示为 CO_2 mg·kg^{-1}·h^{-1}。

$$呼吸强度(CO_2\ mg\cdot kg^{-1}\cdot h^{-1}) = \frac{1.96\times 10^3\times V\times A\%}{t\times m}$$

式中，1.96×10^3 g/L 为 CO_2 密度；A% 为呼吸仪测定的 CO_2 数值；V 为呼吸罐体积，L；t 为测定时间，h；m 为样品质量，kg。

1.2.4　叶绿素降解相关酶活性　粗酶液制备及酶活性测定参考 FUNAMOTO 等[17] 方法并略有改动。准确称取 1.0 g 样品，加入 6 mL 预冷丙酮后充分匀浆，置于−20 ℃ 下 20 min，于 4 ℃、12000×g 离心 20 min，去除上清液，重复数次，直至沉淀无绿色为止。向沉淀中加入 6 mL 磷酸缓冲液（5 mmol/L，pH7.0，包括 50 mmol/L KCl，0.24% Triton-X100），30 ℃ 抽提 1 h，于 4 ℃、12000×g 离心 20 min，取上清液为粗酶液用于酶活性的测定。

按照 FUKASAWA 等[18] 方法制备 100 μg/mL 叶绿素 a-丙酮、100 μmol/L叶绿酸 a 和 10 μmol/L 脱镁叶绿素 a。

1.2.4.1　叶绿素酶(CLH)活性　取 0.5 mL 粗酶液，加入 1.5 mL 磷酸缓冲液（0.1 mol/L，pH7.5），0.7 mL 1.44% Triton-X100，0.3 mL 100 μg/mL 的叶绿素 a-丙酮溶液，混合液在 30 ℃ 黑暗反应 40 min 后加入 3 mL 预冷丙酮终止反应，再加入 3 mL正己烷萃取脱植基叶绿素 a，剧烈摇动，4 ℃ 下 12000×g 离心 10 min，以不加酶液作为对照。取丙酮层测定 667 nm 处吸光值。以每分钟内吸光度变化 0.01 为 1 个酶活力单位，单位记为 U g^{-1} FW。

1.2.4.2　脱镁螯合酶（MDCase）活性　取 0.5 mL 粗酶液，加入 0.2 mL 1% TritonX-100，0.7 mL Tris-HCl 缓冲液（50 mmol/L，pH8.0），0.3 mL 100 μmol/L 叶绿酸 a。混合液在 30 ℃ 黑暗反应 40 min 后，于 686 nm 处测定吸光值。以每分钟内吸光度变化 0.01 为 1 个酶活力单位，单位记为 U g^{-1} FW。

1.2.4.3　脱镁叶绿素水解酶（PPH）活性　取 0.5 mL 酶液，加入 75 μL 2% Triton X-100，0.1 mL 10 μmol/L 脱镁叶绿素 a，0.7 mL Tris-HCl（50 mmol/L，pH8.0），于暗处 30 ℃ 反应 60 min，加入 3 mL 丙酮终止反应。向其中加入 3 mL 正己烷萃取脱植基叶绿素 a，剧烈摇动，4 ℃ 下 12000×g 离心 10 min。取丙酮层测定 535 nm 处吸光值。以每分钟内吸光度变化 0.01 为 1 个酶活力单位，单位记为 U g^{-1} FW。

1.2.5　SOD、CAT、APX、POD 和 LOX 活性测定

1.2.5.1　SOD 活性　SOD 测定采用 NBT 法[19]。称取 0.5 g 样品，加入 6 mL 磷酸钠缓冲液（50 mmol/L，pH7.8），匀浆，于 4 ℃、12000×g 离心 20 min，收集上清液即为粗酶液。试管中加入 0.1 mL 粗酶液、1.5 mL 磷酸钠缓冲液、0.3 mL Met、0.3 mL NBT、0.3 mL EDTA-Na_2、0.3 mL 核黄素、0.5 mL 蒸馏水。暗中对照管加入核黄素后立即避光，全部试剂加完后摇匀。将测定管与光下对照管放在 4000 LX 日光灯下显色反应 60 min。反应结束后用黑布遮盖终止反应。以暗中对照管作为调零管，取上清液测定在 560 nm 下光下对照管与测定管的吸光度。将抑制 NBT 光还原的 50% 为 1 个酶活性单位，结果表示为 U g^{-1} FW。

1.2.5.2　CAT 活性　CAT 活性测定参考曹建康等[19] 并略有改动。称取 0.5 g 样品，加入 6 mL 磷酸钠缓冲液（50 mmol/L，pH7.0），于 4 ℃、12000×g 离心 20 min，收集上清液即为粗酶液。反应体系中加入 1.7 mL 蒸馏水、1.0 mL Tris-HCl（pH7.0）、0.2 mL H_2O_2（200 mmol/L）、最后加入 0.2 mL 上清液启动反应，立即测定 240 nm 处吸光值的变化，以每克样品每分钟吸光度变化 0.01 为 1 个酶活性单位，结果表示为 U g^{-1} FW。

1.2.5.3　APX 活性　APX 活性测定粗酶液提取同 CAT[19]。反应体系中加入 0.1 mL 酶液，1.4 mL APX

反应液(50 mmol/L K_2HPO_4-KH_2PO_4 缓冲液, pH7.0, 内含 0.1 mmol/L EDTA-Na_2, 0.3 mmol/L ASA, 0.06 mmol/L H_2O_2), 立即测定 290 nm 处吸光值, 以每克样品每分钟吸光度变化 0.01 为 1 个酶活性单位, 结果表示为 U g^{-1} FW。

1.2.5.4 POD 活性 POD 活性的测定采用愈创木酚法[19]。称取 0.5 g 样品, 加入 5 mL 磷酸钠缓冲液(100 mmol/L, pH6.0), 匀浆, 于 4 ℃、12000×g 离心 20 min, 收集上清液即为粗酶液。取酶液 0.05 mL, 加入 3 mL POD 反应混合液(含磷酸缓冲液, 愈创木酚和 H_2O_2)启动反应, 每隔 1 min 记录 470 nm 处的吸光值, 连续记录 6 min。POD 以每克样品每分钟内吸光值变化 0.01 为 1 个酶活力单位, 结果表示为 U g^{-1} FW。

1.2.5.5 LOX 活性 LOX 活性测定参考曹建康等[19]并略有改动。取 1.0 g 样品, 加入 6 mL 预冷的磷酸缓冲液(0.1 mol/L, pH7.5), 匀浆, 于 4 ℃、12000×g 离心 20 min, 上清液即为粗酶液。取 0.1 mL 粗酶液, 加入 4.75 mL 乙酸钠缓冲液和 0.15 mL 亚油酸钠底物, 于 234 nm 处测定吸光值。以每克样品每分钟吸光度变化 0.01 为 1 个酶活性单位, 结果表示为 U g^{-1} FW。

1.2.6 $O_2^{\cdot-}$、H_2O_2 和 MDA 含量测定

1.2.6.1 $O_2^{\cdot-}$含量 $O_2^{\cdot-}$含量参考曹建康等[19]并略有改动。称取 1.0 g 样品, 加入 4 mL 磷酸钠缓冲液(pH7.8, 65 mmol/L), 混匀后静置提取 10 min, 4 ℃、12000×g 离心 20 min。取 3 mL 上清液, 加入 1 mL pH7.8、65 mmol/L 磷酸缓冲液和 10 mmol/L 盐酸羟胺 1 mL, 于 25 ℃ 保温 20 min。取出后再依次加入 17 mmol/L 的对氨基苯磺酸 1 mL 和 7 mmol/L 的 α-萘胺溶液 1 mL, 在 25 ℃ 下反应 30 min, 反应后测定 530 nm 处吸光值。标准曲线通过亚硝酸钾来制定, 以超氧阴离子物质的量为横坐标, 吸光值为纵坐标, 标准曲线方程为: y=3.5879x+0.0014, R^2=0.9998。最终的 $O_2^{\cdot-}$含量表示为 nmol $min^{-1}g^{-1}$ FW。

$$O_2^{\cdot-}\text{产生速率(nmol min}^{-1}\text{g}^{-1}\text{ FW)} = \frac{n\times V\times 1000}{V_S\times t\times m}$$

式中, n 表示从标准曲线查得的超氧阴离子的量, μmol; V 表示提取液总体积, mL; V_S 表示测定用样品液体积, mL; m 表示样品质量, g; t 表示样品与羟胺反应的时间, min。

1.2.6.2 H_2O_2 含量 H_2O_2 含量参考曹建康等[19]并略有改动。称取 1.0 g 样品, 加入 5 mL 预冷丙酮, 4 ℃、12000 ×g 离心 20 min。吸取 1 mL 上清液, 加入 0.1 mL 20% 硫酸钛和 0.2 mL 浓氨水, 25 ℃ 反应 10 min 后离心, 去上清液, 沉淀中加入 2 mL 丙酮进行洗脱, 离心, 去上清, 重复两次, 沉淀中加入 2 mol/L 的硫酸 3 mL, 等沉淀完全溶解后测定 415 nm 处吸光值, 按同样的方法制作 H_2O_2 标准曲线, 以 H_2O_2 物质的量为横坐标, 吸光值为纵坐标, 标准曲线方程为: y=1.6871x−0.0063, R^2=0.9998。最终的 H_2O_2 含量表示为 μmol g^{-1} FW。计算公式如下:

$$H_2O_2\text{含量(μmol g}^{-1}\text{ FW)} = \frac{n\times V}{V_S\times m}$$

式中, n 表示标准曲线上查得样品中 H_2O_2 的量, μmol; V 表示样品提取液总体积, mL; V_S 表示测定时用样品提取液的体积, mL; m 表示样品质量, g。

1.2.6.3 MDA 含量 MDA 含量采用硫代巴比妥酸法[19]。称取 2.0 g 样品, 加入 5 mL 10% 的 TCA 溶液, 匀浆, 于 4 ℃、12000×g 离心 20 min, 收集上清液。取 2 mL 上清液, 加入 2 mL 0.67% 的 TBA 溶液, 混匀, 煮沸 30 min, 冷却之后测定 532 nm 和 600 nm 波长处的吸光值, 按以下公式计算 MDA 含量。

$$\text{MDA含量(μmol g}^{-1}\text{ FW)} = \frac{(A_{532\,nm}-A_{600\,nm})\times V}{0.155\times V_S\times m}$$

式中, V 表示提取液总体积, mL; 0.155 表示消光系数 155 $\mu mol^{-1}cm^{-1}$, 为 1 μmol 丙二醛在 532 nm 处的吸光值; V_S 表示测定用样品液体积, mL; m 表示样品质量, g。

1.3 数据处理

采用 Excel 2013 进行基础数据整理, 所有数据均为三生物学样品的平均值; 应用 IBM SPSS Statistics 25 软件进行差异显著性分析, 并将 P<0.05 定义为具有显著性差异; 应用 Origin 2021 进行绘图。

2 结果与分析

2.1 采后 EBR 处理对小白菜 2 ℃ 和 20 ℃ 贮藏期间色泽、叶绿素含量和外观的影响

新鲜的小白菜随着贮藏时间的延长, 叶片逐渐褪绿黄化。如图 1A、B 所示, 2 ℃ 和 20 ℃ 贮藏期间, EBR 处理和对照的小白菜 L^*值均持续上升, H 值不断下降, 其中, 2 ℃ 条件下二个指标的变化速率较 20 ℃ 条件下的变化速率更为平缓, 表明低温较常温更能有效延缓小白菜色泽变化。EBR 处理在 2 ℃ 和 20 ℃ 条件下均有效抑制 L^*值的上升和 H 值的下降, 且 20 ℃ 条件下 EBR 对二者抑制程度更显著。

由图 1C~图 1E 可知, 小白菜总叶绿素、叶绿素 a 和叶绿素 b 含量整体上随贮藏时间的延长而逐渐下降。20 ℃ 贮藏期间, 各指标含量下降迅速, 而 2 ℃ 贮藏各指标下降缓慢。EBR 处理在不同温度下延缓小白菜中叶绿素含量下降的程度有所不同。20 ℃ 贮藏期间, 经 EBR 处理的小白菜总叶绿素、叶绿素 a 和叶绿素 b 含量均显著高于对照小白菜(P<0.05), 贮藏结束时它们的含量均是对照小白菜的 1.45 倍以上。而在 2 ℃ 条件下, EBR 处理仅在贮藏后期可显著延缓叶绿素含量的下降(P<0.05)。表明 EBR 处理在 2 ℃ 和 20 ℃ 贮藏条件下均能延缓总叶绿素、叶绿素 a 和叶绿素 b 含量的下降, 且在 20 ℃ 下效果更明显。

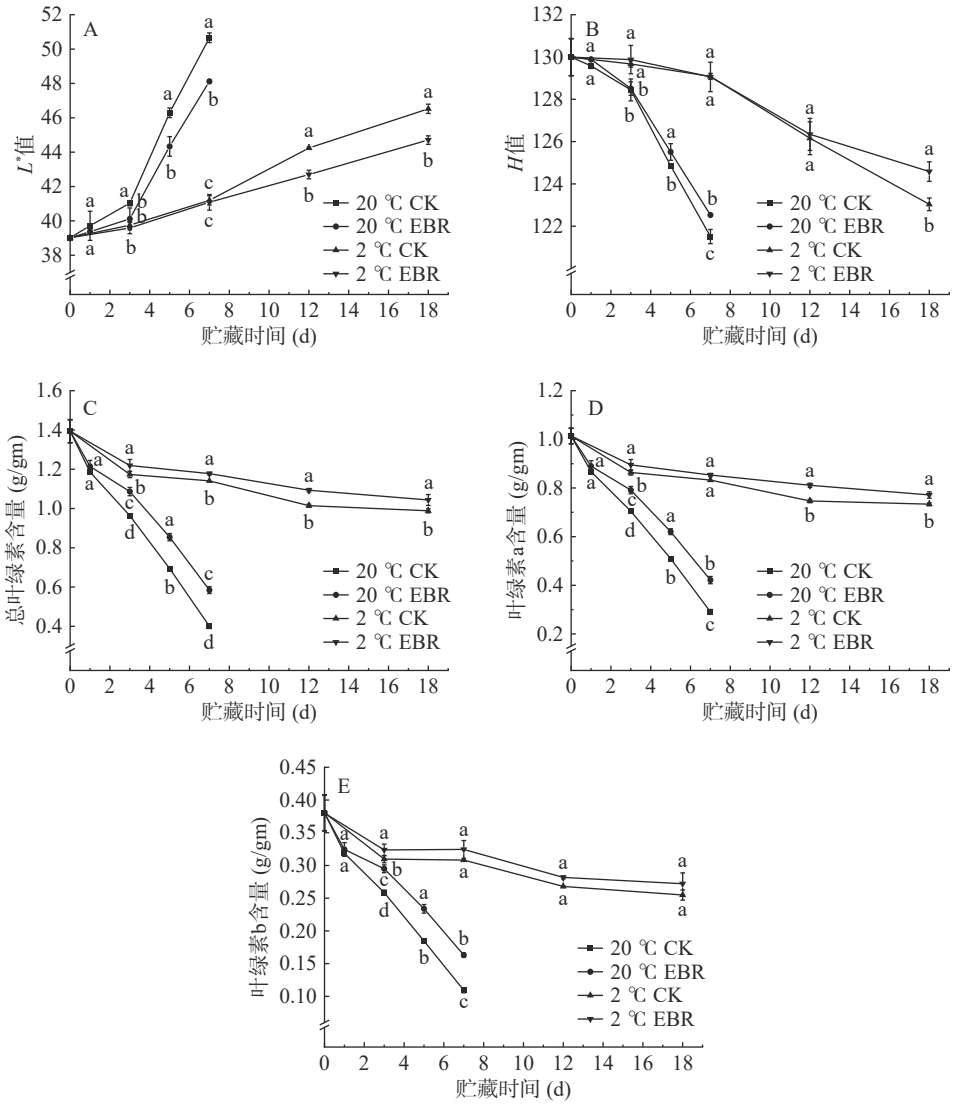


图 1　2 ℃ 和 20 ℃ 贮藏期间 EBR 处理对小白菜 L^*值、H 值和叶绿素含量的影响

Fig.1　Effect of EBR on the lightness value, hue angle value, chlorophyll content of pakchoi during storage at 2 ℃ and 20 ℃

注：不同字母表示不同处理组间差异显著(P<0.05)，图 3、图 4~图 6 同。

由图 2 可见，小白菜贮藏于 2 ℃ 与 20 ℃ 条件下，随贮藏时间延长，外观品质明显下降，出现黄化、腐烂、失水等现象，两温度下贮藏，其品质变化差异较大。20 ℃ 条件下，对照组在第 5 d 出现黄化，叶柄基部失水并有轻微腐烂迹象，第 7 d 叶片黄化和腐烂加重；EBR 处理小白菜第 5 d 时仍保持良好的外观性状，第 7 d 黄化症状开始出现。2 ℃ 条件下，小白菜黄化速度明显减慢，在第 18 d 对照组出现轻微黄化，EBR 处理小白菜仍保持良好的外观性状。由此可见，EBR 处理在 2 ℃ 和 20 ℃ 贮藏条件下均能不同程度地延缓小白菜外观品质的下降，其中，20 ℃ 条件下保鲜效果更明显。

综上可见，与常温 20 ℃ 贮藏相比，低温 2 ℃ 贮藏更能使小白菜保持较好的色泽指标(低 L^*值，高 H 值)，较高的总叶绿素、叶绿素 a 和叶绿素 b 含量，以及较好的外观品质。此外，EBR 处理可有效延缓 2 ℃ 和 20 ℃ 贮藏期间小白菜 L^*值的上升，H 值的下降，总叶绿素、叶绿素 a 和叶绿素 b 的降解，以及外观品质的劣变，其中，对 20 ℃ 贮藏条件小白菜各指标的影响更明显。

2.2　采后 EBR 处理对小白菜 2 ℃ 和 20 ℃ 贮藏期间呼吸强度的影响

由图 3 可见，2 ℃ 条件下，两组小白菜呼吸强度先下降后上升，且 EBR 处理的小白菜呼吸强度在第 7 d 后显著低于对照小白菜呼吸强度(P<0.05)。20 ℃ 贮藏期间，两组小白菜呼吸强度整体呈现先上升后下降的趋势，在第 3 d 达到峰值。经 EBR 处理的小白菜在贮藏过程中呼吸强度均显著低于对照小白菜(P<0.05)，贮藏第 7 d，对照小白菜呼吸强度是 EBR 处理小白菜的 1.29 倍。图 3 还显示，20 ℃ 贮藏期间小白菜的呼吸强度始终显著的大于 2 ℃ 的呼吸强度(P<0.05)。结果表明，低温贮藏比常温贮藏更能维持小白菜较低的呼吸强度，且 EBR 处理可以显著降低 2 ℃ 和 20 ℃下小白菜的呼吸强度，其中，对 20 ℃ 贮藏的小白菜呼吸强度的抑制效果更为明显。

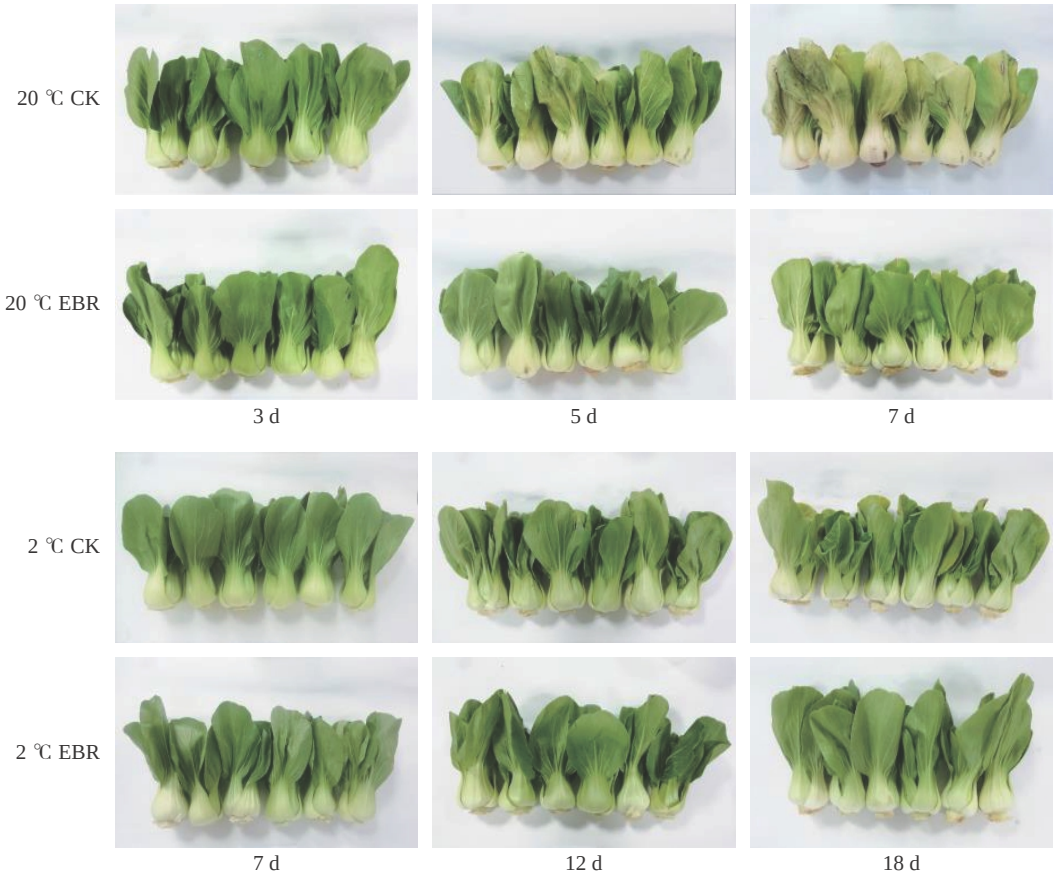


图 2　2 ℃ 和 20 ℃ 贮藏期间 EBR 处理对小白菜外观品质的影响

Fig.2　Effect of EBR on the appearance quality of pakchoi during storage at 2 ℃ and 20 ℃

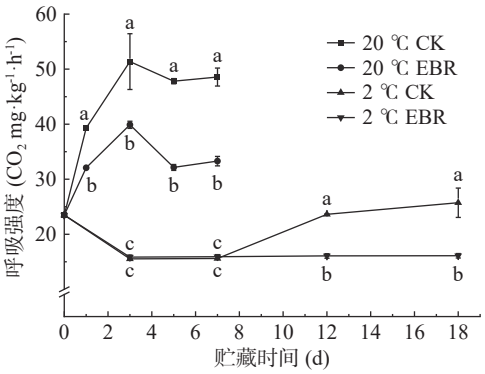


图 3　2 ℃ 和 20 ℃ 贮藏期间 EBR 处理对小白菜呼吸强度的影响

Fig.3　Effect of EBR on the respiration intensity of pakchoi during storage at 2 ℃ and 20 ℃

2.3　采后 EBR 处理对小白菜 2 ℃ 和 20 ℃ 贮藏期间叶绿素降解酶活性的影响

由图 4 可知，2 ℃ 和 20 ℃ 贮藏期间，小白菜 CLH、MDCase 和 PPH 活性整体呈先上升后下降的趋势。2 ℃ 贮藏前期 CLH 活性较低，说明低温能够有效降低 CLH 活性(图 4A)。

20 ℃ 贮藏期间，两组小白菜 CLH 活性均在第 5 d 达到峰值，此时 EBR 处理小白菜 CLH 活性低于对照小白菜 31.58%。2 ℃ 和 20 ℃ 下，EBR 处理小白菜 MDCase 活性均显著低于对照小白菜(P<0.05)，且在第 3 d 时，其 MDCase 活性分别低于对照小白菜 31.17% 和 33.82%(图 4B)。在 2 ℃ 和 20 ℃ 贮藏过程中，EBR 处理的小白菜 PPH 活性分别低于同时期对照小白菜(图 4C)。综上，低温贮藏比常温贮藏更能维持小白菜较低的 CLH、MDCase 和 PPH 活性，且 EBR 处理可以有效降低 2 ℃ 和 20 ℃ 贮藏条件下小白菜叶绿素降解相关酶的活性，其中对 20 ℃ 贮藏的小白菜叶绿素降解酶的抑制效果更为显著。

2.4　采后 EBR 处理对小白菜 2 ℃ 和 20 ℃ 贮藏期间 SOD、CAT、APX、 POD 和 LOX 活性的影响

SOD、CAT 和 APX 是具有清除活性氧作用的抗氧化酶。如图 5(A)显示，2 ℃ 和 20 ℃ 贮藏期间，小白菜 SOD 活性均先上升后下降。2 ℃ 贮藏 3 d 后，EBR 处理的小白菜 SOD 活性显著高于对照小白菜(P<0.05)；20 ℃ 贮藏过程中，EBR 处理的小白菜 SOD 活性始终大于对照，在第 5 d时，EBR 处理的小白菜 SOD 活性是对照小白菜的 1.62 倍。图 5(B)所示，2 ℃ 下 CAT 活性不断上升直至贮藏结束；而 20 ℃ 下 CAT 活性先上升后下降，第 3 d 达到最大值。在两温度下，经 EBR 处理的小白菜 CAT 活性均显著高于对照小白菜(P<0.05)。

图 5(C)可见，2 ℃ 贮藏下，小白菜 APX 活性呈现波动变化；而 20 ℃ 贮藏下，APX 先上升后下降，且整体活性低于 2 ℃ 下的 APX 活性。两贮藏温度

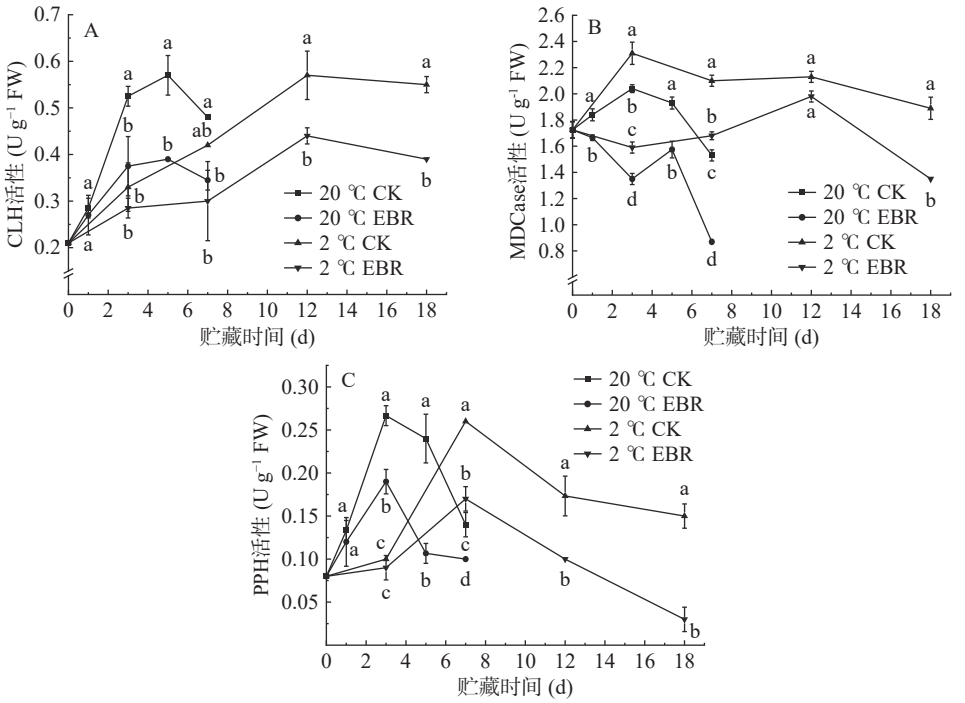


图 4　2 ℃ 和 20 ℃ 贮藏期间 EBR 处理对小白菜 CLH、MDCase 和 PPH 活性的影响

Fig.4　Effect of EBR on the CLH, MDCase and PPH activity of pakchoi during storage at 2 ℃ and 20 ℃

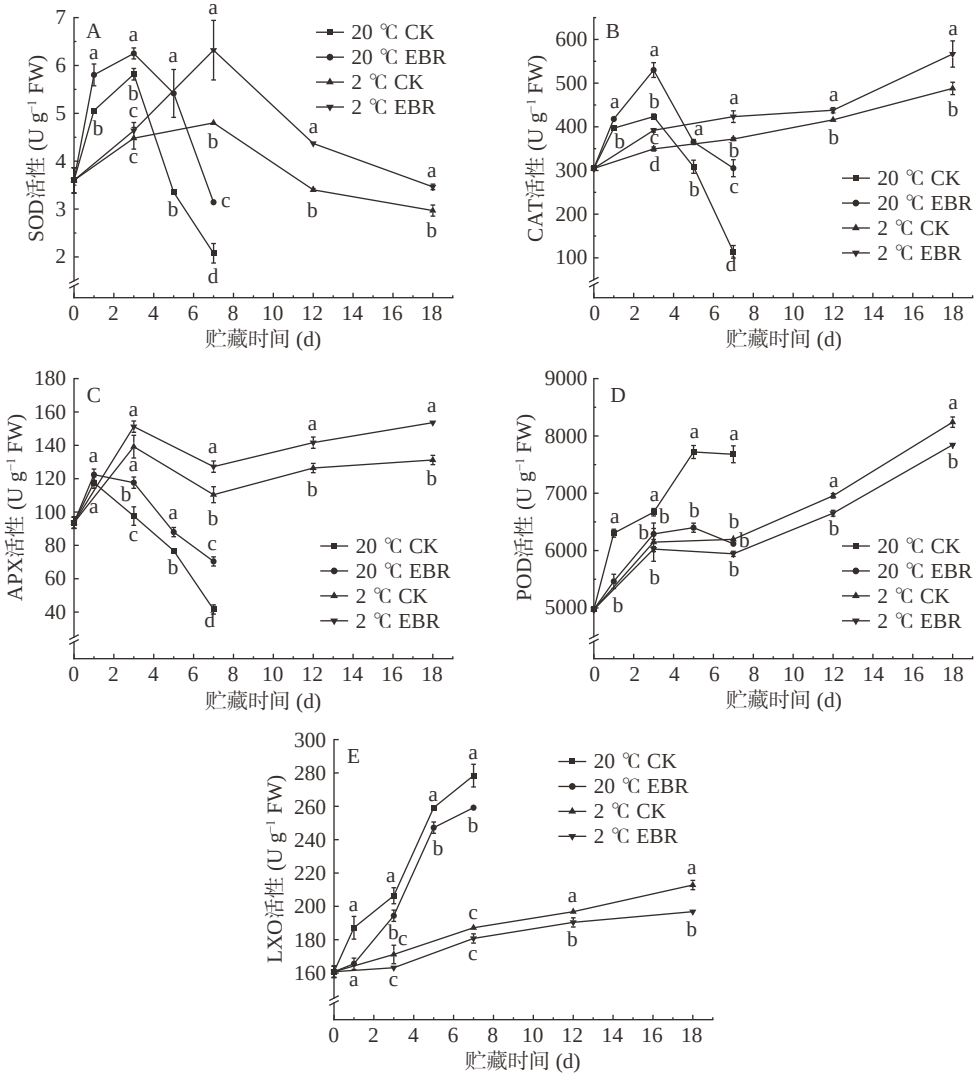


图 5　2 ℃ 和 20 ℃ 贮藏期间 EBR 处理对小白菜 SOD、CAT、APX、POD 和 LOX 活性的影响

Fig.5　Effect of EBR on the SOD, CAT, APX, POD and LOX activity of pakchoi during storage at 2 ℃ and 20 ℃

下，EBR 处理均能显著提高小白菜 APX 活性（$P<0.05$）。

图 5(D)所示，2 ℃ 贮藏期间，小白菜 POD 活性整体呈现上升的趋势，EBR 处理在贮藏后期显著降低小白菜的 POD 活性（$P<0.05$）。20 ℃ 贮藏期间，小白菜 POD 先上升后下降，EBR 处理的小白菜 POD 活性显著低于对照小白菜（$P<0.05$），在第 5 d 达到峰值时，对照小白菜 POD 活性为 7720 U g^{-1} FW，EBR 处理小白菜仅为 6400 U g^{-1} FW。由图 5(E)可见，2 ℃ 和 20 ℃ 贮藏期间，小白菜 LOX 活性持续上升，且以 20 ℃ 上升较为迅速，低温可有效降低 LOX 活性。EBR 处理在 20 ℃ 和 2 ℃ 贮藏后期均可以显著抑制小白菜 LOX 活性的上升（$P<0.05$）。

综上可见，与常温 20 ℃ 贮藏相比，低温 2 ℃ 贮藏更能使小白菜保持较高的 SOD、CAT 和 APX 活性，以及较低的 POD 和 LOX 活性。此外，EBR 处理均可有效提高 2 ℃ 和 20 ℃ 贮藏期间小白菜 SOD、CAT 和 APX 的活性，抑制 POD 和 LOX 活性，从而提高小白菜的抗氧化能力，减轻膜脂过氧化作用，降低活性氧对细胞的损害。

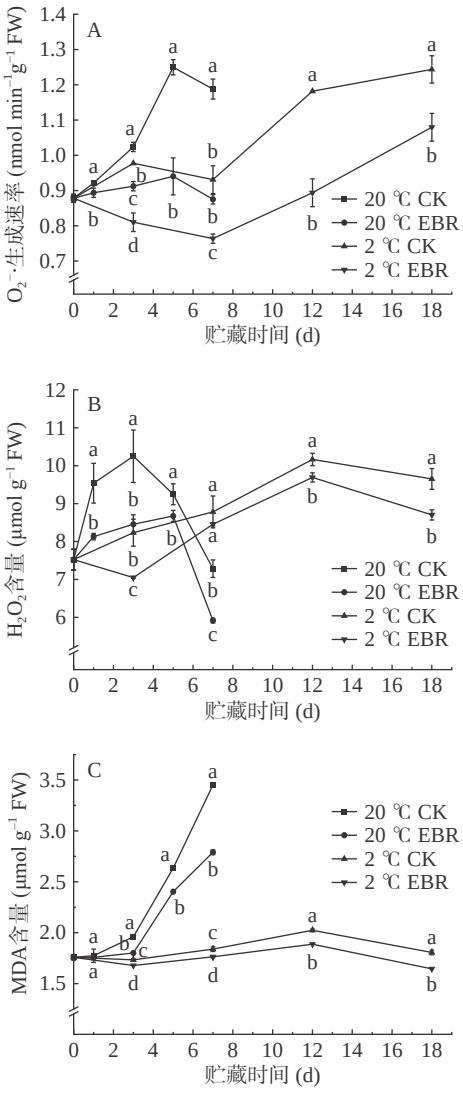


图 6 2 ℃ 和 20 ℃ 贮藏期间 EBR 对小白菜 O_2^{-}·、H_2O_2 和 MDA 含量的影响

Fig.6 Effect of EBR on the O_2^{-}·、H_2O_2 and MDA content of pakchoi during storage at 2 ℃ and 20 ℃

图 6(A~B)显示，2 ℃ 贮藏期间，小白菜 O_2^{-}·和 H_2O_2 含量逐渐增加，EBR 处理可以显著抑制两个指标的上升（$P<0.05$）。20 ℃ 贮藏期间，小白菜 O_2^{-}·和 H_2O_2 含量先上升后下降，EBR 处理显著抑制了小白菜 O_2^{-}·和 H_2O_2 含量的增加（$P<0.05$）。图 6(C)可见，2 ℃ 贮藏期间，小白菜 MDA 含量变化平缓且始终处于较低水平；20 ℃ 贮藏过程中，小白菜 MDA 含量迅速增加；EBR 处理均能显著抑制 2 ℃ 和 20 ℃ 贮藏期间小白菜的 MDA 含量（$P<0.05$）。结果表明，2 ℃ 贮藏比 20 ℃ 贮藏更能维持小白菜较低的 O_2^{-}·和 H_2O_2 含量，EBR 处理可有效抑制小白菜在 2 ℃ 和 20 ℃ 贮藏下 O_2^{-}·和 H_2O_2 的产生，减少 MDA 积累，保持细胞膜的完整性。

3 讨论与结论

小白菜作为一种典型的绿色叶菜，在采后贮藏和运输过程中很快发生萎蔫、黄化、脱帮和腐烂等问题，贮藏时间只有 2~3 d，采后损耗十分严重。色泽是消费者判断蔬菜新鲜程度的重要指标，也是制约贮藏和运输的重要因素。本实验中，1.0 mg/L EBR 采后处理小白菜可以使其保持较高的叶绿素含量及良好的外观品质，降低 2 ℃ 和 20 ℃ 贮藏期间小白菜呼吸强度，这与 0.9 mg/L 的 EBR 处理杏果实的研究结果一致[20]。

参与叶绿素降解的主要酶是 CLH、MDCase 和 PPH，这些酶活性变化会影响叶绿素含量的高低。本研究发现，与 20 ℃ 贮藏相比，2 ℃ 贮藏更能维持小白菜较低的 CLH、MDCase 和 PPH 的活性；同时 EBR 处理可以有效降低 2 ℃ 和 20 ℃ 贮藏条件下小白菜叶绿素降解相关酶的活性。以上结果表明，采后 1.0 mg/L EBR 可能通过抑制 CLH、MDCase 和 PPH 活性的上升，进而减缓叶绿素降解。已有相关的研究证明了这一点，EBR 通过下调青花菜 *BoPPH* 和 *BoPaO* 等叶绿素降解基因的表达，抑制 PPH 和 PaO 活性，从而延缓青花菜黄化[15]。小麦中发现叶绿素酶和脱镁叶绿素水解酶是叶绿素降解途径关键酶[21]，在油麦菜中叶绿素过氧化物酶是叶绿素降解的关键酶[22]，本文的研究表明 CLH 而非 PPH 是小白菜叶绿素降解的关键酶。

本文研究表明 POD 和 LOX 也参与叶绿素的降解，这与以往的研究结论一致。菠菜[23] 和西兰花[24] 在黄化过程中均伴随着叶绿素含量的下降和 POD 活性的上升。LOX 可以启动膜脂过氧化反应，催化不饱和脂肪酸氧化形成自由基而攻击分解叶绿素，同时，膜脂过氧化反应的产物 MDA 会损伤叶绿体膜，引发叶绿素的酶促反应，加速叶绿素降解[24−26]。因此，保持较低的 POD 和 LOX 活性有利于延缓植物叶绿素的降解。ZHAI 等[27] 研究发现，褪黑素处理通过降低梨果实中 LOX 活性，延缓了其叶绿素含量

的下降。SOD、CAT 和 APX 等抗氧化酶能清除活性氧，减轻对细胞的损伤。研究表明[28]，EBR 能通过上调植物抗性相关基因的表达提高抗氧化能力，减轻细胞受损的程度。张瑞杰[20] 在用 EBR 处理杏果实时发现 EBR 能较好地保持杏果实叶绿体的完整性。李进等[29] 通过外源喷施 EBR 提高了棉花的抗氧化酶活性，减少了自由基对叶绿体的破坏，使叶绿素和类胡萝卜素含量保持在较高的水平。本研究中，EBR 处理均有效减少 2 ℃ 和 20 ℃ 贮藏期间小白菜抗氧化酶活性的下降，抑制 POD 和 LOX 活性上升，$O_2^{-}\cdot$ 和 H_2O_2 的产生，MDA 含量的积累，与前人研究结果一致。由此可推测，采后 1.0 mg/L EBR 可能通过维持 SOD、CAT 和 APX 活性，抑制 POD 和 LOX 活性上升，减少膜脂氧化，进而降低了 $O_2^{-}\cdot$、H_2O_2 和 MDA 的积累，最终减少了叶绿素的降解，维持小白菜良好的生理指标。

本研究表明，与常温 20 ℃ 贮藏相比，低温 2 ℃ 贮藏更能保持小白菜较好的色泽指标和外观品质，较高的总叶绿素、叶绿素 a 和叶绿素 b 含量，较低的呼吸强度，$O_2^{-}\cdot$、H_2O_2 和 MDA 含量，以及叶绿素降解酶和膜脂过氧化酶活性，较高的抗氧化酶活性。1.0 mg/L EBR 处理可以通过抑制 2 ℃ 和 20 ℃ 贮藏期间小白菜叶绿素降解相关酶活性上升，从而减少叶绿素的降解，同时通过维持小白菜较低的膜脂过氧化酶活性和较高的抗氧化酶活性，保持细胞膜结构完整性，进而减少小白菜贮藏期间品质和生理的下降，其中对 20 ℃ 贮藏条件小白菜各指标的影响更为明显。以上的研究结果对 EBR 应用于绿色果蔬尤其是叶菜类的保鲜提供了理论依据，今后可进一步明确 EBR 在分子层面对小白菜品质和生理生化的调控机制。

参考文献

[1] HORTENSTEINER S. Chlorophyll degradation during senescence[J]. Annual Review of Plant Biology, 2006(57): 55−77.

[2] FANG Z, BOUWKAMP J C, SOLOMOS T. Chlorophyllase activties and chlorophyll degradation during leaf senescence in non-yellowing mutant and wild type of *Phaseolus vulgaris* L.[J]. Journal of Experimental Botany, 1998, 49(320): 8.

[3] SILVIA S, SYLVAIN A, BO B, et al. Pheophytin pheophorbide hydrolase (pheophytinase) is involved in chlorophyll breakdown during leaf senescence in arabidopsis[J]. The Plant Cell, 2009, 21(3): 767−785.

[4] ALSCHER R G, DONAHUE J L, CRAMER C L. Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells[J]. Physiologia Plantarum, 1997, 100(2): 224−233.

[5] SCANDALIOS J G. Oxygen stress and superoxide dismutases[J]. Plant Physiology, 1993, 101(1): 7−12.

[6] BLOKHINA O, VIROLAINENEIJA E, FAGERSTEDT K V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review[J]. Annals of Botany, 2003, 91(2): 179−194.

[7] SONG L L, YI R X, LUO H B, et al. Postharvest 1-methylcyclopropene application delays leaf yellowing of pakchoi (*Brassica rapa* subsp. *chinensis*) by improving chloroplast antioxidant capacity and maintaining chloroplast structural integrity during storage at 20 °C[J]. Scientia Horticulturae, 2020, 270: 109466.

[8] AL UBEED H M S, BOWYER M C, GOLDING J B, et al. Interaction of the hydrogen sulphide inhibitor, propargylglycine (PAG), with hydrogen sulphide on postharvest changes of the green leafy vegetable, pak choy[J]. Postharvest Biology and Technology, 2019, 147: 54−58.

[9] 耿艺. 低/高湿小白菜的降压调控真空预冷研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2020. [GENG Y. Effects of pressure reduction regulation on vacuum cooling of dry/rainy season pakchoi (*Brassica chinensis* L.)[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2020.]

[10] ZHOU F H, ZUO J H, XU D Y, et al. Low intensity white light-emitting diodes (LED) application to delay senescence and maintain quality of postharvest pakchoi (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* (L.) Makino var. *communis* Tsen et Lee)[J]. Scientia Horticulturae, 2020, 262: 109060.

[11] ZHANG X T, ZHANG M, DEVAHASTIN S, et al. Effect of combined ultrasonication and modified atmosphere packaging on storage quality of pakchoi (*Brassica chinensis* L.)[J]. Food and Bioprocess Technology, 2019, 12(9): 1573−1583.

[12] 胡勇军. 外源复合激素调控下人工草地羊草生长及生理学特性研究 [D]. 长春: 东北师范大学, 2014. [HU Y J. Research on the growth and pgysiological characteristics of *Leymus chinensis* under exogenous complex hormone treatments on the artificial grassland[D]. Changchun: Northeast Normal University, 2014.]

[13] YUAN L Y, NIE L B, JI Q, et al. The effect of exogenous 24-epibrassinolide pretreatment on the quality, antioxidant capacity, and postharvest life of wucai (*Brassica campestris* L.)[J]. Food Science & Nutrition, 2021, 9(3): 1323−1335.

[14] YAO Y M, ZHAO N, XIAN T T, et al. Effect of 2, 4-epibrassinolide treatment on the postharvest quality and physiological metabolism of fresh daylily flower buds during storage[J]. Scientia Horticulturae, 2017, 226: 110−116.

[15] CAI J H, LUO F, ZHAO Y B, et al. 24-Epibrassinolide treatment regulates broccoli yellowing during shelf life[J]. Postharvest Biology and Technology, 2019, 154: 87−95.

[16] 刘红艳. 6-卞氨基嘌呤对采后鲜切西兰花营养品质及保鲜机理的研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2017. [LIU H Y. Study on nutritional quality and preservation mechanism of fresh cut broccoli by 6-benzyl aminopurine[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2017.]

[17] FUNAMOTO Y, YAMAUCHI N, SHIGENAGA T, et al. Effects of heat treatment on chlorophyll degrading enzymes in stored broccoli (*Brassica oleracea* L.)[J]. Postharvest Biology and Technology, 2002, 24(2): 163−170.

[18] FUKASAWA A, SUZUKI Y, TERAI H, et al. Effects of postharvest ethanol vapor treatment on activities and gene expression of chlorophyll catabolic enzymes in broccoli florets[J]. Postharvest Biology and Technology, 2010, 55(2): 97−102.

[19] 曹建康, 姜微波, 赵玉梅. 果蔬采后生理生化实验指导 [M]. 北京: 中国轻工业出版社. 2007. [CAO J K, JIANG W B, ZHAO Y M. Guidance of postharvest physiological and biochemical experi-

ments of fruits and vegetables[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2007.]

[20] 张瑞杰. 24-表油菜素内酯对杏果实采后抗冷性的影响 [D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2018. [ZHANG R J. Effect of 24-epibrassinolide on the cold resistance of postharvest apricot fruits[D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2018.]

[21] 王绘艳, 王曙光, 史雨刚, 等. 小麦叶绿素酶及脱镁叶绿素水解酶活性测定条件的优化[J]. 山西农业科学, 2019, 47(4): 541−544. [WANG H Y, WANG S G, SHI Y G, et al. Optimization of determination conditions of chlorophyllase and pheophytin hydrolase activity in wheat leaf[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2019, 47(4): 541−544.]

[22] 周福慧, 徐冬颖, 左进华, 等. LED 白光处理对采后油麦菜品质的影响[J]. 包装工程, 2020, 41(5): 8−14. [ZHOU F H, XU D Y, ZUO J H, et al. Effect of white LED irradiation on the quality of postharvest *Lautuca sativa*[J]. Packaging Engineering, 2020, 41(5): 8−14.]

[23] 郭淑婷, 薛健翼, 李锋, 等. 真空预冷压力对菠菜采后贮藏保鲜品质的影响[J]. 食品工业科技, 2021, 42(5): 265−269. [GUO S T, XUE J Y, LI F, et al. Effects of vacuum precooling pressure on postharvest preservative quality of spinach[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(5): 265−269.]

[24] 谢晓宇, 韩欣如, 曾媛, 等. 采前 $CaCl_2$ 处理对西兰花采后品质的影响[J]. 保鲜与加工, 2021, 21(3): 40−47. [XIE X Y, HAN X R, ZENG Y, et al. Effects of pre-harvest $CaCl_2$ treatments on postharvest quality of broccoli[J]. Stroage and Process, 2021, 21(3): 40−47.]

[25] WASZCZAK C, CARMODY M, KANGASJARVI J. Reactive oxygen species in plant signaling[J]. Annual Review of Plant Biology, 2018, 69: 209−236.

[26] 范宁波, 蔡斌, 张瑞娜, 等. 雪茄烟叶晾制过程色素降解和膜脂过氧化对颜色变化的影响[J]. 中国烟草报, 2021, 27(2): 102−108. [FAN N B, CAI B, ZHANG R N, et al. The influence of pigment degration and membrane lipid peroxidation on color change of cigar tobacco during air curing[J]. Acta Tabacaria Sinica, 2021, 27(2): 102−108.]

[27] ZHAI R, LIU J L, LIU F X, et al. Melatonin limited ethylene production, softening and reduced physiology disorder in pear (*Pyrus communis* L.) fruit during senescence[J]. Postharvest Biology and Technology, 2018, 139: 38−46.

[28] 雷阳, 乔宁, 白扬, 等. 表油菜素内酯对重度镉胁迫下辣椒幼苗生理特性及抗逆基因的影响[J]. 华北农学报, 2021, 36(5): 99−106. [LEI Y, QIAO N, BAI Y, et al. Effects of epibrassinolide on physiological characteristics and resistance genes of pepper seedlings under severe cadmium stress[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2021, 36(5): 99−106.]

[29] 李进, 张军高, 刘梦丽, 等. 4 种外源物质对低温胁迫下棉花 (*Gossypium hirsutum*) 幼苗的缓解效应分析[J]. 分子植物育种, 2019, 17(17): 5792−5800. [LI J, ZHANG J G, LIU M L, et al. Mitigation effect analysis of four exogenous substances on *Gossypium hirsutum* seedlings under low temperature stress[J]. Molecular Plant Breeding, 2019, 17(17): 5792−5800.]

刘爱青，王海燕，王应强，等. 2 种蛋白肽对电离辐射损伤小鼠的保护作用 [J]. 食品工业科技，2022，43(9)：359−364. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020050346

LIU Aiqing, WANG Haiyan, WANG Yingqiang, et al. Radioprotective Effect of Two Kinds of Protein Peptides in Ray-irradiated Mice[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 359−364. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020050346

·营养与保健·

2 种蛋白肽对电离辐射损伤小鼠的保护作用

刘爱青[1,2]，王海燕[1]，王应强[3]，闫　征[1]，李志国[1]，许智敏[1]

（1.北京盛美诺生物技术有限公司，北京 100062；
2.安徽盛美诺生物技术有限公司，安徽淮北 235000；
3.陇东学院，农林科技学院，甘肃庆阳 745000）

摘　要：目的：探究众多生物活性肽中口感愉悦的菠萝蜜蛋白肽和胶原蛋白肽对^{60}钴 γ 射线辐射损伤小鼠的辅助保护作用。方法：采用无特定病原体（SPF 级）雌性 BALB/c 小鼠 288 只，随机分为四批，每批 6 组，每组 12 只。每组设计空白对照组、模型对照组、菠萝蜜蛋白肽低、高剂量组（0.20、0.80 g/kg BW）以及胶原蛋白肽低、高剂量组（0.53、1.6 g/kg BW）。每日一次经口给予小鼠受试品 26 d 后，除空白对照组，其它各组接受^{60}钴 γ 射线全身辐射，辐射后继续灌胃干预。分别检测外周血白细胞数（照射剂量 3.5 Gy，照射前、照射后第 3 d、第 14 d）、骨髓细胞 DNA 含量和血清 8 羟基脱氧鸟苷的含量（照射剂量 3.5 Gy，照射后第 3 d）、血清溶血素含量（照射剂量 1 Gy，照射后第 7 d），血中超氧化物歧化酶（SOD）活性（照射剂量 7 Gy，照射后第 7 d）。结果：与模型对照组比较，照射后第 3 d、菠萝蜜蛋白肽高剂量组、胶原蛋白肽低、高剂量组外周血白细胞数明显升高（P<0.05），照射后第 14 d，菠萝蜜蛋白肽高剂量组、胶原蛋白肽高剂量组外周血白细胞数显著升高（P<0.05）；照射后第 3 d，菠萝蜜蛋白肽高剂量组能显著升高小鼠骨髓细胞 DNA 含量（P<0.05），菠萝蜜蛋白肽高剂量组和胶原蛋白肽高剂量组能显著降低辐照后小鼠血清中 8 羟基脱氧鸟苷的含量（P<0.01）；照射后第 7 d 菠萝蜜蛋白肽高剂量组能显著升高小鼠血清溶血素的含量（P<0.05）。结论：菠萝蜜蛋白肽对电离辐射损伤有辅助保护作用，胶原蛋白肽对电离辐射损伤的小鼠外周血白细胞数具有一定的改善作用，且能降低辐射后小鼠血清中 8 羟基脱氧鸟苷的含量。

关键词：菠萝蜜蛋白肽，胶原蛋白肽，小鼠，辐射危害，保护

中图分类号：TS202.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1002−0306(2022)09−0359−06

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2020050346

本文网刊：

Radioprotective Effect of Two Kinds of Protein Peptides in Ray-irradiated Mice

LIU Aiqing[1,2]，WANG Haiyan[1]，WANG Yingqiang[3]，YAN Zheng[1]，LI Zhiguo[1]，XU Zhimin[1]

（1.Beijing Semnl Biotechnology Co., Ltd., Beijing 100062, China；
2.Anhui Semnl Biotechnology Co., Ltd., Huaibei 235000, China；
3.College of Agriculture and Forestry, Longdong University, Qingyang 745000, China）

Abstract: Objective: To investigate the radioprotective effect of jackfruit protein peptide and collagen peptide with pleasant mouthfeel in many bioactive peptides in ^{60}Co γ ray-irradiated mice. Methods: Two hundred and eighty eight specific pathogen free (SPF) female BALB/c mice were randomly divided into 4 batches with 6 groups and 12 rats in each group. Each batch divided into blank control group, model control group, 2 jackfruit protein peptide intervention groups (0.20, 0.80 g/kg BW) and 2 collagen peptide intervention groups (0.53, 1.6 g/kg BW). After the 26 days of the intragastric administration, the mice except the blank control group received ^{60}Co γ-ray whole body irradiation, and intragastric intervention continued after irradiation. The number of peripheral blood white blood cells (radiation dose 3.5 Gy, 3 and 14 days after irradiation), bone marrow DNA content and the content of 8-OhdG in serum (radiation dose 3.5 Gy, 3 days after radiation), serum hemolysin (radiation dose 1 Gy, 7 days after radiation) and superoxide dismutase (SOD) activity in

收稿日期：2020−05−28

作者简介：刘爱青（1982−），女，硕士，中级工程师，研究方向：生物活性肽的提取和制造，E-mail: 735668105@qq.com。

blood (radiation dose 7 Gy, 7 days after radiation) were measured, respectively. Results: Compared with the model control group, the number of peripheral blood white blood cells in high dose of jackfruit peptide, and low and high dose of collagen peptide were significantly increased on 3rd day after radiation (P<0.05). The number of peripheral blood white blood cells in high dose of jackfruit peptide, and high dose of collagen peptide were significantly increased on 14th day after radiation (P<0.05). Bone marrow DNA content in high dose of jackfruit peptide were significantly increased on 3rd day after radiation (P<0.05). The high-dose group of jackapple peptide and the high-dose group of collagen peptide could significantly reduce the 8-hydroxydeoxyguanosine content in mouse serum after irradiation (P<0.01). Serum hemolysin were significantly increased on 7th day after radiation (P<0.05). Conclusion: Jackfruit peptide had protective effects against ionizing radiation exposure. Collagen peptides improved the number of peripheral blood white blood cells damaged by ionizing radiation and reduce the content of 8-hydroxydeoxyguanosine in mouse serum after radiation.

Key words: jackfruit protein peptide; collagen peptide; mice; radiation hazard; protection

辐射(radiation)在现实生活中随处可见,对人类造成损伤的主要类型包括 X、γ 射线等电离辐射[1−3]。电离辐射会导致造血、免疫、消化、氧化还原系统及生殖等系统的损害,甚至导致死亡[4−5]。加强辐射防护,预防或减轻放射病已成为当今亟待解决的重要课题[6]。目前,已使用的抗辐射药有氨磷汀、碘化钾等,但均存不同程度的局限性[7],且合成抗辐射剂价格昂贵,大都会引起一定的副作用,临床和实际应用受到很大限制[8]。因此,天然辐射防护剂在现代医药保健行业中日益得到重视,研究者侧重于从可食用的天然植物、动物中开发高效抗辐射损伤的产品。

研究表明,一些植物提取物和小分子生物活性肽能通过免疫调节、刺激骨髓造血机能以及提高氧化酶活力并抑制自由基产生,对辐射所致的造血功能、免疫器官损伤和氧化损伤提供保护作用,具有较好的防辐射损伤功能[9−13]。但很多提取物和生物活性肽因为苦涩难以入口,因此作者在众多植物和动物来源的生物活性肽中,筛选出两种口感最好的生物活性肽—菠萝蜜蛋白肽和胶原蛋白肽进行抗辐射防护作用研究。据文献报道:胶原蛋白肽研究主要集中在抗氧化、抗衰老以及改善骨质疏松方面[14−17];菠萝蜜营养成分丰富且富含多糖、酚类化合物、类胡萝卜素等功能活性成分[18−21]。郝云涛等[22]对菠萝蜜低聚肽进行过部分研究。而胶原蛋白肽和菠萝蜜蛋白肽对电离辐射辅助保护作用的全面研究较少,本文主要依据《保健食品功能评价方法(2020 版)(征求意见稿)》的标准,通过 ^{60} 钴 γ 射线照射 BALB/c 小鼠,照射前后采用胶原蛋白肽和菠萝蜜蛋白肽干预 BALB/c 小鼠,从五个方面系统探究了胶原蛋白肽和菠萝蜜蛋白肽对电离辐射损小鼠的保护作用,并对二者作用效果进行了对比,为选择有效易得,价格亲民、口感良好的防辐射食品提供理论支持。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

菠萝蜜蛋白肽　北京盛美诺生物技术有限公司提供,来源:菠萝蜜果肉和须粉碎后酶解混合物,蛋白肽含量 9.0%,淡黄色粉末,可市场化销售的食品原料;胶原蛋白肽　北京盛美诺生物技术有限公司提供,来源:罗非鱼鱼鳞,100% 蛋白肽(以干基计算),白色至乳白色粉末,可市场化销售的食品、保健品原料;雌性小鼠　选用北京华阜康生物科技股份有限公司繁殖的 18~22 g 昆明健康 SPF 级雌性小鼠 288 只,饲养于北京联合大学应用文理学院保健食品功能检测中心 SPF 级动物室(实验动物使用许可证号:SYXK(京)2017-0038;维持饲料　由北京华阜康生物科技股份有限公司生产;血红蛋白测试液测试盒、SOD 测试盒、8 羟基脱氧鸟苷试剂盒　南京建成生物工程研究所;$CaCl_2$　国药集团化学试剂有限公司;$HClO_4$　天津鑫源化工。

T-1000 型电子天平　美国双杰;BS223S 型电子天平、BS2202S 型电子天平　德国赛多利斯;UV2600 型紫外可见分光光度计　日本岛津;MEK-6318K 型血液分析仪、MEK-640 血常规稀释液、MEK-680 溶血剂　日本光电工业株式会社;HFY-1A 沽源控制台、HFY-601 固定式多路 X γ 剂量仪 ^{60}Co γ 射线辐射源　北京大学化学与分子工程学院;Thermo 全波扫描多功能酶标仪　美国 Thermo Fisher 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 分组与建模　饲养一周适应后,288 只小鼠随机分为四批(每批用于一个功能指标的评价),每批 6 组,每组 12 只。每组设计空白对照组、模型对照组、菠萝蜜蛋白肽低、高剂量组(0.20、0.80 g/kg BW)以及胶原蛋白肽低、高剂量组(0.53、1.6 g/kg BW)。每日一次经口给予小鼠受试品 26 d 后,除空白对照组,其它各组接受 ^{60} 钴 γ 射线全身辐射,辐射后继续灌胃干预。分别检测外周血白细胞数(照射剂量 3.5 Gy,照射前、照射后第 3 d、第 14 d)、骨髓细胞 DNA 含量和血清 8 羟基脱氧鸟苷的含量(照射剂量 3.5 Gy,照射后第 3 d)、血清溶血素(照射剂量 1 Gy,照射后第 7 d),血中超氧化物歧化酶(SOD)活性(照射剂量 7 Gy,照射后第 7 d)。小鼠灌胃体积为 10 mL/kg BW,空白对照组、模型对照组均用无菌纯化水代替受试物,每日灌胃量与各受试物组相同。各组均给予维持饲料。实验中使用无菌水配制两种蛋白肽。菠萝蜜蛋白肽灌胃剂量参考郝云涛等[23]相关研究数据;根据人体推荐剂量 10 倍,30 倍分别设计胶原蛋白肽低剂量组和高剂量组。

1.2.2 外周血白细胞计数　依据《保健食品功能评价

方法(2020 版)》二十三、对电离辐射危害有辅助保护功能检验方法进行外周血白细胞计数实验，照射剂量选择 3.5 Gy。于照射前、照射后第 3 d、照射后第 14 d 分别进行三次采末梢血 20 μL，加入 2.0 mL 稀释液中，混匀后，于血液分析仪上进行白细胞计数。照射后 3 d 辐射模型对照组的白细胞数分别与照射前进行自身比较，差异有显著性，则判定辐射损伤模型成立；任一时间点、任一剂量组与辐射模型对照组比较，白细胞总数增多，差异有显著性，则可判定该实验结果阳性。

1.2.3　骨髓细胞 DNA 含量以及血清 DNA 损伤修复

1.2.3.1　骨髓细胞 DNA 含量　依据《保健食品功能评价方法(2020 版)》二十三、对电离辐射危害有辅助保护功能检验方法进行骨髓细胞 DNA 含量测定实验，照射剂量选择 3.5 Gy，于照射后第 3 d，颈椎脱臼处死动物，剥离出股骨，利用紫外分光光度计法测定 DNA 含量。具体方法参照李解的研究方法[24]。任一剂量组与模型对照组比较，骨髓 DNA 含量增多，差异有显著性，则可判定该实验结果阳性。

1.2.3.2　DNA 损伤修复　8 羟基脱氧鸟苷是目前公认的一种评价 DNA 氧化损伤和氧化应激状态的生物标志物，于照射后第 3 d，通过眼球采血，离心后取上清液，利用 ELISA 法，按照试剂盒说明书对血清中 8 羟基脱氧鸟苷含量进行检测。

1.2.4　血清溶血素(半数溶血值，HC_{50})　依据《保健食品功能评价方法(2020 版)》二十三、对电离辐射危害有辅助保护功能检验方法进行血清溶血素实验，照射剂量选择 1 Gy，于照射后第 7 d，进行血清溶血素的测定。具体方法参照刘雅萍[25] 的方法以及试剂盒检测说明书。任一剂量组与模型对照组比较，血清半数溶血值增多，差异有显著性，则可判定该实验结果阳性。

1.2.5　血中超氧化物歧化酶(SOD)活性　依据《保健食品功能评价方法(2020 版)》二十三、对电离辐射危害有辅助保护功能检验方法进行血中超氧化物歧化酶(SOD)活性实验，照射剂量选择 7 Gy，于照射后第 7 d，进行实验。具体方法参照刘雅萍[25] 方法以及试剂盒检测说明书。任一剂量组与模型对照组比较，血中 SOD 活性增强，差异有显著性，则可判定该实验结果阳性。

1.3　数据处理

实验数据用均值±标准误差表示($\overline{X}\pm SD$)，采用 SPSS11.0 软件对各实验数据进行统计学处理：空白对照组与模型对照组间采用独立样本 t 检验；剂量组与模型对照组间采用独立样本 t 检验。$P<0.05$ 表示具有显著差异性，$P<0.01$ 表示具有极其显著差异性。

2　结果与分析

2.1　2 种蛋白肽对小鼠体重的影响

由表 1 可见，经口给予小鼠不同剂量的蛋白肽 26 d 后，小鼠体重在各剂量组与模型对照组间比较，均无显著性差异($P>0.05$)；模型对照组与空白对照组比较，无显著性差异($P>0.05$)，即两种蛋白肽对小鼠体重无不良影响。此期间各组动物毛发光滑，密度均匀，无脱毛现象，精神活跃，食欲正常，未发现四肢有肿胀等情况。

2.2　2 种蛋白肽对照射后小鼠外周血白细胞计数的影响

由表 2 可见，照射前各剂量组小鼠外周血白细胞数与模型对照组间比较，均无显著性差异($P>0.05$)；模型对照组与空白对照组比较，无显著性差异($P>0.05$)，说明各组间外周血白细胞数较为均衡。3.5 Gy γ 射线全身一次性照射后第 3 d，与照射前进行自身比较，模型对照组的白细胞数降低，有显著性差异($P<0.001$)，即辐射损伤模型建立成功。照射后第 3 d、14 d，与空白对照组比较，模型对照组小鼠外周血白细胞数显著降低($P<0.001$)。照射后第 3 d，与模型对照组比较，菠萝蜜蛋白肽高剂量组能显著升高小鼠外周血白细胞数($P<0.05$)；胶原蛋白肽低剂量组、高剂量组能显著升高小鼠外周血白细胞数($P<0.05$)。辐射后第 14 d，与模型对照组比较，菠萝蜜蛋白肽高剂量组能显著升高小鼠外周血白细胞数($P<0.05$)；胶原蛋白肽高剂量组能显著升高小鼠外周血白细胞数($P<0.05$)，而且菠萝蜜蛋白肽高剂量组要优于胶原蛋白肽高剂量组。胶原蛋白肽的低高剂量组对辐射后小鼠的外周血白细胞均有显著提升，这与胶原蛋白肽具抗氧化[14]、增强免疫力的作用有关[26]；菠萝蜜蛋白肽仅有高剂量组对辐射后小鼠的外周血白细胞有作用，应和菠萝蜜蛋白肽自身蛋白肽的含量低有关。

表 1　2 种蛋白肽对小鼠体重的影响

Table 1　Effects of two protein peptides on body weight of mice

组别	动物数(只)	实验一批	实验二批	实验三批	实验四批
		体重(g)	体重(g)	体重(g)	体重(g)
空白对照组	12	35.3±2.7	36.5±1.1	36.8±2.6	37.7±2.9
模型对照组	12	37.0±1.2	35.9±3.4	36.3±2.4	37.6±3.9
菠萝蜜蛋白肽低剂量组	12	36.4±2.4	35.0±2.5	36.6±2.8	36.2±1.9
菠萝蜜蛋白肽高剂量组	12	36.4±4.3	35.0±2.3	36.0±2.7	35.9±3.6
胶原蛋白肽低剂量组	12	36.4±2.7	34.5±2.3	34.9±3.0	35.9±2.3
胶原蛋白肽高剂量组	12	35.7±3.1	35.7±2.1	36.5±2.3	35.9±2.1

表 2 2 种蛋白肽对照射后小鼠外周血白细胞计数的影响

Table 2 Effects of two protein peptides on peripheral blood white blood cells count of mice after radiation

组别	动物数(只)	照射前白细胞(×10⁹/L)	照射后第3 d白细胞数(×10⁹/L)	照射后第14 d白细胞数(×10⁹/L)
空白对照组	12	6.1±1.4	6.7±1.9	6.9±1.5
模型对照组	12	5.0±1.3	1.1±0.3$^{a\#}$	2.5±0.5$^{a\#}$
菠萝蜜蛋白肽低剂量组	12	5.1±1.9	1.2±0.3	2.7±1.0
菠萝蜜蛋白肽高剂量组	12	5.6±1.9	2.1±0.7*	3.5±0.8*
胶原蛋白低剂量组	12	5.7±1.8	1.4±0.3*	3.1±0.9
胶原蛋白高剂量组	12	6.2±1.6	1.6±0.8*	3.2±0.8*

注: ^{a}表示与照射前比较有显著差异(P<0.001); $^{\#}$表示与空白对照组比较有显著差异(P<0.001); *表示与模型对照组比较有显著性差异(P<0.05)。

此批实验小鼠辐照后首天, 与空白对照比较, 模型对照组以及其它受试物组小组均表现出毛发稍有竖立, 食欲一般, 动作迟缓的现象, 但并无四肢肿胀、死亡等情况; 辐照后第 3 d 模型组和各受试物组小鼠食欲、行动及精神状态有一定改善, 但和空白对照组还有差距; 辐照后第 14 d 各种体态接近空白对照组。

2.3 两种蛋白肽对照射后小鼠骨髓细胞 DNA 含量的影响以及对 DNA 损伤的修复

2.3.1 2 种蛋白肽对照射后小鼠骨髓细胞 DNA 含量的影响 由表 3 可见, 辐射后第 3 d, 与空白对照组比较, 模型对照组小鼠骨髓细胞 DNA 含量显著降低(P<0.001); 与模型对照组比较, 菠萝蜜蛋白肽高剂量组能显著升高小鼠骨髓细胞 DNA 含量(P<0.05); 而胶原蛋白肽剂量组则轻微地降低小鼠骨髓细胞 DNA 含量。

表 3 2 种蛋白肽对照射小鼠骨髓细胞 DNA 含量的影响

Table 3 Effect of two protein peptides on DNA content of irradiated mice's bone marrow cells

组别	动物数(只)	辐照后第3 d 小鼠骨髓细胞DNA含量
空白对照组	12	2.668±0.761
模型对照组	12	1.422±0.479$^{\#}$
菠萝蜜蛋白肽低剂量组	12	1.870±0.767
菠萝蜜蛋白肽高剂量组	12	1.874±0.422*
胶原蛋白肽低剂量组	12	1.233±0.260
胶原蛋白肽高剂量组	12	1.398±0.381

注: *表示与模型对照组比较有显著性差异(P<0.05); $^{\#}$表示与空白对照组比较有显著差异(P<0.001), 表4~表5同。

2.3.2 2 种蛋白肽对照射后小鼠 DNA 损伤修复的影响 由表 4 可见, 辐射后第 3 d, 与空白对照组比较, 模型对照组小鼠血清 8 羟基脱氧鸟苷的含量显著升高(P<0.01); 与模型对照组比较, 菠萝蜜蛋白肽高剂量组和胶原蛋白肽高剂量组能显著降低小鼠血清 8 羟基脱氧鸟苷的含量(P<0.01), 这说明菠萝蜜蛋白肽和胶原蛋白肽对辐照造成的 DNA 损伤具有一定的修复作用。

表 4 2 种蛋白肽对照射后小鼠 DNA 损伤修复的影响

Table 4 Effect of two protein peptides on repair of DNA in irradiated mice

组别	动物数(只)	8羟基脱氧鸟苷含量(ng/mL)
空白对照组	12	0.98±0.17
模型对照组	12	2.60±0.04$^{\#}$
菠萝蜜蛋白肽低剂量组	12	2.56±0.05
菠萝蜜蛋白肽高剂量组	12	2.14±0.15*
胶原蛋白肽低剂量组	12	2.53±0.08
胶原蛋白肽高剂量组	12	2.10±0.17*

菠萝蜜蛋白肽在短时间对骨髓细胞 DNA 含量有显著作用应与其组成成分有关系, 因其是菠萝蜜肉和须酶解后混合物, 除蛋白肽外, 还含有多糖、多酚、类胡萝卜素[21], 而朱科学[27−29]、Fang 等[30]、Yao 等[31]研究显示菠萝蜜中营养成分多糖、多酚具有较好的抗氧化、抗炎活性; Stahl 等[32]研究显示菠萝蜜类胡萝卜素对预防癌症、炎症至关重要, 所以分析菠萝蜜蛋白肽能短时间升高照射后小鼠骨髓细胞的 DNA 含量, 应与这些营养物质的活性作用有关。胶原蛋白肽剂量组反而有轻微降低小鼠骨髓细胞 DNA 含量, 应与其成分单一具有一定的关系, 也可能与照射后灌胃干预时间短有关系。菠萝蜜蛋白肽和胶原蛋白肽能显著降低小鼠血清 8 羟基脱氧鸟苷的含量, 应与两个产品含有的小分子肽具有抗氧化、抗炎和细胞修复作用有关。

此批实验小鼠辐照后首天, 与空白对照比较, 模型对照组以及其它受试物组小组均表现出毛发稍有竖立, 食欲一般, 动作迟缓的现象, 但并无四肢肿胀、死亡等情况; 辐照后第三天模型组和各受试物组小鼠食欲、行动及精神状态有一定改善, 但和空白对照组还有差距。

2.4 2 种蛋白肽对照射后小鼠血清溶血素含量的影响

由表 5 可见, 照射后第 7 d, 与空白对照组比较, 模型对照组小鼠血清溶血素含量显著降低(P<0.05);

表 5 2 种蛋白肽对照射后小鼠血清溶血素含量的影响

Table 5 Effect of two protein peptides on serum hemolysin content of irradiated mice

组别	动物数(只)	半数溶血值
空白对照组	12	211±29
模型对照组	12	180±38$^{\#}$
菠萝蜜蛋白肽低剂量组	12	171±50
菠萝蜜蛋白肽高剂量组	12	207±22*
胶原蛋白肽低剂量组	12	190±37
胶原蛋白肽高剂量组	12	201±20

与模型对照组比较，菠萝蜜蛋白肽高剂量组能显著升高小鼠血清溶血素含量（P<0.05）。而胶原蛋白肽低、高剂量组均能升高血清溶血素的含量，但无显著性差异（P>0.05）其原因可能与 2.3 结果分析原因相同。

此批实验小鼠辐照前后各剂量组和空白对照比较，食欲、精神、行动、毛发未观察到明显变化。

2.5　2 种蛋白肽对照射后小鼠血中超氧化物歧化酶活性影响

由表 6 可见，照射后第 7 d，与空白对照组比较，模型对照组小鼠血中超氧化物歧化酶（SOD）活性无显著性差异（P>0.05）；各剂量组小鼠血中超氧化物歧化酶（SOD）活性与模型对照组比较，均无显著性差异（P>0.05），表明无论 γ 射线照射处理，还是 2 种蛋白肽对小鼠体内超氧化物歧化酶（SOD）活性均无影响。菠萝蜜蛋白肽实验结果与郝云涛等[23] 研究结果不一致的可能原因：一是菠萝蜜蛋白肽的来源本文是菠萝蜜肉和须，而其是菠萝蜜肉和种子；二是和辐照的剂量不同有关系；三是照射后灌胃干预的时间不同。胶原蛋白肽实验组无显著影响应与照射后灌胃干预时间短有关系。

表 6　2 种蛋白肽对照射后小鼠血中超氧化物歧化酶活性的影响

Table 6　Effect of two protein peptides on superoxide dismutase (SOD) activity of irradiated mice's blood

组别	动物数（只）	血中超氧化物歧化酶活性（U/gHb）
空白对照组	12	19530±1596
模型对照组	12	18894±1489
菠萝蜜蛋白肽低剂量组	12	19162±2105
菠萝蜜蛋白肽高剂量组	12	18940±1830
胶原蛋白肽低剂量组	12	18961±1980
胶原蛋白肽高剂量组	12	18818±2738

此批实验首日照射后模型对照组和各受试物组的小鼠与空白对照组的小鼠相比较，明显表现出食欲不好、精神萎靡、行动迟缓、毛发竖立，而且照射后七天稍有好转，但和其它批实验小鼠相比较食欲、精神、行动恢复速度都较慢，应和照射剂量大有一定的关系。

3　结论

本研究说明菠萝蜜蛋白肽对电离辐射损伤小鼠有辅助保护作用：与模型对照组比较，菠萝蜜蛋白肽组和胶原蛋白肽组都可以显著升高外周血白细胞数、小鼠骨髓细胞 DNA 含量（P<0.05），极显著地降低了辐照后小鼠血清中 8 羟基脱氧鸟苷的含量（P<0.01）；同时显著升高血清溶血素（P<0.05）。因此，本研究为抗辐射产品配方开发提供一定的理论依据。

参考文献

[1] 吴苏南. 单宁酸对血小板生成的影响及抗辐射作用研究[D]. 重庆：第三军医大学，2015. [WU Sunan. The influence of tannic acid on thrombopoiesis and its anti-radiation effect[D]. Chongqing: The Third Military Medical University, 2015.]

[2] 李鹏飞. 曲酸的比格犬辐射防护效应及抗辐射分子机制探讨[D]. 合肥：安徽医科大学，2015. [LI Pengfei. Protective effects of kojic acid on radiation damage in beagle dogs and molecular mechanisms of its anti-radiation[D]. Hefei: Anhui Medical University, 2015.]

[3] 洪倩. 阿魏酸抗辐射活性及其作用机制研究[D]. 北京：中国人民解放军军事医学科学院，2012. [HONG Qian. The anti-radiation effect and mechanism of ferulic acid[D]. Beijing: Academy of Military Medical Sciences, 2012.]

[4] KREUZER M, AUVINEN A, CARDIS E, et al. Multidisciplinary European low dose initiative (MELODI): Strategic research agenda for low dose radiation risk research[J]. Radiation and Environmental Biophysics, 2018, 57(1): 1−11.

[5] SINGH V K, HAUERJENSEN M. γ-Tocotrienol as a promising countermeasure for acute radiation syndrome: Currentstatus[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(5): 663.

[6] 赵海田，王振宇，姚磊，等. 天然产物对电离辐射防护与修复作用的研究进展[J]. 东北农业大学学报，2012，43(9)：139−144. [ZHAO Haitian, WANG Zhenyu, YAO Lei, et al. Advance on ionizing radiation protection and repair research of natural products[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2012, 43(9): 139−144.]

[7] 珠娜，李勇. 生物活性肽的辐射防护作用的研究进展[J]. 中国食物与营养，2020，26(2)：62−65. [ZHU Na, LI Yong. Research progress of radio protective effect of bioactive peptiedes[J]. Food and Nutrition in China, 2020, 26(2): 62−65.]

[8] ANNE P R. Phase Ⅱ trial of subcutaneous amifostine in patitents undergoing radiation therapy for head and neek cancer[J]. Sem in Onco, 2002, 29: 80−83.

[9] SRINIVASAN M, SUDHEER A R, RAJASEKARAN KN, et al. Effect of curcumin analog ongamma-radiation-induced cellular changes in primary culture of isolated rat hepatocytes *in vitro*[J]. Chem Biol Interact, 2008, 176(1): 1−8.

[10] BENKOVI V, KNEZEVI A H, DIKI D, etal. Radioprotective effects of quercetin and athanolic extract of propolis in gamma-irradiated mice[J]. Archives of Industrial Hygiene and Toxicology, 2009, 60(2): 129−138.

[11] 伍明江，沈艳，吴晓黎，等. 刺蒺复方抗辐射辅助保护功效研究[J]. 中国科技信息，2008，18：226−227. [WU Mingjiang, SHEN Yan, WU Xiaoli, et al. Study on anti-radiation auxiliary protective effect of Ciyi compound[J]. China Science and Technology Information, 2008, 18: 226−227.]

[12] 罗琦，梁庆模. 天然药物抗辐射损伤作用机制的研究现状与进展[J]. 辽宁中医药大学学报，2011，13(3)：209−211. [LUO Qi, LIANG Qingmo. Research status on mechanism of action of natural medicine on anti-radiation damage[J]. Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2011, 13(3): 209−211.]

[13] 珠娜，张亭，刘睿，等. 核桃低聚肽抗辐射防护作用[J]. 中国公共卫生，2019，35(12)：1648−1651. [ZHU Na, ZHANG Ting, LIU Rui, et al. Radioprotective effect of walnut oligopeptides in mice[J]. Chin J Public Health, 2019, 35(12): 1648−1651.]

[14] 刘雨萱, 陈媛, 李美良, 等. 罗非鱼鱼鳞胶原蛋白的研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(6): 355−360. [LIU Yuxuan, CHEN Yuan, LI Meiliang, et al. Research progress of tilapia fish scale collagen[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(6): 355−360.]

[15] 刘磊, 孙卫东, 张业辉, 等. 罗非鱼鳞胶原蛋白复合凝胶的防辐射作用及理化性质研究[J]. 现代食品科技, 2019, 35(8): 91−97. [LIU Lei, SUN Weidong, ZHANG Yehui, et al. Anti-radiation effect and physicochemical properties of tilapia scale collagen composite gel[J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(8): 91−97.]

[16] 盛周煌, 贾盟盟, 朱良. 罗非鱼皮胶原蛋白多肽的体外抗氧化活性[J]. 食品科技, 2018, 43(11): 274−278. [SHENG Zhouhuang, JIA Mengmeng, ZHU Liang. *In vitro* antioxidant activity of collagen peptides from tilapia skin[J]. Food Science and Technology, 2018, 43(11): 274−278.]

[17] 周先艳, 樊建, 唐远龙, 等. 罗非鱼皮胶原蛋白水解产物的体外抗氧化活性和体内抗衰老作用[J]. 食品科学, 2016, 37(15): 221−226. [ZHOU Xianyan, Fan Jian, TANG Yuanlong, et al. *In vitro* antioxidant activity and *in vivo* anti-aging effect of tilapia skin gelatin hydrolysates[J]. Food Science, 2016, 37(15): 221−226.]

[18] SWAMI S B, THAKOR N J, HALDANKAR P M, et al. Jackfruit and its many functional components as related to human health: A review[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2012, 11(6): 565−576.

[19] HETTIARATCHI U P, EKANAYAKE S, WELIHINDA J. Nutritional assessment of a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) meal[J]. Ceylon Medical Journal, 2011, 56(2): 54−58.

[20] BALIGA M S, SHIVASHANKARA A R, HANIADKAR, et al. Phytochemistry, nutritional and pharmacological properties of *Artocarpus heterophyllus* Lam. (jackfruit): A review[J]. Food Research International, 2011, 44(7): 1800−1811.

[21] 吴刚, 陈海平, 桑利伟, 等. 中国菠萝蜜产业发展现状及对策[J]. 热带农业科学, 2013, 33(2): 91−97. [WU Gang, CHEN Haiping, SANG Liwei, et al. Status of jackfruit industry in China and development countermeasures[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2013, 33(2): 91−97.]

[22] 郝云涛, 珠娜, 刘欣然, 等. 菠萝蜜低聚肽的免疫调节作用研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(7): 284−288,294. [HAO Yuntao, ZHU Na, LIU Xinran, et al. Study on the immunoregulatory function of jackfruit oligopeptides[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(7): 284−288,294.]

[23] 郝云涛, 刘睿, 珠娜. 等. 菠萝蜜低聚肽对γ射线辐照小鼠氧化损伤的保护作用[J]. 中国食品卫生杂志, 2019, 31(4): 325−329. [HAO Yuntao, LIU Rui, ZHU Na, et al. Protective effect of jackfruit oligopeptides on oxidative damage in γ-ray irradiated mice[J]. Food and Nutrition in China, 2019, 31(4): 325−329.]

[24] 李解. 雅安藏茶及其茶褐素、茶多糖提取物对^{60}Co γ辐射损伤小鼠防护作用的研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2017. [LI Jie. Protective effect of extracted theabrownines and tea polysaccharide from Ya'an tibetan tea on radiation damage in mice caused by ^{60}Co γ-ray[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2017.]

[25] 刘雅萍. 雪莲培养物的抗辐射抗疲劳抗氧化功能评价 [D]. 大连: 大连理工大学, 2012. [LIU Yaping. Evaluation on *Sanussurea involucrate* cell cultures for anti-oxidation & radioresistance and anti-fatigue[D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2012.]

[26] 王毅虎, 张兵, 王富荣, 等. 胶原蛋白增强免疫力功能研究[J]. 明胶科学与技术, 2015, 35(3): 137−143. [WANG Yihu, ZHANG Bing, WANG Furong, et al. The Research of bone collagen peptide on enhancing function[J]. The Science and Technology of Gelatin, 2015, 35(3): 137−143.]

[27] 朱科学, 张彦军, 谭乐和, 等. 菠萝蜜多糖提取工艺优化及初步鉴定[J]. 热带作物学报, 2016, 37(2): 404−410. [ZHU Kexue, ZHANG Yanjun, TAN Lehe, et al. Optimized extraction and identification of polysaccharides isolated from jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) pulp[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2016, 37(2): 404−410.]

[28] 朱科学, 王颖倩, 张彦军, 等. 菠萝蜜多糖对脾淋巴细胞抗氧化作用及免疫功能的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(23): 207−212. [ZHU Kexue, WANG Yingqian, ZHANG Yanjun, et al. Antioxidant activity and immune regulation of polysaccharide from *Artocarpus hetreophyllus* Lam. on spleen lymphocyte[J]. Food Science, 2017, 38(23): 207−212.]

[29] ZHU K X, YAO S W, ZHANG Y J, et al. Effects of *in vitro* saliva, gastric and intestinal digestion on the chemical properties, antioxidant activity of polysaccharide from *Artocarpus heterophyllus* Lam. (jackfruit) pulp[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 87: 952−959.

[30] FANG S C, HSU C L, YEN G C. Anti-inflammatory effects of phenolic compounds isolated from the fruits of *Artocarpus heterohyllus*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(12): 4453−4468.

[31] YAO X, WU D, DONG N N, et al. Mocin C, a phenolic compound isolated from *Artocarpus heterophylus*, suppresses lipopolysaccharide-activated inflammatory responses in murine raw 264.7 macrophages[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(8): 1199−1213.

[32] STAHL W, SIES H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids[J]. Biochimica ET Biophysica Acta, 2005, 1740: 101−107.

刘芳彬, 王伟, 黄永春, 等. 棘胸蛙肌肉营养成分季节变化分析与评价 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 365−371. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021060281

LIU Fangbin, WANG Wei, HUANG Yongchun, et al. Analysis and Evaluation of Seasonal Changes on Nutrient Composition in Muscle of *Quasipaa spinosa*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 365−371. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021060281

·营养与保健·

棘胸蛙肌肉营养成分季节变化分析与评价

刘芳彬[1], 王　伟[1], 黄永春[1,*], 杨汉民[2]

（1.集美大学水产学院, 福建厦门 361021;
2.龙岩市上茶亭生态养殖有限公司, 福建龙岩 364000）

摘　要: 棘胸蛙肌肉营养成分受季节变化影响显著，分析不同季节棘胸蛙肌肉营养成分的组成，旨在为后续产品深加工提供理论依据，在加工过程中可以依据产品需求选择合适季节的棘胸蛙。以春、夏、秋、冬四个季节的棘胸蛙（*Quasipaa spinose*）成蛙为试验对象，采用索氏提取法、凯氏定氮法和色谱法等分析其肌肉常规营养成分、氨基酸和脂肪酸组成的差异。结果表明：棘胸蛙肌肉常规营养成分随季节变化较大，粗蛋白（24.79±0.32 g/100 g）和粗脂肪（1.19±0.17 g/100 g）含量在冬季最高，水分和灰分含量在秋季最高；在不同季节，肌肉中氨基酸种类均含有 17 种，必需氨基酸均为赖氨酸含量最高 8.73~10.20 g/100 g，蛋氨酸+胱氨酸含量最低。氨基酸总量、必需氨基酸总量和鲜味氨基酸总量均为秋季棘胸蛙肌肉中最高；缬氨酸和蛋氨酸+胱氨酸为限制性氨基酸，其中第一限制性氨基酸与第二限制性氨基酸在不同季节时存在差异；脂肪酸种类在秋季时最多，共有 18 种，其中秋季中油酸（C18:1n9c）含量最高，其余三季均为亚油酸（C18:2n6c）含量最高。棘胸蛙肌肉营养成分受到季节变化的影响显著。

关键词: 棘胸蛙, 肌肉, 营养成分, 氨基酸, 脂肪酸, 季节变化

中图分类号: TS254.1　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0365−07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021060281

本文网刊:

Analysis and Evaluation of Seasonal Changes on Nutrient Composition in Muscle of *Quasipaa spinosa*

LIU Fangbin[1], WANG Wei[1], HUANG Yongchun[1,*], YANG Hanmin[2]

（1.Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;
2.Shangchating Ecological Breeding Co., Ltd., Longyan 364000, China）

Abstract: The analysis of the nutritional composition of the muscle of *Quasipaa spinosa* in four seasons aimed to provide theoretical basis for the further processing of *Quasipaa spinosa*. In the processing process, *Quasipaa spinosa* in the appropriate season could be selected according to the product requirements. Samples of *Quasipaa spinosa* in four seasons were collected to analyze the differences of muscle basic nutrient composition, amino acids, fatty acids by Soxhlet extraction, Kjeldahl nitrogen determination and chromatography. The results showed that the nutrient composition varied greatly in different seasons. The contents of crude protein (24.79±0.32 g/100 g) and crude fat (1.19±0.17 g/100 g) were the highest in winter, and the contents of water and ash were the highest in autumn. However, 17 kinds of amino acids were all contained in muscles in different seasons, and the contents of lysine (8.73~10.20 g/100 g) was the highest in essential amino acids, and methionine+cysteine was the lowest. The total amino acids (TAA), essential amino acids (EAA) and flavor amino acids (DAA) were the highest in autumn. Valine and methionine+cystine were limiting amino acids, but the first and the second limiting amino acids were different in different seasons. Fatty acids were the most in autumn (18 kinds), and oleic acid (C18:1n9c) content was the highest, while linoleic acid (C18:2n6c) content was the highest in the other three seasons. The muscle nutrient composition of *Quasipaa spinosa* was significantly affected by seasonal changes.

