李浩楠, 黄小敏, 方一荷, 等. 基于体外消化模型研究板栗壳和囊衣原花青素类物质消化前后的组成差异 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 1−9. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100011
LI Haonan, HUANG Xiaomin, FANG Yihe, et al. Composition Differences of Procyanidins in Chestnut Shell and Pellicle before and after Digestion Based on *in Vitro* Digestion Model[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 1−9. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100011

· 未来食品 ·

基于体外消化模型研究板栗壳和囊衣原花青素类物质消化前后的组成差异

李浩楠[1], 黄小敏[1], 方一荷[1], 肖雯馨[1], 张子琴[1], 杨　芳[1,2,3,*]
（1.武汉工程大学环境生态与生物工程学院, 湖北武汉 430205;
2.武汉工程大学绿色化工过程教育部重点实验室, 湖北武汉 430205;
3.磷资源开发利用教育部工程研究中心, 湖北武汉 430073）

摘　要: 本文以板栗壳和囊衣为原料，采用基于超高效液相色谱-串联质谱（UPLC-MS/MS）技术的广泛靶向代谢组学，分析样品中原花青素物质经过模拟消化后的组成变化。结果显示，板栗壳和囊衣及其代谢物中共鉴定出 33 种原花青素类代谢物，差异代谢物分析显示，消化后板栗壳中表儿茶素、原花青素 C2 及原花青素 A1 等 16 种原花青素类化合物均呈显著（P<0.05）下调；板栗囊衣中没食子儿茶素-儿茶素-儿茶素、没食子儿茶素及没食子酸儿茶素没食子酸酯等 17 种原花青素类化合物均呈显著（P<0.05）下调。其中，下调最显著（P<0.05）的是没食子儿茶素-儿茶素-儿茶素，在体外胃肠消化后分别降低了 98.23%（板栗壳）和 97.86%（囊衣）。综上，板栗壳和囊衣中原花青素类物质在消化过程中稳定性较差，未来的研究中可采用设计靶向释放载体对其进行包埋等方式，以提高其生物利用率。

关键词: 板栗壳, 板栗囊衣, 原花青素, 体外消化, 差异代谢物, 代谢组学
中图分类号: TS201.2　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0001−09
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100011
本文网刊:

Composition Differences of Procyanidins in Chestnut Shell and Pellicle before and after Digestion Based on *in Vitro* Digestion Model

LI Haonan[1], HUANG Xiaomin[1], FANG Yihe[1], XIAO Wenxin[1], ZHANG Ziqin[1], YANG Fang[1,2,3,*]
（1.School of Environmental Ecology and Biological Engineering, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430205, China;
2.Key Laboratory for Green Chemical Process of Ministry of Education,
Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430205, China;
3.Engineering Research Center of Phosphorus Resources Development and
Utilization of Ministry of Education, Wuhan 430073, China）

Abstract: In this study, the composition changes of procyanidins in chestnut shell and pellicle after simulated digestion were analyzed by extensive targeted metabolomics based on ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). The results showed that a total of 33 procyanidin metabolites were identified in chestnut shell, pellicle and their metabolites. Differential metabolite analysis showed that 16 procyanidin compounds, including epicatechin, procyanidin C2 and procyanidin A1 were significantly (P<0.05) down-regulated in chestnut shell after digestion. Seventeen procyanidins, including gallocatechin-catechin-catechin, gallocatechin and gallocatechin gallate, were significantly (P<0.05) down-regulated in chestnut pellicle after digestion. Among them, the most significant (P<0.05) down-regulation was gallocatechin-catechin-catechin, which was reduced by 98.23% (chestnut shell) and 97.86% (chestnut

收稿日期: 2021−10−11
基金项目: 武汉工程大学校长基金资助项目（2020151, 2020155）; 国家自然科学基金青年基金（31701604）。
作者简介: 李浩楠（2001−）（ORCID: 0000-0001-8127-4430）, 男, 大学本科, 研究方向: 天然产物与功能因子, E-mail: 15926649163@163.com。
*** 通信作者:** 杨芳（1978−）（ORCID:0000-0002-0067-350X）, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 天然产物与功能因子, E-mail: yangfang2001@126.com。

pellicle) after gastrointestinal digestion *in vitro*. In conclusion, the stability of proanthocyanidins in chestnut shell and pellicle was poor during digestion. In future studies, targeted release carriers could be designed to encapsulate them, so as to improve their bioavailability.

Key words: chestnut shell; chestnut pellicle; procyanidins; *in vitro* digestion; differential metabolites; metabonomics

板栗(*Castanea mollissima* B)属壳斗科植物, 是重要的农作物之一, 分布于世界各地。目前, 我国是板栗的主要生产国, 板栗年产量高达 1.0×10^6 t[1]。板栗仁作为可食用的部分, 其中含有大量的蛋白质、功能性多糖及矿物质等[2], 深受广大消费者喜爱。除此以外, 板栗加工的副产物, 如板栗树及树皮被用于工业生产单宁[1], 板栗叶在民间医学中被用于治疗百日咳和漆中毒[3−4]。然而, 作为主要副产物的板栗壳和囊衣仍以燃烧和自然腐败等方式处理。据资料显示, 板栗壳和囊衣中含有色素、多酚和多糖等化学成分[5]。多酚作为植物的次级代谢产物, 分布于植物的外皮、叶及茎中, 其抗氧化机理主要包括清除自由基, 氢供体, 猝灭单线态氧及螯合金属离子[6−9]。王菲儿等[10]从板栗壳和囊衣分离并鉴定出了 10 个多酚类化合物, 分别为间苯二酚、2-羟基-3',4-二羟基苯乙酮、邻苯二酚、原儿茶醛、没食子酸甲酯、2,5-二羟基苯乙酮、B-羟丙基香草酮、原儿茶酸甲酯、对香豆酸和阿魏酸。Caccio 等[11] 从板栗壳水提物中分离鉴定出了没食子酸、原儿茶酸、绿原酸等多种多酚类化合物。Barreira 等[12] 提取了板栗不同部位的多酚类物质, 发现总酚含量最高的是板栗壳, 其含量高于树叶、皮、花、果实, 并发现抗氧化活性与总酚含量线性相关。因此, 板栗壳可以成为一种廉价和容易获得的天然抗氧化剂来源。

近年来, 多酚类物质已经成为研究热点, 大部分研究者聚焦于研究多酚提取工艺优化、抗氧化活性(包括清除自由基, 作为氢供体, 猝灭单线态氧及螯合金属离子等)以及抑菌活性等方面, 原花青素类物质的抗氧化活性是维生素 C 的 20 倍, 是维生素 E 的 50 倍[13]。但陈梦雨等[14] 通过研究葡萄籽中的原花青素, 阐明它具有抗氧化、抗心肌缺血再灌注损伤、抗动脉粥样硬化、保护血管内皮细胞、抗癌、降血压、降血脂、降血糖等药理活性。研究表明, 酚类化合物在化学溶剂中的抗氧化活性, 抑菌活性与其经过胃肠消化后表现出很大的差异。由于多酚的高代谢率和较低的生物利用度, 能够进入到血液循环和靶器官发挥生物活性的物质可能是其代谢物。所以, 溶剂提取表现出来的抗氧化性并不能代表其在体内的作用。但关于板栗壳和囊衣原花青素类物质在消化前后的组成变化鲜有研究。因此, 本实验以板栗壳和囊衣多酚提取物中的原花青素类为研究对象, 采用广泛靶向代谢组学结合超高效液相色谱串联质谱技术(ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS), 研究板栗壳和囊衣原花青素类物质在体外消化过程中的代谢物种类和含量变化, 为进一步开发利用板栗壳和囊衣生物资源提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

野生板栗 采自山东省祁蒙山; 甲醇、乙腈、乙酸均色谱级 Sigma; 无水乙醇(分析纯)、胃蛋白酶(≥2500 units/mg)、胰蛋白酶(≥2500 units/mg)、胆汁提取物 国药集团化学试剂有限公司。

THZ-100 恒温培养摇床 上海一恒科学仪器有限公司; DK-S24 型电热恒温水浴锅 上海精宏实验设备有限公司; FW100 型高速万能粉碎机 天津市泰斯特仪器有限公司; ML-204/02 型精密电子天平 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; 超高效 Shim-pack UFLC SHIMADZU CBM30A 液相色谱(ultra performance liquid chromatography, UPLC) 岛津公司; Applied Biosystems 6500 Q TRAP 串联质谱(tandem mass spectrometry, MS/MS) 赛默飞公司; GZX-9030 型数显鼓风干燥箱 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; Alpha14LDplus 冻干机 德国 Christ 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 板栗壳和板栗囊衣提取物的制备 采用苏云霞等[15] 研究优化得到的最佳提取工艺提取板栗壳及囊衣中多酚, 将板栗壳和囊衣分别从板栗果上剥离开, 将板栗壳碎后过 60 目筛, 按照 1∶15 g/mL 的料液比, 采用 70% 乙醇(V/V)在 65 ℃ 条件下提取 90 min 后得板栗壳原花青素粗提取液, 对其进行真空抽滤, 并在 40 ℃ 下真空浓缩, 得到粗提液, 再经冷冻干燥得到红棕色的板栗壳提取物(chestnut shell extract, CSE)。按照同样的方法可以制备板栗囊衣提取物(chestnut pellicle extract, CPE), 低温保存备用。

1.2.2 体外模拟胃肠消化模型 取 CSE 和 CPE 溶于蒸馏水 10 mL 中, 加入胃消化液 8 mL(3.2 mg/mL 胃蛋白酶, 7 mL/L HCl 以及 2 g/L NaCl, pH2~3); 于恒温摇床中 250 r/min, 37 ℃ 下孵育 2 h, 再加入 1 mol/L NaOH 调节 pH 为 7, 终止胃液消化反应。向胃消化后的样品中加入肠消化液 8 mL(1.5 mg/mL 胰液素, 1.5 mg/mL 胆汁提取物, pH7~7.4); 于恒温摇床中 250 r/min, 37 ℃ 下孵育 2 h[16]。将肠消化后的样品于冷冻离心机中, 在 8000 r/min, 4 ℃ 条件下离心 10 min, 取上清液于−20 ℃ 下保存待分析[17]。把胃肠消化后的板栗壳代谢物记作 DCSE(digested chestnut shell extract), 胃肠消化后的囊衣代谢物粗提物记作 DCPE(digested chestnut shell extract)。

1.2.3　代谢物定性定量分析

1.2.3.1　样品前处理　参考苏云霞等[15]的方法，并稍作修改，取 CSE、CPE、DCSE、DCPE 分别进行真空冷冻干燥，在研磨仪中研磨 1.5 min，各称取 100 mg 上述样品粉末，加入 1.0 mL 的 70% 甲醇（V/V），放入 4 ℃ 冰箱中过夜，其间辅以涡旋 3 次，辅助样品溶解。在 10000 r/min 下离心 10 min，取上清液 1 mL，过 0.22 μm 滤膜，保存在−20 ℃，供 UPLC-MS/MS 分析。

1.2.3.2　高效液相色谱条件　采用超高效液相色谱进行检测，色谱柱：Waters ACQUITY UPLC HSS T3 C_{18}（2.1 mm×100 mm，1.8 μm）；柱温：40 ℃；流速：0.4 mL/min；流动相：A 相为超纯水（含 0.04% 的乙酸）、B 相为乙腈（含 0.04% 的乙酸）；进样量：2 μL；洗脱梯度：0~11.0 min，流动相 A 由 95% 变化为 5%；11.0~12.0 min，5%（A）；12.0~12.1 min，流动相 A 由 5% 变化为 95%；12.1~15.0 min，95%（A）；流速：0.40 mL/min，具体洗脱程序如表 1 所示。

表 1　色谱梯度洗脱程序

Table 1　Chromatographic gradient elution procedure

时间（min）	A（%）	B（%）
0	95	5
11	5	95
12	5	95
12.1	95	5
15	95	5

1.2.3.3　质谱条件　质谱条件参考陈金泉[18]的方法，MS 条件：电喷雾电离（electrosprey ionization，ESI）离子源，正负离子扫描模式，电喷雾离子源温度 500 ℃；离子喷雾电压 5500 V；离子源气体 1，55 psi；离子源气体 2，60 psi；帘气（curtain gas，CUR）25 psi。

1.2.3.4　代谢物定性定量原理　根据 Zhu 等[19]的方法对代谢物进行定性和定量分析。基于自建数据库 MWDB（metware database）和公共数据库 Mass Bank（http://www.massbank.jp/），KNAPSAcK（http://kanaya.naist.jp/KNApSAcK/），HMDB（http://www.hmdb.ca/），MoTo DB（http://www. ab.wur.nl/moto/）和 METLIN（http://metlin.scripps.edu/index.php），对样品的代谢物进行定性和定量分析。在鉴定过程中，去除了 K、Na、NH4 和其他较大分子量物质的碎片离子的重复信号。代谢物的定量基于三重四级杆质谱的多反应监测模式（multiple reaction monitoring，MRM）。具体来说，首先是筛选前体离子（Q1）去除与其他分子量物质相对应的离子以消除干扰，前体离子冲破碰撞室并诱导电离形成大量碎片离子。再者，为了消除非目标离子干扰，碎片离子通过三重四极杆过滤以选择特征碎片离子（Q3），使定量结果更加准确和可重复。使用 Multia Quant（3.0.2），对色谱峰进行整合和校正，并根据色谱峰的峰面积计算相应物质的相对含量。为了进一步确定各代谢物的相对含量，根据代谢物保留时间和峰型对质谱峰进行了校正。

1.3　数据处理

通过 UPLC-MS/MS 分析得到的数据由 R 软件进行层次聚类分析（HCA）、主成分分析（PCA）和正交偏最小二乘法判别分析（OPLS-DA）、使用变量权重值（Variable Importance for the projection，VIP）和 P 值来筛选胃肠消化后代谢物差异。将比较组得到的显著性差异代谢物进行 KEGG 代谢通路富集分析，每组样品进行 3 次生物学重复实验。

2　结果与分析

2.1　原花青素类化合物定性定量分析

研究表明，多酚在中性或稍碱性 pH 下不稳定，会发生化学转化，如形成不稳定的醌中间体和其他氧化化合物[20]。此外，多酚在碱性条件下往往通过疏水作用、氢键和共价键与蛋白质结合。基于广泛靶向代谢分析方法，利用 UPLC-ESI-MS/MS 对 CSE、CPE、DCSE 和 DCPE 中化合物进行定性定量分析。以正负离子模式检测代谢物，共鉴定出 33 种原花青素类代谢物，包括 14 种黄酮、19 种鞣质。采用聚类热图对 33 种原花青素代谢物进行分析，结果见图 1。

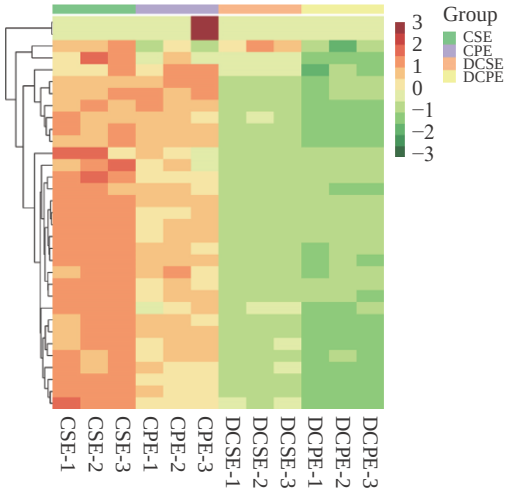


图 1　CSE、CPE、DCSE 和 DCPE 不同原花青素组分的层次聚类分析热图

Fig.1　Hierarchical cluster analysis heat map of different proanthocyanidins components of CSE, CPE, DCSE and DCPE

注：每个样品都显示在一个单独的列中，每个原花青素组分由一个单独的行表示；红色表示高浓度，低浓度用绿色表示。

从图 1 中可以看出，CSE 和 CPE 之间原花青素代谢物含量无显著差异，而 CSE vs DCSE 及 CPE vs DCPE 比较组中，体外消化对原花青素代谢物含量影响较大。CSE 和 CPE 原花青素类含量明显高于 DCSE 和 DCPE。CPE 和 CSE 及其在体外胃肠消化过程中的代谢物中含量在前五位原花青素如表 2 所示。

由表 2 所示，其中 CSE、CPE、DCSE 和 DCPE 中含量最高的前五种原花青素类化合物中都含有表儿茶素、原花青素 C2、原花青素 A1。比较表儿茶

表 2　CPE 和 CSE 体外胃肠消化过程中前五位原花青素类的相对含量

Table 2　Relative contents of the top five proanthocyanidins in gastrointestinal digestion *in vitro* of CPE and CSE

样品	物质	电离样式	分子量	相对含量(×10^6)
CSE	表儿茶素	$[M+H]^+$	290.079	292±17.36^a
	原花青素C2	$[M+H]^+$	866.206	61±3.71^a
	原花青素A1	$[M+H]^+$	576.127	33±2.76^a
	没食子儿茶素	$[M+H]^+$	306.074	27±2.12^a
	没食子儿茶素-儿茶素-儿茶素	$[M+H]^+$	882.201	25±1.78
CPE	表儿茶素	$[M+H]^+$	290.079	214±1.51^b
	原花青素C2	$[M+H]^+$	866.206	46±2.14^b
	原花青素A1	$[M+H]^+$	576.127	32±4.18^a
	没食子儿茶素	$[M+H]^+$	306.074	18±0.74^b
	槟榔鞣质B1*	$[M+H]^+$	866.206	17±0.70
DCSE	表儿茶素	$[M+H]^+$	290.079	35±1.82^c
	原花青素A1	$[M+H]^+$	576.127	12±0.88^b
	原花青素C2	$[M+H]^+$	866.206	11±0.36^c
	槟榔鞣质B1*	$[M+H]^+$	866.206	4.4±0.44
	儿茶素没食子酸酯	$[M-H]^-$	442.09	4.2±0.19
DCPE	表儿茶素	$[M+H]^+$	290.079	20±1.73^d
	原花青素A1	$[M+H]^+$	576.127	6.8±0.19^c
	原花青素C2	$[M+H]^+$	866.206	5.7±0.41^d
	2α,3α-环氧-5,7,3',4'-四羟基黄烷-(4β-8-表儿茶素)*	$[M-H]^-$	576.126	2.6±0.30
	四羟基黄烷酮-(4α-8-表儿茶素)*	$[M-H]^-$	576.126	2.6±0.29

注: 不同字母的两项间具有显著差异(P<0.05); *表示改物质的同分异构体; 表3~表6同。

素、原花青素 C2 和原花青素 A1 的含量变化, 结果显示体外消化后其含量显著(P<0.05)下降。据覃国新等[21] 研究报道, 表儿茶素在胃消化过程中含量并无明显变化, 在模拟小肠消化过程中含量显著下降。原花青素 C2、原花青素 A1 为原花青素二聚体[22], 在模拟胃消化过程中, 二聚体原花青素的分解为二分子原花青素单体, 故导致原花青素二聚体类含量下降[23]。此外, 据报道[24], 板栗壳中还含有没食子酸。Filomena 等[25] 通过 HPLC 测定了板栗不同部位的多酚类化合物, 结果显示 CSE 和 CPE 中均含有没食子酸。Jung 等[26] 通过 HPLC 测定了 CSE 乙醇提取物中没食子酸的含量, 其含量为 4.66 mg/g。而本文发现, 板栗壳和囊衣中的没食子酸与儿茶素结合, 主要以没食子儿茶素的形式大量存在。

2.2　代谢分析

2.2.1　主成分分析(PCA)　为了揭示 CSE 和 CPE 之间的差异以及体外模拟消化对原花青素类成分的总体影响, 对样品组和质量样本(mix)进行了主成分分析。质控样本由样本提取物混合制备而成, 用于分析样本在相同的处理方法下的重复性。在主成分分析得分图(图 2)中, 观察到 CPE vs DCPE、CSE vs DCSE 比较组之间被明显分离, 两个主成分 PC1 和 PC2 的得分分别为 82.19% 和 7.59%。结果表明, 原花青素类物质在模拟胃肠道消化过程中变化明显。此外, 研究发现图 2 中 CPE-3 与其他两个平行样品差距较大, 可能由于实验测定时有一定的误差, 又由于主成分分析舍弃了次要部分, 故而导致 CPE-3 在图中与其他两个平行样品有较大差距。结合图 1 的

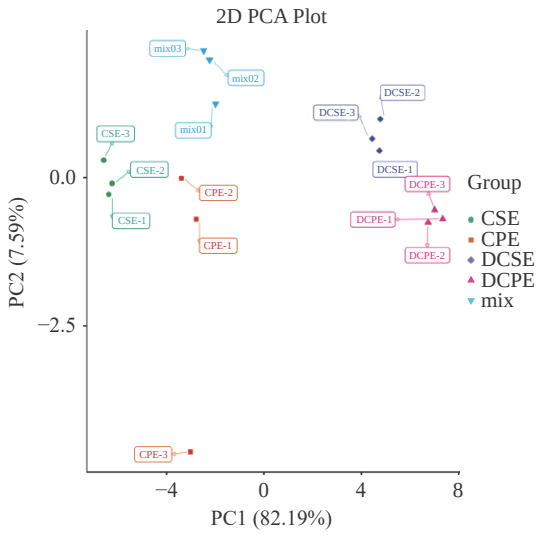


图 2　主成分分析

Fig.2　Principal component analysis

热图分析以及图 3 的 OPLS-DA 可以佐证以上猜想。

2.2.2　正交偏最小二乘法分析(OPLS-DA)　根据 OPLS-DA 模型分析代谢组数据, 绘制各分组的得分图, 进一步展示各个分组之间的差异[27−28], 通过去除不需要的差异, 来筛选差异成分。评价模型的预测参数有R_X^2, R_Y^2和 Q^2, 其中R_X^2和R_Y^2分别表示所建模型对 X 和 Y 矩阵的解释率, Q^2 表示模型的预测能力, 这三个指标越接近于 1 时表示模型越稳定可靠, Q^2>0.5 时可认为是有效的模型, Q^2>0.9 时为出色的模型。OPLD-DA 分析如图 3 所示。

由 图 3 所示, 比较组 CSE vs CPE(R_X^2=0.857, R_Y^2=0.994, Q^2=0.979)、CSE vs DCSE(R_X^2=0.983,

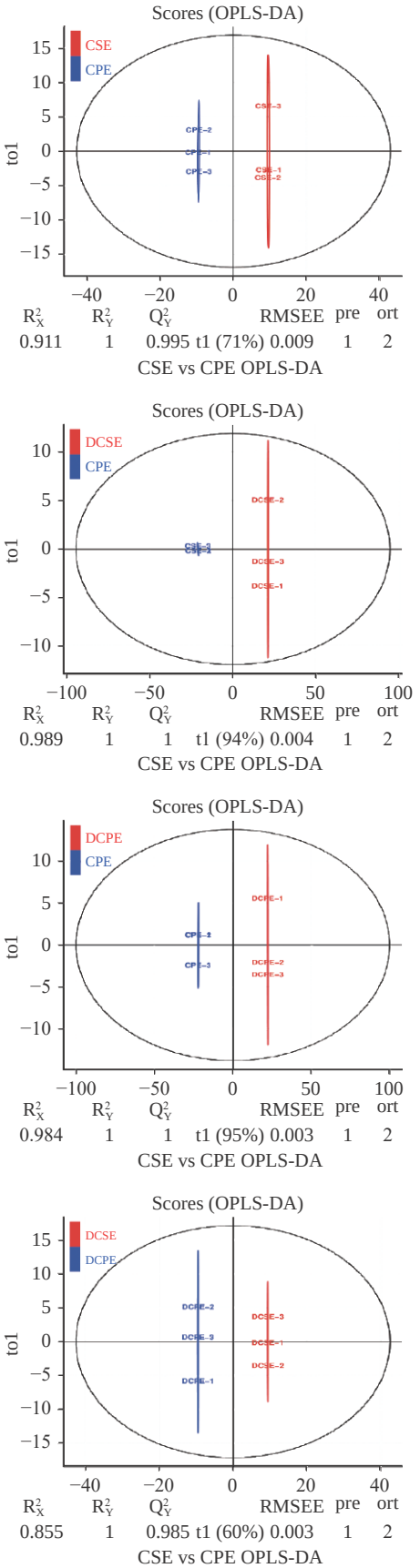


图 3　OPLD-DA 分析

Fig.3　OPLD-DA analysis

R^2_Y=0.999，Q^2=0.998）、CPE vs DCPE（R^2_X=0.975，R^2_Y=0.998，Q^2=0.995）、DCSE vs DCPE（R^2_X=0.882，R^2_Y=0.988，Q^2=0.958）。结果说明，OPLS-DA 模型具有较好的预测性能和可靠性，可用于进一步筛选差异组分。进一步说明 CSE vs CPE、CSE vs DCSE、CPE vs DCPE 与 DCSE vs DCPE 比较组中原花青素含量存在显著差异。

表 3　CSE 和 CPE 的显著差异代谢物

Table 3　Significantly different metabolites between CSE and CPE

ID	代谢物	VIP
mws0034	表没食子儿茶素没食子酸酯*	1.82

表 4　DCSE 和 DCPE 的显著差异物

Table 4　Significant difference between DCSE and DCPE

ID	代谢物	VIP
mws0836	原花青素B1	1.36
pmn001650	肉桂单宁B2	1.33
HJN099	原花青素三聚单酯	1.18
pmp000103	槟榔鞣质A2*	1.15
pme0434	原花青素B2	1.13
Lmhn002953	赤芍素	1.07
pmp000101	槟榔鞣质C1*	1.06
pmn001646	原花青素C1	1.04
pmn001648	肉桂单宁D1	1.04

2.2.3　原花青素差异代谢物筛选　基于 OPLS-DA 分析结果，从获得的多变量分析 OPLS-DA 模型的变量重要性投影（variable importance in project，VIP），可以初步筛选出比较组间差异代谢物。VIP 值表示对应代谢物的组间差异在模型中各组样本分类判别中的影响强度，VIP≥1 的代谢物则为差异显著，见表 3~表 6。VIP 值越大，说明该差异代谢物对样品组间的分类判别的影响强度和解释能力越强[29]。CSE vs CPE 比较组存在的差异代谢物共有 16 种（下调 15 种，上调 1 种），DCSE vs DCPE 比较组存在的差异代谢物共有 12 种（下调 12 种，上调 0 种），CSE 和 DCSE 比较组存在的差异代谢物共有 16 种（下调 16 种，上调 0 种），CPE 和 DCPE 之间存在的差异代谢物共有 17 种（下调 17 种，上调 0 种）。CSE vs DCSE、CPE vs DCPE 比较组中显著差异代谢物只有下调化合物，这表明在消化过程中，原花青素类化合物降解为其他化合物。在此基础上，考虑到有些代谢物的含量较小，存在偶然误差的可能性较大，故本文仅取含量排名前 20 种的代谢物进行差异代谢物分析。

从表 4 和表 5 可以看出，对于初始样品和消化样品（CSE 和 DCSE、CPE 和 DCPE），它表明代谢物中原花青素类的结构在消化过程中显著改变，如板栗壳和囊衣中的没食子儿茶素-儿茶素-儿茶素的 VIP 值分别为 5.82 和 5.55，说明其在消化体系中，降低程度较高，分别达到了 98.23% 和 97.86%。与 OPLS-DA 结果相互验证。因此，在模拟体外消化过程中，原花青素类物质含量普遍下降，转化为其他种类的物质。在 CSE 和 CPE 中检测出的原花青素类物质中，

表 5　CSE 和 DCSE 的显著差异物

Table 5　Significant difference between CSE and DCSE

ID	代谢物	VIP
Lmmp002068	没食子儿茶素-儿茶素-儿茶素	5.82
mws0049	没食子儿茶素	4.31
Lmhn000921	HHDP-glucose isomer	3.34
mws0042	表没食子酸儿茶素	3.27
pme0460	表儿茶素	3.03
pmp000103	槟榔鞣质A2*	2.67
pmb2947	三儿茶素	2.64
pmp000102	槟榔鞣质A1*	2.51
Lmhn002953	赤芍素	2.51
pmp000100	槟榔鞣质B1*	2.49
pmn001646	原花青素C1	1.25
HJAP144	没食子酰原花青素C2	1.21
HJN069	四羟基黄烷酮-(4α-8-表儿茶素)*	1.18
mws0054	儿茶素	1.15
HJN053	2α,3α-环氧-5,7,3',4'-四羟基黄烷-(4β-8-表儿茶素)*	1.13
pmn001648	肉桂单宁D1	1.11

表 6　CPE 和 DCPE 的显著差异物

Table 6　Significant difference between CPE and DCPE

ID	代谢物	VIP
Lmmp002068	没食子儿茶素-儿茶素-儿茶素	5.55
mws0049	没食子儿茶素	4.38
mws0351	没食子酸儿茶素没食子酸酯	4.15
mws0034	表没食子儿茶素没食子酸酯*	3.97
Lmhn000921	HHDP-glucose isomer	3.44
mws0042	表没食子酸儿茶素	3.43
pme0460	表儿茶素	3.41
Lmhn002953	赤芍素	3.33
pmp000103	槟榔鞣质A2*	3.16
pmp000280	原花青素C2	3.01
pmn001646	原花青素C1	1.98
pmb3114	表儿茶素表阿夫儿茶精	1.79
HJAP144	没食子酰原花青素C2	1.65
HJN069	四羟基黄烷酮-(4α-8-表儿茶素)*	1.58
HJN053	2α,3α-环氧-5,7,3',4'-四羟基黄烷-(4β-8-表儿茶素)*	1.57
mws0054	儿茶素	1.55
HJN048	原花青素	1.38

原花青素 C1、表儿茶素、儿茶素等有较多学者研究，但四羟基黄烷酮-(4α-8-表儿茶素)*、2α,3α-环氧-5,7,3',4'-四羟基黄烷-(4β-8-表儿茶素)*、赤芍素等物质少有学者研究，甚至未深入了解其结构和功能特性。

2.2.4　原花青素差异代谢物富集分析　利用差异代谢物 KEGG ID 对显著差异的原花青素化合物进行通路富集分析[30]，代谢通路富集分析结果以气泡图的形式展示，见图 4。图 4A 中每一个纵坐标代表一条代谢通路，共有 5 个，即在 KEGG 中查询到了 5 个代谢通路，分别为新陈代谢途径、类黄酮生物合成、次级代谢产物的生物合成、苯丙烷类生物合成、AMPK 信号通路。图 4B 中，也有 5 个代谢途径，与图 4A 一致。在图 4A 中，苯丙烷类生物合成气泡颜色较深，说明这些代谢途径在模拟消化过程中，变化较大。在图 4B 中，气泡颜色普遍较深，但苯丙烷类生物合成最深，说明它在模拟消化过程中，变化最大。

由表 7 知，在模拟胃肠消化过程中，板栗壳和囊衣中原花青素类物质的差异代谢物有表儿茶素(C09727)、表没食子酸儿茶素(C12136)、没食子儿茶素(C12127)、表没食子儿茶素没食子酸酯*(C09731)。其中，表儿茶素是一种黄酮类化合物，属于黄烷醇类化合物它不仅对心脑血管有防治作用[31]，而且在预防肿瘤和抗氧化性方面作用显效[32]。

本实验通过 KEGG 富集差异组分得到的 5 条代谢通路，其中板栗壳和囊衣中的原花青素在模拟胃

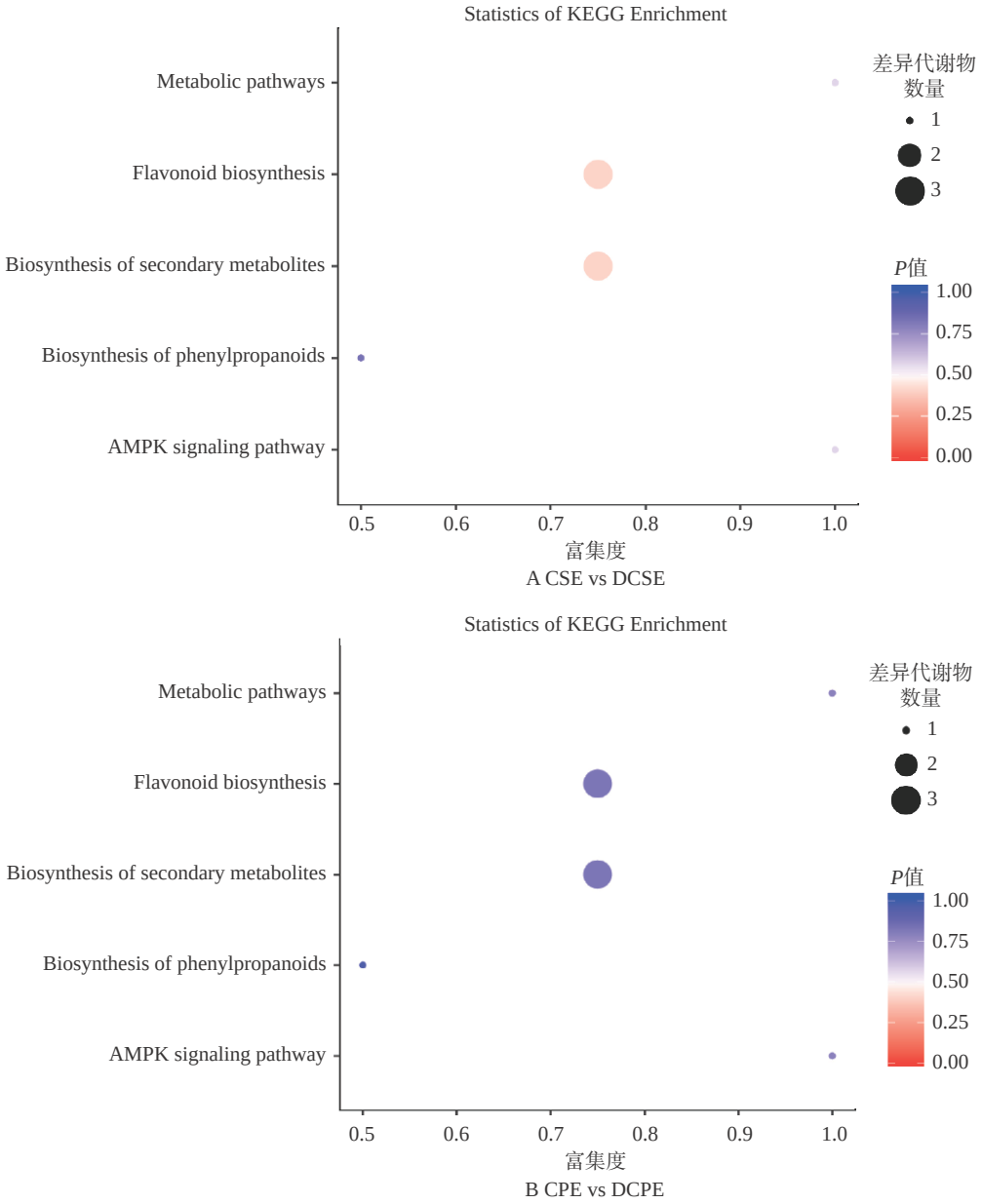


图 4　板栗壳和囊衣组间和消化前后显著性差异原花青素类物质的 KEGG 富集图

Fig.4　KEGG enrichment of procyanidins between chestnut shell and capsule coating groups and before and after digestion

注：横坐标表示每个通路对应的富集度，纵坐标为通路名称，点的颜色为 P 值，越红表示富集越显著；点的大小代表富集到的差异代谢物的个数多少。

表 7　CSE vs DCSE 以及 CPE vs DCPE 差异组分参与的代谢途径

Table 7　Metabolic pathways involved in different components of CSE vs DCSE and CPE vs DCPE

代谢途径	代谢物KEGG编号	代谢途径KEGG编号
新陈代谢途径	C09727	ko01100
类黄酮生物合成	C12127、C12136、C09727	ko00941
次级代谢产物的生物合成	C09727	ko01061
苯丙烷类生物合成	C12127、C09727、C12136	ko01110
AMPK信号通路	C09731	ko04152

肠消化过程中，主要通过苯丙烷类生物合成的方式发生了降解，导致其含量降低。这些变化是导致原花青素类物质生物利用率低的主要原因。对多酚的影响，然后总结肠消化环境影响了苯丙烷类生物合成，导致单体化合物含量降低。

3　结论

本实验以板栗壳和囊衣提取物中的原花青素类为研究对象，采用基于 UPLC-MS/MS 的广泛靶向代谢组学技术，研究板栗壳和囊衣原花青素类物质在体外消化过程中的代谢物种类和含量变化。在板栗壳

和囊衣的组分分析中，我们发现了四羟基黄烷酮-(4α-8-表儿茶素)*、2α,3α-环氧-5,7,3',4'-四羟基黄烷-(4β-8-表儿茶素)*、赤芍素等几类物质少有学者研究，后续研究可对这些原花青素类物质的结构和功能特性做进一步研究。从含量上分析，CSE 和 CPE 中的原花青素类物质在消化后均显著降低。其中，没食子儿茶素-儿茶素-儿茶素降低程度最高，在板栗壳和囊衣两类样品中分别达到了 98.23、97.86%。CSE vs DCSE 分析结果显示，板栗壳原花青素类物质中表儿茶素、原花青素 C2、原花青素 A1、没食子儿茶素、没食子儿茶素-儿茶素-儿茶素等 16 种原花青素类化合物均呈显著下调，CPE vs DCPE 分析结果显示，板栗囊衣原花青素类物质中没食子儿茶素-儿茶素-儿茶素、没食子儿茶素、没食子酸儿茶素没食子酸酯、表没食子儿茶素没食子酸酯*等 17 种原花青素类化合物均呈显著下调。在未来研究中，可以考虑设计靶向释放载体对原花青素类物质进行包埋，以提高其生物利用率。

参考文献

[1] 高海生, 常学东, 蔡金星, 等. 我国板栗加工产业的现状与发展趋势[J]. 中国食品学报, 2006(1): 429−436. [GAO Haisheng, CHANG Xuedong, CAI Jinxing, et al. Current situation and development trend of chestnut processing industry in China[J]. Chinese Journal of Food, 2006(1): 429−436.]

[2] 郭玉曦, 陈雪峰, 龚频. 板栗褐变控制方法研究现状 [J/OL]. 食品与发酵工业, 2020, 46(18): 1−9. [GUO Yuxi, CHEN Xuefeng, GONG Pin. Research status of chestnut browning control methods [J/OL]. Food and Fermentation Industry, 2020, 46 (18): 1−9.]

[3] 刘桂娟. 朝药板栗叶提取物及其有效成分的抗菌活性研究 [D]. 吉林: 延边大学, 2018. [LIU Guijuan. Study on antibacterial activity of Korean medicine chestnut leaf extract and its active components [D]. Jilin: Yanbian University, 2018.]

[4] CARVALHO, ROSA, AIRES, et al. Valorization of solid wastes from chestnut industry processing: Extraction and optimization of polyphenols, tannins and ellagitannins and its potential for adhesives, cosmetic and pharmaceutical industry[J]. Waste Management, 2016, 48: 457−464.

[5] 宋磊肖, 范得跃, 李晓菁, 等. 板栗壳的化学成分、生理活性及其应用 [J]. 河北科技师范学院学报, 2017, 31(3): 30−33. [SONG Leixiao, FAN Deyue, LI Xiaojing, et al. Chemical composition, physiological activity and application of chestnut shell[J]. Journal of Hebei Normal University of Science and Technology, 2017, 31(3): 30−33.]

[6] 李汀, 邹波, 吴继军, 等. 蜜柚果肉膳食多酚的结构鉴定及抗氧化机理 [J/OL]. 食品科学: 1−14[2021-08-04]. [LI Ting, ZOU Bo, WU Jijun, et al. Structure identification and antioxidant mechanism of dietary polyphenols in pomelo pulp [J/OL]. Food Science: 1−14 [2021-08-04].]

[7] OLADOSU O P, ISU N R, ABOH I M, et al. Antibacterial activity of bioflavonoid from fruit pulps of *Acacia nilotica* Willd[J]. Microbiology Research Journal International, 2019: 1−12.

[8] 高子飞. 樱桃中几种多酚类物质清除自由基机理研究 [D]. 烟台: 烟台大学, 2019. [GAO Zifei. Study on free radical scavenging mechanism of several polyphenols in cherry [D]. Yantai: Yantai University, 2019.]

[9] G. Vázquez, FONTENLA E, SANTOS J, et al. Antioxidant activity and phenolic content of chestnut (*Castanea sativa*) shell and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark extracts[J]. Industrial Crops & Products, 2008, 28(3): 279−285.

[10] 王菲儿, 杨跃军, 徐剑等. 板栗壳棕色素的抗氧化活性及其活性成分的分离、鉴定 [J]. 食品工业科技, 2018, 39(24): 86−91,96. [WANG Feier, YANG Yuejun, XU Jian, et al. Antioxidant activity of chestnut shell brown pigment and isolation and identification of its active components[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(24): 86−91,96.]

[11] CACCIOLA N A, SQUILLACI G, D'APOLITO M, et al. *Castanea sativa* Mill. shells aqueous extract exhibits anticancer properties inducing cytotoxic and pro-apoptotic effects[J]. Molecules, 2019, 24(18): 3401.

[12] BARREIRA J C M, FERREIRA I C F R, OLIVEIRA M B P P, et al. Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit[J]. Food Chemistry, 2008, 107: 1106−1113.

[13] XU Z, WEI L H, GE Z Z, et al. Comparison of the degradation kinetics of A-type and B-type proanthocyanidins dimers as a function of pH and temperature[J]. European Food Research and Technology, 2015, 240(4): 707−717.

[14] 陈梦雨, 黄小丹, 王钊等. 植物原花青素的研究进展及其应用现状 [J]. 中国食物与营养, 2018, 24(3): 54−58. [CHEN Mengyu, HUANG Xiaodan, WANG Zhao, et al. Research progress and application status of plant proanthocyanidins[J]. China Food and Nutrition, 2018, 24(3): 54−58.]

[15] 苏云霞, 张丛兰, 邬学勤, 等. 板栗壳原花青素提取工艺优化及结构鉴定 [J]. 食品科技, 2017, 42(12): 196−203. [SU Yunxia, ZHANG conglan, WU Xueqin, et al. Optimization of extraction process and structural identification of procyanidins from chestnut shell[J]. Food Science and Technology, 2017, 42(12): 196−203.]

[16] WEI, QUAN, XUE jiao, et al. Effect of milk addition and processing on the antioxidant capacity and phenolic bioaccessibility of coffee by using an *in vitro* gastrointestinal digestion model[J]. Food Chemistry, 308(C): 125598-125598.

[17] 姜丰, 刘静波, 马思彤, 等. 卵白蛋白体外模拟胃肠道消化产物的抗氧化活性及其结构表征 [J]. 中国食品学报, 2021, 21(9):10-18. [JIANG Feng, LIU Jingbo, MA Sitong, et al. Antioxidant activity and structural characterization of ovalbumin simulated gastrointestinal digestive products *in vitro* [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(9):10-18.]

[18] 陈金泉. 纺织品中四溴双酚 A 的液相色谱三重串联四级杆质谱法研究 [Z]. 福州: 福建省纤维检验所, 2012-12-18. [CHEN Jinquan. Study on liquid chromatography triple tandem quadrupole mass spectrometry of tetrabromobisphenol A in textiles[Z]. Fuzhou: Fujian Fiber Inspection Institute, 2012-12-18.]

[19] ZHU Z J, SCHULTZ A W, WANG J, et al. Liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry characterization of metabolites guided by the METLIN database[J]. Nature Pro-

tocols, 2013, 8(3).
［20］ RODRÍGUEZ-ROQUE M J, ROJAS-GRAÜ M A, ELEZ-MARTÍNEZ P , et al. Erratum: Changes in vitamin C, phenolic, and carotenoid profiles throughout *in vitro* gastrointestinal digestion of a blended fruit juice[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61: 1859−1867.
［21］ 覃国新, 李慧玲, 何洁, 等. 固相萃取净化 HPLC 法同时测定荔枝皮中儿茶素、表儿茶素、没食子酸、原花青素 B2、原花青素 B4、原花青素 A2 的含量 [J/OL]. 现代食品科技: 1−6[2021-09-10].［QIN Guoxin, LI Huiling, HE Jie, et al. Simultaneous determination of catechin, epicatechin, gallic acid and proanthocyanidin B in Litchi peel by solid phase extraction purification HPLC B2. Procyanidin B4, procyanidin A2 content [J/OL]. Modern Food Science and Technology: 1−6 [2021-09-10].］
［22］ GIAN C T, PIETRO C, DANIELA G, et al. Simulated gastrointestinal digestion, intestinal permeation and plasma protein interaction of white, green, and black tea polyphenols[J]. Food Chemistry, 2015: 169.
［23］ TU Fen, XIE Chenyang, LI Haonan, et al. Effect of *in vitro* digestion on chestnut outer-skin and inner-skin bioaccessibility: The relationship between biotransformation and antioxidant activity of polyphenols by metabolomics[J]. Food Chemistry, 2021: 363.
［24］ 雷嗣超, 张家音, 赵泓涛, 等. 基于广泛靶向代谢组学研究板栗皮儿茶素类物质消化前后的组成变化[J]. 中国果菜, 2021, 41(6): 105−111.［LEI Sichao, ZHANG Jiayin, ZHAO Hongtao, et al. Study on the composition changes of catechins in chestnut peel before and after digestion based on extensive targeted metabonomics[J]. Chinese Fruit and Vegetable, 2021, 41(6): 105−111.］
［25］ FILOMENA M V, LUIGI M, ROBERTO C, et al. Valorization of the agro-forestry wastes from Italian chestnut cultivars for the recovery of bioactive compounds[J]. European Food Research and Technology, 2019, 245(12).
［26］ JUNG B S, LEE N, NA Da Som, et al. Comparative analysis of the antioxidant and anticancer activities of chestnut inner shell extracts prepared with various solvents[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2016, 96(6): 2097−2102.
［27］ BYLESJÖ M, RANTALAINEN M, CLOAREC O, et al. OPLS discriminant analysis: Combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification[J]. Journal of Chemometrics: A Journal of the Chemometrics Society, 2006, 20(8/9/10): 341−351.
［28］ ANA F T S, MAFALDA C S, PAULO R R, et al. Statistical process control of cocrystallization processes: A comparison between OPLS and PLS[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2017, 520(1−2).
［29］ THÉVENOT E A, ROUX A, XU Y, et al. Analysis of the human adult urinary metabolome variations with age, body mass index, and gender by implementing a comprehensive workflow for univariate and OPLS statistical analyses[J]. Journal of Proteome Research, 2015, 14(8): 3322−3335.
［30］ KANEHISA, M and S. Goto, KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(1): 27−30.
［31］ ZHOU Binxing, MA Bingsong, MA Cunqiang, et al. Classification of Pu-erh ripened teas and their differences in chemical constituents and antioxidant capacity[J]. Food Science and Technology, 2022: 153.
［32］ MONIKA P, B V B, K N C M. Biological functions of epicatechin: Plant cell to human cell health[J]. Journal of Functional Foods, 2019, 52: 14−24.

苗钧魁, 张雅婷, 金永霈, 等. 近红外技术在南极磷虾油关键品质指标快速检测中的应用研究 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 10−17. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021120098
MIAO Junkui, ZHANG Yating, JIN Yongpei, et al. Application Research of NIR Technology on the Fast Quantification of the Key Quality Indicators of Antarctic Krill Oil[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 10−17. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021120098

· 未来食品 ·

近红外技术在南极磷虾油关键品质指标快速检测中的应用研究

苗钧魁[1], 张雅婷[1], 金永霈[1], 刘小芳[1], 于　源[1], 冷凯良[1,2,*], 杨增光[3], 蒋永毅[3]
（1.中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室, 青岛市极地渔业资源开发工程研究中心, 山东青岛 266071;
2.青岛海洋科学与技术试点国家实验室, 山东青岛 266200;
3.青岛菲优特检测有限公司, 山东青岛 266111）

摘　要: 采用偏最小二乘法（Partial least squares，PLS）作为建模方法，对磷虾油近红外光谱的一阶微分（First-order difference，FD）、FD+SG（Savitzky-Golay，SG）滤波、FD+N（Norris，N）滤波、二阶微分（Second-order difference，SD）、SD+SG 和 SD+N 等 6 种单一或复合方法进行处理，通过对不同方式处理后预测模型的交互验证均方根误差（Root mean square error of cross validation，RMSECV）、外部验证残差均方根（Root mean square error of external prediction，RMSEP）和外部验证用样品真实值的标准差（SD）与 RMSEP 的比值（The ratio of the RMSEP to standard deviation of reference data in the prediction，RPDEV）、建模相关系数（Correlation coefficient in calibration，RC）、交互验证相关系数（Correlation coefficient in cross validation，RCV）和外部验证相关系数（Correlation coefficient in external validation，REV）等参数比较，确定了磷虾油磷脂、EPA 和 DHA 的近红外预测模型最佳处理方式为 FD、FD 和 SD+N，酸价指标模型不需处理。在最优条件下，四种成分近红外预测模型的 RC、REV 和 RCV，除了酸价的 RCV 略小（0.917）其余均达到 0.95 以上，同时，四种成分的 RPDEV 和 RPDCV 值，除酸价的 RPDCV 为 2.365，略小于 2.5，其余均符合大于 2.5 的要求，说明磷虾油磷脂、EPA 和 DHA 的近红外预测模型预测准确度良好；RMSEC 和 RMSECV 相差不大，说明模型稳定性较好。由于含量低、组成复杂等原因，磷虾油虾青素近红外检测模型的 RC、RCV 和 REV 均在 0.60 以下，说明近红外检测不适用于磷虾油中虾青素成分的快速检测。本文证实了近红外光谱技术可作为磷虾油中磷脂、EPA、DHA 和酸价等主要指标的快速检测方法，是传统化学检测方法的有效替代和补充。

关键词: 南极磷虾油, 磷脂, EPA, DHA, 虾青素, 酸价, 近红外光谱技术, 快速检测
中图分类号: Q956　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0010−08
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021120098
本文网刊:

Application Research of NIR Technology on the Fast Quantification of the Key Quality Indicators of Antarctic Krill Oil

MIAO Junkui[1], ZHANG Yating[1], JIN Yongpei[1], LIU Xiaofang[1], YU Yuan[1], LENG Kailiang[1,2,*], YANG Zengguang[3], JIANG Yongyi[3]
（1.Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Sustainable Development of Polar Fishery, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao Engineering Research Center for Polar Fishery Resources Development, Qingdao 266071, China;
2.Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266200, China;
3.Qingdao Future Testing Technology Co., Ltd., Qingdao 266111, China）

收稿日期: 2021−12−09
基金项目: 国家重点研发计划课题（2018YFC1406804）; 山东省支持青岛海洋科学与技术试点国家实验室重大科技专项（2018SDKJ0304-4）。
作者简介: 苗钧魁（1983−）, 男, 博士, 助理研究员, 研究方向: 水产品加工与综合利用, E-mail: miaojk@ysfri.ac.cn。
*** 通信作者:** 冷凯良（1966−）, 男, 本科, 研究员, 研究方向: 水产品加工与质量安全, E-mail: lengkl@ysfri.ac.cn。

Abstract: In this paper, near-infrared spectroscopy technology was used to establish a rapid determination of the content of phospholipids, eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA), astaxanthin and acid value in Antarctic krill oil. Partial least squares (PLS) was used as modeling method. The NIR spectra of krill oil were treated by first-order difference (FD), FD+Savitzky-Golay (SG), FD+Norris (N), second-order difference (SD), SD+SG and SD+N. And root mean square error of cross validation (RMSECV), root mean square error of external prediction (RMSEP), the ratio of the RMSEP to standard deviation of reference data in the prediction (RPDEV), correlation coefficient in calibration (RC), correlation coefficient in cross validation (RCV) and correlation coefficient in external validation (REV) of the prediction models were compared. It was determined that the best treatment methods for phospholipid, EPA and DHA in krill oil were FD, FD and SD+N, and the acid value model did not need to be treated. Under the optimal conditions, RC, RCV and REV of the four components in the NIR prediction model were all above 0.95, except that RCV of acid value was slightly lower (0.917). Meanwhile, the RPDCV and RPDEV of the four components, except for the acid value, which was 2.365, slightly less than 2.5, the rest meet the requirements of greater than 2.5. It showed that prediction model of phospholipid, EPA and DHA of krill oil using near infrared spectroscopy had a good prediction accuracy. The difference between RMSEC and RMSECV was not significant, indicating that the model had good stability. Due to the low content and complex composition of astaxanthin in krill oil, the RC, RCV and REV of the NIR quantification model were all under 0.60, near infrared spectroscopy (NIR) was not suitable for the rapid quantification of astaxanthin in krill oil. In this study, it was confirmed that NIR could be used for the rapid quantification of phospholipids, EPA, DHA and acid value in krill oil and was able to be used as an effective substitute and supplement for traditional chemical detection methods.

Key words: Antarctic krill oil; phospholipid; EPA; DHA; astaxanthin; acid value; near infrared spectroscopy (NIR); fast quantification

随着全球渔业资源的衰退，南极磷虾资源作为可持续的渔业替代资源，受到越来越多的关注[1]。南极磷虾生物量可达 6.5~10 亿吨[2]，南极海洋生物资源养护委员会（CCAMLR）制定的谨慎性捕捞限额为 561 万吨，而目前实际捕捞量约为 20~30 万吨，因此，南极磷虾资源具有巨大的开发潜力[3]。南极磷虾富含优质的蛋白、脂肪、虾青素、矿物质等成分，是优质的食品和保健品原料。以南极磷虾为原料开发的磷虾油产品，因其具有良好的营养功效而备受关注[4−5]。

南极磷虾油富含磷脂、EPA、DHA 等多 ω-3 多不饱和脂肪酸、虾青素等多种功效成分[6]，相较于鱼油，其中 ω-3 多不饱和脂肪酸与磷脂形成的磷脂复合物具有更好的生物利用度和生物活性[7]，并且可以更好的促进虾青素等脂溶性活性物质的吸收[8]。在营养健康方面，南极磷虾油具有心血管预防[9−10]、抗炎[11−12]、调节脂质/糖代谢[13−14]、保护神经功能[15−16]等多种功效。2008 年磷虾油获得美国食品和药物管理局（Food and Drug Administration, FDA）公认安全（Generally Recognized as Safe, GRAS）认证，2009 年欧盟也批准其作为新资源食品[6]，2013 年被中国卫计委（现为国家卫生健康委员会）批准为新食品原料，2019 年 4 种磷虾油产品已获得保健食品批号。磷虾油未来极有可能获得与鱼油同等的认可程度，具有广阔的市场前景[17]。

随着市场热度的不断提升，各类磷虾油产品层出不穷，品质差异很大，对于磷虾油产品品质指标的检测需求也相应提升。行业标准 SC/T 3506-2020《磷虾油》中对于虾油产品品质鉴定的主要指标包括：EPA、DHA、磷脂、虾青素、酸价等，以上检测方法均需要专业检测人员和设备投入，检测周期长，检测成本高，极大的增加了生产企业的成本，因此亟需一种低成本的快速检测方法实现南极磷虾油多指标检测，以满足产业快速发展的需求。

近红外光谱检测方法通过化学计量学建立近红外吸收光谱与待测成分含量间的关系模型，能够实现对于目标成分的快速准确测定[18]，现已发展成为多指标快速检测的主要方法，在食品[19]、医药[20]、农业[21]等众多行业中得到广泛应用。在油脂产品定性和定量检测方面，近红外检测方法也具有很好的应用前景[22]。张瑜等[23] 利用可见-近红外检测方法对鱼油掺假进行定量分析，通过建立偏最小二乘回归（Partial least squares regression, PLSR）模型实现对对鱼油掺假物含量的检测；王楠等[24] 建立了鱼油中 EPA 和 DHA 含量的近红外快速检测方法，其中两种成分的预测模型 R_C 均达到 0.94 以上。但近红外检测技术在磷虾油检测方面的应用研究尚未见报道。本文收集了 10 种不同规格的南极磷虾油样品，依据 SC/T 3506-2020《磷虾油》测定鱼油中磷脂、EPA、DHA、虾青素的含量及酸价，采用偏最小二乘法（Partial least squares, PLS）建立近红外检测模型，通过多种处理方法的比较，择优确定最优模型条件，从而实现对南极磷虾油样品中磷脂、EPA、DHA、虾青素含量和酸价等多指标的快速准确测定。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

南极磷虾油　青岛南极维康生物科技有限公司提供，采样于 2018 年 10 月~2019 年 11 月，分别为：脱磷脂虾油样品 1 份，标为 1 号。未经精制处理的毛油样品 2 份，标为 2、3 号。搜集到的代表性南极

磷虾油成品样品 7 份，分别标为 4~10 号。

Antaris Ⅱ傅里叶变换近红外光谱仪，配备液体透射检测模块、RESULT M 样品光谱采集的集成软件以及 TQ analyst 数据处理软件　美国赛默飞世尔科技公司。

1.2　实验方法

1.2.1　样品前处理　为提升近红外检测方法的准确度，需扩大待测样品的数量。不同南极磷虾油样品经充分混合后可形成相同均一性的新样品，因此将原始样品按照等比例两两混匀，得到总计 50 个磷虾油样品，使各指标含量梯度分布更加均匀。混合后样品于−20 ℃ 冰箱中密封储存以待后续实验使用。

将于−20 ℃ 中取出的凝固态南极磷虾油样品置于 40 ℃ 水浴中加热至其成为可流动的液体，将融化后样品分为两部分，分别进行 NIR 光谱采集和 5 种成分含量的化学值测定。

1.2.2　近红外光谱采集　液体样品采用专用的液体透射检测模块采集光谱图像。参照王楠等利用近红外光谱技术快速测定鱼油中 EPA 和 DHA 含量的方法对南极磷虾油进行检测[24]。研究仪器开始扫描工作前，开机预热 30 min。随后将南极磷虾油样品倒入比色皿中，高度约为比色皿高度的四分之三，要求样品均匀，且无明显气泡存在干扰实验结果，比色皿用擦镜纸擦拭干净确保无样品残留干扰。光谱扫描波数为 10000~4000 cm^{-1}，样品扫描次数为 4 次得平均光谱。共 50 个样品，扫描完成后得到的各样品平均光谱数据 50 个，用于近红外检测模型的建立及验证。

1.2.3　化学真实值测定　样品光谱采集完成后，依据水产行业标准 SC/T 3506-2020《磷虾油》对 10 个初始南极磷虾油样品的磷脂、DHA、EPA、虾青素和酸价进行测定，其中磷脂采用 GB/T 5537-2008 第一法钼蓝比色法测定；EPA 和 DHA 采用 GB 5009.168-2016 第二法中水解-提取法测定；虾青素采用 SC/T 3053-2019 高效液相色谱法测定；酸价采用 GB 5009.229-2016 第二法测定。每个样品平行测试 3 次，测量结果取算数平均值。

1.2.4　模型建立和验证　建模前，先借助软件 TQ Analyst，完成所有样品的原始 NIR 图谱数据处理工作。采用 PLS 作为建模的化学计量法，分别借助导数与平滑结合的 6 种光谱处理技术处理所采集的光谱，确定出最佳处理手段，其中最佳光谱范围由软件 TQ analyst 自动推荐。

检验模型的评价参数包括建模相关系数（Correlation coefficient in calibration, RC）、校正残差均方根（Root mean square error of calibration, RMSEC）、误差交互验证相关系数（Correlation coefficient in cross validation, RCV）、交互验证残差均方根（Root mean square error of cross validation, RMSECV）、交叉验证用样品真实值标准差（SD）与 RMSECV 的比值（The ratio of the RMSECV to standard deviation of reference data in the validation, RPDCV）、外部验证相关系数（Correlation coefficient in external validation, REV）、外部验证残差均方根（Root mean square error of external prediction, RMSEP）以及外部验证用样品真实值的标准差（SD）与 RMSEP 的比值（The ratio of the RMSEP to standard deviation of reference data in the prediction, RPDEV）[25]。

内部验证采取交叉验证模型来进行，校正样品中的每个样品依次作为临时验证样品，除被选中的临时验证样品外的其余样品作为建模样品，构成模型来对临时验证样品进行预测，依次循环完所有样品以得到交叉预测值。在 50 个样品中随机抽取 10 个样品作为建模的外部验证集，40 个样品作为建模集，并建模过程中会对造成预测模型明显偏差的点位进行剔除。本实验中 50 个样品的建模集合验证集的样本数见表 1。

2　结果与分析

2.1　南极磷虾油 5 种成分含量指标描述性统计

表 1 为 5 种不同成分建模集和验证集的样本数、平均值与标准偏差以及范围。表中数据显示各种成分含量差值较大，建模集中磷脂、EPA、DHA、酸价和虾青素的最大值与最小值的比值分别为 3.70、2.77、3.00、20.30 和 8.80，验证集中磷脂、EPA、DHA、酸价和虾青素的最大值与最小值的比值分别为 3.37、1.64、2.42、4.95 和 3.61，符合近红外光谱建模条件中样品含量分布范围广的要求。

2.2　光谱数据

南极磷虾油样品的 NIR 原始光谱如图 1 所示。

表 1　磷虾油样品建模集和验证集样品成分含量

Table 1　Component content of krill oil samples in calibration set and validation set

成分	建模集			验证集		
	样品数	Mean±SDc	范围	样品数	Mean±SDv	范围
磷脂(%)	36	40.41±10.56	16.00~59.15	10	41.6±11.48	16.20~54.65
EPA(%)	40	19.88±4.45	9.82~27.20	10	20.33±6.92	15.90~26.10
DHA(%)	40	10.01±2.47	4.64~13.90	10	10.32±3.93	5.43~13.10
酸价(mg(KOH)/g)	40	12.31±4.92	1.30~26.40	9	11.36±7.11	4.45~22.05
虾青素(mg/kg)	37	117.75±63.73	27.00~237.5	6	101.18±52.17	54.00~195.00

注：N为样品的数量；SDc为建模集的标准偏差；SDv为验证集的标准偏差。

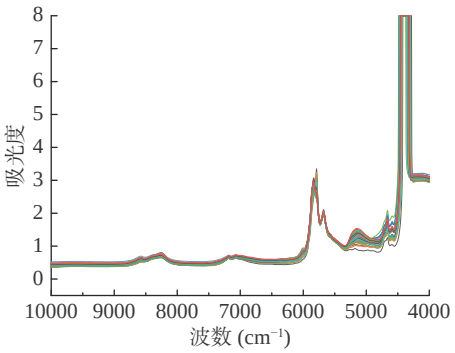


图 1　南极磷虾油样品近红外全光谱

Fig.1　NIR spectrum of Antarctic krill oil samples

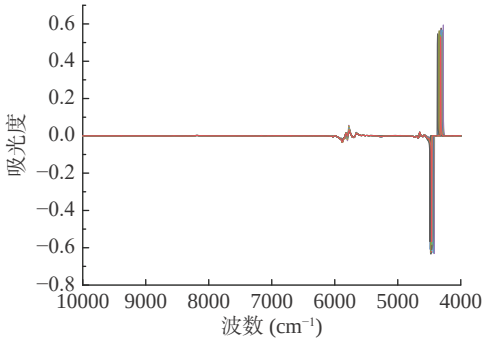


图 2　南极磷虾油样品一阶导数处理近红外光谱

Fig.2　FD processing NIR of Antarctic krill oil sample

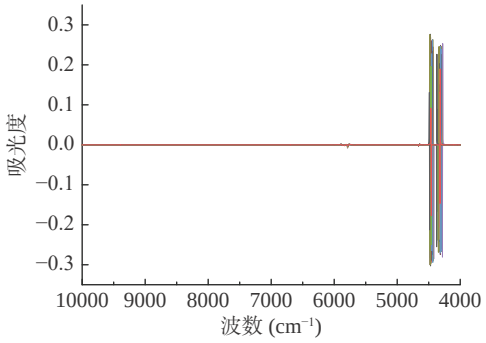


图 3　南极磷虾油二阶导数处理近红外光谱

Fig.3　SD processing NIR of Antarctic krill oil sample

图谱显示了 10000~4000 cm^{-1} 范围内所有样品的扫描全光谱。如图所示，所有样品的光谱具有基本相同的特征，表明磷虾油近红外吸收特性在扫描的光谱范围内基本相同。

南极磷虾油作为脂肪类物质在 8621 cm^{-1} 脂肪烃羰基 C-O 伸缩振动的四级倍频、8258 cm^{-1} 脂肪烃亚甲基的 C-H 伸缩振动的二级倍频、5735 cm^{-1} 甲基的 C-H 的伸缩振动和 5853cm^{-1} 脂肪烃端甲基的 C-H 振动处具有显著吸收峰；4500 cm^{-1} 为 O-H 的伸缩振动，体现为水的特征峰。

2.3　模型的建立与优化

近红外光谱测量过程中，经常出现光谱偏移或飘移，导数处理可有效地消除基线和其他背景的干扰，分辨重叠峰，提高分辨率和灵敏度，常用的处理方式有光谱的一阶导数处理（first derivation，FD）和二阶导数处理（second derivation，SD）。经一阶导数、二阶导数处理后的近红外光谱见图 2 和图 3。磷虾油的近红外光谱经导数处理后 8000 cm^{-1} 范围内的特征吸收峰被消除，特征吸收峰集中在 4000~7000 cm^{-1} 范围内，缩小了有效光谱范围，提高了模型的计算速度和准确性。

平滑是最常用的降噪方法，其实质是一种加权平均法，强调中心点的中心作用。通常的平滑方式为两种，Savitzky-Golay 卷积平滑（SG）和 Norris 平滑（N）。Savitzky-Golay 卷积平滑可以降低谱图的数据分辨率，并平滑掉小的谱峰。Norris 平滑常用于增加被宽谱带覆盖的尖峰。

对南极磷虾油的磷脂、EPA、DHA、虾青素和酸价 5 种指标分别进行 FD、FD+SG、FD+N、SD、SD+SG 和 SD+N 等 6 种单一或复合方式处理，结果如表 2~表 6 所示。

近红外建模相关系数（RC）、交互验证相关系数（RCV）和外部验证相关系数（REV）值与 1 越相近证明模型的精准度越高；定标标准分析误差（RMSECV）、验证标准分析误差（RMSEP）越小，证明模型的拟合度越高，RMSECV 和 RMSEP 越接近，证明模型的稳定性越高。

磷虾油中磷脂、EPA、DHA 和酸价四个指标的原始光谱近红外预测模型图见图 4，其主要参数 RC、REV 和 RCV 均大于 0.92，其中 EPA 和 DHA 更达到 0.97 以上，经处理后四个指标的的模型三类相关系数得到提升，都达到 0.95 以上，说明近红外检测方法适用于这四个指标的快速检测，可以得到较好的预测结果。在不同的处理条件下，RMSECV 和 RMSEP 也较为接近，说明近红外预测模型预测稳定性较好。

虾青素的各种处理方式得到的模型预测结果均

表 2　南极磷虾油磷脂近红外光谱不同方式处理预测模型效果比较

Table 2　Comparison of the effects of different optimized NIR prediction models for phospholipid in Antarctic krill oil

数据处理	主成分因子	RMSEC	RC	RMSEP	REV	RESECV	RCV
Origin	1	4.05	0.9214	4.77	0.9190	4.31	0.9101
FD	4	2.27	0.9760	3.88	0.9510	2.72	0.9655
FD+SG	4	2.43	0.9723	3.87	0.9494	2.71	0.9656
FD+N	3	2.49	0.9709	3.84	0.9486	2.77	0.9640
SD	5	2.09	0.9796	4.64	0.9162	3.19	0.9525
SD+SG	5	2.34	0.9743	3.75	0.9602	2.99	0.9581
SD+N	1	4.04	0.9217	5.04	0.9305	4.33	0.9094

表 3 南极磷虾油 EPA 近红外光谱不同方式处理预测模型效果比较

Table 3 Comparison of the effects of different optimized NIR prediction models for EPA in Antarctic krill oil

数据处理	主成分因子	RMSEC	RC	RMSEP	REV	RESECV	RCV
Origin	5	0.954	0.9762	0.937	0.9945	1.14	0.9660
FD	4	0.921	0.9778	0.665	0.9966	1.10	0.9685
FD+SG	4	0.905	0.9786	0.729	0.9958	1.08	0.9694
FD+N	4	0.920	0.9779	1.56	0.9947	1.07	0.9700
SD	2	1.12	0.9669	1.88	0.9941	1.32	0.9540
SD+SG	3	0.961	0.9758	0.639	0.9968	1.06	0.9708
SD+N	3	0.980	0.9749	1.72	0.9917	1.22	0.9608

表 4 南极磷虾油 DHA 近红外光谱不同方式处理预测模型效果比较

Table 4 Comparison of the effects of different optimized NIR prediction models for DHA in Antarctic krill oil

数据处理	主成分因子	RMSEC	RC	RMSEP	REV	RESECV	RCV
Origin	6	0.568	0.9725	0.940	0.9923	0.715	0.9563
FD	3	0.653	0.9634	1.27	0.9786	0.760	0.9502
FD+SG	3	0.669	0.9616	1.26	0.9797	0.765	0.9496
FD+N	1	0.757	0.9505	1.01	0.9704	0.748	0.9518
SD	1	0.723	0.9550	1.00	0.9711	0.763	0.9497
SD+SG	4	0.622	0.9668	0.667	0.9868	0.741	0.9527
SD+N	5	0.584	0.9709	0.416	0.9947	0.722	0.9553

表 5 南极磷虾油酸价近红外光谱不同方式处理预测模型效果比较

Table 5 Comparison of the effects of different optimized NIR prediction models for acid value in Antarctic krill oil

数据处理	主成分因子	RMSEC	RC	RMSEP	REV	RESECV	RCV
Origin	8	1.60	0.9508	2.14	0.9722	2.08	0.9168
FD	10	1.60	0.9508	3.20	0.9503	2.83	0.8483
FD+SG	8	1.84	0.9349	2.71	0.9570	2.62	0.8685
FD+N	3	2.49	0.9709	3.84	0.9486	2.77	0.9640
SD	9	1.62	0.9496	6.93	0.5125	3.08	0.8244
SD+SG	5	2.55	0.8704	4.59	0.8283	3.16	0.7953
SD+N	4	2.61	0.8637	3.28	0.8800	3.01	0.8140

表 6 南极磷虾油虾青素近红外光谱不同处理方式模型结果比较

Table 6 Comparison of the effects of different optimized NIR prediction models for astaxanthin in Antarctic krill oil

数据处理	主成分因子	RMSEC	RC	RMSEP	REV	RESECV	RCV
Origin	8	50.2	0.6645	45.6	0.5765	52.0	0.6344
FD	10	56.8	0.7261	54.8	0.7614	58.0	0.6686
FD+SG	8	56.7	0.7261	54.8	0.7613	58.0	0.6687
FD+N	3	56.0	0.7366	54.9	0.7199	57.2	0.6829
SD	9	52.9	0.7009	50.3	0.7270	54.2	0.6604
SD+SG	5	53.6	0.7101	51.5	0.7280	54.9	0.6660
SD+N	4	53.9	0.7188	52.8	0.6806	55.2	0.6733

不理想, 可能的主要原因, 一是南极磷虾油产品中虾青素含量较低, 普遍低于 250 mg/kg, 不适合采用近红外检测方法进行定量; 二是虾青素在磷虾油中并非单一组分, 其主要以虾青素酯形式存在, 各类虾青素酯之间存在差异, 且含量较低[26−27], 在近红外检测条件下无法进行统一定量。

经综合比较, 磷脂、EPA、DHA 和酸价的最优预测模型的最佳处理方式、主成分因子数及光谱范围如表 7 所示。

磷脂、DHA 和 EPA 酸价最佳处理方式略有不同, 分别为: FD、FD、SD+N; 酸价经处理后, RCV 虽得到改善, 但 RMSECV 和 RMSEP 显著增加, 故采用不经处理的模型参数。由于虾青素近红外预测模型效果不好, 因此未列在表中。

2.4 最优近红外预测模型指标评价

本文采用偏最小二乘法建立并处理了南极磷虾油中磷脂、EPA、DHA 和酸价的近红外光谱预测模型, 确定了最优的模型参数, 通过交互验证和外部验证, 四种组分的 RC、REV 和 RCV 三类相关系数, 除酸价的 RCV 略低为 0.917 外, 其余均在 0.95 以上, 并且 RMSECV 和 RMSEP 值也均较小, 并且较为接近, 均证明预测模型的准确度和稳定性较好。

除上述指标外, 另一个衡量预测模型准确度的重要指标是 RPD, 当其大于 2.5 时, 方可表明模型具有较好的预测准确度。如表 8 中所示, 磷脂、EPA、DHA 和酸价四种指标的 RPDEV 和 RPDCV 基本满

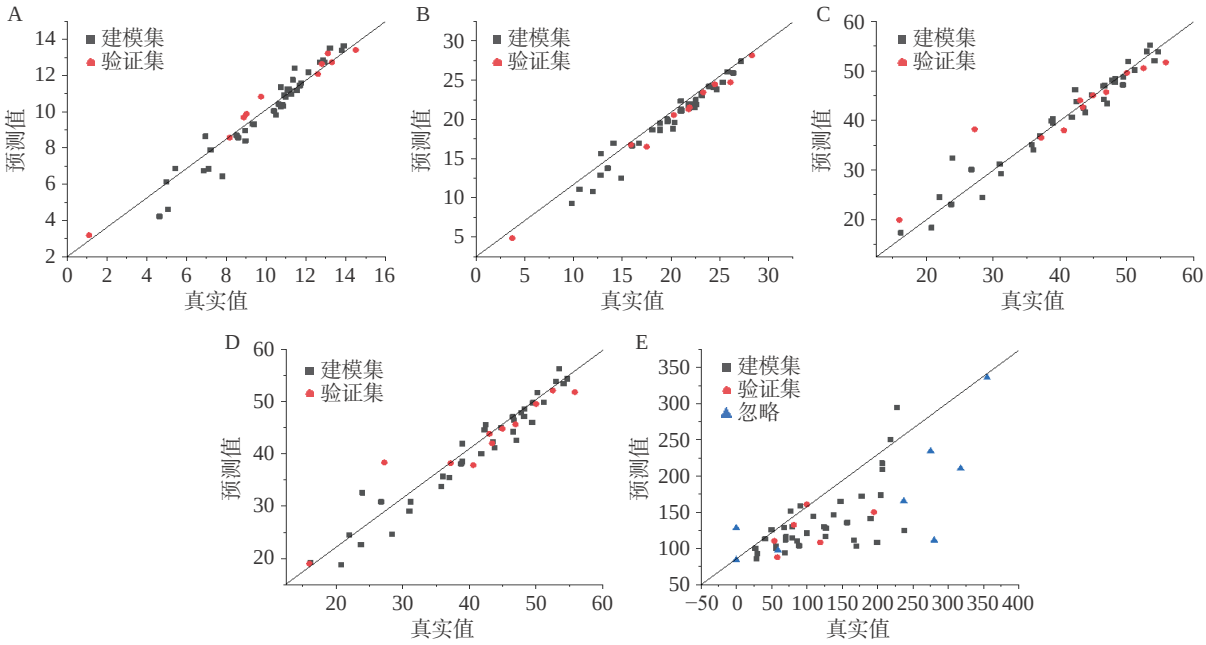


图 4　南极磷虾油样品磷脂建模集以及外部验证

Fig.4　Antarctic krill oil sample phospholipid modeling set and external verification

表 7　南极磷虾油磷脂、EPA、DHA 和酸价指标最优近红外预测模型参数

Table 7　Parameters of optimal NIR prediction model for phospholipid, EPA, DHA and acid value in Antarctic krill oil

成分	最佳处理方式	主成分因子	光谱范围(cm^{-1})
磷脂	FD	4	4636.03~4531.90, 5600.27~5341.85, 6009.10~5974.39
EPA	FD	4	6946.34~5831.68, 5418.99~4578.18
DHA	SD+N	4	7027.33~5827.83
酸价	–	3	5071.87~4578.18, 6024.53~5820.11

表 8　南极磷虾油磷脂、EPA、DHA 和酸价最优近红外预测模型指标描述

Table 8　Indicators description of optimal NIR prediction model for phospholipid, EPA, DHA and acid value in Antarctic krill oil

成分	RMSEC	RC	RMSEP	REV	RPDEV	RESECV	RCV	RPDCV
磷脂	2.270	0.976	3.880	0.951	2.959	2.720	0.966	3.882
EPA	0.921	0.978	0.665	0.997	10.406	1.100	0.969	4.045
DHA	0.584	0.971	0.416	0.995	9.447	0.722	0.955	3.421
酸价	1.600	0.951	2.140	0.972	3.322	2.080	0.917	2.365

足这一指标要求，仅有酸价的 RPDCV 为 2.365，略小于 2.5，这可能是由于建模样品数量仍然偏少，RESECV 偏大导致，可通过后续的样品量增加来进行改善。

3　结论

本研究为南极磷虾油品质关键指标磷脂、DHA、EPA、酸价的含量近红外模型的构建以及快速检测提供了理论上的依据和数据上的支持，充分验证了近红外快速检测方法在磷虾油品质指标检测中应用的可行性。为进一步提升模型的精确度，可通过扩大对主要磷虾油生产厂家的代表性样品数量与样品指标范围，构建更精准成分预测模型。此外，除本文中涉及到的 5 种指标之外，近红外检测方法可能还适用于脂肪酸组成和过氧化值等指标的检测[28−29]。

南极磷虾油产品质量检测包含 9 项以上主要指标，采用传统化学检测方法不但需要气相、液相等大型仪器设备的投入，还需要配备检测人员并且消耗大量的检测试剂。按照常规检测机构对全部指标检测的收费标准，每个样品检测至少需要收费千元以上。与传统检测方法相比，近红外快速检测方法无需配备专业的人员，不需消耗试剂，仅需通过简单处理即可完成对南极磷虾油中的主要指标的检测分析，可极大的提高检测效率，降低检测成本，随着近年来便携式近红外设备的不断发展[30]，在磷虾油产品生产与流通环节其均可作为有效的检测手段。进一步，通过对于检测方法的持续优化，有望实现磷虾油加工过程中的在线品质监控，对于提高生产效率和提升磷虾油产品品质具有积极作用。

参考文献

[1] 黄洪亮，陈雪忠. 南极磷虾资源开发利用现状及发展趋势[J]. 中国水产科学，2004，11(增刊)：114−119. [HUANG H L, CHEN X Z. Status and development trend of resource operate for

Antarctic krill (*Euphausua superba*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2004, 11(Suppl): 114−119.]
[2] 黄洪亮, 陈雪忠, 冯春雷. 南极磷虾资源开发现状分析[J]. 渔业现代化, 2007(1): 48−51. [HUANG H L, CHEN X Z, FENG C X. Analysis on the current situation of Antarctic krill resources [J]. Fishery Modernization, 2007(1): 48−51.]
[3] 贾明秀, 刘长东. 基于捕捞数据的南极半岛北部南极磷虾渔获量与驱动因子关系研究[J]. 中国渔业经济, 2020, 38(2): 102−108. [JIA M X, LIU Z D. Study on the relationships between the catches of Antarctic krill (*Euphausia superba*) and driving factors based on the commercial fishing data[J]. Chinese Fisheries Economics, 2020, 38(2): 102−108.]
[4] 贺瑞坤, 罗海吉. 南极磷虾油对人类健康的作用[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(20): 130−133. [HE R K, LUO H J. Health benefits of Antarctic krill oil[J]. Food Research and Development, 2013, 34(20): 130−133.]
[5] 冯迪娜, 袁玥, 朱晓丽. 南极磷虾油生理功能的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(7): 115−117. [FENG D N, YUAN Y, ZHU X L. Research advances of physiological function on Antartic krill oil[J]. Food Research and Development, 2015, 36(7): 115−117.]
[6] XIE D, GONG M, WEI W, et al. Antarctic krill (*Euphausia superba*) oil: A comprehensive review of chemical composition, extraction technologies, health benefits, and current applications[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2019, 18(2): 514−534.
[7] PHLEGER C F, NELSON M M, MOONEY B D, et al. Interannual and between species comparison of the lipids, fatty acids and sterols of Antarctic krill from the US Amlr Elephant Island survey area[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B:Biochemistry and Molecular Biology, 2002, 131(4): 733−747.
[8] 刘小芳, 刘建志, 唐一新, 等. 南极磷虾油改善虾青素生物利用度的研究[J]. 中国食品学报, 2021, 7(21): 141−148. [LIU X F, LIU J Z, TANG Y X, et al. Studies on the improvement of astaxanthin bioavailability by Antarctic krill oil[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 7(21): 141−148.]
[9] HALS P A, WANG X L, XIAO Y F. Effects of a purified krill oil phospholipid rich in long-chain omega-3 fatty acids on cardiovascular disease risk factors in non-human primates with naturally occurring diabetes Type-2 and dyslipidemia[J]. Lipids in Health and Disease, 2017, 16(1): 11.
[10] BERGE K, MUSA-VELOSO K, HARWOOD M, et al. Krill oil supplementation lowers serum triglycerides without increasing low-density lipoprotein cholesterol in adults with borderline high or high triglyceride levels[J]. Nutrition Research, 2014, 34(2): 126−133.
[11] BONATERRA G A, DRISCOLL D, SCHWARZBACH H, et al. Krill oil-in-water emulsion protects against lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory activation of macrophages *in vitro*[J]. Marine Drugs, 2017, 15(3): 74.
[12] COSTANZO M, CESI V, PALONE F, et al. Krill oil, vitamin D and *Lactobacillus reuteri* cooperate to reduce gut inflammation[J]. Beneficial Microbes, 2018, 9(3): 389−399.
[13] SUN D, ZHANG L, CHEN H, et al. Effects of Antarctic krill oil on lipid and glucose metabolism in C57bl/6j mice fed with high fat diet[J]. Lipids in Health and Disease, 2017, 16(1): 218.
[14] YANG G, LEE J, LEE S, et al. Krill oil supplementation improves dyslipidemia and lowers body weight in mice fed a high-fat diet through activation of amp-activated protein kinase[J]. Journal of Medicinal Food, 2016, 19(12): 1120−1129.
[15] LI Q, WU F, WEN M, et al. The protective effect of Antarctic krill oil on cognitive function by inhibiting oxidative stress in the brain of senescence-accelerated prone mouse strain 8 (Samp8) Mice[J]. Journal of Food Science, 2018, 83(2): 543−551.
[16] KONAGAI C, YANAGIMOTO K, HAYAMIZU K, et al. Effects of krill oil containing n-3 polyunsaturated fatty acids in phospholipid form on human brain function: A randomized controlled trial in healthy elderly volunteers[J]. Clinical Interventions in Aging, 2013, 8: 1247−1257.
[17] KWANTES J M, GRUNDMANN O. A brief review of krill oil history, research, and the commercial market[J]. Journal of Dietary Supplements, 2014, 12(1): 23−35.
[18] 张进, 胡芸, 周罗雄, 等. 近红外光谱分析中的化学计量学算法研究新进展[J]. 分析测试学报, 2020, 39(10): 1196−1203. [ZHANG J, HU Y, ZHOU L X, et al. Progress of chemo metric algorithms in near-infrared spectroscopic analysis[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2020, 39(10): 1196−1203.]
[19] GRASSI S, ALAMPRESE C. Advances in NIR spectroscopy applied to process analytical technology in food industries[J]. Current Opinion in Food Science, 2018, 22: 17−21.
[20] JAMROGIEWICZ M. Application of the near infrared spectroscopy in the pharmaceutical technology[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2012, 66: 1−10.
[21] 李佳楠. 近红外光谱技术在粮食检测中的应用进展[J]. 粮食科技与经济, 2018, 43(8): 77−78. [LI J N. Application progress of near infrared spectroscopy technology in food inspection [J]. Grain Science and Technology and Economy, 2018, 43(8): 77−78.]
[22] 曾子琦, 蒋立文, 刘霞, 等. 近红外光谱无损检测在食用油脂分析中的应用研究进展[J]. 中国油脂, 2018, 43(8): 137−142. [ZENG Z Q, JIANG L W, LIU X, et al. Advance in application of near infrared spectroscopy in nondestructive analysis of edible oil[J]. China Oils and Fats, 2018, 43(8): 137−142.]
[23] 张瑜, 谈黎虹, 曹芳, 等. 可见-近红外光谱分析技术对鱼油掺假定量快速无损检测方法研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2013, 33(6): 1532−1536. [ZHANG Y, TAN L H, CAO F, et al. Application of visible and near infrared spectroscopy for rapid and non-invasive quantification of adulterants in fish oil[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2013, 33(6): 1532−1536.]
[24] 王楠, 于宏威, 李军国, 等. 利用近红外光谱技术快速测定鱼油中 EPA 和 DHA 含量的方法研究[J]. 中国油脂, 2017, 42(10): 138−142. [WANG N, YU H W, LI J G, et al. Rapid determination of EPA and DHA contents in fish oil by NIR technology[J]. China Oils and Fats, 2017, 42(10): 138−142.]
[25] 王卫军, 杨建敏, 董迎辉, 等. 长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 鲜样组织八种成分含量近红外 (NIR) 模型的建立[J]. 海洋与湖沼,

2015，46(4)：845−852. ［WANG W J, YANG J M, DONG Y H, et al. Establishment of near infrared models of eight components on fresh tissue of Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. Oceanologia et Lmimnologia Sinica, 2015, 46(4): 845−852.］

［26］ 丛心缘, 孙伟红, 张辉珍, 等. 南极磷虾中不同形态虾青素的分离制备、结构鉴定及含量分析[J]. 食品与发酵工业，2019，45(2)：174−178. ［CONG X Y, SUN W H, ZHANG H Z, et al. Separation, structure identification and content analysis of different forms of astaxanthin in Antarctic krill[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(2): 174−178.］

［27］ CONG X Y, MIAO J K, ZHANG H Z, et al. Effects of drying methods on the content, structural isomers, and composition of astaxanthin in Antarctic krill[J]. Acs Omega, 2019, 4(19): 17972−17980.

［28］ CASCANT M M, BREIL C, FABIANO-TIXIER A S, et al. Determination of fatty acids and lipid classes in salmon oil by near infrared spectroscopy[J]. Food Chemistry, 2018, 239: 865−871.

［29］ 彭丹, 李林青, 刘亚丽, 等. 基于近红外光谱两种植物油过氧化值通用模型研究[J]. 光谱学与光谱分析，2020，40(6)：1828−1832. ［PENG D, LI L Q, LIU Y L, et al. A general model for the peroxidation values of two vegetable oils based on near infrared spectroscopy[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2020, 40(6): 1828−1832.］

［30］ 褚小立, 陈瀑, 李敬岩, 等. 近红外光谱分析技术的最新进展与展望[J]. 分析测试学报，2020，39(10)：1181−1188. ［CHU X L, CHEN P, LI J Y, et al. Progresses and perspectives of near infrared spectroscopy analytical technology[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2020, 39(10): 1181−1188.］

于德阳, 马俪珍. 基于鲶鱼头和鱼排制备鱼味美拉德反应物微胶囊热稳定性的研究 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 18−26. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090076

YU Deyang, MA Lizhen. Thermal Stability of Fish Flavored Maillard Reactant Microcapsules Based on Catfish Head and Fish Steak[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 18−26. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090076

· 研究与探讨 ·

基于鲶鱼头和鱼排制备鱼味美拉德反应物微胶囊热稳定性的研究

于德阳, 马俪珍*

（天津农学院食品科学与生物工程学院, 天津 300392）

摘　要: 以鲶鱼头和鱼排为基料，经过高压浸提、酶解、发酵、美拉德反应得到美拉德反应产物（Maillard Reaction products，MRPs），并采用微胶囊包埋技术制备微胶囊粉剂。为了研究 MRPs 的微胶囊粉剂热稳定性，将 MRPs（A 样品）和微胶囊粉剂（B 样品）配制成溶液，分别在 90、121、160 ℃ 下加热 20 min，各样品依次记为 A1、A2、A3 和 B1、B2、B3 样品。对各组样品进行电子鼻、固相微萃取/GC-MS 和差示扫描量热仪（DSC）分析。电子鼻 PCA 分析结果，从主成分 1 上看，MRPs 的 A 样品（未经热处理）与其经过热处理后的样品 A1、A2、A3 之间的距离较大，而 B 样品与 B1、B2、B3 之间的距离较小；GC-MS 分析，A 样品和 B 样品经不同热处理会降低 MRPs 中的挥发性风味物质种类，且受热温度越高，这种降低的趋势越明显，但经过微胶囊包埋的样品 B,其挥发性风味物质的种类和相对质量浓度均明显高于 A 样品；DSC 分析结果表明，MRPs 经过微胶囊包埋后，出现明显吸热峰时的温度比 MRPs 时的温度提高了 40 ℃，可有效地扩宽 MRPs 的释放温度。综上所述，MRPs 经微胶囊包埋技术处理后，对热的稳定性明显提高。

关键词: 微胶囊, 热稳定, 鲶鱼, 美拉德反应物, 风味物质

中图分类号: TS254.1　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0018−09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090076

本文网刊:

Thermal Stability of Fish Flavored Maillard Reactant Microcapsules Based on Catfish Head and Fish Steak

YU Deyang, MA Lizhen*

（College of Food Science and Biotechnology, Tianjin Agriculture University, Tianjin 300392, China）

Abstract: Catfish head/fish fillet was used as the base material, and Maillard reaction products (MRPs) were obtained through high-pressure extraction, enzymatic hydrolysis, fermentation, and Maillard reaction, and microcapsule embedding technology was used to prepare micro capsule powder. In order to study the thermal stability of the microcapsule powder of MRPs, MRPs (sample A) and microcapsule powder (sample B) were prepared into solutions and heated at 90, 121, and 160 °C for 20 minutes. Each sample was recorded as A1, A2, A3 and B1, B2, B3 samples. The samples of each group were analyzed by electronic nose, solid phase microextraction/GC-MS and differential scanning calorimeter (DSC). According to the PCA analysis results of the electronic nose, from the main component 1, the distance between the A sample of MRPs (not heat-treated) and the heat-treated samples A1, A2, A3 were relatively large, while the distance between sample B and B1, B2 and B3 was small. GC-MS analysis showed that the different heat treatments of A sample and B sample would reduce the types of volatile flavor substances in MRPs, and the higher the heating temperature, the more obvious this reduction trend, but after microcapsule embedding in sample B, the type and relative mass concentration of volatile flavor substances were significantly higher than that of sample A. According to DSC analysis, after MRPs was embedded in

收稿日期: 2021−09−07

基金项目: 天津市淡水养殖产业技术体系创新团队（水产品加工岗位）项目（ITTFRS2021000）。

作者简介: 于德阳（1984−）（ORCID: 0000-0001-5083-8619）, 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: 24673750@qq.com。

*** 通信作者:** 马俪珍（1963−）（ORCID: 0000-0003-2744-7171）, 女, 博士, 教授, 研究方向: 水产品加工原理与技术, E-mail: Malizhen-6329@163.com。

microcapsules, the temperature at which an obvious endothermic peak appears was 40 ℃ higher than that of MRPs, could effectively broaden the release temperature of MRPs. In summary, after MRPs was processed by microcapsule embedding technology, the thermal stability was significantly improved.

Key words: microcapsules; heat stable; catfish; Maillard reactants; flavor substances

微胶囊技术具有使食品功能成分损失少、延长食品货架期、遮盖和减少异味等优点，微胶囊技术已经在食品的多个领域广泛使用[1]。微胶囊技术主要是指利用天然或合成高分子材料对固体的、液体的或气体的芯材进行包覆形成一种具有半透性或密封囊膜的微型胶囊的技术[2]，它具有保护物质免受环境条件影响，延长挥发性物质存储时间，隔离不可混合的化合物等优点[3]。

目前，关于微胶囊技术的相关报道很多，包含油脂微胶囊化、酶和微生物的微胶囊化、防腐剂的微胶囊化、甜味剂的微胶囊化、酸味剂的微胶囊化、着色剂的微胶囊化、营养强化剂的微胶囊化、香精香料的微胶囊化等。如 Wang 等[4] 将鱼油制成粉状微胶囊，并测定其氧化稳定性，证明微胶囊化具有明显的防止鱼油氧化的作用。苏阳等[5] 研究得出利用 β-环糊精为壁材，鱼油为芯材制备鱼油微胶囊的最佳工艺条件为：芯材壁材比为 1∶7、搅拌时间 2 h、搅拌温度 45 ℃，包埋率为 90.75%，电镜观察微胶囊具有典型的柱状结构，制备微胶囊，具有吸湿性低的优点，因此可以长期保存。万义玲等[6] 采用复凝聚法制备鱼油微胶囊，壁材选用壳聚糖、海藻酸钠，结果表明：反应温度 60 ℃ 下具有最佳的效率及产率。刘伟[7] 通过对河蚌进行酶解，再进行美拉德反应，最后对美拉德反应物进行微胶囊包埋，结果显示：调味料芯材已被很好包埋，形成了基本呈球形的微胶囊。DSC 分析表明微胶囊调味料的玻璃态转变温度为 58.71 ℃，高于常温，因此微胶囊调味料在常温下性质稳定。王正云等[8] 通过复凝聚法对青鱼内脏鱼油进行微胶囊包埋，研究结果表明：结果表明制得的鱼油微胶囊产品品质较好，贮藏期可较未包埋的鱼油分别延长 6 d 以上。李颖杰等[9] 通过对鱼糜酶解蛋白亚铁螯合肽微胶囊工艺，结果表明：微胶囊能有效保护芯材不被氧化，并且由于微胶囊的缓释作用，可以有效发挥其芯材的活性物质，并延长作用时间，为小肽金属螯合物的有效利用提供了参考依据。Sarkar 等[10] 以瓜尔胶和阿拉伯胶为复合壁材制得的薄荷油微胶囊在食品中的应用效果比单独以阿拉伯胶为壁材得到的微胶囊效果好。从以上例子中可以看出，虽然对微胶囊的研究较多，但对于水产品，尤其是利用鲶鱼头和鱼排制备鱼味美拉德反应物再制备微胶囊，并对其热稳定性进行研究的报道较少，而这又是实际应用中急需解决的一个问题。

因此本试验以前期鲶鱼头和鱼排为基料经过高压浸提、酶解、发酵、美拉德反应得到 MRPs 作为芯材，添加量为 8%，再添加 0.3% 吐温-80 作为乳化剂，以 12% 麦芽糊精和 0.16% 大豆分离蛋白作为复合壁材制备出乳化液，喷雾干燥得到微胶囊粉剂。再以 MRPs 和微胶囊粉剂为研究对象，研究其经不同温度加热处理后风味物质的变化，探讨微胶囊包埋技术对稳定 MRPs 的应用效果，为其达到更好的实际应用提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

革胡子鲶鱼（*Clarias gariepinus*），体重 1000~1500 g，体长 30~35 cm　天津市德仁农业发展有限公司提供；复合蛋白酶（酶活 40 万 U/g）　南宁东恒华道生物科技有限公司；风味蛋白酶（3.6 万 U/g）　南宁东恒华道生物科技有限公司；SHI-59（木糖葡萄球菌+戊糖片球菌+植物乳杆菌）　意大利萨科公司；无水葡萄糖　秦皇岛骊骅淀粉有限公司；D-木糖、VB_1、牛磺酸、半胱氨酸、半胱氨酸盐酸盐　河北华恒化工有限公司；氢氧化钠　天津鹏坤化工有限公司；苹果酸　潍坊英轩实业有限公司；麦芽糊精　秦皇岛骊骅淀粉有限公司；大豆分离蛋白　河南万邦实业有限公司；吐温-80　广东润滑化工有限公司（以上材料均为食品级）；2-甲基-3-庚酮　分析纯，美国 Sigma 公司。

Agilent7890A/5975C 气相质谱仪　美国 Agilent 公司；HeraclesII 超快速气相电子鼻　法国 Alpha M.O.S 公司；DSC200F3 差示扫描量热分析仪　德国 NETZSCH 公司；YX-18LM 高压灭菌锅　上海三神医疗器械有限公司；WND-100 高速组织捣碎机　浙江省兰溪市伟能达电器有限公司；ATY124 精密分析天平　日本岛津公司；THZ-98AB 恒温振荡器　上海一恒科学仪器有限公司；ZWY-240 全温型多振幅轨道摇床　上海智城分析仪器制造有限公司；DW-50 调温电热器　南通利豪实验仪器有限公司；SX-GO7102 节能箱式电炉　天津市中环实验电炉有限公司；SDX-1 全自动风冷速冻箱　天津市特斯达食品机械科技有限公司；101-0A 型电热鼓风干燥箱　天津市华仪盛达实验仪器有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　酶解发酵液、美拉德反应产物、微胶囊乳化液和微胶囊粉剂的制备　根据前期试验所得酶解发酵液、美拉德反应产物、微胶囊乳化液和微胶囊粉剂的制备方法制备样品。

1.2.1.1　基于酶解液的发酵液（Fermentation broth based on enzymatic hydrolysis, FBEH）的制备　鲶鱼

头/鱼排用绞肉机绞碎得到鱼骨肉泥，在鱼骨肉泥中加入 2 倍重的蒸馏水进行高压蒸煮（120 ℃/2 h）得到高压浸提液，冷却至 55 ℃，加入 1200 U/g 的复合蛋白酶（以鱼骨肉泥的比例计算），55 ℃ 酶解 2 h 时再加入 720 U/g 的风味蛋白酶，继续酶解 1 h，灭酶（煮沸保持 10 min）后用双层纱布过滤得到分步酶解液。在分步酶解液中接种 SHI-59 发酵剂，接种量为 0.024%，发酵温度 34 ℃，发酵时间 53 h 得到 FBEH。

1.2.1.2 美拉德反应产物（Maillard Reaction products，MRPs）的制备 在美拉德反应体系中依次加入 40% FBEH、2.5% 酵母提取物、0.3% 甘氨酸、1% 木糖、2% 葡萄糖、0.5% 半胱氨酸盐酸盐、0.25% 半胱氨酸、0.2% 丙氨酸、0.2% 牛磺酸、0.3%VB_1，首先用 10% 苹果酸溶液调节反应体系的 pH 为 5.5，在温度保持 100 ℃ 条件下，进行美拉德反应时间为 1 h，然后用 2 mol/L NaOH 调节体系的 pH 为 7.0，再继续反应 1.5 h，得到 MRPs。

1.2.1.3 微胶囊乳化液的制备 在 1 L 的烧杯中依次加入蒸馏水、0.3% 吐温-80（乳化剂）、12% 麦芽糊精（壁材）、0.16% 大豆分离蛋白（壁材），用磁力搅拌器在 60 ℃ 加热搅拌使其完全溶解，然后加入 8% MRPs（芯材），使总量为 500 g，用高速剪切乳化机在 8000 r/min 下剪切 2 min，最后形成均匀的微胶囊乳化液。

1.2.1.4 微胶囊粉剂的制备 将得到的微胶囊乳化液进行喷雾干燥，得到微胶囊粉剂，喷雾干燥的工艺条件为：进风温度 180 ℃，出风温度 80 ℃，风机速度 45.0 Hz，蠕动泵转速 300 mL/h，撞针时间 3 s，撞针间隔 8 s。

1.2.2 热稳定性实验 将 1.2.1.2 中制备的 MRPs 用蒸馏水稀释成浓度为 3% 的稀释液（A 样品）；将 1.2.1.4 中制备的微胶囊粉剂用蒸馏水稀释成浓度为 4.79% 的稀释液（B 样品），根据微胶囊的包埋率（62.67%），使 A 样品和 B 样品两者稀释液中含有的 MRPs 量相等。

将 A 样品和 B 样品分装入试管中（每一种稀释液 12 管），分别在常温常压、90 ℃ 常压、121 ℃，0.12 MPa、160 ℃，常压下加热 20 min，具体试验设计方案和字母表示方法见表 1 所示。为了比较分析样品经不同温度加热处理后，其对热的稳定性，分别对样品进行电子鼻、GC-MS 分析，并对 MRPs 和微胶囊粉剂进行 DSC 分析。

表 1 试验设计方案

Table 1 Experimental design scheme

组别	常温常压	90 ℃常压	121 ℃，0.12 MPa	160 ℃常压	处理时间（min）
第1组	A、B	–	–	–	20
第2组	–	A1、B1	–	–	20
第3组	–	–	A2、B2	–	20
第4组	–	–	–	A3、B3	20

1.2.3 指标测定

1.2.3.1 包埋率的测定 褐色的类黑精是美拉德反应的重要产物，褐变程度提供了一个可视化的测量手段。褐变程度（A_{420}）测定根据文献 [11] 的方法加以修改测定吸光值。本试验的芯材是 MRPs，因此选用 420 nm 处吸光度值表示芯材含量，最终结果越大，则表明褐色产物的生成量越多[12]。将微胶囊乳液在 12000 r/min 下离心 15 min，取上清液（未包埋的芯材）和微胶囊乳液分别稀释 10 倍，在 420 nm 波长处测吸光值。

$$包埋率(\%)=\left(1-\frac{A_{420}上清液稀释液}{A_{420}微胶囊乳液稀释液}\right)\times 100$$

1.2.3.2 HeraclesII 超快速电子鼻分析 本试验参照陈援援等[13] 的方法并稍作修改，将处理后的 4 组稀释液，称取 7 g 样品于 20 mL 顶空样品瓶中，将样品在 55 ℃ 水浴锅中水浴 20 min，用 10 mL 进样针吸取顶空瓶中 5 mL 气体，手动进样注射入电子鼻进样口中。试验条件：进样口温度 200 ℃，持续进样时间 40 s，捕集井分流速率 10 mL/ min，柱温的程序升温方式 0.5 ℃/min 升到 100 ℃，1 ℃ /min，100~200 ℃，采集时间为 140 s。

1.2.3.3 挥发性成分的 GC-MS 分析 参照雷虹[14] 的方法并做修改将 8 g 样品稀释液加入 20 mL 顶空样品瓶中，加 5 mL 的饱和 NaCl 溶液和 2 μL 的 2-甲基-3-庚酮溶液（1 μg/mL），放入转子后置于磁力搅拌器上，将老化的萃取头插入样品瓶使石英纤维头暴露于样品上部空间，在 60 ℃ 下吸附 45 min 后拔出，萃取头在 GC 进样口（250 ℃）下解吸附 4 min。

GC 条件：TR-5 毛细色谱柱（30 m×0.25 mm×0.25 μm），载气为 He，载气流速为 1.0 mL/min，传输线温度 250 ℃，不分流进样，手动进样；升温程序：45 ℃ 保持 2 min，以 6 ℃/min 升温到 230 ℃，保持 5 min。

MS 条件：离子源温度 250 ℃，进样口温度 250 ℃，质量扫描范围 30~400 m/z；溶剂延迟时间为 1 min。风味化合物相对于 2-甲基-3 庚酮的含量，计算公式如下：

$$C=\frac{A_X\times C_0\times V\times 1000}{A_0\times m}$$

式中：C 为所测定的挥发性化合物浓度（μg/kg）；A_X 为测定挥发性化合物的峰面积（AU. min）；C_0 为内标物的浓度（1 μg/mL）；A_0 为内标物的峰面积（AU. min）；V 为内标物的进样量（μL）；m 为所测定样品的质量（g）。

1.2.3.4 DSC 分析 用十万分之一的天平称分别称取 10 mg 左右的样品（样品 A 为 MRPs 液，样品 B 为微胶囊干粉）于 DSC 特制的铝盒中，封口后放入仪器中进行扫描。扫描条件以空铝盒为参比，氮气流

量为 60 mL/min，空气流量为 20 mL/min，以 10 ℃/min 的扫描速率从 25 ℃ 升至 300 ℃ 结束，绘制 DSC 曲线并进行分析。

1.3　数据处理

采用 Excel 2016 软件、Origin10.0 软件进行图表制作，采用 IBM SPSS Statistics 19 软件进行显著性分析，PCA 分析，差异显著水平为 0.05。

2　结果与分析

2.1　热处理后 MRPs 和微胶囊粉剂稀释液的电子鼻分析

电子鼻是气味特征分析中常用的仪器，不同传感器对不同气味物质的灵敏性不同。电子鼻传感器中不同金属氧化物半导体型化学传感元件所对应的敏感物质类型不同[15]，经过不同的温度处理后的稀释液主成分风味物质的种类和相对含量不同，因此在传感器上呈现不同的气味感应信号[16]。因此可以通过传感器比较不同气味的差异。

由图 1(a)可知，PC1、PC2 的方差贡献率分别为 75.62% 和 18.52%，总贡献率为 94.14%，说明在整体香气成分水平上各组样品中主成分可以很好地反映多指标信息[17−18]。在主成分 1 上，从距离上来看，MRPs 的 A 样品(未经热处理)，与其经过高温处理后的样品 A1、A2、A3 之间的距离很大，说明 MRPs 经过热处理后的香气损失比例较大，但 A1、A2、A3 之间的距离很近，这一现象表明，MRPs 的热稳定性较差，受热处理会显著影响它的香味成分，也就是说，如果将 MRPs 直接添加到某一肉制品或鱼糜制品中，随着进一步的加热工序将会影响到 MRPs 作用的发挥。而经过微胶囊包埋后的稀释液 B，与经过高温处理后的稀释液 B1、B2、B3 之间的距离相对较小，说明经过高温处理后的香气损失比例较小，微胶囊包埋可提高 MRPs 的热稳定性。在主成分 2 上，A、A1、A2、A3 都位于负向端，而 B、B1、B2、B3 大部分都位于正向端[19]。

判别因子分析(DFA)是在 PCA 的基础上，对不同气味的信号数据进一步优化，将气味数据的差异性扩大，用少数的几个因子来描述多因素间的联系，以达到用较少的因子去反映原数据大部分信息[20]。由图 1(b)可知第 1 和第 2 主成分贡献率分别为 67.1% 和 25.5%，总贡献率为 92.6%，说明 DFA 表示样本的整体信息是可信的，图中 A2、A3 距离较近较难区分，结合 PCA 的分析可知，可能是由于其耐热性差，高温处理导致挥发性香气成分挥发严重，而 B1、B2、B3 距离较远，可以完全分开，说明在加热过程中挥发性物质的峰度是逐渐减小的。

2.2　热处理对 MRPs 和微胶囊粉剂稀释液挥发性风味物质的影响

热处理对 MRPs 和微胶囊粉剂稀释液挥发性风味物质的影响结果见表 2 所示。从表 2 中可以看

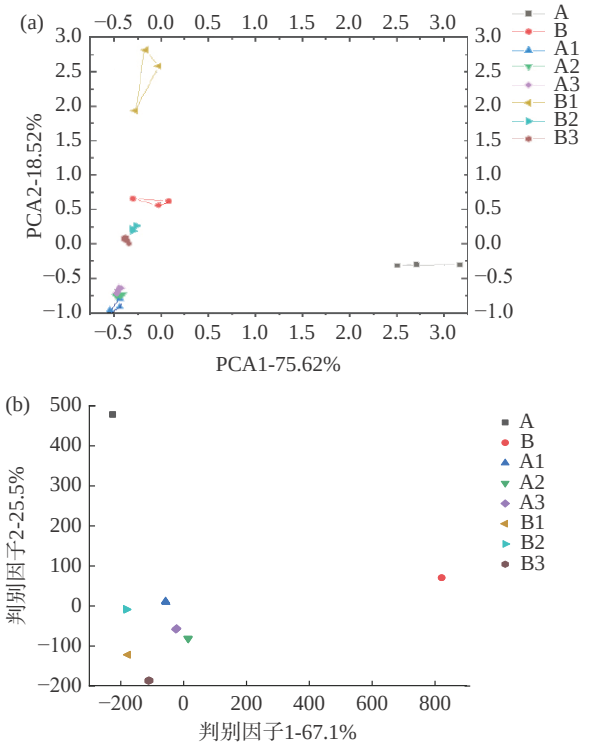


图 1　热处理对 MRPs 和微胶囊粉剂稀释液的 PCA 及判别因子(DFA)分析图

Fig.1　PCA and discriminant factor (DFA) analysis diagram of heat treatment on MRPs and microcapsule powder diluent

出，从 8 组样品中共检出挥发性风味化合物有 7 大类 96 种，其中酸类 18 种、胺类 13 种、吡嗪类 7 种、醇类 14 种、醛类 11 种、酮类 13 种、酯类 10 种。

分析发现，A 样品和 B 样品经不同热处理会显著降低 MRPs 中的挥发性风味物质种类，且受热温度越高，这种降低的趋势越明显，如 A、A1、A2、A3 的挥发性风味物质依次降低为 41、30、25、16 种；B、B1、B2、B3 的挥发性风味物质种类依次降低为 44、42、34、27，其中 A1、A2、A3 中的胺类分别为 15.60、1.23、0.59 μg/kg，而 B1、B2、B3 胺类分别为 48.45、19.29、3.42 μg/kg，可以明显看出 B3 样品的酸类、胺类等物质有明显降低现象[21]，因为酸类和胺类挥发性比较强。同样热处理温度下，B 样品的挥发性物质种类及胺类均显著高于 A 样品。这是因为经微胶囊包埋后随着温度升高，经热处理后油-水界面的蛋白质分子结构展开，分子内部带电基团和氨基酸残基暴露，界面蛋白紧密结合，在油滴表面形成蛋白膜，使得蛋白质分子结构伸展、松散，分子柔性增强对芯材起到保护作用[22−23]。

分析发现，A1、A2、A3 中的吡嗪类物质分别为 7.18、3.83、2.61 μg/kg 而 B1、B2、B3 中吡嗪类物质分别为 9.86、11.32、10.26 μg/kg。A1、A2、A3 中的醇类物质分别为 6.89、4.68、1.70 μg/kg 而 B1、B2、B3 中醇类物质分别为 9.35、5.98、3.59 μg/kg。

醛类物质气味阈值较低，具有脂香气味，是肉类香气的重要指标[24]，A1、A2、A3 中的醛类物质分别

表 2 热处理对 MRPs 和微胶囊粉剂稀释液的 GC-MS 分析结果

Table 2 GC-MS analysis results of heat treatment on MRPs and microcapsule powder diluent

编号	种类	化合物名称	相对质量浓度(μg/kg)							
			A	B	A1	A2	A3	B1	B2	B3
1	酸类(18种)	异戊酸	1.76	–	–	–	1.11	–	0.79	–
2		2- 甲基丁酸	0.37	–	–	–	–	–	–	–
3		三氟乙酸	–	2.08	1.17	–	–	11.70	–	0.32
4		2- 二甲基(乙烯基)硅氧基十三酸	–	0.34	–	–	–	–	–	–
5		亚硫酸	–	0.37	–	1.51	–	0.67	0.28	–
6		1,1-二甲基丙基 -2- 乙基己酸	–	0.51	–	–	–	–	–	–
7		全氟丙酸	–	–	3.17	0.35	–	–	–	–
8		膦酰乙酸	–	–	0.44	–	–	–	–	–
9		丁酸	–	–	0.87	1.51	–	–	–	–
10		3- 环戊基丙酸	–	–	0.40	–	–	–	–	–
11		丁二酸	–	–	0.66	0.98	0.78	–	–	–
12		醋酸	–	–	–	2.84	–	0.75	–	–
13		2- 氨基 -6- 甲基苯甲酸	–	–	–	0.70	–	–	–	–
14		异丁酸	–	–	–	0.39	–	–	–	–
15		富马酸	–	–	–	1.51	0.42	–	–	–
16		2- 甲基丙酸	–	–	–	–	–	6.31	–	–
17		4- 乙基苯甲酸	–	–	–	–	–	4.80	–	–
18		2-乙基丁酸	–	–	–	–	–	–	–	0.32
		合计	2.13	3.30	6.71	9.79	2.31	24.23	1.07	0.64
1	胺类(13种)	甲胺	14.18	12.34	–	–	0.33	6.76	5.53	1.45
2		N-甲基-2-羟基乙胺	0.51		–	–	–	–	–	–
3		N,N'-二甲基乙二胺	3.62	3.52	–	–	–	–	–	–
4		N-甲基单乙醇胺	3.62	3.4	–	–	–	–	–	–
5		草酰胺	3.11	2.76	–	–	–	1.13	0.99	1.66
6		异庚胺	–	8.78	–	–	–	1.54	–	–
7		1- 蒽环胺	–	0.99	–	–	–	–	1.03	–
8		2- 辛胺	–	–	7.07	–	–	19.24	8.58	–
9		二苯乙胺	–	–	1.46	–	–	–	–	–
10		4- 甲基-2- 六胺	–	–	7.07	1.23	–	19.24	3.16	–
11		苯乙胺	–	–	–	–	0.26	–	–	–
12		1,2-丙二胺	–	–	–	–	–	0.54	–	–
13		乙酰胺	–	–	–	–	–	–	–	0.31
		合计	25.04	31.79	15.60	1.23	0.59	48.45	19.29	3.42
1	吡嗪类(7种)	2,5-二甲基吡嗪	5.57	6.67	2.55	1.74	1.67	6.32	4.52	4.20
2		2,6-二甲基吡嗪	5.57	6.67	2.55	1.74	–	0.43	4.52	4.20
3		2- 乙基 -6- 甲基吡嗪	–	0.91	–	–	–	0.59	0.42	0.36
4		2- 乙基 -5- 甲基吡嗪	–	0.91	–	–	–	0.59	0.42	0.36
5		2-甲基-3-甲硫基吡嗪	0.69	0.78	0.54	0.35	0.27	–	–	–
6		三甲基吡嗪	–	–	0.87	–	0.67	1.93	1.44	1.14
7		2,5-二甲基 -3-(2- 甲基丁基)吡嗪	–	–	0.67	–	–	–	–	–
		合计	11.83	15.94	7.18	3.83	2.61	9.86	11.32	10.26
1	醇类(14种)	2,5-二甲基-3-己醇	2.18	–	2.05	1.90	–	–	–	–
2		2-甲基-3-庚醇	1.61	1.77	1.55	1.12	0.97	1.55	1.32	1.12
3		5-壬醇	2.30	1.77	0.36	–	–	1.74	1.34	0.73
4		1,2-己二醇	0.47	0.88	–	–	0.35	0.64	–	–
5		2,2-二甲基-3-庚醇	0.36	–	–	0.35	–	–	–	–
6		芳樟醇	2.49	2.42	1.67	0.68	0.38	1.60	0.55	0.32
7		3,4-二羟基苯乙二醇	0.33	–	–	–	–	–	–	–
8		2,5-二甲基环己醇	0.36	–	–	–	–	–	–	–
9		1- 庚醇	–	2.58	–	–	–	0.96	–	–
10		2-乙基-1-己醇	0.85	0.61	–	–	–	0.45	–	–
11		1- 辛醇	–	1.17	–	–	–	0.65	–	–

续表 2

编号	种类	化合物名称	相对质量浓度(μg/kg)							
			A	B	A1	A2	A3	B1	B2	B3
12		1- 戊烯 -3- 醇	1.57	1.86	1.26	0.63	–	1.76	–	–
13		2- 呋喃甲醇	–	–	–	–	–	–	1.03	–
14		1-辛烯-4-醇	–	–	–	–	–	–	1.74	1.42
		合计	12.52	13.06	6.89	4.68	1.70	9.35	5.98	3.59
1		苯甲醛	1.39	0.92	0.55	0.48	0.33	0.80	0.31	0.21
2		苯乙醛	0.66	0.58	1.05	0.98	0.48	0.50	0.45	–
3		2,4-二羟基苯甲醛	1.86	1.72	–	–	–	1.52	–	–
4		2-丙基-2-庚烯醛	1.83	1.68	0.65	0.52	–	1.23	0.96	0.82
5		癸醛	0.59	0.52	–	0.49	–	0.38	0.28	0.20
6	醛类(11种)	3-甲基-丁醛	–	0.30	–	–	–	0.2	–	–
7		5- 甲基 -2- 噻吩甲醛	–	–	0.30	–	–	–	–	–
8		己醛	–	–	–	–	0.24	–	–	–
9		糠醛	–	–	–	–	–	–	0.35	–
10		庚醛	2.63	2.80	0.60	–	–	2.54	1.13	0.43
11		2,4-壬二烯醛	–	–	–	–	–	–	0.31	0.25
		合计	8.96	8.52	3.15	2.47	1.05	7.17	3.79	1.91
1		4-辛酮	0.62	0.67	0.46	0.35	0.31	0.45	0.43	0.22
2		2-甲基-4-辛酮	1.24	1.16	1.05	–	–	0.54	0.36	–
3		2,6-二甲基-4-庚酮	0.86	0.93	0.63	–	–	–	–	–
4		5-壬酮	8.48	5.27	5.33	4.32	0.35	2.54	1.94	0.86
5		2,2-二甲基-3-己酮	0.84	0.95	–	–	–	0.76	0.34	–
6		2,4-二甲基-3-庚酮	1.83	2.07	–	–	–	1.96	1.23	0.93
7	酮类(13种)	3-甲基-4-庚酮	2.05	1.95	–	–	–	1.86	1.55	1.18
8		二氢-5-丙基2(3h)-呋喃酮	0.36	0.45	–	–	–	0.32	–	0.32
9		3- 乙基-4-庚酮	–	0.51	–	–	–	–	–	–
10		2,3-丁二酮	–	–	0.61	0.56	–	–	–	–
11		1-(2,4,6-三羟基苯基)-乙酮	–	0.82	–	–	–	–	–	–
12		茴香酮	–	–	–	–	–	0.75	–	–
13		2-庚酮	–	–	–	–	–	–	0.67	0.21
		合计	16.28	14.78	8.08	5.23	0.66	9.18	6.52	3.72
1		甲酸庚酯	–	–	–	–	–	–	–	–
2		乙酸乙酯	0.36	–	–	–	–	–	–	–
3		戊酸丁酯	0.32	–	–	–	–	–	–	–
4		2- 丁基四氢呋喃化合物	0.36	–	–	–	–	–	–	–
5	酯类(10种)	异戊酸异丁酯	1.70	0.62	–	0.52	–	–	–	–
6		甲酸庚酯	–	2.58	–	–	–	2.33	1.95	1.67
7		氨基甲酸甲酯	–	3.47	–	–	–	3.20	2.30	0.63
8		异戊酸异丁酯	–	–	0.63	–	–	0.25	–	–
9		巴豆酸戊酯	–	–	–	–	–	–	–	–
10		氯甲酸己酯	–	0.85	–	–	–	0.76	0.52	0.36
		合计	2.74	7.52	0.63	0.52	–	6.54	4.77	2.66
		总计	79.50	94.91	48.24	27.75	8.92	114.78	52.74	26.20

注：表中带“–”表示未检测到。

为 3.15、2.47、1.05 μg/kg 而 B1、B2、B3 中醛类物质分别为 7.17、3.79、1.91 μg/kg。新生成的 2,4-壬二烯醛，具有明显的脂肪香气，这可能是因为 MRPs 中含有的脂肪，随着温度的升高加速了油脂的氧化降解，形成了新的风味物质[25−26]。

酮类物质由脂肪氧化和美拉德反应产生，具有清香、奶油香及果香等令人愉快的香气[27]，如新生成的 2-庚酮等。A1、A2、A3 中的酮类物质分别为 8.08、5.23、0.66 μg/kg 而 B1、B2、B3 中酮类物质分别为 9.18、6.52、3.72 μg/kg。醛类、酮类和醇类均比 A3 有明显增加趋势，并有新的风味物质生成，尤其是醇类和醛类。醇类化合物主要由脂质氧化降解产生，大多数醇类化合物是由脂质氧化和蛋白质水解产生的。如 1-辛烯-3-醇为直链醇，由脂质氧化降解产生，有蘑菇香气；芳樟醇有清香香气，对美拉德反应物的整体香气有明显的修饰作用[28]。

A1、A2、A3 中的酯类物质分别为 0.63、0.52、0 μg/kg 而 B1、B2、B3 中酯类物质分别为 6.54、4.77、

2.66 μg/kg。进一步分析发现 B、B1、B2、B3 样品中挥发性风味物质的相对质量总浓度分别为 94.91、114.78、52.74、26.20 μg/kg，而 A、A1、A2、A3 样品中挥发性风味物质的相对质量总浓度分别为 79.50、48.24、27.75、8.92 μg/kg，B1、B2、B3 样品中挥发性风味物质的相对质量总浓度分别是相对应的 A1、A2、A3 的 2.38、1.90、2.94 倍。综上所述，MRPs 经微胶囊包埋后的样品 B 耐热性优于未经包埋的 MRPs(样品 A)。

2.3 对 MRPs 和微胶囊粉剂的差式量热扫描（DSC）分析

差示扫描量热仪(DSC)反映的是与热效应相关的物理或化学变化。在程序升温条件下，利用仪器中的热流传感器测量待测样品和参照物之间的热流差值来反映出相关的热效应。DSC 能分析微胶囊颗粒发生相变时的起始温度，并了解微胶囊产品的耐热情况[29−30]。

MRPs(A 样品)的 DSC 曲线见图 2 所示。从图 2 中可以看出，其裂解温度范围为 110~150 ℃，明显的吸热峰出现时的温度是 115 ℃。当温度达到 120 ℃时，吸热完成。图 3 所示为以 MRPs 为芯材的微胶囊粉剂(B 样品)DSC 曲线，从图 3 中可以看出，其裂解温度范围为 120~300 ℃，明显的吸热峰出现时的温度是 155 ℃，在 180 和 250 ℃ 又分别出现两个拐点，出现明显吸热峰时的温度比 A 样品的温度提高了 40 ℃，这说明 MRPs 芯材经壁材包埋后可以保护挥发性物质，使其在加热过程中挥发速度减慢[31]。一般来说，微胶囊内无定形物质因受热会发生玻璃化转变，热特性和力学特性、介电特性等会发生明显变化，只有当包埋基质处于玻璃态的内层受到足够的拉力，产生裂痕时才会导致风味包埋物的释放[32]，本试验的微胶囊壁材是麦芽糊精和大豆分离蛋白，这说明本试验所用的壁材种类和比例恰当，起到很好的包埋作用。从图 3 的对比热降解曲线可以看出，MRPs 的热降解曲线变化程度明显高于微胶囊变化曲线。综上所述，通过微胶囊包埋 MRPs 后，可有效地扩宽 MRPs 的释放温度，增加其在热释放领域的应用范围，因此热稳定性更好。

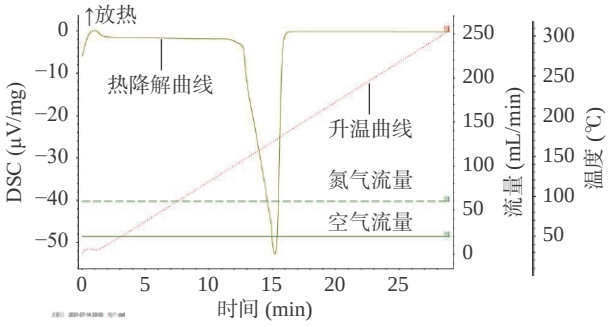


图 2 MRPs(样品 A)的 DSC 曲线图

Fig.2 Thermal degradation (DSC) curve of MRPs (sample A)

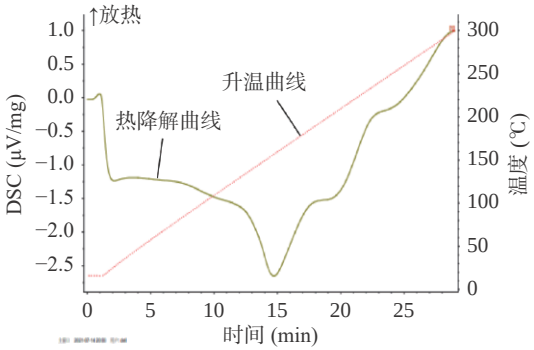


图 3 以 MRPs 为芯材的微胶囊(样品 B)DSC 曲线图

Fig.3 Thermal degradation (DSC) curve of microcapsules with MRPs (sample B) as core material

3 结论

通过电子鼻的 PCA、DFA 分析可知，经微胶囊包埋后的稀释液 B2、B3 热稳定性优于其他稀释液，通过 GC-MS 测定不同稀释液的挥发性风味物质可知，在同样温度处理后，B1、B2、B3 样品的挥发性风味物质种类分别是 A1、A2、A3 样品的 1.4、1.36、1.69 倍；B1、B2、B3 样品的挥发性物质的质量浓度分别是 A1、A2、A3 的 2.38、1.9、2.94 倍。通过 DSC 的曲线图也可以看出，MRPs 的裂解温度范围为 110~150 ℃，以 MRPs 为芯材的微胶囊曲线图,其裂解温度范围为 120~300 ℃，出现明显吸热峰时的温度比 MRPs 时的温度提高了 40 ℃，因此，本试验以 MRPs 为芯材的微胶囊热稳定性优于未经包埋的 MRPs，使通过微胶囊包埋制备美拉德反应调味料得到更广泛的应用。本实验也有不足之处，由于选择的壁材种类有限，包埋率并不是太高，因此后续研究还应进一步探究，提高包埋率。

参考文献

[1] 卢艳慧, 李迎秋. 微胶囊技术的研究进展及在食品行业中的应用[J]. 中国调味品, 2021, 46(3): 171−174. [LU Yanhui, LI Yingqiu. Research progress of microencapsulation technology and its application in the food industry[J]. China Seasoning, 2021, 46(3): 171−174.]

[2] 杨小兰, 袁娅, 谭玉荣, 等. 纳米微胶囊技术在功能食品中的应用研究进展 [J]. 食品科学, 2013, 34(21): 359−368. [YANG Xiaolan, YUAN Ya, TAN Yurong, et al. Research progress in the application of nano-microencapsulation technology in functional foods[J]. Food Science, 2013, 34(21): 359−368.]

[3] XIAO Zuobing, LIU Wanlong, ZHU Guangyong, et al. A review of the preparation and application of flavour and essential oils microcapsules based on complex coacervation technology[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2014, 94(8): 1482−1494.

[4] WANG R, TIAN Z, CHEN L. A novel process for microencapsulation of fish oil with barley protein[J]. Food Research International, 2011, 44(9): 2735−2741.

[5] 苏阳, 匡立学, 周金星, 等. 包络结合法制备 β-环糊精鱼油微胶囊[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(10): 76−80. [SU Yang, KUANG Lixue, ZHOU Jinxing, et al. Preparation of β-cyclodextrin fish oil microcapsules by envelope binding method[J]. Food and

Fermentation Industry, 2012, 38(10): 76−80.]
[6] 万义玲, 洪鹏志, 邱彩虹. 鱼油 (南海低值鱼) 微胶囊化工艺的研究 [J]. 食品科学, 2007, 28(5): 120−125. [WAN Yiling, HONG Pengzhi, QIU Caihong. Study on the microencapsulation technology of fish oil (low value fish in South China Sea)[J]. Food Science, 2007, 28(5): 120−125.]
[7] 刘伟. 超声波处理对河蚌肉酶解物美拉德反应的影响及其微囊化调味料制备 [D]. 长春: 吉林大学, 2019. [LIU Wei. Effect of ultrasonic treatment on Maillard reaction of enzymatic hydrolysate of mussel meat and preparation of microencapsulated seasoning [D]. Changchun: Jilin University, 2019.]
[8] 王正云, 展跃平, 钟川, 等. 复凝聚法青鱼内脏鱼油微胶囊的制备及其性能研究 [J]. 食品工业科技, 2020, 41(23): 155−161. [WANG Zhengyun, ZHAN Yueping, ZHONG Chuan, et al. Study on the preparation and properties of black carp viscera oil microcapsules with complex coacervation[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(23): 155−161.]
[9] 李颖杰, 林慧敏, 吕耿强, 等. 鱼糜酶解蛋白亚铁螯合肽微胶囊工艺及抗氧化研究 [J]. 中国食品学报, 2017, 10(17): 116−120. [LI Yingjie, LIN Huimin, LU Gengqiang, et al. Study on the microcapsule technology and antioxidant of enzymatic hydrolyzed protein ferrous peptide of surimi[J]. Chinese Journal of Food Science, 2017, 10(17): 116−120.]
[10] SARKARS, GUPTAS, VARIYAR P S, et al. Irradiation depoly merized guar gum as partial replacement of gum Arabic for microemcapsulation ofmintoil[J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 90(4): 1685−1694.
[11] BHINDER S, SINGH B, KAUR A, et al. Effect of infrared roasting on antioxidant activity, phenolic composition and Maillard reaction products of Tartary buckwheat varieties[J]. Food Chemistry, 2019, 285: 240−251.
[12] RAO M S, CHAWLA S P, CHANDER R, et al. Antioxidant potential of Maillard reaction products formed by irradiation of chitosan-glucose solution[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 83(2): 714−719.
[13] 陈援援, 于德阳, 秦建鹏, 等. 外源抑制物对风干肠风味变化的影响 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(4): 215−225,231. [CHEN Yuanyuan, YU Deyang, QIN Jianpeng, et al. Effects of exogenous inhibitors on the microbial community composition and flavor changes of air-dried sausage[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(4): 215−225,231.]
[14] 雷虹. 传统风干肉在风干和贮藏过程中品质及风味物质的变化研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018. [LEI Hong, Study on the quality and flavor changes of traditional air-dried meat during air-drying and storage[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2018.]
[15] RAJAMAKI T, ALAKOMI H L, RITCANEN T A, et al. Application of an electronic nose for quality assessment of modifi ed atmosphere packaged poultry meat[J]. Food Control, 2006, 17: 5−13.
[16] 李迎楠, 刘文营, 张顺亮, 等. 反应时间对牛肉、牛骨美拉德反应产物风味品质的影响 [J]. 肉类研究, 2016, 30(5): 1−5. [LI Yingnan, LIU Wenying, ZHANG Shunliang, et al. Effect of reaction time on the flavor quality of beef and beef bone Maillard reaction products[J]. Meat Research, 2016, 30(5): 1−5.]
[17] 陈辰, 鲁晓祥, 张鹏, 等. 玫瑰香普通贮后货架品质的电子鼻结合 GC-MS 检测 [J]. 现代食品科技, 2015, 31(10): 313−320. [CHEN Chen, LU Xiaoxiang, ZHANG Peng, et al. Electronic nose combined with GC-MS detection of shelf quality of rose fragrance after ordinary storage[J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(10): 313−320.]
[18] 贡慧, 史智佳, 杨振, 等. 电子鼻快速检测不同煮制时间的酱牛肉风味 [J]. 肉类研究, 2014, 28(11): 34−37. [GONG Hui, SHI Zhijia, YANG Zhen, et al. Electronic nose quickly detects the flavor of sauced beef with different cooking time[J]. Meat Research, 2014, 28(11): 34−37.]
[19] 孙学颖, 辛晓琦, 刘建林, 等. 不同配料及发酵剂对羊肉发酵香肠滋味及香气成分的影响 [J]. 食品工业科技, 2020, 41(11): 21−27,36. [SUN Xueying, XIN Xiaoqi, LIU Jianlin, et al. Effects of different ingredients and starters on the taste and aroma components of fermented lamb sausage[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(11): 21−27,36.]
[20] 邓龙, 刘雄飞, 刘贤标, 等. GC-MS-O 结合电子鼻对橄榄油挥发性成分的分析与鉴别 [J]. 中国食品学报, 2019, 19(5): 276−284. [DENG Long, LIU Xiongfei, LIU Xianbiao, et al. Analysis and identification of volatile components in olive oil by GC-MS-O combined with electronic nose[J]. Chinese Journal of Food Science, 2019, 19(5): 276−284.]
[21] 孙丽平, 汪东风, 徐莹, 等. pH 和加热时间对美拉德反应挥发性产物的影响 [J]. 食品工业科技, 2009, 4(30): 122−125. [SUN Liping, WANG Dongfeng, XU Ying, et al. The influence of pH and heating time on the volatile products of Maillard reaction[J]. Food Industry Science and Technology, 2009, 4(30): 122−125.]
[22] 孙天颖, 程红, 陈珂玥, 等. 热处理对葵花分离蛋白结构特性的影响 [J]. 中国调味品, 2021, 46(6): 69−71. [SUN Tianying, CHENG Hong, CHEN Keyue, et al. The effect of heat treatment on the structural characteristics of sunflower protein isolate[J]. Chinese Condiments, 2021, 46(6): 69−71.]
[23] 陈艾霖, 刘璐, 宋春勇, 等. 热处理对罗非鱼分离蛋白乳液稳定性的影响 [J]. 广东海洋大学学报, 2021, 41(5): 1−7. [CHEN Ailin, LIU Lu, SONG Chunyong, et al. Effect of heat treatment on the stability of tilapia protein isolate emulsion[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2021, 41(5): 1−7.]
[24] HERRERA JIMENEZ M, ESCALONA BUENDIA H, PONCE ALQUICIRA E, et al. Release of five indicator volatiles from a model meat emulsion to study phase contribution to meat aroma[J]. International Journal of Food Properties, 2007, 10(4): 807−818.
[25] 张凯华, 臧明伍, 张哲奇, 等. 水浴复热时间对猪肉糜制品挥发性风味的影响 [J]. 食品科学, 2018, 40(2): 186−191. [ZHANG Kaihua, ZANG Mingwu, ZHANG Zheqi, et al. Effect of reheating time in water bath on volatile flavor of minced pork products[J]. Food Science, 2018, 40(2): 186−191.]
[26] 王强. 香肠脂肪氧化动力学特性及温度对其影响研究 [J]. 食品科学, 2013, 34(11): 130−133. [WANG Qiang. Study on the kinetic characteristics of sausage fat oxidation and the effect of temperature on it[J]. Food Science, 2013, 34(11): 130−133.]

［27］ TANAKA T, YAMAUCHI T, KATSUMATA R, et al. Comparison of volatile components in commercial Itohiki-Natto by solid phase microextraction and gas chromatography[J]. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, 2003, 50(6): 278−285.
［28］ 崔晓莹, 张庆永, 刘登勇, 等. 德州扒鸡关键挥发性风味物质分析[J]. 肉类研究, 2019, 33(11): 50−54. ［CUI Xiaoying, ZHANG Qingyong, LIU Dengyong, et al. Analysis of key flavor substances in Dezhou braised chicken[J]. Meat Research, 2019, 33(11): 50−54.］
［29］ 赵婕, 王明力, 汤翠, 等. 基于复合壁材的薏米糠油微胶囊制备及热稳定性研究[J]. 油脂深加工, 2018, 43(3): 70−74. ［ZHAO Jie, WANG Mingli, TANG Cui, et al. Preparation and thermal stability of barley bran oil microcapsules based on composite wall materials[J]. Deep Processing of Oils and Fats, 2018, 43(3): 70−74.］
［30］ 李孟强, 万涛, 彭长根, 等. 植物绝缘油中抗氧化剂的PDSC评价和选用[J]. 可再生资源, 2021, 39(6): 711−715. ［LI Mengqiang, WANG Tao, PENG Changgen, et al. PDSC evaluation and selection of antioxidants in plant insulating oil[J]. Renewable Resources, 2021, 39(6): 711−715.］
［31］ 蒋爱月, 马红俊, 宋国宝, 等. 甜橙油微胶囊的制备及其热释放研究[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2021, 43(4): 753−759. ［JIANG Aiyue, MA Hongjun, SONG Guobao, et al. Preparation of sweet orange oil microcapsules and study on heat release[J]. Journal of Yunnan University (Natural Science Edition), 2021, 43(4): 753−759.］
［32］ 赵学伟, 毛多斌. 玻璃化转变对食品稳定性的影响[J]. 食品科学, 2007, 28(12): 539−544. ［ZHAO Xuewei, MAO Duobin. The effect of glass transition on food stability[J]. Food Science, 2007, 28(12): 539−544.］

任戈一, 马雪莲, 潘丽, 等. 不同提取工艺下牛骨胶原蛋白的结构特性 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 27−33. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090282

REN Geyi, MA Xuelian, PAN Li, et al. Structural Characteristics of Bovine Bone Collagen under Different Extraction Processes[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 27−33. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090282

· 研究与探讨 ·

不同提取工艺下牛骨胶原蛋白的结构特性

任戈一, 马雪莲, 潘　丽, 齐海雯, 冰玛拉措, 张书尧, 颜海燕*
（石河子大学食品学院, 新疆石河子 832000）

摘　要: 为提高牛骨资源的利用率，以新鲜牛骨为原料，分别采用乙酸、柠檬酸、乙酸和胃蛋白酶、柠檬酸和胃蛋白酶提取得到四种牛骨胶原蛋白（ASC1、ASC2、PSC1 和 PSC2）并通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE），傅里叶红外光谱（FTIR），扫描电镜（SEM），表面疏水性等指标对其理化性质和结构特征进行研究。结果表明：PSC1 的得率最高，可达 3.23%，四种提取方法得到的胶原蛋白均于 230 nm 附近出现最大紫外吸收峰；SDS-PAGE 和红外光谱分析表明牛骨胶原蛋白主要由 α_1、α_2、β 三种亚基成分组成，属于 I 型胶原蛋白，且胶原蛋白的空间结构保留完整；扫描电镜直观表明了四种胶原蛋白的纤维网络结构均保留较完整，其中酸法提取的胶原蛋白（ASC1 和 ASC2）网络结构分布较为均匀；酶法制得的胶原蛋白（PSC1 和 PSC2）纤维化较为明显，四种胶原蛋白理化特性无显著差异，但微观结构存在一定差异。本研究为提高畜禽副产物高值化应用发展及深加工技术提供了一定的理论基础。

关键词: 牛骨, 胶原蛋白, 提取工艺, 酸法提取, 酶法提取, 结构
中图分类号: TS251.9　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0027−07
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090282
本文网刊:

Structural Characteristics of Bovine Bone Collagen under Different Extraction Processes

REN Geyi, MA Xuelian, PAN Li, QI Haiwen, BING Malacuo, ZHANG Shuyao, YAN Haiyan*
（College of Food, Shihezi University, Shihezi 832000, China）

Abstract: In order to improve the utilization rate of bovine bone resources, fresh bovine bone was used as raw material, four kinds of bovine bone collagen (ASC1, ASC2, PSC1 and PSC2) were extracted by acetic acid, citric acid, acetic acid and pepsin, citric acid and pepsin, the physicochemical properties and structural characteristics were studied by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM), surface hydrophobicity and other indicators. The results showed that PSC1 had the highest yield, which was 3.23%, the maximum ultraviolet absorption peak of the collagen extracted by four kinds of extraction methods were found around 230 nm. SDS-PAGE and infrared spectroscopy analysis showed that four kinds of collagen were composed of α_1, α_2 and β subunits, which belonged to type I collagen and the space structure of bovine collagen was preserved intact. Scanning electron microscopy showed that the fiber network structure of the four kinds of collagen (acid method and enzyme method) were relatively intact, among the network structure of the collagen extracted by acid method (ASC1 and ASC2) was evenly distributed. The collagen extracted by enzymatic method (PSC1 and PSC2) had obvious fibrosis. There was no significant difference in the physicochemical properties of the four kinds of collagen, but there were some differences in the microstructure. This study would provide a theoretical basis for improving the development of high value application and deep processing technology of livestock and poultry by-products.

Key words: bovine bone; collagen; extraction process; acidic extraction method; enzymatic extraction method; structure

收稿日期: 2021−09−26
基金项目: 新疆生产建设兵团科技计划项目（2020AB012）; 国家创新创业计划训练项目（202110759048）。
作者简介: 任戈一（2000−）, 男, 本科, 研究方向: 畜产品加工及质量控制, E-mail: 1315187344@qq.com。
*** 通信作者:** 颜海燕（1974−）, 女, 硕士, 高级实验师, 研究方向: 食品科学, E-mail: 1502314515@qq.com。

我国是畜禽肉类生产和消费大国, 2019 年我国畜禽肉总产量为 7758.78 万 t[1], 其中牛肉产量为 667 万 t。然而, 在牛肉的生产消费过程中, 牛骨作为主要副产物, 约占牛总体重的 20%~30%。胶原蛋白为牛骨中主要蛋白质, 含量高达 90% 以上[2], 胶原蛋白具有乳化、凝胶、起泡等功能特性, 同时还具有促进新陈代谢, 延缓衰老等生理功能。此外, 其中含有多种人体必需氨基酸, 含量为 39.6 mg/100 g[3], 能够满足不同人群对氨基酸的需求, 因此骨胶原蛋白的提取及应用已经成为科研工作者的关注热点。

目前, 胶原蛋白提取的常用方法有: 酸法、酶法、碱法、水热法。酸法提取反应迅速、提取时间较短, 且原料提取较彻底, 得到的胶原蛋白结构较为完整, 但由于酸具腐蚀性, 设备易老化, 设备费用增加; 酶法提取是加入特定的蛋白酶以增进胶原蛋白非螺旋区段肽键降解, 通常不会引起胶原蛋白三股螺旋结构变化[4], 且能够维持其特有的生物活性[5]; 碱法提取虽比较迅速, 但碱性条件下会破坏胶原蛋白中的羟基和巯基并使得某些氨基酸消旋, 蛋白质结构发生变化, 最终影响其功能特性, 产生“三致”毒害性[6], 此方法逐渐被酸法或酶法所替代; 热水提取的胶原蛋白由于长时间在较高的温度下浸提, 破坏其部分结构, 从而影响其功能特性。

现阶段, 有关胶原蛋白的提取主要集中于提取方法及其条件优化的研究, 但不同提取方法得到的胶原蛋白结构差异的研究少有报道。胶原蛋白结构决定胶原蛋白功能特性, 研究不同提取方法下胶原蛋白结构的差异, 可为其后续的功能特性的研究提供基础的理论依据。因此, 本课题采用酸法及酶法提取工艺提取牛骨胶原蛋白, 研究不同提取方法下胶原蛋白结构特性的差异并分析其中的原因, 为有效利用牛骨资源和研究牛骨胶原蛋白的相关功能特性提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

西门塔尔牛股骨 石河子市友好超市; 胃蛋白酶(3000U/mg) 上海麦克林生化科技有限公司; 三羟甲基氨基甲烷、MD10 透析袋(8~14 kDa) 北京索莱宝科技有限公司; 考马斯亮蓝 R-250、溴酚蓝 德国 Meker 公司; 冰乙酸、柠檬酸、溴化钾等 均为国产分析纯。

PG-360 型强力碎骨机 廊坊市惠友机械有限公司; GNM-130AQ 型骨泥磨 廊坊市惠友机械有限公司; X7 型酶标仪 基因有限公司; T2A 型凝胶成像仪 美国 Bio-Red 公司; FEI Quanta 200 型扫描电子显微镜 荷兰 FEI 公司; TENSOR 27 型傅里叶变换红外光谱仪 瑞士 Bruker 公司

1.2 实验方法

1.2.1 脱脂脱钙骨粉的制备

1.2.1.1 原料前处理 去除新鲜牛骨表面的碎肉、脂肪、软骨等杂质, 将其处理成为约 10 cm×10 cm 大小碎块, 破骨机对牛骨块破碎后用纱布吸水分并晾干, 碎骨物料于骨泥机研磨, 重复上述吸水步骤, 真空包装后于−20 ℃ 保存备用。

1.2.1.2 碱洗 根据公维洁等[7] 的方法稍作改动。以料液比 1∶5 g/mL 加入并于 4 ℃ 条件下震摇浸泡 12 h, 每隔 6 h 更换一次溶液, 目的是除去杂蛋白质, 提高胶原蛋白纯度。

1.2.1.3 脱脂处理 根据秦娜娜[8] 的方法稍作改动。将碱洗所得的原料反复冲洗至中性, 沥干后以体积比 1∶5 加入并于 4 ℃ 条件下震摇脱脂, 每 5 h 更换一次溶液, 至溶液表面无明显脂肪液滴。

1.2.1.4 脱钙处理 采用南学敏[9] 方法稍作改动。将脱脂所得原料反复冲洗至中性, 沥干后, 于 4 ℃ 条件下脱脂物料以体积比 1∶10 混合, 每隔 6 h 更换一次溶液, 外液中钙含量参照国标 GB 5009.92-2016[10] 的 EDTA 滴定法测定, 至溶液中无钙含量则表明脱钙完全。

1.2.2 胶原蛋白的提取

1.2.2.1 酸法提取 向骨样中分别加入 0.5 mol/L 乙酸溶液、0.5 mol/L 柠檬酸溶液, 料液比为 1∶5 g/mL, 震摇浸提 24 h, 收集上清液, 调节上清液中 NaCl 终浓度至 0.9 mol/L, 加入三羟甲基氨基甲烷(Tris)(6 g/L), 调节 pH7.5, 搅拌均匀静置过夜后, 4 ℃、5000 r/min 离心 15 min, 沉淀物真空冷冻(−59.6 ℃, 88~90 mT)干燥后得酸溶性胶原蛋白, 分别记为 ASC1、ASC2。

1.2.2.2 酶法提取 采用 Shaik 等[11] 方法稍作改动, 向骨样中分别加入 0.5 mol/L 的乙酸溶液和胃蛋白酶, 0.5 mol/L 的柠檬酸溶液和胃蛋白酶, 胃蛋白酶添加量均为 20 U/mg, 料液比为 1∶5 g/mL, 震摇浸提 24 h。收集上清调节 pH>8 灭酶, 并调节溶液 NaCl 终浓度至 0.9 mol/L, 并加入 Tris(6 g/L), pH 调至 7.5, 搅拌均匀静置过夜后, 4 ℃、5000 r/min 离心 15 min, 沉淀物真空冷冻(−59.6 ℃, 88~90 mT)干燥后得酶溶性胶原蛋白, 分别记为 PSC1、PSC2。

1.2.2.3 胶原蛋白得率计算 对不同提取方法下得到的酸溶性胶原蛋白与酶溶性胶原蛋白的质量进行测定, 并计算胶原蛋白得率。胶原蛋白得率计算公式如下:

$$\text{胶原蛋白得率}(\%)=\frac{\text{胶原蛋白粗品质量}}{\text{原料骨质量}}\times 100$$

1.2.3 胶原蛋白纯化 参考刘丽莉等[12] 的方法稍作改动。对所得胶原蛋白粗品用 0.5 mol/L 冰醋酸再次溶解后装入透析袋(8~14 kDa), 先用 0.1 mol/L 冰醋酸透析 2 d, 再用蒸馏水透析 2 d, 每隔 12 h 换一次透析袋外液。透析结束后沉淀物冷冻(−59.6 ℃, 88~90 mT)干燥即得相对较纯的骨胶原蛋白, 凯氏定氮法测定蛋白质含量, −20 ℃ 贮存备用。

1.2.4　胶原蛋白结构测定

1.2.4.1　紫外光谱分析　参考李秋雨等[13]方法并稍作修改。2 mg/mL 的胶原蛋白溶液。室温条件下用紫外分光光度计于 200~400 nm 波长范围内进行扫描，波长间隔为 1 nm，以蒸馏水为空白对照。

1.2.4.2　扫描电子显微镜分析　参考贾伟[14]方法并稍作改动。使用手术刀将适量冻干后的牛骨胶原蛋白切成约 3×3×2 mm 的薄片均匀粘贴在双面导电胶上，真空喷金后进行牛骨胶原蛋白微观结构扫描观察，放大倍数为 500 倍，加速电压为 1.0 kV。

1.2.4.3　SDS-PAGE 分析　将蛋白质样品溶液与 2x 样品缓冲液按照 1∶1 比例混合后，沸水浴 5 min，冷却后取上清液 15 μL 上样。浓缩胶 10%，分离胶 5%。采用直压恒流电源，浓缩胶电压 120 V，分离胶电压 160 V，结束后，用考马斯亮蓝 R-250 染色 40 min，脱色至透明后，用凝胶成像仪观察分析[15]。

1.2.4.4　傅里叶红外色谱分析　参考蔡路昀等[16]的方法：取一定质量的牛骨胶原蛋白与等量的溴化钾混合研磨压片，置于多次衰减全反射附件上扫描，采用 OMNIC 软件记录光谱图，扫描波长范围设置为 4000~450 cm^{-1}，分辨率为 1 cm^{-1}

1.2.4.5　蛋白质表面疏水性测定　1 mg/mL 蛋白样品溶液取 1 mL 加入 100 μL 1 mg/mL 的溴酚蓝(BPB)，混合 5 min 后，于 4 ℃ 下，5000 r/min 离心 15 min，取上清液在 595 nm 下测定其吸光值，记作 A。同时以磷酸盐缓冲液作空白对照，记作 A_0[17]，计算如下：

$$溴酚蓝(\mu g)=\frac{100\times(A_0-A)}{A_0}$$

1.3　数据处理

每个指标至少平行测定三次，利用 Excel 对数据进行整理，结果用 Mean±SD 来表示，并采用 SPSS 软件进行数据分析和差异显著性分析(ANOVA)检验(P<0.05)。使用 Origin 2018 进行数据分析、图表绘制并进行结果分析。

2　结果与分析

2.1　胶原蛋白得率

不同提取方法下胶原蛋白得率如图 1 所示。由图 1 可知，ASC1，ASC2 胶原蛋白得率分别为 2.23%、2.02%，PSC1，PSC2 胶原蛋白得率则可达到 3.23%、3.01%。酶法提取胶原蛋白得率显著高于酸法(P<0.05)，且乙酸的提取效率略高于柠檬酸。酶法(PSC1 和 PSC2)胶原蛋白得率高于酸法(ASC1 和 ASC2)的原因可能是在最适反应条件下，酶促反应的高效性和专一性使得胶原蛋白得率更高。ASC1 与 ASC2 相比，ASC1 的得率高于 ASC2 的原因可能是相同摩尔浓度下(0.5 mol/L)，H^+的解离程度不同，使得最终溶液的 pH 不同，因此，相同浓度下，柠檬酸的 pH 高于乙酸，影响胶原蛋白的提取效果，最终造成 ASC1 的得率高于 ASC2。王晓军等[18]使用乙酸和胃蛋白酶提取牦牛骨胶原蛋白，其酸法和酶法提取胶原蛋白的得率分别为 2.24%、3.32%。胡建平[19]采用胃蛋白酶在不同酸性环境下酶解鱼鳞得到胶原蛋白，实验结果表明乙酸的提取率高于柠檬酸和盐酸，本研究结果为酶法胶原蛋白得率高于酸法，与上述结论相符。

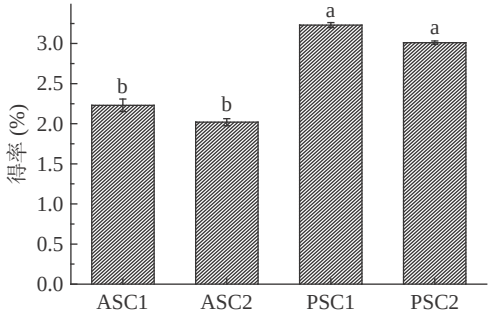


图 1　不同提取方法下的胶原蛋白得率

Fig.1　Collagen yield under different extraction methods

2.2　紫外光谱分析

由图 2 可知，不同方法提取得到的牛骨胶原蛋白的紫外光谱分别位于 228、231、233、231 nm 处。四种胶原蛋白的紫外光谱基本一致，这是由于胶原蛋白不含有色氨酸，且苯丙氨酸和酪氨酸含量极低，使得紫外扫描下胶原蛋白在 280 nm 处基本不出现吸收峰，而在 230 nm 波长附近出现最大吸收峰，这可能由于胶原蛋白中的羰基、羧基和酰胺基团共同作用所致[20]。酸法和酶法提取得到的胶原蛋白紫外吸收峰不一致，可能是酶法提取过程中蛋白质的特定切割位点使最终得到的氨基酸组成和种类存在部分差异。ASC1 和 ASC2 紫外最大吸收峰差异可能是由于提取胶原蛋白的酸种类及 pH 不同影响其特定氨基酸的比例的大小，从而使得提取得到的胶原蛋白于 230 nm 处发生向左或向右的偏移。何兰[21]利用酸法、酶法提取长骨中胶原蛋白在 223、219 nm 处有最大紫外吸收值，Madhuri[22]报道的鱼皮胶原蛋白在 230 nm 波长附近具有最大紫外吸收值，与本实验结果一致。

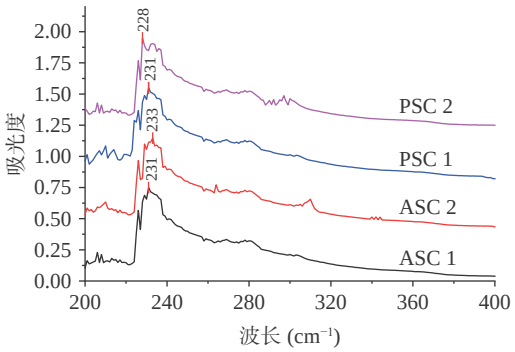


图 2　不同提取方法下的胶原蛋白紫外光谱

Fig.2　Ultraviolet spectra of collagen under different extraction methods

2.3　SDS-PAGE 凝胶电泳分析

对不同提取方法下得到的牛骨胶原蛋白进行聚

丙烯酰胺凝胶电泳分析，如图 3 所示。由图 3 可知，不同提取方法制得的胶原蛋白均具有 β(约 250 kDa)、α_1(约 135 kDa)、α_2(约 130 kDa)三条显著条带。ASC1、ASC2 的 β 链条带细、颜色浅，而 PSC1、PSC2 的 β 链条带较为明显，这可能是由于胃蛋白酶的存在促使胶原蛋白中 γ 链降解为 β 链而造成 PSC1、PSC2 的 β 链条带较深。ASC1、ASC2 的 α_1、α_2 肽链含量略低于相应的 PSC1、PSC2 的两条 α 肽链，这可能是胃蛋白酶的作用使部分胶原蛋白降解成小分子，使 PSC1 和 PSC2 的两条 α 肽链含量增多。β 二聚体为两条 α 链形成的胶原分子，β 链的存在是胶原蛋白高度交联的表现，由此可判断出所得到的胶原蛋白符合Ⅰ型胶原蛋白的特征；与上述紫外光谱结果一致。本研究结果与海蜇[23]、红鼓鱼鳞[24]、尼罗罗非鱼鳞[25]等其他来源的Ⅰ型胶原蛋白电泳图相似。此外，与酸溶性胶原蛋白相比，酶溶性胶原蛋白在 100 kDa 附近存在浅细的条带，其原因可能是酶法提取过程中酶的作用使胶原蛋白酶解为其他小分子[26]。

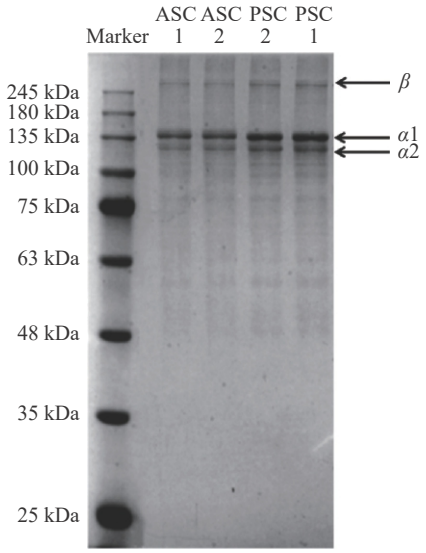


图 3 不同提取方法下胶原蛋白的 SDS-PAGE

Fig.3 SDS-PAGE of collagen under different extraction methods

2.4 表面疏水性分析

研究发现，蛋白质疏水性在其构象和溶解性、乳化性等功能特性方面发挥着关键作用，因此对疏水性进行测定可以评价蛋白质三级结构的改变。本研究通过测定并计算结合态溴酚蓝的量来表征胶原蛋白的疏水性[27]。对不同提取工艺下牛骨胶原蛋白的表面疏水性进行测定，结果如图 4 所示。由图 4 可知，PSC1 胶原蛋白的表面疏水性可达 5.49 μg，ASC2 胶原蛋白的表面疏水性低至 2.64 μg。且 ASC2、PSC1、PSC2 表面疏水性差异显著(P<0.05)，但 ASC1 和 PSC2 差异不显著。酶法提取的胶原蛋白疏水性较高可能是由于在提取过程中，胃蛋白酶切割牛骨蛋白的非螺旋区段，使所得胶原蛋白疏水性大幅增大；此外，胃蛋白酶特定的酶切位点使胶原蛋白的疏水性基团暴露，特别是疏水性氨基酸含量增多，表面疏水性增加。ASC1 显著(P<0.05)高于 ASC2 的原因可能是乙酸的 pH 较低，在此条件下提取的胶原蛋白的表面疏水基团(如色氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、丙氨酸、脯氨酸和蛋氨酸等疏水性氨基酸)暴露更多，因此 ASC1 较 ASC2 的表面疏水性大。

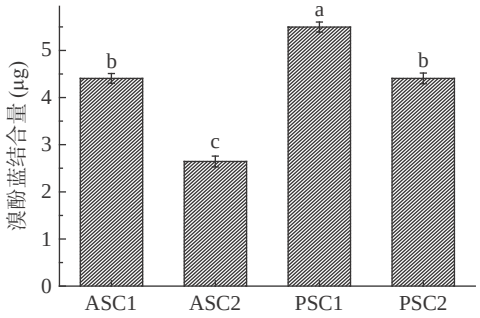


图 4 不同提取方法下牛骨胶原蛋白的表面疏水性

Fig.4 Surface hydrophobicity of bovine collagen under different extraction methods

王立宇等[28]采用酸酶法提取了室温下碱发的毛肚中胶原蛋白并利用溴酚蓝法测定其表面疏水性，其值达到 72~75 μg。与上述研究结果对比，本实验测得胶原蛋白的表面疏水性较小，可能是由于胶原蛋白的来源、提取方法等因素的差异，使得疏水性氨基酸被包裹在内部，游离的疏水性氨基酸较少，造成牛骨胶原蛋白表面疏水性小。

2.5 红外光谱分析

图 5 为采用酸法(ASC1、ASC1)及酶法(PSC1 和 PSC2)提取工艺下牛骨胶原蛋白在波数 4000~450 cm^{-1} 红外吸收谱图。如图 5 所示，从下而上的四种胶原蛋白的红外光谱特征吸收峰相似，酸溶性胶原蛋白与酶溶性胶原蛋白在 3400 cm^{-1} 附近均出现明显的吸收峰，其为酰胺 A 带，这是由于 N-H 收缩振动引起，说明肽链之间存在氢键，且其为蛋白质的特殊吸收峰；图中四种胶原蛋白酰胺Ⅰ带吸收峰分别为 1551.75、1605.75、1618.18、1581.54 cm^{-1}，这是由于 C-O 伸缩振动会引起酰胺Ⅰ带(1550~1660 cm^{-1})出现吸收峰，其与蛋白质的二级结构密切相关；四种胶原蛋白分别在 1421.45、1558.39、1504.39、1492.82 cm^{-1} 处出现吸收峰，其值在酰胺Ⅱ带的特征吸收峰 1400~1600 cm^{-1} 范围内，酰胺Ⅱ带与蛋白质的 C-N 收缩振动和 N-H 弯曲振动有关；此外，还与甘氨酸骨链及脯氨酸侧链的-CH2 摆动引起的振动有关[3]，从而使得胶原蛋白在 1400~1500 cm^{-1} 存在复杂的吸收峰；四种胶原蛋白分别在 1317.30、1300.82、1213.12、1323.09cm^{-1} 出现酰胺Ⅲ带的特征吸收峰，可能是侧链基团会出现多种类型的变形振动造成的。因此，红外光谱表明四种胶原蛋白二级结构保留完整，间接说明了所提的胶原蛋白保留完整。本研究结果与 Gao 等[29]对羊骨胶原蛋白结构，Maria 等[30]对罗非鱼皮，Ali 等[31]对金鱼皮的研究结果一

致，酶法和酸法提取均可以保留胶原蛋白的三股螺旋结构。牛骨胶原蛋白的吸收峰由酰胺 A、B 和酰胺Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ组成。

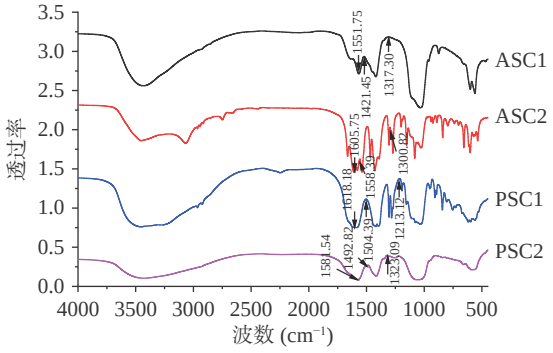


图 5　不同提取方法下胶原蛋白的红外光谱

Fig.5　Infrared Spectra of collagen under different extraction methods

2.6　扫描电镜分析

不同提取方法下得到牛骨胶原蛋白扫描电镜结果如图 6。由图 6 可知，提取方法显著影响胶原蛋白的结构（P<0.05）。酸溶性胶原蛋白较为松散，呈现出纤维状缠绕状态。ASC1、ASC2 分布均匀，具有多孔的网络结构。胶原蛋白在提取过程中，通过氢键和疏水作用等形成纤维状[32]，不同的作用力导致胶原蛋白之间孔径大小不同，外部特征等都存在一定的差异。

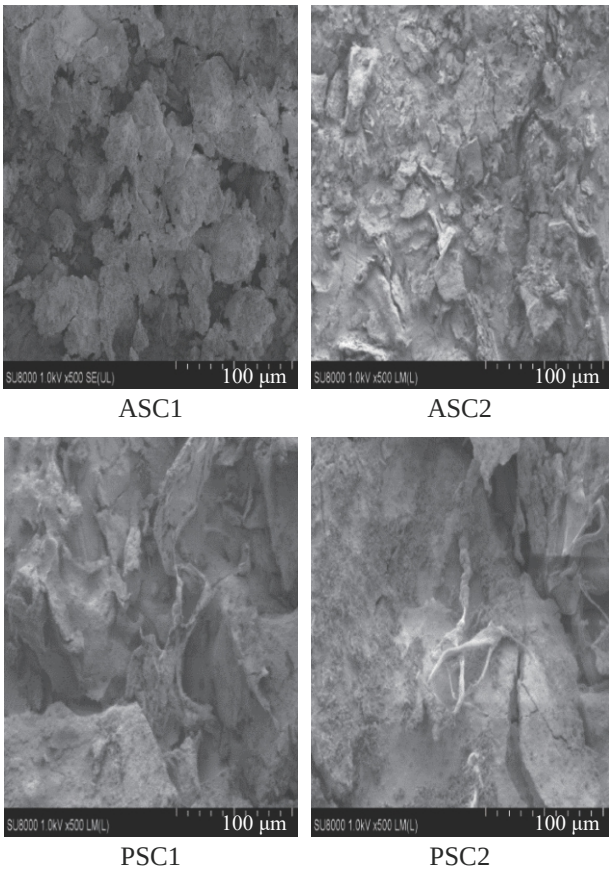


图 6　不同提取方法下胶原蛋白的扫描电镜图

Fig.6　Scanning electron microscope images of collagen under different extraction methods

酸法提取过程中胶原蛋白本身的空间结构没有被破坏，而 PSC1、PSC2 的扫描电镜结果表明酶对胶原蛋白的结构有一定的影响，但其网状结构仍然得到保留，纤维化相较明显。王杉杉等[33] 采用不同的提取方法提取牦牛皮胶原蛋白并进行电镜扫描发现，胶原蛋白的结构和形貌存在显著差异，Li 等[34] 对中华绒螯甲壳组织胶原蛋白电镜扫描后，结果表明酸法提取的胶原蛋白表现出更松散更多孔的网状结构，本研究结果与上述研究一致。通过对 ASC1、ASC2 和 PSC1、PSC2 的电镜扫描结果进行分析可知，胶原蛋白的提取方法不同，其形状结构也截然不同。综合紫外可见光谱、红外光谱、SDS-PAGE 和扫描电子显微镜结果表明，酸法和酶法所提取的蛋白质均保留了其特有的结构。

3　结论

本研究以牛骨为研究对象，采用不同提取方法分别得到胶原蛋白 ASC1、ASC1、PSC1 和 PSC2，并对其性质进行比较分析，结果表明 PSC1（乙酸和胃蛋白酶）得率可达 3.23%，四种胶原蛋白均由 β（约 250 kDa）、α_1（约 135 kDa）、α_2（约 130 kDa）三种亚基构成，为典型的Ⅰ型胶原蛋白，空间结构也均保留完整；然而，酸法制备的胶原蛋白表现出更松散、更多孔的网状结构，而酶法提取的胶原蛋白的网状结构保留更完整，纤维化更明显。本研究为牛骨胶原蛋白的结构特性研究提供了一定的理论基础，为牛骨胶原蛋白的高值化利用提供了理论依据。但大规模、短时间提取和生产牛骨胶原蛋白的最佳工艺和过程控制条件仍需继续探讨，牛骨胶原蛋白的工业化制备及应用仍需深入探究。

参考文献

[1] 张露娟. 畜禽骨的综合利用研究现状与发展趋势[J]. 现代食品，2021(3)：86−90,94. [ZHANG Lujuan. Research status and development trend of comprehensive utilization of livestock and poultry bones[J]. Modern Food, 2021(3)：86−90,94.]

[2] 沈晓丽，闫明俞，耿文宁，等. 骨胶原蛋白肽粉中 DNA 的提取及实时荧光 PCR 法检测其中的猪、羊源性成分 [C]//中国药理学会药检药理专业委员会第十六届 (2019 年) 学术年会论文集，2019: 405−412. [SHEN Xiaoli, YAN Mingyu, GENG Wenning, et al. DNA extraction of bone collagen peptide powder and porcine & ovine derived components detecting with real-time fluorescence PCR. [C]//Proceedings of the 16th Annual Conference of Drug Testing Pharmacology Committee, Chinese Pharmacological Society (2019), 2019: 405−412.]

[3] 吴婷. 牦牛骨胶原蛋白提取纯化及结构解析 [D]. 兰州：甘肃农业大学，2017. [WU Ting. Study on the extraction, purifiation and structure analysis of collagen from yak bone[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2017.]

[4] SONG Z L, LIU H M, CHEN L W, et al. Characterization and comparison of collagen extracted from the skin of the *Nile tilapia* by fermentation and chemical pretreatment[J]. Food Chemistry, 2021, 340: 128139.

[5] 周婷, 杨恒, 王鑫, 等. 酶解技术提取动物组织中的胶原蛋白及其肽的研究进展[J]. 食品工业科技, 2020, 41(15): 332−338. [ZHOU Ting, YANG Heng, WANG Xin, et al. Advances in extraction of collagen and its peptides from animal tissues by enzymatic hydrolysis[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(15): 332−338.]

[6] 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 Songfeng, et al. Research progress on preparation and biological activity of bovine bone collagen peptides[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(15): 357−364.]

[7] 公维洁, 卓先勤, 许环浪. 响应面优化超声波辅助提取马面鱼皮胶原蛋白工艺研究[J]. 食品工业, 2018, 39(7): 92−96. [GONG Weijie, ZHUO Xianqin, XU Huanlang. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of collagen from navodon septentionalis skin by response surface methodology[J]. The Food Industry, 2018, 39(7): 92−96.]

[8] 秦娜娜. 马骨胶原蛋白肽粉及苹果酸钙制备工艺研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2013. [QIN Nana. Preparation of collagen peptide powder and calcium malate horse bones[D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2013.]

[9] 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. Antioxidant activity and amino acid composition of collagen peptide in sheep bone[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2019.]

[10] GB 5009.3-2016 食品安全国家标准 食品中钙的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. [GB 5009.3-2016 食品安全国家标准 食品中钙的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. [GB 5009.3-2016 National Food Safety Standard-Determination of calcium in foods[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.]

[11] SHAIK M I, CHONG JIA Y, SARBON N M. Effect of ultrasound-assisted extraction on the extractability and physicochemical properties of acid and pepsin soluble collagen derived from Sharpnose stingray (*Dasyatis zugei*) skin[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2021: 38.

[12] 刘丽莉, 马美湖, 杨协力. 牛骨Ⅰ型胶原蛋白提取及结构表征[J]. 食品科学, 2010, 31(2): 87−91. [LIU Lili, MA Meihu, YANG Xieli. Extraction and characterization of type Ⅰ collagen from bovine bone[J]. Food Science, 2010, 31(2): 87−91.]

[13] 李秋雨, 刘红梅, 李彦, 等. 鱼鳞胶原蛋白提取残渣中角蛋白的回收与表征[J]. 食品工业科技, 2021, 42(9): 179−185. [LI Qiuyu, LIU Hongmei, LI Yan, et al. Recovery and characterization of keratin from fish scale collagen extraction residue[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(9): 179−185.]

[14] 贾伟. 牛骨营养品质评价与牦牛骨胶原蛋白肽功效研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2017. [JIA Wei. The study of bovine bone nutritional quality assessment and yak (bos grunniens) bone collagen peptide function[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2017.]

[15] 杨平, 刘影, 公丽艳, 等. 酸法和酶法提取草鱼鱼鳞胶原蛋白的特性分析[J]. 食品工业, 2018, 39(7): 129−132. [YANG Ping, LIU Ying, GONG Liyan, et al. Comparative analysis of collagen extracted from grass carp fish scale using acid and enzyme methods[J]. The Food Industry, 2018, 39(7): 129−132.]

[16] 蔡路昀, 史航, 曹爱玲, 等. 鲽鱼骨胶原蛋白的结构及流变学特性[J]. 中国食品学报, 2020, 20(3): 66−73. [CAI Luyun, SHI Hang, CAO Ailing, et al. The structure and rheological characteristics of collagen from flounder bone[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(3): 66−73.]

[17] 呼和木其尔. 羊软骨胶原蛋白水解物抗氧化特性及其应用研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2016. [HU Hemuqier. Study on antioxidant characteristics and application of sheep cartilage collagen hydroly sates[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2016.]

[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. Comparative analysis of collagen extracted from yak bones using acidic and enzymatic treatment[J]. Food Science, 2018, 39(12): 101−106.]

[19] 胡建平. 鱼鳞胶原蛋白的酸法提取及性质研究[J]. 粮食科技与经济, 2012, 37(3): 56−60. [HU Jianping. Extraction and properties on scale collagen[J]. Grain Science and Technology and Economy, 2012, 37(3): 56−60.]

[20] 叶孟亮. 牦牛骨胶原蛋白肽抗骨质疏松作用机制研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2019. [YE Mengliang. Study on the underlying mechanism of anti-osteoporosis of yak (bos grunniens) bone collagen peptides[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2019.]

[21] 何兰. 牛骨胶原蛋白的提取及复合海绵的制备研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2012. [HE Lan. Study on extract of bovine bone collagen and preparation of composite sponge[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2012.]

[22] MADHURI VBHUIMBAR, PRASHANT K BHAGWAT, PADMA B DANDGE. 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] CHEN S J, HONG Z, WEN H M, et al. Compositional and structural characteristics of pepsin-soluble type I collagen from the scales of red drum fish, *Sciaenops ocellatus*[J]. Food Hydrocolloids, 2021: 123.

[24] GOKULA K S A, DIKSHA S, RAJ M B, et al. Extraction, optimization and characterization of collagen from sole fish skin[J]. Sustainable Chemistry and Pharmacy, 2018, 9: 19−26.

[25] AIAH A, AHMED G, ABD E G, et al. Chemical and biological evaluation of Egyptian Nile Tilapia (*Oreochromis niloticas*) fish scale collagen[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 79: 618−626.

[26] TAN Y Q, SAM K C CHANG. Isolation and characterization of collagen extracted from channel catfish (*Ictalurus punctatus*) skin[J]. Food Chemistry, 2018, 242: 147−155.

[27] 贾娜, 王乐田, 马露, 等. 香辛料提取物对猪肉肌原纤维蛋白功能性质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(2): 82−88. [JIA Na, WANG Letian, MA Lu, et al. Effect of spice extracts on functional properties of myofibrillar protein in minced pork[J].

Food and Fermentation Industries, 2016, 42(2): 82−88.］

［28］ 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.［WANG Liyu, XIA Yangyi, ZHAO Luan. Study on the effect of processing temperatures on the structure of tripe collagen[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 56-62.］

［29］ GAO L L, WANG Z Y, ZHENG L, et al. The characterization of acid and Pepsin soluble collagen from ovine bones (Ujumuqin sheep)[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2018, 17(3): 704−711.

［30］ MARIA D L. L R M, HÁLISSON L R, FLÁVIA D O M, et al. Optimization of the collagen extraction from Nile tilapia skin (*Oreochromis niloticus*) and its hydrogel with hyaluronic acid[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2020, 189: 110852.

［31］ ALI M M A, HIDEKI K, SOOTTAWAT B. Extraction efficiency and characteristics of acid and pepsin soluble collagens from the skin of golden carp (*Probarbus jullieni*) as affected by ultrasonication[J]. Process Biochemistry, 2018, 66: 237−244.

［32］ 高玲玲. 羊骨胶原蛋白结构解析、热稳定性与成膜应用研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2017.［GAO Lingling. Study on structure characteristics and film-forming properties of sheep bones collagen[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2017.］

［33］ 王杉杉. 牦牛皮胶原蛋白的提取及其活性肽的制备 [D]. 重庆: 西南科技大学, 2018.［WANG Shanshan. Extracted collagen protein and collagen peptide preparation from the yak skin[D]. Chongqing: Southwest University of Science and Technology, 2018.］

［34］ LI C Y, SONG W, WU J P, LU M N, et al. Thermal stable characteristics of acid- and pepsin-soluble collagens from the carapace tissue of Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*)[J]. Tissue and Cell, 2020: 67.

苏靖程，李晗，范方宇. 无籽刺梨渣膳食纤维的羧甲基化改性及性质 [J]. 食品工业科技，2022, 43(14)：34−42. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090305

SU Jingcheng, LI Han, FAN Fangyu. Carboxymethylation Modification and Properties of Dietary Fiber from *Rosa sterilis* Pomace[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 34−42. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090305

·研究与探讨·

无籽刺梨渣膳食纤维的羧甲基化改性及性质

苏靖程，李　晗，范方宇*

（西南林业大学生命科学学院，云南昆明 650224）

摘　要：为探究羧甲基化改性对无籽刺梨渣膳食纤维性质的影响，本文采用羧甲基化法改性无籽刺梨渣可溶性膳食纤维（*Rosa sterilis* Soluble Dietary Fiber，RSDF）和不溶性膳食纤维（*Rosa sterilis* Insoluble Dietary Fiber，RIDF），对比分析了无籽刺梨渣膳食纤维改性前后以及羧甲基化总膳食纤维（Carboxymethylated Total Dietary Fiber，CTDF）不同混合比例的理化和功能性质。结果表明：改性后，羧甲基化可溶性膳食纤维（Carboxymethylation Soluble Dietary Fiber，CSDF）、羧甲基化不溶性膳食纤维（Carboxymethylation Insoluble Dietary Fiber，CIDF）膨胀力、持水力、持油力、吸湿性、阳离子交换力、亚硝酸盐吸附力和葡萄糖吸附力均显著增大（P<0.05），CSDF/CIDF 混合比例 1∶3 时取代度为 0.53±0.02，综合理化、功能性质为最优混合比例。红外光谱分析可知 CSDF、CIDF 羧甲基化修饰成功；电镜扫描分析可知两种膳食纤维结构疏松、存在大量褶皱和片状物质，CSDF/CIDF 混合比例 1∶3 时孔洞和片状结构更多；差示扫描热分析可知改性后，CSDF、CIDF 贮藏稳定性均提高，CSDF/CIDF 混合比例 1∶3 热熔解温度最高为 145 ℃。综上，羧甲基改性后，无籽刺梨膳食纤维性能均优于改性前且综合各项性能后，CSDF/CIDF 混合比例 1∶3 为最佳混合比。

关键词：无籽刺梨，膳食纤维，羧甲基化，改性，性质

中图分类号：TS209　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1002−0306(2022)14−0034−09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090305

本文网刊：

Carboxymethylation Modification and Properties of Dietary Fiber from *Rosa sterilis* Pomace

SU Jingcheng，LI Han，FAN Fangyu*

（College of Life Science, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China）

Abstract: In order to explore the effect of carboxymethylation on *Rosa sterilis* pomace dietary fiber, the soluble dietary fiber (RSDF) and insoluble dietary fiber (RIDF) of *Rosa sterilis* pomace were modified by carboxymethylation in this paper. And the physicochemical, functional properties of carboxymethylated total dietary fiber and after the carboxymethylation modification of *Rosa sterilis* pomace dietary fiber were compared and analyzed. The results showed that after modification, the swelling capacity, water holding capacity, oil holding capacity, moisture absorption, cation exchange capacity, nitrite adsorption capacity and glucose adsorption capacity of CSDF and CIDF increased significantly (P<0.05). When the degree of substitution was 0.53±0.02, the mixing ratio of CSDF/CIDF was 1∶3. The optimum mixture ratio was obtained by combining physicochemical and functional properties. FTIR analysis showed that the carboxymethylation of CSDF and CIDF was successful. SEM analysis showed that CSDF and CIDF loose structures, there were more holes and flake structures when the CSDF/CIDF mixing ratio was 1∶3. DSC analysis showed that the storage stability of CSDF and CIDF improved after modification. When the mixing ratio of CSDF/CIDF was 1∶3, the maximum hot melting temperature was 145 ℃. In summary, after carboxymethylation, the properties of *Rosa sterilis* dietary fiber were better than before and after integrating various performances, the best CTDF mixing ratio was 1∶3.

Key words: *Rosa sterilis*; dietary fiber; carboxymethylation; modification; properties

收稿日期：2021−09−26

基金项目：西南林业大学科研启动基金；云南省“万人计划”青年拔尖人才专项资助（YNWR-QNBJ-2018-046）。

作者简介：苏靖程（1997−），男，硕士研究生，研究方向：食品加工，E-mail: 601117399@qq.com。

*** 通信作者：**范方宇（1979−），男，博士，教授，研究方向：农林食品加工与综合利用，E-mail: ffy118@163.com。

无籽刺梨（*Rosa sterilis*）为蔷薇科蔷薇属落叶灌木植物，具有重要的药用价值与食用价值，含丰富的黄酮、维生素 C、超氧化物歧化酶等营养物质[1−2]。但无籽刺梨加工过程会产生 40%~50% 的果渣，大部分果渣被当作废弃物丢弃，造成严重的资源浪费和环境污染，如何利用无籽刺梨残渣是无籽刺梨加工产业的一项重要课题。无籽刺梨残渣中的膳食纤维（Dietary Fiber, DF）含量高，在食品和医药领域具有很好的应用价值，可降低机体低密度脂蛋白胆固醇含量[3]。高活性 DF 更活跃，在功能性质方面有更好的应用，摄入高活性 DF 对肥胖症、高血压、高血脂等疾病有预防和治疗作用[4]。目前传统方法提取的 DF 活性不高，因此本文采用化学改性中的羧甲基化修饰增强 DF 活性，以提高膳食纤维生物活性使其应用范围更广，其中，化学改性引入基团修饰 DF 结构，改善 DF 性能，以及能提高生物活性的优点使其成为研究热点。羧甲基化修饰是将 DF 置于碱性环境发生溶胀，再与一氯乙酸发生醚化反应，将羧甲基基团引入 DF 的一种分子修饰方法，该法能有效改善 DF 的生物活性[5]。

不同比例的可溶/不溶性膳食纤维也优于单独成分，如曾荣妹等[6] 报道了刺梨中 SDF 含量约为 IDF 的 1/2。而研究普遍认为，可溶性膳食纤维（Soluble Dietary Fiber, SDF）与不溶性膳食纤维（Insoluble Dietary Fiber, IDF）混合后，SDF/IDF 比值接近 1:2 的总膳食纤维（Total Dietary Fiber, TDF）可作为良好的功能性食品添加剂使用。化学改性 DF 在原有基础上各项性质均有提高，混合后的羧甲基膳食纤维预期可以获得良好的性能，目前尚未见此方面的研究。

基于此，本研究以无籽刺梨残渣为原料制备了羧甲基化可溶性膳食纤维（Carboxymethylation Soluble Dietary Fiber, CSDF）和羧甲基化不溶性膳食纤维(Carboxymethylation Insoluble Dietary Fiber, CIDF)，并将 CSDF 与 CIDF 按照不同比例混合，研究改性前后与改性后不同混合比例性能差异，旨在为无籽刺梨渣膳食纤维功能化提供参考依据。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

无籽刺梨　产自云南昆明阿子营；无水乙醇、亚硝酸钠　天津市致远化学试剂有限公司；氢氧化钠、冰醋酸、盐酸、硫酸　云南杨林工业开发区汕滇药业有限公司；葡萄糖　天津市鼎盛鑫化工有限公司；以上试剂均为分析纯。

UV-2600 型紫外可见分光光度计　日本岛津仪器有限公司；5804R 型台式冷冻离心机　德国艾本德股份公司；Brookfield 型旋转式黏度计　美国博勒菲公司；TM-3000 型扫描电镜　日本日立高新技术公司；IR Prestige-21 型傅立叶变换红外光谱仪　日本岛津仪器公司；200F3 型差示扫描量热仪　德国耐驰仪器制造有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　无籽刺梨渣膳食纤维制备　参考李晗等[7] 方法制备无籽刺梨可溶性膳食纤维（*Rosa sterilis* Soluble Dietary Fiber, RSDF）和无籽刺梨不溶性膳食纤维（*Rosa sterilis* Insoluble Dietary Fiber, RIDF）。

1.2.2　无籽刺梨渣膳食纤维羧甲基化改性条件　参照文献 [8] 制备羧甲基化无籽刺梨可溶/不溶性膳食纤维，略有修改。其中 CSDF 羧甲基化改性工艺条件：乙醇浓度 55%、NaOH 浓度 15%、碱化时间 80 min、一氯乙酸浓度 10%、醚化温度 60 ℃、醚化时间 2.5 h，其取代度为 0.60±0.02；CIDF 羧甲基化改性工艺条件：乙醇浓度 35%、NaOH 浓度 20%、碱化时间 60 min、一氯乙酸浓度 25%、醚化温度 80 ℃、醚化时间 2.5 h，取代度为 0.53±0.02。

1.2.3　羧甲基取代度测定　参照江连洲等[9] 方法测定。称取 0.300 g 羧甲基化样品于 150 mL 锥形瓶，加入 2 mol/L 的 HCl 溶液 50 mL，37 ℃、120 r/min 振荡 3 h 后过滤。70% 甲醇溶液洗涤至无 Cl^- 离子（滴加 $AgNO_3$ 检测滤液）。将样品溶于 50 mL 0.5 mol/L 的 NaOH 溶液，沸水浴至溶液变透明，加入两滴酚酞（10 g/L）为指示剂后，立即用 0.1 mol/L HCl 标准溶液滴定剩余 NaOH，红色刚好褪去为滴定终点，按式（1）和式（2）计算羧甲基取代度：

$$D_S = \frac{0.162X}{1-0.058X} \qquad 式（1）$$

$$X = C_{NaOH}V_{NaOH} - C_{HCl}V_{HCl} \qquad 式（2）$$

式中：D_S 为样品羧甲基取代度；X 为每克羧甲基膳食纤维所需 HCl 摩尔数；C_{NaOH} 为 NaOH 溶液浓度，0.5 mol/L；V_{NaOH} 为 NaOH 溶液体积，50 mL；C_{HCl} 为 HCl 溶液浓度，0.1 mol/L；V_{HCl} 为滴定用 HCl 溶液体积，mL。

1.2.4　理化性质测定　对 RSDF、RIDF、CSDF、CIDF、$RTDF_{1/2}$、$CTDF_{1/1}$、$CTDF_{1/2}$、$CTDF_{1/3}$、$CTDF_{1/4}$、$CTDF_{1/5}$ 理化性质及结构表征进行测定和对比分析。其中 $RTDF_{1/2}$ 指可溶性膳食纤维与不溶性膳食纤维的混合物，$CTDF_{1/2}$ 为羧甲基化可溶/不溶性膳食纤维的混合物，下标为两者的比例 1:2。

1.2.4.1　膨胀力　参照 Rodríguez-Gutiérre 等[10] 方法测定。取 0.300 g（m_1）样品于 10 mL 量筒中，读取体积 V_1，加入 8 mL 蒸馏水，振荡均匀，室温静置 12 h，读取样品自由膨胀体积 V_2。按公式（3）计算膨胀力。

$$膨胀力(mL/g) = \frac{V_2 - V_1}{m_1} \qquad 式（3）$$

1.2.4.2　持水力/持油力　参照 Zhang 等[11] 方法测定。取 0.300 g（m_1）样品于 50 mL 离心管中，加入 8 mL 蒸馏水/植物油，振荡，室温静置 12 h，5000 r/min 离心 10 min，弃上清液/上层油，称取剩余残渣质量（m_2）。按式（4）计算持水力/持油力。

$$持水力/持油力(g/g)=\frac{m_2-m_1}{m_1} \quad 式（4）$$

1.2.4.3 溶解性 参照 Cheng 等[12]方法测定。取 0.300 g(m_1)样品于 100 mL 烧杯中，加入 30 mL 蒸馏水，搅拌，75 ℃ 水浴 1 h，5500 r/min 离心 15 min，收集上清液，105 ℃ 烘箱干燥至恒重，称取残留物质量(m_3)。按式(5)计算溶解性。

$$溶解性(\%)=\frac{m_3}{m_1}\times 100 \quad 式（5）$$

1.2.4.4 黏度 称取一定量样品，配制质量分数 2% 的悬浊液，1500 r/min，25 ℃ 搅拌 1 h 后用旋转式黏度计测定黏度。

1.2.4.5 吸湿性 参照龚卫华等[13]方法测定。将一定量的干燥样品置于恒重的称量皿中，称重(m_4)，放入温度 25 ℃、相对湿度 75% 的恒温培养箱中，每隔 1 h 对样品(m_5)进行称重。按公式(6)计算吸湿率。

$$吸湿率(\%)=\frac{m_5-m_4}{m_4}\times 100 \quad 式（6）$$

参照陶建明等[14]方法，对样品吸湿率进行二项式回归拟合得吸湿方程式(7)。对方程进行一阶求导得吸湿速率方程式(8)。初始吸湿速率 $r_{(0)}$=b；r=0 时达到吸湿平衡，由式(8)得吸湿平衡时间，由式(7)得最大平衡吸湿率。

$$W=at^2+bt+c \quad 式（7）$$

$$r=\frac{dW}{dt}=2at+b \quad 式（8）$$

式中：W 为吸湿率，%；t 为时间，h；r 为 t 时刻的吸湿速率，g/h；a、b、c 为吸湿常数。

1.2.4.6 阳离子交换力 参照齐慧等[15]方法测定。称取 0.500 g(m)样品于 150 mL 锥形瓶中，加入 0.1 mol/L 的 HCl 溶液 20 mL，混匀，4 ℃ 环境静置过夜。用 0.2 mol/L 的 NaOH 溶液(V_3)滴定，同时做试剂空白(V_0)。记录滴定时溶液 pH 随 NaOH 溶液体积消耗产生的变化，作 V_{NaOH}–pH 关系图。按式(9)计算阳离子交换力。

$$阳离子交换力(mmol/g)=\frac{(V_3-V_0)\times C_{NaOH}}{m} \quad 式（9）$$

1.2.4.7 亚硝酸盐吸附力 参照 GB 5009.33-2016《食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定》中分光光度法测定，略有修改。称取 0.400 g 样品于 150 mL 锥形瓶中，加入 200 μg/mL 的 $NaNO_2$ 溶液 50 mL。以 1 mol/L 的 HCl 和 0.1 mol/L 的 NaOH 分别调 pH 至 2.0 和 7.0(模拟胃环境与小肠环境)，混匀。37 ℃、120 r/min 振荡吸附 120 min，过滤。取 0.1 mL 滤液于具塞刻度试管中，加入 1 mL 的 0.4% 对氨基苯磺酸溶液，混匀，静置 5 min 后加入 0.2% 的盐酸萘乙二胺溶液 0.5 mL，加蒸馏水至刻度，混匀，静置 15 min。波长 538 nm 处测吸光度，由标准曲线 y=0.0278x+0.0021，R^2=0.9997，吸光值为纵坐标，NO_2^-含量(mg)为横坐标计算 NO_2^-含量，按式(10)计算 NO_2^-吸附力[12]。

$$NO_2^-吸附力(mg/g)=\frac{吸附前NO_2^-含量(mg)-吸附后NO_2^-含量(mg)}{样品质量(g)} \quad 式（10）$$

1.2.4.8 葡萄糖吸附力 采用蒽酮比色法[16]测定。称取 0.500 g 样品于 150 mL 锥形瓶中，加入 1 mg/mL 的葡萄糖溶液 50 mL，混匀。37 ℃、120 r/min 振荡吸附 6 h，过滤。取 0.1 mL 滤液于具塞刻度试管中，加蒸馏水至 2 mL，混匀后加入 6 mL 蒽酮-硫酸溶液(0.100 g 蒽酮用 80% 硫酸溶解，并定容至 100 mL 棕色瓶)，混匀，沸水浴 15 min，冷却至室温。波长 625 nm 处测定吸光度，由标准曲线 y=0.0052x–0.0101，R^2=0.9998。吸光值为纵坐标，葡萄糖含量(mg)为横坐标计算得滤液中葡萄糖含量。按公式(11)计算葡萄糖吸附力。

$$葡萄糖吸附力(mg/g)=\frac{吸附前葡萄糖含量(mg)-吸附后葡萄糖含量(mg)}{样品质量(g)} \quad 式（11）$$

1.2.5 结构表征

1.2.5.1 傅里叶红外光谱(Fourier Transform Infrared，FTIR)分析 采用溴化钾压片法[9]，扫描范围 4000~500 cm^{-1}。

1.2.5.2 扫描电镜(Scanning Electron Microscopy，SEM)分析 采用扫描电镜对样品的显微结构进行分析，用 5000 倍放大的 15.0 kV 加速电压对样品进行检测。

1.2.5.3 差示扫描量热法(Differential Scanning Calorimetry，DSC)分析 参考龚卫华等[13]方法，称取 5~10 mg 样品于铝制坩埚中，以空坩埚为空白对照，扫描温度范围 35~250 °C，升温速度 10 °C/min，氮气流速 20 mL/min。

1.3 数据处理

每组试验重复 3 次，结果以(平均值±标准差)表示。采用软件 SPSS 20.0 进行 Tukey 显著性检验，软件 Origin 2018 作图。

2 结果与分析

2.1 羧甲基化无籽刺梨渣膳食纤维性质

由表 1 可知，CSDF 的膨胀力、持水力、持油力较改性前分别显著提高了 8.15、4.74、0.69 倍(P<0.05)，CIDF 则分别显著提高了 14.64、4.75、0.82 倍(P<0.05)。与 Park 等[17]报道相符，这与羧甲基亲水功能有关，膨胀力、持水力、持油力的提高可改善膳食纤维功能性质。RSDF、CSDF 溶解性无显著性差别(P>0.05)，因为改性前溶解性已经很高，羧甲基化对溶解性无影响；RIDF 羧甲基化后溶解性提高了 1.25 倍(P<0.05)，与这是由于羧甲基化过程中，不溶

表 1　无籽刺梨渣膳食纤维改性前后的性质

Table 1　Properties of *Rosa sterilis* pomace dietary fiber before and after carboxymethylation modification

样品	膨胀力(mL/g)	持水力(g/g)	持油力(g/g)	溶解性(%)	黏度(mPa·s)
RSDF	3.10±0.23^{a}	3.68±0.23^{b}	2.33±0.08^{a}	89.21±2.26^{f}	29.4±0.85^{cd}
RIDF	1.98±0.14^{a}	2.75±0.11^{a}	2.71±0.10^{b}	10.42±0.88^{a}	20.6±0.85^{a}
$RTDF_{1/2}$	2.76±0.12^{a}	3.25±0.11^{ab}	2.60±0.05^{b}	37.64±3.43^{c}	26.0±2.83^{b}
CSDF	28.37±1.48^{d}	21.14±0.84^{g}	3.94±0.12^{c}	86.01±3.39^{f}	41.4±0.85^{g}
CIDF	30.97±0.68^{e}	15.80±0.18^{c}	4.93±0.15^{f}	23.43±3.03^{b}	27.0±1.41^{bc}
$CTDF_{1/1}$	25.87±0.84^{c}	16.95±0.40^{d}	4.18±0.10^{d}	55.77±0.70^{e}	35.0±1.41^{f}
$CTDF_{1/2}$	30.95±0.46^{e}	19.78±0.57^{f}	4.37±0.07^{d}	44.19±0.01^{d}	33.4±0.85^{ef}
$CTDF_{1/3}$	29.91±0.65^{e}	18.68±0.45^{e}	4.66±0.03^{e}	40.52±0.54^{cd}	31.0±1.41^{de}
$CTDF_{1/4}$	27.69±0.66^{d}	17.64±0.33^{d}	4.85±0.14^{ef}	38.21±0.65^{c}	29.0±1.41^{cd}
$CTDF_{1/5}$	23.89±0.70^{b}	15.51±0.35^{c}	4.78±0.18^{ef}	38.14±0.28^{c}	27.6±0.57^{bc}

注：同列间不同英文字母表示数据差异显著(P<0.05)。

性的部分多糖通过醚化作用，亲水性得到改善，提高了溶解性[11,18]。随 CSDF/CIDF 混合比例增加，CTDF 膨胀力、持水力、持油力均为先增大后减小。$CTDF_{1/2}$ 膨胀力、持水力最高，但与 $CTDF_{1/3}$ 相比仅高了 3.48%(P>0.05)、5.89%(P<0.05)。持油力越高，其油脂、胆固醇、胆酸盐吸附力越好，表中 $CTDF_{1/4}$ 持油力最高，为 4.85±0.14 g/g，但与 $CTDF_{1/3}$ 相差不大(P>0.05)；与 $CTDF_{1/3}$ 相比时溶解性和黏度均下降。要使膳食纤维的功能特性得到综合利用，CSDF/CIDF 混合比例为 1∶2、1∶3 时效果较好。

2.2　羧甲基化无籽刺梨渣膳食纤维吸湿性

图 1、表 2 分别为无籽刺梨渣膳食纤维改性前后的吸湿曲线和吸湿特性。图 1 可见，随时间增加，改性前后的膳食纤维吸湿率均呈先增加后趋于平衡，吸湿速率则随时间增加逐渐减小。图 1(a)中经羧甲基化改性后的 CSDF、CIDF 吸湿率均得到不同程度的提高。这是因羧甲基化过程引入了亲水基团，样品更容易与空气中的水分子结合，增大了吸湿率[19]。

表 2 可知，CSDF、CIDF 初始吸湿速率分别为 2.58、1.77 g/h，较 RSDF、RIDF 分别提高了 1 倍、1.39 倍。根据陶建明等[14]报道，吸湿率能直接影响膳食纤维在环境中的吸潮性能，对功能性质及存放时间造成影响。CTDF 初始吸湿速率、吸湿平衡时间和最大吸湿率随 CSDF/CIDF 比例增加而逐渐减小。与

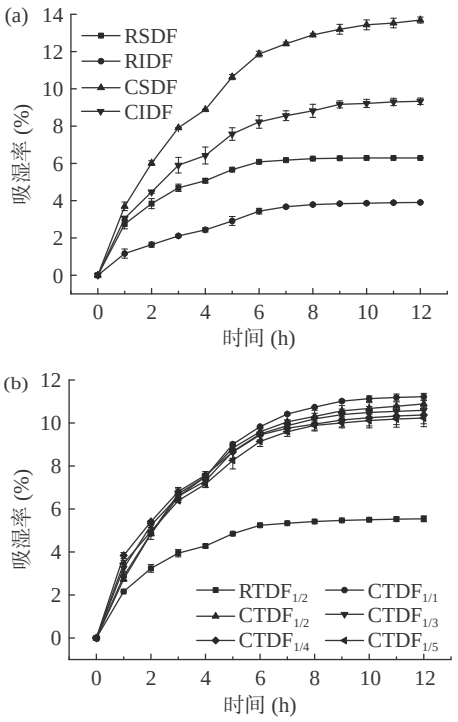


图 1　无籽刺梨渣膳食纤维改性前后的吸湿率

Fig.1　Hygroscopic curve of *Rosa sterilis* pomace dietary fiber before and after carboxymethylation modification

$CTDF_{1/1}$ 相比，CSDF/CIDF 比例 1∶2~1∶5 时，最大吸湿率分别降低了 3.43%、5.36%、7.03%、8.70%。表

表 2　无籽刺梨渣膳食纤维改性前后的吸湿特性

Table 2　Hygroscopic properties of *Rosa sterilis* pomace dietary fiber before and after carboxymethylation modification

样品	吸湿方程	吸湿速率方程	初始吸湿速率(g/h)	平衡时间(h)	最大吸湿率(%)
RSDF	$y=-0.0745x^2+1.2945x+1.0092$	$y=-0.1490x+1.2945$	1.29	8.69	6.63
RIDF	$y=-0.0366x^2+0.7391x+0.2139$	$y=-0.0732x+0.7391$	0.74	10.10	3.95
$RTDF_{1/2}$	$y=-0.0629x^2+1.1198x+0.7728$	$y=-0.1258x+1.1198$	1.12	8.90	5.76
CSDF	$y=-0.1297x^2+2.5813x+0.8549$	$y=-0.2594x+2.5813$	2.58	9.95	13.70
CIDF	$y=-0.0920x^2+1.7730x+0.8873$	$y=-0.1840x+1.7730$	1.77	9.64	9.43
$CTDF_{1/1}$	$y=-0.1136x^2+2.2143x+0.5874$	$y=-0.2272x+2.2143$	2.21	9.75	11.38
$CTDF_{1/2}$	$y=-0.1121x^2+2.1564x+0.6170$	$y=-0.2242x+2.1564$	2.16	9.62	10.99
$CTDF_{1/3}$	$y=-0.1087x^2+2.0707x+0.9068$	$y=-0.2174x+2.0707$	2.07	9.52	10.77
$CTDF_{1/4}$	$y=-0.1080x^2+2.0094x+1.2295$	$y=-0.2160x+2.0094$	2.01	9.30	10.58
$CTDF_{1/5}$	$y=-0.1035x^2+1.9738x+0.9758$	$y=-0.2070x+1.9738$	1.97	9.54	10.39

明吸湿率与 CSDF 含量有关。CSDF 含量减少，能与水分子结合的极性基团数量减少，导致吸湿率下降。

2.3 羧甲基化无籽刺梨渣膳食纤维阳离子交换性质

图 2 为 V_{NaOH}–pH 关系图，图 3 为无籽刺梨渣膳食纤维改性前后阳离子交换力。图 2(a)中，pH 达到 12 后，变化趋于平衡。此时 CSDF、CIDF 阳离子交换力分别为 1.00、0.79 mmol/g，较改性前分别提高了 0.25 倍、0.98 倍。Zhang 等[11]研究发现，羧基和羟基酚基是影响阳离子交换力的主要官能团，能与 Na^+、K^+、Ca^{2+}等发生可逆交换，起到降血压的作用。膳食纤维具有较强的阳离子交换功能，能与肠道中的 Na^+和 K^+进行交换，促进其从尿液和粪便中排出，从而降低血液中的 Na^+/K^+，产生降血压效果。因此，羧甲基含量增加，CSDF、CIDF 的阳离子交换力增强，降血压能力得以提高。

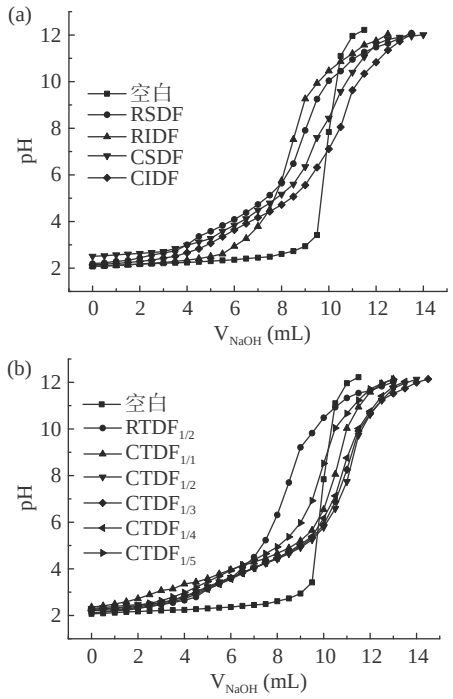


图 2 无籽刺梨渣膳食纤维改性前后的阳离子交换力 V_{NaOH}–pH 关系图

Fig.2 V_{NaOH} – pH relationship between cation exchange capacity of *Rosa sterilis* pomace dietary fiber before and after carboxymethylation modification

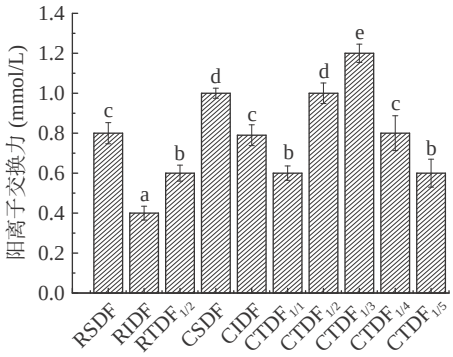


图 3 无籽刺梨渣膳食纤维改性前后的阳离子交换力

Fig.3 Cation exchange capacity of *Rosa sterilis* pomace dietary fiber before and after carboxymethylation modification

注：不同英文字母表示数据差异显著(P<0.05)；图 4~图 5 同。

图 2 与图 3 可见，随 NaOH 体积增加，CSDF、CIDF、$CTDF_{1/1\sim1/5}$ 的 pH 上升速度分别低于 RSDF、RIDF、$RTDF_{1/2}$。CSDF/CIDF 混合比例增加至 1∶3 时，阳离子交换力最大，为 1.20 mmol/g，比 $CTDF_{1/2}$ 高了 20%。表明 CSDF/CIDF 混合比例 1∶3 时，阳离子交换力最好。

2.4 羧甲基化无籽刺梨渣膳食纤维亚硝酸盐吸附性

图 4 为无籽刺梨渣膳食纤维改性前后的 NO_2^-吸附力。据 Song 等[20]报道，膳食纤维的摄入能吸附人体内 NO_2^-，防止过量 NO_2^-损伤人体机能。图 4 可见，模拟胃肠环境中，CSDF、CIDF 的 NO_2^-吸附力均增强。CSDF、CIDF 在胃中的 NO_2^-吸附力分别为 22.33±0.13、20.31±0.12 mg/g，较改性前分别显著提高了 11.09%、12.27%(P<0.05)；CSDF、CIDF 在肠中的 NO_2^-吸附力分别为 8.03±0.14、7.28±0.14 mg/g，较改性前分别显著提高了 56.84%、68.52%(P<0.05)，肠环境 NO_2^-吸附力低于胃，这与 Zheng 等[21]的研究结果类似。这是因肠环境中 pH 高于胃环境，膳食纤维表面负电荷密度更多，与 NO_2^-排斥反应增大。改性后的膳食纤维较改性前具有结构蓬松，孔隙更大和更多的羧甲基基团[12]，该结构特点增强了 CSDF、CIDF 与 NO_2^-之间的作用，提高对 NO_2^-吸附量。图 4(b)可见，随 CSDF/CIDF 混合比例增加至 1∶3，胃肠环境中 CTDF 对 NO_2^-的吸附力增加；比例高于 1∶3 后，吸附力显著下降(P<0.05)。$CTDF_{1/3}$ 的 NO_2^-

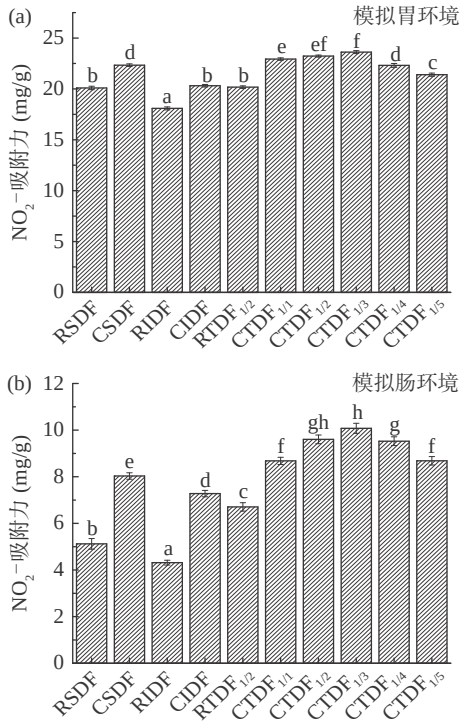


图 4 无籽刺梨渣膳食纤维改性前后的亚硝酸盐吸附力

Fig.4 Nitrite adsorption capacity of *Rosa sterilis* pomace dietary fiber before and after carboxymethylation modification

吸附力最高(P<0.05)，胃中为 23.62±0.15 mg/g，肠中为 10.08±0.22 mg/g。表明 CSDF/CIDF 混合比例 1∶3 时，对 NO_2^-吸附力最好。

2.5　羧甲基化无籽刺梨渣膳食纤维葡萄糖吸附性

图 5 为无籽刺梨渣膳食纤维改性前后的葡萄糖吸附力比较。据 Luo 等[22]报道，膳食纤维对葡萄糖的吸附可有效控制餐后体内血糖水平，间接调控机体脂质代谢过程，对预防和辅助治疗糖尿病具有一定作用。据林良美[16]研究，SDF 与水溶后形成黏膜，延缓小肠对食物中营养成分的吸收速率从而有效降低餐后血糖；IDF 则利用其特殊的网状结构吸附葡萄糖，降低葡萄糖被小肠消化吸收的速度，达到降低血糖的目的，但效果不及 SDF；而 TDF 中包括了 SDF 和 IDF 所具备的功能力，因而 $CTDF_{1/3}$ 的吸附葡萄糖的能力最好。图 5 可见，CSDF、CIDF 葡萄糖吸附力较改性前显著提高(P<0.05)，几种混合比例的 CTDF 吸附力均显著高于 $RTDF_{1/2}$(P<0.05)。表明羧甲基的引入增强了膳食纤维对葡萄糖吸附力。此外，随 CSDF/CIDF 混合比例增加至 1∶3，葡萄糖吸附力显著增加(P<0.05)，为 52.54±0.51 mg/g；其次是 $CTDF_{1/2}$，为 47.59±0.80 mg/g，较 $CTDF_{1/3}$ 显著降低了 9.42%(P<0.05)。混合比例不同，样品结构有差异，对吸附力的影响也不同。CSDF/CIDF 混合比例 1∶3 时，葡萄糖吸附力最好。

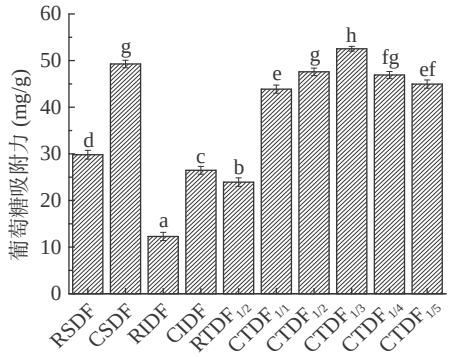


图 5　无籽刺梨渣膳食纤维改性前后的葡萄糖吸附力

Fig.5　Glucose adsorption capacity of *Rosa sterilis* pomace dietary fiber before and after carboxymethylation modification

2.6　FTIR 分析

图 6 为无籽刺梨渣膳食纤维改性前后的红外光谱图。图 6(a)可见，3426 cm^{-1} 处表现出较宽的拉伸强烈特征峰，与 N-H 或 O-H 的伸缩振动有关[23]，CSDF、CIDF 在 3426 cm^{-1} 处峰的强度分别高于 RSDF、RIDF，表明 CSDF 和 CIDF 中-OH 含量更多。2921 cm^{-1} 处是由 C-H 伸缩振动引起的吸收峰，RIDF、CIDF 在此处的峰强分别略高于 RSDF、CSDF，这是因为 RIDF、CIDF 中含有较多木质素、纤维素[24]。1614 cm^{-1} 附近为羧甲基中 C=O 的非对称振动吸收峰，1415 cm^{-1} 处为 C=O 的对称振动吸收峰，1323 cm^{-1} 处为 O-H 的面内变角振动吸收峰[25]。这几个峰是羧甲基的特征吸收峰，图 6(a)中，CSDF、CIDF 在这几个峰的强度明显增大，表明羧甲基基团被成功引入，CSDF、CIDF 羧甲基化成功。图 6(b)可见，CSDF/CIDF 混合比例不同，羧甲基特征吸收峰强度也有所不同。1614 cm^{-1} 处峰强度大小为 $CTDF_{1/2}$>$CTDF_{1/3}$>$CTDF_{1/4}$>$CTDF_{1/1}$>$CTDF_{1/5}$，表明了混合膳食纤维羧甲基取代度的大小。

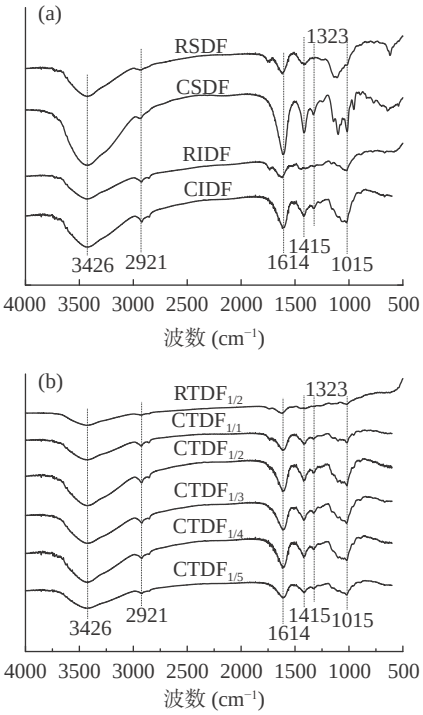


图 6　无籽刺梨渣膳食纤维改性前后的红外光谱图

Fig.6　Infrared spectra of *Rosa sterilis* pomace dietary fiber before and after carboxymethylation modification

2.7　SEM 分析

图 7(a)、图 7(b)、图 7(e)可见，RSDF、RIDF、$RTDF_{1/2}$ 结构紧密，表面较为平整，呈块状分布，颗粒较少。而 CSDF、CIDF 经羧甲基化改性后，其形态结构发生变化，结构变疏松，孔隙变大；表面粗糙且观察到有大量褶皱和片状物质。羧甲基引入 CSDF、CIDF 内部的碱化过程中，纤维素和半纤维素被破坏，引起表观形态发生的变化[26]。图 7(e)~图 7(j)可见，CSDF/CIDF混合比例 1∶2~1∶4 时，CTDF 表面的褶皱、孔洞和片状物质更多，结构完整性被破坏，物质本身孔隙增加，表面积增大，利于吸附，对样品活性和性能产生积极影响[27]。

2.8　DSC 分析

图 8(a)可见，经羧甲基化改性的膳食纤维贮藏稳定性更好。CSDF 热溶解温度较 RSDF 提高了 3.52%，为 147 ℃；CIDF 热溶解温度较 RIDF 提高了 51.43%，为 159 ℃，表明羧甲基的引入提高了热稳定性。这是因为 CSDF、CIDF 中游离的羟基被羧甲基取代[23]，引入羧甲基基团，内部结构发生改变，这与 DSC 分析结果相符。图 8(b)可见，$RTDF_{1/2}$、$CTDF_{1/2}$ 的热溶解温度分别为 123 和 140 ℃，$CTDF_{1/2}$ 比 $RTDF_{1/2}$ 提高了 13.82%。此外，CSDF/CIDF 混合比例为 1∶1~

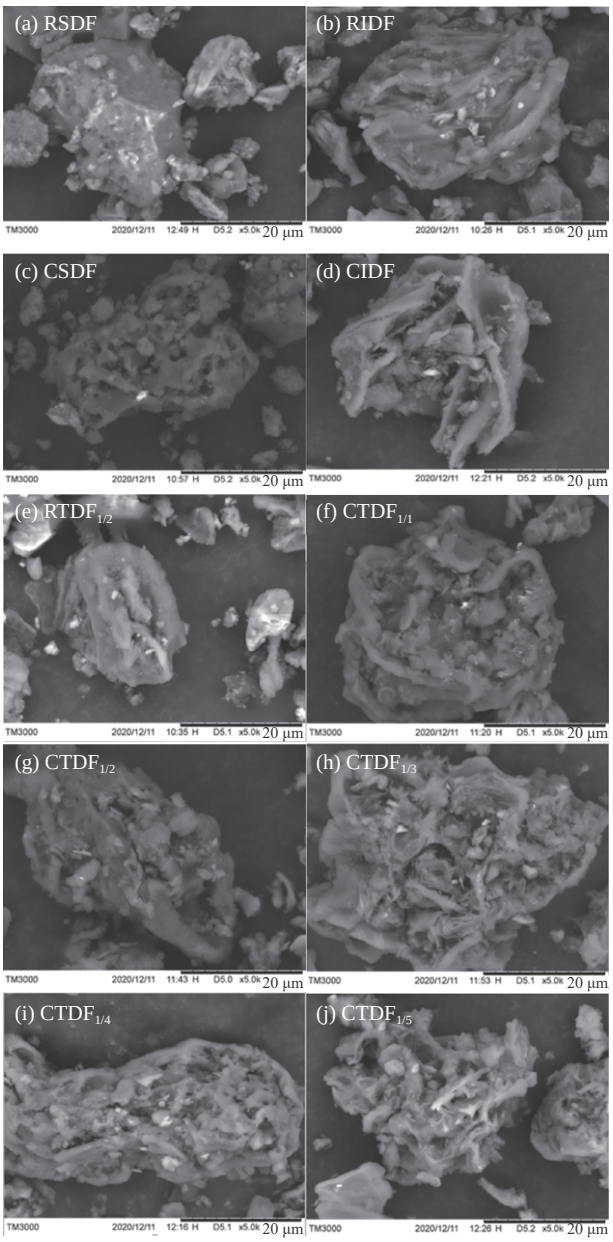


图 7 无籽刺梨渣膳食纤维改性前后的扫描电镜图

Fig.7 SEM micrographs of *Rosa sterilis* pomace dietary fiber before and after carboxymethylation modification

注：(a)~(j)：RSDF、RIDF、CSDF、CIDF、$RTDF_{1/2}$、$CTDF_{1/1}$、$CTDF_{1/2}$、$CTDF_{1/3}$、$CTDF_{1/4}$、$CTDF_{1/5}$。

1∶3 时，CTDF 热溶解温度随混合比例的增加逐渐升高；混合比例 1∶3 时，$CTDF_{1/3}$ 热溶解温度达到最高，为 145 ℃。与 $CTDF_{1/3}$ 相比，$CTDF_{1/4}$ 和 $CTDF_{1/5}$ 热溶解温度分别降低了 12.41%、16.55%。推测这是因 CSDF、CIDF 本身组成结构不同，CSDF 包括了羧甲基化后果胶、寡糖、可溶性半纤维素等物质，CIDF 包括羧甲基后的纤维素、半纤维素和木质素等物质，所以各自发挥的功能存在差异，CSDF/CIDF 按不同比例混合时，对两者产生的协同作用有一定影响，随着 CIDF 量的增加，CSDF 占比逐渐减小，致使热溶解温度在 CSDF/CIDF 比例高于 1∶3 后降低，该现象说明 $CTDF_{1/3}$ 热稳定性最强，贮藏稳定性及应用范围更好。

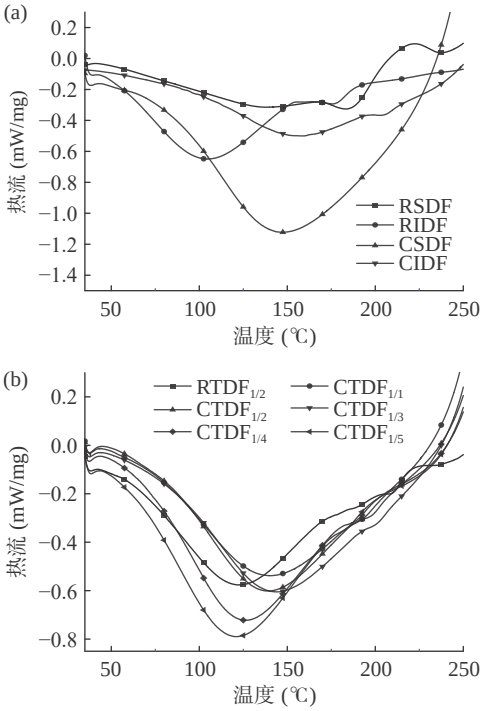


图 8 无籽刺梨渣膳食纤维改性前后的 DSC 曲线

Fig.8 DSC curves of *Rosa sterilis* pomace dietary fiber before and after carboxymethylation modification

3 结论

通过羧甲基法对 RSDF 与 RIDF 改性，研究改性前后及 CTDF 以 1∶1~1∶5 混合比例的性质，主要结论如下：

a.对比改性前，CSDF、CIDF 膨胀力、持水力、持油力、溶解性、黏度、吸湿性均显著提高(P<0.05)。改性后 CSDF、CIDF 阳离子交换力提高了 1.25 倍、1.98 倍。CSDF、CIDF 对 NO_2^-的吸附力在胃中显著提高了 11.09%、12.27%(P<0.05)；在肠环境中对 NO_2^-的吸附力较改性前显著提高了 56.84%、68.52%(P<0.05)。CSDF、CIDF 葡萄糖吸附力较改性前显著提高了 65.28%、115.55%(P<0.05)。由 FTIR 分析可知 CSDF、CIDF 羧甲基化成功，COO⁻基团被成功引入；SEM 分析可见，羧甲基化后，改性后两种膳食纤维均呈现多孔结构、表面粗糙；由 DSC 可知 CSDF、CIDF 热稳定性进一步提高。综上，羧甲基化改性能有效改善膳食纤维的理化性质与功能特性。

b.由 CTDF 混合比例的研究可知，混合比例 1∶3 时发挥的功能作用更好。此时，$CTDF_{1/3}$ 取代度为 0.53±0.02，吸湿率为 10.77%。$CTDF_{1/3}$ 阳离子交换力和葡萄糖吸附力均最高(P<0.05)。$CTDF_{1/3}$ 的 NO_2^-吸附力在胃环境与肠环境中皆为最高(P<0.05)。由 FTIR 分析可知，$CTDF_{1/3}$ 在红外光谱中羧甲基特征峰最为明显，SEM 分析可见，$CTDF_{1/3}$ 结构疏松多孔，有利于吸附的进行，由 DSC 可知 $CTDF_{1/3}$ 热溶解温度最高，为 145 °C，具有较好的热稳定性。综上，要综合发挥改性后混合膳食纤维的功能作用，CSDF/CIDF 混合比例 1∶3 时 CTDF 功能作用能得到最大程度的发挥和利用。

参考文献

[1] XU P, LIU X X, XIONG X W et al. Flavonoids of *Rosa roxburghii* Tratt exhibit anti-apoptosis properties by regulating PARP-1/AIF[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2017, 118(11): 3943−3952.

[2] WU H Y, LI M M, YANG X R, et al. Extraction optimization, physicochemical properties and antioxidant and hypoglycemic activities of polysaccharides from roxburgh rose (*Rosa roxburghii* Tratt.) leaves[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 165: 517−529.

[3] BAYE K, GUYO J P, MOUQUET R C. The unresolved role of dietary fibers on mineral absorption[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2017, 57: 5,949−957.

[4] 黄纪念, 孙强, 王长虹, 等. 羧甲基化法制备高持水力麦麸膳食纤维研究[J]. 中国粮油学报, 2012, 27(6): 94−100. [HUANG J N, SUN Q, WANG C H, et al. Research on the preparation of high water –holding capacity of dietary fiber from wheat bran through carboxymethylation[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2012, 27(6): 94−100.]

[5] RANI D, MUNISH A. Carboxymethylation of *Lepidium sativum* polyuronide, its characterization and evaluation as a nanometric carrier[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 99: 233−240.

[6] 曾荣妹, 刘昕, 蔡倪. 刺梨果渣的加工性能研究及综合利用[J]. 食品工业, 2018, 39(12): 230−234. [ZENG R M, LIU X, CAI N. The processability study and comprehensive utilization of *Rosa roxburghii* pomace[J]. Food Industry, 2018, 39(12): 230−234.]

[7] 李晗, 范方宇, 戚建华, 等. 超声辅助酶法提取无籽刺梨渣膳食纤维及理化性质评价[J]. 食品科技, 2021, 46(4): 194−201. [LI H, FAN F Y, QI J H, et al. Ultrasonic assisted enzymatic extraction of dietary fiber from *Rosa sterilis* pomace and its physicochemical properties[J]. Food Science and Technology, 2021, 46(4): 194−201.]

[8] 罗婷. 苹果渣多糖的羧甲基化修饰及其抗氧化活性研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2019. [LUO T. Carboxymethylated modification and antioxidant activity of apple pomace polysaccharides[D]. Xi'an: Shaanxi University of Science and Technology, 2019.]

[9] 江连洲, 张巧智, 关嘉琦, 等. 羧甲基化大豆水酶法膳食纤维的制备及其性能研究[J]. 农业机械学报, 2017, 48(10): 330−337. [JIANG L Z, ZHANG Q Z, GUAN J Q, et al. Preparation of dietary fiber from enzyme assisted aqueous extraction of soybeans through carboxymethylation and its functional properties[J]. Transactions of the Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2017, 48(10): 330−337.]

[10] RODRIGUEZ G G, RUBIO S F, LAMA M A, et al. Properties of lignin, cellulose, and hemicelluloses isolated from olive cake and olive stones: binding of water, oil, bile acids, and glucose[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(36): 8973−8981.

[11] ZHANG M Y, LIA A M, THAKUR K, et al. Modification of wheat bran insoluble dietary fiber with carboxymethylation, complex enzymatic hydrolysis and ultrafine comminution[J]. Food Chemistry, 2019, 297: 124983.

[12] CHENG L, ZHANG X M, HONG Y, et al. Characterisation of physicochemical and functional properties of soluble dietary fibre from potato pulp obtained by enzyme-assisted extraction[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 101: 1004.

[13] 龚卫华, 胡强, 向卓亚, 等. 麻竹笋壳醋酸木质素结构特性及抗氧化性[J]. 精细化工, 2017, 34(12): 1417−1422. [GONG W H, HU Q, XIANG Z Y, et al. Structural characteristics and antioxidant activities of acetic acid lignin from bamboo shell[J]. Fine Chemicals, 2017, 34(12): 1417−1422.]

[14] 陶建明, 颜才植, 赵国华. 膳食纤维与水的相互作用与其组分和颗粒结构的相关性研究[J]. 食品与机械, 2019, 35(8): 1−9. [TAO J M, YANG C Z, ZHAO G H. Correlation of the water-interacting property of dietary fiber powder with its composition and particle structure[J]. Food & Machinery, 2019, 35(8): 1−9.]

[15] 齐惠, 倪春蕾, 尹园, 等. 不同处理方法对豆渣水溶性膳食纤维结构与功能的影响[J]. 食品工业科技, 2016, 37(11): 62−66. [QI H, NI C L, YIN Y, et al. Effects of treatment methods on structural and characteristics of soluble dietary fiber extracted from soybean dregs[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(11): 62−66.]

[16] 林良美. 笋壳活性膳食纤维的提取及降糖降脂功能特性研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2016. [LIN L M. Extraction, hypoglycemic and hypolipidemic effects of bioactive dietary fiber from bamboo shoot shell[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2016.]

[17] PARK K H, LEE K Y, LEE H G. Chemical composition and physicochemical properties of barley dietary fiber by chemical modification[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 60: 360−365.

[18] CHEIKH R M, ABDELMOUMEN S, THOMAS S, et al. Use of green chemistry methods in the extraction of dietary fibers from cactus rackets (*Opuntia ficus indica*): Structural and microstructural studies[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 116: 901−910.

[19] WANG Y J, XIE Z F, WU Q, et al. Preparation and characterization of carboxymethyl starch from cadmium-contaminated rice[J]. Food Chemistry, 2019, 308(1): 125674.

[20] SONG Y, SU W, MU Y C. Modification of bamboo shoot dietary fiber by extrusion-cellulase technology and its properties[J]. International Journal of Food Properties, 2018, 21(1): 1219−1232.

[21] ZHENG Y J, LI Y, XU J G, et al. Adsorption activity of coconut (*Cocos nucifera* L.) cake dietary fibers: Effect of acidic treatment, cellulase hydrolysis, particle size and pH[J]. Royal Society of Chemistry Advances, 2018, 8(6): 2844−2850.

[22] LUO X L, WANG Q, ZHENG B D, et al. Hydration properties and binding capacities of dietary fibers from bamboo shoot shell and its hypolipidemic effects in mice[J]. Food and Chemical Toxic-

ology, 2017, 109(2): 1003−1009.

[23] BUKZEM A L, SIGNINI R, DOS S D M, et al. Optimization of carboxymethyl chitosan synthesis using response surface methodology and desirability function[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 85: 615−624.

[24] CHEN H H, ZHAO C M, LI J, et al. Effects of extrusion on structural and physicochemical properties of soluble dietary fiber from nodes of lotus root[J]. Food Science and Technology, 2018, 93: 204−211.

[25] 杨阳. 苹果水溶性膳食纤维硫酸酯化改性的研究 [D]. 西安: 陕西科技大学, 2014. [YANG Y. Study on sulfated modification of dietary fiber from apple pomace[D]. Xi'an: Shaanxi University of Science and Technology, 2014.]

[26] 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.

[27] YU G Y, BEI J, ZHAO J, et al. Modification of carrot (*Daucus carota* Linn. var. Sativa Hoffm.) pomace insoluble dietary fiber with complex enzyme method, ultrafine comminution, and high hydrostatic pressure[J]. Food Chemistry, 2018, 257: 333−340.

刘永逸，林华，杨超，等. 不同发酵方式对酸豆角品质和风味的影响 [J]. 食品工业科技，2022, 43(14)：43−51. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090353

LIU Yongyi, LIN Hua, YANG Chao, et al. Effects of Different Fermentation Methods on the Quality and Flavor of Pickled Cowpeas[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 43−51. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090353

· 研究与探讨 ·

不同发酵方式对酸豆角品质和风味的影响

刘永逸[1]，林　华[1]，杨　超[2]，张军蓓[2]，彭帮柱[2,*]

（1.柳州市质量检验检测研究中心，广西柳州 545006；
2.华中农业大学食品科学技术学院，湖北武汉 430070）

摘　要：为了提高酸豆角的品质，本研究以新鲜豆角为原料，采用自然湿法发酵和纯种湿法发酵腌制酸豆角。通过对不同方法腌制过程中 pH、总酸、氨基酸态氮、还原糖和总糖及亚硝酸盐含量进行测定，并对发酵后酸豆角进行质构分析，探究自然湿法发酵和纯种（植物乳杆菌接种量为 0.04 g/kg）湿法发酵对酸豆角品质的影响；结合感官评分和气相色谱-质谱联用（GC-MS）对发酵后酸豆角的风味成分进行解析。结果表明：发酵过程中，纯种湿法发酵酸豆角中 pH、总酸、氨基酸态氮和亚硝酸盐含量均低于自然湿法发酵；还原糖和总糖含量的消耗速率高于自然湿法发酵。发酵后，纯种湿法发酵酸豆角的硬度、脆度及感官评分均优于自然湿法发酵。两种方式腌制的酸豆角中挥发性风味物质较为相近，且酯类、酸类和醇类物质含量较高。与自然湿法发酵相比，纯种湿法发酵酸豆角缩短了发酵周期，降低了亚硝酸含量且最低含量为 0.035 mg/kg，保持了与自然发酵酸豆角相近的风味，该研究为酸豆角的品质优化和风味成分解析提供一定参考价值。

关键词：酸豆角，乳酸菌，发酵，品质优化，风味成分
中图分类号：TS205.2　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1002−0306(2022)14−0043−09
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090353
本文网刊：

Effects of Different Fermentation Methods on the Quality and Flavor of Pickled Cowpeas

LIU Yongyi[1]，LIN Hua[1]，YANG Chao[2]，ZHANG Junbei[2]，PENG Bangzhu[2,*]

（1.Liuzhou Quality Inspection and Testing Research Center, Liuzhou 545006, China；
2.College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China）

Abstract: To enhance the quality of pickled cowpeas, the natural wet fermentation and pure-bred wet fermentation were used to ferment cowpeas in this research, and the fresh cowpea from Liuzhou, Guangxi as raw materials. To explore the effects of natural wet fermentation and wet fermentation with an inoculum of 0.04 g/kg of *Lactobacillus plantarum* on the quality of pickled cowpeas, the pH, total acid, amino acid nitrogen, reducing sugar, total sugar and nitrite content were determined during the curing process of different methods, and the texture analysis of fermented cowpeas was detected. The sensory score and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was used to assess the flavor components of pickled cowpeas. The results indicated that the pH, total acid, amino acid nitrogen and nitrite content of pure-bred wet pickled cowpeas were lower than those of natural wet fermentation during the fermentation process. The consumption rate of reducing sugar and total sugar was higher than that of natural wet fermentation. After fermentation, the hardness, crispness and sensory scores of pure-bred wet fermented cowpeas were higher than those of natural wet pickled cowpeas. The volatile flavors in pickled cowpeas with different fermentation methods were similar, and the content of esters, acids, and alcohols was higher. Compared with natural wet fermentation, the pure-bred wet fermentation shortened the fermentation cycle of cowpeas, and the content of nitrous acid was significantly reduced which was 0.035 mg/kg at minimum. The pure-bred fermented cowpeas maintained the similar flavor with naturally fermented cowpeas. This research would provide a certain

收稿日期：2021−09−30
基金项目：柳州市科技计划重点项目（2019BK10601）。
作者简介：刘永逸（1973−），男，硕士，副主任药师，研究方向：食品药品检测和质量标准研究，E-mail: 1447667562@qq.com。
*** 通信作者：**彭帮柱（1978−），男，博士，教授，研究方向：果蔬加工与品质安全控制，E-mail: bzpeng@mail.hzau.edu.cn。

reference value for the quality optimization and flavor composition analysis of pickled cowpeas.

Key words: pickled cowpeas; *Lactobacillus*; fermentation; quality optimization; flavor composition

豆角是我国夏秋两季盛产的蔬菜，富含蛋白质、维生素和矿物质，具有开胃解腻、益气健脾等功效[1]。受季节性影响，采后如不及时处理易导致其腐烂、褪色等[2]。将豆角腌制处理能保留其原有的营养成分，且发酵后的豆角具有酸香可口、清爽解腻的感官品质，深受大众欢迎。

酸豆角的腌制主要采用自然发酵法和纯种乳酸菌发酵法[3]，不同的发酵条件会影响酸豆角的感官品质和风味成分[4−5]。自然湿法发酵发酵周期较长，其发酵过程是利用豆角表面的微生物，但杂菌的存在不利于乳酸菌的生长；在硝酸还原酶和微生物的作用下，硝酸盐被还原成亚硝酸盐，摄入人体后易形成致癌物亚硝胺[6]，因此需优化腌制条件，降低酸豆角中亚硝酸盐的含量；纯种乳酸菌发酵能缩短发酵周期且减少亚硝酸盐的产生，尚英等[7]通过对比分析不同发酵方式对酸豆角品质的影响，发现纯种湿法发酵酸豆角品质最好且亚硝酸盐含量较低。刘洪等[8]对不同发酵时间的人工接种和自然发酵酸豆角的质地进行测定后发现人工接种酸豆角质地指标变化更快。发酵后的酸豆角具有独特的风味，主要是由于乳酸菌在厌氧条件下发酵作用的结果[9]。Sonmedag 等[10]利用气相色谱-质谱联用、液相色谱-质谱联用对发酵后酸豆角的香气成分和酚类物质进行了检测，发现酸豆角的发酵过程对样品中的中性成分影响较大。王玉玮等[11]采用单因素实验和正交试验确定了雪莲菌发酵酸豆角的最优工艺并检测出 56 种尚未出现在豆角原料中的挥发性风味物质。

为了提高酸豆角的食用安全性，生产低亚硝酸盐的酸豆角，本研究选用实验室保存的植物乳杆菌接种于纯种湿法发酵酸豆角中，与自然湿法发酵酸豆角进行对比分析。通过对酸豆角腌制过程中各项理化指标的检测并结合发酵成品的质构分析，探究不同发酵方式对酸豆角品质的影响；采用气相色谱-质谱联用（GC-MS）解析发酵后酸豆角的风味成分，为规模化和标准化生产品质优良、风味独特的腌制酸豆角提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜无腐烂无虫豆角　广西柳州市前进农贸市场；植物乳杆菌（*Lactobacillus plantarum*）　由柳州市质量检验检测研究中心提供，贮存于华中农业大学食品科学技术学院；食盐　市售；MRS 肉汤、MRS 琼脂　青岛海博生物技术有限公司；硼砂、乙酸锌、亚硝酸钠、氢氧化钠、亚铁氰化钾、盐酸萘乙二胺、对氨基苯磺酸　分析纯，国药集团化学试剂有限公司。

UV-1800 紫外可见分光光度计　日本岛津公司；SPX-250B 生化培养箱　天津市泰斯特仪器有限公司；LDZX-50KBS 高压蒸汽灭菌锅　上海申安医疗器械厂；SW-CJ-1FD 超净工作台　苏州安泰空气技术有限公司；PHS-3C pH 计　上海雷磁仪器厂；TA.XT.Plus 质构仪　英国 Stable Micro System 公司；50/30 μmDVB/CAR/PDMS 固相微萃取纤维头　美国 Supeleo 公司；Agilent 7000D/8890 气相色谱-质谱联用仪　美国 Agilent 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 植物乳杆菌的活化及扩大培养　将实验室保存的植物乳杆菌取一环接种于经 121 ℃ 高压蒸汽灭菌 20 min 后降至室温的 MRS 肉汤培养基中，于 37 ℃ 恒温培养至液体培养基变浑浊。以 2%（v/v）的接种量接种至 100 mL MRS 液体培养基中，扩大培养 22 h。将活化两代的植物乳杆菌接种于 MRS 肉汤培养基中，接种量为 2%，于 37 ℃ 静置培养并每隔 2 h 测定植物乳杆菌在 600 nm 处的吸光值以确定其生长情况[12]。

1.2.2 植物乳杆菌降解亚硝酸盐能力测定　将活化两代的植物乳杆菌按 2% 的接种量接种于含有 150 mg/L $NaNO_2$ 的 50 mL MRS 肉汤培养基中，于 37 ℃ 培养并测定不同时间条件下亚硝酸盐降解率[13]。

亚硝酸盐含量的测定采用盐酸萘乙二胺比色法[14]，标准曲线为 y=1.2002x+0.0076，R^2=0.999。测定样品于 538 nm 处的吸光度值并计算样品中亚硝酸盐的含量，按以下公式计算亚硝酸盐降解率。

$$R(\%) = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100$$

式中：R 表示亚硝酸盐降解率，%；C_0 表示亚硝酸盐含量，mg/kg；C 表示发酵后亚硝酸盐的浓度，mg/kg。

1.2.3 酸豆角的腌制工艺　本实验采取自然湿法发酵和纯种湿法发酵腌制酸豆角。选用产自广西柳州的无虫害新鲜豆角，清洗干净后开水烫漂并晾干水分，将豆角切成长度为 2~3 cm 后装入经开水烫漂并沥干水分的泡菜坛中，将 6% 食盐水煮沸冷却后装入自然湿法发酵坛中，纯种湿法发酵需另加入 0.04 g/kg 活化两代后离心得到的植物乳杆菌菌体[15]，在坛口处加入适量水密封以防止杂菌污染，室温条件下静置发酵 20 d 并每隔 2 d 取样。

1.2.4 酸豆角腌制过程中理化指标的检测　检测腌制过程中各项理化指标的的变化，pH、总酸和氨基酸态氮含量的检测参照现行国标方法[16−17]；还原糖和总糖含量的检测采用直接滴定法[18]；亚硝酸盐含量的检测采用盐酸萘乙二胺比色法[14]。腌制结束后对酸豆

角进行品质分析和感官评定，并解析酸豆角中挥发性风味物质。

1.2.5　酸豆角成品的质地分析　在常温条件下，对发酵 20 d 的酸豆角成品进行质地分析。选取发酵罐内上、中、下部位的三组酸豆角，将其切成 2 cm 段。采用质构仪的穿刺模式对酸豆角无籽部位进行硬度和脆度检测，选择 P/2N-2 mm 不锈钢针形探头，设置测前速度为 1.0 mm/s、测试速度为 3.0 mm/s、测后速度为 10.0 mm/s、穿刺距离为 6 mm、触发力为 3.0 g[8]。每组实验重复 5 次取平均值。

1.2.6　酸豆角成品的感官评价　感官评价方法参考文献 [19] 并略作修改。由 10 人组成感官评价小组（5 男 5 女，包括 2 名感官评价专家），分别从酸豆角的脆度、滋味、气味、色泽和形态进行评分，其在评分中的权重分别为 50%、20%、15%、15%，评分标准如表 1 所示，计算得出其感官评分。

表 1　酸豆角成品感官评分标准

Table 1　Sensory score standard of fermented capers

感官指标	评分标准	评分（分）
脆度（50%）	口感脆嫩，具有酸豆角固有的脆度，无柔软口感	100
滋味（20%）	滋味鲜美，口感适宜，无苦涩味	100
气味（15%）	酸味适宜，豆角香味浓郁，无异味	100
色泽和形态（15%）	色泽均匀（金黄色）、有光泽感，大小一致，无杂质	100

1.2.7　酸豆角挥发性风味物质解析　酸豆角中挥发性风味物质的富集：将自然发酵和纯种植物乳杆菌发酵 20 d 的酸豆角剁碎，取 10 g 分别装入 20 mL 顶空瓶中，将经老化处理后的 50/30 μm DVB/CAR/PDMS 萃取头插入样品瓶中，80 ℃ 下平衡 10 min 后推出萃取头，顶空吸附 30 min，充分富集挥发性成分后推回萃取头。

酸豆角中挥发性风味物质的检测参考文献 [7,20] 方法并略作修改。将已吸附挥发性风味物质的萃取头插入 GC-MS 进样品口中，于 250 ℃ 下解析 5 min。Agilent 7000D 气相色谱条件：色谱柱为 HP-5MS 毛细管柱（30 m×250 μm，0.25 μm）；升温程序为初始温度 40 ℃ 保持 3 min，以 5 ℃/min 升至 120 ℃，再以 10 ℃/min 升至 200 ℃，保持 2 min，最后以 20 ℃/min 升至 240 ℃，保持 5 min；载气为 He 气，不分流进样，流速为 1.0 mL/min，进样量 1.0 μL。Agilent 8890 质谱条件：电子轰击电离源（EI），电子能力为 70 eV；接口温度为 250 ℃，离子源温度为 200 ℃，四级杆温度为 150 ℃；质量扫描范围为 45~500 m/z[21]。通过检测到挥发性风味物质的质谱数据与 NIST05 质谱库及相关文献进行定性分析。

1.3　数据处理

本实验对酸豆角腌制过程中理化指标和挥发性风味物质的解析均设置 3 个平行并重复 2 次，酸豆角成品的硬度和脆度数据重复 5 次。采用 Excel 软件对实验数据进行处理，SPSS 22.0 软件对数据进行分析并用 Origin 9.0 软件绘图，处理结果均以平均值±标准偏差表示。

2　结果与分析

2.1　植物乳杆菌的生长曲线及降解亚硝酸盐能力测定

植物乳杆菌的生长曲线如图 1 所示，植物乳杆菌在 0~4 h 内有明显的迟滞期；在营养物质充足条件下，植物乳杆菌培养 6 h 后呈对数生长，菌量迅速增加；在培养 20 h 后进入稳定生长期，因此，选择培养 20 h 的植物乳杆菌用于酸豆角纯种湿法发酵最佳。

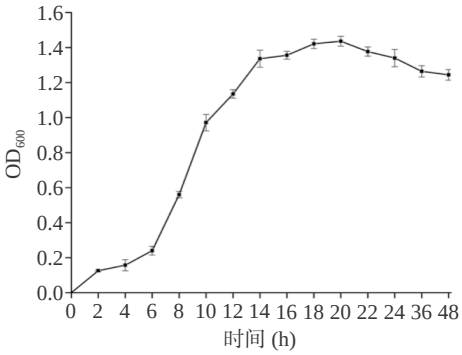


图 1　植物乳杆菌生长曲线

Fig.1　Growth curve of *Lactobacillus plantarum*

如图 2 所示，所选植物乳杆菌对 $NaNO_2$ 降解效果明显。经 12 h 培养后，MRS 培养基中 $NaNO_2$ 的含量由 150 mg/L 降低至 25.605 mg/L，其降解率达 82.93%；经 48 h 培养后，$NaNO_2$ 的含量降低至 0.051 mg/L，降解率达 99.97%，说明该植物乳杆菌菌株具有良好的降解亚硝酸盐能力，在后续纯种湿法发酵酸豆角中能有效降低亚硝酸盐的产生。

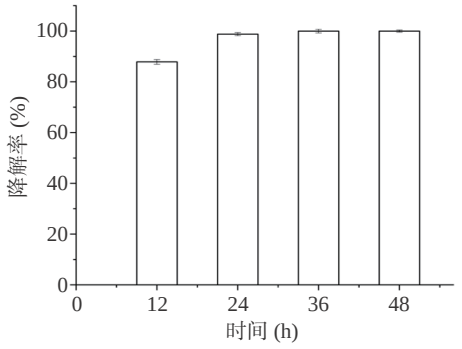


图 2　植物乳杆菌降解亚硝酸盐能力

Fig.2　Degradation rate of nitrite by *Lactobacillus plantarum*

2.2　酸豆角腌制过程中 pH 的变化

如图 3 所示，在酸豆角腌制过程中，自然湿法发酵和纯种湿法发酵发酵液的 pH 随着时间的变化逐渐降低。在腌制初期，酸豆角发酵液的 pH 为 6.96。在 0 至 6 d 内，植物乳杆菌不断的生长代谢，发酵液的 pH 明显降低且纯种湿法发酵液的 pH 低于自然湿法发酵液；6 至 10 d 时，低酸环境下抑制了植物乳杆菌的生长，pH 变化趋于平缓；12 至 20 d 时，两种发酵方式的发酵液中 pH 均有些许回升。当 pH 达

到 3.5 至 3.8 时，酸豆角发酵结束，此时食用理论上风味最佳。在第 6 d 时，纯种湿法发酵液的 pH 达 3.52，而自然湿法发酵在发酵 10 d 后，发酵液 pH 为 3.69，因此纯种湿法发酵法会明显缩短酸豆角的发酵周期。

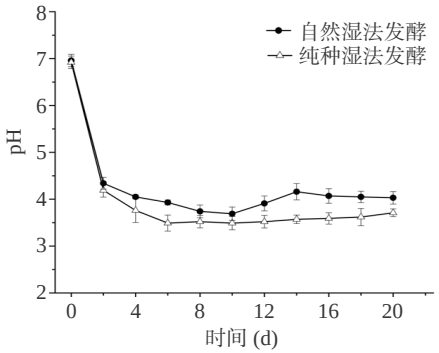


图 3 腌制过程中 pH 的变化

Fig.3 Changes of the pH during fermentation

2.3 酸豆角腌制过程中总酸含量的变化

如图 4 所示，随着发酵时间的延长，自然湿法发酵液中总酸含量均高于纯种湿法发酵。自然湿法发酵酸豆角产酸速度较快，在第 14 d 时达最大值为 0.52%；纯种湿法发酵液中总酸含量在第 8 d 时最高，之后明显降低。结果表明，自然湿法发酵酸豆角中植物乳杆菌含量较少，繁殖周期较长，其产酸能力随腌制时间的延长不断增强。纯种湿法发酵酸豆角中植物乳杆菌为优势菌，能抑制杂菌的污染；但随腌制时间的延长，乳酸菌的大量繁殖积累过量乳酸，使发酵液的 pH 较低，导致植物乳杆菌受到抑制，因此其产酸能力降低，这与陈凤等[2] 的研究结果一致。

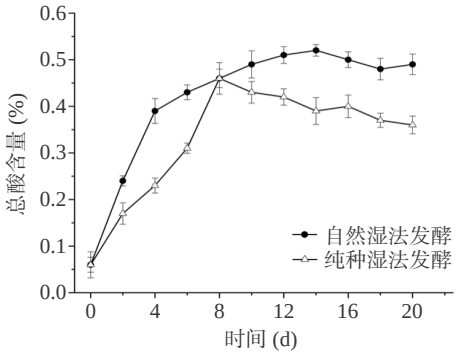


图 4 腌制过程中总酸含量的变化

Fig.4 Changes of the total acid content during fermentation

如图 5 所示，酸豆角中氨基酸态氮含量的变化会影响其风味物质的形成[22]。豆角中的蛋白质被微生物产生的蛋白酶分解成氨基酸、多肽类物质并被微生物生长代谢所利用，因此氨基酸含量随腌制时间发生改变。在 0~14 d 时，纯种湿法发酵中植物乳杆菌大量繁殖，氨基酸态氮含量不断降低，而自然湿法发酵液中氨基酸态氮含量先增多后减少。在第 14~20 d 时，氨基酸态氮含量均有回升，这可能是由于发酵过程中 pH 较低抑制了微生物的生长，导致所需氨基酸态氮含量降低，而豆角中的蛋白质被蛋白酶不断分解使发酵液中的氨基酸态氮含量增多[7]。

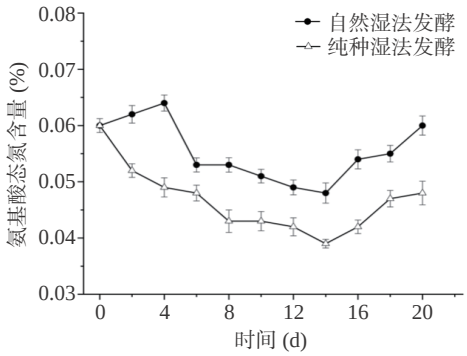


图 5 腌制过程中氨基酸态氮含量的变化

Fig.5 Changes of the amino acid nitrogen content during fermentation

2.4 酸豆角腌制过程中还原糖和总糖含量变化

由图 6 可知，两种不同发酵方式的发酵液中还原糖含量呈下降趋势，在酸豆角腌制初期，微生物利用还原糖进行生长繁殖，还原糖含量降低速率较快；腌制第 10 d 时纯种湿法发酵和自然湿法发酵还原糖含量分别为 0.07% 和 0.13%；腌制 12 d 后，豆角中的多糖被分解成还原糖，增多了还原糖的含量，因此其消耗速率缓慢。

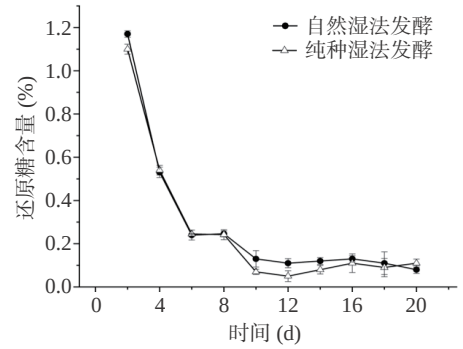


图 6 腌制过程中还原糖含量的变化

Fig.6 Changes of the reducing sugar content during fermentation

如图 7 所示，两种方法腌制的酸豆角发酵液中总糖含量变化趋势没有明显差别，在第 2~8 d 时，微生物生长繁殖并进行乳酸发酵，总糖含量减少较快；

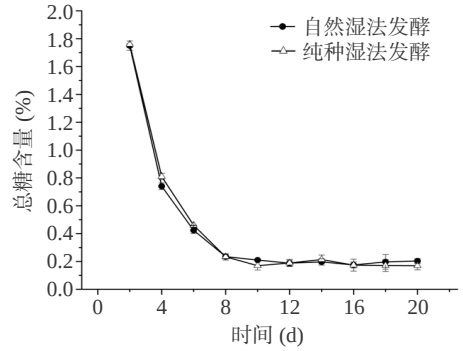


图 7 腌制过程中总糖含量的变化

Fig.7 Changes of the total sugar content during fermentation

在第 10~20 d 时，由于酸度较高，产酸速率较慢，总糖含量趋于稳定。结果表明，在酸豆角腌制过程中，还原糖含量所占总糖含量的比例最大，因此可依据还原糖含量判断发酵终点。纯种湿法发酵中还原糖和总糖含量消耗速率更快，因此该方式发酵能够缩短酸豆角发酵周期，这与尚英等[7]的研究结果一致。

2.5　酸豆角腌制过程中亚硝酸盐含量变化

国家卫生标准规定，酱腌菜中亚硝酸盐的残留量不得超过 20 mg/kg[23]，两种方式腌制的酸豆角中亚硝酸盐含量均未超过此限定标准。由图 8 可知，纯种湿法发酵和自然湿法发酵酸豆角分别在发酵第 8、14 d 时产生了“亚硝峰”，亚硝酸盐含量分别为 0.0422 和 0.058 mg/kg；在第 10 和第 16 d 时，酸豆角中亚硝酸盐浓度最低。说明在乳酸菌的作用下减少了酸豆角中亚硝酸盐的产生，因此纯种湿法发酵得到的酸豆角具备更高的安全性且在发酵第 10 d 时亚硝酸盐含量最低为 0.035 mg/kg。

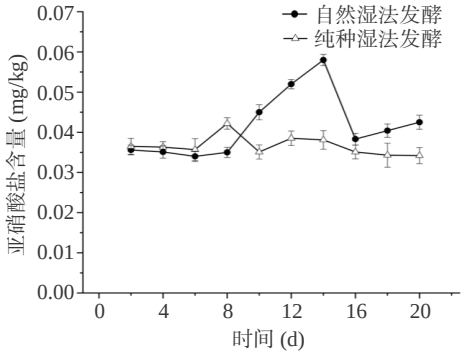


图 8　腌制过程中亚硝酸盐含量的变化

Fig.8　Changes of the nitrite content during fermentation

2.6　酸豆角品质分析

酸豆角腌制过程中，发酵环境中的微生物、酶等影响其硬度，脆度主要与细胞膨压有关[24]。通过质构仪对处于不同发酵位置的自然湿法发酵和纯种湿法发酵酸豆角成品的硬度和脆度进行检测并综合分析（见表 2），结果表明纯种湿法发酵酸豆角成品在硬度和脆度方面均高于自然湿法发酵酸豆角成品，这可能是由于随着发酵时间的延长，纯种湿法发酵环境中的 pH 较低、总酸含量较高抑制了乳酸菌的生长，减少了相关酶类产生[8]。

表 2　不同发酵方式酸豆角品质分析

Table 2　Quality analysis of pickled cowpeas with different fermentation methods

发酵方式	硬度(g)	脆度(g)
自然湿法发酵	160.122±28.39	2.00±0.82
纯种湿法发酵	207.442±48.79	2.71±0.75

2.7　酸豆角感官评价分析

由表 3 可知，通过对酸豆角腌制过程中亚硝酸盐含量的测定，发现腌制 20 d 的自然湿法发酵和纯种湿法发酵酸豆角中亚硝酸盐含量分别为 0.0425 和 0.0342 mg/kg，均低于国家卫生标准，可用于感官评价，结果表明纯种湿法发酵酸豆角感官评分更高。纯种湿法发酵酸豆角在脆度、色泽和形态方面优于自然湿法发酵酸豆角，其感官脆度与质构分析结果一致，且纯种湿法发酵酸豆角色泽均匀呈金黄色；而自然湿法发酵酸豆角相较于纯种湿法酸豆角香气更加浓郁；为减少香辛料对酸豆角挥发性风味物质的影响，在腌制过程中仅加入盐水，因此在滋味方面两种发酵方式的酸豆角评分均较低。

表 3　不同发酵方式酸豆角感官评分比较(分)

Table 3　Comparison of sensory scores of pickled cowpeas with different fermentation methods (scores)

发酵方式	脆度	滋味	气味	色泽和形态	加权平均分
自然湿法发酵	71±4.49	63±6.65	76±3.22	77±3.98	71.05±4.585
纯种湿法发酵	86±5.53	57±5.32	65±2.98	87±4.14	77.20±4.493

2.8　酸豆角风味成分解析

不同发酵条件下腌制成的酸豆角中挥发性成分的种类和含量也不同[25]，为减少香辛料对酸豆角挥发性风味成分的影响，腌制时不添加任何辅料。通过 GC-MS 对发酵 20 d 的自然湿法发酵酸豆角和纯种湿法发酵酸豆角进行风味成分鉴定，结果如图 9 和表 4 所示。自然湿法发酵酸豆角中鉴定出 57 种风味成分，纯种湿法发酵酸豆角中鉴定出 50 种风味成分，发酵后的酸豆角主要风味成分为酯类物质、酸类物质和醇类物质，其次是烷类、酮类、酚类、烯类和醛类物质。由于乳酸菌作为纯种湿法发酵过程中的优势菌抑制了其他微生物的生长，因此其挥发性风味成分种类少于自然湿法发酵酸豆角，但两种发酵方式产生的风味成分较为接近。

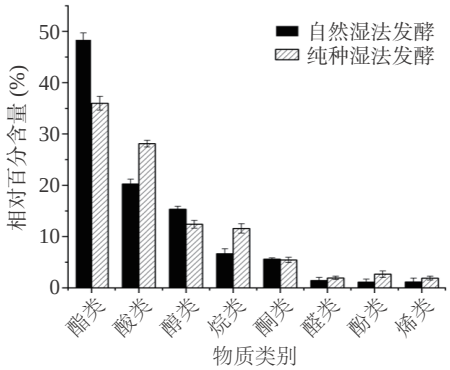


图 9　不同发酵方式酸豆角中挥发性风味成分含量分析

Fig.9　Analysis of volatile flavor components in pickled cowpeas with different fermentation methods

酯类物质具有特殊的水果香味，挥发酯含量越高，腌制的酸豆角酯香味越浓。在自然湿法发酵和纯种湿法发酵酸豆角中分别检测到 20 种和 14 种酯类物质，乙酸乙酯具有苹果和香蕉香味[26]，其含量最高，分别达 9.17% 和 8.23%；其次是亚油酸乙酯（油脂味）[27]，含量分别占 6.753% 和 6.365%；乙酸苯酯具有类似苯酚臭味，使自然湿法发酵酸豆角带有淡淡的

表 4 不同发酵方式的酸豆角风味成分解析

Table 4 Analysis of the flavor components of capers with different fermentation methods

编号	化合物	自然湿法发酵相对含量(%)	纯种湿法发酵相对含量(%)
酯类1	乙酸乙酯	9.17±1.03	8.23±2.19
2	亚油酸已酯	6.75±0.76	6.37±0.53
3	乙酸苯酯	6.52±0.97	ND
4	庚酸乙酯	2.57±0.03	2.77±0.51
5	辛酸甲酯	1.63±0.42	ND
6	反式-2-己烯酸甲酯	1.38±0.84	1.56±0.57
7	2-己烯酸甲酯	1.38±0.11	1.56±0.23
8	棕榈酸已酯	0.99±0.27	ND
9	乙酰基辛酸乙酯	ND	1.45±0.83
10	葵酸乙酯	0.7±0.04	0.89±0.09
11	2-甲基庚酸甲酯	0.49±0.05	ND
12	2-庚烯酸甲酯	0.45±0.03	0.44±0.04
13	9-葵烯酸乙酯	0.44±0.06	0.73±0.07
14	辛酸乙酯	0.45±0.05	0.2±0.03
15	顺-5-十二碳烯酸酯	0.28±0.06	ND
16	水杨酸甲酯	ND	0.48±0.07
17	水杨酸乙酯	0.27±0.04	0.44±0.09
18	乙酸苯乙酯	0.2±0.03	0.25±0.04
19	2, 5-十八烷酸甲酯	0.04±0.01	ND
20	对甲氧基肉桂酸辛酯	0.03±0.01	ND
21	2-乙基己酯	0.02±0.01	ND
22	二(2-乙基己基)己二酸酯	0.02±0.01	ND
23	γ-丁内酯	ND	0.05±0.01
酸类24	庚酸	6.58±0.76	9.84±1.29
25	棕榈酸	3.84±0.87	6.16±0.96
26	α-亚麻酸	2.31±0.77	ND
27	亚油酸	ND	4.47±1.01
28	肉豆蔻酸	0.93±0.13	2.18±0.83
29	乙酸	1.53±0.77	1.41±0.66
30	十八烷二酸	1.42±0.44	1.18±0.37
31	正葵酸	0.80±0.07	1.08±0.19
32	顺式-10-十七烯酸	ND	1.08±0.22
33	辛酸	0.66±0.03	ND
34	十五烷酸	0.66±0.01	0.77±0.13
35	硬脂酸	0.64±0.05	ND
36	月桂酸	0.46±0.04	0.95±0.11
37	顺-5-十二碳烯酸	0.40±0.03	ND
醇类38	环乙醇	10.5±2.31	2.13±0.55
39	苯乙醇	0.53±0.06	5.37±1.17
40	2-十一醇	1.22±0.27	ND
41	乙醇	1.16±0.59	0.97±0.07
42	植物醇	0.93±0.08	2.99±0.89
43	异戊醇	0.82±0.05	0.88±0.06
44	1-十四醇	0.17±0.02	ND
45	糠醇	ND	0.04±0.01
烷类46	十甲基环五硅氧烷	0.63±0.03	5.93±0.78
47	六甲基环三硅氧烷	0.78±0.05	2.06±0.64
48	十三烷	1.21±0.12	1.25±0.08
49	2-甲基十三烷	1.15±0.35	0.81±0.03
50	十六烷	1.01±0.04	0.05±0.01
51	十五烷	0.87±0.02	1.15±0.12
52	2-甲基十四烷	1.02±0.09	0.32±0.04
酮类53	4-羟基查耳酮	ND	2.06±0.15

续表 4

编号	化合物	自然湿法发酵相对含量(%)	纯种湿法发酵相对含量(%)
54	2-十三烷酮	2.31±0.77	1.45±0.52
55	2-壬酮	1.41±0.44	1.13±0.23
56	香叶基丙酮	0.33±0.05	0.33±0.04
57	橙化基丙酮	0.33±0.07	0.40±0.03
58	6,10-二甲基-5,9-十一双烯-2-酮	0.33±0.02	ND
59	α-紫罗兰酮	ND	0.07±0.01
酚类60	2-乙基苯酚	0.56±0.03	ND
61	3-乙基苯酚	0.56±0.04	1.28±0.19
62	4-乙基苯酚	ND	1.28±0.24
醛类63	苯甲醛	1.24±0.22	0.93±0.12
64	4-乙基苯甲醛	0.17±0.03	ND
65	正己醛	0.03±0.01	ND
66	辛醛	ND	0.49±0.02
67	苯乙醛	ND	0.40±0.01
68	葵醛	ND	0.12±0.01
烯类69	新植二烯	1.14±0.77	1.89±0.38

注：ND为未检出成分

霉腐味[28]，而纯种湿法发酵酸豆角中没有检出该物质。此外庚酸乙酯(呈菠萝味)、辛酸乙酯(呈白兰地酒味)、棕榈酸乙酯(呈果爵和奶油味)、水杨酸甲酯(呈冬青叶香味)等对酸豆角的香味也有一定贡献。

酸类物质赋予酸豆角较浓的酸味，自然湿法发酵和纯种湿法发酵酸豆角中分别检测出 12、10 种酸味物质，但接种植物乳杆菌的酸豆角中酸类物质(28.12%)比例高于自然湿法发酵酸豆角(20.25%)。自然湿法发酵和纯种湿法发酵酸豆角中庚酸、棕榈酸和乙酸含量较高，腌制后的酸豆角具有较刺激的酸味，这与发挥性物质中具有醋酸味的乙酸和呈刺激味的棕榈酸的存在有关。

醇类物质具有明显的花果香味，其产生主要是豆角中葡萄糖降解和氨基酸分解代谢的作用[29]。自然湿法发酵酸豆角中检出 7 种醇类物质，分别为环乙醇、2-十一醇、乙醇、植物醇、异戊醇、苯乙醇和 1-十四醇，其中环乙醇含量最高，具有樟脑气味；纯种湿法发酵酸豆角中检出 6 种醇类物质，分别为苯乙醇、植物醇、环乙醇、乙醇、异戊醇和糠醇，苯乙醇具有愉悦的果香，其检出主要与发酵过程中乳酸菌利用氨基酸产生[30]。此外，乙醇的检出赋予了酸豆角一定的酒香味。

烷类物质一般具有刺激味，自然湿法发酵和纯种湿法发酵酸豆角中烷类物质分别占 6.64% 和 11.58%。酮类物质具有水果、花香等香气，在浓度低于阈值时仍具有较强的香味[31]，2-十三烷酮、2-壬酮、香叶基丙酮和橙化基丙酮均在两种酸豆角中检出。此外，酚类物质、醛类物质和烯类物质也有检出，但种类较少。

3　结论

本研究采用两种不同发酵方式腌制酸豆角，通过对酸豆角研制过程中各项理化指标的检测发现，在发酵时间上，纯种湿法发酵在第 6 d 时 pH 达 3.52，且还原糖和总糖含量消耗速率均高于自然湿法发酵，缩短了发酵周期；在发酵品质上，纯种湿法发酵中氨基酸态氮含量下降速率更快且硬度和脆度均优于自然湿法发酵；在食用安全性上，纯种湿法发酵和自然湿法发酵酸豆角分别在第 8 d 和第 14 d 出现亚硝峰，亚硝酸盐含量分别为 0.0422 和 0.058 mg/kg，食用时应避开亚硝酸盐含量高峰期且纯种湿法发酵酸豆角食用安全性更高。结合感官评分和挥发性风味物质解析发现两种发酵方式腌制的酸豆角中挥发性风味物质较为接近，但纯种湿法发酵酸豆角的感官评分更高。综上，纯种湿法发酵酸豆角在品质和风味上优于自然湿法发酵酸豆角，该研究对纯种湿法发酵酸豆角的工业化生产和风味成分解析提供一定的理论依据。

参考文献

[1] 刘楚岑，谭兴和，张春燕，等. 豇豆食品的开发现状与展望[J]. 中国酿造，2017，36(10)：13-16. [LIU C C, TAN X H, ZHANG C Y, et al. Development present situation and prospect of cowpea food[J]. China Brewing, 2017, 36(10): 13-16.]

[2] 陈凤，游玉明，张冬梅，等. 发酵方式对泡豇豆品质的影响[J]. 中国调味品，2018，43(12)：44-49. [CHEN F, YOU Y M, ZHANG D M, et al. Effect of fermentation methods on the quality of pickled cowpea[J]. China Condiment, 2018, 43(12): 44-49.]

[3] JI Y J, LEE S H, LEE H J, et al. Effects of *Leuconostoc mesenteroides* starter cultures on microbial communities and metabolites during kimchi fermentation[J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 153(3): 378-387.

[4] YANG X, HU W, XIU Z, et al. Effect of salt concentration on microbial communities, physicochemical properties, and metabolite profile during spontaneous fermentation of Chinese northeast sauerkraut[J]. Journal of Applied Microbiology, 2020, 129(6): 1458-1471.

[5] LIANG H P, HE Z, WANG X Y, et al. Effects of salt concen-

tration on microbial diversity and volatile compounds during suancai fermentation[J]. Food Microbiology, 2020, 91: 103537.
[6] 杨颖, 王望舒, 吴裕健, 等. 酱腌菜中亚硝酸盐控制技术研究进展[J]. 中国调味品, 2020, 45(10): 197−200. [YANG Y, WANG W S, WU Y J, et al. Research progress on control technology of nitrite in pickles[J]. China Condiment, 2020, 45(10): 197−200.]
[7] 尚英, 杜晓宏, 熊荣园, 等. 不同方法发酵的酸豆角品质对比分析[J]. 现代食品科技, 2020, 36(9): 245−250. [SHANG Y, DU X H, XIONG R Y, et al. Comparative analysis of the quality of pickled cowpeas from different fermentation methods[J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(9): 245−250.]
[8] 刘洪, 车振明, 陈坤, 等. 人工接种与自然发酵泡豇豆的质地研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(14): 111−115. [LIU H, CHE Z M, CHEN K, et al. Research of texture of artificial inoculation and natural fermentation of pickled cowpea[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(14): 111−115.]
[9] PARK E J, CHUN J, CHA C J, et al. Bacterial community analysis during fermentation of ten representative kinds of kimchi with barcoded pyrosequencing[J]. Food Microbiology, 2012, 30(1): 197−204.
[10] SONMEZDAG A S, KELEBEK H, SELLI S. Characterization of aroma-active compounds, phenolics, and antioxidant properties in fresh and fermented capers (*Capparis spinosa*) by GC-MS-Olfactometry and LC-DAD-ESI-MS/MS[J]. Journal of Food Science, 2019, 84(9): 2449−2457.
[11] 王玉玮, 袁亚宏, 岳田利. 雪莲菌发酵豇豆工艺优化及其挥发性风味成分分析[J]. 食品与机械, 2021, 37(5): 176−182,232. [WANG Y W, YUAN Y H, YUE T L. Process optimization of fermented cowpea by kefir grains and analysis of volatile flavor components[J]. Food & Machinery, 2021, 37(5): 176−182,232.]
[12] 熊蝶, 袁岚玉, 李媛媛, 等. 陕西泡菜中降解亚硝酸盐乳酸菌的筛选及其发酵特性与耐受性研究[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(6): 139−144. [XIONG D, YUAN L Y, LI Y Y, et al. Screening, fermentation characteristics and tolerance of nitrite-degrading lactic acid bacteria in Shaanxi Paocai[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(6): 139−144.]
[13] 陈正培, 蒋潮, 夏娴润, 等. 柳州酸笋中降亚硝酸盐乳酸菌的筛选及鉴定[J]. 中国酿造, 2020, 39(3): 26−31. [CHEN Z P, JIANG C, XIA X R, et al. Screening and identification of nitrite-degrading lactic acid bacteria from Liuzhou sour bamboo shoots[J]. China Brewing, 2020, 39(3): 26−31.]
[14] 国家食品药品监督管理总局. GB 5009.33-2016 食品安全国家标准 食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. [China Food and Drug Administration. GB 5009.33-2016 National Food Safety Standard Determination of Nitrite and Nitrate in Foods[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.]
[15] 谭亦成, 谭兴和, 刘甜甜. 腌制方法对酸豆角质量的影响[J]. 食品与机械, 2011, 27(4): 32−34,57. [TAN Y C, TAN X H, LIU T T. Effect of the salting methods on the pickled cowpeas quality[J]. Food and Machinery, 2011, 27(4): 32−34,57.]
[16] 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 12456-2008 食品中总酸的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2008. [General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. China National Standardization Administration. GB/T 12456-2008 Determination of total acid in foods[S]. Beijing: Standards Press of China, 2008.]
[17] GB 5009.235-2016 食品安全国家标准 食品中氨基酸态氮的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. [GB 5009. 235-2016 National Food Safety Standard. Determination of amino acid nitrogen in foods[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.]
[18] GB 5009.7-2016 食品安全国家标准 食品中还原糖的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. [GB 5009.7-2016 食品安全国家标准 食品中还原糖的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. [GB 5009.7-2016 National Food Safety Standard. Determination of reducing sugar in foods[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.]
[19] 刘洪. 自然发酵与人工接种泡菜发酵过程中品质变化规律的动态研究 [D]. 成都: 西华大学, 2012. [LIU H. Dynamic study of quality variation rule between the natural fermentation and artificial inoculation process of kimchi[D]. Chengdu: Xihua University, 2012.]
[20] WEI J P, ZHANG Y X, YUAN Y H, et al. Characteristic fruit wine production via reciprocal selection of juice and non-*Saccharomyces* species[J]. Food Microbiology, 2019, 79: 66−74.
[21] 郑文迪, 关倩倩, 刘长根, 等. 基于 GC-MS 法对比广西地区酸菜和酸笋风味的差异[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(4): 253−257. [ZHENG W D, GUAN Q Q, LIU Z G, et al. Comparison of flavors of Suancai and Suansun in Guangxi based on GC-MS[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(4): 253−257.]
[22] 陈大鹏, 郑娅, 周芸, 等. 自然发酵与人工接种发酵法发酵泡菜的品质比较[J]. 食品工业科技, 2019, 40(18): 368−372. [CHEN D P, ZHENG Y, ZHOU Y, et al. Quality comparison of pickled cabbage fermented by natural fermentation and artificial inoculation[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(18): 368−372.]
[23] 国家食品药品监督管理总局. GB 2762-2017 食品中污染物限量 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2017. [China Food and Drug Administration. GB 2762-2017 National food safety standard quantity of pollutants in foods[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017.]
[24] 杨莉, 陈玲, 赵素娟, 等. 泡渍豇豆脆性的质构仪检测方法[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(12): 209−213. [YANG L, CHEN L, ZHAO S J, et al. Determination of brittleness of pickled cowpea by texture analyzer[J]. Food and Fermentation Industries, 2017, 43(12): 209−213.]
[25] PARK S E, SEO S H, KIM E J, et al. Changes of microbial community and metabolite in kimchi inoculated with different microbial community starters[J]. Food Chemistry, 2019, 274: 558−565.
[26] 沈菲儿. 乳酸菌发酵对莲藕泡菜质构和风味影响的研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2016. [SHEN F E. Study on the effect of

lactic acid bacteria fermentation on the texture and flavor of lotus root kimchi[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2016. ］

［27］ 陈书蓓. 热耦合超声灭活黄豆酱中微生物及其对黄豆酱品质的影响 [D]. 镇江: 江苏大学, 2020. ［CHEN S B. Effects of thermosonication treatment on microbial inactivation and the quality of soybean paste[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2020. ］

［28］ 朱照华. 酸笋的营养成分检测及其主要风味物质的研究 [D]. 南宁: 广西大学, 2014. ［ZHU Z H. Study on fermented bamboo shoot nutrition and flavor components[D]. Nanning: Guangxi University, 2014. ］

［29］ CHEN C, LU Y Q, YU H Y, et al. Influence of 4 lactic acid bacteria on the flavor profile of fermented apple juice[J]. Food Bioscience, 2019, 27: 30−36.

［30］ 蒋丽, 王雪莹, 杨洲, 等. 自然发酵与接种发酵泡菜香气成分分析[J]. 食品科学, 2011, 32(22): 276−279. ［JIANG L, WANG X Y, YANG Z, et al. Analysis of volatile compounds in pickles produced by inoculated or natural fermentation[J]. Food Science, 2011, 32(22): 276−279. ］

［31］ PENG W Y, MENG D Q, YUE T L, et al. Effect of the apple cultivar on cloudy apple juice fermented by a mixture of *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus plantarum*, and *Lactobacillus fermentum*[J]. Food Chemistry, 2021, 340: 127922.

陈春梅, 傅钰, 庄晓雯, 等. 不同稀土离子对海藻酸钠凝胶特性的影响 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 52−58. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100019

CHEN Chunmei, FU Yu, ZHUANG Xiaowen, et al. Effects of Different Rare Earth Ions on the Gel Properties of Sodium Alginate[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 52−58. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100019

·研究与探讨·

不同稀土离子对海藻酸钠凝胶特性的影响

陈春梅, 傅　钰, 庄晓雯, 许加超*, 高　昕, 付晓婷
（中国海洋大学, 海藻化学及应用实验室, 山东青岛 266003）

摘　要: 本文主要研究了四种稀土离子 Y^{3+}、Ce^{3+}、La^{3+}、Er^{3+}对海藻酸钠凝胶特性的影响，通过研究海藻酸钠-稀土凝胶的机械性质、平衡含水量、离子交换率及凝胶机理。结果发现：La^{3+}、Y^{3+}、Er^{3+}、Ce^{3+}可以与 M/G≈1 的海藻酸钠形成不可逆凝胶，其凝胶强度在 32~41 N 之间，杨氏模量在 14~20 N 之间，弹性在 55%~59% 之间，平衡含水量均大于 93%，四种凝胶的强度为 Ce^{3+}>Er^{3+}>Y^{3+}>La^{3+}，弹性为 Ce^{3+}<Er^{3+}<Y^{3+}<La^{3+}，离子交换率大小为：Ce^{3+}为 52.99%，Er^{3+}为 50.81%，Y^{3+}为 40.74%，La^{3+}为 39.33%。在不同 M/G 比值条件下，四种海藻酸钠-稀土凝胶的强度有较大区别：当 M/G=1.99>1 时，大小依次为 Er^{3+}>Ce^{3+}>Y^{3+}>La^{3+}；当 M/G=0.99≈1、M/G=0.19<1 时，大小依次为 Ce^{3+}>Er^{3+}>Y^{3+}>La^{3+}，其中 Ce^{3+}、Y^{3+}、La^{3+}对海藻酸钠中的 G 片段有一定的偏好性，Er^{3+}对 M 片段有一定的偏好性。本文研究为海藻酸钠的精深加工利用与稀土元素的新功能性材料的开发奠定理论基础。

关键词: 海藻酸钠, 稀土离子, M/G 比值, 凝胶特性, 凝胶机理
中图分类号: O648.17　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0052−07
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100019
本文网刊:

Effects of Different Rare Earth Ions on the Gel Properties of Sodium Alginate

CHEN Chunmei, FU Yu, ZHUANG Xiaowen, XU Jiachao*, GAO Xin, FU Xiaoting
(Laboratory of Seaweed Chemistry and Applied Research, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: In this paper, the gel properties of sodium alginate with Y^{3+}, Ce^{3+}, La^{3+} and Er^{3+} were studied. By studying the mechanical properties, equilibrium water content, ion exchange rate and gel mechanism of seaweed rare earth gel, it was found that: The coordination form of rare earth ions and carboxyl group in sodium alginate was pseudo-bridged monodentate coordination and bridge coordination. At the same time, the special three-dimensional network structure of the rare earth gel was formed through the planar and non-planar geometry formed by intramolecular and intermolecular chelation, and the gel strength of the gel formed by La^{3+}, Y^{3+}, Er^{3+}, Ce^{3+} and sodium alginate M/G≈1 was between 32 and 41 N, the Young's modulus was between 14 and 20 N, the elasticity was between 55% and 59%, the equilibrium water content was greater than 93%, the strength of the four gel was Ce^{3+}> Er^{3+}> Y^{3+}> La^{3+}, the elasticity was Ce^{3+}<Er^{3+}<Y^{3+}<La^{3+}, and the ion exchange rate was: Ce^{3+} 52.99%, Er^{3+} 50.81%, Y^{3+} 40.74%, La^{3+} 39.33%. Under different M/G ratio, the affinity between rare earth ions and sodium alginate gel was quite different: When M/G=1.99>1, the affinity of seaweed rare earth gel was in this order: Er^{3+}>Ce3+>Y^{3+}>La^{3+}. When M/G=0.99≈1 and M/G=0.19<1, the affinity of seaweed rare earth gel was in this order: Ce^{3+}> Er^{3+}> Y^{3+}> La^{3+}. Among them, Ce^{3+}, Y^{3+} and La^{3+} had a certain preference for G fragment of sodium alginate, and Er^{3+} had a certain preference for M fragment. This study would lay a theoretical foundation for the intensive processing and utilization of sodium alginate and the development of new functional materials of rare earth elements.

Key words: sodium alginate; rare earth ions; M/G ratio; gel properties; gelation mechanism

海藻酸钠是从海带、巨藻等褐藻中提取出来的一种水溶性天然高分子聚合物。由 β-D-甘露糖醛酸（M）和 α-L-古罗糖醛酸（G）这两种单体聚合而成线性大分子, 两种单体以 MM、GM（MG）、GG 嵌段形

收稿日期: 2021−10−11
基金项目: 山东省重大科技创新工程项目（2019JZZY020613）; 青岛市科技惠民专项（20-3-4-31-nsh）。
作者简介: 陈春梅（1995−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 海藻化学及应用, E-mail: 3067883717@qq.com。
*** 通信作者:** 许加超（1963−）, 男, 硕士, 教授, 研究方向: 海藻化学及应用, E-mail: xujia@ouc.edu.cn。

式交替排列[1−2]。其结构特征受其来源藻类的物种、季节、地理位置等影响而有所不同[3]。因其具有良好的增稠性、成膜性、高凝胶强度等特点，成为众多研究学者的研究热点。其中凝胶化是海藻酸钠重要性质之一，即海藻酸钠中 Na^+可以与多价离子发生离子交换反应[1]，这是其在食品、医药、化妆品、生物技术等领域得到广泛应用的基础[4]。据调查，我国海藻酸钠的年产量可达 4 万吨，占世界总产量的 63% 左右，但仅有 20% 的海藻酸钠进行精深加工应用于食品、医药等行业。

稀土元素具有特殊的光、电、磁等性能，能作为制造多种功能材料的基质和激活剂，目前其研究已扩展至各个领域，稀土元素已成为开发新的功能性材料必不可少的原料，被称作“现代工业的维生素”和神奇的“材料宝库”山[5]。有文献报道了稀土离子与海藻酸钠可以发生配位，制备具有荧光特性、吸附特性的凝胶小球[6−8] 或用于特殊用途的纤维[9−10]、薄膜[11−13] 等，稀土离子与海藻酸钠形成的配合物不仅拥有稀土离子独特的性质，同时还拥有灵活的机械性、良好的化学稳定性以及优良的机械加工性能等[14]。但目前尚未见有关稀土离子对海藻酸钠凝胶性质影响与机理研究相关报道。

目前海藻酸钠-稀土凝胶研究主要集中于 Y^{3+}、Ce^{3+}、La^{3+}、Er^{3+}这四种稀土离子，但都偏向应用型研究，缺乏系统理论性探索。因此本文选用 Y^{3+}、Ce^{3+}、La^{3+}、Er^{3+}研究海藻酸钠-稀土凝胶的凝胶特性，弥补理论上的不足。通过研究海藻酸钠稀土凝胶的机械性质、平衡含水量、离子交换率，分析这四种海藻酸钠-稀土凝胶的性质差异，同时结合红外光谱与微观结构分析，进一步探究稀土离子与海藻酸钠形成的凝胶机理；此外探究不同 M/G 比值对稀土离子与海藻酸钠凝胶亲和性的影响。本文为海藻酸钠的精深加工与稀土元素的新功能性材料的开发奠定理论基础。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

海藻酸钠　青岛海之林生物科技有限公司；氯化钇、氯化铈、氯化镧、氯化铒、钠离子标准溶液、溴化钾（KBr）、重水（D_2O）　均为分析纯，上海麦克林生化科技有限公司；3-（甲基硅基）-1-丙磺酸钠（DSS）　上海迈瑞尔化学技术有限公司。

JJ-1 精密增力电动搅拌器　国华电器有限公司提供；TMS-Touch 质构仪　美国食品技术有限公司；Nicolect470 傅里叶变换红外光谱仪　美国 Thermo Electron 公司；AA-6800 原子吸收分光光度计　岛津公司；JSM-840 扫面电镜　美国 AMETEK 公司；JNM-ECP600 核磁共振仪　日本理光公司；DZG-6020 型电热真空干燥箱　上海培因实验仪器有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　海藻酸钠-稀土凝胶球的制备　将李学锋等[15] 的浸泡法改进，制备直径 20 mm 的凝胶球。用超纯水配制 2.0% 海藻酸钠溶液，在 60 ℃ 水浴下搅拌溶解，冷却后真空脱气至无气泡。取 10 mL 的海藻酸钠胶液于小烧杯中（规格为 25 mL），浸入盛有 0.3 mol/L 交联液的大烧杯（规格为 500 mL），摇动小烧杯至胶液基本成型，再在交联液中浸泡至饱和。取出凝胶球，用超纯水反复冲洗表面交联液。

1.2.2　不同稀土离子对海藻酸钠凝胶特性的影响　配制浓度为 0.2 mol/L 的氯化钇、氯化铈、氯化镧、氯化铒溶液与浓度为 2.0% 的 M/G≈1 的海藻酸钠胶液按照 1.2.1 制成海藻稀土凝胶球，通过测定凝胶性质：凝胶强度、杨氏模量、弹性、平衡含水量、离子交换率，分析其变化趋势与原因，同时结合红外光谱中官能团变化情况与微观结构，分析其内部结构特点。

1.2.3　不同 M/G 比值对稀土离子与海藻酸钠的亲和性的影响　通过测定购买来的三组不同结构的海藻酸钠，确定 M/G 比值。在此基础上，通过测定凝胶强度与离子交换率，对比不同 M/G 比值下 Y^{3+}、Ce^{3+}、La^{3+}、Er^{3+}四种稀土离子对海藻酸钠亲和性的大小关系。

1.2.4　机械性能的测定　凝胶的机械性能主要为凝胶强度、杨氏模量与弹性，均使用质构仪测定。凝胶强度与弹性的测定条件[16]：选用 40 mm 的圆盘探头，检测速度为 30 mm/min，起始力为 0.1 N，形变量为 40%，程序为 TPA。凝胶强度均可以直接得到，弹性可通过：弹性（%）=弹性回程距离（mm）/硬度 1 的位移（mm）计算得出。杨氏模量测试条件：选用 8 mm 的柱型探头，形变量为 10%，起始力为 0.1 N，检测速度为 30 mm/min，程序为应力松弛。对测试原始数据以逐次渐进法[17−18] 处理，得到切线 L 的 b 值。杨氏模量（E）计算方法如下：

$$E = \exp(b)/e_0$$

式中，b 为切线 L 与 Y 轴的交点的纵坐标，单位 N；e_0 为测试的形变量。

1.2.5　平衡含水量的测定　选择 9.00 g 的胶液交联形成的凝胶球，将洗涤好的凝胶球放到 100 mL 超纯水中进行溶胀平衡，按照 GB 5009.3-2016 直接干燥法[19]，测定该凝胶球的平衡含水量。凝胶的平衡含水量（EMC）计算方式如下：

$$EMC = (m_1 - m_2)/(m_1 - m_0)$$

式中，m_0 为干燥的称量瓶重量，单位 g；m_1 称量瓶与湿样品总重量，单位 g；m_2 称量瓶与干燥至恒重的样品总重量，单位 g。

1.2.6　离子交换率的测定　考虑涉及多种离子，避免多种标准曲线导致的实验误差，选择以测定交换的 Na^+离子来衡量各离子交换的含量大小。参考 GB/T 5750.6-2006，测定交联完成后各种交联液中 Na^+的含量[20]，离子交换率（IER）计算方法如下：

$$IER = \rho_1 \times D/\rho_0$$

式中，ρ_0 为 Na^+的初始质量浓度，单位 g/L；ρ_1 为

标曲上测定的 Na^+质量浓度，单位 g/L；D 为稀释的倍数。

1.2.7 红外光谱的测定 将 600 mPa·s、M/G≈1 的海藻酸钠以及已切碎的各种稀土离子与海藻酸钠形成的凝胶球，−40 ℃ 预冻，再进行冷冻干燥，将冷冻样再次研磨成粉。称取各样品粉末与 KBr 以 1∶100(mg)的比例再次研磨，均匀混合后，压片以待测试。测试条件：扫面次数 64 次，分辨率为 4 cm^{-1}，扫描波数范围 400~4000 cm^{-1}。

1.2.8 凝胶微观结构的测定 将 600 mPa·s、M/G≈1 的海藻酸钠与各种稀土离子形成的凝胶球切成 2 mm 左右的薄片，在 10 mPa，−55 ℃ 冷冻干燥后，将凝胶球的表面和横截面进行镀金处理，在 20 kV 的加速电压下观察微观结构。

1.2.9 海藻酸钠 M/G 比值的测定 参考文献 [21] 方法，将海藻酸钠样品进行水解，用超纯水配制海藻酸钠溶液，浓度为 0.5%(w/w)，搅拌至完全溶解。用 HCl 调 pH3.0，沸水浴 1 h，冷却后再用 NaOH 调 pH 7.0，−40 ℃ 预冻，再进行冷冻干燥。称取一定量冷冻干燥样溶于重水(D_2O)中，浓度为 15 mg/mL，以 0.5%(w/w)3-(甲基硅基)-1-丙磺酸钠(DSS)为内标物，使用核磁共振仪 ^{1}H-NMR 测定海藻酸钠样品的组成结构。

根据 Grasdalen 等[22] 提出的一组公式，$F_G+F_M=1$；$F_{GG}+F_{GM}=FG$；$F_{MM}+F_{MG}=F_M$；$F_G=F_{GGG}+F_{MGG}+F_{GGM}+F_{MGM}$；$F_{MG}=F_{GM}=F_{GGM}+F_{MGM}$；$F_{MGG}=F_{GGM}$；$M/G=F_M/F_G$；$\eta=F_{MG}/(F_G\times F_M)$。其中，$F_G$、$F_M$、$F_{GG}$、$F_{GM}$、$F_{MM}$、$F_{MG}$、$F_{GGG}$、$F_{MGG}$、$F_{GGM}$、$F_{MGM}$ 分别为海藻酸钠对应的 G、M、GG、GM、MM、MG、GGG、MGG、GGM、MGM 片段的摩尔分数。参照孙学超[23] 的推理过程，计算各结构片段所占比例以及 M/G 比值和分布系数(η)。

1.3 数据处理

通过 SPSS 统计分析软件对实验数据进行单因素统计分析，结果为平均值±标准差，当试验结果 $P<0.05$ 时，具有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 不同稀土离子对海藻酸钠凝胶性质的影响

2.1.1 海藻酸钠-稀土凝胶的机械性能 随着时间的进行，稀土离子进入海藻酸钠胶液中，与 Na^+发生交换，形成一种不可逆凝胶。由表 1 可知，在海藻酸钠 M/G≈1，交换程度达到饱和时，四种海藻酸钠-稀土凝胶的机械性能如下：a. 大形变下(40% 形变量)各种海藻酸钠-稀土凝胶的凝胶强度在 32~41 N 之间，强度大小依次为 $Ce^{3+}>Er^{3+}>Y^{3+}>La^{3+}$；b. 小形变下(10% 形变量)四种凝胶的杨氏模量在 14~20 N 之间，其大小依次为 $Ce^{3+}>Er^{3+}>Y^{3+}>La^{3+}$；c. 弹性均在 55%~59% 之间，弹性性能较优，其大小关系为 $Ce^{3+}<Er^{3+}<Y^{3+}<La^{3+}$。这四种由稀土离子与海藻酸钠形成的凝胶表现为刚性大、弹性优的一种固形物。

表 1 不同海藻酸钠-稀土凝胶的机械性能

Table 1 Mechanical properties of different seaweed rare earth gels

海藻酸钠-稀土凝胶(M/G≈1)	机械性能		
	凝胶强度(N)	杨氏模量(N)	弹性(%)
Y^{3+}	38.73±1.47^a	15.39±0.12^c	56.99±0.06^b
Ce^{3+}	40.89±0.49^a	19.34±0.52^a	55.94±0.09^d
La^{3+}	32.74±1.26^b	14.25±0.14^c	58.13±0.22^a
Er^{3+}	40.15±0.58^a	17.75±0.43^b	56.52±0.07^c

注：同列不同小写字母表示存在显著性差异($P<0.05$)。

当交换程度达到饱和时，发现四种凝胶的凝胶强度大小关系与杨氏模量的大小关系保持一致，凝胶强度表现凝胶破裂时表皮的强度，而杨氏模量是在保持凝胶的完整性时少量形变的强度，由此说明海藻酸钠-稀土凝胶的内外强度较为一致。当海藻酸钠与稀土离子接触时，胶液的表层最先与稀土离子交联形成凝胶，随后离子穿过表层凝胶，渗透到胶液内部，内部开始交换形成凝胶，凝胶的形成过程是由外向内逐渐形成，在一定时间内，内外凝胶均达到饱和，才呈现内外强度一致。外层凝胶允许稀土离子的向内渗透，证明了海藻酸钠-稀土凝胶也是一种特殊的网状结构。四种海藻酸钠-稀土凝胶的强度大小为：$Ce^{3+}>Er^{3+}>Y^{3+}>La^{3+}$，这可能由于稀土离子与海藻酸钠的交换量有所不同。Ouwerx 等[24] 就指出凝胶的强度与其交联度密切相关，而交联度直接取决于离子交换量的多少，当凝胶的交联度增加，网络结构的交联点之间的链段长度缩短，链段活动能力减弱，同时分子间作用力增强，抵抗力增加。四种海藻酸钠-稀土凝胶的弹性均大于 50%，稀土离子与海藻酸钠中的羧基形成一种网状结构的强凝胶，同时还有部分未取代的海藻酸钠嵌入其中，使形成的凝胶具有一定的柔韧性。对比凝胶的强度与弹性，发现当凝胶的强度增大时，凝胶的弹性会下降。这是因为链段活动能力的减弱，恢复能力减弱，弹性减小。

2.1.2 海藻酸钠-稀土凝胶的平衡含水量 四种凝胶在溶胀平衡状态下的含水量如图 1，海藻酸钠-稀土凝胶平衡含水量均大于 93%，由此可认为这四种凝胶是一种高含水量的水凝胶。从图中的显著性差异来看，Y^{3+}、Er^{3+}、Ce^{3+}平衡含水量基本相同，而 La^{3+}的平衡含水量相对较低。Ouwerx 等[24] 指出凝胶的网络结构越紧密，容纳自由水分子的空间相对减少，凝胶含水量降低。根据 2.1.1 讨论结果来看，结构的紧密性与平衡含水量的大小存在一定的差异。根据 Kawarada 等[25] 提出离子的水化数会随电负性的减小而减少，通过查找资料[26] 发现这四种离子的电负性大小为 $Y^{3+}>Er^{3+}>Ce^{3+}>La^{3+}$，基本与凝胶的平衡含水量大小保持一致。因此，可以得出凝胶的平衡含水量不仅受到其结构的影响，还受到离子自身的电负性的作用，且起到主要影响。

2.1.3 海藻酸钠-稀土凝胶的离子交换率 在交联程

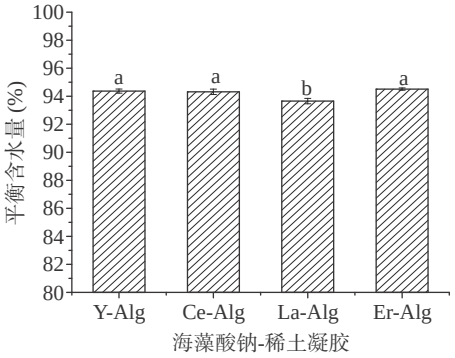


图 1　不同稀土离子对海藻酸钠-稀土凝胶平衡含水量的影响

Fig.1　Equilibrium water content of seaweed rare earth gels

注：不同小写字母表示存在显著性差异（$P<0.05$）；图 2 同。

度达到饱和时，测定四种稀土离子与海藻酸钠中 Na^+交换量的大小如图 2，其中 Ce^{3+}交换率最高，达 52.99%，其次是 Er^{3+}的 50.81%，再者是交换率偏低的 Y^{3+}的 40.74% 和 La^{3+}的 39.33%。稀土离子取代海藻酸钠中 Na^+与羧基螯合形成一种不可逆的强凝胶，越多的 Na^+被取代，交联度增大，形成的强凝胶越多，则宏观表现为凝胶强度的增大，弹性的下降[27]。四种海藻酸钠-稀土凝胶的离子交换率大小关系与 2.1.1 中结果一致，验证了影响此四种凝胶的强度与弹性主要因素就是离子交换量。

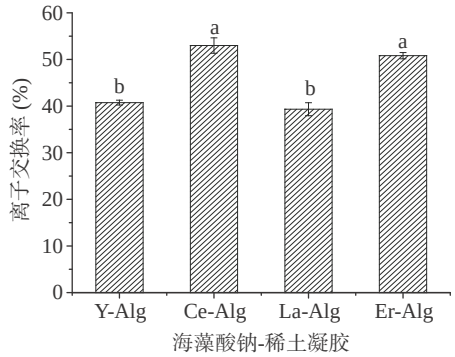


图 2　不同稀土离子对海藻酸钠-稀土凝胶的离子交换率的影响

Fig.2　Ion exchange rate of seaweed rare earth gels

2.1.4　海藻酸钠-稀土凝胶的红外光谱　测定的海藻酸钠和四种稀土凝胶的红外光谱如图 3，在 3400 cm^{-1} 左右的吸收峰归属于-OH 的伸缩振动，在 2925 cm^{-1} 为 C-H 伸缩振动吸收峰，1620 cm^{-1} 与 1400 cm^{-1} 处为-COO-反对称与对称伸缩振动吸收峰，在 1076 cm^{-1} 处为吡喃糖环 C-O 伸缩振动吸收峰[27]。四种稀土凝胶的 C-H 伸缩振动吸收峰明显减弱，由于 GG 片段与稀土离子交联形成的网络结构限制了六元环上 C-H 键的伸缩振动，使得偶极矩变化较小，而吸收峰较弱[28−29]。在-COO-反对称和对称伸缩振动吸收峰上，相对海藻酸钠，Y^{3+}、La^{3+}这两种凝胶振动强度明显减弱，而 Er^{3+}、Ce^{3+}减弱程度较小，尤其 Er^{3+}。首先这一现象由于稀土离子与海藻酸钠中羧基交联形成 C-O-M-O-CO-基团结构，这充分表明海藻酸钠中羧基与稀土离子形成螯合结构，进而证明海藻酸钠-稀土凝胶是稀土离子的交联形成的网状大分子。根据 Hassan[30] 提出的该结构的两种构象，四种稀土离子全是三价离子，可以通过分子间螯合形成非平面几何结构，然而仅通过这种结构形成的凝胶机械性较差，脆性大，不太符合 2.1.1 中稀土凝胶较优的弹性性质，因此稀土凝胶还存在由分子内结合形成平面几何结构。这两种构象使得海藻酸钠-稀土凝胶是一种结构稳定，成胶性能好的凝胶。

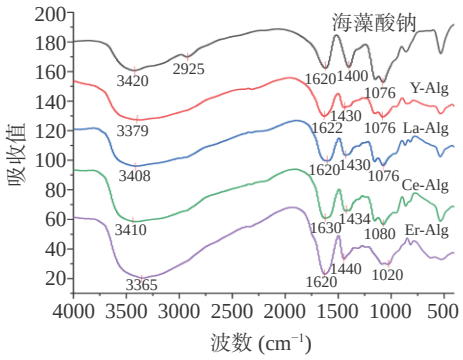


图 3　海藻酸钠和四种海藻酸钠-稀土凝胶的红外光谱

Fig.3　FTIR spectra of sodium alginate and four seaweed rare earth gels

2.1.5　海藻酸钠-稀土凝胶的微观结构　扫面电镜照片可以直观反映海藻酸钠-稀土凝胶的微观结构。由图 4 可知，从表面上来看四种凝胶均表现为无孔、光滑形态，稀土离子进入到海藻酸钠胶液内部，与钠离

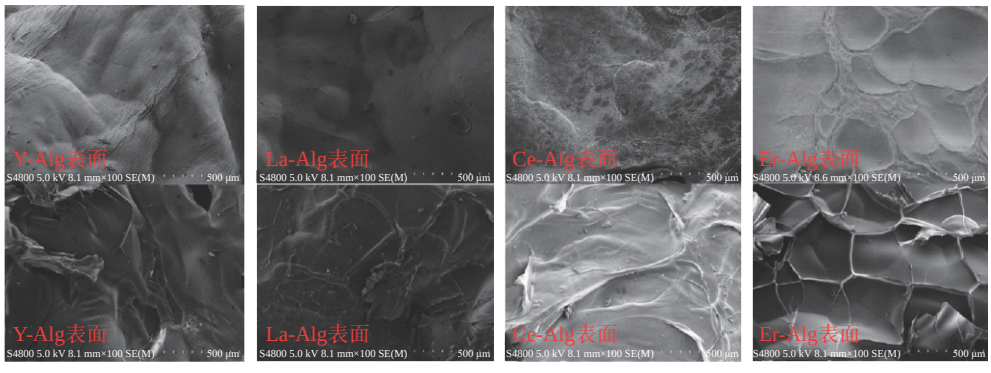


图 4　四种海藻酸钠-稀土凝胶的表面与截面扫描电镜图

Fig.4　SEM of surface and cross sections of four seaweed rare earth gels

子交换，形成一种不可逆凝胶，表面结构紧密度较高。对比四种海藻酸钠-稀土凝胶，表面粗糙度大小依次为 $La^{3+}>Y^{3+}>Er^{3+}>Ce^{3+}$，海藻酸镧凝胶的表面略有裂缝与气泡，海藻酸铈凝胶几乎无气泡与裂缝。从横截面来看，四种海藻酸钠-稀土凝胶均表现为网状结构，稀土离子取代钠离子与海藻酸残基形成具有致密网状结构的强凝胶，同时还存在未取代的海藻酸钠弱凝胶嵌入其中，从而使凝胶在机械性能方面表现为具有粘弹性的固形物。对比四种凝胶，发现凝胶网络结构的网孔大小依次为 $La^{3+}>Y^{3+}>Er^{3+}>Ce^{3+}$，由于更多的稀土离子取代钠离子，与更多海藻酸残基结合，形成更多的交联点，链段缩短，网络结构越紧密。

2.2 M/G 比值对稀土离子与海藻酸钠亲和性的影响

2.2.1 三种海藻酸钠的结构测定 将海藻酸钠降解为小分子片段，得到^{1}H-NMR 谱图，如图 5，其中 G-1 表示以$^1C_4$ 构象连接的单体 G 异头碳质子氢，MM 表示以$^1C_4$ 构象连接的单体 M 异头碳质子氢，GGM 表示单体 G 第五个碳上的质子氢两端分别与 G 和 M 相连，MGM 表示单体 G 第五个碳上的质子氢两端均与 M 相连；MG 表示单体 M 与单体 G 相连，G-5 表示单体 G 第五个碳上的质子氢与 G 相连。

η 是说明海藻酸钠中 M 和 G 分布情况的特征参数，当 $0\leqslant\eta<1$ 时，说明海藻酸钠中 M 和 G 以均聚嵌段为主，主要是 MM，GG 片段排列；当 $\eta=1$ 时说明 M 和 G 处于无规序列；当 $1<\eta\leqslant2$ 是表示 M 和 G 的排列方式是以交替嵌段为主，主要是 MG 片段。由此可见该三种海藻酸钠均是以均聚嵌段为主(表 2)。

第一种海藻酸钠(615 mPa·s)其 M/G 比值约为 2，一种高 M 的海藻酸钠，其二聚体 MM 片段相对较高，达 60.74%，MG 片段相对较低；三聚体 GGG 片段相对较高。第二种海藻酸钠(600 mPa·s)其 M/G 比值约为 1，其中二聚体 MM、GG 含量基本一致，MG 含量相对其他两种海藻酸钠较高。第三种海藻酸钠(66 mPa·s)其 M/G 比值远远小于 1，是一种高 G 的海藻酸钠，其二聚体 GG 含量可达 80.66%；三聚体 GGG 含量也相对较高，占 77.86%。

2.2.2 M/G 比值对海藻酸钠-稀土凝胶亲和性的影响

从图 6 可得到在三种 M/G 比值下，四种海藻酸钠-稀土凝胶的强度与离子交换率大小关系均依次为：a. 当 M/G=1.99>1，$Er^{3+}>Ce^{3+}>Y^{3+}>La^{3+}$；b. 当 M/G=0.99≈1 时，$Ce^{3+}>Er^{3+}>Y^{3+}>La^{3+}$；c. 当 M/G=0.19<1 时，$Ce^{3+}>Er^{3+}>Y^{3+}>La^{3+}$。当海藻酸钠中 G 片段增加时，$Ce^{3+}$、$Y^{3+}$、$La^{3+}$的凝胶强度随之增加，而 Er^{3+}随之下降。而 Ce^{3+}、Y^{3+}、La^{3+}的离子交换率也是随 G 片段增加而增加，Er^{3+}随之下降。这可能由于 Ce^{3+}、Y^{3+}、La^{3+}对海藻酸钠中的 G 片段有一定的偏好性，随 G 片段的增加，使得更多的稀土离子与 Na^+交换，增加交联度，进而凝胶强度增加；而 Er^{3+}反而对 M 片段有一定的偏好性，随 G 片段增加，相对的 M 片段减少，离子交换量较少，导致交联度减小，凝胶强度减弱。

3 结论

M/G≈1 的海藻酸钠与 La^{3+}、Y^{3+}、Er^{3+}、Ce^{3+}形成的海藻酸钠-稀土凝胶的凝胶强度在 32~41 N 之间，杨氏模量在 14~20 N 之间，弹性在 55%~59% 之间，平

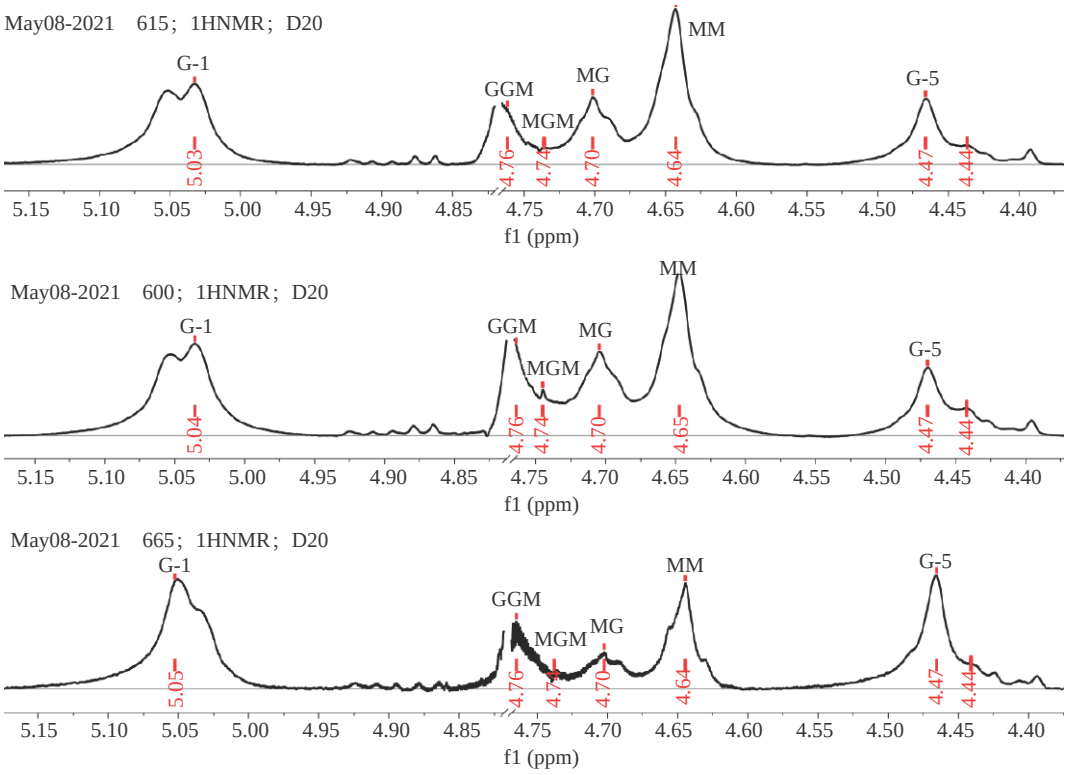


图 5 三种不同 M/G 的海藻酸钠的^{1}H-NMR 图

Fig.5 ^{1}H-NMR of three different M/G sodium alginate

表 2　三种不同 M/G 比值的海藻酸钠结构组成

Table 2　Structural composition of three different M/G sodium alginate

海藻酸钠(mPa·s)	嵌段比例(%)								M/G	分布参数(η)
	FG	FM	FGG	FMG	FMM	FMGM	FGGM	FGGG		
615	33.54	66.46	27.82	5.72	60.74	1.22	4.49	23.32	1.98	0.26
600	50.23	49.77	35.69	14.54	35.23	4.85	9.70	25.99	0.99	0.58
665	84.17	15.83	80.66	3.51	12.32	0.71	2.80	77.86	0.19	0.26

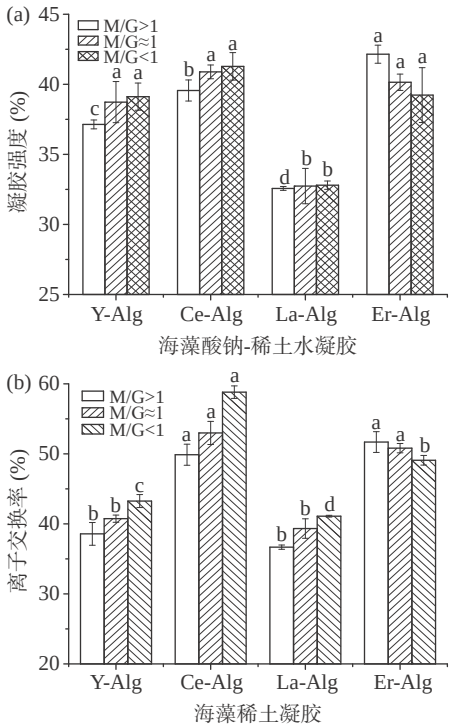


图 6　不同 M/G 比值下四种海藻酸钠-稀土凝胶的凝胶强度(a)与离子交换率(b)

Fig.6　Gel strength (a) and ion exchange rate (b) of four seaweed rare earth gels at different M/G ratios

注：不同小写字母表示同一 M/G 比值下不同海藻酸钠-稀土凝胶之间存在显著性差异(P<0.05)。

衡含水量约大于 93%。四种凝胶的强度为 Ce^{3+}>Er^{3+}>Y^{3+}>La^{3+}，凝胶的内外强度保持一致。弹性为 Ce^{3+}<Er^{3+}<Y^{3+}<La^{3+}，离子交换率大小为：Ce^{3+}为 52.99%，Er^{3+}为 50.81%、Y^{3+}为 40.74%、La^{3+}为 39.33%。离子交换率越高，凝胶的强度越大，弹性越小。

四种海藻酸钠-稀土凝胶的微观结构上，表面上均表现为无孔、光滑形态，横截面均表现为网状结构；C-H 伸缩振动吸收峰与-COO-反对称和对称伸缩振动吸收峰的减弱，是稀土离子与海藻酸钠交联的结果。

在不同 M/G 比值下，四种海藻酸钠-稀土凝胶的强度与离子交换率有所区别，如 a. 当 M/G=1.99>1 时，大小依次为 Er^{3+}>Ce^{3+}>Y^{3+}>La^{3+}；b. 当 M/G=0.99≈1、M/G=0.19<1 时，大小依次为 Ce^{3+}>Er^{3+}>Y^{3+}>La^{3+}，其中 Ce^{3+}、Y^{3+}、La^{3+}对海藻酸钠中的 G 片段有一定的偏好性，随 G 片段的增加，稀土离子与海藻酸钠交换的量增加，交联度增大，凝胶强度增大；而 Er^{3+}却对 M 片段有一定的偏好性，随 G 片段增加，相对的 M 片段减少，离子交换率、凝胶强度均下降。

参考文献

[1] LEE K Y, MOONEY D J. Alginate: Properties and biomedical applications[J]. Prog Polym Sci, 2012, 37(1): 106−126.

[2] PAWAR S N, EDGAR K J. Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications[J]. Biomaterials, 2012, 33(11): 3279−3305.

[3] SETYAWIDATI, N A R, PUSPITA, et al. Seasonal biomass and alginate stock assessment of three abundant genera of brown macroalgae using multispectral high resolution satellite remote sensing: A case study at Ekas Bay (Lombok, Indonesia)[J]. Marine Pollution Bulletin, 2018, 131(b): 40−48.

[4] 李其祥, 肖志方, 易德莲, 等. 海藻酸盐水凝胶研究进展[J]. 科技资讯, 2009, 1(14): 3−4. [LI Q X, XIAO Z F, YI D L, et al. Research progress of alginate saline gel[J]. Science & Technology Information, 2009, 1(14): 3−4.]

[5] 何宏伟. 凝胶电解质的性质与制备 [D]. 青岛: 青岛大学, 2002. [HE H W. Properties and preparation of gelled electrolyte [D]. Qingdao: Qingdao University, 2002.]

[6] 焦联联. 稀土杂化水凝胶的制备及其性能研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2007. [JIAO L L. Preparation and properties of rare earth hybrid hydrogels[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2007.]

[7] 尹海洋. 海藻酸钠/稀土高分子凝胶球的制备及其对染料吸附性能的研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古师范大学, 2019. [YIN H Y. Preparation of SA/rare earth polymer gel spheres and its adsorption properties for dye[D]. Hohhot: Inner Mongolia Normal University, 2019.]

[8] 王志伟. 海藻酸钠-聚谷氨酸凝胶树脂吸附稀土、重金属离子的研究 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2016. [WANG Z W. Adsorption of rare earths and heavy metal ions by using sodium alginate gel resin immobilized poly-γ-glutamate[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2015.]

[9] 闻林刚, 许佳丽, 李皆富, 等. 海藻酸与稀土镧离子的相互作用研究[J]. 成都纺织高等专科学校学报, 2016, 33(3): 23−27. [WEN L G, XU J L, LI J F, et al. Study on the interaction between alginate and lanthanum ion[J]. Journal of Chengdu Textile Colle, 2016, 33(3): 23−27.]

[10] 闻林刚, 许佳丽, 李皆富, 等. 海藻酸镧纤维的制备与表征[J]. 东华大学学报 (自然科学版), 2017, 43(2): 161−167. [WEN L G, XU J L, LI J F, et al. Preparation and characterization of alginate-lanthanum fiber[J]. Journal of Donghua University, 2017, 43(2): 161−167.]

[11] 陈天真. 稀土金属海藻酸盐膜的热性能研究 [D]. 青岛: 青岛大学, 2019. [CHEN T. Study on thermal properties of rare earth metal alginate membrane[D]. Qingdao: Qingdao University, 2019.]

[12] 陈晨. 磁性海藻酸钠/稀土生物高分子凝胶球复合材料的制备, 表征及其吸附特性 [D]. 呼和浩特: 内蒙古师范大学, 2020.

[CHEN C. Preparation, characterization and adsorption properties of magnetic sodium alginate/rare earth biomacromlecule gel spheres composites[D]. Hohhot: Inner Mongolia Normal University, 2020.]
[13] 马强. 稀土离子配位制备海藻酸钠凝胶和层状纳米薄膜[D]. 南京: 东南大学, 2017. [MA Q. Lanthanide ions induced alginate hydrogel and hierarchical and transparent hybrid film[D]. Nanjing: Southeast University, 2017.]
[14] HEBBINK G A, GRAVE L, WOLDERING L A, et al. Unexpected sensitization effeciency of the near-infrared Nd^{3+}, Er^{3+} and Yb^{3+} emission by fluorescein compared to eosin and erythrosin[J]. Journal of Physical Chemistry A Molecules Spectroscopy Kinetics Environment & General Theory, 2003, 107(14): 2483−2491.
[15] 李学锋, 王慧, 龙世军, 等. 离子双交联海藻酸钠/聚(丙烯酰胺-co-丙烯酸)高强度水凝胶的研究[J]. 材料导报, 2020, 34(16): 16149−16154. [LI X F, WANG H, LONG S J, et al. Study on dual ionically crosslinked sodium alginate/poly (acrylamide-co-acrylic acid) high strength hydrogel[J]. Materials Reports, 2020, 34(16): 16149−16154.]
[16] 白玉敏. 全豆营养豆腐工艺的研究 [D]. 成都: 西华大学, 2013. [BAI Y M. Study on the nutrition tofu' technology in whole bean[D]. Chengdu: Xihua University, 2013.]
[17] 韩芳. 鲈鱼贮运过程中理化和质构变化的研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011. [HAN F. Study on physicochemical parameters and texture changes of *Lateolabrax japonicus* meat during storage and transportation[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2011.]
[18] 刘淇, 殷邦忠, 姚健, 等. 牙鲆在低温无水保活过程中的生化变化 [J]. 水产学报, 1999(3): 296−299. [LIU Q, YIN B Z, YAO J, et al. Biochemical changes of the body of *Paralichthys olivaceus* in keeping alive without water and at low temperature condition[J]. Journal of Fisheries of China, 1999(3): 296−299.]
[19] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 5009.3-2016 食品中水分的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 1−2. [National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. GB 5009.3-2016, Determination of moisture in foods[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016: 1−2.]
[20] 中华人民共和国卫生部和中国国家标准化委员会. GB/T 5750.6-2006 生活饮用水标准检验方法金属指标 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2006: 79−82. [Ministry of Health of the People's Republic of China and China National Standardizing Committee. GB/T 5750.6-2006 Standard test method for drinking water metal index[S]. Beijing: Standards Press of China, 2006: 79−82.]
[21] GRASDALEN H, LARSEN B, SMIDSRD O. A PMR study of the composition of uronate residues in alginates[J]. Carbohydrate Research, 1979, 68(1): 23−31.
[22] GRASDALEN H. High-field ^{1}H-NMR spectroscopy of alginate: Sequential structure and linkage conformations[J]. Carbohydr Res, 1983, 118: 255−260.
[23] 孙学超. 不同结构褐藻胶及其系列衍生物的制备与活性研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013. [SUN X C. Preparation and activity studies of different alginates and their series derivaties[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013.]
[24] OUWERX C, VELINGS N, MESTDAGH M M, et al. Physico-chemical properties and rheology of alginate gel beads formed with various divalent cations[J]. Polymer Gels and Networks, 1998, 6(5): 393−408.
[25] KAWARADA H, HIRAI A, ODANI H, et al. Structure characterization of alginate and conformational behaviors of various alkali-metal alginates in solution[J]. Polymer Bulletin, 1990, 24(5): 551−557.
[26] 冯玉彪, 张粉保, 宣利宏, 等. 离子的电负性[J]. 大连轻工业学院学报, 1998, 17(2): 72−78. [FENG Y B, ZHANG F B, XUAN L H, et al. Electronegativity of ions[J]. Journal of Dalian Polytechnic University, 1998, 17(2): 72−78.]
[27] 卢伟丽. 卡拉胶和褐藻胶流变学特性及凝胶特性的研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008. [LU W L. Study on the rheological and gel properties of carrageenan and algin[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2008.]
[28] 秦益民. 甲壳胺和海藻酸纤维在医用敷料中的应用[J]. 针织工业, 2004(5): 60−63. [QIN Y M. Application of chitosan and alginate fiber in medical dressing[J]. Knitting Industry, 2004(5): 60−63.]
[29] 刘昌龄译. 海藻酸盐凝胶和绷带[J]. 印染译丛, 2000(4): 99−103. [LIU C L. Alginate gel and bandage[J]. Printing and Dyeing Translation, 2000(4): 99−103.]
[30] HASSAN R M. Alginate polyelectrolyte lonotropic gels. XIII geometrical aspects for chelation in metal alginate complexes related to their physico-chemical properties[J]. Polymer International, 2010, 31(1): 81−86.

陈玥璋, 曾鸣, 丘建栋, 等. 消费者 Check-all-that-apply 和喜好度测试在植物近水饮料感官评定中的应用研究 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 59−68. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100114

CHEN Yuezhang, ZENG Ming, CHOU Jiandong, et al. Research on the Application of the Consumer Check-all-that-apply and Hedonic Test in the Sensory Profiling of Herbal Near-water Beverages[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 59−68. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100114

· 研究与探讨 ·

消费者 Check-all-that-apply 和喜好度测试在植物近水饮料感官评定中的应用研究

陈玥璋[1], 曾　鸣[1], 丘建栋[1], 曾　辉[1], 朱保庆[2], 刘若瑾[2], 宋　昊[1,*]

（1.北京一轻研究院有限公司, 北京 101111;
2.北京林业大学生物科学与技术学院食品科学系, 林业食品加工与安全北京市重点实验室, 北京 100083）

摘　要: 本研究采用 check-all-that-apply（CATA）法与喜好 9 点标度法相结合的消费者快速感官评价方法，对马尾松、淡竹叶、桑叶、菊花、桂花、薄荷、紫苏、桦树汁露 8 种草本植物近水饮料的感官特征进行分析。消费者在 19 个口感和 24 个气味属性描述词中勾选，对 8 款近水饮料样品进行感官和喜好度评定。喜好度分析结果表明，消费者对 8 款植物近水饮料的喜好度存在差异，消费者对薄荷露和桂花露整体喜好度较高，两者差异不显著（P<0.05）。Cochran's Q test 分析结果表明，样品在 41 个感官属性中均存在显著性差异（P<0.05）。对应分析（Correspondence Analysis，CA）结果说明了 8 种植物近水饮料之间感官特征的差异，薄荷露感官特征突出，具有清凉、薄荷的特征属性；桂花露感官属性主要表现为桂花香、桃香、甜香；菊花露、紫苏露、桑叶露具有相似的绿茶、甘草、菊花等感官属性；马尾松与淡竹叶露感官特征相似；桦树汁露感官特征不明显。结合消费者李克特量表数据进行惩罚分析（Penalty Analysis，PA），本研究发现注重健康人群并未对产品中草药气味表现出显著的不接受；有饮水添加助饮物习惯的人群更偏好甜香、清凉、金银花的感官特征。因此，消费者快速感官评价 CATA 法能够有效测试产品的感官属性和消费者偏好，并在新产品开发和市场调研方向展现出广阔的应用前景。

关键词: 草本植物近水饮料, 消费者, 快速感官评价, CATA, 9 点喜好标度

中图分类号: TS275　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0059−10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100114

本文网刊:

Research on the Application of the Consumer Check-all-that-apply and Hedonic Test in the Sensory Profiling of Herbal Near-water Beverages

CHEN Yuezhang[1], ZENG Ming[1], CHOU Jiandong[1], ZENG Hui[1], ZHU Baoqing[2], LIU Ruojin[2], SONG Hao[1,*]

（1.Beijing Industrial Technology Research Institute Co., Ltd., Beijing 101111, China;
2.Department of Food Science and Engineering, College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China）

Abstract: The sensory characteristics of 8 herbal near-water beverages were studied, which were separately from *Pinus massoniana*, *Lophatherum gracile*, mulberry leaf, chrysanthemum, *Osmanthus fragrans*, *Mentha haplocalyx* leaf, *Perilla frutescens* leaf, and birch sap. The rapid sensory profiling methods involving check-all-that-apply (CATA) test and the 9-point hedonic test were used. The 19 taste and 24 odor attributes were checked by consumers to evaluate the sensory and preference of 8 herbal near-water beverages. The results of hedonic analysis showed that consumers' preferences had differences between 8 herbal near-water beverages. *Mentha haplocalyx* leaf and *Osmanthus fragrans* samples presented higher

收稿日期: 2021−10−14

作者简介: 陈玥璋（1994−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学, E-mail: yuezhang2222@163.com。

*** 通信作者:** 宋昊（1979−）, 女, 博士, 高级工程师, 研究方向: 食品与微生物发酵, E-mail: songhao@bitri.cn。

overall preferences while they did not show significant differences (P<0.05). Cochran's Q test analysis indicated that 8 samples had significant differences in the 41 sensory attributes (P<0.05). In addition, the results of Correspondence Analysis (CA) demonstrated the sensory differences between the 8 herbal near-water beverages. The sensory characteristics of *Mentha haplocalyx* leaf sample showed cool and mint properties. *Osmanthus fragrans* sample showed the odors of Osmanthus, peach, and sweet. Chrysanthemum, *Perilla frutescens* leaf and mulberry leaf samples all illustrated similar green tea, *Glycyrrhiza* and chrysanthemum attributes. Sensory characteristics of *Pinus massoniana* and *Lophatherum gracile* samples were similar and clear, while the sensory profile of birch sap sample was indistinct. Combined with the Penalty Analysis and the results from consumer Likert's rating-scale questionnaires, this study showed that health-conscious consumers did not significantly dislike the odor of Chinese herbal medicines. Moreover, it was found that consumers who have the habit of adding herbs into water preferred sweet, refreshing and honeysuckle sensory attributes. Consequently, the consumer rapid sensory profiling method-check-all-that-apply (CATA) test could availably reveal the sensory profile and consumers' preferences of products, which would show broad application prospects in both directions of new product development and market research.