收稿日期: 2021−07−02

基金项目: 山美水库生态环境保护试点项目-生态系统调控与修复工程。

作者简介: 刘芳彬（1995−）, 男, 硕士研究生, 研究方向: 棘胸蛙生态养殖, E-mail: 781230169@qq.com。

*** 通信作者:** 黄永春（1966−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 水产健康养殖和对虾抗 WSSV 育种选育, E-mail: ychuang@jmu.edu.cn。

Key words: *Quasipaa spinosa*; muscle; nutrient composition; amino acids; fatty acids; seasonal changes

棘胸蛙(*Quasipaa spinosa*)属脊索动物门(Chordata)、两栖纲(Amphibia)、无尾目(Anura)、蛙科(Ranidae)、棘蛙属(*Rana*),俗称石冻和石蛙等,是中国南方特有的大型经济蛙类[1]。棘胸蛙具有较高的食用价值和经济价值,作为特种养殖的品种之一,自 20 世纪 80 年代起,福建、江西等地就开始尝试人工驯养[2]。当前棘胸蛙的总体养殖规模较小,主要以个体养殖户为主。产品结构单一,主要以销售成品蛙为主,缺乏对于棘胸蛙产品的开发和深加工的深入研究,其经济价值还有待进一步的挖掘。

当前研究主要集中在不同部位、不同的生长阶段对棘胸蛙的营养组成方面的研究。舒妙安[3−4]研究不同生长阶段棘胸蛙的肌肉营养成分,其肌肉中的蛋白质含量在 18.55%~19.39%;毛剑婷等[5]对棘胸蛙蝌蚪在不同饲料搭配投喂下的变态发育情况进行了研究,结果表明青饲料配合中华鳖配合饲料进行投喂可以提高其变态率;谢永广等[6]研究了不同饲料水平及投喂频率下的棘胸蛙蝌蚪生长情况,结果表明在饲料含 39% 蛋白,日投喂 2 次情况下,其蝌蚪具有较好的生长速度和变态规整性。综上,棘胸蛙的肉质品质受到多种因素的影响,同时蛙类作为变温动物,对气候变化会更为敏感[7],不同季节的水温和气温等环境因素的变化都可能造成其肌肉营养成分的差异,但目前关于季节变化对于棘胸蛙肌肉营养成分的影响的研究尚未见报道。因此本文对棘胸蛙不同季节的常规营养成分、氨基酸组成、脂肪酸组成进行分析比较,旨在为棘胸蛙的相关产品开发与深加工提供数据参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

棘胸蛙 福建龙岩上茶亭生态养殖有限公司;不同季节投喂饵料均为黄粉虫,样品分别采集于 2019 年 1 月冬季,体长(94.88±6.13)mm,体重(104.19±12.96)g;2020 年 5 月春季,体长(99.41±5.93)mm,体重(117.45±13.05)g;2020 年 8 月夏季,体长(94.99±4.98)mm,体重(108.12±10.99)g 和 2020 年 11 月秋季,体长(96.62±3.84)mm,体重(111.33±10.81)g,四个季节均选取同一批次投放的二龄成蛙,每次采集 12 只,雌雄比例为 1∶1;异辛烷、盐酸、柠檬酸钠、氢氧化钾、氯化钠 分析纯,国药集团化学试剂有限公司;乙醚、甲醇 分析纯,西陇科学股份有限公司。

FD-1A-50 真空冷冻干燥机 北京博医康公司;DHG-9070A 电热恒温鼓风干燥箱 上海精宏公司;Kjeltec-8400 全自动凯氏定氮仪 丹麦 FOSS 公司;L-8800 氨基酸自动分析仪、GC-2010 气相色谱仪 日本岛津公司;B180 马弗炉 德国纳博热公司;RE-2000A 旋转蒸发仪 上海科升公司;HH-2A 恒温水浴锅 上海梅香仪器公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品处理 双毁髓法处理后,从躯干与后肢连接处剪下后肢,剥离皮肤与骨骼,取下肌肉,将肌肉剪成小块混合后分为两份,一份保存于−20 ℃ 冰箱,用于常规营养成分的测定,一份经冷冻干燥后用于氨基酸和脂肪酸组成的测定[8]。

1.2.2 指标测定 水分采用 105 ℃ 烘箱干燥恒重法测定[9],粗脂肪采用索氏提取法测定[10],灰分采用马弗炉灼烧法测定[11],粗蛋白质采用凯氏定氮法测定[12]。

氨基酸采用盐酸水解法测定[13],将冻干后的样品粉碎后称取放入水解管中,加入 15 mL 6 mol/L 的盐酸溶液,然后抽真空密封水解瓶置于(110±1)℃ 干燥箱中,水解 22 h 后,取 1 mL 减压干燥,用柠檬酸钠溶液溶解过滤后采样氨基酸自动分析仪测定。

脂肪酸采用气相色谱法测定[14],将冻干样品粉碎后经过索氏提取后,取适量提取物,加入 4 mL 异辛烷,混匀后加入 0.5 mL 2% 氢氧化钾甲醇溶液,振荡混匀,皂化 2 h,加入正己烷(氯化钠饱和),取上清液待测定。

1.2.3 必需氨基酸组成评价方法 以 FAO/WHO 的氨基酸评分标准模式进行评价,并按下列公式计算氨基酸评分(AAS)、化学评分(CS)和必需氨基酸指数(EAAI)。

$$EAAI = \sqrt[n]{\left[\text{Thr/Thr（egg）}\times\ldots\text{Lys/Lys（egg）}\right]}\times 100 \quad \text{式（1）}$$

$$AAS = \frac{\text{试验样品氨基酸含量(mg/g·N)}}{\text{FAO/WHO评分模式中同种氨基酸含量(mg/g·N)}}\times 100 \quad \text{式（2）}$$

$$CS = \frac{\text{试验样品氨基酸含量(mg/g·N)}}{\text{全鸡蛋蛋白质中同种氨基酸含量(mg/g·N)}}\times 100 \quad \text{式（3）}$$

式中:EAAI 中 n 表示必需氨基酸个数;AAS 和 CS 中 mg/g·N 表示每克氮中氨基酸的毫克数。

1.3 数据处理

每个样品平行测定 3 次。数据用 Excel 2013 软件整理,实验结果用 SPSS 26.0 统计软件进行分析处理,在单因素方差分析(ANOVA)基础上采用 LSD 多重比较法进行分析,结果用平均值±标准误(Mean±SE)来表示,显著水平为 0.05。

2 结果与分析

2.1 不同季节棘胸蛙肌肉常规营养成分分析

棘胸蛙肌肉常规营养成分的季节变化情况如表 1 所示。不同季节水分含量大小依次为秋季、春季、夏季和冬季,其中秋季和春季肌肉的水分含量显著高于夏季和冬季($P<0.05$);不同季节粗蛋白含量大

小依次为冬季、夏季、春季和秋季，冬季肌肉的粗蛋白含量显著高于其余三个季节（$P<0.05$）；不同季节粗脂肪含量大小依次为冬季、夏季、秋季和春季，冬季肌肉粗脂肪含量显著高于其它三个季节（$P<0.05$）；不同季节灰分大小依次为秋季、夏季、冬季和春季，秋季肌肉灰分含量显著高于其它三个季节（$P<0.05$）。四种常规营养成分中粗蛋白和粗脂肪含量的季节变化较大并且变化规律相似。可能与棘胸蛙在不同季节的摄食强度有关。

表 1　棘胸蛙肌肉常规营养成分变化情况（湿重 g/100 g）

Table 1　Changes of basic nutrient composition in muscle of *Quasipaa spinosa* (wet weight g/100 g)

指标	春季	夏季	秋季	冬季
水分	78.30±0.18^{a}	76.05±0.12^{b}	78.48±0.69^{a}	72.78±0.35^{c}
粗蛋白	19.59±0.16^{c}	20.77±0.11^{b}	19.15±0.61^{c}	24.79±0.32^{a}
粗脂肪	0.37±0.02^{c}	0.71±0.03^{b}	0.41±0.03^{c}	1.19±0.05^{a}
灰分	0.94±0.00^{d}	1.19±0.02^{b}	1.78±0.05^{a}	1.05±0.03^{c}

注：组间不同字母表示差异显著$P<0.05$，表2、表5同。

2.2　不同季节棘胸蛙肌肉氨基酸组成分析

棘胸蛙肌肉的氨基酸组成季节变化情况如表 2 所示，棘胸蛙的氨基酸组成种类并未受到季节变化的影响。在不同季节棘胸蛙肌肉中均检测出 17 种氨基酸，其中必需氨基酸为 7 种，鲜味氨基酸为 4 种。不同季节肌肉氨基酸组成中均是谷氨酸含量最高，胱氨酸含量最低。不同季节棘胸蛙肌肉中氨基酸总量大小依次为秋季>春季>冬季>夏季；不同季节肌肉中必需氨基酸含量大小依次为秋季>夏季>春季>冬季；不同季节肌肉中鲜味氨基酸含量大小依次为秋季>春季>冬季>夏季；棘胸蛙肌肉中鲜味氨基酸总量与氨基酸总量的变化趋势一致，氨基酸总量、必需氨基酸和鲜味氨基酸在不同季节中变化幅度不大，均在秋季棘胸蛙肌肉中含量最高。不同季节棘胸蛙肌肉中必需氨基酸含量与氨基酸总量的比值在 0.41~0.42，根据 FAO/WHO 提出的必需氨基酸含量与氨基酸总量的比值在 40% 以上[15]，可以得出棘胸蛙氨基酸组成较为均衡，其中以秋季肌肉中占比最高，冬季最低。不同季节鲜味氨基酸含量与氨基酸总量比值在 0.37~0.38，夏季肌肉中鲜味氨基酸总量低。

表 2　氨基酸含量季节变化情况（干重 g/100 g）

Table 2　Seasonal variation of amino acids contents (dry weight g/100 g)

氨基酸	春季	夏季	秋季	冬季
天门冬氨酸Asp**	9.83±0.06^{b}	9.83±0.04^{b}	10.24±0.06^{a}	9.55±0.11^{c}
苏氨酸Thr*	4.29±0.05^{c}	4.51±0.03^{b}	4.80±0.02^{a}	4.27±0.04^{c}
丝氨酸Ser	4.09±0.02^{b}	4.05±0.02^{b}	4.28±0.03^{a}	4.30±0.04^{a}
谷氨酸Glu**	15.61±0.11^{a}	14.51±0.12^{b}	15.49±0.15^{a}	15.26±0.17^{a}
甘氨酸Gly**	3.85±0.01^{c}	3.95±0.01^{b}	4.08±0.04^{a}	4.16±0.03^{a}
丙氨酸Ala**	5.15±0.02^{ab}	5.06±0.02^{b}	5.21±0.04^{a}	4.83±0.01^{c}
胱氨酸Cys	0.88±0.01^{a}	0.87±0.01^{a}	0.93±0.01^{a}	0.91±0.02^{a}
缬氨酸Val*	4.73±0.03^{a}	4.41±0.03^{b}	4.70±0.03^{a}	4.71±0.02^{a}
蛋氨酸Met*	2.58±0.02^{a}	1.94±0.01^{c}	2.18±0.03^{b}	2.65±0.03^{a}
异亮氨酸Iso*	4.74±0.02^{a}	4.44±0.02^{b}	4.67±0.04^{a}	4.61±0.05^{a}
亮氨酸Leu*	7.86±0.03^{c}	8.69±0.04^{a}	8.20±0.03^{b}	7.84±0.08^{c}
酪氨酸Tyr	3.35±0.02^{a}	2.94±0.02^{b}	3.30±0.04^{a}	3.24±0.04^{a}
苯丙氨酸Phe*	3.97±0.03^{c}	4.66±0.01^{a}	4.08±0.04^{b}	4.13±0.01^{b}
赖氨酸Lys*	9.29±0.04^{b}	9.25±0.07^{b}	10.20±0.05^{a}	8.73±0.10^{c}
组氨酸His	2.3±0.03^{a}	2.24±0.02^{a}	2.19±0.03^{a}	2.25±0.04^{a}
精氨酸Arg	5.71±0.04^{b}	5.69±0.04^{b}	6.31±0.03^{a}	5.78±0.04^{b}
脯氨酸Pro	2.3±0.03^{b}	3.07±0.03^{a}	1.21±0.02^{c}	3.04±0.03^{a}
氨基酸总量TAA	90.55±0.11	90.10±0.26	92.05±0.25	90.37±0.60
必需氨基酸总量TEAA	37.47±0.00	37.90±0.11	38.82±0.15	36.95±0.18
鲜味氨基酸总量TDAA	34.45±0.10	33.35±0.15	35.02±0.17	33.81±0.26
TEAA/TAA	0.41	0.42	0.42	0.41
TDAA/TAA	0.38	0.37	0.38	0.37

注：*代表必需氨基酸；**代表鲜味氨基酸。

2.3　必需氨基酸组成评价

不同季节必需氨基酸含量如表 3 所示。不同季节棘胸蛙肌肉中必需氨基酸含量均为赖氨酸含量最高，蛋氨酸+胱氨酸含量最低。与 FAO/WHO 评分模式标准值相比，除夏季与秋季的蛋氨酸+胱氨酸含量低于 FAO/WHO 评分模式标准值，其余种类氨基酸含量均比标准值高。必需氨基酸指数在 92.63%~97.49%，其中秋季氨基酸指数最高，冬季最低。不同季节棘胸蛙肌肉中氨基酸评分与化学评分如表 4 所示，其肌肉的 AAS 评分均在 0.85 以上，CS 化学评分均在 0.65 以上，表明棘胸蛙肌肉营养价值较高。依据 AAS 评分和 CS 评分作为棘胸蛙的营养评价标准，棘胸蛙肌肉的第一限制性氨基酸与第二限制性氨基酸在不同季节时存在差异，春季和冬季第一限制性

表 3　不同季节必需氨基酸含量（mg/g·N）

Table 3　Changes of essential amino acids content in different seasons (mg/g·N)

必需氨基酸	春季	夏季	秋季	冬季	FAO/WHO评分模式	全鸡蛋白
苏氨酸	297	325	337	293	250	292
缬氨酸	327	318	330	323	310	410
异亮氨酸	328	320	328	316	250	331
亮氨酸	544	626	576	538	440	534
赖氨酸	643	667	716	599	340	441
蛋氨酸+胱氨酸	239	203	218	244	220	386
苯丙氨酸+酪氨酸	507	548	518	506	380	565
EAAI(%)	94.34	96.04	97.49	92.63		

表 4 不同季节氨基酸 AAS 评分和 CS 评分

Table 4 AAS and CS in different seasons

评价指标	季节	苏氨酸	异亮氨酸	亮氨酸	缬氨酸	赖氨酸	蛋氨酸+胱氨酸	苯丙氨酸+酪氨酸
氨基酸评分(AAS)	春季	1.19	1.31	1.24	1.06*	1.89	1.09**	1.33
	夏季	1.30	1.28	1.42	1.03**	1.96	0.92*	1.44
	秋季	1.35	1.31	1.31	1.06**	2.11	0.99*	1.36
	冬季	1.17	1.27	1.22	1.04*	1.76	1.11**	1.33
氨基酸化学评分(CS)	春季	1.02	1.12	1.86	0.80	2.20	0.82	1.74
	夏季	1.11	1.10	2.15	0.78	2.28	0.69	1.88
	秋季	1.15	1.12	1.97	0.81	2.45	0.75	1.77
	冬季	1.00	1.08	1.84	0.79	2.05	0.84	1.73

注: *为第一限制性氨基酸; **为第二限制性氨基酸。

氨基酸为缬氨酸, 第二限制性氨基酸为蛋氨酸+胱氨酸; 夏季和秋季第一限制性氨基酸均为蛋氨酸+胱氨酸, 第二限制性氨基酸为缬氨酸。

2.4 不同季节棘胸蛙肌肉脂肪酸组成分析

不同季节棘胸蛙肌肉中脂肪酸组成存在差异, 如表 5 所示。春季和夏季组成相同, 共 9 种, 其中饱和脂肪酸 2 种, 单不饱和脂肪酸 2 种, 多不饱和脂肪酸 5 种; 秋季脂肪酸组成最丰富, 共 18 种, 其中饱和脂肪酸 7 种, 单不饱和脂肪酸 4 种, 多不饱和脂肪酸 7 种; 冬季脂肪酸共 15 种, 其中饱和脂肪酸 5 种, 单不饱和脂肪酸 3 种, 多不饱和脂肪酸 7 种。秋季棘胸蛙肌肉的脂肪酸组成中 C18:1n9c(油酸, 28.33%)含量最高, 其他三季中均为 C18:2n6c(亚油酸)含量最高。不同季节棘胸蛙肌肉中饱和脂肪酸含量大小依次为秋季>春季>夏季>冬季; 多不饱和脂肪酸含量大小依次为夏季>春季>冬季>秋季; 单不饱和脂肪酸含量大小依次为秋季>夏季>春季>冬季, 饱和脂肪酸和单不饱和脂肪酸含量均为秋季最高, 冬季最低; 多不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸的比值为 0.42~1.64, 高于世界卫生组织的建议值(0.4~0.5)。棘胸蛙肌肉脂肪酸中 EPA+DHA 的含量在不同季节的变化规律与多不饱和脂肪酸并不相同, 其中夏季含量最高, 在春季和夏季棘胸蛙肌肉中未检测到 C20:5n3c(EPA)。

表 5 不同季节棘胸蛙肌肉脂肪酸组成(干重 %)

Table 5 Fatty acids composition in muscle of *Quasipaa spinosa* in different seasons (dry weight %)

脂肪酸	春季	夏季	秋季	冬季
C14:0*	—	—	0.43±0.02^{b}	0.77±0.03^{a}
C15:0*	—	—	0.12±0.01	—
C16:0*	21.4±0.74^{a}	19.33±0.33^{b}	18.07±0.40^{b}	17.33±0.46^{b}
C17:0*	—	—	0.3±0.00^{a}	0.31±0.01^{a}
C18:0*	9.27±0.12^{b}	9.2±0.06^{b}	18±0.52^{a}	6.83±0.37^{c}
C20:0*	—	—	0.39±0.01^{b}	0.65±0.02^{a}
C23:0*	—	—	1.8±0.04	—
∑SFA	30.67±0.80^{b}	28.53±0.43^{b}	39.13±0.94^{a}	25.89±0.71^{c}
C16:1n7c**	0.61±0.01^{c}	0.85±0.02^{a}	0.60±0.02^{c}	0.7±0.01^{b}
C17:1n7c**	—	—	8.7±0.09	—
C18:1n9c**	18.7±0.34^{c}	22.73±0.37^{b}	28.33±0.60^{a}	16.8±0.42^{d}
C20:1n9c**	—	—	0.48±0.01^{b}	0.63±0.01^{a}
∑MUFA	19.31±0.41^{c}	23.58±0.48^{b}	38.12±0.84^{a}	18.12±0.50^{c}
C18:2n6c***	28.93±0.38^{b}	31.93±0.72^{a}	0.21±0.01^{d}	26.2±0.78^{c}
C18:3n3c***	—	—	0.38±0.01^{b}	0.62±0.01^{a}
C20:2n6c***	1.8±0.05^{a}	1.53±0.03^{b}	1.76±0.02^{a}	1.55±0.02^{b}
C20:3n6c***	0.85±0.02^{c}	0.88±0.01^{c}	1.19±0.02^{b}	1.32±0.01^{a}
C20:4n6c***	11.63±0.27^{a}	8.77±0.29^{c}	10.47±0.21^{b}	8.9±0.31^{c}
C20:5n3c***	—	—	0.3±0.01^{a}	0.31±0.00^{a}
C22:6n3c***	3.1±0.05^{b}	3.8±0.05^{a}	2.27±0.07^{d}	2.84±0.07^{c}
∑PUFA	46.32±0.56^{a}	46.92±0.91^{a}	16.57±0.21^{c}	41.74±1.30^{b}
EPA+DHA	3.10±0.06^{b}	3.80±0.06^{a}	2.56±0.08^{c}	3.15±0.08^{b}
∑PUFA/∑SFA	1.51±0.04^{a}	1.64±0.03^{a}	0.42±0.01^{b}	1.61±0.05^{a}

注: ∑SFA为饱和脂肪酸含量总和; ∑PUFA为多不饱和脂肪酸含量总和; ∑MUFA为单不饱和脂肪酸含量总和; *代表饱和脂肪酸; **代表单不饱和脂肪酸; ***代表多不饱和脂肪; —表示未检测到。

3 讨论

两栖动物作为变温动物, 其体温与环境温度密切相关, 为应对冬季低温和食物短缺, 两栖动物会进入冬眠状态, 冬眠状态下代谢受到抑制, 并且其机体代谢强度随季节改变而变化。以往研究表明, 冬眠期间两栖动物的基础代谢降低, 主要利用肝脏和肌肉等组织中的脂肪及糖原为其提供能量, 这些器官的质量在冬眠前明显加重, 在冬眠后出现萎缩现象, 在冬季即将结束时, 许多未成熟的两栖类的脂肪几乎被耗尽[16]。本文结果中棘胸蛙冬季时肌肉粗蛋白和粗脂肪含量最高, 表明棘胸蛙在冬眠前会积蓄能量以应对冬眠期间的能量消耗。棘胸蛙肌肉中粗蛋白含量高于棘腹蛙(*Paa boulengeri*)[17]; 粗脂肪含量高于泰国虎纹蛙(*Rana tigrina cantor*)[18], 棘腹蛙[17] 和中国林蛙(*Rana chensinensis*)[19]。

棘胸蛙肌肉中氨基酸的组成种类在不同季节均为谷氨酸含量最高, 胱氨酸含量最低, 与牛蛙(*Lithobates catesbeiana*)[20] 和黑斑蛙(*Pelophylax nigromaculatus*)[21] 中的氨基酸组成情况相似。棘胸蛙肌肉中氨基酸组成均衡, 接近 FAO/WHO 提出的理想蛋白质标准, 其肌肉中必需氨基酸含量在不同季节均以赖氨酸含量最高, 而赖氨酸是食物中最容易缺乏的氨基酸, 具有促进人体钙吸收等作用[22], 表明了棘胸蛙可以作为一种优质的蛋白质来源。棘胸蛙肌肉中的第一限制性氨基酸与第二限制性氨基酸在不同季节存在差异, 其限制性氨基酸类型与黑斑蛙的研究结果相同[23], 但与虎纹蛙不同[24]。不同季节中棘胸蛙肌肉中的氨基酸总量、必需氨基酸和鲜味氨基酸含量

在秋季最高，冬季棘胸蛙肌肉中必需氨基酸总量最低。除此之外，棘胸蛙肌肉的氨基酸总量与粗蛋白含量的季节变化规律并非一致，造成上述结果差异的原因可能是冬季禁食状态下能量代谢消耗与其他季节不同。在大量进食的情况下，其能量主要用于满足生长及性腺发育，而在冬眠禁食期间，棘胸蛙活动量减弱，并且处于禁食状态，其主要依靠体内的糖原和脂类物质作为能量维持生存，然后才动用蛋白质供能，有研究表明当水生动物遭受饥饿胁迫时，其自身能够将氨基酸转化为葡萄糖来提供能量，具体表现为必需氨基酸总量和氨基酸总量的下降[25]。低温也会抑制其体内氨基酸的合成。有研究表明高山倭蛙（*Nanorana parkeri*）肝脏和肌肉组织中必需氨基酸的含量在冬眠期显著降低（$P<0.05$），其体内参与氨基酸合成的基因在冬眠期显著下调[26]。

棘胸蛙肌肉中脂肪酸组成在不同季节存在差异（$P<0.05$），其中秋季脂肪酸组成最为丰富，造成差异可能是由于不同季节棘胸蛙对于营养需求的不同造成的，另外，环境气温的变化也有可能影响肌肉中脂肪酸的组成。为抵御冬季低温，两栖动物通常会提高其组织中的不饱和脂肪酸含量，或者增加膜磷脂中不饱和脂肪酸的比例，这种机制能导致生物膜在低温环境下保持正常的流动性[27]，并且高水平的不饱和脂肪酸可以有效提高冬眠期间的存活时间，从而提高两栖动物的冬季存活率[28]。已有研究表明，高山倭蛙肝脏和肌肉组织中不同种类的不饱和脂肪酸含量在结冰处理后显著上升[26]。棘胸蛙的肌肉粗脂肪含量与脂肪酸含量的季节变化规律并不一致，可能原因是其对营养物质的代谢利用在不同季节存在差异，肌肉中的粗脂肪除包含脂肪酸外，还包含有其他物质，饥饿胁迫下大多数动物主要消耗机体储存的糖原和脂类物质来维持其基础代谢，并且由于不同组织器官中脂肪酸比例不同，因此在能量利用上也存在先后差异。例如，饥饿前期的太平洋鲑（*Oncorhynchus* spp.）主要消耗肝脏脂肪作为能量维持生命活动，能耗较低；饥饿中后期主要以消耗肠系膜脂肪和肌肉脂肪作为能量维持生命活动[29]。冬季肌肉中脂肪酸的总量下降主要是由 SFA 和 MUFA 的含量大幅下降所导致。有研究表明水生动物在饥饿胁迫下主要利用体内不同组织脂肪中的 SFA 和 MUFA 供能，从而节约机体蛋白质与脂肪中的 PUFA 以维持重要的生命活动[30]。与养殖黑斑蛙相比，黑斑蛙肌肉中脂肪酸组成为单不饱和脂肪酸>多不饱和脂肪酸>饱和脂肪酸[21]，这可能与所摄食的饵料不同相关，本研究中棘胸蛙主要投喂黄粉虫，而养殖黑斑蛙饲养过程主要投喂人工配合饲料。棘胸蛙肌肉富含人体所必需的脂肪酸如亚油酸、亚麻酸，并且高于黑斑蛙[21]和中国林蛙[31]，其肌肉中的多不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸的比值为 0.42~1.64，高于世界卫生组织的建议值 0.4~0.5[32]，说明棘胸蛙的肌肉脂肪酸品质较高。

4　结论

棘胸蛙作为一种高档水产品，其富含氨基酸和脂肪酸，且营养均衡，是较为优质的蛋白质来源。季节变化对于棘胸蛙肌肉中营养成分的影响显著（$P<0.05$）。不同季节下棘胸蛙肌肉中粗脂肪和粗蛋白含量变化较大，均为冬季时含量最高；肌肉中氨基酸组成种类在不同季节相同，其中秋季棘胸蛙肌肉的总氨基酸含量（92.05±0.25）g/100 g、必需氨基酸含量（38.82±0.15）g/100 g 和鲜味氨基酸含量（35.02±0.17）g/100 g 均为最高；肌肉中脂肪酸组成种类在不同季节时不同，其中秋季棘胸蛙肌肉脂肪酸组成最为丰富，含有 18 种，其中饱和脂肪酸 7 种，单不饱和脂肪酸 4 种，多不饱和脂肪酸 7 种。秋季棘胸蛙肌肉中氨基酸和脂肪酸在含量和组成种类等方面均高于其余三个季节，因此，在后续针对棘胸蛙产品综合开发时可以优先考虑以秋季棘胸蛙肌肉为主。

参考文献

[1] 斯烈钢，富裕，李鸿鹏，等. 四明山脉溪流区水产经济动物棘胸蛙（*Paa spinosa*）成体形态性状对体质量和净体质量影响效应的性别差异[J]. 海洋与湖沼，2015，46(3)：679−686. [SI L G, FU Y, LI H P, et al. Sex-related differences reflected in the effect of morphological traits on body weight and net body weight of an economic animal, *Paa spinosa* in streams of siming mountains[J]. Oceanologia Et Limnologia Sinica, 2015, 46(3): 679−686.]

[2] 梅祎芸，叶容晖，宋婷婷，等. 浙江省棘胸蛙养殖现状及发展对策[J]. 浙江农业科学，2015，56(7)：1122−1125. [MEI Y Y, YE R H, SONG T T, et al. Current situation and development countermeasures of *Quasipaa spinosa* in Zhejiang Province[J]. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 2015, 56(7): 1122−1125.]

[3] 舒妙安. 棘胸蛙肌肉营养成分的分析（Ⅰ）一般营养成分的含量及脂肪酸的组成[J]. 浙江大学学报（理学版），2000(4)：433−437. [SHU M A. An analysis of the nutritive compositions in muscle of *Rana spinosa* Ⅱ. contents of normal nutrients and composition of fatty acids[J]. Journal of Zhejiang University (Science Edition), 2000(4): 433−437.]

[4] 舒妙安. 棘胸蛙肌肉营养成分的分析Ⅱ. 氨基酸及矿物元素的组成[J]. 浙江大学学报（理学版），2000(5)：553−559. [SHU M A. An analysis of the nutritive compositions in muscle of *Rana spinosa* Ⅱ. compositions of amino acids and mineral elements[J]. Journal of Zhejiang University (Science Edition), 2000(5): 553−559.]

[5] 毛剑婷，刘泽鹏，张盼，等. 不同饲料对棘胸蛙蝌蚪生长发育及变态率的影响[J]. 浙江农业科学，2017，58(9)：1610−1612. [MAO J T, LIU Z P, ZHANG P, et al. Effects of different diets on growth, development and metamorphosis rate of *Quasipaa spinosa tadpoles*[J]. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 2017, 58(9): 1610−1612.]

[6] 谢永广，张进，王怀昕，等. 不同营养水平与投喂频率对棘胸蛙蝌蚪生长的影响[J]. 水产养殖，2020，41(12)：27−32. [XIE Y G, ZHANG J, WANG H X, et al. Effects of different feed composition and feeding frequency on growth performance in tadpole of *Quasipaa spinosa*[J]. Journal of Aquaculture, 2020, 41(12): 27−

32.]
[7] MEHER B, ANDRÉ N, MOUNA F, et al. Effects of temperature, density and food quality on larval growth and metamorphosis in the north African green frog *Pelophylax saharicus*[J]. Journal of Thermal Biology, 2014, 45: 81−86.
[8] 李潇, 王玲, 张春晓, 等. 啤酒酵母粉替代部分鱼粉对牛蛙生长、抗氧化能力以及肝脏和肠道组织形态学的影响[J]. 动物营养学报, 2019, 31(4): 1864−1876. [LI X, WANG L, ZHANG C X, et al. Effects of partially replacing fish meal with brewer's yeast meal on growth, antioxidant capacity, and liver and intestine tissue morphology of bullfrog (*Rana* (*Lithobates*) *catesbeiana*)[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2019, 31(4): 1864−1876.]
[9] 中国国家标准化管理委员会, 国家食品药品监督管理局. GB 5009.3-2016 食品安全国家标准 食品中水分的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. [China National Standardization Administration Committee, State Food and Drug Administration. GB 5009.3-2016 National food safety standard. Determination of moisture in foods[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.]
[10] 中国国家标准化管理委员会, 国家食品药品监督管理局. GB 5009.6-2016 食品安全国家标准 食品中脂肪的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. [China National Standardization Administration Committee, State Food and Drug Administration. GB 5009.6-2016 National food safety standard. Determination of fats in foods[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.]
[11] 国家卫生和计划生育委员会. GB 5009.4-2016 食品安全国家标准 食品中灰分的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. [National Health and Family Planning Commission. GB 5009.4-2016 National food safety standard. Determination of ash in foods[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.]
[12] 中国国家标准化管理委员会. GB 5009.5-2016 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. [China National Standardization Administration Committee. GB 5009.5-2016 National food safety standard. Determination of protein in food[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.]
[13] 中国国家标准化管理委员会. GB 5009.124-2016 食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. [China National Standardization Administration Committee. GB 5009.124-2016 National food safety standard. Determination of amino acids in foods[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.]
[14] 中国国家标准化管理委员会. GB 5009.168-2016 食品安全国家标准 食品中脂肪酸的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. [China National Standardization Administration Committee. GB 5009.1168-2016 National food safety standard. Determination of fatty acids in foods[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.]
[15] PELLET P L, YOUNG V R. Nutritional evaluation of protein foods[M]. Tokyo: The United National University, 1980: 26-29.
[16] PASANEN S, KOSKELA P. Seasonal and age variation in the metabolism of the common frog, *Rana temporaria* L. in Northern Finland[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A:Comparative Physiology, 1974, 47(2): 635−654.
[17] 温安祥, 曾静康, 何涛. 棘腹蛙肌肉嫩度及营养成分的初步分析[J]. 四川动物, 2001(4): 211−212. [WEN A X, ZENG J K, HE T. Analysis on meat tenderness and nutritional composition of *Rana boulengeri*[J]. Sichuan Journal of Zoology, 2001(4): 211−212.]
[18] 刘丽, 刘楚吾, 林东年, 等. 泰国虎纹蛙与中国虎纹蛙肌肉的营养成分比较[J]. 水利渔业, 2008(3): 64−66. [LIU L, LIU C W, LIN D N, et al. Comparison of nutritional components in muscle of *Rana tigrina rugulosa* and *R. tigrina cantor*[J]. Journal of Hydroecology, 2008(3): 64−66.]
[19] 王彬彬, 张文革, 夏艳洁. 中国林蛙腿肉的营养成分分析与评价[J]. 经济动物学报, 2012, 16(2): 89−93. [WANG B B, ZHANG W G, XIA Y J. Evaluation of nutritional components in the muscle of *Rana chensinensis*[J]. Journal of Economic Animal, 2012, 16(2): 89−93.]
[20] 方卫东, 鲁康乐, 张春晓, 等. 豆粕替代鱼粉对牛蛙生长、体组成、消化酶活力及肝脏生化指标的影响[J]. 水产学报, 2016, 40(11): 1742−1752. [FANG W D, LU K L, ZHANG C X, et al. Effects of fish meal replacement by soybean meal on growth, body composition, digestive enzyme activities and hepatic biochemical indices of *Rana* (*Lithobates*) *catesbeiana*[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(11): 1742−1752.]
[21] 何志刚, 伍远安, 徐永福, 等. 野生与养殖黑斑蛙肌肉营养品质的比较分析[J]. 水产科学, 2019, 38(4): 506−513. [HE Z G, WU Y A, XU Y F, et al. Comparative analysis of muscle nutritional quality of wild and cultured *Rana* black speckled[J]. Fisheries Science, 2019, 38(4): 506−513.]
[22] 杨鲜, 祝慧凤, 王涛, 等. 重庆巫山等多地党参氨基酸及营养价值比较与分析[J]. 食品科学, 2014, 35(15): 251−257. [YANG X, ZHU H F, WANG T, et al. Comparative analysis of amino acid composition and nutritional value of roots of *Codonopsis pilosula* from Wushan and other growing regions in China[J]. Food Science, 2014, 35(15): 251−257.]
[23] 何志刚, 王冬武, 徐永福, 等. 黑斑蛙肌肉营养成分分析及评价[J]. 中国饲料, 2018(17): 74−77. [HE Z G, WANG D W, XU Y F, et al. Analysis and evaluation of nutrition composition in the muscle of *Rana nigromaculata*[J]. China Feed, 2018(17): 74−77.]
[24] 戴聪杰, 耿宝荣. 虎纹蛙的含肉率及蛙肉和蛙皮氨基酸组成分析[J]. 动物学杂志, 2003, 38(2): 60−64. [DAI C J, GENG B R. Composition of amino acids in the muscle and skin of *Hoplobatrachus rugulosa*[J]. Chinese Journal of Zoology, 2003, 38(2): 60−64.]
[25] 宋昱鹏, 汪金海, 陈智威, 等. 周期性饥饿再投喂对长蛸存活、生长以及肌肉脂肪酸和氨基酸的影响[J]. 水生生物学报, 2020, 44(2): 372−378. [SONG M P, WANG J H, CHEN Z W, et al. Effects of cyclical starvation-refeeding on survival, growth, and muscle fatty acids, amino acids of *Octopus minor*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2020, 44(2): 372−378.]
[26] 牛永刚. 高山倭蛙冬眠的生理生化特征及分子机制 [D]. 兰州: 兰州大学, 2019. [NIU Y G. Physiological and biochemical characteristics and underlying molecular mechanisms of hibernation in *Nanorana parkeri*[D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2019.]
[27] SCAPIN S, BALDINI P, LULY P. Phospholipid and fatty acid composition of frog (*Rana esculenta*) liver —a circannual study[J]. Lipids, 1990, 25(8): 443−449.

［28］ FALKENSTEIN F, GEISER F, WATSON K, et al. Dietary fats and body lipid composition in relation to hibernation in free-ranging echidnas[J]. Journal of Comparative Physiology B, 2001, 171(3): 189−194.

［29］ 陈斌, 冯健, 吴彬, 等. 饥饿对太平洋鲑 (*Oncorhynchus* spp.) 鱼体脂肪与脂肪酸的影响[J]. 海洋与湖沼, 2012, 43(6): 1247−1253. ［CHEN B, FENG J, WU B, et al. the effects of starvation on fat and fatty acids composition in pacific salmon (*Oncorhynchus* spp.)[J]. Oceanologia Et Limnologia Ainica, 2012, 43(6): 1247−1253.］

［30］ 陈文静, 丁立云, 邓勇辉, 等. 饥饿胁迫对彭泽鲫幼鱼形体指标、肌肉脂肪酸组成和肝脏脂蛋白脂酶基因表达的影响[J]. 动物营养学报, 2020, 32(6): 2782−2790. ［CHEN W J, DING L Y, DENG Y H, et al. Effects of starvation stress on physical indices, muscle fatty acid composition and liver lipoprotein lipase gene expression of juvenile crucian carp (*Carassius auratus* var. Pengze)[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2020, 32(6): 2782−2790.］

［31］ 李妍妍, 郑卫星, 王日昕, 等. 林蛙营养成分的多元分析[J]. 食品科学, 2007(12): 472−475. ［LI Y Y, ZHENG W X, WANG R X, et al. Nutritive material of *Rana chensinensis* by multivariation analysis methods[J]. Food Science, 2007(12): 472−475.］

［32］ 罗钦, 黄敏敏, 任丽花, 等. 澳洲金鲈鱼种肌肉中氨基酸与脂肪酸组成的分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(11): 3607−3613. ［LUO Q, HUANG M M, REN L H, et al. Analysis on the amino acids and fatty acids compositions in muscle of juvenile Australian golden perch[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2020, 11(11): 3607−3613.］

窦彦丽,陈金鳌. 灵芝多糖结合有氧运动对高血脂症小鼠的降脂和抗氧化水平的影响 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 372−380. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090111

DOU Yanli, CHEN Jin'ao. Effects of *Ganoderma lingzhi* Polysaccharides Combined with Aerobic Exercise on Lipid-lowering and Antioxidant Levels in Hyperlipidemia Mice[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 372−380. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090111

·营养与保健·

灵芝多糖结合有氧运动对高血脂症小鼠的降脂和抗氧化水平的影响

窦彦丽[1],陈金鳌[2]

(1.吕梁学院体育系,山西吕梁 033001;
2.常州大学体育学院,江苏常州 213164)

摘　要:探究灵芝子实体多糖联合有氧运动对高脂小鼠的降脂和抗氧化水平的影响。采用水提醇沉提法提取灵芝子实体粗多糖，然后通过去蛋白、分离纯化得到灵芝多糖纯品（*Ganodema lingzhi* polysaccharide，GLP），经电镜扫描和傅里叶红外光谱法分析 GLP 的结构特征，通过高脂饲料饲喂构建高脂小鼠模型，分别设置正常喂养组（Control group，CG）、高脂喂养组（High-fat diet group，HD）、灵芝多糖组（*Ganodema lingzhi* polysaccharide group，GLP）、有氧运动组（Aerobic exercise control group，AE）和灵芝多糖结合有氧运动组组（GLP/AE），GLP 组和 GLP/AE 组进行灵芝多糖灌胃，剂量为 2.0 g/kg/d，其余组灌胃相同量的生理盐水，AE 组和 GLP/AE 组进行有氧跑台运动，1 h/d，每周 5 d。经过为期 8 周的有氧跑台训练后，分别测定各组小鼠血清中甘油三酯（TG）、总胆固醇（TC）以及高密度脂蛋白胆固醇（HDL-C）和低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）的浓度，同时测定血清中超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）、过氧化氢酶（catalase，CAT）、谷胱甘肽过氧化物歧化酶（glutathione peroxide dismutase，GSH-Px）的活力和丙二醛（malondialdehyde，MDA）含量，并对各组小鼠肝脏组织进行病理学观察。结果表明，灵芝多糖呈现不规则的片状结构，表面不光滑，有斑点状凸起和凹陷，其异头碳为 β 构型。8 周的高脂饲料饲喂后，HD 组小鼠的体重较 CG 组增加了 32.95%，肝脏重量增加了 40.19%，TG、TC 以及 LDL-C 皆出现显著性升高，而内源性抗氧化酶系活力则显著降低，说明脂质过氧化引发的氧化压力对小鼠造成了损伤，HD 组小鼠动脉粥样硬化指数较 CG 组显著升高（$P<0.05$）；GLP、AE 和 GLP/AE 组其小鼠血清内 TC、TG、LDL-C 都出现明显降低，而 HDL-C 含量则均增加，其中有氧运动联合灵芝多糖干预能够显著降低血脂，使得 TG、TC 和 LDL-C 含量分别降低 55.79%，22.54% 及 62.52%；另外，与 HD 组相比，灵芝多糖组、有氧运动组、灵芝多糖结合有氧运动组均能够重塑内源性抗氧化酶系活力，清除 MDA，进而减少肝脏细胞中脂滴数量，从而减轻脂肪变性程度。由此可见，有氧运动联合补充灵芝多糖对小鼠有明显的降血脂作用，同时还能增强小鼠对脂质过氧化引发的氧化损伤的抵御能力。灵芝多糖有望作为一种减肥降脂的产品开发，灵芝多糖联合有氧运动干预则是预防及辅助治疗高血脂症的潜在途径。

关键词:灵芝,多糖,有氧运动,高血脂症,抗氧化
中图分类号:R285.5; G804.2　　**文献标识码:**A　　**文章编号:**1002−0306(2022)09−0372−09
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090111
本文网刊:

Effects of *Ganoderma lingzhi* Polysaccharides Combined with Aerobic Exercise on Lipid-lowering and Antioxidant Levels in Hyperlipidemia Mice

DOU Yanli[1], CHEN Jin'ao[2]

(1.Department of Physical Education, Lvliang College, Lvliang 033001, China;
2.College of Physical Education, Changzhou University, Changzhou 213164, China)

收稿日期: 2021−09−08
基金项目: 2019 山西省高等学校科技创新项目（2019L0973）;2019 吕梁市科技局课题（2019SHFZ73）。
作者简介: 窦彦丽（1981−）,女,硕士,副教授,研究方向:体育社会学,体质研究,E-mail:douyanli81@163.com。

Abstract: To explore the effects of *Ganoderma lingzhi* fruiting body polysaccharide combined with aerobic exercise on the lipid-lowering and antioxidant levels of high-fat mice. The crude polysaccharide of *Ganoderma lingzhi* fruit body was extracted by water extraction and alcohol precipitation, and then purified by deproteinization, separation and purification to obtain pure *Ganoderma lingzhi* polysaccharide (GLP). The structural characteristics of GLP were analyzed by scanning electron microscope and Fourier infrared spectroscopy. A high-fat mouse model was constructed by feeding high-fat diets, including normal feeding group (CG), high-fat diet group (HD), *Ganoderma lingzhi* polysaccharide group (GLP), Aerobic exercise control group (AE) and *Ganoderma lingzhi* polysaccharide and aerobic exercise combined group (GLP/AE), GLP group and GLP/AE group were given *Ganoderma lingzhi* polysaccharide gavage at a dose of 2.0 g/kg/d, and the rest groups were given the same amount of normal saline, and the AE group and GLP/AE group were given aerobic treadmill exercise, 1 h/d, 5 d a week. After 8 weeks of aerobic treadmill training, the concentrations of triglyceride (TG), total cholesterol (TC) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) in the serum of each group of mice were measured. The activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxide dismutase (GSH-Px) and malondialdehyde (MDA) contents, and pathological observations were made on the liver tissues of mice in each group. The result showed *Ganoderma lingzhi* polysaccharide presented an irregular sheet structure, the surface was not smooth, there were spot-like protrusions and depressions, and its anomeric carbon was in the β configuration. After 8 weeks of high-fat diet, the weight of the HD group increased by 32.95% and the liver weight increased by 40.19% compared with the CG group. TG, TC, and LDL-C all increased significantly, while the endogenous resistance The activity of the oxidase system was significantly reduced, indicating that the oxidative stress caused by lipid peroxidation caused damage to the mice. The atherosclerosis index of the HD group was significantly higher than that of the CG group (P<0.05); GLP, AE and GLP/AE group, the serum levels of TC, TG, and LDL-C in mice were significantly reduced, while the content of HDL-C increased. Among them, aerobic exercise combined with *Ganoderma lingzhi* polysaccharide intervention could significantly reduce blood lipids, reducing the content of TG, TC and LDL-C by 55.79%, 22.54% and 62.52%, respectively. In addition, compared with the HD group, the *Ganoderma lingzhi* polysaccharide group, aerobic exercise group, and *Ganoderma lingzhi* polysaccharide combined with aerobic exercise group could reshape the activity of endogenous antioxidant enzymes, clear MDA, and reduce lipid droplets in liver cells and the degree of fatty degeneration. It could be seen that the combination of aerobic exercise and supplementation of *Ganoderma lingzhi* polysaccharides had a significant effect on lowering blood lipids in mice, and at the same time can enhance the resistance of mice to oxidative damage caused by lipid peroxidation. *Ganoderma lingzhi* polysaccharide was expected to be developed as a weight loss and lipid-lowering product. *Ganoderma lingzhi* polysaccharide combined with aerobic exercise intervention was a potential way to prevent and assist the treatment of hyperlipidemia.

Key words: *Ganodema lingzhi*; polysaccharides; aerobic exercise; hyperlipidemia; anti-oxidation

进入 21 世纪后，我国经济呈现高速发展，居民的饮食结构也随之发生了较大变化，由低脂饮食转向高脂肪饮食[1]。高脂饮食最显著的特点之一就是其中包含大量的饱和脂肪酸，而伴随饱和脂肪酸的大量摄入，高脂血症的发病率出现了显著提升[2]。现代临床医学研究显示，高血脂症诱导的脂质代谢异常是导致动脉粥样硬化最主要的影响因素，当血脂过高时，大量脂质会沉积在机体动脉，从而导致动脉粥样硬化。动脉粥样硬化会引起血管管腔狭窄，是引起心脑血管疾病发生、发展的重要危险因素[3−5]。因此，如何科学健康的饮食，预防心脑血管疾病的发生，愈发受到相关学者的关注。

灵芝（*Ganodema lingzhi*）在我国栽培历史悠久，针对其药理作用的论述颇多[6−8]。大量研究表明，多糖是灵芝的主要活性物质，相关研究证实，灵芝多糖具有降血脂、免疫调节、抗氧化及防辐射等生理活性[9]。有氧运动是一种不间断且连续时间较长的中等强度的运动[10]。相关研究证实，在脂肪氧化分解的过程中，脂肪酶的活性会随着有氧运动时间的增加而上升，随之而来的效应是有氧运动可以促进脂肪代谢，减少脂肪堆积所带来的病症[11]。但是，相较于运动控食相结合，单纯依靠节食和运动在减肥降脂方面的效果则不甚理想[12]。基于以上分析，本实验采用热水浸提法提取灵芝子实体粗多糖，然后去蛋白、分离纯化得到灵芝多糖纯品。采用高脂饲料饲喂法构建高血脂症小鼠模型，通过灌胃灵芝多糖结合有氧运动，评价其对小鼠高血脂症的缓解作用。获得的实验数据能够为人工栽培灵芝的药理作用研究提供支撑，以期为灵芝多糖的降血脂作用研究及其在食品和医药领域的开发和应用利用提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

灵芝子实体　金华寿仙谷药业有限公司主栽灵芝品种仙芝 2 号的灵芝子实体，经张蕾[13] 鉴定为赤灵芝（*Ganodema lingzhi*）。栽培模式：青冈树段木栽培（批号：20190625）；昆明小鼠 60 只（SPF 级，雄性，4 周龄），体质量 14~16 g　购自北京维通利华实验动物技术有限公司，许可证号：SCXK（京）2016-0011；小鼠高脂饲料（含有 1.5% 的胆固醇和 34% 的蔗糖，编号 D12451）、小鼠普通饲料（编号 D12450B）、玉米芯垫料（编号：D12453C）　均购自成都达硕实验动物有限公司。

DEAE 纤维素 DE-52 柱(货号: S14024-500 g)源叶生物; 甘油三酯(TG)试剂盒(批号: A054-1-1)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)试剂盒(批号: A082-3-1)、总胆固醇(T-CHO)试剂盒(批号: A032-1-1)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)试剂盒(批号: A016-1-1)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(批号: A001-3)、过氧化氢酶(CAT)试剂盒(批号: A007-1-1)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒(批号: A006-2-1)、丙二醛(MDA)试剂盒(批号: A003-1-2)均购自南京建成生物工程研究所; 无水乙醇(CAS 号: 64-17-5)、甲醛溶液(CAS 号: 67-56-1)、磷酸盐缓冲液(PBS, 货号: 17202)等试剂 均购自于西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司; 其余实验涉及试剂均为分析纯级。

FD-1B-50 真空冷冻干燥机(冷凝温度−50 ℃)上海继谱; Multiskan GO 酶标仪 Thermo 赛默飞; 离子溅射仪 英国 Quotrue;FEG 250 型扫描电镜 美国 Quanta; IX73 倒置显微镜 日本 Olympus; N1200-B 旋转蒸发仪 东京理化; VOSHIN-1000W 超声波清洗器 无锡沃信; XR-PT-10A 型动物实验跑台(跑道长 580 mm、宽 85 mm、高 120 mm) 上海欣软信息科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 灵芝多糖的提取 参考熊川等[14]的方法提取灵芝子实体多糖。将灵芝子实体置于 37 ℃ 烘箱中恒温鼓风干燥 12 h, 干燥后的灵芝子实体切片, 用中药材粉碎机粉碎, 过 60 目塞(孔径 0.25 mm)。称取 1000 g 灵芝子实体粉末, 加入 20 L 95% 的乙醇浸泡过夜脱脂, 离心除去浸泡液, 粉末自然风干。已脱脂的灵芝子实体粉末中加入蒸馏水(料液比为 1∶30), 95 ℃ 水浴 8 h, 5000 r·min^{-1} 离心后收集上清液, 重复操作 3 次, 获得足量上清液后减压蒸馏浓缩。浓缩产物中加入无水乙醇醇沉(料液比 1∶9), 醇沉 12 h。5000 r·min^{-1} 离心收集醇沉产物并用适量蒸馏水溶解, 进一步通过 Savage 法除蛋白。配制 Savage 试剂(氯仿∶正丁醇=4∶1, V/V)并加入到粗多糖溶液中, 振荡后静置分层, 收集上层液体, 重复操作直至蛋白除尽, 除蛋白后的产物减压蒸馏浓缩, 经 7500 Da 分子量透析袋流水透析, 去除小分子杂质, 截留透析液并冷冻干燥得到灵芝粗多糖。

1.2.2 灵芝多糖分离纯化 称取方法 1.2.1 冷冻干燥后得到的灵芝粗多糖样品 25 g, 加入无菌蒸馏水 250 mL, 充分溶解后, 4000 r·min^{-1} 条件下离心 5 min, 去掉下层沉淀, 将上清液再经 0.45 μm 膜过滤, 随之加入到柱层析 DEAE 纤维素 DE-52 柱中分离, 洗脱液为 0.5 mol·L^{-1} NaCl, 洗脱速度为 1.5 mL/min, 多管收集, 每管 10 mL, 在 45 ℃ 条件下将收集的洗脱液通过旋转蒸发浓缩, 浓缩至 50 mL, 再将浓缩液在冷冻干燥机上进行冷冻干燥, 得到多糖样品备用。称取冷冻干燥后的样品, 溶解于无菌蒸馏水中, 配制成 25 mg·mL^{-1} 的多糖溶液, 再将溶液上样到 Sephad 凝胶柱(2.6 cm×100 cm)进行分离, 洗脱液为 0.1 mol·L^{-1} NaCl, 流速为 0.5 mL·min^{-1}, 分管连续收集 30 管, 每管收集 10 mL, 苯酚硫酸法在 490 nm 处测定吸光值检测样品多糖含量[15], 45 ℃ 旋转蒸发浓缩, 冷冻干燥得到多糖纯品。

1.2.3 多糖形貌观察 取质量为 1 mg 的灵芝多糖置于附有铜胶带的样品台, 通过离子溅射仪在多糖样品表面镀上一层导电金粉, 然后置于扫描电镜下观察。样品在 20.0 kV 加速电压下进行检查[16], 选择清晰的视野 100 倍拍照。

1.2.4 多糖红外光谱分析 参考彭天祥等[17]使用傅立叶红外光谱仪对灵芝纯化多糖的功能基团进行分析, 扫描参数: 扫描范围 4000~500 cm^{-1}, 扫描 32 次, 分辨率为 4 cm^{-1}。

1.2.5 小鼠饲喂与处理 将 60 只昆明小鼠用普通饲料适应性饲养 1 周, 1 周后再分为 5 组, 每组 12 只。依次设定为正常喂养组(Control group, CG)、高脂喂养组(High-fat diet group, HD)、灵芝多糖组(*Ganodema lingzhi* polysaccharide group, GLP)、有氧运动组(Aerobic exercise control group, AE)和灵芝多糖与有氧运动联合组(*Ganodema lingzhi* polysaccharide combined with aerobic exercise control group, GLP/AE)。其中 CG 组饲喂普通饲料, 其余 4 组饲喂高脂饲料, 持续饲喂 3 周建模。依据预实验的结果, 从第 4 周开始进行多糖灌胃和有氧运动, 其中 GLP 和 GLP/AE 组进行灵芝多糖灌胃, 剂量为 2.0 g/kg/d, 用无菌蒸馏水配制, 灌胃体积 1 mL, 其余组灌胃相同量的生理盐水。另外, AE 组和 GLP/AE 组进行跑台运动, 每天持续运动 1 h, 速度 10 m/min, 跑台坡度 0°, 每周 5 d, 周一至周五上午 10 点开始, 实验进行 8 周, 在此期间所有小鼠自由饮水和进食。

1.2.6 样品收集与指标检测 实验处理结束后, 小鼠禁食 12 h(正常饮水), 腹部注射 2% 戊巴比妥钠溶液麻醉小鼠, 采用引颈法处死小鼠, 摘取眼球并及时取血, 血液常温存放 2 h, 后于 4 ℃ 下, 3000 r·min^{-1} 离心 15 min, 分离血清, 将血清转移至新 EP 管中并于 −80 ℃ 条件下保存, 备用; 解剖摘取小鼠肝脏组织, 用生理盐水漂洗 3 次, 用吸水纸吸干表面水分, 置于 −80 ℃ 下保存, 备用。测定小鼠肝脏的重量及肝脏系数(Liver index, LI)。

$$LI(\%) = \frac{M}{M_0} \times 100$$

式中, M 为小鼠肝脏组织重量, 单位为 g, M_0 为小鼠最终体重, 单位为 g。

取小鼠血清, 测定血清中抗氧化酶系活力, 包括 SOD、CAT、GSH-Px, 同时测定 MDA 的浓度; 血清中 TC、TG、HDL-C 和 LDL-C 的浓度, 在此基础上, 计算动脉粥样硬化指数(Atherosclerosis index, AI)。

$$AI = \frac{C_{TC} - C_{HDL-C}}{C_{TC}}$$

式中，C_{TC} 为血清中 TC 浓度，单位为 mmol·L^{-1}；C_{HDL-C} 为血清中 HDL-C 浓度，单位为 mmol·L^{-1}。

1.2.7　肝脏组织病理学观察　参考曹智[18]的方法进行肝脏组织染色制片。配制苏木精染液、伊红染液及 1% 的盐酸乙醇分化液。选定肝脏组织，在同一位置上切取组织块，修整成合适大小，流水冲洗 12 h，依次进行脱水透明，包埋修块，脱蜡复水、染色封片后，于光学显微镜下观察。

1.3　数据处理

所有实验重复三次，所得数据采用 SPSS 26.0 软件分析，采用均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，通过 t 检验，确认差异的显著性，以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2　结果与分析

2.1　灵芝多糖的电镜观察

冷冻干燥后的灵芝多糖得率为 3.54%，纯度 95.62%，灵芝多糖的表面结构如图 1，从图中可以看出其呈现不规则的片状结构，表面不光滑，部分表面呈纤维丝状，部分表面有凸起斑点，推测这些凸起斑点就是多糖粒子。张军等[19]观察到灵芝多糖表面有较多的皱褶，且表面有丝带状连接结构，另外金鑫等[20]观察到灵芝多糖呈现块状，块状中部分表面出现绒毛状，这些多糖的表面结构都与研究的灵芝多糖表面结构相似。

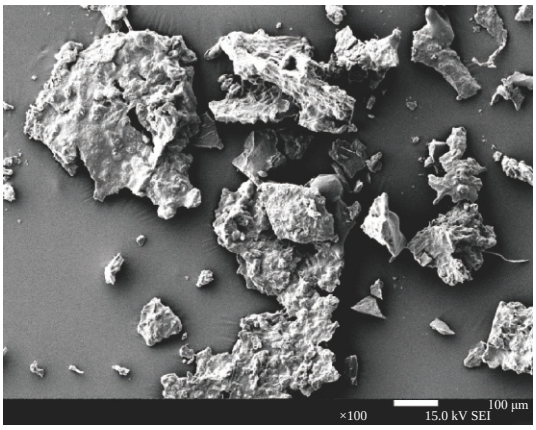


图 1　灵芝多糖的形貌观察

Fig.1　Morphology of the polysaccharide isolated from *Ganodema lingzhi*

2.2　灵芝多糖红外光谱分析

从图 2 可以看出，灵芝多糖样品的特征吸收峰主要出现在 3365、2927、1656、1407、1075、876 cm^{-1} 处。相较于其他特征吸收峰值，在 3365 cm^{-1} 处出现的特征吸收峰较宽，这是由 O-H 的伸缩振动引起，因为多糖分子内的羟基间形成的氢键从而使特征吸收峰变宽[21]；在 2927 cm^{-1} 处和1407 cm^{-1} 处出现的弱吸收峰是由 C-H 的伸缩振动和变角振动引起，这两个特征吸收峰是典型的糖类吸收峰，表明灵芝多糖内含有 -CH_2 和 -CH_3 基团[22]；在 1656 和 1075 cm^{-1} 处出现了 2 个较强的吸收峰，出现这两个吸收峰是由于多糖分子内 C-O伸缩振动引起，一种情况是 C-O-H 伸缩振动，另一种情况是出现了糖环键 C-O-C 伸缩振动[23]；876 cm^{-1}左右较小的吸收峰是典型的吡喃葡聚糖和 β-型糖苷键连接特征吸收峰，说明灵芝多糖含有 β-吡喃糖苷键[24]。该结果表明灵芝多糖的异头碳为 β 构型。

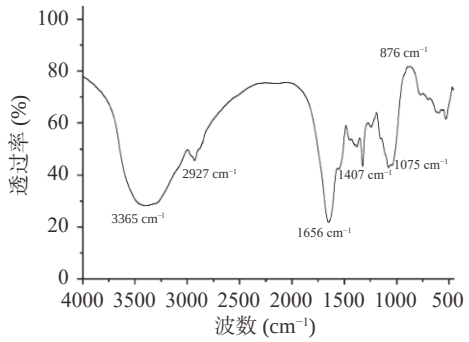


图 2　灵芝多糖红外光谱图

Fig.2　Infrared spectrum of *Ganodema lingzhi* polysaccharide

2.3　各组小鼠生长状态分析

试验期间，所有动物状态良好，未出现死亡情况。各组小鼠间均未出现异常情况，饮食饮水正常。在 1 周普通饲料适应性喂养后，发现 5 组小鼠间体重差异不显著（$P>0.05$），不会对后续试验和数据统计造成显著性差异，见表 1。在整个试验过程中，小鼠的体重逐步上升，通过高脂饲料饲喂组最先与其他各组出现显著差异（$P<0.05$），2 周时，高脂饲料组小鼠体重为（30.13±0.35）g，与正常饲喂组相比显著升高（$P<0.05$）。第 4 周时，正常喂养组与其他处理组都出

表 1　灵芝多糖联合有氧运动对小鼠体重的影响

Table 1　Effect of *Ganodema lingzhi* polysaccharides combined with aerobic exercise on body weight in mice

组别	实验前(g)	实验后(g)			
		2周	4周	6周	8周
正常喂养组(CG)	22.23±0.21^{a}	26.52±0.67^{b}	28.01±0.54^{c}	29.22±0.72^{d}	35.17±0.79^{d}
高脂喂养组(HD)	22.42±0.33^{a}	30.13±0.35^{a}	32.42±0.29^{a}	38.41±0.41^{a}	46.76±0.43^{a}
灵芝多糖组(GLP)	21.76±0.19^{a}	29.56±0.37^{a}	30.53±0.38^{b}	33.62±0.44^{b}	42.89±0.42^{b}
有氧运动组(AE)	21.67±0.24^{a}	29.72±0.34^{a}	30.63±0.41^{b}	34.28±0.36^{b}	41.92±0.39^{c}
灵芝多糖结合有氧运动组(GLP/AE)	22.52±0.37^{a}	29.88±0.54^{a}	29.98±0.35^{b}	31.16±0.51^{c}	36.62±0.79^{d}

注：同列中不同小写字母表示差异显著（$P<0.05$）；表2、表3同。

现显著性差异(P<0.05)，此外，与高脂饲养组相比，灵芝多糖组、有氧运动组及联合组均出现显著差异(P<0.05)。第 6 周时，高脂喂养组体重为(38.41±0.41)g，较正常组增加了 31.45%，灵芝多糖组和有氧运动组能够显著降低高脂小鼠的体重(P<0.05)，降幅分别为 12.47%和 10.75%，此外，6 周的灵芝多糖和有氧运动联合处理，使得小鼠体重降幅为 18.87%。在第 8 周时，与正常喂养组比较，高脂喂养组体重增加了 32.95%，灵芝多糖组体重增加了 21.95%，有氧运动组体重增加了 19.19%，有氧运动联合灵芝多糖组增加了 4.12%；相比高脂喂养组，灵芝多糖组、有氧运动组、灵芝多糖结合有氧运动组小鼠体重降幅分别为 8.27%、10.35%和 21.68%。可见，灵芝多糖和有氧运动均能显著降低小鼠的体重。

2.4 灵芝多糖联合有氧运动对高脂小鼠血脂水平的影响

灵芝多糖和有氧运动干预 8 周后，高脂小鼠的血脂水平如图 3 所示。高脂饲料组(HD)的小鼠，其 TC、TG 及 LDL-C 的含量显著高于普通饲喂组(CG 组)(P<0.05)，而 HDL-C 则显著低于 CG 组。灵芝多糖结合有氧运动组(GLP/AE)对 TC、TG 及 LDL-C 具有最好的清除作用，相较于 HD 组，其含量分别降低 55.79%，22.54% 及 62.52%，而 HDL-C 含量则增加了 21.23%。

本实验中，高脂喂养将小鼠的动脉粥样硬化指数显著提升(表 2)，相较于正常喂养组，增加了近 1 倍。相较于高脂喂养组，灵芝多糖和有氧运动都能够显著降低动脉粥样硬化指数(P<0.05)，联合干预组则具有最好的降低效果。

表 2 小鼠动脉粥样硬化指数

Table 2 The atherosclerosis index (AI) in mice

组别	动脉粥样硬化指数
正常喂养组(CG)	0.44 ± 0.05^{d}
高脂喂养组(HD)	0.84 ± 0.11^{a}
灵芝多糖组(GLP)	0.72 ± 0.08^{b}
有氧运动组(AE)	0.63 ± 0.07^{b}
灵芝多糖结合有氧运动组(GLP/AE)	0.56 ± 0.04^{c}

2.5 灵芝多糖联合有氧运动对高脂小鼠内源性抗氧化酶系活力的影响

高脂饲料的喂养引发小鼠的高血脂症，高血脂症的发生会对小鼠内源性抗氧化酶系的活力造成损伤。从图 4 中可以看出，相较于普通饲料的喂养(CG 组)，8 周的高脂饲料处理，使得小鼠体内的 SOD、CAT 和 GSH-Px 的活力依次降低为对照组的 52.23%±2.47%、43.75%±1.88% 和 50.56%±3.02%，而 MDA 的含量则显著上升(P<0.05)，为对照组的 262.68%±7.09%。灵芝多糖(GLP 组)、有氧运动(AE 组)及联合处理组(GLP/AE 组)都能重塑内源性抗氧化酶系的活力，其中，灵芝多糖(GLP 组)和联合处理(GLP/AE 组)效果较好。此外，有氧运动(AE 组)及联合处理组(GLP/AE 组)对 MDA 含量的降低效果较好。

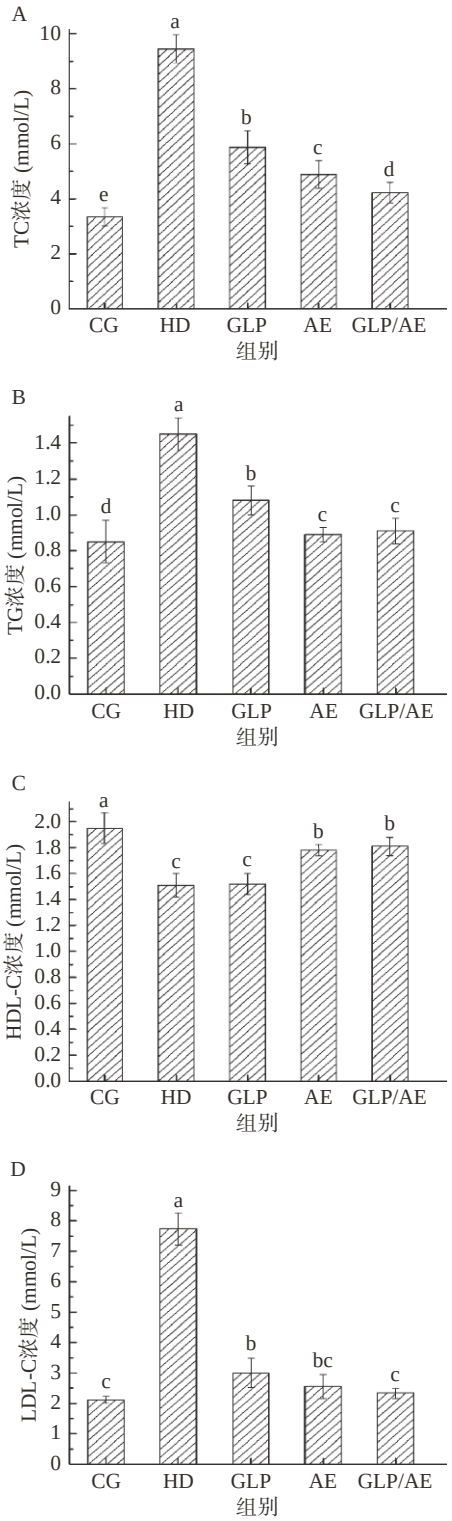


图 3 灵芝多糖联合有氧运动对高脂小鼠血脂水平的影响

Fig.3 Effect of *Ganoderma lingzhi* polysaccharide combined with aerobic exercise on the blood lipid level in hyperlipidemic mice

注：图中不同小写字母表示差异显著，P<0.05，图 4 同。

2.6 灵芝多糖结合有氧运动对高脂小鼠肝脏重量及肝脏系数的影响

处理 8 周后的小鼠的肝脏重量和肝脏系数如表 3

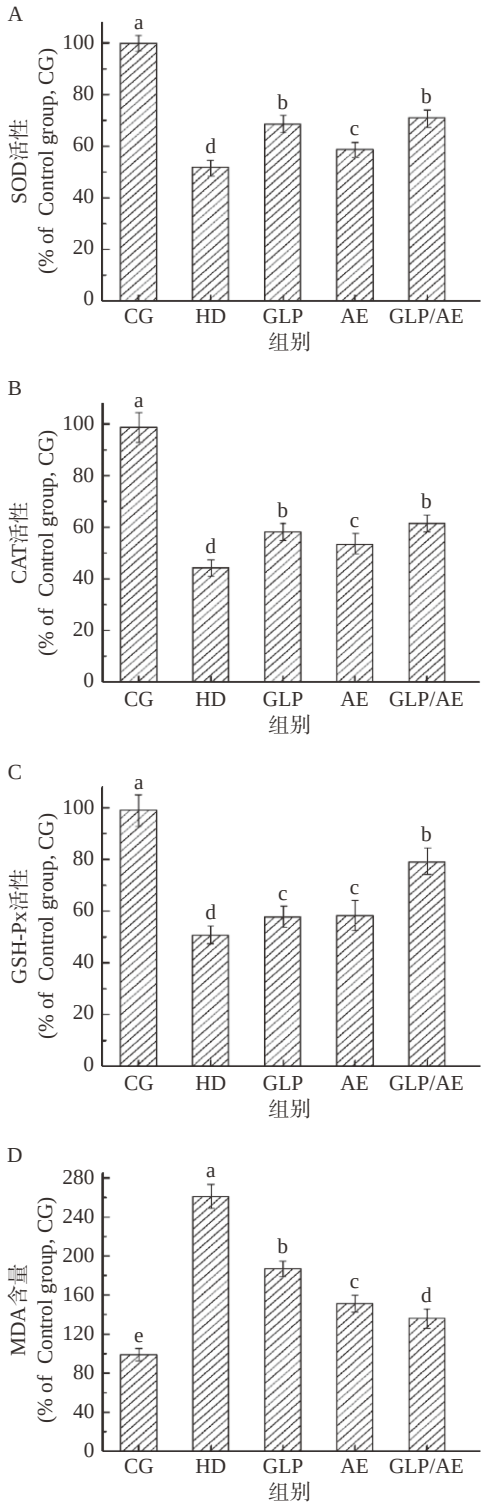


图 4　灵芝多糖联合有氧运动对高脂小鼠内源性抗氧化酶系活力的影响

Fig.4　Effect of *Ganoderma lingzhi* polysaccharide combined with aerobic exercise on the activity of endogenous antioxidant enzymes in hyperlipidemic mice

所示。高脂喂养组小鼠肝脏重量和肝脏系数皆显著高于正常组(P<0.05)，肝脏重量增加了 40.19%。灵芝多糖组小鼠肝脏重量也显著高于正常喂养组(P<0.05)，但显著低于高脂喂养组(P<0.05)，但灵芝多糖对高脂小鼠的肝脏系数未见明显影响。有氧运动组、灵芝多糖结合有氧运动组肝脏重量和肝脏系数均显著低于高脂喂养组(P<0.05)，表明高脂喂养组小鼠肝脏受到损伤，出现了充血或水肿的情况，灵芝多糖组、有氧运动组和联合组的肝系数分别较高脂喂养组降低了 1.40%、2.68% 和 4.80%，其中有氧运动组和联合组与高脂喂养组出现了显著差异(P<0.05)，表明灵芝多糖和有氧运动对高脂小鼠肝充血和肝肿胀具有明显改善作用。

表 3　小鼠肝脏重量与肝脏系数

Table 3　Liver weight and liver index in mice

组别	肝脏重量(g)	肝脏系数(%)
正常喂养组(CG)	1.02±0.05^{c}	38.82±1.23^{c}
高脂喂养组(HD)	1.43±0.10^{a}	41.02±1.01^{a}
灵芝多糖组(GLP)	1.31±0.11^{b}	40.45±0.92^{ab}
有氧运动组(AE)	1.10±0.08^{c}	39.92±0.87^{b}
灵芝多糖结合有氧运动组(GLP/AE)	1.15±0.09^{bc}	39.05±1.04^{b}

2.7　灵芝多糖联合有氧运动对高脂小鼠肝脏组织细胞病理切片的影响

小鼠肝脏组织经过苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin staining)后采用石蜡切片观察，结果如图 5 所示，正常喂养组(CG)的小鼠肝脏组织结构完整(图 5 A)，观测发现小鼠肝细胞形态及大小正常，细胞质均匀，未观测到脂肪变性，细胞内没有出现脂滴，几乎观察不到炎性细胞及细胞中的脂肪颗粒沉淀。高脂饲料处理后，小鼠肝细胞发生肿胀，细胞核偏移，细胞内出现大量的脂滴小空泡，提示肝脏脂肪变形较为严重(图 5 B)。通过灵芝多糖和有氧运动的干预，小鼠干细胞形态恢复正常，细胞内脂滴数量明显减少，脂肪变性程度减轻(图 5 C~E)，可见，补充灵芝多糖和有氧运动可以缓解或消除小鼠肝脏的炎症症状，并降低脂肪组织中的脂肪分解。

3　讨论

3.1　高脂饲料对小鼠高血脂症的影响

高脂饲料的饲喂使得小鼠的体重快速增长，第 2 周时的观测数据显示，所有处理组与正常喂养组皆存在显著性差异(P<0.05)，而处理组之间则未见显著性差异(P>0.05)，数据说明多糖或有氧运动的处理需要一定的持续时间，短期的作用并不能缓解小鼠体重的异常增长。此外，第 6 周时，灵芝多糖结合有氧运动组首次与多糖和运动单独处理组出现差异，第 8 周时，多糖组、有氧运动组及多糖结合有氧运动组首次分别出现差异，且效果逐渐增强，可以推测，有氧运动对于高脂小鼠体重异常增长的抑制作用缓慢但效果较多糖更好，二者联合处理则具有最好的效果。

饮食诱导的肥胖小鼠在一定程度上与人类单纯性肥胖的形成具有相似的发病机制，高脂饲料的喂养，会引起血脂升高及紊乱，进而诱发一系列心血管疾病。血清中 TC 或 TG 水平过高或血浆中 HDL-C 水平过低，极易诱导动脉内皮损伤，使得其通透性增高，加速 LDL-C 在血管内皮下沉积，进而加速了动

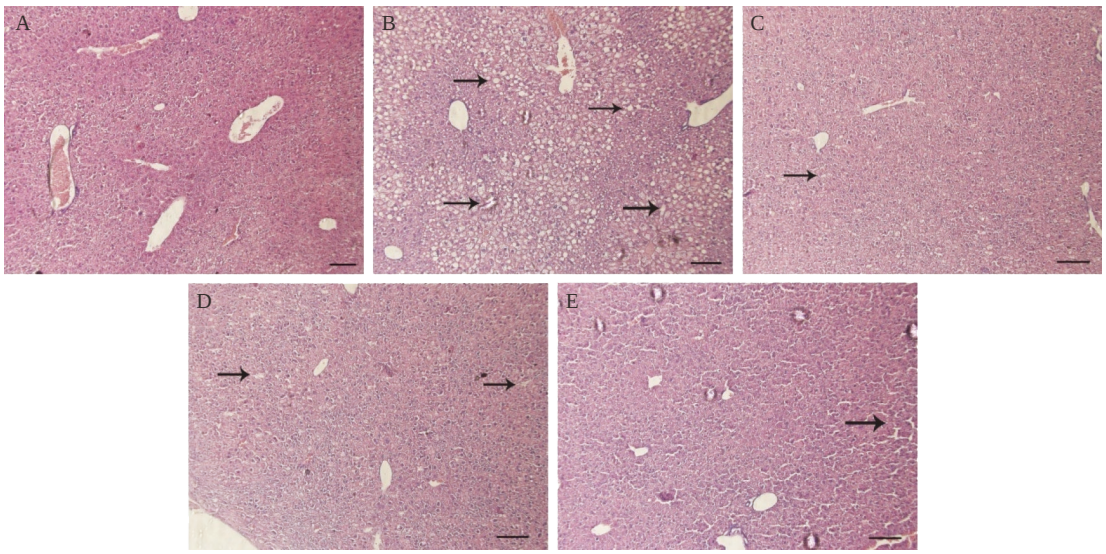


图 5 小鼠肝脏组织病理学变化(100×)

Fig.5 Pathology changes of liver in mice (100×)

注: 采用苏木精-伊红染色法处理; A. 正常喂养组 (CG), B. 高脂喂养组 (HD), C. 灵芝多糖组 (GLP), D. 有氧运动组 (AE), E. 灵芝多糖结合有氧运动组 (GLP/AE); 比例尺 50 μm。

脉硬化的形成[25]。已有研究证实, 血清中 TC 及 LDL-C 的水平过高是导致心血管疾病的独立危险因素, 临床研究确认, TC 和 LDL-C 水平的降低能有效地预防或减少心血管疾病的发生[26]。

此外, 低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)是人体内血浆固醇的主要载体, LDL-C 含量过高, 容易导致胆固醇在细胞内, 包括在血管内皮细胞的堆积, 这是导致动脉粥样硬化的主要原因之一[27]。AI 指数是评判、衡量动脉粥样硬化风险的指标, 其意义大于单项血脂指标[28]。本实验中, 所设定的干预(灵芝多糖组、有氧运动组、灵芝多糖结合有氧运动组)皆能降低动脉粥样硬化指数, 说明灵芝多糖和有氧运动对于高脂引发的动脉粥样硬化有一定的预防和治疗作用。

3.2 高血脂症的发生与氧化压力

生物体内源性抗氧化酶, 包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)以及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)等, 作为机体天然的抗氧化应激防御系统的核心部分而存在[29]。其中, SOD 水平反映了细胞内抗氧化酶系统的负荷, 可间接反映细胞内自由基的水平。由此推测, 长时间高脂饲料的喂养, 使得小鼠体内氧化压力升高, 此时小鼠细胞内的抗氧化酶系明显超过正常负荷, 通过灵芝多糖和有氧运动的处理, SOD 的活性部分得到恢复, 说明灵芝多糖和有氧运动能够清除自由基, 缓解高脂带来的氧化压力。GSH-Px 通常可作为细胞抗氧化防御的核心成分, 一般情况下是活性氧(ROS)的电子供体[30], 高脂饲料显著抑制了 GSH-Px 的活力, 而灵芝多糖及有氧运动能够部分恢复, 提示灵芝多糖及有氧运动可能作为另一种解毒系统, 从而影响 GSH 的代谢, 减轻高脂引起的氧化压力对机体的损伤。MDA 通常作为脂质过氧化的终产物, 一方面能够灵敏地反应机体脂质过氧化的水平, 另一方面, MDA 会改变细胞膜的通透性, 阻止细胞内外物质的流通, 从而造成高脂血症病情加重[31]。实验数据反应, 有氧运动组、灵芝多糖组和灵芝多糖结合有氧运动组均具有较好的 MDA 清除率。总体来看, 灵芝多糖在重塑酶活上效果更好, 而有氧运动的作用则主要体现在清除 MDA 上。

3.3 灵芝多糖与有氧运动对小鼠肝脏的影响

肝脏是机体能量代谢的中心器官, 脂肪代谢、蛋白质代谢及糖类物质等代谢途径中均有肝脏的参与, 肝脏在脂类的消化、吸收、运输、分解与合成等方面均起重要作用[32]。基于此, 很多代谢性疾病的发生都可归因于肝脏的病变。结合肝脏重量和肝脏系数分析可知, 高脂喂养组(HD)中的小鼠由于大量脂类物质的摄入, 肝脏已经出现了脂质代谢障碍, 出现肝脏脂肪沉积, 继而引发肝脏脂肪性病变。从能量代谢来讲, 有氧运动(AE)对 MDA 清除及肝脏中脂滴的减少上具有较好的作用; 而灵芝多糖(GLP)更多的是调节酶活, 从源头强化脂肪的代谢, 这与传统中医中灵芝“扶正固本”的描述一致[33]。因此, 本实验采用灵芝多糖结合有氧运动来对高脂小鼠进行降血脂的处理, 实质上起到了一种标本兼治的作用, 实验结果也显示, 灵芝多糖结合有氧运动具有最好的降脂效果。

4 结论

本实验提取分离纯化得到的灵芝子实体多糖, 通过高脂饲料喂养构建高血脂小鼠模型, 经过灵芝多糖和有氧运动干预后, 验证其对小鼠的降血脂和抗氧化作用。实验结果显示灵芝多糖能够重塑小鼠内源性抗氧化酶系活力, 增强小鼠对脂质过氧化引发的氧化损伤的抵御能力, 而有氧运动能够清除 MDA, 降低血液中 TC、TG 和 LDL-C 的含量, 升高 HDL-C 的含量, 二者联合干预则能够清除血脂, 降低动脉粥

样硬化指数，预防由于过量脂质摄入而引发的肥胖和高血脂症等疾病。因此，灵芝多糖有望作为一种减肥降脂的产品开发，而灵芝多糖结合有氧运动干预则能成为日常生活中预防“三高”的一种健康方式。

参考文献

[1] 杨栩，纪海玉，于娟，等. 一种新型复合多糖提取优化和降血脂活性的研究及其胆固醇结合力预测模型的建立[J]. 食品安全质量检测学报，2021，12(10)：4026−4033. [YANG X, JI H Y, YU J, et al. Study on the extraction optimization and hypolipidemic activities of a novel compound polysaccharides and the establishment of prediction model of cholesterol-binding capacity[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2021, 12(10): 4026−4033.]

[2] 王倩倩，王晓航，邱山虎，等. 运动对肥胖相关代谢异常的作用[J]. 中国实用内科杂志，2022，42(2)：102−106. [WANG Q Q, WANG X H, QIU S H, et al. Effects of exercise on obesity-related metabolic abnormalities[J]. Chinese Journal of Practical Internal Medicine, 2022, 42(2): 102−106.]

[3] 梁有峰，郭增，程宝山，等. 非高密度脂蛋白胆固醇与载脂蛋白 A-I 比值与冠状动脉慢血流相关性分析[J]. 中国心血管病研究，2022，20(2)：161−165. [LIANG Y F, GUO Z, CHENG B S, et al. Correlation analysis between non-high-density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein A-I ratio and coronary slow blood flow[J]. Chinese Cardiovascular Research, 2022, 20(2): 161−165.]

[4] ZHAO L Y, HUANG W, YUAN Q X, et al. Hypolipidaemic effects and mechanisms of the main component of *Opuntia dillenii* Haw. polysaccharides in high-fat emulsion-induced hyperlipidaemic rats[J]. Food Chem, 2012, 134(2): 964−971.

[5] JIANG C, WANG Q, WEI Y J, et al. Cholesterol-lowering effects and potential mechanisms of different polar extracts from *Cyclocarya paliurus* leave in hyperlipidemic mice[J]. J Ethnopharmacol, 2015, 176(March): 17−26.

[6] MENG L Z, XIE J, LV G P, et al. A comparative study on immunomodulatory activity of polysaccharides from two official species of *Ganoderma* (Lingzhi)[J]. Nutr Cancer, 2014, 66(7): 1124−1131.

[7] CAO Y, YUAN H S. *Ganoderma mutabile* sp. nov. from southwestern China based on morphological and molecular data[J]. Mycol Prog, 2013, 12(1): 121−126.

[8] 戴玉成，曹云，周丽伟，等. 中国灵芝学名之管见[J]. 菌物学报，2013，32(6)：947−952. [DAI Y C, CAO Y, ZHOU L W, et al. Notes on the nomenclature of the most widely cultivated *Ganoderma* species in China[J]. Mycosystema, 2013, 32(6): 947−952.]

[9] GOWRIE S U, CHATHURDEVI G, RANI K. Evaluation of bioactive potential of basidiocarp extracts of *Ganoderma lucidum* [J]. Int J Pharm Res All Sci, 2014, 3(1): 36−46.

[10] 周鸣. 有氧运动对肥胖大学生部分心血管疾病危险因素的影响 [D]. 南昌：华东交通大学，2017. [ZHOU M. The effect of aerobic exercise on some risk factors of cardiovascular disease in obese college students[D]. Nanchang: East China Jiaotong University, 2017.]

[11] MEYER A A, KUNDT G, LENSCHOW U, et al. Improvement of early vascular changes and cardiovascular risk factors in obese children after a six-month exercise program[J]. J Am Coll Cardiol, 2006, 48(9): 1865−1870.

[12] 高思垚，吕万刚，聂应军. 不同运动方式对中国超重或肥胖人群代谢指标影响的元分析[J]. 中国体育科技，2021，57(10)：46−54,69. [GAO S Y, LV W G, NIE Y J. Meta-analysis of the effects of different exercise methods on metabolic indicators in Chinese overweight or obese people[J]. China Sports Science and Technology, 2021, 57(10): 46−54,69.]

[13] 张蕾，王瑛，朱惠照，等. 赤灵芝新菌株“仙芝 2 号”的选育[J]. 食用菌学报，2014，21(1)：15−20. [ZHANG L, WANG Y, ZHU H Z, et al. Breeding of a new strain of *Ganoderma lucidum* "Xianzhi 2"[J]. Acta Edible Fungi, 2014, 21(1): 15−20.]

[14] 熊川，罗强，金鑫，等. 人工栽培灵芝中多糖的部分理化性质及免疫调节作用[J]. 微生物学通报，2018，45(4)：825−835. [XIONG C, LUO Q, JIN X, et al. Physiochemical properties immunoregulatory effects of the polysaccharides from *Ganodema lingzhi*[J]. Microbiol China, 2018, 45(4): 825−835.]

[15] 孙恬，郭爱玲. 蓝白光膜对灵芝田间生长、多糖含量及三萜含量的影响[J]. 生物化工，2019，5(1)：70−72,76. [SUN T, GUO A L. Effect of blue and white light film on the field growth, polysaccharide content and triterpene content of *Ganoderma lucidum*[J]. Biochemical Industry, 2019, 5(1): 70−72,76.]

[16] 秦利鸿，曹建波，易伟松. 绿茶多糖的扫描电镜制样新方法及原子力显微镜观察[J]. 电子显微学报，2009，28(2)：162−167. [TAI L H, CAO J B, YI W S. Polysaccharides distilled from green tea and the observation of ultrafine structure of them with atomic force microscope[J]. J Chin Electron Microsc Soc, 2009, 28(2): 162−167.]

[17] 彭天祥，张娟，张利，等. 梯棱羊肚菌多糖的理化性质及神经保护活性研究[J]. 现代食品科技，2019，35(9)：87−95. [PENG T X, ZHANG J, ZHANG L, et al. Study on the physicochemical properties and neuroprotective activity of polysaccharides from *Morchella typhimurium*[J]. Mod Food Sci Techno, 2019, 35(9): 87−95.]

[18] 曹智. 翅果油联合有氧运动对高脂饮食小鼠的降脂减肥作用 [D]. 太原：山西大学，2019. [CAO Z. Effect of decreasing obesity and lipid-lowering of *Elaeagnus mollis* oil with aerobic exercise in high fat diet-fed mice[D]. Taiyuan: Shanxi University, 2019.]

[19] 张军，段杉，全丽金，等. 连续相变萃取灵芝多糖动力学球状模型的建立及其结构特征[J]. 食品工业科技，2020，41(17)：114−120. [ZHANG J, DUAN S, QUAN L J, et al. Establishment of a kinetic spherical model of *Ganoderma lucidum* polysaccharide extraction by continuous phase change and its structural characteristics[J]. Sci Techno Food Ind, 2020, 41(17): 114−120.]

[20] 金鑫，熊川，李萍，等. 三株海南岛野生灵芝的鉴定、多糖组成及其抗氧化活性研究[J]. 天然产物研究与开发，2020，32(2)：190−199. [JIN X, XIONG C, LI P, et al. Identification, polysaccharide composition and antioxidant activity of three wild *Ganoderma lucidum* from Hainan Island[J]. Natural Products Res Dev, 2020, 32(2): 190−199.]

[21] 冯峰，杨淑玲，张奇，等. 霸王花不同部位粗多糖的结构组成及体外抗氧化活性[J]. 中国现代应用药学，2021，38(2)：189−195. [FENG F, YANG S L, ZHANG Q, et al. Structural composition and *in vitro* antioxidant activity of crude polysaccharides

from different parts of *Polygonum sibiricum*[J]. The Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2021, 38(2): 189−195.]

[22] 冯蒙蒙, 王海鸣, 杨惠成, 等. 灵芝孢子粉多糖的分离纯化、结构表征及免疫活性初探[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(5): 502−508. [FENG M M, WANG H M, YANG H C, et al. Isolation, purification, structural characterization and preliminary study of immunological activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* spore powder[J]. Journal of Food and Biotechnology, 2018, 37(5): 502−508.]

[23] LIU W, LV X, HUANG W H, et al. Characterization and hypoglycemic effect of a neutral polysaccharide extracted from the residue of *Codonopsis pilosula*[J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 198: 215−226.

[24] GUO L, XIE J H, RUAN Y Y, et al. Characterization and immunostimulatory activity of a polysaccharide from the spores of *Ganoderma lucidum*[J]. International Immunopharmacology, 2009, 9: 1175−1182.

[25] TUNNICLIFFE J M, ELLER L K, REIMER R A, et al. Chlorogenic acid differentially affects postprandial glucose and glucose-dependent insulinotropic polypeptide response in rats[J]. Appl Physiol Nutr Metab, 2011, 36(5): 650−659.

[26] 陈娟, 汪胡凤, 邓军, 等. 丹红注射液对高脂血症大鼠肝脏AMPK/SREBP-1/ACC 通路的影响[J]. 中国药理学通报, 2018, 34(4): 528−532. [CHEN J, WANG H F, DENG J, et al. Effect of Danhong injection on AMPK/SREBP-1/ACC pathways of liver in hyperlipidemic rats[J]. Chin Pharmacol Bull, 2018, 34(4): 528−532.]

[27] 于航, 杨志洛, 张宁, 等. 外周动脉斑块与冠状动脉粥样硬化程度的相关性及其预测价值[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2021, 13(7): 847−850. [YU H, YANG Z L, ZHANG N, et al. Correlation between peripheral arterial plaque and coronary atherosclerosis and its predictive value[J]. China Journal of Evidence-Based Cardiovascular Medicine, 2021, 13(7): 847−850.]

[28] GERACI G, ZAMUTO M, GAETANI R, et al. Relationship of a body shape index and body roundness index, with carotid atherosclerosis in arterial hypertension[J]. Nutrmetabcardiovas, 2019, 29(8): 822−829.

[29] MORRONE M, ASSIS A M D, ROCHA R, et al. *Passiflora manicata* (Juss.) aqueous leaf extract protects against reactive oxygen species and protein glycation *in vitro* and *ex vivo* models[J]. Food ChemToxicol, 2013, 60: 45−51.

[30] ZHU S, ZHAO L, FAN Y, et al. Interaction between TNF-*α* and oxidative stress status in first-episode drug-nave schizophrenia[J]. Psychoneuroendocrino, 2020, 114: 104595.

[31] FLEMMING N, BORG M B, BO N J, et al. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: Reference interval and effects of life-style factors[J]. Clin Chem, 1997(7): 1209−1214.

[32] MURASE T, NAGASAWA A, SUZUKI J, et al. Beneficial effects of tea catechins on diet-induced obesity: Stimulation of lipid catabolism in the liver[J]. Int J Obes Relat Metab Disord, 2002, 26(11): 1459−1464.

[33] 张群豪, 林志彬. 灵芝多糖 (GL-B) 对肿瘤坏死因子 *α* 和 *γ* 干扰素产生及其 mRNA 表达的影响[J]. 北京医科大学学报, 1999, 31(2): 179−183. [ZHANG Q H, LIN Z B. Effect of *Ganoderma lingzhi* polysaccharides B on TNF*α* and IFN*γ* production and their mRNA expression[J]. J Beijing Med Univ, 1999, 31(2): 179−183.]

尤丽, 党娅, 杨彬彦. 蓝莓花青素对 2 型糖尿病小鼠糖脂代谢的调节作用 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 381−388. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090155

YOU Li, DANG Ya, YANG Binyan. Regulation Effects of Blueberry Anthocyanins on Glucose-Lipid Metabolism in Type 2 Diabetic Mice[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 381−388. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090155

·营养与保健·

蓝莓花青素对 2 型糖尿病小鼠糖脂代谢的调节作用

尤　丽[1,2], 党　娅[1,2,3,*], 杨彬彦[1,2]

（1.陕西理工大学生物科学与工程学院, 陕西汉中 723000;
2.陕西省果业管理局秦巴山区蓝莓研究所, 陕西汉中 723000;
3.陕西省资源生物重点实验室, 陕西汉中 723000）

摘　要: 目的：探讨蓝莓花青素（Blueberry anthocyanins，BA）对 2 型糖尿病小鼠糖代谢、脂代谢的调节作用。方法：采用高脂高糖饮食联合腹腔注射链佐霉素（Streptozocin，STZ）建立 2 型糖尿病小鼠模型，设置正常组、模型组、阳性药物组（250 mg/kg）、蓝莓花青素组（300、200、100 mg/kg）。实验期间测定小鼠的进食量、饮水量、体重和空腹血糖值（Fasting blood-glucose，FBG）；连续灌胃给药 4 周后，分别测定小鼠葡萄糖耐量（Oral glucose tolerance test，OGTT）、糖化血红蛋白（Glycated hemoglobin，HbA1c）含量、血清胰岛素（Insulin，INS）、胰岛素抵抗指数（Homeostasis model assessment insulin resistance，HOMA-IR）和血脂相关指标。结果：与模型组小鼠相比，蓝莓花青素组可明显改善 2 型糖尿病小鼠多饮多食体重减轻的典型症状；改善小鼠的糖代谢水平，促进胰岛素的分泌，降低胰岛素的抵抗性；显著降低 2 型糖尿病小鼠的总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇含量，增加高密度脂蛋白胆固醇含量，且呈现一定的量效关系。结论：蓝莓花青素可通过控制糖尿病小鼠血糖浓度和胰岛素抵抗性途径，抑制血脂代谢异常，起到调节相关糖尿病指标的作用。

关键词: 蓝莓花青素, 2 型糖尿病, 糖代谢, 脂代谢, 胰岛素抵抗
中图分类号: TS202.1　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0381−08
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090155
本文网刊:

Regulation Effects of Blueberry Anthocyanins on Glucose-Lipid Metabolism in Type 2 Diabetic Mice

YOU Li[1,2], DANG Ya[1,2,3,*], YANG Binyan[1,2]

（1.College of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723000, China;
2.Shaanxi Province Fruit Industry Administration Qinba Mountain Blueberry Research Institute, Hanzhong 723000, China;
3.Shaanxi Provincial Key Laboratory of Resource Biology, Hanzhong 723000, China）

Abstract: Objective: To investigate the effects of blueberry anthocyanins (BA) on glucose metabolism and lipid metabolism in type 2 diabetic mice. Methods: The mice model of type 2 diabetes mellitus was established by high-fat and high-sugar diet combined with intraperitoneal injection of streptomycin (STZ), and the normal group, model group, positive drug group (250 mg/kg) and blueberry anthocyanin group (300, 200, 100 mg/kg) were set up. The food intake, water intake, body weight and fasting blood glucose (FBG) of mice were measured during the experiment. Oral glucose tolerance test (OGTT), glycated hemoglobin (HbA1c), serum insulin (INS), homeostasis model assessment insulin resistance (HOMA-IR) and blood lipid related indexes of mice were determined after 4 weeks of continuous intragastric administration. Results:

收稿日期: 2021−09−13
基金项目: 陕西省科技厅项目（2015SZS-15-02）; 陕西理工大学研究生创新基金项目（SLGYCX2016）。
作者简介: 尤丽（1995−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学, E-mail: 1224630450@qq.com。
*** 通信作者:** 党娅（1976−）, 女, 硕士, 副教授, 研究方向: 食品科学, E-mail: dangya@snut.edu.cn。

Compared with model group, blueberry anthocyanin group could significantly improve the typical symptoms of weight loss of type 2 diabetic mice with polydipsia, improve the glucose metabolism level of mice, promote the secretion of insulin and reduce insulin resistance. The contents of total cholesterol, triglyceride and low density lipoprotein cholesterol were significantly decreased in type 2 diabetic mice, while the contents of high density lipoprotein cholesterol were increased in a dose-effect relationship. Conclusion: Blueberry anthocyanins can inhibit dyslipidemia and regulate related diabetes indicators by controlling blood glucose concentration and insulin resistance pathway in diabetic mice.

Key words: blueberry anthocyanins; type 2 diabetes; glucose metabolism; lipid metabolism; insulin resistance

随着全球经济的高速发展，不健康的生活方式，如高热量饮食，加速了糖尿病（diabetes mellitus, DM）的蔓延，据国际糖尿病联盟预测，到 2045 年糖尿病患者人数将增加至 7 亿，成为继心血管疾病和恶性肿瘤后的第三大世界公共卫生问题[1]。糖尿病是由胰岛素作用抵抗或胰岛素分泌不足所引起的碳水化合物、脂肪、蛋白质代谢失调的综合征，伴随着患者体内长期高血糖及高血脂[2]，主要有 1 型糖尿病、2 型糖尿病和少数妊娠糖尿病、特殊类型糖尿病。1 型糖尿病主要是因为自身免疫破坏了胰岛 β 细胞，导致胰岛素分泌的绝对不足；2 型糖尿病是胰岛素分泌相对不足或受体受阻引起的，其中 90% 以上是 2 型糖尿病[3]。多年来治疗糖尿病的药物种类繁多，包括双胍、胰岛素、α-糖苷酶抑制剂、磺脲类等，但这些药物在治疗的同时伴随着一些不良影响，如体重增加、酸中毒、胃肠功能紊乱、肝细胞和胆汁淤积性肝等[4−5]。流行病学研究表明，饮食调整可以预防和缓解一系列以肥胖、血脂异常和高空腹血糖为特征的代谢异常。因此，由于其有效性和安全性，大量食用植物及其生物活性成分已被用于预防和治疗糖尿病及其并发症。

蓝莓因其富含花青素、多酚、有机酸等功能性植物化学成分，具有较强的抗氧化、抗炎、抗肥胖、抗增殖、降低血糖水平和预防心血管疾病等活性，被联合国粮农组织誉为世界五大健康水果之一[6−7]。蓝莓花青素是从蓝莓中提取的一种类黄酮的多酚色素，常由锦葵色素、飞燕草素、矢车菊素等花青素苷元与一个或多个葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖等通过糖苷键形成花青苷[8]。研究发现，若糖尿病病患每天摄入足量的蓝莓花青素，不仅能达到明显的降血糖效果，还能缓解由糖尿病引起的肥胖、炎症、心血管疾病等并发症的发生，这表明将花青素作为一种膳食营养素在预防和干预代谢综合征方面具有一定的潜力[9−10]。然而，对蓝莓花青素在降血糖、降血脂方面的研究限于初级阶段，并没有对体内实验及机理进行系统的研究，且市面上蓝莓功能产品多以缓解疲劳为主，用于预防和治疗糖尿病的产品很少[11]。因此，本研究以蓝莓花青素为原料，探讨蓝莓花青素对糖尿病小鼠糖代谢、脂代谢的调节作用，为预防和治疗糖尿病的天然降血糖功能性食品的开发提供一定参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

SPF 级雄性昆明小鼠（SCXK（陕）2020-001）65 只，体质量（20~25）g　购自西安恩斯维尔生物科技有限公司；饲料　购买于成都达硕实验动物有限公司（SCXK（川）2019-031）；普通饲料配方：玉米 73.5%，麦麸 20%，鱼粉 5%，谷粉 1%，食盐 0.5%；高脂饲料配方：普通饲料 66.5%，蔗糖 20%，胆固醇 2.5%，胆酸盐 1%，猪油 10%。

蓝莓花青素（纯度 98%）　杨凌萃健生物工程技术有限公司（CP190914）；盐酸二甲双胍片　上海普康药业股份有限公司；链脲佐菌素　美国 sigma 公司；柠檬酸、柠檬酸钠、葡萄糖　分析纯，天津市盛奥化学试剂股份有限公司；生理盐水、4% 多聚甲醛组织固定液　广州赛国生物科技有限公司；PBS 磷酸盐缓冲液　上海源叶生物科技有限公司；小鼠总胆固醇（Total cholesterol, TC）、甘油三酯（Triglyceride, TG）、高密度脂蛋白胆固醇（High density liptein cholesterol, HDL-C）、低密度脂蛋白胆固醇（Low-Density Lipoprotein Cholesterol, LDL-C）检测试剂盒　南京建成生物工程研究所；小鼠胰岛素（INS）ELISA 检测试剂盒、小鼠糖化血红蛋白（glycated hemoglobin glycosylated hemoglobin, HbA1c）ELISA 分析试剂盒　江苏晶美生物科技有限公司。

TGL-16M 型高速冷冻离心机、WTL-4K 型微型离心机　湖南湘仪离心机有限公司；NR-EW63WXA-H 型−20 ℃ 低温冰箱、MDF-C8V1 型−80 ℃ 超低温冰箱　Panasonic 日本松下；DSX-18L 型自动高压蒸汽灭菌器　上海博讯医疗生物仪器股份有限公司；DHP-9052 型电热恒温培养箱　上海一恒科学仪器有限公司；eppendorf 型移液器　德国 Eppendorf；ZX-60XZX 型制冰机　上海知信；SpectraMax M3 型全波长酶标仪　美国 Molecular Devices 公司；T6 式紫外可见分光光度计　北京普析通用仪器有限公司；GA-3 型血糖试条、GA-3 型血糖仪、一次性使用末梢采血针　三诺生物传感股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 糖尿病小鼠模型的建立　取 6 周龄，体重 20~25 g 雄性昆明小鼠 65 只适应性喂养 1 周（（24±1）℃、12 h 昼/夜循环），使用正常饲料饲喂小鼠。观察生长情况，自由饮食饮水。随机抽样的方法，将小鼠分正常组（基础饲料饮食组 10 只）、实验组（高脂饲料饮食组 55 只），喂养 4 周。禁食不禁水 8 h 后称量小鼠体重，根据体重计算 STZ 注射量。实验组连续 3 天腹腔注射 STZ 缓冲液（50 mg/kg），注射体积为

0.5 mL/100 g，正常组注射同剂量柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液，造模期间自由摄食、饮水[12]。待稳定 72 h 后禁食不禁水 8 h，用血糖仪以尾静脉针刺的采血方法，测定小鼠的空腹血糖（FBG），选取空腹血糖值大于 11.1 mmol/L 的小鼠进行实验[13]。

1.2.2　分组、给药　将造模成功的小鼠随机分为 5 组，参考文献等效剂量换算[14]，分组及灌胃给药情况如下：正常对照组 8 只（Normal Control Group，NC）、模型对照组 8 只（DM）灌胃等量生理盐水；阳性药物组 8 只（Metformin，MET）灌胃 250 mg/kg 盐酸二甲双胍溶液；蓝莓花青素高剂量组（BA-H）、中剂量组（BA-M）和低剂量组（BA-L）每组 8 只分别灌胃 300、200、100 mg/kg 蓝莓花青素。灌胃时以 0.1 mL/10 g 为标准进行灌胃，每周根据每只小鼠的体重调整灌胃剂量，连续给药 4 周[15]。

1.2.3　检测指标

1.2.3.1　一般指标观察　实验期间，每天观察小鼠活动、生长、排便情况，记录小鼠每日的进食量、饮水量，每周测量小鼠体重一次。

1.2.3.2　空腹血糖（FBG）浓度测定　造模前记录每组小鼠空腹血糖值，造模成功后每周一次于固定时间测定各组小鼠空腹血糖值。

1.2.3.3　葡萄糖耐量（OGTT）测定　实验最后一周对小鼠进行口服糖耐量测定。小鼠禁食不禁水 8 h 后，灌胃 2 g/（kg·bw）的葡萄糖水溶液（按照 w/v 为 40% 配制），然后分别在第 0、30、60、120 min 时测定小鼠血糖值并记录[16]。根据测定结果计算血糖曲线下面积（Area Under Curve，AUC），比较糖耐量水平，公式如下[17]：

$$AUC = \frac{0.5A + B + C + 0.5D}{2}$$

式中：A：0 min 血糖值；B：30 min 血糖值；C：60 min 血糖值；D：120 min 血糖值。

1.2.3.4　血清中糖化血红蛋白（HbA1c）的测定　实验结束后对小鼠进行眼眶静脉取血，血液收集在 10 mL 的离心管中，静置 4 h 后，4 ℃ 下以 4000 r/min 离心 15 min，取上层血清，分装于−20 ℃ 冰箱保存。

使用糖化血红蛋白 ELISA 分析法，按照试剂盒操作步骤，用酶标仪进行测定。

1.2.3.5　血脂相关指标检测　同 1.2.3.4 取血清。测定血清中总胆固醇（TC）、甘油三酯（TG）、高密度脂蛋白胆固醇（HDL-C）、低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C），严格按照试剂盒操作步骤，用酶标仪进行测定。

1.2.3.6　血清胰岛素（INS）含量及胰岛素抵抗指数（HOMA-IR）计算的测定　同 1.2.3.4 取血清。使用胰岛素 ELISA 检测法，按照试剂盒操作步骤，用酶标仪进行测定。

$$HOMA-IR = \frac{空腹胰岛素(mIU/L) \times 空腹血糖(mmol/L)}{22.5}$$

1.3　数据处理

采用 SPSS 25.0、GraphPad Prism8.0 软件对实验数据进行统计分析处理，计量数据用均值±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。采用单因素方差分析法（ANOVA）进行多组间差异显著性分析，$P<0.01$ 表示差异极显著，$P<0.05$ 表示差异显著。

2　结果与分析

2.1　蓝莓花青素对 2 型糖尿病小鼠基础生理指标的影响

2.1.1　蓝莓花青素对 2 型糖尿病小鼠进食量的影响

小鼠进食量结果如表 1 所示，正常组小鼠在给药期间进食量基本保持稳定，与第 0 周相比无显著差异。与正常组健康小鼠相比，2 型糖尿病小鼠的进食量极显著增加（$P<0.01$）。多食是糖尿病的典型症状之一，因此与观察到的结果相一致。与模型组小鼠相比，各给药组进食量均下降，第 4 周达到显著水平（$P<0.05$），且蓝莓花青素高剂量组下降效果基本与药物组持平。综上结果分析，随着药物干预时间的延长，蓝莓花青素能够改善 2 型糖尿病小鼠进食量增加的状况。

2.1.2　蓝莓花青素对 2 型糖尿病小鼠饮水量的影响

小鼠饮水量结果如表 2 所示，正常组小鼠日饮水量基本保持恒定，模型组、药物组、蓝莓花青素高、中、剂量组日饮水量均极显著高于正常对照组（$P<0.01$），差异具有统计学意义。经过四周饮食干预后，蓝莓花青素高、中、低剂量组小鼠饮水量与模型组相

表 1　蓝莓花青素对糖尿病小鼠进食量的影响（$\bar{x}\pm s$，n=8）

Table 1　Effects of blueberry anthocyanins on feed consumption in diabetic mice ($\bar{x}\pm s$, n=8)

分组	进食量(g)				
	0周	1周	2周	3周	4周
正常组	54.03±0.69	54.66±0.74	56.36±1.24	57.73±1.70	54.96±1.66
模型组	77.60±0.42$^{\#\#}$	79.65±1.88$^{\#\#}$	79.95±2.14$^{\#\#}$	80.10±0.92$^{\#\#}$	79.26±1.21$^{\#\#}$
药物组	77.75±1.34$^{\#\#}$	73.30±1.13$^{\#\#}$	69.50±1.60$^{\#\#*}$	67.70±1.83$^{\#\#**}$	65.56±2.38$^{\#**}$
高剂量组	78.95±0.35$^{\#\#}$	74.80±1.83$^{\#\#}$	70.17±0.82$^{\#\#*}$	69.00±1.30$^{\#\#**}$	67.76±1.57$^{\#**}$
中剂量组	78.25±2.33$^{\#\#}$	75.15±0.49$^{\#\#}$	71.20±2.19$^{\#\#*}$	72.23±1.25$^{\#\#*}$	69.16±2.07$^{\#*}$
低剂量组	77.40±1.83$^{\#\#}$	76.70±1.52$^{\#\#}$	74.20±1.29$^{\#\#}$	72.33±1.85$^{\#\#}$	70.36±1.64$^{\#\#*}$

注：与正常组对比，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$；与模型组对比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；表2~表7同。

表 2 蓝莓花青素对糖尿病小鼠饮水量的影响($\bar{x}$±s, n=8)

Table 2 Effects of blueberry anthocyanins on drinking water in diabetic mice ($\bar{x}$±s, n=8)

分组	饮水量(mL)				
	0周	1周	2周	3周	4周
正常组	52.50±1.53	52.50±1.06	51.50±1.12	53.33±0.88	51.66±1.08
模型组	72.50±2.05$^{\#\#}$	76.50±1.50$^{\#\#}$	77.50±1.05$^{\#\#}$	76.50±1.15$^{\#\#}$	78.33±0.91$^{\#\#}$
药物组	75.00±1.00$^{\#\#}$	73.50±1.50$^{\#\#}$	69.50±1.50$^{\#\#*}$	66.50±1.50$^{\#**}$	63.33±1.88$^{\#**}$
高剂量组	72.50±2.50$^{\#\#}$	71.50±1.50$^{\#\#}$	70.50±0.82$^{\#\#*}$	69.00±2.04$^{\#*}$	64.3±2.11$^{\#**}$
中剂量组	74.00±1.41$^{\#\#}$	71.5±2.12$^{\#\#}$	69.00±1.41$^{\#\#}$	67.50±1.53$^{\#\#}$	66.00±2.11$^{\#*}$
低剂量组	71.00±1.00$^{\#\#}$	71.50±1.50$^{\#\#}$	70.00±1.07$^{\#\#}$	67.50±2.50$^{\#\#}$	67.50±0.50$^{\#*}$

比有所下降,其中蓝莓花青素高剂量组饮水增加量低于中、低剂量组,表明蓝莓花青素能够改善 2 型糖尿病小鼠饮水量增加的状况。

2.1.3 蓝莓花青素对 2 型糖尿病小鼠体重的影响

各组小鼠体重变化结果如表 3 所示,造模后各组小鼠的体重与正常组相比较差异不显著(P>0.05)。在蓝莓花青素干预的过程中,正常组小鼠体重增加了 6.13%,而模型组体重减少了 4.37%,且在第三周开始与正常组小鼠体重相比具有显著性差异(P<0.05),说明建模的成功。与模型组相比,蓝莓花青素低、中、高剂量组小鼠体重不存在显著性差异(P>0.05),体重增加速度相对缓慢,其中高剂量组体重增长的速度高于其他组,表明蓝莓花青素在促进小鼠体重的增加方面有积极的作用。

2.2 蓝莓花青素对 2 型糖尿病小鼠糖代谢的影响

2.2.1 蓝莓花青素对 2 型糖尿病小鼠空腹血糖(FBG)的影响 空腹血糖是指隔夜空腹后所检测的血糖值,是糖尿病最基础常用的检测指标,反映胰岛细胞功能和机体实时的血糖水平,但不能有效评价患者在一段时间内的血糖变化情况[18−19]。根据糖尿病的诊断标准,正常人空腹血糖在 3.9~6.1 mmol/L 之间,高于 7.0 mmol/L 则可能是糖尿病,高于 11.1 mmol/L 则被确诊为重度糖尿病[20]。

各组小鼠空腹血糖值变化如表 4 所示。由表可知,2 型糖尿病小鼠空腹血糖值均大于 11.1 mmol/L,且极显著高于正常对照组(P<0.01),表明糖尿病小鼠模型造模成功,且各组小鼠给药前空腹血糖值无显著差异(P>0.05)。各组小鼠连续灌胃给药四周后,正常组小鼠空腹血糖值保持在正常范围内,模型组血糖值持续保持在较高水平,与灌胃给药前无显著差异(P>0.05)。灌胃治疗四周后,蓝莓花青素高、中、低剂量组空腹血糖值与模型组相比分别下降了 27.66%、25.20% 和 20.74%,其中高剂量组与药物组盐酸二甲双胍的降糖效果基本一致,表明蓝莓花青素在一定剂量范围内有降血糖的功效,但并不能使其恢复至正常水平。

表 3 蓝莓花青素对糖尿病小鼠体重的影响($\bar{x}$±s, n=8)

Table 3 Effects of blueberry anthocyanins on body weight in diabetic mice ($\bar{x}$±s, n=8)

分组	体重值(g)				
	0周	1周	2周	3周	4周
正常组	49.12±2.01	50.18±1.30	50.72±0.99	51.36±1.38	52.13±1.12
模型组	50.13±0.74	49.86±1.55	49.01±2.15	48.48±0.92$^{\#}$	47.94±1.07$^{\#}$
药物组	48.62±1.92	48.03±1.65	49.74±1.48	49.97±2.01	50.80±1.55
高剂量组	49.42±1.87	48.34±1.48	49.11±1.70	50.15±2.09	50.39±1.56
中剂量组	48.64±1.99	48.12±1.70	49.81±1.51	49.62±2.05	50.04±1.48
低剂量组	48.72±1.15	47.77±1.43	48.42±2.07	48.90±1.21$^{\#}$	49.74±1.37$^{\#}$

表 4 蓝莓花青素对糖尿病小鼠空腹血糖(FBG)的影响($\bar{x}$±s, n=8)

Table 4 Effects of blueberry anthocyanins on FBG in diabetic mice($\bar{x}$±s，n=8)

分组	空腹血糖(mmol/L)				
	0周	1周	2周	3周	4周
正常组	5.60±0.39	5.33±0.78	5.16±0.68	5.46±0.70	5.62±0.54
模型组	15.27±1.51$^{\#\#}$	14.99±1.42$^{\#\#}$	15.08±1.35$^{\#\#}$	14.93±0.98$^{\#\#}$	15.04±1.08$^{\#\#}$
药物组	14.68±1.57$^{\#\#}$	13.92±1.13$^{\#\#}$	13.04±0.84$^{\#\#*}$	11.87±0.86$^{\#\#**}$	10.57±0.75$^{\#\#**}$
高剂量组	15.11±1.64$^{\#\#}$	14.17±1.69$^{\#\#}$	13.21±1.26$^{\#\#*}$	12.29±0.92$^{\#\#*}$	10.88±0.78$^{\#\#**}$
中剂量组	15.13±1.6$^{\#\#}$	14.21±1.16$^{\#\#}$	13.55±1.11$^{\#\#*}$	12.85±0.83$^{\#\#*}$	11.25±0.79$^{\#\#**}$
低剂量组	14.82±1.42$^{\#\#}$	14.44±1.05$^{\#\#}$	14.01±0.72$^{\#\#}$	13.06±0.82$^{\#\#*}$	11.92±0.93$^{\#\#*}$

2.2.2　蓝莓花青素对 2 型糖尿病小鼠葡萄糖耐量（OGTT）的影响　糖耐量指机体对血糖浓度的调节能力，若口服葡萄糖 2 h 后血糖值在 7.8~11.1 mmol/L 范围内，说明机体对葡萄糖耐量已降低[21]。健康状态下，当机体葡萄糖含量突然增加时，血糖浓度会在短时间内迅速升高。但机体会快速反应，通过自身的胰岛素-血糖调节机制，分泌出更多的胰岛素，使机体内葡萄糖水平维持在正常范围内[22]。因此，通过测定糖耐量可以反映机体对血糖的调控能力和胰岛素抵抗能力。

各组小鼠糖耐量实验结果如表 5 所示。正常对照组小鼠在灌胃葡萄糖溶液后，体内血糖水平很快上升，随后也迅速降低，2 h 后回到正常水平。而模型组小鼠在灌胃葡萄糖后体内血糖水平很快上升到最高水平后逐渐下降。与模型组相比，蓝莓花青素高、中、低剂量组小鼠在灌胃葡萄糖后血糖水平在 30 min 时即达到最高水平，随后快速下降，虽不能回到初始水平，但仍可体现出蓝莓花青素组小鼠的病情已有明显好转。能证明蓝莓花青素可以改善小鼠的糖耐量，且随着蓝莓花青素剂量的增加，小鼠糖代谢能力也随之升高。

表 5　蓝莓花青素对糖尿病小鼠葡萄糖耐量（OGTT）的影响（$\bar{x}$±s, n=8）

Table 5　Effects of blueberry anthocyanins on glucose tolerance in diabetic mice ($\bar{x}$±s, n=8)

分组	血糖值（mmol/L）			
	0 min	30 min	60 min	120 min
正常组	5.74±0.82	10.11±1.02	8.91±1.20	6.00±0.45
模型组	15.10±1.53$^{\#\#}$	19.20±1.98$^{\#\#}$	17.34±1.89$^{\#\#}$	15.41±1.39$^{\#\#}$
药物组	10.54±0.76$^{\#*}$	15.48±1.58$^{\#*}$	14.13±0.91$^{\#*}$	11.14±0.69*
高剂量组	10.95±0.71$^{\#*}$	16.06±1.28$^{\#*}$	14.64±1.13$^{\#*}$	11.44±0.92$^{\#*}$
中剂量组	11.27±0.81$^{\#*}$	16.83±1.52$^{\#}$	15.13±1.38$^{\#}$	11.88±0.65$^{\#}$
低剂量组	11.85±0.87$^{\#\#*}$	17.43±1.41$^{\#\#}$	15.57±0.86$^{\#}$	12.28±0.75$^{\#\#}$

血糖曲线下面积（AUC）可以代表糖耐量水平，反映人体利用和清除葡萄糖的程度，根据糖耐量血糖曲线作曲线下面积分析，数值越大表示糖耐量受损程度越严重[23−24]。由图 1 可知，模型组的血糖曲线下面积比正常组极显著增高（P<0.01），与模型组相比，蓝莓花青素高、中剂量组 AUC 均存在显著差异（P<0.05），低剂量组有降低趋势但未达到显著水平（P>0.05），表明蓝莓花青素可有效减缓糖尿病小鼠餐后血糖水平的迅速升高，改善糖尿病小鼠的糖耐量异常状况。

2.2.3　蓝莓花青素对 2 型糖尿病小鼠糖化血红蛋白的影响　糖化血红蛋白是红细胞中血红蛋白与血清中的糖类相结合的产物，是长期、稳定的血糖指标，可有效反映糖尿病患者过去 8~12 周的血糖控制情况[25]。糖化血红蛋白是衡量血糖控制的标准，也是诊断和管理糖尿病的重要手段。在糖尿病治疗中，糖化血红蛋白水平对评价血糖总体控制、发现治疗中存在的问题以及指导治疗方案均有重要的临床意义[26]。

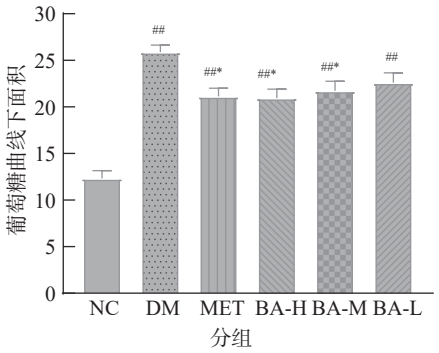


图 1　蓝莓花青素对糖尿病小鼠 AUC 的影响

Fig.1　Effects of blueberry anthocyanins on AUC in diabetic mice

注：NC：正常组；DM：模型组；MET：药物组；BA-H、BA-M、BA-L：蓝莓花青素高、中、低剂量组；与正常组相比，#P<0.05，##P<0.01；与模型组相比，*P<0.05，**P<0.01；图 2 同。

检测结果如图 2 所示，模型组小鼠血清中糖化血红蛋白的含量和正常对照组相比极显著升高（P<0.01）。与模型组相比，经过四周的蓝莓花青素干预后，蓝莓花青素高、中、低剂量组糖化血红蛋白质值分别降低了 21.57%、14.03% 和 8.56%，可看出高剂量的蓝莓花青素对糖化血红蛋白的降低作用极显著（P<0.01），低剂量蓝莓花青素也能有效降低小鼠血清中糖化血红蛋白的含量，但作用效果不显著（P>0.05）。此实验结果与 Grace 等[27] 的结果相一致，进一步证明蓝莓花青素对糖尿病小鼠的糖基化水平有较好的控制作用。

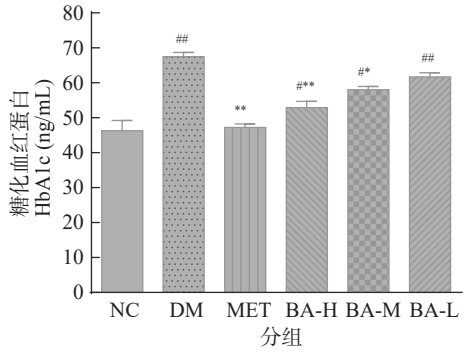


图 2　蓝莓花青素对糖尿病小鼠糖化血红蛋白的影响

Fig.2　Effects of blueberry anthocyanins on HbA1c in diabetic mice

2.3　蓝莓花青素对 2 型糖尿病小鼠脂代谢的影响

糖尿病是一种慢性代谢性疾病，往往伴随着脂代谢异常的发生。调查发现，42% 的 2 型糖尿病患者存在脂代谢异常[28]。脂代谢异常又会引起胰岛素抵抗，长时间脂代谢异常易引起心脑血管疾病的发生[29]。血脂的变化可以反映出机体内脂质代谢的情况，对于体内血脂代谢异常，除血清中胆固醇（TC）、甘油三酯（TG）和低密度脂蛋白（LDL）异常升高外，高密度脂蛋白（HDL）的异常降低也是一种常见的表

现，这些指标的变化易导致肥胖，加重 2 型糖尿病病情[30]。

由表 6 可知，与正常对照组小鼠相比，模型组小鼠血清中 TG、TC 和 LDL-C 水平极显著上升(P<0.01)，而 HDL-C 水平极显著下降(P<0.01)，表明糖尿病病变会导致小鼠血脂代谢的异常。当采用不同剂量的蓝莓花青素灌胃四周后，高、中、低剂量组小鼠血清 TG 水平比模型组下降了 37.36%、24.15% 和 14.88%；高、中、低剂量组小鼠血清 TC 水平分别下降了 29.23%、21.50%、9.06%；高剂量组 LDL-C 水平显著下降(P<0.05)，HDL-C 水平显著升高(P<0.05)，说明蓝莓花青素能够改善因糖尿病所引起的血清 TG、TC、LDL-C 和 HDL-C 代谢紊乱，且呈现一定的剂量效性。

表 6 蓝莓花青素对糖尿病小鼠血脂代谢的影响($\bar{x}$±s, n=8)

Table 6 Effects of blueberry anthocyanins on lipid metabolism in diabetic mice ($\bar{x}$±s, n=8)

分组	总胆固醇（mmol/L）	甘油三酯（mmol/L）	低密度脂蛋白胆固醇（mmol/L）	高密度脂蛋白胆固醇（mmol/L）
正常组	4.26±0.19	1.46±0.10	1.49±0.11	1.44±0.08
模型组	8.28±0.31$^{\#\#}$	3.56±0.13$^{\#\#}$	2.77±0.16$^{\#\#}$	0.83±0.07$^{\#\#}$
药物组	5.20±0.28*	1.91±0.07**	1.72±0.12**	1.27±0.06*
高剂量组	5.86±0.19*	2.23±0.14$^{\#*}$	1.98±0.15*	1.13±0.05*
中剂量组	6.50±0.28$^{\#\#*}$	2.70±0.32$^{\#*}$	2.19±0.12$^{\#}$	1.01±0.05
低剂量组	7.53±0.31$^{\#\#}$	3.03±0.15$^{\#}$	2.41±0.17$^{\#}$	0.92±0.05$^{\#}$

2.4 蓝莓花青素对 2 型糖尿病小鼠胰岛素含量及胰岛素抵抗性的影响

胰岛素是由胰脏内的胰岛 β 细胞分泌的一种蛋白质激素，主要作用是调节代谢过程。胰岛素是机体内唯一降血糖的激素，能将血液中的葡萄糖转运到细胞内，供机体利用，同时还能促进糖原、脂肪、蛋白质合成[31]。发生糖尿病病变时，由于胰岛 β 细胞功能被破坏，造成胰岛素分泌不足或胰岛素抵抗性升高，使葡萄糖的利用率减少，导致血糖水平升高，因此常用 INS 含量和 HOMA-IR 评价激素对血糖的调节能力[32]。

各组小鼠血清胰岛素含量及胰岛素抵抗性如表 7 所示。与正常组相比，模型组小鼠胰岛素含量下降了 53.00%，结果具有极显著性(P<0.01)，而胰岛素抵抗性显著上升了 45.10%(P<0.05)，机体胰岛素敏感性下降，说明造模成功后破坏了胰岛细胞，使其分泌功能下降。与模型组相比，蓝莓花青素组血清胰岛素含量均有所增加，胰岛素抵抗水平均有所下降，且呈现一定的量效关系。可推测蓝莓花青素能提高糖尿病小鼠胰岛细胞对胰岛素的分泌，降低胰岛素抵抗性。

表 7 蓝莓花青素对小鼠胰岛素含量及胰岛素抵抗性的影响($\bar{x}$±s, n=8)

Table 7 Effects of blueberry anthocyanins on insulin content and insulin resistance in mice ($\bar{x}$±s, n=8)

分组	胰岛素(mIU/L)	胰岛素抵抗性
正常组	24.51±1.16	6.12±1.09
模型组	11.52±1.10$^{\#\#}$	8.88±0.77$^{\#}$
药物组	18.92±1.03$^{\#\#**}$	7.70±1.73
高剂量组	17.34±1.44$^{\#\#**}$	7.82±1.41
中剂量组	16.60±1.23$^{\#\#*}$	8.30±0.97
低剂量组	14.77±1.52$^{\#}$	8.38±1.12$^{\#}$

3 讨论与结论

随着现代医学的进步，饮食健康已经成为人们的日常关注问题。糖尿病极高的发病率严重影响着人们的生活，平均每十个人里就有六个人患有糖尿病。江会琴等[33] 总结前人研究得出糖尿病发病率与地理分布、时间分布、人口分布、年龄以及饮食情况均有显著关联。高婷婷等[34] 研究团队发现临床医学中的常用药物盐酸二甲双胍能刺激胃肠道，在糖尿病治疗方面疗效显著，但会严重影响糖尿病病患的消化系统。因此，研究具有降血糖作用的天然食品资源，开发既具有显著降血糖效果、又没有副作用的降血糖保健食品具有非常重要的意义。

糖尿病患者常具有明显的“三多一少”即多饮、多食、多尿和消瘦的临床表现，由于实验条件的限制，收集尿液比较困难，故选择多饮、多食和消瘦三个指标作为评价蓝莓花青素对糖尿病小鼠糖脂代谢调节作用的部分指标[35]。从造模成功到给药结束，与空白组相比，模型对照组日饮食饮水和摄食量均显著增高，体重显著降低，说明 2 型糖尿病小鼠具有明确多饮多食体重减少的特征。经药物治疗后，与模型组相比，各给药组均明显改善了小鼠的多饮多食和体重减轻。该结果与 Johnson 等[36] 对蓝莓花青素的研究结论一致。

高血糖是 2 型糖尿病最重要的症状，OGTT、FBG、AUC、HbA1c 都是评价糖尿病的重要指标。在该研究中，向糖尿病小鼠施用蓝莓花青素显著降低了 FBG 和 HbA1c。OGTT 结果表明蓝莓花青素组的糖耐量 AUC 显著低于糖尿病模型组，表明蓝莓花青素可能对糖尿病小鼠的糖代谢异常起到调节作用，且随着时间和剂量的增加，控制调节效果愈明显。之前研究也报告了类似的结果，Pranprawit 等[37] 的研究发现，蓝莓提取物能够抑制葡萄糖苷酶的活力，并通过阻止体内糖代谢过程来降低血糖的生成量，从而降低体内血糖含量。

高脂血症和血脂异常常与糖尿病密切相关，糖尿病是由高血糖引起的代谢紊乱。TG、TC、LDL-C 和 HDL-C 含量是评价机体内血脂状态的最主要指标。在本研究中，蓝莓花青素的摄入显著降低了糖尿病小鼠的 TC、TG 和 LDL-C 水平，并增加了 HDL-C 水平。TC 和 TG 水平的升高与糖尿病风险相关，而 HDL 水平升高可缓解糖尿病。正如之前的报道，花青素可以通过降低 TC、TG 和 LDL-C 水平并增加 HDL-C 水平来改善脂质稳态和血脂代谢紊乱，从而

发挥心血管保护作用[38]。

胰岛素抵抗是 2 型糖尿病的另一个主要症状，与 STZ 注射和高血糖引起的胰岛素分泌障碍有关。胰岛素是机体内唯一降低血糖的激素，同时促进糖原、脂肪、蛋白质合成，STZ 破坏胰岛 β 细胞，引起胰岛素分泌减少。在本研究中，糖尿病模型组表现出低胰岛素血症症状，表明小鼠出现了胰岛素抵抗。另一方面，与糖尿病模型小鼠相比，蓝莓花青素治疗显著增加了糖尿病小鼠的血清胰岛素水平，降低了胰岛素抵抗水平。

本实验结果显示，蓝莓花青素能降低 2 型糖尿病小鼠的进食量、饮水量，对多饮、多食症有一定的改善作用；改善糖尿病小鼠体重，降低 FBG 含量、OGTT、HbA1c 含量、AUC 和 HOMA-IR 指数，提高 INS 含量，在一定程度上可以保护胰岛细胞，降低胰岛素抵抗性，改善糖尿病小鼠的糖代谢；降低 TG、TC 和 LDL-C 含量，升高 HDL-C 含量，调节糖尿病小鼠脂类物质的代谢。综上，蓝莓花青素可通过控制 2 型糖尿病小鼠血糖浓度和胰岛素抵抗途径，抑制血脂代谢异常，起到预防治疗糖尿病的效果，为控制血糖和预防并发症等天然功能食品的开发提供理论依据，后续将开展蓝莓花青素降血糖机制、肠道微生物组学、代谢组学等的进一步研究，揭示蓝莓花青素降血糖的内在分子机制。

参考文献

[1] 牟严袍，叶中慧，林梅珍，等. 糖尿病流行病学研究进展[J]. 糖尿病新世界，2019，22(4)：196−198. [MOU T P, YE Z H, LIN M Z, et al. Advances in diabetes epidemiology[J]. Diabetes New World, 2019, 22(4): 196−198.]

[2] 于雷，张莉. 天津市成人体检者糖尿病及糖尿病前期的流行病学调查[J]. 中国慢性病预防与控制，2017，25(7)：511−513. [YU L, ZHANG L. An epidemiological survey of diabetes mellitus and prediabetes mellitus among adults in Tianjin[J]. Chinese Journal of Prevention and Control of Chronic Disease, 2017, 25(7): 511−513.]

[3] 吕若琦. 最新版“全球糖尿病地图”里的中国景象[J]. 江苏卫生保健，2020(2)：56. [LV R Q. A view of China in the latest edition of the Global Diabetes Map[J]. Jiangsu Health Care, 2020(2): 56.]

[4] KESAVADEV J, PILAI PBS, SHANKAR A, et al. Sitagliptin 100 mg vs glimepiride 1-3 mg as an add-on to insulin and metformin in type 2 diabetes[J]. Endoer Connect, 2017, 6(8): 748−757.

[5] GHADGE A A, KUVALEKAR A A. Controversy of oral hypoglycemic agents in type 2 diabetes mellitus: Novel move towards combinationtherapies[J]. Diabetes & Metabolic Syndrome Clinical Research & Reviews, 2017, 11(Suppl 1): S5–S13.

[6] BRANDENBURG J P, GILES L V. Four days of blueberry powder supplementation lowers the blood lactate response to running but has no effect on time-trial performance[J]. International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism, 2019, 29(6): 636−642.

[7] WU Y, ZHOU Q, CHEN X Y, et al. Comparison and screening of bioactive phenolic compounds in different blueberry cultivars: Evaluation of anti-oxidation and α-glucosidase inhibition effect[J]. Food Research International, 2017, 100(1): 312−324.

[8] 韩雪，袁玮琼，武艺，等. 利用 HPLC-DAD-ESI/IT-TOF/MSn 分析不同品种蓝莓果实的花青素结构[J]. 食品工业科技，2020，41(8)：210−216，223. [HAN X, YUAN W Q, WU Y, et al. HPLC-DAD-ESI/IT-TOF/MSn were used to analyze the anthocyanin structure of different blueberry fruits[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(8): 210−216, 223.]

[9] CUTLER B R, PETERSEN C, ANANDH BABU P V. Mechanistic insights into the vascular effects of blueberries: Evidence from recent studies[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2017, 61(6): 10.

[10] HUANG W Y, HUTABARAT R P, CHAI Z, et al. Antioxidant blueberry anthocyanins induce vasodilation via PI3K/Akt signaling pathway in high-glucose-induced human umbilical vein endothelial cells[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(5): 1575.

[11] 刘军波，邹礼根，翁丽萍，等. 蓝莓保健食品的现状分析及展望[J]. 农产品加工，2020(18)：88−91. [LIU J B, ZOU L G, WENG J P, et al. Analysis and prospect of blueberry health food[J]. Farm Products Processing, 2020(18): 88−91.]

[12] WEI X Y, TAO J H, SHEN Y M, et al. Sanhuang Xiexin Tang ameliorates type 2 diabetic rats via modulation of the metabolicprofiles and NF-κB/PI-3K/Akt signaling pathways[J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 955.

[13] 唐大轩，李军，张莉，等. 辣木粉调脂降糖作用研究[J]. 中药药理与临床，2018，34(4)：132−134. [TANG D X, LI J, ZHANG L, et al. Effects of moringa oleifera powder on lipid regulation and hypoglycemia[J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2018, 34(4): 132−134.]

[14] 李仪奎. 中药药理实验方法学 [M]. 上海科学技术出版社，2006: 1088. [LI Y K. Experimental methodology of traditional Chinese medicine pharmacology[M]. Shanghai: Science and Technology Press, 2006: 1088.]

[15] 王云威，王景雪. 铁皮石斛多糖对 2 型糖尿病小鼠降糖降脂的作用[J]. 食品科学，2020，41(21)：127−132. [WANG Y W, WANG J X. Effects of *Dendrobium officinale* polysaccharide on hypoglycemic and lipid-lowering effects in type 2 diabetic mice[J]. Food Science, 2020, 41(21): 127−132.]

[16] 曲玲. 干酪乳杆菌发酵乳重塑大鼠肠道菌群结构改善Ⅱ型糖尿病 [D]. 哈尔滨：哈尔滨工业大学，2018. [QU L. *Lactobacillus casei* fermented milk remolded intestinal microflora structure to improve type Ⅱ diabetes mellitus in rats[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2018.]

[17] 吴黉坦，吴晓露，陈煜沛，等. 经培养基优化所得牛樟芝及其功能饮料的护肝和降血糖作用[J]. 现代食品科技，2018，34(6)：24−31,121. [WU H D, WU X L, CHEN Y P, et al. The liver protection and hypoglycemic effects of antrodia giandia and its energy beverage were obtained by medium optimization[J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(6): 24−31,121.]

[18] SCHWINGSHACKL L, MISSBACH B, DIAS S, et al. Impact of different training modalities on glycaemic control and blood

lipids in patients with type 2 diabetes: A systematic review and network meta-analysis[J]. Diabetologia, 2014, 57(9): 1789−1797.
[19] 徐佳, 洪阿娜, 梁金莲. 血糖、血脂及糖化血红蛋白检测对中老年 2 型糖尿病患者诊断价值研究[J]. 临床军医杂志, 2019, 47(9): 949−951. [XU J, HON A N, LIANG J L. Study on the diagnostic value of blood glucose, blood lipid and hBA1c in middle-aged and elderly patients with type 2 diabetes mellitus[J]. Clinical Journal of Medical Officer, 2019, 47(9): 949−951.]
[20] 张彩娟. 糖尿病患者的血糖及尿糖检验临床分析[J]. 糖尿病新世界, 2021, 24(6): 55−56,63. [ZHANG C J. Clinical analysis of blood glucose and urine glucose test in diabetic patients[J]. Diabetes New World, 2021, 24(6): 55−56,63.]
[21] 孙卫芬. 二甲双胍治疗糖耐量降低的临床效果和机制[J]. 中国实用医药, 2015, 10(2): 142−143. [SUN W F. Clinical effect and mechanism of metformin in the treatment of decreased glucose tolerance[J]. China Practical Medicine, 2015, 10(2): 142−143.]
[22] 李耀冬, 叶静, 肖美添. 复方海藻膳食纤维对糖尿病小鼠降血糖作用的研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(10): 341−345. [LI Y D, YE J, XIAO M T. Study on hypoglycemic effect of compound seaweed dietary fiber on diabetic mice[J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(10): 341−345.]
[23] 孙昕. 乳源性复合益生菌对 T2D 大鼠 SCFAs 和 TBA 代谢通路的影响 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2020. [SUN X. Effects of milk-derived compound probiotics on SCFAs and TBA metabolic pathways in T2D rats[D]. Urumqi: Xinjiang Medical University, 2020.]
[24] 彭晓蝶, 秦樱瑞, 黄先智, 等. 桑叶-苦瓜混合粉对糖尿病小鼠的降糖作用[J]. 现代食品科技, 2017, 33(4): 31−37. [PENG X D, QIN Y R, HUANG X Z, et al. Hypoglycemic effect of mulberry leaf-balsam pear mixed powder on diabetic mice[J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(4): 31−37.]
[25] 关合华, 郜亚楠. 对糖化血红蛋白与血脂检测在 2 型糖尿病检测中的临床意义进行探究[J]. 实用糖尿病杂志, 2021, 17(1): 33. [GUAN H H, GAO Y N. To explore the clinical significance of hBA1c and blood lipid detection in type 2 diabetes mellitus[J]. Journal of Practical Diabetes, 2021, 17(1): 33.]
[26] 万辉, 昌利花. 糖化血红蛋白与血脂检测在 2 型糖尿病中临床价值分析[J]. 中国实用医药, 2021, 16(12): 78−81. [WAN H, CHENG L H. Clinical value of hBA1c and blood lipid detection in type 2 diabetes mellitus[J]. China Practical Medicine, 2021, 16(12): 78−81.]
[27] GRACE M H, RIBNICKY D M, KUHN P, et al. Hypoglycemic activity of a novel anthocyanin-rich formulation from lowbush blueberry, *Vaccinium angustifolium* Aiton[J]. Phytomedicine, 2009, 16(5): 406−415.
[28] 曾山容, 邓小敏, 易倍吉, 等. 中医药治疗 2 型糖尿病血脂异常的研究进展[J]. 大众科技, 2021, 23(4): 73−75. [ZWNG S R, DHEG X M, YI B J, et al. Research progress of Chinese medicine in the treatment of dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus[J]. Popular Science and Technology, 2021, 23(4): 73−75.]
[29] 房丹, 周志焕. 中医药治疗 2 型糖尿病脂代谢异常的研究进展[J]. 光明中医, 2019, 34(24): 3852−3854. [FAN D, ZHOU Z H. Research progress of TCM in the treatment of abnormal lipid metabolism in type 2 diabetes mellitus[J]. Guangming Journal of Chinese Medicine, 2019, 34(24): 3852−3854.]
[30] 邹亚兰, 张卫兵, 贺有元, 等. 大柴胡汤对 2 型糖尿病合并肥胖患者血糖及血脂水平的影响[J]. 现代医学与健康研究电子杂志, 2021, 5(9): 18−20. [ZHOU Y L, ZHANG W B, HE Y Y, et al. Effect of Da Chaihu decoction on blood glucose and blood lipid levels in patients with type 2 diabetes complicated with obesity[J]. Modern Medicine and Health Research, 2021, 5(9): 18−20.]
[31] HARAZAKI T, INOUE S, IMAI C, et al. Resistant starch improves insulin resistance and reduces adipose tissue weight and CD11c expression in rat OLETF adipose tissue[J]. Nutrition, 2014, 30(5): 590−595.
[32] SKELDON A M, MORIZOT A, DOUGLAS T, et al. Caspase-12, but not Caspase-11, inhibits obesity and insulin resistance [J]. Journal of Immunology, 2016, 196(1): 437.
[33] 汪会琴, 胡如英, 武海滨, 等. 2 型糖尿病报告发病率研究进展[J]. 浙江预防医学, 2016, 28(1): 37−39, 57. [WANG H Q, HU R Y, WU H B, et al. Progress in research on reported incidence of type 2 diabetes[J]. Zhejiang Journal of Preventive Medicine, 2016, 28(1): 37−39, 57.]
[34] 高婷婷, 叶鸣, 吴凤瑶, 等. 二甲双胍对二型糖尿病大鼠肠道刺激影响[J]. 临床医药文献电子杂志, 2019, 6(23): 178. [GAO T T, YE M, WU F Y, et al. Effect of metformin on intestinal stimulation in type 2 diabetic rats[J]. Journal of Clinical Medical Literature (Electronic Edition), 2019, 6(23): 178.]
[35] 王伊楠, 董征艳, 张莉丹, 等. 四君子汤梯度乙醇提取物干预 2 型糖尿病小鼠糖脂代谢紊乱的评价研究[J]. 中药药理与临床, 2020, 36(4): 93−98. [WANG Y N, DONG Y Z, ZHANG L D, et al. Evaluation of Sijunzi decoction gradient ethanol extract on glucolipid metabolism disorder in type 2 diabetic mice[J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2020, 36(4): 93−98.]
[36] JOHNSON M H, LUCIUS A, MEYER T, et al. Cultivar evaluation and effect of fermentation on antioxidant capacity and *in vitro* inhibition of *α*-amylase and *α*-glucosidase by highbush blueberry (*Vaccinium corombosum*)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(16): 8923−8930.
[37] PRANPRAWIT A, HEYES J A, MOLAN A L, et al. Antioxidant activity and inhibitory potential of blueberry extracts against key enzymes relevant for hyperglycemia[J]. Journal of Food Biochemistry, 2015, 39(1): 109−118.
[38] SI X, TIAN J L, SHU C, et al. Serum ceramide reduction by blueberry anthocyanin-rich extract alleviates insulin resistance in hyperlipidemia mice[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(31): 8185−8194.

叶晓楠, 曾慧慧, 刘思琦, 等. 酸枣提取物的抗氧化及抗衰老作用 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 389−395. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090192

YE Xiaonan, ZENG Huihui, LIU Siqi, et al. Antioxidant and Anti-aging Activity of *Ziziphus jujuba* Extract[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 389−395. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090192

· 营养与保健 ·

酸枣提取物的抗氧化及抗衰老作用

叶晓楠[1,2], 曾慧慧[1], 刘思琦[1], 李毅翔[1], 黄莉莉[1], 于　爽[1], 李廷利[1], 王艳艳[1,*]

（1.黑龙江中医药大学, 黑龙江哈尔滨 150040;
2.黑龙江中医药大学附属第二医院, 黑龙江哈尔滨 150040）

摘　要: 目的：研究酸枣提取物体外和体内抗氧化及抗衰老作用。方法：对不同质量浓度酸枣提取物（0.05、0.10、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00 mg/mL）进行 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼（DPPH）自由基清除率、羟自由基清除率及 Fe^{3+}还原能力测定，评价酸枣提取物体外抗氧化活性；以不同质量分数（0.1%、0.5%、1.0%）酸枣提取物饲喂果蝇，通过果蝇寿命实验、逆重力爬行实验以及测定果蝇体内超氧化物歧化酶（Superoxide dismutase, SOD）活力、丙二醛（Malonic dialdehyde, MDA）含量、过氧化氢酶（Catalase, CAT）活力，评价酸枣提取物体内抗氧化及抗衰老作用。结果：体外实验结果显示，酸枣提取物对 DPPH 自由基、羟自由基均有不同程度的清除作用，其半数清除浓度（IC_{50}）值分别为：0.44、1.40 mg/mL，对 Fe^{3+}具有还原能力。体内实验结果显示，与空白组相比，1.0% 酸枣提取物组雌、雄果蝇平均寿命分别显著延长了 9.61% 和 13.91%（P<0.01）；增强 30 d 雌、雄果蝇逆重力爬行能力（P<0.05 或 P<0.01），降低雌、雄果蝇体内 MDA 含量（P<0.05 或 P<0.01），提高雌、雄果蝇体内 SOD 和 CAT 活力（P<0.05 或 P<0.01）。结论：酸枣提取物具有较好的体内外抗氧化作用和潜在抗衰老作用。

关键词: 酸枣提取物, 抗氧化活性, 抗衰老, 果蝇

中图分类号: TS201.3　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0389−07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090192

本文网刊:

Antioxidant and Anti-aging Activity of *Ziziphus jujuba* Extract

YE Xiaonan[1,2], ZENG Huihui[1], LIU Siqi[1], LI Yixiang[1], HUANG Lili[1], YU Shuang[1], LI Tingli[1], WANG Yanyan[1,*]

（1.Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;
2.Second Affiliated Hospital, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China）

Abstract: Objective:To illustrate the antioxidant and anti-aging activity of *Ziziphus jujuba* extract *in vivo* and *in vitro*. Methods: The antioxidant activity of *Ziziphus jujuba* extract (0.05、0.10、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00 mg/mL) was determined by DPPH free radical scavenging rate, ·OH radical clearance rate and Fe^{3+} reducing antioxidant power assayed *in vitro*. Three different doses of *Ziziphus jujuba* extract (0.1%、0.5%、1.0%) were given to the *Drosophila melanogaster* through the culture to study the *in vivo* antioxidant and anti-aging activity by testing the lifespans, negative geotaxis ability, SOD activity, MAD content and CAT activity. Results: The results of *in vitro* antioxidant activity showed that the *Ziziphus jujuba* extract could scavenge DPPH and OH free radicals *in vitro*, and its IC_{50} were 0.44 and 1.40 mg/mL, respectively. It also could reduce iron *in vitro*. The *in vivo* antioxidant and anti-aging activity results showed that the average life span of female and male *D. melanogaster*were prolonged by 9.61% and 13.91% in 1.0% *Ziziphus jujuba* extract group compared with the control group (P<0.01). Also *Ziziphus jujuba* extract treatment improved the negative geotaxis ability in older female and male *D. melanogaster* (P<0.05 or P<0.01), decreased the MAD content (P<0.05 or P<0.01) and increased the SOD and CAT activity (P<0.05 or P<0.01). Conclusion: The *Ziziphus jujuba* extract has good antioxidant and anti-aging capacity *in vivo* and *in vitro*.

Key words: *Ziziphus jujuba* extract; antioxidant activity; anti-aging; *Drosophila melanogaster*

收稿日期: 2021−09−15

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82003974); 黑龙江省自然科学基金项目（LH2020H098; LH2019H106）。

作者简介: 叶晓楠（1990−）, 女, 博士研究生, 研究方向: 中药抗焦虑及改善睡眠药效物质基础及作用机制研究, E-mail: 498479512@qq.com。

*** 通信作者:** 王艳艳（1982−）, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 中药抗焦虑及改善睡眠药效物质基础及作用机制研究, E-mail: wyy2891@126.com。

酸枣(*Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou)是鼠李科枣属植物酸枣的干燥成熟果实,为药食同源的中药,始载于《神农本草经》,曰:“酸枣,味酸平,主心腹寒热,邪结气聚,四肢酸痛,湿痹,久服安五脏,轻身延年[1]”,这是古代医籍中有关于酸枣延年益寿的最早记载。现代药理学研究表明,酸枣中富含大量三萜及其皂苷类[2]、黄酮类[3]、糖类[4]、氨基酸类[5]等化学成分,具有镇静催眠[6]、调节免疫[7]、保肝[8]、抗氧化[9−12]等多种生物活性。酸枣不同器官包括果实、果皮、果肉和种仁部位的提取液均被证实有清除羟自由基的作用[9],目前酸枣已被广泛加工制成酸枣酒[13]、酸枣醋[14]、酸枣汁[15]等食品,然而有关于其体内抗氧化活性以及延缓衰老相关的基础研究较少。

本研究通过 DPPH 法、羟自由基法、Fe^{3+}还原能力法测定酸枣提取物的体外抗氧化活性,并进一步利用果蝇这一模式生物,研究其对果蝇寿命和抗氧化酶活性的影响,从体外和体内两个角度,探讨酸枣提取物抗氧化和抗衰老作用,为酸枣提取物的开发应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

野生型 Canton S 黑腹果蝇 中国科学院上海生命科学院提供;酸枣果实 产自山西阳泉,选取完整、大小均一、无虫蚀、无损伤的果实,经黑龙江中医药大学药学院王振月教授鉴定为鼠李科枣属植物酸枣的干燥成熟果实;水溶性维生素 C 中国药品生物制品检定所;DPPH Sigma 公司;蔗糖 天津市科密欧化学试剂有限公司;琼脂 北京 Biotopped 科技公司;丙酸 天津致远化学试剂有限公司;酵母粉 安琪酵母股份有限公司;硫酸亚铁 天津市恒兴化学试剂制造有限公司;水杨酸 天津巴斯夫化有限公司;铁氰化钾、三氯乙酸 天津永晟精细化工有限公司;以上试剂均为分析纯;FRAP 检测试剂盒 碧云天生物科技有限公司;羟自由基、SOD、CAT、MDA 测定试剂盒 南京建成生物科技有限公司。

MS204S 分析天平 梅特勒-托利多仪器有限公司;Synergy MX 酶标仪 BIOTEK 公司;N-1100D 旋转蒸发仪、FDU-1200 冷冻干燥机 上海爱朗仪器有限公司;CY600 恒温水浴锅 上海精宏实验设备有限公司;D27 超声波清洗机 GT SONIC 公司;果蝇二氧化碳麻醉装置 自制。

1.2 实验方法

1.2.1 酸枣提取物的制备 依据实验室前期研究基础,用体积分数为 50% 的乙醇进行提取,乙醇和酸枣的液固比为 22∶1(mL/g),超声(450 W,50 ℃)提取 90 min,过滤,取滤液,浓缩,−40 ℃ 15 Pa 冷冻干燥 84 h,得酸枣提取物冻干粉备用。其中,总黄酮得率为 2.31%、总酚得率为 1.98%、多糖得率为 18.50%,总皂苷得率为 12.62%。

1.2.2 酸枣提取物体外抗氧化活性的测定

1.2.2.1 酸枣提取物对 DPPH 自由基清除能力的测定 用蒸馏水配制质量浓度为 0.05、0.10、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00 mg/mL 的酸枣提取物样品和 V_C 溶液。取不同质量浓度的样品和 V_C 溶液各 0.7 mL,加入 1.3 mL 0.3 mmol/L 的 DPPH 乙醇溶液,避光反应完全后在波长 517 nm 处测定混合物的吸光度值[16−18]。

$$\text{DPPH清除率}(\%)=\left(1-\frac{A_1-A_2}{A_0}\right)\times 100 \qquad \text{式(1)}$$

式中:A_0 为空白对照吸光度值,A_1 为样品溶液吸光度值,A_2 为无水乙醇与样品溶液吸光度值。

1.2.2.2 酸枣提取物对羟自由基清除能力的测定 用蒸馏水配制质量浓度为 0.05、0.10、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00 mg/mL 的酸枣提取物样品和 V_C 溶液。在反应体系中依次加入 0.2 mL 6 mmol/L 的硫酸亚铁溶液和水杨酸-乙醇溶液,再加入不同质量浓度的样品溶液和 V_C 溶液各 0.2 mL,0.2 mL 6 mmol/L 的双氧水溶液,于 37 ℃ 反应 1 h,反应完全后在波长 510 nm 处测定混合物的吸光度值[19]。

$$\text{羟自由基清除率}(\%)=\left(1-\frac{A_1-A_2}{A_0}\right)\times 100 \qquad \text{式(2)}$$

式中:A_0 为空白对照吸光度值,A_1 为样品吸光度值,A_2 为不加水杨酸-乙醇溶液的样品本底吸收。

1.2.2.3 酸枣提取物对 Fe^{3+}还原能力的测定 用蒸馏水配制质量浓度为 0.05、0.10、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00 mg/mL 的酸枣提取物样品和 V_C 溶液。取不同质量浓度样品溶液和 V_C 溶液各 0.2 mL,分别加入 pH6.6 的磷酸盐缓冲液和 1% 铁氰化钾溶液各 1.0 mL,在 50 ℃ 条件下反应 20 min,冷却,加入 10% 三氯乙酸溶液 0.8 mL,混匀,3000 r/min,离心 5 min,取 0.5 mL 上清液,加入蒸馏水 0.5 mL 和 0.1% $FeCl_3$ 溶液 0.1 mL,反应完全后在波长 700 nm 处测定混合物的吸光度值[20]。

1.2.3 酸枣提取物体内抗衰老活性的测定

1.2.3.1 果蝇的培养 果蝇饲养在温度(24±1)℃,相对湿度 50%~60%,12 h 明暗交替的环境中。基础培养基的配制[21]:称取蔗糖 31 g、琼脂 3 g,加入到 300 mL 三蒸水中,加热煮沸,再将 42 g 玉米粉加入到 160 mL 三蒸水中混匀后倒入煮沸的液体中,混合均匀,继续加热至混合溶液呈糊状后停止加热。室温条件下放凉至 70 ℃ 左右时,加入 3 g 酵母粉,3 mL 丙酸,搅拌均匀,趁热分装至洗净灭菌的培养指管中备用。含药培养基的配制:参照预实验结果,在制作基础培养基的过程中加入酸枣提取物 0.55、2.73、5.45 g,分别折合药物质量分数为 0.1%、0.5%、1.0%。给药组饲喂含药培养基,空白组饲喂基础培养基,培养基每 5 d 更换一次。

1.2.3.2 酸枣提取物对果蝇寿命的影响 收集刚羽

化 8 h 内未交配的雌、雄果蝇共 800 只，随机分成 4 组，每组 200 只（雌雄各半），分别置于不同质量分数的酸枣提取物（0.1%、0.5%、1.0%）含药培养基和基础培养基中，每日固定时间观察记录死亡的果蝇数，直到全部果蝇死亡（非正常死亡的果蝇不纳入统计）。统计分析果蝇的平均寿命和最长寿命，最长寿命为每组最后 10% 果蝇的平均寿命，记录每管果蝇的存活时间，并绘制生存曲线[22]。

1.2.3.3　酸枣提取物对果蝇逆重力爬行能力的影响　收集刚羽化 8 h 内未交配的雌、雄果蝇共 160 只，随机分成 4 组，即不同质量分数酸枣提取物组（0.1%, 0.5%, 1.0%）与空白组，每组 40 只（雌雄各半）。在上述培养基中将果蝇分别培养至第 10 d 和第 30 d 时，进行果蝇逆重力爬行实验。将待测果蝇转移至测定管中，轻拍测定管使果蝇落在测定管底部，记录在 10 s 内爬升至8 cm 的果蝇数，每组果蝇测 5 次，两次测量之间间隔1 min[23]，按公式计算果蝇攀爬指数，攀爬指数越高，代表果蝇逆重力爬行能力越强。

$$攀爬指数(\%)=\frac{成功攀爬至8\ cm的果蝇数量}{果蝇总数}\times 100 \quad 式（3）$$

1.2.3.4　酸枣提取物对果蝇抗氧化能力的影响　收集刚羽化 8 h 内未交配的雌、雄果蝇共 2400 只，随机分成 4 组，即不同质量分数酸枣提取物组（0.1%, 0.5%, 1.0%）与空白组，每组 600 只（雌雄各半），分别培养于相应质量分数的含药培养基和基础培养基中，培养至第 10 d 和第 30 d 时，每组果蝇用二氧化碳气体麻醉 300 只（雌雄各半，25 只/管），称重并放在装有液氮的研钵中研磨后，加入预冷的生理盐水制备 2% 的组织匀浆液。在 4 ℃ 条件下，3000 r/min，离心 10 min，取上清液用生化法测定 SOD、CAT 活力及 MDA 含量[24]。

1.3　数据处理

实验结果以均值±标准差（Mean±SD）表示。采用 GraphPad Prism 8.0 和 IBM SPSS 26.0 作图和进行统计学处理，采用单因素方差分析，用 LSD 法进行两两比较，生存试验采用 Log-rank 检验分析寿命的显著性，以 $P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2　结果与分析

2.1　酸枣提取物体外抗氧化活性实验结果

2.1.1　DPPH 自由基清除能力　DPPH 在有机溶剂中是一种稳定的脂质自由基，其乙醇溶液（或甲醇溶液）呈深紫色，当加入具有自由基清除能力的物质时，DPPH 的孤对电子被配对，溶液由紫色逐渐褪变为黄色，而颜色褪变的程度与其接受电子的数量呈化学计量关系，因此可用于评价样品的抗氧化能力[18]。由图 1 可知，在 0.05~1.00 mg/mL 质量浓度范围内，酸枣提取物对 DPPH 自由基清除能力随着质量浓度的升高而逐渐增强，当质量浓度达到 1.00 mg/mL 时，其清除能力为 74.17%，且呈继续上升的趋势。V_C 在 0.05~0.20 mg/mL 质量浓度范围内，其对 DPPH 自由基清除能力随着质量浓度的增加大幅增强，但当质量浓度超过 0.20 mg/mL 时，其对 DPPH 自由基的清除能力趋于平缓，不再继续增强。当清除体系 50% 的 DPPH 自由基时，所需酸枣提取物的质量浓度为 0.44 mg/mL，而 V_C 为 0.07 mg/mL。

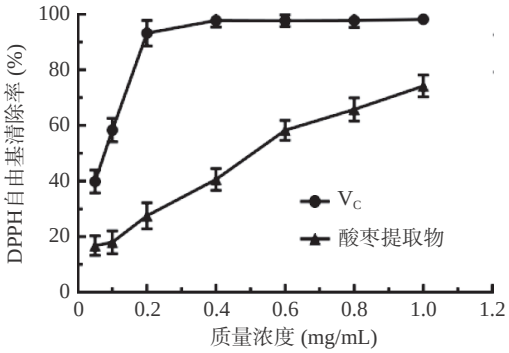


图 1　酸枣提取物对 DPPH 自由基的清除能力

Fig.1　DPPH free radical scavenging ability of extract from *Ziziphus jujuba*

2.1.2　羟自由基清除能力　过氧化氢与 Fe^{2+} 反应可产生羟自由基，在反应体系中加入水杨酸可以与羟自由基反应产生紫色化合物，当加入具有羟自由基清除能力的样品时，可以使紫色化合物生成量减少，利用这一原理可以测定样品对羟自由基的清除能力[18]。由图 2 可知，在 0.05~1.00 mg/mL 质量浓度范围内，与 DPPH 自由基清除能力相似，酸枣提取物对羟自由基清除能力随着质量浓度的增加，羟自由基的清除能力逐渐增强，呈现良好的剂量依赖性。V_C 在 0.05~0.60 mg/mL 质量浓度范围内，其对羟自由基清除能力随着质量浓度的增加大幅增强，当质量浓度大于 0.6 mg/mL 时，其羟自由基清除能力不再增强。虽然酸枣提取物在各质量浓度下，羟自由基清除能力均较 V_C 弱，但仍然具有很强的羟自由基清除效果。当清除体系 50% 的羟自由基时，所需酸枣提取物的质量浓度为 1.40 mg/mL，而 V_C 为 0.19 mg/mL。

2.1.3　Fe^{3+} 还原能力　样品或 V_C 作为还原剂可将铁

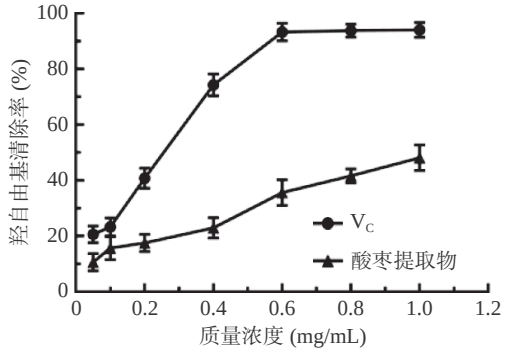


图 2　酸枣提取物对羟自由基的清除率

Fig.2　Hydroxyl radical scavenging ability of extract from *Ziziphus jujuba*

氰化钾体系中的 Fe^{3+}还原成 Fe^{2+}，而后者可与显色剂反应生成蓝色化合物，将混合物置于 700 nm 波长下测定吸光度值，吸光度值越大，则样品还原力越强[25]。由图 3 可知，酸枣提取物对 Fe^{3+}还原能力随着质量浓度的增加，呈缓慢增强的趋势。V_C 在 0.05~0.40 mg/mL 质量浓度范围内，随着质量浓度的增加，其对 Fe^{3+}还原能力大幅增强，当质量浓度超过 0.40 mg/mL 时，其对 Fe^{3+}还原能力趋于平缓。DPPH 自由基清除率、羟自由基清除率及 Fe^{3+}还原能力的测定是常用的评价物质体外抗氧化能力的方法，酚类、多糖[4]、黄酮类[9,26] 化合物已被研究证实具有较好的清除自由基能力和还原能力，酸枣提取物中富含大量的酚类、多糖和黄酮类成分，这些成分可能是其发挥体外抗氧化作用的物质基础。

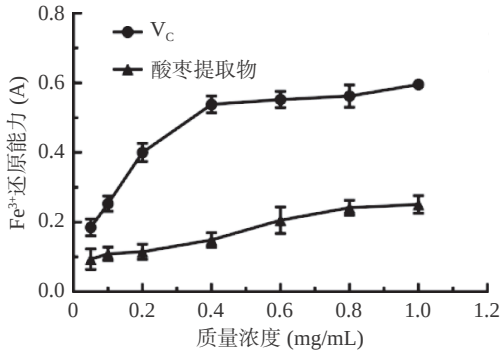


图 3 酸枣提取物对 Fe^{3+}的还原能力

Fig.3 Fe^{3+} reduction ability of extract from *Ziziphus jujuba*

2.2 酸枣提取物的体内抗衰老活性

2.2.1 酸枣提取物对果蝇寿命的影响 在明确酸枣提取物体外抗氧化活性的基础上，进一步利用果蝇进行酸枣提取物体内抗氧化活性研究。选择果蝇这一模式生物是因为果蝇的生命周期短、繁殖能力强、易于饲养、雌雄易分辨，且果蝇与人类有着十分相似的致病基因和衰老基因，因此果蝇在抗衰老药物活性筛选研究中占有重要的地位[27]。本研究通过制作含药培养基的方式，研究酸枣提取物对自然衰老果蝇寿命的影响，结果发现，酸枣提取物可以在一定程度上延长雌、雄果蝇的寿命。与雌性空白对照组相比，1.0% 酸枣提取物组雌果蝇平均寿命由 43.91 d 延长至 48.13 d（P <0.01），延长了 9.61%；酸枣提取物各质量分数组雌果蝇的最长寿命均显著延长（P<0.05 或 P<0.01）。Kaplan-Meier 生存曲线分析显示，与空白组雌果蝇相比，1% 酸枣提取物组雌果蝇的寿命显著延长（P<0.01）。与雄性空白对照组相比，0.5%、1.0% 酸枣提取物组雄果蝇的平均寿命分别由 42.46 d 延长至 46.8、48.36 d（P<0.05 或 P<0.01），分别延长了 10.23%、13.91%；酸枣提 取物各组雄果蝇的最长寿命均显著增加（P<0.01），且呈现出良好的剂量-效应关系。Kaplan-Meier 生存曲线分析显示，与空白组雄果蝇相比，0.5% 与 1% 酸枣提取物组雄果蝇的寿命显著延长（P<0.05、P<0.01）。酸枣提取物延长果蝇寿命的作用可能与其富含的黄酮类[26]、酚类[28]成分有着密切的联系，实验结果见图 4，表 1。

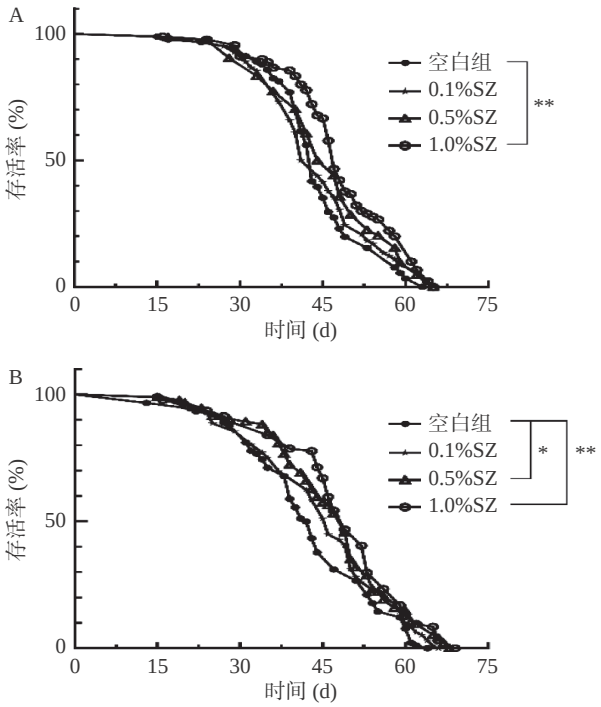


图 4 酸枣提取物对果蝇寿命曲线的影响

Fig.4 Effect of *Ziziphus jujuba* extract on lifespan curves of *D. melanogaster*

注：图 A：雌果蝇，图 B：雄果蝇；SZ：酸枣提取物；图中*表示 P<0.05，**表示 P<0.01。

表 1 酸枣提取物对果蝇寿命的影响

Table 1 Effect of *Ziziphus jujuba* extract on the lifespan of *D. melanogaster*

组别	性别	数量（只）	平均寿命（d）	最长寿命（d）	平均寿命延长率(%)
空白组	雌	91	43.91±9.37	60.33±2.12	–
0.1%SZ组	雌	82	44.16±10.18	62.67±2.35*	0.56
0.5%SZ组	雌	84	45.68±10.68	62.67±1.80*	4.02
1.0%SZ组	雌	90	48.13±10.25**	63.56±1.24**	9.61
空白组	雄	90	42.46±12.13	61.22±1.20	–
0.1%SZ组	雄	96	44.84±12.39	63.56±1.67**	5.63
0.5%SZ组	雄	94	46.80±11.97*	66.22±1.30**	10.23
1.0%SZ组	雄	94	48.36±12.18**	66.89±1.62**	13.91

注：与空白对照组相比，*P<0.05，**P<0.01；SZ：酸枣提取物。

2.2.2 酸枣提取物对果蝇逆重力爬行能力的影响 果蝇逆重力爬行实验是依据果蝇反趋地性行为的特点而设计的，攀爬指数可以从行为学角度反映其运动能力，随着果蝇日龄的增加，其运动能力也会随之降低[29]。由图 5 分析得出，在第 10 d 时，仅 0.5% 酸枣提取物组雄性果蝇攀爬指数增高（P<0.01），当用含药培养基饲喂至第 30 d 时，各不同质量分数酸枣提取物组雌、雄果蝇的攀爬指数均有不同程度的提高（P<0.05 或 P<0.01），酸枣提取物可以显著增强 30 日龄果蝇的攀爬能力，提示酸枣提取物可能对自然衰老果蝇的运动能力具有提升作用。

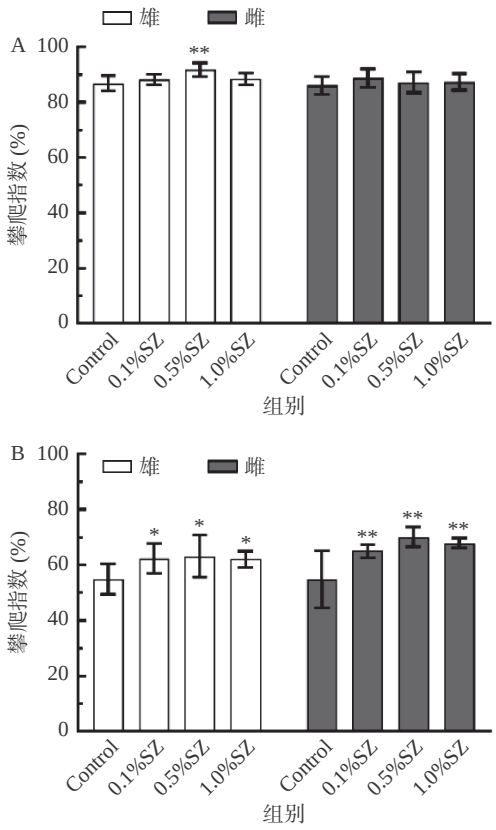


图 5　酸枣提取物对果蝇逆重力爬行能力的影响

Fig.5　Effect of *Ziziphus jujuba* extract on the negative geotaxis ability of *D. melanogaster*

注：图 A：10 d，图 B：30 d；与空白对照组相比，$^{*}P$<0.05、$^{**}P$<0.01；SZ：酸枣提取物；图 6~图 8 同。

2.2.3　酸枣提取物对果蝇体内抗氧化能力的影响

2.2.3.1　酸枣提取物对果蝇体内 SOD 活力的影响

SOD 是一种抗氧化酶，可以清除自由基[30]。不同质量分数酸枣提取物对雌、雄果蝇体内 SOD 活力的影响见图 6。在第 10 d，与空白组相比较，0.5%、1.0% 酸枣提取物组雄果蝇及 1.0% 酸枣提取物组雌果蝇的 SOD 活力显著增强（P<0.05 或 P<0.01）；在第 30 d，与空白组相比，1.0% 酸枣提取物组雄果蝇及 0.5%、1.0% 酸枣提取物组雌果蝇 SOD 活力增强，经统计学分析，具有显著性差异（P<0.05 或 P<0.01）。第 10 d 和第 30 d 的 0.1% 酸枣提取物组雌、雄果蝇体内 SOD 活力与空白组相比较，有升高的趋势，但差异无统计学意义（P>0.05），提示给予酸枣提取物，可以增强雌、雄果蝇体内 SOD 活力，且呈现较好的剂量依赖性，但是在较低剂量时，对雌、雄果蝇体内 SOD 活力的影响较小。

2.2.3.2　酸枣提取物对果蝇体内 MDA 含量的影响

MDA 是脂质发生过氧化反应产生的代谢产物，可作为机体脂质过氧化程度的指标，其含量可间接反映细胞损伤程度[31]。不同质量分数酸枣提取物对雌、雄果蝇体内 MDA 含量的影响见图 7。在第 10 d，与空白组相比较，1.0% 酸枣提取物组的雌、雄果蝇体内的 MDA 含量均显著降低（P<0.05）。在第 30 d，与空白组相比较，0.5%、1.0% 酸枣提取物组雄果蝇

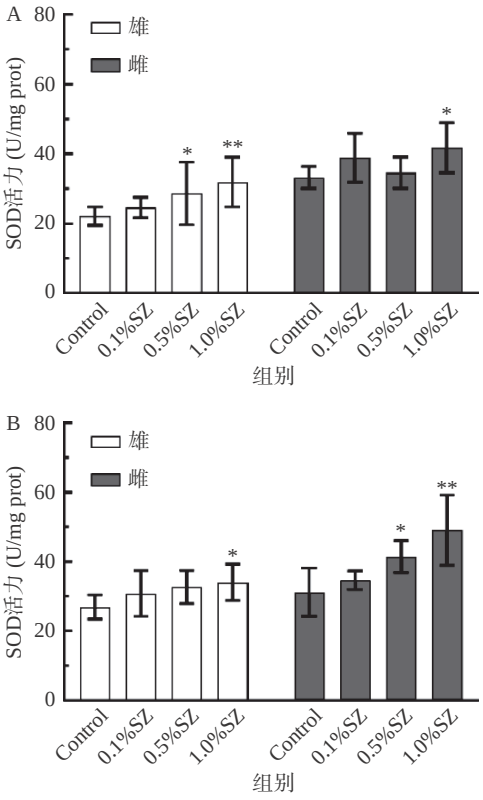


图 6　酸枣提取物对果蝇体内 SOD 活力的影响

Fig.6　Effect of *Ziziphus jujuba* extract on SOD activity in *D. melanogaster*

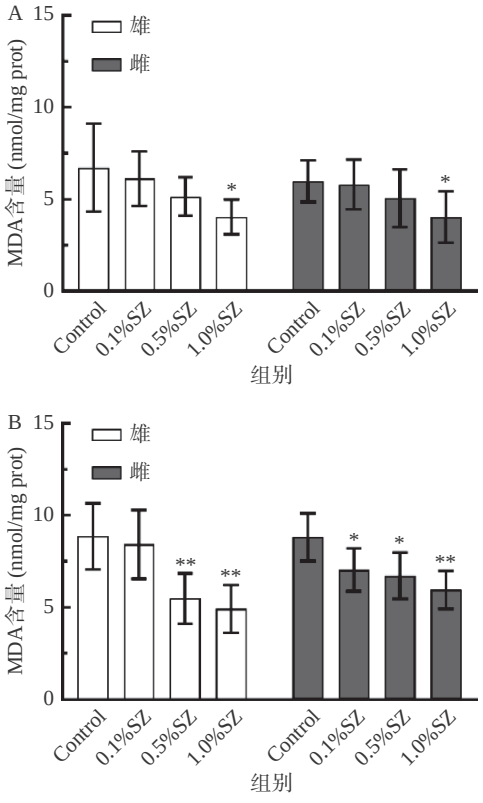


图 7　酸枣提取物对果蝇体内 MDA 含量的影响

Fig.7　Effect of *Ziziphus jujuba* extract on MDA content in *D. melanogaster*

与三个剂量酸枣提取物组雌果蝇体内的 MDA 含量显著降低（P<0.05 或 P<0.01），且 30 d 各组雌、雄果蝇的 MDA 含量均高于 10 d 组，说明 MDA 的含量

会随着果蝇日龄的增加而增加，不同质量分数的酸枣提取物可以降低雌、雄果蝇体内 MDA 的含量。

2.2.3.3 酸枣提取物对果蝇体内 CAT 活力的影响 CAT 是体内另一种抗氧化酶，与 SOD 作用相似，均可清除体内自由基，从而减少机体产生的过氧化物[31]。不同质量分数酸枣提取物对雌、雄果蝇体内 CAT 活力的影响见图 8。在第 10 d，与空白组相比较，0.5% 与 1.0% 酸枣提取物组雌果蝇体内的 CAT 活力显著增强（$P<0.05$），各质量分数组雄果蝇体内 CAT 活力未见明显改变（$P>0.05$），提示酸枣提取物对较低日龄的雄果蝇体内 CAT 活力影响较小。在第 30 d，与空白组相比较，0.1%、1.0% 酸枣提取物组雄果蝇与 0.5% 酸枣提取物组雌果蝇体内的 CAT 活力显著增强（$P<0.05$），说明不同质量分数的酸枣提取物能够提高果蝇体内 CAT 活力。

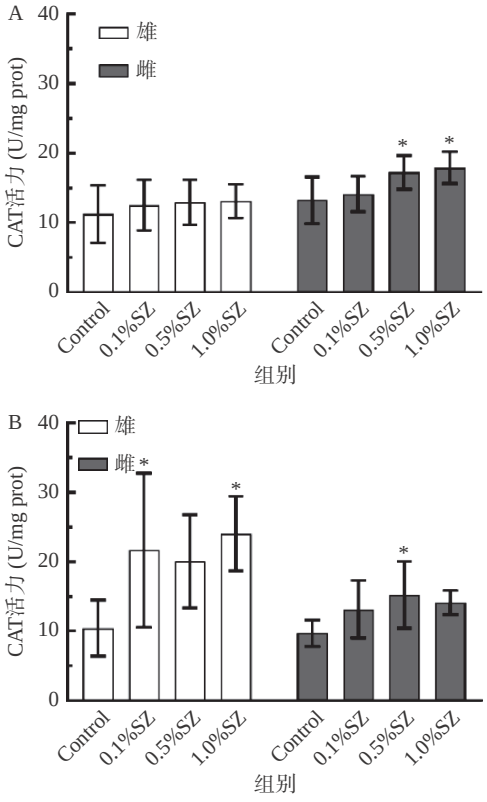


图 8 酸枣提取物对果蝇体内 CAT 活力的影响

Fig.8 Effect of *Ziziphus jujuba* extract on CAT activity in *D. melanogaster*

3 结论

本研究采用了 DPPH 自由基清除率、羟自由基清除率及 Fe^{3+}还原能力的方法评价了酸枣提取物的体外抗氧化活性，结果表明，不同质量浓度的酸枣提取物对 DPPH 自由基、羟自由基均有不同程度的清除作用，对 Fe^{3+}具有还原能力，且呈现良好的剂量依赖性。在此基础上，利用果蝇这一模式生物，通过制作含药培养基的方式，探索了酸枣提取物对自然衰老果蝇寿命的影响，发现酸枣提取物可以在一定程度上延长雌、雄果蝇的平均寿命和最长寿命，说明酸枣提取物具有一定的抗衰老作用。酸枣提取物还可以显著增强 30 日龄果蝇的攀爬能力，提示酸枣提取物可能对自然衰老果蝇的运动能力具有提升作用。此外，酸枣提取物不同质量分数组果蝇 SOD、CAT 活力均有不同程度的升高，MDA 含量降低，说明酸枣提取物对果蝇有一定的抗氧化效果。综上所述，酸枣提取物具有较好的体内外抗氧化能力和潜在抗衰老作用，其作用机制可能与提高抗氧化酶活性及抑制脂质过氧化物的产生有关，该研究结果为酸枣提取物开发成为延缓衰老的中药保健食品提供实验依据。

参考文献

[1] 尚志钧. 神农本草经辑校 [M]. 北京: 学苑出版社, 2014: 41. [SHANG Z J. Edited Shennong's herbal classic[M]. Beijing: Xueyuan Press, 2014: 41.]

[2] WU Y, CHEN M, DU M B, et al. Chemical constituents from the fruit of *Zizyphus jujuba* Mill. var. *spinosa*[J]. Biochemical Systematics & Ecology, 2014, 57: 6−10.

[3] 田秀红, 黎梅, 张慧姣, 等. 河北酸枣总黄酮提取工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(13): 76−78. [TIAN X H, LI M, ZHANG H J, et al. Study on the extraction technology of total flavonoids of Hebei wild jujube[J]. Food Research and Development, 2015, 36(13): 76−78.]

[4] 阮凯华, 唐志书, 刘红波, 等. 不同产地酸枣果肉的品质评价研究[J]. 中南药学, 2021, 19(5): 896−901. [RUAN K H, TANG Z S, LIU H B, et al. Quality evaluation of sour jujube pulp from different origins[J]. Central South Pharmacy, 2021, 19(5): 896−901.]

[5] 解玉军, 李泽, 崔小芳, 等. 酸枣化学成分及药理作用研究进展[J]. 中成药, 2021, 43(5): 1269−1275. [XIE Y J, LI Z, CUI X F, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of wild jujube[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2021, 43(5): 1269−1275.]

[6] 张蕾, 何晓曦, 徐淑萍, 等. 酸枣果肉的镇静催眠作用[J]. 中药材, 2011, 34(8): 1263−1266. [ZHANG L, HE X X, XU S P, et al. Sedative and hypnotic effects of *Zizyphus jujuba* pulp[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2011, 34(8): 1263−1266.]

[7] 郎杰, 崔娜, 张立斌. 酸枣果肉多糖保健功能的初步研究[J]. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2014, 42(2): 162−166. [LANG J, CUI N, ZHANG L B. Preliminary study on healthcare effects of wild jujube pulp polysaccharides[J]. Journal of Northwest A& F University (Nat. Sci. Ed.), 2014, 42(2): 162−166.]

[8] YUE Y, WU S, ZHANG H, et al. Characterization and hepatoprotective effect of polysaccharides from *Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou sarcocarp[J]. Food & Chemical Toxicology, 2014, 74: 76−84.

[9] 薛晓芳, 弓桂花, 赵爱玲, 等. 枣和酸枣不同器官黄酮含量比较及抗氧化能力分析[J]. 中国果树, 2020(1): 59−63. [XUE X F, GONG G H, ZHAO A L, et al. Comparison of flavonoid contents and antioxidant capacities in different organs of Chinese jujube and wild jujube[J]. Journal of China fruiter, 2020(1): 59−63.]

[10] 王相, 杨梦婷, 高乐, 等. 酸枣不同部位提取物指标成分测定及体外抗氧化活性研究[J]. 现代中医药, 2020, 40(4): 13−19. [WANG X, YANG M T, GAO L, et al. A research on the index component measurement of the extracts fromdifferent parts of wild jujube and their antioxidant activities *in vitro*[J]. Modern Tradition-

al Chinese Medicine, 2020, 40(4): 13−19.]
[11] 施利奇, 张彦青, 戚务勤, 等. 酸枣水提物不同提取工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2019, 35(11): 182−190. [SHI L Q, ZHANG Y Q, QI W Q, et al. Optimization of different extraction processes of sour jujube juice and study on its antioxidant activity[J]. Food & Machinery, 2019, 35(11): 182−190.]
[12] 杜晨晖, 解玉军, 申晨曦, 等. 干燥方式对酸枣果肉活性物质及抗氧化能力的影响[J]. 食品科学, 2020, 41(15): 140−147. [DU C H, XIE Y J, SHENG C X, et al. Effects of different drying methods on bioactive compounds and antioxidant capacity of *Ziziphi spinosae* sarcocarp[J]. Food Science, 2020, 41(15): 140−147.]
[13] 解玉军. 基于山西道地中药酸枣的综合利用与功能果酒研发 [D]. 太原: 山西中医药大学, 2021. [XIE Y J. Comprehensive utilization and functional wine development based on Shanxi genuine traditional Chinese medicine *Ziziphus jujube* Minn. var. *spinosa* [D]. Taiyuan: Shanxi University of Chinese Medicine, 2021.]
[14] 毛丽衡, 毛永民, 王颉, 等. 酸枣果醋酒精发酵过程工艺的研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(16): 200−202,206. [MAO L H, MAO Y M, WANG J, et al. Study on technology of alcohol fermentation in wild jujube vinegar[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(16): 200−202,206.]
[15] 徐蕊, 李祥, 王慧, 等. 酸枣浓缩汁抗氧化和血脂调控的功能评价[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(2): 192−197. [XU R, LI X, WANG H, et al. Effect of wild jujube concentrate on antioxidant and lipid metabolism[J]. Food Research and Development, 2018, 39(2): 192−197.]
[16] ZHAO Y J, LI J K, ZHANG X, et al. Study on antioxidant activity of flavonoids from leaves of *Psidium guajava*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2018, 43(4): 760−765.
[17] LUO Y H, LI X R, HE J, et al. Isolation, characterisation, and antioxidant activities of flavonoids from chufa (*Eleocharis tuberosa*) peels[J]. Food Chem, 2014, 164: 30.
[18] SEO J, LEE S, ELAM M L, et al. Study to find the best extraction solvent for use with guava leaves (*Psidium guajava* L.) for high antioxidant efficacy[J]. Food Sci Nutr, 2014, 2(2): 174.
[19] 陆雨芳, 刘庆庆, 朱成成, 等. 梵净山茶生物活性成分及其抗氧化能力的分析[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(12): 46−53. [LU Y F, LIU Q Q, ZHU C C, et al. Analysis of bio-active components and antioxidant capacity of Fanjing Mountain tea[J]. Food Research and Development, 2021, 42(12): 46−53.]
[20] GRZEGORCZYK K I, KRZEMINSKA M, KISS A K, et al. Phytochemical profile and antioxidant activity of aerial and underground parts of *Salvia bulleyana* Diels. plants[J]. Metabolites, 2020, 10(12): 497.
[21] 卞宏生, 蔡江莹, 杨凡静暄. 刺五加总苷及刺五加苷 B 对持续黑暗条件下果蝇睡眠-觉醒节律的量效关系研究[J]. 中国药物依赖性杂志, 2020, 29(3): 231−236. [BIAN H S, CAI J Y, YANG F J X. Study on the dose-effect relationship of *Acanthopanax* total glycoside and eleutheroside B onsleep-wake rhythm in *Drosophila melanogaster* under continuous darkness[J]. Chin J Drug Depend, 2020, 29(3): 231−236.]
[22] 秦永燕, 王妤婕, 李颖, 等. 黄芪多糖对果蝇寿命和抗氧化作用的影响[J]. 食品工业科技, 2020, 41(2): 288−291. [QIN Y Y, WANG Y J, LI Y, et al. Effects of *Astragalus* polysaccharide on life span and antioxidation of *Drosophila melanogaster*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(2): 288−291.]
[23] 王艳艳, 翟春梅, 怀雪, 等. 东北刺人参的抗氧化作用研究[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(4): 13−18. [WANG Y Y, ZHAI C M, HUAI X, et al. Study of antioxidant activity of *Oplopanax elatus* Nakai[J]. Food Researchand Development, 2020, 41(4): 13−18.]
[24] 刘冀婕, 黄玲艳, 曾照准, 等. 桂花提取物对雄性果蝇抗氧化及抗衰老作用的研究[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(21): 38−43. [LIU J J, HUANG L Y, ZENG Z Z, et al. Effects of *Osmanthus fragrans* alcohol extract on anti-oxidation and anti-aging for male fruit fly[J]. Food Research and Development, 2018, 39(21): 38−43.]
[25] HMIDANI A, BOUHLALI E, AJEBLI M, et al. *In vitro* investigation of antioxidant and antihemolytic activities of three Lamiaceae species from Morocco[J]. Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences, 2021, 10(1): 1−8.
[26] 李萌茹, 周玉枝, 杜冠华, 等. 中药黄酮类化合物抗衰老作用及其机制研究进展[J]. 药学学报, 2019, 54(8): 1382−1391. [LI M R, ZHOU Y Z, DU G H, et al. Research progress about the anti-aging effect and mechanism of flavonoids from traditional Chinese medicine[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2019, 54(8): 1382−1391.]
[27] TAORMINA G, FERRANTE F, VIENI S, et al. Longevity: Lesson from model organisms[J]. Genes, 2019, 10(7): 518.
[28] 王艳艳, 王凤玲, 毛子玮, 等. 具有抗衰老作用中药有效成分及作用机制研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 23(5): 142−148. [WANG Y Y, WANG F L. MAO Z W, et al. Advances in research on active ingredients and mechanism of action of traditional Chinese medicine with anti-aging effects[J]. Journal of Liaoning University of TCM, 2021, 23(5): 142−148.]
[29] TOBIASW W, ARIATHNEYC, THOMASE S, et al. Improving mitochondrial function significantly reduces metabolic, visual, motor and cognitive decline in aged *Drosophila melanogaster*[J]. Neurobiology of Aging, 2017, 60: 34−43.
[30] MA C, YANG K, WANG Y, et al. Anti-aging effect of agar oligosaccharide on male *Drosophila melanogaster* and its preliminary mechanism[J]. Mar Drugs, 2019, 17(11): 632.
[31] TANG R, CHEN X, DANG T, et al. *Lycium barbarum* polysaccharides extend the mean lifespan of *Drosophila melanogaster* [J]. Food Funct, 2019, 10(7): 4231−4241.

李静, 李明源, 王继莲, 等. 纤维素的微生物降解研究进展 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 396−403. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021040146

LI Jing, LI Mingyuan, WANG Jilian, et al. Research Progress on Microbial Degradation of Cellulose[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 396−403. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021040146

· 专题综述 ·

纤维素的微生物降解研究进展

李　静, 李明源, 王继莲*, 张　甜, 周　茜

（喀什大学生命与地理科学学院, 叶尔羌绿洲生态与生物资源研究高校重点实验室, 新疆帕米尔高原生物资源与生态重点实验室, 新疆喀什 844000）

摘　要: 纤维素是自然界储量最丰富的可再生生物质原料，具有解决能源危机的巨大潜力，但结构复杂，难以降解，导致综合利用率较低。利用微生物处理技术降解纤维素，是实现其循环利用的一项重要策略。本文从单一菌株、天然复合菌群、优化组合纯培养菌株三个方面对纤维素的微生物降解进行了综述，总结归纳了每种筛选策略的优势特点和应用价值，并阐述了纤维素的微生物降解机理，对其未来发展提出了展望，旨在为探索更高效的纤维素降解新思路提供借鉴。

关键词: 纤维素, 降解, 微生物, 筛选, 机理

中图分类号: TS202.1　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0396−08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021040146

本文网刊:

Research Progress on Microbial Degradation of Cellulose

LI Jing, LI Mingyuan, WANG Jilian*, ZHANG Tian, ZHOU Qian

(Department of Biologic and Geographic Sciences, Kashi University, Key Laboratory of Ecology and Biological Resources in Yarkand Oasis of Education of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Key Laboratory of Biological Resources and Ecology of Pamirs Plateau in Xinjiang Uygur Autonomous Region, Kashi 844000, China)

Abstract: Cellulose is the most abundant renewable biomass raw material in nature and has great potential to solve the energy crisis. However, the comprehensive utilization rate of cellulose is low due to its complex structure, which is difficult to degrade. The degradation of cellulose by microorganism is an important strategy to realize its recycling. The microbial degradation of cellulose is reviewed from three aspects, including single strain, complex flora and optimized combination of isolates. The advantages and application values of each screening strategy are summarized and analyzed. Moreover, the microbial degradation mechanism and future development of cellulose are described to give opportunities for exploring new ideas of more efficient cellulose degradation.

Key words: cellulose; degradation; microorganisms; screening; mechanisms

纤维素是由葡萄糖以 β-1,4 糖苷键连接而成的线性链多糖[1], 结构紧密、排列有序, 具有高结晶度和难溶性等特点[2], 是植物细胞壁的主要组成成分(图 1)。纤维素类物质是世界上年产量最多的二次资源[3], 每年通过光合作用合成的有机物约有 1×10^{11} t, 而纤维素就占 50%, 它们的再利用对社会的可持续发展和环境保护具有重要意义[4]。

纤维素的预处理是目前制约生物质资源高效利用的技术瓶颈之一。物理方法可以有效降低纤维素的结晶度, 包括破碎、高温热解、微波处理和高能辐射等方式, 具有操作简单、污染少的优点, 但同时能耗大, 成本高。化学方法操作繁琐程度较低, 短时间就可达到降解效果, 方式主要包括酸降解、碱降解、有机溶剂预处理和氧化预处理等。但所需试剂浓度较高, 且后续需进行 pH 调节, 生成的化学残留物也会对环境造成污染, 因此处理过的酸碱必须进行回收处理[6]。而微生物预处理是利用高产纤维素酶降解菌对其进行酶解, 具有环保、专一性强、处理成本

收稿日期: 2021−04−15

基金项目: 国家自然科学基金（51878291）; 国家自然科学基金（32160408）。

作者简介: 李静（1997−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 资源微生物, E-mail: lijing_970627@163.com。

*** 通信作者:** 王继莲（1986−）, 女, 硕士, 研究方向: 微生物工程及其应用, E-mail: wjilian0710@sina.com。

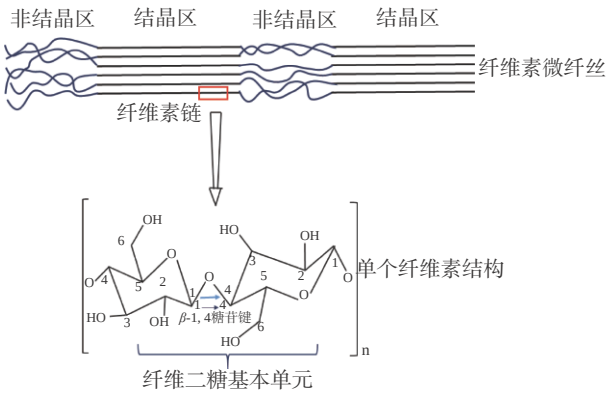


图 1　纤维素结构示意图[5]

Fig.1　The structure of cellulose[5]

低、反应条件温和、能耗低等优点，备受科研人员关注[7−8]。研究者们相继开展了纤维素酶生产菌的选育及降解特性研究，得到了一批宝贵的菌种资源[9]。本文总结归纳了纤维素降解菌的筛选方法和研究策略，探讨了各策略的优势特点和应用价值，并阐释了纤维素的微生物降解机理，对未来如何进一步高效利用纤维素进行了展望，以期为纤维素类物质的降解提供进一步理论支撑，促进二次资源的综合利用。

1　筛选单一菌株降解纤维素

环境中存在着丰富的纤维素降解菌，主要包括真菌、放线菌及细菌等。它们的类群庞杂，相互协调，但绝大多数难以进行人工培养。目前已分离 200 多种，主要来源于枯腐树叶或衣服、秸秆还田的土壤、反刍动物粪便等，多使用单一碳源（滤纸条或羧甲基纤维素钠 CMC-Na）进行富集培养[10−11]。由表 1 可见，降解菌种主要包括青霉属（*Penicillium*）、曲霉属（*Aspergillus*）、链霉菌属（*Streptomyces*）、假单胞菌（*Pseudomonas*）、芽孢杆菌（*Bacillus*）等，以真菌居多，不同菌种对底物的降解效率参差不齐。

纤维素分子间主要靠氢键连接，键能相对较弱，其降解主要靠微生物产生的纤维素酶（包括外切 β-1, 4 葡萄糖苷酶、内切 β-1, 4 葡萄糖苷酶和 β-葡聚糖苷酶）破坏其氢键和 β-1, 4 糖苷键，将其多结构变为单结构。但纤维素酶活力受到诸多因素的影响，与培养温度和培养时间密切相关，温度过高会造成菌株提前失活[12]，微生物培养基的 pH、营养成分比例、接种量等也会对酶活力产生明显影响，影响降解率。而相关研究报道证明通过向培养基中添加一定量的 Fe^{2+} 和 VB_{12} 等附加因子，可以起到稳定酶空间构象及提高微生物代谢效率的作用[20]，有效提高纤维素降解率。此外，培养基中可添加适宜的产酶诱导物也可以提高纤维素酶产量，加速纤维素降解。槐糖是已报道诱导力最强的产纤维素酶诱导物，但大规模生产不具备经济可行性。而以稻草粉代替槐糖作为碳源和诱导物，采用固体发酵法优化绿色木霉的产酶条件，纤维素酶活力得到有效提升[21]。

近年来，环境耐受性良好的高效降解纤维素菌株也被逐步发掘。某些冷适应降解菌的产酶条件经优化后在低温下可保持高效产酶能力。放线菌 *Clavibacter michiganensis* CF11 在低于 10 ℃、pH 为 6.5、培养时间为 10 d 的条件下纤维素酶活力显著提升[22]。而一些耐高温纤维素酶菌株具有高温偏好性，热稳定性强，在高温环境下的纤维素降解能力较强[23]。如解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus methylotrophicus* Y3-2 在 55 ℃ 条件下，不仅能高效降解纤维素，还具有抑制大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等病原菌的能力，具有潜在应用前景[24]。但超高温好氧发酵技术过程中会流失较多的营养成分，如何在高效降解和保持较多的营养成分之间找一个平衡点，有待深层次研究[25]。

2　微生物协同降解纤维素

单一菌株生成的纤维素酶种类相对单一，产酶能力薄弱，降解能力有限。1950 年，Gilligan[26] 首次发现木霉所产的纤维素酶可通过协同作用，实现对纤维素的高效降解。微生物协同降解的优势在于产酶种类多、耗时少、降解覆盖率高、针对性强[27]，但对培养条件、培养基成分、比例等的要求相对严格。工业生产中，常利用微生物的协同作用达到降解纤维素作物的目的[28]。

2.1　筛选复合微生物菌系

直接从自然界筛选的天然复合菌群，基于微生物间的协同作用能有效增强纤维素降解速度，不仅拥有健全的酶系，还可以将不同 pH 的培养液缓冲到中性，更适合菌系生存。崔宗均等[29] 采用酸碱反应互

表 1　单一菌株的纤维素降解特性

Table 1　Characteristics of cellulose degradation activity of single strain

样本来源	菌种	底物	反应条件	降解率(%)	文献
牛粪	孢孢菌*Cladosporium* Z-3 伯氏短杆菌*Brevibacillus borstelensis* X-1	滤纸	50 ℃、7 d	18.86 16.37	[12]
鹅盲肠	草酸青霉*Penicillium oxalicum Currie & Thom* F67	滤纸	30 ℃、8 d	28.53	[13]
腐烂秸秆	黑曲霉*Aspergillus niger* SC2	玉米秸秆	30 ℃、10 d	33.07	[14]
冻牛粪	低温假单胞菌*Pseudomonas* YSX-3	牛粪堆肥	9 ℃、25 d	45.2	[15]
森林土壤	白腐菌*Trametes versicolor* BYL-7	水稻秸秆	30 ℃、10 d	21.5	[16]
寒地土壤	链霉菌*Streptomyces* GS-3-39	玉米芯	28.22 ℃、5 d	39.84	[17]
温泉附近高温土壤	耐高温苏云金厌氧杆菌*Anoxybacillus rupiensis* X-08	玉米秸秆	60 ℃、20 d	16.13	[18]
腐烂烟草茎叶	枯草芽孢杆菌*Bacillus subtilis* SL-3A	烟草秸秆	37 ℃、15 d	20.85	[19]

补原则，在传代时重新优化组合驯化出的复合菌系 MC1 可在 72 h 内将滤纸和脱脂棉等较纯的纤维素材料完全降解，对麦秆、锯末等材料也有较强的降解能力。

复合体系中微生物产生的纤维素酶可降解纤维素生成葡萄糖，起到为菌供能、促进增殖等作用，多组分酶体系在降解过程中互补互利，共同完成降解过程。而复合菌系的构建增加了酶的环境适应性和功能稳定性，弥补了单一菌种的纤维素酶种类不全和纤维素酶配比不协调等缺点，从而提升降解速度。因此可以说，各组成菌之间、组成菌与纤维素酶、各酶与酶之间的协同和拮抗作用，是保持复合菌系稳定的重要机制。即使混入其它杂菌，也很难将这个平衡系统破坏。

复合菌系虽然在降解效果上优于单一菌株，但降解过程中出现的不确定因素也较多，如微生物群落和代谢类型不明确、高温或低温环境中部分酶系易失活、菌系的组成和结构会因培养条件的差异而改变等。因此，要想达到快速、低成本降解纤维素的目的，高效降解菌的筛选还存在一些亟待解决的瓶颈问题：a.明确复合菌系中菌株组成类别，进而准确判断菌株习性，构建最优培养条件；b.深入解析各酶组分之间的重要协同作用关系；c.解析复合菌系中的代谢调控；d.增强对环境耐受性的复合菌系的研究。现阶段可对菌株培养条件（温度、pH、培养时间等）进行变量-非变量研究，观察纤维素降解效率及纤维素酶活峰值的变化，从而确定菌群的最优培养条件[30−31]。或重新组合已有的复合菌群和功能菌群，检测、对比新复合菌系的降解效率、结构稳定性及功能性，从而进一步明确复合体系中各组分间的协同作用关系。此外，还可联合生物工程技术构建基因工程菌，将难培养的微生物中的纤维素酶编码基因克隆到大肠杆菌或酿酒酵母上进行表达，以期获得产率更大、酶系更完整的高活性降解菌。而通过分子生物学技术提取复合菌群的微生物总 DNA，从构建的基因组文库中筛选高产纤维素酶基因，也可提升降解菌系的结构和功能分析效率。

2.2 优化组合纯培养菌株

将单一高活性产酶菌株混合培养，基于不同微生物类群的优化组合可以弥补菌种间的性质差异，所构成的完全酶系可充分发挥各酶系间的协同作用，综合提高酶活性，最大限度发挥纤维素降解潜力，毫不逊于直接筛选到的复合菌系（表 2）。多数学者对霉菌的组合研究较多[32]，对细菌和放线菌的协同作用鲜见报道。细菌的基因无内含子，可直接克隆目的基因，方便构建高效纤维素酶工程菌[33]。而放线菌作为土壤微生物的重要组成部分，参与了大部分高分子聚合物的降解，还可以产生具有抑制杂菌生长的抗菌素[34]。因此，构建细菌与放线菌的复合菌系具有广阔的研究前景。此外，菌株的培养环境也会深刻影响降解效果，原位生长环境的模拟能显著提升其降解效果。

针对分离到的不同单一菌株，总结其相互间的拮抗活性、酶种类和代谢产物，将具有互补差异的几种高酶活菌株进行复配，介导菌株之间的协同作用可起到提高菌系的降解能力和稳定性目的。同时此类复合体系每个菌株的特性明确，在实际应用中能较好地控制其活性，可操作性强。但缺陷在于优化组合单一菌株的过程相比天然复合菌系繁琐复杂。另外需注意的是，并不是所有混合菌的发酵一定比单菌株发

表 2 组合菌株的纤维素降解特性

Table 2 Characteristics of cellulose degradation activity of mixed strains

菌株	底物	反应条件	降解率(%)	文献
黑曲霉*Aspergillus*、木霉*Trichoderma*、草酸青霉*Penicillium*、黄孢原毛平革菌*Phaerochaete chrysosporium*	玉米秸秆	28 ℃、14 d	64.52	[35]
枝孢菌*Cladosporium* sp.Y-2、枝孢菌*Cladosporium* sp.Y-6、镰刀菌*Fusarium* sp.Y-7、绿色木霉*Trichoderma* sp.Y-R	碱处理后的玉米秸秆	30 ℃、30 d	39.02	[36]
嗜糖假单胞菌*Pelomonas gx.*、*Curvibacter zj.*	碱处理后的腐化玉米秸秆	35 ℃、4 d	78.1	[37]
低温菌系：嗜麦芽寡养单胞菌*Stenotrophomonas maltophilia* X24、约氏黄杆菌*Flavobacterium johnsoniae* X26、泛菌属*Pantoea rodasii* X37	玉米秸秆	12 ℃、45 d	58.49	[38]
弗留明拜叶林克氏菌*Beijerinckia fluminensis* XM-3、微杆菌*Microbacterium* sp. TS-3、芽胞杆菌*Bacillus* sp. G-13、链霉菌*Streptomyces* sp. LS-12、毛壳菌*Chaetomium* sp. SLT-12	稻秆	28 ℃、20 d	63.1	[39]
蜡样芽胞杆菌*Bacillus cereus* HDZK-DLCB4、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* HDZK-DLCB9、小孢根霉*Rhizopus microsporus* HDZK-DLCF1、出芽短梗霉*Aureobasidium pullulans* HDZK-BYTF620、苏云金芽孢杆菌*Bacillus thuringiensis* HDZK-DLCB5	玉米秸秆	25 ℃、14 d	67.79	[40]
荧光假单胞菌*Pseudomonas* sp. StFLB209、纤维化纤维菌 Cellulosimicrobiumcellulans LMG 16121^T、无色杆菌*Achromobacter* B2^T *marplatensis*、褐鞘假单胞菌*Pseudomonas fuscovaginae* ICMP 5940^T	玉米秸秆	35 ℃、4 d	47.56	[41]
木霉*Trichoderma*.sp.、青霉*Penicillium*.sp.	玉米秸秆	30 ℃、3 d	68	[42]
黄孢原毛平革菌*Phaerochaete chrysosporium* 5.776、绿色木霉*Trichoderma viride* Y-1	玉米秸秆	30 ℃、10 d	42.63	[43]
木霉*Trichoderma* C9、*Trichoderma* F93、青霉*Penicillium* D72	碱处理后的玉米秸秆	35 ℃、4 d	34.52	[44]

酵能力强，因复合菌系之间可能存在竞争或拮抗作用，不利于菌株的生长和产酶。因此，在进行不同组合的菌株培养时，要充分考虑菌株间的拮抗作用、物种组成和比例、菌株的生长周期和整体酶系的稳定等因素[45]。

3　微生物降解纤维素机理

微生物直接通过胞吞方式将纤维素等大分子物质转移至细胞膜内进行代谢是很难实现的，因此，其对纤维素的降解主要靠分泌至胞外的纤维素酶氧化分解。由于纤维素结构的复杂性，其确切的降解机理至今尚无定论。目前被大家普遍接受的主要有 3 种理论[46]，分别是 C_1-C_X 假说、协同理论和原初反应假说。

3.1　C_1-C_X 假说

此假说认为在纤维素降解过程中，纤维素酶与各个酶或物质要依据一定的步骤顺序才能完成整个水解过程[47]。相关研究表明，需要 C_1 酶（外切 β-1, 4 葡萄糖苷酶）、C_X 酶（内切 β-1, 4 葡萄糖苷酶）和 CB 酶（β-葡聚糖苷酶）同时存在才能将天然纤维素水解为葡萄糖。如果在降解结晶纤维素时首先加入 C_1 酶，反应过后除去 C_1 酶的同时再加入 C_X 酶，则反应过程无法完成。根据 C_1-C_X 假说，先是结晶纤维素在 C_1 酶的作用下将已形成结晶结构的纤维素链断裂，使长链分子的末端脱离，形成非结晶无定型纤维素或可溶性低聚糖，从而导致纤维素链易水解。接着 C_X 酶作用于非结晶无定型纤维素或可溶性低聚糖，产生纤维二糖，最后在 CB 酶的水解作用下生成葡萄糖（图 2）。

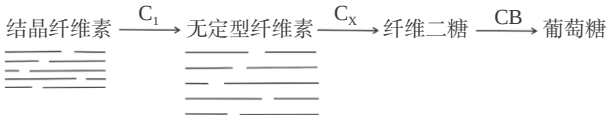


图 2　C_1-C_X 假说理论[48−49]

Fig.2　The C_1-C_X hypothesis theory [48−49]

C_1 酶可作用于纤维素的结晶区，使之转变为可被 C_X 酶作用的形式。但该学说没有很好地解释 C_1 酶的作用机理。有学者对其提出了种种推测及猜想，如 C_1 酶可能作用于连接纤维素分子间的氢键、纤维素分子中的 β-1, 4 糖苷键、其它一些不规则的键或薄弱键等，但都没有得到证实[50]。C_X 酶在水解过程中起着举足轻重的作用，在一定程度上影响着纤维素大分子水解为纤维二糖的程度，可以用来表征纤维素酶降解纤维素的能力。C_1 酶和 C_X 酶对纤维素的水解作用是分阶段协调的，C_1 酶只起到转化纤维素的结晶区但不水解的作用，而 C_X 酶可将部分无定型纤维素水解为可溶性产物。

3.2　协同理论

协同理论是 3 个理论中接受度最高的理论[51]，其降解过程也是由 C_X 酶、C_1 酶和 CB 酶 3 种酶协同完成[52]。其中 C_X 酶的作用是可以给 C_1 酶和 CB 酶创造酶切位点，再通过水解作用，作用于 β-1, 4 糖苷键，长链寡糖被裂解为短链寡糖，此时一些带有非还原性末端的纤维素分子就会显现出来。最后，C_1 酶作用于这些带有非还原性末端的小分子纤维素末端，使纤维二糖分子脱下，再在 CB 酶的水解作用下水解为葡萄糖分子[53]（图 3）。Wood[54] 发现赤木霉 *Trichoderma reesei* 和青霉菌 *Penicillium funiculosumde* 产生的纤维素酶在水解微晶纤维素和棉纤维时具有协同性。这种现象可能是由于两种纤维素酶底物的立体特异性不同所致。在协同过程中，每种纤维素酶作用于两个不同的非还原性链末端中的一个。当一种纤维素酶切断一种非还原链末端的一个纤维二糖单元时，另一种非还原链将暴露出来，并且具有不同底物立体特异性的第二种纤维素酶将切断纤维二糖单元。在这个过程中，这两种酶的协调可以解释协同效应。而在晶态几丁质降解过程中，通过几丁质降解酶系的内外协同，促进了外切几丁质酶在几丁质纤维上“持续奔跑”的耐力，进而增强昆虫在蜕皮过程中表皮的快速降解[55]。

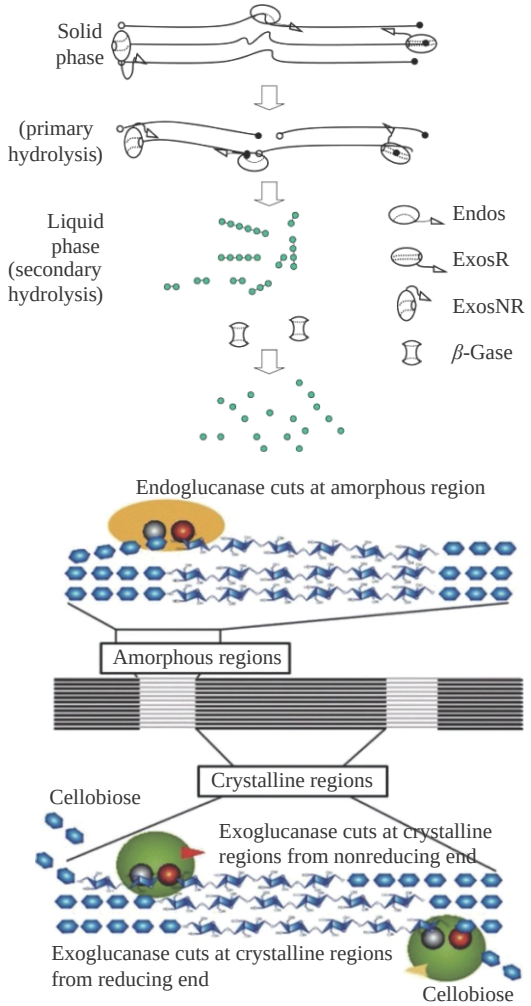


图 3　协同作用降解纤维素示意图[56−57]

Fig.3　Schematic diagram of synergistic cellulose degradation[56−57]

与 C_1-C_X 假说不同的是，在协同理论中，纤维素酶的顺序没有固定性和单一性。由于每种纤维素酶

组分在水解过程中的确切作用还不清楚，纤维素酶的类型也没有严格的区别。因此，虽然协同理论可以解释大多数纤维素的降解过程，但对起始反应是如何开始的及天然纤维素结晶区的降解机制尚不能完全阐明[58]。

3.3 原初反应假说

原初反应是一个无序反应，最早是在褐腐菌的水解研究中提出的。褐腐菌菌丝处于靠近次生木质细胞壁的 S3 层，在降解纤维素过程中菌丝可产生降解剂，扩散到 S2 层，从而导致扩散性腐烂(图 4)。当褐腐菌开始降解纤维素时，机械强度急剧下降，在此过程中只有少量的重量损失和少量的还原糖生成[59]，这与纤维素酶水解过程中产生的聚合度降低而生成的还原糖含量增加的变化明显不同。因此 Coughlan[60] 提出原初反应可以改变纤维素的结晶状态，更有利于纤维素的水解。褐腐菌的独特之处在于，当木材完全降解时，木质素很少被降解，这有利于纤维素和半纤维素的快速解聚。鉴于褐腐菌在降解天然纤维素方面的独特性，有学者推测，褐腐菌可能存在一种特殊的非酶木材降解系统，其中一小部分物质可进入 S2 解聚纤维素[61]。

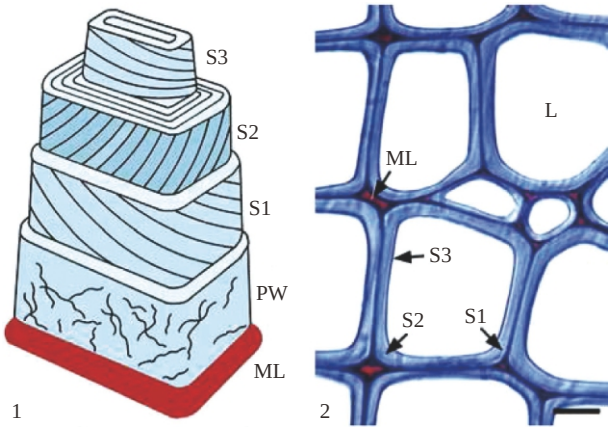


图 4 木质细胞壁模型

Fig.4 Wood cell wall model

注：(1)传统木质细胞壁模型；(2)木质细胞壁横切面；包括中间层(ML)、主墙(PW)和三层二级墙(S)：外(S1)、中间(S2)和内二级墙层(S3)[62]

另外霉菌在降解时首先会进入纤维细胞壁里面，通过 C_X 酶和 C_1 酶的协同作用降解纤维素。而褐腐菌不含 C_1 酶，C_X 酶的作用可能只打开一小部分的糖苷键，能降低纤维素的强度，削弱纤维的表面，所以只能看到机械强度的下降等物理变化，其他变化很小，比如其还原糖含量用还原糖分析方法则无法测出。

4 展望

不同菌种生成的纤维素酶之间可能存在某种程度的拮抗作用，从而影响纤维素降解效率。单一菌株易培养、易获取，但酶活性较低，降解不彻底。而多种微生物协同作用在降解中表现出的优势更明显，降解效果更理想，尤其是复合菌系的环境耐受性和稳定性，对纤维素的降解意义重大。但天然复合菌系和优化组合单一菌株的各方面条件相对严格，因此筛选过程中还需注重培养环境的优化。同时，联合基因工程组学，通过分子生物学技术分离纤维素酶编码基因，促进基因表达，包括排除对阻遏敏感的操纵基因、提高转译效率和将基因连到强启动子上等，都可有效改善纤维素酶稳定性，达到提高降解率目的[63−64]。

天然纤维素在降解过程中涉及到的能量变化、新陈代谢复杂多变，具体的生物降解过程尚不完全明确。因此，仍需进一步探究纤维素酶类的不同组分和小分子活性物质之间的作用，从酶学、动力学等多个角度综合揭示纤维素的降解机理。待深入阐明其降解机制过后，就可以实现菌群的人工调控，基于理论分析和应用研究的有机结合，使纤维素酶的水解达到极致，实现纤维素作物的最大限度利用。总之，实现纤维素的微生物降解和资源化利用，是将闲置纤维素类作物变废为宝、保护环境、缓解世界能源危机、推动绿色可持续发展的重要手段。

参考文献

[1] KARGAR F, MORTAZAVI M, MALEKI M, et al. Isolation, identification and in silico study of native cellulase producing bacteria[J]. Current Proteomics, 2021, 18(1): 3−11.