Key words: herbal near-water beverage; consumer; rapid sensory profiling; check-all-that-apply(CATA); 9-point hedonic test

早在 20 世纪，日本就开始发展并流行一类介于饮用水、功能饮料之间的产品“近水饮料”，它具有透明似水、口味清淡、低卡路里、添加功能成分或天然香味的特点[1]。随着中国消费者健康意识的不断提高，食品饮料领域低糖、低脂的健康饮食观念已逐渐深入人心，天然、健康的无糖饮料也越来越受到消费者关注。在中国，草本植物饮料具有悠久的传统文化特色和饮用习惯，而且“药食同源”草本的健康功能已在消费市场形成认知。草本植物饮料由于满足了消费者对低糖与功能性的双重需求，一跃成为饮品行业发展的关键[2]。

目前，关于草本植物功能性的研究已有很多。例如刘文朵等[3]的研究发现马尾松针水提物对黄色葡萄球菌等 8 种食品腐败细菌均有一定的抑制作用。淡竹叶具有抑菌、抗病毒、抗氧化、降血脂、保肝等功效[4]。桑叶水提物具有防治糖尿病、高血脂症等功效[5−6]。而菊花在中医上具有解表之效，更有研究表明，菊花具有延缓衰老、抗氧化、降低血脂、加强毛细血管的抵抗力、抑制肿瘤、增强人体免疫力等多种药理活性[7]。紫苏中医药理上具有止咳平喘、解表散寒的功效[8]。因此本文将这些草本植物研发成为“近水饮料”，并应用快速感官评价的方法指导以市场为导向的草本植物近水饮料研发。

快速感官评价方法是近年来发展起来的一类针对未经训练消费者的描述性感官评价方法，Check-all-that-apply（CATA）法结合喜好标度法便是其中之一[9]。多年来，针对食品饮料的感官评价工作较为依赖有专业训练的感官小组来对产品进行特征描述分析。然而，这种比较耗费时间和精力的传统感官分析方法对于快速增长的市场需求的适应性越来越差，随着这种演变，消费者快速感官评价方法应运而生[10]。本研究采用的 CATA 法是一种不需要品评者有太强感官认知努力的一种快速感官评价方法，它只需要品评者在问卷中勾选可以描述样品属性的词汇即可[11]。越来越多的证据表明采用专业感官小组的传统感官描述性分析方法例如定量描述性分析法与消费者快速感官评价方法例如 CATA 法得出的结果相似、有效且具备良好的消费者适应性[12−14]。近五年国内外针对 CATA 方法的研究已广泛应用于茶叶[13,15]、酸奶[14,16]、奶酪[17−18]、黄酒[19]、葡萄酒[20]、咖啡[21−24]、鱼类[12,25]、肉制品[26]、炖菜[27]、橄榄油[28]、果蔬汁[29−30]等加工食品及其市场研究领域。

然而，CATA 法在草本饮料领域的研究较少，仅有 P. Monteiro 等学者采用 CATA 法对西方传统木槿花茶的感官描述词典建设进行了研究[31]，而 SONG 和 XIA 等学者在对于消费者消费频率和答题习惯对 CATA 法的影响研究中，选用了菊花茶作为感官评价的对象[22−23]。

基于目前对于草本植物近水饮料的产品研发和消费者快速感官评价分析的研究较少，为满足市场需求及填补科研领域空白，本研究对马尾松、淡竹叶、桑叶、菊花、桂花、薄荷叶、紫苏叶、桦树汁 8 种草本植物进行减压蒸馏提取，以植物萃取液为原料制备成近水饮料，使用消费者测试的快速感官评价方法——CATA 法与喜好标度法相结合对草本植物近水饮料进行感官品质对比分析，为草本植物近水饮料的发展以及消费者快速感官评价方法的应用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

干制马尾松、淡竹叶、桑叶、菊花、桂花、薄荷叶、紫苏叶以及桦树汁　购于徐州茶亦醉人农业发展有限公司。

DC-NSG-20 多功能提取浓缩机组　上海达程实验设备有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 饮料样品制备　根据曾鸣等[32]对金银花露蒸馏液研究中的制备工艺，7 种干制草本植物经低温减压蒸馏工艺分别制成植物提取蒸馏液，该 7 种蒸馏

液及桦树汁分别经调配后制成 8 款草本植物风味近水饮料，用于消费者快速感官 CATA 及喜好度测试。

1.2.2　品评人员　本研究一共募集了 96 位消费者参与测试，男性 30 人，女性 66 人，年龄在 19~36 岁，且主要集中在 20~30 岁。其中 82 人参与消费者问卷调查。他们的职业包括学生、教师和科研人员。此外，本研究招募了 6 位专业品评员，其中男性 3 名，女性 3 名，年龄在 22~36 岁之间，具备专业的感官品评相关知识。

1.2.3　CATA 描述词建立　由 6 位专业品评员组成的评价小组，在北京林业大学感官评价实验室中对 8 款植物近水饮料进行独立的感官评价实验，参考 ISO11035:1994[33] 中对感官描述词的确认和选择方法，整体考虑 8 款植物近水饮料的风味特性，并顾及消费者对描述词的理解性，给出描述产品气味和口感的两类描述词。随后评价小组进行讨论，整理并删减描述词，最终形成了 19 个口感属性描述词和 24 个气味属性描述词，形成的 CATA 评价表见表 1。

1.2.4　样品评价　8 种饮料样品名称使用三位随机编码代表，并以随机顺序呈送给每位消费者。消费者对 8 款样品进行独立评价，通过嗅闻和品尝，对样品进行气味、口感和整体的喜好度测试，测试采用 9 点喜好标度法（1 表示非常不喜欢，9 表示非常喜欢）；同时，如表 1 所示，消费者勾选他们认为所有适合描述产品气味和口感属性的描述词。为了避免感官描述词顺序的影响，CATA 评价表中描述词排列遵循拉丁方设计[34]。在每个样品之间，消费者可以通过纯净水或苏打饼干缓解感官疲劳，休息 3 分钟确定余味消失后，再继续下一样品的测试。

1.2.5　消费者人群分类问卷调查　本问卷调查采用李克特九级量表采集消费者的饮食健康意识和饮水习惯情况信息，从而分析不同类型消费者对草本植物近水饮料感官特征偏好的差异。李克特量表是一种态度反应量表，1932 年被美国社会心理学家李克特首先提出[35]，被广泛应用于调查研究中[36]。消费者通过对量表中陈述问题的回答，反应其对调查主题的态度及意向，研究者通过对不同级别认同程度赋值对结果进行量化和分析。本问卷所设计的陈述性题目从“注重健康情况”和“饮水添加习惯”两主题对消费人群进行调查，具体的“李克特九级量表”题目如表 2 所示，1~8 题为消费者注重健康情况调查，9~12 题为消费者饮水添加习惯情况调查。

1.3　数据处理

使用 SPSS 进行 ANOVA 数据分析；使用 XLSTAT-2019（Addinsoft，美国）分析软件对 CATA 词频和喜好度数据进行分析。

2　结果与分析

2.1　草本植物近水饮料喜好度分析

如图 1、图 2 和图 3 所示，喜好度分析结果表明，消费者对 8 款草本植物近水饮料整体喜好度存在差异，整体喜好度得分由高到低依次是薄荷露、桂花露、菊花露、桑叶露、紫苏露、淡竹叶露、马尾松

表 1　CATA 评价表

Table 1　CATA test form

首先请您嗅闻样品的气味，并根据提示进行打分。

气味喜好程度：

○极其不喜欢 ○很不喜欢 ○比较不喜欢 ○有一点不喜欢 ○谈不上喜欢与不喜欢 ○有一点喜欢 ○比较喜欢 ○很喜欢 ○极其喜欢

请完整浏览以下描述词，并勾选出您能感受到的描述该饮品气味的词。

□树叶　□竹叶　□荷叶　□青草　□甘草　□松针　□螺旋藻　□枸杞　□中草药　□薄荷　□茴香　□紫苏

□桃　□菊花　□桂花　□金银花　□绿茶　□红茶　□凉茶　□甜香　□焦糖　□木头　□霉味　□泥土

现在请您品尝样品，小口品尝并吐掉后，根据提示打分。

口感喜好程度：

○极其不喜欢 ○很不喜欢 ○比较不喜欢 ○有一点不喜欢 ○谈不上喜欢与不喜欢 ○有一点喜欢 ○比较喜欢 ○很喜欢 ○极其喜欢

请完整浏览以下描述词，小口品尝样品并吐掉后，勾选出您能感受到的口感描述词。

□酸　□咸　□苦　□涩　□麻　□辣　□甘甜　□清凉　□菊花　□金银花　□薄荷　□青草

□树叶　□松针　□茴香　□红茶　□绿茶　□凉茶　□酒味

请您综合气味和口感的喜好程度，对样品进行综合评价。

整体喜好程度：

○极其不喜欢 ○很不喜欢 ○比较不喜欢 ○有一点不喜欢 ○谈不上喜欢与不喜欢 ○有一点喜欢 ○比较喜欢 ○很喜欢 ○极其喜欢

表 2 李克特九级量表问卷

Table 2 Likert's 9-rating-scale questionnaire

请选择您对以下描述的同意程度：

○极其不同意 ○很不同意 ○比较不同意 ○有一点不同意 ○谈不上同意与不同意 ○有一点同意 ○比较同意 ○很同意 ○极其同意

1. 我选择食品时从不考虑营养价值。
2. 低脂、低糖饮食对我来说很重要。
3. 我认为方便面和其他食品的营养价值没有什么区别。
4. 我不介意高脂高糖饮食对我的影响。
5. 我非常在意日常饮食的营养价值。
6. 我总是尝试补充一些天然植物成分（例如葡萄籽等），有助于身体健康。
7. 我认为在日常饮食中应摄入足够的膳食纤维和维生素。
8. 我选择食物时，符合我的口味就行，不考虑是否有营养。
9. 我只喝白水，从不添加任何甜味物质。
10. 我喜欢将干花、干果等浸泡在白水中，使白水更有滋味，有助于我饮用更多的水。
11. 我认为白水是甘甜的，不添加任何物质我也能喝很多的白水。
12. 我认为白水没有滋味，我喜欢添加蜂蜜或冰糖一起饮用。

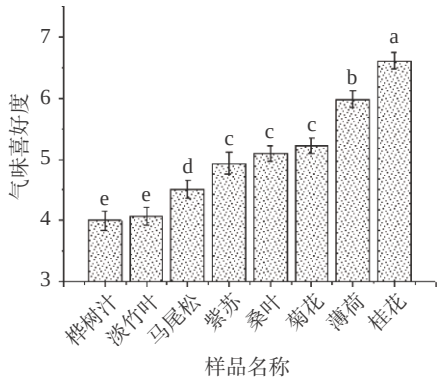


图 1 草本植物近水饮料消费者气味喜好度差异

Fig.1 Consumers' odor hedonic differences between the herbal near-water beverages

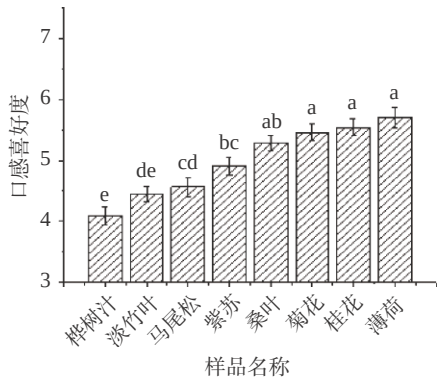


图 2 草本植物近水饮料消费者口感喜好度差异

Fig.2 Consumers' taste hedonic differences between the herbal near-water beverages

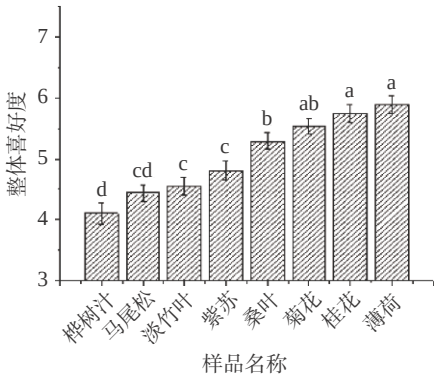


图 3 草本植物近水饮料消费者整体喜好度差异

Fig.3 Consumers' global hedonic differences between the herbal near-water beverages

露、桦树汁露，消费者对薄荷露和桂花露的整体喜好度较高，两者差异不显著（$P>0.05$），口感喜好度得分由高到低排序与整体喜好度排序一致。但气味喜好度得分由高到低依次是桂花露、薄荷露、菊花露、桑叶露、紫苏露、马尾松露、淡竹叶露、桦树汁露，消费者对桂花露的气味喜好度评分最高且与其他草本植物近水饮料的喜好度有显著性差异（$P<0.05$）。

2.2 草本植物近水饮料感官属性分析

2.2.1 词频分析与 Cochran's Q test 分析 图 4 显示了 43 个感官属性描述词的使用频次百分比，其中描述口感的“甘甜”、“清凉”，描述气味的“中草药”、“甜香”为参与测试消费者勾选最多的描述词，而口感描述词“辣”、“酒味”、“麻”、“酸”和气味描述词“螺旋藻”则是勾选频率最低的。据此，“甘甜”、“清凉”、“中草药”、“甜香”是消费者认为草本植物近水饮料中具有普遍性的风味特征属性。

分别分析 8 款植物近水饮料消费者勾选频次最高的词汇，在桂花露中是“桃”气味，在薄荷露中是“薄荷”口感，在马尾松露中是“中草药”气味，在淡竹叶露、桦树汁和桑叶露中是“甘甜”口感，在菊花露中“菊花”口感，在紫苏露中是“清凉”口感。

通过对 8 款植物近水饮料的 43 个感官风味属性进行 Cochran's Q test（表 3），其结果显示产品在 18 个口感属性（酸、咸、苦、涩、麻、辣、甘甜、红茶、

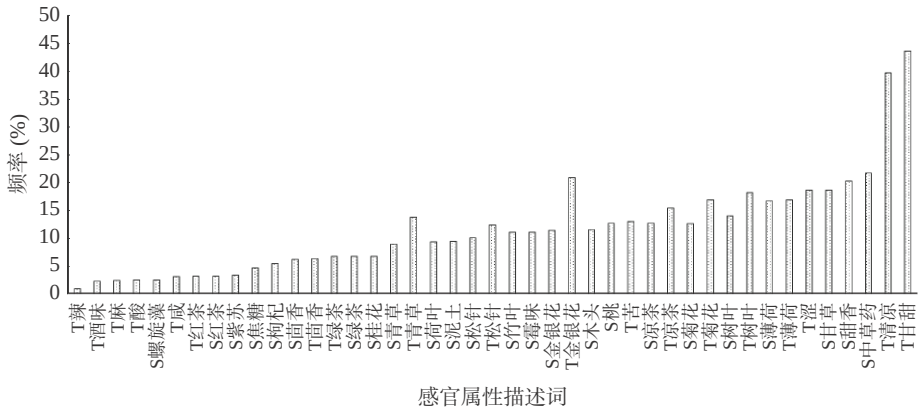


图 4　CATA 测试中草本植物近水饮料各感官属性描述词的出现频率

Fig.4　Frequency of each attribute of herbal near-water beverages in CATA test

注：S 代表气味；T 代表口感。

表 3　43 个感官风味属性 Cochran's Q 检验中的 *P* 值

Table 3　*P*-values of the 43 sensory attributes in Cochran's Q test

气味属性(n=24)	*P*值	口感属性(n=19)	*P*值
树叶	0.00	酸	0.00
竹叶	0.00	咸	0.00
荷叶	0.02	苦	0.00
青草	0.00	涩	0.00
甘草	0.00	麻	0.00
松针	0.00	辣	0.00
螺旋藻	0.00	甘甜	0.00
凉茶	0.00	红茶	0.00
薄荷	0.00	清凉	0.00
茴香	0.00	菊花	0.00
紫苏	0.00	金银花	0.00
桃	0.00	薄荷	0.00
菊花	0.00	青草	0.00
桂花	0.00	树叶	0.00
金银花	0.00	松针	0.00
绿茶	0.00	茴香	0.00
枸杞	0.00	绿茶	0.00
中草药	0.00	凉茶	0.09
红茶	0.14	酒味	0.00
焦糖	0.00		
木头	0.00		
霉味	0.00		
泥土	0.00		
甜香	0.00		

清凉、菊花、金银花、薄荷、青草、树叶、松针、茴香、绿茶、酒味)和 23 个气味属性(树叶、竹叶、荷叶、青草、甘草、松针、螺旋藻、凉茶、薄荷、茴香、紫苏、桃、菊花、桂花、金银花、绿茶、枸杞、中草药、焦糖、木头、霉味、泥土、甜香)中存在显著性差异(P<0.05)，仅在凉茶口感和红茶气味的感官属性上没有显著差异，即 96 位消费者能够显著区分 8 款植物近水饮料中多数感官属性上的差异。

2.2.2　对应分析(Correspondence analysis, CA)　将 8 个近水饮料样品的所有属性频次(即属性强度)进行对应分析(CA)，分析样品与属性之间的关系，如图 5 所示，样品附近的描述词可以体现样品的感官特征[27]。两个成分解释方差达到 66.14%，其中第一主成分解释总变异的 33.93%，第二主成分解释总变异的 32.21%。根据图中样品和描述词的分布情况，薄荷露在第一象限，具有清凉、辣、薄荷的口感属性和薄荷的香气属性；桂花露在第二象限，具有桃、桂花、甜香的气味属性；其余样品主要集中于第三象限，可分为三类，桦树汁自成一类，主要具有苦、涩的口感缺陷，桑叶、菊花、紫苏为一类，具有菊花、紫苏、金银花、绿茶的感官特征，淡竹叶、马尾松为一类，具有树叶、松针、竹叶、泥土的感官特征。

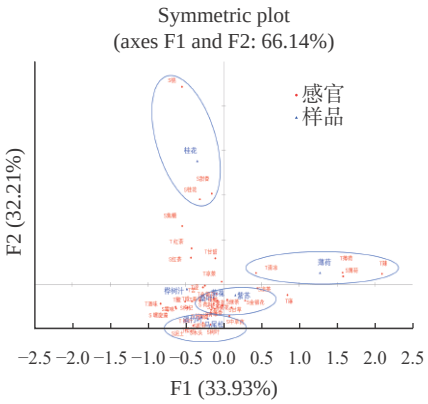


图 5　对应分析中样品与感官属性对称关联图

Fig.5　Symmetric plot of products and attributes in correspondence analysis

注：S 代表气味；T 代表口感；图 6~图 7、图 9 同。

2.3　基于草本植物近水饮料偏好性测试的惩罚分析(Penalty Analysis)与偏好地图分析(Preference Mapping Analysis)

2.3.1　惩罚分析　惩罚分析是通过处理样品属性与总体偏好之间的关系，确定每个感官属性对于总体偏好的影响程度，是用来衡量属性重要程度的标志[37]，

常应用于 CATA 数据的分析[38]。

如图 6 所示，纵坐标反映的是描述词对于样品喜好度的平均影响度，描述词落在纵坐标正值表示其对样品喜好度有正向影响，负值则表示对喜好度有负向影响；横坐标反映的是描述词在所有样品中出现的频率，即强度。由此，口感属性甘甜、清凉、金银花、薄荷、绿茶、红茶等以及气味描述词甜香、桂花、桃、菊花、薄荷等是消费者喜欢的样品属性，而中草药、树叶、青草、泥土等气味和苦、涩、酒等口感则是消费者不喜欢的样品属性。从平均影响度和属性强度两个维度考虑，如图 7 所示，结果表明甘甜、清凉、金银花口感和甜香、中草药气味对样品喜好度产生显著影响（$P<0.05$），其中甘甜、清凉、金银花口感属性和甜香气味会对消费者偏好产生正向影响，而中草药气味则会产生负向影响。

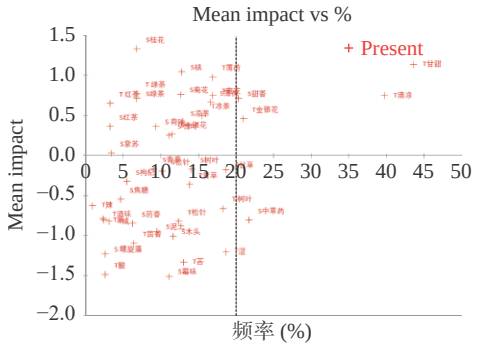


图 6 草本植物近水饮料感官属性对于喜好度的平均影响

Fig.6 Mean impact of attributes of herbal near-water beverages on preference

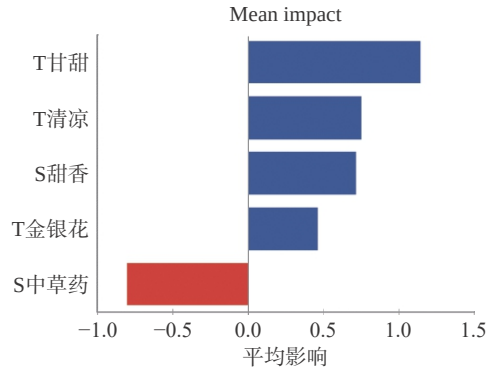


图 7 草本植物近水饮料中对喜好度有显著影响的感官属性

Fig.7 Mean impact of significant attributes of herbal near-water beverages on preference

2.3.2 偏好地图分析 对喜好度数据进行合成聚类（Agglomerative Hierarchical Clustering，AHC）分析，消费者依据其喜好度评价可分为 9 组，见图 8。对样品属性频次进行主成分分析，第一主成分解释了 35.09% 的变异，第二主成分解释了 23.35% 的变异，再将 AHC 中分类距离数据与 PCA 中在两个主成分上的得分图合并，可以得出图 9 所示草本植物近水饮料偏好地图。在偏好地图中，可以直观的发现薄荷露、桂花露更受消费者喜爱，而马尾松、淡竹叶、桦树汁露不被消费者喜爱；而分为 9 组的消费者 C1 人群明确喜爱桦树汁露，C3 人群偏好方向为菊花、紫苏露，C7 人群偏爱桂花露，其余组别消费者都比较喜爱薄荷露，且喜爱“清凉”、“薄荷”的感官属性。

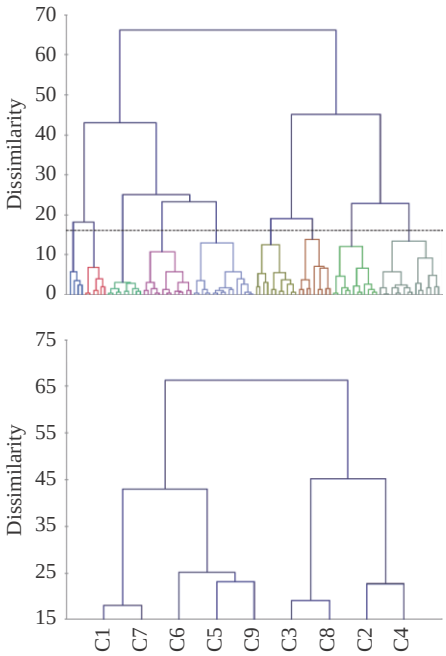


图 8 草本植物近水饮料喜好度的聚合层次聚类系统树图

Fig.8 Dendrogram of AHC of herbal near-water beverages on preference

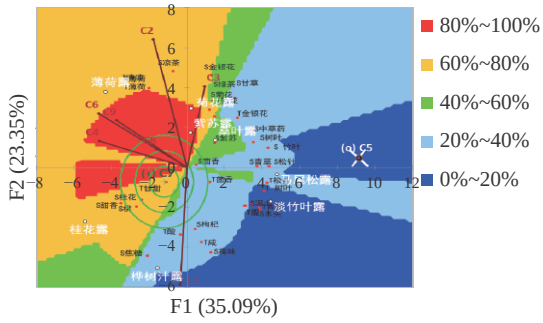


图 9 草本植物近水饮料偏好地图

Fig.9 Preference mapping of herbal near-water beverages

2.4 基于消费人群分类的草本植物近水饮料偏好惩罚分析

2.4.1 不同健康意识人群偏好差异分析 根据消费者李克特量表问卷调查的情况，将消费者分为三类：注重健康人群、中等注重健康人群、不注重健康人群。如图 10 所示，对比三类消费人群对植物近水饮料不同气味属性的偏好发现，虽然中草药气味对三类人群的喜好度都有负面影响，但是对注重健康人群的喜好度并没有形成显著影响（$P<0.05$），即注重健康人群消费者对中草药气味并没有特别介意。三类人群均喜好具有甜香气味的产品；中等注重健康人群不喜欢甘草气味、中草药气味的产品；不注重健康人群不喜欢中草药气味的产品。

如图 11 所示，对比三类消费人群对植物近水饮

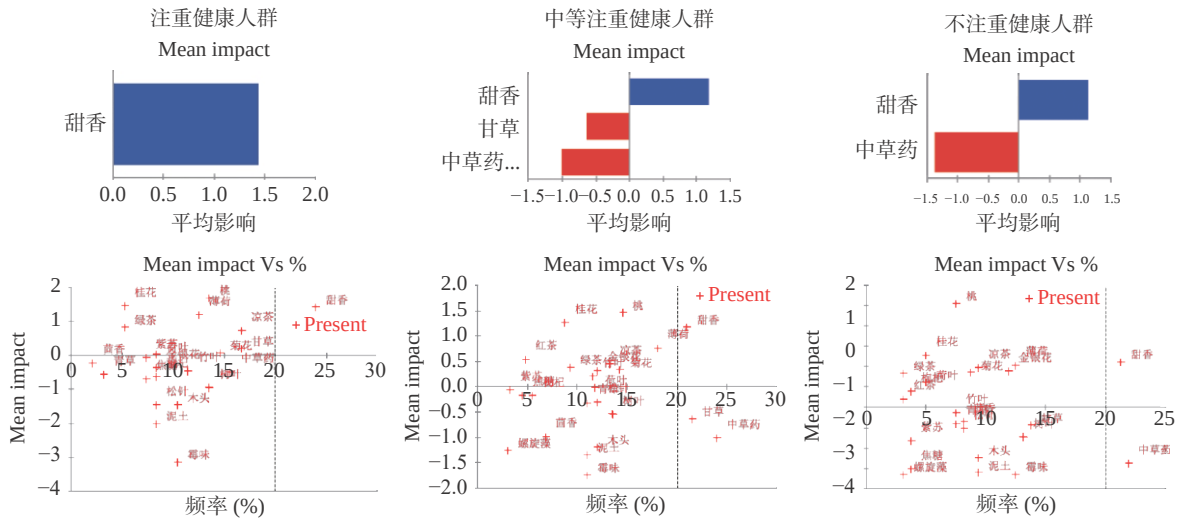


图 10　不同健康意识人群气味偏好惩罚分析

Fig.10　Penalty analysis of the different health-conscious consumers' odor preference

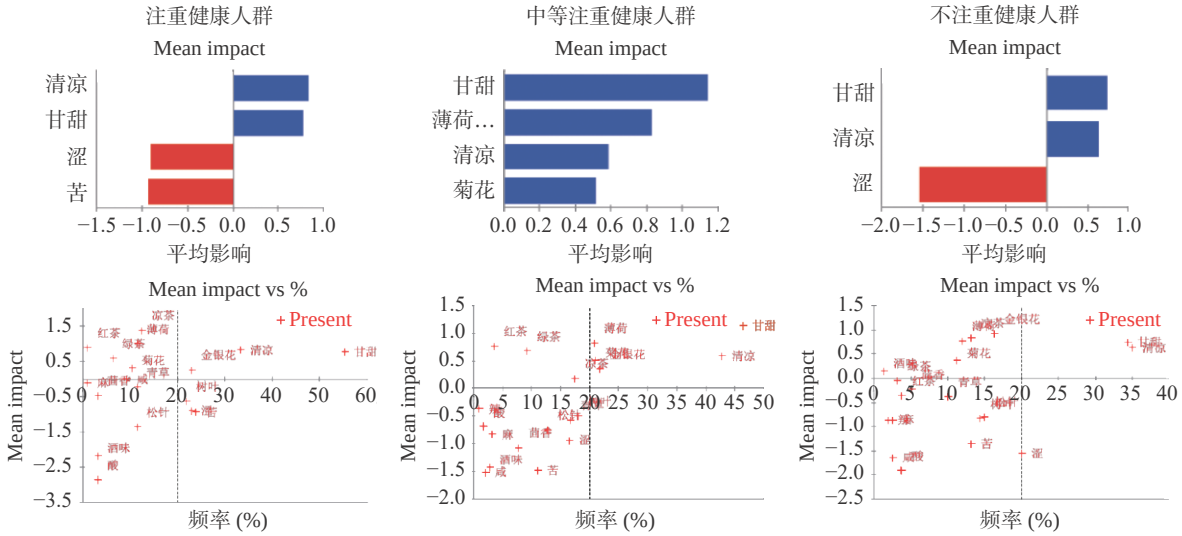


图 11　不同健康意识人群口感偏好惩罚分析

Fig.11　Penalty analysis of the different health-conscious consumers' taste preference

料不同口感属性的偏好发现，三类人群均喜好具有甘甜口感、清凉口感的产品；注重健康人群不喜欢具有苦、涩口感的产品；中等注重健康人群与其他两个人群相比，更显著地喜好具有薄荷、菊花香气的产品；不注重健康人群不喜欢具有涩口感的植物近水饮料。

2.4.2　不同饮水添加习惯人群偏好差异分析　根据消费者李克特量表问卷调查的情况，将消费者分为两类：喜好添加人群与不喜好添加人群。如图 12 和图 13 所示，对比两类消费人群对植物近水饮料不同气味属性的偏好发现，喜好添加草本助饮人群更喜欢草本植物近水饮料中甜香的气味；对比两人群对于口感属性的偏好，喜好添加草本助饮人群除了与不喜好添加人群共同喜爱甘甜的口感外，还偏好草本植物近水饮料中的清凉、金银花口感属性。

3　结论

消费者对 8 款植物近水饮料的喜好度存在差异，薄荷露和桂花露消费者整体喜好度较高，两者不存在显著性差异（P<0.05）；消费者不喜欢马尾松露、淡竹叶露和桦树汁露。消费者对不同草本植物近水饮料的感官认知存在差异，薄荷露感官特征突出，具有清凉口感；桂花露主要表现为桂花香、桃香、甜香；菊花露、紫苏露、桑叶露感官特征相似，主要表现为菊花、紫苏、金银花、绿茶的感官特征；马尾松、淡竹叶露感官特征相似，具有树叶、松针、竹叶、泥土的感官特征；桦树汁主要具有苦、涩的口感缺陷，且感官特征不明显。结合消费者偏好分析，草本植物近水饮料中甘甜、清凉、金银花的口感和甜香、中草药的气味对样品喜好度产生显著影响（P<0.05），说明产品开发方向应主要着力提升甘甜、清凉、金银花口感和甜香气味，规避中草药气味属性。结合消费者行为调查问卷分析，本研究发现注重健康人群并未对产品中草药气味表现出显著的不接受度；有饮水添加草本助

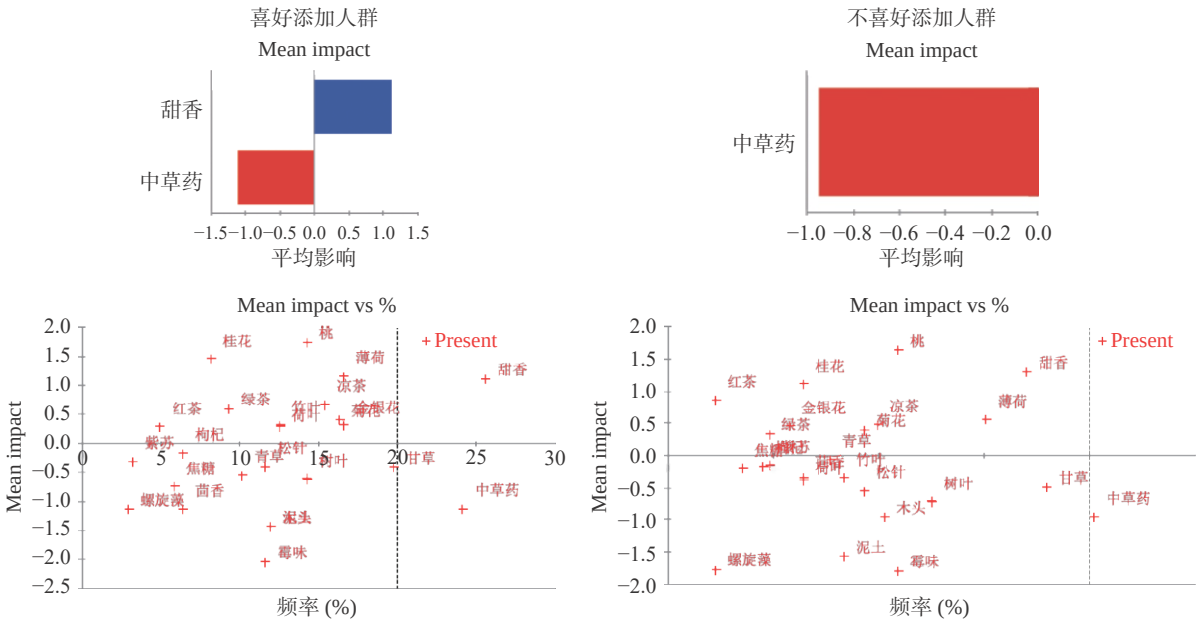


图 12　不同饮水添加习惯人群气味偏好惩罚分析

Fig.12　Penalty analysis of the different drinking-habit consumers' odor preference

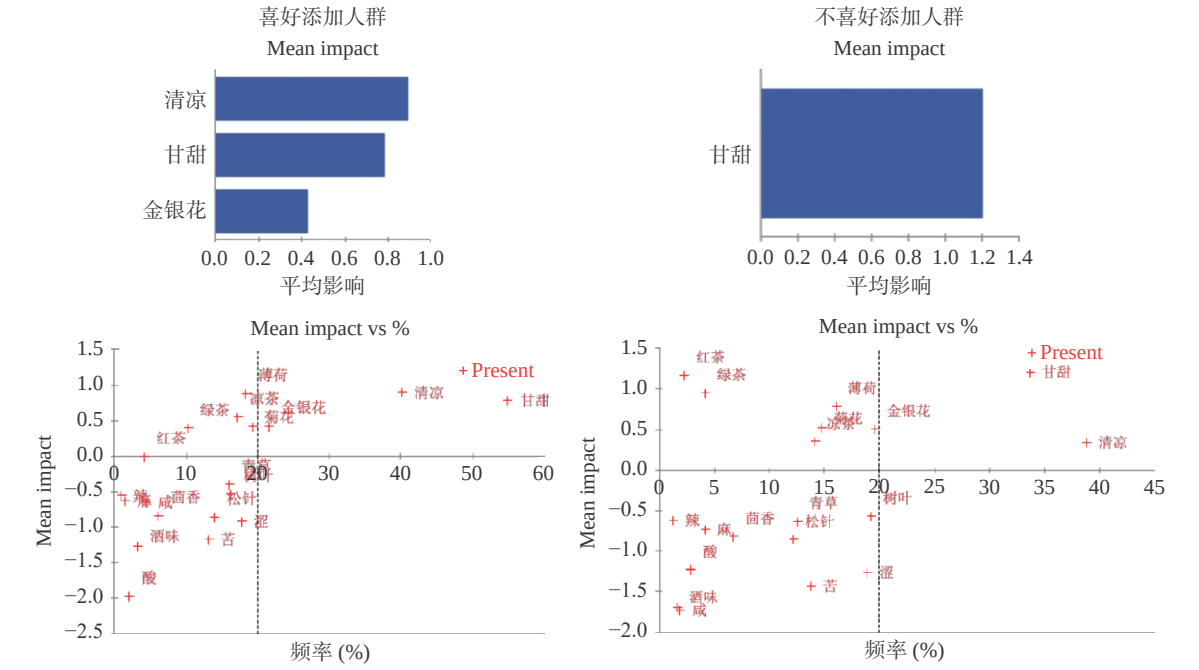


图 13　不同饮水添加习惯人群口感偏好惩罚分析

Fig.13　Penalty analysis of the different drinking-habit consumers' taste preference

饮习惯的人群更偏好甜香、清凉、金银花的感官特征。因此，CATA 测试与喜好度测试相结合的快速感官评价方法可以应用于草本植物近水饮料的感官评价分析，并结合消费者信息指导产品感官改进方向。

参考文献

[1] 邓秀琼, 梁洁红, 程朝阳. 浅谈国内外瓶装水市场发展情况[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(4): 70−74. [DENG X Q, LIANG J H, CHENG Z Y. A superficial view on the development of bottled water market at home and abroad[J]. Food and Fermentation Industries, 2001, 27(4): 70−74.]

[2] 朱向东. 天然草本 (植物) 饮料新品研发与市场趋势的思考[J]. 中国食品添加剂, 2012(5): 192−202. [ZHU X D. R&D and trend of herbal (plant) beverage[J]. China Food Additives, 2012(5): 192−202.]

[3] 刘文朵, 于新, 刘丽, 等. 马尾松针乙醇/水提取物对食品腐败细菌的抑制活性[J]. 中国食品学报, 2013, 13(1): 118−123. [LIU W D, YU X, LIU L, et al. Antimicrobial activities of ethanol and water extract from *Pinus Massoniana* needles[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2013, 13(1): 118−123.]

[4] 陈烨. 淡竹叶化学成分与药理作用研究进展[J]. 亚太传统医药, 2014, 10(13): 50−52. [CHEN Y. Review on research of the chemical constituents and pharmacological activities of *Lophather-*

um Gracile Brongn[J]. Asia-Pacific Traditional Medicine, 2014, 10(13): 50−52.]

[5] 鱼晓敏, 安馨, 鲁慧, 等. 桑叶水提物与醇提物对糖尿病小鼠的协同降血糖效应[J]. 卫生研究, 2018, 47(3): 432−436. [YU X M, AN X, LU H, et al. Hypoglycemic effects of mulberry leaf extracts on diabetic mice[J]. Journal of Hygiene Research, 2018, 47(3): 432−436.]

[6] 邹莉芳, 王玲, 丁晓雯, 等. 桑叶水提物预防小鼠高脂血症的作用研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(8): 3039−3045. [ZOU L F, WANG L, DING X W, et al. Effect study of mulberry leaf water extract prophylaxis of hyperlipemia in high-fat diet mice[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2016, 7(8): 3039−3045.]

[7] 田硕, 苗明三. 菊花的研究及应用现状[J]. 中医学报, 2014, 29(3): 378−380. [TIAN S, MIAO M S. Research and application status of the Chrysanthemum[J]. China Journal of Chinese Medicine, 2014, 29(3): 378−380.]

[8] 何育佩, 郝二伟, 谢金玲, 等. 紫苏药理作用及其化学物质基础研究进展[J]. 中草药, 2018, 49(16): 3957−3968. [HE Y P, HAO E W, XIE J L, et al. Research process on pharmacological effect and substance basis of *Perilla frutescens*[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2018, 49(16): 3957−3968.]

[9] VARELA P, ARES G. Sensory profiling, the blurred line between sensory and consumer science. A review of novel methods for product characterization[J]. Food Research International, 2012, 48(2): 893−908.

[10] DELARUE J, LAWLOR B, ROGEAUX M. Rapid sensory profiling techniques. Applications in new product development and consumer research[M]. Cambridge: Woodhead Publishing, 2014.

[11] ARES G, JAEGER S R. Rapid sensory profiling techniques. Check-all-that-apply (CATA) questions with consumers in practice: experimental considerations and impact on outcome[M]. UK: Woodhead Publishing, 2015: 227-245.

[12] ALEXI N, NANOU E, LAZO O, et al. Check-All-That-Apply (CATA) with semi-trained assessors: Sensory profiles closer to descriptive analysis or consumer elicited data?[J]. Food Quality and Preference, 2018, 64: 11−20.

[13] 李春霖. 基于化学计量学和近红外光谱技术的龙井茶感官及化学品质评价研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2019. [LI C L. Sensory and chemical quality evaluation of longjing tea using chemometrics and near-infrared spectroscopy technique[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2019.]

[14] 杨洋, 杨敏, 索化夷, 等. Check-all-that-apply 和定量描述分析法对褐色酸奶感官性质的分析[J]. 食品与发酵工业, 2020, 18(46): 209−214. [YANG Y, YANG M, SUO H Y, et al. Application of check-all-that-apply and quantitative descriptive analysis in sensory evaluation of brown yogurt[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 18(46): 209−214.]

[15] LIOU B K, JAW Y M, CHUANG G C C, et al. Important sensory, association, and postprandial perception attributes influencing young Taiwanese consumers' acceptance for Taiwanese specialty teas[J]. Foods, 2020, 9(1): 100.

[16] ESMERINO E A, TAVARES FILHO E R, CARR B T, et al. Consumer-based product characterization using Pivot Profile, Projective Mapping and Check-all-that-apply (CATA): A comparative case with Greek yogurt samples[J]. Food Research International, 2017, 99: 375−384.

[17] BORD C, LENOIR L, SCHMIDT-FILGUERAS R, et al. Discrimination and sensory characterization of protected designation of origin salers-and cantal-type cheeses: An approach using descriptive analysis and consumer insights by check-all-that-apply questions[J]. Journal of Sensory Studies, 2021: e12698.

[18] OLIVEIRA E W, ESMERINO E A, CARR B T, et al. Reformulating Minas Frescal cheese using consumers' perceptions: Insights from intensity scales and check-all-that-apply questionnaires [J]. Journal of Dairy Science, 2017, 100(8): 6111−6124.

[19] 王炎, 周志磊, 姬中伟, 等. 年轻消费者黄酒饮用温度偏好研究 [J/OL]. 食品与发酵工业: 1−9[2021-08-27]. [WANG Y, ZHOU Z L, JI Z W, et al. Research on young consumers' preference of serving temperature when drinking Huangjiu[J/OL]. Food and Fermentation Industries: 1−9[2021-08-27].]

[20] MAHIEU B, VISALLI M, THOMAS A, et al. Free-comment outperformed check-all-that-apply in the sensory characterisation of wines with consumers at home[J]. Food Quality and Preference, 2020, 84: 103937.

[21] ESPITIA-LÓPEZ J, ROGELIO-FLORES F, ANGEL-CUAPIO A, et al. Characterization of sensory profile by the CATA method of Mexican coffee brew considering two preparation methods: Espresso and French press[J]. International Journal of Food Properties, 2019, 22(1): 967−973.

[22] GIACALONE D, DEGN T K, YANG N, et al. Common roasting defects in coffee: Aroma composition, sensory characterization and consumer perception[J]. Food Quality and Preference, 2019, 71: 463−474.

[23] XIA Y, SONG J, LEE P Y, et al. Impact of consumption frequency on generations of sensory product profiles using CATA questions: Case studies with two drink categories[J]. Food Research International, 2020, 137: 109378.

[24] SONG J, XIA Y, ZHONG F. Consumers with high frequency of'just about right'in JAR scales may use lower cognitive effort: Evidence from the concurrent 9-point hedonic scale and CATA question[J]. Food Research International, 2021, 143: 110285.

[25] SILVA F, DUARTE A M, MENDES S, et al. CATA vs. FCP for a rapid descriptive analysis in sensory characterization of fish[J]. Journal of Sensory Studies, 2020, 35(6): e12605.

[26] da CONCEIÇÃO JORGE É, MENDES A C G, AURIEMA B E, et al. Application of a check-all-that-apply question for evaluating and characterizing meat products[J]. Meat Science, 2015, 100: 124−133.

[27] HISCOCK L, BOTHMA C, HUGO A, et al. Hedonic evaluation and check-all-that-apply (CATA) question for sensory characterisation of stewed vegetable Amaranthus[J]. Journal of Food Science and Technology, 2020, 57(2): 454−462.

[28] PIOCHI M, CABRINO G, TORRI L. Check-all-that-apply (CATA) test to investigate the consumers' perception of olive oil sensory properties: Effect of storage time and packaging material

[J]. Foods, 2021, 10(7): 1551.
[29] JAEGER S R, BERESFORD M K, LO K R, et al. What does it mean to check-all-that-apply? Four case studies with beverages [J]. Food Quality and Preference, 2020, 80: 103794.
[30] WAEHRENS S S, GRØNBECK M S, OLSEN K, et al. Impact of consumer associations, emotions, and appropriateness for use on food acceptability: A CATA and liking evaluation of vegetable and berry beverages[J]. Journal of Sensory Studies, 2018, 33(4): e12328.
[31] P MONTEIRO M J, A COSTA A I, FRANCO M I, et al. Cross-cultural development of hibiscus tea sensory lexicons for trained and untrained panelists[J]. Journal of Sensory Studies, 2017, 32(5): e12297.
[32] 曾鸣, 吴明辉, 刘传备, 等. 金银花露不同蒸馏段挥发性成分的测定分析[J]. 食品工业科技, 2020, 41(5): 45−51. [ZENG M, WU M H, LIU C B, et al. Determination and analysis of volatile components in different distillation fractions of honeysuckle flower[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(5): 45−51.]
[33] Technical Committee ISO/TC 34. ISO 11035: 1994 Sensory analysis-identification and selection of descriptors for establishing a sensory profile by a multidimensional approach [S].
[34] ARES G, JAEGER S R. Check-all-that-apply questions: Influence of attribute order on sensory product characterization[J]. Food Quality and Preference, 2013, 28(1): 141−153.
[35] LIKERT R. A technique for the measurement of attitudes[J]. Archives of Psychology, 1932(4).
[36] SULLIVAN G M, ARTINO JR A R. Analyzing and interpreting data from Likert-type scales[J]. Journal of Graduate Medical Education, 2013, 5(4): 541−542.
[37] ARES G, DAUBER C, FERNÁNDEZ E, et al. Penalty analysis based on CATA questions to identify drivers of liking and directions for product reformulation[J]. Food Quality and Preference, 2014, 32: 65−76.
[38] MEYNERS M, CASTURA J C, CARR B T. Existing and new approaches for the analysis of CATA data[J]. Food Quality and Preference, 2013, 30(2): 309−319.

向瑞琪, 谢锋, 谭红, 等. 三种食用菌多糖的基本结构与抗氧化活性研究 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 69−76. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100170

XIANG Ruiqi, XIE Feng, TAN Hong, et al. Study on Basic Structure and Antioxidant Activity of Polysaccharides from Three Edible Fungi[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 69−76. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100170

· 研究与探讨 ·

三种食用菌多糖的基本结构与抗氧化活性研究

向瑞琪[1], 谢　锋[1,2,*], 谭　红[3], 李占彬[2], 孙晓红[1]

(1.贵州医科大学公共卫生学院与健康学院, 环境污染与疾病监控教育部重点实验室, 贵州 贵阳 550025;
2.贵州省分析测试研究院, 贵州 贵阳 550000;
3.贵州科学院, 贵州 贵阳 550000)

摘　要: 通过水提醇沉法提取香菇、黑木耳和红托竹荪的边角废料菌托中的多糖，并用 Sevag 试剂和透析法分离纯化，得到三种食用菌多糖。采用紫外分光光度计、高效凝胶渗透色谱法（high performance gel permeation chromatography，HPGPC）、红外光谱法（infrared spectroscopy，IR）、核磁共振波谱法（nuclear magnetic resonance，NMR）和刚果红实验分析三种食用菌多糖的分子量、官能团、糖苷键和三螺旋结构。将清除 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基（1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine free radical，DPPH·）和羟基自由基（Hydroxyl free radicals，OH·）的能力及 Fe^{3+} 总还原力来判断三种食用菌多糖抗氧化能力，比较分析三种食用菌的基本结构和抗氧化活性。结果显示，制备的三种食用菌多糖都具有较好的均一性，分子量分布在万级和百万级。三种食用菌多糖含有相似的官能团，是既具有 α 构型又具有 β 构型的酸性多糖，且均具有三螺旋结构。此外，三种食用菌多糖在实验浓度范围内，均具有良好的抗氧化活性。其中红托竹荪菌托多糖在 1.0 mg/mL 浓度时对 DPPH 和在 3.0 mg/mL 浓度时对 OH 自由基的清除能力优于香菇和黑木耳多糖，高达 66.86% 和 35.69%，对 DPPH 和 OH 自由基的清除能力 IC_{50} 值分别为 0.010 和 0.195 mg/mL。综上，三种食用菌多糖的基本结构无显著性差异，但抗氧化活性差异较大，为工业化生产利用红托竹荪边角废料提取食用菌多糖奠定基础。

关键词: 红托竹荪, 香菇, 木耳, 多糖, 结构, 抗氧化活性

中图分类号: TS201.2　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0069−08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100170

本文网刊:

Study on Basic Structure and Antioxidant Activity of Polysaccharides from Three Edible Fungi

XIANG Ruiqi[1], XIE Feng[1,2,*], TAN Hong[3], LI Zhanbin[2], SUN Xiaohong[1]

(1.The Key Laboratory of Environmental Pollution Monitoring and Disease Control, Ministry of Education, School of Public Health, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China;
2.Guizhou Academy of Testing and Analysis, Guiyang 550000, China;
3.Guizhou Academy of Sciences, Guiyang 550000, China)

Abstract: In this study, polysaccharides from *Lentinus edodes*, *Auricularia auricula* and the waste from the corners of *Dictyophora rubrovolvata* were extracted by water extraction and alcohol precipitation, and separated and purified by Sevag reagent and dialysis. The molecular weight, functional groups, glycosidic bond and three helix structure of three edible fungi polysaccharides were analyzed by ultraviolet spectrophotometer, high performance gel permeation chromatography

收稿日期: 2021−10−18

基金项目: 贵州省科技计划项目（ZWCQ[2019]3013-5）; 贵州省科技计划项目（[2019]2451-8-3）; 贵州省科技计划项目（[2019]4001）。

作者简介: 向瑞琪（1996−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全, E-mail: 351763887@qq.com。

*** 通信作者:** 谢锋（1979−）, 男, 博士, 研究员, 研究方向: 食品检测技术等, E-mail: xiefeng@gzata.cn。

(HPGPC), infrared spectroscopy (IR), nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) and Congo red experiment. The antioxidant capacity of polysaccharides from three edible fungi was evaluated by scavenging 1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine free radical (DPPH·) and hydroxyl free radicals (OH·) and the total reducing power of Fe^{3+}, and the basic structure and antioxidant activity of the three edible fungi were compared and analyzed. The results showed that the three edible fungus polysaccharides had good homogeneity, and the molecular weight distribution was in the order of tens of thousands and millions. The three edible fungus polysaccharides contained similar functional groups, which were the acidic polysaccharides with configuration both α and β, and all of them had triple helix structure. In addition, the three edible fungus polysaccharides had good antioxidant activity in the range of experimental concentration. When the concentration was 1.0 and 3.0 mg/mL, the DPPH and OH radical scavenging ability of *Dictyophora rubrovolvata* polysaccharide was better than that of *Lentinus edodes* and *Auricularia auricula* polysaccharide, up to 66.86% and 35.69%, their IC_{50} value were 0.010 and 0.195 mg/mL. In conclusion, there was no significant difference in the basic structure of polysaccharides from the three kinds of edible fungi, but there was a great difference in antioxidant activities, which laid a foundation for industrial production of extracting edible fungi polysaccharides from the waste of *Dictyophora rubrovolvata.*

Key words: *Dictyophora rubrovolvata*; *Lentinus edodes*; *Auricularia auricular*; polysaccharide; structure; antioxidant activity

红托竹荪(*Dictyophora rubrovolvata*)被称为“山珍之王”和“菌中王后”,是贵州省的特色食用菌产业之一,在贵州的栽培技术水平、产量和产值均为全国第一[1]。红托竹荪子实体分为菌盖、菌柄和菌托 3 个部分。其中不可食用的菌托约占整个竹荪鲜重的 50%,采摘后被去掉,造成了资源浪费和环境污染[2−3]。食用菌中主要活性成分是多糖[4],具有降血脂、降血糖[5]、抗氧化、延缓衰老[6]、抗凝血、免疫调节[7]、抗肿瘤和抗病毒等[8−10] 功效。研究发现红托竹荪菌托中的多糖是三个部分中含量最高、体外抗氧化活性最强的[11]。近年来关于红托竹荪多糖的研究主要集中在子实体可食部分的提取及其抗氧化,而关于红托竹荪菌托多糖的研究较少。滕春丽等[12] 研究超声提取红托竹荪多糖的工艺及其膜分离方法;王新等[13] 研究了红托竹荪子实体多糖对耐缺氧及抗运动疲劳效果的影响;叶敏等[14] 比较了不同去蛋白方法对红托竹荪子实体多糖损失率和脱蛋白效果。

以上研究中均未有对红托竹荪的边角废料菌托的结构与生物活性的相关探究,因此为探索其构效关系,并与同为贵州省食用菌重点产业的香菇和黑木耳对比,提取三种食用菌多糖后去蛋白透析。采用紫外分光光度计、高效凝胶色谱(High Performance Gel Permeation Chromatography, HPGPC)、红外光谱(Infrared spectrum, IR)、核磁共振(Nuclear Magnetic Resonance, NMR)和刚果红实验对比分析红托竹荪菌托中多糖与其他食用菌多糖的基本结构。通过清除 DPPH 和 OH 自由基的能力及 Fe^{3+}总还原力来比较三种食用菌多糖抗氧化能力,为利用红托竹荪边角废料于工业化生产多糖制品,代替昂贵的食用菌多糖食品,开发红托竹荪边角废料的利用价值和食用菌深加工提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

香菇、黑木耳、红托竹荪菌托　贵州省梵天菌业有限公司提供;标准品葡聚糖 Dextran 系列(T-2000、T-150、T-40、T10、T-5)　美国 Sigma 公司;溴化钾光谱纯,上海阿拉丁试剂有限公司;透析袋 3500 Da　北京索莱宝科技有限公司;铁氰化钾　分析纯,上海麦克林生化科技有限公司;1, 1-二苯基-2-苦基肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)　纯度 98%,上海源叶生物科技有限公司;其他化学试剂　均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

BSM220.4 电子天平　上海卓精电子科技有限公司;Milli-Q 实验室超纯水系统　昆明倍捷科技有限公司;SHB-Ⅲ循环水式多用真空泵　郑州长城科工贸有限公司;HH-4 数显恒温水浴锅　金坛区西城新瑞仪器厂;1901PC 紫外可见光分光光度计、723S 可见分光光度计　上海棱光技术有限公司;FD-1A-50 冷冻干燥机　北京博医康实验仪器有限公司;1525 型高效液相色谱仪　美国 Waters 公司;iCAN 9 傅里叶变换红外光谱仪　天津市能谱科技有限公司;Bruker Avance III-600 MHz 超导核磁共振仪　瑞士 Bruker 公司。

1.2 实验方法

1.2.1　食用菌多糖的制备　分别称取粉碎后的食用菌 10 g,按照料液比 1∶25(g/mL)加入蒸馏水,90 ℃提取 2 h。抽滤后收集滤液,滤渣在相同条件下重复提取后合并两次滤液浓缩。加入适量的无水乙醇,配制成 95% 的乙醇浓度,室温下放置过夜。4000 r/min 下离心,弃去上层乙醇溶液,底部沉淀加水溶解。采用 Sevag 法去除蛋白[15],加入 4 倍体积的 Sevag 试剂,匀浆机搅拌 20 min 后离心,去除中间层的变性蛋白,重复以上步骤至无蛋白。浓缩后装入透析袋中流水透析 2 d,冷冻干燥后得到三种食用菌多糖。采用苯酚-硫酸法分别测定三种食用菌多糖纯度[16]。

1.2.2　紫外光谱分析　称取样品用水配制成 1 mg/mL 的溶液,在 190~400 nm 处的紫外分光光度计进行全扫描。

1.2.3　相对分子量测定　采用高效凝胶渗透色谱法（High-Performance Gel Permeation Chromatography, HPGPC）测定三种食用菌的相对分子量[17]。测试条件：Waters 1525 型色谱仪，示差折光检测器；色谱柱：Ultrahydrogel™ Linear（300 mm×7.8 mm id×2）；流动相：0.1 mol/L 硝酸钠溶液；流速：0.9 mL/min；柱温：45 ℃。

葡萄标准曲线：称取 Dextran T-2000（M_W 2×10^7）、T-150（M_W 133850）、T-40（M_W 36800）、T10（M_W 9750）、T-5（M_W 2700）、M_W 180）标准品用流动相溶解配制成 5 mg/mL 的标准分子量溶液。以洗脱峰的保留时间 T（min）为横坐标，葡聚糖标准品分子量的对数值 lgMW 为纵坐标，其回归方程为 y=13.8534x−0.4627，R^2=0.9991。Breeze GPC 软件对曲线进行回归拟合绘制分子量校正曲线。

1.2.4　红外光谱测定　取 2 mg 的三种多糖样品，与 100 mg KBr 混匀研磨，压片后在 4000~400 cm^{-1} 进行傅里叶红外光谱测试[18]。

1.2.5　核磁共振分析　取三种食用菌 30 mg，溶解于 D_2O 重水中，移入核磁管中，在 25 ℃ 条件下，用 Bruker Avance III-600 MHz 核磁共振波谱仪记录，^{1}H NMR 在 600 MHz 测定，^{13}C NMR 在 150 MHz 测定[19]。

1.2.6　刚果红实验　参考文献 [20]，分别吸取 1 mL 配制好的 1 mg/mL 不同食用菌多糖溶液与同体积 80 μmol/L 刚果红溶液混合，再加入 4 mL 用 5 mol/L 氢氧化钠原液配制成 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mol/L 的氢氧化钠溶液，蒸馏水为空白对照，在 25 ℃ 下反应 10 min，400~700 nm 处测量最大吸收波长。

1.2.7　抗氧化性分析

1.2.7.1　DPPH 自由基清除率的测定　根据王莹等[21]的检测方法并加以改进。用无水乙醇配制 0.08 mol/L 的 DPPH 溶液。吸取 2.0 mL 不同浓度（0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL）的三种食用菌多糖样品溶液加入 3.0 mL 的 DPPH 溶液，混匀后避光反应 30 min。蒸馏水为空白对照，于 517 nm 波长处测定吸光度值。

$$\text{DPPH清除能力}(\%)=\frac{A_0-(As-Ac)}{A_0}\times 100 \quad \text{式（1）}$$

式中：A_0 为蒸馏水+DPPH 溶液的吸光度值；Ac 为样品溶液+蒸馏水的吸光度值；As 为样品溶液+DPPH 溶液的吸光度值。

1.2.7.2　Fe^{3+}总还原力测定　参考罗丽平等[22]的测定方法。吸取 2.0 mL 不同浓度（0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 mg/mL）的食用菌多糖样品溶液，依次加入 2.5 mL 的 0.2 mol/L，pH6.6 的磷酸盐缓冲液和 2.5 mL 1% 的铁氰化钾后在 50 ℃ 水浴锅中反应 20 min。加入 2.5 mL 10% 的三氯乙酸，300 r/min 离心 10 min。吸取 2.5 mL 上清液加入 2.5 mL 蒸馏水和 0.5 mL 0.1% 的三氯化铁。蒸馏水为空白对照，700 nm 处测定吸光度值。

$$\text{还原力}=A_h-A_0 \quad \text{式（2）}$$

式中：A_h 为样品溶液的吸光度值；A_0 为空白对照的吸光度值。

1.2.7.3　羟基自由基清除率的测定　按照林陈强等[23]的检测方法并改进。吸取 1.0 mL 不同浓度的食用菌多糖样品溶液（0.5 、1.0、1.5、2.0、3.0 mg/mL），依次加入用无水乙醇配制 10.0 mmol/L 的水杨酸溶液和 9.0 mmol/L 的 $FeSO_4$ 各 1.0 mL 混合均匀。再加入 2.0 mL 蒸馏水和 1.0 mL 6.0 mmol/L 的 H_2O_2，37 ℃ 水浴反应 10 min。蒸馏水为空白对照，在 510 nm 处测定吸光度值。

$$\text{羟基自由基清除率}(\%)=\frac{A_0-(As-Ac)}{A_0}\times 100 \quad \text{式（3）}$$

式中：A_0 为空白对照的吸光度值；As 为样品+$FeSO_4$+水杨酸+H_2O_2 的吸光度值；Ac 为样品+$FeSO_4$+水杨酸的吸光度值。

1.3　数据处理

结果表示为平均值±标准差，采用 SPSS13.0 软件中的单因素方差分析（ANOVA）进行数据统计分析，P<0.05 被认为是具有显著性差异。通过 Origin 2019 软件对数据进行作图，每组实验设置 3 次重复。

2　结果与分析

2.1　三种食用菌多糖纯度测定

以葡萄糖标准品含量为横坐标，以吸光值为纵坐标绘制标准曲线，得标准线性方程为：y=8.0823x−0.0043，R^2=0.9997。以香菇、黑木耳和红托竹荪菌托为原料分别制得的多糖含量为 78%±0.23%、81%±0.15% 和 76%±0.36%。三种食用菌提取的多糖含量与研究[24−26]中的多糖含量相比较低，可能是产地和品种的不同所致。

2.2　三种食用菌多糖紫外光谱分析

三种食用菌紫外全扫描如图 1 所示，由于三种食用菌多糖的溶液颜色、组成物质及其稳定性的不同导致最大吸光度不同。在 260 和 280 nm 处红托

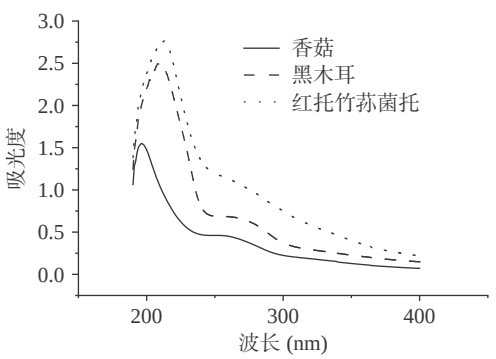


图 1　三种食用菌多糖紫外扫描图谱

Fig.1　UV scanning spectra of polysaccharides from three edible fungi

竹荪菌托无特征吸收峰，在 260 nm 处香菇和黑木耳有特征吸收峰，说明通过 Sevag 脱蛋白和透析后红托竹荪菌托多糖样品不含核酸和蛋白质，而香菇和黑木耳含有少量核酸，不含蛋白质。

2.3 三种食用菌多糖的相对分子量差异

通过高效凝胶渗透色谱法测定三种不同食用菌多糖的相对分子量，三种样品中多糖的相对分子质量分布和其分布范围根据葡聚糖的标准曲线得到，其回归方程为 y=13.3579x−0.5349，R^2=0.9991。如表 1 所示，三种食用菌多糖的分子量分布均出现两个洗脱峰。其中香菇多糖的重均分子量（Mw）主要分布在 1.18×10^4 Da，黑木耳多糖的重均分子量主要分布在 1.29×10^4 Da，红托竹荪菌托多糖的重均分子量主要分布在 3.89×10^4 Da。多分散系数（Mw/Mn）分别为 0.61、0.39、1.20，多分散系数接近于 1，分子量分布越均一。三种食用菌多糖均分布在万级和百万级，并且在分子量分布均一性上红托竹荪菌托多糖最好，香菇多糖其次，黑木耳多糖最差。

表 1 不同食用菌多糖的相对分子量

Table 1 Relative molecular weights of polysaccharides from different edible fungi

样品		保留时间（min）	数均分子量 Mn(Da)	重均分子量 Mw(Da)	峰面积百分比(%)
香菇	峰1	14.450	5048044	2493241	10.36
	峰2	18.581	19323	11833	89.64
黑木耳	峰1	14.533	2888182	1479232	23.76
	峰2	17.317	33425	12910	76.24
红托竹荪菌托	峰1	11.713	70400757	15481643	2.42
	峰2	17.343	32564	38948	97.58

2.4 三种食用菌红外光谱分析

采用傅里叶变换红外光谱法对三种食用菌多糖进行官能团分析。如图 2 所示，三种食用菌多糖的特征峰相似。在 3400~3200 cm^{-1} 处的吸收峰是由 O-H 引起的伸缩振动，在 2900 cm^{-1} 附近的吸收峰是由 C-H 伸缩振动引起的。三种食用菌多糖分别在 3364、3363 和 3335 cm^{-1} 附近出现特征峰，证明三种多糖都存在羟基-OH。2925、2933 和 2931.72 cm^{-1} 是亚甲基-CH_2 的特征峰，羟基和亚甲基是多糖的特征基团[27]。1600 cm^{-1} 附近是酰胺基 C=O 的特征吸收峰，而在 1417 cm^{-1} 附近出现的吸收峰是 C=O 对称伸缩振动引起的，证明三种食用菌多糖含有羧基-COOH。在 1100 cm^{-1} 附近为 C-O-C 伸缩振动吸收峰，是吡喃糖环的特征峰[28]。在 860.10、892.88、898.87 cm^{-1} 附近是 β 糖苷键的特征吸收峰，674.68、609.40、649.89 cm^{-1} 附近是 α 糖苷键特征吸收峰，由图可知，三种食用菌多糖是既具有 α 构型又具有 β 构型的酸性多糖。

2.5 三种食用菌多糖核磁共振分析

在图 3 中，三种食用菌多糖化学位移 δ 在 4.5~5.5 范围内，有 2 处异头氢质子 H-1 的化学位移。一般而言，α 构型多糖分子异头氢的化学位移 δ>5.0，β 构型多糖分子异头氢化学位移 δ<5.0[29]。这表明三种食用菌多糖既存在 α 构型又存在 β 构型，且 δ5.31 处的异头氢质子化学位移指示存在 D-半乳糖醛酸（α 构型）。

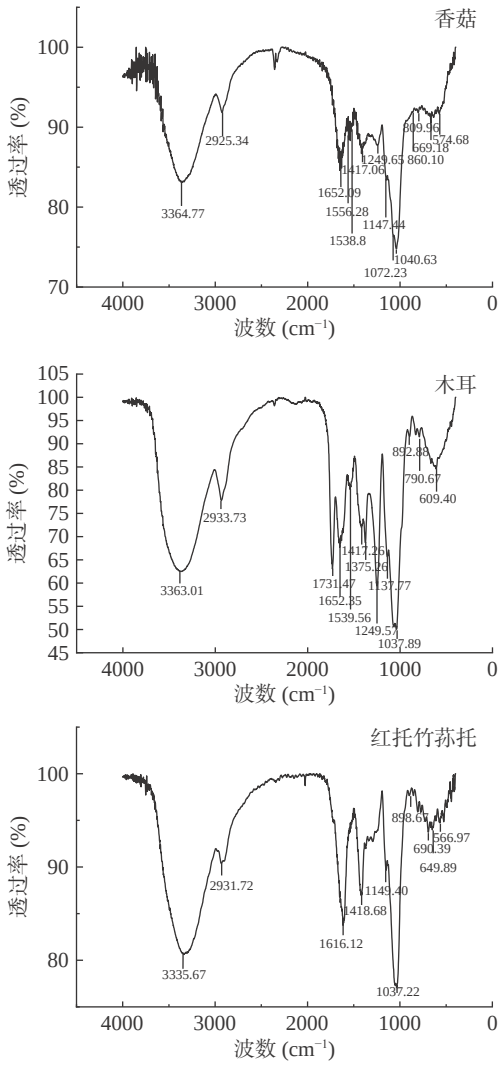


图 2 三种食用菌多糖的红外光谱图

Fig.2 IR spectroscopy of polysaccharides from three edible fungi

在图 4 中，三种食用菌在 δ103.00 附近含有一个异头碳信号，这是 β 糖苷键的典型信号峰。观察到被 O 取代的 C-6 的信号峰在 δ68.83 附近，未取代的 C-6 的信号峰处于 δ60.71 附近，说明可能存在 β-(1→6)-D-吡喃葡萄糖。δ71 附近为 α 构型 C-2，C-3 的吸收峰。δ73.04 处是(1→6)糖苷键中的 C-5。三种食用菌多糖的核磁共振分析进一步验证红托竹荪的边角废料菌托的多糖与可食用的食用菌多糖具有相似的结构，为其代替昂贵的食用菌原料生产多糖提供参考依据。

2.6 刚果红实验结果分析

根据三种食用菌多糖的最大吸收波长与刚果红溶液的相比是否发生红移判断三种食用菌多糖是否

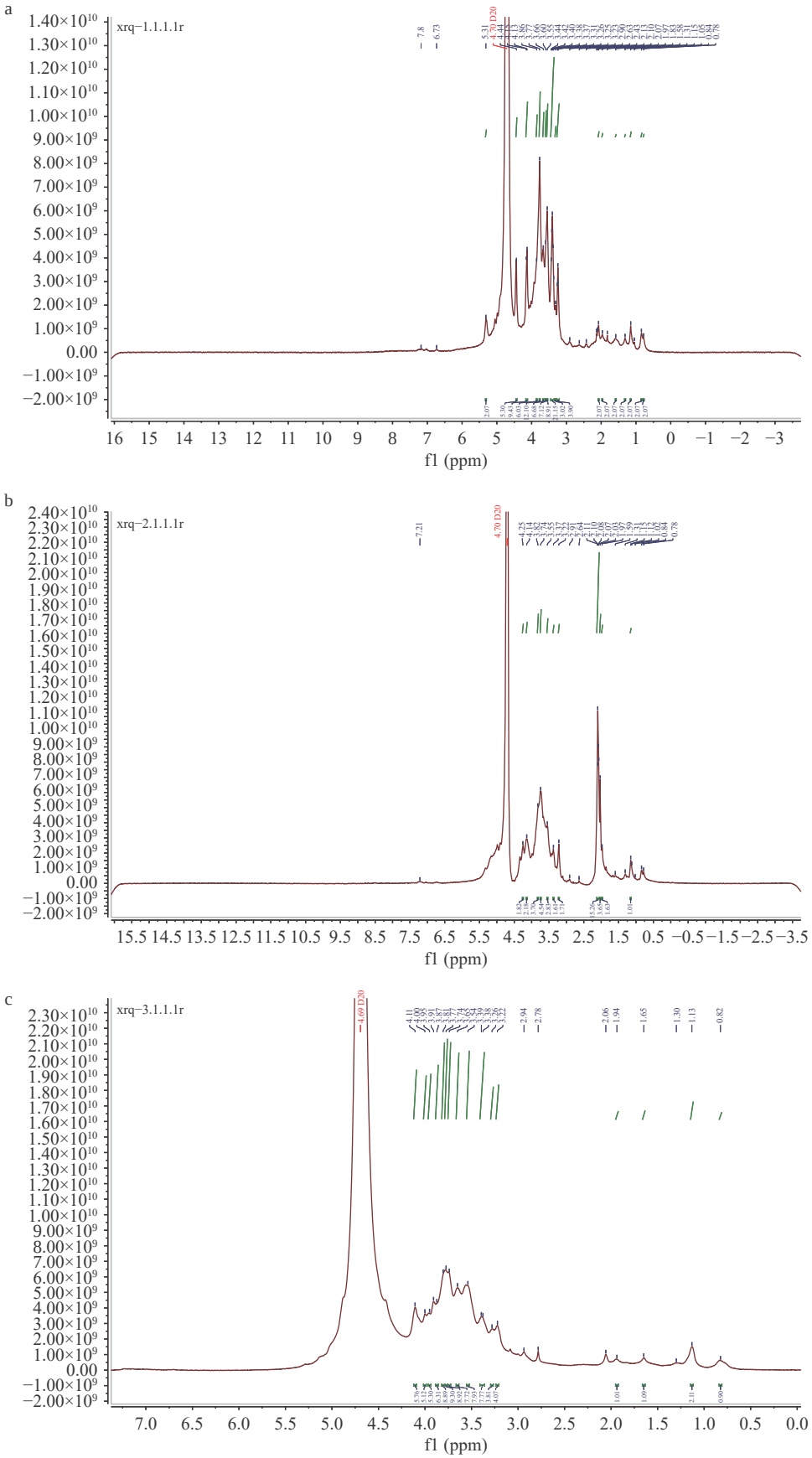


图 3　三种食用菌多糖的[1]H NMR 谱图

Fig.3　[1]H NMR spectra of polysaccharides from three edible fungi

注：a：香菇多糖；b：黑木耳多糖；c：红托竹荪菌托多糖。

具有三重螺旋结构[30]。如图 5 所示，三种食用菌多糖的最大吸收峰与对照组相比发生红移，说明香菇、黑木耳和红托竹荪菌托多糖中存在三螺旋结构，与刚果红络合后在 NaOH 作用下发生一定的红移。

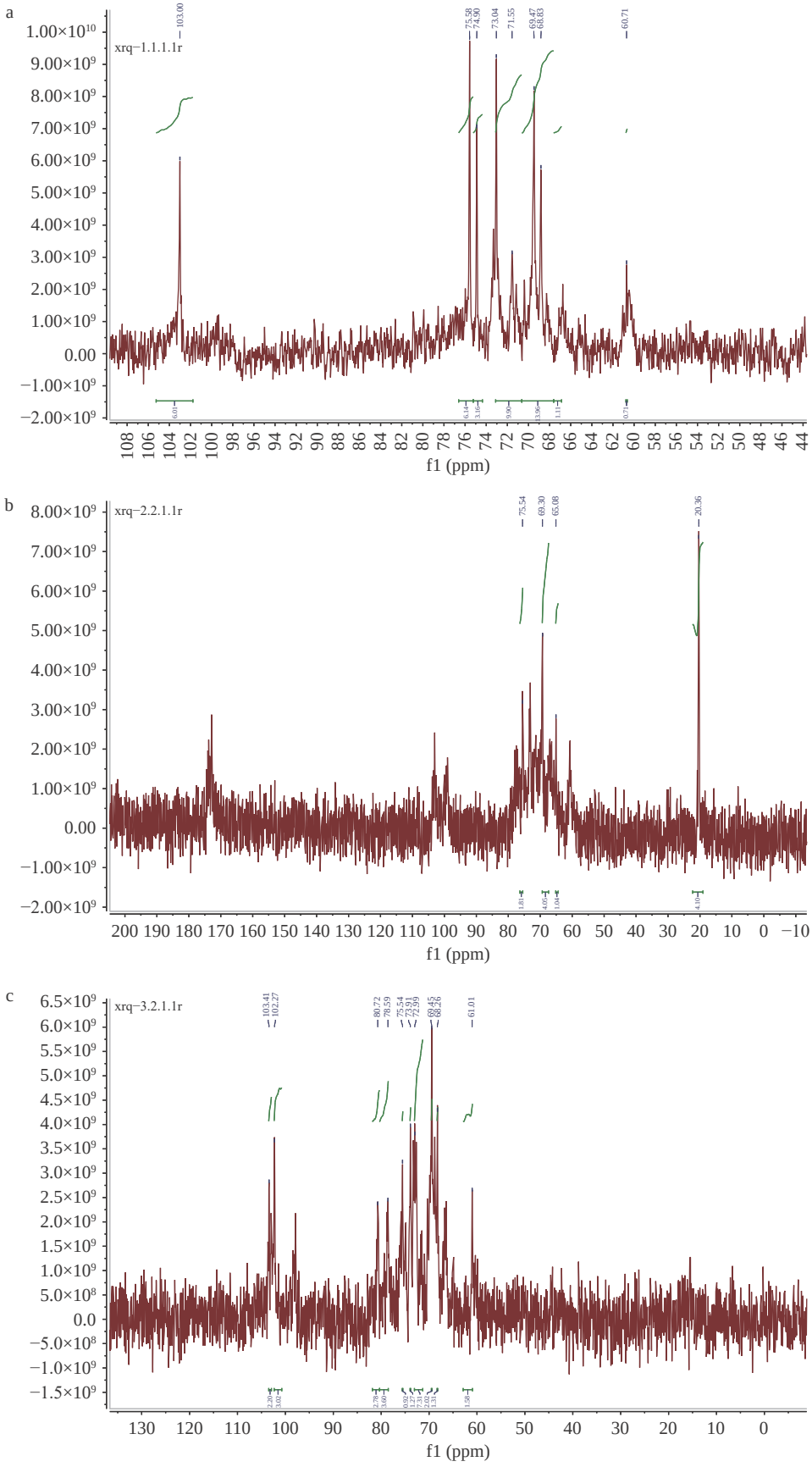


图 4 三种食用菌多糖的^{13}C NMR 谱图

Fig.4 ^{13}C NMR spectra of polysaccharides from three edible fungi

注: a: 香菇多糖; b: 黑木耳多糖; c: 红托竹荪菌托多糖。

2.7 三种食用菌多糖抗氧化活性结果比较

通过测定三种食用菌多糖的 DPPH 和羟基自由基的清除率, 以及对 Fe^{3+}总还原力来判定它们的抗氧化能力。从图 6 可以看出, 三种食用菌多糖在实验

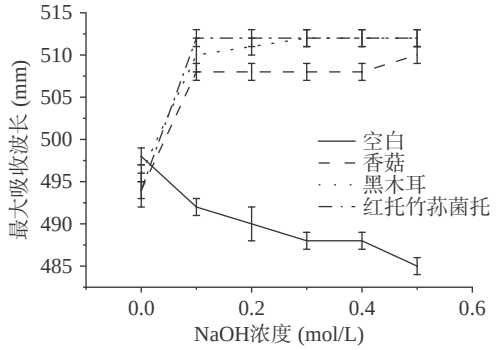


图 5　三种食用菌多糖刚果红实验结果

Fig.5　Experimental results of congo red polysaccharide from three edible fungi

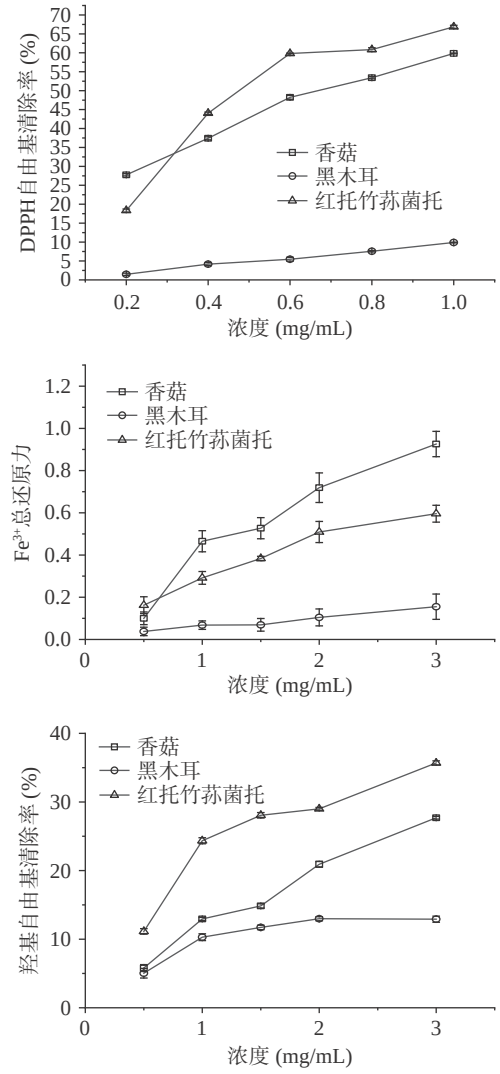


图 6　三种食用菌多糖抗氧化能力实验

Fig.6　Antioxidant capacity of polysaccharides from three edible fungi

浓度范围内，清除 DPPH、OH 自由基和还原 Fe^{3+}的能力均随着浓度的增加而增加。当浓度为 1.0 mg/mL 时，香菇、黑木耳和红托竹荪菌托多糖对 DPPH 自由基的清除率依次为 59.84%、9.88% 和 66.86%，对 DPPH 自由基的清除能力的 IC_{50} 值依次为 0.055、0.180 和 0.010 mg/mL，红托竹荪菌托多糖对 DPPH 的清除率极显著高于香菇和黑木耳多糖(P<0.01)。当浓度为 3.0 mg/mL 时，香菇、黑木耳和红托竹荪菌托多糖对 Fe^{3+}总还原力分别为 0.926、0.1552 和 0.5958，对 Fe^{3+}总还原力的 IC_{50} 值依次为 1.214、1.455 和 1.217 mg/mL，香菇和红托竹荪菌托多糖对 Fe^{3+}总还原力极显著高于黑木耳多糖(P<0.01)，但香菇多糖与红托竹荪菌托多糖组间无显著性差异(P>0.05)。当浓度为 3.0 mg/mL 时，香菇、黑木耳和红托竹荪菌托对 OH 自由基的清除率分别为 27.70%、12.91% 和 35.69%，对 OH 自由基的清除能力的 IC_{50} 值依次为 0.350、0.456 和 0.195 mg/mL，红托竹荪菌托对 OH 自由基的清除率极显著高于香菇和黑木耳(P<0.01)。综合 DPPH 和羟基自由基的清除率，以及对 Fe^{3+}总还原力实验结果来看，红托竹荪菌托多糖的抗氧化能力最佳，香菇多糖次之，黑木耳多糖最差。三种食用菌多糖的抗氧化能力差异较大，可能是由于种类差异或部分结构组成不同造成的。

3　结论

多糖的结构对其生物活性有很大的影响，因此本研究分别对香菇、黑木耳和红托竹荪菌托中多糖的结构进行了测定，对比了三种食用菌多糖的抗氧化能力。通过 Sevag 脱蛋白和透析后红托竹荪托的多糖具有较好的均一性，三种多糖分子量均分布在万级和百万级。通过红外和核磁共振检测出三种食用菌多糖是具有三螺旋结构且含有相似的官能团的 α 和 β 构型的酸性多糖，三种食用菌多糖基本结构无显著性差异。此外，三种食用菌多糖都具备抗氧化活性，其中红托竹荪菌托多糖的抗氧化能力最佳，香菇多糖次之，黑木耳多糖最差。红托竹荪的菌托作为边角废料往往在采摘过程中被去掉丢弃造成浪费，就抗氧化活性上，可将其利用于抗氧化食品和药品的开发中，后续可研究其他的生物活性，代替昂贵的食用菌多糖产品，具有良好发展和应用前景。

参考文献

[1] 赵湘江，杨兰. 贵州省食用菌产业发展研究[J]. 中国食用菌，2021，40(4)：117−122. [ZHAO X J, YANG L. Study on the development of edible fungus industry in Guizhou Province[J]. Chinese Edible Fungi, 2021, 40(4): 117−122.]

[2] 孙燕，李浪，刘妮，等. 红托竹荪不同部位的无机元素含量及相关性[J]. 贵州农业科学，2019，47(6)：113−116. [SUN Y, LI L, LIU N, et al. The content and correlation of inorganic elements in different parts of *Dendrophylla sinensis*[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2019, 47(6): 113−116.]

[3] 梁亚丽，秦礼康，王何柱，等. 红托竹荪及竹荪蛋各部位主要营养功能成分分析[J]. 食品与机械，2020，36(4)：72−76. [LIANG Y L, QIN L K, WANG H Z, et al. Analysis of main nutritional function components in various parts of *Dendrophylla oryzata* and its eggs[J]. Food and Machinery, 2020, 36(4): 72−76.]

[4] SUN Z Q, HAN Q H, DUAN L W, et al. Oridonin increases anticancer effects of lentinan in HepG2 human hepatoblastoma cells[J]. Oncology Letters, 2018, 15(2): 53−56.

[5] WANG Y, HAN X, LI Y D, et al. Lentinan dose dependence between immunoprophylaxis and promotion of the murine liver can-

cer[J]. Oncotarget, 2017, 8(56): 85−88.
[6] 邱军强, 张华, 刘迪迪, 等. 9 种食用菌碱水提取物的抗氧化活性比较研究[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(15): 1−5. [QIU J Q, ZhANG H, LIU D D, et al. Comparative study on antioxidant activity of alkali water extracts from nine edible fungi[J]. Food Research and Development, 2017, 38(15): 1−5.]
[7] ZHANG Y R, ZHANG M, JIANG Y F, et al. Lentinan as an immunotherapeutic for treating lung cancer: A review of 12 years clinical studies in China[J]. Chinese Journal of Cancer Research, 2018, 8(1): 51−54.
[8] WEI Y L, JING L W, HUI P H, et al. Functional polysaccharide lentinan suppresses human breast cancer growth via inducing autophagy and caspase-7-mediated apoptosis[J]. Journal of Functional Foods, 2018, 45(5): 21−25.
[9] JINGMIN Y, ZHU L, QU Y H, et al. Analyses of active antioxidant polysaccharides from four edible mushrooms[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 123: 945-956.
[10] JUAN J C, LÜ Q Q, ZHANG B, et al. Structural characterization and hepatoprotective activities of polysaccharides from the leaves of *Toona sinensis* (*A. juss*) Roem[J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 212: 89−101.
[11] 徐耀. 红托竹荪不同部位多糖提取及体外抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(24): 350−352. [XU Y. Study on extraction and antioxidant activity of polysaccharides from different parts of *Dictyophora rubens*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(24): 350−352.]
[12] 滕春丽, 颜蜜, 向瑞琪, 等. 红托竹荪多糖的提取优化及膜分级分离的研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(12): 4994−4990. [TENG C L, YAN M, XIANG R Q, et al. Study on extraction optimization and membrane separation of polysaccharide from *Dictyophora solani*[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2021, 12(12): 4994−4990.]
[13] 王新, 王强. 红托竹荪多糖的耐缺氧及抗运动疲劳能力的研究[J]. 中国食用菌, 2020, 39(12): 83−86. [WANG X, WANG Q. Study on the anti-hypoxia and anti-exercise fatigue ability of polysaccharides from *Phyllostachys ruthenophora*[J]. Chinese Edible Fungi, 2020, 39(12): 83−86.]
[14] 叶敏, 文竹, 王庆, 等. 不同方法对红托竹荪多糖的脱蛋白效果[J]. 贵州农业科学, 2016, 44(5): 131−135. [YE M, WEN Z, WANG Q, et al. Effects of different methods on the deproteinization of polysaccharides from *Phyllostachys oryzata*[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2016, 44(5): 131−135.]
[15] 苗晶囡, 邱军强, 李海霞, 等. 一种黑木耳酸性多糖的分离纯化及其结构鉴定[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(6): 1−8. [MIAO J N, QIU J Q, LI H X, et al. Isolation, purification and structure identification of acid polysaccharide from *Auricularia auriculata*[J]. Food Research and Development, 2019, 40(6): 1−8.]
[16] QIN L, TIAN G T, YAN H, et al. Characterization of polysaccharides with antioxidant and hepatoprotective activities from the wild edible mushroom *Russula vinosa* Lindblad[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(35): 8858−8866.
[17] 李鸥叶, 张全才, 施晓丹, 等. 基于高效凝胶渗透色谱法和离子色谱法的棘托竹荪提取物的质量控制[J]. 中国食品学报, 2019, 19(12): 213−219. [LI O Y, ZHANG Q C, SHI X D, et al. Quality control of extracts from *Dictyophora echinovolata* by high performance gel permeation chromatography and ion chromatography[J]. Chinese Journal of Food Science, 2019, 19(12): 213−219.]
[18] 王嘉铭, 雷于国, 胡国元, 等. 香菇多糖纯化前后结构和生物活性的比较[J]. 食品与生物技术学报, 2020, 39(1): 99−106. [WANG J M, LEI Y G, HU G Y, et al. Comparison of structure and bioactivity of lentinan before and after purification[J]. Journal of Food and Biotechnology, 2020, 39(1): 99−106.]
[19] 朱森, 侯怡铃, 唐贤, 等. 2 种竹荪多糖的结构鉴定及差异性分析研究[J]. 现代农业科技, 2019(7): 206−207. [ZHU M, HOU Y L, TANG X, et al. Structural identification and difference analysis of polysaccharides from two bamboo dictyophora species[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2019(7): 206−207.]
[20] LIU X, LIU H, YAN Y, et al. Structural characterization and antioxidant activity of polysaccharides extracted from jujube using subcritical water[J]. LWT, 2020, 117: 108645.
[21] 王莹, 邢晓玲, 李屿君, 等. 香菇多糖脱蛋白工艺及其抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(14): 98−103. [WANG Y, XING X L, LI Y J, et al. Deproteinization of lentinan and its antioxidant activity[J]. Food Research and Development, 2020, 41(14): 98−103.]
[22] 罗丽平, 李冰晶, 赵景芳, 等. 三种食用菌提取物体外抗氧化与降血糖活性研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(20): 324−329. [LUO L P, LI B J, ZHAO J F, et al. Study on antioxidant and hypoglycemic activity of three edible fungi extracts *in vitro*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(20): 324−329.]
[23] 林陈强, 陈济琛, 林新坚, 等. 响应面法优化棘托竹荪孢子多糖提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(9): 161−167. [LIN C Q, CHEN J C, LIN X J, et al. Optimization of extraction process and antioxidant activity of polysaccharide from spores of *Dictyophora echinoides* by response surface methodology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(9): 161−167.]
[24] BISEN P S, BAGHELl R K, SANDIAN B S, et al. *Lentinus edodes*: A macrofungus with pharmacological activities[J]. Current Medicinal Chemistry, 2010, 17(22): 2419−2430.
[25] WU N J, CHIOU F J, WENG Y M, et al. *In vitro* hypoglycemic effects of hot water extract from *Auricularia polytricha* (wood ear mushroom)[J]. Int J Food Sci Nutr, 2014, 65(4): 502.
[26] LIU X, CHEN Y, WU L, et al. Optimization of polysaccharides extraction from *Dictyophora indusiata* and determination of its antioxidant activity[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 103(4): 175−181.
[27] 刘露. 壮丽环苞菇多糖 (CIS-A) 和硫黄菌多糖 (LSM-X) 的结构鉴定及生物活性的研究 [D]. 南充: 西华师范大学, 2018. [LIU L. Structural identification and biological activity of *Cyclobractus splendens* polysaccharide (CIS-A) and *Thiobacillus flavus* polysaccharide (LSM-X)[D]. Nanchong: China West Normal University, 2018.]
[28] 赵诗雨, 赵婷婷, 梁锐, 等. 三个不同产地香菇多糖的理化性质及生物活性研究[J]. 菌物学报, 2020, 39(8): 1530−1537. [ZHAO S Y, ZHAO T T, LIANG R, et al. Study on physicochemical properties and bioactivity of lentinan from three different producing areas[J]. Chinese Journal of Fungi, 2020, 39(8): 1530−1537.]
[29] 李亚平. 玉米须多糖结构表征及其生物活性的研究 [D]. 吉林: 吉林化工学院, 2019. [LI Y P. Structural characterization and biological activity of corn whisker polysaccharide[D]. Jilin: Jilin University of Chemical Technology, 2019.]
[30] CHEN G J, KAN J Q. Characterization of a novel polysaccharide isolated from *Rosa roxburghii* Tratt fruit and assessment of its antioxidant *in vitro* and *in vivo*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 107: 166−174.

李媛媛, 陈晓风, 杨小明, 等. 银杏酸的热稳定性及银杏酸 C15:1 热分解动力学 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 77−84. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100297

LI Yuanyuan, CHEN Xiaofeng, YANG Xiaoming, et al. Thermal Stability of Ginkgolic Acids and Thermal Decomposition Kinetics of Ginkgolic Acid C15:1[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 77−84. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100297

· 研究与探讨 ·

银杏酸的热稳定性及银杏酸 C15:1 热分解动力学

李媛媛[1], 陈晓风[1], 杨小明[2,*], 李奉楠[2]

（1.镇江市食品药品监督检验中心, 江苏镇江 212004;
2.江苏大学食品与生物工程学院, 江苏镇江 212013）

摘　要: 为研究银杏酸的热稳定性及热分解动力学，采用高效液相色谱-电喷雾电离-质谱确定银杏酸 70 ℃ 热分解产物，以热重分析法对银杏酸 C15:1 的热分解行为及其动力学规律进行考察。在静止空气气氛下，控制升温速率为 5.0、10.0、15.0 和 20.0 ℃·min^{-1}，记录银杏酸 C15:1 的热重-差示扫描量热曲线，运用 Ozawa-Flynn-Wall、Friedman 和Šatava-Šesták、Coats-Redfern 法计算银杏酸 C15:1 的热分解参数。结果表明银杏酸 70 ℃ 加热 30 d 后有少量银杏酚产生。银杏酸 C15:1 热重曲线上最明显的失重发生在第一失重阶段，失重速率峰温度 243 ℃，失重率为 14.37%，为银杏酸 C15:1 的脱羧分解。计算得出银杏酸 C15:1 热脱羧反应表观活化能为 67.44 kJ·mol^{-1}。银杏酸 C15:1 脱羧动力学模型函数系 Avrami-Erofeev 方程，其积分形式为 $G(\alpha)=[-\ln(1-\alpha)]^{1/2}$，分解机理为随机成核和随后生长，反应级数 n=1/2。该研究为银杏制品中银杏酸含量的控制提供帮助。

关键词: 银杏酸, 热分解, 热重分析, 分解机理
中图分类号: TS255.1　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0077−08
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100297
本文网刊:

Thermal Stability of Ginkgolic Acids and Thermal Decomposition Kinetics of Ginkgolic Acid C15:1

LI Yuanyuan[1], CHEN Xiaofeng[1], YANG Xiaoming[2,*], LI Fengnan[2]

（1.Zhenjiang Food and Drug Supervision and Inspection Center, Zhenjiang 212004, China;
2.School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China）

Abstract: Thermal stability of ginkgolic acids and thermal decomposition kinetics ginkgolic acid C15:1 were investigated. Ginkgolic acid was heated at 70 ℃ for 30 d, a small amount of ginkgols were determined by liquid chromatography electrospray spray ionization mass spectrometry (LC-ESI-MS). The thermal decomposition behavior and kinetics of ginkgolic acid C15:1 were investigated by thermogravimetric analysis (TG) under the static air atmosphere at the heating rates of 5.0, 10.0, 15.0 and 20.0 ℃·min^{-1}. The thermogravimetric differential scanning curve of ginkgolic acid C15:1 was recorded and the thermal decomposition parameters were calculated by Ozawa-Flynn-Wall, Friedman, Šatava-Šesták and Coats-Redfern methods. The most obvious weight loss on the TG curves of ginkgolic acid C15:1 occurred in the first weight loss stage, the peak temperature was 243 ℃, and the weight loss rate was 14.37%, which was the decarboxylation reaction of ginkgolic acid C15:1. The calculated activation energy using Ozawa-Flynn-Wall and Friedman method was 67.44 kJ·mol^{-1}. The dynamic model function of ginkgolic acid C15:1 decarboxylation was Avrami-Erofeev equation, its integral form was $G(\alpha)=[-\ln(1-\alpha)]^{1/2}$, and the decomposition mechanism was random nucleation and subsequent growth, and the reaction order was n=1/2. This study would provide help for the control of silver apricot acid content in ginkgo

收稿日期: 2021−10−28
基金项目: 江苏省市场监督管理局基金（KJ21125110）。
作者简介: 李媛媛（1985−）, 女, 硕士, 副主任药师, 研究方向: 天然产物活性成分提取和分析, E-mail: 420518715@qq.com。
*** 通信作者:** 杨小明（1963−）, 女, 博士, 教授, 研究方向: 天然产物分离, E-mail: XM_Yang1963@126.com。

products.

Key words: ginkgolic acid; thermal decomposition; thermogravimetric analysis; decomposition mechanism.

银杏(*Ginkgo biloba* L.)为我国珍贵树种, 其叶、果具有极高的经济价值。以银杏叶提取物为原料生产的药品或保健食品是目前世界上十大最畅销植物类产品之一[1]。银杏果实俗称白果, 新鲜白果常直接烹饪为菜肴, 大部分白果干燥后被加工成白果粉添加到糕点、饮料中[2]。银杏的叶和果中除了含有黄酮和内酯等活性成分外, 还含有一类具有毒副作用的烷基酚酸类化合物——银杏酸, 在银杏叶提取物生产和白果加工过程中被要求除去[2−4]。

银杏酸(Ginkgolic acids)属漆酚类物质, 为 6-烷基或烯基水杨酸衍生物的同系混合物, 由银杏酸 C13:0、C15:0、C15:1、C17:1、C17:2 五个同系物组成, 其中以银杏酸 C15:1 含量最高[3], 银杏酸 C15:1(白果新酸)也是中国药典银杏酸同系物检测中的定位对照品[5]。由于具有致敏毒性[4,6], 2020 年国家药典规定银杏酸在银杏叶提取物中的含量不得超过 5 ppm[5]。为此, 各种方法被用于控制、降低银杏制品中银杏酸的含量, 如水杨酸脱羧酶降解, 可使银杏酸降解率达到 40% 左右[7]; 采用乳酸菌发酵白果汁, 可减少其中 70% 的银杏酸[8]; 高温热炒短时间就可明显降低白果中银杏酸含量[9]; 水蒸气和微波加热可以减少白果中 54.5% 和 27% 的银杏酸[10]。其中加热法可以保持白果或银杏叶的原始形态而应用更为广泛。研究银杏酸的热稳定性和热分解过程对白果和银杏叶热处理过程控制银杏酸有重要的指导意义。本项目组前期研究了银杏酸在水中的溶解性[11]及银杏酸的光热稳定性[12], 发现银杏酸固体在 70 ℃ 加热 30 d, 其在 310 nm 处的吸收有较明显降低, 在 250 ℃ 加热 30 min, 可使银杏酸脱羧生成银杏酚[13]。但 70 ℃ 条件下银杏酸的降解产物是否为银杏酚并没有实验证实, 且有关银杏酸单体的热分解动力学国内外尚未见报道。

热重分析(TG)是在程序控温条件下测量物质质量变化与温度关系的一类方法, 能够快速准确测定固体化合物的熔融、晶型转变、分解等变化。本文拟采用高效液相色谱-电喷雾电离-质谱(LC-ESI-MS)分析银杏酸 70 ℃ 加热 30 d 的降解产物, 并在分离得到银杏酸 C15:1 单体基础上, 采用非等温 TG 法, 研究其热分解动力学, 为银杏制品热加工过程中降低银杏酸含量提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

银杏酸同系混合物(简称银杏酸) 从银杏外种皮中分离得到, 由银杏酸 C13:0(20.7%)、C15:0(3.3%)、C15:1(51.6%)、C17:1(21.1%)和 C17:2(3.3%)组成, 高效液相色谱(HPLC)纯度 98%, 由本实验室自制, 制备方法见参考文献 [13−14], 于 4 ℃ 保存; 甲醇(色谱级) Tedia 公司; 娃哈哈纯净水 娃哈哈集团有限公司; 其它试剂皆为分析纯 国药集团化学试剂有限公司。

Surveyor LCQ 液相色谱-质谱(LC-MS)联用仪配备电喷雾离子源(ESI)、Thermo-Nicolet iS50 傅里叶变换红外光谱仪 美国 Thermo 公司; HPLC 仪配有 WK500 LC-500P 高压泵、SPD-500 紫外检测器、Welch Ultimate AQ-C_{18}(21.2×250 mm, 10 μm)制备柱、N2000 色谱工作站 杭州旭昱科技有限公司; Agilgent 1260 高效液相色谱仪 包括 G1312C 四元泵、G1322 脱气、G1314B VWD、TC-C_{18} column(150 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱 美国 Agilent 公司; Shimp–pack VP-ODS(4.6×250 mm, 5 μm)色谱柱、UV-2450 紫外可见分光光度计 日本 SHIMADZU 公司; Netzsch STA449C 综合热分析仪 德国 NETZSCH 公司; PH-050A 电动恒温干燥箱 上海实验仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 银杏酸的热稳定性分析 热稳定性参见文献[13], 称取银杏酸 50 mg 于小烧杯中封口膜封口后, 于 70 ℃ 烘箱中恒温 30 d 取出, LC-ESI-MS 分析。色谱条件: 柱温 35 ℃, 流动相为甲醇∶1% 乙酸(90∶10, v/v), 流量 1.0 mL·min^{-1}, 二极管整列检测器检测波长为 275 和 310 nm。质谱条件: 电喷雾电离化(ESI)负离子模式, 喷雾压力 1.4 MPa, 鞘气(N_2)流量 35 arb, 辅助气体流量 5 arb, 质量扫描范围 50~1000 m/z。

1.2.2 银杏酸 C15:1 的制备及表征

1.2.2.1 银杏酸 C15:1 的制备 银杏酸以四氢呋喃∶甲醇(1∶1, v/v)溶解, 配成 200 mg/mL 甲醇溶液, 制备条件: 柱温 40 ℃, 流动相为甲醇-1%HAc 溶液(86∶14, v/v), 流速 24 mL·min^{-1}, 紫外检测波长 300 nm, 进样 1 mL, 分段收集第二个峰, 分析 HPLC 检测峰纯度(分析条件: 柱温 40 ℃, 流动相为甲醇-3% 乙酸溶液(92∶8, v/v), 检测波长 310 nm; 流速 1 mL·min^{-1}), 合并单一组分馏分, 浓缩至干后得银杏酸 C15:1。

1.2.2.2 紫外光谱及红外光谱 银杏酸 C15:1 用甲醇溶解, 紫外扫描范围 190~400 nm, 测其紫外光谱。银杏酸 C15:1 以二氯甲烷为溶剂溶解, 用毛细管滴加两滴在压好的 KBr 压片上面, 待完全干燥后在 400~4000 nm 范围内测其红外光谱。

1.2.3 银杏酸 C15:1 热重和差热分析 称取银杏酸 C5:1 5 mg 置于氧化铝坩埚, 在静态空气气氛中, 分别采用 5.0、10.0、15.0 和 20.0 ℃·min^{-1} 程序升温速率(β)升温, 温度范围: 室温~600 ℃, α-Al_2O_3 为参比, 分别记录热重和差示扫描量热曲线。

1.2.4　银杏酸 C15:1 脱羧的动力学分析条件　本研究采用 Ozawa-Flynn-Wall(OFW)[15−18]、Friedman[17,19]和 Šatava-Šesták[15,20]、Coats-Redfern 法[21−22]来分析银杏酸 C5:1 的第一步热分解动力学。

OFW 法为积分法的一种，适用于升温时试样有质量损失而有小分子释放过程的数学处理，通常根据一组随升温速率提高而向高温推移的热重曲线计算，若反应机制不变，将得到一组平行线[23]；Friedman 法为微分法的一种[17,19,23]，分别用于银杏酸 C15:1 过程表观活化能的计算。

Ozawa-Flynn-Wall 公式[15−18]：

$$\lg\beta = \lg\left[\frac{AE}{RG(\alpha)}\right] - 2.315 - 0.4567\times\frac{E}{RT} \qquad 式（1）$$

式中：α 为失重率，%；β 为升温速率，$K\cdot min^{-1}$；T 为绝对温度，K；A 为指前因子，min^{-1}；E 为活化能，$kJ\cdot mol^{-1}$；R 摩尔气体常数，8.314 $J\cdot K^{-1}\cdot mol^{-1}$；$G(\alpha)$为积分反应机理函数。对于 $G(\alpha)$来说，若 α 为定值，则 $G(\alpha)$也是固定的，因此 $\lg\beta$ 与 1/T 呈线性关系。以 $\lg\beta$ 对 1/T 作图，由直线的斜率即可求出活化能 E。

Friedman 法公式[17,19]：

$$\ln[(d\alpha/dT)\beta] = \ln[Af(\alpha)] - E/RT \qquad 式（2）$$

式中：$f(\alpha)$为微分反应机理函数。以 $\ln[(d\alpha/dT)\beta]$对 1/T 作图，即可得到一条直线，活化能 E 可以通过直线的斜率求出。

因Šatava-Šesták 方程适合研究固相非定温热分解动力学[22]，故采用Šatava-Šesták 方程和 Coats-Redfern 方程进行银杏酸 C15:1 热分解反应动力学模型的推断。

Šatava- Šesták 方程的表达式为[15,20]：

$$\lg G(a) = \lg\frac{AE}{R\beta} - 2.315 - 0.4567\times\frac{E}{RT} \qquad 式（3）$$

式中：因为 β 是固定的，$\lg(AE/R\beta)$即是一个常数，以 $\lg G(\alpha)$对 1/T 作图，通过曲线的斜率和截距即可求得 E_s 和 A。

Coats-Redfern 方程的表达式为[21−22]：

$$\ln\frac{G(\alpha)}{T^2} = \ln\frac{AR}{\beta E} - \frac{E}{RT} \qquad 式（4）$$

式中：$\ln(AR/\beta E)$即是一个常数，以 $\ln[G(\alpha)/T^2]$对 1/T 作图，通过曲线的斜率和截距即可求得 E 和 A。

2　结果与分析

2.1　银杏酸的热稳定性

将银杏酸 70 ℃ 加热 30 d 后的 LC-ESI-MS 分析结果见图 1。图 1A~图 1B 最上一张图为总离子流图(TIC)，其余皆为选择离子流图。由银杏酸结构式[3]，其五个同系物分子量 M 分别为 C13:0(320)、C15:1(346)、C17:2(372)、C15:0(348)和 C17:1(374)；而银杏酚分子量比银杏酸少 44。为了证实银杏酸在 70 ℃ 加热后发生了脱羧反应，采用系统提供的选择离子检测功能，分别选择银杏酸各单体分子离子峰 $[M-H]^-$的质荷比(m/z)及 $[M-44-H]^-$的 m/z 查找，银杏酸的五个同系物及其脱羧产物的分子离子峰均找到，见图 1 上所标注。推测银杏酸在 70 ℃ 加热 30 d 后 310 nm 处紫外吸收降低是部分银杏酸受热脱羧生成银杏酚所致[13]。为深入研究银杏酸热分解过程，分离出银杏酸含量最高的 C15:1 单体进行热重分析。

2.2　银杏酸 C15:1 的制备

银杏酸的 HPLC 制备谱图见图 2，银杏酸分析常在 λ=310 nm 下进行，考虑到制备色谱上样量大，为兼顾上样量和灵敏度，制备色谱波长选择 300 nm，流速 24 $mL\cdot min^{-1}$ 时各组分分离效果较好，所有组分在 100 min 内全部出完。图 2 中第二个峰为银杏酸 C15:1，分段收集第二个峰馏分，HPLC 分析色谱检测峰的单一性，合并单一银杏酸 C15:1 馏分，制备过程重复两次，得到银杏酸 C15:1，为浅黄色固体，其 HPLC 分析谱图见图 3，HPLC 纯度>98%。

对所得银杏酸 C15:1 单体进行紫外和红外扫描，分别得到其紫外和红外吸收光谱(图 4)。

图 4A 显示出银杏酸典型的紫外吸收光谱，在 310 nm 处有最大吸收，与文献报道一致[13,24]。图 4B 的红外光谱数据与文献 [24−25] 一致，银杏酸 C15:1 的酚羟基 ν_{O-H}=3010、1305、710 cm^{-1} 分别为 C-O 键(苯环上的 C 与酚羟基上的 O)的 ν_{C-O} 伸缩振动和 δ_{O-H} 面外弯曲振动。银杏酸 C15:1 中羧基的 O-H 面内弯曲振动 δ_{O-H} 和面外弯曲振动 δ_{O-H} 和 $\nu_{C=O}$ 分别出现在 1211、900 和 1647 cm^{-1}[24]，而 3005、1634、831 cm^{-1} 分别为双键的 $\nu_{=C-H}$、$\nu_{C=C}$ 和 $\delta_{=C-H}$，显示双键存在[22]。证实分离到的为银杏酸 C15:1 单体。

2.3　银杏酸 C15:1 的热重分析

银杏酸 C15:1 在不同升温速率下所得的热重(TG)曲线见图 5。由图 5 可知，随着升温速率的增加，TG 曲线逐渐向高温方向移动，即热分解阶段的温度范围发生了微小的变化，但是升温速率的大小对样品的失重率基本没有影响。这是由于快速升温导致了热滞后现象，升温速率越快，试样的起始分解温度和终止分解温度也会随升温速率的增大而提高，从而使反应曲线向高温方向移动[23]。

2.4　银杏酸 C15:1 的热分解过程

图 6 为升温速率为 10 ℃/min 时银杏酸 C15:1 的热重-差示扫描量热-微商热重(TG-DSC-DTG)曲线。由图 6 可见，DSC 曲线的第一个吸热峰峰值为 45.9 ℃，TG 无相应失重，为银杏酸 C15:1 固体熔融峰，与银杏酸 C15:1 的熔点 40~41 ℃ 接近[11]。银杏酸 C15:1 的 TG 曲线存在三个显著的失重台阶，第一步失重的起始温度为 86.5 ℃，这一阶段的银杏酸单体脱去了一个羧基分解成银杏酚 C15:1，失重率为 14.37%(理论值为 13.0%)，DSC 曲线显示一小吸热峰，DTG 曲线上显示最大失重速率，峰值 243.0 ℃。

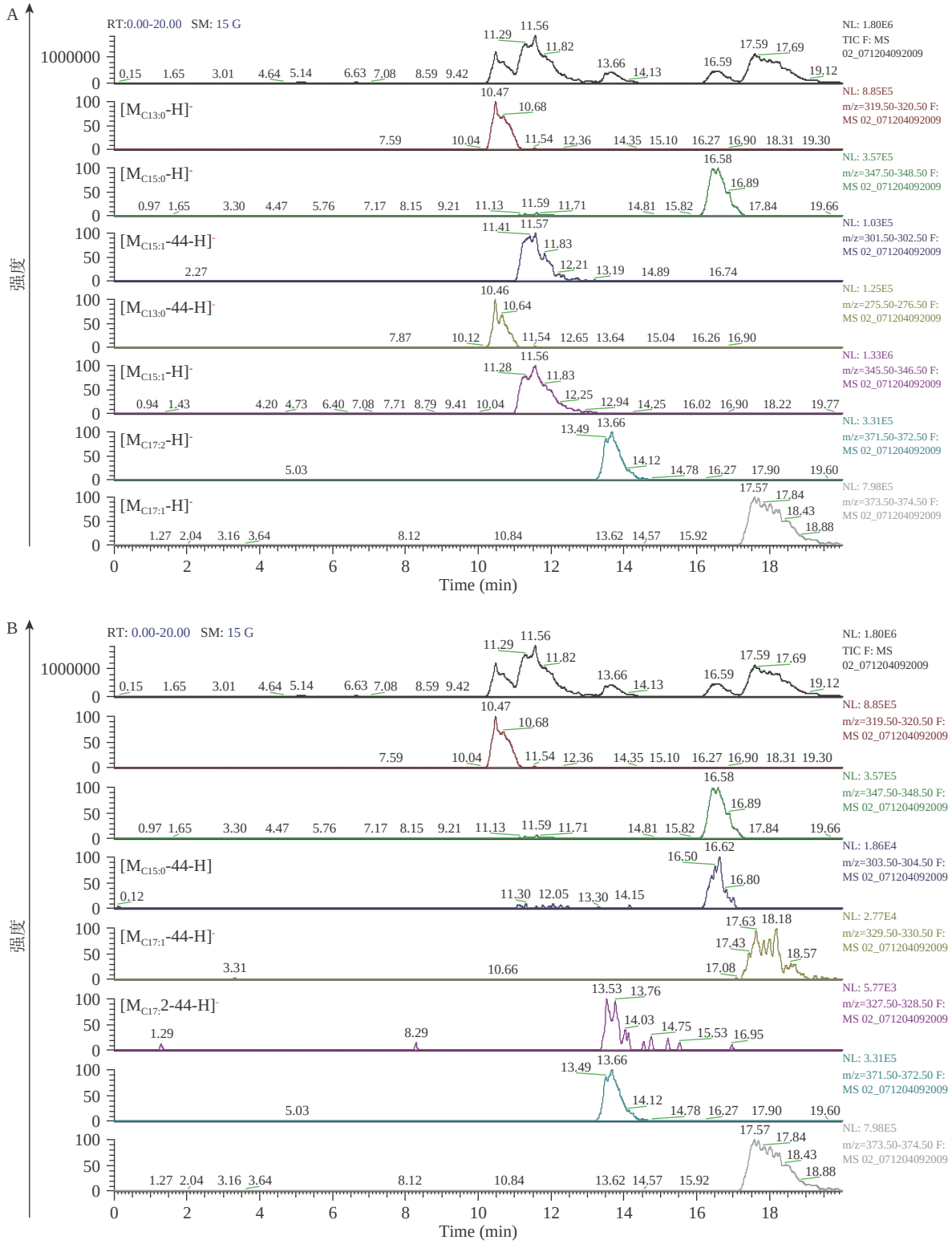


图 1 银杏酸 70 ℃ 加热 30 d 的总离子流色谱图(TIC)和选择离子流图

Fig.1 Chromatograms of total ion current and selected ion current of ginkgolic acids sample after heated 70 ℃ for 30 d

银杏酸热稳定实验的 LC-ESI-MS 分析显示，银杏酸 70 ℃ 加热 30 d 可使银杏酸脱羧转化为银杏酚，使其在 310 nm 的紫外吸收略有减少[13]。受快速升温热滞后效应影响，图 6 中的银杏酸 C15:1 固体的熔融温度和脱羧起始温度都较其熔点和热稳定性实验的分解温度为高。王世霞等[26] 研究苯甲酸脱羧反应时同样发现这种现象，虽然苯甲酸脱羧反应在 170 ℃ 才能完成，但当升温到 100 ℃ 时，其羧基拉曼谱峰已发生变化，显示此时已经发生脱羧反应。本实验结果证实银杏酸的脱羧反应在其热重分析记录的失重起始温度前已经发生，因为反应速率很小，容易被忽略。第二步失重的对应着第三个明显的吸热峰，吸热峰的峰值为 273.0 ℃，这一阶段银杏酸 C15:1 完成脱羧反应，生成的银杏酚 C15:1 有可能烷基侧链断裂，

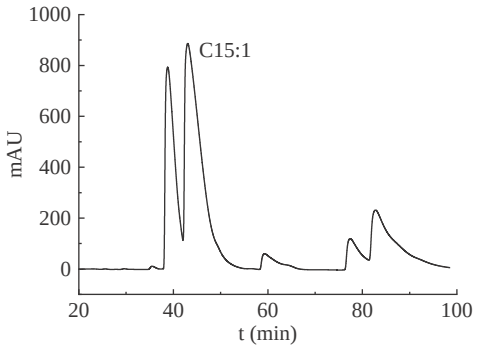


图 2　银杏酸的制备色谱图

Fig.2　Preparative chromatogram of ginkgolic acids

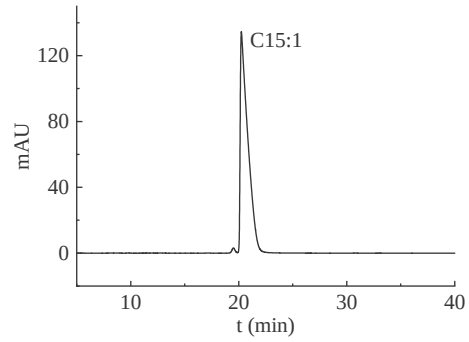


图 3　银杏酸 C15:1 的分析谱图

Fig.3　Analysis chromatogram of ginkgolic acid C15:1

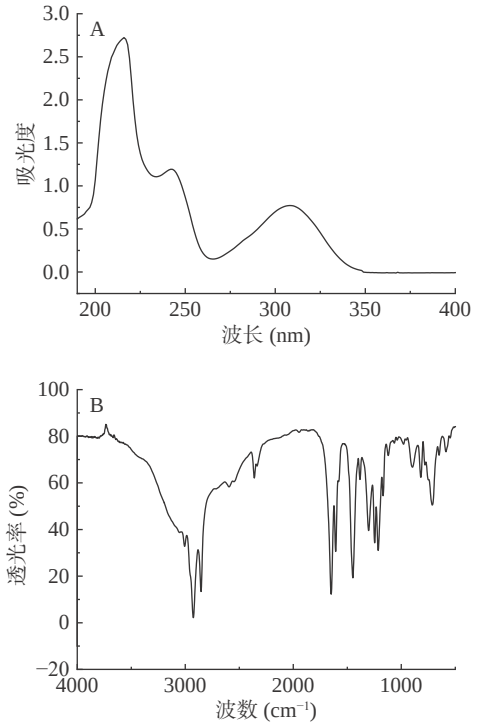


图 4　银杏酸 C15:1 的紫外光谱(A)和红外光谱(B)

Fig.4　UV spectrum (A) and FT-IR spectrum (B) of ginkgolic acid C15:1

形成部分聚合体，DTG 曲线呈现一小的台阶。温度继续升高发生第三步明显失重，DTG 曲线在 430~500 ℃ 之间呈现明显的失重速率变化，DSC 曲线显示一宽大的放热峰，为完全氧化反应。

银杏酸的脱羧产物银杏酚亦为银杏中的活性成分，具有抗肿瘤活性[3]。Lepoittevn 等[6] 采用豚鼠的迟发型超敏反应试验发现银杏中的银杏酸为强致敏源，而银杏酚不引起过敏反应。因此，在制备过程中通过第一步热分解将银杏酸转化为银杏酚，即可实现银杏制品中银杏酸毒性的脱除。由此，本文着重讨论银杏酸 C15:1 的第一级热分解反应过程。

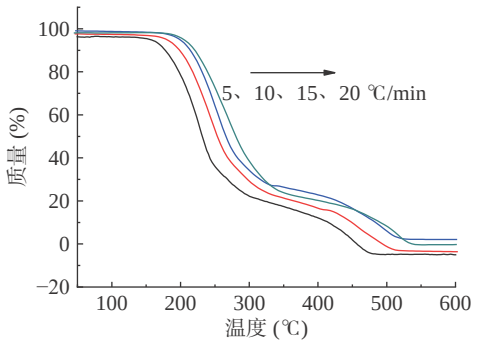


图 5　银杏酸 C15:1 在不同升温速率下的 TG 曲线图

Fig.5　TG curves of ginkgolic acid C15:1 at different heating rate β

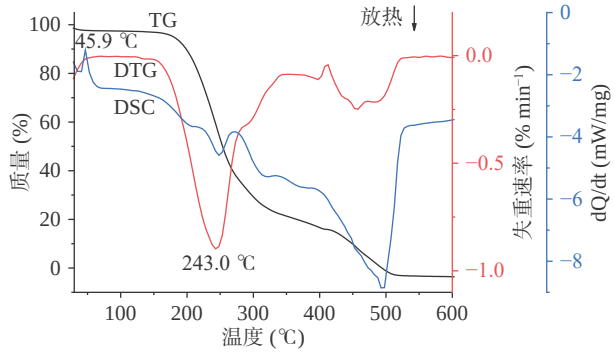


图 6　银杏酸 C15:1 的 TG-DSC-DTG(β=10 ℃·min^{-1})图

Fig.6　TG-DSC-DTG (β=10 ℃·min^{-1}) curves of ginkgolic acid C15:1

2.5　银杏酸 C15:1 热分级机理分析

2.5.1　银杏酸 C15:1 第一级热分解活化能 E 求取依据 OFW 法，在不同的转化率 α 下以 lnβ 对 1/T 作图，再用最小二乘法对曲线进行线性拟合[27−28]，活化能 E 即可通过曲线的斜率求得见图 7，计算结果列于表 1 中。通过 OFW 法计算出的银杏酸 C15:1 热降解第一阶段的平均活化能 E 为 67.50 kJ·mol^{-1}。

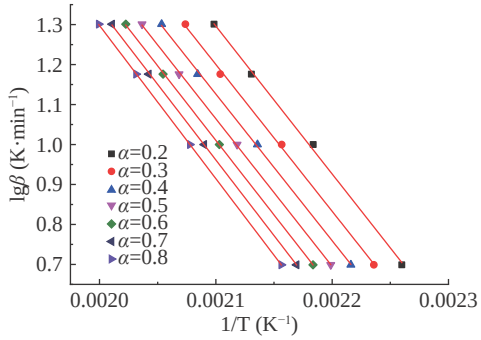


图 7　银杏酸 C15:1 的 lnβ 比 1/T 的曲线图

Fig.7　Curves of lnβ vs 1/T of ginkgolic acid C15:1

表 1 OFW 法和 Friedman 法计算银杏酸 C15:1 热降解过程的活化能

Table 1 Activation energies of degradation process of ginkgolic acid C15:1 with OFW and Friedman methods

转化率α	OFW法		Friedman法	
	E(kJ·mol^{-1})	R^2	E(kJ·mol^{-1})	R^2
0.2	67.3468	0.9980	60.8444	0.9867
0.3	66.8906	0.9986	61.2942	0.9960
0.4	66.8163	0.9993	63.7757	0.9981
0.5	67.2172	0.9997	67.1267	0.9977
0.6	67.8739	0.9999	70.8492	0.9994
0.7	68.8433	0.9999	73.4529	0.9993
0.8	69.7450	0.9999	74.2906	0.9956
平均值	67.498		67.376	

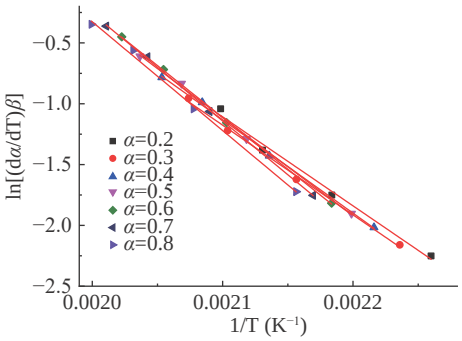


图 8 银杏酸 C15:1 ln[(dα/dT)β] 比 1/T 的曲线图

Fig.8 Curves of ln[(dα/dT)β] vs 1/T of ginkgolic acid C15:1

对于活化能的计算，除了利用 OFW 法计算之外，还可通过 Friedman 法推算，以 ln[(dα/dT)β] 对 1/T 作图，活化能 E 即可通过曲线的斜率求得。Friedman 法计算的银杏酸 C15:1 热降解第一阶段的活化能曲线图以及结果见图 8 和表 1。由表 1 可知，通过 Friedman 法计算出的银杏酸 C15:1 热降解第一阶段的平均活化能为 67.38 kJ·mol^{-1}，与 OFW 的计算结果相近。从而得出银杏酸 C15:1 分解为银杏酚 C15:1 分解反应的平均活化能$\bar{E}$=67.44 kJ·mol^{-1}。

2.5.2 银杏酸 C15:1 热分解最可机理函数的推断

将文献 [22] 中常见的十几种机理模型函数分别带入 Šatava-Šesták 方程和 Coats-Redfern 方程中[29−30]，求出不同机理函数所对应的动力学参数，仅以升温速率为 10 ℃/min 为例，计算结果列于表 2 中。将这些模型函数计算出的 E_s 值与 OFW 法和 Friedman 法计算出的活化能的平均值$\bar{E}$相比较，找出满足 $|(\bar{E}-E_s)/\bar{E}|\leqslant 0.1$ 的 E_s 且相关系数大于 0.99 的机理函数。结果发现，只有当机理函数为 $G(\alpha)=[-\ln(1-\alpha)]^{1/2}$ 时符合要求，Šatava-Šesták 法计算出的 E_s=72.56 kJ·mol^{-1}，lgA=7.74 s^{-1}，而 Coats-Redfern 法计算出的 E_s=68.50 kJ mol^{-1}，lgA=7.06 s^{-1}，其结果与 OFW 法，Friedman 法的 E 值较接近，相关系数数值较大。因此可以判断，银杏酸 C15:1 热分解第一阶段最可能机理函数，即 Avrami-Erofeev 方程，其非等温热降解机理为随机成核和随后生长，反应级数 n=1/2，其积分形式为 $G(\alpha)=[-\ln(1-\alpha)]^{1/2}$，微分形式为 $f(\alpha)=2(1-\alpha)[-\ln(1-\alpha)]^{1/2}$。

3 结论

根据热分析，银杏酸 C15:1 在空气中的热分解为银杏酸脱羧转化为银杏酚主分解阶段和侧链不饱和银杏酚缩合，及银杏酸的完全氧化三个阶段，其中第一步热分解使银杏酸脱羧形成银杏酚，消除了银杏酸的毒性。分别用 Ozawa-Flynn-Wall 法和 Friedman 法计算出银杏酸 C15:1 热分解第一阶段的活化能分别为 67.4981、67.3762 kJ·mol^{-1}。另外，根据Šatava-

表 2 银杏酸 C15:1 热降解过程的动力学参数

Table 2 Kinetic parameters of the thermal degradation of ginkgolic acid C15:1

$G(\alpha)$	Satava-Sestak法			Coats-Redfern法		
	E_s(kJ·mol^{-1})	lgA(s^{-1})	R^2	E_s(kJ·mol^{-1})	lgA(s^{-1})	R^2
$\alpha^{1/3}$	34.3466	3.5915	0.9963	28.3196	2.2128	0.9937
$\alpha^{1/2}$	51.5204	5.3617	0.9963	46.3794	4.3734	0.9948
α	103.0408	10.8997	0.9963	100.5578	10.5485	0.9957
α^2	206.0817	22.2766	0.9963	208.9146	22.5439	0.9960
$(1-2\alpha/3)-(1-\alpha)^{2/3}$	239.5822	25.2954	0.9997	244.1434	25.6959	0.9997
$[-\ln(1-\alpha)]^{1/2}$	72.5590	7.7453	0.9967	68.50337	7.0751	0.9961
$[-\ln(1-\alpha)]^{1/3}$	48.3721	5.1310	0.9967	43.0687	4.0831	0.9956
$[-\ln(1-\alpha)]^{1/4}$	36.2795	3.8608	0.9967	30.3522	2.5359	0.9951
$1-(1-\alpha)^{1/2}$	122.4257	12.8595	0.9998	120.9427	12.6634	0.9998
$1-(1-\alpha)^{1/3}$	129.6143	13.5237	0.9995	128.5022	13.3786	0.9994
$-\ln(1-\alpha)$	145.1179	15.8156	0.9967	144.8057	15.7715	0.9964
$1/(1-\alpha)$	98.7616	11.1068	0.8772	94.7941	10.5676	0.8537
$(1-\alpha)^{-1}-1$	200.6059	22.3336	0.9765	203.1562	22.5771	0.9748

Šesták 方程和 Coats-Redfern 方程推断出银杏酸 C15:1 热降解反应的动力学模型函数系 Avrami-Erofeev 方程，其积分形式为 $G(\alpha)=[-\ln(1-\alpha)]^{1/2}$，微分形式为 $f(\alpha)=2(1-\alpha)[-\ln(1-\alpha)]^{1/2}$，降解机理为随机成核和随后生长，反应级数 n=1/2。

参考文献

[1] 宋洋，于志斌，尤晓敏，等. 我国银杏叶提取物市场发展现状、挑战与对策[J]. 中国新药杂志，2015，24(23)：2651−2655. [SONG Y, YU Z B, YOU X M, et al. The development status, challenges and countermeasures of *Ginkgo biloba* extract market in China[J]. Chinese Journal of New Drugs, 2015, 24(23): 2651−2655.]

[2] 张风景，顾正彪，李兆丰，等. 不同干燥方式对银杏全粉品质的影响[J]. 食品工业科技，2017，38(9)：196−205. [ZHANG F J, GU Z B, LI Z F, et al. Effects of different drying methods on the quality of ginkgo powder[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(9): 196−205.]

[3] YANG X M, ZHONG X L, CHEN Y C, et al. LC method for determination of ginkgolic acids in mice plasma and its application to a pharmacokinetic study[J]. Chromatographia, 2009, 69(5/6): 593−596.].

[4] 房仙颖，谢莹莹，章祎唯，等. 银杏酸毒副作用及朴树提取物对其减毒效果研究[J]. 林产化学与工业，2020，40(6)：99−106. [FANG X Y, XIE Y Y, ZHANG Y W, et al. Toxic and side effects of ginkgolic acid and effect of *Celtis sinensis* extracts on detoxification of ginkgolic acid[J]. Chemistry and Industry of Forest Products, 2020, 40(6): 99−106.]

[5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典，2020 版第一部，植物油脂和提取物，银杏叶提取物 [M]. 北京：中国医药科技出版社，2020. [National Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the people's Republic of China, Part 1, 2020 edition, vegetable oils and extracts, *Ginkgo biloba* extract[M]. Beijing: China Pharmaceutical Science and Technology Press, 2020.]

[6] LEPOITTEVIN J P, BENEZRA C, ASAKAWA Y. Allergic contact dermatitia to *Ginkgo biloba* L. : Relationship with urushiol [J]. Archives of Dermatological Research, 1989, 281: 227−230.

[7] HU Y, HUA Q, SUN G, et al. The catalytic activity for ginkgolic acid biodegradation, homology modeling and molecular dynamic simulation of salicylic acid decarboxylase[J]. Computational Biology and Chemistry, 2018, 75: 82−90.

[8] WANG Y, TAO Y, ZHANG X, et al. Metabolic profile of ginkgo kernel juice fermented with lactic aicd bacteria: A potential way to degrade ginkgolic acids and enrich terpene lactones and phenolics[J]. Process Biochemistry, 2019, 75: 25−33.

[9] 李转梅，张学兰，李慧芬，等. 白果不同部位及不同炮制品种白果酸和总银杏酸定量比较[J]. 中成药，2015，37(1)：164−168. [LI Z M, ZHANG X L, LI H F, et al. Quantitative comparison of ginkgolic acid and total ginkgolic acids in different parts and processed products of *Ginkgo* semen[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2015, 37(1): 164−168.]

[10] FAN G J, WANG X, WU C E, et al. Effect of heating on the content and composition of ginkgolic acids in ginkgo seeds[J]. Quality Assurance and Safety of Crops & Foods, 2017, 9(2): 195−199.

[11] 杨小明，方洋洋，李月英，等. 银杏酸 C15: 1 在水中溶解度的测定及关联[J]. 江苏大学学报 (自然科学版)，2015，36(5)：557−560. [YANG X M, FANG Y Y, LI Y Y, et al. Measurement and correlation of solubility for ginkgolic acid C15: 1 in water[J]. Journal of Jiangsu University (Natural Science Edition), 2015, 36(5): 557−560.]

[12] 杨小明，何军，柳艳君，等. 银杏酸的荧光特征和光热稳定性研究[J]. 时珍国医国药，2009，20(10)：2453−2454. [YANG X M, HE J, LIU Y J, et al. The flurescence characterristics of ginkgolic acid and heat and sunlight stability[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2009, 20(10): 2453−2454.]

[13] YANG X M, WANG Y F, LI Y Y, et al. Thermal stability of ginkgolic acids from *Ginkgo biloba* and the effects of ginkgol C17: 1 on the apoptosis and migration of SMMC7721 cells[J]. Fitoterapia, 2014, 98: 66−76.

[14] 杨小明，陈盛霞，张荣仙，等. 银杏外种皮石油醚提取物的杀钉螺活性研究[J]. 中国人兽共患病学报，2006，22(10)：961−964. [CHEN S X, YANG X M, ZHANG L X, et al. Study on molluscicidal effect of the extracts from sarcotesta of *Ginkgo biloba*[J]. Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases, 2006, 22(10): 961−964.]

[15] 牛芊，周彩荣，詹自力. 甲硫氨酸的非等温热分解动力学的研究[J]. 高校化学工程学报，2018，32(5)：1112−1118. [NIU Q, ZHOU C R, ZHAN Z L. Study on non-isothermal decomposition kinetics of methionine[J]. Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities, 2018, 32(5): 1112−1118.]

[16] 祝远娇，陈小鹏，王琳琳，等. 脱氢枞酸在空气中的热分解动力学[J]. 化工学报，2008，59(10)：2526−2529. [ZHU Y J, CHEN X P, WANG L L, et al. Thermal decomposition kinetics of dehydroabietic acid in air[J]. Journal of Chemical Industry and Engineering (China), 2008, 59(10): 2526−2529.]

[17] TITA M E B, TITA I C, VICAS T J. Thermal behaviour and kinetic study of amygdalin[J]. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2018, 134: 765−772.

[18] 杨鹏，王展，沈汪洋，等. 6-姜酚/麦芽糖基-β-环糊精包合物的热分解机理研究[J]. 食品工业科技，2018，39(22)：46−49. [YANG P, WANG Z, SHEN W Y, et al. Thermal decomposition mechanism study of 6-gingerol/maltosyl-β-cyclodextrin inclusion complex[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(22): 46−49.]

[19] 王韶旭，谭志诚，车如心，等. 丹酚酸 B 的热稳定性及其热分解动力学研究[J]. 化学学报，2012，70(2)：212−216. [WANG S X, TAN Z C, CHE R X, et al. Thermal stability and kinetics of thermal decomposition of salvianolic acid B[J]. Acta Chimica Sinica, 2012, 70(2): 212−216.]

[20] LIU Y, YANG L, MA C, et al. Thermal behavior of sweet potato starch by non-isothermal thermogravimetric analysis[J]. Materials, 2019, 12: 699.

[21] RASOOL T, NAJAR I, SRIVASTAVA V C, et al. Pyrolysis of almond (*Prunus amygdalus*) shells: Kinetic analysis, modelling, energy assessment and technical feasibility studies[J]. Bioresource Technology, 2021, 337: 125446.

［22］ 胡荣祖, 史启祯. 热分析动力学 [M]. 北京: 科学出版社, 2008. ［HU R Z, SI Q Z. Thermal analysis kinetics[M]. Beijing: Science Press, 2008.］
［23］ 刘振海, 张洪林. 分析化学手册⑧热分析与量热学 (第三版)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2016. ［LIU Z H, ZHANG H L. Handbook of analytical chemistry, No 8, thermal analysis and calorimetry (third edition)[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2018.］
［24］ 马景哲. 银杏酸单体的纯化制备及分析方法的研究 [D]. 北京: 北京化工大学, 2011. ［MA J Z. Purification, preparation and analysis of ginkgolic acid monomer[D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2008.］
［25］ 谭卫红, 沈兆邦, 王成章, 等. 银杏叶中烷基酚化合物的分离与鉴定[J]. 林产化学与工业, 2001, 21(4): 1−6. ［TAN W H, SHEN Z B, WANG C Z, et al. Isolation and identification of alkylphenols from *Ginkgo biloba* leaves[J]. Chemistry and Industry of Forest Products, 2001, 21(4): 1−6.］
［26］ 王世霞, 郑海飞. 苯甲酸脱羧反应过程的拉曼光谱研究[J]. 光谱与光谱分析, 2009, 29(12): 3312−3314. ［WANG S X, ZHENG H F. Research on raman spectra of benzoic acid during decarboxylic process[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2009, 29(12): 3312−3314.］
［27］ 何翊, 孙挺. 1-甲基环丙烯与 β-环糊精的相互作用及热分解动力学[J]. 食品科学, 2006, 27(8): 25−28. ［HE Y, SUN T. Interaction and thermal decomposition kinetics between 1-methylcyclopropene and β-cyclodextrin[J]. Food Science, 2006, 27(8): 25−28.］
［28］ 刘建群, 高俊博, 刘小红. 热分析法研究冬凌草甲素的热稳定性和分解动力学[J]. 林产化学于工业, 2015, 35(6): 119−125. ［LIU J Q, GAO J B, LIU X H. Thermal stability and decomposition kinetics of oridonin by thermal analysis method[J]. Chemistry and Industry of Forest Products, 2015, 35(6): 119−125.］
［29］ 王韶旭, 赵波, 谭志诚, 等. 丙硫异烟胺的热稳定性及其热分解动力学[J]. 物理化学学报, 2007, 23(9): 1459−1462. ［WANG Z X, ZHAO Z, TAN Z C, et al. Thermal stability and kinetics of thermal decomposition for protionamide[J]. Acta Phys-Chin Sin, 2007, 23(9): 1459−1462.］
［30］ 崔波, 金征宇, 周万里, 等. 葡萄糖基 (α-1→6)-β-环糊精的热分解动力学研究[J]. 食品工业科技, 2006, 27(12): 55−57. ［CUI B, JIN Z Y, ZHOU W L, et al. Study on thermal decomposition kinetics of glucose group (α-1→6)-β-cyclodextrin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2006, 27(12): 55−57.］

岑南香, 刘宸成, 陈姑, 等. 低温等离子体处理对羊肉脂质与蛋白质氧化性质的影响 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 85−93. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100306
CEN Nanxiang, LIU Chencheng, CHEN Gu, et al. Effects of Cold Plasma Treatments on Lipids and Protein Oxidation Properties of Mutton[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 85−93. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100306

· 研究与探讨 ·

低温等离子体处理对羊肉脂质与蛋白质氧化性质的影响

岑南香, 刘宸成, 陈　姑, 桑晓涵, 符婉丽, 刘雅夫, 王佳媚*
（海南大学食品科学与工程学院, 海南海口 570228）

摘　要: 以新鲜羊肉为研究对象，通过测定羊肉色差、pH、TBARS 值、羰基含量、总巯基含量和蛋白表面疏水性，分析不同低温等离子体处理条件（处理时间、处理电压、处理次数、处理后放置时间）对羊肉色泽、脂质及蛋白质氧化的影响。结果表明：采用低温等离子体处理使羊肉的 L^* 值升高，a^* 值和 b^* 值下降，处理电压超过 50 kV 后，a^* 值下降显著（$P<0.05$），但各处理组之间的总色差值（ΔE）无显著差异（$P>0.05$）；TBARS 值、羰基含量、表面疏水性随处理时间延长、处理电压升高和处理后放置时间延长而逐渐升高，处理时间达到 5 min 时，羊肉 TBARS 值升至 0.215 mg/kg，而 pH 和总巯基含量则呈相反变化趋势；当累计处理时间固定（3 min），处理次数从 1 增加至 4，羊肉 TBARS 值、羰基含量、表面疏水性呈下降趋势，而 pH 和总巯基含量升高。综上，低温等离子体处理未能显著影响羊肉色泽，但促进了羊肉中脂质和蛋白质氧化。

关键词: 羊肉, 低温等离子体, 脂质氧化, 蛋白质氧化, 品质
中图分类号: TS251.1　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0085−09
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100306
本文网刊:

Effects of Cold Plasma Treatments on Lipids and Protein Oxidation Properties of Mutton

CEN Nanxiang, LIU Chencheng, CHEN Gu, SANG Xiaohan, FU Wanli, LIU Yafu, WANG Jiamei*
（College of Food Science and Technology, Hainan University, Haikou 570228, China）

Abstract: With fresh mutton as the research object, the effects of different cold plasma treatment conditions (treatment time, treatment voltage, treatment times, post-storage time after treatment) on mutton were studied by measuring mutton chromatism, pH value, thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) value, carbonyl content, total sulfhydryl content, and protein surface hydrophobicity. The results showed that cold plasma treatment increased L^* value, and decreased a^* value and b^* value of mutton. When the treatment voltage exceeded 50 kV, the a^* value decreased significantly ($P<0.05$), but the total color (ΔE) difference between the treatment groups had no significant difference ($P>0.05$). TBARS value, carbonyl content and surface hydrophobicity were increased gradually with the extension of treatment time, treatment voltage and storage time after treatment. When the treatment time was as long as 5 min, TBARS value of mutton was increased to 0.215 mg/kg, the pH value and total sulfhydryl content of mutton showed the opposite trend. When total treatment time was fixed (3 min), with the increase of treatment times, TBARS value, carbonyl content, and surface hydrophobicity of mutton were decreased, while pH value and total sulfhydryl content were increased. Therefore, cold plasma treatment could not affect the color significantly. However it promoted the oxidation of both lipids and protein in mutton.

Key words: mutton; cold plasma; lipids oxidation; protein oxidation; quality

收稿日期: 2021−11−01
作者简介: 岑南香（1999−）, 女, 本科, 研究方向: 食品安全, E-mail: 2063089093@qq.com。
* **通信作者:** 王佳媚（1984−）, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品安全, E-mail: jiamei2029@163.com。

羊肉是日常生活中常食用的红肉之一，羊肉风味独特、肉质细嫩、味道鲜美，具有高蛋白、低脂肪、低胆固醇等特点，是不饱和脂肪酸的良好来源，且富含人体所必需的氨基酸和微量元素，营养价值高[1]，深受消费者喜爱。近年来，随着城市化的发展，羊肉的生产基地与消费市场相隔较远，羊肉的运输与贮藏保鲜成为问题[2]。目前羊肉贮藏保鲜的方法主要有冷藏（0~4 ℃）、冻藏（−18 ℃ 以下）、冰温保鲜、微冻保鲜、气调包装保鲜技术[3]、添加抗氧化剂、精油保鲜等。

低温等离子体（atmospheric cold plasma，ACP）是一种新兴的非热杀菌技术，具有处理温度低、抗菌特性好、营养破坏少、作用后无残留、能最大限度地保持原有的感官特性、无毒副产品以及成本低等优点[4]，使其在多种食品杀菌中得到广泛应用。Stratakos 等[5] 研究表明，牛肉经低温等离子体处理后，大肠杆菌数量显著减少，且杀菌时间影响杀菌效果。Dirks 等[6] 研究表明，低温等离子体对鸡胸肉和鸡腿皮肤表面的微生物具有显著的抑制作用，可将微生物总数降低一个对数周期。Jayasena 等[7] 研究表明，经低温等离子体处理后，猪肉和牛肉的 L^* 值无显著变化（$P>0.05$），a^* 值显著降低（$P<0.05$）。低温等离子体能有效杀死肉类表面的微生物，但对其味道、颜色、气味、风味及可接受性等感官参数存在一定的影响。因此，优化处理参数，控制处理条件，有效控制低温等离子体处理对肉品品质所造成的不良影响，是应用研究的重要内容之一。目前，低温等离子体在牛肉[8]、猪肉[9]、鸡胸肉[10−11]、鸭肉[12] 等畜禽肉中有较多应用研究，而羊肉中的研究相对较少。

肉类在贮藏过程中都不可避免地发生氧化反应，肉类氧化变质主要是由脂质氧化和蛋白质氧化及二者之间存在的交互氧化作用引起的[13]。评价畜禽肉脂质氧化的常用指标有硫代巴比妥酸反应物值（TBARS）、过氧化值（POV）、酸价（AV）等，反映蛋白质氧化的指标有羰基含量、总巯基含量、活性巯基含量、表面疏水性、二硫键含量等。另外，色泽和 pH 也常用作评价肉类氧化变质的指标。本研究从脂质氧化和蛋白质氧化出发，探讨不同低温等离子体处理条件对羊肉色泽、pH、TBARS 值、羰基含量、总巯基含量和蛋白表面疏水性的影响，为推动低温等离子体在羊肉贮藏保鲜技术中的应用提供一定的理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜本地黑山羊后腿肉　购于海南海口市沿江三农贸市场；尿素、氯化钾、乙酸乙酯、无水乙醇、HCl　西陇科学股份有限公司；氯化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、SDS、溴酚蓝　广东广试试剂科技有限公司；2-硫代巴比妥酸、三氯乙酸、2,4-二硝基苯肼、盐酸胍、DTNB、乙二胺四乙酸二钠　国药集团化学试剂有限公司；总蛋白定量测试盒（BCA 法）　南京建成生物工程研究所。

PHS-25 pH 计　奥维实验仪器有限公司；MAP-H360 型复合气调包装机　苏州森瑞保鲜设备有限公司；低温等离子体发生器　美国 Phoenix 公司；PL303 电子分析天平　美国梅特勒-托利多公司；722G 紫外-可见分光光度计　北京普析通用仪器有限公司；HH-4 数显恒温水浴锅　常州澳华仪器有限公司；CR-10 色差计　日本 Konica Minolta 公司；高速分散机、制冰机　中外合资广州柯尼塔电器有限公司；TGL-16MS 型台式高速冷冻离心机　上海卢湘仪离心机仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品处理　新鲜羊肉剔除多余脂肪和结缔组织，称取大小基本一致的羊肉块（10 g 左右），用色差仪测量色差后将其放入塑料包装盒中，用包装机进行空气密封包装后进行如下处理：A 处理时间：在 70 kV 条件下分别处理 0、1、2、3、4、5 min；B 处理电压：在 40、50、60、70、80 kV 电压条件下处理 3 min；C 处理次数：在 70 kV 条件下分别处理 0 次、1 次（180 s）、2 次（每次 90 s，间隔时间 30 s）、3 次（每次 60 s，间隔时间 30 s）、4 次（每次 45 s，间隔时间 30 s），累计处理时间均为 3 min。D 处理后放置时间：在 70 kV 条件下处理 3 min 后在 4 ℃ 放置 0、24 h。打开包装测定相关指标，未经低温等离子体处理的样品包装后放置相同时间取样。

1.2.2 色差测定　色差仪用标准白板校正后，测定样品处理前后表面色差值，记录其亮度值（L^*）、红度值（a^*）及黄度值（b^*），分别在待测样品上取 5 个测量点，结果取平均值。总色差值 ΔE 的计算公式[14] 为：

$$\Delta E = \sqrt{(L_0^* - L^*)^2 + (a_0^* - a^*)^2 + (b_0^* - b^*)^2} \qquad 式（1）$$

式中：L_0^*、a_0^*、b_0^* 为未包装处理前的色差值；L^*、a^*、b^* 为处理后的色差值。

1.2.3 pH 的测定　根据 GB 5009.237-2016《食品安全国家标准 食品 pH 值的测定》进行测定。

1.2.4 TBARS 含量的测定　根据 GB 5009.181-2016《食品安全国家标准 食品中丙二醛的测定》进行测定。

1.2.5 肌原纤维蛋白提取　参考文献 [15] 中的方法并作适当改进。称取 5 g 羊肉糜于 25 mL PBS 缓冲液中匀浆 4 次，每次 10 s，均质机转速为 10000 r/min，每次转完冰一会。均质完离心（10000 r/min，4 ℃，10 min），倒掉上清液，沉淀用 PBS 缓冲液洗 3 次后加入 20 mL 0.6 mol/L NaCl 的 PBS 缓冲液，均质，放入 4 ℃ 冰箱提取 18 h 后再次离心（10000 r/min，4 ℃，10 min），所得膏状沉淀即为肌原纤维蛋白，肌原纤维蛋白浓度用试剂盒进行测定。

1.2.6 羰基含量的测定　参考黄倩等[16] 的方法并作适当改进。用 0.6 mol/L NaCl 的 PBS 缓冲液将蛋白

浓度调整为 2 mg/mL，取 0.5 mL 稀释过后的蛋白溶液，加入 0.5 mL 2 mol/L HCl 溶液（含 0.01 mol/L 2,4-二硝基苯肼），空白组（用 0.6 mol/L NaCl PBS 缓冲液代替蛋白）加入 0.5 mL 2 mol/L HCl 溶液（不含 2,4-二硝基苯肼），混匀后在 25 ℃ 下反应 1 h，再加入 0.5 mL 三氯乙酸（质量分数 20%），混匀后离心（4 ℃，12000 r/min，10 min），弃上清后，用 1 mL 乙醇乙酸乙酯溶液（1∶1，v/v）对沉淀洗涤 3 次，洗完后用 1.5 mL 6 mol/L 盐酸胍溶液对蛋白溶液进行悬浮，并在 37 ℃ 条件下水浴保温 15 min 溶解沉淀，再将反应液在 12000 r/min、4 ℃ 下离心 15 min 除去不溶物质，以空白组为对照，测定吸光度值（波长为 370 nm），计算公式如下：

$$羰基含哩（nmol/mg）=\frac{A\times n\times 10^6}{\varepsilon\times\rho}\qquad 式（2）$$

式中：A 为 370 nm 波长处的吸光度；n 为稀释倍数；ε 为摩尔吸光系数 22000（$L\cdot mol^{-1}\cdot cm^{-1}$）；$\rho$ 为蛋白质质量浓度（mg/mL）。

1.2.7　总巯基含量的测定　参考徐红艳等[17]的方法并作适当改进。用 0.6 mol/L NaCl 的 PBS 缓冲液将蛋白浓度调整为 2 mg/mL，取 0.5 mL 稀释后的蛋白溶液依次加入 2 mL 尿素-十二烷基硫酸钠溶液（含 8.0 mol/L 尿素，30 g/L SDS，0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液，pH7.4）和 0.5 mL 10 mmol/L DTNB 试剂（溶解在 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液中，pH7.4），在室温下反应 15 min，取上清液在 412 nm 下测定吸光值。用 0.6 mol/L NaCl 的 PBS 缓冲液代替蛋白液用于空白对照。计算公式如下：

$$总巯基含量（nmol/mg）=\frac{A\times n\times 10^6}{\varepsilon\times\rho}\qquad 式（3）$$

式中：A 为 412 nm 波长处的吸光度；n 为稀释倍数；ε 为摩尔吸光系数 11400（$L\cdot mol^{-1}\cdot cm^{-1}$）；$\rho$ 为蛋白质质量浓度（mg/mL）。

1.2.8　表面疏水性的测定　参考黄倩等[16]的方法并作适当改进。用 0.6 mol/L NaCl 的 PBS 缓冲液将蛋白浓度调整为 2 mg/mL，取 1 mL 稀释后份蛋白溶液，加入 200 μL 1 mg/mL 溴酚蓝溶液后进行离心处理（6000 r/min，15 min），并对上清液进行 10 倍稀释，以 0.6 mol/L NaCl 的 PBS 缓冲液为空白对照，测定吸光度值（波长为 595 nm）。以溴酚蓝结合量来表示表面疏水性，计算公式如下：

$$溴酚蓝结合量(\mu g)=\frac{A_1-A_2}{A_1}\times 200\qquad 式（4）$$

式中：A_1 为空白对照组溴酚蓝吸光值；A_2 为样品吸光值。

1.3　数据处理

每个试验重复四次。采用 Microsoft Office Excel 2016 进行处理，结果用平均值±标准差表示。采用 Origin 2021 软件作图，DPS 18.10 软件对数据进行单因素方差分析，Duncan 新复极差法进行差异显著性分析，$P<0.05$ 表示差异显著。

2　结果与分析

2.1　低温等离子体处理对羊肉色泽的影响

色泽是影响肉制品的重要感官参数之一[18]，不仅能反映肉的新鲜程度，而且对深加工制品的品质优劣起着重要作用[2]。羊肉色泽主要受肌红蛋白的影响[19]。如表 1 所示，不同低温等离子体处理条件均使羊肉的亮度值 L^* 升高，红度值 a^* 和黄度值 b^* 下降，各处理组间的总色差值 ΔE 无显著差异（$P>0.05$）。当处理电压超过 50 kV，a^* 值下降显著（$P<0.05$），低

表 1　低温等离子体处理对羊肉色泽的影响

Table 1　Effect of cold plasma treatment on the color of mutton

处理条件		L^*		a^*		b^*		ΔE
		处理前	处理后	处理前	处理后	处理前	处理后	
处理时间(min)	1	36.1±2.55^a	36.3±2.05^a	14.6±0.35^a	11.8±1.63^a	10.6±0.35^a	9.5±0.00^b	3.0±2.00^a
	2	31.6±0.28^b	35.0±1.48^a	13.4±1.63^a	8.8±0.07^b	9.5±0.78^a	8.3±0.35^a	6.1±0.42^a
	3	39.6±0.21^a	40.6±4.67^a	15.0±1.06^a	9.9±0.35^b	11.4±0.00^a	9.0±1.48^a	6.5±2.26^a
	4	36.9±3.75^a	37.7±0.50^a	12.6±3.04^a	8.2±0.14^a	9.5±0.50^a	9.2±0.42^a	5.4±3.18^a
	5	36.1±0.21^a	39.4±2.55^a	13.4±1.48^a	6.4±0.14^b	9.5±0.14^a	8.0±0.50^b	8.0±2.26^a
处理电压(kV)	40	36.4±1.41^a	39.3±2.47^a	13.1±0.64^a	10.4±2.20^a	8.5±0.07^a	8.4±0.71^a	4.2±4.45^a
	50	37.6±2.83^a	39.0±2.26^a	15.4±4.24^a	10.5±0.28^a	10.4±1.63^a	9.6±1.63^a	5.6±4.53^a
	60	33.3±1.77^a	36.4±2.12^a	13.4±1.06^a	8.5±0.21^b	9.1±1.56^a	7.8±0.64^a	5.9±1.48^a
	70	39.6±0.21^a	40.6±4.67^a	15.0±1.06^a	9.9±0.35^b	11.4±0.00^a	9.0±1.48^a	6.5±2.26^a
	80	38.0±2.33^a	39.4±2.33^a	15.6±0.92^a	9.4±0.85^b	11.1±1.34^a	8.5±0.28^a	6.8±2.05^a
处理次数	1	39.6±0.21^a	40.6±4.67^a	15.0±1.06^a	9.9±0.35^b	11.4±0.00^a	9.0±1.48^a	6.5±2.26^a
	2	36.1±0.50^b	38.6±0.14^a	15.6±3.18^a	8.2±1.56^b	10.4±1.06^a	8.4±0.78^a	8.1±4.88^a
	3	37.5±3.82^a	39.3±1.27^a	13.1±1.20^a	7.9±0.07^b	9.6±1.06^a	8.8±0.71^a	5.9±0.42^a
	4	42.0±5.94^a	42.4±5.80^a	12.8±3.25^a	7.6±1.06^a	10.6±0.28^a	9.2±0.50^b	5.6±1.91^a
处理后放置时间(h)	0	39.6±0.21^a	40.6±4.67^a	15.0±1.06^a	9.9±0.35^b	11.4±0.00^a	9.0±1.48^a	6.5±2.26^a
	24	40.7±0.14^a	41.4±0.64^a	14.7±1.41^a	11.7±0.78^a	11.8±1.06^a	10.5±1.77^a	3.4±0.78^a

注：处理前后字母不同表示差异显著（$P<0.05$）；最后一列字母不同表示差异显著（$P<0.05$）。

温等离子体处理过程中产生的自由基能将肌红蛋白血红素辅基中心的 Fe^{2+}氧化成 Fe^{3+}，高铁肌红蛋白不断积累而出现褐变，导致 a^*值下降[2]。L^*值增大是由于肉中的肌原纤维蛋白能够通过毛细作用保持肉中水分，当肌原纤维蛋白发生氧化时，肌肉自身水分溶出，鲜肉的持水力降低，导致鲜肉表面水分含量增大，使亮度值增大[19]。综上可知，低温等离子体处理能够在一定程度上影响羊肉处理前后的色差值，但是总色差值 ΔE 没有发生显著变化，即色泽品质未发生改变。

2.2 低温等离子体处理对羊肉 pH 的影响

pH 常作为评价肉类新鲜程度的指标之一，是因为 pH 能够将肌肉内游离的 H^+和 OH^-的浓度通过一定形式呈现出来[20]。处理时间对羊肉 pH 如图 1A 所示，随着处理时间延长，pH 呈现先下降后上升的趋势，处理 3 min 时 pH 最低，为 5.64；当处理电压小于 70 kV 时，pH 随处理电压的升高显著降低（P<0.05）（图 1B）；图 1C 所示，累计处理时间一定（3 min）处理 4 次时，羊肉 pH 变化最低，处理 1 次和 2 次的差异不显著（P>0.05）；处理后放置 24 h 的 pH 未发现显著（P>0.05）变化（图 1D）。本研究中低温等离子体激发空气产生 NO、NO_3^-、NO_2^-、H^+和 H_2O_2 等活性成分[21]，这些呈酸性物质引起羊肉 pH 下降。当处理电压升高，处理时间延长，低温等离子体处理过程中形成的呈酸性基团增加，可与肉中的蛋白质等物质反应中和部分酸性成分，未能在羊肉中呈现酸性。当累计处理时间固定（3 min）而进行短时多次间歇处理时，每一次的直接处理时间被缩短，低温等离子体中产生的活性成分数量减少，间歇时间部分活性成分因寿命短而消失[22]，因此，尽管累计处理时间（3 min）较长，但对羊肉 pH 影响不明显。低温等离子体产生的活性氧和活性氮等自由基寿命短[22]，对羊肉 pH 不能长时间起作用。综上，羊肉 pH 受低温等离子体处理电压、时间和累计次数的影响明显，随着处理后放置时间延长影响作用逐渐消失。

2.3 低温等离子体处理对羊肉 TBARS 值的影响

脂质氧化的主要产物是过氧化物，过氧化物在酶的作用下进一步分解形成丙二醛（MDA）等低分子量产物，通过量化脂质氧化初级产物丙二醛含量表示肉类脂质氧化的程度[19]。如图 2A 所示，当处理时间超过 1 min 时，羊肉 TBARS 值随处理时间的延长而不断升高（P<0.05）；当电压低于 70 kV 时，TBARS 值随电压的升高略微增加，当处理电压超过 70 kV 时，TBARS 值增幅明显（图 2B）；图 2C 可知，当累计处理时间固定（3 min），随着处理次数的增多，羊肉 TBARS 值降低，处理 1 次和 2 次的 TBARS 值相差不大；处理后放置 24 h，羊肉 TBARS 值显著（P<0.05）升高至 0.235 mg/kg。本研究采用空气作为低温等离子体的激发气体，可形成活性氧（ROS）、活性氮（RNS）等具有高氧化活性的基团，羊肉富含不饱和脂肪酸，易受到 ROS、RNS 等活性基团攻击，提取氢离子而氧化降解生成低分子量产物。延长处理时间，升高处理电压，能够促进羊肉中脂质的氧化，类似现象在新鲜草鱼[21] 中已有报道。当累计处理时间一样（3 min），处理次数越多，活性氧及活性氮生成含量相对较少[23]，与羊肉中脂质和蛋白质的反应时间和作用量变少，使得羊肉的氧化程度相对较弱。综上，不同低温等离子体处理条件均引起羊肉 TBARS 值升高，且研究表明，当肉类的 TBARS 值大于 0.6 mg/kg

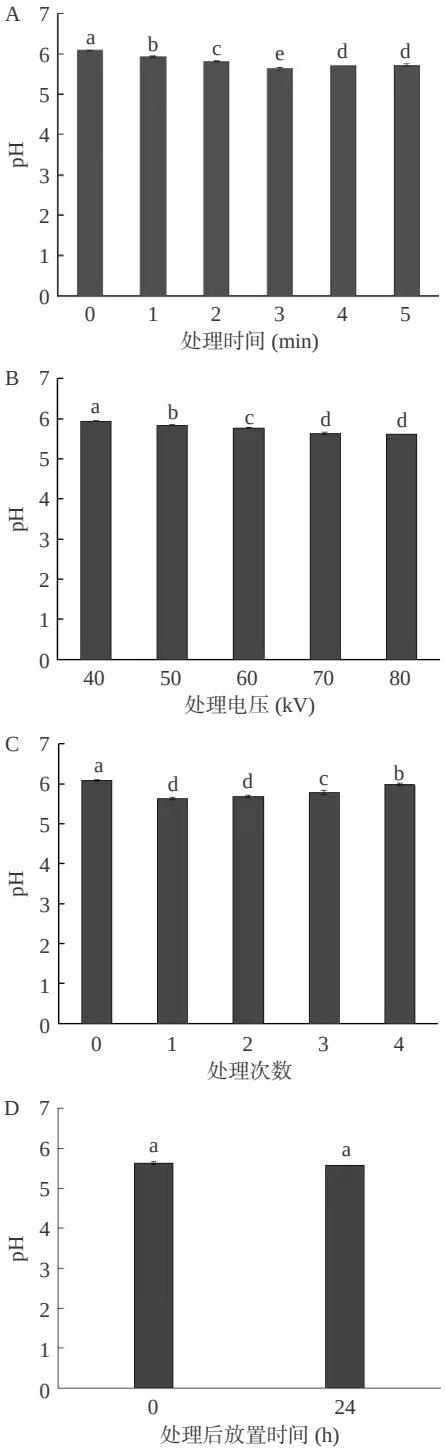


图 1 低温等离子体处理对羊肉 pH 的影响

Fig.1 Effects of cold plasma treatment on pH value of mutton

注：不同小写字母表示差异显著，P<0.05；图 2~图 5 同。

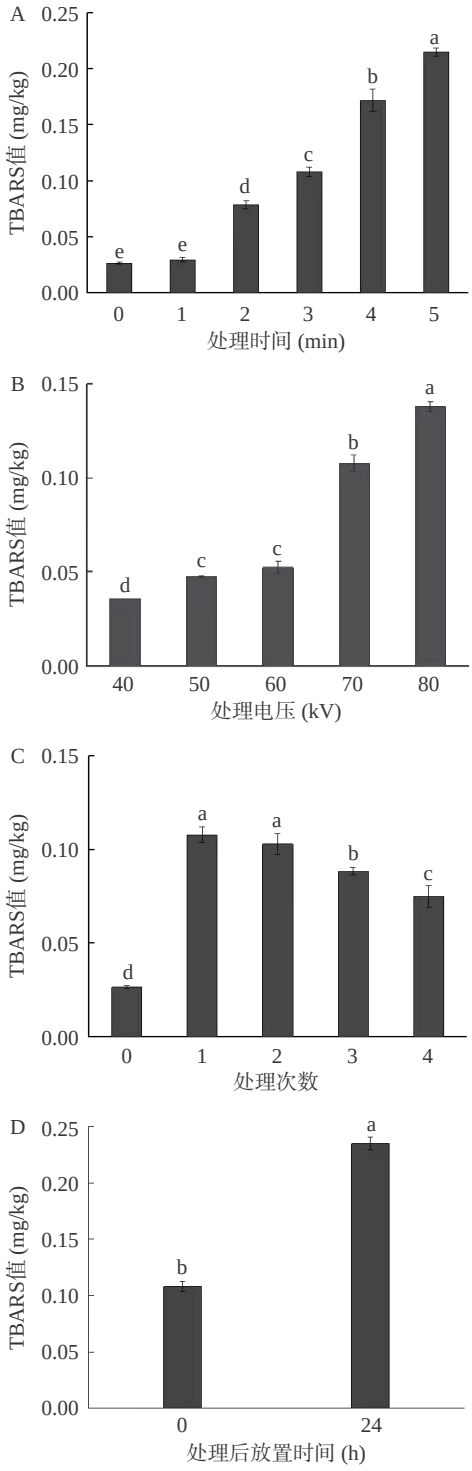


图 2　低温等离子体处理对羊肉 TBARS 值的影响

Fig.2　Effects of cold plasma treatment on TBARS value of mutton

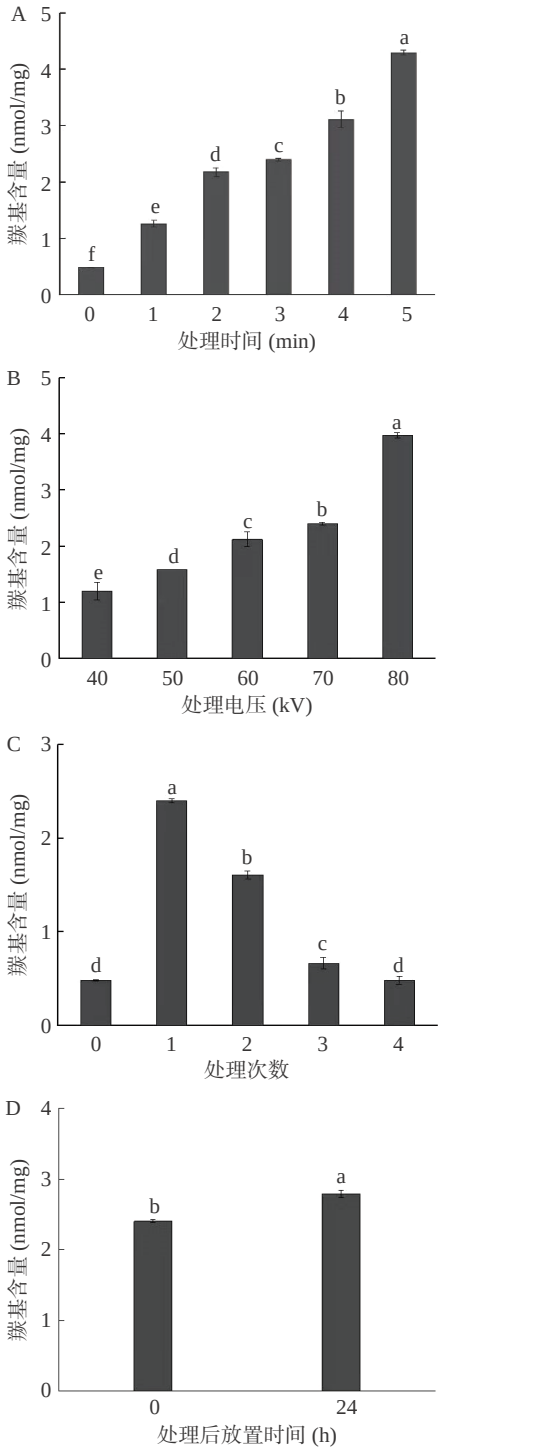


图 3　低温等离子体处理对羊肉肌原纤维蛋白羰基含量的影响

Fig.3　Effects of cold plasma treatment on carbonyl content of mutton myofibrillar protein

时，会对肉类的品质产生影响[24]，实验中最高 TBARS 值为 0.235 mg/kg，远远低于上述值，低温等离子体处理虽会促进羊肉中脂质的氧化，但未对羊肉品质造成负面影响。

2.4　低温等离子体处理对羊肉肌原纤维蛋白羰基含量的影响

羰基是评定肉类中蛋白质氧化最常用的指标，通常由氨基酸残基侧链基团氧化而成[25]。如图 3A 所示，随着处理时间延长，羊肉中羰基含量呈显著上升趋势（P<0.05），处理 5 min 后羰基含量增加到 4.31 nmol/mg；各组羰基含量随处理电压的升高呈显著上升趋势（P<0.05），在处理电压为 80 kV 时，羰基含量为 3.98 nmol/mg（图 3B）；累计处理时间固定（3 min）时，处理次数越多，羊肉羰基含量越低，处理 4 次组与未处理差异不显著（P>0.05）（图 3C），而处理后放置 24 h，羰基含量显著（P<0.05）升高至 2.79 nmol/mg。羰基含量上升由低温等离子体产生的活性氧和活性氮自由基造成，活性氧和活性氮氧化

氨基酸残基侧链，尤其是侧链上有 NH^- 或 NH_2 基团的氨基酸，从而导致肌原纤维蛋白氧化[17]。随着处理时间延长，活性物质浓度增加，羰基含量不断上升，表明羊肉肌原纤维蛋白氧化程度增加，类似现象在用等离子体活性水腌制猪肉的研究中也有发现[25]。Luo 等[26] 的研究中发现，随着处理电压的升高，游离氨基酸含量明显增多，低温等离子体处理产生的活性物质能与游离氨基酸反应生成羰基，导致羰基含量升高。由于低温等离子体中产生的活性自由基半衰期短[23]，处理后 24 h 全部消失，无法直接对羊肉造成影响。但是，脂质和蛋白质氧化过程是复杂的链式反应，低温等离子体中的活性自由基激发羊肉中相关氧化反应后，产生的次级产物或者反应生成物能够继续作用，促进脂质和蛋白质氧化。综上，低温等离子体处理能够促进羊肉肌原纤维蛋白的氧化，并且处理后放置时间延长能够增强蛋白质的氧化变性。

2.5 低温等离子体处理对羊肉肌原纤维蛋白总巯基含量的影响

巯基反应活性很强，能氧化形成二硫键和其他硫醇氧化产物，当总巯基含量减少，表示氧化程度增加，总巯基含量可作为肌原纤维蛋白氧化的一个重要指标[27]。如图 4A 所示，随着低温等离子体处理时间的延长，羊肉中的总巯基含量逐渐降低，在处理 5 min 后，总巯基含量为 44.08 nmol/mg；图 4B 所示，当处理电压达到 70 kV 后，总巯基含量趋于稳定。随着处理时间延长，低温等离子体产生的活性物质会诱导蛋白质氧化作用增强，通过巯基分子内或者分子间交联影响二硫键的生成，进而破坏蛋白质的结构。在高电压下，等离子体中各类粒子会聚合或发生反应一部分，对蛋白质的氧化作用相对减弱[28]，使得总巯基含量相对稳定。当累计处理时间固定(3 min)时，处理次数越多，总巯基含量升高，低温等离子体对羊肉蛋白质氧化作用越低，可能与脂质氧化衍生物含量的降低或活性氧的含量有关[13]。处理后放置过程中，羊肉中蛋白质的氧化反应持续，氧化程度增加。巯基具有较强的亲核性和还原性，在维持肌原纤维蛋白空间结构稳定、保持理化功能方面等具有重要意义[29]。综上，不同低温等离子体处理条件可降低羊肉的总巯基含量，破坏肌原纤维蛋白的空间结构和稳定性，从而促进蛋白质变性。

2.6 低温等离子体处理对羊肉肌原纤维蛋白表面疏水性的影响

蛋白表面疏水性反映蛋白质分子内部疏水基团的暴露程度，暴露程度越大，疏水性越强[29]，一般通过与溴酚蓝的结合量来反映其表面疏水性。随着处理时间延长，溴酚蓝结合量呈显著升高趋势(P<0.05)，处理 5 min 后溴酚蓝的结合量为 68.58 μg(图 5A)；随着处理电压升高，溴酚蓝结合量显著升高(P<0.05)，80 kV 处理后为 65.46 μg(图 5B)；累计处理时间固定(3 min)时，溴酚蓝结合量随处理次数增多呈

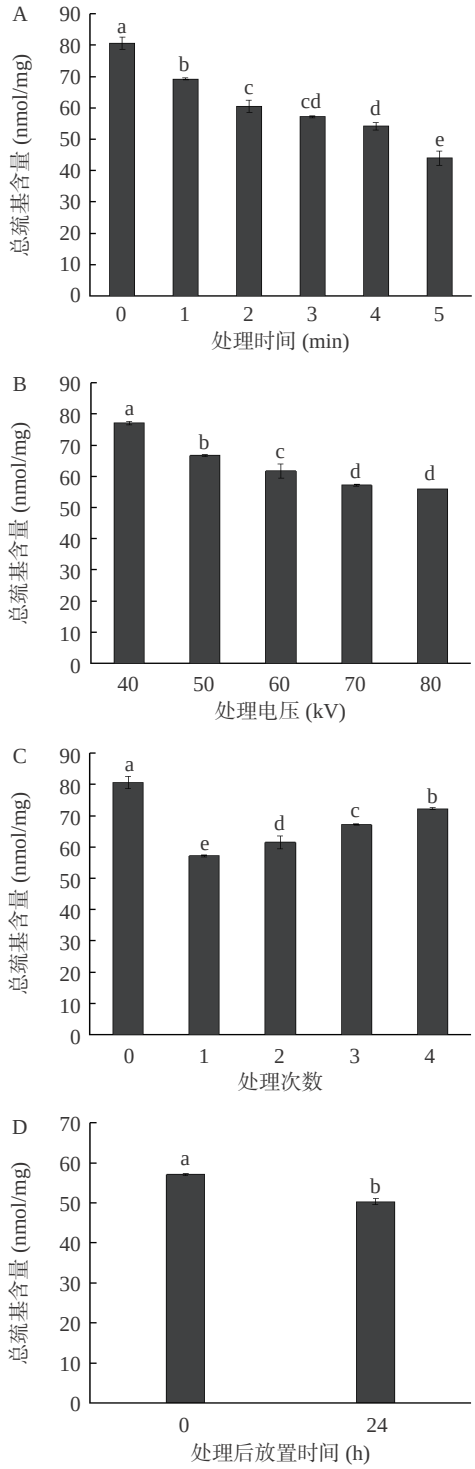


图 4 低温等离子体处理对羊肉肌原纤维蛋白总巯基含量的影响

Fig.4 Effects of cold plasma treatment on total sulfhydryl content of mutton myofibrillar protein

显著下降趋势(P<0.05)(图 5C)，延长放置时间，显著增加溴酚蓝结合量(P<0.05)，这与张海璐等[18] 研究氧化时间对羊肉肌原纤维蛋白表面疏水性的影响的结果一致。肌原纤维蛋白表面疏水性是指蛋白分子与水分子间相互排斥的物理特性，蛋白质发生氧化时会导致埋藏在蛋白质内部结构的疏水性氨基酸残基暴露出来，使其分子间产生聚集和交联[30]。Luo 等[26] 的研究指出，低温等离子体处理会导致肌原纤维蛋

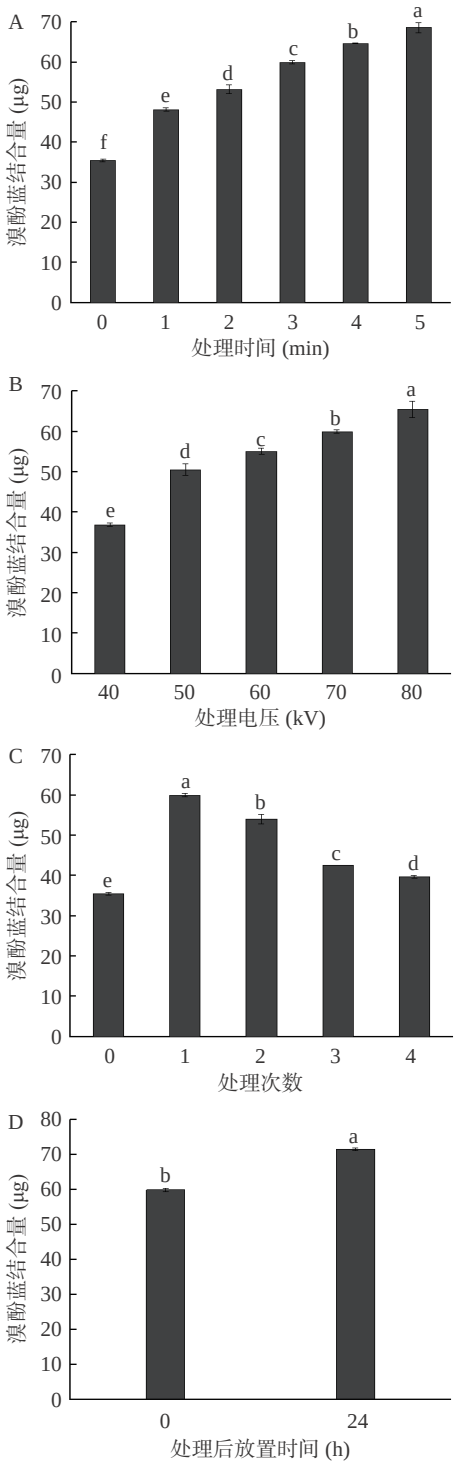


图 5　低温等离子体处理对羊肉肌原纤维蛋白表面疏水性的影响

Fig.5　Effects of cold plasma treatment on surface hydrophobicity of mutton myofibrillar protein

白 α-螺旋结构向其他结构形式展开，α-螺旋含量降低可减弱肌原纤维蛋白结合水的能力，增强肌原纤维蛋白的表面疏水性。随着处理时间延长、处理电压升高，低温等离子体中活性基团对疏水性氨基酸的攻击增加，导致蛋白质表面疏水性升高。累计处理时间固定（3 min），处理次数增加使得相应的处理时间减少，有效的活性粒子减少，蛋白质氧化程度减弱，蛋白质分子聚集或交联使其疏水性降低[17]。综上，低温等离子体处理减弱了蛋白质折叠程度，促进内部疏水基团暴露，加速羊肉肌原纤维蛋白失活和降解。

2.7　脂质和蛋白质氧化指标相关性分析

不同低温等离子体处理条件下羊肉中脂质和蛋白质氧化指标进行相关性结果见表 2。随着处理时间延长，羊肉 TBARS 值与同条件下羰基含量和表面疏水性呈极显著相关（$P<0.01$），与总巯基含量呈极显著负相关（$P<0.01$），表明羊肉中脂质与蛋白质氧化的变化趋势高度一致。随着处理电压升高，羊肉 TBARS 值与羰基含量呈显著正相关（$P<0.05$）；当累计处理时间固定（3 min）时，随着处理次数增多，羊肉 TBARS 值与总巯基含量和表面疏水性分别呈显著负相关和正相关（$P<0.01$）。上述结果表明，处理时间是影响低温等离子体处理羊肉中脂质和蛋白质氧化的重要因素，其对羊肉脂质和蛋白质氧化的变化趋势影响一致。低温等离子体处理产生大量活性自由基，同时攻击羊肉脂质和蛋白质，由于脂质和蛋白质氧化属于链式持续反应，处理时间变化会直接影响活性自由基与羊肉中脂质和蛋白质的氧化反应时间，因此，低温等离子体处理时间对羊肉氧化的影响作用大于其他因素。

表 2　不同处理条件下脂质和蛋白质氧化指标相关性分析

Table 2　Correlation relationships analysis between oxidation index of lipids and protein under different treatment conditions

处理条件	指标	TBARS值	羰基含量	总巯基含量	表面疏水性
处理时间	TBARS值	1			
	羰基含量	0.972**	1		
	总巯基含量	−0.928**	−0.985**	1	
	表面疏水性	0.920**	0.960**	−0.983**	1
处理电压	TBARS值	1			
	羰基含量	0.931*	1		
	总巯基含量	−0.836	−0.825	1	
	表面疏水性	0.865	0.881*	−0.990**	1
处理次数	TBARS值	1			
	羰基含量	0.934	1		
	总巯基含量	−0.990*	−0.969*	1	
	表面疏水性	0.962*	0.992**	−0.980*	1

注：*表示相关性显著（$P<0.05$）；**表示相关性极显著（$P<0.01$）。

3　结论

低温等离子体处理后，羊肉 TBARS 值、羰基含量和蛋白表面疏水性升高，而总巯基含量降低，表明低温等离子体处理能够促进新鲜羊肉中脂质和蛋白质氧化。不同处理条件对羊肉脂质和蛋白质氧化影响存在较大差异，其中处理时间在促进羊肉中脂质和蛋白质氧化具有极显著的影响。羊肉 pH 受处理时间、处理电压和处理次数（累计处理时间固定）的影响明显，而色泽在同条件下未发生明显变化。低温等离子体处理后羊肉的氧化程度均在可接受范围内，适度氧化还可能对肉制品的品质产生有益的影响。因此，低温等离子体处理时应严格控制处理条件，为今

后低温等离子体在羊肉贮藏保鲜中的应用提供参考依据。

参考文献

[1] 马惠敏, 王振宇, 黄彩燕, 等. 包装对羊肉冷藏过程中热休克蛋白表达及羊肉品质的影响[J]. 肉类研究, 2021, 35(3): 35−40. [MA H M, WANG Z Y, HUANG C Y, et al. Effect of packaging on expression of heat shock proteins in lamb and lamb quality during refrigeration storage[J]. Meat Research, 2021, 35(3): 35−40.]

[2] 许立兴, 薛晓东, 仵轩轩, 等. 微冻及冰温结合气调包装对羊肉的保鲜效果[J]. 食品科学, 2017, 38(3): 232−238. [XU L X, XUE X D, WU X X, et al. Comparative effects of superchilling and ice-temperature combined with modified atmosphere packaging on mutton quality during storage[J]. Food Science, 2017, 38(3): 232−238.]

[3] 马强, 王芳, 鹿平, 等. 气调包装技术在冷鲜肉的应用与前景[J]. 新农业, 2020, 10: 45−48. [MA Q, WANG F, LU P, et al. Application and prospect of modified atmosphere packaging technology in cold and fresh meat[J]. New Agriculture, 2020, 10: 45−48.]

[4] 韩格, 陈倩, 孔保华. 低温等离子体技术在肉品保藏及加工中的应用研究进展[J]. 食品科学, 2019, 40(3): 286−292. [HAN G, CHEN Q, KONG B H. Recent advances in application of cold plasma technology in meat preservation and processing[J]. Food Science, 2019, 40(3): 286−292.]

[5] STRATAKOS A C, GRANT I R. Evaluation of the efficacy of multiple physical, biological and natural antimicrobial interventions for control of pathogenic *Escherichia coli* on beef[J]. Food Microbiology, 2018, 76: 209−218.

[6] DIRKS B P, DOBRYNIN D, FRIDMAN G, et al. Treatment of rawpoultry with nonthermal dielectric barrier discharge plasma to reduce *Campylobacter jejuni* and *Salmonella enteria*[J]. Journal of Food Protection, 2012, 75(1): 22−28.

[7] JAYASENA D D, KIM H J, YONG H I, et al. Flexible thin-layer dielectric barrier discharge plasma treatment of pork butt and beef loin: Effects on pathogen inactivation and meat-quality attributes[J]. Food Microbiology, 2015, 46: 51−57.

[8] GK V, AKTOP S, ZKAN M, et al. The effects of atmospheric cold plasma on inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* and some quality characteristics of pastırma-A dry-cured beef product[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2019, 56: 102−188.

[9] 孟婧怡, 黄明明, 王佳媚, 等. 低温等离子体冷杀菌处理时间及电压强度对生鲜猪肉脂质氧化的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(3): 135−141. [MENG J Y, HUANG M M, WANG J M, et al. Impact of cold plasma cold sterilization processing time and voltage on fresh pork lipid oxidation[J]. Food Science, 2019, 40(3): 135−141.]

[10] ZHUANG H, ROTHROCK M J, HIETT K L, et al. In-package antimicrobial treatment of chicken breast meat with high voltage dielectric barrier discharge-electric voltage effect[J]. Journal of Applied Poultry Research, 2019, 28(4): 801−807.

[11] LEE H, YONG H I, KIM H J, et al. Evaluation of the microbiological safety, quality changes, and genotoxicity of chicken breast treated with flexible thin-layer dielectric barrier discharge plasma [J]. Food Science & Biotechnology, 2016, 25(4): 1189−1195.

[12] 王晨, 钱婧, 盛孝维, 等. 低温等离子体冷杀菌对盐水鸭货架期及风味品质的影响[J]. 食品工业科技, 2021: 1−16. [WANG C, QIAN J, SHENG X W, et al. Effects of low-temperature plasma cold sterilization on shelf life and flavor quality of brine duck[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021: 1−16.]

[13] 何晓娜, 杨晓玲, 王宏博, 等. 羊肉冷藏期间蛋白与脂质氧化及风味变化分析[J]. 食品工业科技, 2021, 42(19): 7. [HE X N, YANG X L, WANG H B, et al. Analysis of change of protein and lipid oxidation and flavor in mutton during refrigeration storage[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(19): 7.]

[14] 王佳媚, 符腾飞, 刘雅夫. 不同气调包装组分协同壳聚糖基复合涂膜对金鲳鱼冷藏品质的影响[J]. 肉类研究, 2021, 35(1): 59−65. [WANG J M, FU T F, LIU Y F. Combined effects of modified atmosphere packaging with different gas compositions and chitosan-based composite coatings on quality of *Trachinotus ovatus* during refrigerator storage[J]. Meat Research, 2021, 35(1): 59−65.]

[15] ZHANG Z Y, YANG Y L, ZHOU P, et al. Effects of high pressure modification on conformation and gelation properties of myofibrillar protein[J]. Food Chemistry, 2017, 217: 678−686.

[16] 黄倩, 黄兰兰, 陈炼红, 等. 冻融对冷藏藏羊肉保水性及蛋白氧化和溶解特性的影响[J]. 食品工业科技, 2021, 42(19): 8. [HUANG Q, HUANG L L, CHEN L H, et al. Effects of repeated freezing-thawing on water holding capacity, myofibrillar protein oxidation and dissolution characteristics of Tibetan mutton during chilled storage[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(19): 8.]

[17] 徐红艳, 张珍, 陈雪琴, 等. 复配香辛料精油处理对冷藏藏羊肉氧化特性的影响[J]. 食品科学技术学报, 2020, 38(2): 90−98. [XU H Y, ZHANG Z, CHEN X Q, et al. Effect of compound spice essential oil on oxidation characteristics of Tibetan mutton during refrigeration[J]. Journal of Food Science and Technology, 2020, 38(2): 90−98.]

[18] 张海璐, 黄翔, 杨燃, 等. 氧化对羊肉肌原纤维蛋白分子与理化特性的影响[J]. 食品科学, 2020, 41(23): 8−14. [ZHANG H L, HUANG X, YANG R, et al. Effect of oxidation on molecular and physicochemical properties of mutton myofibrillar protein[J]. Food Science, 2020, 41(23): 8−14.]

[19] 陈春梅, 陆辰燕, 沈银涵, 等. 蒸煮温度对羊肉肌原纤维蛋白特性的影响[J]. 肉类研究, 2020, 34(7): 40−45. [CHEN C M, LU C Y, SHEN Y H, et al. Effect of cooking temperature on the characteristics of mutton myofibrillar proteins[J]. Meat Research, 2020, 34(7): 40−45.]

[20] 陈晓楠, 赵金丽, 张宾, 等. 低温冻藏过程中鲐鱼肌肉蛋白质氧化特性研究[J]. 包装工程, 2020, 41(17): 38−45. [CHEN X N, ZHAO J L, ZHANG B, et al. Oxidation of muscle protein in mackerel during cryopreservation[J]. Packaging Engineerin, 2020, 41(17): 38−45.]

[21] 王艺月, 姜竹茂, 钱婧, 等. 等离子体处理对生鲜鱼肉杀菌效能及贮藏品质的影响 [J]. 食品与发酵工业, 2021. [WANG Y Y, JIANG Z M, QIAN J, et al. Effect of cold plasma on microbial decontamination and storage quality of fish fillets[J]. Food and Fer-

mentation Industries, 2021.］

［22］钱婧，王冶，章建浩，等. 低温等离子体冷杀菌对血红蛋白诱导猪肉脂质氧化的影响[J]. 包装工程，2020，41(19)：1−7.［QIAN J, WANG Y, ZHANG J H, et al. Effect of cold plasma sterilization on hemoglobin-induced lipid oxidation of fresh pork[J]. Packaging Engineering, 2020, 41(19): 1−7.］

［23］ATTRI P, KIM Y H, PARK D H, et al. Generation mechanism of hydroxyl radical species and its lifetime prediction during the plasma-initiated ultraviolet (UV) photolysis[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 9332.

［24］GREENE B E, CUMUZE T H. Relationship between TBA numbers and inexperienced panelists assessments of oxidized flavor in cooked beef[J]. Journal of Food Science, 2010, 47(1): 52−54.

［25］孙克奎，金声琅，潘雅燕，等. 等离子体活性水腌制对猪肉肌原纤维蛋白氧化及结构的影响[J]. 食品科学，2020，41(14)：36−41.［SUN K K, JIN S L, PAN Y Y, et al. Effects of plasma-activated water curing on oxidation and structure of pork myofibrillar protein[J]. Food Science, 2020, 41(14): 36−41.］

［26］LUO J, MUSTAPHA M N, WEN J Y, et al. Effects of dielectric barrier discharge cold plasma treatment on the structure and binding capacity of aroma compounds of myofibrillar proteins from dry-cured bacon[J]. LWT-Food Science and Technology, 2020: 117.

［27］陈家盛，宫玉婷，董依雪，等. 低温等离子体处理对冰鲜鱿鱼品质特性的影响[J]. 食品工业，2021，42(5)：231−235.［CHEN J S, GONG Y T, DONG Y X, et al. Effect of plasma treatment on quality characteristics of chilled squid[J]. Food Industry, 2021, 42(5): 231−235.］

［28］乔维维，黄明明，王佳媚，等. 低温等离子体对生鲜牛肉杀菌效果及色泽的影响[J]. 食品科学，2017，38(23)：237−242.［QIAO W W, HUANG M M, WANG J M, et al. The effect of low-temperature plasma on the sterilization effect and color of fresh beef[J]. Food Science, 2017, 38(23): 237−242.］

［29］冉丽丹，李文慧，赵超，等. 茶多酚-β-环糊精包合物对羊肚冷藏期间肌原纤维蛋白氧化的影响[J]. 食品科学，2021，42(3)：227−235.［RAN L D, LI W H, ZHAO C, et al. Effect of tea polyphenol/hydroxypropyl-β-cyclodextrin inclusion complex on myofibrillar protein oxidation in ovine tripe during refrigerated storage[J]. Food Science, 2021, 42(3): 227−235.］

［30］鲁小川，张伊侬，潘成磊，等. 孜然精油对微冻贮藏羊肉肌原纤维蛋白结构和功能特性的影响[J]. 食品与发酵工业，2019，45(21)：110−117.［LU X C, ZHANG Y N, PAN C L, et al. Effect of cumin (*Cuminum cyminum* L.) essential oil on the structure and functional properties of myofibrillar protein of mutton during super-chilling storage[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(21): 110−117.］

林佳宜, 郑佳纯, 李雁, 等. 自由基接枝改性对乳清分离蛋白乳化稳定性的影响 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 94−100. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110006

LIN Jiayi, ZHENG Jiachun, LI Yan, et al. Effect of Radical Graft Modification on Emulsifying Stability of Whey Protein Isolate[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 94−100. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110006

· 研究与探讨 ·

自由基接枝改性对乳清分离蛋白乳化稳定性的影响

林佳宜, 郑佳纯, 李　雁, 解新安, 李　璐*

（华南农业大学食品学院, 广东广州 510642）

摘　要: 为研究蛋白的共价接枝改性对其乳化稳定性的影响，本文以乳清分离蛋白（whey protein isolate，WPI）和表没食子儿茶素没食子酸酯（epigallocatechingallate，EGCG）为原料，通过自由基接枝法制备 WPI-EGCG 复合物。利用扫描电镜（SEM）对其微观结构进行观测，通过测定界面蛋白吸附量、界面流变学特性来探究共价接枝对界面特性的影响；进而以 WPI-EGCG 接枝物为乳化剂构建番茄红素纳米乳液，并对其物理化学稳定性及储藏稳定性进行研究。结果表明，EGCG 的自由基接枝改变了 WPI 的结构，使之具有更高的黏度和界面稳定性，使以接枝物为乳化剂的番茄红素纳米乳液体系具有更高的物化稳定性。WPI-EGCGE 接枝物稳定的番茄红素纳米乳液在 37 ℃ 下储藏 30 d 后粒径和 ζ-电位绝对值分别增加了 268.3 nm 和 17.6 mV，乳液中番茄红素的保留率仍有 66.23%，呈现出更佳的番茄红素保护效果。本研究为功能活性物质纳米乳液载运体系的构建提供了参考。

关键词: 自由基接枝, 乳清分离蛋白, 表没食子儿茶素没食子酸酯, 界面流变学, 乳化稳定性, 纳米乳液

中图分类号: TS201.2　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0094−07　　本文网刊:

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110006

Effect of Radical Graft Modification on Emulsifying Stability of Whey Protein Isolate

LIN Jiayi, ZHENG Jiachun, LI Yan, XIE Xin'an, LI Lu*

（School of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China）

Abstract: In order to understand the effect of covalent graft modification of protein on its emulsifying stability, WPI-EGCG graft was prepared by free radical grafting using whey protein isolate (WPI) and epigallocatechingallate (EGCG) as raw materials. Scanning electron microscopy (SEM) was used to observe the microstructure, and the effect of covalent grafting on the interface stability was investigated by measuring the adsorption capacity of interfacial protein and the rheological properties of the interface. Lycopene nano-emulsion was constructed by WPI-EGCG graft as emulsifier, and its physicochemical stability and storage stability were studied. The results showed that the free radical grafting of EGCG changed the structure of WPI and made it higher viscosity and interfacial stability, so that the lycopene nano-emulsion system using the graft as emulsifier had higher physical and chemical stability. The size and ζ-potential of the WPI-EGCGE graft-stabilized lycopene nano-emulsion increased 268.3 nm and 17.6 mV, respectively, after 30 days of storage at 37 ℃. The retention rate of lycopene in the emulsion was 66.23%, showing a better lycopene protection effect. This study would provide a reference for the construction of nano-emulsion transport system of functional active substances.

Key words: free radical graft; whey protein isolate; epigallocatechingallate; interfacial rheology; emulsifying stability; nano emulsion

收稿日期: 2021−11−02

基金项目: 国家自然科学基金项目（31501471）。

作者简介: 林佳宜（1997−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品功能载运体系乳化及性能研究, E-mail: Y5592021@163.com。

*** 通信作者:** 李璐（1978−）, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品功能载运体系的构建及应用, E-mail: lulu_lee@scau.edu.cn。

乳清分离蛋白（whey protein isolate, WPI）由 β-乳球蛋白、α-乳清蛋白、牛血清白蛋白以及免疫球蛋白组成[1]，具备优良的乳化性，常作为大分子稳定剂，用于构建纳米乳液体系。WPI 作为乳化剂虽绿色安全，但热稳定性差，在酸性条件下容易出现絮凝和沉淀[2]。因此常用物理或化学的方法对其进行改性，以增强乳液的稳定性[3]。

研究表明，蛋白质与多酚之间可通过酶诱导、碱法和自由基接枝法来实现修饰改性，生成兼具抗氧化性及乳化性的交联产物[4]。自由基接枝是通过蛋白质侧链上的活性基团和羟基自由基发生反应，使多酚与蛋白质之间形成共价键，共价键生成涉及不可逆的相互作用，从而形成更稳定的结合物[5]。较于酶法和碱法，自由基接枝法在反应过程中不涉及有机溶剂，且具有较高的安全性，被广泛应用于食品工业中。目前对于蛋白质-多酚的接枝改性研究主要集中在改性对蛋白结构和功能特性的改变及提高上，如 Lu 等[6]通过自由基接枝法制备卵清蛋白（OVA）-绿原酸（CHA）接枝物并对其抗氧化活性进行测试，发现与未改性 OVA 相比，OVA-CHA 接枝物的抗氧化活性大幅提高。Yi 等[7] 则通过自由基法制备 β-乳球蛋白（BLG）-儿茶素接枝产物并用于制备 β-胡萝卜素纳米乳液，发现在不同温度下储藏 30 d 后 BLG-儿茶素接枝物能显著提高包封在纳米乳液中 β-胡萝卜素的保留率，对多酚接枝对蛋白界面流变性及乳化稳定性的影响等研究较少。

表没食子儿茶素没食子酸酯（Epigallocatechin-gallate, EGCG）是多酚中黄烷醇类物质的主要活性成分，也是绿茶中含量最高的儿茶素，具有抗氧化、抗菌、抗肿瘤等多种功效[8−9]。基于此，本文以 EGCG 作为多酚代表，通过自由基接枝法制备 WPI-EGCG 复合物，探究接枝 EGCG 对 WPI 界面流变性能及其所构建纳米乳液稳定性的影响。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

乳清分离蛋白（HPLC≥90%）　上海江莱生物技术有限公司；表没食子儿茶素没食子酸酯（HPLC≥98%）、番茄红素（HPLC≥90%）　上海源叶生物技术有限公司；中链甘油三酯（MCT）　广州耶尚贸易公司；过氧化氢（30%）　广东省光华科技有限公司；抗坏血酸　广州化学试剂厂；Folin-酚试剂盒　北京鼎国昌盛生物技术有限公司；叠氮化钠　合肥天健化工有限公司；二甲基亚砜　天津市富宇试剂厂。

ATS AH-BASIC 高压均质机　江苏 ATS 工业系统有限公司；FJ200 高速分散均质　搅拌器上海弗鲁克流体机械制造有限公司；EVO MA 15 扫描电子显微镜　德国蔡司；MCR502 模块化智能型高级流变仪　奥地利 Anton Paar。

1.2　实验方法

1.2.1　WPI-EGCG 接枝产物的制备　根据 Gu 等[10]所述的方法稍作修改制备接枝物，用蒸馏水配制 1%（w/v）的 WPI 溶液，加入摩尔比为 5∶1.4 的过氧化氢和抗坏血酸作为引发剂，25 ℃ 水浴恒温振荡 2 h 后加入 EGCG 反应 24 h，将得到的溶液进行透析，冷冻干燥，备用[11]。

1.2.2　扫描电子显微镜（SEM）观察　将待测样品粉末固定在导电双面胶带上，在真空条件下将样品溅射镀上 10 mm 厚的金层，在 20 kV 的加速电压和 450 倍的放大倍数下观察粉末的表观形态。

1.2.3　空白乳液制备　以中链甘油三酸酯（MCT）为分散相，将 WPI-EGCG 接枝物和 WPI 溶解于磷酸盐缓冲溶液（0.01 mol/L, pH7.0）中，配制浓度分别为 0.3%、0.5%、0.7%、1%、1.5%(w/v)的连续相，在 25 ℃ 下 100 r/min 磁力搅拌 4 h。分散相与连续相按 9∶1 的比例混合，在高速分散机的作用下以 10000 r/min 分散 5 min 制得粗乳液，再经高压均质机在 110 MPa 下循环均质 3 次以形成 O/W 纳米乳液。

1.2.4　界面吸附蛋白含量的测定　将空白乳液在 11000 r/min 下离心 1 h，用一次性注射器吸出下清液后经孔径 0.22 μm 的针筒过滤器（水系）过滤，再次在 11000 r/min 下离心至水层中无乳脂析出。采用 Folin-酚试剂盒测定水层中蛋白含量，取 5 mL Folin-酚试剂加入到 1 mL 水相中在室温下反应 10 min，再加入 0.5 mL Folin-酚试剂乙反应 30 min，500 nm 处测量吸光度值[12]。

$$界面蛋白吸附量(mg/mL) = C_0 - C_1$$

式中：C_0 指乳液中总蛋白的浓度，mg/mL；C_1 指未吸附到界面上的蛋白浓度，mg/mL。

1.2.5　乳液流变学特性的测定　采用流变仪测定乳液的流变学特性，用不锈钢平板探头分别进行剪切模式扫描和频率扫描。常温下将刚制备的空白纳米乳液倾倒在测量平台平铺，设置间隙为 1 mm，除去多余乳液。频率扫描的参数设置为：应变 0.1%，频率扫描范围 1~100 Hz。剪切模式扫描的参数设置为：0.1~100 s^{-1}[13]。采用 Ostwald/de waele 流动曲线模型对数据进行分析。

$$\eta = K\gamma n^{-1}$$

式中：η 为表观黏度；γ 为剪切速率（s^{-1}）；K 为黏度系数（$Pa\cdot s^n$）；n 为流动指数。

1.2.6　番茄红素纳米乳液的制备　分别以 WPI-EGCG 接枝物和 WPI 作乳化剂，以中链甘油三酸酯（MCT）为分散相，构建负载番茄红素的纳米乳液体系。具体做法如下：将 WPI 和 WPI-EGCG 分别溶解于磷酸盐缓冲液（0.01 mol/L, pH7.0）中，配制 0.7% 的 WPI 和 WPI-EGCG 蛋白溶液，加入 0.02%（w/w）叠氮化钠抑制微生物生长。蛋白溶液在 25 ℃ 下 100 r/min 磁力搅拌 4 h，形成水相。MCT 油中分散 0.3%（w/w）的结晶番茄红素标品，以此为油相。在高速分散机的作用下将油相加入水相中，以 10000 r/min 分散 5 min

制得粗乳液，再经高压均质机在 110 MPa 下循环均质 3 次，以形成 O/W 纳米乳液[14]。

1.2.7 纳米乳液粒径及电位的测定 利用纳米粒度及 ζ-电位分析仪测定纳米乳液的粒径及电位。将乳液样品稀释 100 倍后吸取适量于石英比色皿（电位测定用其专用比色皿）中，测试的参数为：水的折射率为 1.33，测试温度为 25 ℃，每个样品平行测定三次，取平均值。

1.2.8 番茄红素保留率的测定 取 800 μL 的二甲基亚砜与 200 μL 的番茄红素纳米乳液混合，加入 2 mL 的混合有机相（正己烷∶二氯甲烷=3∶1，v∶v）进行萃取，重复 3 次后上清液装入离心管中在 4000 r/min 下离心 15 min，取上层清液在 472 nm 波长处测定番茄红素的吸光值。根据标准曲线计算得出番茄红素含量，标准曲线为 A=0.052C−0.008，相关系数 r=0.9969。以正己烷为空白对照。

$$负载率(\%)=\frac{C_1}{C_0}\times 100$$

式中，C_1 为新鲜乳液中番茄红素的浓度，μg/mL；C_0 为均质前加入番茄红素的浓度，μg/mL。

$$保留率(\%)=\frac{C_2}{C_3}\times 100$$

式中，C_2 为在储藏时间 t 时乳液中番茄红素的浓度，μg/mL；C_3 为储藏前乳液中番茄红素的浓度，μg/mL。

1.2.9 番茄红素乳液的微观结构观察 将番茄红素乳液稀释 10 倍，取 15 μL 的稀释液滴到显微镜载玻片的中间位置并盖上盖玻片，静置 10 s 后使用光学显微镜在 10 倍的放大倍数下观察番茄红素乳液的微观状态，并用数字图像分析软件 MS Shot 软件拍照保存图像。

1.3 数据处理

本论文所有实验均重复三次或以上，数据均以平均值±标准差表示。使用 SPSS 20.0 进行数据的计算整理和统计分析，Origin 2019 软件作图，选择 Duncan 多重范围检验进行数据间的显著性分析，P<0.05 为差异显著，图中同种物质的不同字母表示具有显著性差异，不同物质之间用大小写进行区分。

2 结果与分析

2.1 SEM 分析

图 1 为 WPI 和 WPI-EGCG 在放大倍数为 450 倍下的 SEM 观察结果。可以看出，WPI 和 EGCG 的共价相互作用导致其微观结构发生变化。EGCG 分子中含有较多的羟基，在接枝反应中易与蛋白质发生相互作用[15]。WPI 具有典型的球蛋白光滑球状结构，接枝后的 WPI-EGCG 复合物球状结构消失，呈现出致密的片状结构，表明 WPI 和多酚之间的共价相互作用破坏了蛋白质的有序结构，使蛋白质的侧链解开并重新排列成片状结构[16]。这与 Zhao 等[17] 从大豆分离蛋白-EGCG 共价复合物的研究结果相一致。

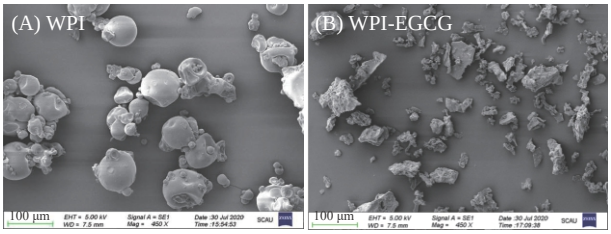


图 1 WPI 和 WPI-EGCG 接枝物的 SEM 图

Fig.1 SEM images of WPI and WPI-EGCG grafts

2.2 界面蛋白吸附量

具有两亲性质的蛋白质作为乳化剂在界面上会自发从体相内向界面吸附[18]，通过降低界面张力来形成吸附膜，从而达到稳定乳液体系的目的。因此，蛋白乳化剂在界面上的吸附动力学、展开和重排、界面蛋白吸附量等界面行为与乳液稳定性有密切联系[19]。一般来说，界面蛋白吸附量越高，蛋白吸附至水油界面的能力越强，乳液就越稳定[20]。不同浓度下 WPI 和 WPI-EGCG 在 MCT 油-水界面上的界面蛋白吸附量结果见图 2。

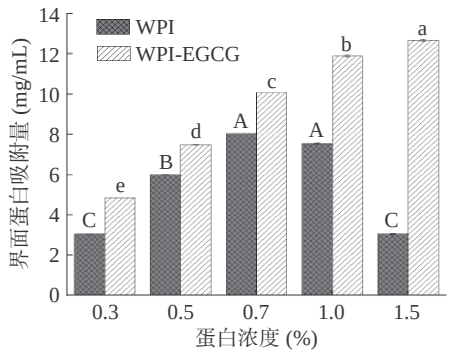


图 2 WPI 和 WPI-EGCG 接枝物在油-水界面的蛋白吸附量

Fig.2 Interface protein adsorption capacity of WPI and WPI-EGCG grafts

注：大小写字母不同分别表示 WPI 和 WPI-EGCG 在不同处理下差异显著（P<0.05）；图 4、图 5 同。

由图 2 可得，随着蛋白浓度的增大，WPI 作乳化剂的界面蛋白吸附量呈现出先增大后减小的趋势，且在浓度为 0.7% 时，界面蛋白吸附量达到最大（8.04 mg/mL）；而接枝后的 WPI-EGCG 复合物稳定的乳液的界面蛋白吸附量随着蛋白浓度的增大而不断增大，且始终大于 WPI（P<0.05）；WPI-EGCG 接枝物在蛋白浓度为 1.5% 时，界面蛋白吸附量可达 12.7 mg/mL。界面蛋白吸附能力与蛋白结构的分子构象柔顺性和表面疏水性相关，据此推测 WPI-EGCG 界面吸附量增大的原因可能是 EGCG 的自由基接枝改性使 WPI 的分子结构发生了变化[21]。WPI 在自由基介导作用下，更多展开的疏水性残基和具有表面活性的多肽移动到油水界面层上并吸附到小油滴上，导致界面吸附量增大[22−23]。在油水界面吸附过程中，WPI-

EGCG 展示出比 WPI 更好的界面吸附能力，可能是因为自由基接枝反应引起 WPI 的柔性发生变化，促使 WPI-EGCG 能更加均匀地分散在乳液中，并且稳定存在[24]。

2.3　流变学特性

界面流变特性是与以蛋白质为乳化剂乳液的长期稳定性相关的重要物理参数。界面剪切流变学可以通过测量黏度的变化来监测聚合物在油/水界面处的吸附动力学[25]。乳液黏度是评价乳液稳定性的一个重要指标，其值越大，代表乳液的小液滴发生沉淀或者上浮的速度越慢，乳液的物理稳定性越高[26]。

对不同浓度 WPI 和 WPI-EGCG 构建的空白乳液进行稳态剪切扫描，分析在 1~100 s^{-1} 范围内剪切速率对表观黏度的影响，结果如图 3 所示。可以看出，不同浓度下的 WPI 和 WPI-EGCG 空白乳液的表观黏度均随剪切速率的增大而先急剧下降，而后趋于平缓，呈负相关关系。当剪切速率在 0.1~20 s^{-1} 范围内变化时，二者均表现出了假塑性流体的剪切稀释特性，后面随着剪切速率进一步的增加，二者的黏度不再变化，并且与剪切方向平行，表现出牛顿型流体特征。WPI 和 WPI-EGCG 乳液的黏度随着蛋白浓度的增大而增大，不同浓度下 WPI-EGCG 空白乳液的黏度值均高于 WPI，原因可能是以蛋白质自由基接枝物为乳化剂制备的乳液液滴之间的相互作用增强，液滴之间的吸引力驱动聚合物的形成，从而在内部空间形成颗粒的网络结构导致黏度增加[27]。但是

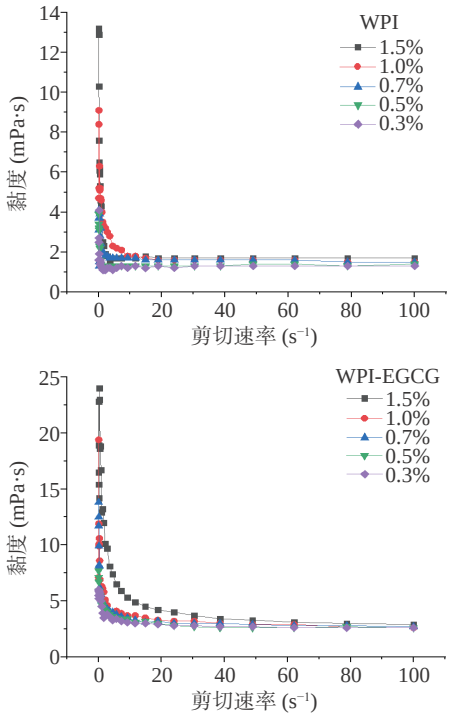


图 3　不同浓度 WPI 和 WPI-EGCG 制备的空白乳液的表观黏度随剪切速率的变化

Fig.3　Changes of apparent viscosity of blank emulsions prepared by different concentrations of WPI and WPI-EGCG varies with shear rates

在高剪切力作用下，WPI 和 WPI-EGCG 乳液的内部结构随着剪切速率的增大而逐渐被破坏，聚合物变形破裂成小液滴，并在剪切力场下重新分布，使其流动阻力变小，因而二者均表现出剪切稀释特性[28]。

采用 Ostwald/de Waele 流动曲线模型对数据进行拟合分析，结果见表 1。静态流变拟合参数测定结果中决定系数 R^2>0.99，表明此模型能较为准确地反映 WPI 和 WPI-EGCG 乳液的表观黏度与剪切速率之间的关系。当 n<1 时，乳液会表现出剪切减薄行为，且 n 值越低，乳液剪切减薄行为越明显，由表 1 可知，WPI 和 WPI-EGCG 乳液均呈现假塑性流体特征(n<1)，说明在高速剪切力下，由弱吸引力形成的网络结构被破坏，这与图 3 表观黏度随剪切速率的增大而减小实验结果相互验证。不同浓度的 WPI 和 WPI-EGCG 的空白乳液流变学测试表明自由基接枝后的 WPI-EGCG 乳液具有更高的黏度，物理稳定性也更强。

表 1　不同浓度 WPI 和 WPI-EGCG 制备的空白乳液的静态流变拟合参数

Table 1　Static rheological fitting parameters of blank emulsions prepared with different concentrations of WPI and WPI-EGCG

样品	浓度(%)	稠度指数K(Pa·s^n)	流动指数n	决定系数R^2
WPI	0.3	0.0016	0.6932	0.9966
	0.5	0.002	0.7259	0.9945
	0.7	0.0026	0.8348	0.9994
	1	0.0039	0.7451	0.9995
	1.5	0.0051	0.6816	0.9931
WPI-EGCG	0.3	0.0066	0.7505	0.9917
	0.5	0.0082	0.7736	0.9926
	0.7	0.0087	0.6639	0.9970
	1	0.0123	0.7915	0.9902
	1.5	0.0152	0.6691	0.9983

2.4　以 WPI 和 WPI-EGCG 为乳化剂构建的番茄红素纳米乳液稳定性研究

在储藏的周期范围内，如果乳液液滴的大小分布、表面电荷，聚集状态或在容器内的空间分布方面没有明显的变化，说明乳液的物理稳定性越高。乳液的化学稳定性是指在一定的储藏时间内负载的功能活性物质含量的变化情况，保留率越高，代表化学稳定性越好。因此，以 WPI-EGCG 为乳化剂，WPI 为对照，通过测定负载番茄红素的纳米乳液在 37 ℃ 下储藏 30 d 内粒径、ζ-电位和番茄红素的保留率，来评价经过 EGCG 自由基接枝改性后的 WPI 乳化性能的变化。

2.4.1　粒径及电位变化　纳米粒度仪测出的由 0.7% WPI 和 0.7% WPI-EGCG 接枝物制备的番茄红素纳米乳液的初始平均粒径分别为 356 和 406 nm，即接枝后的复合物在初始状态下粒径较大，这是共价接枝作用使得复合物的分子量增大的缘故。高压剪切力的作用使得乳液被分散为小液滴并趋于稳态，但由于

复合物作为乳化剂向油水界面处吸附时液滴产生碰撞形成了大液滴，致使其粒径的增大[29]。Gu 等[11] 的研究中也同样发现，未接枝的蛋清蛋白的粒径比经过儿茶素接枝的粒径更小。

从图 4 可以看出，随着储藏时间的增加，两种乳液体系的粒径均呈现不同程度的增加趋势，到了第 30 d 时的平均粒径分别增加至 799.1 和 674.3 nm，由 WPI 稳定的乳液粒径增长速度比 WPI-EGCG 接枝物制备的乳液增长速度快，WPI-EGCG 接枝物还是表现出比 WPI 更好的物理稳定性，这可能是因为共价修饰改善了 WPI 的两亲性，使得接枝产物降低界面张力的效果更好。另外，由前面界面蛋白吸附量测定实验结果可知，WPI-EGCG 接枝物在油水界面上具有更好的界面吸附能力，同样也会增强乳液体系的稳定性。

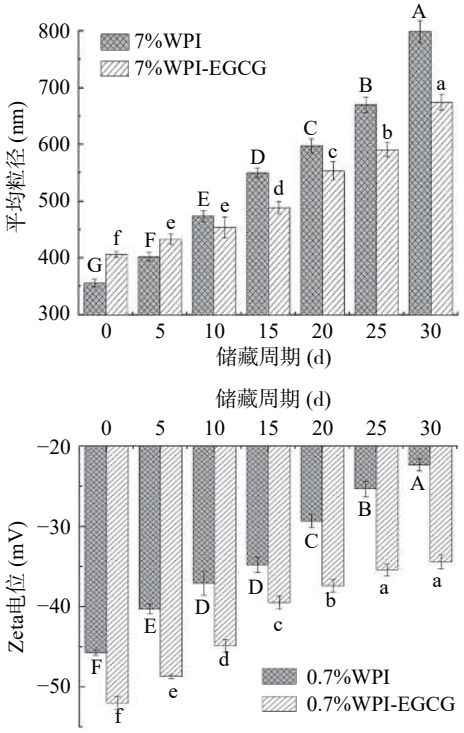


图 4 37 ℃ 下 0.7% 的 WPI 和 WPI-EGCG 构建的番茄红素纳米乳液的粒径和电位变化情况

Fig.4 Changes of particle size and potential of 0.7% WPI and WPI-EGCG nano-emulsions at 37 ℃

ζ-电位是蛋白表面电荷量的表征，可作为乳液体系稳定性的衡量指标[30]。一般来说，电荷绝对值越大，说明乳液体系越稳定，因其所带电荷多，彼此间斥力大，使得油脂分子不易聚集[31]。由图 4 电位测定结果可看出，随着储藏时间的增加，乳液的 ζ-电位也随之下降。其中，由 WPI 制备的番茄红素纳米乳液在 30 d 储藏期内，其电位绝对值降低了 23.4 mV，在第 30 d 时的电位值达到了−22.3 mV，而 WPI-EGCG 制备的番茄红素纳米乳液在 30 d 储藏期内，其电位绝对值仅降低了 17.6 mV，在第 30 d 时的电位值为-34.4 mV，说明以 WPI 为乳化剂构建的乳液体系不稳定，这可能是因为仅由纯蛋白质稳定的乳液液滴的电荷相对较低而导致絮凝，负电荷降低的同时也伴随着静电或空间排斥力的降低，疏水相互作用或范德华力开始占主导地位[32]。随着 WPI-EGCG 浓度的增大，由其制备的乳液 ζ-电位之间的变化量较小，且电位值始终高于 WPI 的番茄红素纳米乳液，说明 EGCG 的自由基接枝改性改善了 WPI 的物理稳定性。

2.4.2 番茄红素保留率 由图 5 发现，两种乳化剂稳定的番茄红素纳米乳液的保留率均随着储藏时间的延长而降低，在储藏 30 d 时，WPI 稳定的番茄红素纳米乳液番茄红素保留率为 35.49%，而 WPI-EGCG 接枝物稳定的番茄红素纳米乳液保留率可达到 66.23%，表现出更好的番茄红素保护效果。这可能是因为 EGCG 具有强表面活性，会阻止番茄红素和单线态氧或其它自由基之间发生氧化还原反应[33]。同时，EGCG 改善了 WPI 的乳化活性，使其更加迅速的吸附至油水界面，对番茄红素提供了有效的保护[34]。Jiang 等[35] 的研究中同样发现在 14 d 的储存期内，用 α-乳白蛋白-儿茶素接枝物稳定的 β-胡萝卜素的保留量明显大于 α-乳白蛋白，这归因于用儿茶素接枝改性后增强了 α-乳白蛋白清除自由基和结合游离金属离子的能力。

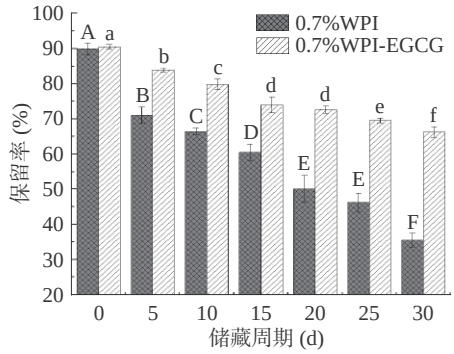


图 5 37 ℃ 下 0.7% 的 WPI 和 WPI-EGCG 构建的番茄红素纳米乳液中番茄红素保留率的变化情况

Fig.5 Lycopene retention rate of 0.7% WPI and WPI-EGCG nanoemulsions at 37 ℃

2.5 番茄红素纳米乳液微观形态

通过光学显微镜对不同贮藏时间下的 WPI 与 WPI-EGCG 为乳化剂构建的番茄红素纳米乳液进行观察，结果如图 6 所示，发现在第 0 d 时，二者的乳液体系未出现液滴聚集现象，乳液液滴颗粒清晰可见；第 15 d 时，WPI 稳定的乳液已开始出现少量聚集的现象，且液滴颗粒附着在聚集物上，这可归因于乳液液滴的重力作用及布朗运动，在高温下加速了液滴之间的碰撞频率形成一个大的聚集体，从而导致粒径的增大[36]；第 30 d 时，WPI 乳液液滴变化最为明显，出现了大规模的聚集结构。相反，由 WPI-EGCG 稳定的番茄红素纳米乳液在储藏 30 d 后仅看到有少量的聚集现象，说明经由自由基接枝改性作用后制备的乳液的乳化稳定性更好，这可能是因为其表面负电荷较

高，因此增强了液滴之间的静电排斥力并改善了 WPI 的抗絮凝和聚结的性能[37]。

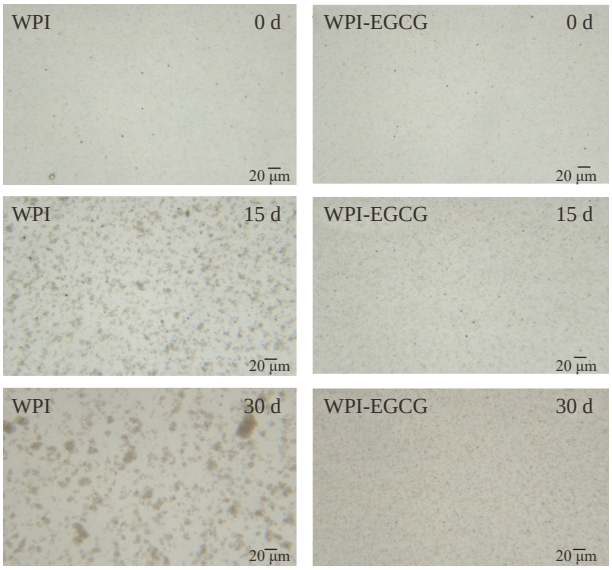


图 6　WPI 和 WPI-EGCG 构建的番茄红素纳米乳液不同贮藏时间的光学显微镜图

Fig.6　Optical microscopy of lycopene nano-emulsion constructed by WPI and WPI-EGCG after standing for different days

3　结论

本文通过制备 WPI-EGCG 复合物研究自由基接枝改性对 WPI 乳化稳定性的影响，结果发现自由基接枝后的 WPI 球状结构消失并转变为片状结构，在油水界面吸附过程中，WPI 在蛋白浓度为 0.7% 时界面蛋白吸附量达到最大值 8.04 mg/mL，而 WPI-EGCG 接枝物在蛋白浓度为 1.5% 时界面蛋白吸附量可达 12.7 mg/mL，WPI-EGCG 展示出比 WPI 更好的界面蛋白吸附能力。流变学行为结果则显示，经 EGCG 接枝改性后的 WPI 乳液黏度更大。在 37 ℃下储藏 30 d 后，与未改性 WPI（番茄红素保留率的 35.49%）相比，以同浓度 WPI-EGCG 为乳化剂构建的番茄红素纳米乳液（保留率为 66.23%）具有更好的储藏稳定性，且在相同储藏温度下粒径和 ζ-电位的增长幅度最小，同时微观结构中也没有观察到明显的聚集现象，表现出相对较好的抗絮凝和聚结性能及乳化稳定性。以上结果表明，WPI-EGCG 自由基改性可以提高蛋白的界面及流变特性，进而有效提高载运体系的稳定性及负载物的保护效果。本研究可为具有长期物理稳定性及高保留率的功能活性物质纳米乳液载运体系的构建提供参考。

参考文献

[1] MENG Y, LIANG Z, ZHANG C, et al. Ultrasonic modification of whey protein isolate: Implications for the structural and functional properties[J]. LWT, 2021: 152.

[2] 侯冬玉, 刘宗尚, 刘维娜, 等. 乳蛋白纳米乳液中蛋白改性技术及体系性质、应用研究进展[J]. 中国油脂, 2021: 1−10. [HOU Dongyu, LIU Zongshang, LIU Weina, et al. Research progress of protein modification technology, system properties and application in milk protein nanoemulsions[J]. China Oils and Fats, 2021: 1−10.]

[3] 刘甜, 赵鹏森, 张玉玲, 等. 提高蛋白质乳化功能性的研究[J]. 中国林副特产, 2020(1): 82−86. [LIU Tian, ZHAO Pengsen, ZHANG Yuling, et al. Study on improving the emulsifying function of protein[J]. Chinese Forest Specialty, 2020(1): 82−86.]

[4] TRAN H Q, SOOTTAWAT B. Duck egg albumen hydrolysate-epigallocatechingallate conjugates: Antioxidant, emulsifying properties and their use in fish oil emulsion[J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2019: 579.

[5] 王炳懿. 多酚-南瓜籽分离蛋白共价修饰反应机理及应用[D]. 天津: 天津科技大学, 2020. [WANG Bingyi. Mechanism and application of covalent modification of polyphenol-pumpkin seed protein isolate[D]. Tianjin: University of Science and Technology, 2020.]

[6] LU Y, LI S, XU H, et al. Effect of covalent interaction with chlorogenic acid on the allergenic capacity of ovalbumin[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(37): 9794−9800.

[7] YI J, ZHANG Y, LIANG R, et al. Beta-carotene chemical stability in nanoemulsions was improved by stabilized with beta-lactoglobulin-catechin conjugates through free radical method[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(1): 297−303.

[8] TONG X, CAO J, TIAN T, et al. Changes in structure, rheological property and antioxidant activity of soy protein isolate fibrils by ultrasound pretreatment and EGCG[J]. Food Hydrocolloids, 2022: 122.

[9] 张宏图, 董伟进, 陈南, 等. 茶多酚对 α-淀粉酶的抑制作用及分子机理[J]. 食品工业科技, 2022, 43(4): 90−96. [ZHANG Hongtu, DONG Weijin, CHEN Nan, et al. Inhibition of α-amylase by tea polyphenols and its molecular mechanism[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(4): 90−96.]

[10] GU L, PENG N, CHANG C, et al. Fabrication of surface-active antioxidant food biopolymers: Conjugation of catechin polymers to egg white proteins[J]. Food Biophysics, 2017, 12(2): 1−13.

[11] GU L, SU Y, ZHANG M, et al. Protection of β-carotene from chemical degradation in emulsion-based delivery systems using antioxidant interfacial complexes: Catechin-egg white protein conjugates[J]. Food Research International, 2017, 96(Jun): 84.

[12] 李梦帆. 醇溶蛋白-多糖复合颗粒的构建及其在 Pickering 乳液的应用研究 [D]. 广州: 广州大学, 2019. [LI Mengfan. Construction of gliadin and polysaccharide complex particles and their application in Pickering emulsion[D]. Guangzhou: Guangzhou University, 2019.]

[13] NATALY D, ELIZABETH T, CAMILA M, et al. The effect of denaturation degree of protein on the microstructure, rheology and physical stability of oil-in-water (O/W) emulsions stabilized by whey protein isolate[J]. Journal of Food Engineering, 2019: 263.

[14] 吴婉仪, 李璐, 李达鸿, 等. 番茄红素纳米乳液体系的稳定性能研究[J]. 中国食品学报, 2019, 19(12): 96−103. [WU Wanyi, LI Lu, LI Dahong, et al. Study on stability of lycopene nanoemulsion system[J]. Chinese Journal of Food Science, 2019, 19(12): 96−103.]

[15] LIANZHOU J, JING W, YANG L, et al. Effects of ultrasound on the structure and physical properties of black bean protein isolates[J]. Food Research International, 2014: 62.

[16] LIU X, SONG Q, LI X, et al. Effects of different dietary polyphenols on conformational changes and functional properties of protein–polyphenol covalent complexes[J]. Food Chemistry, 2021: 361.

[17] ZHAO Y, WANG X, LI D, et al. Effect of anionic polysaccharides on conformational changes and antioxidant properties of protein-polyphenol binary covalently-linked complexes[J]. Process Biochemistry, 2020, 89(3): 89−97.

[18] 纪雪花, 杜启伟, 苏琪皓, 等. 基于油-水界面行为解析蛋白质乳液絮凝机制及其控制方法研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(13): 281−288. [JI Xuehua, DU Qiwei, SU Qihao, et al. Research progress in analytical flocculation mechanism and control methods of protein emulsions based on oil-water interface behavior [J]. Food Science, 2021, 42(13): 281−288.]

[19] 江连洲, 李佳妮, 姜楠, 等. 纳米乳液制备技术及功能应用研究进展[J]. 中国食物与营养, 2017, 23(6): 33−38. [JIANG Lianzhou, LI Jiani, JIANG Nan, et al. Progress in preparation technology and functional application of nanoemulsion[J]. Food and Nutrition in China, 2017, 23(6): 33−38.]

[20] 沈兰. 构象特征影响球蛋白乳化与界面性质的研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2013. [SHEN Lan. Research on the influence of conformation characteristics on globulin emulsification and interface Properties[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2013.]

[21] CHEN W, LIANG G, LI X, et al. Impact of soy proteins, hydrolysates and monoglycerides at the oil/water interface in emulsions on interfacial properties and emulsion stability[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2019, 177: 550−558.

[22] ERIC D. Milk protein interfacial layers and the relationship to emulsion stability and rheology[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2001, 132: 973−978.

[23] 顾璐萍. 儿茶素-蛋清蛋白抗氧化性载体材料的制备、表征及其应用 [D]. 无锡: 江南大学, 2018. [GU Luping. Preparation, characterization and application of catechin-egg white protein antioxidant carrier materials[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2018.]

[24] LAN S, CHUAN-HE T. Emulsifying properties of vicilins: Dependence on the protein type and concentration[J]. Food Hydrocolloids, 2014: 36.

[25] JIN Q, LI X, CAI Z, et al. A comparison of corn fiber gum, hydrophobically modified starch, gum arabic and soybean soluble polysaccharide: Interfacial dynamics, viscoelastic response at oil/water interfaces and emulsion stabilization mechanisms[J]. Food Hydrocolloids, 2017, 70(Sep.): 329−344.

[26] 魏子淏. 乳蛋白-EGCG 和壳聚糖-绿原酸复合物的制备、结构表征及功能评价 [D]. 北京: 中国农业大学, 2015. [WEI Zihao. Preparation, structural characterization and functional evaluation of milk protein-EGCG and chitosan-chlorogenic acid complex[D]. Beijing: China Agricultural University, 2015.]

[27] RAJINDER P. Rheology of simple and multiple emulsions [J]. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2011, 16(1): 41−60.

[28] CHANGHUI S, SUNDARAM G, MARK P R. Effect of xanthan gum on physicochemical properties of whey protein isolate stabilized oil-in-water emulsions[J]. Food Hydrocolloids, 2007, 21(4): 555−564.

[29] ZHOUYANG X, TROY R. Emulsifying properties of succinylatedarabinoxylan-protein gum produced from corn ethanol residuals[J]. Food Hydrocolloids, 2016: 52.

[30] 陈艾霖, 洪鹏志, 宋春勇, 等. 热处理对负载叶黄素的罗非鱼分离蛋白乳液稳定性和体外消化的影响[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(16): 173−180. [CHEN Ailin, HONG Pengzhi, SONG Chunyong, et al. Effects of heat treatment on stability and *in vitro* digestion of tilapia protein isolate emulsion loaded with lutein[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(16): 173−180.]

[31] 齐凤敏, 王来忠, 张佳佳, 等. 不同均质方式对红花籽油 O/W 乳液乳化效果的影响[J]. 食品工业, 2020, 41(12): 8−11. [QI Fengmin, WANG Laizhong, ZHANG Jiajia, et al. Effects of different homogenization methods on the emulsifying effect of O/W emulsion of safflower seed oil[J]. Food Industry, 2020, 41(12): 8−11.]

[32] FUGUO L, CUICUI M, DAVID J M, et al. Development of polyphenol-protein-polysaccharide ternary complexes as emulsifiers for nutraceutical emulsions: Impact on formation, stability, and bioaccessibility of *β*-carotene emulsions[J]. Food Hydrocolloids, 2016: 61.

[33] LET M B, JACOBSEN C, MEYER A S. Ascorbylpalmitate, gamma-tocopherol, and EDTA affect lipid oxidation in fish oil enriched salad dressing differently[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(6): 2369−2375.

[34] ASHWINI K D, KADIRVELU J. Structural characterization and functional evaluation of an exopolysaccharide produced by *Weissella confusa* AJ53, an isolate from fermented uttapam batter supplemented with *Piper betle* L. leaves[J]. Food Science and Biotechnology, 2015, 24(6): 2117−2124.

[35] JIANG Y, YUTING F, YUZHU Z, et al. Characterization of catechin-*α*-lactalbumin conjugates and the improvement in *β*-carotene retention in an oil-in-water nanoemulsion[J]. Food Chemistry, 2016: 205.

[36] 王丽君. 天然蚕丝蛋白乳液的制备与界面稳定机制研究 [D]. 上海: 上海交通大学, 2011. [WANG Lijun. Preparation and interface stability mechanism of natural silk protein emulsion[D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2011.]

[37] TRAN H Q, SOOTTAWAT B, THANASAK S, et al. Protein-polyphenol conjugates: Antioxidant property, functionalities and their applications[J]. Trends in Food Science & Technology, 2019: 91.

吉笑盈, 黄洋, 胡希, 等. 魔芋葡甘聚糖与阿拉伯胶复合水溶胶流变特性及结构表征 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 101−109. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110086
JI Xiaoying, HUANG Yang, HU Xi, et al. Rheological Properties and Structural Characterization of Konjac Glucomannan/Arabic Gum Composite Hydrosol[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 101−109. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110086

·研究与探讨·

魔芋葡甘聚糖与阿拉伯胶复合水溶胶流变特性及结构表征

吉笑盈[1], 黄　洋[1], 胡　希[2], 张　维[2], 张　迪[1], 张佳巍[2], 李东亮[1,*]
（1.四川中烟工业有限责任公司技术中心, 四川成都 610066;
2.四川中烟工业有限责任公司长城雪茄烟厂, 四川什邡 618400）

摘　要: 为了研究魔芋葡甘聚糖（Konjac glucomannan，KGM）与阿拉伯胶（Gum arabic，GA）复合水溶胶的性质，提升其在食品工业中的应用性能，本文以不同比例的 KGM/GA 复合水溶胶为研究载体，采用流变仪、FT-IR、XRD 和 SEM 对其流变特性与结构表征进行研究，探讨添加比例对 KGM/GA 复合水溶胶性能的影响。结果表明，KGM 和 GA 具有良好的相容性，在恰当的复配比例下，二者可以起到协同增效的作用，GA 可以改善 KGM 的流变性和透明度，KGM 可以改善 GA 的粘弹性和稳定性；KGM 和 GA 通过氢键的增加和乙酰基的减少，促进相互的交联，加强复合水溶胶体系的分子间作用力，形成均匀规则的稳定结构。当 KGM:GA 为 5:5（w/w）时，得到综合性能优异的 KGM/GA 复合水溶胶，与 KGM 单一体系相比，透明度提高了 65.82%，结晶度增强了 14.57%，此时样品的黏度适中、稳定性高、粘弹性较好，有望为食品级粘合剂和膳食纤维类饮品等的开发提供一定的理论参考。

关键词: 魔芋葡甘聚糖, 阿拉伯胶, 水溶胶, 粘合剂, 流变特性, 结构表征
中图分类号: TS201.7　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0101−09
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110086
本文网刊:

Rheological Properties and Structural Characterization of Konjac Glucomannan/Arabic Gum Composite Hydrosol

JI Xiaoying[1], HUANG Yang[1], HU Xi[2], ZHANG Wei[2], ZHANG Di[1], ZHANG Jiawei[2], LI Dongliang[1,*]
（1.Technical Center of Sichuan China Tobacco Industry Co., Ltd., Chengdu 610066, China;
2.Sichuan China Tobacco Industry Co., Ltd. Great Wall Cigar Factory, Shifang 618400, China）

Abstract: In order to study the properties of konjac glucomannan (KGM)/gum arabic (GA) composite hydrosol and improve its application performance in food industry, the rheological properties and microstructure of KGM/GA composite hydrosol with different proportions were studied by rheometer, FT-IR, XRD and SEM. The rheological properties and structural characterization of KGM/GA composite hydrosol with different mixing ratio were discussed. The results showed that KGM and GA had a good compatibility, and they could play a synergistic role in a certain mixing ratio. GA could improve the rheology and transparency of KGM, and KGM could improve the viscoelasticity and stability of GA. KGM and GA could promote mutual cross-linking through the increase of hydrogen bonds and the decrease of acetyl groups, strengthen the intermolecular force of the composite hydrosol system and form a uniform and regular structure. When KGM:GA was 5:5(w/w), the KGM/GA composite hydrosol with most excellent comprehensive properties was obtained. Compared with KGM single system, the transparency of the sample increased by 65.82% and the crystallinity was enhanced by 14.57%. And the sample had moderate viscosity, high stability and good viscoelasticity, it was expected to provide some

收稿日期: 2021−11−10
基金项目: 四川中烟工业有限责任公司科技项目（xj202003）。
作者简介: 吉笑盈（1990−）, 女, 博士, 工程师, 研究方向: 烟用材料开发, E-mail: 81494612@qq.com。
*** 通信作者:** 李东亮（1973−）, 男, 博士, 研究员, 研究方向: 烟用材料开发, E-mail: 360188228@qq.com。

theoretical reference for the development of food adhesives and dietary fiber drinks.

Key words: konjac glucomannan; gum arabic; hydrosol; adhesive; rheological properties; structural characterization

多糖因具有良好的生物活性受到人们的广泛关注, 被广泛应用于食品、医药、化工等行业[1]。基于多糖制备而成的水溶胶是一种通过离子交联等相互作用交联而成的生物聚合物, 具有较好的黏性、粘弹性[2], 有望作为粘合剂应用于食品行业。已有研究表明羧甲基纤维素纳水溶胶[3]、壳聚糖/羧甲基纤维素复合水溶胶[4] 可以制成天然粘合剂用于食品粘合。

魔芋葡甘聚糖(Konjac glucomannan, KGM)是一种亲水性天然多糖, 具有良好的吸水性、高黏性、成膜性、凝胶性等特性[5−6]。据报道 KGM 还具有减肥、降血压、降血脂、抗肿瘤等功效[7−9], 被广泛的应用在食品、医学、生物学等方面。KGM 的高黏性使其具有作为粘合剂的潜力, 但 KGM 单一体系存在流动性差、透明性差等问题[10], 极大限制了其在工业中的应用, 如何调控其流动性是目前研究的一大热点。近年来, 有大量研究将 KGM 与其他多糖复配[11−14], 利用分子间的协同相互作用改善其局限性, 以拓展 KGM 在食品工业中的应用。

阿拉伯胶(Gum arabic, GA)是一种植物分泌的多糖, 主要由 D-半乳糖、D-葡萄糖醛酸和 L-鼠李糖组成, 还含有少量蛋白质及钙、镁和钾盐等营养物质[15−16]。在食品工业中, GA 因具有较好的增稠性、生物相容性、稳定性而被广泛用作乳化稳定剂、增稠剂和粘合剂[17−19]。与 KGM 不同的是, GA 在很高的浓度下黏度也很低, 并且具有较高的透明度[20], 可以在一定程度上改善 KGM 单一体系在流动性、透明度等方面存在的局限。有研究表明在 KGM 与 GA 的复配凝胶中, 两者可以通过氢键等相互作用起到协同增效的效果[21], 但目前尚未有关于 KGM/GA 复合水溶胶的研究报道。

本研究将 KGM 与 GA 按照不同比例(10∶0、8∶2、6∶4、5∶5、4∶6、2∶8、0∶10)复配制成复合水溶胶, 通过流变仪对不同比例 KGM/GA 复合水溶胶的稳态和动态流变性能进行研究, 并评估了样品的透明度与黏性; 同时通过测定不同样品的傅里叶红外光谱(Fourier transform infrared spectrometer, FT-IR)、X 射线衍射(X-ray diffraction, XRD)以及扫描电镜(Scanning electron microscope, SEM)等结构表征综合分析不同比例下 KGM/GA 复合水溶胶流变性及稳定性的差别, 以期为进一步研究 KGM/GA 复合水溶胶提供理论依据, 促进其作为粘合剂在食品工业中的应用。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

魔芋精粉(食品级) 魔芋葡甘聚糖含量≥90%, 粒度≤100 目, 分子量为 8.09×10^5 Da, 重庆鑫来农产品开发有限公司; A 型阿拉伯胶(食品级) 河南永尚食品添加剂有限公司。

A1004A 电子分析天平 上海精天电子仪器有限公司; JJ-1 型精密增力电动搅拌器 金坛市城东新瑞仪器厂; HZ-ZK8 型数显恒温水浴锅 巩义市予华仪器有限责任公司; SCIENTZ-10ND 型真空冷冻干燥机 宁波新芝生物科技股份有限公司; HR-1 型 TA 旋转流变仪 美国 TA 公司; Spectrum 100 傅里叶红外光谱仪 美国 Perkin Elmer 公司; X'Pert3 Powder 型 X 射线衍射仪 荷兰帕纳特有限公司; SU3500 扫描电子显微镜 日本 HITACHI 有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 KGM/GA 复配水溶胶的制备 混合胶的总浓度为 1.0%(w/w), KGM 与 GA 的比例分别为 10∶0(w/w, 下同)、8∶2、6∶4、5∶5、4∶6、2∶8、0∶10; 将样品按比例加入电动搅拌器搅拌的 45 ℃ 去离子水中, 在 200 r/min 的转速下搅拌 30 min, 确保搅拌均匀后取下, 自然冷却至室温(约 25 ℃, 下同)后放至 4 ℃ 的冰箱冷藏 24 h 得待测样品, 每次测试前将样品在室温环境放置 30 min 以上, 直至所有样品温度接近室温且保持一致。

1.2.2 透明度测定 使用紫外分光光度计进行透明度的测试, 选择去离子水做参比, 将样品注入 10 mm 石英比色皿中, 在 425 nm 条件下进行测量[22], 记录样品的吸光度值, 吸光度越大代表透明度越小。

1.2.3 流变特性测试 参考 Brito-Oliveira 等[23]、Li 等[21] 的测试方法并稍作修改, 利用 TA-流变仪测试样品的流变特性, 选择直径为 40 mm 的平行板, 测试间隙 1.0 mm, 测试前平衡时间为 120 s。测试样品的稳态剪切和动态流变特性, 其中动态流变特性测试项目包括应变扫描、频率扫描、温度扫描和时间扫描。a. 稳态剪切流变: 选择流动扫描模式, 测试温度为 25 ℃, 剪切速率范围 0.1~100 s^{-1}, 取点模式为对数取点, 取点数 30 个, 测定各样品表观黏度和剪切应力随剪切速率变化的情况; b. 应变扫描: 选择振幅震荡模式, 测试温度为 25 ℃, 角频率为 10 rad/s, 应变范围为 1%~1000%, 根据测定的结果确定样品线性粘弹区; c. 频率扫描: 设定测试温度为 25 ℃, 频率为 0.1~10 Hz, 形变量 γ 为 10% 进行频率扫描, 测定样品的储能模量(G')、损耗模量(G")和损耗正切值($\tan\delta$)随频率的变化; d. 温度扫描: 设定震荡角频率为 10 rad/s, 形变量为 10%, 温度以 5 ℃/min 的升温速率从 10 ℃ 升高到 90 ℃, 测定样品的 G'、G"和 $\tan\delta$ 随温度的变化; e. 时间扫描: 设定测试温度为 25 ℃, 震荡角频率为 10 rad/s, 形变量 γ 为 10%, 剪切时间为 300 s, 每隔 5 s 取点 1 次, 测定样品的 G'、G"和

tanδ 随时间的变化。

1.2.4　傅里叶红外光谱(FT-IR)测定　将样品于−40 ℃预冻 24 h 后进行真空冷冻干燥，干燥后将样品磨成粉末放入干燥皿备用。测量时将适量样品粉末放入圆盘压片测量，扫描光谱范围为 4000~600 cm^{-1}，分辨率为 0.4 cm^{-1}，扫描次数为 64 次[24]，记录样品的红外光谱。

1.2.5　X 射线衍射(XRD)　将样品按照 1.2.4 的方法进行真空冷冻干燥，干燥后研磨成细粉状待测，将适量样品粉末放入载玻片上压片后放入 X 射线衍射仪测试，扫描范围为 5~60°(2θ)，扫描速度为 5°/min[25]，记录样品的图谱，根据测量结果使用 Origin 2019 计算样品的结晶度，其中结晶度(%)=(结晶峰的面积/结晶区和无定形区所有峰的总面积)×100

1.2.6　扫描电子显微镜(SEM)测定　将样品按照 1.2.4 的方法进行真空冷冻干燥，干燥好的样品切成薄片备用。观察前将样品固定在样品铜台上，选择真空度 1.5×10^{-3} Pa，加速电压为 5 kV[26]，将样品送入电镜观察，放大倍数为 100 倍，选择有代表性的区域进行拍摄。

1.3　数据处理

所有实验进行三次平行，结果表示为“平均值±标准差”的形式。采用 SPSS 22.0 进行数据分析与处理，显著性分析以 Duncan’tests 进行方差分析(ANOVA)，P<0.05 被认为存在显著差异；采用 Origin 2019 进行图形绘制。

2　结果与分析

2.1　透明度分析

透明度是溶胶在生产加工过程中的重要指标之一，不同比例的 KGM/GA 复合溶胶吸光度的测试结果如表 1 所示，可以看出随着 GA 比例的增加，样品的吸光度 A 值显著降低(P<0.05)，与单一 KGM 体系相比，当 KGM 与 GA 的比例为 8∶2、6∶4、5∶5、4∶6、2∶8、0∶10 时，透明度分别增强了 39.29%、52.55%、65.82%、75.51%、83.16%、94.39%，单一 GA 体系的透明度是单一 KGM 体系的 18 倍，说明样品的透明度随着 GA 的增加而显著增强(P<0.05)且效果较为明显。不同比例下 KGM/GA 的样品在相同时间相同地点拍摄照片如图 1 所示，可以更直观地看出，随着 GA 比例的增加，烧杯底部的字样越来越清晰，即样品的透明度增强，与吸光度的测试结果一致，表明 GA 的加入可以改善 KGM 的透明性，猜测这是由于 A 型 GA 分子结构的对称性所导致的透明特性，使 KGM/GA 溶胶具有更好的感官特性，有利于透明粘合剂的研制，也有利于 KGM/GA 新型复合食品的研制。

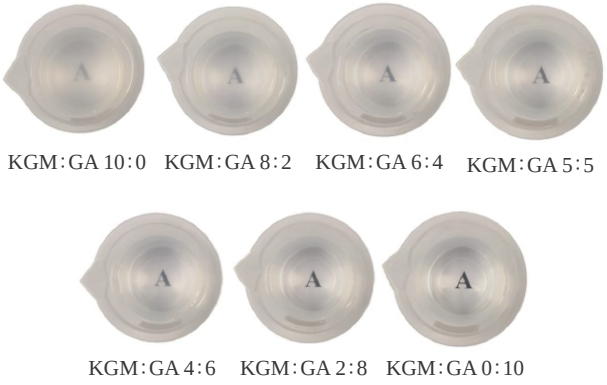


图 1　不同比例下 KGM/GA 复合水溶胶的样品图

Fig.1　Sample diagram of KGM/GA composite hydrosol in different proportions

2.2　流变特性

2.2.1　稳态剪切流变　稳态流变特性可以反映出样品的表观粘度和剪切应力随着剪切速率的改变，稳态流变是粘合剂黏性的直观体现，也可以反应出流体状食品的黏稠性等感官特性。KGM/GA 复合溶胶的稳态剪切流变特性图 2 所示。可以看出，随着剪切速率的增大，样品的表观黏度逐渐减小(图 2A)，剪切应力逐渐增大(图 2B)，呈现剪切稀化的特性，这主要是由于随着剪切速率的增加，体系中高分子链结构的破坏以及分子链在流动方向上的定向取向而导致的[24]。在 KGM/GA 复合溶胶中，随着 GA 添加比例的增加，在相同剪切速率下，复合体系的表观粘度呈现逐渐降低的趋势，说明 GA 的加入可以改变 KGM 体系的流动性。当复合体系中 KGM 与 GA 的比例为 10∶0、8∶2、6∶4、5∶5 时，样品呈现以 KGM 为主的流变特征，在剪切范围内呈现典型的非牛顿流体特性；当比例为 4∶6、2∶8、0∶10 时，样品呈现以 GA 为主的流变特性，剪切速率高于 1 rad/s 时，样品的黏度不再发生明显变化，呈现典型的牛顿流体的特性。同时观察到与单一的 KGM 体系相比，KGM/GA 复合水溶胶的黏度降低趋势较缓，这是因为单一 KGM 溶胶伴随着高剪切速率，分子间作用力减弱，分子链断裂而表现出黏度明显降低[27]，加入 GA 之后，复合体系的结构相对稳定有序，黏度降低趋势较缓，而当复合溶胶中 GA 浓度的比例过高时，随着剪切速率的增大，体系中聚合物分子重排的速率大于剪切变形的速率[28]，样品黏度趋于稳定。

2.2.2　应变扫描　应变扫描是动态流变特性中的第

表 1　不同比例下 KGM/GA 复合水溶胶的吸光度变化

Table 1　Absorbance changes of KGM/GA composite hydrosol at different ratios

KGM∶GA	10∶0	8∶2	6∶4	5∶5	4∶6	2∶8	0∶10
吸光度A	0.196±0.002^{a}	0.119±0.001^{b}	0.093±0.001^{c}	0.067±0.002^{d}	0.048±0.001^{e}	0.033±0.002^{f}	0.011±0.001^{g}

注：数字上标注的字母指在5%水平下的Duncan多重比较检验，不同字母代表不同的显著性(P<0.05)；表2同。

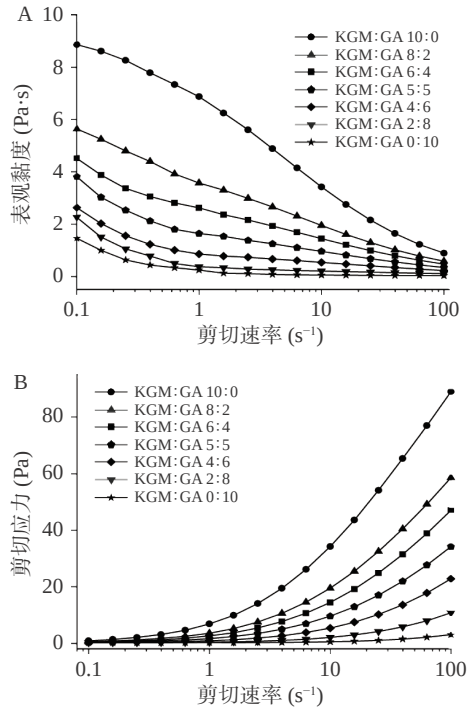


图 2 KGM/GA 复合水溶胶的稳态剪切流变图

Fig.2 Steady state shear rheological diagram of KGM/GA composite hydrosol

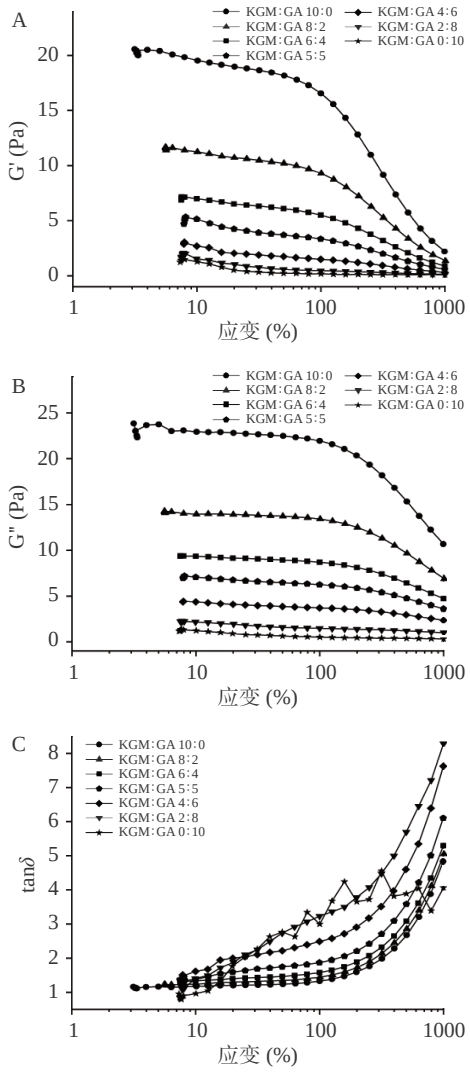


图 3 KGM/GA 复合水溶胶的应变扫描图

Fig.3 Strain scanning diagram of KGM/GA composite hydrosol

一个测试，用以确定样品线性粘弹区，可以间接反映出样品的稳定性。对各比例下的 KGM/GA 复合溶胶进行应变扫描，结果如图 3 所示。G'为储能模量，代表储存在复合体系中的能量，反映体系弹性大小，G"为损耗能量，代表体系由于不可逆粘性形变损耗的能量大小，反映体系粘性大小[29]。从图 3A 和图 3B 可以看出，KGM/GA 复合溶胶在应变为 7%~12% 时出现线性粘弹区域，在 KGM/GA 复合溶胶中随着 GA 添加比例的增加，体系的 G'和 G"均降低，说明体系的弹性和粘性随着 GA 浓度的增加而降低，这可能是因为 KGM 分子链上含有负电基团，可以借助静电及其他分子间作用力与 GA 相互作用，形成彼此缠绕的空间网络结构，从而导致体系粘弹性的改变[30]。

tanδ 为损失角正切值，是 G"与 G'的比值，tanδ 越大，表示体系的内摩擦力越大，tanδ<1 表示样品的弹性占主导地位，而 tanδ>1 表示样品的粘性占主导地位[10]。从图 3C 可以看出与单一 GA 体系相比，添加了 KGM 的样品 tanδ 的值均大于 1，且 tanδ 随着 KGM 添加比例的增加而逐渐减少，表明 KGM/GA 体系表现出粘性流体的行为，随着 KGM 的增加该体系中的内摩擦力逐渐减少，样品越来越趋向于“类固体”[31]。当体系为单一的 GA，应变量小于 12% 时，tanδ 值<1，应变量大于 30% 时，该体系的 tanδ 值不再均匀变化，这可能是因为此时聚合物的交联度较低，结构较为疏松，稳定性较差，因此 tanδ 值随着应变的变化而出现震荡[21]，这也说明 KGM 可以改善 GA 的稳定性，且 KGM 与 GA 的比例在恰当的范围内才会呈现出黏性较好的流体状复合溶胶。

2.2.3 频率扫描 频率扫描可以反映出 KGM/GA 复合溶胶的粘弹性，根据应变扫描的结果，在线性粘弹区域选择形变量为 10% 对不同比例的样品进行频率扫描，结果如图 4 所示。从图 4A、图 4B 可以看出，随着剪切频率的增加，所有样品的 G'和 G"均增高，均表现出一定的频率依赖性，且随着样品中 GA 比例的增加，G'和 G"逐渐降低，与应变扫描测定变化规律一致。

从图 4C 可以看出，对于所有样品而言，tanδ 随着震荡频率的增加逐渐降低，在低频时 tanδ>1，高频时 tanδ<1，可能是因为复合体系的分子链在低频震荡中有长周期的解离，表现为粘性流体，但没有足够的时间在短时间的高频震荡中分离，因而表现出弹性固体的特征[32]。随着复合体系中 GA 比例的增加，样品的 tanδ 逐渐增大，当 KGM 与 GA 的比例为 2∶8、0∶10 时，与其它的样品组相比，样品的 tanδ 值明显升高，这可能是因为此时复合体系的交联度低，分子间相互作用较弱，结构疏松，稳定性较差，从而导致较

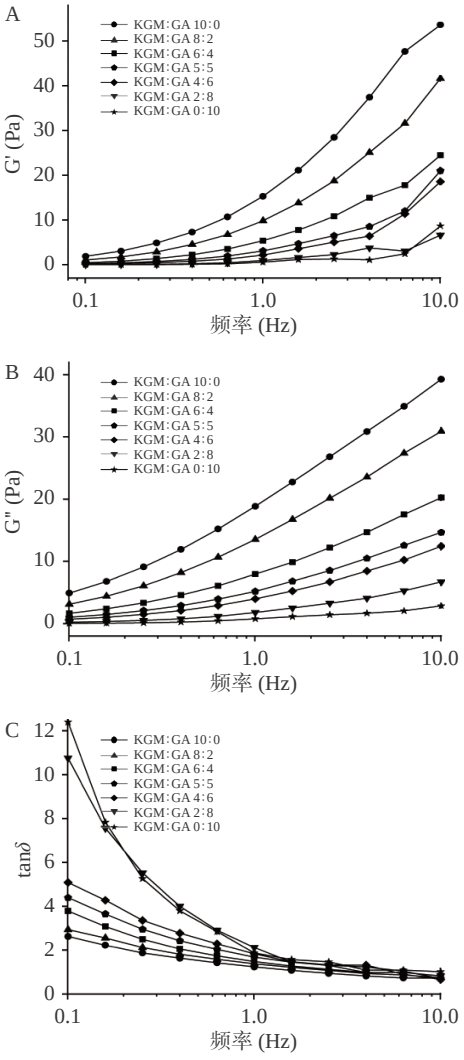


图 4　KGM/GA 复合水溶胶的频率扫描图

Fig.4　Fequency scanning diagram of KGM/GA composite hydrosol

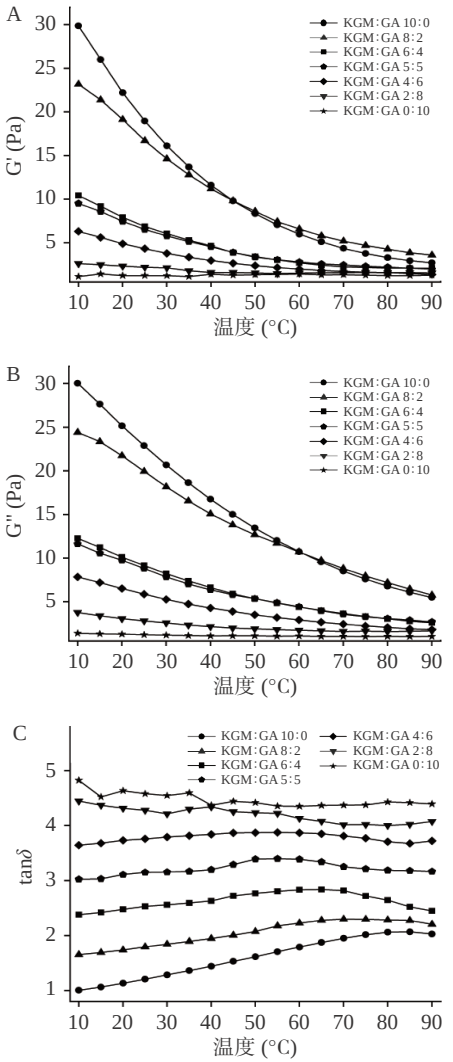


图 5　KGM/GA 复合水溶胶的温度扫描图

Fig.5　Temperature scanning diagram of KGM/GA composite hydrosol

强的损耗正切值，表明 KGM 能改善 GA 单一体系的粘弹性，这可能是因为 KGM 加入体系后会与 GA 产生相互作用，分子间的氢键作用力加强，交联度增加，网络结构增强，进而形成粘弹性较好的溶胶[33]。

2.2.4　温度扫描　温度扫描可以反映出 KGM/GA 复合溶胶的热稳定性，溶胶在加工和储存过程中遇到的温度范围非常广泛，因此研究温度对 KGM/GA 溶胶的影响有重要的意义[34]。利用流变仪对不同比例的样品进行升温扫描，结果如图 5 所示。从图 5A、图 5B 可以看出，随着温度的升高，所有样品的 G'和 G"显著（P<0.05）降低，这是因为温度的升高会导致体系内分子的运动速率增加，分子间的氢键等相互作用减弱，交联结构遭到破坏[35]，当 KGM 与 GA 的比例为 10:0、8:2 时，随着温度的升高，G'和 G"下降程度较大，这是因为此时 KGM 浓度较高，随着温度升高，分子间作用力减弱，分子链断裂，运动阻力也随之降低，导致体系粘性和弹性受温度影响较为显著；当 KGM 与 GA 的比例为 2:8、0:10 时，体系的 G'和 G"受温度变化的显著性（P<0.05）较低，这是因为此时复合体系的交联度低，分子间相互作用较弱，受温度影响较小[21]。

从图 5C 可以看出，当体系中只有 GA，在扫描温度大于 15 ℃ 时，tanδ 小于 1，在 15~55 ℃ 之间随着温度的升高而震荡，这主要是由于此时样品的结构松散，交联度极低造成的，随着温度的升高样品的结构完全崩塌[21]；与单一 GA 体系相比，在扫描温度范围内添加了 KGM 的样品 tanδ 的值均大于 1，说明高温虽然会对 KGM/GA 复合溶胶的弹性和粘性造成影响，但体系仍然维持相对稳定的网络结构，这主要与 KGM 的分支结构以及 KGM 与 GA 之间的相互作用有关[31]，KGM 可以在一定程度上改善 GA 的热稳定性，在恰当的复配比例下可以形成热稳定性较强的 KGM/GA 复合溶胶。

2.2.5　时间扫描　时间扫描可以反映出 KGM/GA 复合溶胶的稳定性，对不同比例的 KGM/GA 复合溶胶进行时间扫描，结果如图 6 所示。可以看出，当体系中 KGM 与 GA 的比例为 10:0、8:2、6:4 时，在测试时间范围内，体系的 G'、G"及 tanδ 均趋于动态

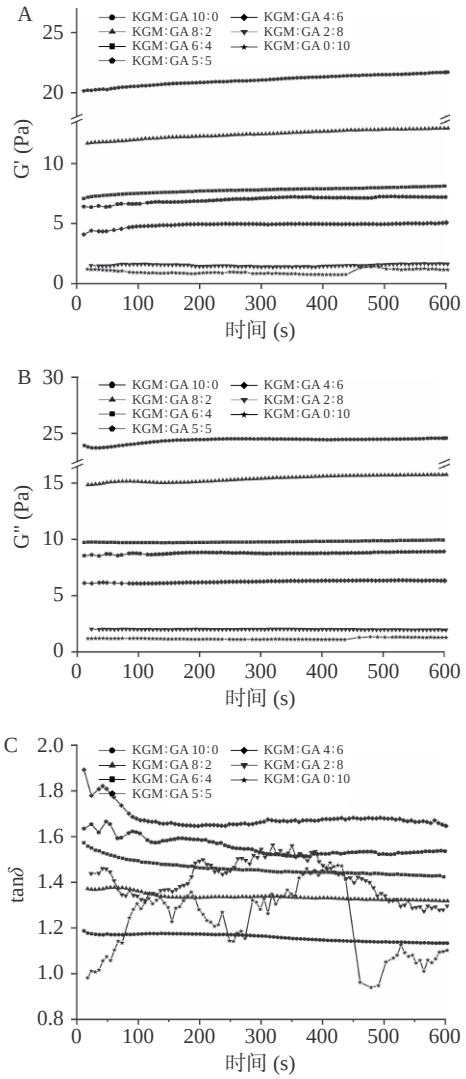


图 6　KGM/GA 复合水溶胶的时间扫描图

Fig.6　Time scanning diagram of KGM/GA composite hydrosol

稳定，说明此时的三个样品组分子间作用力较强，体系的粘弹性不受震荡时间而影响。当比例为 5∶5、4∶6 时，在 120 s 后趋于稳定，在 0~120 s 内，G'、G" 及 tanδ 出现轻微的震荡，这是因为此时体系的网络结构在刚开始震荡时受到破坏，但破坏的程度是有限的，在一定时间后趋于稳定，此时造成的破坏是不明显的；而当比例为 2∶8、0∶10 时，体系的 G'、G"及 tanδ 随着时间出现大幅度的震荡，且当体系内为 GA 单一体系时震荡更为显著，这是因为此时的体系内结构松散，交联度低，体系的结构受破坏严重[21]，说明 KGM 与 GA 可以发生相互作用，改善体系的粘弹性和稳定性。

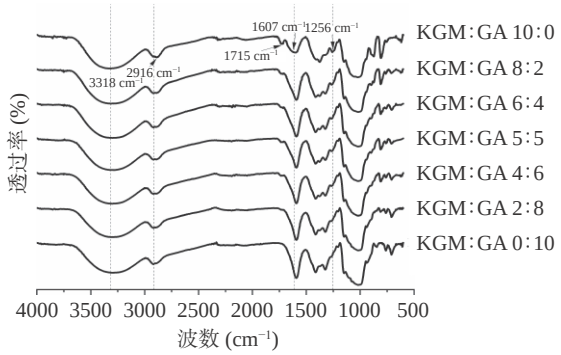


图 7　KGM/GA 复合水溶胶的红外光谱图

Fig.7　Infrared spectrum of KGM/GA composite hydrosol

2.3　傅里叶红外光谱（FT-IR）结果分析

通过 FT-IR 研究了不同比例下的 KGM/GA 复合溶胶的化学结构，结果如图 7 所示。可以看出，所有样品的吸收峰形状大致相同，对于 KGM∶GA=10∶0 的样品来说，3318 cm^{-1} 附近出现的宽峰为分子间-OH 伸缩振动峰，说明样品中存在分子间氢键[36]，2916 cm^{-1} 附近为-CH_2 的 C-H 伸缩振动峰，2000~2500 cm^{-1} 主要为 C≡C 和 C=C 等三键和累积双键的伸缩振动[37]，1715 和 1256 cm^{-1} 附近的特征吸收峰分别为 C=O 和 C-O 之间的拉伸震动，它们代表 KGM 中的乙酰基[24]，1607 cm^{-1} 附近出现的峰为分子内氢键[36]，随着 KGM/GA 复合溶胶体系中添加物质比例的变化，一些吸收峰发生了漂移，具体的变化如表 2 所示。

从表 2 可以看出，两者混合后的 O-H 伸缩振动向低波数移动，表明复合溶胶中形成分子间氢键数更多，且这种变化在 KGM 与 GA 的比例为 5∶5 时最显著，漂移程度为 29 cm^{-1}；随着体系中 KGM 比例的减少，分子内氢键也产生了向低波数移动的现象，表明复合溶胶中形成的分子内氢键数增多；随着 GA 比例的增加，代表 KGM 中乙酰基的 C=O 和 C-O 特征峰向更高的波数移动，这表明复合溶胶中乙酰基的数量减少，这种变化同样在比例为 5∶5 时最为显著；说明 KGM 与 GA 可以发生静电相互作用而产生交联，通过分子间氢键相互连接，加强分子间作用力[38−39]，在 KGM 与 GA 的比例为 5∶5 时，交联程度达到最大，此时的 KGM/GA 复合水溶胶结构紧密，稳定性较高。

2.4　X 射线衍射（XRD）结果分析

X 衍射峰的强度可以反应出被测样品的结晶程度[40]，不同比例 KGM/GA 复合水溶胶的 XRD 衍射

表 2　KGM/GA 复合水溶胶部分吸收峰的变化图

Table 2　Variation diagram of partial absorption peak of KGM/GA composite hydrosol

KGM∶GA	10∶0	8∶2	6∶4	5∶5	4∶6	2∶8	0∶10
O-H伸缩振动	3318.05±0.66^{a}	3308.07±1.06^{c}	3295.56±1.71^{e}	3286.73±0.8^{f}	3302.32±2.84^{d}	3309.23±0.04^{c}	3315.37±0.12^{b}
分子内氢键	1607.74±0.89^{a}	1593.41±0.24^{b}	1591.17±0.02^{c}	1591.05±0.09^{c}	1591.57±0.03^{c}	1591.15±0.08^{c}	1590.93±0.06^{c}
C=O	1715.74±0.32^{c}	1719.29±3.14^{bc}	1722.89±0.08^{b}	1733.97±0.25^{a}	1734.30±0.11^{a}	–	–
C-O	1256.92±0.48^{c}	1260.58±0.48^{b}	1266.66±0.67^{a}	1265.39±0.75^{a}	1266.17±0.18^{a}	–	–

图如图 8 所示。在大约 20°观察到了复合体系的衍射宽峰，可以看出 KGM/GA 复合水溶胶体系为无定形结构，与 KGM 和 GA 的单一体系相比，两者复配后的样品衍射峰向高衍射角方向发生了移动，当 KGM∶GA 比例为 6∶4、5∶5、4∶6 时，衍射角移动较为明显，当比例为 5∶5 时，还观察到了 3 个离子峰，说明 KGM 与 GA 复配后的样品结晶度增强。

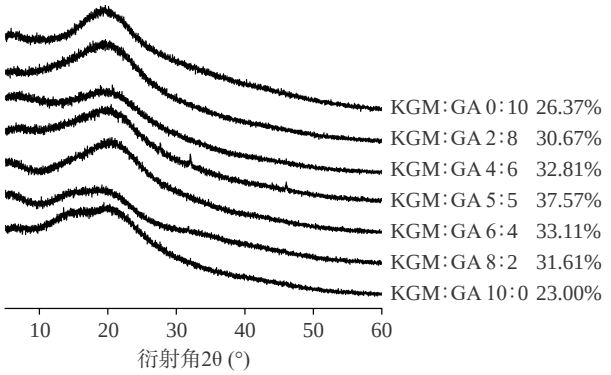


图 8　KGM/GA 复合水溶胶的 X 射线衍射光谱图

Fig.8　X-ray diffraction spectrum of KGM/GA composite hydrosol

根据 XRD 图谱计算各样品的结晶度，结果如图 8 所示，通过结晶度的计算，可以更清楚地看到不同比例下 KGM/GA 复合水溶胶晶体结构的变化。KGM 单一体系的结晶度为 23.00%，GA 单一体系的结晶度为 26.37%，KGM 与 GA 复配后的水溶胶结晶度明显高于任一体系，当 KGM∶GA=5∶5 时，复合体系的结晶度最高，与 KGM 单一体系相比增加了 14.57%，与 GA 单一体系相比增加了 11.20%。说明两者相互作用有利于聚合物的有序结晶，产生这种现象的原因可能是 KGM 与 GA 在合适的比例下能发生相互作用，促进了相邻节段的运动，使复合水溶胶的结构更加有序[41]，这种作用在其比例为 5∶5 时最为显著。

2.5　扫描电子显微镜（SEM）结果分析

图 9 为用扫描电子显微镜对不同比例下 KGM/GA 复合溶胶微观结构的观测图。可以看出当体系为单一的 KGM 时（图 9A），体系呈现致密的、不规则的海绵状网状结构，当体系为单一的 GA 时（图 9H），体系呈现不规则的破碎片状结构；与 XRD 观测结果一致，KGM 和 GA 的单一体系有序性较差，均呈现出不规则的结构。

当 KGM 与 GA 的比例为 8∶2 时（图 9B），体系的孔洞减少，出现了大量的缠结结构，当比例为 2∶8 时（图 9G）观察到规则的、孔径较大的、疏松的蜂窝状结构，说明 KGM 与 GA 之间发生了相互作用，两者作用后结构从无序向有序转变；当比例为 4∶6 时（图 9F），观察到不太规则的致密的层状结构，此时为蜂窝状网络结构向层状网络结构的转变，当比例为 6∶4（图 9C）和 5∶5（图 9D）时，可以观察到体系出现大量如图 9E 般的树枝状网络骨架以及大块的片层结构，且在表面可以清楚观察到天线形状的结构，Feng 等[4] 对壳聚糖/羧甲基纤维素复合水凝胶观察到类似的结构，这种现象可能是由于此时 KGM 与 GA 复配促进氢键相互作用，此时两者之间相互作用比较强，体系分子链之间发生重排，卷曲效应增加所导致[40]，再次证明了 KGM 与 GA 可以通过氢键等相互作用形成交联度更高、稳定性更强的的复合水溶胶。

3　结论

本研究表明，在适当的添加比例下，KGM 与 GA 具有良好的协同增效作用，在 KGM/GA 复合水溶胶体系中，GA 可以在一定程度上调控 KGM 的流动性和透明度，KGM 可以在一定程度上改善 GA 的粘弹性和稳定性，二者可以通过氢键的增加和乙酰基的减少促进交联，形成均匀、规则的三维结构。当 KGM∶GA=5∶5 时，体系的交联度较高，结晶度显著增强，复合体系的结构变得更加有序，此时样品黏度适中，粘弹性适中，稳定性较好，透明度较好，可以作为新型粘合剂应用在食品工业中，有利于多功能食品胶粘剂的开发，也为开发 KGM/GA 功能饮料等新型食品提供了一定的理论指导。本研究秉持着绿色环

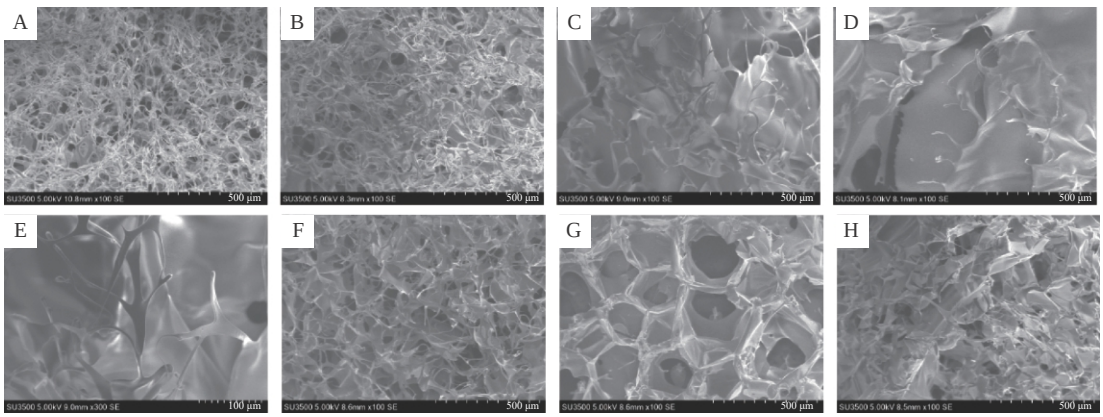


图 9　KGM/GA 复合水溶胶的微观结构观测图

Fig.9　Microstructure observation of KGM/GA composite hydrosol

注：图 A、B、C、D、F、G、H 分别代表 KGM:GA 为 10∶0、8∶2、6∶4、5∶5、4∶6、2∶8、0∶10 时 100×的微观结构观测图；图 E 代表 KGM∶GA 为 6∶4 和 5∶5 时出现的特殊结构 300×的观测图。

保的发展理念，旨在促进天然食品原料在食品工业中的应用，在研制过程中未添加任何化学防腐剂，有关 KGM/GA 复合溶胶的防腐性能、储存条件及使用条件有待进一步优化。

参考文献

[1] BOMBALDI R F, BOMBALDI F C, RODRIGUES C, et al. Mechanically-enhanced polysaccharide-based scaffolds for tissue engineering of soft tissues[J]. Materials Science & Engineering C, Materials for Biological Applications, 2019, 94: 364−375.

[2] QI X L, WEI W, SHEN J L, et al. Salecan polysaccharide-based hydrogels and their applications: A review[J]. Journal of Materials Chemistry B, 2019, 7(16): 2577−2587.

[3] DONG S L, FENG S R, LIU F, et al. Factors influencing the adhesive behavior of carboxymethyl cellulose-based hydrogel for food applications[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 179: 398−406.

[4] FENG S R, LIU F, GUO Y S, et al. Exploring the role of chitosan in affecting the adhesive, rheological and antimicrobial properties of carboxymethyl cellulose composite hydrogels[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 190: 554−563.

[5] TANG H B, WANG L, LI Y P, et al. Effect of acidolysis and oxidation on structure and properties of konjac glucomannan[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 130: 378−387.

[6] ZHU F. Modifications of konjac glucomannan for diverse applications[J]. Food Chemistry, 2018, 256: 419−426.

[7] BEHERA S S, RAY R C. Nutritional and potential health benefits of konjac glucomannan, a promising polysaccharide of elephant foot yam, amorphophallus konjac K. Koch: A review[J]. Food Reviews International, 2016, 33(1): 22−43.

[8] YIN J Y, MA L Y, XIE M Y, et al. Molecular properties and gut health benefits of enzyme-hydrolyzed konjac glucomannans[J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 237: 116117.

[9] LI X H, JAYACHANDRAN M, XU B J. Antidiabetic effect of konjac glucomannan via insulin signaling pathway regulation in high-fat diet and streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Food Research International, 2021, 149: 110664.

[10] QIAO L K, LI Y P, CHI Y Z, et al. Rheological properties, gelling behavior and texture characteristics of polysaccharide from *Enteromorpha prolifera*[J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 136: 1307−1314.

[11] YANG J, KIM J, CHOI Y J, et al. Elastic gels based on flaxseed gum with konjac glucomannan and agar[J]. Food Science and Biotechnology, 2021, 30(10): 1331−1338.

[12] SUN J S, JIANG H X, WU H B, et al. Multifunctional bionanocomposite films based on konjac glucomannan/chitosan with nano-ZnO and mulberry anthocyanin extract for active food packaging[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 107: 105942.

[13] 陈晓涵, 庞杰. 魔芋葡甘聚糖和壳聚糖-富里酸纳米颗粒组成的 pH 值响应性水凝胶的制备 (英文)[J]. 食品科学, 2021, 42(12): 8−16. [CHEN X H, PANG J. Fabrication of pH-responsive hydrogels composed of chitosan-fulvic acid microparticles and konjac glucomannan[J]. Food Science, 2021, 42(12): 8−16.]

[14] YANG X, LI A Q, LI D, et al. Improved physical properties of konjac glucomannan gels by co-incubating composite konjac glucomannan/xanthan systems under alkaline conditions[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 106: 105870.

[15] MA F Y, BELL A E, DAVIS F J, et al. Effects of high hydrostatic pressure and chemical reduction on the emulsification properties of gum arabic[J]. Food Chemistry, 2015, 173: 569−576.

[16] INEGBEDION F, OKOJIE V U, EGHAREVBA F. Physicochemical properties of gum arabic[J]. Organic Polymer Material Research, 2020, 2(2): 13−15.

[17] LEYLAK C, OZDEMIR K S, GURAKAN G C, et al. Optimization of spray drying parameters for *Lactobacillus acidophilus* encapsulation in whey and gum Arabic: Its application in yoghurt[J]. International Dairy Journal, 2021, 112: 104865.

[18] MA C C, JIANG W, CHEN G P, et al. Sonochemical effects on formation and emulsifying properties of zein-gum arabic complexes[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 114(prepublish): 106557.

[19] TAHER M A, MENNATALLAH E A, TADROS L K, et al. The effects of new formulations based on gum Arabic on antioxidant capacity of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit during storage[J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2020(prepublish): 1−14.

[20] YANG Y, ANVARI M, PAN C H, et al. Characterisation of interactions between fish gelatin and gum arabic in aqueous solutions[J]. Food Chemistry,2012: 135, 555-561.

[21] LI Z Y, ZHANG L, MAO C L, et al. Preparation and characterization of konjac glucomannan and gum arabic composite gel [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 183: 2121−2130.

[22] LAU M H, TANG J, PAULSON A T. Effect of polymer ratio and calcium concentration on gelation properties of gellan/gelatin mixed gels[J]. Food Research International, 2001, 34(10): 879−886.

[23] BRITO-OLIVEIRA T C, BISPO M, MORAES I C F, et al. Stability of curcumin encapsulated in solid lipid microparticles incorporated in cold-set emulsion filled gels of soy protein isolate and xanthan gum[J]. Food Research International (Ottawa, Ont.), 2017, 102: 759−767.

[24] JIANG Y Y, REDDY C K, HUANG K H, et al. Hydrocolloidal properties of flaxseed gum/konjac glucomannan compound gel[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 133: 1156−1163.

[25] NING Y J, CUI B, YUAN C, et al. Effects of konjac glucomannan on the rheological, microstructure and digestibility properties of debranched corn starch[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 100: 105342.

[26] YUAN C, XU D Y, CUI B, et al. Gelation of kappa-carrageenan/konjac glucommanan compound gel: Effect of cyclodextrins[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 87: 158−164.

[27] 王晓珊, 袁毅, 龚静妮, 等. 刺云实胶/魔芋葡甘聚糖复合凝胶流变性能[J]. 精细化工, 2018, 35(10): 1707−1712. [WANG X S, YUAN Y, GONG J N, et al. Rheological properties of tara

gum/konjac glucomannan blend hydrogels[J]. Fine Chemicals, 2018, 35(10): 1707−1712.]

[28] EIROBOYI I, IKIENSIKIMAMA S S, ORIJI B A, et al. Synergistic study between gum arabic and carboxymethyl cellulose: Application in polymer flooding[J]. Current Journal of Applied Science and Technology, 2019: 1−7.

[29] WANG Y C, CHANG Y G, XUE Y, et al. Rheology and microstructure of heat-induced fluid gels from Antarctic krill (*Euphausia superba*) protein: Effect of pH[J]. Food Hydrocolloids, 2016, 52: 510−519.

[30] 吴伟都, 姜建, 徐玲玲, 等. 魔芋胶溶液浓度对其流变学特性的影响研究 [J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 18(12): 7403-7409. [WU W D, JIANG J, XU L L, et al. Effects of concentrations of konjac glucomannan solutions on their rheological properties[J]. Food Safety and Quality Detection Technology, 2021, 18(12): 7403-7409.]

[31] ZHOU Y, JIANG R S, PERKINS W S, et al. Morphology evolution and gelation mechanism of alkali induced konjac glucomannan hydrogel[J]. Food Chemistry, 2018, 269: 80−88.

[32] HUANG Q, JIN W P, YE S X, et al. Comparative studies of konjac flours extracted from *Amorphophallus guripingensis* and *Amorphophallus rivirei*: Based on chemical analysis and rheology [J]. Food Hydrocolloids, 2016, 57: 209−216.

[33] WANG S S, ZHAN Y F, WU X F, et al. Dissolution and rheological behavior of deacetylated konjac glucomannan in urea aqueous solution[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 101: 499−504.

[34] RAZMKHAH S, RAZAVI S M A, MOHAMMADIFAR M A. Purification of cress seed (*Lepidium sativum*) gum: A comprehensive rheological study[J]. Food Hydrocolloids, 2016, 61: 358−368.

[35] WU D, YU S M, LIANG H S, et al. The influence of deacetylation degree of konjac glucomannan on rheological and gel properties of konjac glucomannan/*κ*-carrageenan mixed system[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 101: 105523.

[36] SHAH A, GANI A, AHMAD M, et al. *β*-Glucan as an encapsulating agent: Effect on probiotic survival in simulated gastrointestinal tract[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 82: 217−222.

[37] FAN S Y, FANG F, LEI A L, et al. Effects of salts on structural, physicochemical and rheological properties of low-methoxyl pectin/sodium caseinate complex[J]. Foods (Basel, Switzerland), 2021, 10(9): 2009.

[38] 邹小波, ALAA K M K K, 石吉勇, 等. 应用红外光谱结合化学计量学方法检测阿拉伯胶产地和蛋白质含量 (英文)[J]. 食品科学, 2017, 38(20): 229−234. [ZOU X B, ALAA K M K K, SHI J Y, et al. Determination of geographical origin and protein content of acacia gums using infrared spectroscopy and chemometrics[J]. Food Science, 2017, 38(20): 229−234.]

[39] KURT A, KAHYAOGLU T. Gelation and structural characteristics of deacetylated salep glucomannan[J]. Food Hydrocolloids, 2017, 69: 255−263.

[40] LIU K, LI Q M, ZHA X Q, et al. Effects of calcium or sodium ions on the properties of whey protein isolate-lotus root amylopectin composite gel[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 87: 629−636.

[41] LIU Y, LI B F, ZHANG K, et al. Novel hard capsule prepared by tilapia (*Oreochromis niloticus*) scale gelatin and konjac glucomannan: Characterization, and *in vitro* dissolution[J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 206: 254−261.

沈素晴, 徐亚元, 李大婧, 等. 青香蕉微波干燥特性及动力学模型研究 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 110−117. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110276

SHEN Suqing, XU Yayuan, LI Dajing, et al. Research on Microwave Drying Characteristics and Kinetic Model of Green Bananas[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 110−117. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110276

· 研究与探讨 ·

青香蕉微波干燥特性及动力学模型研究

沈素晴[1,2], 徐亚元[1,*], 李大婧[2], 张钟元[2], 肖亚冬[2], 聂梅梅[2], 刘春菊[2], 郑铁松[1]

（1.南京师范大学食品与制药工程学院, 江苏南京 210097;
2.江苏省农业科学院农产品加工研究所, 江苏南京 210014）

摘　要: 为探究青香蕉微波干燥过程中的水分扩散特性，通过开展青香蕉微波干燥试验，考察了青香蕉在不同微波功率密度（3、5、7、9 W/g）下干燥特性，建立了青香蕉微波干燥试验模型；利用低场核磁共振技术（low-field nuclear magnetic resonance，LF-NMR）考察了干燥过程中青香蕉内部水分分布状态与变化规律。结果表明，青香蕉微波干燥过程中干燥速率呈现先上升后下降的趋势；有效扩散系数在 1.082×10^{-8}~7.708×10^{-8} m^2/s 之间，并随着微波功率密的升高而增大。核磁共振试验表明干燥过程中，自由水最先被去除，不易流动水整体呈现先上升后下降的趋势，结合水整体呈上升趋势；随着微波干燥的时间延长，三种状态水分峰面积减小且总峰向弛豫时间减少的方向移动，干燥结束时，青香蕉中的自由水基本被去除，内部水分主要以结合水和不流动水状态存在。通过对青香蕉干燥动力学模型拟合发现，Page 模型拟合度较高（R^2>0.9），可为有效描述青香蕉微波干燥过程中水分随时间的变化规律提供依据。

关键词: 青香蕉, 微波干燥, 有效水分扩散系数, 低场核磁, 干燥动力学模型
中图分类号: TS255　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0110−08
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110276
本文网刊:

Research on Microwave Drying Characteristics and Kinetic Model of Green Bananas

SHEN Suqing[1,2], XU Yayuan[1,*], LI Dajing[2], ZHANG Zhongyuan[2], XIAO Yadong[2], NIE Meimei[2], LIU Chunju[2], ZHENG Tiesong[1]

（1.School of Food and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China;
2.Institute of Agricultural Products Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China）

Abstract: In order to explore the water diffusion characteristics of green bananas during the microwave drying process, a microwave drying test was conducted to investigate the green bananas drying characteristics under different microwave power densities (3, 5, 7 and 9 W/g), and the microwave drying test model of green bananas was established. Low-field nuclear magnetic resonance (LF-NMR) was used to investigate the internal moisture distribution and change law of green bananas during the drying process. Results showed that drying rate of green bananas in the microwave drying process increased first and then decreased, the effective diffusion coefficient was between 1.082×10^{-8} and 7.708×10^{-8} m^2/s, and also increased with the increasing of microwave power density. The nuclear magnetic resonance experiments showed that, during the drying process, the free water was removed first, the non-flowing water showed an overall upward trend and then a downward trend, while the combined water showed an overall upward trend. With the extension of microwave drying time, the water peak area of the three states decreased and the total peak moved in the direction of the decrease of relaxation time, at the end of drying, the free water in green banana was basically removed, and the internal water mainly existed in the state of combined water and non flowing water. By fitting green banana drying kinetics model, it was found that the Page model fitted best (R^2>0.9), which could provide a basis for effectively describing the variation law of water with time

收稿日期: 2021−11−25
基金项目: 江苏省青年基金项目（BK20180307）。
作者简介: 沈素晴（1995−）, 女, 硕士, 研究方向: 果蔬加工与营养, E-mail: 1090954417@qq.com。
*** 通信作者:** 徐亚元（1988−）, 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 果蔬加工与营养, E-mail: xuyayuanxyy2008@126.com。

during the microwave drying process of green bananas.

Key words: green bananas; microwave drying; effective moisture diffusion coefficient; low-field nuclear magnetic resonance; drying kinetic models

青香蕉是广泛分布于热带和亚热带地区的特色水果，含有丰富的碳水化合物、蛋白质、矿物质以及维生素等营养物质，我国的青香蕉主要种植在海南、广东和福建等地带，产量高，营养丰富，是百姓水果盘中的“常客”[1]。同时，青香蕉不仅富含对结肠健康有促进作用的抗性淀粉，也是含水分较高的常见果蔬，具有重要的药用和保健功能[2]。目前，我国市场上的青香蕉多以鲜销为主，在贮藏和运输过程中易发生霉烂损坏等现象，因此发展青香蕉片干燥技术对缓解市场需求具有重要意义[3]。

传统的热风干燥制备的青香蕉片，由于温度较高，抗性淀粉损失十分严重，营养功能下降。微波干燥时间短、热效率高、能耗低，能较好地保留产品的营养和风味，显著优于传统热风干燥，相较于冷冻干燥节能效果明显[4]。微波干燥是对物料进行微波加热而达到水分蒸发的一种干燥方法，它具有干燥速率快、干燥时间短等优越性，目前在紫菜[5]、山楂[6]、莲子[7] 和马铃薯[8] 等方面都有研究报道。同时，微波干燥不仅对热量有传递作用，而且对样品内部水分迁移有一定影响，微波干燥效率高、能耗低，在果蔬干燥行业具有显著优势。陈燕珠[9] 研究了香蕉片微波干燥水分特性，结果表明，在干燥过程中，微波功率密度越大，香蕉片水分含量就越低，干燥速率越快的同时干燥时间也越短。Omolola 等[10] 研究了不同微波功率密度下香蕉片的干燥动力学特性，结果表明，干燥主要发生在降速阶段，且 Wang 和 Singh 方程模型准确性最佳。目前，对于深入探究青香蕉微波干燥过程中内部水分组分的变化及相互转化的研究鲜有报道。

因此，本文以青香蕉为原料进行微波干燥青香蕉片的干燥特性研究，利用低场核磁共振技术（low-field nuclear magnetic resonance, LF-NMR）检测样品中水分分布情况，结合干燥过程中青香蕉的干基含水率、干燥速率和有效水分扩散系数（effective moisture diffusivity coefficient, D_{eff}）的变化规律，确定干燥过程中的数学模型并分析青香蕉的内部水分扩散特性变化，为应用微波干燥技术开发青香蕉片干制品提供科学的理论指导。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

新鲜青香蕉　广西省北流市绿元农业科技有限公司，挑选个体大小均匀、新鲜无损伤、成熟度一致的青香蕉备用，购回后放在−20 ℃ 的冰箱内保存，一周内测完。青香蕉初始湿基含水率按 GB 5009.3-2016[11] 进行测定，初始湿基含水量为 68.39%。

XWJD6SW-2 型微波真空杀菌干燥设备　南京孝马机电设备厂；HQ-12 型光纤测温仪　西安和其光电科技有限公司；DHG-907385-III 电热恒温鼓风干燥箱　上海新苗医疗器械制造有限公司；NIMI20-015V-1-I 型核磁共振成像分析仪　上海纽迈电子科技有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　青香蕉的微波干燥　将青香蕉解冻至室温，切片 4 mm，将一定量的青香蕉片均匀地铺在微波干燥机的材料箱里干燥。在微波干燥过程中，通过光纤测温在线实时记录青香蕉内部温度变化，光纤测温仪配备 6 个光纤测温探头，可在线监测样品盘中 6 个不同位置的香蕉片温度，最后取平均值[3]。根据试验要求调节设备参数，每组微波功率密度（3、5、7、9 W/g）的时间间隔均为 0.5~2 min，每次干燥结束定时记录样品质量并换算为干基含水量[9]，干燥至干基含水量（≤0.2 g/g）停止试验。

1.2.2　干燥参数的计算方法　青香蕉干基含水率与干燥速率的计算公式如下[12]：

$$M_t = \frac{m_t - m_g}{m_g} \qquad 式（1）$$

式中：M_t 为试样干燥至 t 时刻的干基含水率，g/g；m_t 为试样干燥至 t 时刻的质量，g；m_g 为试样干燥至恒重时的质量，g。

$$DR = \frac{M_t - M_{t+\Delta t}}{\Delta t} \qquad 式（2）$$

式中：DR 为试样的干燥速率，g/(g·min)；M_t 为 t 时刻试样的干基含水率，g/g；Δt 为干燥时间，min。

1.2.3　有效水分扩散系数的测定　水分比按照公式（3）计算[13]：

$$MR = \frac{M_t}{M_0} \qquad 式（3）$$

式中：MR 为水分比；M_t 为干燥至 t 时刻的干基含水率，g/g；M_0 为试样初始干基含水率，g/g。

水分有效扩散系数用 Fick 扩散方程来表示，适合于圆柱形等形状规则的物料[14]，按照以下公式计算：

$$D_{eff} = \frac{4L^2\left[\left(\ln\left(\frac{8}{\pi^2}\right) - \ln(MR)\right]\right.}{\pi^2 t} \qquad 式（4）$$

式中：D_{eff} 为水分有效扩散系数，m^2/s；L 为香蕉片厚度，m；t 为干燥时间，s。

从上式的函数关系中可以确定有效扩散系数的对数与时间呈现较高的线性关系，可以通过函数的斜率来求得，其斜率的表达式为[15]：

$$k = -\frac{\pi^2 D_{eff}}{4L^2} \quad 式（5）$$

1.2.4 LF-NMR 分析 将干燥完的青香蕉切片放入样品管中，置于永久磁场中心位置的射频线圈的中央，利用多脉冲回波序列测量样品的横向弛豫时间 T_2。T_2 试验主要参数为：主频 SF=21 MHz，偏移频率 O_1=289966.77 kHz，90°脉冲时间 P_1=7.52 μs，180°脉冲时间 P_2=15.04 μs，累加采样次数 N_S=8，回波个数 NECH=15000。每个样品重复 3 次，将 T_2 进行反演，得到反演图[16]。峰面积表示不同水分状态弛豫时间内对应的信号幅值和，即该状态水分的相对含量，峰面积占总信号幅值的比例为信号峰面积比[17]。

1.2.5 干燥模型的选择 建立微波干燥模型对研究其变化规律以及预测干燥工艺参数具有重大意义[15]。通过 SPSS 软件对实验结果进行数学模型拟合，根据国内外学者对不同物料干燥特性模型的研究，得出几种常用的经验、半经验干燥数学模型[18−20]，从中选出适合青香蕉微波干燥的最佳干燥动力学模型，如下表 1 所示。

表 1 常见干燥数学模型选择

Table 1 Selection of common drying mathematical models

模型	公式
Newton	MR=exp(−kt)
Page	MR=exp(−kt^n)
Henderson and Pebis	MR=aexp(−kt)

注：K为干燥常数；a、n为待定常数；t为干燥时间，min。

模型检验指标可以用决定系数(R^2)、卡方(χ^2)和均方根误差(root mean square error, RMSE)来衡量数学模型与试验数据的匹配程度。其中，R^2 越大、RMSE 和 χ^2 越小，说明模型的匹配结果越好，并选取拟合度较高的模型作为青香蕉微波干燥过程中的数学表征[21]。

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^{N}(MR_{pre,i} - MR_{exp,i})^2}{\sum_{i=1}^{N}(\overline{MR_{pre,i}} - MR_{exp,i})^2} \quad 式（6）$$

$$RMSE = \left[\frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N}(MR_{pre,i} - MR_{exp,i})\right]^{\frac{1}{2}} \quad 式（7）$$

$$\chi^2 = \frac{\sum_{i=1}^{N}(MR_{exp,i} - MR_{pre,i})^2}{N - n} \quad 式（8）$$

式中：$MR_{exp,i}$ 为干燥试验实测的第 i 个水分比；$MR_{pre,i}$ 为利用模型预测的第 i 个水分比；N 为试验测得的数据个数；n 为因素水平个数。

1.3 数据处理

本试验数据采用 Excel 2010 进行处理，采用 Origin 8.5 对试验结果图进行绘制和模型拟合；使用 SPSS 16.0 对试验数据进行显著性分析(P<0.05)，所有的试验平行三次。

2 结果与分析

2.1 微波功率密度对青香蕉干燥特性的影响

不同微波功率密度条件下青香蕉微波干燥曲线、干燥速率及温度变化如图 1 所示。图 1a 表明青香蕉的干基含水率随着微波干燥的进行逐渐降低。青香蕉干燥至干基含水率为 0.15 g/g 左右时，3、5、7、9 W/g 所用微波干燥时间分别为 14、12、10、8 min。由此可得，微波功率密度越高，微波干燥时间越短，同时方差分析表明微波功率密度对干燥时间影响显著(P<0.05)。由图 1b 可知，随着微波功率密度增加，青香蕉干燥速率在微波干燥过程中先增加后减小，微波功率密度越高，最大干燥速率也越大。因此，在保证青香蕉干燥品质的条件下，提高微波功率密度有利于提高干燥速率，缩短干燥时间[22]。图 1c 是青香蕉在不同功率密度下干燥的温度变化，在初始阶段，样品温度均迅速升高。200 s 之后，微波功率密度在 3、5 W/g

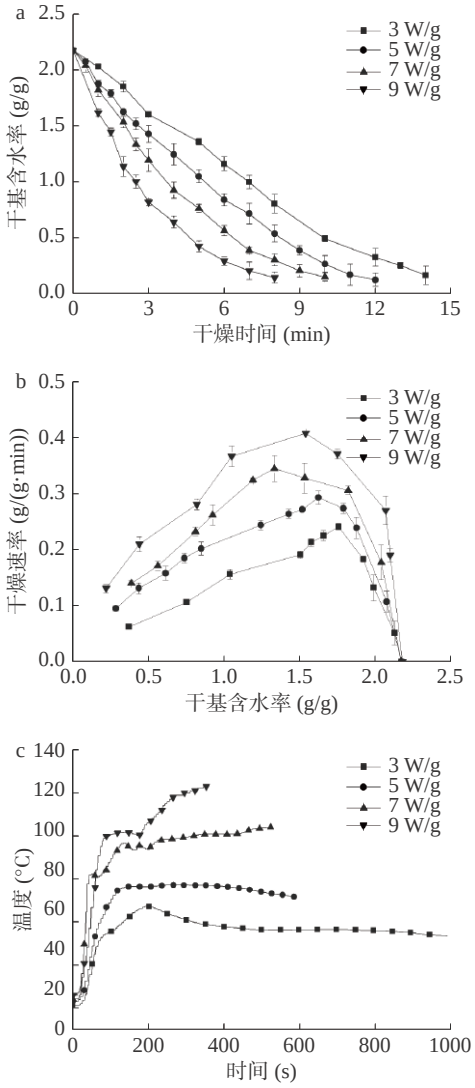


图 1 青香蕉微波干燥特性

Fig.1 Microwave drying characteristics of green banana

注：(a)：干燥曲线；(b)：干燥速率；(c)：温度变化。

时样品温度趋于平缓，7 W/g 时样品温度缓慢上升，不同微波功率密度下的青香蕉水分含量减少主要发生在此阶段；而 9 W/g时温度迅速上升，上升至干燥终点时，温度升至 128 ℃，此时青香蕉切片出现裂纹、焦黄等现象。原因是微波功率密度高，短时间内加热温度会急剧升高，导致所谓的“微波-热失控”现象，这也是大部分果蔬物料中心出现烧焦现象的主要原因[23]。因此，在青香蕉微波干燥过程中，需要控制好微波功率密度与干燥时间。为了后续工业化生产采用，可通过中强度微波功率密度和低功率密度间歇作用，来避免样品焦糊和能源浪费。

2.2　青香蕉微波干燥过程中的 D_{eff}

D_{eff} 是反映样品在干燥过程中内部水分传输性质的重要参数，D_{eff} 与样品的水分含量、水分状态及孔隙等因素相关[24]。青香蕉在微波干燥过程中存在降速阶段，通过式(4)和式(5)计算得出在不同微波功率密度下的青香蕉微波干燥的有效扩散系数，其结果列于表 2。从表 2 中可以看出有效扩散系数的范围为 1.082×10^{-8}~7.708×10^{-8} m^2/s，并随着微波功率密度的增大而不断增大。其中，微波功率密度为 9 W/g 的水分有效扩散系数比 3 W/g 时增大了约 6.1 倍，原因是微波功率密度越大，样品中形成孔隙结构的速度越快，样品中孔隙的增加有利于水分子热运动的加速，即 D_{eff} 越大[25]。Hu 等[26] 在不同的微波功率密度条件下研究微波干燥毛豆，由结果可知有效扩散系数随微波功率密度的增加而增大，与本实验结果一致。

2.3　LF-NMR 分析

2.3.1　青香蕉微波干燥过程中的 T_2 分布与变化　采用 LF-NMR 研究青香蕉在微波干燥过程中的水分状态，迭代次数的参数设置为 100000 次，每个 T_2 反演曲线上均有 3 个波峰(见图 2)。反演图谱中的峰位置越靠右(T_2 越长)，该部分水分受约束的引力越小、自由度越高，与水的结合程度越弱，水越容易被除去；相反，峰位置越靠左(T_2 越短)则水分越难被除去。根据青香蕉弛豫时间 T_2 的差异，将水分的相态特征划分为 3 个存在状态：结合水 T_{21}(0.01~10 ms)、不易流动水 T_{22}(10~100 ms)和自由水 T_{23}(>100 ms)[27]。

随着微波干燥时间的延长，样品的 NMR 信号反演图谱峰值整体左移，信号幅值减小，弛豫时间缩短，水分流动性减少，这与图 1 的微波干燥特性研究结果一致。随着微波功率密度的增加，总峰面积减小，在 5 W/g 第 6 min、7 W/g 第 4 min、9 W/g 第 2 min 时均开始出现峰融合现象，且微波功率密度越高，峰融合出现的时间越早，说明微波干燥后期青香蕉淀粉内部结构发生了大的变化，剩余水分仅以结合水和不易流动水形式存在，且在微波功率密度的影响下，不同状态水分之间的动态变化结果也不一样。由此可见，微波功率密度和干燥时间对青香蕉水分的迁移均有影响[28]。

2.3.2　微波干燥过程中青香蕉水分状态相对比例的变化　青香蕉微波干燥过程中各组分水分状态相对比例的变化如图 3 所示。结合水是指与细胞壁中多糖(如果胶)紧密结合的那部分水[29]。水分结合度大，自由度小，呈现相对稳定的状态，一般不易通过干燥去除[25]。在微波干燥过程中，结合水峰面积的比值随干燥时间的延长而增大，原因是干燥过程中自由水和不易流动水首先转变为结合水，使得结合水的含量显著升高。当微波功率密度为 9 W/g，结合水峰面积比值在第 6 min 时突然降低，可能是因为较高微波功率密度的微波辐射长时间穿透青香蕉，使得青香蕉内的酶和营养成分等分解，最终使部分结合水迁移为不易结合水而被脱除[25]。

不易流动水是指附着在物料组织中胶体表面的水[30]。在微波干燥中，首先去除自由水，只有在去除大部分自由水后，才能去除不易流动水，不易流动水的迁移整体呈现先增加后减小的趋势。干燥前期，四种不同微波功率密度下的不易流动水都出现升高的趋势，但引起升高的原因不同；微波功率密度为 3、5、7 W/g 时的不易流动水上升是由自由水转变为不易流动水引起的；而微波功率密度在 9 W/g 时，大量的自由水被迅速去除，不易流动水的量相对增大，因此不易流动水呈现升高的趋势。在干燥后期，不易流动水呈现出降低的趋势，因为大量的微波能被吸收，样品的内部组织结构被破坏，不易流动水的结合力降低，所以转变为自由水并被迅速清除；当达到微波干燥终点时，微波功率密度为 3、5、7 和 9 W/g 时的不易流动水分别减少至 13.88%、14.88%、15.89% 和 17.03%。

自由水是指青香蕉体内和细胞内相对自由的水[31]。一般来说，在干燥过程中首先除去自由水，自由水峰面积占总峰面积的比例呈下降趋势。微波功率密度对青香蕉的干燥结果有明显影响，自由水在微波功率密度为 3、5、7、9 W/g 时被去除所需要的时间分别为 14、12、10、8 min，说明微波功率密度越高，自由水去除速率越快，去除自由水的时间也越短。但并非

表 2　不同微波功率密度条件下青香蕉的 D_{eff}

Table 2　Plots of water effective diffusion coefficients versus drying time at different microwave power densities

微波功率密度(W/g)	线性回归方程	决定系数R^2	D_{eff}(10^{-8} m^2/s)
3	lnMR=−0.0635t+0.1201	0.922	1.082
5	lnMR=−0.1638t+0.0375	0.994	3.077
7	lnMR=−0.2393t+0.0820	0.984	4.057
9	lnMR=−0.4742t+0.2389	0.949	7.708

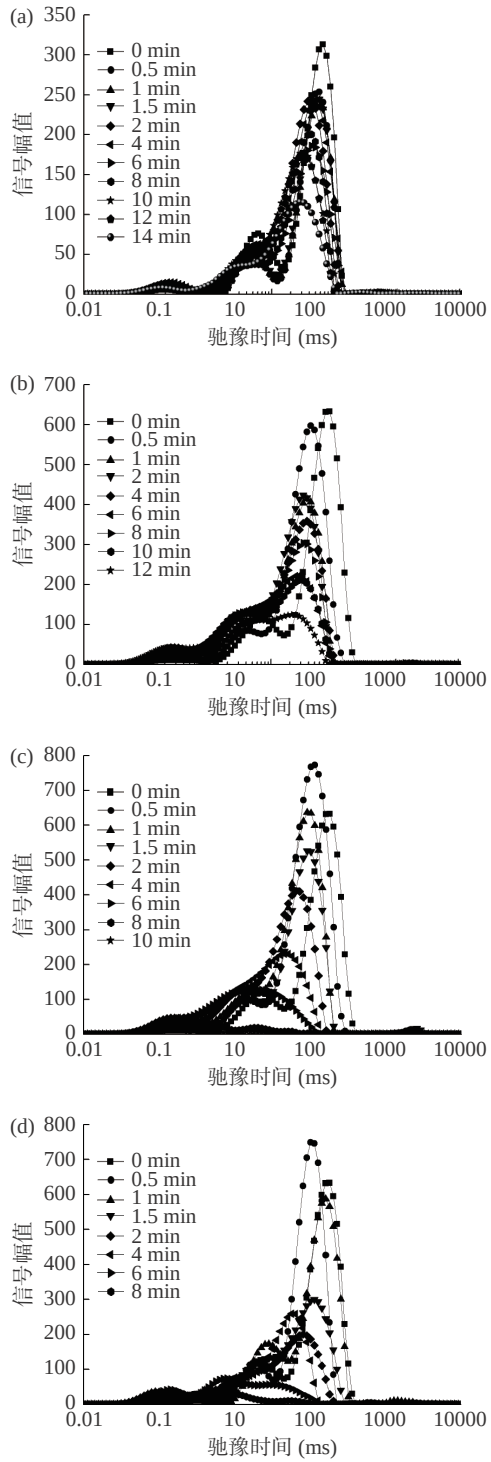


图 2 不同微波功率密度下青香蕉干燥过程的横向弛豫时间(T_2)反演谱

Fig.2 Transverse relaxation time (T_2) spectra of green banana during drying process at different microwave power densites

注:(a):3 W/g;(b):5 W/g;(c):7 W/g;(d):9 W/g;图 3 同。

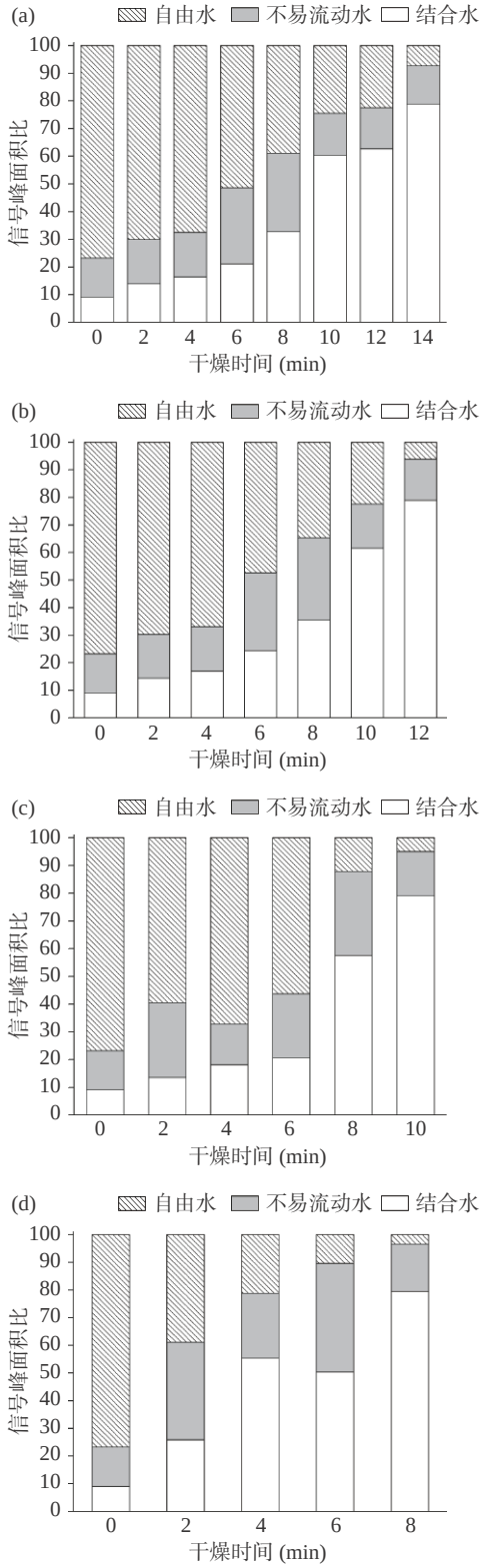


图 3 青香蕉微波干燥过程中各组分水分状态相对比例的变化

Fig.3 Variation of relative proportion of moisture state of components in the process of microwave drying of green banana opposite

微波功率密度越高越好,在 9 W/g 条件下进行微波干燥时,微波功率密度过大,样品容易出现焦黄现象,影响其感官品质,所以选择合适的微波功率密度对保证样品质量至关重要。

2.4 青香蕉微波干燥动力学模型

干燥模型各常数随微波功率密度变化而变化,不同的干燥模型拟合结果不一样,其干燥常数的变化趋势也不同。R^2、χ^2 和 RMSE 表明这些模型在一定范围内适用于模拟青香蕉微波干燥过程。试验选取 3 个干燥模型进行拟合求证,由表 3 可知,Page 模型相较于其它数学模型具备最大的 R^2、较低的 RMSE 和最小的 χ^2,表明其拟合程度最佳;另外,从简洁性和

表 3　干燥模型统计分析结果

Table 3　Results of statistical analyses on modeling of moisture content and drying time

模型	表达式	微波功率密度(W/g)	模型参数	R^2	χ^2	RMSE
Newton	MR=exp(−kt)	3	k=0.1253	0.731	0.0048	0.072
		5	k=0.1651	0.804	0.0033	0.055
		7	k=0.2168	0.832	0.0016	0.035
		9	k=0.3169	0.932	0.0004	0.018
Page	MR=exp(−kt^n)	3	k=0.050, n=1.450	0.995	5.79×10^{-4}	0.076
		5	k=0.107, n=1.248	0.994	9.42×10^{-4}	0.068
		7	k=0.155, n=1.222	0.999	1.36×10^{-4}	0.035
		9	k=0.288, n=1.083	0.999	1.93×10^{-4}	0.010
Henderson and Pebis	MR=aexp(−kt)	3	k=0.136, a=1.037	0.890	0.0036	0.092
		5	k=0.175, a=1.049	0.918	0.0026	0.094
		7	k=0.229, a=1.049	0.944	0.0011	0.077
		9	k=0.324, a=1.019	0.974	0.0003	0.047

实用性角度考虑，Page 模型具备表达形式简单和模拟结果精确的优势[32]。总体看来，最终选择 Page 模型为最优模型并进行拟合验证。

2.5　干燥模型的验证

为了验证 Page 模型的准确性，将理论值与实验值进行拟合，结果如图 4 所示，可以明显看出试验值比较均匀地落在拟合值线上，偏离度小。说明理论值与实验值结果大体一致(R^2>0.9)，Page 模型可用于描述不同微波功率密度下青香蕉微波干燥过程中任意时刻水分比与时间的关系，说明该模型具有较好的预测性，能准确地描述青香蕉微波干燥过程[33]。通过使用该模型可以将干燥规律方程化，对研究微波干燥与青香蕉品质之间的相互联系具有重要意义。

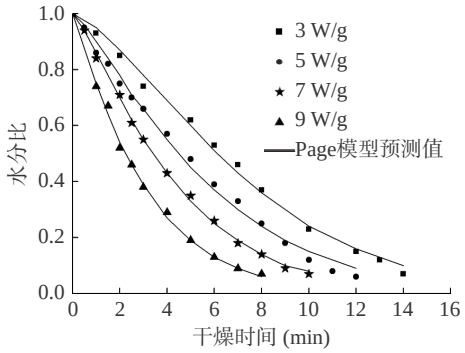


图 4　Page 模型验证曲线

Fig.4　Verification curves of Page model

3　结论

不同微波功率密度下，青香蕉微波干燥过程中的干燥速率曲线呈现基本相同的变化趋势，干燥速率仅呈现开始的迅速上升以及后续下降两个显著不同的阶段，干燥时间随着微波功率密度升高而降低。通过 LF-NMR 试验，在干燥过程中，自由度高的水分向自由度低的水分转化，青香蕉各水分状态的变化是自由水最先被去除，不易流动水整体呈现先上升后下降的趋势，结合水整体呈上升趋势。在试验范围内水分有效扩散系数随着微波功率密度的升高而升高。青香蕉微波干燥过程可以用 Page 模型(R^2>0.9)准确模拟，可以较好地对干燥过程进行预测和控制，为应用微波干燥技术开发青香蕉片干制品提供科学的理论指导。为提高青香蕉微波干燥的品质，可通过中强度微波功率密度和低功率密度间歇作用，来避免样品焦糊和能源浪费。

参考文献

[1] 罗国光. 果树词典 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2007: 425−426. [LUO G G. Fruit tree dictionary[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2007: 425−426.]

[2] ODENIGBO A M, ASUMUGHA V U, UBBOR S, et al. *In vitro* starch digestibility of plantain and cooking-banana at ripe and unripe stages[J]. International Food Research Journal, 2013, 20(6): 3027−3031.

[3] 徐亚元, 沈素晴, 李大婧, 等. 青香蕉微波干燥中淀粉糊化行为及消化特性的研究 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(3): 88−96. [XU Y Y, SHEN S Q, LI D J, et al. Study on starch gelatinization behaviors and digestibility of green bananas during microwave drying[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(3): 88−96.]

[4] ZHANG F, ZHANG M, MUJUMDAR A S. Drying characteristics and quality of restructured wild cabbage chips processed using different drying methods[J]. Drying Technology, 2011, 29(6): 682−688.

[5] 林鹏程, 张钟元, 江宁, 等. 紫菜热风/微波联合干燥工艺优化及品质分析 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(3): 215−225. [LING P C, ZHANG Z Y, JIANG N, et al. Optimization of two step drying process of porphyra by hot air and microwave and quality evaluation study on starch gelatinization behaviors and digestibility of green bananas during microwave drying[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(3): 215−225.]

[6] 何方健. 山楂微波干燥过程中品质监测与工艺优化研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2021. [HE F J. Study on quality monitoring and process optimization of hawthorn during microwave drying[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021.]

[7] 叶大鹏, 崔蕴涵, 翁海勇, 等. 莲子间歇式微波分段变功率真空干燥方法[J]. 农业工程学报, 2021, 37(8): 288−295. [YE D P, CUI Y H, WENG H Y, et al. Lotus seed drying by intermittent

phased varying power microwave under vacuum[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2021, 37(8): 288−295.]

[8] 温家豪, 董继先, 王栋等. 马铃薯片间歇微波真空干燥工艺优化[J]. 食品工业, 2021, 42(1): 130−135. [WEN J H, DONG J X, WANG D, et al. Optimization of intermittent microwave-vacuum drying of potato slices[J]. Technology of Food Industry, 2021, 42(1): 130−135.]

[9] 陈燕珠. 香蕉片微波真空干燥水分特性的研究[J]. 闽西职业技术学院学报, 2010, 12(3): 107−111. [CHEN Y Z. Research on moisture content properties of banana slice under microwave vacuum drying condition[J]. Journal of Minxi Vocational and Technical College, 2010, 12(3): 107−111.]

[10] OMOLOLA A O, JIDEANI A, KAPILA P F. Modeling microwave drying kinetics and moisture diffusivity of Mabonde banana variety[J]. International Journal of Agricultural & Biological Engineering, 2014, 7(6): 107−113.

[11] GB 5009.3−2016 食品安全国家标准食品中水分的测定[S]. 2016. [GB 5009.3-2016 National Food Safety Standard: Determination of moisture in food[S]. 2016.]

[12] 朱文学, 尤泰斐, 白喜婷, 等. 基于低场核磁的马铃薯切片干燥过程水分迁移规律研究[J]. 农业机械学报, 2018, 49(12): 364−370. [ZHU W X, YOU T F, BAI X T, et al. Analysis of moisture transfer of potato slices during drying using low-field NMR[J]. Transactions of The Chinese Society of Agricultural Machinery, 2018, 49(12): 364−370.]

[13] FANEK H, FAVA C, HUANG E C. Determination of effective diffusion coefficient of water in marshmallow from drying data using finite difference method[J]. International Food Research Journal, 2012: 1351−1354.

[14] 任爱清, 邓珊, 唐小闲, 等. 香菇脆片真空油炸过程中传质规律[J]. 食品工业科技, 2021, 42(4): 50−54. [REN A Q, DENG S, TANG X X, et al. Mass transfer during vacuum frying of shiitake mushroom chips[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(4): 50−54.]

[15] 楚文靖, 盛丹梅, 张楠, 等. 红心火龙果热风干燥动力学模型及品质变化[J]. 食品科学, 2019, 40(17): 150−155. [CHU W J, SHENG D M, ZHANG N, et al. Hot-air drying of red-fleshed pitaya: Kinetic modelling and quality changes[J]. Food Science, 2019, 40(17): 150−155.]

[16] LI L L, ZHANG M, BHANDARI B, et al. LF-NMR online detection of water dynamics in apple cubes during microwave vacuum drying[J]. Drying Technology, 2018, 36(16): 2006−2015.

[17] 孙畅莹, 刘云宏, 曾雅, 等. 直触式超声强化热风干燥梨片的干燥特性[J]. 食品与机械, 2018, 34(9): 37−42. [SUN C Y, LIU Y H, ZENG Y, et al. Effect of contact ultrasound power on internal moisture migration of pear slices during ultrasound enhanced hot air drying[J]. Food & Machinery, 2018, 34(9): 37−42.]

[18] SILVA W, E SILVA C, GAMA F, et al. Mathematical models to describe thin-layer drying and to determine drying rate of whole bananas[J]. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, 2014, 13(1): 67−74.

[19] TOĞRUL İT, PEHLIVAN D. Mathematical modelling of solar drying of apricots in thin layers[J]. Journal of Food Engineering, 2002, 55(3): 209−216.

[20] DHANUSHKODI S, WILSON V H, SUDHAKAR K. Mathematical modeling of drying behavior of cashew in a solar biomass hybrid dryer[J]. Resource-Efficient Technologies, 2017, 3(4): 359−364.

[21] 李叶贝, 任广跃, 屈展平, 等. 马铃薯小麦复合面条热泵干燥特性及数学模型的研究[J]. 中国粮油学报, 2019, 34(10): 7−15. [LI Y B, REN G Y, QU Z P, et al. Heat pump drying characteristics and mathematical model of potato wheat compound noodle[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2019, 34(10): 7−15.]

[22] 代建武, 杨升霖, 王杰, 等. 微波真空干燥对香蕉片干燥特性及品质的影响[J]. 农业机械学报, 2020, 51(s1): 500−507. [DAI J W, YANG S L, WANG J, et al. Effect of microwave vacuum drying conditions on drying characteristics and texture structure of banana chips[J]. Transactions of The Chinese Society of Agricultural Machinery, 2020, 51(s1): 500−507.]

[23] 乔柱, 关二旗, 卞科. 玉米热风和过热蒸汽干燥特性及其品质对比研究[J]. 河南工业大学学报 (自然科学版), 2016, 37(3): 1−6. [QIAN Z, GUAN E Q, BIAN K. Comparison of characteristics and quality of maize by hot air and superheated steam drying[J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2016, 37(3): 1−6.]

[24] JAIN D, PATHARE P B. Study the drying kinetics of open sun drying of fish[J]. Journal of Food Engineering, 2007, 78(4): 1315−1319.

[25] 段柳柳, 段续, 任广跃. 怀山药微波冻干过程的水分扩散特性及干燥模型[J]. 食品科学, 2019, 40(1): 23−30. [DUAN L L, DUAN X, REN G Y. Water diffusion characteristics and microwave vacuum freeze-drying modelling of chinese yam (*Dioscorea opposite*) tubers[J]. Food Science, 2019, 40(1): 23−30.]

[26] HU Q G, ZHANG M, MUJUMDAR A S, et al. Drying of edamames by hot air and vacuum microwave combination[J]. Journal of Food Engineering, 2006, 77(4): 977−982.

[27] 刘宗博, 张钟元, 李大婧, 等. 双孢菇远红外干燥过程中内部水分的变化规律[J]. 食品科学, 2016, 37(9): 82−86. [LIU Z B, ZHANG Z Y, LI D J, et al. Analysis of moisture change during far-Infrared drying of *Agaricus bisporus*[J]. Food Science, 2016, 37(9): 82−86.]

[28] 付晓记, 唐爱清, 闵华, 等. 花生浸种过程中水分相态和水分迁移动态研究[J]. 中国油料作物学报, 2018, 40(4): 552−557. [FU X J, TANG A Q, MIN H, et al. Analysis on water phase state and transport in process of peanut seed soaking by using low-field nuclear magnetic resonance[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2018, 40(4): 552−557.]

[29] MOY J H, CHAN K C, DOLLAR A M. Bound water in fruit products by the freezing method[J]. Journal of Food Science, 2010, 36(3): 498−499.

[30] 盘喻颜, 段振华, 钟静妮. 利用低场核磁共振技术分析月柿果片微波间歇干燥过程中的内部水分变化[J]. 食品工业科技,

2021，42(14)：33−39. ［PAN Y Y, DUAN Z H, ZHONG J N. Analysis of internal moisture changes of persimmon slices during intermittent microwave drying using low-field NMR[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(14): 33−39.］

［31］ 魏硕，王德勋，苏家恩，等. 低场核磁共振法测定烘烤过程中烤烟主脉的水分[J]. 烟草科技，2016，49(10)：31−35. ［WEI S, WANG D X, SU J E, et al. Moisture content in midrib of tobacco leaves during flue-curing as determined by LF-NMR[J]. Tobacco Science & Technology, 2016, 49(10): 31−35.］

［32］ 徐建国，张森旺，徐刚，等. 莲子薄层热风干燥特性与水分变化规律[J]. 农业工程学报，2016，32(13)：303−309. ［XU J G, ZHANG S W, XU G, et al. Thin-layer hot air drying characteristics and moisture diffusivity of lotus seeds[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2016, 32(13): 303−309.］

［33］ 周四晴，段续，任广跃，等. 厚度控制对怀山药远红外干燥过程中水分迁移的影响[J]. 食品与机械，2019，35(12)：75−81. ［ZHOU S Q, DUAN X, REN G Y, et al. Effect of thickness on moisture transfer during far-infrared drying of *Dioscorea oppsite*[J]. Food & Machinery, 2019, 35(12): 75−81.］

尚琪, 赵保堂, 丁仙仙, 等. 盐及酪蛋白酸钠对藜麦面团及面条品质的影响 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 118−126. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021120247

SHANG Qi, ZHAO Baotang, DING Xianxian, et al. Effect of Salt and Sodium Caseinate on Quality of Quinoa Dough and Noodle[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 118−126. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021120247

· 研究与探讨 ·

盐及酪蛋白酸钠对藜麦面团及面条品质的影响

尚　琪, 赵保堂, 丁仙仙, 张紊玮, 杨富民*

（甘肃农业大学食品科学与工程学院, 甘肃 兰州 730070）

摘　要: 本文以藜麦面为研究对象，通过添加 KCl、NaCl、酪蛋白酸钠以改善藜麦面团的性质，研究了不同处理条件对藜面团质的硬度、咀嚼性、黏度等质构特性以及储能模量、损耗模量、复合粘度等流变学特性的影响。结果表明：当添加的水量为 50% 藜麦面团成型的光滑程度、弹性较好；当藜麦面中加入 1.5% 酪蛋白酸钠+1% KCl 所制备的藜麦面团粘性适中、硬度和弹性较好；NaCl、KCl、酪蛋白酸钠的加入，均可改善面团的 G"、G'、黏度，1.5% 酪蛋白酸钠+1% KCl 加入，可增大藜麦面团的 G"、G'、黏度；NaCl 和酪蛋白酸钠都可以明显的改善藜麦面条吸水率，NaCl 可降低藜麦面条的干物质损失率，KCl 的作用与之相反，而酪蛋白酸钠与 1% KCl 联合使用，在增加其吸水率的同时减少了干物质损耗率，当同时添加 2.0% 酪蛋白酸钠和 1% KCl 条件下达到最适，而且恢复能力达到最佳；酪蛋白酸钠与 1% KCl 可增加藜麦面条表面片层的致密程度。因此，1.5% 酪蛋白酸钠+1% KCl 的添加量对藜麦面团的弹性、硬度、咀嚼性均达到最佳，同时添加 2.0% 酪蛋白酸钠和 1% KCl 能显著（P<0.05）改善藜麦面条的蒸煮损失及干物质损失率，降低面汤浊度，还可以增加藜麦面条的硬度，从而增加其咀嚼性。

关键词: 藜麦粉, 盐, 酪蛋白酸钠, 质构特性, 流变学特性

中图分类号: TS252.54　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0118−09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021120247　　本文网刊:

Effect of Salt and Sodium Caseinate on Quality of Quinoa Dough and Noodle

SHANG Qi, ZHAO Baotang, DING Xianxian, ZHANG Wenwei, YANG Fumin*

（College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China）

Abstract: In this paper, quinoa dough was used as raw material to investigate the effects of different salt (NaCl, KCl, sodium caseinate) on the texture and rheological properties of quinoa dough and noodles such as hardness, chewiness, viscosity and structural recovery. Sensory evaluation showed that the smoothness and elasticity of quinoa dough were better when the amount of water added was 50%. NaCl, KCl and sodium caseinate could affect the viscosity, elasticity, hardness and chewiness of the quinoa dough. The quinoa dough prepared with 1.5% sodium caseinate+1% KCl in quinoa flour had moderate viscosity, good hardness and elasticity. The rheological experiment results showed that the addition of NaCl, KCl and sodium caseinate could improve the G", G', viscosity of the dough. The addition of 1.5% sodium caseinate+1% KCl could increase the G", G', and viscosity of quinoa dough. Adding NaCl and sodium caseinate to quinoa noodles could significantly improve the water absorption of quinoa noodles, NaCl could reduce the dry matter loss rate of quinoa noodles, KCl had the opposite effect, and sodium caseinate combined with 1% KCl could increase its water absorption while reducing dry matter. The material loss rate reached the optimum under the condition of 2.0% sodium caseinate and 1% KCl, and the recovery ability was the best. The scanning of noodles morphology showed that sodium caseinate and 1% KCl

收稿日期: 2021−12−23

基金项目: 中央引导地方科技发展专项（ZCYD-2020-6-1）; 甘肃农业大学科研项目（GSAU-ZL-2015-048）。

作者简介: 尚琪（1990−）, 女, 硕士, 助教, 研究方向: 农产品加工, E-mail: sq491818537@163.com。

*** 通信作者:** 杨富民（1961−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品加工, E-mail: yfumin@163.com。

could increase the density of the surface lamellae of quinoa noodles. The results showed that the elasticity, hardness and chewiness of quinoa dough reached the maximum when the amount of sodium caseinate and KCl was 1.5% and 1%. Meanwhile, the results quinoa noodles showed that 2.0% sodium caseinate and 1% KCl could improve the cooking loss and dry matter loss rate, reduce the turbidity of noodle soup, and increase the hardness of quinoa noodles.

Key words: quinoa flour; salt; sodium caseinate; texture characteristics; rheology

藜麦（*Chenopodium quinoa* Willd.），又称藜谷、南美藜、昆诺阿藜等，是藜属的一年生双子叶植物，原产于南美洲安第斯地区[1]。藜麦中蛋白质含量高达 22%，其蛋白质生物学价值与牛奶类似，可作为素食者摄取蛋白质的最佳来源；氨基酸含量丰富、比例均衡，适合人体吸收利用；膳食纤维、维生素、矿物质等营养元素的含量也远高于大多数谷类作物[2]。因为藜麦低脂、低糖指数、低热量及不含麸质的特点，适合于幼儿、中老年人以及孕产妇、糖尿病患者和肠胃疾病患者等不同人群食用，如今藜麦已成为欧美热门的养生食材。而藜麦作为一种新型全谷物烹饪食品，很多国家也相继出现了藜麦粉、藜麦面包等深加工产品。

酪蛋白酸钠因其良好的热稳定性、乳化性、起泡性、持水性等功能特性，成为改善食品质地与感官的重要原料，常作为乳化剂、增稠剂和稳定剂被广泛应用于食品行业[3−4]。据报道，很多国家将其作为安全的优良天然多功能食品添加剂广泛地应用于香肠、火腿等乳化凝胶类肉制品领域中[5]，而在面制品中应用的报道比较罕见。流变仪和质构仪相关指标可为产品配方、加工工艺、以及质量检测等提供方便和理论依据，了解样品组织结构和物理性质[6−8]。藜麦面团因其成型性、咀嚼性、粘性等问题，在生产加工中受到限制，基于此问题，本文以藜麦面团为研究对象，通过添加 NaCl、KCl 和酪蛋白酸钠后对其流变学特性及质构特性进行研究，为 NaCl、KCl 及酪蛋白酸钠在藜麦制品中的应用提供理论依据和重要的参考价值。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

藜麦粉　食品级，甘肃省金昌市永昌镇；氯化钠　分析纯，西安化学试剂厂；氯化钾　分析纯，西安化学试剂厂；酪蛋白酸钠　食品级，甘肃省临夏州华安生物制品有限责任公司。

PB203-N 精密电子天平　沈阳龙腾电子产品有限公司；MCR301 旋转流变仪　奥地利安东帕公司；CT3 质构仪　美国博勒飞公司；HITACHI S-450 扫描电子显微镜　日本日立公司；VL-666A 面条机　中山市小榄镇威的电器有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　藜麦面团的制备　参考刘壮等[9] 的方法并加以修改，藜麦面团的制作采用一次成型法。称取 30 g 藜麦粉 7 份，分别与 40%、45%、50%、55%、60% 蒸馏水混合。在室温下进行和面，和好面后将面团放到塑封袋进行保存，然后进行感官评价。

1.2.2　面团感官评价　面团感官评价方法参照 LST 3204-1993《馒头用小麦粉》并适当进行修改，评定人员由经过培训的食品科学与工程专业的 10 名本科生组成评价小组，经感官评价确定此实验中蒸馏水的最佳添加量，总分为 100 分，具体评价指标[10−12] 见表 1。

表 1　藜麦面团的感官评价指标

Table 1　Sensory evaluation indicators of quinoa dough

项目	标准	分数(分)
表皮结构（30 分）	表面光滑、饱满	20~30
	表面光泽度低	10~19
	表面有微小裂痕	0~9
色泽（20 分）	呈土褐色、色泽均匀	16~20
	色泽基本均匀	10~15
	色泽不均匀、肉眼可见生面粉颗粒	0~9
弹性（20 分）	回弹性好	16~20
	稍有回弹	10~15
	回弹弱或直接不回弹	0~9
内部结构（30 分）	纵剖面气泡小而均匀	20~30
	纵剖面气泡适中	10~19
	纵剖面气泡气孔大小不均匀	0~9

1.2.3　添加 NaCl、KCl 藜麦面团的制备　参考张旭东等[13] 方法，依据感官评价确定最佳蒸馏水添加量的结果，准确称取不同质量的盐（NaCl、KCl）加入到 15 mL 蒸馏水中溶解，与 30 g 藜麦粉制成盐（NaCl 或 KCl）质量分数为 0.6%、0.8%、1.0%、1.2% 的藜麦面团，并以不加盐藜麦面团作为空白对照。4 ℃ 保存备用。

1.2.4　添加酪蛋白酸钠、KCl 藜麦面团的制作　在 1.2.2 的基础上，参照蔡旭冉等[14] 的方法，准确称量 30 g 藜麦粉、15 mL 蒸馏水与 KCl 及不同质量的酪蛋白酸钠，制成 KCl 质量分数为 1.0%，酪蛋白酸钠质量分数为 0.5%、1.0%、1.5%、2.0% 的藜麦面团，并以不加酪蛋白酸钠、KCl 质量分数为 1.0% 的藜麦面团作为空白对照。4 ℃ 保存备用。

1.2.5　藜麦面团质构特性的测定　参照张玉荣等[15] 的质构特性的试验方法。将制备好的藜麦面团切成厚度为 15 mm 的圆形薄片，进行 TPA 质构测试。设置参数为：选择 TA44 探头，预测试速度 1.00 mm/s，测试速度 1.00 mm/s，返回速度 1.00 mm/s，可恢复时间 1 s，触发力 5.0 g。

1.2.6　藜麦面团流变学特性的测定　参照何兴芬等[16]、朱科学等[17] 流变学特性的测定方法，并加以修

改。将藜麦面团制成厚度为 6 mm 的圆形薄片，将面饼置于平板上，设置 MCR301 流变仪测定条件：平板系统 PP50，平行板间距 6 mm，测定温度 25 ℃。加上盖板，防止水分蒸发，开始测定。采用恒温循环水系统进行温度控制。

1.2.7 藜麦面条吸水率及蒸煮损失的测定 参考沈耀衡[18]的方法并加以修改，称取 100 g 藜麦粉按 1.2.3、1.2.4 的配比将制成的面团通过面条机压成约厚度 1 mm、宽度 2 mm 的面条。

吸水率的测定：将压好的面条称重记为 m_1，放入沸水中煮至面条芯的白色生粉刚刚消失后将面条捞出，用流动的自来水冲淋约 10 s 后用滤纸吸去面条表面水分再称重，记为 m_2，按公式(1)计算出吸水率。

$$吸水率(\%)=\frac{m_2-m_1\times(1-w)}{m_1\times(1-w)}\times 100 \qquad 式（1）$$

干物质损失率的测定：将测吸水率后的面汤转入烧杯中后加热蒸发掉大部分水，再放入烘箱中烘至恒重，称量干物质质量记为 m_3，按式(2)计算干物质损失率。

$$干物质损失率(\%)=\frac{m_3}{m_1\times(1-w)}\times 100 \qquad 式（2）$$

式中：w 为藜麦面条含水量，%。

1.2.8 藜麦面条的扫描电镜分析 根据前期实验结果，将熟制面条经 50 ℃ 干燥处理 10 h 后置于电子扫描镜样品台的双面胶上，喷镜两次后用扫描电子显微镜观察添加酪蛋白酸钠和 KCl 前后藜麦面条的形貌变化[19−20]。

1.2.9 藜麦面条质构特性的测定 按 1.2.7 的步骤制备藜麦面条后，将生面条煮熟用流动的自来水冲淋后，用滤纸吸去面条表面水分，放入保鲜膜保湿按 1.2.5 试验参数进行质构测定。

1.3 数据处理

每组试验重复 3 次，取平均值，采用 Origin 8.0 软件对数据进行统计分析并绘图。

2 结果与分析

2.1 蒸馏水添加量对藜麦面团感官品质的影响

由表 2 可以看出，当蒸馏水的添加量控制在藜麦粉质量的 40%~60% 时，经感官评价得出，在 30 g 藜麦粉中添加 50% 蒸馏水时，藜麦面团的表皮的光滑程度与弹性都较好，此时感官评价的得分最高，在后续实验中选取的蒸馏水添加量为 50%。

2.2 藜麦面团的质构特性

由表 3 可知，藜麦面团的粘性随 KCl、NaCl 添加量的增多呈先增后减的趋势，在 KCl 添加量为 1% 时粘性最大为 3.2，在 NaCl 添加量为 0.8% 粘性达到 2.6。弹性和咀嚼性变化趋势一致，除了 1.2% KCl 和 0.8% NaCl 处理组，其他处理组的弹性和咀嚼性均小于空白对照组(CK)，但所有处理组的硬度大于对照组。由于藜麦面团难以成型，且面团的粘性会影响面条的成型，因此，在后续实验中选取粘性最大的处理组(1% KCl 的藜麦面团)作为添加酪蛋白酸钠的对照组。

表 2 蒸馏水添加量对藜麦面团品质的影响(分)

Table 2 Effect of the amount of distilled water on the quality of quinoa dough (scores)

蒸馏水添加量(%)	表皮结构	色泽	弹性	内部结构	得分
40	17	9	8	11	45
45	19	13	9	13	54
50	22	17	13	23	75
55	22	15	12	16	65
60	21	15	11	17	64

表 3 KCl、NaCl 处理对藜麦面团质构的影响

Table 3 Results of TPA texture analysis of quinoa dough treated with KCl, NaCl

组别	粘性(g·sec)	弹性	硬度(g)	咀嚼性
CK	1.1±0.03	4.31±0.18	70±2.5	2.1±0.03
0.6% KCl组	2.4±0.21	3.16±0.32	156±3.2	1.2±0.02
0.8% KCl组	2.9±0.05	3.68±0.6	118±2.9	1.8±0.02
1.0% KCl组	3.2±0.32	2.79±0.06	145±3.4	1.4±0.05
1.2% KCl组	1.4±0.08	4.41±0.11	108±1.8	2.4±0.04
0.6% NaCl组	2.3±0.14	2.61±0.09	125±2.1	0.4±0.03
0.8% NaCl组	2.6±0.06	4.55±0.17	112±1.8	2.4±0.02
1.0% NaCl组	1.2±0.04	3.96±0.12	107±1.5	2.0±0.08
1.2% NaCl组	0.3±0.02	2.09±0.09	136±2.1	0.6±0.02

淀粉是藜麦粉中主要的碳水化合物，而其中直链淀粉和支链淀粉的比例也会影响面团的物化特性，硬度和咀嚼性两个指标可以很好的反应面团的品质[21]。根据表 4 可知，与只添加 1.0% KCl 的藜麦面团作比较，当在 1.0% KCl 的藜麦面团中添加酪蛋白酸钠时，面团的粘性会降低，且酪蛋白酸钠添加量为 1.5% 时，粘性达到最小，而弹性是先增加后减少，面团的硬度随着酪蛋白酸钠的添加量的增加出现先减小后增大再减小的一个反复的变化，酪蛋白酸钠的添加量为 0.5% 时最小。面团的咀嚼性也是处于一个先小范围增强后来变弱的趋势，当酪蛋白酸钠的添加量达到 2.0% 时，藜麦面团的弹性、硬度、咀嚼均达到最大，故当酪蛋白酸钠的添加量达到 2.0% 时，藜麦面团最不柔软。这主要是因为 KCl 是亲水性盐类，氯离子还能结合氨基酸极性残基，稳定蛋白结构，两者的加入，使面团的稳定时间、硬度、黏附性也得到不同程度的改善，酪蛋白酸钠中的二硫键连接了半

表 4 不同酪蛋白酸钠添加量对藜麦面团质构特性的影响

Table 4 Results of TPA texture analysis of quinoa dough treated with different sodium caseinates

组别	粘性(g·sec)	弹性	硬度(g)	咀嚼性
1.0% KCl组	3.2±0.32	2.79±0.06	145±3.4	1.4±0.05
0.5%酪蛋白酸钠+1% KCl组	1.0±0.05	3.47±0.12	119±3.7	1.6±0.02
1.0%酪蛋白酸钠+1% KCl组	0.7±0.06	2.34±0.09	154±4.2	1.0±0.04
1.5%酪蛋白酸钠+1% KCl组	3.0±0.11	4.66±0.17	199±3.8	7.7±0.17
2.0 %酪蛋白酸钠1% KCl组	0.5±0.02	1.94±0.08	129±2.1	0.6±0.04

胱氨酸残基，稳定了藜麦面团的结构，KCl 的加入又会破坏二硫键的存在[21]。结合表 4 结果，1% KCl 的藜麦面团中添加酪蛋白酸钠后，藜麦面团的粘性、弹性、硬度、咀嚼性都有所变化，其中粘性变小，综合考虑面团成型时的硬度、弹性，当酪蛋白酸钠的添加量达到 1.5% 时，藜麦面团的粘性、弹性、硬度、咀嚼均达到最大，表明酪蛋白酸钠和 KCl 对面团的网络结构影响达到一个平衡，0.6% NaCl 组和 0.8% NaCl 组没有明显差别，在后续流变实验中为简化实验，去除了 0.8% 的实验组，因此在后续实验中选取 1.5% 酪蛋白酸钠+1% KCl 实验组。

2.3　藜麦面团的流变学特性

2.3.1　NaCl、KCl 添加量对藜麦面团变特性的影响

由图 1 所示，应变范围在 0.01%~100% 时，样品的模量(G')和损耗模量(G")随应变的增大呈现出先下降后保持恒定不变的趋势，但储能模量的变化幅度更大。1.2% NaCl 处理组的 G'变化趋势尤其明显，随着应变的增大，它的储能模量呈现降低趋势，当应变接近 0.4% 时则开始缓慢降低，继续增加应变到接近 50% 时开始恒定不变。对照组作对照，添加 1.0% KCl 时，G'和 G"均达到最大。对比所有处理组当应变接近 50% 均趋于稳定。

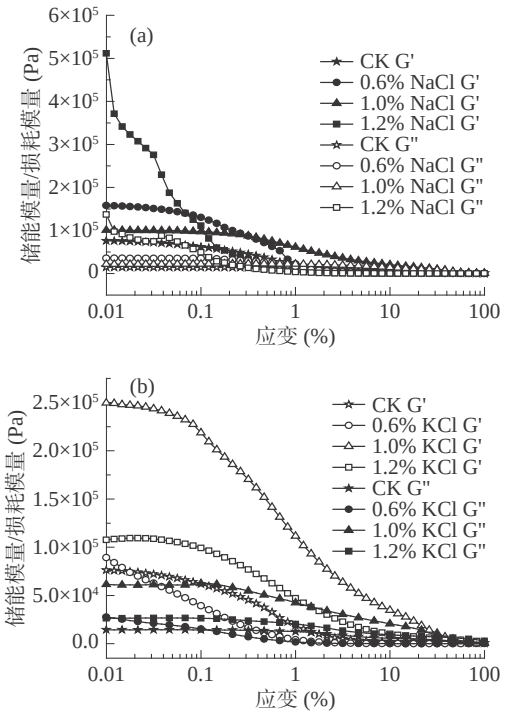


图 1　NaCl、KCl 处理对藜麦粉形变的影响

Fig.1　Effects of NaCl and KCl treatment on deformation of quinoa dough

2.3.2　同时添加 KCl 和酪蛋白酸钠对藜麦面团应变特性的影响

由图 2 所示，当应变范围控制在 0.01%~100%，样品的 G'和 G"都随应变的增大呈现出先下降后恒定的趋势，与对照组(1.0% KCl)相比，当同时添加 1.5% 酪蛋白酸钠时，面团的 G"、G'随应变的增大变化较为明显，表明在藜麦面粉的加工过程中，酪蛋白酸钠的添加可增加面团中淀粉分子与蛋白质直接的交联，从而改善藜麦面团的 G"、G'[16]。

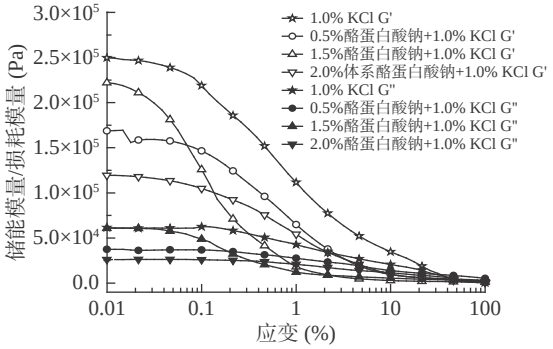


图 2　同时添加 KCl 酪蛋白酸钠藜麦面团应变的影响

Fig.2　Effects of sodium caseinate and KCl treatment on the deformation of quinoa dough

2.3.3　NaCl、KCl 添加量对藜麦面团黏度的影响

由图 3 可见，不同添加量的 NaCl、KCl 处理藜麦面粉时，藜麦面粉的黏度都随剪切速率的增大而先减小后保持不变。与对照组相比，0.6% 和 1.2% 的 NaCl、KCl 处理组的黏度均高于对照组，1.0% NaCl 和 KCl 处理组黏度明显低于对照组，且随剪切速率的增大黏度的变化趋势特别缓慢。这可能是由于当添加 1.0% 的 NaCl 和 KCl 时与面筋蛋白争夺游离水的能力相对处于平衡，导致面团的内部结构比较稳定，使得在整个剪切速率增加的过程中面团黏度没有发生显著的变化[22]。

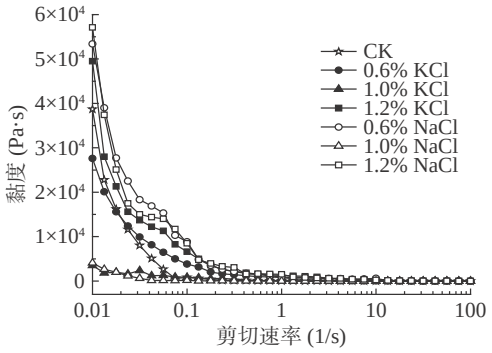


图 3　NaCl、KCl 处理对藜麦面团黏度的影响

Fig.3　Effects of NaCl and KCl treatment on the viscosity of quinoa dough

2.3.4　同时添加 KCl 和酪蛋白酸钠对藜麦面团黏度的影响

由图 4 可见。当剪切速率在 1~100/s 范围内，随剪切速率的增大，所有处理组黏度均随着剪切速率的增加而减小。与 1.0% KCl 对照组比较，添加酪蛋白酸钠可显著(P<0.05)增强藜麦面团的黏度，这可能是因为酪蛋白酸钠具有很强的乳化、增稠作用[4]，而当酪蛋白酸钠的添加量为 0.5% 和 1.5% 时，这种作用更加明显。

2.3.5　NaCl、KCl 添加量对藜麦面团动态黏弹性的影响

如图 5 所示，与对照组相比，除 0.6% NaCl 处

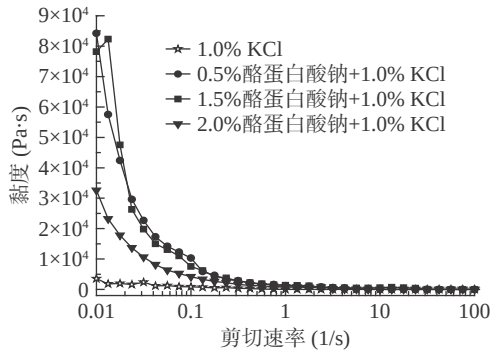


图 4 同时添加 KCl 和酪蛋白酸钠对藜麦面团黏度的影响

Fig.4 Effects of sodium caseinate and KCl treatment on the viscosity of quinoa flour

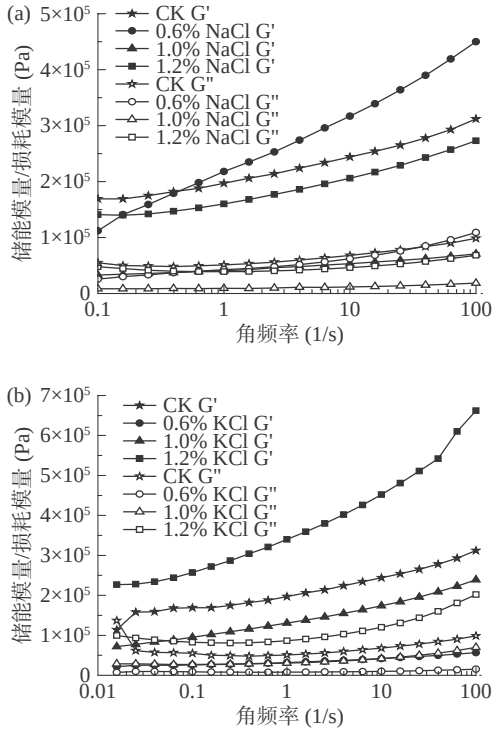


图 5 NaCl、KCl 处理对藜麦面团储能模量(G')和损耗模量(G")的影响

Fig.5 Effects of NaCl and KCl treatment on storage modulus (G') and loss modulus (G") of quinoa dough

理组的储能模量(G')和损耗模量(G")随角频率的增大呈现出明显的上升趋势,其他处理组均呈现出先小幅度降低后逐渐增高的趋势,但图中面团的 G'均大于 G",这说明实验中的面团表现出较大的弹性[23],且频率越高 G'随角频率增大而增加的趋势越明显。图中 G'和 G"降低可能是因为 NaCl、KCl 的添加在低角频率时限制了面团形成黏弹性结构的能力,使得面团的凝胶网络结构减弱;升高则可能是因为随着剪切速率的增大使得藜麦面团重新获得更大的黏弹性,面团的凝胶网状结构得到再次增强的结果[24]。

2.3.6 同时添加 KCl 和酪蛋白酸钠对藜麦粉动态黏弹性的影响 如图 6 所示,图中面团的 G'均大于 G",这说明此实验中的面团表现出的弹性更大[24]。与对照组相比,所有体系处理组的 G'和 G"随角频率的增大呈现出先小幅度降低后明显增高的趋势,其中当酪蛋白酸钠添加量为 0.5%、1.5% 时,其储能模量高于对照组,当酪蛋白酸钠添加量为 2.0% 时,体系的储能模量与损耗能量都明显低于对照组。这说明:当酪蛋白酸钠添加量为 1.5% 时,更有助于藜麦面团获得更大的黏弹性,使得面团的面筋网状结构更加稳定[24]。

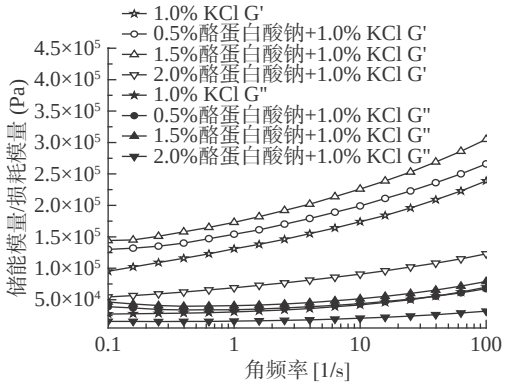


图 6 同时添加 KCl 和 酪蛋白酸钠对藜麦面团储能模量(G')和损耗模量(G")的影响

Fig.6 Effects of sodium caseinate and KCl treatment on storage modulus (G') and loss modulus (G") of quinoa dough

2.3.7 NaCl、KCl 添加量对藜麦面团时间扫描特性的影响 由图 7 可知,NaCl 和 KCl 处理组的 G'和 G"都随时间的增长呈现上升趋势,图中 G'明显大于

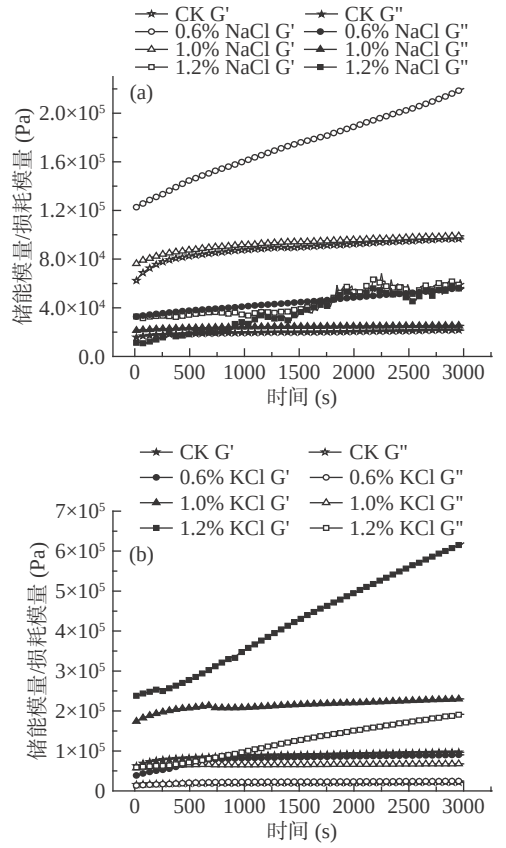


图 7 NaCl、KCl 处理对藜麦面团时间扫描特性的影响

Fig.7 Effects of NaCl and KCl treatment on time-scanning characteristics of quinoa dough

G"，而 G' 代表的是储处在物质中的或经过一个振动周期的正弦形变后所恢复的能量，代表了物质的弹性本质。与对照组作对照，0.6% NaCl 和 1.2% KCl 处理组的 G'明显高于对照组，这说明当添加 0.6% NaCl 和 1.2% KCl 时，对藜麦面团的面筋网络结构的改善作用更加明显，阻碍藜麦面团中水分的迁移，从而提高面团的黏弹性[25]，此结论与 2.3.5 动态黏弹性结果一致。

2.3.8　同时添加 KCl 和酪蛋白酸钠对藜麦面团时间扫描特性的影响　从图 8 可以看出，酪蛋白酸钠添加量为 1.5% 的藜麦面团体系的 G'和 G"的变化趋势相同，开始时随着时间的增加缓慢降低后逐渐增加，当时间达到大约 2700 s 的时候出现储能模量和损耗模量急速下降的现象，当下降到一定程度时又处于平稳状态。与对照组相比，酪蛋白酸钠的添加会显著改变藜麦面团的 G'，且当添加量达到 1.5% 时，G'达到最大。这可能是由于当酪蛋白酸钠的添加量达到 1.5% 时，藜麦面团中面筋的网络结构改变达到最大，从而使得了面团的黏弹性达到最大[25]，此结果与 2.3.6 保持一致。

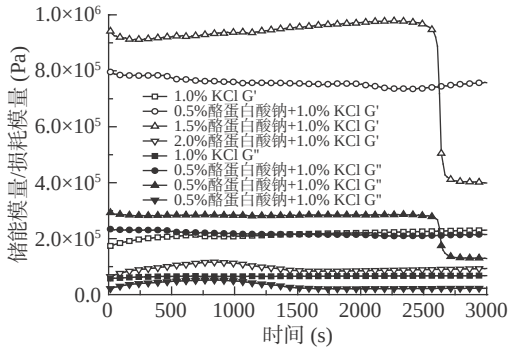


图 8　同时添加 KCL、酪蛋白酸钠对藜麦面团时间扫描特性的影响

Fig.8　Effects of sodium caseinate and KCl treatment on time-scan characteristics of quinoa dough

2.3.9　NaCl、KCl 添加量对藜麦面团触变特性的影响　如图 9 所示，所有处理组均形成了面积不同的触变环，其中空白对照组的触变环面积为 154564.55 Pa，其余处理组的触变环面积如表 5 所示。由表 5 可知，NaCl、KCl 处理组的触变环面积均随盐浓度的增加而增大，但与对照组比较，所有处理组的触变环面积全部小于对照组，这说明：盐的添加会使藜麦面团的触变环面积减小，从而改善藜麦面团的结构恢复能力，且盐浓度越小结构恢复能力越强。

2.3.10　同时添加 KCl 和酪蛋白酸钠添加量对藜麦粉触变特性的影响　如图 10 所示，所有藜麦面团处理组形成了面积不同的触变环，其中空白对照组(1.0% KCl)的触变环面积为 39182.38 Pa，其余处理组的触变环面积如表 6 所示。由表 6 可知，藜麦面团的触变环面积均随酪蛋白酸钠浓度的增加先增大后减小，但与对照组比较，除 2.0% 体系处理组的触变环面积

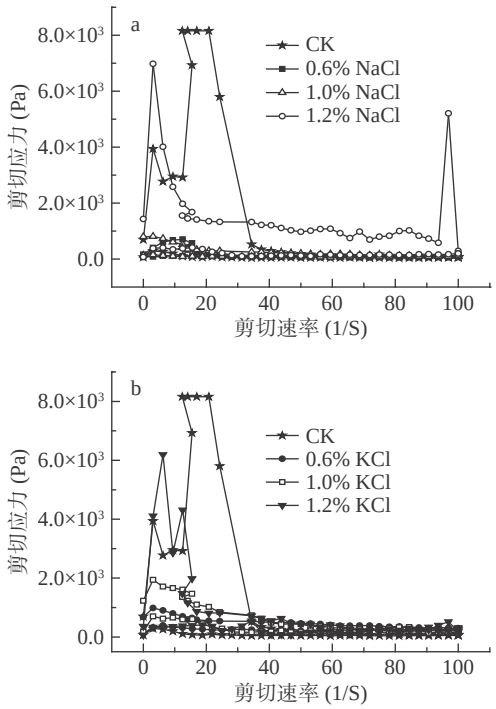


图 9　NaCl、KCl 处理对藜麦面团触变性的影响

Fig.9　Effects of NaCl and KCl treatment on thixotropy of quinoa dough

表 5　NaCl、KCl 处理组触变环面积

Table 5　Hysteresis Area of quinoa dough treatment with NaCl and KCl

处理组	面积(Pa)	处理组	面积(Pa)
0.6% NaCl	11290.07±12.08	0.6% KCl	23680.14±8.94
1.0% NaCl	18332.08±16.17	1.0% KCl	39182.38±11.15
1.2% NaCl	135703.97±11.85	1.2% KCl	76088.50±14.82

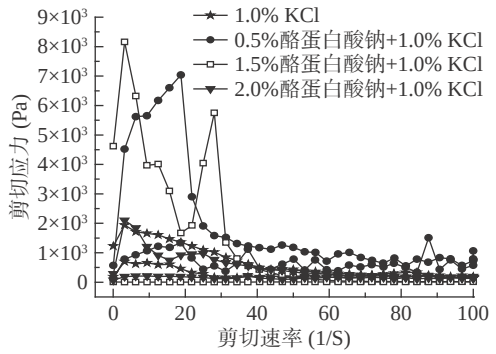


图 10　同时添加 KCl 和酪蛋白酸钠对藜麦面团触变性的影响

Fig.10　Effects of KCl and sodium caseinate treatment on thixotropy of quinoa quinoa dough

小于对照组，其他均大于对照。这说明：酪蛋白酸钠的添加量会改变藜麦面团的触变环面积大小，当酪蛋白酸钠的添加量为 2.0% 时，藜麦面团的结构恢复能力更强。

2.4　酪蛋白酸钠和盐对藜麦面条吸水率及蒸煮损失的影响

按式(1)计算出各处理组藜麦面条的吸水率、按

表 6 同时添加 KCl 和酪蛋白酸钠对触变环面积

Table 6 Hysteresis Area of treatment of KCl and sodium caseinate

处理组	0.5%酪蛋白酸钠+1.0% KCl	1.5%酪蛋白酸钠+1.0% KCl	2.0%酪蛋白酸钠+1.0% KCl
环面积(Pa)	130575.56±7.88	144410.62±13.22	38811.39±9.88

式(2)计算出各处理组藜麦面条的干物质损失率均如表 7、表 8 所示(其中面条含水量 m 为 50%),与对照组作对照,在藜麦面条中添加 KCl 时,当 KCl 的添加量为 1.0% 时,面条的吸水率最大,而面条的干物质损失率则随 KCl 含量的增加而增加。当在藜麦面条中添加 NaCl 时,当 NaCl 的添加量为 0.8% 时,面条的吸水率最大,而面条的干物质损失率则随 NaCl 含量的增加而较小。各藜麦粉-酪蛋白酸钠体系处理组面条的吸水率间则随酪蛋白酸钠的添加量表现出增加的趋势,干物质的损失率呈现出减小的现象。这说明:在藜麦面条中添加 NaCl 和酪蛋白酸钠都可以明显的改善藜麦面条的蒸煮损失,从而使得面汤浊度降低[26]。

表 7 添加不同盐对藜麦面条吸水率和干物质损失率的影响

Table 7 Effect of the results of water absorption and dry matter loss rate of quinoa noodles with different salt added

组别	吸水率(%)	干物质损失率(%)
CK	196.08±2.54	33.47±0.98
0.6% KCl组	254.04±5.29	33.48±1.11
0.8% KCl组	218.63±4.82	43.77±1.43
1.0% KCl组	258.04±8.11	54.42±0.88
1.2% KCl组	222.87±3.45	50.90±0.12
0.6% NaCl组	260.27±2.77	33.40±0.78
0.8% NaCl组	278.49±2.98	24.63±0.54
1.0% NaCl组	250.62±2.65	23.58±1.11
1.2% NaCl组	239.36±4.79	18.29±0.82

表 8 同时添加 KCl 和酪蛋白酸钠对藜麦面条吸水率和干物质损失率的影响

Table 8 Effcet of the results of water absorption and dry matter loss rate of quinoa noodles by adding KCl and sodium caseinate

组别	吸水率(%)	干物质损失率(%)
1.0% KCl组	258.04±8.97	54.42±0.98
0.5%酪蛋白酸钠+1% KCl组	230.64±7.88	27.91±0.22
1.0%酪蛋白酸钠+1% KCl组	244.17±4.35	27.86±0.19
1.5%酪蛋白酸钠+1% KCl组	236.85±9.22	22.24±0.67
2.0%酪蛋白酸钠1% KCl组	262.87±8.97	18.87±0.54

2.5 同时添加 KCl 和酪蛋白酸钠对藜麦面条形貌的影响

如图 11 扫描电镜图所示,空白对照组与添加酪蛋白酸钠和 KCl 的藜麦面条相比,两者存在明显的差异。没有添加酪蛋白酸钠和 KCl 的藜麦面条表面更加凹凸不平、没有一定的规整度,而添加了酪蛋白酸钠和 KCl 的藜麦面条表面更加紧实、凹凸程度相对更小。这说明:酪蛋白酸钠和 KCl 的添加可以改善面条的质构,使得面条的硬度有所增加。

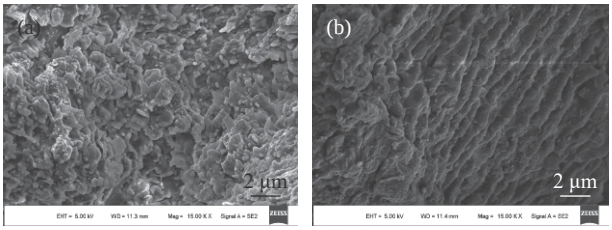


图 11 藜麦面团 SEM 图

Fig.11 SEM image of quinoa noodles

注:a:对照组;b:2.0% 酪蛋白酸钠+1% KCl。

2.6 酪蛋白酸钠和 KCl 对藜麦面条质构特性的影响

如表 9 所示,与对照组作对照,添加了酪蛋白酸钠和 KCl 的藜麦面条除弹性降低以外,粘聚性、硬度和咀嚼性都有所增加,其中硬度的增加幅度最大,咀嚼性的增加幅度次之。这说明:酪蛋白酸钠和 KCl 的添加可以明显增加藜麦面条的硬度,此结论与扫描电镜结果一致。

表 9 同时添加酪蛋白酸钠和 KCl 对藜麦面条质构的影响

Table 9 Results of texture analysis of quinoa noodles treated with KCl and sodium caseinate

组别	粘聚性	弹性	硬度(g)	咀嚼性
对照组	0.23±0.02	0.81±0.05	208.49±4.67	39.86±0.19
2.0%酪蛋白酸钠+1% KCl	0.26±0.01	0.72±0.09	288.05±7.12	54.51±0.82

3 讨论

陈霞等[27]研究发现,食盐的添加量为面粉的 0.75% 时,面条的硬度、黏附性、和咀嚼性达到较高的水平。这与本文中质构分析结果具有相似性,但本实验中当 NaCl 添加量为 0.8% 时,其弹性、咀嚼性达到最大,但硬度并非最大,造成这一结果的原因一方面可能是实验原料和试剂的不同,另一方面可能是实验过程存在差异。陈洁等[28]研究结果表明,在面团中添加食盐时会使氯化钠与面团的自由水结合,导致面团变硬变强,也会使面团的黏弹性模量迅速升高。这与本文结果一致,当 NaCl 添加量为 0.6%、KCl 为 1.2% 时,经流变学特性分析其黏弹性模量迅速上升,且由质构分析得出,此时硬度也达到最大。吴洋[29]在研究中发现,随着食盐添加量的增加,面条的吸水率也随之增加,当食盐添加比例为 1% 时,吸水率最高,再继续增加食盐的添加比例,面条的吸水率呈下降趋势。这与本文中 NaCl 处理组变化趋势一致,但在本实验中当 NaCl 添加量为 0.8% 时,面条吸水率最大。Li 等[30]发现氯化钠增加了面条的蒸煮损失。这与本文中 KCl 处理组结果一致,与 NaCl 处理组结果相反。Luo 等[31]研究发现,加入适量食盐后,鲜面条的微观结构比较紧密,蒸煮后面条表面更加光滑。

这与本文中扫面电镜结果一致，当添加了 KCl 和酪蛋白酸钠以后，由 SEM 图得出面条结构更加紧实、表面更加光滑。

4　结论

文章采用盐及酪蛋白酸钠对藜麦面团及面条品质影响研究，通过流变学特性测定结果表明，KCl、NaCl 和酪蛋白酸钠的添加会改变藜麦面粉的黏度及结构恢复能力，当 NaCl 添加量为 0.6%、KCl 为 1.0%、酪蛋白酸钠为 1.5% 可以显著（$P<0.05$）增强藜麦粉的黏弹性。TPA 质构分析中，1.2% KCl 组和 0.8% NaCl 组的弹性和咀嚼性都比较强，而且粘性和硬度也处于中等，当酪蛋白酸钠的添加量达到 2.0% 时，藜麦面团的弹性、硬度、咀嚼性均达到最大。在藜麦面条中添加 NaCl 和酪蛋白酸钠都可以明显的改善藜麦面条的蒸煮损失，且干物质损失率随 NaCl 和酪蛋白酸钠的添加量的增加而降低。经藜麦面条的扫描电镜和质构分析得出，酪蛋白酸钠和 KCl 的添加可以显著增加藜麦面条的硬度，从而增加其咀嚼性。

参考文献

［1］王晨静，赵习武，陆国权，等. 藜麦特性及开发利用研究进展[J]. 浙江农林大学学报，2014，31(2)：296−301.［WANG Chenjing, ZHAO Xiwu, LU Guoquan, et al. A review of characteristics and utilization of *Chenopodium quinoa*[J]. Journal of Zhejiang A&F University, 2014, 31(2): 296−301.］

［2］胡一晨，赵钢，秦培友，等. 藜麦活性成分研究进展[J]. 作物学报，2018，44(11)：1579−1591.［HU Yichen, ZHAO Gang, QIN Peiyou, et al. Research progress on bioactive components of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.)[J]. Acta Agronomica Sinica, 2018, 44(11): 1579−1591.］

［3］赵正涛，王秀菊. NaCl 对酪蛋白酸钠溶液流变学特性及结构变化的影响[J]. 乳业科学与技术，2013，36(5)：11−15.［ZHAO Zhengtao, WANG Xiuju. Influence of NaCl on rheological properties and structural change of sodium caseinate solution [J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2013, 36(5): 11−15.］

［4］彭媛媛，王昱圭，汤雪纤，等. 酸性条件下低酯果胶对酪蛋白酸钠流变特性及微观结构的影响[J]. 食品与发酵工业，2018，44(8)：127−134.［PENG Yuanyuan, WANG Yugui, TANG Xueqian, et al. Effects of low methoxyl pectin on rheological properties and microstructure of sodium caseinate in acidic conditions[J]. Food and Fermentation Industries, 2018, 44(8): 127−134.］

［5］华晓南. 酪蛋白酸钠预乳化对低饱和脂肪—蛋白质体系乳化凝胶特性的影响 [D]. 南京：南京农业大学，2012.［HUA Xiaonan. Effect of pre-emulsification on emulsifying and gelling properties of low-saturated fat-protein system [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012.］

［6］BONNAND-DUCASSE M, VALLE G D, LEFEBVRE J, et al. Effect of wheat dietary fibres on bread dough development and rheological properties[J]. Journal of Cereal Science, 2010, 52(2): 200−206.

［7］周宇英，唐伟强. 食品流变特性研究的进展[J]. 粮油加工与食品机械，2001(8)：7−9.［ZHOU Yuying, TANG Weiqiang. Study on process of food rheological properties[J]. Food Cereals and Oils Processing and Food Machine, 2001(8): 7−9.］

［8］高瑾，蔡敏. 菠萝风味戚风蛋糕的研制及质构分析[J]. 湖北工程学院学报，2018，38(6)：47−50.［GAO Jin, CAI Min. Preparation and texture analysis of pine apple flavored chiffon cake[J]. Journal of Hu Bei engineering University, 2018, 38(6): 47−50.］

［9］刘壮，张鹏辉，姚亚亚，等. 薏米全粉的添加对小麦粉加工品质的影响[J]. 食品科学，2018，39(20)：99−103.［LIU Zhuang, ZHANG Penghui, YAO Yaya, et al. Effect of coix seed flour on processing properties of wheat flour[J]. Food Science, 2018, 39(20): 99−103.］

［10］艾志录，聂文静，李真，等. 中国不同地区老酵头对馒头质构和感官品质的影响[J]. 食品安全质量检测学报，2018，9(6)：1427−1433.［AI Zhilu, NIE Wenjing, LI Zhen, et al. Effects of traditional starter culture from different regions of China on texture and sensory quality of steamed bread[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2018, 9(6): 1427−1433.］

［11］李萌，李锦旺，宋凤燕，等. 燕麦饼干的研制[J]. 粮食与油脂，2018，31(11)：55−58.［LI Meng, LI Jinwang, SONG Feng'an, et al. Development of oat biscuits[J]. Cereals & Oils, 2018, 31(11): 55−58.］

［12］钟雪婷，华苗苗，任元元，等. 马铃薯全粉对小麦面团及其馒头质构、品质影响的研究[J]. 食品与发酵科技，2018，54(5)：32−35.［ZHONG Xueting, HUA Miaomiao, REN Yuanyuan, et al. Effect of whole potato powder on sensory evaluation of chinese steamed bread (CSB) and textural properties of wheat dough and CSB[J]. Food and Fermentation Sciences & Technology, 2018, 54(5): 32−35.］

［13］张旭东，薛吉全，刘林三，等. 盐对不同直链含量玉米淀粉理化特性及流变学特性的影响[J]. 中国粮油学报，2016，31(11)：26−31.［ZHANG Xudong, XUE Jiquan, LIU Linsan, et al. Influences of salt on physicochemical and rheological properties of corn starch with different amylose contents[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2016, 31(11): 26−31.］

［14］蔡旭冉，顾正彪，洪雁，等. 盐对马铃薯淀粉及马铃薯淀粉-黄原胶复配体系特性的影响[J]. 食品科学，2012，33(9)：1−5.［CAI Xuran, GU Zhengbiao, HONG Yan, et al. Effect of different salts on properties of potato starch and potato starch/xanthan gum composite system[J]. Food Science, 2012, 33(9): 1−5.］

［15］张玉荣，崔晓兰，周显青，等. 蛀食性害虫生长繁殖对小麦馒头品质及质构特性的影响[J]. 粮食与饲料工业，2018(10)：11−16.［ZHANG Yurong, CUI Xiaolan, ZHOU Xianqing, et al. Effects of growth and reproduction of boring pest on the quality and texture characteristics of wheat steamed bread[J]. Cereal & Feed Industry, 2018(10): 11−16.］

［16］何兴芬，杨富民，马蓉，等. 超声波处理对脱脂牛乳流变学特性的影响[J]. 包装与食品机械，2018，36(6)：1−6.［HE Xingfen, YANG Fumin, MA Rong, et al. Effects of ultrasonic treatment on rheological properties of skimmed milk[J]. Packaging and Food Machinery, 2018, 36(6): 1−6.］

［17］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 Kexue, ZHAO Shufan, ZHU Hongying, et al. Rheological properties of

polysaccharide isolated from Ilex kudingcha C. J. Tseng[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(22): 61−65.]
[18] 沈耀衡. 马铃薯面条的工艺研究 [D]. 郑州: 河南工业大学, 2017. [SHEN Yaoheng. Studies on preparation process of potato noodles [D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2017.]
[19] 栗丽萍, 王寿东. 谷朊粉对高含量荞麦面条品质的影响[J]. 农业机械, 2011(8): 67−69. [SU Liping, WANG Shoudong. Effect of wheat gluten on quality of high content buckwheat noodles [J]. Farm Machinery, 2011(8): 67−69.]
[20] 赵保堂, 蔡苗苗, 刘京, 等. 沙枣花精油微胶囊制备工艺优化及缓释性能 [J]. 食品工业科技, 2018, 39(15): 158−164. [ZHAO Baotang, CAI Miaomiao, LIU Jing, et al. Optimization of microencapsulation preparation process and controlled-release properties of *Elaeagnus angustifolia* flowers essential oil[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(15): 158−164.]
[21] 张文杰. 藜麦全粉与淀粉的理化性质与结构研究及应用 [D]. 郑州: 郑州轻工业学院, 2016. [ZHANG WenJie. Physicochemical property and structure study and application of quinoa flour and starch [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University of Light Industry, 2016.]
[22] 申倩, 陆启玉. 盐、碱的添加对面条品质的影响[J]. 粮食与油脂, 2017, 30(3): 31−32. [SHEN Qian, LU Qiyu. Effect of salt and alkali on quality of noodle[J]. Cereals & Oils, 2017, 30(3): 31−32.]
[23] 张凤婕, 任妍妍, 张天语, 等. 不同改良剂对高马铃薯全粉含量面团流变学特性的影响[J]. 食品工业科技, 2019, 40(11): 23−27. [ZHANG Fengjie, REN Yanyan, ZHANG Tianyu, et al. Effect of different modifiers on rheological properties of high contents potato whole flour[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(11): 23−27.]
[24] 陶虹伶, 王丹, 马宁, 等. 松茸粉对面团流变特性及饼干品质的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(5): 51−56. [TAO Hongling, WANG Dan, MA Ning, et al. Effect of *Tricholoma matsutake* powder on rheological properties of dough and quality characteristics of biscuits[J]. Packaging and Food Science, 2019, 40(5): 51−56.]
[25] 万金虎, 陈晓明, 徐学明, 等. 四种常见亲水胶体对面团特性的影响研究 [J]. 中国粮油学报, 2009, 24(11): 22−25,90. [WANG Jinghu, CHEN Xiaoming, XU Xueming, et al. Effects of four common hydrophilic colloids on dough properties[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils, 2009, 24(11): 22−25,90.]
[26] 陈海华, 许时婴, 王璋, 等. 亚麻籽胶对面团流变性质的影响及其在面条加工中的应用 [J]. 农业工程学报, 2006(4): 166−169. [Chen Haihua, Xu Shiying, Wang Zhang, et al. Effect of flaxseed gum on the rheology of dough and its application to noodle processing[J]. Transactions of the CSAE, 2006(4): 166−169.]
[27] 陈霞, 王文琪, 朱在勤, 等. 食盐对面粉糊化特性及面条品质的影响[J]. 食品工业科技, 2015, 36(2): 98−101. [CHEN Xia, WANG Wenqi, ZHU Zaiqin, et al. Effect of salt on the gelatinization properties of flour and noodle quality[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(2): 98−101.]
[28] 陈洁, 汪磊, 吕莹果, 等. 食盐对烩面面团品质和面筋网络结构的影响[J]. 中国粮油学报, 2017, 32(4): 24−30. [CHENG Jie, WANG Lei, LU Yingguo, et al. Effects of salt on stewed noodles dough quality and gluten matrix microstructure[J]. Packaging and Food Machinery, 2017, 32(4): 24−30.]
[29] 吴洋. 几种添加物对全麦湿面蒸煮品质和感官品质的影响[J]. 粮油食品科技, 2016, 24(3): 39−44. [WU Yang. Effect of additives on cooking quality and sensory quality of whole-wheat flour noodle[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2016, 24(3): 39−44.]
[30] LI M, SUN Q J, HAN C W, et al. Comparative study of the quality characteristics of fresh noodles with regular salt and alkali and the underlying mechanisms[J]. Food Chemistry, 2017, 246(25): 335−342.
[31] LUO L J, GUO X N, ZHU K X. Effect of steaming on the quality characteristics of frozen cooked noodles[J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 62(2): 1134−1140.

李颖慧, 徐枫钦, 刘冠闻, 等. 核桃浆对鼠李糖乳杆菌培养特性及其富硒后抗缺氧活性的影响 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 127−137. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100162

LI Yinghui, XU Fengqin, LIU Guanwen, et al. Effects of Walnut Pulp on the Cultivation Characteristics and Anti-hypoxia Potential of *Lactobacillus rhamnosus* Enriched with Selenium[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 127−137. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100162

· 生物工程 ·

核桃浆对鼠李糖乳杆菌培养特性及其富硒后抗缺氧活性的影响

李颖慧[1], 徐枫钦[1,+], 刘冠闻[1], 曲文娟[2], 马海乐[2], Aniqa ZIA[1], 师俊玲[1,*]

（1.西北工业大学生命学院, 陕西西安 710072;
2.江苏大学食品物理加工研究院, 江苏镇江 212013）

摘　要: 为考察以核桃浆为原料开发廉价、高效的鼠李糖乳杆菌培养体系的可行性，本文用核桃浆代替 MRS 培养基中氮源，研究了核桃浆的颗粒度、料液比、用量、脱脂处理以及摇床转速对鼠李糖乳杆菌的生长、发酵液抗菌活性和抗氧化活性的影响，并用所得菌体经富硒处理后饲喂小鼠 3 d，监测小鼠在暴露于低压缺氧条件下（海拔 5000 m）6 h 后的血细胞和血红蛋白含量，评价其抗缺氧潜力。结果发现，采用料液比为 1∶10 (g/mL)，经 120 目筛网过滤的去脂核桃浆完全替代 MRS 培养基中氮源（牛肉膏、蛋白胨），可使培养基成本降低 70%，使菌体产量提高 2.5 倍（从 2.6×10^9 至 7.6×10^9 CFU/mL），但不影响发酵液的抗菌活性和抗氧化活性（$P>0.05$）。连续口服富硒菌体 3 d，可显著提高小鼠在低压缺氧条件下的血红蛋白含量（$P<0.05$），优于 MRS 培养基所得菌体。综上，用核桃浆能够完全代替 MRS 培养基中氮源用于培养鼠李糖乳杆菌，并能有效提高菌体产量和活性。

关键词: 鼠李糖乳杆菌, 富硒菌, 核桃, 氮源, 液体培养
中图分类号: TS255.1　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0127−11
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100162
本文网刊:

Effects of Walnut Pulp on the Cultivation Characteristics and Anti-hypoxia Potential of *Lactobacillus rhamnosus* Enriched with Selenium

LI Yinghui[1], XU Fengqin[1,+], LIU Guanwen[1], QU Wenjuan[2], MA Haile[2], Aniqa ZIA[1], SHI Junling[1,*]

（1.School of Life Sciences, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China;
2.Institute of Food Physical Processing, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China）

Abstract: In order to develop a cheap and efficient culture system of *Lactobacillus rhamnosus*, walnut pulp was used to replace the nitrogen source in MRS medium. Taking cell growth as the indicator, the cultivation system was optimized in aspects of walnut pulp particle size, solid-liquid ratio, dosage, lipid removing treatment, and the shaking speed during the cultivation of *Lactobacillus rhamnosus*. The antibacterial activity and antioxidant activity of cell-free culture supernatant were also tested in all conditions. The obtained cells were also subjected to selenium enrichment treatment and then fed to mice for 3 d before they were exposed to simulated low-pressure hypoxia condition (altitude 5000 m) for 6 h to evaluate their anti-hypoxia potential. As results, complete replacement of the nitrogen source (beef extract and peptone) of MRS medium with the lipid-free walnut pulp filtered by 120 mesh screen at the solid-liquid ratio of 1∶10 (g/mL) could reduce the cost of MRS medium by 70% and increase the cell yield by 2.5 times (from 2.6×10^9 to 7.6×10^9 CFU/mL), but did not affect the antibacterial activity and antioxidant activity of the fermentation broth ($P>0.05$). Continuous oral administration of selenium enriched bacteria for 3 days could significantly increase the hemoglobin content of mice when they were exposed

收稿日期: 2021−10−18　　+并列第一作者
基金项目: 国家重点研发计划政府间国际科技创新合作重点专项（2017YFE0105300）。
作者简介: 李颖慧（1999−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: 173403506@qq.com。
徐枫钦（1998−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: 1284927697@qq.com。
*** 通信作者:** 师俊玲（1972−）, 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: sjlshi2004@nwpu.edu.cn。

to low-pressure hypoxia for 6 h (P<0.05), showing better effects than that cultivated in MRS medium. In conclusion, walnut pulp could be used to replace the nitrogen source in MRS medium for the culture of *Lactobacillus rhamnosus*, and effectively improve the cell growth and activity.

Key words: *Lactobacillus rhamnosus*; selenium-enriched bacterial cells; walnut; nitrogen resource; liquid cultivation

鼠李糖乳杆菌是国内外批准可用于婴幼儿食品的少数益生菌之一，并且具有降血脂、提高免疫、治疗多重耐药菌感染所致腹泻、肠炎，降解呕吐毒素等多种生理功效[1−4]，应用前景好，市场需求量大。大规模、低成本地培养该菌是对其进行工业化生产和产业化应用的前提。乳酸菌肉汤培养基（MRS）是用于培养该菌的主要培养基，其中所用氮源主要是牛肉膏和蛋白胨[5]，原料成本高。

为降低乳酸菌的培养基成本，国内外学者进行了大量尝试。丛美楠[6] 通过优化培养基配方，将保加利亚乳杆菌的培养基成本降低了 4000 元/吨；曹炎[7] 开发了以玉米面为主要成分的廉价培养基，使乳酸菌的培养基成本降低了 86%；邓楚津等[8] 用罗非鱼下脚料水解液代酵母膏，作为乳酸菌发酵产 L-乳酸的氮源；Michalczyk 等[9] 用廉价的豌豆种子水解液作为左旋芽孢乳杆菌培养过程中的可代替氮源，提高了 D 乳酸的生物合成量；Polak-berecka 等[10] 通过优化培养基组成，不仅提高了鼠李糖乳杆菌的生物量，还使培养基成本降低了 25%。本课题组开发了用玉米淀粉加工业的废弃物——玉米浆为碳源的鼠李糖乳杆菌的培养体系，在降低该菌培养成本的同时，有效地提高了菌体活性与产量[11]。考虑到核桃富含蛋白质，具备作为乳酸菌氮源的可能性；同时核桃中含有生育酚、植物甾醇和黄酮类化合物等活性物质[12−14]，可能会有利于鼠李糖乳杆菌的活性功能的提升，本文拟探讨用核桃浆代替 MRS 培养基中氮源，进一步降低培养基成本的可能性。

此外，鉴于核桃浆具有抗氧化活性，鼠李乳杆菌具有抗菌活性，以及课题组前期发现鼠李乳杆菌能够提高小鼠在低压缺氧环境下的血红蛋白水平，推测其有抗缺氧能力。根据已有报道，很多具有抗氧化活性的活性成分、益生菌，以及富硒益生菌（如富硒干酪乳杆菌）都有一定的抗缺氧能力[15−16]。近年来，一些研究指出，富硒处理能够有效提高微生物的抗氧化活性[17−19]。据程远之[17] 报道，富硒处理能够显著提高芽孢杆菌对四种自由基的清除能力，以及对肠上皮细胞的抗氧化能力；Liu 等[18] 发现，富硒处理提高了酵母对氧化胁迫下的仔猪免疫功能和抗氧化能力；Hamid 等[19] 发现，将富硒酵母和阿拉伯胶联用，能够进一步减轻四氯化碳中毒大鼠的氧化性肝损伤。由此推测，富硒处理可能会进一步加强鼠李糖乳杆菌的抗氧化活性，进而提高其抗缺氧能力。另外，根据徐颖等[20] 研究报道，通过优化生产工艺，可以有效提高鼠李糖乳杆菌的富硒量和富硒率。综合现有报道推测，使用本身就具有一定抗氧化活性的核桃浆代替 MRS 培养中氮源，可能会进一步提高鼠李糖乳杆菌的抗氧化活性和抗缺氧能力。

为了验证上述假设，本文较为系统地考察了用不同浓度、颗粒度、用量的核桃浆代替 MRS 培养中氮源，以及核桃浆中脂肪的去除与否和摇床转速对鼠李糖乳杆菌的菌体产量、发酵液抗菌活性和抗氧化活性的影响，优化得到了提高鼠李糖乳杆菌产量的最佳条件，可为该菌的高效、低成本培养提供参考与借鉴；并且对比分析了用核桃浆培养的鼠李糖乳杆菌及其在富硒前后对小鼠暴露于低压缺氧环境（海拔 5000 m）6 h 后血红蛋白含量和血细胞含量的影响，评价了其抗缺氧潜力，可为其抗缺氧功能的开发利用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

鼠李糖乳杆菌 *Lactobacillus rhamnosus* SHA113 由本实验室前期从健康母乳中分离所得，目前保存于武汉典型微生物研究所，菌种编号为 CCTCCM 2017839[21]；大肠杆菌 *Escherichia coli* ATCC 25922（*E. coli* ATCC 25922）、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* ATCC 29213（*S. aureus* ATCC 29213）、沙门氏菌 *Salmonella typhimurium* ATCC 50551（*S. typhimurium* ATCC 50551） 用作抗菌活性评价的指示病原菌；核桃果实 市售干燥的混合核桃品种，陕西省西安市农贸市场；蛋白胨、牛肉膏、Luria-Bertani（LB）培养基、乳酸菌肉汤培养基（MRS 培养基） 北京奥博星生物科技有限责任公司；酵母提取物 英国 Oxoid；磷酸氢二钾、葡萄糖、硫酸镁、硫酸锰 均为分析纯，天津市科密欧化学试剂有限公司；柠檬酸氢二铵、乙酸钠、吐温-80、氢氧化钠、亚硒酸钠 均为分析纯，国药集团化学试剂有限公司；琼脂粉 北京索莱宝生物科技有限公司；脱脂奶粉 内蒙古伊利事业集团股份有限公司；120、150、180 目筛网 绍兴市上虞区宇鼎标准筛具厂；SPF 级昆明（KM）种小鼠 72 只，雄性，4 周龄，体质量 18~22 g，购自西安交通大学实验动物中心，动物许可号：SCXK（陕）2018-001，在进入低压氧舱前，于动物室内标准条件下饲养，自由饮水和采食标准小鼠饲料。

MLS-3781 高压蒸汽灭菌锅 日本三洋集团；SW-CJ-1C 无菌超净工作台、HS-200 破壁机 中山市海尚电器有限公司；BB15 细菌培养箱 赛默飞世尔科技有限公司；PB-10/C pH 计、BL610 精密天平 德国 Sartorius 公司；Synergy HT 多功能酶标仪 美国伯腾仪器；C165048 高速离心机 美国 BD 公司；TF-FD-27 真空冷冻干燥机 上海田枫实业有限

公司；FLYDWC50-II 低压低氧动物实验舱　贵州风雷航空军械有限责任公司。

1.2　实验方法

1.2.1　菌株培养

1.2.1.1　鼠李糖乳杆菌的活化与培养　取出保存于−80 ℃ 的 *L. rhamnosus* SHA113(CCTCCM2017839，保存于中国典型培养物保藏中心)，用 MRS 固体培养基，在 37 ℃ 下平板倒置培养 48 h，挑取形成的单菌落接种于 5 mL MRS 肉汤培养基中，于 37 ℃ 恒温培养箱中静置，维持低溶氧条件，培养 48 h；待菌体浓度达到 10^9 CFU/mL(根据平板计数法检测结果与 $OD_{600\ nm}$ 的吸光度间的标准曲线，由 OD 值进行推算而得)，停止培养。

1.2.1.2　病原菌的活化与培养　取出保存于−80 ℃ 的 *E. coli* ATCC 25922、*S. aureus* ATCC 29213 和 *S. typhimurium* ATCC 50551，用 LB 固体培养基中，在 37 ℃ 下培养 24 h，挑取形成的单菌落接种于 5 mL LB 肉汤培养基中于 37 ℃、200 r/min 条件下培养 24 h，使菌体浓度达到 10^9 CFU/mL(根据平板计数法检测结果与 $OD_{600\ nm}$ 的吸光度间的标准曲线，由 OD 值进行推算而得)，停止培养。

1.2.1.3　发酵上清液的收集　取培养至 10^9 CFU/mL 的鼠李糖乳杆菌的发酵培养物，经 4 ℃、8000 r/min 离心 10 min，收集发酵上清液，备用。

1.2.1.4　菌悬液的制备　取上述培养至 10^9 CFU/mL 的鼠李糖乳杆菌的发酵培养物，经 4 ℃、8000 r/min 离心 10 min，收集菌体沉淀，用生理盐水洗涤三次后，重新用生理盐水悬浮至其浓度为 1×10^9 CFU/mL。

1.2.2　核桃浆的制备　取核桃仁适量，在 8 g/L 的 NaOH 溶液中煮沸 3 min，得到脱皮核桃仁，用清水清洗后，根据实验设计，加入不同量的水置于食物料理机中打浆，经设定目数的筛网过滤，得核桃浆备用。

1.2.3　核桃浆对鼠李菌乳杆菌培养特性的影响　改变培养基中核桃浆的不同参数，培养基用量均为 100 mL(250 mL 三角瓶)，灭菌后，按照 1% 的接种量接入上述制备好的鼠李糖乳杆菌培养物，然后在 37 ℃ 的条件下静置培养(除摇床转速的实验外)48 h 后，用平板计数法分析发酵物中菌体浓度，用 pH 计检测发酵液的最终 pH，用抑菌圈法检测发酵液的抑菌活性。以活菌数、发酵液 pH 和抑菌圈大小为评价指标，探究不同因素对菌体生长量和生物活性的影响，考察不同因素影响时所设条件如下。

1.2.3.1　核桃浆料液比的影响　制备核桃浆的过程中，控制核桃仁与加水量的比例分别为 1∶5、1∶7、1∶10 g/mL，打浆后，按照 20% 体积比例加入 MRS 完全培养基中，灭菌后接种鼠李糖乳杆菌，静置培养。

1.2.3.2　核桃浆颗粒度的影响　固定核桃浆的料液比 1∶10 (g/mL)，分别过 120、150 和 180 目筛网的核桃浆，按照 20% 体积比例加入去除氮源(牛肉膏、蛋白胨)的 MRS 培养基中，灭菌后接种鼠李糖乳杆菌，静置培养。

1.2.3.3　核桃浆用量的影响　固定核桃浆的料液比 1∶10 (g/mL)，过 120 目筛，用核桃浆分别替代 MRS 中 100%、80%、40% 氮源(牛肉膏、蛋白胨)，按照 20% 体积比例加入 MRS 培养基中，灭菌后接种鼠李糖乳杆菌，静置培养。

1.2.3.4　核桃浆去脂的影响　根据优化结果，按照料液比 1∶10 (g/mL)、过 120 目筛、完全替代 MRS 培养基氮源的方法制备核桃培养基，灭菌处理后，在无菌操作条件下，弃去上层脂肪，以不去除脂肪的培养基为对照，接种后静置培养。

1.2.3.5　摇床转速的影响　在上述 MRS 培养基，去脂和不去脂培养实验设计中，分别采用静置培养和在 100 r/min 转速下进行轻微供氧的方式下进行培养，考察是否供氧对菌体生长量和生物活性的影响。

1.2.4　鼠李糖乳杆菌的活菌数分析　菌体培养结束后，摇匀后吸取 100 μL 培养物，分别稀释 10^{-2}、10^{-4}、10^{-5}、10^{-6} 后，用涂布法接种于 MRS 固体平板中，经 37 ℃ 静置培养 48 h 后，统计合格稀释度下的平板菌落后，计算培养物中菌体浓度[11]。

1.2.5　pH 测定　采用 pH 计进行测定，每组样品测量三次。

1.2.6　抑菌活性分析　采用抑菌圈法进行检测，以 *E. coli* ATCC 25922、*S. aureus* ATCC 29213 和 *S. typhimurium* ATCC 50551 为指示菌株[22]。准确吸取 100 μL 浓度为 1×10^6 CFU/mL 的指示菌株，涂布于 LB 固体培养基中，再吸取 100 μL 浓度为 1×10^9 CFU/mL 的鼠李糖乳杆菌发酵液上清，置于孔径为 6 mm 的孔中，在 37 ℃ 静置培养 10 h 后，测量抑菌圈直径(mm)，分析其抑菌活性。

1.2.7　抗氧化活性分析　取培养后的鼠李糖乳杆菌培养物，在 8000 r/min 离心 5 min，取上清液备用。参考文献 [23]，用 DPPH 自由基清除能力评价上清液的抗氧化活性。实现时，准确称取 8 mg DPPH，加入无水乙醇，定容至 100 mL，避光放置，现配现用。取 100 μL 所得发酵液上清与 100 μL 乙醇 DPPH 溶液混合，对照为 100 μL 乙醇与 100 μL 乙醇 DPPH 溶液的混合物，置于 96 孔板中室温黑暗孵育 30 min 后，检测其在 517 nm 处吸光度，按照公式(1)计算 DPPH 自由基的清除率：

$$清除率(\%)=\left[\frac{1-(A_i-A_j)}{A_c}\right]\times100 \qquad 式(1)$$

式中：A_c 表示 100 μL 无水乙醇+100 μL DPPH 在 517 nm 处吸光度值；A_i 表示 100 μL 待测样品+100 μL DPPH 在 517 nm 处吸光度值；A_j 表示 100 μL 待测样品+100 μL 无水乙醇在 517 nm 处吸光度值。

1.2.8　可溶性蛋白质含量测定　采用考马斯亮蓝法[24]进行测定。配制 0.5 mg/mL 的 BSA 蛋白质标准液。

检测时，分别移取标准液 0、1、2、4、8、12、16、20 μL，不足 20 μL 体系中用 PBS 补足至 20 μL。每孔加入 200 μL 考马斯亮蓝 G250，室温放置 5 min 后，于 595 nm 波长处测定反应体系的吸光度值（A）。以浓度（C）为横坐标，得到标准曲线的回归方程为 A=0.0587c+0.3138，决定系数 R^2=0.9608。将待测液释至合适浓度，按上述步骤加入考马斯亮蓝，于 595 nm 处测定吸光度值，根据标准曲线计算可溶性蛋白含量。

1.2.9 总糖含量的测定 采用苯酚-硫酸法[25]测定总糖含量。配制 0.02 mg/mL 的葡萄糖标准溶液。检测时，分别移取浓度为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1 mL 的标准液于试管中，不足 1 mL 的反应体系中，用水溶液补至 1 mL。先加入 5% 苯酚溶液 1 mL，摇匀；再加入浓硫酸 5 mL，摇匀。反应 10 min 后，以水作参比液调零，于 490 nm 波长处测定吸光度值（A）。以浓度（C）为横坐标，得到标准曲线的回归方程为 A=5.254c+0.1252，决定系数 R^2=0.9945。取待测液 1 mL 于试管中，按上述步骤加入苯酚和浓硫酸，于 490 nm 处测定吸光度值，根据标准曲线计算总糖含量。

1.2.10 富硒鼠李糖乳杆菌的制备 将 MRS 培养 36 h 的菌体发酵液，以及用核桃浆完全替代 MRS 中氮源培养 36 h 的菌体发酵液，按照终浓度为 3 mmol/L 加入一定量的 100 mmol/L 亚硒酸钠母液，在 37 ℃ 下继续静置培养 24 h，再将整个培养物在 8000 r/min 下离心 10 min，取沉淀部分用无菌水清洗三次后，得到富硒鼠李糖乳杆菌。按照来自每 100 mL 发酵液的菌体量混合 1 g 奶粉的剂量加入脱脂奶粉作为保护剂，经真空冷冻干燥 24 h 后，得富硒鼠李糖乳杆菌制剂。按照每 300 g 小鼠普通饲料中加入 6 g 菌剂的比例，制备成小鼠饲料；在普通饲料中加入与菌剂中奶粉和核桃剂量相同的奶粉或核桃，作为对照饲料。所有饲料在 4 ℃ 下贮存，并在一周内用完。

菌体中硒含量的测定：参考 GB 5009.93-2017《食品安全国家标准 食品中硒的测定》的第一法氢化物原子荧光光谱法测定[26]。

1.2.11 富硒菌的模拟胃肠液活性分析 模拟胃肠液的配置：根据中国药典中配置人工胃液、人工肠液所示方法。

将在 MRS 培养基中培养的菌体和富硒菌，以及在核桃浆培养基中培养的普通菌和富硒菌的菌悬液加入到模拟胃肠液中，测定经过模拟胃肠液消化后各组体外的抗氧化活性的变化。将 1 mL 菌悬液加至 9 mL 模拟胃液中，混合均匀，于 37 ℃ 条件下孵育 4 h。然后将 1 mL 孵育后的菌液和模拟胃液的混合溶液，加入到 9 mL 模拟肠液中，混合均匀，于 37 ℃ 条件下孵育 4 h[27]。然后按照 1.2.7 中的方法测定经过模拟胃肠液消化后菌悬液的 DPPH 自由基清除率。

1.2.12 小鼠抗缺氧实验 试验动物分组：实验共采用 72 只雄性昆明小鼠。对小鼠进行为期 7 d 的预养，自由饮食，不做任何处理，使小鼠适应饲养环境。随后随机分成 6 个处理组，每组 12 只，其中 6 只置于常规环境，6 只置于低压氧舱（海拔高度 5000 m）。各组间小鼠初始体重无统计学差异（P>0.05）。动物房饲养条件为，温度 20~25 ℃，相对湿度 40%~70%。

实验组小鼠：采用自由进食的方式，饲喂 3 d。饲喂普通饲料（CK 组），饲喂仅添加奶粉的饲料（M 组）、仅添加核桃的饲料（W 组）、添加 MRS 培养基所得鼠李糖乳杆菌的饲料（L 组）、添加用 MRS 培养基所得菌体制备的富硒菌饲料（SL 组），以及用含核桃浆培养基所得菌体的富硒菌饲料（SLW 组）。

抗缺氧实验：每组小鼠在进舱前，对 6 只暴露于常规环境的小鼠取血；另外 6 只经低压氧舱处理 6 h 后取血。

血液采取与检测：采用腹腔注射戊巴比妥钠（5 mg/100 g BW）的方法麻醉小鼠。5 min 后，通过眼球取血法采集小鼠血液（约 0.1 mL），置于 EDTA 抗凝管中，用血液学分析仪分析其中各种血细胞的绝对数量或百分比，主要包括血红蛋白（Hemoglobin Count, HGB）、平均血红蛋白浓度（Mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC）、红细胞数（Red Blood Cell Count, RBC）、白细胞数（White Blood Cell Count, WBC）、中性粒细胞（Neutrophils, NEUT）、淋巴细胞（Lymphocytes, LYMPH）。

1.3 数据处理

将所得实验数据，用 GraphPad Prism 8 绘制图形。使用 SPSS 25.0 分析不同组之间的统计差异。单因素实验组数据用 ANOVA 分析方法，双因素实验组数据用双向方差分析进行组间和组内分析，独立实验组数据用均值±SEM（均值标准误差）的 Tukey 法进行检验。分析各组数据在 P<0.05 水平上的差异显著性。指标检测设三个重复，小鼠实验每组 6 只。

2 结果与分析

2.1 核桃浆对鼠李糖乳杆菌生长特性的影响

2.1.1 核桃浆料液比的影响 如图 1 所示，随着核桃浆料液比的减小，鼠李糖乳杆菌的生长量不断增大，在制备核桃浆时所用料液比为 1∶10 g/mL 时达到最大值 3.3×10^9 CFU/mL，显著高于 MRS 培养基活菌数（P<0.05）。由此说明，核桃浆料液比过高时并不利于菌体的生长，这可能是因为核桃浆引入的过多脂肪和蛋白质不利于菌体的生长。为此，后续实验中均采用料液比为 1∶10 g/mL 的方法制备核桃浆，并在其基础上进一步优化培养基组成与培养条件。

2.1.2 核桃浆颗粒度的影响 控制所用核桃浆的过筛目数，可以改变其中的物质颗粒度。由图 2A 可以看出：当用核桃浆完全代替 MRS 培养基中的氮源（牛肉膏、蛋白胨）时，使用 120 目和 180 目核桃浆所得培养物中活菌数显著高于无核桃浆的 MRS 培养

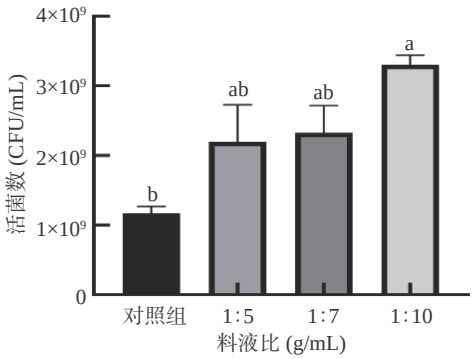


图 1　核桃浆的料液比对鼠李糖乳杆菌生长的影响

Fig.1　Effect of the solid to liquid ratio of walnut pulp on the cell growth of *Lactobacillus rhamnosus*

注：不同小写字母表示差异显著，$P<0.05$；图 2~图 4 同。

基（$P<0.05$）；并以用 120 目核桃浆培养系中的活菌数更高，可达 3.2×10^9 CFU/mL。图 2B 显示，不同目数的核桃浆对发酵液 pH 无显著影响（$P>0.05$），说明核桃浆的使用对菌体的产酸能力没有显著影响。图 2C~图 2E 显示，与对照组相比，不同目数核桃浆的加入也不影响鼠李糖乳杆菌发酵液上清对大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的抑菌活性。由此说明，核桃浆的使用也不会影响鼠李糖乳杆菌代谢产生抑菌活性物质的能力。考虑到菌体生长量较高，采用 120 目的核桃浆进行后续的培养条件优化。

2.1.3　核桃浆含量的影响　用核桃浆替代 MRS 培养中全部，或者部分蛋白胨、牛肉膏后，培养鼠李糖乳杆菌，所得结果如图 3 所示。从中可以看出，用核桃浆提供 MRS 培养基中 40% 和 80% 的氮源时，能显著提高培养物中菌体数量（图 3A），并显著降低发酵液的 pH（图 3B）（$P<0.05$），但对发酵液的抗氧化活性（图 3C）和抗菌活性（图 3D~图 3F）均无显著影响（$P>0.05$）。这说明，核桃浆的使用会提高菌体的产酸量，可能会有利于其对肠道菌群的调控作用。已有大量研究报道，鼠李糖乳杆菌可以著显增加小鼠粪便中短链脂肪酸含量。短链脂肪酸能够为结肠细胞提供能量并增强肠道屏障作用，调节肠腔内的 pH，参与宿主免疫调节等[28−29]。同时，鼠李糖乳杆菌也能够通过改变肠道菌群组成，如显著提高丙酸和丁酸产生菌丰度，提高肠道菌群的多样性[30]。此外，用核桃浆替代培养基中蛋白胨、牛肉膏，还能有效降低菌体的生产成本。

2.1.4　核桃浆中脂肪的影响　培养基中脂肪的存在通常会影响微生物的发酵过程。一方面，脂肪能够起到乳化作用，有利于消除有氧发酵过程所产气泡；另一方面，脂肪漂浮在发酵液上面，会阻隔氧气与菌体的接触。如图 4A 所示，去除核桃浆中脂肪，能够显著（$P<0.05$）提高发酵液中鼠李糖乳杆菌产量，可达 7.6×10^9 CFU/mL；同时，也有利于菌体产酸；但对发酵液的抗氧化活性和抗菌活性无显著影响（$P>0.05$）。此外，从图中还可以看出，控制摇床转速为 100 r/min 时有助于增加菌体产量，但对其产酸、抗氧化活性和抗菌活性无显著影响（$P>0.05$）。相对而言，适当的摇床转速对无脂肪核桃浆发酵体系中菌体数量的增加更为显著。这是因为，鼠李糖乳杆菌并非严格厌氧菌，一定量的溶解氧不会对其产生致死作用，但是由低转速提供的搅拌作用会有助于增加菌体与培养基

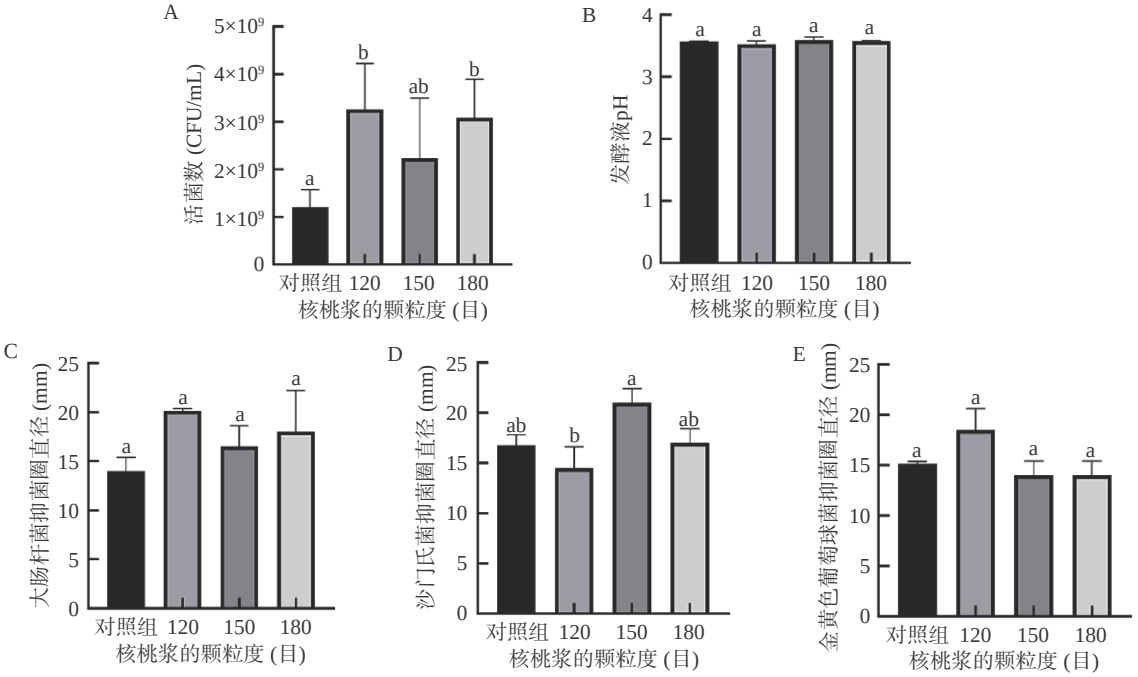


图 2　核桃浆颗粒度对鼠李糖乳杆菌生长和发酵液抑菌活性的影响

Fig.2　Effects of walnut pulp grain size on the cell growth of *Lactobacillus rhamnosus* and the antibacterial activity of cell-free fermentation liquid

注：A.培养物中活菌数；B.发酵液 pH；C~E 为发酵液上清对大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌的抑菌活性。

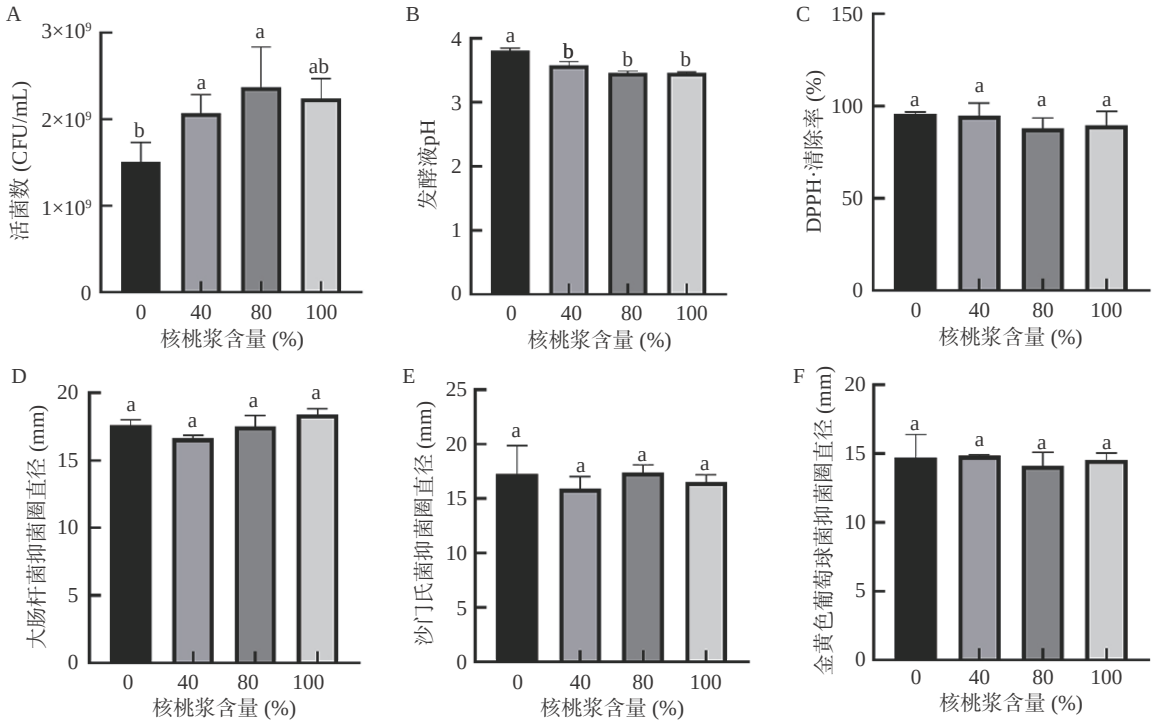


图 3 核桃浆含量对鼠李糖乳杆菌生长和发酵液活性的影响

Fig.3 Effects of walnut pulp content on the growth of *Lactobacillus rhamnosus* and the activity of liquid culture supernatant

注: A.培养物中活菌数; B.发酵液 pH; C~F 为发酵液上清的抗氧化活性及其对大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌的抑菌活性。

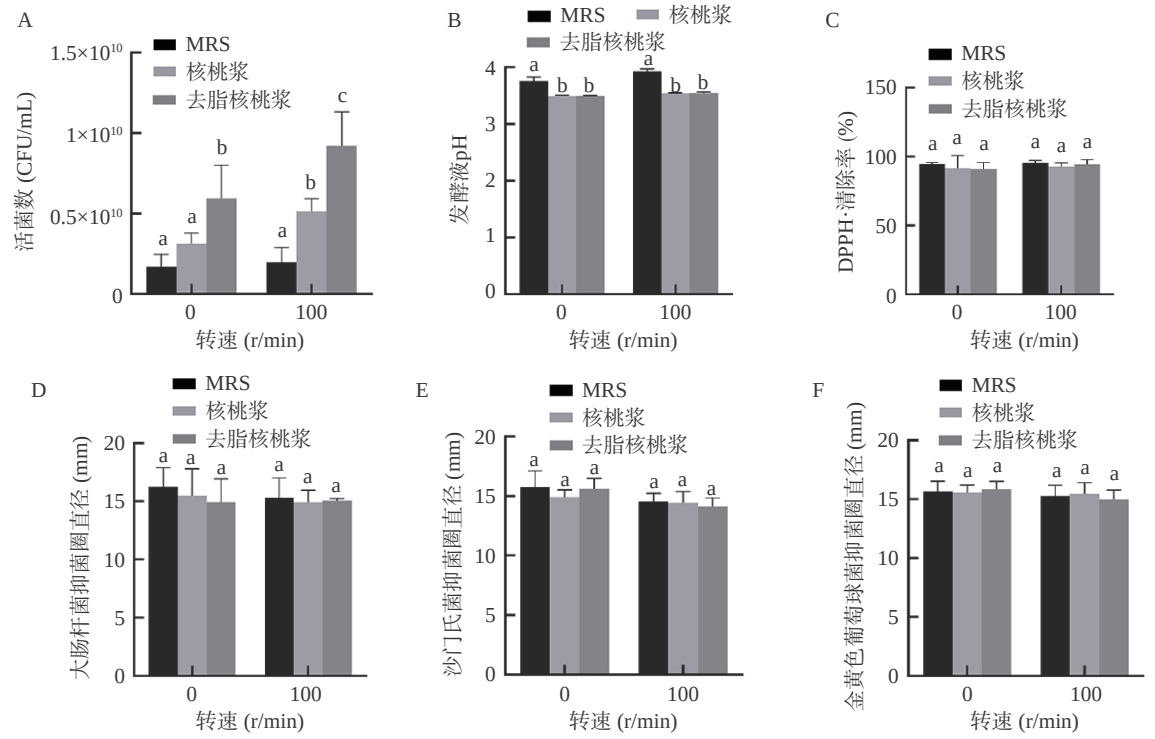


图 4 摇床转速和核桃浆的去脂处理对鼠李糖乳杆菌生长与特性的影响

Fig.4 Effects of shaking speed and fat removing treatment on the growth and characteristics of *Lactobacillus rhamnosus*

注: A.培养物中活菌数; B.发酵液 pH; C~G 为发酵液上清的抗氧化活性及其对大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌的抑菌活性。

中营养成分间的接触, 从而提高菌体对营养物质的利用率, 进而促进了菌体生长。

综上所述, 去除核桃浆中脂肪和适当调节摇床转速都有利于鼠李糖乳杆菌的菌体生长, 但不会对其产酸、抗氧化活性、抗菌活性等产生不利影响。因此, 采用去脂核桃浆完全代替 MRS 培养基中氮源来培养鼠李糖乳杆菌是可行的。

2.2 培养基中营养成分的利用情况

从本质上讲, 核桃浆之所以能够替代 MRS 培养中牛肉膏和蛋白胨之类的氮源, 甚至是促进了鼠李糖

乳杆菌的生长，是因为它提供了菌体生长所需要的营养成分。为此，本文测定了 MRS 培养基和优化后的核桃浆培养基中可溶性蛋白质含量和总糖含量在菌体前后的变化情况，结果如表 1 所示。从中可以看出，核桃浆培养基中可溶性蛋白质含量在菌体培养前为 0.4 mg/mL，是 MRS 培养基 2 倍多，但在菌体培养后低于 MRS 培养基，利用率可达 80%，而 MRS 培养基中蛋白质的利用率只有 33.3%。由此说明，鼠李糖乳杆菌可以有效利用核桃浆中的蛋白质，这也是其能够用于替代 MRS 培养基中氮源的主要原因。同时，与 MRS 培养基中原有氮源牛肉膏和蛋白胨相比，核桃浆的价格和成本要低很多。按照各物质机有的市场价计算，用核桃浆的成本是用牛肉膏和蛋白胨的 30%，仅此一项比 MRS 培养基的成本降低了 70%。

核桃浆培养和 MRS 培养中的总糖含量在菌体培养前后，均无显著性差异（P>0.05）。由此说明，核桃浆的使用并没有影响菌体对培养基中碳源的利用率。目前，也有用可食用植物和动物乳制品，如糙米乳[31]、大豆乳[32] 以及驼乳、牛乳[33] 等生产益生菌的一些研究。与 MRS 培养基相比，这些方法更适合用于食品领域。在节约成本的同时，这些天然动植物原料中的其它营养成分也可以进入益生菌的培养物，从而在功能活性方面起到多重复合效应。

2.3　核桃浆培养所得富硒菌体对模拟胃肠液的耐受性

有研究指出，乳酸菌能够将无机硒转化成有机硒，降低其毒性，使其更易于被吸收，同时提高菌体的抗氧化活性[34]。将核桃浆培养所得鼠李糖乳杆菌与无机硒进行共同孵育后，可得富硒菌体（图 5A、图 5B）。图 5C 显示，核桃浆培养所得富硒菌中的硒含量低于用 MRS 培养基所得菌体，但是其初始菌悬液的体外抗氧化活性显著高于后者（P<0.05）（图 5D），这可能是这是因为核桃浆本身就具有抗氧化性所致。所有菌体，无论是富硒还是原始菌在模拟胃肠液条件下的抗氧化活性无显著差异（P>0.05）（图 5D），说明富硒处理并不能增强菌体在模拟体内环境下的抗氧化活性。

用 MRS 培养基所得原始菌和富硒菌在模拟胃液中的抗氧化活性高于体外条件，但其在模拟肠液中的抗氧化活性低于体外条件，而且在肠液中的抗氧化活性远远低于模拟胃液条件。然而，核桃浆培养所得原始菌和富硒菌在模拟胃肠液条件下的抗氧化活性均低于体外条件，而且在模拟肠液中的活性更低。

总体而言，与 MRS 培养基所得菌体相比，核桃浆的使用能够显著提高菌体的体外抗氧化活性，但对其在模拟胃肠液条件下的抗氧化活性无显著影响（P>0.05）；与不富硒的菌体相比，富硒不能增强菌体在体外和模拟胃肠液条件下的抗氧化活性。这可能是因为没有对菌体进行破碎操作，菌体内的硒未能释放出来所致。就体外抗氧化活性而言，MRS 培养基所得菌体和富硒菌体在模拟胃液条件下的抗氧化活性有显著增大（P<0.05），说明所得菌体在该条件下会有所破损，从而导致菌体内抗氧化活性物质释放。然而，硒的抗氧化活性依然没有体现出优势。但是，与体外抗氧化活性相比，用核桃浆培养的菌体抗氧化活性在模拟胃液中的抗氧化活性均有所下降。这可能是因为模拟胃液条件下破坏了一些抗氧化活性物质所致[35−36]。

2.4　核桃浆培养基所得菌体的抗缺氧功能

根据优化结果，采用料液比 1∶10 g/mL，过 120 目筛的去脂核桃浆完全代替 MRS 培养基中氮源，通过静置培养法制备鼠李糖乳杆菌。经过富硒处理后，离心收集菌体，混合奶粉保护剂进行冻干，得到粉末状制剂，进一步制备成不同饲料，饲喂小鼠，可得不同条件下的血液指标如下。

血红蛋白是是维持血液和组织中足够 O_2 水平的重要蛋白。血红蛋白的水平增加说明机体携带的 O_2 量更多，能够提高机体在缺氧环境下的摄氧能力[37]。人参等复方中药功能液[38] 就是通过增加小鼠血液中的红细胞数量和血红蛋白含量，从而延长小鼠在高原缺氧条件下的存活时间，对心、脑功能具有一定的保护作用。一些抗缺氧药物也能通过提高血红蛋白水平来缓解缺氧损伤[39]。高原训练能够增加运动员的血红蛋白水平，提高了红细胞的携氧功能，从而维持高质量的运动[40]。

从图 6A 可以看出，小鼠在进入低压氧舱前，SLW 组的血红蛋白含量显著高于 L 组（P<0.05）。进舱后，SLW 组的血红蛋白含量也相对 CK、M、W 和 L 组有明显上升。对比进入低压氧舱前后的小鼠中血红蛋白含量可以看出，SLW 组的血红蛋白水平在进舱前后有显著差异，即在经过模拟高原缺氧环境胁迫后，进食核桃富硒菌的小鼠中血红蛋白含量显著升高（P<0.05），而其他组小鼠的血红蛋白在进舱前后无显著变化（P>0.05）。

同样，从图 6B~图 6C 可以看出，进食含有核桃

表 1　培养基中主要营养成分含量在菌体培养前后的变化

Table 1　Chang of nutrient contents in the medium before and after bacterial cultivation

培养基	可溶性蛋白质含量（mg/mL）		总糖含量（mg/mL）	
	菌体培养前	菌体培养后	菌体培养前	菌体培养后
MRS	0.18±0^{a}	0.12±0.01^{a}	2.51±0.07^{a}	1±0.01^{a}
核桃浆	0.4±0.1^{b}	0.08±0.04^{a}	2.26±0.01^{a}	1±0.04^{a}

注：同一列中的不同字母表示数据的t检验具有显著性差异（P<0.05）。

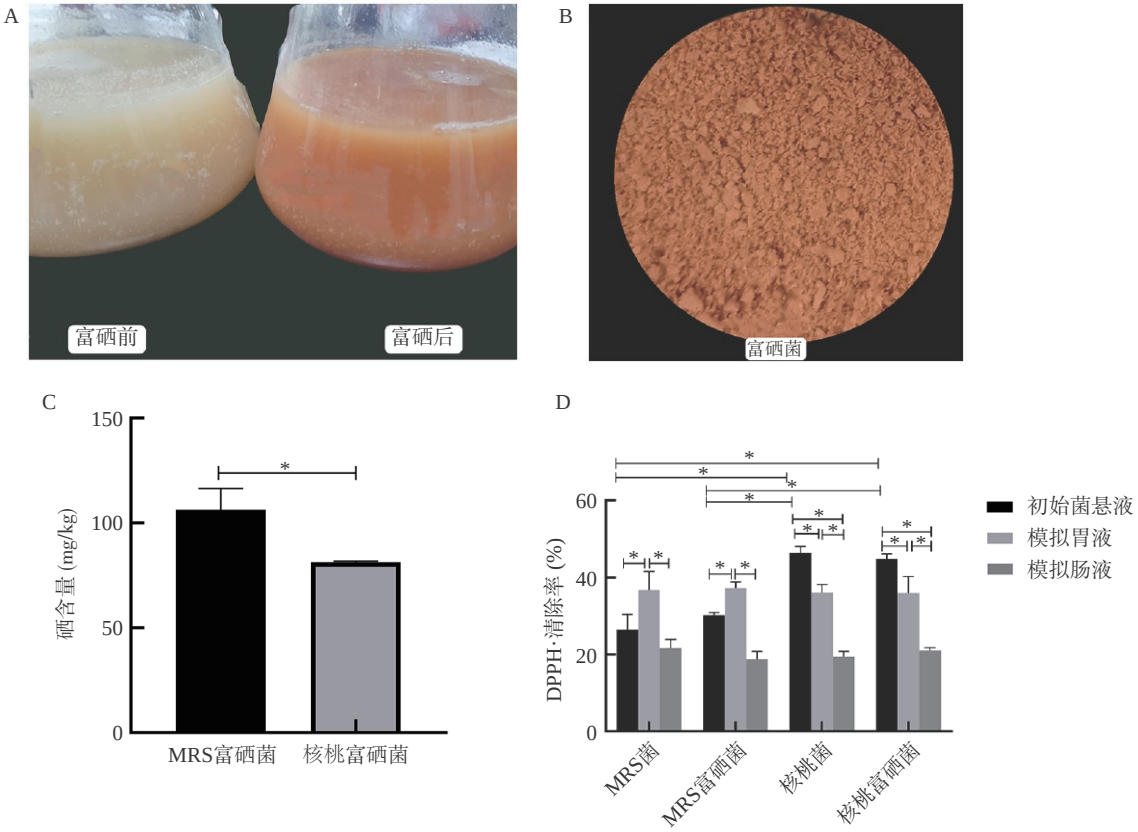


图 5　富硒处理对鼠李糖乳杆菌氧化活性的影响

Fig.5　Effects of selenium enrichment on the antioxidant capacity of *Lactobacillus rhamnosus* cells

注: A.菌体富硒过程中的状态变化; B.冻干富硒菌粉; C.富硒菌中的硒含量; D.不同培养条件所得菌悬液在不同条件下的抗氧化活性; MRS 菌: MRS 培养基所得菌体; MRS 富硒菌: MRS 培养基所得富硒菌; 核桃菌: 核桃浆培养基所得菌体; 核桃富硒菌: 核桃浆培养基所得富硒菌; *表示在 $P<0.05$ 水平上差异显著。

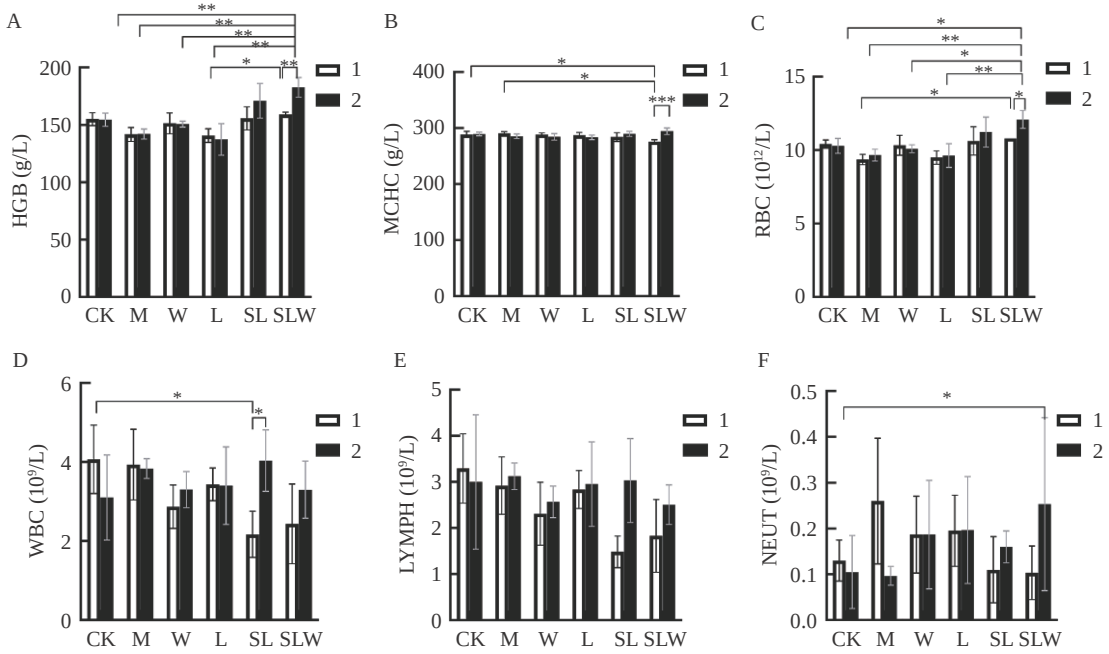


图 6　不同菌剂对小鼠血液指标的影响

Fig.6　Effects of different bacterials agents on blood indexes of mice

注: A.血红蛋白; B.平均血红蛋白浓度; C.红细胞数; D.白细胞数; E.淋巴细胞; F.中性粒细胞; 1 表示进低压氧舱前; 2 表示进低压氧舱后; 普通饲料(CK), 仅添加奶粉的饲料(M)、仅添加核桃的饲料(W)、添加 MRS 培养基所得鼠李糖乳杆菌的饲料(L)、添加用 MRS 培养基所得菌体制备的富硒菌饲料(SL)、含核桃浆培养基所得菌体的富硒菌饲料(SLW); *表示在 $P<0.05$ 水平上差异显著; **表示在 $P<0.01$ 水平上差异显著; ***表示在 $P<0.001$ 水平上差异显著。

富硒菌的饲料能够显著提升小鼠在进舱前后的平均血红蛋白浓度和红细胞数(P<0.05)。由此说明，用核桃浆培养的富硒鼠李糖乳杆菌能够显著提高小鼠在缺氧环境下的血红蛋白、平均血红蛋白浓度和红细胞水平，从而对小鼠适应缺氧环境起到积极作用。

白细胞、淋巴细胞和中性粒细胞的增高与细菌感染和体内炎症有关[41−42]。图 6D~图 6F 显示，与对照组相比，饲喂添加富硒菌饲料的小鼠在进舱前的白细胞和淋巴细胞均有显著降低(P<0.05)，进舱后各组无显著性差异(P>0.05)。这说明，进食添加富硒菌和核桃富硒菌不会对小鼠造成炎症反应。

综合上述结果分析可以看出，用核桃浆培养的富硒菌具有潜在的抗缺氧功效。它能够通过提高小鼠在缺氧环境下的血红蛋白水平，使机体适应低压低氧环境，而且不会对机体造成炎症损伤。

3　结论

本文研究证明，用核桃浆可以完全代替 MRS 培养中的牛肉膏和蛋白胨作为氮源，不仅不会影响鼠李乳杆菌发酵液的抑菌活性和抗氧化活性，而且能够提高培养后的菌体产量和产酸量，是一种经济、有效的益生菌培养方法。经过条件优化，可得有利于菌体生长的最优培养基制备条件为：按照料液比为 1∶10 g/mL 制备核桃浆，过 120 目筛网后，去除脂肪，用于替代 MRS 培养基中氮源，灭菌接种后，在 37 ℃ 静置培养 48 h 后，可使菌体产量增大 2 倍以上(从 2.6×10^9 CFU/mL 增加至 7.6×10^9 CFU/mL)。用核桃浆培养的菌体经富硒处理后，能够显著提高小鼠在低压缺氧环境下的血液中血红蛋白含量，而且不会引起炎症反应，表现出很好的抗缺氧能力。

本研究阐明了用核桃浆高效、低成本地培养高活性鼠李糖乳杆菌的可行性，揭示了其富硒处理后提高机体在低压缺氧条件下抗缺氧能力的潜力，为开发与制备新型抗缺氧微生态制剂提供了理论依据与参考。

参考文献

[1] QU Rui, JIANG Chunmei, WU Wanqin, et al. Conversion of DON to 3-epi-DON *in vitro* and toxicity reduction of DON *in vivo* by *Lactobacillus rhamnosus*[J]. Food & Function, 2019, 10(5): 2785−2796.

[2] LI Na, PANG Bing, LI Junjun, et al. Mechanisms for *Lactobacillus rhamnosus* treatment of intestinal infection by drug-resistant *Escherichia coli*[J]. Food & Function, 2020, 11(5): 4428−4445.

[3] LI Na, PANG Bing, LIU Guanwen, et al. *Lactobacillus rhamnosus* from human breast milk shows therapeutic function against foodborne infection by multi-drug resistant *Escherichia coli* in mice[J]. Food & Function, 2020, 11(1): 435−477.

[4] LIU Guanwen, PANG Bing, LI Na, et al. Therapeutic effect of *Lactobacillus rhamnosus* SHA113 on intestinal infection by multi-drug-resistant *Staphylococcus aureus* and its underlying mechanisms[J]. Food & Function, 2020, 11(7): 6226−6239.

[5] 李晓军, 马跃英, 郭跃东, 等. 响应面法优化保加利亚乳杆菌发酵培养基的氮源[J]. 农产品加工, 2020, 4(22): 56−59. [LI X J, MA Y Y, GUO Y D, et al. Optimization of nitrogen sources for *Lactobacillus bulgaricus* fermentation medium by response surface methodology[J]. Farm Products Processing, 2020, 4(22): 56−59.]

[6] 丛美楠. 保加利亚乳杆菌的低成本培养、保藏及初步应用研究 [D]. 厦门: 集美大学, 2017. [CONG M N. Low-cost culture, preservation and preliminary study of *Lactobacillus bulgaricus*[D]. Xiamen: Jimei University, 2017.]

[7] 曹炎. 低成本乳酸菌培养基筛选及其发酵菌液对稻草发酵效果 [D]. 延边: 延边大学, 2012. [CAO Y. The selection of production *Lactobacillus* at low price and the effect of fermented straw[D]. Yanbian: Yanbian University, 2012.]

[8] 邓楚津, 赖丽芬, 曾少葵, 等. 乳酸菌利用罗非鱼下脚料水解液发酵 L-乳酸的探讨[J]. 南方水产科学, 2012, 8(1): 61−66. [DENG C J, LAI L F, ZENG S K, et al. Research on L-lactic acid fermentation for hydrolysate of tilapia wastes with *Lactobacillus*[J]. South China Fisheries Science, 2012, 8(1): 61−66.]

[9] MICHALCZYK A K, GARBACZEWSKA S, MORYTZ B, et al. Influence of nitrogen sources on D-lactic acid biosynthesis by *Sporolactobacillus laevolacticus* DSM 442 strain[J]. Fermentation-Basel, 2021, 7(2): 78.

[10] POLAK-BERECKA M, WASKO A, KORDOWSKA-WIATER M, et al. Application of response surface methodology to enhancement of biomass production by *Lactobacillus rhamnosus* E/N[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2011, 42(4): 1485−1494.

[11] WU Wanqin, PANG Bing, YANG Rongrong, et al. Improvement of the probiotic potential and yield of *Lactobacillus rhamnosus* cells using corn steep liquor[J]. LWT, 2020, 131: 109862.

[12] RAJA V, AHMADS I, IRSHADM, et al. Anticandidal activity of ethanolic root extract of *Juglans regia* (L.): Effect on growth, cell morphology, and key virulence factors[J]. Journal De Mycologie Medicale, 2017, 27(4): 476−486.

[13] ZHOU Hongxiang, LIU Yin, TIAN Yali, et al. Optimization of the enzymolysis technology of walnut protein by trypsin using response surface methodology[J]. Medicinal Plant, 2014(Z1): 19−23.

[14] 刘丹丹. 核桃蛋白的抗氧化与降血压活性评价及酶解必要性研究 [D]. 镇江: 江苏大学, 2020. [LIU D D. Antioxidant and antihypertensive activities evaluation and the enzymatic hydrolysisnecessity of walnut protein[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2020.]

[15] 杨家军, 黄克和, 赵治平, 等. 富硒益生菌对小鼠生长、抗氧化力和肠道菌群的影响[J]. 食品科学, 2009, 30(1): 242−245. [YANG J J, HUANG K H, ZHAO Z P, et al. Effects of selenium-enriched probiotics on growth performance, anti-oxidant status and resident intestinal flora in Kunming mice[J]. Food Science, 2009, 30(1): 242−245.]

[16] 许牡丹, 贺佳璇, 徐颖, 等. 七株富硒乳酸菌的功能特性评价及其抗氧化活性[J]. 陕西科技大学学报, 2020, 38(4): 31−37. [XU M D, HE J X, XU Y, et al. Evaluation of functional characteristics and antioxidant activity of seven strains of selenium-enriched lactic acid bacteria[J]. Journal of Shaanxi University of Science &

Technology, 2020, 38(4): 31−37.]
[17] 程远之. 富硒芽孢杆菌 SR14 的筛选、性状表征及其抗氧化功能与机制探究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2020. [CHENG Y Z. Screening, characterization, antioxidant function and mechanism of selenium-rich *Bacillus* SR14[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2020.]
[18] LIU Lei, CHEN Daiwen, YU Bing, et al. Influences of selenium-enriched yeast on growth performance, immune function, and antioxidant capacity in weaned pigs exposure to oxidative stress[J]. BioMed Research International, 2021, 2021: 5533210.
[19] HAMID M, ABDULRAHIM Y, LIU D D, et al. Selenium enriched yeast and gum arabic combination attenuate oxidative liver damage via suppression of oxidative stress, inhibition of caspase-3 and pro-inflammatory genes expression in carbon tetrachloride-intoxicated rats[J]. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 2021(26): 100267.
[20] 徐颖, 杨玉洁, 何成艳, 等. 盐胁迫鼠李糖乳杆菌富硒工艺研究 [J]. 陕西科技大学学报, 2020, 38(1): 58−63. [XU Y, YANG Y J, HE C Y, et al. Study on selenium enrichment process of *Lactobacillus rhamnosus* under salt stress[J]. Journal of Shaanxi University of Science & Technology, 2020, 38(1): 58−63.]
[21] RAJOKA M S R, MEHWISH H M, SIDDIQ M, et al. Identification, characterization, and probiotic potential of *Lactobacillus rhamnosus* isolated from human milk[J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 84: 271−280.
[22] TULUMOGLU S, YUKSEKDAG Z N, BEYATLI Y, et al. Probiotic properties of *Lactobacilli* species isolated from children's feces[J]. Anaerobe, 2013, 24: 36−42.
[23] CHOORUK A, PIWAT S, TEANPAISAN R. Antioxidant activity of various oral *Lactobacillus* strains[J]. Journal of Applied Microbiology, 2017, 123(1): 271−279.
[24] 陈庭木, 孙志广, 邢运高, 等. 水稻可消化蛋白质含量测定方法研究及资源筛选[J]. 作物杂志, 2020(1): 61−66. [CHEN T M, SUN Z G, XING Y G, et al. Determination of digestible protein content in rice and resource screening[J]. Crops, 2020(1): 61−66.]
[25] 蔡红梅, 田子玉. 苯酚-硫酸法测定草莓中总糖含量[J]. 吉林农业, 2019(4): 46. [CAI H M, TIAN Z Y. Determination of total sugar in strawberry by phenol-sulfuric acid method[J]. Agriculture of Jilin, 2019(4): 46.]
[26] 国家食品药品监督管理总局, 国家卫生和计划生育委员会. GB 5009.93-2017 食品安全国家标准 食品中硒的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2021. [State Food and Drug Administration, National Health and Family Planning Commission. GB 5009.93-2017 National food safety standard. Determination of selenium in food[S]. Beijing: China Standards Press, 2021.]
[27] 吴艳丽, 刘朋, 苏咏欣, 等. 嗜黏蛋白阿克曼氏菌 ATCC BAA-835 肠道益生作用的体外评价 [J/OL]. 食品与发酵工业: 1−10. https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.027445. [WU Y L, LIU P, SU Y X, et al. Evaluation of the intestinal probiotic effect of *Akkermansia muciniphila* ATCC BAA-835 *in vitro*[J/OL]. Food and Fermentation Industries: 1−10. https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.027445.]
[28] ZENG H, UMAR S, RUST B, et al. Secondary bile acids and short chain fatty acids in the colon: A focus on colonic microbiome, cell proliferation, inflammation, and cancer[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(5): 12−14.
[29] LIU Yuntao, LI Yiwen, KE Yu, et al. *In vitro* saliva-gastrointestinal digestion and fecal fermentation of *Oudemansiella radicata* polysaccharides reveal its digestion profile and effect on the modulation of the gut microbiota[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 251: 117041.
[30] 郑雨星, 朱慧越, 焦婷, 等. 鼠李糖乳杆菌 FZJTZ46L6 通过影响肠道内短链脂肪酸的水平缓解小鼠由葡聚糖硫酸钠导致的结肠炎[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(10): 44−52. [ZENG Y X, ZHU H Y, JIAO T, et al. *Lactobacillus rhamnosus* FZJTZ46L6 alleviates colitis induced by dextran sulfate sodium in mice through short-chain fatty acids regulation[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(10): 44−52.]
[31] 苏娜, 伊丽, 吉日木图. 鼠李糖乳杆菌 GG 发酵驼乳与牛乳的发酵特性和降糖活性比较[J]. 食品工业科技, 2019, 40(24): 14−19,27. [SU N, YI L, JI R M T. The comparison of fermentation characteristics and hypoglycemic activity of camel milk and cow milk fermented by *Lactobacillus rhamnosus* GG[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(24): 14−19,27.]
[32] 朱力杰, 方怡元, 陈妍婕, 等. 发芽糙米乳中双株复合乳酸菌的发酵特性研究 [J]. 食品工业科技, 2016, 37(22): 195−199,204. [ZHU L J, FANG Y Y, CHEN Y J, et al. Fermentation characteristics of two strains of complex lactic acid bacteria in germinated brown rice milk[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(22): 195−199,204.]
[33] 杨雪娇, 张予心, 宋秋梅, 等. 鼠李糖乳杆菌发酵大豆酸乳工艺优化研究 [J]. 食品工业科技, 2014, 35(22): 184−189. [ZHANG X J, ZHANG Y X, SONG Q M, et al. Optimization of soybean yoghurt fermentation by *Lactobacillus rhamnosus*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(22): 184−189.]
[34] 熊传帅, 张海波, 张进明, 等. 硒和硒蛋白调节动物抗氧化功能及硒在畜牧生产中应用的研究进展 [J/OL]. 中国畜牧杂志: 1−11. https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.027445. [XIONG C S, ZHANG H B, ZHANG J M, et al. Research progress of selenium and selenoprotein in regulating antioxidant function and application of selenium in animal production[J/OL]. Chinese Journal of Animal Science: 1−11. https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.027445.]
[35] 李湘利, 刘静, 朱九滨, 等. 鸡枞菌饮料的体外抗氧化特性研究[J]. 食品工业科技, 2017, 38(3): 87−90,96. [LI X L, LIU J, ZHU J B, et al. Study on the antioxidation *in vitro* of *Termitornyces albuminosus* beverages[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(3): 87−90,96.]
[36] 谢海军, 马玲, 赵玉明. 益生菌发酵乳模拟胃肠液环境下抗氧化活性[J]. 中国酿造, 2017, 36(5): 90−94. [XIE H J, MA L, ZHAO Y M. Antioxidant activity of fermented milk with probiotics in simulated gastrointestinal fluid[J]. China Brewing, 2017, 36(5): 90−94.]

［37］ 魏铭. 增高 Hb 氧亲和力对血液携氧特性的影响及抗缺氧效果 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2020. ［WEI M. Effect of increasing oxygen affinity of Hb on blood oxygen carrying characteristics and anti-hypoxia[D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2020.］

［38］ 林松毅, 殷涌光, 刘静波, 等. 人参等复方中药功能液对小白鼠的抗缺氧作用 [J]. 吉林大学学报 (工学版), 2005(1): 106−110. ［LIN S Y, YIN Y G, LIU J B, et al. Anti-anoxic effects for mice of functional liquid from Chinese traditional compound medicines[J]. Journal of Jilin University (Engineering and Technology Edition), 2005(1): 106−110.］

［39］ 陆保革, 郭志坚, 黄慧群, 等. 3 种抗缺氧药物对筑路工人急进海拔 4600 m 不同时间血红蛋白的影响 [J]. 高原医学杂志, 2007(1): 10−12. ［LU B G, GUO Z J, HUANG H Q, et al. Effects of three compound of anti-anoxic drugs on hemoglobin of roadman acute exposed to 4600 m altitude[J]. Journal of High Altitude Medicine, 2007(1): 10−12.］

［40］ 赵少平, 薛文敏. 高原训练对游泳运动员的影响 [J]. 武汉体育学院学报, 2011, 45(4): 78−82. ［ZHAO S P, XUE W M. Effect of altitude training on swimming athletes[J]. Journal of Wuhan Institute of Physical Education, 2011, 45(4): 78−82.］

［41］ HABTEZION A, NGUYEN L P, HADEIBA H, et al. Leukocyte trafficking to the small intestine and colon[J]. Gastroenterology, 2016, 150(2): 340−354.

［42］ MULLERW A. Getting leukocytes to the site of inflammation[J]. Veterinary Pathology, 2013, 50(1): 7−22.

赵电波, 王少丹, 郑凯茜, 等. 等离子体活化水-苯乳酸协同杀灭大肠杆菌 O157:H7 作用及机制研究 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 138−143. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110116

ZHAO Dianbo, WANG Shaodan, ZHENG Kaixi, et al. Synergistic Inactivation Effects and Mechanisms of Plasma-Activated Water Combined with Phenyllactic Acid against *Escherichia coli* O157:H7[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 138−143. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110116

· 生物工程 ·

等离子体活化水-苯乳酸协同杀灭大肠杆菌 O157:H7 作用及机制研究

赵电波[1,2], 王少丹[1,2], 郑凯茜[1,2], 相启森[1,2], 王博华[1,2], 张琪帆[1,2]
（1.郑州轻工业大学食品与生物工程学院, 河南郑州 450001;
2.河南省冷链食品质量与安全控制重点实验室, 河南郑州 450001）

摘　要: 拟研究等离子体活化水（Plasma-activated water，PAW）与苯乳酸（Phenyllactic acid，PLA）协同处理对大肠杆菌 O157:H7 的杀灭效果及其作用机制。采用平板计数、扫描电镜、荧光染色等方法研究 PAW 与 PLA 协同处理对大肠杆菌 O157:H7 的杀灭作用及其对细胞形态、细胞膜完整性和胞内活性氧水平等的影响。结果表明，经终浓度为 0.125~1.0 mg/mL 的 PLA 处理 8 min 后，大肠杆菌 O157:H7 活细胞数未发生显著变化（P>0.05）。经 PAW 与 PLA（终浓度为 1.0 mg/mL）协同处理 8 min 后，大肠杆菌 O157:H7 降低了 5.65 lg CFU/mL，显著高于 PAW 单独处理组（降低了 1.06 lg CFU/mL）（P<0.05）。扫描电镜结果表明，PAW 与 PLA 协同处理可造成细胞形态发生明显变化。与对照组细胞相比，经 PAW-PLA（1.0 mg/mL）协同处理 8 min 后，胞外蛋白含量、细胞膜电位和胞内活性氧分别升高了 25.6、0.75 和 9.53 倍（P<0.05）。综上所述，PAW 与 PLA 协同处理能够有效杀灭大肠杆菌 O157:H7，这可能与其破坏细胞膜及诱导氧化损伤等有关。本研究为 PAW 与 PLA 协同处理在食品保鲜中的应用提供了理论依据。

关键词: 等离子体活化水, 苯乳酸, 大肠杆菌 O157:H7, 杀菌作用, 机理
中图分类号: TS201.3　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0138−06
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110116
本文网刊:

Synergistic Inactivation Effects and Mechanisms of Plasma-Activated Water Combined with Phenyllactic Acid against *Escherichia coli* O157:H7

ZHAO Dianbo[1,2], WANG Shaodan[1,2], ZHENG Kaixi[1,2], XIANG Qisen[1,2], WANG Bohua[1,2], ZHANG Qifan[1,2]
（1.College of Food and Biological Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;
2.Henan Key Laboratory of Cold Chain Food Quality and Safety Control, Zhengzhou 450001, China）

Abstract: The present study aimed to elucidate the antibacterial effect and underlying mechanisms of plasma-activated water (PAW) combined with phenyllactic acid (PLA) against *Escherichia coli* O157:H7. The inactivation effects of PAW and PLA on *E. coli* O157:H7 and their effect on cell morphology, cell membrane integrity and intracellular reactive oxygen species (ROS) level were investigated by plate counting, scanning electron microscopy and fluorescence staining. The results showed that the population of *E. coli* O157:H7 did not change significantly after PLA treatment at 0.125~1.0 mg/mL for 8 min (P>0.05). *E. coli* O157:H7 decreased by 5.65 lg CFU/mL after PAW treatment combined with 1.0 mg/mL of PLA for 8 min, which was significantly higher than the 1.06 lg CFU/mL of PAW alone (P<0.05). As shown by the scanning electron microscope images, obvious changes in the morphology of *E. coli* O157: H7 cells were observed after PAW treatment combined with PLA. After the co-treatment of PAW and PLA (1.0 mg/mL) for 8 min, the extracellular protein content, cell membrane potential and intracellular ROS level of *E. coli* O157:H7 increased by 25.6-, 0.75- and 9.53-fold

收稿日期: 2021−11−12
基金项目: 河南省自然科学基金优秀青年基金（212300410090）。
作者简介: 赵电波（1975−）, 男, 硕士, 副教授, 研究方向: 肉制品加工与安全控制, Email: zhaodb212@163.com。

(P<0.05), respectively, as compared with the control cells. In summary, PAW combined with PLA could effectively inactivate *E. coli* O157:H7 cells, which might be associated with membrane disruption and oxidative damages. The results could provide a scientific basis for the application of PAW and PLA in food sterilization and preservation.

Key words: plasma-activated water; phenyllactic acid; *Escherichia coli* O157:H7; sterilizing effect; mechanisms

等离子体活化水(Plasma-activated water, PAW)又称为等离子体处理水(Plasma-treated water, PTW),主要通过低温等离子体放电装置在水表面或水下放电而产生,富含活性氧(Reactive oxygen species, ROS)、活性氮(Reactive nitrogen species, RNS)等物质。PAW 是一种新兴的非热杀菌技术,在食品保鲜领域具有广泛的应用前景[1]。但研究发现,蛋白质、脂质等食品组分会显著降低 PAW 对微生物的杀灭效果,因此需要和温热、防腐剂、表面活性剂等协同使用以增强杀菌效果[2−7]。Choi 等[5] 发现,经 PAW 和 60 ℃ 温热协同处理后,腌制白菜中的菌落总数和接种的食源性致病菌数量均显著减少。此外,PAW 与尼泊金丙酯等防腐剂联合使用时其杀菌效果也显著增强[6−7]。例如,PAW 和 4 mmol/L 尼泊金丙酯联合处理 10 min 后,大肠杆菌 O157:H7 减少了 6 lg CFU/mL,而 PAW 和尼泊金丙酯单独处理组仅分别降低了 1.54 和 2.18 lg CFU/mL[6]。

苯乳酸(Phenyllactic acid, PLA)又名 β-苯基乳酸或 3-苯基乳酸,是一种具有广谱抑菌作用的生物防腐剂,对细菌和大部分真菌具有良好的抑制作用[8−9]。与传统化学防腐剂相比,PLA 具有安全性高、来源广泛、稳定性强、亲水性好等优点。已有报道证实 PLA 可降低乳制品、焙烤类食品中的微生物数量,其在食品保鲜领域的应用受到广泛关注[10−11]。前期研究发现,PAW 与 PLA 有良好的协同杀菌效果,但其作用机制尚不明确。因此,本研究以常见的大肠杆菌 O157:H7 为研究对象,评价 PAW 与 PLA 的协同抗菌作用,并通过评价细胞形态、细胞膜完整性、细胞膜电位和胞内活性氧水平等指标揭示其协同杀菌作用机制。研究结果将为 PAW 和 PLA 在食品保鲜领域中的应用提供理论参考。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

大肠杆菌 O157:H7　中国工业微生物菌种保藏中心;胰蛋白胨大豆琼脂培养基(Tryptone soy agar, TSA)、胰蛋白胨大豆肉汤培养基(Tryptone soy broth, TSB)　北京奥博星生物技术有限责任公司;L-苯乳酸和 $DiBAC_4(3)$　上海麦克林生化科技有限公司;乙酸异戊酯和磷酸二氢钾　天津市科密欧化学试剂有限公司;50% 戊二醛　上海阿拉丁生化科技股份有限公司;2′,7′-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)　上海源叶生物科技有限公司。

TS-PL200 型等离子表面处理机　深圳东信高科自动化设备有限公司;MJ-54A 型高压灭菌锅　施都凯仪器设备(上海)有限公司;TGL-16M 型台式高速冷冻离心机　上海卢湘仪离心机仪器有限公司;SW-CJ-1FD 型超净工作台　苏净安泰设备有限公司;Tecan Spark 20 M 型多功能微孔板读数仪　瑞士 Tecan 公司;JSM-7001F 型场发射扫描电子显微镜　日本 JEOL 公司;Nano Drop 2000 型超微量分光光度计　美国 Thermo 公司。

1.2　实验方法

1.2.1　菌悬液制备　从−80 ℃ 冰箱中取出甘油管保存的大肠杆菌 O157:H7 菌种,挑取一环菌液在 TSA 培养基上活化培养后,挑取活力旺盛的单菌落接种于 TSB 培养基中,于 37 ℃、180 r/min 恒温振荡培养 12 h。取 7 mL 培养物于 10 mL 离心管,于 3500×g 离心 5 min,弃上清液,所得菌体用 0.85% 无菌生理盐水洗涤 2 次,离心同上。将所得菌体重悬于无菌生理盐水中并混匀,制成活菌数约为 7~8 lg CFU/mL 的菌悬液,备用。

1.2.2　PAW 的制备　参考 Zhang 等[12] 的方法,采用等离子表面处理机制备 PAW,冷等离子体与液面的距离为 0.35 cm,功率为 750 W,工作气体为压缩空气(0.18 MPa)。将 200 mL 无菌去离子水(Sterile distilled water, SDW)经 APPJ 装置处理 60 s 得到 PAW,备用。

1.2.3　PLA 杀菌活性评价　将 PLA 溶解于去离子水并经 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,并稀释到 1.25、2.5、5 和 10 mg/mL。然后将 100 μL菌悬液、800 μL 0.85% 无菌生理盐水和 100 μL PLA溶液充分混匀,PLA 最终浓度分别为 0.125、0.25、0.5 和 1.0 mg/mL,于室温反应 8 min。取 100 μL 处理后的样品,用无菌生理盐水进行梯度稀释后,吸取 100 μL 稀释液涂布于 TSA 平板并于 37 ℃ 培养 24 h,进行菌落计数,结果表示为 lg CFU/mL。

1.2.4　PAW 协同 PLA 杀菌活性评价　研究 PAW 协同 PLA 处理对大肠杆菌 O157:H7 的影响。根据前期预实验结果,分组如下:

a. 对照组:将 100 μL 菌悬液、100 μL SDW 与 800 μL 无菌生理盐水混合均匀,于室温反应 8 min;

b. PAW 单独处理:将 100 μL 菌悬液、100 μL 无菌生理盐水与 800 μL PAW 混合均匀,于室温反应 8 min;

c. PLA 单独处理:将 100 μL 菌悬液、100 μL PLA 溶液和 800 μL 无菌生理盐水混合均匀,PLA 最终浓度分别为 0.125、0.25、0.5 和 1.0 mg/mL,于室温反应 8 min;

d. PAW 协同 PLA 处理:将 100 μL 菌悬液、100 μL PLA 溶液和 800 μL PAW 混合均匀,PLA 最终浓度分别为 0.125、0.25、0.5 和 1.0 mg/mL,于室温反应

8 min。

1.2.5 场发射扫描电镜观察 参考刘骁等[13]的方法，采用场发射扫描电子显微镜（Field emission scanning electron microscope, FESEM）观察 PAW 协同 PLA 处理对大肠杆菌 O157:H7 细胞形态的影响。菌悬液经 PAW、PLA（1.0 mg/mL）或 PAW 协同 PLA（1.0 mg/mL）处理 8 min 后，于 12000×g 离心 2 min，收集菌体，加入 500 μL 预冷的 2.5% 戊二醛溶液并于 4 ℃ 固定 4 h；离心收集菌体，用浓度为 0.1 mol/L 的无菌磷酸盐缓冲液（pH7.2）洗涤样品三次，离心同上；分别用 30%、50%、70%、80%、90% 和 100%（v/v）乙醇溶液对样品逐级洗脱 10 min，其中 100% 乙醇溶液洗脱 2 次；最后用乙酸异戊酯置换乙醇 2 次，每次 10 min，离心条件同上，制备菌悬液，混匀之后滴加到载玻片上，自然晾干，采用 HVB-GB 型真空蒸镀仪喷金 150 s，通过 JSM-7001F 型场发射扫描电子显微镜观察并拍照。

1.2.6 细胞膜完整性评价 大肠杆菌 O157:H7 菌悬液分别经 PAW、PLA（终浓度分别为 0.125、0.25、0.5 和 1.0 mg/mL）或 PAW 协同 PLA（终浓度分别为 0.125、0.25、0.5 和 1.0 mg/mL）8 min 后，在 12000×g 和 4 ℃ 条件下离心 2 min，采用 Nano Drop 2000 型超微量分光光度计测定上清液在 280 nm 处的吸光度[14]。

1.2.7 细胞膜电位测定 大肠杆菌 O157:H7 细胞分别经 PAW、PLA（1.0 mg/mL）或 PAW 协同 PLA（1.0 mg/mL）处理 8 min 后，离心收集菌体。处理后所得菌体与 100 μL（25 μg/mL）$DiBAC_4(3)$ 溶液和 900 μL EDTA 溶液（4 mmol/L）混合均匀，置于 37 ℃ 暗处培养 15 min，离心，弃上清液。菌体用 PBS 洗涤 2 次并重悬，采用多功能微孔板读数仪测定荧光强度，激发波长为 488 nm，发射光波长为 525 nm，以未处理的样品为空白对照[15]。

1.2.8 胞内 ROS 水平测定 采用 DCFH-DA 荧光探针检测大肠杆菌 O157:H7 细胞内 ROS 水平[16]。菌悬液分别经 PAW、PLA（终浓度分别为 0.125、0.25、0.5 和 1.0 mg/mL）或 PAW 与 PLA（终浓度分别为 0.125、0.25、0.5 和 1.0 mg/mL）协同处理 8 min 后，于 4 ℃，12000×g 离心 2 min，弃上清，收集菌体并用 SDW 洗涤两次，后重悬于无菌生理盐水，加入 DCFH-DA 储备液（终浓度为 50 μmol/L）于 37 ℃ 避光反应 30 min；然后于 12000×g 离心 2 min，弃上清，收集菌体并用 PBS 洗涤两次，重悬后采用多功能酶标仪测定荧光强度，激发波长为 488 nm，发射波长为 525 nm。

1.3 数据处理

每次试验均重复 3 次，试验结果表示为平均值±标准差。采用 Prism 软件（Graphpad 7.0）绘图，采用 SPSS 24.0 进行单因素方差分析（one-way ANOVA），各组间采用 LSD 多重比较进行差异显著性（$P<0.05$）。

2 结果与分析

2.1 PLA 处理对大肠杆菌 O157:H7 的影响

通过平板计数法评价不同浓度 PLA 处理对大肠杆菌 O157:H7 细胞活力的影响。如图 1 所示，大肠杆菌 O157:H7 初始菌量为 7.41 lg CFU/mL；经终浓度为 0.125~1.0 mg/mL 的 PLA 处理后，大肠杆菌 O157:H7 活细胞数未发生显著变化（$P>0.05$）。与对照组相比，经终浓度为 1.0 mg/mL 的 PLA 处理后，大肠杆菌 O157:H7 菌落数仅下降 0.18 lg CFU/mL。上述结果与 Ning 等[17]的发现一致。Ning 等[17]发现，经浓度为 1.25 mg/mL 的 PLA 处理 2 h 后，大肠杆菌仅下降了约 1 lg CFU/mL。以上结果表明，低浓度（0.125~1.0 mg/mL）的 PLA 未对大肠杆菌 O157:H7 细胞活力造成显著影响（$P>0.05$）。

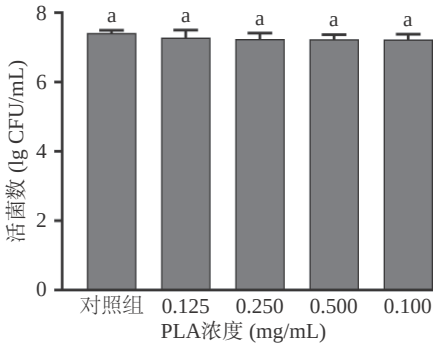


图 1 PLA 对大肠杆菌 O157:H7 的影响

Fig.1 Influences of PLA on *E. coli* O157:H7 cells

注：柱状图上不同字母表示差异显著（LSD 法，$P<0.05$）；图 2、图 4~图 6 同。

2.2 PAW 协同 PLA 处理对大肠杆菌 O157:H7 的杀灭作用

PAW 协同 PLA（终浓度为 0.125~1.0 mg/mL）处理对大肠杆菌 O157:H7 的杀灭作用见图 2。如图 2 所示，大肠杆菌 O157:H7 初始浓度为 7.51 lg CFU/mL；经 PAW 单独处理 8 min 后，细胞数量仅下降了 1.07 lg CFU/mL，表明 PAW 对大肠杆菌 O157:H7 的失活作用较弱。与 PAW 或 PLA 单独处理相比，PAW 与 PLA 协同处理能够有效杀灭大肠杆菌 O157:H7。经 PAW 与终浓度分别为 0.125、0.25、0.5 和 1.0 mg/mL 的 PLA 协同处理 8 min 后，大肠杆菌 O157:H7 菌落数分别减少了 1.17、1.76、1.92 和 5.65 lg CFU/mL（$P<0.05$）。此外，Liu 等[18]发现，经 0.5% PLA 或余氯含量为 30 mg/L 的微酸性电解水（slightly acid electrolyzed water, SAEW）单独处理 5 min 后，产酸克雷伯氏菌（*Klebsiella oxytoca*）分别降低了 5.8 和 0.7 lg CFU/mL；而经 0.5% PLA 与 SAEW（余氯含量为 30 mg/L）协同处理 5 min 后，*K. oxytoca* 由初始的 8.0 lg CFU/mL 降低至 1.4 lg CFU/mL 以下。以上结果表明，PAW 与 PLA 协同处理能够有效杀灭大肠杆菌 O157:H7，且其杀灭效能随 PLA 浓度的升高而增强。

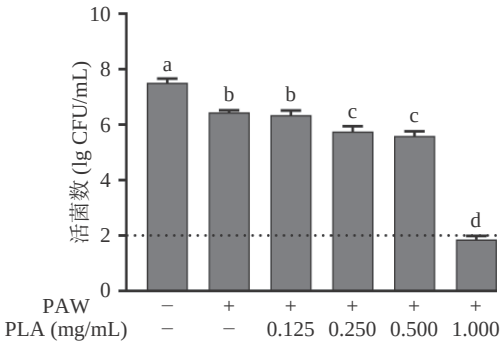


图 2　PAW 协同 PLA 处理对大肠杆菌 O157:H7 的杀灭作用

Fig.2　Inactivation of *E. coli* O157:H7 cells by PAW combined with PLA

2.3　PAW 协同 PLA 处理对大肠杆菌 O157:H7 的细胞形态的影响

采用场发射扫描电镜评价 PAW 协同 PLA 处理对大肠杆菌 O157:H7 细胞形态的影响，结果见图 3。从图 3 可知，对照组大肠杆菌呈现为规则的杆状，细胞大小较为均匀，表面完整光滑；经 PAW 或 PLA（1.0 mg/mL）单独处理后，大肠杆菌菌体均出现轻微的皱缩，表面变得粗糙。宁亚维等[19] 也发现经 PLA（1.25 mg/mL）处理 1 h 后，大肠杆菌细胞发生凹陷等变化。经 PAW 和 PLA（1.0 mg/mL）协同处理后，大肠杆菌细胞表面出现明显的褶皱和塌陷。以上结果表明，PAW 和 PLA 协同处理显著破坏了大肠杆菌的细胞形态，可能进一步影响其正常生理代谢，最终导致其失活。

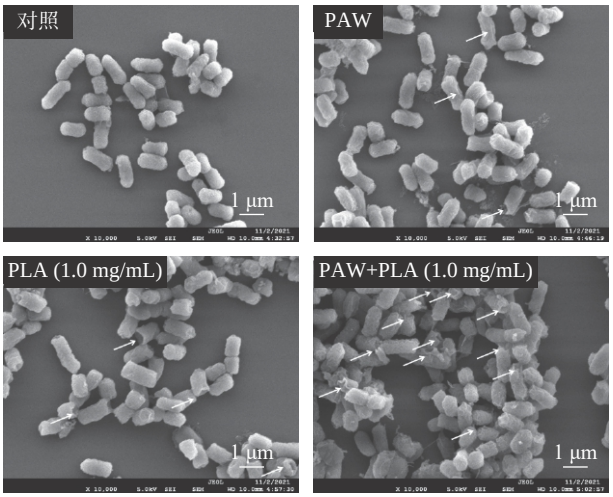


图 3　PAW 协同 PLA 处理对大肠杆菌 O157:H7 细胞形态的影响

Fig.3　Effect of PAW treatment combined with PLA on the morphology of *E. coli* O157:H7 cells

2.4　PAW 协同 PLA 处理对大肠杆菌 O157:H7 细胞膜完整性的影响

细胞膜可保护细菌免受周围环境的影响，并为细菌的生长和代谢输送必需的营养物质[20]。因此，细胞膜完整性对于维持细胞稳态和生长繁殖具有重要意义[21]。本研究通过测定胞内蛋白质的释放评价 PAW 与 PLA 协同处理对大肠杆菌 O157:H7 细胞膜完整性的影响，结果见图 4。

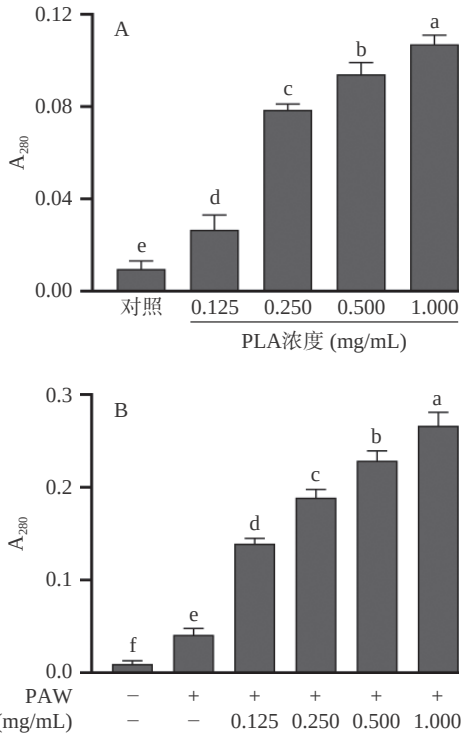


图 4　PLA 单独（A）或 PAW 协同 PLA 处理（B）对大肠杆菌 O157:H7 蛋白释放量的影响

Fig.4　Effect PLA alone (A) or PAW treatment combined with PLA (B) on leakage of proteins from *E. coli* O157:H7 cells

如图 4 所示，与对照组相比，PAW 与 PLA 单独处理组大肠杆菌胞外蛋白含量均显著升高（P<0.05）。如图 4A 当浓度为 0.125~1.0 mg/mL 时，PLA 单独处理组大肠杆菌胞外蛋白含量随着 PLA 浓度的升高而显著升高（P<0.05）。上述结果与 Sorrentino 等[22] 的研究报道一致。Sorrentino 等[22]发现，经终浓度为 11.3 mmol/L 的 PLA 处理 5 h 后，李斯特菌（Listeria innocua）胞内物质释放量与对照组相比显著升高（P<0.05）。与 PAW 或 PLA 单独处理相比，PAW 与 PLA 协同处理组大肠杆菌胞外蛋白质含量明显升高。经 PAW 与 PLA（1.0 mg/mL）协同处理后，上清液在 280 nm 处吸光度升高至 0.266，显著高于 PAW 单独处理组（A_{280}=0.041）或 PLA 单独处理组（A_{280}=0.107）。以上结果表明，PAW 协同 PLA 处理破坏了大肠杆菌 O157:H7 的细胞膜完整性并导致蛋白质、DNA 等胞内组分的泄露，这可能是其杀灭大肠杆菌细胞的重要机制。

2.5　PAW 协同 PLA 处理对大肠杆菌 O157:H7 细胞膜电位的影响

细菌膜电位在调节 pH 稳态、跨膜运输、鞭毛运动、细胞分裂和 ATP 合成等多种生理功能中发挥着重要作用[23]。$DiBAC_4(3)$是一种对膜电位敏感的亲脂性阴离子荧光染料，本身无荧光；当进入去极化细胞后与细胞内富含脂质成分结合而使细胞内的荧光

强度增强[24]，因此被广泛用于评价细胞膜电位的变化。PAW 协同不同浓度 PLA 处理对大肠杆菌 O157:H7 细胞膜电位的影响见图 5。

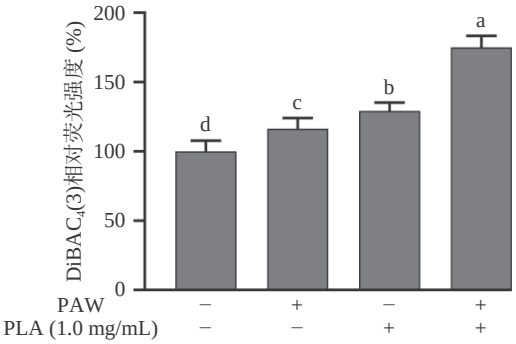


图 5 PAW 协同 PLA 处理对大肠杆菌 O157:H7 细胞膜电位的影响

Fig.5 Effect of PAW treatment combined with PLA on the membrane potential of *E. coli* O157:H7 cells

由图 5 可知，与对照组相比，经 PAW 与 PLA（1.0 mg/mL）协同处理 8 min 后，大肠杆菌 O157:H7 细胞中 $DiBAC_4(3)$ 荧光强度均显著升高（$P<0.05$）。经 PAW 和 PLA（1.0 mg/mL）协同处理后，大肠杆菌 O157:H7 中 $DiBAC_4(3)$ 荧光强度较对照组提高了 74.9%，显著高于 PAW 单独处理组（仅提高了 16.1%）和 PLA 单独处理组（提高了 29.0%）（$P<0.05$）。此外，Liu 等[6] 报道，经 PAW 与尼泊金丙酯协同处理 10 min 后，大肠杆菌 O157:H7 细胞中 $DiBAC_4(3)$ 荧光强度比对照组提高了 505.6%，显著高于 PAW 单独处理组（提高了 34.6%）和尼泊金丙酯单独处理组（提高了 208.5%）。Wang 等[25] 也有类似的发现，经 PLA（1.25、2.5、5 和 10 mg/mL）处理 5 h 后，粪肠球菌（*Enterococcus faecalis*）细胞膜发生去极化，进而影响其 ATP 的产生和物质的跨膜运输。上述结果表明，PAW 和 PLA 协同处理导致大肠杆菌 O157:H7 细胞膜发生去极化，进而干扰各种新陈代谢途径，从而导致细胞死亡。综上所述，细胞膜可能是 PAW 和 PLA 协同作用的主要靶点。

2.6 PAW 协同 PLA 处理对大肠杆菌 O157:H7 胞内 ROS 水平的影响

采用 DCFH-DA 探针检测 PAW 与 PLA 协同处理对大肠杆菌 O157:H7 细胞内 ROS 水平的影响，结果见图 6。如图 6 所示，与对照组相比，经终浓度为 1.0 mg/mL 的 PLA 处理 8 min 后，大肠杆菌 O157:H7 胞内 ROS 水平仅升高了 23.0%（$P<0.05$）；经 PAW 单独处理 8 min 后，大肠杆菌 O157:H7 胞内 ROS 水平仅升高了 4.59 倍（$P<0.05$）。经 PAW 协同 PLA 处理后，大肠杆菌 O157:H7 细胞内 ROS 水平随 PLA 浓度的增加而逐渐升高。与对照组相比，经 PAW 与终浓度为 0.25、0.5 和 1.0 mg/mL 的 PLA 协同处理后，大肠杆菌 O157:H7 胞内 ROS 水平分别升高了 7.38、7.91 和 9.53 倍（$P<0.05$）。研究证实，PAW 中含有过氧化氢（H_2O_2）、臭氧（O_3）、过氧亚硝基阴离子

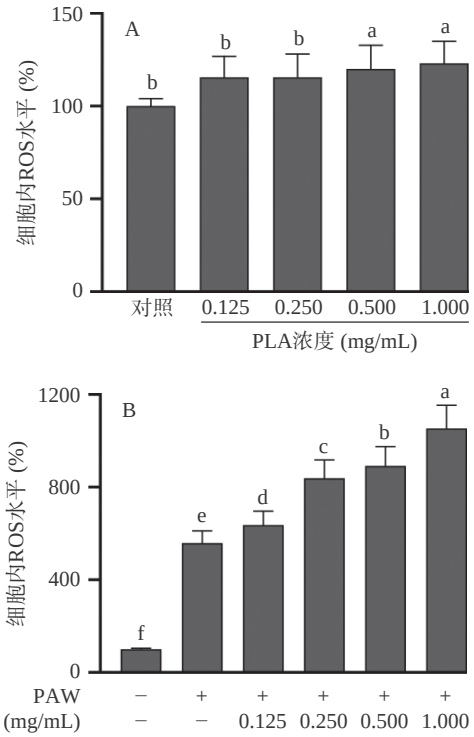


图 6 PLA 单独（A）或 PAW 协同 PLA 处理（B）对大肠杆菌 O157:H7 细胞内 ROS 水平的影响

Fig.6 Effect PLA alone (A) or PAW treatment combined with PLA (B) on intracellular ROS levels of *E. coli* O157:H7

（$ONOO^-$）、NO_2^-、NO_3^- 等活性物质[26−27]。这些活性物质诱导细菌细胞膜中的脂质发生氧化反应，同时活性物质还可以渗透到细胞内，对细胞内的核酸、蛋白质等物质造成氧化损伤，诱导细胞发生氧化应激，进而破坏细胞的正常生理功能[28−30]。综上所述，经 PAW 与 PLA 协同处理会导致 ROS 的过度积累，可能会对大肠杆菌 O157:H7 胞内脂质、蛋白质和 DNA 等物质造成氧化损伤，导致细胞膜和生理功能被破坏，最终造成细胞死亡。

3 结论

综上所述，PAW 与 PLA 协同处理能够有效杀灭大肠杆菌 O157:H7，且其杀菌效能随 PLA 浓度的升高而增强。经 PAW 与终浓度为 1.0 mg/mL 的 PLA 协同处理 8 min 后，大肠杆菌 O157:H7 减少了 5.65 lg CFU/mL。PAW 与 PLA 协同处理后，大肠杆菌 O157:H7 细胞形态发生明显皱缩，细胞膜通透性增强、细胞膜发生去极化且胞内 ROS 水平显著升高，推测 PAW 与 PLA 可能通过破坏细胞膜和诱导氧化应激等途径发挥协同抗菌作用。在今后的研究中应综合运用代谢组学、蛋白质组学、转录组学等方法系统阐明 PAW 与 PLA 协同处理失活微生物的分子机制；此外，还应系统评价 PAW 与 PLA 协同处理对食品表面微生物的杀灭效果及对食品营养、感官及货架期等指标的影响。

参考文献

[1] 康超娣, 相启森, 刘骁, 等. 等离子体活化水在食品工业中应用研究进展[J]. 食品工业科技, 2018, 39(7): 348−352. [KANG

C D, XIANG Q S, LIU X, et al. A review of application of plasma-activated water in food industry[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(7): 348−352.]

[2] LAURITA R, GOZZI G, TAPPI S, et al. Effect of plasma activated water (PAW) on rocket leaves decontamination and nutritional value[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2021, 73: 102805.

[3] ZHAO Y M, OLIVEIRA M, BURGESS C M, et al. Combined effects of ultrasound, plasma–activated water, and peracetic acid on decontamination of mackerel fillets[J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 150: 111957.

[4] ROYINTARAT T, CHOI E H, BOONYAWAN D, et al. Chemical–free and synergistic interaction of ultrasound combined with plasma-activated water (PAW) to enhance microbial inactivation in chicken meat and skin[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 1559.

[5] CHOI E J, PARK H W, KIM S B, et al. Sequential application of plasma–activated water and mild heating improves microbiological quality of ready–to–use shredded salted kimchi cabbage (*Brassica pekinensis* L.)[J]. Food Control, 2019, 98: 501−509.

[6] LIU X, LI Y F, WANG S D, et al. Synergistic antimicrobial activity of plasma-activated water and propylparaben: Mechanism and applications for fresh produce sanitation[J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 146: 111447.

[7] LIU X, LI Y F, ZHANG R, et al. Inactivation effects and mechanisms of plasma-activated water combined with sodium laureth sulfate (SLES) against *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, 105(7): 2855−2865.

[8] 邓廷山, 武国干, 孙宇, 等. 苯乳酸生物合成的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2020, 40(9): 62−68. [DENG T S, WU G G, SUN Y, et al. Advances in biosynthesis of phenyllactic acid[J]. China Biotechnology, 2020, 40(9): 62−68.]

[9] YOO J A, MIN-HO Y, LEE J L, et al. Antifungal effect of phenyllactic acid produced by *Lactobacillus casei* isolated from button mushroom[J]. Journal of Mushrooms, 2016, 14(4): 162−167.

[10] MU W M, YU S H, ZHU L J, et al. Recent research on 3-phenyllactic acid, a broad-spectrum antimicrobial compound[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 95(5): 1155−1163.

[11] RAJANIKAR R V, NATARAJ B H, NAITHANI H, et al. Phenyllactic acid: A green compound for food biopreservation[J]. Food Control, 2021: 108184.

[12] ZHANG R, MA Y F, WU D, et al. Synergistic inactivation mechanism of combined plasma-activated water and mild heat against *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Food Protection, 2020, 83(8): 1307−1314.

[13] 刘骁, 李云菲, 王雯雯, 等. 紫外发光二极管对 *P. deceptionensis* CM2 杀菌作用及机制[J]. 食品工业, 2021, 42(8): 150−154. [LIU X, LI Y F, WANG W W, et al. Effect of ultraviolet-C light-emitting diodes on *P. deceptionensis* CM2: Inactivation efficiency and mechanism[J]. Food Industry, 2021, 42(8): 150−154.]

[14] SANNASIDDAPPA T H, LUND P A, CLARKE S R. *In vitro* antibacterial activity of unconjugated and conjugated bile salts on *Staphylococcus aureus*[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1581.

[15] XING K, XING Y, LIU Y F, et al. Fungicidal effect of chitosan via inducing membrane disturbance against *Ceratocystis fimbriata*[J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 192: 95−103.

[16] 相启森, 张嵘, 杜桂红, 等. 等离子体活化水对沙门氏菌的灭活作用及机制研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(8): 138−143. [XIANG Q S, ZHANG R, DU G H, et al. Inactivation effects and mechanisms of plasma-activated water against *S. typhimurium*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(8): 138−143.]

[17] NING Y W, YAN A H, YANG K, et al. Antibacterial activity of phenyllactic acid against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* by dual mechanisms[J]. Food Chemistry, 2017, 228: 533−540.

[18] LIU F, TANG C, WANG D B, et al. The synergistic effects of phenyllactic acid and slightly acid electrolyzed water to effectively inactivate *Klebsiella oxytoca* planktonic and biofilm cells[J]. Food Control, 2021, 125: 107804.

[19] 宁亚维, 付浴男, 何建卓, 等. 苯乳酸和醋酸联用对大肠杆菌的抑菌机理[J]. 食品科学, 2021, 42(3): 77−84. [NING Y W, FU Y N, HE J Z, et al. Antibacterial mechanism of phenyllactic acid combined with acetic acid on *Escherichia coli*[J]. Food Science, 2021, 42(3): 77−84.]

[20] KONINGS W N, ALBERS S V, KONING S, et al. The cell membrane plays a crucial role in survival of bacteria and archaea in extreme environments[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2002, 81: 61−72.

[21] 康世墨. 乳糖酸对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌抑菌机理的研究 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2020. [KANG S M. Study on the antibacterial mechanism of lactobionic acid against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2020.]

[22] SORRENTINO E, TREMONTE P, SUCCI M, et al. Detection of antilisterial activity of 3-phenyllactic acid using *Listeria innocua* as a model[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1373.

[23] BENARROCH J M, ASALLY M. The microbiologist's guide to membrane potential dynamics[J]. Trends in Microbiology, 2020, 28(4): 304−314.

[24] WANG X Y, TIAN L, FU J P, et al. Evaluation of the membrane damage mechanism of thymol against *Bacillus cereus* and its application in the preservation of skim milk[J]. Food Control, 2021, 131: 108435.

[25] WANG F T, WU H H, JIN P P, et al. Antimicrobial activity of phenyllactic acid against *Enterococcus faecalis* and its effect on cell membrane[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2018, 15(10): 645−652.

[26] ZHOU R W, ZHOU R S, PRASAD K, et al. Cold atmospheric plasma activated water as a prospective disinfectant: The crucial role of peroxynitrite[J]. Green Chemistry, 2018, 20(23): 5276−5284.

[27] HOU C Y, LAI Y C, HSIAO C P, et al. Antibacterial activity and the physicochemical characteristics of plasma activated water on tomato surfaces[J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 149: 111879.

[28] HERIANTO S, HOU C Y, LIN C M, et al. Nonthermal plasma-activated water: A comprehensive review of this new tool for enhanced food safety and quality[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2021, 20(1): 583−626.

[29] ZHAO Y M, OJHA S, BURGESS C M, et al. Inactivation efficacy and mechanisms of plasma activated water on bacteria in planktonic state[J]. Journal of Applied Microbiology, 2020, 129(5): 1248−1260.

[30] LIAO X Y, CULLEN P J, MUHAMMAD A I, et al. Cold plasma-based hurdle interventions: New strategies for improving food safety[J]. Food Engineering Reviews, 2020, 12(3): 321−332.

刘英杰, 黄钧, 唐慧芳, 等. 基于可培和免培法探究大曲生产环境空气微生物群落结构的时空性特征 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 144−154. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110261

LIU Yingjie, HUANG Jun, TANG Huifang, et al. Spatiotemporal Characteristics of Air Microbial Community Structure in Daqu Manufacture Environment Explored by Culture-dependent and Culture-independent Methods[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 144−154. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110261

· 生物工程 ·

基于可培和免培法探究大曲生产环境空气微生物群落结构的时空性特征

刘英杰[1], 黄　钧[1], 唐慧芳[1], 张宿义[2,3], 董　异[2,3], 王　超[2,3], 王小军[2,3], 吴重德[1], 金　垚[1], 周荣清[1,2,*]

（1.四川大学轻工科学与工程学院, 四川 成都 610065;
2.国家固态酿造工程技术研究中心, 四川 泸州 646699;
3.泸州老窖股份有限公司, 四川 泸州 646699）

摘　要: 分别应用可培和免培方法研究同企业使用 2 年和 25 年的新老曲厂空气中的微生物群落结构和多样性随季节的变化规律。结果表明，季节间的差异显著，可培和免培的结果分别是春季的菌群数量和 α-多样性最高，且都随季节先增加后减少。可培方法获得 301 株分离株，所属类别与免培的结果大体一致，细菌菌群由 Acfinobacteria 等 5 个门构成，主要是 *Pseudomonas*、*Staphylococcus*、*Bacillus* 等，真菌群则是 Ascomycota 等 3 个门构成，*Phialemoniopsis* 和 *Aspergillus* 等是优势属。空气中 Proteobacteria 的 *Pseudomonas* 等 8 个细菌属及 Ascomycota 的 *Saccharomycopsis* 等 10 个真菌属可能是大曲优势菌的来源。使用 25 年设施环境空气中的物种数量及多样性更丰富和稳定。相关性分析结果表明，环境的温度、湿度是影响物种数量的关键因素，空气污染程度等可能导致群落结构不稳定。这些结果揭示了制曲小生境群落的时空性特征，为探讨大曲与环境微生物的相互关系及溯源性研究奠定了方法学基础。

关键词: 大曲生产环境, 空气, 可培, 免培, 微生物群落结构, 环境因子
中图分类号: TS261.1; TS201.3　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0144−11
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110261
本文网刊:

Spatiotemporal Characteristics of Air Microbial Community Structure in Daqu Manufacture Environment Explored by Culture-dependent and Culture-independent Methods

LIU Yingjie[1], HUANG Jun[1], TANG Huifang[1], ZHANG Suyi[2,3], DONG Yi[2,3], WANG Chao[2,3], WANG Xiaojun[2,3], WU Chongde[1], JIN Yao[1], ZHOU Rongqing[1,2,*]

（1.College of Biomass Science and Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China;
2.National Engineering Research Center of Solid-state Brewing, Luzhou 646699, China;
3.Luzhou Lao Jiao Co., Ltd., Luzhou 646699, China）

Abstract: The change trend of the microbial community structure and diversity, in the air around new and old Daqu production factories used for 2 and 25 years, respectively, with the seasons were investigated by both culture-dependent and culture-independent methods. The results showed that the constituents and diversities significantly shifted with seasons, and the number of species and α-diversity indexes were the highest in spring, respectively, and both of them increased first and then decreased with seasons. 301 isolates were obtained by culture-dependent method, which belonged to the same category as that obtained by the culture-independent method, the bacterial flora was composed of five phyla, such as Acfinobacteria, etc., in which Pseudomonas, Staphylococcus, Bacillus, were dominant. The fungal flora was composed of three phyla,

收稿日期: 2021−11−22
基金项目: 四川大学-泸州老窖股份有限公司合作项目（21H0997）。
作者简介: 刘英杰（1996−）, 男, 硕士研究生, 研究方向: 现代发酵技术, E-mail: 1225941712@qq.com。
*** 通信作者:** 周荣清（1960−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 发酵工程和微生物群落代谢与调控, E-mail: rqzhou@163.com。

including Ascomycota., *Phialemoniopsis* and *Aspergillus*, etc. were dominant. Among these dominant species, *Pseudomonas* et al. 8 bacterial genera of Proteobacteria and *Saccharomycopsis* et al. 10 fungi genera of Ascomycota in the strong-flavor Daqu might be originated from the air. Compared with facilities used for 2 years, the quantity and diversity indexes in the air around the facilities used for 25 years were richer and more stable. Correlation analysis showed that the temperature and humidity of the air were the key factors affecting the quantity of microorganisms, while the change of the intensity of air pollution resulted in the community structure became unstabitily. These results revealed the spatiotemporal feature of the microbial community in the Daqu manufacturing niche and laid a methodological foundation for the study of the relationship and traceability between Daqu and environmental microorganisms.

Key words: Daqu manufacture environment; air; culture-dependent; culture-independent; microbial community structure; environmental factors

中国传统白酒生产过程中，大曲既是粗酶制剂和发酵剂[1]，也是重要的酿酒原料之一。酿酒所需的功能微生物多数是源于大曲，而大曲中的微生物主要富集于生产环境及设施，环境群落结构和多样性及过程参数显著影响大曲的群落结构及代谢物[2−4]。

环境微生物是导致大曲功能菌群的时空性差异的关键因素。近十年间，环境的群落与大曲群落及代谢物的相关性被广泛关注。可培与免培方法揭示了浓、酱香型大曲的核心菌群构成各有特点[5−6]，并分离到一些功能菌株。夏、秋两季酱香型大曲的真菌群落结构和演变规律存在较大差异[7]，且与环境的温湿度密切相关[8]，类似的结果也曾被相关的文献报道[9−10]。真菌群落的结构与小生境密切相关[4]，大曲生产环境的空气及大曲细菌群落的变化同样具有相关性[11]，清香型白酒发酵过程中耐酸乳杆菌（*Lactobacillus. acetotolerans*）主要源于空气和发酵罐[12]，应用溯源技术也探究了小生境与白酒生产过程主要环节群落的关系[4,13−14]。然而，这些结果都难以解释大曲生产环境中微生物群落的时空性特征。鉴于现有常规技术的局限性，如可培方法仅能检出 0.1%~1% 的环境存在的微生物[15−16]，而基于 PCR 的高通量测序显著提高检出微生物种类的范围[17]，但量化的结果有待完善，两种方法同时用于探讨小生境群落与大曲群落结构特点、二者间相互作用和变迁规律以及稳定性评估[18] 等则是解决当前技术瓶颈的有效措施。

为揭示大曲生产环境空气微生物群落的时空性特征，本文以相同地域不同地点且使用周期差异明显的浓香型大曲生产地为对象，采用可培和免培技术研究了冬、春和夏三个季节环境空气中微生物群落的演变规律，解析了环境因子与环境空气群落结构的相关性，为探讨大曲与环境微生物的相互关系及溯源性研究奠定方法学基础，并为生产区域营造大曲生产的最佳环境微生物群落组成奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

空气样品　采集于石堡湾的泸州老窖制曲生态园（简称老厂，LC，四川省，泸州市，龙马潭区，28°55'22"N、105°28'36"E）和黄舣的泸州老窖制曲中心（简称新厂，XC，四川省，泸州市，江阳区，28°51'46"N、105°34'14"E），前者始于上世纪 90 年代，已使用 25 年，后者自 2019 年建成仅使用 2 年，两厂生产的大曲为同类型大曲，即浓香型大曲。采样地点和具体位置如图 1 和表 1 所示，采样时间分别是 2021 年 1 月（冬）、3~5 月（春）和 7 月（夏）等三个季节，缺少秋季数据是老厂因地方政府建设规划的要求，在夏季须整体拆除，同时春季环境温度、湿度波动较大，将春季细分为初春（3 月）、仲春（4 月）、暮春（5 月）三季；Fast DNA SPIN 基因提取试剂盒　美国 MP Biomedicals 公司；Q5 DNA 高保真聚合酶　美国 New England Biolabs 公司；琼脂糖和琼脂糖凝胶电泳缓冲液 TAE、PicoGreen dsDNA 检测试剂盒　美国 Invitrogen 公司；Marker DL2000　日本 Takara 公司；Agencourt AMPure Beads　美国 Beckman Coulter 公司；孟加拉红琼脂培养基和 PCA 琼脂培养基　北京奥博星生物技术有限责任公司；纳他霉素　上海麦克林生化科技有限公司。

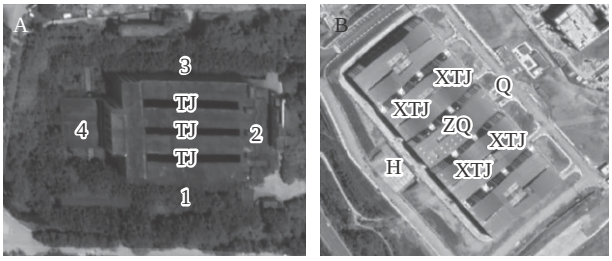


图 1　老厂（A）和新厂（B）的采样位置

Fig.1　Sampling locations of old plant (A) and new plant (B)

PSW-6 型筛孔撞击式采样器、PSW-Y 型液体撞击式采样器　常州普森电子仪器厂；AR866 风速仪　泰安市瑞科航岳机械有限公司；CX31 显微镜　日本 Olympus 公司；GL-20G-Ⅱ立式高速冷冻离心机　上海安亭科学仪器有限公司；Nanodrop ND-1000 紫外分光光度计　美国 ThermoFisher 公司；2720 PCR 扩增仪　美国 ABI 公司；Gel DocTM XR+凝胶成像系统　美国 Bio Rad 公司。

1.2　实验方法

1.2.1　免培养方法　空气样品通过液体撞击式采样器收集于 15 mL 无菌的 0.1 mol/L PBS 缓冲液中，采

表 1 采样位置及环境因子

Table 1 Sampling locations and environmental factors

区域	大气相关参数	采样位置	样品编号	温度T(℃)	湿度(%RH)	风速(V/m·s^{-1})	风向WD
			冬季(Winter)				
LC	AQI=156.0; O_3=28.0; $PM_{2.5}$=119.0; PM_{10}=146.0; NO_2=16.0; SO_2=54.0; CO=1.1	前	L_1	12.13±0.21^{cd}	70.50±0.75^{cd}	0.75±0.04^{abc}	东北
		制曲车间	L_2	12.50±0.52^{bcd}	74.83±2.80^{abc}	0.29±0.03^{d}	东南
		后	L_3	14.30±0.10^{a}	62.33±0.15^{d}	0.77±0.34^{abc}	东
		粉曲车间	L_4	13.77±0.32^{ab}	64.23±0.38^{d}	0.44±0.06^{cd}	东北
		天井	L_TJ	13.46±0.47^{abc}	67.09±4.35^{cd}	0.56±0.30^{bcd}	东
XC	AQI=183.0; O_3=21.0; $PM_{2.5}$=138.0; PM_{10}=168.0; NO_2=18.0; SO_2=56.0; CO=1.2	前	L_Q	11.13±0.12^{d}	80.87±0.25^{ab}	0.96±0.02^{a}	东南
		后	L_H	11.53±0.06^{d}	79.37±0.21^{ab}	0.23±0.02^{d}	东南
		制曲车间	L_ZQ	13.10±0.00^{abc}	73.10±0.00^{bc}	0.81±0.03^{ab}	西南
		天井	L_XTJ	14.57±1.86^{a}	81.80±9.96^{a}	0.50±0.19^{bcd}	西南
			春季(Spring) Ⅰ(Sp1)				
LC	AQI=49.5.0; O_3=46.0; $PM_{2.5}$=37.0; PM_{10}=45.0; NO_2=12.0; SO_2=31.0; CO=0.8	前	L2_1	15.27±0.40^{de}	80.68±0.54^{ab}	0.49±0.25^{bc}	西
		制曲车间	L2_2	16.22±0.53^{cd}	78.10±1.85^{bc}	0.49±0.25^{bc}	北
		后	L2_3	16.48±0.33^{bcd}	73.76±1.65^{cd}	0.55±0.04^{bc}	东南
		粉曲车间	L2_4	18.62±1.41^{a}	64.08±5.36^{e}	0.97±0.12^{b}	北
		天井	L2_TJ	15.21±0.58^{de}	82.84±2.28^{ab}	0.84±0.08^{abc}	西
XC	AQI=65.5; O_3=22.0; $PM_{2.5}$=45.0; PM_{10}=61.0; NO_2=16.0; SO_2=39.0; CO=0.9	前	L2_Q	14.67±0.21^{e}	86.00±1.40^{a}	1.12±0.39^{a}	东南
		后	L2_H	17.27±0.06^{bc}	74.77±0.15^{cd}	1.18±0.24^{a}	东南
		制曲车间	L2_ZQ	15.36±0.17^{de}	78.20±1.57^{bc}	0.48±0.45^{bc}	东北
		天井	L2_XTJ	17.67±1.03^{ab}	70.63±4.56^{d}	0.31±0.22^{c}	东北
			Ⅱ(Sp2)				
LC	AQI=92.0; O_3=161.0; $PM_{2.5}$=52.0; PM_{10}=92.0; NO_2=16.0; SO_2=44.0; CO=0.9	前	L3_1	20.73±0.55^{ef}	77.45±2.05^{ab}	0.87±0.62	东
		制曲车间	L3_2	24.12±0.55^{bc}	60.59±0.60^{de}	1.06±0.40	南
		后	L3_3	27.28±1.13^{a}	49.72±7.60^{fg}	1.00±0.70	东
		粉曲车间	L3_4	26.68±0.71^{a}	49.08±1.20^{g}	0.44±0.23	东
		天井	L3_TJ	22.70±0.48^{cd}	67.38±2.58^{cd}	0.20±0.11	东
XC	AQI=76.0; O_3=144.0; $PM_{2.5}$=49.0; PM_{10}=90.0; NO_2=14.0; SO_2=40.0; CO=0.9	前	L3_Q	19.93±0.32^{f}	75.53±1.42^{ab}	0.76±0.57	东南
		后	L3_H	18.97±0.06^{f}	80.40±0.26^{a}	0.74±0.44	东南
		制曲车间	L3_ZQ	24.65±2.62^{b}	56.33±5.55^{ef}	0.24±0.33	东北
		天井	L3_XTJ	22.20±0.28^{de}	73.10±2.26^{bc}	0.41±0.28	东北
			Ⅲ(Sp3)				
LC	AQI=60.0; O_3=73.0; $PM_{2.5}$=39.0; PM_{10}=53.0; NO_2=12.0; SO_2=33.0; CO=1.0	前	L4_1	16.15±0.20^{e}	94.87±0.34^{a}	0.24±0.05^{b}	东
		制曲车间	L4_2	22.02±1.61^{a}	63.39±4.25^{d}	0.22±0.14^{b}	东
		后	L4_3	20.45±1.09^{b}	76.37±6.05^{c}	0.41±0.32^{b}	东
		粉曲车间	L4_4	18.95±0.73^{c}	84.25±3.83^{b}	0.33±0.14^{b}	东
		天井	L4_TJ	20.84±0.36^{ab}	72.28±1.43^{c}	0.25±0.09^{b}	东
XC	AQI=33.0; O_3=57.0; $PM_{2.5}$=18.0; PM_{10}=28.0; NO_2=9.0; SO_2=25.0; CO=0.7	前	L4_Q	17.30±0.10^{de}	62.00±0.40^{d}	2.25±1.48^{a}	东南
		后	L4_H	17.50±0.10^{cde}	62.17±1.12^{d}	1.11±0.89^{ab}	东南
		制曲车间	L4_ZQ	18.05±0.17^{cd}	62.52±0.72^{d}	0.47±0.25^{b}	东北
		天井	L4_XTJ	18.83±0.65^{c}	61.77±1.46^{d}	0.42±0.12^{b}	东
			夏季(Summer)				
LC	AQI=64.0; O_3=59.0; $PM_{2.5}$=46.0; PM_{10}=51.0; NO_2=7.5; SO_2=23.5; CO=0.6	前	L5_1	20.31±0.09^{d}	87.64±0.25^{a}	0.45±0.21	东
		制曲车间	L5_2	29.75±4.66^{a}	42.19±9.91^{c}	0.72±0.81	东
		后	L5_3	23.90±0.37^{cd}	63.16±5.40^{b}	0.95±0.54	东
		粉曲车间	L5_4	24.72±2.29^{bc}	70.76±8.57^{b}	0.40±0.18	东
		天井	L5_TJ	28.31±2.31^{ab}	45.60±8.63^{c}	0.72±0.28	东
XC	AQI=33.7; O_3=50.7; $PM_{2.5}$=22.7; PM_{10}=27.3; NO_2=9.7; SO_2=17.7; CO=0.5	前	L5_Q	25.77±0.61^{bc}	67.67±0.71^{b}	0.94±0.74	东南
		后	L5_H	24.83±0.49^{bc}	66.77±0.32^{b}	0.80±0.67	东南
		制曲车间	L5_ZQ	24.88±0.32^{bc}	64.24±2.73^{b}	0.36±0.49	西南
		天井	L5_XTJ	25.35±1.07^{bc}	62.20±4.11^{b}	0.48±0.25	西南

注: 同一位置免培和可培方法各重复采样3次, 数据表示为平均值±相对标准偏差(n≥3); 不同字母代表显著性差异(对各季节分别作单因素方差分析, P<0.05); L1~L5分别代表冬、春(初春、仲春、暮春)及夏季。

样期间正值大曲生产，天气晴朗或多云，平均风速<2 m/s，采样流量控制为 12.0 L/min，采样时间为 15 min，然后装入 50 mL 无菌离心管，4 ℃ 保存待处理，采集完后及时在超净工作台中使用溶剂过滤器通过 0.22 μm 硝酸纤维素滤膜进行抽滤，并将滤膜放回 50 mL 离心管中，保存至−80 ℃ 冰箱待 DNA 的提取、扩增。

1.2.2　可培养方法　参考 GB 4789.2-2016 和 GB 4789.15-2016，采用筛孔撞击式采样器将环境中的细菌和真菌分别撞击在添加 0.1% 纳他霉素的 PCA 琼脂培养基（抑制霉菌和酵母）和孟加拉红琼脂培养基得以收集，采样流量 28.3 L/min，采样时间各 10 min，采样高度固定在 1.2 m。样品采集后及时送往实验室，分别于 37 和 28 ℃ 培养细菌和真菌 48 h，并对各级平板计数。

1.2.3　环境因子的测定　采样过程中，AR866 型风速仪和 TES1360A 型温湿度计测量采样点的风速、温度和湿度，记录风向，并从中国环境监测总站查询记录大气污染物（$PM_{2.5}$、PM_{10}、NO_2、SO_2、O_3、CO）和空气质量指数（air quality index，AQI）[19]，具体见表 1。

1.2.4　微生物的计数与分离　按照以下公式计算各采样点的菌落数。

$$P=\frac{N\times 1000}{Q\times T}$$

式中：P 为空气细菌或真菌数（CFU/m^3）；N 为六级平板的细菌或真菌数；T 为采样时间（min）；Q 为采样流量（28.3 L/min）。根据菌落形态特征和镜检结果，分别对细菌和真菌进行分类并编号，采用平板划线法和稀释涂布平板法对所选微生物进行分离纯化，挑选出单菌落，斜面培养后 4 ℃ 冰箱保存，待分子生物学鉴定。

1.2.5　分子生物学鉴定　使用 TSINGKE 植物 DNA 提取试剂盒（通用型）提取纯化的分离株的总 DNA，分别使用 16S 通用引物（27F/1492R）和 ITS 通用引物（ITS1/ITS4）分别进行扩增、测序，测序结果在 NCBI 数据库检索，确定其分类水平。

1.2.6　DNA 的提取、扩增及高通量测序　按照 He 等[20] 和 Tang 等[21] 所述方法进行总 DNA 提取和 PCR 扩增。按照 Fast DNA SPIN 提取试剂盒供应商提供的操作程序提取空气样品的总 DNA 后，Nanodrop ND-1000 测定其浓度和评估纯度，再用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳估算其分子量大小。分别使用通用引物 338F/806R 和通用引物 ITS5F/ITS1R 扩增细菌 16SrRNA 基因的 V3~V4 区和真菌 rRNA 基因的 ITS1 区。PCR 扩增产物用 Agencourt AMPure Beads 纯化，使用 PicoGreen dsDNA 检测试剂盒定量。PCR 纯化产物送至上海派森诺生物科技有限公司，使用 MiSeq 基因测序试剂盒 v3 进行 2×300 bp 双端测序。

1.2.7　生物信息学分析　采用 QIIME pipeline 处理原始序列，依据 Caporaso 等[22] 所述方法去除低质量序列，包括长度<150 bp，序列平均质量<20，单碱基重复数>8 bp 以及模糊的碱基。最后利用 UCLUST 算法将高质量的序列以 97% 的序列相似度聚成不同的操作单元（operational taxonomic unit，OTU）[23]。随后在 Greengenes（Release 13.8，http://greengenes.secondgenome.com/）和 UNITE（Release 8.0，https://unite.ut.ee/）数据库中检索比对这些序列，最后生成 OTU 表，记录每个样本中各 OTU 的丰度和分类。

1.3　数据处理

原始数据采用 IBM SPSS Statistics 26.0 进行单因素方差分析，$P<0.05$ 表示有统计学意义，所有试验平行 3 次，数据以平均值±相对标准偏差（relative standard deviation，RSD）表示。序列数据分析主要使用 QIIME（v1.8.0）进行，使用 R 软件（v4.0.5）进行组间相关性分析、主坐标分析（principal coordinate analysis，PCoA）和冗余分析（redundancy analysis，RDA），并采用贝叶斯算法软件 SourceTracker（v1.0）[24] 分别对新老厂内外环境空气微生物进行溯源分析，其他统计分析使用 Origin 2021。

2　结果与分析

2.1　同域不同点空气中可培微生物群落结构及与环境因子的相关性探讨

同季节，同域不同点可培细菌存在显著差异，可培真菌除夏季外差异显著（$P<0.05$），可培真菌数高于细菌数，初春和仲春老厂真菌数显著高于新厂（$P<0.05$），夏季老厂细菌数显著高于新厂（$P<0.05$）。冬季时，老厂总菌数多高于新厂类似位置的，而在暮春和夏季，新厂持续生产，老厂因待变迁，偶尔生产，制曲车间菌群数小于前者（图 2）。春季，新厂各采样点的菌群数是渐增，老厂则存在波动，可能与老厂间歇生产有关（图 3）。仲春和暮春的温度和湿度适合微生物生长繁殖，两个环境中菌落数在仲春和暮春时达到峰值或转折点（图 3）。总体上，冬、春、夏三季的菌群数是增加后降低的，季节间差异显著，且真菌群数较细菌群变化显著。

菌落总数、细菌和真菌数与环境因子的 Spearman 相关性结果（表 2）显示，菌落数与环境温度正相关，但与湿度、风速、风向呈负相关。细菌数与空气污染指数多呈正相关，尤其是与 O_3 浓度正相关性显著。真菌菌落数与环境温度正相关性显著，与除 O_3 外的空气污染指数呈负相关性。温度显著影响可培微生物的生长，空气污染程度可能是导致群落不稳定的关键因素。曾报道风速导致真菌孢子浓度差异显著[25]，大气中的 O_3 抑制微生物生长[19]，与当前的结果略有差异，可能与检出的种属有关，其原因待进一步探讨。

2.2　可培微生物群落的差异性

基于形态特征获得的分离株，细菌的 16S 系统

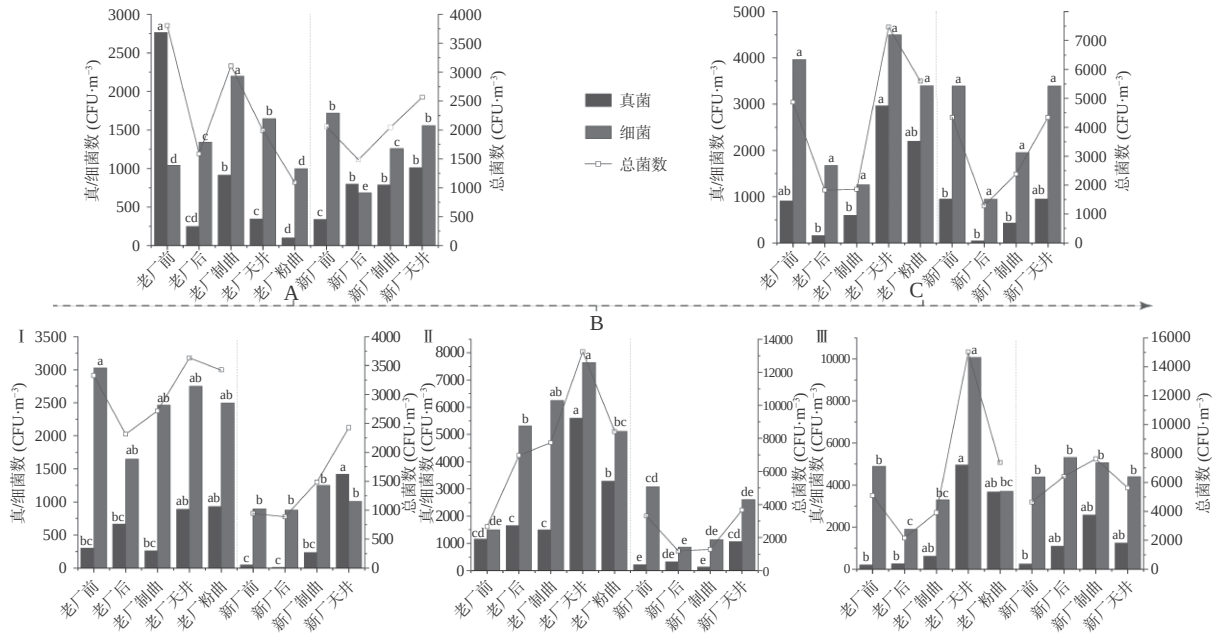


图 2 同季节不同位置的微生物计数结果

Fig.2 Microbial counting results at different locations in the same season

注: A-冬季; B-春季(Ⅰ-初春, Ⅱ-仲春, Ⅲ-暮春); C-夏季; 分别对细菌和真菌数作单因素方差分析, 不同字母代表显著性差异(单因素方差分析, $P<0.05$)。

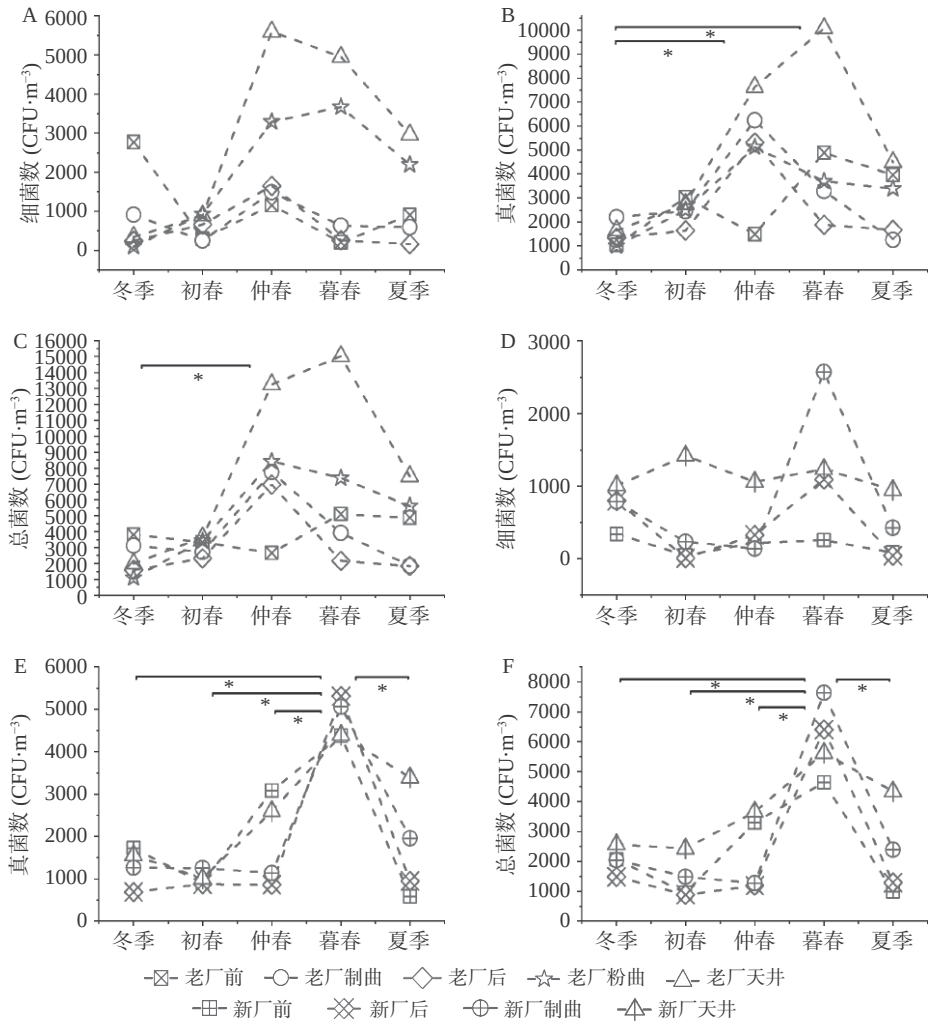


图 3 相同位置不同季节微生物计数平均结果

Fig.3 Average results of microbial counts in different seasons at the same location

注: 分别对老厂和新厂不同季节间作单因素方差分析(整体上), *表示季节间差异显著($P<0.05$)。

表 2　可培微生物计数与环境因子的 Spearman 相关系数

Table 2　Spearman correlation coefficient between cultivable microbial count and environmental factors

指标	环境因子										
	T	O_3	AQI	NO_2	$PM_{2.5}$	PM_{10}	SO_2	CO	WD	% RH	V
细菌数	0.212	0.320*	0.065	−0.014	0.102	0.097	0.085	0.039	−0.197	−0.218	−0.234
真菌数	0.329*	0.562**	−0.301*	−0.343*	−0.248	−0.231	−0.21	−0.186	−0.024	−0.247	−0.248
总菌数	0.300*	0.523**	−0.237	−0.279	−0.189	−0.169	−0.151	−0.134	−0.106	−0.223	−0.262

注：单因素方差分析，**差异极显著（P<0.01）；*差异显著（P<0.05）；表3同。

发育树如图 4A 和图 4B 所示。其中，细菌包括 101 个种，51 属，且老厂和新厂分别包含 27 个属 57 个种和 24 个属 44 个种。类似曾报道的结果[26]，除专性或严格厌氧的拟杆菌门 Bacteroidetes 难培养外，已鉴定的 37 个属主要是 *Actinobacteria*（15）、*Proteobacteria*（11）、*Firmicutes*（10）、*Deinococcus-Thermus*（1），前三者丰度分别为 40.54%、29.73% 和 27.0%。优势菌都是 *Bacillus*、*Staphylococcus*、*Pseudomonas*、*Kocuria*、*Streptomyces* 等，老厂的数量高于新厂的，*Agrococcus* 等 13 个属仅在前者中是次优菌，*Stenotrophomonas* 等 10 个属则在后者是次优属。此外，空气中可培优势细菌可能对大曲优势细菌有贡献，如 *Bacillus subtilis* 和 *Bacillus velezensis*[20] 等。

可培真菌包括 50 个属 69 个种，老厂和新厂分别是 29 个属 37 个种和 21 个属 32 个种。真菌的 ITS 系统发育树如图 4C 和图 4D 所示，真菌 Ascomycota（18）、Basidiomycota（9）和 Mucoromycota（3）的比例分别是 60%、30% 和 10%，优势真菌属包括 *Asper-*

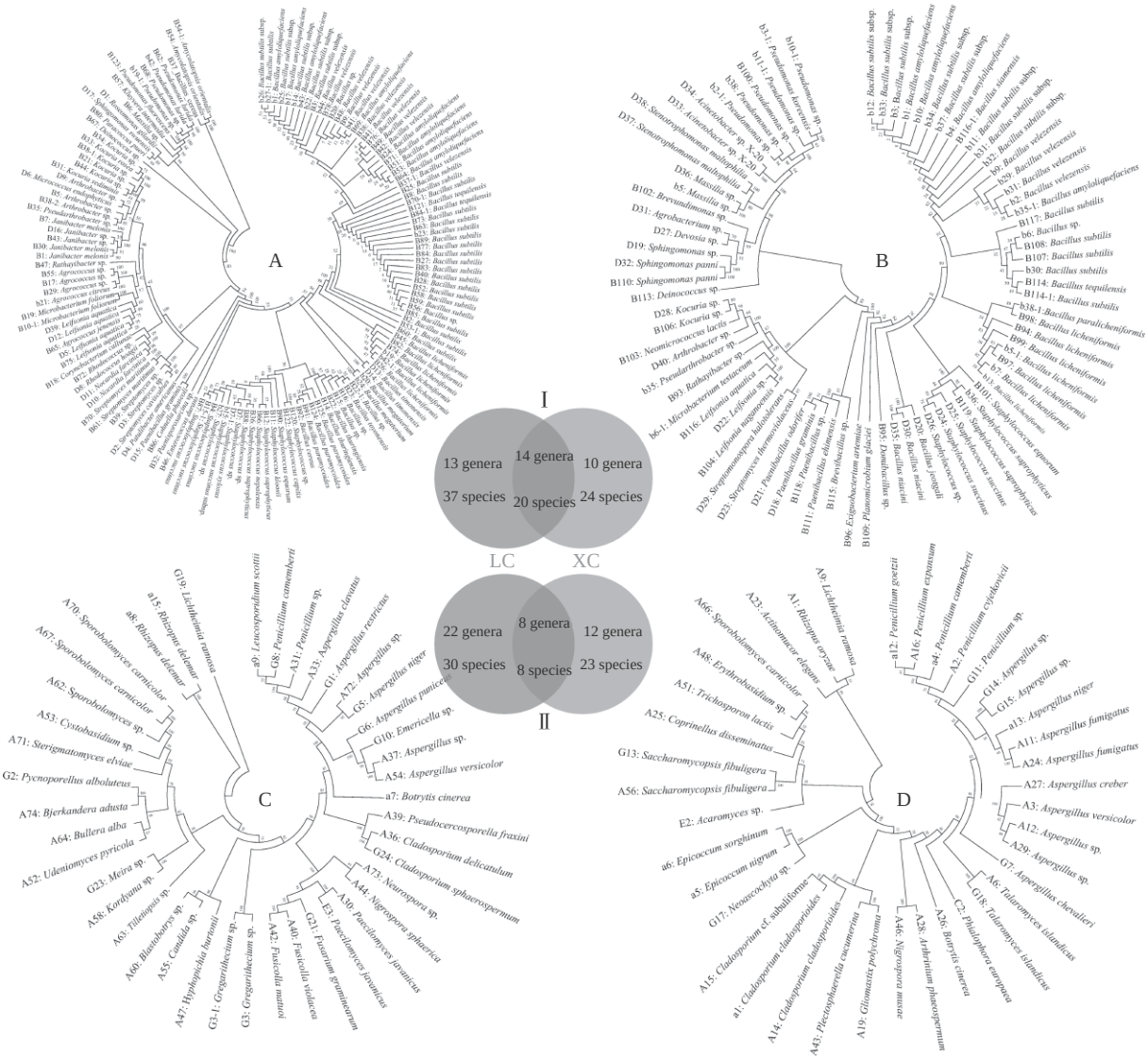


图 4　可培微生物的系统发育树及新老厂分类 Venn 图

Fig.4　Phylogenetic tree of culturable microorganisms and Venn diagram of new and old plant classification

注：A-老厂可培细菌；B-新厂可培细菌；C-老厂可培真菌；D-新厂可培真菌；Ⅰ-两厂细菌；Ⅱ-两厂真菌。

gillus、*Penicillium*、*Gladaxporism* 等，老厂霉菌和酵母数高于新厂的，*Aspergillus* sp.、*Rhizopus* sp.、*Lichtheimia ramosa* 等和 *Saccharomycopsis fibuligera* 亦同样是大曲中检出的优势霉菌和酵母[6,7]。

2.3 免培微生物 α-多样性及与环境因子的相关性探讨

各样品 16S rRNA 基因 V3~V4 区和 ITS 区分别共检出 22289 和 44964 个 OTU，两个生产地点的 α-多样性差异如图 5 所示。同季节，两厂细菌的 α-多样性仅略有差异，季节间差异显著。细菌丰富度和多样性从冬、春、夏季间是增后又减，在仲春季时最高，与冬和夏两季的差异显著（$P<0.05$）。真菌的多样性也类似细菌的，暮春时，α-多样性达到最大，显著高于初春的（$P<0.05$）。此外，真菌的 α-多样性显著小于细菌的，且不同于可培的结果，可能是部分菌不可培[27]。

α-多样性与环境因子的组间 Spearman 相关性分析（表 3）结果显示，与可培结果类似，但真菌的丰富度与温度和湿度分别是显著正相关和显著负相关，这两个参数与细菌 α-多样性分别呈负相关和正相关。可能由于细菌最适温湿度、营养需求（自养和异养）及好氧/厌氧的差异具有不同的生态位[28]，所以群落会因扰动和环境变化改变其结构、生理功能和相互作用关系，真菌群落多样性则相对稳定[29]。类似曾报道的结果[30]，空气污染指数与真菌多样性呈弱相关性，但与其丰富度呈强负相关。

2.4 免培微生物群落的差异性

免培和可培菌群的组成在门水平上无显著性差异，属水平群落组成结构如图 6 所示，季节对同域不同小生境的群落影响显著，尤其是细菌菌群的结构和相对丰度。细菌菌群包括 Proteobacteria、Acfinobacteria、Firmicutes、Bacteroidetes，其丰度分别在 71.08%~99.54%、0.11%~24.22%、0.19%~5.73%、0.01%~1.07%，另外，Deinococcus-Thermus（0.04%~6.38%）也是优势细菌之一。优势细菌包括 *Pseudomonas*、*Acinetobacter*、*Rhodococcus*、*Staphylococcus* 及 *Bacillus* 等，其中 *Pseudomonas* 和 *Acinetobacter* 的丰度在冬、春、夏间分别是减后又增和增后又减。真菌菌群主要包括 Ascomycota、Basidiomycota 和 Mucoromycota，群落结构较类似且稳定，Ascomycota 中的 *Phialemoniopsis* 丰度较高。不同的细菌属，除 *Agrobacterium* 两种培养方法的结果是一致的，而 *Saccharomycopsis*、*Neurospora* 和 *Botrytis* 等 3 个真菌属仅被可培方法确认。*Pseudomonas*、*Staphylococcus*、*Bacillus*、*Weissella*、*Leuconostoc*、*Lactobacillus*、*Thermoactinomyces*、*Pantoea* 等细菌属和 *Aspergillus*、*Thermoascus*、*Pichia*、*Paecilomyces*、*Thermomyces*、*Rhizomucor*、*Rhizopus*、*Trichosporon* 等真菌属也是大曲的优势属[20]，而 *Rhodococcus*、*Massilia*、*Stenotrophomonas*、*Cupriavidus* 等可能是浓香型大曲生产环境中独有的[31]。

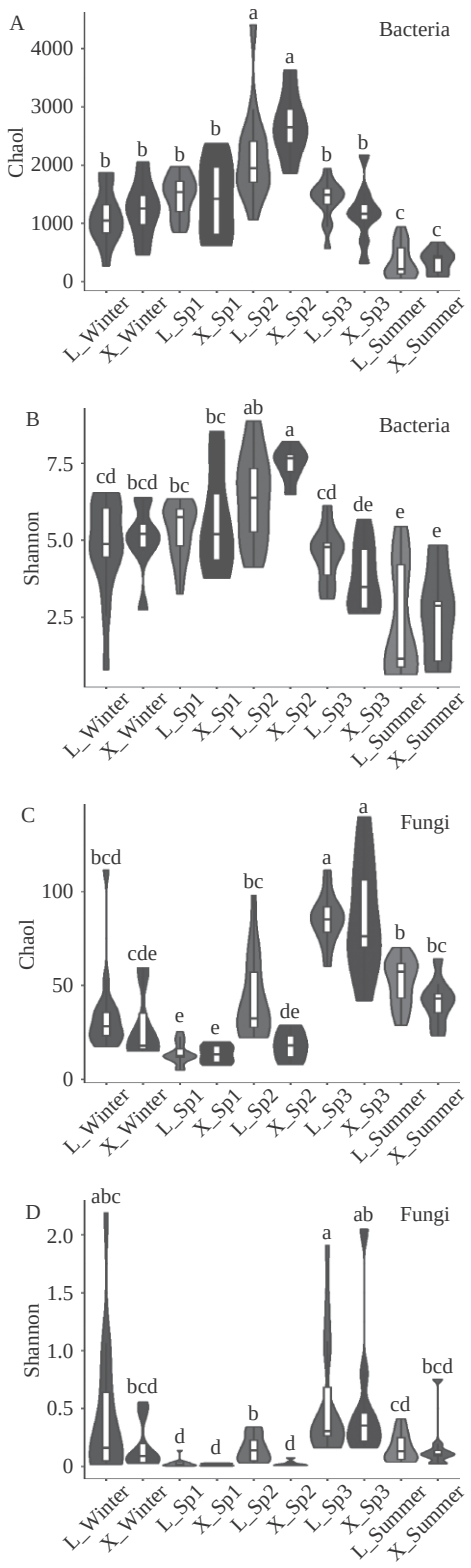


图 5 不同季节环境空气的 α-多样性

Fig.5 α-Diversity of ambient air in different seasons

注：A-老厂细菌；B-新厂细菌；C-老厂真菌；D-新厂真菌；不同字母代表显著性差异（单因素方差分析，$P<0.05$）。

2.5 免培微生物的 β-多样性及与环境因子的相关性探讨

基于 Bray-Curtis 距离的细菌和真菌的 PCoA 分析结果如图 7 所示。冬夏两季，老厂的细菌菌群

表 3　α-多样性与环境因子的 Spearman 相关系数

Table 3　Spearman correlation coefficient between α-diversity and environmental factors

指标		环境因子										
		T	O_3	CO	% RH	NO_2	AQI	$PM_{2.5}$	PM_{10}	SO_2	V	WD
细菌	Chao1	−0.085	0.362*	0.404**	0.161	0.492**	0.321*	0.271	0.416**	0.523**	−0.138	−0.086
	Shannon	−0.118	0.209	0.414**	0.233	0.606**	0.492**	0.440**	0.526**	0.593**	−0.056	−0.089
真菌	Chao1	0.317*	0.432**	−0.151	−0.299*	−0.472**	−0.312*	−0.244	−0.251	−0.307*	−0.113	−0.224
	Shannon	−0.036	0.178	0.219	−0.175	−0.125	−0.001	0.051	0.083	0.062	−0.197	−0.294*

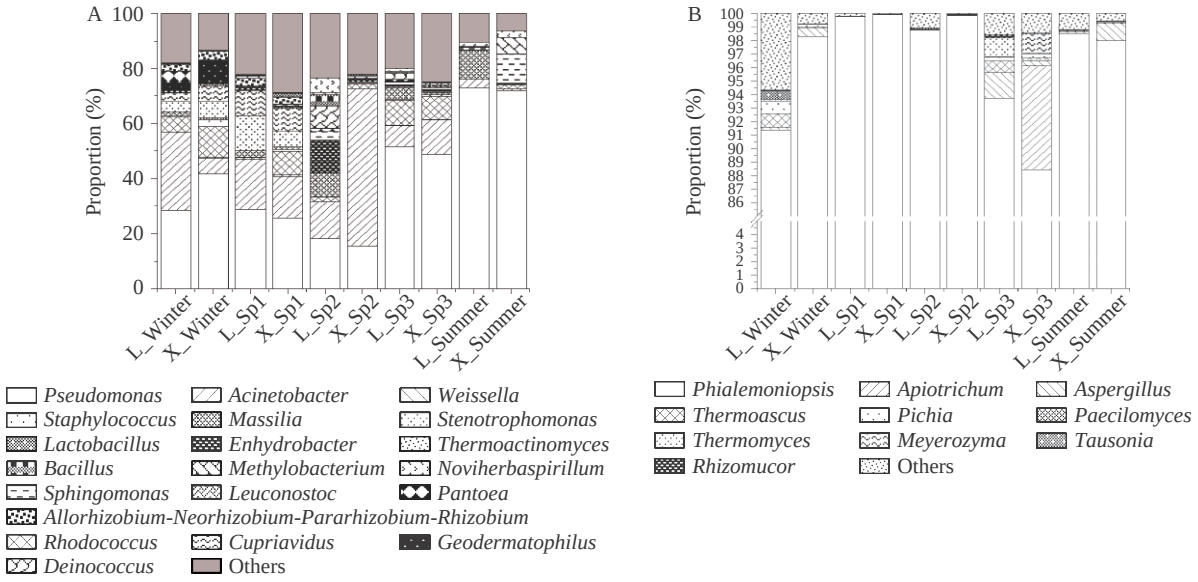


图 6　细菌(A)和真菌(B)的属水平群落组成

Fig.6　Community composition at genus level of bacteria (A) and fungi (B)

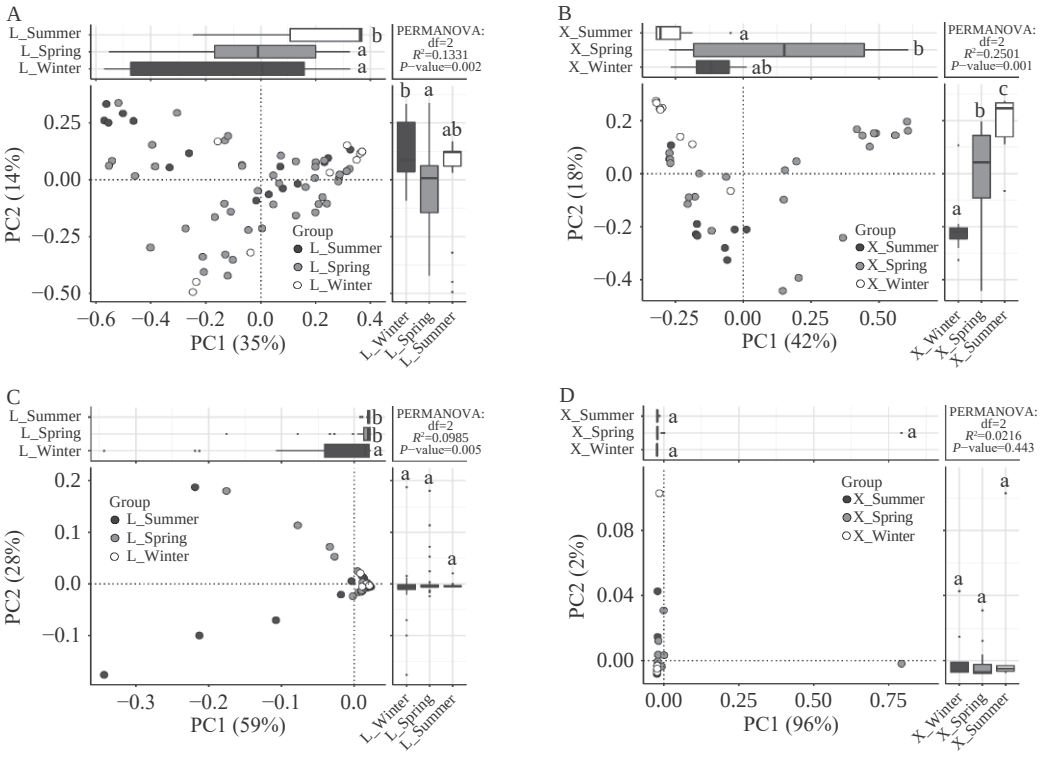


图 7　基于 Bray-Curtis 距离的主坐标分析

Fig.7　Principal coordinate analysis based on Bray-Curtis distance

注: A-老厂细菌; B-新厂细菌; C-老厂真菌; D-新厂真菌; 不同字母代表组间显著性差异(PERMANOVA 检验, P<0.05)。

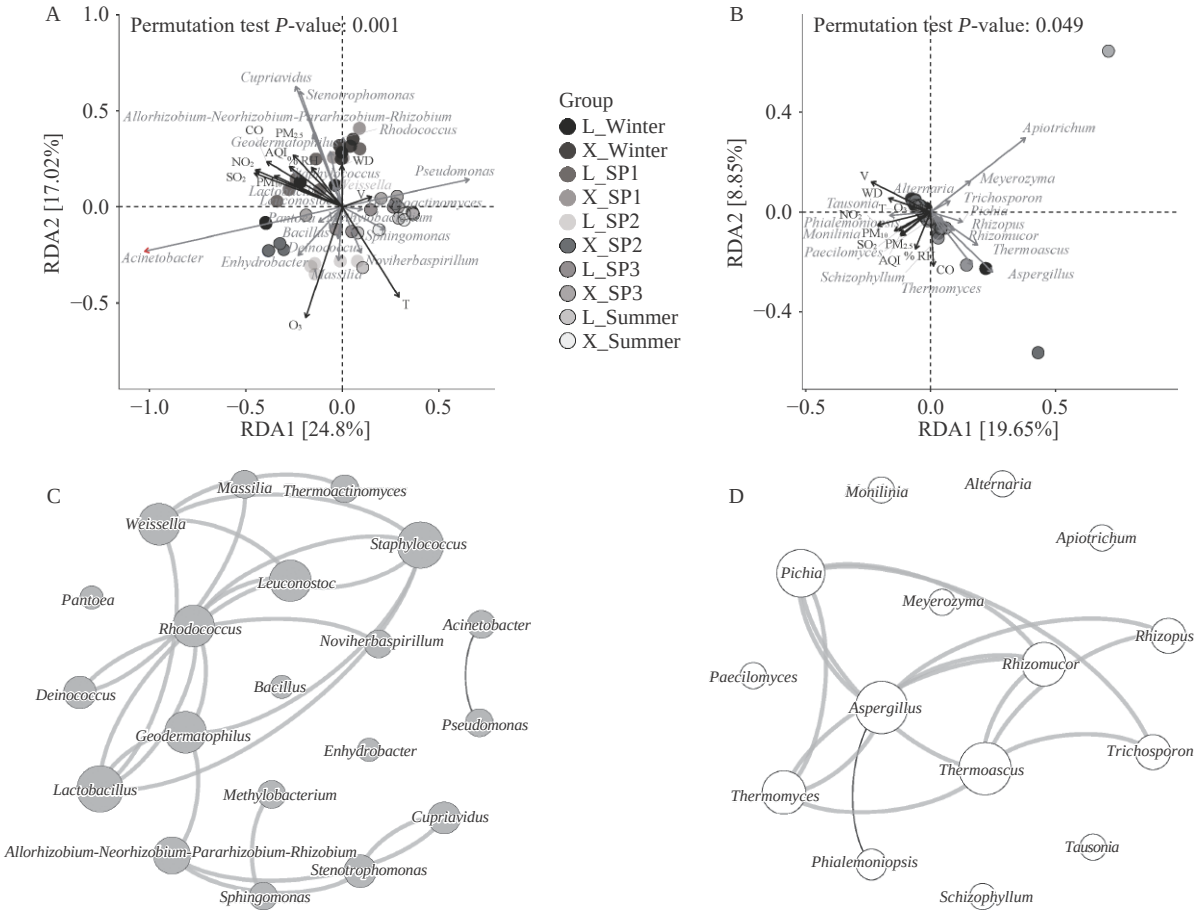


图 8 细菌(A, C)和真菌(B, D)的优势属与环境因子的相关性分析及优势属相关网络分析

Fig.8 Correlation analysis between dominant genera of bacteria (A, C) and fungi (B, D) and environmental factors and correlation network analysis of dominant genera

注: C 和 D 中, $P<0.05$ 表示具有显著性和 $r>0.6$ 表示 spearman 正相关, 边的灰色和黑色分别表示正相关和负相关。

组成差异显著, 春季的与冬、夏两季的有很高的重叠率, 新厂三季差异更显著, 变异系数更大。两个生产环境的真菌群落结构非常类似, 仅老厂的冬、春季节的少数样品的菌群组成略有差异, 而新厂个别样品距离较远。由此可见, 长期制曲小生境的菌群趋于稳定且丰富度更高。

小生境群落中优势属与环境因子的 RDA 分析及网络互作关系如图 8 所示。环境因子与细菌属(至少在一个组内平均丰度大于 5%, 图 8A)和真菌属(至少在一个组内平均丰度大于 0.5%, 图 8B)的相关性分别是极显著和显著。*Pseudomona* 与温度呈正相关而与湿度、大气污染指数等多呈负相关, *Rhodococcus* 则是相反。*Acinetobacter* 与 *Pseudomonas* 是负相关, 具有明显竞争性(图 8A 和图 8C)。真菌受温度等影响较小, 群落结构相对稳定。除 *Phialemoniopsis* 外, 真菌与空气污染指数多呈负相关(图 8B), *Aspergillus* 与 *Phialemoniopsis* 是负相关性, 而与多数的真菌正相关, 真菌群节点联系(图 8D)显著少于细菌的(图 8C)。总之, 细菌菌群结构更丰富, 易受季节的影响, 真菌的群落相对稳定。

基于贝叶斯算法软件 SourceTracker(v1.0)的季节间不同位点, 即楼内(sink)与楼外(source)的群落结构的溯源分析结果如图 9 所示, 可见楼外空气群

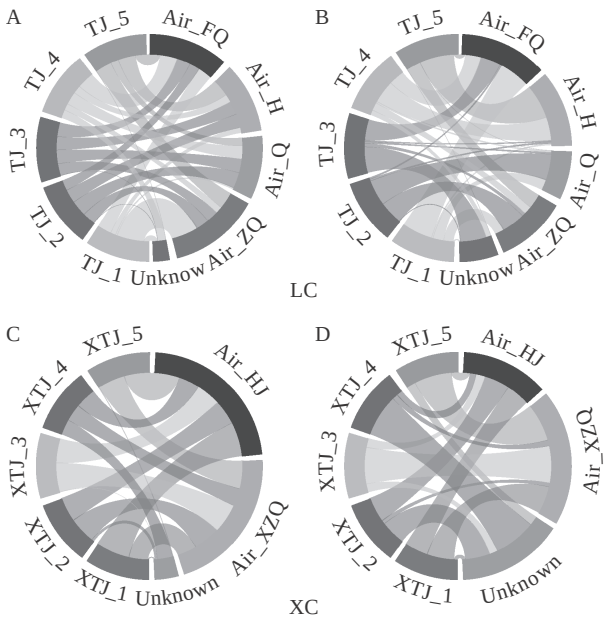


图 9 楼内外空气真菌(A, C)和细菌(B, D)的溯源和弦图

Fig.9 Tracing chord chart of air fungi (A, C) and bacteria (B, D) inside and outside building

注: TJ-老厂天井; XTJ-新厂天井; FQ-粉曲车间; ZQ-制曲车间; Q-老厂前; H-老厂后; HJ-新厂外围环境; 1~5-各季节。

落对楼内环境的影响和贡献在不同季节存在差异，这为解释不同季节制曲环境不同和大曲微生物溯源提供了新的思路，但不同小生境内微生物存在的交换和驱动效应[32]对大曲群落结构的影响仍需待进一步探讨。

3　结论

应用可培和免培方法探讨泸州老窖同域不同制曲小生境的空气微生物随季节的变化趋势的结果表明，可培微生物中细菌是优势，冬、春、夏三季的菌群数和 α-多样性是先增后降的，且季节间差异显著，尤其对真菌群数和细菌群落结构影响显著，细菌的丰富度和多样性则是显著大于真菌的。环境空气中细菌和真菌分别由 Acfinobacteria、Proteobacteria、Firmicutes、Bacteroidetes 以及 Deinococcus-Thermus 与 Ascomycota、Basidiomycota 及 Mucoromycota 等构成。同时，季节对同域不同小生境的群落影响显著，不同属的细菌菌群结构差异显著。空气中的 *Pseudomonas*、*Staphylococcus*、*Bacillus* 等 8 个优势细菌和 *Saccharomycopsis*、*Lichtheimia* 等 10 个优势真菌属可能是大曲中优势菌的来源。此外，环境温度和湿度也显著影响小生境群落结构，空气污染程度可能是导致群落波动的原因，长期的生产使用则使环境的物种数及多样性趋于丰富和稳定。研究结果表明制曲小生境的群落时空性特征显著，且为探讨大曲与环境微生物的相互关系及溯源性研究奠定了方法学基础。

参考文献

[1] XU Y, WANG D, FAN W L, et al. Traditional Chinese biotechnology[J]. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 2010, 122: 189−233.

[2] 王春晓, 袁国亿, 苏伟, 等. 白酒制曲环境和成品曲中产酸微生物分析[J]. 食品科学, 2020, 41(18): 120−126. [WANG C X, YUAN G Y, SU W, et al. Analysis of acid-producing microorganisms from Qu-making environment and mature Qu (Baijiu fermentation starter)[J]. Food Science, 2020, 41(18): 120−126.]

[3] 王琳, 胡小霞, 黄永光, 等. 环境因子对茅台镇不同轮次酿造环境细菌群落结构多样性的影响 [J]. 食品科学, 2022, 43(8): 150-157. [WANG L, HU X X, HUANG Y G, et al. Effects of environmental factors on diversity of bacterial community in different fermentation rounds in Maotai town[J]. Food Science, 2022, 43(8): 150-157.]

[4] DU H, WANG X S, ZHANG Y H, et al. Exploring the impacts of raw materials and environments on the microbiota in Chinese Daqu starter[J]. International Journal of Food Microbiology, 2019, 297: 32−40.

[5] YANG J G, DOU X, HAN P J, et al. Microbial diversity in Daqu during production of Luzhou-flavored liquor[J]. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 2017, 75(2): 136−144.

[6] 向玉萍, 邱树毅, 曹文涛, 等. 酱香型白酒核心产区大曲中霉菌的分离及鉴定[J]. 食品与发酵科技, 2019, 57(2): 56−65. [XIANG Y P, QIU S Y, CAO W T, et al. Isolation and identification of molds in Daqu of the core producing area of moutai-flavor liquor[J]. Food and Fermentation Sciences & Technology, 2019, 57(2): 56−65.]

[7] 朱文优, 聂尧, 徐岩. 不同季节大曲生产过程中真菌群落结构的演变[J]. 食品与机械, 2013, 33(10): 151−154. [ZHU W Y, NIE Y, XU Y. Deep sequencing reveals fungal community evolution in the production of Daqu fermentated different seasons[J]. Food & Machinery, 2013, 33(10): 151−154.]

[8] WANG L, HUANG Y G, HU X X, et al. The impact of environmental factors on the environmental bacterial diversity and composition in the Jiang-flavoured Baijiu production region[J/OL]. LWT, 2021, 149. DOI: 10.1016/j.lwt.2021.111784.

[9] SUN W L, XIAO H Z, PENG Q, et al. Analysis of bacterial diversity of Chinese Luzhou-flavor liquor brewed in different seasons by Illumina Miseq sequencing[J]. Annals of Microbiology, 2016, 66(3): 1293−1301.

[10] HAN X L, JIA S R, ZHANG W J. Analysis of Daqu produced in different seasons[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2016, 122(3): 397−402.

[11] 姚亚林, 邓杰, 任志强, 等. 不同品温大曲及其曲房空气的细菌群落变化规律和相关性[J]. 现代食品科技, 2021, 37(3): 62−69. [YAO Y L, DENG J, REN Z Q, et al. Variations and correlation between bacterial communities in Daqu and the workshop air at different temperatures[J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(3): 62−69.]

[12] PANG X N, HAN B Z, HUANG X N, et al. Effect of the environment microbiota on the flavour of light-flavour Baijiu during spontaneous fermentation[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 1−12.

[13] WANG X S, DU H, XU Y. Source tracking of prokaryotic communities in fermented grain of Chinese strong-flavor liquor[J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 244: 27−35.

[14] WANG X S, DU H, ZHANG Y H, et al. Environmental microbiota drives microbial succession and metabolic profiles during Chinese liquor fermentation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(4): e02369.

[15] MICHAEL S R, STEPHEN J G. The uncultured microbial majority[J]. Annual Review of Microbiology, 2003, 57: 369−394.

[16] SOLDEN L, LLOYD K, WRIGHTON K. The bright side of microbial dark matter: Lessons learned from the uncultivated majority[J]. Current Opinion in Microbiology, 2016, 31: 217−226.

[17] KNIGHT R, VRBANAC A, TAYLOR B C, et al. Best practices for analysing microbiomes[J]. Nature Reviews Microbiology, 2018, 16(7): 410−422.

[18] HALFVARSON J, BRISLAWN C J, LAMENDELLA R, et al. Dynamics of the human gut microbiome in inflammatory bowel disease[J]. Nature Microbiology, 2017, 2: 1−7.

[19] JI L, ZHANG Q, FU X W, et al. Feedback of airborne bacterial consortia to haze pollution with different PM2.5 levels in typical mountainous terrain of Jinan, China[J]. Science of the Total Environment, 2019: 695.

[20] HE G Q, DONG Y, HUANG J, et al. Alteration of microbial community for improving flavor character of Daqu by inoculation with *Bacillus velezensis* and *Bacillus subtilis*[J]. LWT, 2019, 111: 1−8.

[21] TANG Q X, HE G Q, HUANG J, et al. Characterizing relationship of microbial diversity and metabolite in Sichuan Xiaoqu[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 1−10.

[22] CAPORASO J G, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, et al. QIIME allows analysis of high- throughput community sequencing data[J]. Nature Publishing Group, 2010, 7(5): 335−336.

[23] EDGAR R C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST[J]. Bioinformatics, 2010, 26(19): 2460−2461.

[24] KNIGHTS D, KUCZYNSKI J, CHARLSON E S, et al. Bayesian community-wide culture-independent microbial source tracking[J]. Nature Methods, 2011, 8(9): 761−765.

[25] OLIVEIRA M, RIBEIRO H, ABREU I. Annual variation of fungal spores in atmosphere of Porto: 2003[J]. Ann Agric Environ Med, 2005, 12: 309−315.

[26] LEWIS W H, TAHON G, GEESINK P, et al. Innovations to culturing the uncultured microbial majority[J]. Nature Reviews Microbiology, 2021, 19(4): 225−240.

[27] XU H S, ROBERTS N, SINGLETON F L, et al. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment[J]. Microbial Ecology, 1982, 8(4): 313−323.

[28] XIA Q, RUFTY T, SHI W. Soil microbial diversity and composition: Links to soil texture and associated properties[J/OL]. Soil Biology and Biochemistry, 2020, 149: 107953. DOI: 10.1016/j.soilbio.2020.107953.

[29] TANG Q X, HUANG J, ZHANG S Y, et al. Keystone microbes affect the evolution and ecological coexistence of the community via species/strain specificity[J/OL]. Journal of Applied Microbiology, 2021. DOI:10.1111/jam.15255.

[30] HAMEED A A A, KHODER M I, IBRAHIM Y H, et al. Study on some factors affecting survivability of airborne fungi[J]. Science of the Total Environment, 2012, 414: 696−700.

[31] 王琳, 胡小霞, 黄永光. 茅台镇酱香型白酒不同生产轮次酿造环境的细菌菌群结构特征[J]. 食品科学, 2021, 42(22): 185−192. [WANG L, HU X X, HUANG Y G. Characteristics of bacterial microflora structure in environments of Maotai-flavor liquor brewing in different fermentation rounds in Maotai town[J]. Food Science, 2021, 42(22): 185−192.]

[32] BOKULICH N A, MILLS D A. Facility-specific "house" microbiome drives microbial landscapes of artisan cheesemaking plants[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(17): 5214−5223.

田洁, 孙瑞琳, 李俊华, 等. 马铃薯绿茶无糖戚风蛋糕的研制 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 155−162. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090024

TIAN Jie, SUN Ruilin, LI Junhua, et al. Preparation of Potato Green Tea Sugar-free Chiffon Cake[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 155−162. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090024

· 工艺技术 ·

马铃薯绿茶无糖戚风蛋糕的研制

田　洁, 孙瑞琳, 李俊华, 钱志伟*

（河南农业职业学院食品工程学院, 河南郑州 451450）

摘　要: 以马铃薯粉、绿茶粉为主要原料，制备出一种无糖戚风蛋糕。以蛋糕的质构特性、比容和感官评价为指标，考察了马铃薯粉、绿茶粉、木糖醇添加量对戚风蛋糕品质的影响。通过正交试验确定马铃薯绿茶无糖蛋糕的最佳工艺配方为：马铃薯粉添加量 20%，绿茶粉添加量 6%，蛋清添加量 230%，木糖醇添加量 70%。该戚风蛋糕外形完整、色泽淡绿、甜而不腻、清香细腻。与传统戚风蛋糕相比，总糖低（6.03%），粗纤维（7.89%）含量高，且具有抗氧化性（抗氧化能力 0.0560 mmol/g）。

关键词: 马铃薯粉, 绿茶粉, 木糖醇, 戚风蛋糕, 品质, 抗氧化力

中图分类号: TS213.2+3　　**文献标识码:** B　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0155−08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090024　　本文网刊:

Preparation of Potato Green Tea Sugar-free Chiffon Cake

TIAN Jie, SUN Ruilin, LI Junhua, QIAN Zhiwei*

（Henan Vocational College of Agriculture, Zhengzhou 451450, China）

Abstract: The potato green tea sugar-free chiffon cake was made by using potato flour and green tea flour instead of some low gluten flour, and using xylitol instead of sugar in traditional chiffon cake. With texture characteristics, specific volumes and sensory evaluation as evaluation indexes, the optimal formula was determined by single factors and orthogonal tests: 20% potato powder, 6% green tea powder, 230% egg white and 70% xylitol. The potato green tea sugar-free chiffon cake was light green color, sweet and not greasy, rich in flavor. Compared with traditional chiffon cakes, the total sugar content was low (6.03%) and the content of crude fiber was high (7.89%). It also had some oxidation resistance (antioxidant capacity 0.0560 mmol/g).

Key words: potato powder; green tea powder; xylitol; chiffon cake; quality; oxidation resistance

马铃薯是全球第四大重要的粮食作物, 仅次于小麦、稻谷和玉米[1]。在 2010 年马铃薯的世界产量已经达到了 3.2×10^8 吨[2]。我国是世界第一产量大国, 2020 年我国马铃薯鲜薯产量达到了 1 亿吨[3]。马铃薯块茎含有大量的淀粉, 能为人体提供丰富的热量, 且其营养成分丰富而齐全, 其丰富的维生素 C 含量远远超过粮食作物, 其蛋白质、糖类含量又远超一般蔬菜[4−6]。绿茶在我国已有上千年的历史, 富含茶多酚、儿茶素、叶绿素、咖啡碱、氨基酸、维生素等营养成分[7−9]。绿茶中的茶多酚、儿茶素具有抗氧化、延缓衰老、降血脂和降血糖等功能[10−11]。木糖醇的甜度几乎和蔗糖一样, 但与蔗糖相比, 它的能量值更低, 且其本身就是人体正常糖类代谢的中间体, 使用安全性高, 广泛应用于食品加工中[12]。糖尿病是由于体内糖类物质等代谢紊乱造成的, 众多糖尿病患者的饮食需求受到限制, 特别是喜爱甜食的患者的选择范围更小, 木糖醇的代谢与胰岛素无关, 因此开发低糖、低脂、清淡和营养平衡的产品显得尤为重要。

蛋糕因其松软的口感和良好的风味[13], 在全世界范围内都深受消费者的喜爱[14−16], 尤其是常见的戚风蛋糕。戚风蛋糕是乳沫类和面糊类蛋糕改良综合而成的, 制作时蛋白、蛋黄需分开, 分别打发, 最后混

收稿日期: 2021−09−03

基金项目: 2019 年度河南农业职业学院科研项目（HNACKY-2019-02）; 2019 年度河南农业职业学院科研项目（HNACKY-2019-05）; 2019 年度河南农业职业学院科研创新团队项目（HNACKT-2019-02）。

作者简介: 田洁（1979−）, 女, 硕士, 讲师, 研究方向: 食品加工, E-mail: 2006110129@hnca.edu.cn。

*** 通信作者:** 钱志伟（1969−）, 男, 硕士, 教授, 研究方向: 功能性食品, E-mail: qianzhiwei@hnca.edu.cn。

匀。戚风蛋糕组织最为蓬松，水分多而味道清淡不腻。马铃薯粉的高膳食纤维、低脂肪、富钾元素特性及绿茶粉中茶多酚的抗氧化特性等相关研究较多，应用也比较广泛，但在木糖醇戚风蛋糕中同时添加马铃薯粉和绿茶粉，赋予蛋糕均衡的营养价值及功能特性的工艺优化研究还未见报道。

本文是在戚风蛋糕传统工艺的基础上，用木糖醇取代白砂糖，添加马铃薯粉和绿茶粉进行工艺优化，以期获得营养价值高、保健功能强，且口感上更为细腻，香气更为宜人的无糖蛋糕，为新型戚风蛋糕的开发提供依据。

1 材料与方法

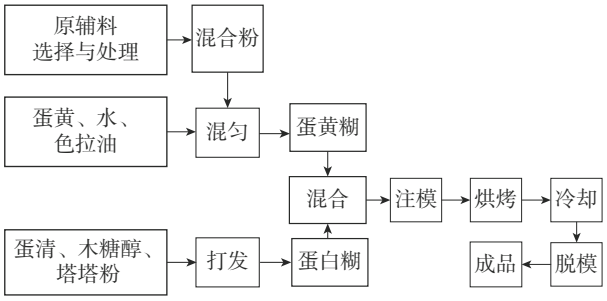
1.1 材料与仪器

糕点粉　青岛星华粮油食品有限公司；马铃薯粉、新鲜鸡蛋、纯净水　市售；绿茶粉　自制；木糖醇　南京甘汁园糖业有限公司；色拉油　河南爱厨植物油有限公司；泡打粉　安琪酵母股份有限公司；塔塔粉　广州焙乐道食品有限公司。

YP502 电子天平　上海柯祁仪器设备有限公司；UV-2350 紫外可见分光光度计　北京同德创业科技有限公司；JM-7LT 型搅拌机　珠海三麦机械有限公司；SM2-521 远红外线烤箱　新麦机械有限公司；TMS-PRO 型质构仪　美国 FTC 公司；JMTY 型面包体积测定仪　杭州大成光电仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1　戚风蛋糕的制作流程及操作要点



1.2.1.1　原料粉的制备　将糕点粉、马铃薯粉和泡打粉过 100 目筛后备用，选取优质绿茶在粉碎机中粉碎后，过 100 目筛，备用。

1.2.1.2　蛋黄糊制作　将纯净水和色拉油搅拌充分混合后，再加入蛋黄，搅拌均匀，最后加入混合好的原料粉（糕点粉、马铃薯粉、绿茶粉和泡打粉的混合物），搅拌均匀，即为蛋黄糊。

1.2.1.3　蛋白糊制作　将蛋清、木糖醇、塔塔粉一起放入搅拌缸中，先慢速搅拌均匀木糖醇完全融化，再快速搅拌至干性发泡期，即为蛋白糊。

1.2.1.4　混合　先取 1/3 的蛋白糊加入蛋黄糊中，由下至上翻拌均匀后，再加入剩下的 2/3 的蛋白糊中，翻拌均匀，即为蛋糕糊。

1.2.1.5　注模　将制作好的蛋糕糊注入戚风蛋糕模具中，七至八成满即可。

1.2.1.6　烘烤　将已注模的蛋糕糊放置于已预热的面火 180 ℃，底火 165 ℃ 烤箱中，烘烤 50 min。

1.2.1.7　脱模　将已烤熟还在模具中的蛋糕从烘箱中取出，倒置在凉架上冷却。冷却 1 h 后脱模即为成品。

1.2.2　单因素实验

1.2.2.1　马铃薯粉添加量对蛋糕品质的影响　分别按照糕点粉质量的 10%、15%、20%、25%、30%、35% 添加马铃薯粉后混匀，再分别加入糕点粉质量 6% 的绿茶粉、210% 的蛋清、80% 的木糖醇、1% 的泡打粉后，按照工艺流程制作戚风蛋糕，考察马铃薯粉添加量对蛋糕质构特性、感官评分和比容的影响。

1.2.2.2　绿茶粉添加量对蛋糕品质的影响　分别按照糕点粉质量的 2%、4%、6%、8%、10% 添加绿茶粉后混匀，再分别加入糕点粉质量 20% 的马铃薯、210% 的蛋清、80% 的木糖醇、1% 的泡打粉后，按照工艺流程制作戚风蛋糕，考察绿茶粉添加量对蛋糕质构特性、感官评分和比容的影响。

1.2.2.3　蛋清添加量对蛋糕品质的影响　按照糕点粉质量的 20% 和 6% 添加马铃薯粉和绿茶粉，依次添加 150%、170%、190%、210%、230% 添加蛋清，再分别添加 80% 的木糖醇、1% 的泡打粉后，按照工艺流程制作戚风蛋糕，考察蛋清添加量对蛋糕质构特性、感官评分和比容的影响。

1.2.2.4　泡打粉添加量对蛋糕品质的影响　按照糕点粉质量的 20% 和 6% 添加马铃薯粉和绿茶粉，依次添加 0.5%、0.7%、0.9%、1.1%、1.3% 添加泡打粉，再分别添加 210% 的蛋清、80% 的木糖醇后，按照工艺流程制作戚风蛋糕，考察泡打粉添加量对蛋糕质构特性、感官评分和比容的影响。

1.2.2.5　木糖醇添加量对蛋糕品质的影响　按照糕点粉质量的 20% 和 6% 添加马铃薯粉和绿茶粉，依次添加 65%、70%、75%、80%、85% 添加木糖醇，再分别添加 210% 的蛋清、1% 的泡打粉后，按照工艺流程制作戚风蛋糕，考察木糖醇添加量对蛋糕质构特性、感官评分和比容的影响。

1.2.3　正交试验　在单因素实验结果的基础上，选取对蛋糕品质影响较大的四个因素（马铃薯粉添加量、绿茶粉添加量、蛋清添加量和木糖醇添加量），以感官评分和比容为主要评价标准，设计 $L_9(3^4)$ 正交试验优化马铃薯绿茶无糖戚风蛋糕的工艺，泡打粉的添加量以单因素结果为准。具体配比见表 1。

表 1　正交试验因素与水平

Table 1　Factors and levels for orthogonal test

水平	因素			
	A马铃薯粉添加量 (%)	B绿茶粉添加量 (%)	C蛋清添加量 (%)	D木糖醇添加量 (%)
1	15	4	190	70
2	20	6	210	75
3	25	8	230	80

1.2.4　品质评价方法

1.2.4.1　待测样品的制备　参考杨利玲等[17]、阮征等[18]方法并适当修改，即将冷却后的成品蛋糕脱模，稍加修正后，用不锈钢锯齿刀将蛋糕切成 5 cm×5 cm×5 cm 的立方块后待测。

1.2.4.2　蛋糕质构测定　一般来说，蛋糕的硬度、咀嚼性越小，蛋糕的品质越好[19]。本文以弹性、硬度、咀嚼性三个质构指标，选用 TMS-PRO 型质构仪，采用 TPA 测试模式，参照王雪等[20]、丁捷等[21]稍加改进，采用 TMS 38.1 mm Perspex 探头，25 N 的力量感应元，速度 60 mm/min、形变量 50%，起始力 1.0N，测定马铃薯绿茶戚风蛋糕的质构特性，每个样品平均测定三次，取其平均值。

1.2.4.3　蛋糕比容测定　参照王兆燃等[22]、Li 等[23]方法稍作改动。取出冷却好的蛋糕，采用面包体积测定仪测定其体积 V。再用天平秤其质量 m，则蛋糕比容 $C(cm^3/g)=\frac{蛋糕体积（cm^3/g）}{蛋糕质量（g）}$。每个样品平均测定三次，取其平均值。

1.2.4.4　感官评分　参考 GB/T 20977-2007《糕点通则》中对糕点的感官评定要求及赵谢等、Ritika 等[24−25]方法，结合本品特点制定马铃薯绿茶无糖戚风蛋糕的感官评价标准，见表 2。将制作好的蛋糕，随机分发给 10 位 18~55 岁，男女比例各占一半的具有食品专业背景的师生进行感评打分。

1.2.4.5　蛋糕营养成分测定　蛋糕总糖含量测定，参照 GB/T 23780-2009 糕点中总糖的检测[26]；蛋糕蛋白质含量测定，参照 GB/T 5009.5-2016 食品中蛋白质的测定[27]；蛋糕水分含量测定，参照 GB/T 5009.3-2016 食品中水分的测定[28]；蛋糕脂肪含量测定，参照 GB/T 5009.6-2016 食品中脂肪的测定[29]；蛋糕粗纤维含量测定，参照 GB/T 5009.10-2003 植物类食品中粗纤维的测定[30]；蛋糕灰分含量测定，参照 GB/T 5009.4-2016 食品中灰分的测定[31]。

1.2.4.6　蛋糕总抗氧化能力测定　为检验绿茶粉对蛋糕抗氧化能力的影响，对蛋糕进行抗氧化能力测定，再对比市售蛋糕。具体测试方法[32]为：采用 FRAP 方法进行测定。将 0.2 mL 样品提取液加入至 10 mL 具塞比色管中，然后将 0.6 mL 水和 6 mL 经过预热至 37 ℃ 的 FRAP 工作液加入，混合均匀后放置 5 min，于 593 nm 处测定其吸光度，最终样品的总抗氧化能力以 $FeSO_4$(mmol/g)表示。

1.3　数据处理

所有数据均为三次平行测量的平均值，采用正交设计助手Ⅱ V3.1 专业版进行实验设计和数据分析，利用 Origin 8.5 作图，运用 SPSSS.20 进行差异显著性分析。

2　结果与分析

2.1　单因素实验结果

2.1.1　马铃薯粉添加量对蛋糕品质的影响　由图 1 可知，不同马铃薯粉添加量蛋糕的比容及感官评分均存在明显差异。马铃薯粉添加量为 10%、30%、35% 时的蛋糕感官评分与其他组存在显著性差异($P<0.05$)，马铃薯粉添加量为 15%、20%、25% 时的蛋糕感官评分彼此间不存在显著性差异($P>0.05$)，且随着马铃薯粉添加量的增加，蛋糕感官评分呈现先增加后降低的趋势，感官评定最高时马铃薯粉的添加量为 15%；马铃薯的添加量为 10%、25%、30%、35%时的蛋糕比容与其他组存在显著性差异($P<0.05$)，马铃薯的添加量为 15%、20% 时蛋糕比容间不存在显著性差异($P>0.05$)，且蛋糕比容总体呈下降的趋势。适量添加马铃薯粉可增加蛋糕的风味和口感，增加蛋糕的细腻感。当添加量超过 30% 后，蛋糕的口感和组织状态

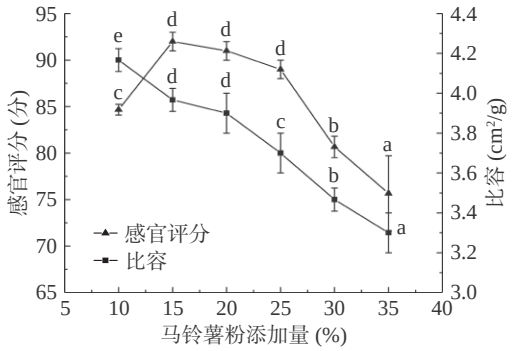


图 1　马铃薯粉添加量对蛋糕感官评分和比容的影响

Fig.1　Effects of potato flour addition on sensory score and specific volume of cakes

注：相同字母表示无显著性差异($P>0.05$)；不同字母表示差异显著($P<0.05$)；图 2~图 5 同。

表 2　马铃薯绿茶无糖蛋糕的感官评价标准(分)

Table 2　Sensory evaluation standard of potato green tea sugar-free cake (scores)

指标	分值	优	良	差
色泽	20	外表色泽呈均匀的金黄色，内部呈均匀的暗绿色，无焦糊和黑斑(16~20)	外表色泽呈较为均匀的金黄色，内部呈均匀的暗绿色，无明显焦糊和黑斑(11~15)	外表颜色不均匀，内部呈褐色，肉眼可见焦糊和黑斑(0~10)
形态	20	外形完整，丰满规范，厚薄均匀(16~20)	外形较为完整，丰满规范，厚薄比较均匀(11~15)	外形不整齐，皱、裂、干瘪(0~10)
内部结构	25	内部组织细密，蜂窝结构均匀，有弹性，按压后很快恢复(21~25)	内部组织较为细密，蜂窝结构不太均匀，有弹性，按压后能恢复(16~20)	内部组织紧实，蜂窝结构不明显，基本没有弹性。(0~15)
气味、口感	25	蛋糕香味纯正，有明显马铃薯和绿茶的风味，无其它异味，口味绵软纯正，糕体松软、细腻(21~25)	有一点蛋糕香味，马铃薯和绿茶的风味不突出，无异味，口味绵软，糕体比较松软、细腻(16~20)	无蛋糕香味，没有马铃薯和绿茶的风味，有异味，口感扎实，糕体较硬(0~15)
甜度	10	稍甜(8~10)	适中(5~7)	甜度不足(0~4)

略有下降。由表 3 也可以看出，马铃薯粉添加量为 10%、15%、20%、25%、30%、35% 时蛋糕的弹性、硬度和咀嚼性彼此间均具有显著性差异（P<0.05）；随着马铃薯粉添加量的增加，蛋糕的硬度增加，弹性下降，咀嚼性增大，这是因为马铃薯粉中没有面筋性蛋白，面糊中的面筋性蛋白减少后难以支撑起蛋糕的体积[33]，蛋糕比容下降，致使蛋糕不松软，综合品质略有下降。综合各项指标可得出马铃薯粉的适宜添加量为 15%~25%。

表 3 马铃薯粉添加量对蛋糕弹性、硬度和咀嚼性的影响

Table 3 Effects of potato flour addition on elasticity, toughness and chewiness of cakes

马铃薯粉添加量(%)	弹性(mm)	硬度(N)	咀嚼性(mJ)
10	6.55±0.03^{f}	9.18±0.02^{a}	23.18±0.02^{a}
15	5.86±0.01^{e}	10.16±0.04^{b}	24.23±0.02^{b}
20	5.44±0.03^{d}	10.82±0.03^{c}	25.35±0.07^{d}
25	5.34±0.03^{c}	11.69±0.10^{d}	24.80±0.12^{c}
30	4.87±0.01^{b}	13.66±0.22^{e}	26.06±0.07^{e}
35	4.18±0.01^{a}	15.56±0.05^{f}	27.55±0.22^{f}

注：数值以平均值±SD表示，相同字母表示无显著性差异（P>0.05）；不同字母表示差异显著（P<0.05）；表4~表7、表9同。

2.1.2 绿茶粉添加量对蛋糕品质的影响 由图 2 可知，不同绿茶粉添加量蛋糕的比容和感官评分均存在明显差异，绿茶粉添加量为 10% 时蛋糕的感官评分与其他组存在显著性差异（P<0.05），绿茶粉添加量为 2%、4%、6%、8% 时蛋糕的感官评分彼此间不存在显著性差异（P>0.05），且随着绿茶粉添加量的增加，蛋糕的感官评分呈先增加后下降的趋势，绿茶粉添加量为 4% 时感官评分最高，添加量为 4%~8% 时感官评分变化不明显，且不存在显著性差异；绿茶粉添加量为 2% 时蛋糕的比容与绿茶粉添加量为 4%、6%、8% 时蛋糕的比容和绿茶粉添加量为 10% 时蛋糕的比容存在显著性差异（P<0.05），但绿茶粉添加量为 4%、6%、8% 时蛋糕的比容彼此间没有显著性差异（P>0.05），且蛋糕比容随绿茶粉添加量增加呈下降趋势。由表 4 可知，不同绿茶粉添加量对蛋糕的弹性、硬度及咀嚼性也存在明显差异，绿茶粉添加量为 4%、10% 时蛋糕的弹性与其他组存在显著性差异（P<0.05），绿茶粉添加量为 2%、6%、8% 时蛋糕的弹性彼此间没有显著性差异（P>0.05）；绿茶粉添加量为 6%、8%、10% 时蛋糕的硬度也与其他组存在显著性差异（P<0.05），绿茶粉添加量为 2%、4% 时蛋糕的硬度间没有显著性差异（P>0.05），绿茶粉添加量为 2% 时蛋糕的咀嚼性与绿茶粉添加量为 6% 时蛋糕的咀嚼性具有显著性差异（P<0.05），而与绿茶粉添加量为 4%、8%、10% 时蛋糕的咀嚼性彼此间均没有显著性差异（P>0.05），绿茶粉添加量为 6% 时蛋糕的咀嚼性与绿茶粉添加量为 10% 时蛋糕的咀嚼性具有显著性差异（P<0.05）。且随着添加量的增加，蛋糕的弹性下降，硬度增加。当绿茶粉添加量为 8% 时，蛋糕切面略粗糙，口感略有苦味，绿茶粉添加量为

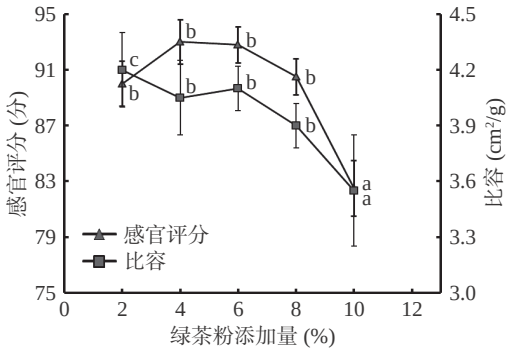


图 2 绿茶粉添加量蛋糕感官评分和比容的影响

Fig.2 Effects of green tea flour addition on sensory score and specific volume of cakes

表 4 绿茶粉添加量对蛋糕弹性、硬度和咀嚼性的影响

Table 4 Effects of green tea flour addition on elasticity, toughness and chewiness of cakes

绿茶粉添加量(%)	弹性(mm)	硬度(N)	咀嚼性(mJ)
2	5.80±0.37^{b}	9.77±0.43^{a}	25.53±1.11^{b}
4	6.56±0.31^{c}	9.94±0.33^{a}	24.70±0.48^{ab}
6	6.00±0.08^{b}	11.55±0.52^{b}	23.55±0.75^{a}
8	5.88±0.11^{b}	12.94±0.11^{c}	24.29±0.35^{ab}
10	5.33±0.16^{a}	14.19±0.30^{d}	25.34±0.18^{b}

10% 时，蛋糕苦味太重，掩盖了蛋糕应有的风味。适量添加绿茶粉可赋予蛋糕淡淡茶叶的清香而不影响蛋糕柔软细腻的口感。综合考虑，绿茶粉的添加量为 4%~8% 为宜。

2.1.3 蛋清添加量对蛋糕品质的影响 由图 3 可知，不同蛋清添加量蛋糕的比容及感官评分均存在明显差异，蛋清添加量为 150%、170%、210% 时蛋糕的感官评分与其他组存在显著性差异（P<0.05），而蛋清添加量为 190%、230% 时蛋糕的感官评分不存在显著性差异（P>0.05）；蛋清添加量为 150%、170%、230% 时蛋糕的比容与其他组存在显著性差异（P<0.05），而蛋清添加量为 190%、210% 时蛋糕的比容间均不存在显著性差异（P>0.05），且随着蛋清添加量的增加，蛋糕的比容呈上升趋势，而感官评分先增加后降低，其原因是由于适量添加蛋清，蛋糕糊比较容易打发，可增加蛋糕的柔软性和细腻感，赋予蛋糕特有的清香；蛋清添加量过多，其蛋腥味也会随之增大，掩盖蛋糕的特有风味，蛋糕的总体可接受性降低。由表 5 可知，不同蛋清添加量弹性、硬度及咀嚼性均存在明显差异。蛋清添加量为 150% 时蛋糕的弹性与其他组间均存在显著性差异（P<0.05），蛋清添加量为 170%、190% 时蛋糕的弹性间没有显著性差异，蛋清添加量为 210%、230% 时也不具有显著性差异（P>0.05）；蛋清添加量为 150%、170%、190%、210%、230% 时蛋糕的硬度均存在显著性差异（P<0.05）；蛋清添加量为 150%、170%、190%时蛋糕的咀嚼性与其他组间存在显著性差异（P<0.05），而蛋清添加量为 150%、170%、190% 时蛋糕的咀嚼性不存在显著性差异，蛋清添加量为 210%、230% 时蛋糕

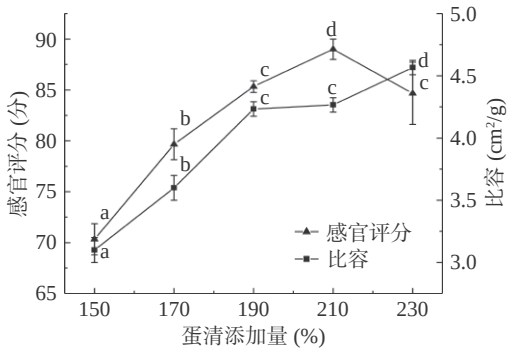


图 3　蛋清添加量对蛋糕感官评分和比容的影响

Fig.3　Effects of egg white addition on sensory score and specific volume of cakes

表 5　蛋清添加量对蛋糕弹性、硬度和咀嚼性的影响

Table 5　Effects of egg white addition on elasticity, toughness and chewiness of cakes

蛋清添加量(%)	弹性(mm)	硬度(N)	咀嚼性(mJ)
150	4.91±0.28^{a}	19.73±0.73^{e}	22.32±0.43^{a}
170	6.24±0.30^{b}	13.09±0.13^{d}	22.94±1.70^{a}
190	6.66±0.31^{b}	9.51±0.71^{c}	23.31±1.28^{a}
210	7.54±0.93^{c}	8.05±0.82^{b}	25.71±0.85^{b}
230	8.13±0.13^{c}	5.26±0.16^{a}	27.25±1.35^{b}

的咀嚼性也不存在显著性差异(P>0.05)。且随着蛋清添加量的增加，蛋糕的弹性不断增加，硬度下降较为明显，咀嚼性也不断增加。综合评价，蛋清的适宜添加量为 210%。

2.1.4　泡打粉添加量对蛋糕品质的影响　由图 4 可知，不同泡打粉添加量蛋糕的比容及感官评分均存在明显差异。泡打粉添加量为 0.5%、0.7%、1.3% 时蛋糕的感官评分与其他组存在显著性差异(P<0.05)，而泡打粉添加量为 0.9%、1.1% 时蛋糕的感官评分间没有显著性差异(P>0.05)；泡打粉添加量为 0.5%、0.7% 时蛋糕的比容与泡打粉添加量为 1.3% 时蛋糕的比容存在显著性差异(P<0.05)，泡打粉添加量为 0.5%、0.7%、0.9%、1.1% 时蛋糕的比容间不存在显著性差异，泡打粉添加量为 0.9%、1.1%、1.3% 时蛋糕的比容间也不存在显著性差异(P>0.05)。且随着泡打粉添加量的增加，蛋糕的感官评分呈现先增加后降低的趋势，感官平分最高时，泡打粉添加量为 0.9%，当泡打粉添加量超过 1.1% 时，泡打粉的碱性气味会影响蛋糕整体风味，所以会导致其感官评分降低；蛋糕比容总体趋势变化不大。由表 6 可知，不同泡打粉添加量对蛋糕弹性、硬度存在显著性差异。泡打粉添加量为 0.5%、0.9% 时蛋糕的弹性与泡打粉添加量为 1.3%时蛋糕的弹性存在显著性差异(P<0.05)，泡打粉添加量为 0.5%、0.7%、0.9%、1.1% 时蛋糕的弹性不存在显著性差异，泡打粉添加量为 0.7%、1.1%、1.3%时蛋糕的弹性也不存在显著性差异(P>0.05)；泡打粉添加量为 0.5% 时蛋糕的硬度与泡打粉添加量为 0.9%、1.1% 时蛋糕的硬度和泡打粉添加量为 1.3% 时蛋糕的硬度存在显著性差异(P<0.05)，泡打粉添加量为 0.5%、0.7% 时蛋糕的硬度间不存在显著性差异，泡打粉添加量为 0.9%、1.1% 时蛋糕的硬度间也不存在显著性差异；泡打粉添加量为 0.5%、0.7%、0.9%、1.1% 时蛋糕的咀嚼性间不存在显著性差异(P>0.05)。综合质构结果，泡打粉对蛋糕质构的影响不明显。因此，综合评价后，泡打粉的添加量 0.9% 为宜。与其他因素相比较，泡打粉添加量对蛋糕的品质影响相对较小，故不进一步优化。

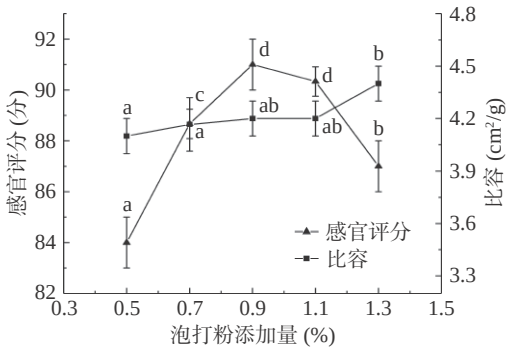


图 4　泡打粉添加量对蛋糕感官评分和比容的影响

Fig.4　Effects of baking powder addition on sensory score and specific volume of cakes

表 6　泡打粉添加量对蛋糕弹性、硬度和咀嚼性的影响

Table 6　Effects of baking powder addition on elasticity, toughness and chewiness of cakes

泡打粉添加量(%)	弹性(mm)	硬度(N)	咀嚼性(mJ)
0.5	6.57±0.23^{b}	9.87±0.64^{c}	23.46±0.61^{a}
0.7	6.19±0.13^{ab}	9.09±0.15^{bc}	23.51±0.92^{a}
0.9	6.32±0.92^{b}	8.88±0.11^{b}	23.38±0.90^{a}
1.1	5.74±0.23^{ab}	8.42±0.34^{b}	23.16±1.48^{a}
1.3	5.31±0.37^{a}	7.46±0.74^{a}	22.83±0.68^{a}

2.1.5　木糖醇添加量对蛋糕品质的影响　由图 5 和表 7 可知，不同木糖醇添加量蛋糕的感官评分存在明显差异。由图 5 可知，木糖醇添加量为 65%、70%、75%、80%、85% 时蛋糕的感官评分间均存在显著性差异(P<0.05)，而木糖醇添加量为 65%、70%、75%、80%、85% 时蛋糕的比容间均不存在显

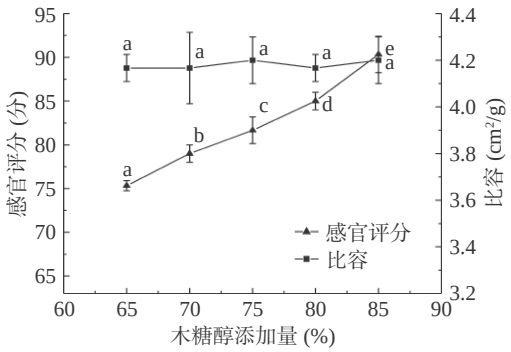


图 5　木糖醇添加量对蛋糕感官评分和比容的影响

Fig.5　Effects of xylitol addition on sensory score and specific volume of cakes

表 7 木糖醇添加量对蛋糕弹性、硬度和咀嚼性的影响

Table 7 Effects of xylitol addition on elasticity, toughness and chewiness of cakes

木糖醇添加量(%)	弹性(mm)	硬度(N)	咀嚼性(mJ)
65	6.36±0.08^{a}	9.27±0.31^{a}	23.48±1.38^{a}
70	6.49±0.10^{a}	9.45±0.08^{a}	23.32±0.32^{a}
75	6.66±0.26^{ab}	9.24±0.22^{a}	23.36±0.36^{a}
80	6.56±0.22^{a}	9.27±0.08^{a}	23.61±0.42^{a}
85	6.88±0.08^{b}	9.30±0.06^{a}	23.36±0.47^{a}

著性差异(P>0.05)。由表 7 可知,木糖醇添加量为 85% 时蛋糕的弹性与木糖醇添加量为 65%、70%、80% 时蛋糕的弹性存在显著性差异(P<0.05),而木糖醇添加量为 65%、70%、75%、80% 时蛋糕的弹性间都不存在显著性差异;木糖醇添加量为 65%、70%、75%、80%、85% 时蛋糕的硬度和咀嚼性间都不存在显著性差异(P>0.05)。且随着木糖醇添加量的增加,蛋糕比容和质构特性变化不明显,而蛋糕的感官评分呈不断上升的趋势。这是因为木糖醇作为一种甜味剂,对蛋糕的比容和质构特性贡献不大,但对蛋糕的甜度和口感影响较大,但木糖醇添加量过多,超过 85% 时,会使蛋糕体过于甜腻。故综合考虑,木糖醇的添加量为 75% 左右。

2.2 正交试验优化

马铃薯绿茶无糖戚风蛋糕正交试验设计与结果表 8。

一般来说,弹性、硬度和咀嚼性与蛋糕感官评分呈正相关,因此在正交试验中选择了蛋糕的感官评分和比容为评价指标。由表 8 可知,各因素对蛋糕感官评分影响的顺序为:A>C>D>B,对蛋糕比容的影响顺序为:B>A>D>C,这说明各个因素对蛋糕的品质影响都比较大。各因素对蛋糕感官评分影响的最佳组合为 $A_2B_2C_3D_2$,即马铃薯粉添加量为 20%,绿茶粉添加量为 6%,蛋清添加量为 230%,木糖醇添加量为 75%;各因素对蛋糕比容影响的最佳组合为 $A_2B_2C_3D_1$,即马铃薯粉添加量为 20%,绿茶粉添加量为 6%,蛋清添加量为 230%,木糖醇添加量为 70%。

表 8 马铃薯绿茶无糖戚风蛋糕正交试验设计与结果

Table 8 Orthogonal experimental design and results of potato green tea sugar-free chiffon cakes

实验号		A	B	C	D	感官评分	比容(cm^3/g)
1		1	1	1	1	78	4.13
2		1	2	2	2	85	4.08
3		1	3	3	3	86	3.95
4		2	1	2	3	87	4.06
5		2	2	3	1	91	4.23
6		2	3	1	2	89	3.98
7		3	1	3	2	92	4.06
8		3	2	1	3	88	3.96
9		3	3	2	1	84	3.92
感官评分	K_1	83.000	85.667	85.000	84.330	最佳组合:$A_2B_2C_3D_2$	
	K_2	89.000	88.000	85.333	88.667		
	K_3	88.000	86.333	89.667	87.000		
	R	6.000	2.333	4.667	4.334		
比容	K_1	4.053	4.083	4.023	4.093	最佳组合:$A_2B_2C_3D_1$	
	K_2	4.090	4.090	4.020	4.040		
	K_3	3.980	3.950	4.080	3.990		
	R	0.110	0.140	0.060	0.103		

由于最佳组合 $A_2B_2C_3D_2$ 不在表 8 实验设计中,需要进一步实验验证。按照组合 $A_2B_2C_3D_2$ 制作马铃薯绿茶无糖戚风蛋糕并进行感官评分和比容测定,结果为感官评分为 92 分,比容为 4.21 cm^3/g,这与组合 $A_2B_2C_3D_1$ 差异并不显著,二者的不同之处仅在木糖醇的添加量不同,而木糖醇是食品添加剂,食品添加剂在使用时要求在达到预期目的前提下应尽可能降低在食品中的使用量,故综合考虑各因素的影响,确定 $A_2B_2C_3D_1$ 马铃薯绿茶无糖蛋糕的最佳配方,即马铃薯粉添加量为 20%,绿茶粉添加量为 6%,蛋清添加量为 230%,木糖醇添加量为 70%。

2.3 马铃薯绿茶无糖蛋糕中营养成分、总抗氧化能力分析

按照最佳配方制作蛋糕,同时将马铃薯粉、绿茶粉换成糕点粉,木糖醇换成蔗糖后同样条件下制作蛋糕,分别测定其营养成分和总抗氧化能力,结果见表 9。

从表 9 可以看出,两种不同蛋糕其粗纤维、蛋白质、水分含量、灰分、总糖、脂肪、总抗氧化能力均存在显著性差异(P<0.05),在粗纤维含量、总糖含量、脂肪含量和总抗氧化能力上,马铃薯绿茶无糖戚风蛋糕明显优于相同条件下普通戚风蛋糕,其中,马铃薯绿茶无糖蛋糕的粗纤维含量明显高于市售普通戚风蛋糕;由于木糖醇的使用,蛋糕总糖含量明显下降,降低了 10% 左右;总抗氧化能力明显提高。通过各项指标对比可知,马铃薯绿茶无糖蛋糕具有明显的低脂、低糖、高纤维的特点,符合当下健康饮食潮流,特别是抗氧化能力的提升,既能延缓蛋糕氧化变质,提高其稳定性和贮存期,又对人体益处颇多,更加符合当代人们对健康饮食的需求。

3 结论

通过正交优化试验,所得的马铃薯绿茶无糖蛋糕最佳配方为:马铃薯粉添加量为 20%,绿茶粉添加量为 6%,蛋清添加量为 230%,木糖醇添加量为 70%,此配方下成品蛋糕的品质综合评分可达 92 分。在

表 9 两种蛋糕中营养成分和总抗氧化能力

Table 9 Results of determination of nutrient composition and total antioxidant capacity in two cakes

类别	粗纤维(%)	蛋白质(%)	水分(%)	灰分(%)	总糖(%)	脂肪(%)	总抗氧化能力(mmol/g)
马铃薯绿茶无糖蛋糕	7.89±0.16^{b}	14.10±0.14^{b}	48.20±0.16^{b}	1.12±0.13^{b}	6.03±0.08^{a}	30.10±0.31^{a}	0.0560±0.0600^{b}
市售普通戚风蛋糕	5.99±0.23^{a}	13.20±0.09^{a}	45.30±0.17^{a}	1.06±0.06^{a}	16.15±0.12^{b}	31.02±0.22^{b}	0.0012±0.0700^{a}

该配方下制作出的戚风蛋糕色泽淡绿、组织均匀膨松、口感细腻，低糖（6.03%）、高纤维（7.89%），具有一定的抗氧化能力（0.0560 mmol/g），不仅有营养价值，还具有一定保健功能，也符合特殊人群的需要。本研究表明马铃薯粉和绿茶粉可以添加到蛋糕的制作过程中，拓宽了马铃薯粉和绿茶粉在烘焙领域的应用，研究结果可为马铃薯绿茶无糖蛋糕的工业化生产提供参数依据。

参考文献

［1］陈寿宏. 中华食材上 [M]. 合肥: 合肥工业大学出版社, 2016: 52. ［CHEN Shouhong. The Chinese food (The first part)[M]. Hefei: Hefei University of Technology Press, 2016: 52.］

［2］徐帮学. 低碳开启绿色生活 [M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 2014: 138. ［XU Bangxue. Low carbon opens green life[M]. Lanzhou: Gansu Science & Technology Press, 2014: 138.］

［3］左晓斌, 邹积田. 脱毒马铃薯良种繁育与栽培技术 [M]. 北京: 科学普及出版社, 2012: 1−5. ［ZUO Xiaobin, ZOU Jitian. Breeding and cultivation techniques of virus-free potato[M]. Beijing: Popular Science Press, 2012: 1−5.］

［4］王朋. 全国鲜薯产量稳定在上亿吨 [EB/OL]. (2020-09-26)[2021-6-16]. http://www.gs.xinhuanet.com/news/2020-09/26/c_1126543438.htm. ［WANG Peng. The national output of fresh potato is stable at over 100 million tons[EB/OL]. (2020-09-26)[2021-6-16]. http://www.gs.xinhuanet.com/news/2020-09/26/c_1126543438.htm.］

［5］PRZEMYSŁAW K, MARIA R, AGNIESZKA M, et al. Production of wheat bread with spray-dried potato juice: Influence on dough and bread characteristics[J]. Food Science and Technology International, 2018, 10(10): 1−10.

［6］GUMUL D, KORUS J, SURMA M, et al. Pulp obtained after isolation of starch from red and purple potatoes (*Solanum tuberosum* L.) as an innovative ingredient in the production of gluten-free bread[J]. PloS One, 2020, 9(18): 1−13.

［7］陈义, 郭红萍, 李玉霞. 信阳毛尖化学成分主成分分析与感官品质[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(17): 40−43. ［CHEN Yi, GUO Hongping, LI Yuxia. The principal component analysis of chemical composition in Xinyangmaojian and its sensory quality[J]. Food Research and Development, 2015, 36(17): 40−43.］

［8］RADOČAJ O, DIMIĆ E, TSAO R. Effects of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil press-cake and decaffeinated green tea leaves (*Camellia sinensis*) on functional characteristics of gluten-free crackers[J]. Journal of Food Science, 2014, 79(3): 318−325.

［9］ROYSTON G, JING G, VICTORIA K A, et al. Green tea catechins reduced the glycaemic potential of bread: An *in vitro* digestibilitystudy[J]. Food Chemistry, 2015(180): 203−210.

［10］黄思雨, 邓利玲, 童芳, 等. 绿茶、桑叶和臭黄荆叶细粉水提液抑菌和抗氧化能力[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(4): 118−124. ［HUANG Siyu, DENG Liling, TONG Fang, et al. Study on antioxidant and antibacterial ability of water extracts from the powder of green tea, mulberry leaves and premna leaves[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(4): 118−124.］

［11］李斌, 武晓雪, 孟瑶瑶, 等. 信阳毛尖茶色素的超声提取及其抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2015, 36(18): 281−285. ［LI Bin, WU Xiaoxue, MENG Yaoyao, et al. Research of ultrasound-assisted extraction of Xinyangmaojian tea pigment and its antioxidant activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(18): 281−285.］

［12］LOUIE T M, LOUIE K, DENHARTOG S, et al. Production of bio-xylitol from D-xylose by an engineered *Pichia pastoris* expressing a recombinant xylose reductase did not require any auxiliary substrate as electron donor[J]. Microbial Cell Factories, 2012, 20: 50,1−22.

［13］CAMPBELL G M, MOUGEOT E. Creation and characterisation of aerated food products[J]. Trends Food Sci Technol, 1999, 10(9): 283-296.

［14］FAKHREDDIN S, SARA A. Effect of dried fruits and vegetables powder on cakes quality: A review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2020(95): 162−172.

［15］谢晋, 连家威, 韩迪, 等. 大豆分离蛋白对蛋糕品质及质构的影响[J]. 食品工业科技, 2019, 40(17): 19−24. ［XIE Jin, LIAN Jiawei, HAN Di, et al. Effects of soy protein isolate on cake quality and texture[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(17): 19−24.］

［16］KHAWLA B J, FATMA B, SOUMAYA Z-E, et al. Improvement of texture and sensory properties of cakes by addition of potato peel powder with high level of dietary fiber and protein[J]. Food Chemistry, 2017(217): 668−677.

［17］杨利玲, 徐兵, 马瑞霞. 麦芽糖醇燕麦戚风蛋糕工艺研究[J]. 粮食与油脂, 2020, 33(5): 59−63. ［YANG Liling, XU Bing, MA Ruixia. Study on processing technology of maltitol and oat chiffon cake[J]. Cereals & Oils, 2020, 33(5): 59−63.］

［18］阮征, 张驰, 李丹丹, 等. 微波预膨发工艺对青稞戚风蛋糕品质的影响[J]. 华南理工大学学报 (自然科学版), 2020, 48(11): 131−138. ［RUAN Zheng, ZHANG Chi, LI Dandan, et al. Effect of microwave pre-expansion process on the quality of highland barley chiffon cake[J]. Journal of South China University of Technology(Natural Science Edition), 2020, 48(11): 131−138.］

［19］刘淑敏, 王浩, 杨庆余, 等. 米糠蛋糕的研制及品质评定[J]. 食品工业, 2019, 40(4): 54−57. ［LIU Shumin, WANG Hao, YANG Qingyu, et al. Development and quality evaluation of rice bran cake[J]. The Food Industry, 2019, 40(4): 54−57.］

［20］王雪, 李冰, 李琳, 等. 羟丙基甲基纤维素对 Par-baking 戚风蛋糕品质改善的研究[J]. 食品科技, 2018, 43(6): 276−282. ［WANG Xue, LI Bing, LI Lin, et al. Effect of HPMC on improving the quality of the par-baking chiffon cake[J]. Food Science and Technology, 2018, 43(6): 276−282.］

［21］丁捷, 廖诚成, 赵雪梅, 等. 速冻微波青稞蛋糕复合品质改良剂组合筛选[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(5): 167−175. ［DING Jie, LIAO Chengcheng, ZHAO Xuemei, et al. Screening of compound quality improvement for frozen microwave cake by highland barley[J]. Food and Fermentation Industries, 2018, 44(5): 167−175.］

［22］王兆燃, 李文钊, 冯艺飞, 等. 粒度对小米粉特性和小米枸杞渣蛋糕品质的影响[J]. 食品工业科技, 2019, 40(13): 40−45. ［WANG Zhaoran, LI Wenzhao, FENG Yifei, et al. Effect of particle size on properties of millet flour the quality of millet *Lyci-*

um barbarum dregs cake[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(13): 40−45.]

[23] LI Wang, ZHAO Siming, LIU Youming, et al. Quality characteristics and evaluation for sponge cakes made of rice flour[J]. Journal of Food Processing Preservation, 2020, 4(44): 1−12.

[24] 赵谢, 甘巧, 汤思忆, 等. 黑芝麻蛋糕配方优化及质构特性研究[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(1): 105−110. [ZHAO Xie, GAN Qiao, TANG Siyi, et al. Optimization of formulation and textural properties study of black sesame cake[J]. Food Research and Development, 2019, 40(1): 105−110.]

[25] BAJAJ R, SINGH N, KAUR A. Effect of native and gelatinized starches from various sources on sponge cake making characteristics of wheat flour[J]. J Food Sci Technol, 2019, 56(2): 1046–1055.

[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 23780-2009 中华人民共和国国家标准糕点质量检验方法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2009. [General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. GB/T 23780-2009 Standardization Administration of China. Method for quality inspection of pastry[S]. Beijing: China Standards Press, 2009.]

[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. GB/T 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. [State Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China State Food and Drug Administration. GB/T 5009.5-2016 National standard for food safety. Determination of protein in foods[S]. Beijing: China Standards Press, 2016.]

[28] 中国人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB/T 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 of the P.R.C. GB/T 5009.3-2016 National standard for food safety. Determination of moisture in food[S]. Beijing: China Standards Press, 2016.]

[29] 中国人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB/T 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. [National Health and Family Planning Commission of the P.R.C. GB/T 5009.6-2016 National standard for food safety. Determination of fat in food[S]. Beijing: China Standards Press, 2016.]

[30] 中华人民共和国国家卫生健康委员会, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.10-2003 植物类食品中粗纤维的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2004. [National Health Commission of the People's Republic of China. Standardization Administration of China. GB/T 5009.10-2003 Determination of crude fiber in plant foods[S]. Beijing: China Standards Press, 2004.]

[31] 中国人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB/T B5009.4-2016 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 of the P.R.C. GB/T B5009.4-2016 National standard for food safety-determination of ash in food[S]. Beijing: China Standards Press, 2016.]

[32] 贾彦杰, 申飞, 钱志伟, 等. 添加杂粮粉改善面包品质及营养特性分析[J]. 现代食品科技, 2020, 36(12): 1−9. [JIA Yanjie, SHEN Fei, QIAN Zhiwei, et al. Analysis on improving bread quality and nutritional characteristics by adding coarse grain powder[J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(12): 1−9.]

[33] GUMUL D, ZIOBRO R, IVANIŠOVÁ E, et al. Gluten-free bread with an addition of freeze-dried red and purple potatoes as a source of phenolic compounds in gluten-free diet[J]. Internatioal Journal of Food Sciences and Nutrition, 2016, 8: 1−10.

廖慧琦, 曹少谦, 杨华, 等. 鲐鱼免疫活性肽的酶解工艺优化 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 163−170. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090087

LIAO Huiqi, CAO Shaoqian, YANG Hua, et al. Optimization of Enzymatic Hydrolysis Process of Immune Active Peptide in Chub Mackerel[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 163−170. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090087

· 工艺技术 ·

鲐鱼免疫活性肽的酶解工艺优化

廖慧琦, 曹少谦, 杨　华*, 戚向阳
（浙江万里学院, 浙江宁波 315100）

摘　要: 为了优化鲐鱼免疫活性肽的酶法制备工艺，以水解度和小鼠脾淋巴细胞相对增殖率为指标，在单因素实验的基础上，选择酶添加量、酶解时间和酶解温度为考察因素，采用 Box-Behnken 法进行三因素三水平响应面试验设计，确定鲐鱼免疫活性肽的最佳酶解条件，并对得到的鲐鱼免疫活性肽进行氨基酸组成分析。结果表明，中性蛋白酶为最优蛋白酶，最佳酶解条件为酶添加量 8800 U/g、时间 7 h、温度 52 ℃，验证实验发现在该条件下得到的酶解产物对小鼠脾淋巴细胞相对增殖率为 48.11%±2.67%，与回归方程预测值相近。同时鲐鱼免疫活性肽氨基酸含量丰富，其中人体必需氨基酸达 45.52%，疏水性氨基酸含量为 32.00%。研究结果为鲐鱼免疫活性肽的酶法制备提供了理论依据，为进一步实现鲐鱼资源的高值化利用提供了参考。

关键词: 鲐鱼, 免疫活性肽, 酶解, 响应面法, 氨基酸组成
中图分类号: TS254　　**文献标识码:** B　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0163−08
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090087
本文网刊:

Optimization of Enzymatic Hydrolysis Process of Immune Active Peptide in Chub Mackerel

LIAO Huiqi, CAO Shaoqian, YANG Hua*, QI Xiangyang
（Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China）

Abstract: In order to optimize the enzymatic extraction process of chub mackerel immune active peptide, taking the proliferation rate and degree of hydrolysis of mouse spleen lymphocytes as indicators, on the basis of single factor tests, the enzyme addition amount, enzymatic hydrolysis time and enzymatic hydrolysis temperature were selected as the investigation factors, and the Box-Behnken method was used for three factors and three levels response surface test design to determine the best enzymatic preparation process of chub mackerel immune active peptide. The amino acid composition of the obtained immune active peptide of chub mackerel was analyzed. The results showed that neutral protease was the best protease, and the best enzymatic hydrolysis conditions were enzyme addition 8800 U/g, time 7 h and temperature 52 ℃. The verification experiment found that the relative proliferation rate of mouse spleen lymphocytes obtained under these conditions was 48.11%±2.67%, which was close to the predicted value of regression equation. At the same time, chub mackerel immune active peptide was rich in amino acids, including 45.52% essential amino acids and 32.00% hydrophobic amino acids. The results would provide a theoretical basis for enzymatic preparation of immune active peptide for chub mackerel, and a reference for further realization of high value utilization of chub mackerel resources.

Key words: chub mackerel; immune active peptide; enzymolysis; response surface experiment; amino acid composition

鲐鱼, 又名青占鱼, 鲈形目, 鲭科, 鲐属, 其具有分布广、产量高等特点, 是北太平洋西部主要的经济鱼类之一, 调查研究显示目前鲐鱼主要仍以鲜食为主, 仅有少量用于鱼粉加工, 其深加工产品与产量相比存在巨大差异[1−3]。

近年来对海洋生物中生物活性物质的研究成为

收稿日期: 2021−09−07
基金项目: 浙江省重点研发计划（2019C02071）; 国家海洋局项目（NBHY-2017-S2）; 浙江省一流学科“生物工程”学生创新项目（CX2021035）。
作者简介: 廖慧琦（1995−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 生物材料与功能制品, E-mail: 1172653884@qq.com。
*** 通信作者:** 杨华（1978−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 水产资源综合利用, E-mail: yanghua@zwu.edu.cn。

热点，其中便包括获得具有不同生理功能的生物活性肽，如抗氧化肽、ACE 抑制肽、免疫活性肽等。海洋鱼类营养价值高，蛋白质含量丰富，一直以来都被视为优质蛋白来源，因此从海洋鱼类蛋白中提取生物活性肽值得更加深入的研究[4−7]。其中免疫活性肽作为一类具有免疫调节功能的生物活性肽，有分子量小、稳定性强、生物活性高等诸多优点[8]，同时根据已有研究证明免疫活性肽具有能刺激淋巴细胞增殖，增强巨噬细胞吞噬等多种生理功能，目前已经成为医学研究与保健食品开发领域的研究热点[9−11]。纪丽娜[12]通过酶解金枪鱼头提取得到的免疫活性肽能刺激巨噬细胞增殖和促进巨噬细胞的吞噬功能。侯虎[13]选用胰蛋白酶酶解阿拉斯加鳕鱼获得的免疫活性肽能提高小鼠脾淋巴细胞转化活性以及巨噬细胞的吞噬功能，后利用离子交换色谱、凝胶过滤色谱和反相高效液相色谱进一步纯化活性最高的肽组分，进而得到 3 种免疫活性肽序列。邓志程[14]采用模拟消化酶解的方式制备马氏珠母贝全脏器免疫活性肽，同时结合超滤、凝胶过滤色谱等技术进行进一步分离纯化，获得了两个免疫活性肽。同时也有一些研究证明通过酶解制备的生物活性肽显示出特定的免疫活性[15−17]。王雪芹[18]通过酶法制备的鲐鱼多肽具有较强的抗氧化性和抗疲劳作用，但是目前将鲐鱼作为蛋白质来源制备免疫活性肽的研究未见报道。

本文以鲐鱼鱼肉为原料，以水解度和小鼠脾淋巴细胞相对增殖率为指标，经单因素实验及响应面法优化鲐鱼免疫活性肽的酶法制备工艺，以期为酶法制备鲐鱼免疫活性肽及进一步研究其免疫活性提供依据，也希望能对后续免疫活性肽的深入研究以及提高海洋低值鱼的利用率提供一些理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜鲐鱼　购于宁波市路林市场；小鼠脾淋巴细胞　购于上海赛百慷生物科技有限公司，由本实验室复苏培养；胰蛋白酶、碱性蛋白酶、酸性蛋白酶、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)　索莱宝生物科技有限公司；磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、柠檬酸、三氯乙酸、二甲亚砜(DMSO)　分析纯，国药集团化学试剂有限公司；胎牛血清、RPMI-1640 完全培养基　美国 Gibco 公司。

组织搅碎机　山东九阳公司；AR223CN 电子天平　常州奥豪斯仪器有限公司；DKS-24 数显恒温水浴锅　常州市伟嘉仪器制造有限公司；超低温高速离心机　日本日立公司；倒置显微镜　日本 Olympus 公司；PHS-29A 数显酸度计　上海虹益仪器有限公司；超净工作台　上海智诚分析仪器制造公司；CO_2 细胞培养箱　美国 Thermo 公司；酶标仪　美国 Bio-Rad 公司；LCJ-25C 型冷冻干燥机　北京四环科学仪器厂有限公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 样品预处理　鲐鱼去头去尾，去除内脏，剥除鱼皮，剔去鱼刺，取纯肉搅碎，置于−40 ℃ 冰箱冷冻备用。

1.2.2 鲐鱼鱼肉基本成分的测定　鲐鱼鱼肉中水分含量测定采用 GB 5009.3-2016《食品安全国家标准 食品中水分的测定》直接干燥法[19]；灰分含量测定采用 GB 5009.4-2016《食品安全国家标准 食品中灰分的测定》高温灰化法[20]；蛋白质含量测定采用 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[21]；脂肪含量的测定采用 GB 5009.6-2016《食品安全国家标准 食品中脂肪的测定》中的索氏提取法[22]。

1.2.3 蛋白酶的筛选　参考胡旭阳[23]的方法，取一定量的鲐鱼鱼肉，以料液比 1∶5 g/mL 加入相应 pH 缓冲溶液，酶添加量为 6000 U/g，在每种蛋白酶的最适条件下酶解 6 h。其中木瓜蛋白酶的酶解条件为 50 ℃，pH7.0；胰蛋白酶的酶解条件为 40 ℃，pH7.0；中性蛋白酶酶解条件为 50 ℃，pH7.0；碱性蛋白酶酶解条件为 50 ℃，pH10.0；酸性蛋白酶酶解条件为 50 ℃，pH3.0。酶解完成后在沸水浴中灭酶 15 min，立即冷却至室温，于 10000 r/min 离心 15 min，取上清液。将上清液进行真空冷冻干燥，配制成相应浓度的样液，采用 MTT 法测定酶解产物对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响，筛选最适蛋白酶。

1.2.4 单因素实验

1.2.4.1 不同酶添加量对小鼠脾淋巴细胞增殖率的影响　将酶添加量分别设为 2000、4000、6000、8000、10000 U/g，按料液比 1∶5 g/mL、pH7.0、温度 50 ℃，时间 6 h 进行酶解，测定酶解产物的水解度，并采用 MTT 法测定小鼠脾淋巴细胞相对增殖率。

1.2.4.2 不同酶解时间对小鼠脾淋巴细胞增殖率的影响　将酶解时间分别设为 4、5、6、7、8 h，按料液比 1∶5 g/mL、pH7.0、温度 50 ℃、酶添加量 6000 U/g 进行酶解，测定酶解产物的水解度，并采用 MTT 法测定小鼠脾淋巴细胞相对增殖率。

1.2.4.3 不同酶解温度对小鼠脾淋巴细胞增殖率的影响　将酶解温度分别设为 30、40、50、60、70 ℃，按料液比 1∶5 g/mL、pH7.0、酶添加量 6000 U/g，时间 6 h 进行酶解，测定酶解产物的水解度，并采用 MTT 法测定小鼠脾淋巴细胞相对增殖率。

1.2.5 响应面试验　在单因素实验结果的前提下，以小鼠脾淋巴细胞相对增殖率为指标，选择酶添加量、酶解时间和酶解温度为工艺参数，设计三因素三水平 Box-Behnken 响应面试验，优化鲐鱼鱼肉免疫活性肽的最佳酶解工艺，试验因素水平如表 1 所示。

1.2.6 水解度测定　水解度根据式(1)计算。其中氨基酸态氮含量采用 GB 5009.235-2016《食品安全国

表 1　响应面试验因素与水平设计

Table 1　Factor and levels of response surface experiment

水平	因素		
	A时间(h)	B温度(℃)	C酶添加量(U/g)
−1	6.5	45	7000
0	7	50	8000
1	7.5	55	9000

家标准 食品中氨基酸态氮的测定》中的酸度计法测定[24]；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》中的凯氏定氮法测定[21]。

$$水解度(\%)=\frac{氨基酸态氮含量}{总氮含量}\times 100 \qquad 式（1）$$

1.2.7　小鼠脾淋巴细胞相对增殖率测定

1.2.7.1　小鼠脾淋巴细胞复苏　参考董晓泽[25]的方法并略做修改，从−80 ℃ 冰箱中将小鼠脾淋巴细胞冻存管取出，立刻置于 37 ℃ 中水浴融解，在超净工作台内将解冻的细胞液全部转移至无菌离心管中，1000 r/min 离心 5 min，弃去上清液，再加入 1 mL 配制好的含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养基，轻轻吹打使之均匀分散。将细胞悬液完全移入 T25 的无菌培养瓶中，继续加入 4 mL 含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 完全营养液，轻轻摇动瓶身，使其均匀分布在培养瓶中，放入 37 ℃，5% CO_2 细胞培养箱中培养观察。

1.2.7.2　鲐鱼鱼肉酶解产物对小鼠脾淋巴细胞的影响　参考李志永[26]的方法以 MTT 法测定小鼠脾淋巴细胞相对增殖率并略做修改，选择对数生长期的细胞进行实验，调整细胞浓度为 4×10^6 个/mL。无菌操作条件下，向 96 孔板中依次接种 100 μL 细胞悬液和 100 μL 样液（浓度为 500 μg/mL，取冻干后的样品粉末以 RPMI-1640 完全培养基溶解，经 0.22 μm 滤膜过滤除菌），以等体积 RPMI-1640 完全培养基代替样品作空白对照组，每组设 5 个复孔，并在 96 孔板最外圈每孔加入 200 μL 无菌 PBS 溶液。于 37 ℃，5% CO_2 细胞培养箱中孵育 48 h 后，在避光条件下每孔加入 20 μL MTT 溶液（浓度为 5 mg/mL，以 PBS 溶解，0.22 μm 滤膜过滤除菌），继续培养 4 h，4000 r/min 离心 5 min，弃去上清，每孔加入 100 μL DMSO，振荡 5 min，立即用酶标仪于 593 nm 处测定 OD 值，根据式（2）计算小鼠脾淋巴细胞相对增殖率。

$$相对增殖率(\%)=\frac{A_1-A_0}{A_0}\times 100 \qquad 式（2）$$

式中：A_1 表示实验组在 593 nm 处的 OD 值；A_0 表示空白组在 593 nm 处的 OD 值。

1.2.8　氨基酸含量测定　采用响应面优化得到的条件制备鲐鱼免疫活性肽，样品经真空冷冻干燥，保存于−40 ℃ 冰箱。根据 GB 5009.124-2016《食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定》[27]的方法，测定分析样品中的氨基酸含量。

1.3　数据处理

所有样品均平行 3 组。采用 Excel 进行数据处理及绘图，Design Expert 10.0 进行响应面设计，SPSS 软件进行数据分析。

2　结果与分析

2.1　鲐鱼鱼肉基本成分分析

鲐鱼鱼肉基本营养组成成分如表 2 所示，可以看出鲐鱼鱼肉中基本营养物质含量丰富，其中蛋白质含量高，脂肪含量较低，适用于后续进行酶解制备免疫活性肽的研究。

表 2　鲐鱼鱼肉营养成分组成

Table 2　Nutrient composition of chub mackerel meat

组分	水分	灰分	蛋白质	脂肪
含量(%)	65.25±0.51	3.64±0.26	25.06±1.05	7.76±0.41

2.2　最适蛋白酶的筛选

选择合适的蛋白酶酶解是提取生物活性肽至关重要的因素，因为不同的蛋白酶具有不同的酶切位点，从而可以影响肽段从蛋白中的释放位点[11]。5 种蛋白酶对鲐鱼鱼肉水解度及酶解产物对小鼠脾淋巴细胞相对增殖率的影响如图 1 所示，由图 1 可以看出水解度和细胞相对增殖率的变化趋势具有明显差异。从水解度来看，胰蛋白酶的水解度最高，酸性蛋白酶次之，然而这两种蛋白酶的酶解产物的细胞相对增殖率较低，中性蛋白酶的水解度虽然偏低，但是具有最高的细胞相对增殖率，达 31.36%，显著高于其他蛋白酶的酶解产物（$P<0.05$）。因为蛋白酶的种类不同，所获得的酶解产物中的多肽组成也会不同，因此其具有的生物活性也存在较大差异。其中中性蛋白酶可以对 C 端为芳香族疏水性氨基酸的肽链进行酶

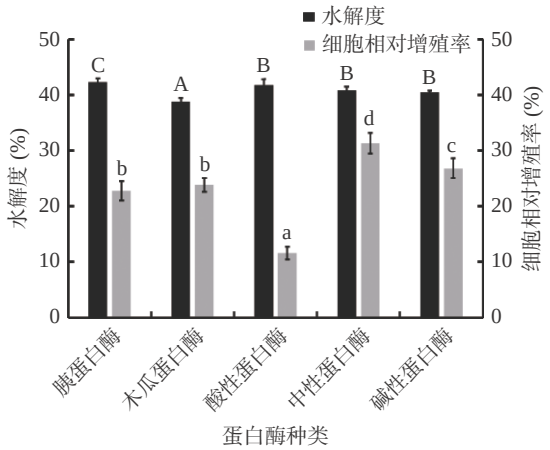


图 1　不同蛋白酶对鲐鱼鱼肉水解度及酶解产物对小鼠脾淋巴细胞相对增殖率的影响

Fig.1　Effects of different proteases on the degree of hydrolysis of mackerel and the relative proliferation rate of spleen lymphocytes in mice

注：不同大写字母表示水解度存在显著性差异（$P<0.05$）；不同小写字母表示细胞相对增殖率存在显著性差异（$P<0.05$）；图 2~图 4 同。

切作用[28]，同时已有大量研究发现免疫活性肽大多含有疏水性氨基酸，故选择中性蛋白酶为本实验中制备鲐鱼免疫活性肽的最适蛋白酶。

2.3 单因素实验结果

2.3.1 酶添加量对水解度和小鼠脾淋巴细胞相对增殖率的影响 图 2 所示为酶添加量对鲐鱼鱼肉水解度及酶解产物对小鼠脾淋巴细胞相对增殖率的影响。酶添加量由 2000 U/g 增加到 8000 U/g 时，水解度和细胞相对增殖率持续升高，在酶添加量达到 8000 U/g 时，相对增殖率达到最高为 43.32%，水解度为 48.88%。这说明酶添加量的增加可以提高底物与酶的作用，从而加速酶解反应。当酶添加量继续增加时，可能因为底物已经充分酶解，酶的作用位点减少，水解度和小鼠脾淋巴细胞相对增殖率不再随着添加量的增多而升高，反而有所下降，这说明适当的蛋白酶添加量，可使酶解产物具有更好的生物活性。酶添加量为 8000 U/g 时，酶解产物的水解度和细胞相对增殖率显著(P<0.05)高于其他组分，故确定中性蛋白酶的最适酶添加量为 8000 U/g。

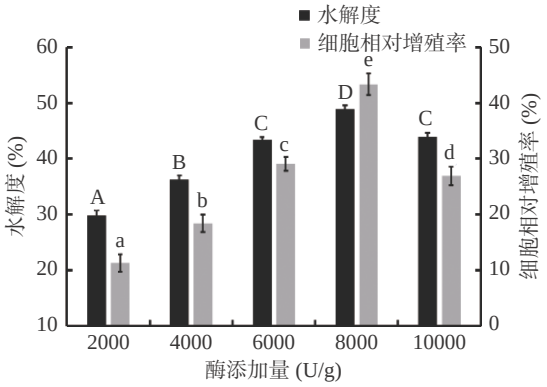


图 2 酶添加量对鲐鱼鱼肉水解度及酶解产物对小鼠脾淋巴细胞相对增殖率的影响

Fig.2 Effects of enzyme addition on the degree of hydrolysis of mackerel and the relative proliferation rate of spleen lymphocytes in mice

2.3.2 酶解时间对水解度和小鼠脾淋巴细胞相对增殖率的影响 图 3 所示为酶解时间对鲐鱼鱼肉水解度及酶解产物对小鼠脾淋巴细胞相对增殖率的影响。时间从 4 h 升至 7 h 时，水解度和细胞相对增殖率持续升高，酶解时间为 7 h 时，细胞相对增殖率达到最高为 44.92%，水解度为 49.17%。当时间继续延长至 8 h 时，细胞相对增殖率开始降低，但是水解度与 7 h 相差不大，这可能是因为酶解时间的延长，蛋白酶活力逐渐下降，故水解度的变化趋势逐渐平缓，但是酶解反应仍在进行，其中一些具有免疫活性的肽链可能会失去活性，导致细胞相对增殖率降低。故确定中性蛋白酶的最适酶解时间为 7 h。

2.3.3 酶解温度对水解度和小鼠脾淋巴细胞相对增殖率的影响 图 4 所示为酶解温度对鲐鱼鱼肉水解度及酶解产物对小鼠脾淋巴细胞相对增殖率的影响。由图 4 可以看出，随着温度的升高，水解度随之变化，当温度为 50 ℃ 时，水解度达 49.75%，显著高于其他温度下的酶解产物(P<0.05)。当温度由 30 ℃ 升高至 40 ℃ 时，细胞相对增殖率升高，50 ℃ 时，细胞相对增殖率最高，达 31.96%。当温度继续升高时，细胞相对增殖率呈下降趋势。这可能是因为在一定范围内，随着温度的升高，蛋白酶活力会增大，有利于酶解反应产生具有免疫活性的肽段[29]。当温度升高至 70 ℃ 时，其水解度和细胞相对增殖率相比 50 ℃ 时明显降低，但是可以看出 70 ℃ 时水解度依然较高，但是细胞相对增殖率偏低，猜测可能是因为 70 ℃ 时酶解反应仍在进行，但长时间在较高温度下进行反应会导致蛋白变性，使酶解产生的肽段失去生物活性。同时根据索莱宝公司提供的产品信息显示，该中性蛋白酶的最适温度为 50~55 ℃，与实验结果也较为符合。故确定中性蛋白酶的最适酶解温度为 50 ℃。

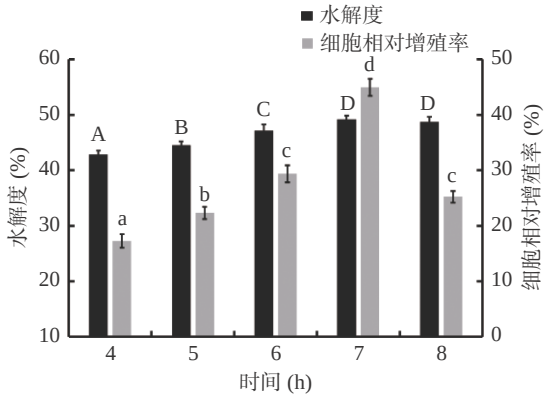


图 3 酶解时间对鲐鱼鱼肉水解度及酶解产物对小鼠脾淋巴细胞相对增殖率的影响

Fig.3 Effects of enzymolysis time on the degree of hydrolysis of mackerel and the relative proliferation rate of spleen lymphocytes in mice

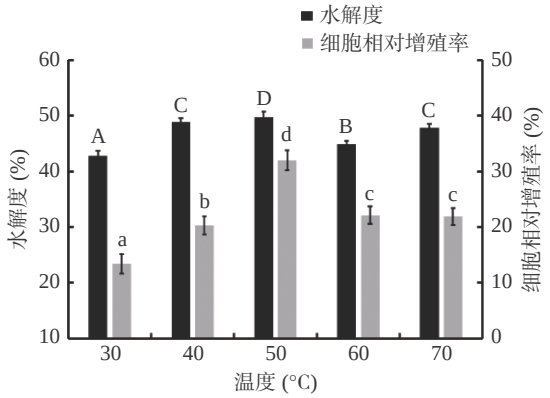


图 4 酶解温度对鲐鱼鱼肉水解度及酶解产物对小鼠脾淋巴细胞相对增殖率的影响

Fig.4 Effects of enzymatic hydrolysis temperature on the degree of hydrolysis of mackerel and the relative proliferation rate of spleen lymphocytes in mice

2.4 响应面试验优化工艺

2.4.1 响应面试验结果 根据 Box-Behnken 的组合设计原理，采用 Design-Expert10.0 软件设计 3 因素

3 水平共 17 组实验，其中中心点重复 5 次实验，以小鼠脾淋巴细胞相对增殖率作为响应值，具体试验设计与结果见表 3。对数据进行多元二次回归拟合，建立制备工艺参数回归模型，拟合得到细胞相对增殖率(Y)和酶解时间(A)、酶解温度(B)、酶添加量(C)的回归方程为：$Y=41.76+1.25A+2.86B+8.578C-1.01AB+0.42AC+1.58BC-1.78A^2-5.94B^2-5.58C^2$。

表 3　响应面试验设计及结果

Table 3　Respond surface experimental design and results

实验号	A(h)	B(℃)	C(U/g)	细胞相对增殖率(%)
1	7	55	9000	40.1135
2	7	45	9000	32.8565
3	6.5	55	8000	38.6696
4	7.5	50	7000	25.5415
5	7	50	8000	39.7399
6	6.5	50	9000	42.4189
7	7.5	45	8000	31.4225
8	7	45	7000	23.5225
9	7	50	8000	40.5652
10	7.5	50	9000	48.2001
11	6.5	45	8000	29.3256
12	7	55	7000	24.4534
13	7	50	8000	43.7055
14	6.5	50	7000	21.4503
15	7	50	8000	40.2038
16	7	50	8000	44.5697
17	7.5	55	8000	36.7383

回归系数的显著性分析结果见表 4，结果显示，模型的 F 值为 9.73，P 值为 0.0033<0.05，表明该回归模型显著。失拟项的 P 值为 0.1029，失拟项不显著，说明试验没有失拟因素，可以充分反映试验的实际情况，因此可以确定该回归模型可以对鲐鱼鱼肉中性蛋白酶酶解产物的小鼠脾淋巴细胞增殖率结果进行预测和分析。由表 4 可知，对结果影响的主次顺序为酶添加量>酶解温度>酶解时间，其中酶添加量对结果的影响极显著。

表 4　回归模型方差分析

Table 4　ANOVA of regression equation

项目	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	1001.15	9	111.24	9.73	0.0033	**
A	12.60	1	12.60	1.10	0.3288	
B	65.25	1	65.25	5.71	0.0482	*
C	588.61	1	588.61	51.49	0.0002	**
AB	4.06	1	4.06	0.35	0.5701	
AC	0.71	1	0.71	0.062	0.8098	
BC	10.00	1	10.00	0.88	0.3807	
A^2	13.28	1	13.28	1.16	0.3169	
B^2	148.66	1	148.66	13.00	0.0087	**
C^2	131.02	1	131.02	11.46	0.0117	*
残差	80.02	7	11.43			
失拟	60.41	3	20.14	4.11	0.1029	
误差	19.61	4	4.90			
总和	1081.17	16				

R^2=0.9260 R_{Adj}^2=0.8308 CV=9.52%

注：*：P<0.05为差异显著；**：P<0.01为差异极显著。

2.4.2　响应曲面分析交互作用　模型的响应曲面如图 5 所示，3 组图直观反映了 3 个因素间的两两交互作用。由图 5a 曲面的弯曲程度和等高线的封闭情况可以看出，当酶添加量固定不变时，酶解温度和酶解时间的交互作用明显，当酶解时间改变时，酶解温度对细胞相对增殖率的影响表现出不同程度的变化；当酶解温度改变时，酶解时间对细胞相对增殖率的影响也表现出不同程度的变化。当酶解温度固定时，酶添加量与酶解时间对细胞相对增殖率的交互作用如图 5b 所示，可以看出酶添加量对细胞相对增殖的影

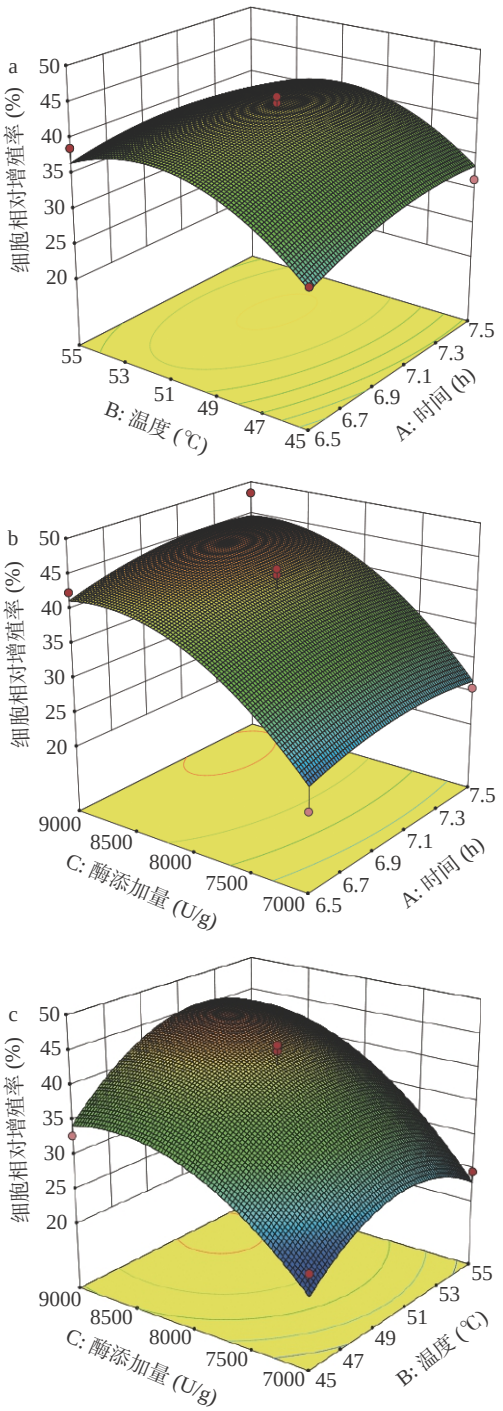


图 5　各因素交互作用的响应曲面图

Fig.5　Response surface plots and corresponding contour plots showing the interaction effects of various parameters

响高于酶解时间，随着酶解时间的变化，细胞相对增殖率变化趋势不明显。由图 5c 可以看出，当酶解时间固定时，酶添加量与酶解温度对细胞增殖率的交互作用明显，其中酶添加量对细胞增殖率的影响高于酶解温度。

通过上述模型对鲐鱼鱼肉免疫活性肽的酶解工艺进行响应面优化分析，软件分析得到的最佳工艺条件为酶解时间 7.18 h，酶解温度 51.6 ℃、酶添加量 8827 U/g，预测的细胞相对增殖率为 45.99%。考虑到实际操作情况，对上述优化条件进行修正，最终确定优化条件为酶解时间 7 h、酶解温度 52 ℃、酶添加量 8800 U/g，在此条件下测得细胞相对增殖率为 48.11%±2.67%，所得实际值与模型预测值接近，证明应用该模型优化提取鲐鱼鱼肉免疫活性肽是准确可行的。

2.5 氨基酸组成分析

鲐鱼免疫活性肽的氨基酸组成如表 5 所示。由表可知，鲐鱼免疫活性肽检测的 16 种氨基酸中谷氨酸含量最高，天冬氨酸次之，同时赖氨酸、亮氨酸、组氨酸、丙氨酸的含量也较高，其中人体必需氨基酸含量占总氨基酸的 45.52%。目前已有研究表明天冬氨酸和谷氨酸在粒细胞和巨噬细胞中起着多种作用，可为免疫细胞供能。亮氨酸能增强免疫细胞杀伤活力，增加对致病因子的清除能力[30]。同时也有众多研究表明生物活性肽的免疫活性与其所含的疏水性氨基酸有着密不可分的关系，当肽链含有较多疏水性氨基酸时，多肽表面具有较强的疏水性作用，可增强多肽对自由基的亲和力，使多肽的抗氧化能力有所提升，进而增强免疫活性[31]。王凯凯[32] 对绿豆免疫活性肽的氨基酸序列进行分析时发现其中疏水性氨基酸对绿豆肽的免疫活性起着重要作用。张亚飞[33] 研究发现小麦蛋白具有免疫活性的肽段中疏水性氨基酸占有较大的比例。杨磊[34] 对螺旋藻免疫活性肽进行氨基酸组成分析，结果显示其中疏水性氨基酸含量为 23.66%。从表 5 数据可以看出鲐鱼免疫活性肽中的疏水性氨基酸含量占总氨基酸的 32.00%，相比已有的一些研究结果，鲐鱼免疫活性肽的疏水性氨基酸含量更加丰富。

表 5 鲐鱼免疫活性肽的氨基酸组成

Table 5 Amino acid composition of immunoactive peptides from chub mackerel

氨基酸种类	含量(g/100 g)	占比(%)
天冬氨酸(Asp)	3.38	10.61
苏氨酸(Thr*)	1.82	5.71
丝氨酸(Ser)	1.38	4.34
谷氨酸(Glu)	4.58	14.40
甘氨酸(Gly)	1.55	4.86
丙氨酸(Ala)	2.02	6.33
半胱氨酸(Cys)	0.38	1.18
缬氨酸(Val*)	1.68	5.27
蛋氨酸(Met)	0.90	2.82
异亮氨酸(Ile*)	1.52	4.77
亮氨酸(Leu*)	2.67	8.39
酪氨酸(Tyr)	1.32	4.14
苯丙氨酸(Phe*)	1.4	4.57
赖氨酸(Lys*)	3.00	9.43
组氨酸(His*)	2.35	7.38
精氨酸(Arg)	1.85	5.81
必需氨基酸总量	14.49	45.52
疏水性氨基酸总量	10.19	32.00
氨基酸总量	31.84	100.00

注：*为必需氨基酸；疏水性氨基酸含量为Ala、Val、Met、Ile、Leu、Phe 6种氨基酸总和。

3 结论

本实验通过酶法制备鲐鱼免疫活性肽，确定提取鲐鱼免疫活性肽的最佳蛋白酶为中性蛋白酶，在单因素实验的基础上，以小鼠脾淋巴细胞相对增殖率为评价指标，利用 Design-Expert 10.0 软件进行响应面试验分析，结果表明利用中性蛋白酶制备鲐鱼免疫活性肽的最优酶解条件为酶解时间 7 h、酶解温度 52 ℃、酶添加量 8800 U/g，进行重复验证实验，该条件下测得小鼠脾淋巴细胞相对增殖率达 48.11%±2.67%，最后对得到的鲐鱼免疫活性肽进行氨基酸组成分析，结果显示其氨基酸含量丰富，其中人体必需氨基酸达 45.52%，疏水性氨基酸含量为 32.00%。

随着对免疫活性肽的研究越来越深入，发现采用酶解法制备免疫活性肽是安全有效的，但是同时也存在着许多难题，因为蛋白质经过酶解之后的组成成分十分复杂，酶解产物中含有大量不同分子量的肽段和游离氨基酸，因此后续仍需选择合适的方法进行进一步分离纯化。本实验结果为后期进一步分离纯化得到鲐鱼免疫活性肽奠定基础，以期为鲐鱼的高值化利用及免疫活性肽保健食品的开发提供理论依据。

参考文献

[1] 徐永霞，孟德飞，赵洪雷，等. 即食鲐鱼肉干的调味配方及微波-热风干燥工艺优化[J]. 食品工业科技，2021，42(16)：171−176. [XU Y X, MENG D F, ZHAO H L, et al. Optimization of seasoning formula and microwave-hot air drying technology for ready-to-eat dried mackerel[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(16): 171−176.]

[2] 王晓龙. 鲐鱼鱼油提取精制及抗氧化活性研究 [D]. 舟山：浙江海洋大学，2014. [WANG X L. Extraction and purification of fish oil from mackerel processing byproduct and its antioxidant activity[D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2014.]

[3] 陈海桂，王阳光. 酶解鲐鱼蛋白制取功能性鱼蛋白粉加工工艺研究[J]. 现代农业科技，2008(20)：227−228. [CHEN H G, WANG Y G. Preparation of functional fish protein powder by enzymatic hydrolysis of mackerel protein[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2008(20): 227−228.]

[4] ROCHA M D, ALEMAN A, BACCAN G, et al. Anti-inflammatory, antioxidant, and antimicrobial effects of underutilized fish protein hydrolysate[J]. Journal of Aquatic Food Product Technology, 2018, 27(5): 592−608.

［5］李致瑜. 大黄鱼内脏抗氧化肽的制备, 分离纯化及其理化性质研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2016. ［LI Z Y. Study on the preparation and purification of antioxidant peptides from large yellow croaker viscera protein and its structure and physicochemical properties[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2016. ］

［6］江锟. 鲈鱼蛋白的酶解工艺优化及活性肽的功能特性研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2013. ［JIANG K. Studies of bass protein hydrolysis process optimization and active peptide functional properties[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2013. ］

［7］XU B, YE L, TANG Y, et al. Preparation and purification of an immunoregulatory peptide from *Stolephorus chinensis* of the East Sea of China[J]. Process Biochemistry, 2020, 98: 151−159.

［8］LOURDES S L, ADRIAN H M, BELINDA V C, et al. Food-derived immunomodulatory peptides[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2016, 96: 3631−3641.

［9］LIU P, LIAO W, QI X, et al. Identification of immunomodulatory peptides from zeinhydrolysates[J]. European Food Research and Technology, 2020, 246(5): 931−937.

［10］MERAM C, YU W L, WU J P. Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review[J]. Food Chemistry, 2018, 245: 205−222.

［11］XU Z, MAO T M, HUANG L, et al. Purification and identification immunomodulatory peptide from rice protein hydrolysates [J]. Food and Agricultural Immunology, 2019, 30(1): 150−162.

［12］纪丽娜. 金枪鱼头酶解物免疫活性肽的分离及对小鼠腹腔巨噬细胞功能的影响 [D]. 湛江: 广东海洋大学, 2012. ［JI L N. Studies on separation of immune activity peptide from tuna head hydrolysates and its effect on mouse peritoneal macrophages[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2012. ］

［13］侯虎. 鳕鱼免疫活性肽的可控制备及其免疫活性研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011. ［HOU H. The controllable preparation of pollock immunomodulating peptide and its immunity activity[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2011. ］

［14］邓志程. 马氏珠母贝全脏器免疫活性肽的制备及其免疫活性的研究 [D]. 湛江: 广东海洋大学, 2015. ［DENG Z C. Study on the preparation of *Pinctada martensii* immunomodulating peptide and its immunity function[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2015. ］

［15］房新平. 牛胎盘免疫活性肽提取与酶法制备研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2007. ［FANG X P. Studies on extraction and enzymatic preparation of the immunoactive peptides from bovine placenta[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2007. ］

［16］YANG R Y, ZHANG Z F, PEI X R, et al. Immunomodulatory effects of marine oligopeptide preparation from Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) in mice[J]. Food Chemistry, 2009, 113(2): 464−470.

［17］YANG Q, CAI X, HUANG M, et al. A specific peptide with immunomodulatory activity from *Pseudostellaria heterophylla* and the action mechanism[J]. Journal of Functional Foods, 2020, 68: 103887.

［18］王雪芹. 鲐鱼多肽的抗氧化活性与抗疲劳作用研究 [D]. 北京: 中国科学院大学, 2014. ［WANG X Q. Study on the antioxidant activity and antifatigue effect of mackerel peptides[D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2014. ］

［19］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 of the People's Republic of China. GB 5009.3-2016 National food safety standards. Determination of moisture in food[S]. Beijing: China Standards Press, 2016. ］

［20］中华人民共和国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 of the People's Republic of China. GB 5009.4-2016 National food safety standards. Determination of ash content in food[S]. Beijing: China Standards Press, 2016. ］

［21］中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 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. ［National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. GB 5009.5-2016 National food safety standards. Determination of protein in food[S]. Beijing: China Standards Press, 2016. ］

［22］中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 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. ［National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. GB 5009.6-2016 National food safety standards. Determination of fat in food[S]. Beijing: China Standards Press, 2016. ］

［23］. 胡旭阳. 日本黄姑鱼肉活性肽的制备及其免疫调节作用研究 [D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2019. ［HU X Y. Studies on the preparation and immunoregulatory effect of peptides from *Nibea japonica*[D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2019. ］

［24］中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 5009.235-2016 食品安全国家标准 食品中氨基酸态氮的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. ［National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. GB 5009.235-2016 National food safety standards. Determination of amino acids nitrogen in food[S]. Beijing: China Standards Press, 2016. ］

［25］董晓泽. 日本黄姑鱼皮活性肽的制备及其免疫作用研究 [D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2019. ［DONG X Z. Preparation and immunological study of active peptides from *Nibea japonica* skin[D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2019. ］

［26］李志永. 蚕蛹蛋白免疫肽的分离纯化、结构鉴定及功能分析 [D]. 镇江: 江苏科技大学, 2019. ［LI Z Y. Purification, identification, and functional analysis of the novel immunomodulatory peptides from silkworm pupa protein[D]. Zhenjiang: Jiangsu University of Science and Technology, 2019. ］

［27］中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 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. ［National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. GB 5009.124-2016 National food safety standards. Determination of amino acids in food[S]. Beijing: China Standards Press, 2016. ］

［28］林凯, 韩雪, 张兰威, 等. ACE 抑制肽构效关系及其酶法制备的研究进展[J]. 食品科学, 2017, 38(3): 261−270. ［LIN K,

HAN X, ZHANG L W, et al. Progress in structure-activity relationship and enzymatic preparation of ACE inhibitory peptides[J]. Food Science, 2017, 38(3): 261−270.]

[29] 屈帅杰, 刘淑集, 苏永昌, 等. 响应面法优化菊黄东方鲀肌肉多肽制备工艺[J]. 食品工业科技, 2021, 42(12): 133−138. [QU S J, LIU S J, SU Y C, et al. Optimization of polypeptides extraction from *Takifugu flavidus* by response surface methodology [J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(12): 133−138.]

[30] 程镇燕, 陈韶阳, 乔秀亭. 鱼类功能性氨基酸营养免疫研究进展[J]. 饲料研究, 2014(9): 53−57. [CHENG Z Y, CHEN S Y, QIAO X T. Research progress on nutritional immunity of functional amino acids in fish[J]. Feed Research, 2014(9): 53−57.]

[31] LI W, YE S, ZHANG Z, et al. Purification and characterization of a novel pentadecapeptide from protein hydrolysates of *Cyclinasinensis* and its immunomodulatory effects on RAW264.7 cells [J]. Marine Drugs, 2019, 17(1): 30.

[32] 王凯凯. 绿豆肽的结构鉴定及对小鼠巨噬细胞免疫活性物质的影响作用研究 [D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2016. [WANG K K. Structure identification of mung bean peptides and its effect on the immunoreactive substances of macrophage in mice [D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2016.]

[33] 张亚飞. 小麦蛋白 Alcalase 水解物中免疫活性肽的研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2008. [ZHANG Y F. The study on immunopeptides from alcalase-hydrolyzed wheat proteins[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2008.]

[34] 杨磊. 螺旋藻活性肽的制备及其免疫调节功能研究 [D]. 南宁: 广西大学, 2009. [YANG L. Study on preparation of active peptides from spirulina mud and its immune regulating function[D]. Nanning: Guangxi University, 2009.]

蔡爱丽，黄名勇，王政，等. 刺葡萄锦葵色素酶促酰化反应条件的优化 [J]. 食品工业科技，2022, 43(14)：171−177. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090328

CAI Aili, HUANG Mingyong, WANG Zheng, et al. Optimization of the Enzymatic Acylation Reaction Conditions of *Vitis davidii* Malvidin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 171−177. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090328

·工艺技术·

刺葡萄锦葵色素酶促酰化反应条件的优化

蔡爱丽[1]，黄名勇[2]，王　政[1]，吴亚波[2]，赵　倩[1,*]，邓洁红[1,*]

（1.湖南农业大学食品科技学院，湖南长沙 410128；
2.湖南省天香生物科技有限责任公司，湖南邵阳 422000）

摘　要：为提高花色苷的结构稳定性，本试验以刺葡萄锦葵色素为材料，脂肪酶 CAL-B 为催化剂，探讨反应时间、反应温度和底物摩尔比对酶促酰化反应效果的影响，并在单因素实验的基础上，以酰化率为响应值，设计响应面试验，优化刺葡萄锦葵色素酶促酰化反应的最佳工艺。结果表明，最优工艺参数为：反应时间为 43 h、反应温度为 54 ℃、底物摩尔比为 1∶24。在此条件下，锦葵色素的酰化率达到 49.92%±0.12%，本实验为刺葡萄锦葵色素的稳定化及工业化生产提供了新的思路。

关键词：刺葡萄，锦葵色素，酶促酰化，反应条件

中图分类号：TS201.2　　**文献标识码：**B　　**文章编号：**1002−0306(2022)14−0171−07

DOI： 10.13386/j.issn1002-0306.2021090328

本文网刊：

Optimization of the Enzymatic Acylation Reaction Conditions of *Vitis davidii* Malvidin

CAI Aili[1]，HUANG Mingyong[2]，WANG Zheng[1]，GUO Yabo[2]，ZHAO Qian[1,*]，DENG Jiehong[1,*]

（1.College of Food Science and Technology, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China；
2.Hunan Tianxiang Biotechnology Co., Ltd., Shaoyang 422000, China）

Abstract: In order to increase the structural stability of anthocyanins, taking *Vitis davidii* malvidin as sample and the lipase CAL-B as catalyst, the effects of reaction time, temperature, and substrate molar ratio on enzymatic acylation were investigated. Based on the single factor experiments and taking the acylation rate as the response value, a response surface optimization experiment was designed to obtain the optimal process parameters for the enzymatic acylation reaction of *Vitis davidii* malvidin. Results showed that, the optimized parameters were as follows: The reaction time was 43 h, reaction temperature was 54 °C, substrate molar ratio was 1∶24. Under these conditions, the acylation rate of malvidin was 49.92%±0.12%, this paper would provide important ideas for the stabilization and industrial production of *Vitis davidii* malvidin.

Key words: *Vitis davidii*; malvidin; enzymatic acylation; reaction condition

刺葡萄是葡萄科葡萄属植物，木制藤本[1]。刺葡萄来源广泛，价格低廉，但果粒小、种子多，不便鲜食，是优秀的加工原材料[2]。紫黑色的刺葡萄果皮中含有大量的纯天然锦葵色素，为花色苷单体，具有保健功效和巨大的应用潜能[3−6]。花色苷作为一种水溶性色素，在日常环境中稳定性差，易分解变色[7]，容易受温度[8−9]、光照[10−11]、pH[12−13] 等外界因素的影响，不能用于工业化大规模生产。锦葵色素属于类黄酮化合物[14]，分子结构上含有多个活泼羟基[15]，使其稳定性受到影响。羟基数量越多，锦葵色素的稳定性越低。而酰化的花色苷的结构具有空间位阻效应，能减少水解反应和花色苷的分子内凸起，防止花色苷转化

收稿日期：2021−09−28

基金项目：湖南省自然科学基金（2018JJ2168）。

作者简介：蔡爱丽（1997−），女，硕士研究生，研究方向：农产品加工与贮藏工程，E-mail: 598543736@qq.com。

*** 通信作者：**赵倩（1989−），女，博士，副教授，研究方向：食品分析与检测，E-mail: zhaoqian@hunau.edu.cn。

邓洁红（1967−），女，博士，教授，研究方向：园艺产品深加工理论与技术，E-mail: hongjiedeng@163.com。

成假碱和查尔酮结构, 从而提高其稳定性[16−18]。

研究者一般通过化学法实现花色苷酰基化[19−20], 改善花色苷稳定性和脂溶性。但由于花色苷结构中的活性羟基均能酰基化, 化学法选择性低, 易与母核上的主要活性酚羟基结合或阻断, 导致削弱甚至丧失原有的抗氧化活性[21]。此外, 采用化学法酰化时, 产物难以分离纯化; 且反应较为剧烈且有毒, 会造成环境污染等[22−23]。近年, 有学者针对花色苷酶促酰化开展了研究[18,24], 发现酶促酰化的反应条件比较温和, 酰化位点明确, 酰化产物单一, 纯度较高, 弥补了化学法酰化反应存在的缺陷[25]。同时, 酶的高效性和选择专一性, 可大大提升底物酰化反应的酰化率。通过酰化反应, 能提高花色苷的抗氧化性[26]、脂溶性[27] 和稳定性[28−29]。

目前, 花色苷酶促酰化的文献大多采用矢车菊 3-O-葡萄糖苷作为研究对象, 锦葵色素的酶促酰化未见报道。研究表明, 酰基供体和反应条件的选择不当会导致转化率相当低[30]。因此, 探寻刺葡萄锦葵色素酰化反应的最适条件, 对提高刺葡萄的利用率及其工业价值是非常重要的。本研究以刺葡萄为试验原材料, 刺葡萄中锦葵素-3,5-O-双葡萄糖苷为反应底物, 以酰化率作为评价指标, 得到酶促酰化的反应时间、反应温度、底物摩尔比的最佳反应条件区间; 以此为基础, 设计响应面优化试验, 对建立的刺葡萄锦葵色素酶促酰化反应体系进行反应参数的优化, 得到最佳反应条件, 为锦葵色素的稳定化及工业利用提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

刺葡萄　从中方县刺葡萄果园基地购回, 用自来水冲洗干净, 晾干后剥皮, 在−20 ℃ 冰箱中冷冻贮藏; 锦葵啶-3,5-双葡萄糖苷标准品　德国 Phyto Lab 公司; 脂肪酶 Candila Antarctica-B(CAL-B, Novozym 435)　诺维信生物技术有限公司; 叔丁醇、月桂酸乙烯酯　分析纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 分子筛 4A 型(工业级)、甲醇、乙醇、盐酸、乙醚、乙酸乙酯　分析纯, 国药集团化学试剂有限公司。

AEY-220 电子分析天平　湘仪仪器设备有限公司; HJ-4A 恒温磁力搅拌器　上海比朗仪器有限公司; e2695 高效液相色谱仪　美国 Waters 公司; RE-2000B 旋转蒸发仪、SHZ-D 循环水式真空泵　予华仪器有限责任公司; THZ-92A 气浴恒温振荡器、HH-8 恒温水浴锅　上海浦东物理光学仪器厂; 真空冷冻干燥机　丹麦 Heto 公司; TDZ5 离心机　湖南赫西仪器装备有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 刺葡萄锦葵色素单体的制备　参照课题组前期试验成果[31], 制备刺葡萄锦葵色素-3,5-O-双葡萄糖苷(Malvidin-3,5-O-diglucoside)。

提取: 刺葡萄果皮以 1∶4(g/mL)的料液比加入 75% 酸化乙醇(含 0.03% 盐酸), 在避光环境下, 浸提 24 h 真空浓缩后离心, 经过 2 次无水乙酸乙酯和无水乙醚萃取, 脱除有机溶剂, 得到锦葵色素粗提液。

纯化: HP-20 树脂预处理后湿法装柱, 锦葵色素粗提液进样至流出液的吸光度值为上样液的 1/10。首先用蒸馏水冲洗, 再用体积分数为 80%、含 0.05% 盐酸的酸化乙醇洗脱, 收集洗脱液于 40 ℃ 浓缩, 真空冻干, 再用甲醇溶解。

单体制备: 通过半制备型高效液相制备, 色谱条件: 柱子: XCharge C_{18} 柱(20 mm×250 mm, 10 μm); 检测波长: 520 nm; 流动相 A: 2% 甲酸溶液; 流动性 B: 甲醇; 进样量: 1.2 mL; 流速: 15 mL/min; 柱温: 30 ℃; 洗脱程序: 0 min: 30% B, 5 min: 35% B, 8 min: 40% B, 12 min: 50% B, 18 min: 60% B, 20 min: 80% B。

参考文献 [31] 进行结构鉴定, 获得 3 种色素, 经过超高效液相色谱三重四级杆飞行时间质谱联用分析鉴定选取锦葵素-3,5-O-双葡萄糖苷为试验单体。

1.2.2 脂肪酶催化花色苷酰化反应

1.2.2.1 反应时间对刺葡萄锦葵色素酶促酰化反应的影响　将活化后的 4A 型分子筛放入叔丁醇中进行干燥, 在 5 个带塞小瓶中加入 2 mL 脱水叔丁醇、0.01 mmol 锦葵素-3, 5-O-双葡萄糖苷、0.10 g 分子筛和 0.15 mmol 月桂酸乙烯酯混合均匀, 连续搅拌至完全溶解, 加入 40 mg 脂肪酶 CAL-B, pH 为 3.0 时在恒温振荡器(45 ℃, 200 r/min)中分别反应 24、30、36、42、48 h 后, 5000 r/min 离心 15 min 后取上清液, 将滤液置于旋转蒸发仪中, 真空蒸馏后, 溶解于 10 mL 的甲醇中, 搅拌至完全溶解后, 12000 r/min 离心 10 min, 取上清液。用体积分数为 0.01% 的甲酸甲醇溶液稀释 50 倍, 液相色谱手动进样 20 μL 进行分析。酰化反应前后, 试验均在避光条件下进行。利用归一法计算出峰面积, 获得反应的酰化率, 探讨反应时间对刺葡萄锦葵色素酶促酰化反应的影响。

1.2.2.2 反应温度对刺葡萄锦葵色素酶促酰化反应的影响　按照 1.2.2.1 的方法, 将锦葵色素的酰化反应温度分别设置为 40、45、50、55、60 ℃, 反应 42 h 后终止反应。经液相色谱分析后计算反应的酰化率, 探讨反应温度对刺葡萄锦葵色素酶促酰化反应的影响。

1.2.2.3 底物摩尔比对刺葡萄锦葵色素酶促酰化反应的影响　按照 1.2.2.1 的方法, 在锦葵色素酰化反应过程中分别添加 0.10、0.15、0.20、0.25、0.30 mmol 的月桂酸乙烯酯, 使底物的摩尔比分别为 1∶10、1∶15、1∶20、1∶25、1∶30, 55 ℃ 下反应 42 h。经液相色谱分析后计算反应的酰化率, 探讨底物摩尔比对刺葡萄锦葵色素酶促酰化反应的影响。

1.2.2.4 响应面优化试验　以单因素实验为基础, 反应时间、反应温度、底物摩尔比为试验因素, 以酰化率为响应值, 根据 Box-Benhnken 原理, 设计响应面优化试验, 因素水平表如表 1 所示。每组试验重复三次, 通过 Design-Expert V8.0.6 软件, 通过数据分

表 1　响应面优化试验因素水平设计

Table 1　Design of factors and levels of response surface optimization test

水平	因素		
	A: 反应时间(h)	B: 反应温度(℃)	C: 底物摩尔比
−1	36	50	1∶20
0	42	55	1∶25
1	48	60	1∶30

析得到试验最优条件方案。

1.2.3　酶促酰化反应酰化率的计算　酰化反应后，利用高效液相色谱仪进行分析。分析条件如下：

流动相 A：1% 甲酸溶液；流动相 B：乙腈；流速：0.6 mL/min；柱温：35 ℃；检测器：PDA 紫外检测器；检测波长：520 nm；进样量：20 μL。

低压梯度洗脱条件：0 min：5% B，5 min：20% B，20 min：90% B，30 min：90% B，45 min：20% B。

花色苷的酰化率计算公式为：

$$反应酰化率=\frac{S_1}{S_1+S_0}\times 100$$

式中：S_1 表示反应后酰化产物的峰面积；S_0 表示反应后未酰化花色苷的峰面积。

1.3　数据处理

试验设重复实验，以平均值±标准偏差表示结果。使用 Origin 2017 64 Bit 软件进行数据绘图，用 SPSS 21.0 软件对试验数据进行多重差异显著性分析。

2　结果与分析

2.1　酰化反应前后的高效液相色谱分析

利用高效液相对酶促酰化反应前后的刺葡萄锦葵色素进行分析。从图 1A 可看出，未酰化花色苷单体在 520 nm 检测只有一个色谱峰，计算出制备的刺葡萄锦葵色素单体纯度为 98.76%。图 1B 为酰化反应后花色苷的液相色谱图，在 520 nm 可以检测到两个色谱峰，与未酰化的色谱图相比，多了一个酰化产物峰。这说明刺葡萄锦葵色素酰化反应可能生成了单酰基产物，脂肪酶催化区域选择性较高，只有一个酰化位点，能更好地分离纯化出酰化花色苷单体。通过酰化产物的峰面积确定酶促酰化反应的酰化率，证明酶促酰化反应的转化率。

2.2　反应条件对刺葡萄锦葵色素酶促酰化反应的影响

如图 2A 所示，随着酰化反应时间的增加，酰化率先提高后降低。酰化反应时间为 24~42 h 时，锦葵色素中酰基供体的浓度较高，酰化产物浓度较低，促进反应向正方向进行，酰化率从 29.8% 提高到 43.2%。但是，反应时间达到 42 h 后，酰化反应基本达到平衡状态，且刺葡萄锦葵色素及酰化产物长时间处于高温下发生分解，酰化率降低。因此，选取反应时间 36、42、48 h 为最优梯度。

酶促酰化反应容易受到温度的影响。在一定温度范围内，升高温度能增加底物分子能量和活化的底物分子，相应增加了单位时间内底物分子有效碰撞次数，从而促进反应的进行。如图 2B 所示，反应温度低于 55 ℃ 时，脂肪酶 CAL-B 的活性、底物的溶解度以及反应体系中底物有效碰撞次数都随着反应温度的提高而增多，酰化效率也随之提高。在 55 ℃ 时，锦葵色素的酰化率最高，继续升高反应温度，酰化效率开始降低。因为当温度过高且在有机溶剂中时，肽键的水解和二硫键的破坏被加剧，脂肪酶的酶蛋白会发生变性最终失活[32−33]。同时，温度过高导致了锦葵色素及其酰化产物的降解[34]。因此，选取反应温度 50、55、60 ℃ 为最优梯度。

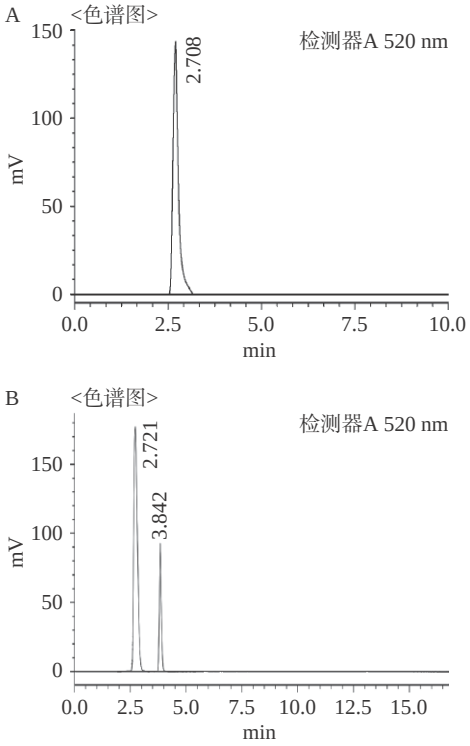


图 1　酰化反应前后样品的液相色谱图

Fig.1　Liquid chromatographic of the sample before and after the acylation reaction

注：(A)反应前；(B)反应后。

刺葡萄锦葵色素酶促酰化体系属于双底物可逆反应，反应中同时存在酶促水解副反应[35]。在酰化反应体系中，加入过量的酰基供体，能够提高反应体系中底物与脂肪酶之间的碰撞，从而提高反应的酰化率。同时提高双底物中一种底物的浓度，有利于热力学平衡向酰化反应的方向进行。因此，最佳摩尔比的确定，既能保证反应充分发生，同时也能节省试剂。底物摩尔比对酰化率的影响结果如图 2C 所示，当刺葡萄锦葵色素与月桂酸乙烯酯的摩尔比从 1∶10~1∶25 时，刺葡萄锦葵色素的酰化率逐渐升高，继续提高月桂酸乙烯酯的浓度，脂肪酶的活性受到影响，反应的酰化率开始降低。综合考虑，选取底物摩尔比 1∶20、1∶25 和 1∶30 为最优梯度。

2.3　响应面优化试验结果分析

对反应时间(A)、反应温度(B)、底物摩尔比(C)

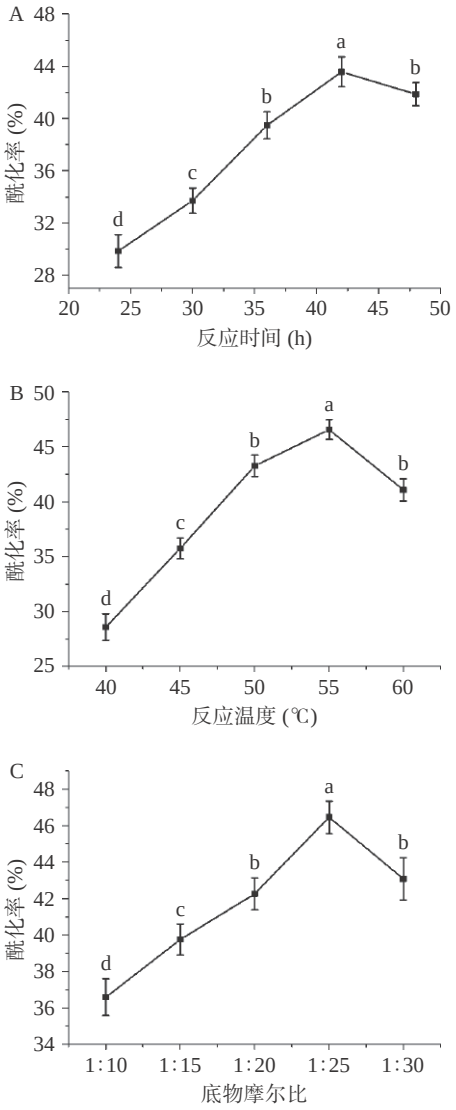


图 2 反应条件对刺葡萄锦葵色素酶促酰化反应的影响

Fig.2 Effects of reaction conditions on the enzymatic acylation of malvidin

注: 不同小写字母表示差异显著, $P<0.05$。

三个因素进行反应条件优化, 通过单因素实验, 选取每个因素的最优梯度, 以酰化率为响应值进行三因素三水平的响应面优化试验, 共设计 17 个试验, 每个试验设三个平行, Box-Behnken 试验设计与结果见表 2。

2.4 回归方程方差分析

通过 Design-Expert V8.0.6 软件对数据进行多元回归拟合, 得到刺葡萄锦葵色素酶促酰化反应酰化率 Y(%)的二次多元回归方程:

$$Y=49.96+0.3125A-0.9500B-0.4625C-1.65AB-1.48AC-0.2500BC-3.14A^2-3.37B^2-2.24C^2$$。

以刺葡萄锦葵色素的酰化率为响应值, 对三个因素(反应时间、反应温度、底物摩尔比)的回归方差分析结果如表 3 所示。该回归方程模型回归极显著($P<0.0001$), 且失拟项不显著, 说明该模型拟合程度好。函数的决定系数 $R^2=0.9818$, 说明该模型可以解释大部分试验数据, 因此可以用该模型预测和分析不同反应时间, 反应温度和底物摩尔比对刺葡萄锦葵色素酶促酰化反应体系酰化率的影响。

表 2 响应面优化试验设计与结果

Table 2 Design and results of response surface optimization test

实验号	A	B	C	Y: 酰化率(%)
1	1	0	−1	46.73
2	−1	−1	0	41.95
3	0	−1	1	45.53
4	0	0	0	49.87
5	0	0	0	49.61
6	0	−1	−1	46.15
7	1	−1	0	45.93
8	−1	0	1	45.48
9	0	0	0	49.51
10	−1	0	−1	43.22
11	0	0	0	49.91
12	0	0	0	49.83
13	1	1	0	41.75
14	0	1	1	42.18
15	−1	1	0	44.36
16	0	1	−1	43.72
17	1	0	1	43.06

表 3 回归方程方差分析结果

Table 3 Regression equation analysis results

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	152.56	9	16.95	42.01	<0.0001	**
A	0.7813	1	0.4513	17.89	0.0039	**
B	7.22	1	7.22	17.89	0.0039	**
C	1.71	1	1.71	4.24	0.0784	
AB	10.89	1	10.89	26.99	0.0013	**
AC	8.70	1	8.70	21.57	0.0024	**
BC	0.2500	1	0.2500	0.6196	0.4570	
A^2	41.58	1	41.58	103.05	<0.0001	**
B^2	47.75	1	47.75	118.33	<0.0001	**
C^2	21.17	1	21.17	52.48	0.0002	**
残差	2.82	7	0.4035			
失拟项	2.07	3	0.6908	3.67	0.1205	不显著
纯误差	0.7520	4	0.1880			
总离差	155.38	16				
	$R^2=0.9818$					

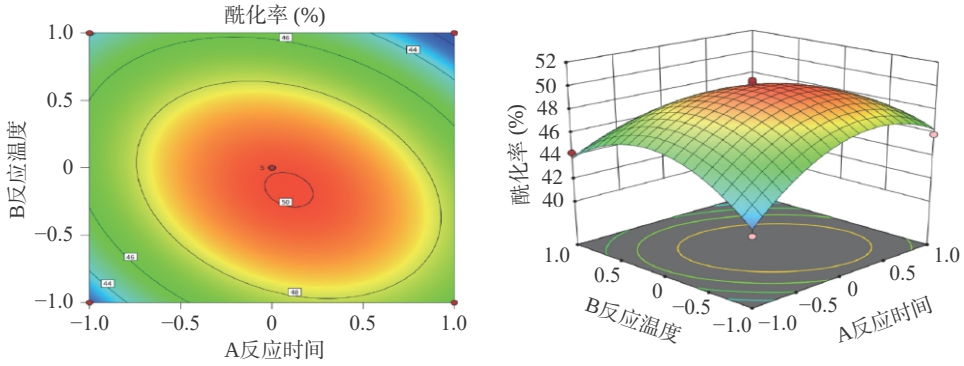
注: *: 影响显著, $P<0.05$, **: 影响极显著, $P<0.01$。

由 P 值可以看出, 反应时间(A)和反应温度(B)的影响极显著($P<0.01$), 底物摩尔比(C)影响不显著, 二次项 A^2、B^2、C^2 极显著($P<0.01$)。AB、AC 的 P 值均小于 0.01, 说明反应时间与反应温度、反应时间与底物摩尔比交互作用对酰化率的影响极显著。

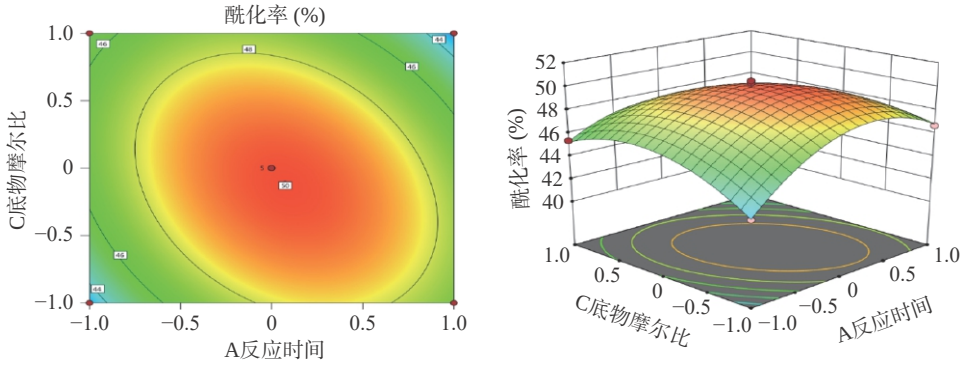
2.5 响应面因素交互作用分析

响应面等高线图及响应图, 反映了试验因素之间的交互作用, 响应曲面越陡峭, 因素对响应值的影响越显著; 而响应面投射出的等高线形状, 如果呈椭圆形则表示两因素交互作用显著, 如果接近圆形则表示两因素交互作用不显著。

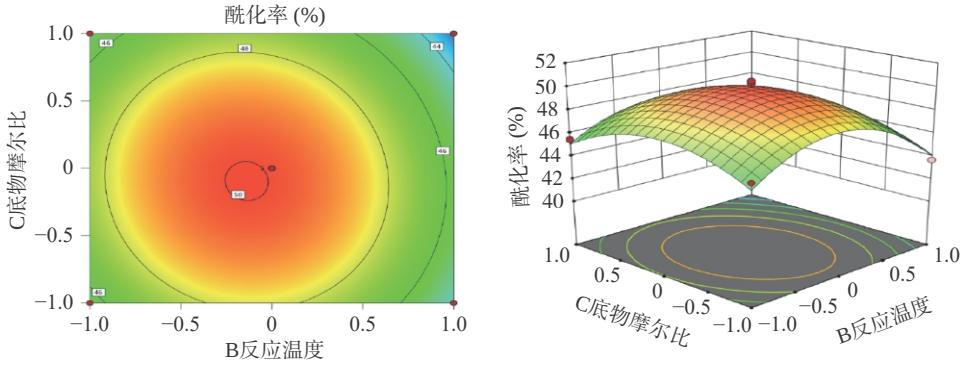
由图 3A 可知, 在底物摩尔比不变的情况下, 反应时间在 36~48 h, 反应温度在 50~60 ℃ 范围内, 刺



（a）反应时间与反应温度交互作用



（b）反应时间与底物摩尔比交互作用



（c）反应温度与底物摩尔比交互作用

图 3　各因素交互作用的等高线图及响应图

Fig.3　Contour diagram and response diagram of interaction of various factors

葡萄锦葵色素的酰化率先升高后降低，且等高线图呈椭圆形，三维曲面图较陡峭，说明两者之间的相互影响显著，得到的结果与回归方程分析中 AB 的 P 值一致。由图 3B 可知，在反应温度不变的情况下，反应时间在 36~48 h，底物摩尔比在 1∶20~1∶30 范围内，刺葡萄锦葵色素的酰化率先升高后降低，且等高线图呈椭圆形，三维曲面图较陡峭，说明两者之间的相互影响显著，得到的结果与回归方程分析中 AC 的 P 值一致。而图 3C 中，等高线图呈圆形且三维曲面图较平缓，说明反应温度与底物摩尔比之间的相互影响不显著。

2.6　响应面最佳反应参数及验证试验

经 Design Expert 优化后的刺葡萄锦葵色素酶促酰化反应的最佳反应条件为反应时间 42.75 h、反应温度 54.16 ℃、底物摩尔比 1∶24.32，此条件下酰化率预测为 50.09%，结合试验可行性，将反应条件调整为反应时间 43 h，反应温度 54 ℃，底物摩尔比 1∶24。该条件下进行三次重复验证试验试验，得酰化率为 49.92%±0.12%，与预测酰化率的相对误差为 0.12%。

3　结论

本文首先以刺葡萄锦葵色素的酰化率为指标，分别探讨反应时间、反应温度和底物摩尔比对酶促酰化反应的影响。其次通过响应面优化试验，进行回归方程方差分析，结果显示回归方程模型回归极显著（P<0.0001）。最终，根据所建立的数学模型进行参数最优分析，得到最佳反应条件，结合试验可行性，确定最佳反应时间为 43 h，反应温度为 54 ℃，底物摩尔比为 1∶24 时，刺葡萄锦葵色素的酶促酰化反应的酰化率为 49.92%±0.12%，与模型预测值 50.09% 的相

对误差为 0.12%，说明该反应条件合理可靠。本研究为天然花青素酰化研究提供了新的数据，为其在食品和保健品中的应用提供了依据。但是，酶促酰化反应位点对花色苷稳定性及抗氧化活性的影响还需要更加深入的探索。

参考文献

[1] 石雪晖, 王益志, 陈祖玉, 等. 湖南刺葡萄植物学性状及抗病性研究初报[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2002(2): 22−24. [WANG Y Z, CHEN Z Y, YANG G S, et al. The preliminary study on the botanical character and the disease resistance of Hunan beiergrape [J]. Sino-Overseas Grapevine & Wine, 2002(2): 22−24.]