[2] SAJID M S, JABEEN F, HUSSAIN D, et al. Boronic acid functionalized fibrous cellulose for the selective enrichment of glycopeptides[J]. Journal of Separation Science, 2020, 43(7): 1348−1355.

[3] RAMEZANI N, SAIN M. Non-catalytic green solvent lignin isolation process from wheat straw and the structural analysis[J]. Renewable Energy, 2019, 140: 292−303.

[4] BARBOSA F C, SILVELLO M A, GOLDBECK R. Cellulase and oxidative enzymes: New approaches, challenges and perspectives on cellulose degradation for bioethanol production[J]. Biotechnology Letters, 2020, 42(6): 875−884.

[5] ISLAM S, CHEN I, SISLER J, et al. Cellulose nanocrystal (CNC)-inorganic hybrid systems: Synthesis, properties and applications[J]. Journal of Materials Chemistry B, 2018, 6(6): 864−883.

[6] 马泽林, 刘家亨, 黄序, 等. 微生物利用木质纤维素的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2017, 37(6): 124−133. [MA Z L, LIU J H, HUANG X, et al. Advances in microbial utilization of lignocellulose[J]. Chinese Academy of Sciences, 2017, 37(6): 124−133.]

[7] PAN Z L, YANG H, SHI J X, et al. Screening identification and characterization of cellulose degrading bacteria[J]. Environmental Science and Management, 2019, 44(4): 102−105.

[8] SHEN F, ZHONG B, WANG Y, et al. Cellulolytic microflora pretreatment increases the efficiency of anaerobic co-digestion of rice straw and pig manure[J]. BioEnergy Research, 2019, 12(3): 703−713.

[9] 陈露露. 玉米秸秆降解菌的分离鉴定及其降解性能研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江科技大学, 2019. [CHEN L L. Isolation, identification and degradation performance of corn straw decomposed bacteria[D]. Harbin: Heilongjiang University of Science and Technology, 2019.]

［10］ SUI M, RONG J, ZHANG Y, et al. Screening of cellulose degrading bacteria and construction of complex microflora[J]. IOP Conference Series Earth and Environmental Science, 2021, 632: 032021.
［11］ YU H J, GUO X L. Screening of straw-degrading bacteria and study on their cellulose-degrading performances[J]. Biotechnology Bulletin, 2019, 35(2): 58.
［12］ 李建树, 孙丽坤, 韩向敏, 等. 高温纤维素降解微生物的筛选、鉴定及其酶活力测定[J]. 甘肃农业大学学报, 2020, 55(3): 29−37. ［LI J S, SUN L K, HAN X M, et al. Screening, identification and determination of enzymatic activity of microorganisms degraded by high temperature cellulose[J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2020, 55(3): 29−37.］
［13］ 张名爱, 王宝维. 鹅源高活力纤维素分解菌的分离鉴定[J]. 中国家禽, 2012, 34(5): 12−15. ［ZHANG M A, WANG B W. Isolation and identification of highly active fibrin dissolving bacteria from goose sources[J]. China Poultry, 2012, 34(5): 12−15.］
［14］ 杨娜, 何鑫, 杜春梅. 一株纤维素降解菌的筛选与鉴定[J]. 中国农学通报, 2021, 37(17): 26−31. ［YANG N, HE X, DU C M. Screening and identification of a cellulose degradation bacterium[J]. Chinese Agricultural Bulletin, 2021, 37(17): 26−31.］
［15］ 单建荣, 全鑫, 朱用哲, 等. 一株低温纤维素降解菌的筛选与产酶条件优化[J]. 生态学杂志, 2021, 40(4): 1128−1136. ［SHAN J R, Q X, ZHU Y Z, et al. Screening and optimization of enzyme conditions of a cryogen cellulose degradation bacterium[J]. Journal of Ecology, 2021, 40(4): 1128−1136.］
［16］ 李灵灵, 王敬红, 赵铎, 等. 木质素降解菌 BYL-7 的筛选及降解条件优化[J]. 微生物学通报, 2020, 47(12): 4059−4071. ［LI L L, WANG J H, ZHAO D, et al. Optimizing the screening and degradation conditions of lignin degradation bacteria BYL-7[J]. Microbiology Bulletin, 2020, 47(12): 4059−4071.］
［17］ 刘晓飞, 侯艳, 马京求, 等. 降解玉米芯木质纤维素放线菌的筛选与发酵条件优化[J]. 农业机械学报, 2020, 51(11): 329−337. ［LIU X F, HOU Y, MA J Q, et al. Efficient degradation and optimization of fermentation conditions of actinomycetes from corn cob[J]. Journal of Agricultural Machinery, 2020, 51(11): 329−337.］
［18］ 刘心吾, 张威, 马玲玲, 等. 耐高温木质纤维素降解菌株的分离筛选、鉴定及降解工艺的研究[J]. 中国农学通报, 2020, 36(21): 118−125. ［LIU X W, ZHANG W, MA L L, et al. Study on separation, identification and degradation of high temperature-resistant lignocellulose degradation strains[J]. China Agricultural Science Bulletin, 2020, 36(21): 118−125.］
［19］ 梅金飞, 刚利萍, 余梅霞, 等. 烟草秸秆废弃物中纤维素降解菌的筛选、鉴定及产酶条件优化[J]. 烟草科技, 2020, 53(8): 15−23. ［MEI J F, GANG L P, YU M X, et al. Screening, identification and optimization of enzyme conditions of cellulose bacteria in tobacco straw waste[J]. Tobacco Technology, 2020, 53(8): 15−23.］
［20］ ZHOU J Q, QIU Z P, HAN Y P, et al. Screening of a cellulose-degrading strain and its enzyme-producing conditions[J]. Journal of Environmental Engineering, 2010, 4(3): 705−708.
［21］ 冯骏, 姚达行, 李晨, 等. 高效低成本纤维素酶诱导物的制备、筛选及应用[J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(6): 2561−2568. ［FENG J, YAO D X, LI C, et al. Preparation, screening and application of high efficiency and low cost cellulase inducers[J]. Genomics and Applied Biology, 2017, 36(6): 2561−2568.］
［22］ 孟建宇, 李蘅, 樊兆阳, 等. 低温纤维素降解菌的分离与鉴定[J]. 应用与环境生物学报, 2014, 20(1): 152−156. ［MENG J Y, LI H, FAN Z Y, et al. Isolation and identification of low temperature cellulose degrading bacteria[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2014, 20(1): 152−156.］
［23］ LU J, YANG Z M, XU W, et al. Enrichment of thermophilic and mesophilic microbial consortia for efficient degradation of corn stalk[J]. Journal of Environmental Sciences, 2019, 78(4): 120−128.
［24］ 沈琦, 孙宏, 王新, 等. 猪粪中嗜热纤维素降解菌的筛选及其除臭特性研究[J]. 中国畜牧杂志, 2020, 56(10): 162−166. ［SHEN Q, SUN H, WANG X, et al. Study on the screening and deodorization characteristics of thermophilic cellulose degradation bacteria in pig manure[J]. Chinese Livestock Journal, 2020, 56(10): 162−166.］
［25］ LI X, HAN C, LI W, et al. Insights into the cellulose degradation mechanism of the thermophilic fungus *Chaetomium thermophilum* based on integrated functional omics[J]. Biotechnology for Biofuels, 2020, 13(1): 1−8.
［26］ GILLIGAN W, REESE E T. Evidence for multiple components in microbial cellulases[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1954, 1(2): 90−107.
［27］ HORN S J, VAAJE-KOLSTAD G, WESTERENG B, et al. Novel enzymes for the degradation of cellulose[J]. Biotechnology for Biofuels, 2012, 5(1): 45−45.
［28］ CHEN X, CHENG W, LI S, et al. The “quality” and “quantity” of microbial species drive the degradation of cellulose during composting[J]. Bioresource Technology, 2021, 320 (Pt B): 124425.
［29］ 崔宗均, 李美丹, 朴哲. 一组高效稳定纤维素分解菌复合系 MC1 的筛选及功能[J]. 环境科学, 2002, 23(3): 36−39. ［CUI Z J, LI M D, PU Z. Screening and function of a group of highly stable cellulose decomposition composite MC1[J]. Environmental Sciences, 2002, 23(3): 36−39.］
［30］ 孟建宇, 杨帆, 冀锦华, 等. 大兴安岭森林土壤中纤维素降解真菌的分离及产酶条件优化[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2020, 17: 108−111, 120, 171. ［MENG J Y, YANG F, JI J H, et al. Isolation and optimization of cellulose degrading fungi in Greater Hinggan Mountains[J]. Heilongjiang Animal Husbandry and Veterinary, 2020, 17: 108−111, 120, 171.］
［31］ 王彦伟, 阮志勇, 江旭, 等. 一株耐受糠醛的纤维素降解菌 *Bacillus siamensis* BREC-11 的分离与鉴定[J]. 应用与环境生物学报, 2018, 24(4): 889−893. ［WANG Y W, RUAN Z Y, JIANG X, et al. Isolation and identification of *Bacillus siamensis* BREC-11, a cellulose degradation bacterium resistant to furfuraldehyde[J]. Application and Environmental Biology, 2018, 24(4): 889−893.］
［32］ SUKMAWATI D, DELLANERRA D, RISANDI A. Screening the capabilities of Indonesian indigenous mold in producing cellulase enzyme[J]. IOP Conference, 2018, 434: 012125.
［33］ SRIKANDACE Y, ANDAYANI D, KARINA M. Preliminary study of the degradation of biocellulose based film using soil fungi *Aspergillus unguis* TP3 and *Paecilomyces marquandii* TP4

producing cellulose[J]. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2019, 277(1): 012001.
[34] SHANG T, QUANHONG L I, DENG S. Screening and isolation of highly efficient cellulose-degrading microorganisms and construction of complex microbial system[J]. Agricultural Science and Technology, 2015, 16(4): 639−652.
[35] 黄开明, 赵立欣, 冯晶, 等. 复合微生物预处理玉米秸秆提高其厌氧消化产甲烷性能[J]. 农业工程学报, 2018, 34(16): 184−189. [HUANG K M, ZHAO L X, FENG J, et al. Improvement of methane production by anaerobic digestion of corn straw pretreated with composite microorganism[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2018, 34(16): 184−189.]
[36] 刘霄. 高效降解玉米秸秆复合菌群的构建及其降解效果研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2019. [LIU X. Study on the construction and degradation effect of high-efficient degradation of corn straw complex bacteria[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2019.]
[37] 张悦, 季静, 关春峰, 等. 秸秆纤维素降解菌的筛选及其产酶特性研究[J]. 纤维素科学与技术, 2018, 26(4): 28−38. [ZHANG Y, JI J, GUAN C F, et al. Screening of straw cellulose degrading bacteria and study on its enzyme producing characteristics[J]. Journal of Cellulose Science and Technology, 2018, 26(4): 28−38.]
[38] 于素素. 低温玉米秸秆降解菌的筛选及其复合菌系产酶条件优化 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2019. [YU S S. Screening of degradable bacteria from low temperature corn straw and optimization of enzyme production conditions of complex strains[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2019.]
[39] 王海滨, 韩立荣, 冯俊涛, 等. 高效纤维素降解菌的筛选及复合菌系的构建[J]. 农业生物技术学报, 2015, 23(4): 421−431. [WANG H B, HAN L R, FENG J T, et al. Screening of highly effective cellulose-degrading bacteria and construction of complex strains[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2015, 23(4): 421−431.]
[40] 王珊珊. 玉米秸秆高效降解菌的筛选及混合菌株降解能力测定 [D]. 哈尔滨: 黑龙江大学, 2016. [WANG S S. Screening of high efficiency degradation bacteria of corn straw and determination of degradation ability of mixed strain[D]. Harbin: Heilongjiang University, 2016.]
[41] 张必周, 高聚林, 于晓芳, 等. 玉米秸秆低温降解菌的分离与鉴定及复配菌降解效果研究[J]. 玉米科学, 2020, 28(6): 168−175. [ZHANG B Z, GAO J L, YU X F, et al. Isolation and identification of low temperature degrading bacteria from corn straw and study on the effect of compound bacteria[J]. Journal of Maize Science, 2020, 28(6): 168−175.]
[42] 宋颖琦, 刘睿倩, 杨谦, 等. 纤维素降解菌的筛选及其降解特性的研究[J]. 哈尔滨工业大学学报, 2002, 34(2): 197−200. [SONG Y Q, LIU R Q, YANG Q, et al. Screening of cellulose degrading bacteria and its degradation characteristics[J]. Journal of Harbin Institute of Technology, 2002, 34(2): 197−200.]
[43] 张立霞. 纤维降解菌组合的筛选、优化及对玉米秸秆的降解效果 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2014. [ZHANG L X. Screening and optimization of fiber degradation bacteria combination and the degradation effect of corn straw[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2014.]
[44] 段杰. 东北地区秸秆纤维素降解菌的筛选及高效降解菌系的构建 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2015. [DUAN J. Screening of straw cellulose degrading bacteria in northeast China and construction of high efficient degrading strains[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2015.]
[45] JAIN D, RAVINA, BHOJIYA A A, et al. Polyphasic characterization of plant growth promoting cellulose degrading bacteria isolated from organic manures[J]. Current Microbiology, 2021, 78(5): 739−748.
[46] ZHANG H, DONG S, LOU T, et al. Complete genome sequence unveiled cellulose degradation enzymes and secondary metabolic potentials in *Streptomyces* sp. CC0208[J]. Journal of Basic Microbiology, 2019, 59(3): 267−276.
[47] 王晓涛, 魏佩玲, 胡波, 等. 纤维素降解酶研究进展[J]. 草食家畜, 2019, 196(3): 19−24. [WANG X T, WEI P L, HU B, et al. Advances in cellulose degradation enzymes[J]. Grass-feeding Livestock, 2019, 196(3): 19−24.]
[48] REESE E T, SIU R, LEVINSON H. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis[J]. Journal of Bacteriology, 1950, 59(4): 485−497.
[49] DIN N, DAMUDE H G, GILKES N R, et al. C_1-C_X revisited: Intramolecular synergism in a cellulase[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1994, 91(24): 11383−11387.
[50] 刘树立, 王华, 王春艳, 等. 纤维素酶分子结构及作用机理的研究进展[J]. 食品科技, 2007, 7(7): 12−15. [LIU S L, WANG H, WANG C Y, et al. Progress in the molecular structure and action mechanism of cellulase[J]. Food Technology, 2007, 7(7): 12−15.]
[51] HENRISSAT B, DRIGUEZ H, VIET C, et al. Synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose [J]. Nature Biotechnology, 1985, 3(8): 722−726.
[52] 张俊, 许超, 张宇, 等. 纤维素酶降解机理的研究进展[J]. 华南理工大学学报 (自然科学版), 2019, 47(9): 121−130. [ZHANG J, XU C, ZHANG Y, et al. Research progress of cellulase degradation mechanism[J]. Journal of South China University of Technology (Natural Science Edition), 2019, 47(9): 121−130.]
[53] YANG M, ZHAO J, LI X, et al. Comparative metagenomic discovery of the dynamic cellulose-degrading process from a synergistic cellulolytic microbiota[J]. Cellulose, 2021, 28(4): 2105−2123.
[54] WOOD T M. Properties of cellulolytic enzyme systems[J]. Biochemical Society Transactions, 1985, 13(2): 407−410.
[55] QU M B, WATANABE-NAKAYAMA T, SUN S, et al. High-speed atomic force microscopy reveals factors affecting the processivity of chitinases during interfacial enzymatic hydrolysis of crystalline chitin[J]. ACS Catalysis, 2020, 10(22): 13606−13615.
[56] ZHANG Y H P, HIMMEL M E, MIELENZ J R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies[J]. Biotechnology Advances, 2006, 24(5): 452−481.
[57] HAMID M B A, ISLAM M M, DAS R. Cellulase biocatalysis: Key influencing factors and mode of action[J]. Cellulose, 2015, 22: 2157−2182.

［58］ VRSANSKA M. The cellobiohydrolase I from *Trichoderma reese*i QM 9414: Action on cello-oligosaccharides［J］. Carbohydrate Research, 1992, 227: 19−27.

［59］ SUGANO J , LINNAKOSKI R, HUHTINEN S, et al. Cellulolytic activity of brown-rot *Antrodia snuosa* at the initial stage of cellulose degradation［J］. Holzforschung, 2019, 73(7): 673−680.

［60］ COUGHLAN M P. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application［J］. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 1985, 3: 39−109.

［61］ NURIKA I, SUHARTINI S, BARKER G C. Biotransformation of tropical lignocellulosic feedstock using the brown rot fungus *Serpula lacrymans*［J］. Waste and Biomass Valorization, 2020, 11(6): 2689−2700.

［62］ FRANCIS W. M. R. SCHWARZE. Wood decay under the microscope［J］. Fungal Biology Reviews, 2007, 21(4): 133−170.

［63］ PHADAGI R, SINGH S, HASHEMI H, et al. Understanding the role of dimethyl form amide as co-solvents in the dissolution of cellulose in ionic liquids: Experimental and theoretical approach［J］. Journal of Molecular Liquids, 2021, 328: 115392.

［64］ TYAGI U, ANAND N. Facile depolymerization of microcrystalline cellulose in ionic liquid medium catalyzed by carbon materials as catalysts［J］. Current Research in Green and Sustainable Chemistry, 2021, 4(1): 100068.

范丽萍, 刘志伟, 焦文娟, 等. 壳寡糖复合物的制备及其功效研究进展 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 404−415. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021040148

FAN Liping, LIU Zhiwei, JIAO Wenjuan, et al. Research Progress on Preparation and Efficacy of Chiooligosaccharide Complex[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 404−415. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021040148

· 专题综述 ·

壳寡糖复合物的制备及其功效研究进展

范丽萍[1], 刘志伟[1], 焦文娟[2,*], 黄利华[3]

（1.嘉应学院生命科学学院, 广东省山区特色农业资源保护与精准利用重点实验室, 广东梅州 514015;
2.广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 农业农村部功能食品重点实验室, 广东省农产品加工重点实验室, 广东广州 510610;
3.广州城市职业学院, 食品科学与美食养生学院, 广东广州 510405）

摘　要: 壳寡糖是自然界中唯一的碱性寡糖，具有-NH_2、-OH 等活性基团，易溶于水，具有极高的抑菌、抗炎、抗氧化、抗癌等生物活性，能够与金属离子、蛋白质、多糖、脂类、黄酮类化合物等通过配位络合、静电相互作用、转氨法、美拉德反应及壳寡糖酰胺化、酯化、羧基化等方法形成壳寡糖复合物。壳寡糖复合物稳定性较好，水溶性高，可同时兼备壳寡糖和复合因子的生物活性的特点，有效拓宽复合物质的应用范围并增强其使用效果。此外，壳寡糖复合物的新型复合方式及安全性，是目前的一个重要研究方向。本文对近年来壳寡糖复合物的制备方法、壳寡糖复合因子及壳寡糖复合物在功能生物医药、农业、食品等领域的功效应用进行了总结，以期为壳寡糖复合物的深入研究提供参考。

关键词: 壳寡糖, 制备方法, 相互作用, 复合物, 功效

中图分类号: TS201.2　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0404−12

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021040148

本文网刊:

Research Progress on Preparation and Efficacy of Chiooligosaccharide Complex

FAN Liping[1], LIU Zhiwei[1], JIAO Wenjuan[2,*], HUANG Lihua[3]

（1.School of Life Science, Jiaying University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Conservation and Precision Utilization of Characteristic Agricultural Resources in Mountainous Areas, Meizhou 514015, China;
2.Sericultural & Agri-Food Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Functional Foods, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangdong Key Laboratory of Agricultural Products Processing, Guangzhou 510610, China;
3.College of Food Science and Health, Guangzhou City Polytechnic, Guangzhou 510405, China）

Abstract: Chitooligosaccharides are the only basic oligosaccharides in nature with -NH_2 and -OH functional groups. They are easily soluble in water and have extremely high biological activities such as antibacterial, anti-inflammatory, anti-oxidant, and anti-cancer. Chitooligosaccharides can be combined with metal ions, proteins, polysaccharides, lipids, and flavonoids through coordination complexation, electrostatic interaction, transamination, Maillard reaction, amidation, esterification, and carboxylation of chitooligosaccharides. Chitooligosaccharide complex has good stability and high water solubility, and can have the biological activity characteristics of chitosan oligosaccharide and complex factor at the same time, which effectively broadens the application range of the complex and enhances the effect of function. In addition,

收稿日期: 2021−04−15

基金项目: 嘉应学院育苗工程项目（2020KJM01）; 梅州市应用型科技专项资金项目（2020B0205004）; 广东省基础与应用基础研究基金（2020A1515110263）; 国家自然科学基金面上项目（31972021）; 广东省高等教育“冲补强”提升计划重点建设学科（农业资源与环境）建设项目（粤教科函 [2018]181 号）; 佛山市科技项目（基塘农业关键技术研究与示范）; 广东省农业科学院水产中心建设项目。

作者简介: 范丽萍（1995−）, 女, 硕士, 助理讲师, 研究方向: 食品加工, E-mail: 2429777453@qq.com。

*** 通信作者:** 焦文娟（1988−）, 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 食品组分与营养, E-mail: jiaowenjuan@gdaas.cn。

studying on the new compound method and the safety of chitooligosaccharide complex, which will become an important research direction. This article summarizes the preparation methods and compound objects of chitooligosaccharide complexes, the efficacy and application research of chitooligosaccharide complexes in functional foods, agriculture, biomedicine and other fields in recent years in order to provide a reference for the further study of chitooligosaccharide complexes.

Key words: chitooligosaccharide; preparation; interaction; complex; efficacy

壳寡糖(chitooligosaccharides)，是以虾、蟹壳为原料，经过生物酶催化降解、化学衍生得到的一种聚合度约为 2~20 的线性低分子量寡糖，由氨基葡萄糖或乙酰氨基葡萄糖通过 β-1,4-糖苷键连接而成[1]。壳寡糖生物活性极高[2]，具有抑菌[3]、抗氧化[4]、抗炎[5]、抗肿瘤[6]、免疫调节[7] 等活性。此外，壳寡糖的无毒、易降解、具有高水溶性及生物相容性和低黏度的特性，使其在农业、饲料、化妆品、食品、医药行业获得广泛应用[8]，且已作为新型的药物原料用于阿尔茨海默氏病的临床研究中[7]。另外，一些天然功能成分会受到溶解性低、生物相容性差等性质的影响而限制其功能作用的发挥，此时，天然功能成分能够通过与低分子量的壳寡糖相互作用，获得新型的复合生物原料，改善或消除天然功能成分的不良性质，扩大应用范围，增强其功能效用。

随着壳寡糖的功能特性被广泛认可，壳寡糖在开发新型生物材料的研究被逐渐挖掘，壳寡糖复合物得到了高度重视，尤其是在药物负载[9]、分子改性和引入壳寡糖活性基团以改善复合材料功能等[10] 研究应用中。Juthamas 等[11] 对比了新型生物材料明胶/壳聚糖和明胶/壳寡糖复合膜对小鼠骨髓干细胞(bone marrow-derived stem cells, MSCs)生物学反应的影响，发现骨髓干细胞在壳寡糖/明胶复合膜中具有更好的增殖效果。而夏文水制备了曲酸[12]、香叶醇[13] 接枝壳寡糖复合物，提高了二者的抑菌活性。此外，当具有抗新生血管生成活性的内皮抑素(Endostatin, ES)衍生多肽(Endostatin2, ES2，即氨基酸序列为 IVRRADRAAVP 的多肽)接枝到季铵化壳寡糖链中[14]，可合成具有更好生物相容性和可降解性的糖-肽化合物，延长 ES2 在肝脏中的停留时间，增强药物作用效果，且壳寡糖复合物在抗氧化[15]、提高药物水溶性[16] 等多方面的作用，也已得到证实，本文将对壳寡糖复合物的制备方法、功能性质以及应用进行综述。

1　壳寡糖复合物制备方法

壳寡糖具有-NH_2、-OH 等活性基团(图 1)，可发生多种化学反应[17]。如壳寡糖分子 C_2 位的氨基/乙酰氨基，易在水溶液中电离携带正电荷[18]，与阴离子化合物发生静电相互作用。此外，氨基/乙酰氨基结构[19] 中的 N 含孤对电子，可利用亲核反应对壳寡糖进行修饰，或与金属离子形成配位复合物。同时，壳寡糖 C_6 位的羟基、C_3 的仲羟基和 C_2 的氨基，能够发生配位、酯化、酰化、烷基化、卤代等多种化学反应[20−21]，其中，C_6 位中的伯羟基，可被氧化形成醛基甚至羧基[22]，再与其他有机/无机物质进行复合，形成新型生物材料。

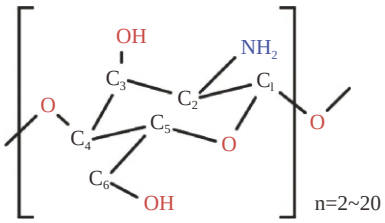


图 1　壳寡糖结构式

Fig.1　The structure of chitooligosaccharide

1.1　金属配位法

壳寡糖通过 C_2 位氨基/乙酰氨基和 C_3 位的羟基与金属离子进行配位复合获得壳寡糖-金属离子复合物。在一定 pH 条件下，壳寡糖可与 Nd[23]、Fe[24]、Zn[25]、Cu[26]、Mn[27] 等多种金属离子形成配位复合物。图 2 为吕丹丹[28] 研究的壳三糖与 Fe^{2+}，Zn^{2+}和 Mg^{2+}的结合模型，壳寡糖 C_2 位中氨基的 N、C_6 位仲羟基的 O 均参与配位过程，而壳寡糖在与三价金属离子铬(Ⅲ)形成配合物的过程中[29]，其配位基团仅为-NH_2，表明带有孤对电子的-NH_2、-OH 均为壳寡糖的常见配位基团，但对于不同种类、价态的金属离子，壳寡糖分子中参与配位的基团略有差异。对于同一金属离子而言，配位环境(温度、pH 等)及壳寡糖特性(脱乙酰度、分子量等)能够通过影响壳寡糖配位基团的含量及带电情况[30]，进而影响配位过程。已有研究表明，壳寡糖-Nd 的最适配位 pH 为 6.8[23]，壳寡糖-Fe^{3+}配合物形成的数量随温度的升高而增多，40 ℃ 后趋于平衡[24]，90% 脱乙酰度的壳寡糖-Zn 配

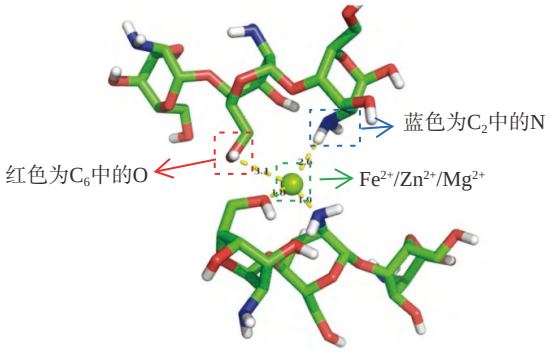


图 2　壳寡糖与金属离子(绿色球)间的典型结合模式图[28]

Fig.2　Typical binding patterns between chitooligosaccharides and metal ions (green spheres)[28]

位数与完全脱乙酰化的壳聚糖相同[25]，但未阐明聚合度、分子量对配位过程的影响。因此，金属离子与壳寡糖的配位选择机理与模型还需进一步研究。

1.2 美拉德反应法

美拉德反应是指含羰基化合物（糖）和含氨基化合物（氨基酸）之间发生的一系列复杂反应[31]。与常见还原糖不同，壳寡糖分子中含有氨基，可与还原糖（果糖）[32]发生美拉德反应，如图 3 所示，同时，因壳寡糖分子量小、聚合度低，当末端单体以链状结构存在时，还可作为含醛基化合物参与美拉德反应。Yan[15]和 Yu 等[33]分别选择了甘氨酸和赖氨酸作为美拉德反应底物，制备了壳寡糖复合物，分析三者结构，壳寡糖、甘氨酸、赖氨酸均含有游离-NH_2 基团，而甘氨酸、赖氨酸均不含羰基/醛基基团，无法作为亲电试剂参与亲核加成过程，由此推测是氨基酸中-NH_2 与壳寡糖短链两端具有醛基结构的氨基葡萄糖分子发生亲核加成反应。

1.3 转氨酶法

氨基酸中的 α-氨基经质子化后，在转氨酶通用辅酶磷酸吡哆醛[34]的作用下，形成 α-酮酸，酮酸进一步与磷酸吡哆胺发生作用，形成相应的氨基酸[35]。壳寡糖分子中的-NH_2 易接受质子，在转氨酶的作用下，可与蛋白质或者多肽分子发生氨基转移过程，形成壳寡糖-蛋白质或者壳寡糖-多肽复合物。目前，利用转氨酶法进行壳寡糖复合物的制备研究主要作用酶为转谷酰胺酶，如江文等[36]采用转氨酶法成功制备了壳寡糖-水解麦醇溶肽共聚物，其反应方程式如图 4 所示，提示壳寡糖可合成抗菌蛋白接枝共聚物纤维材料；Yang[37]通过转谷氨酰胺酶催化制备壳寡糖糖基化的笼状铁蛋白，郭晓晓[38]以壳寡糖为修饰物，采用转氨酶法对丝胶蛋白材料进行改性，提升了丝胶膜材料的成型效果和抑菌、抗氧化等功能特性；此外，Avtar 等[39]发现在 40 ℃ 时，壳寡糖在鱼糜转氨酶作用下可与谷氨酸/赖氨酸交联形成了复合物，提高了复合物的结构稳定性。与美拉德反应相比，转氨酶作用下形成的壳寡糖/蛋白质、壳寡糖/多肽，反应选择性较高，结构稳定，且几乎不产生有毒化合物。同时，复合物以化学键连接，其稳定性通常优于壳寡糖配位复合物及静电复合产物。

1.4 静电相互作用（离子凝胶法）

聚电解质具有可电离基团，易在极性溶剂中发生电离形成带电荷化合物，与电性相反的聚电解质发生聚集行为[40]。壳寡糖分子链中含有氨基，是常见的聚电解质，可在水溶液中发生电离，携带一定数量的正电荷，与聚阴离子化合物中带负电的基团（例如三聚磷酸）发生静电相互作用[41]。Chen[42]研究了壳寡糖和木质素在水溶液状态下的静电自组装行为，结果与曾尔曼[43]一致，表明该行为的主要推动力为壳寡糖-NH_3^+与带负电分子中的-COO^-间的静电作用力，结合过程如图 5 所示，同时，壳寡糖-NH_2、-OH，与聚丙烯酸中羰基形成的氢键[44−45]，对二者的聚集也具有一定助力。此外，基于聚电解质的交联结合作用，胡晓芬[46]构建了壳寡糖/Pluronic®纳米复合体，该复合物携带正电荷，可再与聚阴离子肝素通过静电作用，形成肝素/壳寡糖/Pluronic®静电组装多层膜，表明静电过程具有叠加性。然而，该聚集过程受体系环境的影响较大，笔者[47]以静电相互作用为自组装推动力，制备了壳寡糖/果胶静电复合物，结果表明该复合物具有 pH 依赖性，当溶液 pH<2 或者 pH>7 时，静电复合物消失，壳寡糖、果胶不再聚集，调节至最适 pH，复合物可再次形成；Chebl[48]则研究了壳寡糖/乳酸纳米聚集体，实验通过增强介质中的离子强度，改

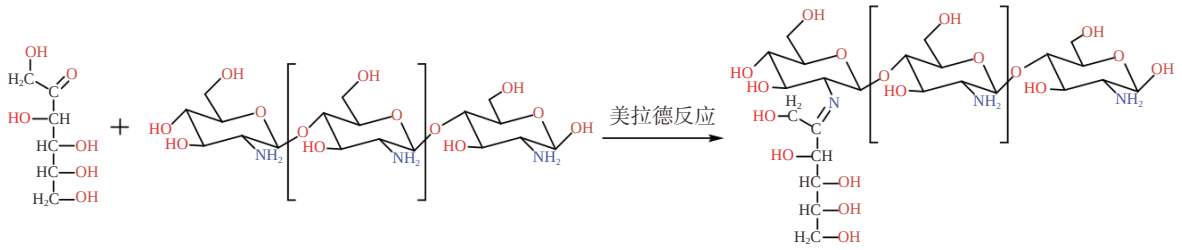


图 3 美拉德反应[32]

Fig.3 Millard reaction[32]

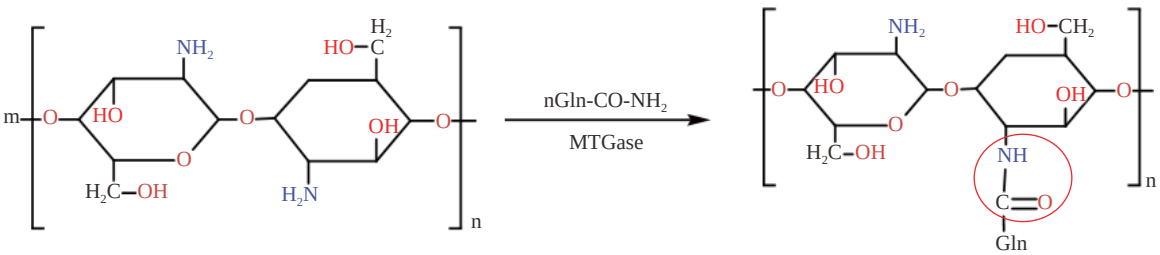


图 4 转谷氨酰胺酶催化过程[36]

Fig.4 Transglutaminase catalytic process[36]

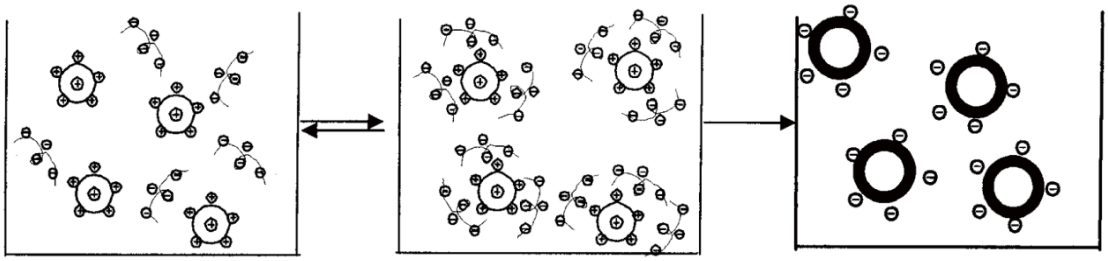


图 5　壳寡糖静电自组装过程示意图[43]

Fig.5　Schematic diagram of electrostatic self-assembly process of chitooligosaccharides[43]

变了二者的临界聚集浓度，可用于制备不同粒度的复合物。静电结合在极性共同溶剂即可进行，过程较为简单，且具有可逆性、叠加性，是制备二元甚至多元复合物的常用方法。

1.5　有机合成法

通过酯化、酰化、缩合、加成等方法引入特殊基团、分子，是制备壳寡糖复合物常用化学方法，如利用醛胺缩合反应，制备壳寡糖-N-苄基磺酸钠[49]，壳寡糖/碘取代水杨酸[26] 等复合物。利用环氧化合物在酸性条件下可发生开环加成反应，Rbaa[50] 制备了 D-葡萄糖接枝壳寡糖复合物(COS-g-Glu)，该复合物作为混合型腐蚀抑制剂，可有效减缓盐酸溶液对低碳钢的腐蚀作用。田金花[51−52] 和宋玥等[53] 通过酯化反应，均合成了寡糖磷酸酯代物，但通过酯化、酰化等方法引入大体积基团形成的复合物，受空间阻力影响，稳定性通常较差。此外，对于复合物合成后，与原料物质对比，其分子结构、性能改变造成的影响仍需进一步探究。

在缩醛-醛平衡作用基础上，利用壳寡糖末端醛基的可逆特点，还进行了壳寡糖/接枝物复合过程的研究[55]。如 Vikøren[54] 的研究中，探讨了壳寡糖末端醛基与 O, O'-1,3-丙二基双羟胺中氨基间，通过醛胺缩合成席夫碱，进而共价交联的过程[56](图 6)，该复合过程可为壳寡糖末端接枝有机物提供参考。相较于配位法、美拉德反应、转氨法及静电相互作用法，利用有机合成法合成的壳寡糖复合物，具有较宽的选择性及结合物质选择范围，但该复合过程需用到食用安全性较低的有机化合物，因此较少运用于食品体系中。

1.6　其他方法

为提高黄酮类化合物的活性，减少其使用限制，蒋艳荣[57] 通过溶剂法，获得了壳寡糖/黄芩苷复合体，复合物中黄芩苷以非晶体形态存在，具有高水溶性的特点。与之相似，郑虎哲[58] 以蒸馏水为共同溶剂，采用喷雾干燥法制备了苹果多酚-壳寡糖微胶囊（apple polyphenols-chitooligosaccharides microcapsule, APCM）复合物，何文[59] 通过 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和 N-羟基硫代琥珀酰亚胺对精氨酸羧基活化后，与壳聚糖产生相互作用，制备了壳聚糖-精氨酸复合物，该类方式获得的壳寡糖复合物，主要结合位点仍为壳寡糖-NH_2、-OH，但具体作用方式及其规律，所得复合物物理、化学及功能性质，还需进一步研究总结。此外，部分复合研究对壳聚糖在降解[60]、氧化还原反应[61] 过程中形成的中间产物进行了实验，杜金凤[60] 利用芬顿(Fenton)反应降解壳聚糖/钙、壳聚糖/锌配合物，可获得不同分子量的壳寡糖金属配合物。Hyeon-ho[61] 发现，在 H_2O_2 的介导下，壳寡糖 C_2 位氨基、C_6 羟基可分别形成带有 O·、N·自由基的中间产物，与没食子酸(gallic acid, GA)中羧基发生相互作用，制备壳寡糖/没食子酸复合物，表明该类中间产物，也可用以制备功能性壳寡糖复合物。

2　壳寡糖复合因子

根据不同壳寡糖复合物制备方法，结合复合因子的特点，本文将常见复合因子进行了总结，具体可分为以下五个类型，不同复合因子的壳寡糖复合物的获得方式及应用情况如表 1 所示。

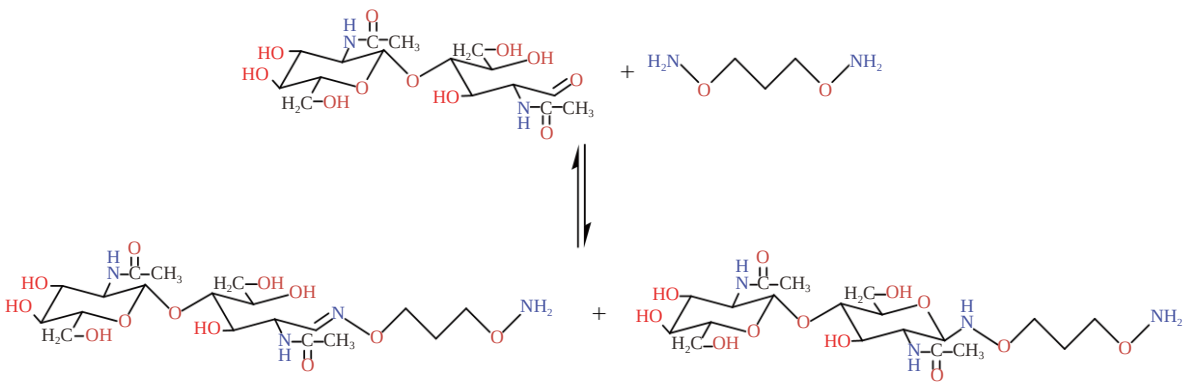


图 6　醛胺缩合过程[54]

Fig.6　Condensation process of aldehydes and amines[54]

表 1 不同复合因子的壳寡糖复合物的获得方式及应用

Table 1 Obtaining methods and application fields of chitooligosaccharide complexes with different complexing factors

复合因子类型	复合因子	获得/结合方式	应用
无机物	金属离子(Nd[23]、Fe[24]、Zn[25]、Cu[26]、Mn[27]、Mg[28]、Cr[29])	金属离子配位	制备金属离子吸附吸附、微量元素递送体系
	N-苄基磺酸钠[49]	醛胺缩合	材料改性
	磷酸[51-53]	酯化反应	提高活性用于载药系统
	硒[62]	复凝聚法	植物营养调节剂
蛋白质/多肽/氨基酸	甘氨酸[15]、赖氨酸[33]	美拉德反应	食品加工与保鲜
	水解麦醇溶肽[36]、铁蛋白[37]、丝胶蛋白[38]、谷氨酸/赖氨酸[39]	转氨酶法	制备新型的功能食品、生物、化学材料
	红瓜(CIA17[63]、CIA24[64])、黄瓜(CPL)[65]、南瓜(PPL)[66]韧皮部凝集素	氢键、范德华力作用下定点结合位	植物生长应激反应、抗虫去病害
	抗菌肽(AMP)[67]	有机合成(DMSO体系)	医用多功能抗菌剂
	胃蛋白酶[68],酵母β-D-果糖呋喃糖苷酶[69]	氢键结合	提高酶的稳定性,用于医药和工业
	脱盐鸭蛋蛋清[70]、酪蛋白磷酸肽[71]	美拉德反应、转氨酶法	促进钙在人体的吸收
碳水化合物	果胶[47]	静电相互作用、氢键	食品、医药负载体系
	果糖[32]	美拉德反应	可用于食品领域的荧光标记纳米粒子
	葡萄糖[50]	化学加成	工业抗腐蚀材料
	细菌纤维素[72-73]	生产菌培养产物	食品包装、医药包扎
	抗性淀粉[74-76]	分子交联产物	降脂、调节肠道菌群
脂类物质	油酸[77]、胆固醇琥珀酸单酯[78]、硬脂酸[79]	有机合成法	难溶性食品组分、药物的负载
其他化学物质	黄酮类化合物(柚皮苷[80]、橙皮苷[16]、芦丁[81])、黄芩苷[57]、多酚[58]	溶剂法	去苦、提高成分的水溶性和功能活性
	没食子酸[61]	O·、N·自由基与羧基结合	提高没食子酸抗氧化活性
	聚丙烯酸[43-45]	静电相互作用	功能性水凝胶
	木质[42]	静电相互作用	Pickering乳液稳定剂
	肝素/Pluronic®[46]、乳酸[48]	静电相互作用	疏水食品组分及药物的载体

2.1 无机物

壳寡糖是良好的金属离子配体,可与铁、钙等金属离子作用得到壳寡糖/金属离子复合物,也可通过酯化等化学反应与磷酸、磺酸等物质复合,二者之间的配位过程发生,复合有关作用位点及其作用机制,在文中壳寡糖复合物制备方法中进行了详细介绍。

2.2 蛋白质/多肽

蛋白质通常携带有-NH_2、-OH、-SH 等多种活性基团,易与壳寡糖结合,得到壳寡糖/蛋白质、壳寡糖/多肽复合物。然而,蛋白质/多肽的构象易受壳寡糖结合的影响,可用于实现壳寡糖与蛋白质/多肽的有目的组装。但二者的结合过程中具有较多不确定性,且壳寡糖-蛋白质/多肽间的合成过程及蛋白质构象改变机理还需进一步进行深入探讨。

2.3 碳水化合物

自然界中常见的多糖均为酸性/中性多糖,壳寡糖作为自然界中唯一的碱性寡糖,可以发生静电相互作用,或与其他多糖进行交联作用,形成新型复合物。但参与该复合过程的分子基团,以及复合原料结合后对两种多糖结构、生物活性的影响均未明确,还需再进一步研究确定。

2.4 脂类物质

壳寡糖在有机溶剂与介导物的作用下,可与脂类物质发生结合,形成脂多糖复合物,形成脂多糖[82],可为其应用在水溶性较差的药物负载中提供参考。此外,通过与疏水性脂类物质的结合,壳寡糖复合物具有良好的细胞识别特性,但对于此类特异性识别过程以及作用药物定点、控制释放后的生物降解过程,仍在等待进一步的研究结论。

2.5 其他化学物质

化学产物的来源广泛,包括除上述复合因子以外的有机物,如天然化学产物,含一切植物、动物、微生物及其代谢产物,如生物碱、黄酮类和萜类、甾类化合物等。在食品领域中,天然化学产物是常见的研究对象,但其与壳寡糖结合形成复合物,现有的研究主要集中于多酚、黄酮等化合物中(表 1),与其他活性物质的相互作用以及其复合物的性质研究并不多见,因此二者间相关作用的研究与应用空间仍然较大。

3 壳寡糖复合物的应用

通过分子中的氨基/乙酰氨基、羟基等活性基团,壳寡糖可与蛋白质、多糖等多种生物大分子产生相互作用,利用前述制备方法制备的复合物,具有调控功能成分活性效果的作用,或作为一种新型生物材料,用以稳定、交联、负载稳定性较差的功能成分,广泛运用于医药、农业及食品领域。

3.1 壳寡糖复合物在医药领域的应用

壳寡糖具有良好的生物相容性,可与体内多种器官、细胞共存,作为常见药物、活性成分载体组成,抑菌、抗氧化、抗炎功能成分,壳寡糖在制备人体营养补充剂及推动细胞凋亡、抗肿瘤药物的研究中,具

有重大意义。

壳寡糖复合物用于药物载体时，可显著降低载体原料的毒性，具有良好的药物负载[83]、运输效果，且可有效保护药物顺利进入作用位点。Wang[84] 在对急性肾损伤（AKI）的靶向药物研究中，发现三苯基膦壳寡糖-姜黄素（TPP-LMWC-CUR，TLC）具有良好的缓冲靶向释放效果，其中正电的壳寡糖给予了药物较好的溶酶体逃逸能力；黄佩文[85] 制备的壳寡糖-水杨酸药物负载粒子，粒径小、稳定性高，细胞毒性低，是一种优质的药物载体，且在以阿霉素为模型药物进行体外释放的研究中，还表现出一定的缓释效果。而 Zhang[86] 的研究表明，全反式维甲酸-壳寡糖复合物用于紫杉醇和其他疏水性药物时，通过简单的口服方式，即可使载药纳米粒子快速连续地被 HepG2 细胞吸收并转运到细胞核中。此外，带有正电荷的壳寡糖与齐多夫定（Zidovudine，AZT）进行络合，所得复合物在用于药物肾靶向传递时[87]，可极大延长药物在肾脏中的停留时间，该研究与 Wang[14] 在利用季铵化壳寡糖延长新型抗癌药物 ES2 在小鼠体内停留时间的效果研究相似，均表明壳寡糖复合物可在抗癌过程中发挥重大效用。

在恶性或恶变前组织的检测中，5-氨基乙酰丙酸（5-aminolevulinic acid，5-ALA）降解、转化所得的原卟啉 IX（Protoporphyrin IX，PpIX），是常用的外源发色团，但未保护的 5-ALA 易被胃肠道中的细菌吞噬，极大影响检测结果的准确性。Yang[88] 以叶酸/壳聚糖复合物为 5-ALA 靶向释放载体，有效避免了 5-ALA 被胃肠道中的细菌吞噬，并通过叶酸受体介导的内吞作用，进入结肠直肠癌细胞中。但到达结肠直肠癌变细胞的 5-ALA 释放效果欠佳，无法完全转化为原卟啉 IX，细胞癌变情况的检测结果仍受影响。因此，Yang[9] 对上述方法进行了改良，将藻酸盐物理掺入带有 5-ALA 的叶酸修饰的壳聚糖纳米颗粒中，进入肠癌细胞后，碱性大肠环境降低了壳聚糖的正电荷携带量，利用阴离子聚合物藻酸盐与 5-ALA 竞争壳聚糖阳离子残基的作用特性，可达到较好的 5-ALA 释放效果。与之类似，王荣民[89−90] 制备了壳寡糖-金属卟啉的配合物以及壳寡糖-5-氟尿嘧啶（5-Fluorouracil，5-FU）的研究表明，壳寡糖的加入有效降低了金属卟啉和 5-FU 配合物的毒性，提示壳寡糖负载的金属卟啉及 5-FU 在开发抗癌药物领域有较好的应用前景。

综上研究，壳寡糖在用于开发有效的功能成分及药物递送系统时，除需具备较好的目标成分结合能力与降低药物毒性外，还需考虑该负载体系的目标产物靶向释放效果，以保证其功效和利用率。

3.2　壳寡糖复合物在农业领域的应用

壳寡糖在植物生长过程具有良好的应用，李雨新[91] 综述了壳寡糖在种植领域的应用，表明壳寡糖具有抗病、促进生长、抗逆、增产、提质和保鲜等作用；而壳寡糖有较高的生物相容性、水溶性及低毒性，且易与多种功能成分发生相互作用，是常见的接枝修饰物，与之结合，可增强原有功能成分中的抑菌等有益功能，或提高其生物相容性，降低产物毒性。童春义[62] 采用复凝聚法制备的壳寡糖-硒复合物，作为植物营养调节剂，提高了稻谷的产量以及所得大米中的抗氧化性。此外，Schloffel[92] 在文章中提到，蛋白分子与壳寡糖之间的相互作用，可为植物对该类物质做出适合植物生长的应激反应[93] 活性的探讨提供参考。Bobbili[63−64] 对红瓜韧皮部中不同分子量同源二聚体凝集素与壳寡糖之间的复合过程的进行了研究，表明氨基葡萄糖残基和蛋白质的氨基、羧基等基团之间存在分子间氢键、范德华力，但此类植物凝集素不与壳聚糖发生此类型作用；而黄瓜[65]、南瓜[66] 等植物韧皮部凝集素与不同聚合度的壳寡糖之间相互作用的研究，同样表明凝集素可以与壳寡糖发生水介导的相互作用，此类复合物的研究，可为植物的防御和进攻等生物功能提供参考依据。

此外，结合某些特定复合因子的壳寡糖复合材料，其抗菌功能效用可得到显著提高。Jun[94] 通过将氨基脲引入壳寡糖中，制备了肼基-乙基壳寡糖衍生物，显著提高了配体复合材料的抗菌活性；而 Wang[26] 则将制备的壳寡糖-碘代水杨酸复合物（chitooligosaccharide and iodosubstituted salicylaldehyde，I-SCOS）与 Cu（Ⅱ）进行络合，研究表明铜离子与亚氨基 N 原子和 I-SCOS 配体的酚羟基 O 原子进行四配位结合，进一步增强了壳寡糖-碘代水杨酸的抑菌效果。以上结果表明，与不同成分复合形成的壳寡糖复合物，可增强金属离子/壳寡糖等作为营养物质的生物活性效果，提高复合因子作为植物营养剂应用于农业领域的抗菌等效果。

目前，壳寡糖在农业中的抗病、增产等效果得到了广泛认可，但壳寡糖复合物在农业领域的研究较少，且上述研究表明壳寡糖复合物在植物营养液、土壤调理剂、农药和果蔬保鲜剂的应用可能更具优势，提示新型壳寡糖复合物的探索，以及其在农业领域中的应用，将会是壳寡糖发展的一大方向。

3.3　壳寡糖复合物在食品领域的应用

壳寡糖作为一种新型的食品原料，利用其与蛋白质/多肽进行结合的作用特点，可制备高活性壳寡糖-蛋白质/壳寡糖-多肽复合物，如 Dong[67] 制备的壳寡糖-抗菌肽（Antimicrobial peptide，AMP）复合物，该复合物结构与细菌细胞壁更接近，显著提高了抗菌肽抑菌效果。然而，Li[68] 制备的壳寡糖-胃蛋白酶（Pepsin，PP）复合物，胃蛋白酶稳定性得到提高，但降低了胃蛋白酶的活性，这与经过壳寡糖化法修饰得到的酵母 β-D-果糖呋喃糖苷酶（yeast beta-D-fructofuranosidase，YFF）[69]，酶活显著提高的结果并不一致，这可能是由于壳寡糖对胃蛋白酶、糖苷酶酶活性位点的影响不同，经壳寡糖修饰后的糖苷酶，降低了活性

位点中氨基酸残基的离子化程度，使酶对蔗糖的亲和度有所提高。因此，对于壳寡糖修饰对酶活的影响，需要结合酶活性中心与底物的亲和度原理进行深入探讨，提高壳寡糖复合物在食品酶体系中应用的准确性。

基于壳寡糖自身的结构特点，壳寡糖与其他食品活性成分的组合研究也有多方面的突破。蒋艳荣[57]对壳寡糖和黄芩苷的复合物的研究表明，壳寡糖复合物可用于对稳定性较低的活性物质进行保护；在 Cao 等[80−81] 的研究中，通过喷雾干燥法，壳寡糖可与柚皮苷等黄酮类物质相互作用，以提高该类物质的水溶性，并降低柚皮苷的苦味，可拓宽其作为功能成分的使用范围，与此同时，壳寡糖与茶多酚[95]、没食子酸[61]等具有协同作用的功能成分的复合研究仍然在不断进行中。此外，在果蔬保鲜过程，壳寡糖复合物有重要应用意义，如 Yan 等[15,33] 基于壳寡糖与氨基酸的美拉德反应，制备了壳寡糖/甘氨酸、壳寡糖/赖氨酸等复合产物，可在果汁与鲜切果实的储存过程进行使用，具有提高其抗氧化性能的优点。另外，与美拉德反应有关的壳寡糖复合物的研究表明，利用壳寡糖与还原糖发生美拉德反应的特点，还可有效降低含氨基酸（尤其是天门冬氨酸）的食物在加热过程中丙烯酰胺的生成量[96−97]，从而提高烘焙食品的安全性。

此外，壳寡糖复合物在高效补充钙、铁、锌等人体所需营养物质的研究中具有重要意义。Zhao 等[70−71] 以蛋清肽-壳寡糖纳米递送体系和酪蛋白磷酸肽-壳寡糖运载体系为研究基础，制备了壳寡糖-脱盐鸭蛋蛋清、壳寡糖-酪蛋白磷酸肽复合物，显著提高了可溶性钙结合能力以及稳定性，提示可促进人体对钙的吸收效果，在功能性食品领域进行应用。

基于壳寡糖的带电情况及分子结构所得的复合物，壳寡糖可用于制备具有特定结构、功能的食品级材料，吸附、稳定体系中的功能成分，以提高或保护功能成分的生物活性。在对黄酮类功能成分的研究中，Seong[98] 利用层层自组装（layer-by-layer self-assembly，LbL）技术，制备了可携带疏水性黄酮类物质的壳寡糖-脂质复合物载体，该复合物载体性质稳定，亲肤效果佳，可有效提高负载槲皮素的释放量及皮肤渗透率。此外，王亚珍[99] 的研究表明，壳寡糖的添加可显著提高壳聚糖/明胶食品复合膜的抗氧化性能和抑菌活性。Chen[100] 在制备伤口敷料的探索过程中，将季铵化壳寡糖固定在聚氨酯（polyurethane，PU）纤维膜表面，获得了具有较好亲水性的聚氨酯纤维膜。陈胜杰[72] 以常见的阴离子生物材料细菌纤维素（Bacterial cellulose，BC）为复合原料，制备了壳寡糖-细菌纤维素湿膜，显著提高了细菌纤维素的抑菌性和持水性[101]，Nan 等[73] 制备了壳寡糖细菌纤维素膜，该膜不仅具有较好的机械性能，还提高了抗菌、抗氧化性等特性。以上实验结果可为壳寡糖在食品包装等领域提供参考。

4 讨论与展望

壳寡糖生物活性极高，与其他物质发生复合，可改善复合因子的水溶性，提高复合物因子生物活性，使功能物质有效地运用于生物医药、食品、农业等领域。壳寡糖复合物的研究通常涉及到壳寡糖分子中的活性基团-NH_2、-OH，复合因子包括蛋白质、糖类物质等生物大分子，主要通过转氨酶的催化和、美拉德反应制备壳寡糖复合物，此外，常见的复合原理还有静电相互作用、配位络合及壳寡糖酰胺化、酯化、羧基化等。

目前，对壳寡糖复合因子及其复合过程进行了大量的研究，制备了许多高生物活性的新型壳寡糖复合材料，针对结合过程可能产生的不良副反应，初步探讨了复合干扰因素及易受损基团，并对基团的钝化及保护处理方式进行了研究，但壳寡糖与蛋白质、黄酮类化合物等复合因子的复合过程的确切结合位点及复合物分子结构的研究仍较欠缺，精准复合理论尚不完善，后期仍需对合成机理和作用位点进一步研究描述，以增大复合产物的可调控性。

此外，对于壳寡糖与新型壳寡糖复合因子（尤其为天然化学产物）可能发生的生物、化学反应过程及具体复合方式，均需进一步探索，以获得更多的壳寡糖复合物的制备方法，扩大其在食品、生物、医药等行业的应用范围及功效作用。

最后，壳寡糖本身是安全、无毒的，但与复合因子结合后，分子结构会发生改变，复合因子的功能活性可能受到影响，保持复合因子的功能活性及复合物的安全性也是未来壳寡糖复合物研究的一个热点。尤其作为载药成分时，壳寡糖复合物在人体内的代谢途径与安全性，仍需进一步进行研究确定，以加强壳寡糖的应用研究，推动壳寡糖产业进一步发展。

参考文献

[1] LIANG S, SUN Y, DAI X. A review of the preparation, analysis and biological functions of chitooligosaccharide[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(8): 2197.

[2] MUANPRASAT C, CHATSUDTHIPONG V. Chitosan oligosaccharide: Biological activities and potential therapeutic applications[J]. Pharmacology & Therapeutics, 2017, 170: 80−97.

[3] SUN G, YANG Q, ZHANG A, et al. Synergistic effect of the combined bio-fungicides epsilon-poly-l-lysine and chitooligosaccharide in controlling grey mould (*Botrytis cinerea*) in tomatoes[J]. International Journal of Food Microbiology, 2018, 276: 46−53.

[4] BAI K, HONG B, HUANG W, et al. Selenium-nanoparticles-loaded chitosan/chitooligosaccharide microparticles and their antioxidant potential: A chemical and *in vivo* investigation[J]. Pharmaceutics, 2020, 12(1): 43.

[5] SANTOS-MORIANO P, FERNANDEZ-ARROJO L, MENGIBAR M, et al. Enzymatic production of fully deacetylated chitooligosaccharides and their neuroprotective and anti-inflammatory properties[J]. Biocatalysis and Biotransformation: Biocatalysis in Spain: A Field of Success and Innovation, 2018, 36(1): 57−67.

[6] LUO Z, DONG X, KE Q, et al. Downregulation of CD147 by chitooligosaccharide inhibits MMP-2 expression and suppresses the metastatic potential of human gastric cancer[J]. Oncology Letters, 2014, 8(1): 361−366.
[7] ZHANG P, LIU W, PENG Y, et al. Toll like receptor 4 (TLR4) mediates the stimulating activities of chitosan oligosaccharide on macrophages[J]. International Immunopharmacology, 2014, 23(1): 254−261.
[8] YUAN X, ZHENG J, JIAO S, et al. A review on the preparation of chitosan oligosaccharides and application to human health, animal husbandry and agricultural production[J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 220: 60−70.
[9] YANG S, LIN F, TSAI H, et al. Alginate-folic acid-modified chitosan nanoparticles for photodynamic detection of intestinal neoplasms[J]. Biomaterials, 2011, 32(8): 2174−2182.
[10] 杜昱光. 壳寡糖的功能研究及应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2009. [DU Yuguang. The function research and application of chitosan oligosaccharide[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2009.]
[11] JUTHAMAS R, SORADA K, YASUHIKO T, et al. Modulation of *in vitro* Attachment, proliferation and osteogenic differentiation of rat bone-marrow-derived stem cells using different molecular mass chitosans and their blends with gelatin[J]. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2010, 21(8-9): 1301−1304.
[12] LIU X, XIA W, JIANG Q, et al. Synthesis, characterization, and antimicrobial activity of kojic acid grafted chitosan oligosaccharide[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 62(1): 297−303.
[13] YUE L, LI J, CHEN W, et al. Geraniol grafted chitosan oligosaccharide as a potential antibacterial agent[J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 176: 356−364.
[14] WANG Z, LI Y, XING L, et al. Effects of the anti-angiogenic carbohydrate-peptide conjugate, chitooligosaccharide-ES2 on endothelial cells and tumor-bearing mice[J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 208: 302−313.
[15] YAN F, YAN F, YU X, et al. Optimized preparation, characterization, and antioxidant activity of chitooligosaccharide-glycine Maillard reaction products[J]. Journal of Food Science and Technology, 2018, 55(2): 712−720.
[16] CAO R, ZHAO Y, ZHOU Z, et al. Enhancement of the water solubility and antioxidant activity of hesperidin by chitooligosaccharide[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2018, 98(6): 2422−2427.
[17] 曾名勇. 甲壳质和甲壳胺的化学改性和应用[J]. 渔业机械仪器, 1994(6): 35−39. [ZENG Mingyong. Chemical modification and application of chitin and chitosan[J]. Fishery Machinery and Instruments, 1994(6): 35−39.]
[18] YIN H, DU Y, DONG Z. Chitin oligosaccharide and chitosan oligosaccharide: Two similar but different plant elicitors[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 522.
[19] SAVINO S, JENSEN S, TERWISSCHA V S A, et al. Analysis of the structure and substrate scope of chitooligosaccharide oxidase reveals high affinity for C2-modified glucosamines[J]. FEBS Letters, 2020, 594(17): 2819−2828.
[20] 周天韡, 唐文琼, 沈青. 壳聚糖改性技术的新进展Ⅰ. 烷基化、酰化以及接枝化改性[J]. 高分子通报, 2008(11): 54−65. [ZHOU Tianwei, TANG Wenqiong, SHEN Qing. New progress on modifications of chitosan Ⅰ. Alkylation, acylation and grafting modification[J]. Polymer Bulletin, 2008(11): 54−65.]
[21] 周天韡, 唐文琼, 沈青. 壳聚糖改性技术的新进展Ⅱ. 交联化、季铵盐化、羧基化改性及其低聚糖衍生物[J]. 高分子通报, 2008(12): 52−66. [ZHOU Tianwei, TANG Wenqiong, SHEN Qing. New progress on modifications of chitosan Ⅱ. Cross-linking, quaternary ammonium salting, carboxylation modification and its oligosaccharide derivatives[J]. Polymer Bulletin, 2008(12): 52−66.]
[22] 胡雪芳, 田志清, 梁亮, 等. 6-羧基壳寡糖螯合钙制备工艺与络合性能研究[J]. 农业机械学报, 2018, 49(4): 381−388. [HU Xuefang, TIAN Zhiqing, LIANG Liang, et al. Preparation technology and complexing properties of 6-Carboxy chitooligosaccharides chelate calcium(CCOS-Ca(Ⅱ))[J]. Journal of Agricultural Machinery, 2018, 49(4): 381−388.]
[23] 任群翔, 翟玉春, 白玉红, 等. 壳寡糖与硝酸钕配合物的合成和配位机理研究[J]. 分子科学学报, 2008(5): 316−319. [REN Qunxiang, ZHAI Yuchun, BAI Yuhong, et al. Synthesis and coordination mechanism of the coordination compound of chitooligosaccharide with $Nd(NO)_3$[J]. Journal of Molecular Science, 2008(5): 316−319.]
[24] 徐进云, 贾辉, 杨俊玲, 等. 壳寡糖铁(Ⅲ)配位产物的合成与表征[J]. 天津工业大学学报, 2017, 36(2): 25−30. [XU Jinyun, JIA Hui, YANG Junling, et al. Synthesis and characterization of chitooligosaccharides-Fe(Ⅲ) complex[J]. Journal of Tianjin Polytechnic University, 2017, 36(2): 25−30.]
[25] 田金花, 杨华, 迟光伟, 等. 壳寡糖锌(Ⅱ)配合物的合成与结构表征[J]. 高分子通报, 2011(1): 71−74. [TIAN Jinhua, YANG Hua, CHI Guangwei, et al. Synthesis and characterization of chitooligosaccharides-zinc complex[J]. Polymer Bulletin, 2011(1): 71−74.]
[26] WANG Y, LIU T, ZHONG G. Synthesis, characterization and applications of copper(II) complexes with Schiff bases derived from chitooligosaccharide and iodosubstituted salicylaldehyde[J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 224: 115151.
[27] 何昇鸿, 王一安, 曾令智, 等. 营养强化剂壳寡糖铜、锰螯合物的合成与表征及抗氧化活性[J]. 中国食品添加剂, 2018(4): 148−153. [HE Shenghong, WANG Yian, ZENG Lingzhi, et al. Synthesis, characterization and antioxidant activity of nutrition fortifiers chitooligosaccharide copper and manganese chelates[J]. China Food Additives, 2018(4): 148−153.]
[28] 吕丹丹, 张宾, 房传栋, 等. 基于分子模拟的壳寡糖-金属配合物的结合模式分析[J]. 中国食品学报, 2019, 19(7): 79−84. [LV Dandan, ZHANG Bin, FANG Chuandong, et al. Analysis of binding mechanism between chitooligosaccharides and metal ions based on molecular simulation[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(7): 79−84.]
[29] 许牡丹, 王晓燕. 壳低聚糖 Cr(Ⅲ)离子配合物的制备及其结构表征[J]. 现代食品科技, 2007(12): 15−18. [XU Mudan,

WANG Xiaoyan. Preparation and structure characterization of oligochitosan Cr(Ⅲ) complex[J]. Modern Food Science and Technology, 2007(12): 15−18.]

[30] NASEEM K, FAROOQI Z H, BEGUM R, et al. Synthesis and characterization of poly(N-isopropylmethacrylamide-acrylic acid) smart polymer microgels for adsorptive extraction of copper(II) and cobalt(II) from aqueous medium: Kinetic and thermodynamic aspects[J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2020, 27(22): 28169−28182.

[31] JIANHUA L, QIAOMEI R, YUTING D. Glycation a promising method for food protein modification: Physicochemical properties and structure, a review[J]. Food Research International, 2012, 49(1): 170−183.

[32] ZHANG H, ZHANG Y, BAO E, et al. Preparation, characterization and toxicology properties of α- and β-chitosan Maillard reaction products nanoparticles[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 89: 287−296.

[33] YU X, JING Y, YAN F. Chitooligosaccharide-lysine Maillard reaction products: Preparation and potential application on fresh-cut kiwifruit[J]. Food and Bioprocess Technology, 2019, 12(7): 1133−1143.

[34] DU Y, RYAN K S. Pyridoxal phosphate-dependent reactions in the biosynthesis of natural products[J]. Natural Product Reports, 2019, 36(3): 430−457.

[35] EIDEN C G, ALDRICH C C. Synthesis of a 3-amino-2, 3-dihydropyrid-4-one and related heterocyclic analogues as mechanism-based inhibitors of BioA, a pyridoxal phosphate-dependent enzyme [J]. The Journal of Organic Chemistry, 2017, 82(15): 7806−7819.

[36] 江文, 周桢, 石业新, 等. 壳寡糖-水解麦醇溶肽共聚物的制备和表征[J]. 应用化学, 2016, 33(3): 284−292. [JIANG Wen, ZHOU Zhen, SHI Yexin, et al. Preparation and characterization of chitosan oligo-saccharide-hydrolyzed gliadin copolymer[J]. Chinese Journal of Applied Chemistry, 2016, 33(3): 284−292.]

[37] YANG R, ZUO P, ZHANG M, et al. Transglutaminase induced oligochitosan glycosylation of ferritin as a novel nanocarrier for food bioactive molecules[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 94: 500−509.

[38] 郭晓晓, 农叶琳, 王平, 等. TGase 催化丝胶-壳寡糖交联及其复合膜材料性能探究[J]. 丝绸, 2020, 57(7): 071102. [GUO Xiaoxiao, NONG Yelin, WANG Ping, et al. TGase-catalyzed cross-linking reaction between sericin and chitooligosaccharide and properties of the composite membrane[J]. Journal of Silk, 2020, 57(7): 071102.]

[39] AVTAR S, SOOTTAWAT B, THUMMANOON P. Effect of chitooligosaccharide from squid pen on gel properties of sardine surimi gel and its stability during refrigerated storage[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2019, 54(10): 2831−2838.

[40] 刘卅, 林欣欣, 陈立班. 聚电解质复合物研究进展[J]. 广州化学, 1996(3): 1−6. [LIU Sa, LIN Xinxin, CHEN Liban. Progress in polyelectrolyte complexes[J]. Guangzhou Chemistry, 1996(3): 1−6.]

[41] ADRIAN M, AXEL J, RENATO G, et al. A study on the molecular existing interactions in nanoherbicides: A chitooligosaccharide/tripolyphosphate loaded with paraquat case[J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2019, 562(2): 220−228.

[42] CHEN K, QIAN Y, WANG C, et al. Tumor microenvironment-responsive, high internal phase Pickering emulsions stabilized by lignin/chitosan oligosaccharide particles for synergistic cancer therapy[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2021, 591: 352−362.

[43] 曾尔曼, 杨雪慧, 陈丹梅, 等. 壳寡糖和聚丙烯酸的自组装行为[J]. 商丘师范学院学报, 2008(9): 1−4. [ZENG Erman, YANG Xuehui, CHEN Danmei, et al. The self-assembly conduct of chitooligosaccharide and polyacrylic acid[J]. Journal of Shangqiu Normal University, 2008(9): 1−4.]

[44] STOYANOVA N, IGNATOVA M, MANOLOVA N, et al. Nanoparticles based on complex of berberine chloride and polymethacrylic or polyacrylic acid with antioxidant and *in vitro* antitumor activities[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2020, 584: 119426.

[45] CAO J, WANG Y, HE C, et al. Ionically crosslinked chitosan/poly(acrylic acid) hydrogels with high strength, toughness and antifreezing capability[J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 242: 116420.

[46] 胡晓芬, 盛振华, 杨洁红, 等. (肝素/壳寡糖/Pluronic®) 静电组装多层膜的构建[J]. 高分子学报, 2015(6): 650−656. [HU Xiaofen, SHENG Zhenhua, YANG Jiehong, et al. Fabrication of (heparin/chitosan oligosaccharides/Pluronic®) multilayer films via electrostatic layer-by-layer assembly[J]. Acta Polymerica Sinica, 2015(6): 650−656.]

[47] 范丽萍. 壳寡糖/果胶静电自组装复合作用以及复合物负载 BSA 的研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2019. [FAN Liping. Studies on chitooligosaccharide/pectin electrostatic self-assembly and complex BSA loading[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2019.]

[48] CHEBL M, ABIAD M G, MOUSSA Z, et al. Two modes of associations of curcumin with pre- and nanoaggregated chitosan oligosaccharide lactate: Ionic strength and hydrophobic bile salt modulate partition of drug and self-assembly process[J]. The Journal of Physical Chemistry C, 2016, 120(20): 11210−11224.

[49] YAN K, YANG H, HUANG S, et al. A sulfonated chitooligosaccharide modified silica material for hydrophilic interaction liquid chromatography and its chromatographic evaluation[J]. Analytical Methods, 2018, 10(10): 1258−1265.

[50] RBAA M, BENHIBA F, HSSISOU R, et al. Green synthesis of novel carbohydrate polymer chitosan oligosaccharide grafted on d-glucose derivative as bio-based corrosion inhibitor[J]. Journal of Molecular Liquids, 2021, 322: 114549.

[51] 田金花, 杨华, 迟光伟, 等. 壳聚糖和壳寡糖的磷酸化研究[J]. 化学研究与应用, 2010, 22(5): 554−558. [TIAN Jinhua, YANG Hua, CHI Guangwei, et al. Study on the phosphorylation of chitosan and chitooligosaccharides[J]. Chemical Research and Application, 2010, 22(5): 554−558.]

[52] 莫宇星, 卢瑞, 田金花, 等. 壳寡糖和磷酸化壳寡糖对

Cu(Ⅱ)的络合和缓释性能[J]. 化学研究，2016, 27(6): 767−770. [MO Yuxing, LU Rui, TIAN Jinhua, et al. Complexation reaction and sustained release of chitooligosaccharides and phosphorylated chitooligosaccharides with copper ion[J]. Chemical Research, 2016, 27(6): 767−770.]

[53] 宋玥, 林强. 磷酸化壳寡糖制备工艺研究[J]. 安徽农业科学，2010, 38(1): 48−50. [SONG Yue, LIN Qiang. Study on the preparation of phosphorylated chitosan oligosaccharide[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2010, 38(1): 48−50.]

[54] VIKØREN MO I, FENG Y, ØKSNES DALHEIM M, et al. Activation of enzymatically produced chitooligosaccharides by dioxyamines and dihydrazides[J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 232: 115748.

[55] SCHATZ C, LECOMMANDOUX S. Polysaccharide-containing block copolymers: Synthesis, properties and applications of an emerging family of glycoconjugates[J]. Macromolecular Rapid Communications, 2010, 31(19): 1664−1684.

[56] NOVOA-CARBALLAL R, MULLER A H E. Synthesis of polysaccharide-b-PEG block copolymers by oxime click[J]. Chemical Communications (Cambridge, England), 2012, 48(31): 3781−3783.

[57] 蒋艳荣, 张振海, 叶羽苗, 等. 黄芩苷-壳寡糖复合物的制备及其表征[J]. 中国中药杂志，2014, 39(4): 648−652. [JIANG Yanrong, ZHANG Zhenhai, YE Yumiao, et al. Preparation of baicalin-chitooligosaccharide compound and its characterization[J]. Chinese Journal of Chinese Materia Medica, 2014, 39(4): 648−652.]

[58] 郑虎哲, CHOI Jihye, SEONG Giun, 等. 苹果多酚-壳寡糖微胶囊的制备表征及释放特性 (英文)[J]. 农业工程学报，2020, 36(14): 281−289. [ZHENG Huzhe, CHOI Jihye, SEONG Giun, et al. Preparation, characterization and health benefit functions of unripe apple polyphenols-chitooligosaccharides microcapsule[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2020, 36(14): 281−289.]

[59] 何文, 刘贝, 郭咸希. 不同取代度的寡聚精氨酸壳聚糖的合成与鉴定[J]. 安徽医药，2014, 18(5): 826−829. [HE Wen, LIU Bei, GUO Xianxi. Synthesis and characterization of chitosan modified nonaarginine with different degrees of substitution[J]. Anhui Medical and Pharmaceutical Journal, 2014, 18(5): 826−829.]

[60] 杜金凤, 郝红元, 张岐, 等. 壳聚糖钙/锌配位降解产物的 GFC 及清除 $O_2^{\cdot-}$研究[J]. 分子科学学报，2006, 22(6): 376−380. [DU Jinfeng, HAO Hongyuan, ZHANG Qi, et al. Formation of Ca(Ⅱ) and Zn(Ⅱ) with chitosan and the study on GFC spectra of oligosaccharides by oxidizing degradation and their reactivity of scavenging active oxygen[J]. Journal of Molecular Science, 2006, 22(6): 376−380.]

[61] HYEON-HO P, SEOK-CHUN K, GUN-WOO O, et al. Characterization and biological activity of PVA hydrogel containing chitooligosaccharides conjugated with gallic acid[J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 198: 197−205.

[62] 童春义, 肖苏尧, 王贝, 等. 壳寡糖-硒纳米植物营养调节剂的研制与应用[J]. 湖南大学学报 (自然科学版), 2008(10): 60−64. [TONG Chunyi, XIAO Suyao, WANG Bei, et al. Preparation and application of chitooligosaccharides-selenium nanoparticles for plant nutrition regulator[J]. Journal of Hunan University (Natural Sciences), 2008(10): 60−64.]

[63] BOBBILI K B, SINGN B, NARAHARI A, et al. Chitooligosaccharide binding to CIA17 (*Coccinia indica* agglutinin). Thermodynamic characterization and formation of higher order complexes[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 137: 774−782.

[64] BOBBILI K B, DATTA D, MONDAL S, et al. Purification, chitooligosaccharide binding properties and thermal stability of CIA24, a new PP2-like phloem exudate lectin from ivy gourd (*Coccinia indica*)[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 110: 588−597.

[65] NAREDDY P K, BOBBILI K B, SWAMY M J. Purification, physico-chemical characterization and thermodynamics of chitooligosaccharide binding to cucumber (*Cucumis sativus*) phloem lectin[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 95: 910−919.

[66] NARAHARI A, SINGLA H, NAREDDY P K, et al. Isothermal titration calorimetric and computational studies on the binding of chitooligosaccharides to pumpkin (*Cucurbita maxima*) phloem exudate lectin[J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2011, 115(14): 4110−4117.

[67] DONG Z, WANG Y, WANG C, et al. Cationic Peptidopolysaccharide with an intrinsic AIE effect for combating bacteria and multicolor imaging[J]. Advanced Healthcare Materials, 2020: 2000419.

[68] LI C Y, HUANG Z L, DONG L, et al. Improvement of enzymological properties of pepsin by chemical modification with chitooligosaccharides[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 118: 216−227.

[69] LI C. Effects of chemical modification by chitooligosaccharide on enzyme activity and stability of yeast beta-D-fructofuranosidase[J]. Enzyme Microb Technol, 2014, 64-65: 24−32.

[70] ZHAO M, MA A, HE H, et al. Desalted duck egg white peptides-chitosan oligosaccharide copolymers as calcium delivery systems: Preparation, characterization and calcium release evaluation *in vitro* and *vivo*[J]. Food Research International, 2020, 131: 108974.

[71] ZHU B, HOU T, HE H. Calcium-binding casein phosphopeptides-loaded chitosan oligosaccharides core-shell microparticles for controlled calcium delivery: Fabrication, characterization, and *in vivo* release studies[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 154: 1347−1355.

[72] 陈胜杰. 壳寡糖—细菌纤维素的制备及体外生物相容性评价 [D]. 海口：海南大学，2012. [CHEN Shengjie. Preparation of chitosan oligosaccharides/bacterial cellulose and evaluation of its biocompatibility *in vitro*[D]. Haikou: Hainan University, 2012.]

[73] NAN Y, RENPENG D, FANGKUN Z, et al. Characterization of antibacterial bacterial cellulose composite membranes modified with chitosan or chitooligosaccharide[J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 229: 115520.

[74] 周中凯, 李莹, 王俊轩, 等. 壳寡糖、抗性淀粉及其复合物对高脂饮食大鼠粪便中脂质成分的差异性[J]. 食品科技，2016,

41(8): 79−83. [ZHOU Zhongkai, LI Ying, WANG Junxuan, et al. Differences effect of lipid composition in the feces of high fat rat with chitosan oligosaccharides, resistant starch and its compound[J]. Food Science and Technology, 2016, 41(8): 79−83.]

[75] 李莹, 周中凯, 王俊轩. 壳寡糖、抗性淀粉及其复合物对高脂饮食大鼠脂代谢及肠道菌群的影响[J]. 中国食品添加剂, 2016(11): 94−101. [LI Ying, ZHUO Zhongkai, WANG Junxuan. Chitosan oligosaccharide, resistant starch and its compound on lipid metabolism and intestinal flora in high-diet rats[J]. China Food Additives, 2016(11): 94−101.]

[76] 周中凯, 王俊轩, 李莹. 壳寡糖修饰抗性淀粉的物化与消化特性研究[J]. 粮食与油脂, 2017, 30(5): 16−19. [ZHOU Zhongkai, WANG Junxuan, LI Ying. Study on physicochemical properties and digestion characteristics of resistant starch modified by chitosan oligosaccharide[J]. Food and Oils, 2017, 30(5): 16−19.]

[77] ZHANG J, CHEN X G, HUANG L, et al. Self-assembled polymeric nanoparticles based on oleic acid-grafted chitosan oligosaccharide: Biocompatibility, protein adsorption and cellular uptake[J]. Journal of Materials Science-Materials in Medicine, 2012, 23(7): 1775−1783.

[78] 刘金虎. 磷酸壳寡糖脂质体的构建及用于骨肉瘤治疗的体内外研究 [D]. 烟台: 烟台大学, 2019. [LIU Jinhu. Construction of phosphate chitosan-oligosaccharide liposomes and *in vitro* and *in vivo* research for osteosarcoma treatment[D]. Yantai: Yantai University, 2019.]

[79] 李樱红, 胡富强, 袁弘. 壳寡糖硬脂酸接枝物纳米粒的制备及其体外释放[J]. 中国药学杂志, 2005, 40(14): 1083−1086. [LI Yinghong, HU Fuqiang, YUAN Hong. Preparation and release profiles of chitosan oligosaccharide grafted stearic acid nanoparticles *in vitro*[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2005, 40(14): 1083−1086.]

[80] CAO R, LI X, ZHOU Z, et al. Synthesis and biophysical analysis of naringin-chitooligosaccharide complex[J]. Natural Product Research, 2019, 6: 1−7.

[81] CAO R, MA Q, FU Y, et al. Preparation, evaluation and characterization of rutin-chitooligosaccharide complex[J]. Plant Foods for Human Nutrition, 2019, 74(3): 328−333.

[82] XIN C, YAO X, DU B, et al. Stearic acid-grafted chitooligosaccharide nanomicelle system with biocleavable gadolinium chelates as a multifunctional agent for tumor imaging and drug delivery[J]. Pharmaceutical Research, 2018, 36(1): 10.

[83] LUO Q, ZHAO J, ZHANG X, et al. Nanostructured lipid carrier (NLC) coated with chitosan oligosaccharides and its potential use in ocular drug delivery system[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2011, 403(1-2): 185−191.

[84] WANG D, LI S, TAN X, et al. Engineering of stepwise-targeting chitosan oligosaccharide conjugate for the treatment of acute kidney injury[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 256: 117556.

[85] 黄佩文, 陈苏萍, 魏晓红, 等. 壳寡糖/水杨酸接枝物纳米粒用于释放阿霉素的研究[J]. 中国现代应用药学, 2014, 31(1): 61−66. [HUANG Peiwen, CHEN Suping, WEI Xiaohong, et al. Chitosan oligosaccharide/salicylic acid nanoparticles for doxorubicin delivery[J]. China Modern Applied Pharmacy, 2014, 31(1): 61−66.]

[86] ZHANG J, HAN J, ZHANG X, et al. Polymeric nanoparticles based on chitooligosaccharide as drug carriers for co-delivery of all-trans-retinoic acid and paclitaxel.[J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 129(9): 25−34.

[87] LIANG Z, GONG T, SUN X, et al. Chitosan oligomers as drug carriers for renal delivery of zidovudine[J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 87(3): 2284−2290.

[88] YANG S, LIN F, TSAI K, et al. Folic acid-conjugated chitosan nanoparticles enhanced protoporphyrin IX accumulation in colorectal cancer cells[J]. Bioconjugate Chemistry, 2010, 21(4): 679−689.

[89] 王荣民, 裴菲, 何玉凤, 等. 低聚壳聚糖负载金属卟啉配合物的制备及生物活性研究[J]. 化学研究与应用, 2012, 24(2): 278−281. [WANG Rongmin, PEI Fei, HE Yufeng, et al. Preparation and biological activitiy of chitooligosaccharide supported porphyrins metallic complexes[J]. Chemical Research and Application, 2012, 24(2): 278−281.]

[90] RONG M W, JING F S, YU F H, et al. Conjugation of chitooligosaccharide-5-fluorouracil with bovine serum albumin[J]. Chinese Chemical Letters, 2006(11): 1495−1498.

[91] 李雨新, 李尚勇, 陈雪红. 壳寡糖的分析方法及其在种植业领域的应用[J]. 农村经济与科技, 2020, 31(8): 78−80. [LI Yuxin, LI Shangyong, CHEN Xuehong. The analysis method of oligochitosan and its application in crop industry[J]. Rural Economy and Technology, 2020, 31(8): 78−80.]

[92] SCHLOFFEL M A, KASBAUER C, GUST A A. Interplay of plant glycan hydrolases and LysM proteins in plant—bacteria interactions[J]. International Journal of Medical Microbiology, 2019, 309(3-4): 252−257.

[93] CHEN W, YANG Q. Development of novel pesticides targeting insect chitinases: A minireview and perspective[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(16): 4559−4565.

[94] JUN Z, SONG L, YUKUN Q, et al. Preparation, characterization, and antifungal evaluation of a new type of aminourea chitooligosaccharide derivatives[J]. Journal of Oceanology and Limnology, 2020(3): 841−850.

[95] 高晓冉, 刘程惠, 陈立国, 等. 壳寡糖与茶多酚复合保鲜剂对冷鲜牛肉的保鲜效果[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(11): 172−178. [GAO Xiaoran, LIU Chenghui, CHEN Liguo, et al. Preservative effects of chitosan oligosaccharide and tea polyphenol together on chilled beef[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(11): 172−178.]

[96] CHANG Y, SUNG W, CHEN J. Effect of different molecular weight chitosans on the mitigation of acrylamide formation and the functional properties of the resultant Maillard reaction products[J]. Food Chemistry, 2016, 199(5): 581−589.

[97] SHYU Y S , HSIAO H I , FANG J Y, et al. Effects of dark brown sugar replacing sucrose and calcium carbonate, chitosan, and chitooligosaccharide addition on acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural mitigation in brown sugar cookies[J]. Processes, 2019, 7(6): 360.

[98] SEONG J S, MID E Y, SOO N P. Surfactant-stable and pH-

sensitive liposomes coated with N-succinyl-chitosan and chitooligosaccharide for delivery of quercetin[J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 181: 659−667.

[99] 王亚珍, 谢晶, 李立, 等. 壳寡糖对壳聚糖-明胶-壳寡糖三元复合膜的性能影响研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(8): 134−137. [WANG Yazhen, XIE Jing, LI Li, et al. Effect of chitosan oligosaccharide on properties of chitosan-gelatin-chitosan oligosaccharide ternary composite films[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(8): 134−137.]

[100] CHEN S, LUO C, WEN W, et al. Fabrication, antibacterial activity and cytocompatibility of quaternary ammonium chitooligosaccharide functionalized polyurethane membrane via polydopamine adhesive layer[J]. Materials Science & Engineering C, 2018, 93: 319−331.

[101] BU X, PEI J, ZHANG F, et al. The hydration mechanism and hydrogen bonding structure of 6-carboxylate chitooligosaccharides superabsorbent material prepared by laccase/TEMPO oxidation system[J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 188: 151−158.

王艳, 苑宏博, 董迎迎, 等. 桦褐孔菌子实体中三萜类化合物的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 416−422. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021040158

WANG Yan, YUAN Hongbo, DONG Yingying, et al. Analysis on Research Status of Triterpenoids in Sporophore of *Inonotus obliquus*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 416−422. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021040158

· 专题综述 ·

桦褐孔菌子实体中三萜类化合物的研究进展

王　艳[1], 苑宏博[1], 董迎迎[1], 李虹佳[1], 赵　宁[1], 辛嘉英[1,2], 张兰威[3]

（1.哈尔滨商业大学食品工程学院, 黑龙江哈尔滨 150076;
2.中国科学院兰州化学物理研究所, 羰基合成与选择氧化国家重点实验室, 甘肃兰州 730000;
3.哈尔滨工业大学, 化工学院食品科学与工程系, 黑龙江哈尔滨 150076）

摘　要: 桦褐孔菌是一种具有多种生物活性的天然植物真菌资源，三萜类化合物是其主要功效成分，因三萜类化合物具有优良的抗癌、降血糖和抗氧化等功能特性，其相关研究开发近年来备受关注。本文主要从桦褐孔菌三萜类化合物的诱导发酵生产，子实体三萜类化合物的分离纯化、化学组成及结构解析、功能特性和应用开发等方面对其研究现状进行总结分析，其中，诱导发酵生产方面使用植物共生微生物提取物作为诱导剂效果最为显著，分离纯化技术根据目的不同各有优势，在进行化学组成及结构解析时更适合采用分离效能高的分离纯化技术如高效逆流色谱、高效液相色谱等，规模化应用则大孔树脂更具优势，基于以上分析对其今后的研究方向进行了展望，为后续开发研究和医药与食品行业应用提供了理论依据。

关键词: 桦褐孔菌, 子实体, 三萜类化合物, 抗癌, 降血糖, 抗氧化

中图分类号: S646.9　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0416−07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021040158

本文网刊:

Analysis on Research Status of Triterpenoids in Sporophore of *Inonotus obliquus*

WANG Yan[1], YUAN Hongbo[1], DONG Yingying[1], LI Hongjia[1], ZHAO Ning[1], XIN Jiaying[1,2], ZHANG Lanwei[3]

（1.College of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China;
2.State Key Laboratory for Oxo Synthesis and Selective Oxidation, Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;
3.College of Chemical and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150076, China）

Abstract: *Inonotus obliquus* is anatural plant fungal resource with a variety of biological activities. Triterpenoids are the main functional components. Because triterpenoids have excellent anticancer, hypoglycemic and antioxidant properties, the related research and development has attracted much attention in recent years. In this paper, the current research status of *Inonotus obliquus* triterpenoid compounds are summarized and analyzed from the aspects of induction fermentation production, separation and purification of sporophore triterpenoid compounds, chemical composition and structure analysis, functional characteristics and application development, among which the use of plant commensal microbial extracts as inducers in induction fermentation production is the most significant. The separation and purification techniques have respective advantages according to different purposes. The separation and purification technologies with high separation efficiency such as high-performance counter-current chromatography and high-performance liquid chromatography are more suitable for chemical composition and structure analysis, and macroporous resin has more advantages in large-scale application. Based on the above analysis, the future research direction is prospected, which provides a theoretical basis for subsequent development and research and application in that medicine and food industry.