[2] 陈婷, 刘鑫铭, 蔡盛华, 等. 刺葡萄种质资源研究进展[J]. 中国农学通报, 2017, 33(1): 52−56. [CHEN T, LIU X M, CAI S H, et al. Germplasm resources of *Vitis davidii*: Research advances[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2017, 33(1): 52−56.]

[3] 周敏. 刺葡萄矿质营养变化规律与钾对果实糖分积累的影响研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2017. [ZHOU M. Research on nutrients change rule of *Vitis davidii* Foëx. and influence of potassium to fruit sugar accumulation[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2017.]

[4] KHALIFA I, XIA D, DUTTA K, et al. Mulberry anthocyanins exert anti-AGEs effects by selectively trapping glyoxal and structural-dependently blocking the lysyl residues of beta-lactoglobulins[J]. Bioorganic Chemistry, 2020: 96.

[5] SANG J, ZHANG Y, SANG J, et al. Anthocyanins from *Nitraria tangutorun*: Qualitative and quantitative analyses, antioxidant and anti-inflammatory activities and their stabilities as affected by some phenolic acids[J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2019, 13(1): 421−430.

[6] JIANG T, SHUAI X Y, LI J, et al. Protein-bound anthocyanin compounds of purple sweet potato ameliorate hyperglycemia by regulating hepatic glucose metabolism in high-fat diet/streptozotocin-induced diabetic mice[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(6): 1596−1608.

[7] ZHANG N, JING P. Anthocyanins in Brassicaceae: Composition, stability, bioavailability, and potential health benefits[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2020: 1−15.

[8] 常影, 杨晓雪, 焦岩, 等. 桑葚花色苷纳米脂质体的修饰及稳定性研究[J]. 食品科技, 2020, 45(12): 251−257. [CHANG Y, YANG X X, JIAO Y, et al. Study on modification and stability of mulberry anthocyanin nanoliposomes[J]. Food Science and Technology, 2020, 45(12): 251−257.]

[9] 李泉岑, 王佳奇, 伍子涵, 等. 天然植物色素稳定性及其应用研究进展[J]. 现代食品, 2020(22): 59−62. [LI Q C, WANG J Q, WU Z H, et al. Research progress on the stability and application of natural plant pigments[J]. Modern Food, 2020(22): 59−62.]

[10] CARRILLO C, KAMILOGLU S, GROOTAERT C, et al. Co-ingestion of black carrot and strawberry. Effects on anthocyanin stability, bioaccessibility and uptake[J]. Foods, 2020, 9(11): 1595.

[11] 李金星, 胡志和, 马立志, 等. 蓝莓加工过程中出汁率及花青素的稳定性[J]. 食品科学, 2014, 35(2): 120−125. [LI J X, HU Z H, MA L Z, et al. Juice yield and anthocyanins stability during the processing of blueberry[J]. Food Science, 2014, 35(2): 120−125.]

[12] WU H Y, YANG K M, CHIANG P Y. Roselle anthocyanins: Antioxidant properties and stability to heat and pH[J]. Molecules, 2018, 23(6): 1357.

[13] LI N, MA D, ZONG M H. Enhancing the activity and regioselectivity of lipases for 3′-benzoylation of floxuridine and its analogs by using ionic liquid-containing systems[J]. Journal of Biotechnology, 2008, 133(1): 103−109.

[14] KAMIYA H, YANASE E, NAKATSUKA S. Novel oxidation products of cyanidin 3-O-glucoside with 2, 2′-azobis-(2, 4-dimethyl) valeronitrile and evaluation of anthocyanin content and its oxidation in black rice[J]. Food Chemistry, 2014, 155: 221−226.

[15] BROWNMILLER C, HOWARD L R, PRIOR R L. Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blueberry products[J]. Journal of Food Science, 2008, 56(3): 689−695.

[16] ZHAO C L, CHEN Z J, BAI X S, et al. Structure–activity relationships of anthocyanidin glycosylation[J]. Molecular Diversity, 2014, 18(3): 687−700.

[17] 孙建霞, 张燕, 胡小松, 等. 花色苷的结构稳定性与降解机制研究进展[J]. 中国农业科学, 2009, 42(3): 996−1008. [SUN J X, ZHANG Y, HU X S, et al. Structural stability and degradation mechanisms of anthocyanins[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2009, 42(3): 996−1008.]

[18] GUIMARÃES M, MATEUS N, DE FREITAS V, et al. Improvement of the color stability of cyanidin-3-glucoside by fatty acid enzymatic acylation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(38): 10003−10010.

[19] 崔清慧. 蓝莓花色苷的酰化及抑制 Hep G2 和 Caco-2 细胞增殖活性的研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2016: 12−40. [CUI Q H. Acylation of blueberry anthocyanin and its inhibitory activity of HepG2 and Caco-2 cells[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2016: 12−40.]

[20] 洪森辉, 黄冰晴, 张晶怡, 等. 越橘花色苷的酰化修饰及其稳定性改善研究[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(16): 84−89. [HONG S H, HUANG B Q, ZHANG J Y, et al. Improvement the stability of the bilberry anthocyanins through acylating modification[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(16): 84−89.]

[21] HOWELL A B. Clinical evidence supporting cranberry as a complementary approach to *Helicobacter pylori* management[J]. Food Frontiers, 2020, 1(3): 329−331.

[22] 周萍, 郑洁. 花色苷改性及应用研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(3): 346−354. [ZHOU P, ZHENG J. Modification of anthocyanins for extended application: A review[J]. Food Science, 2021, 42(3): 346−354.]

[23] 卢晓蕊, 武彦文, 欧阳杰, 等. 响应面法优化萝卜红色素酯化修饰条件的研究[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(7): 71−76. [LU X R, WU Y W, OUYANG J, et al. Optimization of radish red esterification modification by quadratic regression[J]. Food and Fermentation Industries, 2008, 34(7): 71−76.]

[24] GUIMARAES M, PEREZ GREGORIO M, MATEUS N, et al. An efficient method for anthocyanins lipophilization based on enzyme retention in membrane systems[J]. Food Chemistry, 2019: 300.

［25］ CRUZ L, FERNANDES I, GUIMARAES M, et al. Enzymatic synthesis, structural characterization and antioxidant capacity assessment of a new lipophilic malvidin-3-glucoside-oleic acid conjugate[J]. Food and Function, 2016, 7(6): 2754−2762.

［26］ CRUZ L, FERNANDES V C, ARAUJO P, et al. Synthesis, characterisation and antioxidant features of procyanidin B4 and malvidin-3-glucoside stearic acid derivatives[J]. Food Chemistry, 2015, 174: 480−486.

［27］ YANG W, KORTESNIEMI M, YANG B, et al. Enzymatic acylation of anthocyanins isolated from alpine bearberry (*Arctostaphylos alpina*) and lipophilic properties, thermostability, and antioxidant capacity of the derivatives[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(11): 2909−2916.

［28］ ERNANDEZ AULIS F, TORRES A, SANCHEZ MENDOZA E, et al. New acylated cyanidin glycosides extracted from underutilized potential sources: Enzymatic synthesis, antioxidant activity and thermostability[J]. Food Chemistry, 2020: 309.

［29］ 朱勇生. 黑米花青素的分子修饰及其修饰产物的稳定性和益生元活性研究 [D]. 合肥: 合肥工业大学, 2018: 14-50. ［ZHU Y S. Study on the molecular modification, activity and prebiotic activity of anthocyanins from black rice and prebiotic activity of anthocyanins from black rice and preparation of anthocyanins salts[D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2018: 14-50.］

［30］ ARDHAOUI M, FALCIMAIGNE A, OGNIER S, et al. Effect of acyl donor chain length and substitutions pattern on the enzymatic acylation of flavonoids[J]. Journal of Biotechnology, 2004, 110(3): 265−272.

［31］ 王维茜, 邓洁红, 刘永红. 半制备型高效液相色谱法分离刺葡萄锦葵色素单体[J]. 食品科学, 2016, 37(18): 71−76. ［WANG W Q, DENG J H, LIU Y L. Preparation of monnmeric anthocyanins from *Vitis davidii* Foex by semi-preparative HPLC[J]. Food Science, 2016, 37(18): 71−76.］

［32］ ARCUS V L, VAN DER KAMP M W, PUDNEY C R, et al. Enzyme evolution and the temperature dependence of enzyme catalysis[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2020, 65: 96−101.

［33］ SABRIEH G, MARJAN H, ZOHREH H, et al. Immobilisation of lipase on the surface of magnetic nanoparticles and non-porous glass beads for regioselective acetylation of prednisolone[J]. IET Nanobiotechnology, 2013, 7(3): 100−108.

［34］ TENG H, MI Y, CAO H, et al. Enzymatic acylation of raspberry anthocyanin: Evaluations on its stability and oxidative stress prevention[J]. Food Chemistry, 2022, 372: 130766.

［35］ XU P, ZHENG G W, ZONG M H, et al. Recent progress on deep eutectic solvents in biocatalysis[J]. Bioresources and Bioprocessing, 2017, 4(1): 34.

曹赓，温成荣，陈学亭，等. 马铃薯蒸馍的配方优化 [J]. 食品工业科技，2022, 43(14)：178−184. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090330

CAO Geng, WEN Chengrong, CHEN Xueting, et al. Optimization of the Formula of Potato Steamed Bread[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 178−184. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090330

·工艺技术·

马铃薯蒸馍的配方优化

曹　赓，温成荣*，陈学亭，胡冰冰

（大连工业大学食品学院，国家海洋食品工程技术中心，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：为了开发高含量马铃薯泥主食制品，本文探究了马铃薯泥含量为 50% 的马铃薯蒸馍的最优配方。以面团发酵特性、蒸馍感官评分、质构和色差等为指标，采用单因素和正交试验优化了马铃薯蒸馍配方。结果表明，随着谷朊粉含量增加，面团比容先增大后减小、宽高比先减小后增大，蒸馍的硬度、胶着度和咀嚼度先减小后增大，感官评分先增大后减小；随着棕榈油和酵母含量增加，面团比容增大、宽高比减小，蒸馍的硬度、胶着度和咀嚼度和感官评分增大。正交试验优化得到蒸馍的最佳配方为：马铃薯薯泥 50%、面粉 30%、谷朊粉 5%、水 7%、棕榈油 4%、酵母 3.5%、小苏打 0.2%、盐 0.3%，在此条件下得到的马铃薯蒸馍的感官评分为 90.50 分，蒸馍表面光滑、色泽亮丽均匀、外观挺立饱满并且具有马铃薯香气。本研究结果可为马铃薯主食化加工提供了理论基础。

关键词：马铃薯，蒸馍，配方，优化

中图分类号：TS213.2　　**文献标识码：**B　　**文章编号：**1002−0306(2022)14−0178−07

DOI：10.13386/j.issn1002-0306.2021090330　　本文网刊：

Optimization of the Formula of Potato Steamed Bread

CAO Geng，WEN Chengrong*，CHEN Xueting，HU Bingbing

（School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University, National Engineering Research Center of Seafood, Collaborative Innovation Center of Seafood Deep Processing, Dalian 116034, China）

Abstract: In order to develop staple foods containing high content mashed potato, the optimal formula of potato steamed bread with 50% mashed potato was explored. The formula of potato steamed bread was optimized by single factors and orthogonal experiment with taking potato dough fermentation characteristics, sensory evaluation, texture and color difference of potato steamed bread as indicators. The results showed that with the increasing of gluten content, the specific volume of dough increased firstly and then decreased, but the width to height ratio decreased initially followed by an increase. The hardness, stickiness and chewiness of potato steamed bread decreased initially, and then increased, while the sensory score increased firstly and then decreased. As palm oil and yeast contents increased, the specific volume of potato dough increased, but the width to height ratio decreased. The hardness, stickiness, chewiness and sensory score of potato steamed bread increased gradually. The optimal formula was obtained as follows: Potato 50%, flour 32%, gluten 5%, water 7.0%, palm oil 4%, yeast 3.5%, baking soda 0.2%, salt 0.3%, in which the sensory score of steamed bread was 90.50 scores, and the potato steamed bread had smooth surface, bright and uniform color, upright and full appearance, and potato aroma. The study could be used as theoretical basis for potato staple food processing.

Key words: potato; steamed bread; formula; optimization

马铃薯（*Solanum tuberosum* L.）又名洋芋、土豆，是茄科一年生草本植物[1]。从 2017 年开始，中国马铃薯种植面积和总产量居世界首位[2−3]。马铃薯中含有维生素 B_1、维生素 B_2、维生素 C、矿物质、钙、钾、铁等，并且具有低脂肪、低热量、低糖分的营养特点[4−5]。目前，我国的马铃薯工业化产品主要用于加工薯条、淀粉、全粉、粉丝、粉条等，产品种类较少、营养价值单一，同发达国家相比还有存在加工能

收稿日期：2021−09−28

基金项目：国家重点研发计划项目（2016YFD0401304）。

作者简介：曹赓（1995−），男，硕士研究生，研究方向：农产品加工与贮藏，E-mail：bu52@163.com。

*** 通信作者：**温成荣（1984−），男，博士，副教授，研究方向：农产品加工与贮藏，E-mail:wencr2014@163.com。

力不强、产业链不够完善、加工产品单一等差距[5−6]。2015 年，我国政府提出马铃薯主食化战略，将马铃薯作为第四大主粮进行主食产品开发及产业推广，有利于进一步发挥马铃薯作为主食的营养价值，推动马铃薯全产业链的发展。

蒸馍是我国传统的发酵蒸制面食制品，在中国饮食文化中扮演着重要的角色，深受北方人民的喜爱。随着市场的发展，人民消费水平的提升，蒸馍的种类不断丰富，添加了薯类、豆类、杂粮等的蒸馍越来越受欢迎[7]。将小麦粉与马铃薯结合制备蒸馍，丰富了蒸馍的种类，增加了蒸馍的营养价值、也丰富了马铃薯主食产品[8]。而目前马铃薯蒸馍以添加马铃薯全粉为主，虽然马铃薯全粉可以较大程度的保持马铃薯中的维生素、矿物质、氨基酸等营养成分，可以改善食品口感，调整食品营养结构，使用较为方便[9]，但是马铃薯全粉生产存在能耗高、营养成分损失、特征风味减弱等问题[10]，也增加了马铃薯蒸馍的生产成本。而将马铃薯制泥后直接添加到蒸馍中可以很好的解决这些问题，现有研究发现马铃薯薯泥添加量为 30% 的蒸馍具有较好的品质[11]，添加量继续升高会存在面团黏度大、发酵难、难成型等技术难题，从而导致蒸馍品质下降[12]。提高蒸馍中马铃薯原薯的含量成为马铃薯主食化的一个重要研究方向。

本文研究了高含量马铃薯泥蒸馍，分析了谷朊粉与面粉、水与棕榈油、酵母与小苏打的比例对马铃薯蒸馍的品质的影响；通过正交优化方法，确定马铃薯蒸馍最优配方。研究结果可为马铃薯系列产品开发提供理论基础，丰富马铃薯主食产品。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

大西洋品种马铃薯（干物质 24%，淀粉含量 15%，还原糖含量 0.16%）　甘肃薯香园农业科技有限公司；低筋小麦粉　豫粮集团濮阳专用面粉有限公司；酵母　安琪酵母股份有限公司；小苏打　吉林省杞参食品有限公司；谷朊粉　承德魁仙食品有限公司；食盐　大连盐业有限公司；棕榈油　天津市聚龙粮油有限公司。

SCC-WE101 万能蒸烤箱　德国 Rational 公司；AB204 型电子天平　梅特勒-托利多仪器有限公司；YP6001N 型电子天平　上海精密科学仪器有限公司；BQPJ-1 切片机　中国艾博公司；北格第五代饸饹型压面机　浙江金华华强机械公司；TA.XT Plus 物性测试仪　英国 SMS 公司；UltraScan PRO 测色仪　美国 HunterLab 公司；KENWOOD-KM020 厨师机　英国凯伍德家电公司；TF-16 发酵箱　加拿大雷鸟食品机械公司。

1.2　实验方法

1.2.1　马铃薯蒸馍制作方法　将马铃薯置于蒸锅中隔水加热 1.4 h，去皮切块，用饸烙机挤压 3 次得到马铃薯薯泥。采用面粉三次加入、面团三次发酵法进行发酵。首先，将活化好的酵母和马铃薯薯泥加入厨师机中搅拌均匀，依次加入 83.33% 低筋面粉、谷朊粉、小苏打和食盐，搅拌均匀，揉制成面团，置于温度 32 ℃、湿度 75% 条件下一次发酵 2 h；然后揉入 10% 低筋面粉，二次发酵 1 h；再揉入 6.67% 低筋面粉，三次发酵 1 h；最后加入棕榈油并揉至均匀，得到马铃薯蒸馍面团。将面团分成 50 g 左右的蒸馍生胚，置于 100 ℃ 蒸箱中蒸制 30 min，得到马铃薯蒸馍。

1.2.2　单因素实验　根据预实验结果，基本配方为马铃薯 50%、面粉 30%、谷朊粉 5%、水 8.6%、棕榈油 2.4%、酵母 2.1%、小苏打 1.6%、食盐为 0.3%。分别研究谷朊粉和面粉的总含量为 35%，比例分别为 1∶34、3∶32、5∶30、7∶28、9∶26，其他物料比例不变；水和棕榈油的总含量为 11%，比例分别为 10.2∶0.8、9.4∶1.6、8.6∶2.4、7.8∶3.2、7∶4，其他物料比例不变；酵母和小苏打的总含量为 3.7%，比例为 0.7∶3、1.4∶2.3、2.1∶1.6、2.8∶0.9、3.5∶0.2，其他物料比例不变，马铃薯发酵面团特性和马铃薯蒸馍品质。

1.2.3　正交试验　根据单因素实验结果，以谷朊粉和面粉比例、水和棕榈油比例、酵母和小苏打比例设计三因素三水平的正交试验（表 1），以感官评分为指标选出最佳配方。

表 1　正交试验因素与水平设计
Table 1　Factor and horizontal design

编号	A谷朊粉和面粉的比例	B水和棕榈油的比例	C酵母和小苏打的比例
1	5∶30	8.6∶2.4	2.1∶1.6
2	7∶28	7.8∶3.2	2.8∶0.9
3	9∶26	7∶4	3.5∶0.2

1.2.4　发酵特性测定　采用小米体积替代法测定面团的体积，使用分析天平测得面团的重量，根据以下公式（1）计算面团比容。用游标卡尺测量蒸馍的直径和高度，宽高比按公式（2）计算。

$$\lambda = V/M \qquad 式（1）$$

式中：λ 为比容，mL/g；V 为面团体积，mL；M 为面团重量，g。

$$R = D/H \qquad 式（2）$$

式中：R 为宽高比，cm；D 为面团直径，cm；H 为面团高度，cm。

1.2.5　质构测定　蒸馍质构特性的测定采用质构剖面分析（TPA）的方法[13]。选择 P50 探头，测前速率 1 mm/s，测试速率和测后速率均为 2 mm/s；压缩比例为 50%；触发力为 5 g。

1.2.6　色差测定　采用测色仪测定马铃薯蒸馍的色差，从蒸馍的中心部位取样，制成 5 cm×4 cm×4 cm 样品，测定色差参数 L^*、a^*、b^*。此外，色度按下式计算[14]。

$$色度 = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \qquad 式（3）$$

表 2　马铃薯蒸馍感官评价标准

Table 2　Standard for sensory evaluation of potato steamed bread

项目(分值)	评分标准(分)		
比容(20 分)	比容≥2.3 mL/g, 每少0.1减1分		
色泽(10 分)	颜色亮丽均匀(8~10)	颜色暗稍不均匀(5~7)	颜色灰暗不均匀(0~4)
外观(20 分)	挺立、饱满、表面光滑(17~20)	轻微塌陷、表面微皱, 有轻微收缩现象(11~16)	萎缩、与品种造型不一致(0~10)
内部结构(10 分)	纵剖面气孔小而均匀(8~10)	气孔大小适中(5~7)	气孔大小不均匀(0~4)
口感滋味(20 分)	口味淡香, 有发酵香味, 咀嚼适口、较柔软、易下咽(17~20)	口感软硬适中(11~16)	略带面腥味, 咀嚼干硬(0~10)
弹韧性(20 分)	回弹快、能复原、能压 1/2(17~20)	回弹稍差, 能压 1/4 以上(11~16)	回弹弱(0~10)

1.2.7　感官评价　将蒸馍冷却到室温, 选取有感官评定经验的 10 人进行评价, 去掉最大值和最小值后, 取平均值。感官评分标准参照 GB/T 17320-2013《小麦品牌品质分类》的蒸馍评定方法做部分修改(表 2)[15]。

1.3　数据处理

采用 Microsoft Excel 2010 进行实验数据统计分析, 采用 SPSS22.0 进行显著性分析(P<0.05), 采用 Origin 2018 进行作图。

2　结果与分析

2.1　谷朊粉和面粉的比例对马铃薯蒸馍的影响

随着谷朊粉和面粉中谷朊粉比例的增大, 面团的比容先增大后减小(图 1A), 宽高比先减小后增加(图 1B), 面团的比容曲线升高和宽高比曲线降低的时间从 140 min 延长至 160 min; 马铃薯蒸馍的硬度、胶着度、咀嚼度先显著减小后显著增大(图 1C, P<0.05), 感官评分先显著升高后显著降低(图 1D, P<0.05), 谷朊粉和面粉的比例在 5∶30 时, 面团有最大的比容 3.74 mL/g 和最小的宽为 1.2, 蒸馍的硬度、胶着度和咀嚼度最小值为 1013.32 g、817、783.26, 感官评分值达到最大值 90 分。适量的谷朊粉可以增加面团中的面筋含量, 改善面团的弹性、持气性, 制品松软[16], 但体积过度膨大会引起产品气孔不均, 硬度、咀嚼度、胶着度过小。过量的谷朊粉会导致面团的面筋过多, 使蒸馍硬度过大, 口感降低[17−18]。周杰等[19] 发现蒸馍的咀嚼度在 1000 左右时, 甘薯蒸馍口感较好。

由表 3 可知, 随着谷朊粉和面粉中谷朊粉比例的增大, L^*值、a^*值、b^*值和色度呈现升高的趋势, 蒸馍的白亮度增强, 偏向红色和黄色。其中谷朊粉和面粉在 3∶32 和 5∶30 比例时, a *、b^*值和色度都没有显著性差异(P>0.05), 随后显著性升高(P <0.05); L^*值在 5∶30 时出现显著性升高(P<0.05)。以感官评

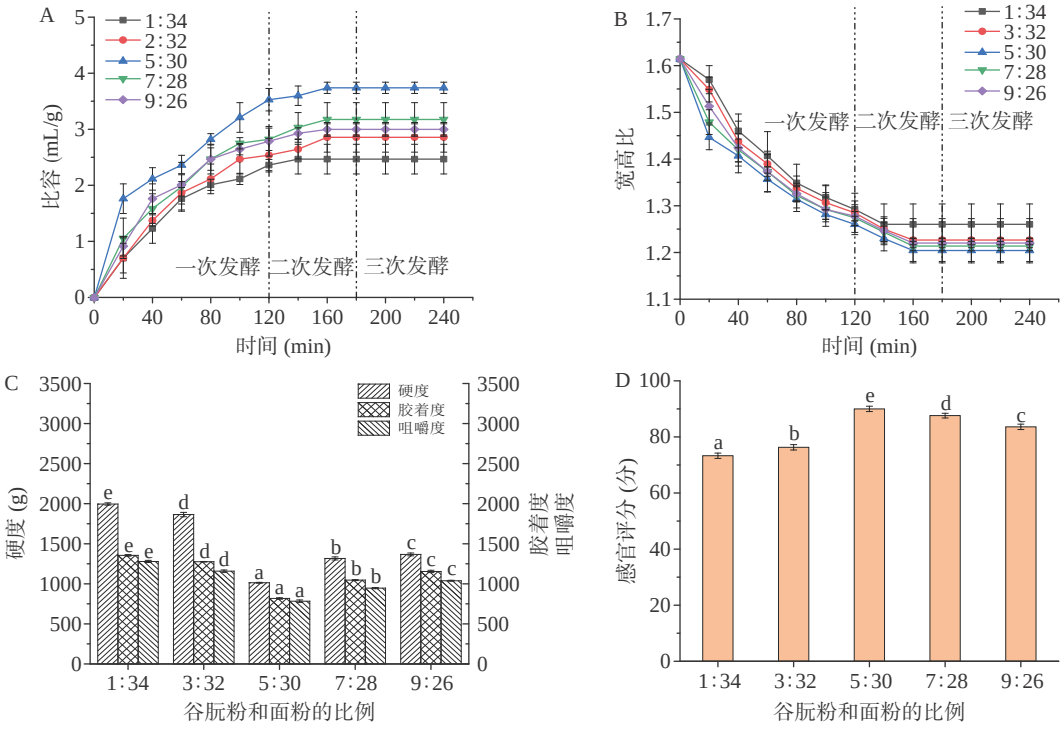


图 1　不同谷朊粉和面粉比例对马铃薯面团和蒸馍的影响

Fig.1　Effect of different gluten and flour ratios on potato dough and steamed bread

注: A: 面团的比容; B: 面团的宽高比; C: 蒸馍的质构特性; D: 蒸馍的感官评分; 不同字母表示差异显著(P<0.05); 图 2~图 3、表 3~表 5 同。

表 3　不同谷朊粉和面粉比例下马铃薯蒸馍的色度

Table 3　Color of potato steamed bread with different ratios of gluten and flour

指标	谷朊粉和面粉比例				
	1∶34	3∶32	5∶30	7∶28	9∶26
L^*	63.42±0.33^a	63.99±1.24^a	65.33±0.44^b	65.63±0.89^b	65.55±0.94^b
a^*	−0.08±0.37^a	0.26±0.15^b	0.36±0.10^{bc}	0.67±0.19^{cd}	0.84±0.12^d
b^*	20.35±0.82^a	21.96±0.54^b	22.00±0.76^b	22.70±0.79^c	24.77±0.48^d
色度	20.29±0.07^a	22.07±0.39^b	22.35±0.37^b	22.98±0.28^c	24.97±0.19^d

定为基础，综合考虑蒸馍事宜的硬度、胶着度、咀嚼度（图 1）和色度（表 3），选择谷朊粉和面粉的比例 5∶30、7∶28、9∶26 进行后续正交试验。

2.2　水和棕榈油的比例对马铃薯蒸馍的影响

随着水和棕榈油中棕榈油比例的增加，面团的比容增大（图 2A），宽高比减小（图 2B），面团的比容曲线升高和宽高比曲线降低的从 160 min 延长至 180 min；马铃薯蒸馍的硬度、胶着度和咀嚼度显著减小（图 2C，P<0.05），感官评分显著升高（图 2D，P<0.05）；水和棕榈油的比例在 7∶4 时，面团有最大的比容值 3.99 mL/g 和最小的宽高比 1.17，蒸馍的硬度、胶着度和咀嚼度有最小值为 1456.62 g、982.03、928.25，感官评分值最高为 88.70 分。这可能是因为棕榈油具有疏水作用和润滑作用，抑制水和淀粉结合，使酵母利用水和淀粉充分发酵，同时能促进面团的自由水与面筋蛋白结合，加速面筋网络的形成，使面团质地变得柔软，增大面团体积[20]。

由表 4 可以看出，随着棕榈油含量的增加，蒸馍的 L^*值、a^*值和色度数值逐渐增大，蒸馍的表面白亮度增强，并且有偏红色和黄色的趋势，这与棕榈油具有增加亮度的作用有关[21]。其中在水和棕榈油的比列达到 7.8∶3.2 时，L^*值从 64.02 增加至 66.70 显著升高（P<0.05），b^*在二者比例为 7∶4 时从 21.41 显著升高至 22.90（P<0.05），色度在 8.6∶2.4 时从 20.84

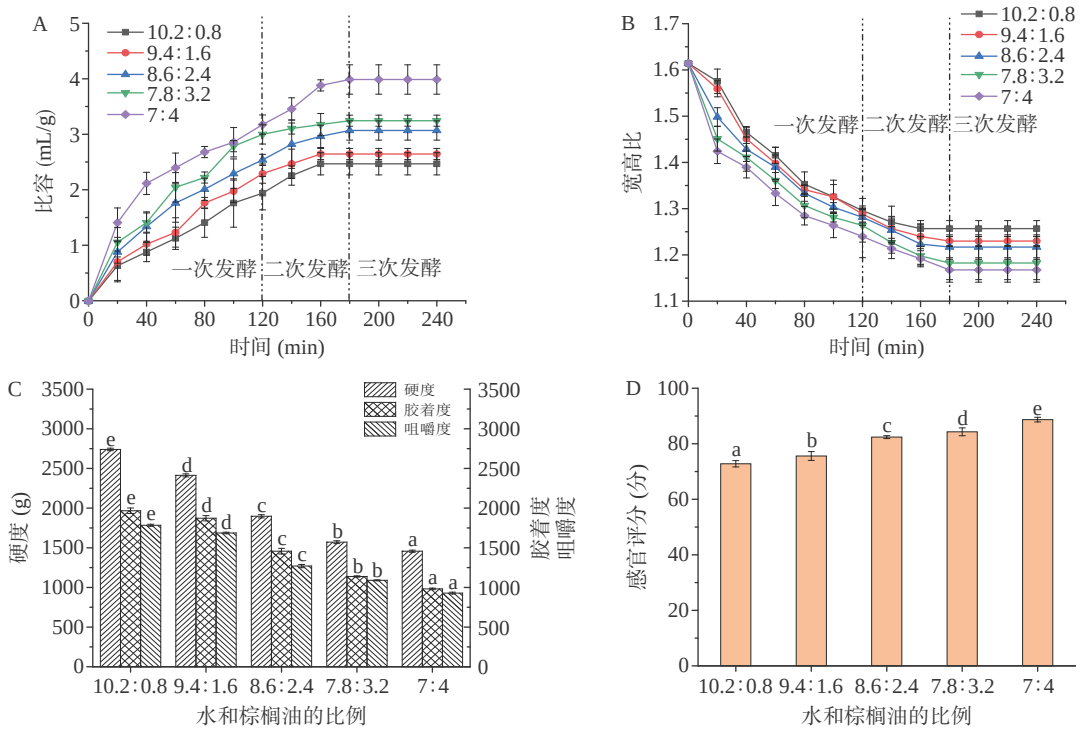


图 2　不同水和棕榈油比例的马铃薯面团和蒸馍的影响

Fig.2　Effect of different water and palm oil ratios on potato dough and steamed bread

表 4　不同水和棕榈油水平下马铃薯原薯蒸馍的色度

Table 4　Color of potato steamed bread with different water and palm oil ratios

指标	水和棕榈油的比例				
	10.2∶0.8	9.4∶1.6	8.6∶2.4	7.8∶3.2	7∶4
L^*	63.55±0.90^a	63.99±0.98^a	64.02±1.39^a	66.70±1.48^b	67.24±1.48^b
a^*	0.44±0.13^a	0.46±0.26^a	0.58±0.17^a	0.68±0.09^{ab}	0.94±0.18^b
b^*	20.65±0.41^a	21.68±1.03^a	21.16±0.70^a	21.41±0.49^a	22.90±0.32^b
色度	20.17±0.46^a	20.84±0.15^a	21.16±0.12^b	21.54±0.16^b	23.12±0.17^c

显著升高至 21.16(P<0.05)。以感官评定为基础,综合考虑蒸馍适宜的硬度、胶着度、咀嚼度(图 2)和色度(表 4),选择水和棕榈油的比例 8.6∶2.4、7.8∶3.2、7∶4 进行后续正交实验。

2.3 酵母和小苏打的比例对马铃薯蒸馍的影响

随着酵母和小苏打中酵母比例增加,面团的比容(图 3A)逐渐升高和宽高比(图 3B)逐渐降低,比容曲线升高和宽高比曲线下降时间从 140 min 延长至 200 min;蒸馍的硬度、胶着度和咀嚼度显著性降低(图 3C,P<0.05),感官评分显著性升高(图 3D,P<0.05),酵母和小苏打的比例在 3.5∶0.2 时,面团具有最大的比容为 4.23 mL/g 和最小的宽高比为 1.17,蒸馍具有最小的硬度、胶着度和咀嚼度为 1255.25 g、1033.67、952.01,最大的感官评定值为 91 分。随着小苏打含量降低,面团内部的 pH 降低,酵母菌数量增加,有利于酵母菌发酵,产生大量气体,面团比容增大,宽高比减小,蒸馍的硬度、胶着度和咀嚼度减小[22−23]。

由表 5 可以看出,随着酵母和小苏打中酵母比例增加,L^*值、a^*值、b^*和色度逐渐增大。其中 L^*在 0.7∶3 和 2.1∶1.6,以及 2.8∶0.9 和 3.5∶0.2 之间具有显著性差异(P<0.05);a^*值开始显著增加(P<0.05),当二者比例从 2.8∶0.9 到 3.5∶0.2 升高不显著;除了 2.1∶1.6 和 2.8∶0.9 之间,其他组的 b^*值存在显著性差异(P<0.05)。小苏打调节面团 pH 与酵母发酵产生协同作用使蒸馍变得更加亮白[24],蒸馍色泽由暗褐色变为光亮明艳。以感官评定为基础,综合考虑蒸馍事宜的硬度、胶着度、咀嚼度(图 3)和(表 5),蒸馍的硬度值较低相应的胶着度和咀嚼度较低,口感降低,综合考虑选择酵母和小苏打比例 2.1∶1.6、2.8∶0.9、3.5∶0.2 进行后续正交试验。

2.4 正交试验优化马铃薯蒸馍的配方

根据单素实验结果,选取面粉和谷朊粉比例、水和棕榈油比例、酵母和小苏打比例进行 $L_9(3^3)$正交实验,确定各组分的最佳添加量。正交试验结果如表 6 所示。

从表 6~表 7 可知,对马铃薯蒸馍感官评分的影响因素主次关系为:水和棕榈油比例>酵母和小苏打比例>面粉和谷朊粉比例。最优组合为 $A_1B_3C_3$,即面粉和谷朊粉比例为 5∶30,水和棕榈油比例为 7∶4,酵母和小苏打比例 3.5∶0.2,此时感官评分为 90.50 分。

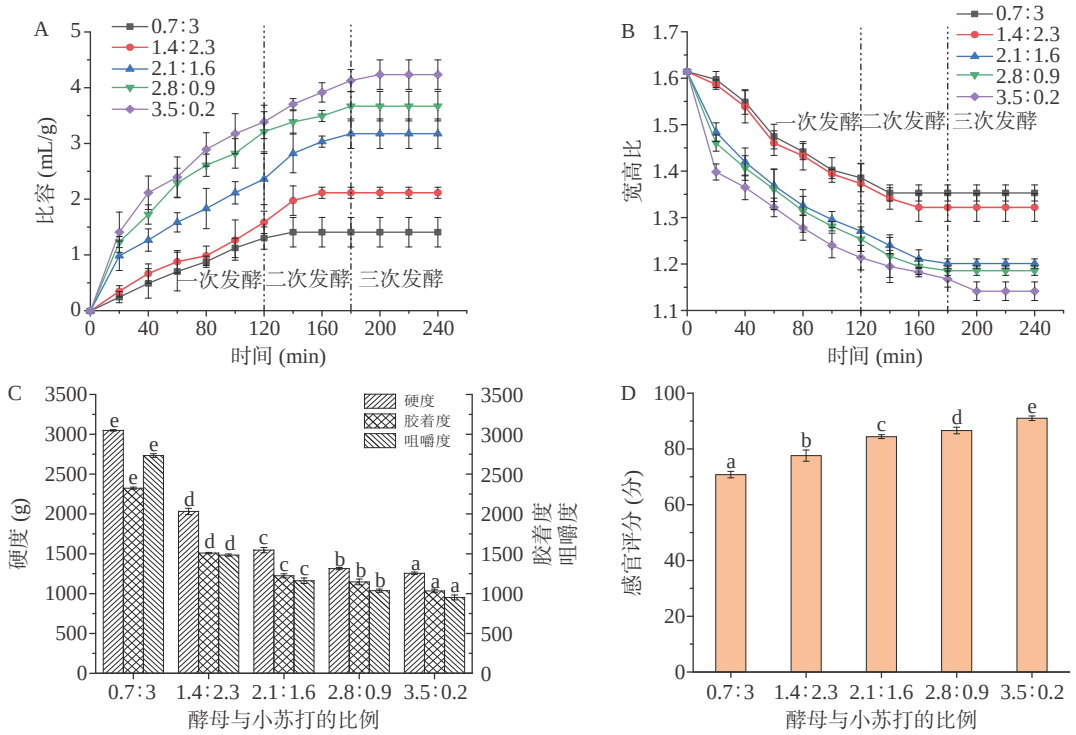


图 3 不同酵母与小苏打比例对马铃薯面团和蒸馍的影响

Fig.3 Effect of different yeast and baking soda ratios on potato dough and steamed bread

表 5 不同酵母和小苏打比例下马铃薯蒸馍的色度

Table 5 Color of potato steamed bread with different ratios of yeast and baking soda

指标	酵母与小苏打比例				
	0.7∶3	1.4∶2.3	2.1∶1.6	2.8∶0.9	3.5∶0.2
L^*	61.34±0.93^a	62.26±0.66^{ab}	63.55±0.72^b	66.18±1.56^c	70.49±1.65^d
a^*	−1.16±0.18^a	0.16±0.10^b	0.43±0.09^c	0.81±0.13^d	0.96±0.08^d
b^*	16.41±0.55^a	17.71±0.43^b	21.78±0.25^c	21.82±0.42^c	22.60±0.52^d
色度	16.40±0.61^a	17.62±0.34^b	21.32±0.67^c	21.75±0.25^c	22.91±0.34^d

表 6　正交试验结果

Table 6　Results of orthogonal experiment

实验号	A	B	C	感官评分(分)
1	1	1	1	72.00
2	1	2	2	81.50
3	1	3	3	90.50
4	2	1	2	63.50
5	2	2	3	84.00
6	2	3	1	87.00
7	3	1	3	76.50
8	3	2	1	68.00
9	3	3	2	79.00
K1	244.00	212.00	227.00	
K2	234.50	233.50	224.00	
K3	223.50	256.50	251.00	
k1	81.33	70.67	75.67	
k2	78.17	77.83	74.67	
k3	74.50	85.50	83.67	
r	6.83	14.83	9.00	

注：1~9分别代表9个实验组合；K1~K3分别代表各要素的和；k1~k3分别代表各要素的平均值；r代表极差。

表 7　正交试验结果方差分析

Table 7　Analysis of variance of orthogonal test results

	偏差平方和	自由度	均方	*F*	显著性
A	130.604	2	65.302	2.318	0.421
B	360.417	2	180.208	6.398	0.269
C	206.5	3	68.833	2.444	0.432
误差	28.167	1	28.167		
总计	55391	9			

可得马铃薯蒸馍的最佳配方为马铃薯原薯 50%、面粉 30%、谷朊粉 5%、水 7%、棕榈油 4%、酵母 3.5%、小苏打 0.2%、盐 0.3%。但是方差分析得出面粉和谷朊粉比例、水和棕榈油比例、酵母与小苏打比例对马铃薯蒸馍感官品质没有显著性影响。

3　结论

以马铃薯薯泥含量为 50%，辅以面粉、谷朊粉、棕榈油等制备的蒸馍表面光滑、色泽亮丽、质地松软、外观饱满。通过单因素实验和正交试验得到马铃薯蒸馍的最优配方为：马铃薯薯泥 50%、面粉 30%、谷朊粉 5%、水 7%、棕榈油 4%、酵母 3.5%、小苏打 0.2%、盐 0.3%，所制得的蒸馍综合加权评分最高，90.5。此时马铃薯香味浓郁，具有较高的接受度。综上，添加马铃薯泥可提高蒸馍的营养价值，降低马铃薯蒸馍的生产成本，未来还需对马铃薯蒸馍的生产工艺进行优化，减少面团发酵时间，本研究为该产品工业化推广提供参考。

参考文献

[1] 程晓惠，李琳，肖帅，等. 马铃薯主食化的问题与对策研究[J]. 粮食与油脂，2020，33(1)：12−14. [CHENG X H, LI L, XIAO S, et al. Problems and countermeasures of using potato as staple food[J]. Cereals & Oils, 2020, 33(1): 12−14.]

[2] 傅童成，唐朝臣，焦大春，等. 栽培技术对马铃薯营养和食用品质的影响[J]. 中国马铃薯，2020，34(6)：366−373. [FU T C, TANG C C, JIAO D C, et al. Cultivation technique influences on nutritional and edible qualities of potato[J]. Chinese Potato Journal, 2020, 34(6): 366−373.]

[3] 崔永伟，杜聪慧，李树君. 中国马铃薯种薯产业发展分析与展望[J]. 农业展望，2020，16(1)：71−76. [CUI Y W, DU C H, LI S J. Analysis and prospect on china's seed potato industrial development[J]. Agricultural Outlook, 2020, 16(1): 71−76.]

[4] 彭鑑君，吴刚，杨延辰，等. 马铃薯颗粒全粉与雪花全粉的生产应用[J]. 粮油食品科技，2007(4)：12−13. [PENG J J, WU G, YANG Y C, et al. Production and application of potato granule powder and snowflake powder[J]. Science and Technology of Cereals, 2007(4): 12−13.]

[5] 李燮昕，周航，刘世洪，等. 马铃薯全粉速冻披萨饼坯的工艺优化研究[J]. 粮食与油脂，2021，34(4)：114−118,128. [LI X X, ZHOU H, LIU S H, et al. Study on technology optimization of potato full flour frozen pizza[J]. Cereals & Oils, 2021, 34(4): 114−118,128.]

[6] 马梦梅，木泰华，孙红男. 营养健康型薯类食品加工与副产物高值化利用研发进展[J]. 食品安全质量检测学报，2020，11(24)：9154−9163. [MA M M, MU T H, SUN H N. Research progress of nutritional and healthy potato food processing and high-value utilization of by-products[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2020, 11(24): 9154−9163.]

[7] 戴媛，冷进松，傅婷婷. 豌豆蛋白面包的制作工艺优化及其品质[J]. 食品工业科技，2020，41(11)：194−199. [DAI Y, LENG J S, FU T T. Optimization of preparation process of pea protein bread and its quality characteristics[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(11): 194−199.]

[8] 吴海霞，田志芳. 马铃薯全粉馒头制作配方优化及其质构特性主成分分析[J]. 食品研究与开发，2020，41(13)：88−92. [WU H X, TIAN Z F. Optimization of potato steamed bread formula and principal component analysis of texture profiles[J]. Food Research and Development, 2020, 41(13): 88−92.]

[9] 张云焕，李书国. 马铃薯全粉对比萨饼底加工工艺及品质的影响[J]. 食品科学，2017，38(22)：239−245. [ZHANG Y H, LI S G. Effect of potato flour on processing and quality of pizza base[J]. Food Science, 2017, 38(22): 239−245.]

[10] 张艺萱，刘伟，张良，等. 酶解马铃薯泥对馕质构和风味的影响[J/OL]. 中国粮油学报：1−12[2021-09-01]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2864.TS.20210604.1426.013.html. [ZHANG Y X, LIU W, ZHANG L, et al. Effects of enzymatic modified mashed potatoes on the texture and flavor of nang[J/OL]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association: 1−12[2021-09-01]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2864.TS.20210604.1426.013.html.]

[11] 曹燕飞，张凤婕，张天宇，等. 响应面法优化马铃薯生浆馒头的发酵工艺[J]. 食品研究与开发，2019，40(8)：32−39. [CAO Y F, ZHANG F J, ZHANG T Y, et al. Optimization of fermentation process for potato pulp steamed bread by response surface methodology[J]. Food Research and Development, 2019, 40(8): 32−39.]

[12] 姜鹏飞，陈玲，高婧妍，等. 不同改良剂对马铃薯发酵面团特性的影响[J]. 现代食品科技，2020，36(12)：161−167. [JIANG P F, CHEN L, GAO J Y, et al. Effects of different modifiers on the characteristics of potato fermented dough[J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(12): 161−167.]

[13] HSU C T, CHANG Y H, SHIAU S Y. Color, antioxidation and texture of dough and Chinese steamed bread enriched with pitaya peel powder[J]. Cereal Chemistry, 2018, 96(1): 75−76.
[14] YANG Z, XU F, ZHANG Z, et al. Genetic determination of sex and shell color in the Pacific abalone *Haliotis discus hannai* revealed by an integrated linkage map[J]. Animal Genetics, 2019, 50(6): 733−739.
[15] 黑龙江农产品安全研究所. 小麦品种品质分类. GB/T. 17320-2013[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013. [Heilongjiang Institute of Agricultural Product Safety. Quality classification of wheat varieties. GB/T. 17320-2013[S]. Beijing: Standards Press of China, 2013.]
[16] KATHARINAA S, PETERK. Optimization of micro-scale extension tests for wheat dough and wet gluten[J]. Journal of Cereal Science, 2018, 79: 477−485.
[17] 孙涟漪. 谷朊粉基面粉改良剂的制备研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2014. [SUN L Y. Study on the preparation of gluten-based flour improver starter cultures[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2014.]
[18] 徐小娟. 营养面包的开发及其品质提升的研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2019. [XU X J. Study on the development and quality improvement of nutritional bread[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2019.]
[19] 周杰, 孙科祥. 甘薯渣粉对馒头品质的影响及品质改良方法[J]. 粮食与油脂, 2021, 34(9): 73−77. [ZHOU J, SUN K J. Effect of sweet potato residue powder on the quality of steamed bread and its improvement method[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 34(9): 73−77.]
[20] ISAAK C, SAPIRSTEIN H, WU Y, et al. Effects of water absorption and salt on discrimination of wheat gluten strength assessed by dough mixing and protein composition[J]. Journal of Cereal Science, 2019, 89: 102752.
[21] JIANG H, XU W, DING Y, et al. Quantitative analysis of yeast fermentation process using Raman spectroscopy: Comparison of CARS and VCPA for variable selection[J]. Spectrochimica Acta Part A:Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2020, 228: 117781.
[22] 滕超, 曲玲玉, 师雨梦, 等. 传统面食发酵剂中酵母菌的筛选及性能研究[J]. 中国食品学报, 2017, 17(11): 74−81. [TENG C, QU L Y, SHI Y M, et al. Studies on fermentation characteristics of the yeasts screened from traditional starter cultures[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2017, 17(11): 74−81.]
[23] CHANGX H, HUANGX Y, TIANX Y, et al. Dynamic characteristics of dough during the fermentation process of Chinese steamed bread[J]. Food Chemistry, 2020: 312.
[24] CHENG J, HUR J, LIY H. Potassium bicarbonate improves dough and cookie characteristics through influencing physicochemical and conformation properties of wheat gluten[J]. Food Chemistry: X, 2020, 5: 100075.

景永帅, 袁鑫茹, 代立霞, 等. 纤维素酶协同超声波辅助提取北沙参多糖工艺优化及其理化性质和免疫调节活性研究 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 185−193. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100033
JING Yongshuai, YUAN Xinru, DAI Lixia, et al. Optimization of Cellulase Synergistic Ultrasonic-Assisted Extraction of Polysaccharide from Glehniae Radix and Its Physicochemical Properties and Immunomodulatory Activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 185−193. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100033

· 工艺技术 ·

纤维素酶协同超声波辅助提取北沙参多糖工艺优化及其理化性质和免疫调节活性研究

景永帅[1], 袁鑫茹[1], 代立霞[2], 张瑞娟[1], 张　浩[1], 郑玉光[3,*], 吴兰芳[3,*]
（1.河北科技大学化学与制药工程学院, 河北石家庄 050018;
2.石家庄市中医院肛肠科, 河北石家庄 050051;
3.河北中医学院药学院, 河北石家庄 050200）

摘　要: 目的：响应面法优化纤维素酶协同超声波辅助提取北沙参多糖（Glehniae Radix polysaccharides，GLP）的工艺条件，并对其理化性质和免疫调节活性进行研究。方法：选择酶解时间、料液比、超声时间、超声温度、纤维素酶添加量为影响因素，以 GLP 的得率为评价指标，进行单因素考察。在此基础上，利用 Box-Behnken 响应面法进行提取工艺的优化。采用扫描电子显微镜（Scanning Electron Microscope，SEM）、热重分析-差示扫描量热仪（Thermogravimetric Analysis-Differential Scanning Calorimetry，TGA-DSC）、傅里叶变换红外光谱（Fourier Transform Infrared Spectroscopy，FT-IR）以及高效液相色谱（High Performance Liquid Chromatography，HPLC）对 GLP 的理化性质进行分析，通过体外试验评估其对 RAW 264.7 巨噬细胞的免疫调节作用。结果：GLP 的最优提取工艺：酶解时间 112 min、料液比 1∶30 g·mL^{-1}、超声时间 41 min、超声温度 65 ℃、酶添加量 2%。在此条件下，GLP 的得率为 39.58%±0.90%。此外，GLP 主要由葡萄糖组成，热稳定性良好。体外免疫调节活性结果表明，在 0.5~250 μg·mL^{-1} 浓度范围内，GLP 均能显著（P<0.05）促进 RAW 264.7 巨噬细胞的增殖，且在 0.5~10 μg·mL^{-1} 浓度范围内，显著（P<0.05）抑制 LPS 诱导的巨噬细胞过度活化。结论：该工艺稳定、可行，北沙参多糖 GLP 得率相对较高，且具有一定的免疫调节活性。

关键词: 北沙参, 多糖, 响应面法, 纤维素酶, 理化性质, 免疫调节
中图分类号: TQ281　　**文献标识码:** B　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0185−09
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100033
本文网刊:

Optimization of Cellulase Synergistic Ultrasonic-Assisted Extraction of Polysaccharide from Glehniae Radix and Its Physicochemical Properties and Immunomodulatory Activity

JING Yongshuai[1], YUAN Xinru[1], DAI Lixia[2], ZHANG Ruijuan[1], ZHANG Hao[1], ZHENG Yuguang[3,*], WU Lanfang[3,*]
（1.College of Chemistry and Pharmaceutical Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China;
2.Anorectal Department, Shijiazhuang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050051, China;
3.College of Pharmacology, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China）

Abstract: Objective: In this study, the response surface method (RSM) was used to optimize the extraction conditions of

收稿日期: 2021−10−12
基金项目: 河北省省级科技计划资助（H2021423057）; 河北省中医药管理局中医药科研计划项目（2020331）; 中央财政公共卫生专项“中药资源普查项目”（Z135080000022）。
作者简介: 景永帅（1985−）, 男, 博士, 副教授, 研究方向: 药食两用资源开发与利用, E-mail: cjys1985@126.com。
*** 通信作者:** 郑玉光（1973−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 中药学, E-mail: zyg314@163.com。
吴兰芳（1985）, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品科学, E-mail: wulanfang757@163.com。

Glehniae Radix polysaccharides (GLP) by cellulase and ultrasonic-assisted, and its physicochemical properties and immunomodulatory activity were studied. Methods: The factors of enzymolysis time, material to liquid ratio, ultrasonic time, ultrasonic temperature and cellulase additions were selected as influencing factors, the yield of GLP was the evaluation index, and single factor experiments was conducted. Based on single factor results, the optimal extraction process of GLP was obtained by RSM. The physicochemical properties were analyzed by scanning electron microscope (SEM), thermogravimetric analysis-differential scanning calorimetry (TGA-DSC), fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), and high performance liquid chromatography (HPLC), and the immunomodulatory activity of RAW 264.7 macrophage was evaluated by *in vitro* test. Results: The optimal conditions were as follows: Enzymolysis time was 112 min, material to liquid ratio was 1∶30 g·mL^{-1}, ultrasonic time was 41 min, ultrasonic temperature was 65 ℃, and cellulase additions was 2%. Under these conditions, the yield of GLP was 39.58%±0.90%. Besides, GLP was mainly composed of glucose, well thermal stability. The results of *in vitro* immunomodulatory activity showed that GLP could significantly (P<0.05) promote the proliferation of RAW 264.7 macrophages in the concentration range of 0.5 to 250 μg·mL^{-1}, and significantly (P<0.05) inhibit LPS induced overactivation of macrophages in the concentration range of 0.5 to 10 μg·mL^{-1}. Conclusions: This process was stable and feasible, which not only had a relatively high GLP yield, but also had certain immunoregulatory activity.

Key words: Glehniae Radix; polysaccharides; response surface method; cellulase; physicochemical properties; immunomodulation

北沙参(Glehniae Radix)是珊瑚菜(*Glehnia littoralis* Fr. Schmidt ex Miq.)的根,为药食两用资源,其甘、微苦,微寒,归肺、胃经。具有养阴清肺,益胃生津等功效[1]。研究表明北沙参中含有多糖类、磷脂、香豆素类等多种有效成分[2],其中含量最多的是多糖类,也是其主要有效成分之一,具有抗氧化、降血糖和免疫调节等作用[3−4]。

在多糖的研究过程中,多糖的提取是研究的第一步,也是研究过程中的关键环节。目前,多糖的提取方法主要有热水提取法、超声波辅助提取法、微波辅助提取法、酶辅助提取法及联合辅助提取法等,每法各有优劣,如热水提取法在多糖的提取中最为常用,其工艺简单、操作安全、成本较低,但得率不高,且耗时长[5]。微波和超声波提取法具有效率高、时间短、溶剂用量少等优点,但微波和超声波可能会引起多糖的降解,改变多糖分子结构[6]。酶法提取是一种高效、环保的方法,已被证明可提高多糖得率,同时还具有投资成本低、能耗低的优点,但是可能会对多糖各组分之间的比例造成影响[7−8]。多种技术的联合使用,可以充分发挥各自的优势,弥补各法存在的缺点,提高多糖的得率,保证多糖质量稳定。因此,本试验选用纤维素酶协同超声波辅助提取法提取 GLP,综合单因素考察结果,利用 Box-Behnken 响应面法确定多糖的最佳提取工艺;并进一步探究其理化性质和免疫调节活性,以期为 GLP 的后续研究提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

北沙参(批号 2019061501) 康美药业股份有限公司;纤维素酶 酶活力 1×10^5 U·g^{-1},宁夏夏盛实业集团有限公司;各单糖标准品 色谱纯,阿拉丁试剂(上海)有限公司;无水乙醇 分析纯,天津大茂化学试剂厂。

101-2AB 型电热鼓风干燥箱 泰斯特仪器有限公司;TGL-15B 型高速离心机 安亭科学仪器厂;HH-2 型恒温水浴锅 金坛宏华仪器厂;KS-300DE 型超声波清洗器 昆山洁力美超声仪器有限公司;EYELAN-1100 型旋转蒸发仪 东京理化株式会社;UV-2550 型紫外-可见分光光度计 岛津仪器有限公司;1220 型高效液相色谱仪 安捷伦科技有限公司;JSM-7610F 型场发射扫描电镜 日本电子。

1.2 实验方法

1.2.1 北沙参粗多糖提取工艺流程 取北沙参药材,粉碎,过 40 目筛,3 倍体积的 95% 乙醇回流提取 2 次,除脂,过滤得到的药渣烘干备用。

称取 4.6 g 除脂后的干燥药渣,加入样品重量 2% 的纤维素酶,加入 30 倍体积的蒸馏水,60 ℃ 提取,提取完成后,将温度调至 95 ℃,并维持 10 min 使纤维素酶灭活,冷却,再置于数控超声波中 50 ℃,210 W 超声提取 20 min。重复上述步骤,合并 2 次提取液,离心(9000 r/min、5 min),收集上清液,过滤,减压浓缩至原体积的 1/4,加入 4 倍体积的无水乙醇醇沉,冰箱 4 ℃ 静置过夜,抽滤,收集沉淀,真空干燥后即得 GLP。

1.2.2 热水提取法制备北沙参粗多糖 称取 4.6 g 除脂后的干燥药渣,加入 30 倍体积的蒸馏水,于 100 ℃ 水浴锅中回流提取 2 h,提取 2 次,合并 2 次提取液,其他步骤同 1.2.1,得热水提取 GLP。

1.2.3 单因素实验 称取 4.6 g 除脂后的干燥药渣,蒸馏水作为溶剂,预设料液比 1∶30 g·mL^{-1}、纤维素酶添加量 2%、酶解温度 60 ℃、超声时间 20 min、超声温度 50 ℃、超声波功率 210 W 为工艺流程中的常规量,以酶解时间(0.5、1、1.5、2.0、2.5、3.0 h)、料液比(1∶20、1∶30、1∶40、1∶50 g·mL^{-1})、超声时间(20、30、40、50、60 min)、超声温度(40、50、60、

70、80 ℃）、纤维素酶添加量（1.0%、1.5%、2.0%、2.5%）5 个单因素变量替换工艺流程中相应的常规量，考察各因素对北沙参粗多糖得率的影响。

1.2.4　Box-Behnken 法优化提取工艺　依据单因素实验结果，进一步采用 Box-Behnken 法设计试验，以超声温度（A）、超声时间（B）、酶解时间（C）三个因素为变量，以 GLP 的得率为响应值，寻找最佳提取工艺，Box-Behnken 试验因素水平见表 1。

表 1　试验因素水平设计

Table 1　Factor levels of experimental design

因素	水平		
	−1	0	1
A超声温度（℃）	55	60	65
B超声时间（min）	35	40	45
C酶解时间（h）	1.5	2.0	2.5

1.2.5　多糖得率的测定　按式（1）计算北沙参粗多糖的得率。

$$E(\%) = \frac{m_1}{m_2} \times 100 \qquad 式（1）$$

式中：E 为多糖得率，%；m_1 为粗多糖质量，g；m_2 为北沙参粉末质量，g。

1.2.6　北沙参多糖的理化性质分析

1.2.6.1　微观形态观察　将 GLP 溶液超声分散后，滴于样品台上，经喷金处理后，采用 SEM 进行分析，加速电压 3.0 kV，分辨率 7.2 mm，分别放大不同的倍数进行观察[3]。

1.2.6.2　热稳定性分析　称取 GLP 2.0 mg，利用 TGA-DSC 进行热重分析，由室温升至 800 ℃，升温速率为 10 ℃/min[9]。

1.2.6.3　官能团分析　利用 FT-IR，在 4000~500 cm^{-1} 范围内进行扫描[10]。

1.2.6.4　单糖组成测定　根据文献 [11]，Eclipse XDB-C_{18} 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；检测波长 245 nm；柱温 30 ℃；上样量 20 μL；流速 1 mL/min；流动相为磷酸盐缓冲液（0.1 mol/L，pH6.85）-乙腈（83∶17，v/v）；洗脱方式为等度洗脱。

1.2.7　免疫调节活性

1.2.7.1　RAW 264.7 巨噬细胞的细胞培养　RAW 264.7 小鼠巨噬细胞购自中国科学院上海细胞库，基于 37 ℃ 和 5% CO_2 条件下培养（完全培养基：基本培养基：FBS：双抗=100∶10∶1），24 h 后，更换新鲜培养液并继续培养。当细胞长至培养瓶底面积的 80%~90%，且细胞形态良好时，传代培养。

1.2.7.2　细胞种板　调整细胞浓度 2×10^5 个/mL 后接种于 96 孔板中，每孔 100 μL 置于细胞培养箱中培养。

1.2.7.3　GLP 对 RAW 264.7 巨噬细胞的影响　通过 MTT 法[12] 进行测定：待孵育 24 h，细胞完全贴壁后，按 GLP 浓度 0、0.5、1、10、50、100、250 μg·mL^{-1} 给予 GLP 孵育 24 h，每组 5 个复孔；孵育 24 h 后，每孔加入 5 mg·mL^{-1} 的 MTT 储备液 10 μL，继续孵育 4 h；孵育结束后，用注射器小心吸弃上清，再加入 150 μL 二甲基亚砜，于震板仪上充分溶解甲臜结晶 10 min 后，在波长为 490 nm 处测吸光度，对数据进行处理，并用 SPSS 进行统计学分析。

1.2.7.4　GLP 对 LPS 诱导的 RAW 264.7 巨噬细胞的影响　分别加入浓度为 0、0.5、1、10、50、100、250 μg·mL^{-1} 的 GLP 继续孵育 24 h，用终浓度为 1 μg·mL^{-1} 的 LPS 刺激后[13]，按上述方法检测。

1.3　数据处理

单因素实验数据均为 3 次重复试验的平均值，细胞试验均为 5 次重复试验的平均值，并用平均值±标准差表示，采用 Excel 对试验数据进行整理，响应面试验设计及相关分析由 Design Expert 8.0 软件完成，采用 SPSS 16.0 软件进行显著性分析，用 Origin 8 进行绘图。

2　结果与分析

2.1　单因素实验

2.1.1　酶解时间对北沙参粗多糖得率的影响　由图 1 可知，在 0.5~1.0 h 范围内，随着酶解时间的增加，多糖的得率显著增加（$P<0.05$），在 1.0~1.5 h 范围内，多糖的得率无显著性差异（$P>0.05$），在 1.5~2.0 h 范围内，多糖的得率又呈现出显著性差异（$P<0.05$），再延长酶解时间时，得率反而下降。由于在一定时间内，随着纤维素酶酶解时间的增加，可能导致部分含有 β-1,4 葡萄糖糖苷键的多糖降解，从而使得率降低[14]。所以将最优酶解时间定为 2.0 h。

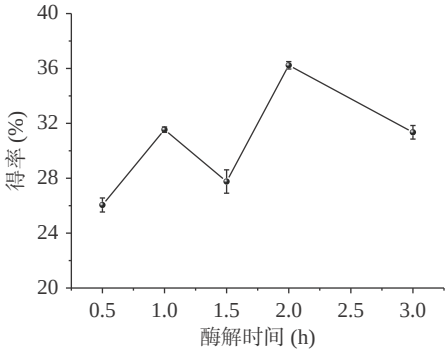


图 1　酶解时间对得率的影响

Fig.1　Effect of enzymolysis time on the yield

2.1.2　料液比对北沙参粗多糖得率的影响　从图 2 可以看出，多糖得率随着料液比先增加后降低，而当料液比为 1∶30 g·mL^{-1} 时，多糖的得率达到最大，这是因为增大溶剂量，会增大北沙参颗粒与溶剂接触面积，使多糖充分溶解，而当料液比由 1∶30 g·mL^{-1} 增加到 1∶40 g·mL^{-1} 时，多糖的得率显著下降（$P<0.05$），由于其他成分溶出的影响，以及溶液中的多糖被北沙参残渣吸附，多糖的得率有所降低[15]。所以将最优料

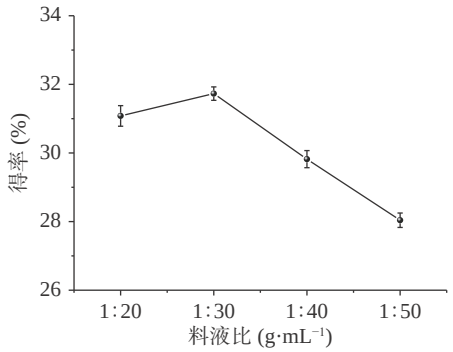


图 2 料液比对得率的影响

Fig.2 Effect of material-to-liquid ratio on the yield

液比定为 1∶30 g·mL^{-1}。

2.1.3 超声时间对北沙参粗多糖得率的影响 由图 3 可知，在 20~40 min 内，随着超声时间的增加，多糖的得率显著提高(P<0.05)，再继续增加超声时间，得率反而下降。可能由于超声时间过长，多糖发生降解，分子量变小，醇沉时得到的多糖沉淀变少，导致得率降低[16]。而在 60 min 时多糖的得率增加，可能是因为超声时间越长，少部分剩余北沙参残渣的细胞壁破碎，使得细胞内多糖类物质溶解在溶剂中，因此得率有所升高。综合分析，为了降低耗能，节约资源，方便操作，选取得率最高时的时间 40 min 为最佳超声时间。

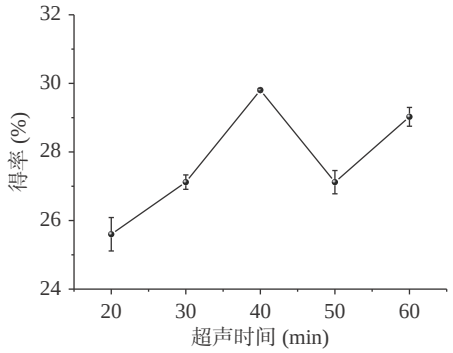


图 3 超声时间对得率的影响

Fig.3 Effect of ultrasonic time on the yield

2.1.4 超声温度对北沙参粗多糖得率的影响 由图 4 可以看出，在 40~60 ℃ 时，多糖得率基本随着温度的升高呈上升趋势，超过 60 ℃ 时，得率显著降低(P<0.05)，由于超声波提取过程中温度过高，会导致多糖在超声波的作用下发生降解，糖苷键断裂，分子量降低，得率会显著降低[17]，所以将超声温度选定为 60 ℃。

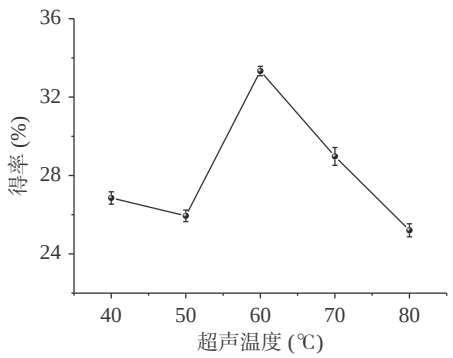


图 4 超声温度对得率的影响

Fig.4 Effect of ultrasonic temperature on the yield

2.1.5 纤维素酶添加量对北沙参粗多糖得率的影响

由图 5 可以看出，在 1.0%~2.0% 范围内，酶量越大，得率越高，而当酶量为 2% 时，得率达到最大值。超过 2.0% 后，得率显著下降(P<0.05)。因为纤维素酶能够有效破坏植物细胞壁，利于多糖的释放。而当酶量继续增加时，有限的底物浓度抑制酶解过程或者过量的酶包吸附在北沙参颗粒表面，阻止多糖进一步溶出[18]，从而使多糖的得率下降。所以将最优纤维素酶添加量定为 2.0%。

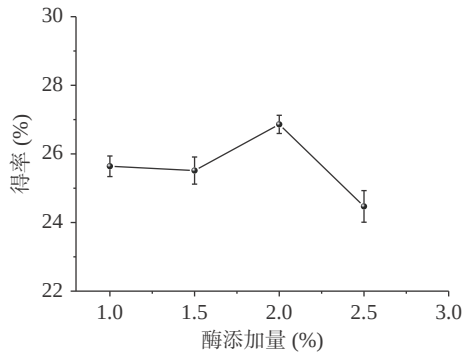


图 5 酶量对得率的影响

Fig.5 Effect of enzyme addition on the yield

2.2 Box-Behnken 法优化试验结果

2.2.1 响应面试验结果 由以上几组单因素实验结果可知，酶解时间、超声温度和超声时间对工艺的影响较大，而酶量和料液比则可固定为 2% 和 1∶30 g·mL^{-1}。根据三因素三水平的原则，将超声温度定为 55、60、65 ℃；超声时间定为 35、40、45 min；酶解时间定为 1.5、2.0、2.5 h，设计 17 组试验(表 2)。

表 2 多糖得率的 Box-Behnken 试验设计与结果

Table 2 Box-Behnken experimental design and results of the yield of polysaccharide

实验号	A(℃)	B(min)	C(h)	多糖得率(%)
1	60	35	1.5	26.87±1.14
2	60	35	2.5	30.52±1.21
3	60	40	2.0	39.47±0.98
4	60	45	1.5	31.97±0.89
5	55	40	1.5	29.47±0.92
6	60	40	2.0	39.47±0.96
7	60	45	2.5	24.14±1.13
8	55	40	2.5	33.95±1.08
9	60	40	2.0	39.47±0.97
10	65	40	2.5	32.14±1.14
11	65	45	2.0	36.40±0.87
12	65	35	2.0	34.85±0.91
13	55	45	2.0	36.18±0.85
14	60	40	2.0	39.47±1.11
15	60	40	2.0	39.47±1.32
16	65	40	1.5	37.63±1.15
17	55	35	2.0	37.42±0.96

采用 Box-Behnken Design（BBD）试验设计方法，通过多元二次方程来拟合因素和响应值之间的函数关系，对回归方程进行分析寻求最优工艺参数[18]。拟合回归方程为：

$$Y=39.47+0.50A-0.12B-0.65C+0.70AB-2.49AC-2.87BC+0.83A^2-4.09B^2-7.00C^2$$

对该方程的方差分析结果见表 3。

表 3　响应面方差分析

Table 3　ANOVA for response surface quadratic model

类型	平方和	自由度	均方	*F*值	*P*值	显著性
模型	355.97	9	39.55	25.09	0.0002	***
A	2.00	1	2.00	1.27	0.2971	
B	0.12	1	0.12	0.075	0.7926	
C	3.37	1	3.37	2.14	0.1873	
AB	1.95	1	1.95	1.23	0.3032	
AC	24.85	1	24.85	15.77	0.0054	**
BC	32.95	1	32.95	20.90	0.0026	**
A^2	2.92	1	2.92	1.85	0.2158	
B^2	70.43	1	70.43	44.69	0.0003	***
C^2	206.61	1	206.61	131.08	<0.0001	***
残差	11.03	7	1.58			
失拟误差	11.03	3	3.68			不显著
纯误差	0.000	4	0.000			
总和	367.01	16				

注：**表示极显著（*P*<0.01）；***表示高度显著（*P*<0.001）。

由表 3 可知，此模型的 *P*=0.0002，说明本试验模型是具有显著性的。失拟误差 *P* 为 3.68，不显著，则说明该模型对试验的拟合情况较好。拟合系数 R^2 值为 0.9699，可以认为模型解释了 96.99% 响应值的变化。由此说明，可以用此模型对纤维素酶协同超声波辅助提取 GLP 的工艺进行分析和预测[19]。显著性结果表明，交互项 AC、BC 及二次项 B^2、C^2 的 *P* 值均小于 0.01，对响应值影响极为显著。根据表 3 得出，对 GLP 得率的影响大小为 C>A>B。

2.2.2　等高线图和响应曲面分析　等高线图中心椭圆越接近圆形，表明因素的交互作用越不明显；曲面图越陡峭，说明交互作用越显著[20]。由图 6 可知，当超声温度一定时，随着超声时间的增长，多糖的得率先上升后下降。当超声时间一定时，随着超声温度的升高，多糖的得率呈现缓慢上升的趋势。由图 7 可知，当酶解时间一定时，多糖的得率随着超声温度的升高而缓慢提高。当超声温度一定时，在一定范围内，酶解时间越长，多糖的得率越高，超出这个范围，多糖的得率则呈下降的趋势。由图 8 可知，当酶解时间一定时，多糖的得率随着超声时间的增加呈现先升高后缓慢下降的趋势。相反，当超声时间一定时，多糖的得率随着酶解时间的增加呈缓慢上升趋势。由以上可以看出，酶解时间和超声时间的交互作用对得率影响的响应面图等高线图为椭圆形，曲面图陡峭，结合表 3 中的方差分析显示，酶解时间和超声时间的交互作用对得率的影响较为显著。

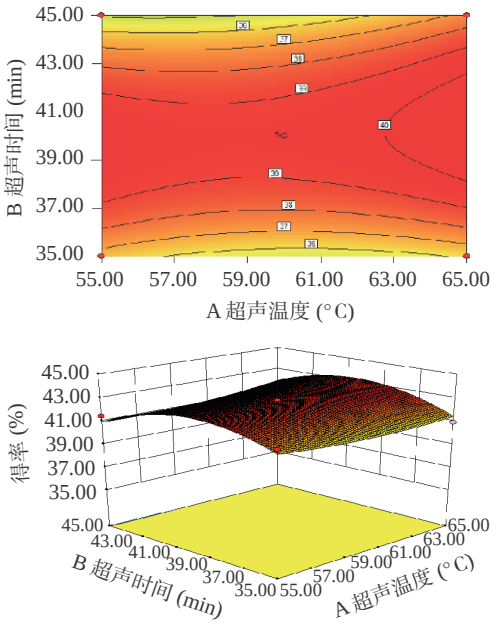


图 6　超声温度与超声时间交互作用对得率的影响

Fig.6　Effect of ultrasonic time and ultrasonic temperature on yield

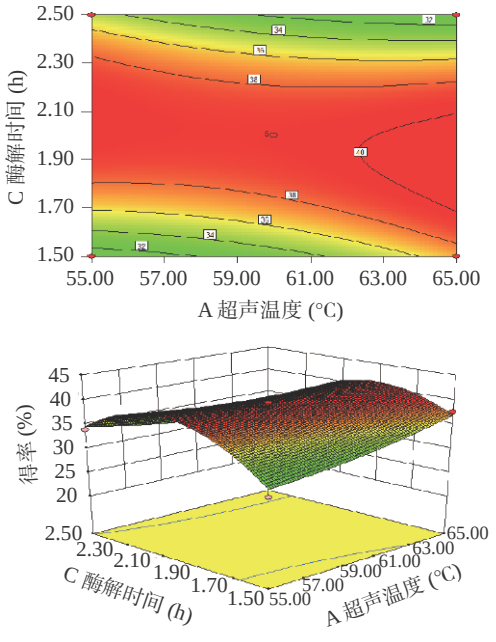


图 7　超声温度与酶解时间交互作用对得率的影响

Fig.7　Effect of ultrasonic temperature and enzymolysis time on yield

2.2.3　优化模型后的验证　采用 Design-Expert 8.0 软件，最优工艺为：超声温度 65 ℃，超声时间 40.80 min，酶解时间 1.87 h，此时预测的 GLP 得率为 41.25%。为了说明优化结果的真实性，需要对其进行验证。考虑实际操作，将超声时间定为 41 min，酶解时间定为 112 min。在纤维素酶添加量 2%、料液比 1∶30 g·mL^{-1}、超声功率 210 W、超声温度 65 ℃、超声时间 41 min 和酶解时间 112 min 的条件下进行三组平行试验，最终得到的多糖得率为 39.58%±0.90%。较预测值 41.25% 误差为 1.62%<2%，说明该模型能够很好地预测 GLP 的提取工艺。课题组前期研究表明，超声

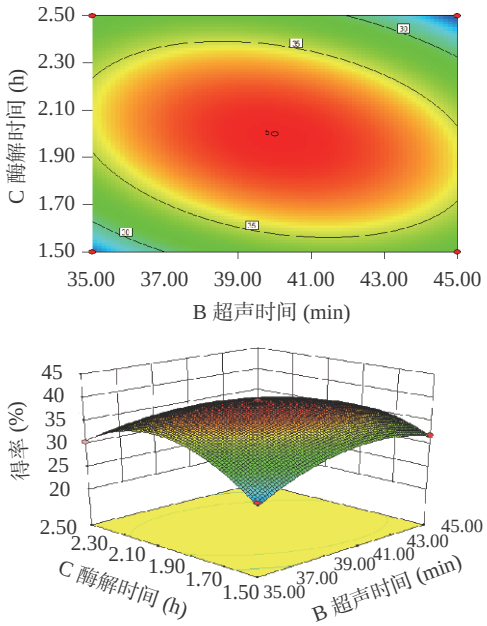


图 8　超声时间与酶解时间交互作用对得率的影响

Fig.8　Effect of ultrasonic time and enzymolysis time on yield

波提取的多糖得率为 12.13%[21]，热水回流提取的多糖得率为 23.93%[22]，而纤维素酶协同超声波辅助得率为 39.58%±0.90%，多糖得率明显提高。采用苯酚-硫酸法测定[6] 可溶性总糖含量，得到的标准曲线为 b=9.1a+0.0824（R^2=0.998），经计算样品中总糖含量为 90.40%。因此，新的提取技术在多糖提取中具有良好的应用前景。

2.3　理化性质分析

2.3.1　北沙参多糖的微观形态　由图 9 可以看出，GLP 表面孔洞较少，表面不平整。而之前的研究表明，采用传统的热水提取法得到的北沙参粗多糖，外观光滑平整。相反，超声波辅助提取得到的多糖表面粗糙，孔洞较多。纤维素酶提取的多糖呈块状[23]，这些结果与本研究不同。可能是由于和纤维素酶协同超声波的作用，多糖的平面和链状结构被降解聚集成小分子碎片堆积起来，使其生物活性显著增强[24]。

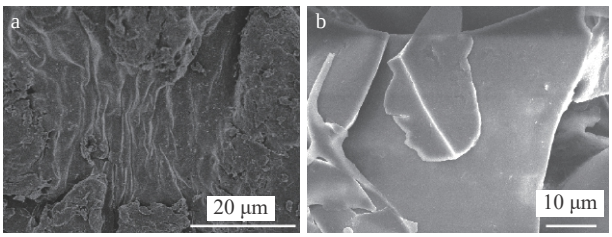


图 9　GLP 扫描电子显微镜图

Fig.9　Scanning electron microscope of GLP

注：a：纤维素酶辅助超声提取法得到的多糖；b：热水提取法得到的粗多糖。

2.3.2　热稳定性分析　由图 10 可以看出多糖的吸热和放热的情况。根据热重分析曲线，可以了解 GLP 的热裂解温度和失重率[25]。从热重曲线可知，GLP 分为三个阶段。第一阶段为 10~150 ℃，失重率为 6.98%，这个阶段是主要是自由水的流失；第二阶段为 150~500 ℃，失重率为 63.18%，说明 GLP 受热分解，化学键被破坏；第三阶段为 500~800 ℃，失重率为 2.43%，失去的主要是总灰分中的有机物质[26]。由此可见，GLP 的热降解温度约为 300 ℃，总失重率约为 73%，因此 GLP 具有良好的热稳定性。

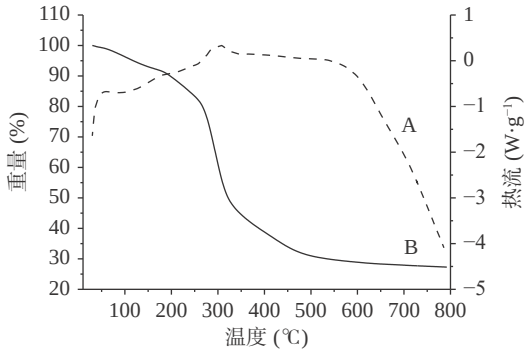


图 10　GLP 差示扫描量热曲线图

Fig.10　Thermogravimetric analysis-differential scanning calorimetry curves of GLP

注：A：热流曲线；B：重量曲线。

2.3.3　红外光谱分析　由图 11 可以看出，样品具有多糖的特征吸收峰，在 3400 cm^{-1} 处出现的强宽峰是 O-H 伸缩振动引起的；2930 cm^{-1} 处的吸收峰是 C-H 的伸缩振动；1637 cm^{-1} 附近可能是 O-H 引起的弯曲振动吸收峰、C-O 吸收峰或 COO-不对称伸缩振动吸收峰；1021 cm^{-1} 处特征吸收峰为醚键的弯曲振动；849 cm^{-1} 为 α-葡萄糖苷键的吸收峰[27]。

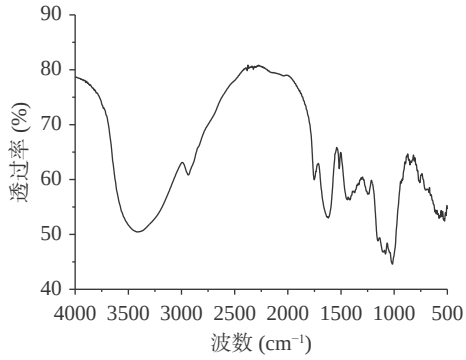


图 11　GLP 红外光谱图

Fig.11　Fourier transform infrared spectroscopy of GLP

2.3.4　单糖组成　由图 12 可知，与标准品对比，GLP 主要由葡萄糖组成。于钦辉等[4] 通过 DEAE-52 纤维素柱对北沙参粗多糖进行分离纯化，得到的 D1 组分只含有葡萄糖，与本研究结果一致。

2.4　免疫活性调节

由图 13a 可知，不同浓度多糖均能促进 RAW 264.7 巨噬细胞的增殖，显著高于空白对照组（P<0.05），且浓度为 10、50 μg·mL^{-1} 时，对巨噬细胞的增殖效果最好。另外，可以看出北沙参多糖在试验范围内（0.5~250 μg/mL）对 RAW 264.7 细胞没有明显毒性。巨噬细胞在 LPS 的诱导下，不仅细胞增殖能力和吞噬能力明显增强，而且还能够释放大量的细胞因

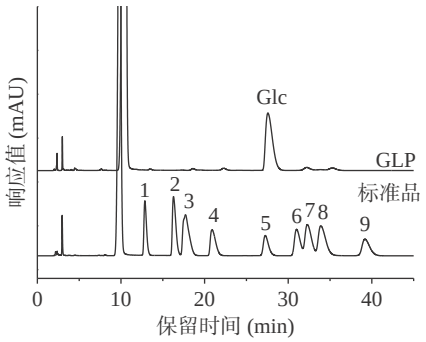


图 12　单糖标准品及 GLP 高效液相色谱图

Fig.12　HPLC of monosaccharide standard and GLP

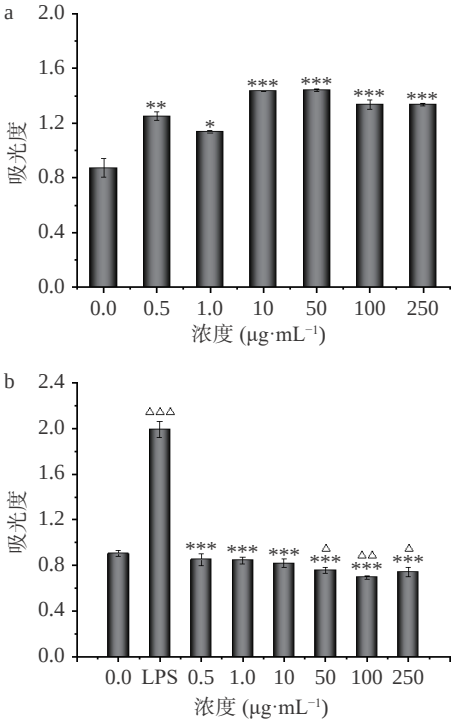


图 13　多糖的免疫调节活性

Fig.13　Immunomodulatory activity of polysaccharides

注：a：多糖对 RAW 264.7 巨噬细胞的影响；b：多糖对 LPS 诱导 RAW 264.7 巨噬细胞的影响；*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001，与 LPS 组比；△P<0.05，△△P<0.01，△△△P<0.001，与空白对照组相比。

子、炎症介质，如一氧化氮、肿瘤坏死因子(TNF-α)、白介素-1β(IL-1β)等，这些介质会对病原微生物的入侵产生抵御作用，但是过量分泌则会引发炎症反应，因此 LPS 诱导巨噬细胞活化模型被用做炎症模型[28]。由图 13b 可以看出，经 LPS 处理后，巨噬细胞明显活化，加入多糖样品后，多糖能够缓解 LPS 诱导的过度活化。与 LPS 组相比，在 0.5~250 μg·mL^{-1} 浓度范围内均能显著抑制 LPS 诱导的细胞过度活化(P<0.01)。这可能是因为多糖与细胞表面受体结合，竞争性抑制 LPS 与细胞受体结合，防止 LPS 过度诱导细胞活化[13]。与空白对照组相比，在低浓度范围内(0.5、1、10 μg·mL^{-1})，使其恢复到正常水平，且无显著性差异(P>0.05)，而在高浓度范围内(50、100、250 μg·mL^{-1})，使其低于正常水平，出现抑制现象。因此，低浓度的 GLP 能够缓解 LPS 诱导的巨噬细胞细胞过度活化。Du 等[29]分离纯化了一种新的多糖 GRP(北沙参多糖)，结果显示 GRP 对 A549 细胞增殖和 RAW 264.7 细胞 NO 生成有抑制作用，对小鼠脾淋巴细胞和 RAW 264.7 细胞增殖有促进作用。由此可见，GLP 具有潜在的免疫调节活性。

3　结论

本研究采用纤维素酶协同超声波辅助法提取 GLP。采用响应面法优化提取工艺优化条件，得出最佳提取工艺为：超声功率 210 W，酶解时间 112 min，料液比 1∶30 g·mL^{-1}，超声温度 65 ℃，超声时间 41 min，纤维素酶添加量 2%。在此条件下，GLP 的得率为 39.58%±0.90%，理化性质分析结果表明，GLP 具有多糖的特征吸收峰和良好的热稳定性，主要由葡萄糖组成。以上结果表明，该法提取得到的多糖得率较高，且稳定性好，为其他多糖的提取提供了一定的参考价值。

巨噬细胞积极参与宿主对外源性病原体和微生物的免疫防御，是免疫细胞分化成多种功能细胞并在免疫应答中发挥相应作用的前提与基础。体外免疫活性研究结果表明，在 0.5~250 μg·mL^{-1} 浓度范围内，GLP 均能显著促进 RAW 264.7 巨噬细胞的增殖(P<0.05)。其中，在 10、50 μg·mL^{-1} 时，其对 RAW 264.7 巨噬细胞的增殖效果最好。而在低浓度时(0.5、1、10 μg·mL^{-1})，GLP 能够缓解 LPS 诱导的 RAW 264.7 巨噬细胞的过度活化，说明北沙参多糖可作为一种免疫调节剂，在食品和医药行业具有潜在的应用前景。

参考文献

[1] 李蒙，陈燕平，韩笑，等. 北沙参研究进展[J]. 食品与药品，2018，20(3)：247−252. [LI M，CHEN Y P，HAN X，et al. Research progress on Glehniae Radix[J]. Food and Drug，2018，20(3)：247−252.]

[2] 刘伟，李中燕，田艳，等. 北沙参的化学成分及药理作用研究进展[J]. 国际药学研究杂志，2013，40(3)：291−294. [LIU W，LI Z Y，TIAN Y，et al. Pharmacological effects and chemical components of Glehnia Radix：Research advances[J]. Journal of International Pharmaceutical Research，2013，40(3)：291−294.]

[3] 景永帅，金姗，张丹参，等. 北沙参乙醇分级多糖的理化性质及抗氧化活性研究[J]. 食品与机械，2020，36(7)：175−180. [JING Y S，JIN S，ZHANG D S，et al. Ethanol fractional purification，physicochemical properties and antioxidant activity of polysaccharides from Glehnia Radix[J]. Food & Machinery，2020，36(7)：175−180.]

[4] 于钦辉，杜宝香，杜以晴，等. 北沙参多糖分离纯化及经肠道菌群降解对体外免疫细胞增殖的影响[J]. 中成药，2020，42(5)：1362−1366. [YU Q H，DU B X，DU Y Q，et al. Isolation and purification of polysaccharides from Glehnia Radix and its effect on immune cell proliferation *in vitro* by intestinal flora degradation[J]. Chinese Traditional Patent Medicine，2020，42(5)：1362−1366.]

[5] 李翠丽，王炜，张英，等. 中药多糖提取、分离纯化方法的研究进展[J]. 中国药房，2016，27(19)：2700−2703. [LI C L，

WANG W, ZHANG Y, et al. Research progress in extraction, separation and purification of polysaccharides from traditional Chinese medicine[J]. China Pharmacy, 2016, 27(19): 2700−2703.]
[6] 崔守富, 邵家威, 郝征红, 等. 超声波-微波联合提取绿芦笋中水溶性粗多糖的工艺优化[J]. 食品工业, 2020, 41(5): 72−76. [CUI S F, SHAO J W, HAO Z H, et al. Process optimization of ultrasonic-microwave combined extraction of water-soluble crude polysaccharides from green asparagus[J]. The Food Industry, 2020, 41(5): 72−76.]
[7] PARK J J, LEE W Y. Anti-glycation effect of *Ecklonia cava* polysaccharides extracted by combined ultrasound and enzyme-assisted extraction[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 180(5): 684−691.
[8] PAN S, WU S. Cellulase-assisted extraction and antioxidant activity of the polysaccharides from garlic[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 111: 606−609.
[9] 赵谋明, 邹林武, 游丽君. 提取方法对香菇多糖性质的影响[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2013, 41(10): 26−33. [ZHAO M M, ZOU L W, YOU L J, et al. Effect of extraction methods on the properties of lentinan[J]. Journal of South China University of Technology (Natural Science Edition), 2013, 41(10): 26−33.]
[10] 圣志存, 陈晓兰. 安徽产地桑叶多糖分离纯化、结构鉴定与抗氧化活性研究[J]. 中国食品添加剂, 2020, 31(1): 59−67. [SHENG Z C, CHEN X L. Purification, characterization and antioxidant properities of polysaccharides of Anhui mulnerry leaves[J]. China Food Additives, 2020, 31(1): 59−67.]
[11] 景永帅, 张丹参, 张瑞娟, 等. 北沙参多糖复合酶提取工艺及理化性质研究[J]. 食品与机械, 2019, 35(11): 191−197. [JING Y S, ZHANG D S, ZHANG R J, et al. Study on the compound enzyme extraction process of Glehniae Radix and its physicochemical properties[J]. Food & Machinery, 2019, 35(11): 191−197.]
[12] 王淑惠, 杨玉洁, 周爱梅, 等. 两种方法提取佛手渣多糖及其对巨噬细胞 RAW 264.7 免疫调节活性的研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(15): 179−187. [WANG S H, YANG Y J, ZHOU A M, et al. Study on the polysaccharide extracted from *Bergamot* (*Citrus medica* L. var. *sarcodactylis*) residue by two methods and its immunomodulatory function in RAW 264.7 cells[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(15): 179−187.]
[13] 苗月, 任桂红, 甄东, 等. 蛹虫草多糖调节小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 免疫活性的分子机制[J]. 食品科学, 2019, 40(9): 188−194. [MIAO Y, REN G H, ZHEN D, et al. Molecular mechanism of *Cordyceps militaris* polysaccharides in regulating the immune function of macrophage RAW 264.7 cells[J]. Food Science, 2019, 40(9): 188−194.]
[14] 周丽明, 张勇. 脂肪酶-蜗牛酶提取茶籽多糖及其抗氧化作用[J]. 中国油脂, 2021, 46(2): 114−118. [ZHOU L M, ZHANG Y. Extraction of *Camellia oleifera* seed polysaccharides by lipase-snailase and its antioxidant effect[J]. China Oils and Fats, 2021, 46(2): 114−118.]
[15] 王锐, 张泽俊, 熊汝琴. 肾茶多糖纤维素酶法提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(13): 145−151. [WANG R, ZHANG Z J, XIONG R Q. Study on polysaccharides by cellulase extraction from *Clerodendranthus spicatus* and its antioxidant activity[J]. Food Research and Development, 2020, 41(13): 145−151.]
[16] MZA C, MZ A, YQ C, et al. Study on immunostimulatory activity and extraction process optimization of polysaccharides from *Caulerpa lentillifera*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 143: 677−684.
[17] ZHAO Y M, SONG J H, WANG J, et al. Optimization of cellulase-assisted extraction process and antioxidant activities of polysaccharides from *Tricholoma mongolicum* Imai[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2016, 96(13): 4484−4491.
[18] 谷旭晗, 刘傲霞, 成悦, 等. 纤维素酶法提取川牛膝多糖[J]. 生物加工过程, 2015, 13(6): 75−80. [GU X H, LIU A X, CHENG Y, et al. Cellulase-assited extraction of polysaccharide from *Cyathula officinalis* Kuan[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2015, 13(6): 75−80.]
[19] 张艳, 李永哲, 张扬, 等. Box-Behnken 设计-响应面法优选平菇中多糖的超声波辅助纤维素酶提取工艺[J]. 西北药学杂志, 2014, 29(1): 1−5. [ZHANG Y, LI Y Z, ZHANG Y, et al. Optimization of extraction technique for polysaccharides from *Pleurotus ostreatus* by ultrasonic-assisted cellulase hydrolysis by using Box-Behnken design and response surface methodology[J]. Northwest Pharmaceutical Journal, 2014, 29(1): 1−5.]
[20] 温思萌, 王亚冬, 昝立峰, 等. 响应面优化酶法提取茯苓多糖工艺[J]. 中国食品添加剂, 2021(8): 36−43. [WEN S M, WANG Y D, ZAN L F, et al. Optimization of enzymatic extraction of pachyman from *Poria cocos* by response surface methodology [J]. China Food Additives, 2021(8): 36−43.]
[21] 景永帅, 苏蕾, 韩钰, 等. 北沙参多糖的提取工艺、理化性质及生物活性研究[J]. 食品与机械, 2018, 34(6): 152−157. [JING Y S, SU L, HAN Y, et al. Study on the extraction technology, physicochemical properities and bioactivity of the polysaccharide from Glehnia Radix[J]. Food & Machinery, 2018, 34(6): 152−157.]
[22] 景永帅, 张丹参, 张瑞娟, 等. 提取方法对北沙参多糖性质及生物活性的影响[J]. 食品与机械, 2017, 33(10): 149−153. [JING Y S, ZHANG D S, ZHANG R J, et al. Effect of different extraction methods on the properities and biological activity of polysaccharides from Glehnia Radix[J]. Food & Machinery, 2017, 33(10): 149−153.]
[23] 王超, 杨晰茗, 赵起越, 等. 高粱乌米多糖精制及抗氧化作用研究[J]. 食品科技, 2019, 44(7): 235−239. [WANG C, YANG X M, ZHAO Q Y, et al. Purification and antioxidant activity of *Sphacelotheca sorghi* (Link) Clint polysaccharide[J]. Food Science and Technology, 2019, 44(7): 235−239.]
[24] 汪鹤, 洪胜, 潘利华, 等. 超声波对密花石斛多糖理化性质及免疫调节活性的影响[J]. 食品工业科技, 2014, 35(9): 121−124. [WANG H, HONG S, PAN L H, et al. Effect of ultrasonic treatment on the physicochemical properties and immunoregulatory activity of polysaccharides from *Dendrobium densiflorum*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(9): 121−124.]
[25] LEE H H, LEE J S, CHO J Y, et al. Structural characteristics

of immunostimulating polysaccharides from *Lentinus edodes*[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009, 19(5): 455.

[26] 张翼飞, 刘志凯, 林雨晟, 等. 香加皮精多糖的单糖组成、热重和热裂解分析[J]. 食品工业科技, 2019, 40(6): 256−262. [ZHANG Y F, LIU Z K, LIN Y S, et al. Monosaccharide composition, thermogravimetric and thermal gravimetric analysis of Corlex Periplocae polysaccharide[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(6): 256−262.]

[27] TU W S, ZHU J H, BI S X, et al. Isolation, characterization and bioactivities of a new polysaccharide from *Annona squamosa* and its sulfated derivative[J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 152: 287−296.

[28] 宋阳, 朱凌羽, 李若楠, 等. 虾青素对脂多糖诱导的 RAW 264.7 细胞炎症反应的影响及机制[J]. 华南农业大学学报, 2020, 41(5): 9−16. [SONG Y, ZHU L Y, LI R N, et al. Effect of astaxanthin on inflammatory response of RAW 264.7 cells induced by lipopolysaccharide and its mechanism[J]. Journal of South China Agricultural University, 2020, 41(5): 9−16.]

[29] DU B X, FU Y P, WANG X, et al. Isolation, purification, structural analysis and biological activities of water-soluble polysaccharide from Glehniae Radix[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 128: 724−731.

张阳, 代成, 谭梓铭, 等. 混合型反相微乳体系萃取茶渣蛋白的工艺优化 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 194−203. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100122

ZHANG Yang, DAI Cheng, TAN Ziming, et al. Optimization of Extraction Process of Tea Protein by Mixed Reverse Microemulsion System[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 194−203. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100122

· 工艺技术 ·

混合型反相微乳体系萃取茶渣蛋白的工艺优化

张　阳[1], 代　成[1], 谭梓铭[1], 李　璐[1], 李　雁[1], 解新安[1,2,*]

（1.华南农业大学食品学院, 广东广州 510642;
2.广东省功能食品活性物重点实验室, 广东广州 510642）

摘　要: 使用双（2-乙基己基）磺基琥珀酸钠（AOT）、十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）、十二烷基硫酸钠（SDS）分别和吐温 80（Tween80）混合制备了三种反相微乳体系，并通过单因素实验研究了表面活性剂浓度、离子型表面活性剂含量、水分含量（W_0）、水相 pH、萃取温度和萃取时间等因素对蛋白质前萃率和 KCl 浓度、水相 pH 和萃取温度对蛋白质后萃率的影响，然后通过正交试验得到了最佳萃取条件。结果表明，Tween80-CTAB 微乳体系对茶渣蛋白的提取效果较好，在表面活性剂浓度 0.10 mol/L，离子型表面活性剂含量 70%，水相 pH13.0，W_0 25，萃取温度 40 ℃，萃取时间为 40 min 的最佳条件下，茶渣蛋白的前萃率达到最大值 16.17%，其后萃率在 KCl 浓度为 1.2 mol/L，pH7.0，提取温度 40 ℃ 的最佳条件下可达到 94.78%。SDS-PAGE 电泳图的结果表明，反相微乳萃取得到的茶渣蛋白分子条带较小，即能够选择性的萃取小分子蛋白。

关键词: 反相微乳, 茶渣蛋白, 前萃取, 后萃取, 双 (2-乙基己基) 磺基琥珀酸钠, 十六烷基三甲基溴化铵, 十二烷基硫酸钠, 吐温 80

中图分类号: TQ936.2　　**文献标识码:** B　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0194−10　　**本文网刊:**

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100122

Optimization of Extraction Process of Tea Protein by Mixed Reverse Microemulsion System

ZHANG Yang[1], DAI Cheng[1], TAN Ziming[1], LI Lu[1], LI Yan[1], XIE Xin'an[1,2,*]

（1.College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;
2.Guangdong Provincial Key Laboratory of Nutraceuticals and Functional Foods, Guangzhou 510642, China）

Abstract: Three reverse microemulsion systems were prepared using sodium bis (2-ethylhexyl) sulfosuccinate (AOT), cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), sodium dodecyl sulfate (SDS) and Tween80, and the effects of surfactant concentration, ionic surfactant content, water content (W_0), aqueous phase pH, extraction temperature and extraction time on protein forward extraction yield and KCl concentration, aqueous phase pH and extraction temperature on protein backward extraction yield were investigated by single-factor experiments, then the optimal extraction conditions were obtained by orthogonal experiments. The results showed that the Tween80-CTAB microemulsion system was effective for the extraction of tea residues protein, and under the optimal conditions of surfactant concentration of 0.10 mol/L, ionic surfactant content of 70%, aqueous phase pH13.0, W_0 25, extraction temperature of 40 ℃ and extraction time of 40 min, the forward extraction yield of tea residues protein reached the maximum value of 16.17%. Under the optimal conditions of KCl concentration of 1.2 mol/L, pH7.0 and extraction temperature of 40 ℃, the backward extraction yield of residues protein could reach 94.78%. SDS-PAGE showed that the molecular bands of tea residues protein obtained by reverse

收稿日期: 2021−10−14

基金项目: 国家茶叶产业技术体系项目（CARS-19）。

作者简介: 张阳（1997−）, 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与优化, E-mail: 1083879863@qq.com。

*** 通信作者:** 解新安（1964−）, 男, 博士, 研究员, 研究方向: 食品加工与模拟, E-mail: xinanxie@scau.edu.cn。

microemulsion extraction were small, which could selectively extract small molecular proteins.

Key words: reverse microemulsion; tea residues protein; forward extraction; backward extraction; sodium bis (2-ethylhexyl) sulfosuccinate; cetyltrimethylammonium bromide; sodium dodecyl sulfate; Tween80

茶叶是一种起源于中国的产品，是一种天然的健康饮料，在世界各地工厂的加工过程中，会产生大量的茶叶残渣[1−2]。据报道，茶渣中含有多种活性成分，其中粗蛋白含量为 20%~30%，且 80% 以上为非水溶性蛋白质[3]。茶渣蛋白由多种氨基酸组成，具有较高的营养价值，此外，它还具有较好的防辐射[4]、抗氧化[5] 和降血脂的功能[6]，是一种有着极大开发潜力的优质植物蛋白源[7]。目前，茶渣蛋白主要是通过碱提取法[8] 和酶提取法[9] 来进行萃取。然而，这些方法有着一定的局限性，如环境污染和资源消耗等问题，无法大规模生产。

微乳提取被认为是取代传统方法的理想选择[10−11]。微乳是一个单一的光学各向同性且热力学稳定的体系，是一种含有水相、油相和表面活性剂的自发形成的宏观分散溶液[12−13]。其中常见的微乳为水包油(O/W)型，而油包水(W/O)微乳也称为反相微乳。已经证明了 W/O 微乳体系中的“水池”比纯水有更好的溶解能力[14]。因此，W/O 型微乳已被广泛用于植物蛋白的提取[15]。反相微乳萃取茶渣蛋白的过程包括两个步骤：前萃和后萃，其中蛋白质从水相进入表面活性剂聚合物的水池中称为前萃，而含有这些蛋白质的溶液从反胶束被回收到新的水溶液中的过程称之为后萃[16−17]。

已有报道表明，反相微乳提取的植物蛋白具有更好的功能特性和结构[18]。Zhao 等[19] 使用 AOT 反胶束提取大豆蛋白，发现其具有更好的功能、营养和风味特性，并且 FTIR 和氨基酸分析结果表明，大豆蛋白在 AOT 反胶束中几乎保持了原有的结构。可能是因为反相微乳中的反胶束结构对植物蛋白有着一定的保护作用[20−21]。此外，Zhu 等[22] 研究发现，与碱提法和等电点沉淀法制备的蛋白相比，反胶束法提取的脱脂小麦胚芽蛋白具有相对较好的氮溶性、脂肪吸收能力、起泡性、起泡稳定性和乳化稳定性，结构也更加致密有序。因此使用反相微乳能够从茶渣中提取优质的茶渣蛋白，但目前用反相微乳法从茶叶残渣中提取蛋白质的研究鲜有报道。

在本实验室以前的研究中，Tween80、AOT、SDS 和 CTAB 四种表面活性剂制成的反相微乳对茶渣蛋白的提取效率不高，因此本文使用 Tween80、AOT、SDS 和CTAB 制备了 Tween80-AOT、Tween80-CTAB、Tween80-SDS 三种反相微乳体系，并研究了各种因素(前萃：表面活性剂浓度、离子型表面活性剂含量、pH、W_0、萃取温度和萃取时间，后萃取：KCl 浓度、缓冲液 pH 和提取温度)对反相微乳提取茶渣蛋白的影响。然后通过正交试验对提取条件进行了优化，并通过 SDS-PAGE 电泳测定了由反相微乳提取的茶渣蛋白的分子量，为后续生产中进一步开发深加工的茶渣资源提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

茶叶　广州曼陀岭茶厂提供；AOT、SDS、CTAB、KCl 溶液　广州裕兆科技有限公司提供；Tween80、异辛烷、正辛醇　广州光华科技有限公司；一级水　实验室自制；所有有机溶剂　均为分析纯。

PL203 电子天平　梅特勒-托利多仪器有限公司；DF-15 型中药粉碎机　温岭市大德中药机械有限公司；KQ-100 超声波清洗机　昆山市超声仪器有限公司；磁力搅拌器　江苏市富华有限公司；HH-2 数显恒温水浴锅　常州澳华仪器有限公司；KJELTEC 8200 快速定氮仪　福斯特卡托公司；DL-5 高速离心机　上海安亭科学仪器厂；FD-EC-80 冷冻干燥机、PHS-3C 数显 pH 计　上海精科仪器厂。

1.2　实验方法

1.2.1　茶渣的制备　将蒸馏水加热至沸腾状态，然后将茶叶按料液比 1∶40 加入并煮沸提取 20 min。随后，用棉布将提取物过滤出来。上述处理重复 2 次后放入烘箱干燥至恒重，然后用 DF-15 型中药粉碎机将茶渣磨碎。磨碎的茶渣用 60 目网筛过筛[23]。

1.2.2　反相微乳的制备　将一定浓度的表面活性剂溶解在由异辛烷和正辛醇组成的有机溶剂中，得到反相微乳，三种混合表面活性剂(Tween80-AOT、Tween80-CTAB、Tween80-SDS)由两种不同的表面活性剂按一定质量比(w/w)混合组成。然后用磁力搅拌器搅拌混合后的溶液，直到完全溶解。反相微乳体系中的水含量表示为 W_0(水与表面活性剂的摩尔比)，用含有氯化钾的磷酸盐缓冲液调节离子强度和 pH。然后，溶液在超声波条件下反应 30 min，直到其清晰透明[24]。

1.2.3　蛋白质含量的测定　茶渣蛋白含量的测定参考 GB 5009.5-2010《食品安全国家标准食品中蛋白质的测定》中的凯氏定氮法。

1.2.4　蛋白质前萃实验　取按试验要求配制的反相微乳置于锥型瓶中，加入一定量的茶渣，超声一定的时间，然后 4000 r/min 离心分离 20 min。萃取体系分为两层，上层为萃取蛋白质的反相微乳层，下层为残渣，除去残渣，测量上清液(即为前萃液)体积，取 5 mL 上清液定氮(以萃取前的反相微乳作为空白样)[25]。然后以茶渣蛋白前萃率为指标，考察表面活性剂浓度(0.02、0.04、0.06、0.08、0.10、0.12、0.14 g/mL)、离子型表面活性剂质量分数 ω(占表面活性剂总质量的比例，10%、20%、30%、40%、50%、

60%、70%、80%、90%)、W_0(5、10、15、20、25、30、35)、水相 pH(7、8、9、10、11、12、13)、萃取温度(25、30、35、40、45、50、55、60 ℃)以及萃取时间(20、40、60、80、100、120 min)5 种因素不同水平对前萃过程的影响。固定考察因素表面活性剂浓度 0.08 g/mL, 离子型表面活性剂质量分数 50%, W_0 25, 水相 pH10, 萃取温度 40 ℃, 萃取时间 60 min。蛋白质前萃率由下式计算:

$$前萃率(\%)=\frac{上清液中的蛋白质含量}{茶叶残渣中的全部蛋白质含量}\times 100$$

根据单因素实验的结果, 选择了表面活性剂浓度(A)、离子型表面活性剂的质量分数(B)、水相增溶能力 W_0(E)和水相 pH 四个因素。以茶渣蛋白前萃率为指标, 通过正交试验确定最佳提取工艺, 因素水平设计如表 1 所示。

表 1 前萃正交试验因素与水平 $L_{16}(4^5)$

Table 1 Factors and levels of forward extraction orthogonal test $L_{16}(4^5)$

水平	因素					空白列
	A c(g/mL)	B ω(%)	C pH_1	D pH_2	E W_0	
1	0.06	60	7	10	15	1
2	0.08	70	8	11	20	2
3	0.10	80	9	12	25	3
4	0.12	90	10	13	31	4

注: 第2、3、4、6、7列为Tween80-AOT与Tween80-SDS反相微乳体系前萃茶渣蛋白正交试验因素与水平; 第2、3、5、6、7列为Tween80-CTAB反相微乳体系前萃茶渣蛋白正交试验因素与水平。

1.2.5 蛋白质后萃取实验 取 10 mL 前萃液置于锥形瓶中, 加入等体积的具有一定离子强度和 pH 的 KCl 缓冲液, 超声波萃取一定时间, 然后 4000 r/min 离心分离 20 min。分液漏斗分层后取下层水相, 测量体积, 取 5 mL 下层水相定氮(以 KCl 缓冲液作为空白样), 余者真空冷冻干燥, 得粗蛋白, 测定蛋白质含量[25]。然后以茶渣蛋白后萃率为指标, 考察了缓冲液 KCl 浓度(0.25、0.5、1.0、1.5、2.0 mol/L)、缓冲液 pH(5.5、6.0、6.5、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0)以及萃取温度(25、30、35、40、45、50、55、60 ℃)三个因素不同水平对后萃过程的影响。后萃单因素实验初始条件为: KCl 浓度 0.08 mol/L、水相 pH7 以及萃取温度 40 ℃。蛋白质后萃率由下式计算:

$$后萃率(\%)=\frac{水相中的蛋白质含量}{上清液中的蛋白质含量}\times 100$$

通过正交试验进一步研究了茶渣蛋白后萃的最佳条件。如表 2 所示, 对氯化钾的浓度(A)和 pH(B, C)以及提取温度(D)进行考察, 每个因素选取三个水平, 进行正交优化试验。

1.2.6 茶渣蛋白分子量测定 参照何忠效的《生物化学试验技术》中的试验方法。使用 4% 的浓缩胶和 15% 的分离凝胶进行 SDS-PAGE 电泳分析。含有相同数量的蛋白质的样品与分子量的标记蛋白一起被加载到丙烯酰胺凝胶上。电泳步骤结束后, 使用考马斯亮蓝 R-250 染色 1 h, 然后用脱色液(乙醇∶乙酸∶蒸馏水=25∶8∶67)脱色 2 h。

表 2 后萃正交试验因素与水平 $L_9(3^4)$

Table 2 Factors and levels of forward extraction orthogonal test$L_9(3^4)$

水平	因素				空白列
	A KCl浓度(mol/L)	B 缓冲液 pH_1	C 缓冲液 pH_2	D 萃取温度(℃)	
1	0.8	10	6.0	30	1
2	1.0	11	6.5	40	2
3	1.2	12	7.0	50	3

注: 第2、3、5、6列为Tween80-AOT与Tween80-SDS反相微乳体系后萃茶渣蛋白的正交试验因素与水平; 第2、4、5、6列为Tween80-CTAB反相微乳体系后萃茶渣蛋白的正交试验因素与水平。

1.3 数据处理

实验结果为重复三次实验后, 取平均值。所有的实验数据都使用 SPSS 软件包(11.5 版)进行分析, 并使用 Excel 2013(Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA)绘制了曲线。然后进行方差分析以评估独立之间的显著差异, 并通过邓肯多重范围检验(DMRT)评估平均值之间的差异是否显著, 不同的小写字母表示具有显著性差异(P<0.05)。

2 结果与分析

2.1 茶渣蛋白前萃实验结果

2.1.1 表面活性剂浓度对蛋白质前萃率的影响 由图 1 可知, 随着表面活性剂浓度的增加, Tween80-SDS 和 Tween80-CTAB 反相微乳的前萃率先增加后减少, 当表面活性剂浓度为 0.10 g/mL 时, 前萃率达到最高值。Tween80-AOT 反相微乳体系的前萃率低于上述两种微乳体系, 当表面活性剂浓度为 0.08 g/mL 时, 萃取率达到最大值 9.5%。这一结果可能是表面活性剂浓度的影响造成的, 表面活性剂的浓度升高后增强了微乳中水的增溶作用, 从而增大了胶束的尺寸和/或增加了胶束的数量[26], 使蛋白质更有选择性地增加转移到有机相。另一方面, 表面活性剂浓度过高, 不利于茶渣蛋白的前萃取。因此选择

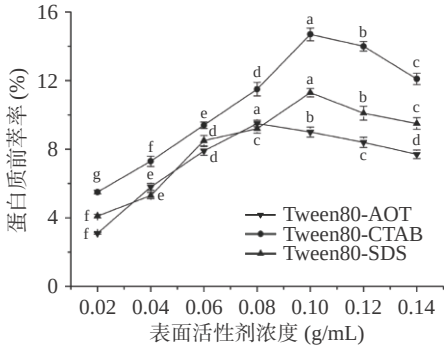


图 1 表面活性剂浓度对前萃率的影响

Fig.1 Effect of surfactant concentration on the forward extraction

注: 不同的小写字母表示具有显著性差异; 图 2~图 9 同。

0.08 g/mL 的表面活性剂浓度（Tween80-AOT）和 0.10 g/mL 的表面活性剂浓度（Tween80-SDS 和 Tween80-CTAB）进行后续实验。

2.1.2　离子型表面活性剂质量分数对蛋白质前萃率的影响　在离子型表面活性剂含量增加的条件下（图 2），三种不同的反相微乳体系提取的茶渣蛋白含量均迅速攀升，然后下降。在 Tween80-CTAB 和 Tween80-SDS 微乳体系中，CTAB 和 SDS 含量为 70% 时，萃取率达到最高，分别为 15.1% 和 11.9%。而在 Tween80-AOT 微乳体系中，AOT 含量从 10% 到 80% 变化时，前萃率逐渐增加，且 AOT 含量增加到 80% 时，茶渣蛋白的前萃率接近最大值（10.9%），然而，当 AOT 含量进一步增加时，前萃率反而开始下降。因此在配制混合反相微乳时，本实验选取 AOT 的含量为 80%，选取 CTAB 与 SDS 的含量为 70%。

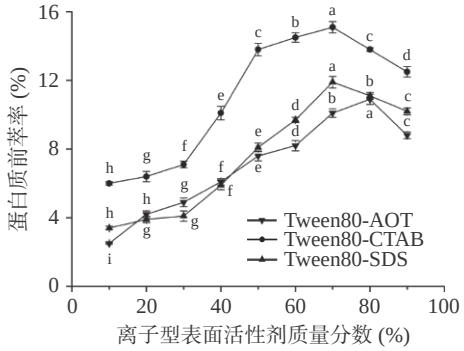


图 2　离子型表面活性剂质量分数对前萃率的影响

Fig.2　Effect of ionic surfactant content on the forward extraction

2.1.3　W_0 对蛋白质前萃率的影响　当 W_0 从 5 增加到 30 时，Tween80-CTAB、Tween80-AOT 和 Tween80-SDS 反相微乳体系的前萃率都有极大的提升（图 3），当 W_0 达到 25 时，前萃率的增加趋势趋于平缓。W_0 的增加对应于胶束大小的增加，这与蛋白质的溶解度密切相关。这些现象可能是因为随着 W_0 的增加，一些较大的反相胶束形成，可以包含多个蛋白质分子[27]。因此，最佳的 W_0 应该是 25。

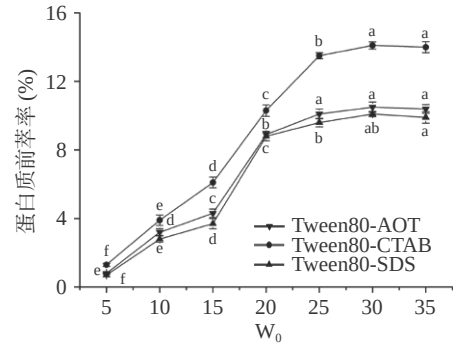


图 3　W_0 对前萃率的影响

Fig.3　Effect of W_0 on the forward extraction

2.1.4　水相 pH 对蛋白质前萃率的影响　从图 4 可以看出，在三种反相微乳体系中中，茶渣蛋白前萃率的变化与 pH 的变化趋势不同。对于 Tween80-AOT 和 Tween80-SDS 微乳体系，前萃率先上升然后略有下降，当 pH 为 9 时达到最大值。对于 Tween80-CTAB 微乳体系，前萃率随着 pH 的增加而增加，但当 pH 达到 12 时，茶渣蛋白的前萃率（14.2%）最高。相比于其他两种反相微乳体系在相同 pH 下的提取效果，Tween80-CTAB 微乳体系对茶蛋白的提取率最高。在最佳 pH 下，蛋白质的提取率会通过静电相互作用或疏水相互作用得到改善[16]。过高或过低的 pH 不仅会导致蛋白质变性，而且由于将蛋白质和表面活性剂混合成乳状液而无法形成反相胶束[28]。后续实验 Tween80-AOT 和 Tween80-SDS 微乳体系的水相 pH 选择为 9.0，而 Tween80-CTAB 微乳体系的水相 pH 选择 12.0。

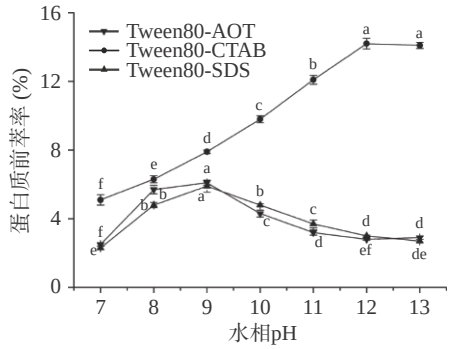


图 4　pH 对前萃率的影响

Fig.4　Effect of pH on the forward extraction

2.1.5　萃取温度对蛋白质前萃率的影响　如图 5 所示，随着温度的升高，微乳的整体萃取趋势表现为先升高然后降低。当萃取温度为 45 ℃ 时，Tween80-AOT 反相微乳体系获得了最大的萃取率，而当温度为 40 ℃ 时，Tween80-CTAB 体系和 Tween80-SDS 体系的萃取率最高，然后当温度继续上升时，萃取率逐渐开始下降。这表明温度过高或过低都不利于蛋白质的前萃取，不恰当的温度会影响蛋白质在微乳中的溶解度[29−30]。而在适当的温度下，蛋白质和反相胶束分子之间的相互作用会增强[31]。因此，本实验中 Tween80-AOT 微乳体系的适宜萃取温度为 45 ℃，Tween80-SDS 和 Tween80-CTAB 微乳体系的适宜

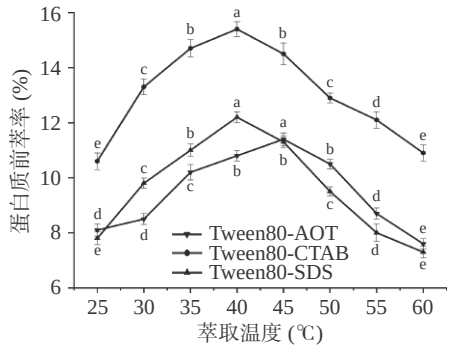


图 5　萃取温度对前萃率的影响

Fig.5　Effect of temperature on the forward extraction

提取温度为 40 ℃。

2.1.6 萃取时间对蛋白质前萃率的影响 在图 6 中，前萃率在提取时间为 20~60 min 的范围内明显增加，随后在 60~120 min 之间的上升趋势趋于平缓。这表明在早期阶段(20~60 min)，蛋白质的前萃取容易受到提取时间的影响，而且提取率随着提取时间的增加而上升。在 60~80 min 之间，茶渣蛋白的前萃率没有随着提取时间的增加而发生明显的改变，这可能是由于在前期的萃取过程中，反胶束已经增溶了大量的茶渣蛋白，达到一个饱和状态，并且随着萃取时间的增加，离子强度等因素也会对反胶束结构造成一定的影响[31]，因此在随后实验中萃取时间选择 40 min。

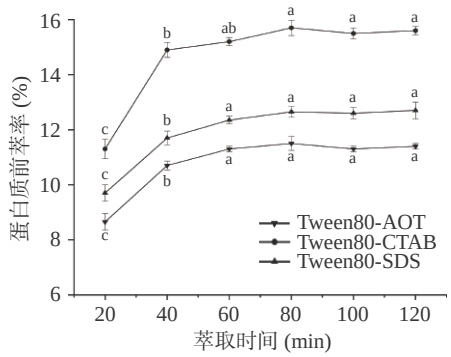


图 6 萃取时间对前萃率的影响

Fig.6 Effect of extraction time on the forward extraction

2.1.7 前萃工艺的正交试验 根据上述单因素实验的结果，对影响前萃取的四个主要因素(表面活性剂浓度、离子型表面活性剂的质量分数、W_0 和水相的 pH)进行了正交优化试验。从表 3 中正交试验结果可以看出，影响 Tween80-AOT、Tween80-CTAB 和 Tween80-SDS 三种反相微乳体系前萃率的主次顺序分别是 W_0>pH>表面活性剂浓度>离子型表面活性剂质量分数、表面活性剂浓度>pH>W_0>离子型表面活性剂质量分数和表面活性剂浓度>pH>离子型表面活性剂质量分数>W_0。且从表 4~表 6 中可以看出，仅有 W_0 对 Tween80-SDS 体系的前萃率影响不显著。实验结果表明，Tween80-AOT 微乳体系中四个

表 3 前萃正交试验安排与结果

Table 3 Arrangement and results of forward extraction orthogonal experiment

实验号		A c(g/mL)	B ω(%)	C pH_1	D pH_2	E W_0	空白列	前萃率(%)		
								AOT	CTAB	SDS
1		1(0.06)	1(60)	1(7)	1(10)	1(15)	1	4.63	6.47	4.92
2		1	2(70)	2(8)	2(11)	2(20)	2	8.94	9.31	6.30
3		1	3(80)	3(9)	3(12)	3(25)	3	10.50	10.12	9.50
4		1	4(90)	4(10)	4(13)	4(30)	4	10.78	12.02	8.46
5		2(0.08)	1	2	2	3	4	8.99	12.33	8.92
6		2	2	1	1	4	3	8.20	12.63	9.45
7		2	3	4	4	1	2	5.98	14.08	11.16
8		2	4	3	3	2	1	7.96	10.49	12.30
9		3(0.10)	1	3	3	4	2	10.73	11.89	10.17
10		3	2	4	4	3	1	11.95	16.37	10.89
11		3	3	1	1	2	4	8.18	11.03	9.17
12		3	4	2	2	1	3	7.10	12.49	8.42
13		4(0.12)	1	4	4	2	3	7.95	11.04	9.17
14		4	2	3	3	1	4	6.66	12.12	11.17
15		4	3	2	2	4	1	10.17	14.09	9.67
16		4	4	1	1	3	2	8.87	12.22	9.54
AOT	K_1	8.713	8.075	7.470		6.093	8.678	最佳试验条件为: $A_3B_2C_4E_3$		
	K_2	7.782	8.938	8.800		8.258	8.630			
	K_3	9.490	8.707	8.963		10.078	8.438			
	K_4	8.412	8.677	9.165		9.970	8.652			
CTAB	K_1	9.480	10.433		10.588	11.290	11.855	最佳试验条件为: $A_3B_2D_4E_3$		
	K_2	12.383	12.607		12.055	10.467	11.875			
	K_3	12.945	12.330		11.155	12.760	11.570			
	K_4	12.367	11.805		13.377	12.657	11.875			
SDS	K_1	7.295	8.295	8.270		8.918	9.445	最佳试验条件为: $A_2B_3C_3E_3$		
	K_2	10.457	9.453	8.328		9.235	9.293			
	K_3	9.663	9.875	10.785		9.713	9.135			
	K_4	9.887	9.680	9.920		9.438	9.430			
R_1		1.708	0.863	1.695		3.985	0.240			
R_2		3.465	2.174		2.789	2.293	0.305			
R_3		3.162	1.580	2.515		0.795	0.310			

注: AOT、CTAB和SDS分别表示Tween80-AOT、Tween80-CTAB以及Tween80-SDS体系; 第2、3、4、6、7列为Tween80-AOT与Tween80-SDS反相微乳体系前萃茶渣蛋白正交试验安排; 第2、3、5、6、7列为Tween80-CTAB反相微乳体系前萃茶渣蛋白正交试验安排。

表 4　Tween80-AOT 体系前萃正交试验方差分析表

Table 4　Significant analysis on forward extraction orthogonal test of Tween80-AOT system

误差来源	偏差平方和	自由度	*F*比	*F*临界值	显著性
表面活性剂浓度	6.033	3	41.896	$F_{0.05}$=9.280	*
离子型表面活性剂质量分数	1.628	3	11.306	$F_{0.05}$=9.280	*
pH_1	7.070	3	49.097	$F_{0.05}$=9.280	*
W_0	41.859	3	290.688	$F_{0.05}$=9.280	*
空白列	0.144	3	1.000	$F_{0.05}$=9.280	
误差	0.144	3			

注：*表示具有显著性差异。

表 5　Tween80-CTAB 体系前萃正交试验方差分析表

Table 5　Significant analysis on forward extraction orthogonal test of Tween80-CTAB system

误差来源	偏差平方和	自由度	*F*比	*F*临界值	显著性
表面活性剂浓度	29.419	3	109.772	$F_{0.05}$=9.280	*
离子型表面活性剂质量分数	11.212	3	41.836	$F_{0.05}$=9.280	*
pH_2	17.758	3	66.261	$F_{0.05}$=9.280	*
W_0	14.770	3	55.112	$F_{0.05}$=9.280	*
空白列	0.268	3	1.000	$F_{0.05}$=9.280	
误差	0.268	3			

表 6　Tween80-SDS 体系前萃正交试验方差分析表

Table 6　Significant analysis on forward extraction orthogonal test of Tween80-SDS system

误差来源	偏差平方和	自由度	*F*比	*F*临界值	显著性
表面活性剂浓度	23.335	3	93.340	$F_{0.05}$=9.280	*
离子型表面活性剂质量分数	6.023	3	24.092	$F_{0.05}$=9.280	*
pH_1值	18.375	3	73.500	$F_{0.05}$=9.280	*
W_0	1.348	3	5.392	$F_{0.05}$=9.280	
空白列	0.250	3	1.000	$F_{0.05}$=9.280	
误差	0.250	3			

因素的最佳组合是：$A_3B_2C_4E_3$，即在表面活性剂浓度为 0.10 mol/L、离子型表面活性剂含量为 70%、pH 为 10.0、W_0 为 25 的条件下，Tween80-AOT 微乳体系的茶渣蛋白前萃率最高(11.49%)。Tween80-CTAB 微乳中四个因素的最佳组合是：$A_3B_2D_4E_3$，茶蛋白的最大前萃率的条件为：表面活性剂浓度 0.10 mol/L，离子型表面活性剂含量 70%，pH13.0，W_0 25，最高前萃率为 16.17%。Tween80-SDS 体系中四个因素的最佳组合是：$A_2B_3C_3E_3$，在最佳条件下(表面活性剂浓度为 0.08 mol/L，SDS 含量为 80%，pH 9.0，W_0 25)进行实验后，前萃率为 13.10%。

2.2　茶渣蛋白后萃实验结果

2.2.1　缓冲液 KCl 浓度对蛋白质后萃率的影响　图 7 显示了 KCl 浓度对后萃率的影响。随着 KCl 浓度的增加，三种反相微乳体系的后萃率均表现为先上升后下降，当 KCl 浓度为 1.0 mol/L 时达到最大值，其中 Tween80-CTAB 最大后萃率为 94.5%，而 Tween80-AOT 和 Tween80-SDS 最大后萃率分别为 90.21% 和 89.41%。研究发现，随着 KCl 浓度的增加，表面活性剂周围的电层厚度逐渐变薄，表面活性剂的极性头之间的相互排斥力降低，导致反相微乳中的胶束变小，使

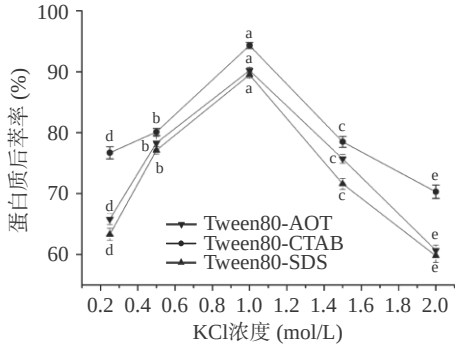


图 7　KCl 浓度对后萃率的影响

Fig.7　Effect of KCl concentration on the backward extraction

得微乳中蛋白质的增溶作用减弱，后萃率得到提高[32]。

2.2.2　缓冲液 pH 对蛋白质后萃率的影响　如图 8 所示，Tween80-AOT 和 Tween80-SDS 微乳体系的茶渣蛋白后萃率随着 pH 的升高而增大，当 pH 在 5.5~11 时，茶渣蛋白的后萃率明显上升，在 pH 到达 11 后，出现缓慢下降的趋势，因此在 pH 为 11 时达到最高值。在 Tween80-CTAB 体系中，pH 在 5.5~6.5 时，蛋白质的后萃率大大增加，然后随着 pH 的增加逐渐降低，茶渣蛋白的后萃率在 pH 6.5 时达到最

高。缓冲液 pH 影响后萃率的原因是随着 pH 的增加，更多的茶渣蛋白分子带负电，电荷密度增加，削弱了蛋白质与表面活性剂之间的静电作用，促进了后萃取过程，即蛋白质从反相胶束中的释放率增加[33]。另一方面，较高的 pH 反而会增大蛋白质之间的静电排斥作用，导致蛋白质后萃率下降[34]。

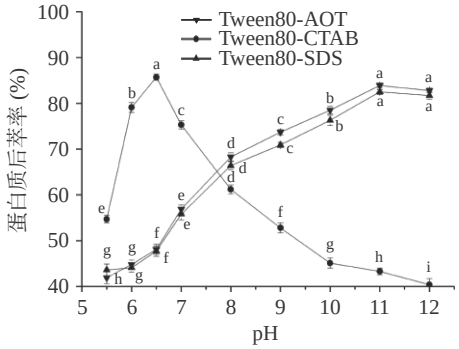


图 8 缓冲液 pH 对后萃率的影响

Fig.8 Effect of buffer pH on the backward extraction

2.2.3 萃取温度对蛋白质后萃率的影响 反相微乳中茶蛋白的提取率可能受到温度的影响[24]。从图 9 中可以得知，三种反相微乳体系对茶渣蛋白的提取率趋势一致，且在 40 ℃ 时后萃率达到最高值，但随着温度的持续升高，后萃率均明显下降。原因是在温度升高之初，反相微乳与水相之间的分子运动加快，反相微乳的胶束破坏变大，蛋白质的后萃率增加。当温度继续升高，萃取率反而开始下降，且过高的温度会导致蛋白变性[25]。因此，三种反相微乳体系的最佳萃取温度为 40 ℃。

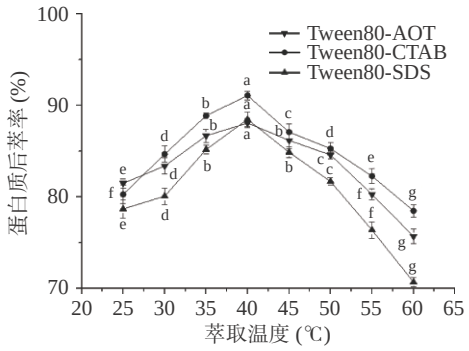


图 9 萃取温度对后萃率的影响

Fig.9 Effect of temperature on the backward extraction

2.2.4 后萃正交试验 从表 7 中正交试验结果可以看出，影响 Tween80-AOT、Tween80-CTAB 和 Tween80-SDS 三种反相微乳体系后萃率的主次顺序分别是萃取温度>KCl 浓度>缓冲液 pH、KCl 浓度>缓冲液 pH>萃取温度和萃取温度>KCl 浓度>缓冲液 pH。且从表 8~表 10 中可以看出，三个因素对三种反相微乳体系都有显著影响。实验结果表明，在 KCl 浓度为 1.2 mol/L、pH 为 11.0、萃取温度为 50 ℃ 的条件下，茶渣蛋白在 Tween80-AOT 微乳体系中的后萃率最高(91.53%)，则三个因素的最佳组合是：$A_3B_2D_3$。Tween80-CTAB 微乳体系中的三个因素的最佳组合是：$A_3C_3D_2$，即 KCl 浓度为 1.2 mol/L，

表 7 后萃正交试验安排与结果

Table 7 Arrangement and results of backward extraction orthogonal experiment

实验号		A KCl浓度(mol/L)	B 缓冲液pH$_1$	C 缓冲液pH$_2$	D 萃取温度(℃)	空白列	后萃率(%)		
							AOT	CTAB	SDS
1		1(0.8)	1(10)	1(6.0)	1(30)	1	79.58	77.44	81.57
2		1	2(11)	2(6.5)	2(40)	2	71.47	82.64	76.58
3		1	3(12)	3(7)	3(50)	3	85.25	81.26	83.20
4		2(1.0)	1	1	2	3	66.59	88.93	70.00
5		2	2	2	3	1	84.09	89.27	79.14
6		2	3	3	1	2	83.71	88.09	81.70
7		3(1.2)	1	1	3	2	85.75	91.12	80.76
8		3	2	2	1	3	89.88	90.97	87.72
9		3	3	3	2	1	80.02	94.78	78.09
AOT	K_1	79.767	77.037		83.723	80.563			
	K_2	76.797	82.813		73.360	80.310	最佳试验条件为：$A_3B_2D_3$		
	K_3	85.217	81.660		84.697	80.907			
CTAB	K_1	80.447		85.83	85.5	87.163			
	K_2	88.763		87.627	88.783	87.283	最佳试验条件为：$A_3C_3D_2$		
	K_3	92.29		88.043	87.217	87.053			
SDS	K_1	80.45	77.443		83.663	79.600			
	K_2	76.947	81.147		74.890	79.680	最佳试验条件为：$A_3B_2D_1$		
	K_3	82.19	80.997		81.033	80.307			
R_1		8.420	5.506		11.337	0.597			
R_2		11.843		2.213	3.283	0.230			
R_3		5.243	3.704		8.773	0.707			

注：AOT、CTAB和SDS分别表示Tween80-AOT、Tween80-CTAB以及Tween80-SDS体系。第2、3、5、6列为Tween80-AOT与Tween80-SDS反相微乳体系后萃茶渣蛋白的正交试验因素与水平；第2、4、5、6列为Tween80-CTAB反相微乳体系后萃茶渣蛋白的正交试验因素与水平。

表 8　Tween80-AOT 体系后萃正交试验方差分析结果

Table 8　Significant analysis on backward extraction orthogonal test of Tween80-AOT system

误差来源	偏差平方和	自由度	F比	F临界值	显著性
KCl浓度	109.420	2	203.383	$F_{0.05}$=19.000	*
缓冲液pH	50.605	2	94.061	$F_{0.05}$=19.000	*
萃取温度	236.866	2	440.271	$F_{0.05}$=19.000	*
空白列	0.538	2	1.000	$F_{0.05}$=19.000	
误差	0.538				

表 9　Tween80-CTAB 体系后萃正交试验方差分析结果

Table 9　Significant analysis on backward extraction orthogonal test of Tween80-CTAB system

因素	偏差平方和	自由度	F比	F临界值	显著性
KCl浓度	221.869	2	2808.468	$F_{0.05}$=19.000	*
缓冲液pH	8.300	2	105.063	$F_{0.05}$=19.000	*
萃取温度	16.182	2	204.835	$F_{0.05}$=19.000	*
空白列	0.079	2	1.000	$F_{0.05}$=19.000	
误差	0.079	2			

表 10　Tween80-SDS 体系后萃正交试验方差分析结果

Table 10　Significant analysis on backward extraction orthogonal test of Tween80-SDS system

因素	偏差平方和	自由度	F比	F临界值	显著性
KCl浓度	42.793	2	47.654	$F_{0.05}$=19.000	*
缓冲液pH	26.363	2	29.357	$F_{0.05}$=19.000	*
萃取温度	121.629	2	135.444	$F_{0.05}$=19.000	*
空白列	0.898	2	1.000	$F_{0.05}$=19.000	
误差	0.898	2			

pH 为 7.0，萃取温度为 40 ℃，达到最高后萃率 94.78%。表中观察到 Tween80-SDS 微乳体系中茶渣蛋白的最佳后萃取条件为 KCl 浓度 1.2 mol/L，pH11.0，提取温度 30 ℃，则三个因素的最佳组合是：$A_3B_2D_1$，在最佳条件下茶渣蛋白的后萃率为 87.72%。

2.3　茶蛋白分子量测定结果

图 10 展示了用 Tween80-CTAB 反相微乳提取茶渣蛋白的 SDS-PAGE 电泳图。在茶渣蛋白的光谱中，有两条带子，两条带子的分子量分别为 27.18 和 20.85 kDa，小于碱法提取茶渣蛋白的分子量。在以前的工作中，我们研究了不同方法（反相微乳法、碱法和酶法）提取的茶渣蛋白的特性，结论表明，反相微乳法提取的茶叶蛋白与碱法和酶法提取的蛋白相比，具有更好的溶解性和乳化性等功能特性[23]。根据 SDS-PAGE 电泳的结果可知，碱溶法提取的茶渣蛋白的分子带多于反转微乳法提取的茶叶蛋白。因此，可以知道反相微乳可以选择性地提取高活性的茶渣蛋白。

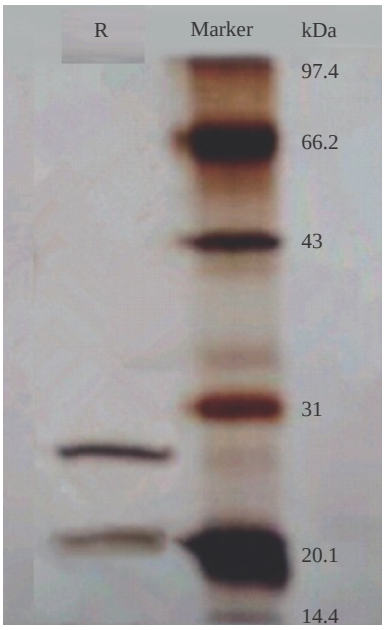


图 10　茶渣蛋白分子量

Fig.10　Molecular weight of tea residues protein

注：R 表示由 Tween80-CTAB 反相微乳提取的茶渣蛋白的分子量。

3　结论

本研究用非离子型表面活性剂（Tween80）和离子型表面活性剂（AOT、SDS、CTAB）制备了 3 种混合表面活性剂的反相微乳体系用于提取茶渣蛋白。实验结果表明，从茶叶残渣中提取高活性的茶叶蛋白，Tween80-CTAB 反相微乳是最佳选择，其最佳提取条件为表面活性剂浓度 0.10 mol/L，离子型表面活性剂含量 70%，pH13.0，W_0 25，萃取温度 40 ℃，萃取时间 40 min。在这种条件下，茶渣蛋白的前萃率为 16.17%。然后在最佳条件（氯化钾浓度为 1.2 mol/L，pH7.0，提取温度 40 ℃）下进行后萃实验后，得到其

最佳后萃率为 94.78%。这些数据证明了用反相微乳法从茶叶残渣中提取蛋白质的可行性，为如今大量存在的废弃茶渣提供了一个切实可行的处理方法，同时也减少了废弃茶渣对环境的污染。另一方面，未来的研究还需要进一步提高茶渣蛋白的前萃率，使茶渣能够得到更充分的利用。SDS-PAGE 结果显示，反相微乳可以选择性地提取分子量较小的高活性茶渣蛋白，这可能是前萃率较低的原因。

参考文献

[1] YANG C S, HONG J. Prevention of chronic diseases by tea: Possible mechanisms and human relevance[J]. Annual Review of Nutrition, 2013, 33(1): 161−181.

[2] MORIKAWA C K, SAIGUSA M. Recycling coffee grounds and tea leaf wastes to improve the yield and mineral content of grains of paddy rice[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2011, 91(11): 2108−2111.

[3] REN Z, CHEN Z, ZHANG Y, et al. Functional properties and structural profiles of water-insoluble proteins from three types of tea residues[J]. LWT, 2019, 110: 324−331.

[4] FUKUSHIMA Y, OHIE T, YONEKAWA Y, et al. Coffee and green tea as a large source of antioxidant polyphenols in the Japanese population[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2009, 57(4): 1253−1259.

[5] ZHANG Y, CHEN H, ZHANG N, et al. Antioxidant and functional properties of tea protein as affected by the different tea processing methods[J]. Journal of Food Science and Technology, 2015, 52(2): 742−752.

[6] LI R, WANG X, LIU J, et al. Relationship between molecular flexibility and emulsifying properties of soy protein isolate-glucose conjugates[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67: 4089−4097.

[7] LAI X, PAN S, ZHANG W, et al. Properties of ACE inhibitory peptide prepared from protein in green tea residue and evaluation of its anti-hypertensive activity[J]. Process Biochemistry, 2020, 92: 277−287.

[8] ZHANG C, BOZILEVA E, FRITS V, et al. Integration of galacturonic acid extraction with alkaline protein extraction from green tea leaf residue[J]. Industrial Crops & Products, 2016, 89: 95−102.

[9] AYIM I, MA H, ALENYOREGE E A. Optimizing and predicting degree of hydrolysis of ultrasound assisted sodium hydroxide extraction of protein from tea (*Camellia sinensis* L.) residue using response surface methodology[J]. Journal of Food Science and Technology, 2018, 55: 5166−5174.

[10] HAYES D G, YE R, DUNLAP R N, et al. Protein extraction into the bicontinuous microemulsion phase of a Water/SDS/pentanol/dodecane winsor-III system: Effect on nanostructure and protein conformation[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2017, 160: 144−153.

[11] AMIRI-RIGI A, ABBASI S. Microemulsion-based lycopene extraction: Effect of surfactants, co-surfactants and pretreatments [J]. Food Chemistry, 2016(197): 1002−1007.

[12] YEW HAN-CHOI, MISRAN M B. Nonionic mixed surfactant stabilized water-in-oil microemulsions for active ingredient *in vitro* sustained release[J]. Journal of Surfactants & Deterge, 2016, 19: 49-56.

[13] JALALI-JIVAN M, ABBASI S, FATHI-ACHACHLOUEI B. Lutein extraction by microemulsion technique: Evaluation of stability versus thermal processing and environmental stresses[J]. LWT- Food Science and Technology, 2021(16): 111839.

[14] YANG S, CHENG D, CHEN X, et al. A reverse microemulsion of water/AOT/1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate for selective extraction of hemoglobin[J]. Separation and Purification Technology, 2008, 64(2): 154−159.

[15] SHEN C W, YU T. Protein separation and enrichment by counter-current chromatography using reverse micelle solvent systems[J]. Journal of Chromatography A, 2007, 1151(1-2): 164−168.

[16] NEIRA-VIELMA A A, A ILINÁ, GM ÁLVAREZ, et al. Recovery and purification of *Aspergillus niger* phytase from crude extract using AOT/isooctane reversed micelles[J]. Biotechnology Reports, 2020: e00471.

[17] JAYACHANDRAN D, CHITYALA S, PRABHU A A, et al. Cationic reverse micellar based purification of recombinant glutaminase free L-asparaginase II of *Bacillus subtilis* WB800N from fermentation media[J]. Protein Expression and Purification, 2019, 157: 1−8.

[18] FATEHI P, BABA A S, SUK V R E, et al. Preparation and characterization of palm oil in water microemulsion for application in the food industry[J]. British Food Journal, 2020, 122: 3077−3088.

[19] ZHAO X, ZHANG X, LIU H, et al. Functional, nutritional and flavor characteristic of soybean proteins obtained through reverse micelles[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 74: 358−366.

[20] ZHANG L, CHEN F, ZHANG W, et al. Kinetics and characteristics of soybean oil and protein extracted by aot reverse micelle technology[J]. Journal of Chemistry, 2018, 2018: 1−11.

[21] 张倩, 陈复生. 反胶束萃取对大豆分离蛋白结构和特性的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(7): 108−113. [ZHANG Q, CHEN F S. Effect of reverse micellar extraction on structure and physicochemical properties of soybean protein isolate[J]. Food Science, 2019, 40(7): 108−113.]

[22] ZHU K X, SUN R H, CHEN R C, et al. Comparison of functional properties and secondary structures of defatted wheat germ proteins separated by reverse micelles and alkaline extraction and isoelectric precipitation[J]. Food Chemistry, 2010, 123(4): 1163−1169.

[23] 文静, 万紫媛, 解新安, 等. 反相微乳法与碱法、酶法制备的茶蛋白功能性质比较研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(7): 97−100. [WENG J, WAN Z Y, XIEX A, et al. Comparison of functional properties of tea protein in reverse micelles, alkali and enzymatic[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(7): 97−100.]

[24] WANG N N, WANG J R, LI Y, et al. Reverse microemulsion prepared by AOT/CTAB/SDS/Tween80 for extraction of tea residues protein[J]. Journal of Molecular Liquids, 2020, 320: 114474.

［25］ 高艳秀，陈复生，郭珍，等. 不同反胶束体系后萃取花生蛋白质的比较[J]. 中国粮油学报，2013(8)：12−18. ［GAO Y X, CHEN F S, GUO Z, et al. Comparison of the backward extraction of peanut protein in different reverse micelles[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2013(8): 12−18.］

［26］ AFERNI A E, GUETTARI M, TAJOURI T. Determination of the water/AOT/isooctane reverse micelles size parameters from their refractive index data[J]. Journal of Solution Chemistry, 2017, 46(1): 1−14.

［27］ ICHIKAWA S, IMAI M, SHIMIZU M. Solubilizing water involved in protein extraction using reversed micelles[J]. Biotechnology & Bioengineering, 1992, 39(1): 20−26.

［28］ CHEN C, TIAN H, XING S, et al. Influence of different parameters on reverse micelle extraction combined with acetone precipitation to purify sn-1, 3 extracellular lipase from *Aspergillus niger* GZUF36[J]. Journal of Food Science and Technology, 2019, 56(6): 2899−2908.

［29］ ZHAO X, ZHU H, CHEN J, et al. Effects of sodium bis(2-ethylhexyl) sulfo succinate (AOT) reverse micelles on physicochemical properties of soy protein[J]. Food & Bioproducts Processing, 2014, 94: 500−506.

［30］ ZHAO X Y, ZHANG X W, LIU H K, et al. Optimization of AOT reversed micelle forward extraction of 7S globulin subunits from soybean proteins[J]. Journal of Food Science & Technology, 2018, 55: 4909−4917.

［31］ 赵萍，佐玲，郭求实，等. SDS/正辛醇/异辛烷反胶束体系萃取葵花籽粕蛋白工艺研究[J]. 食品工业科技，2015，36(8)：262−267. ［ZHAO P, ZUO L, GUO Q S, et al. SDS/isooctane/octanol reverse micellar extraction process of sunflower seed meal protein[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(8): 262−267.］

［32］ 王丽敏，陈复生，刘昆仑，等. 超声波辅助不同反胶束体系萃取大豆蛋白的研究进展[J]. 粮食与油脂，2014，12(12)：5−8. ［[WANG L M, CHEN F S, LIU K L, et al. Research on progressing of soybean protein extraction in different reverse micelles by ultrasonic[J]. Cereals & Oils, 2014, 12(12): 5−8.］

［33］ GUO Z, CHEN F S, YANG H S, et al. Kinetics of protein extraction in reverse micelle[J]. International Journal of Food Properties, 2015, 18: 1707−1718.

［34］ 李润洁，布冠好，陈复生，等. SDS-Tween 60 混合反胶束体系萃取大豆蛋白工艺优化[J]. 粮食与油脂，2013，26(9)：14−19. ［LI R J, BU G H, CHEN F S, et al. Optimization of extraction of soybean protein by mixed reverse micelles composing of SDS-tween 60/isooctane-octanol[J]. Cereals & Oils, 2013, 26(9): 14−19.］

毕晓娟, 魏亮, 杨慧莹, 等. 响应面法优化元宝枫籽粕酶解工艺及多肽功能特性研究 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 204−214. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100138

BI Xiaojuan, WEI Liang, YANG Huiying, et al. Optimization of the Enzymatic Hydrolysis Process of *Acer truncatum* Seed Meal by Response Surface Methodology and the Functional Characteristics of the Polypeptide Obtained[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 204−214. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100138

· 工艺技术 ·

响应面法优化元宝枫籽粕酶解工艺及多肽功能特性研究

毕晓娟[1], 魏　亮[1], 杨慧莹[1], 于欣馨[2], 蒲铎文[2], 路　祺[1,*], 祖元刚[1]
（1.东北林业大学化学化工与资源利用学院, 黑龙江哈尔滨 150040;
2.东北林业大学林学院, 黑龙江哈尔滨 150040）

摘　要: 本文以元宝枫籽粕为原料，采用碱性蛋白酶法对元宝枫籽粕进行酶解，以酶解时间、加酶量、pH、酶解温度、料液比为考察因素，酶解多肽得率为评价指标，在单因素实验的基础上，根据 Box-Behnken 中心组合实验设计对元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽制备工艺进行优化，并对优化工艺获得的酶解多肽进行了氨基酸组成、吸水性、吸油性、起泡性质、乳化性质和表面疏水性等功能特性表征。结果表明：最优的酶解制备工艺为：酶解时间 3.3 h，pH 为 10，加酶量为 3%，酶解温度为 55 ℃。在最优制备工艺条件下元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽得率为 40.13%±0.15%。氨基酸组成分析表明酶解多肽所含八种必需氨基酸量高达 20.3%，远高于国际粮农组织所建议成人所需必需氨基酸量。此外，酶解多肽的吸油性（4.553 g/g）高于大豆蛋白（2.61 g/g），其表面疏水性（1365.3）与大豆 7S 球蛋白的表面疏水性相似，乳化性和乳化稳定性略低于大豆分离蛋白。本研究所获得的元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽具有较好的功能特性，这也表明它可作为一种潜在的功能成分应用于食品中，为元宝枫籽粕的新应用开发提供数据和理论支撑。

关键词: 元宝枫籽粕, 酶解多肽, 氨基酸分析, 响应面分析, 碱性蛋白酶
中图分类号: TS229　　**文献标识码:** B　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0204−11
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100138
本文网刊:

Optimization of the Enzymatic Hydrolysis Process of *Acer truncatum* Seed Meal by Response Surface Methodology and the Functional Characteristics of the Polypeptide Obtained

BI Xiaojuan[1], WEI Liang[1], YANG Huiying[1], YU Xinxin[2], PU Duowen[2], LU Qi[1,*], ZU Yuangang[1]
（1.College of Chemistry, Chemical Engineering and Resource Utilization, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China;
2.School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China）

Abstract: In this paper, *Acer truncatum* seed meal was hydrolyzed by alkaline protease method. The enzymatic hydrolysis time, enzyme dosage, pH, enzymatic hydrolysis temperature and solid-liquid ratio were investigated, and the yield of enzymatic hydrolysis polypeptide was taken as the evaluation index. On the basis of the single-factor experiments and the Box-Behnken central combination experimental design, the preparation process of alkaline protease hydrolyzed polypeptide of *Acer truncatum* seed meal was optimized. The amino acid composition, water absorption, oil absorption, foaming, emulsifying and surface hydrophobicity of the enzymatic hydrolyzed peptides were characterized. The results showed that the optimal enzymatic hydrolysis process was as follows: enzymatic hydrolysis time 3.3 h, pH10, enzyme dosage 3%, enzymatic hydrolysis temperature 55 ℃. Under the optimum preparation conditions, the yield of peptides hydrolyzed by

收稿日期: 2021−10−18
基金项目: 黑龙江省基金面上项目（C2018003）。
作者简介: 毕晓娟（1996−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 生物学, E-mail: b15776570507@163.com。
*** 通信作者:** 路祺（1974−）, 男, 博士, 副教授, 研究方向: 药物化学, E-mail: luqi42700473@126.com。

alkaline protease from *Acer truncatum* seed meal was 40.13%±0.15%. The analysis of amino acid composition showed that the amount of eight essential amino acids contained in the enzymatic hydrolysis polypeptide was as high as 20.3%, which was much higher than the amount of essential amino acids recommended by FAO. In addition, the oil absorption of enzymatic hydrolysis polypeptide (4.553 g/g) was higher than that of soybean protein (2.61 g/g), its surface hydrophobicity (1365.3) was similar to that of soybean 7S globulin, and its emulsifying property and emulsifying stability were slightly lower than that of soybean protein isolate. The alkaline protease hydrolyzed polypeptide of *Acer truncatum* seed meal obtained in this study had good functional characteristics, which also showed that it could be used as a potential functional component in food, providing data and theoretical support for the new application and development of *Acer truncatum* seed meal.

Key words: *Acer truncatum* seed meal; enzymolysis polypeptide; amino acid analysis; response surface analysis; alkaline protease

元宝枫（*Acer truncatum* Bunge.）又名元宝槭，隶属于槭树科槭树属[1−2]，是一种落叶乔木，主要分布在吉林、辽宁、内蒙古、河北、山西、山东、陕西、及甘肃等地区。作为我国特有的食用木本油料树种，元宝枫籽仁含油率为 42.6%[3]，元宝枫籽油富含神经酸[4]，被认为是一种优良的食用油[5]，其籽仁中蛋白质含量也仅次于大豆[6]。卫生部已于 2011 年 3 月将元宝枫籽油列入新的资源食品[7]。目前，我国元宝枫种植面积已超过 4×10^4 公顷[8]，每年籽粒产量约为 30×10^4 吨，如果将全部种仁用于生产籽油，每年可产生 19.5×10^4 吨左右的元宝枫籽粕剩余物。元宝枫籽粕剩余物不仅蛋白质含量高（52%），而且所含蛋白为不含淀粉的完全蛋白质。当前关于元宝枫的开发研究还主要集中在油的提取、食用、保健，以及药理特性方面[9−11]。对于元宝枫籽粕剩余物应用的研究甚少，仅仅有少量应用于酿制酱油、生产饲料、肥料等[12−14]，大部分被堆弃，这就造成了严重的资源浪费和环境污染。因此，元宝枫籽粕开发利用研究迫在眉睫。

多肽是蛋白质水解的中间产物，与蛋白质相比，其转换后的多肽具有分子量小，利于人体吸收和较强的生理活性等优点[15]。通常制备多肽的方法有：生物提取法[16−17]、微生物发酵法[18−19]、合成法[20−21]、化学法[22] 和酶解法[23] 等。Fu 等[24] 利用高氯酸从牛肉中提取内源性活性肽，由于提取流程复杂，难度比较大，投入成本高，活性肽产量少，不能满足人们的需求[25]，因而不具备实际生产价值；王文江等[26] 利用黑曲霉发酵法制备山杏多肽，微生物发酵法虽然具有繁殖速度快，生长周期较短等优势，但很多的产酶菌有毒或对人体有害，目前已经证明无毒，可以用于食品开发的菌种并不多，安全问题、作用机理成为阻碍微生物发酵法制备活性肽的最大障碍；Yu 等[27] 采用固相多肽合成的方法，先确定目标肽段中氨基酸的组成及排列顺序，然后分步合成抗癌生物活性肽。但该方法存在副反应多，不易控制，产生的肽活性低，多样性差等缺点。化学方法是用酸或碱水解，酸碱水解虽然简单，成本低，但不易控制生产，生产条件较苛刻，所获氨基酸营养价值有所降低，目前此方法很少采用[28−29]。酶解法是近年来发展比较快的一种获取生物活性肽的方法，它具有稳定性好、可操作性强、反应条件比较温和、多肽制备效率高、周期短、安全性高、生产成本低等优点。安兆祥等[30] 采用碱性蛋白酶提取黑木耳蛋白，所提取的黑木耳蛋白具有较好的溶解性、乳化性、乳化稳定性、泡沫稳定性。程赞等[31] 采用碱性蛋白酶对核桃分离蛋白进行酶解，发现酶解后所获得的核桃分离蛋白吸水性、吸油性、溶解性、乳化性和起泡性有了明显改善。综上所述，酶解法的应用更为广泛，发展前景更好。

目前，关于元宝枫籽粕酶解工艺及其多肽功能特性方面的研究较少。本研究采用碱性蛋白酶酶解法制备元宝枫籽粕酶解多肽。通过单因素实验和 Box-Behnken 中心组合试验设计，确定了元宝枫籽粕酶解多肽的最优制备工艺条件。并对元宝枫籽粕酶解多肽进行氨基酸成分分析和功能特性测定，以期为元宝枫籽粕酶解多肽的提取和高值化利用提供数据和理论支撑。减少废弃物对环境污染同时，也对资源进行了合理利用，具有重要的经济意义和生态意义。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

元宝枫籽粕　陕西金旺农林科技有限公司；8-苯胺基-1-萘磺酸钠（ANS）　上海麦克林生物科技有限公司；十二烷基硫酸钠（SDS）　天津百伦斯生物技术有限公司；碱性蛋白酶（200 U/mg）　上海源叶生物科技有限公司；大豆色拉油　九三粮油工业集团有限公司；其余试剂　均为国产分析纯。

多功能粉碎机（QJ-20）　上海兆申科技有限公司；紫外-可见光分光光度计（UV-5500）　上海元析仪器有限公司；荧光分光光度计（F-700）　天美（中国）科学仪器有限公司；电子调温加热套（98-1-B）　天津市泰斯特仪器有限公司；高速电动匀浆器（FSH-II）　江苏金坛市环宇科学仪器厂。

1.2　实验方法

1.2.1　原料预处理　将元宝枫籽粕机械粉碎，并使用 40 目筛过滤，得到元宝枫籽粕粉，置于 0~4 ℃ 冰箱封存供后续使用。脱油处理：按料液比 1∶10，石油醚回流提取时间 4.0 h，重复提取 3 次，60 ℃ 烘干得

到脱油后元宝枫籽粕粉末样品。脱糖处理: 按照料液比 1∶20 g·mL^{-1} 将脱油后的元宝枫籽粕粉末, 沸水回流提取 4.0 h, 在 8000 r·min^{-1} 下离心 5 min, 将离心后的沉淀于 105 ℃ 烘箱中烘干, 得到脱油脱糖粉, 储存在棕色干燥器中, 供后续实验使用。

1.2.2 碱性蛋白酶酶解多肽的制备 称取一定质量的脱油脱糖元宝枫籽粕粉 121 ℃ 灭菌 15 min 后, 用氢氧化钠和盐酸将样品溶液调整到适当 pH, 加入适量的碱性蛋白酶, 预设环境下进行酶解, 反应结束后, 沸水浴中灭活 15 min, 在 5000 r·min^{-1} 下离心 10 min, 取上清液装于截留分子质量为 3000 Da 的透析袋中透析, 每 4 h 更换一次透析液, 直至透析液 pH 为中性不在发生变化为止, 透析后溶液冻干, 得到元宝枫籽粕粉酶解多肽, 0~4 °C 低温保存, 用于后续实验。酶解多肽得率(Y_1)的计算公式如下:

$$Y_1(\%) = \frac{m_1 \times c}{m_2} \times 100 \qquad \text{式（1）}$$

式中: m_1—冻干所获得样品质量, g; c—冻干所获得样品中多肽的含量, %; m_2—酶解前元宝枫籽粕(去油去糖)的质量, g。

1.2.3 单因素实验 固定料液比 1∶20 g·mL^{-1}, 加酶量 3%, 酶解温度 55 ℃, 酶解体系 pH10, 酶解时间 3 h, 在上述工艺条件下, 以酶解多肽得率为响应值, 分别探讨酶解时间(0.5、1、2、3、4 h)、加酶量(0.3%、1.5%、3%、15%、30%)、酶解温度(25、40、55、70、85 ℃)、酶解体系 pH(4、6、8、10、12)、料液比(1∶10、1∶20、1∶30、1∶40、1∶50 g·mL^{-1})5 个因素对元宝枫籽粕酶解多肽得率的影响。每个实验重复 3 次, 取均值。

1.2.4 响应面法优化酶解工艺 根据 Box-Behnken 中心组合实验的设计原理, 在单因素实验基础上, 以多肽得率为响应值, 进行四因素三水平响应面分析试验(见表 1), 四个因子分别为酶解时间(h)、加酶量(%)、酶解温度(℃)和酶解体系 pH, 试验总共设计 29 个试验点, 其中包括 5 个中心点用来验证试验误差。

表 1 响应面试验因素与水平

Table 1 Response surface test factors and levels

因素	水平		
	−1	0	1
A酶解体系pH	8	10	12
B加酶量(%)	2	3	4
C酶解时间(h)	2	3	4
D酶解温度(℃)	40	55	70

1.2.5 酶解多肽氨基酸组成分析 参照 Jin 等[32] 的方法, 称取一定量的酶解多肽样品, 加入 6.0 mol/L HCl, 氮气保护下密封在玻璃管中, 110 °C 水解 24 h。使用超纯水将过滤后的水解液稀释至 50.0 mL。取 1.0 mL 溶液在 45 ℃ 真空脱酸, 再用 5.0 mL 0.1 mol/L HCl 溶解。另外, 进行色氨酸含量分析时, 称取一定量的酶解多肽样品, 4.0 mol/L LiOH 在氮气保护下加入到聚四氟乙烯管中, 110 ℃ 下水解 24 h。水解产物过滤后, 用 6.0 mol/L 盐酸中和至 pH2.2。加入超纯水, 定容到 100.0 mL。酶解多肽的氨基酸组成成分采用 A300 氨基酸分析仪(德国)进行分析, 依据不同氨基酸积峰面积和相应标准曲线来计算相应氨基酸含量, 即 $C_{氨基酸}=f(A_{氨基酸})$。

1.2.6 元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽功能特性的测定

1.2.6.1 元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽溶解度 元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽与水混合, 用 1.0 mol/L NaOH 和 HCl 将混合物的 pH 调节至 2.0~12.0。室温下搅拌 30 min, 5000 r·min^{-1} 离心 5 min, 通过凯氏定氮法[33] 确定样品中的总蛋白质浓度和上清中的蛋白浓度, 6.25 作为转换因子。平行测定三次, 并通过蛋白质的浓度(%)与 pH 作图来获得溶解度曲线。溶解度(P)的计算方法如下:

$$P(\%) = \frac{W_1}{W_2} \times 100 \qquad \text{式（2）}$$

式中: W_1—上清中蛋白的浓度, mg·mL^{-1}; W_2—样品中总蛋白的浓度, mg·mL^{-1}。

1.2.6.2 元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽吸油性和吸水性 根据 Monteiro 等[34] 方法测定元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽的吸油性或吸水性。称 0.5 g 元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽, 于离心管中。缓慢向离心管中加入 5 mL 的大豆油或超纯水, 涡旋振荡器充分振荡混匀后, 室温静置 0.5 h 后, 5000 r·min^{-1} 离心 10 min, 准确测量上清液体积。以每克样品吸附油或水的体积来评估其吸油性或吸水性。

1.2.6.3 元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽乳化性及乳化稳定性 根据 Pearce 等[35] 的方法对元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽的乳化特性进行测定。用乳化活性指标(EAI)和乳化稳定性(ES)评估元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽的乳化活性。准确称取 100 mg 元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽, 分散于 100 mL 的蒸馏水中, 置于涡旋振荡器上室温振荡溶解, 用 1.0 mol/L NaOH 和 HCl 调节酶解多肽溶液 pH 为 2、4、6、8、10, 加入 15 mL 大豆油 10000 r·min^{-1} 室温匀浆 2 min。用移液器在 0 和 5 min 时迅速从容器底部取样 50 μL 乳状液置于 10 mL 离心管中, 再加入 4.95 mL 的 SDS(0.1%)溶液, 涡旋振荡器振荡混匀 30 s。在 500 nm 的条件下, 测定样品的吸光值。乳化活性指标(EAI)和乳化稳定性(ES)的计算方法如下:

$$EAI(m^2/g) = \frac{2 \times 2.303 \times A_0}{C \times \varphi \times 10^4} \times N \qquad \text{式（3）}$$

$$ES(min) = \frac{A_0}{A_0 - A_5} \times \Delta t \qquad \text{式（4）}$$

式中：N—稀释倍数；C—蛋白质的质量分数（$g \cdot mL^{-1}$）；φ—混合体系油的体积分数；A_0—0 min 时乳化液的吸光值；A_5—5 min 后乳化液的吸光值；△t—5 min。

1.2.6.4　元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽起泡性和起泡稳定性　根据 Booma 等[36] 的方法对元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽起泡性和起泡稳定性进行测定。称取一定质量的元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽样品，用蒸馏水将其配制成浓度为 50 $mg \cdot mL^{-1}$ 溶液。取 10 mL 样品溶液，调节 pH 为 2、4、6、8、10，10000 $r \cdot min^{-1}$ 高速均浆 3 min。将酶解多肽溶液移到量筒中，测量此时的泡沫体积（记为 V），在室温静置，并间隔不同的时间（0、5、10、20、30 min）测量此时泡沫的体积（记为 V_1）。起泡性（FC）和起泡稳定性（FS）的计算公式如下：

$$FC(\%) = \frac{V}{10\ mL} \times 100 \qquad 式（5）$$

$$FS(\%) = \frac{V_1}{V} \times 100 \qquad 式（6）$$

式中：V—在 0 min 时溶液的气泡体积，mL；V_1—在 5、10、20、30 min 时的泡沫体积，mL。

1.2.6.5　元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽表面疏水性　元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽的表面疏水性通过荧光探针（ANS）的方法进行测定[37−38]。10 mg 酶解多肽样品悬浮在 10 mL 磷酸缓冲液中（0.01 mol/L，pH7），250 $r \cdot min^{-1}$ 低速搅拌 2 min，通过磷酸缓冲液将酶解多肽样品溶液对半稀释成不同浓度。取 4 mL 酶解多肽溶液，加入 20 μL 8 mmol/L 的 ANS（用 0.01 mol/L PBS 溶液配置）溶液后，混匀、避光静置 5 min 后 10000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 5 min，取上清液用荧光光度计测定酶解多肽样品的荧光强度（Fluorescenceintensity，FI）。设置酶解多肽样品的激发波长、发射波长、狭缝宽度分别为 287、352、5 nm，图像自变量为酶解多肽的浓度，因变量为荧光强度（FI），初始斜率为酶解多肽的表面疏水性指数。

1.3　数据处理

使用 Design-Expert 10.0.1 软件进行 Box-Behnken 试验设计及响应面试验数据处理，并对实验数据进行方差分析及二次多项式回归拟合。每组实验数据设置 3 个平行，实验数据以平均值±标准误差来表示，采用 Excel 和 Origin 2018.0 进行数据和图像处理并生成图片。

2　结果与分析

2.1　单因素实验结果

2.1.1　酶解时间对元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽得率的影响　在其他因素固定条件下，比较不同酶解时间对元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽得率的影响（见图 1A）。可以看出，元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽得率随着酶解时间的不断延长表现为先上升的趋势，在 3 h 时到达峰值，而后趋势逐渐下降。因此，选择酶解时间为 3 h。

2.1.2　加酶量对元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽得率的影响　同样固定其他反应条件不变，比较不同加酶量对元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽得率的影响（见图 1B）。可以看出，随着碱性蛋白酶用量的增加，元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽得率表现为先急剧增加的趋势，而后趋于平缓，即当碱性蛋白酶用量超过 3% 时，元宝枫籽粕碱性蛋白酶的多肽得率变化不明显。因此，考虑到加工成本，选择加酶量 3%。

2.1.3　pH 对元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽得率的影响　同样固定其他反应因素不变，比较不同 pH 对元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽得率的影响（见图 1C）。从图可以看出，随着溶液体系 pH 逐渐升高，元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽得率也逐渐增加。当溶液体系 pH 超过 10 时，元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽得率略有降低。这是过量的碱影响了酶分子的特殊构象，使碱性蛋白酶的活性受到抑制。因此，溶液体系 pH 选为 10。

2.1.4　酶解温度对元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽得率的影响　同样固定其他反应因素不变，比较不同酶解温度对元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽的得率呈现逐渐增加的趋势。而当反应温度高于 55 ℃ 时，随着反应温度的增加，元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽得率呈现逐渐降低的趋势。因此，酶解温度选定为 55 ℃。

2.1.5　料液比对元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽得率的影响　同样固定其他反应因素不变，比较不同料液比对元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽得率的影响（见图 1E）。增加料液比，元宝枫籽粕碱性蛋白酶解多肽得率急剧增加。当料液比超过 1∶20（$g \cdot mL^{-1}$）时，元宝枫籽粕碱性蛋白酶解多肽得率趋于平缓，多肽得率增加不明显。因此，选择料液比为 1∶20（$g \cdot mL^{-1}$）。

2.2　响应面试验结果

2.2.1　回归方程与检验　对表 2 酶解多肽得率（Y）的实验数据进行多元回归拟合后，得到元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽的酶解多肽得率对 pH（A）、加酶量（B）、酶解时间（C）、酶解温度（D）各因素变量的多元二次回归方程为：

$$Y(\%)=39.68+1.49A+2.24B+2.48C-0.57D-0.21AB-0.45AC+0.20AD+0.14BC-0.13BD+0.69CD-2.43A^2-4.87B^2-3.40C^2-1.83D^2$$

如表 3 所示，对元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽得率来说，模型 F 值为 107.95（$P<0.01$），说明该模型显著性良好，失拟项（$P=0.4267>0.05$）不显著，说明回归模型拟合程度良好。其中，$R^2=0.9908$，单因素变量可以解释 99.08% 的响应值变化。模型一次项 A、B 和 C，交互项 CD 和二次项 A^2、B^2、C^2、D^2 对元宝枫

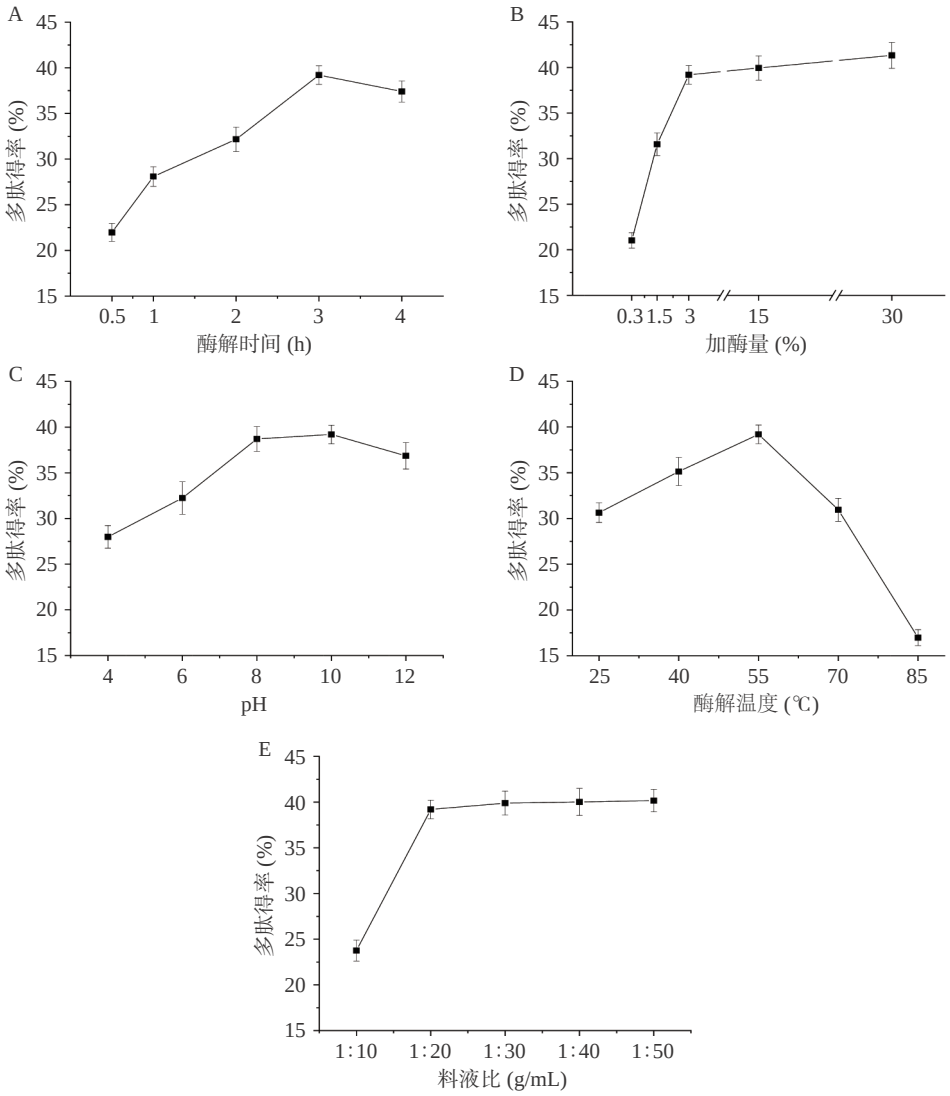


图 1 各个单因素对多肽得率的影响

Fig.1 Effect of each single factor on polypeptide yield

籽粕碱性蛋白酶酶解多肽得率的影响极显著($P<0.01$)，如表 4 所示，校正系数 R^2_{Adj}=0.9816，表明仅有总变量的 1.84% 不能用此模型来解释，R^2 与 R^2_{Adj} 二者之差小于 0.2，更加验证回归方程和实验结果一致性较高。变异系数(CV)为 1.44%(<5%)，信噪比 35.974(>4)，均表明该回归方程精度和可信性比较高，可以用该模型分析并确定制备元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽的最佳工艺参数。

2.2.2 响应面曲面分析 酶解时间、酶解温度、溶液体系 pH、加酶量对元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽得率影响的三维立体图以及等高线图(如图 2)。由图可知，元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽得率与 4 个因素的三维立体图抛物面的开口均向下，有最大值，等高线图近似呈椭圆形，各个因素之间存在交互作用，由图 2k 可知，元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽得率随着酶解时间和酶解温度增大呈现先上升后下降趋势，等高线图(如图 2l)较为密集，图形接近椭圆形，说明酶解时间和酶解温度交互作用对元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽得率影响显著。根据系数估计值绝对值的大小，4 个因素对多肽得率的影响大小依次为：C(酶解时间)>B(加酶量)>A(pH)>D(酶解温度)。

2.2.3 元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽最优工艺条件验证 由 Design Expert 10.0.1 软件分析，得到最优的工艺条件为：酶解时间为 3.30 h，加酶量为 3.01%，酶解温度为 52.29 ℃，pH 为 10.25，元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽得率的预测值为 40.2682%。考虑实际的操作性，对工艺参数进行调整：酶解时间为 3.30 h，加酶量为 3%，酶解温度为 55 ℃，pH 为 10。进行 3 次验证实验，最后实际酶解多肽得率为 40.13%±0.15%，与预测值相差 0.1382。较为接近，表明优化的试验条件较为可信，具有实际应用价值。

2.3 元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽氨基酸组成分析

元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽的氨基酸组成分析如图 3A。从图可以看出，元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽中所检测到的十八种氨基酸含量均高于原料，其中含量最高的是谷氨酸(Glu)(8.096%)，然后是脯氨酸(Pro)(5.719%)和亮氨酸(Leu)(4.731%)，

表 2　响应面试验设计及试验结果

Table 2　Response surface test design and test results

编号	A	B	C	D	Y多肽得率(%)
1	−1	−1	0	0	28.13
2	1	−1	0	0	32.07
3	−1	1	0	0	33.66
4	1	1	0	0	36.75
5	0	0	−1	−1	33.35
6	0	0	1	−1	36.85
7	0	0	−1	1	31.21
8	0	0	1	1	37.46
9	−1	0	0	−1	34.79
10	1	0	0	−1	37.48
11	−1	0	0	1	32.94
12	1	0	0	1	36.44
13	0	−1	−1	0	27.07
14	0	1	−1	0	30.85
15	0	−1	1	0	31.67
16	0	1	1	0	36.03
17	−1	0	−1	0	29.44
18	1	0	−1	0	32.68
19	−1	0	1	0	35.42
20	1	0	1	0	36.87
21	0	−1	0	−1	31.06
22	0	1	0	−1	35.61
23	0	−1	0	1	30.11
24	0	1	0	1	34.14
25	0	0	0	0	39.95
26	0	0	0	0	39.16
27	0	0	0	0	39.28
28	0	0	0	0	40.22
29	0	0	0	0	39.78

表 3　响应面回归模型及方差分析结果

Table 3　Response surface regression model and analysis of variance results

方差来源	离差平方和	自由度	均方和	*F*值	*P*值	显著性
模型	371.98	14	26.57	107.95	<0.0001	**
pH(A)	26.73	1	26.73	108.60	<0.0001	**
加酶量(B)	60.44	1	60.44	245.53	<0.0001	**
酶解时间(C)	73.51	1	73.51	298.64	<0.0001	**
酶解温度(D)	3.90	1	3.90	15.84	0.0014	**
AB	0.18	1	0.18	0.73	0.4061	
AC	0.80	1	0.80	3.25	0.0928	
AD	0.16	1	0.16	0.67	0.4280	
BC	0.084	1	0.084	0.34	0.5682	
BD	0.068	1	0.068	0.27	0.6084	
CD	1.89	1	1.89	7.68	0.0150	*
A^2	38.15	1	38.15	155.00	<0.0001	**
B^2	153.54	1	153.54	623.78	<0.0001	**
C^2	74.83	1	74.83	304.01	<0.0001	**
D^2	21.70	1	21.70	88.16	<0.0001	**
残差	3.45	14	0.25			
失拟项	2.64	10	0.26	1.31	0.4267	
误差项	0.80	4	0.20			
总和	375.43	28				

注：*表示差异显著（$P<0.05$）；**表示差异极显著（$P<0.01$）。

这表明经过碱性蛋白酶处理后元宝枫籽粕的多肽含量有了很大程度的提高，这也与核桃多肽的氨基酸组成具有相似性[39]，必需氨基酸与非必需氨基酸的比值为 0.6238，高于大豆蛋白（0.4804）[40]。元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽所含八种必需氨基酸的含量高达 20.3%，远高于国际粮农组织所建议成人所需必需氨基酸的量（10.75%）[41]。另外，除不含有谷氨酰胺（Gln）和天冬酰胺（Asn），元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽含有其他全部十二种非必需氨基酸。通过对元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽氨基酸的增量进行分析（见图 3B），可以看出经过碱性蛋白酶酶解处理后，氨基酸增量最大的为脯氨酸（Pro），其次是谷氨酸（Glu）、苏氨酸（Thr）和亮氨酸（Leu）。其中，脯氨酸不仅可以有效清除自由基，还可用于营养不良、蛋白质缺乏症和胃肠道疾病治疗[42]，谷氨酸属于呈味氨基酸的一种[43]，苏氨酸和亮氨酸属于人体八种必需氨基酸，这些都表明元宝枫籽粕经过碱性蛋白酶后所获得的酶解多肽具有更高的营养价值。

表 4　回归方程的可信度分析

Table 4　Reliability analysis of regression equation

类别	指标
标准误差(Std.Dev)	0.50
R^2	0.9908
R^2_{Adj}	0.9816
预测复R^2	0.9561
精确度(%)	1.44
平均值	34.50
信噪比	35.974

2.4　元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽的溶解度

元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽溶解度受溶液体系 pH 的影响比较明显（如图 4），在 pH 为 2~12 范围内，元宝枫碱性蛋白酶酶解多肽的溶解度图形呈“V”形，pH 为 4 时溶解度最小。这与王性炎等[44]报道的在等电点处溶解度较低的结果相似，随着 pH 从 4 逐渐增加到 10，元宝枫碱性蛋白酶酶解多肽的溶解度逐渐增大，这可能是因为在碱性环境条件下，蛋白质分子和水之间的相互作用增大，从而导致溶解度的增大。在茶籽多肽[45]中也观察到类似的 pH 溶解度曲线。

2.5　元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽吸水性和吸油性

吸水性和吸油性用来表示多肽分子与水（油）相的结合能力。元宝枫碱性蛋白酶酶解多肽的吸水性为 2.02 mL/g（即 2.02 g/g）与冷榨大豆饼粉的吸水性（2.27 g/g）较为接近，吸水性在食品加工过程中对食品的黏性，可塑性以及样品流动性具有很大的影响。Aletor 等报道建议蛋白质的持水性在 1.49 到 4.72 g/g 范围内就可以应用在有一定粘性的食品中[46]。元宝枫碱性蛋白酶酶解多肽吸油性为 4.95 mL/g（即 4.553 g/g）要高于大豆蛋白的吸油性（2.61 g/g）[47]，蛋白质的吸油性是影响食品风味的保留，具有延长保质期的功能特性[48]。因此，元宝枫碱性蛋白酶酶解多肽可以作为食品中的一种潜在的功能成分，如烘焙型产品和乳液型食品。

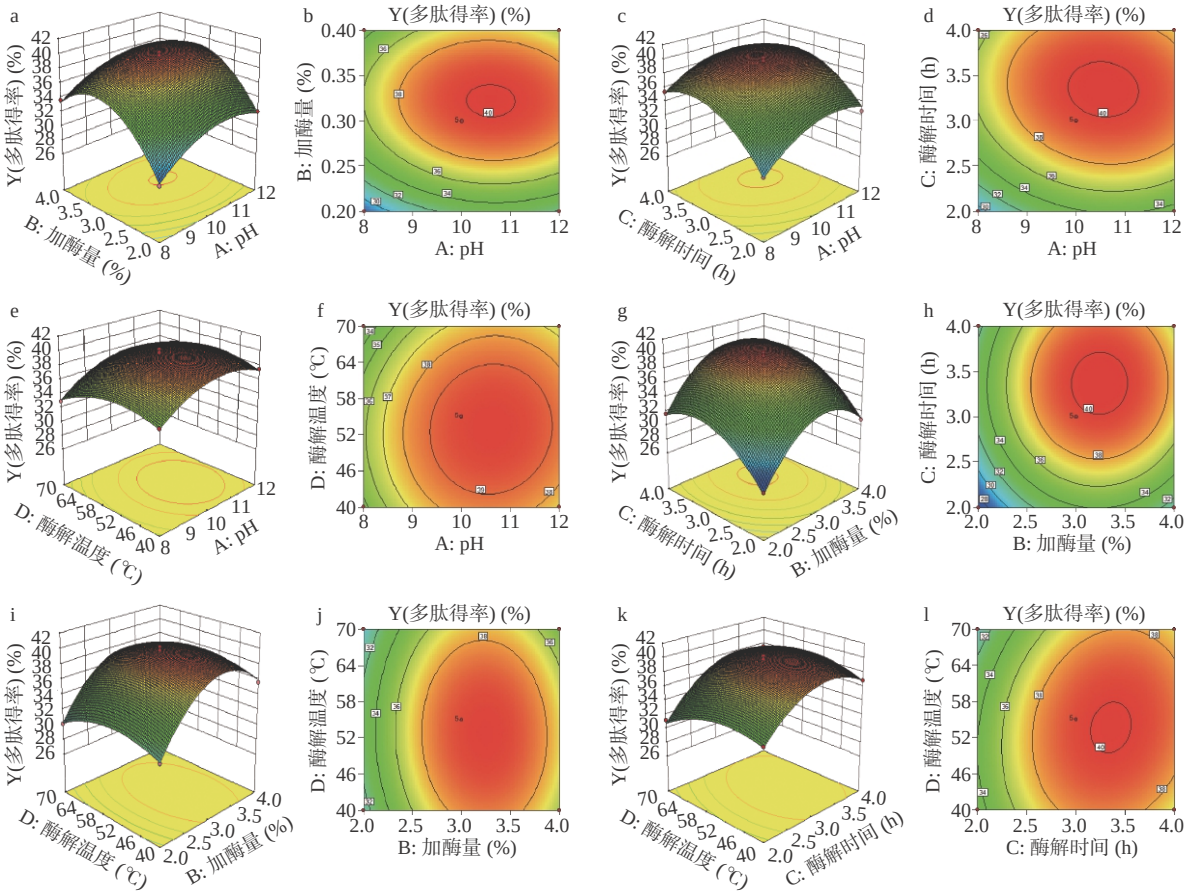


图 2　各因素交互作用对多肽得率影响的响应面图

Fig.2　Response surface diagram of the interaction of various factors on the yield of peptides

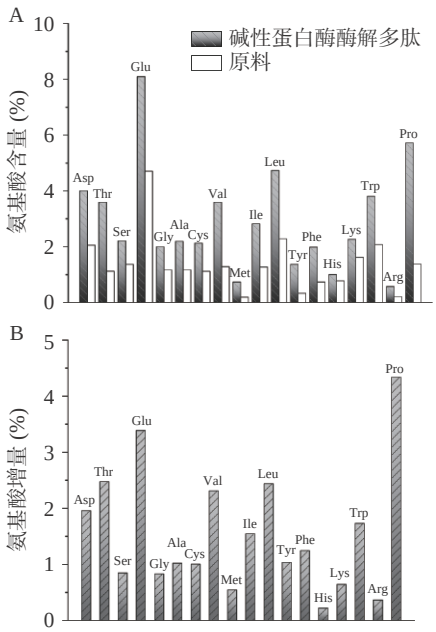


图 3　氨基酸图

Fig.3　Amino acid diagram

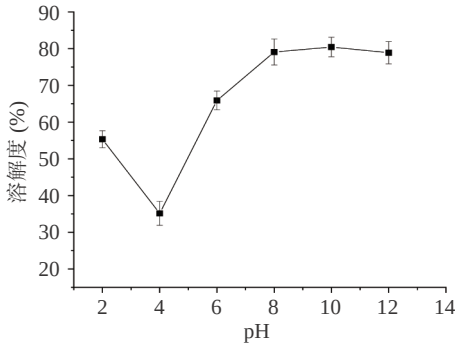


图 4　多肽的溶解度

Fig.4　Solubility of peptides

2.6　元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽乳化性和乳化稳定性

蛋白质乳化性是指蛋白质能够使油和水之间形成乳状液的能力，而在一定时间内，维持乳状液分散体系稳定而不破碎的能力称为乳化稳定性。由图 5 可知，随着溶液体系 pH 的不断变化，元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽的乳化性和乳化稳定性也不断变化。当溶液体系 pH4 时，多肽的乳化性较小，原因可能是 pH4 临近蛋白质等电点，此处静电荷较少，导致元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽聚集形成沉淀，溶解度较低，乳化性较低。酶解多肽的乳化性及乳化稳定性随着 pH 增加(4~10)而逐渐增强。碱性环境下，酶解多肽所带负电荷对多肽在水油界面乳状液的形成更加有利[49]。另外，酶解多肽在碱性环境下，较高的溶解度有利于增大水油间相互作用力，使酶解多肽乳化活性增加[50]。元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽乳化性和乳化稳定性略低于大豆分离蛋白乳化性和乳化稳定性[51]。

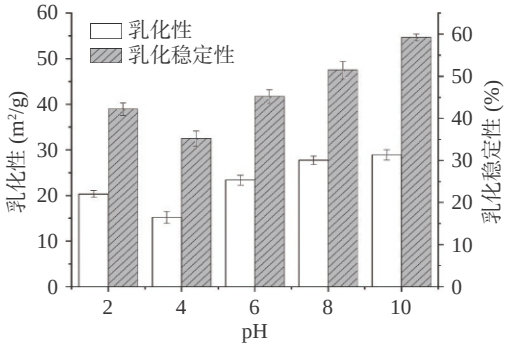


图 5　元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽的乳化性和乳化稳定性

Fig.5　Emulsifying property and emulsifying stability of polypeptides hydrolyzed by alkaline protease from *Acer truncatum* seed meal

2.7　元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽起泡性和起泡稳定性

从图 6A 能够看出，元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽的起泡性在 pH4 时较低，这是因为在临近等电点时，酶解多肽的溶解度比较低，溶液中较低的多肽浓度导致形成泡沫的数量比较少，不利于多肽分子在界面形成刚性膜[52−55]。随着 pH 的增加，酶解多肽的起泡性逐渐增强，这主要是因为酶解多肽的溶解度随着溶液体系 pH 的增大而逐渐增加，且在 pH10 时起泡性达到最大值。而元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽的起泡稳定性呈现逐渐增加的趋势(见图 6B)，这是由于随着 pH 的增大，酶解多肽的溶解度增加，增强分子间的作用，形成的泡沫的稳定性也增强[56]，元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽起泡性低于大豆酶解分离蛋白，其起泡稳定性与大豆酶解分离蛋白相当[57]。

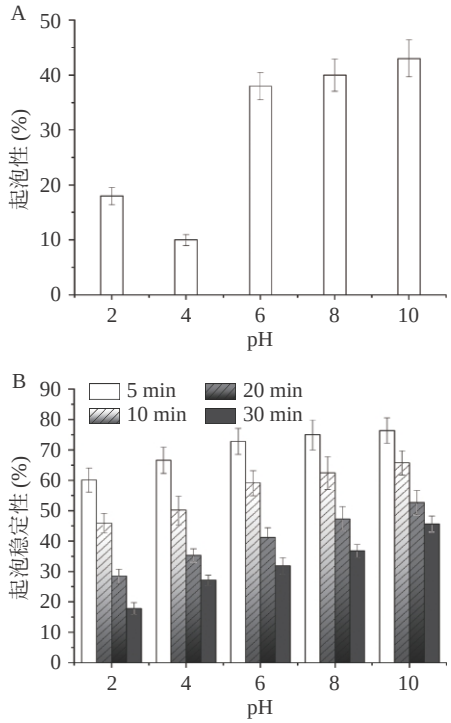


图 6　元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽起泡性和起泡稳定性

Fig.6　Foaming property and foaming stability of polypeptides hydrolyzed by alkaline protease from *Acer truncatum* seed meal

2.8　元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽表面疏水性

元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽表面疏水性主要反映的是多肽分子疏水集团的暴露程度，可以用来表征多肽的分子构象及其稳定性。实验结果表明元宝枫籽粕碱性蛋白酶解多肽的表面疏水性为 1365.3，这与范丽丽等[58] 的研究以微生物转谷氨酰胺酶素交联处理大豆 7S 球蛋白的表面疏水性结果相似。

3　结论

本研究以元宝枫籽粕剩余物为原料，通过碱性蛋白酶酶解方式获得酶解多肽，在单因素实验的基础上，采用响应面优化法对酶解工艺进行优化，获得了最优制备工艺条件。在最优制备工艺条件下元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽得率与理论值接近，响应面模型准确可靠，具有实际应用价值。

通过对元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽氨基酸成分分析，酶解多肽中所含八种必需氨基酸的含量远高于国际粮农组织所建议成人所需必需氨基酸的含量。除了不含有谷氨酰胺(Gln)和天冬酰胺(Asn)，酶解多肽含有其他全部十二种非必需氨基酸。经过碱性蛋白酶酶解处理后，氨基酸增量最大的为脯氨酸(Pro)，其次是谷氨酸(Glu)、苏氨酸(Thr)和亮氨酸(Leu)，这些都表明元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽具有较高的营养价值。另外，元宝枫籽粕碱性蛋白酶酶解多肽具有一定的吸水性和吸油性，可作为一种潜在的功能成分应用于食品中。

元宝枫籽油已经列入新资源食品，目前关于元宝枫的开发研究主要集中在元宝枫籽油方面，而对于元宝枫籽油加工剩余物方面的研究甚少，元宝枫籽粕的开发利用研究迫在眉睫。本研究将为元宝枫籽粕开发应用提供数据和理论支撑，有助于发现元宝枫籽粕新的潜在应用，为元宝枫籽仁的高值化利用奠定了基础。元宝枫籽仁蛋白属于全价蛋白，不含淀粉，可针对特殊人群开发成食品，用于糖尿病人、营养不良、蛋白质缺乏症和胃肠道疾病治疗。未来还需对元宝枫籽粕酶解多肽体外、体内生理活性以及作用机制进行深入的研究，开发一些功能性产品。最终实现元宝枫籽粕剩余物的综合利用率，提高资源的利用效率。

参考文献

[1] LI Q, CHEN J, YU X, et al. A mini review of nervonic acid: Source, production, and biological functions[J]. Food Chemistry, 2019, 301: 125286.

[2] CHEN G, XIE Y, YANG Y, et al. Natural therapeutic agents for neurodegenerative diseases from the shells of *Xanthoceras sorbifolium*[J]. Bioorganic Chemistry, 2020, 101: 104038.

[3] 魏伊楚, 樊金拴, 徐丹. 元宝枫油成分、加工工艺及功能性研究进展[J]. 中国油脂, 2018, 43(1): 34−38. [WEI Yichu, FAN Jinshuan, XU Dan. Advance in component, processing and functionality of *Acer truncatum* Bunge. seed oil[J]. China Oils and Fats,

2018, 43(1): 34−38.]
[4] HU P, XU X B, YU L L. Interesterified trans-free fats rich in sn-2 nervonic acid prepared using *Acer truncatum* oil, palm stearin and palm kernel oil, and their physicochemical properties[J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 76: 156−163.
[5] 刘祥义, 付惠, 陈玉惠. 元宝枫油理化特性及脂肪酸组成研究[J]. 中国油脂, 2003, 28(3): 66−67. [LIU Xiangyi, FU Hui, CHEN Yuhui. Study on the physico-chemical properties and fatty acid composition of *Acer truncatum* Buge oil[J]. China Oils and Fats, 2003, 28(3): 66−67.]
[6] 王琨, 刘少波, 张娜, 等. 元宝枫研究进展[J]. 西北林学院学报, 2021, 36(3): 52−157,280. [WANG Kun, LIU Shaobo, ZHANG Na, et al. Research progress on *Acer truncatum*[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2021, 36(3): 52−157,280.]
[7] 中华人民共和国卫生部公告 2011 年第 9 号 [J]. 中国食品添加剂, 2011(2): 264−264. [Announcement of the Ministry of health of the people's Republic of China No. 9 of 2011[J]. China Food Tim Additive, 2011 (2): 264−264.]
[8] QIAO Q, XUE W, FENG Z. Variability of seed oil content, fatty acid composition, and nervonic acid content in *Acer truncatum*, native to 14 regions of China[J]. Grasasy Aceites, 2018, 69(4): 274.
[9] WU B, YING G, JIE S, et al. Traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of the genus *Acer* (maple): A review[J]. Journal of EthnopHarmacology, 2016, 189: 31−60.
[10] 王性炎, 谢胜菊, 王高红. 中国富含神经酸的元宝枫籽油应用研究现状及前景[J]. 中国油脂, 2018, 43(12): 93−95,104. [WANG Xingyan, XIE Shengju, WANG Gaohong. Application research status and prospect of *Acer truncatum* Bunge. seed oil rich in nervonic acid in China[J]. China Oils and Fats, 2018, 43(12): 93−95,104.]
[11] 闫莉华, 陈冬菊, 李潜, 等. 元宝枫油的超声提取及其萌发前后神经酸含量分析[J]. 食品工业科技, 2017, 38(16): 178−181,188. [YAN Lihua, CHEN Dongju, LI Qian, et al. Ultrasonic extraction of *Acer truncatum* Bunge oil and the analysis of the nervonic acid content during the germination[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(16): 178−181,188.]
[12] 李文保. 元宝枫丰产栽培及药品保健品产业链开发[J]. 海峡科技与产业, 2014, 2(2): 48−53. [LI Wenbao. High-yield cultivation of *Acer truncatum* and development of industrial chain of medicine and health products[J]. Technology and Industry Across the Straits, 2014, 2(2): 48−53.]
[13] 苏德林. 元宝枫全身都是宝[J]. 国土绿化, 2018, 11(11): 56−57. [SU Delin. *Acer truncatum* Bunge whole body is treasure[J]. Green Encyclopedia, 2018, 11(11): 56−57.]
[14] 张抗抗. 爱上元宝枫[J]. 民主, 2019(4): 51−54. [ZHANG Kangkang. Fall in love with *Acer truncatum* Bunge[J]. Democracy Monthly, 2019(4): 51−54.]
[15] 谢丽平. 具有抗氧化、抗衰老活性的多肽筛选、分离纯化及结构鉴定 [D]. 广州: 华南理工大学, 2019. [XIE L P. Screening, purification and structural identification of peptides with antioxidant and anti-aging activities[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2019.]
[16] 陈芊如, 褚德朋, Naila I, 等. 海藻提取物的农业应用研究进展[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(20): 49−56. [CHEN Qianru, CHU Deming, NAILA I, et al. Research progress in the agricultural application of seaweed extracts[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2021, 49(20): 49−56.]
[17] 杜金婷, 李雁, 张雁, 等. 茶皂素提取纯化技术及生物活性研究进展[J]. 广东农业科学, 2021, 48(3): 167−176. [DU Jinting, LI Yan, ZHANG Yan, et al. Research progress in extraction and purification technology of tea saponin and its biological activity[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2021, 48(3): 167−176.]
[18] LI C S, ZHAO Y, WANG Y Q, et al. Microbial community changes induced by *Pediococcus pentosaceus* improve the physico-chemical properties and safety in fermented tilapia sausage[J]. Food Research International, 2021, 147(2): 110476.
[19] CAHYO D N, YUSIATI L M, KURNIAWATI A, et al. Catfish oil supplementation in Bali cattle diet: Effects on rumen fermentation parameters, carboxymethylcellulase and protease activity [J]. IOP Conference Series:Earth and Environmental Science, 2021, 782(2): 022082.
[20] 谢博, 傅红, 杨方. 生物活性肽的制备、分离纯化、鉴定以及构效关系研究进展[J]. 食品工业科技, 2021, 42(5): 383−391. [XIE Bo, FU Hong, YANG Fang. Research progress on preparation, purification, identification and structure-activity relationship of bioactive peptides[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(5): 383−391.]
[21] 郑龙, 田佳鑫, 张泽鹏, 等. 多肽药物制备工艺研究进展[J]. 化工学报, 2021, 72(7): 3538−3550. [ZHENG Long, TIAN Jiaxin, ZHANG Zepeng, et al. Progress on pharmaceutical engineering of peptide-based drugs[J]. CIESC Journal, 2021, 72(7): 3538−3550.]
[22] 齐慧丽, 王佳蕊, 李书国. 小麦胚芽生物活性肽的制备及功能性食品开发[J]. 粮食与油脂, 2020, 33(11): 120−122. [QI Huili, WANG Jiarui, LI Shuguo. Preparation of wheat germ bioactive peptide and its functional foods development[J]. Cereals & Oils, 2020, 33(11): 120−122.]
[23] 朱秀清, 李美莹, 孙冰玉, 等. 复合酶分步水解法制备汉麻多肽及其抗氧化特性研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(2): 161−169. [ZHU Xiuqing, LI Meiying, SUN Bingyu, et al. Preparation of polypeptides from hemp by two-step enzymatic hydrolysis with complex enzymes and its antioxidant properties[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(2): 161−169.]
[24] FU Y, YOUNG J F, THERKILDSEN M. Bioactive peptides in beef: Endogenous generation through postmortem aging[J]. Meat Science, 2017, 123: 134−142.
[25] 李璇, 杜梦霞, 王富龙, 等. 生物活性肽的制备及分离纯化方法研究进展[J]. 食品工业科技, 2017, 38(20): 336−340,346. [LI Yuan, DU Mengxia, WANG Fulong, et al. Research progress in preparation and purification of bioactive peptides[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(20): 336−340,346.]
[26] 王文江. 黑曲霉发酵法制备山杏多肽及其生物活性的研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2013. [WANG W J. Preparation of apricot polypeptide by *Aspergillus niger* fermentation and its biological activity[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2013.]
[27] YU L, YANG L, WEI A, et al. Anticancer bioactive peptide-

3 inhibits human gastric cancer growth by suppressing gastric cancer stem cells[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2014, 115(4): 697−711.

[28] 陈丽娜, 温宇旗, 韩国庆, 等. 生物活性肽制备工艺的研究进展[J]. 农产品加工, 2018, 17: 57−62. [CHEN Lina, WEN Yuqi, HAN Guoqing, et al. The research progress of preparation of bioactive peptide[J]. Farm Products Processing, 2018, 17: 57−62.]

[29] 李书国. 大豆多肽食品的开发[J]. 食品科学, 1997, 9: 13−15. [LI Shuguo. Development of soybean peptide food[J]. Food Science, 1997, 9: 13−15.]

[30] 安兆祥, 蔡志鹏, 黄占旺, 等. 黑木耳蛋白提取工艺优化及其功能特性研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(18): 157−166. [AN Zhaoxiang, CAI Zhipeng, HUANG Zhanwang, et al. Optimization of extraction process of *Auricularia auricula* protein and its functional properties[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(18): 157−166.]

[31] 程赞, 赵晓燕, 张晓伟, 等. 核桃分离蛋白的酶法改性及其结构与功能性的研究 [J/OL]. 中国油脂: 1−15 [2021-11-19]. https://doi.org/10.19902/j.cnki.zgyz.1003-7969.210280. [CHENG Z, ZHAO X Y, ZHANG X W, et al. Enzymatic modification of walnut protein isolate and its structure and function[J/OL]. China Oils and Fats, 1−15[2021-11-19]. https://doi.org/10.19902/j.cnki.zgyz.1003-7969.210280.]

[32] JIN W G, WU H T, ZHU B W, et al. Functional properties of gelation-like protein hydrolysates from scallop (*Patinopecten yessoensis*) male gonad[J]. European Food Research and Technology, 2012, 234(5): 863−872.

[33] YOSHINOBU N, HIDEKI S. Methods of analysis for nutritional labelling: Edited by Darryl M. Sullivan and Donald E. Carpenter, Association of Official Analytical Chemists International, 1993.112.00(N.America)/112.00(N.America)/125.00(elsewhere)(vi+624 pages) ISBN 0 935584 52 8[J]. Trends in Food Science & Technology, 1994, 5(5): 175−176.

[34] MONTEIRO P V, PRAKASH V. Functional properties of homogeneous protein fractions from peanut (*Arachis hypogaea* L.)[J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 1994, 42(2): 274−278.

[35] PEARCE K N, KINSELLA J E. Emulsifying properties of proteins: Evaluation of turbidimentric technique[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1978, 26: 716−723.

[36] BOOMA K, PRAKASH V. Functional properties of the flour and the major protein fraction from sesame seed, sunflower seed and safflower seed[J]. Acta Alimentaria, 1990, 19: 163−176.

[37] HAYAKAWA S, NAKAI S. Relationships of hydrophobicity and net charge to the solubility of milk and soy proteins[J]. Journal of Food Engineering, 1985, 50: 486−491.

[38] 周麟依, 孙玉凤, 吴非. 丙二醛氧化对米糠蛋白结构及功能性质的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(12): 98−107. [ZHOU Linyi, SUN Yufeng, WU Fei. Effects of oxidation by malondialdehyde on the structure and function of rice bran protein[J]. Food Science, 2019, 40(12): 98−107.]

[39] 李汉洋, 李建杰, 王帅, 等. 核桃多肽的抗氧化活性及其分子量、氨基酸组成特性研究[J]. 食品工业科技, 2018, 39(13): 1−7,13. [LI Hanyang, LI Jianjie, WANG Shuai, et al. Study on antioxidant activity of walnut polypeptide and its molecular weight, amino acid composition characteristic[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(13): 1−7,13.]

[40] KAUSHIK P, DOWLING K, MCKNIGHT S, et al. Preparation, characterization and functional properties of flax seed protein isolate[J]. Food Chemistry, 2016, 197(APR.15PT.A): 212−220.

[41] DU Y, JIANG Y, ZHU X, et al. Physicochemical and functional properties of the protein isolate and major fractions prepared from *Akebia trifoliata* var. *australis* seed[J]. Food Chemistry, 2012, 133(3): 923−929.

[42] 段静怡, 李自燕, 李建, 等. 基于游离氨基酸的组分及特征比较四种食用菌与四种果蔬的营养与风味特征[J]. 菌物学报, 2020, 39(6): 1077−1089. [DUAN Jingyi, LI Ziyan, LI Jian, et al. Comparison of nutritional and flavor characteristics between four edible fungi and four fruits and vegetables based on components and characteristics of free amino acids[J]. Mycosystema, 2020, 39(6): 1077−1089.]

[43] SAIDI S, DERATANI A, BELLEVILLE M P, et al. Antioxidant properties of peptide fractions from tuna dark muscle protein by-product hydrolysate produced by membrane fractionation process[J]. Food Research International, 2014, 65: 329−336.

[44] 王性炎, 李艳菊, 王姝清. 食品蛋白新资源——元宝枫蛋白[J]. 中国油脂, 2007, 32(8): 30−33. [WANG Xingyan, LI Yanju, WANG Shuqing. A new resource of food protein: *Acer truncatum* Bunge protein[J]. China Oils and Fats, 2007, 32(8): 30−33.]

[45] 孙英. 茶籽饼粕多肽的制备、纯化及抗氧化活性研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2013. [SUN Y. Preparation, purification and antioxidant activity of tea seed meal peptides[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2013.]

[46] ALETOR O, OSHODI A A, IPINMOROTI K. Chemical composition of common leafy vegetables and functional properties of their leaf protein concentrates[J]. Food Chemistry, 2002, 78: 63−68.

[47] TOMOTAKE H, SHIMAOKA I, KAYASHITA J, et al. Physicochemical and functional properties of buckwheat protein product[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(7): 2125−2129.

[48] 马梦婷. 棉籽蛋白结构功能特性与多肽抗氧化活性研究 [D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2018. [MA M T. Study on structural and functional characteristics of cottonseed protein and antioxidant activity of polypeptides[D]. Xianyang: Northwest A&F University.]

[49] 高蕾蕾. 牡丹籽蛋白的理化和功能特性及多肽的抗氧化活性研究 [D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2018. [GAO L L. Physicochemical and functional properties of peony seed protein and antioxidant activity of peptides[D]. Jinan: Qilu University of Technology, 2018.]

[50] 苏现波, 尚会霞. 马铃薯淀粉废水蛋白的功能特性[J]. 食品科学, 2016, 37(17): 115−120. [SU Xianbo, SHANG Huixia. Functional properties of protein extracted from potato starch wastewater[J]. Food Science, 2016, 37(17): 115−120.]

[51] 张聪聪. 水溶性猪肝蛋白功能特性及其在肉制品中的应用 [D]. 重庆: 西南大学, 2017. [ZHANG C C. Functional character-

istics of water-soluble porcine liver protein and its application in meat products[D]. Chongqing: Southwest University, 2017.]

[52] MALOMO S A, ALUKO R E. Conversion of a low protein hemp seed meal into a functional protein concentrate through enzymatic digestion of fibre coupled with membrane ultrafiltration[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2015, 31: 151−159.

[53] MUNDI S, ALUKO R E. Physicochemical and functional properties of kidney bean albumin and globulin protein fractions[J]. Food Research International, 2012, 48(1): 299−306.

[54] MWASARU A M, MUHAMMAD K, BAKAR J. Influence of altered solvent environment on the functionality of pigeon pea (*Cajanus cajan*) and cowpea (*Vigna unguiculata*) protein isolates [J]. Food Chemistry, 2000, 71: 157−165.

[55] ZHU K X, SUN X H, CHEN Z C, et al. Comparison of functional properties and secondary structures of defatted wheat germ proteins separated by reverse micelles and alkaline extraction and isoelectric precipitation[J]. Food Chemistry, 2010, 123(4): 1163−1169.

[56] 彭吟雪. 椰子蛋白及多肽的制备研究 [D]. 武汉: 武汉轻工大学, 2018. [PENG Y X. Preparation of coconut protein and polypeptide[D]. Wuhan: Wuhan Polytechnic University, 2018.]

[57] 王利国, 刘锐, 张民, 等. 大豆分离蛋白酶解产物的理化性质研究[J]. 中国食品添加剂, 2018, 3: 73−79. [WANG Liguo, LIU Rui, ZHANG Min, et al. Study on physicochemical properties of hydrolysatessoy protein isolate[J]. China Food Additives, 2018, 3: 73−79.]

[58] 范丽丽, 窦博鑫, 张晓琳, 等. 大豆 7S 球蛋白的 MTGase 条件对其表面疏水性与功能特性、溶液性质的影响及相关性分析[J]. 食品工业科技, 2020, 41(5): 52−57,62. [FAN Lili, DOU Boxin, ZHANG Xiaolin, et al. Effect of MTGase conditions on surface hydrophobicity, functional properties and solution properties of soybean 7S globulin and correlation analysis of its indexes[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(5): 52−57,62.]

时凤翠, 于晓涵, 韩坤宸, 等. 广西长寿人群食谱中膳食纤维复合体提取工艺优化及其特性 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 215−223. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100163
SHI Fengcui, YU Xiaohan, HAN Kunchen, et al. Optimization of Extraction Process and Characteristics of Dietary Fiber Complex in Recipes of Longevity People in Guangxi[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 215−223. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100163

· 工艺技术 ·

广西长寿人群食谱中膳食纤维复合体提取工艺优化及其特性

时凤翠, 于晓涵, 韩坤宸, 郑文轩, 李锐定, 宋　瑶, 廖艳婷, 李全阳*
（广西大学轻工与食品工程学院, 广西南宁 530004）

摘　要: 在前期对广西长寿人群队列饮食研究的基础上总结出长寿人群食谱，本研究以食谱中特定比例的 8 种代表性膳食纤维复合体（dietary fiber complex，DFC）作为研究对象，采用超声波辅助酶法提取，通过单因素实验和响应面试验探究提取工艺的最优条件，并进行基本组成成分以及理化性质分析。结果表明：在 *α*-淀粉酶添加量 0.3%，超声波功率 242 W，液料比 15 mL/g，提取温度 86 ℃ 时，总膳食纤维（total dietary fiber，TDF）的最大得率为 63.90%，与理论预测值基本一致。优化后 DFC 中的蛋白质、脂肪等杂质含量分别由（2.66%±0.12%）、（5.31%±0.14%）降至（1.90%±0.08%）、（1.77%±0.26%），且 TDF 含量有显著提高（$P<0.05$），从（39.71%±1.17%）增加至（64.83%±0.28%）。持水力、膨胀力、持油力、乳化能力和乳化稳定性分别提高了 5.36 g/g、2.83 mL/g、3.56 g/g、21.81%、36.8%。因此认为不同种类、特定比例的多种膳食纤维复合体（DFC）具有良好的品质，为广西长寿人群食谱中膳食纤维复合体特性的了解及应用提供了理论参考。

关键词: 广西长寿人群食谱, 膳食纤维复合体, 超声波辅助酶法, 提取工艺, 总膳食纤维, 特性
中图分类号: TS201.1　　**文献标识码:** B　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0215−09
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100163
本文网刊:

Optimization of Extraction Process and Characteristics of Dietary Fiber Complex in Recipes of Longevity People in Guangxi

SHI Fengcui, YU Xiaohan, HAN Kunchen, ZHENG Wenxuan, LI Ruiding, SONG Yao, LIAO Yanting, LI Quanyang*
（College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China）

Abstract: Based on the previous study on the diet of the cohort of long-lived people in Guangxi, the recipes of long-lived people were summarized. In this study, eight representative dietary fiber complexes (DFC) with specific proportion in the recipes were extracted by ultrasonic assisted enzyme method, and the optimal conditions of extraction process were explored through single factor and response surface tests, the basic components and physical and chemical properties were analyzed. The results showed that the maximum yield of total dietary fiber (TDF) was 63.90%, which was basically consistent with the theoretical prediction when the addition of *α*-amylase was 0.3%, the ultrasonic power was 242 W, the liquid-solid ratio was 15 mL/g and the extraction temperature was 86 ℃. After optimization, the contents of protein, fat and other impurities in TDF decreased from (2.66%±0.12%) and (5.31%±0.14%) to (1.90%±0.08%) and (1.77%±0.26%) respectively, and the content of TDF increased significantly ($P<0.05$) from (39.71%±1.17%) to (64.83%±0.28%). The water holding capacity, swelling capacity, oil holding capacity, emulsifying capacity and emulsifying stability were increased by 5.36 g/g, 2.83 mL/g, 3.56 g/g, 21.81% and 36.8% respectively. Therefore, it could be considered that a variety of dietary fiber complexes (DFC) with different types and specific proportions had good quality, which would provides a theoretical

收稿日期: 2021−10−18
基金项目: 国家自然科学基金（项目批准号: 31871802）; 广西重点研发计划项目（桂科 AB18221065）。
作者简介: 时凤翠（1996−）, 女, 硕士, 研究方向: 食品营养与健康, E-mail: 1648104023@qq.com。
*** 通信作者:** 李全阳（1964−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品营养与健康, E-mail: liquanyang@gxu.edu.cn。

reference for the understanding and application of the characteristics of dietary fiber complexes in the recipes of long-lived people in Guangxi.

Key words: recipes of Guangxi longevity population; dietary fiber complex; ultrasonic assisted enzymatic method; extraction process; total dietary fiber; characteristics

广西巴马县是世界知名的长寿之乡，长寿现象凸显。根据 2020 年第七次全国人口普查数据显示，巴马瑶族自治县 100 岁及以上老人比例为 43 人/10 万人，远高于中国老年学和老年医学学会组织对“长寿之乡”的认定标准（11 人/10 万人）。本团队前期对广西长寿人群饮食特征进行了调研，巴马地区传统饮食主要以植物性食物如粗杂粮、蔬菜和水果等食物摄入为主，膳食纤维摄入量相对较高[1−2]，认为膳食纤维对长寿现象的形成联系紧密。依据前期调研结果，结合中国居民膳食营养素推荐摄入量，本团队总结出了反映长寿人群饮食特征的食谱。对反映长寿人群饮食特征的食材，利用该食谱结合营养素摄入量与能量限制的因素进行研究，发现该食谱具有良好的抗衰老作用和开发潜力[3−4]，但其中膳食纤维从中发挥了多大作用还未做研究。

膳食纤维（dietary fiber, DF）被人类称为“第七大营养素”，具有缓解便秘、维持肠屏障完整性、调节血糖血脂代谢、降低胆固醇、防治癌症、增强免疫功能等作用[5−7]。目前，关于膳食纤维的提取及特性分析已被广泛研究，千春录等[8] 采用酶-碱法对水芹中膳食纤维进行提取优化；Jia 等[9] 通过酶-化学法提取优化毛木耳中膳食纤维；Kurek 等[10] 以藜麦、苋菜和小米三种膳食纤维为研究对象，采用酶、酶超声和超声法提取并探究了其不同理化性质与营养参数，这些报道多是以某种或者某几种膳食纤维为研究对象，关于一个具体食谱中所有代表性膳食纤维的复合体作为研究对象目前尚未见报道。

本团队前期针对广西长寿人群膳食中谷物和果蔬膳食纤维的益生效果进行了研究，聂梦琳等[11] 采用酶-碱法提取优化火麻中膳食纤维，发现火麻膳食纤维具有良好的益生特性，饶川艳等[12] 发现广西长寿人群膳食中代表性膳食纤维具有显著的抗氧化效果，然而食谱中膳食纤维通常为多种食材组成的复合体，研究膳食纤维复合体能更真实地反映食谱的饮食特征。因此，为了探究膳食纤维在食谱中发挥作用的机制，本文以食谱中代表性膳食纤维红薯叶、枸杞叶、苦麦菜、空心菜、香蕉、芭蕉、沃柑、芋头等[2] 8 种作为原料，进行不同比例的复合，采用超声波辅助酶法进行提取，通过单因素和响应面试验探究 TDF 得率最高时的工艺参数，然后对提取产物进行基本成分和理化性质分析，以期为长寿地区特色功能性产品的开发提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

红薯叶、枸杞叶、苦麦菜、空心菜、香蕉、芭蕉、沃柑、芋头、金龙鱼花生油　当地农贸市场；α-淀粉酶（CAS9000-90-2，4000 U/g）　上海江莱生物科技有限公司；α-淀粉酶溶液（CAS9000-85-5，10000±1000 U/mL）、淀粉葡糖苷酶溶液（CAS9032-08-0，2000~3000 U/mL）、蛋白酶溶液（CAS9014-01-1，300~400 U/mL）　嘉兴思成化工有限公司；95% 乙醇　成都市科隆化学品有限公司；草酸铵　天津市科密欧化学试剂有限公司；硼氢化钠　天津欧博凯化工有限公司；冰醋酸　天津新技术产业园区科茂化学试剂有限公司；其他试剂　均为国产分析纯。

XT-A400 型多功能粉碎机　永康市红太阳机电有限公司；WGL-125B 电热鼓风干燥箱　天津市泰斯特仪器有限公司；HH-4 数显恒温水浴锅　金坛区水北科普实验仪器厂；KQ-800DE 数控超声波清洗器　昆山市超声仪器有限公司；RE-2000A 旋转蒸发器　上海亚荣生化仪器厂；TG16-WS 台式高速离心机　湖南湘仪实验室仪器开发有限公司；UP-FG-1 台式冷冻干燥机（多歧管压盖型）　上海优普实业有限公司；K-375 全自动凯氏定氮仪　上海沃珑仪器有限公司；HYP-314 十四孔智能消化炉　上海纤检仪器有限公司；SZF-06C 脂肪测定仪　浙江托普仪器有限公司；SX2-10-13 马弗炉　上海实研电炉有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 材料预处理　红薯叶、枸杞叶、苦麦菜、空心菜、芋头：将红薯叶、枸杞叶、苦麦菜、空心菜、芋头分别进行清洗、切段，然后置于电热鼓风干燥箱中 65 ℃ 烘干，烘干后进行粉碎，最后过筛后备用。

芭蕉、香蕉、沃柑：将芭蕉、香蕉、沃柑分别进行剥皮、切片，然后置于电热鼓风干燥箱中 65 ℃ 烘干，烘干后进行粉碎，最后过筛后备用。

1.2.2 超声波辅助酶法提取广西膳食纤维工艺

1.2.2.1 工艺流程　本文采用超声波辅助酶法提取广西膳食纤维，提取工艺流程设计如图 1 所示：

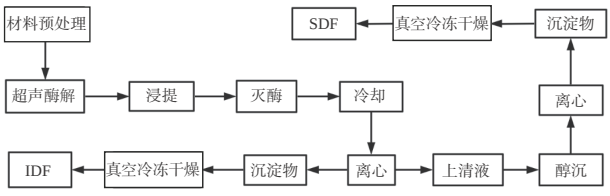


图 1　广西长寿地区代表性膳食纤维提取工艺流程图

Fig.1　Process flow chart of representative dietary fiber extraction in longevity area of Guangxi

1.2.2.2 操作要点　准备过筛后的不同种类原料粉末，以本团队对前期获得的长寿人群食谱[3−4] 为依据，经计算获得红薯叶、枸杞叶、苦麦菜、空心菜、香

蕉、芭蕉、沃柑、芋头的复合比例为 1.4∶1.3∶0.98∶0.8∶11.5∶5.4∶1.3∶7.4，这就构成了长寿人群膳食纤维复合体（dietary fiber complex，DFC）的初级混合物，将初级混合物充分混匀后按照一定液料比加入蒸馏水，置于 100 ℃ 水煮沸 5 min，冷却至室温后添加一定量的 α-淀粉酶（CAS9000-90-2，4000 U/g），调整 pH 至 5.0，调整合适的超声波功率辅助酶解 20 min，放置于水浴锅中在一定时间温度和时间内进行提取，然后在 100 ℃ 水浴中灭酶 10 min，于 8000 r/min 离心 15 min，沉淀物经真空冷冻干燥后得不可溶性膳食纤维（insoluble dietary fiber，IDF）；上清液加入 4 倍体积 95% 乙醇进行醇沉，于 8000 r/min 离心 10 min，沉淀物经真空冷冻干燥得可溶性膳食纤维（soluble dietary fiber，SDF），IDF 和 SDF 得率分别以下列公式计算。

$$\text{IDF得率}(\%)=\frac{\text{IDF质量}}{\text{DFC质量}}\times 100$$

$$\text{SDF得率}(\%)=\frac{\text{SDF质量}}{\text{DFC质量}}\times 100$$

$$\text{TDF得率}(\%)=\text{IDF得率}(\%)+\text{SDF得率}(\%)$$

1.2.3　单因素实验　固定液料比 20 mL/g、提取时间 90 min、提取温度 70 ℃、添加 0.3% α-淀粉酶和超声波功率 240 W 为单因素实验条件，按照 1.2.2 节超声波辅助酶法，以总膳食纤维（TDF）得率为评价指标，选择液料比（10、15、20、25、30 mL/g）、提取时间（60、90、120、150、180 min）、提取温度（50、60、70、80、90 ℃）、α-淀粉酶添加量（0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%）、超声波功率（80、160、240、320、400 W）5 个因素进行单因素实验，考察各因素对 TDF 得率的影响，每个单因素实验平行重复 3 次，结果取平均值。

1.2.4　响应面试验优化广西长寿人群食谱中膳食纤维复合体的提取工艺　在单因素实验的基础上，选择 α-淀粉酶添加量、超声波功率、液料比和提取温度为因素，TDF 得率为响应值进行试验，并进行数据拟合优化广西长寿人群食谱中 DFC 的提取工艺，试验因素与水平设计见表 1。

表 1　响应面试验因素与水平

Table 1　Factors and levels used for response surface design

水平	因素			
	A α-淀粉酶添加量（%）	B超声波功率（W）	C液料比（mL/g）	D提取温度（℃）
−1	0.2	160	10	70
0	0.3	240	15	80
1	0.4	320	20	90

1.2.5　基本成分测定

1.2.5.1　水分含量的测定　参考 GB 5009.3-2016《食品安全国家标准食品中水分的测定》[13]。

1.2.5.2　灰分含量的测定　参考 GB 5009.4-2016《食品安全国家标准食品中灰分的测定》[14]。

1.2.5.3　蛋白质含量的测定　参考 GB 5009.5-2016《食品安全国家标准食品中蛋白质的测定》[15]。

1.2.5.4　脂肪含量的测定　参考 GB 5009.6-2016《食品安全国家标准食品中脂肪的测定》[16]。

1.2.5.5　果胶、纤维素、半纤维素和木质素含量的测定　参考 Ma 等[17] 和 Capek 等[18] 的方法并进行修改，将待测样品（Y）与 0.25% 草酸铵溶液按 1∶10 m/v 的比例混匀后，于 90 ℃ 水浴中连续搅拌 2 h，离心收集上清液，重复以上操作两次，合并上清液，装入透析袋（截留分子量：7000 U）中透析至与去离子水的电导率相同，收集截留液冷冻干燥，得到果胶类物质（A_1）。上述滤渣依次用 80% 乙醇洗涤 2 次，用蒸馏水洗涤 3 次后，冷冻干燥，在室温下，将冻干后的残渣与含有 0.1% 硼氢化钠的氢氧化钾溶液（4 mol/L）按 1∶30 m/v 的料液比混合，搅拌提取 24 h 后过滤，滤液采用醋酸溶液（4 mol/L）中和后，用透析袋透析至与去离子水的电导率相同，截留液冷冻干燥，得到半纤维素（A_2）；过滤后的残渣洗涤后冻干得样品 A_3；向 A_3 中按 1∶1 m/v 的比例加入浓硫酸溶液（72%，m/m），于 4 ℃ 冰箱中浸提 24 h，依次经过滤、洗涤、干燥得样品 A_4，其中，灰分质量为 A_5。

$$\text{纤维素含量}(\text{以干基计},\%)=\frac{A_3-A_4-A_5}{Y}\times 100$$

$$\text{木质素含量}(\text{以干基计},\%)=\frac{A_4-A_5}{Y}\times 100$$

式中：A_1 是果胶类物质的质量，g；A_2 是半纤维素的质量，g；A_3 是将 A_2 过滤、洗涤、冻干后沉淀物的质量，g；A_4 是将 A_3 过滤、洗涤、干燥后沉淀物的质量，g；A_5 是灰分质量，g。

1.2.5.6　膳食纤维含量的测定　参考 GB 5009.88-2014《食品安全国家标准食品中膳食纤维的测定》[19]。

1.2.6　理化性质测定

1.2.6.1　持水力的测定　参考 He 等[20] 的方法并略作修改，精确称取 0.5 g（m_1）的 TDF、SDF、IDF 试样，置于 50 mL 离心管中，加入 10 mL 蒸馏水，振荡混匀后，室温下静置 24 h，5000 r/min 离心 20 min，弃去上清液后称质量（m_2）。

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

式中：m_1 是 TDF、SDF、IDF 初始样品的质量，g；m_2 是 TDF、SDF、IDF 持水后样品的质量，g。

1.2.6.2　膨胀力的测定　参考 Ghribi 等[21] 的方法并略作修改，精确称取 0.5 g（m_1）的 TDF、SDF、IDF 试样，置于 10 mL 量筒中，读取体积 V_1，加入 5 mL 蒸馏水，振荡混匀后，室温下静置 24 h，试样吸水膨胀后读取体积 V_2。

$$膨胀力(mL/g)=\frac{v_2-v_1}{m_1}$$

式中：m_1 是 TDF、SDF、IDF 初始样品的质量，g；v_1 是将 TDF、SDF、IDF 样品置于量筒后的体积，mL；v_2 是 TDF、SDF、IDF 样品吸水膨胀后的体积，mL。

1.2.6.3 持油力的测定 参考 Wang 等[22]的方法并略作修改，精确称取 1 g(m_1)的 TDF、SDF、IDF 试样，置于 50 mL 离心管中，加入花生油，振荡混匀后，室温下静置 12 h，5000 r/min 离心 20 min，弃掉上层油脂后称质量(m_2)。

$$持油力(g/g)=\frac{m_2-m_1}{m_1}$$

式中：m_1 是 TDF、SDF、IDF 初始样品的质量，g；m_2 是 TDF、SDF、IDF 持油后样品的质量，g。

1.2.6.4 乳化能力及乳化稳定性的测定 参考任庆等[23]的方法并略作修改，精确配制质量浓度 0.1 g/mL 的 TDF、SDF、IDF 试样溶液，取 10 mL 加入到离心管中，读取液体总高度 h_1，再向离心管中加入 5 mL 花生油，均质成乳化液，离心后读取离心管中乳化层的高度 h_2；将离心管置于 85 ℃ 水浴锅内保持 30 min，离心后再次读取离心管中的乳化层高度 h_3。

$$乳化能力(\%)=\frac{h_2}{h_1}\times 100$$

$$乳化稳定性(\%)=\frac{h_3}{h_2}\times 100$$

式中：h_1 是 TDF、SDF、IDF 初始试样溶液置于离心管的高度；h_2 是均质、离心后乳化层的高度；h_3 是水浴、离心后乳化层的高度。

1.3 数据处理

采用 Design-Expert 10.0.7 设计响应面、Origin 2018 绘图和 IBM SPSS Statistics 24 进行数据处理，并设置 3 次平行试验，以平均值±标准差(Mean±SD)表示，$P<0.05$ 表示具有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 液料比对广西长寿人群食谱中膳食纤维复合体提取效果的影响 由图 2 可知，随液料比增加，TDF 和 IDF 得率总体呈先上升后下降的趋势，这可能是由于在一定范围内液料比的增加会增大膳食纤维与蒸馏水间的接触面积，从而提高 IDF 的溶出率，故 IDF 得率增加；而当液料比大于 15 mL/g 时，IDF 得率逐渐下降，这可能是由于 IDF 溶出速率已经接近于零，溶液体系达到平衡状态，如果继续增加液料比，反而可能水解溶出的 IDF[24]。SDF 得率在液料比 25 mL/g 时达到最大值，但无显著性差异($P>0.05$)，而当液料比为 15 mL/g 时，TDF 和 IDF 得率有显著性差异($P<0.05$)，因此在保证试验效果、节约水资源以及乙醇成本的综合考虑下，确定 15 mL/g 为最佳液料比。

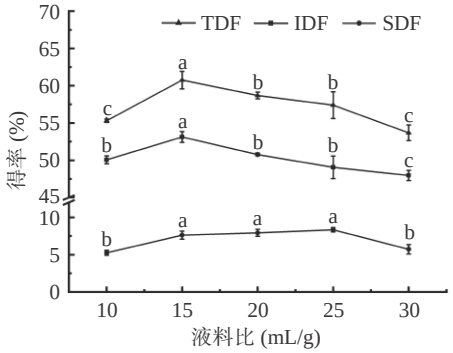


图 2 液料比对广西长寿人群食谱中膳食纤维复合体得率的影响

Fig.2 Effect of liquid-solid ratio on the yield of dietary fiber complex in the diet of longevity people in Guangxi

注：不同小写字母表示同一指标差异显著($P<0.05$)，图 3~图 6、图 8 同。

2.1.2 提取时间对广西长寿人群食谱中膳食纤维复合体提取效果的影响 由图 3 可知，TDF 和 IDF 得率随提取时间的延长，呈现先上升后下降的趋势，90 min 时达到最大值，这可能是由于 90 min 时，酶与底物反应接近于反应完全，如果继续增加提取时间，反而会导致 IDF 发生轻度水解[25]。SDF 得率随提取时间的延长而增大，90 min 之后呈现下降的趋势，原因可能是 SDF 提取存在一个最适时间，超过最适时间后容易引起多糖分子的降解。当提取时间为 90 min 时，TDF、SDF 得率有显著性差异($P<0.05$)，而 IDF 无显著性差异($P>0.05$)，因此综合考虑，确定 90 min 为最佳提取时间。

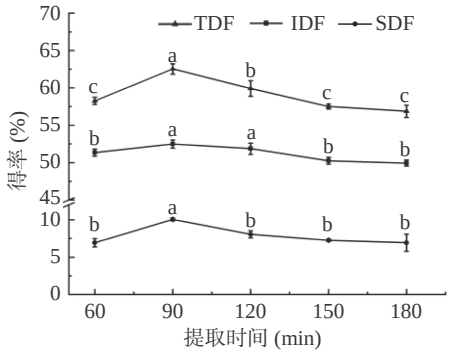


图 3 提取时间对广西长寿人群食谱中膳食纤维复合体得率的影响

Fig.3 Effect of extraction time on the yield of dietary fiber complex in the diet of longevity people in Guangxi

2.1.3 提取温度对广西长寿人群食谱中膳食纤维复合体提取效果的影响 由图 4 可知，随提取温度升高，TDF、IDF 以及 SDF 得率不断增大，80 ℃ 时达到最大值，继续升高温度，得率出现下降的趋势，原因可能是酶反应与最适温度有关，80 ℃ 时酶的活性达到了最大值，得率也达到最大值，如果继续提高温度，酶的活性会降低，且温度过高会导致纤维物质的降

解。当提取温度为 80 ℃ 时，TDF、IDF 和 SDF 得率有显著性差异（P<0.05），因此综合考虑，确定 80 ℃ 为最佳提取温度。

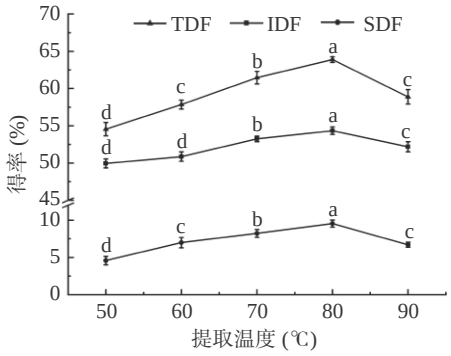


图 4　提取温度对广西长寿人群食谱中膳食纤维复合体得率的影响

Fig.4　Effect of extraction temperature on the yield of dietary fiber complex in the diet of longevity people in Guangxi

2.1.4　α-淀粉酶添加量对广西长寿人群食谱中膳食纤维复合体提取效果的影响　由图 5 可知，随 α-淀粉酶添加量增加，TDF 和 IDF 得率先增大后减小，当添加量为 0.3% 时，得率达到最大值，这可能是由于在一定范围内 α-淀粉酶添加量的增加促使淀粉充分酶解，IDF 得率随之达到最大值，如果继续增加 α-淀粉酶，酶的活性会趋于饱和[26]，IDF 得率也会随之下降。而 SDF 得率在添加量为 0.4% 时，得率达到最大值，且有显著性差异（P<0.05），当 α-淀粉酶添加量为 0.3% 时，TDF 和 IDF 得率均有显著性差异（P<0.05），因此综合考虑节约酶的使用量，确定 0.3% 为最佳 α-淀粉酶添加量。

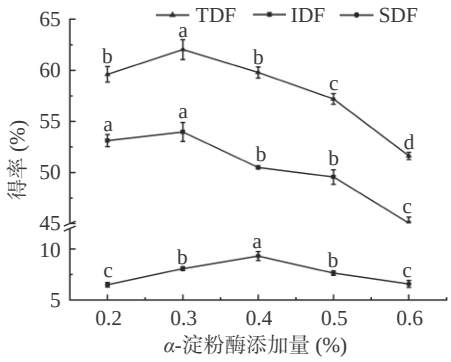


图 5　α-淀粉酶添加量对广西长寿人群食谱中膳食纤维复合体得率的影响

Fig.5　Effect of α-amylase addition on the yield of dietary fiber complex in the diet of longevity people in Guangxi

2.1.5　超声波功率对广西长寿人群食谱中膳食纤维复合体提取效果的影响　由图 6 可知，随超声波功率增大，TDF、IDF 和 SDF 得率总体呈先上升后下降的趋势，原因可能是超声处理会产生空化和机械作用[27]，在一定超声波功率范围内，纤维物质会快速溶出，如果继续增大超声波功率，将会破坏纤维网状结构，随之被降解掉。当超声波功率为 240 W 时，TDF、IDF 和 SDF 得率有显著性差异（P<0.05），因此综合考虑，确定 240 W 为最佳超声波功率。

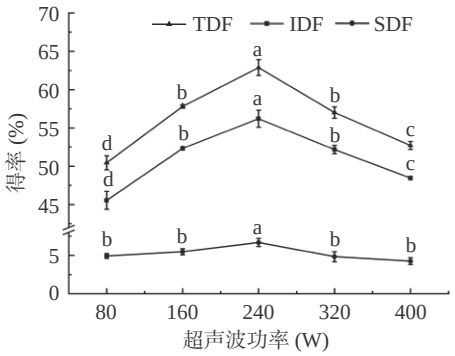


图 6　超声波功率对广西长寿人群食谱中膳食纤维复合体得率的影响

Fig.6　Effect of ultrasonic power on the yield of dietary fiber complex in the diet of longevity people in Guangxi

2.2　响应面试验结果

2.2.1　Box-Behnken 试验设计及结果　在单因素实验基础上，根据 5 个因素对 TDF 得率产生影响的显著性大小，选择 α-淀粉酶添加量、超声波功率、液料比和提取温度为因素，TDF 得率为响应值进行试验，Box-Behnken 试验设计及结果见表 2。

表 2　Box-Behnken 试验设计及结果

Table 2　Experimental design and results for Box-Behnken

实验号	A	B	C	D	TDF 得率(%)
1	0	−1	0	−1	52.21
2	0	0	−1	1	53.04
3	0	0	0	0	58.53
4	1	0	−1	0	60.21
5	0	0	0	0	64.64
6	0	0	1	1	59.56
7	−1	0	1	0	52.42
8	1	0	1	0	49.66
9	0	1	−1	0	53.56
10	−1	0	0	−1	49.50
11	0	0	0	0	64.04
12	0	0	−1	−1	51.04
13	0	0	0	0	63.41
14	0	1	0	−1	50.13
15	1	−1	0	0	55.11
16	1	1	0	0	54.20
17	0	−1	1	0	52.81
18	1	0	0	−1	63.87
19	0	−1	−1	0	48.14
20	0	1	0	1	58.18
21	−1	−1	0	0	55.42
22	0	−1	0	1	58.79
23	−1	0	0	1	53.19
24	0	0	1	−1	47.72
25	1	0	0	−1	53.33
26	0	0	0	0	66.48
27	0	1	1	0	52.03
28	−1	0	−1	0	44.48
29	−1	1	0	0	52.36

2.2.2　回归模型的建立及其显著性检验　从表 3 可看出，模型极显著（P<0.01），失拟项不显著（P>0.05），

表明该回归模型可以较好地拟合预测值与实测值，适用于对广西长寿人群食谱中膳食纤维复合体提取工艺进行分析和预测。决定系数 R^2 为 0.9140，R^2_{Adj}=0.8280，表明该回归模型可以解释 91.4% 的响应值，且模型具有较好的拟合度，可以准确分析和预测提取结果。用 Design-Expert 10.0.7 软件对表 2 数据进行多元回归拟合，得到 TDF 得率(Y)对自变量 α-淀粉酶添加量(A)、超声波功率(B)、液料比(C)、提取温度(D)的二次多项回归模型：$Y=63.42+2.42A-0.17B+0.31C+3.56D+0.54AB-4.62AC+1.71AD-1.55BC+0.37BD+2.46CD-4.61A^2-4.72B^2-7.00C^2-3.76D^2$。$F$ 值可以判定各变量对响应值影响的显著性大小，根据显著性大小决定主次顺序，结果表明：A、D、AC、A^2、B^2、C^2、D^2 达到极显著水平($P<0.01$)，其他均不显著($P>0.05$)，各因素对响应值影响排序为：提取温度>α-淀粉酶添加量>液料比>超声波功率。

表 3 响应面方差分析

Table 3 Analysis of variance for response surface analysis

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	819.99	14	58.57	10.63	<0.0001	**
A α-淀粉酶添加量	70.13	1	70.13	12.73	0.0031	**
B 超声波功率	0.34	1	0.34	0.062	0.8074	
C 液料比	1.16	1	1.16	0.21	0.6535	
D 提取温度	151.94	1	151.94	27.58	0.0001	**
AB	1.16	1	1.16	0.21	0.6540	
AC	85.47	1	85.47	15.51	0.0015	**
AD	11.73	1	11.73	2.13	0.1666	
BC	9.61	1	9.61	1.74	0.2078	
BD	0.54	1	0.54	0.098	0.7588	
CD	24.21	1	24.21	4.39	0.0547	
A^2	138.13	1	138.13	25.07	0.0002	**
B^2	144.25	1	144.25	26.18	0.0002	**
C^2	317.80	1	317.80	57.68	<0.0001	**
D^2	91.87	1	91.87	16.67	0.0011	**
残差	77.14	14	5.51			
失拟项	41.99	10	4.20	0.48	0.8433	不显著
净误差	35.15	4	8.79			
总离差	897.13	28				

注：$P<0.05$，差异显著*；$P<0.01$，差异极显著**。

2.2.3 响应曲面及等高线分析 等高线图和响应面图均可以直观地判断交互作用的显著程度，等高线形状越接近椭圆形且越密集，响应面越陡峭，说明交互作用越显著。与其他两因素之间的响应曲面与等高线图相比，AC 响应面更陡峭，等高线的形状更接近椭圆形，因此判断 AC 交互作用更显著。由此交互项的影响从大到小排列依次为：AC>CD>AD>BC>AB>BD，如图 7 所示，AC 交互作用显著，其余不显著，这与响应面方差分析结果一致。

2.2.4 最佳工艺平行验证试验 根据单因素实验结果以及响应面模型计算得出，广西长寿人群食谱中膳食纤维复合体(DFC)的最优提取工艺是：α-淀粉酶添加量 0.34%，超声波功率 242.04 W，液料比 14.98 mL/g，

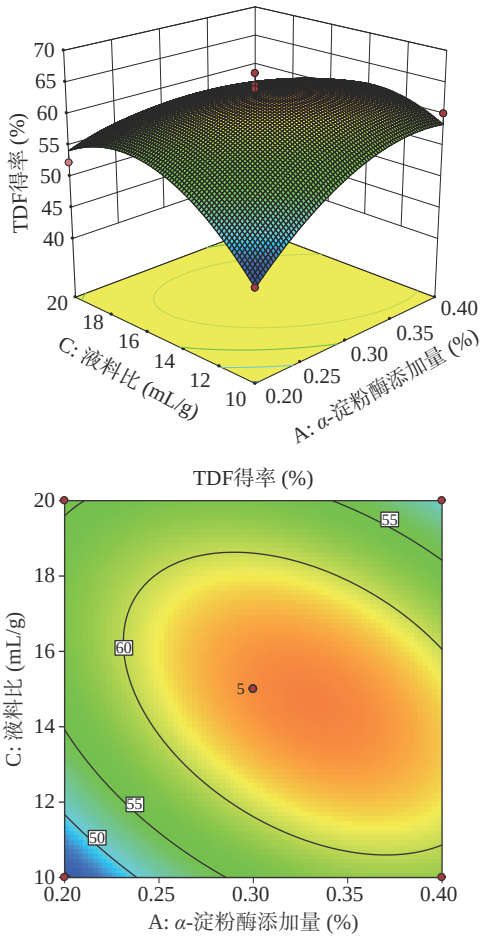


图 7 α-淀粉酶添加量与液料比交互作用对 TDF 得率影响的响应面和等高线图

Fig.7 Response surface and contour map of the interaction between α-amylase addition and liquid-solid ratio on the yield of TDF

提取温度 85.50 ℃，此时 TDF 最大得率为 64.85%。为了试验操作的可行性，将提取条件设置为 α-淀粉酶添加量 0.3%，超声波功率 242 W，液料比 15 mL/g，提取温度 86 ℃，平行 3 次试验，测得 TDF 得率为(63.90%±1.60%)，与理论预测值基本一致。因此经响应面模型计算得出的最优条件可靠，能真实地反映超声波辅助酶法对 TDF 得率的影响。

2.3 DFC 基本组成成分分析

由图 8 可知，DFC 与优化后的 DFC 中主要成分是纤维素、半纤维素和木质素，且经超声波辅助酶解提取后得到的总膳食纤维中蛋白质、脂肪等杂质含量分别由提取前的(2.66%±0.12%)、(5.31%±0.14%)降至提取后的(1.90%±0.08%)、(1.77%±0.26%)，总膳食纤维含量有显著提高($P<0.05$)，从(39.71%±1.17%)增加到了(64.83%±0.28%)，即其纯度提高了约 25.12%。8 种广西长寿人群食谱中膳食纤维复合体提取前总膳食纤维含量(39.71%±1.17%)高于甘薯渣(24.06%)[28]，且优化后，总膳食纤维含量明显高于红枣渣(26.5% 左右)[29]，而目前对于膳食纤维的研究大多集中于单一膳食纤维，关于广西长寿人群食谱中

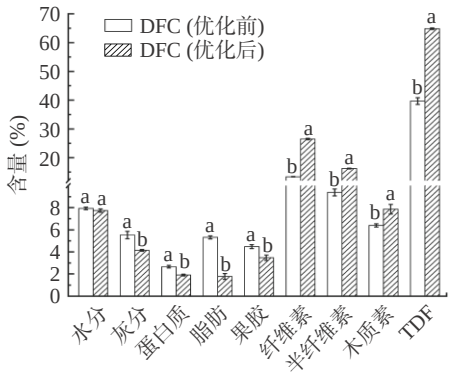


图 8　工艺优化前后提取的 DFC 基本组成成分分析

Fig.8　Analysis of basic components of DFC extracted before and after process optimization

膳食纤维复合体特性的研究还未见有报道。

2.4　DFC 理化性质分析

为了衡量 DFC 品质的好坏，对其进行理化性质分析，结果如表 4 所示，超声波辅助酶法制备的 TDF 与膳食纤维粉相比较，其持水力、膨胀力、持油力、乳化能力及乳化稳定性均有明显提高，分别提高了 5.36 g/g，2.83 mL/g，3.56 g/g，21.81%，36.8%，且分离后的 SDF 持水力、膨胀力、乳化能力及乳化稳定性均优于 IDF，持油力则相反。制备后的 DFC 中 IDF 持油力为(9.06±0.23)g/g。对于膳食纤维的持油力，丁政宇等[30]报道黄精渣为(3.97±0.04)g/g、Lou 等[31]报道牛蒡根粉为(8.50±0.36)g/g，比本研究结果差别明显；SDF 持水力和膨胀力分别为(10.08±0.28)g/g、(8.24±0.31)mL/g，明显高于黄秋葵(5.61 g/g、3.35 mL/g)[32]、木瓜皮(5.26 g/g、4.54 mL/g)[33]、稻壳(2.58 g/g、3.27 mL/g)[34]的有关研究，且 DFC 的 SDF 具有较好的乳化性和乳化稳定性，这表明 DFC 具有较好的工艺学属性，有利于其制品的后续开发。研究发现用等比的苦荞麦粉、绿豆粉和燕麦粉制备的抗性淀粉，对小鼠具有明显的减肥降脂作用[35]，绿豆、苦荞、藜麦复合抗性淀粉多元复合 RS 有助于降低高糖高脂模型小鼠的血糖血脂水平，提高肠道内乙酸、丙酸、丁酸的含量[36]。本研究的 DFC 则是 8 种膳食纤维原料按照不同的比例复合，因此可以预测 DFC 具有良好的潜在益生价值，这也从侧面反映了广西长寿人群食谱对人体健康的促进和保障作用。

表 4　DFC 的理化性质

Table 4　Physicochemical properties of DFC

样品	持水力 (g/g)	膨胀力 (mL/g)	持油力 (g/g)	乳化能力 (%)	乳化稳定性 (%)
DFC	2.42±0.21^{d}	2.95±0.09^{d}	1.50±0.28^{d}	9.42±0.65^{d}	26.11±2.79^{d}
TDF	7.78±0.25^{b}	5.78±0.44^{b}	5.06±0.14^{b}	31.23±0.91^{b}	62.91±0.63^{b}
IDF	5.18±0.16^{c}	4.74±0.18^{c}	9.06±0.23^{a}	16.59±0.42^{c}	41.68±1.26^{c}
SDF	10.08±0.28^{a}	8.24±0.31^{a}	3.74±0.32^{c}	58.04±1.23^{a}	90.75±1.32^{a}

注：同列不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。

3　结论

本研究采用超声波辅助酶法提取优化广西巴马长寿地区食谱中膳食纤维复合体(DFC)，通过单因素实验和响应面试验探究膳食纤维最佳提取工艺。结果表明：在 α-淀粉酶添加量 0.3%，超声波功率 242 W，液料比 15 mL/g，提取温度 86 ℃ 时，TDF 最大得率为 63.90%；基本成分结果表明：DFC 与优化后的 DFC 中主要成分是纤维素、半纤维素和木质素，且优化后 TDF 含量有显著提高(P<0.05)；理化性质结果表明：优化后的 DFC 持水力、膨胀力、持油力、乳化能力和乳化稳定性分别提高了 5.36 g/g，2.83 mL/g，3.56 g/g，21.81%，36.8%，DFC 中 SDF 持水力、膨胀力、乳化能力及乳化稳定性均优于 IDF，持油力则相反。以上结果表明 DFC 是一种优质的膳食纤维原料，在开发广西长寿地区特色功能性产品方面具有广阔的应用前景，关于其进一步的益生效果分析和广泛应用，还需要更深入地探究其结构、性质及其他功能效果之间的联系。

参考文献

[1] 蔡达. 广西长寿之乡老人饮食与代谢特征及其相关性研究[D]. 南宁：广西大学，2017. [CAI D. A correlation between diet and metabolic characteristics of healthy elderly people from longevous region in Guangxi province[D]. Nanning: Guangxi University, 2017.]

[2] 王芳. 广西巴马长寿老人肠道菌群及其与膳食纤维多糖饮食关联性研究 [D]. 南宁：广西大学，2015. [WANG F. Chinese centenarians gut microbiota and its correlation with high-fiber diet[D]. Nanning: Guangxi University, 2015.]

[3] 宋奇，艾连中，鲁红岩，等. 巴马长寿饮食模式在衰老小鼠模型中的抗氧化应激效果[J]. 食品科学，2018，39(19)：147−153. [SONG Q, AI L Z, LU H Y, et al. Effect of Bama longevity dietary patterns on antioxidant stress in a mouse model of aging[J]. Food Science, 2018, 39(19): 147−153.]

[4] 黄燕婷，梅丽华，潘海博，等. 巴马长寿特征饮食模式对自然衰老小鼠的抗衰老效果[J]. 食品科学，2021，42(5)：137−144. [HUANG Y T, MEI L H, PAN H B, et al. Anti-aging effect of Bama longevity characteristic dietary patterns in naturally aging mice[J]. Food Science, 2021, 42(5): 137−144.]

[5] VERSPREET J, DAMEN B, BROEKAERT W F, et al. A critical look at prebiotics within the dietary fiber concept[J]. Annual Review of Food Science and Technology, 2016, 7(1): 167−190.

[6] YANG Y Y, MA S, WANG X X, et al. Modification and application of dietary fiber in foods[J]. Journal of Chemistry, 2017, 2017: 1−8.

[7] SURYANTI V, KUSUMANINGSIH T, RUMINGTYAS Y S. Physicochemical properties of dietary fibers from artocarpus camansi fruit[J]. IOP Conference Series-Materials Science and Engineering, 2017, 193(1): 012012.

[8] 千春录，王兢业，戴露婷，等. 水芹膳食纤维提取工艺优化及其特性[J]. 食品工业科技，2017，38(22)：119−124. [QIAN C L, WANG J Y, DAI L T, et al. Optimization of extraction technology of dietary fiber from *Oenanthe javanica* and its character[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(22): 119−124.]

[9] JIA F J, YANG S F, MA Y Y, et al. Extraction optimization

and constipation-relieving activity of dietary fiber from *Auricularia polytricha*[J]. Food Bioscience, 2020, 33.

[10] KUREK M A, KARP S, WYRWISZ J, et al. Physicochemical properties of dietary fibers extracted from gluten-free sources: Quinoa (*Chenopodium quinoa*), amaranth (*Amaranthus caudatus*) and millet (*Panicum miliaceum*)[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 85: 321−330.

[11] 聂梦琳, 饶川艳, 莫明规, 等. 广西火麻膳食纤维提取及其特性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(17): 6188−6195. [NIE M L, RAO C Y, MO M G, et al. Study on the extraction of *Guangxi hemp* dietary fiber and its characteristics[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2020, 11(17): 6188−6195.]

[12] 饶川艳, 聂梦琳, 莫明规, 等. 广西巴马长寿人群饮食中 7 种膳食纤维成分及抗氧化活性分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(19): 6990−6999. [RAO C Y, NIE M L, MO M G, et al. Determination of 7 dietary fiber components and antioxidant effects in diet of Guangxi Bama longevity population[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2020, 11(19): 6990−6999.]

[13] 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: 1−2. [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: 1−2.]

[14] 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: 1−4. [National Health and Family Planning Commission. GB 5009.4-2016 National Standard for Food Safety Determination of ash in food[S]. Beijing: China Standards Press, 2016: 1−4.]

[15] 国家食品药品监督管理总局, 国家卫生和计划生育委员会. 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: 1−3. [State Food and Drug Administration, State Health and Family Planning Commission. GB 5009.5-2016 National Food Safety Standard Determination of protein in food[S]. Beijing: China Standards Press, 2016: 1−3.]

[16] 国家食品药品监督管理总局, 国家卫生和计划生育委员会. 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: 1−5. [State Food and Drug Administration, State Health and Family Planning Commission. GB 5009.6-2016 National Food Safety Standard Determination of fat in foods [S]. Beijing: China Standards Press, 2016: 1−5.]

[17] MA M M, MU T H, SUN H N, et al. Optimization of extraction efficiency by shear emulsifying assisted enzymatic hydrolysis and functional properties of dietary fiber from deoiled cumin (*Cuminum cyminum* L.)[J]. Food Chemistry, 2015, 179: 270−277.

[18] CAPEK P, HRIBALOVA V, SVANDOVA E, et al. Characterization of immunomodulatory polysaccharides from *Salvia officinalis* L.[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2003, 33(1): 113−119.

[19] 国家卫生和计划生育委员会. GB 5009.88-2014 食品安全国家标准 食品中膳食纤维的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2014: 1−7. [National Health and Family Planning Commission. GB 5009.88-2014 National Food Safety Standard Determination of dietary fiber in foods[S]. Beijing: China Standards Press, 2014: 1−7.]

[20] HE Y Y, LI W, ZHANG X Y, et al. Physicochemical, functional, and microstructural properties of modified insoluble dietary fiber extracted from rose pomace[J]. Journal of Food Science and Technology, 2020, 57(4): 1421−1429.

[21] GHRIBI A M, SILA A, GAFSI I M, et al. Structural, functional, and ACE inhibitory properties of water-soluble polysaccharides from chickpea flours[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 75: 276−282.

[22] WANG L, XU H G, YUAN F, et al. Preparation and physicochemical properties of soluble dietary fiber from orange peel assisted by steam explosion and dilute acid soaking[J]. Food Chemistry, 2015, 185: 90−98.

[23] 任庆, 孙波, 于敬鑫, 等. 白菜渣可溶性膳食纤维酸法提取工艺优化及理化性质测定[J]. 食品科学, 2015, 36(10): 70−75. [REN Q, SUN B, YU J X, et al. Optimization of acid extraction and physicochemical properties of soluble dietary fiber from Chinese cabbage residue[J]. Food Science, 2015, 36(10): 70−75.]

[24] 李琦, 曾凡坤, 华蓉, 等. 响应面法优化超声辅助提取韭菜根不溶性膳食纤维[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(3): 128−134. [LI Q, ZENG F K, HUA R, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of insoluble dietary fiber from chive roots by response surface method[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(3): 128−134.]

[25] 张荣, 任清, 罗宇. 小米可溶性膳食纤维提取及其理化性质分析[J]. 食品科学, 2014, 35(2): 69−74. [ZHANG R, REN Q, LUO Y. Extraction of soluble dietary fiber from foxtail millet and analysis of its physical and chemical properties[J]. Food Science, 2014, 35(2): 69−74.]

[26] 马子晔, 何孟欣, 孙剑锋, 等. 超声波辅助提取马铃薯全粉加工副产物中膳食纤维[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(22): 79−85. [MA Z Y, HE M X, SUN J F, et al. Ultrasonic-assisted extraction of dietary fiber from by-products of whole potato processing[J]. Food Research and Development, 2020, 41(22): 79−85.]

[27] MA M M, MU T H. Effects of extraction methods and particle size distribution on the structural, physicochemical, and functional properties of dietary fiber from deoiled cumin[J]. Food Chemistry, 2016, 194: 237−246.

[28] 赖爱萍, 陆国权, 王颖. 超声波辅助酶法制备甘薯渣膳食纤维工艺研究[J]. 中国粮油学报, 2015, 30(8): 99−104. [LAI A P, LU G Q, WANG Y. Ultrasonic -assisted enzymatic extraction technology of dietary fiber from sweetpotato residue[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2015, 30(8): 99−104.]

[29] 张孟凡, 岳丽, 敬思群, 等. 超声辅助-酶解协同作用提取红枣渣膳食纤维及其促消化作用[J]. 食品工业科技, 2019, 40(7): 205−212. [ZHANG M F, YUE L, JING S Q, et al. Extraction of dietary fiber from red jujube residue by ultrasonic-enzymatic hydrolysis synergistic action and its promoting digestion function[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(7): 205−212.]

[30] 丁政宇, 张士凯, 何子杨, 等. 响应面优化黄精渣不溶性膳食纤维酶法提取工艺及其结构表征 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(20): 157-163. [DING Z Y, ZHANG S K, HE Z Y, et al.

Response surface optimization enzymatic extraction and characterization of insoluble dietary fiber from polygonatum waste[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(20): 157-163.］

［31］ LOU Z X, WANG H X, WANG D X, et al. Preparation of inulin and phenols-rich dietary fibre powder from burdock root[J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 78(4): 666−671.

［32］ 梁文康, 苏平, 魏丹. 复合酶法提取黄秋葵可溶性膳食纤维的工艺优化及其理化特性、结构表征[J]. 食品工业科技, 2020, 41(17): 199−205.［LIANG W K, SU P, WEI D. Optimization techniques for the extraction of soluble dietary fiber from okra with complex enzymes and its physicochemical properties and structure characterization[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(17): 199−205.］

［33］ ZHANG W M, ZENG G L, PAN Y G, et al. Properties of soluble dietary fiber-polysaccharide from papaya peel obtained through alkaline or ultrasound-assisted alkaline extraction[J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 172: 102−112.

［34］ JACOMETTI G A, MELLO L R P F, NASCIMENTO P H A, et al. The physicochemical properties of fibrous residues from the agro industry[J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 62(1): 138−143.

［35］ 吕明彧, 刘家宏, 陈彦君, 等. 多元复合抗性淀粉减肥功效评价[J]. 食品科技, 2021, 46(1): 251−257.［LÜ M Y, LIU J H, CHEN Y J, et al. Evaluation of multi-element compound resistant starch for weight loss[J]. Food Science and Technology, 2021, 46(1): 251−257.］

［36］ 陈彦君, 刘家宏, 张 翔, 等. 多元复合抗性淀粉对高糖高脂模型小鼠代谢调节作用及机制 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(19): 357-362.［CHEN Y J, LIU J H, ZHANG X, et al. Metabolic regulation and mechanism of multi-component resistant starch on high-sugar and high-fat model mice[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(19): 357-362.］

雷秋琪, 叶诗洁, 黄永康, 等. 菱角壳黄酮提取工艺优化及抑肿瘤细胞增殖活性作用 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 224−232. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100178
LEI Qiuqi, YE Shijie, HUANG Yongkang, et al. Optimization of Extraction Process of Flavonoids from Water Chestnut Shell and Effect on Anti-tumor Cell Proliferation Activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 224−232. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100178

· 工艺技术 ·

菱角壳黄酮提取工艺优化及抑肿瘤细胞增殖活性作用

雷秋琪[1], 叶诗洁[2], 黄永康[2], 杨　过[2], 周　敏[1,3], 王宏勋[2,3], 王丽梅[2,3,*]
（1.武汉轻工大学食品科学与工程学院, 湖北武汉 430023;
2.武汉轻工大学生命科学与技术学院, 湖北武汉 430023;
3.湖北省生鲜食品工程技术研究中心, 湖北武汉 430023）

摘　要: 本实验旨在优化菱角壳黄酮提取工艺，并考察其对人宫颈癌 Hela 细胞增殖的抑制作用。采用单因素实验考察了提取时间、料液比、乙醇浓度以及提取温度对菱角壳总黄酮得率的影响，并以菱角壳总黄酮得率为响应值进行响应面分析，得出菱角壳黄酮提取的最佳提取工艺。同时，采用 CCK-8 法测定菱角壳黄酮对人宫颈癌 Hela 细胞增殖的影响，并测定其 IC_{50} 值，考察菱角壳黄酮的抗肿瘤活性。结果表明，菱角壳黄酮最佳提取工艺为：提取时间 28 min、料液比 1∶33 g/mL、乙醇浓度 53%。在该条件下菱角壳粗提物总黄酮的提取率可达 3.455%±0.16%。5、100、200、400、800 μg/mL 浓度的菱角壳黄酮粗提物、纯化物溶液孵育均对 Hela 细胞增殖均具有较好的抑制作用，且存在时间和剂量依赖性。以作用时间 48 h 为例，菱角壳黄酮粗提物、菱角壳黄酮纯化物、5-Fu 的 IC_{50} 值分别为 271.46、268.16、152.09 μg/mL。因此，同等时间下，菱角壳黄酮提取物的对于 Hela 细胞的增殖抑制作用弱于阳性对照 5-Fu。

关键词: 菱角壳黄酮, 工艺优化, 人宫颈癌 Hela 细胞, 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)14−0224−09
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100178
本文网刊:

Optimization of Extraction Process of Flavonoids from Water Chestnut Shell and Effect on Anti-tumor Cell Proliferation Activity

LEI Qiuqi[1], YE Shijie[2], HUANG Yongkang[2], YANG Guo[2], ZHOU Min[1,3], WANG Hongxun[2,3], WANG Limei[2,3,*]
（1.College of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China;
2.College of Life Science and Technology, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China;
3.Hubei Engineering Research Center for Fresh Food, Wuhan 430023, China）

Abstract: This experiment was to optimize the extraction process of water chestnut shell flavonoids and investigate its inhibitory effect on the proliferation of human cervical cancer Hela cells. A single factor experiment was used to investigate the effects of extraction time, material-to-liquid ratio, ethanol concentration and extraction temperature on the yield of total flavonoids in water chestnut shells, and response surface analysis was carried out based on the yield of total flavonoids in water chestnut shells to obtain the extraction of water chestnut shell flavonoids. At the same time, the CCK-8 method was used to determine the effect of water chestnut flavonoids on the proliferation of human cervical cancer Hela cells, and to determine its IC_{50} value to investigate the anti-tumor activity of water chestnut flavonoids. The experimental results showed that the best extraction process of water chestnut shell flavonoids was: extraction time 28 min, material-to-liquid ratio 1∶33 g/mL, and ethanol concentration 53%. Under these conditions, the extraction rate of total flavonoids in the crude

收稿日期: 2021−10−19
基金项目: 湖北省重点研发计划项目（2020BBB074）; 农产品加工与转化湖北省重点实验室开放课题（2018HBSQGDKFA03）。
作者简介: 雷秋琪（1997−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物, E-mail: 13746342732@qq.com。
*** 通信作者:** 王丽梅（1980−）, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 天然产物, E-mail: wanglimeiyx@163.com。

extract of water chestnut shell could reach 3.455%±0.16%. Incubation with the crude extract or purified solution of water chestnut shell flavonoids at concentrations of 5, 100, 200, 400, 800 μg/mL, all had a proliferation inhibitory effect on Hela cells, and there was a time and concentration dependence. Taking action time 48 h as an example, the IC_{50} values of the crude extract of water chestnut shell flavonoids, the purified material of water chestnut shell flavonoids, and 5-Fu were 271.46, 268.16, and 152.09 μg/mL, respectively. Therefore, at the same time, the inhibitory effect of water chestnut extract on the proliferation of Hela cells was weaker than that of the positive control 5-Fu.

Key words: water chestnut shell flavonoids; process optimization; human cervical cancer Hela cells; anti-tumor activity

菱角作为我国民间一种药用佳果已有几千年的历史[1]。根据《中华药海》所记载：“菱壳性味微苦、涩，性凉，入肺、脾、肠三经，具有解毒疗疮、涩肠止泻、清华湿热的功效”。《中药大辞典》记载：“菱壳可治腹泻、脱肛、痔疮、黄水疮、天泡疮”。研究表明，菱角壳具有抗肿瘤细胞增殖、抗氧化、抗菌、降糖和抗炎等作用[2−5]。在中国的民间用药中，菱角壳被用于辅助治疗癌症[6−10]。牛凤兰等[11]用富含三羟基苯甲酸二聚体粗菱壳水提物对 MFC 荷瘤小鼠进行体内实验，发现菱角壳水提物具有抑瘤效果而且存在量效关系。文献报道菱角壳中含有生物碱、酚酸类、萜类、黄酮类及多糖等功能成分[12−14]。李丽等[15]对东北菱黄酮类化合物的成分进行定性定量分析，发现其中可能含有黄酮苷或苷元、山柰酚、高良姜素的 2 个对映异构体以及多种其他成分。黄酮[16−17]具有抗氧化性[18−19]，可作为天然抗氧化剂用于食品行业。另外，黄酮还具有抗肿瘤、抗炎镇痛、保护肝脏等功效[20−25]，可用于相关疾病的药物开发。常见的黄酮提取方式有热水浸提法[26]、有机溶剂提取法[27]、超声波提取法[28−29]、酶解法[30]、膜分离提取法[31]、超临界流体萃取[32]。其中，热水浸提、有机溶剂提取法等是实验室常见提取工艺。主要依据相似相溶的原理[27]，一般具有操作简单、实验器材要求低、节约成本等诸多优点。另外，酶解法具有高度专一的特性，能够避免使用有机试剂且具有较高的提取率，但作用条件不便于调控。膜分离浓缩可以减少干燥时间，提高干燥效率。超临界 CO_2 萃取是目前国际上公认的先进物理萃取技术，主要是运用其溶剂力将超临界流体与萃取物接触，选择性分离提纯。但这三种提取方式均成本较高，不适于大规模生产。

根据目前的研究现状，黄酮已经广泛用于植物抗肿瘤活性的研究中[33]，但将菱角壳黄酮用于抗肿瘤活性的文献并不多见。其中 Hela 作为常见的人源肿瘤细胞[34−35]，也没有相关报道将其用于验证菱角壳黄酮的抗肿瘤活性。常见的用来检测肿瘤细胞增殖活性的方法有很多[36−37]，如：台盼蓝染色法、^3H 放射性同位素掺入法、MTT 法、细胞仪法等。MTT 法形成的蓝紫色结晶甲瓒（Formazan）物质不溶于水[28]，添加有机溶剂溶解后，因为弃去上清液的同时可能会丢失少部分的 Formazan，因此可能会产生误差。为了减少实验误差，目前更常用 CCK-8 法检测细胞增殖活性。CCK-8 法比 MTT 法对细胞浓度变化更敏感，测得的结果则更为准确。

因此，本研究以湖北洪湖菱角种植区所产的菱角取壳做为原料，采用单因素实验结合响应面分析法优化菱角壳黄酮提取工艺，运用 CCK-8 法检测菱角壳黄酮对人宫颈癌 Hela 细胞增殖的影响。拓展黄酮类物质的提取来源，为菱角壳黄酮的体外的抗肿瘤活性研究及菱角壳的开发利用理论基础。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

菱角壳（两角菱，Water chestnut shell）　湖北洪湖菱角种植地；人宫颈癌 Hela 细胞株　武汉百迈生物科技有限公司；无水乙醇（分析纯）、芦丁标品、亚硝酸钠（$NaNO_2$，分析纯）、硝酸铝（$Al(NO_3)_3$，分析纯）、氢氧化钠（NaOH，分析纯）　国药集团化学试剂有限公司；磷酸缓冲盐溶液（PBS）、DMEM（Dulbecco’s modified Eagle's medium）高糖培养基　塞默尔飞世尔生物化学制品有限公司；5-氟尿嘧啶（5-Fu）　sigma 公司；胎牛血清（Fetal Bovine Serum）　浙江天杭生物科技有限公司；青霉素链霉素溶液-双抗（后文均简称双抗）　上海斯信生物科技有限公司；胰蛋白酶（Trypsin）、乙二胺四乙酸（EDTA）　吉诺生物医药技术有限公司；二甲基亚砜（DMSO）　湖北百奥斯生物科技有限公司；细胞活力检测试剂盒（cell counting kit-8，CCK-8）　日本同仁试剂公司。

BL 2000F 型电子天平　上海升隆电子科技有限公司；PL402-L 型电子天平　梅特勒-托利多仪器有限公司；HH-S114 型电热恒温水浴锅　上海太仓精宏仪器设备有限公司；721-100 型紫外可见分光光度计　上海菁华科技仪器有限公司；T25 细胞培养瓶、冻存管　北京中创先锋科技有限责任公司；96 孔培养板　上海化科实验器材有限公司；CW-CJ-2FD 型双人单面净化工作台　苏州净化设备公司；SCHP-80 型 CO_2 培养箱　深圳市奥德玛电子科技有限公司；BX19-HK830 型倒置显微镜　奥林巴斯有限公司；SUNRISE 型酶标仪　奥地利 Tecan 公司；普通冰箱、−80 ℃ 低温冰箱　海尔集团；DHG-9145A 型电热恒温鼓风干燥箱　上海恒科学仪器有限公司；TGL-16GB 型离心机　北京医用离心机厂制造；GR60DA 型立式自动压力蒸汽灭菌锅　上海博迅实业有限公司医疗设备厂；SCIENTZ-12N 型真空冷冻干燥机　宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品处理 选用新鲜的菱角，摘去果肉，将菱角壳洗干净之后放在 40 ℃ 烘箱中烘干，用药物粉碎机粉碎，过 80 目筛得菱角壳粉，4 ℃ 下避光保存备用。

1.2.2 单因素实验 通过实验室原有实验基础以及相关文献资料，确定了对菱角壳总黄酮含量有明显影响的四个因素：提取时间、料液比、乙醇浓度、提取时间。

a：提取时间对菱角壳黄酮提取得率的影响：准确称取 15 份菱角壳粉，每份 1.0 g，置于 500 mL 三角瓶中，分为五个实验组，每组三个平行。选取浓度为 70% 的乙醇水溶液作为其提取溶剂，选取 1∶30 的料液比，将三角瓶分别放置在 50 ℃ 恒温水浴锅中提取，并分别提取 10、30、50、70、90 min，提取结束后用纱布进行过滤，得到样品液，冷却待测。

b：料液比对菱角壳黄酮提取得率的影响：选取浓度为 70% 的乙醇水溶液作为其提取溶剂，料液比分别为 1∶20、1∶30、1∶40、1∶50、1∶60，将三角瓶分别放置在 50 ℃ 恒温水浴锅中提取 50 min，其余实验操作与提取时间实验组相同。

c：乙醇浓度对菱角壳黄酮提取得率的影响：分别选取浓度为 30%、40%、50%、60%、70% 的乙醇水溶液作为其提取溶剂，料液比为 1∶30，将三角瓶分别放置在 50 ℃ 恒温水浴锅中提取 50 min，其余实验操作与提取时间实验组相同。

d：提取温度对菱角壳黄酮提取得率的影响：选取浓度为 70% 的乙醇水溶液作为其提取溶剂，料液比为 1∶30，将三角瓶分别放置在 40、50、60、70、80 ℃ 恒温水浴锅中提取 50 min，其余实验操作与提取时间实验组相同。

1.2.3 Box-Behnken 试验设计 如表 1 所示，根据单因素实验的结果，结合 Box-Behnken 中心组合的试验来设计优化试验，分析影响菱角壳黄酮提取得率主要因素，得出最佳提取工艺。

表 1 响应面试验因素水平

Table 1 Response surface experimental factor level

水平	提取时间(min)	料液比(g/mL)	乙醇浓度(%)
−1	10	1∶20	40
0	30	1∶30	50
1	50	1∶40	60

1.2.4 总黄酮含量的测定方法：

1.2.4.1 制作标准曲线 分别准确量取 0.3 mg/mL 芦丁标准品溶液(无水乙醇溶解)1、2、3、4、5、6、7、8 mL 置于 25 mL 容量瓶中，取无水乙醇分别补充至 1 mL，加超纯水至 12.5 mL，再加入 5% $NaNO_2$ 溶液 0.7 mL，充分混合均匀，静置 5 min。再加入 10% $Al(NO_3)_3$ 溶液 0.7 mL，混合均匀，静置 6 min 后，加入 1 mol/L NaOH 溶液 5 mL。最后加入无水乙醇补充样液的总体积至 25 mL，混合均匀，静置 10 min。另取 1 mL 无水乙醇，按照相同步骤进行处理后作为空白对照，在最大吸收波长 510 nm 处，使用紫外可见分光光度计测定吸光度，以吸光度 Y 值为纵坐标(Y)，以相应试管中浓度 X(mg/mL)为横坐标(X)，绘制标准曲线，得出回归方程。

1.2.4.2 测定样品中总黄酮含量 取 1 mL 样品液(无水乙醇溶解)，置于 25 mL 容量瓶中，加超纯水至 12.5 mL，再加入 5% $NaNO_2$ 溶液 0.7 mL，混合均匀，静置 5 min。再加入 10% $Al(NO_3)_3$ 溶液 0.7 mL，混合均匀，静置 6 min，加入 1 mol/L NaOH 溶液 5 mL，最后加入无水乙醇水补液至 25 mL，摇匀之后再静置 10 min。直接取 1 mL 超纯水按照相同步骤进行处理后作为空白对照，在最大吸收波长 510 nm 处，使用紫外可见分光光度计测定吸光度，最后结合标准曲线计算测定样品中总黄酮浓度计算总黄酮提取得率。样品中总黄酮得率(%)=$\frac{C\times V}{m\times 1000}\times 100$。式中，C 为由标曲得出的总黄酮浓度，mg/mL；V 为样液总体积，mL；m 为菱角壳粉的质量，g。

1.2.5 菱角壳黄酮对 Hela 细胞增殖活性的影响

1.2.5.1 药品配制方法 a：培养基：以 DMEM 高糖培养基∶胎牛血清∶双抗=90∶10∶1 的比例，取 45 mL 的 DMEM 高糖培养基 5 mL 胎牛血清、0.5 mL 双抗配制成 50 mL 培养基。

b：冻存液：将 DMEM 高糖培养基、胎牛血清、DMSO 按照 7∶3∶1 比例混合配制成冻存液，密封保存于 4 ℃ 冰箱。

1.2.5.2 菱角壳黄酮纯化及样品配制 根据实验室研究基础以及现有研究成果[38−39]，采用 AB-8 大孔树脂对菱角壳黄酮粗体物进行纯化，以进行后续实验。预处理：将 AB-8 大孔吸附树脂用无水乙醇浸泡 24 h 以充分溶胀后，95% 乙醇冲洗至洗出液加 5 倍量超纯水时无白色浑浊，超纯水洗三次，密封保存，备用。再生：将使用过树脂用无水乙醇洗脱至无色后，0.5 mol/L 盐酸浸泡 2 h，水洗至中性，0.5 mol/L NaOH 浸泡 2 h，水洗至中性。纯化工艺为：将处理过的 AB-8 大孔吸附树脂加入 26×50 mm 层析柱中，吸附流速 0.8 mL/min，一次洗脱上样体积为 20 mL，样品浓度 10 mg/mL，用 70% 乙醇溶液洗脱，洗脱样品的流速为 0.8 mL/min，经纯化浓缩冻干后得到菱角壳黄酮纯化物。

菱角壳黄酮溶液的配制：按照 1.2.1 中得出的提取工艺进行菱角壳黄酮粗提取物的提取，并取一定量菱角壳黄酮粗提物按照上述方法进行纯化。分别称量 80 mg 菱角壳黄酮粗提物、菱角壳黄酮纯化物、5-Fu 溶解于 1 mL DMSO 溶液中，用 DMEM 培养基分别稀释到 50、100、200、400、500、600、700、800 μg/mL。黄酮不溶于水，可溶于 DMSO，而 DMSO 溶液本身对细胞具有毒害作用，以 DMSO 作为溶剂配置相应浓度的药品时，其浓度不可高于 0.5%。

1.2.5.3　Hela 细胞复苏　将冻存于−80 ℃ 冰箱装有 Hela 细胞的冻存管取出后迅速放入 37 ℃ 水浴锅中快速解冻，解冻后立即停止水浴，将冻存管移入超净工作台，用移液枪轻轻吹打细胞使之悬浮混匀，将冻存管所有细胞转移到离心管中离心（1000 r/min，5 min），离心结束后弃去离心管中的上清液。在离心管中加入 1 mL DMEM 高糖培养基，用移液枪轻轻吹打离心管底部，使底部细胞悬浮并与 DMEM 高糖培养基充分混匀。将细胞转移到 T25 细胞培养瓶中，加入 4 mL DMEM 高糖培养基，将瓶盖拧紧，水平划十字摇匀后将培养瓶放入 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养。放入培养箱之前注意用 75% 酒精喷洒培养瓶，以达到灭菌目的。放入培养箱之后适度将瓶盖拧紧后再回转半圈，以达到与培养箱通气目的。每 24 h 换液一次：把培养基吸出，加 1 mL PBS，盖上瓶盖轻轻摇动后弃去 PBS，反复清洗三次，在培养瓶中加入 5 mL DMEM 高糖培养基，最后放入 37 ℃、5% CO_2 培养箱培养。

1.2.5.4　细胞传代　首先在倒置显微镜下观察，将融合度大于 90% 的培养瓶挑出，弃去培养基，向培养瓶中加入 1 mL PBS 清洗细胞，随后弃去 PBS，反复三次，在培养瓶中加入 1 mL 胰蛋白酶消化 1 min，立即弃去胰蛋白酶。在培养瓶中加入 1 mL DMEM 高糖培养基，终止消化，用移液枪将瓶壁上剩余的细胞轻轻吹打使之脱落。将培养瓶中的细胞转移到 15 mL 离心管内，1000 r/min 离心 5 min，弃去上清液。按照适当密度在离心管中加入 2~3 mL 培养基，用移液枪轻轻吹打使离心管底部细胞浮起，再将离心管中细胞转移 1 mL 至装有 4 mL 培养基的 T25 瓶内，轻轻摇匀，定期观看细胞生长状态。Hela 细胞传代培养若干代后，待 Hela 细胞处于对数生长期时，细胞活力增强，细胞密度明显增大，此时的细胞就可以用于 CCK-8 法测定药物对肿瘤细胞的增殖抑制作用。

1.2.5.5　细胞冻存　取对数生长期细胞，冻存前 2 h 换液一次，用胰蛋白酶消化制成细胞悬浮液，转移到离心管中离心（1000 r/min、5 min）后弃去上清液。在离心管中添加 1.5 mL 冻存液，用移液枪轻轻吹打细胞，使之悬浮并与冻存液混匀后，将细胞转移至冻存管中。用封口膜密封，贴上标签，标记名称、时间。实行分阶段降温：4 ℃ 保存 2 h，随后−20 ℃ 保存 2 h，最后将细胞转移至−80 ℃ 下冻存。

1.2.5.6　CCK-8 法测定菱角壳黄酮对 Hela 细胞增殖抑制作用　实验开始前首先用胰蛋白酶消化细胞，将细胞制成悬浮液，置于 15 mL 离心管中离心（1000 r/min，5 min），最后在离心管中加入 8 mL 培养基。将浓度为 1×10^5 cells/mL 的 Hela 细胞悬浮液接种 96 孔培养板，取三瓶细胞分别接种于三个 96 孔培养板，每个孔加入 100 μL 细胞液。一个培养板用 3 种药品，每种药品有 5 个浓度，每一个浓度 5 个复孔，同时设置 5 个空白对照孔。三个培养板置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中 48 h，使孔板中细胞生长状态同步，培养期间有换液步骤。48 h 后，向培养板中分别加入 200 μL 浓度分别为 50、100、200、400、800 μg/mL 的菱角壳黄酮粗提物、菱角壳黄酮纯化物、5-Fu。其中 5-Fu 作为阳性对照，另外加入 200 μL 培养基作为空白对照，分别培养 12、24、48 h。达到适当时间后移除孔板中的培养基，加入 100 μL 新鲜培养基，避光加入 10 μL CCK-8 试剂，置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中孵育 3 h，用酶标仪于 450 nm 条件下读数，测出 OD 值。按照以下计算公式计算细胞增殖抑制率：细胞增殖抑制率（IC%）$=\left(1-\frac{OD_{实验组}}{OD_{对照组}}\right)\times100\%$。其中，$OD_{实验组}$值：菱角壳黄酮提取物或 5-Fu 处理孔的 OD 值；$OD_{对照组}$值：无药物处理孔的 OD 值。

根据不同样品不同浓度对 Hela 细胞的增殖抑制率，选择抑制率在 50% 左右的浓度范围，进一步试验得出半抑制质量浓度，即 IC_{50} 值。以样品浓度作为横坐标，抑制率 IC% 为纵坐标，作线性回归方程，分别计算菱角壳黄酮粗提物、纯化物，以及 5-Fu 作用 12、24、48 h 的 IC_{50} 值。

1.3　数据处理

本文中，单因素实验与响应面试验的实验组样品平行次数与测试平行次数均为 3 次，而 CCK-8 法测定菱角壳黄酮对 Hela 细胞增殖抑制作用的实验中，均复孔 5 次，以均值表示最终结果。利用 Excel 2020、SPSS16.0、Design ExpertV8.0.6.1 软件进行数据分析以及绘图处理。

2　结果与分析

2.1　单因素实验结果分析

2.1.1　提取时间对菱角壳黄酮得率的影响　如图 1 所示，在实验组中，提取时间为 30 min 时菱角壳黄酮得率最高为 3.04%。当提取时间小于 30 min 时，菱角壳黄酮提取得率随着提取时间的增加而上升成，而后，随着提取时间增加，菱角壳黄酮得率会随之下降。原因可能是提取时间过长，使得原料中的其他醇溶性物质被溶解，进而导致杂质增加，使得黄酮提取率下降。因此，选择提取时间 10、30、50 min 作为响

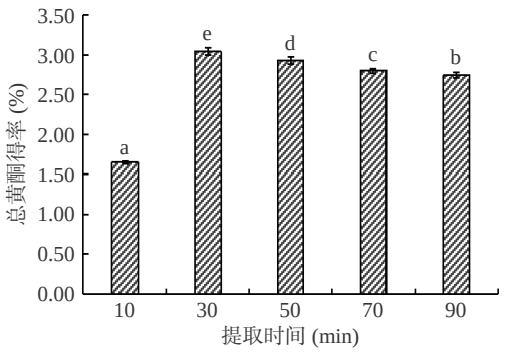


图 1　提取时间对菱角壳黄酮提取得率的影响

Fig.1　Effect of extraction time on the extraction yield of water chestnut flavonoids

应面试验的因素水平。提取时间的变化对菱角壳黄酮提取得率的影响极显著(P<0.01),以上结果表明提取时间对菱角壳黄酮得率有影响。

2.1.2 料液比对菱角壳黄酮得率的影响结果分析

如图 2 所示,在实验组中,料液比为 1∶30 g/mL 时菱角壳黄酮提取效果最佳,此时的菱角壳黄酮得率为 3.13%。料液比超过 1∶30 g/mL 之后,菱角壳黄酮得率呈下降趋势。产生这种现象的原因可能是溶剂用量少时,提取不够充分,但随着溶剂增多,其它杂质的溶出率也会增大。因此,选择料液比 1∶20、1∶30、1∶40 g/mL 作为响应面试验的因素水平。料液比的变化对菱角壳黄酮得率的影响极显著(P<0.01),以上结果表明料液比对菱角壳黄酮得率有影响。

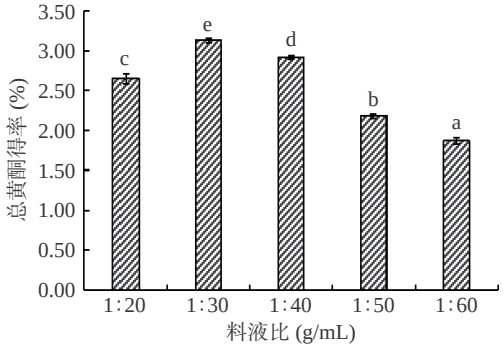


图 2 料液比对菱角壳黄酮提取得率的影响

Fig.2 Effect of the ratio of material to liquid on the extraction yield of water chestnut flavonoids

2.1.3 乙醇浓度对菱角壳黄酮得率的影响结果分析

由图 3 所示,在实验组中,乙醇浓度为 50% 时菱角壳黄酮提取得率最高为 3.20%。当乙醇的浓度超出 50% 时,菱角壳中总黄酮得率与乙醇浓度成反比。原因可能是乙醇浓度过高,某些醇溶性杂质和脂溶性物质的溶出率会增大,使黄酮类物质的溶出受到影响,从而造成菱角壳黄酮的提取率下降。因此,选择乙醇浓度 40%、50%、60% 作为响应面实验的因素水平。乙醇浓度的变化对菱角壳黄酮得率的影响极显著(P<0.01),以上结果表明乙醇浓度对菱角壳黄酮得率有影响。

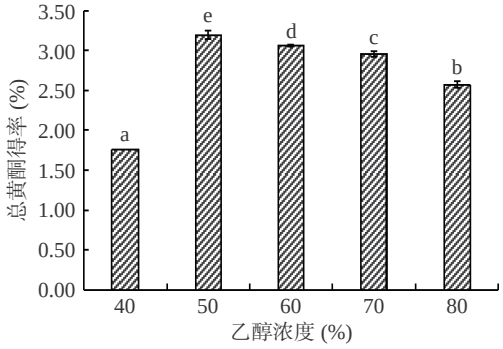


图 3 乙醇浓度对菱角壳黄酮提取得率的影响

Fig.3 Effect of ethanol concentration on the extraction yield of water chestnut flavonoids

2.1.4 提取温度对菱角壳黄酮得率的影响结果分析

如图 4 所示,在实验组中,提取温度为 60 ℃ 时,菱角壳黄酮提取效果最佳,对应总黄酮提取率为 3.11%。当提取温度变化时,40、50、70 ℃ 处理,以及 60、70 ℃ 处理之间对于菱角壳黄酮提取得率的影响差异并不显著(P>0.05)。以上结果表明提取温度对菱角壳黄酮提取得率没有影响,因此在进行响应面试验设计时可以舍去对该因素的讨论,固定提取温度为 60 ℃。

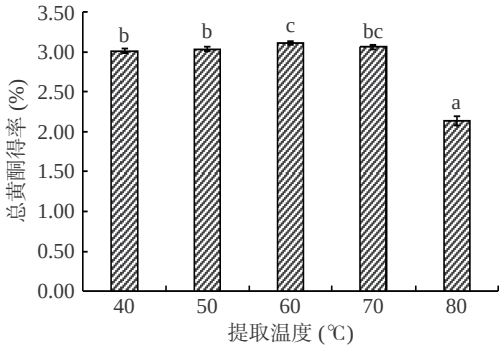


图 4 提取温度对菱角壳总黄酮提取得率的影响

Fig.4 Effect of extraction temperature on the extraction yield of total flavonoids from water chestnut shell

2.2 响应面试验结果分析

2.2.1 响应面试验结果 根据 Design Expert 软件提供的模型,选取提取时间(X_1, min)、料液比(X_2, g/mL)、乙醇的浓度(X_3, %)为变量因素,设定响应值为菱角壳总黄酮得率(Y, %),响应面试验结果如表 2:

表 2 响应面试验结果

Table 2 Response surface experimental design and results

实验号	X_1	X_2	X_3	Y
1	−1	−1	0	2.720
2	−1	1	0	2.395
3	1	−1	0	2.343
4	1	1	0	1.909
5	0	−1	1	3.311
6	0	−1	−1	2.735
7	0	1	−1	2.631
8	0	1	1	2.803
9	−1	0	−1	2.429
10	1	0	−1	1.953
11	−1	0	1	2.621
12	1	0	1	2.254
13	0	0	0	3.427
14	0	0	0	3.412
15	0	0	0	3.518
16	0	0	0	3.453
17	0	0	0	3.409

2.2.2 回归模型建立及方差分析 通过 Design-Expert 软件进行回归分析得到回归方程:$Y=-9.77070+0.11095X_1+161.07200X_2+0.34237X_3-0.10900X_1X_2+1.36250E-004X_1X_3-0.80800X_2X_3-2.07225E-003X_1^2-1748.16000X_2^2-3.00650E-003X_3^2$,$R^2=0.9960$。如表 3 所示,模型 P<0.0001,达到极显著水平;失拟项

P>0.05，表示方程拟合度良好。方差分析的结果表明提取时间、料液比和乙醇浓度对菱角壳黄酮得率的影响均极显著（P<0.01）。$P(X_1X_2)$>0.05、$P(X_1X_3)$>0.05、$P(X_2X_3)$<0.01，由此证明，料液比(X_2)和乙醇浓度(X_3)的交互作用对菱角壳黄酮得率的影响显著，其余交互作用的影响不显著。

2.2.3　两两因素交互作用分析　为了使结果更直观，做出三维空间图进行进一步的分析：响应面坡度越陡峭，表明响应值对于条件的改变越敏感，该因素对菱角壳黄酮得率的影响越大；反之则表明该因素对菱角壳黄酮得率的影响越小。如图 5 所示，在各因素两两交互作用对总黄酮得率的影响中，提取时间与料液比的交互作用显著，提取时间与乙醇浓度、料液比与乙醇浓度的交互作用对菱角壳黄酮得率的影响不显著，这与方差分析的结果一致。

2.2.4　优化工艺的验证实验　通过 Design-Expert 软件设计响应面试验优化菱角壳黄酮提取工艺的条件，结果显示最佳提取工艺：提取时间 27.65 min、料液比 1∶33.33 g/mL、乙醇浓度 53.13%，对应的总黄酮得率为 3.512%。为了实际操作可行，将最佳工艺条

表 3　回归模型方差分析

Table 3　Analysis of variance of regression model

方差来源	自由度	方差	均方差	F	$Pr>F$
模型	9	4.710	0.520	193.040	<0.0001
X_1	1	0.360	0.360	134.220	<0.0001
X_2	1	0.230	0.230	86.680	<0.0001
X_3	1	0.190	0.190	71.020	<0.0001
X_1X_2	1	2.970E-003	2.970E-003	1.100	0.3300
X_1X_3	1	2.970E-003	2.970E-003	1.100	0.3300
X_2X_3	1	0.041	0.041	15.050	0.0061
X_1^2	1	2.890	2.890	1067.28	<0.0001
X_2^2	1	0.310	0.310	115.900	<0.0001
X_3^2	1	0.380	0.380	140.410	<0.0001
残差误差	7	0.019	2.711E-003		
失拟项	3	0.011	3.626E-003	1.790	0.2880
纯误差	4	8.095E-003	2.024E-003		
总和	16	4.730			

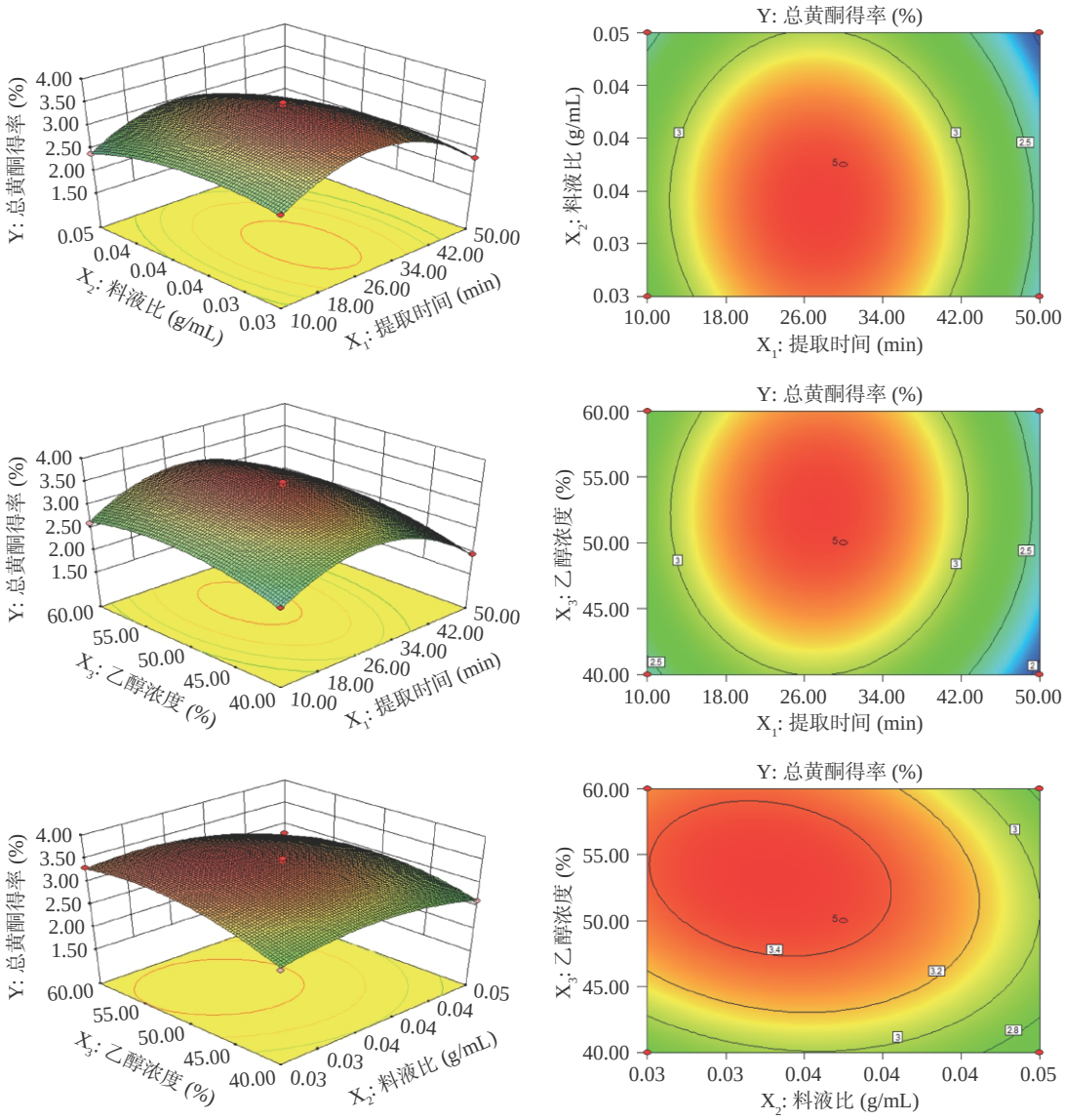


图 5　各因素两两交互作用对总黄酮得率的影响

Fig.5　Effect of the interaction of various factors on the yield of total flavonoids

件修正为：提取时间 28 min、料液比 1∶33 g/mL、乙醇浓度 53%，对应的总黄酮得率为 3.512%，对该工艺条件下进行验证，重复实验三次，得到菱角壳总黄酮得率为 3.455%±0.16%。实际值与模型预测值相近，表明该模型具有一定的可行性。

2.3 菱角壳黄酮对 Hela 细胞增殖的影响

2.3.1 不同药物不同条件对 Hela 细胞增殖的影响

根据不同浓度、不同作用时间的菱角壳黄酮粗提物溶液、菱角壳黄酮纯化物溶液、5-Fu 溶液对 Hela 细胞增殖的抑制率，评价菱角壳黄酮对 Hela 细胞的增殖抑制效果。5-Fu，即胸苷酸合成酶抑制药，是尿嘧啶 5 位上的氢被氟取代的衍生物。5-Fu 在细胞内转变为 5-氟尿嘧啶脱氧核苷酸（5F-dUMP），而抑制脱氧胸苷酸合成酶，阻止脱氧尿苷酸（dUMP）甲基化转变为脱氧胸苷酸（dTMP），从而影响 DNA 的合成。此外，5-FU 在体内可转化为 5-氟尿嘧啶核苷，以伪代谢产物形式掺入 RNA 中干扰蛋白质的合成，从而干扰细胞增殖，可作为阳性对照。

根据表 4 可知菱角壳黄酮粗提物、纯化物均对 Hela 细胞具有抑制作用，这种抑制作用在实验范围内，均弱于阳性对照 5-Fu。同时，菱角壳提取物对 Hela 细胞增殖的抑制作用与提取物的浓度、作用时间均呈正相关，会随着作用时间的增加或作用浓度的升高而增长。本文中的实验组参数范围内，并未出现高浓度或长时间抑制作用。此外，药物浓度低至 50 μg/mL 时，作用相同时间，5-Fu 抑制率>菱角壳黄酮粗提物抑制率>菱角壳黄酮纯化物溶液抑制率，；当药物浓度在 100~800 μg/mL 时，5-Fu 溶液抑制率>菱角壳黄酮纯化物抑制率>菱角壳黄酮粗提物溶液抑制率。出现这种现象的原因可能是，低浓度的菱角壳黄酮对于 Hela 细胞的毒性作用不明显，需要浓度累积，并且由于其对于微生物的抑制作用反而会为 Hela 细胞提供更好的生长环境。黄酮类物质对于 Hela 细胞等肿瘤细胞具有一定的细胞毒性，可通过促进细胞凋亡来抑制其增殖。根据现有文献报道[40−41]，大多数情况下这种抑制作用，有一定的浓度依赖，与本文的研究结果一致。

表 4 不同药物不同条件下对 Hela 细胞增殖的抑制作用

Table 4 Inhibitory effects of different drugs on the growth of Hela cells under different conditions

药物种类	浓度（μg/mL）	抑制率（%）		
		12 h	24 h	48 h
空白对照组	0	0.00	0.00	0.00
菱角壳黄酮粗提物	50	7.07	13.39	20.80
	100	13.34	15.74	26.60
	200	33.29	39.26	42.31
	400	43.18	49.66	51.27
	800	53.31	61.70	76.92
菱角壳黄酮纯化物	50	6.22	7.24	10.05
	100	16.10	18.95	22.77
	200	20.45	22.84	40.50
	400	44.42	46.38	65.10
	800	59.25	63.03	74.16
5-Fu	50	8.32	23.29	30.34
	100	11.41	26.16	42.45
	200	23.08	58.24	57.58
	400	45.91	62.74	66.43
	800	54.31	71.27	75.75

2.3.2 不同药物抑制 Hela 细胞的 IC_{50} 值 IC_{50} 值[42−43]（half maximal inhibitory concentration）是指示某一物质（主要指抑制剂）或者药物在抑制某些生物程序的时半量。在凋亡方面，可以理解为一定浓度的某种药物诱导细胞凋亡率达到 50%，该浓度称为 50% 抑制浓度，即凋亡细胞与全部细胞数之比等于 50% 时所对应的浓度。IC_{50} 值可以用来衡量药物诱导凋亡的能力，即诱导能力越强，该数值越低。

根据表 5 可知随着作用时间的增加，菱角壳黄酮粗提物、纯化物、5-Fu 的 IC_{50} 值逐渐下降，则进一步证明在已验证的 48 h 处理时间内，菱角壳黄酮粗提物、菱角壳黄酮纯化物、5-Fu 对 Hela 细胞的增殖抑制作用均有时间依赖性，呈极显著正相关（$P<0.01$）。同时，以作用时间达到 48 h 为例，菱角壳黄酮粗提物、菱角壳黄酮纯化物、5-Fu 的 IC_{50} 值分别为：271.46、268.16、152.09 μg/mL。菱角壳黄酮纯化物 IC_{50} 值低于菱角壳黄酮粗提物，同时，菱角壳黄酮粗提物、纯化物的 IC_{50} 值均高于 5-Fu。进一步验证说明在实验范围内，菱角壳黄酮纯化物对 Hela 细胞的增殖抑制作用高于菱角壳粗提物，菱角壳提取物对 Hela 细胞的抑制作用均弱于阳性对照 5-Fu。且，不同药物对 Hela 细胞 IC_{50} 值得影响差异显著（$P<0.05$）。

表 5 不同药物对 Hela 细胞增殖抑制作用的 IC_{50} 值

Table 5 Inhibitory effect of purified water chestnut shell flavonoids on the growth of Hela cells

药物种类	IC_{50}值		
	12 h	24 h	48 h
菱角壳黄酮粗提物	600.73^{Cb}	409.35^{Bb}	271.46^{Ac}
菱角壳黄酮纯化物	550.81^{Ca}	473.04^{Bc}	268.16^{Ab}
5-Fu	602.00^{Cc}	238.39^{Ba}	152.09^{Aa}

注：不同大写字母表示相同药物不同时间的IC_{50}值差异极显著，$P<0.01$；不同小写字母表示，相同时间不同药物的IC_{50}值差异显著，$P<0.05$。

3 结论

以菱角壳黄酮粗提物中的总黄酮提取得率为评价指标，优化所得最佳工艺参数为：提取时间 28 min、料液比 1∶33 g/mL、乙醇浓度 53%。在该条件下，菱角壳黄酮的提取率为 3.455%±0.16%。其中，提取温度对最终得率的影响不显著（$P>0.05$），提取时间、料液比、乙醇浓度对于最终结果的影响均极显著（$P<0.01$）。两两交互，仅提取时间与料液比的交互作用对最终菱角壳黄酮粗提物中的总黄酮提取得率影响极显著（$P<0.01$）。通过此工艺提取所得菱角壳黄酮粗提物，以及经过进一步分离纯化的菱角壳黄酮纯化物均能够有效抑制 Hela 细胞的增殖，说明菱角壳黄酮提取物具有一定的抗肿瘤活性。结合抑制率的

变化趋势可知，菱角壳黄酮提取物抑制 Hela 细胞活性对浓度和作用时间有依赖性。在一定范围内，其抑制作用与提取物浓度和作用时间均呈正相关。菱角壳作为菱角生产企业的下脚料，每年产量颇多，直接丢弃会造成了较大的资源浪费。本研究可以对菱角壳以及其它类似的农副产品资源开发利用提供参考。

参考文献

[1] 周光雄, 吴志敏, 杨政红, 等. 菱角皮中鞣质类成分研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(6): 1414−1415. [ZHOU G X, WU Z M, YANG Z H, et al. Study on tannins in water chestnut skin[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica, 2010, 21(6): 1414−1415.]

[2] 江燕. 菱角壳化学成分及体外生物活性研究 [D]. 杭州: 浙江工业大学, 2019. [JIANG Y. Study on the chemical composition and *in vitro* biological activity of water chestnut shell[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2019.]

[3] 左袁袁, 吕寒, 简暾昱, 等. 菱角壳化学成分及其药理作用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(4): 94−99. [ZUO Y Y, LÜ H, JIAN T Y, et al. Research progress on the chemical constituents and pharmacological effects of water chestnut shells[J]. Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2019, 21(4): 94−99.]

[4] 牛凤兰, 陈林, 宋德锋, 等. 菱角的化学成分及药效活性研究进展[J]. 中药材, 2009, 32(12): 1926−1929. [NIU F L, CHEN L, SONG D F, et al. Research progress on the chemical composition and pharmacodynamic activity of water chestnut[J]. Chinese Medicinal Materials, 2009, 32(12): 1926−1929.]

[5] 董晶莱, 高广春. 菱角壳的化学成分和药理活性研究进展[J]. 嘉兴学院医学院学报, 2009, 8(10): 23−27. [DONG J L, GAO G C. Research progress on the chemical constituents and pharmacological activities of water chestnut shells[J]. Journal of Jiaxing University Medical College, 2009, 8(10): 23−27.]

[6] 任青. 菱角壳提取物的抗癌研究及其胃漂浮片的研制 [D]. 天津: 天津大学, 2010. [REN Q. Anti-cancer research of water chestnut shell extract and development of gastric floating tablets [D]. Tianjin: Tianjin University, 2010.]

[7] WU C H, DING Y Z. Study of different extracts from water caltrop shells on inhibiting lung cancer cell line A549[J]. Journal of TCM Univ of Hunan, 2012, 32(1): 27−30.

[8] 林秋生. 菱壳生物活性成分分析及抗胃癌机制研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2013. [LIN Q S. Analysis of bioactive components of rhizome and study on anti-gastric cancer mechanism[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2013.]

[9] NING Y, YU H N, ZHOU X M, et al. Optimal process for semi-bionic extraction of bioactive compounds against gastric cancer from water chestnut shell by uniform designation[J]. Journal of Zhejiang University (Agric. & Life Sci.), 2011, 37(3): 332−337.

[10] DONG J L, GAO G C. Review on the phytochemical and pharmacological study of trapa shell[J]. Journal of Jiaxing University, 2014, 26(26): 68−71.

[11] 牛凤兰, 李晨旭, 董威严, 等. 菱壳水提物对胃癌细胞抑制作用的实验研究 [J]. 白求恩医科大学学报, 2001, 27(5): 495−496. [NIU F L, LI C X, DONG W Y, et al. Experimental study on the inhibitory effect of water extract of water chestnut shells on gastric cancer cells[J]. Journal of Baiqiuen Medical University, 2001, 27(5): 495−496.]

[12] 李亚军, 梁忠厚. 黄酮类化合物提取研究进展[J]. 粮食与油脂, 2021, 34(11): 14−17. [LI Y J, LIANG Z H. Research progress on the extraction of flavonoids[J]. Food and Oils, 2021, 34(11): 14−17.]

[13] 刘冬敏, 王建辉, 刘永乐. 菱角壳中黄酮、总酚和皂苷的提取及其抗氧化性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(9): 3668−3672. [LIU D M, WANG J H, LIU Y L. Extraction of flavonoids, total phenols and saponins from water chestnut shells and their antioxidant properties[J]. Journal of Food Safety and Quality Inspection, 2016, 7(9): 3668−3672.]

[14] TULYAHAN V, BOONDEE K, MAHAWANICH T. Characteristics of starch from water chestnut (*Trapa bispinosa* Roxb.)[J]. Journal of Food Biochemistry, 2005, 29(4): 337−348.

[15] 李丽, 李杰民, 盛金凤, 等. 超声波提取罗汉果渣中的黄酮优化工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(15): 61−65. [LI L, LI J M, SHENG J F, et al. Study on the optimization technology of ultrasonic extraction of flavonoids from Luo Han Guo pomace[J]. Food Research and Development, 2016, 37(15): 61−65.]

[16] 胡金颖, 代立霞, 张丹参, 等. 酸枣仁中黄酮类物质药理作用研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2021, 35(10): 785−786. [HU J Y, DAI L X, ZHANG D S, et al. Research progress on the pharmacological effects of flavonoids in jujube seed[J]. Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology, 2021, 35(10): 785−786.]

[17] 李志平, 李护护. 银杏叶中黄酮类化合物的提取和分离[J]. 中国油脂, 2021, 46(2): 131−134. [LI Z P, LI H H. Extraction and separation of flavonoids from ginkgo biloba leaves[J]. China Oils and Fats, 2021, 46(2): 131−134.]

[18] 陈惠卿, 陈惠婷, 张颖, 等. 乙醇法制备葛花醇提物的工艺优化及其抗氧化活性[J]. 福建轻纺, 2021(10): 2−8,11. [CHEN H Q, CHEN H T, ZHANG Y, et al. Process optimization and antioxidant activity of ethanol extracts of *Pueraria lobata* flower prepared by ethanol[J]. Fujian Textile, 2021(10): 2−8,11.]

[19] 李鹏婧, 柳旭光, 龙海荣, 等. 超声波辅助提取菱角壳总黄酮及抗氧化性研究[J]. 食品科技, 2011, 36(1): 167−171. [LI P J, LIU X G, LONG H R, et al. Ultrasonic-assisted extraction of total flavonoids from water chestnut shells and their antioxidant properties[J]. Food Science and Technology, 2011, 36(1): 167−171.]

[20] 高慧, 付强, 孙洁, 等. 黄酮类化合物及其纳米制剂在肿瘤防治中的研究进展[J]. 肿瘤代谢与营养电子杂志, 2020, 7(3): 362−365. [GAO H, FU Q, SUN J, et al. Research progress of flavonoids and their nano-preparations in tumor prevention and treatment[J]. Electronic Journal of Tumor Metabolism and Nutrition, 2020, 7(3): 362−365.]

[21] LISKOVA A, SAMEC M, KOKLESOVA L, et al. Flavonoids as an effective sensitizer for anti-cancer therapy: Insights into multi-faceted mechanisms and applicability towards individualized patient profiles[J]. The EPMA Journal, 2021(prepublish): 21−22.

[22] WANG J G, JIAN W J, LI Y, et al. Nobiletin promotes the pyroptosis of breast cancer via regulation of miR-200b/JAZF1 axis[J]. The Kaohsiung Journal of Medical Sciences, 2021, 37(7): 572−582.

[23] GANAI S A, SHEIKH F A, BABA Z B, et al. Anticancer activity of the plant flavonoid luteolin against preclinical models

of various cancers and insights on different signalling mechanisms modulated[J]. Phytotherapy Research: PTR, 2021, 35(7): 3509−3532.

[24] 王雪, 刘景楠, 夏顺利, 等. 中药总黄酮抗肿瘤活性及机制的研究现状[J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(4): 484−486,496. [WANG X, LIU J N, XIA S L, et al. Research status of anti-tumor activity and mechanism of total flavonoids of traditional Chinese medicine[J]. Chinese Journal of Clinical Pharmacology, 2021, 37(4): 484−486,496.]

[25] 许地元, 叶萍, 李海丽, 等. 芭叶雪莲总黄酮提取工艺优化及其粗提物抗肿瘤活性[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(4): 130−134. [XU D Y, YE P, LI H L, et al. Optimization of the extraction process of the total flavonoids of *Saussurea praecox* and the anti-tumor activity of the crude extract[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2021, 49(4): 130−134.]

[26] 刘冬敏, 王建辉, 刘永乐, 等. 菱角壳中总黄酮提取工艺的优化[J]. 食品与机械, 2016, 32(5): 173−176. [LIU D G, WANG J H, LIU Y L, et al. Optimization of extraction process of total flavonoids in water chestnut shells[J]. Food and Machinery, 2016, 32(5): 173−176.]

[27] LI C B, XU M Y, CHEN Y, et al. Extraction of flavonoids from sword flower and methodology of its preparations[J]. International Journal of Food Science and Biotechnology, 2021, 6(1).

[28] 王艳, 张铁军. 微波萃取技术在中药有效成分提取中的应用[J]. 中草药, 2005, 36(3): 67. [WANG Y, ZHANG T J. Application of microwave extraction technology in the extraction of effective components of traditional Chinese medicine[J]. Chinese Herbal Medicine, 2005, 36(3): 67.]

[29] LIAO J Q, GUO Z R, YU G C. Process intensification and kinetic studies of ultrasound-assisted extraction of flavonoids from peanut shells[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2021, 76: 56−61.

[30] 许一平, 王新功, 梁伟玲, 等. 酶解-超声偶联法提取桔梗茎叶总黄酮的工艺研究[J]. 化工管理, 2020(29): 19−20,34. [XU Y P, WANG X G, LIANG W L, et al. Study on the technology of extracting total flavonoids from *Platycodon grandiflorum* stems and leaves by enzymolysis-ultrasonic coupling[J]. Chemical Management, 2020(29): 19−20,34.]

[31] 郑菲艳, 洪佳敏, 徐晓俞, 等. 木豆叶提取液膜分离纯化研究[J]. 福建农业学报, 2016, 31(10): 1122−1125. [ZHENG F Y, HONG J M, XU X Y, et al. Study on separation and purification of pigeon pea leaf extract with liquid membrane[J]. Fujian Journal of Agriculture, 2016, 31(10): 1122−1125.]

[32] 牛凤兰, 黄占有, 吴秀华, 等. 菱角挥发成分超临界萃取及GC-MS方法检测[J]. 中国公共卫生, 2009, 25(1): 119−120. [NIU F L, HUANG Z Y, WU X H, et al. Supercritical extraction and GC-MS detection of volatile components of water chestnut[J]. Chinese Public Health, 2009, 25(1): 119−120.]

[33] SHIREEN A, FERDUSEE A M, MOUTIUR R M, et al. Computational and experimental studies to optimize the extraction of flavonoids from mango powder using response surface methodology[J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2021 (prepublish): 1−12.

[34] 刘瑞芳, 张志迪, 陈梦茜, 等. PHF19对宫颈癌细胞增殖、侵袭和迁移的影响[J]. 牡丹江医学院学报, 2021, 42(3): 8−12. [LIU R F, ZHANG Z D, CHEN M X, et al. The effect of PHF19 on the proliferation, invasion and migration of cervical cancer cells[J]. Journal of Mudanjiang Medical College, 2021, 42(3): 8−12.]

[35] 邓春玲, 朱坤, 刘涛瑞, 等. 敲低葡萄糖-6-磷酸酶催化亚基(G6PC)阻断AKT/mTOR通路抑制宫颈癌HeLa细胞增殖、侵袭和迁移[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2021, 37(6): 520−526. [DENG C L, ZHU K, LIU T R, et al. Knockdown of the glucose-6-phosphatase catalytic subunit (G6PC) blocks the AKT/mTOR pathway and inhibits the proliferation, invasion and migration of cervical cancer HeLa cells[J]. Cells and Journal of Molecular Immunology, 2021, 37(6): 520−526.]

[36] TOMINAGA H, ISHIYAMA M, OHSETO F, et al. A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay[J]. Anal Commun, 1999, 36(1): 47−50.

[37] LIU A Q, XIA L. Comparative study on the optimal experiment conditions between CCK-8 and MTT in rabbit fibroblasts[J]. Medical Innovation of China, 2013, 10(2): 12−13.

[38] 李玉霞, 尚庆坤, 许蕾蕾. AB-8大孔树脂对菱角壳黄酮提取物的吸附性能研究[J]. 北华大学学报(自然科学版), 2006(5): 403−406. [LI Y X, SHANG Q K, XU L L. Study on the adsorption performance of AB-8 macroporous resin to the extract of water chestnut shell flavonoids[J]. Journal of Beihua University (Natural Science Edition), 2006(5): 403−406.]

[39] 徐晶, 陈再兴, 袁昌鲁. 大孔吸附树脂富集纯化黄芩总黄酮的工艺研究[J]. 中医药学刊, 2006(9): 1648−1649. [XU J, CHEN Z X, YUAN C L. Study on the process of enrichment and purification of total flavonoids from *Scutellaria baicalensis* Georgi with macroporous adsorption resin[J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2006(9): 1648−1649.]

[40] 李新明, 李群. 大枣黄酮的抗菌与抗肿瘤活性研究[J]. 农产品加工, 2020(22): 12−14. [LI X M, LI Q. Research on antibacterial and antitumor activities of jujube flavonoids[J]. Agricultural Products Processing, 2020(22): 12−14.]

[41] 李亚男. 黄芪抗肿瘤的有效成分及作用机制的研究进展[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2017. [LI Y N. Research progress on anti-tumor active ingredients and mechanism of astragalus [D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2017.]

[42] 袁燕, 李艳红, 段先乐, 等. 蒜头果蛋白对HeLa细胞体外抗肿瘤活性及稳定性研究[J]. 云南民族大学学报(自然科学版), 2021, 30(5): 454−458. [YUAN Y, LI Y H, DUAN X L, et al. *In vitro* anti-tumor activity and stability of *Allictocarpus* protein on HeLa cells[J]. Journal of Yunnan Nationalities University (Natural Science Edition), 2021, 30(5): 454−458.]

[43] 王姗姗, 刘明, 刘英, 等. MTT法测定多柔比星和氟尿嘧啶及顺铂对肝癌耐药细胞Bel-7402/ADM的IC_{50}值[J]. 医药报, 2010, 29(5): 579−581. [WANG S S, LIU M, LIU Y, et al. MTT method to determine the IC_{50} value of doxorubicin, fluorouracil and cisplatin on the resistance of liver cancer cell Bel-7402/ADM[J]. Medical Journal, 2010, 29(5): 579−581.]

宋雪, 王增斌, 包俊文, 等. 基于水蒸气蒸馏法的狮头柑精油提取工艺优化及成分分析 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 233−242. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100182
SONG Xue, WANG Zengbin, BAO Junwen, et al. Optimization of Extraction Process and Composition Analysis of Essential Oil from *Citrus reticulata* Blanco cv. Manau Gan Based on Steam Distillation[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 233−242. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100182

· 工艺技术 ·

基于水蒸气蒸馏法的狮头柑精油提取工艺优化及成分分析

宋　雪, 王增斌, 包俊文, 庞同汇, 鲁周民*
（西北农林科技大学林学院, 陕西 杨凌 712100）

摘　要: 为优化狮头柑精油的水蒸气蒸馏提取工艺，以狮头柑果皮鲜样为材料，采用超声辅助处理，在优选蒸馏设备和单因素实验基础上，对超声温度、超声功率及超声时间 3 因素进行响应面优化研究，并采用气相色谱-质谱法（GC-MS）对所得精油进行成分分析。结果表明：采用 Clevenger 挥发油蒸馏仪的提取效果优于其他 3 种蒸馏设备；响应面分析得到狮头柑精油最优提取工艺为：超声温度 33 ℃、超声功率 80 W、超声时间 32 min，此条件下精油得率可达到 2.50%±0.02%。从狮头柑精油中共鉴定出 29 种化合物，占总挥发物的 99.16%，包括烯烃类（主要为 D-柠檬烯，含量可达 88.35%）、醇类（主要为芳樟醇 0.18%）、醛类（主要为正辛醛 0.17%）等。该研究技术可用于狮头柑果皮精油的提取。

关键词: 狮头柑, 水蒸气蒸馏法, 精油, 响应面分析, 气相色谱-质谱法（GC-MS）
中图分类号: TQ654.2　　**文献标识码:** B　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0233−10
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100182
本文网刊:

Optimization of Extraction Process and Composition Analysis of Essential Oil from *Citrus reticulata* Blanco cv. Manau Gan Based on Steam Distillation

SONG Xue, WANG Zengbin, BAO Junwen, PANG Tonghui, LU Zhoumin*
（College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling 712100, China）

Abstract: In order to optimize the steam distillation extraction process of essential oil from *Citrus reticulata* Blanco cv. Manau Gan, fresh peel samples were used as materials, and ultrasonic assisted treatment was adopted. On the basis of optimized distillation equipment and single factor tests, Box-Behnken experiment was used to design for ultrasonic temperature, ultrasonic power and ultrasonic time. The essential oils were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The results showed that the extraction effect of Clevenger distillation apparatus was better than the other three distillation devices. The optimal oil extraction process was obtained by response surface analysis: ultrasonic temperature 33 ℃, ultrasonic power 80 W, ultrasonic time 32 min. Under the optimal conditions, the extraction yield of essential oil reached 2.50%±0.02%. Twenty-nine compounds were identified by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), accounted for 99.16% of the total volatiles, including alkenes (mainly D-limonene, content up to 88.35%), alcohols (mainly Linalool 0.18%), aldehydes (mainly Octanal 0.17%), et al. This research technique could be used for the extraction of essential oil from *Citrus reticulata* Blanco cv. Manau Gan.

Key words: *Citrus reticulata* Blanco cv. Manau Gan; steam distillation; essential oils; response surface analysis; gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

收稿日期: 2021−10−19
基金项目: 财政部“以大学为依托的农业科技推广模式建设”项目（XTG2021023）。
作者简介: 宋雪（1995−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 植物资源利用, E-mail: 1104651724@qq.com。
*** 通信作者:** 鲁周民（1966−）, 男, 硕士, 研究员, 研究方向: 经济林果品加工, E-mail: lzm@nwsuaf.edu.cn。

植物精油是从植物的花、叶、果实等部位提取的一类次生代谢产物[1]。研究表明植物精油具有抑菌[2]、消炎[3]、抗氧化[4]、减肥[5]、镇痛[6]、抗癌[7]、杀虫[8]、改善高胆固醇血症和肝脂肪变性[9]等作用。植物精油提取及应用已成为目前研究的热点。精油的提取方法有压榨法[10]、水蒸气蒸馏法[11]、有机溶剂萃取法[12]、超临界 CO_2 萃取法[13]及亚临界流体萃取法[14]等。压榨法操作周期长、出油率低,有机溶剂萃取法虽然提取率较高、但有机溶剂与精油难分离,超临界 CO_2 萃取法及亚临界流体萃取法成本高。水蒸气蒸馏法具有成本低、水油易分离、简便无污染等优点,广泛用于橘皮[15]、肉桂[16]、玫瑰[17]等植物精油提取。

狮头柑(*Citrus reticulata* Blanco cv. Manau Gan)属于芸香科(Rutaceae)柑橘属(*Citrus*),为陕西安康特有经济林果树[18]。狮头柑因果面粗糙,形似狮子头而得名[19],其果实个大、皮肉不粘连易剥离,果肉汁多渣少、酸甜适中、后味微苦,具有清热解毒、降火明目、止咳生津等多种保健作用。据西北农林科技大学农科院校区测试中心对狮头柑果实检测报告显示,狮头柑果实含蛋白质 0.95%,V_C 0.12 mg/100 g,含钙(Ca)147.4 mg/kg,含磷(P)166.9 mg/kg,含铁(Fe)2.31 mg/kg,未检出砷、铅、汞等 12 种有毒物质,具有很高的营养价值[20]。前期研究表明,狮头柑具有和其他柑橘完全不同的香味[21]。目前,有关狮头柑研究报道主要有以狮头柑皮为原料的果酱加工工艺[22],超声辅助有机溶剂萃取狮头柑精油[23],狮头柑果皮总黄酮提取工艺优化[24],狮头柑籽油的提取工艺优化及脂肪酸组分分析[25]等,水蒸气蒸馏法提取狮头柑精油鲜见报道。本研究以狮头柑果皮鲜样为原料,首先对水蒸气蒸馏设备进行优选,在单因素实验的基础上对水蒸气蒸馏工艺进行响应面优化,并对精油成分进行分析,旨在为狮头柑及其他柑橘果皮精油的提取与利用提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

狮头柑 采摘自西北农林科技大学安康北亚热带经济林果树试验示范站;液氮 杨凌液氮服务配送中心。

BCD-215DC 型冰箱 中国海尔集团;R200D 型电子分析天平 精度 0.0001,德国 Sartorious 公司;KH-500DE 型数控超声波清洗器 昆山禾创超声仪器有限公司;1310GC-MS 联用仪(四极杆质量分析器,电子电离源和化学电离源) 美国赛默飞世尔科技有限公司;佳声 800C 多功能粉碎机 永康市红太阳机电有限公司;1.5 L 蒸馏锅 丽水市玖亚商贸有限公司;可调式电热套 北京科伟永兴仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 狮头柑鲜果皮样品的制备 选用果形饱满、成熟度一致、无病虫害和机械损伤的狮头柑,其鲜果皮经多功能粉碎机加液氮冷冻研磨一定时间得到果皮样品。

1.2.2 狮头柑鲜果皮精油的制备 采用水蒸气蒸馏法[26]提取精油,取果皮样于 500 mL 蒸馏瓶中,加入一定比例蒸馏水并进行超声辅助处理后,加入两粒沸石进行蒸馏提取一定时间,收集精油并称量,计算得率 Y,每个处理 3 次重复。计算公式为:

$$Y(\%) = \frac{M_1}{M_2} \times 100$$

式中:Y 表示精油得率,%;M_1 为提取后精油的质量,g;M_2 为经过处理之后的狮头柑样品质量,g。

1.2.3 水蒸气蒸馏提取设备优选 准确称取 30 g 狮头柑果皮样品 4 份,按照料液比 1∶8(g/mL)加入蒸馏水于烧瓶中,在超声功率 80 W、超声温度 40 ℃、超声处理 30 min,分别使用如图 1 所示的 4 种水蒸气蒸馏设备蒸馏提取 2 h,称量精油质量,计算得率 Y。

1.2.4 单因素实验

1.2.4.1 研磨时间对狮头柑精油得率的影响 固定料液比 1∶8(g/mL)、超声功率 80 W、超声温度 40 ℃、超声处理 30 min、蒸馏时间 2 h,分别考察狮头柑鲜果皮样品经冷冻研磨 10、15、20、25、30 s 后对精油得率的影响,按照 1.2.2 工艺流程制备狮头柑鲜果皮精油,并计算得率 Y。

1.2.4.2 料液比对狮头柑精油得率的影响 固定冷冻研磨 25 s、超声功率 80 W、超声温度 40 ℃、超声处理 30 min、蒸馏时间 2 h,分别考察料液比 1∶6、1∶7、1∶8、1∶9、1∶10(g/mL)对精油得率的影响,按照 1.2.2 工艺流程制备狮头柑鲜果皮精油,并计算得率 Y。

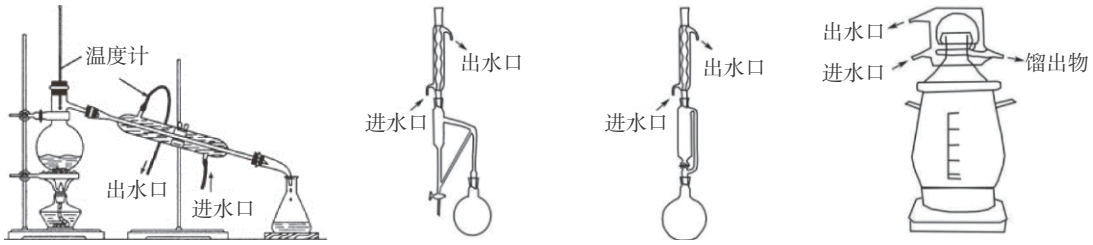


图 1 4 种不同的水蒸气设备

Fig.1 Four different steam equipment

注:I:普通水蒸气蒸馏设备;II:Clevenger 挥发油蒸馏仪;III:恒压水蒸气蒸馏设备;IV:蒸馏锅设备。

1.2.4.3　蒸馏时间对狮头柑精油得率的影响　固定冷冻研磨 25 s、料液比 1∶8（g/mL）、超声功率 80 W、超声温度 40 ℃、超声处理 30 min，分别考察蒸馏时间 1、1.5、2、2.5、3 h 对精油得率的影响，按照 1.2.2 工艺流程制备狮头柑鲜果皮精油，并计算得率 Y。

1.2.4.4　超声温度对狮头柑精油得率的影响　固定冷冻研磨 25 s、料液比 1∶8(g/mL)、超声功率 80 W、超声处理 30 min、蒸馏时间 2 h，分别考察超声温度 20、30、40、50、60 ℃ 对精油得率的影响，按照 1.2.2 工艺流程制备狮头柑鲜果皮精油，并计算得率 Y。

1.2.4.5　超声功率对狮头柑精油得率的影响　固定冷冻研磨 25 s、料液比 1∶8（g/mL）、超声温度 40 ℃、超声处理 30 min、蒸馏时间 2 h，分别考察超声功率 60、70、80、90、100 W 对精油得率的影响，按照 1.2.2 工艺流程制备狮头柑鲜果皮精油，并计算得率 Y。

1.2.4.6　超声时间对狮头柑精油得率的影响　固定冷冻研磨 25 s、料液比 1∶8（g/mL）、超声功率 80 W、超声温度 40 ℃、超声处理 30 min、蒸馏时间 2 h，分别考察超声时间 10、20、30、40、50 min 对精油得率的影响，按照 1.2.2工艺流程制备狮头柑鲜果皮精油，并计算得率 Y。

1.2.5　响应面优化试验　在单因素实验的基础上，采用 Box-Behnken 试验设计对超声温度、超声功率和超声时间 3 因素进行响应面优化设计。试验设计见表 1。

表 1　狮头柑精油提取试验因素水平设计

Table 1　Factors level of essential oil extraction test of *Citrus reticulata* Blanco cv. Manau Gan

因素	水平		
	−1	0	1
A超声温度(℃)	20	30	40
B超声功率(W)	70	80	90
C超声时间(min)	20	30	40

1.2.6　狮头柑鲜果皮精油成分测定　将提取的狮头柑精油用正己烷稀释 1000 倍后，吸取 1 mL 加入进样瓶中进行 GC-MS 分析[27]。

气相色谱条件：色谱柱：TG-5MS 石英毛细管柱（30 m×0.25 mm，0.25 μm），程序升温，初始柱温为 50 ℃，保持 1 min，以 3.0 ℃/min 升温至 130 ℃，保持 1 min，以 2 ℃/min 升温至 150 ℃，保留 1 min，以 10 ℃/min 升温至 280 ℃，保持 5 min，载气为高纯氦气，流速 1.000 mL/min，进样口温度 250 ℃，进样量 0.2 μL，分流比 40∶1。

质谱条件：离子源为 EI，电子能量 70 eV，接口和离子源的温度分别为 280 和 270 ℃，扫描范围：40~460 aum。

1.3　数据处理

利用 Excel 对数据进行分析与统计；采用 Origin 2021 b 进行制图；SPSS 25.0 进行单因素方差分析；Design-Expert V 10.0.1 进行响应面试验设计；所得质谱图运用计算机 Xcalibur 系统 NIST2014 谱库自动检索，仅报道 SI 和 RSI 均大于 800 的鉴定结果，面积归一化法计算各组分相对含量；数据以平均值±标准差表示。

2　结果与分析

2.1　水蒸气提取设备选择结果

4 种水蒸气蒸馏设备提取狮头柑精油结果如图 2 所示。由图 2 可知，所选 4 种水蒸气蒸馏设备提取精油的得率由高及低依次为：II（Clevenger 挥发油蒸馏仪）>III（恒压萃取水油分离器）>I（普通水蒸气设备）>IV（蒸馏锅提取设备）。普通水蒸气蒸馏设备和蒸馏锅提取设备在蒸馏过程中提取物一直暴露在外界空气中，精油挥发较多，而恒压萃取水油分离器的提取物处于较为密闭的环境，但三者收集到的精油均需要通过分液漏斗进行进一步分离，在此过程会造成精油损失；Clevenger 挥发油蒸馏仪具有密闭性好，蒸馏过程中自动进行水油分离的优点，并且价格较其他设备更有优势，故选用 Clevenger 挥发油蒸馏仪作为后续试验的提取设备。

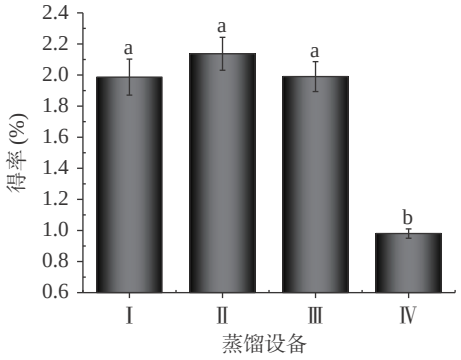


图 2　不同水蒸气设备对狮头柑精油得率的影响

Fig.2　Effects of different steam equipment on the extraction rate of essential oil from *Citrus reticulata* Blanco cv. Manau Gan

注：不同小写字母表示差异显著（P<0.05）；图 3~图 8 同。

2.2　单因素实验结果

2.2.1　研磨时间对狮头柑精油得率的影响　随着狮头柑研磨时间的增加，狮头柑精油得率呈先上升后下降趋势，在 25 s 处达最大值 2.03%±0.02%，如图 3 所示。研磨时间太短，物料粒径过大，表面油囊未破坏完全，挥发油未能充分释放，导致得率低；当研磨时间不断增长，根据扩散定律[28]，粉碎度越高，粒径越小，与水蒸气接触面积越大，越有助于挥发油提取，狮头柑得率就越高；但当物料颗粒度过细，颗粒容易吸附一部分精油，挥发油阻力增大，使得率降低。因此选择研磨时间 25 s。

2.2.2　料液比对狮头柑精油得率的影响　随着料液比的增加，狮头柑精油得率呈现先上升后下降趋势，当料液比达到 1∶8（g/mL）时精油得率达到最大为 2.27%±0.03%，当料液比超过 1∶8（g/mL）时精油得率

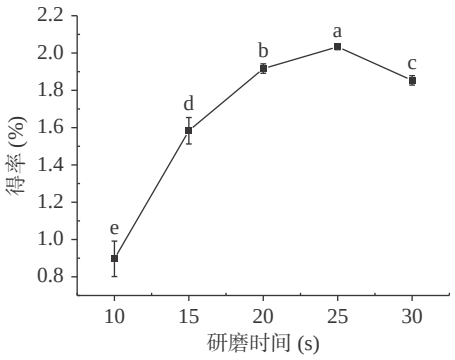


图 3　研磨时间对狮头柑精油得率的影响

Fig.3　Effect of grinding time on the extraction rate of essential oil from *Citrus reticulata* Blanco cv. Manau Gan

不断降低趋于平衡，如图 4 所示。加水量较低，狮头柑样品不能充分和溶剂结合，得率低，并容易导致糊化。随着料液比增加，物料与水充分融合，接触面积加大，扩散速度提高，得率也相应提高。当料液比过大时，虽然挥发油充分释放，但总量不再增加，在水中溶解度也相应提高，于溶剂中损失的量增加，故最终的挥发油得率降低[29]。因此料液比选取 1∶8（g/mL）。

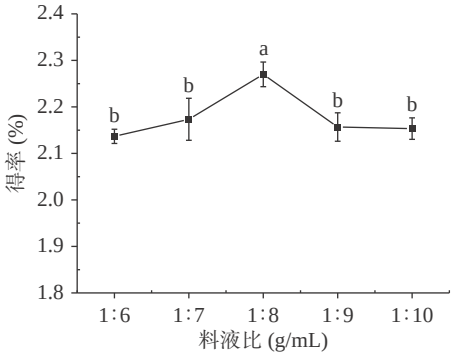


图 4　料液比对狮头柑精油得率的影响

Fig.4　Influence of solid-liquid ratio on extraction rate of essential oil from *Citrus reticulata* Blanco cv. Manau Gan

2.2.3　蒸馏时间对狮头柑精油得率的影响　狮头柑精油得率随蒸馏时间呈先上升后缓慢下降趋势，在蒸馏时间 2.5 h 时精油得率高达 2.32%±0.03%，如图 5 所示。蒸馏 2.5 h 能够使狮头柑果皮中的精油最大限度的提取出来，精油基本提取完成。提取时间过

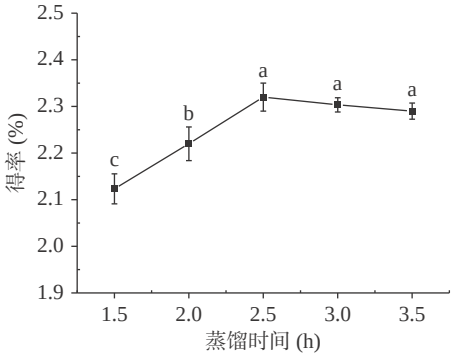


图 5　蒸馏时间对狮头柑精油得率的影响

Fig.5　Effect of distill time on the extraction rate of essential oil from *Citrus reticulata* Blanco cv. Manau Gan

长，精油得率稍微有所下降，是因为长时间的提取，造成精油中部分化学性质发生变化破坏，导致得率降低[30]。因此蒸馏时间选取 2.5 h。

2.2.4　超声温度对狮头柑精油得率的影响　狮头柑精油得率随超声温度的增加呈先上升后下降的趋势，如图 6 所示，由于狮头柑精油的溶出需要一定的温度条件，温度上升可加快分子运动，动能增大，狮头柑精油得率呈现上升趋势，在 30 ℃ 达到最大值 2.26%±0.03%。在 30 ℃ 之后，得率呈现下降状态，原因是高温导致狮头柑精油成分降解、热敏性物质的氧化[31]。

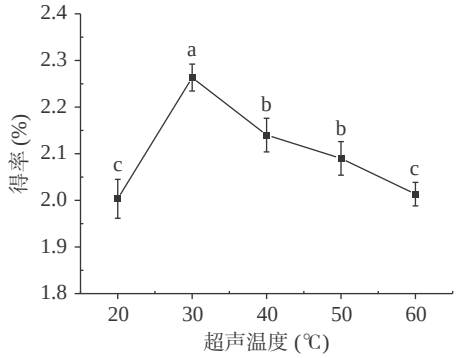


图 6　超声温度对狮头柑精油得率的影响

Fig.6　Effect of ultrasonic temperature on the extraction rate of essential oil from *Citrus reticulata* Blanco cv. Manau Gan

2.2.5　超声功率对狮头柑精油得率的影响　图 7 为超声功率对狮头柑精油得率的影响，狮头柑精油得率随超声功率的增加呈现先增加后降低的趋势，在超声功率达到 80 W 时得率达到最大值 2.46%±0.03%。其原因可能是超声波的空化作用形成高温高压环境，增加水分子穿透力，加速精油进入水蒸气中，提高精油得率[32]；随着超声波功率的增大，对细胞壁的破碎作用增强，破坏细胞类物质结构[33]；较高的超声波直接导致精油的分解，导致得率降低[34]；另一方面，超声波的除气效果可能是造成部分精油的流失。

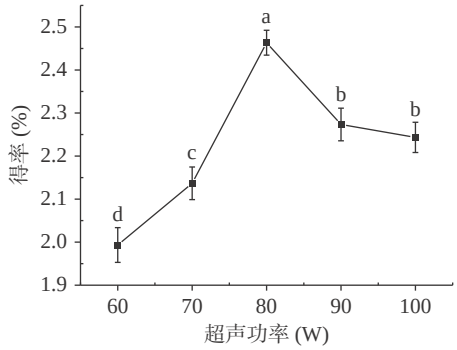


图 7　超声功率对狮头柑精油得率的影响

Fig.7　Effect of ultrasonic power on the extraction rate of essential oil from *Citrus reticulata* Blanco cv. Manau Gan

2.2.6　超声时间对狮头柑精油得率的影响　随着超声时间的延长，狮头柑精油的得率呈现先上升后下降趋势，在 30 min 时达到最大，为 2.36%±0.03%。如图 8 所示，当超声时间在 10~30 min 时，精油得率随

时间延长呈上升趋势，这可能是因为超声波的作用加剧了细胞破碎度，利于狮头柑精油在溶剂中的溶出，提高了得率[35]。在超声时间超过 30 min 后，得率呈现下降状态，可能是因为超声时间增加，热敏性提高，导致狮头柑精油中的某些物质分解和挥发，也可能由于物料中一些水溶性杂质溶解于水中，增加了提取溶液的浓度，降低了精油在蒸汽中的得率，使得精油得率降低[36]。

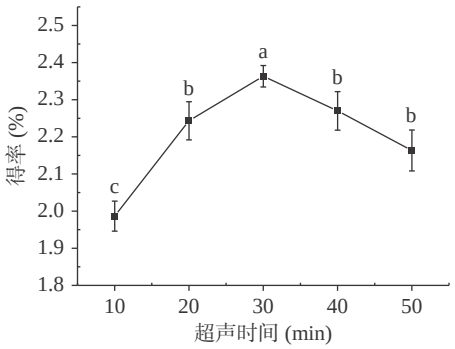


图 8　超声时间对狮头柑精油得率的影响

Fig.8　Effect of ultrasonic time on the extraction rate of essential oil from *Citrus reticulata* Blanco cv. Manau Gan

2.3　响应面优化结果

2.3.1　响应面试验设计及结果　综合单因素实验结果，考虑到超声辅助处理对狮头柑精油的提取有较大影响，因此固定研磨时间、料液比和蒸馏时间，选择超声温度(A)、超声功率(B)和超声时间(C)三个因素，狮头柑精油得率(Y)为响应值，采用 Box-Behnken 中心组合试验原理设计三因素三水平试验优化狮头柑精油提取条件。响应面试验方案及结果见表 2。

表 2　响应面试验设计及结果

Table 2　Response surface test design and results

实验号	因素			得率(%)
	A	B	C	
1	1	0	1	2.26±0.02
2	0	−1	1	1.91±0.03
3	−1	1	0	2.08±0.01
4	0	0	0	2.50±0.01
5	0	1	1	2.36±0.01
6	0	0	0	2.44±0.02
7	−1	0	1	2.11±0.02
8	0	−1	−1	1.94±0.02
9	−1	0	−1	2.01±0.01
10	0	1	−1	2.11±0.01
11	1	0	−1	2.20±0.03
12	1	1	0	2.39±0.01
13	0	0	0	2.46±0.01
14	0	0	0	2.45±0.02
15	1	−1	0	2.04±0.03
16	−1	−1	0	1.85±0.04
17	0	0	0	2.48±0.02

2.3.2　回归模型的建立与分析　应用 Design-Expert V 10.0.1 软件对表 2 中的狮头柑精油得率 Y 结果进行响应面回归拟合分析，所建立的二次回归模型为：

$Y=2.47+0.11A+0.15B+0.047C+0.030AB-0.010AC+0.070BC-0.16A^2-0.22B^2-0.17C^2$，对此模型进行显著性分析，结果见表 3。

表 3　回归模型显著性分析结果

Table 3　Significance analysis results of regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	*F*值	*P*>*F*	显著性
模型	0.78	9	0.087	98.28	<0.0001	***
A	0.088	1	0.088	100.06	<0.0001	***
B	0.18	1	0.18	204.21	<0.0001	***
C	0.018	1	0.018	20.48	0.0027	**
AB	0.0036	1	0.0036	4.08	0.0830	
AC	0.0004	1	0.004	0.45	0.5221	
BC	0.020	1	0.020	22.24	0.0022	**
A^2	0.10	1	0.10	115.51	<0.0001	***
B^2	0.20	1	0.20	232.26	<0.0001	***
C^2	0.12	1	0.12	130.84	<0.0001	***
残差	0.00617	7	0.0008814			
失拟项	0.00385	3	0.001283	2.21	0.2291	
纯误差	0.00232	4	0.00058			
总方差	0.79	16				
R^2=0.9921						
R^2_{Adj}=0.9871						

注：***表示差异极显著(*P*<0.001)；**表示差异高度显著(*P*<0.01)。

由表 3 可知，回归模型的 *F* 值为 98.28，*P* 值<0.01，表明模型显著，失拟项 *P* 值=0.2291>0.05，没有显著差异，说明该模型与试验结果拟合程度良好。该模型决定系数 R^2=0.9921，剔除二次项中不显著项，将拟合方程修正为：$Y=2.47+0.11A+0.15B+0.047C+0.070BC-0.16A^2-0.22B^2-0.17C^2$，调整后决定系数 R^2_{Adj} 为 0.9871，大于 0.80，进一步证明该模型与试验结果拟合程度较好，变异系数 CV=1.52%，说明预测值与试验值相关性较好，试验误差较小，可用来对狮头柑精油提取工艺进行分析和预测。

F 值大小可以判断各因素对试验指标的重要程度，*F* 值越大，说明此因素对狮头柑精油得率的影响越大，通过表 3 可以看出狮头柑精油得率受 3 种因素影响大小顺序为：B>A>C，即超声功率>超声温度>超声时间。根据试验结果可知，模型中 A、B、A^2、B^2、C^2 对得率的影响极显著(*P*<0.001)，C、BC 为高度显著(*P*<0.01)，其余项对狮头柑精油影响不显著。

2.3.3　响应面试验图形分析　利用软件 Design-Expert V 10.0.1 模拟得到各因素交互作用对狮头柑精油得率的三维响应面和等高线，通过三维响应面图和等高线图分析各因素之间交互作用的强弱。如图 9a 三维响应面图，发现开口为向下的曲面图，形如山丘一样中间拱起，而四周相对较低的曲面，代表存在极大值，表明超声功率与超声时间两因素交互作用对响应值的影响较强，两者组合对狮头柑精油得率影响较显著。在等高线图中，最小圆的中心响应值最大，圆形表示因素之间交互作用较弱，椭圆形表示因

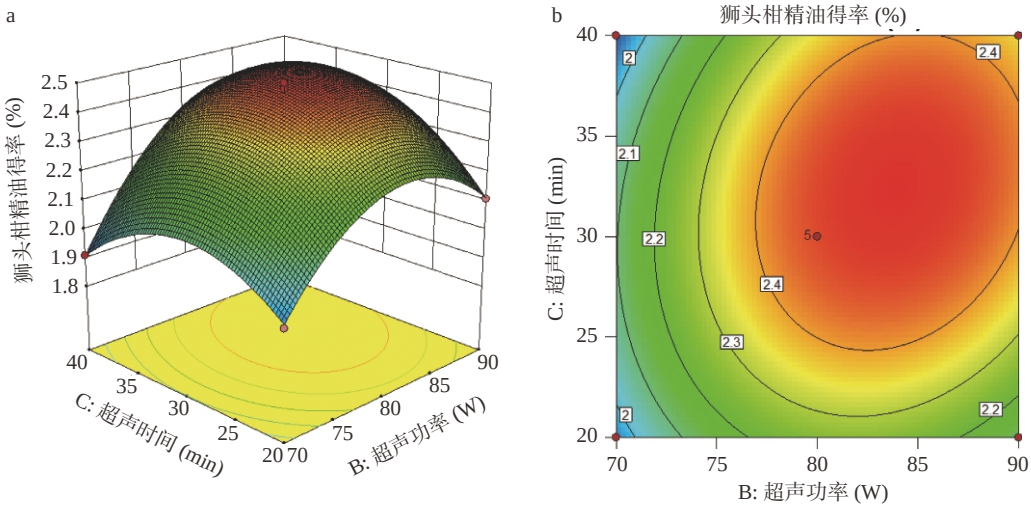


图 9　各因素间交互作用对狮头柑精油得率的响应面及等高线图

Fig.9　Response surface and contour diagram of interaction between various factors on the extraction rate of essential oil of *Citrus reticulata* Blanco cv. Manau Gan

素之间交互作用较强，由图 9b 可以看出，超声功率 B 与超声时间 C 两因素的交互作用对狮头柑精油得率影响的等高线图呈椭圆形，表明两者组合对狮头柑精油得率影响较强，这与 2.3.1 中显著性分析结果相一致。

2.3.4　最优工艺参数确定及验证　通过 Design-Expert V 10.0.1 软件，并结合回归模型和响应面图分析得出狮头柑精油得率的最佳工艺条件为：超声温度 33.382 ℃、超声功率 83.752 W、超声时间 32.230 min，在该条件下模型预测狮头柑精油得率为：2.517%±0.013%。为方便实际试验操作，将最佳工艺条件修正为：超声温度 33 ℃、超声功率为 80 W、超声时间 32 min，在此条件下重复验证 3 次所得到的狮头柑精油的得率为 2.50%±0.02%，与预测值十分接近，说明此二次多项式回归方程对狮头柑精油得率的预测是可靠的，具有一定的实际指导意义。

2.4　水蒸气蒸馏法提取狮头柑精油的成分分析

利用 GC-MS 方法分析狮头柑精油成分，总离子色谱图如图 10 所示。所得质谱图运用计算机 Xcalibur 系统 NIST2014 谱库自动检索，并结合文献报道的已知化合物确认检测物成分后，初步确认了 29 种化学成分(表 4)。

水蒸气蒸馏法提取的狮头柑精油中共鉴定出 29 种相对含量较多的组分，共占气相出峰总萃取物的 99.16%。主要成分为烯烃类 97.75%，主要有 D-柠檬烯(88.35%)，这与林梦雅[37] 文中提到的柑橘皮中含有 32%~98% 的柠檬烯所吻合，其次是萜品烯(6.23%)、á-月桂烯(1.63%)、蒎烯(1.21%)这与王会全等[26] 研究成果 D-柠檬烯(84.22%)、萜品烯(6.55%)、月桂烯(1.67%)、α-蒎烯(1.13%)萜类化合物为柑橘皮精油的主要成分大体上吻合；除此之外还有少量的醇类 0.27%，醛类 0.26% 等单萜类物质。特别地，

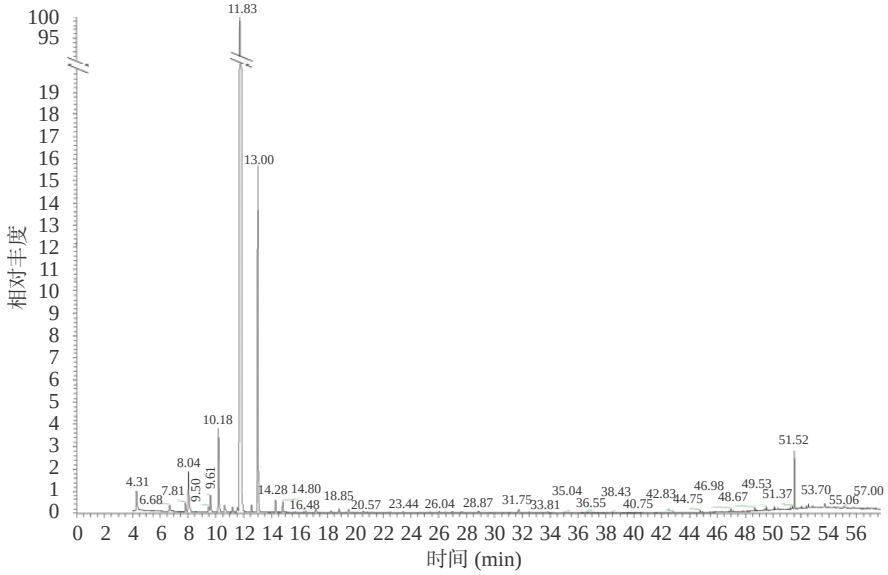
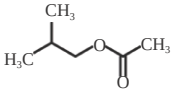
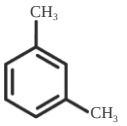
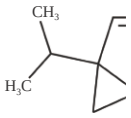
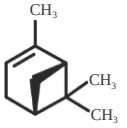
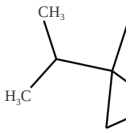
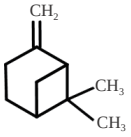
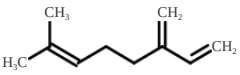
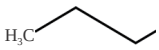
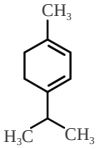
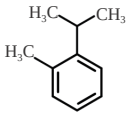
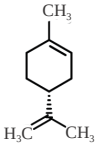
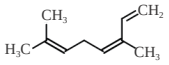
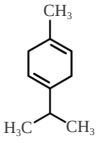
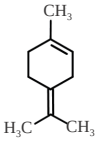


图 10　狮头柑精油成分总离子流

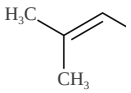
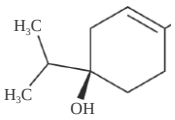
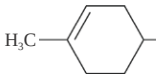
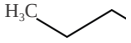
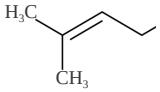
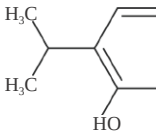
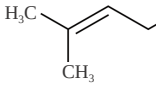
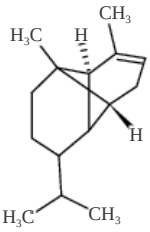
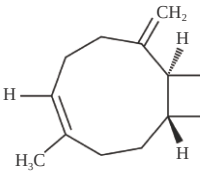
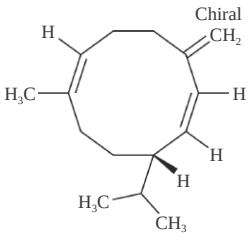
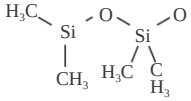
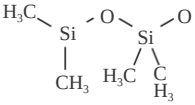
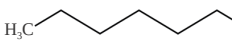
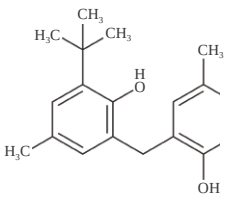
Fig.10　Total ion flow of essential oil components of *Citrus reticulata* Blanco cv. Manau Gan

表 4　狮头柑精油 GC-MS 分析结果

Table 4　GC-MS analysis results of essential oil of *Citrus reticulata* Blanco cv. Manau Gan

序号	保留时间(min)	SI	RSI	化合物	分子式	分子量	结构式	相对含量(%)	CAS
1	4.59	816	822	乙酸异丁酯Isobutyl acetate	$C_6H_{12}O_2$	116		0.02	110-19-0
2	6.68	939	943	间二甲苯m-Xylene	C_8H_{10}	106		0.13	108-38-3
3	7.81	925	948	4甲基-1-(1-甲基乙基)-双环[3.1.0]己二烯Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-	$C_{10}H_{16}$	136		0.16	28634-89-1
4	8.04	950	956	à-蒎烯à-Pinene	$C_{10}H_{16}$	136		0.85	80-56-8
5	9.49	919	930	4亚甲基-1-(1-甲基乙基)-双环[3.1.0]己烷 Bicyclo[3.1.0]hexane, 4-methylene-1-(1-methylethyl)-	$C_{10}H_{16}$	136		0.09	3387-41-5
6	9.61	944	945	á-蒎烯á-Pinene	$C_{10}H_{16}$	136		0.35	127-91-3
7	10.18	905	906	á-月桂烯á-Myrcene	$C_{10}H_{16}$	136		1.63	123-35-3
8	10.63	893	901	正辛醛Octanal	$C_8H_{16}O$	128		0.17	124-13-0
9	11.21	916	930	*α*-萜品烯 *α*-Terpinene	$C_{10}H_{16}$	136		0.09	99-86-5
10	11.54	944	956	邻-异丙基苯o-Cymene	$C_{10}H_{14}$	134		0.10	527-84-4
11	11.82	905	905	柠檬烯D-Limonene	$C_{10}H_{16}$	136		88.35	5989-27-5
12	12.56	930	934	á-罗勒烯á-Ocimene	$C_{10}H_{16}$	136		0.12	13877-91-3
13	13.00	910	911	*γ*-萜品烯*γ*-Terpinene	$C_{10}H_{16}$	136		5.94	99-85-4
14	14.28	944	956	萜品油烯 Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)-	$C_{10}H_{16}$	136		0.20	586-62-9
15	14.80	937	941	芳樟醇Linalool	$C_{10}H_{18}O$	154		0.18	78-70-6

续表 4

序号	保留时间(min)	SI	RSI	化合物	分子式	分子量	结构式	相对含量(%)	CAS
16	17.17	917	926	香茅醛6-Octenal, 3,7-dimethyl-, (R)-	$C_{10}H_{18}O$	154		0.04	2385-77-5
17	18.25	853	870	(-)-4-萜品醇 3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-, (R)-	$C_{10}H_{18}O$	154		0.02	20126-76-5
18	18.85	927	941	à-松油醇à-Terpineol	$C_{10}H_{18}O$	154		0.06	98-55-5
19	19.53	897	907	癸醛Decanal	$C_{10}H_{20}O$	156		0.05	112-31-2
20	20.57	868	901	3,7-二甲基-6-辛烯醇 3,7-dimethyl-6-Octen-1-ol	$C_{10}H_{20}O$	156		0.01	1117-61-9
21	23.44	835	873	麝香草酚Thymol	$C_{10}H_{14}O$	150		0.01	89-83-8
22	26.04	801	853	乙酸香茅酯 Citronellyl acetate	$C_{12}H_{22}O_2$	198		0.01	150-84-5
23	26.98	811	855	蒎烯Copaene	$C_{15}H_{24}$	204		0.01	3856-25-5
24	28.87	888	905	*β*-石竹烯*β*-Caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	204		0.02	87-44-5
25	31.75	896	932	香叶烯Germacrene D	$C_{15}H_{24}$	204		0.05	23986-74-5
26	44.75	819	830	1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13,15,15-十六甲基八硅氧烷 1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13,15,15-hexadecamethyl- Heptasiloxane	$C_{16}H_{50}O_7Si_8$	578		0.02	19095-24-0
27	48.67	820	834	1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13-十四甲基七硅氧烷1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13-tetradecamethyl- Heptasiloxane	$C_{14}H_{44}O_6Si_7$	504		0.01	19095-23-9
28	49.53	872	903	硬脂醇乙酸酯 Acetic acid n-octadecyl ester	$C_{20}H_{40}O_2$	312		0.02	822-23-1
29	51.52	910	933	2,2'-亚甲基双-(4-甲基-6-叔丁基苯酚) 2,2'-methylenebis[6-(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-	$C_{23}H_{32}O_2$	340		0.45	119-47-1

2,2'-亚甲基双-(4-甲基-6-叔丁基苯酚)一般出现在玫瑰精油中[38−43]，这很可能是狮头柑拥有不同于其他柑橘气味的原因，有待进一步研究。

3　结论

对 4 种水蒸气蒸馏提取设备优选结果表明，Clevenger 挥发油蒸馏仪是狮头柑精油的最佳水蒸气提取设备；狮头柑精油提取的最佳工艺为：粉碎时间 25 s、料液比 1∶8（g/mL）、超声温度 33 ℃、超声功率 80 W、超声时间 32 min、蒸馏提取 2.5 h，此条件下狮头柑精油得率可达到 2.50%±0.02%。通过气相色谱-质谱法（GC-MS）对狮头柑精油进行成分分析，主要包括烯烃类、醇类、醛类等，共鉴定出 29 种化合物，占总萃取物的 99.16%，其中以 D-柠檬烯相对含量最高，达到 88.35%，萜品烯 6.23%、á-月桂烯 1.63% 等。本研究对常用水蒸气蒸馏提取设备进行提取效果比较，为水蒸气蒸馏提取设备选择方面提供理论参考；研究优化的精油提取工艺可用于狮头柑精油提取生产，具有较好的提取效果，同时为其他柑橘类精油提取提供理论指导。

参考文献

[1] JU J, XIE Y, GUO Y, et al. Application of edible coating with essential oil in food preservation[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2019, 59(15): 2467−2480.

[2] NIDHI P, ROLTA R, KUMAR V, et al. Synergistic potential of *Citrus aurantium* L. essential oil with antibiotics against Candida albicans[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2020, 262: 113135.

[3] MATUKA T, OYEDEJI O, GONDWE M, et al. Chemical composition and *in vivo* anti-inflammatory activity of essential oils from *Citrus sinensis* (L.) Osbeck growing in South Africa[J]. Journal of Essential Oil Bearing Plants Jeop, 2020, 23(4): 638−647.

[4] ISHFAQ M, AKHTAR B, MUHAMMAD F, et al. Antioxidant and wound healing potential of essential oil from *Citrus reticulata* peel and its chemical characterization[J]. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2021, 22(8): 1114−1121.

[5] LI Dahu, WU Houjiu, DOU Huating, et al. Microcapsule of sweet orange essential oil changes gut microbiota in diet-induced obese rats[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2018, 505(4): 991−995.

[6] LOMBARDO G E, CIRMI S, MUSUMECI L, et al. Mechanisms underlying the anti-inflammatory activity of bergamot essential oil and its antinociceptive effects[J]. Plants, 2020, 9(6): 704.

[7] LIU K, DENG W, HU W, et al. Extraction of 'Gannanzao' orange peel essential oil by response surface methodology and its effect on cancer cell proliferation and migration[J]. Molecules, 2019, 24(3): 499.

[8] OYEDEJI A O, OKUNOWO WO, OSUNTOKI A A, et al. Insecticidal and biochemical activity of essential oil from *Citrus sinensis* peel and constituents on Callosobrunchus maculatus and Sitophilus zeamais[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2020, 168(73): 104643.

[9] FENG Konglong. Dietary citrus peel essential oil ameliorates hypercholesterolemia and hepatic steatosis by modulating lipid and cholesterol homeostasis[J]. Food & Function, 2020, 11(8): 7217−7230.

[10] MUHARREM G, RAMAZAN T, HALUK T, et al. Bitter orange (*Citrus aurantium* L.) peel essential oil compositions obtained with different methods[J]. Derim, 2015, 32(2): 161−170.

[11] 赵静, 向丹, 喻娜, 等. 龙安柚果皮精油水蒸气蒸馏法提取工艺及抗氧化、抑菌活性研究[J]. 中国南方果树, 2019, 48(6): 21−24. [ZHAO Jing, XIANG Dan, YU Na, et al. Extraction technology and antioxidant and antibacterial activity of essential oil from pomelo peel of Longan by steam distillation[J]. South China Fruit Trees, 2019, 48(6): 21−24.]

[12] 薛山, 袁园. 柠檬精油提取工艺优化及抗氧化性测定[J]. 中国食品添加剂, 2017(5): 183−188. [XUE Shan, YUAN Yuan. Optimization of extraction process and determination of antioxidant activity of lemon essential oil[J]. China Food Additives, 2017(5): 183−188.]

[13] 李勇慧, 耿惠敏, 李双双. 四种柑橘类果皮精油成分分析[J]. 现代食品科技, 2019, 35(4): 270−278. [LI Yonghui, GENG Huimin, LI Shuangshuang. Analysis of essential oils from citrus peel[J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(4): 270−278.]

[14] HALIM N A A, ABIDIN Z Z, SIAJAM S I, et al. Optimization studies and compositional analysis of subcritical water extraction of essential oil from *Citrus hystrix* DC. leaves[J]. Journal of Supercritical Fluids, 2021(4): 105384.

[15] 王建美, 罗玲环, 吴梦霞, 等. 酶解-水蒸气蒸馏法提取桔皮精油的工艺研究[J]. 金华职业技术学院学报, 2013, 13(6): 86−89. [WANG Jianmei, LUO Linghuan, WU Mengxia, et al. Extraction of essential oil from orange peel by enzymolysis and steam distillation[J]. Journal of Jinhua Vocational and Technical College, 2013, 13(6): 86−89.]

[16] 李娜, 乔宏萍, 刘地, 等. 肉桂精油成分分析及其抗氧化性和抑菌活性的研究[J]. 中国粮油学报, 2020, 35(9): 96−102. [LI Na, QIAO Hongping, LIU Di, et al. Study on antioxidant and antibacterial activity of essential oil from *Cinnamomum cassia* L.[J]. Chinese Journal of Cereals and Oils, 2020, 35(9): 96−102.]

[17] 王虎虎, 徐翠香, 高强. 水蒸气蒸馏法提取玫瑰精油的影响因素研究[J]. 云南化工, 2020, 47(11): 69−70. [WANG Huhu, XU Cuixiang, GAO Qiang. Influence factors of rose essential oil extraction by steam distillation[J]. Yunnan Chemical Industry, 2020, 47(11): 69−70.]

[18] 孟瑶瑶. 狮头柑籽油的提取工艺及成分研究 [D]. 西安: 西北农林科技大学, 2018. [MENG Yaoyao. Study on extraction technology and components of essential oil of *Citrus reticulata* Blanco cv. Manau Gan [D]. Xi'an: Northwest A&F University, 2018.]

[19] 赵晨, 邹国林. 狮头柑挥发油化学成分分析[J]. 中国调味品, 2007(8): 71−73. [ZHAO Chen, ZOU Guolin. Chemical composition analysis of volatile oil of *Citrus reticulata* Blanco cv. Manau Gan[J]. China Condiment, 2007(8): 71−73.]

[20] 向江花. 浅谈狮头柑建园管理及病虫害防治技术[J]. 陕西林业科技, 2011, 185(1): 46−48. [XIANG Jianghua. Discussion on *Citrus reticulata* Blanco cv. Manau Gan garden management and pest control technology[J]. Shaanxi Forestry Science and Technology, 2011, 185(1): 46−48.]

[21] 张涵. 狮头柑主要成分及抗氧化物质研究 [D]. 西安: 西北农林科技大学, 2017. [ZHANG Han. Study on main components

and antioxidant substances of *Citrus reticulata* Blanco cv. Manau Gan [D]. Xi'an: Northwest A&F University, 2017.]
[22] 赵丹, 齐婷, 华俊朝, 等. 狮头柑皮果酱加工工艺研究[J]. 食品科技, 2020, 45(12): 86−91. [ZHAO Dan, QI Ting, HUA Junchao, et al. Research on processing technology of *Citrus reticulata* Blanco cv. Manau Gan[J]. Food Science and Technology, 2020, 45(12): 86−91.]
[23] 马学峰, 茹超, 刘雨晴, 等. 超声辅助溶剂萃取狮头柑精油及其主要成分研究[J]. 食品研究与开发, 2021, 419(22): 117−124. [MA Xuefeng, RU Chao, LIU Yuqing, et al. Ultrasound-assisted solvent extraction of essential oil and main components of *Citrus reticulata* Blanco cv. Manau Gan[J]. Food Research and Development, 2021, 419(22): 117−124.]
[24] 王杰, 张鹏锋, 赵小娜, 等. 响应面法优化狮头柑果皮总黄酮提取工艺 [J]. 西北林学院学报, 2021, 36(5): 118-124. [WANG Jie, ZHANG Pengfeng, ZHAO Xiaona, et al. Optimization of extraction technology of total flavonoids from *Citrus reticulata* Blanco cv. Manau Gan by response surface methodology [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2021, 36(5): 118-124.]
[25] 孟瑶瑶, 王俊淇, 王杰, 等. 狮头柑籽油提取工艺及脂肪酸组成研究 [J]. 西北林学院学报, 2019, 34(2): 199-205. [MENG Yaoyao, WANG Junqi, WANG Jie, et al. Study on extraction technology and fatty acid composition of *Citrus reticulata* Blanco cv. Manau Gan seed oil [J] Journal of Northwest Forestry University, 2019, 34(2): 199-205.]
[26] 王会全, 刘鑫, 吴英祥, 等. 柑橘果皮精油提取工艺及成分分析研究[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(21): 92−99. [WANG Huiquan, LIU Xin, WU Yingxiang, et al. Study on extraction technology and component analysis of essential oil from *Citrus* peel[J]. Food Research and Development, 2018, 39(21): 92−99.]
[27] 柴倩. 橘皮精油提取, 成分分析及其贮藏加工过程中的品质变化研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2007. [CHAI Qian. Study on extraction, composition analysis and quality change of essential oil from orange peel during storage and processing [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2007.]
[28] 张兆旺. 中药药剂学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003. [ZHANG Zhaowang. Traditional chinese medicine pharmacy [M]. Beijing: China Traditional Chinese Medicine Publishing, 2003.]
[29] 戴余军, 武瑞鹏, 石会军, 等. NaCl 溶液协同蒸馏法提取香柏精油工艺的研究[J]. 北方园艺, 2011(23): 41−43. [DAI Yujun, WU Ruipeng, SHI Huijun, et al. Study on extraction of essential oil from cedar by NaCl solution synergic distillation[J]. Northern Horticulture, 2011(23): 41−43.]
[30] 吴朝霞, 夏天爽, 李琦, 等. 同时蒸馏法提取艾叶挥发油及其抑菌性研究[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(8): 19−22. [WU Zhaoxia, XIA Tianshuang, LI Qi, et al. Extraction of volatile oil from artemisia argyi leaves by distillation and antibacterial activity [J]. Food Research and Development, 2010, 31(8): 19−22.]
[31] 耿军凤, 张丽芬, 陈复生, 等. 超声波辅助酶技术在食品蛋白质中的应用研究[J]. 食品工业, 2019, 40(1): 237−242. [GENG Junfeng, ZHANG Lifen, CHEN Fusheng, et al. Application of ultrasound-assisted enzyme technology in food protein[J]. Food Industry, 2019, 40(1): 237−242.]
[32] 徐文, 王彬, 昌鲁, 等. 超声波辅助同时蒸馏萃取制备玫瑰油的工艺研究[J]. 香料香精化妆品, 2021(4): 21−24,80. [XU Wen, WANG Bin, CHANG Lu, et al. Study on preparation of rose oil by ultrasonic assisted simultaneous distillation and extraction[J]. Fragrance and Flavor Cosmetics, 2021(4): 21−24,80.]
[33] 刘媛洁, 张良. 响应面法优化复合酶辅助超声波提取柚子皮总黄酮工艺[J]. 食品工业科技, 2019, 40(23): 143−150. [LIU Yuanjie, ZHANG Liang. Optimization of ultrasonic extraction of total flavonoids from pomelo peel with complex enzyme assisted by response surface methodology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(23): 143−150.]
[34] ZHU Caiping, ZHAI Xichuan, LI Linqiang, et al. Response surface optimization of ultrasound-assisted polysaccharides extraction from pomegranate peel[J]. Food Chemistry, 2015, 177: 139−146.
[35] 李双明, 顾雅玲, 解晓, 等. 超声强化水蒸气蒸馏法提取薰衣草精油[J]. 食品工业, 2013, 34(2): 41−44. [LI Shuangming, GU Yaling, XIE Xiao, et al. Extraction of lavender essential oil by ultrasonic enhanced steam distillation[J]. Food Industry, 2013, 34(2): 41−44.]
[36] MOORTHY I G, MARAN J P, ILAKYA S, et aL. Ultrasound assisted extraction of pectin from waste *Artocarpus heterophyllus* fruit peel[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2017, 34: 525−530.
[37] 林梦雅. 精油的提取方法[J]. 黑龙江农业科学, 2013(9): 165−167. [LIN Mengya. Extraction method of essential oil[J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, 2013(9): 165−167.]
[38] 母多, 徐兴梦, 郭亚东, 等. 玫瑰精油的提取工艺及化学成分的 GC-MS 分析研究[J]. 昆明学院学报, 2017, 39(6): 101−106. [MU Duo, XU Xingmeng, GUO Yadong, et al. Extraction technology and chemical composition analysis of rose essential oil by GC-MS[J]. Journal of Kunming University, 2017, 39(6): 101−106.]
[39] 黄朝情, 郭宝林, 黄文华, 等. 北京妙峰山玫瑰精油化学成分的 GC-MS 分析[J]. 北京农学院学报, 2011, 26(1): 46−50. [HUANG Chaoqing, GUO Baolin, HUANG Wenhua, et al. Analysis of chemical constituents of essential oil from Beijing Miaofeng mountain rose by GC-MS[J]. Journal of Beijing Agricultural University, 2011, 26(1): 46−50.]
[40] KASKOOS R A. Essential oil analysis by GC-MS and analgesic activity of *Lippia citriodora* and *Citrus* limon[J]. Journal of Essential Oil-bearing Plants, 2019, 22(1): 273−281.
[41] SEVINDIK E, AYDIN S, SUJKA M, et al. GC-MS analysis and evaluation of antibacterial and antifungal activity of essential oils extracted from fruit peel of *Citrus aurantium* L. (Rutaceae) grown in the west Anatolian area[J]. Erwerbs-Obstbau, 2021, 63(2): 135−142.
[42] 冯堃, 秦昭, 王文蜀, 等. 5 种柚皮精油成分及油脂抗氧化和抑菌活性[J]. 食品科技, 2018, 43(11): 255−261. [FENG Kun, QIN Zhao, WANG Wenshu, et al. Five essential oils from pomelo peel antioxidant and antibacterial activities[J]. Food Science and Technology, 2018, 43(11): 255−261.]
[43] 刘波, 鲍峰伟, 潘文亮, 等. 水蒸气蒸馏和超临界 CO_2 萃取橘皮精油及应用[J]. 烟草科技, 2014(9): 52−56. [LIU Bo, BAO Fengwei, PAN Wenliang, et al. Extraction of essential oil from orange peel by steam distillation and supercritical CO_2 and its application[J]. Tobacco Science and Technology, 2014(9): 52−56.]

张雪, 刘娅, 刘秀敏, 等. 超声辅助低共熔溶剂提取新疆红枣中环磷酸腺苷的工艺优化 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 243−250. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100308
ZHANG Xue, LIU Ya, LIU Xiumin, et al. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate from Xinjiang Jujube by Deep Eutectic Solvent[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 243−250. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100308

· 工艺技术 ·

超声辅助低共熔溶剂提取新疆红枣中环磷酸腺苷的工艺优化

张　雪[1], 刘　娅[1], 刘秀敏[1], 单春会[1,2,*]
（1.石河子大学食品学院, 新疆石河子 832000;
2.新疆特色果蔬贮藏加工教育部工程研究中心, 新疆石河子 832000）

摘　要: 针对新疆红枣，采用绿色、高效的低共熔溶剂（Deep Eutectic Solvent，DES）为提取剂，通过超声波辅助技术提取其中的功能性成分——环磷酸腺苷（cyclic adenosine 3',5'-monophosphate，cAMP）。研究低共熔溶剂的摩尔比、含水量以及料液比、超声时间、超声温度与 cAMP 提取量的关系，通过单因素实验和响应面优化试验，得出新疆红枣中 cAMP 提取的最佳条件为：氯化胆碱与丙三醇摩尔比为 1∶3，DES 体系含水量为 44%，红枣粉末与 DES 的料液比为 1∶35 g/mL，超声时间为 45 min，超声温度为 45 ℃，此时与同等超声条件下的水提法和醇提法相比，低共熔溶剂法提取 cAMP 的含量最高为（284.15±0.06）μg/g。因此，选用超声波辅助低共熔溶剂提取新疆红枣中的 cAMP 是获得较高提取量的一种新型、高效和安全的方法。

关键词: 新疆红枣, 环磷酸腺苷, 低共熔溶剂, 超声波辅助, 高效液相色谱法
中图分类号: TS255　　**文献标识码:** B　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0243−08
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100308
本文网刊:

Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate from Xinjiang Jujube by Deep Eutectic Solvent

ZHANG Xue[1], LIU Ya[1], LIU Xiumin[1], SHAN Chunhui[1,2,*]
（1.College of Food Science, Shihezi University, Shihezi 832000, China;
2.Engineering Research Center of Xinjiang Ministry of Education for Fruit and Vegetable Storage and Processing, Shihezi 832000, China）

Abstract: Using green and highly efficient deep eutectic solvent (DES) as the extraction agent, this study extracted the functional ingredient—cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) from Xinjiang jujube through ultrasound-assisted technology. The relationships between the molar ratio of deep eutectic solvent, water content of deep eutectic solvent, solid-liquid ratio, ultrasonic time, ultrasonic temperature and extraction amount of cAMP were studied. Through single factor experimentas and response surface optimization experiment, the optimal conditions for cAMP extraction from Xinjiang jujube were as follows: The molar ratio of choline chloride to glycerol was 1∶3, the water content of DES system was 44%, the solid-liquid ratio of jujube powder to DES was 1∶35 g/mL, the ultrasonic time was 45 min, and the ultrasonic temperature was 45 ℃. At this time, compared with water extraction and alcohol extraction under the same ultrasonic conditions, the highest content of cAMP extracted by deep eutectic solvent was (284.15±0.06) μg/g. Therefore, ultrasonic-assisted deep eutectic solvent extraction of cAMP in Xinjiang jujube was a new, efficient and safe method to obtain a higher extraction amount.

Key words: Xinjiang jujube; cyclic adenosine monophosphate; deep eutectic solvent; ultrasonic assisted; high performance liquid chromatography

收稿日期: 2021−11−01
基金项目: 新疆生产建设兵团重点领域创新团队建设计划项目（2017CB012）; 新疆生产建设兵团南疆重点产业创新发展支撑计划项目（2018DB002）。
作者简介: 张雪（1997−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品化学与营养学, E-mail: 1103020650@qq.com。
*** 通信作者:** 单春会（1978−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 果蔬加工与贮藏, E-mail: 972338194@qq.com。

红枣(*Zizyphus jujube* Mill)作为一种药食同源食物,因其中富含膳食纤维、多糖、多酚和环磷酸腺苷(cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, cAMP)[1−2]等多种营养和功效成分而广受消费者青睐。已有研究表明,红枣中 cAMP 具有第二信使作用,是生物界普遍存在的一种生物活性成分,广泛调节生物体生理生化过程,人类至少有 40 多种疾病(包括心肌梗塞、冠心病、心源性休克、高血压等重大疾病)与 cAMP 的代谢调控相关[3−4]。

目前,cAMP 常见的生产方法有:化学合成法、微生物发酵法及天然产物提取法。微生物发酵法存在培养周期长、产量低等缺点;化学合成法的不足之处是化学试剂残留,易污染环境[5];而天然产物提取法中的水提法和醇提法存在耗时长,所需条件较高等问题。低共熔溶剂(Deep Eutectic Solvent, DES)作为一种新型、绿色的高效溶剂,主要是由氢键受体和氢键供体组成[6],相比于传统的有机溶剂,DES 不仅环保、无毒、可生物降解,而且还具有生产成本低、可回收和易于生产的特点[7−8]。已有研究用于总黄酮、多酚、多糖等多种功效成分的提取[9],Chen 等[10]利用超声辅助 DES 从东茜草和茜草的果实中提取出总黄酮;Gao 等[11]通过微波辅助 DES 从桑叶中提取出酚类物质;Chen 等[12]研究发现氯化胆碱/乙二醇型 DES 可同时快速高效萃取出卷丹茎中的酚酸和多糖,但是使用 DES 提取 cAMP 的文章未见报道。本文研究从超声波辅助不同类型的 DES 中选择出一种 DES 能够从新疆红枣中提取出最多的 cAMP,结合单因素实验和响应面优化试验获得最佳提取条件,旨在提升新疆红枣附加值,促进新疆红枣产业经济增长和可持续发展。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

红枣片 新疆石河子市金马市场;氯化胆碱(分析纯)、磷酸二氢钾(色谱纯) 上海源叶生物科技有限公司;丙三醇、乙二醇 分析纯,天津市富宇精细化工有限公司;尿素 分析纯,天津市光复科技发展有限公司;果糖、葡萄糖 分析纯,福晨(天津)化学试剂有限公司;超纯水 屈臣氏桶装水;甲醇 色谱纯,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;环磷酸腺苷标准品(cAMP) 纯度≥99%,上海麦克林生化科技有限公司。

LC-20AT 高效液相色谱仪 日本岛津制作所;78-1 磁力加热搅拌器 常州普天仪器制造有限公司;JPGL-20G-Ⅱ高速离心机 赛默飞世尔科技(中国)有限公司;JP-1000B-2 高速多功能粉碎机 永康市永久工贸有限公司;SK5200BT 超声清洗器 上海科导超声仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 低共熔溶剂的制备与筛选 以氯化胆碱为氢键受体,按 1:2 的摩尔比,含水量 30% 分别与 5 种氢键供体丙三醇、乙二醇、尿素、果糖、葡萄糖配制 DES,使用磁力搅拌器加热、搅拌至澄清透明状态,冷却至室温保存备用[13−14]。使用 5 种 DES 以相同的提取条件进行新疆红枣中 cAMP 的提取,选择提取量较高的 DES 做以下研究。

1.2.2 红枣中 cAMP 的提取 红枣片烘干、粉碎、过 0.25 mm 筛网,4 ℃ 保存。将红枣粉与 DES 按一定料液比混合均匀,使用 200 W 超声功率和 35 kHz 超声频率的超声清洗仪在 55 ℃ 下进行提取,3000 r/min 离心 15 min,上清液即为红枣中 cAMP 提取液。

1.2.3 cAMP 含量的测定及标准曲线的绘制 采用 HPLC 法测定 cAMP 含量[15]。色谱柱为 C_{18}(4.6×250 nm, 5 μm);检测器为紫外检测器;流动相为 V(甲醇):V(0.05 mol/L 磷酸二氢钾)=20:80 等度洗脱,流速 1.0 mL/min,柱温 25 ℃,进样量 20 μL,在 254 nm 波长下测定[16−17]。

配制浓度为 1、5、10、15、20、25、30、35、40、45 和 50 μg/mL 的 cAMP 标准品溶液,按照上述的色谱条件测定,并记录峰面积。

cAMP 提取量(μg)=提取液中 cAMP 质量(μg)/红枣粉质量(g)

1.2.4 单因素实验 氯化胆碱为氢键受体,丙三醇为氢键供体组成的 DES,以 DES 摩尔比分别为 1:1、1:2、1:3、1:4、1:5,DES 含水量分别为 30%、40%、50%、60%、70%、80%,料液比分别为 1:5、1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35 g/mL,超声时间分别为 15、30、45、60、75、90 min,超声温度分别为 25、35、45、55、65 ℃ 的条件,按照 1.2.2 的提取方法,研究 DES 摩尔比、DES 含水量、料液比、超声时间和超声温度五个因素对新疆红枣中 cAMP 提取量的影响。

1.2.5 响应面优化试验 根据单因素实验结果,以 DES 含水量、料液比、超声时间和超声温度为自变量,cAMP 提取量(Y)为响应值,利用 Box-Behnken 设计四因素三水平的响应面优化试验,试验因素与水平见表 1。

表 1 Box-Behnken 响应面因素水平设计

Table 1 Box-Behnken response surface factor horizontal design

水平	因素			
	A含水量(%)	B料液比(g/mL)	C超声时间(min)	D超声温度(℃)
−1	30	1:25	30	45
0	40	1:30	45	55
1	50	1:35	60	65

1.2.6 对照试验 分别以报道较多的水提法和醇提法为对照,进行新疆红枣中 cAMP 的提取。按照 1.2.2 中的提取方法,以相同的提取条件,不同的提取溶剂提取新疆红枣中的 cAMP,按照 1.2.3 的色谱条件进行测定,计算 cAMP 提取量。

1.3 数据处理

采用 Origin 8.5 和 Design-Expert 8.0.6 软件进

行数据分析，每组试验重复 3 次，采用单因素方差分析，不同字母代表差异显著（P<0.05）。

2　结果与分析

2.1　cAMP 标准曲线及样品 cAMP 的定性

以 cAMP 浓度为横坐标，以色谱峰面积为纵坐标进行线性回归分析，得到的回归方程为：y=44824x−3538.1，R^2=0.9992，表明 cAMP 标准品浓度与色谱峰面积有良好的线性关系。如图 1 和图 2 所示，在 HPLC 条件下，cAMP 分离度良好，表明样品与标品保留时间一致，说明 DES 法能够提取出新疆红枣中的 cAMP[18]。

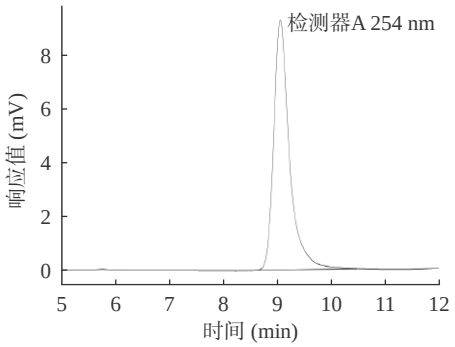


图 1　cAMP 标准品色谱图（5 μg·mL^{-1}）

Fig.1　Chromatogram of cAMP standard substance (5 μg·mL^{-1})

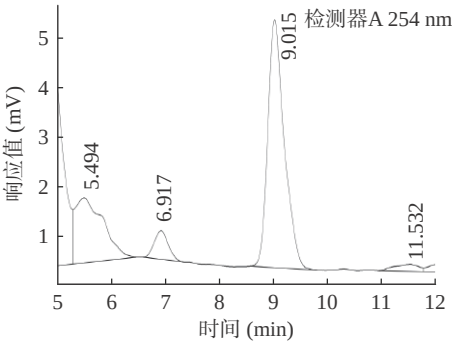


图 2　DES 提取 cAMP 色谱图

Fig.2　cAMP chromatogram extracted by DES

2.2　低共熔溶剂体系筛选试验

如图 3 所示，以氯化胆碱为氢键受体，丙三醇、乙二醇、尿素、果糖、葡萄糖分别作为氢键供体构成的不同 DES 体系提取新疆红枣中的 cAMP，得到的提取量分别是(256.02±0.07)、(227.76±0.08)、(226.56±0.12)、(219.28±0.16)、(188.16±0.06) μg/g。氯化胆碱-丙三醇是这 5 种 DES 中提取 cAMP 含量最高的。这可能是因为 cAMP 溶液本身呈酸性，氯化胆碱-丙三醇中含有羟基比较多，并且黏度相对于氯化胆碱-果糖和氯化胆碱-葡萄糖体系较小，有利于 cAMP 的溶出，因此选用氯化胆碱-丙三醇构成的 DES 体系提取新疆红枣中的 cAMP。

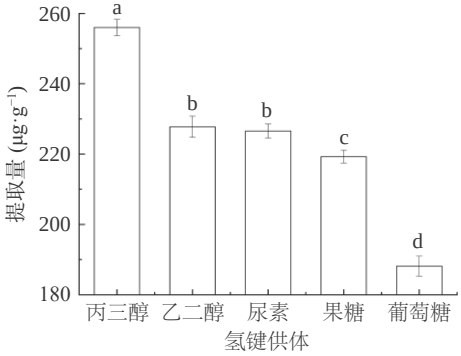


图 3　不同低共熔溶剂对 cAMP 提取量的影响

Fig.3　Effect of different DES on cAMP extraction amount

注：不同字母表示差异显著（P<0.05）；图 4~图 8、图 10 同。

2.3　单因素实验结果

2.3.1　DES 摩尔比对 cAMP 提取量的影响　以氯化胆碱与丙三醇构建 DES 体系，考察二者摩尔比对 cAMP 提取量的影响见图 4。

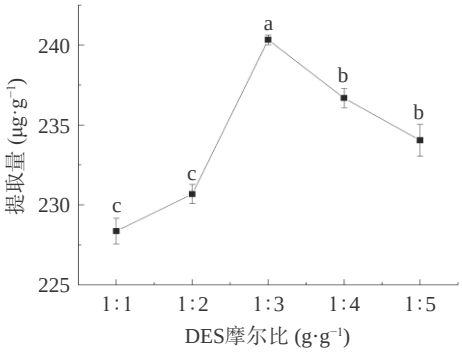


图 4　摩尔比对 cAMP 提取量的影响

Fig.4　Effect of molar ratio on cAMP extraction amount

由图 4 可知，DES 体系中氢键受体-氯化胆碱与氢键供体-丙三醇的摩尔比从 1∶1 至 1∶3 时，cAMP 提取量呈上升趋势；摩尔比为 1∶3 时达到 cAMP 的最大提取量，为（240.33±0.13）μg/g；二者摩尔比从 1∶3 至 1∶5 时，cAMP 提取量呈下降趋势。这可能是因为 cAMP 为极性大分子，而氯化胆碱与丙三醇 DES 体系的极性也较大，根据相似相溶原理，cAMP 会在氯化胆碱与丙三醇 DES 体系中溶解进而释出[19−20]，也可能是因为不同的摩尔比使 DES 体系的黏度和表面张力不同，过高或者过低的摩尔比会弱化溶剂与 cAMP 的相互作用，而 1∶3 的摩尔比可能恰好达到使 cAMP 容易扩散的 DES 体系[21]。所以，氯化胆碱与丙三醇的摩尔比以 1∶3 为宜。由于不同 DES 摩尔比提取出的 cAMP 含量相差较小，最大值与最小值相差 12 μg/g，所以不选择 DES 摩尔比作为响应面优化条件[22]。

2.3.2　DES 含水量对 cAMP 提取量的影响　以氯化胆碱与丙三醇构建 DES 体系，考察 DES 含水量对 cAMP 提取量的影响见图 5。

由图 5 可知，DES 含水量从 30%~40% 时，cAMP 提取量逐渐增加；当 DES 含水量达到 40% 时，cAMP 提取量最大值为（257.89±0.09）μg/g；DES 含水量从 40%~80% 时，cAMP 提取量反而逐渐下降。这主要是因为低含水量的 DES 体系黏度太大，渗透性弱[23]。随着含水量的增加，DES 体系黏度降低增加了溶剂的传质效率。然而过高的含水量会增加混合物的极

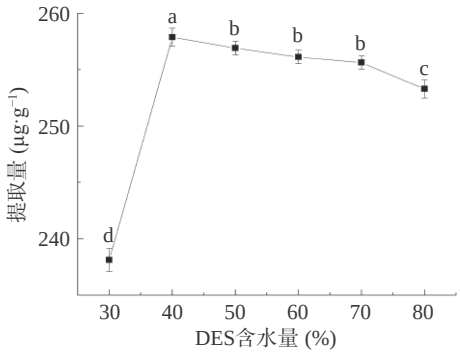


图 5 DES 含水量对 cAMP 提取量的影响

Fig.5 Effect of DES water content on cAMP extraction amount

性, 极性过大会引起分子间氢键的断裂[24]。

2.3.3 料液比对 cAMP 提取量的影响 以氯化胆碱与丙三醇构建 DES 体系, 考察料液比对 cAMP 提取量的影响见图 6。

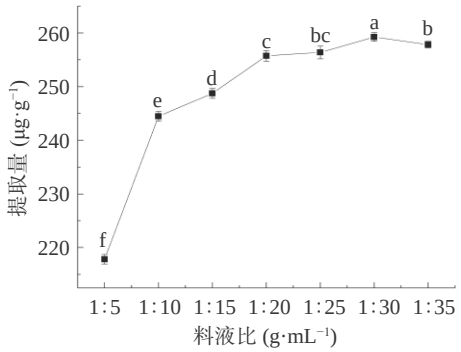


图 6 料液比对 cAMP 提取量的影响

Fig.6 Effect of solid-liquid ratio on cAMP extraction amount

由图 6 可知, 随着料液比的减小, cAMP 提取量逐渐增加, 当料液比 1∶30 g/mL 时, cAMP 提取量达到最大值(259.25±0.10) μg/g, 随后 cAMP 提取量开始下降。这可能是因为溶剂量逐渐增加时, 红枣粉与溶剂的接触面积会大大增加, 有利于 cAMP 的析出; 而 cAMP 提取量的下降可能是由于 cAMP 在溶剂中溶解达到饱和[25], 或者过多的溶剂起到了稀释作用。所以, 料液比选择 1∶30 g/mL。

2.3.4 超声时间对 cAMP 提取量的影响 以氯化胆碱与丙三醇构建 DES 体系, 考察超声时间对 cAMP 提取量的影响见图 7。

由图 7 可知, 超声时间从 15~45 min 时, cAMP 提取量不断增加, 当达到 45 min 时, 提取量达到最大值(263.94±0.04) μg/g, 之后随时间的延长, cAMP 提取量逐渐减少。这种现象可能是因为随着超声时间的延长, 超声波产生的能量在溶液中形成的空化效应和机械效应越来越强[26], 加强了对红枣细胞壁的破坏, 使 cAMP 充分扩散, 所以 cAMP 提取量越来越高。但是随着超声时间的延长, 体系处于超声辐射和热效应的作用下, 可能会溶出其他物质干扰 cAMP 的释出[27], 导致了 cAMP 提取量的下降。所以, 超声时间以 45 min 为宜。

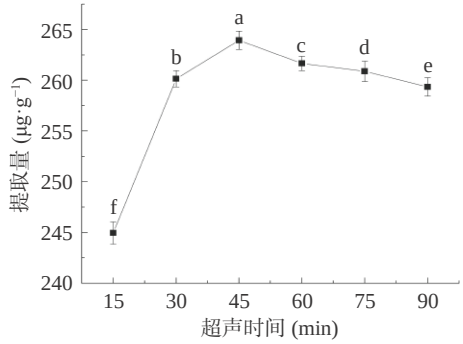


图 7 超声时间对 cAMP 提取量的影响

Fig.7 Effect of ultrasonic time on cAMP extraction amount

2.3.5 超声温度对 cAMP 提取量的影响 以氯化胆碱与丙三醇构建 DES 体系, 考察超声温度对 cAMP 提取量的影响见图 8。

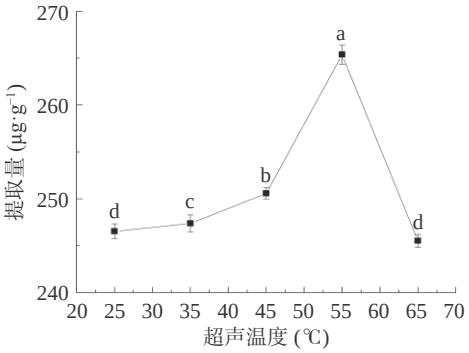


图 8 超声温度对 cAMP 提取量的影响

Fig.8 Effect of ultrasonic temperature on cAMP extraction amount

由图 8 可知, 随着超声温度的不断升高, cAMP 的提取量也在不断增加, 当超声温度为 55 ℃ 时, 达到 cAMP 最大提取量(265.38±0.05) μg/g, 之后随着温度继续升高, cAMP 提取量呈下降趋势。这可能是由于适当升高温度导致 DES 表面张力降低, 黏度下降, 有利于红枣粉与 DES 的接触, 增强了 cAMP 在溶剂中的溶解; 然而温度过高可能会导致热敏感物质降解和溶剂的挥发[28]。所以, 55℃ 为 cAMP 提取的适宜温度。

2.4 响应面试验

2.4.1 响应面试验结果及方差分析 响应面试验结果见表 2。回归模型方差分析见表 3。

对模型数据进行回归拟合, 得到自变量含水量(A)、料液比(B)、超声时间(C)、超声温度(D)与 cAMP 提取量(Y)的二次多元回归方程: $Y=276.03+1.03A+5.93B+1.00C-4.05D+4.56AB+2.23AC-8.06AD-3.02BC-11.90BD-1.78CD-18.88A^2-8.76B^2-15.73C^2-6.49D^2$

从表 3 可以看出, 回归模型 $P<0.0001$, 说明模型拟合程度良好; 失拟项不显著, 说明未知因素对试验结果干扰小[29]。方程复相关系数的平方 $R^2=0.9901$, 说明该方程拟合度较高, 可用该模型对 cAMP 得率

表 2　响应面试验结果

Table 2　Response surface test results

实验号	A	B	C	D	Y cAMP提取量(μg/g)
1	0	−1	0	1	261.34
2	0	1	1	0	253.60
3	0	−1	1	0	250.36
4	1	0	1	0	244.37
5	1	0	0	1	239.32
6	0	0	0	0	274.22
7	0	0	0	0	275.92
8	−1	0	1	0	241.50
9	0	1	0	−1	284.82
10	0	0	0	0	276.81
11	1	−1	0	0	240.12
12	0	1	0	1	251.59
13	0	1	−1	0	257.62
14	1	1	0	0	261.46
15	1	0	0	−1	264.18
16	0	0	0	0	277.78
17	0	0	1	−1	259.69
18	0	0	1	1	250.02
19	−1	−1	0	0	244.76
20	0	0	−1	1	251.82
21	−1	0	0	−1	244.76
22	0	−1	−1	0	242.32
23	−1	0	−1	0	243.70
24	1	0	−1	0	237.67
25	−1	0	0	1	252.13
26	0	0	−1	−1	254.37
27	0	0	0	0	275.44
28	−1	1	0	0	247.88
29	0	−1	0	−1	246.96

进行分析和预测。模型 R^2=0.9803，说明试验稳定性较高[30]。一次项 B、D 对响应值影响极显著(P<0.01)；交互项 AB、AD、BC、BD 对响应值影响极显著(P<0.01)，AC 对响应值影响显著(P<0.05)；二次项 A^2、B^2、C^2、D^2 对响应值影响极显著(P<0.01)。根据 F 值可知各因素对 cAMP 提取量影响程度的大小顺序为：料液比>超声温度>含水量>超声时间。

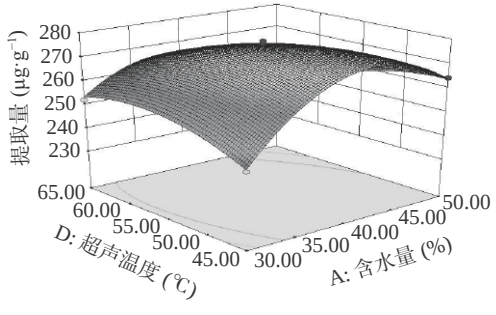
表 3　回归模型方差分析

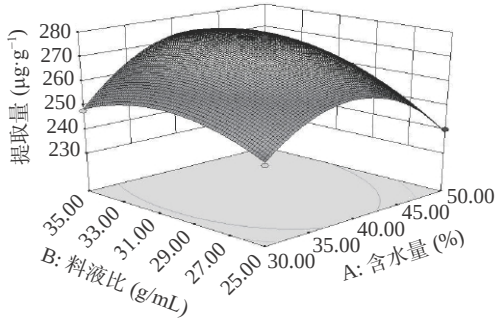
Table 3　Regression model variance analysis

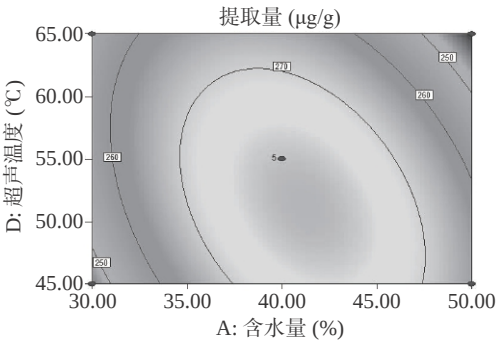
方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	5003.75	14	357.41	100.39	<0.0001	**
A	12.80	1	12.80	3.60	0.0788	
B	421.38	1	421.38	118.35	<0.0001	**
C	12.10	1	12.10	3.40	0.0865	
D	196.49	1	196.49	55.19	<0.0001	**
AB	82.99	1	82.99	23.31	0.0003	**
AC	19.83	1	19.83	5.57	0.0333	*
AD	259.81	1	259.81	72.97	<0.0001	**
BC	36.39	1	36.39	10.22	0.0065	**
BD	566.65	1	566.65	159.15	<0.0001	**
CD	12.67	1	12.67	3.56	0.0802	
A^2	2312.91	1	2312.91	649.62	<0.0001	**
B^2	497.80	1	497.80	139.82	<0.0001	**
C^2	1605.35	1	1605.35	450.89	<0.0001	**
D^2	273.24	1	273.24	76.74	<0.0001	**
残差	49.85	14	3.56			
失拟项	42.53	10	4.25	2.33	0.2160	
纯误差	7.32	4	1.83			
总误差	5053.59	28				
			决定系数R^2=0.9901			

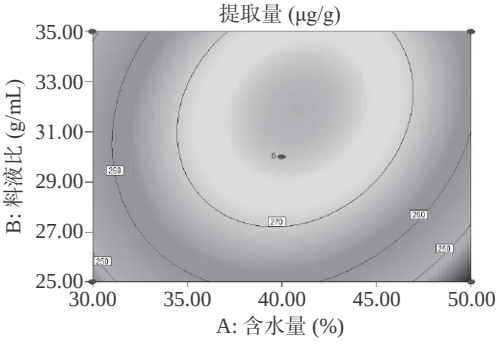
注：**差异极显著(P<0.01)；*差异显著(P<0.05)。

2.4.2　响应面分析　3D 响应面图的曲线越陡峭，说明该因素对 cAMP 提取量的影响越大。椭圆形的等高线说明两因素的交互作用较强，等高线越密集，表明因素对响应值的影响越显著[31]。由图 9 可以看出 AB、AD、BC、BD 的交互作用曲面坡度较大，等高线密集，说明其对 cAMP 提取量影响显著(P<0.01)。由等高线图的密集程度可知，料液比对提取量的影响比超声温度、超声时间、含水量影响显著；超声温度对提取量的影响比含水量影响显著。









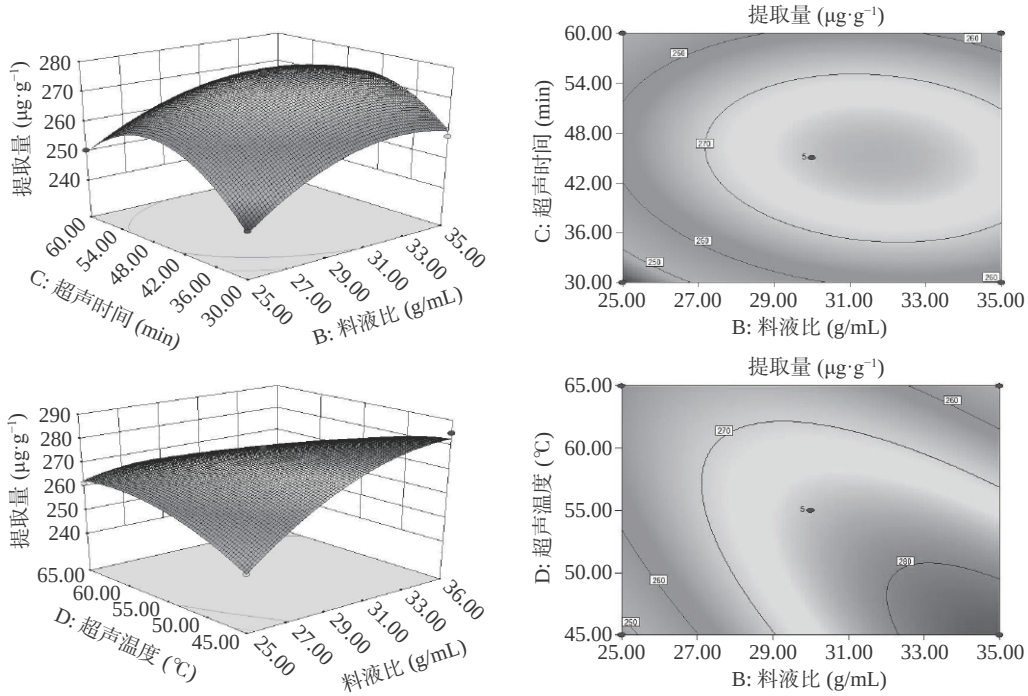


图 9　各因素交互作用的响应面图

Fig.9　Response surface diagram of interaction of various factors

2.4.3　验证试验　响应面优化后的提取条件为: 含水量 44.21%, 料液比 1∶35 g/mL, 超声时间 44.83 min, 超声温度 45.34 ℃, 预测 cAMP 提取量为 293.35 μg/g。结合实际操作可行性, 以含水量 44%, 料液比 1∶35 g/mL, 超声时间 45 min, 超声温度 45 ℃ 的提取条件提取新疆红枣中的 cAMP, 得到实际 cAMP 提取量为(284.15±0.06) μg/g。实际提取量达到预测值的 96.9%, 验证了响应面法优化新疆红枣中 cAMP 的提取工艺可行, 得到的回归模型可靠。

2.5　对照试验

将 DES 提取法与传统水提法、醇提法进行比较, 如图 10 所示。DES 提取 cAMP 得到的提取量最高(284.15±0.06) μg/g, 优于水提法(266.25±0.12) μg/g 与醇提法(270.14±0.10) μg/g。李辉等[32] 对北方红枣中 cAMP 提取一次得到的 cAMP 含量约为 240 μg/g, 袁辉等[33] 从 50 批次不同产品和品种的新疆红枣中测定 cAMP 的平均含量为 190.68 μg/g, 本次试验提取的 cAMP 含量高于已有的研究结果。这可能是因为氯化胆碱-丙三醇这种 DES 可以活化改性红枣中的木质素和分离木质纤维材料的组分[34], 使 cAMP 更容易溶出。

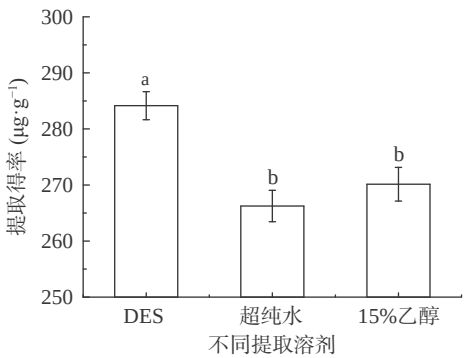


图 10　不同提取溶剂下的 cAMP 提取量

Fig.10　cAMP extraction amount under different extraction solvents

3　结论

试验以新疆红枣为原料, 以氯化胆碱-丙三醇为提取溶剂, 利用超声波辅助技术进行 cAMP 的提取, 确定了 cAMP 的最佳提取条件: DES 体系含水量 44%, 料液比 1∶35 g/mL, 超声时间 45 min, 超声温度 45 ℃, 此时的 cAMP 提取量为(284.15±0.06) μg/g, 比同等条件下的水提法和醇提法得到的 cAMP 提取量分别高出 6.7% 和 5.2%。综合考虑天然 cAMP 的含量和实际应用价值, 说明了超声波辅助 DES 提取 cAMP 的可行性和高效性。本文研究打破传统的 cAMP 提取方法, 选用超声波辅助新型、绿色的 DES 提取方法, 开拓了 DES 的使用领域, 也增加了新疆红枣的附加值, 拉动新疆枣业经济发展, 为今后的 cAMP 提取研究提供了参考意义。

参考文献

[1] WOJDYLO A, FIGIEL A, LEGUA P, et al. Chemical composition, antioxidant capacity, and sensory quality of dried *Jujube* fruits as affected by cultivar and drying method[J]. Food Chemistry, 2016, 207: 170−179.

[2] 刘丹. 南疆不同品种红枣环磷酸腺苷的差异性及浓缩产品的制备 [D]. 阿拉尔: 塔里木大学, 2016. [LIU D. The diversity of cAMP in Southern Xinjiang *Jujube* cultivars and preparation of concentrated product[D]. Alaer: Tarim University, 2016.]

[3] BERGANTIN L B. Diabetes and inflammatory diseases: An overview from the perspective of Ca2+/3'-5'-cyclic adenosine mono-

phosphate signaling[J]. World Journal of Diabetes, 2021, 12(6): 767.

[4] DONG J, FU X M, WANG P F, et al. Construction of industrial baker's yeast with high level of cAMP[J]. Journal of Food Biochemistry, 2019, 43(7): 1−7.

[5] 张义军. 红枣中环磷酸腺苷的提取及成型工艺研究 [D]. 石河子: 石河子大学, 2018. [ZHANG Y J. Study on the extraction process and forming process for cAMP from *Ziziphus jujube* mill[D]. Shihezi: Shihezi University, 2018.]

[6] ABBOTT A P, CAPPER G, DAVIES D L, et al. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures[J]. Chemical Communications, 2003(1): 70−71.

[7] CUNHA S C, FERNANDES J O. Extraction techniques with deep eutectic solvents[J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2018, 105: 225−239.

[8] 唐兰芳, 王锋, 苏小军, 等. 低共熔溶剂提取对黄精多糖性质及抗氧化活性的影响[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(11): 151−157. [TANG L F, WANG F, SU X J, et al. Effects of deep eutectic solvents on the properties and antioxidant activity of polysaccharides from *Polygonatum cyrtonema* Hua[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(11): 151−157.]

[9] 刘金铭, 王辉, 张欢, 等. 超声辅助低共熔溶剂萃取法在活性成分提取与食品分析预处理中应用的研究进展[J]. 食品工业科技, 2021, 42(7): 399−407. [LIU J M, WANG H, ZHANG H, et al. Research progress on extraction of active ingredients and pretreatment of food analysis by ultrasound-assisted deep eutectic solvent method[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(7): 399−407.]

[10] CHEN X Q, LI Z H, LIU L L, et al. Green extraction using deep eutectic solvents and antioxidant activities of flavonoids from two fruits of *Rubia* species[J]. LWT, 2021, 148: 111−708.

[11] GAO M Z, CUI Q, WANG L T, et al. A green and integrated strategy for enhanced phenolic compounds extraction from mulberry (*Morus alba* L.) leaves by deep eutectic solvent[J]. Microchemical Journal, 2020, 154: 104598.

[12] CHEN L, YANG Y Y, ZHOU R R, et al. The extraction of phenolic acids and polysaccharides from *Lilium lancifolium* Thunb. using a deep eutectic solvent[J]. Analytical Methods, 2021, 13(10): 1226−1231.

[13] XU M, RAN L, CHEN N, et al. Polarity-dependent extraction of flavonoids from citrus peel waste using a tailor-made deep eutectic solvent[J]. Food Chemistry, 2019, 297: 124−136.

[14] 孙悦, 刘晓冰, 苏卓文, 等. 微波辅助低共熔溶剂提取鹰嘴豆中黄酮及其抗氧化活性的研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(14): 120−128. [SUN Y, LIU X B, SU Z W, et al. Extraction of flavonoids from Chickpea by microwave assisted eutectic solvent and its antioxidant activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(14): 120−128.]

[15] TSJOKAJEV A, ROBERG-LARSEN H, WILSON S R, et al. Mass spectrometry-based measurements of cyclic adenosine monophosphate in cells, simplified using reversed phase liquid chromatography with a polar characterized stationary phase[J]. Journal of Chromatography B, 2020, 1160: 122−128.

[16] 岳盈肖, 王永霞, 赵彤, 等. 超声波辅助水浴法提取大枣中环磷酸腺苷工艺优化[J]. 中国食品添加剂, 2019, 30(9): 87−93. [YUE Y X, WANG Y X, ZHAO T, et al. Optimization of extraction process of adenosine cyclic phosphate from Chinese *Jujube* by ultrasound-assisted water bath[J]. China Food Additives, 2019, 30(9): 87−93.]

[17] TANG B, ZHANG H, ROW K H. Application of deep eutectic solvents in the extraction and separation of target compounds from various samples[J]. Journal of Separation Science, 2015, 38(6): 1053−1064.

[18] MANSUR A R, SONG N, JANG H W, et al. Optimizing the ultrasound-assisted deep eutectic solvent extraction of flavonoids in common buckwheat sprouts[J]. Food Chemistry, 2019, 293: 438−445.

[19] 孙平, 董萍萍, 董丹华, 等. 超声波辅助低共熔溶剂提取野菊花总黄酮的工艺研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(20): 147−152. [SUN P, DONG P P, DONG D H, et al. Ultrasound-assisted deep eutectic solvent extraction of total flavonoids from *Chrysanthemum indicum*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(20): 147−152.]

[20] 张莹莹, 毛向红, 张建英. 不同方法对酸枣果实环磷酸腺苷提取效果的比较[J]. 食品科技, 2018, 43(3): 192−195. [ZHANG Y Y, MAO X H, ZHANG J Y. Effects of different extraction methods on cAMP from wild *Jujube*[J]. Food Science and Technology, 2018, 43(3): 192−195.]

[21] CUI Q, PENG X, YAO X H, et al. Deep eutectic solvent-based microwave-assisted extraction of genistin, genistein and apigenin from *pigeon pea* roots[J]. Separation and Purification Technology, 2015, 150: 63−72.

[22] 张锦钰. 低共熔溶剂提取淮山多糖及其结构、生物活性研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2020. [ZHANG J Y. Study on structure and bioactivity of polysaccharides extracted from *Chinese Yam* using deep eutectic solvents[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2020.]

[23] 黄秀红, 刘丽辰, 阮怿航, 等. 响应面优化低共熔溶剂提取乌龙茶多糖的研究[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(11): 96−103. [HUANG X H, LIU L C, RUAN Y H, et al. Optimization of deep eutectic solvents extraction of polysaccharides from oolong tea by response surface methodology[J]. Food Research and Development, 2020, 41(11): 96−103.]

[24] DAI Y, WITKAMP G J, VERPOORTE R, et al. Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications[J]. Food Chemistry, 2015, 187: 14−19.

[25] CONTAMINE R F, WILHELM A M, BERLAN J, et al. Power measurement in sonochemistry[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 1995, 2(1): 43−47.

[26] MENG Z R, ZHAO J, DUAN H X, et al. Green and efficient extraction of four bioactive flavonoids from *Pollen typhae* by ultrasound-assisted deep eutectic solvents extraction[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2018, 161: 246−253.

[27] HSIEH Y H, LI Y B, PAN Z C, et al. Ultrasonication-assisted synthesis of alcohol-based deep eutectic solvents for extraction of active compounds from ginger[J]. Ultrasonics Sonochem-

istry, 2020, 63: 104−115.
[28] BUBALO M C, ĆURKO N, TOMAŠEVIĆ M, et al. Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents [J]. Food Chemistry, 2016, 200: 159−166.
[29] THU H N, VAN P N, MINH K N, et al. Optimization of extraction conditions of flavonoids from celery seed using response surface methodology[J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2020, 52(22): 4215−4218.
[30] 孙悦, 何莲芝, 苏卓文, 等. 超声辅助低共熔溶剂提取甘草多糖的研究[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(2): 84−91. [SUN Y, HE L Z, SU Z W, et al. Ultrasonic-assisted eutectic solvent extraction of glycyrrhiza polysaccharide[J]. Food Research and Development, 2021, 42(2): 84−91.]
[31] 董嘉琪, 张晓松, 彭晓婷, 等. 响应面法优化红芪多糖的提取工艺 [J]. 动物医学进展, 2021, 42(4): 64−71. [DONG J Q, ZHANG X S, PENG X T, et al. Optimization of extraction process of *Radix hedysari* polysaccharide by response surface methodology [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2021, 42(4): 64−71.]
[32] 李辉, 赵亮, 李建贵, 等. 高效液相色谱法测定我国北方红枣中环磷酸腺苷的含量[J]. 分析测试技术与仪器, 2020, 26(1): 42−48. [LI H, ZHAO L, LI J G, et al. Determination of cAMP in *Jujube* from north of China by high performance liquid chromatography[J]. Analysis and Testing Technology and Instruments, 2020, 26(1): 42−48.]
[33] 袁辉, 张煌涛, 王建玲. HPLC 法测定新疆地区红枣中黄酮类物质的含量[J]. 食品工业, 2020, 41(8): 284−287. [YUAN H, ZHANG H T, WANG J L. Determination of flavonoids in *Jujube* from Xinjiang by HPLC[J]. Food Industry, 2020, 41(8): 284−287.]
[34] 李利芬, 胡英成, 吴志刚, 等. 杨木木粉在酸性氯化胆碱/丙三醇中的快速液化研究[J]. 西北林学院学报, 2019, 34(6): 172−177. [LI L F, HU Y C, WU Z G, et al. Rapid liquefaction of poplar wood in choline chloride/glycerol solvent[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2019, 34(6): 172−177.]

汪涛, 李良群, 严艳芳, 等. 刺梨中质量标记物的提取工艺优化及其含量同时测定 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 251−260. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110095

WANG Tao, LI Liangqun, YAN Yanfang, et al. Optimization of Extraction Process and Simultaneous Content Determination for Quality Marker from *Rosa roxburghii*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 251−260. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110095

·工艺技术·

刺梨中质量标记物的提取工艺优化及其含量同时测定

汪　涛[1,2], 李良群[2,3], 严艳芳[2,3], 田　强[1,2], 陈发菊[2,3], 谭云飞[2,3], 杨　娟[2,3], 彭　梅[2,3], 杨礼寿[2,3], 罗忠圣[2,3], 李齐激[2,3], 杨小生[1,2,3,*]

（1.贵州中医药大学研究生院, 贵州 贵阳 550025;
2.贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵州 贵阳 550014;
3.贵州医科大学天然产物化学重点实验室, 贵州 贵阳 550014）

摘　要: 利用响应面法优化刺梨中质量标记物的提取工艺，并建立 HPLC 法同时测定其含量。以刺梨根为原料，利用单因素实验与响应面试验优化了刺梨中 4 个质量标志物（三萜类化合物）的提取工艺，并比较分析刺梨不同部位（根、茎、叶子和果实）的质量标志物含量差异。结果表明，单因素实验确定了影响刺梨萜类物质得率的重要因素为溶剂用量、乙醇浓度、提取时间和提取次数。以刺梨中 4 个质量标志物的总含量为综合考察指标，采用响应面试验确定了刺梨三萜化合物的最适提取工艺条件为：按照溶剂用量为 1∶25 g/mL 加入体积分数为 70% 的乙醇，先超声 30 min，再将料液进行加热回流 2 h，在此条件下，刺梨叶中 4 个质量标志物的总含量为 2.64%，其中刺梨苷含量为 0.99%、野蔷薇苷含量为 0.72%、蔷薇酸含量为 0.43%、委陵菜酸含量为 0.51%；刺梨不同部位的 4 个质量标志物总含量为刺梨叶>刺梨根>刺梨茎>刺梨果。本研究为刺梨的质量评价及其总三萜的开发利用提供科学参考。

关键词: 刺梨, 质量标志物, 三萜化合物, 提取工艺, 含量同时测定

中图分类号: TS201.1　　**文献标识码:** B　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0251−10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110095

本文网刊:

Optimization of Extraction Process and Simultaneous Content Determination for Quality Marker from *Rosa roxburghii*

WANG Tao[1,2], LI Liangqun[2,3], YAN Yanfang[2,3], TIAN Qiang[1,2], CHEN Faju[2,3], TAN Yunfei[2,3], YANG Juan[2,3], PENG Mei[2,3], YANG Lishou[2,3], LUO Zhongsheng[2,3], LI Qiji[2,3], YANG Xiaosheng[1,2,3,*]

（1.Graduate School of Guizhou University of Chinese Medicine, Guiyang 550025, China;
2.The Key Laboratory of Chemistry for Natural Products of Guizhou Province and Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550014, China;
3.The Key Laboratory of Chemistry for Natural Products of Guizhou Medical University, Guiyang 550014, China）

Abstract: Extraction process for Q-markers from *Rosa roxburghii* using response surface methodology was optimized and HPLC method was established for simultaneous determination of their content. The extraction process of Q-marker from the root of *Rosa roxburghii* Tratt was optimized by single factor experiments and response surface methodology, and the

收稿日期: 2021−11−10

基金项目: 贵州省科技创新能力建设专项: “贵州食药用资源康养产品研发与成果转化创新能力提升平台建设项目”（黔科合服企 [2020]4013 号）; 贵州省工信厅刺梨专项: “刺梨核心功效及健康养生产品研究与开发”（黔财农 [2020]307 号）; 贵州省教育厅高等学校特色重点实验室项目: “贵州省高等学校特色重点实验室”（黔教合 KY 字 [2020]018 号）; 贵州省科技计划项目（黔科合支撑 [2022] 一般 171, [2020]1Y148, 黔科合基础-ZK[2021] 一般 512）。

作者简介: 汪涛（1997−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 天然药物化学及活性研究, E-mail: 1753373328@qq.com。

*** 通信作者:** 杨小生（1966−）, 男, 博士, 研究员, 研究方向: 民族食药用植物资源的高效生态利用方面的研究, E-mail: gzcnp@sina.cn。

four Q-markers (triterpenoids) in different parts (root, stem, leaf and fruit) of *Rosa roxburghii* Tratt were analyzed. Results showed that, through single factor experiments, the important factors affecting the yield of Q-markers were determined as solvent dosage, ethanol concentration, extraction time and extraction times. Response surface methodology was used to optimize the extraction process of Q-markers from *Rosa roxburghii*. The optimal extraction conditions were as follows: The solvent dosage was 1∶25 g/mL, 70% ethanol was added, the extraction time was 30 min, and then the material was refluxed for 2 h. The yield of four Q-markers from the *Rosa roxburghii* leaves was 2.64%, including 0.99% of Kaji-ichigoside F1, 0.72% mg/g of rosamultin, 0.43% of rosolic acid and 0.51% of 2*α*,19*α*-dihydroxyursolic acid. The total content of Q-markers in different parts of *Rosa roxburghii* Tratt was in the order of leaves, roots, stems and fruits. This study would provide scientific reference for quality evaluation of *Rosa roxburghii* and development and utilization of total triterpenoids.

Key words: *Rosa roxburghii*; quality marker; triterpenes; extraction process; simultaneous content determination

刺梨(*Rosa roxburghii*)是一种蔷薇科蔷薇属多年生灌木,是我国西南地区特有的一种野生药用植物,集中分布于贵州、云南、四川等地区[1]。刺梨的利用迄今已有 400 多年的历史,具有很高的营养和药用价值。刺梨的根、茎、叶、果实均可入药,有健胃、消食、滋补的作用[2−3]。研究表明,刺梨富含维生素 C、五环三萜、黄酮类、多糖类、有机酸类、其他类化合物如超氧化物歧化酶(SOD)等化学成分[4−8],具有抗凋亡作用、降血糖、抗氧化、减轻炎症作用、增强免疫功能、调节小鼠结肠菌群等多种生物活性[9−13];因此刺梨被广泛应用于食品、医药、保健品等行业。

中药质量标志物(Q-marker)是用于评价中药质量的新概念,2016 年由刘昌孝院士首次提出,为药材、饮片、制剂等方面建立了可参照的质量评价和质量控制模式,对形成质量和风险控制的“药材-饮片-成药”全过程质量追溯系统、建立全新的质量管理体系具有实践应用价值[14−15]。现代药理学研究表明,刺梨三萜类物质在抗抑郁、消炎、对海马神经元的保护及机体免疫调节等方面具有较好的药理活性[16−19],此外,刺梨三萜提取物对酒精性肝损伤的小鼠具有很好的治疗效果[20],并且刺梨总三萜(主要含刺梨苷、野蔷薇苷、蔷薇酸和委陵菜酸)还可以改善机体免疫抑制[21]。基于刺梨三萜成分的活性以及其在刺梨植物体内中的较高含量,因此可以作为刺梨质量标志物。

迄今,有关刺梨三萜的研究主要集中于总三萜含量检测或者 2 种三萜的含量测定。南莹等[22] 研究了贵州龙里地区的刺梨果实中总三萜的含量;代甜甜等[23] 测定了贵州松桃地区野生刺梨中总三萜的含量;刘英枭等[24] 研究了刺梨果渣中蔷薇酸的提取工艺;李齐激等[25−26] 使用 HPLC 测定了刺梨中刺梨苷或蔷薇酸和 1-*β*-羟基蔷薇酸的含量。在提取工艺研究方面,刺梨三萜的提取方法主要有超声提取[27] 和乙醇回流提取[28],但是普遍存在提取效率不高,损失较大的问题。特别是近几年来,贵州省将刺梨产业打造成富民和乡村振兴的大产业,大面积种植刺梨和开发高附加值的刺梨产品是贵州促进经济发展的主要方式之一。如能以刺梨中含有的功能性三萜类物质为基础开发高附加值的产品,将会创造更大的经济效益。因此,对刺梨中质量标记物的提取工艺进行优化及其含量同时的测定进行研究,具有较强的新颖性和实际应用价值。本研究以贵州惠水野生刺梨为原材料,以 4 个化合物即蔷薇酸、委陵菜酸、刺梨苷、野蔷薇苷为质量标志物建立 HPLC 同时测定方法并优化提取工艺,分析刺梨根、茎叶、果四个不同部位中 4 种化合物的含量,为其开发利用与质量评价提供重要参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

刺梨根、茎、叶、果　采自贵州省黔南布依族苗族自治州惠水县 212 国道(经度:106.673411,纬度:26.197517),经贵州中医药大学孙庆文教授鉴定为蔷薇科蔷薇属植物缫丝花的根、茎、叶、果实,标本(凭证 202106001)保存于贵州省、中国科学院天然产物化学重点实验室;三萜化合物标准品(蔷薇酸,刺梨苷,野蔷薇苷自制,经 HPLC 检测测定纯度≥98%);乙醇(分析级)　国药集团化学试剂有限公司;甲醇、乙腈(HPLC 级)　上海阿拉丁生化科技股份有限公司;三氟乙酸(分析级)　天津市科密欧化学试剂有限公司。

BJ-400T 型粉碎机　陕西现代医药有限公司;SB25-12DTD 型超声波清洗器　宁波新芝生物科技股份有限公司;FA2004N 型电子天平(万分之一)　上海菁海仪器有限公司;DKN612C 型电热鼓风干燥箱　上海雅马拓科技贸易有限公司;DK-98-Ⅱ型水浴锅　天津市泰斯特仪器有限公司;Eppendor f 5427R 型高速冷冻离心机　北京龙跃生物科技发展有限公司;Agilent-1260 型高效液相色谱仪　上海连桥生物科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1　质量标志物的提取工艺　参照刘伟等[29] 的方法,略改:将刺梨根置于 65 ℃ 的烘箱中烘干,粉碎,过 3 号筛。精密称定 2.00 g 刺梨根粉末,按照料液比 1∶25 加入体积分数 70% 的乙醇,先放入超声仪中 25 ℃、250 W 超声 30 min,再将料液进行加热回流 2 h,连续提取 3 次,得到刺梨总质量标志物提取液。以同样的方法对刺梨茎、叶、果进行提取。

1.2.2　试样制备

1.2.2.1　标准品溶液配制　精密称定刺梨苷标准品

10.00 mg，置于 10 mL 容量瓶中，用 75% 甲醇完全溶解，定容至刻度线，即得刺梨苷标准溶液（刺梨苷浓度为 1.022 mg/mL）。按照同样的方法配制浓度为 1.020 mg/mL 的野蔷薇苷标准品溶液，浓度为 1.192 mg/mL 的蔷薇酸标准品溶液和浓度为 1.098 mg/mL 的委陵菜酸标准溶液。

1.2.2.2　供试品溶液配制　精密称定刺梨根、茎、叶、果粉末样品 2.00 g，置于具塞锥形瓶中，装入 250 mL 锥形瓶中，按 1∶25 g/mL 的比例加入 50 mL 70% 乙醇。先放入超声仪中 25 ℃、250 W 超声 30 min，再将料液进行加热回流 2 h，重复提取 3 次，合并提取液，低温浓缩后用 75% 甲醇定容至 25 mL 量瓶中，0.45 μm 微孔滤膜过滤，然后以刺梨苷、野蔷薇苷、蔷薇酸和委陵菜酸 4 个质量标志物的含量为指标，用 HPLC 进行检测。

1.2.3　提取方法

1.2.3.1　超声提取　精密称定 2.00 g 预处理后的刺梨根粉末，装入 250 mL 锥形瓶中，按 1∶20 g/mL 的比例加入 40 mL 100% 乙醇。放入超声仪中 25 ℃、250 W 超声 30 min 后将料液过滤，取滤液，过 0.45 μm 微孔滤膜装入 2 mL 螺纹样品瓶中，待 HPLC 检测使用。

1.2.3.2　乙醇回流提取　精密称定 2.00 g 预处理后的刺梨根粉末，装入 250 mL 锥形瓶中，按 1∶20 g/mL 的比例加入 40 mL 100% 乙醇，加热回流 2 h，过滤，取滤液，过 0.45 μm 微孔滤膜装入 2 mL 螺纹样品瓶中，待 HPLC 检测使用。

1.2.3.3　超声辅助乙醇回流提取　精密称定 2.00 g 预处理后的刺梨根粉末，装入 250 mL 锥形瓶中，按 1∶20 g/mL 的比例加入 40 mL 100% 乙醇。放入超声仪中 25 ℃、250 W 超声 30 min 后加热回流 2 h，取滤液，过 0.45 μm 微孔滤膜装入 2 mL 螺纹样品瓶中，待 HPLC 检测使用。

1.2.4　单因素实验

1.2.4.1　溶剂用量对各质量标志物含量的影响　精密称定 2.00 g 预处理后的刺梨根粉末，装入 250 mL 锥形瓶中，以不同溶剂用量（1∶10、1∶15、1∶20、1∶25、1∶30 g/mL）加入 100% 乙醇。放入超声仪中 25 ℃、250 W 超声 30 min 后加热回流 2 h，以 4 个刺梨质量标志物的含量为指标，用 HPLC 进行检测。

1.2.4.2　乙醇浓度对各质量标志物含量的影响　精密称定 2.00 g 预处理后的刺梨根粉末，装入 250 mL 锥形瓶中，按 1∶25 的比例加入 50 mL 不同的乙醇体积分数（60%、70%、80%、90% 和 100%）乙醇。放入超声仪中 25 ℃、250 W 超声 30 min 后加热回流 2 h，然后以 4 个刺梨质量标志物的含量为指标，用 HPLC 进行检测。

1.2.4.3　回流时间对各质量标志物含量的影响　精密称定 2.00 g 预处理后的刺梨根粉末，装入 250 mL 锥形瓶中，按 1∶25 的比例加入 50 mL 70% 乙醇。放入超声仪中 25 ℃、250 W 超声 30 min 后分别加热回流（0.5、1、1.5、2 和 2.5 h），然后以 4 个刺梨质量标志物的含量为指标，用 HPLC 进行检测。

1.2.4.4　提取次数对各质量标志物含量的影响　精密称定 2.00 g 预处理后的刺梨根粉末，装入 250 mL 锥形瓶中，按 1∶25 的比例加入 50 mL 70% 乙醇。放入超声仪中 25 ℃、250 W 超声 30 min 后加热回流 2 h（分别加热 1、2、3、4 和 5 次），然后以 4 个刺梨质量标志物的含量为指标，用 HPLC 进行检测。

1.2.5　响应面试验　本研究使用 Design Export 8.0 软件中的 Box-Behnken 中心组合设计优化提取条件（表 1），在上述单因素实验基础上，考察溶剂用量（A）、乙醇浓度（B）和回流时间（C）3 个因素对刺梨三萜质量标志物含量的影响，从而确定刺梨中三萜质量标志物的最适提取工艺。

表 1　响应面试验因素与水平

Table 1　Design and results of response surface method

水平	因素		
	溶剂用量（g/mL）	乙醇浓度（%）	提取时间（h）
−1	1∶20	60	1.5
0	1∶25	70	2
1	1∶30	80	2.5

1.2.6　刺梨根、茎、叶、果中 4 个标志物的提取及含量测定

1.2.6.1　样品处理　通过单因素与响应面试验，得到提取刺梨质量标志物的最佳条件，在最佳条件下继续提取刺梨根、刺梨茎、刺梨叶、刺梨果实中的质量标志物。然后采用高效液相色谱法对从刺梨中提取到的质量标志物含量进行分析。各质量标志物的含量等于各质量标志物的量/刺梨原料质量（单位 mg/g），以 4 种质量标志物的百分含量总和即总三萜化合物百分含量为评价指标。

1.2.6.2　仪器参数　Thermo C_{18} 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；检测波长 203 nm；柱温 20 ℃；流速为 1 mL/min；进样体积为 10 μL；流动相 A 为 0.05% 三氟乙酸水，B 为乙腈；梯度洗脱条件为 0~15 min，25% A~30% A；15~20 min，30% A~35% A；20~60 min，35% A 等度洗脱。

1.3　数据处理

每个实验重复 3 次，结果表示为 Mean±SD，未做特殊说明差异显著性分析限定为 P=0.05，利用 Excel 2010 对实验数据进行分析，采用 Origin 2018 64Bit 软件进行绘图。

2　结果与分析

2.1　系统适用性考察

吸取“1.2.3.1”项下标准品溶液适量，在“1.2.2”项色谱条件下进样，结果见图 1。由此表明，理论塔板数以刺梨苷、野蔷薇苷、蔷薇酸、委陵菜酸峰计，

分别为 30592、40063、30163、34065, 分离度均大于 1.5, 各基线分离良好。

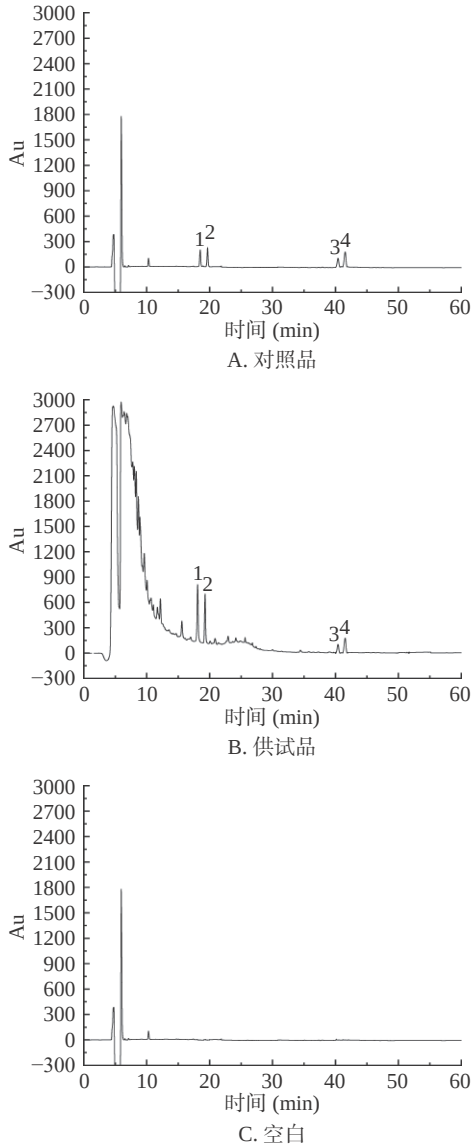


图 1 各成分 HPLC 色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms of various constituents

注: 1.刺梨苷; 2.野蔷薇苷; 3.蔷薇酸; 4.委陵菜酸。

2.2 方法学考察

2.2.1 线性关系考察 吸取“1.2.2.1”项下标准品溶液适量, 在“1.2.6.2”项色谱条件下进样。进样体积依次为 2、4、6、8、10、20 μL, 以质量浓度与进样体积的乘积为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y)进行回归并分析, 结果各成分的 r 都在三个 9 以上, 表明各成分峰面积和质量浓度与进样体积的乘积呈良好线性关系(见表 2)。

2.2.2 日内和日间精密度试验 吸取“1.2.2.1”项下标准品溶液适量, 在“1.2.6.2”项色谱条件下连续进样 6 次, 连续 3 d, 测得刺梨苷、野蔷薇苷、蔷薇酸、委陵菜酸的日内精密度 RSD 分别为 1.20%、1.80%、1.20%、1.40%; 日间精密度分别为 1.79%、0.89%、1.26%、1.23%, 表明仪器日内和日间精密度良好。

表 2 各成分标准曲线方程

Table 2 Standard curve equation of various constituents

成分	回归方程	r	线性范围(mg/mL)
刺梨苷	y=335.94x+29.605	0.9997	0.0371~0.4069
野蔷薇苷	y=427.70x+0.6098	0.9999	0.0405~0.4081
蔷薇酸	y=524.74x−4.7934	0.9997	0.0448~0.4750
委陵菜酸	y=335.91x−28.457	0.9996	0.0312~0.4218

2.2.3 稳定性试验和重复性试验 吸取“1.2.2.1”项下标准品溶液适量, 于 0、2、4、8、12、24 h 在“1.2.6.2”项色谱条件下进样, 测得刺梨苷、野蔷薇苷、蔷薇酸、委陵菜酸的精密度 RSD 分别为 1.44%、0.96%、0.96%、1.47%, 表明溶液在 24 h 内稳定性良好。精密称取同一批刺梨根粉末 6 份, 按“1.2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“1.2.6.2”项色谱条件下进样, 测得刺梨苷、野蔷薇苷、蔷薇酸、委陵菜酸的精密度 RSD 分别为 1.40%、1.48%、1.65%、1.78%, 表明该方法重复性良好。

2.2.4 加样回收试验 精密称定刺梨根粉末样品 6 份, 每份 1.00 g, 精密称定, 每份样品分别加入相对应标准品(刺梨苷 4.61 mg、野蔷薇苷 5.02 mg、蔷薇酸 4.88 mg、委陵菜酸 3.24 mg), 按“1.2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 测得 4 种成分加样回收率, 结果见表 3。

2.3 刺梨中各质量标志物提取方法比较结果

首先以刺梨根为提取原料, 对比超声提取法、乙醇回流提取法及超声-乙醇回流法三种提取工艺, 以刺梨质量标志物化合物类型为横坐标, 质量标志物含量为纵坐标, 其结果如图 2 所示。由图 2 可知, 先超声再乙醇回流结合方法优于单独超声提取法与单独乙醇回流提取法; 其二是超声加乙醇回流得到的刺梨各质量标志物含量分别为, 刺梨苷 0.43%, 野蔷薇苷 0.55%, 蔷薇酸 0.22%, 委陵菜酸 0.26%。因此, 接下来的试验都以超声-乙醇回流法提取刺梨根、刺梨茎、刺梨叶和刺梨果中质量标志物。

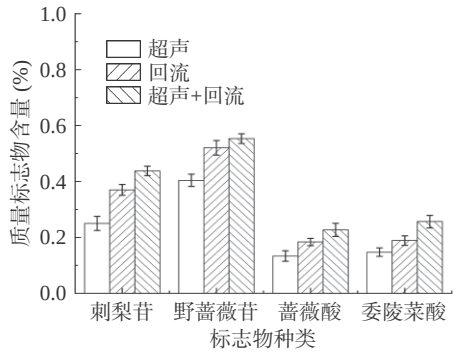


图 2 三种提取方法效率对比图

Fig.2 Comparison of three extraction methods

2.4 单因素实验结果

溶剂用量、乙醇浓度、提取时间及提取次数等是影响刺梨中 4 个质量标志物含量的主要因素[30]。因

表 3　各成分加样回收率试验结果(n=6)

Table 3　Results of recovery tests for various constituents (n=6)

成分	取样量(g)	原有量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
刺梨苷	1.0002	4.6142	4.4344	9.0613	99.27	101.03	1.15
	1.0040	4.6318	4.4254	9.0888	100.72		
	1.0027	4.6258	4.4315	9.1178	101.37		
	1.0246	4.7268	4.3954	9.2479	102.86		
	1.0131	4.6737	4.4158	9.1245	100.79		
	1.0045	4.6341	4.4127	9.0988	101.18		
野蔷薇苷	1.0002	5.0199	5.0258	10.1309	101.69	100.09	1.72
	1.0040	5.0390	5.0187	10.1414	101.67		
	1.0027	5.0325	5.1582	10.1566	99.34		
	1.0246	5.1424	5.0587	10.1887	99.76		
	1.0131	5.0846	5.0169	10.1455	100.88		
	1.0045	5.0415	5.0247	9.9245	97.18		
蔷薇酸	1.0002	4.8820	4.5826	9.4919	100.60	101.80	1.34
	1.0040	4.9005	4.6018	9.5934	101.98		
	1.0027	4.8942	4.9875	10.0512	103.40		
	1.0246	5.0011	4.9985	10.1189	102.39		
	1.0131	4.9449	4.9927	10.0693	102.65		
	1.0045	4.9030	4.7143	9.6053	99.75		
委陵菜酸	1.0002	3.2371	3.2894	6.5966	102.13	101.22	1.23
	1.0040	3.2494	3.2895	6.6397	100.60		
	1.0027	3.2452	3.3586	6.6137	100.29		
	1.0246	3.3161	3.3982	6.8237	103.22		
	1.0131	3.2789	3.4166	6.7335	101.11		
	1.0045	3.2511	3.4257	6.6747	99.94		

此，基于超声-乙醇回流法，考察溶剂用量、乙醇浓度、回流时间以及提取次数对刺梨中 4 个质量标志物含量的影响。

2.4.1　溶剂用量对刺梨中各质量标志物含量的影响

溶剂用量对刺梨根中各质量标志物含量的影响结果见图 3。由图 3 可知：当料液比从 1∶10~1∶25 时，刺梨中三萜化合物的含量呈现增大的趋势，可能由于随着溶剂用量的增大，刺梨三萜在乙醇中的溶解度也增大，在 1∶25 的时候刺梨三萜的溶解度达到最大，各三萜化合物的含量也达到最大(刺梨苷 0.40%、野蔷薇苷 0.58%、蔷薇酸 0.18%、委陵菜酸 0.24%)；当料液比从 1∶25~1∶30 时，刺梨苷和野蔷薇苷明显降低，委陵菜酸和蔷薇酸的含量逐渐下降，这可能是由于其他醇溶性成分溶出，使得刺梨三萜的含量下降。选定料液比 1∶20、1∶25、1∶30 作为响应面试验水平。

2.4.2　乙醇浓度对刺梨中各质量标志物含量的影响

乙醇浓度对刺梨根中各质量标志物含量的影响结果见图 4。由图 4 可知：当乙醇体积分数从 60% 升到 70% 时，刺梨苷的含量增大，其含量从 0.52% 增加到 0.55%，提高了 5.77%；当乙醇体积分数从 60% 升到 70% 时，野蔷薇苷的含量缓慢上升，其含量从 0.59% 增加到 0.63%，提高了 6.78%；而当乙醇体积分数从 80% 升到 100% 时，两者的含量呈现快速下降的趋势；当乙醇浓度从 60% 升到 80% 时，蔷薇酸的含量呈现缓慢上升的趋势，从 0.11% 增加到 0.21%，提高了 90.90%；委陵菜酸的含量增加到最大(2.37 mg/g)，而乙醇浓度在 80% 以后两者的含量开始下。这可能是由于刺梨苷和野蔷薇苷在乙醇浓度为 70% 的时候的溶出率较好，因此在此时的含量较高；而蔷薇酸和委陵菜酸则在乙醇浓度为 80% 的时候溶出率较好。

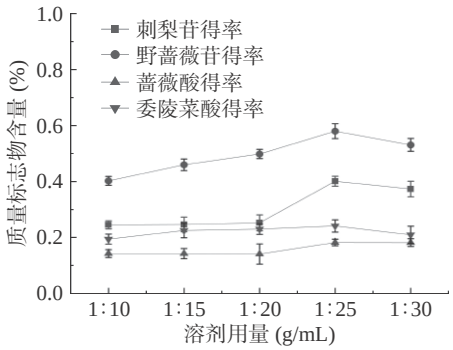


图 3　溶剂用量对刺梨根中质量标志物含量的影响

Fig.3　Effects of solvent dosage on the contents of Q-marker in *R. roxburghii* root

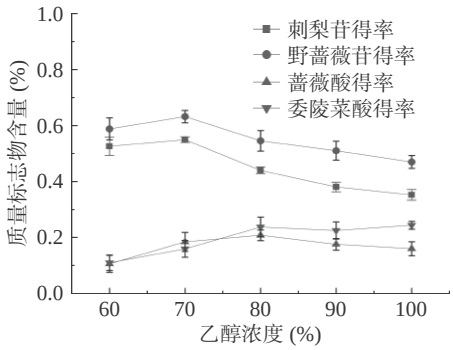


图 4　乙醇浓度对刺梨根中质量标志物含量的影响

Fig.4　Effects of ethanol concentration on the contents of Q-marker in *R. roxburghii* root

综合四者的总含量考虑，选定乙醇浓度 60%、70%、80% 作为响应面试验水平。

2.4.3 回流时间对刺梨中各质量标志物含量的影响

回流时间对刺梨根中各质量标志物含量的影响结果见图 5。提取时间过短会造成原料提取不完全，时间过长且在较高的温度下会导致成分破坏。由图 5 可知：在 30 min 时，提取不够完全，刺梨三萜浸出不完全，因此含量较低；随着回流时间的增加，刺梨苷、野蔷薇苷和委陵菜酸的含量均呈上升趋势，在回流时间为 2 h 时，两者的含量达到最高（刺梨苷 0.87%、野蔷薇苷 0.98%、委陵菜酸 0.26%），随后刺梨苷的含量呈现下降的趋势，而野蔷薇苷和委陵菜酸的含量基本变化不大；在回流时间从 0.5 h 到 1.5 h 时，蔷薇酸的含量缓慢上升，达到最大值（0.34%）；当继续增加回流时间时，蔷薇酸的含量变化基本不大，这表明提取液已基本饱和，刺梨中蔷薇酸已不易再渗出至溶液中，野蔷薇苷和委陵菜酸亦是如此。本研究结果和高伟城等[31] 采用 响应面法优化枇杷叶三萜酸类成分的提取工艺中提取时间研究结果相一致，结合四者的总含量考虑，选定提取时间 1.5、2、2.5 h 作为响应面试验水平。

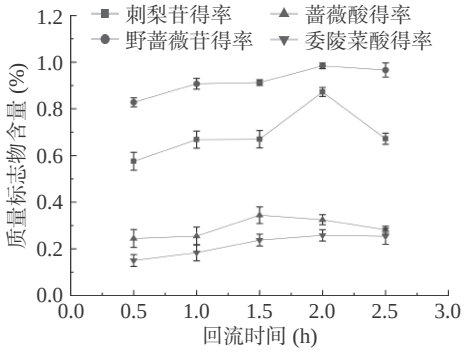


图 5 回流时间对刺梨根中质量标志物含量的影响

Fig.5 Effect of reflux time on the contents of Q-marker in *R. roxburghii* root

2.4.4 提取次数对刺梨中各质量标志物含量的影响

提取次数对刺梨根中各质量标志物含量的影响结果见图 6。由图 6 可知，当提取次数逐渐增加到 3 次时，刺梨苷的含量从 0.17% 到 0.22%、野蔷薇苷的含量从 0.27% 到 0.36%，而蔷薇酸和委陵菜酸的含量差别不大；提取 3 次以上，刺梨中各质量标志物含量几乎无增加，因此在后续实验中将提取 3 次。而在实际生产中考虑到生产成本的问题，提取次数因根据实际情况而定。考虑到提取次数对提取刺梨质量标志物的影响不大，将不作为响应面优化的影响因素。

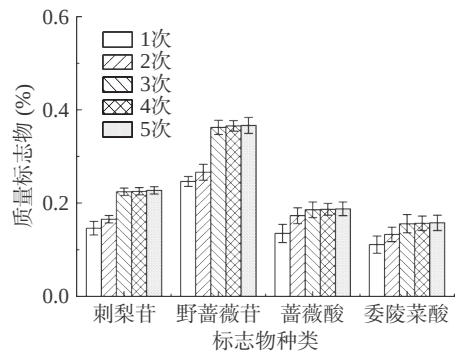


图 6 提取次数对刺梨根中质量标志物物含量的影响

Fig.6 Effect of extraction times on the contents of Q-marker in *R. roxburghii* root

2.5 响应面试验结果

2.5.1 试验设计与结果 参考刺梨质量标志物提取单因素实验结果，设计响应面试验考察溶剂用量、乙醇浓度及提取试剂对刺梨中 4 个三萜化合物含量的影响，结果见表 4。

表 4 响应面法试验结果

Table 4 Design and results of response surface method

实验号	A	B	C	总含量(%)
1	0	0	0	4.71
2	0	0	0	4.85
3	0	−1	−1	4.00
4	1	0	1	3.10
5	0	0	0	4.89
6	1	0	−1	3.63
7	1	1	0	4.33
8	0	1	1	3.72
9	1	−1	0	3.58
10	0	1	−1	3.33
11	0	0	0	4.80
12	−1	−1	0	3.12
13	−1	0	−1	3.84
14	0	−1	1	4.24
15	−1	0	1	3.50
16	−1	1	0	4.25
17	0	0	0	5.10

通过对表 4 试验数据进行二次回归分析，得出多项式回归方程如下：$Y=0.096+(1.200E-003)A-(1.325E-003)B+(3.050E-003)C+(4.975E-003)AB-(1.975E-003)AC-(2.250E-004)BC-0.017A^2-(5.558E-003)B^2-(9.507E-003)C^2$，式中 Y 为三萜化合物得率，A、B、C 分别为溶剂用量、乙醇浓度及提取时间，$R^2=0.8834$。

2.5.2 响应面结果分析 由表 5 回归模型方差分析结果可以看出，实验设计模型 $P<0.05$，具有显著差异，三萜化合物与 3 个变量之间有显著的线性关系。失拟项 $P>0.05$ 不显著，表明所建立的二次回归模型能有效的对响应值进行预测。通过表 5 回归模型系数显著性检验结果可知，A^2、C^2 对刺梨 4 个三萜化合物含量的影响显著。回归优化响应面图见图 7、图 8、图 9，响应值与各因素的等高线图、三维空间响应面图可直观地展现各因素之间的交互作用对刺梨三萜含量的影响，通过等高线的密集程度判断两因素交互的影响程度[32]。由图 7a 可知，等高线沿乙醇浓度密集，乙醇浓度对刺梨三萜化合物含量的影响大于溶剂用量。由图 7b 可知，乙醇浓度固定不变时，增大溶剂用量，刺梨三萜化合物的含量先增大后减小；溶剂用量固定不变时，乙醇浓度增加，刺梨三萜

表 5　回归模型的方差分析和回归系数的显著性检验

Table 5　Analysis of variance for the established regression model and significance test of each regression coefficient

变量来源	平方和	自由度	均方	*F*值	*P*值	显著性
模型	4.19	9	0.47	5.89	*P*<0.05	*
A	1.51E-03	1	1.51E-03	0.019	0.8939	
B	0.03	1	0.03	0.38	0.5573	
C	8.00E-04	1	8.00E-04	0.01	0.9227	
AB	0.026	1	0.026	0.32	0.5871	
AC	0.016	1	0.016	0.2	0.67	
BC	0.031	1	0.031	0.39	0.5534	
A^2	1.55	1	1.55	19.66	*P*<0.01	**
B^2	0.35	1	0.35	4.4	0.074	
C^2	1.81	1	1.81	22.85	*P*<0.01	**
残差	0.55	7	0.079			
失拟项	0.46	3	0.15	6.34	0.0533	
误差项	0.096	4	0.024			
总和	4.75	16				

注：*为显著（*P*<0.05），**为极显著（*P*<0.01）；E代表数值乘以10倍数。

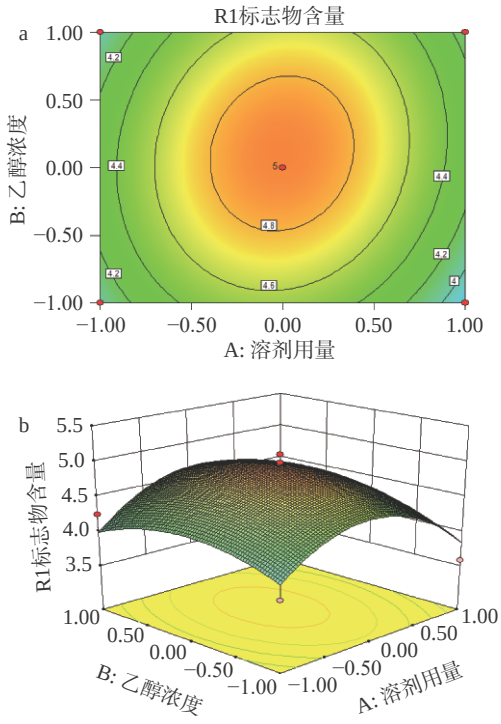


图 7　溶剂用量和乙醇浓度交互作用对刺梨根中质量标志物含量的影响

Fig.7　Effect of solvent dosage and ethanol concentration on the contents of Q-marker in *R. roxburghii* root

化合物的含量先增大后减小；由图 8a 可知，等高线沿溶剂用量密集，溶剂用量对刺梨三萜含量的影响大于回流时间。由图 8b 可知，溶剂用量固定不变时，回流时间增加，刺梨三萜化合物的含量先增大后减小；回流时间固定不变时，溶剂用量增加，刺梨三萜化合物的含量先增大后减小；由图 9a 可知，等高线沿乙醇浓度密集，乙醇浓度对刺梨三萜含量的影响大于回流时间。由图 9b 可知，乙醇浓度固定不变时，回流时间增加，刺梨三萜化合物的含量先增大后减小；回流

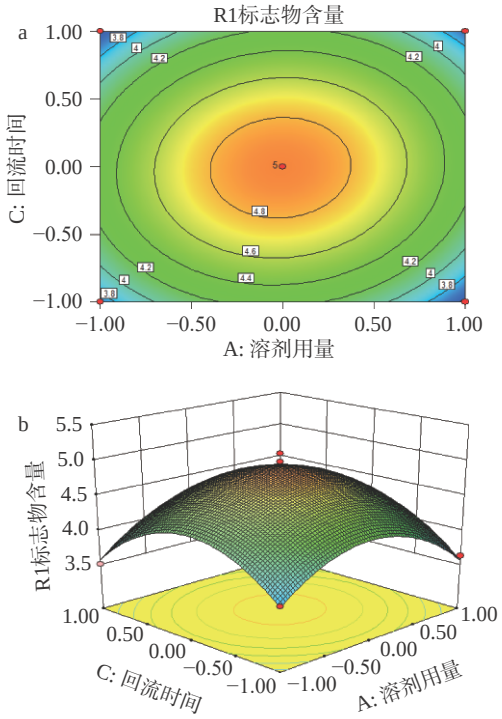


图 8　溶剂用量和回流时间交互作用对刺梨根中质量标志物含量的影响

Fig.8　Effect of solvent dosage and reflux time on the contents of Q-marker in *R. roxburghii* root

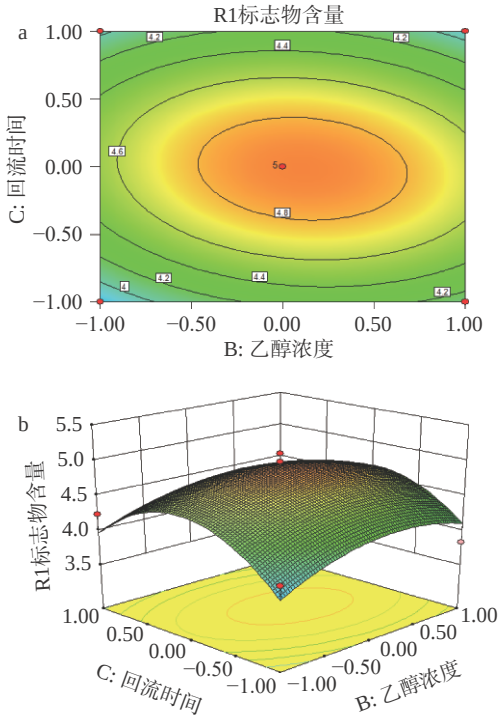


图 9　乙醇浓度和回流时间交互作用对刺梨根中质量标志物含量的影响

Fig.9　Effect of ethanol concentration and reflux time on the contents of Q-marker in *R. roxburghii* root

时间固定不变时，乙醇浓度增加，刺梨三萜化合物的含量先增大后减小。综上，3 个因素对刺梨三萜化合物含量影响为乙醇浓度>溶剂用量>提取时间。

2.5.3　提取工艺优化及验证　通过 Design-Expert 8.0

软件中 Numerical 优化模块得到预测值，给出模型预测最佳提取条件为溶剂用量为 1∶25(g/mL)、乙醇浓度 70.11%、提取时间 1.98 h；在此优化条件下刺梨质量标志物的总含量为 4.89%。因试验仪器精度限制，采用溶剂用量为 1∶25(g/mL)、乙醇浓度 70%、提取时间 2 h 的提取条件进行 3 次平行实验，测得刺梨质量标志物的平均含量 5.12%±0.02%，RSD 为 1.923%，说明响应面模型具有可行性。

2.6 刺梨中不同部位 4 个质量标志物的含量测定

全面考察 4 个标志物在刺梨各部位的分布情况，使用最适的条件和方法，经 HPLC 测定刺梨根、茎、叶和果中 4 个标志物的含量，结果见表 6。由表 6 可知：刺梨苷在叶子中的含量较高，这可能是由于叶片的光合作用或其转化产物是次生代谢产物的底物，叶片光合作用旺盛，产生的底物多，所以合成的次生代谢产物也多[33]，而刺梨苷的合成底物可能在叶片较多，则在叶片的含量较其他部位高；野蔷薇苷在茎中的分布较高；蔷薇酸和委陵菜酸则较多的分布于果实中，这可能是由于在合成、运输的过程中产生了一定的差异。4 个标志物在刺梨不同部位的总含量分别为刺梨叶 2.64%、刺梨根 2.41%、刺梨茎 2.40%、刺梨果 2.23%。由此可见，刺梨的不同部位中 4 个标志物的总含量(从大到小)顺序为刺梨叶、刺梨根、刺梨茎、刺梨果。

表 6 刺梨不同部位的含量

Table 6 Contents of different parts of *R. roxburghii*

部位	刺梨苷(%)	野蔷薇苷(%)	蔷薇酸(%)	委陵菜酸(%)
刺梨根	0.56%	0.74%	0.69%	0.42%
刺梨茎	0.94%	0.98%	0.22%	0.26%
刺梨叶	0.99%	0.72%	0.43%	0.51%
刺梨果	0.11%	0.19%	0.97%	0.96%

3 结论与讨论

迄今，国内外对刺梨成分工艺的研究主要集中在刺梨中多糖和黄酮类物质的提取工艺优化以及刺梨果酒的工艺优化[34−37]，也有部分研究是关于刺梨多酚[38] 和刺梨膳食纤维的工艺优化[39]，而对刺梨中三萜提取条件的优化研究较少。本实验的单因素实验结果表明，采用超声-回流的方法以高收率获得刺梨质量标志物，该方法可以作为刺梨质量标志物的提取工艺方式。据相关文献报道[34]，溶剂用量、乙醇浓度与提取时间是影响刺梨质量标志物提取效率最主要的因素。实验过程中，随着溶剂用量的增加，刺梨三萜化合物的含量会增加；但是如果乙醇的添加量太少，会导致其无法浸润整个刺梨根粉末，影响刺梨三萜的提取，也会为后续过滤、检测等工艺增加一定的难度。此外，本研究在对刺梨根质量标志物的提取过程中发现：从回流时间来看，回流 2 h 可提高刺梨三萜的含量，但是当超过 2 h 后，刺梨三萜的含量呈现下降的趋势，这可能是由于在一定时间后，提取过程中的原料和溶剂达到了饱和状态。根据本研究中的响应面试验结果，可以得出影响提取工艺效率大小，依次为乙醇浓度>溶剂用量>提取时间。提取刺梨中质量标志物的最佳工艺为：按照料液 1∶25(g/mL)加入 70% 的乙醇，先放入超声仪 25 ℃、250 W 超声 30 min，再将料液进行加热回流 2 h，连续提取 3 次。在此条件下，所得到的刺梨叶中质量标志物的总含量为 2.64%，分别为刺梨苷含量为 0.99%、野蔷薇苷含量为 0.72%、蔷薇酸含量为 0.43% 和委陵菜酸含量为 0.51%。考虑到实际生产中需要成本问题，应当适当地降低乙醇浓度和提取次数以提高经济效益。

与此同时，采用 HPLC 法同时测定刺梨中 4 种质量标志物的研究尚未见报道。本研究探索了 HPLC 同时测定刺梨 4 种质量标志物的含量分析检测方法，以 Thermo C_{18} 色谱柱(250 mm×4.6 mm，5 μm)；检测波长 203 nm；柱温 20 ℃；流速为 1 mL/min；进样体积为 10 μL；流动相 A 为 0.05% 三氟乙酸水，B 为乙腈；梯度洗脱条件为 0~15 min，25% A~30% A；15~20 min，30% A~35% A；20~60 min，35% A 等度洗脱作为检测条件，能够较好同时测定 4 种质量标志物。以此条件，采用 HPLC 测定了刺梨不同部位的质量标志物，发现刺梨三萜总含量在刺梨中的(从大到小)顺序为刺梨叶、刺梨根、刺梨茎、刺梨果。而目前刺梨常用的药用部位为根、茎和果实，叶片利用较少，因此可以将叶片作为开发三萜类化合物的新选择。刺梨中质量标记物的提取工艺及其含量 HPLC 同时测定的研究将为刺梨质量评价和开发及生产利用提供科学依据。

参考文献

[1] 李齐激，南莹，秦晶晶，等. 药食两用植物刺梨的化学成分研究[J]. 中国中药杂志，2016，41(3)：451−455. [LI Q J，NAN Y，QIN J J，et al. Chemical constituents from medical and edible plants of *Rosa roxburghii*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica，2016，41(3)：451−455.]

[2] 杨志怡，刘同亭. 中药刺梨的临床研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘，2018，18(76)：97−98. [YANG Z Y，LIU T T. Clinical research progress of traditional chinese medicine *Rosa roxburghii* Tratt[J]. World Latest Medicine Information，2018，18(76)：97−98.]

[3] 吕佳敏，刘同亭，田瑛. 刺梨的主要医学功效及应用研究进展[J]. 实用医药杂志，2018，35(4)：370−372. [LÜ J M，LIU T T，TIAN Y，et al. Research progress on main medical effect and application of cili[J]. Practical Journal of Medicine & Pharmacy，2018，35(4)：370−372.]

[4] 梁勇，李良群，王丽，等. 民族药刺梨根茎化学成分及其抗炎活性研究 [J/OL]. 广西植物：1−12[2021-10-11]. [LIANG Y，LI L Q，WANG L，et al. Chemical constituents and their anti-inflammatory activities from rhizome of ethnicmedicine *Rosa roxbunghii* [J/OL]. Guihaia，1−12[2021-10-11].]

[5] HAO M H，ZHANG F，LIU X X，et al. Qualitative and quantitative analysis of catechin and quercetin in flavonoids extracted

from *Rosa roxburghii* Tratt[J]. Tropical Journal of Pharmaceutical Research:TJPR, 2018, 17(1): 71.

[6] CHEN G J, KAN J Q. Characterization of a novel polysaccharideIsolated from *Rosa roxburghii* Tratt fruit and assessment of its antioxidant *in vitro* and *in vivo*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 107: 166−174.

[7] TAKAYAMA S, KAWANISHI M, YAMAUCHI K, et al. Ellagitannins from *Rosa roxburghii* suppress poly (I: C)-induced IL-8 production in human keratinocytes[J]. Journal of Natural Medicines, 2021(75): 623−632.

[8] 付安妮, 高明波, 冯杰. 刺梨中 SOD 的提取和酶活测定[J]. 广州化工, 2016, 44(16): 144−146. [FU A N, GAO M B, FENG J. Extraction and activity determination of SOD in *Rosa roxburghii* Tratt[J]. Guangzhou Chemical Industry, 2016, 44(16): 144−146.]

[9] XU P, LIU X X, XIONG X W, et al. Flavonoids of *Rosa roxburghii* Tratt exhibit anti-apoptosis properties by regulating PARP-1/AIF[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2017, 118(11): 3943−3952.

[10] WANG L, ZHANG B, XIAO J, et al. Physicochemical, functional, and biological properties of water-soluble polysaccharides from *Rosa roxburghii* Tratt fruit[J]. Food Chemistry, 2018, 249(30): 127−135.

[11] CHEN G J, KAN J Q. Ultrasound-assisted extraction, characterization, and antioxidant activity *in vitro* and *in vivo* of polysaccharides from chestnut rose (*Rosa roxburghii* tratt) fruit[J]. Journal of Food Science and Technology, 2018(55): 1083−1092.

[12] XU S J, ZHANG F, WANG L J, et al. Flavonoids of *Rosa roxburghii* Tratt offers protection against radiation induced apoptosis and inflammation in mouse thymus[J]. Apoptosis, 2018(23): 470−483.

[13] WANG L, LI C, HUANG Q, et al. Polysaccharide from *Rosa roxburghii* Tratt fruit attenuates hyperglycemia and hyperlipidemia and regulates colon microbiota in diabetic db/db mice[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(1): 147−159.

[14] LIU C X, CHEN S L, XIAO X H, et al. A new concept on quality marker of Chinese materia medica: Quality control for Chinese medicinal products[J]. China Tradit Herb Drugs, 2016, 47(9): 1443−1457.

[15] 刘昌孝. 中药质量标志物 (Q-Marker) 研究发展的 5 年回顾[J]. 中草药, 2021, 52(9): 2511−2518. [LIU C X. Five-year review on development of quality markers of traditional Chinese medicine[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2021, 52(9): 2511−2518.]

[16] SMAILI H, SOSA S, BEKIC D, et al. Topical anti-inflammatory activity of extracts and compounds from thymus broussonettii[J]. Pharm Pharmacol, 2002, 54(8): 1137−1140.

[17] MARTIN-ARAGON S, HERAS B D L, SANCHEZ-REUS M I, et al. Pharmacological modification of endogenous a tioxidant enzymes by ursolic acid on tetrachiorlde induced liver damage in-rats and primary cultures of rat hepatocytes[J]. Exp Toxi-col Pathol, 2001, 53(2−3): 199−206.

[18] CHEN X Q, CHEN S J, LING W N, et al. Saikosaponin a attenuates perimenopausal depression-like symptoms by chronic unpredictable mild stress[J]. Neuroscience Letters, 2018, 662: 283−289.

[19] SUDHARSAN P T, MYTHILI Y, SELVAKUMAR E, et al. Lupeol and its ester ameliorate the cyclophosphamide provoked cardiac lysosomal damage studied in rat[J]. Mol Cell Biochem, 2006, 282(12): 23−29.

[20] CHEN F J, LI L Q, PENG M, et al. Identification of triterpenoids and hepatoprotective property of Fructus *Rosa roxburghii* against alcohol-induced liver injury by regulating keap1- Nrf2 signaling[J]. Phytomedicine Plus, 2021, 1(4): 1−8.

[21] 田强, 李良群, 彭梅, 等. 刺梨总三萜的免疫活性研究[J/OL]. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2022(6): 1−9 [2021-12-15] https://doi.org/10.13207/j.cnki.jnwafu.2022.06.002. [TIAN Q, LI L Q, PENG M, et al. Immunocompetence of total teiterpenoids from *Rosa roxburghii* Tratt fruit[J/OL]. Journal of Northwest A&F University(Natural Science Edition), 2022(6): 1−9 [2021-12-15].https://doi.org/10.13207/j.cnki.jnwafu.2022.06.002.]

[22] 南莹, 李齐激, 马琳, 等. 紫外分光光度法测定刺梨总三萜与总黄酮含量[J]. 遵义医学院学报, 2012, 35(6): 473−476. [NAN Y, LI Q J, MA L, et al. The content determination of total triterpenoids and flavonoids in *Rosa roxbughii* by ultraviolet spectrophotometry[J]. Acta Acdemiae Medicinae Zunyi, 2012, 35(6): 473−476.]

[23] 代甜甜, 李齐激, 陈晓靓, 等. 刺梨总三萜的提取及含量测定[J]. 贵州师范大学学报 (自然科学版), 2018, 36(3): 36−39. [DAI T T, LI Q J, CHEN X L, et al. Extraction and determination of total triterpenoids of *Rosa roxburghii* Tratt[J]. Journal of Guizhou Normal University (Natural Sciences), 2018, 36(3): 36−39.]

[24] 刘英枭, 袁小红. 刺梨果渣中蔷薇酸的提取工艺研究[J]. 湖北农业科学, 2021, 60(5): 103−107,112. [LIU Y X, YUAN X H. Study on technology extracting rosolic acid of *Rosa roxburghii* Tratt. pomace[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2021, 60(5): 103−107,112.]

[25] 李齐激, 南莹, 杨艳, 等. HPLC 同时测定刺梨中 2 种三萜成分[J]. 贵州农业科学, 2016, 44(9): 125−128. [LI Q J, NAN Y, YANG Y, et al. Simultaneous determination of two triterpenoids components from *Rose roxburghii* by HPLC[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2016, 44(9): 125−128.]

[26] 李齐激, 南莹, 杨艳, 等. HPLC 法测定药食两用植物刺梨中刺梨苷的含量[J]. 中国民族民间医药, 2016, 25(9): 22−23,25. [LI Q J, NAN Y, YANG Y, et al. Determination of kaiiichigeside F1 from the medical and edible plants of *Rose roxburghii* by HPLC[J]. Chinese Journal of Ethnomedicine and Ethnopharmacy, 2016, 25(9): 22−23,25.]

[27] 潘泓伊. 刺梨果实中主要成分的提取分离及提取机制研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2021. [PAN H Y. Enhanced extraction and separation process of main phytochemicals from *Rosa roxburghii* Traat and extraction mechanism [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2021.]

[28] 秦晶晶, 李齐激, 薛琰, 等. 刺梨总三萜提取方法及其 α-葡萄糖苷酶抑制活性研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(10): 186−189. [QIN J J, LI Q J, XUAN Y, et al. Study on extraction

methods and α-glucosidase inhibitory activity from the total triterpenes of *Rosa roxbughii*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(10): 186−189.]

[29] 刘伟, 周龙飞, 李会, 等. 沙棘中三萜酸物质的提取及含量测定 [J/OL]. 生物加工过程: 1−7[2021-10-11]. [LIU W, ZHOU L F, LI H, et al. Extraction anddetermination of triterpene acids in *Hippophae rhamnoides* [J/OL]. Chinese Journal of Bioprocess Enginerring, 1−7[2021-10-11].]

[30] 谢晓阳, 范毅, 王伟, 等. 响应面法优化刺梨果多糖发酵工艺研究[J]. 中国酿造, 2021, 40(4): 177−182. [XIE X Y, FAN Y, WANG W, et al. Optimization of fermentation technology of *Rosa roxburghii* fruit polysaccharide by response surface method[J]. China Brewing, 2021, 40(4): 177−182.]

[31] 高伟城, 王小平, 黄建军, 等. 响应面法优化云霄产枇杷叶三萜酸类成分的提取工艺 [J/OL]. 中国现代中药: 1−14 [2021-12-15] https://doi.org/10.13313/j.issn.1673-4890.20201213001. [GAO W C, WANG X P, HUANG J J, et al. Optimization of extraction process of triterpenoid acids in *Folium eriobotryae* from Yunxiao by response surface methodology[J/OL]. Modern Chinese Medicine, 1−14 [2021-12-15].https://doi.org/10.13313/j.issn.1673-4890.20201213001.]

[32] 林春花, 范乃立, 芮培欣, 等. 超高效合相色谱-质谱法快速检测工业油酸中 5 种常见的脂肪酸[J]. 分析化学, 2015, 43(1): 75−80. [LIN C H, FAN N L, RUI P X, et al. Rapid detection of five common fatty acids in industrial oleic acid based on ultra performance convergence chromatography-mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2015, 43(1): 75−80.]

[33] 李彦. 光照和种源对青钱柳叶三萜类化合物积累的影响[D]. 南京: 南京林业大学, 2013. [LI Y. Influence of illumination intensity and provenance on triterpenoids accumulation in the leaves of *Cyclocarya paliurus* seedlings abstract[D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2013.]

[34] 黄小兰, 何旭峰, 周浓, 等. HPLC 法同时测定地参中 3 种三萜酸的含量[J]. 食品工业科技, 2020, 41(11): 273−278, 286. [HUANG X L, HE X F, ZHOU N, et al. Simultaneous determination of three rriterpenic acids in lycopus lucidus turcz. var. hirtus regel by high performance liquid chromatography[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(11): 273−278, 286.]

[35] 周笑犁, 阳桥美, 孔艳秋, 等. 刺梨果渣多糖对 α-淀粉酶活性的抑制作用[J]. 食品科技, 2020, 45(10): 207−212. [ZHOU X L, YANG Q M, KONG Y Q, et al. Inhibitory effect of polysaccharides from *Rosa roxburghii* Tratt on activity of α-amylase[J]. Food Science and Technology, 2020, 45(10): 207−212.]

[36] 刘英, 张丽艳, 罗君, 等. 响应面法优化刺梨总黄酮提取工艺[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(2): 51−55. [LIU Y, ZHANG L Y, LUO J, et al. Optimization of extraction technology for total flavonoids from *Rose roxburghii* by response surface methodology [J]. Food Research and Development, 2018, 39(2): 51−55.]

[37] 赵驰, 苏伟, 母应春, 等. 刺梨蜂蜜果酒酿造工艺优化[J]. 食品与发酵科技, 2020, 56(6): 31−38. [ZHAO C, SU W, MU Y C, et al. Optimization of fermentation process for *Roxburgh* rose honey wine[J]. Food and Fermentation Sciences & Technology, 2020, 56(6): 31−38.]

[38] 孙红艳, 胡凯中, 郭志龙, 等. 超声波法提取刺梨多酚的工艺优化及体外抑菌活性研究[J]. 中国食品添加剂, 2016(2): 57−61. [SUN H Y, HU K Z, GUO Z L, et al. Study on the extraction technology and antibacterial activity of polyphenols from fruits of *Rosa roxburghii* Tratt by ultrasonic assistance[J]. China Food Additives, 2016(2): 57−61.]

[39] 王丽, 张想, 李全力, 等. 碱法提取刺梨果渣可溶性膳食纤维工艺研究[J]. 中国调味品, 2021, 46(6): 125−128. [WANG L, ZHANG X, LI Q L, et al. Study on the extraction process of soluble dietary fiber from *Rose roxbunghii* by alkli method[J]. China Condiment, 2021, 46(6): 125−128.]

史继童, 孙羽, 姜欣洋, 等. 超声辅助三相分配法同步提取大蒜中大蒜辣素和多糖的工艺优化 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 261−267. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022010284
SHI Jitong, SUN Yu, JIANG Xinyang, et al. Optimization of Ultrasound-Assisted Three-phase Partitioning Simultaneous Extraction of Allicin and Polysaccharide from Garlic[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 261−267. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022010284

· 工艺技术 ·

超声辅助三相分配法同步提取大蒜中大蒜辣素和多糖的工艺优化

史继童, 孙　羽, 姜欣洋, 刘兰玲, 颜培正, 李　佳, 蒲高斌*, 赵东升*
（山东中医药大学药学院, 山东济南 250355）

摘　要: 为了优化超声辅助三相分配法同步提取大蒜中大蒜辣素和多糖工艺。以大蒜为原料，分别考察聚乙二醇质量分数、硫酸铵质量分数、超声温度和超声时间对大蒜辣素和多糖提取量的影响，并根据 Box-Behnken 试验设计优化大蒜辣素和多糖同步提取工艺条件。结果表明，最佳提取工艺条件为：聚乙二醇质量分数为 24%，超声温度为 34 ℃，超声时间为 50 min，此条件下大蒜辣素和多糖的提取量（按干燥品计算）可达 3.564、43.86 mg/g。优化后的提取工艺可高效同步提取大蒜中大蒜辣素和多糖，可为天然大蒜功能性产品的深度研究、开发与应用奠定一定的基础。

关键词: 大蒜辣素, 大蒜多糖, 三相分配法, 超声辅助, 同步提取
中图分类号: TS201.1　　**文献标识码:** B　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0261−07
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022010284
本文网刊:

Optimization of Ultrasound-Assisted Three-phase Partitioning Simultaneous Extraction of Allicin and Polysaccharide from Garlic

SHI Jitong, SUN Yu, JIANG Xinyang, LIU Lanling, YAN Peizheng, LI Jia, PU Gaobin*, ZHAO Dongsheng*
（College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China）

Abstract: To optimize the ultrasound-assisted three-phase partitioning for the simultaneous extraction of allicin and polysaccharides from garlic. The effect of polyethylene glycol (PEG) concentration, ammonium sulfate concentration, sonication temperature, and sonication time on the extraction efficiency of allicin and polysaccharides were investigated, respectively. The simultaneous extraction process conditions of allicin and polysaccharides were optimized according to the Box-Behnken experimental design. Results showed that the optimal conditions were PEG concentration of 24%, the ultrasonic temperature of 34 °C, and ultrasonic time of 50 min. Under these conditions, the extraction efficiency of allicin and polysaccharide was calculated according to the anhydrous calculation, reaching 3.564 and 43.86 mg/g, respectively. The optimized extraction process could effectively and simultaneously extract allicin and polysaccharides from garlic, which would provide a foundation for the deep research, development, and application of functional products from natural garlic.

Key words: allicin; garlic polysaccharide; three-phase partitioning; ultrasound assistance; simultaneous extraction

大蒜(*Allium sativum* L.)为葱科或广义百合科葱属草本植物[1], 地下鳞茎为药食两用资源, 性温, 味辛, 富含大蒜辣素、多糖、蒜氨酸等多种活性成分[2−3], 大蒜辣素是大蒜中最主要的活性成分, 多糖含量最

收稿日期: 2021−02−10
基金项目: 国家重点研发计划（2017YFC1701503）; 国家自然科学基金（82004233, 81872963）; 山东省中医药科技发展计划项目（2019-0030）; 山东省大学生创新创业训练计划项目（S202110441014, S202110441015）; 山东中医药大学中药资源保护与质量评价青创团队支持项目。
作者简介: 史继童（2001−）, 女, 本科, 研究方向: 中药学, E-mail: 2168990069@qq.com。
*** 通信作者:** 蒲高斌（1979−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 中药资源学, E-mail: gbpu@163.com。
赵东升（1983−）, 男, 博士, 讲师, 研究方向: 特色药食两用中药资源研究与开发, E-mail: dongshengpw2008@163.com。

大, 约占鲜蒜质量的 26%~30%, 二者具有高效的抗菌、抗癌、抗氧化和免疫调节活性等药理作用[4−6]。

目前国内外研究多集中对大蒜中大蒜辣素或多糖的单一成分提取[7−9], 而鲜有同步提取两种活性成分的工艺研究。若能对大蒜中大蒜辣素和多糖进行同步提取, 不仅可以提高大蒜资源的利用率, 且降低成本, 将产生良好的经济效益。三相分配体系(three-phase partitioning, TPP)是一种简易的新型分离技术, 可以将从动植物中提取的组分分配在三相中实现选择性分离, 即上相(油脂及脂溶性物)、中相(蛋白质)和下相(多糖类等水溶性物质)[10], 已有学者利用三相分配体系提取多糖、蛋白质、油脂等天然活性成分[11−14]。大部分 TPP 体系由叔丁醇、硫酸铵和粗水提取液(或悬浮液)组成。聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)为水溶性非离子聚合物, 与叔丁醇相比具有无毒性、生物相容性等优点[15], 已被广泛应用于新型 TPP 体系中, 并有研究报道称聚乙二醇可以大大提高大蒜中蒜酶催化反应中的稳定性[16]。

因此, 本研究以聚乙二醇为有机相, 硫酸铵为水相, 采用超声辅助三相分配法同步提取大蒜中大蒜辣素和多糖, 通过单因实验和响应面法优化提取工艺, 并对上相大蒜辣素提取液的稳定性进行考察, 为大蒜资源的进一步研究开发和综合利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大蒜 山东省济南市长清区当地超市, 置 4 ℃冰箱保存备用; L-半胱氨酸(纯度大于 99%)、5,5′-二硫代双(DTNB, 纯度大于 98%)、浓硫酸(纯度大于 98%)、聚乙二醇 4000、硫酸铵、Hepes、苯酚 上海麦克林生化科技有限公司。

KQ-500GVDV 双频恒温数控超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司; ST 16R 高速离心机 赛默飞世尔科技有限公司; UV 9100 B 紫外可见分光光度计 北京莱伯泰科仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 大蒜辣素和多糖的同步提取

1.2.1.1 样品预处理 参考关明等报道方法[17], 取适量新鲜大蒜, 去皮, 用蒸馏水洗净, 晾干鳞茎, 用组织捣碎机捣碎成蒜浆, 置 40 ℃ 水浴 10 min。

1.2.1.2 三相分配法提取大蒜辣素和多糖 参照 Yan 等[11] 报道并稍做修改。将聚乙二醇和硫酸铵按一定质量比例置于离心管中, 加入蒜浆 5.0 g, 固定体系质量为 25 g, 剩余质量用蒸馏水补足。在一定条件超声提取, 过滤, 6000 r/min 离心 10 min, 得到 TTP 体系。分别取上、下相提取液以蒸馏水稀释并定容至 25 mL 容量瓶, 用于测定大蒜辣素和多糖提取量。

1.2.2 单因素实验 为了确定超声辅助三相分配法同步提取大蒜中大蒜辣素和多糖的工艺优化参数范围, 在前期预试验和文献报道[18] 的基础上, 固定超声频率 45 kHz 和功率 350 W, 选取 PEG 质量分数、硫酸铵质量分数、超声温度、超声时间为主要工艺参数进行研究。

1.2.2.1 不同硫酸铵质量分数对大蒜辣素和多糖提取量的影响 称取 5.0 g 蒜浆 5 份, 设置硫酸铵质量分数分别为 12%、15%、18%、21%、24%, 在 PEG 质量分数为 24%、超声时间为 40 min、超声温度为 30 ℃ 条件下提取, 试验重复 3 次, 取平均值计算大蒜辣素和多糖提取量。

1.2.2.2 不同 PEG 质量分数对大蒜辣素和多糖提取量的影响 称取 5.0 g 蒜浆 5 份, 设置 PEG 质量分数分别为 14%、19%、24%、29%、31%, 在硫酸铵质量分数为 18%、超声时间为 40 min、超声温度为 30 ℃ 条件下提取, 试验重复 3 次, 取平均值计算大蒜辣素和多糖提取量。

1.2.2.3 不同超声温度对大蒜辣素和多糖提取量的影响 称取 5.0 g 蒜浆 5 份, 设置超声温度分别为 10、30、50、70、80 ℃, 在 PEG 质量分数为 24%, 硫酸铵质量分数为 18%, 超声时间为 40 min 条件下提取, 试验重复 3 次, 取平均值计算大蒜辣素和多糖提取量。

1.2.2.4 不同超声时间对大蒜辣素和多糖提取量的影响 称取 5.0 g 蒜浆 5 份, 设置超声时间为 10、40、70、100、130 min, 在 PEG 质量分数为 24%, 硫酸铵质量分数为 18%、超声温度为 30 ℃ 条件下提取, 试验重复 3 次, 取平均值计算大蒜辣素和多糖提取量。

1.2.3 响应面试验 基于单因素实验结果, 选择对大蒜辣素和多糖提取量影响显著的三个因素为 Box-Behnken 试验的自变量, 以大蒜辣素和多糖提取量为响应值, 优化提取工艺。因素水平设计见表 1。

表 1 响应面因素水平设计

Table 1 Response surface factor level design

因素	水平		
	−1	0	1
PEG质量分数(%)	19	24	29
超声温度(℃)	10	30	50
超声时间(min)	10	40	70

1.2.4 大蒜辣素提取液稳定性的考察 由于大蒜辣素化学性质不稳定, 遇光、热分解成各种含硫化合物[19], 因此在 Design-Expert 8.0.6 软件优化的最佳工艺条件下, 考察大蒜辣素提取液在室温放置 0、2、4、6、8、10 h 后, 大蒜辣素提取液的稳定性。

1.2.5 大蒜辣素和多糖提取量的测定 由于生长环境、气候等因素导致不同产地和采收期大蒜含水量差异较大, 本研究以干燥品计算大蒜辣素和多糖的提取量[20]。

1.2.5.1　大蒜辣素提取量的测定　取 5.0 mL Hepes 缓冲液(pH7.5)配制的 10 mmol/L 半胱氨酸溶液，加入 1.0 mL 上相提取液，混合均匀，26 ℃ 水浴静置 15 min，取 1.0 mL 稀释 100 倍；取 4.5 mL 稀释后的反应混合液与 0.5 mL 用 Hepes 缓冲液(pH7.5)配制浓度为 1.5 mmol/L 的 DTNB 溶液，混合均匀，26 ℃ 水浴静置 15 min，在 412 nm 波长下测量吸光度值(A)[21]。按上述操作步骤加 1.0 mL 去离子水测量半胱氨酸溶液未与上相提取液反应的初始吸光度值(A_0)。

其计算公式如下：

$$c = \frac{(A_0 - A) \times \beta}{2 \times 14150} \quad \text{式（1）}$$

式中：c 为大蒜辣素物质的量浓度(mmol/mL)；A_0 为半胱氨酸溶液的初始吸光度值；A 为半胱氨酸溶液与上相提取液反应后的吸光度值；β 为半胱氨酸溶液的稀释倍数；14150 为摩尔消光系数。

$$Y_1 = \frac{c \times V \times M}{m} \quad \text{式（2）}$$

式中：Y_1 为大蒜辣素提取量(mg/g)；V 为上相提取液总体积(mL)；M 为大蒜辣素的分子量；m 为蒜浆的质量(g)。

1.2.5.2　多糖提取量的测定　多糖的提取量用苯酚-硫酸法测定[22]。以葡萄糖的浓度 C(g/L)和吸光度 A 为 X、Y 轴，标准曲线方程为 A=89.235C+0.0771 (r=0.9989)。根据标准曲线方程计算多糖在下相中的提取量。

$$Y_2 = \frac{C \times V \times N}{m} \times 10^3 \quad \text{式（3）}$$

式中：Y_2 为多糖提取量(mg/g)；C 为按照标准曲线方程计算得到的多糖质量浓度(g/L)；V 为下相提取液总体积(mL)；N 为下相提取液稀释倍数；m 为蒜浆的质量(g)；10^3 为单位转换。

1.3　数据处理

所有实验操作重复 3 次，实验数据为 3 次平行测定的平均值。使用软件 Excel、SPSS 26.0、Design-Expert 8.0.6 分析数据，GraphPad Prism 8 绘图。在单因素方差分析(ANOVA)之后，进行事后 Turkey HSD 检验，方差分析中 P<0.05 表明具有显著差异。

2　结果与分析

2.1　单因素实验结果

2.1.1　硫酸铵质量分数对大蒜辣素提取量和多糖提取量的影响　由图 1 可知，在固定相同提取条件下，随着硫酸铵质量分数的增大，上相中大蒜辣素的提取量先呈现先下降后上升的趋势，这与前期报道现象一致[23]，可能由于体系中硫酸铵的质量分数增加时，会与 PEG 争夺体系中的水分子，使大蒜辣素在上相的含量减少，导致提取量下降。当硫酸铵质量分数超过 18% 后，提取量显著下降(P<0.05)。下相中多糖的提取量呈现先上升后下降的趋势，由于硫酸铵质量分数的增加，盐溶效应不断增强，下相水合能力增强从而吸水能力增强，加强了多糖在下相的析出作用[24]，当硫酸铵质量分数过高时，影响多糖结构表面的疏水性，改变了上下两相体积比和分配系数，从而使得提取量降低[25]。由于硫酸铵质量分数为 15%~21% 时多糖提取量变化不显著(P>0.05)，综合考虑，选择硫酸铵质量分数为 18% 作为后续提取条件。

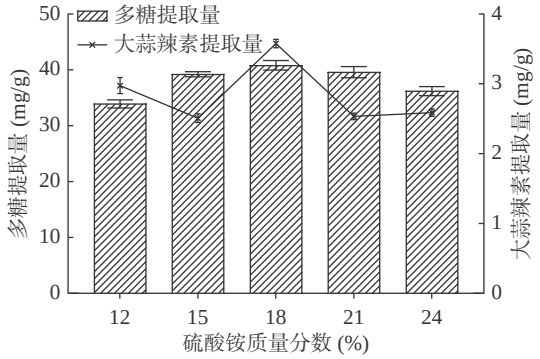


图 1　硫酸铵质量分数对大蒜辣素和多糖提取量的影响

Fig.1　Effects of ammonium sulfate concentration on extraction efficiency of allicin and polysaccharides

2.1.2　不同 PEG 质量分数对大蒜辣素和多糖提取量的影响　由图 2 可知，在固定相同提取条件下，随着 PEG 质量分数的增大，上相中大蒜辣素的提取量呈现先上升后下降的趋势，且在 PEG 质量分数为 24% 时达到最大，且与其它 PEG 质量分数存在显著性差异(P<0.05)。下相中多糖的提取量呈下降的趋势。由于 PEG 质量分数的不断增加，TPP 体系的黏度增加，成相物质分子之间空间位阻增大[26]，导致大蒜辣素和多糖在 TPP 体系中分配减少，TTP 体系溶液黏度的增加不利于蒜浆的过滤分离，更不便于工业化生产。综合考虑，选择 PEG 质量分数为 24% 作为后续提取条件。

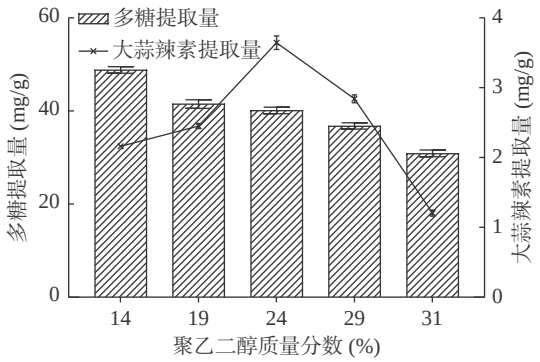


图 2　PEG 质量分数对大蒜辣素和多糖提取量的影响

Fig.2　Effects of PEG concentration on extraction efficiency of allicin and garlic polysaccharides

2.1.3　超声温度对大蒜辣素和多糖提取量的影响　由图 3 可知，在固定相同提取条件下，随着超声温度

的增大，上相、下相中大蒜辣素、多糖的提取量均呈现先上升后下降的趋势。大蒜辣素和多糖的提取量分别在 30 和 70 ℃ 时达到最大。由于大蒜辣素在高温下不稳定，易分解，提取温度在 30 ℃ 之后，上相中大蒜辣素提取量显著降低(P<0.05)。同时随着体系温度过高，硫酸铵的水解程度越大，不利于大蒜辣素和多糖的提取。综合考虑，选择超声温度 30 ℃ 作为后续提取条件。

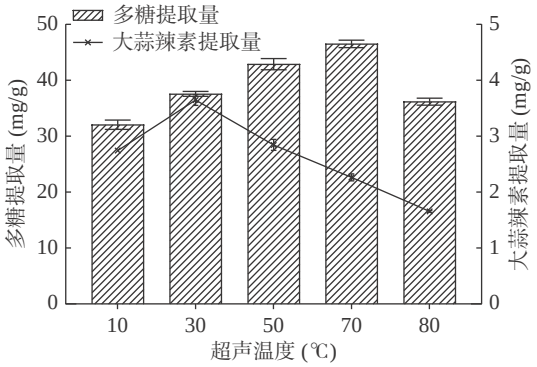


图 3 超声温度对大蒜辣素和多糖提取量的影响

Fig.3 Effects of sonication temperatures on extraction efficiency of allicin and polysaccharides

2.1.4 超声时间对大蒜辣素和多糖提取量的影响

由图 4 可知，在固定相同提取条件下，随着超声时间的增大，上相、下相中大蒜辣素、多糖的提取量均呈现先上升后下降的趋势。大蒜辣素和多糖的提取量分别在 40 和 70 min 时达到最大。随着超声时间的增加，大蒜辣素由于发生分解，而多糖由于长时间处理破坏结构导致提取量显著降低(P<0.05)[27]。综合考虑，选择超声时间为 40 min 作为后续提取条件。

2.2 响应面试验结果

2.2.1 回归模型建立与方差分析 选用超声时间(A)、超声温度(B)、聚乙二醇质量分数(C)为自变量，大蒜辣素提取量(Y_1)和多糖提取量(Y_2)为响应值，进行三因素三水平的实验设计(表 2)。运用

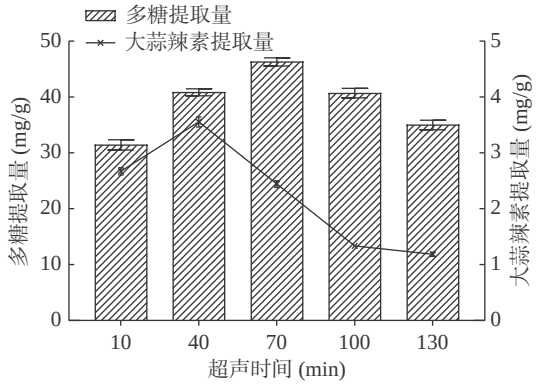


图 4 超声时间对大蒜辣素和多糖提取量的影响

Fig.4 Effects of sonication times on extraction efficiency of allicin and garlic polysaccharides

表 2 响应面分析设计及结果

Table 2 Design and results of response surface analysis

实验号	A	B	C	大蒜辣素提取量(mg/g)	多糖提取量(mg/g)
1	1	0	1	1.711	41.276
2	0	−1	−1	2.243	39.118
3	0	0	0	3.625	40.680
4	0	1	1	2.383	36.977
5	0	0	0	3.403	37.775
6	−1	−1	0	1.584	29.838
7	0	0	0	3.509	41.884
8	1	−1	0	2.788	33.743
9	0	1	−1	1.530	42.713
10	−1	1	0	2.270	30.854
11	0	0	0	3.594	39.656
12	−1	0	−1	1.489	28.528
13	−1	0	1	1.881	32.341
14	1	0	−1	2.509	38.513
15	0	0	0	3.627	40.991
16	0	−1	1	1.650	34.063
17	1	1	0	2.233	45.300

Design-Expert 8.0.6 软件进行拟合分析，结果见表 3、表 4。

由表 3 可知：回归模型极显著(P<0.01)，失拟项不显著(P>0.05)，表明回归方程模拟可靠，不存在失

表 3 大蒜辣素提取量回归模型方差分析

Table 3 Analysis of variance of regression model for allicin extraction

回归方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
回归模型	10.2603	9	1.1400	74.9879	<0.0001	**
A	0.5081	1	0.5081	33.4230	0.0007	**
B	0.0029	1	0.0029	0.1899	0.6761	
C	0.0026	1	0.0026	0.1724	0.6905	
AB	0.3847	1	0.3847	25.3013	0.0015	**
AC	0.3537	1	0.3537	23.2651	0.0019	**
BC	0.5221	1	0.5221	34.3429	0.0006	**
A^2	2.0237	1	2.0237	133.1145	<0.0001	**
B^2	1.7214	1	1.7214	113.2271	<0.0001	**
C^2	3.8852	1	3.8852	255.5559	<0.0001	**
残差	0.1064	7	0.0152			
失拟性	0.0695	3	0.0232	2.5107	0.1975	
纯误差	0.0369	4	0.0092			
总误差	10.3667	16				

注：“*”表示P<0.05，有显著性差异；“**”表示P<0.01，有极显著性差异；表4同。

拟因素。大蒜辣素提取量与各因素的拟合方程为：Y_1(大蒜辣素提取量)=3.55+0.25A+0.019B−0.018C−0.31AB−0.30AC+0.36BC−0.69A^2−0.64B^2−0.96C^2。R^2=0.9897，说明该模型拟合度较好，数学模型稳定，可以对不同提取条件下大蒜辣素提取量结果进行预测。对各因素的 *P* 值和 *F* 值进行综合分析，A、AB、AC、BC、A^2、B^2 和 C^2 对大蒜辣素提取量的影响极具显著性。影响主次因素为超声时间(A)>超声温度(B)>聚乙二醇质量分数(C)。各交互因素中对大蒜辣素提取量影响程度最大的为 BC，影响程度最小的为 AC。

由表 4 可知：回归模型显著(P<0.05)，失拟项不显著(P>0.05)，表明回归方程模拟可靠，不存在失拟因素。多糖提取量与各因素的拟合方程为：Y_2(多糖提取量)=40.20+4.66A+2.39B−0.53C+2.64AB−0.26AC−0.17BC−4.16A^2−1.11B^2−0.87C^2。R^2=0.8653，说明该模型拟合度良好，数学模型稳定，可以对不同提取条件下多糖提取量结果进行预测。对各因素的 *P* 值和 *F* 值进行综合分析，A 和 A^2 对多糖提取量的影响极具显著性，B 的影响显著。而各因素交互作用 AB、AC、BC 的影响均不具有显著性(P>0.05)。影响主次因素为超声时间(A)>超声温度(B)>聚乙二醇质量分数(C)。

2.2.2　响应曲面图分析　根据多元回归方程获得不同处理因素影响大蒜辣素提取量的等高线图(图 5)。等高线密集，形状趋于椭圆且对应的响应曲面走势陡峭，表明交互作用的响应值的影响显著。由此可知，超声时间与超声温度、超声时间与聚乙二醇质量分数和超声温度与聚乙二醇质量分数对大蒜辣素提取量的交互作用对响应值的影响显著，这与方差分析结果一致。

2.2.3　验证试验　通过 Design-Expert 8.0.6 软件分析优化，预测在稳定状态下从大蒜中提取大蒜辣素、多糖最佳工艺条件为：PEG 质量分数为 23.7%，超声温度为 34.7 ℃，超声时间为 51.2 min。此条件下大蒜辣素、多糖的提取量理论上可达 3.489、42.132 mg/g。结合实际情况，将上述工艺条件修正为：PEG 质量分数为 24%，超声温度为 34 ℃，超声时间为 50 min。并以此条件进行 3 次平行实验，大蒜辣素、多糖提取量分别为 3.564 mg/g(RSD=0.38%)、43.86 mg/g(RSD=0.57%)，实验结果与预测值十分接近，表明该模型有效可行，适用于大蒜辣素、多糖的同步提取。这与前期从大蒜中单独提取大蒜辣素或多糖工艺研究[9,18,23]相比，TPP 法同步提取大大提高了提取效率，更能充分利用大蒜资源，具有极大的应用优势。

2.3　大蒜辣素提取液稳定性试验结果

由表 5 可知，大蒜辣素溶液在室温放置下随时间的延长而提取量降低，大蒜辣素溶液在 4 h 内较为稳定，无显著性差异(P>0.05)，在 4 h 后显著降低(P<0.05)。因此，用此种方法提取后需要在 4 h 内对大蒜辣素进行测定或冷冻干燥处理保存。

3　结论

本研究采用响应面法优化三相分配体系同步提取大蒜中大蒜辣素和多糖，获得的最佳提取工艺条件为：聚乙二醇质量分数 24%，超声温度 34 ℃，超声时间 50 min，此条件下按干燥品计算大蒜辣素和多糖的提取量可达 3.564、43.86 mg/g。三相分配体系与其他提取方法相比具有明显的优势，提取条件温和，

表 4　多糖提取量回归模型方差分析

Table 4　Analysis of variance of regression model for polysaccharide extraction

回归方差来源	平方和	自由度	均方	*F*值	*P*值	显著性
回归模型	335.51	9	37.2789	4.9983	0.0227	*
A	173.64	1	173.6436	23.2821	0.0019	**
B	45.51	1	45.5088	6.1018	0.0428	*
C	2.22	1	2.2217	0.2979	0.6022	
AB	27.78	1	27.7754	3.7241	0.0950	
AC	0.28	1	0.2755	0.0369	0.8530	
BC	0.12	1	0.1158	0.0155	0.9044	
A^2	72.80	1	72.7981	9.7607	0.0167	**
B^2	5.14	1	5.1441	0.6897	0.4337	
C^2	3.22	1	3.2205	0.4318	0.5321	
残差	52.21	7	7.4583			
失拟性	42.34	3	14.1127	5.7196	0.0626	
纯误差	9.87	4	2.4674			
总误差	387.72	16				

表 5　大蒜辣素提取液稳定性试验

Table 5　Stability test of allicin capsaicin extract

放置时间(h)	0	2	4	6	8	10
大蒜辣素提取量(mg/g)	3.590	3.564	3.483	3.153	2.908	2.076

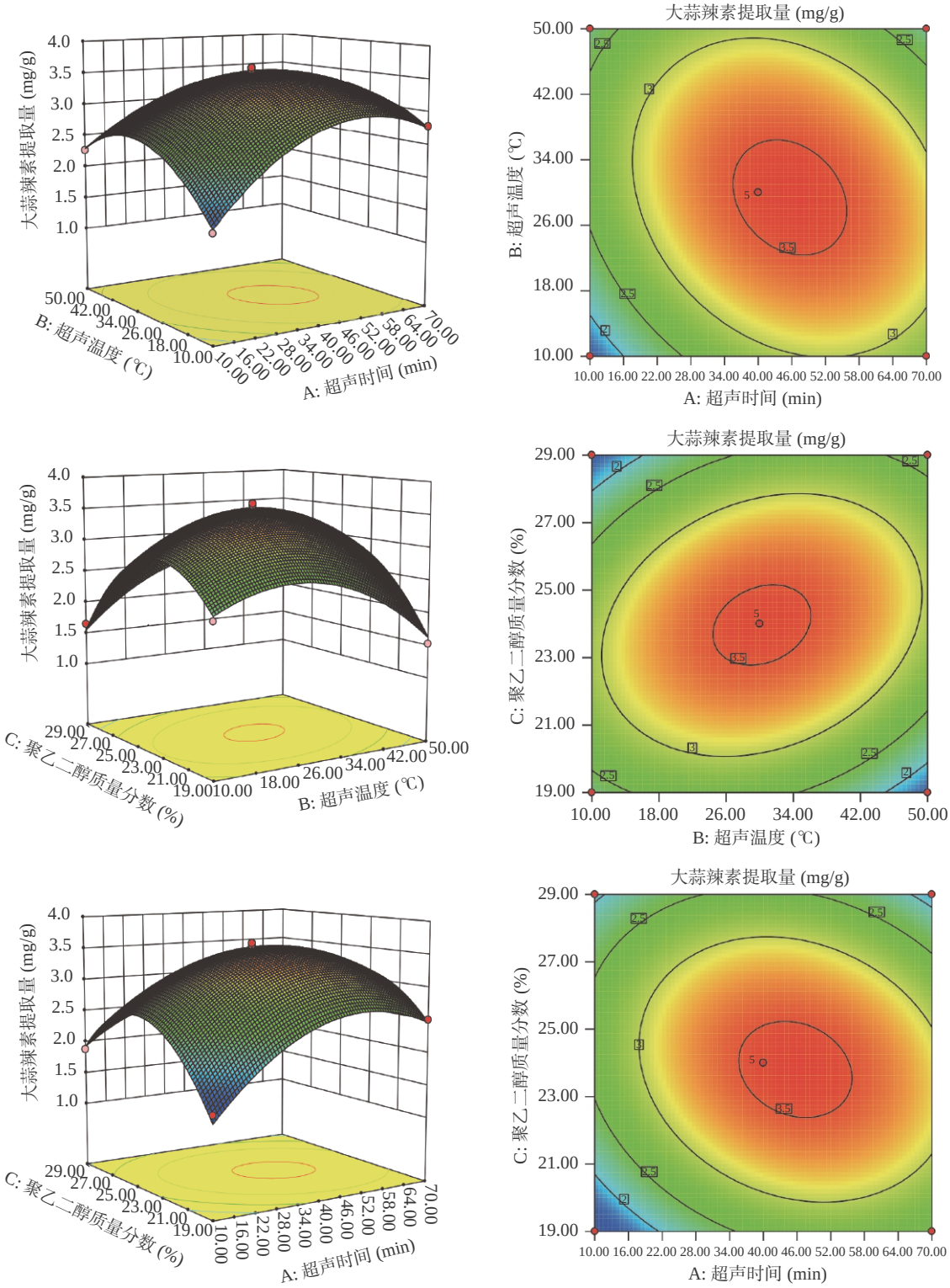


图 5　不同处理因素交互作用对大蒜辣素提取量的响应面和等高线图

Fig.5　Response surface plots and contour plots showing the interactive effects on extraction efficiency of allicin

操作简便高效，不仅极大地保护了大蒜辣素的生物活性，又将多糖与蛋白质分开，获得较高纯度的多糖提取液，具有经济和绿色双重效应，实验得到的最佳提取参数稳定可行，为后续进一步从大蒜中快速、廉价的提取、回收活性成分提供一定的指导作用。此外，还可将三相分配体系与酶辅助、高压均质预处理、微波辅助等辅助工艺相结合，提高 TPP 法的效率，发展更方便、快捷的三相分配体系。三相分配法在大蒜活性成分提取这一领域的应用有待于更加深入的研究。

参考文献

[1] RIVLIN R S. Historical perspective on the use of garlic[J]. J Nutr, 2001, 131(3s): 951S−954S.

[2] STOLL A, SEEBECK E. About alliin, the genuine mother substance of garlic oil[J]. Helv Chim Acta, 1948, 31(1): 189−210.

[3] BO R, JI X, YANG H, et al. The characterization of optimal

selenized garlic polysaccharides and its immune and antioxidant activity in chickens[J]. Int J Biol Macromol, 2021, 182: 136−143.
[4] MOSBAUER K, FRITSCH V N, ADRIAN L, et al. The effect of allicin on the proteome of SARS-CoV-2 infected Calu-3 cells[J]. Front Microbiol, 2021, 12: 746−795.
[5] MAITISHA G, AIMAITI M, AN Z, et al. Allicin induces cell cycle arrest and apoptosis of breast cancer cells *in vitro* via modulating the p53 pathway[J]. Mol Biol Rep, 2021, 48(11): 7261−7272.
[6] SHAO X, SUN C, TANG X, et al. Anti-inflammatory and intestinal microbiota modulation properties of Jinxiang garlic (*Allium sativum* L.) polysaccharides toward dextran sodium sulfate-induced colitis[J]. J Agric Food Chem, 2020, 68(44): 12295−12309.
[7] WANG J, CAO Y, WANG C, et al. Low-frequency and low-intensity ultrasound accelerates alliinase-catalyzed synthesis of allicin in freshly crushed garlic[J]. J Sci Food Agric, 2011, 91(10): 1766−1772.
[8] CHENG H, HUANG G, HUANG H. The antioxidant activities of garlic polysaccharide and its derivatives[J]. Int J Biol Macromol, 2020, 145: 819−826.
[9] 董玉玮, 苗敬芝, 李勇. 双酶法提取大蒜多糖工艺优化及其体外抗氧化活性研究[J]. 中国调味品, 2020, 45(10): 30−35. [DONG Y W, MIAO J Z, LI Y. Study on the optimization of extraction technology of polysaccharides from garlic by double-enzymatic method and their antioxidant activity *in vitro*[J]. China Condiment, 2020, 45(10): 30−35.]
[10] MAHINDRAKAR K V, RATHOD V K. Valorization of waste *Syzygium cumin* seed kernels by three-phase partitioning extraction and evaluation of *in vitro* antioxidant and hypoglycemic potential[J]. Prep Biochem Biotechnol, 2021, 51(10): 1036−1045.
[11] YAN J K, WANG C, YU Y B, et al. Physicochemical characteristics and in vitro biological activities of polysaccharides derived from raw garlic (*Allium sativum* L.) bulbs via three-phase partitioning combined with gradient ethanol precipitation method[J]. Food Chem, 2021, 339: 128081.
[12] AZMI A, CHEW K W, CHIA W Y, et al. Green bioprocessing of protein from chlorella vulgaris microalgae towards circular bioeconomy[J]. Bioresour Technol, 2021, 333: 125197.
[13] 张喜峰, 陆子茜, 王鑫鑫, 等. 不同超声波处理方式辅助三相分配法提取琉璃苣籽油的比较[J]. 中国油脂, 2021, 46(3): 8−11. [ZHANG X F, LU Z X, WANG X X, et al. Comparison of different ultrasound treatments assisted three-phase partitioning for extraction of *Borago officinalis* seed oil[J]. China Oils and Fats, 2021, 46(3): 8−11.]
[14] WANG Y Y, MA H, YAN J K, et al. Three-phase partitioning system with dimethyl carbonate as organic phase for partitioning of exopolysaccharides from *Phellinus baumii*[J]. Int J Biol Macromol, 2019, 131: 941−948.
[15] 卫晶晶, 李晨阳, 王萍, 等. 聚乙二醇在神经功能重建领域应用及存在的问题[J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(16): 2618−2624. [WEI J J, LI C Y, WANG P, et al. Application and existing problems of polyethylene glycol in the field of neurological reconstruction[J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2022, 26(16): 2618−2624.]
[16] JANSKA P, KNEJZLIK Z, PERUMAL A S, et al. Effect of physicochemical parameters on the stability and activity of garlic alliinase and its use for in-situ allicin synthesis[J]. PLoS One, 2021, 16(3): e248878.
[17] 关明, 陈利新, 佟小强, 等. 不同地理居群大蒜中潜在大蒜辣素的含量测定及聚类分析[J]. 食品科学, 2011, 32(8): 186−189. [GUAN M, CHEN L X, DONG X Q, et al. Determination and cluster analysis of potential allicin content in garlic from different geographic populations[J]. Food Science, 2011, 32(8): 186−189.]
[18] 李利华. 正交试验法优化超声辅助提取大蒜多糖工艺[J]. 中国调味品, 2014, 39(7): 70−73. [LI L H. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of polysaccharide from garlic by orthogonal array design[J]. China Condiment, 2014, 39(7): 70−73.]
[19] MAJEWSKI M. Allium sativum: Facts and myths regarding human health[J]. Rocz Panstw Zakl Hig, 2014, 65(1): 1−8.
[20] 赵东升, 宋百灵, 史荣梅, 等. 关于《中国药典》大蒜药材水分测定标准的商榷[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(5): 1175−1178. [ZHAO D S, SONG B L, SHI R M, et al. Discussion on the standards for water determination of garlic medicinal materials in the Chinese Pharmacopoeia[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2016, 27(5): 1175−1178.]
[21] 李瑜, 许时婴. 分光光度法测定大蒜提取物中硫代亚磺酸酯含量[J]. 中国调味品, 2004(7): 43−48. [LI Y, XU S Y. Determination of thiosulfinates in garlic extracts by spectrophotometry[J]. China Condiment, 2004(7): 43−48.]
[22] 王瑞海, 柏冬, 刘丽梅. 比色法测定大蒜多糖提取物中总多糖含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10): 158−161. [WANG R H, BAI D, LIU L M. Content determination of total polysaccharide in the garlic polysaccharide by colorimetry[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2012, 18(10): 158−161.]
[23] 王婉舒, 徐艳阳, 李越山. 超声辅助双水相法提取大蒜素的工艺研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(24): 294−298,303. [WANG W S, XU Y Y, LI Y S. Extraction technique of allicin from Chinese garlic by the ultrasonic-assisted aqueous two-phase system[J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(24): 294−298,303.]
[24] 邵圣娟, 胡学豪, 郭佳仪, 等. 超声辅助双水相提取山药皮总多酚工艺的优化[J]. 中成药, 2020, 42(3): 740−744. [ZHAO S J, HU X H, GUO J Y, et al. Optimization of ultrasound-assisted Bi aqueous phase extraction for total polyphenols from Chinese yam peels[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2020, 42(3): 740−744.]
[25] 武洪敏, 高青青, 陈庚, 等. 双水相法萃取白及多糖及其对亚硝酸盐的清除作用[J]. 北方园艺, 2021(3): 114−121. [WU H M, GAO Q Q, CHEN G, et al. Extraction of white and polysaccharides by aqueous two-phase method and their nitrite scavenging effect[J]. Northern Horticulture, 2021(3): 114−121.]
[26] 杨子敬, 饶桂维, 王磊. 超声波辅助双水相提取枇杷花总黄酮工艺优化及其抗氧化性[J]. 食品工业科技, 2021, 42(19): 218−225. [YANG Z J, RAO G W, WANG L. Ultrasonic assisted aqueous two-phase extraction and antioxidant activity of total flavonoid from loquat flower[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(19): 218−225.]
[27] ZHENG Q, LI W, ZHANG H, et al. Optimizing simultaneous extraction and antioxidant activity evaluation of polyphenols and polysaccharides from Ya'an Tibetan tea (*Camellia sinensis*)[J]. Food Sci Nutr, 2020, 8(1): 489−499.

纪登杰, 许依能, 杨威, 等. 改性扇贝壳粉与壳聚糖复合膜的制备及性质研究 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 268−275. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110118

JI Dengjie, XU Yineng, YANG Wei, et al. Preparation and Properties of Modified Scallop Shell Powder and Chitosan Composite Film[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 268−275. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110118

· 包装与机械 ·

改性扇贝壳粉与壳聚糖复合膜的制备及性质研究

纪登杰[1,2], 许依能[1,2], 杨　威[1,2], 马　洁[1,2], 王　磊[1,2], 陈　丽[1,2,*]

(1.江苏海洋大学, 江苏连云港 222005;
2.江苏海洋大学江苏省海洋资源开发研究院, 江苏连云港 222005)

摘　要: 以扇贝壳为原料，硬脂酸钠为改性剂，通过湿法改性制备了改性扇贝壳粉。采用单因素和响应面试验探讨改性温度、改性剂用量、改性时间对扇贝壳粉改性效果的影响，利用傅里叶红外光谱仪、电子扫描电镜和 X 射线衍射仪对扇贝壳粉进行表征。将制成的改性扇贝壳粉与壳聚糖制成复合膜，考察改性扇贝壳粉质量分数对复合膜性质的影响。结果表明，扇贝壳粉最佳改性条件为：硬脂酸钠添加量 2.53%，改性温度 80.70 ℃，改性时间 43.19 min，在此条件下制得的扇贝壳粉活化度最高可达到 76.41%，结合表征图谱分析，硬脂酸钠成功结合到壳粉表面，壳粉粉体粒子间团聚作用减弱，制得的改性扇贝壳粉具有良好的分散性。添加改性扇贝壳粉可以有效提高壳聚糖膜的机械性能、透光性和水蒸气阻隔性能。当改性扇贝壳粉的质量分数为 1% 时，改性扇贝壳粉与壳聚糖复合膜的性能最佳，此时膜拉伸强度为 30.19 MPa，断裂伸长率为 10.2%，水蒸气透过量为 35.1 $g \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$，透光性为 2.9 mm·%。

关键词: 改性扇贝壳粉, 活化度, 壳聚糖, 复合膜, 机械强度
中图分类号: TS206.4　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0268−08
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110118
本文网刊:

Preparation and Properties of Modified Scallop Shell Powder and Chitosan Composite Film

JI Dengjie[1,2], XU Yineng[1,2], YANG Wei[1,2], MA Jie[1,2], WANG Lei[1,2], CHEN Li[1,2,*]

(1.Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China;
2.Jiangsu Institute of Marine Resources Development, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China)

Abstract: Using scallop as raw material and sodium stearate as modifier, the modified scallop powder was prepared by wet modification. Using single factor and response surface experiments to explore the effects of modification temperature, modifier dosage, and modification time on the modification effect of scallop shell powder. The scallop shell powder was characterized by Fourier infrared spectrometer, scanning electron microscope and X-ray diffractometer. The modified scallop shell powder and chitosan were made into a composite film, and the influence of the mass fraction of the modified scallop shell powder on the properties of the composite film was investigated. The experimental results showed that the best modification conditions of scallop shell powder were: Sodium stearate addition amount 2.53%, modification temperature 80.70 ℃, modification time 43.19 min. The activation of the fan shellshell powder produced under these conditions could reach up to 76.41%. Combined with characterization mapping analysis, sodium stearate was successfully incorporated onto the surface of shell powder, and the inter particle agglomeration of shell powder was weakened, and the prepared modified

收稿日期: 2021−11−12
基金项目: 江苏省海洋科技创新专项项目（HY2018-10）; 江苏省“333”工程高层次人才培养资金资助项目（BRA2014111）; 连云港市“521 高层次人才培养工程”资助项目（LYG52105-2018028）。
作者简介: 纪登杰（1995−）, 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: 1156568100@qq.com。
*** 通信作者:** 陈丽（1970−）, 女, 硕士, 教授, 研究方向: 海洋生物资源综合利用研究, E-mail: chenli@jou.edu.cn。

scallop shell powder showed good dispersion. Adding modified scallop shell powder could effectively improve the mechanical properties, light transmittance and water vapor barrier properties of the chitosan film. When the mass fraction of modified scallop powder was 1%, the performance of the composite film of modified scallop powder and chitosan was the best. At this time, the tensile strength of the film was 30.19 MPa, the elongation at break was 10.2%, the water vapor transmission rate was 35.1 $g \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$, and the light transmittance was 2.9 mm·%.

Key words: modified scallop shell powder; activation degree; chitosan; composite film; mechanical strength

壳聚糖(Chitosan, CTS)是由甲壳素脱乙酰作用得到的一种多糖[1]。以壳聚糖为成分制成的保鲜膜，能够有效减弱呼吸速率、控制水分损失以及抑制微生物等[2−3]。在抑制细菌生长的同时，壳聚糖还可以通过清除机体自由基等作用隔绝食品与空气的接触，从而达到抗氧化效果。壳聚糖因其良好的生物相容性、可降解性和安全无毒等特性，备受关注，具有很高的应用前景[4−7]。但是，单一的壳聚糖膜机械能较差，一定程度上限制了应用范围。为解决这个问题，需要寻求适合的填充材料，改善膜的性能[8−11]。

扇贝是我国重要的优势高值养殖贝类之一，年养殖产量占世界扇贝类年养殖产量的 80% 以上[12]。扇贝壳资源丰富，其主要成分为碳酸钙，经粉碎后的贝壳粉可以作为良好的无机填充材料加入到有机聚合物中，起到增强韧性的作用[13]。但是将贝壳粉直接应用于有机聚合物时，由于贝壳粉颗粒表面能较大，粉体团聚现象明显，导致在聚合物中分散性能较差[14]。因此，需要对贝壳粉进行表面改性，消除表面高势能，减弱粒子表面极性等方式降低贝壳粉的团聚现象，从而提高聚合物制品的物理性能[15]。

本文探究改性扇贝壳粉的质量分数对壳聚糖复合膜性能的影响，为进一步研究该复合膜在食品保鲜中的应用提供理论基础。开发贝壳资源利用新途径，一定程度上解决了废弃贝壳造成的环境问题，同时还能创造经济效益，促进我国贝壳资源的有效利用。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

新鲜扇贝　购于江苏连云港大润发超市；壳聚糖(脱乙酰度>95%)、冰乙酸、丙三醇、无水乙醇、硬脂酸钠　国药集团化学试剂有限公司。

DHG-9140A 型电恒温鼓风干燥机　上海一恒科技有限公司；DF-1015 型集热式恒温加热套　上海力辰邦西仪器科技有限公司；KQ-300B 型超声波清洗器　昆山市超声仪器有限公司；XQM-04L 型变频行星式球磨机　南京科析实验仪器研究所；TMS-PRO 质构仪　美国 FTC 公司；UV-1100 紫外可见分光光度计　上海凌析达仪器公司；Nicolet 5700 傅立叶红外光谱仪　Thermo Electron Corporation；JSM-5610LV 扫描电镜　日本电子(JEOL)；XPERT POWDER　荷兰帕纳科公司。

1.2　实验方法

1.2.1　贝壳预处理　称取一定量的扇贝贝壳，在超声波清洗器内超声 2 h，加以清洗除去贝壳表面残余的肉质和附着物，在电恒温鼓风干燥机内 300 ℃ 烘干 24 h。将烘干的贝壳进行粉碎机粗粉后，放入球磨机内进行一定时间的球磨得到贝壳粉粉体。

1.2.2　贝壳粉改性步骤　称取一定量的贝壳粉，以 1∶10 的质量比加入蒸馏水于集热式恒温加热套内加热，加热到一定温度后，加入硬脂酸钠反应，经过一段时间后反应结束，进行抽滤，置于 60 ℃ 下烘干，得到改性贝壳粉。

1.2.3　单因素实验　分别以硬脂酸钠添加量、改性时间、改性温度 3 个因素进行单因素实验，以粉体活化度作为衡量指标。

1.2.3.1　硬脂酸钠添加量对贝壳粉改性效果的影响　在改性温度为 80 ℃,改性时间为 40 min 时，分别添加 1%、1.5%、2%、2.5%、3% 的硬脂酸钠，探究硬脂酸钠对贝壳粉改性效果的影响。

1.2.3.2　改性温度对贝壳粉改性效果的影响　在硬脂酸钠添加量为 2.5%，改性时间为 40 min 时，分别在 60、70、80、90、100 ℃ 下进行改性，考察改性温度对贝壳粉改性效果的影响。

1.2.3.3　改性时间对贝壳粉改性效果的影响　在硬脂酸钠添加量为 2.5%，改性温度为 80 ℃ 时，分别在 20、30、40、50、60 min 下进行改性，探究改性时间对贝壳粉改性效果的影响。

1.2.4　贝壳粉最佳改性条件优化响应面设计　使用 Design Expert 8.0.6 软件进行响应面设计。以硬脂酸钠添加量、改性温度、改性时间 3 个考察因素及其变化水平设计三因素三水平响应面方案，试验因素设计如表 1。

表 1　响应面试验因子水平

Table 1　Response surface test factor levels

因素	水平		
	−1	0	+1
A硬脂酸钠添加量(%)	2	2.5	3
B改性温度(℃)	70	80	90
C改性时间(min)	30	40	50

1.2.5　贝壳粉活化度测定　将贝壳粉置于分液漏斗中，加 200 mL 纯化水，反复震荡 1 min 后，放于漏斗架上，静置，待其明显分层后将下层贝壳粉放入坩埚中，置于 105 ℃ 恒温干燥箱内干燥至恒重，精确至 0.001 g[16]。按下式计算活化度(X)：

$$X(\%) = (X_1/X_2) \times 100 \qquad \text{式（1）}$$

式中：X_1 为样品中漂浮部分的质量；X_2 为样品总质量。

1.2.6 贝壳粉的结构表征

1.2.6.1 X 射线衍射分析 取一定量改性前后的贝壳粉干燥后进行粉末衍射实验，对贝壳粉晶体结构进行分析。仪器扫描范围 20°~60°，扫描速度为 1°·min^{-1}[17]。

1.2.6.2 红外光谱分析 将贝壳粉与 KBr 粉末按 1∶100 的质量比在研钵中研磨均匀后，进行红外分析，测定贝壳粉的官能团，仪器扫描范围 400~4000 cm^{-1}。

1.2.6.3 扫描电子显微镜分析 取少量改性前后的贝壳粉干燥后均匀平铺在铝片上，喷金，观察贝壳粉的微观结构形貌。

1.2.7 贝壳粉-壳聚糖复合膜的制备

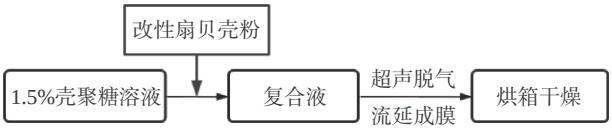


图 1 复合膜制备流程

Fig.1 Composite film preparation process

复合膜的制备工艺见图 1。称取 1.5%(m/v)的壳聚糖溶于冰乙酸 1%(v/v)和丙三醇 0.6%(v/v)的混合溶液，40 ℃ 下搅拌至完全溶解。依次按 0%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%的添加量分别加入改性贝壳粉，超声脱气 15 min 后，取 80 mL 膜液倒入 20 cm×20 cm 的亚克力板上流延制膜，置于 30 ℃ 下鼓风干燥，脱膜[18]。实验中以不添加改性贝壳粉的壳聚糖复合膜为空白对照。复合膜中改性扇贝壳粉质量分数以其与壳聚糖的质量比计。

1.2.8 复合膜性能测定

1.2.8.1 机械性能测定 采用质构仪测定复合膜的拉伸强度(Ts)和断裂伸长率(EB)[19]。

$$Ts = P/(b \times d) \quad 式（2）$$

式中：P 为复合膜断裂时的拉力，N；b 为复合膜的宽度，mm；d 为复合膜的厚度，mm。

$$EB = [(L - L_0)/L_0] \times 100\% \quad 式（3）$$

式中：L_0 为复合膜的初始长度，mm；L 为复合膜断裂时的长度，mm。

1.2.8.2 水蒸气透过量(WVTR)测定 在称量瓶中倒入不超过 2/3 的纯化水，用复合膜包住瓶口，放于 30 ℃ 干燥器内，每隔 12 h 测定 1 次称量瓶的质量，连续测量 3 次计算：

$$WVTR = \Delta m/(A \times t) \quad 式（4）$$

式中：Δm 为称量瓶质量损失量，g；A 为称量瓶口膜的面积，m^2；t 为时间，h。

1.2.8.3 透光性测定 将复合膜贴在比色皿内，采用紫外-可见分光光度计测定 450 nm 下的透光率，以“透光率×厚度”表示测定结果。

1.3 数据处理

以上实验结果平行测定 3 次。使用 Design-Expert 8.0.6 进行响应面设计，实验结果用 Origin7.5 软件进行统计分析并作图，用 Jade 软件对 XRD 图谱进行分析。其中 $P<0.05$ 说明差异显著，$P<0.01$ 说明差异极显著[20−21]。

2 结果与分析

2.1 贝壳粉改性条件的工艺优化

2.1.1 单因素实验

2.1.1.1 硬脂酸钠添加量对贝壳粉活化度的影响

在改性温度为 80 ℃，改性时间为 40 min 的条件下，硬脂酸钠添加量对贝壳粉的活化度的影响如图 2 所示。贝壳粉的活化度随着硬脂酸钠的增加而提高，当硬脂酸钠增加到 2.5% 时，贝壳粉活化度最高。继续增加硬脂酸钠添加量时，活化度开始下降。这与雷鹏飞[22] 研究的硬脂酸钠用量对碳酸钙原位改性结果趋势一致，由于贝壳粉已经被完全包覆，过量的硬脂酸钠分子与贝壳粉表面长链硬脂酸钠分子发生缠绕作用，使粉体表面的硬脂酸钠分子具有亲水能力的羧基裸露出来，导致贝壳粉活化度的降低。因此，选取 2.5% 为硬脂酸钠的最适添加量。

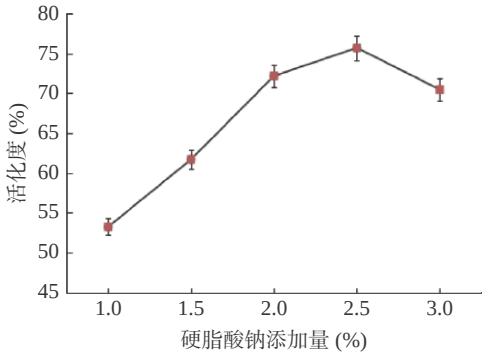


图 2 硬脂酸钠添加量对改性扇贝壳粉活化度的影响

Fig.2 Effect of mass fraction of sodium stearate on activity of modified scallop powder

2.1.1.2 改性温度对贝壳粉活化度的影响 在硬脂酸钠添加量为 2.5%，改性时间 40 min 的条件下，改性温度对贝壳粉活化度的影响如图 3 所示。随着改性温度的提升，硬脂酸钠溶解度增加，贝壳粉活化度逐渐提升并在温度为 80 ℃ 时达到最大值。当温度高于 80 ℃ 时，溶剂挥发过快，粉体与改性剂不能充分混合均匀，不利于改性过程的进行，使得粉体活化度逐步下降。因此，选取 80 ℃ 为最佳改性温度。

2.1.1.3 改性时间对贝壳粉活化度的影响 在硬脂酸钠添加量为 2.5%，改性温度 80 ℃ 的条件下，改性时间对贝壳粉活化度的影响如图 4 所示。随着改性时间的增加，贝壳粉浆液中的 Ca^{2+}、$CaOH^+$等组分与硬脂酸钠 RCOO-反应较为充分，硬脂酸钠对贝壳粉

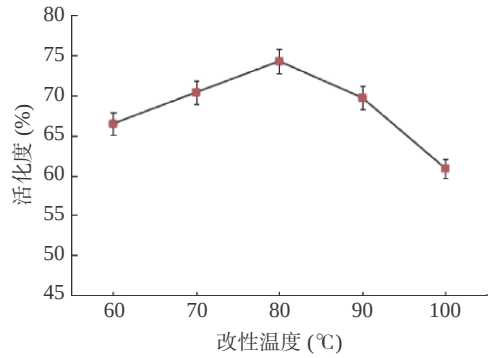


图 3　改性温度对改性扇贝壳粉活化度的影响

Fig.3　Effect of modification temperature on activity of modified scallop powder

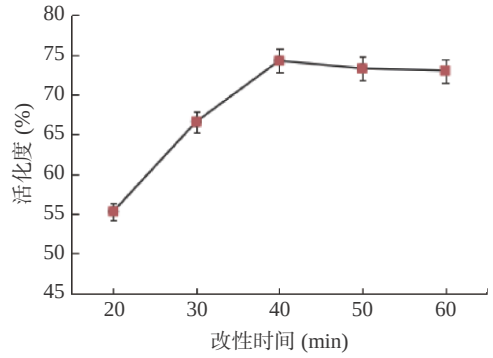


图 4　改性时间对改性扇贝壳粉活化度的影响

Fig.4　Effect of modification time on activity of modified scallop powder

较快包覆，粉体活化度提高。覃筱燕[23]也研究了相关对生蚝壳粉改性效果实验，她发现在不同的改性温度下贝壳粉体活化度呈现先升高后略有降低的的趋势。当温度超过一定数值时，由于长时间的搅拌，导致贝壳粉表面少量硬脂酸钠的脱落，使得改性效果变差。因此，选取 40 min 为最佳反应时间。

2.1.2　响应面试验设计结果　在单因素实验基础上，以硬脂酸钠添加量、改性温度、改性时间为变量，以活化度为响应值，设计响应面分析试验，试验结果见表 2 和表 3。

用 Design Expert 8.0.6 软件对表 2 中的响应值进行多元二次分析，得到贝壳粉活化度的回归模型方程如下：

$$Y=75.85+1.05A+0.28B+2.72C+0.4AB-0.62AC+0.19BC-6.65A^2-2.64B^2-4.21C^2$$

该方程的 R^2 为 98.9%，模型达到显著水平（$P<0.0001$），失拟项不显著，表明该模型拟合性能良好、方法可靠。模型的 R^2=98.9%，说明响应值变化的 98.9% 与选择的变量相关，模型校正决定系数 R^2_{Adj}=0.9750，表明此回归方程可以表示响应值变化具有可行性。

根据以上回归方程绘制响应面交互作用曲面图，研究硬脂酸钠添加量、改性温度、改性时间三个因素对贝壳粉活化度的影响，响应面如图 5~图 7。

表 2　响应面试验结果

Table 2　Response surface test results

实验号	A	B	C	活化度(%)
1	−1	0	−1	60.51
2	1	−1	0	67.53
3	1	1	0	68.36
4	0	−1	1	70.55
5	0	0	0	76.25
6	0	0	0	76.42
7	0	1	−1	67.07
8	0	1	1	72.02
9	−1	1	0	64.79
10	0	0	0	75.68
11	0	−1	−1	66.36
12	−1	−1	0	65.55
13	−1	0	1	68.06
14	0	0	0	75.96
15	1	0	−1	63.17
16	1	0	1	68.23
17	0	0	0	74.96

表 3　响应面方差分析结果

Table 3　Analysis of variance results of response surface test

来源	平方和	自由度	均方	F	P值	显著性
模型	389.64	9	43.29	70.41	<0.0001	**
A	8.78	1	8.78	14.28	0.0069	
B	0.63	1	0.63	1.03	0.3441	
C	59.13	1	59.13	96.17	<0.0001	**
AB	0.63	1	0.63	1.03	0.3444	
AC	1.55	1	1.55	2.52	0.1564	
BC	0.14	1	0.14	0.23	0.6428	
A^2	186.31	1	186.31	302.99	<0.0001	**
B^2	29.45	1	29.45	47.89	0.0002	**
C^2	74.61	1	74.61	121.34	<0.0001	**
残差	4.3	7	0.61			
失拟项	2.99	3	1	3.02	0.1567	不显著
纯误差	1.32	4	0.33			
总误差	393.94	16				

注：*表示差异显著，P<0.05；**表示差异极显著，P<0.01。

硬脂酸钠添加量、改性温度、改性时间对贝壳粉活化度的影响趋势可以通过图 5~图 7 直接得出，改性时间对贝壳粉活化度的影响较大，表现为较陡曲线；硬脂酸钠添加量、改性温度对贝壳粉活化度的影响较小，曲线相对平滑。通过软件分析，确定贝壳粉最佳改性条件：硬脂酸钠添加量为 2.53%，改性温度为 80.70 ℃，改性时间为 43.19 min，在此条件下贝壳粉的活化度为 76.33%。在此条件下，重复 3 次贝壳粉改性实验，此时的贝壳粉的活化度为 76.41%±0.3%，与模型预测结果基本相同，说明该模型能够较好的模拟贝壳粉改性过程和预测贝壳粉的活化度。

2.2　改性贝粉的表征

2.2.1　贝壳粉 XRD 分析　图 8 所示是扇贝壳粉和改性扇贝壳粉的 XRD 图，利用 jade 软件检索分析，扇贝壳粉的 XRD 图中 23°、29°、36°、39°、43°、47°、49°处的 7 个衍射峰分别对应方解石型碳酸钙的（012）、（104）、（110）、（113）、（202）、（018）、

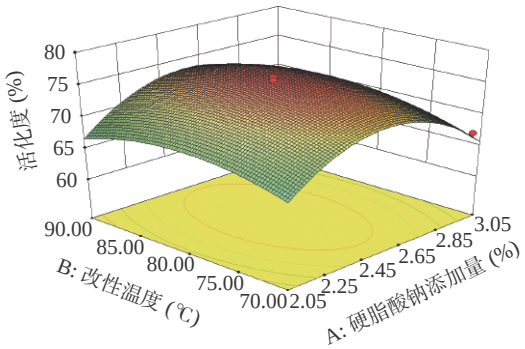


图 5　改性温度和硬脂酸钠添加量对贝壳粉活化度的交互影响

Fig.5　Interactive effects of modification temperature and amount of sodium stearate on the activity of shell powder

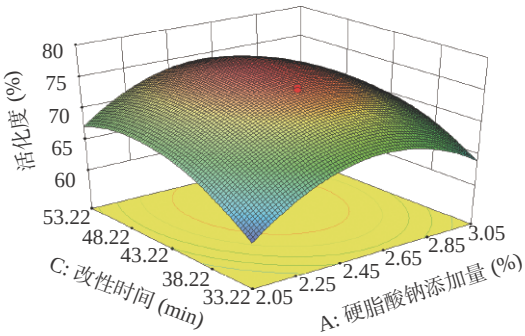


图 6　改性时间和硬脂酸钠添加量对贝壳粉活化度的交互影响

Fig.6　Interactive effects of modification time and amount of sodium stearate on the activity of shell powder

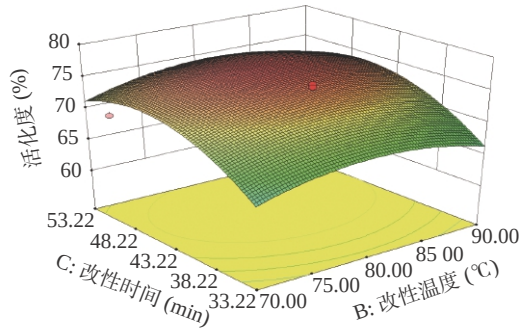


图 7　改性时间和改性温度对贝壳粉活化度的交互影响

Fig.7　Interactive effects of modification time and temperature on the activity of shell powder

(116)7 个晶面。改性扇贝壳粉的 XRD 图谱与之相比，也出现了方解石的 7 个衍射峰，说明经硬脂酸钠对贝壳粉的改性只是改善扇贝壳粉的疏水性，并没有破坏扇贝壳粉的晶体结构，因此不会影响扇贝壳粉的原有性质[24]。

2.2.2　贝壳粉改性前后的 FT-IR 分析　为证明改性成功，以未改性的扇贝壳粉作为实验的对照组，图 9 表示扇贝壳粉改性前后的红外光谱图。从图 9 可知，未改性的扇贝粉在 713 和 873 cm^{-1} 处有较大的峰，分别对应着CO_3^{2-}面外变形振动峰，O-C-O 面内变形振动的吸收峰，为碳酸钙方解石晶型的特征峰。1500 cm^{-1} 处有一个较宽的峰，这是碳酸根的特征峰，2500 cm^{-1} 附近为CO_3^{2-}质子化形态的伸缩振动吸收

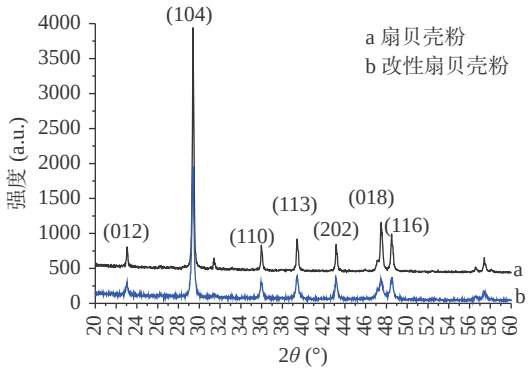


图 8　改性扇贝壳粉 XRD 图谱

Fig.8　XRD pattern of modified scallop powder

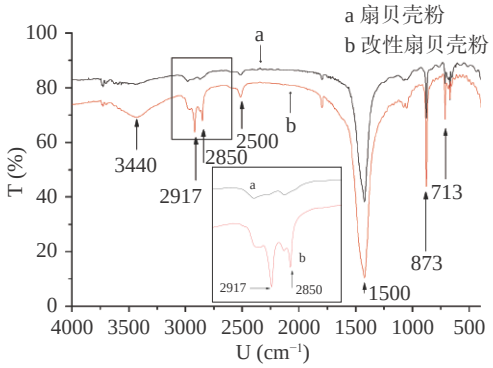


图 9　改性扇贝壳粉红外图谱

Fig.9　Infrared spectrum of modified scallop powder

峰[25]。3440 cm^{-1} 的宽吸收峰，是由于贝壳粉微粒表面的羟基和吸附水的存在造成的 H-O 键的对称伸缩振动和不对称伸缩振动。与未改性的扇贝壳粉相比，用 2.5% 的硬脂酸钠改性后的扇贝粉在 2850 和 2917 cm^{-1} 处出现了特征峰，这两个特征峰对应的是 -CH_3 和-CH_2 伸缩振动吸收峰，这说明改性后的扇贝粉表面存在 CH 化合物，实验结果表明硬脂酸钠成功包覆在扇贝粉表面[26−27]。

2.2.3　贝壳粉改性前后的 SEM 分析　利用发射扫描电子显微镜对贝壳粉进行观察，贝壳粉的 SEM 照片如图所示。从图 10a 中可知，经过行星式球磨机细粉后的扇贝粉团聚现象非常明显，其中纤维状结构的方解石型碳酸钙最多，相互交错团聚一块。从图 10b 中可知，经过硬脂酸钠改性后的扇贝粉颗粒，团聚现象明显减弱，颗粒与颗粒之间间隔较大。粉体经过改

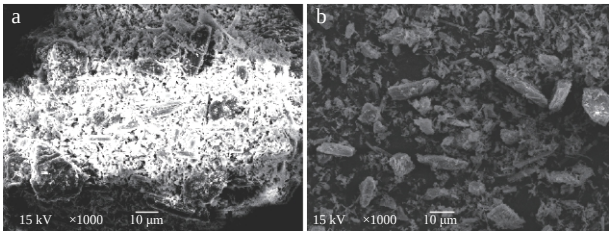


图 10　扇贝壳粉改性前后 SEM 图谱

Fig.10　SEM of modified scallop powder

注：a：未改性扇贝壳粉 SEM 图谱；b：改性后扇贝壳粉 SEM 图谱。

性后得到了很好的分散效果[28]。

2.3　贝壳粉-壳聚糖复合膜理化性质分析

2.3.1　改性贝壳粉质量分数对复合膜机械性能的影响　改性扇贝壳粉添加量对复合膜机械性能的影响如图所示。由图 11 可以看出，随着改性扇贝壳粉添加量的增加，贝壳粉与壳聚糖复合膜的拉伸强度(Ts)缓慢提升，当贝壳粉添加为 1% 时，复合膜的拉伸强度达到最大；继续增加贝壳粉添加量，复合膜的拉伸强度降低。由图 12 可以看出，当改性扇贝壳粉添加量在 0.5% 时，复合膜断裂伸长率达到最大，之后随着贝壳粉的添加量增加而逐步下降[29]。

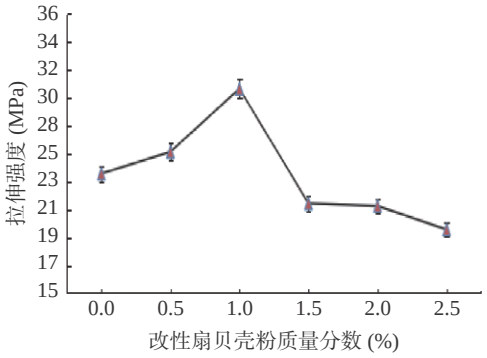


图 11　改性扇贝壳粉质量分数对复合膜拉伸强度的影响

Fig.11　Effect of mass fraction of modified fan shells powder on tensile strength of composite membranes

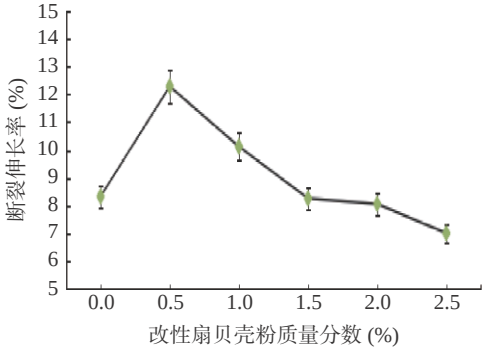


图 12　改性扇贝壳粉质量分数对复合膜断裂伸长率的影响

Fig.12　Effect of mass fraction of modified fan shells powder on the breaking elongation of composite membranes

分析认为，改性扇贝壳粉添加量较少时，贝壳粉粒子在复合膜中均匀分布，且经改性后的贝壳粉体亲水性能降低，与壳聚糖相容性更好，进而改善了两者间的粘合状态和应力的传递，促进了机械性能的改善[30]。当改性贝壳粉添加量过高时，贝壳粉体粒子间团聚作用加巨，使其在壳聚糖溶液中分布不均，导致复合膜拉伸强度降低。李金星等[9]在研究壳聚糖复合膜时发现甘油具有较强的亲水性，甘油中的羟基能够与壳聚糖分子中的羟基结合形成链间氢键，导致壳聚糖分子内部间的作用力减小，使复合膜更加柔软，而复合膜的断裂伸长率受柔韧性的影响。韩英等[31]在研究碳酸钙壳聚糖复合膜时发现，碳酸钙与壳聚糖分子发生氢键作用，壳聚糖分子间连接点减少，减弱了分子间作用力，所以随着贝壳粉添加量的提高，壳聚糖分子之间的连接点减少，复合膜的柔韧性增强；当改性扇贝壳粉添加量过大时，贝壳粉体、甘油和壳聚糖连接位点形成大量链式氢键，使得复合膜韧性降低刚性增强，因而断裂伸长率降低。

2.3.2　水蒸气透过量　如图 13 所示，随着改性扇贝壳粉质量分数的增加，水蒸气透过量逐步降低，当未加入改性扇贝壳粉时可能由于单一壳聚糖空隙较大，结构较为松散，导致水蒸气透过量较大。通过李金星等[9]与韩英等[31]对壳聚糖复合膜的研究发现甘油、贝壳粉与壳聚糖分子以氢键结合，这促使分子紧密排列，改善了壳聚糖分子间结构，因而降低了复合膜水蒸气透过量。

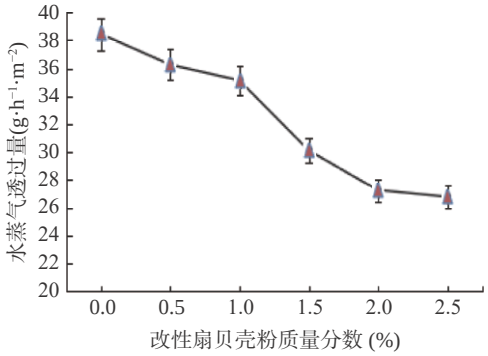


图 13　改性扇贝壳粉质量分数对复合膜水蒸气透过量的影响

Fig.13　Effect of mass fraction of modified fan shell powder on water vapor transmission of composite membrane

2.3.3　透光性　复合膜的透光性反映了壳聚糖与改性贝壳粉分子间的相容性，分子间相容性越好，复合膜透光性越大。由图 14 可以看出，随着改性贝壳粉质量分数的增加，复合膜的透光性先增加后降低，当改性贝壳粉质量分数为 1.5% 时，粉体粒子与壳聚糖相容性最好，粉体均匀分散在复合膜中，此时复合膜的透光性能最好。当改性贝壳质量分数超过 1.5% 时，在改性贝壳粉/壳聚糖复合液超声过程中，贝壳粉体粒子碰撞几率增大，导致部分粉体团聚，复合膜界面因光的折射和散射作用，致使透光性降低[30]。

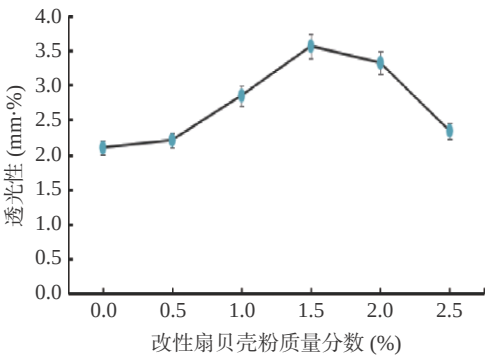


图 14　改性扇贝壳粉质量分数对复合膜透光性的影响

Fig.14　Effect of mass fraction of modified fan shell powder on light transmittance of composite membrane

3　结论

本实验以硬脂酸钠为改性剂，通过单因素实验

和响应面试验分析改性温度、硬脂酸钠质量分数、改性时间对扇贝壳粉活化度的影响，并确定了最佳的反应条件：硬脂酸钠添加量 2.53%，改性温度 80.70 ℃，改性时间 43.19 min，在此条件下改性扇贝壳粉活化度可以达到 76.41%。随后对改性扇贝壳粉的进行表征实验，对其在晶体结构、基团和微观结构对粉体进行分析并确定改性实验的成功。

随后采用流延法制备了改性扇贝壳粉与壳聚糖的复合膜，以不添加改性扇贝壳粉的壳聚糖复合膜为对照。结果表明，当改性扇贝壳粉质量分数为 1% 时，复合膜拉伸强度最大，水蒸气透过率降低，透光性提高，此时改性扇贝壳粉粒子与壳聚糖分子的相容性较好。

本文对贝壳利用方式进行探索，以资源量丰富的扇贝壳作为复合膜材料来源，为进一步研究改性扇贝壳粉/壳聚糖复合膜在食品保鲜中的应用提供基础研究。

参考文献

[1] 徐庭巧, 罗自生, 徐晓铃, 等. 纳米碳酸钙改性壳聚糖涂膜对鲜切茄子生理生化指标的影响[J]. 食品科学, 2009, 30(4): 264−267. [XU T Q, LUO Z S, XU X L, et al. Effects of chitosan coating modified by nano calcium carbonate on physiological and biochemical indexes of fresh cut eggplant[J]. Food Science, 2009, 30(4): 264−267.]

[2] 顾凤兰, 章建浩, 马磊, 等. 不同涂膜材料对清洁鸡蛋的保鲜效果[J]. 农业工程学报, 2015, 31(1): 303−310. [GU F L, ZHANG H J, MA L, et al. Preservation effect of different coating materials on clean eggs[J]. Journal of Agricultural Engineering, 2015, 31(1): 303−310.]

[3] 欧阳锐, 盛潇潇, 王燕珈, 等. 生物可降解壳聚糖复合膜的制备及其在鸡胸肉中的保鲜应用[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(21): 123−128. [OU Y R, SHENG X X, WANG Y J, et al. Preparation of biodegradable chitosan composite membrane and its application in chicken breast meat preservation[J]. Food Research and Development, 2020, 41(21): 123−128.]

[4] CONG H, ZUO J H, WANG Q, et al. Effects of chitosan coating on postharvest quality and shelf life of sponge gourd (*Luffa cylindrica*) during storage[J]. Scientia Horticulturae, 2014, 166: 1−8.

[5] ZHANG H Y, LIANG Y, LI X L, et al. Effect of chitosan-gelatin coating containing nano-encapsulated tarragon essential oil on the preservation of pork slices[J]. Meat Science, 2020, 166: 53−79.

[6] QIAN T T, SU H J, TAN T W. The bactericidal and mildew-proof activity of a TiO_2–chitosan composite[J]. Journal of Photochemistry & Photobiology, A:Chemistry, 2011, 218(1): 130−136.

[7] ELENA L K, ROMAN A S. Predictive analysis of chitosan-based nanocomposite biopolymers elastic properties at nano- and microscale[J]. Journal of Molecular Modeling, 2016, 22(4): 75.

[8] 郑优, 贾亮, 段蓉, 等. 响应面法优化壳聚糖/核桃蛋白复合膜的制备工艺[J]. 食品工业科技, 2016, 37(21): 274−279, 290. [ZHEN Y, JIA L, DUAN R, et al. Optimization of preparation process of chitosan/walnut protein composite membrane by response surface methodology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(21): 274−279, 290.]

[9] 李金星, 沈春红, 黎先发. 改性壳聚糖复合膜的制备及优化[J]. 食品工业科技, 2021, 42(8): 144−151. [LI J X, SHEN C H, LI X F. Preparation and optimization of modified chitosan composite membrane[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(8): 144−151.]

[10] FU R R, JI X J, REN Y F, et al. Antibacterial blend films of cellulose and chitosan prepared from binary ionic liquid system[J]. Fibers and Polymers, 2017, 18(5): 852−858.

[11] MOUSA S, ELAHEH H, KAMALADIN G. Treating wool fibers with chitosan-based nano-composites for enhancing the antimicrobial properties[J]. Applied Nanoscience, 2020, 10(4): 1219−1229.

[12] 代银平, 王雪莹, 叶炜宗, 等. 贝壳废弃物的资源化利用研究[J]. 资源开发与市场, 2017, 33(2): 203−208. [DAI Y P, WANG X Y, YE W Z, et al. Research on resource utilization of shell waste[J]. Resource Development and Market, 2017, 33(2): 203−208.]

[13] 张东洋. 改性纳米碳酸钙对 PP 的增韧研究 [D]. 吉林: 吉林大学, 2020. [ZHANG D Y. Study on Toughening of PP by modified nano calcium carbonate[D]. Jilin: Jilin University, 2020.]

[14] 王明, 郝文婷, 杨丽丽, 等. 壳聚糖分子质量对原位改性纳米 $CaCO_3$-壳聚糖涂膜食品保鲜性能的影响[J]. 中国食品学报, 2020, 20(8): 191−200. [WANG M, HAO W T, YANG L L, et al. Effect of molecular weight of chitosan on in situ modified nano $CaCO_3$ -chitosan coating on food preservation[J]. Chinese Journal of Food, 2020, 20(8): 191−200.]

[15] 孙红娟, 彭同江, 马国华, 等. 纳米碳酸钙合成-改性一体化工艺研究[J]. 非金属矿, 2007(3): 12−14. [SUN H J, PENG T J, MA G H, et al. Study on synthesis modification integrated process of nano calcium carbonate[J]. Nonmetallicore, 2007(3): 12−14.]

[16] 苑永伟. 活性纳米碳酸钙改性剂的合成及碳酸钙改性研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2013. [YUAN Y W. Synthesis of active nano calcium carbonate modifier and its modification[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2013.]

[17] 赵鲁苹, 徐焕志, 陈东, 等. 厚壳贻贝贝壳的微结构及光谱分析[J]. 浙江大学学报 (理学版), 2015, 42(3): 339−346. [ZHAO L P, XU H Z, CHEN D, et al. Microstructure and spectral analysis of mussel shells[J]. Journal of Zhejiang University (Science Edition), 2015, 42(3): 339−346.]

[18] 郝文婷, 郝晗, 孙彤, 等. 纳米 $CaCO_3$ 原位改性对壳聚糖复合涂膜性能的影响[J]. 现代食品科技, 2015, 31(1): 71−76. [HAO W T, HAO H, SUN T, et al. Nano $CaCO_3$ effect of in-situ modification on properties of chitosan composite coating[J]. Modern Food Technology, 2015, 31(1): 71−76.]

[19] 王赢, 牛广财, 张东杰, 等. 壳聚糖基抗菌保鲜膜制备工艺的优化[J]. 保鲜与加工, 2020, 20(2): 22−27,34. [WANG Y, NIU G C, ZHANG D J, et al. Optimization of preparation process of chitosan based antibacterial fresh-keeping film[J]. Storage and Process, 2020, 20(2): 22−27,34.]

[20] 刘可, 高锋, 刘佳豪, 等. 响应面法优化羧甲基壳聚糖——纳米银凝胶工艺研究[J]. 中国食品工业, 2021(20): 122−127.

［LIU K, GAO F, LIU J H, et al. Response surface methodology to optimize carboxymethyl chitosan nano silver gel technology[J]. China Food Industry, 2021(20): 122−127.］
［21］郭睿, 张瑶, 韩双, 等. 响应面法优化羟丙基壳聚糖的合成工艺[J]. 生物质化学工程, 2019, 53(1): 25−32.［GOU R, ZHANG Y, HAN S, et al. Optimization of synthesis process of hydroxypropyl chitosan by response surface methodology[J]. Biomass Chemical Engineering, 2019, 53(1): 25−32.］
［22］雷鹏飞. 碳酸钙涂层填充剂的表面改性及应用研究 [D]. 杭州: 浙江理工大学, 2019.［LEI P F. Study on surface modification and application of calcium carbonate coating filler[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2019.］
［23］覃筱燕. 贝壳粉负载型抗菌材料及抗菌涂料的研究 [D]. 南宁: 广西大学, 2017.［QIN X Y. Research on shell powder-loaded antibacterial materials and antibacterial coatings[D]. Nanning: Guangxi University, 2017.］
［24］胡应模, 于梦兰. 硬脂酸钠对电气石的表面改性及其结构表征[J]. 中国非金属矿工业导刊, 2013(1): 27−29.［HU Y M, YU M L. Surface modification and structural characterization of tourmaline by sodium stearate[J]. China Nonmetallic Mineral Industry Guide, 2013(1): 27−29.］
［25］DING H, LU S C, DENG Y X, et al. Mechano-activated surface modification of calcium carbonate in wet stirred mill and its properties[J]. Transactions of Nonferrous Metals Society of China, 2007, 17(5): 1100−1104.
［26］陈列列. 贝壳粉基光催化环保涂料的制备与研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2020.［CHEN L L. Preparation and research of shell powder based photocatalytic environmental protection coating [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2020.］
［27］雷鹏飞, 黄亚伟, 袁森浩, 等. 油酸原位合成碳酸钙及其在聚酰胺湿法涂层中的应用[J]. 纺织学报, 2019, 40(5): 70−77.［LEI P F, HUANG Y W, YUAN S H, et al. In situ synthesis of calcium carbonate from oleic acid and its application in polyamide wet coating[J]. Journal of Textiles, 2019, 40(5): 70−77.］
［28］唐强. 贝壳粉改性及在隔热涂料中的应用研究 [D]. 南京: 东南大学, 2018.［TANG Q. Study on modification of shell powder and its application in thermal insulation coatings[D]. Nanjing: Southeast University, 2018.］
［29］ZHI C, MICHAEL D, LOPEZ C, et al. Chemical surface modification of calcium carbonate particles with stearic acid using different treating methods[J]. Applied Surface Science, 2016, 378: 320−329.
［30］李金星. 改性壳聚糖复合膜的制备及水果保鲜研究 [D]. 绵阳: 西南科技大学, 2021.［LI J X. Preparation of modified chitosan composite film and fruit preservation[D]. Mianyang: Southwest University of Science and Technology, 2021.］
［31］韩英, 郝文婷, 魏旭青, 等. $CaCO_3$ 添加量对原位改性纳米 $CaCO_3$/壳聚糖复合涂膜理化性能的影响[J]. 现代化工, 2018, 38(9): 77−80.［HAN Y, HAO W T, WEI X Q, et al. Effect of addition amount on in-situ modified nano $CaCO_3$/effect of chitosan composite coating on physical and chemical properties[J]. Modern Chemical Industry, 2018, 38(9): 77−80.］

沈文，吴立新，刘树兴，等. 蜂王浆泡腾片的制备及王浆酸溶出的测定 [J]. 食品工业科技，2022, 43(14)：276−282. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100180

SHEN Wen, WU Lixin, LIU Shuxing, et al. Preparation of Royal Jelly Effervescent Tablets and Determination of 10-HDA Dissolution[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 276−282. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100180

· 食品添加剂 ·

蜂王浆泡腾片的制备及王浆酸溶出的测定

沈　文*，吴立新，刘树兴，延梦瑶

（陕西科技大学食品与生物工程学院，陕西西安 710021）

摘　要：目的：为解决蜂王浆泡腾片中难溶成分 10-羟基-2-癸烯酸（10-HDA）溶出率低的问题。方法：采用单因素实验和正交试验，研究了泡腾剂添加量、泡腾剂比例（柠檬酸∶碳酸氢钠）、甜味剂添加量对蜂王浆泡腾片崩解时间及产气量的影响，并探索了不同食品添加剂对蜂王浆泡腾片中 10-HDA 溶出度的影响，获得了最佳配方。同时，利用 X 射线衍射（XRD）表征蜂王浆泡腾片的结晶度。结果：最佳配方为蜂王浆冻干粉 10%，泡腾剂添加量 45%，泡腾剂最佳比例（柠檬酸∶碳酸氢钠）=1.5∶1，甘露醇 10%，罗汉果甜苷 1%，硬脂酸镁 0.8%，15% 乳酸钙或者 0.5% 聚甘油脂肪酸酯，剩余以乳糖填充至 100%。该配方下制得的蜂王浆泡腾片，口感良好、崩解迅速，并有效提高了 10-HDA 的溶出率，10-HDA 的累计溶出率在 15 min 左右可使达到 85% 以上。结论：在蜂王浆泡腾片配方中加入乳酸钙或聚甘油脂肪酸酯可以有效提高 10-HDA 的溶出率，为提高蜂王浆相关产品中 10-HDA 溶出率提供了数据参考。

关键词：蜂王浆泡腾片，崩解时间，食品添加剂，10-HDA 溶出率

中图分类号：TS201.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1002−0306(2022)14−0276−07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100180　　本文网刊：

Preparation of Royal Jelly Effervescent Tablets and Determination of 10-HDA Dissolution

SHEN Wen*，WU Lixin，LIU Shuxing，YAN Mengyao

（School of Food and Biolohical Engineering, Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an 710021, China）

Abstract: Objective: To solve the problem of low dissolution rate of 10-hydroxy-2-decenoic acid (10-HDA) in royal jelly effervescent tablets. Methods: The disintegration time and gas production were used as evaluation indexes. Single factor experiments and orthogonal test were used to optimize the amount of effervescent agent, the ratio of effervescent agent (citric acid∶$NaHCO_3$), and the amount of sweetener added. Then different food additives were added to the formula. The effect of different food additives on the dissolution of 10-HDA was explored. And the optimum formula was obtained. Meanwhile, X-ray diffraction (XRD) was used to characterize the crystallinity of royal jelly effervescent tablets. Results: The optimum formula were royal jelly lyophilized powder 10%, effervescent agent 45%, best effervescent ratio (citric acid∶$NaHCO_3$)=1.5∶1, mannitol 10%, mogroside 1%, and magnesium stearate 0.8%, 15% calcium lactate or 0.5% polyglycerol fatty acid ester, and the rest was filled with lactose to 100%. The royal jelly effervescent tablets prepared by the formula had a good taste and rapid disintegration. In about 15 minutes, the cumulative dissolution rate of 10-HDA could reach 85% or more. Conclusion: Adding calcium lactate or polyglycerol fatty acid ester to the royal jelly effervescent tablets' formulation could effectively improve the dissolution rate of 10-HDA. This study provided data reference for improving 10-HDA dissolution rate in royal jelly related products.

Key words: royal jelly effervescent tablets; disintegration time; food additives; 10-HDA dissolution rate

蜂王浆是一种纯天然功能性食品和膳食补充剂[1]。其中 10-羟基-2-癸烯酸（10-HDA）被认为是产生生物活性的重要成分之一[2]。10-HDA 作为蜂王浆特有的脂肪酸，具有免疫调节、抗癌、抑菌抗炎、

收稿日期：2021−10−19

基金项目：陕西省科技厅重点研发计划项目（2020SF-423，2020FP-029，2021SF-339）。

作者简介/通信作者*：沈文（1982−），男，博士，高级实验师，研究方向：药用高分子材料与制剂，E-mail：shenwensm@sust.edu.cn。

抗氧化和抗肿瘤等多种生物活性功能[3−7]。蜂王浆作为食品、保健食品，存在着巨大的发展前景。而 10-HDA 难溶于水，造成体外溶出率低[8]，这极大地限制了蜂王浆的开发利用。

泡腾片遇水发生崩解时，酸碱反应释放的二氧化碳气体促进了片剂崩解以及微粒多孔释放系统的形成，促使有效成分的快速溶出[9−10]。例如，Nusrat Iqbal 开发一种印楝泡腾片可以提高印楝的释放及其生物利用度[11]。然而，气体的产生并不能改善难溶成分水溶性差、生物利用度差的问题[12]，泡腾组分在多孔体系的形成和诱导释放效应中仅仅起到了促进崩解与小分子扩散的基础作用[13]。同时有研究指出，药物的溶出会随环境温度的提高而增加[14−15]。另外，食品可添加的乳化剂降低了表面张力，从而促进固液两相的界面润湿性能，对难溶物质是一种潜在的增溶介质[16−17]。增加释放环境温度，添加乳化剂是提高难溶性物质溶出率的有效途径[18−19]。

因此，本研究采用单因素和正交试验确定蜂王浆泡腾片的基本配方，其次，在泡腾片压片糖配方中引入乳酸钙、羧甲基纤维素钠(CMC-Na)两种可以溶解产热的糖果用食品添加剂以及聚甘油脂肪酸酯(PGFEs)、双乙酰酒石酸单双甘油酯(DATEM)、蔗糖脂肪酸酯(SEs)三种乳化剂，利用其溶解放热或表面活性来增加 10-HDA 溶出度，旨在解决蜂王浆泡腾片中 10-HDA 溶出率低的问题。同时，对蜂王浆泡腾片进行崩解时限、产气量、XRD 及 10-HDA 溶出率等质量评价，以期改善了 10-HDA 溶出度低的问题，开发出具备高 10-HDA 溶出率的蜂王浆泡腾片。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

10-HDA(纯度≥98.0%)　上海源叶生物科技有限公司；蜂王浆冻干粉(含 6%10-HDA)　西安普瑞斯生物工程有限公司；柠檬酸、$NaHCO_3$　食品级，天津市天力化学试剂公司；乳糖　食品级，北京生物科技有限公司；甘露醇　食品级，安徽山河药用辅料股份有限公司；罗汉果甜苷　食品级，河北润步生物科技有限公司；硬脂酸镁　西安天正康源生物技术有限公司；乳酸钙、CMC-Na　徐州丰瑞生物科技公司；PGFEs、DATEM、SEs　食品级，河南奥尼斯特食品有限公司；无水乙醇　分析纯，天津市天力化学试剂公司。

DHG-9030 型电热鼓风干燥箱　上海科恒实业发展有限公司；YD-1 单冲压片机　北京国药龙立科技有限公司；ZB-1 智能崩解仪　天津天大天发科技有限公司；Smart Lab 9kW X 射线衍射仪　日本理学 Rigaku 公司；UV-1800 型紫外可见分光光度计　上海美谱达仪器有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　10-HDA 标准曲线的制作　准确称取 10-HDA 0.01 g 置于 100 mL 容量瓶中，加 1 mL 去离子水，以无水乙醇定容到 100 mL，配制得到质量浓度为 100 μg/mL 的储备液。分别取储备液 0.5、1、1.5、2、2.5、3 mL 定容到 50 mL，得到浓度分别为 1、2、3、4、5、6 μg/mL 的标准溶液。在 218 nm 吸收波长下，测定上述标准溶液的吸光度。以质量浓度为横坐标，吸光度为纵坐标，绘制标准曲线，并通过最小二乘法拟合出线性回归方程。本研究所得 10-HDA 的标准曲线方程为：y=0.1915x+0.0007，R^2=0.9996。其中 x 表示 10-HDA 溶液的浓度，y 表示 10-HDA 溶液在 218 nm 处的吸光度值。

1.2.2　蜂王浆泡腾片的制备　湿法制粒，采用酸碱分开制粒的方法，将柠檬酸、$NaHCO_3$ 分别与其他原辅料混合均匀，以 80% 乙醇作为粘合剂制粒，分别制成酸粒和碱粒。随后将制好的湿颗粒放入 65 ℃ 的烘箱中干燥后取出，整粒，加入硬脂酸镁混合均匀后压片，调节片重 400 mg，硬度 3~4 kg[20]。

1.2.3　蜂王浆泡腾片单因素实验

1.2.3.1　泡腾剂的添加量　选取泡腾剂添加量因素水平为 30%、35%、40%、45%、50%，固定泡腾剂比例(柠檬酸∶$NaHCO_3$)=2∶1，蜂王浆冻干粉添加量为 10%(含 6%10-HDA)，甘露醇添加量为 10%，罗汉果甜苷添加量 0.8%，硬脂酸镁添加量为 0.8%，剩余为乳糖。以泡腾片的崩解时间及产气量为指标确定泡腾剂的添加量。

1.2.3.2　泡腾剂比例　选取泡腾剂比例(柠檬酸∶$NaHCO_3$)因素水平为 2.5∶1、2∶1、1.5∶1、1∶1.5、1∶2，固定泡腾剂添加量为 45%，蜂王浆冻干粉添加量为 10%，甘露醇添加量为 10%，罗汉果甜苷添加量 0.8%，硬脂酸镁添加量为 0.8%，剩余为乳糖。以泡腾片的崩解时间及产气量为指标确定泡腾剂最优比例。

1.2.3.3　甜味剂的添加量　选取罗汉果甜苷添加量因素水平为 0.5%、0.8%、1%、1.2%、1.5%，固定泡腾剂添加量为 45%，泡腾剂比例(柠檬酸∶$NaHCO_3$)=1.5∶1，蜂王浆冻干粉添加量为 10%，甘露醇添加量为 10%，硬脂酸镁添加量为 0.8%，剩余为乳糖。以泡腾片的崩解时间及产气量为指标确定泡腾剂的添加量。

1.2.4　蜂王浆泡腾片配方的正交试验　根据单因素实验结果，以崩解时间、产气量作为评定指标，以泡腾剂添加量(A)、泡腾剂比例(B)及甜味剂添加量(C)为考察因素，进行 $L_9(3^4)$ 正交试验，因素水平见表 1。

1.2.5　具有放热性能的食品添加剂的考察

1.2.5.1　不同食品添加剂的选择　固定蜂王浆冻干粉添加量为 10%，泡腾剂添加量为 45%，泡腾剂比例(柠檬酸∶$NaHCO_3$)=1.5∶1，甘露醇添加量为 10%，罗汉果甜苷添加量为 1%，硬脂酸镁添加量为 0.8%，分别加入添加量为 10% 的乳酸钙和添加量为 10% 的

表 1 泡腾片配方优化正交试验设计

Table 1 Design of orthogonal tests for the formula optimization of effervescent

水平	因素		
	A泡腾剂添加量(%)	B泡腾剂比例	C甜味剂添加量(%)
1	40	2∶1	0.8
2	45	1.5∶1	1
3	50	1∶2	1.2

CMC-Na, 剩余以乳糖填充。以泡腾片中 10-HDA 的溶出率为指标进行考察筛选。

1.2.5.2 乳酸钙的添加量 固定蜂王浆冻干粉添加量为 10%, 泡腾剂添加量为 45%, 泡腾剂比例(柠檬酸∶$NaHCO_3$)=1.5∶1, 甘露醇添加量为 10%, 罗汉果甜苷添加量为 1%, 硬脂酸镁添加量为 0.8%, 选取乳酸钙添加量因素水平为 5%、8%、10%、12%、15%, 剩余以乳糖填充。以泡腾片中 10-HDA 的溶出率为指标进行考察筛选。

1.2.6 乳化剂的考察

1.2.6.1 不同乳化剂的选择 固定蜂王浆冻干粉添加量为 10%, 泡腾剂添加量为 45%, 泡腾剂比例(柠檬酸∶$NaHCO_3$)=1.5∶1, 甘露醇添加量为 10%, 罗汉果甜苷添加量为 1%, 硬脂酸镁添加量为 0.8%, 分别加入添加量为 0.5% 的 PGFEs、1% 的 DATEM 和 1% 的的 SEs, 剩余以乳糖填充。以泡腾片中 10-HDA 的溶出率为指标进行考察筛选。

1.2.6.2 聚甘油脂肪酸酯的添加量 固定蜂王浆冻干粉添加量为 10%, 泡腾剂添加量为 45%, 泡腾剂比例(柠檬酸∶$NaHCO_3$)=1.5∶1, 甘露醇添加量为 10%, 罗汉果甜苷添加量为 1%, 硬脂酸镁添加量为 0.8%, PGFEs 添加量因素水平为 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%, 剩余以乳糖填充。以泡腾片中 10-HDA 的溶出率为指标进行考察筛选。

1.2.7 蜂王浆泡腾片的表征

1.2.7.1 崩解时间的测定 按照《中国药典》片剂的崩解时限检查法。测定时, 取 6 个片剂置于吊篮玻璃管中, 于 37±1 ℃ 的恒温水, 按每分钟 30~32 次作上下移动, 观察崩解情况, 片剂完全通过筛网, 筛网上不应有残留颗粒, 记录崩解时间[21]。

1.2.7.2 产气量的测定 取 25 mL 具塞刻度试管, 精密加入 10 mL 水后, 25 ℃ 恒温水浴 5 min 后, 投入一片泡腾片, 闭塞 10 min, 观察并记录最大产气体积[22]。

1.2.8 10-HDA 累积溶出率的测定 取 6 片蜂王浆泡腾片于崩解仪中, 按照溶出度测定方法, 以 200 mL 水为介质, 分别在 1、3、5、10、15、20 min 取样 0.1 mL, 并补充水 0.1 mL, 将取出的样品用无水乙醇稀释至 10 mL, 混匀后静置 5 min, 然后 5000 r/min, 离心 15 min。取上清液, 于吸收波长处测定样品的吸光度, 计算 10-HDA 含量及溶出度[23−24]。

1.2.9 XRD 表征 将样品碾碎成粉末放入 XRD 薄膜池, 以 CuKα(λ=0.154 nm)作激发射线, 以 30°/min 的扫描速度将样品在 5°~60°(2θ 扫描角度范围)内扫描, 得到 X 射线衍射图谱[25]。

1.3 数据处理

实验数据均为 3 次重复实验结果的平均值, 结果表示为平均值及标准差。采用 Origin 9.1 软件作图, 正交设计助手 v3.1 进行正交试验数据处理, 采用 MDI Jade 6.5 软件计算结晶度。

2 结果与分析

2.1 蜂王浆泡腾片单因素实验

2.1.1 泡腾剂的添加量对泡腾片崩解时间及产气量的影响 如图 1 所示, 随着泡腾剂添加量的增加, 产气量逐渐增加, 蜂王浆泡腾片的崩解时间先减小后增大。与泡腾剂添加量为 40% 和 50% 相比, 当泡腾剂添加量为 45% 时, 显著缩短了崩解时间(P<0.05), 而当泡腾剂添加量为 30%、35%、40% 时, 其产气量显著低于泡腾剂添加量为 45% 的产气量(P<0.05)。增加泡腾片中泡腾剂的量可以缩短崩解时间, 这是可以预见的, 因为柠檬酸和 $NaHCO_3$ 之间的反应将通过产生二氧化碳气泡形式的泡腾, 帮助泡腾片快速崩解[12]。但是当泡腾剂添加量大于 45% 时, 泡腾片崩解时间反而延长。王文宝等[22] 在研究中也有类似发现, 当猴头菇泡腾片泡腾剂总量超过 45% 时, 泡腾片的崩解时间并没有缩短反而会延长。因此, 本实验确定泡腾剂的添加量为 45%。

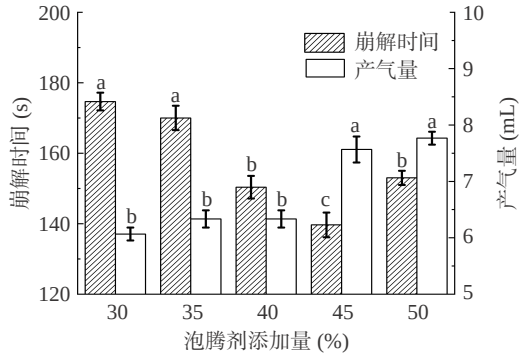


图 1 泡腾剂添加量对泡腾片的影响

Fig.1 Effect of effervescent agent on effervescent tablets

注: a、b、c 分别表示同一指标下的不同水平之间两两相比差异具有统计学意义, P<0.05; 图 2~图 3 同。

2.1.2 泡腾剂比例对泡腾片崩解时间及产气量的影响 从图 2 可以看到随着柠檬酸添加比例的减少, 泡腾片崩解时间逐渐变大, 产气量也越来越少。泡腾剂比例处于 1∶1.5 时的崩解时间显著低于泡腾剂比例为 1∶2 的崩解时间(P<0.05); 与泡腾剂比例为 1∶1.5 相比, 泡腾比例为 1.5∶1 也显著缩短了崩解时间(P<0.05); 同时, 当泡腾剂比例为 1∶1.5 时, 产气量也显著低于泡腾剂比例为 2.5∶1、2∶1、1.5∶1 的产气量(P<0.05)。但是柠檬酸容易吸湿, 使用量过多时,

泡腾片在制备过程中容易黏冲，不易成型，成型后的泡腾片表面色泽不均[26]。当泡腾剂比例（柠檬酸∶$NaHCO_3$）达到 1.5∶1 时，泡腾片产气效果好，崩解时间较短。故综合考虑后，本实验确定泡腾剂比例（柠檬酸:$NaHCO_3$）为 1.5∶1。

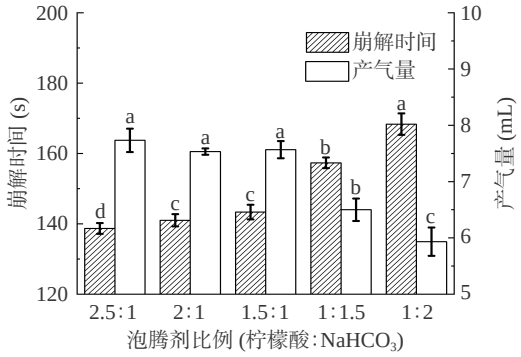


图 2　泡腾剂比例对泡腾片的影响

Fig.2　Effect of effervescent agent ratio on effervescent tablets

2.1.3　甜味剂的添加量对泡腾片崩解时间及产气量的影响　从图 3 可以明显看到，甜味剂的改变对于蜂王浆泡腾片的崩解时间、产气量并没有较明显的影响，其中崩解时间及产气量差异无统计学意义（P>0.05），但是当罗汉果甜苷加入较少时，泡腾片过酸，无法掩盖蜂王浆酸涩口感，加入较多泡腾片过于甜腻，在其添加量为 1% 时，可获得最适宜的口感。因此，本实验确定甜味剂罗汉果甜苷的添加量为 1%。

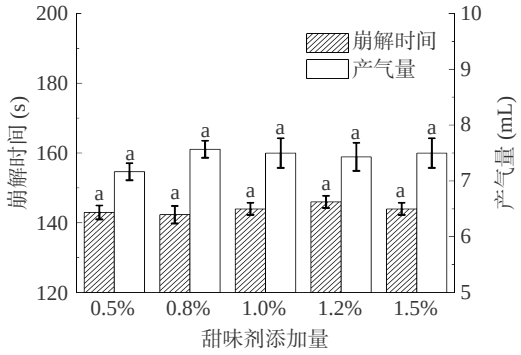


图 3　甜味剂添加量对泡腾片的影响

Fig.3　Effect of sweetener addition on effervescent tablets

2.2　泡腾片配方优化正交试验结果

2.2.1　正交试验结果与分析　结果见表 2~表 4。分析结果可知，各因素对泡腾片崩解时间及产气量影响的主次顺序为 B>A>C。其中，泡腾剂添加量（A）和泡腾剂比例（B）对泡腾片崩解时间及产气量的影响显著，结合直观分析结果选取 A_2、B_2 水平，甜味剂添加量（C）水平任选。为了保证泡腾片口感较好，选定 C_2 水平。最终确定蜂王浆泡腾片的最佳配方为 $A_2B_2C_2$，即泡腾剂添加量 45%，泡腾剂比例为 1.5∶1，甜味剂添加量为 1%。

2.2.2　验证试验　按照最佳配方进行验证试验，平行 3 次，并测定其崩解时间、产气量。结果见表 5。

表 2　正交试验结果

Table 2　Results of orthogonal test

编号	A	B	C	空白	指标	
					崩解时间(s)	产气量(mL)
1	1	1	1	1	150.3	6.3
2	1	2	2	2	155.3	6.1
3	1	3	3	3	174.0	5.1
4	2	1	2	3	146.6	7.2
5	2	2	3	1	146.0	7.4
6	2	3	1	2	168.3	5.7
7	3	1	3	2	164.7	7.1
8	3	2	1	3	160.0	7.2
9	3	3	2	1	174.3	6.0

表 3　崩解时间分析结果

Table 3　Disintegration time analysis results

因素	k_1	k_2	k_3	R	SS	F比	显著性
A	159.867	153.633	166.333	12.7	241.962	7.41	**
B	153.867	153.767	172.2	18.433	675.909	20.698	**
C	159.533	158.733	161.567	2.834	12.802	0.392	
误差					65.31		

注:**表示差异显著（P<0.05）；表4同。

表 4　产气量分析结果

Table 4　Gas production analysis results

因素	k_1	k_2	k_3	R	SS	F比	显著性
A	5.833	6.767	6.767	0.934	1.742	24.028	**
B	6.867	6.9	5.6	1.3	3.296	45.462	**
C	6.4	6.433	6.533	0.133	0.029	0.4	
误差					0.14		

表 5　验证试验结果

Table 5　Verify the results of the experiment

批次	崩解时间(s)	产气量(mL)
1	145.3	7.9
2	142.3	8.1
3	145.7	8.2

该结果表明采用最佳配方制备的泡腾片，崩解时间快，且产气量较高，条件稳定，重现性好。

2.3　食品添加剂的考察

2.3.1　不同食品添加剂对 10-HDA 溶出的影响　如图 4 所示，明显看出蜂王浆泡腾片中 10-HDA 的累积溶出率高于普通蜂王浆片，加入这两种食品添加剂后，10-HDA 的溶出度有了一定的改善。这是因为，在溶解释放系统中，主要是通过扩散来控制 10-HDA 的释放，最初是从泡腾片的表面突然释放，随后是源于泡腾片内部更深处的释放，所以不同蜂王浆片前期 10-HDA 的溶出率并没有较大差异，主要取决于后期的溶出。这对于普通泡腾片来说，溶出速率会大大降低。而加入这两种食品添加剂后，促使更多 10-HDA 小分子溶解。也有研究表明，温度的升高加剧了各分子运动的速度和程度，对难溶物的溶解度有促进作用[27−28]。但是，可以看出乳酸钙要比 CMC-Na 的增溶效果更好，这是因为 CMC-Na 在溶解过程

中会产生局部凝胶[29]，凝胶的存在会将 10-HDA 分子包裹，反而降低了其溶出率。因此，本实验确定通过加入一定量的乳酸钙来改善蜂王浆泡腾片中 10-HDA 的溶出率。

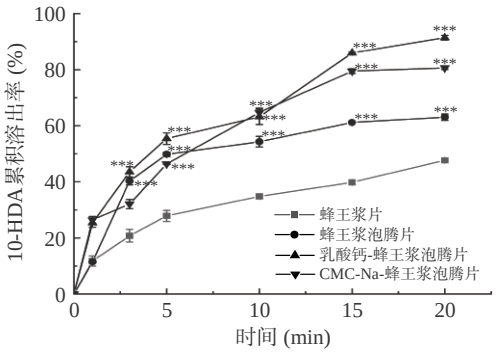


图 4 不同食品添加剂对蜂王浆泡腾片 10-HDA 溶出率的影响

Fig.4 Effects of different food additives on the dissolution rate of 10-HDA in royal jelly effervescent tablets

注：与蜂王浆片比较，**P<0.05 表示差异显著；***P<0.01 表示差异极显著。

2.3.2 乳酸钙的添加量对 10-HDA 溶出的影响 在水中加入不同量的乳酸钙，水的温差变化见表 6，乳酸钙在水中溶解的过程中会发生水合作用[30]，在这一过程会释放大量的热量[31]。由图 5 可知，在所有乳酸钙的添加范围内，明显增强了蜂王浆泡腾片中 10-HDA 的累积溶出率，且随乳酸钙添加量的增加 10-HDA 溶出率越大。乳酸钙用量越大，温度的升高就越多，其增溶效果越明显。但在食品中，乳酸钙常用作一种补钙剂，在水中溶解度较小，用量过多的话，不利于泡腾片的口感以及溶解效果，不适合大量使用。因此，将乳酸钙的添加量控制在 10%~15% 左右。

表 6 加入不同量乳酸钙的水溶液温差变化

Table 6 Changes in temperature difference of aqueous solutions with different amounts of calcium lactate

乳酸钙添加量(g)	0.1	0.5	1	1.5
温差(℃)	1	1.2	3	4.7

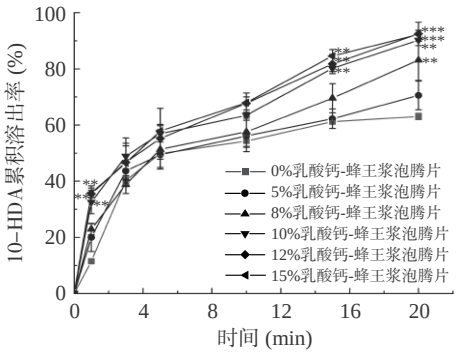


图 5 不同乳酸钙添加量对蜂王浆泡腾片 10-HDA 溶出率的影响

Fig.5 Effects of different calcium lactate addition on the dissolution rate of 10-HDA in royal jelly effervescent tablets

注：与 0% 乳酸钙-蜂王浆泡腾片比较，**P<0.05 表示差异显著；***P<0.01 表示差异极显著。

2.4 乳化剂的考察

2.4.1 不同乳化剂对 10-HDA 溶出的影响 如图 6，在蜂王浆泡腾片中加入乳化剂后明显提高了 10-HDA 的溶出度。这是因为，乳化剂是一种两亲性的物质，对油或水具有亲和力。乳化剂的结构中含有羟基等亲水性自由基，这类自由基与水相互作用后，会降低泡腾片与水接触表面的张力，帮助更多的水保留在泡腾片内部[32]。同时，也有研究表明，在乳化过程中，乳化剂通过胶束增溶作用直接与难溶性物质相互作用，从而提高了难溶成分溶解性[33]。另外，图 6 中可以明显看出，三种乳化剂中 PGFEs 相比与于 DATEM 和 SEs 的增溶效果更好一些，这可能是因为 PGFEs 具有更多的亲水性羟基，所以表现出更好的乳化作用[34]。因此，本实验确定以添加 PGFEs 的方式来改善蜂王浆泡腾片中 10-HDA 的溶出率。

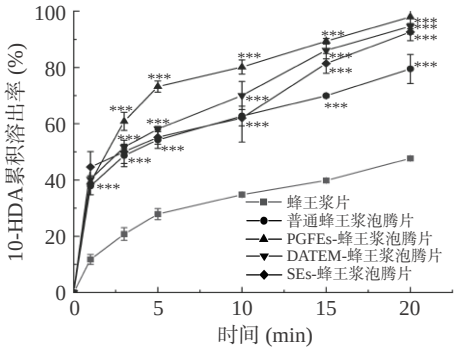


图 6 不同乳化剂对蜂王浆泡腾片 10-HDA 溶出率的影响

Fig.6 Effects of different emulsifiers on the dissolution rate of 10-HDA in royal jelly effervescent tablets

注：与蜂王浆片比较，**P<0.05 表示差异显著；***P<0.01 表示差异极显著。

2.4.2 PGFEs 的添加量对 10-HDA 溶出的影响 由图 7 可知，蜂王浆泡腾片中 10-HDA 累积溶出率的大小依赖于 PGFEs 的使用量。PGFEs 具有优异的乳化效果，在所有 PGFEs 添加量下，都增强了蜂王浆泡腾片中 10-HDA 的溶出率。在 PGFEs 添加量为 0.5% 时，蜂王浆泡腾片表现出最佳 10-HDA 的溶出

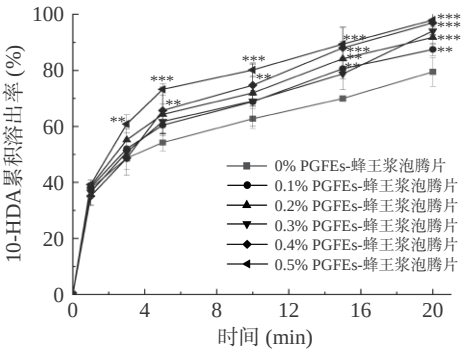


图 7 PGFEs 添加量对蜂王浆泡腾片 10-HDA 溶出率的影响

Fig.7 Effect of PGFEs addition on 10-HDA dissolution rate of royal jelly effervescent tablets

注：与 0% PGFEs-蜂王浆泡腾片比较，**P<0.05 表示差异显著；***P<0.01 表示差异极显著。

效果。

2.5　XRD 表征

通常，结晶度高的样品显示出一系列尖且窄的衍射峰，而那些没有明显衍射峰的样品则认为是无定形产物。从图 8 中明显看出，蜂王浆泡腾片衍射图谱中有很多的特征峰，并且峰面窄。三种蜂王浆泡腾片的结晶度都比较高，尤其是蜂王浆泡腾片的结晶度高达 53.38%。而加入 PGFEs 的蜂王浆泡腾片结晶度略低，可能是因为 PGFEs 具有优异的乳化效果和结晶调节能力[34]。但是，通过测定不同配方蜂王浆泡腾片中 10-HDA 的溶出率，结果表明在泡腾片中高结晶度对 10-HDA 的溶出率影响并不大。

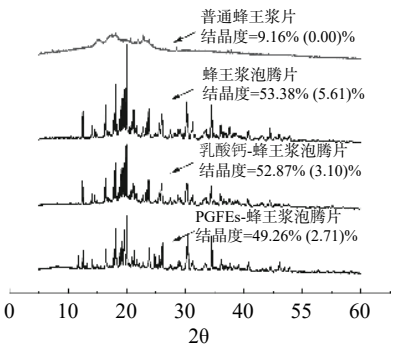


图 8　不同蜂王浆片的 XRD 图

Fig.8　XRD patterns of different royal jelly tablets

3　结论

本文通过单因素和正交试验得到高 10-HDA 溶出率的蜂王浆泡腾片最佳配方，在此配方中泡腾剂质量比(柠檬酸:$NaHCO_3$)为 1.5∶1 时，泡腾片崩解时间最短。在此基础上以添加乳酸钙溶解放热和乳化剂增加表面活性为策略，促进 10-HDA 的溶出。结果表明在配方中分别加入 15% 的乳酸钙或 0.5% 的 PGFEs，得到的蜂王浆泡腾片中 10-HDA 的累计溶出率在 15 min 左右均可以达到 85% 以上。相对于空白组普通蜂王浆泡腾片中 10-HDA 69% 的溶出率来说，采用本研究策略制备的蜂王浆泡腾片表现出更高的 10-HDA 溶出程度。这为如何提高蜂王浆相关产品中 10-HDA 溶出率提供了数据参考。

参考文献

[1] GUO J Y, WANG Z X, CHEN Y X, et al. Active components and biological functions of royal jelly[J]. Journal of Functional Foods, 2021, 82: 104514.

[2] KOCOT J, KIELCZYKOWSKA M, LUCHOWSKA-KOCOT D, et al. Antioxidant potential of propolis, bee pollen, and royal jelly: Possible medical application[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2018: 7074209.

[3] FAN P, HAN B, HU H, et al. Proteome of thymus and spleen reveals that 10-hydroxydec-2-enoic acid could enhance immunity in mice[J]. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2020, 24(3): 267−279.

[4] ESLAMI-KALIJI F, SARAFBIDABAD M, KIANI-ESFAHANI A, et al. 10-hydroxy-2-decenoic acid a bio-immunomodulator in tissue engineering; generates tolerogenic dendritic cells by blocking the toll-like receptor4[J]. Journal of Biomedical Materials Research. Part A, 2021, 109(9): 1575−1587.

[5] LIN X M, LIU S B, LUO Y H, et al. 10-HDA induces ROS-mediated apoptosis in A549 human lung cancer cells by regulating the MAPK, STAT3, NF-κB, and TGF-β1 signaling pathways[J]. BioMed Research International, 2020(2): 1−15.

[6] YANG Y C, CHOU W M, WIDOWATI D A, et al. 10-hydroxy-2-decenoic acid of royal jelly exhibits bactericide and anti-inflammatory activity in human colon cancer cells[J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2018, 18(1): 202.

[7] YOU M M, MIAO Z N, TIAN J, et al. Trans 10-hydroxy-2-decenoic acid protects against LPS-induced neuroinflammation through FOXO1-mediated activation of autophagy[J]. European Journal of Nutrition, 2020, 59(7): 2875−2892.

[8] 陶文卿. 10-HDA 对大肠杆菌抑制机理的研究 [D]. 济南: 山东轻工业学院, 2012. [TAO W Q. Study on inhibition mechanism of 10-HDA to *E. coli*[D]. Jinan: Shandong Institute of Light Industry, 2012.]

[9] JAMAR A, SHAMSUL A M, MOHD T S. Frictional effects, mechanical strength, and disintegration of coffee mix tablet, effervescent coffee mix tablet and with added lubricant[J]. Particulate Science and Technology, 2019(3): 1−6.

[10] ELSAMALIGY S, BODMEIER R. Development of extended release multiple unit effervescent floating drug delivery systems for drugs with different solubilities[J]. Journal of Drug Delivery Science & Technology, 2015, 30: 467−477.

[11] IQBAL N, AGRAWAL A, KUMAR J. An effervescent generated tablet for rapid control of mosquito problem in early stages from different breeding sites[J]. Arabian Journal of Chemistry, 2021, 14(1): 103082.

[12] BANSAL S, BEG S, GARG B, et al. QbD-oriented development and characterization of effervescent floating-bioadhesive tablets of cefuroxime axetil[J]. AAPS PharmSciTech, 2016, 17(5): 1086−1099.

[13] CHOIRI S, SULAIMAN T N S, ROHMAN A. Assessment of the effect of polymers combination and effervescent component on the drug release of swellable gastro-floating tablet formulation through compartmental modeling-based approach[J]. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2020, 46(1): 146−158.

[14] 谭亚南. 功能性修饰糖脂纳米给药系统线粒体靶向与敏感释放的抗肿瘤研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2019. [TAN Y N. Mitochondrial targeting and responsive drug release mediated cancer therapy by functional modified glycolipid-like drug delivery system[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2019.]

[15] 贾利娜. 基于分子模拟方法丙磺舒药物固液相平衡研究 [D]. 北京: 北京化工大学, 2018. [JIA L N. Study on solid-liquid phase equilibrium of probenecid based on molecular simulation[D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2018.]

[16] ALAMA T, KUSAMORI K, MORISHITA M, et al. Mechanistic studies on the absorption-enhancing effects of gemini surfactant on the intestinal absorption of poorly absorbed hydrophilic drugs in rats[J]. Pharmaceutics, 2019, 11(4): 170.

[17] HAYES D G. 可持续生产再生资源表面活性剂的国际研究进展[J]. 粮油食品科技, 2020, 28(5): 31−40. [HAYES D G. The global research progress on sustainable production of surfactants from renewable resources[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2020, 28(5): 31−40.]
[18] 张金彦, 匡雯婕, 吉绍长, 等. 拉莫三嗪-邻苯二甲酰亚胺药物共晶在有机溶剂中溶解度及三元相图测定[J]. 化工学报, 2019, 70(11): 4153−4161. [ZHANG J Y, KUANG W J, JI S C, et al. Determination of solubility and ternary phase diagram of lamotrigine-phthalimide pharmaceutical cocrystal in pure solvent[J]. CIESC Journal, 2019, 70(11): 4153−4161.]
[19] SARAF A, SHARMA S, SACHAR S. Evaluation of surfactants as solubilizing medium for levofloxacin[J]. Journal of Molecular Liquids, 2020, 319: 114060.
[20] 王艺萌, 国佳鑫, 孔庆新, 等. 荔枝草泡腾片的制备工艺及质量评价[J]. 食品工业科技, 2019, 40(2): 165−169. [WANG Y M, GUO J X, KONG Q X, et al. Preparation technology and quality evaluation of *Salvia plebeia* R. Br. effervescent tablets[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(2): 165−169.]
[21] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典 (四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 118−120. [Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (Volume IV)[M]. Beijing: China Pharmaceutical Science and Technology Press, 2015: 118−120.]
[22] 王文宝, 杨俊涛, 毛讯, 等. 猴头菇水提取物泡腾片的制备工艺[J]. 食品工业, 2021, 42(5): 139−142. [WANG W B, YANG J T, MAO X, et al. Preparation of effervescent tablets of *Hericium erinaceus* water extract[J]. Food Industry, 2021, 42(5): 139−142.]
[23] 徐焰, 李柏林, 程明, 等. 10-羟基-2-癸烯酸的紫外分光光度法快速测定的研究[J]. 上海水产大学学报, 2004(1): 84−87. [XU Y, LI B L, CHENG M, et al. Study on the rapid determination of 10-hydroxy-2-decenoic acid by ultraviolet spectrophotometry[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2004(1): 84−87.]
[24] 柴宝丽, 王双侠. 粉末直接压片法制备布洛芬分散片[J]. 哈尔滨商业大学学报 (自然科学版), 2020, 36(2): 137−141. [CHAI B L, WANG S X. Preparation of ibuprofen dispersible tablets by direct powder compression[J]. Journal of Harbin University of Commerce (Natural Science Edition), 2020, 36(2): 137−141.]
[25] YUSRIADI Y, SULASTRI E, LEMBANG N P. Synthesis of type a zeolite from rice husk ash and its application as a builder on effervescent tablet form detergent[J]. Tenside Surfactants Detergents, 2020, 57(3): 203−210.
[26] 姚洪礼, 邢爽, 丁之恩, 等. 响应面设计法优化甘草山楂泡腾片配方的研究[J]. 宿州学院学报, 2021, 36(3): 41−46. [YAO H L, XING S, DING Z E, et al. Optimization of the formula of licorice and hawthorn effervescent tablets using Box-Behnken surface response design[J]. Journal of Suzhou University, 2021, 36(3): 41−46.]
[27] BASALEH S, BISHARAT L, CESPI M, et al. Temperature: An overlooked factor in tablet disintegration[J]. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2020: 151.
[28] 李晓溪. 抗天花病毒创新药物特考韦瑞三元组合物及其增溶机制的研究 [D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2016. [LI X X. The design, evaluation and mechanism study of ternary complex of tecovirimat, a novel anti-samllpox drug[D]. Beijing: PLA Academy of Military Medical Sciences, 2016.]
[29] 孟天宇, 刘英丹, 娄永江. 长效二氧化氯缓释剂的制备[J]. 食品工业科技, 2020, 41(16): 26−31. [MENG T Y, LIU Y D, LOU Y J. Preparation of sustained-release agent of long-acting chlorine dioxide[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(16): 26−31.]
[30] SAKATA Y, SHIRAISHI S, OTSUKA M. Characterization of dehydration and hydration behavior of calcium lactate pentahydrate and its anhydrate[J]. Colloids & Surfaces B Biointerfaces, 2005, 46(3): 135−141.
[31] 张雪龄, 雷旭东, 王菲菲, 等. 水合无机盐热化学储热材料及技术研究进展[J]. 化工新型材料, 2021, 49(8): 6−11. [ZHANG X L, LEI X D, WANG F F, et al. Research progress on hydrated salt thermochemical heat storage materials and technology [J]. New Chemical Materials, 2021, 49(8): 6−11.]
[32] LIAN H, PENG Y, SHI J Y, et al. Effect of emulsifier hydrophilic-lipophilic balance (HLB) on the release of thyme essential oil from chitosan films[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 97: 105213.
[33] ANUAR N, SABRI A H, EFFENDI T J B, et al. Development and characterisation of ibuprofen-loaded nanoemulsion with enhanced oral bioavailability[J]. Heliyon, 2020, 6(7): e04570.
[34] PENG B, XIONG C Y, HUANG Y, et al. Study on enzymatic synthesis of polyglycerol fatty acid esters and its application as an emulsion stabilizer[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(30): 8104−8113.

古丽乃再尔·斯热依力, 黄文书, 阿丽旦·苏力唐麦麦提, 等. 响应面法优化洋葱浆馕中复配防腐剂的配方 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 283−292. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100313

Gulnazar Sireyil, HUANG Wenshu, Alida Sultanmamat, et al. Optimization of the Formulation of Compound Preservatives in Onion Paste Nang by Response Surface Methodology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 283−292. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100313

· 食品添加剂 ·

响应面法优化洋葱浆馕中复配防腐剂的配方

古丽乃再尔·斯热依力[1,2], 黄文书[1,2,*], 阿丽旦·苏力唐麦麦提[1], 冯作山[1,2], 阿衣古丽·阿力木[1,2,*]

（1.新疆农业大学食品科学与药学学院, 新疆乌鲁木齐 830052;
2.新疆果品采后科学与技术重点实验室, 新疆乌鲁木齐 830052）

摘　要: 本实验研究一种延长洋葱浆馕贮藏期的复合防腐剂。以菌落总数和 pH 为指标，在不同防腐剂单因素实验的基础上，选取 3 种具有显著良性变化的防腐剂进行以菌落总数为响应值的响应面试验。结果表明：单因素效应及方差分析显示，3 个因素的影响主次顺序为：外控型保鲜剂>脱氢乙酸钠>双乙酸钠。双乙酸钠与脱氢乙酸钠的交互作用和双乙酸钠与外控型保鲜剂交互作用均存在协同增效效应，且后者增效效应强于前者，但脱氢乙酸钠和外控型保鲜剂间无协同增效作用；复合防腐剂最优配方为双乙酸钠添加量 1.06 g/kg、外控型保鲜剂添加量 1.33 片/200 g、脱氢乙酸钠添加量 0.16 g/kg，以此配方制备的洋葱浆馕在室温（27~30 ℃）贮藏 6 d 后，洋葱浆馕的菌落总数为 (2.61±0.02) lg CFU/g，贮藏期限可达 23 d，说明该复合防腐剂能够明显改善洋葱浆馕的抑菌作用，对延长洋葱浆馕的货架期有重要意义。

关键词: 复合防腐剂, 外控型保鲜剂, 洋葱浆馕, 菌落总数

中图分类号: TS202.3　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0283−10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100313

本文网刊:

Optimization of the Formulation of Compound Preservatives in Onion Paste Nang by Response Surface Methodology

Gulnazar Sireyil[1,2], HUANG Wenshu[1,2,*], Alida Sultanmamat[1], FENG Zuoshan[1,2], Aygul Alim[1,2,*]

（1.College of Food Science and Pharmacy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China;
2.Xinjiang Key Laboratory of Postharvest Science and Technology of Fruit, Urumqi 830052, China）

Abstract: A compound preservative for prolonging the storage period of onion paste Nang was studied. Picking up the total number of colonies and pH as indicators, based on the single factor test of different preservatives. Three preservatives with significant benign changes were chosen for the response surface test with the total number of colonies as the response value. The sole factor effect and analysis of variance showed that the primary and secondary order of the three factors was: External control preservative>sodium dehydrogenate>sodium diacetate. The interaction between sodium diacetate and sodium dehydrogenate and the interaction between sodium diacetate and external control preservative had synergistic effect, and the synergistic effect of the latter was stronger than the former, but there was no synergistic effect between sodium dehydrogenate and external control preservative. The optimum formula of compound preservative was sodium diacetate 1.06 g/kg, external control preservative 1.33 tablets/200 g and sodium dehydrogenate 0.16 g/kg. After storage for 6 days at room temperature (27~30 ℃), the total number of colonies of onion pulp Nang was (2.61±0.02) lg CFU/g, and the storage life could reach 23 days. The results showed that the compound preservative could significantly improve the antibacterial effect of onion paste Nang and it was of great significance to prolong the shelf life of onion paste Nang.

Key words: compound preservative; externally controlled preservative; onion paste Nang; total number of colonies

收稿日期: 2021−11−01

基金项目: “科创中国@新疆”示范项目“乌鲁木齐馕产业品质安全提升建设方案”。

作者简介: 古丽乃再尔·斯热依力（1997−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 农产品加工与综合利用, E-mail: 3044721060@qq.com。

*** 通信作者:** 黄文书（1975−）, 女, 博士, 教授, 研究方向: 农产品加工, E-mail: xjnd-hws@126.com。

阿衣古丽·阿力木（1985−）, 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食品风味化学, E-mail: aygulalim@sina.com。

馕一般是以小麦面粉, 玉米面粉或高粱面粉为原料, 再加少许盐、水和酵母, 发酵后将面团擀制饼状馕胚, 并用馕针在馕胚印上特殊花纹, 撒上芝麻, 贴在馕坑坑壁上烘烤而成的圆形烤饼, 其具有色泽金黄, 酥脆可口等特点[1]。但由于馕的营养价值较丰富、水分含量较高, 使其容易发霉变质, 货架期缩短。尤其是在夏秋季高温高湿条件下, 馕在 6~7 d 内就会长霉, 失去食用价值和商业价值, 通过添加食品防腐剂可以延长馕的货架期[2]。

目前, 大部分食品防腐剂属于化学防腐剂, 有一定的毒性, 在食品中过量或者长期使用会对人体的健康造成一定的损害[3−4]。使用单一防腐剂防腐效果有限, 多种防腐剂的复配可以起到协同增效的作用[5]。目前有关面制品防腐剂的研究主要集中在山梨酸钾、脱氢醋酸钠、丙酸钙、双乙酸钠、纳他霉素等[6−8], 由于不同防腐剂对微生物作用效果不同, 当几种复配使用时, 在抑菌效果可互补, 起到协同增效作用。张攀先等[9] 研究了常用化学防腐剂脱氢乙酸钠、丙酸钠和乳酸链球菌素对蛋糕的抑菌效果, 并发现乳酸链球菌素、脱氢乙酸钠、丙酸钠添加量分别为 0.2、0.25、0.3 g/kg 时能够有效的抑制蛋糕中微生物的生长繁殖。李柯欣研究发现, 纳他霉素和山梨酸钾的复配使用时, 能很好的抑制细菌真菌的生长, 可使月饼货架期延长至 60 d 以上[10]。覃平[11] 研究发现, 纳他霉素浓度 0.4 g/kg 和山梨酸钾 8 g/kg 复配使用时, 对真菌细菌都有明显的抑制作用, 并对焙烤食品有最好的防腐效果。邵源[12] 通过单因素和正交实验发现, 脱氢乙酸钠质量分数 0.015%, 丙酸钙质量分数 0.1%, 抗坏血酸质量分数 0.18% 时, 馒头的货架期能延长至 80 h。而双乙酸钠[13]、脱氢乙酸钠[14−15] 和外控型保鲜剂的复配未见报道。

本实验研究不同食品防腐剂和外控型保鲜剂对洋葱浆馕菌落总数和 pH 的影响, 对洋葱浆馕复合防腐剂进行优化, 得到复配防腐剂的配方, 为开发产品复配防腐剂的选择和添加量的优化提供一定的参考, 为延长馕的货架期为提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

天山牌小麦粉　新疆天山面粉有限责任公司; 加碘精制盐　新疆盐湖制盐有限责任公司; 纯正白糖　乌鲁木齐市同得利商贸有限公司; 燕子即发酵母　乐斯福明光有限公司; 菜籽油　中粮昌吉粮油工业有限公司; 白皮圆葱、PP/PET 包装袋　市售; 山梨酸钾、丙酸钙、脱氢乙酸钠(均食品级)　浙江一诺生物科技有限公司; 双乙酸钠(食品级)　英博生物科技有限公司; 外控型保鲜剂　广东广益科技实业有限公司; 氯化钠(分析纯)　天津市致远化学试剂有限公司; 平板计数琼脂(PCA)、孟加拉红琼脂　青岛高科技工业园海博生物技术有限公司。

TP-A500 型电子分析天平　福州华志科学仪器有限公司; LLJ-B12C8 型打浆机　小熊电器股份有限公司; H20F 立式双速和面机　广东力丰机制造有限公司; 电馕坑　新疆想象环保科技公司; ME204/02 型电子分析天平、FE20 型实验室 pH 计　上海市梅特勒-托利多仪器有限公司; 真空封口机　永康市诺邦富贸易有限公司; JH-SCA 型净化工作台、MHP-250 型智能霉菌培养箱　上海鸿都电子科技有限公司; XMTD-4000 型电热恒温水浴锅　北京市永光明医疗仪器厂; DHP-9162 型电热恒温培养箱　上海一恒科学仪器有限公司; LDZX-50KB 型高压蒸汽灭菌锅　上海申安医疗器械厂。

1.2 实验方法

1.2.1 洋葱浆馕的工艺流程及操作要点　洋葱浆馕的制作基本配方为小麦粉 1000 g, 食盐 18 g, 白糖 30g, 酵母 5 g, 植物油 24 g, 洋葱浆 270 g, 温水 300 g。

馕的工艺流程: 原料→活化酵母→面团制作→醒发→面团分割→揉匀滚圆→醒发滚圆→成型(馕坯)→印花纹(打馕针)→烘烤→冷却和包装。

操作要点: a.洋葱浆制备: 将洋葱去皮, 洗净, 切片, 用打浆机来打浆, 备用; b.原料: 将小麦面粉, 食盐, 白砂糖, 酵母, 植物油, 洋葱浆, 水和改良剂准确称取; c.活化酵母: 将酵母加入 30 ℃ 温水中活化; d.面团制作: 按照基本配方将小麦粉、食盐、白砂糖混合加入和面机中均匀搅拌。然后将活化好的酵母溶液、植物油、洋葱浆和水加入到和面机, 并搅拌至面团揉出筋膜为止; e.醒发: 待面团软硬适度, 将其放在室温中(28~30 ℃), 持续 2 h。待其发酵至原体积 2 倍时取出; f.面团分割: 面团醒发好后, 取出排气, 面团分割成自己需要的重量; g.揉匀滚圆: 反复多次搓揉面团, 排出发酵产生的气体、揉匀、揉透、至表面光滑。在揉面时讲究揉匀, 这种馕吃起来才有劲, 也不会松散; h.醒发滚圆: 将揉搓成的面团滚圆在面板上, 并盖保鲜膜, 放温暖处发酵 30 min; i.成型: 先用擀面杖将发酵面团擀压成圆饼状, 然后用手抻成中间薄四周厚的形状, 可以根据需求做不同形状馕坯; j.印花纹: 用馕针在馕坯上打出均匀的花纹, 戳花纹在入馕坑前, 要戳透, 不然馕坯在馕坑里会鼓起来; k.烘烤: 先将电馕坑提前预热至 200 ℃。然后成型的馕坯放入电馕坑中烤制 10~15 min; l.冷却和包装: 馕烘烤完毕, 冷却 2 h, 即可包装成品。

1.2.2 馕样处理　根据查阅相关文献, 本试验共选取了山梨酸钾、双乙酸钠、丙酸钙、脱氢乙酸钠 4 种食品防腐剂和 1 种外控型保鲜剂这 5 种处理组用于洋葱浆馕的防腐保鲜。4 种不同添加量的防腐剂分别称取(以面粉为基准, 全文同), 并加入到和面用水中, 按照 1.2.1 的方法烤制成洋葱浆馕, 外控型保鲜剂则采用直接添加的方式。以上 5 组馕样品烤制成的馕置于使用 75% 酒精擦拭的工作台上, 冷却 2 h, 最后

装到在超净工作台中紫外照射 30 min 的 PP/PET 包装袋，每袋装一个完整的洋葱浆馕(200±20 g)，分装结束后使用自动封口机来进行包装(包装时用 75% 精棉擦拭包装口)，以未加任何食品防腐剂的馕为对照。馕放置于 27~30 ℃ 的条件下贮藏 5 d 后进行测定菌落总数，重复 3 次，结果取平均值。

1.2.3　微生物的测定　洋葱浆馕菌落总数测定：参照 GB 4789.2-2016《食品安全国家标准食品微生物学检验菌落总数测定》[16] 进行测定。

洋葱浆馕霉菌计数：参照 GB 4789.15-2016《食品安全国家标准食品微生物学检验霉菌和酵母计数》[17] 进行测定。

1.2.4　洋葱浆馕 pH 的测定　参考周文利[18] 的方法进行测定，将洋葱浆馕磨碎后混合均匀，然后称取 10 g 馕样品置于 90 mL 新煮沸并冷却的蒸馏水中，充分搅拌 5 min 使其均匀混合，静置 10 min 后测定其 pH。

1.2.5　单因素实验　根据查阅相关文献，本试验选取了山梨酸钾、双乙酸钠、丙酸钙、脱氢乙酸钠这 4 种食品防腐剂和酒精片用于洋葱浆馕的防腐保鲜，以菌落总数和 pH 为评价指标，各防腐剂的浓度分别按国标限量的 0%、20%、40%、60%、80%、100%(不添加其他食品防腐剂)和保鲜卡添加量 1~2 片/200 g 添加，所制备洋葱浆馕在室温(25±2 ℃)贮藏 6 d 后，检测洋葱浆馕的菌落总数和 pH。

1.2.6　复合防腐剂配方优选响应面试验设计　在单因素实验的基础上，以双乙酸钠(A)、脱氢乙酸钠(B)和保鲜卡(C)三种防腐剂进行复合防腐剂的配方。我国规定面包、糕点中双乙酸钠最大使用量为 4 g/kg(占限量 100%)，脱氢乙酸钠最大使用量为 0.5 g/kg(占限量 100%)，保鲜卡不限量[19]；同一功能食品添加剂在混合使用时，各自用量占其最大使用量的比例之和不应超过 1[19]。依据上述原则，设定双乙酸钠和脱氢乙酸钠用量的高水平分别为 2 和 0.25 g/kg(均为占限量 50%)，依据预实验结果设定保鲜卡高水平为 2 片/200 g，进行 Box-Behnken 试验设计，以菌落总数为响应值，优选复合防腐剂配方。响应面试验设计因素与水平见表 1。

表 1　响应面试验设计因素与水平

Table 1　Response surface test design factors and levels

水平	因素		
	A双乙酸钠(g/kg)	B脱氢乙酸钠(g/kg)	C酒精片(片/200 g)
−1	0	0	0
0	1	0.125	1
1	2	0.25	2

1.3　数据处理

采用 Excel、Origin 2019b、SPSS 20.0、Design-Expert.V8.0.6.1 等软件对数据进行处理、作图、显著性分析与统计处理、响应面分析。

2　结果与分析

2.1　不同防腐剂对洋葱浆馕菌落总数及 pH 的影响

2.1.1　不同添加量的山梨酸钾对洋葱浆馕菌落总数及 pH 的影响　山梨酸钾是结晶粉末，无色，属于酸性食品防腐剂，易溶于乙醇，并难溶于水，属于一种毒性最低的防腐剂[19−20]。山梨酸钾在 pH5~6 的环境中抑菌防腐效果更佳。虽然它的溶解性比较好，但价格是比较高。因此，当山梨酸钾应用时，还需要综合考虑其价格[21−22]。不同添加量的山梨酸钾对洋葱浆馕菌落总数和 pH 的影响见图 1。

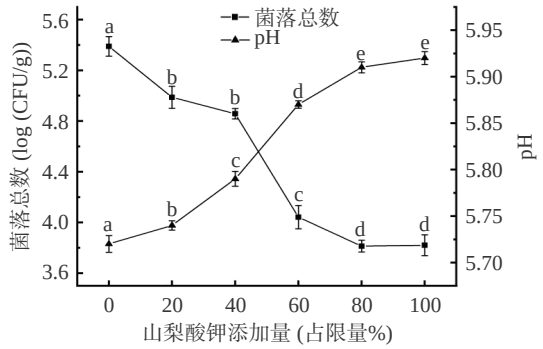


图 1　不同添加量的山梨酸钾对洋葱浆馕菌落总数和 pH 的影响

Fig.1　Effects of different amounts of potassium sorbate on the total number of colonies and pH of onion pulp Nang

注：不同字母表示差异显著(P<0.05)，相同字母表示差异不显著(P>0.05)；图 3、图 5、图 7、图 9 同。

由图 1 可知，随着山梨酸钾添加量的增大，洋葱浆馕的 pH 呈显著上升的趋势(P<0.05)，其原因可能是山梨酸钾的水溶液偏碱性，山梨酸钾的添加量增大导致浓度的增大，从而产品的 pH 呈升高的趋势。当山梨酸钾的添加量为限量的 80% 和 100% 时，洋葱浆馕的 pH 差异不显著(P>0.05)；随着山梨酸钾添加量的增大，洋葱浆馕的菌落总数呈降低的趋势(P<0.05)，其抑菌机理是山梨酸钾能抑制柠檬酸循环中的某些酶的活力，也会干扰细胞壁、蛋白质、RNA 和 DNA 的合成，干扰膜电位，通过产生游离山梨酸，山梨酸通过与微生物酶系统中的巯基相结合，破坏微生物细胞中许多重要酶系作用，从而抑制霉菌，酵母菌等细菌的生长，这与荆亚玲等的研究结果相一致[21]。结合菌落总数和 pH，山梨酸钾添加量为限量的 80% 为最佳。山梨酸钾添加量为限量的 0% 和 80% 洋葱浆馕随贮藏时间的菌落总数变化对比见图 2。

如图 2 所示，图中横线表示菌落总数为 10^5 CFU/g，国家相关标准规定面包糕点类面制品的菌落总数不能超过 10^5 CFU/g[23]，未加山梨酸钾洋葱浆馕的菌落总数第 6 d 超标，添加山梨酸钾的洋葱浆馕的菌落总数第 9 d 超标。但是随着贮藏时间的延长，加入山梨酸钾的洋葱浆馕菌落总数变化与对照组相差不大，说明对馕的抑菌效果不明显。所以不作为响应面试验的考察因素。

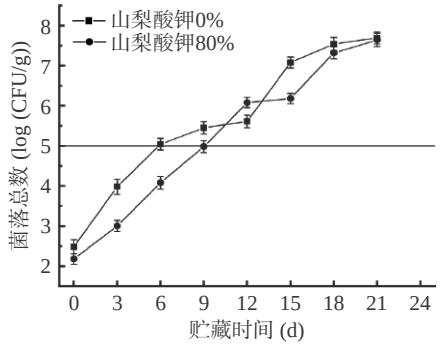


图 2 对比添加量为 0% 和 80% 山梨酸钾洋葱浆馕随贮藏时间的菌落总数变化

Fig.2 Comparison of the total number of colonies of onion paste Nang with 0% and 80% potassium sorbate added with storage time

2.1.2 不同添加量的双乙酸钠对洋葱浆馕菌落总数及 pH 的影响 双乙酸钠为乙酸钠和乙酸的分子复合物，是白色吸湿性结晶状固体，带有醋酸气味，易吸湿，极易溶于水，10% 水溶液的 pH 为 4.5~5.0[24]。双乙酸钠能有效地抑制真菌、霉菌、细菌等菌类的生长繁殖[24]。不同添加量的双乙酸钠对洋葱浆馕菌落总数和 pH 的影响见图 3。

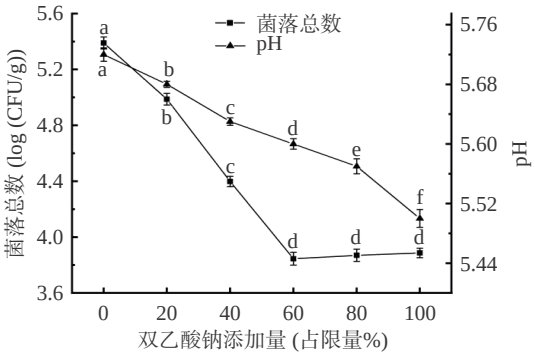


图 3 不同添加量的双乙酸钠对洋葱浆馕菌落总数和 pH 的影响

Fig.3 Effects of different amounts of sodium diacetate on the total number of colonies and pH of onion pulp Nang

图 3 可知，随着双乙酸钠添加量的增大，洋葱浆馕的 pH 呈显著下降的趋势(P<0.05)，洋葱浆馕的菌落总数呈现显著减小的趋势(P<0.05)，当添加量大于限量的 20% 时，洋葱浆馕的菌落总数均下降显著(P<0.05)，添加量为限量的 60% 时，样品的菌落总数最小，抑菌效果最好，添加量为限量的 80 % 时的菌落总数略有上升但与添加限量的 40%、60% 和 80% 时的差异不显著(P>0.05)。其抑菌机理是双乙酸钠产生的乙酸能渗入霉菌组织的细胞壁，干扰细胞内各种酶的体系而产生作用，使细胞内蛋白质变性，且改变细胞形态和结构，抑制微生物生长繁殖，从而起到抗菌防腐的作用[24]，这与徐梅等人的研究结果相一致[25]。结合菌落总数和 pH，双乙酸钠添加量为限量的 60% 为最佳。双乙酸钠添加量为限量的 0% 和 60% 洋葱浆馕随贮藏时间的菌落总数变化对比见图 4。

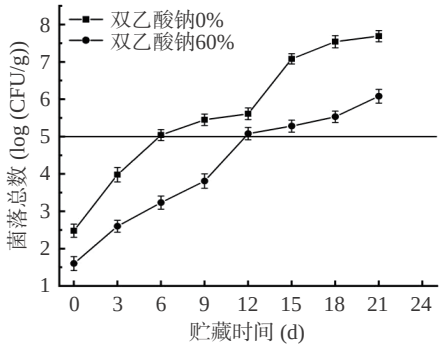


图 4 对比添加量为 0% 和 60% 双乙酸钠洋葱浆馕随贮藏时间的菌落总数变化

Fig.4 Compare the changes of the total number of colonies of 0% and 60% sodium diacetate onion pulp Nang with storage time

如图 4 所示，未加双乙酸钠洋葱浆馕的菌落总数第 6 d 超标，添加双乙酸钠的洋葱浆馕的菌落总数第 12 d 超标，随着贮藏时间的增加，加入双乙酸钠的洋葱浆馕菌落总数变化与对照组相差大，说明其对馕的抑菌的效果很明显。所以作为响应面试验的考查因素。

2.1.3 不同添加量的丙酸钙对洋葱浆馕菌落总数及 pH 的影响 丙酸钙是白色的颗粒或粉末，易溶于水，水溶液 pH 为 8~10，对人体几乎无毒性的防腐剂。丙酸钙属于酸性防腐剂，在酸性条件下产生的游离丙酸而抑制霉菌的生长，且其抑菌效果受 pH 的影响[26]。不同添加量的丙酸钙对洋葱浆馕菌落总数和 pH 的影响见图 5。

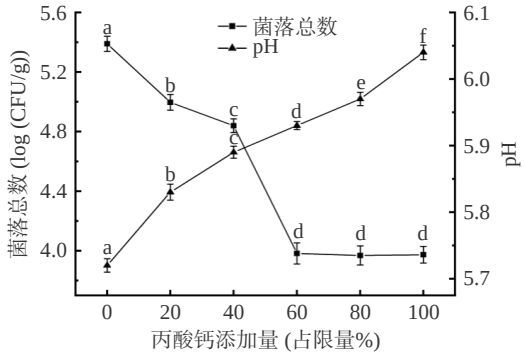


图 5 不同添加量的丙酸钙对洋葱浆馕菌落总数和 pH 的影响

Fig.5 Effects of different amounts of calcium propionate on the total number of colonies and pH of onion pulp Nang

图 5 可知，随着丙酸钙添加量的增大，洋葱浆馕的 pH 呈显著上升的趋势(P<0.05)，其原因可能是由于丙酸钙的水溶液呈碱性，丙酸钙的添加量增大导致浓度的增大，从而使产品 pH 呈升高的趋势。随着丙酸钙添加量的增大，洋葱浆馕的菌落总数呈现显著减小的趋势(P<0.05)，添加量为限量的 80% 时，样品的菌落总数最小，抑菌效果最好，但添加量限量的 60%、80% 和 100% 时的差异不显著(P>0.05)。其原因是丙酸钙通过酸化细胞质和使细胞膜质子梯度

失去稳定性而发挥抑菌作用[27]。结合菌落总数和 pH，丙酸钙添加量为限量的 60% 为最佳。丙酸钙添加量为限量的 0% 和 60% 洋葱浆馕随贮藏时间的菌落总数变化对比见图 6。

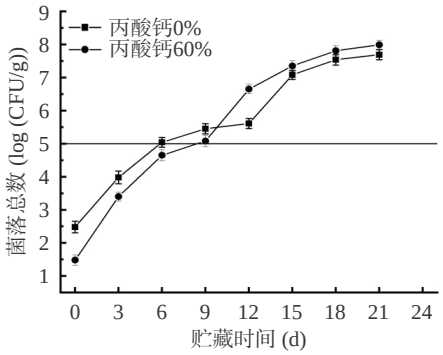


图 6　对比添加量为 0% 和 60% 丙酸钙洋葱浆馕随贮藏时间的菌落总数变化

Fig.6　Comparison of the total number of colonies of onion paste Nang with 0% and 60% calcium propionate added with storage time

如图 6 所示，未加丙酸钙洋葱浆馕的菌落总数第 6 d 超标，添加丙酸钙的洋葱浆馕的菌落总数第 9 d 超标，但是随着贮藏时间的延长，洋葱浆馕菌落总数发生不良改变，菌落总数相比对照组有所上升，对馕的抑菌无优化效果，所以不作为响应面试验的考查因素。

2.1.4　不同添加量的脱氢乙酸钠对洋葱浆馕菌落总数及 pH 的影响　脱氢乙酸钠是结晶粉末，无毒，无臭，无色，易溶于水，呈中性或微碱性[28]。在烘焙食品中应用广泛的防腐剂之一，抑菌能力在食品 pH4~8 范围内较强[29]。不同添加量的脱氢乙酸钠对洋葱浆馕菌落总数和 pH 的影响见图 7。

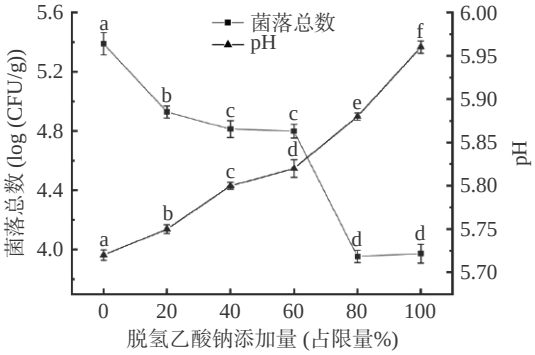


图 7　不同添加量的脱氢乙酸钠对洋葱浆馕菌落总数和 pH 的影响

Fig.7　Effects of different amounts of sodium dehydroacetate on the total number of colonies and pH of onion pulp Nang

由图 7 可知，随着脱氢乙酸钠添加量的增大，洋葱浆馕的 pH 呈显著升高的趋势（P<0.05），其原因可能是脱氢乙酸钠的水溶液呈中性或微碱性，从而导致了 pH 的增大，pH 随着脱氢乙酸钠的添加量增大也增大。随着双乙酸钠添加量的增大，洋葱浆馕的菌落总数呈现显著减小的趋势（P<0.05），当添加量为限量的 40%、60% 时，洋葱浆馕的菌落总数逐渐降低，但无显著差异（P>0.05），添加量为限量的 80% 时，样品的菌落总数最小，说明该添加量抑菌效果最好，添加量为限量的 100% 时的菌落总数略有上升，但与限量的 80% 的差异不显著（P>0.05）。其抑菌机理是脱氢乙酸钠通过中和细胞膜的电化学梯度以及使细胞内的蛋白质变性，由三羰基甲烷结构与金属离子发生螯合作用，破坏微生物的酶系、从而抑制酵母菌、腐败菌、霉菌的生长[30]。结合菌落总数和 pH，脱氢乙酸钠添加量为限量的 80% 为最佳。脱氢乙酸钠添加量为限量的 0% 和 80% 洋葱浆馕随贮藏时间的菌落总数变化对比见图 8。

如图 8 所示，未加脱氢乙酸钠洋葱浆馕菌落总数第 6 d 超标，添加脱氢乙酸钠的洋葱浆馕的菌落总数第 15 d 超标，随着贮藏时间的增加，加入脱氢乙酸钠的洋葱浆馕菌落总数变化与对照组相差大，说明其对馕的抑菌效果很明显。所以作为响应面试验的考查因素。

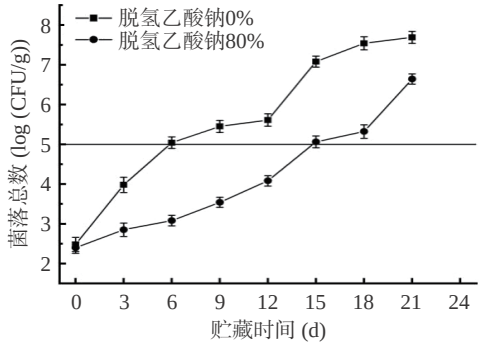


图 8　对比添加量为 0% 和 80% 脱氢乙酸钠洋葱浆馕随贮藏时间的菌落总数变化

Fig.8　Comparison of the total number of colonies of 0% and 80% sodium dehydroacetate onion pulp Nang with storage time

2.1.5　不同添加量的外控型保鲜剂对洋葱浆馕菌落总数及 pH 的影响　外控型保鲜剂是以食用酒精和柠檬酸混合药液为保鲜主剂，采用复合纸塑片为载体而制成的小纸片，具有高效防霉抗菌，无毒无害的一种新鲜的食品保鲜剂，简称酒精片，单位为 g/片。不同添加量的外控型保鲜剂对洋葱浆馕菌落总数和 pH 的影响见图 9。

图 9 可知，随着外控型保鲜剂添加量的增大，洋葱浆馕的 pH 和菌落总数呈显著降低的趋势（P<0.05）。洋葱浆馕添加 1 片/200 g、1 片/200 g 外控型保鲜剂抑菌效果比未加明显，其原因是在贮藏期间按预设速度缓慢挥发酒精片中的保鲜液体，包装袋缓慢充满混合气，且吸附食品中的水分，最终达到袋内气体饱和，从而起到抑制霉菌，腐败菌的滋生，杀灭细菌，从而达到良好的抑菌效果[31]。2 片/200 g 外控型保鲜剂抑菌效果比 1 片/200 g 较好，但是口感较差，其原因是由于外控型保鲜剂的添加量过多，略有酒精味，从而

导致了口感的下降。因此，综合考虑较适的酒精片的添加量为 1 片/200 g。随贮藏时间的增加，脱氢乙酸钠添加量为未加和 1 片/200 g 酒精片洋葱浆馕随贮藏时间的菌落总数变化对比见图 10。

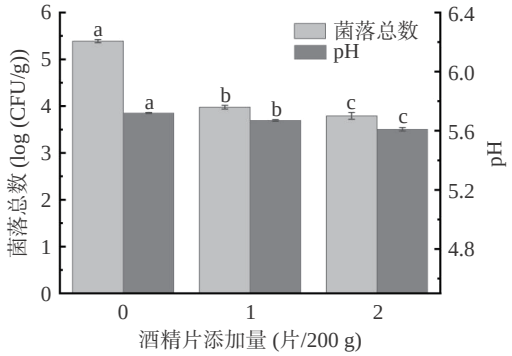


图 9 不同添加量的酒精片对洋葱浆馕菌落总数和 pH 的影响

Fig.9 Effects of different amounts of alcohol tablets on the total number of colonies and pH of onion pulp Nang

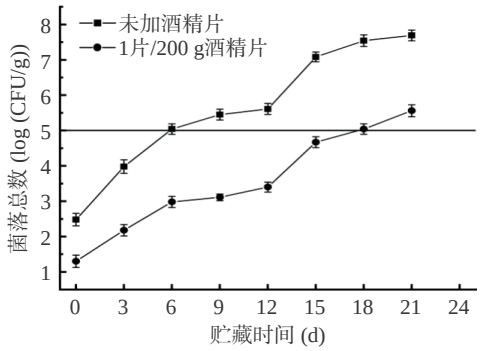


图 10 对比未加和 1 片/200 g 酒精片洋葱浆馕随贮藏时间的菌落总数变化

Fig.10 Changes of total bacterial count of onion paste Nang without and 1 piece/200 g alcohol slice with storage time

如图 10 所示，未加酒精片洋葱浆馕的菌落总数第 6 d 超标，添加 1 片/200 g 酒精片洋葱浆馕的菌落总数第 18 d 超标，随着贮藏时间的增加，加入酒精片的洋葱浆馕菌落总数变化与对照组相差大，说明酒精片对馕的抑菌效果很明显。所以作为响应面试验的考查因素。

2.2 响应面优化试验结果

2.2.1 Box-Behnken 试验设计及结果 用 Design-Expert 8.05 软件进行试验设计和数据处理。按照试验方法处理馕样，测定菌落总数。菌落总数响应面试验设计与结果见表 2。

2.2.2 模型的建立及方差分析 选择菌落总数为响应值，使用软件 Design-Expert.V8.0.6.1 分析得到 3 种食品防腐剂对菌落总数的二次多元回归拟合预测模型方程：

$$R=2.70-0.036A-0.083B-0.110C-0.053AB+0.065AC+0.013BC+0.22A^2+0.17B^2+0.15C^2$$

由表 3 可知，建立的菌落总数回归模型中的

表 2 响应面试验设计与结果

Table 2 Response surface analysis test results

实验号	A双乙酸钠添加量(g/kg)	B脱氢乙酸钠添加量(g/kg)	C保鲜卡添加量(片/200 g)	菌落总数(lg CFU/g)
1	0	0	0	2.68
2	−1	−1	0	3.18
3	0	1	−1	3.05
4	0	1	1	2.82
5	0	−1	1	2.96
6	1	0	−1	3.08
7	−1	0	1	2.93
8	0	−1	−1	3.24
9	0	0	0	2.72
10	1	0	1	3.04
11	0	0	0	2.73
12	−1	0	−1	3.23
13	0	0	0	2.66
14	1	−1	0	3.16
15	−1	1	0	3.12
16	0	0	0	2.71
17	1	1	0	2.89

F=40.22，P<0.0001，表明该二次方程模型达到极显著水平；失拟项 P=0.1249>0.05，说明失拟项差异不显著，因此，该模型的拟合程度比较好，试验模型合理。方程决定系数 R^2=0.9810，R^2_{Adj}=0.9566，说明方程能解释 95.66% 的响应值变化，拟合程度较好。变异系数为 1.43%，表明模型可信度较高；R^2_{Pred}=0.7708 与 R^2_{Adj}=0.9566 合理一致；精密度为 17.80，精密度值大于 4.0 视为合理；因此，可以用该方程推测试验结果。由 F 值大小可推断 3 个因素对菌落总数影响的主次顺序为：C>B>A，即外控型保鲜剂添加量>脱氢乙酸钠添加量>双乙酸钠添加量。

2.2.3 单因素效应分析 采用降维分析法进行单因素效应分析，即将回归方程中的两个因素固定在零水平，分别得到 3 个因素的单因素模型如下：

$$R_A=2.70-0.036A+0.22A^2$$

$$R_B=2.70-0.083B+0.17B^2$$

$$R_C=2.70-0.110C+0.15C^2$$

根据以上方程得到各因素的单因素轨迹见图 11。

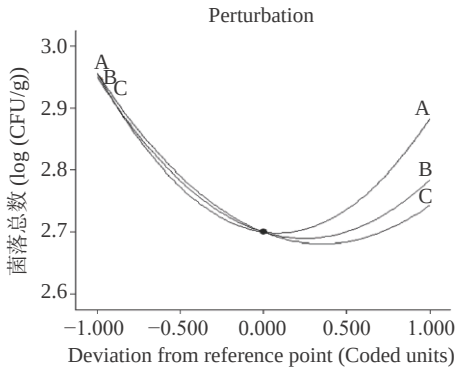


图 11 单因素轨迹图

Fig.11 Perturbation of single factors

单因素轨迹图曲线表示各个因素改变对响应值的影响趋势，曲线弯曲程度越大表明该因素对响应值

表 3　响应面回归模型方差分析结果(菌落总数)

Table 3　Analysis of variance of response surface regression model (Antibacterial rate)

方差来源	平方和	自由度	均方	*F*值	*P*	显著性
模型	0.65	9	0.072	40.22	<0.0001	**
A	0.011	1	0.011	5.88	0.0458	*
B	0.054	1	0.054	30.43	0.0009	**
C	0.09	1	0.09	50.47	0.0002	**
AB	0.011	1	0.011	6.16	0.0421	*
AC	0.017	1	0.017	9.45	0.0180	*
BC	6.25E-04	1	6.25E-04	0.35	0.5731	
A^2	0.2	1	0.2	113.89	<0.0001	**
B^2	0.12	1	0.12	66.02	<0.0001	**
C^2	0.095	1	0.095	52.95	0.0002	**
残差	0.013	7	1.79E-03			
失拟项	9.13E-03	3	3.04E-03	3.58	0.1249	
纯误差	3.40E-03	4	8.50E-04			
总和	0.66	16				
	R^2=0.9810	R^2_{Adj}=0.9566	C.V.%=1.43	R^2_{Pred}=0.7708	精密度=17.80	

注：**表示差异极显著(P<0.01)；*表示差异显著(P<0.05)。

的影响越强烈，反之影响越弱[32]。由图 11 可看出菌落总数随着双乙酸钠，脱氢乙酸钠和外控型保鲜剂添加量的增加而呈先下降后缓慢增大的趋势，各因素在 0~1 水平间对菌落总数的影响均存在极小值。曲线的弯曲程度为 C>B>A，表明外控型保鲜剂添加量对菌落总数的影响最大，脱氢乙酸钠影响次之，双乙酸钠影响最小，与方差分析结果一致。

2.2.4　因素交互效应分析　由响应面回归模型方差分析结果可知，交互项 AB 和 AC 对菌落总数存在显著作用，交互项 BC 对菌落总数不存在显著作用，为考察其交互效应，采用降维分析得回归方程如下：

$$R_{AB}=2.70-0.036A-0.083B-0.053AB+0.22A^2+0.17B^2$$

$$R_{AC}=2.70-0.036A-0.110C+0.065AC+0.22A^2+0.15C^2$$

$$R_{BC}=2.70-0.083B-0.110C+0.013BC+0.17B^2+0.15C^2$$

各因素对响应值影响的大小由响应面图坡度的大小来确定[33]。图 12a 中，双乙酸钠添加量与脱氢乙酸钠添加量的交互作用等高线趋近椭圆，表明两者存在交互作用；当双乙酸钠添加量 1.5 g/kg 左右和脱氢乙酸钠 0.156 g/kg 左右时，菌落总数是最小值；当双乙酸钠添加量小于 1.5 g/kg、脱氢乙酸钠添加量小于 0.156 g/kg 时，菌落总数随两者添加量增加而降低，这是两种防腐剂协同作用所致；当双乙酸钠添加量大于 1.5 g/kg、脱氢乙酸钠添加量大于 0.156 g/kg 时，菌落总数随两者添加量增加而逐步增大，双乙酸钠增加导致酸度增大而降低了脱氢乙酸钠的菌落总数。

图 12b 中，双乙酸钠添加量与外控型保鲜剂添加量交互效应等高线趋近椭圆，表明两者存在交互作用；当双乙酸钠添加量 1.88 g/kg 左右和外控型保鲜剂添加量 1.0 片/200 g 左右时，菌落总数降到最小值；在双乙酸钠添加量小于 1.88 g/kg 左右和外控型保鲜剂添加量小于 1.0 片/200 g 的水平范围内，菌落总数随两者添加量增加而降低，这是两种防腐剂协同作用所致；当双乙酸钠大于 1.88 g/kg、外控型保鲜剂添加量大于 1.0 片/200 g 时，菌落总数随两者用量增加而有所降低。

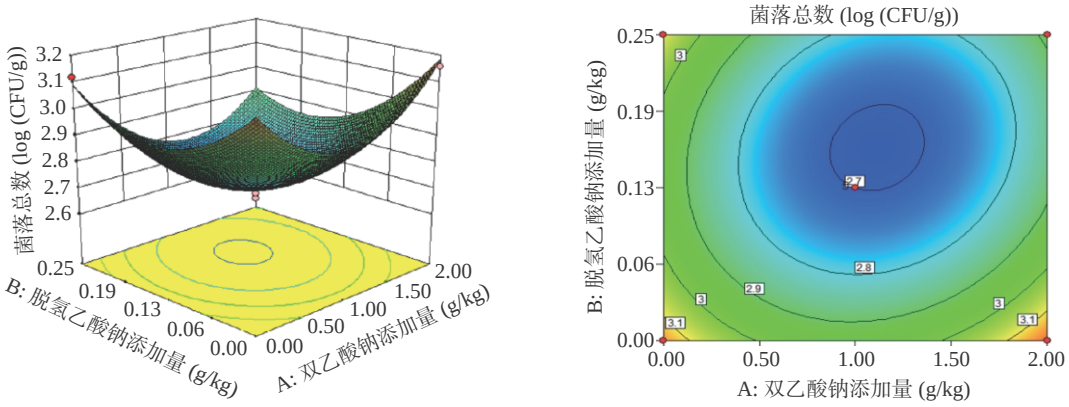
图 12c 中，脱氢乙酸钠添加量与外控型保鲜剂添加量交互效应等高线趋近圆形，表明两者不存在交互作用。其原因尚待进一步研究。

2.2.5　复合防腐剂配方优化及验证实验结果　利用 Design-Expert.V8.0.6.1 软件优化得到的复合防腐剂最佳添加量为双乙酸钠添加量 1.06 g/kg、脱氢乙酸钠添加量 0.16 g/kg、外控型保鲜剂添加量 1.33 片/200 g，为操作方便保鲜卡添加量取为 1 片/200 g，预测菌落总数为 2.67 log CFU/g。采用上述复合防腐剂的最佳添加量进行菌落总数测定验证实验，重复 3 次，结果取平均值，得到的实际菌落总数为(2.61±0.02) log CFU/g，与理论预测值接近，表明优化所得的复合防腐剂配方可靠。

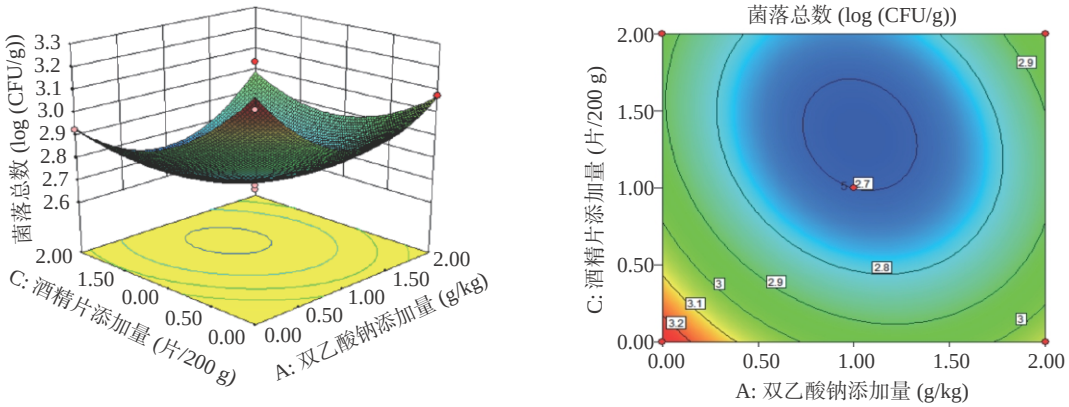
2.3　复合防腐剂贮藏效果

以筛选出的复合防腐剂配方配置防腐剂，馕放置于 27~30 ℃ 的条件下贮藏每 3 d 取样进行测定菌落总数和霉菌数，并以贮藏时间(d)为横坐标，菌落总数对数值(log CFU/g)为纵坐标作图见图 13。

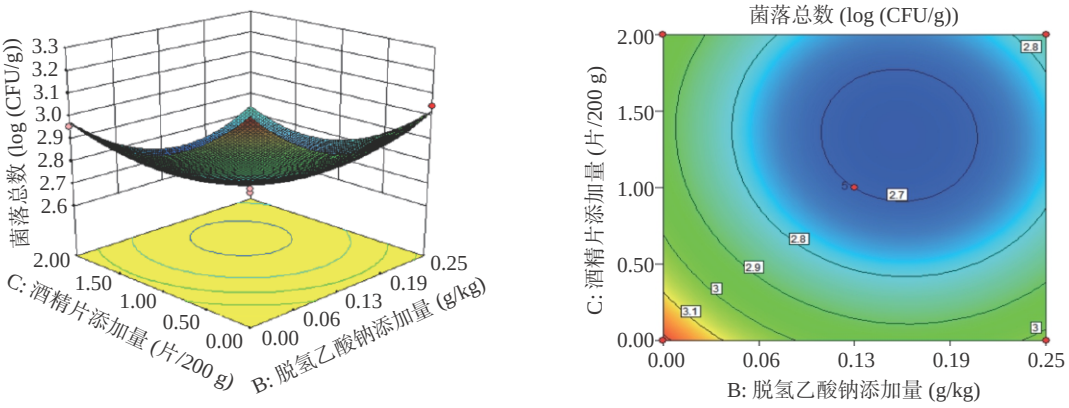
由图 13 可见，经复合防腐剂处理的馕样菌落总数变化与单一防腐剂相比，呈明显下降的趋势。未加任何防腐剂的馕样第 6 d 超标，贮藏时间只 5 d；添加双乙酸钠处理组的馕样第 12 d 超标，表明只添加添加量为限量的 60% 双乙酸钠的馕样的贮藏时间能延长到第 11 d；添加脱氢乙酸钠处理组的馕样第 15 d 超标，表明只添加添加量为限量的 80% 脱氢乙酸钠的馕样的贮藏时间能延长到第 14 d；添加酒精片处理组的馕样第 18 d 超标，表明只添加添加量为 1 片/200 g



（a）双乙酸钠添加量与脱氢乙酸钠添加量的交互作用



（b）双乙酸钠添加量与外控型保鲜剂添加量的交互作用



（c）脱氢乙酸钠添加量与外控型保鲜剂添加量的交互作用

图 12　响应面图及等高线图

Fig.12　Response surface and contour map

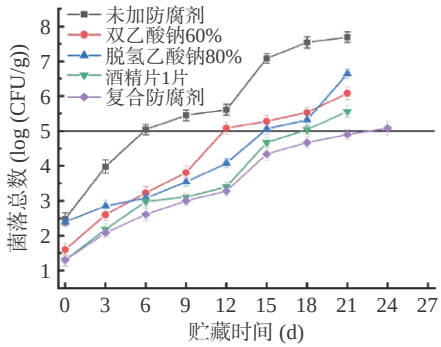


图 13　洋葱浆馕贮藏期间菌落总数变化

Fig.13　Changes of total bacterial count of onion pulp Nang during storage

酒精片的馕样的贮藏时间能延长到第 17 d; 经复合防腐剂处理的馕样菌落总数呈明显下降的趋势, 第 24 d 超标, 贮藏时间可达 23 d 左右。

3　结论

本实验首先测定多个单因素食品防腐剂对洋葱浆馕菌落总数和 pH 的影响, 结合贮藏期间的变化情况, 并筛选出显著性变化明显的 3 种防腐剂进行响应面试验。采用响应面法, 以菌落总数为响应值, 考察双乙酸钠、脱氢乙酸钠和外控型保鲜剂 3 种防腐剂对洋葱浆馕菌落总数的影响, 优化复合防腐剂贮藏洋葱浆馕的最佳配方; 单因素效应及方差分析显示, 脱氢乙酸钠、双乙酸钠和外控型保鲜剂添加量对菌

落总数均存在极显著影响，并 3 个因素的影响主次顺序为：外控型保鲜剂>脱氢乙酸钠>双乙酸钠。双乙酸钠与脱氢乙酸钠的交互作用和双乙酸钠与外控型保鲜剂交互作用均存在协同增效效应，且后者增效效应强于前者，但脱氢乙酸钠和外控型保鲜剂间无协同增效作用；通过回归优化所得的复合防腐剂最优配方为双乙酸钠添加量 0.80 g/kg、脱氢乙酸钠添加量 0.16 g/kg、外控型保鲜剂添加量 1.33 片/200 g，以此配方处理洋葱浆馕的菌落总数预测值为 2.67 log CFU/g，经试验验证，常温条件下，添加最佳复合防腐剂的洋葱浆馕的菌落总数为 2.61 log CFU/g，贮藏期限可达 23 d，说明该复合防腐剂能够明显改善洋葱浆馕的抑菌作用，对延长洋葱浆馕的货架期有重要意义。

参考文献

[1] 安尼瓦尔·哈斯木. 馕坑与馕文化漫谈[J]. 新疆地方志, 2017(2): 53−58. [Anniwalhasmu. Nang, Nang pit and Nang culture[J]. Xinjiang Local Chronicles, 2017(2): 53−58.]