收稿日期: 2021−04−15

基金项目: 黑龙江省自然科学基金（LH2021C051）; 哈尔滨商业大学青年创新人才项目青年后备人才专项（2019CX33）; 黑龙江省“百千万”工程科技重大专项支撑行动计划（2021ZX12B07）的子课题（2021ZX12B07-2）; 中央支持地方高校改革发展资金人才培养支持计划项目（高水平人才）（304017）。

作者简介: 王艳（1984−）, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品生物技术和微生物发酵技术研究, E-mail: wangyan_123456@163.com。

Key words: *Inonotus obliquus*; sporophore; triterpenoids; anticancer; hypoglycemic; antioxidant activity

桦褐孔菌是一种生物活性优良的药食两用真菌[1]，其自然生长环境主要分布在低纬度地区，如俄罗斯及中国东北部等。国内主要分布在黑龙江大小兴安岭、吉林长白山、内蒙古、山西等地[2]。虽然早在400 年前就有关于桦褐孔菌入药的记载，但是有关于桦褐孔菌的深入研究是在上世纪 50 年代末才开始的[3]。经过了近些年的开发研究，人们发现桦褐孔菌具有多种有利于人体的功能特性，美国、俄罗斯、日本、中国等国都有在进行褐孔菌功能特性的相关研究[4]。目前，关于桦褐孔菌的研究主要分为桦褐孔菌野生子实体及人工培养两方面，因桦褐孔菌对土壤条件、森林类型、共生树种要求较高[2]，故野生桦褐孔菌资源较为有限，桦褐孔菌的人工培养在近些年已成为许多研究人员极为关注的研究方向。桦褐孔菌中包含 Fe、Mg、Ca 等常量元素在内的无机元素足有 22 种[5]，这 22 种无机元素均对人体无毒害作用，在无机元素角度看桦褐孔菌制品具有足够的食用安全性，且通过小鼠急性毒性试验、小鼠骨髓细胞微核试验、Ames 试验、小鼠精子畸形试验、大鼠 28 d 喂养试验及大鼠 90 d 喂养等试验探究桦褐孔菌的毒性作用，也证实了桦褐孔菌具有食用安全性属实际无毒级[6]。除上述无机元素外，桦褐孔菌中还具有多种功效成分如三萜类化合物、多糖类化合物、多酚类化合物、甾体等物质，其中，桦褐孔菌中的三萜类化合物是桦褐孔菌中的主要功效成分之一，因其具有抗癌、降血糖、抗氧化等功效[7]，而备受国内外医药及食品行业关注。各国学者也一直在探索开发桦褐孔菌三萜类化合物的新功能性。目前，我国的桦褐孔菌开发与利用程度仍较为落后，市场上多数还停留在利用桦褐孔菌菌块泡水饮用阶段，其中的功效成分未被有效利用，但随着对桦褐孔菌三萜类化合物相关研究的进一步深入，桦褐孔菌三萜类化合物产业化的医疗产品与保健食品市场必然会得到大力的开发。故本文综述了国内外对桦褐孔菌三萜类化合物的人工诱导生成、提取分离纯化、结构及功能性研究等内容，以期对桦褐孔菌资源的开发、桦褐孔菌的产业化开发、桦褐孔菌的医疗产品及食用产品的开发提供参考。

1　人工诱导桦褐孔菌发酵高产三萜类化合物

桦褐孔菌的功效很大程度上来源于桦褐孔菌所含的功能性物质，三萜类化合物作为桦褐孔菌主要功效成分之一，具有很高的研究价值。因野外桦褐孔菌资源有限，人工诱导培养桦褐孔菌菌种产三萜类化合物是目前国内外极为关注的研究方向，基于灵芝等药用真菌的诱导培养机制，对桦褐孔菌的诱导培养也在逐渐深入。近年来，国内外研究人员通过实验发现还原桦褐孔菌野外生长条件并添加相关物质也可以使桦褐孔菌中的三萜类化合物产量增加。目前，关于桦褐孔菌三萜类化合物的诱导培养研究现状见表 1。

可以看出传统的诱导剂如茉莉酸甲酯、脂肪酸、金属离子等物质中，茉莉酸甲酯对桦褐孔菌三萜类化合物的诱导作用较好。桦褐孔菌宿主提取物及植物共生微生物提取物诱导剂中根瘤菌提取物的诱导作用最好。通过上表也可看出，目前桦褐孔菌三萜类化合物诱导实验所测定的多为总三萜或者单种类三萜，对诱导前后三萜类化合物的种类与含量关系测定研究较少。除添加诱导剂外，紫外诱变也可筛选出高产三萜菌株，且可参考其他类似真菌的诱导发酵培养实验，如同属于纤孔菌的粗毛纤孔菌诱导发酵培养试验一样进行诱导剂筛选并复配[12]。

2　桦褐孔菌三萜类化合物提取与分离纯化

2.1　桦褐孔菌三萜类化合物的提取

三萜类化合物的提取原理主要是利用其在不同的有机溶剂中溶解性的差别，进而甄选有机溶剂进行提取。提取方法主要有回流提取法、高压脉冲法、超声提取法等，每种方法的提取效率与三萜类化合物得率都不同。研究人员对提取方法参数进行调整以期提高每种方法三萜类化合物得率，经实验后，采用回流提取法，提取时间为 2.5 h、提取溶剂为异丙醇、料液比 1∶22，回流温度 80 ℃，提取三萜类化合物的最佳得率为 1.13%[13]。采用超声提取法，提取时间为

表 1　桦褐孔菌三萜类化合物的诱导培养研究现状

Table 1　Research status of induction culture of triterpenoids from *Inonotus obliquus*

研究人员	添加诱导剂种类	诱导效果	优势
杨宏博等[8]	茉莉酸甲酯、水杨酸、亚油酸、桦树皮水提物、铁离子	茉莉酸甲酯诱导效果最佳，三萜总量增加了1.2倍	对诱导后的三萜类化合物功能特性进行了实验并发现所选用诱导剂可增强桦褐孔菌三萜类化合物的抗氧化能力
管玉艳等[9]	香叶醇、茉莉酸甲酯、角鲨烯、柠檬烯、β-蒎烯、萜品油烯	香叶醇诱导效果最佳，可将桦褐孔菌醇的产量提升3.02倍	探明了香叶醇的诱导机制为使酶活性增加从而促使桦褐孔菌醇产量上升
Lin等[10]	桦树皮提取物、桦树根际土壤提取物、固氮菌提取物、根瘤菌提取物	发现根瘤菌刺激菌丝三萜类化合物积累量最高，三萜总量增加了4倍	发现可以通过调控桦褐孔菌中FPS(法尼基焦磷酸合酶)来影响三萜类化合物的积累，探索了诱导剂与三萜类化合物积累之间的关系
Xu等[11]	油酸、亚油酸、软脂酸、含Tween-80和长链脂肪酸的茉莉酸甲酯	添加含Tween-80和长链脂肪酸的茉莉酸甲酯将三萜总量提升了1.3倍，并将肌醇、曲烯果酸、栓菌酸和桦木素，分别增加3.0倍、5.5倍、4.7倍和21.8倍	首次对桦褐孔菌中的单种类三萜诱导前后进行了含量比对；分析出Tween-80的茉莉酸甲酯可提高桦褐孔菌三萜类化合物产量

15 min、提取溶剂为异丙醇、料液比 1∶30、超声功率 300 W、超声 30 次，提取三萜类化合物的最佳得率为 1.06%[14]。采用高压脉冲法，提取时间为 20 μs、提取溶剂为 75% 乙醇溶液、料液比 1∶30、电场强度 50 kV/cm、脉冲数 10、提取三萜类化合物的最佳得率为 1.18%，且比同采用 75% 乙醇溶液作为提取溶剂的超声波法、溶剂浸提法提取率高 5% 和 8%[15]。采用回流提取法三萜类化合物得率较高，仪器简单，但提取时间较长。超声提取法提取较为快速，但三萜类化合物得率较低。高压脉冲法能耗低、重复性好、效率高且提取速度快，但设备复杂昂贵[16]。因此，在工业生产及实验室提取时建议根据所有设备及提取目的甄别方法。

为了提高三萜类化合物得率，超声波辅助技术与其它提取方法联用备受关注。经实验人员将仅采用超声波提取法[14] 与超声波辅助技术联用双水相体系提取法比较发现，采用超声波辅助技术联用双水相体系提取三萜类化合物得率提高了 12.94%[17]。另有研究人员利用超声波辅助技术联用回流提取法提取三萜类化合物，将三萜类化合物得率提高至 1.42%[18]。但其未与联用提取法前得率进行对比，故参考价值有限。但仍可以看出利用超声波辅助技术联用其他方法可有效提高三萜类化合物得率，工厂及实验室在选用提取方法时可以进行有效参考，选取合适的辅助与提取技术提取桦褐孔菌三萜类化合物。

2.2 桦褐孔菌三萜类化合物的分离纯化

无论是通过野外子实体还是人工培养菌种提取得到的三萜粗提物成分均较为复杂，未达到可直接利用的纯度，因此，需要对三萜粗提物进行分离纯化才能进行利用。目前，三萜类化合物的分离纯化方法主要有高效逆流色谱法、柱层析反复分离法、大孔树脂吸附法和高效液相色谱法等，其特点见表 2。

桦褐孔菌三萜类化合物的分离纯化对于桦褐孔菌实验室研究与工业化生产均具有重要意义。其中，大孔吸附树脂吸附法，因其具有不含交换基团、不溶于水、吸附量大、选择性好、吸附速度快、可再生等优点，被研究人员广泛用来进行桦褐孔菌三萜类化合物的分离纯化。其中，AB-8 和 D101 两种树脂常用来进行桦褐孔菌三萜类化合物的分离纯化，研究人员对两种树脂进行了筛选，发现 AB-8 大孔树脂较 D101 大孔树脂更适合用于分离纯化桦褐孔菌三萜类化合物[21]，而后有研究人员对 AB-8 大孔树脂分离纯化三萜类化合物进行了工艺优化，其分离纯化纯度可达 85.13%，与纯化前相比总三萜量提高了 2.04 倍[23]。为了寻找更适合进行桦褐孔菌三萜类化合物分离纯化的树脂，研究人员扩大了筛选范围对 5 种常用的大孔吸附树脂进行了筛选实验，实验结果也证实了 AB-8 树脂是目前更适宜进行桦褐孔菌三萜类化合物分离纯化的大孔吸附树脂[24]。

除了大孔树脂吸附法，在实验室及工业生产过程中色谱法也是分离纯化三萜类化合物常用且高效的方法[25]。尽管高效液相色谱及高效逆流色谱提取三萜类化合物的纯度较高，但是因为大孔吸附树脂分离纯化法具有工艺简单、操作简便、成本低、产率高等优点，后者应用更加广泛。对于纯度要求较高的实验室研究选用高效液相色谱及高效逆流色谱法比较合适，对于成本要求更高的工厂应用则选用大孔吸附树脂分离纯化法更为合适。目前，关于桦褐孔菌三萜类化合物分离纯化的研究较少但仍在持续进行，希望可以筛选出更多的桦褐孔菌三萜类化合物分离纯化法，根据不同目的去选择相应的分离纯化方法是推动桦褐孔菌三萜资源开发的重要一步。

3 桦褐孔菌三萜类化合物结构研究

桦褐孔菌中三萜类化合物是由多种三萜类化合物组合构成的，目前，对于桦褐孔菌三萜类化合物结构的研究主要集中在其三萜类化合物萜组成成分方面，研究桦褐孔菌三萜类化合物的结构与功能特性之间的关系是后续亟需深入研究的部分。对桦褐孔菌三萜类化合物结构的研究方法主要有化学法和波谱法。波谱法（紫外吸收光谱法 UV，红外吸收光谱法 IR，核磁共振波谱法 NMR，质谱法 MS）因具有样品用量少，精确度高以及分析时间短等优点，已逐步取代化学法，广泛应用于有机化合物的结构鉴定。

3.1 桦褐孔菌三萜化合物的结构研究现状

关于桦褐孔菌的结构研究，目前多通过分离纯化后，对分离物的波谱数据采用红外光谱、核磁共振等技术进行分析，从而研究其结构。目前，关于桦褐孔菌三萜类化合物的结构研究尚处在起步阶段，与桦

表 2 桦褐孔菌三萜类化合物分离纯化方法表

Table 2 Table of separation and purification methods of triterpenoids from *Inonotus obliquus*

方法	原理	优点	缺点
高效逆流色谱法[19]	利用特殊的流体动力学现象使两相溶剂在螺旋管中高效接触、混合、分配，而后按照分离物质分配系数依次洗脱分离。	重现性好，无不可逆吸附，回收率高，无制备柱消耗，无需太多样品前处理。	消耗有机溶剂多，难以放大规模进行工业化分离，使用有局限性。
柱层析反复分离法[20]	利用固定相对液体相的各组分吸附力不同而使各组分分离。	操作简单，经济实惠，样品承载量大。	分析应用不方便，再现性较差，不适于梯度洗脱。
大孔树脂吸附法[21]	大孔树脂具有吸附与筛选作用，有机化合物根据吸附力、分子量的大小，在大孔吸附树脂上经一定溶剂洗脱而达到分离的目的。	工艺简单，操作简便，成本低，可重复利用。	对树脂要求较高，树脂品种有限。
高效液相色谱法[22]	根据混合物中的各个组成成分在固定相和流动相之间的分配比例的不同，实现成分之间的分离。	分离效率高，选择性好，灵敏度高，应用范围广，操作简单。	分析成本较高，仪器价格及维护费用昂贵。

褐孔菌多糖的结构研究相比较为落后，对于分离出的三萜类化合物功能性研究也较为不足。各桦褐孔菌三萜类化合物的功能活性与其结构间的关系也尚未被探明，有研究显示茯苓皮中的羊毛甾烷型三萜的 16 位或 15 位羟基、BC 环上的双键均与其对肿瘤细胞的毒性密切相关[26]，桦褐孔菌中也含有多种羊毛甾烷型三萜，其结构与功能性的关系可能与茯苓皮羊毛甾烷型三萜类似。桦褐孔菌醇是一种羊毛甾烷型三萜，且是桦褐孔菌所含三萜类化合物中研究较早的，也是三萜类化合物中功能活性研究较为明确的。有学者根据灵芝中的灵芝酸 A 和灵芝酸 H 抑制癌细胞的增殖作用与其 3 位、7 位和 15 位的羟基取代有关，推测出如果化学修饰桦褐孔菌醇 7 位、15 位和 16 位上的羟基也可增加桦褐孔菌醇的抗肿瘤作用[27]。目前，桦褐孔菌三萜类化合物结构研究还停留在结构鉴定阶段，其结构与功能特性的关系研究还处在起步阶段正在等待科研人员的继续探索。

3.2　桦褐孔菌三萜类化合物的结构鉴定

国内外研究人员采用了不同的方法对桦褐孔菌三萜类化合物进行了结构鉴定，目前，对桦褐孔菌三萜类化合物的结构鉴定见表 3。

表中结构鉴定结果不同可能与其分离条件和方法选择有关，从表中可以看出分离手段较少则所鉴定出的三萜类化合物种类也相应会较少，因此，在进行结构分析时需要将桦褐孔菌三萜提取物采用多种分离方法进行分离，故建议在进行桦褐孔菌三萜类化合物结构鉴定时根据已有条件尽量选用多种分离手段。

4　桦褐孔菌三萜类化合物的功能性

桦褐孔菌三萜类化合物的功能性研究是桦褐孔菌研究的重要组成部分，桦褐孔菌资源的开发依赖于其功能性的相关开发，对桦褐孔菌三萜类化合物的功能性进行透彻的体外实验及动物实验乃至临床试验对桦褐孔菌资源的开发、桦褐孔菌的工业化生产具有重要意义。

4.1　抗癌作用

桦褐孔菌三萜类化合物的抗癌功效一直是桦褐孔菌三萜类化合物功能性研究中的热点，有报道显示桦褐孔菌提取物对正常细胞无毒性作用，相比较其他抗癌药物可能会有更小的副作用[32]。桦褐孔菌三萜类化合物对于抗癌的作用主要是从抑制癌细胞增殖作用和使癌细胞凋亡作用两个方向进行实验的[33]。有实验发现桦褐孔菌三萜类化合物浓度达到 250 μg/mL 时即可明显抑制癌细胞的增殖，并随着剂量加大其抑制性也随之增加，其胞外三萜类化合物对癌细胞增殖的抑制性明显高于胞内三萜类化合物[30]。有研究人员在其研究上用其他癌细胞进一步进行了验证，证实了其结论并发现桦褐孔菌胞外三萜类化合物含量高于胞内三萜类化合物含量[34]。因此，桦褐孔菌胞外三萜类化合物在抗癌领域更有进一步研究的价值。为了研究桦褐孔菌三萜类化合物对癌细胞的凋亡作用，有研究通过桦褐孔菌三萜类化合物诱导不同 p53 状态的人肺癌细胞，发现其可使人肺癌细胞裂解从而使其凋亡，以达到抗癌作用[35]。有实验发现桦褐孔菌三萜类化合物中的抗癌作用物为白桦脂醇、栓菌酸、桦褐孔菌醇和羊毛甾醇[36]。为了更加贴近实际应用效果，有研究人员对桦褐孔菌三萜类化合物抗癌作用与抗癌药物紫杉醇做了对照，实验结果表示桦褐孔菌三萜类化合物对人宫颈癌细胞、人结肠癌细胞、白血病肿瘤细胞及小鼠淋巴细胞均有较强的细胞毒性[37]。总的来说，体外实验证明了桦褐孔菌三萜类化合物具有一定的抗癌功能，但是活体实验的缺乏使其抗癌性能的作用效果并不明确，未来需要研究人员进行动物实验乃至临床试验才能准确验证评估桦褐孔菌三萜化合物的抗癌功能性。

4.2　降血糖作用

据估计，2045 年，全球糖尿病患者人数将增至 7 亿[38]。糖尿病药物的研发是目前医疗行业的热点项目，也是广大糖尿病患者的期望福音。市面上许多商家对桦褐孔菌冠以“天然胰岛素”之名，有研究表示桦褐孔菌对Ⅱ型糖尿病大鼠具有降血糖作用[39]，但桦褐孔菌资源开发程度较低，其降血糖作用也只处在保健或者辅助治疗阶段，只有对桦褐孔菌的功效物质进行更准确的降血糖功能实验之后才能够更好地将

表 3　桦褐孔菌三萜类化合物结构鉴定表

Table 3　Structure identification table of triterpenoids from *Inonotus obliquus*

研究人员	分离方法	鉴定方法	鉴定出的三萜类化合物
王健铭等[28]	硅胶柱色谱、HPLC	^{1}H-NMR	白桦脂酸、白桦醇、羽扇豆醇、8,24-羊毛甾二烯-3β,21β-二醇、3β-羟基-羊毛甾-8,24-二烯-21-醛、8,23-二烯羊毛甾-3β,22(R),25-三醇、桦褐孔菌醇D
陈程等[25]	硅胶柱色谱	IR、^{1}H-HMR、^{13}C-HMR	羊毛甾醇、栓菌酸
张仕瑾等[29]	硅胶、MCI、SephadexLH-20凝胶等柱色谱	HR-EI-MS、HMR	3-羊毛甾8,24-二烯-21-醛、羊毛甾醇、3β-羟基-羊毛甾-8,24-二烯-21-醛、白桦脂醇、桦褐孔菌醇、栓菌酸、3β,21-二羟基-羊毛甾-8,24-二烯、齐墩果酸、乌苏酸、白桦脂酸、桦褐孔菌素A、桦褐孔菌萜D、3β-乙酰氧基-11α,12α-环氧-齐墩果烷-28,13β-内酯
李广林[21]	大孔吸附树脂吸附法	UV、IR、EI-MS、^{1}HNMR	羽扇豆醇、羊毛甾-8, 24-二烯-3β-内酯
Kim等[30]	大孔吸附树脂吸附法	HPLC、LC-ESI-MS	白桦脂醇、白桦酸、桦褐孔菌醇、栓菌酸
Alzand等[31]	硅胶柱色谱、TLC、HPLC	IR、^{1}D-NMR、^{2}D-NMR、HR-EI-MS	3β, 22-二羟基-5α-羊毛甾-8, 25-烯-24-酮、桦褐孔菌醇、羊毛甾醇、3β, 22-二羟基羊毛甾8, 24-烯-11酮、栓菌酸、麦角甾-7, 22-烯-3β-醇、24β-乙基胆甾-4烯-3β醇、麦角甾-7-烯-3β-醇

桦褐孔菌资源应用于糖尿病的治疗当中。研究人员根据市面上的降糖药物阿卡波糖的降糖原理——抑制 α-葡萄糖苷酶与 α-淀粉酶活性使进食的碳水化合物分解成葡萄糖的时间延长[40],对桦褐孔菌三萜类化合物的 α-葡萄糖苷酶抑制率与 α-淀粉酶抑制率进行了实验,实验发现其对 α-葡萄糖苷酶和 α-淀粉酶均具有一定的抑酶活性,其中,白桦脂酸对 α-葡萄糖苷酶的活性抑制 IC_{50} 值为 0.26 mg/mL,显著低于降糖药物阿卡波糖的活性抑制 IC_{50} 值(0.37 mg/mL),桦褐孔菌萜 D 对 α-淀粉酶的活性抑制 IC_{50} 值为 7.86 mg/mL,显著低于降糖药阿卡波糖 IC_{50} 值(10.51 mg/mL);其作用机制为桦褐孔菌三萜类化合物对 α-葡萄糖糖苷酶产生了竞争性抑制,对 α-淀粉酶产生了非竞争性与竞争性抑制混合抑制[41]。体外实验的成功也希望可以为后续的桦褐孔菌三萜类化合物降血糖动物实验及开发新型抗糖尿病药物提供新的思考。

4.3 抗氧化作用

在日常生活中人体会持续产生氧化性自由基,当自由基在体内积累过多时,就会加速人体的衰老甚至引发心血管疾病。目前,关于桦褐孔菌三萜类化合物的抗氧化相关试验较为匮乏,基本停留在体外抗氧化试验上,通过体外实验发现桦褐孔菌三萜类化合物可清除 DPPH、ABTS、超氧化物和过氧自由基,并随着其浓度的升高其清除自由基能力也随之升高[17,42],体外实验的结果证明了桦褐孔菌三萜类化合物具有一定的提高抗氧化能力作用。有研究人员对于氧化损伤小鼠模型做了相关实验,发现桦褐孔菌对氧化损伤具有一定保护作用,功效成分为桦褐孔菌醇[43]。目前,关于桦褐孔菌的抗氧化小鼠实验较少且均是腹腔给药,相对较为偏重于医疗行业的应用,其以食品方向进行的喂药小鼠实验较少[44−46]。因此,在桦褐孔菌三萜类化合物抗氧化能力小鼠实验中应进行喂药供药,以期更好地应用于食品行业。近年来我国针对脑卒中所开发的药物丁基苯酞就可有效提高细胞抗氧化活性,桦褐孔菌的抗氧化作用研究对于脑卒中开发新药及医美行业抗衰老等都具有很大的研究价值。

4.4 其他作用

桦褐孔菌三萜类化合物的功能性作用仍然处于不断开发阶段,研究人员们基于桦褐孔菌的免疫调节、抗炎、抗氧化和抗凋亡性能,正在拓展研究桦褐孔菌三萜类化合物的一系列新的功能特性,如神经保护作用、抗脱发作用、抑制一氧化氮合成逆转内毒素和肿瘤坏死因子引起的低血压、和肝保护作用[31,47−49]。桦褐孔菌也在从泡水饮用的保健食品一步步向治疗疾病的医药产品进发,研究人员致力于将桦褐孔菌不同的功效成分应用于治疗不同的疾病,并将不同的功能特性应用于预防各类疾病。桦褐孔菌三萜类化合物作为桦褐孔菌中含量最多的脂溶性化合物,提取价值高,功能特性优越,桦褐孔菌三萜类化合物的研究开发对推动桦褐孔菌的产业化、应用化、规模化将起到重要作用。

5 结语与展望

桦褐孔菌三萜类化合物具有抗癌、降血糖、消炎、抗氧化等多种功效,并基于以往研究的成果正在不断研究、开发和应用于其他保健与医疗场景,对未来的保健品、药品与食品行业的市场应用具有一定的启发。因野生桦褐孔菌资源有限,大规模的桦褐孔菌三萜类化合物产品生产将更加依赖于人工培养桦褐孔菌,为促使桦褐孔菌资源的规模化发展,今后应系统化的对人工诱导培养出的桦褐孔菌菌株进行后续相应的提取、分离纯化和功能特性的相关实验并与野外子实体相关实验数据进行比对,并在实验室及工厂化两个方面去进行提取及分离纯化的技术筛选进而推动桦褐孔菌的规模化和产业化。

对桦褐孔菌三萜类化合物今后的研究方向,可以从以下几个方面进行:a.目前桦褐孔菌三萜类化合物的诱导性高产研究多与单一刺激物或外源因子有关,复配诱导剂的有关研究相对较少,并可将复配诱导剂与物理诱变法相结合以期提高三萜化合物产量;b.目前缺少桦褐孔菌三萜类化合物对人体的作用研究,基本停留在体外实验阶段,动物实验也较少,体外实验的成果在人体上效果如何,是否有不良反应及禁忌尚未可知,应增加动物实验比例并随进度进行临床试验;c.尚未探明桦褐孔菌三萜类化合物的结构与其功能活性的关系,探明关系后多展开关于桦褐孔菌单体三萜化合物的功能性实验及化学修饰,以期增加其功能性,推广桦褐孔菌开发。

桦褐孔菌作为尚未广泛应用于医疗及食品行业的新兴研究真菌,与灵芝等真菌不同,尽管已经过了科研人员几十年的不懈研究,但尚有许多作用机制尚未明确,大多数研究目前还停留在应用方面,对作用机制的研究较少。作用机制的明确对于桦褐孔菌的医用食用安全性研究将起到很大地促进作用,并从临床角度齐头并进,才能更好地开发利用桦褐孔菌资源,为人类的生活质量与疾病治疗做出贡献。

参考文献

[1] 戴玉成,李玉. 中国六种重要药用真菌名称的说明[J]. 菌物学报,2011,30(4):515−518. [DAI Yucheng, LI Yu. Notes on the nomenclature of six important medicinal fungi in China[J]. Mycosystema, 2011, 30(4): 515−518.]

[2] 李艳婷,郭尚,徐莉娜,等. 桦褐孔菌资源分布及其地域环境条件分析[J]. 中国林副特产,2019(4):60−65. [LI Yanting, GUO Shang, XU Lina, et al. Distribution of *Inonotus obliquus* resources and analysis of its regional environmental conditions[J]. Forest By-Product and Speciality in China, 2019(4): 60−65.]

[3] 齐亭娟,周玉柏,曾毅. 桦褐孔菌活性成分及药理作用的研究进展[J]. 智慧健康,2018,4(24):50−53. [QI Tingjuan, ZHOU Yubai, ZENG Yi. Research progress on active constituents and pharmacological action of betula brown-hole bacteria[J]. Smart Healthcare, 2018, 4(24): 50−53.]

［4］梁清乐，王秋颖，樊锦燕，等. 桦褐孔菌的研究概况[J]. 中草药，2005(4)：623−625. ［LIANG Qingle, WANG Qiuying, FAN Jinyan, et al. A survey of *Inonotus obliquus*[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2005(4): 623−625.］

［5］马微，谭阳阳，魏书娟，等. 俄罗斯桦褐孔菌中无机元素含量分析[J]. 食品与机械，2020，36(12)：34−38,135. ［MA Wei, TAN Yangyang, WEI Shujuan, et al. Analysis of inorganic elements in Russian *Inonotus obliquus*[J]. Food & Machinery, 2020, 36(12): 34−38,135.］

［6］孙嵘. 桦褐孔菌的食用安全性评价 [D]. 长春：吉林农业大学，2019. ［SUN Rong. Evaluation of edible safety of *Inonotus obliquus*[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2019.］

［7］贺紫薇，刘旭，李东辉，等. 桦褐孔菌研究进展[J]. 中医药信息，2020，37(2)：119−123. ［HE Ziwei, LIU Xu, LI Donghui, et al. Research progress of *Inonotus obliquus*[J]. Chinese Medicine Information, 2020, 37(2): 119−123.］

［8］杨宏博，韩增华，杨红，等. 诱导发酵桦褐孔菌三萜类化合物合成及其抗氧化功能的研究[J]. 食品工业科技，2020，41(13)：105−111. ［YANG Hongbo, HAN Zenghua, YANG Hong, et al. Study on the synthesis and antioxidant function of triterpenes from *Inonotus obliquus* induced by fermentation[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(13): 105−111.］

［9］管玉艳，王琨，左松，等. 外源因子对桦褐孔菌发酵产桦褐孔菌醇的影响[J]. 菌物学报，2020，39(7)：1368−1379. ［GUAN Yuyan, WANG Kun, ZUO Song, et al. Effects of elicitors on the production of inotodiol by submerged fermentation of *Inonotus obliquus*[J]. Mycosystema, 2020, 39(7): 1368−1379.］

［10］LIN P, YAN Z F, LI C T. Effects of exogenous elicitors on triterpenoids accumulation and expression of farnesyl diphosphate synthase gene in *Inonotus obliquus*[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2020, 25(4): 580−588.

［11］XU X, ZHANG X, CHEN C. Stimulated production of triterpenoids of *Inonotus obliquus* using methyl jasmonate and fatty acids[J]. Industrial Crops and Products, 2016, 85: 49−57.

［12］刘爽爽. 粗毛纤孔菌总三萜的诱导合成、纯化及降血脂作用研究 [D]. 哈尔滨：东北林业大学，2020. ［LIU Shuangshuang. Synthesis, purification and hypolipidemic effect of total triterpenoids from *Inonotus hispidus*[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2020.］

［13］檀琪. 桦褐孔菌三萜类化合物的提取纯化及抗氧化活性研究 [D]. 太原：山西医科大学，2020. ［TAN Qi. Extraction, purification and antioxidant activity of triterpenoids from *Inonotus obliguus* [D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2020.］

［14］胡涛，王亚亚，路春桃，等. 超声波辅助提取桦褐孔菌子实体中三萜类化合物的研究[J]. 安徽农业科学，2011，39(35)：21634−21635, 21643. ［HU Tao, WANG Yaya, LU Chuntao, et al. Study on the ultrasonic assisted extraction technology of triterpenoid from *Inonotus obliquus*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2011, 39(35): 21634−21635, 21643.］

［15］崔彦如. 桦褐孔菌有效成分的 PEF 提取、化学修饰和抗癌活性的研究 [D]. 吉林：吉林大学，2008. ［CUI Yanru. Active components extraction from *Inouotus Obliquus*, PEF and its chemical modification and anticancer activities[D]. Jilin: Jilin University, 2008.］

［16］赵佳敏，陈泓鑫，林宇冲，等. 灵芝三萜的提取工艺及其抗氧化研究进展[J]. 安徽化工，2021，47(1)：11−12,16. ［ZHAO Jiamin, CHEN Hongxin, LIN Yuchong, et al. Research progress on extraction technology and antioxidation of triterpenes from *Ganoderma lucidum*[J]. Anhui Chemical Industry, 2021, 47(1): 11−12, 16.］

［17］赵艳霞，刘峰，魏娟娟，等. 双水相超声法提取桦褐孔菌三萜[J]. 菌物学报，2014，33(1)：129−137. ［ZHAO Yanxia, LIU Feng, WEI Juanjuan, et al. Extraction of triterpenoids from *Inonotus obliquus* by aqueous two-phase systems associated with ultrasonic extraction[J]. Mycosystema, 2014, 33(1): 129−137.］

［18］戚月婷，玄光善. 桦褐孔菌总三萜提取工艺的研究[J]. 应用化工，2015，44(5)：924−926, 932. ［QI yueting, XUAN guangshan. Study on extraction process of total triterpenoids from *Inonotus obliquus*[J]. Applied Chemical Industry, 2015, 44(5): 924−926, 932.］

［19］王干珍，易晓明，周林宗，等. 高效逆流色谱原理及其研究进展[J]. 工业技术创新，2017，4(1)：179−182. ［WANG Ganzhen, YI Xiaoming, ZHOU Linzong, et al. Principle and research progress of high performance countercurrent chromatography[J]. Industrial Technology Innovation, 2017, 4(1): 179−182.］

［20］刘延杰，陈弯弯，向碧云，等. 硅胶柱层析分离天然产物实验要点分析[J]. 生物学通报，2018，53(6)：44−46. ［LIU Yanjie, CHEN Wanwan, XIANG Biyun, et al. Analysis of the experimental points of separating natural products by silica gel column chromatography[J]. Biology Bulletin, 2018, 53(6): 44−46.］

［21］李广林. 桦褐孔菌三萜提取分离、结构鉴定及生物活性研究 [D]. 杭州：浙江工业大学，2014. ［LI Guanglin. Extraction, isolation, structural identification and biological activity of triterpenoid from *Inonotus obliquus*[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2014.］

［22］吴战海. 高效液相色谱法在药品质量分析中的应用进展[J]. 黑龙江科技信息，2017(4)：118. ［WU Zhanhai. Application progress of high performance liquid chromatography in drug quality analysis[J]. Heilongjiang Science and Technology Information, 2017(4): 118.］

［23］檀琪，阮文辉，杨官娥，等. 大孔吸附树脂纯化桦褐孔菌三萜类化合物工艺优化[J]. 食品工业，2021，42(3)：142−146. ［TAN Qi, RUAN Wenhui, YANG Guan'e, et al. Optimization of purification process of triterpenoids from *Inonotus obliquus* by macroporous adsorption resin[J]. Food Industry, 2021, 42(3): 142−146.］

［24］胡涛，黄美，刘萍. 大孔吸附树脂分离纯化桦褐孔菌三萜工艺研究[J]. 食品科技，2012，37(4)：206−210. ［HU Tao, HUANG Mei, LIU Ping. Isolation and purification of triterpenes in *Inonotus obliquus* by macroporous resins[J]. Food Science and Technology, 2012, 37(4): 206−210.］

［25］陈程，徐向群. 桦褐孔菌子实体三萜单体的分离及鉴定[J]. 浙江理工大学学报，2015，33(3)：264−268. ［CHEN Cheng, XU Xiangqun. Isolation and identification of triterpenoids in *Inonotus obliquus*[J]. Journal of Zhejiang Sci-Tech University, 2015, 33(3): 264−268.］

［26］董红敬. 茯苓皮三萜提取物化学成分及抗肿瘤活性研究

[D]. 北京: 中国中医科学院, 2015. [DONG Hongjing. Antitumor activities of triterpenes isolated from theepidermis of *Poria cvcvs* (Schw). Wolf[D]. Beijing: Chinese Academy of Traditional Chinese Medicine, 2015.]

[27] 赵卓卓, 冉棋, 丁辉, 等. 桦褐孔菌醇研究进展[J]. 食用菌学报, 2018, 25(4): 121−129. [ZHAO Zhuozhuo, RAN Qi, DING Hui, et al. Advances in inotodiol research[J]. Acta Edulis Fungi, 2018, 25(4): 121−129.]

[28] 王健铭, 李晓雪, 陈俊磊, 等. 桦褐孔菌三萜类化合物的研究[J]. 齐齐哈尔大学学报 (自然科学版), 2017, 33(4): 62−64. [WANG Jianming, LI Xiaoxue, CHEN Junlei, et al. Study on triterpenes of *Inonotus obliquus*[J]. Journal of Qiqihar University (Natural Science Edition), 2017, 33(4): 62−64.]

[29] 张仕瑾, 谢运飞, 谭玉柱, 等. 桦褐孔菌三萜类化学成分研究[J]. 中草药, 2015, 46(16): 2355−2360. [ZHANG Shijin, XIE Yunfei, TAN Yuzhu, et al. Studies on triterpenoids from *Inonotus obliquus*[J]. Chinese Herbal Medicine, 2015, 46(16): 2355−2360.]

[30] KIM J, YANG S C, HWANG A Y, et al. Composition of triterpenoids in *Inonotus obliquus* and their anti-proliferative activity on cancer cell lines[J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2020, 25(18): 425−432.

[31] ALZAND K I, NAL S, BOUFARIS M. Lanostane-type triterpenes and abietane-type diterpene from the sclerotia of Chaga medicinal mushroom, *Inonotus obliquus* (agaricomycetes), and their biological activities[J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2018, 20(6): 58−65.

[32] DURU K C, KOVALEVA E G, DANILOVA I G, et al. The pharmacological potential and possible molecular mechanisms of action of *Inonotus obliquus* from preclinical studies[J]. Phytotherapy Research, 2019, 33(8): 1966−1980.

[33] PFEFFER C M, SINGH A T K. Apoptosis: A target for anticancer therapy[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(2): 448.

[34] KIM J, YANG S C, HWANG A Y. Composition of triterpenoids in *Inonotus obliquus* and their anti-proliferative activity on cancer cell lines[J]. Molecules, 2020, 25(18): 4066.

[35] BAEK J, ROH H S, BAEK K H, et al. Bioactivity-based analysis and chemical characterization of cytotoxic constituents from Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) that induce apoptosis in human lung adenocarcinoma cells[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2018, 224: 63−75.

[36] ZHAO F, MAI Q, MA J, et al. Triterpenoids from *Inonotus obliquus* and their antitumor activities[J]. Fitoterapia, 2015, 101: 34−40.

[37] 金黎达, 欧文斌, 徐向群. 液体发酵桦褐孔菌三萜类成分抑制肿瘤细胞活性研究[J]. 浙江理工大学学报 (自然科学版), 2019, 41(1): 98−105. [JIN Lida, OU Wenbin, XU Xiangqun. Preliminary study on tumor cell activity inhibition effect of triterpene from submerged fermentation of *Inonotus obliquus*[J]. Journal of Zhejiang Sci-Tech University, 2019, 41(1): 98−105.]

[38] MA Q, LI Y, WANG M, et al. Progress in metabonomics of type 2 diabetes mellitus[J]. Molecules, 2018, 23(7): 1834.

[39] 王秋爽. 桦褐孔菌对不同造模方法建立的 2 型糖尿病大鼠降血糖作用初探 [D]. 延吉: 延边大学, 2017. [WANG Qiushuang. A preliminary study on the hypoglycemic effects of *Inonotus pbliquus* of type 2 diabetic rats made by different methods[D]. Yanji: Yanbian University, 2017.]

[40] KUMAR S R, SINGH R, KUMAR D A. Important aspects of post-prandial antidiabetic drug, acarbose[J]. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2016, 16(23): 2625−2633.

[41] 黄盼盼, 陈程, 徐向群. 桦褐孔菌三萜对 α-葡萄糖苷酶和 α-淀粉酶的抑制活性及其有效成分鉴定[J]. 浙江理工大学学报 (自然科学版), 2020, 43(5): 678−686. [HUANG Panpan, CHEN Cheng, XU Xiangqun. Inhibitory activity of triterpenoids from *Inonotus obliquus* on α-glucosidase and α-amylase and identification of their effective compounds[J]. Journal of Zhejiang Sci-Tech University, 2020, 43(5): 678−686.]

[42] CUI Y, KIM D S, PARK K C. Antioxidant effect of *Inonotus obliquus*[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2005, 96(1-2): 79−85.

[43] 赵芬琴, 严琳, 崔仙红, 等. 桦褐孔菌三萜对 CCl_4 致小鼠氧化应激损伤的保护作用[J]. 药学学报, 2012, 47(5): 680−684. [ZHAO Fenqin, YAN Lin, CUI Xianhong, et al. Triterpenoids from *Inonotus obliquus* protect mice against oxidative damage induced by CCl_4[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2012, 47(5): 680−684.]

[44] 许丽璇, 蔡建秀, 岳枝玲. 桦褐孔菌乙醇提取物对小鼠体内外抗氧化作用研究[J]. 中国食品学报, 2012, 12(6): 48−55. [XU Lixuan, CAI Jianxiu, YUE Zhiling. Study on the antioxidant activity of ethanol crude extracts from mycelia of *Inonotus obliquus*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2012, 12(6): 48−55.]

[45] 高愿军, 王娟娟, 龙娇妍, 等. 桦褐孔菌多酚在小鼠血清中的抗氧化作用研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(9): 331−333. [GAO Yuanjun, WANG Juanjuan, LONG Jiaoyan, et al. Study on the antioxidation effect of *Inonotus obliquus* polyphenol on mice serum[J]. Science and Technology of Food Industry, 2010, 31(9): 331−333.]

[46] 吴艳玲, 南极星. 桦褐孔菌多糖对小鼠抗氧化清除自由基作用的研究[J]. 亚太传统医药, 2009, 5(12): 9−10. [WU Yanling, NAN Jixing. Study on antioxidant and free radical scavenging effects of *Inonotus obliquus* polysaccharide in mice[J]. Asia-Pacific Traditional Medicine, 2009, 5(12): 9−10.]

[47] ZOU C X, DONG S H, HOU Z L, et al. Modified lanostane-type triterpenoids with neuroprotective effects from the fungus *Inonotus obliquus*[J]. Bioorganic Chemistry, 2020, 105: 104438.

[48] SAGAYAMA K, TANAKA N, FUKUMOTO T, et al. Lanostane-type triterpenes from the sclerotium of *Inonotus obliquus* (Chaga mushrooms) as proproliferative agents on human follicle dermal papilla cells[J]. Journal of Natural Medicines, 2019, 73(3): 597−601.

[49] PARK S, SHIN H, PARK D, et al. Structure elucidation of a new triterpene from *Inonotus obliquus*[J]. Magnetic Resonance in Chemistry, 2021, 59(4): 489−494.

王颂萍, 王雪羽, 杨欣悦, 等. 超声波技术嫩化机理及其在肉制品中应用效果的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 423−431. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021040166
WANG Songping, WANG Xueyu, YANG Xinyue, et al. Research Progress on the Mechanism of Ultrasound Tenderization and Application Effect in Meat Products[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 423−431. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021040166

· 专题综述 ·

超声波技术嫩化机理及其在肉制品中应用效果的研究进展

王颂萍[1], 王雪羽[2], 杨欣悦[2], 李海静[2], 夏秀芳[2,*]
(1.河北工程大学科信学院, 河北 邯郸 056038;
2.东北农业大学食品学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘　要: 嫩度是评估肉制品品质的重要指标, 提高嫩度有利于吸引消费者二次购买。传统物理嫩化技术虽广泛应用于肉及肉制品的嫩化加工, 但在线应用差这一缺陷导致消费者接受度较低, 因此推进了新兴物理嫩化技术的研究。其中, 超声波作为一种高效节能、绿色环保、穿透力强的非热加工技术广泛用于肉制品的嫩化。本文综述了肉制品嫩化理论、嫩度主要影响因素以及超声波嫩化的基本原理, 并从不同角度(肌纤维和结缔组织特性)阐述了超声波技术对肉制品嫩度的影响, 为超声波技术在改善肉制品品质方面提供新思路和理论指导。

关键词: 超声波, 肉制品, 嫩度, 影响因素, 嫩化机理
中图分类号: TS251.5　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0423−09
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021040166
本文网刊:

Research Progress on the Mechanism of Ultrasound Tenderization and Application Effect in Meat Products

WANG Songping[1], WANG Xueyu[2], YANG Xinyue[2], LI Haijing[2], XIA Xiufang[2,*]
(1.Kexin College, Hebei University of Engineering, Handan 056038, China;
2.College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Tenderness is an important index to evaluate the quality of meat products, and improving the tenderness of meat products is conducive to attracting consumers to buy again. Although traditional physical tenderization technology is widely used in tenderizing processing of meat and meat products, the defect of poor online application leads to low consumer acceptance, which has promoted the research of emerging physical tenderization technologies. Among them, ultrasound as an energy-efficient, green environmental protection, strong penetration of non-thermal processing technology has been widely used in the tenderization of meat products. The theory of meat products tenderization, the main influencing factors of meat products tenderness and the basic principle of ultrasound tenderization are reviewed. The effects of ultrasound technology on tenderization of meat products are discussed from different perspectives (muscle fiber and connective tissue properties). It provides new ideas and theoretical guidance for ultrasound technology to improve the quality of meat products.

Key words: ultrasound; meat products; tenderness; influencing factors; tenderization mechanism

嫩度是指食用肉口感的老嫩, 反映了肉的质地, 它会影响肉制品的营养、口感、风味和消化等, 有研究表明, 消费者愿意花费更多的钱去购买具有较好嫩度的肉类产品[1]。而肉制品的不当处理会使它们出

收稿日期: 2021−04−26
基金项目: 黑龙江省百千万工程科技重大专项(2019ZX07B03)。
作者简介: 王颂萍(1976−),女,硕士,副教授,研究方向:食品安全,E-mail:297868536@qq.com。
*** 通信作者:** 夏秀芳(1973−),女,博士,教授,研究方向:畜产品加工工程,E-mail:xxfang524@163.com。

现肉质硬、嫩度差等问题，很难咀嚼，因此，在其加工过程中需进行嫩化处理[2]。

肉品中常用的嫩化方法包括物理（自然熟化法[3]、电刺激法[4]、超高压法[5]、冲击波法[6]和超声波法[7]等）、化学（盐法[8]、一磷酸腺苷法[9]和有机酸法[10]）和酶法嫩化（内源酶法[11]和外源酶法[12]）等，而化学和酶法嫩化需要精确控制化学试剂的用量和纯度并严格控制生物酶的用量和作用条件[13]，相比之下，物理嫩化简单安全，可操作性更强。其中，超声波作为 90 年代提出的一种新兴的嫩化技术，凭借其安全性高、绿色环保、高效节能、运行成本低等优点广泛应用于肉及肉制品中[14−15]。

超声波是一种由纵波产生的能量，其振动频率大约每秒 20000 次（20 kHz），超出人类的听觉极限，它还可以穿透各种物质[16]。在超声系统中，电能转化为振动能，即机械能，它通过超声介质传递，产生机械效应、热效应和空化效应等[7]。其中，空化效应是使肉制品发生化学、物理和生物变化的主要原因。本文将从肉制品嫩化理论、嫩度的主要影响因素以及超声嫩化的原理和影响因素进行概述，并从两个方面（肌纤维和结缔组织特性）阐明超声波技术对肉制品嫩度的影响。为超声波技术在肉制品嫩度领域的广泛应用奠定理论基础并提供参考。

1 肉制品的嫩化

1.1 嫩度的定义

嫩度是决定肉制品品质的主导因素及感官特征的决定性因素，它直接影响着肉的食用价值和商品价值，反映了肌肉中不同蛋白的结构特性[17]。肉的嫩度是指肉易切割的程度，一般用剪切力来表征，剪切力越大，嫩度越差[18]。肉的嫩度指肉入口咀嚼时，其对舌或颊的柔软性、对牙齿压力的抵抗力、咬断肌纤维的难易程度和嚼碎程度[5]。

1.2 肉制品嫩化的理论

肉制品嫩化机制是不同的嫩化方法通过其物理和化学作用改变肉制品的组织结构，使其发生生物、物理、化学反应的过程[19]。在肉制品成熟过程中，诸如肌原纤维联接蛋白、肌膜链接蛋白以及肌细胞基板连接蛋白等维持肌原纤维结构完整的蛋白被降解，即推进肉的嫩化过程[20]。肉制品四大成熟理论（钙蛋白酶、溶酶体组织蛋白酶、细胞凋亡酶和蛋白酶体理论）所涉及的钙蛋白酶在降解宰后肌肉蛋白质的过程中起主导作用[21]。因此，钙蛋白酶体系主导成熟过程中肉类的嫩化。其中，m-和 μ-钙蛋白酶较为活跃，而 m-钙蛋白酶的激活受限于极高的 Ca^{2+}浓度，所以 μ-钙蛋白酶较广泛地应用于肉制品的嫩化[13]。

肌肉可食化过程中，Ca^{2+}渗出并激活钙蛋白酶，进而降解肌原纤维中肌联蛋白以及肌间线蛋白等维持肌原纤维完整性的主要蛋白[21]，Z 盘结构弱化、M 线消失、Z 线和 I 带断裂以及 H 区肿胀，肌原纤维及肌纤维结构被破坏，弱化细丝及细丝与 Z 线间相互作用，增加肌原纤维小片化程度，从而提高肉制品嫩度[13]（如图 1 所示）。

1.3 肉制品嫩度的影响因素

肉制品嫩度受宰前和宰后因素的影响，主要表

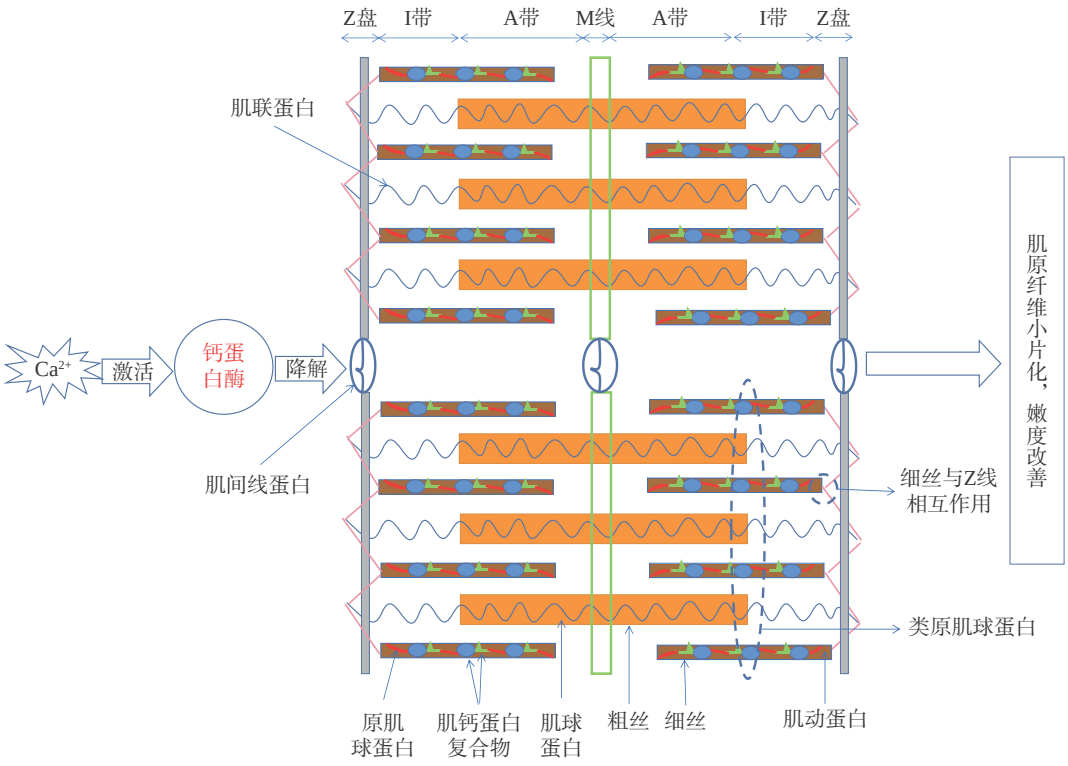


图 1 钙蛋白酶嫩化机制[13]

Fig.1 Tenderization mechanism of calpain[13]

现在：a.宰前因素：畜禽品种、年龄、性别、饲养条件和肌肉部位等[5]。畜禽的品种不同，肌肉嫩度不同，例如：西门塔尔肉牛和夏洛莱肉牛的嫩度比利木赞肉牛嫩度差；同一种动物年龄小的其肉质嫩，因为随动物年龄的增长，胶原蛋白的交联增加，胶原纤维间的联结强度变大，肌内膜和肌束膜变得更有规则，厚度增加，导致肉嫩度下降；公畜肉要比母畜肉嫩度差；圈养或很少放养的牛肉嫩度高于经常放养的牛肉；同一种动物的不同部位肌肉嫩度存在差异，一般来说腰部肉比腿部肉更嫩，这主要是由肌肉中结缔组织的分布情况决定的[22−23]。b.宰后因素：宰后排酸和成熟、烹调方法和温度等[8]。在 pH 较高的肉中很难形成僵直收缩，同时肌肉中钙激活酶的活性较强，故肉的嫩度较高；肉在烹饪过程中，采用煮、焖、烧等烹饪方法时，肉的嫩度要高于采用炒、炸、烤等方法；肉在卤煮时，随温度升高其硬度增加，烤制时，肉的嫩度随肉中心温度的升高而降低[24]，这可能是由于肉在加热过程中，蛋白质会发生变性，从而影响嫩度。

宰前和宰后因素对嫩度影响的不同，究其根本是肌纤维和结缔组织的含量和性质的不同[21]。肉的成熟嫩化经历快速和慢速两个阶段：快速嫩化阶段，肌原纤维结构弱化；慢速嫩化阶段，肌束膜和肌内膜结缔组织结构变弱[12]。

1.3.1　肌纤维特性对嫩度的影响　肌肉由肌纤维组成，肌节是肌纤维的重复构造单位，也是肌肉伸缩与松弛的基本单元，故肌纤维类型、密度、直径和肌节长度等因素的不同会引起肉嫩度的差异[25]。肌纤维分为：红肌（Ⅰ型）纤维和白肌（Ⅱ型）纤维，其中慢收缩氧化Ⅰ型纤维的蛋白酶与其抑制剂的比例要比快收缩糖酵解Ⅱ型纤维的小，因此，白肌成熟更快，故在宰后成熟过程中高红肌（Ⅰ型）纤维含量肉的嫩化效果劣于高白肌（Ⅱ型）纤维含量肉[26]。臧大存[27] 研究发现肌纤维直径越小，其密度越大，保水性越强，肌肉嫩度越大，因此，肌纤维密度与肉嫩度呈正相关。当肌肉发生冷收缩时，肌纤维直径增加，加剧了肌节的缩短，引起肉的嫩度下降。此外，肌原纤维是肌纤维独特的细胞器。有研究表明肌原纤维降解对肌肉嫩度具有重要作用[21]，它会使 Z 盘结构被弱化，肌原纤维断裂，使肉嫩化。

1.3.2　结缔组织特性对嫩度的影响　结缔组织呈网状且质地坚硬，构成了肌肉的支撑骨架，且具有较好的锁水能力，故其分布越广，持水力越强，嫩度越好，其中，肌束膜厚度、胶原蛋白含量、热溶解性和共价交联等对肌肉嫩度的影响较大[23]。肌肉中占结缔组织总量 90% 的肌束膜的厚度是导致不同部位肉嫩度差异的决定性因素[25]，二者呈正相关。此外，结缔组织成分中胶原纤维的直径也会影响肉类嫩度，由于蛋白水解酶能有效地攻击细小的纤维束，降解纤维，故可通过有效控制蛋白水解酶的活性来改善肉制品的嫩度[28]。胶原蛋白是肌内结缔组织的主要成分[12]，其含量与肌肉嫩度呈负相关[29]，且其热溶解性与肉嫩呈正相关[30]。胶原蛋白在成熟过程中会形成多重多种共价交联，包括：二共价键的分子间交联和三共价键的分子内交联（吡啶交联）[12]，其中，分子间交联只是暂时的，随着时间的推移，它会消失并被吡啶交联所代替[27]，吡啶交联形成的羟赖氨酸吡啶啉和赖氨酸吡啶啉反映了肌肉中的交联情况[23]，随着动物年龄的增长，胶原蛋白共价交联数目增加，溶解度下降，最终导致肉嫩度降低。

2　超声波嫩化原理及影响因素

20 世纪 90 年代，SOLOMON 等[31] 发现了超声波嫩化（又称水波嫩化）是一种嫩化原理完全异于其他技术的全新技术，它是机械波在食品领域应用的新进展。超声嫩化是指超声作用于液体产生的震荡波可以穿透肉块，改变了影响肉嫩度的蛋白质之间的相互作用力及联接键，进一步改善肉的嫩度[32]。现在通常利用低频超声波（20~100 kHz）的“声耦”作用使肉受迫振动，从而提高嫩度。超声波在液体介质中传播时，受压力和位移的影响，表现为一种由密部（高压区）和疏部（低压区）交替组成的纵波[33]。超声波会产生机械效应、热效应和空化效应，其中，对肉制品嫩化起主要作用的是空化效应。张苏苏[14] 对牛仔盖肉排进行超声波处理，得出最佳超声嫩化条件：温度 44 ℃，功率 187 W，时间 19 min，此时牛仔盖肉排的剪切力最小，这可能是由于超声产生的空化效应使肌肉中的肌原纤维发生断裂，从而有效地改善了牛仔盖肉排的嫩度。

2.1　超声波嫩化肉制品的原理

超声波是在介质中传播的弹性波，当波的能量达到一个阈值时，就会产生空化现象[34]。超声空化指当适度频率的超声波作用于液体时，声波在正负压之间传播引起微小气泡发生膨胀、压缩、崩溃和震荡等一系列非线性过程[16]。超声波作用下液体中气泡的运动包括两个阶段：稳态空化和瞬态空化。稳态空化，即空化气泡在超声波的作用下膨胀或震荡，在此过程中泡内温度变化很小，故可理解为等温过程[35]。瞬态空化是指超声波作用于液体时，负压声强会破坏液体分子间的结合键或其它相互作用，导致液体分子断开，形成微小的空穴，即气泡核，气泡核与原来存在于液体中的微小气泡由于泡内压强高于泡外压强而膨胀，同时从声场中吸收大量能量；当进入正压时，气泡会被压缩而急剧崩溃，并且产生瞬时高温（5000 K）、高压（50 MPa）、自由基及微射流等，引起组织结构改变，从而起到嫩化肉的效果[35−36]（如图 2 所示）。

嫩化肉制品的机制可推断为：a.超声波在传播过程中引起极小的介质颗粒位移，但引起的加速度很大，它将导致介质颗粒的机械振动剧烈而迅速变化[37]。因此，超声波本身的振动以及超声空化的破坏作用将通过破坏力弱的分子间相互作用，如氢键和范德华力等，引起肌肉组织结构受到物理破坏，破坏

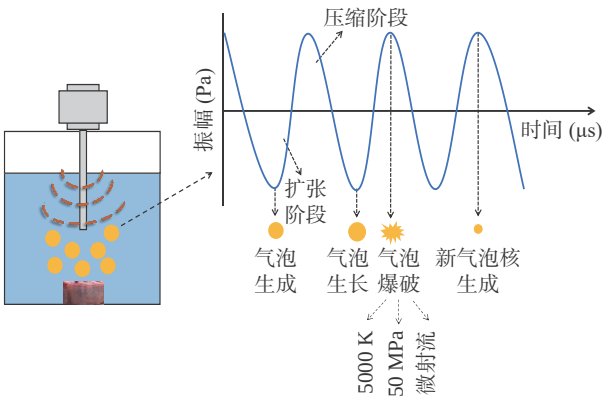


图 2 超声产生空化效应示意图

Fig.2 Diagrammatic sketch of cavitation effect produced by ultrasound

Z 盘的完整性，导致肌动蛋白丝解聚[38]；b.超声处理破坏细胞结构，加速细胞凋亡，促使肌细胞内 Ca^{2+}外流，活化钙激活酶，进而促进了肌原纤维蛋白的分解，改善肉的嫩度[19]；c.空化气泡的内爆会产生一些物理效应，包括微射流、微湍流、自由基和高剪切应力等，这些物理效应可以导致细胞膜损伤，对蛋白质产生理化破坏，从而达到嫩化效果[33]。

2.2 超声波参数对肉制品嫩化的影响因素

超声波依频率和功率的差异可以分为：高频低强度(>1 MHz，<1 W/cm^2)和低频高强度(20~100 kHz，10~1000 W/cm^2)[16]。其中，低频高强度超声波较多用于食品分析、蛋白质改性和肉制品嫩化等方面。除频率与功率外，超声时间以及温度等对嫩度的影响也较大。

2.2.1 超声波频率对嫩度的影响 超声波在低频条件下可以产生较高能量，易在液体中产生较强的空化效应。钟赛意[39]研究发现盐水鸭经不同频率(26.4、49.8、70.2 kHz)超声处理后，剪切力都较未超声组小，其中，26.4 kHz 处理组剪切力约为 2700 g，70.2 kHz 处理组剪切力约为 3100 g，这可能是由于低频超声产生了较强的空化作用，对肌纤维产生了机械破坏，激活了钙蛋白酶和组织蛋白酶并降解蛋白质，提高了盐水鸭的嫩度。

2.2.2 超声波功率对嫩度的影响 超声波功率也会通过空化效应的强弱影响肉制品的嫩度。KANG 等[40]探究了不同超声波功率(0、150、200、250、300 W)对腌制牛肉嫩度的改善情况。结果表明：经过超声处理 120 min 后，其压缩损失和剪切力随着超声功率的增加而减小，且 300 W 处理组相比于对照(0 W)组而言，分别减小了 23.89% 和 27.44%，即达到了最佳的腌制和嫩化效果。这可能是由于超声频率和时间都相同时，功率越大，能量越高，产生的空化作用越强，促使肌肉组织中的细胞破裂，水分进入到肌肉细胞内，使细胞的持水性增加，改善嫩度。

2.2.3 超声波时间对嫩度的影响 在合理的超声时间内，肉制品嫩度与时间呈正相关，但过长时间的超声处理会降低蛋白酶活性，抑制蛋白的分解，从而引起肉嫩度的下降，因此，可以结合频率和功率合理控制超声嫩化时间。李正英等[41]应用 3.0 W/cm^2 超声波处理蒙古绵羊后腿肉来研究超声波时间(0、10、20、30、40、50 min)对羊肉的嫩化效果，发现 30 min 处理组的羊肉剪切力和破碎指数最小。

2.2.4 超声波温度对嫩度的影响 超声波嫩化肉制品时，温度同样起着重要的作用。当嫩化温度较低时，肉中酶的活性不能全部被激活，致使嫩化效果不佳；当温度较高时，由于过度嫩化导致肌肉组织蛋白网络中的水分流出较多，降低持水性，故要合理控制超声波温度[42]。张苏苏[14]研究超声温度(20、30、40、50、60 ℃)对牛仔盖肉排嫩度的影响，发现持水力和剪切力随温度的升高呈现先降低后升高的趋势，持水力在 40 ℃ 达到最小值，剪切力在 50 ℃ 达到最小值，然后通过响应面优化试验得到超声温度为 44 ℃ 时，嫩化效果最佳。

3 超声波技术对肉制品肌纤维特性及结缔组织特性的影响

嫩度是决定肉制品品质最重要的感官特性，超声波可以通过改善与肌肉嫩度有关的肌纤维(主要由肌原纤维构成)和肌内结缔组织(主要由胶原纤维构成)的特性以达到嫩化肉制品的目的(机理如图 3 所示)。例如：激活组织蛋白酶或降解肌肉中的肌原纤维蛋白，破坏肌纤维和结缔组织结构，从而改善肉制品嫩度，提高其口感与品质。WANG 等[17]利用超声(20 kHz，25 W/cm^2)处理牛半腱肌 40 min，其剪切力比未经超声处理样品低，可能是由于超声通过加速肌纤维的分解及肌间线蛋白和肌钙蛋白-T 的降解，从而提高了嫩度。同时，超声波还可以通过削弱肌球蛋白和肌动蛋白间的相互作用提高嫩度[43]。ZOU 等[20]报道了超声处理破坏了肌球蛋白和肌动蛋白的完整性以及肌动蛋白-肌球蛋白相互作用，使肌动球蛋白解离，从而增加了肌动蛋白的数量，改善嫩度。

3.1 超声波嫩化技术对肉制品肌纤维特性的影响

肌纤维(肌细胞)是肌肉的基本组成单位，肌原纤维是肌细胞特有的细胞器，约占肌纤维固形成分的 60%~70%，粗丝和细丝结合形成了肌原纤维，1000~2000 条肌原纤维组成一个肌纤维[23]。此外，其主要蛋白成分为肌原纤维蛋白。超声波会通过影响肌纤维组织结构和持水性以及肌原纤维蛋白的降解和持水能力等因素影响肉制品的嫩度[12]。

3.1.1 超声波嫩化技术对肌纤维微观结构的影响

肌原纤维的断裂被认为是肉变嫩的最重要间接因素之一，超声空化效应产生气泡，气泡内爆引起的微射流会造成物体表面物理性破坏，破坏了肌纤维的完整性，使纤维间距增加，在纤维间隙中可以观察到细胞内容物的释放，并将肌原纤维分解成大小不同的片段，肌原纤维小片化增加，肉的嫩度得以提高[44]。此外，超声波可以通过改变肌纤维直径和肌节长度等来

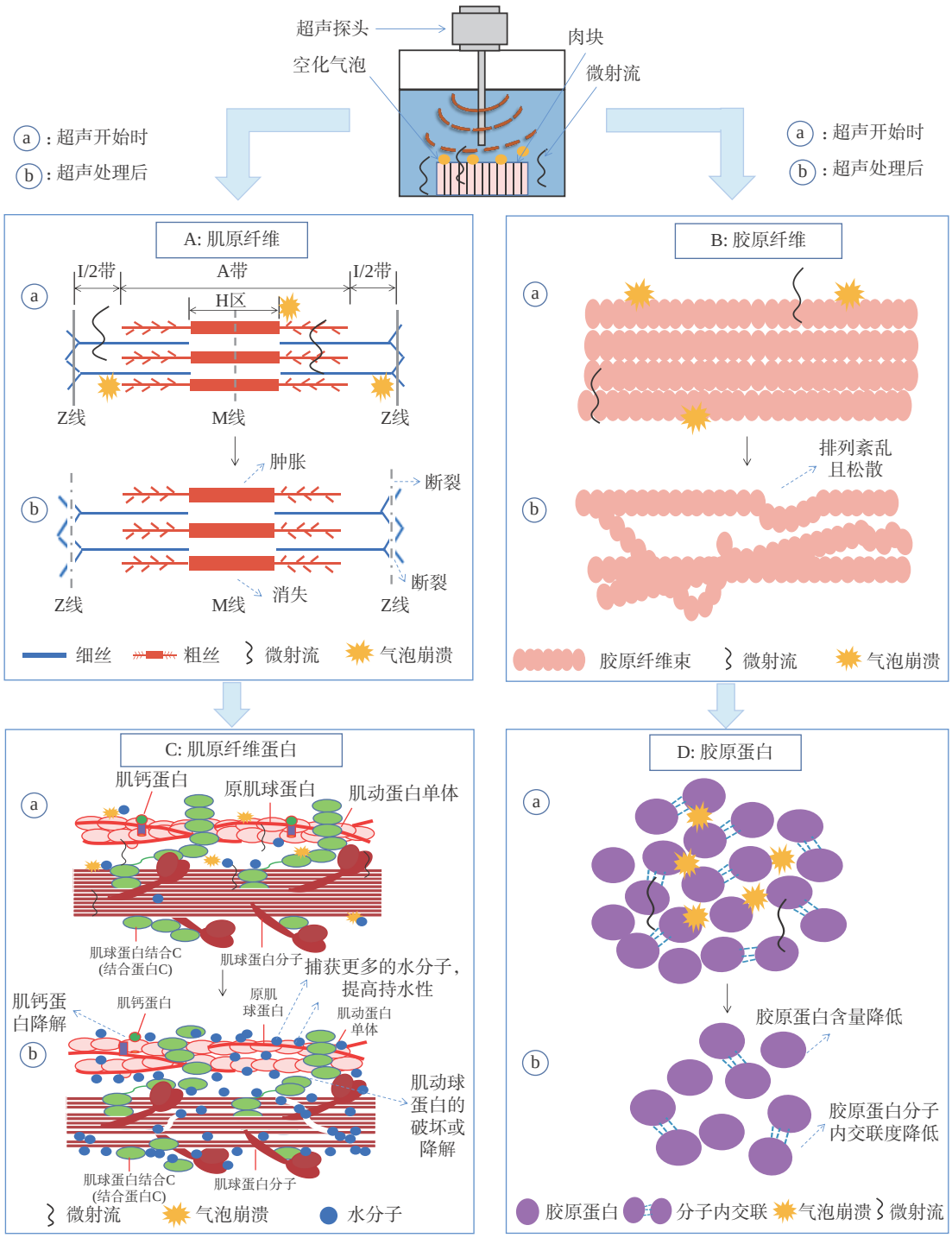


图 3　超声波技术嫩化肉制品机制

Fig.3　Mechanism of tenderizing meat products by ultrasound technology

改善肉制品的嫩度。超声空化产生的微射流和高剪切应力等会破坏肌原纤维结构，使 M 线消失、Z 线和 I 带断裂以及 H 区肿胀，肌肉纤维直径变小，肌节变宽，造成肌纤维结构松弛，提高肉制品嫩度[5]（如图 3A 所示）。同时，超声还可以使固体物质产生系列快速的收缩和膨胀循环，即“整合扩散”机制，对肌纤维产生拉伸作用，使肌节长度增加，改善肉制品嫩度[39]。

3.1.2　超声波嫩化技术对肌纤维保水性的影响　保水性主要由位于肌原纤维晶格外部以及肌肉细胞外部的弱结合水决定[45]。一般认为，肌纤维的保水性越好，肉制品越嫩，因此，提高肌纤维保水能力有利于嫩度的改善。超声波可以提高肉制品保水能力，这可能是因为超声波使纤维间距增加，水分进入到肌纤维间隙，增强肌纤维的保水性[5]。同时，高天丽[8] 发现超声处理可以使细胞破裂，使水分渗透到到细胞中，保水性增加，改善了横山羊肉的嫩度。此外，超声波可以增加肌纤维结合水分的强度，通过降低肉类的蒸煮损失提高肉类的持水能力[46]。SHIKHAOJHA 等[47] 发现超声处理可以增大肌丝的拉伸收缩幅度，从而导致肌原纤维扩张，增加保水能力。

3.1.3　超声波嫩化技术对肌原纤维蛋白降解和持水

性的影响　蛋白质是肉制品的主要成分，其中，肌原纤维蛋白占肌肉总蛋白质的 55%~60%，其结构和功能的改变会极大程度地影响肉制品品质[48]。超声波可以降解肌原纤维蛋白以改善其结构特性或促进肌原纤维蛋白与水结合来捕获水分子以提高其持水性，起到嫩化肉制品的效果[49]（如图 3C 所示）。

肌原纤维蛋白主要由肌球蛋白、肌动蛋白以及一些结构蛋白等组成，共同维持肌原纤维的完整性[21]。超声波快速破坏肌肉细胞中的溶酶体、肌质网和线粒体等，促进蛋白酶的释放；同时，肌质网和线粒体结合 Ca^{2+}的能力下降，Ca^{2+}被释放，有助于激活酶原，降解肌原纤维结构蛋白和肌纤维间联接蛋白，提高了肌原纤维蛋白的降解速率，使可溶性蛋白含量增加，从而改善了肉制品的嫩度[12]。超声波还可以促进 μ-钙蛋白酶的自溶和活化，μ-钙蛋白酶激活后可降解膜、细胞质和核底物等，导致细胞结构破坏，改变了细胞膜的通透性，促使肌细胞释放组织蛋白酶和钙蛋白酶，在酶体系的作用下，加速了肌动球蛋白的降解和肌原纤维蛋白的水解，破坏肌原纤维紧密结构，使肉制品得以嫩化[50]。此外，WANG 等[17] 发现超声波可以降解牛肉的肌间线蛋白和肌钙蛋白-T，进而导致细丝或肌动球蛋白被破坏，使剪切力降低。

超声空化产生的机械和化学效应，可以改变肉制品中肌原纤维蛋白的结构，从而增强其功能特性，改善肉制品品质[51]。超声空化现象会产生微射流和高压，破坏水分子而产生高活性自由基（·OH、O·和 H·）和超氧化物，这些自由基可以与蛋白质分子发生反应，破坏蛋白质分子之间的相互作用（如疏水作用、氢键和二硫键等），加速改变肌原纤维蛋白空间结构和溶解度，增强水-蛋白质相互作用，同时，这些蛋白通过与水结合的方式捕获水分子，通过提高持水性的方式嫩化肉制品[52−53]。KANG 等[40] 发现超声波处理可以促进肌原纤维蛋白的降解与肌球蛋白的提取，从而增强肉制品保水性、凝聚性和多汁性并降低其硬度值。

3.2　超声波嫩化技术对肉制品结缔组织特性的影响

结缔组织是肌肉的次要组成部分，由三部分构成（肌内膜、肌束膜和肌外膜）。修整肉时剔除肌外膜，保留大量的肌束膜和肌内膜[23]。二者主要由胶原纤维构成，主成分为胶原蛋白，还存在少许弹性蛋白、网状蛋白、糖蛋白和蛋白多糖[25]。其中，胶原蛋白是影响嫩度的主要成分，胶原纤维的连接主要是由蛋白多糖完成的。肉的硬度分为尸僵和基础硬度（背景嫩度），改善尸僵硬度是通过肌纤维的降解，而改善基础硬度是通过降低肌内结缔组织的含量和破坏结缔组织结构特性来实现[30]。

3.2.1　超声波嫩化技术对胶原蛋白含量和溶解性的影响　胶原蛋白含量反映了结缔组织含量，并且胶原蛋白含量与剪切力呈正相关，侧面反映出肉的嫩度。GONZALEZ 等[54] 报道超声后牛肉样品的总胶原蛋白含量明显低于未超声牛肉样品，其嫩度得到了改善。因此，超声处理可以通过降低胶原蛋白含量提高嫩度（如图 3D 所示）。此外，胶原蛋白的溶解性也会决定肉制品的嫩度。大量研究表明，肉的嫩度可以通过增加可溶性胶原蛋白含量来改善[55]。超声空化效应产生的较强穿透力可以破坏肌肉原有结构的支撑骨架（肌束膜、肌内膜），使结缔组织变得疏松，胶原蛋白可溶性增加，促进肉制品的嫩化[19]。

3.2.2　超声波嫩化技术对结缔组织结构的影响　肌束膜与肌内膜的厚度是影响剪切力的主要因素，胶原纤维作为细胞外基质的主要结构成分，它也是结缔组织的重要结构，而超声空化产生的微射流、微湍流和高温高压等会使肌内膜和肌束膜出现裂痕，肌内膜紧密结构发生变形，肌束膜破裂并部分溶解，破坏胶原纤维的物理结构，引起胶原纤维变性并聚集在细胞外，使胶原纤维排列紊乱且松散，进而提高肉制品的嫩度[56]（如图 3B 所示）。同时，超声破坏肌束膜和肌内膜，使其分解成单个胶原纤维，并使肌束膜中的蛋白多糖发生较大程度的降解，使胶原纤维间连接断裂，弱化肌内结缔组织结构，故结缔组织的这种分解及结构的弱化可能会导致肉制品的嫩度增加[25]。此外，结缔组织的稳定性还与胶原蛋白分子内交联程度密切相关。LEPETIT[29] 发现随着熟肉中胶原蛋白交联数量的增加，肉的韧性也会相应的增加。超声空化作用会对胶原纤维产生机械物理破坏或者增加肌肉酶的降解，影响胶原蛋白中羟基吡啶和赖氨酸吡啶的交联度和稳定性，破坏了胶原纤维的内部交联，导致胶原蛋白分子内交联度降低，使胶原蛋白的平均稳定性下降，从而有利于肉制品的嫩化[57]（如图 3D 所示）。另外，胶原蛋白分子间的作用力大小也会决定嫩度的高低，而超声空化产生的微射流等可能会破坏胶原蛋白分子间的作用力，使胶原蛋白分子间作用力减小，胶原蛋白结构更加疏松，进而改善肉制品的嫩度。

4　展望

超声波技术可以克服传统物理嫩化技术的不稳定性及在线应用差等缺点，目前已广泛应用于鹅肉、鸡肉、牛肉和羊肉等的嫩化。同时，在肉制品加工过程中，超声波可以破坏肉的肌原纤维、溶酶体和结缔组织等，达到嫩化肉制品的效果，其中，在酱牛肉和牛肉粒的生产加工过程中，超声波技术已得到广泛应用。但仍存在一些问题需要进一步解决，主要包括：a.如何在利用超声波技术嫩化肉制品时最大程度抑制/消除超声产生的局部过热现象；b.应该研发输出稳定的超声设备，使其更加适应工业化规模的肉类嫩化，实现科技到生产力的转化。

肉制品多种多样，不同肉制品中肌纤维及结缔组织特性也不尽相同，并且在嫩化过程中，一些外部条件也会不可避免地影响肌原纤维蛋白和胶原蛋白的变性，因此，利用单一的处理手段完全无损地嫩化

肉制品相对来说较为困难。可以通过超声波与其他技术结合的方式嫩化肉制品。首先，超声波与不同加工方式（熏烤、蒸煮、干燥、腌制、发酵等）结合使用，既可以提高肉制品的嫩化效率，又可以节约资源和成本；其次，超声波与其它新兴技术结合，如脉冲电场、脉冲光、超高压、冲击波等，以避免超声可能产生的不良影响，达到较好的嫩化效果，为肉制品的精深加工奠定较好的基础，推进肉类加工业的发展；最后，超声波与新型辅料相结合，超声处理可以使肌纤维结构相对松散，通过新型纳米材料将磷酸盐或对温度以及酸碱性较为敏感的嫩化剂包埋其中，由于纳米材料的稳定性更高及其缓释作用，可以将嫩化剂相对准确且长时间稳定释放于肌纤维当中，起到更好的嫩化效果。

参考文献

[1] ZHU C Z, YIN F, TIAN W, et al. Application of a pressure-transform tumbling assisted curing technique for improving the tenderness of restructured pork chops[J]. LWT, 2019, 111: 125−132.

[2] ZOU Y, SHI H B, XU P P, et al. Combined effect of ultrasound and sodium bicarbonate marination on chicken breast tenderness and its molecular mechanism[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2019, 59: 104735.

[3] 高海燕, 张瑞瑶, 贾甜, 等. 不同嫩化方法对鹅肉品质的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(7): 190−194. [GAO H Y, ZHANG R Y, JIA T, et al. Effects of different tenderization treatments on the quality of goose meat[J]. Food Science, 2017, 38(7): 190−194.]

[4] ZHANG Y M, JI X K, MAO Y W, et al. Effect of new generation medium voltage electrical stimulation on the meat quality of beef slaughtered in a Chinese abattoir[J]. Meat Science, 2019, 149: 47−54.

[5] 苏丹. 老龄梅花鹿肉嫩化方法研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2012. [SU D. Research on tenderizing methods of aging sika meat[D]. Changchun: Jilin University, 2012.]

[6] ZUCKERMAN H, BOWKER B C, EASTRIDGE J S, et al. Microstructure alterations in beef intramuscular connective tissue caused by hydrodynamic pressure processing[J]. Meat Science, 2013, 95(3): 603−607.

[7] PEÑA-GONZALEZ E, ALARCON-ROJO A D, GARCIA-GALICIA I, et al. Ultrasound as a potential process to tenderize beef: Sensory and technological parameters[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2019, 53: 134−141.

[8] 高天丽. 中式烹制及嫩化工艺对横山羊肉品质的影响研究 [D]. 西安: 陕西师范大学, 2017. [GAO T L. The effects of Chinese cooking and tenderization methods on the quality of Hengshan goat meat[D]. Xi'an: Shaanxi Normal University, 2017.]

[9] 张森, 王道营, 张牧焓, 等. 一磷酸腺苷与肌动球蛋白相互作用的荧光光谱研究[J]. 食品科学, 2016, 37(17): 32−37. [ZHANG M, WANG D Y, ZHANG M H, et al. Fluorescence spectroscopic study of the molecular interaction between adenosine 5'-monophosphate and actomyosin[J]. Food Science, 2016, 37(17): 32−37.]

[10] KE S, HUANG Y, DECKER E A, et al. Impact of citric acid on the tenderness, microstructure and oxidative stability of beef muscle[J]. Meat Science, 2009, 82(1): 113−118.

[11] 朱蓓薇, 董秀萍, 李岩, 等. 通过内源酶嫩化技术生产低温熟化海参制品的方法: 中国, CN104286975A[P]. 2015-01-21. [ZHU B W, DONG X P, LI Y, et al. A method for producing low-temperature matured sea cucumber products by endogenous enzyme tenderization technology: China, CN104286975A[P]. 2015-01-21.]

[12] 张宝珣. 不同处理对秦川牛肉品质影响的研究 [D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2008. [ZHANG B X. Study on effects on beef quality of Qinchuan cattle among different factor[D]. Xianyang: Northwest A&F University, 2008.]

[13] 时海波, 诸永志, 方芮, 等. 宰后肉品嫩化技术及其作用机理研究进展[J]. 食品科学, 2020, 41(23): 311−321. [SHI H B, ZHU Y Z, FANG R, et al. Progress of technologies and mechanisms of tenderization of post-mortem muscle[J]. Food Science, 2020, 41(23): 311−321.]

[14] 张苏苏. 牛仔盖肉排品质改良及贮藏特性研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2019. [ZHANG S S. Study on the quality improvement and storage characteristics of beef round steaks[D]. Changchun: Jilin University, 2019.]

[15] ALARCON-ROJO A D, JANACUA H, RODRIGUEZ J C, et al. Power ultrasound in meat processing[J]. Meat Science, 2015, 107: 86−93.

[16] ALARCON-ROJO A D, CARRILLO-LOPEZ L M, REYES-VILLAGRANA R, et al. Ultrasound and meat quality: A review[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2019, 55: 369−382.

[17] WANG A R, KANG D C, ZHANG W G, et al. Changes in calpain activity, protein degradation and microstructure of beef *M. semitendinosus* by the application of ultrasound[J]. Food Chemistry, 2018, 245: 724−730.

[18] 孔令明, 李芳, 张文, 等. 不同电刺激处理时间对宰后马肉成熟过程中嫩度的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(9): 76−81. [KONG L M, LI F, ZHANG W, et al. Effect of electrical stimulation on horsemeat tenderness during postmortem aging[J]. Food Science, 2018, 39(9): 76−81.]

[19] 张坤, 王道营, 张森, 等. 高强度超声对鹅胸肉嫩度及品质的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(15): 122−127. [ZHANG K, WANG D Y, ZHANG M, et al. Effect of high-intensity ultrasonic treatment on goose tenderness and meat quality[J]. Food Science, 2018, 39(15): 122−127.]

[20] ZOU Y, ZHANG K, BIAN H, et al. Rapid tenderizing of goose breast muscle based on actomyosin dissociation by low-frequency ultrasonication[J]. Process Biochemistry, 2018, 65: 115−122.

[21] 郎玉苗. 肌纤维类型对牛肉嫩度的影响机制研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2016. [LANG Y M. Mechanism and effects of muscle fiber types on beef tenderness[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2016.]

[22] VOLPELLI L A, FAILLA S, SEPULCRI A, et al. Calpain system *in vitro* activity and myofibril fragmentation index in fallow deer (*Damadama*): Effects of age and supplementary feeding[J]. Meat Science, 2005, 69(3): 579−582.

[23] 刘晶晶. 结缔组织热变化对牛肉嫩度影响的研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2018. [LIU J J. The influence of heat change of connective tissue on beef tenderness[D]. Beijing: Chinese Aca-

demy of Agricultural Sciences, 2018.]
[24] BERRY B W. Tenderness of beef loin steaks as influenced by marbling level, removal of subcutaneous fat, and cooking method[J]. Journal of Animal Science, 1993, 71(9): 2412−2419.
[25] 李春保. 牛肉肌内结缔组织变化对其嫩度影响的研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2006. [LI C B. Effects of intramuscular connective tissue on beef tenderness[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2006.]
[26] KLONT R E, BROCKS L, EIKELENBOOM G. Muscle fibre type and meat quality[J]. Meat Science, 1998, 49: S219−S229.
[27] 臧大存. 鸭肉嫩度影响因素及变化机制的研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2007. [ZANG D C. Studies on the mechanism and factors of tenderness variation in duck meat[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2007.]
[28] LIGHT N, CHAMPION A E, VOYLE C, et al. The role of epimysial, perimysial and endomysial collagen in determining texture in six bovine muscles[J]. Meat Science, 1985, 13(3): 137−149.
[29] LEPETIT J. A theoretical approach of the relationships between collagen content, collagen cross-links and meat tenderness [J]. Meat Science, 2007, 76(1): 147−159.
[30] KIM H W, CHOI Y S, CHOI J H, et al. Tenderization effect of soy sauce on beef *M. biceps femoris*[J]. Food Chemistry, 2013, 139(1-4): 597−603.
[31] SOLOMON M B, LONG J B, EASTRIDGE J S. The hydrodyne: A new process to improve beef tenderness[J]. Journal of Animal Science, 1997, 75(6): 1534−1537.
[32] JAYASOORIYA S D, TORLEY P J, D'ARCY B R, et al. Effect of high power ultrasound and ageing on the physical properties of bovine *Semitendinosus* and *Longissimus* muscles[J]. Meat Science, 2007, 75(4): 628−639.
[33] WEN C T, ZHANG J X, YAO H, et al. Advances in renewable plant-derived protein source: The structure, physicochemical properties affected by ultrasonication[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2019, 53: 83−98.
[34] LÓPEZ-PEDROUSO M, PÉREZ-SANTAESCOLÁSTICA C, FRANCO D, et al. Proteomic footprint of ultrasound intensification on sliced dry-cured ham subjected to mild thermal conditions [J]. Journal of Proteomics, 2019, 193: 123−130.
[35] 沈阳. 超声空化的理论研究及影响因素的模拟分析 [D]. 沈阳: 东北大学, 2014. [SHEN Y. Theoretical research on ultrasonic cavitation and simulation analysis of affecting factors[D]. Shenyang: Northeastern University, 2014.]
[36] KANG D C, ZOU Y H, CHENG Y P, et al. Effects of power ultrasound on oxidation and structure of beef proteins during curing processing[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2016, 33: 47−53.
[37] ZOU Y, SHI H, CHEN X, et al. Modifying the structure, emulsifying and rheological properties of water-soluble protein from chicken liver by low-frequency ultrasound treatment[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 139: 810−817.
[38] TEREFE N S, SIKES A L, JULIANO P. 8-Ultrasound for structural modification of food products[J]. Innovative Food Processing Technologies, 2016: 209−230.
[39] 钟赛意. 超声波在盐水鸭加工中的应用研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2007. [ZHONG S Y. Study on the application of ultrasonic in salting processing of salted duck[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2007.]
[40] KANG D C, GAO X Q, GE Q F, et al. Effects of ultrasound on the beef structure and water distribution during curing through protein degradation and modification[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2017, 38: 317−325.
[41] 李正英, 陈锦屏, 陈忠军, 等. 羊肉超声波嫩化技术的研究 [J]. 食品科学, 2006, 27(12): 413−416. [LI Z Y, CHEN J P, CHEN Z J, et al. Study on ultrasonic technology to tender lamb meat[J]. Food Science, 2006, 27(12): 413−416.]
[42] 唐福元, 王玮, 刘晓庚, 等. 超声辅助无花果叶蛋白酶复合嫩化剂对猪腩肉嫩度的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(12): 204−210. [TANG F Y, WANG W, LIU X G, et al. Optimization of pork tenderization using ultrasound treatment combined with tenderizer combination[J]. Food Science, 2017, 38(12): 204−210.]
[43] SALEEM R, AHMAD R. Effect of low frequency ultrasonication on biochemical and structural properties of chicken actomyosin[J]. Food Chemistry, 2016, 205: 43−51.
[44] XIONG G Y, FU X Y, PAN D M, et al. Influence of ultrasound-assisted sodium bicarbonate marination on the curing efficiency of chicken breast meat[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2020, 60: 104808.
[45] BERTRAM H C, PURSLOW P P, ANDERSEN H J. Relationship between meat structure, water mobility, and distribution: A low-field nuclear magnetic resonance study[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(4): 824−829.
[46] LI X, WANG Y, SUN Y Y, et al. The effect of ultrasound treatments on the tenderizing pathway of goose meat during conditioning[J]. Poultry Science, 2018, 97(8): 2957−2965.
[47] SHIKHAOJHA K, KERRY J P, TIWARI B K. Investigating the influence of ultrasound pre-treatment on drying kinetics and moisture migration measurement in *lactobacillus sakei* cultured and uncultured beef jerky[J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 81: 42−49.
[48] WANG B, KONG B H, LI F F, et al. Changes in the thermal stability and structure of protein from porcine *Longissimus dorsi* induced by different thawing methods[J]. Food Chemistry, 2020, 316: 126375.
[49] 康大成, 刘云国, 张万刚. 高功率超声波对蛋白质功能特性的影响及其在肉品加工中的应用研究进展[J]. 食品科学, 2019, 40(23): 289−297. [KANG D C, LIU Y G, ZHANG W G. Recent advances in understanding the effect of high power ultrasound on protein functional characteristics and its applications in meat processing[J]. Food Science, 2019, 40(23): 289−297.]
[50] 张坤, 邹烨, 王道营, 等. 高强度超声处理对鹅胸肉肌动球蛋白特性的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(21): 59−65. [ZHANG K, ZOU Y, WANG D Y, et al. Effect of high-intensity ultrasound on the characteristics of goose breast muscle actomyosin[J]. Food Science, 2018, 39(21): 59−65.]
[51] LI K, FU L, ZHAO Y Y, et al. Use of high-intensity ultrasound to improve emulsifying properties of chicken myofibrillar protein and enhance the rheological properties and stability of the

emulsion[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 98: 105275.

[52] BAREKAT S, SOLTANIZADEH N. Improvement of meat tenderness by simultaneous application of high-intensity ultrasonic radiation and papain treatment[J]. Innovative Food Science&Emerging Technologies, 2017, 39: 223−229.

[53] WANG B, DU X, KONG B H, et al. Effect of ultrasound thawing, vacuum thawing, and microwave thawing on gelling properties of protein from porcine *Longissimus dorsi*[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2020, 64: 104860.

[54] GONZALEZ-GONZALEZ L, ALARCON-ROJO A D, CARRILLO-LOPEZ L M, et al. Does ultrasound equally improve the quality of beef? An insight into longissimus lumborum, infraspinatus and cleidooccipitalis[J]. Meat Science, 2020, 160: 107963.

[55] BURKE R M, MONAHAN F J. The tenderisation of shin beef using a citrus juice marinade[J]. Meat Science, 2003, 63(2): 161−168.

[56] 万云飞. 超声与氯化钙联合处理影响牛肉超微结构与嫩度的机理研究 [D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2019. [WAN Y F. The effect of ultrasound combined with calcium chloride on the ultrastructure and tenderness of beef[D]. Xianyang: Northwest A&F University, 2019.]

[57] CHANG H J, XU X L, ZHOU G H, et al. Effects of characteristics changes of collagen on meat physicochemical properties of beef semitendinosus muscle during ultrasonic processing[J]. Food and Bioprocess Technology, 2012, 5(1): 285−297.

陆家慧, 刘树萍. 奇亚籽胶的功能性质及其在食品中的应用研究进展 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 432−438. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050001

LU Jiahui, LIU Shuping. Research Progress on the Functional Properties of Chia Gum and Its Applications in Foods[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 432−438. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050001

· 专题综述 ·

奇亚籽胶的功能性质及其在食品中的应用研究进展

陆家慧, 刘树萍*

（哈尔滨商业大学旅游烹饪学院, 黑龙江哈尔滨 150028）

摘　要: 奇亚籽在食品和医疗领域已有很长的应用历史。作为奇亚籽副产物，奇亚籽胶具有特殊的理化性质和多样化的结构构象。奇亚籽胶作为食品工业应用的一个新型资源，可以改善产品的营养价值，调整食品系统的粘度、稳定性和质构。本文就奇亚籽胶的提取和干燥方式、主要营养价值和功能性质及其在肉制品、烘焙制品、乳制品和食品保鲜与包装等领域的应用进行综述。对奇亚籽胶未来研究方向和应用前景进行探讨，以期为食品工业谋求新型绿色改良剂提供思路和目标。

关键词: 奇亚籽, 胶体, 提取方式, 营养价值, 功能性质, 应用

中图分类号: TS202.1　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0432−07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050001　　本文网刊:

Research Progress on the Functional Properties of Chia Gum and Its Applications in Foods

LU Jiahui, LIU Shuping*

（College of Tourism and Cuisine, Harbin University of Commerce, Harbin 150028, China）

Abstract: Chia seed has been applied in foods and medical field for a long history. As a by-product of chia seed, chia gum has unique physical and chemical properties and diverse structural conformations. As an emerging resource in food industry applications, chia gum can also be used in technological applications such as improving the nutritional value of products, adjusting the viscosity, stability and texture of the food system. This paper reviews the extraction and drying methods, main nutritional value and functional properties of chia gum and its application in meat products, baking products, dairy products, food preservation and packaging. The future research direction and application prospect of chia gum are discussed in order to provide ideas and objectives for the food industry to seek new green modifiers.

Key words: chia seeds; colloid; extraction methods; nutritional value; functional properties; application

奇亚籽(Chia seed)是薄荷类植物芡欧鼠尾草的种子, 具有很高的营养价值, 已逐渐成为最受消费者欢迎的食品之一[1]。奇亚籽蛋白质含量相对较高(16%~26%), 且富含多不饱和脂肪酸尤其是亚麻酸[2], 达总油脂(30%~34%)含量的 68%[3]。相比其他水果和种子, 它具有更高的膳食纤维含量(34%~42%)[4]。同时, 奇亚籽也含有多种多酚和抗氧化成分, 例如: 咖啡酸、迷迭香酸、杨梅素和槲皮素等[5]。奇亚籽及其衍生产物在食品、医疗、制药、营养保健以及动物饲料等领域具有广阔的应用前景, 其中, 奇亚籽胶尤其受到研究者的关注。它良好的生物活性功能和物理性质, 不仅可以降低人体胆固醇水平并有助于改善肠道功能, 而且可以作为增稠剂、胶凝剂和螯合剂等应用于食品、制药和化妆品领域[6], 是一种富有前景的

收稿日期: 2021−05−06

基金项目: 黑龙江省科学基金项目（LH2021B015）; 哈尔滨商业大学“青年创新人才”支持计划学术骨干项目（2019CX18）; 烹饪科学四川省高等学校重点实验室资助项目（PRKX201906）; 黑龙江省博士后科研启动金（LBH-Q15072）。

作者简介: 陆家慧（1996−）, 男, 硕士研究生, 研究方向: 烹饪营养与工业化, E-mail: 18012238100@163.com。

*** 通信作者:** 刘树萍（1982−）, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 传统烹饪工业化, E-mail: liusp201@163.com。

新兴生物材料。

奇亚籽胶的主要成分是一种阴离子杂多糖，由 α-D-吡喃木糖、β-D-吡喃葡萄糖和 4-O-甲基-D-吡喃葡萄糖醛酸组成[7]（图 1）。当奇亚籽浸没于水溶液时，其表皮细胞外细胞壁会释放出高粘度的奇亚籽胶溶液。在完全水合后，会呈现附着在种粒上的透明溶胶状物[8]。这些黏液牢固地附着在种子上（主要存在于种皮和相邻层中，部分交联或结合在种子表面[9]），提高了提取的困难程度。研究者们通过多种手段提取出奇亚籽胶，得率为 5%~15.5%[10]。奇亚籽胶具有良好的吸水、保水和乳化等能力，因此，在肉制品、烘焙产品、乳制品等领域有着出色的应用潜能[11]。本文将就奇亚籽胶的提取工艺、奇亚籽胶所具有的营养成分和功能性质以及目前在食品中的应用进行综述。

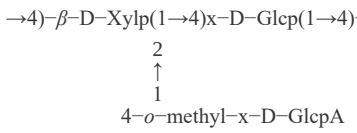


图 1　奇亚籽多糖结构

Fig.1　Structure of chia seed polysaccharide

注：xyl：木糖；glc：葡萄糖；methyl：甲基。

1　奇亚籽胶的制备工艺

提取奇亚籽胶的方法主要是水提法[12]，分为三个步骤，首先是奇亚籽的水合阶段，该过程中不同的水提参数不仅会明显改变得率，而且对粗多糖纯度和相对粘度也有重要影响。常规的选择是冷水浸提，但该方法耗时长，得率较低。因此，研究者开发了多种优化方案，例如：调整溶液酸碱度或改变水提温度等；第二步是通过物理方法将附着在奇亚籽表面的胶体剥离下来，并根据应用目的采用旋蒸或索式抽提的方式进行纯化；第三步是通过不同的干燥技术，例如：热风空气循环或冷冻干燥，将提取的液态产品进行脱水以便存储。

1.1　奇亚籽胶的渗出提取

优化水提方案的首要目的是促进奇亚籽粘液在水性介质中渗出。通过改变料液比和温度，调节 pH 等方法可以有效提高提取率[13]。MUNOZ 等[14] 研究了料液比、温度、pH 等参数对奇亚籽胶提取率的影响，发现在料液比为 1∶40（w/v），温度 80 ℃，pH9 时提取率最大（7%）。并且随着三者的增大，提取率都呈上升趋势，其中，温度和料液比对提取率的影响比 pH 更显著。ORIFICI 等[15] 使用响应面方法对奇亚籽胶的提取参数进行建模和优化，并用二阶多项式模型预测提取率的变化。预期最佳提取条件为温度 85 ℃，料液比为 1∶31（w/v），该条件下的提取率为 11.6%。GUSTAVO 等[16] 发现在水合过程中采用超声技术也可以促使种子周围的粘液层渗出，并且随着超声功率的增加和时间的延长，提取率始终保持增加的趋势，在最高施加能量密度（10080 J/mL）下，粘液从种子上完全剥离。同时超声技术对纯化胶体去除杂质也有显著增益的效果。

1.2　奇亚籽胶的分离纯化和干燥

1.2.1　奇亚籽胶的分离纯化方法　粘液从种子中渗出后，通常采用机械搅拌或真空过滤[17] 的方式将其分离。ORIFICI 等[15] 控制其他变量固定，研究机械搅拌时间对奇亚籽胶提取效果的影响，结果表明当机械搅拌时间从 1 h 增加到 2 h 时，产率显著增加了 26.3%（P<0.05），在 2 h 时达到最高（9.7%），而在 3 h 时产率明显下降。

纯化方式同样也是奇亚籽胶提取过程中的一个研究焦点。GOH 等[18] 采用室温水合加机械搅拌的方式进行提取，并使用旋转蒸发仪对奇亚籽胶溶液进一步浓缩提纯，提高了奇亚籽胶的纯度，提取率仅为 1.2%，但是浓缩后再水化的样品粘度值更高。这可能是因为纯化后凝胶的致密网状结构限制了分子间运动。SEGURA 等[19] 在水提前分别用索氏提取法和超临界流体萃取法对奇亚籽颗粒进行脱脂，在 25~30 ℃ 下搅拌 2 h，悬浊液经过真空过滤可得到 12.6% 的奇亚籽胶，并且脱脂后的奇亚籽胶粘度值显著增加。综上所述，高温水提与机械搅拌更适用于工业领域进行大规模提取。而目前纯化手段的研究仅仅停留在实验室小批量提纯阶段，条件较为苛刻，还需要进行广泛深入的研究以谋求工业适用性更强的方法。

1.2.2　奇亚籽胶的干燥方法　在室温条件下，奇亚籽胶的保质期仅有数小时。因此，合适的干燥技术能够尽可能地保存其大部分活性成分，从而延长其储存寿命。目前研究中应用最多的是热风干燥和真空冷冻干燥。TAVARES 等[20] 对上述两种干燥方式进行了比较，发现使用真空冷冻干燥的奇亚籽凝胶的提取率（8.31%）较热风干燥（6.42%）提高了 1.89%，并且该凝胶溶液具有更高的触变性。YEDIDA 等[21] 研究了喷雾干燥法对奇亚籽胶回收率的影响，结果表明回收率随进风温度的升高而降低，随进料流量和空气流量的增加而增加。当喷雾干燥的参数为 150 ℃，475 mL/h 和 54 m^3/h 时回收率最高。研究表明以喷雾干燥法生产的奇亚籽胶提取率显著升高，其自动化和省时高效的特性非常符合标准化工业生产的要求。

2　奇亚籽胶的主要营养成分与功能性质

2.1　奇亚籽胶的主要营养成分

奇亚籽胶是一种高分子量复合碳水化合物，它的主要成分是膳食纤维（29%~38%），其中，可溶性膳食纤维比重约占种子整体纤维含量的 6%[22]。它的高膳食纤维含量使其易于形成凝胶从而具有良好的包封特性。YEH 等[23] 认为奇亚籽胶含有的大量膳食纤维使其具有良好的保水性和吸水性。奇亚籽胶的蛋白质含量约为 10% 且脂肪含量较低[24]，同时也含有一定量的抗氧化成分（包括酚类化合物）和不饱和脂肪酸，尤其是亚麻酸（56.16%）和亚油酸（20.64%）[25]。

2.2 奇亚籽胶的功能性质

2.2.1 奇亚籽胶的生理功能 奇亚籽胶作为一种高膳食纤维含量的水凝胶,具有改善人体健康的良好生理特性。VERA 等[26] 研究表明奇亚籽胶可以在胃肠道中保持一定的粘度从而附着在胃壁上达到减缓肠道运输、提供更多饱腹感的目的。ALFONSO 等[27] 认为奇亚籽胶可以缓解胃排空并改善肠胃松弛,还能够抑制营养物质吸收以及胆汁酸的结合,从而降低人的餐后血糖反应和胆固醇,并减少患冠心病,高血压,糖尿病等疾病的风险。TAMARGO 等[28] 认为奇亚籽胶不会影响肠道的物理特性(肠内腔的粘度),但可能会影响肠道菌群的细菌生长和代谢活性,这和 RUBIO[29] 的研究结果相似。

2.2.2 奇亚籽胶的抗氧化能力 研究表明奇亚籽胶中含有丰富的天然抗氧化剂,例如生育酚、植物甾醇、类胡萝卜素和酚类化合物[30−31],目前,已有研究表明,奇亚籽胶具有一定的抗氧化性。COELHO 等[32] 提取出了奇亚籽胶中的酚类化合物,发现其具有淬灭 DPPH 自由基的能力以及可以抑制愈创木酚的酶促氧化。REYES 等[33] 在奇亚籽胶中鉴定出的主要生物活性化合物是槲皮素和山奈酚,同时还含有浓度较低的咖啡酸和绿原酸,研究者也分析了奇亚籽胶对 β-胡萝卜素-亚油酸模型(β-CLAMS)和体外脂质氧化的影响,结果表明奇亚籽胶具有与市售抗氧化剂相当的功能效果,是良好的天然抗氧化剂。

2.2.3 溶解性 溶解度表示在受控温度下一段时间内已溶解的分子数量[34]。HERNÁNDEZ 等[35] 的研究表明在不同温度(30、60、70 和 90 ℃)、浓度(0.15%、0.25% 和 0.5%)和离心条件(800 和 2000 r/min)下奇亚籽胶的溶解度都接近 100%,显著高于刺梧桐胶、阿拉伯胶以及落叶松胶[36−37]。TIMILSENA 等[38] 的研究表明奇亚籽胶的溶解度会随 pH 和温度的增加而提高,在碱性条件(pH9.0)和室温下的溶解度(97%)比在中性和酸性高,但在 60 ℃ 后溶解度变化不显著。TIMILSENA 等[39] 发现解聚后奇亚籽胶馏分在水中的溶解能力更强,推测是由于相邻链之间的分子间相互作用减弱所致。

2.2.4 乳化活性及乳化稳定性 乳化活性是指分子促进两种不相溶液体的增溶或分散,乳化稳定性是维持乳状液稳定及抗破裂的能力[40],这是蛋白质和多糖在基于乳液的食品系统中重要的功能特性。大多数亲水胶体可以充当油水乳液的稳定剂,但只有少数可以充当乳化剂[41]。MARIANELA 等[42] 的研究表明,奇亚籽胶的乳化活性及稳定性显著大于明胶和瓜尔豆胶,这为食品行业乳化稳定剂的选择提供了新的思路。研究者们对奇亚籽胶高乳化活性的原因也展开了探究,GARTI 等[43] 认为奇亚籽胶之所以具备稳定乳液的能力,是其含有的少量蛋白质使它能够吸附到固体或液体界面上,并且在没有任何化学或酶促改性的情况下能够稳定水乳液中的油相。AVILADE 等[44] 的研究结果则表明,奇亚籽胶溶液的黏弹特性与其界面距离密切相关,他们认为该凝胶乳化性能的形成是由油相周围空间结构所决定的,因此,奇亚籽胶在低浓度或室温条件下均可呈现出高乳化活性(>45%)和乳化稳定性[45]。浓度的改变也会增强奇亚籽胶的乳化能力,刘婷婷等[46] 进一步提纯出奇亚籽胶中的多糖,对其进行功能和流变特性分析,结果表明随着质量浓度的增加,奇亚籽胶多糖对乳状液的稳定性显著增强,因为多糖质量浓度的升高减缓了乳状液液滴的扩散运动,使液滴间具有强作用力从而形成稳定结构。不同干燥方式对奇亚籽胶乳化活性也有影响,ANTIGO 等[47] 研究了冷冻干燥和热风干燥对奇亚籽胶功能特性的影响,结果显示两种胶体溶液均显示出假塑性特征,并且冷冻干燥后的样品在乳化活性、乳液稳定性和溶解度等方面性能更佳。以上结果表明,奇亚籽胶颗粒可在连续的可溶性聚合物溶液中组成独特稳定的体系,有利于在食品基质中提供不同程度的稳定作用,并且在食品工业中尤其是加工条件较为苛刻的领域,有潜力取代人工合成的稳定剂和乳化剂。

2.2.5 持水力和持油力 持水力(WHC)是在施加外力后被水化样品吸收和持有水分的能力,持油力(OHC)则表现为通过蛋白质分子内的非极性侧向位点吸收油的能力[48]。持水力的大小取决于许多因素,例如:物料成分和水的相互作用,水合位置数和蛋白质构型等[49]。研究表明奇亚籽胶具有良好的持水力和持油力。OLIVOS 等[50] 将奇亚籽胶与其他商用胶体进行了比较,发现奇亚籽胶的 WHC 和 OHC 显著高于常见市售商业胶体。GALLA 等[51] 认为奇亚籽胶之所以具有良好的持水力是因为它的蛋白质和纤维含量高,二者可以充分地与水结合从而锁住水分。SALGADO等[52] 使用扫描电镜和拉曼光谱对奇亚籽胶的微观结构进行分析,发现构成奇亚籽胶的黏液丝是一种纳米团聚体,彼此相互交织构成了海绵状的空间网格结构。COOREY 等[45] 认为这种海绵状结构具有更好的捕获和吸收油滴的能力。此外,SEGURA 等[53] 发现提取原材料的不同会影响奇亚籽胶的功能性质,研究者从整粒和研碎的奇亚籽中提取了奇亚籽胶,发现前者的吸水能力显著高于后者,二者的持水力(100~149.28 g/g)和持油力(19.5~40.4 g/g)也不尽相同。奇亚籽胶的高 WHC 可以确保烘焙产品的新鲜度和柔软度,而它优越的脂肪吸收能力则与油炸食品的脱脂效果以及风味属性息息相关,因而可在食品加工设计中发挥重要作用。

3 奇亚籽胶在食品中的应用

奇亚籽胶因其营养价值及持水/油性、乳化性、稳定性等特性,可在食品工业中充当绿色改良剂或抗氧化剂,因此,对其在食品领域的应用开展研究很有学术意义和实用价值。

3.1　在肉类产品中的应用

奇亚籽良好的乳化稳定性和抗氧化性在肉类产品中有着广阔的应用前景，它可以提高烹饪产量，降低配方和生产成本，改善肉制品的质构和营养属性，延长肉制品的货架期。目前，在肉类产品中主要的添加方式是直接添加或制作成多糖/蛋白质或复合基质的乳液凝胶（EG）。CAMARA 等[54] 尝试用冻干的粉末状奇亚籽胶与均质冷凝的奇亚籽凝胶替代博洛尼亚香肠中的磷酸盐以充当乳化剂和粘合剂，结果表明添加了奇亚籽凝胶的香肠比添加冻干粉的香肠具有更好的乳液稳定性，且当添加量为 2% 时感官接受性最佳。在此基础上，CAMARA 等[55] 使用响应面法探究不同种类胶凝剂（羧甲基纤维素钠、转谷氨酰胺酶、角叉菜胶、乳清蛋白、胶原蛋白、复合藻酸盐）与奇亚籽胶复配制作成的 EG，并研究其对猪肉肠品质的影响，发现奇亚籽胶与乳清蛋白、藻酸盐、胶原蛋白相容性最佳，复配添加可提高 EG 和猪肉肠的稳定性。同时该研究还表明奇亚籽胶与转谷氨酰胺酶和角叉菜胶结合效果不理想，可能是由于各种成分的混合增加了乳液系统的复杂性，从而阻碍空间网络的交互作用。ANA 等[56] 进一步使用藻酸盐-奇亚籽胶复配的乳液凝胶替代博洛尼亚香肠中的猪背脂，并研究了模拟体外消化过程中产品微观结构的变化，结果表明，奇亚籽胶对蛋白质网络中分散脂肪滴的大小和密致程度有很大的影响。以上研究表明，奇亚籽胶与藻酸盐及蛋白质之间有着良好的化学亲和性，可以形成稳定的凝胶网络。使用其所制成的乳液凝胶既具有与动物脂肪相似的功能性，又不会对感官特性造成很大的影响，说明其作为一种肉类产品的乳化剂和粘合剂是具有市场前景的。

3.2　在焙烤类制品中的应用

由于奇亚籽胶具有强大的保水和保油能力，因此，可作为一种天然添加剂，应用在烘焙产品中。FERNANDES 等[57] 使用奇亚籽胶替代面包中的油脂，所制得的面包与对照组相比脂类含量降低了 36.7%，消费者的感官接受性更高且购买意向更强烈。GALLO 等[58] 研究了在同等储存条件下使用奇亚籽胶作为巧克力蛋糕中的鸡蛋替代品，感官结果分析表明奇亚籽胶的添加对巧克力蛋糕的风味没有造成明显影响，并且相较对照组，添加奇亚籽胶还可以抑制蛋糕的脂质氧化，提高产品的储存安全性。奇亚籽胶不仅可以单独添加到产品中，还能与其他功能成分复配使用。GUIOTTO 等[59] 将经全脂、半脱脂和脱脂的奇亚籽粉复合奇亚籽胶添加到面包中以替代小麦面粉，改良后的面团吸水率更高、稳定性更强、面包感官接受性良好。LUNA 等[60] 使用水、菊粉、奇亚籽胶和亚麻籽油组合制作成的功能成分作为松饼中的黄油替代品，改良后的松饼营养品质得到了提升，脂肪含量降低且 TBARS 值较对照组显著降低。研究者认为这与奇亚籽胶中存在的抗氧化化合物有关。在焙烤类产品中使用奇亚籽胶不仅可以用作脂肪替代品以实现降脂的目的，还可以改善产品的感官特性，为食品企业改良烘焙产品提供了思路。

3.3　在乳制品及衍生品中的应用

鉴于消费者对食品健康和营养的需求不断提升，研究者和食品制造商设计出纤维含量高、脂肪含量低、不含化学添加剂的新型乳制品。将奇亚籽胶添加在乳制品及衍生产品中，充当脂肪或者商用乳化剂/增稠剂来改善食品的口感和质量。CAMPOS 等[61] 基于对冰淇淋质构、超限和融溶测试的结果，认为奇亚籽胶可以代替配方中的乳化剂和稳定剂。刘婷婷等[62] 研究发现，奇亚籽胶所具有的保水性和保油性会使得冰淇淋浆料黏度增加，进而阻碍溶质分子的迁移，减少物质间的相互作用从而增强冰淇淋的稳定性；但感官分析显示，用粘液配制的冰淇淋样品和对照组之间存在显著性差异，主要是由于奇亚籽胶的添加会加重产品的颜色。DARWISH 等[63] 发现随着酸奶中奇亚胶浓度的增加（最高 2%）膳食纤维含量也随之增加，弹性值及感官评分也相应升高，但是添加量为 3% 时会让酸奶的口味变得过淡。RIBES 等[64] 进一步研究了奇亚籽胶对脱脂酸奶营养、质构和感官特性的影响，在酸奶配方中添加 7.5% 的奇亚籽胶可以降低储存过程中的脱水收缩程度，并且在酸奶内部形成了高度集中的网络结构，具有更好的抗应力性，因此，它的稠度、硬度和粘度值更高。CHAVES 等[65] 探究了奇亚籽胶复配刺槐豆胶添加到甜品羊奶冻中的影响，结果表明：二者的添加增加了羊奶冻的水分含量和表观粘度，而表观粘度的增加也降低了膨胀率，阻碍了气泡掺入从而加强了产品的稳定性，同时羊奶冻的总脂质含量较对照样品降低了 50%。奇亚籽胶可以单独或与其他亲水胶体协同作用，使得乳制品的质地和热稳定性增强，营养成分得以改善，其独特的物理和化学特性使之在乳类制品中有着广阔的应用前景，也为乳品行业研发新型产品开辟了新的道路。

3.4　在食品保鲜和包装中的应用

奇亚籽胶作为一种新型的复杂多糖可以和蛋白质、脂质等结合，具有建立聚合物相互作用的能力，因此有良好的成膜特性，可用于包装涂料和可食用涂膜。不同干燥方式得到的奇亚籽胶成膜性能有所差异。VIEIRA 等[66] 发现奇亚籽胶作为一种新型膜基具有较高的热稳定性和潜在的天然抗氧化能力，作为包装材料可以延长食品的保质期。为了达到更好的储藏效果，奇亚籽胶可以单独或与其他材料复配应用于食品保鲜和包装中。OBAN 等[67] 使用奇亚籽胶与枸杞提取物复配制作了可食用包衣，将其涂在虹鳟鱼片的表面，涂膜在鱼片的表面形成了活性涂层；与对照组相比，鱼片的保质期延长了 5 倍，使用 2% 枸杞提取物的奇亚籽胶包衣抑制脂质氧化最为显著，并且有效阻碍了各类嗜温需氧菌的生长。COBAN 等[68]

表 1 奇亚籽胶在食品中的应用及效果

Table 1 Application and effect of chia gum in food

目标产品	添加目的	添加方式	作用效果	参考文献
博洛尼亚香肠	替代磷酸盐	直接添加	降低了50%的脂肪,改善了产品稳定性和质构特性	[55]
猪肉肠	替代磷酸盐	制成乳液凝胶	改善产品稳定性	[56]
博洛尼亚香肠	替代脂肪与磷酸盐	制成乳液凝胶	改善产品稳定性和产品质构特性	[57]
面包	替代油脂	直接添加	降低了56.6%的脂肪,提高了产品的储存安全性	[58]
巧克力蛋糕	替代鸡蛋	直接添加	降低了51.6%的脂肪,改善产品稳定性和产品质构特性	[59]
面包	替代小麦面粉	复配添加	增强了面团吸水率、醒发时间和稳定性,改善了面包的营养品质	[60]
松饼	替代黄油	复配添加	降低了78%的脂肪,增加了膳食纤维和不饱和脂肪酸的含量,提高了产品的储存安全性	[61]
冰淇淋	作为乳化稳定剂	直接添加	增加了黏度和稳定性,对色泽有负面作用	[62]
酸奶	作为乳化稳定剂	直接添加	改善了营养特性,提高了感官属性	[63]
脱脂酸奶	作为乳化稳定剂	直接添加	降低储存过程中的脱水收缩程度,提高感官属性	[64]
羊奶冻	改善产品稳定性	复配添加	降低了50%的脂肪,改善产品稳定性,增加了表观粘度	[65]
虹鳟鱼片	改善产品储存特性	制成可食用涂膜	抑制了脂质氧化和微生物生长,延长保质期	[67]
鲈鱼鱼片	改善产品储存特性	制成可食用涂膜	延长产品货架期至20 d	[68]
可食用甜菜染料	封装保护	微囊化封装	稳定保留了食用染料的颜色	[69]

将奇亚籽胶复配蜂胶提取物制作的涂膜包裹在鲈鱼鱼片上,研究了其在 2 ℃ 储存期间的储藏特性,经测定,未涂膜的鱼片有效保质期为 8 d 而奇亚籽胶和 0.3% 蜂胶提取物的组合可延长保质期至 20 d。除了制作涂膜,奇亚籽胶因其在室温下优异的稳定性还可以作为食品包装,微囊化多种活性成分。LDA 等[69]使用奇亚籽胶作为天然甜菜染料的包封剂,结果表明,与对照组相比,用奇亚籽胶和麦芽糊精制备的样品在喷雾干燥后花青素负载量更高,并且将其分散在不同 pH 和温度的水溶液中,微胶囊显示出良好的染料保留能力。开发奇亚籽胶作为可食用涂膜可以延缓食品脱水、抑制脂质氧化和微生物生长,并且可以延长食品的货架期,因此,其在高水分产品(如肉类和乳制品)中的应用前景广阔。由于奇亚籽胶有着优秀的包封特性,可在部分稳定性较差的食品基质中作为封装过程中的防腐剂,其绿色天然的特点也为生产可生物降解的食品包装提供了新的可能(表 1)。

4 结论与展望

作为一种新型天然绿色凝胶,奇亚籽胶拥有广阔的市场前景。目前,奇亚籽胶的水提工艺研究已较为成熟,但其最佳的干燥方式和纯化手段尚未有一致的结论,因此,接下来的研究应着眼于通过可靠的科学数据支持,实现提取方法和剂量的标准化以支持大规模的食品应用,在改善提取参数的同时,挖掘更具有工业潜力的纯化与干燥方法。

奇亚籽胶在食品工业中有着巨大的应用潜力,在肉类产品中可以作为天然乳化剂替代磷酸盐来改善肉制品的质量;在烘焙食品中不仅可以提高产品营养价值,还可以作为稳定剂代替蛋白、脂肪或面筋;而增稠和乳化的效果同样可以作为绿色增稠剂开发新型乳制品。此外,奇亚籽胶也因其优异的成膜特性和抗氧化性为食品保鲜领域增添了新的选项。在未来的研究中,除了优化相应配方和技术手段以确保质量之外,还应该对现有或新型食品基质中掺入奇亚籽胶的感官特性进行验证和分析,探究奇亚籽多糖和食品内其他生物活性物质的相互作用以及对食品本身的影响,在明确奇亚籽胶对人体消化性能影响的基础上,进行相应的研究以消除或抑制其对肠道菌群的负面作用。

参考文献

[1] ULLAH R, NADEEM M, KHALIQUE A, et al. Nutritional and therapeutic perspectives of chia: A review[J]. Journal of Food Science & Technology, 2016, 53(4): 17−25.