[2] 张越, 李秋爽, 梁建芬. 面包防腐技术研究进展[J]. 食品科技, 2021, 46(4): 127−132. [ZHANG Yue, LI Qiushuang, LIANG Jianfen. Research progress of bread preservative technology[J]. Food Science and Technology, 2021, 46(4): 127−132.]

[3] 周雪. 乳酸菌发酵剂在汉堡面包防腐中的应用 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2020. [ZHOU Xue. Application of lactic acid bacteria starter in hamburger bread preservation[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2020.]

[4] 李丹丹, 王涛涛, 彭业芳, 等. 紫薯色素与防腐剂复配抑菌作用研究 [J]. 中国食品添加剂, 2012(6): 174-180. [LI Dandan, WANG Taotao, PENG Yefang, et al. Study on antibacterial effect of purple potato pigment and preservative[J]. China Food Additives, 2012(6): 174-180.]

[5] European Committee for Antimicrobial Susceptiility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiol-ogy and Infectious Diseases (ESCMID). Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents [J]. Clinical Microbiology and Infection, 2000, 6(9): 503−508.

[6] 刘天意. 食品防腐剂苯甲酸钠的作用机理、毒性及其检测方法综述[J]. 现代食品, 2020(7): 32−34. [LIU Tianyi. Review of action mechanism, toxicity and detection methods of food preservative sodium benzoate[J]. Modern Food, 2020(7): 32−34.]

[7] 赵芸. 添加不同防腐剂奶酪酱在贮藏期内品质变化规律及货架期预测[J]. 中国酿造, 2021, 40(8): 211−214. [ZHAO Yun. Quality change law and shelf life prediction of cheese sauce with different preservatives during storage[J]. China Brewing, 2021, 40(8): 211−214.]

[8] 豆康宁, 白春启, 王飞. 面包防腐剂对酵母发酵力的影响研究[J]. 中国食品添加剂, 2014(1): 116−119. [DOU Kangning, BAI Chunqi, WANG Fei. Study on the effect of bread preservatives on yeast fermentation[J]. China Food Additives, 2014(1): 116−119.]

[9] 张攀先, 叶盛德, 周斌. 复配防腐剂在蒸蛋糕中的应用研究[J]. 中国食品添加剂, 2018(3): 131−136. [ZHANG Panxian, YE Shengde, ZHOU Bin. Application of compound preservatives in steamed cake[J]. China Food Additives, 2018(3): 131−136.]

[10] 李柯欣, 江燕竹, 覃平, 等. 纳他霉素在月饼中抑菌防腐的研究[J]. 中国食品添加剂, 2016(3): 138−142. [LI Kexin, JIANG Yanzhu, QIN Ping, et al. Study on bacteriostasis and antisepsis of natamycin in moon cake[J]. China Food Additives, 2016(3): 138−142.]

[11] 覃平. 纳他霉素在焙烤食品中抑菌防腐的研究 [D]. 成都: 西华大学, 2015. [QIN Ping. Study on bacteriostasis and antisepsis of natamycin in baked food[D]. Chengdu: Xihua University, 2015.]

[12] 邵源. 延长馒头保质期措施的研究和实施 [D]. 郑州: 河南工业大学, 2014. [SHAO yuan. Research and implementation of measures to extend the shelf life of steamed bread[D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2014.]

[13] CARLOS LUZ, LORENARODRIGUEZ, RAFFAELE ROMANO, et al. A natural strategy to improve the shelf life of the loaf bread against toxigenic fungi: The employment of fermented whey powder[J]. International Journal of Dairy Technology, 2020 (1): 88-97.

[14] SUN Q, LI J M, SUN Y, et al. The antifungal effects of cinnamaldehyde against *Aspergillus niger* and its application in bread preservation[J]. Food Chemistry, 2020, 317: 126405.

[15] 潘焰琼. 食品添加剂的使用对食品安全的影响及应对措施[J]. 食品安全导刊, 2019(15): 56,63. [PAN Yanqiong. Impact of the use of food additives on food safety and countermeasures[J]. Food Safety Guide, 2019(15): 56,63.]

[16] 中华人民共和国卫生部. GB/T 4789.2-2010. 食品微生物学检验菌落总数测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2010. [Ministry of Health, PRC. GB/T 4789.2-2010. Microbiological examination of food-Determination of total bacterial count[S]. Beijing: China Standard Press, 2010.]

[17] 中华人民共和国卫生部. GB/T 4789.15-2010. 食品安全国家标准食品微生物学检验霉菌和酵母计数 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2010. [Ministry of Health, PRC. GB/T 4789.15-2010. National standard for food safety microbiological examination of food mould and yeast counts[S]. Beijing: China Standard Press, 2010.]

[18] 周文利. 不同处理方法对蒲城槁头馍保鲜效果的研究 [D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2017. [ZHOU Wenli. Study on the fresh-keeping effect of different treatment methods on Pucheng rafter steamed bun [D]. Xianyang: Northwest A&F University, 2017.]

[19] 吴超, 王江琴. 壳聚糖、ε-聚赖氨酸及山梨酸钾对杨梅的保鲜效果研究 [J]. 现代食品, 2021(21): 91-97. [WU Chao, WANG Jiangqin. Chitosan ε- study on the fresh-keeping effect of polylysine and potassium sorbate on *Myrica rubra*[J]. Modern Food, 2021(21): 91-97.]

[20] 李丹丹. 响应面法优化紫薯花色苷与防腐剂复配抑菌作用研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2013. [LI Dandan. Optimization of bacteriostatic effect of purple potato anthocyanins and preservatives by response surface methodology[D]. Nanchang: Nanchang University, 2013.]

[21] 荆亚玲, 闫立江, 岳桂云. 食品防腐剂复配形式在面包中的防腐应用研究[J]. 中国食品添加剂, 2010(2): 197−200. [JING Yaling, YAN Lijiang, YUE Guiyun. Study on the application of food preservatives in bread[J]. China Food Additives, 2010(2): 197−200.]
[22] 胡秀雪, 秦秀芳, 诸天庆, 等. 化学合成食品防腐剂的进展[J]. 化工管理, 2021(22): 60−61. [HU Xiuxue, QIN Xiufang, ZHU Tianqing, et al. Progress in chemical synthesis of food preservatives[J]. Chemical Management, 2021(22): 60−61.]
[23] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 7099-2015. 食品安全国家标准糕点, 面包 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2015. [State health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. GB 7099-2015. National food safety standard pastry, bread [S]. Beijing: China Standard Press, 2015.]
[24] 闫国胜, 薛向阳, 李彦军. 双乙酸钠的特性及其在肉制品中的应用[J]. 肉类工业, 2006(1): 1−2. [YAN Guosheng, XUE Xiangyang, LI Yanjun. Characteristics of sodium diacetate and its application in meat products[J]. Meat Industry, 2006(1): 1−2.]
[25] 徐梅, 秦丽娟, 宋贤良, 等. 不同防腐剂对盐焗鸡制品的抑菌性能及品质的影响[J]. 食品工业科技, 2016, 37(24): 333−354. [XU Mei, QIN Lijuan, SONG Xianliang, et al. Effects of different preservatives on antibacterial properties and quality of salt baked chicken products[J]. Food Industry Science and Technology, 2016, 37(24): 333−354.]
[26] 巴都马拉, 贾月梅. 食品添加剂丙酸钙的生产工艺优化研究[J]. 中国食品, 2021(8): 104. [Badumala, JIA Yuemei. Study on production process optimization of food additive calcium propionate[J]. China Food, 2021(8): 104.]
[27] 马智刚, 刘长虹, 张梅. 食品抗菌添加剂对馒头面团发酵的影响[J]. 食品与发酵工业, 2004(4): 83−85. [MA Zhigang, LIU Changhong, ZHANG Mei. Effect of food antibacterial additives on steamed bread dough fermentation[J]. Food and Fermentation Industry, 2004(4): 83−85.]
[28] 王明. 防腐剂在熟肉制品保藏中的应用研究 [D]. 成都: 西华大学, 2016. [WANG Ming. Study on the application of preservatives in the preservation of cooked meat products [D]. Chengdu: Xihua University, 2016.]
[29] 彭家泽. 脱氢醋酸钠及其复配形式在食品中的防腐应用研究[J]. 中国食品添加剂, 2007(增刊 ement): 253−257. [PENG Jiaze. Study on antiseptic application of sodium dehydroacetate and its compound forms in food[J]. China Food Additives, 2007(Supplement): 253−257.]
[30] YANG Sha, SHAN Changsong, XU Yongqiang, et al. Dissimilarity in sensory attributes, shelf life and spoilage bacterial and fungal microbiota of industrial-scale wet starch noodles induced by different preservatives and temperature[J]. Food Research International, 2021, 140: 109980−109980.
[31] Q/XBJ 1-2019 鲜百吉生物技术 (东莞) 有限公司企业标准外控型食品保鲜剂 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2019. [Q/XBJ 1-2019 Xianbaiji Biotechnology (Dongguan) Co., Ltd. enterprise standard external control food preservative [S]. Beijing: China Standards Press, 2019.]
[32] 张辉, 张娜娜, 马丽, 等. 响应面法优化大麦苗叶绿素提取工艺 [J]. 食品科学, 2014, 35(2): 75−80. [ZHANG Hui, ZHANG Nana, MA Li, et al. Optimization of chlorophyll extraction process of barley seedlings by response surface methodology[J]. Food Science, 2014, 35 (2): 75−80.]
[33] 杨雪飞, 袁蓓蕾, 罗水忠, 等. 品质改良剂对复合杂粮面包粉流变学特性的影响[J]. 食品科学, 2015, 36(11): 75−80. [YANG Xuefei, YUAN Beilei, LUO Shuizhong, et al. Effect of quality improvers on rheological properties of composite coarse grain bread flour[J]. Food Science, 2015, 36(11): 75−80.]

徐飞飞, 李跃麒, 林珺, 等. 典型环境高镉地区常见蔬菜中镉的生物可及性及健康风险评估 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 293−300. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090114

XU Feifei, LI Yueqi, LIN Jun, et al. Bioaccessibility of Cadmium in Common Vegetables in Typical Environmental High Cadmium Region and the Health Risk Assessment[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 293−300. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090114

· 食品安全 ·

典型环境高镉地区常见蔬菜中镉的生物可及性及健康风险评估

徐飞飞[1], 李跃麒[2], 林　珺[1], 赖月妃[1], 黎姿茵[1], 林秀琴[1], 陈颖思[1], 吴炜亮[1,*], 杨杏芬[1,*]

(1.南方医科大学公共卫生学院, 食物安全与健康研究中心, 广东省热带病研究重点实验室, 粤港澳污染物暴露与健康联合实验室, 广东广州 510515;
2.暨南大学基础医学和公共卫生学院, 广东广州 510632)

摘　要: 为研究种植于典型环境高镉（Cadmium，Cd）地区的蔬菜对人体的健康风险，使用电感耦合等离子体质谱（ICP-MS）对种植于该区域的 9 种常见蔬菜中的元素（Mg、K、Ca、Cu、Zn）及重金属 Cd 进行检测，并研究蔬菜的烹调方式、消化过程和主要金属元素含量对 Cd 生物可及性的影响。同时，采用健康风险值（THQ）对膳食消费蔬菜暴露 Cd 的风险进行评估。结果表明，蔬菜样品中重金属 Cd 的平均含量范围为 0.02~0.30 mg/kg。水煮可显著降低蔬菜中的 Cd 含量（P<0.05），而生炒对蔬菜中的 Cd 含量未有显著影响（P>0.05）。对于生物可及性，水煮可显著提高蔬菜中 Cd 的生物可及性（P<0.05），而生炒则无显著影响（P>0.05）。利用相关分析可知，Cd 的生物可及性与 K 和 Cu 之间存在负相关关系（P<0.05）。若将 Cd 生物可及性纳入健康风险评估，仅高消费生菜人群的 THQ 大于 1，提示当地居民消费蔬菜引起的健康风险较小。然而，仍需关注环境高镉地区其他膳食途径暴露 Cd 的慢性健康危害。因此，当地居民应选择消费低于 Cd 限量标准的蔬菜，并进行合理烹调以降低健康风险。

关键词: 镉, 蔬菜, 生物可及性, 膳食暴露, 风险评估

中图分类号: TS206.1　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0293−08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090114　　本文网刊:

Bioaccessibility of Cadmium in Common Vegetables in Typical Environmental High Cadmium Region and the Health Risk Assessment

XU Feifei[1], LI Yueqi[2], LIN Jun[1], LAI Yuefei[1], LI Ziyin[1], LIN Xiuqin[1], CHEN Yingsi[1], WU Weiliang[1,*], YANG Xingfen[1,*]

(1.Guangdong-Hongkong-Macao Joint Laboratory for Contaminants Exposure and Health, Guangdong Provincial Key Laboratory of Tropical Disease Research, Food Safety and Health Research Center, School of Public Health, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;
2.School of Medicine and Public Health, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: In order to assess the health risk of consumption of local planted vegetables in high-level Cd contaminated region, inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) was employed to determine the elements of Cd, Mg, K, Ca, Cu and Zn in the commonly consumed vegetables collected from this region. The effects of the cooking methods, the process of gastrointestinal digestion, and the concentrations of elements on the bioaccessibility of Cd were investigated using *in vitro* RIVM model. In addition, the health risk of Cd exposure via vegetable consumption for the local residents

收稿日期: 2021−09−09

基金项目: 国家重点研发计划（2018YFC1603101）; 广东省重点领域研发计划（2019B020210002）; 国家重点研发计划（2018YFC1602205）。

作者简介: 徐飞飞（1996−）, 女, 博士研究生, 研究方向: 食品安全风险评估, Email: fjykdxxff0924@126.com。

*** 通信作者:** 吴炜亮（1981−）, 男, 博士, 高级工程师, 研究方向: 食品安全及检测技术, Email: wu1108@smu.edu.cn。
杨杏芬（1962−）, 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品安全风险评估, Email: yangalice79@smu.edu.cn。

were evaluated using the target hazard quotients (THQs). The results showed that the average contents of Cd in vegetables were ranged from 0.02 to 0.30 mg/kg. Cooking methods did influence the concentration of Cd in the samples, indicating that boiling significantly reduced the concentration of Cd in vegetables (P<0.05), while frying had no significant effect (P>0.05). In contrast, boiling significantly increased the bioaccessibility of Cd (P<0.05), and frying had no significance (P>0.05). The results of correlation analysis showed that Cd bioaccessibility had significantly negative correlation with K and Cu (P<0.05), indicating that mineral elements in vegetables could influence on the bioaccessibility of Cd in vegetables. The results of health risk assessment showed that only the THQ of sub-population of highly consumed with lettuce higher than 1 when the Cd bioaccessibility was considered in the process of health risk assessment, suggesting that the health risk of local residents was low with consumption of local planted vegetables. However, the chronic hazards of Cd exposure should be highly concerned on other dietary sources in this high-level Cd region. Therefore, local residents should choose the vegetables lower than the maximum limit values with appropriate cooking to reduce health risk.

Key words: cadmium; vegetables; bioaccessibility; dietary exposure; risk assessment

2015 年全国土壤调查结果显示, 我国 19.4% 的农业土壤受到重金属污染, 其中镉是主要的重金属污染物之一[1]。种植于受污染土壤中的农作物易富集重金属, 如水稻、蔬菜在种植过程中易富集 Cd[2]。对于非吸烟人群, 膳食是摄入 Cd 的主要途径, 而大米和蔬菜是中国南方地区人群暴露 Cd 的主要膳食来源[3−4]。由于 Cd 的半衰期长达 10~30 年, 摄入 Cd 易在体内蓄积而造成严重的健康损害, 如骨骼、肾、神经等损伤[3,5−8]。因此, 常使用风险熵评估模型对膳食 Cd 暴露的非致癌风险进行评估, 在评估过程中一般使用食物中 Cd 的浓度水平与膳食消费量计算其膳食暴露量[9]。然而, 由于实际产生毒性作用的是通过膳食摄入后经消化吸收到达组织的镉浓度水平, 因此目前的风险评估结果可能高估 Cd 引起的健康风险。

近年来, 国内外提出了多种生物可及性体外测试模型用于研究污染物在胃肠道消化过程中从食品基质释放到胃肠液中的水平[10], 如生理原理提取法(the Physiologically Based Extraction Test, PBET)[11]、荷兰公共卫生与环境国家研究院法(National Institute of Public Health and the Environment, RIVM)[12−16]、德国标准研究院法(DIN)[17] 等, 其均发现在消化过程中基质中的污染物并非全部被释放, 而使用这些体外方法可获得污染物被机体吸收的最高浓度水平, 有助于提高风险评估的精确度。目前, Cd 膳食暴露风险评估的研究主要集中于不同膳食因素[18]、烹调方式[18−20] 对膳食摄入 Cd 的影响, 尚未系统研究食物中 Cd 的生物可及性及其对风险评估的作用。课题组前期研究显示, 某高镉地区蔬菜中 Cd 的平均浓度水平为 0.14 mg/kg, 且有 23.75% 的样本超过食品安全国家标准 GB 2762 的限量值[4]。因此, 本研究以该典型环境高镉地区居民日常消费的 9 种蔬菜为研究对象, 探索烹调方式、金属元素含量对蔬菜中 Cd 生物可及性的影响, 并在风险评估过程中引入生物可及性, 旨在更全面地评价通过蔬菜消费而导致的 Cd 暴露对人体产生的健康风险提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

蔬菜样品于 2020 年 1 月, 在华南某高镉区域随机采集, 共 4 类 9 种 42 份蔬菜样品。由于历史原因, 该区域土壤中 Cd 浓度大于 1.25 mg/kg, 高于 GB 15618-1995《土壤环境质量标准》规定的保证农林业生产和植物正常生长的土壤临界值。采集的样品分别为叶菜类蔬菜(芥菜、白菜、麦菜、生菜和菜心)、甘蓝类蔬菜(西兰花)、鳞茎类蔬菜(韭菜)、根茎类蔬菜(大薯和萝卜)。蔬菜样品均为当地居民所种植。样品低温冷藏运输至实验室后, 去除不可食部后, 使用超纯水将可食部洗净, 于室温沥干多余水分。之后, 每份蔬菜样品称取 1 kg, 装入密封袋中供后续实验及检测使用。

猪胃蛋白酶、胰酶、脂肪酶、α-淀粉酶、牛血清白蛋白和粘蛋白　生化试剂, Sigma 公司; NaCl、KCl、KSCN、NaH_2PO_4、$NaHCO_3$、$CaCl_2$、$MgCl_2$、KH_2PO_4、Na_2SO_4、尿酸和尿素(分析纯)、D-(+)-葡萄糖、D-(+)-葡萄糖胺(生化试剂)　麦克林生化科技有限公司; D-葡萄糖醛酸、牛胆汁粉　索莱宝(中国北京)公司; Cd(1000 mg/L)、^{115}In(1000 mg/L)标准溶液以及标准物质圆白菜(GBW10014)和菠菜(GBW10015)　国家标准(北京)检测认证有限公司; 烹调时所用的鲁花牌花生油　购置于当地超市, Cd 的检测结果为“未检出”。

350X 电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS)　美国珀金埃尔默公司; SHJ-6AB 双数显水浴磁力搅拌器　中国常州高德仪器制造有限公司; Milli-Q 超纯水机　美国 Millipore 公司; MARS7 微波消解仪　培安·CEM 微波化学(中国)技术中心; Newclassic-MS205DU 分析天平(万分之一)　美国 METTLER TOLEDO 公司; SevenCompactS210-S 电子 pH 计　美国 METTLER TOLEDO 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 烹调方法　根据当地居民的烹饪习惯, 采用不同烹调方式对所采集样品进行处理。每份样品取 500 g, 将其切成小块后分为 3 份, 每份 150 g, 其中 1 份不经烹调处理, 其余 2 份分别进行水煮和生炒。其中, 水煮样品置于 500 mL 煮沸的超纯水中, 于 100 ℃ 水煮 5 min, 捞出, 将水弃去; 生炒样品则待花生油(15 mL)温度达 180~190 ℃ 后, 加入至不锈钢平底锅中翻炒 1~2 min, 取出。所有样品经烹调后使用匀浆机进行匀浆备用。

1.2.2　生物可及性测定方法　采用 RIVM 体外消化模型模拟蔬菜的胃肠消化过程, 对蔬菜中 Cd 的生物可及性进行测定, 分别为口腔、胃和小肠三个阶段。模拟消化液配制参照 Rotard 等[12] 和 Oomen 等[21] 研发者所使用的成分及配比。具体流程如下:

口腔阶段: 将 5.0 g 样品置于 50 mL 具塞三角瓶中, 加入 6 mL 模拟唾液, 使用 1 mol/L HCl 溶液将 pH 调节至 6.5±0.2。三角瓶置于 37 ℃ 恒温水浴磁力搅拌器中以 100 r/min 搅拌 2 min。

胃消化阶段: 口腔阶段结束后, 加入 13 mL 模拟胃液于具塞三角瓶, 使用 1 mol/L HCl 溶液将 pH 调节至 1.5±0.1。三角瓶置于 37 ℃ 恒温水浴磁力搅拌锅中以 100 r/min 搅拌 2 h。

小肠消化阶段: 胃消化阶段后, 加入 12 mL 小肠液和 6 mL 胆汁于具塞三角瓶, 使用 1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 至 7.8±0.2。三角瓶置于 37 ℃ 水浴中以 100 r/min 搅拌 2 h。

消化完成后, 三角瓶置于沸水中 30 s, 将酶灭活。使用自来水冷却至室温后, 消化液及消化残渣转移至 50 mL 离心管中, 5000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 经 0.22 μm 滤膜过滤后, 于−80 ℃ 中储存待测。

1.2.3　金属元素的测定

1.2.3.1　前处理方法　蔬菜样品的前处理参照 GB 5009.268-2016《食品安全国家标准 食品中多元素的测定》。首先, 称取 0.2~0.5 g 样品(精确到 0.001 g)于聚四氟乙烯消解罐中, 加入 10 mL 硝酸并放置 1 h, 后旋紧不锈钢外套, 置于微波消解仪中消解。完成后, 将消解内罐取出, 旋开盖子, 于 100 ℃ 赶酸 30 min。最后, 将消解液转移至 25 mL 容量瓶中, 使用超纯水进行定容。

使用 0.22 μm 滤膜过滤经消化后所得的消化液, 取 1 mL 并直接加入 100 μL 硝酸后, 使用超纯水定容至 2 mL。

1.2.3.2　分析方法　蔬菜样品中元素的测定参照 GB 5009.268-2016《食品安全国家标准 食品中多元素的测定》, 使用电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)分别对蔬菜样品中的 Mg、K、Ca、Cu、Zn、Cd 浓度水平以及消化液中 Cd 的浓度水平进行测定。蔬菜样品 Cd 的浓度水平以鲜重计。

1.2.3.3　质量控制　采用一系列质量控制程序保证 Cd 测定的准确性和精密度: a.进行化学试剂空白测定, 以校准 ICP-MS 读数的准确度; b.通过加标回收实验获得蔬菜样品和消化液中 Cd 的回收率, 分别为 94.3%~108.4% 和 92.3%~99.8%; c.测定了标准物质圆白菜(GBW 10014)和菠菜(GBW10015)的 Cd, 结果如表 1 所示; d.在 20 次测定后使用空白和漂移标准样品维持仪器准确度; e.重复测定计算变异系数, 以验证分析精度并确保样品在前处理期间无污染。

表 1　食品标准物质中 Cd 浓度及分析结果 (μg/kg, x±s, n=7)

Table 1　Cadmium concentrations of food certified references materials and their determination results (μg/kg, x±s, n=7)

标准物质	标准值(μg/kg)	测量值(μg/kg)	相对标准偏差(%)
圆白菜(GBW10014)	35.0±6.0	31.4±3.7	6.7
菠菜(GBW10015)	150.0±25.0	159.3±19.1	2.1

1.2.4　生物可及性的计算　蔬菜中 Cd 的生物可及性是指样品在消化过程中释放至模拟消化液的浓度水平与样品中 Cd 的浓度水平的比值, 计算公式如下:

$$BAS(\%) = \frac{C_{IV} \times V_{IV}}{C_V \times M} \times 100 \qquad 式(1)$$

式中: BAS 为 Cd 的生物可及性; C_{IV} 为消化液中 Cd 的浓度水平, mg/L; V_{IV} 为消化液体积, L; C_v 为蔬菜样品中 Cd 的浓度水平, mg/kg; M 为蔬菜样品的质量, kg。

1.2.5　健康风险评估　采用每日估计摄入量(Estimated daily intake, EDI)及目标风险熵(Target Hazard Quotient, THQ)评估环境高镉地区居民通过消费蔬菜摄入 Cd 的健康风险。若 THQ< 1, 表明无显著健康风险。反之, 则存在健康风险。EDI 和 THQ 的计算公式如下:

$$EDI = \frac{C_V \times W_V}{BW} \times 10^3 \qquad 式(2)$$

$$BEDI = \frac{C_V \times w_V \times BAS}{BW} \times 10^3 \qquad 式(3)$$

式中: C_v 为蔬菜样品中 Cd 的浓度水平, mg/kg; W_v 为每日蔬菜消费量, kg/d; BEDI 是指经生物可及性校正后的每日估计摄入量; BAS 为 Cd 的生物可及性; BW 为平均体重, kg。本研究采用的平均体重以及蔬菜消费量为课题组前期于环境高镉地区开展膳食调查得到的数据。其中, 成人的平均体重为 54.80 kg, 成人每日蔬菜平均消费量为 374 g/d, P95 值为 997 g/d(P95 值代表高消费人群的摄入量)。

$$THQ = \frac{Ef_r \times ED \times EDI}{RfD \times AT} \times 10^{-3} \qquad 式(4)$$

$$BTHQ = \frac{Ef_r \times ED \times BEDI}{RfD \times AT} \times 10^{-3} \qquad 式(5)$$

式中: Ef_r 是暴露频率(365 d); ED 为暴露持续时间(70 年); RfD 为每日口服参考剂量(mg/kg); AT 是非致癌物质的平均时间(365 d/年×ED); 10^{-3} 是单位换算系数; BTHQ 是指经过生物可及性校正后的目标风险熵。根据美国环境保护局的数据, Cd 的每日经口暴露参考剂量为 0.001 mg/kg[22]。

1.3　数据处理

所有实验均重复 3 次。相关数据采用 SPSS 21.0 进行数据处理。所有数据采用平均值或者平均值±标准偏差的形式表示。组间比较采用方差分析, 相关性采用 Pearson 和 Spearman 相关分析。当

P<0.05 时, 差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 蔬菜中的矿物元素及 Cd 浓度水平

样品中 Mg、K、Ca、Cu、Zn 及 Cd 的浓度水平如表 2 所示。蔬菜样品中主要元素的平均浓度水平为 K(1.32~4.54 g/kg)>Ca(0.04~0.76 g/kg)>Mg(0.06~0.26 g/kg)>Zn(1.27~6.93 mg/kg)>Cu(0.10~1.64 mg/kg)。蔬菜样品中重金属 Cd 的平均浓度范围为 0.02~0.30 mg/kg, 叶菜类和根茎类蔬菜的 Cd 浓度水平较高, 其中麦菜的 Cd 平均浓度最高, 达 0.30 mg/kg, 高于标准限量值 0.20 mg/kg, 其次为生菜(平均浓度为 0.15 mg/kg)和菜心(平均浓度为 0.09 mg/kg)。不同种类蔬菜中重金属 Cd 的浓度水平差异较大。其中, 叶菜类蔬菜的麦菜、生菜和菜心的 Cd 含量较高, 提示叶菜类蔬菜较其他种类蔬菜更易富集重金属 Cd, 与 Chen 等和侯胜男等的研究结果相似[23−24]。此外, Zhuang 等[25−26] 的研究结果提示, 除叶菜类蔬菜外, 根茎类蔬菜亦较易累积 Cd。值得注意的是, 本次研究采集的根茎类蔬菜大薯中的 Cd 浓度水平也较高, 可能是由于根茎类蔬菜的可食用部分生长于土壤中, 相比于其他类蔬菜更容易富集 Cd[27]。

2.2 烹调方法对蔬菜中 Cd 浓度水平的影响

对每种蔬菜分别采用水煮和生炒 2 种烹调方式进行处理, 烹调方法对 Cd 浓度水平的影响如图 1 所示。结果表明, 水煮蔬菜的 Cd 浓度范围为 0.02~0.12 mg/kg, 而未经烹调和生炒蔬菜样品的 Cd 浓度范围分别为 0.03~0.24 和 0.03~0.21 mg/kg。与未经烹调的相应蔬菜样品比较, 烹调方式水煮显著降低各类蔬菜 Cd 的平均浓度水平(P<0.05)。其中, 芥菜经水煮后的平均下降比例最高, 约为 45.73%, 其次为萝卜和大薯, 平均下降比例分别为 36.83% 和 35.02%。然而, 烹调方式生炒对蔬菜 Cd 浓度水平的影响则未见显著性差异(P>0.05)。水煮可显著降低蔬菜中 Cd 的浓度水平的原因可能是水煮过程中 Cd 从蔬菜析出至水中, 从而降低了蔬菜中的 Cd 含量, 结果与 Mnisi 等[19] 和 Zhuang 等[26] 的研究结果一致。由于生炒过程中水分损失较少, 而且植物组织软化程度也较水煮低, 因此与烹调前的蔬菜相比 Cd 浓度无显著变化。

2.3 蔬菜中 Cd 的生物可及性

如表 3 所示, 未经烹调的蔬菜样品中 Cd 的生物可及性范围为 4.44%~40.86%, 其中西兰花的 Cd 生物可及性最高, 达 40.86%, 其次为芥菜(32.64%), 菜心和大薯的 Cd 生物可及性最低, 分别为 12.92% 和 4.44%。经水煮后, 蔬菜中 Cd 的生物可及性显著增加(P<0.05), 其生物可及性变化范围为 5.36%~55.33%。其中, 菜心样品经水煮后, Cd 的生物可及性增加 0.88 倍。对于烹调方式生炒而言, 烹调前后 Cd 的生

表 2 环境高镉地区常见蔬菜中主要元素和 Cd 的浓度水平(x±s)

Table 2 Average concentrations of major elements and cadmium in commonly consumed vegetables collected from a high-level environmental Cd region (x±s)

蔬菜种类	样本量	Mg(g/kg)	K(g/kg)	Ca(g/kg)	Cu(mg/kg)	Zn(mg/kg)	Cd (mg/kg)
芥菜	5	0.18±0.08	1.96±0.74	0.74±0.24	0.39±0.20	3.39±0.50	0.03±0.02
白菜	7	0.11±0.07	2.31±0.62	0.50±0.25	0.16±0.03	3.90±2.51	0.03±0.02
麦菜	6	0.22±0.09	2.86±1.26	0.44±0.44	0.34±0.09	5.37±3.30	0.30±0.61
生菜	4	0.13±0.03	2.39±1.14	0.25±0.06	0.30±0.08	3.83±2.13	0.15±0.21
菜心	3	0.19±0.08	2.78±0.05	0.49±0.05	0.56±0.21	6.93±3.91	0.09±0.11
西兰花	6	0.18±0.04	2.86±0.48	0.28±0.12	0.41±0.14	5.15±1.22	0.04±0.03
韭菜	3	0.26±0.15	3.01±0.28	0.76±0.35	0.70±0.16	5.19±2.43	0.03±0.04
大薯	5	0.15±0.05	4.54±0.78	0.04±0.01	1.64±0.41	4.33±1.46	0.08±0.08
萝卜	3	0.06±0.01	1.32±0.70	0.20±0.06	0.10±0.02	1.27±0.05	0.02±0.01

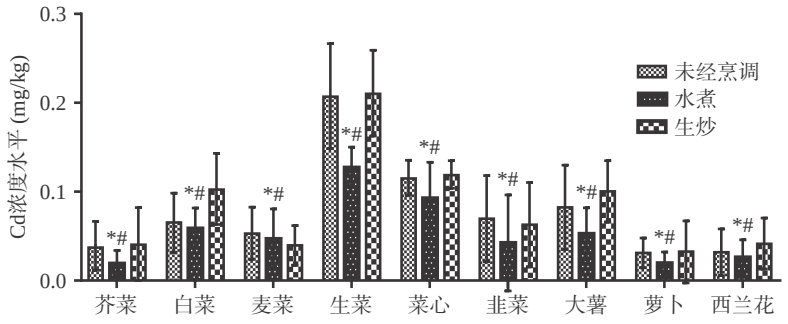


图 1 不同烹调方式对蔬菜中 Cd 浓度水平的影响

Fig.1 Effects of different cooking methods on the cadmium concentrations in vegetable samples

注: *表示与未经烹调的样品相比, 水煮蔬菜中 Cd 浓度水平有显著性差异, P<0.05; #表示与生炒样品相比, 水煮蔬菜中 Cd 浓度水平有显著性差异, P<0.05。

表 3　烹调前后蔬菜中 Cd 的生物可及性(x±s)

Table 3　Cd bioaccessibility of vegetables before and after different cooking methods (x±s)

蔬菜种类	Cd初始浓度(mg/kg)	Cd生物可及性(%)		
		未经烹调	水煮	生炒
韭菜	0.070	15.07±15.24	24.73±15.78*#	19.95±14.49
大薯	0.082	4.44±0.78	5.36±1.59*#	5.68±3.74
萝卜	0.031	30.50±8.64	42.79±16.63*#	11.72±3.92
西兰花	0.032	40.86±17.84	55.33±18.19*#	26.73±11.25
芥菜	0.037	32.64±26.04	45.61±15.18*#	24.43±14.80
白菜	0.065	15.19±7.70	21.31±12.95*#	13.03±7.38
麦菜	0.053	15.04±7.52	25.72±11.81*#	24.31±16.75
生菜	0.240	25.72±13.43	36.26±18.57*#	31.67±16.18
菜心	0.115	12.92±7.13	24.29±6.10*#	10.02±4.84

注: *表示与未经烹调的样品相比, 水煮蔬菜中Cd的生物可及性有显著性差异, $P<0.05$; #表示与生炒样品相比, 水煮蔬菜中Cd的生物可及性有显著性差异, $P<0.05$。

物可及性变化无显著性差异($P>0.05$)。对于蔬菜中 Cd 生物可及性而言, 水煮可使蔬菜中 Cd 的生物可及性明显增加, 与 Pelfrêne 等的研究结果相近, 这可能归因于水煮过程中植物组织由于细胞壁膨胀、果胶溶解/解聚和细胞分离而软化, 因此植物组织可在消化过程中受到一定破坏而将 Cd 更完全地释放[28]。然而, Fu 等的研究结果显示水煮的烹调方式可显著降低蔬菜中 Cd 的生物可及性, 这可能是因为相关研究所采用的烹调时间较长, 或在水煮过程中加入盐, 从而可能会导致更多的 Cd 释放至水中, 导致水煮过程中蔬菜初始浓度下降比例较高, 从而掩盖了体外消化过程的影响[18−19,26]。

Zhuang 等[26] 对生菜、马铃薯等 6 种蔬菜中 Cd 的生物可及性进行了研究, 其范围在 35%~66% 之间, 而 Pelfrêne 等[28] 通过体外消化模型 UBM 而得到的韭菜、法国豆、胡萝卜等 7 种蔬菜中 Cd 的生物可及性范围为 63%~72%。与上述两项研究结果相比, 本研究通过 RIVM 体外消化模型得到的蔬菜中 Cd 的生物可及性略低, 可能是由于所使用的体外消化方法不同以及蔬菜样本中 Cd 浓度水平的差别所造成的。Aziz 等通过体外消化模型得到的蔬菜中 Cd 的生物可及性为 7.21%~63.62%, 与本次研究的 Cd 生物可及性范围较为接近[29]。此外, 本研究表明不同种类蔬菜中 Cd 的生物可及性存在一定的差异, 甘蓝类>块根类>叶菜类>块茎类, 与 Hu 等[20] 的研究结果一致。

2.4　蔬菜中主要矿物元素对 Cd 生物可及性的影响

相关性分析结果显示, 环境高镉地区蔬菜样品中矿物元素浓度水平与烹调前后 Cd 的浓度水平、Cd 生物可及性的相关关系如表 4 所示。蔬菜样品中矿物元素与 Cd 的浓度水平之间相关关系不具有统计学意义。蔬菜样品中矿物元素、Cd 浓度水平与 Cd 的生物可及性的关系为: K 的含量和未经烹调蔬菜 Cd 的生物可及性存在极显著负相关关系($P<0.01$),

表 4　蔬菜中主要矿物元素与 Cd 及其生物可及性之间的相关性

Table 4　Correlations of the major mineral elements with Cd and Cd bioaccessibility in vegetable samples

	Cd	R-BAS	B-BAS	F-BAS
Mg	−0.084	−0.051	−0.014	0.385*
K	−0.132	−0.384**	−0.345	0.004
Ca	−0.08	0.032	−0.009	0.27
Cu	0.162	−0.415*	−0.451*	−0.161
Zn	0.182	−0.1	−0.084	0.105
Cd	1	−0.478*	−0.535**	−0.333
R-BAS		1	0.825**	0.496**
B-BAS			1	0.582**
F-BAS				1

注: *表示相关性分析有显著性意义, $P<0.05$; **表示相关性分析有极显著性意义, $P<0.01$; R-BAS: 未经烹调蔬菜的Cd生物可及性; B-BAS: 水煮蔬菜的Cd生物可及性; F-BAS: 生炒蔬菜的Cd生物可及性。

而 Cu 的含量和烹调前蔬菜 Cd 的生物可及性、水煮后蔬菜 Cd 的生物可及性存在显著负相关关系($P<0.05$)。烹调前 Cd 的浓度水平与烹调前 Cd 的生物可及性、水煮后 Cd 的生物可及性存在显著负相关关系($P<0.05$; $P<0.01$); 烹调前 Cd 的生物可及性、水煮后 Cd 的生物可及性以及生炒后 Cd 的生物可及性两两之间存在极显著正相关关系($P<0.01$)。

本研究未发现蔬菜样品中 Cd 的浓度水平与矿物元素之间存在显著的相关关系。然而, Cd 的生物可及性与样品中的 Cu、K 之间存在显著的负相关关系, 可能是由于这些金属离子表现出与 Cd 相似的物理化学性质, 通过影响 pH 或是竞争性与蛋白结合而影响蔬菜中 Cd 的溶解度[30]。相关的研究结果表明, 添加 $CaCl_2$ 可显著降低大米和蔬菜中 Cd 的生物可及性, 而添加葡萄糖酸锌显著降低蔬菜中 Cd 的生物可及性[18,30], 这与本文所观察到的结果较为一致。烹调前蔬菜的 Cd 浓度水平与烹调前蔬菜的 Cd 生物可及性和水煮后蔬菜 Cd 的生物可及性存在显著的负相关关系, 表明随着蔬菜样品中的 Cd 浓度水平增加, 食品基质中释放出镉的能力降低, 从而导致释放出的 Cd 浓度与初始 Cd 浓度的比值下降, 即其生物可及性降低。然而, 相关研究结果表明 Cd 浓度水平与 Cd 的生物可及性之间存在显著正相关关系($P<0.05$)[28,31], 可能是因为本研究中的蔬菜样品 Cd 浓度水平较低(85% 的样本<0.1mg/kg), 仅代表该浓度下的相关关系, 具有一定的局限性。

2.5　健康风险评估

根据前期横断面调查所得的膳食消费量和体重数据, 对环境高镉地区居民消费蔬菜摄入 Cd 的 EDI 和 THQ 进行评估, 如表 5 所示。结果表明, 在使用常规的风险评估模型时, 一般消费人群通过消费蔬菜而每日摄入 Cd 的平均水平为 0.55 μg/kg·bw, 而蔬菜高消费人群每日摄入 Cd 的平均水平为 1.47 μg/kg·bw。2010 年, 联合国粮农组织/世界卫生组织食品添加剂联合专家委员会(JECFA)制定了 Cd 的

表 5 环境高镉地区居民通过消费蔬菜每日摄入 Cd 的水平(μg/kg·bw)及其风险熵

Table 5 EDI (μg/kg·bw) and THQ of Cd for local residents in high-level environmental Cd region via vegetable consumption

蔬菜名称	烹调方式	Mean EDI		P95EDI		Mean THQ		P95 THQ	
		EDI	BEDI	EDI	BEDI	THQ	BTHQ	THQ	BTHQ
韭菜	未经烹调	0.48	0.07	1.27	0.19	0.48	0.07	1.27	0.19
	水煮	0.29	0.07	0.77	0.19	0.29	0.07	0.77	0.19
	生炒	0.43	0.09	1.15	0.23	0.43	0.09	1.15	0.23
大薯	未经烹调	0.56	0.03	1.50	0.07	0.56	0.03	1.50	0.07
	水煮	0.36	0.02	0.96	0.05	0.36	0.02	0.96	0.05
	生炒	0.69	0.04	1.83	0.10	0.69	0.04	1.83	0.10
萝卜	未经烹调	0.21	0.06	0.57	0.17	0.21	0.06	0.57	0.17
	水煮	0.13	0.06	0.36	0.15	0.13	0.06	0.36	0.15
	生炒	0.22	0.03	0.59	0.07	0.22	0.03	0.59	0.07
西兰花	未经烹调	0.22	0.09	0.58	0.24	0.22	0.09	0.58	0.24
	水煮	0.18	0.10	0.48	0.26	0.18	0.10	0.48	0.26
	生炒	0.28	0.08	0.75	0.20	0.28	0.08	0.75	0.20
芥菜	未经烹调	0.25	0.08	0.67	0.22	0.25	0.08	0.67	0.22
	水煮	0.13	0.06	0.35	0.16	0.13	0.06	0.35	0.16
	生炒	0.28	0.01	0.74	0.18	0.28	0.01	0.74	0.18
大白菜	未经烹调	0.45	0.07	1.19	0.18	0.45	0.07	1.19	0.18
	水煮	0.35	0.08	0.95	0.20	0.49	0.10	1.31	0.28
	生炒	0.65	0.08	1.72	0.22	0.65	0.08	1.72	0.22
麦菜	未经烹调	0.36	0.05	0.96	0.14	0.36	0.05	0.96	0.14
	水煮	0.32	0.08	0.85	0.22	0.32	0.08	0.85	0.22
	生炒	0.27	0.07	0.72	0.17	0.27	0.07	0.72	0.17
生菜	未经烹调	1.64	0.42	4.37	1.12	1.64	0.42	4.37	1.12
	水煮	0.85	0.31	2.25	0.82	0.85	0.31	2.25	0.82
	生炒	1.43	0.45	3.82	1.21	1.43	0.45	3.82	1.21
菜心	未经烹调	0.78	0.10	2.09	0.27	0.78	0.10	2.09	0.27
	水煮	0.67	0.16	1.78	0.43	0.67	0.16	1.78	0.43
	生炒	0.81	0.08	2.16	0.22	0.81	0.08	2.16	0.22
总	未经烹调	0.55	0.12	1.47	0.31	0.55	0.12	1.47	0.31
	水煮	0.36	0.11	0.97	0.30	0.36	0.11	0.97	0.30
	生炒	0.56	0.10	1.50	0.28	0.56	0.10	1.50	0.28

注: BEDI: 经生物可及性校正的EDI值; BTHQ: 经生物可及性校正的THQ值。

膳食暴露健康指导值, 即 Cd 的每月容许摄入量(PTMI)为 25 mg/kg·bw[32]。通过换算, 蔬菜高消费人群的 Cd 每日摄入量已高于 JECFA 建立的健康指导值。相比较而言, 在风险评估过程中引入 Cd 的生物可及性, 则发现一般消费人群通过蔬菜而每日摄入 Cd 的平均水平为 0.12 μg/kg·bw, 高消费人群每日摄入 Cd 的平均水平为 0.31 μg/kg·bw, 均低于 JECFA 设定的健康指导值, 提示其引起人体健康风险的可能性较低。同样地, 如表 5 所示, 根据每日消费蔬菜摄入 Cd 的平均水平得到一般消费人群的平均 THQ 为 0.55, 高消费人群的平均 THQ 为 1.47。在考虑 Cd 的生物可及性时, 一般消费人群的平均 THQ 为 0.12, 高消费人群的平均 THQ 为 0.31。引入生物可及性后, 高消费人群的平均 THQ 小于 1, 提示蔬菜中 Cd 经消化吸收后其对人体的危害降低, 总体而言, 当前的结果提示食用蔬菜摄入 Cd 引起的健康风险较低。

通过前期调查所获得蔬菜消费量以及当地人群的体重, 计算出的当地通过食用蔬菜获得的 EDI 为生菜>菜心>大薯>韭菜>大白菜>麦菜>芥菜>西兰花>萝卜。对于居住于该环境高镉地区的一般人群而言, 除生菜外, 通过其他蔬菜摄入 Cd 的水平均低于健康指导值。相反, 对于高消费人群, 除了萝卜、西兰花和芥菜外, 通过其他蔬菜消费而暴露 Cd 的水平均高于 PTMI。烹调方式对蔬菜的 EDI 无明显影响, 但将 Cd 的生物可及性引入膳食暴露评价模型, 可使因消费蔬菜而摄入 Cd 的暴露量明显降低, 除该地区的高消费人群通过消费生菜摄入 Cd 的暴露水平高于健康指导值外, 消费其他蔬菜的 BEDI 均低于 PTMI。同样地, 除萝卜、西兰花、芥菜和麦菜外, 高消费人群的 THQ 均大于 1。然而, 考虑 Cd 的生物可及性后, 高消费人群消费除生菜外的其他蔬菜摄入的 Cd 所造成的健康风险较低, 因 BTHQ 均小于 1。但值得注意的是, 通过蔬菜摄入的 Cd 仅是膳食 Cd 暴露的一部分, 前期有研究提示通过大米暴露 Cd 可能会造成一定的潜在健康风险[4,16,33], 因此环境

高镉地区居民因膳食暴露 Cd 而带来的健康风险仍较高，需引起高度关注。

3　结论

本研究以典型环境高镉地区为研究区域，对当地种植的 9 种常见蔬菜中五种金属元素（Mg、K、Ca、Cu、Zn）及 Cd 进行检测，采用体外 RIVM 胃肠消化模型测定蔬菜中 Cd 的生物可及性，评估通过消费蔬菜摄入 Cd 对人体造成的健康风险。结果表明，水煮可以降低蔬菜中的 Cd 浓度水平，并对 Cd 的生物可及性有明显影响。利用相关分析发现，蔬菜中的 K 和 Cu 显著影响蔬菜中 Cd 的生物可及性。若不考虑生物可及性，摄入所采集的蔬菜样本对当地一般人群造成的健康风险较低，但可能导致高消费人群的健康风险。若将生物可及性的数据纳入计算，除生菜外其余蔬菜的高消费人群的 BTHQ 均低于 1，提示食用蔬菜引起健康风险的可能性较低。然而，仍应关注环境高镉地区人群其他膳食来源的 Cd 暴露水平以及总体情况是否可造成慢性长期暴露而引起的健康风险。

参考文献

[1] ZHAO F J, MA Y, ZHU Y G, et al. Soil contamination in China: Current status and mitigation strategies[J]. Environmental Scienceand Technology, 2015, 49(2): 750−759.

[2] 王亦欣. 大米中镉的生物可及性和体内外生物利用率研究[D]. 武汉: 武汉轻工大学, 2019. [WANG Y X. Bioavailability and bioavailability of cadmium in rice[D]. Wuhan: Wuhan Polytechnic University, 2019.]

[3] JRUP L, AKESSON A. Current status of cadmium as an environmental health problem[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2009, 238(3): 201−208.

[4] ZHU P, LIANG X X, WANG P, et al. Assessment of dietary cadmium exposure: A cross-sectional study in rural areas of south China[J]. Food Control, 2016, 62: 284−290.

[5] NORDBERG G, JIN T, BERNARD A, et al. Low bone density and renal dysfunction following environmental cadmium exposure in China[J]. Ambio, 2002, 31(6): 478−481.

[6] NORDBERG G F, JIN T, WU X, et al. Prevalence of kidney dysfunction in humans-relationship to cadmium dose, metallothionein, immunological and metabolic factors[J]. Biochimie, 2009, 91(10): 1282−1285.

[7] MOITRA S, BLANC P D, SAHU S. Adverse respiratory effects associated with cadmium exposure in small-scale jewellery workshops in India[J]. Thorax, 2013, 68(6): 565−570.

[8] JRUP L. Hazards of heavy metal contamination[J]. British Medical Bulletin, 2003, 68: 167−182.

[9] CHIEN C L, HUNG T C, CHOANG K Y, et al. Daily intake of TBT, Cu, Zn, Cd and As for fishermen in Taiwan[J]. Science of the Total Environment, 2002, 285(1-3): 177−185.

[10] PAUSTENBACH D J. The practice of exposure assessment: A state-of-the-art review[J]. Journal of Toxicology and Environmental Health Part B, Critical Reviews, 2000, 3(3): 179−291.

[11] RUBY M V, DAVIS A, LINK T E, et al. Development of an *in vitro* screening test to evaluate the *in vivo* bioaccessibility of ingested mine-waste lead[J]. Environtecnol, 1993, 27(13): 2870−2877.

[12] ROTARD W, CHRISTMANN W, KNOTH W, et al. Investigation on the absorption availability of PCDD/PCDF from industriogenic soil. Model experiments on absorption assessment after oral ingestion[J]. Organohalogen Compounds, 1992, 10: 199−200.

[13] WRAGG J, CAVE M, BASTA N, et al. An inter-laboratory trial of the unified BARGE bioaccessibility method for arsenic, cadmium and lead in soil[J]. The Science of the Total Environment, 2011, 409(19): 4016−4030.

[14] OOMEN A G, HACK A, MINEKUS M, et al. Comparison of five *in vitro* digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants[J]. Environmental Science and Technology, 2002, 36(15): 3326−3334.

[15] VERSANTVOORT C H, OOMEN A G, VANDE KAMP E, et al. Applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food[J]. Food and Chemical Toxicology, 2005, 43(1): 31−40.

[16] PRAVEENA S M, OMAR N A. Heavy metal exposure from cooked rice grain ingestion and its potential health risks to humans from total and bioavailable forms analysis[J]. Food Chemistry, 2017, 235: 203−211.

[17] HACK A, SELENKA F. Mobilization of PAH and PCB from contaminated soil using a digestive tract model[J]. Toxicology Letters, 1996, 88(1-3): 199−210.

[18] FU J, CUI Y. *In vitro* digestion/Caco-2 cell model to estimate cadmium and lead bioaccessibility/bioavailability in two vegetables: The influence of cooking and additives[J]. Food and Chemical Toxicology, 2013, 59: 215−221.

[19] MNISI R L, NDIBEWU P P, MAFU L D, et al. Bioaccessibility and risk assessment of essential and non-essential elements in vegetables commonly consumed in Swaziland[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2017, 144: 396−401.

[20] HU J, WU F, WU S, et al. Bioaccessibility, dietary exposure and human risk assessment of heavy metals from market vegetables in Hong Kong revealed with an *in vitro* gastrointestinal model[J]. Chemosphere, 2013, 91(4): 455−461.

[21] OOMEN A G, ROMPELBERG C J M, BRUIL M A, et al. Development of an *in vitro* digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants[J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2003, 44(3): 281−287.

[22] The United States Environmental Protection Agency (USEPA). Integrated risk information system-database[R]. Washington, DC: USEPA, 2007.

[23] CHEN Y, WU P P, SHAO Y F, et al. Health risk assessment of heavy metals in vegetables grown around battery production area[J]. Scientia Agricola, 2014, 71(2): 126−132.

[24] 侯胜男, 汤琳, 郑娜, 等. 典型锌冶金区蔬菜重金属的生物可给性及健康风险评价[J]. 环境科学学报, 2018, 38(1): 343−349. [HOU S N, TANG L, ZHENG N, et al. Bioavailability and health risk assessment of heavy metals in vegetables from typical Zn-metallurgy regions[J]. Journal of Environmental Science,

2018, 38(1): 343−349.]

[25] ZHUANG P, MCBRIDE M B, XIA H, et al. Health risk from heavy metals via consumption of food crops in the vicinity of Dabaoshan mine, South China[J]. The Science of the Total Environment, 2009, 407(5): 1551−1561.

[26] ZHUANG P, LI Y, ZOU B, et al. Oral bioaccessibility and human exposure assessment of cadmium and lead in market vegetables in the Pearl River Delta, South China[J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2016, 23(23): 24402−24410.

[27] 刘金林, 周秀佳. 谷物、蔬菜对铅、镉、锌、铜吸收与富集的研究[J]. 华东师范大学学报 (自然科学版), 1986: 4. [LIU J L, ZHOU X J. Study on absorption and enrichment of lead, cadmium, zinc and copper in cereals and vegetables[J]. Journal of East China Normal University (Natural Science), 1986: 4.]

[28] PELFRENE A, WATERLOT C, GUERIN A, et al. Use of an *in vitro* digestion method to estimate human bioaccessibility of Cd in vegetables grown in smelter-impacted soils: The influence of cooking[J]. Environmental Geochemistry and Health, 2015, 37(4): 767−778.

[29] AZIZ R, RAFIQ M T, HE Z, et al. *In vitro* assessment of cadmium bioavailability in chinese cabbage grown on different soils and its toxic effects on human health[J]. BioMed Research International, 2015: 285351.

[30] SUN S, ZHOU X, LI Y, et al. Use of dietary components to reduce the bioaccessibility and bioavailability of cadmium in rice[J]. Environmental Science and Technology, 2020, 68(14): 4166−4175.

[31] INTAWONGSE M, DEAN J R. Use of the physiologically-based extraction test to assess the oral bioaccessibility of metals in vegetable plants grown in contaminated soil[J]. Environmental Pollution, 2008, 152(1): 60−72.

[32] World Health Organization. Evaluation of certain food additives. Seventy-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives[R]. Geneva: WHO, 2010.

[33] ZHUANG P, ZHANG C, LI Y, et al. Assessment of influences of cooking on cadmium and arsenic bioaccessibility in rice, using an *in vitro* physiologically-based extraction test[J]. Food Chemistry, 2016, 213: 206−214.

李太平, 薄慧敏. 中国食品安全监督抽检效率的定量评价研究 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 301−310. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100174

LI Taiping, BO Huimin. Quantitative Evaluation of Supervision Sampling Efficiency of Food Safety in China[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 301−310. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100174

·食品安全·

中国食品安全监督抽检效率的定量评价研究

李太平, 薄慧敏

（南京农业大学经济管理学院, 江苏南京 210095）

摘　要: 食品安全监督抽检效率是衡量政府在监督抽检环节发现问题食品和问题企业能力的重要指标，科学评价食品安全监督抽检效率对提升政府监管效能、夯实食品安全战略具有重要意义。文章基于监督抽检不合格率与随机抽检不合格率之间的理论逻辑关系，系统构建了食品安全监督抽检效率测度方法，并利用 30 个省（区、市）公布的 30 类加工食品共 919630 批次监督抽检数据，对我国食品安全监督抽检效率进行定量评价。研究表明，2017~2019 年我国食品安全监督抽检效率整体水平严重偏低且存在明显的省际差异。具体而言，2017~2019 年我国平均食品安全监督抽检效率分别仅有 0.8056、0.8493、0.8673，其中 10 个省（区、市）的监督抽检效率年均增长率为负数，监督抽检效率处于高水平和较高水平的省（区、市）数量不足 10 个，且逐渐向东部沿海地区集聚。因此，建议政府在开展食品安全监督抽检工作时，切实坚持问题导向原则，有效提高监督抽检效率。

关键词: 食品安全, 监督抽检效率, 监督抽检不合格率, 随机抽检不合格率, 定量评价

中图分类号: TS201.6; F203　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0301−10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100174

本文网刊:

Quantitative Evaluation of Supervision Sampling Efficiency of Food Safety in China

LI Taiping, BO Huimin

（College of Economics and Management, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China）

Abstract: The supervision sampling efficiency of food safety is an important index to measure the ability of the government to find problem food and problem enterprises in the supervision and sampling process. It is of great significance to scientifically measure the efficiency of food safety supervision and random inspection to improve the government's supervision efficiency and consolidate the food safety strategy. Based on the internal logical relationship between the unqualified rate of random sampling and the unqualified rate of supervision sampling, this paper systematically constructs a method to measure the efficiency of food safety supervision and sampling, and makes a quantitative evaluation of the efficiency of food safety supervision and sampling in China by using the data of 30 kinds of processed food supervision and sampling at 30 provincial levels. The results show that the overall level of supervision sampling efficiency of food safety in China from 2017 to 2019 is seriously low, and there are some inter provincial differences. Specifically, from 2017 to 2019, China's average supervision sampling efficiency of food safety was only 0.8056, 0.8493 and 0.8673 respectively. Among them, the average annual growth rate of supervision sampling efficiency of 10 regions was negative. The number of regions with high and higher supervision sampling efficiency was less than 10, and gradually concentrated in the eastern coastal areas. Therefore, it is suggested that when carrying out food safety supervision and sampling, the government should earnestly adhere to the problem oriented principle and effectively improve the supervision sampling efficiency.

Key words: food safety; supervision sampling efficiency; unqualified rate of random sampling; unqualified rate of supervision sampling; quantitative evaluation

食品安全具有公共物品属性, 在生产者受经济利益驱动、消费者受信息搜寻成本阻滞的情况下, 政

收稿日期: 2021−10−18

基金项目: 国家自然科学基金面上项目（71973066）; 江苏省高校优势学科建设工程资助项目（PAPD）。

作者简介: 李太平（1970−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品安全管理, E-mail: ltp@njau.edu.cn。

府监管是保障食品安全的根本途径[1−2]。作为政府监管的首要环节，食品安全监督抽检承担着发现问题食品和实施有效处罚措施之衔接的重任[3−4]。为此，《“十三五”国家食品安全规划》和《中共中央、国务院关于深化改革加强食品安全工作的意见》中明确提出“要持续增加监督抽检批次”、“到 2020 年，食品抽检量达到 4 批次/千人”，试图通过增加监督抽检批次提高生产者违规成本，最终达到改善食品安全状况的目的[5−6]。

事实上，根据国家市场监督管理总局网站公布的数据显示，2019 年我国食品安全监督抽检样本数量已经达到 473.68 万批次，分别是 2015、2016、2017、2018 年抽检样本数量的 27.49、3.16、2.00 和 1.41 倍，监督抽检强度已经实现 3.38 批次/千人，远远超过美国每三年对高风险食品企业检查 1 次的抽检水平[7]。然而我国食品安全状况并未随之发生明显改善。运用木桶原理和黄金分割法则，采用取值区间为 [0, 500] 的食品安全指数来衡量食品安全水平[8]，测度发现，2015~2019 年我国食品安全指数分别为 296、279、307、289、264，始终未能突破 307，甚至略有下降趋势。此外，2020 年全国消协组织受理消费者食品类投诉达 64351 件，与 2019 年相比上升 2.28 个百分点[9]。显然，在“史上最严”食品安全法全面实施的背景下[10]，我国食品安全状况未能随监督抽检批次显著增加而发生明显好转。

监督抽检的目的在于发现问题食品和问题企业，是监督处罚得以有效实施的重要前提和根本保障。所以，提高监督抽检效率即提高政府发现问题食品和问题企业的能力，是政府监管的核心和基础。2021 年国家“十四五”规划再次提出“加强食品安全监督抽检”[11]。那么，在我国食品安全监督抽检批次成倍增加的条件下，如何科学评价食品安全监督抽检效率？我国食品安全监督抽检效率究竟如何？不同地区食品安全监督抽检效率是否存在差异？目前，已有研究尚未给予足够重视，也并未做出定量回答。在此背景下，亟需客观评价我国食品安全监督抽检效率，以期从整体性和区域性的角度，为提高食品安全监督抽检效率提出更具针对性的建议，也为后续进一步探究其影响因素及作用机制奠定研究基础。

1 文献回顾

从政府监管角度来看，食品安全监管行为具体包括监督抽检和监督处罚两个环节[12]，已有研究将二者视为整体，重点探究食品安全监管效率，缺乏对食品安全监督抽检效率的考察。目前，国内外关于食品安全监管效率的研究主要从两个方面展开：一是监管效率测度方法；二是监管效率结果评价。

1.1 食品安全监管效率测度方法

食品安全监管效率的测度方法主要有两大类：一类是客观指标体系评价法。该方法以具体的监管事务为维度，投入-产出为各维度的具体指标构建逻辑，将监管过程与结果相结合来测度食品安全监管效率[13−15]。国外学者运用该方法测度食品安全监管效率起步较早，如 Kleter 和 Marvin 构建了食品在不同生产环节所遭遇安全风险的指标体系，通过测度食品安全风险系数来评估政府监管效率[16]；Bruce 和 Ariane 通过比较计算成本和收益的各种方法，对英国当局食品安全监管效率进行评估[17]；Luning 等从环境风险、食品安全管理体系性能以及产出结果三个维度构建指标体系，对欧洲各国食品安全监管效率进行测度[18]。该方法被引入国内后，国内学者根据我国食品安全监管实际情况对其进一步完善。李太平和祝文峰、赵晓丹运用成本收益法分别测度了我国政府对蔬菜和畜产品的质量安全监管效率[19−20]；王能和任运河运用数据包络分析法针对体制改革过程中食品安全监管横向水平和纵向水平的相对效率进行测度[21]；葛娟和李丽在此基础上，对投入产出指标进行细化[22]；张红凤和赵胜利除考虑正向产出指标外，还意识到非期望产出对食品安全监管效率的影响，运用 BCC 模型和超效率 SBM-DEA 模型对我国 22 个省份的食品安全监管效率进行测度[23]。

另一类是主客观指标体系结合评价法。该方法的中心思想是构建客观指标和主观指标相结合的评价指标体系[24]，重视公众对食品安全监管效率评估的参与。刘录民等将客观指标体系划分为监管效率影响因素、效率评估特征、效率评估目标，并结合公众满意度这一主观指标构建评价指标体系，进一步采用德尔菲法遴选出最终评价指标并测度食品安全监管效率[25]；王珍和袁梅采用层次分析法建立地方政府食品安全监管效率评估指标体系模型，将准则层划分为投入指标、监管过程指标、产出及结果指标，其中监管过程指标涉及公众对食品安全的满意度[26]；刘鹏从工作业绩、相关利益者、内部管理以及学习与成长四个维度设计评估指标体系，采用平衡记分卡法构建了一套更为全面的省级政府食品安全监管效率评价指标体系[27]；还有学者将德尔菲法与模糊综合评价法[28]、网络层次分析法与模糊综合评价法相结合[29]，对我国食品安全监管效率进行评估。

1.2 食品安全监管效率评价结果

既有研究中针对食品安全监管效率的评价，学者们尚未达成共识。一种观点认为食品安全监管效率正在逐步提升。自新中国成立以来，食品安全监管体制和机构历经多次变迁[30]。尤其是改革开放 40 年来，食品安全工作经历了混合过渡阶段（1979~1993 年）、全面外部监督阶段（1994~2002 年）、科学监管阶段（2003~2011 年）、治理现代化阶段（2012 年至今）[31]。其中，与混合过渡阶段相比，全面外部监督阶段和科学监管阶段的食物中毒事件数、食物中毒人数及死亡人数均呈现下降趋势，且食品卫生抽检合格率处于上升阶段，表明食品安全监管效率有所提高[32]。另一种观点认为政府监管存在缺陷[33]，导致食品安全

监管效率低下。李先国通过分析发达国家食品安全监管体系的特点及其成功经验，指出我国食品安全监管过程中缺位、错位和越位现象严重，预警处罚机制不完善，导致食品安全监管效率不高[34]。周小梅和龚强等分别从消费者感知视角和政府规制俘获视角出发，均指出食品安全监管低效是导致我国食品安全事件频发的重要原因[35−36]。还有学者认为我国食品安全监管效率存在区域异质性，虽然 2016~2017 年我国食品安全监管效率整体处于略微上升状态，但是总体水平依然不高，特别是部分地区的食品安全监管效率下降严重，呈现出“东高西低”的地区差异[23]。

尽管国内外学者围绕食品安全监管效率开展了大量的先驱性研究，为本文提供了十分有价值的参考，但已有研究仍存在如下不足之处。第一，研究视角有待聚焦。既有研究将食品安全监管中的监督抽检和监督处罚视为整体，重点关注并测度食品安全监管效率，并未将研究视角聚焦于政府监督抽检行为，特别是测度食品安全监督抽检效率的文献较为匮乏。第二，研究方法有待改进。已有研究在测度食品安全监管效率时，虽然已经将主客观指标相结合，但是由于评价指标选取存在较大差异、指标权重赋值具有不确定性，导致评价结果缺乏可比性。第三，研究范围有待拓展。现有研究鲜见对全国范围内省级层面的食品安全监督抽检效率进行测度，或者研究样本数量较少，缺乏一定的代表性。因此，本文在研究视角、研究方法和研究范围上拓宽了已有文献的局限之处，基于监督抽检不合格率与随机抽检不合格率之间的理论逻辑关系，构建食品安全监督抽检效率测度方法，并利用 2017~2019 年全国 30 个省（区、市）市场监管局网站公布的 30 类加工食品监督抽检数据，定量测度我国食品安全监督抽检效率，具有较强的客观性和真实性。

2　食品安全监督抽检效率测度原理与方法

食品安全监督抽检效率，是指一个国家或地区在食品安全水平一定的情况下，政府监管部门通过监督抽检方式发现问题食品和问题企业的能力[37]。为了坚持问题导向，提高食品安全监督抽检效率，自 2013 年起食品药品监督管理总局（现市场监督管理总局）开始实施食品分类监督抽检制度[38]。所谓食品分类监督抽检制度，就是按照食品原料属性和居民消费特征，把食品划分为若干种类，各级政府根据上一年度的监督抽检结果，合理安排下一年度的监督抽检计划，有计划有意识地多抽检上一年度合格率较低的食品种类，而少抽检上一年度合格率较高的食品种类，以达到提高政府发现问题食品和问题企业的能力的目的。因此，在食品安全水平一定的情况下，监督抽检不合格率的判别依据是越高越好，监督抽检不合格率越高，说明每百抽检批次所能发现问题食品和问题企业的能力越强，即监督抽检效率越高。因此，利用监督抽检不合格率与随机抽检不合格率之间的理论逻辑关系，可以很好地定量测度食品安全监督抽检效率。

2.1　测度监督抽检不合格率

监督抽检不合格率指的是监督抽检不合格批次占监督抽检总批次的百分比。在实施分类监督抽检条件下，假设被抽检食品按照食品原料属性和居民消费特征被划分为T类，则各地区监督抽检不合格率S的计算公式为：

$$S=\left(\sum_{i=1}^{T}Q_i\right)/\left(\sum_{i=1}^{T}N_i\right) \qquad 式（1）$$

式中：Q_i表示第i类食品监督抽检不合格批次；N_i表示第i类食品监督抽检总批次。

2.2　测度随机抽检不合格率

随机抽检不合格率可以客观反映食品安全实际情况，指的是问题食品占食品总量的百分比。本文借鉴李太平的研究方法测度各地区随机抽检不合格率R，计算公式为[39]：

$$R=\sum_{i=1}^{T}(M_i/M)\times(Q_i/N_i) \qquad 式（2）$$

式中：M表示企业总数；M_i表示第i类食品企业数量；N_i表示第i类食品监督抽检批次；Q_i表示第i类食品监督抽检不合格批次。

2.3　测度监督抽检效率

本文借鉴摸球实验和抽检概率模型[40−42]，并结合下列情形，通过分析监督抽检不合格率与随机抽检不合格率之间的理论逻辑关系，阐明食品安全监督抽检效率测度方法。

首先分析食品安全监督抽检效率与监督抽检不合格率的关系（见图 1）。假设箱中有 10 个黑球，

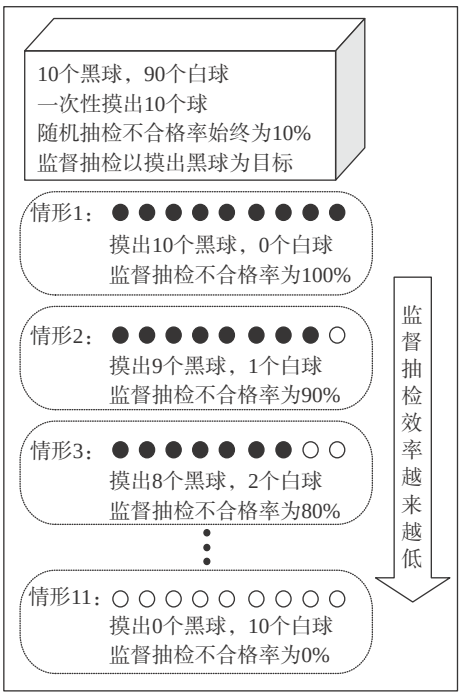


图 1　监督抽检效率与监督抽检不合格率的关系

Fig.1　Relationship between supervision sampling efficiency and the unqualified rate of supervision sampling

90 个白球，黑球代表不合格食品，白球代表合格食品。一次性摸出 10 个球，则随机抽检不合格率始终为 10%。以摸出黑球为目标，模拟监督抽检。情形 1 摸出 10 个黑球，监督抽检不合格率为 100%；情形 2 摸出 9 个黑球，1 个白球，监督抽检不合格率为 90%；情形 3 摸出 8 个黑球，2 个白球，监督抽检不合格率为 80%；以此类推，情形 11 摸出 10 个白球，监督抽检不合格率为 0%。由于监督抽检是以发现问题为导向，摸出的黑球越多表明发现问题食品的能力越强，即监督抽检效率越高。因此，由情形 1 至情形 11 可知，在随机抽检不合格率一定的条件下，监督抽检不合格率逐渐降低，监督抽检效率随之降低，故监督抽检效率与监督抽检不合格率正相关。

其次分析食品安全监督抽检效率与随机抽检不合格率的关系（见图 2）。黑球代表不合格食品，白球代表合格食品。仍然以一次性摸出 10 个黑球为目标，模拟监督抽检。情形 1 箱中有 100 个黑球，随机抽检不合格率为 100%；情形 2 箱中有 90 个黑球，10 个白球，随机抽检不合格率为 90%；以此类推，情形 10 箱中有 10 个黑球，90 个白球，随机抽检不合格为 10%。假设情形 1 到情形 10，每次监督抽检都能摸出 10 个黑球，随着箱中黑球个数逐渐减少，监督抽检摸出 10 个黑球的难度越来越大。当箱中只有 1 个黑球，99 个白球时，如情形 19 所示，以摸出这 1 个黑球为目标，则随机抽检不合格率为 1%，假设监督抽检确实摸出 1 个黑球，此时监督抽检效率最高。因此，由情形 1 至情形 19 可知，随机抽检不合格率逐渐降低，监督抽检效率反而随之提高，故监督抽检效率与随机抽检不合格率负相关。

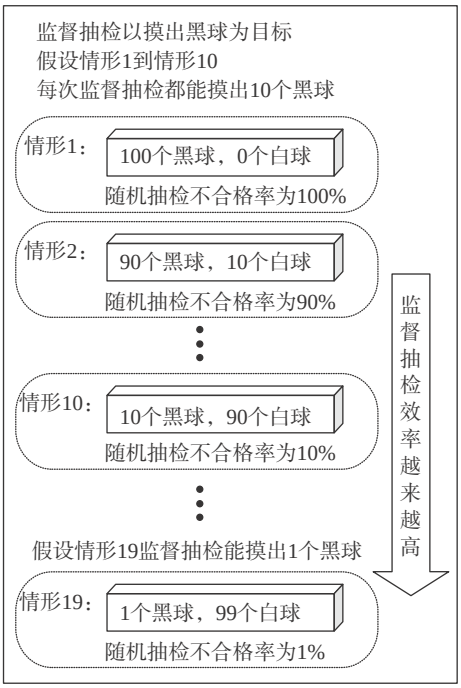


图 2 监督抽检效率与随机抽检不合格率的关系

Fig.2 Relationship between supervision sampling efficiency and random sampling unqualified rate

基于上述分析，本文采用监督抽检不合格率与随机抽检不合格率的比值来定量测度食品安全监督抽检效率，具体计算公式为：

$$E = S/R \quad \text{式（3）}$$

式中：E表示某地区食品安全监督抽检效率；S表示该地区监督抽检不合格率；R表示该地区随机抽检不合格率。

当随机抽检不合格率为 0% 时，表示食品安全状况没有任何问题，此时不再需要监督抽检。事实上，食品安全问题依然存在，因此随机抽检不合格率不可能为 0%。但是，如果监督抽检未能发现问题食品和问题企业，则监督抽检不合格率为 0%。因此，当监督抽检不合格率小于或等于随机抽检不合格率，即监督抽检效率E小于或等于 1 时，表明监督抽检效果与随机抽检效果一致，换言之，与随机抽检相比，监督抽检未能发现更多的问题食品和问题企业；当监督抽检不合格率大于随机抽检不合格率，即监督抽检效率E大于 1 时，表明监督抽检遵循了问题导向原则，发现了更多的问题食品和问题企业。因此，采用监督抽检不合格率与随机抽检不合格率的比值，可以较为客观准确地测度食品安全监督抽检效率。

3 数据选取与描述性统计

食品根据生产特征和食用方式可划分为加工食品、餐饮食品、食用农产品三大类。其中，加工食品分类于 2016 年第三季度发生较大变化，由原来的 23 类调整为 30 类。由于加工食品具有包装密封性好、产品信息标注完整、责任主体明确可溯等共同特点，且监督抽检批次已超过监督抽检总批次的 50%，但质量安全问题仍层出不穷，因此本研究选取 2017~2019 年各省（区、市）30 类加工食品为研究对象。

国家市场监督管理总局于每年年初制定并发布《食品安全监督抽检计划》，其中规定省级市场监督管理局监督抽检的对象主要是辖区内拥有生产许可证的在产食品生产企业[43]，且监督抽检信息以一周一次或两周一次的频率，发布在各地区市场监督管理局网站。由于西藏自治区数据缺失，故本研究数据涵盖 30 个省（区、市）。数据收集与整理步骤如下：首先，下载各地区历年各期食品安全监督抽检信息；其次，按照加工食品分类分别汇总监督抽检信息中的合格信息和不合格信息；最后，根据监督抽检信息中的“标称生产企业地址”，剔除非本省（区、市）的监督抽检信息。最终得到的各地区食品安全监督抽检数据如表 1 所示。

从监督抽检总批次来看，各地区食品安全监督抽检批次数量相差悬殊。2017~2019 年总抽检批次最多的地区分别为河南、山东和福建，总抽检批次均超过 22000 次；2017~2019 年总抽检批次最少的地区均为青海，总抽检批次均不足 2000 次；前者的监督抽检数量是后者的十倍之多。从监督抽检不合格批次来看，监督抽检不合格批次较多的地区，并非监

表 1　2017~2019 年各地区食品安全监督抽检数据

Table 1　Sampling inspection data of food safety supervision in various regions from 2017 to 2019

省份	2017年			2018年			2019年		
	总抽检批次（次）	不合格批次(次)	监督抽检不合格率(%)	总抽检批次（次）	不合格批次（次）	监督抽检不合格率(%)	总抽检批次（次）	不合格批次（次）	监督抽检不合格率(%)
河南	23303	634	2.72	19815	641	3.23	20106	439	2.18
江苏	20169	277	1.37	19349	310	1.60	19410	364	1.88
福建	18461	181	0.98	23027	191	0.83	22031	243	1.10
湖北	17918	383	2.14	12357	202	1.63	12658	265	2.09
广东	16730	424	2.53	22260	590	2.65	21067	473	2.25
河北	16671	632	3.79	13407	385	2.87	17585	264	1.50
山东	15035	390	2.59	31538	549	1.74	18394	279	1.52
上海	14903	87	0.58	13324	53	0.40	14486	57	0.39
重庆	13438	575	4.28	8176	136	1.66	8600	146	1.70
安徽	10636	345	3.24	12050	396	3.29	9982	217	2.17
黑龙江	9412	190	2.02	10110	175	1.73	12364	191	1.54
浙江	9103	223	2.45	17010	402	2.36	9238	201	2.18
湖南	8885	349	3.93	8785	223	2.54	11311	108	0.95
贵州	8556	112	1.31	9049	335	3.70	14785	329	2.23
辽宁	8481	162	1.91	8502	153	1.80	7768	109	1.40
四川	8074	177	2.19	13519	323	2.39	10068	262	2.60
天津	7940	69	0.87	7800	114	1.46	7743	111	1.43
江西	7440	178	2.39	6132	198	3.23	6137	135	2.20
北京	6525	58	0.89	7713	53	0.69	10885	34	0.31
新疆	6516	262	4.02	8566	187	2.18	7821	198	2.53
云南	5483	96	1.75	4712	9	0.19	6269	98	1.56
广西	5072	439	8.66	5766	377	6.54	6423	371	5.78
陕西	4881	103	2.11	5214	106	2.03	6254	248	3.97
内蒙古	4136	124	3.00	4109	122	2.97	7398	49	0.66
山西	3754	162	4.32	4017	108	2.69	4683	92	1.96
甘肃	3418	199	5.82	7123	221	3.10	7211	148	2.05
海南	3107	86	2.77	3004	96	3.20	3602	96	2.67
吉林	3011	78	2.59	4785	113	2.36	9890	178	1.80
宁夏	1527	6	0.39	4131	81	1.96	3567	139	3.90
青海	959	18	1.88	1300	25	1.92	1700	25	1.47
合计	283544	7019		316650	6874		319436	5869	

督抽检总批次也较多。如 2017 年新疆的不合格批次有 262 次，位列全国第 11 位，但是总抽检批次数量位于全国第 20 位；2018 年安徽不合格批次有 396 次，位列全国第 5 位，但总抽检批次数量位列全国第 11 位；2019 年广西不合格批次有 371 次，位列全国第 3 位，但总抽检批次仅位列全国第 23 位。

2015 年新修订的《中华人民共和国食品安全法》规定，国家对食品生产经营实行许可认证制度，将原先的“QS”认证标志改为食品生产许可证编号“SC”标志[44]。食品生产企业只有在申请“SC”编号后才能生产食品，该信息汇总于国家市场监督管理总局网站上。利用食品生产许可证编号中的食品类别代码和省（区、市）代码，汇总并整理 2017~2019 年各地区加工食品生产企业数量如表 2 所示。由于篇幅所限，此处仅列示由公式（2）测度的随机抽检不合格率，未详细列示各地区 30 类加工食品企业数量。

从加工食品企业数量来看，2017~2019 年各地区食品企业数量基本保持稳定，但不同地区食品企业数量相差悬殊。食品企业数量最多的地区是山东，食品企业数量最少的地区是青海，前者数量是后者的 50 倍之多。结合表 1 中的总抽检批次，各地区历年食品安全监督抽检批次数量均大于当地食品企业数量，说明理论上每家食品企业每年至少被抽检一次，再次表明我国食品安全监督抽检力度较大，已超过美国每三年对高风险食品企业检查一次的抽检力度。

由前文分析可知，随机抽检不合格率能够较为准确地反映一个地区食品安全真实水平，此时监督抽检不合格率越高说明政府监管部门发现问题食品和问题企业的能力越强，即监督抽检效率越高。由于国家市场监管总局提出 2020 年监管目标是食品安全监督抽检合格率达到 98%，因此，此处以抽检不合格率 2% 为基准，通过比较随机抽检不合格率与监督抽检不合格率高于 2% 的省份个数，初步判断我国食品安全监督抽检效率大致情况。从随机抽检不合格率

表 2 2017~2019 年各地区食品生产企业数量及随机抽检合格率

Table 2 Number of food production enterprises and random sampling qualification rate in different regions from 2017 to 2019

省份	2017年		2018年		2019年	
	食品企业数量(家)	随机抽检不合格率(%)	食品企业数量(家)	随机抽检不合格率(%)	食品企业数量(家)	随机抽检不合格率(%)
山东	14702	2.78	16634	1.74	17183	1.46
广东	10965	2.37	11205	2.69	11547	1.84
江苏	9294	1.55	9709	1.78	10222	2.12
安徽	8241	3.38	8494	3.24	9175	2.09
浙江	8198	3.46	8718	2.98	8988	2.62
福建	7251	1.04	7530	0.97	8170	0.96
黑龙江	7037	1.90	7414	1.59	7639	1.43
湖北	6655	2.16	6949	1.58	7220	1.69
河南	6558	2.73	6951	2.99	6960	2.09
河北	6484	3.81	6772	3.52	6907	1.93
湖南	6107	4.38	6472	2.96	6926	1.22
辽宁	6015	1.72	6016	1.66	6031	1.43
云南	5373	8.08	5917	0.45	6102	2.99
四川	5067	3.11	5526	2.41	5646	2.87
广西	5034	7.98	5326	7.00	5837	9.10
吉林	4376	9.08	4366	4.78	4680	2.39
贵州	3727	1.85	3946	3.93	4139	2.26
江西	3660	2.07	4004	3.34	4195	2.34
重庆	2972	4.38	3043	1.60	3075	2.12
山西	2765	4.46	3017	3.64	3178	2.85
内蒙古	2716	2.87	2862	3.45	2912	0.79
甘肃	2168	8.87	2447	4.96	2503	3.15
陕西	2047	3.27	2163	2.87	2176	4.91
新疆	1453	16.03	1559	9.47	1640	8.83
天津	1264	1.52	1289	1.73	1317	1.55
上海	1197	0.66	1197	0.45	1294	0.41
海南	1102	2.94	1166	2.78	1184	2.49
北京	1017	0.92	1027	0.73	1027	0.33
宁夏	1009	1.31	1088	2.32	1136	4.06
青海	267	7.09	313	5.32	467	5.03

来看,2017~2019 年随机抽检不合格率高于 2% 的省份个数分别为 21、19 和 18 个,结合表 1 可知,2017~2019 年监督抽检不合格率高于 2% 的省份个数分别为 20、17 和 14 个,前者数量均多于后者,说明部分省份食品安全监督抽检效率亟待提高。

4 食品安全监督抽检效率定量评价

本文测度了 2017~2019 年我国 30 个省(区、市)的食品安全监督抽检效率,结果见表 3。具体而言,2017 年食品安全监督抽检效率大于 1 的地区有 6 个,分别是内蒙古、黑龙江、辽宁、江西、广东、广西;2018 年食品安全监督抽检效率大于 1 的地区有 7 个,分别是黑龙江、辽宁、安徽、河南、湖北、海南、重庆;2019 年食品安全监督抽检效率大于 1 的地区有 8 个,分别是黑龙江、安徽、福建、山东、河南、湖北、广东、海南。尽管食品安全监督抽检效率大于 1 的地区数量呈现逐年递增趋势,但是各地区年均监督抽检效率大于 1 的地区数量仅占样本总数的 26.67%,且年均监督抽检效率最大值为 1.0926,最小值则低至 0.2558,表明不同地区食品安全监督抽检效率相差悬殊。从年均增长率来看,10 个省(区、市)的食品安全监督抽检效率的年均增长率为负数,表明研究区域中有三分之一的地区食品安全监督抽检效率呈现下降趋势。从各年度我国食品安全监督抽检效率均值来看,2017~2019 年我国平均食品安全监督抽检效率分别为 0.8056、0.8493、0.8673,尽管监督抽检效率逐年提升,但是始终未能突破 1,表明我国食品安全监督抽检效率水平整体偏低。进一步采用方差分析可知,各年度之间的显著性水平为 0.6151,表明总体上我国食品安全监督抽检效率在 2017~2019 年期间并未发生显著提升。

为了进一步剖析我国食品安全监督抽检效率的区域异质性,本文借鉴江恩波动法则对省级食品安全监督抽检效率进行分组。江恩波动法则强调以 8 为基础的分割比例关系,其中心思想是当事物达到第一个分割比例点 1/8 时,就会出现共振关系,产生更有力的作用达到下一个分割比例点 3/8,该法则广泛应用于证券投资、军事指挥、天文潮汐、音乐作曲等领域[45]。本文借鉴江恩波动法则,并结合监督抽检效率

表 3　2017~2019 年各地区食品安全监督抽检效率

Table 3　Supervision sampling efficiency of food safety in different regions from 2017 to 2019

编号	省份	食品安全监督抽检效率				
		2017年	2018年	2019年	均值	年均增长率
1	北京	0.9663	0.9517	0.9420	0.9533	-0.0127
2	天津	0.5716	0.8450	0.9198	0.7788	0.2685
3	河北	0.9952	0.8162	0.7776	0.8630	-0.1161
4	山西	0.9682	0.7387	0.6871	0.7980	-0.1576
5	内蒙古	1.0453	0.8615	0.8381	0.9150	-0.1046
6	辽宁	1.1134	1.0843	0.9780	1.0586	-0.0628
7	吉林	0.2851	0.4938	0.7538	0.5109	0.6260
8	黑龙江	1.0635	1.0882	1.0748	1.0755	0.0053
9	上海	0.8762	0.8794	0.9550	0.9035	0.0440
10	江苏	0.8839	0.8977	0.8885	0.8900	0.0026
11	浙江	0.7081	0.7926	0.8316	0.7774	0.0837
12	安徽	0.9572	1.0169	1.0402	1.0048	0.0425
13	福建	0.9399	0.8523	1.1477	0.9800	0.1050
14	江西	1.1565	0.9668	0.9413	1.0215	-0.0978
15	山东	0.9332	0.9972	1.0402	0.9902	0.0558
16	河南	0.9956	1.0811	1.0419	1.0395	0.0230
17	湖北	0.9918	1.0295	1.2382	1.0865	0.1173
18	湖南	0.8967	0.8578	0.7813	0.8453	-0.0666
19	广东	1.0683	0.9869	1.2227	1.0926	0.0698
20	广西	1.0852	0.9342	0.6353	0.8849	-0.2349
21	海南	0.9436	1.1492	1.0727	1.0552	0.0662
22	重庆	0.9769	1.0361	0.8026	0.9385	-0.0936
23	四川	0.7044	0.9924	0.9045	0.8671	0.1332
24	贵州	0.7076	0.9423	0.9846	0.8782	0.1796
25	云南	0.2165	0.4208	0.5218	0.3864	0.5525
26	陕西	0.6459	0.7069	0.8086	0.7205	0.1189
27	甘肃	0.6564	0.6256	0.6516	0.6445	-0.0037
28	青海	0.2651	0.3610	0.2923	0.3061	0.0500
29	宁夏	0.2982	0.8438	0.9595	0.7005	0.7938
30	新疆	0.2508	0.2301	0.2864	0.2558	0.0686
	均值	0.8056	0.8493	0.8673		

测度原理与测度结果，对食品安全监督抽检效率进行划分，具体划分准则如下：以 1 为分界线，选取 1/8 和 3/8 分割点把监督抽检效率划分为 5 类，将食品安全监督抽检效率位于(0, 0.625]、(0.625, 0.875]、(0.875, 1]、(1, 1.125]、(1.125, 1.375] 分别界定为极低水平、低水平、较低水平、较高水平、高水平。各地区食品安全监督抽检效率水平见表 4。

总体而言，各地区食品安全监督抽检效率水平呈现三个特征：第一，食品安全监督抽检效率水平划分结果呈现出“中间多、两头少”的特征。2017 年食

表 4　2017~2019 年各地区食品安全监督抽检效率水平

Table 4　Level of supervision sampling efficiency of food safety in different regions from 2017 to 2019

效率水平	效率区间	2017年		2018年		2019年	
		省份	合计	省份	合计	省份	合计
极低水平	(0, 0.625]	新疆、宁夏、青海、云南、吉林、天津	6	新疆、青海、云南、吉林	4	新疆、青海、云南	3
低水平	(0.625, 0.875]	浙江、贵州、四川、甘肃、陕西	5	湖南、福建、天津、宁夏、河北、浙江、山西、陕西、甘肃、内蒙古	10	浙江、陕西、重庆、湖南、河北、吉林、山西、甘肃、广西、内蒙古	10
较低水平	(0.875, 1]	河南、河北、湖北、重庆、山西、北京、安徽、海南、福建、山东、湖南、江苏、上海	13	山东、四川、广东、江西、北京、贵州、广西、江苏、上海	9	贵州、辽宁、宁夏、上海、北京、江西、天津、四川、江苏	9
较高水平	(1, 1.125]	广东、广西、辽宁、黑龙江、内蒙古	5	重庆、湖北、河南、安徽、辽宁、黑龙江	6	海南、河南、安徽、山东、黑龙江	5
高水平	(1.125, 1.375]	江西	1	海南	1	湖北、福建、广东	3

品安全监督抽检效率极低水平地区有 6 个，较低水平和低水平地区共 18 个，而较高水平和高水平地区共 6 个；2018 年食品安全监督抽检效率极低水平地区有 4 个，较低水平和低水平地区共 19 个，而较高水平和高水平地区共 7 个；2019 年食品安全监督抽检效率极低水平地区有 3 个，较低水平和低水平地区共 19 个，而较高水平和高水平地区共 8 个。显然，大多数地区的食品安全监督抽检效率处于较低水平和低水平阶段。第二，食品安全监督抽检效率高水平地区具有不稳定性。2017 年食品安全监督抽检效率高水平地区为江西，2018 年为海南，2019 年为湖北、广东、福建，尽管监督抽检效率高水平地区的数量有所增加，但是监督抽检效率高水平地区每年都在变动，缺乏稳定性，说明监督抽检效率高水平地区未能充分发挥辐射带动作用。第三，食品安全监督抽检效率较高水平和高水平地区逐渐向东部地区集聚。2017~2019 年食品安全监督抽检效率较高水平和高水平地区中，属于东部地区的省（区、市）数量分别为 1、1 和 4 个，从这些地区的地理区位来看，食品安全监督抽检效率较高水平和高水平地区逐渐向东部沿海地区集聚，且出现集中连片趋势。

5 结论与启示

随着食品安全监督抽检批次不断增加，提高食品安全监督抽检效率已成为政府监管的核心和基础。本文在充分考虑食品安全监督抽检目的和具体执行方法的基础上，基于监督抽检不合格率与随机抽检不合格率之间的理论逻辑关系，系统构建了食品安全监督抽检效率测度方法，并利用 2017~2019 年全国 30 个省（区、市）市场监督管理局公布的 30 类加工食品监督抽检数据，对我国省级历年食品安全监督抽检效率进行定量测度。结果显示，2017~2019 年我国食品安全监督抽检效率整体水平严重偏低且存在明显的省际差异。具体而言，我国平均食品安全监督抽检效率分别仅有 0.8056、0.8493、0.8673，且年度之间并未发生显著提升，其中 10 个省（区、市）的监督抽检效率年均增长率为负数；进一步对 30 个省（区、市）食品安全监督抽检效率进行分组，食品安全监督抽检效率水平呈现出“中间多、两头少”的特征，监督抽检效率高水平地区具有不稳定性，但是监督抽检效率高水平和较高水平地区逐渐向东部沿海地区集聚。上述结论表明我国食品安全监督抽检效率亟待提高。

本文的研究结论可以为地方政府及相关部门提高食品安全监督抽检效率提供信息参考和决策依据，同时也为保障消费者“舌尖上的安全”、全面实施国家“食品安全战略”提供研究思路。第一，坚持食品安全监督抽检以问题为导向，合理分配食品安全监督抽检批次。地方政府在食品安全监督抽检过程中，应始终坚持以发现问题食品和问题企业为原则，只有通过监督抽检发现更多的问题食品和问题企业，才能依据《食品安全法》对违规生产企业进行处罚，提高企业违规成本，倒逼企业规范生产。在实施分类监督抽检的条件下，地方政府在增加监督抽检批次数量的同时，更应重视监督抽检批次在不同食品种类之间分配的数量，切实根据上一期的监督抽检结果合理制定下一期监督抽检计划，为有效提高食品安全监督抽检效率营造良好的制度氛围。第二，重视食品安全监督抽检效率地区差异问题，重点提高中西部地区食品安全监督抽检效率。在贯彻落实食品安全监督抽检工作时，应依据各地区食品安全实际状况，不断调整具体的监督抽检措施，转变“一刀切”的监管思路。特别是针对中西部地区，为鼓励当地政府提高监督抽检效率，可以根据地方政府发现问题食品和问题企业的数量或比例，及最终解决食品安全问题的效果，给予一定的监管资源配置奖励，为全面提高食品安全监督抽检效率建立完善的激励机制。

参考文献

[1] JOUANJEAN M A, MAUR J C, SHEPHERD B. Reputation matters: Spillover effects for developing countries in the enforcement of US food safety measures[J]. Food Policy, 2015, 55: 81−91.

[2] 聂文静, 薄慧敏, 李太平. 消费者搜寻农产品分级信息的阻滞机制及要素选择研究[J]. 华中农业大学学报 (社会科学版), 2021(3): 51−62. [NIE W J, BO H M, LI T P. Blocking mechanism and attributes selection of consumers' searching grading information of agricultural products[J]. Journal of Huazhong Agricultural University (Social Sciences Edition), 2021(3): 51−62.]

[3] STARBIRD S A. Designing food safety regulations: The effect of inspection policy and penalties for noncompliance on food processor behavior[J]. Journal of Agricultural & Resource Economics, 2000, 25(2): 616−635.

[4] 范伟. 食品安全监督抽检制度的规范建构基于行政过程论视角的分析[J]. 中外法学, 2021, 33(1): 265−279. [FAN W. Standard construction of the sampling system for food safety supervision from[J]. Peking University Law Journal, 2021, 33(1): 265−279.]

[5] 施京京. 全方位筑牢食品安全堤坝《中共中央国务院关于深化改革加强食品安全工作的意见》解读[J]. 中国质量技术监督, 2019(6): 18−21. [SHI J J. Building a strong food safety dam from all dimensions[J]. China Quality Supervision, 2019(6): 18−21.]

[6] 聂文静, 李太平, 薄慧敏. 基于法经济学视角的农产品质量分级监管力度与监管选择——以企业伪造等级标签为例[J]. 财贸研究, 2020, 31(3): 49−58. [NIE W J, LI T P, BO H M. Regulatory strength and regulatory choice for quality grading system of agricultural products based on the economics of law: An example of suppliers falsifying grade labels[J]. Finance and Trade Research, 2020, 31(3): 49−58.]

[7] 李婷, 刘武兵. 美国食品安全管理做法及启示[J]. 世界农业, 2014(8): 12−14. [LI T, LIU W B. US experience in food safety supervision[J]. World Agriculture, 2014(8): 12−14.]

[8] 李太平. 我国食品安全指数的编制理论与应用研究——以国家食品抽检数据为例[J]. 农业经济问题, 2017, 38(7): 80−87.

［LI T P. On the theory and application of Chinese food safety index: A case of national food quality sampling and detecting data[J]. Issues in Agricultural Economy, 2017, 38(7): 80−87.］
［9］ 宋莹. 中消协发布 2020 年全国消协组织受理投诉情况分析[J]. 轻工标准与质量，2021(1): 9−11.［SONG Y. China Consumers' Association released the analysis of complaints accepted by the China Consumers' Association in 2020[J]. Standard & Quality of Light Industry, 2021(1): 9−11.］
［10］ 王冀宁, 韦浩然, 庄雷. “最严格的监管”和“最严厉的处罚”指示的食品安全治理研究——基于委托代理理论的分析[J]. 南京工业大学学报 (社会科学版), 2019, 18(3): 80−89.［WANG J N, WEI H R, ZHUANG L. Food safety governance research under the “strictest supervision” and “strictest punishment”: Based on the analytical perspective of principal-agent theory[J]. Journal of Nanjing Tech University (Social Science Edition), 2019, 18(3): 80−89.］
［11］ 江奕涵. 我国食品安全政府监管的问题及对策分析[J]. 现代食品，2021(14): 44−46.［JIANG Y H. Problems and countermeasures of food safety supervision in China[J]. Modern Food, 2021(14): 44−46.］
［12］ 聂文静, 薄慧敏, 李太平. 中国农产品质量分级的理论依据与福利评估——基于选择实验调查的福利评估[J]. 农业技术经济，2021(7): 65−78.［NIE W J, BO H M, LI T P. A theoretical basis for and path towards quality grading system of agricultural products in China—welfare evaluation based on choice experiment survey[J]. Journal of Agrotechnical Economics, 2021(7): 65−78.］
［13］ ANTLE J M. Efficient food safety regulation in the food manufacturing sector[J]. American Journal of Agricultural Economics, 1996, 78(5): 1242−1247.
［14］ ARROW K J, CROPPER M L, EADS G C, et al. Is there a role for benefit-cost analysis in environmental, health, and safety regulation?[J]. Science, 1996, 272(5259): 221−222.
［15］ MASSIANI J. Cost-Benefit analysis of policies for the development of electric vehicles in germany: Methods and results[J]. Transport Policy, 2015, 38: 19−26.
［16］ KLETER G A, MARVIN H. Indicators of emerging hazards and risks to food safety[J]. Food & Chemical Toxicology, 2009, 47(5): 1022−1039.
［17］ BRUCE T W, ARIANE K. Economic assessment of food safety standards: Costs and benefits of alternative approaches[J]. Food Control, 2010, 21(12): 1611−1619.
［18］ LUNING P A, KIREZIEVA K, HAGELAAR G, et al. Performance assessment of food safety management systems in animal-based food companies in view of their context characteristics: A European study[J]. Food Control, 2015, 49: 11−22.
［19］ 李太平, 祝文峰. 生鲜农产品质量安全监管力度研究——以蔬菜农药残留为例[J]. 江苏社会科学，2017(2): 84−91.［LI T P, ZHU W F. Study on quality and safety supervision of fresh agricultural products: Taking pesticide residues in vegetables as an example[J]. Jiangsu Social Sciences, 2017(2): 84−91.］
［20］ 赵晓丹. 基于成本收益法的北京市畜禽产品监管效率分析[J]. 农业技术经济，2018(2): 119−129.［ZAHO X D. Efficiency and effectiveness of supervision policy on quality and safety of livestock and poultry products in Beijing[J]. Journal of Agrotechnical Economics, 2018(2): 119−129.］
［21］ 王能, 任运河. 食品安全监管效率评估研究[J]. 财经问题研究，2011(12): 35−39.［WANG N, REN Y H. Study on efficiency evaluation of food safety supervision[J]. Research on Financial and Economic Issues, 2011(12): 35−39.］
［22］ 葛娟, 李丽. 我国食品安全规制效率的实证分析[J]. 安徽工业大学学报 (社会科学版), 2014, 31(6): 41−44.［GE J, LI L. Empirical analysis of the efficiency of rules and restrictions to China food security[J]. Journal of Anhui University of Technology (Social Sciences), 2014, 31(6): 41−44.］
［23］ 张红凤, 赵胜利. 我国食品安全监管效率评价——基于包含非期望产出的 SBM-DEA 和 Malmquist 模型[J]. 经济与管理评论，2020, 36(1): 46−57.［ZHANG H F, ZHAO S L. The efficiency evaluation of food safety regulation in China-based on SBM-DEA and malmquist models with undesired outputs[J]. Review of Economy and Management, 2020, 36(1): 46−57.］
［24］ 陈磊, 林婧庭. 法治政府绩效评价: 主客观指标的互补互证[J]. 中国行政管理，2016(6): 16−21.［CHEN L, LIN J T. On the subjective and objective indicators of nomocracy government performance evaluation[J]. Chinese Public Administration, 2016(6): 16−21.］
［25］ 刘录民, 侯军歧, 董银果. 食品安全监管绩效评估方法探索[J]. 广西大学学报 (哲学社会科学版), 2009, 31(4): 5−9.［LIU L M, HOU J Q, DONG Y G. Exploration on performance evaluation method of food safety supervision[J]. Journal of Guangxi University (Philosophy and Social Science), 2009, 31(4): 5−9.］
［26］ 王珍, 袁梅. 地方政府食品安全监管绩效指标体系的重要性分析[J]. 粮食科技与经济，2010, 35(5): 9−10.［WANG Z, YUAN M. Analysis on the importance of local government food safety supervision performance index system[J]. Grain Science and Technology and Economy, 2010, 35(5): 9−10.］
［27］ 刘鹏. 省级食品安全监管绩效评估及其指标体系构建——基于平衡计分卡的分析[J]. 华中师范大学学报 (人文社会科学版), 2013, 52(4): 17−26.［LIU P. On food safety regulation performance evaluation and its indicator system[J]. Journal of Central China Normal University (Humanities and Social Sciences), 2013, 52(4): 17−26.］
［28］ 陈红华, 向南. 北京市乳制品安全监管政府绩效评估[J]. 中国农业大学学报，2016, 21(11): 175−184.［CHEN H H, XIANG N. Government performance evaluation of dairy products safety regulation in Beijing[J]. Journal of China Agricultural University, 2016, 21(11): 175−184.］
［29］ 王冀宁, 王帅斌, 郭百涛. 中国食品安全监管绩效的评价研究——基于全国 688 个监管主体的调研[J]. 现代经济探讨，2018(8): 17−24.［WANG J N, WANG S B, GUO B T. The evaluation of China's food safety regulation performance: A sampling survey of 690 eegulatory bodies in 31 provinces[J]. Modern Economic Research, 2018(8): 17−24.］
［30］ 詹承豫. 中国食品安全监管体制改革的演进逻辑及待解难题[J]. 南京社会科学，2019(10): 75−82.［ZHAN C Y. The evolutionary logic of China’s food safety regulatory system reform and the problem to be solved[J]. Nanjing Journal of Social Sciences,

2019(10): 75−82.]
[31] 胡颖廉. 改革开放 40 年中国食品安全监管体制和机构演进[J]. 中国食品药品监管, 2018(10): 4−24. [HU Y L. Evolution of China's food safety supervision system and institutions in the 40 years of reform and opening up[J]. China Food & Drug Administration Magazine, 2018(10): 4−24.]
[32] 刘鹏. 中国食品安全监管——基于体制变迁与绩效评估的实证研究[J]. 公共管理学报, 2010, 7(2): 63−78. [LIU P. Chinese food safety regulation: An empirical study on regime change and performance evaluation[J]. Journal of Public Management, 2010, 7(2): 63−78.]
[33] SHAPIRO C. Premiums for high quality products as returns to reputations[J]. The Quarterly Journal of Economics, 1983, 98(4): 659−680.
[34] 李先国. 发达国家食品安全监管体系及其启示[J]. 财贸经济, 2011(7): 91−96. [LI X G. Study on food safety supervision system in developed countries[J]. Finance & Trade Economics, 2011(7): 91−96.]
[35] 周小梅. 我国食品安全管制的供求分析[J]. 农业经济问题, 2010, 31(9): 98−104. [ZHOU X M. Supply and demand analysis of food safety control in China[J]. Issues in Agricultural Economy, 2010, 31(9): 98−104.]
[36] 龚强, 雷丽衡, 袁燕. 政策性负担、规制俘获与食品安全[J]. 经济研究, 2015, 50(8): 4−15. [GONG Q, LEI L H, YUAN Y. Policy burden, regulation capture and food safety[J]. Economic Research Journal, 2015, 50(8): 4−15.]
[37] 李太平, 薄慧敏, 聂文静. 中国食品安全监督抽检效率评价研究——基于政绩考核压力下的抽检批次分配视角[J]. 宏观质量研究, 2021, 9(6): 86−98. [LI T P, BO H M, NIE W J. A study on the evaluation of supervision sampling efficiency of food safety in China—based on the perspective of sampling batches distribution under the pressure of government performance evaluation[J]. Journal of Macro-quality Research, 2021, 9(6): 86−98.]
[38] 聂磊, 汪永信. 食品安全监督抽检视角下的食品分类体系研究[J]. 现代食品, 2020(13): 118−121. [NIE L, WANG Y X. Study on food classification system from the perspective of food safety supervision and inspection[J]. Modern Food, 2020(13): 118−121.]
[39] 李太平. 基于分类抽样原理的我国食品安全状况定量评价研究[J]. 农业经济问题, 2020(9): 132−142. [LI T P. Study on China's food safety situation evaluation with classification random sampling theory[J]. Issues in Agricultural Economy, 2020(9): 132−142.]
[40] ELLSBERG D. Risk, ambiguity, and the savage axioms[J]. Quarterly Journal of Economics, 1961, 75(4): 643−669.
[41] 姚东旻, 王麒植, 庄颖. 模糊性情形下互动决策的行为探析[J]. 经济学报, 2020, 7(3): 112−140. [YAO D M, WANG Q Z, ZHUANG Y. Analysis of the behavior in interactive decision-making under ambiguous situation[J]. China Journal of Economics, 2020, 7(3): 112−140.]
[42] 聂文静. 基于消费者视角的农产品质量分级研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2018. [NIE W J. Study on quality grading of agricultural products from the perspective of consumers[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2018.]
[43] 李太平, 薄慧敏, 聂文静. 自由贸易是否改变了区域食品生产结构——来自省级层面的食品企业数据[J]. 经济问题, 2021(4): 112−120. [LI T P, BO H M, NIE W J. Does free trade change the structure of regional food production: Based on data of interprovincial food enterprises[J]. On Economic Problems, 2021(4): 112−120.]
[44] 刘亚平, 梁芳. 监管国家的中国路径: 以无证查处为例[J]. 学术研究, 2018(9): 44−52. [LIU Y P, LIANG F. China's path to the regulatory country: Taking undocumented investigation as an example[J]. Academic Research, 2018(9): 44−52.]
[45] 蒋义行, 陶暐拟. 江恩理论解析与实战应用十六讲 (第三版)[M]. 北京: 地震出版社, 2019: 13−19. [JIANG Y X, TAO W N. Sixteen lectures on the analysis and practical application of Gann Theory (Third Edition)[M]. Beijing: Seismological Press, 2019: 13−19.]

李俊, 蔡滔, 代虹镜, 等. 基于气相色谱质谱法测定茶叶中哒螨灵等 9 种农药残留量的测量不确定度评定 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 311−322. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090073

LI Jun, CAI Tao, DAI Hongjing, et al. Evaluation of Measurement Uncertainty for the Determination of Pyridaben and Other Nine Pesticide Residues in Tea by Gas Chromatography-Mass Spectrometry [J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 311−322. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090073

· 分析检测 ·

基于气相色谱质谱法测定茶叶中哒螨灵等 9 种农药残留量的测量不确定度评定

李　俊[1], 蔡　滔[1], 代虹镜[2], 苏美丞[1], 祝　愿[1], 王　震[1,*]

(1.贵州省农产品质量安全监督检验测试中心, 农业部农产品质量安全风险评估实验室, 贵州贵阳 550004;
2.黔南民族师范学院化学化工学院, 贵州都匀 558000)

摘　要: 目的: 评定气相色谱质谱法测定茶叶中哒螨灵等 9 种农药含量的不确定度。方法: 本研究基于气相色谱质谱法, 结合内标定量, 采用两个不同检测方法对茶叶中哒螨灵等 9 种农药的残留进行了不确定度的详细评定, 对标准物质的配制、样品称量、样品提取、净化、测量等实验过程引入的不确定度进行评定和分析。结果: 分析评定合成不确定度过程, 可知不确定度贡献主要来自标准曲线拟合（不确定度 1.45%~7.93%）、样品添加回收率（方法 1 不确定度 2.64%~3.54%, 方法 2 不确定度 1.62%~5.89%）和标准溶液配制（不确定度 2.46%）, 对实验结果的影响较大, 其次是样品测量重复性, 在极低测量浓度时（不确定度为 0.5%~2.56%）, 影响最为明显。结论: 选择合适的前处理方法, 严格控制样品前处理各步骤, 使用合适的标准曲线浓度点范围, 在定量软件中调整标准曲线浓度点的权重, 能够获得更好的拟合结果, 测量结果如出现阳性检出时, 样品需要复测 3 次以上计算平均值才能得到较可靠的结果。

关键词: 气相色谱质谱法, 农药残留, 茶叶, 不确定度

中图分类号: S481.8　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0311−12

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090073

本文网刊:

Evaluation of Measurement Uncertainty for the Determination of Pyridaben and Other Nine Pesticide Residues in Tea by Gas Chromatography-Mass Spectrometry

LI Jun[1], CAI Tao[1], DAI Hongjing[2], SU Meicheng[1], ZHU Yuan[1], WANG Zhen[1,*]

(1.Guizhou Provincial Supervision and Testing Center for Agricultural Product Quality, Agricultural Product Quality and Safety Risk Assessment Laboratory of the Ministry of Agriculture, Guiyang 550004, China;
2.School of Chemistry and Chemical Engineering, Qiannan Normal College for Nationalities, Duyun 558000, China)

Abstract: Objective: To evaluate the uncertainty of determination of nine pesticides in tea by gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS). Methods: The uncertainties of nine pesticide residues in tea were evaluated by GC-MS combined with internal standard quantitative method. Five evaluation components, including pesticide standards preparation, sample weighing, extraction, purification and detection were studied. Results: The main uncertainty in the determination of pesticides came from the fitting process of standard curve ($u_{rel}(R)$=1.45%~7.93%), sample recovery ($u_{rel}(Q)^a$= 2.64%~3.54%, $u_{rel}(Q)^b$=1.62%~5.89%) and standard solution preparation ($u_{rel=}$2.46%), then the repetition of the sample measurement ($u_{rel}(A)$=0.5%~2.56%), especially at the extremely low concentration. Conclusion: For the reliable results, it is

收稿日期: 2021−09−06

基金项目: 2021 年国家农产品质量安全风险评估项目（GZFP2020001）。

作者简介: 李俊（1982−）, 男, 硕士, 高级实验师, 研究方向: 农产品安全与仪器分析, E-mail: JunL82@163.com。

*** 通信作者:** 王震（1970−）, 男, 大学本科, 高级实验师, 研究方向: 农产品安全, E-mail: 992068690@qq.com。

important to choose the accurate sample preparation, the concentration range of standard curve. And when the results indicates positive, reassays should be done in triplicate.

Key words: gas chromatography and mass spectrometry; pesticide residues; tea; uncertainty

茶叶是我国重要的农产品之一，具有几千年的生产历史。茶叶生产和销售拉动了内需消费，促进了经济的可持续发展[1]。农药在茶树生产中具有防治病虫害、提升产量和改善产品品质等重要作用[2−5]，同时茶叶中农药残留问题成为茶叶质量安全关注的焦点之一[6]。为了保证茶叶质量安全，灵敏、准确的农药残留检测技术必不可少[7−8]。2021 年 9 月实施的《食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量》[9]规定了茶叶中农药最大残留限量有 106 项限量要求，存在一个农药规定了几种检测方法的现象，比如哒螨灵、氯菊酯、氯唑磷等农药可采用 GB/T 23200.113 或 GB/T 23204-2008 方法检测。

在检验检测工作中，取样的代表性、溶液的配制以及样品处理过程等方面，都会导致检测结果产生一定的不确定性，对检测结果不能肯定的程度即为不确定度。不同方法引入的不确定度因方法差异而不同，为保证检测结果的准确度和可信性，有必要采用适当的检测方法，并对其测量不确定度进行合理评定[10−12]。测量不确定度是与测量结果相联系的参数，代表检测值的可信区间，是衡量实验室检测质量的重要指标，是实验室提高检验结果可靠性的重要保障[13−16]；当不确定度越小，检测结果可信度越高；反之越低。通过不确定度来源分析和分量评定，掌握影响检测质量的关键步骤，从而可提高检测实验室的数据质量[17−21]。

本研究分别采用国家标准《茶叶中 519 种农药及相关化学品残留量的测定 气相色谱-质谱法》[22] 和《植物源性食品中 208 种农药及其代谢物残留量的测定 气相色谱-质谱联用法》[23] 方法定量检测茶叶中哒螨灵等 9 种农药残留量，依据《测量不确定度评定与表示》[24] 和《化学分析测量不确定度评定》[25]，分析评定两个不同检测方法检测过程中各不确定度分量的来源，给出扩展不确定度，以期为农药残留检测实验室评定不确定度提供参考范例，为实验室选择更适应的检测方法，为检测结果的合理判定提供科学依据[26−27]。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

乙腈、甲苯　色谱纯，美国天地；氯化钠、正己烷、乙酸乙酯　分析纯，国药集团；PSA 吸附剂、C18 吸附剂、GCB 粉末　色谱纯，美国安捷伦；固相萃取柱 Cleanert TPT 10 mL 2.0 g　Agela 公司；9 种农药标准品：哒螨灵（pyridaben）、氟氯氰菊酯（Cyfluthrin）、甲拌磷（phorate）、甲基对硫磷（parathion-methy）、氯菊酯（Permethrin）、氯氰菊酯（Cypermethrin）、氯唑磷（isazofos）、氰戊菊酯（fenvalerate）、水胺硫磷（isocarbophos）　浓度均为 1000 mg/L，农业部环境质量安全监督检验测试中心（天津）。

GC-MS/MS 联用仪 Trace GC Ultra-TSQ MS/MS　美国赛默飞世尔公司；IKA T18 高速匀浆机　德国 IKA 公司；IKA VRTEX2 涡旋混合器　德国 IKA 公司；BUCHI R-200 旋转蒸发仪　瑞士 BUCHI 实验仪器公司；Organomation N-EVAP　美国 OI 分析仪器公司；TSL-5-A 离心机　上海安亭科学仪器。

1.2 实验方法

1.2.1 标准品的配制

1.2.1.1 单标标准储备液的配制　准确吸取 9 种农药标准和内标溶液各 1.0 mL 于 10 mL 容量瓶中，用丙酮溶液稀释到刻度，得到 100.0 mg /L 标准单标储备液。

1.2.1.2 混合标准储备液的配制　准确吸取适量的 100.0 mg/L 单标储备液于 50 mL 容量瓶中，用丙酮稀释配制成 2~4 mg/L 混合标准储备液。内标物配制为 10 mg/L 的标准储备液。

1.2.1.3 基质匹配混合标准工作溶液配制　取不含待测物的茶叶样品，按相应的前处理方法制得空白基质溶液，准确吸取适量的混合标准储备液和 1 mL 内标于 10 mL 容量瓶中，用空白基质溶液定容配制成所需的标准工作液。混合标准工作溶液系列配制见表 1。

表 1　混合标准系列溶液

Table 1　Preparation of mixed standard series solution

序号	1	2	3	4	5	6
配制浓度(mg/L)	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
吸取体积(mL)	0.5	1	2	3	4	5

1.2.2 样品前处理

1.2.2.1 方法选择　分别参照方法 1：GB 23200.113-2018《食品安全国家标准 植物源性食品中 208 种农药及其代谢物残留量的测定气相色谱-质谱联用法》QuEChERS 部分；方法 2：GB/T 23204-2008《茶叶中 519 种农药及相关化学品残留量的测定气相色谱-质谱法》进行样品前处理。供试茶样购置于市场，茶叶样品粉碎后过 60 目筛，待分析。

1.2.2.2 样品提取　方法 1：准确称取 2 g 试样（精确至 0.01 g）于 50 mL 塑料离心管中，加 10 mL 水涡旋均匀，静置 30 min。加入 15 mL 乙腈-醋酸溶液、6 g 无水硫酸镁、1.5 g 醋酸钠及 1 颗陶瓷均质子，剧烈振荡提取 1 min，4200 r/min 离心 5 min，吸取 8 mL 上清液，待净化。

方法 2：准确称取 5 g 试样（精确至 0.01 g），于 80 mL 离心管中，加入 15 mL 乙腈，15000 r/min 均质

提取 1 min，4200 r/min 离心 5 min，取上清液于 200 mL 鸡心瓶中。残渣用 15 mL 乙腈重复提取一次，离心，合并二次提取液，40 ℃ 水浴旋转蒸发至 1 mL 左右，待净化。

1.2.2.3　样品净化　方法 1：吸取 8 mL 上清液加到内含 1200 mg 硫酸镁、400 mg PSA，400 mg C_{18} 及 200 mg GCB 的 15 mL 塑料离心管中，涡旋混匀 1 min。4200 r/min 离心 5 min，准确吸取 2 mL 上清液于 10 mL 试管中，40 ℃ 水浴中氮气吹至近干。加入 100 μL 的内标溶液，加入 1 mL 乙酸乙酯复溶，过微孔滤膜，待气相色谱质谱测定。

方法 2：用 10 mL 的 $v_{(乙腈)}$∶$v_{(甲苯)}$=3∶1 混合洗液预洗 Cleanert TPT 固相萃取柱（柱中加入约 2 cm 高无水硫酸钠），加入待净化样品浓缩液转移至固相萃取柱中，用 2 mL 混合洗液洗涤样液瓶，重复三次，并将洗涤液移入柱中，再用 25 mL 乙腈-甲苯洗涤小柱，收集上述所有流出液于鸡心瓶中，40 ℃ 水浴中旋转浓缩至约 0.5 mL。加入 5 mL 正己烷进行溶剂交换，重复两次，最后使样液体积约为 1 mL，加入 100 μL 内标溶液，过微孔滤膜，待气相色谱质谱测定。

1.2.3　仪器条件

1.2.3.1　气相色谱条件　方法 1：色谱柱：DB-1701MS 石英毛细管柱（30 m×0.25 mm，0.25 μm）；程序升温条件为；程序升温：初温 40 ℃，以 40 ℃/min 升温至 120 ℃，再以 5 ℃/min 升温至 240 ℃，再以 12 ℃/min 升温至 300 ℃，保持 6 min；载气为 He，流速 1.0 mL/min；进样口温度（280.0 ℃）；进样量 1.0 μL；不分流进样。

方法 2：色谱柱：DB-1701MS 石英毛细管柱（30 m×0.25 mm，0.25 μm）；程序升温条件为；程序升温：初温 40 ℃，以 30 ℃/min 升温至 130 ℃，再以 5 ℃/min 升温至 250 ℃，再以 10 ℃/min 升温至 300 ℃，保持 5 min；载气为 He，流速 1.0 mL/min；进样口温度（290.0 ℃）；进样量 1.0 μL；不分流进样。

1.2.3.2　质谱条件　方法 1：电子轰击（EI）离子源；电子能量 70 eV；气相色谱-质谱传输线温度 280 ℃；离子源温度 280 ℃；多反应监测（MRM）模式扫描，碰撞反应气压力（Ar，2×10^{-4} kPa）；溶剂延迟 3 min。

方法 2：电子轰击（EI）离子源；电子能量 70 eV；气相色谱-质谱传输线温度 280 ℃；离子源温度 230 ℃；选择性离子监测（SIM）模式扫描；溶剂延迟 5 min。

1.3　不确定度分析

1.3.1　数学模型的建立　根据 GB/T 23200.113-2018 和 GB/T 23204-2008 方法（表 2），茶叶中被测农药残留含量（w）按式（1）计算：

$$w=\frac{c\times v}{m}\times f\times\frac{1000}{1000}\qquad 式（1）$$

式中：w：茶叶中被测农药残留含量（mg/kg）；c：由标准曲线计算出测试样液的浓度（mg/L）；v：样液定容体积（mL）；m：样品称样量（g）；*f*：稀释因子（GB/T 23200.113-2018 为 7.5、GB/T 23204-2008 为 1.0）。

1.3.2　不确定度来源分析　按规范方法抽样和制备样品样品均匀性引入的不确定度忽略不计[26]。从数学模型和测定过程可知，不确定度分量包括以下几个方面：标准物质及其配制过程中引入的不确定度 c_s；内标物质使用引入的不确定度 c_{si}；样品称量引入的不确定度 m；前处理过程中液体体积量取引入的不确定度 v；标准工作液测量不确定度（R_{rec}）；样品溶液液中被测组分与内标峰面积比（A_i/A_{si}）；检测回收率（Q_{rec}）等方面；不确定度分量来源见图 1。

1.4　数据处理

通过 Excel2010 与 SPSS22.0 进行数据统计分析。

2　结果与分析

2.1　标准溶液配制引入不确定度 u_{rel}（c）

实验室通常选择购买 100 或 1000 mg/L 的有证标准物质。通过配制成农药单标储备液、混合标准储备液、混合标准工作溶液、混合标准工作测试液。每一步都会有不确定度的带入，分析不确定带入因子详见表 3。

2.1.1　标准物质纯度引入不确定度 $u_{rel}(c_1)$　本研究中哒螨灵、氟氯氰菊酯、甲拌磷等 9 个标准品的质量浓度均为 1000 mg/L，其扩展不确定度 [$u_{95}(c_1)$] 为 7 mg/L，包含因子（k）为 2，则由标准品纯度引入的相对不确定度 $u_{rel}(c_{s-1})$为：

$$u_{rel}(c_1)=\frac{u_{95}(c_1)}{1000\times\sqrt{k}}=\frac{7}{1000\times\sqrt{2}}=0.50\%\qquad 式（2）$$

某品牌标准品生产厂家生产标准品质量浓度均为 1000 mg/L 时，其扩展不确定度 [$u_{95}(c_1)$] 为 20 mg/L，其引入的相对不确定度 $u_{rel}(c_1)$为 1.41%。

2.1.2　标准储备液配制引入不确定度 $u_{rel}(c_2)$　实验室储备液的配制包括单一标准储备液和混合标准储备液。先用 1 mL A 级吸量管移取 1.0 mL 1000 mg/L 的标准溶液于 10 mL 容量瓶中，用丙酮定容并配成

表 2　GB/T 23200.113-2018 与 GB/T 23204-2008 标准比较

Table 2　Comparison Table of GB/T 23200.113-2018 and GB/T 23204-2008 standards

序号	称样(g)	样品提取				净化	稀释因子	定量方法
		提取体积(mL)	提取方式	分取体积(mL)	定容体积(mL)			
GB/T 23200.113-2018	2	15	振荡提取	2	1	分散固相萃取	7.5	内标法
GB/T 23204-2008	5	30	均质提取	不分取	1	固相萃取	1	内标法

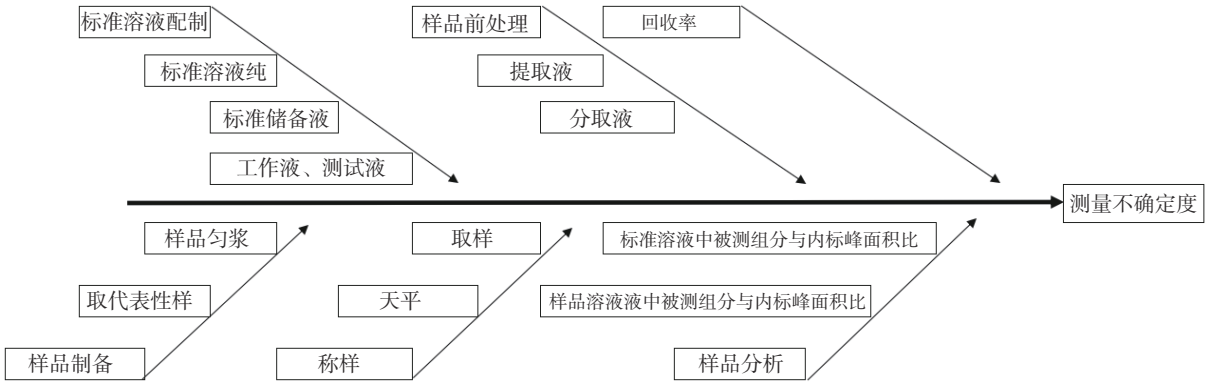


图 1 测量不确定度分量鱼骨图

Fig.1 Fishbone diagram of measurement uncertainty component

表 3 标准溶液配制引入不确定度

Table 3 Introduction uncertainty of standard solution configuration

主要步骤	标准物质	单标储备液	混合标准储备液	混合标准工作液
不确定度来源	浓度扩展 不确定度	环境温度 容量瓶 移液管	环境温度 容量瓶 移液管	环境温度 容量瓶 移液管

100 mg/L 的单一标准储备液。然后再分别吸取 1 mL 单一标准储备液于 50 mL 容量瓶中，用丙酮定容并配成 2 mg/L 的混合标准储备溶液。过程中涉及温度变化对试剂膨胀的影响、人员量取误差及吸量管、容量瓶引入的不确定度。

丙酮膨胀引入分量，实验室温度通常为(20±5)℃，丙酮的膨胀系数为 0.00143 $℃^{-1}$，由温度效应产生的丙酮体积变化为：$u(v_{丙酮})=±(0.00143\ mL×5×v)=±0.00715×v\ mL$，服从矩形分布，则温度对丙酮体积变化的不确定度 $[u_{rel}(v_{丙酮})]$ 为：

$$u_{rel}(v_{丙酮})=\frac{u(v_{丙酮})}{\sqrt{3}\times v}=\frac{0.00715\times v}{\sqrt{3}\times v}=\frac{0.00715}{\sqrt{3}}=0.41\% \quad 式（3）$$

利用式(3)计算出标准储备液配制中，丙酮膨胀引入的不确定度 $[u_{rel}(v_{丙酮})]$，为 0.41%，引入 4 次。

人员吸量管使用量取误差引入分量，采用统计方法评定不确定度，通过在重现性、重复性条件下使用同一吸量管，重复量取纯水，利用电子天平测量，得到 n=9 次测量值(x)，标准偏差 s(x)利用贝塞尔式(4)计算，不确定度 $u_{rel}(x)$按式(5)计算。

$$s(x)=\sqrt{\frac{1}{n-1}\sum_{i=1}^{n}(x_i-\bar{x})^2} \quad 式（4）$$

$$u_{rel}(x)=\frac{s(x)}{\sqrt{n}}=\sqrt{\frac{1}{n(n-1)}\sum_{i=1}^{n}(x_i-\bar{x})^2} \quad 式（5）$$

利用式(5)计算出标准储备液配制中，使用 1 mL 的 A 级吸量管移取 1.0 mL 样液时引入的人员测量不确定度 $[u_{rel}(s_1)]$，为 0.13%，对于每一个组分引入 2 次。

量具允许误差引入分量：A 级 1 mL 吸量管允许误差为±0.008 mL[27]，满足三角形分布，则由吸量管量取 1.0 mL 溶液引入的不确定度 $[u_{rel}(v_1)]$ 为：

$$u_{rel}(v_1)=\frac{0.008\ mL}{\sqrt{6}\times v}=\frac{0.008\ mL}{\sqrt{6}\times 1\ mL}=0.33\% \quad 式（6）$$

利用式(6)计算出标准储备液配制中，使用 1 mL 的 A 级吸量管移取 1.0 mL 样液引入的不确定度 $[u_{rel}(v_1)]$，为 0.33%，对于每一个组分引入 2 次。

A 级 10、50 mL 容量瓶的允许误差分别为±0.02 和±0.05 mL，读数重复性偏差分别为±0.01 和±0.025 mL，均服从三角形分布。利用(6)式计算，则由 10 mL 容量瓶允许误差带来的不确定度 $[u_{rel}(v_2)]$ 为 0.082 % 和读数误差带来的不确定度 $[u_{rel}(v_3)]$ 为 0.041%；由 25 mL 容量瓶允许误差带来的不确定度 $[u_{rel}(v_4)]$ 为 0.041% 和读数误差带来的不确定度 $[u_{rel}(v_5)]$ 为 0.020 %。

$$u_{rel}(c_2)=\sqrt{4\times u_{rel}(v_{丙酮})^2+2\times u_{rel}(s_1)^2+2\times u_{rel}(v_1)^2+u_{rel}(v_2)^2+u_{rel}(v_3)^2+u_{rel}(v_4)^2+u_{rel}(v_5)^2} \quad 式（7）$$

利用式(7)计算可得由标准储备液配制带来的不确定度 $[u_{rel}(c_2)]$ 为 0.97%。

2.1.3 混合标准工作液配制引入不确定度 $u_{rel}(c_3)$

混合标准工作液是通过使用混合标准储配液稀释，本实验中的混合标准工作液按表 1 中浓度配制，分别吸取混合标准储备液于 10 mL 容量瓶内，加入 1 mL 内标溶液，丙酮定容得到所需标准工作液。过程中涉及温度变化对试剂膨胀的影响、人员量取误差及吸量管、容量瓶引入的不确定度。标液和样液中内标物是采用同一瓶内标物质添加，故不考虑内标物质在配制过程中的不确定度的引入，仅考虑内标物添加时，体积引入的那部分不确定度。

丙酮膨胀引入分量，利用式(3)计算出标准工作溶

液配制中，丙酮膨胀引入引入的不确定度 [$u_{rel}(v_{丙酮})$] 为 0.41%，对每一个浓度点引入 3 次（标液量取、内标量取、容量瓶定容）。

人员吸量管使用量取误差引入分量，利用式（5）计算出标准工作溶液配制中，使用 1 mL 的 A 级吸量管移取 0.5 mL 混合储备液配制浓度点 1 时引入的人员测量不确定度 [$u_{rel}(s_1)$] 为 0.14%。浓度点 2 时引入的人员测量不确定度 [$u_{rel}(s_2)$] 为 0.13%。浓度点 3 时引入的人员测量不确定度 [$u_{rel}(s_3)$] 为 0.26%。浓度点 4 时引入的人员测量不确定度 [$u_{rel}(s_4)$] 为 0.59%。浓度点 5 时引入的人员测量不确定度 [$u_{rel}(s_5)$] 为 0.50%。浓度点 6 时引入的人员测量不确定度 [$u_{rel}(s_6)$] 为 0.49%。浓度点 7 时引入的人员测量不确定度 [$u_{rel}(s_7)$] 为 0.76%。使用 1 mL 的 A 级吸量管移取 1.0 mL 内标溶液时引入的人员测量不确定度 [$u_{rel}(s_i)$] 为 0.13%。

量具允许误差引入分量，A 级 1、2、5、10 mL 吸量管，A 级 10 mL 容量瓶允许误差与读数重复性偏差引入不确定度。

A 级 1、2、5、10 mL 吸量管，A 级 10 mL 容量瓶的允许误差分别为±0.008、±0.012、±0.025、±0.050、±0.02、读数重复性偏差分别为±0.004、±0.006、±0.01、±0.025、±0.01mL。利用式（6）计算，浓度点 1 使用 A 级 1 mL 吸量管吸取 0.5 mL 混合标液和 1 mL 内标物，引入的不确定度 [$u_{rel}(v_1)$]：

A 级 1 mL 吸量管允许误差带来的不确定度 [[$u_{rel}(v_{1-1})$] 为 0.653% 和读数误差带来的不确定度 [$u_{rel}(v_{1-2})$] 为 0.327%；10 mL 容量瓶带来的不确定度 [[$u_{rel}(v_{1-3})$] 为 0.082% 和读数误差带来的不确定度 [$u_{rel}(v_{1-4})$] 为 0.041%；内标物对每个浓度点不确定度均为 A 级 1 mLA 级 1 mL 吸量管允许误差带来的不确定度 [[$u_{rel}(v_{1-5})$] 为 0.327% 和读数误差带来的不确定度 [$u_{rel}(v_{1-6})$] 为 0.163%。按式（8）计算，浓度点 1 引入的不确定度 [$u_{rel}(v_1)$] 为 0.822%。

$$u_{rel}(v_1) = \sqrt{u_{rel}(v_{1-1})^2 + u_{rel}(v_{1-2})^2 + u_{rel}(v_{1-3})^2 + u_{rel}(v_{1-4})^2}$$

式（8）

利用式（8），计算其他浓度点不确定度 [$u_{rel}(v_2)$] 为 0.525、[$u_{rel}(v_3)$] 为 0.466%、[$u_{rel}(v_4)$] 为 0.525%、[$u_{rel}(v_5)$] 为 0.450%、[$u_{rel}(v_6)$] 为 0.436%、[$u_{rel}(v_7)$] 为 0.473%。

混合标准工作液每个浓度点引入不确定度 [$u_{rel}(c_{3-x})$]，利用式（9）计算出混合标准工作溶液浓度点 1[$u_{rel}(c_{3-1})$] 不确定度为 1.15%。

$$u_{rel}(c_{3-1}) = \sqrt{3 \times u_{rel}(v_{丙酮})^2 + u_{rel}(s_1)^2 + u_{rel}(s_i)^2 + u_{rel}(v_1)^2}$$

式（9）

利用式（9），计算其他浓度点不确定度 [$u_{rel}(c_{3-2})$] 为 0.902%，[$u_{rel}(c_{3-3})$] 为 0.898%，[$u_{rel}(c_{3-4})$] 为 1.07%，[$u_{rel}(c_{3-5})$] 为 0.987%，[$u_{rel}(c_{3-6})$] 为 0.975%。

利用式（10），计算可得由混合标准工作液配制带来的不确定度 [$u_{rel}(c3)$] 为 2.21%。

$$u_{rel}(c_3) = \sqrt{u_{rel}(c_{3-1})^2 + u_{rel}(c_{3-2})^2 + u_{rel}(c_{3-3})^2 + u_{rel}(c_{3-4})^2 + u_{rel}(c_{3-5})^2 + u_{rel}(c_{3-6})^2 + u_{rel}(c_{3-7})^2}$$

式（10）

综上，在标准品配制中，单标储备液、混合标准储备液、混合标准工作液配制引起的合成不确定度 [$u_{rel}(c)$] 为：

$$u_{rel}(c) = \sqrt{u_{rel}(c_1)^2 + u_{rel}(c_2)^2 + u_{rel}(c_3)^2}$$

式（11）

利用式（11），计算可得标准溶液配制步骤带来的不确定度 [$u_{rel}(c)$] 为 2.46 %。

2.2　样品前处理引入不确定度 u_{rel}（P）

2.2.1　样品质量称取引入的相对标准不确定度 $u_{rel}(m)$

由天平允许误差不确定度 $u_{rel}(m_1)$、天平示值误差不确定度 $u_{rel}(m_2)$、称量重复性不确定度 $u_{rel}(m_3)$ 引入。

方法 1，采用百分之一天平称取 2 g 样品，天平的允许误差为 0.01g、示值误差为 0.005 g，符合矩形分布，则天平允许误差不确定度 $u_{rel}(m_1)$、天平示值误差不确定度 $u_{rel}(m_2)$分别为：

$$u_{rel}(m_1) = \frac{\sqrt{2} \times 0.01\ g}{\sqrt{3} \times m} = \frac{\sqrt{2} \times 0.01\ g}{\sqrt{3} \times 2\ g} = 0.408\%$$

式（12）

$$u_{rel}(m_2) = \frac{\sqrt{2} \times 0.005\ g}{\sqrt{3} \times m} = \frac{\sqrt{2} \times 0.005\ g}{\sqrt{3} \times 2\ g} = 0.204\%$$

式（13）

称样重复性（n=9），用标准偏差 S(x)利用贝塞尔公式（4）计算，不确定度 $u_{rel}(m_3)$按公式（5）计算为 1.07%。

利用式（14），计算可得方法 1 由称样带来的不确定度 [$u_{rel}(m)$] 为 1.16 %，方法 2 由称样带来的不确定度 [$u_{rel}(m)$] 为 1.10%。

$$u_{rel}(m) = \sqrt{u_{rel}(m_1)^2 + u_{rel}(m_2)^2 + u_{rel}(m_3)^2}$$

式（14）

2.2.2　样品提取引入的相对标准不确定度 $u_{rel}(v_1)$

样品在提取、分取步骤过程中，方法 1 仅考虑样品提取引入的相对标准不确定度 $u_{rel}(v_1)$，由乙腈膨胀引入不确定度 $u_{rel}(v_{1-1})$、吸量管引入不确定度 $u_{rel}(v_{1-2})$、量取重复性引入不确定度 $u_{rel}(v_{1-3})$，吸取 8 mL 上清液待净化，体积不直接带入不确定度，故不考虑不确定度引入。方法 2 中提取液全部转入鸡心瓶 40 ℃水浴旋转蒸发至 1 mL 左右，待净化，无分取步骤，不考虑该步骤的不确定度引入。但无水硫酸镁、醋酸钠等试剂的多少、提取时间、均值转速等因素带入的不确定度均体现在样品的加标回收上，在后文回收率分量进行评定。

提取步骤是用 A 级 25 mL 吸量管量取 15 mL

乙腈试剂。乙腈膨胀引入分量，实验室温度通常为(20±5)℃，乙腈的膨胀系数为 0.00137 $℃^{-1}$，由温度变化引起试剂膨胀带来的不确定度服从矩形分布，不确定度 [$u_{rel}(v_{1-1})$] 为 0.395。A 级 25 mL 吸量管最大允许误差±0.1 mL，读数重复性偏差为±0.05 mL，量器量取偏差服从三角形分布，故 25 mL 吸量管量取 15 mL 乙腈，允许误差和读数重复性引起的不确定度分别为 [$u_{rel}(v_{1-2})$] 为 0.272%、[$u_{rel}(v_{1-3})$] 为 0.136%。

$$u_{rel}(v_1)=\sqrt{u_{rel}(v_{1-1})^2+u_{rel}(v_{1-2})^2+u_{rel}(v_{1-3})^2} \quad 式（15）$$

利用式(15)，计算可得方法 1 由提取步骤带来的不确定度 [$u_{rel}(v_1)$] 为 0.499%。

2.2.3 样品净化、定容引入的相对标准不确定度 $u_{rel}(v_2)$ 样品净化、定容步骤过程中，两个方法的净化过程，方法 1 中各填料的称取量、振动的频率和时间、离心的转速和时间、样品定容等均不直接带入不确定度，仅与量取 2 mL 净化后样液和内标溶液的量取引入的相对标准不确定度 [$u_{rel}(v_2)$]；方法 2 中洗液的量取、洗脱的速度、样品定容等均不直接带入不确定度，仅与内标溶液的量取有关；

净化步骤，方法 1 用 A 级 2 mL 吸量管分取 2 mL 净化后样液，再用 100 μL 单通道移液器量取 100 μL 内标，约用 1 mL 乙酸乙酯复溶，待测。

乙腈试剂膨胀引起的相对不确定度 [$u_{rel}(v_{2-1})$] 为 0.395%，A 级 2 mL 吸量管最大误差为±0.012 mL，其相对不确定度 [$u_{rel}(v_{2-2})$] 为 0.245%，读数重复性偏差为土 0.006 mL，其相对不确定度 [$u_{rel}(v_{2-3})$] 为 0.122%。

丙酮试剂膨胀引起的相对不确定度 [$u_{rel}(v_{2-4})$] 为 0.41%，A 型 100 μL 单通道移液器最大误差为±0.8 μL，其相对不确定度 [$u_{rel}(v_{2-5})$] 为 0.327%。

$$u_{rel}(v_2)=\sqrt{u_{rel}(v_{2-1})^2+u_{rel}(v_{2-2})^2+u_{rel}(v_{2-3})^2+u_{rel}(v_{2-4})^2+u_{rel}(v_{2-5})^2} \quad 式（16）$$

利用式(16)，计算可得方法 1 由净化步骤带来的不确定度 [$u_{rel}(v_2)$] 为 0.711%，方法 2 由净化步骤带来的不确定度 [$u_{rel}(v_2)$] 为 0.327%。

综上，在样品前处理中，提取液量取、分取、定容、内标量取引起的合成不确定度 [$u_{rel}(P)$] 为：

$$u_{rel}(P)=\sqrt{u_{rel}(m)^2+u_{rel}(v_1)^2+u_{rel}(v_2)^2} \quad 式（17）$$

利用式(17)，计算可得方法 1 由样品前处理步骤带来的不确定度 [$u_{rel}(P)$] 为 1.45 %，方法 2 由样品前处理步骤带来的不确定度 [$u_{rel}(P)$] 为 1.15%。

2.3 标准曲线拟合引入不确定度 u_{rel}（R）

按 1.2.3 配制好混合标准工作溶液，气质联用仪检测，每个浓度点测量 5 次，标准溶液化合物与内标物浓度比与标准溶液化合物与内标物峰面积比数据见表 4。利用 SPSS20.0 软件对表中数据作最小二乘法线性回归处理。拟合曲线和确定系数见表 5。

$$S_A=\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}[y_i-(a+bx_i)]^2}{n-2}} \quad 式（18）$$

$$U(R)=\frac{S_A}{b}\times\sqrt{\frac{1}{p}+\frac{1}{n}+\frac{(\bar{x}_S-\bar{x})^2}{\sum_{i=1}^{n}(x_i-\bar{x})^2}} \quad 式（19）$$

利用式(18)计算出标准拟合曲线标准偏差 S_A，y_i 为第 i 次测量的溶液化合物与内标物峰面积比；a 为截距；b 为斜率；x_i 为第 i 次测量的标准溶液化合物与内标物浓度比；n 为标准溶液的测定总次数(n=30)。线性关系及拟合曲线的确定系数见表 5。

利用式(19)计算拟合曲线引入的不确定度 U(R)。S_A 为准曲线的标准差；p 为样品的测定次数(p=10)；n 为标准溶液的测定总次数(n=30)；b 为标准曲线的斜率；$\bar{x}_S$ 为由标准曲线求得的样品溶液浓度平均值(见表 5)；$\bar{x}$为各标准系列溶液浓度的平均值，为 0.517 mg/L；x_i 为第 i 次测量的标准曲线浓度。

$$U_{rel}(R)=\frac{U(R)}{\bar{x}_s} \quad 式（20）$$

标准曲线拟合引入不确定度为 A 类评定，样液测定浓度在 0.17~0.235 mg/L，每个样品重复 10 次测定，标准曲线拟合引入不确定度和相对相对不确定度计算结果见表 5。由结果可知氯氰菊酯在测定浓度为 0.172 mg/L 时，引入测量不确定度为 7.93 %，水胺硫磷、氯唑磷、甲基对硫磷引入测量不确定度均大于 5.0%。

假设 1：在同一条件下测定同一样品 n 次，考察了测量次数与不确定度的关系，利用测量次数和相对不确定度作图 2。随着测量次数的增加，样品测量由标准曲线拟合引入的不确定度降低，样品测量次数在 3~4 次时，不确定度的变化不明显。结果说明，在检测工作中，测量结果如出现阳性检出时，样品需要平行测量 3 次以上才能得到较可靠的结果。

假设 2：在同一条件下测定不同阳性样品，每个

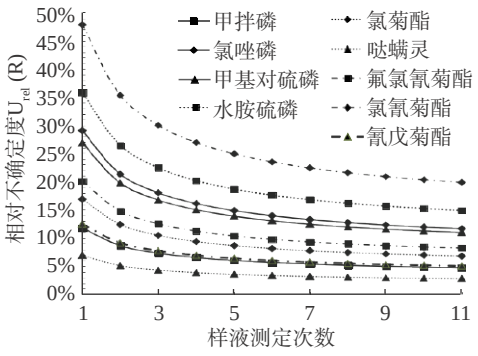


图 2 样液测量次数与标准曲线拟合引入相对不确定度的关系

Fig.2 Relationship of the relative uncertainty resulting from the measurement times of the sample liquid and the fitting of the standard curve

表 4　农药标准曲线测量结果

Table 4　Measurement results of pesticide standard curve

浓度(mg/L)	标准系列溶液化合物峰面积与内标物峰面积比								
	甲拌磷	氯唑磷	甲基对硫磷	水胺硫磷	氯菊酯	哒螨灵	氟氯氰菊酯	氯氰菊酯	氰戊菊酯
	0.22	1.07	0.4	0.53	1.01	0.61	0.46	0.47	0.79
	0.22	1.08	0.44	0.66	1.07	0.63	0.49	0.48	0.83
0.1	0.22	1.1	0.45	0.68	1.06	0.63	0.51	0.48	0.84
	0.22	1.12	0.45	0.66	1.06	0.64	0.49	0.49	0.84
	0.22	1.14	0.46	0.73	1.14	0.68	0.53	0.65	0.87
	0.46	2.34	0.97	1.55	2.3	1.35	1.07	1.36	1.76
	0.45	2.35	0.95	1.48	2.26	1.36	1.07	1.32	1.76
0.2	0.48	2.4	1.01	1.62	2.29	1.4	1.09	1.09	1.79
	0.44	2.28	0.95	1.52	2.21	1.37	1.04	1.28	1.74
	0.47	2.39	0.99	1.57	2.34	1.39	1.09	1.08	1.79
	0.9	4.74	2.07	3.46	4.62	2.9	2.19	2.7	3.64
	0.94	4.9	2.14	3.48	4.78	2.93	2.3	2.84	3.76
0.4	0.91	4.81	2.16	3.55	4.68	2.96	2.26	2.82	3.73
	0.95	4.93	2.16	3.51	4.81	2.91	2.26	2.21	3.72
	0.92	4.8	2.16	3.56	4.68	2.93	2.22	2.78	3.67
	1.42	7.42	3.39	5.63	7.39	4.61	3.44	4.33	5.7
	1.41	7.47	3.43	5.79	7.4	4.58	3.5	4.28	5.74
0.6	1.42	7.47	3.42	5.79	7.43	4.56	3.5	3.42	5.76
	1.43	7.44	3.43	5.84	7.37	4.55	3.52	4.42	5.77
	1.42	7.45	3.43	5.82	7.4	4.55	3.51	4.01	5.76
	1.91	9.92	4.74	8.24	10.01	6.18	4.85	4.77	7.91
	1.88	9.87	4.7	8.08	9.97	6.12	4.74	5.89	7.74
0.8	1.93	10.17	4.83	8.2	10.73	6.14	4.94	6.45	7.93
	2.05	12.49	5.44	9.03	11.27	6.36	5.32	5.37	8.42
	1.97	10.37	4.94	8.73	10.34	6.31	4.92	4.87	7.96
	2.42	12.72	6.28	10.81	12.87	7.92	6.2	6.06	10.09
	2.34	12.6	6.27	10.69	12.82	7.82	6.18	6.02	9.99
1.0	2.38	12.7	6.33	10.79	12.91	7.82	6.15	6.05	10.05
	2.34	12.3	6.17	10.51	12.79	7.78	6.14	5.98	9.95
	2.36	12.57	6.31	10.51	12.89	7.82	6.28	6.11	10.18

表 5　标准曲线引入的相对标准不确定度

Table 5　Relative standard uncertainty introduced by the standard curves

化合物	线性关系	确定系数	校正样品平均浓度 $\bar{x}_S$ (mg/L)	标准曲线的标准偏差(S_A)	U(R)浓度 (mg/L)	U_{rel}(R)(%)
甲拌磷	y=2.145x−0.025	0.998	0.235	0.037	0.0061	2.60
氯唑磷	y=13.026x−0.25	0.988	0.228	0.465	0.0143	6.28
甲基对硫磷	y=6.531x−0.346	0.994	0.196	0.161	0.0101	5.14
水胺硫磷	y=11.276x−0.725	0.995	0.170	0.269	0.0099	5.84
氯菊酯	y=13.283x−0.399	0.996	0.223	0.265	0.0080	3.59
哒螨灵	y=8.038−0.226	0.999	0.218	0.063	0.0032	1.45
氟氯氰菊酯	y=6.375x−0.219	0.997	0.196	0.117	0.0075	3.84
氯氰菊酯	y=6.408x+0.025	0.984	0.172	0.210	0.0136	7.93
氰戊菊酯	y=10.296x−0.304	0.998	0.215	0.141	0.0055	2.58

样品重复 10 次，考察了测量不同样液检出浓度(0.05~1 mg/L)与不确定度的关系，利用测量浓度和相对不确定度作图 3，随着检测浓度的增加，标准曲线引入的相对不确定度 u_{rel}(R)降低，当样液测定浓度为 0.3 mg/L 时，各化合物 u_{rel}(R)均小于 5.0%，但样液测定浓度为 0.05 mg/L 时，由各化合物 u_{rel}(R)相对较高。并不是样液测定浓度越高测定结果越可靠，当样液浓度继续升高，设备单位检测灵敏性会下降或者检测器出现过载，样液浓度和检测器信号成下抛弧线，造成测量结果偏低的风险。

结果说明，在测定中，样液测定浓度在标准曲线平均浓度附近时，检测结果较可靠，不同浓度的样品要使用合适的标准曲线定量或者通过样品稀释、浓缩等方式让样液检测浓度在合适的范围内进行测定。

2.4　样液峰面积测定重复性引入的不确定度 u_{rel}（A）

方法采用内标法定量，进样量的体积误差不会对检测带来测量不确定度，主要考虑仪器对各组分的测量稳定性，分析各目标物与内标物峰面积的比值的测量偏差，用来评定仪器测量重复性引入的不确定度

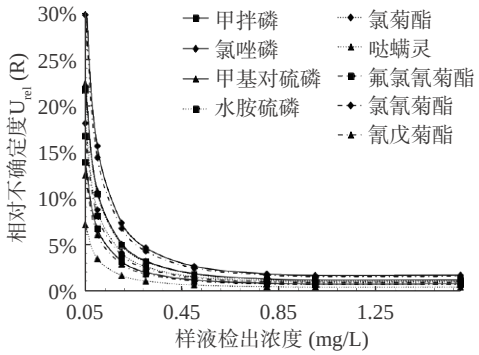


图 3 样液检出浓度与标准曲线拟合引入相对不确定度的关系

Fig.3 Relationship of the relative uncertainty introduced by the detected concentration of the sample solution and the standard curve fitting

的程度。

茶叶样品经过 1.3 步骤处理成样液后，添加加入一定量农药成分，制备成模拟阳性检样品，上机样液溶度为 0.1~0.3 mg/L 为宜，采用统计方法评定不确定度，通过在重现性、重复性条件下，连续重复测试农药分面积与内标物分面积比 10 次，利用贝塞尔式(4)计算出峰面积比标准偏差 S(A)、式(5)计算出不确定度 $u_{rel}(A)$，结果见表 6。

结果可知，甲拌磷、氯唑磷等 9 个农药由样品溶液峰面积测定重复性引入的不确定度为 0.5%~2.56%，其中菊酯类农药引入不确定度较大，氯氰菊酯引入的不确定度达 2.56%。分析可知峰面积测定重复性引入的不确定度主要和仪器的稳定性、灵敏度有关，也和农药的自身性质有关。比如氯唑磷和水胺硫磷这两个农药的稳定性不如其他农药，在检测分析中容易发生分解，增加了不确定度的引入；再比如氯氰菊酯、氰戊菊酯等菊酯存在异构体，工作站对异构体积分计算峰面积加和时也会引入不确定度；仪器的状态，如进样口衬管、色谱柱柱效、离子源污染程度都会引起峰面积的测量不确定度的增加。

2.5 检测回收率 u_{rel}（Q）

添加回收率引入不确定度为 A 类评定，采用在茶叶中分别加入浓度为方法 1(0.10、0.20、0.50 mg/kg)，方法 2(0.02 、0.05 、0.10 mg/kg)的目标分析物，每个添加水平重复 6 次。为扣除标准曲线拟合带入的不确定度，采取使用标准曲线上浓度值较接近点浓度单点定量，计算回收率，结果见表 7。

$$u_{rel}(Q) = \frac{S(Q)}{\sqrt{n} \times \overline{Q}} \quad \text{式（21）}$$

$$t = \frac{|1 - \overline{Q}|}{u_{rel}(Q)} \quad \text{式（22）}$$

表 6 样品溶液峰面积测定重复性引入的不确定度 U_{rel}(A)(n=10)

Table 6 Uncertainty U_{rel} (A) of repetitive ability (n=10)

化合物名称	样品中农药分面积与内标物分面积比										平均值	标准偏差	U_{rel}(A)(%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	A	S(A)	
甲拌磷	0.30	0.28	0.31	0.33	0.31	0.32	0.32	0.33	0.33	0.33	0.31	0.016	0.50
氯唑磷	1.37	1.46	1.50	1.56	1.46	1.54	1.51	1.49	1.52	1.53	1.49	0.055	1.75
甲基对硫磷	0.30	0.31	0.35	0.37	0.35	0.35	0.32	0.32	0.33	0.35	0.33	0.021	0.67
水胺硫磷	0.09	0.12	0.14	0.19	0.18	0.20	0.18	0.21	0.20	0.20	0.17	0.039	1.24
氯菊酯	1.24	1.34	1.36	1.42	1.24	1.36	1.31	1.28	1.37	1.33	1.33	0.058	1.82
哒螨灵	0.71	0.76	0.77	0.80	0.74	0.82	0.77	0.79	0.84	0.81	0.78	0.040	1.27
氟氯氰菊酯	0.40	0.45	0.51	0.46	0.43	0.44	0.47	0.41	0.44	0.45	0.45	0.030	0.95
氯氰菊酯	0.55	0.55	0.36	0.37	0.53	0.57	0.54	0.55	0.48	0.40	0.49	0.081	2.56
氰戊菊酯	0.97	0.90	0.99	0.98	0.90	0.94	0.91	0.92	0.99	0.94	0.95	0.036	1.14

表 7 回收率引入的相对标准不确定度

Table 7 Relative standard uncertainty introduced in the recovery rate

化合物名称	GB/T 23200.113-2018					GB/T 23204-2008				
	平均回收率(%)	标准偏差s(Q)(%)	Urel(Q)(%)	显著性检验t	是否回收率修正	平均回收率(%)	标准偏差s(R)(%)	Urel(Q)(%)	显著性检验t	是否回收率修正
甲拌磷	85.94	11.52	3.16	4.45	是	92.06	8.87	3.49	3.4946	是
氯唑磷	86.87	9.76	2.65	4.96	是	93.61	6.80	3.73	3.7334	是
甲基对硫磷	88.57	10.22	2.72	4.20	是	95.22	5.86	3.30	3.3000	是
水胺硫磷	88.41	13.29	3.54	3.27	是	94.59	8.86	2.45	2.4522	是
氯菊酯	89.06	12.17	3.22	3.40	是	95.43	9.69	1.91	1.9103	否
哒螨灵	88.23	9.88	2.64	4.46	是	97.06	7.46	1.62	1.6212	否
氟氯氰菊酯	87.80	10.90	2.93	4.17	是	93.36	4.46	5.90	5.9046	是
氯氰菊酯	87.61	11.82	3.18	3.90	是	92.59	7.76	3.75	3.7501	是
氰戊菊酯	89.65	10.73	2.82	3.67	是	91.96	5.33	5.89	5.8920	是

利用式(21)计算回收率引入的相对不确定度[$u_{rel}(Q)$]，式中 n 为回收率独立样本个数 18，S(Q)为回收率标准偏差，$\overline{Q}$为回收率平均值。按式(22)对上述结果进行显著性检验，在 95% 置信区间，自由度为 17 时，t 分布临界值 $t_{0.95(17)}$=2.110，当检验值 $t \geq 2.110$ 时，则与回收率有显著性差异，需要使用回收率修正结果，反之不需要[20]。

2.6　相对不确定度的合成

统计上述各不确定度分量，结果见表 8~表 9，各农药的合成相对不确定度 $u_{rel}(X)$由各分量相对不确定度按公式(23)计算合成而得，结果见表 8。

$$u_{rel}(X) = \sqrt{u_{rel}(c)^2 + u_{rel}(P)^2 + u_{rel}(R)^2 + u_{rel}(A)^2 + u_{rel}(R)^2} \quad 式（23）$$

由表 8~表 9 可知，两个方法的合成不确定度引入量有差异，其中 B 类不确定度分量中，由于前处理不同而引入不同量，A 类不确定度分量中主要是方法的原理不一样，由于方法中农药的提取效率，基质影响等因素造成回收率引入不确定度的差异。

从整个合成不确定度过程分析来看，各分量合成不确定度贡献最大的是标准曲线拟合引入不确定度、回收率引入不确定度和标准溶液配制引入；标准溶液配制引入不确定度分量主要为混合标准工作液配制引入引起，标准品的配制过程不容忽视；通过测算，样液的测量浓度很低时，标准曲线拟合引入贡献很大；回收率引入不确定度最为重要，它也是我们在日常检测工作的质控手段之一，通过它的值来评价方法的准确度，回收率的好坏受方法原理、农药性质、人员操作、试剂耗材等多方面的影响。农药残留检测值即使不折算回收率，其对检测结果的准确度也存在影响，原因是回收率折算的是平均残留值，但其对检测结果的偏差无法被忽略[19]。

2.7　不确定度的表示

根据测量不确定度评定指南要求，在 95% 置信水平时，取子 k=2，在 0.15 mg/kg 添加水平下，每个水平重复 6 次，当回收率在满足方法要求时，各农药在茶叶样品中的扩展不确定度[28]，见表 10。

2.8　实际样品分析中不确定度评定

在实际样品检测中，对于农药残留值为最大允许残留值附近时，测量不确定的正确引入可决定该样品是否超标，这对实验室和企业都非常重要。在分析检测中，方法 GB/T 23204-2008 和方法 GB/T 23200.113-2018 都为茶叶中农药残留检测的推荐方法，方法的选择可能会影响检测结论。GB/T 23200.113-2018 由于具有简单、快速、高效且成本低的特点，广泛被作为实验室的第一方法来使用，由表 11 可知，由于方法的稀释倍数为 7.5，甲拌磷、氯唑磷、甲基对硫磷、氰戊菊酯 5 个农药，如果检出浓度为 MRLs

表 8　B 类评定不确定度的构成

Table 8　Composition of class B

B类评定不确定度统计		符号	单项引入不确定度(%)	各部分合成不确定度(%)
标准溶液配制$u_{rel}(c)$	标准物质纯度	$u_{rel}(c_1)$	0.5	2.46
	标准储备液配制引入不确定度	$u_{rel}(c_2)$	0.97	
	混合标准工作液配制引入不确定度	$u_{rel}(c_3)$	2.21	
样品前处理$u_{rel}(P)$	样品质量称取	$u_{rel}(m)$	1.16[a] 1.1[b]	1.45[a]
	样品提取	$u_{rel}(v_1)$	0.499[a] 0[b]	
	样品净化、定容步骤过程中	$u_{rel}(v_2)$	0.711[a] 0.327[b]	1.15[b]

注：a GB/T 23200.113-2018方法；b GB/T 23204-2008方法；表同。

表 9　A 类评定不确定度的构成和合成相对不确定度

Table 9　Composition and synthesis of class A

A类评定不确定度统计	标准曲线拟合引入不确定度$u_{rel}(R)$(%)	样液峰面积测定重复性引入不确定度$u_{rel}(A)$(%)	回收率引入不确定度$u_{rel}(Q)$[a](%)	回收率引入不确定度$u_{rel}(Q)$[b](%)	合成相对不确定度$u_{rel}(X)$[a](%)	合成相对不确定度$u_{rel}(X)$[b](%)
甲拌磷	2.6	0.5	3.16	3.49	5.01	5.15
氯唑磷	6.28	1.75	2.65	3.73	7.59	7.99
甲基对硫磷	5.14	0.67	2.72	3.3	6.51	6.72
水胺硫磷	5.84	1.24	3.54	2.45	7.51	7.00
氯菊酯	3.59	1.82	3.22	1.91	5.89	5.22
哒螨灵	1.45	1.27	2.64	1.62	4.34	3.70
氟氯氰菊酯	3.84	0.95	2.93	5.9	5.69	7.60
氯氰菊酯	7.93	2.56	3.18	3.75	9.37	9.53
氰戊菊酯	2.58	1.14	2.82	5.89	4.91	7.07

表 10 茶叶中 9 种农药残留的检测结果不确定度

Table 10 Uncertainty of 9 pesticide residues in tea leaves

化合物名称	GB/T 23200.113-2018					GB/T 23204-2008				
	平均回收率(%)	检测结果(mg/kg)	合成相对标准不确定度(%)	相对扩展不确定度(%)	扩展不确定度 u_{95}(mg/kg)	平均回收率(%)	平均含量(mg/kg)	合成相对标准不确定度(%)	相对扩展不确定度(%)	扩展不确定度 u_{95}(mg/kg)
甲拌磷	80.72	0.12	5.01	10.02	0.012	96.88	0.15	5.15	10.30	0.015
氯唑磷	84.98	0.13	7.59	15.18	0.019	96.74	0.15	7.99	15.98	0.023
甲基对硫磷	89.52	0.13	6.51	13.02	0.017	101.29	0.15	6.72	13.44	0.020
水胺硫磷	84.15	0.13	7.51	15.02	0.019	103.45	0.16	7.00	14.00	0.022
氯菊酯	83.20	0.12	5.89	11.78	0.015	101.59	0.15	5.22	10.44	0.016
哒螨灵	88.92	0.13	4.34	8.68	0.012	103.18	0.15	3.70	7.40	0.011
氟氯氰菊酯	90.28	0.14	5.69	11.38	0.015	92.60	0.14	7.60	15.20	0.021
氯氰菊酯	83.78	0.13	9.37	18.74	0.024	94.13	0.14	9.53	19.06	0.027
氰戊菊酯	88.38	0.13	4.91	9.82	0.013	97.33	0.15	7.07	14.14	0.021

表 11 方法 GB/T23204 和方法 GB/T 23200.113-2018 比较

Table 11 Comparison of method GB/T23204 and the method GB/T 23200.113-2018

农药	MRLs(mg/kg)	当检测值为MRLs, 理论样液浓度(mg/L)		推荐方法	解决措施
		GB/T 23204-2008	GB/T 23200.113-2018		
甲拌磷	0.01	0.05	0.0027	GB/T 23204-2008	
哒螨灵	5	25.00	1.3	GB/T 23200.113-2018	
甲基对硫磷	0.02	0.10	0.0053	GB/T 23204-2008	
水胺硫磷	0.05	0.25	0.013	GB/T 23204-2008	
氯菊酯	20	100.00	5.3	GB/T 23200.113-2018	最后一步加入10 mL乙酸乙酯, 同时内标准确添加1 mL
氯唑磷	0.01	0.05	0.0027	GB/T 23204-2008	
氟氯氰菊酯	1	5.00	0.27	GB/T 23200.113-2018	
氯氰菊酯	20	100.00	5.3	GB/T 23200.113-2018	最后一步加入10 mL乙酸乙酯, 同时内标准确添加1 mL
氰戊菊酯	0.1	0.50	0.027	GB/T 23204-2008	

时, 样液的理论检测浓度在 0.027 mg/L 以下, 最低至 0.0027 mg/L, 在实际检测分析中, 由于仪器灵敏度和回收率的影响, 样品检测结果的不确定度很大, 对检测结果的判定存在很大的风险, 建议这 5 个药使用 GB/T 23204-2008 检测分析。

哒螨灵、氯菊酯、氯氰菊酯、氟氯氰菊酯在 GB 2763-2021 食品中农药最大残留限量上的允许最大残留较高, 分别为 5、20、20、1 mg/kg。较高浓度的样液进入仪器后会造成色谱柱的过载、检测器过载, 产生测量误差, 建议使用 GB/T 23200.113-2018 方法, 同时采用增加乙酸乙酯的复溶体积和内标物的添加量, 控制内标物浓度和标液中内标物浓度基本一致为宜。

3 讨论

通过气相色谱质谱联用法, 采用不同方法分析评估茶叶中哒螨灵等 9 种农药残留含量测定过程中的不确定度, 实验过程中对标准物质的配制、样品称量、样品提取、净化、测量等过程会引入不确定度进行分析, 分析评定合成不确定度过程, 可知不确定度贡献主要来自标准曲线拟合、样品添加回收率和标准溶液配制, 对实验结果的影响较大, 其次是样品测量重复性, 在极低测量浓度时, 影响最为明显。

在分析检测中, 方法 GB/T 23204-2008 和方法 GB/T 23200.113-2018 都为茶叶中哒螨灵等 9 种农药残留检测的推荐方法, 方法的选择可能会影响检测结论。建议甲拌磷、氯唑磷、甲基对硫磷、氰戊菊酯 5 个农药, 使用 GB/T 23204-2008 检测分析; 哒螨灵、氯菊酯、氯氰菊酯、氟氯氰菊 4 个农药, 使用 GB/T 23200.1134-2018 检测分析。可通过方法优化, 调节合适的检测浓度, 如: 茶叶中氰戊菊酯和氯唑磷在 MRLs 值检出时, 可适当增加样品称样量或减少定容液体积; 氯菊酯和氯氰菊酯在 MRLs 值检出时, 可增加提取液的体积和增加定容液体积。

标准曲线拟合引入的不确定度大小与样品测量次数呈相关性, 随着测量次数的增加, 样品测量由标准曲线拟合引入的不确定度降低, 样品测量次数在 3~4 次时, 不确定度的变化不明显。结果说明, 检测工作中, 测量结果如出现阳性检出时, 样品需要复测 3 次以上计算平均值才能得到较可靠的结果。测定中, 样液测定浓度在标准曲线平均浓度附近时, 检测结果较可靠, 不同浓度的样品要使用合适的标准曲线定量或者通过样品稀释、浓缩等方式让样液检测浓度在合适的范围内进行测定。结果表明, 选择合适的校准曲线和增加样品的测量次数, 可以降低标准曲线

拟合引入的不确定度影响。

回收率引入不确定度最为重要，它也是我们在日常检测工作的质控手段之一，通过它的值能够评价方法的准确度。回收率的好坏受方法原理、农药性质、样品基质、人员操作、试剂耗材等多因素干扰，造成测量结果不确定度数值增大。

4　结论

在采用气相色谱质谱法测定茶叶中的农药残留量时，需要选择合适的前处理方法，保障实验室温湿度环境条件，提高实验人员的操作水平，使用满足实验需要的量具精度，试剂耗材的纯度，做好仪器调试准备工作，以满足检验检测的需求。样品前处理中应严格控制的各个步骤，操作精确，减少样品称样量、提取液体积、定容溶液体积等引入的不确定度。使用合适的标准曲线浓度点范围，在定量软件中调整标准曲线浓度点的权重，获得更好的拟合结果，提高在 MRL 值附近的测量准确度。测量结果如出现阳性检出时，样品需要复测 3 次以上计算平均值才能得到较可靠的结果，从而降低测定结果的不确定度，确保检测结果的置信度。

参考文献

[1] 韩俊英. 茶叶外贸中的绿色壁垒及法律对策分析[J]. 福建茶叶, 2016, 38(5): 52−53. [HUAN J Y. Tea in the green barriers in foreign trade and legal countermeasure analysis[J]. Tea in fu jian, 2016, 38(5): 52−53.]

[2] 欧阳凌, 廖翼, 梁景普. 我国茶叶产业国际竞争力与提升对策分析[J]. 湖南农业科学, 2020(4): 76−79. [OUYANG L, LIAO Y, LIANG J P. Analysis on International competitiveness of china's tea industry and its development countermeasures[J]. Hunan Agricultural Sciences, 2020(4): 76−79.]

[3] 李裴, 胡继承. 2015 贵州茶产业发展报告 [M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2015. [LIF,HUJC.Guizhouchachanyefazhanbaogao(2015)[M].Guiyang: Guizhou Science and Technology Press, 2015.]

[4] 谢争珍. 中国输日茶叶贸易及影响因素研究[J]. 茶叶, 2008(4): 225−229, 236. [XIE Z Z. The research on exportation of chinese tea to Japan and its impact factors[J]. Journal of Tea, 2008(4): 225−229, 236.]

[5] 柴宗龙, 袁彩霞, 周鑫魁, 等. 气相色谱法测定黄瓜中丙溴磷农药残留量的测量不确定度评定[J]. 食品工业科技, 2020, 41(12): 238−244. [ZHI Z L, YUAN C X, ZHOU X K, et al. Measurement uncertainty of determination of profenofos (PFF) residues in cucumber evaluated by gas chromatography(GC)[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(12): 238−244.]

[6] 胡贝贞, 蔡海江, 宋伟华. 茶叶中氟虫腈等 8 种农药残留的液相色谱-串联质谱法测定及不确定度评定[J]. 色谱, 2012, 30(9): 889−895. [FU B Z, CAI H J, SONG W H. Determination of eight pesticide residues in tea by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its uncertainty evaluation[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2012, 30(9): 889−895.]

[7] 许凌. 我国茶叶质量安全分析及提升研究 [D]. 杭州: 浙江农林大学, 2018. [XU L. The tea quality and safety of analysis and research in our country[D]. Hangzhou: Zhejiang A&F University, 2018.]

[8] 陈桃, 孙剑, 李紫娟. 我国茶产业发展中存在的问题、原因与对策[J]. 农业现代化研究, 2018, 39(3): 424−431. [CHEN T, SHUN J, LI Z J. The problems, causes, and solutions of China's tea industry[J]. Research of Agricultural Modernization, 2018, 39(3): 424−431.]

[9] 食品中农药最大残留限量: GB2763-2021 中国标准书号 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2021. [National Food Safety Standard. Maximum residue limits for pesticides in food: GB 2763-2021[S]. Beijing: Standards Press of China, 2021.]

[10] 刘腾飞, 董明辉, 杨代凤, 等. 茶叶质量安全主要化学影响因素分析方法研究进展[J]. 食品科学, 2018, 39(09): 310−325. [LIU T F, DONG M H, YANG D F, et al. Progress in analytical methods for major chemical contaminants affecting tea quality and safety[J]. Food Science, 2018, 39(09): 310−325.]

[11] 高彦. QuEChERS 结合 LC-MS/MS 法在动物源性食品中兽药残留分析中的应用研究 [D]. 郑州: 郑州大学, 2017. [GAO Y. Research and application of QuEChERS combined LC-MS/MS on veterinary drug residue in animal-derived food[D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2017.]

[12] 陆明, 范国荣, 汪杨, 等. 测量不确定度在药品检测领域的研究进展[J]. 中国药事, 2013, 27(5): 485−492. [LU M, FANG G R, WANG Y, et al. Research progress of measurement uncertainty in drug detection[J]. Chinese Pharmaceutical Affairs, 2013, 27(5): 485−492.]

[13] 刘淑华, 张宜文, 王冰玥, 等. 高效液相色谱法测定鸡蛋中角黄素的不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(17): 6872−6878. [LIU S H, ZHANG Y W, WANG B Y, et al. Uncertainty evaluation of the determination of canthaxanthin in eggs by high performance liquid chromatography[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(17): 6872−6878.]

[14] 王璐璐, 张水锋, 施元旭, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定豆芽中甲硝唑及羟基甲硝唑残留量的不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(17): 6902−6908. [WANG L L, ZHANG S F, SHI Y X, et al. Uncertainty evaluation for determination of metronidazole and hydroxym etronidazole residues in bean sprouts by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(17): 6902−6908.]

[15] 王承忠. 测量不确定度基本原理和评定方法及在材料检测中的评定实例 第一讲 测量不确定度的基本原理和定义[J]. 理化检验 (物理分册), 2013, 49(9): 597−604, 617. [WANG C Z. Basic principle and evaluation method of measurement uncertainty and evaluation llustrations in material detection lecture No. 1 basic principle and definitions of measurement uncertainty[J]. Physical Testing and Chemical Analysis(Part A:Physical Testing), 2013, 49(9): 597−604, 617.]

[16] 王承忠. 测量不确定度与误差的区别及在评定中应注意的问题 [J]. 物理测试, 2004(1): 1−5. [WANG C Z. Distinction between error and uncertainty of measurement and some problems need attention in uncertainty evaluation[J]. Physics Examination and Testing, 2004(1): 1−5.]

[17] 苏美玲, 刘海旭, 丁勇宝, 等. 气相色谱法测定粮食中 4 种

有机磷农药残留量的不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(21): 5618−5622. [SU M L, LIU H X, DING Y B, et al. Uncertainty evaluation of determination of 4 kinds of or ganophosphorus pesticide residues in grain by gas chromatography[J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(21): 5618−5622.]

[18] 潘灿平, 钱传范, 江树人. 农药残留分析不确定度的评价及其应用[J]. 现代农药, 2002, 1(2): 12−14. [PAN C P, QIAN C F, JIANG S R. Estimation of uncertainty of pesticide residue analysis and its use[J]. Mod Agrochem, 2002, 1(2): 12−14.]

[19] 汪志威, 周思齐, 李非里, 等. 实验室农药残留检测的测量不确定度评定以 GB 23200.8-2016 测定草莓中 4 种农药残留为例[J]. 农药学学报, 2020, 22(1): 105−114. [WANG Z W, ZHOU S Q, LI F L, et al. Evaluating the uncertainty of measurement of pesticide residue detection—a case study of four pesticide residues in strawberry by GB 23200.8-2016[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2020, 22(1): 105−114.]

[20] 洪泽淳, 熊含鸿, 刘莹莹, 等. 气相色谱法测定蔬菜中 16 种有机磷农药残留量的测量不确定度评定[J]. 食品工业科技, 2020, 41(3): 239−245. [HONG Z C, XIONG H H, LIU Y Y, et al. Evaluation of measurement uncertainty in the determination of 16 kinds of organophosphorus pesticide residues in vegetables by gas chromatography[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(3): 239−245.]

[21] 郭军霞, 成娟, 雷茜, 等. 气相色谱法测定鲜枸杞中氧乐果农药残留量的不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(20): 7570−7575. [GUO J X, CHEN J, LEI Q, et al. Evaluation of uncertainty in determination of omethoate pesticide residues in fresh wolfberry by gas chromatography[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2020, 11(20): 7570−7575.]

[22] 植物源性食品中 208 种农药及其代谢物残留量的测定 气相色谱-质谱联用法: GB23200.113-2018 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2018. [National Food Safety Standard-Determination of 208 pesticides and metabolites residues in foods of plant origin-gas chromatography-tandem mass spectrometry method: GB23200.113-2018 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2021.]

[23] 茶叶中 519 种农药及相关化学品残留量的测定 气相色谱-质谱法: GB/T23204-2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008. [Determination of 519 pesticides and related chemicals residues in tea-GC-MS method: GB/T23204-2008[S]. Beijing: Standards Press of China, 2008.]

[24] 测量不确定度评定与表示: JJF 1059.1-2012[S]. 北京: 中国计量出版社, 2012. [Evaluation and expression of uncertainty in measurement: JJF 1059.1-2012[S]. Beijing: China Metrology Press, 2012.]

[25] 化学分析测量不确定度评定: JJF 1135-2005 [S]. 北京: 中国计量出版社, 2005. [Evaluation of uncertainty in chemical analysis measurement: JJF 1135-2005 [S]. Beijing: China Metrology Press, 2005.]

[26] 李清. 气相色谱仪测定蔬菜中农药残留的测量不确定度评定及质量判定[J]. 榆林学院学报, 2020, 30(6): 32−37. [LI Q. Measurement uncertainty and quality judgement of determination of pesticide residue in vegetable with gas chromatography[J]. Journal of Yulin College, 2020, 30(6): 32−37.]

[27] JJG 196-2006 常用玻璃量器检定规程 [S]. 北京: 中国计量出版社, 2006. [JJG 196-2006 Working glass container[S]. Beijing: China Metrology Press, 2006.]

[28] 乔海霞, 孙效乐, 曹宁, 等. 气相色谱-三重四极杆质谱联用法测定黄瓜中嘧霉胺的不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(24): 9256−9260. [QIAO H X, SUN X L, CAO N, et al. Uncertainty evaluation for the determination of pyrimethanil residues in cucumber by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2020, 11(24): 9256−9260.]

吴海涛，张艺玮. 椴树蜂蜜多糖和多花种蜂蜜多糖加工特性的比较 [J]. 食品工业科技，2022, 43(14)：323−328. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090359

WU Haitao, ZHANG Yiwei. Comparative Study on Processing Characteristics of Linden Honey Polysaccharide and Multifloral Honey Polysaccharide[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 323−328. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090359

·分析检测·

椴树蜂蜜多糖和多花种蜂蜜多糖加工特性的比较

吴海涛[1]，张艺玮[2]

（1.黑龙江八一农垦大学理学院，黑龙江大庆 163319；
2.黑龙江八一农垦大学食品学院，黑龙江大庆 163319）

摘　要：本文旨在研究不同蜂蜜多糖的加工特性，探究种类对蜂蜜多糖加工特性的影响。本文制备椴树蜂蜜多糖（Linden honey polysaccharides，LHP）和多花种蜂蜜多糖（Multifloral honey polysaccharides，MHP），并对其进行结构、热力学特性和流变学分析，对蜂蜜多糖的加工特性研究。结果表明，LHP 和 MHP 的 X-射线衍射出现不明显的突起。LHP 和 MHP 的重量损失分别为 85.05% 和 81.3%，热降解温度分别为 236.7 和 322 ℃；LHP 和 MHP 均表现出一个较宽的放热反应峰，分别在 75 和 72 ℃ 附近；LHP 和 MHP 在高剪切速率下粘度分别在 1.3 和 1.2 mPa·s 保持不变；LHP 和 MHP 的持水量分别为 1.6 和 0.4 g 水/g；LHP 和 MHP 的持油量分别为 18.8 和 11.4 g 油/g。这表明两种蜂蜜多糖具有良好的抗热特性及粘度，为蜂蜜多糖在功能性食品及天然药物开发等领域的应用提供理论支持。

关键词：椴树蜂蜜多糖，多花种蜂蜜多糖，热力学特性，流变特性

中图分类号：S896.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1002−0306(2022)14−0323−06

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090359　　本文网刊：

Comparative Study on Processing Characteristics of Linden Honey Polysaccharide and Multifloral Honey Polysaccharide

WU Haitao[1]，ZHANG Yiwei[2]

（1.College of Science, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China；
2.College of Food Science, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China）

Abstract: The purpose of this study was to study the processing characteristics of different honey polysaccharides and explore the effects of different kinds on the processing characteristics of honey polysaccharides. Linden honey polysaccharides (LHP) and multifloral honey polysaccharides (MHP) were prepared. The processing characteristics of polysaccharides honey were studied by thermodynamic and rheological analysis. The results showed that the weight losses of LHP and MHP were 85.05% and 81.3%, respectively. The thermal degradation temperatures of LHP and MHP were 236.7 and 322 ℃, respectively. Both LHP and MHP showed a wide exothermic reaction peak at 75 and 72 ℃, respectively. The viscosity of LHP and MHP remains unchanged at 1.3 and 1.2 mPa·s at high shear rates, respectively. The water holding capacity of LHP and MHP was 1.6 and 0.4 g water/g, respectively. The oil holding capacity of LHP and MHP was 18.8 and 11.4 g oil/g, respectively. It was suggested that honey polysaccharides had better heat resistance and viscosity. It could provide theoretical support for the application of honey polysaccharides in the development of functional foods and natural medicines.

Key words: linden honey polysaccharide; multifloral honey polysaccharide; thermodynamic characteristics; rheological properties

收稿日期：2021−10−11

作者简介：吴海涛（1977−），男，硕士研究生，实验师，研究方向：应用化学，E-mail: wht0788@163.com。

多糖作为天然食品添加剂是安全的，被认为是改善产品品质的重要物质，此外，多糖化具有提升食品的营养价值，广泛应用于医学、食品等多个行业，对多糖加工特性的探究为其应用提供理论基础。近年来，蜂蜜多糖被人们渐渐关注。蜂蜜多糖是存在于蜂蜜中罕见的微量物质，又称作蜂蜜糊精，是蜂蜜的胶体成分，来源为花蜜和脂质[1]。有研究表明，蜂蜜含有低分子量多糖，可以抵抗宿主酶的降解，因此可作为肠道微生物菌群的营养来源[2−3]。总之，蜂蜜作为一种独特的天然产物具有重要的研究价值。

蜂蜜多糖种类随蜜源的不同而具备不同的特性。1965 年，Siddiqui 等[4] 已对一些蜂蜜样品中多糖成分含量进行了检测，多糖组成中均含有葡萄糖、半乳糖、甘露糖、阿拉伯糖和木糖，其中个别蜂蜜多糖中存在鼠李糖和微量的糖醛酸。Tonks 等[5] 按分子大小对麦卢卡蜂蜜进行分馏，结果表明 30 kDa 离心过滤器保留的物质中存在多糖，并且与大多数免疫细胞因子刺激活性相关，但是没有进一步对其成分进行研究。Megherbi 等[6] 对金合欢、山地多花和多花种蜂蜜进行了指纹图检测，发现痕量的多糖。王彤[7] 采用水溶醇沉法得到多糖沉淀，通过脱蛋白、透析和冷冻干燥得到产率均在 0.04% 左右的 10 种蜂蜜多糖，利用毛细管电泳-紫外检测方法测定单糖组成和含量，结果表明 10 种蜂蜜多糖均含不同比例的果糖和葡萄糖，天然多花种蜂蜜多糖和枣花蜂蜜多糖含鼠李糖，天然枣花蜂蜜多糖和荞面花蜂蜜多糖含阿拉伯糖。关于多糖的热力学研究是其生物应用的一个重要内容，多糖的热稳定性可确定其在工业生产中质量的变化。流变特性是多糖作为增稠和稳定剂的必需研究指标，主要受温度、pH 及多糖浓度的影响，如角叉菜聚糖和卡拉胶在一定温度范围内的抗粘度能力使其成为食品或化妆品添加剂的理想备选材料[1]。对水和脂肪的结合能力是食品配方和加工中最实用的功能特性，多糖通过水和油的相互作用与食品的质地直接相关[8]，具有高持油性（oil holding capacity，OHC）的多糖能使高脂肪食品和乳液更加稳定。多糖的晶体特性与其物理、化学性能有直接的关系[9]。胶凝性质的探究为其在食品工业中胶凝剂和增稠剂的原料应用提供理论依据[10]；黑孜然种子多糖发泡性的探究为其用于食品配方中的发泡剂提供数据支撑[11]。综上，加工特性的探究是研究多糖特性的重要内容。然而，蜂蜜多糖作为一种新型多糖，其加工特性鲜有研究。亟需关于蜂蜜多糖的热力学、流变学方面的研究，从而促进蜂蜜多糖的开发利用。

蜂蜜多糖作为珍贵的功能性物质，其成分的探究及开发具有一定的研究价值。为了开发有价值的蜂蜜多糖，本实验选择椴树蜂蜜、多花种蜂蜜作为原材料进行蜂蜜多糖的制备及特性研究。采用热重和差示扫描量热分析进行热力学测试，采用静态和动态流变测试进行流变特性分析，测定蜂蜜多糖的持水性及持油性；以期为椴树蜂蜜、多花种蜂蜜在保健产品中的利用提供科学依据，促进新型多糖的开发及利用，并且推动蜂蜜整个产业的发展。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

椴树蜂蜜、多花种蜂蜜　购自黑龙江省哈尔滨市超市（天然原料蜜，保存在 4 ℃）；其他试剂　均为国产分析纯。

HH-4J 数显恒温搅拌水浴锅　上海霓玥仪器有限公司；TDL-40B 高速大容量离心机　华威科创科技有限公司；Pilot10-15M 冷冻干燥机　北京博医康实验仪器有限公司；SDT 650 同步热分析仪、Discover-HR-1 旋转流变仪　美国 TA 公司；RE-2000A 旋转蒸发仪　河南益源仪器有限公司；D8 ADVANCE 采用 X-射线衍射仪　德国 Bruker。

1.2 实验方法

1.2.1 蜂蜜多糖的制备　采用水溶醇沉法提取蜂蜜多糖[4,12]。100 g 蜂蜜加 200 mL 蒸馏水于烧杯中，60 ℃溶解 2 h，室温下加 3 倍体积 95% 的乙醇提取 14 h。离心（6000×g，10 min）收集沉淀物，然后将沉淀物溶解在水中。采用 Sevag 法去除蛋白，采用过氧化氢法脱色。使用旋转蒸发仪进行浓缩。选择分子截留量为 8~14 kDa 的透析袋透析 48 h，每 6 h 换水。收集透析液，离心，冻干得到蜂蜜多糖。多糖含量通过苯酚-硫酸法测定[13]，以葡萄糖标准品为参照，标准曲线方程为 $Y=6.99X+0.00733$（$R^2=0.99656$），其中 X 为葡萄糖质量浓度（mg/mL），Y 为吸光值。根据标准曲线计算蜂蜜多糖中粗多糖含量。

1.2.2 X-射线衍射测定　采用 X-射线衍射仪进行蜂蜜多糖晶体结构的分析。室温（20 °C）下，取微量样品（2 mg），衍射角度 2θ=5°~60°，步长为 0.1°，扫描速度为每 0.1 s/步。

1.2.3 热力学特性分析　蜂蜜多糖的热力学特性采用热重-差热同步热分析仪进行分析，在升温、恒温或降温过程中，观察样品的质量随温度或时间的变化。将 10 mg 样品放入铂坩埚中，使用空铝盘作为参考，在氮气保护下以 10 ℃/min 的速率从 25 ℃ 升温到 700 ℃，得到热重（TG）和导数热重（DTG）；将仪器从室温加热到 400 ℃ 进行 DSC 分析测定，升温速率同上。

1.2.4 流变特性测定　取 5 mg/mL 的蜂蜜多糖溶液，水浴（60 ℃）搅拌 2 h 后，密封，静置过夜。使用旋转流变仪测定蜂蜜多糖溶液的流变特性。

选用 Steady-State flow 模式，测试温度为 25 ℃，测定多糖溶液在剪切速率为 0.1~100 s^{-1} 条件下的表观粘度和应力。

选用 Oscillation-Frequency 模式，测试温度为 25 ℃，扫描频率为 0.1~100 Hz，振荡应变固定为 2%，研究多糖随振动频率变化的粘弹性质，得到储能模

量、损耗模量及相位角 tanδ。

流变仪设定温度扫描范围为 20~90 ℃，升温速率为 2 ℃/min，频率固定为 1 Hz(6.28 rad/s)，记录温度对多糖流变特性的影响。

1.2.5　持水性与持油性测定　蜂蜜多糖的持水量(Water holding capacity, WHC)和持油量(Oil holding capacity, OHC)根据 Yuan 等报道的方法稍作改动进行测定[14]。

持水量的测定：将 50 mg 蜂蜜多糖(精确到 0.001 g)放入离心管中，称重，分散到 5 mL 蒸馏水中。在室温下混匀，每 15 min 振摇 5 s，1 h 后将其离心(4000×g，20 min)，除去上层水分，游离水的质量为 m。WHC 表示为每克多糖所含的水克数，计算公式如下：

$$\text{持水率(g水/g)} = \frac{5-\text{m}}{0.05}$$

持油量的测定：将 50 mg 蜂蜜多糖(精确到 0.001 g)放入离心管中，称重，然后加入 5 mL 大豆油。在室温下孵育 60 min，每 15 min 将悬浮液涡旋混合 5 s。1 h 后将其离心(4000×g，20 min)，除去上层相，将与多糖分离的油的质量测定为 m_0。OHC 表示为每克多糖中所含油的克数，计算公式如下：

$$\text{持油率(g油/g)} = \frac{5-\text{m}_0}{0.05}$$

1.3　数据处理

数据采用平均值±标准偏差的形式。使用 SPSS 26.0 软件进行方差分析，使用 Origin 9.65 绘图处理。所有试验至少重复三次。

2　结果与分析

2.1　X-射线衍射分析

多糖的晶体和半晶体结构直接影响其物理性质[15]。蜂蜜多糖的 X-衍射记录见图 1。

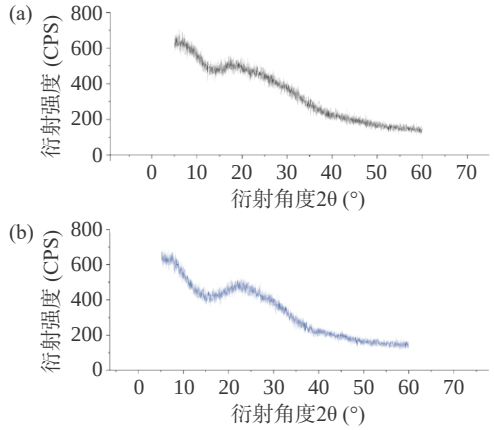


图 1　蜂蜜多糖的 X-射线衍射图

Fig.1　X-ray diffraction spectrum of honey polysaccharides

注：a：椴树蜂蜜多糖(LHP)；b：多花种蜂蜜多糖(MHP)；图 2、图 4 同。

如图 1 所示，两种蜂蜜多糖的 X-射线衍射出现不明显的凸起，并无任何典型或尖锐的强烈峰，表明均为典型的无定形性质，MHP 分别在 2θ=20°处有较弱的衍射峰出现，说明可能存在晶体结构，结晶度较小，与川贝母多糖的 X-射线衍射分析相似[16]，而 LHP 的 X-衍射峰较 MHP 更弱。X-衍射表明蜂蜜多糖既有结晶性又有无定形状态。

2.2　热力学特性

2.2.1　热重分析　多糖的热稳定性是多糖应用的重要特征，通过热重分析(TG)、导数热重分析(DTG)和示差扫描量热(DSC)分析蜂蜜多糖的热力学性质。TG 可测量温度变化过程中产品的重量损失和热降解温度[17]，见图 2。如图 2 所示，蜂蜜多糖的热分解分成两个阶段，第一阶段为水分的流失，第二阶段为蜂蜜多糖的化学分解。兰茎粉多糖[18]和绿豆皮多糖[19]等天然多糖也有两个热分解阶段。通过分析可知，LHP 和 MHP 的重量损失分别为 85.05% 和 81.30%，热降解温度分别为 236.7 和 322 ℃。LHP 失重比 MHP 多，MHP 具有更强的热稳定性和更稳定的结构，这种热稳定性的差异可能是由多糖的结构、分子量大小引起的[20]。

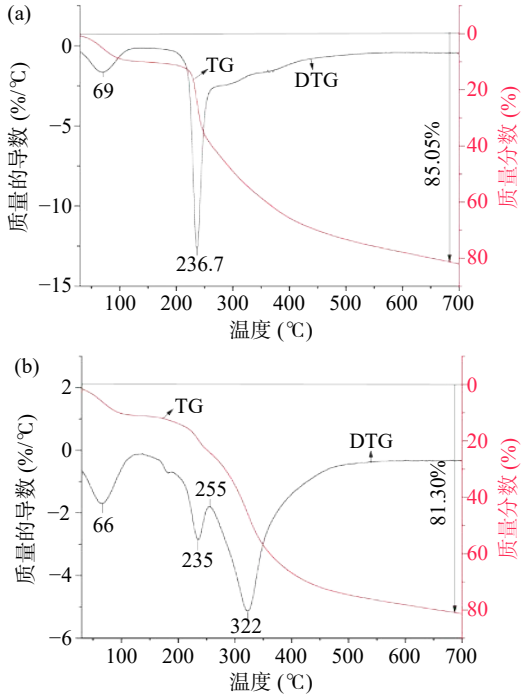


图 2　蜂蜜多糖的 TG、DTG 曲线图

Fig.2　TG and DTG curve of honey polysaccharides

2.2.2　示差扫描量热分析　DSC 用于确定蜂蜜多糖随着温度升高而发生的吸热或放热变化[21]，见图 3。如图 3 所示，LHP 和 MHP 均表现出一个较宽的放热反应峰，分别在 75 和 72 ℃ 附近，该范围蜂蜜多糖为失重状态，可能发生分解反应，而在 400 ℃ 后可能存在特征峰-吸热峰。川贝母多糖的 DSC 分析在 231.9 和 300.1 °C 出现放热谷，多糖热稳定性的差异可能是由提取方法、多糖的化学组成和结构之间的差异引起[22]。总体来看，LHP 和 MHP 的热稳定性较强，可在正常操作温度下保持稳定。

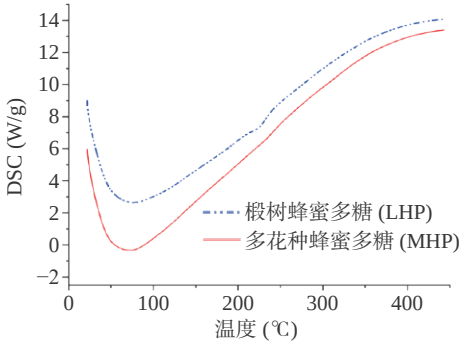


图 3 蜂蜜多糖的 DSC 曲线图

Fig.3 DSC curve of honey polysaccharides

2.3 流变特性

2.3.1 静态流变学测试 如图 4 所示，显示了蜂蜜多糖溶液(0.5%)的稳态剪切流动曲线。图 4 中两种蜂蜜多糖溶液均表现出剪切变稀行为。随剪切速率的增大，表观粘度逐渐降低，符合非牛顿流体特征，即为剪切稀化的假塑性流体，此现象与黑穗醋栗多糖的流变特性相同[23]。剪切变稀的主要原因是分子在流动方向的取向、柔性链的变形和分子间相互作用的减少[24−25]。LHP 和 MHP 在高剪切速率下粘度分别在 1.3 和 1.2 mPa·s 保持不变，LHP 的分子量大，阻力大，进而粘度相对较大，而粘度较低的多糖，意味着可以在较低的能量下运行，能够减少机械运转过程中的能损耗，利于工业化生产[26]。

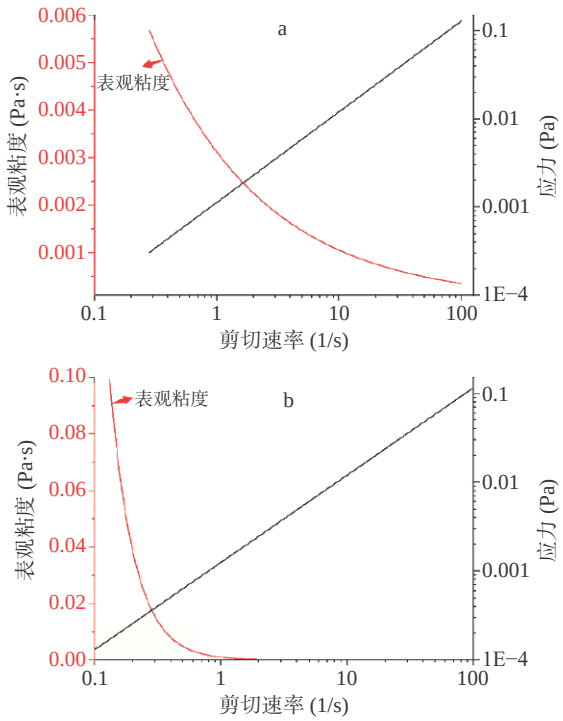


图 4 蜂蜜多糖随剪切速率的流变学变化

Fig.4 Rheological changes of honey polysaccharides with shear rate

2.3.2 动态流变学测试 0.5% 的 LHP 和 MHP 的频率扫描变化见图 5。储能模量(G')反映了蜂蜜多糖溶液的弹性性质，损耗模量(G″)反映了蜂蜜多糖溶液的粘性性质[27]。如图 5 所示，LHP 和 MHP 在频率为 0.1~100 Hz 内 G″<G'，且两条曲线接近于平行变化，表现为弱凝胶行为，刺梨多糖也得到了类似的结果[28]。

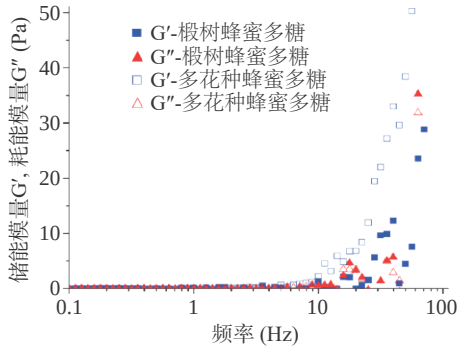


图 5 蜂蜜多糖的流变特性随频率的变化

Fig.5 Changes of rheological properties of honey polysaccharides with frequency

蜂蜜多糖溶液(0.5%)从 20 ℃ 升温到 90 ℃ 的粘度和应力变化见图 6，如图 6a 所示，两种蜂蜜多糖溶液的粘度在温度 20~63 ℃ 范围内几乎没有变化，并在很宽的温度范围内保持稳定(见图 6b)。绿藻胞外多糖也得到了类似的结果[7]。结果表明，在一般温度范围内，LHP 和 MHP 的粘度不受影响，是食品或化妆品添加剂的理想选择。

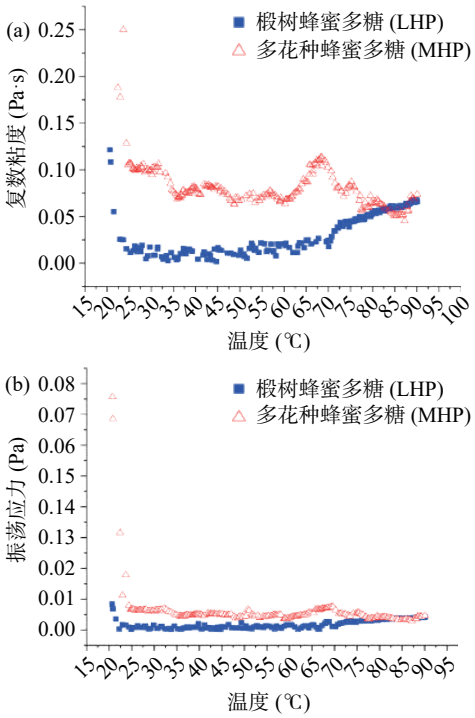


图 6 蜂蜜多糖随温度影响的流变变化图

Fig.6 Rheological changes of honey polysaccharides with temperature

注：a：复数粘度；b：振荡应力。

2.4 持水性与持油性

保水和结合脂肪的能力是食品配制和加工中最实用的功能特征，通过水和油之间的相互作用直接与产品质地相关[2]。结果如表 1 所示，LHP 和 MHP 的

持水量分别为 (1.60±0.09) g 水/g 和 (0.40±0.02) g 水/g，低于杏仁多糖 1.95 g 水/g[28]。LHP 和 MHP 的持油量分别为 (18.80±1.05) g 油/g 和 (11.4±0.89) g 油/g，高于绿藻酸性多糖的持油量(15.09 g 油/g)[15]，高 OHC 的多糖对高脂食品和乳液的稳定性能更强。蜂蜜多糖具有理想的脂肪结合力，因此，蜂蜜多糖在功能性食品工业中具备潜在的应用基础。蜂蜜多糖作为水溶性多糖，其表现出的持水持油特性是多糖与其所合有的蛋白质共同作用的结果，即蛋白质作为疏水结构存在，而多糖链作为亲水性结构存在。

表 1　蜂蜜多糖的持水性和持油性

Table 1　Water holding capacity and oil holding capacity of honey polysaccharides

样品	持水性(g)	持油性(g)
LHP	1.60±0.09	18.80±1.05
MHP	0.40±0.02	11.4±0.89

3　结论

本文利用 X 射线衍射研究椴树蜂蜜多糖和多花种蜂蜜多糖的晶体结构，也通过热力学特性、流变学特性、持水性和持油性来研究其加工特性。结果表明，MHP 具有更好的热稳定性；两种多糖溶液在高频率剪切下表现为弱凝胶行为；剪切速率变化下，表现为剪切稀化行为；且温度对蜂蜜多糖的流变特性不具有很大程度的影响。根据流体力学，多糖加热后，分子无规则运动增加，分子间距增大，减弱了多糖分子链之间的相互作用，多糖链更易于运动，溶液粘度降低，剪切稀化现象明显。根据本文结果，可以利用蜂蜜多糖热重分析，对不同温度下的蜂蜜多糖开发利用。同时，蜂蜜多糖具有较好的水和脂肪结合能力。多糖加工特性的研究应从热力学特性和流变学特性等方面结合物理加工特性进行全面研究，进而为其在工业和功能性食品中的应用打下基础。

参考文献

[1] ZHENG H, PERREAU J, POWELL J E, et al. Division of labor in honey bee gut microbiota for plant polysaccharide digestion[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2019, 116(51): 25909−25916.

[2] VALVERDE S, ARES A M, STEPHEN ELMORE J, et al. Recent trends in the analysis of honey constituents[J]. Food Chemistry, 2022, 116(51): 25909−25916.

[3] 颜秋燕. 党参和党参蜂蜜中主要成分和活性物质的研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2020. [YAN Qiuyan. Study on main components and active substances in *Codonopsis pilosula* and *Codonopsis pilosula* honey[D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2020.]

[4] SIDDIQUI I R. Constitution of an arabinogalactomannan from honey[J]. Canadian Journal of Chemistry, 1965, 43(2): 421−425.

[5] TONKS A J, DUDLEY E, PORTER N G, et al. A 5.8-kDa component of manuka honey stimulates immune cells via TLR4[J]. Journal of Leukocyte Biology, 2007, 82(5): 1147−1155.

[6] MEGHERBI M, HERBRETEAU B, FAURE R, et al. Polysaccharides as a marker for detection of corn sugar syrup addition in honey[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(6): 2105−2111.

[7] SASAKI M, TAKAGI A, SASAKI D, et al. Characteristics and function of an extracellular polysaccharide from a green alga *Parachlorella*[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 254: 117252.

[8] HADIDI M, AMOLI P I, JELYANI A Z, et al. Polysaccharides from pineapple core as a canning by-product: Extraction optimization, chemical structure, antioxidant and functional properties[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 163: 2357−2364.

[9] JI X, HOU C, YAN Y, et al. Comparison of structural characterization and antioxidant activity of polysaccharides from jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) fruit[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 149: 1008−1018.

[10] BAO H, YOU S, CAO L, et al. Chemical and rheological properties of polysaccharides from fruit body of *Auricularia auricular*-judae[J]. Food Hydrocolloids, 2016, 57: 30−37.

[11] TRIGUI I, YAICH H, SILA A, et al. Physicochemical properties of water-soluble polysaccharides from black cumin seeds[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 117: 937−946.

[12] AM S. Removal of proteins-Sevag method[J]. Methods Carbohydr Chem, 1965: 5.

[13] DUBOIS M, GILLES K A, HAMILTON J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. Analytical chemistry, 1956, 28(3): 350−356.

[14] Yuan Y, Xu X, Jing C, et al. Microwave assisted hydrothermal extraction of polysaccharides from *Ulva prolifera*: Functional properties and bioactivities[J]. Carbohydrate polymers, 2018, 181: 902−910.

[15] 王森. 扁桃胶多糖组分鉴定与加工特性变化规律研究 [D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2010. [WANG Sen. Study on component identification and processing characteristics of almond gum polysaccharide [D]. Changsha: Central South University of Forestry Science and Technology, 2010]

[16] ROZI P, ABUDUWAILI A, MUTAILIFU P, et al. Sequential extraction, characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Fritillaria pallidiflora* Schrenk[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 131: 97−106.

[17] Hu L, Liu R, Wu T, et al. Structural properties of homogeneous polysaccharide fraction released from wheat germ by hydrothermal treatment[J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 240: 116238.

[18] NUERXIATI R, ABUDUWAILI A, MUTAILIFU P, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction, characterization and biological activities of polysaccharides from *Orchis chusua* D. Don (Salep)[J]. Journal of Biological Macromolecules, 2019, 141: 431−443.

[19] JIANG L, WANG W, WEN P, et al. Two water-soluble polysaccharides from mung bean skin: Physicochemical characterization, antioxidant and antibacterial activities[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 100: 105412.

[20] TAHMOUZI S, NEJAT M R S. New infertility therapy effects of polysaccharides from *Althaea officinalis* leaf with emphasis on characterization, antioxidant and anti-pathogenic activity[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 145: 777−787.

[21] GOTTLIEB H E, KOTLYAR V, NUDELMAN A. NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities [J]. Journal of Organic Chemistry, 1997, 62(21): 7512−7515.

[22] YANG H, BAI J, MA C, et al. Degradation models, structure, rheological properties and protective effects on erythrocyte hemolysis of the polysaccharides from *Ribes nigrum* L[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 165: 738−746.

[23] WANG L, ZHANG B, XIAO J, et al. Physicochemical, functional, and biological properties of water-soluble polysaccharides from *Rosa roxburghii* Tratt fruit[J]. Food Chemistry, 2018, 249: 127−135.

[24] SILA A, BAYAR N, GHAZALA I, et al. Water-soluble polysaccharides from agro-industrial by-products: functional and biological properties[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 69: 236−243.

[25] 李洁, 郭玉蓉, 窦姣, 等. 不同方法提取苹果肉渣果胶的流变学特性研究 [C]//现代果业标准化示范区创建暨果树优质高效生产技术交流会论文汇编, 2015. [LI Jie, GUO Yurong, DOU Jiao, et al. Study on rheological properties of pectin extracted from apple pulp residue by different methods [C]//Compilation of papers on the establishment of modern fruit industry standardization demonstration area and fruit tree high-quality and efficient production technology exchange, 2015]

[26] 郝正祺. 绣球菌多糖结构鉴定, 流变凝胶学特性及其抗氧化和免疫功能的研究 [D]. 晋中: 山西农业大学, 2018. [HAO Zhengqi. Structural identification, rheological and gel characteristics, antioxidant and immune functions of hydrangea polysaccharides [D]. Jinzhong: Shanxi Agricultural University, 2018.]

[27] 冯蕾. 决明子水溶性多糖的精细结构、构象特征及其流变行为研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2018. [FENG Lei. Study on fine structure, conformational characteristics and rheological behavior of water-soluble polysaccharides from cassia seed [D]. Nanchang: Nanchang University, 2018]

[28] WANG P, ZHAO S, YANG B, et al. Anti-diabetic polysaccharides from natural sources: A review[J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 148: 86−97.

杜邵龙, 周志梅, 雷亚兰, 等. 基于色差系统的宝庆桂丁红茶品质量化评价模型构建 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 329−335. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100164
DU Shaolong, ZHOU Zhimei, LEI Yalan, et al. Construction of Quantitative Evaluation Model of Baoqing Guiding Black Tea Based on Chromatic Aberration Analysis[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 329−335. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100164

· 分析检测 ·

基于色差系统的宝庆桂丁红茶品质量化评价模型构建

杜邵龙[1,2], 周志梅[1], 雷亚兰[2], 李　瑾[3], 田容积[3], 唐　瀚[3,*]
（1.湖南兴盛茶业科技有限公司, 湖南邵阳 422900;
2.湖南师范大学化学化工学院, 湖南长沙 410083;
3.邵阳市农业科学研究院, 湖南邵阳 422000）

摘　要: 目的：基于茶叶色差构建宝庆桂丁红茶品质量化评价模型。方法：以宝庆桂丁红茶为研究对象，在感官审评的基础上，分别测定干茶、茶汤和叶底的色差值，分析茶叶色差值与品质之间的相关性，并以 GA-BP 神经网络构建品质量化评价模型。结果：宝庆桂丁红茶品质与茶汤和叶底的 L、a、b 值呈极显著相关（P<0.01），与干茶 a 值呈显著相关（P<0.05）；遗传算法（GA）的引进明显提高了 BP 神经网络的拟合精度，GA-BP 模型的决定系数（R^2）明显高于 BP 网络；通过对比不同隐含层结构，优选结构为 9-5-1 的 GA-BP 神经网络结构；优选的 GA-BP 神经网络模型的训练、验证、测试和预测的决定系数（R^2）分别为 0.988、0.976、0.933 和 0.95。结论：基于色差系统和 GA-BP 神经网络对宝庆桂丁红茶品质进行量化评价的方法是可行的。

关键词: 色差系统, GA-BP 神经网络, 宝庆桂丁红茶, 品质评价模型
中图分类号: TS207.7　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0329−07
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100164
本文网刊:

Construction of Quantitative Evaluation Model of Baoqing Guiding Black Tea Based on Chromatic Aberration Analysis

DU Shaolong[1,2], ZHOU Zhimei[1], LEI Yalan[2], LI Jin[3], TIAN Rongji[3], TANG Han[3,*]
（1.Hunan Xinsheng Tea Sci-tech Co., Ltd., Shaoyang 422900, China;
2.College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan Normal University, Changsha 410083, China;
3.Shaoyang Academy of Agricultural Sciences, Shaoyang 422000, China）

Abstract: Objective: In order to construct a quantitative evaluation model of Baoqing Guiding black tea based on chromatic aberration. Methods: Baoqing Guiding black tea were used as materials. On the basis of sensory evaluation, the chromatic aberration value of dry tea, tea infusion and infused leaf were measured respectively. The correlation between chromatic aberration value and tea quality were analyzed, and the quality evaluation model were constructed by GA-BP neural networks. Results: The quality of Baoqing Guiding black tea was extremely significant correlated with the Lab value of tea infusion and leaves (P<0.01), and significantly correlated with the a value of dry tea (P<0.05). The introduction of genetic algorithm (GA) obviously improved the fitting accuracy of BP neural network, the coefficient of determination (R^2) of GA-BP model was obviously higher than BP model. By comparing different hidden layer structures, the GA-BP neural network with structure of 9-5-1 were selected. The determination coefficients (R^2) of training, verification, test and prediction of optimized GA-BP model were 0.988, 0.976, 0.933 and 0.95 respectively. Conclusion: The quantitative quality evaluation method of Baoqing Guiding black tea based on chromatic aberration and GA-BP neural network was feasible.

收稿日期: 2021−10−18
基金项目: 湖南省自然科学基金（2018JJ2253）; 湖南创新型省份建设专项（2020NK2047）; 邵阳市科技计划项目（2020GZ44）。
作者简介: 杜邵龙（1975−）, 男, 博士, 讲师, 研究方向: 天然植物化学及茶叶加工, E-mail: dsl@hunnu.edu.cn。
*** 通信作者:** 唐瀚（1969−）, 男, 本科, 高级农艺师, 研究方向: 茶树种植、种质创新、茶叶品质化学与加工研究, E-mail: th13307391919@163.com。

Key words: chromatic aberration system; GA-BP neural networks; Baoqing Guiding black tea; quality evaluation model

茶叶色泽是茶叶等级划分的主要指标之一，在茶叶感官审评法中外形、汤色和叶底三项审评因子都与颜色有关[1]。茶叶的色泽一直茶叶感官审评的难点之一，其审评结果不仅与审评专业人员主观喜好有关，还受到光线、审评器具等外部环境因素的干扰[2]。为尽可能消除人为因素对茶叶品质分析结果的干扰，广大茶学研究学者尝试采用茶汤色差值对茶叶品质进行定量化表征[3−6]。余书平等[7] 对小叶种红茶发酵过程中发酵叶色差及儿茶素、茶黄素等成分进行跟踪检测，发现发酵叶色差与茶样感官品质和相关生化成分均呈现显著性相关。杨娟等[8] 测定了福鼎大白等 10 个茶树品种原料制成的工夫红茶干茶、汤色和叶底色泽，并分析了各色泽 L、a、b 值与审评因子得分、色素含量和总得分的相关性，结果显示红茶试样的感官审评评分与茶汤、叶底的色差均有较高的相关性。王家勤等[9] 对 26 个产于福建地区的工夫红茶的 43 个茶汤样品进行色差分析，并结合多变量分析和线性回归拟合，建立茶汤亮度预测方程。陈星等[10] 测定了滇红、祁红等 8 种工夫红茶的茶汤色差、色素含量，并与感官审评评分进行相关性分析，结果显示采用亨特-Lab 表色系表色法能够较为准确、快速地反映茶汤色品质特点。以上研究都明确证实了茶叶色差与感官品质之间存在显著相关性，但目前的研究主要针对特定品种红茶的色差值与品质的相关性，且主要分析茶汤色泽，如需推广至其他品种红茶，需要根据具体品种色差值进行校正[11]。茶叶品质的影响因素众多，例如茶叶品种、种植环境和加工工艺等，各个因素与茶叶品质多是非线性对应关系，但目前的研究主要采用线性回归拟合的方法，难以满足茶叶品质分析的要求。

人工神经网络是人工智能的重要分支，采用并行分布式系统，具有自适应、自组织和实时学习的特点，在理论上可实现任意函数的逼近[12]。神经网络能够根据视觉图像处理[13]、电子舌[14]、电子鼻[15]、近红外光谱[16] 等分析结果，实现对茶叶品质的准确评价。BP(Back Propagation)神经网络是人工神经网络中最为经典的模型之一，但由于 BP 神经网络采用梯度下降法，容易出现收敛速度慢，陷入局部极值等缺点[17]。遗传算法(Genetic Algorithms, GA)是模拟自然界遗传和生物进化论的一种随机搜索优化算法，具有良好的全局寻优能力[18]。利用遗传算法生成 BP 神经网络的权值和阈值，能够提高 BP 神经网络的泛化和学习能力，从而改进神经网络的整体搜索效率[19]。

宝庆桂丁茶是湖南省新邵县特有的茶树品种，历史上曾是明清两朝贡茶。宝庆桂丁红茶是湖南兴盛茶业科技有限公司在湖南农业大学和邵阳市农科院茶科所指导下，借鉴湖南红茶工夫红茶加工技术规程，自主研发的新品类[20]。宝庆桂丁红茶花蜜香浓郁，滋味鲜爽，回味甘甜，品质优异。目前，关于宝庆桂丁红茶的品质研究还处于起步阶段，相关研究还鲜有报道。本文在感官审评的基础上，测定了不同等级宝庆桂丁红茶干茶、茶汤和叶底的色泽，利用 GA-BP 神经网络建立宝庆桂丁红茶品质量化评价模型，以期为宝庆桂丁红茶品质评判和工艺优化提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

供试的 110 份宝庆桂丁红茶　全部由湖南兴盛茶业科技有限公司提供，2021 年 3 月至 6 月采自湖南省新邵县巨口铺镇，参照湖南红茶工夫红茶制作规程生产制作，按照采制时间顺序编号为 1~110 号；试验用水　为农夫山泉天然饮用水。

NH300 电脑色差仪、色差仪多功能测试组件　深圳市三恩时科技有限公司；FA1004 电子分析天平　上海力辰邦西仪器科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 感官审评方法　参照《GB/T 23776-2018 茶叶感官审评方法》[21]，称取 3 g 茶样，用沸水 150 mL 冲泡 5 min 后，将茶汤倒入审评碗。由 7 名专业审评人员分别对茶样的外形、汤色、香气、滋味和叶底进行感官审评，具体标准见表 1。综合得分采用权数法：外形 20%，汤色 10%，香气 30%，滋味 30%，叶底 10%。去除最高分和最低分后，余下的 5 个审评结果取平均得到最终审评结果。

1.2.2 茶汤和叶底色差的测定方法　参照陆建良等[22] 提出的方法。感官审评余下的茶汤经滤纸过滤后，冷却至 40 ℃，倒入万能测试组件配备的石英比

表 1　宝庆桂丁绿茶感官评定标准和评分系数

Table 1　Sensory evaluation standards and score coefficients of Baoqing guiding green tea

因子	优(90~100分)	良(80~89分)	合格(70~79分)	评价系数
外形(a)	乌黑油润，肥壮紧实，显金毫、匀整	乌黑尚油润、肥壮紧实、匀整	乌黑、尚肥壮、尚匀整、有茎梗	20%
汤色(b)	橙红、明亮、纯净透明	红、尚亮、纯净透明	红、较亮、稍有浑浊	10%
香气(c)	花香或果香，香气馥郁持久	纯正、香气浓郁但持久性稍差	香气平和、持久性较差	30%
滋味(d)	浓厚鲜爽、无异味、有回甘	浓厚较鲜、稍带苦涩味	滋味平和、带苦涩味	30%
叶底(e)	红、匀整、明亮	红、尚匀整、尚明亮	红、较匀整、较明亮	10%

色皿，以蒸馏水为对照，用 NH300 电脑色差仪测定色度，重复 5 次，取平均值。将冲泡后的红茶叶底置于万能测试组件的粉末测试盒，用 NH300 电脑色差仪测试色度。色差值采用 CIE-1976 色差系，测定三个分量 L、a、b。

1.2.3　干茶色泽的测定方法　参照严俊等[23]提出的方法。取茶样 10 g，用粉碎机粉碎后，过 100 目筛。取 5 g 茶样，置于万能测试组件的粉末测试盒中测定色差值。用 NH300 电脑色差仪测试色度，测量 5 次，记录 L、a、b 值，取平均值。

1.3　数据处理

采用 EXCEL 和 SPSS 26.0 软件对试验数据进行分析处理。采用 MATLAB2020b 软件进行 GA-BP 神经网络构建，随机取 110 份茶样中的 88 份测试结果用于评价模型的建立，余下 22 份用于模型的验证。

2　结果与分析

2.1　宝庆桂丁红茶的色差测试的描述性分析

对 110 个宝庆桂丁红茶茶样分别测试了干茶、汤色和叶底的色差值，并进行了描述性分析，结果见表 2。

表 2　宝庆桂丁红茶色差结果描述性分析

Table 2　Descriptive statistics of color difference analysis of Baoqing guiding black tea

指标	变化范围	均值	方差	变异系数
茶汤L值(CTL)	64.25~76.26	68.95	7.05	3.85
茶汤a值(CTA)	16.16~25.73	22.33	4.98	9.99
茶汤b值(CTB)	60.88~77.34	71.58	11.47	4.73
干茶L值(GCL)	16.29~19.55	17.77	0.64	4.49
干茶a值(GCA)	2.15~3.14	2.66	0.05	8.39
干茶b值(GCB)	4.08~4.92	4.52	0.04	4.37
叶底L值(YDL)	24.28~26.33	25.02	0.22	1.89
叶底a值(YDA)	8.24~11.06	9.79	0.42	6.60
叶底b值(YDB)	9.04~16.35	12.84	4.43	16.39

表 2 色差分析结果显示，宝庆桂丁红茶汤 L 值在 64.25~76.26 之间，平均值为 68.95，a 值在 16.16~25.73，平均值为 22.33，b 值在 60.88~77.34，平均值为 71.58。根据 CIE-LAB 表色体系，L 值越大，说明茶汤的亮度越高，a 值越大则颜色偏红，b 值越大则颜色偏黄[24]，因此，宝庆桂丁红茶茶汤呈现出橙黄明亮的特征。

宝庆桂丁红茶干茶的 L 值在 16.29~19.55 之间，平均值为 17.77，a 值在 2.15~3.14 之间，平均值为 2.66，b 值在 4.08~4.92 之间，平均值为 4.52。因此，宝庆桂丁红茶的干茶颜色特征为黑色，符合乌黑油润的颜色描述。

宝庆桂丁红茶叶底的 L 值为 24.28~26.33，平均值为 25.02，a 值为 8.24~11.06，平均值为 9.79，b 值为 9.04~16.35，平均值为 12.84。因此，宝庆桂丁红茶的叶底颜色特征为红褐色。

2.2　宝庆红茶色差与品质的相关性

2.2.1　宝庆红茶汤色与品质的相关性分析　对宝庆桂丁红茶茶汤色差与品质的相关性进行了分析，结果见表 3。

表 3　宝庆桂丁红茶茶汤色差与品质相关性分析

Table 3　Analysis on correlation between infusion color and quality of Baoqing guiding black tea

	汤色	综合	CTL	CTA	CTB
汤色	1				
综合	0.869**	1			
茶汤L值(CTL)	−0.924**	−0.882**	1		
茶汤a值(CTA)	0.922**	0.847**	−0.886**	1	
茶汤b值(CTB)	0.905**	0.791**	−0.865**	0.852**	1

注：*表示在置信度为0.05时相关性达到极显著水平，**表示在置信度为0.01时相关性达到极显著水平；表4~表5同。

从表 3 的结果可以看出，宝庆桂丁红茶汤色指标、综合品质这两个指标均与茶汤的 L 值呈极显著的负相关(P<0.01)，而与 a 值和 b 值呈极显著正相关(P<0.01)。且茶汤的 L、a、b 值之间呈极显著相关性(P<0.01)，其中 L 值与 a、b 值之间为负相关，a 和 b 值之间呈正相关。

2.2.2　干茶色泽与品质的相关性分析　对宝庆桂丁红茶的干茶色泽与品质之间的相关性进行了分析，结果见表 4。

表 4　宝庆桂丁红茶干茶色差结果相关性分析

Table 4　Analysis on correlation between tea color and quality of Baoqing guiding black tea

	外形	综合	GCL	GCA	GCB
外形	1				
综合	0.934**	1			
干茶L值(GCL)	−0.403	−0.487	1		
干茶a值(GCA)	0.590*	0.694*	−0.814	1	
干茶b值(GCB)	0.346	0.322	−0.845	0.786**	1

从表 4 的结果来看，宝庆桂丁红茶茶叶外形指标与综合品质这两个指标与干茶的 L 和 b 值相关性较低，而干茶的 a 值与外形和综合品质都呈显著正相关(P<0.05)，这可能与茶叶外形审评时，不仅仅看色泽，还需要考虑茶叶的紧细度和净度等其他指标有关[25]。干茶的 L、a、b 值之间存在一定的相关性，其中 L 值与 a、b 值之间为负相关，a 和 b 值之间呈正相关。

2.2.3　叶底色泽与品质的相关性分析　对宝庆桂丁红茶叶底色泽与品质的相关性进行了分析，结果见表 5。

从表 5 的结果可以看出，宝庆桂丁红茶叶底指标和综合品质这两个指标与叶底的 L 值均呈极显著负相关(P<0.01)，而与 a 值和 b 值呈极显著正相关(P<0.01)。且叶底的 L、a、b 值之间呈极显著相关性

表 5 宝庆桂丁红茶叶底色差结果相关性分析

Table 5 Analysis on correlation between leaves' color and quality of Baoqing guiding black tea

	叶底	综合	YDL	YDA	YDB
叶底	1				
综合	0.964**	1			
叶底*L*值(YDL)	−0.827**	−0.859**	1		
叶底*a*值(YDA)	0.880**	0.897**	−0.843**	1	
叶底*b*值(YDB)	0.923**	0.952**	−0.833**	0.874**	1

(P<0.01),其中 L 值与 a、b 值之间为负相关,a 和 b 值之间呈正相关。

从以上相关性分析得出,茶叶的茶汤、叶底和综合品质指标与茶汤和叶底三者的 L、a、b 值之间呈极显著相关性(P<0.01)。这是因为在对茶汤和叶底进行感官审评时颜色是最重要的审评标准,茶汤要求是橙红或橙黄明亮,而叶底则要求红匀明亮。因此,采用茶叶色差值作为茶叶品质的评价方法是可行的。

2.3 基于神经网络的宝庆桂丁红茶品质量化评价模型的构建

2.3.1 神经网络的选择 为了选择合适的神经网络,对 BP 神经网络和 GA-BP 神经网络的拟合情况进行了比较,结果见图 1 和图 2。两个神经网络的结构均为 9-5-1 结构,即隐含层的节点数为 5。其余神经网络结构参数为:神经网络算法为 Levenberg-Marquardt 算法,最大循环次数为 1000 次,学习速率为 0.1,方差目标为 0.0001。遗传算法初始化参数为:种群规模为 10,进化迭代数为 200,染色体编码长度为 55,学习因子为 C_1=C_2=1.5,交叉概率为 0.4,变异概率为 0.1。本文将 110 组数据的 80%(即 88 组)划分为训练集、验证集和测试集,分别为 62 组、13 组和 13 组数据,用于模型的构建,余下的 22 组数据作为预测集进行模型的验证。

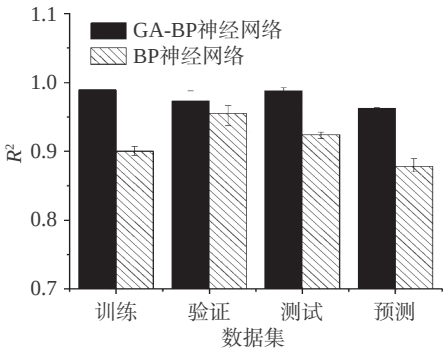


图 1 BP 神经网络和 GA-BP 神经网络的拟合效果对比

Fig.1 Comparisonof fitting ability of BP network and GA-BP network

从图 1 中可以看出,BP 网络和 GA-BP 网络都具有较好的拟合精度,决定系数 R^2 都大于 0.9。在相同的数据和神经网络结构情况下,GA-BP 网络的训练、验证、测试和预测的决定系数(R^2)都明显高于 BP 网络,说明 GA-BP 网络的训练和拟合效果要

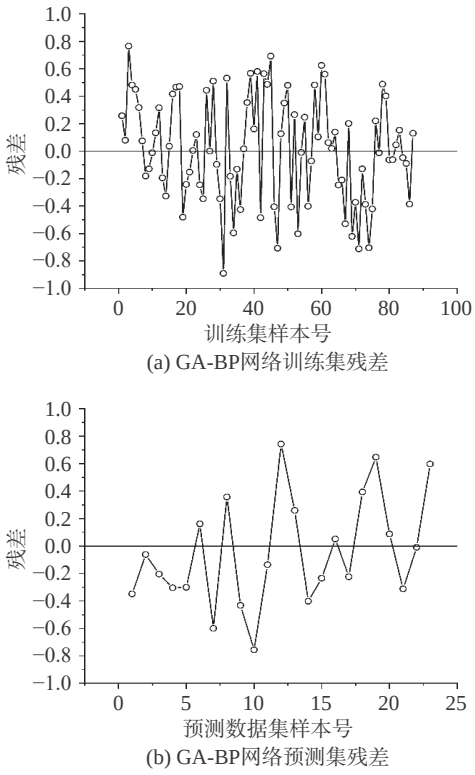


图 2 GA-BP 网络残差分析图

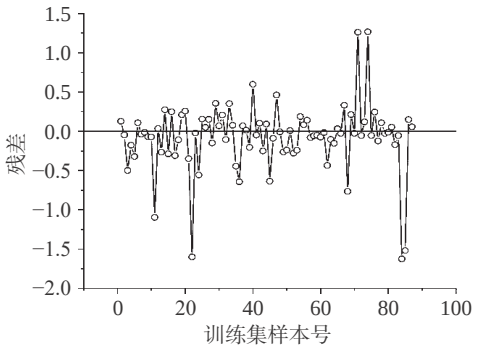
Fig.2 Residual analysis of GA-BP network

优于 BP 网络。GA-BP 网络采用遗传算法(GA)对 BP 神经网络连接权值和阈值进行优化,利用遗传算法全局搜索最优解的算法,将 BP 神经网络最优解的搜索范围缩小到一个较小的解空间,使得网络训练过程中收敛速度加快,同时解决 BP 神经网络容易下入局部最优的问题[26]。

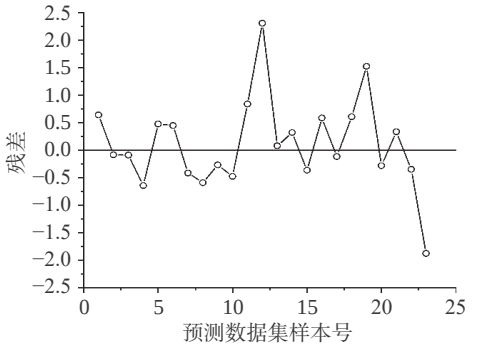
从图 2 和图 3 可以看出,2 种模型的测试集和预测集样本拟合结果的标准残差大部分都落在 [−2,2] 的 95% 置信区间内,标准残差点的分布没有明显规律,均匀地分布在 0 的两侧,表明拟合结果误差服从正态分布,具有很好的随机性,模型的选择是合适的。

对比图 2 和图 3 可以发现,GA-BP 网络的训练集和预测集的残差也明显优于 BP 网络。GA-BP 网络的训练和预测的残差全部均匀地落在 [−1,1] 区间内,而 BP 网络的训练的残差也大多落在 [−1,1] 区间内,大约有不到 10% 的残差落在 [−1,1] 区间之外,但预测的残差波动相对大一些,22 个预测残差绝对值中有 3 个超过 1,其中两个甚至超过 2。这表明 GA-BP 模型的拟合精度比 BP 模型高,GA-BP 模型更适合于对宝庆桂丁红茶品质量化模型的构建。

2.3.2 GA-BP 神经网络模型的构建 为了进一步优化 GA-BP 模型的结构,在 [3,8] 范围内对不同隐含层节点数 GA-BP 神经网络分别进行 5 次训练、验证、测试和预测,取 5 次的决定系数(R^2)进行分析,结果见图 4。从图 4 的结果可以看出,GA-BP 模型的训练效果都非常好,隐含层的增加对训练结果影响不大,所有拟合的决定系数都在 0.99 左右。但隐含



（a）BP网络训练集残差



（b）BP网络预测集残差

图 3　BP 网络残差分析图

Fig.3　Residual analysis of BP network

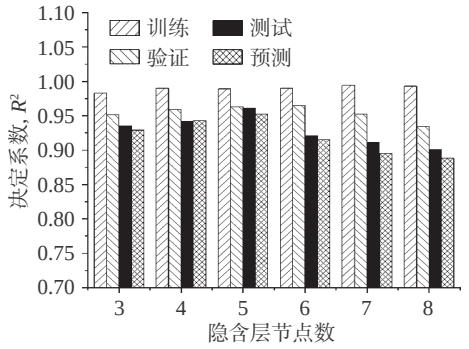


图 4　不同隐含层节点数拟合比较

Fig.4　Comparison of fitting ability of different hidden layer nodes

层节点数对验证、测试和预测的决定系数影响较大，且都呈现先增大而后减少的趋势，在隐含层节点数为 5 时达到最大值，验证、测试和预测的平均决定系数分别为 0.973、0.988 和 0.962，因此选择隐含层节点数为 5 进行模型的构建。

对 GA-BP 模型构建过程的均方误差(RMSE)进行观察，结果见图 5。从图 5 的结果可以看出，在 GA-BP 神经网络训练的初期，训练、验证和测试的均方误差在第 2 次训练 RMSE 即下降至 0.1 以下，而后验证和预测集的 RMSE 基本保持不变，训练集的 RMSE 仍持续下降至 0.01，在训练至第 8 次时，验证的 RMSE 开始上升至 0.1 左右。从网络的均方误差变化情况来看，在模型训练的后期可能存在一定的过拟合情况，导致验证的误差开始变大。通过对隐含层节点数的观察，最终的 GA-BP 神经网络采用 9-5-1 的 3 层网络结构。

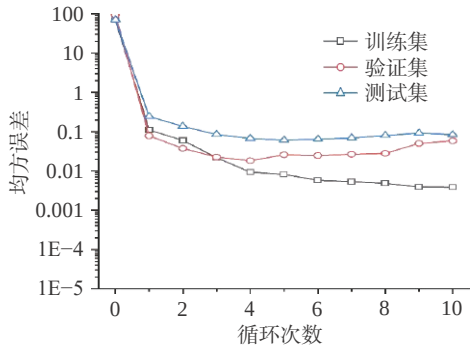
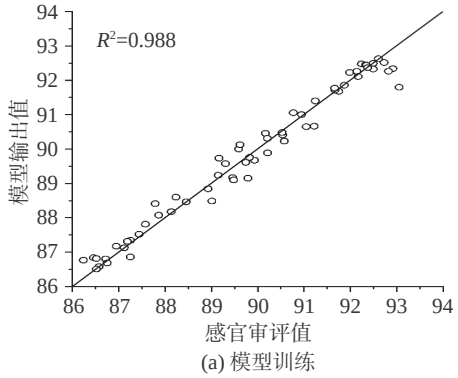


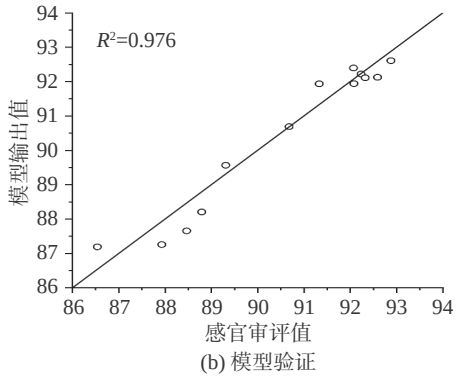
图 5　GA-BP 神经网络训练曲线图

Fig.5　Training curve of GA-BP network

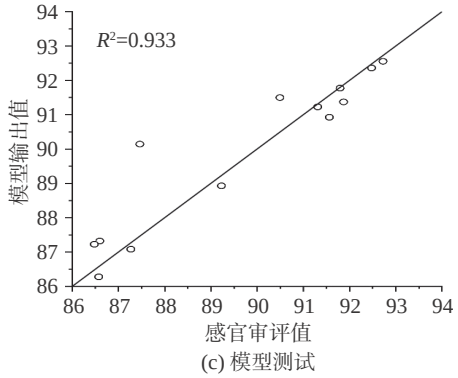
图 6 是 88 组数据在模型训练时的拟合效果，可以看出，GA-BP 模型的训练集、验证集和测试集的决定系数 R^2 都大于 0.9，说明该模型能够较好地完成输入数据与输出数据之间的非线性映射。训练集的决定系数最大，验证集的决定系数次之，测试集的



(a) 模型训练



(b) 模型验证



(c) 模型测试

图 6　GA-BP 神经网络拟合优度图

Fig.6　Goodness of fit of GA-BP network

决定系数最小，这样反映出 GA-BP 神经网络在训练过程中存在一定的过拟合。结合图 1 的对比结果也可以发现遗传算法的引进，对于 BP 神经网络存在的过拟合情况也有一定程度的改善，模型测试的决定系数也达到 0.933。未来，我们将通过增加数据组数和算法优化等方面的努力，进一步提高模型的预测能力，解决过拟合现象。

2.3.3 模型的预测结果分析 为了验证所构建的 GA-BP 模型的预测精度，将 22 组数据对模型进行验证，结果见图 7。

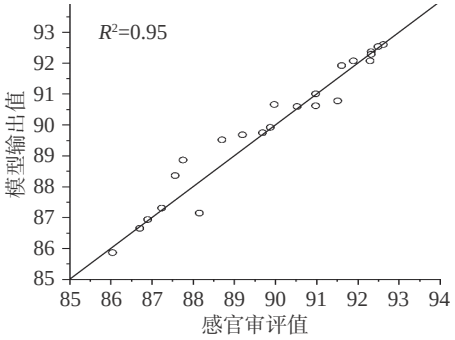


图 7 GA-BP 模型预测值与感官审评值的比较图

Fig.7 Comparison of model predict value and sensor evaluation

从图 7 中可以看出，虽然预测的决定系数仍然小于模型训练和验证的决定系数，但达到 0.95，说明 GA-BP 模型的预测性能是比较好的，可以准确地反映宝庆桂丁红茶品质情况，所构建地宝庆桂丁红茶品质量化评价神经网络模型是可靠的。

3 结论

茶叶色泽的审评普遍是通过人眼观察，并结合经验进行感官审评，不仅受到感官审评环境(亮度等)的影响，也容易受个人喜好所左右[27−28]。为了提高红茶品质评价的客观性，本文在感官审评的基础上，用色差仪对宝庆桂丁红茶的干茶、茶汤和叶底的色差值进行测定，并利用 GA-BP 神经网络构建量化评价模型。研究结果表明：

宝庆桂丁红茶的感官审评因子和综合品质与茶汤和叶底的 L、a、b 值之间呈现极显著相关性(P<0.01)，与干茶的 L、a、b 值之间相关性不显著。这说明感官审评在进行汤色和叶底审评时重点关注颜色，而对外形审评时不仅关注颜色，还有外形精细、显毫等其他维度。这也表明，利用茶叶色差值对茶汤和茶叶的颜色进行检测能够反映茶叶品质的优劣，因此基于色差值构建量化评价模型是可行的。

通过对比 GA-BP 神经网络和 BP 神经网络，可以发现通过遗传算法 GA 的引进能够较好地解决 BP 神经网络局部优化和收敛速度低等问题，更好地反映色差值与茶叶品质之间的非线性映射关系[29]。

通过对比不同隐含层的拟合效果，优选出 9-5-1 的网络结构，验证、测试和预测的平均决定系数分别为 0.973、0.988 和 0.962。对构建的 GA-BP 神经网络模型的预测能力进行验证，发现该模型预测值与感官审评值的决定系数达到 0.95，说明该模型具有可接受的预测网络输出的能力，且误差较小。

本文采用 GA-BP 神经网络对茶叶色差值与感官审评综合品质评价得分进行非线性关联，对茶叶品质的色差分析以及非线性数学模型的构建进行了探索，为茶叶品质评价提供了新的思路和方法。课题组也发现因为所构建遗传算法和神经网络模型属于“黑箱”模型，无法揭示色差值与茶叶品质的内在关联关系，因此，构建的模型在理论上只能针对特定茶叶品种[30]。另外，神经网络容易出现过拟合的现象，也是在进一步优化模型算法时需要关注的方向。

参考文献

[1] 王璟, 高静, 刘思彤, 等. 基于色差系统的黄茶外观色泽评价模型构建及其关键物质基础分析[J]. 食品科学, 2017, 38(17): 145−150. [WANG Jin, GAO Jing, LIU Sitong, et al. Establishment of an evaluation model for color of yellow tea based on color difference and analysis of key pigments[J]. Food Chemistry, 2017, 38(17): 145−150.]

[2] OUYANG Qin, LIU Yan, CHEN Quansheng, et al. Intelligent evaluation of color sensory quality of black tea by visible-near infrared spectroscopy technology: A comparison of spectra and color data information[J]. Spectrochimica Acta Part A:Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2017, 180: 91−96.

[3] LIANG Yuerong, LU Jiangliang, ZHANG Lingyun, et al. Estimation of black tea quality by analysis of chemical composition and colour difference of tea infusions[J]. Food Chemistry, 2003, 80: 283−290.

[4] LI Luqing, XIE Shimeng, ZHU Fengyuan, et al. Colorimetric sensor array-based artificial olfactory system for sensing Chinese green tea's quality: A method of fabrication[J], International Journal of Food Properties, 2017, 20(20): 1762−1773.

[5] 关洁婷, 谢郁超, 周巧仪, 等. 英红九号红茶茶汤色泽与感官评价之间的相关性研究[J]. 广东茶叶, 2020(3): 22−25. [GUAN Jieting, XIE Yuchao, ZHOU Qiaoyi, et al. Study on correlation between tea infusion color and sensory evaluation of Yinghong No. 9 black tea[J]. Guangdong Tea, 2020(3): 22−25.]

[6] 苏静, 李长文, 梁慧珍, 等. 色差技术在普洱茶品质控制中的应用研究[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(20): 148−151. [SU Jing, LI Changwen, LIANG Huizhen, et al. Application and research of chromaticity technology in quality control of Pu 'erh tea[J]. Food Research and Development, 2017, 38(20): 148−151.]

[7] 余书平, 尹军峰, 袁海波, 等. 小叶种红茶发酵外观色差及其主要品质成分相关性[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(6): 2201−2208. [YU Shuping, YIN Junfeng, YUAN Haibo, et al. Appearance chromatic aberration of fermented leaves of small leaf black tea and correlation analysis of the main quality components [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2015, 6(6): 2201−2208.]

[8] 杨娟, 袁林颖, 钟应富, 等. 工夫红茶色泽与品质相关性研究[J]. 西南农业学报, 2014, 27(6): 2605−2610. [YANG Juan, YUAN Linying, ZHONG Yingfu, et al. Study on correlation between color and quality of congou made of different varieties of tea[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2014,

27(6)：2605−2610.］
［9］ 王家勤, 姚月凤, 袁海波, 等. 基于色差系统的工夫红茶茶汤亮度的量化评价方法研究[J]. 茶叶科学, 2020, 40(2)：259−268.［WANG Jiaqin, YAO Yuefeng, YUAN Haibo, et al. A quantitative method for brightness evaluation of congou black tea infusion based on color difference analysis[J]. Journal of Tea Science, 2020, 40(2)：259−268.］
［10］ 陈星, 赵雯俊. 8 种工夫红茶的色素含量、茶汤色差值与感官品质间的相关性探讨[J]. 江西农业学报, 2014, 26(5)：47−50.［CHEN Xing, ZHAO Wenjun. Studies on correlation between pigment contents, tea soup chromatism parameters and sensory quality of eight congou black tea[J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2014, 26(5)：47−50.］
［11］ 马婉君, 马士成, 施 江, 等. 六堡茶茶汤色泽量化分析 3 种方法的比较[J]. 食品科学, 2021, 42(16)：155−161.［MA Wanjun, MA Shicheng, SHI Jiang, et al. Comparative study on three quantitative analysis methods for the color Liupao tea infusion[J]. Food Chemistry, 2021, 42(16)：155−161.］
［12］ 韩力群. 人工神经网络教程 [M]. 北京：北京邮电大学出版社, 2006: 16.［HAN Liqun. Artifical neural networks tutorial[M]. Beijing: Beijing University of Posts and Telecommunications Press, 2006: 16.］
［13］ 黄凤. 基于计算机视觉技术的武夷岩茶识别研究[J]. 哈尔滨师范大学自然科学学报, 2014, 30(6)：60−64.［HUANG Feng. The study of Wuyi rock tea recognition based on computer vision technology[J]. Natural Sciences Journal of Harbin Normal University, 2014, 30(6)：60−64.］
［14］ XU Min, WANG Jun, ZHU Luyi. The qualitative and quantitative assessment of tea quality based on E-nose, E-tongue and E-eye combined with chemometrics[J]. Food Chemistry, 2019, 289：482−489.
［15］ 薛大为, 孔慧芳, 杨春兰. 主成分分析与神经网络结合的黄山毛峰茶品质检测[J]. 计算机与应用化学, 2014, 31(5)：578−582.［XUE Dawei, KONG Huifang, YANG Chunlan. Huangshanmaofeng tea quality detection based on principal component analysis and neural network[J]. Computers and Applied Chemistry, 2014, 31(5)：578−582.］
［16］ SONG Yan, WANG Xiaozhong, XIE Hanlei, et al. Quality evaluation of Keemun black tea by fusing data obtained from near-infrared reflectance spectroscopy and computer vision sensors[J]. Spectrochimica Acta Part A:Molecular and biomolecular Spectroscopy, 2021, 252：119522.
［17］ YU Peigen, LOW Meiyin, ZHOU Weibiao. Development of a partial least suqares-artifical neural network (PLS-ANN) hybrid model for the prediction of consumer liking scores of ready-to-drink green rea beverages[J]. Food Research International, 2018, 103：68−75.
［18］ SHI Bolin, ZHAO Lei, ZHI Ruicong, et al. Optimization of electronic nose sensor array by genetic algorithms in Xihu-Longjing tea quality analysis[J]. Mathematical and Computer Modelling, 2013(58)：752−758.
［19］ YU Huichun, WANG Jun, YAO Cong, et al. Quality grade identidication of green tea using E-nose by CA and ANN[J]. LWT-Food Science and Technology, 2008, 41(7)：1268−1273.
［20］ 雷亚兰, 周志梅, 李瑾, 等. 基于主成分分析和聚类分析方法评价宝庆桂丁绿茶品质特性[J]. 食品工业科技,2022,43(06):269-277..［LEI Yalan, ZHOU Zhimei, LI Jin, et al. Quality analysis of Baoqing Guiding Green Tea based on principal component and cluster analysis[J]. Science and Technology of Food Industry,2022,43(06):269-277.］
［21］ 国家标准化管理委员会. 茶叶感官审评方法: GB/T 23776-2018[S]. 北京：中国标准出版社, 2018: 1−28.［Standardization Administration of the People's Republic of China. Methodology for sensory evaluation of tea: GB/T 23776-2018 [S]. Beijing: China Standard Press, 2018: 1−28.］
［22］ 陆建良, 梁月荣, 龚淑英, 等. 茶汤色差与茶叶感官品质相关性研究[J]. 茶叶科学, 2002, 22(1)：57−61.［LU Jianliang, LIANG Yuerong, GONG Shuying, et al. Studies on relationship between liquor chromaticity and organoleptic quality of tea[J]. Journal of Tea Science, 2002, 22(1)：57−61.］
［23］ 严俊, 林刚, 叶付刚, 等. 测色技术在工夫红茶品质评价中的应用研究[J]. 中国农学通报, 1997, 13(6)：24−26.［YAN Jun, LIN Gang, YE Fugang, et al. The study on the application of the measuring color technique to Congo (Qimen black tea) quality evaluation[J]. Chinese Agricultural Science Bulltin, 1997, 13(6)：24−26.］
［24］ 钟应富, 李中林, 周正科, 等. 利用色差计分析针形绿名茶色泽在加工过程中的变化[J]. 南方农业, 2008, 7(2)：12−13.［ZHONG Yingfu, LI Zhonglin, ZHOU Zhengke, et al. Analysis of the change of needle green tea color during the manufacture processing using color difference meter[J]. South China Agriculture, 2008, 7(2)：12−13.］
［25］ 严俊, 林刚. 测色技术在工夫红茶品质评价中的应用研究(二) 茶叶色泽的测定[J]. 茶业通报, 1995, 17(2)：1−3.［YAN Jun, LIN Gang. The study on the application of the measuring color technique to Congo (Qimen black tea) quality evaluation (2) determination of tea color[J]. Journal of Tea Business, 1995, 17(2)：1−3.］
［26］ 陈鹏. 基于 GA-BP 神经网络的运营高速公路隧道健康评价 [D]. 石家庄：石家庄铁道大学, 2019.［CHEN Peng. Health assessment of operating expressway tunnel based on GA-BP neural network[D]. Shijiazhuang: Shijiazhuang Tiedao University, 2019.］
［27］ 欧伊伶, 张娅楠, 覃 丽, 等. 茶叶色香味品质评价方法研究进展 [J], 食品工业科技, 2019, 40(6): 342−360.［OU Yiling, ZHANG Yaan, QIN Li, et al. Research advances on quality evaluation methods of tea color, aroma and taste[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(6): 342−360.］
［28］ 周敬. 基于多特征融合的茶叶外观品质分级检测技术研究[D]. 成都：成都大学, 2021.［ZHOU Jing. Research on tea appearance quality classification detection technology based on multi-feature fusion[D]. Chengdu: Chengdu University, 2021.］
［29］ GUO Z M, BARIMAH A O, SHUJAT A, et al. Simultaneous quantification of active constituents and antioxidant capability of green tea using NIR spectroscopy coupled with swarm intelligence algorithm[J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 129：109510.
［30］ BHATTACHARYYA N, SETH S, TUDU B, et al. Detection of optimum fermentation time for black tea manufacturing using electronic nose[J]. Sensors and Actuators B, 2007, 122：627−634.

杨明华, 解道豪, 张昕, 等. 蓝莓蜜主要品质特性及挥发性成分分析 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 336−344. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100197

YANG Minghua, XIE Daohao, ZHANG Xin, et al. Analysis of Major Quality Characteristics and Volatile Components of Blueberry Honey[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 336−344. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100197

· 分析检测 ·

蓝莓蜜主要品质特性及挥发性成分分析

杨明华, 解道豪+, 张　昕, 匡海鸥, 李　雪, 谭　霞, 董　坤, 李亚辉*

（云南农业大学动物科学技术学院, 云南昆明 650201）

摘　要: 目的：近年来，蓝莓蜜作为市场上炙手可热的一个新近开发蜜种，由于产量有限，市面上的蓝莓蜜质量参差不齐，为了让人们更好地了解蓝莓蜜，对蓝莓蜜的基本品质特性、抗氧化性及挥发性成分进行了研究。方法：采用气相色谱-质谱联用（GC-MS）法分析蓝莓蜜的挥发性成分；参照食品安全国家标准中的方法测定蓝莓蜜的理化性质、微生物和污染物；采用分光光度法测定 4 种蓝莓蜜中总酚、总黄酮、脯氨酸含量、DPPH 自由基清除能力和总抗氧化能力来分析蓝莓蜜的品质特性。结果：理化性质检测结果表明采自长白山蜂场的蓝莓蜜 LM17 为一级品（优质蜂蜜），不含呋喃果糖酶（BFF）、大米糖浆标志物（SMR）、甜菜糖浆标志物（SMB）、甜菜糖浆（BS）、糖浆标志物（SMX）、大环内酯类物质和甘露糖，属于无掺假、无添加的纯天然蜂蜜；菌落总数、大肠菌群、霉菌计数、嗜渗酵母计数均低于蜂蜜国家标准指标。镉、铅、蝇毒磷、氟胺氰菊酯和双甲脒五种有毒有害物质含量远低于蜂蜜国家标准指标或未被检出。4 个蓝莓蜜样品总抗氧化性由强到弱分别为：LM17>LM-MJ18ZH>LM-MJ18ZZ>LM18TH，其中各样品的抗氧化物质总酚、总黄酮、脯氨酸的含量均有显著差异。蓝莓蜜样品中共检测出 60 种挥发性成分，其中 3-甲基-戊酸、庚酸、顺式-芳樟醇、苯甲醛 4 种物质属于致香成分，其致香成分数量与其他香味明显的蜂蜜（如野坝子蜜和椴树蜜）所含的致香物质数量相当，由此也可推断蓝莓蜜的清香滋味应该主要来自这些成分；其中蓝莓与蓝莓蜜共有的挥发性成分为乙醇、苯甲醛、辛烷三种；而 1-甲基-4-（1-甲基乙烯基）-苯、1,2,4-三甲基-5-（1-甲基乙基）-苯、（S）-（+）-3-甲基-1-戊醇、顺式-5-乙烯基四氢-α，5-三甲基-2-呋喃甲醇、5,5-二甲基-3-氧代-1-环己烯-1-甲醛、3-（2,2,6-三甲基-7-氧杂双环 [4.1.0] 庚-1-基）-2-丙烯醛、（E）-1-（2,6,6-三甲基-1,3-环己二烯-1-基）-2-丁烯-1-酮、1- {2-[3-甲基-3-（5-甲基-呋喃-2-基）-丁基]-环氧乙烷-2-基}-乙酮、4,5-二氢-5,5-二甲基-4-异亚丙基-1H-吡唑、8-丙氧-塞德兰这 10 种物质则为蓝莓蜜特有的挥发性成分。结论：通过对蓝莓蜜的基本理化性质、抗氧化性物质含量、抗氧化能力及挥发性成分等的分析，蓝莓蜜的所有挥发性成分中属于致香成分的有 4 种，综合基本理化性质、微生物、农药残留、污染物、抗氧化性、挥发性成分及致香成分的研究，鉴定了采自长白山蜂场的蓝莓蜜（LM17）属于优质蜂蜜。

关键词: 蓝莓蜜, 蓝莓, 挥发性成分, 理化性质, 抗氧化性, 致香成分, 气相色谱-质谱联用

中图分类号: S896.1　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0336−09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100197

本文网刊:

Analysis of Major Quality Characteristics and Volatile Components of Blueberry Honey

YANG Minghua, XIE Daohao+, ZHANG Xin, KUANG Haiou, LI Xue, TAN Xia, DONG Kun, LI Yahui*

（Faculty of Animal Science and Technology , Yunnan Agricultural University , Kunming 650201, China）

Abstract: Objective: As the most popular honey newly developed in the market, blueberry honey has attracted extensive attention in recent years. However, the quality difference of blueberry honey was large on the market because of the limitation of yield, in order to make people better understand blueberry honey, we studied the basic quality characteristics, antioxidant and volatile components of blueberry honey. Methods: The volatile components of blueberry honey were

收稿日期: 2021−10−20　　+并列第一作者

基金项目: 云南省农业基础研究联合专项重点项目（2018FG001-012）; 国家蜂产业技术体系项目（CARS-44-KXJ13）。

作者简介: 杨明华（1967−）, 女, 硕士, 高级实验师, 研究方向: 动物营养与畜产品加工, E-mail: 1161205847@qq.com。

解道豪（1995−）, 男, 硕士, 研究方向: 蜜蜂生物学和蜂产品开发利用, E-mail: 18468167655@163.com。

*** 通信作者:** 李亚辉（1967−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 生殖与发育生物学和蜜蜂科学, E-mail: kmliyh@163.com。

analyzed by GC-MS. The basic physical and chemical indexes of blueberry honey were determined according to the national standard method, the contents of total phenols, total flavonoids, proline, DPPH radical scavenging capacity and total antioxidant capacity in four blueberry honey were determined by spectrophotometry. Results: The test results of physical and chemical properties show that the blueberry honey LM17 collected from Changbai Mountain bee farm was a first-class product (high-quality honey). It did not contain BFF enzyme, SMR, SMB, BS, SMX, macrolides and mannose. It was a pure natural honey without adulteration. The total number of colonies, coliform group, mold count, osmotic yeast count were lower than those of the national standard of honey. The contents of cadmium, lead, coumaphos, fluvalinate and amitraz were far lower than the national standard index of honey or had not been detected. The total antioxidant activity of four blueberry honey samples from strong to weak were LM17>LM-MJ18ZH>LM-MJ18ZZ>LM18TH, there were significant differences in the contents of total phenols, total flavonoids and proline. A total of 60 volatile components were detected in the blueberry honey samples. Among them, 3-methyl-valeric acid, heptanoic acid, cis-linalool, and benzaldehyde belong to the aroma components, and the number of aroma components was more obvious than other scents. Honey (such as *Elsholtzia rugulosa* Hems L. honey and Linden honey) contained the same amount of aroma substances. It could also be inferred that the fragrance and flavor of blueberry honey should mainly come from these ingredients, among them, the volatile components shared by blueberry and blueberry honey were ethanol, benzaldehyde and octane. The 10 substances included 1-methyl-4-(1-methylvinyl)-benzene, 1,2,4-trimethyl-5-(1-methylethyl)-benzene, (S)-(+)-3-methyl-1-pentanol, cis-5-vinyltetrahydro-*α*,5-trimethyl-2-furanmethanol, 5,5-dimethyl-3-oxo 1-cyclohexene-1-carbaldehyde, 3-(2,2,6-trimethyl-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-1-yl)-2-propenal, (E)-1-(2,6,6-trimethyl-1,3-cyclohexadien-1-yl)-2-buten-1-one, 1-{2-[3-methyl-3-(5-methyl-furan-2-yl)-butyl]-oxiran-2-yl}-ethanone, 4,5-dihydro-5,5-dimethyl-4-isopropylidene-1H-pyrazole, 8-propoxy-cedrane were the unique volatile component of blueberry honey. Conclusion: Through the analysis of the basic physical and chemical properties, antioxidant content, antioxidant capacity and volatile components of blueberry honey, there were 4 kinds of aroma components in all volatile components of blueberry honey. Based on the study of basic physical and chemical properties, antioxidant, volatile components and aroma components, LM17 was identified as high-quality honey.

Key words: blueberry honey; blueberries; volatile components; physical and chemical properties; oxidation resistance; aroma components; gas chromatography-mass spectrometry

蓝莓又称越桔，属杜鹃花科，越桔亚科，越桔属植物，株高 10~20 cm，茎直立，枝细小，常绿或落叶灌木，其种类繁多，已知的大约有 450 种，其野生种广布北半球温带、亚热带，美洲和亚洲热带山区[1]。常见的栽培蓝莓有 3 种，分别是“高灌蓝莓”、“低灌蓝莓”和“兔眼蓝莓”[2]。蓝莓在国外已有多年种植历史，1983 年引进我国吉林种植，主要种植区域分布在东北、华南和西南地区，其中，贵州省种植面积居全国首位[3]。蓝莓因其果肉细腻，风味独特，口感酸甜适中且具有香爽宜人的香气而深受消费者的喜爱。此外，蓝莓营养丰富，不仅富含蛋白质、氨基酸、有机酸、维生素、矿物质等常规营养成分，而且还含有极为丰富的花青素和黄酮类物质，因此又被称为“水果皇后”和“浆果之王”。蓝莓中富含的花青素被认为是最好的天然抗氧化剂，对于自由基的清除能力远高于其他物质[4−5]。

蜂蜜是蜜蜂采集植物的花蜜、分泌物或蜜露，与自身分泌物混合后，经充分酿造而成贮藏在巢脾内的天然甜物质，是一种不人为改变其成分，甜而有黏性的、透明或半透明的液体[6−7]，其主要成分为糖类[8]，同时还富含多种有益于人类身体健康的氨基酸、维生素、微量元素等成分[9−13]。单花蜜或单一植物蜂蜜是由蜜蜂主要采集一种蜜源植物的花蜜酿造而成的蜂蜜[9]。蓝莓蜜是指蜜蜂采集蓝莓花蜜腺分泌的花蜜，经蜜蜂充分酿造而成的天然蜂蜜。目前国内外市场单花蜜的价格远高于杂花蜜，不少不法商人为追求利益以低价杂花蜜冒充高价单花蜜的现象屡见不鲜，又因缺乏相关专业知识的普通消费者难以鉴别蜂蜜种类及质量高低，而造成市场混乱。国外采用测定挥发性成分的方法来鉴别蜂蜜，迄今为止，已确定了几十种单花蜜的挥发性成分[14−17]。关于蜂蜜中的抗氧化物质与抗氧化能力的研究，如总黄酮、总酚的含量及组成国外已有较多报道[18−19]，国内的研究还非常有限，关于蓝莓蜜挥发成分的相关数据测定与研究还未见报道。

蓝莓受到了广大消费者的青睐，其价格也一直居高不下，蓝莓的热销也带动了相关产品如蓝莓蜜的消费增长，加之蓝莓蜜色泽美观、结晶细腻、滋味清香、口感甜润。近年来，蓝莓蜜开始受到人们的追捧，但由于蓝莓蜜是新近开发的一个蜜种，其基本品质属性尚未见报道，而且蓝莓种植规模不大，花期较短，致使蓝莓蜜产量有限，市面上的蓝莓蜜难免会鱼目混杂。因此，为了明确蓝莓蜜的基本品质特性、抗氧化特性、挥发性成分及致香成分，探究其滋味与所含化学成分的关系，探明蓝莓蜜和蓝莓果实挥发性化学成分的异同，并最终为蓝莓蜜的品质鉴定、消费提供参考，本论文对蓝莓蜜的基本品质特性及挥发性成分进行了研究，研究结果可为蓝莓蜜鉴定与质量检测提供参考数据，商品蓝莓蜜的产业化发展提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

蜂蜜样品 均采自蓝莓种植基地的蜂场, 包括 2017 年采自吉林省长白山蓝莓种植基地(LM17), 2018 年采自贵州省麻江蜂场中蜂早期和后期采集的两种蓝莓蜜(LM-MJ18ZZ、LM-MJ18ZH)和 2018 年采自吉林省通化蜂场的蓝莓蜜(LM18TH)。没食子酸(AR≥98%)、槲皮素(HPLC≥98%)、L-脯氨酸标准品(色谱纯≥98%)、茚三酮(AR≥95%)、Folin-酚试剂、PBS 缓冲液 北京索莱宝科技; Torlox(AR≥97%) Sigma-Aldrich; DPPH 自由基(AR≥97%) TCI 化工; 铁氰化钾(AR)、氯化铁(CP)、三氯乙酸(AR) 麦克林生化科技; 三氯化铝(试剂级)阿法爱莎化学; 甲醇(AR)、异丙醇(AR≥99.7%) 广东光华科技; 甲酸(AR≥98%)、乙二醇单甲醚(特纯≥99%) 北京百威灵科技。

HP7890A/5975C 型气相色谱-质谱联用仪 美国 Agilent 公司; PC-420D 型磁力加热搅拌器 美国 Corning 公司; AB-204 型分析天平 美国 METTLER 公司; 75 μm Carboxen-PDMS 固相微萃取头(黑色) 美国 Supelco 公司; A360 型紫外分光光度计 翱艺仪器; AX223ZHE 型电子天平 常州奥豪斯仪器; HH-8 型数字显示恒温水浴锅 国华电器; 玻璃试管、各种规格的容量瓶等。

1.2 实验方法

1.2.1 蓝莓蜜理化性质检测分析 按 GB 14963-2011《食品安全国家标准 蜂蜜》的方法进行。

1.2.2 蓝莓蜜农药残留和污染物检测分析 按 GB 14963-2011《食品安全国家标准 蜂蜜》、GB 5009.268-2016《食品安全国家标准 食品中多元素的测定》的方法进行。

1.2.3 蓝莓蜜微生物检测分析 按 GB 4789.2《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》、GB 4789.3-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠菌群计数》、GB 4789.15-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 霉菌和酵母计数》、GB 14963-2011《食品安全国家标准 蜂蜜》的方法进行检验。

1.2.4 蓝莓蜜抗氧化物质和抗氧化能力的检测分析

总酚含量测定采用 Folin-ciocalteu[20] 法: 没食子酸标准品(0.1 g/mL)用移液枪分别准确吸取 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mL 分别加入 2.5 mL 0.2 mol/L 福林酚试剂, 静待 5 min 后和加入 2.5 mL 75 g/L 的 Na_2CO_3。在室温下在避光反应 2 h, 以超纯水为空白, 在 760 nm 处测定吸光度。建立没食子酸标准曲线: Y=0.1308X+0.0017(R^2=0.9946)。吸取 0.5 mL 蜂蜜样液(0.01 g/mL)加入 2.5 mL 0.2 mol/L 福林酚试剂, 5 min 后和加入 2.5 mL 75 g/L 的 Na_2CO_3。避光反应 2 h 后测定吸光度。根据回归方程计算总酚含量, 单位用 mgGAE/100 g。

总黄酮含量测定采用 Arvouet-Grand[21] 法: 精密量取槲皮素标准品(0.1 mg/mL)0.00、1.00、2.00、3.00、4.00、5.00 mL 定容到 10 mL, 各量取 5 mL 加入 5 mL $AlCl_3$(2% 溶于甲醇中)摇匀, 10 min 后以未加槲皮素标准溶液的作空白, 415 nm 处测定吸光度。以槲皮素含量(μg)为横坐标, OD 值为纵坐标绘制标准曲线: Y=0.0081X−0.0063(R^2=0.9852)。取 5 mL 蜂蜜样液(0.01 g/mL)两份, 其中一份不加三氯化铝, 作样品空白, 10 min 后测定吸光度。根据回归方程计算黄酮含量, 单位用 mgQE/100 g。

总抗氧化性测定采用 Oyaizu [22] 法: 精确称取 25 mg 标准品 Trolox 溶于 80% 乙醇溶液, 定容到 100 mL, 取 0.00、0.50、1.00、2.00、3.00、4.00、5.00 mL 定容至 10 mL。吸取各标准溶液 1 mL, 加入 2.5 mL PBS 缓冲液(0.2 mol/L pH6.6), 加入 2.5 mL 1% 的铁氰化钾溶液, 50 ℃ 水浴 15 min, 再加入 5 mL 10% 三氯乙酸摇匀, 800 r/min 离心 5 min, 取 2.5 mL 上清液, 加入 2.5 mL 蒸馏水和 0.5 mL 0.1% 氯化铁, 混匀后于 700 nm 处测定吸光值, 用超纯水调零。以 Trolox 含量(μg)为横坐标, OD 值为纵坐标绘制标准曲线: Y=0.9465X+0.2041(R^2=0.9955)。取 1 mL 蜂蜜样液(0.01 g/mL), 其他处理同标准品, 测定吸光值, 以超纯水调零。根据回归方程计算总抗氧化性, 单位用 mgTrolox/100 g。

DPPH 自由基清除率和脯氨酸含量的测定按照国际蜂蜜委员会协调方法[23] 进行。

1.2.5 蓝莓蜜挥发性成分分析 称取样品 1.0 g 于 20 mL 顶空瓶中, 加入 0.1 g 氯化钠, 再加入 1 mL 去离子水。将顶空瓶放置于 60 ℃ 水浴中, 用固相微萃取头置于顶空瓶中进行萃取, 萃取时间为 30 min。之后将固相微萃取头插入气相色谱进样口进样, 时间为 2 min, 经气相色谱分离后用质谱鉴定, 并经 NIST05a, WILEY275 标准谱库进行检索, 挥发性物质的含量为峰面积归一化百分含量, 若不特别说明, 匹配度均大于 60。

色谱质谱条件: 毛细管柱: DB-5MS(30 m×0.25 mm×0.25 μm), 进样口温度: 280 ℃, 载气: He, 流速: 1.0mL/min, 分流比: 10∶1, GC-MS 接口温度: 280 ℃, 升温梯度: 50 ℃(2 min)~10 ℃/min~140 ℃(1 min)~10 ℃/min~280 ℃(1 min), 离子源: EI 源, 电子能量: 70 eV, 离子源温度: 230 ℃, 扫描范围: 29~350 amu, 标准图谱库: NIST05a, WILEY275 谱库。

1.3 数据处理

本文挑选了其中一种蓝莓蜜进行理化性质、微生物限量、农药残留和挥发性成分的系统检测, 数据使用 Excel 软件统计, 所有蓝莓蜜样品的抗氧化物质含量和抗氧化能力均测定三次, 计算平均值, 结果以平均值±标准差(SD)表示, 用 SPSS 23 软件分析数据间的显著性。

2　结果与分析

2.1　理化性质

蓝莓蜜的具体理化性质见表 1，所有理化指标值均符合 GB14963-2011《食品安全国家标准 蜂蜜》的要求。高果糖淀粉糖浆薄层法结果显示阴性，不含呋喃果糖酶（BFF）、大米糖浆标志物（SMR）、甜菜糖浆标志物（SMB）、甜菜糖浆（BS）、糖浆标志物检测（SMX）、大环内酯类物质和甘露糖，外来寡糖含量小于 0.01 %，表明该蜂蜜没有掺假，属于纯天然蜂蜜。

表 1　蓝莓蜜理化性质

Table 1　Physicochemical properties of blueberry honey

检验项目	实测值	指标要求
水分（%）	18.41	≤24
色泽（mm）	34.00	–
果糖（%）	35.11	–
葡萄糖（%）	30.09	–
蔗糖（%）	1.85	≤5
麦芽糖（%）	2.02	–
果葡比	1.17	–
还原糖（%）	65.20	≥60
羟甲基糠醛（mg/kg）	0.79	≤40
淀粉酶值（mL/g·h）	50.00	≥8
TLC（高果糖淀粉糖浆薄层法）	阴性	–
BFF 酶（呋喃果糖酶）	ND	<20
SMR（大米糖浆标志物）	ND	–
SMB（甜菜糖浆标志物）	ND	<5
BS（甜菜糖浆）	ND	<5
SMX（糖浆标志物）	ND	<5
大环内酯类	ND	<2 ppb
甘露糖	ND	<250 mg/kg
外来寡糖（%）	<0.01	–

注：ND，未检出。

2.2　农药残留和污染物检测结果分析

本文挑选了养蜂生产中使用较为普遍的 3 种农药进行检测，蓝莓蜜中蝇毒磷、氟胺氰菊酯和双甲脒均未检出。检测了镉、铅两种污染物，其中镉（以 Cd 计）<0.005 mg/kg，铅（以 Pb 计）<0.05 mg/kg。五种有毒有害物质含量均符合 GB 2763-2019《食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量》、GB 2762-2017《食品安全国家标准 食品中污染物限量》的相关规定。以上数据也反映了该蓝莓蜜受环境污染较少。

2.3　蓝莓蜜微生物检测结果分析

所检测蜂蜜样品菌落总数（CFU/g）（≤1000）为 80 CFU/g，大肠菌群（MPN/g）（≤0.3）为小于 0.3 MPN/g，霉菌计数（CFU/g）（≤200）为 13 CFU/g，嗜渗酵母计数（CFU/g）（≤200）为 56 CFU/g，均远低于国标 GB 14963-2011《食品安全国家标准 蜂蜜》的要求。

2.4　抗氧化物质含量和抗氧化能力分析

4 个蓝莓蜜样品的中抗氧化物质总酚、总黄酮、脯氨酸的含量及 DPPH 自由基清除能力和总抗氧化性分析见表 2，不同的蜂蜜的总酚含量各不相同，含量在 (31.34±0.04)~(47.40±0.79) mgGAE/100 g 之间，LM18TH 极显著高于其他蜜（P<0.01），LM-MJ18ZH 和 LM17 的总酚含量差异不显著。总黄酮含量在 (4.69±0.14)~(9.00±0.70) mg QE/100 g 之间，采集自同一蜂场不同时期的两个样品 LM-MJ18ZH 和 LM-MJ18ZZ 差异不显著，LM17 中总黄酮含量极显著高于其他样品（P<0.01）。蓝莓蜜的脯氨酸含量变化可能与地域差异有较大关系，贵州麻江同一蜂场不同时期的两个样品脯氨酸含量极显著低于北方采集的蓝莓蜜，且后期采集的蓝莓蜜极显著高于前期的（P<0.01），表明脯氨酸含量的积累可能与蜂蜜的酿造过程和成熟时间有关。采自吉林通化蜂场和长白山蜂场的两个蓝莓蜜的脯氨酸含量较高，且差异不显著。所有的蜂蜜样品都对 DPPH 自由基具有清除作用，根据不同浓度梯度蜂蜜的自由基清除率计算出 IC_{50} 值，4 个蜂蜜样品对自由基清除能力 IC_{50} 值范围是 0.14~1.77 mg/mL，值越小表示清除作用越强。LM-MJ18ZH 和 LM18TH 的自由基清除能力极显著高于其余两个样品（P<0.01）。蜂蜜的总抗氧化性又称还原力，体现的是蜂蜜中所有抗氧化物质的抗氧化性，4 个样品总抗氧化性由强到弱分别为：LM17>LM-MJ18ZH>LM-MJ18ZZ>LM18TH。

2.5　挥发性成分

采用气相色谱-质谱联用（GC-MS）法对蓝莓蜜挥发性成分进行检测，并与国外报道的使用同一方法检测出的蓝莓果实挥发性成分进行对比（具体结果见表 3），文中选取的是‘比洛克西’、‘布里吉塔’、‘森吐里昂’、‘高丛’和‘欧扎克蓝’五种蓝莓果实的挥发性成分分析结果[24]，长白山蓝莓种植园中蜜蜂采集蓝莓蜜的蓝莓品种为‘北陆’、‘蓝丰’、‘瑞卡’、‘派吹特’、‘奇伯瓦’、‘北蓝’、‘美登’。

表 2　四种蓝莓蜜抗氧化性成分及分析

Table 2　Antioxidant components and analysis of four kinds of blueberry honey

样品名称	总酚含量（mgGAE/100 g）	总黄酮（mg QE/100 g）	脯氨酸（mg/kg）	DPPH IC_{50}（mg/mL）	总抗氧化性（mgTrolox/100 g）
LM-MJ18ZH	40.11±0.04^{b}	5.30±0.36^{a}	417.82±8.43^{b}	0.14±0.001^{a}	38.13±0.11^{b}
LM-MJ18ZZ	31.34±0.04^{a}	4.69±0.14^{a}	237.28±14.65^{a}	1.77±0.210^{c}	30.66±0.40^{a}
LM17	40.82±0.04^{b}	9.00±0.70^{c}	1220.58±5.95^{c}	1.36±0.279^{b}	38.55±0.21^{b}
LM18TH	47.40±0.04^{c}	6.54±0.26^{b}	1212.19±2.95^{c}	0.19±0.003^{a}	29.71±0.16^{a}

注：同一列数值上标不同字母为同一指标不同样品之间具有极显著差异（P<0.01）。

表 3 蓝莓果与蓝莓蜜(LM17)挥发性成分对比

Table 3 Comparison of volatile components between blueberry fruit and blueberry honey (LM17)

蓝莓果实[24]			蓝莓蜜		
化合物名称	保留时间(min)	相对含量(μg/kg)	化合物名称	保留时间(min)	峰面积归一化百分比含量(%)
			烃类		
辛烷	1.23	5.2	辛烷	4.217	0.014
乙苯	6.48	3.5	2,4-二甲基-己烷	4.217	0.014
对二甲苯	6.71	0.5	1-甲氧基-4-甲基-苯	10.027	0.0093
间二甲苯	6.9	1.2	1-甲基-4-(1-甲基乙烯基)-苯	12.147	0.0277
			(2-甲基-1-丙烯基)-苯	12.147	0.0277
			二十烷	20.954	0.00268
			二十四烷	20.954	0.00268
			二十一烷	20.954	0.00268
			十三烷	23.39	0.00197
			2,6,10,14-四甲基-十六烷	23.39	0.00197
			3-甲基-5-丙基-壬烷	23.39	0.00197
			1,2,4-三甲基-5-(1-甲基乙基-苯	25.853	0.0191
			醇类		
乙醇	2.36	675	乙醇	1.613	0.0712
3-甲基-1-丁醇	9.21	0.5	1,5-己二烯-3-醇	4.217	0.014
戊醇	10.57	6	3-甲基-1-戊醇-1-戊醇	5.181	0.0315
2-庚醇	12.88	0.1	(S)-(+)-3-甲基-1-戊醇	5.181	0.0315
己醇	13.92	26.4	顺式-芳樟醇	11.56	0.0325
(E)-3-己烯-1-醇	14.26	0.6	顺式-5-乙烯基四氢-α, 5-三甲基-2-呋喃甲醇	11.56	0.0325
(Z)-3-己烯-1-醇	14.9	34.4	3,7-二甲基-1.6辛二烯-3-醇	12.421	0.0193
(Z)-2-己烯-1-醇	15.63	30.5	3,7-二甲基-1,5,7-辛三烯-3-醇	12.521	0.129
1-辛烯-3-醇	17.05	3.4			
1-庚醇	17.17	1.2			
2-乙基-1-己醇	18.26	0.6			
1-辛醇	20.3	3			
HO-三烯醇	21.86	1.1			
1-壬醇	23.26	1.1			
苯甲醇	29.01	0.4			
苯乙醇	29.85	0.1			
			醛类		
2-甲基丁醛+ 3-甲基丁醛	3.03	8.5	苯甲醛	8.3	0.0079
己醛	5.33	134	苯乙醛	10.729	0.0039
(E)-2-戊烯醛	6.66	3.4	丁香醛A	13.649	0.029
(Z)-3-己烯醛	7.68	176	丁香醛B	13.649	0.029
庚醛	8.39	7.4	5,5-二甲基-3-氧代-1-环己烯-1-甲醛	13.741	0.0111
(Z)-2-己烯醛	8.91	25.8	3-(2,2,6-三甲基-7-氧杂双环[4.1.0]庚-1-基)-2-丙烯醛	21.156	0.0143
(E)-2-己烯醛	9.42	632			
辛醛	11.74	4.6			
(E)-2-庚烯醛	12.8	10.7			
2-壬烯醛	15.13	8.1			
(E, Z)-2,4-己二烯醛	15.3	3.6			
(E, E)-2,4-己二烯醛	15.39	17.8			
(E)-2-辛烯醛	16.17	9.7			
(E, E)-2,4-庚二烯醛	17.37	0.9			
癸醛	18.4	2.3			
苯甲醛	19.04	1.2			
(E)-2-壬烯醛	19.44	1.5			
3-乙基苯甲醛	24.37	0.2			

续表 3

蓝莓果实[24]			蓝莓蜜		
化合物名称	保留时间(min)	相对含量(μg/kg)	化合物名称	保留时间(min)	峰面积归一化百分比含量(%)
			酮类		
2-庚酮	8.27	16.7	3,5,5-三甲基-2-环己烯-1-酮	13.047	0.0265
2-辛酮	11.59	3.8	1-(2,6,6-三甲基-1,3-环己二烯-1-基)-2-丁烯-1-酮	20.329	0.00483
1-辛烯-3-酮	12.16	2.3	(E)-1-(2,6,6-三甲基-1,3-环己二烯-1-基-2-丁烯-1-酮	20.329	0.00483
6-甲基-5-庚烯-2-酮	13.34	30	1-{2-[3-甲基-3-(5-甲基-呋喃-2-基)-丁基]-环氧乙烷-2-基}-乙酮	22.593	0.011
2-壬酮	14.96	2.7	1-(2,4,6-三甲基苯基)-乙酮	25.853	0.0191
2-十一烷酮	21.38	2.3	2,6,6三甲基2 -环己烯-1,4-二酮	13.741	0.0111
苯乙酮	22.76	0.5			
			酯类		
乙酸甲酯	1.4	0.2	1,4-二甲基茚基乙酸酯	25.853	0.0191
乙酸乙酯	1.84	5.4	三醋酸甘油酯	19.257	0.00483
丙酸乙酯	2.68	0.3	1,2-苯二甲酸, 丁基环己基酯	28.659	0.0186
异丁酸乙酯	2.8	0.3	邻苯二甲酸, 癸基异丁基酯	28.659	0.0186
甲基-2-甲基丁酸酯	3.64	0.1	1,2-苯二甲酸, 双(2-甲基丙基)酯	28.659	0.0186
异戊酸甲酯	3.85	1.9			
丁酸乙酯	4.28	0.3			
乙基-2-甲基丁酸酯	4.6	0.7			
异戊酸乙酯	4.99	8			
(2E)-2-丁烯酸乙酯	7.78	0.3			
己酸乙酯	10.01	0.2			
乙酸己酯	11.24	0.4			
(Z)-3-己烯基乙酸酯	12.75	22.9			
乙酸2-己烯酯	13.33	2.5			
甲基3-羟基-3-甲基丁酯	14.44	0.2			
乙基-3-羟基-3-甲基丁酯	15.65	0.1			
2-乙基-2-羟基-3-甲基丁酯	16.15	0.4			
(E,Z)-2,4-己二烯酸乙酯	16.9	0.3			
(Z)-3-己烯基丁酸酯	17.29	0.2			
(E,E) - 2,4-己二烯酸乙酯	18	0.8			
(Z,Z)-2,4-己二烯酸乙酯	18.7	0.2			
呋喃-2-羧酸乙酯	22.16	0.3			
苯甲酸乙酯	23.26	0.5			
乙酸苯乙酯	26.63	0.1			
水杨酸2-乙基己酯	38.86	2			
			酸类		
己酸	33.27	0.6	2-氨基-6-甲基苯甲酸	6.378	0.0029
辛酸	38.25	0.4	3-甲基-戊酸	7.72	0.0281
壬酸	40.4	3.4	2-乙基-己酸	12.978	0.1117
癸酸	42.77	2.9	二甲基二硫代次膦酸	8.51	0.017
			庚酸	8.654	0.011
			醋酸	1.895	0.0383
单萜类			酚类		
β-月桂烯	7.68	1.6	2,4-双(1,1-二甲基乙基)苯酚	23.486	0.00268
柠檬烯	8.6	8.7	2,5-双(1,1-二甲基乙基)苯酚	23.486	0.00268
1,8-桉树脑	8.83	63.6	含氧、氮、硫杂环类		
(E)-β-罗勒烯	10.54	1	二甲基硫化物	1.738	0.038
α-异松油烯	11.41	2.9	4,5-二氢-5,5-二甲基4异亚丙基1H吡唑	13.047	0.0265
芳樟醇氧化物A	16.55	1.6	二甲基-二硫化物	3.317	0.028

续表 3

蓝莓果实[24]			蓝莓蜜		
化合物名称	保留时间(min)	相对含量(μg/kg)	化合物名称	保留时间(min)	峰面积归一化百分比含量(%)
芳樟醇氧化物B	17.46	2.9	二甲基三硫化物	8.51	0.017
芳樟醇	20.03	106	1,5-二甲基-1H-吡唑	14.156	0.017
4-松油醇	21.41	1	2-甲基 -呋喃	2.074	0.0084
α-松油醇	24.18	9.8	腈类		
橙花醇	27.08	0.3	异丁腈	2.131	0.0129
香叶醇	28.36	1.9	3-甲基-丁腈	3.103	0.0932
香叶基丙酮	28.34	9.3	苄基腈	13.531	0.061
丁子香酚	36.07	0.1	其他物质		
降碳倍半萜及其衍生物			α-甲基α.-[4-甲基-3-戊烯基]缩水甘油	11.56	0.0325
β-大马酮	27.43	0.1	反式-芳樟醇氧化物	12.036	0.00626
倍半萜			8-丙氧-塞德兰	25.434	0.0132
δ-榄香烯	17.32	0.1	乙基β-D-核糖核苷	3.729	0.007
(E)-石竹烯	21.02	1.2	1,2-二甲基-肼	1.895	0.0383
石竹烯氧化物	31.31	0.3			

蓝莓果实中含有 93 种挥发性成分，分属于 10 类化合物，分别是酸类、醇类、醛类、酯类、烃类、酮类、内酯类、单萜类、降碳倍半萜及其衍生物和倍半萜。其中数量最多的为酯类，占 46.8%，最少的为降碳倍半萜及其衍生物，占 0.1%。蓝莓蜜中含有 11 类共 60 种挥发性成分，分别是醇类 0.3615%、含氮、硫杂环类 0.1265%、含氧杂环类 0.0084%、腈类 0.1671%、烃类 0.17894%、酸类 0.209%、醛类 0.0662%、酮类 0.07736%、酚类 0.00536%、酯类 0.07973% 和其他物质 0.11046%。其中数量最多的为烃类，占 0.17894%，最少的为酚类，占 0.00536%，相对含量最多的是醇类，占 0.3615%，相对含量最少的是酚类，占 0.00536%。蓝莓果实与蓝莓蜜挥发性成分差异较大，其中相同的仅有乙醇、苯甲醛、辛烷 3 种，苯甲醛也是两者共有的致香成分。蓝莓蜜中烃类和酸类物质多于蓝莓果实，蓝莓果实的酯类、醇类、醛类、酮类物质种类上多于蓝莓蜜。

3 讨论

本研究对采自长白山蜂场的蓝莓蜜(LM17)的理化性质进行检测，数据表明此蓝莓蜜(LM17)各项指标均符合食品安全国家标准蜂蜜一级品指标，且羟甲基糠醛含量低，淀粉酶活性高，表明蜂蜜检测时处于比较新鲜的状态。掺假检测分析表明该蜂蜜没有掺入各类糖浆，属于纯天然蜂蜜，无外来物质添加，污染物和微生物限量分析表明该蓝莓蜜的生产基地生态环境优越，无污染，蜂群健康安全。

蜂蜜含有多种天然抗氧化物质，在体内外均有显著的抗氧化活性。其中酚酸类物质是抗氧化活性的主要物质，主要包括苯甲酸和肉桂酸以及它们的酯，不同地域不同种类蜂蜜所含酚酸的种类存在较大差异，不同种类的酚类化合物的含量也存在差异，比如新西兰的麦卢卡蜜中没食子酸含量最高，被作为麦卢卡蜜的一个标志物。在所检测的三种来自不同蜂场的蓝莓蜜中，总酚含量最多的是 LM18TH，其次是 LM17，同时 LM17 的总黄酮含量、脯氨酸含量和总抗氧化性也是最高的；蜂蜜中的黄酮类物质来自植物的花蜜、花粉和蜂胶，是蜂蜜中常见的抗氧化物质，在几个蓝莓蜜样品种，总黄酮含量最少的是采自麻江蜂场的蓝莓蜜(LM-MJ18ZZ)；研究表明，蜂蜜中含有多种游离氨基酸，其中脯氨酸含量最高，且其含量与蜂蜜的自由基清除能力有关[25]。脯氨酸含量最多是采自长白山蜂场的 LM17，LM18TH 的脯氨酸含量仅次于 LM17，且它们之间无显著差异，但它们的自由基清除率之间却存在较大差异，分析认为，自由基清除能力不仅和脯氨酸有关，且与总酚含量有较大关系，LM18TH 总酚含量极显著高于 LM17，所以总酚含量最少，脯氨酸含量也较低的 LM-MJ18ZZ 的自由基清除作用是最弱的。综上可知，总酚和总黄酮是影响蜂蜜总抗氧化性的主要因素。

Alissandarkis 等[26] 认为某种物质仅在一种单花蜜中出现或在其他单花蜜中含量较少时，可认为该化合物是这种蜂蜜的独有的挥发性物质。蓝莓蜜(LM17)的挥发性成分分别与野坝子蜜、苕子蜜、油菜(*Brassica napus* L.)蜜、洋槐(*Robinia pseudoacacia* L.)蜜、椴树(*Tilia tuan Szyszy* L.)蜜[27]、沙枣(*Elae agrnus angustifolia* L.)蜜、葵花(*Helianthus annuus* L.)蜜、棉花(*Gossypium* spp.)蜜[28]、野桂花(*Osmanthus yunnanensis* P. S. Green)蜜[29]、雪脂莲(*Vicia sepium* L.)、柠檬(*Citrus limon* L.)蜜、菊花(*Dendranthema morifolium* Ramat.)蜜、枇杷(*Eriobotrya japonica* Lindl.)蜜、益母草(*Leonurus japonicas* Houtt)蜜[29]、桉树(*Eucalyptus robusta* Smith)蜜和荔枝(*Litchi chinensis* Sonn.)蜜[30] 挥发性成分进行比较，其中 1-甲基-4-(1-甲基乙烯基)-苯、1,2,4-三甲基-5-(1-甲基乙基)-苯、(S)-(+)-3-甲基-1-戊醇、顺式-5-乙烯基四氢-α，5-三甲基-2-呋喃甲醇、5,5-二甲

基-3-氧代-1-环己烯-1-甲醛、3-(2,2,6-三甲基-7-氧杂双环 [4.1.0] 庚-1-基)-2-丙烯醛、(E)-1-(2,6,6-三甲基-1,3-环己二烯-1-基)-2-丁烯-1-酮、1- {2-[3-甲基-3-(5-甲基-呋喃-2-基)-丁基]-环氧乙烷-2-基}-乙酮、4,5-二氢-5,5-二甲基-4-异亚丙基-1H-吡唑、8-丙氧基-雪松烷等 10 种物质为 LM17 的特有成分。

通过比较指纹图谱数据库中已收录的 GC-MS 谱图的香原料数据发现，蓝莓果实中所含挥发性物质属于致香成分的为：己酸、壬酸、辛酸、癸酸、己醇、戊醇、苯甲醇、苯乙醇、1-辛烯-3-醇、2-壬烯醛、芳樟醇、香叶醇、苯甲酸乙酯、丙酸乙酯、丁酸乙酯、乙酸己酯、2-辛酮、2-庚酮、橙花醇和 β-大马酮 20 种成分；蓝莓蜜所含挥发性物质中属于致香成分的为：3-甲基 -戊酸、庚酸、顺式-芳樟醇、苯甲醛 4 种物质；椴树蜜挥发性成分中属于致香成分的为：苯甲醛、苯甲醇、己酸、壬酸、乙酸苯乙酯；野坝子蜜挥发性成分中属于致香成分的为：苯甲醇、薄荷醇、己酸、苯甲酸、辛酸；柠檬蜜挥发性成分中属于致香成分的为芳樟醇氧化物；苕子蜜挥发性成分中属于致香成分的为癸醛。基于感官评价，野坝子蜜和椴树蜜的香味明显优于苕子蜜，其原因可从蜂蜜所含的挥发性成分看出：野坝子蜜和椴树蜜分别含有 5 种和 4 种致香成分，而苕子蜜仅有 1 种致香成分。而本研究中 LM17 含有 4 种致香成分，水平与野坝子蜜和椴树蜜的相当，说明这可能是蓝莓蜜清香滋味的主要来源。此外，蓝莓蜜、野坝子蜜和椴树蜜所含的致香成分种类虽然处于同一水平，但具体致香成分不尽相同，这可能构成了不同蜂蜜之间风味的差异与独特性。

为进一步探究挥发性成分与蜂蜜种类、蓝莓果实与蓝莓蜜及不同地域蓝莓蜜与挥发性成分的关系，我们将蓝莓蜜(LM17)与蓝莓及其他常见蜂蜜的挥发性成分进行了比较分析。蓝莓果实与采自长白山蜂场的蓝莓蜜挥发性成分中相同的有乙醇、苯甲醛、辛烷 3 种。苕子蜜、野坝子蜜、油菜蜜、洋槐蜜、椴树蜜、柠檬蜜、荔枝蜜、沙枣蜜、葵花蜜、棉花蜜等常见蜂蜜含有的共同挥发性成分为：乙醇、苯甲醇、辛酸、壬醛、苯乙醛。其中乙醇为蓝莓、蓝莓蜜(LM17)、苕子蜜、野坝子蜜、油菜蜜、洋槐蜜、椴树蜜、柠檬蜜、荔枝蜜、沙枣蜜、葵花蜜、棉花蜜等常见蜂蜜含有的共同挥发性成分。本文还将采自长白山蜂场蓝莓蜜(LM17)与采自云南石屏蜂场蓝莓蜜的挥发性成分进行了比较分析，发现二者的挥发性成分的数量和种类均存在较大差异，蓝莓蜜(LM17)含有 60 种挥发性物质，11 类物质，分别是醇类、含氮、硫杂环类、含氧杂环类、腈类、烃类、酸类、醛类、酮类、酚类、酯类和其他物质；采自云南石屏蜂场的蓝莓蜜仅含 15 种挥发性成分，5 类物质，分别是醇类、醛类、酸类、酯类及其他物质；两种蜂蜜相同的挥发性成分仅有乙醇、苯甲醛、苯乙醛、1,2-苯二甲酸，双(甲基丙基)酯等 4 种，其原因可能与地域、蜂种或蓝莓品种的不同有关。

通过蓝莓蜜与蓝莓果实挥发性成分的比较可以看出，蓝莓果实含有的挥发性成分和致香成分均多于蓝莓蜜，这种差异暗示着蓝莓的果实和花蜜中挥发性成分的物质合成代谢途径可能存在较大差异甚至完全不同，也可能与蓝莓的品种、蜂蜜中的微生物活动、蜂蜜酿制过程中蜜蜂对花蜜的化学转化作用以及蜂蜜的加工贮存条件等有关[31−33]，并且蓝莓极受欢迎的独特风味可能与其所含有的丰富的致香成分有直接关系。

4　结论

对蓝莓蜜(LM17)理化性质检测结果的分析表明：蓝莓蜜各项基本理化指标均符合蜂蜜国家标准，微生物、污染物均低于蜂蜜国家标准，其中蝇毒磷、氟胺氰菊酯和双甲脒均未检出。通过检测 4 种蓝莓蜜的抗氧化物质和抗氧化能力，进行比较后发现抗氧化性最好的是采自长白山蜂场的蓝莓蜜(LM17)。

采用气相色谱-质谱联用(GC-MS)法检测长白山蜂场采集的蓝莓蜜(LM17)挥发性成分并与国外报道的蓝莓果实和几种常见蜂蜜挥发性成分进行对比。蓝莓蜜含有 10 种区别于野坝子蜜、苕子蜜、油菜蜜、洋槐蜜、椴树蜜、沙枣蜜、葵花蜜、棉花蜜、野桂花蜜、雪脂莲、柠檬蜜、菊花蜜、枇杷蜜、益母草蜜、桉树蜜和荔枝蜜的挥发性成分，比对指纹图谱数据库中已收录的 GC-MS 谱图的香原料数据发现，在蓝莓蜜所有挥发性成分中属于致香成分的有 4 种。最后我们综合理化性质、农药残留、微生物、抗氧化性、挥发性成分及致香成分的研究，鉴定采自长白山蜂场的蓝莓蜜(LM17)属于优质蜂蜜。

参考文献

[1] 方瑞征, 彭华, 李德铢, 等. 中国植物志 [M], 1991, 57(3): 75. [FANG R Z, PENG H, LI D Z, et al. Flora of China[M], 1991, 57(3): 75.]

[2] MARVIN P P, JAMES F H, BC S. Highbush blueberry production guide[M]. Northeast Regional Agricultural Engineering Service, 1992: 4−7.

[3] 李亚东, 姜惠铁, 张志东, 吴林. 中国蓝莓产业化发展的前景, 沈阳农业大学学报 (社会科学版), 2001, 3(1): 39−42. [LI Y D, JIANG H T, ZGANG Z D, WU L. The prospects of China's blueberry industrialization, Journal of Shenyang Agricultural University (Social Science Edition), 2001, 3(1): 39−42.]

[4] 顾姻, 贺善安, 於虹等. 蓝浆果与蔓越橘 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 1−6. [GU Y, HE S A, YU H, et al. Blue berries and cranberries [M]. Beijing:China Agricultural Press, 2001: 1−6.]

[5] 邵芳芳, 尹卫平, 梁菊. 重要的植物多酚及其抗氧化性能的研究概况[J]. 西北药学杂志, 2010, 25(1): 66−68. [SHAO F F, YIN W P, LIANG J. Research overview of important plant polyphenols and their antioxidant properties[J]. Northwest Journal of Pharmacy, 2010, 25(1): 66−68.]

[6] 中华人民共和国卫生部. GB 14963-2011 食品安全国家标准 蜂蜜 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2011. [Ministry of Health, PRC.

GB 14963-2011 national food safety standard honey [S]. Beijing: China Standards Press, 2011]
[7] 和绍禹, 林尊诚, 周振桓, 等. 蜜蜂产品认知大全 [M] 云南科技出版社, 2005: 126−127. [HE S Y, LIN Z C, ZHOU Z H, et al. Cognition of bee products [M]. Yunnan Science and Technology Press, 2005: 126−127]
[8] DA S P M, GAUCHE C, GONZAGA L V, et al. Honey: Chemical composition, stability and authenticity[J]. Food Chemistry, 2016, 196(APR.1): 309−323.
[9] BOGDANOV S, JURENDICT, SIEBER R, et al. Honey for nutrition and health: A review[J]. Journal of the American College of Nutrition, 2008, 27(6): 677−689.
[10] 闫玲玲, 杨秀芬. 蜂蜜的化学组成及其药理作用[J]. 特种经济动植物, 2005, 8(2): 40−42. [YAN L L, YANG X F. Chemical composition and pharmacological action of honey[J]. Special Economic Animals and Plants, 2005, 8(2): 40−42.]
[11] 顾雪竹, 李先瑞, 钟银燕, 毛淑杰. 蜂蜜的现代研究及应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(6): 70−72. [GU X Z, LI X D, ZHONG Y Y, MAO S J. Modern research and application of honey[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2007, 13(6): 70−72.]
[12] 朱金明. 酶-蜂产品增强消化能力的主要因素[J]. 养蜂科技, 2004(1): 30−31. [ZHU J. Main factors of enzyme bee products to enhance digestive capacity[J]. Apicultural Science and Technology, 2004(1): 30−31.]
[13] 石永峰, 戴红霞. 蜂蜜的特性及其在食品中的应用[J]. 陕西粮油科技, 1995, 20(2): 25−27. [SHI Y F, DAI H X. Characteristics of honey and its application in food[J]. Shanxi Science and Technology of Cereals, Oils, 1995, 20(2): 25−27.]
[14] 张静, 于世锋, 任志娟, 王毕妮, 陈卫军, 曹炜. 蜂蜜中挥发性化合物的分析方法研究进展[J]. 中国蜂业, 2008, 59(9): 5−7. [ZHANG J, YU S F, REN Z J, et al. Advances of studies on volatile analytical methods of honey[J]. Apiculture of China, 2008, 59(9): 5−7.]
[15] CUEVASGLORY L F, PINO J A, SANTIAGO L S, et al. A review of volatile analytical methods for determining the botanical origin of honey[J]. Food Chemistry, 2007, 103(3): 1032−1043.
[16] ODEH I, ABULAFI S, DEWIK H, et al. A variety of volatile compounds as markers in Palestinian honey from *Thymus capitatus, Thymelaea hirsuta*, and *Tolpis virgata*[J]. Food Chemistry, 2007, 101(4): 1393−1397.
[17] 李成斌, 林瑜, 邓国宾, 等. 八种蜂蜜挥发性成分分析[J]. 精细化工, 2006, 23(11): 1082−1089. [LI C B, LIN Y, DENG G B, et al. Analysis of the volatile components of eight kinds of honey by GC-MS[J]. Fine Chemicals, 2006, 23(11): 1082−1089.]
[18] MARTOS I, FERRERES F, YAO L, et al. Flavonoids in monospecific eucalyptus honeys from Australia[J]. J Agric Food Chem, 2000, 48: 4744−4748.
[19] SNOW M J, MANLEY H M. Study on the nature of non-peroxide antibacterial activity in New Zealand manuka honey[J]. Food Chem, 2004, 84: 145−147.
[20] SINGLETON V L, ORTHOFER R, ROSA M L-R. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent[J]. Methods in Enzymology, 1999, 299C(1): 152−178.
[21] ARVOUET G A, VENNAT B, POURRAT A, et al. Standardisation d'un extrait de propolis et identification des principaux constituants[J]. Journal de Pharmacie de Belgique, 1994, 49: 462−468.
[22] OYAIZU M. Studies on products of browning reactions; Antioxidantive activities of products of browning reaction prepared from glucosamine[J]. Japanese Journal of Nutrition, 1986(44): 307−315.
[23] BOGDANOV S. Harmonised methods of the international honey commission[C]. Swiss Bee Research Center, FAM, Liebefeld, CH-3003 Bern, Switzerland, 1999: 59-60.
[24] BRIAN, IULIIA K, MARCELLA G, et al. Exploring blueberry aroma complexity by chromatographic and direct-injection spectrometric techniques[J]. Frontiers in Plant Science, 2017: 8.
[25] MEDA A, LAMIEN C E, ROMITO M, et al. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity[J]. Food Chemistry, 2005, 91(3): 571−577.
[26] ALISSANDARKIS E, TARANTILIS P A, HARIZANIS P C, et al. Aroma investigation of unifloral Greek citrus honey using solid-phase micro extraction coupled to gas chromatographic-mass spectrometric analysis[J]. Food Chemistry, 2007, 100(1): 396−404.
[27] 裴高璞, 史波林, 赵镭, 等. 3 种蜜源蜂蜜香气成分差异化信息分析研究[J]. 食品科技, 2014, 39,(2): 68−73. [PEI G P, SHI B L, ZHAO L, et al. The analysis research of three nectar source honey aroma ingredients differentiation information[J]. Food Science and Technology, 2014, 39,(2): 68−73.]
[28] 栗有志, 谢丽琼, 王强, 等. 4 种新疆单花蜜挥发性成分的 SPME-GC-MS 分析[J]. 食品科学, 2010, 31(24): 293−299. [SU Y Z, XIE L Q, WANG Q, et al. SPME-GC-MS Analysis of volatile compounds from four Xinjiang monofloral honey[J]. Food Science, 2010, 31(24): 293−299.]
[29] 张丽珍, 曾志将, 郑云林, 等. 江西野桂花蜂蜜成分分析[J]. 食品科学, 2012, 33(10): 195−199. [ZHANG L Z, ZENG Z J, ZHENG Y L, et al. Components analysis of honey *Eurya* spp. in Jiangxi[J]. Food Science, 2012, 33(10): 195−199.]
[30] 陈志燕, 黄世杰, 朱静, 等. 5 种蜂蜜挥发性成分的 GC- MS 分析[J]. 农产品加工, 2013, 11: 72−74. [CHEN Z Y, HUANG S J, ZHU J, et al. Analysis of volatile components in 5 kinds honey by GC-MS[J]. Academic Periodical of Farm Products Processin, 2013, 11: 72−74.]
[31] 龙银花, 黄爱今, 孙亦梁, 等. 桉树蜜和荔枝蜜的气味分析[J]. 北京大学学报 (自然科学版), 1994, 30(6): 671−676. [LONG Y H, HUANG A J, SUN Y L, et al. Analysis of eucalyptus honey and litchi honey[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis, 1994, 30(6): 671−676.]
[32] JERKOVIC I, MARIJANOVIC Z. Screening of volatile composition of lavandula hybrida reverchon II honey using headspace solid-phase microextraction and ultrasonic solvent extraction[J]. Chemistry & Biodiversity, 2010, 6(3): 421−430.
[33] ALISSANDRAKIS E, TARANTILIS P A, HARIZANIS P C, et al. Evaluation of four isolation techniques for honey aroma compounds[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2005, 85(1): 91−97.

陈君玉, 孙渊, 饶雷, 等. 基于不同杀菌方式的红烧肉内脂质和挥发性成分的差异分析 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 345−353. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100300

CHEN Junyu, SUN Yuan, RAO Lei, et al. Comparision of Lipids and Volatile Flavor Components in Chinese Braised Pork in Brown Sauce with Different Sterilization Methods[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 345−353. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100300

· 分析检测 ·

基于不同杀菌方式的红烧肉内脂质和挥发性成分的差异分析

陈君玉[1], 孙　渊[1], 饶　雷[1], 赵　靓[1,2], 王永涛[1], 李全宏[1], 吴晓蒙[1,*], 廖小军[1]

（1.中国农业大学食品科学与营养工程学院, 国家果蔬加工工程技术研究中心, 农业农村部果蔬加工重点实验室, 食品非热加工北京市重点实验室, 北京 100083;
2.中国农业大学（兴化）健康食品产业研究院, 江苏兴化 225700）

摘　要: 为了研究红烧肉在不同杀菌过程中脂质和挥发性成分的变化，本文采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱技术对未杀菌、巴氏杀菌和超高压杀菌处理的红烧肉的全脂质组分进行定量分析，共鉴定出 251 种脂质化合物。利用偏最小二乘判别分析和层次聚类分析模型可有效区分未杀菌、巴氏杀菌、超高压杀菌的红烧肉样品，其中 24 种脂质物质是将其有效区分的关键差异性化合物，包括 15 种甘油三酯，8 种磷脂，1 种 N-酰基乙醇胺。根据脂质化合物的相对含量，超高压组的红烧肉比巴氏杀菌组更接近于对照组。采用固相微萃取-气相色谱-质谱联用技术比较了不同杀菌方式处理的红烧肉中主要挥发性物质的种类和含量差异。3 种杀菌方式中共鉴定出 31 种挥发性风味成分，包括 4 种醇、4 种酸、4 种脂、7 种烷烃、2 种酮、9 种醛和 1 种呋喃。综合分析，超高压杀菌较好地保持了红烧肉原有的风味和脂质成分，在肉制品以及中式菜肴的杀菌领域具有较好的应用前景。

关键词: 红烧肉, 脂质成分, 挥发性成分, 杀菌方式, 巴氏杀菌, 超高压杀菌

中图分类号: TS251.5　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0345−09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100300

本文网刊:

Comparision of Lipids and Volatile Flavor Components in Chinese Braised Pork in Brown Sauce with Different Sterilization Methods

CHEN Junyu[1], SUN Yuan[1], RAO Lei[1], ZHAO Liang[1,2], WANG Yongtao[1], LI Quanhong[1], WU Xiaomeng[1,*], LIAO Xiaojun[1]

（1.College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, National Engineering Research Center for Fruit and Vegetable Processing, Key Laboratory of Fruit and Vegetable Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing Key laboratory for Food Non-thermal Processing, Beijing 100083, China;
2.Xinghua Industrial Research Center for Food Science and Human Health, China Agricultural University, Xinghua 225700, China）

Abstract: To investigate the changes of lipids and volatile flavor components of Chinese braised pork in brown sauce after sterilization processes, quantitative analysis of the whole lipid components of unpasteurized, pasteurized, and ultra-high pressure (UHP) braised pork in the brown sauce was conducted using ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time of flight mass spectrometry. A total of 251 different lipids were identified. Partial least squares discriminant analysis and hierarchical clustering analysis were used to successfully distinguish the braised pork samples processed with different sterilization methods. Among them, 24 lipid substances were the key compounds to effectively distinguish the lipids, including 15 types of triglycerides (TG), 8 types of phospholipids, and N-acylethanolamine.

收稿日期: 2021−10−28

基金项目: 国家重点研发计划项目（2018YFD0400500）; 国家重点研发计划项目（2018YFD0400805）; 中国农业大学 2115 人才工程资助。

作者简介: 陈君玉（1998−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 营养与食品安全, E-mail: 1245221634@qq.com。

*** 通信作者:** 吴晓蒙（1986−）, 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品包装与食品安全, E-mail: wuxmeng@cau.edu.cn。

According to the relative contents of lipid compounds, the braised meat after UHP sterilization was closer to the control group than the ones pasteurized. Using solid-phase micro-extraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry, the types and contents of volatile components in braised pork under different sterilization methods were compared. A total of 31 volatile flavor components were identified, including 4 types of alcohols, 4 types of acids, 4 types of lipids, 7 types of alkanes, 2 types of ketones, and 9 types of aldehydes and furan. Based on these results, it was found that the UHP sterilization could maintain the original flavor and lipid composition of Chinese braised pork in brown sauce, which had great potential in meat processing and Chinese cuisine preparation.

Key words: Chinese braised pork in brown sauce; lipid components; volatile components; sterilization; pasteurization; ultra-high pressure (UHP) sterilization

红烧肉是以肥瘦相间的肉为主要原料，配以多种辅料和调味料红烧加工而成的一种典型的传统中式肉类菜肴，其风味独特，咸中带甜、肥而不腻、瘦而不柴，深受广大消费者喜爱[1]。随着人们生活水平逐渐提高，社会节奏越来越快，消费者在厨房备餐的时间越来越少，进而对方便快捷的预制菜肴产品的市场需求不断提高。作为中式调理食品和中式快餐中重要的菜肴，将传统红烧肉经加工制成即热食用的肉类方便菜肴调理包，配送至熟食店和便利店等，可弥补红烧肉罐头因高温杀菌对品质破坏较大、保质不保鲜的不足，满足快节奏生活人群对食品营养、安全、美味、方便的追求。

肉类食品富含蛋白质、脂肪、氨基酸、维生素等多种营养成分，是微生物生长繁殖的良好基质。因此，在生产和加工过程中极易受到污染。有效杀灭肉品中的微生物是保障肉品安全的一个重要途径[2]。目前肉制品方便菜肴常用的杀菌方式有热杀菌、辐照杀菌、微波杀菌、超高压杀菌等。其中传统热杀菌虽然在延长保质期方面效果最好，但是对产品质构、颜色、营养等损失较大；辐照杀菌作为一种非常高效的冷杀菌技术，虽然可以有效杀灭或减少肉中的食源性致病微生物和寄生虫，但是也会导致肉风味和色泽的劣变[3]；微波杀菌作为一种新型杀菌方式，具有快速、高效、安全、保鲜等优点，但研究表明不适宜的温度、时间、功率等因素易造成肉质构、感官品质以及风味的改变[4]；而超高压(Ultra-high Pressure, UHP)杀菌作为一种非热杀菌技术，对食物的风味、色素等小分子物质的天然结构及水解[5]几乎无影响，且能够更好地保持食品原有的色香味，此外，UHP 具有很好的杀菌灭酶效果，利于食品的长期储藏[6]。

红烧肉加工过程中脂类物质分解与氧化对风味形成具有重要作用。脂肪酸作为脂肪的主要组成部分，可降解形成游离脂肪酸等风味前体物质，再经过复杂的化学反应产生红烧肉的特征性风味，且肉制品中挥发性香气物质中大部分来自加工过程中脂肪的氧化[7−8]，因此测定红烧肉中脂质的变化是研究红烧肉风味品质的关键。

作为代谢组学的分支之一，脂质组学可以系统、全面地分析研究生物体、组织和细胞中的脂质以及变化机制[9]，其中非靶向脂质组学可以无针对性地对样品脂质的变化情况进行分析，最大程度地反映样品中脂质的变化规律和趋势，从而找出差异标志物[10]。它可以和各种分析方法如核磁共振、近红外光谱、气相色谱-质谱、液相色谱-质谱等结合以评估代谢物水平与外界因素之间的关系[11]，其中，超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱(Ultra Performance Liquid Chromatography Coupled with Quadrupole-Time of Flight Mass Spectrometry, UPLC/Q-TOF-MS)因具有高灵敏度、高选择性、高精密度、高信息采集速度等不可比拟的优势而得到广泛应用[12]。

近些年来，基于固相微萃取-气相色谱-质谱联用技术(Solid Phase Micro-Extraction-Gas Chromatographic-Mass Spectrometric, SPME-GC-MS)能有效地对挥发性物质进行检测，该方法最大程度地保留了原有化合物性状，避免了萃取而带来的杂质且操作连续[13]，采用 SPME-GC-MS 研究挥发性成分的应用已十分广泛。王学敬等[14]利用该法分析出了德州扒鸡中 57 种挥发性风味成分；肖虹等[15]也从冷却肉中共测出 25 种挥发性成分；孟一等[16]利用顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用技术检测出牛肉中 37 种特征性挥发成分。

关于红烧肉的研究主要集中在以五花肉为原料的工艺研究，而以肥瘦相间的肉的研究较少，基于此，本研究以猪前肩肉为原料，在前期优化后的红烧肉制作工艺基础上进行巴氏、UHP 杀菌处理，采用 UPLC-Q-TOF-MS 结合非靶向脂质组学技术对处理后红烧肉的脂质成分进行分析，利用主成分分析(Principal Component Analysis, PCA)、偏最小二乘法判别分析(Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA)和层次聚类分析(Hierarchical Clustering Analysis, HCA)，旨在探明不同杀菌方式间红烧肉脂质含量和分布的差异性；采用 SPME-GC-MS 检测了不同杀菌方式后红烧肉样品中挥发性物质的种类和含量，以此来研究产品风味物质的变化规律，以期为企业红烧肉产品杀菌方式的选择提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

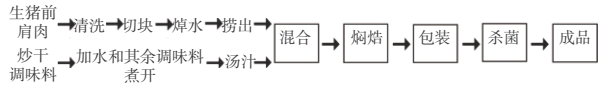
新鲜猪前尖肉、葱、姜、蒜、花椒、大料、桂皮、干辣椒、香叶　购于北京新发地农贸市场；食盐、鸡精、白砂糖、色拉油、老抽酱油、东古一品鲜、料酒、

番茄酱、红曲红　购于当地超市；炸酱、糖色　自制；甲醇、乙腈、异丙醇、甲酸铵　均为色谱纯，赛默飞世尔科技公司。

DHG-9053A 电热鼓风干燥箱　上海精宏实验设备有限公司；TAXT Plus 质构仪　英国 Stable Micro System 公司；Color Quest XE 色差仪　美国 HunterLab 公司；Agilent 7890B/5977A 气相色谱质谱联用仪　美国安捷伦科技有限公司；Sciex Triple TOF6600 离子型淌度超高分辨飞行时间质谱仪　美国 AB Sciex 公司；HPP-30L 超高压设备　北京速原中天。

1.2　实验方法

1.2.1　样品制备



将 500 g 猪前肩肉自然解冻，去除淋巴、碎骨、伤肉、淤血、毛和其它杂质后，洗净、切成 1 cm×1.5 cm×3 cm 的带皮长方体并在 100 ℃ 沸水中焯水 8 min；将 7 g 葱、6 g 姜、4 g 蒜洗净后切碎放置到纱布中包裹，制得调料包备用；0.7 g 花椒、1 g大料、1 g 干辣椒（即干调味料）洗净后在锅中炒制20 min 后盛出，将炒制后的干调味料、调料包和洗净后的 1 g 桂皮、0.3 g 香叶放入水中煮制，滤出调料取汤汁备用；将焯水后的猪肉块加入煮好的汤汁中，加入鸡精 3 g、色拉油 10 g、酱油 7 g、料酒 10 g、番茄酱 5 g、炸酱 9 g、红曲红 0.15 g、糖色 10 g，在 90 ℃下焖焙 35 min，最后加入食盐 6 g、白砂糖 6 g，得到红烧肉产品并真空包装后，分别进行巴氏杀菌（80 ℃、10 min）、UHP 杀菌（600 MPa、5 min）得到成品，以未杀菌组作为对照组。

1.2.2　脂质组学测定　样品预处理：参考 Sarafian 等[17] 的方法。称取 300 mg 搅碎的红烧肉末于 4 mL 离心管中，加入 2.7 mL 异丙醇，涡旋混合 10 s 后超声处理 10 min。将混合物在−20 ℃ 下放置 1 h 以上备用。将样品在室温下涡旋混匀后在 4 ℃ 下以 10000 r/min 离心 10 min。上清液过 0.22 μm 聚偏二氟乙烯膜后准备质谱分析。

色谱条件：色谱柱：CSH C_{18} 柱（50 mm×2.1 mm，1.7 μm）；柱温：55 ℃；流动相 A：含有 0.1% 甲酸和 10 mmol/L 甲酸铵的乙腈/水（60/40，v/v）溶液；流动相 B：含有 0.1% 甲酸和 10 mmol/L 甲酸铵的异丙醇/乙腈（90/10，v/v）溶液；流速：300 μL/min。梯度洗脱程序：0~3 min，98% A；3~5 min，90% A；5~6 min，50% A；6~9 min，40% A；9~11 min，30% A；11~15 min，98% A；进样量 2 μL。

质谱条件：正离子模式检测；扫描范围 m/z 50~2000 Da；去簇电压：80.0 V；离子源温度：550 ℃；雾化气：50 psi；辅助加热气：50 psi；气帘气：25 psi；喷雾电压：5500 V；扫描持续时间：15 min，周期：818，循环时间：1.1003 s；其中，一级质谱和二级质谱碰撞能量分别为 10 和 30 eV，积累时间分别为 0.049982 和 0.100030 s/spectra。

每个样品各取 2 个重复，作为 2 个平行进行各项指标的测定。

1.2.3　挥发性成分测定　红烧肉挥发性成分测定参考王瑞澄等[18] 的方法并略做修改。

固相微萃取：取杀菌后红烧肉样品于-20 ℃ 冷冻，用打浆机搅碎混匀后在液氮下速冻后，研磨成粉末。称取 8 g 样品转移至 40 mL 的顶空瓶中，并加入 1 μL 0.816 mg/mL 的 2-甲基-3-庚酮作为内标物。在 60 ℃ 水浴条件下将老化的 DVB/CAR/PDMS 50/30 μm 萃取头插入样品瓶中，顶空吸附 40 min。吸附后的萃取头取出并插入 GC 进样口，于 250 ℃ 解吸 5 min，同时进行 GC-MS 联机分析。

色谱条件：DB-WAX 毛细管色谱柱（30 m×0.25 mm，0.25 μm）；进样口温度 250 °C，分流比 3∶1；载气为 He，流速 1.2 mL/min；升温程序：柱温 40 ℃，保持 3 min，以 5 °C/min 升至 200 ℃，保持 1 min，然后以 10 °C/min 升至 230 ℃，保持 3 min。

质谱条件：电子电离源；电子能量 70 eV；离子源温度 230 ℃；接口温度 280 ℃；四极杆温度为 150 ℃；质量扫描范围 m/z 45~350。

定性方法：挥发性成分的定性分析通过不同成分在 DB-WAX 色谱柱上的线性保留指数（Linear Retention Index，LRI）并结合 NIST14 谱库检索进行。LRI 可通过配置正构系列烷烃混合标样（C_6-C_{30}）得到保留时间并根据下式进行计算[19]。

$$LRI = 100N + 100\frac{t_{R_a} - t_{R_N}}{t_{R(N+n)} - t_{R_N}} \quad 式（1）$$

式中：N 为色谱图中位于目标物质左侧正构烷烃的碳原子数；n 为位于目标物质两侧的正构烷烃的碳分子数之差；t_{R_a}、t_{R_N}、t_R分别是色谱图中待测物质、待测物质左侧和右侧正构烷烃的保留时间，min。

定量方法：用 1 μL 的 0.816 μg/μL 的 2-甲基-3-庚酮为内标。对气相色谱-质谱所测得的香气物质浓度进行数据处理，假设其相对内标校正因子为 1，根据下式进行计算：

$$m_s = \frac{m_i \times A_s}{A_i \times m_0 \times 1000} \quad 式（2）$$

式中：m_s 为挥发性物质含量，μg/kg；m_i 为内标物含量，μg；m_0 为实验所用肉的质量，g；A_s 为挥发性物质峰面积；A_i 内标物峰面积。

每个样品各取 3 个重复，作为 3 个平行进行各项指标的测定。

1.3　数据处理

利用 MS-DIAL 中自带质谱数据包对 UPLC-Q-TOF-MS 得到的原始数据进行特征峰的提取和处理，并利用 SIMCA-P 14.1 软件进行多元统计分析（PCA、PLS-DA）；利用 Origin 2019 绘制聚类热图；利用 SPSS 22.0 进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 基于 UPLC-Q-TOF-MS 的脂质组学分析

2.1.1 不同杀菌方式红烧肉脂质成分的分布分析

本研究采用非靶向脂质组学方法对 3 种杀菌方法处理后的红烧肉进行了脂质组学分析。3 种处理方式中，累计鉴定出包括甘油三酯（Triglyceride, TG）、磷脂酰胆碱（Phosphatidylchlines, PC）、磷脂酰乙醇胺（Phosphatidylethanolamines, PE）、甘油二脂（Diglyceride, DG）等在内的 251 种脂质化合物。

因红烧肉的脂质成分复杂、难以分析，而多元统计分析手段能够在多个对象和多个指标互相关联的情况下分析目标样品的统计规律，因此被广泛运用于组学分析领域。其中 PCA 作为常见的统计学分析手段，是将原始的多维变量按一定权重组合产生新的主成分，PCA 图可体现样本之间的离散和聚集趋势[20−21]。本研究基于不同杀菌方式红烧肉的脂质成分的相对含量建立了相应的 PCA 模型，如图 1 所示，在 PCA 模型上，虽所有的样品都在 95% 的置信区间内，但 R^2X=0.777, Q^2=0.336，依据脂质的组成，对照组、巴氏杀菌组和 UHP 杀菌组红烧肉样品无法较好地进行区分。

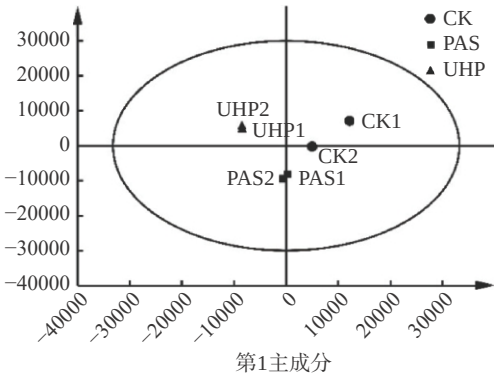


图 1 不同杀菌方式红烧肉脂质成分 PCA 得分图

Fig.1 PCA score plot of lipid components in braised pork in different sterilization methods

注：CK：对照组；PAS：巴氏杀菌组；UHP：超高压杀菌组；图 2，图 4 同。

因 PCA 采用无监督的降维分析方法，存在与研究目的无关的组内误差以及随机误差，不利于分组信息的准确性。为了准确地确定各组样品的差异，进一步采用有监督模式识别的 PLS-DA。PLS-DA 通过对不同处理样本（如观测样本、对照样本）的特性分别进行训练以产生训练集，并检验训练集的可信度，由于其降维能力和处理多重共线性和相关变量的能力，且能忽略组内误差、消除与研究目的无关的随机误差，是代谢组数据分类和回归的经典工具[22−24]。

根据红烧肉样品的 251 种脂质成分组成和相对含量，对 3 种处理方式的红烧肉样品进行 PLS-DA 分析，建立各个处理方式红烧肉的判别分析模型。由图 2 所知，样品均在 95% 的置信区间内，各样表现出明显的聚类趋势，未发现离群样本点，说明建立的 PLS-DA 模型可对不同杀菌方式的红烧肉进行分类，其中对照组和 UHP 杀菌组在第 1 主成分上进行分离，对照组和巴氏杀菌组主要通过第 2 主成分进行有效区分，巴氏杀菌组和 UHP 杀菌组在第 1 主成分和第 2 主成分上均可以进行区分。结果表明，本研究建立的 PLS-DA 模型有良好的拟合参数，R^2X=0.769，R^2X 越接近 1，模型越稳定[25]，R^2Y(cum)=0.963，该模型能够解释 96.3% 的原始数据；Q^2(cum)=0.845，Q^2 大于 0.5，说明模型的预测能力强。

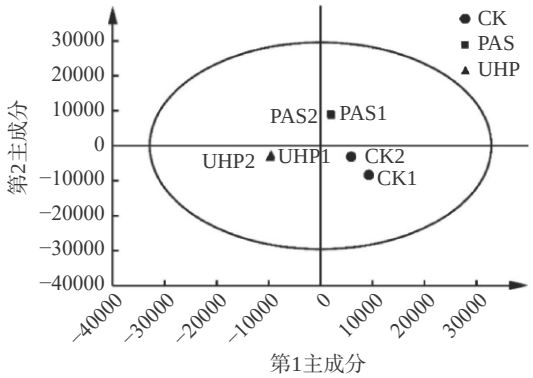


图 2 不同杀菌方式红烧肉脂质成分 PLS-DA 得分图

Fig.2 PLS-DA score plot of lipid components in braised pork in different sterilization methods

由于当变量数量大于样品数量时，使用有监督判别方法进行分析时易产生过拟合现象，因此需要使用置换检验方法考察 PLS-DA 在无差异情况下的建模效果[24]。如图 3 所示，经过 200 次交叉验证之后，3 个模型中 Q^2 回归直线在 Y 轴的截距均小于 0，表明该 PLS-DA 判别模型不存在过拟合现象，模型较为可靠，可进行后续差异性成分分析。

2.1.2 不同杀菌方式红烧肉脂质成分的差异分析

变量重要性预测（variable importance in the projection, VIP）值可以量化 PLS-DA 模型的每个变量对分类的贡献，VIP 值越大，该脂质成分的含量在不同杀菌方式的红烧肉样品之间的差异越大，对分类起着越关键的作用，通常认为 VIP 值大于 1 的变量在不同类别之间差异显著，对分类起着重要作用，同时结合 t 检验的 P 值（P<0.05）比较分析不同组样品中的具体差异性表达化合物[25−26]。寻找差异化合物并鉴定结果如表 1 所示，不同杀菌方式的红烧肉中显著差异化合物有 24 个，包括 15 种 TG、4 种 PC、3 种 PE、1 种溶血磷脂酰胆碱（lyso-PC, LPC）以及 1 种 N-酰基乙醇胺（N-acylethanolamine, NAE）。

采用次聚类分析法对杀菌方式的红烧肉中的差异化合物进行分析，结果见图 4。图中颜色表示含量，红色表示相对含量较高，绿色表示相对含量较低，通过对鉴定的化合物进行 HCA 后，从图中可以看出不同杀菌方式的红烧肉中脂质化合物的含量具有显著差别，可以根据脂质种类区分每组杀菌方式。

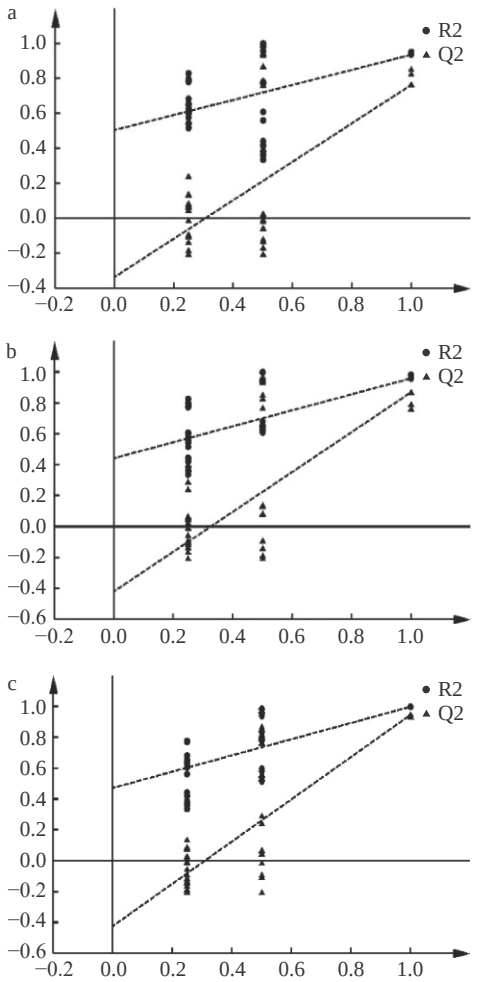


图 3　不同杀菌方式红烧肉脂质成分 PLS-DA 模型置换验证图

Fig.3　PLS-DA model replacement validation plots of lipid components in braised pork in different sterilization methods

注：a：对照组；b：巴氏杀菌组；c：超高压杀菌组。

经过巴氏杀菌以及 UHP 处理后，红烧肉中的 TG 种类发生较大改变，TG 中序号 1~4、6~8 类在巴氏杀菌中含量增加，7、8、10、14 类在 UHP 处理组含量增加，而其原有的 TG 种类含量降低；除 PE(O-40:9)、PE(O-38:8)、LPC 18:2 外，其余磷脂均有不同程度的增加，且 UHP 处理后磷脂相对含量总体高于巴氏杀菌，这可能与磷脂的长链多不饱和脂肪酸含量

表 1　PLS-DA 模型中 VIP 值大于 1、*P* 值小于 0.05 的 24 种脂质化合物

Table 1　The 24 lipid components with VIP>1, *P*<0.05 in PLS-DA model

序号	化合物	VIP
1	TG 46:2;TG（10:0/18:1/18:1）	1.50
2	TG 46:1;TG（14:0/14:0/18:1）	1.09
3	TG 56:2;TG（16:0/20:1/20:1）	2.02
4	TG 54:2;TG（16:0/18:1/20:1）	3.35
5	PC（O-36:3）	1.03
6	TG 56:7;TG（18:1/18:1/20:5）	1.11
7	TG 56:5;TG（18:1/18:1/20:3）	1.15
8	TG 50:2;TG（16:0/16:1/18:1）	2.84
9	PC 35:4;PC（18:0/17:4）	1.40
10	TG 54:5;(TG 18:1/18:2/18:2）	3.38
11	PE（P-38:5）;PE（P-18:1/20:4）	1.10
12	PC 36:3	1.75
13	PC 36:3;PC（18:1/18:2）	2.45
14	TG 48:2;TG（16:0/16:1/16:1）	1.76
15	TG 54:6;TG（18:2/18:2/18:2）	3.76
16	TG 54:8;TG（18:2/18:3/18:3）	1.36
17	TG 56:2;TG（20:0/18:1/18:1）	2.11
18	PE（O-40:9）	1.26
19	TG（52:3;1O）;TG（16:0/18:1/18:2;1O）	1.02
20	TG 54:1;TG（18:0/18:0/18:1）	2.77
21	TG 52:5;TG（16:0/18:2/18:3）	1.35
22	PE（O-38:8）	1.36
23	LPC 18:2	1.16
24	NAE 4:0	1.07

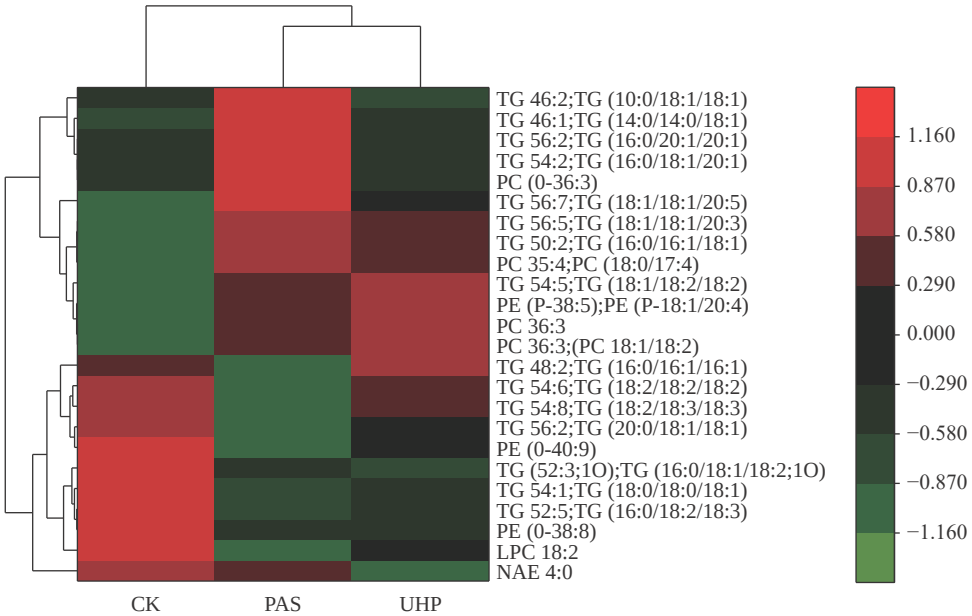


图 4　24 种关键差异脂质成分在不同杀菌方式红烧肉中的含量分布热图

Fig.4　Heat map of 24 key lipid components among braised pork in different sterilization methods

高，巴氏杀菌温度高使得磷脂容易降解有关[27]。研究表明，在加热过程中红烧肉脂肪组织中结缔组织受热收缩，致使其包裹的脂肪细胞受到较大的压力后破碎，另一方面，脂肪受热后熔化分解，产生脂肪酸、风味物质等，也会使脂肪含量发生变化[28]，而在压力处理的过程中，红烧肉中的肌红蛋白会转变为变性的铁肌红蛋白，同时释放三价铁离子，促进脂肪氧化[29]，另一方面，超高压作用导致肌原纤维蛋白与游离脂肪酸之间静电力、范德华力、疏水力等相互作用的改变而引起了游离脂肪酸的释放[30]，进一步造成了两种杀菌方式下红烧肉脂质的变化。

2.2 基于 SPME-GC-MS 的挥发性成分分析

肉制品中挥发性成分的种类及相对含量是评价肉制品杀菌方式好坏的重要指标[31]。利用 SPME-GC-MS 方法对 3 种不同处理方式红烧肉进行挥发性化合物检测及定性定量分析。如表 2 所示，共鉴定出 31 种挥发性风味成分，包括 4 种醇、4 种酸、4 种脂、7 种烃、2 种酮、9 种醛和 1 种呋喃。

醇类物质主要来源于脂肪氧化和 Strecker 降解反应，饱和脂肪醇的阈值较高，对整体风味贡献相对较小，而不饱和醇的阈值较低，对风味有一定贡献[32]。肉桂醇为含有油脂香气的不饱和醇[33]，与对

表 2 不同杀菌方式对红烧肉挥发性成分的影响

Table 2 Effect of different pasteurization methods on volatile components of stewed pork

序号	化合物	线性保留指数		含量(μg/kg)			定性方法
		计算值	引用值	对照	巴氏杀菌	超高压杀菌	
	醇类						
1	正戊醇	762	759	1.95±0.12^{b}	1.32±0.04^{c}	2.43±0.13^{a}	MS/RI
2	正辛醇	1053	1061	1.76±0.10^{b}	1.65±0.08^{c}	2.75±0.15^{a}	MS/RI
3	3-莰醇(+)	1257	1259	1.87±0.09^{a}	1.27±0.05^{b}	1.86±0.10^{a}	MS/RI
4	肉桂醇	NA	NA	1.13±0.03^{a}	0.93±0.02^{b}	1.12±0.03^{a}	MS
	酸类						
5	己酸	973	982	1.38±0.07^{a}	1.43±0.06^{a}	0.92±0.03^{b}	MS/RI
6	辛酸	1168	1161	2.14±0.14^{a}	1.42±0.07^{b}	0.43±0.02^{c}	MS/RI
7	壬酸	1274	1280	1.59±0.09^{b}	2.27±0.15^{a}	1.32±0.08^{c}	MS/RI
8	正癸酸	1361	1353	1.42±0.08^{a}	0.76±0.04^{b}	1.41±0.07^{a}	MS/RI
	酯类						
9	正己酸乙烯酯	NA	NA	1.42±0.06^{b}	1.92±0.10^{a}	1.39±0.07^{b}	MS
10	2-糠酸甲酯	NA	NA	1.15±0.05^{b}	1.25±0.04^{a}	1.12±0.06^{b}	MS
11	苯甲酸乙基己酯	NA	NA	0.98±0.04^{b}	1.28±0.04^{a}	0.99±0.03^{b}	MS
12	辛酸乙烯酯	1324	1315	0.93±0.04^{a}	0.97±0.04^{a}	0.93±0.03^{a}	MS
	烃类						
13	正二十一烷	2357	2341	14.32±0.34^{a}	12.37±0.33^{b}	14.35±0.46^{a}	MS/RI
14	正十八烷	1785	1791	2.47±0.03^{b}	3.24±0.05^{a}	2.45±0.02^{b}	MS/RI
15	反式-1,2二甲基环戊烷	NA	NA	0.43±0.02^{a}	0.24±0.01^{b}	0.46±0.01^{a}	MS
16	正十九烷	1964	1957	4.18±0.05^{b}	5.32±0.06^{a}	4.20±0.04^{b}	MS/RI
17	十二烷	1202	1211	0.42±0.02^{b}	0.51±0.03^{a}	0.41±0.02^{b}	MS/RI
18	柠檬烯	1194	1205	0.43±0.02^{b}	0.63±0.02^{a}	0.24±0.01^{c}	MS/RI
19	月桂烯	1153	1143	20.35±0.43^{a}	19.27±0.41^{b}	18.43±0.36^{c}	MS/RI
	酮类						
20	3-羟基-2-丁酮	618	622	3.44±0.03^{a}	2.92±0.02^{b}	3.37±0.02^{a}	MS/RI
21	2,3-辛二酮	991	995	0.71±0.01^{a}	0.43±0.01^{b}	0.69±0.01^{a}	MS/RI
	醛类						
22	正己醛	851	858	5.52±0.05^{a}	5.32±0.04^{a}	3.46±0.03^{b}	MS/RI
23	正辛醛	1061	1058	0.74±0.01^{a}	0.71±0.01^{a}	0.72±0.01^{a}	MS/RI
24	壬醛	1152	1154	2.53±0.02^{a}	2.43±0.03^{b}	2.55±0.02^{a}	MS/RI
25	苯甲醛	942	938	0.65±0.02^{a}	0.92±0.01^{b}	0.67±0.01^{a}	MS/RI
26	反式-2-癸烯醛	1206	1213	3.39±0.03^{c}	3.87±0.02^{a}	3.61±0.02^{b}	MS/RI
27	柠檬醛	1423	1432	3.45±0.04^{a}	3.34±0.04^{b}	3.42±0.03^{a}	MS/RI
28	十三醛	1556	1562	0.82±0.02^{b}	0.89±0.02^{a}	0.80±0.01^{b}	MS/RI
29	反式肉桂醛	NA	NA	5.28±0.04^{b}	5.42±0.02^{a}	5.31±0.03^{b}	MS
30	糠醛	NA	NA	2.45±0.02^{b}	2.74±0.03^{a}	2.51±0.02^{b}	MS
	呋喃						
31	2-正戊基呋喃	NA	NA	4.31±0.04^{a}	5.21±0.04^{a}	4.35±0.03^{a}	MS

注：上标不同字母标注表明同一行中数据差异显著（P<0.05）；NA表示未查到线性保留指数。

照组相比，巴氏杀菌样品中不饱和醇肉桂醇的含量显著降低（P<0.05），而 UHP 样品中未发生显著变化（P>0.05）。

酯类物质常具有水果和清甜香气，主要来源于加热过程中猪肉脂质氧化产生的醇与游离脂肪酸的相互作用，为肉带来特征香气[8,34]，但由表 2 可知，酯类在红烧肉中种类较少且相对含量低，且因酯类物质的阈值较高，对风味的影响较小[35]，因此对红烧肉风味贡献不突出。

烃类物质在各组样品中均具有较高的含量，它主要来源于脂肪酸烷氧自由基的均裂，在检测到的 7 种烃类物质中，饱和烃类占 5 种，且 3 组样品之间差异不大。由于烃类物质具有较高的阈值，一般认为对红烧肉香气无特殊贡献，但有些可能是形成杂环化合物的重要中间体，有助于提高红烧肉的整体风味质量[36−37]。巴氏杀菌组的烷烃化合物与其他组存在较大差异，但超高压杀菌组和未杀菌组物质含量差异不大，揭示饱和烃类物质可能受温度影响较大，而三组之间烯烃化合物相对差异较小，表明烯烃化合物受温度影响较小[34]。

在红烧肉氧化降解生成的物质中，醛类是最丰富的挥发性化合物，三种样品中共检测出 9 类化合物，醛的阈值一般很低，具有脂肪香味，是肉品香味的主要构成部分[36]。由表 2 可知，3 组样品未杀菌组-巴氏杀菌组-超高压杀菌组醛类物质含量比为 1∶1.03∶0.93，可以看出巴氏杀菌组醛类物质的含量高于其他 2 组，而超高压杀菌组含量最低，这是由于醛类物质主要来源于脂肪酸的受热降解、氧化。含量较多的几种物质中，正己醛是亚油酸的氧化产物，浓度较低时，具有清香和草香味，浓度较高时，具有酸败味和辛辣味[38−39]，壬醛具有玫瑰、柑橘等香气，有强的油脂气味，存在于肉桂油中，能够使肉香更浓郁[40]。反式肉桂醛大量存在于肉桂等植物体内，具有肉桂芳香气味，不饱和醛大多具有愉快的香气且阈值较低，如反式-2-癸烯醛，此物质具有脂肪香味且带有猪肉香韵[41−42]，糠醛具有焙烤香、苦杏仁气味，呈黄棕色，可能对红烧肉鲜艳的色泽有贡献[8,33]。

酮类化合物主要来自于脂肪或醇类的氧化降解作用和美拉德反应，因其阈值远高于醛类，一般认为对风味影响不大，主要对其他风味物质起辅助作用，使肉类产品香味更加饱满，有层次感[40]。3-羟基-2-丁酮具有甜香、奶制品香，并带有脂肪的油腻气息，2,3-辛二酮稀释有油脂香味[43]，与对照组相比，巴氏杀菌后红烧肉中两种酮的相对含量均明显降低（P<0.05），而 UHP 后无明显影响，UHP 能更好地维持红烧肉的原有香气。

呋喃物质主要来源于美拉德反应以及氨基酸、硫胺素的热降解反应，虽含量较少，但阈值较低，对风味具有较大影响[37]。2-正戊基呋喃具有豆香、果香、青香及类似蔬菜的香韵[40]；巴氏杀菌后，产品中呋喃物质略有升高。

酸类化合物主要来自脂肪的水解以及脂肪氧化过程中产生的小分子脂肪酸，对整体的风味起到协调、平衡的作用[8]。本实验中共检测到 4 种酸类化合物，其中壬酸具有一定的脂肪香，己酸具有一定的腐臭味，辛酸具有一定的汗味，正癸酸具有一定的酸腐味和脂肪味[44−45]，与对照组相比，巴氏杀菌在增强了红烧肉原有的香味的同时，也增加了霉臭味等不良风味，而超高压杀菌可以减弱红烧肉的脂肪臭味和酸腐味，更好地保持和突出红烧肉的特征香气物质。

3　结论

本研究通过 UPLC-Q-TOF-MS 结合非靶向代谢组学技术对不同杀菌方式下的红烧肉的脂质成分进行测定并最终筛选出 24 种关键性脂质物质且主要差异物质为 TG，且该技术可有效区分不同杀菌方式处理的红烧肉。根据脂质化合物的相对含量，显示 UHP 杀菌组更接近于对照组。采用 SPEM-GC-MS 技术，对不同杀菌方式处理的红烧肉挥发性成分进行检测并鉴定出包括 4 种醇、4 种酸、4 种脂、7 种烃、2 种酮、9 种醛和 1 种呋喃物质在内的 31 种化合物，且不同杀菌方式处理的红烧肉中挥发性成分含量差异较明显。综合看来，不同杀菌方式均会对脂质化合物和风味物质产生一定的影响，但从脂质成分和挥发性成分方面来看，UHP 较巴氏杀菌对产品的影响较小。

参考文献

[1] 刘登勇，谭阳，董丽. 红烧肉的传承、挖掘与提升[J]. 食品研究与开发，2015，36(13)：134−138. [LIU D Y, TAN Y, DONG L. The inheritance, exploration and advance of stewed pork with brown sauce[J]. Food Research and Development, 2015, 36(13): 134−138.]

[2] 白艳红，李全顺，毛多斌，等. 电子束辐照对冷却猪肉杀菌保鲜效果的研究[J]. 辐射研究与辐射工艺学报，2009，27(2)：89−94. [BAI Y H, LI Q S, MAO D B, et al. The effects of electron beam irradiation on sterilization and preservation of chilled pork[J]. J Radiat Res Radiat Process, 2009, 27(2): 89−94.]

[3] 李成梁，靳国锋，马素敏，等. 辐照对肉品品质影响及控制研究进展[J]. 食品科学，2016，37(21)：271−278. [LI C L, JIN G F, MA S M, et al. Progress in understanding and controlling the detrimental effects of irradiation treatment on meat quality[J]. Food Science, 2016, 37(21): 271−278.]

[4] 张祎敬，秦丽娟，宋贤良，等. 微波杀菌对盐鸡翅根杀菌效果及品质影响[J]. 食品工业科技，2016，37(20)：245−248. [ZHANG Y J, QIN L Y, SONG X L, et al. Effects of microwave sterilization on sterilization effect and quality of salt-baked chicken wings[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(20): 245−248.]

[5] 赵俊芳，赵玉生. 初探食品工业中的超高压灭菌技术[J]. 包装与食品机械，2006(5)：27−30. [ZHAO J F, ZHAO Y S. Discussion on the ultra- high pressure sterilization technology in food industry[J]. Packaging and Food Machinery, 2006(5): 27−30.]

[6] B B BOYNTON, CA SIMS, STEVEN SARGENT, et al. Quality and stability of precut mangos and carambolas subjected to high-pressure processing[J]. Journal of Food Science, 2002, 67(1): 405−415.
[7] 纪有华, 王荣兰. 红烧肉风味形成途径探讨[J]. 扬州大学烹饪学报, 2006(2): 19−23. [JI Y H, WANG R L. Discussion on the ways of flavour development in stewed pork with brown sauce[J]. Culinary Science Journal of Yangzhou University, 2006(2): 19−23.]
[8] 史笑娜, 黄峰, 张良, 等. 红烧肉加工过程中脂肪降解、氧化和挥发性风味物质的变化研究[J]. 现代食品科技, 2017, 33(3): 257−265. [SHI X N, HUANG F, ZHANG L, et al. Changes in lipolysis, lipid oxidation, and volatile flavor compounds during the processing of red braised pork[J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(3): 257−265.]
[9] XIANLIN H, W G R. Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: A bridge to lipidomics[J]. Journal of Lipid Research, 2003, 44(6): 1071−1079.
[10] 缪秋韵, 高雯, 李杰, 等. 脂质组学分析方法进展及其在中药研究中的应用[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(9): 1760−1766. [MIAO Q Y, GAO W, LI J, et al. Progress on lipidomics analytical methods and their applications in studies of traditional Chinese medicines[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2019, 44(9): 1760−1766.]
[11] 徐春晖, 王远兴. 基于 UPLC-QTOF-MS 结合非靶向代谢组学鉴别三种江西名茶[J]. 食品科学,2022,43(02):316-323. DOI: 10.7506/spkx1002-6630-20210105-042. [XU C H, WANG Y X. Discrimination of three famous tea in Jiangxi based on UPLC-QTOF-MS combined with non-targeted metabonomics[J]. Food Science,2022,43(02):316-323. DOI: 10.7506/spkx1002-6630-20210105-042.]
[12] 张杨, 冯宝民, 卢轩. UPLC/Q-TOF-MS 联用技术在药物分析中的应用进展[J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(11): 1992−1996. [ZHANG Y, FENG B M, LU X. Research progress on application of UPLC/Q-TOF-MS in pharmaceutical analysis[J]. Natural Product Research and Development, 2017, 29(11): 1992−1996.]
[13] 何余勤, 胡荣锁, 张海德, 等. 基于电子鼻技术检测不同焙烤程度咖啡的特征性香气[J]. 农业工程学报, 2015, 31(18): 247−255. [HE Y Q, HU R S, ZHANG H D, et al. Characteristic aroma detection of coffee at different roasting degree based on electronic nose[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2015, 31(18): 247−255.]
[14] 王学敬, 李聪, 王玉峰, 等. SPME-GC-MS 法分析德州扒鸡挥发性风味成分的条件优化及成分分析[J]. 南京农业大学学报, 2016, 39(3): 495−501. [WANG X J, LI C, WANG Y F, et al. Condition optimization and analysis of volatile flavour compounds in Dezhou braised chicken by SPME-GC-MS[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2016, 39(3): 495−501.]
[15] 肖虹, 谢晶. SPME-GC-MS 法测定冷却肉的挥发性成分[J]. 食品科学, 2010, 31(20): 406−409. [XIAO H, XIE J. Determination of volatile components of chilled pork based on SPME-GC-MS[J]. Food Science, 2010, 31(20): 406−409.]
[16] 孟一, 张玉华, 姜沛宏, 等. 不同新鲜度牛肉特征性挥发成分的研究[J]. 现代食品科技, 2017, 33(4): 271−277. [MENG Y, ZHANG Y H, JIANG P H, et al. Study of the characteristic volatile components in beef at different degrees of freshness[J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(4): 271−277.]
[17] SARAFIAN M H, GAUDIN M, LEWIS M R, et al. Objective set of criteria for optimization of sample preparation procedures for ultra-high throughput untargeted blood plasma lipid profiling by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Analytical Chemistry, 2014, 86(12): 5766−5774.
[18] 王瑞澄, 周芳伊, 黄峰, 等. 毛氏红烧肉挥发性风味物质分析方法的建立[J]. 食品科技, 2019, 44(4): 308−313. [WANG R C, ZHOU F Y, HUANG F. Establishment of analysis method for volatile flavor compounds in Mao red braised pork[J]. Food Science and Technology, 2019, 44(4): 308−313.]
[19] ZHAO C, LIANG Y, FANG H, et al. Temperature-programmed retention indices for gas chromatography-mass spectroscopy analysis of plant essential oils[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1096(1): 76−85.
[20] 胡谦, 张九凯, 韩建勋, 等. 基于 UPLC-QTOF-MS 技术的压榨和浸出油茶籽油甘油酯组成比较分析[J]. 食品科学, 2021, 42(2): 235−240. [HU Q, ZHANG J K, HAN J X, et al. Comparative analysis of the glyceride compositions of pressed and extracted camellia seed oil using ultra-high performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. Food Science, 2021, 42(2): 235−240.]
[21] 李鑫磊, 俞晓敏, 林军, 等. 基于非靶向代谢组学的白茶与绿茶、乌龙茶和红茶代谢产物特征比较[J]. 食品科学, 2020, 41(12): 197−203. [LI X L, YU X M, LIN J, et al. Comparative metabolite characteristics of white tea with green tea, oolong tea and black tea based on non-targeted metabolomics approach[J]. Food Science, 2020, 41(12): 197−203.]
[22] CHUEN L L, AZIZ J A. Predictive modelling of colossal ATR-FTIR spectral data using PLS-DA: Empirical differences between PLS1-DA and PLS2-DA algorithms[J]. The Analyst, 2019, 144(8).
[23] 石婷, 陈倩, 闫小丽, 等. 核磁共振氢谱结合化学计量学快速检测掺假茶油[J]. 食品科学, 2018, 39(22): 241−248. [SHI T, CHEN Q, YAN X L, et al. ^{1}H NMR spectroscopy combined with chemometrics for the rapid detection of adulterated camellia oil (*Camellia oleifera* Abel.)[J]. Food Science, 2018, 39(22): 241−248.]
[24] SUYOUNG KANG, 朱荫, 郑新强, 等. 不同季节绿茶香气成分的判别与聚类分析[J]. 食品科学, 2018, 39(14): 268−275. [SUYOUNG K, ZHU Y, ZHENG X Q, et al. Multivariate statistical analysis of volatiles compounds in green teas from different harvesting seasons[J]. Food Science, 2018, 39(14): 268−275.]
[25] 田甜, 韦锦坚, 文金华, 等. 不同季节凌云白毫绿茶的香气成分差异分析[J]. 食品科学, 2020, 41(22): 252−259. [TIAN T, WEI J J, WEN J H, et al. Seasonal variability of aroma components of lingyun pekoe green tea[J]. Food Science, 2020, 41(22): 252−259.]

［26］ WOLD S, SJÖSTRÖM M, ERIKSSON L. PLS-regression: A basic tool of chemometrics[J]. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 2001, 58(2): 109−130.
［27］ 许雪萍. 不同加工方式处理对猪肉中脂质的影响研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2018. ［XU X P. Effect of different processing methods on lipid in pork[D]. Nanchang: Nanchang University, 2018.］
［28］ 刘登勇, 谭阳, 盖圣美, 等. 猪五花肉红烧过程中脂肪和脂肪酸的变化规律[J]. 食品科学, 2015, 36(23): 28−32. ［LIU D Y, TAN Y, GAI S M, et al. Changes in fatty acid composition and fat content during processing of braised pork belly in brown sauce[J]. Food Science, 2015, 36(23): 28−32.］
［29］ 董士楷, 张志祥, 尚海涛, 等. 腌制类食品的超高压处理研究进展[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(10): 14−16,20. ［DONF S K, ZHANG Z X, SHANG H T, et al. Review of the research on the ultra-high pressure treatment of pickled food[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2018, 46(10): 14−16,20.］
［30］ 崔燕, 林旭东, 康孟利, 等. 超高压技术在水产品贮藏与加工中的应用研究进展[J]. 食品科学, 2016, 37(21): 291−299. ［CUI Y, LIN X D, KANG M L, et al. Advances in application of ultra high pressure for preservation and processing of aquatic products[J]. Food Science, 2016, 37(21): 291−299.］
［31］ 黄易安, 徐耀. 不同杀菌方式对酱卤肉制品中风味成分的影响[J]. 中国调味品, 2019, 44(4): 89−92,112. ［HUANG Y A, XU Y. Effects of different sterilization ways on flavor components in marinated meat products[J]. China Condiment, 2019, 44(4): 89−92,112.］
［32］ 刘登勇, 赵志南, 吴金城, 等. 基于 SPME-GC-MS 分析熏制材料对熏鸡腿挥发性风味物质的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(24): 220−227. ［LIU D Y, ZHAO Z N, WU J C, et al. Effects of different smoking materials on volatile flavor compounds in smoked chicken thighs[J]. Food Science, 2019, 40(24): 220−227.］
［33］ 范丽, 徐晓东, 宋泽, 等. 自制调味汁烹饪红烧肉中关键香气活性化合物的分析研究[J]. 现代食品科技, 2017, 33(7): 245−253,230. ［FAN L, XU X D, SONG Z, et al. Analysis of the key aroma-active compounds in braised pork[J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(7): 245−253,230.］
［34］ 张哲奇, 臧明伍, 张凯华, 等. 关键工艺对粉蒸肉挥发性特征风味形成的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(4): 222−228. ［ZHANG Z Q, ZANG M W, ZHANG K H, et al. Effect of key processing steps on formation of volatile flavor components in steamed pork with rice[J]. Food Science, 2019, 40(4): 222−228.］
［35］ 朱文政, 严顺阳, 徐艳, 等. 顶空固相微萃取-气质联用分析不同烹制时间红烧肉挥发性风味成分[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(2): 247−253. ［ZHU W Z, YAN S Y, XU Y, et al. Analysis of volatile flavor components of braised pork with different cooking time by SPME-GC-MS[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(2): 247−253.］
［36］ 范婷婷, 郑福平, 张逸君, 等. 不同蒸制时间条件下鸡胸肉挥发性成分比较[J]. 食品科学, 2014, 35(22): 115−120. ［FAN T T, ZHENG F P, ZAHNG Y J, et al. Comparison of volatile components in chicken breast steamed for different periods[J]. Food Science, 2014, 35(22): 115−120.］
［37］ 张薇, 程晓燕, 黄卫宁, 等. 含天然酵母粉发酵面包的营养与老化特性及风味化合物特征[J]. 食品科学, 2014, 35(23): 33−38. ［ZHANG W, CHENG X Y, HUANG W N, et al. Nutritional properties, staling characteristics and volatile flavor compounds of natural yeast sourdough bread[J]. Food Science, 2014, 35(23): 33−38.］
［38］ 康翠翠, 施文正, 方林, 等. 不同冻结方式对草鱼肉挥发性成分的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(14): 229−235. ［KANG C C, SHI W Z, FANG L, et al. Effects of different freezing methods on the volatile components of grass carp meat[J]. Food Science, 2018, 39(14): 229−235.］
［39］ 郭昕, 张春江, 胡宏海, 等. 不同类型腊肉挥发性风味成分的比较研究[J]. 现代食品科技, 2014, 30(12): 247−254. ［GUO X, ZHANG C J, HU H H, et al. Analysis and comparison of volatile flavor compounds in different styles of Chinese traditional bacon[J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(12): 247−254.］
［40］ 孟凡冰, 刘达玉, 向茂德, 等. 不同卤制方法对白鹅腿肉品质及挥发性风味成分的影响[J]. 食品工业科技, 2018, 39(5): 272−279. ［MENG F B, LIU D Y, XIANG M D, et al. Effects of different bittern process on volatile flavor compounds of white goose thigh[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(5): 272−279.］
［41］ 潘见, 杨俊杰, 邹英子. 不同涂层 SPME 与 GC-MS 联用比较分析两种猪肉挥发性风味成分[J]. 食品科学, 2012, 33(12): 169−172. ［PAN J, YANG J J, ZOU Y Z. Comparative analysis of flavor components in pork from different breeds by SPME with different fiber coatings and GC-MS[J]. Food Science, 2012, 33(12): 169−172.］
［42］ 胡玉娇, 李诚, 苏赵, 等. 泡椒鹅肉工艺优化及挥发性风味物质的构成[J]. 食品工业科技, 2014, 35(4): 261−266. ［HU Y J, LI C, SU Z, et al. Processing optimization and volatile flavor compounds of goose meat with pickled peppers[J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(4): 261−266.］
［43］ 李星, 张晓春, 欧秀琼, 等. 微波杀菌对荣昌卤鹅皮脂及肌肉中挥发性风味化合物的影响研究[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(1): 42−50. ［LI X, ZHANG X C, OU X Q, et al. Study on changes of volatile components in sebum and muscle of halogen goose before and after microwave sterilization[J]. Food Research and Development, 2020, 41(1): 42−50.］
［44］ 何英霞, 蒋玉梅, 李霁昕, 等. 不同酶和酵母对干红葡萄酒香气影响的差异分析[J]. 农业工程学报, 2016, 32(S1): 325−332. ［HE Y X, JIANG Y M, LI J X, et al. Effection of different yeasts and maceration enzymes on aromatic components of cabernet gernischt red wine[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2016, 32(S1): 325−332.］
［45］ 张文刚, 张垚, 杨希娟, 等. 不同品种青稞炒制后挥发性风味物质 GC-MS 分析[J]. 食品科学, 2019, 40(8): 192−201. ［ZHANG W G, ZHANG Y, YANG X J, et al. GC-MS analysis of volatile flavor substances in different varieties of roasted hulless barley[J]. Food Science, 2019, 40(8): 192−201.］

黄杨, 高田毅, 朱宏星, 等. 基于生物基质碳点构建荧光探针用于腌腊肉制品中亚硝酸盐的检测 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 354−361. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110113

HUANG Yang, GAO Tianyi, ZHU Hongxing, et al. A Fluorescent Probe Based on Biological Matrix Carbon Dots for the Detection of Nitrite in Cured Meat Products[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 354−361. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110113

· 分析检测 ·

基于生物基质碳点构建荧光探针用于腌腊肉制品中亚硝酸盐的检测

黄　杨[1,2], 高田毅[3], 朱宏星[2], 孙　冲[2,*], 韩婷婷[2], 王道营[2], 徐为民[2,*]

（1.南京师范大学食品与制药工程学院, 江苏南京 210023;
2.江苏省农业科学院农产品加工研究所, 江苏南京 210014;
3.苏州工业园区生物产业发展有限公司, 江苏苏州 215123）

摘　要: 为建立一种快速检测食品中亚硝酸盐含量的方法，以生物基质鸡爪外皮为碳源，采用一步水热法合成绿色碳量子点（carbon quantum dots, CQDs）。通过高分辨率透射电子显微镜、紫外可见吸收光谱、傅里叶变换红外光谱仪、X 射线光电子能谱、荧光光谱仪对其形貌、结构及光学性质进行表征。结果表明：所制备的鸡爪外皮 CQDs 尺寸均匀，分散性良好，表面富含羟基、羧基、羰基等多种官能团；在 365 nm 紫外光照射下发射出蓝色荧光，荧光激发峰与发射峰呈现狭窄对称特征，具有良好的发光特性。在酸性溶液中，亚硝酸盐（NO_2^-）具有很强的氧化性，能将 Fe^{2+}转化为 Fe^{3+}，Fe^{3+}可与 CQDs 表面的含氧官能团形成配位键从而导致 CQDs 荧光信号被猝灭，从而可实现 NO_2^-的间接检测。基于此原理构建 CQDs-Fe^{2+}荧光探针，对 CQDs 的激发波长、缓冲液 pH、反应时间进行优化。在实验优化条件下，CQDs-Fe^{2+}体系荧光猝灭值与 NO_2^-浓度在 1~500 μmol/L 范围内呈现良好的线性关系（R^2=0.9979），检出限为 0.61 μmol/L，且具备良好的抗干扰能力。将该方法应用于三种不同腌腊肉制品中亚硝酸盐的测定，结果显示回收率为 98.61%~100.95%，与离子色谱检测所得的结果相接近，表明制备的 CQDs-Fe^{2+}荧光探针可用于实际样品中 NO_2^-的检测。综上所述，基于生物基质碳点构建的荧光探针绿色安全，制备简单，可实现对腌腊肉制品中亚硝酸盐含量的检测，具有良好的实际应用前景。

关键词: 生物基质, 碳量子点（CQDs）, 荧光探针, 亚硝酸盐（NO_2^-）, 检测

中图分类号: TB383.1; O657.3　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0354−08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110113

本文网刊:

A Fluorescent Probe Based on Biological Matrix Carbon Dots for the Detection of Nitrite in Cured Meat Products

HUANG Yang[1,2], GAO Tianyi[3], ZHU Hongxing[2], SUN Chong[2,*], HAN Tingting[2], WANG Daoying[2], XU Weimin[2,*]

（1.School of Food Science and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China;
2.Institute of Agricultural Products Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China;
3.Suzhou Industrial Park Biotech Development Co., Ltd., Suzhou 215123, China）

Abstract: In order to establish a rapid method for detecting the content of nitrite in food, green carbon quantum dots (CQDs) originating from chicken paw skin were synthesized by the one-step hydrothermal method. The morphology, structure and optical properties of CQDs were characterized systematically by high resolution transmission electron

收稿日期: 2021−11−12

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目（CX（21）3042）。

作者简介: 黄杨（1997−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全控制, E-mail: huangyang_17sz@163.com。

*** 通信作者:** 孙冲（1981−）, 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 肉品加工与质量控制, E-mail: sunchong0106@163.com。

徐为民（1969−）, 男, 博士, 研究员, 研究方向: 肉品加工与质量控制, E-mail: weiminxu2002@aliyun.com。

microscopy (HRTEM), UV-Vis absorption spectroscopy (UV-Vis), Fourier transforms infrared spectroscopy (FTIR), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and fluorescence spectroscopy (FS) technologies. The prepared CQDs were distributed uniformly with a regular size, and the surface of the CQDs was rich in functional groups including hydroxyl, carboxyl, and carbonyl, et al. In addition, the CQDs emitted intense blue fluorescence under the excitation of a 365 nm UV light lamp. And the excitation spectrum and emission spectrum of CQDs were narrow and symmetrical, indicating CQDs had good luminescence properties. In the presence of Fe^{3+}, the fluorescence of CQDs was quenched due to the formation of coordination bonds between Fe^{3+} and the oxygen-containing functional groups on the surface of CQDs. Based on that, a simple fluorescent probe was designed to detect indirectly nitrite (NO_2^-) by CQDs for nitrite possesses strong oxidation in acidic solution and was capable to transform iron (II) into iron (III) ions. The parameters including the excitation wavelength of CQDs, buffer pH value and reaction time were studied. Under the optimized conditions, the fluorescence quenching intensity of CQDs-Fe^{2+} fluorescent probe increased linearly with the NO_2^- concentration in the range of 1~500 μmol/L (R^2=0.9979) with a low detection limit of 0.61 μmol/L, and the probe had a good anti-interference ability. The method was applied to the determination of NO_2^- in three marinate meat and satisfactory recoveries of 98.61%~100.95% and consistent data compared with ion chromatography were obtained. The results indicated that the CQDs-Fe^{2+} fluorescent probe could be used for the detection of NO_2^- in real samples. In summary, the fluorescent probe constructed based on the carbon dots of the biological matrix is green and safe, simple to prepare, can detect the content of nitrite in cured meat products, indicating a good practical application prospect.

Key words: biological matrix; carbon quantum dots (CQDs); fluorescent probe; nitrite (NO_2^-); detection

亚硝酸盐（NO_2^-）是一种常见的食品添加剂，在腌肉制品、果酱、乳制品、肉脯等食品加工中具有广泛的应用[1]。亚硝酸盐作为肉制品护色剂，可与肉品中的肌红蛋白反应生成亚硝基肌红蛋白，从而赋予肉制品良好的色泽，同时增进肉的风味，还可抑制肉毒芽孢杆菌生长[2]。然而，长期过量摄入亚硝酸盐会对人体健康造成损害，增加患高铁血红蛋白症、胃癌、食管癌等疾病的风险[3]。目前，对于 NO_2^-检测分析的常见方法有离子色谱法[4]、高效液相色谱法[5]、毛细管电泳法[6] 和分光光度法[7] 等，但这些方法存在前处理复杂、设备昂贵、检测时间长、需要专业的技术人员操作、不适用大量现场分析的问题。因此，开发绿色环保、成本低廉、操作简单且灵敏度高的新方法，对实际产业中检测亚硝酸盐具有重要意义。

近年来，纳米材料因其拥有稳定的物理化学性能、优良的尺寸效应和制备方法多样性等优点[8]，在生物学、食品、医学和环境检测[9−11] 等诸多领域展现出良好的应用前景。碳量子点（Carbon quantum dots, CQDs）是一种尺寸小于 10 nm 的新型纳米材料，具有粒径小、水溶性良好、光学性质稳定和生物相容性优良等特点，因此 CQDs 被认为是荧光探针的潜在替代材料[12−14]。生物基质作为一种低成本、绿色无污染、可再生的自然资源，在 CQDs 制备中已得到广泛研究和应用。

荧光分析法是一种新兴的检测方法。与传统的检测方法相比，荧光探针具有简单方便，成本低，特异性好，灵敏度高等特点[15−16]。Li 等[17] 基于柠檬酸/乙二胺碳纳米点开发荧光猝灭毛细管分析方法，实现了对食品和自然水中的亚硝酸盐的检测。Wang 等[18] 通过沉淀法制备 1-氨基芘纳米颗粒，基于纳米颗粒与亚硝酸盐的重氮化反应构建荧光探针，并将其应用水样中亚硝酸盐的分析，表现出良好的选择性和稳定性。尽管目前已报道多种荧光检测亚硝酸盐的分析方法，但大多来源于有机染料及化学原料，且合成过程较为繁琐，因此开发绿色经济、简单高效的荧光探针仍然是一个巨大的挑战。

针对这种不足，本文以肉鸡加工废弃物鸡爪外皮作为生物基质碳源，采用一步水热法制备了具有蓝色荧光特性的 CQDs，从而建立了一种绿色、安全、快速检测亚硝酸盐的新技术，同时为畜禽加工废旧生物资源利用提供新的途径。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

实验所用鸡爪外皮　收集于江苏南京市孝陵卫农贸市场；腌肉制品（腊肠、腊肉及腊排）　购买于南京市孝陵卫苏果超市；亚硝酸钠（$NaNO_2$）、硝酸钠（$NaNO_3$）、磷酸钠（Na_3PO_4）、硫酸钠（Na_2SO_4）、碳酸氢钠（$NaHCO_3$）、乙酸钠（CH_3COONa）、草酸钠（$Na_2C_2O_4$）、磷酸氢二钠（Na_2HPO_4）、硫代硫酸钠（$Na_2S_2O_3$）、四硼酸钠（$Na_2B_4O_7$）　均为分析纯，西陇化工股份有限公司；焦磷酸钠（$Na_4P_2O_7$）、钨酸钠（Na_2WO_4）、碳酸钠（Na_2CO_3）、氯化铁（$FeCl_3·6H_2O$）、氯化钠（NaCl）、氯化钾（KCl）、氯化铵（NH_4Cl）、氯化铜（$CuCl_2·2H_2O$）、氯化钡（$BaCl_2·2H_2O$）、氯化铝（$AlCl_3·6H_2O$）、氯化镁（$MgCl_2·6H_2O$）、氯化铁（$FeCl_2·4H_2O$）、氯化锂（LiCl）、氯化钙（$CaCl_2·2H_2O$）、氯化锶（$SrCl_2·6H_2O$）、氯化钴（$CoCl_2$）均为分析纯　国药集团试剂有限公司；实验用水　为超纯水，电阻率 18.5 MΩ·cm^{-1}。

JEM-2100F 场发射透射电子显微镜　日本电子株式会社；Cary 5000 紫外可见吸收光谱仪　美国 Varian 公司；Nicolet iS50 傅里叶变换红外光谱仪　美国 Thermo 公司；ESCALAB 250Xi X 射线光电子能谱仪、ICS1100 离子色谱仪　美国赛默飞世尔科

技公司；LS 55 荧光分光光度计　珀金埃尔默股份有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　CQDs 的制备　参照 Wang 等[19] 的方法制备 CQDs，略作修改。以鸡爪外皮为碳源，采用一步水热合成碳量子点荧光材料。具体步骤如下：鸡爪外皮经洗净烘干后，用食品粉碎机打磨成粉末。称取 2.0 g 鸡爪外皮粉置于 200 mL 的聚四氟乙烯反应釜中，加入 100 mL 超纯水，混匀后于 200 ℃ 下水热反应 10 h。待反应釜冷却至室温，将反应后得到的混合溶液转移至离心管，在 10000 r/min 下离心 10 min，吸取上清液，经 0.22 μm 滤膜过滤后置于 1000 Da 的透析袋内，室温透析 24 h。收集透析袋内溶液冻干，将冻干后的絮状物研磨得到的 CQDs 粉末放置于干燥皿中保存。

1.2.2　CQDs 的表征

1.2.2.1　微观结构观察　通过透射电子显微镜（Transmission electron microscopy，TEM）和高分辨率透射电子显微镜（High resolution transmission electron microscopy，HR-TEM）观察 CQDs 形貌。将制备的 CQDs 粉末超声溶解，使纳米颗粒均匀分散到超纯水中，取稀释好的样品液滴至超薄碳膜网上，室温下干燥后于场发射透射电子显微镜上观察其形貌及晶格结构。

1.2.2.2　紫外可见吸收光谱分析　称取 CQDs 粉末 100 mg，用蒸馏水溶解定容至 100 mL，获得 1 mg/mL 的 CQDs 水溶液作为样品溶液。采用紫外可见吸收光谱仪（Ultraviolet-visible absorption spectroscopy，UV-vis）对 CQDs 溶液进行扫描。以去离子水作为空白对照，扫描波长范围为 200~700 nm，扫描速度为 600 nm/min。

1.2.2.3　傅里叶变换红外光谱分析　采用傅里叶变换红外光谱（Fourier transform infrared spectroscopy，FTIR）分析 CQDs 表面基团。使用 KBr 压片法制备样品，扫描范围为 500~4000 cm^{-1}，分辨率为 4.00 cm^{-1}。

1.2.2.4　X-射线光电子能谱分析　采用 X-射线光电子能谱（X-ray photoelectron spectroscopy，XPS）确定 CQDs 表面元素组成、含量和化学键状态。将 CQDs 粉末固定到样品台上，使用单色 X 射线源 Al Kα 作为激发源，激发电压为 1487 eV，以测得结合能 284 eV 的 C 1s 进行校准。

1.2.2.5　荧光光谱分析　采用荧光光谱仪（Fluorescence Spectrometer）对 CQDs 的荧光性质进行分析。以 1 mg/mL CQDs 水溶液作为样品溶液，设定激发和发射狭缝宽度均为 5 nm。固定激发波长 370 nm，发射波长范围 380~600 nm 得到 CQDs 的荧光发射光谱；固定发射波长 450 nm，激发波长范围 280~430 nm 得到 CQDs 的荧光激发光谱。

1.2.3　CQDs 荧光量子产率测定　荧光量子产量根据参比法[20] 测定。以硫酸奎宁（荧光量子产率为 0.54）作为参比标准物质，测定 CQDs 与硫酸奎宁在同一激发波长下的荧光发射峰面积及同一波长处的吸光度。代入下式：

$$Q_1 = Q_2\left(\frac{S_1}{S_2}\right)\left(\frac{A_2}{A_1}\right)\left(\frac{\eta_1}{\eta_2}\right)^2$$

式中：下标 1 和 2 分别代表待测样品和标准物质；Q 表示荧光量子产率（%）；S 表示荧光发射积分面积；A 为吸光度；η 为溶剂的折射率（蒸馏水为 1.33）。

1.2.4　CQDs-Fe^{2+}荧光探针检测 NO_2^-　配制浓度为 1、5、10、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000 μmol/L 的 NO_2^-溶液，取 400 μL 不同浓度的 NO_2^-溶液和相同体积的 1 mmol/L Fe^{2+}溶液加入到 1 mL 的 1 mg/mL CQDs 溶液中，加入 1.5 mL PBS（0.1 mol/L，pH3.0），100 W 超声 30 min 使其混合均匀，记录荧光发射光谱。每个浓度梯度设置 5 次平行实验。参数设置为：固定激发波长为 370 nm，发射波长范围为 380~600 nm，激发和发射狭缝宽度均为 5 nm。通过分析体系荧光猝灭值△F 与 NO_2^-浓度之间的变化关系，得出线性方程和相关系数。

1.2.5　实际样品分析　参照 GB 5009.33-2016 对购买的腌腊肉制品进行前处理[21]。具体步骤如下：将腌腊肉制品用食品粉粹机制成匀浆，称取试样匀浆 1 g，置于 100 mL 离心管中，加入 40 mL 水，超声提取 30 min，每隔 5 min 振摇一次。于 75 ℃ 水浴中放置 5 min 后取出，冷却至室温后转移至 50 mL 容量瓶中定容。溶液经滤纸过滤后，于 1000 r/min 下离心 15 min，将上清液经 0.22 μm 滤膜过滤后作为样品原液。每组样品制备三组平行试样，分别采用离子色谱法和 CQDs-Fe^{2+}荧光探针进行检测，结果取平均值。向腌腊肉制品样品原液中添加 100 μmol/L 的 NO_2^-，计算实际样本中 NO_2^-的加标回收率。

1.3　数据处理

每组实验重复 3~5 次取平均值，采用 IBM SPSS Statistics 25 进行单因素方差分析，结果采用 $\bar{X}$±SD 表示。使用 Origin8.5 软件（OriginLab 公司）对数据进行图谱绘制。

2　结果与分析

2.1　CQDs 的表征

采用场发射透射电子显微镜对 CQDs 形貌进行观察，如图 1 所示，CQDs 为球形纳米颗粒，尺寸均一，且具有良好的分散性。插图 HR-TEM 图像显示，CQDs 的面间距为 0.22 nm，这属于石墨的（100）衍射面，表明 CQDs 对应于 sp^2 型石墨碳纳米晶芯[22]。图 2 为紫外可见吸收光谱及荧光光谱图。由图 2 中可知，在 263 nm 处 CQDs 有明显紫外吸收峰，这是芳香（C-C）sp^2 杂化轨道典型的 π→π*跃迁产生的[23]。CQDs 的荧光激发峰与发射峰呈现狭窄对称的特征，

说明 CQDs粒径尺寸均匀且分散性良好[24]。插图表明合成的 CQDs 水溶液在自然光下呈现淡黄色或接近无色(左)，在 365 nm 紫外灯照射下发射出强烈的蓝色荧光(右)。以硫酸奎宁作为标准物测得 CQDs 荧光量子产率为 8.23%，说明其具有良好的荧光性能。

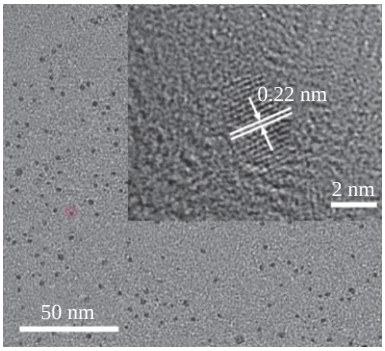


图 1　CQDs 的透射电子显微镜图

Fig.1　TEM image of CQDs

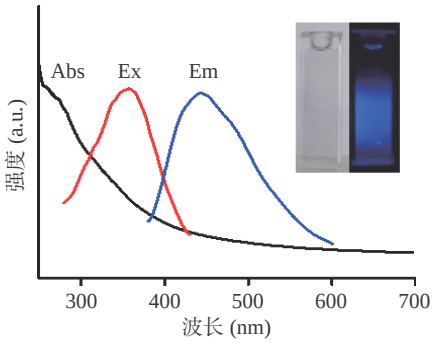


图 2　CQDs 的紫外可见吸收光谱及荧光光谱图

Fig.2　UV-vis absorption and fluorescence spectra of the CQDs

注：Abs 为 CQDs 紫外可见吸收光谱；Ex 为 CQDs 荧光激发光谱；Em 为 CQDs 荧光发射光谱。

采用傅里叶变换红外光谱表征 CQDs，结果如图 3 所示，3285 cm^{-1} 处吸收峰归因于 O-H 和 N-H 基团的伸缩振动，2921 和 2868 cm^{-1} 处是 C-H 对称伸缩振动[25]。1627、1519、1451、1242 和 1087 cm^{-1} 附近的峰对应着 C=O、C=C、C-N-C、C-OH 和 C-O-C[26–28]。这些官能团使得 CQDs 具有良好的水溶性，有望进一步扩展其应用领域。

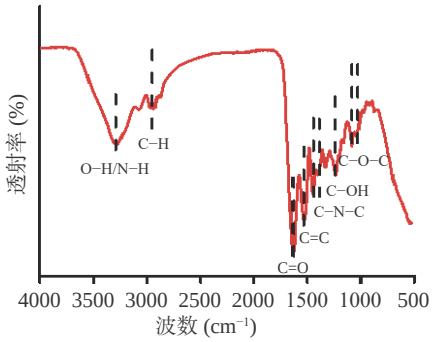


图 3　CQDs 的傅里叶变换红外光谱图

Fig.3　FTIR spectrum of the CQDs

通过 XPS 表征 CQDs 的元素组成、化合状态和分子结构。图 4A 为 CQDs 的 XPS 全扫描谱图，图中分布 284、398 和 531 eV 三个主要峰，对应 C、N 和 O 三个元素。根据峰面积计算 CQDs 中 C、N 和 O 三个元素的相对含量，分别为 63.82%、16.06%、20.12%。通过 XPSPEAK 软件进一步分析 CQDs 表面基团信息。图 4B 表示 CQDs 的 C 1s 谱图，284.3 eV 处的峰归属于石墨碳[29]，284.8 eV 处的峰表示 C-N/C-O 键，285.8 eV 处的峰对应 C=N 或者 C=O 键，287.6 eV 处的峰则对应于 HO-C=O 键[30]。N 1s 谱

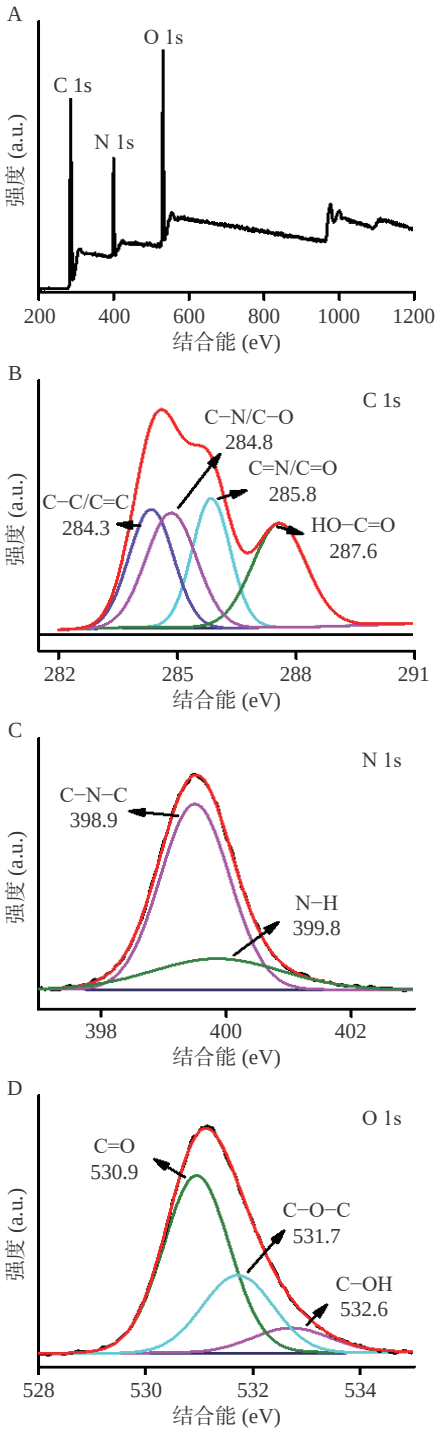


图 4　CQDs 的 X-射线光电子能谱

Fig.4　XPS spectra of the CQDs

注：A：XPS 全扫描谱图；B：XPS C 1s 谱图；C：XPS N 1s 谱图；D：XPS O 1s 谱图。

图(图 4C)存在 398.9 和 399.8 eV 两个峰, 分别对应 C-N-C 键和 N-H 官能团中的氮原子[31]。O 1s 谱图如图 4D 所示, 图中 530.9、531.7、532.6 eV 三个特征峰对应 C=O、C-O-C、C-OH 键[32]。XPS 分析结果证明 CQDs 中存在羟基、羧基和烷基等多种基团, 与傅里叶变换红外光谱结果一致。

2.2 CQDs-Fe^{2+}探针检测 NO_2^-机理研究

本实验研究了 CQDs 荧光探针对 Fe^{3+}、Na^+、Cu^{2+}、K^+、NH_4^+、Ba^{2+}、Al^{3+}、Mg^{2+}、Fe^{2+}、Li^+、Ca^{2+}、Sr^{2+}和 Co^{2+} 13 种常见金属阳离子的特异选择性。根据相对荧光强度值 F/F_0(F 为添加 1 mmol/L 不同金属离子后荧光值, F_0 为未添加其他离子的荧光值)评价荧光探针选择性。测试三次取平均值, 由 SPSS 软件进行数据处理分析。由图 5 可知, 与其他金属离子相比, 添加 Fe^{3+}后的相对荧光强度为 25.69%, 而其他离子相对荧光强度在 85.55%~101.66% 范围间。与空白组相比, 仅有 Fe^{3+}与其具有显著性差异(P<0.05), 说明 Fe^{3+}对 CQDs 具有明显的荧光猝灭作用。

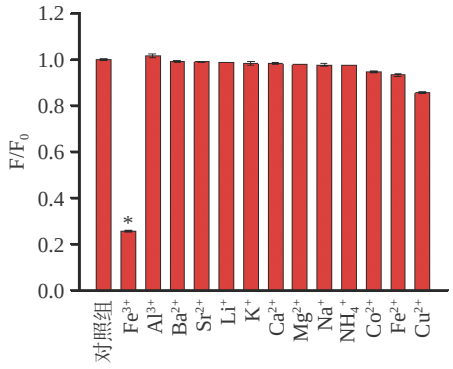


图 5 CQDs 对常见金属离子的选择性

Fig.5 Selectivity of CQDs toward common metal ions

注: "*"表示金属离子组与对照组存在显著差异(P<0.05)。

如图 6 所示, 当仅存在 NO_2^-或 Fe^{2+}时, CQDs 的荧光基本无变化。在 NO_2^-和 Fe^{2+}同时存在时, Fe^{2+}因 NO_2^-的氧化作用转化为 Fe^{3+}, Fe^{3+}与 CQDs 表面的羟基、羧基等形成铁-羟基或铁-羧基复合物从而导致 CQDs 荧光猝灭[33]。检测机制如图 7 所示, CQDs

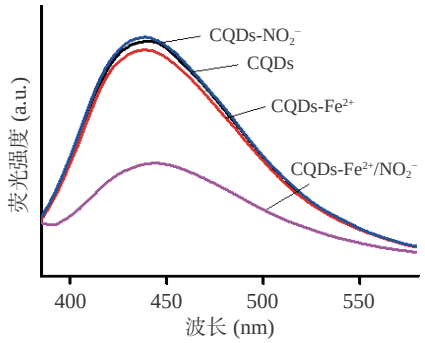


图 6 CQDs 与 Fe^{2+}、NO_2^-、Fe^{2+}/NO_2^-的荧光发射光谱

Fig.6 Fluorescence spectra of CQDs with Fe^{2+}, NO_2^- and Fe^{2+}/NO_2^-

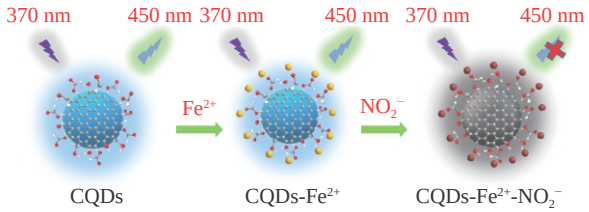


图 7 CQDs-Fe^{2+}检测 NO_2^-的机制

Fig.7 Mechanism of NO_2^- detection by CQDs-Fe^{2+}

与 Fe^{2+}混合后在 370 nm 激发波长下仍然发出强烈的蓝色荧光, 加入 NO_2^-后, Fe^{2+}转化为 Fe^{3+}使得 CQDs 荧光强度值降低, 由此可构建 CQDs-Fe^{2+}探针实现对 NO_2^-的间接检测。

2.3 CQDs-Fe^{2+}探针参数优化

为了更好地优化 CQDs-Fe^{2+}探针对 NO_2^-的检测性能, 对 CQDs 的激发波长、缓冲液 pH、反应时间进行研究。图 8A 为 CQDs 溶液在不同激发波长下的荧光发射光谱, 由图中可知, 最大激发波长位于 370 nm 左右。随着激发波长的增加, 最大发射峰荧光强度逐渐增强, 当激发波长超过 370 nm 后, 荧光强度开始下降。图 8B 为荧光强度归一化后的荧光发射光谱, 由图中可以看出, 在 300~450 nm 的激发波长范围内, CQDs 的荧光发射光谱表现出明显的红移现象。这种现象是由 CQDs 的费米能级附近不同表面缺陷态的光学选择引起的[34]。在不同的激发波长下, CQDs 表面相应的发色基团将占据主导地位,

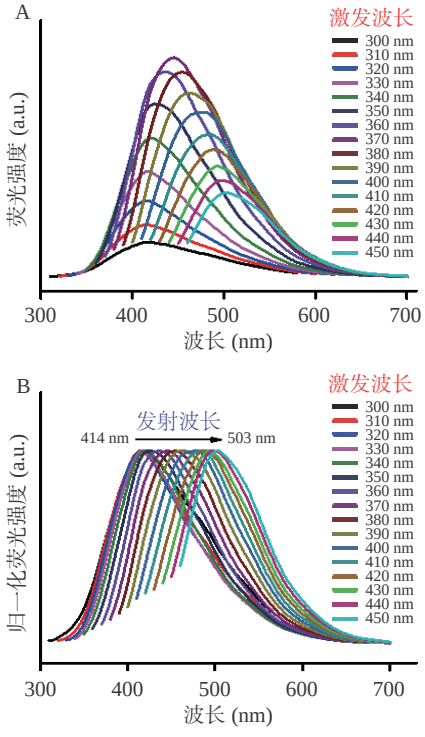


图 8 不同激发波长下 CQDs 的荧光发射光谱(A)和归一化发射光谱(B)

Fig.8 Fluorescence emission spectra (A) and emission normalized spectra of CQDs (B) in different excitation wavelengths

产生依赖于激发波长的荧光[35]。说明该 CQDs 具有激发波长的依赖性。当激发波长为 370 nm CQDs 荧光强度最强，最大发射波长在 450 nm 处。故后续实验所选激发波长为 370 nm。

图 9A 显示了在不同 pH 的缓冲液中 NO_2^-添加前后 CQDs-Fe^{2+}体系的荧光强度。结果表明，当缓冲液 pH 在 1~7 范围内变化时，随着 pH 逐渐增加，CQDs-Fe^{2+}与 CQDs-Fe^{2+}/NO_2^-两者荧光强度逐渐增高，当 pH 在 4~7 变化时，体系荧光基本保持稳定，这是因为过酸环境会导致 CQDs 的表面基团发生质子化从而引起体系荧光强度减弱。通过分析 NO_2^-添加前后 CQDs-Fe^{2+}体系荧光猝灭程度(图 9B)，可以发现，当 pH 为 2 和 3 时，体系荧光猝灭程度最大，考虑到 CQDs-Fe^{2+}在 pH 为 3 时荧光强度远大于 pH 为 2 时，因此选择 pH3 作为体系反应的最佳缓冲条件。

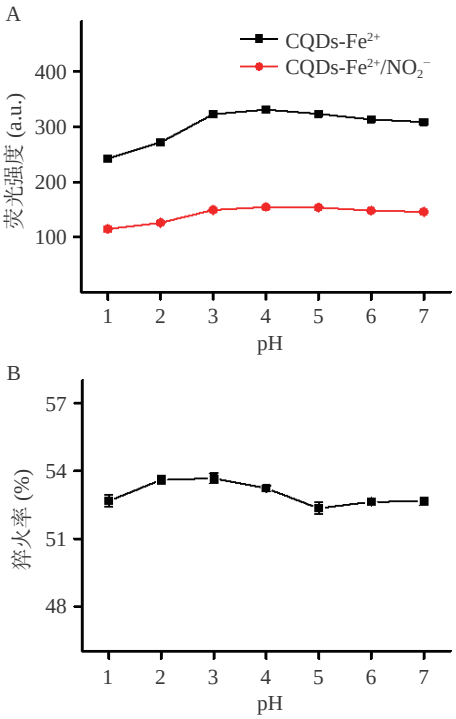


图 9　pH 对体系荧光强度(A)和猝灭程度(B)的影响

Fig.9　Influence of pH on the fluorescence intensity (A) and the quenching rates (B)

图 10 是 CQDs-Fe^{2+}与 NO_2^-反应时间(0~75 min)的优化。从图中可以看出，随着反应时间的增加，体系荧光强度值逐渐降低并趋于稳定，结合时间在 40 min 后，荧光强度保持恒定，表明 NO_2^-和 Fe^{2+}之间的氧化还原反应以及产生的 Fe^{3+}对荧光的猝灭作用在 40 min 内达到动态平衡。因此在后续实验中选择 40 min 作为 NO_2^-加入 CQDs-Fe^{2+}体系的反应时间。

2.4　CQDs-Fe^{2+}探针线性检测 NO_2^-

由图 11 的荧光光谱图可以看出，在 CQDs-Fe^{2+}中加入 NO_2^-后，体系荧光强度随着 NO_2^-浓度增加逐渐降低。以 NO_2^-浓度为横坐标，450 nm 处 CQDs 荧光猝灭值(△F=F_0–F，F_0 为空白对照组荧光值，F 为

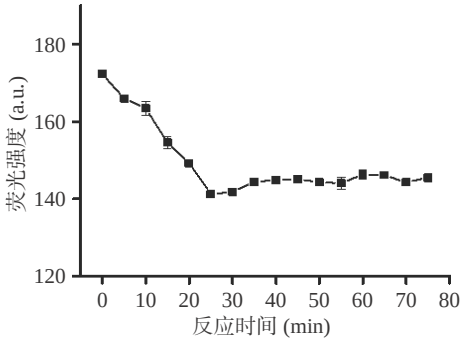


图 10　反应时间对 CQDs-Fe^{2+}/NO_2^-体系荧光强度的影响

Fig.10　Influence of reaction time on the fluorescence intensity of CQDs-Fe^{2+}/NO_2^-

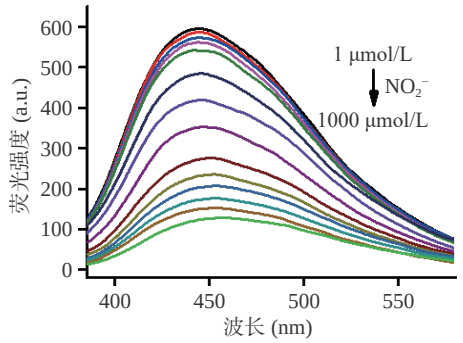


图 11　不同浓度 NO_2^-的 CQDs-Fe^{2+}/NO_2^-荧光光谱图

Fig.11　Fluorescence spectra of CQDs-Fe^{2+} with different concentrations of NO_2^-

待测组荧光值)为纵坐标，在 1~500 μmol/L 范围内，两者呈现良好的线性关系，回归方程为△F=0.60c+1.01(R^2=0.9979)，检出限为 0.61 μmol/L。与表 1 中已报道的 NO_2^-检测方法相比，本方法建立的荧光探针具有较宽的线性范围和较低的检测限。

表 1　不同方法检测 NO_2^-的比较

Table 1　Comparison of methods for the NO_2^- detection

检测方法	线性范围(μmol/L)	检出限(μmol/L)	参考文献
比色法	1~75	0.73	[36]
表面增强拉曼散射法	10.87~369.57	4.57	[37]
离子色谱法	9.91~77.61	1.74	[38]
荧光法	0~10	0.1	[39]
荧光法(CQDs)	1~500	0.61	本研究

2.5　CQDs-Fe^{2+}探针抗干扰分析

为考察 CQDs 荧光探针在检测 NO_2^-时的抗干扰性，在相同实验条件下，选择 500 μmol/L 的 NO_2^-、HPO_4^{2-}、$H_2PO_4^-$、PO_4^{3-}、HCO_3^-、$C_2O_4^{2-}$、CH_3COO^-、CO_3^{2-}、SO_4^{2-}、$S_2O_3^{2-}$、NO_3^-、WO_4^{2-}、$P_2O_7^{4-}$等阴离子对 CQDs-Fe^{2+}荧光探针的抗干扰性能进行测试。如图 12 所示，与空白组相比，NO_2^-对 CQDs-Fe^{2+}体系的荧光猝灭效果明显，而其他相同浓度的阴离子则对 CQDs 的荧光猝灭效应较小，证明其他阴离子在该荧光探针用于检测 NO_2^-时的影响很小，即 CQDs-Fe^{2+}荧光探针在检测 NO_2^-时具有良好的抗干扰能力。

表 2 实际样品中 NO_2^-的测定结果

Table 2 Detection of NO_2^- in actual samples

样品	添加值(μmol/L)	CQDs-Fe^{2+}探针			离子色谱		
		初始值(μmol/L)	检出值(μmol/L)	回收率(%)	初始值(μmol/L)	检出值(μmol/L)	回收率(%)
腊肠	100	0	98.61±2.78	98.61	ND	98.63±0.05	98.63
腊肉	100	0	98.98±1.34	98.98	ND	99.66±0.21	99.66
腊排	100	0.81±0.02	101.76±1.19	100.95	ND	101.08±0.29	101.09

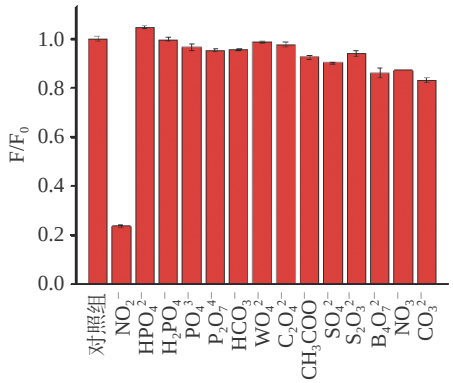


图 12 CQDs-Fe^{2+}检测 NO_2^-的抗干扰性

Fig.12 Anti-interference of CQDs-Fe^{2+} in detection of NO_2^-

2.6 实际样品检测

为评估所制备的 CQDs-Fe^{2+}荧光探针用于 NO_2^-检测的实际应用价值，以市售三种腌腊肉制品，腊肠、腊肉、腊排为样品，对其中 NO_2^-含量进行加标回收试验。测定结果如表 2 所示。该荧光探针测得样品中 NO_2^-的回收率为 98.61%~100.95%，RSD 均小于 5%，且与离子色谱得到的结果基本一致，表明本研究所制备的 CQDs 荧光探针可用于实际样品中 NO_2^-的检测。

3 结论

本文以生物基质鸡爪外皮为碳源，采用一步水热法合成具有良好荧光特性的 CQDs。基于 Fe^{3+}对 CQDs 的荧光猝灭能力和 NO_2^-可将 Fe^{2+}转化为 Fe^{3+}的氧化能力，进而构建了 CQDs-Fe^{2+}荧光探针用于 NO_2^-的检测。在 1~500 μmol/L 范围内，NO_2^-浓度与探针荧光猝灭值呈现良好的线性关系，检测限为 0.61 μmol/L。将其应用于腌腊肉制品中亚硝酸盐的检测，结果表明，与离子色谱法相比，本方法具有更低的检测限，适用于实际样品中亚硝酸盐的微量分析。

综上，本方法构建的荧光探针在实现禽肉加工废弃物再利用的同时，开发了一种绿色安全、快速、高效检测亚硝酸盐的技术，具有良好的检测性能与实际应用价值。此外，由于基于荧光物质建立的预测模型会因模型选择、人员操作及计量方法的不同存在精度上的差异，因此寻求精度高、稳定性好、适用范围广的亚硝酸盐检测方法有待更深一步的研究。

参考文献

[1] HUANG L, ZENG X Q, SUN Z, et al. Production of a safe cured meat with low residual nitrite using nitrite substitutes[J]. Meat Science, 2020, 162: 108027.

[2] FLORES M, TOLDRA F. Chemistry, safety, and regulatory considerations in the use of nitrite and nitrate from natural origin in meat products-invited review[J]. Meat Science, 2020, 171: 108272.

[3] 杨建飞, 马倩, 左勇, 等. 亚硝酸盐快速检测试剂研究及其在酱腌菜中的应用[J]. 食品科学, 2021, 42(18): 321−328. [YANG J F, MA Q, ZUO Y, et al. A spectrophotometric reagent for the rapid detection of nitrite and its application to pickles[J]. Food Science, 2021, 42(18): 321−328.]

[4] 孙延勤, 张芳芳, 沈娟, 等. 抑制型离子色谱法电导检测畜禽肉中硝酸盐和亚硝酸盐[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(11): 264−268. [SUN Y Q, ZHANG F F, SHEN J, et al. Conductance detection of nitrate and nitrite in livestock and poultry muscle by inhibitory ion chromatography[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(11): 264−268.]

[5] REFAI H M, SEBAEI A S. Daily intake of nitrate and nitrite via meat and poultry in Egypt[J]. Food & Additives & Contaminants:Part B, 2020, 13(4): 292−297.

[6] 李秀明, 马俪珍. HPCE 法同时检测果蔬及肉制品中硝酸盐和亚硝酸盐含量[J]. 食品科学, 2018, 39(12): 301−307. [LI X M, MA L Z. Simultaneous determination of nitrate and nitrite in vegetables and meat products by high performance capillary electrophoresis[J]. Food Science, 2018, 39(12): 301−307.]

[7] 王盼雪, 孙妍, 单锦瑞, 等. 一步分光光度法检测肉制品中亚硝酸盐的含量[J]. 陕西科技大学学报, 2021, 39(1): 58−62. [WANG P X, SUN Y, SHAN J R, et al. Detection of nitrite in meat products using one-step spectrophotometry[J]. Journal of Shaanxi University of Science, 2021, 39(1): 58−62.]

[8] CHEN J M, FAN T J, ZENG Q Q, et al. Advances in nanomaterials for photodynamic therapy applications: Status and challenges[J]. Biomaterials, 2020, 237: 119827.

[9] JEON J. Review of therapeutic applications of radiolabeled functional nanomaterials[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(9): 2323.

[10] JING W X, YAO K, XU Z K. Nanomaterials with a photothermal effect for antibacterial activities: An overview[J]. Nanoscale, 2019, 11(18): 8680−8691.

[11] PAN M F, XIE X Q, LIU K X, et al. Fluorescent carbon quantum dots-synthesis, functionalization and sensing application in food analysis[J]. Nanomaterials, 2020, 10(5): 930.

[12] SHARMA N, DAS G S, YUN K. Green synthesis of multipurpose carbon quantum dots from red cabbage and estimation of their antioxidant potential and bio-labeling activity[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(16): 7187−7200.

[13] FENG H, QIAN Z S. Functional carbon quantum dots: A versatile platform for chemosensing and biosensing[J]. The Chemical

Record, 2018, 18(5): 491−505.
[14] DEVI P, SAINI S, KIM K H. The advanced role of carbon quantum dots in nanomedical applications[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2019, 141: 111158.
[15] WANG Z H, ZHANG L, HAO Y M, et al. Ratiometric fluorescent sensors for sequential on-off-on determination of riboflavin, Ag^{+} and L-cysteine based on NPCl-doped carbon quantum dots[J]. Analytica Chimica Acta, 2021, 1144: 1−13.
[16] NAN Z Z, HAO C C, ZHANG X G, et al. Carbon quantum dots (CQDs) modified ZnO/CdS nanoparticles based fluorescence sensor for highly selective and sensitive detection of Fe(III)[J]. Spectrochimica Acta Part A:Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2020, 228: 117717.
[17] LI B L, LI Y S, GAO X F. Fluorescence quenching capillary analysis for determining trace-level nitrite in food based on the citric acid/ethylenediamine nanodots/nitrite reaction[J]. Food Chemistry, 2019, 274: 162−169.
[18] WANG L, DONG L, BIAN G R, et al. Using organic nanoparticle fluorescence to determine nitrite in water[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2005, 382(5): 1300−1303.
[19] WANG X, YANG P, FENG Q, et al. Green preparation of fluorescent carbon quantum dots from cyanobacteria for biological imaging[J]. Polymers, 2019, 11(4): 616.
[20] RAHIMI M, MAHANI M, HASSANI Z. Carbon quantum dots fluorescence quenching for potassium optode construction[J]. Luminescence, 2019, 34(4): 402−406.
[21] 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 5009.33-2016 食品安全国家标准 食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定 [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. GB 5009.33-2016 National food safety standard determination of nitrite and nitrate in food[S]. Beijing: China Standard Press, 2016.]
[22] JOTHI V K, GANESAN K, NATARAJAN A, et al. Green synthesis of self-sassivated sluorescent sarbon sots serived from rice bran for degradation of methylene blue and fluorescent ink applications[J]. 2021, 31(2): 427-436.
[23] 王庆红, 谭明乾, 齐子和, 等. 扇贝来源碳量子点性质及与镉联合毒性[J]. 食品科学, 2021, 42(5): 169−176. [WANG Q H, TAN M Q, QI Z H, et al. Charaterization of carbon quantum dots from boiled scallop (*Patinopecten yesspensis*) and its combined toxicity with cadmium[J]. Food Science, 2021, 42(5): 169−176.]
[24] 黄珊, 姚建东, 宁淦, 等. 石墨烯量子点荧光探针对碱性磷酸酶活性的高效检测[J]. 高等学校化学学报, 2021, 42(8): 169−176. [HUANG S, YAO J D, NING G, et al. Efficient determination of alkaline phosphatase activity based on graphene quantum dots fluorescent probes[J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2021, 42(8): 169−176.]
[25] EMAM H E, AHMED H B. Antitumor/antiviral carbon quantum dots based on carrageenan and pullulan[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 170: 688−700.
[26] HU X T, LI Y X, GAN Z Y, et al. Green one-step synthesis of carbon quantum dots from orange peel for fluorescent detection of *Escherichia coli* in milk[J]. Food Chemistry, 2020, 339: 127775.
[27] WANG N, WANG Y T, GUO T T, et al. Green preparation of carbon dots with papaya as carbon source for effective fluorescent sensing of Iron (III) and *Escherichia coli*[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2016, 85: 68−75.
[28] YANG P, ZHU Z Q, ZHANG T, et al. Orange‐emissive carbon quantum dots: Toward application in wound pH monitoring based on colorimetric and fluorescent changing[J]. Small, 2019, 15(44): 1902823.
[29] QIAO Y Q, LUO D, YU M, et al. A precisely assembled carbon source to synthesize fluorescent carbon quantum dots for sensing probes and bioimaging agents[J]. Chemistry, 2018, 24(9): 2257−2263.
[30] ATCHUDAN R, EDISON T N J I, SHANMUGAM M, et al. Sustainable synthesis of carbon quantum dots from banana peel waste using hydrothermal process for *in vivo* bioimaging[J]. Physica E Low-dimensional Systems and Nanostructures, 2021, 126: 114417.
[31] JIAN J, CHEN W. Synthesis of highly fluorescent nitrogen-doped graphene quantum dots for sensitive, label-free detection of Fe (III) in aqueous media[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2014, 58(10): 219−225.
[32] ATCHUDAN R, MUTHUCHAMY N, EDISON T N J I, et al. An ultrasensitive photoelectrochemical biosensor for glucose based on bio-derived nitrogen-doped carbon sheets wrapped titanium dioxide nanoparticles[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2019, 126: 160−169.
[33] PU Z F, WEN Q L, YANG Y J, et al. Fluorescent carbon quantum dots synthesized using phenylalanine and citric acid for selective detection of Fe^{3+} ions[J]. Spectrochimica Acta Part A:Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2020, 229: 117944.
[34] LIIU Y S, LI W, WU P, et al. Organosilane-functionalized carbon quantum dots and their applications to "on-off-on" fluorometric determination of chromate and ascorbic acid, and in white light-emitting devices[J]. Microchimica Acta, 2019, 186(8): 516.
[35] ZHANG R Z, CHEN W. Nitrogen-doped carbon quantum dots: Facile synthesis and application as a "turn-off" fluorescent probe for detection of Hg^{2+} ions[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2014, 55: 83−90.
[36] CHEN Y Y, ZHAO C X, YUE G Z, et al. A highly selective chromogenic probe for the detection of nitrite in food samples[J]. Food Chemistry, 2020, 317: 126361.
[37] WANG P X, SUN Y, LI X, et al. One-step chemical reaction triggered surface enhanced Raman scattering signal conversion strategy for highly sensitive detection of nitrite[J]. Vibrational Spectroscopy, 2021, 113: 103221.
[38] COVIELLO D, PASCALE R, CIRIELLO R, et al. Validation of an analytical method for nitrite and nitrate determination in meat foods for infants by ion chromatography with conductivity detection[J]. Foods, 2020, 9(9): 1238.
[39] ZHANG F Y, ZHU X Y, JIAO Z J, et al. Sensitive naked eye detection and quantification assay for nitrite by a fluorescence probe in various water resources[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2018, 200: 275−280.

王婷, 梁琼, 赵晓野, 等. 9 种腹泻性贝类毒素的高效液相色谱-串联质谱测定方法的建立 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 362−370. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110122
WANG Ting, LIANG Qiong, ZHAO Xiaoye, et al. Establishment of HPLC-MS/MS Method for Determination of Nine Diarrhoeal Shellfish Toxins[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 362−370. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110122

· 分析检测 ·

9 种腹泻性贝类毒素的高效液相色谱-串联质谱测定方法的建立

王　婷, 梁　琼*, 赵晓野, 王　儒
（海南省食品药品检验所海口分所, 海南海口 570311）

摘　要: 建立一种同时测定贝类产品中 9 种腹泻性贝类毒素的高效液相色谱-串联质谱（HPLC-MS/MS）方法。本文通过优化色谱条件、质谱条件、前处理等步骤，最终确定以 80% 乙腈水溶液对样品进行提取，利用 QuEChERS 和分散固相萃取技术进行净化，以 C_{18} 色谱柱进行分离，5 mmoL/L 乙酸铵（加 0.1% 甲酸）缓冲液和乙腈为流动相进行梯度洗脱，质谱采用多反应监测模式（MRM），外标法定量。9 种腹泻性贝类毒素在质量浓度 0.5~50 ng/mL 的范围内线性关系良好，其线性相关系数均在 0.996 以上，检出限为 1~10 μg/kg，回收率为 87.2%~111.2%，相对偏差（n=6）为 2.8%~9.2%。结果表明，该方法前处理简便快捷，准确性高、灵敏度较高、重现性好，而且节约成本，适合大批量检验，满足实际检测要求。

关键词: 腹泻性贝类毒素, 高效液相色谱-串联质谱, 贝类, 检测
中图分类号: TS254.7　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0362−09
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110122
本文网刊:

Establishment of HPLC-MS/MS Method for Determination of Nine Diarrhoeal Shellfish Toxins

WANG Ting, LIANG Qiong*, ZHAO Xiaoye, WANG Ru
（Hainan Provincial Institute For Food and Drug Control Haikou Branch, Haikou 570311, China）

Abstract: A liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method was developed for simultaneous determination of nine diarrhoeal shellfish toxins in shellfish products. In this paper, through optimizing the chromatographic conditions, mass spectrometry conditions, pretreatment methods and other steps, it was finally determined that 80% acetonitrile aqueous solution was used to extract the sample, QuEChERS and dispersed solid-phase extraction technology were used to purify the sample, C_{18} chromatographic column was used for separation, 5 mmol/L ammonium acetate (plus 0.1% formic acid) buffer and acetonitrile were used as mobile phase for gradient elution, and mass spectrometry was quantified by multiple reaction monitoring mode (MRM) and external standard method. The 9 kinds of diarrhoeal shellfish toxins had a good linear relationship within the mass concentration range of 0.5~50 ng/mL. The linear determination coefficient were above 0.996. The limits of detection were 1~10 μg/kg. The recoveries were 87.2%~111.2%. The relative deviation (n=6) of the measured values was 2.8%~9.2%. The results showed that the method is simple and quick, with high accuracy, sensitivity, reproducibility and cost saving. It was suitable for mass inspection and meets the requirements of practical testing.

Key words: diarrhetic shellfish poisoning (DSP); UPLC-MS/MS; shellfish; detection

海洋生物毒素是一类存在于海洋生物体内的特殊高活性代谢产物, 多存在于贝类及西甲鱼类中, 其生物结构为生物碱和多肽, 按其毒素毒性作用机制可分为麻痹性贝类毒素、腹泻性贝类毒素、失忆性贝类

收稿日期: 2021−11−12
基金项目: 海南省自然科学基金项目（219QN332）。
作者简介: 王婷（1987−）, 女, 本科, 中级工程师, 研究方向: 食品检验检测, E-mail: chenxi_wt@126.com。
*** 通信作者:** 梁琼（1981−）, 女, 硕士, 高级工程师, 研究方向: 食品检验检测, E-mail: 75159506@qq.com。

毒素及神经性贝类毒素。其中腹泻性贝类毒素（Diarrhetic Shellfish Poisoning, DSP）是一类大环内酯或聚醚的脂溶性化合物，主要是由原甲藻类和鳍藻等藻类产生[1−4]。DSP 毒素包括：米氏裸甲藻毒素（Gymnodimine, GYM）、螺环内酯毒（Spirolides, SPXs）、软海棉酸毒素（Okadaic acid, OA）及其衍生物鳍藻毒素（Dinophys-istoxin, DTX 毒素）、聚醚类毒素，如原多甲藻酸（Azaspir acid, AZAs），蛤毒素（Pectonotoxin, PTXs）和虾夷扇贝毒素[5−6]。贝类等虑食性动物通过滤食有毒藻类而使得 DSP 在体内富集，危害食用者健康。当人们误食染毒的贝类后就会造成中毒，症状主要表现为腹泻，与一些普通腹泻症状相似，所以往往被人们忽视[7−8]。DSP 在全球沿岸海域均有分布，是世界范围内具有最严重威胁的赤潮藻毒素之一。由于腹泻性贝类中毒现象普遍存在，且分布较广、致毒性强，故被列为世界食品卫生学重要问题之一。

目前贝类毒素检测方法有小鼠生物测定法（MBA 法）、酶联免疫吸附测定（ELASA）法、高效液相色谱-荧光法、高效液相色谱-串联质谱法（HPLC-MS/MS）等[9−14]。虽然 MBA 法是腹泻性贝类毒素最普遍的检测方法，但该方法需大量使用小鼠，不符合“3R”的要求[15]，而且灵敏度低、准确性和重现性差，具有易出现假阳性和无法确定毒素的成分、结构和含量等缺点；ELASA 试剂盒虽灵敏度高、操作简单，但其试剂盒昂贵，也有因类似物干扰作用，出现假阳性的情况[16]，不适合日常监测使用；高效液相色谱-荧光法是国内外目前常用的贝类毒素检测方法，但是分析过程中使用的柱衍生试剂如 ADAM 价格昂贵[17]，背景干扰对试验结果影响大，操作繁琐，重复性差，因此其应用受到一定的限制；HPLC-MS/MS 测定是近年兴起的一种检测技术，比其他方法重复性好，不会出现假阳性，是一种能够准确定性定量，并能够提供准确的分子结构信息的新型分离技术[18]。在众多的分析测试方法中，HPLC-MS/MS 以其同时具备高特异性和高灵敏度的特点而被广泛应用于生物毒素研究领域。

此次研究以可食用新鲜贝类为研究对象，针对其中可能存在脂溶性贝类毒素的污染情况，开发了适用于腹泻性贝类毒素的检测方法，通过快速、高效的 QuEChERS 和分散固相萃取技术进行净化，建立 HPLC-MS/MS 法对 9 种腹泻性贝类毒素进行定性和定量测定，以获得快速、准确的检验数据，为不安全贝类产品及其制品的毒素检测提供依据，为监管部门提供可靠的技术支撑和参考价值，保障广大消费者的生命健康安全。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

菲律宾蛤仔、魁蚶、栉江珧、波纹巴非蛤、华贵栉孔扇贝、裂纹格特蛤、翡翠贻贝、钝缀锦蛤、方斑东方螺、蛏子等，分别于海南省海口市、文昌市、琼海市、三亚市、儋州市、东方市五个取样点进行采样；甲醇、乙腈、正己烷、二氯甲烷　均为色谱纯，德国默克公司；无水硫酸钠、无水硫酸镁、氯化钠、氢氧化钠、盐酸　均为分析纯，广州化工；甲酸　色谱纯，美国 ACS 公司；乙酸铵　色谱纯，美国 Fisher 公司。

标准物质：大田软海绵酸（Okadaic acid, OA）：8.4±0.4 μg/mL，鳍藻毒素 1（Dinophys-istoxin, DTX1）：8.5±0.7 μg/mL，鳍藻毒素 2（Dinophys-istoxin, DTX2）：3.83±0.25 μg/mL，扇贝毒素 2（Pectonotoxin, PTX2）：4.4±0.13 μg/mL，原多甲藻酸贝类毒素 1（Azaspir acid, AZA1）：1.3±0.07 μg/mL，原多甲藻酸贝类毒素 2（Azaspir acid, AZA2）：1.22±0.06 μg/mL，原多甲藻酸贝类毒素 3（Azaspir acid, AZA3）：1.18±0.25 μg/mL，米氏裸甲藻毒素（Gymnodimine, GYM）：2.5±0.13 μg/mL，螺环内酯毒素 1（Spirolides, SPX1）：7.25±0.3 μg/mL　NRC，加拿大海洋研究中心。

LC 1290-MS 6460 液相色谱-质谱联用仪　美国安捷伦科技有限公司；Multi Reax（EU）涡旋振荡器　德国海道尔夫（Heidolph）公司；MS3 D S025 涡旋仪　德国 IKA 仪器设备有限公司；舒美 KQ-50 超声仪　昆山仪器；3-18K 离心机　德国 SIGMA 公司；TTL-DCII 氮吹仪　同泰公司；MSE125P-CE（感量为 0.00001 g）天平　德国 Sartorius 公司；PL602-L 天平（感量为 0.01 g）　瑞士梅特勒-托利多公司；Milli-Q IQ7000 超纯水系统　美国默克密理博公司；Prime HLB 固相萃取小柱（6 cc, 200 mg）、MCX 混合型阳离子柱（6 cc, 200 mg）、C_{18} 固相萃取柱（6 cc, 200 mg）　美国 Waters 公司；C_{18} 粉　美国 Agela 公司；腹泻性贝类毒素免疫亲和柱（3 mL）　美正生物。

1.2　标准溶液配制

精确量取一定量标准物质溶液，用乙腈配制成 1 μg/mL 标准储备液；取 1 mL 储备液，用乙腈定容至 10 mL，得到 100 ng/mL 标准使用液。称取阴性空白样品，按照前处理过程处理样品，得到空白基质。取一定量标准使用液，用空白基质配制成浓度梯度为 0.5、1、2、5、10、20、50 ng/mL 的标准曲线[19−22]。

1.3　样品制备

样品用清水洗净外部泥沙，去壳取出贝肉，再将贝肉用超纯水清洗干净，沥干水分，将样品剪碎后用均质机均质备用。样品制备完成后，放置−20 ℃ 冷冻储存，测定前将其室温解冻。

1.4　样品处理方法

样品经 80% 乙腈水提取，利用 QuEChERS 和分散固相萃取技术进行净化，具体操作如下：称取 2.00 g 样品，加入 10 mL 80% 乙腈水溶液，再加入 1 g 无水硫酸镁和 0.5 g 氯化钠，涡旋振荡 5 min，5000 r/min 离心 5 min，取上清液 40 ℃ 氮吹近干，甲醇定容至 1 mL，再加入 125 μL 氢氧化钠溶液（2.5 mol/L），于 76 ℃

下温育 40 min 后冷却至室温，再加入 125 μL 盐酸溶液（2.5 mol/L），所得水解液中加入 0.05 g C_{18} 粉和 0.1 g 无水硫酸镁，涡旋振荡，5000 r/min 离心 5 min，过 0.22 μm 有机滤膜，上机检测。

1.5 分析条件

1.5.1 液相色谱条件 色谱柱：Waters ACQUITY UPLC BEH C_{18}（2.1 mm×100 mm，1.7 μm）。流动相 A 相为 5 mmol/L 乙酸铵 0.1% 甲酸水溶液，B 相为乙腈，梯度洗脱程序见表 1。流速：0.3 mL/min。柱温：30 ℃。进样量：5 μL。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 The gradient elution program

时间	A(%)	B(%)
0.00	95	5
5.00	15	85
11.00	15	85
11.50	95	5
13.00	95	5

1.5.2 质谱条件 离子源：AJS ESI；扫描方式：Positive/Negative；检测方式：多重反应监测（MRM）；毛细管电压：4000 V；雾化器压力：35 psi；离子源温度：300 ℃；氮气作为鞘气和碰撞气，其中鞘气为 11.5 L/min，辅助气为 1.65 L/min。各组分监测的 MRM 参数见表 2。

表 2 MRM 参数

Table 2 MRM parameters

化合物	母离子（m/z）	子离子（m/z）	去簇电压（V）	碰撞能量（V）	扫描方式
AZA-1	842.5	824.5*	200	40	Positive
		806.5	200	55	Positive
AZA-2	856.5	838.5*	200	40	Positive
		820.5	200	55	Positive
AZA-3	828.5	810.5*	200	40	Positive
		792.5	200	55	Positive
OA	803.46	255.1*	255	55	Negative
		113.1	255	79	Negative
DTX-1	817.47	255*	265	55	Negative
		112.9	265	75	Negative
DTX-2	803.49	255*	255	55	Negative
		113	255	75	Negative
PTX-2	881.5	837*	230	60	Positive
		539.3	230	70	Positive
GYM	508.3	490.6*	100	23	Positive
		174.2	100	38	Positive
SPX1	692.5	674.5*	100	23	Positive
		444.5	100	34	Positive

注：*为定量离子。

1.6 方法学验证

本研究采用外标法进行定量，根据目标物所建立标准曲线，计算各目标化合物的线性范围、检出限。同时称取空白样品进行样品加标回收实验，每个样品做 6 个平行样，计算目标物的回收率和精密度。

1.7 数据处理

本文图谱采用安捷伦 Qualitative Analysis B.07.00>绘制。数据处理采用安捷伦 QQQ Quantitative Analysis 软件进行标准曲线建立、实验结果计算、信噪比计算。提取液选择中的回收率的计算、不同净化方法回收率的计算均采用两个平行样品取平均值计算。精密度选择三个浓度梯度，每个浓度梯度取连续采集 6 针数据的峰面积进行相对标准偏差 RSD 值的计算。方法检出限按照检出限公式：检出限=3×对照品浓度×样品稀释体积/信噪比/取样量，计算出目标物检出限。

2 结果与分析

2.1 质谱条件优化

根据 9 种 DSP 的分子量以及化学电离性质，分别在正、负离子扫描模式下进行母离子全扫描，筛选相应较高的离子对。对目标物浓度为 1 μg/mL 标准液进行一级离子扫描，扫描结果显示 OA、DTX-1、DTX-2 在负离子模式下响应更高，其余化合物在正离子模式下响应更优。在获得分子离子峰后，进行二级质谱扫描，选择多反应监测（MRM）扫描，对 Fragmentor 电压和碰撞能（Collision Energy）等质谱参数进行优化，最终得到表 2 的质谱参数。在该仪器条件下对浓度为 50 ng/mL 的 9 种 DSP 混合标准溶液进行测定，单个物质色谱图如图 1~图 9 所示，9 种 DSP 总离子流图如图 10 所示，所有物质均在 9 min 前完成出峰，响应值均在 10^3 以上。

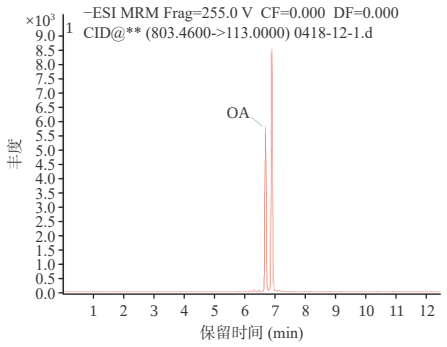


图 1 大田软海绵酸色谱图

Fig.1 Acid chromatogram of okadaic acid

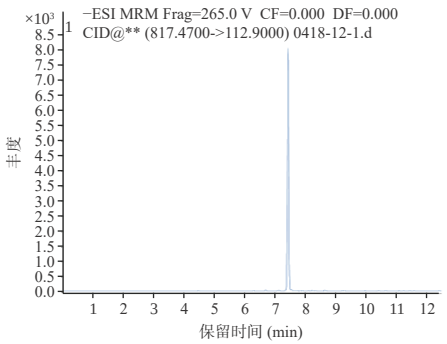


图 2 鳍藻毒素 1 色谱图

Fig.2 Acid chromatogram of dinophysistoxin-1

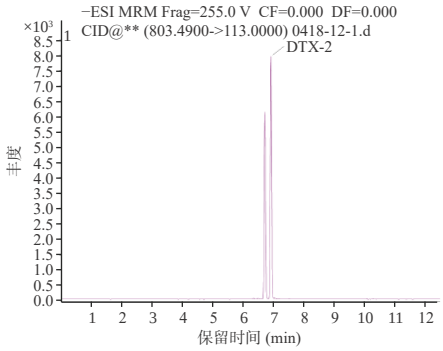


图 3　鳍藻毒素 2 色谱图

Fig.3　Acid chromatogram of dinophysistoxin-2

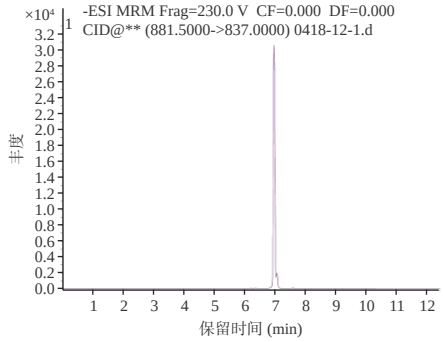


图 4　扇贝毒素 2 色谱图

Fig.4　Acid chromatogram of pectonotoxin-2

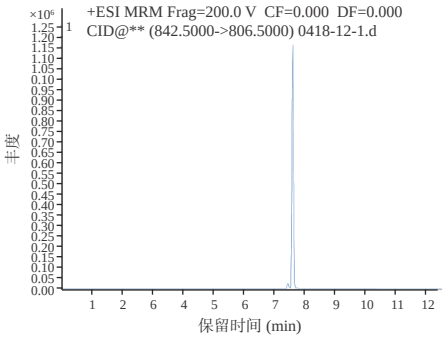


图 5　原多甲藻酸贝类毒素 1 色谱图

Fig.5　Acid chromatogram of azaspir acid-1

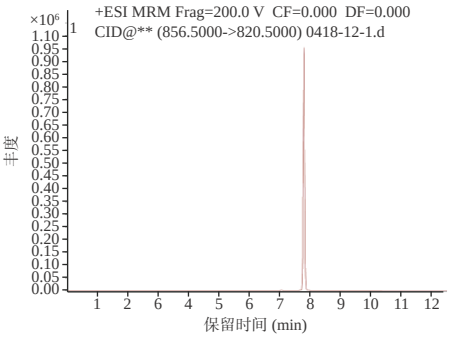


图 6　原多甲藻酸贝类毒素 2 色谱图

Fig.6　Acid chromatogram of azaspir acid-2

2.2　液相条件优化

DSP 属于亲脂性海洋生物毒素，在理化性质方面呈现多样性，如其含有羧酸、磺酸、氨基和亚氨基官能团[23−28]。DSP 毒素有一定的复杂性，根据碳骨架结构将这些成分分为酸性成分、中性成分以及碱性成分[29−30]。因此，实验过程中流动相选择、样品前处理和净化洗脱都要考虑到目标物的属性。

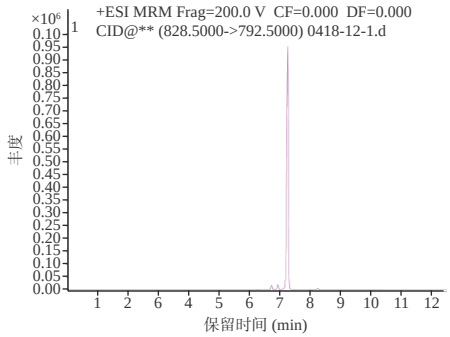


图 7　原多甲藻酸贝类毒素 3 色谱图

Fig.7　Acid chromatogram of azaspir acid-3

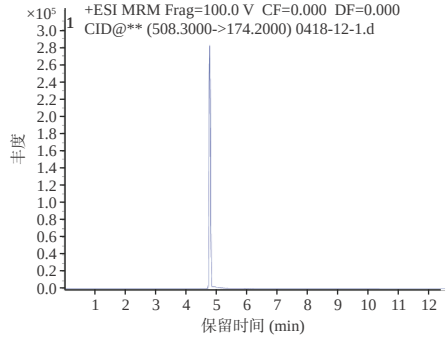


图 8　米氏裸甲藻毒素色谱图

Fig.8　Acid chromatogram of gymnodimine

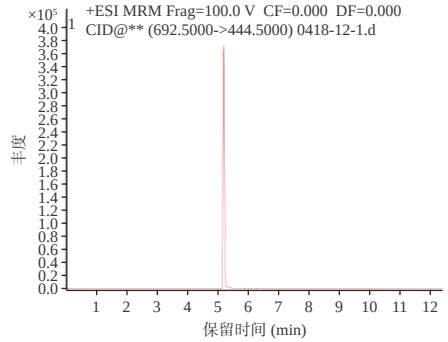


图 9　螺环内酯毒素 1 色谱图

Fig.9　Acid chromatogram of spirolides

2.2.1　色谱柱选择　本实验采用了比较常见的 C_{18} 反相色谱柱。研究比较了 ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱和 ACQUITY UPLC HSS T_3 色谱柱分离效果的差异[31]。比较图 10 和图 11 发现，C_{18} 分离效果相较 T_3 柱更好，因此选用 Waters ACQUITY UPLC BEH C_{18} 的液相色谱柱对其余毒素进行采集分离。实验中发现 C_{18} 柱不仅对软海棉酸(OA)类毒素的分离效果好，对其他 DSP 也能够完全分离，没有毛峰，而且灵敏度也较高，满足实验需要。

2.2.2　流动相的选择　因 DSP 是一种脂溶性物质，且 9 种目标物中存在酸性成分、中性成分和碱性成分。根据其不同的性质以及 9 种目标物在质谱上

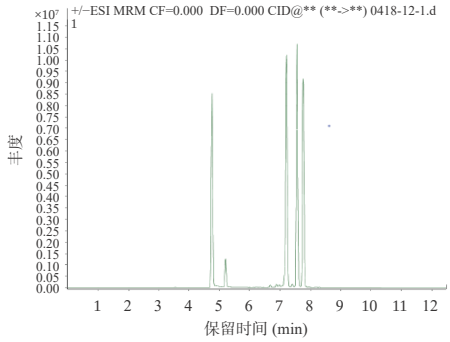


图 10 C_{18} 柱分离 9 种 DSP 混合物总离子流图(50 ng/mL)

Fig.10 Total ion flow diagram of separation of 9 DSP mixtures on C_{18} column(50 ng/mL)

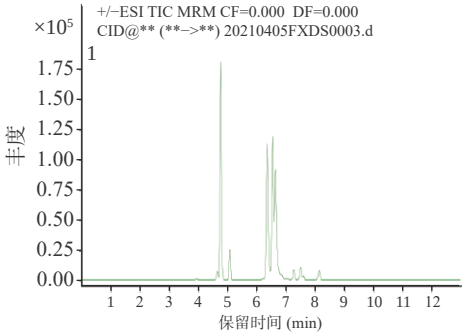


图 11 T_3 柱分离 9 种 DSP 混合物总离子流图(50 ng/mL)

Fig.11 Total ion flow diagram of separation of 9 DSP mixtures on T_3 column(50 ng/mL)

正、负离子不同扫描模式不同,在流动相中添加甲酸,使得 H^+浓度增加,增强离子化效率,在正离子扫描模式下提高响应;同时在流动相中添加弱碱性的缓冲盐溶液,增强分离度,提高负离子扫描模式下的响应。所以选择 5 mmol/L 乙酸铵水溶液(加 0.1% 甲酸)和乙腈为流动相,通过改变流动相的比例对 DSP 混合标准溶液进行分离实验,最终采用梯度洗脱方法将 9 种 DSP 毒素完全分开,并且灵敏度较高,峰形尖锐平滑对称,最佳的洗脱条件见表 1。

2.3 前处理步骤优化

2.3.1 提取液选择 目前常用的提取剂有乙腈、甲醇、丙酮等[32−33]。本实验对比纯甲醇、80% 甲醇水溶液、80% 乙腈水溶液进行提取。在同一加标水平,三种提取液提取效果见表 3。结果显示纯甲醇的总体回收率较差,因甲醇对脂肪具有一定的溶解性,会降低提取效果;80% 乙腈水溶液比 80% 甲醇水溶液总体回收率略高,因乙腈比甲醇使蛋白质变性的能力更强,为降低基质影响,最后选择 80% 乙腈水溶液作为提取液。

2.3.2 酯化态 DSP(DTX-3)水解释放 据所查阅资料,对 DSP 提取方法研究大多数都未涉及到 DTX-3。DTX-3 是 OA、DTX-1、DTX-2 的酯化态形式,存在于贝类样品中[33−34],本身对人体无害,但其在碱性条件下可以水解释放出有毒的 OA、DTX-1、DTX-2,致人中毒。因此实验前处理中加入水解一步,这样更能准确定量贝类中 DSP 的含量。

2.3.3 净化方法的选择 贝类样品基质复杂,富含蛋白质和脂肪等,待测样品净化不足极易污染离子源,导致 HPLC-MS/MS 的检测易被杂质干扰,从而灵敏度下降,定量偏低,所以净化方法对结果影响很大。为了降低基质效应,应选择适当的净化方法。本实验比较了液液萃取、固相萃取(包括 Prime HLB 固相萃取小柱、MCX 固相萃取小柱、腹泻性贝类毒素免疫亲和柱)和 QuECHERS 净化方法对 DSP 的加标回收效果如下表 4 所示。

液液萃取技术试剂用量大,操作繁杂,并且实验过程中容易产生乳化现象,降低提取效率;Waters Prime HLB 固相萃取小柱,无需活化,实验步骤简单

表 3 不同提取液回收率比较

Table 3 Comparison of recovery rates of different extracts

提取液	回收率(%)								
	AZA-1	AZA-2	AZA-3	OA	DTX-1	DTX-2	PTX-2	GYM	SPX1
纯甲醇	69.3	72.7	71.2	68.4	65.5	62.7	74.1	66.3	67.2
80%甲醇水	87.9	92.9	86.5	80.1	72.6	75.8	82.0	74.3	76.4
80%乙腈水	93.4	106.6	89.3	85.9	88.1	84.9	104.2	85.7	87.1

表 4 不同净化方法比较

Table 4 Comparison of different purification methods

	净化方法	回收率(%)								
		AZA-1	AZA-2	AZA-3	OA	DTX-1	DTX-2	PTX-2	GYM	SPX1
固相萃取	液液萃取	72.9	77.4	69.8	73.5	54.5	59.2	78.5	53.7	66.1
	Prime HLB固相萃取小柱	73.5	76.2	70.4	83.3	69.1	77.0	79.9	49.8	70.5
	MCX固相萃取小柱	107.3	79.7	82.5	85.3	76.2	74.4	72.6	82.4	89.3
	DSP免疫亲和柱	103.9	102.5	96.3	98.6	90.2	91.4	92.7	104.4	104.7
	C_{18}固相萃取小柱	83.6	87.9	90.2	82.3	70.2	69.3	81.5	63.4	78.8
	QuECHERS	111.2	103.1	98.6	95.3	87.2	89.6	90.3	87.7	91.5

易操作，并且净化脂肪、蛋白质等大分子物质能力较强，通用能力较强，但是对毒素吸附性较强，不易洗脱干净，导致大部分毒素回收率偏低至 50% 以下，对实验准确度影响较大；Waters MCX 混合型阳离子交换柱，由于具有磺酸基基团，所以对碱性化合物具有很高的选择性和灵敏度。交换柱对于 GYM、SPX、OA、PTX2、AZA-1 净化效果尚佳，回收率范围为 82.4%~107.3%，但对其他毒素净化效果较差，回收率范围为 72.6%~79.7%，整体偏低；腹泻性贝类毒素免疫亲和柱回收率在 90.2%~104.7% 间，回收效果很好，但操作复杂，成本非常昂贵，不适合大批量检测。

因 C_{18} 可以有效去除脂类和碳水化合物，所以采用以 C_{18} 粉和无水硫酸镁的混合物对腹泻性贝类毒素进行净化的 QuEChERS 方法。但过量使用 C_{18} 也会降低回收率。多次试验后发现，如果预先加入 0.1 g 无水硫酸镁，再加入 0.05 g 净化吸附剂 C_{18}，即可获得最高的回收率。9 种毒素回收率均在 87%~112% 的范围为内，净化效果较好。对于基质较为复杂的样品，无需增加额外的处理，即可达到满意的净化效果，同时节省了实验的时间和成本，因此实验前处理选择 QuECHERS 净化方法。

2.4　方法学验证

2.4.1　方法的线性范围和检出限　为消除基质效应对分析结果的影响，将 100 ng/mL 标准使用液用空白基质配制成线性范围为 0.5~50 ng/mL 的标准曲线。以各目标化合物的浓度（ng/mL）为横坐标，响应值的峰面积为纵坐标建立标准曲线。将阴性样品中添加 9 种腹泻性贝类毒素混合标准使用液，使得上机检测理论浓度为 0.5 ng/mL，在优化的色谱条件下进回收试验，经测定信噪比（S/N）均大于 3，按照检出限公式：检出限=3×对照品浓度×样品稀释体积/信噪比/取样量，计算出目标物检出限。相应的线性方程、相关系数和检出限见表 5。

表 5　标准物质线性方程、相关系数、检出限
Table 5　Linear equation of reference material, decision coefficient, detection limit

化合物	线性方程	相关系数	检出限（μg/kg）
AZA-1	y=137883.866743x−25234.938994	0.99911033	1
AZA-2	y=102879.550891x−20877.309295	0.99927245	2
AZA-3	y=125805.585830x−22637.529925	0.99965979	3
OA	y=1251.790695x−26.700279	0.99782187	2
DTX-1	y=2409.044825x+364.609597	0.99968786	1
DTX-2	y=1531.640029x+290.300430	0.99873070	7
PTX-2	y=2731.258074x−979.308697	0.99836841	3
GYM	y=159685.130489x+8024.304167	0.99606143	10
SPX1	y=16759.216394x−1213.049297	0.99893683	1

由表 5 可知，9 种腹泻性贝类毒素标准方程的线性相关系数均在 0.996~0.999 之间，线性良好，可以满足实验要求。欧盟对于亲脂性海洋生物毒素 AZA-1、AZA-2、AZA-3、OA、DTX-1、DTX-2、PTX-2 的限制浓度为 160 μg OA 当量/kg，GYM 的限制浓度为 200 μg OA 当量/kg，SPX1 的限制浓度为 100 μg OA 当量/kg[33, 35−37]，本方法的检出限比欧盟管制毒素规定浓度的 0.05 倍还低，仍可获得大于 3 的信噪比，说明检测灵敏度良好。

2.4.2　方法的平均回收率和精密度　分别在空白样品中加入不同浓度的 9 种腹泻性贝类毒素混合标准使用液，按照优化方法条件进行处理和检测，每个目标物添加三个浓度梯度，重复测定 6 次，计算低、中、高三个浓度梯度的回收率和相对标准偏差，以考察方法的准确度和精密度（RSD）。

由表 6 数据可知，9 种化合物三个浓度梯度的回收率在 87.2%~111.2% 之间，相对标准偏差均小于 10%，由此可以说明该方法的准确度和精密度均符合实际分析检测的要求。

表 6　回收率和精密度
Table 6　Recovery rate and precision

化合物	理论浓度（ng/mL）	平均回收率（%）	精密度RSD（%）
AZA-1	0.5	89.2	7.2
	2	102.4	5.5
	6	93.9	3.7
AZA-2	0.5	89.8	6.9
	2	96.1	4.4
	6	93.3	4.0
AZA-3	0.5	90.2	7.5
	2	104.7	7.1
	6	95.1	3.9
OA	0.5	91.4	5.6
	2	90.0	3.9
	6	87.2	2.8
DTX-1	0.5	108.6	8.1
	2	111.2	6.4
	6	101.9	3.3
DTX-2	0.5	107.3	7.4
	2	105.1	6.0
	6	96.5	3.9
PTX-2	0.5	106.2	8.6
	2	104.7	5.1
	6	96.9	4.2
GYM	0.5	88.2	8.7
	2	98.3	7.9
	6	92.8	5.3
SPX1	0.5	88.1	9.2
	2	95.4	5.5
	6	94.5	3.7

2.5　实际贝类样品测定

用本实验建立的方法检测海南省五个城市市售的菲律宾蛤仔、魁蚶、华贵栉孔扇贝等约十个品种的贝类，对检出率和超标率进行分析（表 7）。我国大部分沿海海域，如广东沿海、江浙海域均有 DSP 的污染存在，个别海域超标率竟达 77%[38−43]。此次实验发现，海南省近岸海域贝类腹泻性贝类毒素的污染概率较大，但是超标率不高。

3　结论

贝类毒素种类繁多、结构复杂、样本基质较为复

表 7 不同海域中 DSP 的检出率和超标率

Table 7 Detection rate and over - standard rate of DSP in different sea areas

地区	样品量(份)	检出率(%)	超标率(%)
海口海域	54	13.0	1.9
文昌海域	52	17.3	0
琼海海域	54	1.9	0
三亚海域	53	5.7	0
儋州海域	54	11.1	0
东方海域	55	3.6	0

杂，为尽量避免或减少假阳性结果出现，研究开发高分辨率质谱测定技术，能够快速、准确进行大批量样品检测，多种毒素同时定性定量的检测技术是非常必要的。本方法可同时检测 9 种 DSP，OA、DTX1、DTX2、PTX2、GYM、SPX1、AZA1、AZA2、AZA3 在质量浓度 0.5~50 ng/mL 的范围内，其线性相关系数均在 0.996 以上，检出限为 1~10 μg/kg，远远低于欧盟立法机构所确定的限量要求，回收率为 87.2%~111.2%，相对标准偏差为 2.8%~9.2%。本方法的线性相关系数、检出限、回收率、精密度均能满足腹泻性贝类毒素的日常检测需要，并且一个样品从前处理到上机检测，最多只需要 2 h 就可以完成。结果表明，在众多方法中 HPLC-MS/MS 可满足多种毒素同时检测需求，操作简便快捷、特异性高、灵敏度较高、重复性好、准确性高，实验过程中损失较小，稳定性重现性均良好，而且节约成本，适合大批量检验。

参考文献

[1] LEE J S, YANAGI T, KANNA R, Fluorometric determination of diarrhetic shellfish toxins by high performance liquid chromatography [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1987, 51: 877-881.

[2] CHEN Junhui, HAN Tongzhu, LI Xiaotong, et al. Occurrence and distribution of marine natural organic pollutants: Lipophilic marine algal toxins in the Yellow Sea and the Bohai Sea, China[J]. J Science of the Total Environment, 2018: 931−939.

[3] CHOONSHIK SHIN, HAERIM JANG, HYEJIN JO, et al. Development and validation of an accurate and sensitive LC-ESI-MS/MS method for the simultaneous determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish and tunicate[J]. Food Control, 2017: 171−178.

[4] 金薇, 姚敬元, 陈文博, 等. 利玛原甲藻中大田软海绵酸和鳍藻毒素-1 提取与纯化[J]. 海洋环境科学, 2020(5): 791−797. [JIN Wei, YAO Jingyuan, CHEN, Wenbo, et al. Extraction and purification of hydrochloric acid and finotoxin-1 from prodinoflagellates Lima[J]. Marine Environmental Science, 2020(5): 791−797.]

[5] 杨维东, 彭喜春, 刘洁生, 等. 腹泻性贝毒研究现状[J]. 海洋科学, 2005(5): 66−72. [YANG Weidong, PENG Xichun, LIU Jiesheng et al. Research status of diarrhea shellfish virus[J]. Marine Science, 2005(5): 66−72.]

[6] 刘仁沿. 我国贝类中赤潮毒素腹泻性贝毒免疫检测技术研究 [D]. 大连: 大连海事大学, 2008. [LIU Renyan. Study on immunodetection technology of red tide toxin diarrhea shellfish in China[D]. Dalian: Dalian Maritime University, 2008.]

[7] JAMES KJ, LEHANE M, MORONEY C, et al. Azaspiracid shellfish poisoning: unusual toxin dynamics in shellfish and the increased risk ofacute human intoxications[J]. Food Additives and Contaminants, 2002

[8] 梁玉波, 李冬梅, 姚敬元, 等. 中国近海藻毒素及有毒微藻产毒原因种调查研究进展[J]. 海洋与湖沼, 2019(3): 511−524. [LIANG Yubo, LI Dongmei, YAO Jingyuan, et al. Research progress on the causative species of peralgal toxins and toxic microalgae in China[J]. Chinese Journal of Microbiology and Biotechnology, 2019(3): 511−524.]

[9] NONG SOO LEE, TOSHIHIKO YANAGI, RITSUKO KENMA, et al. fluorometric determination of diarrhetic shellfish toxins by high-performance liquid chromatography[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1987(3): 877−881.

[10] BERND KROCK, URBAN TILLMANN, UWE JOHN, et al. LC-MS-MS aboard ship: tandem mass spectrometry in the search for phycotoxins and novel toxigenic plankton from the North Sea[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008(5): 797−803.

[11] 刘晓玉, 徐静, 黄莲芝, 等. 腹泻性贝类毒素及检测技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2015(10): 4096−4102. [LIU Xiaoyu, XU Jing, HUANG Lianzhi, et al. Research progress of diarrhea shellfish toxins and detection technology[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2015(10): 4096−4102.]

[12] 柳俊秀, 胡乐琴, 何培民. 腹泻性贝毒素软海绵酸的昆明系小鼠生物学检测法的建立[J]. 生态毒理学报, 2009(3): 446−451. [LIU Junxiu, HU Leqin, HE Peimin. Establishment of a biological assay for diarrhea betoxin-soft sponge acid in Kunming mice[J]. Journal of Ecotoxicology, 2009(3): 446−451.]

[13] BERND CHRISTIAN, BERND LUCKAS. Determination of marine biotoxins relevant for regulations: from the mouse bioassay to coupled LC-MS methods[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008, 391: 117−134.

[14] GERSSEN A, MULDER P, BOER J D. Screening of lipophilic marine toxins in shellfish and algae: Development of a library using liquid chromatography coupled to orbitrap mass spectrometry [J]. Analytica Chimica Acta, 2011, 685: 175−185.

[15] 方丽媛, 李代宗, 肖勤. 贝类毒素及其检测方法研究进展[J]. 中国渔业质量与标准, 2017(1): 41−49. [FANG Liyuan, LI Daizong, XIAO Qin. Research progress of shellfish toxin and its detection methods[J]. China Fishery Quality and Standards, 2017(1): 41−49.]

[16] 潘柳波, 黄薇, 王舟, 等. 深圳市市售贝类的腹泻性贝类毒素污染状况分析[J]. 职业与健康, 2016, 32(1): 630−632. [PAN Liubo, HUANG Wei, WANG Zhou, et al. Analysis of diarrhoeal shellfish toxin pollution of shellfish sold in Shenzhen[J]. Occupation and Health, 2016, 32(1): 630−632.]

[17] 李芳, 李雪梅, 李献刚, 等. 贝类毒素检测方法研究概况[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(23): 184−186. [LI Fang, LI Xuemei, LI Xiangang, et al. Overview of shellfish toxin detection methods [J]. Food Research and Development, 2015, 36(23): 184−186.]

［18］ 郑仁锦, 李榕珊, 黄宏南, 等. 福建省市售水产品中河豚毒素及腹泻性贝类毒素污染状况[J]. 职业与健康, 2016, 32(17): 2367−2370. ［ZHENG Renjin, LI Rongshan, HUANG Hongnan, et al. Pollution status of tetrodotoxin and diarrhoeal shellfish toxin in aquatic products sold in Fujian Province[J]. Occupational and Health, 2016, 32(17): 2367−2370.］

［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. GB 5009.212-2016 食品安全国家标准贝类中腹泻性贝类毒素的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. ［State Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China State Food and Drug Administration. GB 5009.212-2016 National Standard for Food Safety: Determination of diarrhea shellfish toxins in shellfish [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. GB 5009.213-2016 食品安全国家标准贝类中麻痹性贝类毒素的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. ［State Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China State Food and Drug Administration. GB 5009.213-2016 National Standard for Food Safety: Determination of paralytic shellfish toxins in shellfish [S]. Beijing: China Standard Press, 2016.］

［21］ 浙江省质量监督局. DB33/T 743-2009 水产品中腹泻性贝类毒素残留量的测定液相色谱-串联质谱法 [S]. Zhejiang Provincial Bureau of Quality Supervision. DB33/T 743-2009 Determination of diarrhea shellfish toxin residues in aquatic products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [S].

［22］ 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SN/T 4251-2015 出口贝类中原多甲藻酸类贝类毒素的测定也想色谱-质谱/质谱法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2015. ［General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. Determination of polydinoic acid shellfish toxins in export shellfish is similar to chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry [S]. Beijing: China Standard Press, 2015.］

［23］ 柳俊秀, 何培民. 赤潮藻毒素种类与化学结构研究进展[J]. 中国医药生物技术, 2009, 4(2): 144−147. ［LIU Junxiu, HE Peimin. Research progress on species and chemical structure of red tide alga toxin[J]. China Medical Biotechnology, 2009, 4(2): 144−147.］

［24］ SATAKE M, OFUJI K, NAOKI H, et al. Azaspiracid, a new marine toxin havingunique spiro ring assemblies, isolated from Irish-mussels, *Mytilus edulis*[J]. Journal of the American Chemical Society, 1998, 120(38): .9967−9968.

［25］ VILARI O N, NICOLAOU K C, FREDERICK M O, et al. Irreversible cytoskeletal disarrangement is independent of caspase activation during *in vitro* azaspiracid toxicity in human neuroblastoma cells[J]. Biochemical Pharmacology, 2007, 74(2): 327−335.

［26］ JAMES KJ, MORONEY C, RODEN C, et al. Ubiquitous b' enign ' algae emerges as the cause of shellfish contamination responsible for the human toxic syndrome, Azaspiracid poisoning[J]. Toxicon, 2003, 41(2): .145−151.

［27］ LIU Lei, WEI Ning, GOU Yuxiao, et al. Seasonal variability of Protoceratium reticulatum and yessotoxins in Japanese scallop *Patinopecten yessoensis* in northern Yellow Sea of China[J]. Toxicon, 2017, 139: 31−40.

［28］ 李兆新, 孙晓杰, 郭萌萌,等. 腹泻性贝类毒素的检测、制备与预警技术 [Z]. 青岛市级科技成果, 2017. ［LI Zhaoxin, SUN Xiaojie, GUO Mengmeng, et al. Detection, preparation and early warning technology of diarrheal shellfish toxins[Z]. Qingdao Municipal Scientific and Technological Achievements, 2017.］

［29］ YANG Liu, REN Cheng YU, FAN Zhoukong, et al. Lipophilic marine toxins discovered in the Bohai Sea using high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry[J]. Chemosphere, 2017, 180: 380−388.

［30］ LIU R Y, LIU L, XU Y L, et al. The production, distribution and fate of yessotoxins, taking the Northern Yellow Sea of China for example[J]. Environment and Ecology Research, 2016, 4(6): 322−345.

［31］ 刘琳琳. 超高效液相色谱-串联质谱法检测织纹螺中多种海洋生物毒素的研究 [D]. 福州: 福建医科大学, 2016. ［LIU Linlin. Studies on detection of multiple marine biotoxins in nassarius by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[D]. Fuzhou: Fujian Medical University, 2016.］

［32］ 刘琳琳, 郑仁锦, 李志军, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定织纹螺中腹泻性贝类毒素的实验研究[J]. 中国预防医学杂志, 2016(6): 414−418. ［LIU Linlin, ZHENG Renjin, LI Zhijun, et al. Determination of diarrhoeal shellfish toxins in snails by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Preventive Medicine, 2016(6): 414−418.］

［33］ GERSSEN A, MULDER PP, MCELHINNEY MA, et al. Liquid chromatography-andem mass spectrometry method for the detection of marine lipophilic toxins under alkaline conditions[J]. J Chromat A, 2009, 1216(9): 1421−1430.

［34］ 方兰云, 姚浔平, 王立, 等. 固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法测定双壳贝类中扇贝毒素和原多甲藻酸[J]. 中国卫生检验杂志, 2014(16): 2316−2320. ［FANG Lanyun, YAO Xunping, WANG Li, et al. Determination of scallop toxin and propolydinoic acid in bivalve shellfish by solid phase extraction/high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Science, 2014(16): 2316−2320.］

［35］ 严忠雍, 张小军, 李奇富, 等. 免疫亲和净化-液相色谱-串联质谱法测定贝类中腹泻性贝类毒素 [J]. 食品科学, 28(18): 304−309. ［YAN Zhongyong, ZHANG Xiaojun, LI Qifu, et al. Determination of diarrhea toxin in shellfish by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Science, 28(18): 304−309.］

［36］ EU-Harmonised Standard Operating Procedure for determination of lipophilic marine biotoxins in molluscs by LC-MS/MS[S]. Version 5. European Union Reference Laboratory for Marine Biotoxins (EU-RL-MB), 2015.

［37］ 刘丽, 刘磊, 赵芮, 等. 酶联免疫吸附分析检测鳍藻毒素 DTX1 和 DTX2[J]. 分析科学学报, 2016(4): 557−560. ［LIU Li, LIU Lei, ZHAO Rui, et al. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect DTX1 and DTX2[J]. Journal of Analytical Science, 2016(4): 557−560.］

［38］ 吴施卫, 张纯超, 卢楚谦, 等. 南海近岸海域腹泻性贝类毒素分析 [J]. 海洋环境科学, 2005, 24(4): 48−51. ［WU Shiwei,

ZHANG Chunchao, LU Chuqian, et al. Marine Environmental Science, 2005, 24(4): 48−51. ］

［39］ 吴施卫, 曾森, 卢大鹏, 等. 广东近岸海域 2005 年春季的腹泻性贝毒素特征分析 [J]. 海洋环境科学, 2008, 27(2): 165−168. ［WU Shiwei, ZENG Miao, LU Dapeng, et al. Marine Environmental Science, 2008, 27(2): 165−168. ］

［40］ 徐志斌, 吴施卫, 陈凯彪, 等. 广东省近岸海域贝类腹泻性毒素含量与胃含物的分析[J]. 海洋通报, 2010, 29(4): 444−449. ［XU Zhibin, WU Shiwei, CHEN Kaibiao, et al. Analysis of contents of diarrheal toxins and stomach contents in shellfish in coastal waters of Guangdong Province[J]. Marine Science Bulletin, 2010, 29(4): 444−449. ］

［41］ 戴红, 李奶姜, 陈国斌. 福建三都湾赤潮监控区的麻痹性贝毒和腹泻性贝毒研究[J]. 海洋环境科学, 2005, 24(1): 44−47. ［DAI Hong, LI Naijiang, CHEN Guobin. Study on paralytic shellfish toxicity and diarrhea shellfish toxicity in Sandu Bay red tide monitoring area[J]. Marine Environmental Science, 2005, 24(1): 44−47. ］

［42］ 张树刚, 邹清, 陈雷, 等. 浙南海域腹泻性贝毒分析 [J]. 海洋科学, 2011, 35(1): 44−47. ［ZHANG Shugang, ZOU Qing, Chen Lei, et al. Marine Science, 2011, 35(1): 44−47. ］

［43］ WU J Y, ZHENG L, WANG J H. Contamination of shellfish from Shanghai seafood markets with paralytic shellfish poisoning and diarrhetic shellfish poisoning toxins determined by mouse bioassay and HPLC[J]. Food Additives and Contaminants, 2005, 22(7): 647−651.

王东鹏, 叶诚. 增强型固相萃取净化-高效液相色谱-串联质谱法测定鲈鱼中 18 种磺胺类药物的残留量 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 371−377. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110162

WANG Dongpeng, YE Cheng. Determination of 18 Sulfonamide Drugs Residues in *Lateolabrax japonicus* by High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry with Enhanced Solid Phase Extraction[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 371−377. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110162

· 分析检测 ·

增强型固相萃取净化-高效液相色谱-串联质谱法测定鲈鱼中 18 种磺胺类药物的残留量

王东鹏, 叶　诚*

（武汉海关技术中心, 湖北武汉 430050）

摘　要: 建立了增强型脂质去除固相萃取净化高效液相色谱串联质谱法同时检测鲈鱼中 18 种磺胺类药物残留的分析方法。鱼肉样品经 1% 甲酸乙腈提取，增强型脂质去除固相萃取柱进行净化，用 CNW Athena C_{18}-WP 色谱柱（2.1 mm×100 mm，3 μm）进行分离，以甲醇和 0.1% 甲酸水溶液为流动相梯度洗脱，ESI 正离子模式扫描，采用多反应监测模式测定，内标法定量。结果表明：18 种磺胺类药物在 5~200 ng/mL 范围内具有良好的线性关系（$r \geq 0.9962$），方法的检出限和定量限分别为 0.11~0.47 和 0.37~1.57 μg/kg。在 3 个不同浓度添加水平下，样品回收率在 73.30%~116.9% 之间，相对标准偏差为 0.29%~7.74%（n=6）。该方法操作简单，准确快速，灵敏度高，可用于鲈鱼中多种磺胺类药物残留的检测。

关键词: 增强型固相萃取, 鲈鱼, 磺胺类药物, 高效液相色谱串联质谱法

中图分类号: TS251.7　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0371−07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021110162

本文网刊:

Determination of 18 Sulfonamide Drugs Residues in *Lateolabrax japonicus* by High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry with Enhanced Solid Phase Extraction

WANG Dongpeng, YE Cheng*

（Wuhan Customs Technology Center, Wuhan 430050, China）

Abstract: A high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method was developed for simultaneous determination of 18 sulfonamide drugs residues in fish. The samples were extracted by 1% formic acid acetonitrile and the extracts were purified on enhanced solid-phase extraction column. The 18 sulfonamide drugs were analyzed by CNW Athena C_{18}-WP column (2.1 mm×100 mm, 3 μm) using methanol and 0.1% formic acid as the mobile phases, the sample was analyzed under the multiple reaction monitoring mode with positive electrospray ionization(ESI^+) and quantify by internal standard. The results showed that good linearities were obtained for the 18 sulfonamides in 5~200 ng/mL ($r \geq 0.9962$). The limits of detection and quantification for sulfonamides were 0.11~0.47 and 0.37~1.57 μg/kg, respectively. The recoveries at three concentrations ranged from 73.30%~116.9%, with the RSD from 0.29%~7.74% (n=6). The method was simple, accurate, rapid, and highly sensitive. The method was successfully used for measurement of multiple sulfanilamide drugs residues in fish.

Key words: enhanced solid phase extraction; *Lateolabrax japonicus*; sulfonamides; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

收稿日期: 2021−11−15

基金项目: 武汉海关科研项目（2019WK005）。

作者简介: 王东鹏（1995−）, 男, 硕士, 研究方向: 药物分析, E-mail: 1808124001@qq.com。

*** 通信作者:** 叶诚（1981−）, 男, 硕士, 高级工程师, 研究方向: 食品安全分析与检测, E-mail: yechenghust@163.com。

磺胺类药物(sulfonamides, SAS)是含有对氨基苯磺酰胺结构的人工合成的抗菌药物[1−2], 因抗菌谱广[3]、抗菌效应强、成本低[4] 以及化学性质稳定等优点而广泛应用于临床及畜牧业和养殖业[5−6]。然而, 磺胺类药物在体内代谢缓慢, 长期大量使用容易导致该类药物在动物体内残留, 进一步通过食物链在人体内蓄积, 引发肾毒性、胃肠道出血、再生障碍性贫血[7]、过敏反应、以及细菌耐药性和致癌性等[4,8−10], 严重危害人类健康。许多国家对动物源性食品中磺胺类药物的最大残留量有明确规定, 国际食品法典委员会(Codex Alimentarius Commission, CAS)规定动物源性食品中磺胺类药物最大残留量为 100 μg/kg[11]。我国在 GB31650-2019《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》中规定, 除牛奶外, 动物源性食品中磺胺类药物最大残留量为 100 μg/kg[12]。值得注意的是, 尽管多个国家和地区明确规定磺胺类药物的最大残留量, 但农户为追求更高的商业价值, 磺胺类药物的滥用现象仍然存在。因此, 建立高效、准确、快速的磺胺类药物检测方法对食品安全至关重要。

目前, 高效液相色谱-串联质谱法、毛细管电泳法、高效液相色谱法、放射性免疫法、免疫传感器法、酶联免疫吸附法和胶体金免疫层析法是磺胺类抗菌药物常用的检测方法[4,13], 高效液相色谱-串联质谱法因具有灵敏度高、准确性好等优点, 是目前动物源性食品中抗生素残留最主要的检测方法。样品前处理方法直接影响检测结果, 磺胺类药物常用的提取溶剂为乙腈、二氯甲烷或混合溶剂, 在提取溶剂中加入酸或碱可增加提取效果。QuEChERS 净化法[14]、固相萃取法[15−16]、固相微萃取法、基质固相分散法[17]、加压液体萃取法、免疫亲和色谱法[18] 和液液萃取法[19] 是常用的提取方法。动物源性食品常含有大量脂肪、蛋白质等大分子化合物, 对样品检测干扰较大, 传统的前处理方法操作复杂、耗时长、溶剂消耗大, 提取液中较高含量的脂肪和蛋白质仍然是其主要缺点[19], 新型增强型脂质去除净化柱(Captiva EMR-Lipid)通过体积排阻和疏水作用, 可有效地去除脂质, 最大程度地减少分析物的流失, 方法的可靠性和耐用性显著提高。目前增强型脂质去除固相萃取净化柱在动物源性食品中磺胺类药物检测中应用较少。

本研究拟采用新型增强型脂质去除固相萃取柱结合高效液相色谱-串联质谱法建立鲈鱼中 18 种磺胺类抗菌药物高效、灵敏、快速的检测方法, 旨在为鲈鱼等动物源性食品中磺胺类抗菌药物的快速检测提供新的依据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大口黑鲈鱼样品 购于超市; 磺胺醋酰、磺胺对甲氧嘧啶、磺胺吡啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺甲噻二唑、磺胺噻唑、磺胺氯哒嗪、磺胺甲噁唑、磺胺异噁唑、磺胺嘧啶、磺胺喹恶啉、磺胺间二甲氧嘧啶、磺胺甲基嘧啶、磺胺邻二甲氧嘧啶、磺胺苯吡唑、苯甲酰磺胺(浓度 100 μg/mL) 天津阿尔塔科技有限公司; 甲氧苄啶(浓度 100 μg/mL) 北京坛墨质检科技有限公司; 2 种内标(磺胺间二甲氧嘧啶-D6 和磺胺邻二甲氧嘧啶-D3) 纯度≥ 98.9%, 上海安谱璀世标准技术服务有限公司; 甲醇 色谱纯, 武汉弗顿控股有限公司; 乙酸乙酯 色谱纯, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 乙腈 色谱纯, 美国 Honeywell 公司; 甲酸铵 色谱纯, 德国 CNW 公司; 甲酸 分析纯, 广东光华科技股份有限公司; 氯化钠、无水硫酸钠 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; 实验用水 为超纯水。

Agilent1200 高效液相色谱仪配二元高压泵、自动进样器和柱温箱, Captiva EMR-Lipid 3 mL/300 mg 固相萃取柱 美国 Agilent 公司; Poly-Sery MCX 3 mL/60 mg 固相萃取柱、CNW Athena C_{18}-WP 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 3 μm) 德国 CNW 公司; AB SCIEX API 4000Q 质谱联用系统配电喷雾离子源(ESI) 美国 AB SCIEX 公司; Neofuge1600R 台式冷冻离心机 上海力申科学仪器有限公司; BS210S 万分之一电子天平 德国赛多利斯仪器系统有限公司; DMT-2500 涡旋振荡仪 杭州米欧仪器有限公司; HGC-24A 氮气吹干仪 天津恒奥科技发展有限公司; KQ-500 超声波清洗仪 昆山市超声仪器有限公司; 优普超纯水制造系统 四川优普超纯科技有限公司; GM200 刀式捣磨仪 德国 RETSCH 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 标准品溶液的配制 准确移取 18 种磺胺标准储备液(100 μg/mL)各 1 mL, 用 10% 甲醇水溶液定容至 10 mL, 配制成浓度为 10 μg/mL 的标准中间液。移取各标准中间液 1 mL, 用 10% 甲醇水溶液配制成浓度为 1 μg/mL 的混合标准中间溶液。此外, 配制 1 μg/mL 磺胺间二甲氧嘧啶-D6 和磺胺邻二甲氧嘧啶-D3 内标工作液。用 10% 甲醇水溶液逐级稀释配制成质量浓度为 5、10、20、50、100、200 ng/mL 的标准工作液, 同时, 在每个浓度点添加 50 μL 内标工作液, 内标浓度为 10 ng/mL。

1.2.2 样品前处理 取鲈鱼去鳞去鳃后, 清洗干净取鲈鱼可食用肌肉部位, 用刀式捣磨仪充分混匀粉碎。精密称取鱼肉样品 5 g 于 50 mL 离心管中, 加入 50 μL 内标工作液, 加入 10 mL 乙腈溶液(含 1% 甲酸), 再涡旋 2 min, 加入 1 g 氯化钠和 4 g 无水硫酸钠, 涡旋 5 min, 振荡 30 min, 超声 15 min, 8500 r/min 离心 5 min, 取上清液于另一 50 mL 离心管。

取 2 mL 上清液过增强型脂质去除净化柱, 重力自流, 收集流出液, 在 45℃ 水浴下氮吹至近干, 用 10% 甲醇水溶液定容至 1 mL, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 待测。

1.2.3 色谱条件 色谱柱: CNW Athena C_{18}-WP (2.1 mm×100 mm, 3 μm); 流动相 A 为 0.1% 甲酸水

溶液，B 为甲醇；流速为 0.3 mL/min；进样体积为 10 μL；柱温 30 ℃；洗脱梯度：0~0.5 min，90% A；0.5~2.0 min，90%~60% A；2.0~11.0 min，60%~10% A；11.0~11.1 min，10%~90% A；11.1~15.0 min，90% A。

1.2.4　质谱条件　电喷雾离子源（electrospray ionization，ESI）；多反应监测模式（multiple reaction monitoring，MRM）；正离子模式；离子源温度（TEM）：500 ℃；气帘气（CUR）10 psi；喷雾电压（IS）5000 V；雾化气 40 psi；辅助气 50 psi。其他参数见表 1。

1.2.5　线性范围、检出限与定量限测定　配制质量浓度为 5、10、20、50、100、200 ng/mL 的标准工作液，分别以进样浓度 X（ng/mL）和峰面积 Y 为横坐标和纵坐标，绘制标准曲线，并计算回归方程和相关系数。以信噪比为 3（S/N=3）作为检出限（limits of detection，LOD），以信噪比为 10（S/N=10）作为定量限（limits of quantification，LOQ）。

1.2.6　回收率与精密度实验　在阴性鱼肉样品中各添加质量浓度为 5、10、50 μg/kg 三水平的混合标准溶液，重复测定 6 次，计算各磺胺类药物回收率和精密度。

1.3　数据处理

采用统计软件 Excel 2016、GraphPad Prism 6 和 Analyst 1.6.2 软件对采集和检测结果进行数据处理分析。

2　结果与分析

2.1　仪器条件的优化

2.1.1　色谱条件的优化　根据中华人民共和国国家标准 GB/T 21316-2007[20]、农业农村部 1025 号公告-23-2008 及文献报道，磺胺类化合物常用的流动相为乙腈[21−22] 和甲醇[23−25]。此外，磺胺类化合物在酸性条件下具有较高的较稳定性和溶解性[19]，因此，本研究考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1% 甲酸水溶液和乙腈-0.1% 甲酸水溶液对 18 种磺胺类化合物的分离度、峰形及灵敏度的影响。结果表明，以甲醇-水和乙腈-水为流动相时，化合物峰形差，对于待测组分中存在的同分异构体，基线无法实现完全分离。通过比较甲醇-0.1% 甲酸水溶液和乙腈-0.1% 甲酸水溶液发现，在水相中加入 0.1% 甲酸时，待测组分峰型尖锐，拖尾现象有所改善，同时甲酸有利于提高待测物在正离子扫描模式中的离子化效率，进一步提高了灵敏度。与乙腈相比，采用甲醇-0.1% 甲酸水溶液梯度洗脱时，待测物可以实现良好的基线分离。

研究发现加入甲酸铵或乙酸铵可以稳定水相，改善峰型，对同分异构体实现更好的分离效果[13, 26]，然而本研究通过比较甲醇-0.1% 甲酸水溶液和甲醇-0.1% 甲酸-5 mmol/L 甲酸铵水溶液对待测物峰型及分离度的影响，发现加入甲酸铵对待测物峰型及分离度影响较小，因甲酸铵属于盐类化合物，考虑到试剂的消耗以及盐类流动相残留对色谱柱和仪器使用寿命的影响，因此本研究最终选择甲醇-0.1% 甲酸水溶液为流动相。18 种磺胺类化合物的总离子流图如图 1。

表 1　18 种磺胺类药物和内标的质谱参数

Table 1　Mass spectrum parameters of 18 sulfonamides and internal standard

序号	化合物	母离子（m/z）	子离子（m/z）	去簇电压（V）	碰撞能（eV）
1	甲氧苄啶	291.1	230*	60	32
			261		27
			123.1		36
2	磺胺醋酰	215	275.1	40	25
			156*		18
			108		28
3	磺胺嘧啶	251	156*	55	23
			108		31
4	磺胺吡啶	250	156*	50	25
			184	55	22
			92.1		26
5	磺胺噻唑	256	108.1	55	30
			108.01		30
			92		33
			156.02*	50	22
			108.02		27
6	磺胺甲基嘧啶	265	156.02*	55	25
			172		22
			108		32
7	磺胺二甲嘧啶	279	186*	55	20
			156		23
			108		28
8	磺胺对甲氧嘧啶	281	156.02*	55	25
			108.02		28
9	磺胺间甲氧嘧啶	281	156.03*	55	23
			108.03		29
10	磺胺甲噻二唑	271	156*	50	20
			108		26
11	磺胺氯哒嗪	285	156*	50	23
			108		34
12	磺胺甲噁唑	254	156*	50	23
			108		25
13	磺胺异噁唑	268	156*	45	23
			173		20
			108.1		31
14	磺胺喹噁啉	301	156*	50	25
			108		28
15	磺胺间二甲氧嘧啶	311	156.01*	65	31
			108.01		35
16	磺胺邻二甲氧嘧啶	311	156.02*	65	28
			108.02		32
17	磺胺苯吡唑	315.2	158.1	60	26
			108.1		32
			156.1*		28
18	苯甲酰磺胺	277	156*	55	23
			108		28
19	磺胺间二甲氧嘧啶-D6	317	162.1*	44	30
			156.1		33
			251.1		29
20	磺胺邻二甲氧嘧啶-D3	314	156.1*	77	26
			92.1		42
			108.1		36

注：*为定量离子。

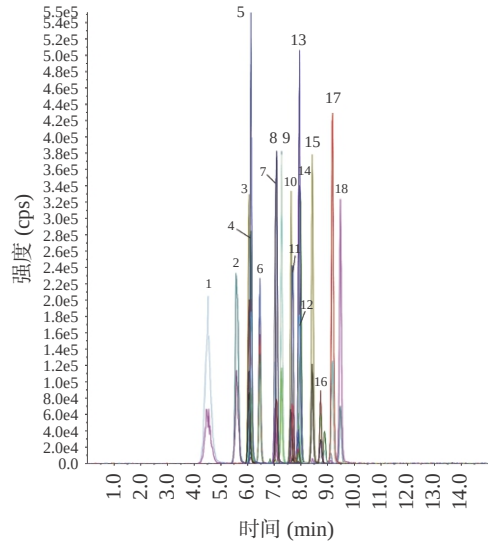


图 1 混合标准品溶液总离子流图

Fig.1 TIC chromatograms of mixed standard solution

注: 1: 磺胺醋酰; 2: 磺胺嘧啶; 3: 磺胺噻唑; 4: 磺胺吡啶; 5: 甲氧苄啶; 6: 磺胺甲基嘧啶; 7: 磺胺二甲嘧啶; 8: 磺胺甲噻二唑; 9: 磺胺对甲氧嘧啶; 10: 磺胺氯哒嗪; 11: 磺胺甲噁唑; 12: 磺胺间甲氧嘧啶; 13: 磺胺邻二甲氧嘧啶; 14: 磺胺异噁唑; 15: 苯甲酰磺胺; 16: 磺胺苯吡唑; 17: 磺胺间二甲氧嘧啶; 18: 磺胺喹噁啉。混合标准品溶液的质量浓度为 100 ng/mL。

2.1.2 质谱条件的优化 通过在离子源正负离子模式下对 18 种磺胺类药物扫描, 发现 18 种磺胺类药物在正离子模式下响应较好, 因此选择离子源正离子模式对磺胺类药物母离子全扫, 确定目标化合物的母离子。再进一步通过二级质谱优化磺胺类抗菌药物的子离子、碰撞能以及去簇电压等参数(见表 1)。采用优化后的色谱和质谱参数对 18 种磺胺类药物采集, 如图 1 所示, 结果表明化合物具有良好的分离度和灵敏度, 优化的仪器参数可满足磺胺类抗菌药物分析。

2.2 前处理条件的优化

2.2.1 提取条件的优化 动物源性食品中磺胺类化合物常用的提取溶剂为乙酸乙酯、甲醇[27]和乙腈[28−31], 本研究考察了上述 3 种溶剂的提取效果, 结果表明, 甲醇提取液含有白色浑浊物, 且难以通过增强型脂质去除固相萃取净化柱。乙酸乙酯和乙腈提取液较澄清透明, 且易通过增强型脂质去除固相萃取净化柱。与乙酸乙酯相比, 采用乙腈作为提取溶剂时, 回收率相对较高。此外, 磺胺类化合物结构中因含有芳伯氨基而呈现弱碱性, 研究发现, 使用酸化有机试剂提取, 磺胺类化合物溶解度更高, 提取效率较好[18,31], 与甲醇相比, 乙腈极性与待测物极性相近, 因动物源性食品中含有大量的脂肪和蛋白质, 考虑到乙腈具有较好的蛋白沉淀效果, 因此本研究在参考赵巧灵等、容裕棠等方法[8,14]基础上, 最终选用 1% 甲酸乙腈为提取溶剂。

2.2.2 净化方式的优化 样品中大量的脂肪和蛋白质对检测结果影响较大, 本研究在提取过程中加入氯化钠和无水硫酸钠, 通过盐析使蛋白质沉淀, 进一步减少了蛋白质对样品检测的干扰。尽管蛋白质可通过盐析后离心去除, 而样品中的脂肪和磷脂等仍然会干扰待测物的检测, 因此, 本研究比较了新型 Captiva EMR-Lipid 固相萃取柱与 Poly-Sery MCX 固相萃取柱的净化效果及对磺胺类药物回收率的影响。由图 2 可以看出, 采用 Captiva EMR-Lipid 固相萃取柱净化时, 化合物回收率高, 且相对稳定。此外, 如图 3 所示, 在净化过程中该净化柱无需活化、淋洗等过程, 通过重力自流即可完成净化, 极大地简化了样品

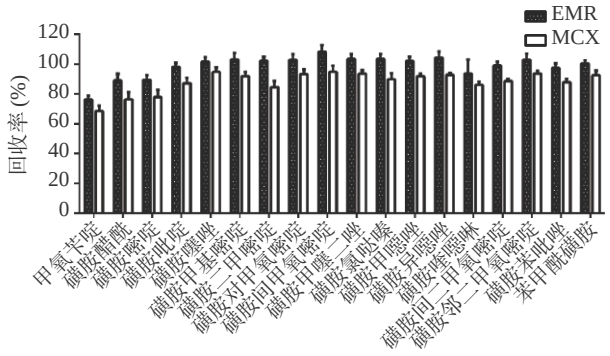


图 2 不同净化柱对 18 种磺胺回收率的影响

Fig.2 Effects of different purification columns on recovery rates of 18 sulfonamides

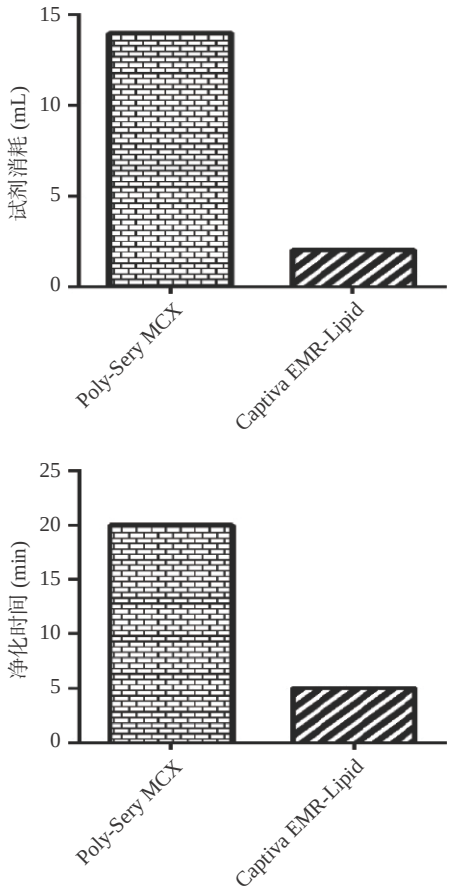


图 3 不同固相萃取柱对磺胺类药物净化效果的影响

Fig.3 Effect of different solid phase extraction columns on the purification effect of sulfonamides

前处理步骤，在减少有机试剂消耗的同时，有效缩短了净化时间，简便易用，省时省力，显著提高了方法的可操作性和便利性。该方法最大的优点在于采用的 Captiva EMR-Lipid 固相萃取柱结合了体积排阻和疏水相互作用，在高选择性和高效去除脂质的同时，能最大程度地减少待测物的流失，从而有利于改善方法的耐用性及可靠性。

2.3　方法学考察

2.3.1　线性范围、检出限与定量限　配制质量浓度为 5、10、20、50、100、200 ng/mL 的标准工作液，按照 1.2 步骤测定。以信噪比为 3(S/N=3)作为检出限(LOD)，以信噪比为 10(S/N=10)作为定量限(LOQ)。结果表明，18 种磺胺类抗菌药物在 5~200 ng/mL 范围内具有良好的线性关系，相关系数 $r \geqslant 0.9962$，方法的检出限为 0.11~0.47 μg/kg，定量限为 0.37~1.57 μg/kg(见表 2)。

2.3.2　回收率与精密度　按 1.2.6 项下方法，向阴性鱼肉样品中分别添加浓度为 5、10、50 μg/kg 三水平的回收率试验，每个添加水平重复测定 6 次。结果表明，3 个添加水平下鲈鱼样品中 18 种磺胺类抗菌药物的平均回收率为 73.30%~116.9%，相对标准偏差为 0.29%~7.74%。结果表明该方法回收率和精密度良好，可满足鲈鱼中 18 种磺胺类抗菌药物残留检测的需求(见表 3)。

表 2　18 种磺胺类抗菌药物的线性范围、相关系数、回归方程、检出限和定量限

Table 2　Linear range, correlation coefficients, regression equations, limits of detection and limits of quantification of 18 sulfonamides

化合物	线性范围(ng/mL)	回归方程	相关系数(r)	检出限(μg/kg)	定量限(μg/kg)
甲氧苄啶	5~200	$y=9.91\times10^{-2}x+9.52\times10^{-1}$	0.9966	0.12	0.41
磺胺醋酰	5~200	$y=1.22\times10^{-1}x+2.29\times10^{-1}$	0.9995	0.41	1.37
磺胺嘧啶	5~200	$y=9.99\times10^{-2}x+9.18\times10^{-2}$	0.9995	0.15	0.50
磺胺吡啶	5~200	$y=6.06\times10^{-2}x+5.69\times10^{-1}$	0.9965	0.16	0.55
磺胺噻唑	5~200	$y=3.08\times10^{-2}x-2.34\times10^{-2}$	0.9989	0.24	0.80
磺胺甲基嘧啶	5~200	$y=6.54\times10^{-2}x-8.95\times10^{-3}$	0.9995	0.24	0.64
磺胺二甲嘧啶	5~200	$y=8.67\times10^{-2}x+2.38\times10^{-1}$	0.9995	0.46	1.56
磺胺对甲氧嘧啶	5~200	$y=1.05\times10^{-1}x+4.25\times10^{-2}$	0.9990	0.47	1.57
磺胺间甲氧嘧啶	5~200	$y=4.14\times10^{-2}x-7.84\times10^{-2}$	0.9979	0.32	1.07
磺胺甲噻二唑	5~200	$y=9.27\times10^{-2}x-2.38\times10^{-1}$	0.9979	0.11	0.37
磺胺氯哒嗪	5~200	$y=7.21\times10^{-2}x-3.05\times10^{-1}$	0.9971	0.16	0.54
磺胺甲噁唑	5~200	$y=6.50\times10^{-2}x-1.33\times10^{-1}$	0.9988	0.15	0.50
磺胺异噁唑	5~200	$y=8.72\times10^{-2}x+1.90\times10^{-1}$	0.9983	0.17	0.58
磺胺喹噁啉	5~200	$y=2.18\times10^{-1}x+6.78\times10^{-2}$	0.9962	0.18	0.60
磺胺间二甲氧嘧啶	5~200	$y=3.15\times10^{-1}x+4.35\times10^{-1}$	0.9967	0.41	1.37
磺胺邻二甲氧嘧啶	5~200	$y=1.51\times10^{-1}x+3.51\times10^{-1}$	0.9984	0.45	1.50
磺胺苯吡唑	5~200	$y=1.67\times10^{-2}x-5.98\times10^{-2}$	0.9971	0.40	1.33
苯甲酰磺胺	5~200	$y=1.03\times10^{-1}x-4.52\times10^{-1}$	0.9966	0.26	0.89

表 3　18 种磺胺类抗菌药物在鱼肉中的回收率和相对标准偏差(RSD)(n=6)

Table 3　Recoveries and relative standard deviations of 18sulfonamidesin fish meat (n=6)

化合物	5 μg/kg		10 μg/kg		50 μg/kg	
	平均回收率(%)	RSD(%)	平均回收率(%)	RSD(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
甲氧苄啶	92.33	0.97	73.30	1.01	116.8	3.68
磺胺醋酰	86.83	1.01	90.15	0.79	92.30	7.74
磺胺嘧啶	86.33	0.89	85.25	1.26	89.23	3.08
磺胺吡啶	113.6	1.29	103.5	0.80	111.2	3.53
磺胺噻唑	104.2	1.02	106.7	1.04	97.97	2.70
磺胺甲基嘧啶	94.90	0.92	112.7	1.20	104.3	2.35
磺胺二甲嘧啶	93.47	1.10	105.3	1.15	116.9	3.99
磺胺对甲氧嘧啶	88.53	0.86	105.3	1.15	98.97	1.22
磺胺间甲氧嘧啶	99.60	1.13	107.5	1.14	99.50	2.53
磺胺甲噻二唑	91.40	0.51	99.50	0.52	99.40	2.92
磺胺氯哒嗪	90.80	1.21	103.0	1.21	104.3	2.53
磺胺甲噁唑	95.10	1.01	104.3	0.45	102.5	2.04
磺胺异噁唑	92.37	1.03	108.2	2.63	98.83	2.14
磺胺喹噁啉	86.03	1.36	86.48	2.44	84.03	2.85
磺胺间二甲氧嘧啶	84.90	2.30	100.9	1.57	99.67	2.70

续表 3

化合物	5 μg/kg		10 μg/kg		50 μg/kg	
	平均回收率(%)	RSD(%)	平均回收率(%)	RSD(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
磺胺邻二甲氧嘧啶	100.3	1.32	106.7	1.99	104.2	4.22
磺胺苯吡唑	86.53	1.21	98.48	0.29	101.7	3.42
苯甲酰磺胺	100.7	0.29	106.0	2.09	100.8	3.14

2.4 实际样品的测定

采用本研究建立的检测方法测定当地市售的 15 份鲈鱼样品，结果显示，18 种磺胺类药物在 15 份鲈鱼样品均未检出。

3 结论

本研究采用新型的增强型脂质去除净化柱结合高效液相色谱-串联质谱法以内标法定量，建立了鲈鱼样品中 18 种磺胺类药物残留的检测方法。通过对色谱、质谱条件以及提取溶剂和净化方式的优化，样品以 1% 甲酸乙腈提取，采用新型的增强型脂质去除固相萃取柱净化，可以有效去除脂质和蛋白质等干扰物，有效提高了回收率，达到了更好的净化效果。该方法操作简单，无需活化、淋洗和洗脱等过程，在减少有机试剂消耗的同时，省时省力，线性关系良好，回收率和精密度均可满足检测分析的需求，适用于以鲈鱼为主的多种水产品中磺胺类药物残留的检测分析。

参考文献

[1] 刘红, 曾建勇, 梁雪琪, 等. QuEChERS EMR-Lipid 结合 LC-MS/MS 测定鸡蛋中磺胺类和喹诺酮类药物残留[J]. 现代食品科技, 2018, 34(9): 235−243. [LIU H, ZENG J Y, LIANG X Q, et al. Determination of sulfonamides and quinolones in eggs by QuEChERS EMR-lipid and high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Modern Food Science & Technology, 2018, 34(9): 235−243.]

[2] AZEVEDO-BARBOSA H, DIAS D F, FRANCO L L, et al. From antibacterial to antitumour agents: A brief review on the chemical and medicinal aspects of sulfonamides[J]. Mini reviews in Medicinal Chemistry, 2020, 20(18): 2052−2066.

[3] 张晓强, 张波, 方萍, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法快速测定鱼肉中 22 种磺胺类药物残留[J]. 理化检验 (化学分册), 2015, 51(3): 369−374. [ZHANG XQ, ZHANG B, FANG P, et al. Rapid determination of 22 sulfonamide residues in fish by QuEChERS-UPLC-MS/MS[J]. Physical Testing and Chemical Analysis(Part B:Chemical Analysis), 2015, 51(3): 369−374.]

[4] 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 GY, SONG GJ, WANG ZH, et al. Determination of sulfonamide drugs residues in aquatic product by solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Food Safety and Quality Detection Technology, 2019, 10(8): 2240−2246.]

[5] CHANG C P, HOU P H, YANG W C, et al. Analytical detection of sulfonamides and organophosphorus insecticide residues in fish in Taiwan[J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2020, 25(7): 1501.

[6] QIN L T, PANG X R, ZENG H H, et al. Ecological and human health risk of sulfonamides in surface water and groundwater of Huixian karst wetland in Guilin, China[J]. The Science of the Total Environment, 2020, 708: 134552.

[7] 张梦雪, 赵义良, 苏青, 等. 水产品中磺胺类药物残留危害及常用检测方法[J]. 今日畜牧兽医, 2019, 35(7): 79−80. [ZHANG M X, ZHAO Y L, SU Q, et al. Residual hazards of sulfonamides in aquatic products and common detection methods[J]. Today Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2019, 35(7): 79−80.]

[8] 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 18 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 18 sulfonamides residues in cultured fish muscle with accelerated solvent extraction by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food Science and Technology, 2019, 44(12): 335−341.]

[9] 萨仁高娃. 磺胺类药物在饲料和畜产品中的残留危害[J]. 草食家畜, 2021(4): 63−66. [Sa RGW. Residue detection of sulfonamides in feed and animal products and harm evaluation[J]. Grass-feeding Livestock, 2021(4): 63−66.]

[10] KHAN D A, KNOWLES S R, SHEAR N H. Sulfonamide hypersensitivity: Fact and fiction[J]. The Journal of Allergy and Clinical Immunology:In Practice, 2019, 7(7): 2116−2123.

[11] Codex Alimentarius Commission. CAC/MRL 2-2015 Maximum residue limits (MRLs) and risk management recommendations (RMRs) for residue of veterinary drugs in foods[S].

[12] 农业农村部, 国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局. GB 31650-2019 中国食品安全标准食品中兽药最大残留限量[S]. 北京: 中国标准出版社, 2019. [Ministry of Agriculture and Rural Affairs Announcement, National Health Commission, State Administration for Market Regulation. GB 31650-2019 National Food Safety Standard. Maximum residue limits for veterinary drugs in foods[S]. Beijing: National Standards Press, 2019.]

[13] 许晓辉, 徐惠昌, 王小乔, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定海螺蛸中 9 种磺胺类药物残留量[J]. 化学试剂, 2021, 43(11): 1546−1550. [XU X H, XU H C, WANG X Q, et al. Ultra-performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry for determination of nine kinds of sulfonamides residues in cuttlebone[J]. Chemical Reagents, 2021, 43(11): 1546−1550.]

[14] 容裕棠, 张宪臣, 张朋杰, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定蜂蜜中 21 种磺胺类药物残留[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(4): 226−233. [RONG Y T, ZHANG X C, ZHANG P J, et al. Simultaneous determination of twenty-one sulfonamides residues in honey by QuEChERS ultra liquid chromatography-mass mass spectrometry[J]. Food and Fermentation Indus-

tries, 2018, 44(4): 226−233.]
[15] 周瑞铮, 陈锦杭, 张树权, 等. 分散固相萃取结合液相色谱-串联质谱法测定淡水鱼中 9 种磺胺类和 3 种喹诺酮类药物残留量[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(17): 6946−6952. [ZHOU R Z, CHEN J H, ZHANG S Q, et al. Determination of 9 kinds of sulfonamides and 3 kinds of quinolones residues in freshwater fish by dispersive solid phase extraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food Safety and Quality Detection Technology, 2021, 12(17): 6946−6952.]
[16] 赵寅, 卢玉, 刘桂亮, 等. 固相萃取-高效液相色谱法同时测定牛奶中 22 种磺胺类兽药残留[J]. 分析试验室, 2021: 1−10. [ZHAO Y, LU Y, LIU G L, et al. Determination of 22 sulfonamides residues in milk by high performance liquid chromatography with solid phase extraction[J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2021: 1−10.]
[17] ZHANG Y P, XU X, QI X, et al. Determination of sulfonamides in livers using matrix solid-phase dispersion extraction high-performance liquid chromatography[J]. Journal of Separation Science, 2012, 35(1): 45−52.
[18] 杨杰程, 刘丁溪, 郭抗抗, 等. 动物性食品中磺胺类药物残留检测方法研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2019, 51(6): 134−139. [YANG JC, LIU DX, GUO KK, et al. Progress in research on detection of sulfonamide residues in animal derived foods[J]. Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2019, 51(6): 134−139.]
[19] 刘培勇, 张惠, 米之金, 等. 两步液液萃取-固相萃取净化结合高效液相色谱-串联质谱法测定猪肉中 11 种磺胺类兽药残留[J]. 色谱, 2019, 37(10): 1098−1104. [LIU P Y, ZHANG H, MI Z J, et al. Determination of 11 sulfonamides in pork by two-step liquid-liquid extraction-solid phase extraction purification coupled with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2019, 37(10): 1098−1104.]
[20] 国家标准化管理委员会, 国家质量监督检验检疫总局. GB/T 21316-2007 动物源性食品中磺胺类药物残留量的测定液相色谱-质谱/质谱法 [S]. 北京: 国家标准出版社, 2007. [National Standardization Management Committee, General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine. GB/T 21316-2007 Determination of sulfonamide residues in food of animal origin liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry[S]. Beijing: National Standards Press, 2007.]
[21] WEN L, LIU L, WANG X, et al. Spherical mesoporous covalent organic framework as a solid-phase extraction adsorbent for the ultrasensitive determination of sulfonamides in food and water samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2020, 1625: 461275.
[22] ZHAO Y F, WU R, YU H, et al. Magnetic solid-phase extraction of sulfonamide antibiotics in water and animal-derived food samples using core-shell magnetite and molybdenum disulfide nanocomposite adsorbent[J]. Journal of Chromatography A, 2020, 1610: 460543.
[23] YANG Y, QIU W Q, LI Y X, et al. Antibiotic residues in poultry food in Fujian Province of China[J]. Food Additives & Contaminants. Part B, Surveillance, 2020, 13(3): 177−184.
[24] CHENG S, WEI Z, ZHIMING X, et al. Trace analysis and identification of 33 sulfonamides and sulfonamide potentiators in eggs by ultrahigh-performance liquid chromatography coupled with quadrupole-high-field orbitrap high-resolution mass spectrometry [J]. Analytical Methods:Advancing Methods and Applications, 2021, 13(38): 4452−4460.
[25] FU L, ZHOU H, MIAO E M, et al. Functionalization of amino terminated carbon nanotubes with isocyanates for magnetic solid phase extraction of sulfonamides from milk and their subsequent determination by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2019, 289: 701−707.
[26] 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]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2018, 30(1): 28−34.]
[27] DASENAKI M E, THOMAIDIS N S. Multi-residue determination of seventeen sulfonamides and five tetracyclines in fish tissue using a multi-stage LC-ESI-MS/MS approach based on advanced mass spectrometric techniques[J]. Analytica Chimica Acta, 2010, 672(1-2): 93−102.
[28] 方灵, 韦航, 黄彪, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定牛奶中 38 种抗生素残留[J]. 分析测试学报, 2019, 38(6): 681−686,692. [FANG L, WEI H, HUANG B, et al. Simultaneous determination of 38 antibiotics residues in milk by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2019, 38(6): 681−686,692.]
[29] 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]. Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2019, 1114-1115: 110−118.
[30] 杨坤, 刘桂琼, 管春成, 等. 通过型固相萃取净化-超高效液相色谱-串联质谱法检测鸡肉中 23 种磺胺类药物残留[J]. 食品工业科技, 2021, 42(18): 284−291. [YANG K, LIU G Q, GUAN C C, et al. Determination of 23 sulfonamide drugs residues in chicken by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with pass-through solid phase extraction[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(18): 284−291.]
[31] 谢瑜杰, 李铁梅, 牛相涛, 等. 一步式 QuEChERS 方法结合高效液相色谱-串联质谱法测定牛肉中 25 种磺胺类药物残留[J]. 食品工业科技, 2021, 42(20): 268−278. [XIE Y J, LI T M, NIU X T, et al. Determination of sulfonamides in beef by one step QuEChERS method combined with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(20): 268−278.]

方欢乐，张洁，赵玉文，等. 破壁油菜花粉的抗氧化及抗衰老作用 [J]. 食品工业科技，2022, 43(14)：378−384. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100200

FANG Huanle, ZHANG Jie, ZHAO Yuwen, et al. Antioxidant and Anti-aging Mechanism of Wall Broken Rape Pollen[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 378−384. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100200

·营养与保健·

破壁油菜花粉的抗氧化及抗衰老作用

方欢乐[1]，张　洁[1]，赵玉文[1]，韩宁娟[1]，王卫东[2]，李　元[1,*]

（1.西安培华学院医学院，陕西西安 710125；
2.陕西康泰莱生物医药工程有限公司，陕西西安 710065）

摘　要：目的：探讨破壁油菜花粉对 D-半乳糖所致衰老模型小鼠的抗氧化及抗衰老作用。方法：将 48 只小鼠随机分为空白对照组、衰老模型组、破壁油菜花粉高（560 mg/kg）、中（280 mg/kg）、低（140 mg/kg）组及 V_C 组。空白对照组每日腹腔注射生理盐水，其余各组每日腹腔注射 D-半乳糖（120 mg/kg）诱导衰老模型，同时药物组灌胃高、中、低剂量破壁油菜花粉混悬液及 V_C 溶液，每周称重，连续 6 周后取小鼠的肝、脾、肾、胸腺称取脏器质量并计算脏器指数；生化法测定血清及肝脏中超氧化物歧化酶（SOD）、丙二醛（MDA）、过氧化氢酶（CAT）、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）的含量；HE 染色观察衰老小鼠肝脏形态的改变；Western Blot 检测衰老小鼠肝脏组织中 Bax、Sirt1、p53 蛋白表达。结果：与衰老模型组相比，破壁油菜花粉中、高剂量组能显著提高衰老小鼠体质量、胸腺、肝脏、脾、肾脏的脏器指数（P<0.05，P<0.01），显著升高小鼠血清及肝脏内 SOD、CAT、GSH-Px 含量，降低 MDA 含量（P<0.05，P<0.01），同时可以改善肝细胞肿大，使得肝脏组织中细胞凋亡蛋白 Bax、促衰老蛋白 p53 的表达降低，抗衰老蛋白 Sirt1 的表达升高（P<0.05，P<0.01）。结论：破壁油菜花粉可通过抗氧化，对抗细胞凋亡，调节衰老蛋白含量改善机体衰老。

关键词：破壁油菜花粉，抗氧化作用，Sirt1/p53 通路，抗细胞凋亡，抗衰老作用
中图分类号：R151　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1002−0306(2022)14−0378−07
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100200
本文网刊：

Antioxidant and Anti-aging Mechanism of Wall Broken Rape Pollen

FANG Huanle[1]，ZHANG Jie[1]，ZHAO Yuwen[1]，HAN Ningjuan[1]，WANG Weidong[2]，LI Yuan[1,*]

（1.Medical College of Xi'an Peihua University, Xi'an 710125, China；
2.Shaanxi Kangtailai Biomedical Engineering Co., Ltd., Xi'an 710065, China）

Abstract: Objective: To investigate the antioxidant and anti-aging effects of wall broken rape pollen on aging model mice induced by D-galactose. Methods: 48 mice were randomly divided into blank control group, aging model group, wall broken rape pollen high (560 mg/kg), medium (280 mg/kg), low (140 mg/kg) group and V_C group. The blank control group was intraperitoneally injected with normal saline every day, and the other groups were intraperitoneally injected with D-galactose (120 mg/kg) every day to induce the aging model. At the same time, the drug group was gavaged with high, medium and low doses of broken wall rape pollen suspension and V_C solution, weighed every week, and the liver, spleen, kidney and thymus of mice were taken after 6 weeks to weigh the organ mass and calculate the organ index. The contents of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-PX) in serum and liver were determined by biochemical method. HE staining was used to observe the morphological changes of liver in aging mice. The expressions of Bax, Sirt1 and p53 proteins in the liver of aging mice were detected by Western Blot. Results: Compared with the aging model group, the medium and high dose groups of broken wall rape pollen could significantly improve the body mass, organ index of thymus, liver, spleen and kidney (P<0.05, P<0.01), significantly increase the contents of SOD, CAT and GSH-Px in serum and liver, reduce the content of MDA (P<0.05, P<0.01), improve hepatocyte swelling, make the expression of the apoptotic protein Bax and pro-aging protein p53 decrease, and the expression of anti-

收稿日期：2021−10−21
基金项目：陕西省重点研发计划项目（2021SF-362）；西安培华学院横向课题（202204070019）；陕西省大学生创新创业项目（S202011400007）。
作者简介：方欢乐（1981−），女，硕士，副教授，研究方向：心血管药理学，E-mail：43599079@qq.com。
*** 通信作者：**李元（1960−），男，博士，教授，研究方向：微生物学，E-mail：liyuan@peihua.edu.cn。

aging protein Sirt1 increase (P<0.05, P<0.01). Conclusion: Broken wall rape pollen can improve the aging of the body by anti-oxidation, anti apoptosis, regulating the content of aging protein.

Key words: broken wall rape pollen; antioxidation; Sirt1/p53 pathway; anti apoptosis; anti-aging effect

油菜花粉是人们公认的天然健康食品，其中富含酚类、黄酮类、脂肪酸、维生素和无机元素等物质[1]，具有抗疲劳、降血脂、抑制前列腺增生、促进神经系统功能等多种作用[2]。油菜花粉其中含有的丰富黄酮类物质具有很好的清除机体自由基（·OH、O_2^{-}·、DPPH·等）作用[3−4]。研究发现，破壁技术可以使蜂花粉内丰富营养成分充分释放，其中抗氧化成分总黄酮及黄酮类化合物的生物利用度明显提升[5−6]。

衰老是生命体发展的必然选择趋势，其受多种因素调控，目前关于衰老的理论主要有自由基氧化应激学说、DNA 损伤学说、细胞凋亡学说等[7]。多项研究表明，Sirt1（沉默信息调节因子 2 相关酶 1）可抑制细胞凋亡，激活负调节促凋亡因子如 p53 来增加氧化应激的对抗性调控新陈代谢，延缓细胞的衰老。因此 Sirt1 在抗衰老方面的重要作用引起人们关注[8]。Bax 蛋白是一种促进细胞凋亡的蛋白，其蛋白表达也能一定程度反应组织的衰老情况[9]。

目前关于破壁油菜花粉的研究主要是探讨破壁技术的方法及其对主要成分的影响，王伟等[10−11] 研究破壁油菜花粉在体抗氧化作用表明其具有良好的在体抗氧化活性。但破壁油菜花粉是否可以通过抗氧化改善衰老作用，目前未见报道。本研究建立 D-半乳糖衰老模型[12] 观察破壁油菜花对机体血清及肝脏匀浆液中抗氧化指标 SOD、MDA、GSH-Px、CAT 的变化，同时研究破壁油菜花是否具有通过抗氧化作用抑制肝脏中 Bax 蛋白表达，调节 Sirt1 蛋白含量对抗 p53 途径的凋亡通路，从而延缓组织衰老。本研究可为破壁油菜花粉保健产品的研发提供实验依据。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

SD 小鼠 48 只　雄性，体重（25±2）g，清洁级，购买于西安交通大学医学动物实验中心，动物质量合格证号：SCXK（陕）2012-003；破壁油菜花粉　陕西康泰莱生物医药工程有限公司；V_C 注射液　华润双鹤利民药业（济南）有限公司；D-半乳糖粉剂　上海国药集团；超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）活性检测试剂盒、丙二醛（malondialdehyde，MDA）活性检测试剂盒、过氧化氢酶（Catalase，CAT）活性检测试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶（glutathione peroxidase，GSH-Px）活性检测试剂盒、BCA 蛋白定量检测试剂盒　南京建成生物工程研究所；多克隆第一抗体 Sirt1、p53、bax 及 GAPDH 抗体　由 Abcam 公司提供。

H-1600A 型高速离心机　上海利鑫坚离心机有限公司；超声波组织粉碎仪　南京先欧仪器制造有限公司；HH-2 数显恒温水浴锅　常州中捷实验仪器制造有限公司；1510 酶标仪　Thermo 公司；PowerPac^{tm} Basic 电泳设备、Universal Hood III 发光设备　美国 Bio-Red 公司。

1.2　实验方法

1.2.1　破壁油菜花粉混悬液的制备　分别称取相应质量的破壁油菜花粉，加超纯水混悬制备为所需浓度。置于试剂瓶中，4 ℃ 冷藏保存待用。

1.2.2　动物分组、造模及给药处理　SD 小鼠随机分为 6 组，每组 8 只，分别为空白对照组、衰老模型组、破壁油菜花粉低剂量组（140 mg/kg）、中剂量组（280 mg/kg）、高剂量组（560 mg/kg）和 V_C 组（100 mg/kg）。动物研究获西安培华学院动物保护与使用委员会批准。所有动物实验均按照实验动物机构指南进行。药物给药剂量根据临床常用剂量，按照人和动物间体表面积折算的等效剂量比值进行换算[13]，并结合文献资料报道的破壁油菜花粉抗氧化小鼠给药剂量设计[10]。动物适应性饲养一周后，除空白对照组外的各组每日腹腔注射 D-半乳糖（120 mg/kg）造模，空白对照组每日腹腔注射生理盐水，同时破壁油菜花粉各组和 V_C 组分别灌胃不同剂量破壁油菜花粉混悬液及 V_C 溶液，空白对照组及衰老模型组灌胃等容积生理盐水。连续给药六周。

1.2.3　指标测定

1.2.3.1　小鼠行为活动观察和体重检测　在实验期间，每天观察和记录各组小鼠的食欲、外表、精神状况和行为活动。每周称重 1 次，绘制小鼠体重变化曲线图。

1.2.3.2　脏器指数测定　采血后立即脱颈椎处死小鼠，置于冰块上取出胸腺、肝脏、肾和脾脏。用 4 ℃ 生理盐水多次冲洗，滤纸吸干水分，称重，计算脏器指数。脏器指数（mg/g）=脏器质量（mg）/体质量（g）。

1.2.3.3　血清及肝脏生化指标检测　末次给药禁食不禁水 12 h 后，眼球取血，3500 r/min 离心 20 min 后，分离血清。取小鼠部分肝脏加冰浴过的生理盐水制备 10% 的肝组织匀浆 2 mL，12000 r/min 低温离心 10 min，分离上清液。采用试剂盒测定小鼠血清及肝脏匀浆液中 SOD、MDA、GSH-Px、CAT 含量。

1.2.3.4　肝脏组织切片观察　取小鼠部分肝脏组织，10% 甲醛溶液固定，石蜡包埋、切片，HE 染色。生物显微镜下观察、拍照。

1.2.3.5　Western Blot 检测肝脏组织中衰老蛋白表达　取−80 ℃ 保存的肝脏组织，裂解，12000 r/min，4 ℃ 离心 10 min。取上清液蛋白定量，剩余与 5× loading buffer 混合，恒温金属浴 100 ℃ 变性 10 min 后保存

备用。用 8% SDS-多聚酰胺凝胶电泳分离，湿法转移蛋白到 PVDF 膜上。膜用 5% 脱脂牛奶溶液室温封闭 1 h，分别加入特异性一抗 bax（1∶500）、Sirt1（1∶500）、p53（1∶500）、GAPDH（1∶2000）孵育，4 ℃过夜。用 TBST 洗膜 5 次后与二抗结合（抗鼠或抗兔 1∶5000）室温孵育 1 h 后，TBST 洗膜 5 次。发光，照片用 Gel-Pro Analyzer 4.0 software 分析。

1.3 数据处理

采用 SPSS 16.0 统计软件，计量资料结果以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，多组间比较采用单因素方差分析（one-way ANOVA）双侧 t 检验。$P<0.05$ 为差异有显著性，$P<0.01$ 为差异具有极显著性。

2 结果与分析

2.1 破壁油菜花粉对 D-半乳糖衰老小鼠体重的影响

体重是反映小鼠的生长情况的一个重要指标。由表 1 所示，衰老模型组小鼠随着造模后体质量增加缓慢，食欲差、皮肤松弛、活动量明显减少等现象，提示衰老模型组小鼠出现衰老症状。破壁油菜花粉各组小鼠体重不断增加，小鼠皮肤状态及活动量有所改善。进一步从表 1 数据分析得出，和衰老模型组比较，破壁油菜花中、高剂量组给药 14 d 后小鼠体重均显著增加（$P<0.05$，$P<0.01$），低剂量组在 32 d 后体重也在增加（$P<0.05$）。表明破壁油菜花粉可改善小鼠体重及活动对抗衰老。

2.2 破壁油菜花粉对 D-半乳糖衰老小鼠脏器指数的影响

脏器系数的变化可反映器官或组织结构的变化，由表 2 可知，与空白对照组相比，衰老模型组小鼠的肝脏、肾脏、脾脏、胸腺的脏器指数呈极显著下降趋势（$P<0.05$，$P<0.01$），表明衰老小鼠的肝、肾及免疫器官功能出现萎缩。与衰老模型组相比，破壁油菜花粉中、高剂量组小鼠的肝脏、脾脏、胸腺、肾脏的脏器指数均显著升高（$P<0.05$，$P<0.01$）。从数据结果可看出破壁油菜花粉对 D-半乳糖诱发的小鼠脏器衰老有一定的改善作用。

2.3 破壁油菜花粉对 D-半乳糖衰老小鼠血清中 SOD、MDA、GSH-Px 及 CAT 活性的影响

大量研究表明，自由基及其诱导的氧化反应可导致机体的衰老[14]。实验结果表明与空白对照组相比，衰老模型组小鼠血清 SOD、CAT、GSH-Px 含量极显著降低（$P<0.01$），MDA 含量极显著升高（$P<0.01$）。与衰老模型组相比，中、高剂量破壁油菜花粉组 SOD、GSH-Px 含量极显著升高（$P<0.01$），MDA 含量极显著减小（$P<0.01$），CAT 含量中剂量组显著升高（$P<0.05$）、高剂量组极显著升高（$P<0.01$），结果见表 3。

2.4 破壁油菜花粉对 D-半乳糖衰老小鼠肝脏中 SOD、MDA、GSH-Px 及 CAT 活性的影响

由表 4 可以看出，与空白对照组相比，衰老模型组小鼠的肝脏中 SOD、CAT、GSH-Px 活性极显著降低，MDA 含量极显著增加（$P<0.01$）。与衰老模型组相比，破壁油菜花粉中、高剂量组可显著提高小鼠肝脏中 SOD、CAT、GSH-Px 含量，降低 MDA 含量（$P<0.05$，$P<0.01$）。有研究表明机体正常情况下处于一种氧化与抗氧化的动态平衡当中，衰老机体产生大量自由基诱导脂质过氧化产物 MDA 的生成，而同时机体中重要的抗氧化酶含量下降，因此清除自由基抑制机体氧化反应可改善衰老[15]。表 3~表 4 结果显示衰老模型组小鼠体内 MDA 含量增加，抗氧化酶 SOD、

表 1 破壁油菜花粉对衰老小鼠体质量的影响（g, n=8）

Table 1 Effect of wall broken rape pollen on body mass of aging mice (g, n=8)

组别	7 d	14 d	21 d	28 d	32 d	42 d
空白对照组	22.06±0.99	26.17±0.99	29.87±1.10	33.81±1.53	38.84±1.12	43.21±0.95
衰老模型组	22.76±1.80	22.23±0.80$^{\#\#}$	24.90±0.99$^{\#\#}$	25.67±0.78$^{\#\#}$	26.11±0.93$^{\#\#}$	27.90±1.69$^{\#\#}$
破壁油菜花粉低剂量	21.79±1.05	23.54±1.84	25.82±0.71	28.15±1.53	29.37±0.94*	31.62±0.96*
破壁油菜花粉中剂量	22.95±0.45	24.23±0.58*	27.86±1.21*	30.48±1.53*	33.55±0.51**	37.15±1.61**
破壁油菜花粉高剂量	22.06±0.91	25.17±0.69*	28.71±0.90**	31.18±1.01**	34.85±1.35**	39.54±0.83**
V_C组	22.09±0.97	26.51±0.54**	29.37±1.24**	32.15±0.90**	36.18±1.04**	41.54±0.57**

注：模型组与空白对照组比较$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$；各剂量组和V_C组与衰老模型组比较$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；表2~表4、图2同。

表 2 破壁油菜花粉对衰老小鼠脏器指数的影响（mg/g, n=8）

Table 2 Effect of wall broken rape pollen on organ index of aging mice (mg/g, n=8)

组别	剂量（mg/kg）	肝	肾	脾	胸腺
空白对照组		49.43±5.87	14.77±1.53	8.58±0.94	3.70±0.65
衰老模型组		40.50±3.78$^{\#\#}$	11.70±0.94$^{\#}$	6.21±0.88$^{\#\#}$	2.42±0.37$^{\#\#}$
破壁油菜花粉低剂量	100	44.99±7.25	12.50±1.95	6.92±0.83	2.55±0.26*
破壁油菜花粉中剂量	200	46.72±6.03*	13.32±1.39*	7.49±1.18*	2.875±0.21*
破壁油菜花粉高剂量	300	49.10±8.59**	14.46±1.48**	7.88±0.85**	3.36±0.63*
V_C组	100	50.81±7.59**	14.17±1.30**	8.05±1.03**	3.48±0.51**

表 3　破壁油菜花粉对衰老小鼠血清 SOD、MDA、GSH-Px、CAT 活性的影响(n=8)

Table 3　Results of wall broken rape pollen on serum SOD, MDA, GSH-Px and CAT activities of aging mice (n=8)

组别	SOD(U/mL)	MDA(nmol/mL)	GSH-Px(U/mL)	CAT(U/mL)
空白对照组	122.67±22.50	7.80±0.68	90.80±7.52	15.41±1.81
衰老模型组	86.92±19.02$^{\#\#}$	9.77±1.02$^{\#\#}$	81.05±3.90$^{\#\#}$	11.44±1.71$^{\#\#}$
破壁油菜花粉低剂量	103.00±19.21*	9.30±0.98	85.85±6.62	12.06±0.91
破壁油菜花粉中剂量	116.33±23.06**	8.32±0.77**	89.45±5.49**	12.80±1.36*
破壁油菜花粉高剂量	119.33±27.32**	8.17±0.94**	90.50±6.40**	14.05±2.25**
V_C组	121.00±20.63**	7.97±0.89**	93.50±9.99**	14.21±0.87**

表 4　破壁油菜花粉对衰老小鼠肝脏 SOD、MDA、GSH-Px、CAT 活性检测结果(n=8)

Table 4　Detection results of SOD, MDA, GSH-Px and CAT activities of wall broken rape pollen on liver of aging mice (n=8)

组别	SOD(U/mg prot)	GSH-Px(U/mg prot)	MDA(nmol/mg prot)	CAT(U/mg prot)
空白对照组	175.17±24.03	50.80±7.52	2.40±0.87	112.75±9.62
衰老模型组	131.92±32.88$^{\#\#}$	35.65±14.80$^{\#\#}$	3.87±0.86$^{\#\#}$	89.25±11.00$^{\#\#}$
破壁油菜花低剂量	151.33±16.47	48.85±8.84*	3.10±0.85*	90.50±18.48
破壁油菜花中剂量	168.00±23.09**	51.45±7.70**	3.02±0.87*	101.75±11.08*
破壁油菜花高剂量	169.33±27.32**	51.50±11.87**	2.47±0.65**	106.00±11.11**
V_C组	174.33±24.55**	54.50±9.54**	2.57±0.53**	111.00±11.51**

CAT、GSH-Px 含量极显著下降(P<0.01)。破壁油菜花粉能明显抑制血清及肝脏中 MDA 含量，增加 SOD、CAT、GSH-Px 含量，表现出较好的抗氧化、保护肝脏、抗衰老的作用。

2.5　破壁油菜花粉对 D-半乳糖衰老小鼠肝脏的影响

随着衰老的发生，肝脏老化质量明显减少，肝脏功能及其结构也会发生变化[16]。本研究进一步通过 HE 染色观察肝脏结构的变化，结果发现空白对照组小鼠肝脏细胞排列紧密，胞核清晰；衰老模型组小鼠肝脏细胞疏松肿胀，排列紊乱，胞质受损。药物组有所改善，其中破壁油菜花粉中、高剂量组小鼠肝细胞细胞形态逐渐趋于正常，细胞损伤情况得到有效缓解。表明破壁油菜花粉对衰老的肝脏具有一定的保护作用。结果见图 1 所示。

2.6　破壁油菜花粉对 D-半乳糖衰老小鼠肝脏 Sirt1、Bax、p53 蛋白表达的影响

研究显示 Sirt1 的激活对衰老调节因子 p53 有明显的抑制作用，从而减少细胞凋亡，延缓衰老[17]。本研究结果如图 2 所示，与空白对照组相比，衰老模型组小鼠的肝脏中 Sirt1 蛋白量极显著降低(P<0.01)，Bax、p53 蛋白表达量极显著增加(P<0.01)，与衰老模型组相比，破壁油菜花中、高剂量组能显著地提高肝组织 Sirt1 蛋白表达(P<0.05, P<0.01)，降低 Bax、p53 蛋白表达(P<0.01)。这表明破壁油菜花粉可通过调控衰老蛋白 Sirt1、p53 含量，抑制促细胞凋亡基因 *Bax*表达量的增多，对抗机体衰老。

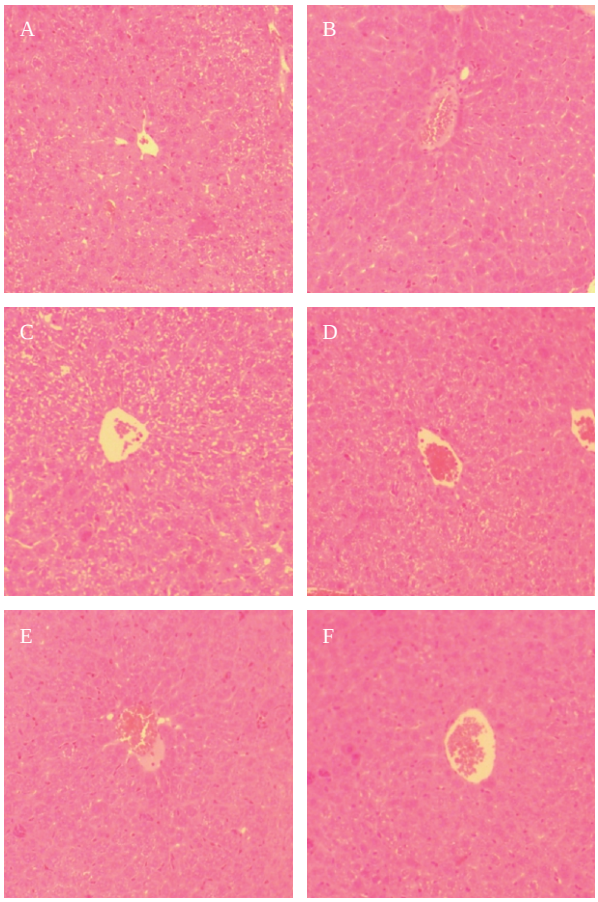


图 1　各组小鼠肝脏光镜下病理形态学改变(HE 200×)

Fig.1　Pathomorphological changes of liver of mice in each group under light microscope (HE 200×)

注：A：空白对照组；B：衰老模型组；C：破壁油菜花低剂量组；D：破壁油菜花中剂量组；E：破壁油菜花高剂量组；F：V_C 组；图 2 同。

3　讨论

衰老是随着机体年龄的增长，脏器萎缩、机体功能衰退的生命过程中一种自然现象[18]。体内 SOD、GSH-Px、CAT 抗氧化酶，有很好的抗氧化，对抗机体自由基破坏的作用。而随着衰老的发生，机体氧化还

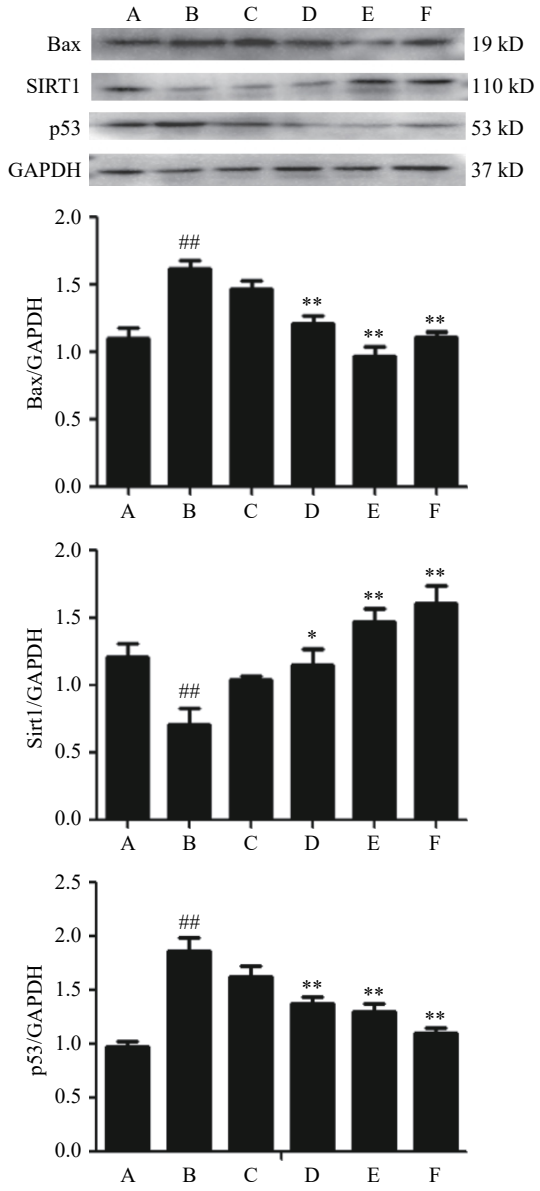


图 2 破壁油菜花对衰老模型小鼠肝脏 Bax、Sirt1、p53 蛋白表达的影响(n=3)

Fig.2 Effect of wall broken rape flower on the expression of Bax, Sirt1 and p53 proteins in liver of aging model mice (n=3)

原系统变得不平衡,清除自由基的 SOD、CAT、GSH-Px 等内源性抗氧化酶活性降低而脂质氧化产物 MDA 含量增多,引发细胞损伤、组织器官紊乱[19−20]。研究衰老最普遍的模型为给正常小鼠注射大剂量的 D-半乳糖,引起机体氧化反应产生大量氧自由基等出现衰老症状,同时其还可在机体酶的作用下转化为半乳糖醇堆积,导致机体功能障碍及衰老[21]。

油菜花粉是油菜精华的浓缩,营养成分丰富,具有抗氧化、免疫调节等功效,通过破壁技术可使其营养成分充分释放[22]。本实验结果显示衰老模型组小鼠的体质量明显下降,重要脏器胸腺、脾、肝脏、肾脏的脏器指数均下降,出现机体衰老症状。而破壁油菜花粉中、高剂量组小鼠体质量明显改善,各脏器的脏器指数均增大,表明破壁油菜花粉可保护脏器对 D-半乳糖所致的衰老现象有一定的延缓发展作用。由于衰老小鼠体内自由基防御系统损伤[23],本实验进一步测定了血清中 CAT、GSH-Px、MDA、SOD 含量来研究机体的衰老状况。结果显示衰老模型组 MDA 含量增多,SOD、CAT、GSH-Px 含量降低,其体内氧化与抗氧化动态平衡被打破。破壁油菜花粉中、高剂量组 SOD、CAT、GSH-Px 含量明显增加,MDA 含量降低。表明破壁油菜花粉可以改善 D-半乳糖所致氧化应激反应。

肝脏是物质代谢的主要器官,也是个体衰老中最易受累的器官[24]。本研究进一步观察了小鼠肝脏的变化发现伴随衰老,模型组出现肝脏脏器指数的下降同时肝脏中 SOD、CAT、GSH-Px 降低,MDA 含量增加,肝脏细胞之间出现萎缩、损伤等情况,但是破壁油菜花中、高剂量组得到很大改善,肝脏指数增加,肝脏中抗氧化酶含量提高,肝细胞趋于正常。表明其可以改善肝脏的功能,提高机体抵抗力,抗氧化对抗衰老。

研究显示机体发生自由基氧化应激反应导致衰老同时伴随着细胞凋亡速度加快,多种衰老组织中均发现细胞凋亡蛋白 Bax 的表达异常,引发细胞增殖减慢[25]。大量研究显示 *Sirt1* 与 *p53* 基因可通过改善细胞凋亡参与衰老过程的调节[26],*Sirt1* 可通过抑制细胞凋亡,延缓细胞衰老,在衰老研究的发展起到了重要作用。p53 是最早发现的 Sirt1 生理产物,是抑癌基因也参与细胞衰老过程[27]。本研究进一步观察了衰老小鼠肝脏内衰老基因表达,结果衰老基因 Sirt1 蛋白表达显著降低,p53 蛋白表达升高,同时伴随凋亡蛋白 Bax 增多。破壁油菜花粉中、高剂量可以调节衰老基因蛋白表达,改善细胞凋亡,对抗机体衰老。

4 结论

本文研究了破壁油菜花粉对 D-半乳糖诱导的衰老小鼠抗氧化,改善衰老的作用机制。结果显示破壁油菜花粉可以调节体内血清及肝脏中氧化酶的活性,表现出很好的抗氧化作用,可对抗衰老小鼠体重减轻、脏器损伤,保护肝脏。同时研究发现破壁油菜花粉抗衰老的作用机理可能与激活肝脏 Sirt1/p53 信号通路,抑制肝脏 Bax 细胞凋亡有关。此研究可为破壁油菜花粉研制成抗氧化、抗衰老功效的保健品,用于预防疾病等研究提供理论依据。但破壁油菜花粉抗衰老保健品人体长期服用的安全性与保健功效还有待于进一步深入研究,下一步可开展破壁油菜花粉保健品长期服用的安全性试验研究。总之,破壁油菜花粉的开发对防治衰老疾病,提高人们生活质量水平有重要意义。

参考文献

[1] KCP M, CAV F, TB F, et al. Antiallergic effect of bee poleen phenolic extract and myricetin in ovalbuminsensitized mice[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2008, 119(1): 41−46.

［2］ 郝转. 油菜花粉的功效及研究进展[J]. 粮食与油脂, 2020, 33(8): 4−6. ［HAO Z. Efficacy and research progress of rape pollen[J]. Grain and Oil, 2020, 33(8): 4−6.］
［3］ CHEN H, WANG Z B, CHANG Q Y, et al. Determination of trace elements in rape honey and its corresponding rape flower and stem by ICP-MS[J]. Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi, 2014, 34(2): 548−552.
［4］ 郭雪微, 卢挺, 鲍艳江, 等. 油菜蜂花粉黄酮类化合物抗氧化等作用的临床观察[J]. 北京中医药, 2011, 30(7): 488−492. ［GUO X L, LU T, BAO Y J, et al. Clinical observation on antioxidant effects of flavonoids from rape bee pollen[J]. Beijing Traditional Chinese Medicine, 2011, 30(7): 488−492.］
［5］ 郭雪微, 卢挺, 鲍艳江, 等. 油菜蜂花粉破壁前后黄酮类化合物及其它营养成分的比较[J]. 北京中医药, 2010, 29(9): 700−702. ［GUO X W, LU T, BAO Y J, et al. Comparison of flavonoids and other nutrients before and after wall breaking of rape bee pollen[J]. Beijing Traditional Chinese Medicine, 2010, 29(9): 700−702.］
［6］ WU W, QIAO J T, XIAO X Y, et al. *In vitro* and *in vivo* digestion comparison of bee pollen with or without wall-disruption[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2021, 101(7): 2744−2755.
［7］ 游庭活, 温露, 刘凡. 衰老机制及延缓衰老活性物质研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(11): 1985−1990. ［YOU T H, WEN L, LIU F. Research progress on aging mechanism and anti-aging active substances[J]. Research and Development of Natural Products, 2015, 27(11): 1985−1990.］
［8］ 李凌娟, 胡庆亮. SIRT1 与衰老分子机理研究进展[J]. 绿色科技, 2013(5): 292−295. ［LI L J, HU Q L. Research progress of SIRT1 and molecular mechanism of aging[J]. Green Science and Technology, 2013(5): 292−295.］
［9］ 王晶, 王勇, 李海龙, 等. 党参水提物对 D-半乳糖致衰老小鼠肝脾形态结构和 Bax 蛋白及 VEGF 表达的影响[J]. 西北师范大学学报 (自然科学版), 2016, 52(4): 72−77. ［WANG J, WANG Y, LI H L, et al. Effects of aqueous extract of *Codonopsis pilosula* on the morphological structure of liver and spleen and the expression of Bax protein and VEGF in aging mice induced by D-galactose[J]. Journal of Northwest Normal University (Natural Science Edition), 2016, 52(4): 72−77.］
［10］ 王伟, 张晓丽, 李姗姗. 破壁油菜花粉在体抗氧化作用及量效[J]. 辽宁科技大学学报, 2020, 43(6): 478−480. ［WANG W, ZHANG X L, LI S S. Antioxidant effect and dose effect of wall broken rape pollen *in vivo*[J]. Journal of Liaoning University of Science and Technology, 2020, 43(6): 478−480.］
［11］ 李姗姗, 赵鸿仁, 王伟. 破壁油菜花粉配伍的体内抗氧化活性研究[J]. 辽宁科技大学学报, 2020, 43(3): 237−240. ［LI S S, ZHAO H R, WANG W. Study on the *in vivo* antioxidant activity of the pollen compatibility of broken rapeseed[J]. Journal of Liaoning University of Science and Technology, 2020, 43(3): 237−240.］
［12］ 赵凡凡, 周玉枝, 高丽, 等. D-半乳糖致衰老大鼠模型的研究进展[J]. 药学学报, 2017(3): 347−354. ［ZHAO F F, ZHOU Y Z, GAO L, et al. Research progress of aging rat model induced by D-galactose[J]. Journal of Pharmacy, 2017(3): 347−354.］
［13］ 徐叔云. 药理实验方法学 [M].第三版. 北京: 人民卫生出版社, 2002. ［XU S Y. Methodology of pharmacological experiments [M]. Third Edition. Beijing: People's Medica Publishing House, 2002.］
［14］ 卢春雪, 杨绍杰, 陶荟竹, 等. 衰老机制研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(1): 248−250. ［LU C X, YANG S J, TAO H Z, et al. Research progress on aging mechanism[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2018, 38(1): 248−250.］
［15］ 许梦然, 王迦琦, 高婧雯, 等. 北柴胡多糖对 D-半乳糖致衰老模型小鼠的保护作用及其机制[J]. 吉林大学学报 (医学版), 2020, 46(6): 1215−1220. ［XU M R, WANG J Q, GAO J W, et al. Protective effect of Bupleurum polysaccharide on aging model mice induced by D-galactose and its mechanism[J]. Journal of Jilin University (Medical Edition), 2020, 46(6): 1215−1220.］
［16］ 赵凡凡, 李肖, 高丽, 等. 甘草水提物干预 D-半乳糖致衰老大鼠的肝脏代谢组学研究[J]. 中草药, 2017, 48(17): 3545−3553. ［ZHAO F F, LI X, GAO L, et al. Intervention of licorice aqueous extract on liver metabolomics in aging rats induced by D-galactose[J]. Chinese Herbal Medicine, 2017, 48(17): 3545−3553.］
［17］ 田勇, 郅琦, 李福香, 等. 昆仑胎菊水溶性黄酮提取工艺优化及其对衰老小鼠肝组织 SIRT1、p53 表达的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(14): 296−303. ［TIAN Y, ZHI Q, LI F X, et al. Optimization of extraction process of water-soluble flavonoids from Kunlun foetal chrysanthemum and its effect on theexpression of SIRT1 and p53 in liver tissue of aging mice[J]. Food Science, 2019, 40(14): 296−303.］
［18］ 何源, 王露露, 张晶. 多糖抗衰老作用机制的研究进展[J]. 中成药, 2022, 44(2): 528−531. ［HE Y, WANG L L, ZHANG J. Research progress on anti-aging mechanism of polysaccharides[J]. Chinese Patent Medicine, 2022, 44(2): 528−531.］
［19］ 徐舜, 崔红晶, 赵炜, 等. 细胞衰老分子机制的研究进展[J]. 广东医科大学学报, 2020, 38(1): 1−10. ［XU S, CUI H J, ZHAO W, et al. Research progress on molecular mechanism of cell aging[J]. Journal of Guangdong Medical University, 2020, 38(1): 1−10.］
［20］ 刘玥辰, 阎星旭, 赵焕, 等. 衰老的分子机制及相关代谢组学研究[J]. 天津中医药大学学报, 2021, 40(2): 267−272. ［LIU Y C, YAN X X, ZHAO H, et al. Molecular mechanism of aging and related metabolomics[J]. Journal of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, 2021, 40(2): 267−272.］
［21］ 彭壮, 李弘, 彭莎, 等. 玉竹多糖对 D-半乳糖诱导衰老小鼠认知障碍的改善[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(11): 254−258. ［PENG Z, LI H, PENG S, et al. Effect of *Polygonatum odoratum* polysaccharide on cognitive impairment in aging mice induced by D-galactose[J]. Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine, 2020, 38(11): 254−258.］
［22］ 冯慧, 焦士蓉, 刘佳, 等. 油菜花研究进展[J]. 食品工业, 2011, 12(9): 108−111. ［FENG H, JIAOS R, LIU J, et al. Research progress of rape flower[J]. Food Industry, 2011, 12(9): 108−111.］
［23］ 折丽婷, 赵彩虹, 陈春红, 等. 橄榄苦苷对 D-半乳糖诱导衰老小鼠的抗衰老作用研究[J]. 中国中医药科技, 2020, 27(1): 37−40. ［ZHE L T, ZHAO C H, CHEN C H, et al. Study on anti-aging effect of oleopicroside on aging mice induced by D-

galactose[J]. China Science and Technology of Traditional Chinese Medicine, 2020, 27(1): 37−40.]

[24] 柳江枫, 杨晔宏, 武乐, 等. 自然衰老 C57BL/6J 雄性小鼠肝脏的定量与乙酰化修饰蛋白质组学特征[J]. 中国医学科学院学报, 2021, 43(5): 696−705. [LIU J F, YANG Y H, WU L, et al. Quantitative and acetylation modified proteomic characteristics of liver in naturally aging C57BL/6J male mice[J]. Journal of Chinese Academy of Medical Sciences, 2021, 43(5): 696−705.]

[25] 薛亚兰, 许晶廷, 邱继红. 淫羊藿苷对抑郁症大鼠抑郁样行为和神经元损伤的影响[J]. 临床和实验医学杂志, 2021, 20(20): 2152−2156. [XUE Y L, XU J T, QIU J H. Effects of Icariin on depression like behavior and neuronal damage in depressed rats[J]. Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2021, 20(20): 2152−2156.]

[26] LI Q S, ZENG J C, SU M L, et al. Acetylshikonin from Zicao attenuates cognitive impairment and hippocampus senescence in d-galactose-induced aging mouse model via upregulating the expression of $SIRT_1$[J]. Brain Research Bulletin, 2018, 137: 311−318.

[27] ZHU R Z, LI B S, GAO S S, et al. Luteolin inhibits H_2O_2-induced cellular senescence via modulation of $SIRT_1$ and p53[J]. Environmental Pollution, 2021, 25(4): 297−305.

陈红旭, 苑丽葳, 张竣雄, 等. 五味子藤茎木脂素对小鼠镇静催眠及抗焦虑作用研究 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 385−391. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100209
CHEN Hongxu, YUAN Liwei, ZHANG Junxiong, et al. Sedative, Hypnotic and Anti-anxiety Effects of Lignans from *Schisandra chinensis* Vine Stem in Mice[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 385−391. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100209

·营养与保健·

五味子藤茎木脂素对小鼠镇静催眠及抗焦虑作用研究

陈红旭[1], 苑丽葳[1], 张竣雄[1], 王文欣[1], 刘佳乐[2], 王春梅[1], 孙靖辉[1], 张成义[1], 李　贺[1], 陈建光[1,*]
(1.北华大学药学院, 吉林吉林 132000;
2.吉林市中心医院, 吉林吉林 132000)

摘　要: 目的：研究五味子藤茎木脂素（Schisandra chinensis vine stem lignans，SSL）的镇静、抗焦虑及催眠作用并初步探讨其作用机制。方法：将 150 只 ICR 雄性小鼠平均随机分为 5 组，分别为空白对照组、SSL 低、中、高剂量组和地西泮阳性对照组。采用灌胃给药，每次 0.1 mL/10 g，每天一次，连续 7 d。应用小鼠自主活动实验观察镇静效果；应用高架十字迷宫、高架零迷宫实验观察抗焦虑作用；通过戊巴比妥钠协同睡眠实验观察催眠作用；用酶联免疫吸附法检测小鼠脑组织中 γ-氨基丁酸（γ-aminobutyric acid, GABA）、谷氨酸（glutamate, Glu）含量。应用 Western blot 方法检测小鼠脑组织中 $GABA_{A\alpha1}$ 表达水平。结果：与对照组比，各剂量 SSL 显著减少小鼠站立次数和活动次数（$P<0.01$）；中、高剂量 SSL 显著增加小鼠进入开放臂次数（open arm entry, OE），开放臂停留时间（open arm time, OT）和开放探头次数（open arm probe, OP）（$P<0.05$ 或 $P<0.01$）；各剂量 SSL 均增加阈下剂量戊巴比妥钠诱导小鼠睡眠只数，显著延长阈剂量戊巴比妥钠诱导的小鼠睡眠时间（$P<0.05$ 或 $P<0.01$），缩短小鼠睡眠潜伏期（$P<0.01$）；各剂量 SSL 组小鼠脑组织中 GABA 含量极显著增加（$P<0.01$），而中、高剂量 SSL 组小鼠脑组织中 Glu 含量极显著降低（$P<0.01$），GABA/Glu 极显著增加（$P<0.01$）。高剂量 SSL 组小鼠脑组织中 $GABA_{A\alpha1}$ 蛋白表达极显著增加（$P<0.01$）。结论：SSL 对小鼠具有镇静、催眠及抗焦虑作用，其机制可能与其调节其脑组织中 GABA 及 Glu 含量及 $GABA_{A\alpha1}$ 受体表达水平有关。

关键词: 五味子藤茎, 木脂素, 镇静催眠, 抗焦虑
中图分类号: R914　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0385−07
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100209
本文网刊:

Sedative, Hypnotic and Anti-anxiety Effects of Lignans from *Schisandra chinensis* Vine Stem in Mice

CHEN Hongxu[1], YUAN Liwei[1], ZHANG Junxiong[1], WANG Wenxin[1], LIU Jiale[2], WANG Chunmei[1], SUN Jinghui[1], ZHANG Chengyi[1], LI He[1], CHEN Jianguang[1,*]
(1.College of Pharmacy, Beihua University, Jilin 132000, China;
2.Jilin Central Hospital, Jilin 132000, China)

Abstract: Objective: To study thesedative, anti-anxiety and hypnotic effects of *Schisandra chinensis* vine stem lignans (SSL) and its underlying mechanism. Methods: One hundred and fifty ICR male mice were evenly and randomly divided into 5 groups, namely the blank control group, the SSL low-dose group (35 mg/kg), middle-dose group (70 mg/kg), and high-dose group (140 mg/kg), and diazepam positive control group (4 mg/kg). All treatments were administered intragastrically, 0.1 mL/10 g and once daily for 7 days. The autonomous activities of mice were used to observe the sedative effect, the elevated plus maze and elevated zero Maze were used to observe the anti-anxiety effect. The synergistic sleep test

收稿日期: 2021−10−21
基金项目: 吉林省发改委项目（2020C033-2）; 吉林省科学技术厅项目（192485YY010160879）; 吉林市科技局项目（20190601177, 20210409048）。
作者简介: 陈红旭（1999−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药保健食品开发, E-mail: 1730409119@qq.com。
*** 通信作者:** 陈建光（1962−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 中药保健食品开发, E-mail: chenjg@beihua.edu.cn。

of pentobarbital sodium at subthreshold and threshold doses was used to observe the hypnotic effect. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the content of γ-aminobutyric acid (GABA) and glutamate (Glu) in mouse brain tissue. Results: In comparison to the blank control group, the numbers of standing and spontaneous activities of the mice was significantly reduced (P<0.01) in all SSL groups. The open arm time, the numbers of open arm entry and open arm probe significantly increased (P<0.05 or P<0.01) in SSL middle- and high-dose groups. The number of sleep mice under the subthreshold dose of pentobarbital sodium increased in all SSL groups, the sleep latency was shortened and sleep time increased in mice under the threshold dose of pentobarbital sodium in all SSL groups (P<0.05 or P<0.01). The content of GABA in brain tissue significantly increased (P<0.01) in all SSL groups, while Glu content significantly decreased (P<0.01) and GABA/Glu ratio significantly increased (P<0.01) in SSL middle- and high-dose groups, and the expression of $GABA_{A\alpha 1}$ protein in brain tissue of mice significantly increased (P<0.01) in SSL high-dose group. Conclusion: SSL had sedative, hypnotic and anti-anxiety effects in mice, the mechanism might be related to the regulation of GABA content in the brain tissue.

Key words: *Schisandra chinensis* vine stem; lignan; sedative and hypnotic; anti-anxiety

长期失眠对人体身心健康十分不利[1]。中药治疗失眠在古籍中多有记载[2−3]。以中药提取物及其活性成分为对象,研究其镇静催眠作用及相关机制,已成为研究热点[4]。五味子(*Schisandra chinensis*),始收录于《神农本草经》,被列为上品中药,具有极高的药用价值[5]。木脂素作为其主要活性成分之一,其抗疲劳、抗衰老、抗炎、保肝、镇咳等功效已被广泛研究[6−12]。本课题组前期研究表明,五味子木脂素具有显著的镇静、催眠及抗焦虑作用[13−15]。《中国药典》中规定五味子果实部位为入药部位[16],并且可用作保健食品的原料。目前,在我国最为广泛使用的保健食品原料中,有 9 种为传统中药,分别为五味子、酸枣仁、茯苓、灵芝、天麻、刺五加、珍珠、远志和百合[17]。其中,五味子在种植时,为了提高果实的产量和品质,藤茎作为非药用部位需要减掉 30%~40%,其中一部分用作调料粉在餐桌上被使用,绝大多数则直接被丢弃[18]。研究表明,五味子藤茎的木脂素含量较果实偏低,但其化学成分与果实相似,提示五味子藤茎木脂素有可能具有与五味子果木脂素相似的功效[19]。目前,关于五味子藤茎木脂素镇静催眠作用的研究尚无任何报道。因此,本研究以课题组前期工作中五味子果木脂素的功效研究为基础,按照《中国药典》中规定五味子木脂素测定标志物醇甲含量为基准,设定五味子藤茎木脂素的给药剂量,观察其镇静、催眠及抗焦虑作用,以期为非药用部位资源的利用提供理论基础,为开发安全有效的镇静催眠药物提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

五味子藤茎总木脂素(*Schisandra chinensis* vine stem lignans, SSL) 经高效液相色谱法检测其五味子醇甲含量为 0.14 mg/mL,北华大学五味子开发及产业化工程研究中心提供;羧甲基纤维素钠、戊巴比妥钠 北京化学试剂公司;地西泮(Diazepam, DAP) 山东信谊制药有限公司;小鼠 γ-氨基丁酸(γ-aminobutyric acid, GABA)ELISA 试剂盒、谷氨酸(glutamate, Glu)ELISA 试剂盒 上海酶联生物科技有限公司。清洁级 ICR 小鼠 体重(20±2)g 雄性,动物许可证编号:SCXK(吉)-2020-0001,长春市亿斯实验动物技术有限责任公司提供。

ZZ-6 小鼠自主活动测试仪、PMT-100 高架十字迷宫、ZMT-100 高架零迷宫 成都泰盟科技有限公司;手持组织匀浆机 上海净信实业发展有限公司;全自动酶标仪 瑞士 Tecan 集团。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组 实验流程严格遵守《实验动物的护理和使用指南》,并获得北华大学动物保护与使用委员会(IACUC)的批准。ICR 小鼠 150 只,平均随机分组,每组 30 只。因木脂素为脂溶性物质,故以 5% 的羧甲基纤维素钠水溶液作为溶媒将木脂素制成不同浓度的混悬液,将小鼠分为空白对照组(CON, 5% 羧甲基纤维素钠溶液灌胃)、藤茎木脂素低剂量组(SSL(L), 37.5 mg/kg)、中剂量组(SSL(M), 75 mg/kg)、高剂量组(SSL(H), 150 mg/kg)、地西泮阳性对照组(地西泮, 4 mg/kg)。分笼饲养,自由饮水、饮食,室温 20~25 ℃。每天灌胃 1 次,每次 0.1 mL/10 g,连续 7 d。1~10 号小鼠于实验第 5 d 进行小鼠自主活动检测,第 6 d 进行高架十字迷宫及零迷宫检测,第 7 d 进行戊巴比妥钠阈下剂量协同睡眠试验;11~20 号小鼠于实验第 7 d 进行阈剂量协同睡眠试验;21~30 号小鼠于实验第 7 d 麻醉处死小鼠后迅速取出脑组织,进行相关指标检测。

1.2.2 SSL 对小鼠自主活动的影响 小鼠于实验第 5 d 灌胃 40 min 后进行试验,记录小鼠 5 min 内站立以及活动次数,每组实验结束后喷洒酒精除去气味后方可进行下一组实验。

1.2.3 SSL 对小鼠抗焦虑作用的影响 小鼠于实验第 6 d 灌胃 40 min 后进行试验。

1.2.3.1 SSL 对小鼠高架十字迷宫行为学的影响 将小鼠从高架十字迷宫中心处面向开臂放入。计算小鼠 5 min 内开臂与在臂滞留时间的比值(OT%)和开臂与在臂进入次数比值(OE%)。实验完成后喷洒

适量酒精除去气味后再放入下一只小鼠。

1.2.3.2　SSL 对小鼠高架零迷宫行为学的影响　将小鼠从高架零迷宫面向闭合臂放入。计算小鼠在 5 min 内平台边缘探头次数百分率(OP%)、进入开臂的次数百分率(OE%)。实验结束后喷洒适量酒精除去气味后再放入下一只小鼠。

1.2.4　SSL 对戊巴比妥钠诱导小鼠睡眠的影响

1.2.4.1　阈下剂量戊巴比妥钠协同睡眠试验　于实验第 7 d 灌胃给药 40 min 后将 1~10 号小鼠腹腔注射戊巴比妥钠 37.5 mg/kg。记录 30 min 内小鼠翻正反射消失 60 s 的只数，即为 30 min 内各组小鼠入睡的只数。

1.2.4.2　阈剂量戊巴比妥钠协同睡眠试验　于实验第 7 天另取 11~20 号小鼠，于灌胃给药 40 min 后腹腔注射戊巴比妥钠 49.5 mg/kg。计算小鼠的睡眠潜伏期(入睡时间-注射时间)和睡眠时长(睡醒时间-入睡时间)。

1.2.5　小鼠脑组织中 GABA、Glu 含量测定　在末次给药 40 min 后，将 21~30 号小鼠断颈处死，于装满冰块的烧杯中快速取出大脑，用 4 ℃ 生理盐水洗净并擦干后高速匀浆并分离上清液。(1∶4 加入生理盐水，4 ℃，离心 10 min)，检测按照试剂盒说明书进行操作。

1.2.6　小鼠脑组织中 $GABA_{A\alpha1}$ 受体表达水平检测　使用 Western Bolt 法检测，取小鼠脑组织约 50 mg 于 1.5 mL EP 管中，加入(RIPA 裂解液∶PMSF=9∶1)的混合溶液 450 μL，置于−20 ℃ 裂解 1 h，4 ℃，12000 r/min 离心 10 min 后取上清，蛋白含量使用 BCA 试剂盒测定。10% SDS-PAGE 电泳分离 $GABA_{A\alpha1}$ 后转移到 PVDF 膜上，取出膜在 Tris 缓冲液中在摇床上漂洗 5 min，然后用 5% 脱脂奶粉的 TBS-T 缓冲液中摇床上封闭 1 h。室温孵育后舍弃奶粉溶液。加入一抗($GABA_{A\alpha1}$，1∶1000)，内参为 GAPDH(兔抗 GAPDH，1:5000)，4 ℃ 过夜孵育，第二日用 TBS-T 缓冲溶液清洗 3 次(每次 10 min)，加入二抗(1∶2000)室温在摇床上孵育 2 h，TBS-T 缓冲溶液清洗 3 次(每次 10 min)，最后加入 ECL 发光液显色。

1.3　数据处理

数据以 Mean±SD 表示，使用 SPSS 软件(SPSS 20.0)进行数据分析。多组间比较采用单因素方差分析，两组间比较采用最小显著差异法 t 检验，$P<0.05$ 即有统计学意义。Weastern Bolt 条带分析使用 Image J 软件。

2　结果与分析

2.1　SSL 对小鼠自主活动的影响

小鼠自主活动实验是一种常用的药物镇静作用检测方法，其中的活动次数和站立次数是常用的评价指标，与小鼠中枢神经的兴奋程度成正相关[20−22]。结果如图 1 所示，与 CON 组相比，SSL(M)、SSL(H)以及 DAP 组小鼠活动次数显著减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$)，SSL 各组及 DAP 组小鼠站立次数极显著减少($P<0.01$)，其中 SSL 组间比较结果显示 SSL(H)较 SSL(L)组小鼠站立次数显著减少($P<0.05$)。以上结果提示 SSL 具有镇静作用。

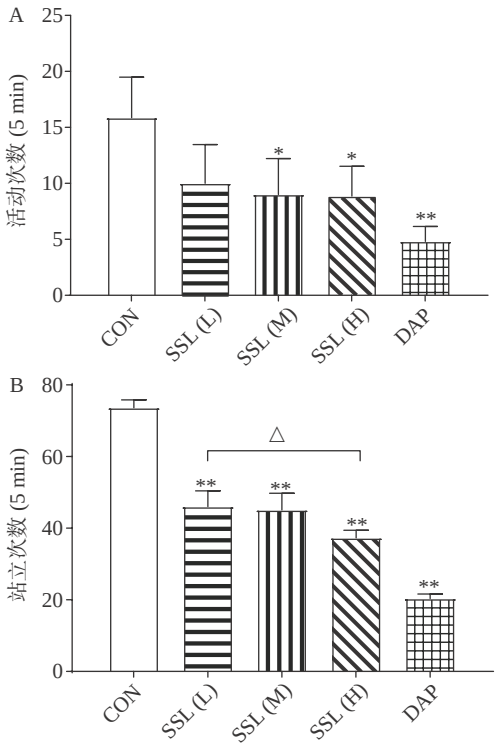


图 1　SSL 对小鼠自主活动的影响(n=10, mean±SD)

Fig.1　Effects of cane lignans from *Schisandra chinensis* on autonomous activities of mouse (n=10, mean±SD)

注：与空白对照组比较，*表示差异显著，$P<0.05$，**表示差异极显著，$P<0.01$；给药组间比较，△表示差异显著，$P<0.05$，△△表示差异极显著，$P<0.01$。图 2~图 5 同。

2.2　SSL 对小鼠抗焦虑作用的影响

2.2.1　SSL 对小鼠高架十字迷宫行为学的影响　高架十字迷宫实验是检测小鼠焦虑水平常用的实验方法[23]，开臂与在臂进入次数比值(OE%)及开臂与在臂滞留时间的比值(OT%)常作为评价焦虑程度的直接指标[24]。由图 2 可知，与 CON 组比较，SSL(M)、SSL(H)及 DAP 组小鼠 OE% 及 OT% 均极显著增加($P<0.01$)，SSL 各给药组间比较无统计学差异($P>0.01$)。以上结果提示 SSL 具有抗焦虑作用。

2.2.2　SSL 对小鼠高架零迷宫行为学的影响　高架零迷宫实验也是检测动物焦虑水平常用的实验方法之一，与十字迷宫原理相同，常把 OE% 和开臂探头次数比例(OP%)作为评价指标[25]。本实验研究结果由图 3 可知，与 CON 比较，SSL(M)、SSL(H)以及 DAP 组小鼠 OE% 及 OP% 均显著增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。SSL 各给药组间比较无统计学差异($P>0.01$)。该结果进一步验证了高架十字迷宫的实验结果，提示 SSL 具有抗焦虑作用。

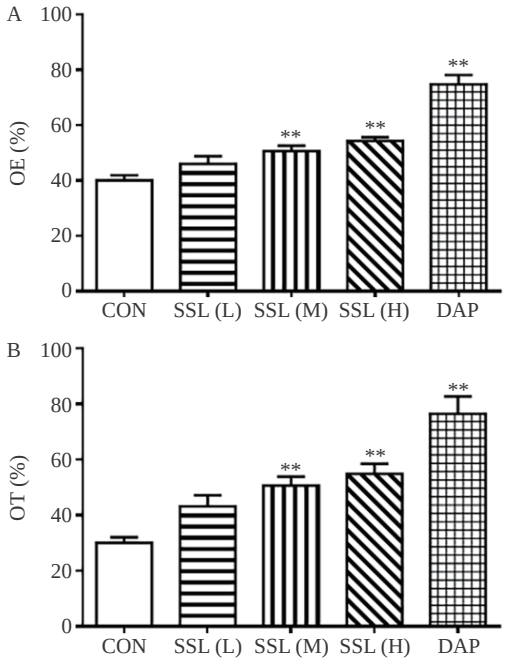


图 2 SSL 对小鼠高架十字迷宫行为学的的影响
（n=10, mean±SD）

Fig.2 Effects of cane lignans from *Schisandra chinensis* on the behavior of anxious mouse with elevated plus maze
（n=10, mean±SD）

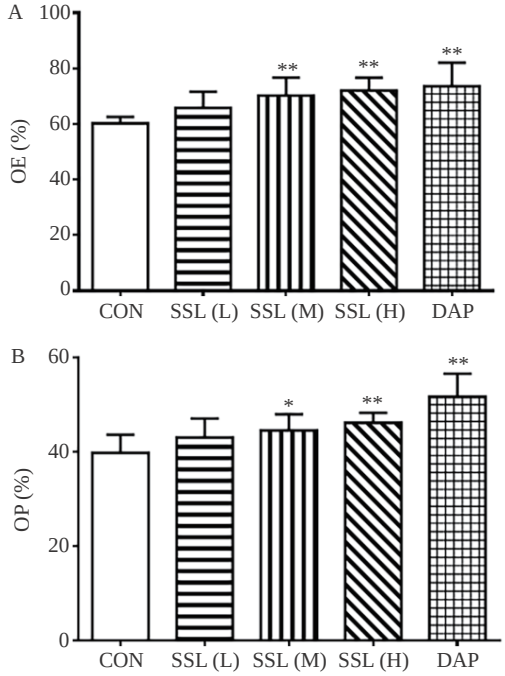


图 3 SSL 对小鼠高架零迷宫行为学的的影响
（n=10, mean±SD）

Fig.3 Effect of SSL on the behavior of elevated zero maze in mice (n=10, mean±SD)

2.3 SSL 对戊巴比妥钠对小鼠协同睡眠实验的影响

戊巴比妥钠协同睡眠试验是观察药物催眠作用的经典试验[26]。戊巴比妥钠阈下剂量协同睡眠实验结果如表 1 所示，空白对照组的睡眠只数为 1 只，SSL(L)组睡眠只数为 3 只，SSL(M)组睡眠只数为 6 只，SSL(H)组的睡眠只数为 7 只，DAP 组的睡眠只数为 10 只。

表 1 SSL 对阈下剂量戊巴比妥钠诱导小鼠睡眠只数的影响

Table 1 Effects of cane lignans from fructus *Schisandra chinensis* on the sleep number of mouse induced by subthreshold dose of pentobarbital sodium

分组	睡眠只数	睡眠率(%)
CON	1	10
SSL(L)	3	30
SSL(M)	6	60
SSL(H)	7	70
DAP	10	100

戊巴比妥钠阈剂量协同睡眠实验结果如图 4 所示，与 CON 组相比，各 SSL 组及 DAP 组小鼠睡眠潜伏期均极显著缩短(P<0.01)，SSL 各给药组间比较结果显示，SSL(H)组较 SSL(M)及 SSL(L)组小鼠睡眠潜伏期显著缩短(P<0.05 或 P<0.01)；与 CON 组相比，各 SSL 组及 DAP 组小鼠睡眠时间均极显著缩短(P<0.01)，其中 SSL(H)组较 SSL(L)组小鼠睡眠睡眠时间极显著延长(P<0.01)；各给药组间比较显示睡眠时间显著延长(P<0.05)。以上结果提示 SSL 具有催眠作用，且随着剂量的增加，催眠效应明显增强。

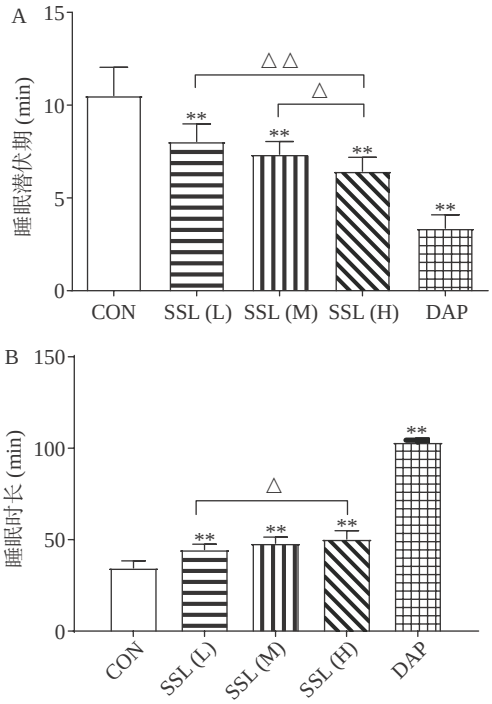


图 4 SSL 对阈剂量戊巴比妥钠诱导小鼠睡眠时间的影响
（n=10, mean±SD）

Fig.4 Effects of *Schisandra chinensis* lignans on sleep time in mouse induced by threshold dose of pentobarbital sodium
(n=10, mean±SD)

2.4 SSL 对小鼠脑组织中 GABA、Glu 含量的影响

睡眠与中枢神经系统的众多神经网络及神经递质密切相关[27]。Glu 和 GABA 是中枢神经系统(CNS)中的主要调节递质，GABA 是抑制性递质，由 Glu 脱羧生成，主要通过与 $GABA_A$ 受体结合，从而发挥作用，其在缺乏时会导致焦虑情绪的产生。Glu 是兴奋

性递质，在 CNS 含量较高。但是由于机体代谢水平以及环境的不停变化，少部分的 Glu 才具有神经递质的功能，所以 Glu 含量不能完全判断神经功能的兴奋或抑制状态[28]。能客观评价中枢神经系统功能兴奋和抑制程度的指标通常为 GABA/Glu 的比值[29−30]。

本研究应用酶联免疫吸附试验对各组小鼠脑组织 GABA 和 Glu 含量进行检测。结果如图 5 所示：与 CON 组相比，SSL 各剂量给药组小鼠 GABA 含量极显著升高（P<0.01），SSL（M）及 SSL（H）组小鼠 Glu 含量极显著降低（P<0.01），SSL 各组 GABA/Glu 比值均极显著升高（P<0.01）。对上述各指标 SSL 不同给药剂量组组间比较结果显示，SSL（M）组较 SSL（L），SSL（H）组较 SSL（M）及 SSL（L）均具有显著统计学差异（P<0.01，P<0.05）。以上结果提示 SSL 能够增高小鼠脑组织 GABA 含量，降低 Glu 含量，升高 GABA/Glu 的比值，且随着 SSL 剂量的增加，该效应逐渐增强。该结果提示 SSL 的催眠作用可能与其调节小鼠脑组织 GABA/Glu 的比值有关，且该作用存在剂量效应关系。

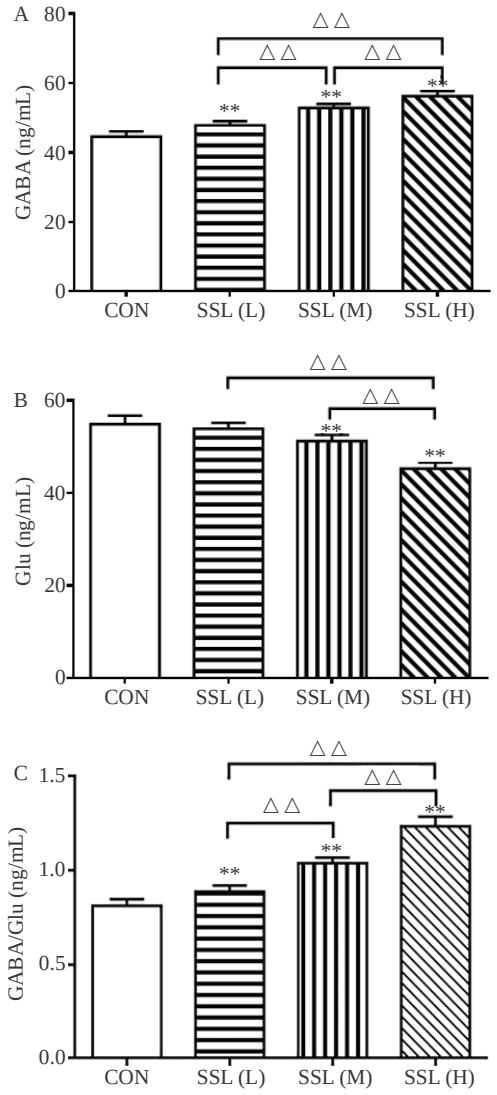


图 5　SSL 对小鼠脑组织中 GABA、Glu 含量的影响（n=10, mean±SD）

Fig.5　Effects of cane lignans from fructus *Schisandra chinensis* on the contents of GABA, Glu in brain tissues of mouse (n=10, mean±SD)

2.5　高剂量 SSL 对小鼠脑组织中 $GABA_{A\alpha1}$ 蛋白表达的影响

作为 $GABA_A$ 受体重要亚型之一的 $GABA_{A\alpha1}$，被激活时可抑制神经递质的兴奋作用，从而达到镇静、催眠作用[31−32]。为了进一步探讨 SSL 对中枢神经镇静催眠等抑制作用的机制，本研究选择效应最明显的 SSL(H)组小鼠，应用 Western Blot 方法对 $GABA_{A\alpha1}$ 表达水平进行观察。对本研究结果如图 6 和表 2 所示，与 CON 组比较，SSL 组小鼠脑组织 $GABA_{A\alpha1}$ 蛋白表达水平极显著增加（P<0.01）。本结果提示 SSL 的镇静催眠及抗焦虑作用可能与其上调小鼠脑组织 $GABA_{A\alpha1}$ 水平有关。

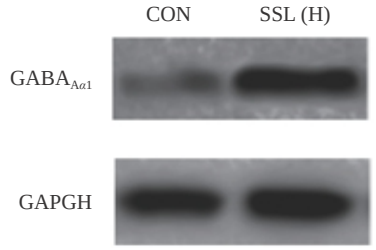


图 6　小鼠脑组织中 $GABA_{A\alpha1}$ 蛋白表达电泳

Fig.6　$GABA_{A\alpha1}$ protein expression electrophoresis in mouse brain tissue

表 2　小鼠脑组织 $GABA_{A\alpha1}$ 蛋白表达（n=3, mean±SD）

Table 2　Expression of $GABA_{A\alpha1}$ protein in mouse brain tissue (n=3, mean±SD)

分组	GABA/GAPGH
CON	0.357±0.022
SSL(H)	2.586±0.116**

注：**表示与对照组比较具有差异极显著，P<0.01。

3　结论

本实验选用低、中、高三个剂量对 SSL 的镇静催眠及抗焦虑作用进观察，研究结果显示，给予 SSL 后，自主活动检测中小鼠的站立次数、活动次数均有所减少；高架十字迷宫及零迷宫的检测中小鼠 OE%、OT% 及 OP% 明显增加；戊巴比妥钠协同睡眠实验中小鼠睡眠只数增加，睡眠潜伏期明显减少并且睡眠时长明显增加，提示 SSL 具有镇静催眠及抗焦虑作用。对小鼠脑组织中 GABA 及 Glu 含量及 $GABA_{A\alpha1}$ 受体表达水平检测结果显示，SSL 能够明显提高 GABA/Glu 的比值，增加 $GABA_{A\alpha1}$ 表达水平，这可能是 SSL 发挥镇静催眠抗焦虑作用的主要机制之一。本研究明确了 SSL 对小鼠的镇静催眠及抗焦虑作用，为五味子非药用部位资源的利用提供理论基础，为开发安全有效的镇静催眠药物提供实验依据。

参考文献

[1] KORKUTATA M, SAITOH T, CHERASSE Y, et al. Enhan-

cing endogenous adenosine A receptor signaling induces slow-wave sleep without affecting body temperature and cardiovascular function[J]. Neuropharmacology, 2019, 144: 122−132.

[2] SHI Y, DONG J W, ZHAO J H, et al. Herbal insomnia medications that target GABAergic systems: A review of the psychopharmacological evidence[J]. Curr Neuropharmacol, 2014, 12: 289−302.

[3] SHI M, PIAO J, XU X, et al. Chinese medicines with sedative–hypnotic effects and their active components[J]. Sleep Medicine Reviews, 2016, 9: 108−118.

[4] SHRGI J L, NI X, S, ARRIS J, et al. *Ziziphus spinosa* seeds for insomnia: A review of chemistry and psychopharmacology[J]. Phytomedicine, 2017, 34: 38−43.

[5] 余黄合, 李鑫, 杨珍, 等. 中药五味子药理作用研究进展[J]. 环球中医药, 2019, 12(07): 1133−1138. [YU H H, LI X, YANG Z, et al. Research progress in pharmacological effects of *Fructus Schisandra* Chinensis[J]. Global Traditional Chinese Medicine, 2019, 12(07): 1133−1138.]

[6] 牛佳牧, 刘嘉玮, 林慧娇, 等. 五味子酸性多糖对小鼠抗疲劳作用的实验研究[J]. 北华大学学报 (自然科学版), 2020, 21(6): 730−733. [NIU J M, LIU J W, LIN H J, et al. Experimental study on anti-fatigue effect of *Schisandra chinensis* acid polysaccharide on mice[J]. Journal of Beihua University (Natural Science), 2020, 21(6): 730−733.]

[7] YANG B Y, HAN W, HAN H, et al. Effects of Lignans from schisandra chinensis rattan stems against Aβ1-42-induced memory impairment in rats and neurotoxicity in primary neuronal cells[J]. Molecules, 2018, 23(4): 870.

[8] 李薇, 于佳卉, 王新婷, 等. 北五味子总木脂素对环磷酰胺诱导的免疫功能低下小鼠的调节作用[J]. 吉林大学学报 (医学版), 2019, 45(2): 294−299,472. [LI W, YU J H, WANG X T, et al. Immunomodulatory effect *Schisandra chinensis* lignans in cyclophosphamide-induced immunocompromised mice[J]. Journal of Jilin University (Medicine Edition), 2019, 45(2): 294−299,472.]

[9] ZHU H Y, ZHANG L N, WANG G L, et al. Sedative and hypnotic effects of supercritical carbon dioxide fluid extraction from *Schisandra chinensis* in mice[J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2016, 24(4): 831−838.

[10] 陶雪, 车金营, 杨硕, 等. 五味子多糖对 2 型糖尿病大鼠肝脏的保护作用[J]. 北华大学学报 (自然科学版), 2019, 20(1): 43−46. [TAO X, CHE J Y, YANG S, et al. Protective Effects of Schisandra chinensis Polysaccharides on Liver in Rats with T2DM[J]. Journal of Beihua University (Natural Science), 2019, 20(1): 43−46.]

[11] 胡波, 孙红霞, 李贺, 等. 五味子有效成分保护心室重构的研究进展[J]. 北华大学学报 (自然科学版), 2018, 19(1): 34−38. [HU B, SUN H X, LI H, et al. Research advances of active ingredients of *Schisandra chinensis* on the protection of ventricular remodeling[J]. Journal of Beihua University (Natural Science), 2018, 19(1): 34−38.]

[12] ZHON S, LIU X D, NIE Y C, et al. Antitussive activity of the *Schisandra chinensis* fruit polysaccharide (SCFP-1) in guinea pigs models[J]. Journal of ethnopharmacology, 2016, 194: 378−385.

[13] 石绘, 万丽华, 李贺, 等. 北五味子木脂素对小鼠镇静催眠作用的实验研究[J]. 中国老年保健医学, 2012, 10(5): 27−28. [SHI H, WAN L H, LI H, et al. Experimental study on sedative and hypnotic effects of *Schisandra chinensis* Lignans on mice[J]. Chinese Journal of Geriatric Care, 2012, 10(5): 27−28.]

[14] 李贺, 李宁, 刘聪, 等. 五味子乙素对 ICR 小鼠的抗焦虑作用及其作用机制[J]. 吉林大学学报 (医学版), 2018, 44(1): 78−82. [LI H, LI N, LIU C, et al. Antianxiety effect of schizandrin B in ICR mice and its mechanism[J]. Journal of Jilin University (Medicine Edition), 2018, 44(1): 78−82.]

[15] 王春梅, 李贺, 孙靖辉, 等. 北五味子多糖抗焦虑和镇静催眠作用[J]. 食品科学, 2015, 36(13): 239−242. [WANG C M, LI H, SUN J H, et al. Antianxiety, sedative and hypnotic effects of *Schisandra chinensis* polysaccharides[J]. Food Science, 2015, 36(13): 239−242.]

[16] 中国药典委员会 (编). 中华人民共和国药典 [M].北京: 国家药典科学技术出版社, 2020. [Chinese Pharmacopoeia Committee (edited). Pharmacopoeia of the People's Republic of China [M]. Beijing: National Pharmacopoeia Science and Technology Press, 2020.]

[17] 吕辰鹏, 王丽斐, 何泉泉, 等. 改善睡眠功能保健食品的研究进展[J]. 食品工业, 2017, 38(8): 238−243.]. [HE Q Q, et al. Research progress of health food with effect of improving sleeping [J]. Food Science, 2017, 38(8): 238−243.].]

[18] 姜瑞平, 邵信儒, 孙海涛, 等. 北五味子藤茎调味粉的研制[J]. 中国调味品, 2017, 42(12): 134−137. [[JIANG R P, SHAO X R, SUN H T, et al. Study on seasoning powder of caulis of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill[J]. China Condiment, 2017, 42(12): 134−137.]

[19] 李国成, 邱凯锋, 刘恩桂, 等. 北五味子藤茎的化学成分研究[J]. 中药材, 2006(10): 1045−1047. [LI G C, QIU K F, LIU E G, et al. Study on the chemical constituents of the cane of *Schisandra chinensis*[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2006(10): 1045−1047.]

[20] 买文丽, 王琼, 刘新民, 等. 小鼠自主活动实验中的评价指标[J]. 中国实验动物学报, 2008(3): 172−175,244. [MAI W L, WANG Q, LIU X M, et al. Evaluation index in the experiment of autonomous activity in mice[J]. Chinese Journal of Experimental Animal, 2008(3): 172−175,244.]

[21] TCHEKALAROVA J, KUBOVA H, MARES P. Postnatal caffeine exposure: effects on motor skills and locomotor activity during ontogenesis[J]. Behavioural Brain Research, 2005, 160(1): 99−106.

[22] 于泽鹏, 高佳琪, 刘聪, 等. 五味子醋镇静催眠抗焦虑作用及其作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(11): 139−143. [YU Z P, GAO J Q, LIU C, et al. Sedative, hypnotic and anxiolytic effects ang mechanism of *Schisandra chinensis* fructus vinegar [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2018, 24(11): 139−143.]

[23] PELLOW S, CHOPIN P, FILE S E, et al. Validation of open: Closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat[J]. Elsevier, 1985, 14(3): 149−167.

[24] 张燕, 郑伟, 丁莹, 等. BALB/c 和 C57BL/6J 小鼠高架十字

迷宫焦虑表现行为比较[J]. 疾病预防控制通报，2012，27(3)：18−20. ［ZHANG Y, ZHENG W, DING Y, et al. Comparison of anxiety-like behaviors in elevated plus maze test between BALB/c and C57BL/6J mice[J]. Bulletin of Disease Control & Prevention (China), 2012, 27(3): 18−20.］

［25］ TUCKER L B, MCCABE J T. Measuring anxiety-like behaviors in rodent models of traumatic brain injury[J]. Front Behav Neurosci, 2021, 15: 682935.

［26］ 叶少剑，黄念芳. 戊巴比妥钠多种药理效应的阈剂量观察[J]. 卫生职业教育，2014，32(24)：94−95. ［YE S J, HUNANG N Fg. The threshold dose observation of various pharmacological effects of pentobarbital sodium[J]. Health Vocational Education, 2014, 32(24): 94−95.］

［27］ 刘海云，宋渺渺，肖爱娇. 菟丝子提取物对失眠大鼠学习记忆能力及神经递质的影响[J]. 江西中医药，2018，49(9)：60−62. ［LIU H Y, SONG M M, XIAO A J. Effects of *Cuscuta* seed extract on learning and memory ability and neurotransmitters in insomnia rats[J]. Jiangxi Traditional Chinese Medicine, 2018, 49(9): 60−62.］

［28］ 饶曼妮，常翠，赵奎，等. 五味子宁神口服液对大鼠脑组织中 GABA 和 Glu 含量的影响[J]. 临床医药实践杂志，2008，1(16)：739−740. ［RAO M N, CHANG C, ZHAO K, et al. Effects of Wuweizi Ningshen oral liquid on GABA and Glu contents in brain tissue of rats[J]. Journal of Clinical Medicine Practice, 2008, 1(16): 739−740.］

［29］ 桂丽，章功良，张景行，等. 兴奋和损毁外侧缰核对大鼠睡眠觉醒周期的影响[J]. 安徽医科大学学报，2006(5)：511−513. ［GUI L, ZHANG G L, ZHANG J X, et al. The effect of excitement and damage to the lateral habenula on sleep and wake cycle in rats[J]. Journal of Anhui Medical University, 2006(5): 511−513.］

［30］ 李求实，王升旭. REM 睡眠剥夺后大鼠脑组织氨基酸类神经递质含量的变化[J]. 华南国防医学杂志，2002(3)：1−3. ［LI Q S, WANG S X. Changes in the content of amino acid neurotransmitters in the brain tissue of rats after REM sleep deprivation[J]. South China Medical Journal of National Defence, 2002(3): 1−3.］

［31］ MODIRROUSTA, M, L MAINVILE, B E J. Gabaergic neurons with α2-adrenergic receptors in basal forebrain and preoptic area express c-Fos during sleep. Neuroscience, 2004. 129(3): 803-810.

［32］ WATSON C J, LYDIC R, BAGHDOYAN H A. Sleep and GABA levels in the oral part of rat pontine reticular formation are decreased by local and systemic administration of morphine[J]. Neuroscience, 2007, 144(1):375-386.

谢美林, 徐海清, 李景明, 等. 太子参多糖的纯化、组成及对 LPS 损伤 Raw264.7 巨噬细胞的保护作用 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 392−400. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100292

XIE Meilin, XU Haiqing, LI Jingming, et al. Purification and Composition of Polysaccharides from *Pseudostellaria heterophylla* and Protective Effect on Raw 264.7 Cells Induced by LPS[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 392−400. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100292

· 营养与保健 ·

太子参多糖的纯化、组成及对 LPS 损伤 Raw264.7 巨噬细胞的保护作用

谢美林[1], 徐海清[2,*], 李景明[1], 查道喜[2], 王学瑛[2], 陈　洋[2], 朱启法[2]
（1.中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083;
2.安徽皖南烟叶有限责任公司, 安徽宣城 242000）

摘　要: 太子参是我国传统中药材，为明确其多糖的组成与对 Raw 264.7 巨噬细胞的保护作用，本研究采用水提醇沉法提取其主要活性成分多糖，并通过阴离子交换柱层析纯化得太子参多糖（*Pseudostellaria heterophylla* polysaccharide，PHP）；利用凝胶渗透色谱（GPC）法、高效液相色谱（HPLC）法测定其分子量、单糖组成，紫外光谱扫描、傅里叶红外光谱扫描初步解析其结构特征。进一步通过小鼠单核巨噬细胞白血病细胞（Raw 264.7）模型探究了 PHP 对 LPS 诱导损伤的保护作用。结果表明，太子参粗多糖的得率为 8.23%，纯度为 51.47%，而经 DEAE-52 柱层析分离纯化后得的 PHP 纯度达到了 80.52%；PHP 的分子量在 500~92×10^3 Da 之间，单糖组成为葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖、甘露糖及葡萄糖醛酸。细胞实验确定 80~640 μg/mL 为 PHP 的安全剂量，此浓度下可以提高脂多糖（Lipopolysaccharide，LPS）诱导损伤下的细胞存活率，640 μg/mL 的 PHP 剂量下存活率最大提升了 7.21%，并且 PHP 可改善 Raw 264.7 巨噬细胞形态。综上，本研究提纯了太子参中多糖，对 PHP 进行了结构表征，并初步证实了 PHP 对 LPS 诱导损伤的 Raw 264.7 巨噬细胞有保护作用，这为太子参多糖的功能活性探索及构效、量效等深入研究奠定了基础。

关键词: 太子参多糖, 单糖组成, Raw 264.7 巨噬细胞, 保护作用
中图分类号: TS201.4　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0392−09
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100292
本文网刊:

Purification and Composition of Polysaccharides from *Pseudostellaria heterophylla* and Protective Effect on Raw 264.7 Cells Induced by LPS

XIE Meilin[1], XU Haiqing[2,*], LI Jingming[1], ZHA Daoxi[2], WANG Xueying[2], CHEN Yang[2], ZHU Qifa[2]
（1.College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;
2.Anhui Wannan Tobacco Leaf Co., Ltd., Xuancheng 242000, China）

Abstract: To determine the composition and protective effect on Raw 264.7 cells of polysaccharide from *Pseudostellaria heterophylla* as a traditional Chinese medicinal, the main active ingredient-*Pseudostellaria heterophylla* polysaccharide (PHP) was extracted by water, precipitated by ethanol, and purified by anion exchange column chromatography. Gel permeation chromatography (GPC) and high performance liquid chromatography (HPLC) were used to determine molecular weight and monosaccharide composition of PHP. Ultraviolet spectroscopy (UV) and Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) were used for primary structural characterization of PHP. Furthermore, the Raw 264.7 cell model was used to explore protective effect of PHP on Raw 264.7 cells induced by LPS. The results showed that the yield of crude polysaccharide of *Pseudostellaria heterophylla* was 8.23%, and the polysaccharide content was 51.47%. After purification by DEAE-52 column chromatography, the polysaccharide content increased to 80.52%, and the molecular weight

收稿日期: 2021−10−28
基金项目: 太子参脱毒示范种植及深加工研究（20190563004）。
作者简介: 谢美林（1997−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品工程, E-mail: 1270583589@qq.com。
*** 通信作者:** 徐海清（1971−）, 男, 硕士, 研究方向: 农经, E-mail: 83137294@qq.com。

distribution was between 500 to 92×10^3 Da. The monosaccharide components of PHP include glucose, galactose, arabinose, mannose and glucuronic acid. Cell experiments showed that the safe dose of PHP was 80~640 μg/mL and could increase the survival rate of cells induced by lipopolysaccharide (LPS). At a dose of 640 μg/mL, the survival rate increased by 7.21%, and it was found that PHP could improve the morphology of Raw 264.7 cells. In summary, in this study the polysaccharides from *Pseudostellaria heterophylla* were purified, the structure of PHP was characterized, and it was preliminarily confirmed that PHP had potential protective effect on LPS-induced damage to Raw 264.7 cells. This laid the foundation for the follow-up exploration of functional activity, structure-effect and dose-effect of PHP.

Key words: *Pseudostellaria heterophylla* polysaccharide; monosaccharide composition; Raw 264.7 cells; protective effects

太子参是石竹科植物孩儿参 *Pseudostellaria heterophylla*（Miq.）Pax ex Pax et *Hoffm*.干燥后的块根，具有益气、健脾润肺之功效[1]。近 30 年，太子参的年需求量表现出强劲的增长趋势，支撑其市场需求不断攀升的背后，是太子参较为稳定、温和的功能性。现有研究表明，太子参有抗肿瘤[2−3]、免疫调节[4−5]、降血糖[6−7]、抗氧化应激[8]、保护心肌[9] 等保健功效。目前公认多糖是太子参中最主要的活性物质之一，然而有关太子参多糖的研究大多集中在粗多糖的功能活性评价上，缺乏前期的纯化工艺、理化性质研究基础，其功能、药理活性的物质基础和指标性成分不够明确[10−11]，这给太子参多糖资源的开发和利用带来了局限。

免疫系统是一个错综复杂又重要的生理体系，伴随着免疫系统的钝化和免疫应答的失衡，各种疾病接踵而至[12]，通过调节免疫来预防或治疗疾病已成为研究热点之一。已有研究表明太子参在免疫调节方面表现出潜力，陈耀金等[4] 利用太子参胶囊粉灌胃小鼠，结果表明其对免疫功能低下小鼠的免疫力有增强效果；并且张炎达等[5] 从太子参须获得的粗提物也表现出显著改善小鼠免疫功能。由于小鼠单核巨噬细胞白血病细胞（Raw 264.7）体外培养过程中也具备对抗原的较强吸附与吞噬能力，并释放相关的免疫调节因子，在一定程度上能够模拟体内巨噬细胞有关的免疫调节作用，是该类研究中常用的模型细胞[13]。因此，本研究提纯了太子参多糖，并测定了太子参多糖的分子量与组成以及初步表征其结构，以此基础利用 Raw 264.7 细胞模型初探了太子参多糖对脂多糖（Lipopolysaccharide, LPS）损伤 Raw264.7 巨噬细胞的保护作用，以期促进太子参资源的开发应用。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

太子参　安徽皖南烟叶公司太子参种植基地提供，采收年份为 2019 年，经晒干后直接运回实验室，于−20 ℃ 保存留用；小鼠单核巨噬细胞系 Raw 264.7　中国科学院细胞库提供；DEAE Cellulose-52　北京拜尔迪生物技术有限公司；单糖标准品（葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖、岩藻糖、甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、核糖、N-乙酰-氨基葡萄糖、N-乙酰-氨基半乳糖）　上海源叶生物科技有限公司；葡聚糖分子量标准品（1、3、12、70、126、287 kDa）、青霉素-链霉素双抗（100×）、噻唑蓝（3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT）、二甲基亚砜（dimethyl sulfoxide, DMSO）　北京索莱宝科技有限公司；脂多糖（lipopolysaccharide, LPS）　Sigma 公司；DMEM 高糖培养基　美国 Gibco 公司；类胎牛血清　美国 HyClone 公司。

紫外可见分光光度计　北京普析通用仪器有限责任公司；IR Tracer-10 傅里叶变换红外光谱仪　岛津企业管理（中国）有限公司；U3000 高效液相色谱仪　赛默飞世尔科技公司；Agilent 1206 高效液相色谱仪　安捷伦科技有限公司；XSP-C204 光学显微镜　CIC 公司；RT-6100 酶标仪　雷杜生命科学股份有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　太子参粗多糖的提取　参考 Hu 等[14] 的方法，并稍作修改：太子参破碎成粉，过 40 目筛，以蒸馏水为溶剂，100 ℃ 水浴提取 120 min（1∶8，m/v），8000 r/min 离心 15 min，取上清液备用，残渣按照相同方法反复提取共 3 次，合并上清液。旋蒸浓缩、Sevag 法除蛋白后加入无水乙醇配成终浓度为 80% 的乙醇溶液，于 4 ℃ 条件下沉淀过夜 12 h，8000 r/min 离心 5 min 后，收集沉淀，冷冻干燥，得太子参粗多糖。

1.2.2　太子参粗多糖的纯化工艺优化　DEAE Cellulose-52 是一种弱碱性阴离子填料，当粗多糖溶液通过时，中性多糖可以流出，酸性多糖吸附在色谱物质中，从而实现对中性与酸性多糖的有效分离[15]。因此，本研究使用 DEAE Cellulose-52 填料进行粗多糖的纯化，参考雷思敏等[16] 的方法，并稍作修改：以 DEAE Cellulose-52 为柱填料，Tris-HCl 缓冲液溶解粗多糖上样，上样粗多糖浓度为 1 mg/mL，采用 NaCl 盐溶液进行洗脱，流速为 2.0 mL/min，10 mL/tube 收集，苯酚-硫酸法跟踪检测洗脱液，绘制洗脱曲线。

1.2.2.1　pH 的选择　预实验测定了缓冲液环境为 pH7.2~7.8 的洗脱效果，其中 pH7.6 的效果较佳。在预实验结果的基础上，准确称取太子参粗多糖样品 25.0 mg，分别溶于 25 mL pH 7.4、7.6、7.8 的 Tris-HCl 缓冲液中，0.45 μm 微孔滤膜过滤后缓慢上样，吸附 15 min，用 0~0.3 mol/L NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液洗脱。

1.2.2.2　洗脱盐浓度的选择　参考 1.2.2.1 中步骤，

参数加以修改：pH7.6 缓冲液条件下，分别含 0~0.1（0、0.1）、0~0.3（0、0.1、0.2、0.3）、0~0.5（0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5）mol/L NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液梯度洗脱，浓度梯度为 0.1 mol/L。

1.2.3 太子参多糖（PHP）的理化特征及结构表征

1.2.3.1 紫外光谱扫描 称取适量冷冻干燥后的 PHP，用去离子水配制成 100 μg/mL 的 PHP 溶液，在 25 ℃，波长 190~400 nm 范围的紫外扫描仪中进行扫描。

1.2.3.2 红外光谱扫描 称取 2 mg 冷冻干燥后的 PHP，与 100 mg 经 120 ℃ 烘干 4 h 的溴化钾研磨混合后压片，在 4000~400 cm^{-1} 的范围进行红外光谱扫描[17]。

1.2.3.3 分子量检测 采用凝胶渗透色谱（Gel permeation chromatography，GPC）测定 PHP 的分子量分布[18]。具体如下：色谱仪为 Agilent 1206，选用 Agilent PL aquageL-OH MIXED-M 色谱柱（7.5 mm×300 mm，8 μm），检测器为示差折光检测器，进样量为 20 μL，流动相为 0.1 mol/L $NaNO_3$ 溶液，流速为 1.0 mL/min，柱温为 30 ℃。

1.2.3.4 单糖组成 采用 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮（1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone，PMP）柱前衍生化结合 U3000 高效液相色谱（HPLC）法检测 PHP 的单糖组成。参考戴军等的方法[19]，并稍作修改。PMP 衍生：准确吸取 250 μL 混合对照溶液到 5 mL EP 管中，加入 250 μL 0.6 mol/L NaOH，500 μL 0.4 mol/L PMP-甲醇，70 ℃ 反应 1 h。冷水中冷却 10 min；加入 500 μL 0.3 mol/L HCl 中和，再加入 1 mL 氯仿漩涡 1 min，3000 r/min 离心 10 min，小心取上清，萃取 3 次。上清用 HPLC 进行检测。检测条件：色谱仪为赛默飞 U3000，选用 Xtimate C_{18} 色谱柱（4.6 mm×200 mm，5 μm），进样量为 20 μL，流动相为 0.05 mol/L 的磷酸二氢钾溶液：乙腈（83∶17），流速为 1.0 mL/min，柱温 30 ℃，检测波长为 250 nm。

1.2.4 PHP 对 Raw 264.7 巨噬细胞的保护作用

1.2.4.1 PHP 对 Raw264.7 巨噬细胞的毒性作用浓度 细胞种板、培养参考 Lee 等[20] 的方法。取对数生长期细胞以 1.0×10^5 个/孔接种于 96 孔培养板，每孔体积 100 μL，37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 12 h，待细胞贴壁后，弃去上清液，分别加入含 80、160、320、640、960 μg/mL PHP 的饥饿培养基（含 2% 胎牛血清）100 μL，空白对照组为相同体积的饥饿培养基，同一处理设置 6 个平行复孔。24 h 后采用 MTT 法检测细胞存活率，用酶标仪检测各孔在 492 nm 下的吸光值。

1.2.4.2 PHP 对 LPS 诱导伤害的细胞存活率影响 LPS 诱导的免疫损伤是研究免疫调节作用的常用模型。参考 Jin 等[21] 的方法，并稍作修改。取对数生长期细胞 1.0×10^5 个/孔接种于 96 孔培养板，每孔体积 100 μL，37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h，待细胞贴壁后，弃去上清液，分别加入含 80、160、320、640 μg/mL PHP 的饥饿培养基 100 μL，空白对照组和阳性对照组均加入相同体积饥饿培养基。处理 4 h 后，更换培养液，除空白对照组外均加入含 1 μg/mL LPS 的饥饿培养基 100 μL，继续培养 20 h。同一处理设置 6 个平行复孔，随后采用 MTT 法检测各孔在 492 nm 下的吸光值，计算细胞存活率，并采用光学显微镜对培养结束后的细胞形态进行观察。

$$细胞存活率(\%)=\frac{A_2-A_0}{A_1-A_0}\times100$$

式中：A_2 表示实验组的吸光值；A_1 表示对照组吸光值；A_0 表示空白组吸光值。

1.2.5 太子参多糖的测定 采用苯酚-硫酸法测定太子参多糖[22]。具体如下：准确称取无水葡萄糖 10 mg，用蒸馏水定容至 100 mL，摇匀后即得 100 mg/L 的葡萄糖标准溶液。分别量取 0.1、0.3、0.5、0.7、0.9、1.1、1.3 mL 于试管中，加蒸馏水定容至 2 mL。先加入 1 mL 5% 苯酚，振荡摇匀后再加入 5 mL 浓硫酸，振荡摇匀后于 100 ℃ 沸水浴中先加热 15 min，后冰浴 5 min，于 490 nm 波长处测定吸光度。以 2 mL 蒸馏水按同样显色操作为空白对照。分别以葡萄糖含量（μg）为横坐标，吸光度为纵坐标，绘制标准曲线。太子参粗多糖得率及纯度计算公式如下：

$$得率(\%)=\frac{m\times n}{M_1}\times100$$

$$纯度(\%)=\frac{m\times n}{M_2}\times100$$

式中：m 表示由标准曲线计算出的多糖质量，mg；M_1 表示提取时太子参粉的质量，mg；M_2 指太子参粗多糖的质量，mg；n 表示稀释倍数。

1.3 数据处理

测定结果采用平均值±标准差表示，数据采用 SPSS Statistics 23 软件进行单因素方差分析，采用 Excel、Origin 2017 软件作图。

2 结果与分析

2.1 太子参多糖的测定

由图 1 可知，葡萄糖标准曲线方程为 y=0.0067x−0.0667，其 R^2=0.9987，表明在 32~138 μg 的质量范围

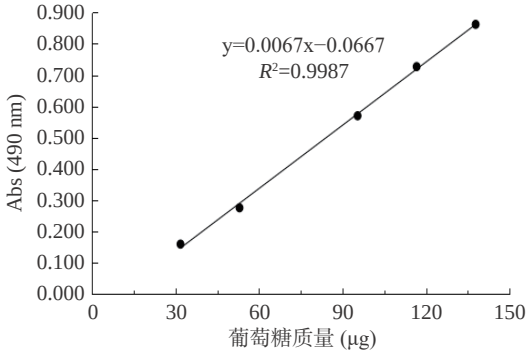


图 1 葡萄糖标准曲线

Fig.1 Standard curve of glucose

内具备良好的线性关系。通过水提醇沉法对太子参粗多糖进行提取，由苯酚-硫酸法检测得知太子参多糖得率为 8.23%±0.78%，多糖纯度为 51.47%±2.59%。与 Hu 等的文献相比，多糖纯度提高了 7.07%[14]。

2.2　太子参多糖的纯化工艺优化

2.2.1　pH 条件优化　DEAE Cellulose-52 是一种阴离子交换树脂，在碱性条件下有利于交换发生。基于此，本研究首先对比了太子参粗多糖在不同弱碱性（pH 为 7.4、7.6、7.8）环境下的洗脱效果，以确定洗脱液的最佳 pH。由图 2 可知，该粗提物中性多糖含量高，酸性多糖含量相对较低。并且不同 pH 的洗脱液处理时，表现出不同分离效果；当 pH 为 7.4（图 A）时，前半段分离效果比较好，而后三个峰存在连续拖尾现象；当 pH 为 7.6（图 B）时，洗脱峰分离度高，无拖尾现象，主要峰的吸光值最高，洗脱效果较好；当 pH 为 7.8（图 C）时，虽然峰形明显，但峰形不够尖锐。因此，选择 pH 为 7.6 作为太子参多糖纯化的 pH 条件。

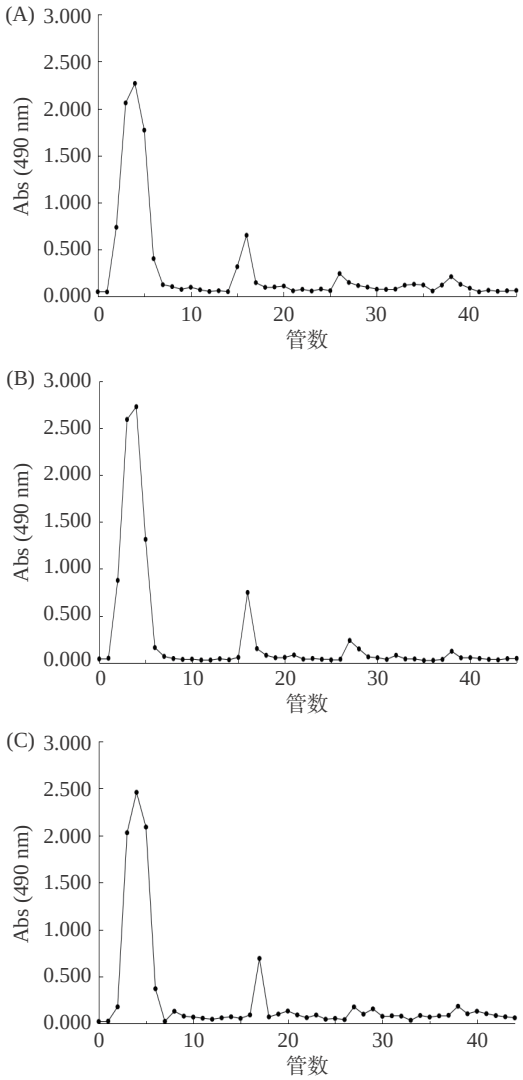


图 2　不同 pH 下的离子交换洗脱曲线

Fig.2　Ion exchange elution curve at different pH

注：图（A）为 pH7.4；图（B）为 pH7.6；图（C）为 pH7.8。

2.2.2　梯度洗脱盐浓度的选择　进一步对比了不同盐浓度（0~0.1、0~0.3、0~0.5 mol/L，NaCl）的洗脱液对太子参粗多糖的洗脱效果。由图 3 可知，在 0~0.1 mol/L 的 NaCl 条件下，峰分离度高，但峰数少，具有一定分离效果；在 0~0.3 mol/L 的 NaCl 条件下，多糖被主要分成 5 个峰，其中前 3 个分离度好，且吸光值高。在 0~0.5 mol/L 的 NaCl 条件下，多糖被分成更多级分，但分离度差，拖尾现象严重，不利于选择组分进行收集。因此本实验选择 0~0.3 mol/L 的 NaCl 作为太子参多糖纯化的盐浓度洗脱条件。

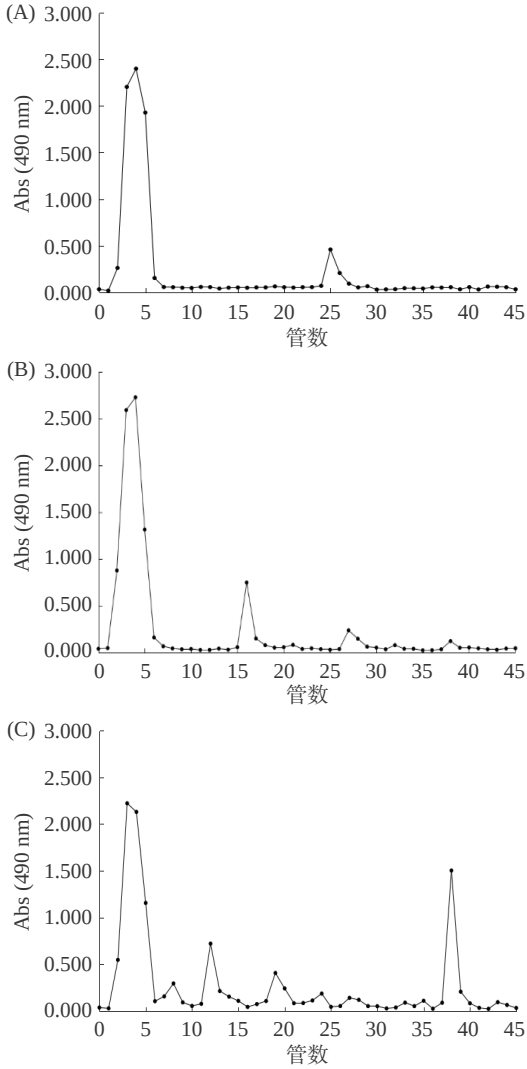


图 3　不同洗脱盐浓度的离子交换洗脱曲线

Fig.3　Ion exchange elution curve at different salt concentrations

注：图（A）为 0~0.1 mol/L NaCl；图（B）为 0~0.3 mol/L NaCl；图（C）为 0~0.5 mol/L NaCl。

综上，以 pH7.6 的 Tris-HCl 缓冲液上样，选择 0~0.3 mol/L NaCl 的盐溶液进行洗脱，收集第 1 个主峰，旋蒸浓缩，透析除盐，冷冻干燥，即得太子参多糖。采用苯酚-硫酸法检测其纯度为 80.52%±1.84%，相比于现有文献，用于功能研究的太子参的多糖提取物，纯度提高了 17.02%[23]。

2.3　PHP 的结构表征

2.3.1　紫外光谱扫描　如图 4 所示，曲线整体呈先上

升再下降的趋势，在 210 nm 左右有最大吸收，且吸光值高达 2.000，而 210 nm 为多糖的特征吸收峰[24]，此处吸光值高说明 PHP 的主要成分为多糖。图中在 240~290 nm 处有一个较宽的小吸收峰，吸光值低于 0.500。260 和 280 nm 分别是核酸和蛋白质的特征吸收波长[25]，这说明纯度为 80.52% 的 PHP 的杂质主要可能为蛋白质和核酸。

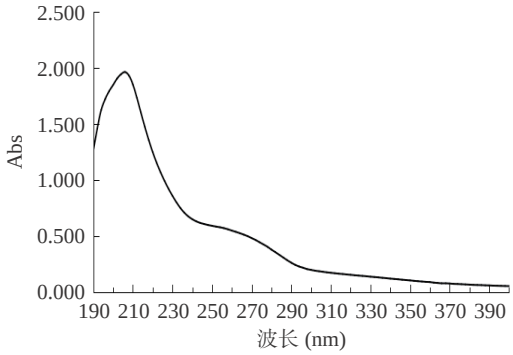


图 4 PHP 的紫外全扫描图谱

Fig.4 UV spectra of PHP

2.3.2 红外光谱扫描 红外图谱常常用来鉴定多糖的初级结构。在中红外图谱解析中，一般将波数 4000~1300 cm^{-1} 称为特征区，可以根据分子官能团和基团吸收峰来判断物质类别。1300~400 cm^{-1} 称为指纹区，可以判断糖苷键类型和构型[26]。

PHP 的红外扫描图谱见图 5。图中 3400 cm^{-1} 的-OH 伸缩振动峰、2936 cm^{-1} 的 C-H 键的伸缩振动峰和 1380 cm^{-1} 的 C-H 键的弯曲振动峰，联合证明所检测化合物为糖类化合物[27−29]。在 1636 和 1424 cm^{-1} 分别为-COOH 的非对称及对称伸缩振动峰。图谱在 1000~1200 cm^{-1} 的三个吸收峰是吡喃环吸收振动引起的，具有 C-O-C 骨架[30]，α 型的 C-H 在 844 cm^{-1} 会有一个吸收峰，而 β 型的在 891 cm^{-1} 处有一个吸收峰[31]，图中在 852 cm^{-1} 有一个吸收峰，说明含有 α-型糖苷键。综上说明 PHP 是一种 α-吡喃糖。

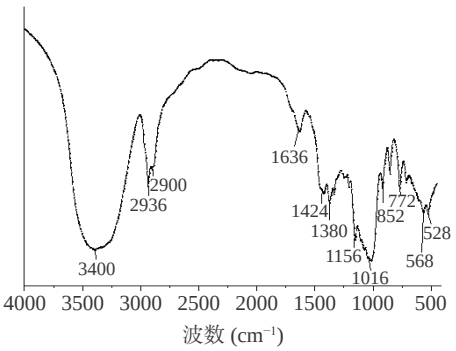


图 5 PHP 的红外光谱扫描图

Fig.5 Scanning infrared spectrum of PHP

2.3.3 分子量检测 多糖的溶解度和粘度受其分子量大小的影响，并且多糖链的大小与结构与其生物活性密切相关[30]。以出峰时间(t)为横坐标，分子量的对数值(lg Mw)为纵坐标，绘制标准曲线，得回归方程为 lg Mw=−1.2807 t+15.374，R^2=0.9981。

如图 6 所示，PHP 主要被分成 3 个峰，其中 2 个强吸收峰的出峰时间在 9.38 与 9.90 min，代入标准曲线计算分子量分别为 2.3×10^3 和 500 Da。此外，8.13~9.10 min 有 1 个较大连续峰，代入标曲后分子量在 5.2×10^3~92×10^3 Da 之间。结合文献，太子参中多糖的分子量基本在 3×10^3~2.2×10^5 Da 之间[14,32−33]。有研究报道，醇沉的乙醇终浓度不同，所得多糖的分子量会不同[34]，李松法等[35] 采用不同浓度的乙醇分级醇沉了黄芪多糖，发现醇沉所得黄芪多糖的分子量随乙醇浓度的升高而降低。本研究中太子参多糖分子量在 500~92×10^3 Da 之间，与现有的太子参多糖的分子量存在差异，这可能是使用 80% 乙醇浓度醇沉导致的。

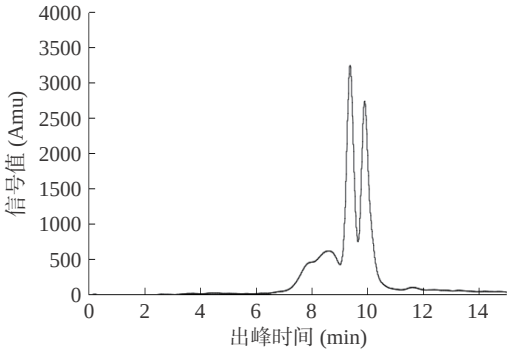


图 6 PHP 的分子量分布

Fig.6 Molecular weight distribution of PHP

2.3.4 单糖组成检测 标准单糖出峰时间及顺序见图 7。图 8 为 PHP 的 HPLC 色谱图，PHP 主要是由葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖、甘露糖和葡萄糖醛酸组成。郭守斌测定了 10 种不同产地太子参的单糖，总结出太子参的单糖组成为半乳糖、D-甘露糖、鼠李糖、阿拉伯糖、D-无水葡萄糖、D-葡萄糖醛酸、D-半

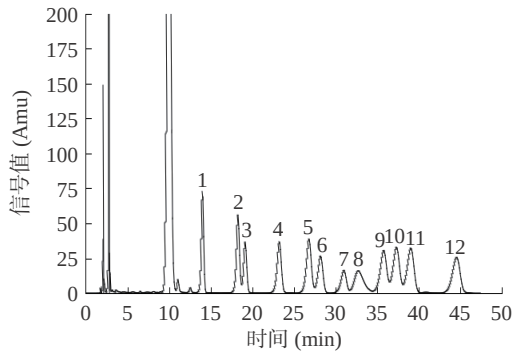


图 7 单糖混标样品的 HPLC 色谱图

Fig.7 HPLC spectrum of the mixture of monosaccharides

注：1-甘露糖、2-核糖、3-鼠李糖、4-葡萄糖醛酸、5-半乳糖醛酸、6-N-乙酰-氨基葡萄糖、7-葡萄糖、8-N-乙酰-氨基半乳糖、9-半乳糖、10-木糖、11-阿拉伯糖、12-岩藻糖。

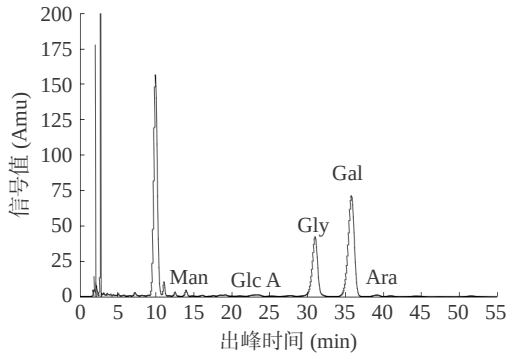


图 8　PHP 的 HPLC 图谱

Fig.8　HPLC spectrum of PHP

乳糖醛酸，且不同产地太子参多糖中单糖组成略有差异[36]，这与本实验结果是基本一致的。夏和先等比较了组培太子参和野生太子参的单糖组成，发现其单糖组成基本相同，但单糖的比例明显不同[37]。葡萄糖与半乳糖是 PHP 中最主要的两种单糖，这与金针菇、杏鲍菇、猴头菇等食用菌多糖的单糖组成相类似[38]，可能具有与其类似的免疫调节、降血糖血脂、抗疲劳等生理活性[39]。

2.4　PHP 对 Raw 264.7 巨噬细胞的保护作用

2.4.1　PHP 对 Raw 264.7 巨噬细胞的毒性作用浓度　PHP 对 Raw 264.7 巨噬细胞毒性作用结果如图 9 所示。PHP 在 80~640 μg/mL 范围内，对 Raw 264.7 巨噬细胞的存活率具有提升作用，且呈现剂量-反应关系，在添加量为320 μg/mL 时，细胞存活率最大，为 111.35%。但是当浓度达到 960 μg/mL 后，PHP 对细胞表现出毒害作用，因此，选择 PHP 浓度为 80~640 μg/mL 进行下一步实验。张丽娟等[40] 探究了太子参多糖对 Raw 264.7巨噬细胞免疫调节作用的影响，结果表明太子参多糖的安全浓度为 600 μg/mL，这与本文研究结果相近。研究表明多糖可以通过促进巨噬细胞的增殖，从而增强巨噬细胞的吞噬作用[41]。此外，铁皮石斛多糖、杏鲍菇等多糖的单糖组成均以葡萄糖、半乳糖、甘露糖为主[38, 42]，与本研究中 PHP 的单糖组成较为一致，且此类多糖均表现出免疫调节

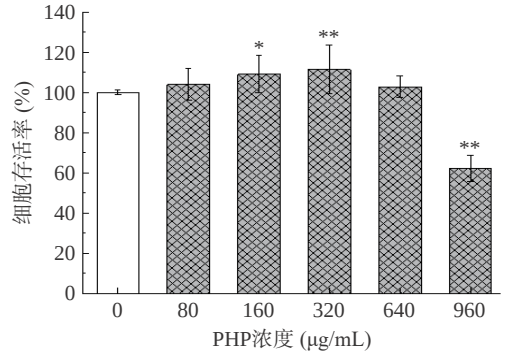


图 9　PHP 对 Raw 264.7 巨噬细胞存活率的影响

Fig.9　Effects of PHP on cell viability in Raw264.7 cells

注：与空白对照组相比，*表示差异显著，P<0.05；**表示差异极显著，P<0.01。

活性[42−43]，进一步说明 PHP 具备潜在的免疫调节活性。

2.4.2　PHP 对 LPS 诱导免疫损伤的 Raw 264.7 巨噬细胞存活的影响　PHP 对 LPS 诱导的免疫损伤下细胞存活检测结果如图 10 所示。与空白组相比，在 1 μg/mL 的 LPS 的诱导损伤下，细胞相对存活率极显著降低（P<0.01），说明本实验成功建立了免疫损伤模型。不同浓度的 PHP 处理后，Raw 264.7 巨噬细胞存活率有一定提升效果；当剂量为 640 μg/mL 时，细胞存活率极显著提高了 7.21%（P<0.01）。这表明太子参多糖对 Raw 264.7 巨噬细胞的免疫损伤具有一定缓解作用。

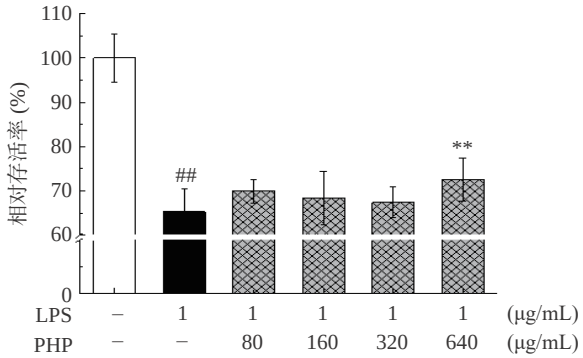


图 10　PHP 对 LPS 诱导损伤的 Raw264.7 细胞存活率的影响

Fig.10　Effects of PHP on cell viability in Raw264.7 cells induced by LPS

注：与对照组相比，#表示差异显著，P<0.05，##表示差异极显著，P<0.01；与 LPS 伤害组相比，*表示差异显著，P<0.05，**表示差异极显著，P<0.01。

Raw 264.7 巨噬细胞最好的状态呈透亮的圆形，细胞吞噬抗原过多、培养环境恶劣都会促使该细胞呈现梭形、长梭形[44]。由图 11 可知，空白对照组的 Raw 264.7 巨噬细胞呈椭圆或圆形。模型组在 LPS 刺激下，细胞发生形态变化，呈菱形、梭形，细胞密度明显少于空白对照组。陈光勇[45]、郑胜眉[46] 等显微镜下观察 Raw 264.7 巨噬细胞时，LPS 处理组同样出现了数量降低、长梭状的细胞形变等。加入 PHP 的处理组中，细胞形态出现明显改善，大多细胞呈标准圆形、类椭圆形、纺锤形等，这表明 PHP 具有改善 Raw 264.7 巨噬细胞形态的作用。

3　结论

本实验通过水提醇沉法从太子参中提取了太子参粗多糖，得率为 8.23%，纯度为 51.47%。并采用 DEAE Cellulose-52 离子交换柱法纯化得太子参多糖（PHP），其纯度为 80.52%。PHP 是一种 α-吡喃糖，分子量在 500~92×10^3 Da，主要由葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖、甘露糖及葡萄糖醛酸组成。以 LPS 诱导的 Raw 264.7 小鼠巨噬细胞为模型，PHP 可以提高免疫损伤后的细胞存活率，改善细胞形态，说明

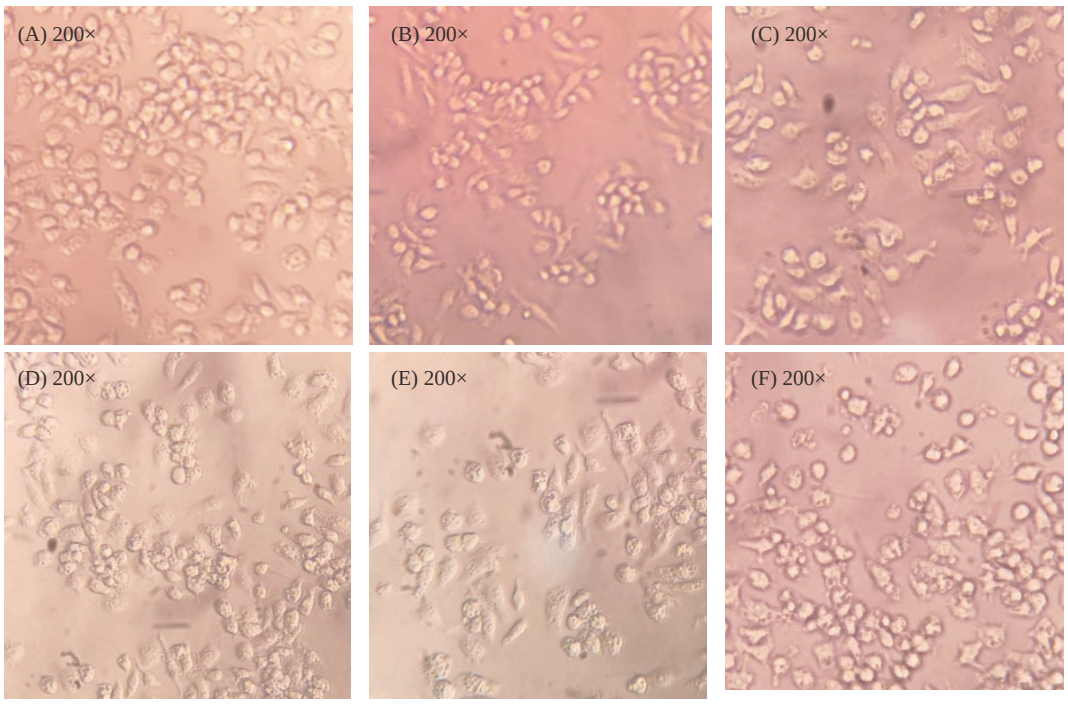


图 11 PHP 对 LPS 诱导损伤的 Raw 264.7 巨噬细胞形态的影响

Fig.11 Effects of PHP on cell morphology in Raw264.7 cells induced by LPS

注: A: 空白组; B: 模型组; C: 80 μg/mL PHP 组; D: 160 μg/mL PHP 组; E: 320 μg/mL PHP 组; F: 640 μg/mL PHP 组。

了 PHP 对由 LPS 诱导损伤的 Raw 264.7 巨噬细胞有保护作用, 初步表明具备体外调节免疫的潜力。

参考文献

[1] 刘训红, 阚毓铭. 太子参研究概述[J]. 时珍国医国药, 2000, 11(12): 1131−1132. [LIU Xunhong, KAN Yuming. Overview of the research on *Pesudostellaria heterophylla*[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2000, 11(12): 1131−1132.]

[2] SUN H W, SHI K Q, QI K, et al. *Pseudostellaria heterophylla* extract polysaccharide H-1-2 suppresses pancreatic cancer by inhibiting hypoxia-induced AG2[J]. Molecular Therapy-Oncolytics, 2020, 17: 61−69.

[3] YOU S Y, LIU X W, XU G T, et al. Identification of bioactive polysaccharide from *Pseudostellaria heterophylla* with its anti-inflammatory effects[J]. Journal of Functional Foods, 2021, 78(150): 104353.

[4] 陈耀金, 陈建洪, 刘伟招, 等. 太子参胶囊增强免疫作用实验研究[J]. 中医药临床杂志, 2015, 27(8): 1172−1174. [CHEN Yaojin, WANG Gong, CHEN Jianhong, et al. Study on Taizishen capsule's functions in enhancing immunity[J]. Clinical Journal of Traditional Chinese Medicine, 2015, 27(8): 1172−1174.]

[5] 张炎达, 潘慧青, 衣伟萌, 等. 太子参须提取物对小鼠免疫功能的影响[J]. 现代畜牧兽医, 2021(10): 46−49. [ZHANG Yanda, PAN Huiqing, YI Weimeng, et al. Effect of *Pseudostellaria heterophylla* fibrous root extraction on immunologic functions of mice[J]. Graziery Veterinary Sciences, 2021(10): 46−49.]

[6] CHEN J L, PANG W S, KAN Y J, et al. Structure of a pectic polysaccharide from *Pseudostellaria heterophylla* and stimulating insulin secretion of INS-1 cell and distributing in rats by oral[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 106: 456−463.

[7] FANG Z H, DUAN X C, ZHAO J D, et al. Novel polysaccharide H-1-2 from *Pseudostellaria heterophylla* alleviates type 2 diabetes mellitus[J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2018, 49(3): 996−1006.

[8] YANG C J, YOU L T, YIN X B, et al. Heterophyllin B ameliorates lipopolysaccharide-induced inflammation and oxidative stress in Raw264.7 macrophages by suppressing the PI3K/Akt pathways [J]. Molecules, 2018, 23(4): 717.

[9] WANG Z, LIAO S G, HE Y, et al. Protective effects of fractions from *Pseudostellaria heterophylla* against cobalt chloride-induced hypoxic injury in H9c2 cell[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2013, 147(2): 540−545.

[10] 陈小英, 曾晏萍, 刘汉儒, 等. 太子参须多糖粗提物对小鼠免疫功能的调节作用[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2020, 42(4): 56−64. [CHEN Xiaoying, ZENG Yanping, LIU Hanru, et al. Effects of crude polysaccharides from Radix pseudostellariae on immunoregulation function in mice[J]. Journal of Southwest University (Natural Science Edition), 2020, 42(4): 56−64.]

[11] 冯丹, 郝思钰, 付杨, 等. 太子参多糖注射液对免疫抑制小鼠免疫功能的影响[J]. 中兽医医药杂志, 2020, 39(3): 74−77. [FENG Dan, HAO Siyu, FU Yang, et al. Effect of Taizishen polysaccharide injection on the immune function of immunosuppressive mice[J]. Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine, 2020, 39(3): 74−77.]

[12] SARAH J, CLEMENTS, SIMON R CARDING. Diet, the intestinal microbiota, and immune health in aging[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2018, 58(4): 651−661.

[13] 崔石阳, 姜帆, 韩建春, 等. 北五味子多糖对 RAW 264.7 巨噬细胞的免疫调节作用[J]. 食品科学, 2017, 38(19): 201−205. [CUI Shiyang, JIANG Fan, HAN Jianchun, et al. The immun-

omodulatory effect of *Schisandra chinensis* polysaccharide on Raw 264.7 cells[J]. Food Science, 2017, 38(19): 201−205.]
[14] HU J, PANG W S, CHEN J L, et al. Hypoglycemic effect of polysaccharides with different molecular weight of *Pseudostellaria heterophylla*[J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2013, 13(1): 1−9.
[15] 野津, 张文森, 王知斌, 等. DEAE-52 在中药多糖分离纯化中的应用[J]. 化学工程师, 2019, 33(11): 43−45,22. [YE Jin, ZHANG Wensen, WANG Zhibin, et al. Application of DEAE-52 in the separation and purification of polysaccharides from traditional Chinese medicine[J]. Chemical Engineers, 2019, 33(11): 43−45, 22.]
[16] 雷思敏, 肖榕, 章莹, 等. 铁皮石斛中性多糖分离纯化及其体内免疫调节作用研究[J]. 中药新药与临床药理, 2018, 29(6): 748−753. [LEI Simin, XIAO Rong, ZHANG Ying, et al. Isolation and purification of neutral polysaccharides from *Dendrobium candidum* and its immune regulation *in vivo*[J]. New Chinese Medicines and Clinical Pharmacology, 2018, 29(6): 748−753.]
[17] 陈杨扬, 李娇, 王向红, 等. 滑子菇多糖的结构及体外生物活性探究[J]. 中国食品学报, 2019, 19(6): 68−73. [CHEN Yangyang, LI Jiao, WANG Xianghong, et al. Structural characterization and bioactivities of polysaccharides from *Pholiota nameko* in *vitro*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(6): 68−73.]
[18] 宁慧娟. 灵芝子实体多糖碱性电解水提取工艺优化及其性质分析 [D]. 北京: 中国农业大学, 2018. [NING Huijuan. Optimization of alkaline electrolyzed water extraction and characterization of polysaccharide from *Ganoderma lucidum* fruiting bodies[D]. Beijing: China Agricultural University, 2018.]
[19] 戴军, 朱松, 汤坚, 等. PMP 柱前衍生高效液相色谱法分析杜氏盐藻多糖的单糖组成[J]. 分析测试学报, 2007(2): 206−210. [DAI Jun, ZHU Song, TANG Jian, et al. Analysis of monosaccharide compositions in polysaccharides from *D. salina* by precolumn derivatization high performance liquid chromatography[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2007(2): 206−210.]
[20] LEE S M, Y M, P H. Protective effects of *Paeonia lactiflora* pall on hydrogen peroxide-inducedapoptosis in PC12 cells[J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 2008, 5(72): 1272−1277.
[21] JIN S E, KIM O S, YOO S, et al. Anti-inflammatory effect and action mechanisms of traditional herbal formula Gamisoyo-san in Raw264.7 macrophages[J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2016, 16(1): 1−11.
[22] 林巧美, 庞文生, 曾洁, 等. 福建柘荣不同品种太子参浸出物及多糖含量测定[J]. 中国民族民间医药, 2019, 28(3): 21−23. [LIN Qiaomei, PANG Wensheng, ZENG Jie, et al. Experimental study on the extracts and polysaccharides of different sarieties of *Pseudostellaria heterophylla* from Zhelong Fujian province[J]. Chinese Journal of Ethnomedicine and Ethnopharmacy, 2019, 28(3): 21−23.]
[23] 闵思明, 赵晓瑶, 陈赛红, 等. 太子参参须多糖对免疫抑制小鼠的免疫调节作用研究[J]. 动物医学进展, 2020, 41(8): 23−28. [MIN Siming, ZHAO Xiaoyao, CHEN Saihong, et al. Immunomodulatory effects of radix pseudostellariae fibrous root polysaccharides on cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2020, 41(8): 23−28.]
[24] 陶俊, 文汉. 油茶籽多糖分离纯化和结构分析[J]. 食品工业科技, 2011, 32(6): 132−135. [TAO Jun, WEN Han. Isolation, purification and structural analysis of *Camellia* seed polysaccharides[J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 32(6): 132−135.]
[25] 张发宇, 余金卫, 张浏, 等. 巢湖蓝藻藻蓝蛋白纯化过程中紫外-可见吸收光谱特征分析[J]. 光谱学与光谱分析, 2017, 37(3): 806−810. [ZHANG Fayu, YU Jinwei, ZHANG Liu, et al. Characteristic analysis of ultraviolet-visible absorption spectrum during purification of cyanobacterial cyanophytein in Chaohu Lake [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2017, 37(3): 806−810.]
[26] 董洲. 野葛根多糖的提取、分离纯化、结构鉴定及对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 的免疫调节活性研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2018. [DONG Zhou. Extraction, isolation, purification, structural characterization and immunomodulatory activity in RAW264.7 cells of the polysaccharides from *Pueraria lobate* (willd.) Ohwi root[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018.]
[27] 黄娜. 血清色素上皮衍生因子 (PEDF) 与糖尿病肾病蛋白尿的相关性及其机制研究 [D]. 上海: 中国人民解放军陆军军医大学, 2019. [HUANG Na. The effect and mechanism of increased levels of serum pigment epithelium-derived factor in proteinuria in diabetic kidney disease[D]. Shanghai: Army Medical University, 2019.]
[28] HAN L, SUO Y, YANG Y, et al. Optimization, characterization, and biological activity of polysaccharides from *Berberis dasystachya* Maxim[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 85: 655−666.
[29] ZHANG L, ZHANG W, WANG Q, et al. Purification, antioxidant and immunological activities of polysaccharides from *Actinidia chinensis* roots[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 72: 975−983.
[30] LÜ X, CHEN D, YANG L, et al. Comparative studies on the immunoregulatory effects of three polysaccharides using high content imaging system[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 86: 28−42.
[31] 王银平. 玉木耳多糖的制备、结构表征及其与乳清蛋白相互作用研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2020. [WANG Yinping. Preparation and structural characterization of polysaccharides from *Auricularia cornea* var. Li. and their interactions with whey protein[D]. Changchun: Jilin University, 2020.]
[32] 史文涛, 庞文生, 胡娟. 高效凝胶色谱法测定太子参均一多糖分子量[J]. 中国民族民间医药, 2015, 24(2): 20−30. [SHI Wentao, PANG Wensheng, HU Juan. Determination of the molecular weight of uniform polysaccharides of radix pseudostellariae by high performance gel chromatography[J]. Chinese National Folk Medicine, 2015, 24(2): 20−30.]
[33] 杨斌, 庞文生, 胡娟. 太子参均一多糖的分离与表征[J]. 中国民族民间医药, 2017, 26(4): 11−16. [YANG Bin, PANG Wensheng, HU Juan. Isolation and characterization of homogeneous polysaccharides from radix pseudostellariae[J]. Chinese National

Folk Medicine, 2017, 26(4): 11−16.]
[34] 刘艳红, 唐祥, 李娅琳, 等. 活性多糖提取纯化及结构解析的研究进展[J]. 中国民族民间医药, 2020, 29(3): 67−73. [LIU Yanhong, TANG Xiang, LI Yalin, et al. Research progress on the extraction and purification and structure analysis of active polysaccharides[J]. Chinese Ethnic Folk Medicine, 2020, 29(3): 67−73.]
[35] 李红法, 郭松波, 满淑丽, 等. 乙醇分级沉淀提取黄芪多糖及其理化性质和抗氧化活性研究[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(11): 2111−2116. [LI Hongfa, GUO Songbo, MAN Shuli, et al. Extraction of *Astragalus* polysaccharide by ethanol fractional precipitation and its physical and chemical properties and antioxidant activity[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2015, 40(11): 2111−2116.]
[36] 郭守斌. 柱前衍生超高效液相色谱法分析太子参多糖中单糖的组成[J]. 中国现代医学杂志, 2016, 26(23): 37−41. [GUO Shoubin. Analysis of monosaccharide composition of *Pseudostellaria heterophylla* polysaccharides by pre-column derivatization ultra performance liquid chromatography[J]. China Journal of Modern Medicine, 2016, 26(23): 37−41.]
[37] 夏和先, 陈乃东, 姚厚军, 等. 不同种源的太子参多糖含量及其单糖组成 GC-MS 研究[J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(4): 542−546. [XIA Hexian, CHEN Naidong, YAO Houjun, et al. Study on the polysaccharide content and monosaccharide composition of *Pseudostellaria heterophylla* from different provenances by GC-MS[J]. Natural Products Research and Development, 2016, 28(4): 542−546.]
[38] 商佳琦, 邹丹阳, 滕翔宇, 等. 5 种食用菌多糖的结构特征及抗氧化活性对比[J]. 食品工业科技, 2020, 41(15): 77−83. [SHANG Jiaqi, ZOU Danyang, TENG Xiangyu, et al. Structural characterization and antioxidant activity of five kinds of edible fungus polysaccharides[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(15): 77−83.]
[39] 宋立立, 张兆英. 食用菌多糖的生物活性研究现状[J]. 中国食用菌, 2019, 38(2): 14−16. [SONG Lili, ZHANG Zhaoying. The status of biological activity of mushroom polysaccharides[J]. Edible Fungi of China, 2019, 38(2): 14−16.]
[40] 张丽娟, 王珍, 廖尚高. 太子参多糖对 RAW 264.7 巨噬细胞免疫调节作用的初步研究[J]. 中国野生植物资源, 2018, 37(4): 14−17. [ZHANG Lijuan, WANG Zhen, LIAO Shanggao. Preliminary study on the immunomodulatory activity of *Pseudostellaria* polysaccharides on macrophage cell line RAW 264.7[J]. Chinese Wild Plant Resources, 2018, 37(4): 14−17.]
[41] 方瑶, 毛旭虎. 小鼠巨噬细胞 RAW264.7 的培养技巧及经验总结[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(22): 4358−4359. [FANG Yao, MAO Xuhu. Cultivation skills and experience summary of mouse macrophage RAW264.7[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2012, 12(22): 4358−4359.]
[42] 张勇. 铁皮石斛茎、叶、花多糖理化性质及抗氧化、免疫调节活性研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2016. [ZHANG Yong. Study on the physicochemical properties and antioxidant and immunomodulatory activities of polysaccharides from stems, leaves and flowers of *Dendrobium candidum*[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2016.]
[43] 亢玉莹. 七种真菌多糖免疫活性的筛选及杏鲍菇多糖免疫机制的研究 [D]. 长春: 东北师范大学, 2018. [KANG Yuying. Screening of seven fungal polysaccharides for immune activity and study on immune mechanism of *Pleurotus eryngii* polysaccharide [D]. Changchun: Northeast Normal University, 2018.]
[44] 王成蓉, 吴金华, 涂丽蓉, 等. 肉苁蓉多糖对鸡免疫 ND 苗后血液中 T 淋巴细胞及 IFN-γ 活性的影响[J]. 四川畜牧兽医, 2008(8): 29−30,32. [WANG Chengrong, WU Jinhua, TU Lirong, et al. Effects of *Cistanche deserticola* polysaccharides on T lymphocytes and IFN-γ activity in the blood of chickens immunized with ND vaccine[J]. Sichuan Animal and Veterinary Sciences, 2008(8): 29−30,32.]
[45] 郑胜眉, 周兴, 黄文涛, 等. 岩白菜素对 LPS 诱导 RAW264.7 巨噬细胞炎性因子产生及细胞形态变化的影响[J]. 中药材, 2020, 43(1): 206−210. [ZHENG Shengmei, ZHOU Xing, HUANG Wentao, et al. Effects of *Bergenin* on LPS-induced inflammatory factor production and cell morphological changes in Raw264.7 cells[J]. Chinese Medicinal Materials, 2020, 43(1): 206−210.]
[46] 陈广勇, 韩乾杰, 张玲玲, 等. 人参多糖对脂多糖刺激小鼠巨噬细胞的免疫调控作用[J]. 动物健康, 2021, 57(2): 182−186. [CHEN Guangyong, HAN Ganjie, ZHANG Lingling, et al. The immune regulation effect of ginseng polysaccharide on lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophages[J]. Animal Health, 2021, 57(2): 182−186.]

赵云龙. 芜菁山楂复合饮料配方优化及其对运动耐力的影响 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 401−408. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022010246

ZHAO Yunlong. Optimization of Formula of *Brassica rapa* L. and Hawthorn Compound Beverage and Its Effect on Exercise Endurance[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 401−408. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022010246

·营养与保健·

芜菁山楂复合饮料配方优化及其对运动耐力的影响

赵云龙

（信阳农林学院, 河南信阳 464000）

摘　要: 以芜菁和山楂为原料，制备芜菁山楂复合饮料，并考察其对小鼠的运动耐力影响。基于单因素实验结果，采用响应面分析确定芜菁山楂复合饮料的最佳配方后，分别对低、中、高剂量组动物按照 0.1、0.2 和 0.3 mL/10 g 鼠重剂量灌胃，探讨复合饮料对小鼠运动耐力的影响。结果显示，该复合饮料的最佳配方为山楂浸提液与芜菁多糖溶液的体积比 3∶1，赤藓糖醇用量 3.4%，柠檬酸用量 0.23%，复合稳定剂（$m_{羧甲基纤维素钠}$∶$m_{黄原胶}$∶$m_{海藻酸钠}$=2∶1∶1）用量 0.06%，所得饮料色泽均一，酸甜适中，具有芜菁与山楂的混合风味，静置后无明显沉淀，感官得分为（88.9±0.4）分。与空白对照组相比，所有饮料灌胃组均可显著延长小鼠的运动时间（P<0.05，P<0.01），减少运动时体内的乳酸累积和蛋白质或氨基酸分解（P<0.05，P<0.01），并可提高超氧化物歧化酶（Superoxide dismutase，SOD）和谷胱甘肽过氧化物酶（Glutathione peroxidase，GSH-Px）（P<0.05，P<0.01）的活性，因此有助于提高机体的运动耐力。

关键词: 芜菁, 山楂, 复合饮料, 配方, 响应面分析, 运动耐力

中图分类号: TS275.5　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0401−08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022010246　　本文网刊:

Optimization of Formula of *Brassica rapa* L. and Hawthorn Compound Beverage and Its Effect on Exercise Endurance

ZHAO Yunlong

（Xinyang Agriculture and Forestry College, Xinyang 464000, China）

Abstract: The *Brassica rapa* L. and hawthorn were acted as raw materials to develop the compound beverage of *Brassica rapa* L. and hawthorn. Subsequently, its effect on exercise endurance of animal was researched. Basing on the result of single factor test, the optimum formula of compound beverage was designed by response surface test. Meanwhile its effect on exercise endurance *in Vivo* was explored by animal test after for low, medium and high dosage groups were given at 0.1, 0.2 and 0.3 mL/10 g·BW intragastric administration, respectively. The optimal formula of the compound beverage were as follows: Volume proportion of hawthorn juice and polysaccharides solution of *Brassica rapa* L. was 3∶1, dosage of erythritol was 3.4%, dosage of citric acid was 0.23%, dosage of compound stabilizer (sodium carboxymethyl cellulose∶xanthan gum∶sodium alginate = 2∶1∶1, mass ratio) was 0.06%. The ultimate beverage presented uniform color, moderate sweet and sour, mixture flavor of *Brassica rapa* L. and hawthorn, not observed obvious precipitate, the sensory score of beverage was 88.9±0.4. Compared with the results of blank control group, the compound beverage at different dosage could prolonged the exercise time of mice (P<0.05, P<0.01), decreased the LA accumulation and decomposition of protein or amino acid (P<0.05, P<0.01), and enhanced activity of SOD and GSH-Px (P<0.05, P<0.01). Therefore, it could contribute to improve exercise endurance of body.

Key words: *Brassica rapa* L.; hawthorn; compound beverage; formula; response surface methodology; exercise endurance

收稿日期: 2022−01−26

作者简介: 赵云龙（1980−）, 男, 硕士, 讲师, 研究方向: 运动训练营养, E-mail: ylza2010@126.com。

高强度的运动使得身体反应迟缓，运动耐力下降，从而出现疲劳感。有研究表明，疲劳感的产生可能归因于运动代谢产物如：乳酸、酮体等在体内的蓄积和自由基生成量的增多导致肌肉的收缩能力下降，及细胞所需氧气和营养物质的供应不足[1−2]，而补充多糖类抗氧化剂是缓解机体运动疲劳的有效方式之一。Cai 等[3] 研究证实灵芝多糖可显著改善体内 SOD 与乳酸脱氢酶（Lactate dehydrogenase，LDH）活力，延长动物的运动时间；吴云等[4] 发现树莓果肉多糖能维持血糖和糖原至一定的浓度水平，有效提高小鼠的运动耐力，并加快体内的乳酸清除；谢飞飞[5] 发现远志多糖可较好清除多种氧自由基，并可较少运动后体内乳酸与尿素氮的浓度，缓解运动疲劳。

芜菁（*Brassica rapa* L.）属于十字花科芸台属草本植物，也称“蔓菁”、“莞根”、“恰麻古”，具有药食两用特性，富含多糖、黄酮、皂苷、萜烯及香豆素等活性成分，具有抗氧化、调节机体免疫功能等作用[6−7]。李欢欢等[8] 曾通过动物实验发现芜菁中性多糖可显著提高小鼠血清中过氧化氢酶（CAT）、GSH-Px 和 SOD 的活性，并显著降低丙二醛（MDA）的浓度，从而减少体内氧化应激反应；王伟等[9] 发现芜菁多糖对 DPPH 自由基的清除能力和还原力的 EC_{50} 值分别达到 8.55 和 2.25 mg/mL；蔡啸镝等[10] 研究显示芜菁多糖可延长小鼠负重游泳时间，具有较好的抗疲劳作用。

山楂属于蔷薇科山楂属植物的果实，是常见水果之一，具有消食健胃、抗氧化等特性，特别是山楂多糖也具有抗疲劳的作用[11−12]。由于目前暂未有芜菁食品加工的相关报道，为提高该资源的利用度，本研究以芜菁多糖为原料，另添加山楂浸提物制备芜菁山楂复合饮料，既可丰富饮料的口感，又能提高其抗疲劳作用，随后通过动物实验验证，以期为芜菁的深度开发与利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

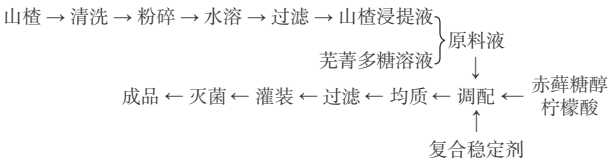
芜菁多糖（纯度：82.2%） 西安青芷生物技术有限公司；个大饱满、无虫点的山楂 信阳农贸市场；葡萄糖对照品 中国食品药品检定研究院；浓硫酸、苯酚、乙醇等均为分析纯 上海阿拉丁试剂有限公司；赤藓糖醇、羧甲基纤维素钠 辰善食品配料有限公司；柠檬酸、海藻酸钠、黄原胶 中团食化食品配料有限公司；乳酸（Lactic acid，LA）、尿素氮（Blood urea nitrogen，BUN）、SOD、GSH-Px 检测试剂盒 合肥莱尔生物科技有限公司；试验用水 为纯化水；SPF 级健康雄性小鼠 100 只，体质量 17~26 g，河南省实验动物中心（动物许可证号：SYXK（豫）2017-0001）。

YT-774 型实验室均质机 英拓智能装备有限公司；DF-45 型粉碎机 温岭林大机械设备有限公司；UV-3802 型紫外-可见分光光度计 上海兰科仪器有限公司；DHG-9140 型恒温干燥箱 上海一恒科学仪器有限公司；FA1004 型分析天平 上海力辰仪器科技有限公司；

AXTD4 型台式离心机 盐城市安信实验仪器有限公司；WYA-2S 型手持折光仪 济南来宝医疗器械有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 工艺流程



1.2.2 复合饮料制备要点

1.2.2.1 山楂浸提液制备 山楂洗净去核后，晒干粉碎过 80 目筛，称取一定质量的山楂粉置于 10 倍重量的水中，在 80 ℃ 回流 2 h 后，经 6 层纱布过滤，重复上述操作，合并两次滤液，蒸发浓缩至总体积的 20%，即得山楂浸提液，待用[13]。

1.2.2.2 混合调配 根据预实验结果，将一定质量的芜菁多糖溶液完全溶于水中，配制成 20% 芜菁多糖水溶液，按照一定的体积比加入山楂浸提液与芜菁多糖水溶液，制得原料液后，添加相对原料液重量的赤藓糖醇、柠檬酸和复合稳定剂（$m_{羧甲基纤维素钠}$∶$m_{黄原胶}$∶$m_{海藻酸钠}$=2∶1∶1），搅拌 30 min。

1.2.2.3 均质、过滤 将调配后的溶液置于均质机内，在 60 ℃、2.5 MPa 下均质 5 min 后脱气 10 min，过滤。

1.2.2.4 灌装、灭菌 将过滤后的溶液灌装于瓶内，于 100 ℃ 灭菌 8 min，即得饮料成品。

1.2.3 感官评价 参考相关饮料的评价维度和要求[14−15]，以色泽、气味、口感和组织形态为评价指标，制定芜菁山楂复合饮料的感官评价标准，具体见

表 1 复合饮料的感官评价标准

Table 1 Sensory evaluation criterion of the compound beverage

评价维度	评价标准	得分（分）
色泽（20分）	呈淡红色、色泽均一、未有异色、有光泽	14~20
	色泽偏淡或偏深、光泽感差	8~13
	色泽过深或过淡、无光泽	0~7
气味（20分）	有芜菁与山楂的混合香味、气味协调、无明显异味	14~20
	芜菁或山楂的气味突出，不协调	8~13
	有明显刺激性气味	0~7
口感（30分）	酸甜适宜、具有芜菁与山楂的特有风味、口感柔和	20~30
	酸甜比例适中、无芜菁涩味、口感偏浓或淡	10~19
	酸甜比例不协调、芜菁或山楂风味过浓或过淡	0~9
组织形态（30分）	澄清透明、组织形态均一、未有明显沉淀	20~30
	静置一段时间后略有分层，粘度较大	10~19
	组织形态不均一、静置后有明显分层	0~9

表 1。另外，选择 10 位具有饮料感官评价经验的人员对不同配方制得的复合饮料进行感官评价，结果去掉最高分与最低分后的平均值即为该饮料的感官得分。

1.2.4　复合饮料的配方考察　基于预实验结果，分别考察山楂浸提液与芜菁多糖溶液体积比、赤藓糖醇用量、柠檬酸用量及复合稳定剂的用量对复合饮料的感官评价影响，具体如下：固定赤藓糖醇 3%、柠檬酸 0.2%、复合稳定剂 0.05%，考察山楂浸提液与芜菁多糖溶液体积比（1∶1、2∶1、3∶1、4∶1、5∶1）对感官得分的影响；固定山楂浸提液与芜菁多糖溶液体积比 3∶1、柠檬酸 0.2%、复合稳定剂 0.05%，考察赤藓糖醇用量（1%、2%、3%、4%、5%）对感官得分的影响；固定山楂浸提液与芜菁多糖溶液体积比 3∶1、赤藓糖醇 3%、复合稳定剂 0.05%，考察柠檬酸用量（0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%）对感官得分的影响；固定山楂浸提液与芜菁多糖溶液体积比 3∶1、赤藓糖醇 3%、柠檬酸 0.2%，考察复合稳定剂用量（0.01%、0.03%、0.05%、0.07%、0.09%）对感官得分的影响。

1.2.5　复合饮料的配方优化　在单因素实验结果的基础上，以山楂浸提液与芜菁多糖溶液体积比和赤藓糖醇、柠檬酸及复合稳定剂的用量为响应面试验考察因素，确定芜菁山楂复合饮料的最佳配方，具体见表 2。

表 2　响应面试验考察因素与水平

Table 2　Investigating factors and levels of response surface experiment

水平	A:体积比	B:赤藓糖醇(%)	C:柠檬酸(%)	D:复合稳定剂(%)
−1	2∶1	2	0.1	0.03
0	3∶1	3	0.2	0.05
1	4∶1	4	0.3	0.07

1.2.6　质量指标检测　可溶性固形物含量：通过手持折光仪测定；pH：通过 pH 计测定；多糖含量：通过苯酚-硫酸法[16]，在 490 nm 波长下测定样品的吸光度后，以葡萄糖标准品质量浓度为横坐标，吸光度为纵坐标，绘制回归方程：y=0.1252x+0.0031，r=0.9993；离心沉淀率：样品静置 24 h 后离心（转速：4000 r/min，离心时间：5 min），取下层沉淀称重，计算离心沉淀率，离心沉淀率（%）=沉淀重量/饮料重量×100；微生物检测：按照 GB 4789.2-2016 和 GB 4789.3-2016 要求检测饮料的菌落总数及大肠杆菌群。

1.2.7　饮料对运动耐力的影响

1.2.7.1　动物试验设计　所有小鼠随机平均分为 5 组，每组各 20 只，分为空白对照组、阴性对照组和低、中、高剂量组，并按照《保健食品检验与评价技术规范》要求评价该复合饮料对运动耐力的影响，其中低、中、高剂量组分别 0.1、0.2、0.3 mL/10 g 鼠重灌胃复合饮料，而空白对照组按照 0.2 mL/10 g 鼠重灌胃纯净水；阴性对照组按照 0.2 mL/10 g 鼠重灌胃不含有原料液的饮料样品，每天灌胃 1 次，连续 30 d[17]。

1.2.7.2　负重游泳时间　灌胃结束后的第 1 d，各组随机选取 10 只小鼠置于常温泳池内，使其游泳至力竭沉没，记录小鼠自入水至沉没的时间[18]。

1.2.7.3　生化指标考察　各组剩余小鼠置于常温游泳池内，游泳 30 min 后，取出休息 10 min，采血离心制备血清，通过试剂盒检测 LA 与 BUN 含量。同时切取肝脏组织经盐水匀浆处理后，通过试剂盒检测 SOD、GSH-Px 的活力[19−20]。

1.3　数据处理

所有结果均采用 SPSS 18.0 分析，并以均值±标准差表示，另对动物实验的组间结果进行 t 检验，以 P<0.05 表示显著性差异，P<0.01 表示极显著性差异。

2　结果与分析

2.1　山楂浸提液与芜菁多糖溶液体积比对饮料的感官影响

图 1 为不同山楂浸提液与芜菁多糖溶液的体积比对复合饮料的感官得分影响。随着山楂浸提液的占比增大，饮料的感官得分呈先增高后减小的趋势，当体积比为 3:1 时，感官评分达到最高。这归因于芜菁多糖浓度较高时，溶液口感偏涩，提高山楂浸提液的比例，可改善口感，并使得二者气味协调，但山楂浸提液占比较大时，溶液酸甜感突出，并能掩盖芜菁特有风味，同时溶液颜色偏深，且静置后有明显沉淀物，因此选择山楂浸提液与芜菁多糖溶液体积比 2:1、3:1 和 4:1 作为响应面分析因素考察水平。

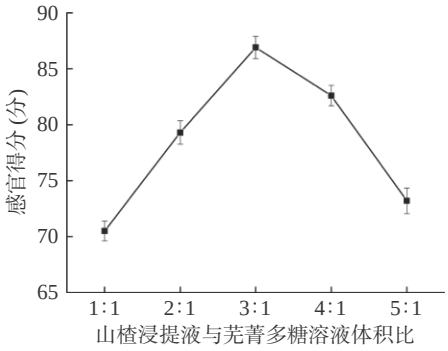


图 1　山楂浸提液与芜菁多糖溶液体积比对饮料的感官品质影响

Fig.1　Effect of volume proportion of hawthorn juice and polysaccharides solution of *Brassica rapa* L. on sensory scores of compound beverage

2.2　赤藓糖醇用量对饮料的感官影响

图 2 为赤藓多糖用量对复合饮料的感官得分影响，随着赤藓多糖用量的增多，复合饮料的感官得分先增高后降低，当用量为 3% 时，其感官得分最高。赤藓糖醇作为新型甜味剂，甜度仅有蔗糖的 60%~70%，稳定性良好且溶解度高[21−22]，在饮料中复配芜菁、山楂及柠檬酸可产生清爽、酸甜口感，并使芜菁

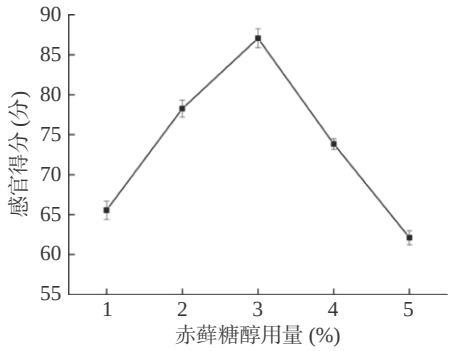


图 2 赤藓糖醇用量对饮料的感官品质影响

Fig.2 Effect of amount of erythritol on sensory score of compound beverage

与山楂的滋味协调，但用量过多，可使甜味较为突出，清凉感过重，从而减少“口感”得分，因此选择赤藓糖醇用量 2%、3%、4% 作为响应面分析因素考察水平。

2.3 柠檬酸用量对饮料的感官影响

图 3 为柠檬酸用量对复合饮料的感官得分影响，随着柠檬酸用量的增多，复合饮料的感官得分先增大后减少，当用量为 0.2% 时，饮料的感官得分达到最高。适当的柠檬酸有助于提升复合饮料的口感，但用量增多，使得溶液酸度较高，从而掩盖芜菁与山楂的特有风味，造成“气味”与“口感”得分下降，因此选择柠檬酸用量 0.1%、0.2%、0.3% 作为响应面分析因素考察水平。

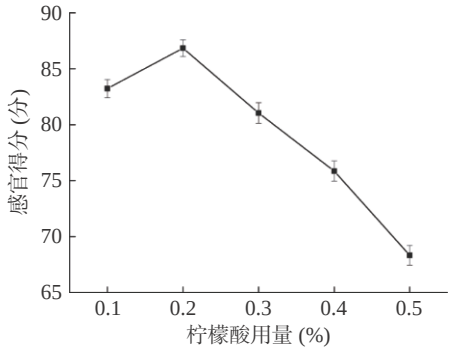


图 3 柠檬酸用量对饮料的感官品质影响

Fig.3 Effect of amount of citric acid on sensory score of compound beverage

2.4 复合稳定剂用量对饮料的感官影响

羧甲基纤维素钠、海藻酸钠及黄原胶作为饮料中常用的稳定剂，按照一定比例复配具有协同作用，考察不同复合稳定剂的用量对饮料的感官得分影响，结果见图 4。从图 4 可知，随着复合稳定剂用量的增多，饮料的感官得分逐渐升高，当用量为 0.05% 时达到最高，此时溶液中微粒悬浮稳定，分散性好，使口感细腻、爽滑，但添加较多会造成溶液黏度偏高，“口感”得分下降，这与陈战永等考察小麦肽运动饮料最佳配方结果相近[23]，因此选择复合稳定剂用量 0.03%、0.05%、0.07% 作为响应面分析因素考察水平。

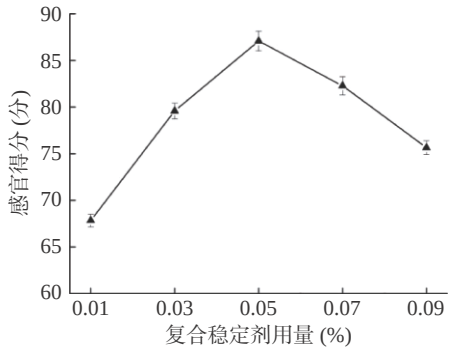


图 4 复合稳定剂用量对饮料的感官品质影响

Fig.4 Effect of amount of compound stabilizer on sensory score of compound beverage

2.5 响应面试验分析

2.5.1 试验结果 基于单因素实验结果，进行四因素三水平响应面考察试验，结果见表 3。采用 Design Expert 8.0 软件对表 3 中结果进行多元回归拟合，得到以 4 个自变量为编码值的二次多项回归方程：$Y=87.00+1.14A+3.28B+1.87C+2.11D-2.60AB-0.70AC+0.53AD+0.77BC+0.37BD+2.18CD-2.55A^2-4.51B^2-5.31C^2-5.42D^2$，另对该回归模型进行方差分析，结果见表 4。从表 4 可知，该二次多项式模型具有极显著性（$P<0.01$），其决定系数为 0.9721，校正决定系数为 0.9442，而失拟项的 $P>0.05$，可知该模型能

表 3 响应面试验结果

Table 3 Results of the response surface experiment

实验号	A	B	C	D	Y:感官得分(分)
1	0	−1	0	−1	71.5
2	0	1	0	1	82.6
3	−1	0	−1	0	74.6
4	0	0	0	0	86.8
5	1	1	0	0	83.2
6	1	0	1	0	81.5
7	−1	1	0	0	85.8
8	0	0	0	0	87.7
9	0	1	0	−1	76.5
10	0	−1	1	0	73.8
11	−1	0	1	0	81.2
12	0	1	−1	0	78.2
13	0	0	−1	1	75.1
14	0	−1	−1	0	73.3
15	−1	0	0	−1	76.4
16	1	0	−1	0	77.7
17	0	0	0	0	86.8
18	0	0	0	0	86.3
19	0	0	−1	−1	75.1
20	−1	−1	0	0	73.1
21	0	0	0	0	87.4
22	0	−1	0	1	76.1
23	0	1	1	0	81.8
24	0	0	1	−1	74.7
25	0	0	1	1	83.4
26	1	0	0	−1	77.9
27	−1	0	0	1	78.3
28	1	−1	0	0	80.9
29	1	0	0	1	81.9

表 4　响应面方差分析

Table 4　Variance analysis of response surface experiment

来源	平方和	自由度	均方	*F*值	*P*值	显著性
模型	661.77	14	47.27	34.86	<0.01	**
A	15.64	1	15.64	11.54	<0.01	**
B	129.36	1	129.36	95.41	<0.01	**
C	41.81	1	41.81	30.84	<0.01	**
D	53.34	1	53.34	39.34	<0.01	**
AB	27.04	1	27.04	19.94	<0.01	**
AC	1.96	1	1.96	1.45	0.2492	
AD	1.10	1	1.10	0.81	0.3825	
BC	2.40	1	2.40	1.77	0.2044	
BD	0.56	1	0.56	0.41	0.5299	
CD	18.92	1	18.92	13.96	<0.01	**
A^2	42.04	1	42.04	31.01	<0.01	**
B^2	131.84	1	131.84	97.23	<0.01	**
C^2	182.78	1	182.78	134.80	<0.01	**
D^2	190.61	1	190.61	140.58	<0.01	**
残差	18.98	14	1.36			
失拟项	17.76	10	1.78	5.82	0.0521	
误差项	1.22	4	0.31			
总和	18.98	14	1.36			
R^2	0.9721		调整R^2	0.9442		

注：**差异显著（*P*<0.01）。

较好拟合实验结果。在回归方程中，一次项和二次项对复合饮料感官得分的影响均极显著（*P*<0.01），另外山楂浸提液与芜菁多糖溶液的体积比和赤藓糖醇的用量以及柠檬酸用量与复合稳定剂的用量对结果的影响均极显著（*P*<0.01），而其它交互作用对结果的影响均不显著。从 *F*值可知，四种因素对饮料的感官得分影响顺序为：赤藓糖醇（B）>复合稳定剂（D）>柠檬酸（C）>体积比（A）。

2.5.2　响应曲面交互分析与最佳配方验证　图 5 为两个因素之间的交互作用响应曲面，从图 5 可见，固定一个因素，随着另一个因素的值增大，相应结果均呈先增大后减小的趋势，其中山楂浸提液与芜菁多糖溶液的体积比和赤藓糖醇的用量，柠檬酸用量与复合稳定剂用量的交互响应面坡度陡峭，表明饮料的感官得分受其影响较大。通过对二次多项回归方程进行极值分析，预测得到该饮料的最佳配方参数为：山楂浸提液与芜菁多糖溶液的体积比为 3.01∶1，赤藓糖醇用量 3.39%，柠檬酸用量 0.23%，复合稳定剂用量 0.06%，理论预测得分 88.2 分。为便于操作，选择山楂浸提液与芜菁多糖溶液的体积比为 3∶1，赤藓糖醇

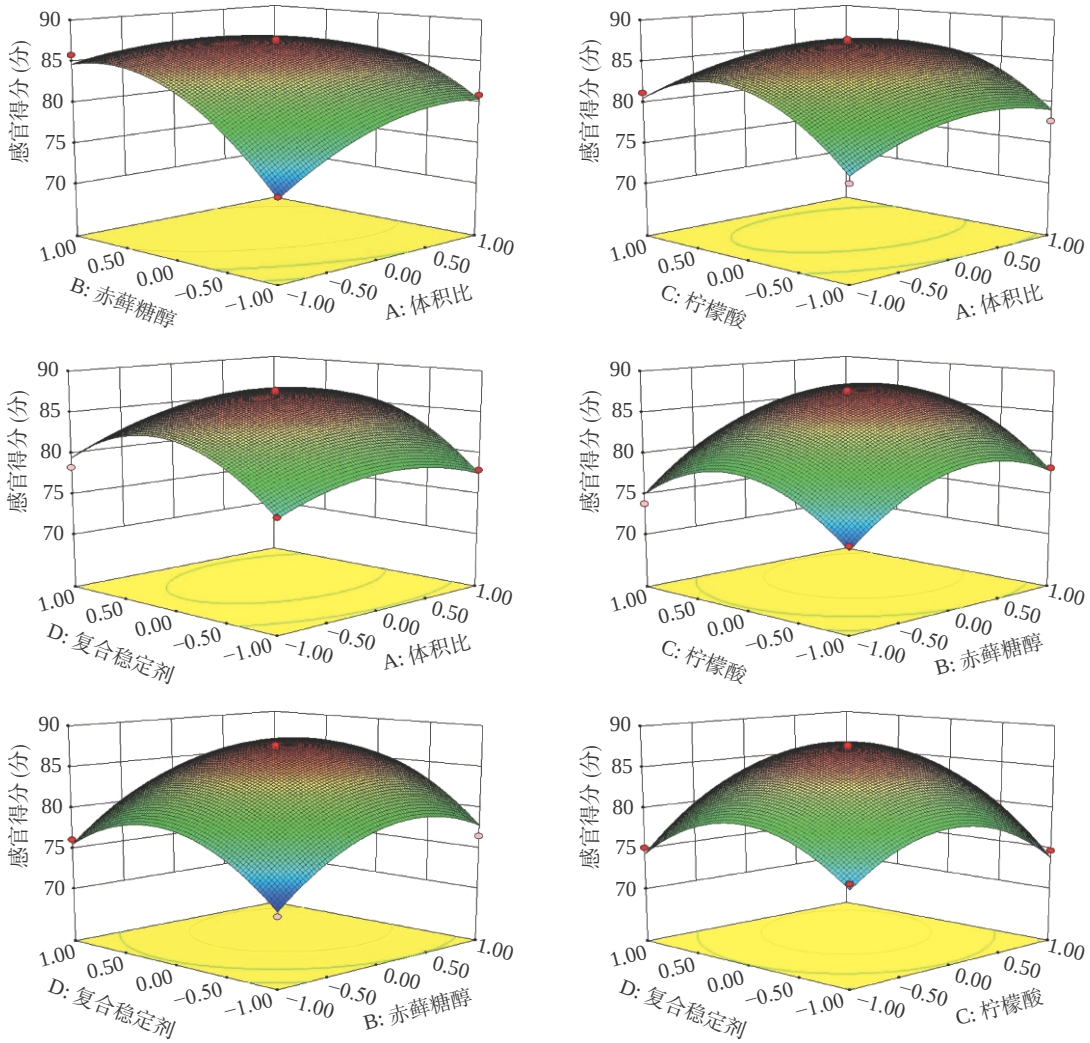


图 5　不同因素的交互作用响应曲面

Fig.5　Response surface of interaction between different factors

用量 3.4%, 柠檬酸用量 0.23%, 复合稳定剂($m_{羧甲基纤维素钠}$:$m_{黄原胶}$:$m_{海藻酸钠}$=2:1:1)用量 0.06% 配制饮料, 感官得分为(88.9±0.4)分, 表明该回归模型预测的结果可行, 具有实际意义。

2.6 产品质量检测结果

根据最佳配方制得的复合饮料呈淡红色, 溶液色泽均一, 酸甜适中, 具有芜菁与山楂混合风味, 静置后无明显沉淀。溶液 pH 为 5.5, 可溶性固形物含量为 9.2%, 多糖含量为 4.1%, 离心沉淀率为 0.71%, 菌落总数<100 CFU/mL, 大肠杆菌<3 MPN/mL, 未有致病菌检出, 符合 GB 4789.3-2016 要求。。

2.7 饮料对运动耐力的影响结果

2.7.1 负重游泳时间比较 表 5 为不同组动物的负重游泳时间比较, 与空白对照组相比, 灌胃不同剂量复合饮料的小鼠负重游泳时间均有明显延长, 延长率分别为 16.5%、25.4% 和 35.3%, 表明芜菁山楂复合饮料有助于提高动物的运动耐力, 起到抗疲劳的作用, 其中低剂量组小鼠较空白对照组的游泳时间差异, 具有显著性(P<0.05), 而中、高剂量组小鼠较空白对照组的游泳时间差异, 具有极显著性(P<0.01), 且该复合饮料的抗运动疲劳作用呈现剂量的正相关性。另外, 阴性对照组小鼠较空白对照组的负重游泳时间, 无显著性差异(P>0.05), 表明该复合饮料中其它成分不会对运动疲劳的小鼠产生积极影响。

表 5 不同组小鼠的负重游泳时间(n=10)

Table 5 The loaded swimming time of mice of different groups (n=10)

组别	负重游泳时间(min)	延长率(%)
空白对照组	14.2±1.0	/
阴性对照组	14.6±1.2	2.7
低剂量组	15.5± 1.5*	16.5
中剂量组	16.8±1.3**	25.4
高剂量组	18.2±1.4**	35.3

注: 与空白对照组相比, *表示差异显著(P<0.05); **表示差异极显著(P<0.01); 表6同。

2.7.2 体内生化指标结果比较 芜菁山楂复合饮料对不同组运动后小鼠体内 LA、BUN、SOD 和 GSH-Px 的影响见表 6。由于机体剧烈运动时, LA 生成量逐渐增多, 不仅可减缓肌肉收缩能力, 并能降低血液 pH, 引起各种生理副反应, 加重疲劳感[24−25], 同时当体内的糖类、脂类物质的分解无法满足其能量需求时, 蛋白质与氨基酸的分解便加强, 使得 BUN 浓度升高[26−27]。与空白对照组相较, 灌胃复合饮料的各组运动后小鼠体内 LA 与 BUN 含量均明显降低, 其中低、中、高剂量组 LA 含量分别显著下降 1.2 mmol/L(P<0.05)、1.8 mmol/L(P<0.01)、2.5 mmol/L(P<0.01), 而 BUN 含量分别显著下降了 1.1 mmol/L(P<0.05)、1.8 mmol/L(P<0.01)、2.3 mmol/L(P<0.01), 表明灌胃一定量的芜菁山楂复合饮料有助于减少运动后体内的乳酸蓄积, 加快其代谢清除, 并减少蛋白质与氨基酸的分解, 而阴性对照组的 LA、BUN 结果与其相较, 未有显著性变化(P>0.05), 表明饮料中的其他组分不会对运动后的动物体内 LA 与 BUN 浓度产生影响。

表 6 复合饮料对运动后小鼠体内 LA、BUN、SOD 和 GSH-Px 的影响(n=10)

Table 6 Effect of compound beverage on LA, BUN contents and SOD, GSH-Px activities in mice after exercise (n=10)

组别	LA(mmol/L)	BUN(mmol/L)	SOD(U/mL)	GSH-Px(U/mL)
空白对照组	12.1±1.2	9.6±0.7	309.2±22.4	222.7±39.8
阴性对照组	11.6±0.8	9.4±1.1	316.5±31.3	231.8±25.6
低剂量组	10.9±1.1*	8.5±1.2*	337.2±36.4*	258.4±41.4*
中剂量组	10.3±1.0**	7.8±0.8**	359.4±30.3**	289.8±29.1**
高剂量组	9.6±0.9**	7.3±0.7**	371.3±40.5**	301.4±30.3**

自由基能够破坏线粒体等生物膜, 造成生物膜的流动性受损和能力代谢的紊乱, 也可产生疲劳感[28−29], 而体内主要的抗氧化酶 SOD 与 GSH-Px 可有效减轻氧自由基的不利影响, 与空白对照组相较, 灌胃芜菁山楂复合饮料的各组运动后小鼠 SOD 和 GSH-Px 的活力均有明显提高, 其中低、中、高剂量组的 SOD 活力分别显著升高 28.0 U/mL(P<0.05)、50.2 U/mL(P<0.01)、62.1 U/mL(P<0.01), 而 GSH-Px 的活力分别显著升高 35.7 U/mL(P<0.05)、67.1 U/mL(P<0.01)、78.7 U/mL(P<0.01), 表明该复合饮料在体内具有较好的抗氧化作用, 有助于增强机体的运动耐力, 这与马识淳等对襄荷桑葚复合饮料的考察结果相近[30], 而阴性对照组的 SOD 与 GSH-Px 结果与其相较, 未有明显变化(P>0.05), 表明饮料中的其他组分不会对运动后的动物体内的 SOD 与 GSH-Px 活力产生积极影响。

3 结论

本研究以芜菁多糖和山楂为原料, 添加赤藓糖醇、柠檬酸等常用辅料, 制得芜菁山楂复合饮料。通过单因素实验与响应面分析确定该复合饮料的最佳配方为: 山楂浸提液与芜菁多糖溶液的体积比为 3:1, 赤藓糖醇用量 3.4%, 柠檬酸用量 0.23%, 复合稳定剂 ($m_{羧甲基纤维素钠}$:$m_{黄原胶}$:$m_{海藻酸钠}$=2:1:1)用量 0.06%, 所得饮料的感官评分为(88.9±0.4)分, 溶液呈淡红色, 溶液色泽均一, 酸甜适中, 具有芜菁与山楂混合风味, 静置后无明显沉淀。动物实验结果表明, 芜菁山楂复合饮料可明显延长小鼠的运动时间, 减少其运动时体内乳酸的蓄积和蛋白质、氨基酸的分解, 并可提高体内 SOD 和 GSH-Px 的活性, 从而可为相关运动食品的开发提供思路。

参考文献

[1] BLOCH W, ZOPF E, ZIMMER P, et al. Role of physical activity in tumor patients and possible underlying mechanisms[J]. European Review of Aging and Physical Activity, 2013, 10(1): 25−32.