[2] CYNTHIA S F, SOUZA L F, GILZE E S, et al. Effect of chia seed consumption on cardiovascular risk factors in humans: A systematic review[J]. Nutricion Hospitalaria, 2015, 15(9): 25−30.

[3] URRUTIA O, SORET B, INSAUSTI K, et al. The effects of linseed or chia seed supplementation on adipose tissue development, fatty acid composition, and lipogenic gene expression in lambs[J]. Small Ruminant Research, 2014, 123(2-3): 204−211.

[4] DINCOGLU A, OZAY O. A renewable source as a functional food: Chia seed[J]. Current Nutrition & Food Science, 2019, 42(6): 54−60.

[5] AGUILAR J E, LICEAGA A M. Identification of chia seed peptides with enzyme inhibition activity towards skin-aging enzymes[J]. Amino Acids, 2020, 52(6): 1149−1159.

[6] LUO M, CAO Y, WANG W, et al. Sustained-release antimicrobial gelatin film: Effect of chia mucilage on physicochemical and antimicrobial properties[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 87(2): 783−791.

[7] LIN K Y, DANIEL J R. Structure of chia seed polysaccharide exudates[J]. Carbohydrate Polymers, 1994, 23(1): 13−18.

[8] DAVOUD S, MOHSEN T. An update on physicochemical and functional properties of newly seed gums[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 119(25): 1240−1247.

[9] RODRIGUEZ E, MARIA, ROMAN G, et al. Sorption isotherms, thermodynamic properties and glass transition temperature of mucilage extracted from chia seeds[J]. Carbohydrate Polymers: Scientific and Technological Aspects of Industrially Important Polysaccharides, 2015, 121(3): 441−449.

[10] FERNANDES S S, ROMANI V P, FILIPINI G, et al. Chia seeds to develop new biodegradable polymers for food packaging: Properties and biodegrad ability[J]. Polymer Engineering and Science, 2020, 85(1): 255−264.
[11] WEN W U, YANG Z, TING L I, et al. Research on the processing technology of the chia seed fruit with peach gum tremella beverage[J]. The Food Industry, 2018, 15(2): 1−6.
[12] HUBER K L, FERNANDEZ J R, WEBB C, et al. Hyvia: A novel, topical chia seed extract that improves skin hydration[J]. Journal of Cosmetic Dermatology, 2020, 19(1): 22−28.
[13] JUSTYNA W, DOMINIK P, LENAENA R. Ionic liquids as a key medium for efficient extraction of copper complexes from chia seeds[J]. Talanta, 2016, 152(24): 482−488.
[14] MUNOZ L A, COBOS A, DIAZ O, et al. Chia seeds: Microstructure, mucilage extraction and hydration[J]. Journal of Food Engineering, 2012, 108(1): 216−224.
[15] ORIFICI S C, CAPITANI M I, MC TOMÁS, et al. Optimization of mucilage extraction from chia seeds using response surface methodology[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2018, 98(6): 4495−4500.
[16] GUSTAVO A P, ARAUJO N M P, PEREIRA G M, et al. Obtaining a novel mucilage from mutamba seeds exploring different high-intensity ultrasound process conditions[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2019, 64(18): 258−264.
[17] XING X, HSIEH Y S Y, YAP K, et al. Isolation and structural elucidation by 2D NMR of planteose, a major oligosaccharide in the mucilage of chia seeds[J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 175(23): 231−240.
[18] GOH K, MATIA M L, CHIANG J H, et al. The physicochemical properties of chia seed polysaccharide and its microgel dispersion rheology[J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 149(45): 297−307.
[19] SEGURA C M, ACOSTA C Z, ROSADO R G, et al. Whole and crushed nutlets of chia from Mexico as a source of functional gums[J]. Food Science & Technology, 2014, 34(4): 701−709.
[20] TAVARES L S, JUNQUEIRA L A, DOGÍ C, et al. Cold extraction method of chia seed mucilage: Effect on yield and rheological behavior[J]. Journal of Food Science & Technology, 2018, 55(20): 457−466.
[21] YEDIDA H V, BITRA V, BURLA S, et al. Hydration behavior of chia seed and spray drying of chia mucilage[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2020, 44(2): 144−156.
[22] YAKINDRA P T B, BO W C, RAJU A B, et al. Preparation and characterization of chia seed protein isolate-chia seed gum complex coacervates[J]. Food Hydrocolloids, 2016, 52(8): 554−563.
[23] YEH H Y, SU N W, LEE M H. Chemical compositions and physicochemical properties of the fiber-rich materials prepared from shoyu mash residue[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2005, 53(11): 43−51.
[24] SPADA J C, DICK M, PAGNO C H, et al. Caracterização física, química e sensorial de sobremesas à base de soja, elaboradas com mucilagem de chia[J]. Ciência Rural, 2014, 44(2): 374−379.
[25] FERNANDA S S, CAMPO C, COSTA T M H, et al. Nanoencapsulation of linseed oil with chia mucilage as structuring material: Characterization, stability and enrichment of orange juice[J]. Food Research International, 2019, 120(11): 872−879.
[26] VERA N, LAGUNA L, ZURA L, et al. A comparative study of the physical changes of two soluble fibers during *in vitro* digestion[J]. Proceedings, 2020, 53(21): 18−25.
[27] ALFONSO B P, EVA M, SANZ Y, et al. Impact of dietary fiber and fat on gut microbiota re-modeling and metabolic health[J]. Trends in Food Science & Technology, 2016, 57(12): 201−212.
[28] TAMARGO A, CUEVA C, LAGUNA L, et al. Understanding the impact of chia seed mucilage on human gut microbiota by using the dynamic gastrointestinal model simgi[J]. Journal of Functional Foods, 2018, 50(26): 104−111.
[29] MA R. Implicaciones de la fibra en distintas patologías[J]. Horizons, 2012, 31(31): 121−140.
[30] MARINELI R, ÉRICA A M, LENQUISTE S A, et al. Chemical characterization and antioxidant potential of Chilean chia seeds and oil[J]. LWT-Food Science & Technology, 2014, 59(2): 1304−1310.
[31] OLIVEIRA A S C, VENDRAMINI C D B, CAZARIN C B, et al. Characterization of phenolic compounds in chia seeds, fiber flour and oil[J]. Food Chemistry, 2017, 232(1): 295−305.
[32] COELHO M S, SALAS D L M. Chemical characterization of chia for use in food products[J]. Journal of Food & Nutrition Research, 2014, 2(5): 263−269.
[33] REYES C E, TECANTE A, VALDIVIA L M A. Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia seeds[J]. Food Chemistry, 2008, 107(2): 656−663.
[34] SABATIER M, HUSNY J, NICOLAS M, et al. Solubility and impact of ascorbic acid on the *in vitro* bioavailability of two casein-based iron fortificants from reconstituted milk[J]. Current Developments in Nutrition, 2020, 4(2): 1836−1836.
[35] HERNÁNDEZ M L. Mucilage from chia seeds: Microestructure, physico-chemical characterization and applications in food industry[J]. Journal of Comparative Physiology B, 2012, 157(3): 393−402.
[36] LÓPEZ F Y, HIGUERA C I, GOYCOOLEA F M, et al. Other exudates: Tragancanth, karaya, mesquite gum and larchwood arabinogalactan[J]. Handbook of Hydrocolloids, 2009, 25(18): 495−534.
[37] ZHAO F, YANG Z, RAO J, et al. Gum arabic-mediated synthesis of glyco-pea protein hydrolysate via maillard reaction improves solubility, flavor profile, and functionality of plant protein [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(36): 36−45.
[38] TIMILSENA Y P, ADHIKARI R, KASAPIS S, et al. Molecular and functional characteristics of purified gum from Australian chia seeds[J]. Carbohydr Polym, 2016, 136(54): 128−136.
[39] TIMILSENA Y P, ADHIKARI R, KASAPIS S, et al. Rheological and microstructural properties of the chia seed polysaccharide[J]. International Journal of Biological Macromolecules: Structure, Function and Interactions, 2015, 89(43): 687−692.
[40] GHADERI S, HESARINEJAD M A, SHEKARFOROUSH E, et al. Effects of high hydrostatic pressure on the rheological properties and foams/emulsions stability of alyssum homolocarpum seed gum[J]. Food Science & Nutrition, 2020, 8(10): 42−51.
[41] CHEN M, LU J, LIU F, et al. Study on the emulsifying stabil-

ity and interfacial adsorption of pea proteins[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 88(35): 159−164.
[42] MARIANELA I, SUSANA M, MABEL C. Effect of mucilage extraction on the functional properties of chia meals[M]. New York: Food Industry, 2013: 25−38.
[43] GARTI N, YAGHMUR A, LESER M E, et al. Improved oil solubilization in oil/water food grade microemulsions in the presence of polyols and ethanol[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2001, 49(5): 2552−2562.
[44] AVILADE L R G, ALVAREZ R J, VERNON C R E J, et al. Viscoelasticity of chia seed mucilage dispersion in the vicinity of an oil-water interface[J]. Food Hydrocolloids, 2015, 49(15): 200−207.
[45] COOREY R, TJOE A, JAYASENA V. Gelling properties of chia seed and flour[J]. Journal of Food Science, 2014, 79(5): 859−866.
[46] 刘婷婷, 赵文婷, 刘鸿铖, 等. 奇亚籽皮多糖对乳状液聚集稳定性的影响[J]. 食品科学, 2020, 41(10): 29−37. [LIU T T, ZHAO W T, LIU H C, et al. Effects of chia seed peel polysaccharides on the stability of emulsion aggregation[J]. Food Science, 2020, 41(10): 29−37.]
[47] ANTIGO J, BERGAMASCO R, MADRONA G S. How drying methods can influence the characteristics of mucilage obtained from chia seed and psyllium husk[J]. Ciência Rural, 2020, 50(8): 65−72.
[48] WANG L, XING X, LIU Y, et al. Effects of different drying methods on the functional and structural properties of dietary fiber from peanut shell[J]. Agricultural Biotechnology, 2020, 9(3): 132−136.
[49] ZONDO S, MAHLAMBI P. Correlation between chemical composition, water holding capacity and flavonoids content of maize verities harvested at Buxedeni village of Kwanongoma in Kwazulu natal, south Africa[J]. Journal of Food and Nutrition Research, 2020, 8(11): 675−681.
[50] OLIVOS L B L, VALDIVIA L M A, TECANTE A, et al. Thermal and physicochemical properties and nutritional value of the protein fraction of mexican chia seed[J]. Food Science & Technology International, 2010, 16(1): 89−96.
[51] GALLA N R, DUBASI G R. Chemical and functional characterization of gum karaya seed meal[J]. Food Hydrocolloids, 2010, 24(5): 479−485.
[52] SALGADO C M D L P, CALDERÓN D G, CHANONA P J, et al. Chia seed mucilage release characterisation a microstructural and image analysis study[J]. Industrial Crops & Products, 2013, 51(8): 453−462.
[53] SEGURA C M, ACOSTA C Z, ROSADORUBIO G, et al. Whole and crushed nutlets of chia from Mexico as a source of functional gums[J]. Food Science and Technology, 2014, 34(4): 701−709.
[54] CMARA A, VIDAL V, SANTOS M, et al. Reducing phosphate in emulsified meat products by adding chia mucilage in powder or gel format: A clean label technological strategy[J]. Meat Science, 2020, 163: 108085.
[55] CMARA A, OKURO P K, SANTOS M, et al. Understanding the role of chia mucilage on olive oil-based emulsion gels as a new fat substitute in emulsified meat products[J]. European Food Research and Technology, 2020, 35(8): 1−14.
[56] ANA K, FERREIR A, IGNÁCIO C, et al. Satiety and *in vitro* digestibility of low saturated fat bologna sausages added of chia mucilage powder and chia mucilage-based emulsion gel[J]. Journal of Functional Foods, 2020, 65: 103753.
[57] FERNANDES S S, MERCEDES M L. Addition of chia seed mucilage for reduction of fat content in bread and cakes[J]. Food Chemistry, 2017, 227(15): 237−244.
[58] GALLO L, BOTELHO R B A, GINANI V C, et al. Chia gel as egg replacer in chocolate cakes: Applicability and microbial and sensory qualities after storage[J]. Journal of Culinary Science & Technology, 2018, 18(9): 1−11.
[59] GUIOTTO E N, MABEL C T, HAROS C M. Development of highly nutritional breads with by-products of chia seeds[J]. Foods, 2020, 9(6): 34−42.
[60] LUNA K G, ANSORENA D, ASTIASARÁN I. Flax and hempseed oil functional ingredient stabilized by inulin and chia mucilage as a butter replacer in muffin formulations[J]. Journal of Food Science, 2020, 85(1): 159−167.
[61] CAMPOS B E, RUIVO T D, SCAPIM M R D S, et al. Optimization of the mucilage extraction process from chia seeds and application in ice cream as a stabilizer and emulsifier[J]. LWT-Food Science and Technology, 2016, 65(26): 874−883.
[62] 刘婷婷, 张闪闪, 赵文婷, 等. 奇亚籽皮多糖对冰淇淋乳化稳定性及品质的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(10): 6. [LIU T T, ZHANG S S, ZHAO W T, et al. The effect of chia seed peel polysaccharides on the emulsification stability and quality of ice cream[J]. Food Science, 2021, 42(10): 6.]
[63] DARWISH A, SOHAIMY S A. Functional properties of chia seed mucilage supplemented in low fat yoghurt[J]. The Alexandria Medical Journal, 2018, 39(3): 450−459.
[64] RIBES S, PEA N, FUENTES A, et al. Chia (*Salvia hispanica* L.) seed mucilage as a fat replacer in yogurts: Effect on their nutritional, technological, and sensory properties[J]. Journal of Dairy Science, 2020, 104(3): 81−88.
[65] CHAVES M A, PIATI J, MALACARNE L T, et al. Extraction and application of chia mucilage and locust bean gum in goat milk frozen dessert[J]. Journal of Food Science and Technology, 2018, 55(10): 4148−4158.
[66] VIEIRA I S, SOUSA R M, OLIVEIRA A, et al. Polymeric blends of hydrocolloid from chia seeds/apple pectin with potential antioxidant for food packaging applications[J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 202(24): 203−210.
[67] OBAN Z E, N ERGÜR. Chia musilage coating: Applications with gojiberry extract for shelf-life extension of oncorhynchus mykiss and it's antibacterial and oxidative effects[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2020, 45(3): 132−139.
[68] COBAN M Z, COBAN O E. Potency and use of chia mucilage coating containing propolis liquid extract for improves shelf-life of sea bass fillets[J]. Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria, 2020, 19(3): 255−260.
[69] LDA J A, APS A, RDCB B, et al. Chia seed mucilage as a potential encapsulating agent of a natural food dye[J]. Journal of Food Engineering, 2020, 285: 110101.

李阳, 曹婷, 安琪, 等. 柑橘中黄酮类化合物的提取技术、功能特性及应用研究进展 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 439−446. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050020

LI Yang, CAO Ting, AN Qi, et al. Advance on Extraction Technology, Functional Properties and Application of Flavonoids in *Citrus*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 439−446. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050020

· 专题综述 ·

柑橘中黄酮类化合物的提取技术、功能特性及应用研究进展

李　阳[1], 曹　婷[2], 安　琪[1], 屈沙沙[1], 宋　悦[1], 范　刚[1,*], 任婧楠[1], 潘思轶[1]

（1.华中农业大学食品科学技术学院, 环境食品学教育部重点实验室, 湖北武汉 430070;
2.武汉食品化妆品检验所, 湖北武汉 430040）

摘　要: 柑橘中的黄酮类化合物是自然界存在的多酚类物质中占比最多的一类，是植物次生代谢产物，具有如抗氧化、抗癌、抗炎抑菌、抗衰老等多种对人体有益的生理作用。本综述介绍了柑橘中黄酮类化合物的种类以及包括溶剂浸提、超临界流体萃取、超声波辅助、酶法在内的多种有效提取方法。并在此基础上进一步对其所具有的抗氧化、抗炎抑菌、抗衰老等生理功能活性以及其最新应用等方面的研究进展进行了调研总结，以期为柑橘黄酮的深度开发及综合利用提供参考。

关键词: 柑橘, 黄酮类化合物, 提取, 功能特性

中图分类号: TS255.1　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0439−08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050020

本文网刊:

Advance on Extraction Technology, Functional Properties and Application of Flavonoids in *Citrus*

LI Yang[1], CAO Ting[2], AN Qi[1], QU Shasha[1], SONG Yue[1], FAN Gang[1,*], REN Jingnan[1], PAN Siyi[1]

（1.College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Key Laboratory of Environment Correlative Dietology, Ministry of Education, Wuhan 430070, China;
2.Wuhan Institute for Food and Cosmetic Control, Wuhan 430040, China）

Abstract: The flavonoids in *Citrus* are the most common type of polyphenols in nature. They are the secondary metabolites of plants. They have many beneficial physiological effects to the human body, such as antioxidant, anti-cancer, anti-inflammatory, anti-bacterial, and anti-aging. This review introduces the types of flavonoids in *Citrus* and a variety of effective extraction methods including solvent extraction, supercritical fluid extraction, ultrasonic assist, and enzymatic extraction. And on this basis, the research progress of its anti-oxidation, anti-inflammatory, antibacterial, anti-aging and other physiological functions, as well as the latest applications, etc. are investigated and summarized, in order to provide references for the in-depth development and comprehensive utilization of *Citrus* flavonoids.

Key words: *Citrus* ; flavonoids; extract; functional properties

全球范围内柑橘类水果的年产量高达 1.24 亿吨, 主要生产地集中在巴西、中国、印度及美国等[1]。每年, 全球加工业产生的如皮渣、种子和膜渣等柑橘废弃物超过了 5400 吨[2], 相当于 50%~60% 的果实质量。其中, 黄酮类化合物(flavonoids)是柑橘最重要的生理功能活性成分之一, 含量相对较高, 尤其是在柑橘属果皮、果肉以及种子中, 安全无毒, 易于分离。柑橘黄酮的化学结构是由 15 个碳原子组成的

收稿日期: 2021−05−08

基金项目: 湖北省重点研发计划项目（项目批号: 2020BBA049）。

作者简介: 李阳（1997−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 果蔬加工和风味化学, E-mail: 944343720@qq.com。

*** 通信作者:** 范刚（1982−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 果蔬加工和风味化学, E-mail: fangang@mail.hzau.edu.cn。

C_6-C_3-C_6骨架，骨架由两个苯环（A 环和 B 环）通过一个吡喃杂环（环 C）连接而成[3]，如图 1 所示。在过去的十年里，柑橘黄酮因其具有的众多对人体有益的生理功能而在实验研究中受到极大的关注，目前已被广泛应用于食品、医药、保健品以及化妆品等行业。

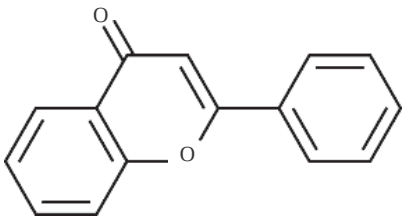


图 1 黄酮基本结构

Fig.1 The basic structure for flavonoid

本文介绍了黄酮类化合物的主要种类，并综述了近年来有关柑橘中黄酮类化合物的提取技术、功能活性以及应用现状的研究进展，旨在为柑橘黄酮进一步的开发利用提供参考。

1 柑橘中黄酮类化合物的种类

柑橘类水果中的黄酮类物质大致可分为两类，一是黄烷酮类化合物（flavanone），含量最高，大多以糖苷的形式存在，如橙皮苷（hesperidin）、芸香柚皮苷（narirutin）、新橙皮苷（neohesperidin）及柚皮苷（naringin）等[4]。上述几种黄烷酮化合物间的主要区别是黄酮母体结构 A 环-7 位和 C 环-3’、-4’位置上的取代基团不同，A 环-7 位以芸香糖苷和新橙皮糖苷为主，形成了如橙皮苷/新橙皮苷、芸香柚皮苷/柚皮苷等多种同分异构体。第二类是多甲氧基黄酮类化合物，它是柑橘属植物中的特有成分，可用作柑橘分类的标识物，较为常见的有川陈皮素（nobiletin，NOB）、橘皮素（tangeretin，TAN）以及甜橙黄酮（sinensetin）。它们之间的主要区别在于黄酮母体结构 A 环-8 位和 C 环-3’位甲氧基数目和位置不同。NOB 纯品是一类浅黄色结晶性粉末，经水解加氢可以得到柚苷二氢查耳酮，它的甜度约为蔗糖的 150 倍，甜味持久且安全性高，是新一代无毒、低能量、防龋齿的高甜度甜味剂[5]；TAN 纯品为白色晶体，难溶于水，易溶于乙醇、乙醚等有机溶剂；甜橙黄酮多存在于柑橘属植物的果实与果汁中，具有抗菌、抗炎以及抗癌等功效。目前，提取橘皮中黄酮类化合物的工艺逐渐多样，建立更加安全、有效及环保的提取方法也成为了黄酮开发、利用的研究热点。

2 柑橘中黄酮类化合物提取工艺的研究进展

分离和纯化是测定柑橘皮渣中黄酮类化合物浓度和生物活性的基础和前提。就分离目的而言，首选具有优异性能的先进技术，例如分离时间短、成本低、重现性以及自动化程度高[6]。目前对于黄酮类化合物提取工艺的研究，主要有溶剂浸提法、高效液相色谱法（HPLC）、超声波辅助提取法及酶法提取等。

2.1 溶剂浸提法

李继伟等[7]以柑橘皮渣为原料，分别选用石灰水、NaOH 溶液和乙醇作为提取剂，通过单因素实验和正交试验优化柑橘皮渣黄酮的提取条件。结合实验数据及后期纯化综合比较，发现将饱和石灰水稀释 4 倍后，采取液料比为 30 mL/g、90 ℃ 水浴 2 h 的实验条件，可以得到较高的提取率，为（5.15±0.03）mg/g。单飞狮等[8]采用乙醇-碱液法提取红橘果皮中的橙皮苷，通过正交试验探究其最优提取工艺，所得橙皮苷产率为 3.63%。与现有的其他醇类或醚类提取黄酮类化合物的方法相比[9]，使用乙醇-碱液作为提取剂的优势在于提取所得橙皮苷的紫外与红外光谱图更加接近标品，为橙皮苷未来的工业化提取提供了参考。MIYAKE 等[10]考察了不同浓度的乙醇溶液对柑橘中多甲氧基黄酮（Polymethoxylated flavones，PMFs）的萃取效率，结果表明，75% 浓度的乙醇浓度可以做到完全提取。此外，PMFs 的提取率还受到温度的影响，在一定范围内温度越高，提取率越高。溶剂浸提相对于其他高新技术，是较为传统且应用较多的提取方法。其最大的不足就是耗时较长，同时大量提取剂的回收也是阻碍溶剂浸提技术广泛应用的难题，因此在未来还需不断对溶剂浸提法进行改进或者与其他技术联用才能避免在众多提取方法中被淘汰。

2.2 超临界流体萃取法

吕凛等[11]使用超临界CO_2萃取柑橘皮中的黄酮类化合物，经过单因素实验确定了影响提取效果的主要因素依次为夹带剂用量、萃取压力、萃取温度及萃取时间，最终所得的柑橘黄酮提取率为 2.723%。姜泽放等[12]以柑橘属植物海南山柚为原料，使用超临界流体萃取技术萃取山柚油，当萃取温度为 40 ℃，萃取压力为 25 MPa，萃取流量为 20 L/min，萃取时间为 90 min 的条件下，萃取率达到最大，为 80.05%。超临界流体萃取与传统溶剂提取法相比，由于其高扩散性和低黏度性，使得超临界流体能够迅速渗透进入复杂基质的孔隙中，从而大大提高提取效率。另外，超临界流体萃取得到的提取物在减压之后能够被高度浓缩，可以大大缩短提取周期，实现高效、快速连续提取，是一种公认的绿色提取方法。

2.3 超声波辅助提取法

超声处理的过程是通过空化现象在液体介质中传输大于 16 kHz 的超声波，具有高强度的功率特性[13]。IDARESIT 等[14]研究了使用超声波对食品级溶剂中的黄酮类化合物芦丁产生的影响，实验对经过超声处理后样品溶剂中的总酚含量进行了测量，结果发现与超声处理前相比，总酚含量提升了超过 56%。这是由于芦丁水解为槲皮素、3,4 二羟基苯甲酸、儿茶酚以及山奈酚等衍生物所导致的[15−16]，而槲皮素具有比芦丁更高的抗氧化活性（2.3 倍）[17]。因此，可以证实使用超声处理具有增加芦丁水解为其苷元以及抗氧化的能力。此外，超声波处理还增加了芦丁的左旋对

映体[14]，可用于进一步改变其他食品成分的物理化学性质。

党娅等[18]利用超声波辅助提取橘皮中的黄酮类化合物，并探讨了超声波频率、溶剂浓度、提取时间、提取温度及料液比对于提取效果的影响，从单因素实验数据来看，超声波频率 25.5 kHz、乙醇浓度 60%、提取时间 40 min、提取温度 75 ℃ 及料液比 1∶10(g/mL)时，提取效果最好。低共熔溶剂(Deep eutectic, DES)，是指由一定化学计量比的氢键受体(如季铵盐)和氢键供体(如酰胺、羧酸和多元醇等化合物)组合而成的两组分或三组分低共熔混合物[19]，其凝固点显著低于各个组分纯物质的熔点，是一种快速兴起的替代传统溶剂和离子液体的新型绿色溶剂。刘丹宁等[20]利用超声波辅助低共熔溶剂提取枳实中的芸香柚皮苷、柚皮苷和橙皮苷，当超声功率升高时，可以促进细胞壁的破碎，有利于有效成分的溶出，但若功率过高，热效应则会导致有效成分被破坏。实验首先合成了 16 种低共熔溶剂，随后经由单因素实验以及 Box-Behnken(BBD)优化，结果证明，氯化胆碱/醋酸低共熔溶剂提取枳实黄酮的效果最好。超声波辅助提取法的工艺成本低，提取效果相较于传统的提取方法更加快捷，效果更好。

2.4　酶法提取

酶法提取的反应条件需要严格控制，即使条件微小的波动，也有可能引起酶活性的下降。实验中所用到的酶可能会与溶剂中的其他化学物质发生反应，从而影响反应速率和产物纯度。故实验室或工业生产中，多采用酶法与其他技术联合的方式进行提取，发挥协同作用，提高有效成分的提取效率。李建凤等[21]首先利用超声波辅助法提取夏橙中的橙皮苷，得出最优提取工艺，随后按照最佳工艺配比进一步使用纤维素酶对样品进行预处理，混合均匀并用保鲜膜封住瓶口酶解一段时间后再次测量，数据显示橙皮苷的提取率由之前的 3.18% 上升到了 3.71%，且试验重现性好。任明等[22]在碱提酸沉法的基础上，利用纤维素酶、木聚糖酶、蛋白酶、果胶酶等降解枳实细胞壁及间质成分，打开细胞结构对橙皮苷的包裹，进而促进有效成分的溶出，这是将复合酶法应用于黄酮类化合物提取的首次探索。酶反应可以温和地将植物组织分解，较大幅度提高收率，故酶法提取不失为一种最大限度从植物体内提取有效成分的方法，是一项很有前途的新技术。

2.5　其他方法

除上述提取方法之外，提取柑橘黄酮还有亚临界水萃取、分子印迹技术、闪式提取等方法。亚临界水萃取技术是以亚临界状态的水为溶剂，通过改变温度和压力使水在较高温度下保持液态，同时改变水的极性使其介电常数接近有机溶剂，能让中性乃至非极性的组分可以溶解于水中的一种绿色萃取技术[23]。齐兵等[24]采用亚临界水萃取技术提取陈皮中的橙皮苷，设定提取温度为 140 ℃、压力为 6 MPa、流速为 40 mL/min、提取时间为 100 min 时，橙皮苷提取率最大，为(3.54%±0.05%)，相较于传统的乙醇热回流法，亚临界水流体萃取缩短了提取时间，柑橘黄酮得率高且无溶剂残留，为实现天然产物的绿色、高效工业化提取提供了新的路径。另外，SHAO 等[25]首次将分子印迹固相萃取整体柱与高效液相色谱联用，用于柑橘果肉中橙皮素(hesperitin, HES)的提取。谢捷等[26]利用闪式提取器高速转动时所产生的巨大机械剪切作用、振动作用和负压涡流，将陈皮的细胞组织破碎，从而提取组织内的橙皮苷。结果显示经闪式提取处理的橙皮苷得率为 6.35%。

从上文中所提到的几种针对黄酮类化合物最常见的提取方法中可以看出，溶剂提取法尽管较为常见，但是效率偏低且污染较严重。超临界流体萃取法相对而言更加绿色环保，快速高效，缺点是成本较高。超声波辅助提取法能够加快提取速度，与其他几种提取方法配合使用可以达到较好的效果。酶法提取较为温和，在未来有很大的发展前景。但是总体而言，当前有关柑橘黄酮的提取技术仍局限在实验室阶段，工业化程度不高。这与其提取成本较高有紧密关系，若能进一步的优化黄酮类化合物提取工艺体系，提高终产物的产量，推动黄酮类化合物研究从实验室向工业化、连续化生产转变，这将使得果蔬黄酮得到大规模应用，经济效益可观。

3　柑橘中黄酮类化合物功能活性的研究进展

3.1　抗氧化活性

在过去的几十年里，柑橘黄酮的抗氧化能力已经通过例如 DPPH 和 ABTS 自由基清除能力试验等各种体外自由基清除试验得到证实[27]。杨雪妍[4]选用大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞 PC12 为实验样本，以高浓度的谷氨酸(Glu)来建立神经细胞氧化损伤模型，模拟体内毒性兴奋状态，通过检测荧光信号的淬灭强度来检测四种柑橘黄酮，即 NOB、TAN、HES、柚皮素(naringenin, NAR)抑制自由基的能力。抗氧化活性的强弱通过待测样品的氧自由基吸收能力(ORAC)来判别，其中，以 NOB 的 ORAC 值最高，活性最强；HES、NAR 次之，TAN 的 ORAC 值最低。由此可见，柑橘中的黄酮类化合物单体具有良好的抗氧化活性。文红波等[28]以甲醇为溶剂提取柑橘皮总黄酮，通过体外抗氧化活性研究结果表明，柑橘黄酮的自由基清除能力随提取剂浓度的增加而增强，且对超氧阴离子自由基($O_2^-\cdot$)和二苯代苦味酰基苯肼(DPPH·)自由基的清除率均高于对照物芦丁。

陈庆菊[29]研究了柑橘黄酮对于仔猪血清抗氧化功能的影响，试验选取 50 头 28 日龄健康的断奶仔猪，将其随机分为 5 组，经过 28 d 的单栏饲养后发现，柑橘黄酮能够显著提高仔猪血清和肝脏中的总抗氧化能力(T-AOC)以及过氧化氢酶(CAT)与总超氧化物歧化酶(T-SOD)的含量，同时显著降低了血清和

肝脏中的丙二醛(MDA)含量。MDA 是脂质过氧化的代谢产物,可反映细胞膜被氧化的程度,表明在仔猪日粮中添加柑橘类黄酮能够促进血清中的抗氧化酶将超氧自由基转化为水,从而达到清除自由基目的,使细胞免受氧化损伤。经过张华等[30] 对柑橘果实中主要酚类物质抗氧化活性的比较,总结出柑橘黄酮的抗氧化活性强弱与结构中的酚羟基数目有关,酚羟基数目越多,则抗氧化活性越强。

3.2 抗炎抑菌

急性肺损伤(ALI)是一种低氧性呼吸衰竭,其症状主要表现为肺部炎症、中性粒细胞积聚及气体交换受损等[31]。MA 等[32] 研究探讨了柑橘中所含有的 HES 对于大鼠因呼吸机所致的急性肺损伤的保护作用。大鼠在机械通气诱导急性肺损伤前 2 h 口服 HES(含量分别为 10、20 或 40 mg/kg)。然后按照不同条件将其分为六个实验组,结果显示,HES 对通气诱导的肺损伤有保护作用,这种抗炎作用源于其增加过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR)-γ 的表达和抑制核因子-κB 途径的激活的能力。这些结果表明,HES 可能是一种用于保护呼吸机诱导的急性肺损伤的潜在新型治疗候选物。

丘晓花等[33] 使用乙酸乙酯溶剂萃取经过甲醇浸泡后的柑橘皮中的黄酮类化合物,经过打孔法和最低浓度抑菌法(MIC)的验证,得出其对于大肠杆菌(*E.coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)以及绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)均具有较好的抑菌性。钟桂云等[34] 测定了柑橘干燥果皮中黄酮类提取物对禾谷镰孢菌(*Fusarium graminearum*)、番茄早疫病菌(Tomato Early Blight)等 7 种病菌的杀菌活性,由普筛结果可以发现柑橘黄酮对芦笋茎枯(*Asparagus* stem blight)、水稻纹枯(*Rhizoctonia solani*)以及水稻曲(*Aspergillus oryzae*)三种病菌均具有很强的抑制作用,杀灭率为 100%,对剩余 4 种病菌也具有中等强度的抑制作用。柑橘黄酮关于抗炎抑菌的特性,在日化产业领域的应用前景十分广阔。国内外已有部分企业尝试将柑橘黄酮添加到牙膏产品中,对于治疗牙龈炎起到了很好的效果。

3.3 抗衰老

秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*)是最简单的真核生物之一,也是研究衰老通路应用最广泛的生物模型。杨雪妍[4] 以线虫为实验对象,选用柑橘中各项活性都较高的 NOB 进行抗衰老活性检测。首先使用不同浓度(3.13、6.25、12.5 μmol/L)的 NOB 处理线虫,并比较它们与对照组之间线虫的寿命及宏观生命表征差异,包括运动力、脂褐素含量、体长、产卵量等。结果显示 NOB 可显著延长线虫的寿命,同时还可以改善在衰老过程中线虫的各项指标健康水平。另外,NOB 对于线虫的体长和繁殖能力没有显著影响,为后续保健食品的开发提供了非常好的理论数据和发展方向。POZZO 等[35] 发现柑橘中的 NAR 还能预防心脏细胞的衰老。通过建立衰老心肌细胞模型,使用比色、荧光和免疫测定技术的评估发现,例如 X-gal 染色、细胞周期调节剂水平等相关的衰老标记,在 NAR 的存在下显著降低。这一发现为未来将柑橘中的 NAR 应用于保健食品中奠定了基础。

毛玉霞[36] 将 30 只 12 月龄的老年小鼠分为两组,分别使用生理盐水与黄酮类化合物给小鼠灌胃,观察小鼠体内超氧化物歧化酶(SOD)与谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性以及小鼠穿越平台的次数。结果显示,服用了柑橘中存在的黄酮类化合物的研究组小鼠 SOD 及 GSH-Px 酶活性明显低于服用生理盐水的对照组,研究组小鼠穿越平台次数也明显少于对照组。说明黄酮类化合物对于衰老小鼠的学习记忆功能具有一定的改善和提高作用,在一定程度上减少了脑内炎症,有明显的抗衰老作用,为未来对抗神经炎性反应和神经退行性变的药物研制提供了一个很好的选项。

3.4 神经保护活性

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是常见的中老年神经系统退行性疾病,其发病机理与人体内黑质多巴胺能神经元的进行性退化和成人脑中纹状体多巴胺及其代谢物水平的降低有关[37]。最近的研究已经确定过量活性氧(ROS)产生诱导的氧化应激广泛参与了帕金森的发病机制,这种氧化还原的平衡遭到任何程度的破坏都会导致黑质纹状体多巴胺通路的神经退化和神经功能障碍。KIM 等[38] 建立了体内和体外的帕金森病模型,研究了柑橘黄酮(柚皮素和橙皮苷)的神经保护活性。结果显示 NAR 和橙皮苷都可以穿过血脑屏障,防止神经元退化,对神经变性起到保护作用[39]。另外,还可通过抑制 α-突触聚集、诱导神经营养因子和抑制神经毒性炎症来保护黑质纹状体多巴胺系统[40−42],在日常膳食中适当补充黄酮类化合物有望起到对于帕金森病预防和治疗的作用。张海萍等[43] 的研究发现柑橘黄酮可通过下调 SNHGl 表达来促进 1-甲基-4-苯基-吡啶离子(MPP^+)诱导 SH-SY5Y 细胞增殖,并抑制其凋亡,证实了黄酮类化合物可作为治疗帕金森的潜在药物,但其具体作用机制还有待深入研究。

阿尔茨海默病(Alzheimer's Disease, AD)是一种常见的以进行性认知功能障碍、记忆损害和行为异常为特征的神经退行性疾病,其病理特征之一为老年斑沉积。β-淀粉样蛋白(Aβ)是 AD 老年斑的主要成分,它能够抑制海马神经元细胞蛋白激酶 A(PKA)的磷酸化和谷氨酸受体 1(GluR1)的跨膜运输。YAMAKUNI 等[44] 的体外实验证实,柑橘黄酮川陈皮素可以逆转这种抑制作用,从而减轻 Aβ 对神经元的损伤,起到预防 AD 的神经保护作用。此外,毕俊英[45] 从柑橘果皮中提取出 NOB,并探索其对麻醉后大鼠学习记忆功能损伤的调节作用。结果显示 NOB

能够显著降低这种损害，且较大剂量的 NOB 改善作用更为明显。NOB 能够防治 AD 这一作用机理的揭示，不仅为传统中药药理提供了科学依据，而且还有益于进一步推动开发利用我国丰富的柑橘资源。

3.5　抗血小板过度聚集作用

血小板是血液的一种成分，是最小的非核血细胞，其功能（与凝血因子一起）是通过凝块对血管损伤出血作出反应，从而引发血凝块。然而，若血小板过度聚集则容易引发心血管疾病，特别是可能增加患冠心病的风险，所以必须严格控制聚集过程。ZARAGOZA 等[46] 探究了柑橘中所含有的 NAR、柚皮苷以及香豆素类药物抑制血小板活性的作用，试验从 40 名健康的不吸烟者身上采集血液，分别测定柚皮苷、NAR 等与 GPIIb/IIIa 受体结合的百分比。结果表明，柚皮苷呈现出最大的抗血小板活性，在血小板受体中所占的百分比为（14.82%±0.81%），另外，NAR、七叶亭也表现出显著的抗血小板能力和一些受体结合能力，香豆素抗血小板和受体结合能力相对较低。

此外，黄曼婷等[47] 比较了柑橘中不同种类黄酮抑制血小板的活性强弱，通过比浊法检测 TAN、NOB 等六种成分在大鼠富血小板血浆（PRP）或洗涤血小板中对二磷酸腺苷（ADP）诱导的大鼠血小板聚集的抑制作用。结果表明 NOB 的抑制作用最强，橘红素次之，随后是 HES、NAR、橙皮苷以及柚皮苷。根据以上研究推断，柑橘黄酮有望成为破坏血小板聚集的天然调节剂和抗血小板药物。但目前许多关于柑橘类水果抗血小板潜力的研究都还受到体外观察浓度和体内生理血浆浓度之间缺乏联系的限制，在未来还需要对柑橘类黄酮的抗血小板潜能进行更加详细特别是基于体内模型的研究[48]。

4　柑橘中黄酮类化合物的应用现状

随着社会的进步和食品工业的发展，人们的消费水平提高，更加注重健康养生，饮食营养均衡。人体获取黄酮类化合物的唯一途径就是通过食品摄入。果蔬黄酮以其成分的天然、安全性，且具有抗氧化、抗炎及调节内分泌等多种生理活性功能优势，逐渐成为人们选购保健食品、药品等产品时的目标，市场上相关品牌也逐渐增多。除此之外，柑橘黄酮还可作为添加剂用于化妆品行业、肉类果蔬保鲜以及饲料加工等方面。这些产品在调节人体生理功能，预防疾病，提高人们的生活质量，为食用者带来健康体魄方面都具有重要作用。

4.1　食品、化妆品添加剂

柑橘类黄酮在功能性食品、膳食补充剂、功能饮料开发等方面的优势显著。从柑橘属黄酮新橙皮苷中衍生氢化得到的新橙皮苷二氢查耳酮（Neohesperidin dihydrochalcone, NHDC）的甜度为蔗糖的 950 倍，热量小，余味持久，可直接用作食品、医疗及饲料等领域的功能性甜味剂[49]。从酸橙中分离出的黄酮糖苷新地奥明，可以抑制水果在加工过程中由于柚皮苷和柠檬苦素（Limonin）所带来的苦味。若考虑将新地奥明复配与环糊精包合，有望作为苦味抑制剂改善橘子果酒的风味[50]。除此之外，有试验证明将柑橘黄酮中的柚皮苷作为抗氧化剂添加到植物油中时，可以有效延长植物油的稳定性，且风味要强于 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚（BHT）。另外，由于柑橘黄酮的抑菌性，还可用作食品防腐剂，延长食品的保藏期[51]。

牛丽娜等[52] 利用柑橘黄酮提取物制作保湿护肤霜，分别测定不同时间段受试者皮肤的含水量，以此来验证柑橘保湿霜的保湿作用。占晨等[53] 将黄酮加入到美白霜化妆品中，挑选志愿者进行半脸试用，试验 8 周后对美白霜的理化性质及使用效果进行检测，比较志愿者使用美白霜前后脸部色泽的变化。验证了含有黄酮类化合物的化妆品具有美白效果，且无毒无副作用，制备工艺简单可行。

4.2　肉类、果蔬保鲜

众所周知，柑橘黄酮具有抑菌、抗氧化等功能，从植物中提取生理活性成分应用于肉类及果蔬的保鲜，既能延长产品货架期又对人体无副作用，因此成为近几年的研究热点。姚晓琳等[54] 利用从柑橘中提取出的 PMFs 良好的抑菌活性，将制备好的 PMFs 溶液对鲜猪肉进行均匀涂膜处理，并采用 PE 有氧包装形式，选取肉质色泽、pH、细菌总数等作为判断猪肉新鲜程度和品质变化指标，结果显示，经 PMFs 涂膜后的冷却肉保质期可达 8 d，且对肉色无不良影响，与气调包装的保鲜效果接近[55]。

王晓君[56] 研究了橙皮黄酮对于番茄的保鲜效果，用 75% 的乙醇溶液配制成不同浓度的柑橘黄酮溶液均匀喷涂到纸上制成橙皮黄酮保鲜纸（OPF 保鲜纸），将其晾干后进行番茄的单果包装，放入最适温度（10±1）℃ 下贮藏，每隔三天测定一次指标。根据结果可以看出使用了 OPF 保鲜纸包装的番茄相较于没有任何包装普通贮藏的番茄，水分散失量和硬度下降，呼吸强度减弱，说明黄酮类化合物延迟了番茄呼吸高峰的到来时间，抑制丙二醛（MDA）含量的增加同时保持着较高的活性酶活，减缓了番茄在贮藏期膜脂的氧化速率，从而增强番茄在贮藏期间的抗衰老能力，对番茄起到良好的保鲜作用，具有一定的现实意义。

4.3　保健品成分

NAR 是一种存在于柑橘皮渣中的黄酮类化合物，美国路易斯安那州立大学生物医学研究中心最近的一项研究表明，NAR 能够激活那些负责改善血糖控制和增加燃烧热量的基因，有助于人体维持健康体重[57]。流行病学研究表明，摄入黄酮类化合物可降低肥胖诱发的炎症。SILVEIRA 等[58] 将 35 名健康志愿者分为正常体重组与超重组，将柑橘榨汁，并让所有志愿者连续 8 周每日饮用富含黄酮类化合物的柑橘汁，分别在最初和最后一天进行临床和生化评估，对比前后数据发现两组志愿者在食用红橙汁后的腹型肥胖无变化，但低密度脂蛋白胆固醇、C-反应蛋白

下降(CRP),血清抗氧化活性增加。正常体重组志愿者的胰岛素抵抗和收缩压降低,超重志愿者的舒张压降低。红橙汁在试验中显示出抗炎、抗氧化和降脂的特性,可以防止代谢综合征的发展,添加至保健品中有较好效果。

4.4 家禽饲料成分

由于肉用鸡(肉鸡)生长速度的遗传选择以及饲养它们的环境条件等因素,使得肉用鸡非常容易受到氧化应激的影响,在这种状态下,鸡体内活性氧(ROS)和活性氮(RNS)的产生已经超过了其自身抗氧化系统的清除能力,这会为家禽的产量与健康带来不良影响[59]。RAFIEIA 等[60] 研究发现将柑橘中所含有的黄酮类化合物作为天然抗氧化剂加入到肉用鸡饲料中,既可以减轻肉用鸡的氧化应激现象同时又可以提高黄酮类化合物的生物利用度。槲皮素(Quercetin)属于柑橘黄酮中的黄酮醇类。BHUTTO 等[61] 的试验发现槲皮素以剂量依赖的方式增加肉用鸡对 P-糖蛋白的吸收和过度表达。GOLIOMYTIS 等[62] 在肉用鸡饲料中分别掺入了 0.5 和 1 g/kg 的槲皮素,研究报告称槲皮素能够通过降低脂质过氧化率延长了饲料的货架期。目前,槲皮素已经被广泛用作鸡饲料中的植物添加剂,以改善禽类的生长性能和肉质。综上所述,将柑橘果皮适量的添加到家禽饲料中,其中的有效成分可改善动物的生产性能及畜产品品质,节约饲料资源,降低饲料成本,具有明显的生态效益。

5 总结与展望

本文围绕柑橘中黄酮类化合物的提取技术、生理功能活性以及最新应用现状这三个方面的研究进展进行论述,从以上调查总结中可以得出提取黄酮类化合物常见的方法有:溶剂浸提、超临界CO_2流体萃取、超声波、复合酶辅助提取法等,且柑橘中黄酮类化合物具有抗氧化、抗炎抑菌、抗衰老以及抗血小板过度聚集等多种生理功能活性,依据其众多优良特性可将其应用于膳食补充剂、果蔬保鲜以及家禽饲料加工等各个方面,开发前景良好,利用价值极高。然而未来亟需解决的问题仍然存在,由于柑橘黄酮不同分子结构的异质性和生物利用度数据的缺乏,且没有足够的方法来测量人体内的氧化损伤,有关长期摄入黄酮类化合物会对人体造成什么影响等方面的问题,客观终点的测量仍然是困难的。因此,需要改进分析技术,进行分子对接研究,以提高柑橘黄酮在饮食中的有效性,从而改善人类健康。我国柑橘资源的丰富为柑橘黄酮的综合利用提供了物质基础,提高柑橘加工业的附加值,推动“零浪费”柑橘产业的发展,具有重大的现实意义和经济意义。

参考文献

[1] FAO. *Citrus* fruit fresh and processed[R]. Statistical Bulletin, 2017.

[2] MAHATO N, SINHA M, SHARMA K, et al. Modern extraction and purification techniques for obtaining high purity food-grade bioactive compounds and value-added co-products from *Citrus* wastes[J]. Foods, 2019, 8: 1.

[3] HOSSAIN M K, DAYEM A A, HAN J, et al. Molecular mechanisms of the anti-obesity and anti-diabetic properties of flavonoids[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17: 569.

[4] 杨雪妍. 柑橘黄酮抗氧化、抗增殖及抗衰老活性研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2020. [YANG X Y. Research on anti-oxidative, anti-proliferative and anti-aging activities of *Citrus* flavonoids [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2020.]

[5] 王刚, 蔡才, 王亚珍, 等. 新橙皮苷二氢查耳酮的合成工艺及应用进展[J]. 江汉大学学报 (自然科学版), 2020, 48(1): 37−44. [WANG G, CAI C, WANG Y Z, et al. Synthetic technology and application progress of neohesperidin dihydrochalcone[J]. Journal of Jianghan University (Natural Science Edition), 2020, 48(1): 37−44.]

[6] PEREIRA C G, LUDWIG I A, POLYVIOU T, et al. Identification of plasma and urinary metabolites and catabolites derived from orange juice (poly) phenols: Analysis by high performance liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64: 5724.

[7] 李继伟, 任璇, 周绍庆. 柑橘皮黄酮石灰水提取工艺及果胶去除效果的研究[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(10): 101−104. [LI J W, REN X, ZHOU S Q. Study on the extraction technology of *Citrus* peel flavonoids with lime water and the removal effect of pectin[J]. Food Research and Development, 2019, 40(10): 101−104.]

[8] 单飞狮, 张东钫, 杨敏. 乙醇-碱液回流法提取红橘果皮中橙皮苷工艺研究[J]. 绵阳师范学院学报, 2018, 2(37): 66−71. [SHAN F S, ZHANG D F, YANG M. Study on extraction process of hesperidin from red orange peel by ethanol-lye reflux method[J]. Journal of Mianyang Normal University, 2018, 2(37): 66−71.]

[9] 区晓云, 王浩, 谢宝谊, 等. 紫外光谱检测下陈皮中橙皮苷的提取工艺研究[J]. 食品科学, 2010, 35(8): 265−267. [QU X Y, WANG H, XIE B Y, et al. Study on the extraction process of hesperidin from tangerine peel by ultraviolet spectroscopy[J]. Food Science, 2010, 35(8): 265−267.]

[10] MIYAKE Y. Characteristics of flavonoids in niihime fruit-a new sour *Citrus* fruit[J]. Food Science & Technology International, 2006, 12(3): 186−193.

[11] 吕凛, 陶宁萍. 超临界二氧化碳萃取橘皮中黄酮类化合物的工艺研究[J]. 食品科学, 2008, 29(9): 150−154. [LV L, TAO N P. Study on the technology of supercritical carbon dioxide extraction of flavonoids from orange peel[J]. Food Science, 2008, 29(9): 150−154.]

[12] 姜泽放, 林敏, 李雪, 等. 超临界萃取山柚油及其 Sn-2 位脂肪酸的测定[J]. 食品安全与检测, 2019, 1(44): 330−335. [JIANG Z F, LIN M, LI X, et al. Supercritical extraction of grapefruit oil and determination of Sn-2 fatty acid[J]. Food Safety and Testing, 2019, 1(44): 330−335.]

[13] ZHU F. Impact of ultrasound on structure, physicochemical properties, modifications, and applications of starch[J]. Trends in

Food Science & Technology, 2015, 43: 1.
[14] IDARESIT E, SALDAÑA M. Ultrasound processing of rutin in food-grade solvents: Derivative compounds, antioxidant activities and optical rotation[J]. Food Chemistry, 2021: 344.
[15] KIM D S, LIM S B. Optimization of subcritical water hydrolysis of rutin into isoquercetin and quercetin[J]. Preventive Nutrition and Food Science, 2017, 22: 131.
[16] RAVBER M, KNEZ Z, ŠKERGET M. Optimization of hydrolysis of rutin in subcritical water using response surface methodology[J]. The Journal of Supercritical Fluids, 2015, 104: 145.
[17] SCHERER R I, GODOY H T. Effects of extraction methods of phenolic compounds from *Xanthium strumarium* L. and their antioxidant activity[J]. Revista Brasileira De Plantas Medicinais, 2014, 16: 41.
[18] 党娅, 耿静章. 超声波辅助提取橘皮中黄酮类化合物[J]. 食品研究与开发, 2012, 10(33): 10−13. [DANG Y, GENG J Z. Ultrasonic assisted extraction of flavonoids from orange peel[J]. Food Research and Development, 2012, 10(33): 10−13.]
[19] ABBOTT A P, CAPPER G, DAVIES D L, et al. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures[J]. Chemical Communications, 2003, 9: 70.
[20] 刘丹宁, 黄洁瑶, 杨璐嘉, 等. 超声波辅助低共熔溶剂提取枳实中芸香柚皮苷、柚皮苷和橙皮苷[J]. 中药材, 2020, 1(43): 155−160. [LIU D N, HUANG J Y, YANG J L, et al. Ultrasonic-assisted eutectic solvent extraction of ruta naringin, naringin and hesperidin from fructus aurantii[J]. Chinese Herbal Medicine, 2020, 1(43): 155−160.]
[21] 李建凤, 廖立敏. 纤维素酶-超声波法提取夏橙皮橙皮苷[J]. 食品工业, 2019, 2(40): 39−42. [LI J F, LIAO L M. Extraction of hesperidin by cellulase-ultrasonic method[J]. Food Industry, 2019, 2(40): 39−42.]
[22] 任明, 刘建民, 孙荣. 酶法提取枳实中橙皮苷工艺研究[J]. 食品与药品, 2019, 3(21): 206−209. [REN M, LIU J M, SUN R. Study on enzymatic extraction of hesperidin from fructus aurantii [J]. Food and Medicine, 2019, 3(21): 206−209.]
[23] NERMIN S K. Organic reactions in subcritical and supercritical water[J]. Tetrahedron, 2012, 68: 949−958.
[24] 齐兵, 何志勇, 秦舫. 亚临界水萃取陈皮中橙皮苷的工艺研究[J]. 食品工业科技, 2013, 12(34): 225−228. [QI B, HE Z Y, QIN F. Study on the technology of subcritical water extraction of hesperidin from tangerine peel[J]. Food Industry Technology, 2013, 12(34): 225−228.]
[25] SHAO H K, ZHAO L G, CHEN J, et al. Preparation, characterization and application of molecularly imprinted monolithic column for hesperetin[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2016, 111: 241−247.
[26] 谢捷, 曹铭希, 朱兴一, 等. 响应面法优化闪式提取陈皮中橙皮苷工艺的研究[J]. 食品工业科技, 2019, 10(32): 285−288. [XIE J, CAO X M, ZHU X Y, et al. Optimization of flash extraction process for hesperidin from tangerine peel by response surface methodology[J]. Food Industry Technology, 2019, 10(32): 285−288.]
[27] ZOU Z, XI W P, HU Y, et al. Antioxidant activity of *Citrus* fruits[J]. Food Chemistry, 2016, 196: 885.
[28] 文红波, 吴玉兰, 李斌元, 等. 甲醇提取柑橘皮总黄酮及其体外抗氧化活性研究[J]. 微量元素与健康研究, 2012, 29(6): 1−4. [WEN H B, WU Y L, LI B Y, et al. Study on extraction of total flavonoids from *Citrus* peel by methanol and its antioxidant activity *in vitro*[J]. Research on Trace Elements and Health, 2012, 29(6): 1−4.]
[29] 陈庆菊. 柑橘黄酮对断奶仔猪生长性能、抗氧化功能和肠道健康的影响研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2020. [CHEN Q J. Effects of *Citrus* flavonoids on growth performance, antioxidant function and intestinal health of weaned piglets[D]. Chongqing: Southwest University, 2020.]
[30] 张华, 周志钦, 席万鹏, 等. 15 种柑橘果实主要酚类物质的体外抗氧化活性比较[J]. 食品科学, 2015, 11(26): 64−70. [ZHANG H, ZHOU Z Q, XI W P, et al. Comparison of antioxidant activity of main phenolic compounds in 15 *Citrus* fruits *in vitro*[J]. Food Science, 2015, 11(26): 64−70.]
[31] REDDY N M, SURYANARAYA V, YATES M S, et al. The triterpenoid CDDO-imidazolide confers potent protection against hyperoxic acute lung injury in mice[J]. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2009, 180: 867.
[32] MA H, FENG X, DING S. Hesperetin attenuates ventilator-induced acute lunginjury through inhibition of NF-κB-mediated inflammation[J]. European Journal of Pharmacology, 2015, 769: 333.
[33] 丘晓花, 冯明英, 李燕, 等. 柑橘皮提取物体外抑菌活性的研究[J]. 中国民族民间医药, 2011, 20(10): 31−32. [QU X H, FENG M Y, LI Y, et al. Study on antibacterial activity of *Citrus* peel extract *in vitro*[J]. Chinese Folk Medicine, 2011, 20(10): 31−32.]
[34] 钟桂云, 郑晓瑞. 新会陈皮黄酮类化合物的提取及其杀菌抗肿瘤活性研究[J]. 云南化工, 2020, 47(8): 65−66. [ZHONG G Y, ZHENG X R. Study on the extraction of flavonoids from tangerine peel and its bactericidal and antitumor activity[J]. Yunnan Chemical Industry, 2020, 47(8): 65−66.]
[35] POZZO E D, COSTA B, CAVALLINI C, et al. The *Citrus* flavanone naringenin protects myocardial cells against age-associated damage[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2017, 2017: 9536148.
[36] 毛玉霞. 黄酮类化合物抗炎免疫及抗衰老药理研究分析[J]. 实验研究, 2018, 1(17): 39−40. [MAO Y X. Analysis of flavonoids anti-inflammatory immunity and anti-aging pharmacological research[J]. Experimental Study, 2018, 1(17): 39−40.]
[37] HAYES M T. Parkinson's disease and parkinsonism[J]. The American Journal of Medicine, 2019, 7: 802.
[38] KIM T Y, LEEM E, LEE J M. Control of reactive oxygen species for the prevention of Parkinson's disease: The possible application of flavonoids[J]. Antioxidants, 2020, 9: 583.
[39] KHAN A, IKRAM M, HAHM J R, et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Citrus* flavonoid hesperetin: Special focus on neurological disorders[J]. Antioxidants, 2020, 9: 609.
[40] ZHU Q, ZHUANG X, LU J. Neuroprotective effects of baicalein in animal models of Parkinson's disease: A systematic review of experimental studies[J]. Phytomedicine, 2019, 55: 302.
[41] MAHER P. Protective effects of fisetin and other berry

flavonoids in Parkinson ’s disease[J]. Food & Function, 2017, 8: 3033.

[42] LEEM E, NAM J H, JEON M T, et al. Naringin protects the nigrostriatal dopaminergic projection through induction of GDNF in a neurotoxin model of Parkinson’s disease[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2014, 25: 801.

[43] 张海萍, 袁梅, 蒋玲, 等. 柑橘黄酮对帕金森病模型细胞增殖和凋亡的影响研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(5): 555−559. [ZHANG H P, YUAN M, JIANG L, et al. Effect of *Citrus* flavonoids on cell proliferation and apoptosis in Parkinson's disease models[J]. Chinese Journal of Clinical Pharmacology, 2020, 36(5): 555−559.]

[44] YAMAKUNI T, NAKAJIMA A, OHIZUMI Y. Preventive action of nobiletin, a constituent of aurantiin nobilis pericarpium with anti-dementia activity, against amy-loid-beta peptide-induced neurotoxicity expression and memory impairment[J]. Yakugaku Zasshi, 2010, 130(4): 517−520.

[45] 毕俊英. 川陈皮素改善麻醉后老龄大鼠学习记忆功能损伤的机制研究 [D]. 济南: 山东大学, 2019. [BI J Y. Study on the mechanism of nobiletin on improving the learning and memory impairment of aged rats after anesthesia[D]. Jinan: Shandong University, 2019.]

[46] ZARAGOZA C, MONSERRAT J, MANTECON C, et al. Antiplatelet activity of flavonoid and coumarin drugs[J]. Vascular Pharmacology, 2016, 87: 139.

[47] 黄曼婷, 吴焕林, 徐丹苹, 等. 化橘红黄酮抗血小板聚集作用及其构效关系研究[J]. 中药新药与临床药理, 2017, 28(3): 268−272. [HUANG M T, WU H L, XU D P, et al. Anti-platelet-aggregation effects of flavonoids from *Citrus* grandis 'Tomentosa' and their structure-activity correlation[J]. Traditional Chinese Medicine and Clinical Pharmacology, 2017, 28(3): 268−272.]

[48] KARLIZKOVA J, RIHA M, FILIPSKY T, et al. Antiplatelet effects of flavonoids mediated by inhibition of arachidonic acid based pathway[J]. Planta Medica, 2016, 82: 76.

[49] 隗继浩. 新橙皮苷二氢查耳酮对 OVA 诱导口服耐受的影响 [D]. 长春: 吉林大学, 2020. [KUI J H. Effect of neohesperidin dihydrochalcone on oral tolerance induced by OVA[J]. Changchun: Jilin University, 2020.]

[50] 黄嘉丽. 柑橘源黄酮作为甜味剂和苦味抑制剂的评价和应用研究 [D]. 广州: 广东工业大学, 2020. [HUANG J L. Evaluation and application of *Citrus*-derived flavonoids as sweeteners and bitterness inhibitors[D]. Guangzhou: Guangdong University of Technology, 2020.]

[51] 钟永恒, 贾仕杰, 郝同江, 等. 甘草黄酮类化合物生理功能及其在食品中应用研究[J]. 中国林副特产, 2016(3): 91−94. [ZHONG Y H, JIA S J, HAO T J, et al. Study on the physiological function of licorice flavonoids and its application in food[J]. China's Forest by-Products, 2016(3): 91−94.]

[52] 牛丽娜, 那冬晨. 柑橘保湿霜的制作与保湿效果测试[J]. 广东化工, 2020, 419(47): 32−33. [NIU L N, NA D C. The production of *Citrus* moisturizing cream and the test of moisturizing effect[J]. Guangdong Chemical Industry, 2020, 419(47): 32−33.]

[53] 占晨, 周琪, 刘光斌, 等. 天然野生植物葛根黄酮的提取及其在化妆品的应用[J]. 应用化工, 2018, 6(48): 1351−1353. [ZHAN C, ZHOU Q, LIU G B, et al. Extraction of natural wild plant *Pueraria lobata* flavonoids and its application in cosmetics[J]. Application Chemical, 2018, 6(48): 1351−1353.]

[54] 姚晓琳, 潘思轶, 张晓维, 等. 多甲氧基黄酮提取物对冷却肉保鲜效果的影响[J]. 食品科学, 2009, 24(30): 460−463. [YAO X L, PAN S Y, ZHANG X W, et al. Effect of polymethoxy flavonoid extract on preservation of chilled meat[J]. Food Science, 2009, 24(30): 460−463.]

[55] 段静芸, 徐幸莲, 周光宏. 壳聚糖和气调包装在冷却肉保鲜中的应用[J]. 食品科学, 2002, 23(2): 138−142. [DUAN J Y, XU X L, ZHOU G H. Application of chitosan and modified atmosphere packaging in the fresh-keeping of chilled meat[J]. Food Science, 2002, 23(2): 138−142.]

[56] 王晓君. 橙皮黄酮的提取及其对番茄的保鲜效果研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2017. [WANG X J. Study on extraction of orange peel flavonoids and its fresh-keeping effect on tomato[J]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2017.]

[57] 研究发现: 柑橘皮提取物有助维持健康体重 [N]. 中国食品报网, 2019(5). [Research found: *Citrus* peel extract helps maintain a healthy weight[N]. China Food News, 2019(5).]

[58] SILVEIRA J Q, CESAR T B. Red-fleshed sweet orange juice improves the risk factors for metabolic syndrome[J]. Food Science and Nutrition, 2015, 66: 830.

[59] SURAI P F, KOCHISH I I, FISININ V I. Antioxidant defence systems and oxidative stress in poultry biology: An update[J]. Antioxidants, 2019: 8.

[60] RAFIEIA F, KHAJALI F. Flavonoid antioxidants in chicken meat production: Potential application and future trends[J]. World’s Poultry Science Journal, 2021.

[61] BHUTTO Z A, HE F, ZLOH M, et al. Use of quercetin in animal feed: Effects on the P-gp expression and pharmacokinetics of orally administrated enrofloxacin in chicken[J]. Scientific Reports, 2018, 8: 1.

[62] GOLIOMYTIS M, KARTSONASN, CHARISMIADOUM A, et al. The influence of naringin or hesperidin dietary supplementation on broiler meat quality and oxidative stability[J]. Plos One, 2014, 93: 1957.

吴平, 姚芳, 祁兴普, 等. 银杏全资源主要成分与功能活性 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 447−455. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050026

WU Ping, YAO Fang, QI Xingpu, et al. Main Components and Functional Activities of *Ginkgo biloba*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 447−455. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050026

· 专题综述 ·

银杏全资源主要成分与功能活性

吴　平, 姚　芳, 祁兴普, 刘　萍, 王海波, 徐嘉蔓, 郑海松
（江苏农牧科技职业学院食品科技学院, 江苏泰州 225300）

摘　要: 我国是银杏的主要产地之一，银杏资源十分丰富，其食用和药用价值也十分巨大。为了更精确地利用具有“药食同源”特性的银杏资源进行深度开发，就必然需要清晰地掌握它的化学成分与功效。因此，本文从银杏叶、银杏花、银杏果和银杏树全资源的角度系统地介绍与分析了银杏各部位的化学组成。同时，还对银杏各部分中相关成分的具体功能活性进行了详细地阐述，为银杏资源在食品、医药、保健和饲料等领域的精准利用提供有价值的参考。

关键词: 银杏, 资源, 成分, 活性, 药食同源
中图分类号: TS209　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0447−09
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050026
本文网刊:

Main Components and Functional Activities of *Ginkgo biloba*

WU Ping, YAO Fang, QI Xingpu, LIU Ping, WANG Haibo, XU Jiaman, ZHENG Haisong
(College of Food Science and Technology, Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300, China)

Abstract: China is one of the main producing areas of *Ginkgo biloba*, which resources are quite rich. Its edible and medicinal values are also huge. To make more accurate use of *Ginkgo biloba* resources with the characteristic of "homology of medicine and food" for further development, it is necessary to master their chemical compositions and efficacy clearly. Thus, the chemical compositions of *Ginkgo biloba* leaves, flowers, fruits and trees are systematically introduced and analyzed in this paper. In addition, the specific functional activities of the related components of *Ginkgo biloba* are described in detail. It aims to provide valuable references for the accurate utilization of *Ginkgo biloba* resources in the fields of food, medicine, health care and feed.

Key words: *Ginkgo biloba*; resource; component; activity; homology of medicine and food

银杏作为地球上古老的遗存植物之一, 已有上亿年的历史。它曾广泛分布于北半球, 但由于地球气候的急剧变化, 在第四纪冰河时期后只独存于东亚。因此, 幸存下来的银杏成为种子植物最古老的“活化石”之一。目前, 我国银杏资源广泛地分布在山东、贵州、四川、福建和云南等地, 覆盖全国 22 个省、自治区和直辖市[1]。研究表明, 银杏果含银杏内酯、三萜类和生物碱等[2]; 银杏叶含黄酮、原花青素、萜内酯、羧酸、儿茶素、非黄酮苷类等[3]; 银杏花中含有黄酮、酚酸、聚异戊烯醇等[4]; 银杏树中也含有黄酮类和内酯类物质[5]。正是由于内含这些具有生物功能活性的物质, 银杏才作为“药食同源”的植物资源被广泛地开发与利用。本文就银杏果、银杏叶、银杏花和银杏树全资源的主要物质成分以及各功能活性展开详细综述, 旨在为银杏资源在食品、医药、保健和饲料等领域的精准利用提供有价值的参考。

1　银杏资源的主要物质成分

1.1　银杏果

银杏果, 又称白果, 我国产量占全世界的 70% 左右。它的各成分含量见表 1。其中, 银杏果的主要成分为淀粉(73.97%)、非淀粉多糖(3.08%)、蛋白质(12.61%)、多肽(2.2%)、脂肪(4.3%)和粗纤维(2.19%)。尽管银杏果的蛋白含量不算高, 但氨基酸组成丰富, 属于优质蛋白。它的蛋白分子量分布较为

收稿日期: 2021−05−08
基金项目: 江苏省大学生创新创业训练计划项目（202112806027Y）; 江苏农牧科技职业学院校级科研项目（NSF2021CB02）。
作者简介: 吴平（1990−）, 男, 博士, 讲师, 研究方向: 食品物理加工, E-mail: wupping114@126.com。

均匀, 77% 的亚基集中在 31~100 kDa, 其中主要的银杏果蛋白亚基为 21 和 32 kDa[6]; 必需氨基酸含量占氨基酸总量高达 38.82%[7]。另外, 银杏果还有一些含量较低, 但对机体有着重要作用的化合物以及微量元素, 如总黄酮醇苷、双黄酮、萜内酯等[8], 以及 K、Ca、Mg、Fe、Zn、Mn 和 Cu 等微量元素[9]。

表 1 银杏果和外种皮营养成分及含量[7−11]

Table 1 Nutritional components and contents of *Ginkgo biloba* and its episperm[7−11]

类别	成分	含量	类别	成分	含量
主要成分（%）	淀粉	73.97	微量元素（g/kg）	Ca	0.08
	蛋白	12.61		Mg	0.94
	脂肪	4.30		Fe	19.70
	非淀粉多糖	3.08		Zn	14.32
	多肽	2.20		Cu	6.71
	粗纤维	2.19		Mn	1.81
氨基酸（g/100 g）	Asp	1.19		N	17.90
	Thr	0.42		P	3.28
	Ser	0.28		K	13.09
	Glu	1.42	活性成分（mg/g）	总黄酮醇苷	0.17
	Pro	0.48		萜内酯	0.07
	Gly	0.38		双黄酮	0.01
	Ala	0.54		白果毒	2.21
	Cys	0.03	其他成分（mg/g）	银杏酸	0.25
	Val	0.54		4’-O-甲基吡哆醇	0.06
	Met	0.14		氰苷	0.00021
	Ile	0.36			
	Leu	0.67			
	Tyr	0.24			
	Phe	0.33			
	His	0.28			
	Lys	0.26			
	Arg	0.90			
	必需氨基酸	3.28			
	总氨基酸	8.45			
	必需/总量(%)	38.82			

纵观银杏果, 其药用成分包括黄酮类、萜类物质和双黄酮等; 其营养成分包括蛋白质、淀粉、脂肪、游离氨基酸以及微量元素等, 其中淀粉和蛋白质等成分经研究发现其也具有一定的药用成分。此外, 银杏果还具有少量的中毒性成分, 如白果毒、银杏酸、氰苷和 4’-O-甲基吡哆醇(MPN)等[8,11]。

1.2 银杏叶

我国银杏叶资源十分丰富, 是银杏叶的主要产地。银杏叶中的化学物质种类繁多、成分复杂, 富含 20 多种黄酮类化合物、萜类、多酚、维生素、氨基酸、微量元素和酚酸类等[12]。表 2 显示, 银杏叶成分中含有总糖(16.80%)、蛋白质(5.60%)和粗脂肪(3.60%); 并且氨基酸组成平衡且必需氨基酸含量占比达到了总氨基酸含量的 38.77%, 其有望成为高营养价值的食品添加剂。同时, 银杏叶中微量元素种类多、含量较高, 特别是 Fe 作为人体必需微量元素更是达到了 488.4 mg/kg, 而 Ca、Mg、K、Sr元素也均超过了 100 mg/kg, 它们对人体心血管等系统有着重要的生理功能[13]。此外, 银杏叶中也含有萜类(4.2 mg/g)、黄酮类(16.6 mg/g)和多酚类(68.9 mg/g)等活性物质[13−15]; 还包含一些银杏酚酸类物质, 尽管其具有一定的抗炎、抗菌活性, 但银杏酸也具有致突变和致敏性以及细胞毒性, 它的含量是评价银杏叶制品质量高低的关键指标之一。

表 2 银杏叶成分及含量[13−16]

Table 2 Main components and contents of *Ginkgo biloba* leaves[13−16]

类别	成分	含量	类别	成分	含量
主要成分（%）	总糖	16.80	微量元素（mg/kg）	Mn	36.20
	粗脂肪	3.60		Cu	4.90
	蛋白质	5.60		Zn	16.20
氨基酸（g/100 g）	Asp	0.44		Fe	488.40
	Tyr	0.34		Sr	168.20
	Ser	0.26		Co	1.60
	Glu	0.71		Mo	1.20
	Pro	0.31		Na	82.00
	Gly	0.28		Ca	331.00
	Ala	0.33		Mg	116.00
	Cys	0.16		K	162.00
	His	0.13		Si	86.40
	Arg	0.42		Sn	1.60
	Ile	0.27		Se	0.78
	Leu	0.41	活性成分（mg/g）	总黄酮	16.6
	Thr	0.33		萜类	4.2
	Phe	0.24		总多酚	68.9
	Lys	0.32	其他成分（mg/g）	白果新酸	1.52
	Val	0.38		白果酸	5.81
	Met	0.19		氢化白果酸	0.48
	必需氨基酸	2.14		十七烷一烯银杏酸	7.38
	总氨基酸	5.52		十七烷二烯银杏酸	0.76
	必需/总量(%)	38.77			
维生素（mg/100 g）	V_E	1.80			
	V_{B2}	0.12			
	V_{B6}	0.66			
	V_{PP}	0.18			

1.3 银杏花

银杏花及花粉中的营养成分与含量与银杏叶相比有所差异, 同时花粉中富含黄酮类和其他营养成分, 推测银杏花提取物要比其叶子活性更好[4]。目前国内外对银杏花营养成分的研究较少, 因此对其化学成分进行系统性和深入地研究很有必要。表 3 显示, 银杏花粉中总黄酮含量为 21.12 mg/g, 高于叶片中的含量(16.6 mg/g, 表 2); 其中类黄酮化合物槲皮素(0.27 mg/g)、山柰酚(7.54 mg/g)和异鼠李素(0.23 mg/g)含量均较高, 有研究报道它们在抗氧化、预防心血管疾病、抗肿瘤等方面有着重要功效[17−18]。另外, 其内酯和 V_{B2} 也较高, 说明其营养价值确实高于银杏叶片。它的必需氨基酸含量为 5.66 g/100 g, 相比于总氨基酸含量, 占比也达 23.86%; 各类氨基酸组成平衡, 特别是谷氨酸(Glu)和脯氨酸(Pro)含量更是达到了 4.50 和 5.38 g/100 g, 前者可降低肠道炎性

细胞因子，缓解肠道损伤[19]；后者参与细胞增殖和胎儿生长发育[20]。两种氨基酸对机体均有重要作用。

表 3　银杏花化学成分及含量[21−22]

Table 3　Main chemical components and contents of *Ginkgo biloba* flowers[21−22]

类别	成分	含量	类别	成分	含量
氨基酸（g/100 g）	Asp	2.68	维生素（mg/100 g）	V_C	27.22
	Thr	1.15		V_{B2}	65.07
	Ser	1.09		V_{B1}	7.23
	Glu	4.50	活性成分（mg/g）	总黄酮	21.12
	Gly	0.66		槲皮素	0.27
	Ala	1.74		异鼠李素	0.23
	Val	0.69		内酯	5.16
	Met	0.26		山奈酚	7.54
	Ile	0.59			
	Leu	1.53			
	Tyr	0.37			
	Phe	0.71			
	Lys	0.73			
	Cys	0.48			
	His	0.20			
	Arg	0.96			
	Pro	5.38			
	必需氨基酸	5.66			
	总氨基酸	23.72			
	必需/总量(%)	23.86			

1.4　银杏树

相比于银杏果、银杏叶和银杏花，银杏树资源的开发和利用报道较少。银杏树是我国特有树种，因它的木材质地良好、纹理直、光泽度好，素有“银香木”之美誉。其干缩性小加上不易变形、不开裂以及耐腐蚀性强的特点，银杏树木常用于乐器、家具、建筑等。有研究报道显示银杏树同样具有一些营养成分。表 4 显示，银杏树不同部位的黄酮类化合物含量有所差别，从树木的空间结构由上至下分析，枝椏中含量（皮：0.41 mg/g、材：0.035 mg/g）高于主干（皮：0.26 mg/g、材：0.018 mg/g），而主干高于树根（皮：0.12 mg/g、材：0.014 mg/g），这符合植物的生物合成规律。另外，枝椏属于采伐废弃料，其中较高的黄酮类化合物含量为银杏树枝椏资源的废物利用、增加其经济附加值提供了理论依据[5]。从银杏树结构的外部向内部分析，银杏树各部位外皮中黄酮（0.12~0.41 mg/g）含量普遍高于心材（0.014~0.035 mg/g），这意味着除银杏叶外，银杏树皮也可作为黄酮类物质提取的重要来源之一。银杏树在不同溶剂中的提取物，生物活性成分的含量也不相同。表 5 显示，在乙醚提取物中，主要含有丁基苯酚（44.01%）、芝麻素（18.62%）、十六酸甲酯（7.66%）、环己甲酸-2-甲基苯酯（7.61%）、邻苯二甲酸二乙酯（6.86%）和邻苯二甲酸-单-乙基己基酯（4.76%）。在复合溶剂提取物（乙醚：乙酸乙酯=1∶1 和 1∶3）中，分别含有芝麻素（33.89%）、γ-谷甾醇（41.53%）、4-羟基-苯甲醇（4.99%），以及丁

表 4　银杏树中黄酮类化合物含量[5]

Table 4　The contents of flavonoids in *Ginkgo biloba* tree[5]

银杏树黄酮类化合物含量（mg/g）						
根（皮）	根（材）	主干（皮）	主干（材）	枝椏（皮）	枝椏（材）	苗木
0.12	0.014	0.26	0.018	0.41	0.035	0.12

表 5　银杏树各提取物中成分[23]

Table 5　Components in different extracts of *Ginkgo biloba*[23]

提取物	成分	含量（%）
乙醚提取物	丁基苯酚	44.01
	芝麻素	18.62
	十六酸甲酯	7.66
	环己甲酸-2-甲基苯酯	7.61
	邻苯二甲酸二乙酯	6.86
	邻苯二甲酸-单-乙基己基酯	4.76
混合溶剂提取物（乙醚:乙酸乙酯=1:1）	γ-谷甾醇	41.53
	芝麻素	33.89
	4-羟基-苯甲醇	4.99
混合溶剂提取物（乙醚:乙酸乙酯=1:3）	丁基苯酚	72.06
	环己甲酸-2-甲苯酯	10.24
	邻苯二甲酸-单-乙基己基酯	7.52
超临界CO_2萃取物	丁基苯酚	41.29
	芝麻素	13.47
	十六酸甲酯	9.59
	环己甲酸-2-甲基苯酯	8.67

基苯酚（72.06%）、环己甲酸-2-甲苯酯（10.24%）、邻苯二甲酸-单-乙基己基酯（7.52%）。而在超临界 CO_2 提取物中，主要有丁基苯酚（41.29%）、芝麻素（13.47%）、十六酸甲酯（9.59%）和环己甲酸-2-甲基苯酯（8.67%）。这四种提取物中的主要共性成分有丁基苯酚、芝麻素和甾醇类物质等，它们与银杏树木材抑菌、抗腐能力有关[23]。

2　银杏资源的主要功能活性

2.1　降血压

传统的降压药物大多数源自于化学工艺的合成，难免有一定的副作用，人们迫切需要从天然产物中获取副作用小、安全可靠、价格低廉的药物。银杏中黄酮类化合物具有降血压功效，被广泛用于药品、保健品等领域。目前市场上约 24% 的银杏黄酮来源于其叶子提取物[24]。银杏叶提取物中黄酮类化合物通常作为一种自由基清除剂和血管扩张剂参与机体的新陈代谢，通过增强血管张力、改善管壁通透性来达到降血压作用；银杏果中黄酮类物质可促进冠状血管扩张[25]。银杏花总黄酮化合物中的槲皮素也可降低血压，其代谢产物异鼠李素、山奈酚均具有内皮非依赖性血管舒张作用，对主力动脉血管更为明显[26]。此外，它的降压作用还与氧化应激水平的变化[27] 以及抑制一氧化氮合酶活性[28] 有关。银杏果、叶、花均是黄酮类物质的提取来源，除银杏叶之外，果和花中的黄酮成分的低损与高效提取，将是银杏黄酮类物质开发与研究的新方向。

2.2 降血糖

糖尿病数十年来已发展成为全球主要公共卫生问题之一。它属于内分泌代谢疾病，严重影响到人类生命健康。银杏提取物能显著降低Ⅱ型糖尿病大鼠的高血糖症状，研究报道提示这与银杏多糖缓解胰岛 β 细胞损伤、银杏叶提取物激活 *SIRT1* 生长基因以提高线粒体功能降低血清 MDA 含量等有关[29−30]。具体机制如下。首先，银杏黄酮类物质可提高丝氨酸/苏氨酸激酶 Akt 磷酸化程度，被激活的 Akt 进一步促使葡萄糖转运蛋白-4（GLUT-4）向细胞膜的转移，促进葡萄糖的吸收，这是血糖降低的主要原因之一[31]。其次，银杏黄酮又与 α-葡萄糖苷酶和 α-淀粉酶抑制活性显著相关[32]，它通过对 α-葡萄糖苷酶的反竞争抑制作用，阻断了碳水化合物的分解，降低了机体内单糖含量，抑制餐后高血糖。此外，银杏种子中的胰蛋白酶抑制剂也可起到降血糖作用，通过提高机体胰脂联素水平，降低了单核细胞趋化蛋白-1（MCP-1）和转化生长因子-β_1（TGF-β_1）水平，从而达到控制糖尿病的目的[33]。另一个值得关注的是，银杏淀粉指数为 36，是中等血糖指数食品。有研究报道表明，抗性淀粉可降低餐后血糖、缓解糖尿病症状[34]。最后，银杏中的活性多肽对机体血糖水平的降低也有显著效果，其降糖机理可能与胰岛素 β 细胞修复、加快机体葡萄糖磷酸化进程与葡萄糖代谢速率有关[35]。由上述研究可以看出，银杏活性物质降糖作用主要是通过阻断碳水化合物的分解、促进单糖吸收、降低糖尿病炎症因子等多种方式来实现的。这是从降低血糖的表观角度来进行的相关研究，另有相关报道从银杏活性成分降低机体血糖水平后、实现糖尿病症状缓解的潜在作用机制进行了探究。

糖尿病所致高血糖可引起心肌细胞钙调节异常，而银杏提取物可通过减少大鼠心肌细胞 Ca^{2+}通道蛋白 mRNA 表达水平，以缓解胞外 Ca^{2+}向胞内的超负荷转运、减轻心肌功能异常，这有助于糖尿病的治疗。银杏活性成分还可下调体内肾核炎症因子-κB 和 TGF-β_1 的表达，发挥对高血糖下肾脏的保护作用[36]。银杏提取物在显著降低机体空腹和餐后血糖后，同时还能通过升高脑血流、改善内皮因子（NO 和 ET-1）含量、维持血管张力，降低炎症因子（IL-1β）水平以减轻细胞的炎症反应，延缓了血管疾病的进展[37]。银杏活性成分在降低机体高血糖水平的同时，还能减缓由高血糖引起的糖尿病心脏、肾脏和血管并发症的进展，这证实了银杏提取物作用效果显著，是优质的天然降糖活性物质。

2.3 降血脂

高血脂症是人类健康三大杀手之一，患者数量呈逐年上升趋势。它不仅易引起冠心病、动脉粥样硬化、脑中风等，还会引发脂肪肝、高血压等危害人体健康的严重疾病。银杏叶提取物据报道可显著降低大鼠血清中胆固醇（TC）、甘油三酯（TG）与低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）水平，从而降低冠心病发病率；同时提高高密度脂蛋白胆固醇（HDL-C）水平，并通过调节脂肪代谢来降低动脉粥样硬化等心血管疾病的发病率[38]。银杏叶中的黄酮类物质可清除由于脂质过氧化作用产生的过多自由基，以降低其对心脑血管内皮细胞的侵害作用[39]；此外，它在提高血清中 HDL-C 含量的同时，抑制了 LDL-C 含量，阻碍了机体内胆固醇的堆积，使其转为脂肪形式排出体外，从而减少血脂水平。而银杏内酯可阻断血小板活化因子与其受体的结合，改善血小板凝聚，降低血液粘稠度[40]。黄酮类和内酯类以及酚类物质可改善机体的高血脂症状[41]。银杏提取物还可通过抑制胆固醇合成与转运，提高机体脂蛋白脂肪酶和肝脂酶活性、增大胆汁酸的分泌量以提高胆固醇代谢速率来实现高血脂的调节[42]。高血脂也属于“三高”之一，银杏提取物降血脂作用的效果与机制研究成果将有助于开发新型调节血脂的药物。

2.4 抗氧化

氧化应激状态常常是细胞发生凋亡的一个重要途径，凋亡过程伴随着氧化应激过程以及 ROS 活性氧基团的产生过程[43]。而各类银杏提取物均具有较高的抗氧化活性，可起到缓解细胞氧化应激状态的效果。首先是银杏叶提取物，其含有多种黄酮类物质和萜内酯成分，丰富的酚羟基结构（多酚）[44] 以及原花青素[45]，均有助于羟自由基和超氧阴离子自由基的清除，提高抗氧化酶 GCLC 的表达。银杏提取物能抑制大鼠肝细胞脂质过氧化，通过减少脂质过氧化和抗氧化能力的提高发挥对机体脊髓损伤的保护作用，并通过 Keap1/Nrf2/ARE 途径发挥其心肌细胞抗 H/R 所致的氧化损伤作用[46]。银杏叶黄酮还能清除亚硝酸盐并阻断亚硝胺合成、延缓运动性氧化并加快机体恢复[47]。其次，银杏内酯和银杏果多糖均可提高细胞内超氧化物歧化酶 SOD 和谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-Px 含量，降低丙二醛 MDA 含量发挥机体细胞的抗氧化作用[48]。银杏叶提取物中还有一些有机酸、氨基酸、单宁和生物碱等也具备抗氧化协同作用。此外，银杏果多肽的抗氧化性与多肽中的氨基酸种类有关，贾韶千[49] 对银杏抗氧化肽进行分离鉴定后发现，两种小肽 YVGD（Tyr-Val-Gly-Asp）和 LGNTDYAVH（Leu-Gly-Asn-Thr-Asp-Tyr-Ala-Val-His）中均包括含酚羟基的 Tyr、含非极性脂肪族基团的 Val 和 Asp，因而表现出一定的抗氧化性。多肽与黄酮相互协同后，抗氧化活性更高[50]。最后，银杏种皮挥发性油成分也具有抗氧化性[51]。总之，银杏提取物是依靠银杏黄酮、多酚、花青素、内酯、多糖、多肽、脂肪以及一些酶实现抗氧化活性的。

2.5 抗衰老

目前，银杏的抗衰老功效已被逐步肯定。已有研究发现，银杏叶提取物可以促使大脑循环代谢速率增加，增强记忆力；减少海马区神经元丢失，起到抗衰

老作用；缓解心肌结构的破坏、改善心肌老化，降低糖基化终末期产物含量，减少其在肾小球膜的沉积，同时抑制纤维因子的表达、阻断肾细胞纤维化进程，增加抗衰老基因 Klotho 蛋白的表达，最终使肾脏结构和功能得到一定程度的恢复[52]；通过降低 MDA、提高 ATPase 和 SOD 活性来减缓红细胞的衰老以及激活脑内源性 Nrf2-ARE 通路，保护脑内黑质多巴胺能神经元[53]。银杏提取物制作的软膏等制品还可以改善皮肤光泽与弹性，延缓皮肤衰老[54]。

高浓度的血小板活化因子（PAF）可损伤神经细胞、降低脑血流量，从而引发炎症和加速衰老进程。而银杏黄酮可抑制 PAF 诱发的血小板聚集，可起到延缓衰老的目的。脂质过氧化的发生也是加速机体衰老的又一重要因素，其产生的自由基链反应及其次级代谢物会损伤细胞膜[55]。此时，银杏黄酮一方面挥发了其金属离子螯合作用，促使脂质过氧化物分解；另一方面，其清除自由基作用，还可缓解脂质过氧化过程；同时，它的减少 NO 含量的作用，抑制了神经细胞的凋亡，缓解了衰老[56]。银杏内酯可减少小鼠海马体中小胶质细胞、TNF-α 和 IL-1β 因子数量，增强自然衰老小鼠的学习记忆能力；还能改善老年退行性疾病，辅助改善记忆功能；促进神经生长、防止神经脱鞘、防止老年痴呆[24,26]。银杏活性成分对机体大脑、心脏、皮肤、血液和神经细胞的抗衰老作用机制研究，为银杏相关保健产品的研发提供了理论基础。

2.6　抗炎

炎症是生命机体对损伤因子所产生的防御机制与反应。炎症反应包括急性和慢性两个病程，其中以血管反应为主的白细胞渗出是炎症的主要标志之一。在此过程中，细胞黏附分子参与了整个炎症反应，起到了重要的载体作用。据报道，银杏提取物对炎症反应有较好的抑制效果，其通过减少 Aβ 聚集与沉积，缓解了神经炎症[57]，这对开发神经退行性疾病相关靶向药物提供了新线索。从银杏叶中提取的多糖成分可通过充当 P-选择素的配位阻断剂，以阻断 P-选择素与其配体的相互识别作用，进而抑制中性粒细胞在血管内皮素上的滚动、黏附和渗出，产生抗炎作用[58]；还可通过调节炎症信号通路中炎症细胞内核转录因子-κB 的表达，抑制 TNF-α 和 IL-6 等促炎细胞因子基因的表达水平，以及促炎介质 iNOS 和 COX-2 等的表达，发挥出抗炎活性[59]。银杏叶黄酮能减少哮喘模型小鼠体内引起气道炎症的嗜酸性粒细胞（EOS）数量，减轻 EOS 在肺部的聚集，缓解肺部炎症[60]。同时，它还能逆转抑郁模型大鼠血清以及海马炎症细胞因子水平，改善模型大鼠抑郁行为[61]。银杏果内酯也能明显地降低缺氧状态下模型大鼠脑中 TNF-α、IL-6、IL-1β 和干扰素-γ 等炎性因子的含量；降低受过氧化氢诱导的人角质形成细胞（HaCaT）中 SOD 和 GSH-Px 含量的下降，减少活性氧 ROS 水平，提高抗炎活性；抑制心肌组织炎症反应和氧化应激反应；通过影响炎症因子和抗氧化作用减轻 ApoE 小鼠的动脉粥样硬化损伤[62−63]。银杏花提取物也是不可忽视的抗炎物质，其中含有的单体化合物白果素、异银杏黄素对巨噬细胞分泌的具有促炎作用的一氧化氮（NO）的抑制率超过 80%，显著降低了其细胞毒性和促炎性[4]。银杏叶多糖和黄酮、银杏果内酯、银杏花提取物能分别从神经系统、体液循环、脑和心肺组织等层面上抑制炎症因子、缓解炎症的发展，这为天然抗炎药物的研制指引了新的研究方向。

2.7　抗菌

银杏中的种仁蛋白、多糖、黄酮类以及酚酸类等物质，均有抗菌能力。吴海霞[64] 研究发现，银杏种仁多糖对枯草芽孢杆菌有抑制作用；而种仁蛋白对革兰氏阳性菌和阴性菌均有抑菌活性，其中对克雷伯杆菌的抑菌效果最好。其作用机理与菌体细胞壁破裂、渗透性变化、内容物流出、细胞崩解有关；此外，银杏种仁抑菌蛋白还会通过抑制胞内 ATP 酶活、β-半乳糖苷酶和碱性磷酸酶活性对受试菌的代谢产生负面作用[65]。银杏抗菌蛋白与多肽也具有抑菌能力，其所带的正电荷残基与菌体细胞膜负电荷通过静电相互作用吸引后，可对细胞膜产生损伤作用[66−67]。银杏多糖同样可以破坏细胞膜，但其与抗菌蛋白不同的是，多糖可以抑制菌体 DNA 和蛋白质合成，从而限制细菌生长[68]。银杏黄酮与糖类物质生产黄酮苷，可通过水解细胞壁糖苷键起到破坏细胞壁的作用，且该黄酮苷属于多酚类物质，偏酸的 pH 属性可导致细胞内蛋白质变性，进而发挥抑菌作用[69]。另外，银杏长链酚类、白果酸、白果酚和不同烷基侧链的漆树酸都是抗菌的主要物质，其中银杏酚酸对青霉菌抑菌作用最强，最小抑菌质量浓度为 25 mg/mL[70]。银杏的抗菌、抑菌活性，赋予了其用作于天然防腐剂和抗菌剂的开发前景。

2.8　抗病毒

银杏相关提取物除上述生物活性外，还能对病毒有一定的抑制作用。在上世纪 90 年代时，就有相关报道提示，银杏提取物治疗乙型慢性活动型肝炎不仅可以提高机体免疫功能，还能增强抗乙肝病毒的能力[71]。杨芳[72] 进一步研究发现，银杏叶提取物是通过抑制乙肝病毒表面抗原 HBsAg 和 e 抗原 HBeAg 活性来进行抗病毒的，且抑制作用呈剂量依赖效应。另外，乙肝病毒引起的肝脏疾病的逐渐恢复，还与银杏叶提取物具有血浆因子（外周血核因子-κB、TNF-α、脂氧素 A4、内毒素）调节能力有关[73]。银杏叶提取物中槲皮素、内酯还能通过抑制细胞凋亡效应酶 Caspase-3 活性、缓解宿主细胞凋亡作用，从而对甲型 H1N1 病毒以及慢病毒的胞内感染产生抑制作用[74−75]。银杏叶提取物以及银杏外种皮多糖可抑制新城疫病毒（NDV）活性，其含有的多糖类物质可显著降低 NDV 对宿主细胞的吸附和胞内增殖[76]。这对于禽类新城疫传染病的防治提供了基于天然植物

提取物进行制剂开发的新思路。银杏种皮多糖的抗病毒功能不仅于此，它还具有抑制 J 亚群禽白血病病毒复制的作用。在宿主细胞中，外种皮多糖发挥出抑制该病毒基因表达、蛋白质合成和病毒繁殖的功效[77]。这一结果提示，加快开展银杏外种皮多糖类抗病毒制剂的研究，将对我国家禽养殖业的健康、绿色和可持续发展产生重要的意义。

3 总结与展望

我国是银杏资源大国，也是银杏叶、花、果、树等原料的主要产地之一。本文详细综述了银杏全资源的主要化学成分与其功能活性，其丰富的物质组成、微量元素等代表着银杏市场的潜力巨大。银杏的降血压、降血糖、降血脂、抗氧化、抗衰老、抗炎、抗菌和抗病毒功能活性奠定了其“药食同源”的理论基础，为银杏资源在食品、药品、保健和饲料等领域中的综合利用提供了应用依据。目前与银杏研究相关主要问题是研究领域过多集中在银杏叶、银杏果等银杏资源的提取物上，对于其中某种具体活性物质在产生功效作用的过程中发挥着何种具体生物学机制并不清晰，这就会造成一个“重应用、轻基础”的现象，从而产生银杏资源的一系列利用与推广上的阻力，特别是在“药食”领域，更为苛刻。此外，银杏中的白果毒、氰苷、银杏酸等毒性成分也不可忽视，在各类银杏制品开发与研究的同时，安全性永远是摆在第一位的。因此，银杏研究将来一段时间的研究方向一方面可转向更加“下沉”的基础研究中；另一方面，要注重安全性研究，开发各种“脱毒增效”的新手段、新方法、新技术也是研究重点之一。这样才能在既有“基础”理论、又有“应用”研究，加之“安全”保障的框架下，顺利地向国内外推广各类银杏制品，最终建设良性发展的银杏资源产业链。

参考文献

[1] 曹钟允, 邢世岩, 叶宝兴, 等. 复干古银杏资源分布及生长特性分析[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2019, 50(3): 399−404. [CAO Z Y, XING S Y, YE B X, et al. Distribution and analysis of growth characteristics of secondary trunk ancient *Ginkgo biloba* L.[J]. Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science Edition), 2019, 50(3): 399−404.]

[2] 朱国磊. 绿升麻、滇红椿和银杏果实的化学成分及其生物活性研究 [D]. 北京: 中国科学院大学, 2016. [ZHU G L. Studies on chemical constituents and biological activities of the fruits of *Cimicifuga foetida* L., *Toona sinensis* and *Ginkgo biloba*[D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2016.]

[3] 蒋永红, 唐仕荣. 银杏渣中多糖的超声波-微波协同萃取及抗氧化性研究[J]. 食品工业科技, 2009, 30(7): 244−246. [JIANG Y H, TANG S S. Study on extraction and antioxidant activity of polysaccharides from ginkgo residue by ultrasonic wave and microwave[J]. Science and Technology of Food Industry, 2009, 30(7): 244−246.]

[4] 李敏. 银杏花的化学成分及生物活性研究 [D]. 北京: 军事科学院, 2019. [LI M. Chemical constituents from the male flowers of *Ginkgo biloba* L. and their biological activities[D]. Beijing: Military Academy of Sciences, 2019.]

[5] 周统建, 曹福亮, 汪贵斌, 等. 银杏树中黄酮类化合物分布规律研究[J]. 林产化学与工业, 2009, 29(6): 78−80. [ZHOU T J, CAO F L, WANG G B, et al. Study on distribution rule of flavonoids in *Ginkgo biloba* Linn[J]. Chemistry and Industry of Forest Products, 2009, 29(6): 78−80.]

[6] 李莹莹, 吴彩娥, 杨剑婷, 等. 白果蛋白质提取及 SDS-PAGE 分析[J]. 食品科学, 2010, 31(22): 36−40. [LI Y Y, WU C E, YANG J T, et al. Extraction and SDS-PAGE analysis of proteins from *Ginkgo biloba* seed[J]. Food Science, 2010, 31(22): 36−40.]

[7] 周梦怡, 花彤彤, 马小芳, 等. 基于氨基酸成分分析比较不同品种白果的营养价值[J]. 河北农业大学学报, 2019, 42(2): 74−80. [ZHOU M Y, HUA T T, MA X F, et al. Nutritional values of *ginkgo* (*Ginkgo biloba* L.) nut among different cultivars based on the analysis of amino acids profile[J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2019, 42(2): 74−80.]

[8] 罗珂. 白果, 银杏外种皮医药保健作用的化学基础研究 [D]. 武汉: 武汉理工大学, 2019. [LUO K. Chemical basic research of *Ginkgo biloba* seeds and exocarp for healthcare function[D]. Wuhan: Wuhan University of Technology, 2019.]

[9] 林睦就, 张云跃, 马常耕. 我国银杏遗传变异研究之二——种仁营养成分和无机元素含量的变异[J]. 林业科学, 2002, 38(2): 157−161. [LIN M J, ZHANG Y Y, MA C G. Study on genetic variation of *Ginkgo biloba* Ⅱ——the variation of content of nutrient substance and mineral elementin nut among and within population[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2002, 38(2): 157−161.]

[10] 陈西娟. 白果蛋白的提取分离、结构表征及酶解制备多肽的研究 [D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2010. [CHEN X J. Study on separation and structure of ginkgo protein and preparation of peptide by enzymatic hydrolysis[D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry, 2010.]

[11] 咸怡婷. 高压蒸汽爆裂和植物乳杆菌发酵法降低银杏果毒性及应用 [D]. 无锡: 江南大学, 2019. [QI Y T. Detoxification of *Ginkgo biloba* seeds by high pressure steam burst and *Lactobacillus plantarum* fermentation and its application[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2019.]

[12] GUO J, WU Y Q, WANG G B, et al. Integrated analysis of the transcriptome and metabolome in young and mature leaves of *Ginkgo biloba* L.[J]. Industrial Crops and Products, 2020, 143: 111906.

[13] 岳红, 胡小玲, 苏克和, 等. 银杏叶中营养成分的测试及饮品的研究[J]. 经济林研究, 2000, 18(4): 19−20. [YUE H, HU X L, SU K H, et al. Determination of the nutritive elements in the *Ginkgo* leaf with reference to beverage making from it[J]. Non-wood Forest Research, 2000, 18(4): 19−20.]

[14] 陈再兴, 朱旭, 王琳, 等. 不同季节银杏叶中总黄酮、总黄酮醇苷及萜类内酯的含量变化[J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(12): 1067−1069. [CHEN Z X, ZHU X, WANG L, et al. Changes of total flavonoids, total flavonol glycosides and terpene lactones in *Ginkgo biloba* leaves in different seasons[J]. Chinese Journal of Hospital Pharmacy, 2010, 30(12): 1067−1069.]

[15] 向静, 刘付明亮, 崔旭兰, 等. 银杏叶多酚物质不同提取方

法的比较研究[J]. 广州中医药大学学报, 2019, 36(5): 734−737. [XIANG J, LIU F M L, CUI X L, et al. Comparison of different extraction methods for polyphenols in folium ginkgo[J]. Journal of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, 2019, 36(5): 734−737.]

[16] 王荞薇, 谢媛媛, 王义明, 等. 银杏叶中银杏酚酸类成分含量测定方法研究[J]. 中国药学杂志, 2015, 50(2): 167−173. [WANG Q W, XIE Y Y, WANG Y M, et al. Simultaneous determination of five ginkgolic acids in ginkgo folium by HPLC[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2015, 50(2): 167−173.]

[17] VÁSQUEZ A, YAÑEZ O, OSORIO E, et al. Theoretical study of the antioxidant activity of quercetin oxidation products[J]. Frontiers in Chemistry, 2019, 7(7): 818−828.

[18] WANG J Q, FANG X Y, GE L, et al. Antitumor, antioxidant and anti-inflammatory activities of kaempferol and its corresponding glycosides and the enzymatic preparation of kaempferol[J]. Plos One, 2018, 13(5): 1−12.

[19] QIN Q, XU X, WANG X, et al. Glutamate alleviates intestinal injury, maintains mTOR and suppresses TLR4 and NOD signaling pathways in weanling pigs challenged with lipopolysaccharide [J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 1−10.

[20] LIU N, CHEN J, HE Y, et al. Effects of maternal L-proline supplementation on inflammatory cytokines at the placenta and fetus interface of mice[J]. Amino Acids, 2020, 52(4): 587−596.

[21] 王国霞, 曹福亮. 4 个银杏主要产区的银杏花粉营养成分比较研究[J]. 浙江林业科技, 2007, 27(3): 8−11. [WANG G X, CAO F L. Comparative study on nutrient components of *Ginkgo biloba* pollen from 4 major production areas[J]. Journal of Zhejiang Forestry Science and Technology, 2007, 27(3): 8−11.]

[22] 李卫星, 甄珍, 周春华, 等. 银杏雄株叶片和花粉主要类黄酮成分含量分析[J]. 中国农业科学, 2010, 43(13): 2775−2783. [LI W X, ZHEN Z, ZHOU C H, et al. Flavonoid content of the leaves and pollen of male *Ginkgo biloba* plants[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2010, 43(13): 2775−2783.]

[23] 张玲. 银杏树木提取物对木材防腐作用的研究 [D]. 南京: 南京林业大学, 2009. [ZHANG L. Study on preservative effect of *Ginkgo* tree extract on wood[D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2009.]

[24] 赵文龙. 从银杏叶中提取精制银杏黄酮的研究 [D]. 北京: 北京化工大学, 2018. [ZHAO W L. Study on extraction and purification of *Ginkgo* flavonoids from *Ginkgo biloba* leaves[D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2018.]

[25] ZHANG B, HOU Y L, LIU B J, et al. The *Rhododendron dauricum* L. flavonoids exert vasodilation and myocardial preservation [J]. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 2010, 9(3): 303−311.

[26] RENDIG S V, SYMONS D J, LONGHURST J C, et al. Effects of red wine, alcohol, and quercetin on coronary resistance and conductance arteries[J]. Journal of Cardiovascular Pharmacology, 2001, 38(2): 219−227.

[27] AHMED O A, HANAN S F, ABEER E E, et al. Protective effect of the standardized leaf extract of *Ginkgo biloba* (EGb761) against hypertension-induced renal injury in rats[J]. Clinical and Experimental Hypertension, 2018, 40(8): 703−714.

[28] ABDEL-ZAHER A O, FARGHALY H S M, EL-REFAIY A E M, et al. Protective effect of the standardized extract of *Ginkgo biloba* (EGb761) against hypertension with hypercholesterolemia-induced renal injury in rats: Insights in the underlying mechanisms[J]. Biomedicine and Pharmacotherapy, 2017, 95(1): 944−955.

[29] 魏攀凤, 程晶. 银杏叶有效成分的提取及对糖尿病大鼠体重的影响[J]. 化工设计通讯, 2020, 46(9): 160−161. [WEI P F, CHENG J. Extraction of effective components from *Ginkgo biloba* leaves and its effect on the body weight of diabetic rats[J]. Chemical Engineering Design Communications, 2020, 46(9): 160−161.]

[30] NASEEM M, ZAMAN M Q, NAZIH H, et al. The effects of *Ginkgo biloba* leaf extract on metabolic disturbances associated to alloxan-induced diabetic rats[J]. The Journal of Animal & Plant Sciences, 2016, 26(3): 627−635.

[31] 王国光, 张翠, 李伟, 等. 银杏叶总黄酮对糖尿病大鼠的降糖作用研究[J]. 亚太传统医药, 2008, 4(8): 31−32. [WANG G G, ZHANG C, LI W, et al. Hypoglycemic effect of total flavonoids from *Ginkgo biloba* leaves on diabetic rats[J]. Asia-Pacific Traditional Medicine, 2008, 4(8): 31−32.]

[32] PINTO M, KWON Y I, APOSTOLIDIS E, et al. Potential of *Ginkgo biloba* L. leaves in the management of hyperglycemia and hypertension using *in vitro* models[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(24): 6599−6609.

[33] 陈金铭, 赵丽薇, 庄鹏宇, 等. 银杏种子中胰蛋白酶抑制剂的降糖活性研究[J]. 成都中医药大学学报, 2015, 38(1): 34−36. [CHEN J M, ZHAO L W, ZHUANG P Y, et al. Lower blood glucose activity of *Ginkgo* seeds trypsin inhibitor[J]. Journal of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2015, 38(1): 34−36.]

[34] 张伟, 张焕新, 武云龙. 银杏抗性淀粉蛋糕的研制及其消化性能评价[J]. 食品工业科技, 2018, 39(19): 168−174. [ZHANG W, ZHANG H X, WU Y L. Development and digestion function evaluation of *Ginkgo biloba* resistant starch cake[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(19): 168−174.]

[35] SEKAR D S, SIVAGNANAM K, SUBRAMANIAN S. Antidiabetic activity of *Momordica charantia* seeds on streptozotocin induced diabetic rats[J]. Pharmazie Die, 2005, 60(5): 383−387.

[36] ZHANG J W, YANG S X, CHEN F, et al. Ginkgetin aglycone ameliorates LPS-induced acute kidney injury by activating SIRT1 via inhibiting the NF-κB signaling pathway[J]. Cell & Bioscience, 2017, 7(1): 1−10.

[37] HUANG M, QIAN Y, TENG G, et al. Different neuroprotective responses of Ginkgolide B and bilobalide, the two ginkgo components, in ischemic rats with hyperglycemia[J]. European Journal of Pharmacology, 2012, 677(1-3): 71−76.

[38] 李贵星, 刘双凤. 动脉粥样硬化发病机制的研究进展[J]. 中国实验诊断学, 2007, 11(9): 1268−1271. [LI G X, LIU S F. Research progress in the pathogenesis of atherosclerosis[J]. Chinese Journal of Laboratory Diagnosis, 2007, 11(9): 1268−1271.]

[39] 张蔚. 银杏叶胶囊对高脂血症血脂代谢的影响及抗氧化作用分析[J]. 中国初级卫生保健, 2016, 30(6): 70−72. [ZHANG W. Analysis on the influence of *Ginkgo biloba* capsule on hyperlip-

idemia blood lipid metabolism and antioxidant effect[J]. Chinese Primary Health Care, 2016, 30(6): 70−72.]

[40] CUI J, HU L A, SHI W, et al. Design, synthesis and anti-platelet aggregation activity study of ginkgolide-1, 2, 3-triazole derivatives[J]. Molecules, 2019, 24(11): 2516−2537.

[41] RAMCHOUN M, KHOUYA T, HARNAFI H, et al. Effect of polyphenol, flavonoid, and saponin fractions from *Thymus atlanticus* on acute and chronic hyperlipidemia in mice[J]. Future Journal of Pharmaceutical Sciences, 2020, 6(1): 1−9.

[42] 张琪, 马博, 朱玲玲, 等. 银杏叶提取物对实验性高脂血症大鼠的调脂机制[J]. 华西药学杂志, 2007, 22(6): 605−608. [ZHANG Q, MA B, ZHU L L, et al. Mechanism of *Ginkgo biloba* extracts in regulating blood-lipid on experimental hyperlipidemic rats[J]. West China Journal of Pharmaceutical Sciences, 2007, 22(6): 605−608.]

[43] KEHRER J P. Cause-effect of oxidative stress and apoptosis[J]. Teratology, 2000, 62(4): 235−236.

[44] JOANNAA K C, MARCINA, D, OSKARA, S, et al. Effect of metal ions from *Ginkgo biloba* extracts on the oxidative stability of rapeseed oil and its triacylglycerols[J]. Journal of Elementology, 2020, 25(3): 851−862.

[45] NI J, RUAN R, WANG L, et al. Functional and correlation analyses of dihydroflavonol-4-reductase genes indicate their roles in regulating anthocyanin changes in *Ginkgo biloba*[J]. Industrial Crops and Products, 2020, 152(1): 1−10.

[46] 朱燕梅. 银杏叶提取物保护心肌细胞抗氧化损伤及其基于 Keap1/Nrf2/ARE 通路的作用机制 [D]. 成都: 成都医学院, 2015. [ZHU Y M. The protective effect of *Ginkgo biloba* extract on cardiomuocytes injured with hypoxia/reoxygenation and its machanism based on Keap1/Nrf2/ARE signaling pathway[D]. Chengdu: Chengdu Medical College, 2015.]

[47] LI W, LI X, MENG N, et al. Effect of additives on flavonoids, D-chiro-Inositol and trypsin inhibitor during the germination of tartary buckwheat seeds[J]. Journal of Cereal Science, 2013, 58(2): 348−354.

[48] LO C T, CHENG A C, CHIU K H, et al. Correlation evaluation of antioxidant properties on the monosaccharide components and glycosyl linkages of polysaccharide with different measuring methods[J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 86(1): 320−327.

[49] 贾韶千. 银杏抗氧化肽的制备, 结构鉴定及活性研究 [D]. 南京: 南京林业大学, 2011. [JIA S Q. The preparation, identification and activity of ginkgo antioxidant peptides[D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2011.]

[50] HERNANDEZ-JABALERA A, CORTES-GIRALDO I, DAVILA-ORTIZ G, et al. Influence of peptides-phenolics interaction on the antioxidant profile of protein hydrolysates from *Brassica napus*[J]. Food Chemistry, 2015, 178(1): 346−357.

[51] 赵浩晨, 王婉婷, 雷佳美, 等. 银杏果外种皮多糖的脱色工艺及抗氧化活性研究[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(10): 234−237. [ZHAO H C, WANG W T, LEI J M, et al. Study on decolorization process and antioxidant activity of ginkgo fruit exocarp polysaccharide[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2020, 48(10): 234−237.]

[52] 邱书娟, 孙秀菊, 李香玲, 等. 银杏叶提取物减轻糖尿病大鼠肾缺血再灌注损伤[J]. 基础医学与临床, 2019, 39(12): 1729−1734. [QIU S J, SUN X J, LI X L, et al. EGB761 alleviates ischemia reperfusion injury on kidney of diabetic rats[J]. Basic & Clinical Medicine, 2019, 39(12): 1729−1734.]

[53] 张辉, 马惠清, 王晓娟. 银杏叶提取物通过激活 Nrf2-ARE 信号通路对帕金森病大鼠发挥脑保护作用[J]. 沈阳药科大学学报, 2018, 35(8): 79−83,99. [ZHANG H, MA H Q, WANG X J. The protective effect of *Ginkgo biloba* extract on the brain of Parkinson's disease rats through the activation of the Nrf2-ARE pathway[J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 2018, 35(8): 79−83,99.]

[54] 蒋瑶, 孔荔, 童杰, 等. 含银杏药妆品的研究进展[J]. 长沙医学院学报, 2018, 16(2): 33−36. [JIANG Y, KONG L, TONG J, et al. The research progress of ginkgo cosmeceutical[J]. Journal of Changsha Medical University, 2018, 16(2): 33−36.]

[55] LUCHI K, TAKAI T, HISSATOMI H. Cell death via lipid peroxidation and protein aggregation diseases[J]. Biology, 2021, 10(5): 399−418.

[56] 权明春, 苏振宏, 方大维, 等. 银杏黄酮的提取与功能研究进展[J]. 今日药学, 2020, 30(11): 72−75. [QUAN M C, SU Z H, FANG D W, et al. Research progress on extraction and function of ginkgo flavone[J]. Pharmacy Today, 2020, 30(11): 72−75.]

[57] VERMA S, RANAWAT P, SHARMA N, et al. *Ginkgo biloba* attenuates aluminum lactate-induced neurotoxicity in reproductive senescent female rats: Behavioral, biochemical, and histopathological study[J]. Environmental Science And Pollution Research International, 2019, 26(26): 27148−27167.

[58] 张丽娇. 银杏叶多糖抗炎作用的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2006. [ZHANG L J. The research of *Ginkgo biloba* leaf polysaccharides for anti-inflammation effect[D]. Changchun: Jilin University, 2006.]

[59] 臧中昊. 银杏叶多糖降解产物对巨噬细胞抗炎抗氧化活性的影响 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2020. [ZANG Z H. Effects of *Ginkgo biloba* polysaccharide degradation products on anti-inflammatory and antioxidant activities of macrophages[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2020.]

[60] ALWISAWI A, ALMUKHTAR N, HASSOON A F. A compare study effects of *Ginkgo biloba* extract and corticosteroid in induce allergic asthma in rabbits in regards to physiological and immunological parameters[J]. Medical Journal of Babylon, 2017, 14(2): 341−352.

[61] 赵妍, 夏趁意, 包怡敏, 等. 银杏酮酯对抑郁大鼠行为及炎症细胞因子的影响[J]. 中药药理与临床, 2015, 31(3): 88−92. [ZHAO Y, XIA C Y, BAO Y M, et al. The effect of *Ginkgo biloba* extract on behavior and inflammatory cytokines levels in depressed rats[J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2015, 31(3): 88−92.]

[62] PRIYANKA A, NISHA V M, ANUSREE S S, et al. Bilobalide attenuates hypoxia induced oxidative stress, inflammation, and mitochondrial dysfunctions in 3T3-L1 adipocytes via its antioxidant potential[J]. Free Radical Research, 2014, 48(10): 1206−1217.

[63] 杨雨微, 陈璟, 汪洁, 等. 银杏内酯 B 对 ApoE~(-/-) 小鼠动脉粥样硬化的抗氧化和抗炎作用研究[J]. 中国野生植物资源,

2020, 39(9): 23−25. ［YANG Y W, CHEN J, WANG J, et al. Antioxidative and anti-inflammatory effects of ginkgolide B on atherosclerosis in ApoE~(-/-) mice[J]. Chinese Wild Plant Resources, 2020, 39(9): 23−25.］

［64］吴海霞. 银杏种仁抑菌蛋白及其抑菌机制研究 [D]. 南京: 南京林业大学, 2014. ［WU H X. Study on antimicrobial activity and mechanism of protein from *Ginkgo biloba* seeds[D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2014.］

［65］吴朝霞, 张敏, 金楠, 等. 胡桃醌对大肠杆菌呼吸及能量代谢的影响[J]. 食品与机械, 2011, 27(6): 131−134. ［WU Z X, ZHANG M, JIN N, et al. Effects on juglone to *Escherichia coli* respiration energy metabolism[J]. Food & Machinery, 2011, 27(6): 131−134.］

［66］黄小炯, 区子弁, 王琴. 银杏抗菌蛋白的提取及其抗菌性研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(10): 139−141. ［HUANG X J, QU Z M, WANG Q. Study on extract of antibacterial protein from *Ginkgo biloba*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2008, 29(10): 139−141.］

［67］刘蕾, 何光志, 王文佳. 银杏抗菌肽蛋白基因原核表达及其重组蛋白的体内外抑菌作用研究[J]. 中国药房, 2019, 30(18): 2513−2518. ［LIU L, HE G Z, WANG W J. Study on gene prokaryotic expression of *Ginkgo biloba* antimicrobial peptide protein and antimicrobial activity of its recombinant protein *in vivo* and *in vitro*[J]. China Pharmacy, 2019, 30(18): 2513−2518.］

［68］WANG Z, SUN Q, ZHANG H, et al. Insight into antibacterial mechanism of polysaccharides: A review[J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 150(1): 1−6.

［69］莫晓宁, 潘海燕, 李艾, 等. 银杏叶提取物的抑菌活性研究[J]. 粮食科技与经济, 2019, 44(4): 97−99,105. ［MO X N, PAN H Y, LI A, et al. Study on the antibacterial activity of *Ginkgo biloba* leaf extract[J]. Grain Science and Technology and Economy, 2019, 44(4): 97−99,105.］

［70］吴海霞, 吴彩娥, 刘金达, 等. 银杏种仁酚酸的纯化、鉴定及其抑菌活性分析[J]. 中国食品学报, 2015, 15(3): 207−215. ［WU H X, WU C E, LIU J D, et al. Purification, identification and the antimicrobial activity of ginkgolic acids in ginkgo seeds[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2015, 15(3): 207−215.］

［71］李薇, 戴庆棠, 刘作恩, 等. 银杏叶治疗慢性乙型肝炎研究[J]. 北京军区医药, 1994, 6(4): 257−259. ［LI W, DAI Q T, LIU Z E, et al. Study on *Ginkgo biloba* leaf in the treatment of chronic hepatitis B[J]. Medical Journal of Beijing Military Region, 1994, 6(4): 257−259.］

［72］杨芳. 银杏叶提取物体外抗乙型肝炎病毒分泌抗原的作用 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2011. ［YANG F. Inhibitory effect of *Ginkgo biloba* extract (EGb761) on hepatitis B virus secreting HBV antigens *in vitro*[D]. Nanning: Guangxi Medical University, 2011.］

［73］李峥, 童旭东. 银杏叶提取物联合复方甘草酸苷治疗 HBV 感染慢加急性肝功能衰竭疗效及对外周血 NF-κB、TNF-α、LXA4 和 LPS 的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2018, 27(21): 42−45, 114. ［LI Z, TONG X D. Effect of *Ginkgo biloba* extract combined with compound glycyrrhizin on hepatitis B virus related acute-on-chronic liver failure and its influence on peripheral blood NF-κB, TNF-α, LXA4 and LPS[J]. Modern Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, 2018, 27(21): 42−45, 114.］

［74］万巧凤, 吴莉, 杨美玲, 等. 槲皮素对甲型 H1N1 流感病毒诱导的 A549 细胞凋亡效应酶 Caspase-3 的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2011, 18(10): 42−44. ［WAN Q F, WU L, YANG M L, et al. Effect of quercetin on Caspase-3 of A549 cell induced by influenza virus H1N1[J]. Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine, 2011, 18(10): 42−44.］

［75］廖群, 杨碧莹, 杜宝新, 等. 银杏内酯 B 对肌萎缩侧索硬化细胞模型的保护作用及其机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(15): 33−38. ［LIAO Q, YANG B Y, DU B X, et al. Protective effect and mechanism of ginkgolide B on amyotrophic lateral sclerosis cell model[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2020, 26(15): 33−38.］

［76］夏前贤. 银杏外种皮多糖抑制新城疫病毒作用的研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2017. ［XIA Q X. Inhibitory effect of *Ginkgo biloba* exotesta polysaccharide on Newcastle disease virus[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2017.］

［77］钱琨, 孔正茹, 张杰, 等. 银杏外种皮多糖抑制 J 亚群禽白血病病毒在 DF-1 细胞中的复制[J]. 中国动物传染病学报, 2018, 26(1): 13−18. ［QIAN K, KONG Z R, ZHANG J, et al. Antiviral activity of *Ginkgo biloba* exocarp polysaccharide against subgroup J avian leukosis virus in DF-1 cell[J]. Chinese Journal of Veterinary Parasitology, 2018, 26(1): 13−18.］

刘以晴, 马月云, 刘宗浩, 等. 褐藻胶寡糖的制备、分离及表征研究进展 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 456−468. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050030

LIU Yiqing, MA Yueyun, LIU Zonghao, et al. Review on Preparation, Separation and Characterization of Alginate Oligosaccharide[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 456−468. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050030

· 专题综述 ·

褐藻胶寡糖的制备、分离及表征研究进展

刘以晴[1,2], 马月云[1], 刘宗浩[1], 左依瑾[1], 汪秋宽[1], 武　龙[1], 周　慧[1,3,*]

（1.大连海洋大学食品科学与工程学院, 辽宁大连 116023;
2.河南工业大学粮油食品学院, 河南郑州 450001;
3.大连工业大学海洋食品精深加工关键技术省部共建协同创新中心, 辽宁大连 116034）

摘　要: 褐藻胶寡糖是通过褐藻胶降解制备得到的、由 2~25 个单糖（甘露糖醛酸、古洛糖醛酸）通过糖苷键结合而成的低分子聚合物。与褐藻胶相比，寡糖具有粘度低、易溶于水、易吸收、稳定性强的特点，以及食品保鲜、抗凝血、抗肿瘤、降血压血脂、促进植物生长、诱导植物产生抗性等诸多生物活性，近年来成为海洋多糖领域的研究热点。褐藻胶寡糖的纯度、性能、结构与其制备、分离以及表征方法密切相关。本文综述了褐藻胶寡糖的制备方法，如物理降解法、化学降解法、酶降解法和发酵法等；褐藻胶寡糖的分离技术，如沉降分离法、膜分离法和色谱法等；褐藻胶寡糖的结构表征法，如薄层色谱法、红外吸收光谱、圆二色谱、质谱、核磁共振波谱等，以期为褐藻胶寡糖的进一步研究和应用提供参考。

关键词: 褐藻胶, 寡糖, 制备, 分离, 表征

中图分类号: TS254.4　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0456−13

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050030

本文网刊:

Review on Preparation, Separation and Characterization of Alginate Oligosaccharide

LIU Yiqing[1,2], MA Yueyun[1], LIU Zonghao[1], ZUO Yijin[1], WANG Qiukuan[1], WU Long[1], ZHOU Hui[1,3,*]

（1.Food Science and Engineering, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;
2.College of Food Science and Technology, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China;
3.Collaborative Innovation Center of Seafood Deep Processing, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China）

Abstract: Alginate oligosaccharide (AOS) is a kind of low molecular polymer, which is composed of 2~25 monosaccharides (mannuronic acidandguluronic acid) by glycoside bond. Compared with alginate, AOS, which has the characteristics of low viscosity, good water solubility, easy absorption and strong stability, meanwhile which has many biological activities, such as food preservation, anticoagulation, anti-tumor, blood pressure and lipids reduction, promoting plant growth, inducing plant resistance, has become a research hotspot in the field of marine polysaccharides. The purity, structure and properties of alginate oligosaccharides are closely related to their preparation, separation and characterization. This paper reviews the preparation methods of alginate oligosaccharides, such as physical degradation, chemical degradation, enzymatic degradation and fermentation; The separation technology of alginate oligosaccharides, such as sedimentation separation, membrane separation and chromatography; The structure characterization methods of alginate oligosaccharides, such as Thin Layer Chromatography (TLC), Infrared Absorption Spectroscopy(FTIR), Circular Dichroism (CD), Mass Spectroscopy (MS), Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR), in order to provide reference or further research and application of AOS.

收稿日期: 2021−05−08

基金项目: 国家自然科学基金青年项目（32101861）; 国家重点研发计划蓝色粮仓科技创新（2019YFD0901800, 2018YFD0901104）; 辽宁省博士科研启动基金计划项目（2019-BS-036）; 辽宁省教育厅科学研究经费项目（QL201907）; 催化基础国家重点实验室基金课题（N-17-08）。

作者简介: 刘以晴（1997−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品工程, E-mail: liuyiqing0310@163.com。

*** 通信作者:** 周慧（1981−）, 女, 博士, 讲师, 研究方向: 多孔材料改性及其在食品分离领域的应用, E-mail: zhouhui@dlou.edu.cn。

Key words: alginate; oligosaccharide; preparation; separation; characterization

褐藻胶（Alginate）是一种主要从海带、巨藻、裙带菜、马尾藻等褐藻中提取的水溶性酸性多糖[1−2]，棕色固氮菌、绿脓杆菌等微生物经培养也可产生褐藻胶[3]。据调查显示，褐藻胶的世界产量约为30000 t/年[4]。褐藻胶分子是由 β-D-甘露糖醛酸（M）和 α-L-古洛糖醛酸（G）两种同分异构单体通过1→4 糖苷键连接而成的直链线型嵌段多糖，主要有均聚甘露糖醛酸（PM）、均聚古洛糖醛酸（PG）和异聚褐藻胶（PMG）三种排列方式[3,5]（见图 1）。褐藻胶的M/G、分子量、乙酰化程度等结构特征，直接影响其粘度、凝胶性、水溶性等物理化学性质[6]。褐藻胶作为增稠剂、乳化剂、品质改良剂等食品添加剂广泛应用于食品加工领域。但是由于褐藻胶的分子量较大、凝胶性强、粘度大、不易被机体吸收，限制了其更多潜在的应用[7]。

褐藻胶寡糖（Alginate oligosaccharides, AOS）是由褐藻胶通过物理、化学及生物方法降解生成的、聚合度 2~25 的线性寡糖[3,8]。AOS 由于分子量小、水溶性好，克服了褐藻胶粘度大、不易被机体吸收的缺点[9]，并且具有独特的保鲜[10]、抑菌性[11]、抗肿瘤[12]、抗氧化[13]、降血压[14]、降血糖[15]、促进植物生长[16]、诱导植物抗性[17] 等多种生物活性，因此在食品、保健品、医药和绿色农业等领域的研究和应用得到了极大的发展。褐藻胶寡糖的生物活性与其结构密切相关，而降解方法和分离技术又直接影响着得到褐藻胶寡糖的分子量、化学结构和纯度等性质[18]。因此，本文对褐藻胶寡糖的制备方法、分离技术及结构表征进行了综述，并对其未来的发展提出了展望，以期为未来褐藻胶寡糖的应用和发展提供理论参考依据。

1　褐藻胶寡糖的制备

1.1　物理降解法

物理降解法是指通过辐射[19−20]、高温高压[21] 等物理手段使褐藻胶中糖苷键断裂生成褐藻胶寡糖的方法。目前研究报道较多的物理降解法主要有辐射法和热液法。

1.1.1　辐射法　辐射降解法是褐藻胶在高能射线的作用下使糖苷键发生断裂，从而生成褐藻胶寡糖的一种方法[22]。

El-Mobby 等[19] 使用^{60}Co 的 γ 射线在剂量为 20~100 kGy 范围内照射褐藻胶，并加入化学引发剂过硫酸钾（KPS）产生协同效应，以提高褐藻胶降解的速率，减少降解所需褐藻胶的剂量。通过调节射线的照射剂量和照射时间，可以控制褐藻胶降解产物的分子量。Hu 等[23] 通过微波降解法降解褐藻胶，在 130 ℃、纯水体系中使用 1600 W 微波降解褐藻胶 15 min，得到了重均分子量为 3200 Da 的褐藻胶寡糖，寡糖产率为 71%，发现制得的褐藻胶寡糖的重均分子量随着辐射时间的延长和降解温度的增加而显著降低，实现了褐藻胶寡糖的可控降解。Jankana 等[20] 使用紫外光照射 1 g/L 褐藻胶，加入二氧化钛（TiO_2）作为催化剂，在 pH7 条件下反应 3 h，最终得到产率达到 90%、富含 PolyMG/GM 片段的褐藻胶寡糖。

辐射法不需要对环境进行特殊的控制，操作简单，使用的催化剂为二氧化钛，反应完成后过滤容易除去，绿色环保。但是由于利用辐射法定向制备褐藻胶寡糖的技术尚不成熟，还未应用于褐藻胶寡糖的大规模生产。

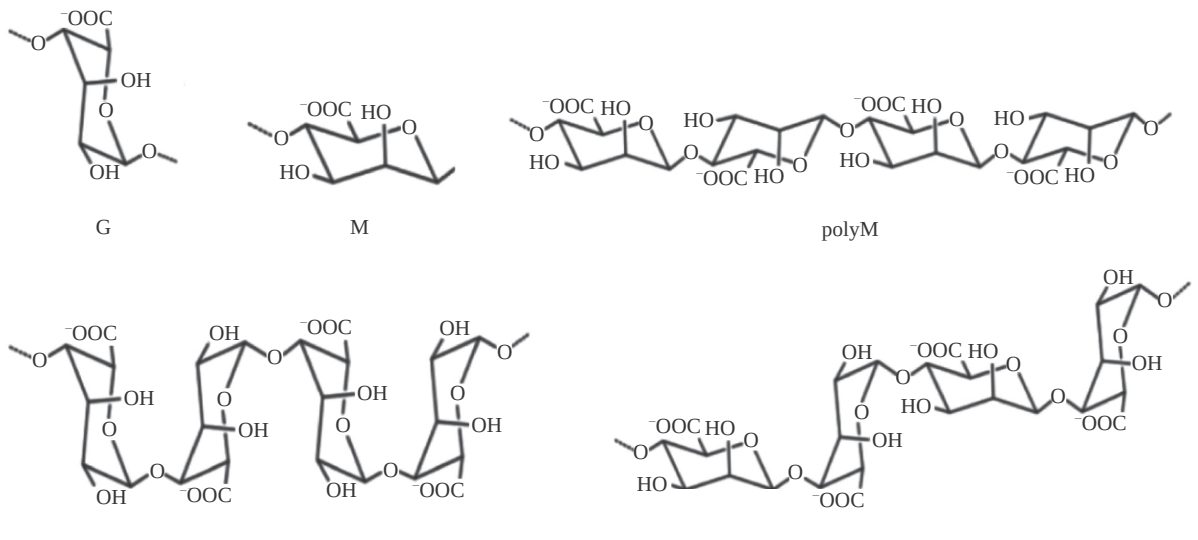


图 1　褐藻胶的结构单体 G 和 M，褐藻胶的均聚片段 polyM 和 polyG，以及杂聚片段 polyMG/GM[3]

Fig.1　Structural monomers G and M, homopolymer fragments polyM and polyG, and heteropoly fragment polyMG/GM of alginate[3]

1.1.2 热液法 热液法分为水热法和溶剂热液法，其中水热法较为常见。在水热法降解过程中，首先将水加热使其超过临界点温度和压强，由于处于超临界状态的水具有溶解大量氧气、离子积大、粘度低、表面张力较低和扩散系数较高等特点，作为新型反应介质具有超级催化作用，能在短时间内降解褐藻胶[21]。

Matsushima 等[24] 采用超临界水法降解褐藻胶，在 250 ℃ 下，1 s 内可获得含有 98% 古洛糖醛酸的均聚物和富含甘露糖醛酸的水溶性杂聚物、重均分子量为 670~770 Da 的寡糖，通过改变反应压强和温度，可以控制制备寡糖的分子量和寡糖分子中 M、G 的相对含量。Aida 等[25] 利用热液法降解褐藻胶，发现降解过程中糖苷键的裂解有选择性，裂解顺序依次是同聚体 MM、异聚体 MG、同聚体 GG，而不是在随机位点发生裂解，利用 2.0 wt.% 的褐藻胶水溶液在高温条件下（180~240 ℃）可降解成重均分子量为 500~800 Da 的寡糖，随着温度的升高会促进褐藻胶降解为单糖，同时导致单糖分解产生乳酸和乙酸等副产物。

热液法可以选择性的降解褐藻胶，实现定向制备褐藻胶寡糖，但是由于强烈的反应条件会导致褐藻胶过度分解而降低产率，产生过多的副产物。

1.2 化学降解法

化学降解法通过氧化剂、酸或碱与褐藻胶作用，使其中的糖苷键断裂而降解为褐藻胶寡糖的一种方法。目前化学降解法主要包括氧化降解法、酸降解法和碱降解法。

1.2.1 氧化降解法 氧化降解法常用的氧化剂有 H_2O_2、NaClO、$KMnO_4$、$NaNO_2$ 等，并且在 Cu^{2+}、Fe^{2+}等催化剂的协同作用下可以达到更好的降解效果[3]。其中 H_2O_2 作为氧化剂降解褐藻胶，绿色环保且成本低，易于实现工业化生产，是研究较深入的一种方法[21]。目前较为公认的 H_2O_2 降解机理为：H_2O_2 产生羟自由基导致褐藻胶降解。羟自由基随机攻击褐藻胶糖链上任意糖残基 C-1 位上的氢，使分子重排并破坏 1-4 糖苷键，得到褐藻胶寡糖[26]。

H_2O_2 作为氧化剂降解褐藻胶，反应速率受到氧化物浓度、反应时间、反应温度等因素的影响[27]。Yang 等[26] 使用浓度为 5% 的 H_2O_2 溶液降解经盐酸预处理的褐藻胶，在 90 ℃ 下反应 0.5~4 h，得到聚合度 2~15 的甘露糖醛酸寡糖，最大产率为 58%，且随着降解时间的延长，低分子量片段逐渐增加；但是由于反应体系中含有 H_2O_2，寡糖中还原端醛基大部分被氧化成羧基。Gan 等[28] 采用 H_2O_2 降解褐藻胶，0.5 mmol H_2O_2 与 40 mmol 的 Fe^{2+}（芬顿试剂）混合，在 37 ℃ 下反应 10 h，得到聚合度为 2~10 的褐藻胶寡糖。李海波等[29] 选用体积分数 6% 过氧化氢，在 60 ℃ 下降解褐藻胶 8 h，得到重均分子量为 1000~6000 Da 的褐藻胶寡糖，寡糖的产率可达到 70%。曹柳[30] 选用 H_2O_2 降解褐藻胶，得到褐藻胶降解的最佳条件是 5% 褐藻胶溶液与 2% H_2O_2，在 pH5.0、90 ℃ 反应 2 h，得到聚合度为 2~9 的褐藻胶寡糖。

H_2O_2 降解褐藻胶反应的唯一副产物是 H_2O，且没有其它杂质，因此被视为一种绿色降解方法，适用于生产低分子量的褐藻胶寡糖。但是依据现有的机理研究，H_2O_2 对褐藻胶的降解位点随机，难以控制生成寡糖的结构，且 H_2O_2 具有强氧化性，反应过程中会破坏制备寡糖的还原基，影响寡糖的生物活性。

1.2.2 酸降解法 酸降解法是利用盐酸、草酸、甲酸等无机或有机酸对褐藻胶进行降解的一种方法。褐藻胶中的糖苷键在酸性条件下进行水解，首先糖苷氧质子化生成共轭酸；然后共轭酸杂化，形成碳氧鎓离子和非还原端；最后水分子迅速进入碳鎓-氧鎓离子中，形成还原末端[31]（如图 2）。

Haug 等[32] 在 100 ℃ 下使用 1 mol/L 的草酸降解褐藻胶 10 h，得到了聚合度为 10~30 的甘露糖醛酸片段和古洛糖醛酸片段，寡糖的产率可达到 80%。Chandia 等[33] 使用盐酸、硫酸和甲酸降解褐藻胶，在

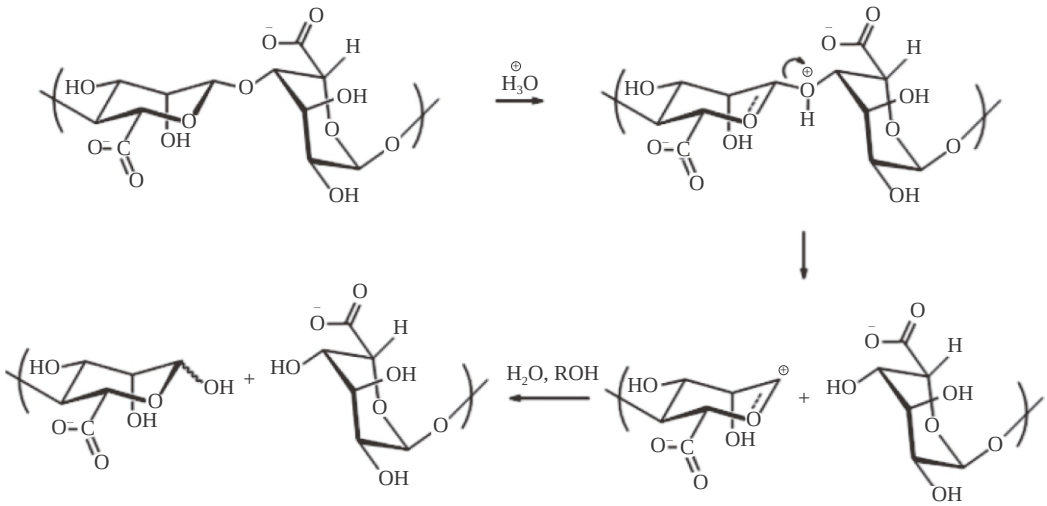


图 2 褐藻胶酸降解法的机理[31]

Fig.2 Acid degradation mechanism of alginate[31]

100 ℃ 利用 90% 甲酸降解褐藻胶 6 h，并不能将褐藻胶完全降解，需用 1.5 mol/L 甲酸在 100 ℃ 下继续反应 2 h 才能将褐藻胶完全降解，但甲酸降解比硫酸、盐酸降解效率高，且清洁。Leal 等[34] 在 100 ℃ 用 4.5 mL 90% 的甲酸降解 10 g/L 的褐藻胶 6 h，褐藻胶寡糖的产率可达到 75%。胡博旸等[35] 利用 0.5 mol/L 盐酸在 90 ℃ 下降解褐藻胶 10 h，得到甘露糖醛酸和古洛糖醛酸的总产率为 70%，发现在前 6 h 内产物中还原糖的含量随时间的延长而增加。

酸降解法制备褐藻胶寡糖可以保留褐藻胶大分子中固有的结构特征，且一次降解可以获得系列聚合度的寡糖[21]。但是褐藻胶对无机酸的耐受性较强，很难将褐藻胶完全水解；且酸降解反应在较高温度下进行，反应剧烈不易控制。

1.2.3　碱降解法　碱降解褐藻胶的机理是 β-消除反应，在碱性条件下褐藻胶的 C-5 失去质子，由于羧基诱导效应电子从 C-4 位转移到 C-5 位，促使 1→4 糖苷键断裂，并在降解产物的 4→5 位上形成一个与羧基共轭的双键[36]（如图 3）。

Niemela 等[37] 在氮气条件下，分别在 95 ℃ 和 135 ℃ 利用 0.5 mol/L 和 2 mol/L 的 NaOH 溶液对褐藻胶处理 2.5 h，发现褐藻胶在高浓度的碱液和较低温下会降解生成脱水异糖精酸、糖化异糖精酸和 2-脱氧-3-C-甲基酒石酸，而在低浓度碱液中主要产物为 2,3-二脱氧戊糖酸。Kristiansen 等[38] 在高碘酸钠的作用下，在 37 ℃、pH10.4~10.3 用 0.0625 mol/L 碳酸钙降解 3 g/L 的褐藻胶，得到重均分子量为 1000 g/mol 的褐藻胶寡糖。由于氧化残留物二元醛对碱非常敏感，所以经高碘酸盐氧化处理的褐藻胶比未氧化的褐藻胶在碱性条件下更容易降解。

碱降解法操作简单，但是其降解是通过 β-消除反应实现的，会导致原多糖结构发生改变，且目标产物的生成量难以控制，易生成甲酸、乙酸、酒石酸等副产物[8]。

1.3　酶降解法

酶降解法是在褐藻胶裂解酶的作用下使褐藻胶中的 1→4 糖苷键断裂，从而制备褐藻胶寡糖的一种方法[39]。根据褐藻胶裂解酶对褐藻胶特定片段表现出的底物特异性，可将褐藻胶裂解酶分为：聚甘露糖醛酸特异性裂解酶（polyM）、聚古洛糖醛酸特异性裂解酶（polyG）和双功能裂解酶（polyMG）[3]。褐藻胶裂解酶一般来源于藻类、海洋微生物和海洋无脊椎动物等，其中对于来源于黄杆菌、弧菌、假交替单胞菌等海洋微生物的褐藻胶裂解酶的研究和应用最为广泛[3, 40–42]。

Boucelkha 等[43] 在 30 ℃ 下利用来源于黄杆菌、5 个单位的聚古洛糖醛酸特异性裂解酶降解 1.0% 古洛糖醛酸片段 6 h 后，得到重均分子量为 3742 g/mol、数均分子量为 3219 g/mol 的古洛糖醛酸寡糖。Li 等[44] 利用来源于弧菌 SY08 的、21.5 U/mg 的内溶性双功能褐藻胶裂解酶 AlySY08 在 40 ℃、pH7.6 下，降解 0.3% 褐藻胶 8 h，得到聚合度为 2~5 的褐藻胶寡糖，寡糖的产率可达到 81%。Xie 等[45] 运用来源于假交替单胞菌 NJ-21 的、具备 256 U/mg polyM、625 U/mg polyG 和 303 U/mg polyMG 底物特性的褐藻胶裂解酶 Al163，在 40 ℃、pH7.0 下降解 0.2% 褐藻胶 8 h，得到富含二聚体和三聚体的褐藻胶寡糖。Chen 等[46]利用来源于芽孢杆菌 Alg07 的聚甘露糖醛酸特异性褐藻胶裂解酶 AlgA，在 40 ℃、pH7.5 下降解 10 g/L的褐藻胶，得到聚合度 2~4 的褐藻胶寡糖和甘露糖醛酸寡糖。酶降解法制备褐藻胶寡糖的实例研究总结见表 1。

褐藻胶裂解酶来源广泛，酶活力高，专一性强、反应条件温和、耗能少、产物得率较高，可应用于褐藻胶寡糖的定向制备[46–48]。由于酶降解法得到的褐藻胶寡糖为生物活性高的不饱和寡糖，如图 4 所示，所以酶降解法是目前研究应用于制备褐藻胶寡糖的主要方法[49]。但是由于不同来源的褐藻胶裂解酶降解褐藻胶的机理和制备寡糖的结构不同。因此，需深

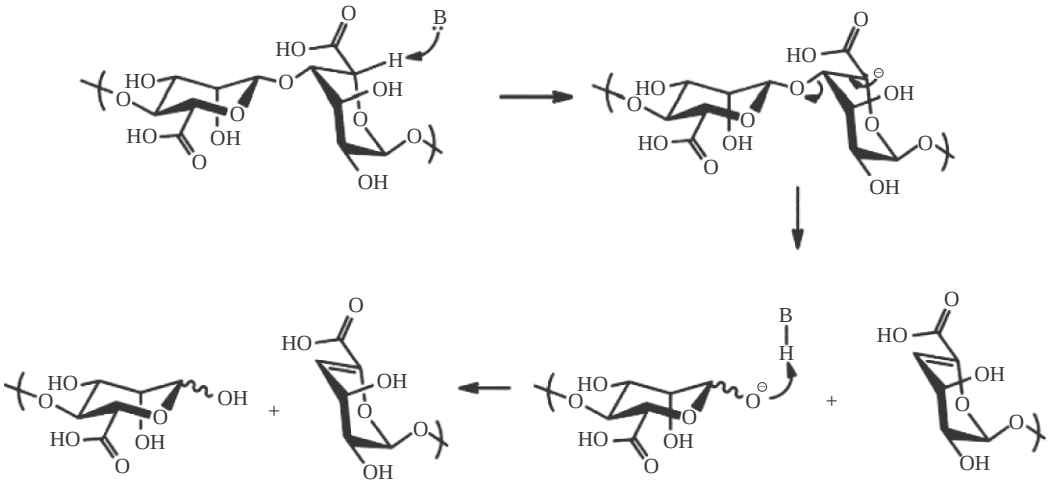


图 3　褐藻胶碱降解法的机理[36]

Fig.3　Alkaline degradation mechanism of alginate[36]

表 1 酶降解制备褐藻胶寡糖

Table 1 Preparation of alginate oligosaccharides by enzymatic degradation

酶的来源	酶的类型	制备寡糖类型	文献来源
黄杆菌	polyG	古洛糖醛酸寡糖	[43]
弧菌SY08	polyMG	聚合度2~5 褐藻胶寡糖	[44]
假交替单胞菌NJ-21	polyM、polyG、polyMG	聚合度2和3褐藻胶寡糖	[45]
芽孢杆菌Alg07	polyM	甘露糖醛酸寡糖、聚合度2~4褐藻胶寡糖	[46]

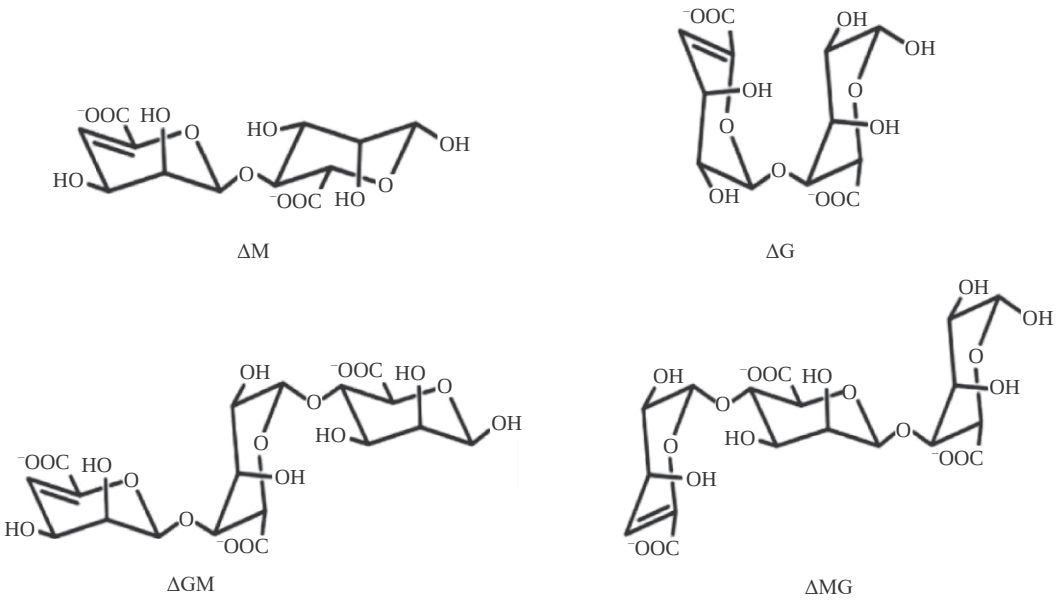


图 4 酶降解 AOS 结构[3]

Fig.4 The structure of AOS by enzymatic degradation[3]

入探索不同褐藻胶裂解酶与制备寡糖的结构和功能之间的关系。

1.4 发酵法

发酵法是将褐藻胶与特定微生物培养, 褐藻胶为微生物生长提供碳源, 使微生物分泌褐藻胶裂解酶降解褐藻胶, 而制备褐藻胶寡糖[3]。

Bang 等[50] 将枯草芽孢杆菌 KCTC 11782BP 菌株与含有 1.0% 褐藻胶共同培养, 在 37 ℃ 培养 3 d 得到的发酵产物加入到含有 3% 褐藻胶的培养基中, 在 37 ℃ 下培养 14 d, 得到平均聚合度为 5 的褐藻胶寡糖。此外, 枯草芽孢杆菌 KCTC 11872BP 和 3% 褐藻胶在 37 ℃ 下发酵 14 d, 可制得重均分子量低于 10 kDa 的褐藻胶寡糖[3]。Wang 等[51] 将斜纹芽孢杆菌 M3 和 0.5(w/v)褐藻胶, 同 0.5% $(NH_4)_2SO_4$、0.2 KH_2PO_4、0.1 $MgSO_4$ 和 0.002% $FeSO_4$, 在 pH7.2、30 ℃ 下发酵 24 h, 得到聚合度 2~4 的褐藻胶寡糖。赵婉琳等[52] 在 25 ℃ 下将海科贝特氏菌 HQZ08 与 7 g/L 的褐藻胶共同培养 24 h, 得到聚合度为 2~6 的褐藻胶寡糖, 寡糖的产率为 32.15%。

与传统工业化酶法制备褐藻胶寡糖相比, 发酵法制备褐藻胶寡糖成本低、操作简单。但是发酵法对于最优发酵条件和优质发酵工程菌的研究尚不成熟, 目前产率较低, 还需要开发更多活性高的褐藻胶降解菌株应用于发酵法制备褐藻胶寡糖[53]。

褐藻胶寡糖制备方法的优缺点总结见表 2。

2 褐藻胶寡糖的分离纯化

不同结构和组成的褐藻胶寡糖具有不同的生物活性, 由于褐藻胶降解产物是由不同分子量的寡糖组

表 2 褐藻胶寡糖制备方法

Table 2 Preparation methods of alginate oligosaccharides

制备方法		优点	缺点
物理降解法	辐射法	操作简单, 绿色环保	定向制备寡糖技术不成熟
	热液法	定向制备褐藻胶寡糖	反应强烈, 产生副产物
化学降解法	H_2O_2法	绿色无污染, 适合低分子量寡糖制备	破坏寡糖还原基, 影响寡糖生物活性
	酸降解法	保留褐藻胶固有结构特征	难实现褐藻胶完全水解, 反应剧烈不易控制
	碱降解法	操作简单	改变原多糖结构, 生成副产物
酶降解法		耗能少, 得率高, 定向制备不饱和寡糖	缺乏高活力酶
发酵法		成本低, 操作简单	产率低

成的混合物，所以选用合适的分离方法分离获得高纯度的褐藻胶寡糖，对其构效关系的研究和应用尤为重要。目前褐藻胶寡糖分离纯化的方法主要有沉降分离法、膜分离法和色谱分离法等。

2.1　沉降分离法

沉降分离法是一种传统的、经典的分离方法。将寡糖混合物溶解到有机溶剂（如乙醇或丙酮）中，不同分子量的褐藻胶寡糖在有机溶剂中的溶解度不同，分子量较大的寡糖在较低浓度的有机溶剂中容易被沉淀出来，因此通过调整有机溶剂的浓度，可将不同分子量范围的寡糖进行分离[54]。

Hu 等[23] 利用沉降法对褐藻胶寡糖混合液进行初步分离，寡糖混合液通过 80% 的乙醇离心沉淀后，取上清液干燥再经凝胶渗透色谱分离得到 10 个寡糖组分。Zhang 等[55] 将乙醇加入到褐藻胶裂解酶降解制备的褐藻胶寡糖混合液中直至体积比为 50%，沉降 24 h 后，取上清液蒸发，除去占体积比 28% 的褐藻胶衍生低聚糖，再经凝胶渗透色谱分离、紫外检测得到 4 个褐藻胶寡糖组分。

沉降分离法不需要特殊的设备，操作简单，且应用范围广泛，但其分离不完全，常用于褐藻胶寡糖混合物的初步分离。

2.2　膜分离法

膜分离是在滤膜两侧施加压力差、浓度差等推动力，使不同大小的物料选择性通过滤膜。膜分离近似于筛分过程，褐藻胶寡糖混合物通过膜时，由于不同分子量的寡糖体积不同，大于膜孔径的微粒被截留，小于膜孔径的微粒透过滤膜，从而实现寡糖混合物的分离[54,56]。

根据孔径的大小滤膜可分为微滤膜（MF）、超滤膜（UF）、纳滤膜（NF）、反渗透膜（RO）等[54]。欧昌荣等[57] 通过超滤-纳滤两级膜分离发酵法制备的褐藻胶寡糖，发酵液经离心除去菌体后，取上清液先后利用 MWC5000 中空纤维膜超滤和 MWC325 纳滤膜纳滤，滤液经浓缩和冷冻干燥后，得到 5 个组分的褐藻胶寡糖，寡糖的回收率为 94.0%、脱盐率为 93.3%。Luan 等[58] 采用膜分离法分离辐射法降解制备的褐藻胶寡糖，经 YM4（截留分子量 MWCO30000）、YM3（MWCO10000）、YM2（MWCO3000）、YM1（MWCO1000）纤维膜超滤，得到 5 个组分，分析各组分的寡糖的分子量，发现随着辐照剂量的增加得到寡糖的分子量逐渐降低。Yang 等[59] 采用膜分离法分离褐藻胶寡糖混合物，经 MWCO10000 的超滤膜初步分离，截留分子量为 10 kDa 的褐藻胶寡糖。

膜分离法设备简单、启动快、不污染环境。但是膜分离法的分离效率易受到温度、压强、混合液浓度等因素的影响，其分离效果不易控制，且膜清洗的成本较高。

2.3　色谱分离法

分离组分中不同物质通过色谱柱，固定相对其吸附力不同，使其在色谱柱内移动速度不同，因而流出色谱柱的时间不同，从而达到分离的目的。色谱法具有分离效率高、检测灵敏度高、分析速度快、易于实现自动化的优点[54]。目前已经应用于褐藻胶寡糖分离的色谱分离法有凝胶渗透色谱法、离子交换色谱法、硅胶柱分离法、高效毛细管电泳法、薄层色谱法和荧光辅助糖电泳法等。

2.3.1　凝胶渗透色谱法（Gel Permeation Chromatography, GPC）

凝胶渗透色谱法是根据分子大小和形状来分离物质分子的一种非吸附方式的层析技术[30]。褐藻胶寡糖混合物在通过具有三维网络结构的凝胶时，因分子体积不同，通过的速度不同，体积大的寡糖速率快，分子小的寡糖速率慢，因此不同寡糖分子通过凝胶的时间不同而实现对不同体积的褐藻胶寡糖的分离[54]。

Aida 等[25] 利用 GS-220HQ 柱和 GS-520HQ 柱分离热液法制备的褐藻胶寡糖，采用流速 1 mL/min 0.3 mol/L 的 $NaNO_3$ 为流动相，得到甘露糖醛酸寡糖和古洛糖醛酸寡糖。陈岩君等[60] 采用 Bio-Gel P2 柱分离酶降解制备的褐藻胶寡糖，以流速 0.1 mL/min 2.5 mmol/L 的 NaCl 为流动相，在 230 nm 处经紫外测定，得到聚合度均一的三个寡糖组分，寡糖聚合度为 4~6。Ueno 等[61] 利用 2.64 cm×100 cm 的 Bio-Gel P6 凝胶柱分离褐藻胶寡糖，加入 50 mol/L 的磷酸缓冲液平衡到 pH7.0，得到聚合度为 2~8 的褐藻胶寡糖。Chen 等[46] 采用 Superdex Peptide 10/300 柱分离的酶降解制备的褐藻胶寡糖，以流速 0.4 mL/min 0.2 mol/L NH_4HCO_3 为流动相，得到三个寡糖组分，寡糖聚合度为 2~3。

凝胶渗透色谱法操作简单，条件温和，分离率高，且不需要有机溶剂，但这种方法对分子量的差异仅表现在流速的差异上，需严格控制流速，所以分析速度较慢，且凝胶渗透色谱不能分析分子量相近而结构不同的寡糖，适合分析分子量相差 10% 以上的寡糖[62]。

2.3.2　离子交换色谱分离法（Ion-exchange chromatography, IEC）

离子交换色谱法是以离子交换剂为固定相、利用被分离组分与固定相之间发生离子交换能力的差异而实现分离的一种液相色谱分离技术。离子交换色谱固定相上的离子基团可与褐藻胶寡糖游离的羧基结合，当用流动相洗脱时，寡糖按结合能力从小到大的顺序依次被洗脱下来，而达到分离的目的[63]。

Balance 等[64] 选用半制备离子型 Pac-AS4A 柱分离酸水解得到的褐藻胶寡糖，NaOH/NaAc 进行洗脱，并通过脉冲安培检测技术（Pulsed-amperometric detection, PAD）对分离寡糖纯度进行检测，得到聚合度为 5 的寡糖，寡糖的纯度为 96%。Li 等[65] 采用 2 cm×35 cm 的 Pharmacia 柱分离酶解法制备的褐藻胶寡糖，以 0.2 mol/L 的 NaAc 为洗脱剂，流速设置为 1.0 mL/min 进行梯度洗脱，在 235 nm 对分离产品进

行紫外检测，得到包括二糖和三糖的 6 种寡糖。Peng 等[66] 采用 TSK-GEL DEAE-2SW 柱分离褐藻胶寡糖混合物，以 0~0.25 mol/L 的 NaCl 作为流动相进行梯度洗脱，流速为 7 mL/min，洗脱液在波长 230 nm 进行紫外检测，分离得到 12 个褐藻胶寡糖组分，各组分的纯度均高于 97%。

离子交换色谱法具有样品用量少、分离效率高、灵敏度高的优点，适用于分离酸性寡糖，但是其定性能力差，可与其它色谱法联用提高分离纯化效果[63]。

2.3.3 硅胶柱分离法 硅胶柱分离法主要是利用硅胶载体对于不同极性的物质结合吸附的程度不同，而实现分离的一种方法。不同聚合度的褐藻胶寡糖极性不同，一般情况下，极性较大的物质容易被硅胶载体吸附，而极性较弱的物质不易被硅胶载体吸附，因此，褐藻胶寡糖混合物因吸附程度不同而达到分离[67]。

黄菊等[68] 利用粒度为 200~300 目的柱层析硅胶柱对酶解产生的褐藻胶寡糖进行分离，将 200 mg 褐藻胶寡糖同 5 g 硅胶一起加入 10 mL 蒸馏水中混匀，于 35 ℃ 的烘箱中烘干，洗脱至洗脱液（洗脱液为甲醇:水:正丁醇:醋酸系统）中无糖检出，洗脱液经蒸发浓缩后通过薄层色谱法（TLC）测定得到 4 个褐藻胶寡糖组分，各组分已经被分为两种或三种寡糖的混合物，每个组分再次分别进行硅胶柱分离，通过 MALDE-TOF-MS 测定得到分子量为 1000~8000 Da 的寡糖，且每种寡糖已经得到基本的分离。王红敏[69] 使用粒度为 200~300 目的柱层析硅胶分离褐藻胶寡糖，将 500 mg 褐藻胶寡糖同 1 g 硅胶一起加入 1 mL 蒸馏水中混匀，于 35 ℃ 的烘箱中烘干，以正丁醇:甲酸:水（4:6:1, v/v）为洗脱剂洗脱混合液至无糖检出，浓缩蒸发后经质谱测定得到 4 个寡糖组分，各个寡糖组分进行第二次硅胶柱分离，利用 TLC 分析发现聚合度为 2~5 的寡糖达到基本分离，且三糖的纯度最大。

硅胶柱分离法操作简便，不需要昂贵的仪器设备，成本低，但是由于其洗脱液大多含有大量的有机溶剂，易造成环境污染。

2.3.4 高效毛细管电泳法（High Performance Capillary Electrophoresis, HPCE） 高效毛细管电泳法是依据在高压电场中，不同物质在毛细管分离通道中的淌度和分配行为不同而进行分离的一种方法[70]。不同的褐藻胶寡糖带电荷不同，在均一的缓冲溶液体系中，由于电泳的淌度不同而分离成单一的区带，而达到分离纯化的效果[63]。

孙燕[71] 选用有效长度为 48 cm、内径 50 μm 的熔融石英管为毛细管，通过 HPCE 分离酶降解制备的褐藻胶寡糖。在进样压力为 50 mbar、分离温度为 30 ℃ 下进行分离，在 235 nm 处进行紫外检测，得到 4 个寡糖组分，分别为二糖、三糖、四糖和五糖，且具有较高的纯度。张真庆[63] 采用高效毛细血管电泳法分离酶降解产生的寡糖，在电压为 20 kV、温度为 25 ℃ 下，用分离长度为 40 cm 内径为 50 μm 未涂层的石英毛细管进行分离，在 235 nm 处进行紫外在线检测，得到 4 个褐藻胶寡糖组分，各组分的纯度分别是 85.23%、84.73%、97.77%、95.25%。

高效毛细管电泳法分析时间短、耗样少，进样量可达纳升级，适用于微量试样的分离纯化，但是由于会电渗导致样品组成发生变化，从而影响分离效果[71]。

褐藻胶寡糖分离技术的优缺点总结见表 3。

3 褐藻胶寡糖的表征

3.1 纯度分析

荧光辅助糖电泳法是利用可以提供荧光电荷和基团的衍生剂，使寡糖衍生化而携带荧光基团和电荷，然后经过电泳使不同聚合度的寡糖单体呈现单一的条带，并对其进行纯度分析的一种方法[67]。

王莹等[72] 采用荧光辅助电泳法对稀酸降解制备的褐藻胶寡糖进行分析，将寡糖混合物溶于含 5 mg 7-氨基萘-1,3-二磺酸（ANDS）、15% HAc 中，在室温下避光静止 1 h 后，加入硼氢化钠在 45 ℃ 反应 12 h，经 Sephadex G25 柱脱盐，得到的标有荧光的寡糖进行梯度电泳，结果显示一条单带，表明得到的寡糖纯度较高。刘斌等[73] 采用荧光辅助糖电泳法分析酸降解法制备的褐藻胶寡糖，将 100 μg 的寡糖利用 7-氨基萘-1,3-二磺酸荧光标记后进行分析，结果呈现较清晰的双条带，表明测定的样品纯度较高；经进一步分析证实，测定组分分子量越大，电泳距离越短，并且按聚合度大小分布成连续的梯状。

荧光辅助糖电泳法是一种简单、快捷的分析方法，可以获得分子量信息，使检测结果更加直观有效。但是如果寡糖中存在较多相似的化学组成或异构体，采用荧光辅助糖电泳法分析难度很大，且会产

表 3 褐藻胶寡糖的分离技术

Table 3 Separation technology of fucoidan oligosaccharides

分离方法	优点	缺点
沉淀分离法	操作简单，应用范围广	分离不完全，适于初步分离
膜分离法	设备简单，启动快，无污染	分离效果不易控制，成本高
凝胶渗透色谱法	操作简单，条件温和，分离效率高	分析速度慢，不适于分离分子量相近的寡糖
离子交换色谱分离法	耗样少，分离效率高，灵敏度高	定性能力差
硅胶柱分离法	操作简单，成本低	使用大量有机试剂，易造成环境污染
高效毛细管电泳法	分析时间短，耗样少，进样量可达纳升级	易发生电渗改变样品组成

生较大的误差。因此荧光辅助糖电泳法适用于分析结构组成不同的寡糖[72]。

3.2　结构鉴定

由于褐藻胶寡糖的结构直接影响着其理化性质与生物活性，所以对褐藻胶寡糖结构的表征尤为重要。褐藻胶寡糖的结构鉴定包括测定寡糖中寡糖聚合度（分子量），M、G 的相对含量即 M/G，及寡糖中均聚、异聚片段组成、含量等。目前广泛使用的结构表征方法包括凝胶渗透色谱法、薄层色谱法、红外吸收光谱、圆二色谱、质谱、核磁共振波谱等。

3.2.1　薄层色谱法(Thin Layer Chromatography, TLC)

薄层色谱法是利用褐藻胶通过吸附剂时，会不断地产生吸附-解吸过程，不同聚合度的褐藻胶寡糖对同一吸附剂的吸附能力不同，根据比移值(R_f)与适宜的对照物按同法所得的色谱图的比移值(R_f)作对比，从而分析褐藻胶寡糖的聚合度[54]。

Zhu 等[74] 利用 1-丁醇∶乙酸∶水（3∶2∶2, v/v）的溶剂体系对褐藻胶寡糖进行薄层色谱分析，得到了三个组分的寡糖，寡糖的聚合度为 5~7。Zhu 等[75] 以 1-丁醇∶乙酸∶水（3∶2∶3, v/v）作为溶剂体系，采用薄层色谱法对酶降解制备的褐藻胶寡糖进行分析测定，得到了聚合度为 2~4 的褐藻胶寡糖。Zhuang 等[76] 使用 1-丁醇∶甲酸∶水（4∶6∶1, v/v）的溶剂体系对褐藻胶裂解酶降解制备的褐藻胶寡糖进行薄层色谱分析，发现褐藻胶裂解酶 AlyAa 降解制备的褐藻胶寡糖为二糖、三糖、四糖，其中三糖是主要产物；褐藻胶裂解酶 AlyAb 降解制备的褐藻胶寡糖主要为三糖、四糖和五糖。薄层色谱法还可以通过测定褐藻胶中还原糖含量的变化，作为褐藻胶在降解过程中是否完全降解的参考[77]。

薄层色谱分析法操作简单、分析速度快、成本低，适用于寡糖的快速分析。但是定量分析时误差较大，通常只用做定性分析。

3.2.2　红外吸收光谱法（Infrared Absorption Spectroscopy, FTIR）

红外吸收光谱是根据不同结构的官能团吸收不同波长的红外射线，而对物质组分进行分析和鉴定的一种方法。红外吸收光谱法主要鉴定寡糖中糖环骨架和官能团，一般用于褐藻胶寡糖结构的初步表征[54]。

王莹等[72] 采用红外吸收光谱法对褐藻胶寡糖进行分析，发现在 950 cm^{-1} 出现的吸收峰对应于吡喃糖环的非对称伸缩振动，在 1613 cm^{-1} 和 1416 cm^{-1} 的吸收峰分别对应于羧基的非对称和对称的伸缩振动，证明寡糖结构中含有糖醛酸单元。Chandia 等[33] 利用红外吸收光谱分析酸降解制备的聚古洛糖醛酸片段和聚甘露糖醛酸片段，发现在 947、903、813、780 cm^{-1} 处有古洛糖醛酸糖环的特征吸收峰；在 893、822 cm^{-1} 处有甘露糖醛酸糖环的特征吸收峰。Xu 等[78] 利用红外吸收光谱测定酶降解制备的褐藻胶寡糖，分别在 789 和 821 cm^{-1} 处出现特征吸收峰，表明寡糖中含有古洛糖醛酸糖环和甘露糖醛酸糖环。Falkeborg 等[79] 利用红外吸收光谱对褐藻胶寡糖的结构进行表征，发现在 1700 cm^{-1} 处存在 C=O 的不对称伸缩振动，比羧酸的振动频率大，证实一些羧基仍以羧酸盐的形式存在。褐藻胶寡糖的特征红外吸收峰总结见表 4。

表 4　红外吸收光谱对褐藻胶寡糖的表征

Table 4　Characterization of alginate oligosaccharides by infrared absorption spectroscopy

伸缩振动吸收带	结构	参考文献
950 cm^{-1}	吡喃糖环	[72]
1613 cm^{-1}和1416 cm^{-1}	羧基	[72]
947、903、813、780 cm^{-1}	古洛糖醛酸环	[33]
893、822 cm^{-1}	甘露糖醛酸环	[33]
789 cm^{-1}	古洛糖醛酸环	[78]
821 cm^{-1}	甘露糖醛酸环	[78]
2500~3300 cm^{-1}	羟基	[79]
1600、1700 cm^{-1}	羧基、羧酸盐	[79]

红外吸收光谱可用于不同组成褐藻胶寡糖结构的初步分析和表征，仪器操作简单、测量精度高、分析速度快。但是水中的羟基会干扰测定，不适合测定水分含量高的样品。定量分析时误差较大，一般用于褐藻胶寡糖的定性分析。

3.2.3　圆二色谱法（Circular Dichroism, CD）

圆二色谱是根据光学活性物质对偏振光的吸收率不同，来推断物质非对称分子构象的一种旋光光谱。圆二色谱一般用于测定褐藻胶寡糖分子的 M/G[54]。

Morris 等[80] 采用圆二色谱法对聚古洛糖醛酸和聚甘露糖醛酸的结构进行测定，通过分析波谱中的分子椭圆度，得到样品中 M/G 值为 29∶71。Sim 等[81] 利用圆二色谱对酸降解制备的、沉淀分离后的褐藻胶寡糖进行分析，通过波谱的椭圆率计算各嵌段的长度，得到褐藻胶寡糖 M/G 值为 9∶8。

圆二色谱法操作简单，测定速度快，灵敏度高，是糖类化合物进行结构鉴定常用的一种方法。但是光吸收杂质的存在会干扰圆二色谱的测定，所以测定样品需要保证一定的纯度。

3.2.4　质谱法（Mass Spectroscopy, MS）

质谱法是根据不同物质组分的质荷比不同，而对样品结构进行分析和测定的一种方法。质谱法一般用于测定褐藻胶寡糖的糖链结构和分子量，是寡糖结构鉴定的重要方法之一[54]。

Falkeborg 等[79] 采用质谱法对酶降解制备的褐藻胶寡糖进行分析，寡糖通过沉淀分离后，经 ESI-TOF-MS 测定，结果显示寡糖的聚合度为 2~4，非还原末端由 4-脱氧-erythro-hex-4-烯醇式吡喃糖醛酸盐组成。Peng 等[66] 采用 ESI-MS 法对离子交换色谱分离得到的聚合度为 2~5 的 4 个寡糖组分进行分析，发现 4 个组分寡糖的结构组成分别是ΔG、ΔMG、ΔGMG、ΔGGG（寡糖结构片段）。Zhu 等[82] 对酶降

表 5 褐藻胶寡糖的表征方法

Table 5 Characterization methods of alginate

表征方法	优点	缺点
荧光辅助糖电泳法(纯度)	简单快捷, 表征分子量信息	不适于分析化学组成相似的寡糖
薄层色谱法(结构)	操作简单, 分析速度快, 成本低	不适于定量分析
红外吸收光谱法(结构)	操作简单, 精度高, 分析速度快	不适于定量分析, 测定易受水中羟基干扰
圆二色谱法(结构)	操作简单, 测定速度快, 灵敏度高	易受光吸收杂质的干扰
质谱法(结构)	测定速度快, 灵敏度高, 耗样少	——
核磁共振波谱法(结构)	耗样少, 可回收样品	分析样品纯度要求高

解制备的褐藻胶寡糖进行测定, 寡糖经沉淀分离后, 通过 ESI-MS 分析测得制备褐藻胶寡糖聚合度为 2~4, 并发现ΔGGGG 是能被褐藻胶裂解酶 FsAlgB 识别和切割的最短底物。Fischer 等[83] 对酶降解制备的褐藻胶寡糖进行测定, 寡糖经离子交换色谱分离后, 通过 AXP-MS 进行测定, 发现寡糖中只含有不饱和古洛糖醛酸片段, 证明褐藻胶裂解酶 CaAIy1 为聚古洛糖醛酸特异性裂解酶。Pei 等[84] 采用 MS 分析凝胶渗透色谱分离的褐藻胶寡糖, 测定得到寡糖的重均分子量分别为 352、528、704、880、1056 Da。

质谱法测定速度快, 灵敏度高, 样品用量少。通常采用串联质谱法以提高分析的精度和准确度[85]。

3.2.5 核磁共振波谱法(Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR) 核磁共振波谱法是利用特定的原子核在给定的磁场中, 只吸收特定射频辐射形成核磁共振信号, 从而进行结构鉴定[86]。通过糖残基中各位点元素的化学位移产生的信号可以获得褐藻胶寡糖的结构信息, 通过信号峰面积的积分可得到残基的相对含量[54]。

Penman 等[87] 分析酸降解制备的、经沉淀分离后的褐藻胶寡糖, 利用^{1}H-NMR 光谱测定寡糖中的甘露糖醛酸和古洛糖醛酸嵌段, 通过计算各嵌段峰面积, 得到古洛糖醛酸片段和甘露糖醛酸片段的比值为 0.32, 且褐藻胶寡糖中均聚的甘露糖醛酸片段与杂聚片段大致相等。Liu 等[3] 通过酶降解制备褐藻胶寡糖, 经离子交换色谱分离纯化后得到 2 个组分, 通过分析^{13}C-NMR 波谱中元素化学位移产生的信号, 与已知分子量的样本波谱对比, 测得寡糖的重均分子量分别为 396 和 594 Da。Guo 等[88] 利用^{1}H-NMR 光谱测定经凝胶渗透色谱分离的褐藻胶寡糖, 得到甘露糖醛酸片段与古洛糖醛酸片段的比值是 1∶2.6。Sun 等[89] 利用^{1}H-NMR 光谱测定经凝胶渗透色谱分离后的褐藻胶寡糖, 通过比较寡糖和标准样品的嵌段峰, 计算得到褐藻胶寡糖的平均聚合度为 10。Chen 等[90] 通过酶降解制备的褐藻胶寡糖, 经凝胶渗透色谱分离后得到 4 个组分, 通过分析^{1}H-NMR 光谱在 J_{HH}=8.6 Hz 和 J_{HH}=8.4 Hz 出现的单峰, 发现组分 1 只含ΔG 寡糖片段, 组分 2 含ΔGG 和ΔMG 两种寡糖片段, 组分 3 含ΔGGG、ΔGMG、ΔMGG 和ΔMMG 四种寡糖片段。

核磁共振波谱法测定消耗样品量少, 且不会破坏样品, 可回收样品, 是一项发展较成熟的结构测定技术。但是核磁共振波谱需要纯度较高的分析物才能得到确定的光谱, 并且需要较高浓度的褐藻胶寡糖才能进行明确的结构分析[3]。

褐藻胶寡糖表征方法的优缺点总结见表 5。

4 结语与展望

褐藻胶寡糖的组成和结构直接影响着其生物活性, 而通过不同制备方法可生成不同结构的褐藻胶寡糖。目前褐藻胶寡糖可以通过物理、化学、酶降解、发酵等方法制备, 其中酶降解法得到的褐藻胶寡糖是 C4 和 C5 处具有双键的不饱和寡糖, 且产物得率高、绿色无污染, 是现在研究和应用较为广泛的一种制备褐藻胶寡糖的方法, 未来发展方向为可定向制备特定结构褐藻胶寡糖高活力酶的研发。褐藻胶寡糖混合物可以通过沉降分离法、膜分离法、色谱分离法等方法分离。色谱分离法灵敏度高、分离效率高、易于实现自动化, 是实验室研究较为广泛的一种方法, 未来可应用于工业自动化分离。褐藻胶寡糖的纯度、分子量、M/G 及其连接方式等特征可以通过荧光辅助糖电泳法、凝胶渗透色谱法、薄层色谱法、红外吸收光谱、圆二色谱、质谱、核磁共振等方法进行表征。各种结构表征方法各有优缺点, 未来发展趋势是多种方法联用, 实现更高效、快速的表征褐藻胶寡糖。

褐藻胶寡糖的制备方法、分离技术和表征方法的发展, 对褐藻胶寡糖的合理应用有着深远的意义。相信未来可以实现褐藻胶寡糖的定向制备、高效精准分离和表征, 使其在食品、医药和农业等领域发挥更加重要的作用。

参考文献

[1] BELIK A A, SILCHENKO A S, KUSAYKIN M I, et al. Alginate lyases: Substrates, structure, properties, and prospects of application[J]. Journal of Bioorganic Chemistry, 2018, 44(4): 386−396.

[2] 杨金生, 陈晶晶, 潘玉英, 等. 褐藻胶生物活性应用及最新研究进展[J]. 农村经济与科技, 2017, 28(5): 90−91. [YANG J S, CHEN J J, PAN Y Y, et al. Application and latest research progress of alginate bioactivity[J]. Rural Economy Science and Technology, 2017, 28(5): 90−91.]

[3] LIU J, YANG S Q, LI X T, et al. Alginate oligosaccharides: Production, biological activities, and potential applications[J]. Com-

prehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2019, 18(6): 1859−1881.

[4] RHEIN-KNUDSEN N, ALE M T, MEYER A S. Seaweed hydrocolloid production: An update on enzyme assisted extraction and modification technologies[J]. Marine Drugs, 2015, 13(6): 40−59.

[5] SHI Q, WANG A J, LU Z H, et al. Overview on the antiviral activities and mechanisms of marine polysaccharides from seaweeds[J]. Carbohydrate Research, 2017, 453-454: 1−9.

[6] KHANRA S, MONDAL M, HALDER G, et al. Downstream processing of microalgae for pigments, protein and carbohydrate in industrial application: A review[J]. Food and Bioproducts Processing, 2018, 110: 60−84.

[7] URTUVIA V, MATURANA N, ACEVEDO F, et al. Bacterial alginate production: An overview of its biosynthesis and potential industrial production[J]. World Journal Microbiology Biotechnology, 2017, 33(11): 198−208.

[8] 吴哲, 任丹丹, 梁新元, 等. 褐藻胶寡糖的制备分离及生物活性[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(1): 1−7. [WU Z, REN D D, LIANG X Y, et al. Preparation, separation and bioactivity of alginate oligosaccharides[J]. Journal of Food Safety and Quality Inspection, 2020, 11(1): 1−7.]

[9] 武敏. 褐藻源和菊芋源低聚糖的分离纯化及对益生菌生长的影响 [D]. 烟台: 烟台大学, 2018. [WU M. Isolation and purification of oligosaccharides from brown algae and Jerusalem artichoke and their effects on the growth of probiotics[D]. Yantai: Yantai University, 2018.]

[10] LIU J, KENNEDY J F, ZHANG X F, et al. Preparation of alginate oligosaccharide and its effects on decay control and quality maintenance of harvested kiwifruit[J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 242: 116462−116470.

[11] PRITCHARD M F, POWELL L C, JACK A A, et al. A low-molecular-weight alginate oligosaccharide disrupts pseudomonal microcolony formation and enhances antibiotic effectiveness[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2017, 61(9): 1−34.

[12] HAN Y, ZHANG L, YU X, et al. Alginate oligosaccharide attenuates alpha 2, 6-sialylation modification to inhibit prostate cancer cell growth via the Hippo/YAP pathway[J]. Cell Death & Disease, 2019, 10(5): 374−390.

[13] WAN J, ZHANG J, CHEN D W, et al. Alginate oligosaccharide enhances intestinal integrity of weaned pigs through altering intestinal inflammatory responses and antioxidant status[J]. RSC Advances, 2018, 8(24): 13482−13492.

[14] HU Y, FENG Z, FENG W J, et al. AOS ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension by restraining the activation of P-selectin/p38MAPK/NF-kappaB pathway in rats[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 109: 1319−1326.

[15] HAO J J, HAO C, ZHANG L J, et al. OM2, a novel oligomannuronate-chromium (III) complex, promotes mitochondrial biogenesis and lipid metabolism in 3T3-L1 adipocytes via the AMPK-PGC1alpha pathway[J]. Plos One, 2015, 10(7): 1−15.

[16] ZHANG C G, WANG W X, ZHAO X M, et al. Preparation of alginate oligosaccharides and their biological activities in plants: A review[J]. Carbohydrate Research, 2020, 494: 108056−108090.

[17] ZHANG C G, HOWLADER P, LIU T M, et al. Alginate oligosaccharide (AOS) induced resistance to Pst DC3000 via salicylic acid-mediated signaling pathway in arabidopsis thaliana[J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 225: 115221−115228.

[18] RAMOS P E, SILVA P, ALARIO M M, et al. Effect of alginate molecular weight and M/G ratio in beads properties foreseeing the protection of probiotics[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 77: 8−16.

[19] EL-MOHDY H L A. Radiation-induced degradation of sodium alginate and its plant growth promotion effect[J]. Arabian Journal of Chemistry, 2017, 10: 431−438.

[20] BURANA-OSOT J, HOSOVAMA S, NAGAMOTO Y, et al. Photolytic depolymerization of alginate[J]. Carbohydrate Research, 2009, 344(15): 2023−2027.

[21] 孙哲朴, 刘辉, 武欣雨, 等. 褐藻胶寡糖制备和生物活性研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(2): 284−289. [SUN Z P, LIU H, WU X Y, et al. Research progress on preparation and biological activity of alginate oligosaccharides[J]. Food Industry Technology, 2019, 40(2): 284−289.]

[22] DAR T A, UDDIN M, KHAN M A, et al. Modulation of alkaloid content, growth and productivity of *Trigonella foenum-graecum* L. using irradiated sodium alginate in combination with soil applied phosphorus[J]. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 2016, 3(4): 200−210.

[23] HU T, LI C X, ZHAO X, et al. Preparation and characterization of guluronic acid oligosaccharides degraded by a rapid microwave irradiation method[J]. Carbohydrate Research, 2013, 373: 53−58.

[24] KEIICHIRO M, HIRONORI M, HAJIME K, et al. Decomposition reaction of alginic acid using subcritical and supercritical water[J]. Industrial Engineering Chemistry Research, 2005, 44: 9626−9630.

[25] AIDA T M, YAMAGATA T, WATANABE M, et al. Depolymerization of sodium alginate under hydrothermal conditions [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80(1): 296−302.

[26] YANG Z, LI J P, GUAN H S. Preparation and characterization of oligomannuronates from alginate degraded by hydrogen peroxide[J]. Carbohydrate Polymers, 2004, 58(2): 115−121.

[27] LI X X, XU A H, XIE H G, et al. Preparation of low molecular weight alginate by hydrogen peroxide depolymerization for tissue engineering[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 79(3): 660−664.

[28] GAN L, XIN X, LI J, et al. Characterization of conformational epitope of alginate-derived polymannuronates by surface plasmon resonance[J]. Biochimie, 2005, 87(11): 959−966.

[29] 李海波, 谢超, 丁晨, 等. 海藻胶低聚寡糖的化学氧化制备纯化技术及保水理化性质分析[J]. 海洋与湖沼, 2015, 46(4): 915−921. [LI H B, XIE C, DING C, et al. Preparation and purification of alginate oligosaccharides by chemical oxidation and analysis of their water retention properties[J]. Oceans and Lakes, 2015, 46(4): 915−921.]

[30] 曹柳. 褐藻胶的提取纯化、氧化降解及体外活性研究 [D]. 济南: 山东大学, 2015. [CAO L. Extraction, purification, oxidative degradation and *in vitro* activity of alginate[D]. Jinan: Shandong University, 2015.]

[31] TIMELL T E. The acid hydrolysis of glycosides: I. general conditions and the effect of the nature of the aglycone[J]. Canadian Journal Chemistry, 1964, 42(6): 1456−1472.
[32] HAUG A, LARSEM B. A study on the constitution of alginic acid by partial acid hydrolysis[J]. Acta Chemica Scandinavica, 1966, 20(1): 183−190.
[33] CHANDIA N P, MATSUHIRO B, VASQUEZ A E. Alginic acids in *Lessonia trabeculata*: Characterization by formic acid hydrolysis and FT-IR spectroscopy[J]. Carbohydrate Polymers, 2001, 46: 81−87.
[34] LEAL D, MATSUHIRO B, ROSSI M, et al. FT-IR spectra of alginic acid block fractions in three species of brown seaweeds[J]. Carbohydrate Research, 2008, 343(2): 308−316.
[35] 胡博旸, 聂莹, 孙路, 等. 酸降解法制备褐藻寡糖抗氧化性的研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(10): 136−140. [HU B Y, NIE Y, SUN L, et al. Antioxidant activity of alginate oligosaccharides prepared by acid degradation method[J]. Food Industry Technology, 2016, 37(10): 136−140.]
[36] PAWAR S N, EDGAR K J. Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications[J]. Biomaterials, 2012, 33(11): 3279−3305.
[37] NIEMRLA K, SJOSTROME E. Alkaline degradation of alginates to carboxylic acids[J]. Curbohydate Research, 1985, 144: 241−249.
[38] KRISTIANSEN K A, TOMREN H B, CHRISTENSEN B E. Periodate oxidized alginates: Depolymerization kinetics[J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 86(4): 1595−1601.
[39] WONG T Y, PRENSYON L A, SCHILLER N L, et al. Alginate lyase: Review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications[J]. Annual Review of Microbiology, 2000, 54(1): 289−340.
[40] INOUE A, ANRAKU M, NAKAGAWA S, et al. Discovery of a novel alginate lyase from *Nitratiruptor* sp. SB155-2 thriving at deep-sea hydrothermal vents and identification of the residues responsible for its heat stability[J]. The Journal Biological Chemistry, 2016, 291(30): 51−63.
[41] ZHU B W, CHEN M J, YIN H, et al. Enzymatic hydrolysis of alginate to produce oligosaccharides by a new purified endo-type alginate lyase[J]. Marine Drugs, 2016, 14(6): 108−119.
[42] 江君, 刘军, 杨绍青, 等. 黄杆菌褐藻胶裂解酶的高效表达及其在褐藻寡糖制备中的应用[J]. 食品科学, 2021, 42(4): 145−152. [JIANG J, LIU J, YANG S Q, et al. High level expression of *Flavobacterium* alginate lyase and its application in preparation of alginate oligosaccharides[J]. Food science, 2021, 42(4): 145−152.]
[43] BOUCELKHA A, PETIT E, ELBOUTACHFAITI R, et al. Production of guluronate oligosaccharide of alginate from brown algae stypocaulonscoparium using an alginate lyase[J]. Journal of Applied Phycology, 2016, 29(1): 509−519.
[44] LI S Y, WANG L N, HAO J H, et al. Purification and characterization of a new alginate lyase from marine bacterium *Vibrio* sp. SY08[J]. Marine Drugs, 2016, 15(1): 1−11.
[45] XIE M S, LI J, HE P Q, et al. Expression and characterization of a bifunctional alginate lyase named Al163 from the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. NJ-21[J]. Journal of Oceanology and Limnology, 2018, 36(4): 1304−1314.
[46] CHEN P, ZHU Y M, MEN Y, et al. Purification and characterization of a novel alginate lyase from the marine bacterium *Bacillus* sp. Alg07[J]. Marine Drugs, 2018, 16(3): 86−99.
[47] ZHU B W, N F, XIONG Q, et al. Marine oligosaccharides originated from seaweeds: Source, preparation, structure, physiological activity and applications[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2020, 23(1): 1−15.
[48] 李树, 张伟, 赵春梅, 等. 易错 PCR 技术定向进化褐藻胶裂解酶 Alg-2 的分析[J]. 食品科学, 2019, 40(4): 146−151. [LI S, ZHANG W, ZHAO C M, et al. Directed evolution of alginate lyase ALG-2 by error prone PCR[J]. Food Science, 2019, 40(4): 146−151.]
[49] PENG C, WANG Q B, LU D R, et al. A novel bifunctional endolytic alginate lyase with variable alginate-degrading modes and versatile monosaccharide-producing properties[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 167−181.
[50] BANG M A, SEO J H, SEO J W, et al. *Bacillus subtilis* KCTC 11782BP-produced alginate oligosaccharide effectively suppresses asthma via T-helper cell type 2-related cytokines[J]. Plos One, 2015, 10(2): 1−15.
[51] WANG M P, CHEN L, LIU Z Y, et al. Isolation of a novel alginate lyase-producing *Bacillus litoralis* strain and its potential to ferment sargassum horneri for biofertilizer[J]. Microbiologyopen, 2016, 5(6): 1038−1049.
[52] 赵婉琳, 叶静, 张娜. 褐藻胶降解菌的筛选、鉴定及产酶条件优化[J]. 微生物学报, 2019, 59(1): 175−186. [ZHAO W L, YE J, ZHANG N. Screening, identification of alginate degrading bacteria and optimization of enzyme production conditions[J]. Journal of Microbiology, 2019, 59(1): 175−186.]
[53] 国晶晶, 宋悦凡, 何云海, 等. 高效产褐藻胶裂解酶菌株产酶条件优化及降解寡糖结构分析[J]. 大连海洋大学学报, 2019, 34(2): 252−259. [GUO J J, SONG Y F, HE Y H, et al. Optimization of alginate lyase producing conditions and analysis of oligosaccharide degrading structure of alginate lyase producing strain[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2019, 34(2): 252−259.]
[54] 陈岩君. 低聚合度褐藻寡糖的分离制备及其脂蛋白代谢影响初步研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2018. [CHEN Y J. Isolation and preparation of oligomeric alginate oligosaccharides and their effects on lipoprotein metabolism[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2018.]
[55] ZHANG Z Q, YU G L, GUAN H S, et al. Preparation and structure elucidation of alginate oligosaccharides degraded by alginate lyase from *Vibro* sp. 510[J]. Carbohydrate Research, 2004, 339(8): 1475−1481.
[56] 张潇, 李珂, 于春阳, 等. 分子模拟技术在膜分离技术领域的应用[J]. 膜科学与技术, 2019, 39(2): 105−115. [ZHANG X, LI K, YU C Y, et al. Application of molecular simulation technology in membrane separation technology[J]. Membrane Science and Technology, 2019, 39(2): 105−115.]
[57] 欧昌荣, 薛长湖, 汤海青, 等. 微生物发酵-膜分离法制备褐藻胶寡糖及其产物分析[J]. 微生物学报, 2005, 45(2): 309−311.

［OU C R, XUE C H, TANG H Q, et al. The preparation of alginate oligosaccharides by microbial fermentation membrane separation and analysis of their products[J]. Journal of Microbiology, 2005, 45(2): 309−311.］
［58］ LUAN L Q, NAGASAWA N, HA V T T, et al. Enhancement of plant growth stimulation activity of irradiated alginate by fractionation[J]. Radiation Physics and Chemistry, 2009, 78(9): 796−799.
［59］ YANG W J, CHEN D Y, HE Z C, et al. NMR characterization and anticoagulant activity of the oligosaccharides from the fucosylated glycosaminoglycan isolated from *Holothuria coluber* [J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 233: 115844−115853.
［60］ 陈岩君, 窦文芳, 李恒, 等. 酶解褐藻寡糖的分离制备及其脂蛋白调节作用[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(12): 30−35.［CHEN Y J, DOU W F, LI H, et al. The preparation of enzymatic hydrolysis of alginate oligosaccharides and its role of lipoproteins regulation [J]. Food and Fermentation Industry, 2018, 44(12): 30−35.］
［61］ UENO M, CHO K, NAKAZONO S, et al. Alginate oligomer induces nitric oxide (NO) production in RAW264.7 cells: Elucidation of the underlying intracellular signaling mechanism[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2015, 79(11): 1787−1793.
［62］ 王平. 高效液相色谱在中药研究中的应用 [M]. 冶金工业出版社, 2010.［WANG P. Application of high performance liquid chromatography in the study of traditional Chinese medicine[M]. Metallurgical Industry Press, 2010.］
［63］ 张真庆. 褐藻胶酶解寡糖的制备、分离和结构鉴定 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2003.［ZHANG Z Q. Preparation, isolation and structure identification of alginate oligosaccharides[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2003.］
［64］ BALLANCE S, ARSTAD A, ACHMANN F L, et al. Preparation of high purity monodisperse oligosaccharides derived from mannuronan by size-exclusion chromatography followed by semi-preparative high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection[J]. Carbohydrate Research, 2009, 344(2): 255−259.
［65］ LI L Y, JIANG X L, GUAN H S, et al. Preparation, purification and characterization of alginate oligosaccharides degraded by alginate lyase from *Pseudomonas* sp. HZJ 216[J]. Carbohydrate Research, 2011, 346(6): 794−800.
［66］ PENG Q, ZHANG M M, GAO L, et al. Effects of alginate oligosaccharides with different molecular weights and guluronic to mannuronic acid ratios on glyceollin induction and accumulation in soybeans[J]. Journal of Food Science Technology, 2018, 55(5): 1850−1858.
［67］ 李潇. 褐藻胶寡糖的分离分析及其抗氧化活性的研究 [D]. 西安: 西北大学, 2011.［LI X. Separation and analysis of alginate oligosaccharides and their antioxidant activities[D]. Xi'an: Northwest University, 2011.］
［68］ 黄菊, 丁晨, 谢超, 等. 海藻胶低聚寡糖的酶法制备纯化技术及保水理化性质分析[J]. 海洋与湖沼, 2015, 46(3): 595−602.［HUANG J, DING C, XIE C, et al. Enzymatic preparation and purification of alginate oligosaccharides and analysis of their water retention properties[J]. Oceans and Lakes, 2015, 46(3): 595−602.］
［69］ 王红敏. 海藻胶寡糖理化性质、分离制备及生物活性初步研究 [D]. 西安: 西北大学, 2009.［WANG H M. Preliminary study on physicochemical properties, separation, preparation and biological activity of alginate oligosaccharides[D]. Xi'an: Northwest University, 2009.］
［70］ 白沙沙, 赵笑, 孔凡华, 等. 乳及乳制品中蛋白组分测定方法研究进展[J]. 食品工业科技, 2022, 43(4): 396−403.［BAI S S, ZHAO X, KONG F H, et al. Research progress on determination methods of protein components in milk and dairy products[J]. Food Industry Technology, 2022, 43(4): 396−403.］
［71］ 孙燕. 褐藻胶寡糖的高效毛细管电泳分离分析方法的研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2004.［SUN Y. Study on separation and analysis of alginate oligosaccharides by high performance capillary electrophoresis[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2004.］
［72］ 王莹, 于广利, 赵峡, 等. 几种寡聚古罗糖醛酸的制备和结构表征[J]. 高等学校化学学报, 2005, 26(1): 179−183.［WANG Y, YU G L, ZHAO X, et al. Preparation and structural characterization of several oligo-guluronic acids[J]. Journal of Chemistry of Colleges and Universities, 2005, 26(1): 179−183.］
［73］ 刘斌, 王长云, 张洪荣, 等. 系列甘露糖醛酸寡糖的制备与鉴定[J]. 高等学校化学学报, 2006, 27(3): 485−487.［LIU B, WANG C Y, ZHANG H R, et al. Preparation and identification of a series of mannuronic oligosaccharides[J]. Journal of Chemistry of Colleges and Universities, 2006, 27(3): 485−487.］
［74］ ZHU X, LI X, SHI H, et al. Characterization of a novel alginate lyase from marine bacterium *Vibrio furnissii* H1[J]. Marine Drugs, 2018, 16(1): 30−42.
［75］ ZHU B W, SUN Y, NI F, et al. Characterization of a new endo-type alginate lyase from *Vibrio* sp. NJU-03[J]. International Journal of Biologiacal Macromolecules, 2018, 108: 1140−1147.
［76］ ZHUANG J J, ZHANG K K, LIU X H, et al. Characterization of a novel polyM-preferred alginate lyase from marine *Vibrio splendidus* OU02[J]. Marine Drugs, 2018, 16(9): 295−307.
［77］ 周敏. 褐藻胶裂解酶产酶菌株的优选及褐藻寡糖的研究 [D]. 青岛: 青岛大学, 2019.［ZHOU M. Optimization of alginate lyase producing strain and study on alginate oligosaccharides[D]. Qingdao: Qingdao University, 2019.］
［78］ XU X, WU X T, WANG Q Q, et al. Immunomodulatory effects of alginate oligosaccharides on murine macrophage RAW264.7 cells and their structure-activity relationships[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(14): 3168−3176.
［79］ FALKEBORG M, CHEONG L, GIANFICO C, et al. Alginate oligosaccharides: Enzymatic preparation and antioxidant property evaluation[J]. Food Chemistry, 2014, 164: 185−194.
［80］ MORRIS E R, RESSD A, THOM D. Characterization of polysaccharide structure and interactions by circular dichroism: Order-disorder transition in the calcium alginate system[J]. Journal Chemical Society Chemical Communications, 1973, 9: 245−246.
［81］ SIM P F, FURURSAWA G, THE A. The functional and structural studies of a multidomain alginate lyase from *Persicobacter* sp. CCB-QB2[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 13656−13665.
［82］ ZHU B W, NI F, SUN Y, et al. Elucidation of degrading pattern and substrate recognition of a novel bifunctional alginate lyase

from *Flammeovirga* sp. NJ-04 and its use for preparation alginate oligosaccharides[J]. Biotechnology for Biofuels, 2019, 12(1): 13−26.

[83] FISCHER A, WEFERS D. Chromatographic analysis of alginate degradation by five recombinant alginate lyases from *Cellulophaga algicola* DSM 14237[J]. Food Chemistry, 2019, 299: 125142−125150.

[84] PEI X, CHANG Y, SHEN J. Cloning expression and characterization of an endo-acting bifunctional alginate lyase of marine bacterium *Wenyingzhuangia fucanilytica*[J]. Protein Expression Purification, 2019, 154: 44−51.

[85] HUANG G Y, WANG Q Z, LU M Q, et al. AlgM4: A new salt-activated alginate lyase of the PL7 family with endolytic activity[J]. Marine Drugs, 2018, 16(4): 120−133.

[86] 陈辉, 张佳琳, 鞠晶, 等. 核磁共振波谱法结合化学计量学判别油菜蜜的成熟蜜、非成熟蜜和加工蜜[J]. 北京大学学报(自然科学版), 2021, 57(4): 614−622. [CHEN H, ZHANG J L, JU J, et al. Nuclear magnetic resonance spectroscopy combined with chemometrics to distinguish mature honey, immature honey and processed honey from rape honey[J]. Journal of Peking University (Natural Science Edition), 2021, 57(4): 614−622.]

[87] PENMAN A, SENDERSO G R. A method for the determination of uronic acid sequence in aiginates[J]. Carbohydrate Research, 1972, 25: 273−282.

[88] GUO J J, MA L, SHI H T, et al. Alginate oligosaccharide prevents acute doxorubicin cardiotoxicity by suppressing oxidative stress and endoplasmic reticulum-mediated apoptosis[J]. Marine Drugs, 2016, 14: 1−13.

[89] SUN M, SUN C, XIE H G, et al. A simple method to calculate the degree of polymerization of alginate oligosaccharides and low molecular weight alginates[J]. Carbohydrate Research, 2019, 486: 107856.

[90] CHEN Y J, DOU W F, LI H, et al. The alginate lyase from *Isoptericola halotolerans* CGMCC 5336 as a new tool for the production of alginate oligosaccharides with guluronic acid as reducing end[J]. Carbohydrate Research, 2018, 470: 36−41.

杨晓东, 张杨, 张寿, 等. 胶原蛋白肽的提取及应用研究进展 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 469−476. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050196

YANG Xiaodong, ZHANG Yang, ZHANG Shou, et al. Research Progress in Extraction and Application of Collagen Peptides[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 469−476. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050196

· 专题综述 ·

胶原蛋白肽的提取及应用研究进展

杨晓东[1], 张　杨[2], 张　寿[3], 阎向民[2], 李洪波[2], 孙宝忠[1], 雷元华[1], 张松山[1], 谢　鹏[1], 王　煦[4], 胡常红[4,*]

（1.中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100089;
2.新疆畜牧科学院畜牧研究所, 新疆乌鲁木齐 830000;
3.青海大学, 农牧学院, 青海西宁 810000;
4.伊犁职业技术学院, 动物科学系, 新疆伊犁 835100）

摘　要: 我国既是家畜养殖大国也是渔业大国，拥有着丰富的畜骨、畜皮、鱼骨、鱼皮和鱼鳞等资源。胶原蛋白肽是胶原蛋白经酶解或热水解得到的衍生产品。因为具有良好的生物相容性、可降解性、可塑性、热稳定性、柔韧性、吸收性、溶解性、保水性、抗氧化性和弱抗原性等优点，被广泛应用于食品、医疗、护肤和饲料等行业中。本文从胶原蛋白肽的原料来源、提取方法及应用方面进行了综述，同时对目前胶原蛋白肽生产制造研究方面存在的问题，提出了可行的解决办法，也预测了未来胶原蛋白肽的研究方向，以期为胶原蛋白肽的进一步发展提供参考意义。

关键词: 胶原蛋白, 胶原蛋白肽, 原料来源, 提取方法, 应用领域

中图分类号: TS201.2　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0469−08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050196

本文网刊:

Research Progress in Extraction and Application of Collagen Peptides

YANG Xiaodong[1], ZHANG Yang[2], ZHANG Shou[3], YAN Xiangmin[2], LI Hongbo[2], SUN Baozhong[1], LEI Yuanhua[1], ZHANG Songshan[1], XIE Peng[1], WANG Xu[4], HU Changhong[4,*]

（1.Beijing Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100089, China;
2.Institute of Animal Husbandry, Xinjiang Academy of Animal Husbandry, Urumqi 830000, China;
3.College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining 810000, China;
4.Departmet of Animal Science,Yili Vocational and Technical College, Yili 835100, China）

Abstract: My country is both a big country of livestock breeding and a big fishery country, and it has abundant resources such as animal bones, animal skins and fish bones, fish skins and fish scales. Collagen peptides are derived products obtained by enzymatic or thermal hydrolysis of collagen. Because of its good biocompatibility, degradability, plasticity, thermal stability, flexibility, absorbency, solubility, water retention, anti-oxidation, weak antigenicity and other advantages, it is widely used in food, medical, and skin care, feed and other industries. In this paper, the raw material sources, extraction methods and applications of collagen peptides are reviewed. At the same time, feasible solutions are proposed for the problems existing in the production and manufacturing of collagen peptides, and the research direction of collagen peptides in the future is also predicted in order to provide reference for the further development of collagen peptides.

Key words: collagen; collagen peptide; raw material source; extraction method; application field

收稿日期: 2021−05−25

基金项目: 科技援青合作专项 提高柴达木肉牛牛肉品质和牛肉产品研发与推广（2020-QY-217）;“财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系资助”（CARS-37）;河北省现代农业（肉牛）产业技术体系创新团队建设项目（HBCT2018130204）。

作者简介: 杨晓东（1997−）, 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: 2317066570@qq.com。

*** 通信作者:** 胡常红（1968−）, 女, 本科, 副教授, 研究方向: 畜牧与动物医学, E-mail: 1505721802@qq.com。

胶原蛋白是动物体内分布最广，含量最高的功能性细胞外蛋白，目前发现的胶原蛋白有 29 种，分为五大类型[1]。常见的是Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ型，其中Ⅰ型最丰富，约占整个胶原蛋白的 80%~90%[2]。而胶原蛋白肽是胶原蛋白经酶解和热水解处理后制成的一种具有三螺旋结构、由 2~20 个氨基酸残基短序列组成的功能性肽类，由三条肽链构成，每条肽链又包含(Gly-X-Y)的重复序列，X 和 Y 分别是脯氨酸和羟脯氨酸[3]，通过测定羟脯氨酸含量来计算胶原蛋白肽得率。

胶原蛋白常常被添加到功能食品和保健品中，但因分子量高，人服用后消化吸收率低，一定程度上限制了它的进一步应用[4]，而胶原蛋白肽因为具有较低分子量和优异的水溶性，容易被肠壁吸收，更易发挥生物功能，近年来渐渐成为食品领域中的一个研究热点。此外，胶原蛋白肽还具有高度的生物相容性和可降解性，使其拥有优越的细胞调节能力；且与人工合成的高分子材料相比，免疫原性低也更容易穿透皮肤组织深层[5]；这些优点使得其被广泛应用于医药、生物材料和美容护肤等领域中。

1 原料来源

胶原蛋白肽大部分从陆生动物和水生生物加工后的副产物中提取，少部分从皮革废弃物中提取。陆生动物主要指人工饲养的家畜和特种经济动物，水生生物主要指鱼类、海藻、海绵和水母等，皮革废弃物主要指制革过程中产生的边角料。目前，按不同原料提取的胶原蛋白肽市场的占比：陆生动物>水生生物>皮革废弃物，近年来，随着食品健康安全意识增强，人们意识到以陆生动物为原料来源的胶原蛋白肽，存在疾病安全风险，会引发过敏反应，加之一些宗教问题，使得陆生动物来源的胶原蛋白肽发展减慢[5]。而人们普遍认为，水生生物胶原蛋白肽受污染小，与畜禽相比疾病和抗生素影响小，是一种相对安全的产品，所以近年来，以水生生物为原料的胶原蛋白肽发展迅速(尤其是以深海鱼类为原料来源的胶原蛋白肽)[6]。从皮革废弃物中提取的胶原蛋白肽因为含有重金属 Cr^{3+}，且去除工艺较为复杂，现在应用较少。

1.1 陆生动物加工后副产物

我国是世界上最大的家畜养殖国，也是肉产品生产主要消费国[7]。在动物加工过程中接近 40% 的畜体部分被认为是副产物，传统的处理方法是深埋填土，小部分焚烧发电，处理成本高，收益低。如果将其做成附加值更高的胶原蛋白肽产品，既利用了资源，也创造了更高的价值，获得高收益。目前，用于制备胶原蛋白肽的动物加工副产物主要是牛骨、牛皮、猪骨、猪皮、驴皮、鹿骨、马骨。牛骨胶原蛋白肽是世界最丰富的食源性胶原，它具有良好的清除自由基和抑制多不饱和脂肪酸氧化细胞的能力[8]。猪胶原蛋白肽与人类胶原蛋白肽结构相似，一般不会引起过敏应激反应[9]。从驴皮制取的驴胶和阿胶因其补养气血、安胎、提神益志的功效在国内市场一直享誉盛名，其蛋白肽也具有同样的功效。

1.2 水生生物加工废弃物

鱼类副产物是目前公认最安全、最好的胶原蛋白肽原料来源[10]。主要从比目鱼、海鳗鱼、黄鳍金枪鱼、军曹鱼、鲤鱼、罗非鱼、红鼓鱼、水母、海蜇、海星、墨鱼等水生动物中提取。鱼皮中富含胶原蛋白，胶原蛋白含量占蛋白质总含量的 80% 左右，比鱼体其他部位高许多[11]。鱼类胶原蛋白肽具有缓解机体疲劳，增强免疫力等作用，具有良好的开发利用价值。目前，有极少数的报道称，服用鱼源胶原蛋白肽会引起极小部分人群过敏反应，表现为红色的褐斑或者红疹[12]。

1.3 皮革废弃物

皮革工业一直存在废渣、废水处理难的问题，大量的皮革废弃物未得到充分利用，造成了不小的经济损失。研究报道，1 t 原料皮只有 20%~30% 被制成成品革，另外的 70%~80% 变成固体废弃物[13]。皮革废弃物通过预处理和水解就可以得到胶原蛋白，再对其进行水解处理即可得到胶原蛋白肽，而之所以在该行业没有大量用于提取胶原蛋白是因为：第一，提取技术不成熟导致提取率相对较低，且提取出来的胶原蛋白肽重金属 Cr^{3+}超标；第二，没有具体的政策支持；第三，部分企业因为高额的废物处理费用以及提取出的胶原蛋白难以找到销售渠道，所以从利益角度出发一般不提取。针对从皮革废弃物中提取胶原蛋白肽含有重金属 Cr^{3+}超标的问题，大量科研者已经对其提取工艺进行了不断优化，现在通常采用 2 种或以上的提取方法相结合进行解决，如酸碱法、碱酶法、碱-超声波法和酸-碱-氧化法等[14]。

2 提取方法

胶原蛋白肽的提取分为三个关键步骤：第一步是对原料进行预处理，目的是净化原料：去除脂类、杂蛋白和色素。第二步是应用物理、化学、生物酶解的方法，破坏胶原纤维组织，削弱疏水作用力和氢键力对胶原蛋白结构的结合能力，使得肽键水解，最终提取得到胶原蛋白。第三是在胶原蛋白的基础上对其进行水解/酶解，得到胶原蛋白肽。常见提取方法有酸法、碱法、酶法、水热抽提、热压浸提、中性盐提取法和微生物发酵法等。目前，常用酶法提取或者是将以上几种方法联合起来提取胶原蛋白肽[15]。

2.1 酸法提取

酸法中常用低浓度盐酸、醋酸、柠檬酸等作为提取介质。王信苏等[16]的研究表明，利用不同类型的酸提取草鱼鱼鳞胶原蛋白肽，提取效果由高到低分别为柠檬酸>乳酸>醋酸。浓度、水解温度和时间是酸法提取需要严格控制的三个因素，为的是避免胶原蛋白肽结构被破坏[17]。但该方法特异性差，使用酸也会破坏产品的营养价值，工业上酸法提取一般温度都相对较高，对设备的抗腐蚀能力也有相应的要求，一定

程度上增加了成本，所以该方法现在不常用[18]

2.2　碱法提取

碱法提取也是一种比较简单的提取方法，碱法既可以提取也可以修饰蛋白。碱性物质通过分解蛋白质基质，提高蛋白得率，肽得率也相应提高。常用的碱提取物质是氧化钙、烧碱、碱石灰等。碱法提取的实质是碱性物质破坏含羟基和巯基的氨基酸，导致氨基和羧基之间的酰胺键水解，引发消旋作用[19]。碱法提取胶原蛋白降解为多肽，肽氨基酸可能会被破坏，会产生对人体有害物质且反应进程难以控制，现在，在实验室和工业中很少采用[20]。

2.3　酶法提取

酶法提取是在溶解的骨、皮、壳等中加入某种酶以促使胶原蛋白非螺旋区段肽键降解，该方法可以改善骨源蛋白质的质量和其功能特性[21]。酶法是生产胶原蛋白肽的重要手段，普遍应用在行业生产和实验室中，常用的酶按来源分为动物蛋白酶（胃蛋白酶、胰蛋白酶）、植物蛋白酶（木瓜蛋白酶）、微生物蛋白酶（枯草杆菌蛋白酶），按水溶液中氢离子浓度分：酸性蛋白酶、碱性蛋白酶、中性蛋白酶。魏洁琼等[2] 对牛骨胶原蛋白肽提取工艺进行优化，发现用碱性蛋白酶，在酶添加量为 3.0%，酶解时间为 5 h，肽提取率为 12.45%。聂凌鸿等[22] 在探究鳝鱼皮胶原蛋白肽抗氧化性能时，用碱性蛋白酶在 pH9，酶解时间 4 h，酶解温度 45 ℃ 时得胶原蛋白肽提取率为 13.16%，肽含量为 77.70%。邵宏宏等[23] 在探究鲅鳙皮胶原蛋白肽自由基清除活性时，用胃蛋白酶，酶解时间为 5 h，在酶解温度 5 ℃ 时得胶原蛋白肽得率为 11.46%。

2.4　水热抽提和热压浸提

两种方法原理都相同，只是施加条件不一样，是利用加热、加压破坏胶原蛋白氨基酸之间的疏水作用力和氢键力，使胶原蛋白得以水解，得到肽。最近报道称，蛋白质在 150~190 ℃ 的区间内，只要温度升高，蛋白质水解程度就会增大，游离氨基酸增加，胶原蛋白肽得率提高，而在 190~240 ℃ 区间内，蛋白质被大量水解为小肽和游离氨基酸[24]。PARK 等[25] 在 190 ℃ 采用水热法提取胶原蛋白肽为 56.96%。该方法是一种环保有效提取胶原蛋白肽的方法，其显著优势是无毒、安全。

2.5　中性盐提取法

中性盐提取法的原理为胶原蛋白在盐浓度达到一定程度时发生溶解，得到盐溶性胶原蛋白，再进行水解得到盐溶性胶原蛋白肽[26]。张晓亮等[27] 用兔皮为原料，加入中性盐，搅拌 2~3 h 后，离心 30 min，弃上清液，再加入 3% 冰醋酸溶液，抽取搅拌过夜，再离心 90 min，取上清液即可得胶原蛋白肽。中性盐常使用的中性盐有盐酸-三羟甲基胺基甲烷、氯化钾、氯化钠、乙酸钠、柠檬酸盐等。该方法制得的胶原蛋白肽为盐溶性胶原蛋白肽，不同的盐对胶原蛋白肽的结构稳定性不一致，有的提高，有的则降低，所以该方法几乎不被用来单独提取胶原蛋白肽。

2.6　微生物发酵法

该方法利用微生物在生长过程中产生的各类酶作用于肽链进行酶解，制备具有不同功能的生物活性肽[28]。此方法利用微生物代谢的胞外酶，一部分对胶原蛋白进行降解，另一部分转化自身发生降解或者转化为原料中脂肪，会产生一定的发酵香味，提高了肽质量[29]。刘唤明等[30] 对罗非鱼皮接入枯草芽孢杆菌进行发酵法处理，发现在罗非鱼皮添加量为 3%，枯草芽孢杆菌接种量为 5%、接种 14 h 的枯草芽孢杆菌的液体种子，发酵 52 h 时，胶原蛋白肽得率为 36.88%。张京楼等[31] 发现用混合菌种（酵母菌、细菌、霉菌 1:2:1 的比例添加），发酵温度 30 ℃ 的情况下，胶原蛋白肽得率为 50.65%。相比于酶法，微生物发酵法操作复杂、条件要求高，发酵过程中由于细胞代谢，还可能产生细胞次级代谢产物污染产品，所以该方法现在还没有得到推广应用。

2.7　复合法提取

复合法就是将不同提取方法联合起来，是为了克服单一提取方法提取率太低而得到的一种方法。常见的有酸酶复合法、酸热水合法、超声波辅助法和酸碱酶复合法等[32]。超声波辅助酸酶复合法因其简单、快速、安全、经济适用的优点也被大量应用于生产中，超声波能够破坏胶原纤维组织，促进酸和酶处理，加快水解速度，它能保存胶原蛋白肽完整的三级结构，增加热稳定性，胶原蛋白肽的产量取决于超声时间和频率。周婷等[33] 利用 Box-Behnken 响应面法分析试验，采用碱性蛋白酶和超声波辅助法相结合的方法对鸡膝胶原蛋白肽进行提取，在超声功率 253 W、酶提时间 4 h，胶原蛋白肽得率为 42.83%。冯玲玲等[34] 以海蜇为原料，采用盐酸-胃蛋白酶法提取，得蛋白质含量 73.03%，胶原蛋白的含量为 1.96%，占蛋白质总量 39.22%，之后低温干燥成胶原蛋白肽。郭宏辉等[35] 在探究河豚鱼皮胶原蛋白肽的美白功效时，先对鱼皮进行酸碱预处理，然后用热水浸提制得胶原蛋白，再用二次酶解法得到胶原蛋白肽，得率明显提高。通常，复合法的提取效果整体优于单一提取。

3　基于其生理活性的应用

3.1　食品工业

胶原蛋白肽目前在食品中的应用主要是在食品添加剂、食品保健两方面。在肉制品、乳制品、固体饮料、糖果、调味品、烘培食品中都有相应的应用。它可以改善食品的口感，增强营养，延长保质期和保持颜色[36]。

3.1.1　食品添加剂　胶原蛋白肽被用于添加剂主要是作为增稠剂、乳化剂、稳定剂、澄清剂。常常被添加到乳制品、饮料、罐头、酒水和面包等产品中。董世荣等[37] 将胶原蛋白肽添加到凝固型酸奶中，发现胶原蛋白肽的添加显著提高了酸奶的持水能力和

pH, 降低了酸奶的硬度和胶着性, 延长了酸奶的发酵时间。宋维春等[38] 将胶原蛋白肽加入运动饮料中, 发现运动饮料氨基酸含量增加, 可以为运动员提供电解质和糖的同时提供丰富的氨基酸, 为运动员迅速提供能量。张顺亮等[39] 研究发现, 风味蛋白酶解液对金黄色葡萄球菌有抑菌效果, 动物复合蛋白酶、胰蛋白酶对肠炎沙门氏菌具有抑菌效果, 因此将其加入产品中, 还有一定的抑菌效果。市场上, 牛奶中添加胶原蛋白肽可以抵抗乳清析出, 增加免疫力, 增加乳品保健功能, 例如: 三元极致牛奶、伊利营养舒化牛奶、蒙牛新养道沁研牛奶; 酒水中添加胶原蛋白肽可以去除悬浮物; 面包中加入胶原蛋白肽可以增加淀粉熟化程度, 使面包质地膨松柔软, 增加口感。

3.1.2 食品保健 胶原蛋白肽是小肽类物质, 其自身含有丰富的氨基酸, 也兼备各种营养功能, 非常适合被用来做功能性营养食品的原料。在食品保健方面, 胶原蛋白肽主要被用于降低高血压、补钙和促进肠道吸收。胶原蛋白肽之所以能作为降低高血压的保健品是因为它能够抑制血管紧张素升高, 血管紧张素升高是造成血压升高的最大诱因[40]。人体骨骼中的钙主要是被胶原蛋白粘合沉积在羟基磷酸盐中, 由此摄入胶原蛋白或者胶原蛋白肽都能促进骨胶原蛋白的代谢, 减少钙损失, 抑制骨质疏松, 并且胶原蛋白肽吸收效果更好[41]。胶原蛋白可以给皮肤供给丰富的脯氨酸和羟脯氨酸, 而优质的胶原蛋白肽可以给胶原蛋白的合成提供优质原料, 促进人体胶原蛋白的合成, 从而促进胶原纤维和弹性纤维形成, 及时补充人体损失的胶原蛋白和弹性蛋白, 维持皮肤网状结构, 增加皮肤含水率, 而达到延缓皮肤衰老的效果[42]。

3.2 医疗

抗氧化性、抗肿瘤活性、抗凝血活性、抗冻活性、血管紧张素转换酶抑制活性和促细胞增殖活性是胶原蛋白肽具有的最显著的生物活性。它制成的胶原蛋白/肽材料拥有极佳的机械性、低抗原性、生物降解性和自缔合性等特性, 所以它也被普遍应用于医疗行业[43]。具体医疗领域主要是被用于控制肥胖、愈合伤口、治疗骨质疏松等方面。

3.2.1 控制肥胖 肥胖已逐步成为全世界面临的一大健康难题, 它是由个体遗传变异和能量平衡失调引起的[44]。摄入高纯度的胶原蛋白肽(脂肪极低), 可以增加饱腹感。VELDHORST 等[45] 对 24 列受试者展开随机研究, 研究让他们随机吃富含蛋白质、胶原蛋白肽和富含色氨酸的胶原蛋白肽的早餐, 发现早餐中 10%~25% 的能量由胶原蛋白肽或是富含色氨酸的胶原蛋白肽代替, 可以减少当天午餐的 20% 热量, 减少 40% 的食欲。此外, 胶原蛋白肽是一种功能性营养素, 能抑制脂肪细胞的成脂肪分化, 促进细胞代谢, 能够降低高密度脂蛋白、低密度脂蛋白和游离氨基酸含量, 导致血脂浓度下降, 从而调控肥胖疾病的发生[46]。

3.2.2 促进伤口愈合 皮肤是人类抵御外界伤害的第一道防线也是最大的器官。自然状态下, 皮肤能够自发愈合, 但是速度非常慢, 蚯蚓和壁虎是自然界最常见的强自愈能力的生物。胶原蛋白肽能够治愈伤口的宏观机理是增强成纤维细胞的向伤口迁移能力[47]。为弄清楚胶原蛋白肽愈合伤口的分子机制, DU 等[48] 将皮肤创伤的小鼠皮下包埋蚯蚓胶原蛋白肽作为实验组, 对照组为包埋聚琥珀酸丁二酯以及不予以处理的组, 用 TMT 标记定量蛋白质组学技术研究其作用机制, 实验结果显示实验组纤维胶原三聚体、I 型胶原三聚体、胶原纤维组织明显增多, 说明可能是与胶原蛋白肽转运的相关受体通路打开; 而进一步研究发现, COL_4A_1 是治疗伤口愈合的胶原蛋白肽受体。

3.2.3 治疗骨质疏松 骨质疏松是由于成骨细胞和破骨细胞介导的骨代谢失衡引起的, 骨骼结构被破坏, 骨重量减少, 骨骼脆性增强[49]。治疗骨质疏松的药物常见有降钙素、雌激素、双磷酸盐, 但是这些药物对机体都会产生一定的副作用。口服胶原蛋白肽促进成骨细胞的活性, 抑制破骨细胞的活性, 用成骨细胞 Mc3T3-E1 细胞研究其促成骨方面的机制, 最终发现它是通过激活 PI3K/AKt 通路抑制细胞凋亡, 促进 Mc3T3-E1 细胞增殖和分化[50]。最近报道, 司秋霞[51] 发现绝经后骨质疏松妇女口服胶原蛋白肽能够调节骨代谢平衡, 通过增强骨合成, 降低骨吸收, 使身体骨量增加。SONG 等[52] 在小鼠日粮中添加胶原蛋白肽饲喂 56 d 后, 发现小鼠骨机械强度、骨密度、骨胶原蛋白增加, 并且老龄鼠骨微结构得以改善。

3.3 美容化妆

皮肤的生物特性是由细胞外基质网络中的细胞、细胞因子、生长因子之间的相互作用决定的[50]。成纤维蛋白是由转化生长因子活化后分泌的, 可调节细胞外基质蛋白的表达(弹力蛋白、胶原蛋白、蛋白聚糖构成胞外基质蛋白的三大部分), 促进细胞增殖, 弹性蛋白的功能决定皮肤的弹性, 它的丢失和改变是皮肤老化的最主要原因; 胶原蛋白和弹力蛋白具有协同作用, 口服胶原蛋白肽被肠刷状缘转运体吸收进入血液, 运输到皮肤细胞被利用, 其促进了胞外基质蛋白的表达, 进而促进了胶原蛋白和弹力蛋白在细胞中所占的比例, 因此, 延长皮肤细胞寿命[42]。胶原蛋白肽能够有效地渗入角质层、真皮层细胞, 通过增加细胞含水量来改善皮肤功能。多数化妆品中使用的防腐剂是苯甲酸酯, 它会诱导精子畸形发育, 损害生殖系统, 激素分泌紊乱, 也会诱发乳腺癌, 引发部分人群的过敏反应[53]。用天然油脂和胶原蛋白肽制成的化妆品, 不仅克服了传统防腐剂的弊端, 也同样具有抗菌防腐的功效[54]。

胶原蛋白肽被认为是最出色的抗氧化剂, 骨胶原蛋白肽更是被美称“皮肤软黄金”、“肤中之肤、骨中之骨”, 它可以抑制基质金属蛋白酶的表达, 进而抑

制了细胞老化[55]。盛周煌等[56]发现罗非鱼皮胶原蛋白肽对自由基有清除能力，且对羟基自由基清除能力最强，抑制细胞的死亡和突变，有利于机体健康。大量研究表明皮肤衰老过程，实际上是胶原蛋白大量流失造成的。一般女性体内胶原蛋白老化、流失始于20 岁，且流失量是男人的 2.5 倍[57]。李艳莉[58]发现将猪皮胶原蛋白肽样品涂于皮肤表面时，皮肤呈现出水嫩光滑的效果，这是人体皮肤吸收胶原蛋白肽以后达到的美容保湿效果。

3.4　组织工程

胶原蛋白肽被认为是组织工程的“金标准”[59]，它常常被制成骨再生支架和可注射基质，如皮肤、骨组织、气管和血管支架等。胶原蛋白肽支架有利于伤口周边细胞增殖，周围和中枢神经系统损伤神经组织的修复和再生。薛延等[60]用茎状细胞和胶原蛋白肽凝胶制作肌腱用于腱后修复，还可以把胶原蛋白肽水溶液制成各式的给药物品，如眼科方面的胶原蛋白肽保护物、烧伤使用的胶原海绵、蛋白质传输的微粒、皮肤给药调控材料、基因传输的纳米微粒、细胞培养系统的基质等。

3.5　饲料行业

胶原蛋白肽含有脯氨酸和羟脯氨酸，也作为磷酸钙制剂或动物饲料的原料，能显著的促进毛发生长，提高毛发等级，常用于名贵毛皮动物的饲料添加剂[61]。研究表明，在肥育猪日粮中添加胶原蛋白肽粉，添加比例在 6% 以下时，其育肥效果与鱼粉或豆粕相当，当添加量大于 8% 时，肥育猪生产性能及消化率降低[62]。在哺乳母羊的饲料中加入胶原蛋白粉，可以增加母羊饲料摄入量，提高母羊营养水平，进而提高产母羊产奶量，改善羊奶的品质[63]。李二凤等[64]发现在牧区的羊饲料中添加胶原蛋白肽，羊发生疾病的概率大大减小，而且羊毛顺滑细致。

3.6　生物材料

胶原蛋白肽生物材料具有良好的可塑性、热稳定性、柔韧性。现在常见的生物材料是胶原蛋白制成的，最常见的是支架生物材料，有胶原蛋白凝胶、琼脂糖、富血小板纤维蛋白凝胶和 3D 支架[65]。胶原蛋白水凝胶是小分子药物的适宜支架，如工程水凝胶促进牙龈细胞的生长，肝素水凝胶改善血脑屏障，减少脑内疾病发生[66]。胶原蛋白交联氧化锌纳米颗粒盾片治疗青光眼，3D 生物打印技术应用于组织工程支架、器官替代品的制造，3D 生物打印与胶原蛋白生物墨水结合已经打印出了心脏、脑、脂肪、皮肤、膀胱，具有良好的生物相容性，如今加入了刺激响应材料的 4D 生物打印也在发展中[67]，而胶原蛋白肽作为生物材料还比较少，刘琦等[68]从Ⅰ型胶原蛋白提取出来两种末端肽，之后将微生物源谷氨酰胺转氨酶引入其中进行交联，产生了一种新型胶原蛋白肽复合材料，它为附着物提供了更大的表面积，适宜用作药物传送的载体物质。吴欢[69]用胶原蛋白肽和壳聚糖、胶原蛋白肽与羧甲基壳聚糖组成了药物缓释载体，其抗菌性、抗氧化性、生物可降解性增强。郭恩慧等[70]制备了一种光交联鱼胶原蛋白肽-透明质酸水凝胶，发现具有良好的组织相容性和体内降解性。BILEK 等[71]发现了水母胶原肽多孔支架，可用于软骨再生并促进人间充质干细胞增殖。

4　展望

针对目前胶原蛋白肽生产制造研究方面存在的问题，以下方面是应该致力解决的方向：a. 明确胶原蛋白肽对人体功效的分子机制，从而制备出更多具有专一功能的胶原蛋白肽产品；b. 建立对鱼类产品有效的脱腥方法；c. 研究出能够有效克服牛等动物胶原蛋白肽过敏反应的药物；d. 完善胶原蛋白肽市场法律法规和标准，比如，使计算胶原蛋白肽提取率标准化；e. 提高分离纯化技术，研究减少温度对其热稳定性差的限制；f. 补充和完善胶原蛋白肽指纹图谱图库，为行业高效生产提供参考；g. 企业做到在生产和服务过程中与先进的互联网技术结合，如 5G、6G，云计算、人工智能等新技术。

随着科学技术的发展和人们对绿色安全食品需求的增长，胶原蛋白肽的各项功能正在逐步被揭晓，也被广泛应用于人类市场上，推测未来胶原蛋白肽研究方向可能集中于以下几方面：a.从预防和临床医学的角度入手，开发出更多适宜人类疾病的特征药物或包囊、能替代人类组织器官的生物工程材料。例如：壳聚糖热敏胶原蛋白肽纳米粒子在药物传递和组织修护和热效应水解胶原蛋白凝胶在细胞封装和伤口愈合中逐被应用于临床中；b.从基因工程、蛋白质工程、基因组学方面考虑：制造重组胶原蛋白，利用胶原蛋白/肽指纹图谱，对生物进行追根溯源分析。目前，这方面的最新报道是利用胶原蛋白肽图谱对日本考古鸡和野鸡起源的研究；c.从人体代谢组学、生理学入手：研发类人胶原蛋白肽、纳米颗粒胶原蛋白肽、药物基因输送系统；d.从人类膳食、营养吸收方面考虑：更多的胶原蛋白肽膳食补充剂将会被开发出来，如无毒无害的肽钙螯合物，促进人体对钙的吸收；e.从环境科学、生态工程方面考虑：由于它极佳的生物可降解性，在将来可能与纳米碳颗粒、硅颗粒、天然生物材料以及其他高分子材料一起被制成能用来代替塑料袋的廉价环保包装材料。

未来各种丰富生物性功能的胶原蛋白肽产品将会以不同方法被提取制备出来，大量用于保健品、化妆品、生物工程材料和医学器材等领域。胶原蛋白肽在国际国内市场将会占有越来越大的份额，在人民的日常生活中扮演着重要角色，对人民产生深远影响，也会创造更大的社会和经济效益，具有巨大的开发潜力和市场前景。

参考文献

[1] QIU Y M, POPPLETON E, MEKKAT A, et al. Enzymatic phosphorylation of Ser in a type I collagen peptide[J]. Biophysical Journal, 2018, 115(12): 2327-2335.

[2] 魏洁琼, 余群力, 韩玲, 等. 牛骨胶原蛋白肽制备工艺优化及抗氧化活性分析[J]. 甘肃农业大学学报, 2020, 55(5): 203−211. [WEI Jieqiong, YU Qunli, HAN Ling, et al. Optimization of preparation process and antioxidant activity of vine collagen peptide [J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2020, 55(5): 203−211.]

[3] CHEN Junde, SUN Shanshan, LI Yushuang, et al. Proteolysis of tilapia skin collagen: Identification and release behavior of ACE-inhibitory peptides[J]. Food Science and Technology, 2021, 139: 110502.

[4] 梁飞, 左红梅. 胶原蛋白肽的性质、应用及发展前景的研究综述[J]. 明胶科学与技术, 2014, 34(3): 109−115. [LIANG Fei, ZUO Hongmei. Review of the properties, applications and development prospects of collagen peptides[J]. Gelatin Science and Technology, 2014, 34(3): 109−115.]

[5] HONG Hui, FAN Hongbing, CHALAMAIAH Meram, et al. Preparation of low-molecular-weight, collagen hydrolysates (peptides): Current progress, challenges, and future perspectives[J]. Food Chemistry, 2019, 301: 121−131.

[6] AHMED M, VERMA A K, PATEL R. Collagen extraction and recent biological activities of collagen peptides derived from sea-food waste: A review[J]. Sustainable Chemistry and Pharmacy, 2020, 18: 100315.

[7] 胡颀, 步婷婷, 于松峰, 等. 牛骨源胶原蛋白肽的制备及其生理活性研究进展[J]. 食品工业科技, 2020, 41(15): 357−364. [HU Qi, BU Tingting, YU Song, et al. Progress in preparation and physiological activity of vine bone-derived collagen peptides[J]. Food Industry Technology, 2020, 41(15): 357−364.]

[8] ZHANG Hongru, ZHAO Laiyu, SHEN Qingshan, et al. Preparation of cattle bone collagen peptides-calcium chelate and its structural characterization and stability[J]. Food Science and Technology, 2021, 144: 111264.

[9] CAO Hui, ZHAO Ying, ZHU Yubing, et al. Antifreeze and cryoprotective activities of ice-binding collagen peptides from pig skin[J]. Food Chemistry, 2016, 194: 1245−1253.

[10] ZAMORANO-APODACA J C, GARCÍA-SIFUENTES C O, CARVAJAL-MILLÁN E, et al. Biological and functional properties of peptide fractions obtained from collagen hydrolysate derived from mixed by-products of different fish species[J]. Food Chemistry, 2020, 331: 127350−127359.

[11] 朱必康, 罗善超, 罗世兴. 鱼皮胶原在组织工程中的研究进展与主要应用[J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(28): 4561−4566. [ZHU Bikang, LUO Shanchao, LUO Shixing. Progress and main application of fish skin collagen in tissue engineering[J]. China Organizational Engineering Research, 2021, 25(28): 4561−4566.]

[12] 张余莽, 马井喜, 杨纯媛. 鱼鳞胶原蛋白肽应用研究[J]. 河南农业, 2016(23): 117. [ZHANG Y M, MA J X, YANG C Y. Application study of fish-scale collagen peptides[J]. Henan Agriculture, 2016(23): 117.]

[13] 祝德义, 李彦春, 靳丽强, 等. 胶原多肽与钙结合性能的研究[J]. 中国皮革, 2005(3): 29−32. [ZHU Deyi, LI Yanchun, JIN Liqiang, et al. Study on the binding properties of collagen polypeptides and calcium[J]. China Leather, 2005(3): 29−32.]

[14] 葛淑华. 利用废革屑制备多肽螯合肥工艺及应用研究 [D]. 烟台: 烟台大学, 2019. [GE Shuhua. Study on the process and application of polypeptide fertilizer[D]. Yantai: Yantai University, 2019.]

[15] ZHANG Chang, YANG Xiaoshuang, HU Wanqing, et al. Preparation and characterization of carboxymethyl chitosan/collagen peptide/oxidized konjac composite hydrogel[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 149: 31−40.

[16] 王信苏, 汪之和. 草鱼鱼鳞胶原蛋白的提取[J]. 现代食品科技, 2006(4): 148−150. [WANG Xinsu, WANG Zhihe. Scaled collagen extraction from grass carp[J]. Modern Food Science and Technology, 2006(4): 148−150.]

[17] 伊莉, 李娅茹. 酸法提取鸭皮中胶原蛋白的工艺研究[J]. 食品工业, 2017, 38(9): 123−126. [E Li, LEE Yarru. Preparation of collagen from duck skin by acid method[J]. Food Industry, 2017, 38(9): 123−126.]

[18] 王晓军, 吴婷, 贾伟, 等. 酸法和酶法提取牦牛骨胶原蛋白的特性分析[J]. 食品科学, 2018, 39(12): 101−106. [WANG Xiaojun, WU Ting, JIA Wei, et al. Analysis of collagen by acid and enzyme[J]. Food Science, 2018, 39(12): 101−106.]

[19] MOMEN Shima, ALAVI Farhad, AIDER Mohammed. Alkali-mediated treatments for extraction and functional modification of proteins: Critical and application review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 110: 778−797.

[20] 王传幸, 李国英. 小分子鱼鳞胶原蛋白肽的制备及其抗氧化性测定[J]. 食品科技, 2019, 44(4): 141−145. [WANG Chuanxing, LI Guoying. Preparation and antioxidant determination of small molecular fish scales[J]. Food Technology, 2019, 44(4): 141−145.]

[21] 张强. 中华鳖裙边胶原蛋白的提取及其胶原蛋白肽对大鼠伤口愈合机制的研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2019. [ZHANG Qiang. Extraction of collagen and the mechanism of wound healing in rats[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2019.]

[22] 聂凌鸿, 冯怡秋. 鳝鱼皮胶原蛋白肽的制备及其抗氧化性能的研究[J]. 中国食品添加剂, 2017(11): 113−118. [NIE Lingfeng, FENG Yiqiu. Preparation and antioxidant properties of eel skin collagen peptide[J]. China Food Additives, 2017(11): 113−118.]

[23] 邵宏宏, 周秀锦, 相兴伟, 等. 鲛鳐皮胶原蛋白肽最佳制备工艺及自由基清除活性研究[J]. 食品工业, 2016, 37(5): 119−124. [SHAO Honghong, ZHOU Xiujin, XIANG Xingwei, et al. Study on the optimal preparation process and free radical clearance activity of skin collagen peptides[J]. Food Industry, 2016, 37(5): 119−124.]

[24] MIN S G, JO Y J, PARK S H. Potential application of static hydrothermal proces-sing to produce the protein hydrolysates from porcine skin by-products[J]. LWT-Food Sci Technol, 2017, 83: 18−25.

[25] PARK S H, JO Y J. Static hydrothermal processing and fractionation for production of a collagen peptide with anti-oxidative and anti-aging properties[J]. Process Biochemistry, 2019, 83: 176−182.

[26] 朱德誉, 公维洁, 卓先勤, 等. 鱼皮胶原蛋白肽的制备与应用研究进展[J]. 农产品加工, 2019(14): 84−85. [ZHU Deyu, GONG Weijie, ZHUO Xianqin, et al. Progress in preparation and

application of skin collagen peptides[J]. Agricultural Product Processing, 2019(14): 84−85.]
[27] 张晓亮, 张毅. 兔皮胶原蛋白的性质及凝胶临界模型的建立[J]. 食品科学, 2020, 41(24): 16−21. [ZHANG Xiaoliang, ZHANG Yi. Nature of rabbit skin collagen and the establishment of gel critical model[J]. Food Science, 2020, 41(24): 16−21.]
[28] 侯增淼, 李晓颖, 李敏, 等. 重组人源性胶原蛋白的制备及表征[J]. 生物工程学报, 2019, 35(2): 319−326. [HOU Zengmiao, LI Xiaoying, LI Min, et al. Preparation and characterization of recombinant hydrogenic collagen[J]. Bioengineering Journal, 2019, 35(2): 319−326.]
[29] 马丽杰. 发酵法制备鳕鱼皮胶原多肽及脱腥机理研究 [D]. 烟台: 烟台大学, 2013. [MA Lijie. Study on the mechanism of cod collagen and polypeptide by fermentation[D]. Yantai: Yantai University, 2013.]
[30] 刘唤明, 曾少葵. 发酵法制备罗非鱼皮胶原蛋白肽的工艺的研究[J]. 食品科技, 2012, 37(4): 232−235. [LIU Huanming, ZENG Shaokui. Study on the preparation of tilapia skin collagen peptide by fermentation method[J]. Food Technology, 2012, 37(4): 232−235.]
[31] 张京楼, 梁丽琨, 马丽杰, 等. 复合微生物发酵制备鳕鱼皮多肽的工艺探索[J]. 农产品加工 (学刊), 2012(3): 42−45, 50. [ZHANG Jinglou, LIANG Likun, MA Lijie, et al. Study on preparation of cod skin polypeptide by compound microbial fermentation [J]. Agricultural Products Processing (Journal), 2012(3): 42−45, 50.]
[32] 张鹏程, 幺宝金, 冷向阳. 鹿筋胶原蛋白提取条件优化[J]. 延边大学农学学报, 2020, 42(1): 69−75. [ZHANG Pengcheng, YAO Baojin, LENG Xiangyang. Optimization of deer tendon collagen extraction conditions[J]. Journal of Agriculture, Yanbian University, 2020, 42(1): 69−75.]
[33] 周婷, 吴瑀婕, 卢方云, 等. 鸡膝软骨胶原蛋白肽的超声辅助酶提工艺优化及抗氧化性[J]. 肉类研究, 2021, 35(4): 7−15. [ZHOU Ting, WU Yujie, LU Fangyun, et al. Optimization of ultrasonic-assisted enzyme extraction and antioxidant process of chicken knee[J]. Meat Research, 2021, 35(4): 7−15.]
[34] 冯玲玲, 冯进, 李春阳. 海蜇Ⅰ型胶原蛋白的提取及结构特性研究[J]. 食品工业科技, 2020, 5(2): 37−42. [FENG Lingling, FENG Jin, LI Chunyang. Study on the extraction and structural properties of jellyfish-type collagen[J]. Food Industry Technology, 2020, 5(2): 37−42.]
[35] 郭洪辉, 王令充, 洪专. 河豚鱼皮胶原寡肽的护肤美白功效研究[J]. 中国海洋药物, 2015, 34(4): 37−42. [GUO Honghui, WANG Lingchong, HONG Zhuan. Study on the skin care and whitening effect of puffer fish skin collagen oligopeptides[J]. Chinese Marine Drugs, 2015, 34(4): 37−42.]
[36] LUCA S, NUNZIA G, MARIA L N, et al. Marine collagen and its derivatives: Versatile and sustainable bio-resources for healthcare[J]. Materials Science & Engineering C, 2020, 113: 110963.
[37] 董世荣, 徐微, 李欣, 等. 胶原蛋白肽对凝固型酸奶品质的影响[J]. 食品工业科技, 2020, 41(16): 1−6. [DONG Shirong, XU Wei, LI Xin, et al. Effect of collagen peptides on the quality of solidified yogurt[J]. Food Industry Technology, 2020, 41(16): 1−6.]
[38] 宋维春, 徐云升. 水解明胶运动饮料的研究[J]. 食品工业科技, 2005(2): 138−139. [SONG W C, XU Y S. Study on hydrolytic gelatin sports drinks[J]. Food Industry Technology, 2005(2): 138−139.]
[39] 张顺亮, 成晓瑜, 潘晓倩, 等. 牛骨胶原蛋白抗菌肽的制备及其抑菌活性[J]. 肉类研究, 2012, 26(10): 5−8. [ZHANG Shunliang, CHENG Xiaoyu, PAN Xiaoqian, et al. Preparation and antibacterial activity of vine collagen[J]. Meat Research, 2012, 26(10): 5−8.]
[40] FU Y, YOUNG J F, LØKKE M M, et al. Revalorisation of bovine collagen as a potential precursor of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides based on in silico and *in vitro* protein digestions[J]. Journal of Functional Foods, 2016, 24: 196−206.
[41] CULPEPPER B K, PHIPPS M C, BONVALLET P P, et al. Enhancement of peptide coupling to hydroxyapatite and implant osseointegration through collagen mimetic peptide modified with a polyglutamatedomain[J]. Biomaterials, 2010, 31(36): 9586−9594.
[42] KAZUHISA M. Skin-moisturizing effect of collagen peptides taking orally[J]. Nutrition & Food Sciences, 2018, 8(2): 1−8.
[43] 韦倩妮, 吴军, 戚启琼. 鱼源胶原蛋白肽的制备及其生理活性研究进展[J]. 食品安全导刊, 2021(9): 5−6,8. [WEI Qianni, WU Jun, QI Qiqiong. Progress in the preparation and physiological activity of fish-source collagen peptides[J]. Food Safety Guide, 2021(9): 5−6,8.]
[44] JOYCE P, MEOLA T R, SCHULTZ H B, et al. Biomaterials that regulate fat digestion for the treatment of obesity[J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 100: 235−245.
[45] VELDHORST M A B, NIEUWENHUIZEN A G, HOCHSTENBACH-WAELEN A, et al. Effects of high and normal soyprotein breakfasts on satiety and subsequent energy intake, including amino acid and 'satiety' hormone responses[J]. European Journal of Nutrition, 2009, 48(2): 92−100.
[46] GRÄSSEL S, BAUER R J. Collagen XVI in health and disease[J]. Matrix Biology, 2013, 32(2): 64−73.
[47] DENG Aipeng, YANG Yang, DU Shimei, et al. Preparation of a recombinant collagen-peptide (RHC)-conjugated chitosan thermosensitive hydrogel for wound healing[J]. Materials Science & Engineering C, 2021, 119: 111555.
[48] DU Chunyu, LI Ying, XIA Xiaoling, et al. Identification of a novel collagen-like peptide by high-throughput screening for effective wound-healing therapy[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 173: 541−553.
[49] RICHARD Eastell. Prevention and management of osteoporosis[J]. Medicine, 2017, 45(9): 565−569.
[50] ZHU Lingyu, XIE Yingying, WEN Boting, et al. Porcine bone collagen peptides promote osteoblast proliferation and differentiation by activating the PI3K/Akt signaling pathway[J]. Journal of Functional Foods, 2020, 64: 103697.
[51] 司秋霞. 胶原蛋白肽对维甲酸致骨质疏松大鼠的效果观察[J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2020, 8(23): 53. [SI Qiuxia. Observation of the effect of collagen peptide on osteoporosis in-

duced by retinoic acid[J]. Electronic Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine in Cardiovascular Diseases, 2020, 8(23): 53.]

[52] SONG Hongdong, ZHANG Siqi, ZHANG Ling, et al. Ingestion of collagen peptides prevents bone loss and improves bone microarchitecture in chronologically aged mice[J]. Journal of Functional Foods, 2019, 52: 1−7.

[53] AKINORI H, DAISUKE W, TAKUYA F, et al. Effects of oral administration of collagen peptides on skin collagen content and its underlying mechanism using a newly developed low collagen skin mice model[J]. Journal of Functional Foods, 2015, 16: 174−182.

[54] 凌嘉阳, 曾晓房. 畜禽类骨胶原蛋白及其肽的研究进展[J]. 肉类工业, 2021(06): 51−57. [Ling Jiayang, Zeng Xiaofang. Progress in the studies of livestock and poultry bone collagen and their peptides[J]. Meat Industry, 2021(06): 51−57.]

[55] KOBAYASHI K, MAEHATA Y, KAWAMURA Y, et al. Direct assessments of the antioxidant effects of the novel collagen peptide on reactive oxygen species using electron spin resonance spectroscopy[J]. Journal of Pharmacological Sciences, 2019, 116(1): 97−106.

[56] 盛周煌, 贾盟盟, 朱良. 罗非鱼皮胶原蛋白多肽的体外抗氧化活性[J]. 食品科技, 2018, 43(11): 274−278. [SHENG Zhouhuang, JIA League, ZHU Liang. *In vitro* antioxidant activity of the tilapia skin collagen polypeptide[J]. Food Technology, 2018, 43(11): 274−278.]

[57] 宣敏, 程飚. 皮肤衰老的分子机制[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(15): 4375−4380. [XUAN Min, CHENG Biao. Molecular mechanism of skin aging[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2015, 35(15): 4375−4380.]

[58] 李艳莉. 猪皮胶原蛋白肽的保湿功能评价[J]. 现代农业科技, 2019(14): 229, 232. [LI Yanli. Evaluation of the moisturizing function of pig skin collagen peptide[J]. Modern Agricultural Technology, 2019(14): 229, 232.]

[59] MA Chunyang, WANG Hetong, CHI Yongjie, et al. Preparation of oriented collagen fiber scaffolds and its application in bone tissue engineering[J]. Applied Materials Today, 2021, 22: 100902.

[60] 薛延, 吴树勋, 黄任, 等. 骨膳食营养补充剂研究进展[J]. 食品科学技术学报, 2017, 35(3): 25−30. [XUE Yan, WU Shuxun, HUANG Ren, et al. Progress in bone dietary nutritional supplements[J]. Journal of Food Science and Technology, 2017, 35(3): 25−30.]

[61] 周倩, 罗志刚, 何小维. 胶原蛋白的应用研究[J]. 现代食品科技, 2008(3): 285−289. [ZHOU Qian, LUO Zhigang, HE Xiaowei. Application study of collagen study[J]. Modern Food Technology, 2008(3): 285−289.]

[62] 赵然, 曹敏杰, 王晶, 等. 水产动物源胶原蛋白的提取及应用研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(22): 8157−8165. [ZHAO Ran, CAO Minjie, WANG Jing, et al. Progress in the extraction and application of derived collagen from aquatic animals[J]. Food Safety and Quality Testing Journal, 2020, 11(22): 8157−8165.]

[63] 南学敏. 羊骨胶原蛋白肽抗氧化活性及氨基酸组成分析[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2019. [NAN Xuemin. Analysis of the antioxidant activity and amino acid composition of sheep bone collagen peptide[D]. Huhhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2019.]

[64] 李二凤, 何小维, 罗志刚. 胶原蛋白饲料粉的制备、组成分析及在饲料中的应用[J]. 粮食与饲料工业, 2006(6): 33−34. [LI Shuangfeng, HE Xiaowei, LUO Zhigang. Preparation, composition analysis and application of collagen feed powder in feed[J]. Food and Feed Industry, 2006(6): 33−34.]

[65] TÜRK S, ALTINSOY I, ÇELEBIEFE G, et al. 3D porous collagen/functionalized multiwalled carbon nanotube/chitosan/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering[J]. Materials Science & Engineering C, Materials for Biological Applications, 2018, 92: 757−768.

[66] YANG Y, RITCHIE A C, EVERITT N M. Recombinant human collagen/chitosan-based soft hydrogels as biomaterials for soft tissue engineering[J]. Materials Science & Engineering C, 2021, 121: 11846.

[67] YANG Xingchen, LU Zhenhui, WU Huayu, et al. Collagen-alginate as bioink for three-dimensional (3D) cell printing based cartilage tissue engineering[J]. Materials Science & Engineering C, 2018, 83: 195−201.

[68] 刘琦, 吴晓萌, 钱方, 等. mTGase 交联胶原蛋白肽获得的新型生物材料的热稳定性和结构特性分析 [C]. 中国食品科学技术学会第十六届年会暨第十届中美食品业高层论坛. [LIU Qi, WU Xiaomeng, QIAN Fang, et al. Analysis of the thermal stability and structural properties of the new biomaterial obtained by mTGase crosslinked collagen peptides[C]. The 16th Annual Meeting of China Society of Food Science and Technology and the 10th China-American Food Industry High-level Forum.]

[69] 吴欢. 壳聚糖及其衍生物接枝多肽的制备及其性能研究[D]. 武汉: 武汉理工大学, 2015. [WU Huan. Preparation and properties of chitosan and its derivatives grafted polypeptides[D]. Wuhan: Wuhan University of Technology, 2015.]

[70] 郭恩慧, 许子桐, 梁贻泽, 等. 一种新型光交联鱼胶原蛋白肽-透明质酸水凝胶的性能表征[J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(28): 4518−4525. [GUO Enhui, XU Zitong, LIANG Yize, et al. Performance characterization of a new type of photocross-linked fish collagen peptide-hyaluronic acid hydrogel[J]. China Organizational Engineering Research, 2020, 24(28): 4518−4525.]

[71] BILEK S E, BAYRAM S K. Fruit juice drink production containing hydrolyzed collagen[J]. Journal of Functional Foods, 2015, 14: 562−569.

沈雨婷, 栗绍文, 孟宪荣. 核心参数模型在食品微生物监控中的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 477−484. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050213

SHEN Yuting, LI Shaowen, MENG Xianrong. Cardinal Parameters Model in Food Microbiological Monitoring: A Review[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 477−484. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050213

· 专题综述 ·

核心参数模型在食品微生物监控中的研究进展

沈雨婷, 栗绍文, 孟宪荣*

（华中农业大学动物医学院, 湖北武汉 430070）

摘　要: 食源性疾病的暴发促使研究人员寻找更快捷有效的方法来监控食品中的微生物。预测微生物模型通过定量内在因素和外在因素对食品中微生物行为的影响，从而进行食品风险管理和产品研发。核心参数模型是其中的一种二级模型，适用于多种环境因素共同作用下微生物生长情况的预测。近年来，随着其不断被完善，已经发展成为研究微生物的重要工具。本文首先介绍了核心参数模型的概念以及现阶段国内外使用最广泛的核心参数模型。然后介绍了近年来核心参数模型的扩展和优化情况以及其在食品安全领域的应用，最后对未来的研究方向进行了展望。

关键词: 预测微生物学, 核心参数模型, Gamma 概念, 食品安全, 微生物监控

中图分类号: TS201.3　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)09−0477−08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050213

本文网刊:

Cardinal Parameters Model in Food Microbiological Monitoring: A Review

SHEN Yuting, LI Shaowen, MENG Xianrong*

（School of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China）

Abstract: Outbreaks of foodborne diseases prompted researchers to look for faster and more effective ways to monitor microorganisms in food. Predictive microbial models quantify the impact of intrinsic and extrinsic factors on microbial behavior in food for food risk management and product development. The cardinal parameters model is one of the secondary models, which is suitable for the determination of microbial growth under the combined action of various environmental factors. As cardinal parameters model has been refined in recent years, it has developed into an important tool for the study of microorganisms. Firstly, this article introduces the concept of the cardinal parameters model and the most widely used cardinal parameters models at this stage. Then it introduces the extension and optimization of cardinal parameters models and their application in food safety in recent years, and finally gives an outlook on future research directions.

Key words: predictive microbiology; cardinal parameters model; Gamma concept; food safety; microbiological monitoring

WHO 估算每年将近 6 亿人因食用被污染的食品而生病, 造成约 42 万人死亡, 其中, 引起食品污染的主要微生物是弯曲菌（*Campylobacter*）、沙门菌（*Salmonella*）和肠出血性大肠埃希菌（Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC）等致病菌[1]。食源性疾病的暴发促使研究人员寻找更快捷有效的方法来监控食品中的微生物。随着计算机技术的发展, ROBERTS 等[2] 提出“预测微生物学”这一概念, 通过开发相应的数学模型可预测食品从原材料到食用过程中每个阶段微生物的行为, 解决食源性疾病暴发下

收稿日期: 2021−05−25

基金项目: 十三五国家重点研发计划专项（2018YFD0500500）。

作者简介: 沈雨婷（1997−）, 女, 硕士, 研究方向: 动物源性食品安全, E-mail: 814736360@qq.com。

*** 通信作者:** 孟宪荣（1973−）, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 动物源性食品安全, E-mail: xianrongmeng@mail.hzau.edu.cn。

检测手段不足的问题。构建正确的预测模型可为食品安全决策者提供准确且快速的微生物信息，有效地开展微生物定量风险评估[3]、货架期估算[4] 等生产活动。

现在主要的分类方式由 WHITING 等[5] 建立，按照变量类别分为一级模型、二级模型和三级模型。二级模型则是描述微生物生长参数(最大生长速率 μ_{max}、延滞时间 λ)与环境参数(温度、pH 等)之间的关系。现在研究过程中使用较多的二级模型是平方根模型[6−7]，其仅考虑为温度这一环境变量。为了面对更为复杂多样的食品环境，如核心参数模型(cardinal parameters model, CPM)[8] 和响应面模型(response surface model)[9] 等定量描述多环境因素对生长参数影响的模型将会被更广泛地应用到研究和实践中。核心参数模型的优点是其容易获得参数的初始值且参数具有明确生物学意义、类型广泛，因而逐渐成为研究预测微生物学的重要工具[10−12]。

本文首先介绍了核心参数模型的概念以及现阶段国内外使用最广的核心参数模型。然后介绍了核心参数模型的扩展和优化情况以及其在食品安全领域的应用，最后对未来的研究方向进行了展望，以期为预测微生物学的相关研究提供参考。

1 核心参数模型

核心参数模型是预测微生物模型中的一种二级模型，最早由 ROSSO 等[8] 提出基于温度的 CPM(cardinal temperature model with inflection, CTMI)，通过定义核心环境因素即温度的参数(最大值、最小值和最适值)和最适条件时的最大生长速率来描述微生物生长速率和温度的方程。随后又提出了基于 pH 的 CPM (cardinal pH model)[13] 和基于水分活度(water activity, a_w)的 CPM[14]。ROSSO 等[8] 所建立的 CPM 相对于现在使用最频繁的平方根模型的优点在于其参数具有明确的生物学意义，并且随着研究的深入开发了针对不同环境因素的模型，大大增强了适用范围，成为研究食品生产、贮藏过程中微生物监控技术的重要工具。

1.1 单因素的核心参数模型

Gamma 概念(γ concept)[15−16] 量化了环境因素对微生物生长速率的独立影响，CPM 则基于 Gamma 概念进一步发展，其中每个最佳生长条件的 μ_{max} (μ_{opt})因与最佳生长条件不同的每个环境因素而降低。每个次优环境因子的影响 $\gamma(X)$都用一个介于 0 和 1 之间值的项来表示；当环境因素值在 X_{min}—X_{max} 的范围之外时，$\gamma(X)$为 0。

单因素的 CPM 公式[16] 为：

$$\mu_{max} = \mu_{opt} \times \gamma(X) \qquad 式（1）$$

式中，μ_{max} 为最大生长速率，lnCFU·(g·h)$^{-1}$；μ_{opt} 是最佳生长条件下的最大生长速率，lnCFU·(g·h)$^{-1}$；$\gamma(X)$描述了环境因素 X 对微生物生长速率的相对影响。

$\gamma(X)$的类别多样。现阶段使用较多的描述温度、pH、a_w 的 $\gamma(X)$公式具备拐点[17](如式 2)。

$$\gamma(X) = \frac{(X - X_{max})(X - X_{min})^n}{(X_{opt} - X_{min})^{n-1} \times \left\{ \begin{matrix} (X_{opt} - X_{min})(X - X_{opt}) - (X_{opt} - X_{max}) \times \\ [(n-1)X_{opt} + X_{min} - nX)] \end{matrix} \right\}}$$
$$X_{min} < X < X_{max} \qquad 式（2）$$

描述 CO_2 的 $\gamma([CO_2])$较为简单[17−18]，公式为：

$$\gamma([CO_2]) = \left(\frac{CO_{2\,max} - CO_2}{CO_{2\,opt} - CO_{2\,max}} \right)^2 \qquad 式（3）$$

式中，X_{max}、X_{min}、X_{opt} 分别是微生物能够生长的最大环境因素值、最小环境因素值以及最适环境因素值；n 是形状参数(温度和 a_w 的 n 为 2；pH 的 n 为 1)。a_w 的 X_{max} 一般设定为 1；对真菌而言，当不存在 CO_2 时真菌生长最佳，因此，$CO_{2\,opt}$ 可以设置为 0%[19]。

常用的平方根模型和 Arrhenius 模型[20−21] 无法准确描述当温度超过 T_{opt} 时 μ_{max} 降低这一现象；而从式(2)可以看出，CTMI 并非单纯地描述线性关系，其通过计算 μ_{opt} 和 T_{opt}，避免了因线性形式所产生的参数间结构相关性等问题，有效增大了模型预测温度的有效范围[8, 22]。

描述有机酸的 $\gamma([HA])$则有所不同[23]，其抑制作用主要归因于其未解离形式 HA，未解离的酸能够穿透细胞膜，降低细胞内 pH 从而引起抑制作用。$\gamma([HA])$的公式如下：

$$\gamma([HA]) = \left[1 - \left(\frac{[HA_U]}{MIC_{UHA}} \right)^{n1} \right]^{n2} \qquad 式（4）$$

$$[HA_U] = \frac{[HA]}{1 + 10^{pH - pKa}} \qquad 式（5）$$

式中，$[HA_U]$、[HA] 分别为未解离和初始有机酸的浓度(mmol/L)；MIC_{UHA} 是未解离有机酸的最小抑菌浓度；pK_a 为酸解离常数；n_1、n_2 是数学参数，为了最恰当的描述变化，n_1 被设置为 0.5 或 1.0，n_2 被设置为 1.0 或 2.0，设置值通过均方误差确定，与有机酸的种类、微生物的类型有一定关系(见表 1)[23]。

表 1 在不同有机酸中单增李斯特菌和乳酸菌的 $\gamma([HA])$所对应的 n_1、n_2 的值[23]

Table 1 Values of n_1 and n_2 corresponding to γ ([HA]) of *Listeria monocytogenes* and lactic acid bacteria in different organic acids[23]

有机酸	单增李斯特菌		乳酸菌	
	n_1	n_2	n_1	n_2
乙酸	0.5	1	0.5	1
乳酸	1	1	1	2
柠檬酸	1	1	1	2
山梨酸	1	1	1	2
苯甲酸	1	1	1	2

1.2　多因素的核心参数模型

多因素的 CPM 基于单因素的 CPM，通过将各因素的 γ(X)相乘来确定多个环境因素的组合效果。MARC 等[24] 引入互作效应因子 ξ，从每个环境因素项中获得 φ_{ei}，扩展了 Gamma 概念，以考虑环境因素之间相互作用的影响。例如温度、pH 和 a_w 这类环境因素相对独立，互作不明显，ξ 可设定为 1[19]；而像有机酸的解离会受到温度和 pH 的影响，需要考虑互作效应[24]。

以基于温度、pH、有机酸的 CPM[24] 为例，公式如下：

$$\mu_{max} = \mu_{opt} \times \gamma(T) \times \gamma(pH) \times \gamma([HA]) \times \xi(T, pH, [HA]) \quad 式（6）$$

$$\xi(\varphi(T, pH, [HA])) = \begin{cases} 1 & \psi \leqslant \theta \\ 2(1-\psi) & \theta < \psi < 1 \\ 0 & \psi \geqslant 1 \end{cases} \quad 式（7）$$

$$\psi = \sum_i \frac{\varphi_{ei}}{2\prod_{j\neq i}(1-\varphi_{ej})} \quad 式（8）$$

$$\varphi T = \left(1 - \sqrt{\gamma(T)}\right)^2 \quad 式（9）$$

$$\varphi pH = (1 - \gamma(pH))^2 \quad 式（10）$$

$$\varphi[HA] = (1 - \gamma([HA]))^2 \quad 式（11）$$

式中，ξ 为各因素的互作因子；φ_{ei} 是每个因素对相互作用的影响，根据 ψ 把生长状态分为三个部分，(i)如果 $\psi \leqslant$ 阈值(θ)，此时微生物生长且各环境因素之间不产生相互作用(ξ=1)；(ii)如果 $\theta<\psi<1$，微生物会生长，但由于各因素之间相互作用 μ_{max} 减小；(iii)如果 $\psi \geqslant 1$，微生物不生长(ξ=0)，ψ=1 为微生物的生长边界。根据理论假设，θ 设定为 1/2。

2　核心参数模型的扩展及优化

近年来，研究人员对核心参数模型进行扩展和优化，以更加有效地监控食品中的微生物，一是在已有模型的基础上增加新的环境参数，特别是各种有机酸以及有机酸盐等；二是对原有的模型因子进行优化或者扩展。

在原有 CPM 的基础上增加新的环境参数，可以使模型更加完善，应对复杂的食品环境。GIMÉNEZ 等[25] 比较已建立的模型，通过合并这些模型获得了描述苯酚、温度、a_w、pH、乳酸、亚硝酸盐的核心参数模型。在此之后，研究人员又陆续研究了包括 CO_2、双乙酸盐等环境因素的 γ 函数并将其添加到已有的模型上[25−32]，表 2 简单地展示了与 CPM 扩展有关的研究。例如通过不断地扩展，MEJLHOLM 等建立的模型(2009)[28] 包含了 12 个环境因素及其交互作用，并且通过 Ψ 值量化生长边界与特定产品特征之间的距离。MEJLHOLM 等[29] 证实了只要模型的复杂性与产品的复杂性相匹配(即所有重要的环境参数都应包括在模型中)，一个预测模型就足以准确预测乳酸杆菌(*Lactobacillus* spp.)的生长。除此以外，他们还发现尽管新模型并不适用于其它细菌，如肉杆菌(*Carnobacterium* spp.)、明串珠菌(*Leuconostoc* spp.)、魏斯菌(*Weissella* spp.)，但它可以帮助了解关于其他细菌与乳酸杆菌的生长特性的信息，从而提供这些细菌的潜在腐败域[29]。KOUKOU 等[32] 建立的模型对研究中未涉及的奶制品也有良好的预测。上述扩展以单增李斯特菌等细菌为对象的 CPM 时所运用的方法可为建立其他微生物的多因素 CPM 提供有效参考。

微生物的生物学特性各不相同，因而相同环境下它们表现的生长状态也各有差异。例如 BAJARD 等[33] 发现某些李斯特菌菌株的 μ_{max} 的平方根与温度在次优范围内并不呈线性关系，在 10~15 ℃ 之间存在一变化温度(change temperature)，低于此温度时单增李斯特菌的生长速率快于预期。因此，MARC 等[24] 针对李斯特菌的 CTMI 进行了调整，在基本温度(T_{min}, T_{opt}, T_{max})的基础上增加两个附加参数 T_c、T_1，获得的 aCTMI 能更好地预测较低温度下的生长速率(见式 12)。同时也有研究证明 aCTMI 在预测大肠埃希菌 K12 MG1655 的生长速率优于 CTMI 和平方根模型[34]。

$$aCTMI = \begin{cases} \dfrac{\mu_{opt} \times (T_c - T_{max})(T_c - T_1)^2}{(T_{opt} - T_1) \times \left\{ \begin{array}{l} (T_{opt} - T_1)(T_c - T_{opt}) - (T_{opt} - T_{max}) \\ \times (T_{opt} + T_1 - 2T_c) \end{array} \right\}} & \\ \left(\dfrac{T - T_{min}}{T_c - T_{min}}\right) & T_{min} < T \leq T_c \\ \dfrac{\mu_{opt} \times (T - T_{max})(T - T_1)^2}{(T_{opt} - T_1) \times \left\{ \begin{array}{l} (T_{opt} - T_1)(T - T_{opt}) - (T_{opt} - T_{max}) \\ \times (T_{opt} + T_1 - 2T) \end{array} \right\}} & \\ 1 & T_c < T < T_{max} \end{cases} \quad 式（12）$$

式中，T_c 为变化温度(℃)，将模型分为两个部分，在其上下使用不同的数学表达式；T_1 为第一个线性部分和横坐标直线之间的交点(℃)[24]。

针对 pH 的 CPM 展开的改造也非常多样化。有研究表明 pH 的下降只引起相对较小的生长速度下降，只有当接近极限 pH 时，生长速率会发生明显下降，而式(2)表示的 γ(pH)则接近于对称的抛物线曲线[13]。为了解决这一问题，通过在原有的 γ(pH)上进行开方处理(见式 13)，从而使模型在 pH_{opt} 周边的变化更趋于和缓；而针对在次优和超优 pH 范围内 pH 值变化的反应在结构上存在不同的情况，则进一步将“$pH-pH_{min}$”改为“$(pH-pH_{min})^{\eta}$”(见式 14)，通过添加参数使得 CPM 更容易调整到最优状态[35]。

$$\gamma(pH) = \left[\frac{(pH - pH_{max})(pH - pH_{min})}{(pH - pH_{max})(pH - pH_{min}) - (pH - pH_{opt})^2}\right]^{1/\kappa} \quad 式（13）$$

$$\gamma(pH) = \left[\frac{(pH - pH_{max})(pH - pH_{min})^{\eta}}{(pH - pH_{max})(pH - pH_{min})^{\eta} - (pH - pH_{opt})^2}\right]^{1/\kappa} \quad 式（14）$$

式中，κ、η 为数学参数，$\kappa \geqslant 1$。

表 2 核心参数模型在食品环境参数上的扩展

Table 2 Extension of the cardinal parameters models on food environmental parameters

时间	细菌	对象	CPM的环境参数	参考文献
2004	单增李斯特菌	冷熏三文鱼	苯酚、温度、a_w、pH、乳酸、亚硝酸盐	[25]
2007	单增李斯特菌	轻度腌制海鲜	CO_2、双乙酸盐、温度、a_w、pH、乳酸、亚硝酸盐、苯酚	[26]
2007	乳酸菌	轻度腌制海鲜	CO_2、双乙酸盐、温度、NaCl/a_w、pH、乳酸、苯酚	[27]
2009	单增李斯特菌	轻度腌制和即食虾	乙酸、苯甲酸、柠檬酸、山梨酸、CO_2、双乙酸盐、温度、a_w、pH、乳酸、亚硝酸盐、苯酚	[28]
2013	乳酸杆菌	海鲜、肉类	亚硝酸盐、乙酸、苯甲酸、柠檬酸、山梨酸、温度、a_w、pH、乳酸、CO_2、苯酚、双乙酸盐	[29]
2019	单增李斯特菌	干酪	柠檬酸、正磷酸盐、二磷酸盐、三磷酸盐、温度、a_w、pH、乳酸、乙酸、	[30]
2021	单增李斯特菌	干酪	乳链菌肽(Nisin A)、柠檬酸、正磷酸盐、二磷酸盐、三磷酸盐、温度、a_w、pH、乳酸、乙酸	[31]
2021	肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*)	新鲜或轻度腌制的海鲜、家禽	温度、pH、NaCl//a_w、乙酸、苯甲酸、柠檬酸、乳酸、山梨酸	[32]

除此以外, MEJLHOLM 等[27] 建立的模型(2009)仅适用于 pH>5.4 的环境, 而单增李斯特菌在 pH<5.4 时依然可以生长[36]。为了弥补这一缺陷, MARTINEZ-RIOS 等[37] 通过试验和文献数据发现 pH_{min} 与温度存在数量关系, 因而建立了基于温度的 pH_{min} 函数(见式 15), 并用其代替了原模型中恒定的 pH_{min}, 建立了新的 CPM。验证结果显示其成功地将适用范围扩展到 pH>4.6, 从而提高对单增李斯特菌在低 pH 食品中生长的预测准确性。

$$pH_{minT}=\begin{cases} pH_{min0}-T\times\left(\dfrac{pH_{min0}-pH_{minR}}{T_R}\right) & 0\le T\le T_R \\ pH_{minR}-(T-T_R)\times\left(\dfrac{pH_{min37}-pH_{minR}}{37-T_R}\right) & T_R<T<37 \end{cases} \quad \text{式(15)}$$

式中, T_R 是与最小的 pH_{min} 相对应的温度(℃); pH_{minR} 是 T_R 时的 pH_{min}, T 是储存温度(℃); pH_{minR}、pH_{minT}、pH_{min0} 和 pH_{min37} 分别为 T_R、T、0 ℃ 和 37 ℃ 时的 pH_{min}。

通过对 $\gamma(X)$进行优化和修正, CPM 能够更准确地预测并监控微生物的生长情况, 同时这也对研究人员提出了更高的数学素养要求, 需进一步推进学科间的交互。

3 核心参数模型在食品安全领域的应用

预测食品微生物学模型可以量化微生物对食品的理化特性的响应, 预测在预期和恶劣的储存条件下的潜在增长, 促进微生物食品安全性的评估和管理。核心参数模型通过与其他预测模型联用, 尤其是一级模型以及生长概率模型[38−39], 以更好地发挥作用, 展现了模型间使用的联动性。

一方面, CPM 可以确定主要的环境因素(如温度、pH、a_w)对微生物生长的影响, 从而开展食品的风险评估以及为食品保存提供参考(见表 3)。董庆利等[40] 在模型基础上根据食品安全目标(food safety objective, FSO)定性分析生熟食品中单增李斯特菌在不同材质的案板上交叉污染水平并进行风险等级排序, 结果表明对案板不进行任何清洗处理时最易引发交叉污染, 木质案板相较于塑料和不锈钢的风险更大。BELBAHI 等[19] 的研究结果显示 a_w 和 CO_2 的组合显著影响了黑曲霉(*Aspergillus niger*)和链格孢菌(*Alternaria alternata*)的生长, 开发的模型为选择枣类水果保存方式(即冷藏、干燥、改良的大气包装或其组合)提供了决策支持。KAKAGIANNI 等[41] 模拟食品在交付给消费者之前的运输、分配和储存的各个过程, 从而评估在等温和非等温条件下细菌生长情况, 用于食品安全的有效风险管理。DALGAARD 等[23] 则是将 CPM 和交互模型[42] 联用, 建立的单增李斯特菌生长和生长边界模型被纳入食品腐败和安全预测软件(food spoilage and safety predictor software, FSSP)以更好地开展实际应用。

另一方面, CPM 还可对食品抑菌剂的效果进行

表 3 核心参数模型在食品风险管理中的应用

Table 3 Application of the cardinal parameters models in food risk management

细菌	对象	CPM的环境参数	联用模型	参考文献
单增李斯特菌	黄瓜	温度、a_w、pH	Baranyi模型[43-44]	[40]
黑曲霉和链格孢菌	海枣	温度、a_w、CO_2	二项线性模型[45]	[19]
嗜热脂肪地芽孢杆菌(*Geobacillus stearothermophilus*)	牛奶	温度	Baranyi模型	[46]
酸土脂环酸芽孢杆菌(*Alicyclobacillus acidoterrestris*)	水果饮料	温度、pH	生长概率模型	[41]
大肠埃希菌O157:H7	碎牛肉	温度	Baranyi模型	[47]
单增李斯特菌	即食炖牛肉	温度	Baranyi模型	[48]
胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)	木瓜	温度/相对湿度	Baranyi模型和Arrhenius模型	[49]

评价，确定合适的抑菌剂使用量，同时也有助于开发新的抑菌剂，例如乙酸、柠檬酸等有机酸已作为食品的抑菌剂被美国食品药品监督管理局（food and drug administration，FDA）确定为一般公认安全（generally recognized as safe，GRAS）添加剂[50]。有研究表明乳酸钠（NaL）可作为防腐剂显著抑制铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）的生长[51−52]，因此，董庆利等[53]将 NaL 整合到 CPM 之中，确定了 NaL 的最小抑制铜绿假单胞菌浓度。VALÍK 等[54]就通过 CPM 模拟了乳酸，苯甲酸钠和温度对麦芽假丝酵母生长的影响，研究发现乳酸浓度的增加可以延长延滞时间和降低生长速率以及苯甲酸钠对酵母菌群的抑制作用随温度的变化而变化。MARTINEZ-RIOS 等[31]则为将 Nisin A 作为抑菌剂添加到奶酪中的实际应用提供了参考。而 MARTINEZ-RIOS 等[37]为了探讨葡萄糖酸（gluconic acid，GAC）对单增李斯特菌的抑制作用，在 MEJLHOLM 等建立的模型（2009）[28]的基础上增加了与 GAC 相关的 γ 函数，结果却显示其在预测奶酪中单增李斯特菌的性能时弱于原始模型。虽然模型的结果看起来增加的 GAC函数是无用的，但这也说明奶酪中单增李斯特菌的生长抑制可能是通过食品的 pH 等其他因素的综合作用导致的，而不是通过 GAC 发挥作用。因而 CPM 也可用于排除无效的抑制因素。

除原有的预测微生物模型应用外，核心参数模型也逐渐应用到其他方面。例如，以往有关细菌生物被膜的研究多为定性[55−57]，研究人员开始利用 CPM 定量评估环境因素对生物被膜形成的影响，展现了模型使用的广泛性。DIMAKOPOULOU-PAPAZOGLOU 等[11]建立了评估 pH 和 a_w 对新港沙门菌（*S. newport*）的生物被膜形成能力的 CPM 和概率模型，发现允许沙门菌形成生物被膜的 pH 和 a_w 的范围比允许细菌生长的范围更大。TANGO 等[58]开发了评估 pH、乙醇浓度和 a_w 对金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）的生物被膜形成能力的 CPM。尽管上述模型基于简化的生长介质（液体培养基）以及间接测定（光密度）形成的生物被膜，但开发的模型为量化影响生物被膜多种环境因素的整体相互作用奠定了良好的基础，并且可以为控制生物被膜提供有用的信息。对于生物被膜建模方法的发展具有重大价值，包括开发直接定量生物被膜的方法，基于实验室基质的食品基质和食品相关环境（食品接触表面）中模型的预测能力的评估和验证，其他环境因素（例如温度、抑菌剂等）对生物被膜形成影响的描述，以及在生物被膜形成模型中纳入变异性。

CPM 也开始用于研究其他单细胞生物的生长情况。例如在成功优化微绿球藻在浊静操作下的稳态生物量生产力的基础上[59]，WEISE 等[60]利用动态的粗粒度模型和 CTMI 来描述不连续操作过程中中试规模的管状光生物反应器内与光和温度有关的特定微藻的生长速率，以最终预测生物量的增长并且根据模型的反馈结果优化了工艺参数，明显提高了生产率，为转移至更大规模的管状光生物反应器提供了参考。上述的研究为 CPM 乃至预测微生物在食品安全以及生产中的应用提供了新的可能。

4　小结

描述多环境因素的核心参数模型可以应对复杂的食品环境，有其研究和发展的必要性。国外自 20 世纪 90 年代起对 CPM 的研究逐渐增多，其研究对象不仅包括单增李斯特菌、金黄色葡萄球菌等食源性致病菌，还包括黑曲霉菌等腐败真菌。科研人员通过增加新的环境参数 γ 函数以及对原有的模型因子进行优化或扩展来有效地提高 CPM 的准确性，但国内与此相关的研究仍较少。CPM 考虑了各种食品特性和存储条件的影响以及这些环境因素的影响，然后通过模型预测并监控食品环境中的微生物，从而确定食品的安全性，使开发或重新制定安全食品配方（例如改变的 pH 和有机酸浓度）变得更加容易和快捷。与此同时，CPM 的使用也日趋多元化。

为了使核心参数模型能够更好地运用于实践中，还有许多工作需要完善，对于 CPM 未来地研究方向展望如下：a.建立 CPM 需要大量的试验数据，因而试验负担很大，需要思考简便的试验方法包括已经发表的文献数据来有效地缩短模型的研发时间；b.现在研究的 CPM 多以培养基为基础，与实际的食品基质存在一定区别，同时微生物的生物学特性各不相同，为了解决这类问题，CPM 需要根据食品和微生物的种类进行调整，因此在发展过程中需更加多元化、专业化，使 CPM 更加紧密有效地应用到食品质量和安全控制中去；c.将 CPM 与已有的微生物预测软件结合，使非专业人员在食品监控和研发过程中可以快速准确地了解并使用相关模型。

参考文献

[1] 钟延旭，赵鹏. 我国食源性疾病监测工作进展[J]. 应用预防医学，2019，25(1)：80−83. [ZHONG Y X，ZHAO P. Progress of foodborne disease surveillance in China[J]. Applied Preventive Medicine，2019，25(1)：80−83.]

[2] ROBERTS T A，JARVIS B. Predictive modelling of food safety with particular reference to *Clostridium botulinum* in model cured meat systems[J]. Society for Applied Bacteriology Symposium，1983，11(11)：85−95.

[3] POSSAS A，VALDRAMIDIS V，GARCÍA-GIMENO R M，et al. High hydrostatic pressure processing of sliced fermented sausages：A quantitative exposure assessment for *Listeria monocytogenes*[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies，2019，52：406−419.

[4] GONZÁLEZ-TEJEDOR G A，MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ G B，GARRE A，et al. Quality changes and shelf-life prediction of a fresh fruit and vegetable purple smoothie[J]. Food and Bioprocess Technology，2017，10(10)：1892−1904.

[5] WHITING R C，BUCHANAN R L. A classification of mod-

els for predictive microbiology[J]. Food Microbiology, 1993, 10(2): 175−177.

[6] RATKOWSKY D A, OLLEY J, MCMEEKIN T A, et al. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures[J]. Journal of Bacteriology, 1982, 149(1): 1−5.

[7] 叶可萍. 真空包装冷却猪肉中单增李斯特菌的生长预测模型研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2013. [YE Keping. Predictive modelling of *Listeria monocytogenes* growth on vacuum-packaged chilled pork[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2013.]

[8] ROSSO L, LOBRY J R, FLANDROIS J P. An unexpected correlation between cardinal temperatures of microbial growth highlighted by a new model[J]. Journal of Theoretical Biology, 1993, 162(4): 447−463.

[9] ZURERA-COSANO G, GARCÍA-GIMENO R M, RODRÍGUEZ-PÉREZ R, et al. Performance of response surface model for prediction of *Leuconostoc mesenteroides* growth parameters under different experimental conditions[J]. Food Control, 2006, 17(6): 429−438.

[10] ARYANI D C, ZWIETERING M H, den BESTEN H M. The effect of different matrices on the growth kinetics and heat resistance of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus plantarum*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 238: 326−337.

[11] DIMAKOPOULOU-PAPAZOGLOU D, LIANOU A, KOUTSOUMANIS K P. Modelling biofilm formation of *Salmonella enterica* ser. Newport as a function of pH and water activity[J]. Food Microbiology, 2016, 53(Pt B): 76-81.

[12] ANASTASIADI M, LAMBERT R J W. Modelling the effect of combined antimicrobials: A base model for multiple-hurdles[J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 252: 10−17.

[13] ROSSO L, LOBRY J R, BAJARD S, et al. Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(2): 610−616.

[14] ROSSO L, ROBINSON T P. A cardinal model to describe the effect of water activity on the growth of moulds[J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 63(3): 265−273.

[15] ZWIETERING M H, WIJTZES T, DE WIT J C, et al. A decision support system for prediction of the microbial spoilage in foods[J]. Journal of Food Protection, 1992, 55(12): 973−979.

[16] ROSSO L. Models using cardinal values: Predictive microbiology applied to chilled food preservation[C]. Proceeding of Conference No 1997/2 of Commission C2, European Commission, 1999, 18816: 48–55.

[17] NUNES S B, CADAVEZ V, TEIXEIRA J A, et al. Cardinal parameter meta-regression models describing *Listeria monocytogenes* growth in broth[J]. Food Research International, 2020, 136: 109476.

[18] DEVLIEGHERE F, GEERAERD A H, VERSYCK K J, et al. Growth of *Listeria monocytogenes* in modified atmosphere packed cooked meat products: A predictive model[J]. Food Microbiology, 2001, 18(1): 53–66.

[19] BELBAHI A, LEGUERINEL I, MÉOT J M, et al. Modelling the effect of temperature, water activity and carbon dioxide on the growth of *Aspergillus niger* and *Alternaria alternata* isolated from fresh date fruit[J]. Journal of Applied Microbiology, 2016, 121(6): 1685−1698.

[20] TAOUKIS P S, KOUTSOUMANIS K, NYCHAS G J. Use of time-temperature integrators and predictive modelling for shelf life control of chilled fish under dynamic storage conditions[J]. International Journal of Food Microbiology, 1999, 53(1): 21−31.

[21] TARLAK F, OZDEMIR M, MELIKOGLU M. Mathematical modelling of temperature effect on growth kinetics of *Pseudomonas* spp. on sliced mushroom (*Agaricus bisporus*)[J]. International Journal of Food Microbiology, 2018, 266: 274−281.

[22] SAUTOUR M, DANTIGNY P, DIVIES C, et al. A temperature-type model for describing the relationship between fungal growth and water activity[J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 67(1-2): 63−69.

[23] DALGAARD P, MEJLHOLM O. Modeling growth of *Listeria* and lactic acid bacteria in food environments[J]. Methods in Molecular Biology, 2019, 1918: 247−264.

[24] MARC Y L, HUCHET V, BOURGEOIS C M, et al. Modelling the growth kinetics of *Listeria* as a function of temperature, pH and organic acid concentration[J]. International Journal of Food Microbiology, 2002, 73(2-3): 219−237.

[25] GIMÉNEZ B, DALGAARD P. Modelling and predicting the simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and spoilage microorganisms in cold-smoked salmon[J]. Journal of Appllied Microbiology, 2004, 96(1): 96−109.

[26] MEJLHOLM O, DALGAARD P. Modeling and predicting the growth boundary of *Listeria monocytogenes* in lightly preserved seafood[J]. Journal of Food Protection, 2007, 70(1): 70−84.

[27] MEJLHOLM O, DALGAARD P. Modeling and predicting the growth of lactic acid bacteria in lightly preserved seafood and their inhibiting effect on *Listeria monocytogenes*[J]. Journal of Food Protection, 2007, 70(11): 2485−2497.

[28] MEJLHOLM O, DALGAARD P. Development and validation of an extensive growth and growth boundary model for *Listeria monocytogenes* in lightly preserved and ready-to-eat shrimp[J]. Journal of Food Protection, 2009, 72(10): 2132−2143.

[29] MEJLHOLM O, DALGAARD P. Development and validation of an extensive growth and growth boundary model for psychrotolerant *Lactobacillus* spp. in seafood and meat products[J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 167(2): 244−260.

[30] MARTINEZ-RIOS V, JØRGENSEN MØ, KOUKOU I, et al. Growth and growth boundary model with terms for melting salts to predict growth responses of *Listeria monocytogenes* in spreadable processed cheese[J]. Food Microbiology, 2019, 84: 103255.

[31] MARTINEZ-RIOS V, PEDERSEN M, PEDRAZZI M, et al. Antimicrobial effect of nisin in processed cheese-quantification of residual nisin by LC-MS/MS and development of new growth and growth boundary model for *Listeria monocytogenes*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2021, 338: 108952.

[32] KOUKOU I, MEJLHOLM O, DALGAARD P. Cardinal parameter growth and growth boundary model for non-proteolytic *Clostridium botulinum*-effect of eight environmental factors[J]. In-

ternational Journal of Food Microbiology, 2021, 346: 109162.

[33] BAJARD S, ROSSO L, FARDEL G, et al. The particular behaviour of *Listeria monocytogenes* under sub-optimal conditions[J]. International Journal of Food Microbiology, 1996, 29(2-3): 201−211.

[34] VAN DERLINDEN E, VAN IMPE J F. Modeling growth rates as a function of temperature: Model performance evaluation with focus on the suboptimal temperature range[J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 158(1): 73−78.

[35] AKKERMANS S, NORIEGA F E, LOGIST F, et al. Introducing a novel interaction model structure for the combined effect of temperature and pH on the microbial growth rate[J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 240: 85−96.

[36] 任静静, 杨铭伟, 陈云飞, 等. 食源性单增李斯特菌 *inlA/inlB/inlC* 基因缺失株的构建及其生物学特性分析[J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46(1): 45−53. [REN J J, YANG M W, CHEN Y F, et al. Construction and characterization of *inlA/inlB/inlC* gene deleted mutant strains of food-borne *Listeria monocytogenes*[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2019, 46(1): 45−53.]

[37] MARTINEZ-RIOS V, GKOGKA E, DALGAARD P. New term to quantify the effect of temperature on pH_{min}-values used in cardinal parameter growth models for *Listeria monocytogenes*[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 1510.

[38] RATKOWSKY D A, ROSS T. Modelling the bacterial growth/no growth interface[J]. Letters in Applied Microbiology, 1995, 20(1): 29−33.

[39] DING T, YU Y Y, HWANG C A, et al. Modeling the effect of water activity, pH, and temperature on the probability of enterotoxin a production by *Staphylococcus aureus*[J]. Journal of Food Protection, 2016, 79(1): 148−152.

[40] 董庆利, 陆冉冉, 汪雯, 等. 基于 FSO 值对生熟食品交叉污染中单增李斯特菌的危害识别[J]. 现代食品科技, 2016, 32(11): 286−292, 266. [DONG Q L, LU R R, WANG W, et al. Hazard identification of *Listeria monocytogenes* cross-contamination from raw to cooked food based on food safety objective values[J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(11): 286−292, 266.]

[41] KAKAGIANNI M, KALANTZI K, BELETSIOTIS E, et al. Development and validation of predictive models for the effect of storage temperature and pH on the growth boundaries and kinetics of *Alicyclobacillus acidoterrestris* ATCC 49025 in fruit drinks[J]. Food Microbiology, 2018, 74: 40−49.

[42] 张文敏, 方太松, 王翔, 等. 食品中微生物间交互模型的研究进展[J]. 食品科学, 2020, 41(1): 277−283. [ZHANG W M, FANG T S, WANG X, et al. Microbial interaction modeling in foods: A review[J]. Food Science, 2020, 41(1): 277−283.]

[43] BARANYI J, ROBERTS T A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food[J]. International Journal of Food Microbiology, 1994, 23: 277−294.

[44] BARANYI J, ROBINSON T P, KALOTI A, et al. Predicting growth of *Brochothrix thermosphacta* at changing temperature[J]. International Journal of Food Microbiology, 1995, 27(1): 61−75.

[45] GOUGOULI M, KOUTSOUMANIS K P. Modelling growth of *Penicillium expansum* and *Aspergillus niger* at constant and fluctuating temperature conditions[J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 140(2-3): 254−262.

[46] KAKAGIANNI M, GOUGOULI M, KOUTSOUMANIS K P. Development and application of *Geobacillus stearothermophilus* growth model for predicting spoilage of evaporated milk[J]. Food Microbiology, 2016, 57: 28−35.

[47] KAKAGIANNI M, KOUTSOUMANIS K P. Assessment of *Escherichia coli* O157:H7 growth in ground beef in the Greek chill chain[J]. Food Res Int, 2019, 123: 590−600.

[48] LIU Y, WANG X, LIU B, et al. One-step analysis for *Listeria monocytogenes* growth in ready-to-eat braised beef at dynamic and static conditions[J]. Journal of Food Protection, 2019, 82(11): 1820−1827.

[49] SANDOVAL-CONTRERAS T, IÑIGUEZ-MORENO M, GARRIDO-SÁNCHEZ L, et al. Predictive model for the effect of environmental conditions on the postharvest development of *Colletotrichum gloeosporioides* strains isolated from papaya (*Carica papaya* L.)[J]. Journal of Food Protection, 2020, 83(9): 1495−1504.

[50] 姜春新, 王雅莹, 洪小利, 等. 柠檬酸和乙酸对致腐假单胞菌的抗生物被膜研究[J]. 核农学报, 2021, 35(1): 120−127. [JIANG C X, WANG Y Y, HONG X L, et al. Anti-biofilm study of citric acid and acetic acid against *Pseudomonas putrefaciens*[J]. Journal of Nuclear Agricultural Science, 2021, 35(1): 120−127.]

[51] 熊成, 董庆利, 姚远. 乳酸钠对铜绿假单胞菌生长的影响[J]. 食品科学, 2012, 33(13): 144−146. [XIONG C, DONG Q L, YAO Y. Effect of sodium lactate on the growth of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Food Science, 2012, 33(13): 144−146.]

[52] 姚远, 董庆利, 熊成. 乳酸钠抑制铜绿假单胞菌生长的机理[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(3): 54−57. [YAO Y, DONG Q L, XIONG C. Mechanism of growth inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* by sodium lactate[J]. Food and Fermentation Industries, 2012, 38(3): 54−57.]

[53] 董庆利, 姚远, 赵勇, 等. 铜绿假单胞菌的温度、pH 值和乳酸钠主参数模型构建[J]. 农业机械学报, 2014, 45(1): 197−202. [DONG Q L, YAO Y, ZHAO Y, et al. Modeling the cardinal parameters model of temperature, pH and sodium lactate of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2014, 45(1): 197−202.]

[54] VALÍK Ľ, AČAI P, LIPTÁKOVÁ D. Modelling the effects of lactic acid, sodium benzoate and temperature on the growth of *Candida maltosa*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2017, 65(5): 453−460.

[55] 朱娟, 佘鹏飞, 谭芮辰, 等. 3 种液体培养基对表皮葡萄球菌生物膜形成的影响[J]. 临床检验杂志, 2018, 36(4): 245−247. [ZHU J, SHE P F, TAN R C, et al. Effects of three kinds of liquid media on the biofilm formation of *Staphylococcus* epidermidis[J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2018, 36(4): 245−247.]

[56] 严一舟, 袁中伟, 何泾正, 等. 百里香酚联合苯唑西林对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 生物被膜的影响[J]. 微生物学通报, 2020, 47(12): 4205−4218. [YAN Y Z, YUAN Z W, HE J Z, et al. Effect of thymol combined with oxacillin on methicillin-res-

istant *Staphylococcus aureus* (MRSA) biofilm[J]. Microbiology China, 2020, 47(12): 4205−4218.]

[57] 曹启航, 刘圆园, 孙亚楠, 等. 不同培养条件对单核细胞增生李斯特菌生物被膜形成的影响[J]. 中国兽医科学, 2020, 50(12): 1563−1571. [CAO Q H, LIU Y Y, SUN Y N, et al. Effect of different culture conditions on the formation of biofilm of *Listeria monocytogenes*[J]. Chinese Veterinary Science, 2020, 50(12): 1563−1571.]

[58] TANGO C N, AKKERMANS S, HUSSAIN M S, et al. Modeling the effect of pH, water activity, and ethanol concentration on biofilm formation of *Staphylococcus aureus*[J]. Food Microbiology, 2018, 76: 287−295.

[59] WEISE T, REINECKE J M, SCHUSTER S, et al. Optimizing turbidostatic microalgal biomass productivity: A combined experimental and coarse-grained modelling approach[J]. Algal Research, 2019, 39: 101439.

[60] WEISE T, GREWE C, PFAFF M. Experimental and model-based analysis to optimize microalgal biomass productivity in a pilot-scale tubular photobioreactor[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2020, 8: 453.