[2] MA S, SUZUKI K. Keto-adaptation and endurance exercise capacity, fatigue recovery, and exercise-induced muscle and organ

damage prevention: A narrative review[J]. Sports, 2019, 7(2): 40−49.

[3] CAI M, XING H Y, TIAN B M, et al. Characteristics and anti-fatigue activity of graded polysaccharides from *Ganoderma lucidum* separated by cascade membrane technology[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 269: 118329.

[4] 吴云, 陈薇, 田文慧, 等. 树莓果肉多糖超声提取工艺优化及其抗疲劳作用[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(12): 2081−2093. [WU Y, CHEN W, TIAN W H, et al. Ultrasonic extraction optimization of raspberry (*Rubus idaeus* L.)pulp polysaccharides and its anti-fatigue activity[J]. Natural Product Research and Development, 2020, 32(12): 2081−2093.]

[5] 谢飞飞. 远志多糖对力竭运动小鼠体内抗疲劳和体外抗氧化作用研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(6): 332−336. [XIE F F. Effects of anti-fatigue *in vivo* and anti-oxidant *in Vitro* of polysaccharides from *Polygala tenuifolia* Willd. on exhaustive exercise mice[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(6): 332−336.]

[6] 马一栋, 李晓娟, 赵孟良, 等. 不同芜菁种质资源营养品质分析及综合评价[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(19): 277−287. [MA Y D, LI X J, ZHAO M L, et al. Evaluation of nutrient components of different Turnip germplasm resources[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(19): 277−287.]

[7] 唐伟敏, 金露, 谢亮华, 等. 芜菁多糖的分离纯化、化学结构及其抗疲劳动物试验研究[J]. 中国食品学报, 2018, 18(12): 22−31. [Tang W M, Jin L, XIE L H, et al. Purification, structural characterization and anti-fatigue effect *in vivo* of Tibetan turnip (*Brassica rapa* L.) polysaccharide[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(12): 22−31.]

[8] 李欢欢, 陈春丽, 海力茜·陶尔大洪. 芜菁中性多糖对 D-半乳糖致衰老小鼠的抗氧化作用[J]. 食品科技, 2021, 46(5): 168−173. [LI H H, CHEN C L, HAILIQIAN T D. Antioxidant effect of turnip neutral polysaccharide on D-galactose-induced aging mice[J]. Food Science and Technology, 2021, 46(5): 168−173.]

[9] 王伟, 杨晓君, 高蕾, 等. 响应面法优化新疆芜菁多糖提取工艺及体外抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2018, 39(2): 229−233. [WANG W, YANG X J, GAO L, et al. Optimization the extraction process of polysaccharide by response surface methodology from *Brassica rapa* L. and its antioxidant activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(2): 229−233.]

[10] 蔡啸镝, 刘跃峰. 恰玛古多糖的纯化及对运动小鼠抗疲劳活性研究[J]. 食品工业, 2015, 36(8): 59−62. [Cai X D, Liu Y F. Purification process of polysaccharide from Qamgur and its anti-fatigue activity[J]. Food Industry, 2015, 36(8): 59−62.]

[11] 孙晓成, 房磊. 山楂钙果复合运动饮料的研制及抗疲劳功能评测[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(24): 113−117. [SUN X C, FANG L. Development of hawthorn fruit composite sports drinks and anti-fatigue function evaluation[J]. Food Research and Development, 2013, 34(24): 113−117.]

[12] Tong H, Sun J. Research on the selection of supercritical fluid extraction conditions and antioxidation of hawthorn oil[J]. Journal of Computational and Theoretical Nanoscience, 2017, 14(1): 747−755.

[13] 肖庆群. 石斛多糖山楂复合饮料制备及缓解运动性疲劳的作用[J]. 食品工业科技, 2021, 42(12): 191−197. [XIAO Q Q. Study on preparation of mixed beverage of *Dendrobium candidum* polysaccharide and hawthorn and its effect on relieving exercise fatigue[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(12): 191−197.]

[14] 王举翠, 李明芝. 鲜芦根荷叶复合饮料研制及对运动耐力的影响研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(17): 7021−7029. [WANG J C, LI M Z. Development and effect on exercise endurance of compound beverage of Rhizoma Phragmitis and lotus leaf[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(17): 7021−7029.]

[15] 杨旭, 何述栋, 张诗意, 等. 黑米黑豆芝麻乳饮料的开发[J]. 中国食品添加剂, 2021, 32(9): 51−57. [YANG X, HE S D, ZHANG S Y, et al. Vegetable protein drink using black rice, black bean and sesame[J]. China Food Additives, 2021, 32(9): 51−57.]

[16] 海力茜·陶尔大洪, 祖丽皮艳·阿布力米特, 李亚童, 等. 新疆芜菁多糖含量测定及提取工艺优化[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(5): 1960−1965. [HAILIQIAN·T, ZULIPIYAN·A, LI Y T, et al. Determination of polysaccharide content from *Brassica rapa* L. in Xinjiang and optimization of extraction technology[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(5): 1960−1965.]

[17] TAN W, YU K Q, LIU Y Y, et al. Anti-fatigue activity of poly-saccharides extract from Radix Rehmannia Preparat[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2012, 50(1): 59−62.

[18] 王书全, 李丽. 螺旋藻多糖抗疲劳作用研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(22): 328−330. [WANG S Q, LI L. Study on anti-fatigue effect of *Spirulina* polysaccharide[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(22): 328−330.]

[19] WANG J, LI S S, FAN Y Y, et al. Anti-fatigue activity of the water-soluble polysaccharides isolated from *Panax ginseng* C. A. Meyer[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2010, 130(2): 421−423.

[20] GUO X F. Effect of Jujube date polysaccharide in resisting sports fatigue[J]. Advance Journal of Food Science & Technology, 2015, 9(12): 939−943.

[21] 张恒, 郑俏然, 何靖柳, 等. 藏茶玫瑰乌梅无糖复合饮料研制及功能性成分分析与抗氧化研究[J]. 食品科技, 2021, 46(1): 46−53. [ZHANG H, ZHENG Q R, HE J L, et al. Development, functional components and antioxidant activity of sugar-free compound beverage of tibetan tea, rose and mume fructus[J]. Food Science and Technology, 2021, 46(1): 46−53.]

[22] 柴梅梅, 侯磊磊, 加力, 等. 饮料中甜味剂的应用与食品安全[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(11): 2573−2577. [CHAI M M, HOU L L, JIA L, et al. Application of sweetness in beverages and food safety[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2018, 9(11): 2573−2577.]

[23] 陈战永, 全粤华. 小麦肽运动饮料制备及其体内抗氧化与抗运动疲劳活性研究[J]. 食品工业科技, 2022, 43(4): 230−237. [CHEN Z Y, QUAN Y H. Study on preparation of wheat peptide sports beverage and its activity of antioxidant and anti-exercise fatigue *in vivo*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(4): 230−237.]

[24] MASON S A, MORRISON D, MCCONELL G K, et al.

Muscle redox signalling pathways in exercise. Role of antioxidants [J]. Free Radical Biology & Medicine, 2016, 98: 29−45.

[25] 王爱霞, 崔胜文, 丁玉婵. 霍山石斛运动饮料研制及其抗疲劳功能研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(1): 248−253. [WANG A X, CUI S W, DING Y C. Study on the development of *Dendrobium huoshanense* sprorts drink and its anti-fatigue function [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2022, 13(1): 248−253.]

[26] YANG D S, LIAN J H, WANG L Y, et al. The anti-fatigue and anti-anoxia effects of *Tremella* extract[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2019, 26(8): 2052−2056.

[27] 申晗, 李红涛. 藿香玫瑰复合饮料研制及抗运动疲劳作用研究[J]. 食品工业科技, 2022, 43(4): 205−213. [SHEN H, LI H T. Development and anti-exercise fatigue of compound beverage of *Agastache rugosa* and rose[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(4): 205−213.]

[28] YOU L, ZHAO M, REGENSTEIN J M, et al. *In vitro* antioxidant activity and *in vivo* anti-fatigue effect of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) peptides prepared by papain digestion[J]. Food Chemistry, 2011, 124(1): 188−194.

[29] 雷培培. 短梗五加多酚运动饮料制备及缓解疲劳作用[J]. 食品工业科技, 2021, 42(11): 174−179. [LEI P P. Preparation of polyphenols of *Acanthopanax* sessiliflorus sports beverage and its fatigue relieving effect[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(11): 174−179.]

[30] 马识淳, 韩伟. 襄荷桑葚复合饮料研制及其抗运动疲劳作用研究[J]. 中国食品添加剂, 2021, 32(8): 67−75. [MA S C, HAN W. Development and anti-fatigue effect of compound beverage of *Zingiber strioatum* and mulberry[J]. China Food Additives, 2021, 32(8): 67−75.]

于坚, 孙嘉笛, 孙秀兰, 等. 发酵类食品中微生物鉴定方法及功能研究进展 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 409−416. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050244

YU Jian, SUN Jiadi, SUN Xiulan, et al. Research Progress of Microorganism Identification Methods and Functions in Fermented Food[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 409−416. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050244

· 专题综述 ·

发酵类食品中微生物鉴定方法及功能研究进展

于　坚[1], 孙嘉笛[1], 孙秀兰[1], 黄耀光[1], 黄鹤阳[1], 刘忠思[2], 张银志[1], 纪　剑[1,*]

（1.江南大学, 江苏无锡 214100;
2.卫龙生物技术有限公司, 河南漯河 462000）

摘　要: 发酵类食品是主要通过直接接种微生物而产生特殊风味或者将食物浸入含有微生物的臭卤水中，从而获得特殊食品风味的中国传统食品。其中，采用含有微生物的卤水进行发酵是常见的发酵方式。因此，微生物在该类食品中一直扮演着一种非常重要的角色，具有较高的研究价值。本文阐述了发酵类型的食品所需要的卤水中微生物的鉴定常用方法，以及卤水微生物与风味成分的产生之间的关系，同时论述了卤水中微生物在各种发酵食品制作过程中所起到的功能特性，包括提高豆制品的营养价值、延长保质期、去除有害成分等问题，并提出了较为可行的新型发酵类食品卤水改进方向，为进一步开发理想的食品微生物发酵剂，控制有害物质的残留、拓展相关有益微生物资源的研究提供较为明确的指导方向。

关键词: 卤水改良, 发酵食品, 微生物, 菌群分析, 功能特性

中图分类号: Q819　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0409−08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050244

本文网刊:

Research Progress of Microorganism Identification Methods and Functions in Fermented Food

YU Jian[1], SUN Jiadi[1], SUN Xiulan[1], HUANG Yaoguang[1], HUANG Heyang[1], LIU Zhongsi[2], ZHANG Yinzhi[1], JI Jian[1,*]

（1.Jiangnan University, Wuxi 214100, China;
2.Weilong Biotechnology Co., Ltd., Luohe 462000, China）

Abstract: Fermented foods are traditional Chinese foods that produce special flavors by directly inoculating microorganisms or immersing the food in stinky brine containing microorganisms to obtain special food flavors. Among them, using brine containing microorganisms for fermentation is a common fermentation method. Therefore, microorganisms have always played a very important role in this type of food and have high research value. This review describes the common methods for identification of microorganisms in brine required for fermented foods, and the relationship between brine microorganisms and the production of flavor components. At the same time, the functional characteristics of the microorganisms in the brine in the production of various fermented foods are discussed, including issues such as improving the nutritional value of soy products, extending the shelf life, and removing harmful ingredients. The improvement direction of the more feasible new fermented food brine are proposed to provided clear guidance for the further development of the ideal food microbial starter, the control of the residue of harmful substances, and the expansion of related beneficial microbial resources.

Key words: brine improvement; fermented food; microorganism; flora analysis; functional characteristics

收稿日期: 2021−05−28

基金项目: “十三五”国家重点研发计划（2017YFF021130）。

作者简介: 于坚（1997−）, 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全与毒理, E-mail: jiangsuyzyj@163.com。

*** 通信作者:** 纪剑（1988−）, 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 食品安全与毒理, E-mail: jijian@jiangnan.edu.cn。

发酵类食品是我国一类具有悠久历史文化的食品，是我国早期劳动人民合理使用微生物资源的智慧的结晶，最早可起源于中国明代。最初的发酵类食品致力于改善食品的原有风味，从而获得更好的食用体验。然而，随着发酵工艺条件的不断进步，以及针对发酵过程中的微生物种类的研究不断深入，并且呈现了诸如功能性发酵食品的新趋势。而在这其中微生物的作用不可忽视。因此发酵类食品中的微生物研究具有重大的意义。

我国有较多使用微生物作为媒介发酵形成的传统食品[1]。其中臭豆腐是最为著名的一种。它是将块状的豆腐浸泡在卤水中达数小时或几天发酵后制成的食品。制作臭豆腐的卤水是以一些香辛料、竹笋、蔬菜、豆腐花、豆豉等植物为原料，并经过微生物自然发酵作用形成。臭豆腐因发酵工艺和地域的细微差异分为南豆腐和北豆腐。北方王致和臭豆腐主要采用深度发酵，南方臭豆腐需要先制作卤水后再将豆腐进行浅度发酵。此外，腐乳也是一种非常重要的发酵类食品。腐乳中含有的氨基酸具有促进脂肪代谢，控制人体胆固醇含量，控制血压，抑制肿瘤生长，防止心脑血管疾病的发生等的作用[2]，并且具有较高的食用价值，食物材质结构类似于干酪，获得了“东方奶酪”的美称[3]。

其中，微生物的种类和含量对于发酵类食品的风味以及营养价值具有非常重大的影响。此外，发酵的温度、pH 和营养基质等因素都可能会对发酵相关的微生物的存在与发酵能力产生较大的影响[4]。同时，卤水中的微生物可能会产生多种对人体有益的代谢物，例如氨基酸、抗氧化因子等。目前，许多研究者针对发酵食品工艺中常用微生物进行了非常深入的研究，该类微生物逐渐成为了传统发酵工业的研究重点[5−6]。因此，对于臭豆腐等发酵类食品中新型微生物的分离，分析与风味的关系，深入探究并开发新型的微生物功能性物质，对于未来改良开发新型风味与新型功能性卤水，并提高我国传统发酵工业的创新能力，具有非常重要的意义。

1 发酵食品中微生物的分离与鉴定方法

此前针对于发酵食品中常见的微生物种属的鉴定方法主要是纯培养分离方法。但是，随着新兴的高科技技术如生物信息技术和生物分子技术的普及，高效的 PCR-DGGE 技术和高灵敏度的高通量测序技术开始出现在微生物的鉴定领域。

1.1 纯培养分离

纯培养分离方法是根据可能的微生物去遴选可能合适的培养基进行菌种扩大培养，再通过微生物的生理生化及形态特征进行菌落挑取后纯化并进行菌种鉴别的一种发酵食品微生物的研究方法。常常用于当研究对象中存在多种菌落时使用，是一种最为常见且简便的微生物研究方法。孙贵朋[7] 用纯培养方法对从发酵卤水中分离到的 6 株高纯度细菌，其中的 5 种菌属于芽孢杆菌的类别，而其中的 1 株属于鲁氏不动杆菌。翁美芝等[8] 采用平板接种分离法对发酵淡豆豉中产纤溶酶微生物进行筛选，得到了枯草芽孢杆菌等三种不同的细菌。张煜坤等[9] 采用浓度梯度稀释法及平板涂布法分别对 3 种神农架豆豉样品中微生物进行分离鉴别，分离出不同形态的单菌落，然后将获得的分离菌落进行 DNA 测序最终得到 4 株枯草芽孢杆菌属的 4 个亚种。

1.2 PCR-DGGE 技术

梯度凝胶电泳（DGGE）是一种基于生物信息学和分子生物学两种学科作为理论基础的生命科学鉴定。采用在一般电泳实验的基础上，根据 DNA 片段在不同浓度的变性剂温度中双链结构解螺旋后片段大小的不同，将片段碱基组成相异，但是大小接近的片段进行分离，并经过官方常用的包含生物信息的数据库内的数据进行比对后，获得微生物的遗传学信息。Tanaka 等[10] 采用该项技术研究了豆酱生产过程中微生物群落的组成，细菌 DGGE 图谱表明酱油在微生物反应过程中主要起作用的是乳杆菌属、发酵乳杆菌等。燕平梅等[11] 采用该项技术分析散装泡菜、白菜泡菜、泡酸菜 3 种不同泡菜中酵母菌多样性，并鉴定出多种类型的酵母菌。另外，目前也有研究者将 PCR-DGGE 技术应用到水果酵素发酵相关的微生物菌群分析，能够检测出培养基中致病菌类[12]。

1.3 高通量测序技术

高通量测序（HTS），也可叫做二代基因检测，在使用过程中可以产生多种基因信息。该项技术能够同时筛选多个不同的基因组区域，准确的识别出样品中绝大多数的微生物类群，包括不能在培养基内培养的，以及丰度较低的菌类[13]。HTS 包括 ABI SOLiD 连接法测序、454 焦磷酸测序和 Illumina Solexa 合成测序等。孙娜等[14] 采用 HTS 对发酵前期和发酵末期青腐乳卤水中的微生物种类进行分析。Ezeokoli 等[15] 利用高通量测序技术分析发酵豆制品中的核心菌落，用 16S rRNA 技术分析了 7 个大豆发酵制品样品中的 DNA 序列。HTS 的技术优势在于可以较为完整地获取菌种的遗传信息，通过例如 NCBI 等大型生物信息数据库的数据比较，可以较为准确地获知该种微生物的种属名称，对后续的微生物培养与特性研究给予一定的支撑。

2 发酵食品中的微生物种类分析

在发酵食品的卤水制作时，微生物的种类选择极其重要。并且此前的研究表明，卤水中含有的微生物种类非常的丰富，不同的微生物在卤水的发酵、气味、功能性等方面起着重要的作用。卤水中微生物在臭豆腐等豆类食品发酵过程中作用十分明显，不仅能够分解大豆中蛋白质、脂质等大分子物质，而且能够参与风味物质的形成，有效提高大豆极其相关产品的营养成分的分解与吸收。其中，在发酵类食品中含有的微生物主要为细菌、真菌两大类，具体名称如表 1

表 1　发酵食品制作中的微生物

Table 1　Microorganisms in the production of brine

菌种分类	形态分类	中文学名	拉丁学名	常用食品
细菌类	球菌类	漫游球菌[16]	*Vagococcus collins*	臭豆腐卤水
		鸟肠球菌[16]	*Enterococcus*	
		巴黎链球菌[16]	*Streptococcus lutetiensis*	
		乳球菌[16]	*Lactococcus*	
		亮粘球菌[17]	*Leuconostoc*	酱油
		小球菌[17]	*Pediococcus*	
		链球菌[17]	*Streptococcus*	
		嗜麦芽单胞球菌[17]	*Stenotrophomonas*	
		四球菌[17]	*Tetragenococcus*	
		禽肠球菌[17]	*Enterococcusavium*	
	杆菌类	芽孢杆菌[18]	*Bacillus*	茶叶
		乳酸杆菌[18]	*Lactobacillus*	
		魏氏杆菌[18]	*Weissella*	
真菌	酵母类	酿酒酵母[18]	*Sac-charomyces cerevisiae*	茶叶
		毕赤酵母[19]	*Pichia pastoris*	
		汉逊氏酵母[19]	*Hansenula severus*	酒曲、豆豉、盐渍辣椒
		异常汉逊氏酵母[19]	*Hansenula anomala*	
	霉菌类	鲁氏毛霉[19]	*Mucor roxianus*	臭豆腐、腐乳
		黑曲霉[19]	*Aspergillus niger*	酱油

所示。

2.1　细菌

细菌是一类非常常见的菌类，并且在中国传统发酵食品中应用非常广泛，目前在发酵类食品的卤水中发现的细菌种类主要是球菌类和杆菌类。

2.1.1　球菌类　球菌一般为球状或近球状类型的细菌。根据显微镜下菌落排列数量以及方式的不同，区分为单、双、链、四联和八叠等[20]。赵国忠等[21]通过 16S rRNA 测序方法鉴定了臭豆腐卤水中的微生物种类，认为臭豆腐卤水中的主要细菌为漫游球菌（*Vagococcus collins*）、鸟肠球菌（*Enterococcus*），并且为臭豆腐的规范性制作提供了指导性建议。范博望等[22]通过对臭豆腐卤水的稀释分离，发现了臭豆腐卤水中存在巴黎链球菌（*Streptococcus lutetiensis*）等球形细菌。此外，其研究发现，若采用相同的发酵条件，对单一菌和混合菌进行卤水发酵比较，单一菌经过相同时间发酵后产生的卤水感官评价不如混合菌株发酵出的卤水优越，进一步证明了高质量卤水是混合发酵的结果。范洪臣等[23]也通过分离腐乳的发酵用酱料中的微生物获取了多种如芽孢杆菌等多种微生物，并分析了最佳的配比方案。

2.1.2　杆菌类　杆菌是指形状为圆柱，或者近卵圆形的菌株。根据堆积数量可分为单、双、链、球、棒状、分枝、双歧杆菌等。Gu 等[24]采用二代测序方法，研究臭豆腐中微生物菌群的多样性，乳杆菌属是整个发酵过程中的主要乳酸菌（lactic acid bacteria，LAB），臭豆腐中还具有盐单胞菌属等部分潜在有害细菌，提高了对臭豆腐中微生物的认识。Xie 等[25]采用随机扩增多态性 DNA 分型和 16S rDNA 测序对从 3 种发酵茶叶和酱油卤水中分离到的 168 个菌株进行测序。共鉴定出 136 株代表菌株，有乳杆菌和魏氏杆菌等 7 个属 32 个种。南晓芳[26]从 9 个豆豉和腐乳样品中共分离出 31 株乳酸菌，筛选出 5 株耐盐乳杆菌，发现 5 株菌对大肠杆菌等致病菌有较好的控制作用，并且都具有降解胆固醇的能力以及抗氧化能力。5 株菌株的有害产物检测均呈阴性，并且均对抗生素敏感，是比较安全的菌株。

2.2　真菌

真菌是具真核、可产孢子且不具有叶绿体的真核菌类。在传统发酵食品工业中，常见的真菌类为各种酵母菌和一些少量的霉菌类。这些少量的真菌微生物可产酸产碱，代谢糖类物质产生芳香醇类和芳香醛类物质，使卤水呈现足够的风味。

2.2.1　酵母类　酵母（*Saccharomyces*）是一种单胞菌，常常用于酱油、面团等食品的发酵。常见的酵母菌有酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）、毕赤酵母（*Pichia pastoris*）、茶酵母和啤酒酵母等。王正莉等[27]在传统发酵酒曲和豆豉类食品中分离得到了西弗汉逊氏酵母（*Hansenula severus*）、异常汉逊氏酵母（*Hansenula anomala*）等 10 多种真菌类微生物，并且根据风味成分对其进行了关联。此外，赵玲艳等[28]对盐渍辣椒发酵过程中所参与的菌种进行了种群样品分析，发现优势真菌属为毕赤酵母属（*Pichia pastoris*）、异常汉逊氏酵母属（*Hansenula anomala*）等。基于这一点，分析了盐渍辣椒真菌菌落的多样性，以及发酵过程中微生物群落结构以及相对丰度的变化，分析了多种微生物在发酵过程的风味作用，对于新菌种资源的开发具有重要意义。

2.2.2 霉菌 以北方王致和臭豆腐为首的传统发酵类食物中存在的霉菌类常见的为各种曲霉，此外还有常见的毛霉等。此类微生物可以在臭豆腐等豆制品表面形成坚硬的外壳状物质，并代谢内部的豆类蛋白等，分泌不同类型的氨基酸等。Qiu 等[29] 从发酵豆豉产品中得到了一种食品级黑曲霉(*Aspergillus niger*)，可以参与酱油、豆豉等食品的代谢，并对食品中的霉菌毒素具有一定的抑制作用。此外，高玉荣等[30] 采用鲁氏毛霉(*Mucor roxianus*)发酵后的豆制品分析了不同时间点的风味变化。总状毛霉也可以在豆粕食品的发酵过程中对食品本身风味产生非常积极的影响。因此，霉菌类在发酵臭豆腐等食品的制作流程中是主要的发酵剂。

3 发酵食品中微生物的功能性分析及品质风味关系

发酵食品中含有许多功能型微生物，他们能够通过分解原料中的大分子物质，并产生大量的水解蛋白和游离氨基酸，以及大量的维生素类物质[31]，主要可以形成发酵类食品的特殊腌渍风味。此外，采用不同的菌种进行发酵可以获得多种功能的卤水，如改善营养组成、改善肠道菌群组成、减少食物中的抗营养成分等，具体功能特性如表 2 所示。研究微生物在发酵类食品发酵流程中的所起到的作用，对于提高此类食品的风味以及功能品质具有重要意义。

表 2 卤水中不同微生物与功能

Table 2 Different microorganisms and functions in brine

功能特性	代表微生物	拉丁学名
形成食品风味	乳酸杆菌[32]	*Lactobacillus*
改善营养组成	鲁氏毛霉[33]	*Mucor roxianus*
益生功能	乳酸杆菌[33]	*Lactobacillus*
吸附有害物质	黑曲霉[34]	*Aspergillus niger*
抑制有害菌	芽孢杆菌[34]	*Bacillus*

3.1 形成食品风味

发酵类食品例如臭豆腐等的风味主要是源于各种挥发类物质，使得豆腐原材料中的蛋白、糖在自身内源酶和微生物分泌酶系作用下形成大量酯类、醇类、含硫化合物等挥发性物质，使得豆腐具有特殊的气味[31]。气味物质所带来的食品风味是多种微生物联合作用下产生的，并且在不同发酵时期风味物质也有一定的差异[31]。不同卤水配方中微生物的种类也不尽相同，所形成的风味物质具有一定的差异，因此，发酵微生物在臭豆腐风味物质形成过程中发挥着重要作用。

李雨枫等[35] 研究了臭豆腐卤水在发酵时微生物种类和数量的变化及风味成分分析，利用固相微萃取(SPME)联合气相质谱(GC-MS)的方法(SPME-GC-MS)检测发酵完成的卤水中存在的挥发性成分，并比较了它们的差异性。主要发现了吲哚等气味物质，其中明串珠菌属和盐厌氧菌属与含硫化合物、吲哚有极大的关联，是臭味的主要来源；乳杆菌属、四联球菌属和酯类、酮类、醇类物质的相关性最大，为臭豆腐提供香气。邓思敬等[36] 利用实验室前期从自然发酵臭豆腐的剩余卤水中得到的 13 株乳酸菌，并从中筛选 8 株活性优良的菌种接种于生产配方中，经过 37 ℃ 发酵 20 h 制得臭豆腐发酵液，经过 GC-MS 鉴定得到 61 种气味性物质，其香气成分与市售发酵臭豆腐卤水相仿。郑小芬等[37] 采用同样的上述方法，分析了 2 种不同臭豆腐所对应的卤水中气味物质的差异，采用归一化法计算了其相对含量。根据微生物种类与气味物质之间的相关系数，并预测成分的变量重要性，还确定了芽孢杆菌、肠杆菌、乳杆菌、鞘氨酸杆菌、单胞菌、四基因球菌等 9 种细菌和交链孢属、杂交链霉属、放线菌属等 6 种真菌是发酵过程中核心功能微生物[38]。

3.2 改善营养组成

维生素 B_{12} 是维持大脑关键功能的重要营养素，对于抑制抑郁症、老年痴呆及贫血具有重要作用，腐乳中 B 族维生素种类多样，腐乳在发酵时经过微生物的作用会产生维生素 B_{12}[38]。经过鲁氏毛霉、酿酒酵母等真菌类微生物发酵后，腐乳中含有大豆多肽和蛋白黑素，其中蛋白黑素具有强抗氧化性[39]。这些微生物所产生的大豆多肽等物质具有抗高血压、降血脂、抗氧化、提高免疫力、抗癌作用及缓解运动疲劳等多项功能[40]。另外，发酵过程中的酵母能够将蛋白质、脂肪、糖类等生物大分子物质分解为游离氨基酸、脂肪酸和葡萄糖等小分子物质，在发酵时也会产生一些人体必需氨基酸。例如，陈嘉序等[41] 通过对魏氏杆菌等微生物发酵的食品中的成分研究，发现雌马酚和大豆异黄酮类等营养物质含量出现了明显的升高。这也表明微生物的发酵对于发酵食品的营养成分的改善有一定的作用。

3.3 增强食品抗氧化作用

人体在新陈代谢中可能产生较多的自由基，过多自由基的生成会影响人体健康，导致人体衰老。臭豆腐在发酵过程中产生大豆异黄酮、大豆多肽等抗氧化物质，能够延缓衰老，促进人体健康。研究表明发酵食品中的微生物例如毛霉、曲霉等霉菌微生物可以产生具有增强食品的抗氧化的能力的营养物质[42]。邹磊等[43] 分别接种两种不同的毛霉制作了腐乳，并对其进行自由基的去除、抑制油脂过氧化以及其还原能力检测实验，以此为标准评价微生物在发酵过程中产生的代谢物的抗氧化能力，结果发现，黄色毛霉发酵产生的腐乳中具有更优的抗氧化功能。王富豪等[44] 提取了多个大豆品种里大豆异黄酮的含量，并对其对 DPPH、ABTS 自由基去除水平进行了测定，发现糖苷型异黄酮含量与 DPPH 和 ABTS 自由基去除水平有较高的线性相关性。董爽等[45] 对鲁氏毛霉促腐乳发酵过程中产生的抗氧化物质含量变化进行了研究，在豆腐坯上接种毛霉进行发酵后，测定发酵

腐乳在不同阶段的抗氧化能力，发现随着微生物分泌的酶的作用腐乳的抗氧化能力在前发酵期和水解阶段快速上升，发酵后期上升较慢，在后酵期达 20 d 时，腐乳的抗氧化能力达到最大值。

3.4　降血压作用

血管紧张素Ⅱ是可以引起血压升高的血管收缩剂。因此，抑制这些可以产生血管紧张素Ⅱ的酶的活性，以减少这种物质的产生是用于控制高血压的一个重要途径。在腐乳生产过程中，某些生物活性肽能够抑制血管紧张素Ⅱ催化酶的活性从而起到防止血压升高的的作用，其中鲁氏毛霉和乳酸杆菌的联合发酵可以达到该种效果。Kuba 等[46] 从鲁氏毛霉和乳酸杆菌的联合发酵的腐乳中分离到两种具有抑制上述酶类活性的生物活性肽，其活性肽序列分别为 Ile-Phe-Leu 和 Trp-Leu。其中产生的 γ-氨基丁酸(GABA）会结合神经受体在脑血管中，能够有效提升血管的扩张能力，从而抑制血管血压过高。

3.5　抑制抗营养成分

大豆的抗营养因成分包括营养抑制因子等热敏性物质以及植酸、寡糖、单宁、抗原蛋白等耐热并抗维生素因子及其他化学成分[39]。在发酵豆制品中存在的部分微生物能够降解大豆中的抗营养因子，并将其转化为被人体吸收的成分。例如从印度尼西亚的豆酵饼中发现的的寡孢根霉能够降解引起胃胀气的水苏糖等物质，以及甘油三酯等酯类，并使之降解成可供人体吸收分解的单糖和二糖[47]。

3.6　改善肠道菌群

肠道微生物与它们可以产生的次级代谢产物对人体健康和保持肠道中免疫系统的稳态具有巨大的功效。熊骏等[48] 从传统方法发酵制作而成的发酵类豆豉中分离出具有抑菌活性的乳酸菌，可以产生有机酸、细菌素等，对广谱的致病菌均可以产生较好的抑制效果。Lee 等[49] 从韩国传统酱油中分离筛选出 3 株芽孢杆菌 MKSK-E1、MKSK-J1 和 MKSK-M1，并在模拟胃肠道环境条件下，证明了这 3 株菌具有广泛的抑菌活性。因此，这 3 株菌对人体具有益生菌功能性，可以从发酵豆制品中分离出对人体有益的微生物，并制成相应的益生菌产品。Yuan 等[50] 研究发现在猪每日饲料中添加 3.75% 质量分数的发酵豆粕和 7.5% 质量分数的大豆浓缩蛋白，分别提高了 38~68 d 的仔猪的养份消化率、粪便酶活性和乳酸菌数量，降低粪便中大肠杆菌数量，能够有效改善猪肠道菌群组成。Yi 等[51] 从臭豆腐卤水中分离到一株居里乳杆菌 CCTCC M2011381 在大豆分离蛋白、豆奶和银杏饮料中的生长 20 h 后，该菌株的数量均增加。此外，根据小鼠体内实验，在所有发酵基质中存活的菌株均能在小鼠肠道中存活。

3.7　抑制有害菌

臭豆腐卤水在发酵产生多种营养物质的期间经过益生芽孢杆菌、乳酸杆菌、鸟肠球菌等微生物的作用会产生大量的挥发性物质[51]，具有延长食品货架期，增强食品安全品质的作用。另一方面大豆中的物质能够被黑曲霉[52]、异常汉逊氏酵母[53] 等真菌分解产生抗菌物质。在某些以根霉为发酵剂制成的发酵豆制品中，异黄酮对腊样芽孢杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌等能够引起食物中毒和腐败的致病微生物有较强的抑制作用。

3.8　吸附有害物质

发酵食品中的微生物的另一个作用就是减少有害物质的产生，例如卤水中的乳酸菌能够抑制不饱和脂肪酸的过氧化或减少来源于相应醇类的醛[54]，部分乳杆菌能够吸附食品中的真菌毒素，研究发现真菌毒素的存在并不影响乳杆菌的生长，3 株植物乳杆菌对黄曲霉毒素的吸收能力最强，对真菌毒素的结合率接近 60%，而对 ST 产毒菌株的结合率可达 20% 以上。乳酸菌还能够吸附重金属离子，如汞、镉等。有研究表明，源自我国传统泡菜的菌株 *Lb. plantarum* 70810 EPS 在鱼肠道环境中，当 pH5.0 且温度为 30 ℃ 时，该菌株 6 h内的对铅的吸附能力可达 160.62 mg/g，傅立叶变换红外光谱表明，参与吸附的是-OH、-NH 和 COO-等官能团[55]。He 等[54] 分离出了一株酱油中的食品级黑曲霉，发现该种菌株可以抑制酱油等发酵食品中玉米赤霉烯酮（ZEN）等真菌毒素的产生。徐智虎等[56] 分离出了贵州传统的发酵类食品中的乳酸杆菌，并进行了性质探究，发现此类乳酸杆菌具有较好的吸附生物胺等有害物质的能力。因此，在发酵食品中，微生物除了可以提高营养价值与风味外，还具有减少有害物质生成的作用。

4　挑战与展望

4.1　特殊风味臭卤水发酵存在的挑战

微生物已被证明是丰富的自然资源，在食品领域的应用最广。以臭豆腐为主的发酵类食品十分需要微生物的发酵，采用多样的微生物对食品进行混合发酵，可以较大程度上赋予食品一定的风味特性以及功能特性。因此，必须重视对已有的卤水中存在的微生物种类及其功能探究。

此外，在卤水发酵过程中，由于发酵条件的简陋以及发酵前期的卫生措施简陋，时常存在着一些有害微生物，其能够产生生物胺，对人体健康造成威胁，如有害霉菌、蜡样芽孢杆菌等[57]。

4.2　下一步的研究展望

未来更应该以臭豆腐卤水中的微生物作为重要的研究对象，探究卤水发酵过程中各种微生物菌群的特性，控制致病菌繁衍，减少有害物质的出现，促进有益产物的产生。合理利用臭豆腐卤水中的微生物资源，分离发酵期间产生的对人体有益的微生物，并将其作为益生菌资源，减少益生菌资源的浪费，开发既有有益菌的发酵剂又能减少有害菌的数量的混合发酵剂，提高产品的品质。研究卤水发酵的过程中所出现的不同微生物的作用，开发不同种类的卤水，制作

工业化卤水微生物生产发酵剂，为发酵食品逐步走向工业化和标准化提供一定的参考。卤水中微生物多样，研究微生物之间的生物化学作用，对于提高发酵类型食品的品质具有巨大的战略意义。

参考文献

[1] 张雅卿, 叶书建, 周睿, 等. 发酵食品风味物质及其相关微生物[J]. 酿酒科技, 2021, 11(2): 85−96. [ZHANG Y Q, YE S J, ZHOU R, et al. Fermented food flavor substances and related microorganisms[J]. Wine Making Science and Technology, 2021, 11(2): 85−96.]

[2] 万红芳, 赵勇, 王正全, 等. 生产菌种及环境微生物与腐乳品质关系研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(6): 255−261. [WAN H F, ZHAO Y, WANG Z Q, et al. Research progress on the relationship between production strains and environmental microorganisms and fermented bean curd quality[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(6): 255−261.]

[3] STEINKRAUS K H. Classification of fermented foods: Worldwide review of household fermentation techniques[J]. Food Control, 1997, 8(5): 311−317.

[4] 马勇. 青方腐乳酿造技术研究[J]. 中国酿造, 1996, 11(5): 35−36,44. [MA Y. Research on brewing technology of green fermented bean curd[J]. China Brewing, 1996, 11(5): 35−36,44.]

[5] 吴彩梅, 王静, 曹维强. 臭豆腐的不安全因素及其监控[J]. 食品与发酵工业, 2005(7): 97−99,103. [WU C M, WANG J, CAO W Q. Unsafe factors and monitoring of stinky tofu[J]. Food and Fermentation Industries, 2005(7): 97−99,103.]

[6] JOU H J, TSAI P J, TU J H, et al. Stinky tofu as a rich source of bioavailable S-equol in Asian diets[J]. Journal of Functional Foods, 2013, 5(2): 651−659.

[7] 孙贵朋. 臭豆腐卤液中微生物多样性研究 [D]. 广州: 华东理工大学, 2011. [SUN G P. Study on the diversity of microorganisms in stinky tofu brine[D]. Guangzhou: East China University of Science and Technology, 2011.]

[8] 翁美芝, 邓雄伟, 王立元, 等. 淡豆豉炮制过程中产纤溶酶微生物的筛选和鉴定[J]. 中草药, 2020, 51(24): 6221−6228. [WENG M Z, DENG X W, WANG L Y, et al. Screening and identification of fibrinolytic enzyme-producing microorganisms during the processing of light tempeh[J]. Chinese Herbal Medicine, 2020, 51(24): 6221−6228.]

[9] 张坤煜, 赵舒欣, 王红丁, 等. 神农架豆豉样品中微生物的分离鉴定[J]. 绿色科技, 2020(20): 167−170. [ZHANG K Y, ZHAO S X, WANG H D, et al. Isolation and identification of microorganisms in Shennongjia Douchi samples[J]. Green Science and Technology, 2020(20): 167−170.]

[10] TANAKA Y, WATANABE J, MOGI Y. Monitoring of the microbial communities involved in the soy sauce manufacturing process by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis[J]. Food Microbiology, 2012, 31(1): 228−298.

[11] 燕平梅, 李安萍. PCR-DGGE 法分析泡菜中酵母菌微生物的多样性[J]. 中国调味品, 2020, 45(12): 23−26. [YAN P M, LI A P. Analysis of the diversity of yeast microorganisms in kimchi by PCR-DGGE method[J]. China Seasoning, 2020, 45(12): 23−26.]

[12] 李希羽, 高洁, 李云姣, 等. 水果酵素自然发酵过程中优势菌群与有机酸变化规律分析[J]. 食品科学, 2020, 41(24): 61−68. [LI X Y, GAO J, LI Y J, et al. Analysis of dominant flora and organic acid changes during the natural fermentation of fruit enzymes [J]. Food Science, 2020, 41(24): 61−68.]

[13] 夏傲喃, 李建华, 林祥娜, 等. 发酵食品微生物多样性分析方法研究进展[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(4): 220−224. [XIA A N, LI J H, LIN X N, et al. Research progress on microbial diversity analysis methods of fermented food[J]. Food Research and Development, 2021, 42(4): 220−224.]

[14] 孙娜, 张雅婷, 于寒松, 等. 发酵型青腐乳菌群结构与风味物质及其相关性分析[J]. 食品科学, 2020, 41(22): 177−183. [SUN N, ZHANG Y T, YU H S, et al. Analysis of fermented bean curd flora structure and flavor substances and their correlation[J]. Food Science, 2020, 41(22): 177−183.]

[15] EZEOKOLI O T, ADELEKE R A, BEZUIDENHOUT C C. Core bacterial community of soy-daddawa: Insights from high-throughput DNA metabarcoding[J]. LWT, 2018, 97: 61−66.

[16] 何理. 发酵型臭豆腐生产工艺及营养价值的研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2012. [HE L. Research on the production technology and nutritional value of fermented stinky tofu[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2012.]

[17] 邓林, 刘延岭, 魏明英, 等. 四川冬菜卤水发酵制取酱油的工艺研究[J]. 食品与发酵科技, 2012, 48(3): 26−29. [DENG L, LIU Y L, WEI M Y, et al. Study on the technology of preparing soy sauce from Sichuan winter vegetable brine fermentation[J]. Food and Fermentation Science & Technology, 2012, 48(3): 26−29.]

[18] WANG Z, ZHENG C, MA C, et al. Comparative analysis of chemical constituents and antioxidant activity in tea-leaves microbial fermentation of seven tea-derived fungi from ripened Pu-erh tea[J]. LWT, 2021, 142: 111006.

[19] BUYTAERS F E, FRAITURE M A, BERBERS B, et al. A shotgun metagenomics approach to detect and characterize unauthorized genetically modified microorganisms in microbial fermentation products[J]. Food Chemistry: Molecular Sciences, 2021, 2: 100023.

[20] 刘玉平, 陈海涛, 孙宝国, 等. 固相微萃取与 GC-MS 法分析发酵型臭豆腐中挥发性成分[J]. 食品工业科技, 2009, 30(12): 403−405. [LIU Y P, CHEN H T, SUN B G, et al. Analysis of volatile components in fermented stinky tofu by solid phase microextraction and GC-MS[J]. Science and Technology of Food Industry, 2009, 30(12): 403−405.]

[21] 赵国忠, 谢小芳, 邸海波, 等. 臭豆腐卤水微生物群落及其接种发酵[J]. 中国酿造, 2017, 36(2): 21−24. [ZHAO G Z, XIE X F, DI H B, et al. Microbial community of stinky tofu brine and its inoculation and fermentation[J]. China Brewing, 2017, 36(2): 21−24.]

[22] 范博望, 任翊, 樊青青, 等. 臭豆腐卤水中的主要发酵菌株及发酵研究[J]. 生物化工, 2021, 7(2): 52−54. [FAN B W, REN Y, FAN Q Q, et al. Study on the main fermentation strains and fermentation of stinky tofu brine[J]. Biochemical Industry, 2021, 7(2): 52−54.]

[23] 范洪臣, 王冰, 马永强. 克东腐乳的研究进展[J]. 中国调味品, 2021, 46(6): 184−187. [FAN H C, WANG B, MA Y Q. Research progress of Kedong fermented bean curd[J]. Chinese Condi-

ments, 2021, 46(6): 184−187.]
[24] GU J, LIU T, HOU J, et al. Analysis of bacterial diversity and biogenic amines content during the fermentation processing of stinky tofu[J]. Food Research International, 2018, 111: 689−698.
[25] XIE, CHUNZHI, ZENG, et al. Comprehensive explorations of nutritional, functional and potential tasty components of various types of Sufu, a Chinese fermented soybean appetizer[J]. Food Science and Technology, 2019: 39.
[26] 南晓芳. 豆豉和腐乳中耐盐乳酸菌的筛选、鉴定及其功能特性研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2016. [NAN X F. Screening, identification and functional characteristics of salt-tolerant lactic acid bacteria in tempeh and fermented bean curd[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2016.]
[27] 王正莉, 王卫, 陈林, 等. 传统腌腊肉制品中微生物多样性研究进展[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(8): 202−206. [WANG Z L, WANG W, CHEN L, et al. Research progress of microbial diversity in traditional cured meat products[J]. Food Research and Development, 2021, 42(8): 202−206.]
[28] 赵玲艳, 黄嘉欣, 杨剑, 等. 盐渍辣椒真菌多样性分析[J]. 中国食品学报, 2021, 11(8): 1−9. [ZHAO L Y, HUANG J X, YANG J, et al. Diversity analysis of salted pepper fungi[J]. Chinese Journal of Food Science, 2021, 11(8): 1−9.]
[29] QIU T Y, HAIMING W, YANG Y, et al. Exploration of biodegradation mechanism by AFB1-degrading strain *Aspergillus niger* FS10 and its metabolic feedback[J]. Food Control, 2021, 121(2): 107609.
[30] 高玉荣, 刘晓燕. 多菌种低盐分段发酵生产豆豉工艺[J]. 农业工程学报, 2010, 26(S1): 369−373. [GAO Y R, LIU X Y. Multi-strain low-salt staged fermentation process for producing tempeh[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2010, 26(S1): 369−373.]
[31] LIBO L, XIAOQIAN C, LINLIN H, et al. Traditional fermented soybean products: Processing, flavor formation, nutritional and biological activities[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2020.
[32] WANG B, WU Q, XU Y, et al. Multiple sugars promote microbial interactions in Chinese baijiu fermentation[J]. LWT, 2021, 138: 110631.
[33] ZHANG H, WANG L, WANG H, et al. Effects of initial temperature on microbial community succession rate and volatile flavors during Baijiu fermentation process[J]. Food Research International, 2021, 141: 109887.
[34] SHI Y, HUANG K, PAN X, et al. Substrate degradation, biodiesel production, and microbial community of two electro-fermentation systems on treating oleaginous microalgae *Nannochloropsis* sp[J]. Bioresource Technology, 2021, 329: 124932.
[35] 李雨枫, 徐睿烜, 蒋立文, 等. 臭豆腐卤水发酵过程中微生物变化及风味成分研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(10): 3098−3109. [LI Y F, XU R X, JIANG L W, et al. Study on microbial changes and flavor components during fermentation of stinky tofu brine[J]. Journal of Food Safety and Quality Inspection, 2014, 5(10): 3098−3109.]
[36] 邓思敬, 杜磊, 谢静莉, 等. 发酵臭豆腐卤液的乳酸菌发酵菌种研究及香气成分分析[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(17): 107−113,118. [DENG S J, DU L, XIE J L, et al. Study on lactic acid bacteria fermentation strains of fermented stinky tofu brine and analysis of aroma components[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(17): 107−113,118.]
[37] 郑小芬, 苏悟, 蒋立文. 两种臭豆腐卤水中挥发性成分的比较[J]. 中国酿造, 2013, 32(10): 122−125. [ZHENG X F, SU W, JIANG L W. Comparison of volatile components in two kinds of stinky tofu brines[J]. China Brewing, 2013, 32(10): 122−125.]
[38] MA, WANG, CHENG, et al. Selected quality properties and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of low-salt Sufu, a new type of Chinese fermented Tofu[J]. International Journal of Food Properties, 2014, 17(9): 2025−2038.
[39] 彭湘屏, 卢红梅. 腐乳研究新进展[J]. 中国调味品, 2010, 35(2): 31−34,45. [PENG X P, LU H M. The new development of fermented bean curd research[J]. China Seasoning, 2010, 35(2): 31−34,45.]
[40] 肖聪丽, 李理, 陈敏. 大豆多肽的分离纯化及其体外降血脂功能研究[J]. 中国酿造, 2020, 39(7): 30−35. [XIAO C L, LI L, CHEN M. Isolation and purification of soybean peptides and its *in vitro* hypolipidemic function[J]. China Brewing, 2020, 39(7): 30−35.]
[41] 陈嘉序, 陈如扬, 连媛, 等. 大豆异黄酮的生物转化及功能活性研究进展[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(9): 176−182. [CHEN J X, CHEN R Y, LIAN Y, et al. Research progress on biotransformation and functional activity of soybean isoflavones[J]. Food Research and Development, 2021, 42(9): 176−182.]
[42] 于坚, 夏邦恩, 王廷玮, 等. 土茯苓的功能性分析及其在功能性食品中的应用进展[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(8): 166−171. [YU J, XIA B E, WANG T W, et al. Functional analysis of *Smilax glabra* and its application progress in functional foods[J]. Food Research and Development, 2021, 42(8): 166−171.]
[43] 邹磊, 呼晴, 殷丽君. 黄色毛霉腐乳抗氧化能力的研究[J]. 食品与机械, 2007, 11(5): 98−100,108. [ZOU L, HU Q, YIN L J. Study on antioxidant ability of mucor yellow Sufu[J]. Food & Machinery, 2007, 11(5): 98−100,108.]
[44] 王富豪, 黄璐, 薛晨晨, 等. 不同品种大豆异黄酮组分及体外抗氧化活性分析[J]. 食品工业科技, 2021, 42(17): 247−255. [WANG F H, HUANG L, XUE C C, et al. Analysis of isoflavone components and antioxidant activity *in vitro* of different varieties of soybean[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(17): 247−255.]
[45] 董爽, 陶杰, 汪建明. 酶促腐乳生产过程中各种理化性质的变化研究[J]. 食品与发酵科技, 2014, 50(5): 23−26,69. [DONG S, TAO J, WANG J M. Study on the changes of various physical and chemical properties in the production process of enzymatic fermented bean curd[J]. Food and Fermentation Technology, 2014, 50(5): 23−26,69.]
[46] KUBA M, TANAKA K, TAWATA S, et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides isolated from Tofuyo fermented soybean food[J]. Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, 2003, 67(6): 1278−1283.
[47] 侯星, 易弋, 张兴猛, 等. 发酵食品中微生物的功能特性[J].

中国调味品, 2019, 44(1): 191−194,197. [HOU X, YI Y, ZHANG X M, et al. Functional characteristics of microorganisms in fermented foods[J]. China Condiments, 2019, 44(1): 191−194,197.]

[48] 熊骏, 韩瑞娜, 张忠华, 等. 豆豉中高效抑菌活性乳酸菌的筛选及其抑菌研究[J]. 中国微生态学杂志, 2011, 23(6): 485−489. [XIONG J, HAN R N, ZHANG Z H, et al. Screening of lactic acid bacteria with high antibacterial activity in tempeh and its antibacterial research[J]. Chinese Journal of Microecology, 2011, 23(6): 485−489.]

[49] LEE S, LEE J, JIN Y I, et al. Probiotic characteristics of *Bacillus* strains isolated from Korean traditional soy sauce[J]. LWT-Food Science and Technology, 2017: 79.

[50] YUAN L, CHANG J, YIN Q, et al. Fermented soybean meal improves the growth performance, nutrient digestibility, and microbial flora in piglets[J]. Animal Nutrition, 2017, 3(1): 19−24.

[51] YI A, YZ A, KSR A, et al. Gastrointestinal survival and potential bioactivities of *Lactobacillus curieae* CCTCC M2011381 in the fermentation of plant food[J]. Process Biochemistry, 2020, 88: 222−229.

[52] 邱天宇, 王海鸣, 朱瑜, 等. 响应面优化黑曲霉生物发酵花生粕脱除黄曲霉毒素研究[J]. 农产品加工, 2020(20): 1−7. [QIU T Y, WANG H M, ZHU Y, et al. Response surface optimization of *Aspergillus niger* bio-fermentation of peanut meal to removal of aflatoxins[J]. Agricultural Products Processing, 2020(20): 1−7.]

[53] 江月, 何松贵, 周世水. 异常汉逊酵母和植物乳杆菌菌液浓度与光密度值的关系研究[J]. 安徽农业科学, 2017, 45(19): 99−100. [JIANG Y, HE S G, ZHOU S S. Study on the relationship between the concentration of abnormal Hansenula yeast and *Lactobacillus plantarum* and optical density value[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2017, 45(19): 99−100.]

[54] HE M, LI Y, PI F, et al. A novel detoxifying agent: Using rice husk carriers to immobilize zearalenone-degrading enzyme from *Aspergillus niger* FS10[J]. Food Control, 2016, 68: 271−279.

[55] MCKNIGHT S V, BOUTT D F, MUNK L A. Impact of hydrostratigraphic continuity on brine-to-freshwater interface dynamics: Implications from a two-dimensional parametric study in an arid and endorheic basin[J]. Water Resources Research, 2021, 57(4).

[56] 徐智虎, 王雪晰, 刘雪婷, 等. 贵州镇远道菜中生物胺降解菌的筛选及鉴定 [J]. 食品与发酵工业, 2021, 21(9):10-18. [XU Z H, WANG X L, LIU X T, et al. Screening and identification of bioamine-degrading bacteria in Zhenyuan dishes in Guizhou[J]. Food and Fermentation Industry, 2021, 21(9): 10-18.]

[57] 于坚, 孙嘉笛, 纪剑, 等. 区块链技术在食品溯源体系中的应用[J]. 食品工业科技, 2021, 42(15): 377−382. [YU J, SUN J D, JI J, et al. Application of blockchain technology in food traceability system[J]. Food Industry Science and Technology, 2021, 42(15): 377−382.]

莫新良, 杨亮, 滕明德, 等. 饮料酒中香草醛的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 417−426. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021060115

MO Xinliang, YANG Liang, TENG Mingde, et al. Research Progress on Vanillin in Alcoholic Beverages[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 417−426. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021060115

· 专题综述 ·

饮料酒中香草醛的研究进展

莫新良, 杨　亮, 滕明德, 钟艳霞, 李芳香
（茅台学院酿酒工程系, 贵州仁怀 564501）

摘　要: 香草醛是饮料酒中一种非常重要的香气化合物，因其具有令人愉悦的甜香及香荚兰豆香草香气，同时具有一定的生理功能而被广泛关注。香草醛具有很强的极性且在酒中含量甚微，常规的检测方法难以有效检出饮料酒中香草醛的含量，探究酒中香草醛的分析方法一直是研究的课题。饮料酒的原辅料细胞壁中含有丰富的木质素、阿魏酸等，是形成香草醛的重要前驱物质，它可以通过真菌、细菌等微生物经非氧化脱羧反应等代谢途径在酿造过程中转换成香草醛。本文从饮料酒中香草醛的分析方法、香气贡献、含量差异及形成机理等方面进行综述，以期为我国饮料酒中香草醛的研究提供理论参考。

关键词: 饮料酒, 香草醛, 分析方法, 香气贡献, 形成机理
中图分类号: TS201.2　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0417−10
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021060115
本文网刊:

Research Progress on Vanillin in Alcoholic Beverages

MO Xinliang, YANG Liang, TENG Mingde, ZHONG Yanxia, LI Fangxiang
（Department of Brewing Engineering, Moutai College, Renhuai 564501, China）

Abstract: Vanillin is a very important aroma compound in alcoholic beverages. It has been widely concerned because of its pleasant sweet aroma, vanilla aroma and physiological function. Vanillin has strong polarity and trace in alcoholic beverage, so conventional detection methods are difficult to effectively detect the content of vanillin in alcoholic beverage. Therefore, exploring the analysis method of vanillin in alcoholic beverage has always been a research topic. The cell wall of the raw and auxiliary materials of alcoholic beverage is rich in lignin and ferulic acid, which is an important precursor for the formation of vanillin. It can be converted into vanillin in the brewing process through metabolic pathways such as non oxidative decarboxylation reaction of fungi, bacteria and other microorganisms. In this paper, analytical method, aroma contribution, different content and formation mechanism of vanillin in alcoholic beverage are reviewed, which can provide theoretical reference for the research of vanillin in alcoholic beverage.

Key words: alcoholic beverages; vanillin; analytic method; aroma contribution; formation mechanism

香草醛(vanillin)是香子兰花荚中的典型香荚兰豆香气物质, 又称香兰素、香草素、香兰醛, 其化学名为 3-甲氧基-4-羟基苯甲醛。香草醛是一种重要的香气化合物, 因其具有令人愉悦的甜香、浓烈的奶香气及香荚兰豆香草香气, 广泛应用于食品、饮料等领域, 常作为香料添加于糕点、糖果及清凉饮料等食品中, 起助香和定香作用[1]。

饮料酒是指酒精体积含量为 0.5%~60% 的酒精饮料[2]。饮料酒, 特别是经陈酿过的葡萄酒[3]、黄酒[4−5]、日本烧酒[6]、白兰地[7]、朗姆酒[7−8] 等含有相当数量的香草醛, 其对酒的香气、口感以及稳定性等品质具有重要作用[8]。此外, 香草醛具有多种生理活性功能, 如通过自身聚合化及与自由基反应清除自由基, 从而拥有较强的抗氧化活性, 同时还具有抗炎、增加免疫力、预防和抑制各种慢性疾病的发生与发展等功能[9−11], 深受人们广泛关注。香草醛在饮料酒

收稿日期: 2021−06−15
基金项目: 贵州省科技计划基础研究项目（黔科合基础 [2019]1295）; 贵州省教育厅普通高等学校特色重点实验室项目（黔教合 KY 字 [2018]003）; 贵州省科技计划基础研究项目（黔科合基础-ZK[2021] 一般 093）; 贵州省教育厅青年科技人才成长项目（黔教合 KY 字 [2018]462; 黔教合 KY 字 [2018]449; 黔教合 KY 字 [2018]451）。
作者简介: 莫新良（1970−）, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品生物发酵、风味物质分析及机理, E-mail: xinliangmo@163.com。

中的香气阈值为 22~438.52 μg/L[8,12]。研究发现，木质素的降解和阿魏酸的转化是香草醛的重要来源，而饮料酒的原辅料中通常含有大量的木质素和阿魏酸[13−14]，为香草醛的形成提供了重要的物质基础。本文从饮料酒中香草醛的分析方法、香气贡献、含量差异及形成机理等方面进行综述，以期为我国饮料酒中香草醛及其形成机理研究提供参考依据。

1 饮料酒中香草醛的分析方法

香草醛具有强极性且在酒中含量甚微，常规的检测方法难以将其有效检出。目前，关于饮料酒中香草醛的分析方法主要有样品预处理、仪器检测、定性定量分析及香气贡献判定和确认等几部分。样品预处理过程主要有化学衍生化(Chemical derivatization, CD)[15]、液-液萃取(liquid-liquid extraction, LLE)[16]、固相萃取(solid-phase extraction, SPE)[4,17]、固相微萃取(solid-phase microextraction, SPME)[18−19]、液-液微萃取(liquid-liquid microextraction, LLME)[4−5]等，仪器检测主要有：气相色谱-质谱联用(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)[3−5]、高效液相色谱(High-performance liquid chromatography, HPLC)[6,20−21]、液相色谱-质谱联用(Liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)[22−23]等。以下将具体介绍饮料酒中香草醛的分析方法。

1.1 饮料酒中香草醛的样品预处理方法

饮料酒基质复杂，其中存在香草醛等各种香气成分浓度低，且有着不同的挥发性、溶解性及极性等性质的物质。因此，样品预处理方法的选择非常重要。

1.1.1 化学衍生化法(CD) 对于香草醛、不饱和烯醛等这样一些香气贡献大但含量低的物质，常规方法难以分析，通常采用 CD 进行处理分析，因需先将被分析物质萃取出来再进行化学衍生，故该法较为繁琐。轻工业部食品发酵研究所[24]曾用该预处理方法分析了茅台酒中的愈创木酚、4-甲基愈创木酚等 12 种挥发性酚类物质，由于受当时香气物质认知条件限制，没有香草醛的相关信息。傅玉书等[15]使用双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺做衍生剂，将茅台酒等白酒中的香草醛等酚类物质检测出来，香草醛不但被鉴定出来，同时还得到初步定量分析。曹长江等[25]使用羟胺盐酸盐作为衍生剂，将白酒中含量低的反-2-壬烯醛、反,反 2,4-壬二烯醛等检测出来。

1.1.2 液-液萃取法(LLE) LLE 是一种根据相似相溶原理，利用香草醛等微量成分在溶剂相和样品基质中的分配系数差异，直接从样品中萃取、分离挥发性成分的方法。其缺点是耗时、费力且需要的样品及溶剂较多，但该方法因具有操作简便、萃取效果好、能较全面提取样品中的目标物质等优点，被广泛应用在饮料酒风味物质分析中[16,26−27]。丁云连[16]应用该萃取法分析出了清香型白酒中包括香草醛在内的 90 种香气化合物；杨亮等[26]利用该方法分析了缺陷型白酒中的挥发性成分，香草醛被分析出来；尹建邦等[27]采用此方法分析发现，经橡木桶陈酿的葡萄酒香气成分如香草醛等的香气强度明显高于未经橡木桶陈酿的葡萄酒。

1.1.3 固相萃取法(SPE) SPE 是一种用固体材料吸附样品中需分析的成分，然后用恰当的洗脱剂将目标物洗脱下来的方法。其缺点是方法开发较复杂、且萃取小柱的成本较高，但其因具有集样品中目标物质的富集与净化为一体、重现性较好等优点而被应用在饮料酒的香气物质分析中[4,17,28]。应用该方法时，吸附剂和洗脱剂的选择是关键，需依据待处理的样品基质而定。用在饮料酒中香气物质分析的吸附剂主要为 LiChrolut–EN[4,17,28]，洗脱剂主要有二氯甲烷、乙醚、戊烷等。如在葡萄酒的香气物质分析中[17]，酒样通过填料吸附后，用二氯甲烷进行洗脱，59 种葡萄酒中的香草醛等香气成分被成功分析出来；在白酒香气物质鉴定中[28]，用戊烷、乙醚对经吸附后的酒样洗脱，包括香草醛在内的多种香气物质被鉴定出来；在黄酒香气物质分析中[4]，用二氯甲烷作洗脱剂，香草醛等微量挥发性香气成分被顺利分析出。

1.1.4 固相微萃取法(SPME) SPME 应用在饮料酒微量成分分析中，主要为顶空固相微萃取(head-space SPME, HS-SPME)。HS-SPME 是一种利用被分析物在萃取头与萃取基质之间达到平衡时的分配系数和吸附量的差异来进行分离浓缩的方法[19]。该法优点较多，如无需溶剂且集采样、萃取、浓缩为一体，操作简便、快速，但也存在萃取效果会受到诸多因素如萃取头、萃取温度、基质等严重影响的缺点，尤其是存在萃取头对某些极性强、含量低的挥发性物质响应差的缺点，故该方法在饮料酒香草醛的分析方面应用不多，目前主要集中在陈酿葡萄酒中有较高含量香草醛等香气成分的分析中[29−30]。尹建邦等[29]利用该法鉴定出了经橡木桶陈酿的葡萄酒中的橡木香气物质，香草醛是其成分之一。李兰晓等[30]采用此法快速检测了经不同橡木制品陈酿的葡萄酒中主要陈酿香气成分及其变化，香草醛的相关信息包含在其中。

1.1.5 液-液微萃取法(LLME) LLME 是一种用极少体积有机溶剂萃取一定体积样品中目标物质的方法。其优点是只需一步萃取无需多步浓缩样品的繁琐操作步骤，是一种快速简单且无需大量溶剂的萃取方法。但该方法不适合用于样品中宽范围的香气物质的全面分析。Ferreira 最早开发该方法定量分析了葡萄酒中有机酸等极性风味成分[31]，因其操作简单，随后逐渐被其他研究者采纳用来分析相关目标物质。饮料酒中用 HS-SPME 方法难以分析检测的香草醛用 LLME 方法可以完成，LLME 应用在黄酒[4−5]、白酒[32]等香草醛的定量分析中，结果均比较理想。莫新良等[5]利用此方法对黄酒中的香草醛进行分析，较理想地将黄酒中的香草醛定量出来；赵雅敏等[32]运用 LLME 快速定量了 70 种不同白酒样品中的

9 种酚类物质，香草醛包含在其中。

1.2　饮料酒中香草醛的检测方法

1.2.1　气相色谱-质谱联用技术（GC-MS）　饮料酒中香草醛等成分经预处理后，即可通过仪器来进行检测分析，检测仪器通常采用质谱，如对黄酒[4−5]、白酒[16,26]、葡萄酒[27,29]等香草醛的检测分析。随着仪器的快速发展，各种高端质谱的诞生，饮料酒中香草醛等各种挥发性物质检测的种类更加丰富，如 Zhu 等[33]应用全二维气相色谱与飞行时间质谱联用技术从酱香型白酒中分离出 528 种物质，陈双等[34]同样用该检测方法从清香型白酒中检测到 1092 个峰，定性了 340 种挥发性物质。

1.2.2　高效液相色谱法（HPLC）　对于热敏性、沸点比较高或极性强的物质的分析，通常选择 HPLC 来进行检测，配合适当的检测器，该方法能够对物质进行准确的定量。紫外可见吸收检测器（ultraviolet-visible detector, UVD）[6,20]和二极管阵列检测器（Diode-array Detection, DAD）[35−36]，在饮料酒中香草醛的分析中应用比较广泛，Koseki 等[6,20]采用 HPLC-UVD 定量分析了日本烧酒中酚类物质，发现香草醛是其陈酿酒中的重要香气物质；之后用同样方法快速分析了日本烧酒模拟酒中香草醛的形成途径及其影响因素。Goldberg 等[35]用高效液相色谱-光电二极管阵列检测器（photodiode array detector, PDAD）分析了 12 种国外蒸馏酒中的 11 种酚类物质，香草醛均被检测出；Turkoz 等[21]用 HPLC-DAD 快速分析了葡萄酒中包括香草醛在内的 8 种酚类物质。Vanbeneden 等[36]用高效液相色谱-电化学（electrochemistry detection, ECD）法分析了啤酒老化过程中 4-乙烯基愈创木酚（4-vingylguaiacol, 4-VG）的降解及其产物的形成，在老化后的啤酒模拟溶液中鉴定到了香草醛。

1.2.3　LC-MS　随着仪器的快速发展，LC-MS 被应用在饮料酒化合物分析中，利用此技术不但能对已知物质进行定量分析，同时还能对未知物进行定性鉴定。Pai 等[22]用 LC-MS 分析发现印度啤酒中香草醛的含量均比较低；Gonzalez-Centeno 等[37]用 LC-MS 研究了橡木在霞多丽葡萄酒苹果酸-乳酸发酵和陈酿过程中的作用及相关香气物质，香草醛是其研究的主要香气成分之一；Canas 等[23]研究了微氧条件下陈酿过程中葡萄蒸馏酒中的香气物质变化情况，用 LC-MS 检测定性鉴定香草醛等香气物质，用 HPLC-UVD 定量分析，发现在有氧条件下随着储存时间的延长，香草醛的含量逐渐增加。

1.3　饮料酒中香草醛的定性定量方法

1.3.1　定性方法　香气物质的定性分析常用的手段为标准品比对法、质谱库比对法、保留指数对比法。当未知化合物色谱保留值、质谱库信息以及香气特征与标准品完全一致时，即可得以确认[38]。对于无标准品的化合物，可以采用保留指数法定性（Retention Index, RI 或 Kovats 指数），相比与用一个参比化合物，这种标定方法更为精确[39]。将保留指数法与质谱谱库对比法结合使用是饮料酒中常用的定性方法[4−5,16]。

1.3.2　定量方法　饮料酒中香草醛的定量方法主要有外标定量法和内标定量法。外标法定量法方法简单，只需校正待测组分峰，但对仪器稳定性及进样量的准确性要求较高。内标法定量并未严格要求进样量且因内标的加入可消除一定的系统误差，但因在样品中加入一个组分，易导致面积测量误差增加[40]。饮料酒中香草醛的定量分析用得比较多的是内标法[4−5,9]。

1.4　饮料酒中香草醛的香气贡献分析方法

1.4.1　香草醛香气贡献的判定　判定饮料酒中风味物质香气贡献的方法主要有气相色谱嗅闻（gas chromatography-olfactometry, GC-O）技术中的香气强度分析法（Osme）[16,27]和香气萃取稀释分析法（aroma extract dilution analysis, AEDA）[4,11,16]，这些方法和 GC-MS 结合后即可初步判断香草醛等物质的香气贡献。Osme 技术[18]是将预处理浓缩获得的样品，直接进样进行 GC-O 分析，其结果以香气强度表示。AEDA 法[41]是将预处理浓缩后得到的组分与溶剂以一定比例梯度稀释，每一个稀释度样品进样进行 GC-O 闻香，直到闻不到香气为止，结果由 FD 值来确定。这两种方法已普遍应用在饮料酒香草醛等呈香化合物的香气贡献分析中。Lee 等[42]用 Osme 的方法鉴定出了葡萄酒中 81 种具有香气活性的物质，香草醛在其中。用 AEDA 的方法分析发现，香草醛在传统黄酒、机械黄酒和新酒中的 FD 值分别为 1024、132 和 32，是黄酒中的重要香气贡献物质[4,43]。

GC-O 能够发现具有重要贡献的香气物质，但因基质效应的影响，鉴定到的这些物质呈现的香气强度与饮料酒样品中本身香气强度存在一定差异，故通常采用香气活力值（odor activity value, OAV）的大小来确证其重要程度。OAV 是香气物质在饮料酒中的含量与其在相应基质中的香气阈值的比值[41]，OAV>1，说明该香气物质对酒样贡献明显。Franitza 等[8]研究发现香草醛在朗姆酒中的 FD 为 2048，OAV 为 42，证实香草醛在该酒中的重要性；赵东瑞[9]发现香草醛在古井贡酒中的 FD≥729，但是其 OAV 均小于 1，说明白酒基质对香草醛的香气表达有明显的抑制作用，故在评价香气物质对饮料酒香气贡献时，采用多种方法并结合 OAV 是很有必要的。

1.4.2　关键香气物质的香气重要性验证　确定了酒样中重要贡献的香气物质后，还需进一步对其进行验证，通常采用香气重组、香气缺失实验完成。在进行香气重组时，通常对 OAV>1 的物质进行香气重组，如在陈酿黄酒香气研究中[4]，共鉴定到 43 个活性香气物质，却仅采用 31 个 OAV>1 的物质进行重组，OAV 为 56 的香草醛在其中。鉴于不同物质在同一

基质中可能产生的风味物质间的交互作用，在香气重组时，除了采用 OAV>1 的物质，还有必要考虑那些 OAV<1 但 FD 值却很高的物质，如在浓香型白酒古井贡酒香气分析中[9]，共鉴定到 60 个香气物质，除采用 35 个 OAV>1 的香气物质外，也将另外 11 个 OAV<1 但 FD 值很高的物质一起进行重组，香草醛在这 11 个物质之中。

当重组后的溶液香气与实际饮料酒样品香气相似时，即可确认重组溶液中的香气物质是该酒中的重要香气贡献物质[4,12]，此时，即可进行缺失实验。缺失实验的目的是为确定重组的化合物中某一种或某一类香气物质对该酒风味形成的贡献，当某一香气物质缺失后，重组溶液的香气和实际酒样有显著性差异时，即可认为该物质是关键香气物质。如在陈酿黄酒香气研究中[4]，缺失实验证明香草醛、葫芦巴内酯等是黄酒中的香气贡献关键物质；在浓香型白酒古井贡酒香气分析中[9]，缺失实验证明香草醛、苯乙醇等是白酒中的香气贡献关键物质。

2 饮料酒中的香草醛及其含量分析

按照生产工艺的不同，饮料酒主要分为三大类：发酵酒、蒸馏酒和配制酒。黄酒与啤酒、葡萄酒并称为“世界三大发酵酒”，白酒是世界六大蒸馏酒之一，中国黄酒和白酒是中国独有的酒种。表 1 列出了部分饮料酒中香草醛的含量情况。

2.1 葡萄酒中的香草醛

关于葡萄酒中香草醛的研究主要集中在经橡木桶陈酿的葡萄酒方面，葡萄酒中香草醛含量为 0.66~590000 μg/L[21,43]。相对来说，国外葡萄酒中香草醛的研究起步较早。1984 年，Aiken 等[50] 发现通过橡木桶陈酿过的葡萄酒其香气物质香草醛等产生的香草香、橡木香及调料香味显著增加。2002 年，Lopez 等[17] 定量了西班牙 59 种葡萄酒中的 27 种重要香气物质，香草醛的含量在白葡萄新酒中为 1.43 μg/L，在红葡萄陈酿酒中为 9.60~140.00 μg/L，平均含量为 59.00 μg/L。2003 年，Lee 等[42] 对美国加利福尼亚州的 19 种白葡萄陈酿酒的香气成分进行了定量分析，香草醛含量为 107.00~1172.00 μg/L。2004 年，Culleré 等[43] 对 6 种西班牙红葡萄酒中的 78 种香气成分进行了定量分析，其中，香草醛的含量为 0.66~2.09 μg/L。2018 年，Turkoz 等[21] 定量分析了土耳其葡萄酒中包括香草醛在内的 8 种酚类物质，香草醛的含量在 10000~590000 μg/L。以上研究表明，不同地区不同品种的葡萄酒中香草醛的含量差异较大，总的来说，葡萄酒新酒中香草醛含量极低，经过陈酿过的特别是橡木桶陈酿过的葡萄酒，其香草醛的含量普遍较高。

我国研究者们对国内葡萄酒中香草醛的研究虽然起步较晚，却对橡木制品陈酿过的葡萄酒中香草醛的定性、定量及其变化规律等分析得较为透彻。2011 年，尹建邦等[29] 定量分析了经橡木桶陈酿的赤霞珠葡萄酒中的橡木香气成分，结果显示香草醛含量为 754.56 μg/L，是该产区葡萄酒中含量最高的橡木香气成分。2015 年，李兰晓等[30] 分析发现橡木制品类型及陈酿时间对葡萄酒的陈酿香气有重要影响，通过橡木片陈酿的葡萄酒，香草醛含量在 30 d 时达到

表 1 饮料酒中香草醛的分析方法及其含量

Table 1 Analysis method and content of vanillin in alcoholic beverages

序号	饮料酒	分析方法	含量(μg/L)	出版时间	文献来源
1	西班牙葡萄酒	SPE-GC-MS	9.60~140.00	2002	[17]
2	美国白葡萄酒	LLE-GC-MS	107.00~1172.00	2003	[42]
3	西班牙红葡萄酒	SPE-GC-MS	0.66~2.09	2004	[43]
4	土耳其葡萄酒	HPLC-DAD	10000~590000	2018	[21]
5	中粮长城葡萄酒	HS-SPME-GC-MS	754.56	2011	[29]
6	中国烟台葡萄酒	HS-SPME-GC-MS	0~8000000	2015	[30]
7	江浙沪地区黄酒	LLME-GC-MS	80.12~4058.12	2012	[5]
8	浙沪地区黄酒	LLME-GC-MS	40.00~2300.00	2016	[44]
9	浙江绍兴黄酒	LLME-GC-MS	3.40~1460.00	2019	[4]
10	中国各地区黄酒	SPE-GC-MS	381.00~1720.00	2018	[45]
11	黄酒麦曲	LLME-GC-MS	126.90~549.40	2015	[46]
12	印度啤酒	LC-MS	2.43~20.54	2015	[22]
13	比利时浓色啤酒	LLE-GC-MS	2.30~180.00	2014	[47]
14	比利时淡色啤酒	LLE-GC-MS	0.00~590.00	2008	[36]
15	酱香型白酒	CD-GC-MS	30	1985	[15]
16	酱香型白酒 浓香型白酒 清香型白酒 威士忌	LLME-GC-MS	66.00~255.70 0.00~130.50 73.60~111.50 1154.20~2180.30	2018	[32]
17	古井贡白酒	LLE-GC-MS	210.00~306.00	2018	[9]
18	各香型白酒	GC-MS	0.54~279.18	2019	[48]
19	古井贡白酒原酒	LLME-GC-MS	5.98~40.10	2020	[49]

最高值，此后逐渐减少，而橡木板陈酿的葡萄酒，其含量在 90 d 的陈酿过程中一直在增加。

2.2　黄酒中的香草醛

黄酒中香草醛含量在 3.40~4058.12 μg/L 之间[4−5]。关于黄酒香草醛的研究主要集中在国内，大多是关于成品黄酒中香草醛的含量差异、储存过程中的含量变化及其影响因素等方面的研究。莫新良等[5,44]对中国不同种类黄酒中香草醛进行分析，发现香草醛的含量为 80.12~4058.12 μg/L，陈酿酒中香草醛的含量普遍高于新酒中的含量，说明香草醛主要来源于储存过程，进一步跟踪发现，随着储存时间的延长，香草醛的含量在不断增加，其主要来源于 4-VG 的降解，氧气和温度有利于香草醛的形成。Chen 等[4,45]综合分析了陈酿黄酒、新酒及传统黄酒、机械黄酒中的香气物质，香草醛在这四种黄酒中的含量分别为 1460.00、3.40、1180.00 和 381.00 μg/L，模拟黄酒缺失实验证明，香草醛是陈酿黄酒中非常重要的香气贡献物质。总的来说，香草醛在黄酒新酒中含量比较低，陈酿有利于香草醛的形成。另外，关于黄酒生产过程中糖化剂麦曲中的香草醛也有一定的研究，莫新良等[46]通过分析发现，麦曲中香草醛的总含量为 126.00~549.40 μg/kg，脚踏麦曲中香草醛的总含量均高于机械麦曲中的总含量。

2.3　啤酒中的香草醛

关于啤酒中香草醛的研究较少，可能与啤酒新鲜度有关。研究发现，新鲜啤酒中香草醛的含量较低甚至没有，但陈酿或老化一段时间，其含量则增加。Pai 等[22]分析印度啤酒中的酚类物质发现，香草醛的含量在 2.43~20.54 μg/L 之间。Scholtes 等[47]研究发现香草醛在 12 种新鲜啤酒中的含量范围为 2.30~113.80 μg/L，在陈酿 14 个月的啤酒中，其含量达到了 180.00 μg/L。Vanbeneden 等[36]对啤酒老化过程中 4-VG 的降解及其产物的形成进行了分析，发现在老化后的啤酒模拟溶液中，鉴定到了香草醛和罗布麻酚两种香气物质，二者共占 4-VG 减少量的 85%，氧气有助于香草醛的形成。

2.4　白酒中的香草醛

白酒中香草醛的含量为 0.54~306.00 μg/L[9,48]，白酒香型众多，不同香型、不同种类香草醛差异较大。傅玉书等[15]估测了茅台酒中的香草醛含量为 30 μg/L；赵雅敏等[32]分析发现，香草醛在酱香型、浓香型和清香型白酒中的平均含量分别为 128.20、86.40 和 89.00 μg/L，含量范围分别为 66.00~255.70、0.00~130.50 及 73.60~111.50 μg/L，而威士忌中香草醛平均含量为 1734.30 μg/L，含量范围为 1154.20~2180.30 μg/L。赵东瑞等[9]定量分析结果显示古井贡酒中香草醛的浓度为 210.00~306.00 μg/L。史冬梅等[48]对中国白酒 103 种样品中的 6 种酚类物质进行分析，香草醛在 94 种白酒中被检出，其含量为 0.54~279.18 μg/L。陈璐等[49]对古井贡酒原酒香气成分在蒸馏过程中的变化进行研究，结果表明，香草醛在不同馏分中的含量随着蒸馏时间的延长而呈现上升趋势，香草醛的含量变化范围为 5.98~40.10 μg/L。综合目前的各种研究，不难发现，白酒中香草醛的研究主要集中在成品酒各香型白酒中香草醛含量方面，虽有对生产中的蒸馏过程中香草醛的含量变化进行了分析，但并未在白酒中陈酿过程及其影响因素等方面进行系统研究。

3　饮料酒中香草醛的形成机制

关于香草醛在饮料酒中形成机理的研究，主要集中在葡萄酒、啤酒、黄酒和日本烧酒等饮料酒酿造及贮存过程。饮料酒的原辅料通常来源于植物，而植物细胞壁中的阿魏酸、木质素、丁香酚等物质作为前体均可通过化学或生物的途径转化形成香草醛，其中，阿魏酸的转化和木质素的降解是香草醛的重要来源[1,14,51]。已有研究发现，在饮料酒酿造和贮存过程中，香草醛的形成主要是通过阿魏酸的非氧化脱羧反应代谢途径转化和木质素的降解而成的。

3.1　饮料酒中香草醛由阿魏酸的转化形成途径

3.1.1　结合态阿魏酸转化成游离阿魏酸及其相关的酶　阿魏酸，即 4-羟基-3-甲氧基肉桂酸，是自然界中极其丰富的苯丙烯酸衍生物，主要存在于草本植物、木本植物和粮谷壳等细胞壁中。农副产品如麦麸、米糠和甜菜糖浆等，均含有数量不等的阿魏酸[14]。在植物细胞壁中，阿魏酸很少以游离态的形式存在，大多与各种碳水化合物以糖苷键、酯键等相连。在谷物的细胞壁中，阿魏酸的单体和多种二聚体主要以酯键的形式连接在阿拉伯木聚糖的阿拉伯糖残基上，因此，要获得游离阿魏酸，需打破阿魏酸与多聚糖之间连接的酯键[42]。通过化学法（酸、碱、热）或酶的水解作用，可以使植物中结合的阿魏酸游离出来。其中，在酶的水解中，阿魏酸酯酶是水解阿魏酸酯键的一种关键酶[52]。

阿魏酸酯酶（EC3.1.1.73，ferulic acid esterase，FAE）又称肉桂酸酯酶，属于羧酸酯水解酶的一个亚类，是一种能水解阿魏酸甲酯、低聚糖阿魏酸酯和多糖阿魏酸酯中的酯键，将阿魏酸游离出来的胞外酶。若和其它酶如纤维素酶、半纤维素酶或木聚糖酶协同作用，更加有利于阿魏酸的释放。因为纤维素酶和半纤维素酶能够降解植物细胞壁中的多聚糖，从而有助于阿魏酰酯酶和结合态的阿魏酸酯的接触[53]。

3.1.2　饮料酒中阿魏酸转化成香草醛的途径　由阿魏酸降解产生香草醛的途径非常复杂，综合概括主要有四条代谢途径，分别是：非氧化脱羧反应、侧链还原、不依赖于辅酶 A 的去乙酰反应和依赖于辅酶 A 的去乙酰反应[1]。

其中在非氧化脱羧反应中，阿魏酸首先脱羧形成 4-VG，然后 4-VG 再氧化形成香草醛，在反应基质中还有极少部分的副产物香草酸和愈创木酚产生[1]。

已有的研究发现，在饮料酒酿造和贮存过程中香草醛的形成主要是通过阿魏酸的非氧化脱羧反应这条代谢途径转化而成的[20,44,54]，具体代谢途径见图 1。

Koseki 等[20] 研究了日本烧酒 shochu 模拟酒中香草醛的形成途径，发现该途径是由原料细胞壁中的结合态阿魏酸水解成游离的阿魏酸后，再脱羧形成 4-VG，4-VG 再氧化成香草醛，香草醛又可转化成香草酸。其中，4-VG 是在蒸馏过程中产生的，香草醛和香草酸是在储存过程中形成的。香草醛的形成与储存温度、基质 pH、酒精度有关。2008 年，Vanbeneden 等[36] 分析了啤酒贮存过程中香草醛的形成途径，证明香草醛是由 4-VG 转化而来，其中氧气和温度有利于此反应的进行。Mo 等[54] 对黄酒发酵过程中阿魏酸和 4-VG 的变化进行了跟踪，发现在黄酒酿造过程中，随着发酵时间的延长，阿魏酸和 4-VG 的浓度逐渐增加，发酵的前 5 d 上升幅度较大，第 6 d 后上升缓慢，并且证明阿魏酸和 4-VG 的产生源于麦曲而不是酵母。2016 年，莫新良等[44] 对黄酒中香草醛的形成及其影响因素进行了研究，发现香草醛是 4-VG 降解的主要产物，氧气、温度及储存时间有利于香草醛的形成。

3.1.3 阿魏酸转化成香草醛过程中的相关微生物

将植物细胞壁中结合态阿魏酸转化为游离阿魏酸的阿魏酸酯酶，主要由真菌、细菌等产生，如曲霉（*Aspergillus*）[55]、青霉（*Penicillium*）[56]、乳酸菌（Lactic acid bacteria）[52]、植物乳杆菌（*Lactobacillus plantarum*）[57] 和链霉菌（*Streptomyces*）[58] 等产生，表 2 列出了文献报道中的部分相关微生物。

由阿魏酸降解产生香草醛的途径中，与之相关的微生物主要有真菌（如黑曲霉（*Aspergillus niger*）、白腐菌（*Phanerochaete chrysosporium*）等）[59−60]；某些细菌（如枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）[61]、阿氏芽胞杆菌（*Bacillus aryabhattai*）[62]、乳酸片球菌（*Pediococcus acidilactici*）[63]、荧光假单胞菌（*Pseudomonas fluorescens*）[64] 和链霉菌（*Streptomyces*）[58] 等）（见表 2）。综合表 2 发现，细菌分泌阿魏酸酯酶的效果比真菌要好，产生阿魏酸或香草醛的含量也比真菌的多。故细菌是该途径中香草醛形成的重要微生物。

3.2 饮料酒中木质素的降解形成香草醛的途径

木质素是一种由苯基丙烷结构单元构成的、具有复杂的三维网状结构的高分子物质，主要由对羟基苯丙烷、紫丁香基丙烷和愈创木基丙烷单元通过醚键和碳-碳键随机聚合而成，不同植物纤维原料木质素的结构组成不同，当受到温度、酸度、化学试剂等影响时，木质素被水解或氧化降解形成单体或低聚物[65−66]。

研究发现，当饮料酒用橡木桶长期储存时，饮料酒中的酒精、酸度及微量氧气等有助于橡木木质素

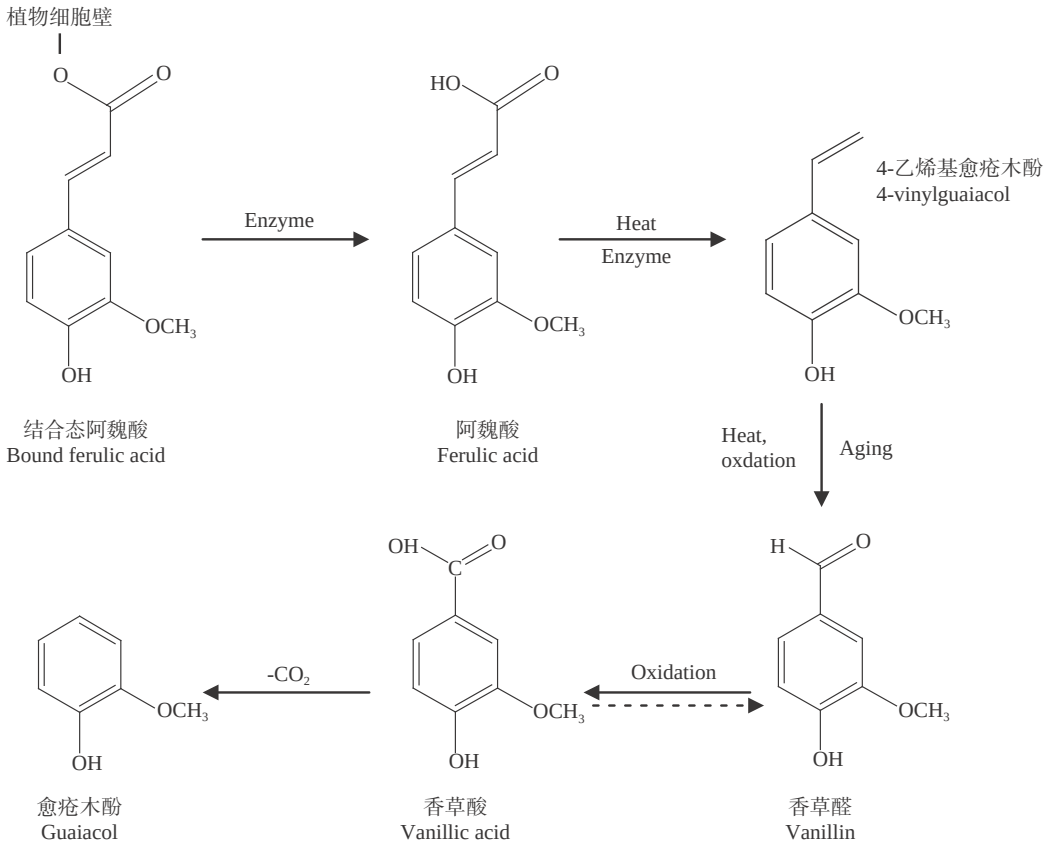


图 1 饮料酒中阿魏酸转化成香草醛的形成途径

Fig.1 Pathways of vanillin formation from the degradation of ferulicacid in alcoholic beverages

注：饮料酒酿造过程和储存过程中，结合态阿魏酸水解成游离的阿魏酸、游离的阿魏酸脱羧形成 4-VG、4-VG 氧化成香草醛、香草醛氧化形成香草酸及香草酸脱羧成愈创木酚的途径。

表 2　香草醛形成过程中的相关微生物

Table 2　Different microorganisms involved in synthesis of vanillin

序号	微生物	产物	产物浓度	出版时间	文献来源
1	乳酸菌	阿魏酸酯酶、阿魏酸	7.54 U/mL、5500 mg/kg	2020	[52]
2	曲霉	阿魏酸酯酶	0.070 U/mL	2016	[55]
3	青霉	阿魏酸酯酶、阿魏酸	0.009 U/mL、115.93 mg/kg	2021	[56]
4	植物乳杆菌	阿魏酸	6336 mg/kg	2018	[57]
5	链霉菌	阿魏酸酯酶、香草醛	0.294 U/mL、708 mg/L	2018	[58]
6	黑曲霉	香草醛、香草酸	7、5 mg/L	2020	[59]
7	白腐菌	香草醛	55 mg/L	2013	[60]
8	枯草芽孢杆菌	香草醛	1500 mg/L	2016	[61]
9	阿氏芽胞杆菌	香草醛	147.1 mg/L	2018	[62]
10	乳酸片球菌	香草醛	1060 mg/L	2017	[63]
11	荧光假单胞菌	香草醛	1279 mg/L	2011	[64]

的降解、木质素单体或低聚成分的溶出及陈酿香气成分的形成，其中能深刻影响陈酿香气的几种重要的橡木挥发性成分有香草醛、丁香醛等，在此过程中，橡木木质素降解形成香草醛等香气化合物融入饮料酒中，其降解途径主要包括部分水解，醚键和碳-碳键的断裂，脱甲氧基化、烷化和缩合反应，在较低温度的温和条件下，醚键和碳-碳键断裂，生成酚类单体、二聚体和寡聚体化合物，再转化成香草醛等香气物质[66]，具体代谢途径模型见图 2。香草醛是橡木浸渍物的主要成分，具有令人愉悦的香草和香子兰甜香香气，对饮料酒的风味品质及酒质风格起到重要作用[3,13,67]。

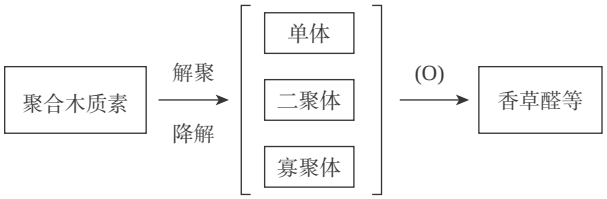


图 2　饮料酒中木质素降解形成香草醛的代谢途径模型

Fig.2　Metabolic pathway model of vanillin formation from the degradation of lignin in alcoholic beverages

3.3　饮料酒中香草醛来源的鉴别

要呈现香草醛的特有风味，未经过长时间橡木桶陈酿的饮料酒很难达到相应浓度要求，新酒若达到则存在人为添加的可能，而添加合成香草醛香精以呈现其甜香风味的酒，将被欧盟法规（European Commission, EC, Regulation No. 110/2008）所禁止[68]。因此，关于鉴别和区分饮料酒中香草醛甜香及香草香风味的真实来源（是来源于自然发酵或陈酿产生还是外来添加的合成香精）的研究，受到国外该领域范围内研究的重点关注。Van 等[68] 用气相色谱-同位素比质谱仪检测分析了 48 种蒸馏酒样品中的香草醛的来源，发现不同来源的香草醛所具有的 $\delta^{13}C$ 值不同，人为添加合成香草醛香精的蒸馏酒中的 ^{13}C 值和自然产生的完全不同。来源于橡木桶陈酿的蒸馏酒中香草醛的 $\delta^{13}C$ 值为−28.9‰~−25.7‰，而人为添加合成香草醛香精的蒸馏酒中香草醛的 $\delta^{13}C$ 值为−32.5‰~−29.3‰，能够被很好的区分开来，为甄别是否是人为添加香草醛人工合成添加剂来源的饮料酒提供了好的鉴定依据。

4　结语

香草醛是饮料酒中重要的风味和生物活性物质，然而现阶段仍缺乏对香草醛分析的有效方法，这些缺陷可能存在样品预处理上，也可能在 GC-O 阶段香草醛的香气被其它物质所掩盖而无法鉴定，亦或是关键香气的构成是香草醛等几种香气物质协同作用的结果。这些问题的解决，需要开发一些新的研究策略来完成，但无论如何，最后仍然需要进行定性定量、GC-O、OAV 分析，并进行香气重组与缺失试验。

对香草醛的产生路径及代谢相关微生物，有部分研究通过相关性分析、参与代谢的酶及陈酿过程影响因素等层面进行了探讨，这也有助于解析饮料酒中香草醛的产生机理、改善饮料酒风味。随着新技术的开发及组学的广泛使用，使得全面揭示饮料酒生产过程中香草醛的代谢机制成为可能，如在研究生物代谢香草醛中，可以香草醛关键结构为靶向，采用代谢组学的研究思路解析其代谢，在宏基因组解析传统发酵过程中与香草醛代谢相关的微生物的基础上，结合转录组及宏蛋白质学方法，考察相关微生物代谢酶的转录或翻译情况，以验证微生物功能，从而构建香草醛代谢图谱。

饮料酒中香草醛的含量与其品质关系密切，目前，国内相关研究比较薄弱，虽在黄酒和葡萄酒中有一定的研究，但在白酒中的研究尤其是其在形成机理方面的研究非常欠缺。白酒作为中国的国酒，其香型众多，酿造工艺、酿造微生物、酿造环境千差万别，不同地域不同香型的白酒形成了其独特的风格，其中香草醛的含量也差异显著。未来对白酒中香草醛的研究，应集中在不同地区、不同香型白酒以及同一香型白酒不同生产环节中香草醛的检测分析方法、含量差异、变化规律、影响因素等方面，以此探寻并明晰白酒中香草醛的形成机制，通过优良自然微生物发酵或良好的贮存条件对其进行调控，以期为更好的提高

白酒中香草醛的含量，最终达到有效控制白酒品质的目的提供基础。

参考文献

[1] PRIEFERT H, RABENHORST J, STEINBÜCHEL A. Biotechnological production of vanillin[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2001, 56(3-4): 296−314.

[2] 马佩选, 管锡建. 科学分类饮料酒促进行业发展[J]. 酿酒科技, 2010, 194(8): 117−119. [MA P X, GUAN Y J. Scientific classification of alcoholic beverage to advance healthy industry development[J]. Liquor−Making Science & Technology, 2010, 194(8): 117−119.]

[3] SANCHEZ-GOMEZ R, DEL A S M, NEVARES I. Volatile composition of oak wood from different customised oxygenation wine barrels: Effect on red wine[J]. Food Chemistry, 2020, 329: 127181.

[4] CHEN S, WANG C C, QIAN M C, et al. Characterization of the key aroma compounds in aged Chinese rice wine by comparative aroma extract dilution analysis, quantitative measurements, aroma recombination, and omission studies[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(17): 4876−4884.

[5] 莫新良, 徐岩, 范文来. 中国黄酒中香草醛的定性定量分析[J]. 食品与发酵工业杂志, 2012, 38(12): 133−137. [MO X L, XU Y, FAN W L. The qualitative and quantitative analysis of vanillin in different chinese rice wines[J]. Food and Fermentation Industries, 2012, 38(12): 133−137.]

[6] KOSEKI T, ITO Y, ITO K, et al. Phenolic compounds found in awamori[J]. Nippon Jozo Kyokai Zasshi, 1994, 89(5): 408−411.

[7] GRANJA-SOARES J, ROQUE R, CABRITA M J, et al. Effect of innovative technology using staves and micro-oxygenation on the odorant and sensory profile of aged wine spirit[J]. Food Chemistry, 2020, 333: 127−450.

[8] FRANITZA L, GRANVOGL M, SCHIEBERLE P. Characterization of the key aroma compounds in two commercial rums by means of the sensomics approach[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(3): 637−645.

[9] 赵东瑞. 古井贡酒风味物质及酚类风味物质的抗氧化性和抗炎性的研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2019. [ZHAO D R. Research on the aroma compounds of Gujinggong Chinese Baijiu and evaluation of the antioxidant and anti-inflammatory effects of phenolic aroma compounds[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2019.]

[10] ZHAO D R, SUN J Y, SUN B G, et al. Intracellular antioxidant erect of vanillin, 4-methylguaiacol and 4-ethylguaiacol: Three components in Chinese Baijiu[J]. Royal Society Chemistry Advances, 2017, 7(73): 46395−46405.

[11] ZHAO D R, SHI D M, SUN J Y, et al. Quantification and cytoprotection by vanillin, 4-methylguaiacol and 4-ethylguaiacol against AAPH-induced abnormal oxidative stress in HepG2 cells[J]. Royal Society Chemistry Advances, 2018, 8: 35474−35484.

[12] 范文来, 徐岩. 白酒 79 个风味化合物嗅觉阈值测定[J]. 酿酒, 2011, 38(4): 80−84. [FAN W L, XU Y. Determination of odor thresholds of volatile aroma compounds in Baijiu by a forced-choice ascending concentration series method of limits[J]. Liquor Making, 2011, 38(4): 80−84.]

[13] MAYR MARANGON C, DE ROSSO M, CARRARO R, et al. Changes in volatile compounds of grape pomace distillate (Italian grappa) during one-year ageing in oak and cherry barrels[J]. Food Chemistry, 2021, 344: 128658.

[14] ROSAZZA J P N, HUANG Z, DOSTAL L, et al. Review: Biocatalytic transformations of ferulic acid: An abundant aromatic natural product[J]. Journal of Industrial Microbiology, 1995, 15(6): 457−471.

[15] 傅玉书, 胡国栋, 龚书宝. 气相色谱法分析白酒的非挥发性酚类化合物[J]. 色谱, 1985(S1): 111−115. [FU Y S, HU G D, GONG S B. Analysis of non-volatle phenolic compounds in chinese spirits by gas chromatography[J]. Chinese Journal of Chromatography, 1985(S1): 111−115.]

[16] 丁云连. 汾酒特征香气的研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2008. [DING Y L. Studies on characteristic aroma compounds in Fen-Liquor[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2008.]

[17] LOPEZ R A, MARGARITA C, JUAN F V. Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection[J]. Journal of Chromatography A, 2002, 966(1-2): 167−177.

[18] WANG J, YUAN C, GAO X, et al. Characterization of key aroma compounds in Huangjiu from northern China by sensory-directed flavor analysis[J]. Food Research International, 2020, 134: 109−238.

[19] ARTHUR C L, PAWLISZYN J. Solid-phase microextraction with thermal-desorption using fused-silica optical fibers[J]. Analytical Chemistry, 1990, 62(19): 2145−2148.

[20] KOSEKI T, ITO Y, FURUSE S, et al. Conversion of ferulic acid into 4-vinylguaiacol, vanillin and vanillic acid in model solutions of shochu[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1996, 82(1): 46−50.

[21] TURKOZ A E, CELEP M E, CHAREHSAZ M, et al. Development and validation of a high-performance liquid chromatography-diode-array detection method for the determination of eight phenolic constituents in extracts of different wine species[J]. Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences, 2018, 15(1): 22−28.

[22] PAI T V, SAWANT S Y, GHATAK A A, et al. Characterization of Indian beers: Chemical composition and antioxidant potential[J]. Journal of Food Science and Technology, 2015, 52(3): 1414−1423.

[23] CANAS S, DANALACHE F, ANJOS O, et al. Behaviour of low molecular weight compounds, iron and copper of wine spirit aged with chestnut staves under different levels of micro-oxygenation[J]. Molecules, 2020, 25(22): 52−66.

[24] 轻工业部食品发酵研究所发酵室、酒分析小组. 气相色谱法分析白酒的挥发性酚元化合物[J]. 食品与发酵工业, 1980, 6(2): 10−15. [Fermentation chamber and beverage analysis group of the food fermentation Institute of ministry of light industry. Volatile phenols compounds in Baijiu are analyzed by gas chromatography[J]. Food and Fermentation Industries, 1980, 6(2): 10−15.]

[25] 曹长江, 范文来, 聂尧, 等. HS-SPME 同时萃取衍生化定量白酒中反-2-稀醛和二烯醛类化合物[J]. 食品工业科技, 2014,

35(21)：286−290,296.［CAO C J, FAN W L, NIE Y, et al. Quantification of trans-2-alkenals and alkadienals in Chinese liquors by simultaneous extraction/derivatization by HS-SPME coupled with GC-MS-SIM[J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(21)：286−290,296.］

［26］杨亮, 陈双, 徐岩. LLE 和 HS-SPME 与 GC-MS 联用分析酱香型盐菜味缺陷酒中挥发性物质[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(17)：221−226.［YANG L, CHEN S, XU Y. Identification of volatile compounds from pickledmustard-like off-flavor Maotai by LLE and HS-SPME combined with GC-MS[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(17)：221−226.］

［27］尹建邦. 烟台产区蛇龙珠葡萄酒中挥发性香气成分的研究[D]. 无锡：江南大学, 2009.［YIN J B. Free volatile aroma compounds of Cabernet Gernischet wine in Yantai region[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2009.］

［28］沈海月. 酱香型白酒香气物质研究 [D]. 无锡：江南大学, 2010.［SHEN H Y. Studies on aroma compounds of Chinese soy sauce aroma type liquor[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2010.］

［29］尹建邦, 张辉, 孙建平, 等. 沙城产区橡木桶陈酿赤霞珠葡萄酒中橡木香气成分的研究[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2011, 5：30−32.［YIN J B, ZHANG H, SUN J P, et al. Study of volatile oak compounds in oak-aged Cabernet Sauvignon from Shacheng district wine[J]. Sino-Overseas Grapevine & Wine, 2011, 5: 30−32.］

［30］李兰晓, 李记明, 徐岩, 等. 不同类型国产橡木制品对葡萄酒陈酿香气的影响[J]. 食品工业科技, 2015, 36(15)：184−193.［LI L X, LI J M, XU Y, et al. Effect of different types of domestic oak products on wine aging aroma[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(15)：184−193.］

［31］FERREIRA V, RAPP A, CACHO J, et al. Fast and quantitative determination of wine flavor compounds using microextraction with Freon 113[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1993, 41(9)：1413−1420.

［32］赵雅敏, 林琳, 王和玉, 等. 液-液微萃取结合气相色谱-质谱联用技术快速测定饮料酒中挥发性酚类化合物[J]. 分析科学学报, 2018, 34(6)：789−794.［ZHAO Y M, LIN L, WANG H Y, et al. Quantitative analysis of volatile phenols in alcoholic beverages by liquid-liquid microextration coupled with gas chromatography mass spectrometry[J]. Journal of Analytical Science, 2018, 34(6)：789−794.］

［33］ZHU S K, LU X, JI K L, et al. Characterization of flavor compounds in Chinese liquor Moutai by comprehensive two chromatography/time-of-flight mass spectrometry[J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 597(2)：340−348.

［34］陈双, 徐岩. 全二维气相色谱-飞行时间质谱法分析芝麻香型白酒中挥发性组分特征[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(7)：212−218.［CHEN S, XU Y. Characterization of volatile compounds in Chinese roasted sesame-like flavor type liquor by comprehensive two-dimensional gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry[J]. Food and Fermentation Industries, 2017, 43(7)：212−218.］

［35］GOLDBERG D M, HOFFMAN B, YANG J, et al. Phenolic constituents, furans, and total antioxidant status of distilled spirits [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47(10)：3978−3985.

［36］VANBENEDEN N, SAISON D, DELVAU X F, et al. Decrease of 4-vinylguaiacol during beer aging and formation of apocynol and vanillin in beer[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(24)：11983−11988.

［37］GONZALEZ-CENTENO M R, CHIRA K, TEISSEDRE P L. Use of oak wood during malolactic fermentation and ageing: Impact on chardonnay wine[J]. Food Chemistry, 2019, 278: 460−468.

［38］GATES V E, MELOAN C E. Separation of sulfones by gas chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 1963, 11(4)：472−478.

［39］徐杨斌, 侯静林, 章俊, 等. 气相色谱保留指数在定性分析中的应用研究进展[J]. 香料香精化妆品, 2017(3)：59−63.［XU Y B, HOU J L, ZHANG J, et al. Advance in application of gas chromatography retention index in the qualitative analysis[J]. Flavour Fragrance Cosmetics, 2017(3)：59−63.］

［40］孙宝国, 吴继红, 黄明泉, 等. 白酒风味化学研究进展[J]. 中国食品学报, 2015, 15(9)：1−8.［SUN B G, WU J H, HUANG M Q, et al. Recent advances of flavor chemistry in Chinese liquor spirits (Baijiu)[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2015, 15(9)：1−8.］

［41］范文来, 徐岩. 白酒香气物质研究的方法学[J]. 食品科学技术学报, 2018, 36(3)：1−10.［FAN W L, XU Y. Methodology for aroma compounds in Baijiu[J]. Journal of Food Science and Technology, 2018, 36(3)：1−10.］

［42］LEE S J, NOBLE A C. Characterization of odor-active compounds in Californian Chardonnay wines using GC-olfactometry and GC-mass spectrometry[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(27)：8036−8044.

［43］CULLERÉ L, ESCUDERO A, CACHO J, et al. Gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of six premium quality Spanish aged red wines[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(6)：1653−1660.

［44］莫新良, 徐岩, 范文来. 黄酒储存期间 4-乙烯基愈疮木酚和香草醛的变化及其影响因素[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(2)：29−33.［MO X L, XU Y, FAN W L. Evolution of 4-vinylguaiacol and vanillin as well as factors affected its change during the storage of Chinese rice wines[J]. Food and Fermentation Industries, 2016, 42(2)：29−33.］

［45］CHEN S, XU Y, QIAN M C. Comparison of the aromatic profile of traditional and modern types of Huang Jiu (Chinese rice wine) by aroma extract dilution analysis and chemical analysis[J]. Flavour and Fragrance Journal, 2018, 33(3)：263−271.

［46］莫新良, 徐岩, 范文来. 液液微萃取-气相色谱/质谱法测定黄酒麦曲中挥发性酸及香草醛[J]. 分析科学学报, 2015, 31(5)：616−620.［MO X L, XU Y, FAN W L. Determination of volatile-organic acids and vanillin in wheat Qu by liquid liquid microextraction combined with gas chromatography/mass spectrometry[J]. Journal of Analytical Science, 2015, 31(5)：616−620.］

［47］SCHOLTES C, NIZET S, COLLIN S. Guaiacol and 4-methylphenol as specific markers of torrefied malts. Fate of volatile phenols in special beers through aging[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(39)：9522−9528.

[48] 史冬梅, 王松, 赵东瑞, 等. GC-MS/SIM 法检测 103 种白酒中 6 种酚类化合物[J]. 中国食品学报, 2019, 19(4): 235−248. [SHI D M, WANG S, ZHAO D R, et al. Determination of 6 phenols in 103 kinds of Chinese Baijiu by GC-MS/SIM[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(4): 235−248.]

[49] 陈璐, 史冬梅, 何宏魁, 等. 酒醅蒸馏过程中部分挥发性活性成分的变化[J]. 食品科学, 2020, 41(24): 137−143. [CHEN L, SHI D M, HE H K, et al. Changes in some volatile bioactive ingredients of fermented grains of Chinese Baijiu during distillation[J]. Food Science, 2020, 41(24): 137−143.]

[50] AIKEN J, NOBLE A. Comparison of the aromas of oak-and glassaged wines[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 1984, 35(4): 196−199.

[51] BANERJEE G, CHATTOPADHYAY P. Vanillin biotechnology: The perspectives and future[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2019, 99(2): 499−506.

[52] SHARMA A, SHARMA A, INGH J, et al. A biorefnery approach for the production of ferulic acid from agroresidues through ferulic acid esterase of lactic acid bacteria[J]. 3 Biotechnology, 2020, 10(8): 1−10.

[53] HARSHVARDHAN K, SURI M, GOSWAMI A, et al. Biological approach for the production of vanillin from lignocellulosic biomass (Bambusatulda)[J]. Journal of Cleaner Production, 2017, 149: 485−490.

[54] MO X L, XU Y. Ferulic acid release and 4-vinylguaiacol formation during Chinese rice wine brewing and fermentation[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2010, 116(4): 304−311.

[55] PÉREZ-RODRÍGUEZ N, MOREIRA C D, TORRADO A A, et al. Feruloyl esterase production by *Aspergillus terreus* CECT 2808 and subsequent application to enzymatic hydrolysis[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2016, 91: 52−58.

[56] LI J S, LAU Y Q, SUN T Y, et al. Purification and biochemical characterization of an alkaline feruloyl esterase from *Penicillium sumatrense* NCH-S2 using rice bran as substrate[J]. CyTA - Journal of Food, 2021, 19(1): 1−10.

[57] LI F H, DING Z T, CHEN X Z, et al. The effects of *Lactobacillus plantarum* with feruloyl esterase-producing ability or high antioxidant activity on the fermentation, chemical composition, and antioxidant status of alfalfa silage[J]. Animal Feed Science and Technology, 2021, 273: 114835.

[58] CHATTOPADHYAY P, BANERJEE G, SEN S K. Cleaner production of vanillin through biotransformation of ferulic acid esters from agroresidue by *Streptomyces sannanensis*[J]. Journal of Cleaner Production, 2018, 182: 272−279.

[59] TANG P L, HASSAN O. Bioconversion of ferulic acid attained from pineapple peels and pineapple crown leaves into vanillic acid and vanillin by *Aspergillus niger* I-1472[J]. BMC Chemistry, 2020, 14(1): 1−7.

[60] KARODE B, PATIL U, JOBANPUTRA A. Biotransformation of low cost lignocellulosic substrates into vanillin by white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium* NCIM 1197[J]. Indian Journal of Biotechnology, 2013, 12(2): 281−283.

[61] YAN L, CHEN P, ZHANG S, et al. Biotransformation of ferulic acid to vanillin in the packed bed-stirred fermentors[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 34644.

[62] PAZ A D, OUTEIRIÑO R P, DE S O, et al. Fed-batch production of vanillin by *Bacillus aryabhattai* BA03[J]. New Biotechnology, 2018, 40: 186−191.

[63] CHAKRABORTY D, KAUR B, OBULISAMY K, et al. Agrowaste to vanillin conversion by a natural *Pediococcus acidilactici* strain BD16[J]. Environmental Technology, 2017, 38(13-14): 1823−1834.

[64] DI G D, LUZIATELLI F, NEGRONI A, et al. Metabolic engineering of *Pseudomonas fluorescens* for the production of vanillin from ferulic acid[J]. Journal of Biotechnology, 2011, 156(4): 309−316.

[65] 赵煜涵, 郭俊江. 木质素的降解及其应用概述[J]. 胶体与聚合物, 2021, 39(2): 92−94. [ZHAO Y H, GUO J J. Overview of the degradation of lignin and its application[J]. Chinese Journal of Colloid & Polymer, 2021, 39(2): 92−94.]

[66] VIRIOT C, SCALBERT A, LAPIERRE C. Ellagitannins and lignins in aging of spirits in oak barrels[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1993, 41(11): 1872−1879.

[67] COLDEA T E, SOCACIU C, MUDURA E, et al. Volatile and phenolic profiles of traditional Romanian apple brandy after rapid ageing with different wood chips[J]. Food Chemistry, 2020, 320: 126643.

[68] VAN L K A, PRENZLER P D, RYAN D, et al. Differentiation of wood derived vanillin from synthetic vanillin in distillates using GC/C-IRMS for $\delta^{13}C$ analysis[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2018, 32(4): 313−318.

尹舒婷, 姜玉锁, 李强强, 等. 蜂花粉过敏原识别及微生物发酵法降解过敏原的潜在应用研究进展 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 427−434. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021060122

YIN Shuting, JIANG Yusuo, LI Qiangqiang, et al. Advances in Allergen Recognition of Bee Pollen and the Potential Application in Allergen Degradation by Microbial Fermentation[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 427−434. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021060122

· 专题综述 ·

蜂花粉过敏原识别及微生物发酵法降解过敏原的潜在应用研究进展

尹舒婷[1,2], 姜玉锁[2], 李强强[1,*], 吴黎明[1,*]

（1.中国农业科学院蜜蜂研究所, 北京 100093;
2.山西农业大学动物科学学院, 山西晋中 030801）

摘　要: 蜂花粉是蜜蜂从显花植物上采集的花粉粒，并向其中加入花蜜及唾液腺分泌物而形成的团状物。蜂花粉营养物质和活性成分十分丰富，具有极高的药用价值。然而，部分易敏人群因食用蜂花粉产生临床过敏症状，限制了蜂花粉食用安全。然而目前国内外关于蜂花粉的致敏机制研究尚不完善，制约了蜂花粉进一步开发利用。本文通过对近年来国内外关于蜂花粉致敏性及其过敏原识别的相关研究现状进行综述，并对微生物发酵法降解过敏原的潜在应用进行分析讨论，以期为后续开发高效的蜂花粉脱敏技术提供参考。

关键词: 蜂花粉, 过敏反应, 过敏原, 微生物发酵, 脱敏

中图分类号: TS201.1　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0427−08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021060122　　本文网刊:

Advances in Allergen Recognition of Bee Pollen and the Potential Application in Allergen Degradation by Microbial Fermentation

YIN Shuting[1,2], JIANG Yusuo[2], LI Qiangqiang[1,*], WU Liming[1,*]

（1.Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China;
2.College of Animal Science, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, China）

Abstract: Bee pollen is collected from flowering plants and added with nectar and salivary gland secretions by honeybees. Bee pollen is abundant in various nutrients and active ingredients, and exerts excellent medicinal efficacy. However, some susceptible population developed clinical allergic symptoms due to eating bee pollen, which caused serious influences to the food safety and further application of bee pollen. Currently, the research on the allergenic mechanism of bee pollen is insufficient, which limits the utilization of bee pollen. The research advances of bee pollen allergenicity and allergens, as well as the microbial fermentation techniques for allergen degradation are summarized and discussed, aiming to provide a reference for the development of bee pollen allergen removal technology in the future.

Key words: bee pollen; allergenicity; allergens; microbial fermentation; allergen degradation

蜂花粉是蜜蜂从植物雄蕊上和裸子植物小孢子囊内采集的花粉粒, 经过蜜蜂向其中加入花蜜及唾液腺分泌物而形成的团状物, 既可经脱粉器脱落后, 直接或经适当加工后使用, 也可由蜜蜂携带入巢并酿制成蜂粮后, 作为蜜蜂主要的食物来源。蜂花粉以其极为丰富的营养成分在国际上被称为“完全营养品”。随着应用范围的扩大, 因食用蜂花粉而产生过敏症状的病例逐渐增多, 蜂花粉食源性过敏引起的安全问题

收稿日期: 2021−06−17

基金项目: 国家自然科学基金（32102605）。

作者简介: 尹舒婷（1996−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 蜂产品质量安全, Email: yst1206317258@126.com。

*** 通信作者:** 李强强（1991−）, 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 蜂产品质量安全, Email: liqiangqiang@caas.cn。

吴黎明（1973−）, 男, 博士, 研究员, 研究方向: 蜂产品质量安全, Email: apiswu@126.com。

开始引起人们的关注。然而，近年来国内外关于蜂花粉致敏性的研究多集中于风媒花粉混入的鉴别，关于不同植物来源的蜂花粉其自身存在的致敏原识别与分离鉴定研究尚不完善，致敏性仍是蜂花粉食用安全的重要威胁之一，严重制约了蜂花粉安全利用与发展。微生物发酵法在降低食物致敏性方面具有独特优势，未来或可适用于降低蜂花粉致敏性。因此，本文对近年来国内外关于蜂花粉致敏性及其过敏原识别的研究现状进行综述，并对微生物发酵法降解过敏原的潜在应用进行分析讨论，同时对未来通过微生物发酵手段降解或消除蜂花粉中过敏原的研究提出展望。

1 蜂花粉的营养价值与药用功效

蜂花粉是蜜蜂从植物雄蕊上和裸子植物小孢子囊内采集的花粉粒，经过蜜蜂向其中加入花蜜及唾液腺分泌物而形成的团状物，既可经脱粉器脱落后，直接或经适当加工后使用，也可由蜜蜂携带入巢并酿制成蜂粮后，作为蜜蜂的主要食物来源。蜂花粉以其极为丰富的营养成分在国际上被称为“完全营养品”。研究表明，蜂花粉中含有 200 多种营养成分，包括 20 多种游离氨基酸及 11%~35% 的蛋白质，蛋白质中必需氨基酸含量高于 WHO 提出的优质食品氨基酸模式，并且其组成与动物机体中氨基酸的组成极其相似，故蜂花粉拥有极高的食用价值和营养价值[1−3]。此外，蜂花粉中含有大量维生素如 V_{B1}、V_{B2}、烟酸、V_{B6}、V_H、泛酸、叶酸、V_E、肌醇等，以及含有胡萝卜素，可转化为 V_A[4]。花粉中还含有 Ca、Na、K、Fe、Mg、Cu、P、S、Se 等 60 多种矿物质元素[5]，这些元素构成动物机体组织，维持机体平衡和正常生理活动。蜂花粉中还富含脂类物质，包括月桂酸、十四烷酸、亚油酸和不饱和脂肪酸等，对于机体中物质交换、降低血液中胆固醇浓度、以及治疗和预防动脉粥样硬化等有重要的作用[6−8]。蜂花粉中碳水化合物占 25%~48%，主要包括单糖（如葡萄糖和果糖）、双糖（如麦芽糖和蔗糖）和多糖（如淀粉、纤维素和果胶等），具有增强机体免疫等功效[9−11]。

蜂花粉因其丰富的营养价值、繁多的资源品种、极高的研究潜力，近年来已经成为国内外学者探究的热点。经过对蜂花粉的深入研究发现其具有极高的药用功效和食用价值。研究表明，蜂花粉具有较强的抗氧化特性，并且在一定浓度范围内，蜂花粉中的黄酮含量与自由基清除率呈现正相关[12]，其提取物酚类物质具有较好的 DPPH 和 $ABTS^+$ 自由基清除能力[13−14]，而蜂花粉中一些其他物质，如蜂花粉蛋白质也与蜂花粉良好的抗氧化活性有关[15]。蜂花粉对心血管系统有良好的调节作用，可降低血糖血脂、降低血液中胆固醇、预防和治疗动脉粥样硬化[16−19]。蜂花粉还有一定的抗癌抗肿瘤的作用，提高实验动物机体的免疫力，促使免疫细胞增殖，促进淋巴因子和抗体释放，抑制细胞异常生长[20−21]。蜂花粉还可防治前列腺疾病，蜂花粉中多种成分通过多途径、多靶点的机制作用于机体，抑制前列腺增生[22]。

因其拥有诸多营养功效，蜂花粉在畜牧养殖方面也被大量运用。实验证明，日粮添加蜂花粉饲喂产蛋母鸡可提高其产蛋率，降低料蛋比，提高蛋的质量和品质[23]。饲喂肉鸡可促进生长，提高肉鸡肌肉品质，提高饲料转化率[24]。饲喂犊牛可使其生长性能提高，饲料中营养转化率提高[25]。蜂花粉里的多种活性物质可提高畜禽的免疫指数，增强免疫功能[26]。大量实验证明了蜂花粉作为饲料添加剂的卓越性和可行性，蜂花粉在畜牧养殖业的应用越来越广泛。

2 蜂花粉过敏原因及过敏原识别

2.1 蜂花粉过敏原因调查

据早期研究报道，约有 1/10000~1/20000 的人在食用蜂花粉或蜂花粉制品后会出现轻微过敏症状[27]。然而，近年来越来越多的蜂花粉过敏病例被报道出来。Martín 等[28] 报道了一例鼻炎患者摄取蜂花粉后发生过敏反应的病例，研究者在蜂花粉中检测出菊科和蔷薇科植物花粉，特异性 IgE 测定显示菊科植物花粉的血清特异性 IgE 水平最高，并且由于菊科植物花粉存在交叉反应性，研究者认为过敏反应最可能来源于菊科植物花粉中的过敏原。Jeong 等[29] 报道了一例相似病例，研究人员镜检蜂花粉后也在其中发现菊科类植物花粉，蜂花粉与菊科类植物同样具有较强的交叉反应性，但并未有明确证据证明过敏原仅菊类植物花粉，患者可能对蜂花粉和其他植物花粉产生了共敏反应。Nonotte 等[30] 报道过一名有艾蒿过敏史的患者因食用混有艾蒿花粉的蜂花粉而引发过敏反应，皮肤点刺试验表明该患者的皮肤过敏反应与蜂花粉中所含艾蒿花粉的质量成正比。随后，研究者们对 10 名禾本植物花粉过敏患者进行混有玉米花粉的蜂花粉皮肤点刺试验，患者的皮肤过敏反应与蜂花粉中禾本植物绝对质量成正比。Greenberger 等[31] 首次报道了一名接受了过敏原免疫治疗并获得成功的患者，第一次摄入蜂花粉时发生了过敏症状，显微分析发现食用的蜂花粉中含有豚草类和藤本植物花粉，酶联免疫实验证明蜂花粉与短豚草和黑麦草花粉之间存在交叉反应性。但诸多实验未证明掺杂的风媒植物花粉是否为单一过敏原，因此进一步探究蜂花粉中的过敏原组成是十分必要的。

此外，机体本身的状态发生变化也可能是蜂花粉致敏的原因之一，一例食用蜂花粉后因运动诱发过敏反应的病例，患者此前摄入蜂花粉并无过敏症状，他在跑步前食用了蜂花粉补充剂，后剧烈跑步中出现过敏症状，皮肤点刺实验显示其对蜂花粉补充剂为阳性，推测是蜂花粉中存在豚草花粉或其他杂草花粉。运动诱发过敏的机制可能是运动增加肠胃通透性或渗透效应来降低肥大细胞脱粒的阈值[32]。Akiyasu 等[33] 报道了首例摄入含蜂花粉的营养补充剂后发生急性肾衰竭的病例，该病人无过敏史和其他病症，食

用营养补充剂五个月后出现急性肾衰竭症状，研究者通过药物淋巴细胞刺激试验（DLST）排除补充剂中另一成分诺丽果的作用，活检显示肾小球无增生，散在白细胞尤其是嗜酸性粒细胞间质发生弥漫性纤维化和细胞浸润，认为蜂花粉导致了药物性肾脏疾病。由于此前并无此类病例的报道，关于蜂花粉副作用的信息不准确，因此摄入之前应该有相应风险评估和提醒[34]。

而部分学者则发现，蜂花粉中含有黄酮类和脂类成分具有抗过敏作用。Medeiros 等[35] 将蜂花粉中酚提取物（BPPE）中的黄酮类化合物作用于卵清蛋白诱导的小鼠过敏模型，分析小鼠免疫参数，发现 BPPE 抑制了足爪水肿和特异性抗体 IgE、IgG_1 的产生、降低了支气管液中白细胞的总数和促红细胞生成素的水平，抑制细胞向肺腔迁移，降低小鼠过敏性休克引起的死亡率。得出结论，蜂花粉中黄酮类成分对改善变态反应是有效的，具有抗过敏作用。另有实验发现，小鼠每日口服蜂花粉可降低特异性抗体 IgE 的产生，同时也发现蜂花粉中的脂溶性成分可通过抑制 FcεRI 介导的肥大细胞激活发挥抗过敏作用[36]。尽管蜂花粉中含有黄酮类和脂类抗敏性成分，但蜂花粉致敏问题仍然是影响蜂花粉食用安全和制约开发利用的重要共性难题。

由此可见，蜂花粉致敏的主要原因可归结为以下四点：a.具有过敏史或过敏体质人群在食用蜂花粉后易产生过敏风险；b.蜂花粉中若混入致敏性风媒花粉可能导致食用人群产生过敏反应；c.对于无过敏史或非过敏体质人群来说，若机体免疫状态发生了变化，在食用蜂花粉后仍存在致敏风险；d.蜂花粉中混入的致敏性风媒花粉并非唯一过敏原，蜂花粉本身也可能存在多种致敏成分。然而，目前关于蜂花粉本身过敏原的研究十分有限，使对蜂花粉的质量安全控制及进一步开发利用难度增加。

2.2　蜂花粉过敏原识别

目前国内外诸多研究认为，绝大多数蜂花粉引起的过敏反应是由致敏性风媒花粉，如豚草等禾本植物花粉，及桦树等木本植物花粉中过敏原的混入导致的。花粉过敏原通常是分子量为 10~70 kDa 的糖蛋白或水溶性蛋白质[37]，并且不同植物来源的花粉中致敏蛋白的种类和数量有所不相同。近年来，科学家利用免疫印迹法（Western-blotting）、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法（SDS-PAGE）等已从豚草花粉中鉴定提取出 12 种过敏原[38−39]，从桦树花粉中鉴定出 7 种过敏原[40]（见表 1），这为蜂花粉后续过敏原研究提供了一定的科学依据。

蜂花粉中除了致敏性风媒花粉的混入导致易感人群产生过敏反应外，其自身植物源花粉同样存在致敏风险。以我国最大宗蜂花粉——油菜蜂花粉为例，其自身植物源花粉（油菜花粉）也存在多种过敏原[41−42]。Puumalainen 等 [41] 利用 SDS-PAGE、酶联免疫法（ELISA），并结合基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术（MALDI-TOF）从芥菜型油菜（*Brassica juncea*）、甘蓝型油菜（*Brassica napus*、*Brassica oleifera*）、白菜型油菜（*Brassica rapa* ）花粉中鉴定出 6 种过敏原（见表 2）。Singh 等[42] 利用 SDS-PAGE 结合 ELISA 和免疫印迹法（Western blot）从白菜型油菜（*Brassica campestris*）、甘蓝型油菜（*Brassica napus*）、芥菜型油菜（*Brassica juncea*）和黑芥（*Brassica nigra*）花粉

表 1　豚草花粉（*Ambrosia artemisiifolia*）和桦树花粉（*Betula verrucosa*）中已鉴定出的过敏原[38,40]

Table 1　Identified allergens in *Ambrosia artemisiifolia* and *Betula verrucose* pollens[38,40]

过敏原	化学名称	分子量（kDa）
Ambrosia artemisiifolia		
Amb a 1	Pectate lyase	38
Amb a 2	renamed to Amb a 1.05, number not available for future submissions	–
Amb a 3	Plastocyanine	11
Amb a 4	Defensin-like protein linked to polyproline-rich region	28~30
Amb a 5	–	5
Amb a 6	Non-specific lipid transfer protein type 1	10
Amb a 7	Plastocyanin	12
Amb a 8	Profilin	14
Amb a 9	Polcalcin	9
Amb a 10	Polcalcin-like protein（4 EF-hands）	17
Amb a 11	Cysteine protease	37 kDa（natural purified mature protein），52 kDa（natural purified zymogen）
Amb a 12	Enolase	48
Betula verrucosa		
Bet v 1	Pathogenesis-related protein, PR-10, Bet v 1 family member	17
Bet v 2	Profilin	15
Bet v 3	Polcalcin-like protein（4 EF-hand）	24
Bet v 4	Polcalcin	7~8
Bet v 6	PhenylCoumaran benzylic ether reductase	35
Bet v 7	Cyclophilin	18
Bet v 8	Glutathione-S-transferase	27

表 2 油菜花粉中已鉴定出的过敏原[41]

Table 2 Identified allergens in *Brassica napus* pollen[41]

过敏原	化学名称	分子量(kDa)
Brassica		
Bra j 1	2S albumin seed storage protein	14
Bra n 1	2S albumin seed storage protein	15
Bra o 3	Non-specific lipid transfer protein type 1	9
Bra r 1	2S albumin, napins	10~14
Bra r 2	Prohevein homologue	25
Bra r 5	Polcalcin	8

中测定出分子量为 15~90 kDa 的 8 种致敏蛋白质，但并未鉴定出其致敏蛋白的氨基酸序列而无法进一步研究其致敏属性。近期，笔者团队基于蛋白质组学分析技术，从油菜蜂花粉中检出了一种已知的油菜花粉过敏原即 Polcalcin(Bra r 5)，而其余 5 种已知过敏原尚未检出。但基于与其他植物中致敏蛋白(如 Profilin 家族、Oleosin 家族等)同源序列比对后发现，油菜蜂花粉中仍存在诸多同源性较高的未知潜在过敏原。此外，不同植物来源蜂花粉中过敏原种类和数量均有不同。目前国内外对蜂花粉自身植物源花粉的过敏原研究尚不完善。基于以往对致敏性风媒花粉过敏原研究技术，未来可对不同植物来源蜂花粉的过敏原识别进行更深入的探索。

3 微生物发酵干预食物致敏性研究

诸如蜂花粉等食物类引起的食源性过敏已经成为亟待解决的全球性问题，如何使用安全卫生科学有效的手段降低食物致敏性是学者们近年来关注的热点。为此科学家们提出许多加工手段以期从食物本身源头性降低致敏威胁[43]。其中发酵法在降低食物致敏性中具有独特的优势，它通过微生物代谢水解蛋白质过敏原[44]。同时，发酵提高了食品原料的营养价值和理化性质[45−46]。不少研究使用微生物发酵法将食物中的致敏蛋白分解变性，以达到降低或消除过敏原的目的，而不同食物选用合适的菌种、温度、配比和时间可将致敏性降至较低水平甚至消除。微生物发酵技术在之前的研究中曾被用于改善蜂花粉的口感、风味和营养价值[47]，但目前并未研究其是否作用于蜂花粉过敏原的降解。

由于蜂花粉来源于植物花粉，蜂花粉中部分致敏蛋白与植物类食物中致敏蛋白存在共性。笔者团队目前的关于蜂花粉过敏原的研究中发现蜂花粉中致敏蛋白主要来源于 Profilin、Oleosin 等家族(数据尚未公开发表)。而植物类食物中的一部分致敏蛋白同样来源于这些致敏家族，致敏蛋白之间存在一定的同源性和氨基酸序列相似性。因此，利用微生物发酵改善植物类食物的食源致敏性可为微生物发酵改善蜂花粉致敏性的研究提供依据。以下将对一些较普遍的植物类致敏性食物中过敏原的微生物发酵降解技术进行概述与分析，希望从中找到微生物发酵降解食物过敏原的共性与规律，为后续微生物发酵降解蜂花粉中过敏原的方法开发提供技术支持。

3.1 微生物发酵降解花生中的过敏原

关于花生中的致敏蛋白目前已发现 17 种(见表 3)，包括 Ara h1~Ara h18(Ara h4 更名为 Ara h3.02)[48]，其中 Ara h1、Ara h2、Ara h3 和 Ara h6 为主要致敏蛋白，可引起大部分敏感人群产生过敏反应[49]。周阳[50]利用间接酶联免疫法检测发酵对花生蛋白致敏性的影响，研究发现，使用枯草芽孢杆菌发酵花生样品在前 8 h 样品与 IgE 结合能力缓慢上升，而 8 h 后则显著下降，至 44 h 时，样品与 IgE 结合能力降为 0，Ara h1

表 3 花生中已鉴定出的过敏原[48]

Table 3 Identified allergens in peanut[48]

过敏原	化学名称	分子量(kDa)
Arachis hypogaea (Peanut, groundnut)		
Ara h 1	Cupin (Vicillin-type, 7S globulin)	64
Ara h 2	Conglutin (2S albumin)	17
Ara h 3	Cupin (Legumin-type, 11S globulin, Glycinin)	60, 37 (fragment)
Ara h 4	Renamed to Ara h 3.02,number not available for future submissions	–
Ara h 5	Profilin	15
Ara h 6	Conglutin (2S albumin)	15
Ara h 7	Conglutin (2S albumin)	15
Ara h 8	Pathogenesis-related protein, PR-10, Bet v 1 family member	17
Ara h 9	Nonspecific lipid-transfer protein type 1	9.8
Ara h 10	Oleosin	16
Ara h 11	Oleosin	14
Ara h 12	Defensin	8 kDa (reducing), 12 kDa (non-reducing), 5.184 kDa (mass)
Ara h 13	Defensin	8 kDa (reducing), 11 kDa (non-reducing), 5.472 kDa (mass)
Ara h 14	Oleosin	17.5
Ara h 15	Oleosin	17
Ara h 16	Non-specific Lipid Transfer Protein 2	8.5 kDa by SDS PAGE reducing
Ara h 17	Non-specific Lipid Transfer Protein 1	11 kDa by SDS-PAGE reducing
Ara h 18	Cyclophilin - peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	21

蛋白含量为 0，很可能使花生完全脱敏；使用纳豆芽孢杆菌发酵样品，44 h 内与 IgE 结合能力逐渐下降，但降低幅度有限，最多降低 48%，纳豆芽孢杆菌发酵也能使 Ara h1 蛋白含量显著下降。皮潇文[51]将花生浆样品高温蒸汽处理后用纳豆芽孢杆菌发酵，花生样品的总体致敏性最高可降低 77.3%，纳豆芽孢杆菌发酵可产生大量蛋白酶，将花生中大部分致敏蛋白分解为小分子，而无法完全消除可能是因为小分子物质仍保留特异性 IgE 结合位点。花生中存在来自 Profilin 家族和 Oleosin 家族的致敏蛋白，与笔者团队所研究得到的蜂花粉中潜在的致敏蛋白具有同源性，因此以上对花生中致敏蛋白的降解方法可能适用于蜂花粉中的致敏蛋白，具体发酵工艺及降解机制需进一步探究。

3.2　微生物发酵降解豆类中的过敏原

大豆营养丰富，蛋白质的氨基酸组成和动物蛋白质相似，氨基酸比例接近人体，易于机体消化吸收，是重要的粮食作物之一，同时也是目前八大致敏食物之一，大豆中目前鉴定出 16 种抗原蛋白，IUIS 命名的有 8 种（见表 4），主要过敏原为两种储藏蛋白即大豆球蛋白和 β-伴大豆球蛋白[52−53]。豆粕是大豆抽取豆油后的产物，豆粕中存在大豆过敏蛋白，影响机体对豆粕中营养物质的吸收和利用，发酵法是豆粕加工中常用的方法，而多菌种混合发酵更优于单菌种发酵[54]。赖晗等[55]用枯草芽孢杆菌、干酪乳杆菌和酵母菌混合发酵，混合比例为 2∶1∶1，温度 30 ℃，接种量为发酵物总量的 12%，优先将枯草芽孢杆菌发酵 24 h 后加入干酪乳杆菌和乳酸菌继续发酵 48 h，SDS-PAGE 电泳评估显示豆粕中致敏蛋白含量显著降低。Yang 等[56]使用同样的发酵方法，豆粕样品与 IgE 结合能力显著降低，研究者认为微生物使大豆蛋白降解为低分子多肽，破坏致敏蛋白序列，从而降低其致敏性。大豆中存在来自 Profilin 家族的致敏蛋白，与蜂花粉中致敏蛋白具有同源性，因此在未来研究中可借鉴上述发酵工艺用以降解蜂花粉中的致敏蛋白。

表 4　大豆中已鉴定出的过敏原[52−53]
Table 4　Identified allergens in soybean[52−53]

过敏原	化学名称	分子量(kDa)
Glycine max（Soybean）		
Gly m 1	Hydrophobic protein from soybean	7
Gly m 2	Defensin	8
Gly m 3	Profilin	14
Gly m 4	Pathogenesis-related protein, PR-10, Bet v 1 family member	17
Gly m 5	Beta-conglycinin（vicilin, 7S globulin）	subunits
Gly m 6	Glycinin（legumin, 11S globulin）	subunits
Gly m 7	Seed biotinylated protein	76.2
Gly m 8	2S albumin	28

3.3　微生物发酵降解小麦中的过敏原

小麦致敏较复杂，不同的小麦品种过敏原不同，致敏机制不同，而引起的症状也不同，小麦中蛋白按溶解度的不同分为四类：清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白和麦谷蛋白，是小麦过敏原的来源[57]。IUIS 命名的过敏原有 28 种（见表 5），其中 Tri a 19 是小麦主要过敏原，Tri a 14 可引起面包师哮喘症，Tri a 25 是一种硫氧化蛋白，虽然被 IUIS 命名委员会收录为过敏原，但有研究表明，硫氧化蛋白可缓解过敏反应，因此 Tri a 25 的过敏原性存在一定争议[58]。李玺等[59]用酵母菌发酵面团，发酵初期面筋蛋白交联结构改变，二硫键含量降低，过敏原性增加，随着时间的延长，发酵产生的酒精溶解大量醇溶蛋白，以及蛋白酶分解面团中蛋白，小麦结构被破坏，致敏性降低。Carlo 等[60]探究酵母乳酸菌水解小麦和黑麦过敏原的能力，研究发现发酵导致样品面包中与 IgE 结合的低分子量蛋白/多肽的含量显著减少，推测是发酵产生的消化酶将 IgE 结合蛋白水解，使小麦致敏性下降。小麦中存在来自 Thioredoxin 家族、Profilin 家族的致敏蛋白，与蜂花粉中致敏蛋白具有同源性，因此以上对小麦中致敏蛋白的发酵降解工艺可为后续开发蜂花粉致敏蛋白的降解技术提供参考。

表 5　小麦中已鉴定出的过敏原[54−55]
Table 5　Identified allergens in wheat[54−55]

过敏原	化学名称	分子量（kDa）
Triticum aestivum（Wheat）		
Tri a 12	Profilin	14
Tri a 14	Non-specific lipid transfer protein 1	9
Tri a 15	Monomeric alpha-amylase inhibitor 0.28	–
Tri a 17	Beta-amylase	56
Tri a 18	Agglutinin isolectin 1	–
Tri a 19	Omega-5 gliadin, seed storage protein	65
Tri a 20	Gamma gliadin	35 to 38
Tri a 21	Alpha-beta-gliadin	–
Tri a 25	Thioredoxin	–
Tri a 26	High molecular weight glutenin	88
Tri a 27	Thiol reductase homologue	27
Tri a 28	Dimeric alpha-amylase inhibitor 0.19	13
Tri a 29	Tetrameric alpha-amylase inhibitor CM1/CM2	13
Tri a 30	Tetrameric alpha-amylase inhibitor CM3	16
Tri a 31	Triosephosphate-isomerase	–
Tri a 32	1-cys-peroxiredoxin	–
Tri a 33	Serpin	–
Tri a 34	Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase	–
Tri a 35	Dehydrin	–
Tri a 36	Low molecular weight glutenin GluB3-23	40
Tri a 37	Alpha purothionin	12
Tri a 39	Serine protease inhibitor-like protein	–
Tri a 40	Chloroform/methanol-soluble（CM）17 protein [alpha-amylase inhibitor]	15.96
Tri a 41	Mitochondrial ubiqutin ligase activator of NFKB1	–
Tri a 42	Hypothetical protein from cDNA	–
Tri a 43	Hypothetical protein from cDNA	–
Tri a 44	Endosperm transfer cell specific PR60 precursor	–
Tri a 45	Elongation factor 1（EIF1）	–

4　展望

蜂花粉具有极高的营养价值和药用功效，然而

蜂花粉致敏问题成为威胁其食用安全的主要因素之一。国内外学者对蜂花粉致敏性研究目前多集中于风媒花粉混入的鉴别中，而关于不同植物来源的蜂花粉中过敏原的识别研究尚不完善，严重制约蜂花粉的质量安全控制与深加工利用。加强蜂花粉中过敏原的分离鉴定，深入研究其致敏机理，可为蜂花粉脱敏技术开发提供理论基础。

微生物发酵技术作为一种安全健康有效的食品加工技术，目前已广泛应用于诸多过敏食物的致敏蛋白降解中，并且已经取得了较为可观的成效。芽孢杆菌、酵母菌、乳酸菌等多用于发酵植物类食物，降解其过敏原，降低致敏性。蜂花粉中存在与其他植物类食物（如花生、大豆、小麦等）相同致敏家族的过敏原，如 Profilin 家族、Oleosin 家族、Thioredoxin 家族等，因此植物类致敏蛋白与蜂花粉致敏蛋白之间存在一定的同源性与氨基酸序列相似性。通过微生物发酵降解植物类食物中过敏原的研究，可为后续开发利用微生物发酵降解蜂花粉中过敏原的技术提供一定的依据与指导。在未来研究中，建立降低或消除蜂花粉过敏原的微生物发酵法，以及探究微生物发酵对蜂花粉中过敏原的降解机制，将对蜂花粉的安全利用发挥重要作用。

参考文献

[1] 牛德芳, 王波, 陈玉勇, 等. 油菜蜂花粉及其蜂粮的营养成分[J]. 食品工业科技, 2019, 40(9): 218−223. [NIU D F, WANG B, CHEN Y Y, et al. Analysis of the nutrient of rape bee pollen and rape bee bread[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(9): 218−223.]

[2] LI Q Q, WANG K, MARCUCCI M C, et al. Nutrient-rich bee pollen: A treasure trove of active natural metabolites[J]. Journal of Functional Foods, 2018, 49: 472.

[3] KHALIFA S A M, ELASHAL M H, YOSRI N, et al. Bee pollen: Current status and therapeutic potential[J]. Nutrients, 2021, 13(6): 1876.

[4] 赵国建, 赵悦菡, 徐悦, 等. 蜂花粉营养活性成分研究进展[J]. 特产研究, 2020, 42(2): 90−94. [ZHAO G J, ZHAO Y H, XU Y, et al. Research progress on components of bee pollen and its pharmacological activity[J]. Special Wild Economic Animal and Plant Research, 2020, 42(2): 90−94.]

[5] 曾志将, 谢国秀, 樊兆斌. 蜜蜂花粉中矿物质元素形态研究[J]. 蜜蜂杂志, 2004(8): 3−4. [ZENG Z J, XIE G X, FAN Z B. Study on the element speciation analysis in honeybee pollen[J]. Journal of Bee, 2004(8): 3−4.]

[6] 李志, 李琳, 石晓峰. 油菜花粉化学成分和药理作用的研究进展[J]. 甘肃医药, 2018, 37(5): 394−398. [LI Z, LI L, SHI X F. Research progress of chemical constituents and pharmacological effects of rape pollen[J]. Gansu Medical Journal, 2018, 37(5): 394−398.]

[7] NAGAI T, INOUE R, INOUE H, et al. Scavenging capacities of pollen extracts from *Cistus ladaniferus* on autoxidation, superoxide radicals, hydroxyl radicals, and DPPH radicals[J]. Nutrition Research, 2002, 22(4): 519−526.

[8] 潘建国, 段怡, 吴惠勤, 等. 油菜蜂花粉中脂肪酸的 GC-MS 分析[J]. 分析测试学报, 2003(1): 74−76. [PAN J G, DUAN Y, WU H Q, et al. Analysis of fatty acids in rape pollen by GC-MS[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2003(1): 74−76.]

[9] ZHU L Y, LI J, WEI C H, et al. A polysaccharide from *Fagopyrum esculentum* Moench bee pollen alleviates microbiota dysbiosis to improve intestinal barrier function in antibiotic-treated mice[J]. Food Funct, 2020, 11: 10519−10533.

[10] 王博. 八种蜂花粉多糖的分析及抗肿瘤活性研究 [D]. 长春: 东北师范大学, 2013. [WANG B. Structure analysis of polysaccharides from eight types of bee pollen and their antitumor activities[D]. Changchun: Northeast Normal University, 2013.]

[11] RZEPECKA-STOJKO A, STOJKO J, KUREK-GÓRECKA A, et al. Polyphenols from bee pollen: Structure, absorption, metabolism and biological activity[J]. Molecules, 2015, 20(12): 21732−21749.

[12] 雷润梅, 旦增诺宗, 刘睿, 等. 油菜蜂花粉酚类物质的抗氧化能力比较[J]. 食品科技, 2017, 42(10): 223−229. [LEI R M, DAN Z N Z, LIU R, et al. Comparison of antioxidant activity of phenolic compounds from rape bee comparison of antioxidant activity of phenolic compounds from rape bee pollen[J]. Food Science and Technology, 2017, 42(10): 223−229.]

[13] 徐元元, 王悦, 杨二林, 等. 3 种蜂花粉酚类化合物组成及抗氧化活性研究[J]. 西北大学学报 (自然科学版), 2021, 51(2): 303−313. [XU Y Y, WANG Y, YANG E L, et al. Phenolic composition and antioxidant activities of three kinds of bee pollen[J]. Journal of Northwest University (Natural Science Edition), 2021, 51(2): 303−313.]

[14] 李奉. 荞麦蜂花粉中化学成分研究 [D]. 西安: 西北大学, 2018. [LI Z. Chemical constituents from *F. esculentum* bee pollen[D]. Xi'an: Northwest University, 2018.]

[15] 邓建军, 杨海霞, 曹炜, 等. 油菜蜂花粉蛋白的分离提取及其抗氧化活性[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(10): 218−222. [DENG J J, YANG H X, CAO W, et al. Study on extraction and antioxidant activity analysis of rape bee pollen protein[J]. Food and Fermentation Industries, 2011, 37(10): 218−222.]

[16] ATTLA Y A, HANOUN A E, DIN F, et al. Effect of bee pollen levels on productive, reproductive and blood traits of NZW rabbits[J]. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl), 2011, 95(3): 294−303.

[17] HABIB F K, ROSS M, BUCK A C, et al. *In vitro* evaluation of the pollen extract, cernitin T-60, in the regulation of prostate cell growth[J]. Br J Urol, 1990, 66: 393−397.

[18] 彭国霞. 茶花粉的抗氧化、保肝及其降血糖功能的研究 [D]. 西安: 西北大学, 2018. [PENG G X. Research on the antioxidant, hepatoprotective and hypolycemic of *Camellia japonica* bee pollen[D]. Xi'an: Northwest University, 2018.]

[19] ANNA R S, AGATA K D, ROBERT K, et al. Protective effect of polyphenol-rich extract from bee pollen in a high-fat diet[J]. Molecules, 2018, 23(4): 805.

[20] 褚珊珊, 左绍远. 蜂花粉多糖生物活性研究进展[J]. 蜜蜂杂志, 2018, 38(7): 8−10. [CHU S S, ZUO S Y. Research progress on the bioactivity of polysaccharide from bee pollen[J]. Journal of

Bee, 2018, 38(7): 8−10.]
[21] TANATORN S, PAPASSARA S, PIROONPORN S, et al. Hydrolysates from bee pollen could induced apoptosis in human bronchogenic carcinoma cells (ChaGo-K-1)[J]. J Food Sci Technol, 2021, 58: 752−763.
[22] 郭欣欣. 油菜蜂花粉抗前列腺增生的机制及其临床研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2019. [GUO X X. Study on the mechanism and clinical of rape bee pollen against benign prostatic hyperplasia[D]. Shanghai: Shanghai JiaoTong University, 2019.]
[23] 杜迎雪, 刘振国, 张卫星, 等. 饲粮添加油菜蜂花粉对芦花鸡生产性能、蛋品质和血清生化指标的影响[J]. 动物营养学报, 2019, 31(6): 2915−2926. [DU Y X, LIU Z G, ZHANG W X, et al. Effects of dietary rape bee pollen on performance, egg quality and serum biochemical indexes of Luhua hens[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2019, 31(6): 2915−2926.]
[24] 廖吕燕, 陈小权, 李健, 等. 油菜花粉超微粉对肉鸡生长性能、血液生化、激素指标和屠宰性能的影响[J]. 中国兽医学报, 2018, 38(11): 2181−2187. [LIAO L Y, CHEN X Q, LI J, et al. Effects of ultramicro powder from rape bee pollen on growth performance, serum biochemical parameters, serum hormones and slaughter trait of broiler chickens[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2018, 38(11): 2181−2187.]
[25] 张国锋, 刁其玉, 屠焰, 等. 蜂花粉及其多糖对犊牛体增质量、物质消化与血清指标的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2010, 41(8): 981−987. [ZHANG G F, DIAO Q Y, TU Y, et al. Effects of bee pollen and its polysaccharides on growth performance, nutrient digestibility and serum[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2010, 41(8): 981−987.]
[26] 廖吕燕, 陈小权, 李健, 等. 油菜花粉超微粉对肉鸡免疫功能和抗氧化能力的影响[J]. 中国兽医学报, 2018, 38(12): 2398−2403. [LIAO L Y, CHEN X Q, LI J, et al. Effects of rape pollen ultramicro powder on immune function and antioxidant capacity of broiler chickens[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2018, 38(12): 2398−2403.]
[27] 魏文挺, 郑火青, 胡福良. 蜂花粉过敏研究进展[J]. 中国蜂业, 2011, 62(Z3): 46−49. [WEI W T, ZHENG H Q, HU F L. Advances in anaphylaxis of bee pollen[J]. Apiculture of China, 2011, 62(Z3): 46−49.]
[28] MARTÍN-MUÑOZ M F, BARTOLOME B, CAMINOA M, et al. Bee pollen: A dangerous food for allergic children. Identification of responsible allergens[J]. Allergologia et Immunopathologia, 2010, 38(5): 263−265.
[29] JEONG-HEE C, YOUNG-SOOK J, JAE-WON O, et al. Bee pollen-induced anaphylaxis: A case report and literature review[J]. Allergy Asthma Immunol Res, 2015, 7(5): 513−517.
[30] NONOTTE-VARLY C. Allergenicity of artemisia contained in bee pollen is proportional to its mass[J]. Eur Ann Allergy Clin Immunol, 2015, 47: 218−224.
[31] GREENBERGER P A, FLAIS M J. Bee pollen-induced anaphylactic reaction in an unknowingly sensitized subject[J]. Annals of Allergy Asthma & Immunology, 2001, 86(2): 239−242.
[32] MCNAMARA K B, PIEN M L. Exercise-induced anaphylaxis is associated with the use of bee pollen[J]. Annals of Allergy, Asthma & Immunology, 2019, 122(1): 118−119.
[33] AKIYASU T, PAUDYAL B, PAUDYAL P, et al. A case report of acute renal failure associated with bee pollen contained in nutritional supplements[J]. Ther Apher Dial, 2010, 14(1): 93−97.
[34] PITSIOS C, CHLIVA C, MIKOS N, et al. Bee pollen sensitivity in airborne pollen allergic individuals[J]. Annals of Allergy Asthma & Immunology, 2006, 97(5): 703−706.
[35] MEDEIROS K, FIGUEIREDO C, FIGUEREDO T B, et al. Anti-allergic effect of bee pollen phenolic extract and myricetin in ovalbumin-sensitized mice[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2008, 119(1): 41−46.
[36] ISHIKAWA Y, TOKURA T, USHIO H, et al. Lipid-soluble components of honeybee-collected pollen exert antiallergic effect by inhibiting IgE-mediated mast cell activation *in vivo*[J]. Phytother Res, 2009, 23(11): 1581−1586.
[37] 陈森林. 植物花粉过敏原的起源进化和功能预测 [D]. 上海: 上海交通大学, 2016. [CHEN M L. Origin and functional prediction of pollen allergens in plants[D]. Shanghai: Shanghai JiaoTong University, 2016.]
[38] 刘玲, 肖小军, 李兵, 等. 三裂叶豚草花粉致敏蛋白组分的分离、纯化及鉴定[J]. 中华临床免疫和变态反应杂志, 2014, 8(1): 15−17, 90. [LIU L, XIAO X J, LI B, et al. Isolation, purification, and identification of allergens of *Ambrosia trifida* pollen[J]. Chinese Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2014, 8(1): 15−17, 90.]
[39] CHEN K W, MARUSCIAC L, TAMAS P T, et al. Ragweed pollen allergy: Burden, characteristics, and management of an imported allergen source in Europe[J]. Int Arch Allergy Immunol, 2018, 176: 163−180.
[40] IPSEN H, LOWENSTEIN H. Isolation and immunochemical characterization of the major allergen of birch pollen (*Betula verrucosa*)[J]. J Allergy Clin Immunol, 1983, 72(2): 150−159.
[41] PUUMALAINEN T J, POIKONEN S, KOTOVUORI A, et al. Napins, 2S albumins, are major allergens in oilseed rape and turnip rape[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2006, 117(2): 426−432.
[42] SINGH A, SHAHI S, KATIYAR R K, et al. Hypersensitivity to pollen of four different species of brassica: A clinico-immunologic evaluation in patients of respiratory allergy in India[J]. Asia Pacific Allergy, 2014, 4(4): 197−205.
[43] 黄婷, 布冠好, 陈复生. 食物蛋白过敏原及其脱敏方法的研究进展[J]. 粮食与油脂, 2015, 28(8): 4−7. [HUANG T, BU G H, CHEN F S. Research progress in protein allergens in food and the methods of reducing allergenicity[J]. Cereals & Oils, 2015, 28(8): 4−7.]
[44] PI X, YANG Y, SUN Y, et al. Recent advances in alleviating food allergenicity through fermentation[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2021(1): 1−14.
[45] CHEN L, SONG P, JIA F, et al. Reducing the allergenicity from food by microbial fermentation[J]. Advanced Materials Research, 2012: 524−527.
[46] EL-GHAISH S, AHMADOVA A, HADJI-SFAXI I, et al. Potential use of lactic acid bacteria for reduction of allergenicity and

for longer conservation of fermented foods[J]. Trends in Food Science & Technology, 2011, 22(9): 509−516.

[47] YAN S, LI Q Q, XUE X F, et al. Analysis of improved nutritional composition of bee pollen (*Brassica campestris* L.) after different fermentation treatments[J]. International Journal of Food Science & Technology, 54(6): 2169-2181.

[48] PI X W, WAN Y, YANG Y L, et al. Research progress in peanut allergens and their allergenicity reduction[J]. Trends in Food Science & Technology, 2019, 93: 212−220.

[49] 刘胜男, 孟继秋, 王珊, 等. 花生致敏蛋白免疫学检测方法研究进展[J]. 粮食与油脂, 2020, 33(11): 14−16. [LIU S N, MENG J Q, WANG S, et al. Research progress on immunological methods in peanut allergenic proteins detection[J]. Cereals & Oils, 2020, 33(11): 14−16.]

[50] 周阳. 微生物发酵对花生蛋白中致敏因子的影响研究 [D]. 郑州: 河南工业大学, 2014. [ZHOU Y. Effect of microbial fermentation on the allergens in peanut protein[D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2014.]

[51] 皮潇文. 高压蒸汽处理联合纳豆芽孢杆菌发酵对花生过敏性及其理化指标的影响 [D]. 南昌: 南昌大学, 2019. [PI X W. Effects of autoclaving combined with fermentation by *Bacillus nattoon* the allergenicity, physical and chemical properties of peanut [D]. Nanchang: Nanchang University, 2019.]

[52] 李堂昊, 布冠好, 陈复生. 大豆主要过敏原 β-伴大豆球蛋白及其抗原表位的研究进展[J]. 大豆科学, 2019, 38(5): 806−812. [LI T H, BU G H, CHEN F S. Development in major allergen β-conglycinin and its antigen epitopes of soybean[J]. Soybean Science, 2019, 38(5): 806−812.]

[53] 赵小明. 大豆过敏原检测研究[J]. 现代食品, 2018(20): 53−55. [ZHAO X M. Soybean allergen detection research[J]. Modern Food, 2018(20): 53−55.]

[54] 林文辉, 虞宗敢. 发酵豆粕生产工艺与产品质量及其稳定性的关系[J]. 渔业现代化, 2010, 37(3): 51−54. [LIN W H, YU Z G. The relationship between the fermentation methods and the production quality as well as the stability of the quality during the fermented soybean manufacture processes[J]. Fishery Modernization, 2010, 37(3): 51−54.]

[55] 赖晗, 程友飞, 杨安树, 等. 发酵工艺条件对豆粕中过敏蛋白降解的影响[J]. 食品科技, 2019, 44(1): 228−233. [LAI H, CHENG Y F, YANG A S, et al. Effect of fermentation conditions on the degradation of allergenic proteins in soybean meal[J]. Food Science and Technology, 2019, 44(1): 228−233.]

[56] YANG A S, ZUO L L, CHENG Y F, et al. Degradation of major allergens and allergenicity reduction of soybean meal through solid-state fermentation with microorganisms[J]. Food & Function, 2018, 9(3): 1899−1909.

[57] 路雪蕊, 张卉, 欧阳伶俐, 等. 小麦蛋白过敏原的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(7): 2783−2788. [LU X R, ZHANG H, OU Y L L, et al. Research progress of wheat protein allergens[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2015, 6(7): 2783−2788.]

[58] BUCHANAN B B, FRICK O L. Thioredoxin and food allergy[J]. Journal of Allergy & Clinical Immunology, 2007, 119(2): 513−514.

[59] 李玺, 田阳, 唐杰, 等. 酵母菌和植物乳杆菌发酵对小麦过敏原性的影响[J]. 食品工业科技, 2017, 38(2): 235−239, 312. [LI X, TIAN Y, TANG J, et al. The influence of fermentation on wheat allergy by yeast and *Lactobacillus*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(2): 235−239, 312.]

[60] CARLO G R, MARIA A, ROSSANA C, et al. Use of selected sourdough lactic acid bacteria to hydrolyze wheat and rye proteins responsible for cereal allergy[J]. European Food Research and Technology, 2006, 223(3): 405−411.

姚明静, 杨杨, 范婧, 等. 纳豆激酶的微生物生产及其生理功能的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 435−444. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021070016

YAO Mingjing, YANG Yang, FAN Jing, et al. Advance on Nattokinase Microbial Production and Physiological Function[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 435−444. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021070016

· 专题综述 ·

纳豆激酶的微生物生产及其生理功能的研究进展

姚明静[1,2], 杨　杨[1], 范　婧[1], 赵祥颖[2], 任丽琨[1], 边　鑫[1], 邢童林[1], 朱鹏宇[1], 孙智慧[1], 张　娜[1,*]

（1.哈尔滨商业大学食品工程学院, 黑龙江省食品科学与工程重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150076;
2.齐鲁工业大学（山东省科学院）山东省食品发酵工业研究设计院,
山东省食品发酵重点实验室, 山东济南 250013）

摘　要: 随着人们生活水平的提高，血栓病患者呈逐渐增多的趋势。现有的溶栓药物中，纳豆激酶因其半衰期长、特异性强、副作用小、可直接口服等优点而引起了广大关注。本文结合近年来国内外的相关研究成果，详述了纳豆激酶的结构特征、纤溶活性和抗血栓活性的作用机制，总结了纳豆激酶的现有生产菌株及利用发酵优化及基因工程和蛋白质工程提高酶产量或改善酶学特性等方面的进展，阐述了纳豆激酶的生理功能，最后对纳豆激酶应用面临的挑战和未来发展趋势进行了展望，以期为纳豆激酶的进一步研究提供理论依据。

关键词: 纳豆激酶, 枯草芽孢杆菌, 微生物发酵生产, 生理功能

中图分类号: TS201.25　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0435−10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021070016　　本文网刊:

Advance on Nattokinase Microbial Production and Physiological Function

YAO Mingjing[1,2], YANG Yang[1], FAN Jing[1], ZHAO Xiangying[2], REN Likun[1], BIAN Xin[1], XING Tonglin[1], ZHU Pengyu[1], SUN Zhihui[1], ZHANG Na[1,*]

（1.Key Laboratory of Food Science and Engineering of Heilongjiang Province, College of Food Science and Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China;
2.Shandong Provincial Key Laboratory of Food and Fermentation Engineering, Shandong Food Ferment Industry Research & Design Institute, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250013, China）

Abstract: With the improvement of people's living standard, the number of patients with thromboembolism is increasing gradually. Among the existing thrombotic drugs, nattokinase attracts great attention due to its advantages of long half-life, strong specificity, small side effects, and can be taken orally directly. Based on the related research results at home and abroad, the structure features of nattokinase, the fibrinolytic activity and the mechanism of action of antithrombotic activity of NK are described. Also, the hard work in strain breeding, strain transformation for higher enzyme yield or better enzyme character and medium optimization are also summarized. Moreover, the physiological function of nattokinase are expounded. Finally, the challenges and future development trends of nattokinase application are prospected in order to provide theoretical basis for further research on nattokinase.

Key words: nattokinase; *Bacillus subtilis* (natto); production by microbial fermentation; physiological function

收稿日期: 2021−07−02

基金项目: 国家自然科学基金（32072258）; 黑龙江省科技重大专项资助（2020ZX08B02, 2019ZX08B02）; 中央财政支持地方高校发展专项资金优秀青年人才支持计划项目; 哈尔滨商业大学"青年创新人才"支持计划（2019CX06）; 哈尔滨商业大学研究生科研创新项目（YJSCX2020-636HSD）。

作者简介: 姚明静（1989−）, 女, 博士研究生, 研究方向: 食品微生物, E-mail: mingjing1004 @163.com。

*** 通信作者:** 张娜（1979−）, 女, 博士, 教授, 研究方向: 谷物化学与食品微生物, E-mail: foodzhangna@163.com。

随着人们生活水平的提高，人们的饮食方式发生了改变，肉类、脂肪类摄入量增加，膳食纤维、果蔬摄取减小，由此引发了心血管疾病、肥胖症和糖尿病等慢性疾病[1]，尤其是心血管疾病，已成为人类健康第一大杀手，每年约有 1790 万患者死于该病，占全世界死亡率的 31%（World Health Statistics, 2019）。在心血管疾病患者中，85% 的患者死于心脏病和中风，而血栓的形成是是心脏病和中风的重要诱因，因此，血栓的治疗引起了科研工作者广泛的关注。目前已有的溶栓药物链激酶、尿激酶、单链尿激酶型纤溶酶原激活剂（scu-PA）、组织型纤溶酶原激活剂（t-PA）等具有半衰期短、特异性差等缺陷，可能会造成局部出血等副作用，因此，开发半衰期长、特异性强的新型溶栓酶具有重大的现实意义。

纳豆激酶（Nattokinase，简称 NK）（EC 3.4.21.62），又被称为枯草杆菌蛋白酶 NAT（subtilisin NAT），最初由日本科研人员 Sumi 在 1987 年研究纳豆时发现[2]。纳豆激酶可直接水解纤维蛋白，半衰期长、特异性强、副作用小，且在胃肠道内可保持稳定，因此，纳豆激酶成为溶栓药物的新热点。研究发现，纳豆激酶是由纳豆中的 *Bacillus subtilis*（natto）分泌而来，是一种碱性丝氨酸蛋白酶[3]，等电点为 8.6±0.3，在 pH6~12 时可保持良好的纤溶活性，最适 pH8.0，在酸性条件下活性和稳定性较差，当 pH 低于 3 时，酶活性彻底丧失[2]。NK 在低温环境中（60 ℃ 以下）更稳定，反复冻融 5 个循环，仍可保持 95% 的酶活力，但是热稳定性差，当环境温度高于 60 ℃ 时，酶会迅速失活[4−5]。此外，野生型 *Bacillus subtilis*（natto）产纳豆激酶的产量较低，导致纳豆激酶价格较高，限制了其的大范围应用。目前国内外学者分别从菌种选育、培养基优化、基因工程和蛋白质工程改造等方面入手，以期提高纳豆激酶产量、改善纳豆激酶的酸稳定性和热稳定性。

随着对纳豆激酶研究的深入，人们发现纳豆激酶不仅具有溶栓的功效，还可以预防血栓的形成。此外，纳豆激酶在降血压[6−7]、降血脂[8−9]、治疗鼻窦炎[10] 等方面也有明显的生理功效。因此，本文结合近年来国内外的相关研究成果，详述了纳豆激酶的结构特征、纤溶活性和抗血栓活性的作用机制，总结了纳豆激酶在提高酶活性和稳定性，提升产量方面有关生产菌株选育、发酵优化、工程菌株改造以及酶固定化等方面的进展，阐述了纳豆激酶的生理功能，最后对纳豆激酶应用面临的挑战和未来发展趋势进行了展望，以期为纳豆激酶的进一步研究提供理论依据。

1 纳豆激酶的简介

1.1 纳豆激酶的结构

纳豆激酶是一种丝氨酸蛋白酶，属于丝氨酸蛋白酶 S8 家族。*aprN* 基因为 NK 的编码基因，长度为 0.8 kb，以 GTG 为起始密码子，共编码 381 个氨基酸，包含引导蛋白质分泌的信号肽序列（29 个氨基酸），帮助蛋白质正确折叠的分子伴侣前导肽（77 个氨基酸），以及最终产生的纳豆激酶成熟肽（275 个氨基酸）[5]。NK 为一条单链多肽，分子内不含半胱氨酸，因此无二硫键，成熟肽的分子量为 27.7 kDa[11]。NK 成熟肽的氨基酸序列与其他枯草杆菌蛋白酶序列高度同源，如与枯草杆菌蛋白酶 E（Subtilisin E）、枯草杆菌蛋白酶 BPN'（Subtilisin BPN'）、枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg（Subtilisin Carlsberg）、枯草杆菌蛋白酶 DY（Subtilisin DY）在氨基酸序列上的同源性分别为 99.5%、86%、72% 和 70%。然而，与其它枯草杆菌蛋白酶不同的是，NK 对纤维蛋白表现出高度的底物特异性[12]。基于枯草杆菌 E 的晶体结构，Yanagisawa 构建了 NK 的三维结构模型（如图 1 所示），该酶的成熟肽主要由 9 个 α-螺旋和 9 个 β-折叠构成，以及 2 个与稳定性相关的 Ca^{2+}结合位点[13]。

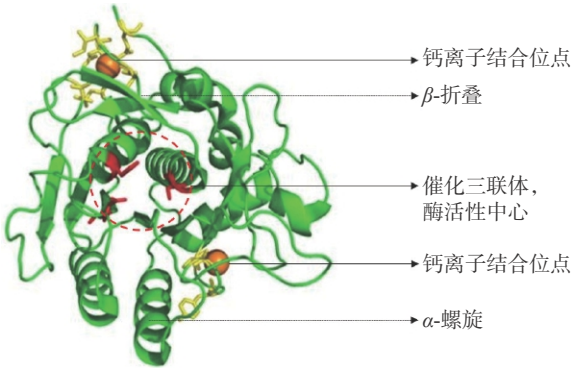


图 1 纳豆激酶的三维结构图[13]

Fig.1 3D structure of nattokinase[13]

在 NK 的氨基酸组成中，一些关键氨基酸残基对 NK 的活性和结构稳定性有着重要的影响。NK 是一个球状蛋白，其催化活性中心位于球状蛋白表面浅槽，由 Asp32-His64-Ser221 三联体组成，NK 的底物结合位点由 Ser125、Leu126 和 Gly127三个保守的氨基酸组成[14]。氢键在 NK 的催化活性和稳定性中起着重要作用，A32-H64-S221 三联体和 Gln155 氧离子洞中的氢键对肽键的催化至关重要，Ser33、Asp60、Ser62 和 Thr220 形成的氢键可稳定水解反应中的过渡态（图 2）。NK 的 S3 结合区域的三个残基 Gly100、Ser101 和 Leu126 对 NK 的纤溶酶活性至关重要，因为它们可影响底物特异性[15−17]。在 Gly100 位点引入侧链较长的氨基酸可能会降低底物结合和酶的催化活性[17]。与 Gly100 相反，在 Ser101 位引入体积较大的侧链可以提高蛋白酶活性[17]。Leu126 被认为是 NK 活性裂隙的重要结构成分，它埋藏在活性裂隙中，靠近催化三联体。这个残基是保守的，对所有枯草杆菌蛋白酶的功能非常重要[3]。

1.2 纳豆激酶的作用机制

与其它纤溶酶相比，纳豆激酶的溶栓作用明显，溶栓效率高，作用时间长，是由多个机制同时作用。纳豆激酶不仅可以通过直接水解纤维蛋白和纤溶酶

底物来分解血液凝块，还可以将内源性尿激酶原转化为尿激酶（u-PA），降解纤溶酶原激活物抑制物-1（PAI-1，可以抑制 t-PA 的活性），并增加具有纤溶活性的组织纤溶酶原激活物（t-PA，可以促进人体内纤溶酶原向纤溶酶的转化反应）（图 3）[11]。与 t-PA 和 uPA 等常见的纤溶酶不同，纳豆激酶不会产生出血等副作用，在人体血液中的半衰期可超过 3 h，远优于其它纤溶酶[11]。

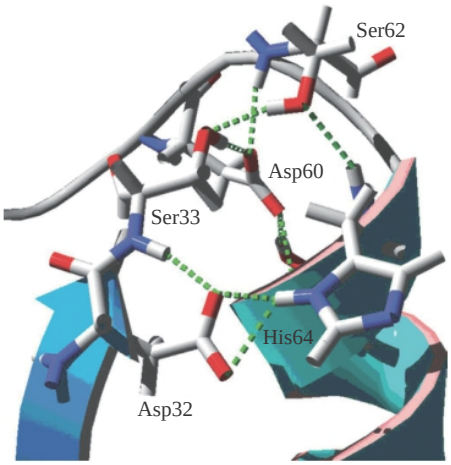


图 2　NK 中由 Ser33、Asp60 和 Ser62 形成的环状结构[16]

Fig.2　Loop structure of NK including Ser33, Asp60 and Ser62[16]

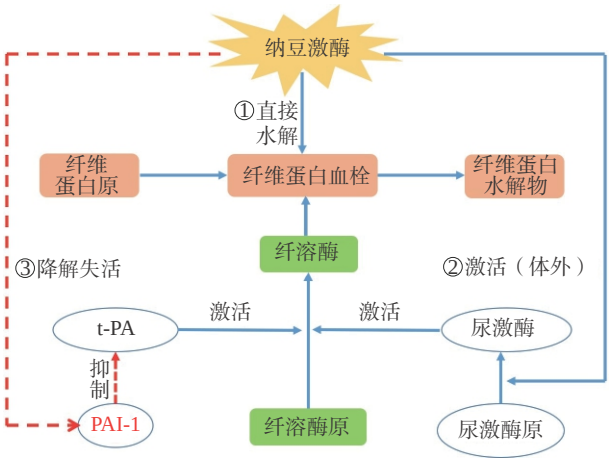


图 3　纳豆激酶的作用机制

Fig.3　Mechanism of nattokinase

因此，NK 目前被认为是一种高效、安全和经济的酶，也是溶栓药物研究的焦点。降低 NK 的生产成本，进一步提高 NK 产量，增强 NK 稳定性成为 NK 的研究热点。

2　纳豆激酶的生产和发酵

2.1　纳豆激酶的生产菌株

目前，纳豆激酶主要由三种微生物发酵产生，芽孢杆菌（*Bacillus*）、海洋生物[18] 和假单胞菌（*Pseudomonas* sp.）[19]。如表 1 所示，NK 的生产菌株主要是从发酵食品中分离出来的。*B. subtilis* LSSE-62 来自于中国大豆酱中[20]，*B. amyloliquefaciens* DC-4 和 *B. sublitis* DC33 则是从中国传统发酵食品豆豉中获得的[21−22]。*Bacillus* sp. CK 11-4 来自传统的韩国发酵食品 Chungkook-Jang[23]，*B. subtilis* WRL101 和 *Bacillus* sp. DJ-4 是从传统的韩国发酵食品豆浆 Doenjang 中筛选出来的[24−25]。从牛乳中筛选而来的 *Pseudomonas aeruginosa* CMSS[26]，从土壤中获得的 *Pseudomonas* sp. TKU015[27] 以及从铁锈中分离而来的 *B. cereus* VITSDVM3[28] 也被确认为有效的 NK 生产者。由于研究人员定义 NK 活性的单位不一致，如 FU/mL、U/mL、IU/mL、FU/g 和 U/g 等，因此很难比较各个菌株之间的 NK 产量。目前研究最多的是枯草芽孢杆菌，尤其是从日本纳豆中筛选的 *Bacillus subtilis* natto。

2.2　纳豆激酶的制备

目前，纳豆激酶主要通过发酵来制备，根据发酵方式可分为固态发酵和液态发酵两种。固态发酵所使用的生产设备要求简单，控制方便，发酵原料成本较低。液态发酵过程传质均匀可控，监测技术成熟，易放大，可实现大规模的自动化连续生产。因此，两种发酵方式在研究和实际生产中均有应用。

表 1　NK 的生产菌株来源及发酵底物

Table 1　Strain source and fermentation substrates of NK

来源		菌株	底物	参考文献
发酵食品	泰国*Thua nao*	*B. sublitis*	大豆	[29]
	中国大酱	*B. subtilis* LSSE-62	鹰嘴豆	[20]
	中国豆豉	*B. amyloliquefaciens* DC-4	纤维素，酵母提取物，糊精和蛋白胨	[21]
	豆豉	*B. sublitis* DC33	胰蛋白胨和半乳糖	[22]
	韩国*Chungkook-Jang*	*Bacillus* sp. CK 11-4	牛肉提取物和蛋白胨	[23]
	韩国*Doenjang*	*B. subtilis* WRL101	胰酶大豆培养基	[24]
	韩国*Doen-Jang*	*Bacillus* sp. DJ-4	胰蛋白酶，大豆蛋白胨和葡萄糖	[25]
	发酵豆制品	*B. sublitis* RJAS19	内酯和蛋白胨	[30]
土壤	土壤	*Pseudomonas* sp. TKU015	虾壳粉	[27]
	中国台湾	*B. subtilis* IMR-NK1	麦麸	[31]
	土壤	*Bacillus subtilis* TKU007	虾壳废弃物	[32]
牛乳	牛乳	*Pseudomonas aeruginosa* CMSS	蔗糖和虾壳粉（SSP）	[19]
铁锈	铁锈	*B. cereus* VITSDVM3	蛋白胨和磷酸盐	[28]

2.2.1 纳豆激酶的固态发酵 固态发酵通常是在没有游离水的情况下，以具有一定湿度的水不溶性的固态物质做物理介质及营养来源，接种一种或多种微生物发酵的生物反应过程。固态发酵是纳豆激酶制备的重要生产方式，纳豆激酶的制备最初主要从固态发酵豆制品如纳豆[2]、豆豉[33]、豆酱[34]、Jotgal[35] 等中提取而来。影响固态发酵的因素主要有发酵物料、料液比、发酵温度、接种量和发酵时间。固态发酵可选用的发酵物料比较多，既可以选择黄豆[36]、黑豆[37]、鹰嘴豆[20]、银杏果[38]、板栗[39] 等天然作物，还可以选择豆粕[40]、麦麸、稻壳[36] 等农产品加工副产物。其不仅可降低成本，还可以减少环境污染实现资源的最大化利用。此外，固态发酵过程中几乎无废水产生，环境污染少；通气可采用自然通风或者间歇通风，无需严格的无菌空气及相应的设备。因此，固态发酵的投资较少，能耗低，技术比较简单，适于小规模生产。目前，商业化应用的固态发酵制备纳豆激酶活性一般能达到 20~100 FU/g[41]。然而，由于固态发酵培养基中水分含量较少，流通性差，整个过程较为粗放，发酵过程中间参数难以进行检测及监测，发酵调控比较困难，因此固态发酵很难进行纯种培养和大规模工业化生产。

2.2.2 纳豆激酶的液态发酵 液态发酵具有传质均匀，发酵过程检测技术成熟、可控，能够实现自动连续化和易于放大等优势，是近 20 年 NK 大规模生产研究的主要方法。影响液态发酵的主要因素有发酵培养基，发酵条件和发酵方式。培养基中碳源、氮源及无机盐的种类对最终 NK 的产量影响较大。碳源可为微生物的生产代谢提供能量，而氮源则可为微生物合成蛋白质和核酸等生物大分子提供原料。比较适宜用于生产 NK 的碳源主要有葡萄糖[42]、麦芽糖[34]、甘油[43]，而蛋白胨[44]、酵母提取物和大豆蛋白被确认为 NK 生产的氮源[19, 45]。无机盐种类，例如 Ca^{2+}、Mg^{2+}、Al^{3+}、Co^{2+}、Cu^{2+}、Fe^{3+}、Zn^{2+}、Mn^{2+}、Na^{+}等也会对 NK 的产量有影响。其中 Ca^{2+}一般可促进 NK 的产量，这可能是因为 Ca^{2+}参与酶的协同作用，可将表面蛋白固定在细胞壁上，提高了菌体对蛋白的利用效率进而可产生更高产量的 NK[46−47]。而其余的金属离子对 NK 产量的影响与具体的菌株及培养基成分有关，例如 0.02% 的 $MgSO_4$ 的添加可显著提高 *Bacillus subtilis* MX-6 的 NK 产量[47]，然而 $MgSO_4$ 却对 *Bacillus natto* NLSSE 生产 NK 的产量无显著影响[34]。

发酵条件主要包含 pH、温度和溶氧。一个最佳的培养基 pH 有助于维持膜中的电荷和培养基中的蛋白质的稳态，通过调节质子泵和通过膜运输营养物质[48]。大多数纤溶酶发酵的最适 pH 范围为中性到微碱性(pH6.0~9.0)，一般每种菌都有一个自己最适宜的 pH，高于或低于此 pH 酶产量明显减少[49]。例如，*Bacillus subtilis* natto 在 pH7.5 时 NK 产量最高，低于或高于 pH7.5 时酶产量急剧降低[46]。温度是发酵过程的一个重要变量，大多数产纤溶酶的微生物的发酵温度一般在 30~40 ℃[50, 51]，而一些嗜热菌的最适发酵温度一般较高。例如，*B. tequilensis* ZMS-2 最适温度 60 ℃[52]，而 *S. megasporus* SD5 MCMB-379 最适温度 55 ℃[53]。NK 生产菌株一般都为好氧菌，溶氧量的控制对 NK 的生产至关重要，一般可以通过调节装液量(摇瓶)、转速(摇瓶和发酵罐)及通气量(发酵罐)来控制溶氧[49]。菌株的生长对数期耗氧量比较大，提高溶氧有助于菌体的生长，发酵后期菌株进入稳定期耗氧量稳定，因此发酵过程中可通过分阶段控制溶氧来提高 NK 产量[49]。

液态发酵根据发酵方式可分为分批发酵和补料分批发酵，与分批发酵方式相比，在细胞生长阶段补料发酵更具有优势，例如在菌体生长的对数期分批补料甘油显著提高 NK 的产量[43]。此外，还可以通过 pH 值恒定补料分批培养法，通过补料添加葡萄糖和蛋白胨保持发酵过程中的稳定 pH，最终 NK 产量为分批发酵的 3 倍[54]。

微生物发酵产纳豆激酶，最初采用固态发酵方式，后由于固态发酵需要空间比较大，发酵周期长，时间成本较高，人们逐渐采用了液态发酵。后研究发现，由于一般液态发酵的培养基营养比较丰富，导致发酵结束后 NK 产品分离纯化困难。而且，液态发酵过程中产生的大量废水，易造成环境污染。因此，目前固态发酵生产 NK 又重新吸引了人们的关注，具体生产过程中固态发酵与液态发酵方式的选择应根据具体的菌株以及实际情况来选择。

3 提高 NK 产量、酶活性及稳定性的方法

3.1 发酵优化

发酵优化包含发酵培养基优化、发酵条件优化及发酵方式的优化，通过优化可以显著提高 NK 的产量。传统发酵优化的方法是一次改变变量(碳源种类、温度、pH、接种量、转速和物料浓度等)，其余条件保持不变，依据最终 NK 产量获取最优的发酵条件。这种方法耗时长、工作量大，有时还因为各因素间的交互作用而产生不正确的结果。利用统计学方法可很好的解决此类问题，例如响应面优化方法，田口正交设计或部分析因设计[49]。统计方法提供了可靠性，有助于确定最佳的营养成分，了解参数之间的相互作用，因此节省时间和能量。例如，以板栗为原料进行固体发酵，经 Box-Behnken design(BBD)优化后，NK 的产量提高了 1.2 倍[39]。发酵方式的优化主要指的是分批发酵、连续发酵等发酵过程方式选择的优化，一般通过分批补料发酵或者连续发酵最终生成的 NK 产量更高[43, 54]，然而其操作过程相对复杂，对仪器设备的要求也比较高。

3.2 基因工程及蛋白质工程方法

除了普通的发酵培养基优化及发酵方式优化外，基因工程技术可用于提高 NK 产量。源于 *Bacillus*

subtilis natto 纳豆激酶的基因 *aprN* 通过基因克隆后可通过异源表达方式提高 NK 产量，目前常用的基因工程宿主既有细菌宿主，如 *Bacillus subtilis*[55]、*Escherichia coli*[56] 和 *Lactococcus lactis*[57]，也有植物宿主(如烟叶和甜瓜[58])和动物宿主(如果蝇和甜菜夜蛾的昆虫细胞[59])。微生物宿主生长成本低，繁殖周期短，但各宿主工程菌有其固有的缺点此外，可以通过基因工程技术和营养优化策略提高重组纳豆激酶的表达量。例如，可以通过启动子优化，改变 NK 基因启动子(P*aprN*)的-10 或-35 元件的序列，特别是-10 元件的序列，提高重组 NK 的胞外表达[60]。利用 DNA 家族重排技术也可将 NK 的催化效率提高 2.3 倍[61]。此外，还可以通过信号肽优化、合成启动子及删除冗余基因元件提高 *Bacillus subtilis* 表达 NK 的产量[62]。另外，对于重组的产 NK 的枯草芽孢杆菌，可以通过在培养基中添加金属离子和谷氨酸等营养物质将 NK 产量提高 4 倍[63]。

蛋白质工程技术通过氨基酸的定点突变也可实现 NK 活性的提高及稳定性的增强，例如优化位于酶催化残基 Ser221 附近的氨基酸残基 Thr220 和 Met222，可提高 NK 的活性及氧化稳定性[16]。将 NK 分子表面的天冬酰胺和谷氨酰胺突变为天冬氨酸和谷氨酸，可提高 NK 的酶活和热稳定性，例如 Q59E 的突变株的酶活为野生型 NK 的 1.54 倍，N218D 的突变株在 55 ℃ 的半衰期为 28 min，是野生型菌株的 1.35 倍[14]。然而，通过引入半胱氨酸残基从而形成二硫键来提高 NK 的热稳定性的尝试并不成功[64]。

3.3　酶的固定化

为提高纳豆激酶的稳定性，除了应用基因工程和蛋白质工程的定点诱变技术外，还可采用酶的固定化技术。固定化是一种商业应用和方便的方法，因为它通常可以提高酶的热稳定性和 pH 稳定性，降低生产成本，而且易于处理和分离，进而可使酶重复使用[73]。NK 的固定化现在已用的方法主要有吸附法、包埋法、共价结合法及交联法(表 2)。目前吸附法研究的最热的就是以纳米颗粒为材料进行 NK 的固定，例如选用聚羟基丁酸酯(PHB)纳米粒子进行 NK 的吸附固定，固定后酶的稳定性明显提高，4 °C 保存 25 d 活性完全保持不变[65]。包埋法也是 NK 固定化常用的方法，目前使用的包埋材料主要有 γ-聚谷氨酸[66]、聚赖氨酸[67]、叶酸改性壳聚糖(CS-FA)[68]、多巴胺微胶囊[69] 等，包埋后的 NK 的酶活、稳定性都会明显提高，而且有的还可以实现体内靶药给药的功效[69]。共价结合法和交联法也是 NK 固定的常用方法，NK 通过化学键的结合或者交联与材料结合在一起，稳定性较好，同时也可保持 NK 的生物活性。当以 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺为偶联剂，将 NK 固定在磁性纳米颗粒 Fe_3O_4 中，发现 NK 纳米颗粒结合物的最佳溶栓活性可达 91.89%，明显高于纯酶活性 82.86%[70]。以聚(赖氨酸)树枝状大分子为材料，通过交联作用可与 NK 形成纳米复合物，明显提高了 NK 相对酶活性、热稳定性和酸稳定性，体内溶栓率在 12 h 达到 50%，并可有效避免出血等其他并发症[67]。综上所述，利用共价结合、吸附、包埋、交联等方法进行 NK 的固定化，可以显著提高酶的酶学性质(包含纤溶活性，酸稳定性和热稳定性)。

此外，为了保持纳豆激酶在人体内的活性，防止被胃酸变性，可以将纳豆激酶制成制剂，控制其在人体内的释放速度。可先将 NK 粉末压缩成片剂，然后用 Eudragit L100-55 肠道材料和羟丙基纤维素的混合物通过直接压缩涂覆，进而可保证 NK 通过胃肠道时的活性[74]。也可先用薄膜法制备的植物甾醇脂质体，再将脂质体包封纳豆激酶(NK)，制备 NK 口服药[75]，保护 NK 通过胃时不变性。NK 制剂的研究将会推进 NK 作为一种口服药的推广，对 NK 未来的应用有重大意义。

4　纳豆激酶的生理功能

4.1　纳豆激酶的抗血栓功效

在体外和动物模型中，已经进行了大量的工作来评估 NK 的溶栓作用，研究发现 NK 不仅可溶解已有的血栓，还可预防血栓的形成，且出血等副作用较小。以经过化学诱导产生颈总动脉(CCA)血栓的大鼠为研究对象，NK 的溶栓效力是纤溶酶的 4 倍[76]，在 2836FU 浓度下，NK 在 6 h 内可溶解 88% 的血栓。用卡拉胶诱导的小鼠尾部血栓形成，发现事先服

表 2　NK 的固定化原理及效果

Table 2　Principle of immobilization and its effect on NK activity and stability

固定化材料	原理	效果	参考文献
聚羟基丁酸酯(PHB)纳米粒子	吸附	酶活性提高20%，酶的稳定性提高，4 ℃保存25 d后活性完全保持	[65]
γ-聚谷氨酸	包埋	提高NK的酸稳定性、热稳定性及贮藏稳定性	[66]
聚赖氨酸	包埋	提高酶的相对酶活，酸稳定性及热稳定性	[67]
叶酸改性壳聚糖(CS-FA)	包埋	可提高酶的纤溶活性及稳定性	[68]
多巴胺微胶囊	包埋	可提高NK的抗血栓活性并实现NK的靶向给药	[69]
磁性纳米颗粒Fe_3O_4	通过1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺偶联	将NK的活性提高1.1倍	[70]
多巴胺包裹的聚砜表面(PSf)	共价结合	可提高NK在体内的生物活性和血液相容性	[71]
壳聚糖，京尼平，谷氨酰胺转氨酶，酪蛋白	交联	可提高NK口服给药的酸稳定性	[72]

用 NK 的小鼠血栓形成的时间明显延迟[77], 说明 NK 可以减缓血栓的形成。与组织纤溶酶原激活剂(t-PA)相比, NK 的出血等副作用明显较小。先用 $FeCl_3$ 浸泡的纸诱导大鼠颈动脉血栓形成, 后静脉注射 NK 或 t-PA, 结果发现 NK 和 t-PA 均可延迟血栓形成, 分别在 75 和 8.5 mg/kg 时几乎完全抑制(90%), 但 NK 在 300 mg/kg 时才会引起出血, 而 t-PA 在 10 mg/kg 时即可引起点状出血[78]。此外, 在肺血栓小鼠模型以及健康人类志愿者中, 口服 NK 可导致血栓计数和血浆优球蛋白溶解时间(ELT)的减少, 以及 t-PA 的增加, 表明 NK 能够激活小鼠和人体的血浆纤溶能力[79]。目前关于 NK 的作用机制仍主要从图 3 所示的三个方面来考虑, 然而, 关于 NK 在体内的具体作用机制现在研究的还不够透彻, 未来仍需要此方面的研究。

4.2 纳豆激酶的降血压功效

纳豆激酶可在预防和治疗高血压中发挥作用。2008 年, Kim 等研究了 NK 补充剂对高血压前期或 1 期高血压受试者血压的影响, 结果发现口服 NK 8 周后可降低患者的收缩压和舒张压(NET)变化分别为−5.55 和−2.84 mmHg(P<0.05)[7]。最近, Jensen 等[6] 的一项研究表明, 服用 NK8 周后, 高血压患者的血压发生有益变化。这与之前的报道一致, NK 给药可有效降低自发性高血压大鼠的血压[80−84]。

关于 NK 的抗高血压的作用机制目前尚无定论。在 Jensen 等[6] 的研究中, 高血压患者血压的下降与血浆肾素活性无关, 并且血管紧张素转换酶(ACE)在 NK 的降压作用中的功效备受争议。虽然人体研究表明, 接受 NK 治疗的患者的 ACE 浓度没有统计学上的显著差异, 但其他 8 项使用动物模型的研究表明, NK 的降压作用与 ACE 的抑制有关[83]。然而, 根据口服给药方式的不同, 可能存在不同的降压作用机制。在一项使用自发性高血压大鼠的研究中, NK 及其片段通过不同的机制降低了高血压[80], NK 可能通过血浆中纤维蛋白原的裂解来降低血压, 而 NK 片段可能阻止血浆血管紧张素 II 水平的升高, 从而抑制大鼠高血压[80]。此外, NK 的 ACE 抑制作用呈剂量依赖性[81,84]。

由于长期使用抗高血压药物具有明显的副作用[85], NK 摄入可能是治疗 CVD 患者高血压的一种有希望的替代方案。因此, 每天摄入 NK 可能是治疗高血压的一种有效策略[82]。

4.3 纳豆激酶的降血脂功效

多个实验室证实 NK 具有降血脂作用, 食用 NK 或含有 NK 的纳豆提取物, 可显著降低动物模型中升高的血清甘油三酯、总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平[8−9]。在高脂血症患者中, NK 治疗(6500 FU 治疗 26 周)降低了总胆固醇、LDL-C 和甘油三酯, 提高了高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平[86]。然而, 在小样本实验中, 以原发性高胆固醇血症患者为对象, NK 治疗组每天给与 4000 FU, 治疗 4 周后血清胆固醇、LDL-C 和 HDL-C 均有所下降, 但无明显差异, 可能是由于实验中使用 NK 的剂量相对较低, 治疗时间也相对较短[87]。当 NK 使用剂量较高, 并延长其治疗时间时, NK 的降血脂效果较显著, 例如, 谢嵩等[88] 以大鼠为动物模型每天使用 360 mg/kg 的剂量(约为 3000 FU)连续治疗六周后, 总胆固醇含量(TC)可降低 16%, 甘油三酯含量(TG)含量可降低 20%。因此, 当利用 NK 来进行降血脂时, 需使用较高的 NK 剂量并延长治疗时间。此外, 还有研究发现, NK(100 mg/d)结合红曲米(1200 mg/d)对高脂血症患者的血脂控制更加有效[89−90], 这也为降血脂药物的开发提供了新思路。

关于 NK 降胆固醇血脂的机制现在研究的还比较少, Yoo 等[91] 研究了发现补充 NK 对非糖尿病和高胆固醇血症患者胶原-肾上腺素关闭时间、凝血酶原时间和活化部分凝血活酶时间的影响, 结果发现 NK 可改变止血因子, NK 实验组的胶原-肾上腺素关闭时间、凝血酶原时间和活化部分凝血活酶时间明显延长。

4.4 纳豆激酶其它方面的功效

纳豆激酶在保护神经细胞预防阿尔茨海默病(AD)方面有明显的功效。蛋白质由正常的三维结构转变成淀粉样结构是 AD 的重要表征, 纳豆激酶可通过减少蛋白淀粉样结构来治疗阿尔茨海默病(AD)患者。在 AD 大鼠模型中, 口服 NK 对降低 AD 通路中乙酰胆碱酯酶(AchE)活性、转化生长因子 β(TGF-β)、Fas 和白细胞介素-6(IL-6)含量的调节具有积极作用[91]。在秋水仙碱中毒引起的 AD 认知障碍的大鼠模型中, 含有 NK 的纳米营养剂被证明能够修复其受损的学习和记忆能力, 并且可有效抑制 β-淀粉样蛋白和 BACE-1 活性, 从而表明 NK 具有神经保护作用[92]。与未经治疗的 AD 对照组相比, 在 360 FU/kg 的剂量下, NK 可显著降低 TGF-β、IL-6 和 p53 含量以及胆碱酯酶活性, 增加 Bcl-2 含量[93]。以上数据表明, NK 的神经保护作用是由于其水解蛋白、抗炎和抗凋亡作用。

纳豆激酶还可以有效地治疗慢性鼻窦炎、玻璃体视网膜疾病和长时间飞行导致的疾病。纳豆激酶可以通过水解纤维蛋白有效收缩慢性鼻窦炎患者的鼻息肉组织, 进而缓解慢性鼻窦炎所引起的哮喘, 因此 NK 有望成为慢性鼻窦炎鼻息肉和共病哮喘患者的有效替代治疗方案[10]。NK 还可以用于治疗增殖性玻璃体视网膜疾病患者, 这一作用是由于 NK 可诱导玻璃体后脱离(PVD)的有效性[94]。Flite Tabs (Aidan, AZ, USA)的一项研究发现, Pinokinase(碧萝芷和纳豆激酶的组合)可显著改善长时间飞行导致的腿部肿胀、深静脉血栓形成(DVT)和肺栓塞(PE)。此外, 纳豆激酶在抑制小鼠肝细胞癌(HCC)[95]、改善胰岛素缺乏性 2 型糖尿病大鼠肠道菌群失调[96]、用

作医疗器械工具涂层预防手术中血栓并发症的发生等方面也有重要的应用[97]。

5　结论与展望

纳豆激酶生产菌株目前已从食物和非食物中分离得到，与非食品来源相比，食品来源的生产菌株，尤其是来自于传统发酵食品的菌株在未来 NK 的生产应用中更具有竞争力。其中，*Bacillus* 种属产的纤溶酶因其高特异性及酶活性而引起广泛关注。NK 可通过固态发酵和液态发酵来制备，并通过发酵优化、基因工程和蛋白质工程等进行菌株改造来提高酶的产量、酶活性和稳定性。然而，目前 NK 的发酵产量还不能满足大规模生产，未来新菌株选育及改造仍是未来的努力方向。现在已发现 NK 在抗血栓、降血压、降血脂、预防 AD、治疗鼻窦炎等方面具有明显的生理功效，但是关于 NK 的具体作用机制尤其是体内的作用机制研究的仍比较少，限制了 NK 的推广使用。未来关于 NK 的临床实验研究、体内作用机制研究将有助于推动 NK 的进一步进展。此外，NK 突出的溶栓效果和抗出血倾向的特性，或许可成为 COVID 患者（常存在凝血功能异常问题）的辅助治疗方案[98−99]。

参考文献

[1] MOZAFFARIAN D. Dietary and policy priorities for cardiovascular disease, diabetes, and obesity: A comprehensive review [J]. Circulation, 2016, 133(2): Circulationaha. 115.018585.

[2] SUMI H, HAMADA H, TSUSHIMA H, et al. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet[J]. Experientia, 1987, 43(10): 1110−1111.

[3] DABBAGH F, NEGAHDARIPOUR M, BERENJIAN A, et al. Nattokinase: Production and application[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(22): 9199−9206.

[4] FUJITA M, NOMURA K, HONG K, et al. Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto, a popular soybean fermented food in Japan[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1993, 197(3): 1340−1347.

[5] NAKAMURA T, YAMAGATA Y, ICHISHIMA E. Nucleotide sequence of the subtilisin NAT gene, aprN, of *Bacillus subtilis* (natto)[J]. Bioscience Biotechnology & Biochemistry, 1992, 56(11): 1869−1871.

[6] JENSEN G, LENNINGER M, ERO M P, et al. Consumption of nattokinase is associated with reduced blood pressure and von willebrand factor, a cardiovascular risk marker: Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter North American clinical trial[J]. Integrated Blood Pressure Control, 2016, 9: 95−104.

[7] KIM J Y, GUM S N, PAIK J K, et al. Effects of nattokinase on blood pressure: A randomized, controlled trial[J]. Hypertension Research, 2008, 31(8): 1583−1588.

[8] PARK K J, KANG J I, KIM T S, et al. The antithrombotic and fibrinolytic effect of natto in hypercholesterolemia rats[J]. Preventive Nutrition and Food Science, 2012, 17(1): 78−82.

[9] KANG S J, LIM Y, KIM A J. Korean red ginseng combined with nattokinase ameliorates dyslipidemia and the area of aortic plaques in high cholesterol-diet fed rabbits[J]. Food Science & Biotechnology, 2014, 23(1): 283−287.

[10] TAKABAYASHI T, IMOTO Y, SAKASHITA M, et al. Nattokinase, profibrinolytic enzyme, effectively shrinks the nasal polyp tissue and decreases viscosity of mucus[J]. Allergology International: Official Journal of the Japanese Society of Allergology, 2017, 66(4): 594−602.

[11] WENG Y, YAO J, SPARKS S, et al. Nattokinase: An oral antithrombotic agent for the prevention of cardiovascular disease[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(3): 523.

[12] PENG Y, YANG X, ZHANG Y. Microbial fibrinolytic enzymes: An overview of source, production, properties, and thrombolytic activity *in vivo*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 69(2): 126−132.

[13] YANAGISAWA Y, CHATAKE T, CHIBA-KAMOSHIDA K, et al. Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction experiment of nattokinase from *Bacillus subtilis* natto[J]. Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications, 2010, 66(12): 1670−1673.

[14] LIU Z, ZHAO H, HAN L, et al. Improvement of the acid resistance, catalytic efficiency, and thermostability of nattokinase by multisite-directed mutagenesis[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2019, 116(8): 1833−1843.

[15] ZHENG Z L, ZUO Z Y, LIU Z G, et al. Construction of a 3D model of nattokinase, a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus natto*: A novel nucleophilic catalytic mechanism for nattokinase[J]. Journal of Molecular Graphics & Modelling, 2005, 23(4): 373−380.

[16] ZHENG Z L, YE M Q, ZUO Z Y, et al. Probing the importance of hydrogen bonds in the active site of the subtilisin nattokinase by site-directed mutagenesis and molecular dynamics simulation[J]. Biochemical Journal, 2006, 395(3): 509−515.

[17] WU S, FENG C, ZHONG J, et al. Roles of S3 site residues of nattokinase on its activity and substrate specificity[J]. Journal of Biochemistry, 2007, 142(3): 357−364.

[18] MAHAJAN P M, NAYAK S, LELE S S. Fibrinolytic enzyme from newly isolated marine bacterium *Bacillus subtilis* ICTF-1: Media optimization, purification and characterization[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2012, 113(3): 307−314.

[19] CHANDRASEKARAN S D, VAITHILINGAM M, SHANKER R, et al. Exploring the *in vitro* thrombolytic activity of nattokinase from a new strain *Pseudomonas aeruginosa* CMSS[J]. Jundishapur Journal of Microbiology, 2015, 8(10): e23567.

[20] WEI X, LUO M, XU L, et al. Production of fibrinolytic enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* by fermentation of chickpeas, with the evaluation of the anticoagulant and antioxidant properties of chickpeas[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2011, 59(8): 3957−3963.

[21] PENG Y, HUANG Q, ZHANG R H, et al. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 screened from douchi, a traditional Chinese soy-

bean food[J]. Comparative Biochemistry and Physiology. B: Biochemistry and Molecular Biology, 2003, 134(1): 45−52.

[22] WANG C T, JI B P, LI B, et al. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme of *Bacillus subtilis* DC33, isolated from Chinese traditional Douchi [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2006, 33(9): 750-758.

[23] KIM W. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from Chungkook-Jang[J]. Applied & Environmental Microbiology, 1996, 62(7): 2482−2488.

[24] CHANG S P, KIM D H, LEE W Y, et al. Identification of fibrinogen-induced nattokinase WRL101 from *Bacillus subtilis* WRL101 isolated from Doenjang[J]. African Journal of Microbiology Research, 2013, 7(19): 15−22.

[25] KIM S H, CHOI N S. Purification and characterization of Subtilisin DJ-4 secreted by *Bacillus* sp. strain DJ-4 screened from Doen-Jang[J]. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, 2000, 64(8): 1722−1725.

[26] DEVI C S, MOHANASRINIVASAN V, SHARMA P, et al. Production, purification and stability studies on nattokinase: A therapeutic protein extracted from mutant *Pseudomonas aeruginosa* CMSS isolated from bovine milk[J]. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2015, 22(2): 263−269.

[27] WANG S L, CHEN H J, LIANG T W, et al. A novel nattokinase produced by *Pseudomonas* sp. TKU015 using shrimp shells as substrate[J]. Process Biochemistry, 2009, 44(1): 70−76.

[28] VAITHILINGAM M, CHANDRASEKARAN S D, GUPTA S, et al. Extraction of nattokinase enzyme from *Bacillus cereus* isolated from rust[J]. National Academy Science Letters, 2016, 39(4): 263−270.

[29] INATSU Y, NAKAMURA N, YURIKO Y, et al. Characterization of *Bacillus subtilis* strains in Thua nao, a traditional fermented soybean food in northern Thailand[J]. Letters in Applied Microbiology, 2006, 43(3): 237−242.

[30] KUMAR D J M, RAKSHITHA R, M ANNU V, et al. Production, optimization and characterization of fibrinolytic enzyme by *Bacillus subtilis* RJAS19[J]. Pakistan Journal of Biological Sciences, 2014, 17(4): 529−534.

[31] CHANG C T, FAN M H, KUO F C, et al. Potent fibrinolytic enzyme from a mutant of *Bacillus subtilis* IMR-NK1[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2000, 48(8): 3210−3216.

[32] WANG S L, WU Y Y, LIANG T W. Purification and biochemical characterization of a nattokinase by conversion of shrimp shell with *Bacillus subtilis* TKU007[J]. New Biotechnology, 2011, 28(2): 196−202.

[33] LUO Y, LI B O, JI H, et al. Effect of voybean varieties on the fibrinolytic activity and sensory characteristics of Douchi[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2010, 34: 457−469.

[34] LIU J, XING J, CHANG T, et al. Optimization of nutritional conditions for nattokinase production by *Bacillus* natto NLSSE using statistical experimental methods[J]. Process Biochemistry, 2005, 40(8): 2757−2762.

[35] KIM C, RI K, CHOE S. A novel fibrinolytic enzymes from the Korean traditional fermented food-Jotgal: Purification and characterization[J]. Journal of Food Biochemistry, 2020, 44(7): e13255.

[36] NIE G, ZHU Z, LIU F, et al. Co-production of nattokinase and poly (γ-glutamic acid) under solid-state fermentation using soybean and rice husk[J]. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2015, 58(5): 718−724.

[37] SHIH M C, YANG K A I T U, SU S Y, et al. Optimization process of roasted broken black soybean natto using response surface methodology[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2011, 37(5): 474−482.

[38] GUO N, JIANG Y W, SONG X R, et al. Effect of *Bacillus natto* solid-state fermentation on the functional constituents and properties of Ginkgo seeds[J]. Journal of Food Biochemistry, 2019, 43(5): e12820.

[39] DONG M Z, AN J Y, WANG L T, et al. Development of fermented chestnut with *Bacillus natto*: Functional and sensory properties[J]. Food Research International, 2020, 130: 108941.

[40] VONG W C, LIU S Q. Biovalorisation of okara (soybean residue) for food and nutrition[J]. Trends in Food Science & Technology, 2016, 52: 139−147.

[41] PAGNONCELLI M G B, FERNANDES M J, RODRIGUES C, et al. Nattokinases [M]. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering, 2017: 509-526.

[42] CAI D, ZHANG B, RAO Y, et al. Improving the utilization rate of soybean meal for efficient production of bacitracin and heterologous proteins in the aprA-deficient strain of *Bacillus licheniformis*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(12): 4789−4799.

[43] BERENJIAN A, MAHANAMA R, KAVANAGH J, et al. Nattokinase production: Medium components and feeding strategy studies[J]. Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly, 2014, 20(4): 541−547.

[44] YANG H, LIU Y, NING Y, et al. Characterization of an intracellular alkaline serine protease from *Bacillus velezensis* SW5 with fibrinolytic activity[J]. Current Microbiology, 2020, 77(8): 1610−1621.

[45] MAHAJAN P M, GOKHALE S V, LELE S S. Production of nattokinase using *Bacillus natto* NRRL 3666: Media optimization, scale up, and kinetic modeling[J]. Food Science and Biotechnology, 2010, 19(6): 1593−1603.

[46] TUAN N A, THUAN D H T, TAM T T M, et al. Determination the optimum fermentation in obtaining nattokinase by *Bacillus subtilis* natto[J]. International Journal of Innovation and Applied Studies, 2015, 13: 663−668.

[47] MAN L L, XIANG D J, ZHANG C L. Strain screening from traditional fermented soybean foods and induction of nattokinase production in *Bacillus subtilis* MX-6[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2019, 11(1): 283−294.

[48] KHURSADE P S, GALANDE S H, SHIVA KRISHNA P, et al. *Stenotrophomonas maltophilia* Gd2: A potential and novel isolate for fibrinolytic enzyme production[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2019, 26(7): 1567−1575.

[49] MOULA ALI A M, BAVISETTY S C B. Purification, physi-

cochemical properties, and statistical optimization of fibrinolytic enzymes especially from fermented foods: A comprehensive review [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 163: 1498−1517.

[50] AVHAD D N, RATHOD V K. Ultrasound assisted production of a fibrinolytic enzyme in a bioreactor[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2015, 22: 257−264.

[51] SINGH R, KUMAR M, MITTAL A, et al. Microbial enzymes: Industrial progress in 21st century[J]. 3 Biotech, 2016, 6(2): 174.

[52] ZAHOOR, KHAN, MARYAM, et al. *Bacillus tequilensis* ZMS-2: A novel source of alkaline protease with antimicrobial, anticoagulant, fibrinolytic and dehairing potentials [J]. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 2019, 32(4(Supplementary)): 1913-1918.

[53] CHITTE R R, DESHMUKH S V, KANEKAR P P. Production, purification, and biochemical characterization of a fibrinolytic enzyme from thermophilic *Streptomyces* sp. MCMB-379[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2011, 165(5-6): 1406−13.

[54] KWON E Y, KIM K M, KIM M K, et al. Production of nattokinase by high cell density fed-batch culture of *Bacillus subtilis*[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2011, 34(7): 789−793.

[55] LIU Z, ZHENG W, GE C, et al. High-level extracellular production of recombinant nattokinase in *Bacillus subtilis* WB800 by multiple tandem promoters [J]. BMC Microbiology, 2019, 19(1): 89.

[56] PURWAENI E, RIANI C, RETNONINGRUM D S. Molecular characterization of bacterial fibrinolytic proteins from indonesian traditional fermented foods[J]. Protein J, 2020, 39(3): 258−267.

[57] LIANG X, ZHANG L, ZHONG J, et al. Secretory expression of a heterologous nattokinase in *Lactococcus lactis*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 75(1): 95−101.

[58] HAN L, ZHANG L, LIU J, et al. Transient expression of optimized and synthesized nattokinase gene in melon fruit by agroinfiltration[J]. Plant Biotechnology, 2015, 32(2): 175−180.

[59] LI X, WANG X, XIONG S, et al. Expression and purification of recombinant nattokinase in *Spodoptera frugiperda* cells[J]. Biotechnology Letter, 2007, 29(10): 1459−1464.

[60] WU S M, FENG C, ZHONG J, et al. Enhanced production of recombinant nattokinase in *Bacillus subtilis* by promoter optimization[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2011, 27(1): 99−106.

[61] CAI Y J, BAO W, JIANG S J, et al. Directed evolution improves the fibrinolytic activity of nattokinase from *Bacillus natto*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2011, 325(2): 155−161.

[62] CUI W, SUO F, CHENG J, et al. Stepwise modifications of genetic parts reinforce the secretory production of nattokinase in *Bacillus subtilis*[J]. Microbial Biotechnology, 2018, 11(5): 930−942.

[63] CHEN P T, CHAO Y P. Enhanced production of recombinant nattokinase in *Bacillus* subtilisby the elimination of limiting factors[J]. Biotechnology Letters, 2006, 28(19): 1595−1600.

[64] WENG M, DENG X, JIEYUAN W U, et al. Thermostability of subtilisin nattokinase obtained by site-directed mutagenesis[J]. Wuhan University Journal of Natural Sciences, 2014, 19(3): 229−234.

[65] DEEPAK V, PANDIAN S, KALISHWARALAL K, et al. Purification, immobilization, and characterization of nattokinase on PHB nanoparticles[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(24): 6644−6646.

[66] HSIEH C W, LU W C, HSIEH W C, et al. Improvement of the stability of nattokinase using γ-polyglutamic acid as a coating material for microencapsulation[J]. LWT-Food Science and Technology, 2009, 42(1): 144−149.

[67] WU C, GAO C, LÜ S, et al. Construction of polylysine dendrimer nanocomposites carrying nattokinase and their application in thrombolysis[J]. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2018, 106(2): 440−449.

[68] CHEN C, DUAN H, GAO C, et al. Non-covalent modification of thrombolytic agent nattokinase: Simultaneous improvement of fibrinolysis activity and enzymatic stability[J]. RSC Advances, 2014, 4(52): 27422−27429.

[69] YE W, WANG N, HU K, et al. Bio-inspired microcapsule for targeted antithrombotic drug delivery[J]. RSC Advances, 2018, 8(48): 27253−27259.

[70] REN L, WANG X, WU H, et al. Conjugation of nattokinase and lumbrukinase with magnetic nanoparticles for the assay of their thrombolytic activities[J]. Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic, 2010, 62(2): 190−196.

[71] JI M, CHEN X, LUO J, et al. Improved blood compatibility of polysulfone membrane by anticoagulant protein immobilization [J]. Colloids and surfaces B, Biointerfaces, 2019, 175: 586−595.

[72] ZHANG X, LYU X, TONG Y, et al. Chitosan/casein based microparticles with a bilayer shell-core structure for oral delivery of nattokinase[J]. Food & Function, 2020, 11(12): 10799−10816.

[73] ARSALAN A, YOUNUS H. Enzymes and nanoparticles: Modulation of enzymatic activity via nanoparticles [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 118(Pt B): 1833-1847.

[74] LAW D, ZHANG Z. Stabilization and target delivery of nattokinase using compression coating[J]. Drug Development & Industrial Pharmacy, 2007, 33(5): 495−503.

[75] DONG X Y, KONG F P, YUAN G Y, et al. Optimisation of preparation conditions and properties of phytosterol liposome-encapsulating nattokinase[J]. Natural Product Research, 2012, 26(6): 548−556.

[76] FUJITA M, HONG K, ITO Y, et al. Thrombolytic effect of nattokinase on a chemically induced thrombosis model in rat[J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 1995, 18(10): 1387−1391.

[77] KAMIYA S, HAGIMORI M, OGASAWARA M, et al. *In vivo* evaluation method of the effect of nattokinase on carrageenan-induced tail thrombosis in a rat model[J]. Acta Haematologica, 2010, 124(4): 218−224.

[78] GUO H, BAN Y H, CHA Y, et al. Comparative anti-thrombotic activity and haemorrhagic adverse effect of nattokinase and tissue-type plasminogen activator[J]. Food Science and Biotechnology, 2019, 28(5): 1535−1542.

[79] SUMI H, YANAGISAWA Y, YATAGAI C, et al. Natto *Bacillus* as an oral fibrinolytic agent: Nattokinase activity and the ingestion effect of *Bacillus subtilis* natto[J]. Food Science & Technology International Tokyo, 2004, 10(1): 17−20.

[80] FUJITA M, OHNISHI K, TAKAOKA S, et al. Antihypertensive effects of continuous oral administration of nattokinase and its fragments in spontaneously hypertensive rats[J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2011, 34(11): 1696−1701.

[81] LEE B H, LAI Y S, WU S C. Antioxidation, angiotensin converting enzyme inhibition activity, nattokinase, and antihypertension of *Bacillus subtilis* (natto)-fermented pigeon pea[J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2015, 23(4): 750−757.

[82] SUWANMANON K, HSIEH P C. Effect of gamma-aminobutyric acid and nattokinase-enriched fermented beans on the blood pressure of spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats[J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2014, 22(4): 485−491.

[83] MURAKAMI K, YAMANAKA N, OHNISHI K, et al. Inhibition of angiotensin I converting enzyme by subtilisin NAT (nattokinase) in natto, a Japanese traditional fermented food[J]. Food & Function, 2012, 3(6): 674−678.

[84] IBE S, YOSHIDA K, KUMADA K, et al. Antihypertensive effects of natto, a traditional Japanese fermented food, in spontaneously hypertensive rats[J]. Food Science & Technology Research, 2009, 15(2): 199−202.

[85] WEBER M A, SCHIFFRIN E L, WHITE W B, et al. Clinical practice guidelines for the management of hypertension in the community a statement by the american society of hypertension and the international society of hypertension[J]. Journal of Clinical Hypertension, 2014, 16(1): 14−26.

[86] LIN Y. A clinical study on the effect of nattokinase on carotid artery atherosclerosis and hyperlipidaemia[J]. Chinese Medical Journal, 2017, 97(26): 2038−2045.

[87] WU D J, LIN C S, LEE M Y. Lipid-lowering effect of nattokinase in patients with primary hypercholesterolemia[J]. Acta Cardiologica Sinica, 2009, 25(1): 26−30.

[88] 谢嵩, 于宗琴, 刘秀菊. 纳豆激酶的制备及其降血脂功效研究[J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35(1): 17−20. [XIE S, YU Z, LIU X. Preparation of nattokinase and study on its hypolipidemic effect[J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2015, 35(1): 17−20.]

[89] YANG N C, CHOU C W, CHEN C Y, et al. Combined nattokinase with red yeast rice but not nattokinase alone has potent effects on blood lipids in human subjects with hyperlipidemia[J]. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 2009, 18(3): 310−317.

[90] FOGACCI F, BANACH M, MIKHAILIDIS D P, et al. Safety of red yeast rice supplementation: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Pharmacological Research, 2019, 143(1-16).

[91] YOO H J, KIM M, LEE A, et al. The effects of nattokinase supplementation on collagen-epinephrine closure time, prothrombin time and activated partial thromboplastin time in nondiabetic and hypercholesterolemic subjects[J]. Food & Function, 2019, 10(5): 2888−2893.

[92] BHATT P C, PATHAK S, KUMAR V, et al. Attenuation of neurobehavioral and neurochemical abnormalities in animal model of cognitive deficits of Alzheimer ’s disease by fermented soybean nanonutraceutical[J]. Inflammopharmacology, 2018, 26(1): 105−118.

[93] AHMED H H, FADL N N, EL-SHAMY K A, et al. Miracle enzymes serrapeptase and nattokinase mitigate neuroinflammation and apoptosis associated with Alzheimer's disease in experimental model[J]. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2014, 3(2): 876−891.

[94] TAKANO A, HIRATA A, OGASAWARA K, et al. Posterior vitreous detachment induced by nattokinase (subtilisin nat): A novel enzyme for pharmacologic vitreolysis[J]. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2006, 47(5): 2075−2079.

[95] YAN Y, WANG Y, QIAN J, et al. Nattokinase crude extract inhibits hepatocellular carcinoma growth in mice[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2019, 29(8): 1281−1287.

[96] YANG H J, KIM M J, KWON D Y, et al. Combination of aronia, red ginseng, shiitake mushroom and nattokinase potentiated insulin secretion and reduced insulin resistance with improving gut microbiome dysbiosis in insulin deficient type 2 diabetic rats[J]. Nutrients, 2018, 10(7): 948−967.

[97] WEI X, LUO M, LIU H. Preparation of the antithrombotic and antimicrobial coating through layer-by-layer self-assembly of nattokinase-nanosilver complex and polyethylenimine[J]. Colloids and Surfaces B, Biointerfaces, 2014, 116: 418−423.

[98] GOSHUA G, PINE A B, MEIZLISH M L, et al. Endotheliopathy in COVID-19-associated coagulopathy: Evidence from a single-centre, cross-sectional study[J]. The Lancet Haematology, 2020, 7(8): e575−e582.

[99] REN B, YAN F, DENG Z, et al. Extremely high incidence of lower extremity deep venous thrombosis in 48 patients with severe COVID-19 in Wuhan[J]. Circulation, 2020, 142(2): 181−183.

宋微, 辛嘉英, 路雪纯, 等. 小麦中阿魏酸的分布、存在形式以及制备方法的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 445−452. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021070224

SONG Wei, XIN Jiaying, LU Xuechun, et al. Research Progress on Distribution, Forms and Preparation Methods of Ferulic Acid in Wheat[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 445−452. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021070224

· 专题综述 ·

小麦中阿魏酸的分布、存在形式以及制备方法的研究进展

宋　微[1], 辛嘉英[1,2,*], 路雪纯[1], 肖婧泓[1], 李　越[1]

（1.哈尔滨商业大学食品科学与工程重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150028;
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）

摘　要: 阿魏酸是一种有益人类健康的酚酸，它可以使糖尿病、胆固醇、心脏病和癌症等严重疾病的风险降低。在小麦中阿魏酸是含量最高的酚酸类物质，主要集中在小麦麸皮部位。随着人们保健意识的不断提高，小麦麸皮中阿魏酸的制备和阿魏酸功能研究日益受到重视。小麦麸皮制备阿魏酸的方法一般有碱解法、生物酶法和生物发酵法，也有很多研究通过物理手段来辅助以上制备方法，例如超声波、高温蒸汽等。本文通过总结小麦中阿魏酸的分布、存在形式及利用小麦麸皮制备阿魏酸的方法，分析以小麦麸皮为原料制备阿魏酸方法优缺点，为小麦麸皮中阿魏酸的开发研究和工业化生产提供一些参考和思路。

关键词: 小麦, 阿魏酸, 分布, 存在形式, 小麦麸皮, 制备

中图分类号: TS202.3　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0445−08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021070224　　本文网刊:

Research Progress on Distribution, Forms and Preparation Methods of Ferulic Acid in Wheat

SONG Wei[1], XIN Jiaying[1,2,*], LU Xuechun[1], XIAO Jinghong[1], LI Yue[1]

（1.Key Laboratory of Food Science and Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150028, China;
2.State Key Laboratory of Carbonyl Synthesis and Selective Oxidation, Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China）

Abstract: Ferulic acid is a beneficial human health phenolic acid that reduces the risk of serious diseases such as diabetes, cholesterol, heart disease and cancer. Ferulic acid is the highest content phenolic acid in wheat, mainly concentrated in wheat bran. With the improvement of people's awareness of health care, the preparation and function of ferulic acid in wheat bran have been paid more and more attention. The methods of preparing ferulic acid from wheat bran generally include alkaline hydrolysis, biological enzyme and biological fermentation, and many studies have assisted the above preparation methods by physical means, such as ultrasonic and high temperature steam, etc. In this paper, the distribution and form of ferulic acid in wheat and the method of preparing ferulic acid from wheat bran are summarized, and the advantages and disadvantages of the method of preparing ferulic acid from wheat bran are analyzed, so as to provide some references and ideas for the development, research and industrial production of ferulic acid in wheat bran.

Key words: wheat; ferulic acid; distribution; form of existence; wheat bran; preparation

收稿日期: 2021−07−20

基金项目: 国家自然科学基金项目（21573055）; 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）; 黑龙江省自然科学基金项目（LH2020C063）。

作者简介: 宋微（1981−）, 女, 博士研究生, 研究方向: 生物催化, E-mail: 474835302@qq.com。

*** 通信作者:** 辛嘉英（1966−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 生物催化, E-mail: xinjiayingvip@163.com。

阿魏酸又称 3-甲氧基-4-羟基肉桂酸，因最初在阿魏中发现所以得名阿魏酸，其结构式为 $C_{10}H_{10}O_4$，分子结构如图 1 和图 2 所示，分子量为 194.19[1]。阿魏酸有顺式和反式两种结构，顺式为黄色油状物，反式为正方形结晶或纤维结晶，溶点为 174 ℃，溶于热水，乙醇和乙酸乙酯，稍溶于乙醚，难溶于苯和石油醚[2]。阿魏酸是一种广泛存在于植物中的酚酸，在细胞壁中与多糖和蛋白质结合成为细胞壁的骨架。在食品原料中，咖啡、谷壳、香兰豆、麦麸、米糠中的阿魏酸含量较高。迄今为止，阿魏酸已被证实具有多种生物活性，是一种有益人类健康的酚酸，它可以使糖尿病、胆固醇、心脏病和癌症等严重疾病的风险降低，且具有优异的抗氧化和抑菌的特性[3]。

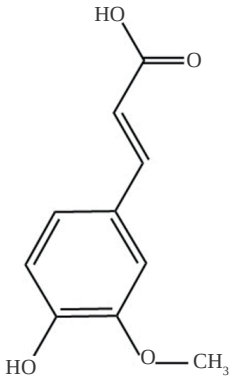


图 1 顺式阿魏酸

Fig.1 Cis-ferulic acid

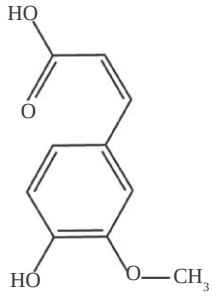


图 2 反式阿魏酸

Fig.2 Trans-ferulic acid

在日本、美国等一些发达国家为了提高食品的品质，已将阿魏酸和阿魏酸衍生物作为食品添加剂在食品中使用，比如可作为抗氧化剂和机能促进剂应用到运动食品中[4]，也可作为防腐剂应用在普通食品中。现阶段，阿魏酸在食品添加剂方向主要的研究应用有抗氧化剂、食品香料、食品交联剂、抗菌剂。作为抗氧化剂，阿魏酸及其衍生物可抑制鱼油[5]、菜籽油、亚麻籽油、初榨橄榄油[6] 等氧化。作为食品香料，阿魏酸可作为底物生产香兰素[7]。作为食品交联剂，阿魏酸可和多糖交联制备食品胶和可食性包装膜[8−9]。作为抗菌剂，阿魏酸及其衍生物可抑制食品中单核李斯特菌、大肠杆菌[10−11] 等。在我国，一些肉桂酸类衍生物，如肉桂酸甲酯、肉桂酸乙酯、肉桂酸苄酯等可作为香料类食品添加剂用在食品中[12]。

小麦麸皮大约占小麦籽粒重量的 25%[13]，是小麦加工过程中最重要的副产物，每年产量可达 1.5 亿吨[14]。羟基肉桂酸衍生物是小麦麸皮中含量最多的酚酸，其中阿魏酸约占麸皮重量的 0.4%~0.7%，占总酚酸的绝大多数[11]。在资源循环和环境友好制备的前提下，以小麦麸皮为原料制备阿魏酸具有副产物再利用和提升麦麸价值的深远意义。

在采用小麦麸皮制备阿魏酸之前，了解小麦中阿魏酸的分布、存在形式有助于选择适合的制备方法有针对性地将小麦麸皮中阿魏酸合理的释放出来。本论文主要介绍了小麦中阿魏酸的分布、结合形式以及以小麦麸皮制备阿魏酸的研究进展情况，通过分析以小麦麸皮为原料制备阿魏酸的各种方法优缺点，为后续小麦麸皮中阿魏酸的开发研究和工业化生产提供一些参考和思路。

1 小麦中阿魏酸分布及存在形式

1.1 小麦中阿魏酸的分布

酚类物质分布于植物的不同部位，且分布的含量也有所差异[15]。在植物体内的代谢过程中，苯丙氨酸途径的第一个底物为苯丙氨酸，它启动酚酸的生物合成，酚酸属于植物的次生代谢产物[16]。在植物受到各种生物和非生物刺激时，植物体内会启动防御机制，在植物的发育过程中，酚酸物质受环境因素影响会在植物的不同组织和细胞中积累。因此，植物的不同部位含有不同数量和种类的酚酸[17]。在小麦中阿魏酸是含量最高的酚酸类物质，小麦麸皮含有大量的阿魏酸及其氧化偶联产物（称为阿魏酸或阿魏酸脱氢二聚体）。表 1 为小麦籽粒不同部位阿魏酸（mg/g 干物质）含量。表 1 中 FA 为阿魏酸；DHD 为阿魏酸脱氢二聚体；DHT 为阿魏酸脱氢三聚体；从表 1 中可以看出阿魏酸在谷物的颗粒中分布不均匀，且在小麦籽粒的果皮部位中阿魏酸的含量最高，为 8.18 mg/g，DHD 达 5.12 mg/g，DHT 达 1.21 mg/g；在谷物的外层中阿魏酸含量最高，而在谷物的胚乳层中阿魏酸含量最低[18]。

1.2 小麦中阿魏酸的存在形式

小麦中存在 3 种形式的阿魏酸，即游离型（水溶型）、可溶性结合型（酯溶型）和不可溶性结合型（束

表 1 小麦籽粒不同部位阿魏酸、阿魏酸脱氢二聚体和阿魏酸脱氢三聚体（mg/g 干物质含量）[19−20]

Table 1 FA, DHD and DHT in different parts of wheat kernel (mg/g dry matter content) [19−20]

组织	阿魏酸	阿魏酸脱氢二聚体	阿魏酸脱氢三聚体
麸皮（Bran）	5.26	1.01	0.24
胚乳（Endosperm）	0.1	0.03	0.00
糊粉层（Aleurone）	8.17	1.07	0.11
种皮（Intermediate layer）	5.92	0.91	0.07
果皮（Pericarp）	8.18	5.12	1.21
胚盘（Scutellum）	3.48	0.37	0.03
胚轴（Embryonic axis）	0.31	0.09	0.01

缚型），小麦中的阿魏酸主要为不可溶性结合型[21]。研究表明，谷粒中游离阿魏酸大部分与多糖和甾醇结合[22]。麦麸中含量最高的阿魏酸是细胞壁多糖的结构元素，大多数阿魏酸与细胞壁结构共价结合[23]。Adom 等[24] 通过测定小麦的酚酸含量，得出小麦颗粒中大部分酚类化合物均为阿魏酸，各种形式的阿魏酸比例分别为游离型 0.2%、可溶性结合型 1%、不可溶性结合型 98.8%。Kaur 等[25] 的研究同样说明了小麦麸皮中的阿魏酸大部分以不可溶性结合型存在，他们发现碱解小麦麸皮中得到的阿魏酸高于纯水提取，从 4 种小麦麸皮中分离得到的富含纤维素的阿拉伯木聚糖组分，经红外光谱分析证实了半纤维素在 1364、1028 和 849 cm^{-1} 处存在波段信号，说明在木聚糖主链上存在很多阿拉伯糖残基支链，在 1520 cm^{-1} 处的吸收带证实了酚环结构的存在，这与阿魏酸的酯化结构有关。

阿拉伯木聚糖（AX）属于非淀粉多糖，它是麦麸细胞壁的主要结构成分。如图 3 所示，麦麸中的非淀粉多糖由 β-1,4-糖苷键连接 β-D-吡喃类木糖残基形成主干。α-L-阿拉伯呋喃糖取代基与木糖残基的（O）-2 和/或（O）-3 位置相连，AX 中的阿拉伯糖/木糖（A/X）比值在 0.3~1.1 之间，比值与小麦的植物来源有关，阿魏酸间或与木质素或阿拉伯糖残基以酯键相连，或阿魏酸本身酯化形成二阿魏酸[27]。

目前，从禾草细胞壁中分离到的阿魏酰低聚糖均具有相同的结构。D-木聚糖通过 β-1,4-糖苷键相连成骨架链，α-L-呋喃型阿拉伯糖残基与木糖残基 O-3 位相连，阿魏酸与阿拉伯糖残基上的 O-5 位相连[27]，表 2 为阿魏酸与阿拉伯糖基木聚糖的链接位置，目前的很多研究结果也证实了这一点。

2　利用小麦麸皮制备阿魏酸的方法

如上所述，阿魏酸在麦麸中的含量较多，多为束缚型，是含量最大的酚酸，和细胞壁多糖、木质素以酯键相连[34]，所以小麦麸皮是制备阿魏酸非常好的原料来源。在胃肠道运输过程中小麦麸皮中的阿魏酸不会从食物基质中释放出来，从而无法被肠道吸收和利用，这是小麦麸皮中阿魏酸生物利用的一个限制因素，在之前的体外研究中发现，麸粉和富含麸粉面包的生物可及性极低（1%）[35]。为了提高小麦麸皮中阿魏酸的生物利用度，必须将小麦麸皮中的束缚型阿魏酸从小麦麸皮基质中释放出来。酸碱法、生物酶法或发酵法、物理辅助法等都能释放小麦麸皮中阿魏酸。传统有机溶剂提取的只是麦麸中的游离型阿魏酸，利用碱解提取的是束缚型和游离型阿魏酸，生物法能够获得各种形式的阿魏酸，所以生物法是获得阿魏酸最大量的制备方法。基于目前以小麦麸皮制备阿魏酸的研究，本文主要分析每种制备方法的优势和局限。

2.1　碱解法

采用酸解或碱解均可制备麦麸酚酸，但 Robbins 等[36] 研究表明在高温的酸性环境下获得酚酸类物质会发生分解，所以采用酸解法会使阿魏酸的提取率降低。强碱（如氢氧化钠）可以破坏酯键，释放游离的阿魏酸。因此，麦麸可通过碱性水解制备阿魏酸。

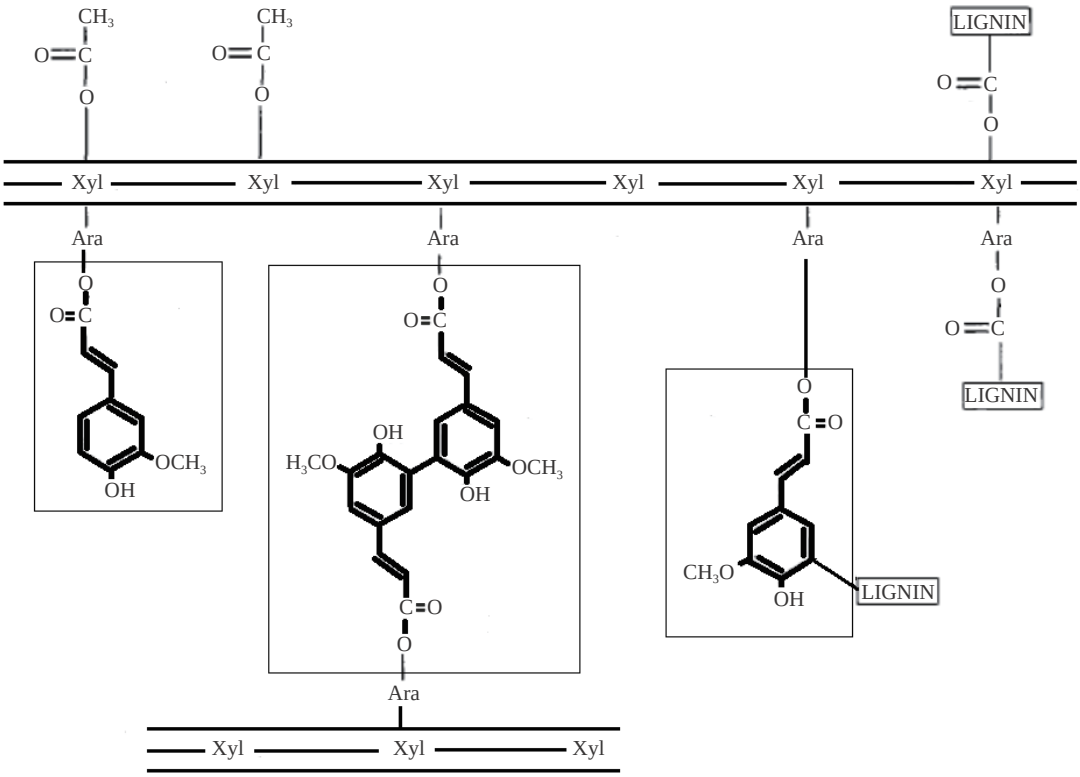
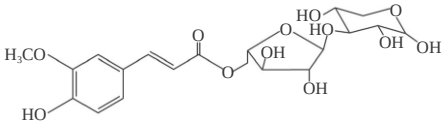
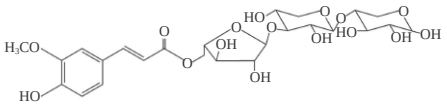
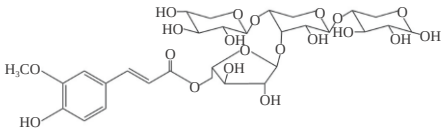
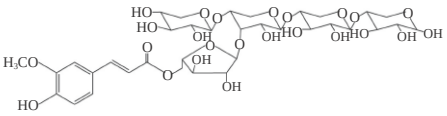


图 3　小麦麸皮中戊聚糖的结构图[26]

Fig.3　Structure diagram of pentosan in wheat bran[26]

表 2 麦麸中阿魏酸与阿拉伯糖基木聚糖链接位置

Table 2 Linking location of ferulic acid and arabinosyl xylan in wheat bran

分子式	分子组成	文献
	FA-ara-xly(阿魏酰阿拉伯糖基木糖)	[28]
	FA-ara-(xly)2(阿魏酰阿拉伯糖基木二糖)	[29−30]
	FA-ara-(xly)3(阿魏酰阿拉伯糖基木三糖)	[31−32]
	FA-ara-(xly)4(阿魏酰阿拉伯糖基木四糖)	[33]

Ideia 等[37] 以小麦发酵啤酒的副产物(啤酒废粮)为原料, 进行碱性水解, 可以提高阿魏酸的产量。碱解法可以有效地从小麦麸皮基质中释放阿魏酸, 但在后续处理存在风险, 因为在生产阿魏酸后, 采用酸处理生产过程的碱会导致盐的产生, 当引入水流会增加周围土壤的盐分和其他生态变化而导致土壤贫瘠问题, 同时这种制备方法不能充分保存阿魏酸的活性, 近几年研究者几乎均采用生物法来制备小麦麸皮中的阿魏酸。

2.2 生物法

2.2.1 酶解法

2.2.1.1 单一酶法 阿魏酸酯酶(EC3.1.1.73)是一种微生物的胞外酶, 可以催化阿魏酸和多糖间酯键水解, 如阿拉伯木聚糖和果胶阿拉伯多糖生产阿魏酸和多糖部分[38]。Nishant 等[39] 用阿魏酸酯酶水解脱淀粉麦麸, 以阿魏酸提取量为考察指标, 研究了载酶量、反应时间、pH、温度等工艺参数对阿魏酸提取量的影响, 使阿魏酸的提取率提高 2.52 倍。Wang 等[40] 研究发现单独使用阿魏酸酯酶(从嗜酸乳酸杆菌中分离纯化得到)水解麸皮不释放阿魏酸, 该酶与木聚糖酶共同水解麸皮时才能释放阿魏酸得到 12.4 nmol 的阿魏酸, 与 α-L-阿拉伯糖苷酶共同水解麸皮时得到 3.64 nmol 的阿魏酸, 如果 3 种酶共同水解小麦麸皮, 阿魏酸可达到 15.7 nmol, 这一点充分证明了木聚糖酶为作用麸皮的主要水解酶, α-L-阿拉伯呋喃糖苷酶为辅助水解酶, 此 2 种酶协同阿魏酸酯酶共同作用小麦麸皮可以促进阿魏酸的充分释放。

阿魏酸酯酶单独水解麸皮不释放阿魏酸的原因可能是: 麸皮中纤维素所形成的空间致密网状结构阻碍了阿魏酸酯酶分解麦麸释放阿魏酸。在小麦麸皮的降解过程中, 细胞壁的半纤维素由木聚糖酶水解成阿魏酸寡聚多糖, 这使细胞壁的物理化学性质发生改变; 随后添加阿魏酸酯酶水解阿魏酸和寡聚多糖的酯键, 从而提高了麦麸基质中阿魏酸的释放量[41]。龚燕燕等[41] 在酶解植物细胞壁时先添加木聚糖酶比先添加阿魏酸酯酶更有利于释放阿魏酸, 也可以证明这一点。

2.2.1.2 酶协同法 降解细胞壁多糖的酶, 而不是破坏酚酸和多糖之间的酯键的酯酶, 例如木聚糖酶类, 在释放游离酚含量中起着最重要的作用[42]。纤维素酶、糖苷酶、阿魏酸酯酶共同参与降解细胞壁中的纤维素及半纤维素分子, 以破坏细胞壁致密的网状交联结构, 可较为彻底地降解植物细胞壁组织[43], 可以说其它酶协同阿魏酸酯酶比单独使用阿魏酸酯酶可更好的释放小麦麸皮中的阿魏酸。目前, 研究比较多的是阿魏酸酯酶与木聚糖酶类的协同作用。Faulds 等[44] 率先用黑曲霉(*Aspergillus niger*)阿魏酸酯酶-Ⅲ与绿色木霉(*Trichodermaviride*)木聚糖酶协同酶解小麦麸皮, 阿魏酸释放量可达到麸皮中总阿魏酸的 95%, 比单独用阿魏酸酯酶水解小麦麸皮时提高了约 24 倍。Li 等[45] 利用木聚糖酶和阿魏酸酯酶的协同水解小麦麸皮, 获得了阿魏酸和低聚木糖, 与单独使用一种酶相比, 在木聚糖酶和阿魏酸酯酶的协同作用下, 小麦麸皮释放阿魏酸的比例提高到 70%。*Thermobacillus xylanilyticus* 是一种嗜热和半纤维素分解细菌, 能够产生含有木聚糖酶、木糖苷酶、阿拉伯糖苷酶和酯酶活性的酶混合物。Dupoiron 等[46] 用该混合酶分解脱浆的麦麸, 使单体阿拉伯糖、木糖和阿魏酸分别释放 6%、20% 和 37% (w/w)。Wang 等[47] 利用有木聚糖酶/阿魏酸酯酶双重作用酶, 从 20 mg 不溶性小麦阿拉伯木聚糖、脱淀粉麦麸中分离得到高得率 FA(分别为 2.78 和 1.82 mg/g 底物)。这种酶具有木聚糖酶/阿魏酸酯酶的双重功能, 生产此酶的重组菌株在生产阿魏酸方面具有很大的应用潜力, 可利用重组菌种生产多种催化功能的酶来降低酶制

剂的生产成本。Mfa 等[48] 研究了小麦麸皮中阿魏酸的酶解提取工艺，阿魏酸提取率高于氢氧化钠控制的水解，证实了通过生物酶法获得有价值的化合物的可行性和潜在的工业开发领域。

2.2.2　发酵法　上述中酶法制备阿魏酸是一种从麸皮中有效释放阿魏酸的方法，但是酶制剂因为成本较高，所以越来越多的研究者采用直接发酵小麦麸皮来释放麦麸中的阿魏酸。根据培养基中是否有游离水流动，发酵可分为液态发酵和固态发酵。研究表明液态发酵的方法效果微弱，有效的相应的相关报道在世界权威杂志上几乎检索不到[49]，一般采用固态发酵制备小麦麸皮阿魏酸。在发酵过程中，微生物一般会同时代谢出木聚糖酶类、阿魏酸酯酶等共同作用小麦麸皮。在自然界中生产阿魏酸酯酶的大多数微生物为真菌，也有少部分为细菌[50]。

Mao 等 [51] 利用从不同食品中分离的乳酸菌（LAB）中筛选出优势菌株粪肠球菌（*Enterococcus faecalis* M2），采用固态发酵法发酵小麦麸皮，使阿魏酸含量提高了 5.5 倍。孙晓明[52] 探究了酶辅助好食脉孢菌固态发酵麦麸释放阿魏酸的最佳方式，研究发现在先接菌发酵 3 d 后再加入木聚糖酶反应 8 h 条件下阿魏酸产量最高，为 4.27 mg/g。高鹏[53] 研究了好食脉孢菌在固态发酵条件下，发酵小麦麸皮生产阿魏酸（游离型）的最佳工艺条件，阿魏酸（游离型）的得率达到 71.45%。2015 年胡博涵[54] 筛选出一株烟青烟曲霉，此菌同时产阿魏酸酯酶、纤维素酶和木聚糖酶，小麦麸皮经固态发酵后，总酚酸释放量提高 6.6 倍，酚酸中阿魏酸占比为 0.697%，较未发酵麸皮的阿魏酸提高了 0.22%。2017 年尹志娜等[55] 比较三种曲霉发酵麦麸释放结合酚酸的能力，发现黑曲霉能够分泌具有较高酶活性的纤维素酶、木聚糖酶、阿拉伯呋喃糖苷酶和 β-糖苷酶，经发酵液分析，其释放结合态阿魏酸的能力最强。同年 Yin 等[56] 评价了两种丝状真菌对小麦麸皮降解能力，以及对酚酸释放能力的差异，发现黑曲霉对麦麸的降解水平及对阿魏酸的释放水平都明显高于棒曲霉，但是微生物分泌酶系降解麦麸产生酚酸的同时也可能会分泌某种酶或其他未知成分来降解某些酚酸组分，当释放率大于降解率时，得到酚酸增加的检测结果，当小于降解率时，测定酚酸值可能会低于原麦麸测定值，说明了小麦麸皮发酵过程中存在微生物消耗阿魏酸的可能。

生物发酵法是一种清洁、对环境友好的生产方式，虽然目前的研究已经说明了发酵法可以有效释放小麦麸皮中的阿魏酸，但是在发酵过程中存在微生物消耗产物阿魏酸的可能。

2.3　物理辅助法

利用超声波的空化作用、机械振动、粉碎和扩散等次级效应[57−59]，能够破坏小麦麸皮的细胞壁以提高其通透性，促进阿魏酸的释放。超声波具有提取时间短、室温环境下操作、溶剂需求小和提取率高的优点，是一种目前辅助提取多酚类化合物应用较多的技术[57−58]。但是，超声辅助提取不能作为一种独立的方法来实现，其作为预处理或辅助制备酚酸，可能会大大提高多酚的提取率[60]。Cherif 等[61] 采用超声波辅助预处理小麦麸皮来提取阿魏酸等酚酸类物质，超声波处理可以显著提高多酚的总收率，每克小麦麸皮中阿魏酸的产量由 6.31 达到 94.62 mg。对于小麦麸皮中阿魏酸的提取超声波仅仅是一种有效的辅助技术，超声波技术的使用受到相对较高成本的阻碍，这阻碍了工业过程的扩大。除此之外，有些报道说明超声波辅助萃取技术可能会降解敏感的多酚类化合物，如阿魏酸等酚酸类物质[62]。

另外，采用高温蒸煮、微粉化等方法对小麦麸皮原料预处理有助于阿魏酸的释放，这些方法可以破坏麦麸中部分的化学键。Liu 等[63] 研究了高温蒸汽预处理对提高麦麸酚类物质提取率的效果。高温蒸汽辅助萃取可释放结合酚酸，在实验过程中，在 215 ℃ 下 120 s 高温蒸汽处理后，阿魏酸游离型从 55.7 μg/g 增加到 586.3 μg/g，结合型从 44.9 μg/g 增加到 1108.4 μg/g。Chen 等[64] 研究了蒸汽闪爆对麦麸酚类成分变化，发现适度蒸汽闪爆处理显著提高了麦麸总可溶性酚含量、游离和共轭阿魏酸含量。Sla 等[65] 研究麦麸微粉化对抗氧化性能及面团性能的影响，麦麸微粉化后提高了阿魏酸释放量。

3　展望

以小麦麸皮为原料制备阿魏酸具有副产物再利用和提升麦麸价值的深远意义，但是目前采用小麦麸皮制备阿魏酸还处于研究阶段，未实现产业化生产。小麦麸皮中富含丰富的非淀粉多糖，可以考虑在工业化生产小麦麸皮膳食纤维的同时实现阿魏酸的生产，通过一次生产得到小麦麸皮中的多种天然产物成分。在小麦麸皮制备阿魏酸的方法中研究者一般采用微生物发酵法或酶解法，生物法相对于化学法对环境较友好、可进行绿色生产，而且生物法更加节能和更具有选择性，利用生物法还可以产生具有不同化学、功能和工艺特征的更大范围的馏分，重要的是，在萃取过程的最后不需要溶剂回收。可以说，在环境可持续发展的大环境下生物法必将是未来制备阿魏酸比较有效的一种方式。在生物法中酶法处理更具体，可以靶向释放目标产物（例如：游离阿魏酸或者共价结合型阿魏酸），但目前酶制剂的成本相对较高，降低产阿魏酸类酶制剂的成本和简化酶法生产阿魏酸的工序，将是实现小麦麸皮生产阿魏酸产业化的主要研究趋势。针对阿魏酸类酶制剂的成本可考虑通过筛选高产酶的菌种、缩短发酵周期、降低发酵原料成本（例如：麦麸的处理成本）实现。在简化酶法生产阿魏酸的工序上，可考虑酶制剂种类的选择，添加的先后顺序等来实现推进小麦麸皮中阿魏酸工业化生产。

参考文献

[1] 孙晓明, 辛嘉英, 林雪, 等. 阿魏酸及其衍生物在食品添加剂领域研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2019, 30(1): 170−176. [SUN X M, XIN J Y, LIN X, et al. Research progress of ferulic acid and its derivatives in food additives[J]. China Food Additives, 2019, 30(1): 170−176.]

[2] LIU K W, MAO-RUN F U. Research progress of ferulic acid[J]. Jiangsu Condiment and Subsidiary Food, 2016.

[3] LI D, RUI Y X, GUO S D, et al. Ferulic acid: A review of its pharmacology, pharmacokinetics and derivatives[J]. Life Sciences, 2021, 284: 119921.

[4] BARBARA L, SOFIA C, GIOVANNI M. Wheat bran phenolic acids: Bioavailability and stability in whole wheat-based foods[J]. Molecules, 2015, 20(9): 15666−15685.

[5] YU L, WANG Y, WEN H, et al. Synthesis and evaluation of acetylferulic paeonol ester and ferulic paeonol ester as potential antioxidants to inhibit fish oil oxidation[J]. Food Chemistry, 2021(8): 130384.

[6] TANSKA M, MIKOLAJCZAK N, KONOPKA I. Comparison of the effect of sinapic and ferulic acids derivatives (4-vinylsyringol vs. 4-vinylguaiacol) as antioxidants of rapeseed, flaxseed, and extra virgin olive oils[J]. Food Chemistry, 2017, 240: 679−685.

[7] PRITAM C, GOUTAM B, SUKANTA K, et al. Cleaner production of vanillin through biotransformation of ferulic acid esters from agroresidue by *Streptomyces sannanensis*[J]. Biosystems Engineering, 2018.

[8] 刘延照, 李想, 刘功继, 等. 辣根过氧化物酶催化阿魏酸交联果胶物化特性[J]. 食品科学, 2020, 41(14): 9−14. [LIU Y Z, LI X, LIU G J, et al. Physicochemical properties of pectin modified by cross-linking with ferulic acid under the catalysis of horseradish peroxidase[J]. Food Science, 2020, 41(14): 9−14.]

[9] 贾超, 王利强, 卢立新, 等. 阿魏酸对马铃薯淀粉基复合膜性能的影响[J]. 食品工业科技, 2013, 34(7): 82−85. [JIA C, WANG L Q, LU L X, et al. Effect of ferulic acid on properties of potato starch-based composite films[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(7): 82−85.]

[10] SHI Y G, BIAN L Q, ZHU Y J, et al. Multifunctional alkyl ferulate esters as potential food additives: Antibacterial activity and mode of action against *Listeria monocytogenes* and its application on American sturgeon caviar preservation[J]. Food Control, 2019, 96: 390−402.

[11] TAKAHASHI H, KASHIMURA M, KOISO H, et al. Use of ferulic acid as a novel candidate of growth inhibiting agent against *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat food[J]. Food Control, 2013, 33(1): 244−248.

[12] 国家卫生和计划生育委员会. GB 2760-2014 文后附录 B [S]. 北京: 中国标准出版社, 2014. [People's Republic of China National Health and Family Planning Commission. GB 2760-2014 Appendix B [S]. Beijing: Standards Press of China, 2014.]

[13] 吴凡, 蔡红燕, 沈汪洋, 等. 小麦麸皮的营养特性与应用进展[J]. 食品工业, 2020, 41(5): 284−287. [WU F, CAI H Y, SHEN W Y, et al. Nutritional characteristics and application progress of wheat bran[J]. Food Industry, 2020, 41(5): 284−287.]

[14] M PRÜCKLER, SIEBENHANDL-EHN S, APPRICH S, et al. Wheat bran-based biorefinery 1: Composition of wheat bran and strategies of functionalization[J]. LWT-Food Science and Technology, 2014, 56(2): 211−221.

[15] BING Z, YZ A, HL A, et al. A review on insoluble-bound phenolics in plant-based food matrix and their contribution to human health with future perspectives[J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 105: 347−362.

[16] KUMAR N, GOEL N. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications[J]. Biotechnology Reports, 2019, 24: e00370.

[17] WEIDNER S, AMAROWICZ R, KARAMA M, et al. Changes in endogenous phenolic acids during development of *Secale cereale caryopses* and after dehydration treatment of unripe rye grains[J]. Plant Physiology & Biochemistry, 2000, 38(7−8): 595−602.

[18] PATRICIA R R, ALFONSO V L, TY FORBES-HERNÁNDEZ, et al. Phenolic compounds isolated from olive oil as nutraceutical tools for the prevention and management of cancer and cardiovascular diseases[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(8): 2305−2325.

[19] BARRON C, SURGET A, ROUAU X. Relative amounts of tissues in mature wheat (*Triticumaestivum* L.) grain and their carbohydrate and phenolic acid composition[J]. Journal of Cereal Science, 2007, 45(1): 88−96.

[20] ANTOINE C. Wheat bran tissue fractionation using biochemical markers[J]. Journal of Cereal Science, 2004, 39(3): 387−393.

[21] 王薇薇, 潘奕鸥, 王丽, 等. 谷物中阿魏酸的分布及其生理活性的研究进展 [J]. 粮油食品科技, 2019, 27(5): 43-48. [WANG W W, PAN Y O, WANG L, et al. Research advances on the distribution and physiological activity of ferulic acid in grain[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2019, 27(5): 43-48.]

[22] ZHAO Z, MOGHADASIAN M H. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review[J]. Food Chemistry, 2008, 109(4): 691−702.

[23] A K SINGH, JAGBIR, REHAL, et al. Enhancement of attributes of cereals by germination and fermentation: A review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2015, 55(11): 1575−1589.

[24] ADOM K K, LIU R H. Antioxidant activity of grains[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2002, 50(21): 6182−7.

[25] KAUR A, SINGH B, YADAV M P, et al. Isolation of arabinoxylan and cellulose-rich arabinoxylan from wheat bran of different varieties and their functionalities[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 112: 106287.

[26] 张璟. 黑曲霉液体发酵法产酶制备阿魏酸和低聚糖的研究[D]. 广州: 暨南大学, 2004. [ZHANG J. Production of enzymes from *Aspergillus niger* by liquid culture and their application in preparation of trans-ferulic acid and oligosaccharide[D]. Guangzhou: Jinan University, 2004.]

[27] MARQUEZ-ESCALANTE J A, CARVJAL-MILLAN E, YADAV M P, et al. Rheology and microstructure of gels based on wheat arabinoxylans enzymatically modified in arabinose to xylose

ratio.[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2018, 98(3): 914−922.

[28] C EL MODAFAR, E EL BOUSTANI. Cell wall-bound phenolic acid and lignin contents in date palm as related to its resistance to *Fusarium oxysporum*[J]. Biologia Plantarum, 2001, 44(1): 125−130.

[29] YOSHIDA-SHIMOKAWA T, YOSHIDA S, KAKEGAWA K, et al. Enzymicferuloylation of arabinoxylan-trisaccharide by feruloyl-CoA: Arabinoxylan-trisaccharide O-hydroxycinnamoyltransferase from *Oryza sativa*[J]. Planta, 2001, 212(3): 470−474.

[30] MCCALLUM J A, TAYLOR I, TOWERS G. Spectrophotometric assay and electrophoretic detection of trans-feruloyl esterase activity[J]. Analytical Biochemistry, 1991, 196(2): 360−366.

[31] RALET M C, FAULDS C B, WILLIAMSON G, et al. Degradation of feruloylated oligosaccharides from sugar-beet pulp and wheat bran by ferulic acid esterases from *Aspergillus niger*[J]. Carbohydrate Research, 1994, 263(2): 257−269.

[32] RHODES D I, SADEK M, B A STONE. Hydroxycinnamic acids in walls of wheat aleurone cells[J]. Journal of Cereal Science, 2002, 36(1): 67−81.

[33] LEQUART C, NUZILLARD J M, KUREK B, et al. Hydrolysis of wheat bran and straw by an endoxylanase: Production and structural characterization of cinnamoyl-oligosaccharides[J]. Carbohydrate Research, 1999, 319(1-4): 102.

[34] TANG Y, HAO J, FAN C, et al. Preparative separation of high-purity trans- and cis-ferulic acid from wheat bran by pH-zone-refining counter-current chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2020, 1636: 461772.

[35] WANG P, HOU C, ZHAO X, et al. Molecular characterization of water-extractable arabinoxylan from wheat bran and its effect on the heat-induced polymerization of gluten and steamed bread quality[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 87: 570−581.

[36] ROBBINS R J. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2003, 51(10): 2866−2887.

[37] IDEIA P, SOUSAFERREIRA I , CASTILHO P C. A novel and simpler alkaline hydrolysis methodology for extraction of ferulic acid from brewer 's spent grain and its (partial) purification through adsorption in a synthetic resin[J]. Foods, 2020, 9(5).

[38] AI M, SAKKA M, KOSUGI A, et al. Significance of a family-6 carbohydrate-binding module in a modular feruloyl esterase for removing ferulic acid from insoluble wheat arabinoxylan.[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2020, 138: 109546.

[39] NISHANT G, MADHAVAN N K. Biorefining of wheat bran for the purification of ferulicacid[J]. Biocatalysis & Agricultural Biotechnology, 2018, 15: 304−310.

[40] WANG X, XIN G, EGASHIRA Y, et al. Release of ferulic acid from wheat bran by an inducible feruloyl esterase from an intestinal bacterium *Lactobacillus acidophilus*[J]. Food Science and Technology Research, 2005, 11(3): 241−247.

[41] 龚燕燕, 殷欣, 唐存多, 等. 宇佐美曲霉阿魏酸酯酶与木聚糖酶协同作用降解小麦麸皮制备阿魏酸[J]. 中国生物制品学杂志, 2014, 27(2): 262−266. [GONG Y Y, YIN X, TANG C D, et al. Synergistic effect of feruloyl esterase and xylanase from *Aspergillus usamii* in preparation of ferulic acid by degradation of wheat bran[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2014, 27(2): 262−266.]

[42] YIN Z N, YAO K, MIN T, et al. Antioxidant and anti-inflammatory capacity of ferulic acid released from wheat bran by solid-state fermentation of *Aspergillus niger*[J]. Biomedical and Environmental Sciences, 2019, 32(1): 11−21.

[43] WONG D W. Feruloyl esterase: A key enzyme in biomass degradation[J]. Applied Biochemistry & Biotechnology Part A Enzyme Engineering & Biotechnology, 2006, 133(2): 87−112.

[44] FAULDS C B, WILLIAMSON G. Release of ferulic acid from wheat bran by a ferulic acid esterase (FAE-III) from *Aspergillusniger*[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 1995, 43(6): 1082−1087.

[45] LI H, GAN L, JIAN L, et al. High efficiency co-production of ferulic acid and xylooligosaccharides from wheat bran by recombinant xylanase and feruloylesterase[J]. Biochemical Engineering Journal, 2017, 120: 41−48.

[46] DUPOIRON S, LAMELOISE M L, POMMET M, et al. A novel and integrative process: From enzymatic fractionation of wheat bran with a hemicellulasic cocktail to the recovery of ferulic acid by weak anion exchange resin[J]. Industrial Crops & Products, 2017, 105: 148−155.

[47] WANG R, YANG J, JIN M J, et al. Efficient ferulic acid and xylo-oligosaccharides production by a novel multi-modular bifunctional xylanase/feruloyl esterase using agricultural residues as substrates[J]. Bioresource Technology, 2019, 297: 122487.

[48] MFA B, AH C, GZ A, et al. Advances in combined enzymatic extraction of ferulic acid from wheat bran[J]. New Biotechnology, 2020, 56: 38−45.

[49] 尹志娜. 小麦麸皮固态发酵过程中活性成分释放的机理研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2018. [YIN Z N. Study on mechanism of active component released by solid-state fermentation of wheat bran[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018.]

[50] TOPAKAS E, VAFIADI C, CHRISTAKOPOULOS P. Microbial production, characterization and applications of feruloyl esterases[J]. Process Biochemistry, 2007, 42(4): 497−509.

[51] MAO M, WANG P, SHI K, et al. Effect of solid state fermentation by *Enterococcus faecalis* M2 on antioxidant and nutritional properties of wheat bran[J]. Journal of Cereal Science, 2020, 94: 102997.

[52] 孙晓明. 好食脉孢菌发酵小麦麸皮释放阿魏酸及其衍生物研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2019. [SUN X M. Ferulic acid and its derivatives release from wheat bran by *Neurospora sitophila* fermentation[D]. Harbin: Harbin University of Commerce, 2019.]

[53] 高鹏. 好食脉孢菌发酵麸皮制备游离阿魏酸及其改性研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2020. [GAO P. Study on the preparation and modification of free Ferulic acid from fermentation bran of *Neurospora fastidious*[D]. Harbin: Harbin University of Commerce, 2020.]

[54] 胡博涵. 利用发酵法释放麦麸中束缚型酚酸及其抗氧化活

性的研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2015. [HU B H. Using fermentation release type bound phenolic acids in the wheat bran and its antioxidant activity[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2015.]

[55] 尹志娜, 吴晖, 赖富饶, 等. 两种丝状真菌发酵小麦麸皮中酚酸的释放及与阿魏酸酯酶和木聚糖酶的关系[J]. 现代食品科技, 2017(3): 81−87. [YIN Z N, WU H, LAI F R, et al. Release of phenolic acid by two filamentous fungi during the fermentation of wheat bran with ferulic acid esterase and xylanase[J]. Modern Food Science and Technology, 2017(3): 81−87.]

[56] YIN Z, WU W, SUN C, et al. Comparison of releasing bound phenolic acids from wheat bran by fermentation of three *Aspergillus* species[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2017, 53(5): 1120−1130.

[57] 吴非, 李钊, 周琪, 等. 超声波辅助水酶法提取米胚油及其成分分析[J]. 食品科学, 2020, 41(24): 233−241. [WU F, LI Z, ZHOU Q, et al. Ultrasonic-assisted aqueous enzymatic extraction and chemical composition of rice germ oil[J]. Food Science, 2020, 41(24): 233−241.]

[58] ALEXANDRE E, CA STRO L, MOREIRA S A, et al. Comparison of emerging technologies to extract high-added value compounds from fruit residues: Pressure- and electro-based technologies[J]. Food Engineering Reviews, 2017, 9(3): 190−212.

[59] L F CĂLINOIU, C V DAN. Thermal processing for the release of phenolic compounds from wheat and oat bran[J]. Biomolecules, 2019, 10(1): 21.

[60] QIAO L, YE X, SUN Y, et al. Sonochemical effects on free phenolic acids under ultrasound treatment in a model system[J]. Ultrasonics-Sonochemistry, 2013, 20(4): 1017−1025.

[61] CHERIF M M, GRIGORAKIS S, HALAHLAH A, et al. High-efficiency extraction of phenolics from wheat waste biomass (bran) by combining deep eutectic solvent, ultrasound-assisted pretreatment and thermal treatment[J]. Environmental Processes:An International Journal, 2020, 7(3): 845−859.

[62] ITAGAKI S, KUROKAWA T, NAKATA C, et al. *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of ferulic acid: A comparative study with other natural oxidation inhibitors[J]. Food Chemistry, 2009, 114(2): 466−471.

[63] LIU L, ZHAO M, LIU X, et al. Effect of steam explosion - assisted extraction on phenolic acid profiles and antioxidant properties of wheat bran[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2016, 96(10): 3484−3491.

[64] CHEN Y, ZHANG R, LIU C, et al. Enhancing antioxidant activity and antiproliferation of wheat bran through steam flash explosion[J]. Journal of Food Science & Technology, 2016, 53(7): 3028−3034.

[65] SLA C, XJA C, JING G, et al. Impact of wheat bran micronization on dough properties and bread quality: Part I-bran functionality and dough properties[J]. Food Chemistry, 2021, 353(6): 129407.

石长波, 孙昕萌, 赵钜阳, 等. 单宁酸和蛋白质相互作用机制及其对蛋白质理化及功能特性影响的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 453−460. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021070225
SHI Changbo, SUN Xinmeng, ZHAO Juyang, et al. Interaction Mechanism between Tannic Acid and Protein and Its Effects on Physicochemical and Functional Properties of Protein[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 453−460. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021070225

· 专题综述 ·

单宁酸和蛋白质相互作用机制及其对蛋白质理化及功能特性影响的研究进展

石长波, 孙昕萌, 赵钜阳*, 袁惠萍
(哈尔滨商业大学旅游烹饪学院, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘　要: 单宁酸具有抗氧化、抑菌、抗病毒等活性，可与蛋白质结合形成复合物，改变蛋白质的结构和功能性质。本文首先阐述了单宁酸-蛋白质相互作用的机理；其次介绍了二者互作的影响因素，单宁酸和蛋白质的相互作用结果取决于蛋白质的类型、单宁酸的构象及二者互作的环境条件，如温度、pH、离子类型和其他加工条件；进而总结了单宁酸对蛋白质结构和功能特性的研究进展及在食品领域的应用，并基于此对单宁酸-蛋白质复合物未来的研究方向进行了展望，以期为单宁酸在食品加工中的应用和改善蛋白质的功能特性提供参考。

关键词: 单宁酸, 蛋白质, 相互作用, 影响因素
中图分类号: TS201.2　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0453−08
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021070225
本文网刊:

Interaction Mechanism between Tannic Acid and Protein and Its Effects on Physicochemical and Functional Properties of Protein

SHI Changbo, SUN Xinmeng, ZHAO Juyang*, YUAN Huiping
(College of Tourism and Cuisine, Harbin University of Commerce, Harbin 150030, China)

Abstract: Tannic acid has antioxidant, antibacterial, antiviral and other activities, which can combine with proteins to form complexes and change the structure and functional properties of proteins. In this paper, the mechanism of tannic acid-protein interaction is first described. Secondly, the influencing factors of the interaction between tannic acid and protein are introduced. The results of the interaction depend on the type of protein, the conformation of tannic acid and the environmental conditions of the interaction, such as temperature, pH, ion type and other processing conditions. Furthermore, the research progress of tannic acid on protein structure and functional properties and its application in food field are summarized. Based on this, the future research direction of tannic acid-protein complexes is prospected, so as to provide reference for the application of tannic acid in food processing and the improvement of protein functional properties.

Key words: tannic acid; protein; interaction; influence factor

多酚类物质是植物次生代谢产物, 由于其潜在的保健作用, 近几十年来受到广泛关注。多酚类化合物主要存在于绿茶和红茶、葡萄酒(尤其是红酒)、一些水果和谷类食品中[1]。据估计, 人类每天约摄入 1 g 多酚, 其中单宁的平均摄入量占 50 % 以上[2]。单宁酸(Tannic acid, TA)又名丹宁酸、鞣酸, 它的化学式为 $C_{76}H_{52}O_{46}$, 分子量在 500 到 3000 kDa 之间, 是一类复杂的高分子多元酚类化合物[2]。单宁酸通常分为可水解单宁和缩合单宁。可水解单宁酸是结构简单的酚类混合物, 其中包括没食子酸和鞣花酸[3], 结

收稿日期: 2021−07−20
基金项目: 黑龙江省普通本科高等学校青年创新人才培养计划（UNPYSCT-2020213）; 哈尔滨商业大学“青年创新人才”支持计划项目（2019CX23）; 哈尔滨商业大学博士科研启动项目（2019DS60）; 烹饪科学四川省高等学校重点实验室资助项目（PRKX201901）。
作者简介: 石长波（1963−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 烹饪科学, E-mail: shicb777@sina.com。
*** 通信作者:** 赵钜阳（1987−）, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 大豆蛋白加工、烹饪科学, E-mail: zhaojuyang1987@163.com。

构如图 1 所示；缩合单宁也称原花青素或类黄酮[4]，是以黄烷-3-醇为基本结构的聚合物，结构如图 2 所示。其用于合成各种次生代谢物，包括萜烯类、生物碱类和酚类化合物。

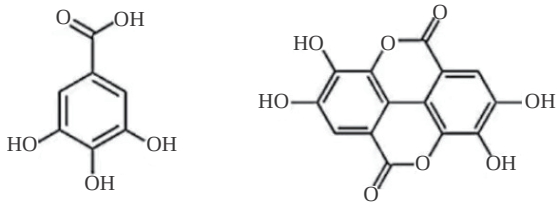


图 1 可水解单宁结构示意图[4]

Fig.1 Hydrolyzed tannin structure[4]

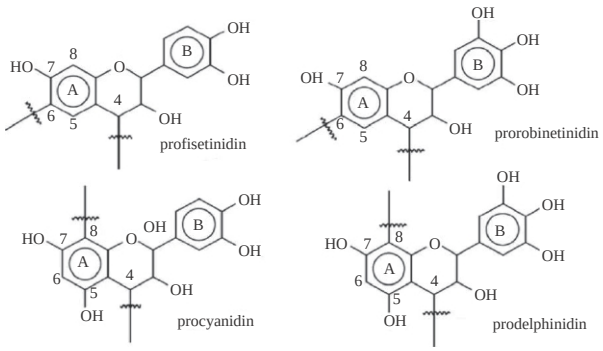


图 2 缩合单宁的主要结构[4]

Fig.2 Four main structures of flavonoid tannins[4]

单宁酸因其生物和药理活性而受到广泛关注（图 3）。一方面，由于单宁具有抗菌、抗病毒和抗突变等活性，对人类慢性病的发展提供了保护作用[5]。另一方面，单宁酸作为抗氧化化合物，可以保护蛋白质、脂质和维生素等营养物质免受氧化[6]。单宁酸与食物中存在的碳水化合物、蛋白质或脂质等天然活性功能化合物的复合可改善许多聚合物的功能属性，扩大其应用领域。蛋白质和单宁酸之间的相互作用会自发地在大多数食品系统中产生“蛋白质-单宁酸复合物”，并且会影响食品的感官、功能和营养特性。研究表明单宁酸和蛋白质的复合物有助于改变食物结构[4]，例如增强小麦面筋的强度[7]以及减少葡萄糖代谢[8]；单宁酸还可以与蛋白质结合形成保护层，用来制备生物膜，例如 Picchio 等[9]使用与卵清蛋白共价交联的单宁酸制备食品包装膜；另一方面，

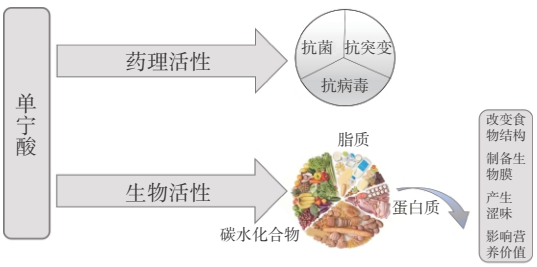


图 3 单宁酸的生物和药理活性[11]

Fig.3 Biological and pharmacological activities of tannic acid[11]

在食品体系中，单宁酸由于与蛋白质的相互作用进而引发沉淀，导致食物涩味的产生[10]；并且单宁酸与消化道中的膳食蛋白相结合，会降低蛋白质的营养价值；蛋白质多肽碳酰基与单宁酸中的烃基形成氢键，结合病原体的酶和毒性蛋白使其失活进而抑制酶活性。

已知单宁酸和蛋白质的相互作用影响蛋白质的结构和功能特性等，更好地理解单宁酸与蛋白质的相互作用将有助于控制食品加工、运输和储存过程中蛋白质的功能特性。并且了解单宁酸和蛋白质之间的结合机制对于开发功能性食品配方和评估单宁酸的生物利用度是必不可少的。基于此，本文主要对单宁酸与蛋白质的相互作用进行阐述，包括单宁酸与蛋白质互作的机理、影响因素，以及单宁酸和蛋白质相互作用的应用，为开发单宁酸-蛋白质功能性产品提供理论依据。

1 单宁酸与蛋白质相互作用的机理

1.1 非共价相互作用

由于单宁酸含有众多的羟基，可以与蛋白质形成强烈的非共价相互作用[12]，其中主要结合方式包括氢键、疏水作用和范德华力[13−14]，如图 4 所示[15]。氢键产生于单宁酸的羟基和蛋白质的羰基和肽键之间[16]。在单宁酸与蛋白质结合的过程中，氢键是二者结合的主要驱动力。Jing 等[17]在 pH6.0 下研究了 TA 与牛乳铁蛋白（Bovine lactoferrin, LF）的络合。发现二者之间存在氢键相互作用，分子对接表明，TA 被残基 Arg654, Pro655, Pro409, Ser601, Arg323, Ser322, Leu385, Tyr319, Leu318, Gln249, Leu687, Cys405, Thr688 和 Lys404 包围（如图 5）。Simon 等[18]通过核磁共振和分子模拟研究表明，原花青素二聚体 B3 与唾液 14-a.a 肽 IB7 通过氢键结合。Frazier 等[5]发现在单宁与富含脯氨酸的唾液蛋白片段结合的过程中，脯氨酸羰基与苯酚或邻苯二酚羟基基团之间通过氢键结合。疏水相互作用主要发生在多酚的苯环与蛋白质脂肪族、芳香族氨基酸之间[19]，其中疏水性氨基酸，如亮氨酸，色氨酸等的蛋白质残基与单宁酸多酚的非极性芳香环相互作用[20]。Ishtikhar 等[1]发现单宁酸的芳香杂环能够与氨基酸残基之间发生疏水相互作用，从而引起蛋白质构象的改变。单宁酸与蛋白质相互作用方式也可能是混合方式，比如同时存在氢键和疏水相互作用，Wang 等[21]研究了玉米醇溶蛋白水解物与单宁酸的胶体络合，通过等温滴定量热法证实了二者之间的络合是由疏水相互作用和氢键驱动的。此外，酚类化合物的苯环与蛋白质非极性氨基酸侧链之间的疏水作用增强了范德华相互作用[22]。Cong 等[23]研究了单宁酸中的缩合单宁葡萄籽原花青素与动物源蛋白之间的相互作用，荧光结果表明二者主要作用力是范德华力、氢键和疏水作用。尽管形成的键可能是可逆的并且能量低，但是非共价蛋白-多酚相互作用可能在食品工业中对改善食品的功能和质量起重要作用。

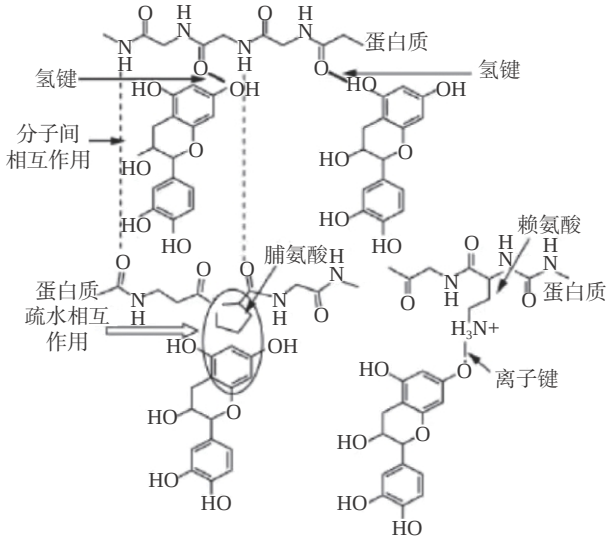


图 4　单宁酸与蛋白质非共价作用机制[13]

Fig.4　Mechanism of non-covalent interaction between tannic acid and proteins[13]

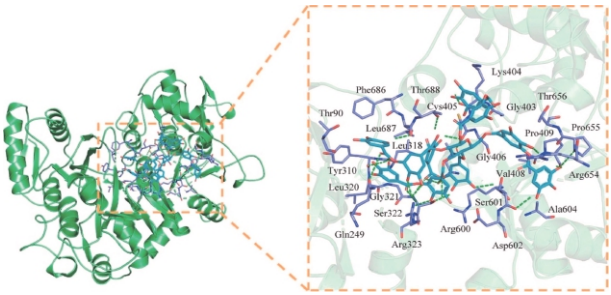


图 5　乳铁蛋白与单宁酸分子对接图[17]

Fig.5　Molecular docking diagram of lactoferrin and tannic acid[17]

1.2　共价相互作用

单宁酸和蛋白质的非共价结合是可逆的，然而二者之间的共价结合是不可逆的。蛋白质和单宁酸通过共价键结合，共价键由蛋白质的亲核基团，例如 $-NH_2$ 和–SH 与单宁酸氧化产生的醌基，如图 6 所示[15]；或由酸催化缩合单宁酸解聚产生的碳阳离子之间的反应产生[22]。单宁酸与蛋白质的共价结合可能发生在碱性、氧化酶存在以及高温处理等条件下[23]（图 7）。单宁酸可以在碱性 pH 下被带有侧链氨基的分子氧化成奎宁，从而导致蛋白质交联的形成[5]，进而改变蛋白质的功能性和其他理化特性；在有氧及氧化酶存在条件下[24]，单宁酸被氧化成醌，从而与蛋

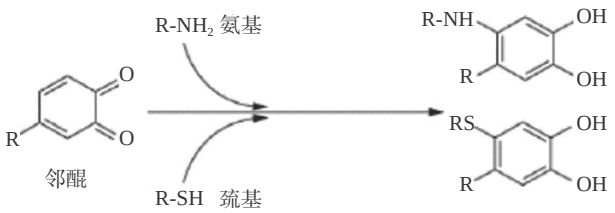


图 6　邻醌与氨基、巯基的 1, 4-亲核加成反应示意图[13]

Fig.6　Schematic diagram of 1,4-nucleophilic addition reaction of o-quinone with amino and sulfhydryl groups[13]

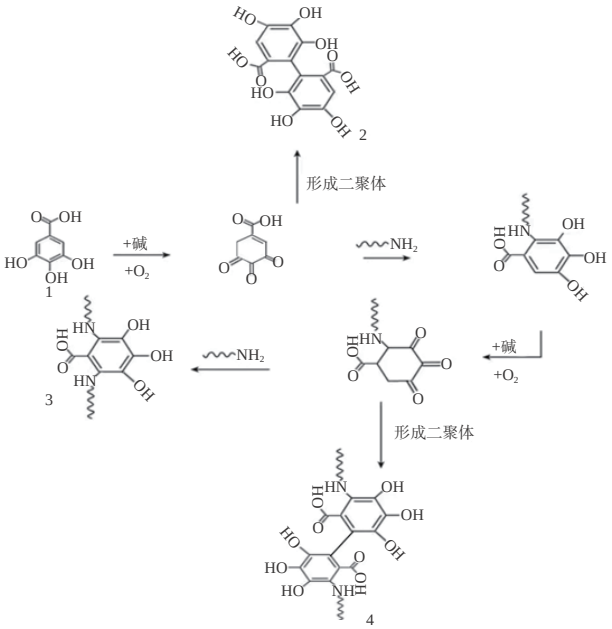


图 7　碱处理形成蛋白质—单宁酸（没食子酸为例）复合物的机理[13]

Fig.7　Mechanism of formation of protein- tannic acid (gallic acid as an example) complex by alkali treatment[13]

白亲核加成；在高温处理条件下，单宁酸会发生氧化和裂解，蛋白的二级结构也同时改变，氨基酸暴露程度增加[25]。

Guo 等[25] 研究发现在碱性条件下，单宁酸（TA）可与大豆分离蛋白（Soy protein isolate, SPI）的共价交联，形成的 SPI-TA 复合物可改善 SPI 抗氧化活性和凝胶特性，且碱处理后，复合物中的色氨酸含量降低，共价结合率提高。Nie 等[26] 发现在碱性和加热条件下，单宁的掺入导致肌原纤维蛋白的聚合，并会产生具有较高拉伸强度和较低水蒸气透过率的薄膜，此外，还发现氧化的单宁和肌原纤维蛋白之间的主要相互作用是形成非二硫键的共价键。Chen 等[27] 发现在碱性及有氧条件下，氧化的单宁酸与猪血浆蛋白水解产物通过共价键发生相互作用。其中单宁酸的 C–S 或 C–N 键与多肽的巯基或氨基侧链形成了二聚体或共价共轭物。目前，描述可逆相互作用的研究数量多于不可逆相互作用，主要是由于缺乏合适的方法来定量分子间共价键，因此单宁酸与蛋白质的共价相互作用机理探究将是未来的研究方向之一。

2　单宁酸与蛋白质相互作用的影响因素

单宁酸和蛋白质相互作用类型受条件的影响（图 8），进而影响蛋白质的功能特性以及单宁酸的活性。此外，单宁酸与蛋白质的相互作用很大程度上取决于蛋白质和单宁酸的构象或类型以及环境条件。不同种类的蛋白质氨基酸组成、疏水性和等电点均不同，这会影响蛋白质与多酚的结合能力[10]。根据 Yildirim-Elikogl 等[28] 的发现，未折叠的天然蛋白质对多酚的亲和力比致密和球形的蛋白质强，这是因为氨基酸残基与多酚相互作用的可能性更高。不同的

酚类化合物在分子量, 羟基化, 甲基化, 氢化和糖基化上有不同的变化, 这强烈影响蛋白质与多酚的相互作用。此外, 还包括一些环境因素, 如温度、酸碱度、离子强度和加工条件等。温度会影响氢键并导致疏水键的形成; 不同的 pH 会改变蛋白质的构象以及蛋白质和多酚的电荷, 从而影响蛋白质与多酚之间相互作用的程度和类型[23]。此外, 蛋白质和单宁酸之间的亲和力会随离子强度的增加而增加。

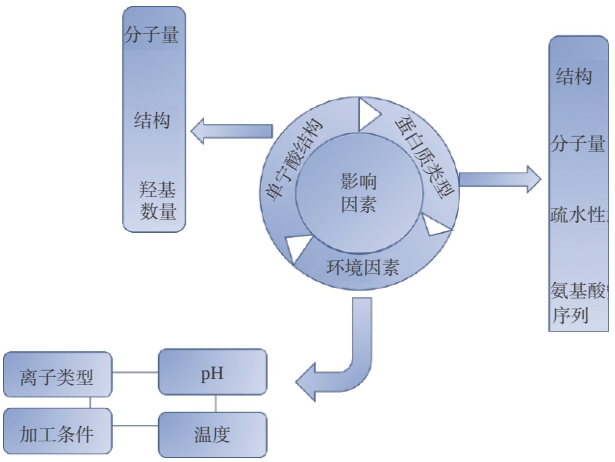


图 8 单宁酸与蛋白质相互作用影响因素图

Fig.8 Influence factors of tannic acid-protein interaction

2.1 蛋白质的类型

蛋白质的结构、分子量、疏水性和氨基酸序列强烈影响其与单宁酸的结合亲和力[29]。不同结构的蛋白质与单宁酸的结合亲和力不同。Xie 等[30] 研究了牛血清白蛋白、β-乳球蛋白、卵清蛋白与单宁酸的复合,发现三种蛋白质对单宁酸的结合亲和力为牛血清白蛋白>β-乳球蛋白>卵清蛋白, 因为牛血清蛋白相比其他两种蛋白质有更多的结合位点与单宁酸结合。具有灵活、无规则卷曲结构的蛋白质比球状的蛋白质更容易与单宁酸结合[6]。Girard 等[31] 研究表明谷蛋白由于具有较大分子量、开放的结构、脯氨酸含量较高更易与单宁酸相互作用。缩合单宁(原花青素)与疏水性不同的蛋白质相互作用时, 表现出的相互作用强度不同。Prigent 等[32] 发现牛血清白蛋白比 α-乳清蛋白和溶菌酶更疏水, 与原花青素的结合亲和力更高[33]。另外, 蛋白质表面上脯氨酸的含量还决定了蛋白质与多酚之间的结合能力, 蛋白质中脯氨酰残基的吡咯烷环能够作为结合位点, 与多酚的没食子酸环结合[20]。序列中含有高比例脯氨酸残基的蛋白质, 例如唾液蛋白质, 与单宁酸的结合能力更强[20]。

2.2 单宁酸的结构

多酚的分子量、结构以及羟基的数量在蛋白质与多酚的相互作用中起着重要作用。研究表明, 高分子量的单宁酸能够优先与蛋白质结合。Jakobek 等[34] 发现聚合度和分子量较高的单宁酸沉淀蛋白质的能力会增强。Carvalho 等[35] 研究发现缩合单宁比水解单宁结合蛋白质的能力更强。

单宁酸结构的灵活性也会影响单宁酸和蛋白质之间的相互作用。例如, 没食子单宁具有柔韧性, 通过分子内旋转, 可以很容易地改变分子构象, 能够适应蛋白质的结合口袋结构[36]。此外, 单宁酸与蛋白质结合的顺序随着分子上羟基数量的增加而增加[37]。Amoako 等[38] 研究发现单宁酸可以通过其羟基和芳香环在蛋白质表面充当多齿配体, 并且二者的结合程度随着二者聚合度的增加而增加。

2.3 环境因素

2.3.1 温度 温度是影响酚类化合物与蛋白质结合亲和力的重要环境因素。在蛋白质与多酚的体系中, 温度主要会影响氢键和疏水相互作用。当温度升高时, 会引起蛋白质构象的改变, 并暴露先前埋藏的疏水位点, 引发与酚类化合物上非极性基团的疏水相互作用, 疏水相互作用力增强, 氢键作用力减弱甚至消失[13]。Prigent 等[37] 发现在 5、25 和 60 ℃ 条件下, 5-O-咖啡酰奎宁酸对葵花籽 11S 蛋白和牛血清白蛋白的结合亲和力随温度升高而降低。

2.3.2 pH 另一个环境影响因素是 pH。pH 直接影响单宁与蛋白质之间的相互作用, 因为 pH 会影响溶液离子化程度。通常, 在低 pH 和高 pH 时, 二者结合和沉淀的程度会降低, 在接近等电点处, 达到最大程度, 此时蛋白质之间的静电排斥最小[22]。Bourvellec 等[36] 发现球状蛋白质, 例如牛血清白蛋白在 pH4.9 时与 TA 结合的亲和力比在 pH7.8 时更高。在接近蛋白质等电点的 pH 下, 观察到蛋白质-单宁复合物的沉淀增加, 因为这些复合物在该 pH 下的溶解度较低[33]。粗单宁菜籽油提取物与牛血清白蛋白、胎球蛋白、明胶和溶菌酶结合后产生的沉淀, 都在蛋白质的等电点附近观察到[33]。研究表明单宁酸和唾液蛋白在 pH 为 3.5 时结合, 比在 pH 为 7 时结合, 产生的涩味更强[37]。这是因为相互作用的分子的电荷或氢键形成位点结构的变化, 从而导致涩味的变化。Jauregi 等[39] 将乳清蛋白与单宁络合, 二者相互作用产生沉淀有效降低了涩味。

2.3.3 离子类型 离子类型也能够影响单宁和蛋白质之间的相互作用。随着离子强度的增加, 蛋白质的疏水氨基酸残基可以暴露出来, 增加了蛋白质和单宁之间的亲和力[40], 此外离子浓度还会影响蛋白质的消化率。Elaine 等[33] 观察到二价阳离子能够增加单宁酸和蛋白质的亲和力并影响蛋白质的消化率。其中 Mg^{2+}和 Ca^{2+}能够降低蛋白质消化率, 而 Mn^{2+}使蛋白质的消化率增加了。Kaspchak 等[41] 采用等温滴定量热法研究单宁酸与蛋白质的相互作用, 结果表明在高离子强度条件下单宁酸和蛋白质的结合, 降低了蛋白质的消化率。

2.3.4 加工条件 不同的加工条件对蛋白质和单宁酸复合物的影响效果依具体的反应条件而异。在不同的加工条件下, 能够改变单宁酸的化学结构, 从而改变生物活性[42]。研究表明高压处理能够增强多酚

和蛋白质分子间的氢键和疏水相互作用，从而形成粒径更小、结构更紧密的复合物[43]。富含原花青素的葡萄籽提取物经高强度超声纯化后，原花青素的抗氧化活性显著提高[42]。此外，一些非热加工技术的使用，可以改善蛋白质的功能特性，有利于更好的应用在食品领域。经超声和高压均质处理后，蛋白质的溶解性、乳化性均有显著提高[44]。目前，大多数研究集中在其他酚类化合物和蛋白质的预处理，对单宁酸和蛋白质复合物进行不同加工条件预处理的研究较少，未来可考虑通过调节加工条件来改善单宁酸和蛋白质复合，使其更好的应用于食品领域。

2.3.5　其他环境因素　单宁酸-蛋白质的相互作用也可能受到其他环境因素的影响，例如当复合物体系中存在其他物质时，通过改变溶液的极性或是改变体系的表面活性等，也会相应影响单宁酸-蛋白质间的相互作用。例如溶液中含有乙醇能够改变溶液的极性。陈雨桐等[45]研究发现单宁酸与小麦醇溶蛋白溶解在乙醇-水溶剂中时，色氨酸的最大发射波长比在水溶液中有所偏移，这是由于乙醇的存在导致溶剂的极性降低，从而造成色氨酸最大发射波长蓝移。此外，有些表面活性剂可与蛋白质相互作用，吸附在气/水、油/水、乳状液等界面[46]，进而改变蛋白质的功能性质。邹苑[47]通过制备玉米醇溶蛋白-单宁酸-十二烷基硫酸钠（Sodium dodecyl sulfate, SDS）复合体系，发现 SDS 加入改善了复合物的起泡性和起泡稳定性，因此也可以通过添加表面活性剂等人工分子伴侣，介导单宁酸-蛋白质相互作用，进而优化蛋白乳液性质。

3　单宁酸对蛋白质结构与特性的影响

单宁酸通过共价或者非共价与蛋白质进行相互作用，二者之间互作受多种因素影响，且不同种类蛋白质的结构和功能性变化不同，二者复合后对蛋白质的结构、功能特性以及对单宁酸的生物利用率均会产生显著影响（图 9），进而影响复合物在食品领域中的应用。

3.1　对蛋白质结构的影响

单宁与蛋白质相互作用对蛋白质结构性质的影响可以用荧光光谱、差示扫描量热法、圆二色谱、傅里叶红外变换光谱、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳等技术来研究。蛋白质游离氨基酸和巯基含量的变化可以反映蛋白质一级结构的变化。单宁酸含有大量的羟基，羟基转化为具有交联作用的醌，进而与巯基相互作用[48]。此外，羟基还可以与氨基相互作用，导致氨基含量的降低。有研究发现在鱼肌原纤维蛋白中添加单宁酸，单宁酸与肌原纤维蛋白通过共价结合，结合后复合物中氨基和巯基含量显著降低[49]。蛋白质二级结构的变化反映为 α-螺旋、β-折叠、β-转角和无序卷曲结构的百分比变化。Wang 等[50]研究了单宁对面筋蛋白结构性质的影响，傅里叶变换红外光谱分析表明，添加单宁后面团中 β-转角和 α-螺旋构象增加，而 β-折叠构象减少，表明单宁酸能够促进面筋蛋白的聚集从而改善面筋网络的微观结构。然而，有研究表明单宁的加入，会诱导蛋白质参与其他反应，因此不会改变或破坏大豆蛋白的二级结构[48]。Deng 等[51]发现原花青素与大豆铁蛋白质的相互作用，不能引起大豆铁蛋白质的二级结构的改变，这是因为原花青素与铁蛋白的交联，诱导蛋白与蛋白相互作用的发生，导致铁蛋白质聚集体产生。单宁酸与蛋白质发生相互作用时，蛋白质三级结构的变化可以反映为色氨酸及酪氨酸残基的极性变化。Xie 等[30]通过制备单宁酸-β-乳球蛋白复合物，发现 β-乳球蛋白的荧光强度随着单宁酸浓度的增加而降低，荧光峰波长发生红移，表明 Trp 残基周围极性增强，疏水性显著降低。综上所述，单宁酸与蛋白质互作会引起蛋白质结构发生不同程度的改变，具体的影响与蛋白质的种类有关。

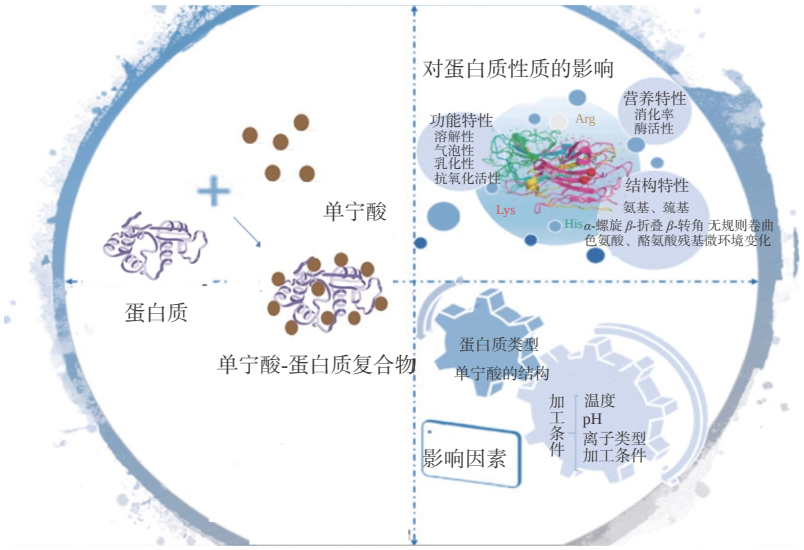


图 9　单宁酸和蛋白质互作对蛋白质理化及功能特性影响概述

Fig.9　Summary of the effects of tannic acid and protein interaction on physicochemical and functional properties of proteins

3.2 对功能特性的影响

单宁酸和蛋白质复合会影响蛋白质的功能特性，如溶解性、起泡性、乳化性、抗氧化能力等，还可能会对产品感官品质以及贮藏特性产生影响。曹慧英等[52]将玉米黄粉蛋白(Corn Yellow Protein, CYP)与 TA 复合，结果表明 TA 的加入 CYP 的溶解性和抗氧化活性显著提高。Wang 等[53]利用玉米蛋白水解酸(Corn Protein Hydrolytic Acid, CPH)与 TA 的复合物来改善 CPH 本身的发泡特性，与纯 CPH 相比，CPH-TA 复合物保持了 CPH 本身良好的发泡能力，且提高了其泡沫稳定性。用酚类化合物改性的蛋白质可用作食品体系中的乳化剂，以降低乳液稳定性并增加油滴的尺寸。单宁酸和蛋白质相互作用后可以使乳液具有良好的氧化稳定性，可用作乳化食品体系中的抗氧化剂和乳化剂。Li 等[54]将豌豆蛋白和单宁酸制成复合物，研究它们在亚麻籽水包油乳液中作为抗氧化剂和乳化剂的能力。结果表明，复合物能够增强亚麻籽油输送系统的氧化稳定性。Intarasirisawat 等[55]研究发现氧化单宁酸与鱼卵蛋白水解物结合后，可以增强乳液的稳定性和氧化稳定性。一些发现表明，由于蛋白质表面的活性以及单宁酸的抗氧化活性，单宁酸与肉制品中的蛋白质相互作用，可以提高蛋白质结构稳定性，并改善肉类产品的质量。Zhong 等[56]在腌制猪肚中添加不同浓度的单宁酸，研究肌原纤维蛋白的水分分布和结构特性的变化。结果表明，添加浓度为 0.50 g/kg 的单宁酸可以抑制腌制过程中水分流失，并保持肌原纤维蛋白的结构稳定性。

3.3 对营养特性和消化率的影响

食物蛋白质的营养价值取决于几个因素，其中包括蛋白质来源、氨基酸组成、消化过程中对水解的敏感性等，单宁酸与蛋白质结合可能影响某些氨基酸的有效性，也可能改变蛋白质的结构，从而影响蛋白质的营养特性、消化率以及酶活性[37]。大豆蛋白与没食子酸、咖啡酸、槲皮素等几种酚类化合物作用后，赖氨酸、半胱氨酸、色氨酸含量降低[57]。高粱中缩合单宁与高粱中主要蛋白质发生络合作用会导致高粱蛋白消化率下降。原花青素也可以导致蛋白质沉淀和消化酶的抑制，从而改变蛋白质的消化率。Jing 等[17]将 TA 与 LF 复合，通过蛋白水解消化实验证明，TA 的加入降低了 LF 的消化能力，根据这一特性可以改善生物复合物的消化稳定性，用于口服药物的功能成分。

此外，单宁酸与蛋白质相互作用后还会影响单宁酸的相关性质，如改变单宁酸的生物利用率。单宁酸与人血清白蛋白(Humanserum albumin, HSA)结合会降低单宁酸的生物利用度。HSA 是血浆中含量较多的蛋白质，主要用于结合一些重要的生物化合物，如胆红素。而当 TA 进入人体代谢至血液中时，TA 和 HSA 的相互作用能够影响人血清白蛋白的化学结构和结合能力。另一方面，二者结合会导致单宁从血液中清除，最终降低单宁酸的生物利用率[39]。

4 总结与展望

对于单宁酸和蛋白质相互作用的研究日渐增多，这些相互作用可以是非共价的，例如疏水相互作用或氢键等；也可以在单宁转变成醌或酚基形式后与蛋白质进行共价结合。二者之间互作受蛋白质的类型，酚类化合物的结构以及环境因素的影响，并会引起蛋白质理化及功能特性的改变，还会影响单宁酸的相关性质。更好地理解单宁酸与蛋白质的相互作用将有助于控制食品加工、运输和储存过程中蛋白质的功能特性，未来的研究应考虑对不同基质和不同加工条件下蛋白质与单宁酸的相互作用进行更深入的研究，以指导开发富含单宁酸的功能性食品，提高其营养和健康效益，进一步扩大其应用领域。

参考文献

[1] ISHTIKHAR M, AHMAD E, SIDDIQUI Z, et al. Biophysical insight into the interaction mechanism of plant derived polyphenolic compound tannic acid with homologous mammalian serum albumins[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017: S0141813017330040.

[2] 石闪闪, 何国庆. 单宁酸及其应用研究进展[J]. 食品工业科技, 2012, 33(4): 410−412,416. [SHI S S, HE G Q. The research progress of tannic acid and its application[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(4): 410−412,416.]

[3] AROSO I M, ARAÚJO, ANA R, et al. Cork–current technological developments and future perspectives for this natural, renewable and sustainable material[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2017: acssuschemeng, 7b00751.

[4] SHIRMOHAMMADLI Y, EFHAMISISI D, PIZZI A. Tannins as a sustainable raw material for green chemistry: A review[J]. Industrial Crops and Products, 2018, 126: 316−332.

[5] FRAZIER R A, DEAVILLE E R, GREEN R J, et al. Interactions of tea tannins and condensed tannins with proteins[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2010, 51(2): 490−495.

[6] ADRAR N S, MADANI K, ADRAR S. Impact of the inhibition of proteins activities and the chemical aspect of polyphenols-proteins interactions[J]. PharmaNutrition, 2019, 7: 100142.

[7] GIRARD A L, CASTELL-PEREZ M E, BEAN S R, et al. Effect of condensed tannin profile on wheat flour dough rheology[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2016: 7348.

[8] AMOAKO D B, AWIKA J M. Polymeric tannins significantly alter properties and *in vitro* digestibility of partially gelatinized intact starch granule[J]. Food Chemistry, 2016, 208: 10−17.

[9] PICCHIO M L, LINCK Y G, MONTI G A, et al. Casein films crosslinked by tannic acid for food packaging applications[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 84: 424−434.

[10] WANG Z, KANG H, ZHANG W, et al. Improvement of interfacial interactions using natural polyphenol-inspired tannic acid-coated nanoclay enhancement of soy protein isolate biofilms[J]. Applied Surface Science, 2017, 401: 271−282.

[11] ARJONA, MERLY F. Functional foods for chronic diseases [M]. Delve Publishing, 2008: 286.

[12] CHEN Y, LI Z, YI X, et al. Influence of carboxymethylcellulose on the interaction between ovalbumin and tannic acid via non-covalent bonds and its effects on emulsifying properties[J]. LWT-Food Science and Technology, 2019, 118: 108778.
[13] QUAN T H, BENJAKUL S, SAE-LEAW T, et al. Protein–polyphenol conjugates: Antioxidant property, functionalities and their applications[J]. Trends in Food Science & Technology, 2019, 91: 507−517.
[14] YOU J, LUO Y, WU J. Conjugation of ovotransferrin with catechin shows improved antioxidant activity[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2014, 62(12): 2581−2587.
[15] 黄子林, 孔祥珍, 张丽娜, 等. 蛋白质与多酚相互作用研究进展[J]. 中国粮油学报, 2021, 36(3): 195−202. [HUANG Z L, KONG X Z, ZHANG L N, et al. Progress in the interaction between protein and polyphenols[J]. Journal of Grain and Oil of China, 2021, 36(3): 195−202.]
[16] BUREN J P V, ROBINSON W B. Formation of complexes between protein and tannic acid[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 1969, 17(4): 772−777.
[17] JING H, HUANG X, JIANG C, et al. Effects of tannic acid on the structure and proteolytic digestion of bovine lactoferrin[J]. Food Hydrocolloids, 2021(3): 106666.
[18] SIMON C, BARATHIEU K, LAGUERRE M, et al. Three-dimensional structure and dynamics of wine tannin-saliva protein complexes. A multitechnique approach[J]. Biochemistry, 2003, 42(35): 10385−10395.
[19] 关惠, 李锋, 李大鹏. 多酚与蛋白质相互作用的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(3): 682−687. [GUAN H, LI F, LI D P. Research progress on the interaction between polyphenols and protein[J]. Journal of Food Safety and Quality Inspection, 2020, 11(3): 682−687.]
[20] OZDAL T, CAPANOGLU E, ALTAY F. A review on protein –phenolic interactions and associated changes[J]. Food Research International, 2013, 51(2): 954−970.
[21] WANG Y H, WAN Z L, YANG X Q, et al. Colloidal complexation of zein hydrolysate with tannic acid: Constructing peptides-based nanoemulsions for alga oil delivery[J]. Food Hydrocolloids, 2016, 54(mar.pt.A): 40−48.
[22] FREITAS D, VICTOR. Protein/polyphenol interactions: Past and present contributions. Mechanisms of astringency perception[J]. Current Organic Chemistry, 2012, 16(6): 724−746.
[23] CONG J, CUI J, ZHANG H, et al. Binding affinity, antioxidative capacity and *in vitro* digestion of complexes of grape seed procyanidins and pork, chicken and fish protein[J]. Food Research International, 2020, 136: 109530.
[24] 郝雪娇, 程亚, 曾茂茂, 等. 食品多酚与蛋白相互作用及其对多酚生物可利用性影响的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(8): 232−237. [QIE X J, CHENG Y, ZENG M M, et al. Research progress on the interaction between food polyphenols and protein and its effect on the bioavailability of polyphenols[J]. Food and Fermentation Industry, 2019, 45(8): 232−237.]
[25] GUO Y, BAO Y H, SUN K F, et al. Effects of covalent interactions and gel characteristics on soy protein-tannic acid conjugates prepared under alkaline conditions[J]. Food Hydrocolloids, 2020: 106293.
[26] NIE X, ZHAO L, WANG N, et al. Phenolics-protein interaction involved in silver carp myofibrilliar protein films with hydrolysable and condensed tannins[J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 81: 258−264.
[27] CHEN Y, JIANG S, CHEN Q, et al. Antioxidant activities and emulsifying properties of porcine plasma protein hydrolysates modified by oxidized tannic acid and oxidized chlorogenic acid[J]. Process Biochemistry, 2019, 79: 105−113.
[28] YILDIRIM-ELIKOGLU S, ERDEM Y K. Interactions between milk proteins and polyphenols: Binding mechanisms, related changes, and the future trends in the dairy industry[J]. Food Reviews International, 2017: 665-697.
[29] YL A, DONG H, BING L D, et al. Engineering polyphenols with biological functions via polyphenol-protein interactions as additives for functional foods[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 110(5): 470−482.
[30] XIE L, WEHLING R L, CIFTCI O, et al. Formation of complexes between tannic acid with bovine serum albumin, egg ovalbumin and bovine beta-lactoglobulin[J]. Food Research International, 2017, 102(dec.): 195.
[31] GIRARD A L, TEFERRA T, AWIKA J M. Effects of condensed vs hydrolysable tannins on gluten film strength and stability[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 89(APR.): 36−43.
[32] PRIGENT S V E, VORAGEN A G J, KONINGSVELD G A V, et al. Interactions between globular proteins and procyanidins of different degrees of polymerization[J]. Journal of Dairy Science, 2009, 92(12): 5843−5853.
[33] ELAINE, KASPCHAK, ANA, et al. Effect of divalent cations on bovine serum albumin (BSA) and tannic acid interaction and its influence on turbidity and *in vitro* protein digestibility[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 136: 486−492.
[34] JAKOBEK L. Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins[J]. Food Chemistry, 2015, 175: 556−567.
[35] CARVALHO E, MARIA JOO PÓVOAS, MATEUS N, et al. Application of flow nephelometry to the analysis of the influence of carbohydrates on protein–tannin interactions[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2006, 86(6): 891−896.
[36] LE BOURVELLEC C, RENARD C M G C. Interactions between polyphenols and macromolecules: Quantification methods and mechanisms[J]. Critical Reviews in Food Science & Nutrition, 2012, 52(3): 213−248.
[37] PRIGENT S, KONINGSVELD G, GRUPPEN H, et al. Effects of non-covalent interactions with 5-O-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid) on the heat denaturation and solubility of globular proteins[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2003, 51(17): 5088−5095.
[38] D AMOAKO, AWIKA J M. Polyphenol interaction with food carbohydrates and consequences on availability of dietary glucose[J]. Current Opinion in Food Science, 2016, 8(Complete):

14−18.
[39] JAUREGI P, GUO Y, ADELOYE J B. Whey proteins-polyphenols interactions can be exploited to reduce astringency or increase solubility and stability of bioactives in foods[J]. Food Research International, 2020: 110019.
[40] BOHIN M C, VINCKEN J P, WESTPHAL A H, et al. Interaction of flavan-3-ol derivatives and different caseins is determined by more than proline content and number of proline repeats[J]. Food Chemistry, 2014, 158(sep.1): 408−416.
[41] KASPCHAK E, MAFRA L I, MAFRA M R. Effect of heating and ionic strength on the interaction of bovine serum albumin and the antinutrients tannic and phytic acids, and its influence on *in vitro* protein digestibility[J]. Food Chemistry, 2018, 252: 1−8.
[42] ANA M L, MARIN P, V MAR. Effects of high intensity ultrasound on disaggregation of a macromolecular procyanidin-rich fraction from *Vitis vinifera* L. seed extract and evaluation of its antioxidant activity[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2018, 50: S1350417718310617-.
[43] JIN B, ZHOU X, ZHONG Y, et al. The synergistic effect of high pressure processing and pectin on the physicochemical stability and antioxidant properties of biopolymer complexes composed of soy protein and coumarin[J]. Process Biochemistry, 2021: 104.
[44] 韩莛璐. 高压均质和超声处理对酪蛋白和乳清蛋白结构及功能特性的研究 [D]. 济南: 山东师范大学, 2020. [HAN L L. Study on the structure and functional properties of casein and whey protein by high pressure homogenization and ultrasonic treatment [D]. Jinan: Shandong Normal University, 2020.]
[45] 陈雨桐, 梁宏闪, 李斌. 单宁酸对小麦醇溶蛋白结构及功能性质的影响[J]. 食品工业科技, 2020, 41(6): 39−46,52. [CHEN Y T, LIANG H S, LI B. Effects of tannic acid on the structure and functional properties of wheat gliadin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(6): 39−46,52.]
[46] 葛思彤, 贾睿, 刘回民, 等. 玉米醇溶蛋白基纳米颗粒的制备及应用研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(15): 285−292. [GE S T, JIA R, LIU H M, et al. Progress in preparation and application of zein based nanoparticles[J]. Food Science, 2021, 42(15): 285−292.]
[47] 邹苑. 玉米醇溶蛋白-单宁酸复合颗粒对界面主导食品体系的调控研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2018. [ZOU Y. Study on the regulation of zein tannic acid composite particles on interfacial dominant food system[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018.]
[48] 隋晓楠, 黄国, 刘贵辰. 大豆蛋白质-植物多酚互作的研究进展[J]. 中国食品学报, 2019, 19(7): 1−10. [SUI X N, HUANG G, LIU G C. Research progress of soybean protein plant polyphenol interaction[J]. Chinese Journal of Food Science, 2019, 19(7): 1−10.]
[49] 张慧芸, 吴静娟, 段续. 添加多酚对鲤鱼肌原纤维蛋白结构及膜性能的影响[J]. 食品科学, 2016, 37(5): 35−40. [ZHANG H Y, WU J J, DUAN X. Effects of polyphenols on structure and membrane properties of carp myofibrillar protein[J]. Food Science, 2016, 37(5): 35−40.]
[50] WANG Q, LI Y, SUN F, et al. Tannins improve dough mixing properties through affecting physicochemical and structural properties of wheat gluten proteins[J]. Food Research International, 2015, 69(1): 64-71.
[51] DENG J, LI M, ZHANG T, et al. Binding of proanthocyanidins to soybean (Glycine max) seed ferritin inhibiting protein degradation by protease *in vitro*[J]. Food Research International, 2011, 44(1): 33−38.
[52] 曹慧英, 柴媛, 段玉敏, 等. 单宁酸-玉米黄粉蛋白复合物抗氧化性研究[J]. 食品科技, 2020, 45(9): 253−260. [CAO H Y, CHAI Y, DUAN Y M, et al. Antioxidant activity of tannic acid corn glutenin complex[J]. Food Science and Technology, 2020, 45(9): 253−260.]
[53] WANG Y H, LIN Y, YANG X Q. Foaming properties and air –water interfacial behavior of corn protein hydrolyzate –tannic acid complexes[J]. Journal of Food Science and Technology, 2019.
[54] LI R, DAI T, TAN Y, et al. Fabrication of pea protein-tannic acid complexes: Impact on formation, stability, and digestion of flaxseed oil emulsions[J]. Food Chemistry, 2020, 310(Apr.25): 125828.1−125828.11.
[55] INTARASIRISAWAT R, BENJAKUL S, VISESSANGUAN W. Stability of emulsion containing skipjack roe protein hydrolysate modified by oxidised tannic acid[J]. Food Hydrocolloids, 2014, 41: 146−155.
[56] ZHONG Q, LI H, DENG S, et al. Tannic acid-induced changes in water distribution and protein structural properties of bacon during the curing process[J]. LWT, 2020: 110381.
[57] TO A, PEY B, GT C, et al. Polyphenol-protein interactions and changes in functional properties and digestibility[J]. Encyclopedia of Food Chemistry, 2019: 566−577.

赵彤，王宣，吴黎明，等. 发酵蜂产品研究进展 [J]. 食品工业科技，2022, 43(14)：461−466. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021070251

ZHAO Tong, WANG Xuan, WU Liming, et al. Research Progress of Fermented Bee-products[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 461−466. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021070251

·专题综述·

发酵蜂产品研究进展

赵　彤[1]，王　宣[1]，吴黎明[1]，延　莎[1,2]，卢焕仙[3]，赵洪木[3,*]，薛晓锋[1,*]

（1.中国农业科学院蜜蜂研究所，北京 100093；
2.山西农业大学食品科学与工程学院，山西太谷 030801；
3.云南省农业科学院蚕桑蜜蜂研究所，云南蒙自 661100）

摘　要：蜂产品，即与蜜蜂相关的产品，包括蜂蜜、蜂花粉、蜂王浆等。发酵蜂产品指以蜂产品为原料，通过发酵作用所得产品，如蜂花粉面包、蜂蜜酒等，其营养丰富、口味独特。发酵蜂产品较蜂产品有更多优势，如含糖量低、致敏性蛋白少、易吸收、口感佳等。但由于诸多因素限制，相对于其他发酵产品，发酵蜂产品发展缓慢。因此，总结分析发酵蜂产品的发展现状及技术应用前景，对我国蜂产业发展及综合利用意义重大。文章综述了发酵蜂产品的种类和特征，针对发酵蜂产业现存的问题提出了改进方法，以期为发酵蜂产品的开发利用提供参考。

关键词：蜂产品，发酵，营养功能，研究进展

中图分类号：TS205.5　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1002−0306(2022)14−0461−06

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021070251　　本文网刊：

Research Progress of Fermented Bee-products

ZHAO Tong[1]，WANG Xuan[1]，WU Liming[1]，YAN Sha[1,2]，LU Huanxian[3]，ZHAO Hongmu[3,*]，XUE Xiaofeng[1,*]

（1.Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China；
2.College of Food Science and Engineering, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China；
3.Sericultural and Apicultural Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Science, Mengzi 661100, China）

Abstract: Bee-products are the kinds of products which relate to bees, include honey, bee pollen, royal jelly, etc. Fermented bee-product is a kind of added-value product by microbial fermentation. There are many types of fermented bee-products such as honey wine, royal jelly yoghourt and royal jelly beer, etc. Fermented bee-products are rich in nutrition and unique in taste. Fermented bee-products have more advantages than raw bee-product materials, such as lower sugar content, less allergenic protein, easier absorption, better taste, etc. Compared with other fermented products, the development of fermented bee-products is slow. Therefore, it is significant to summarize and analyze the development status and application prospect of fermented bee-product for the development and comprehensive utilization of the bee industry in China. In this paper, the types and characteristics of fermented bee-products are reviewed, and the improvement methods for the existing problems of fermentation bee industry are put forward. The purpose is to provide reference for the development and utilization of fermented bee-products.

Key words: bee-products; fermentation; nutritional function; research progress

发酵食品是以农副产品为原料，利用微生物发酵生产的产品，即通过微生物的生长代谢赋予食品营养、香味，并延长食品保质期的加工食品[1]。发酵食品是日常饮食的重要组成部分，约占人们饮食的三分之一[2]。传统发酵食品大多凭借经验操作，缺乏规范的指导，过程难以控制。现代发酵技术结合了传统发酵技术和现代生物技术，使发酵工艺更趋向于多元化的复合菌株发酵，温湿度等相关指标更易控制，菌种

收稿日期：2021−07−22

基金项目：所企合作创新项目（MFSHTK-CS-2020088）；所企合作创新项目（202005AF150027）。

作者简介：赵彤（1994−），女，博士研究生，研究方向：农产品质量与食物安全，E-mail: m13583224087_1@163.com。

*** 通信作者：**赵洪木（1969−），男，本科，高级实验师，研究方向：蜜蜂养殖及蜂产品研发，E-mail: 774050097@qq.com。

薛晓锋（1979−），男，博士，研究员，研究方向：蜂产品质量与安全，E-mail: xue_xiaofeng@126.com。

生长情况更易监测，显著提高了发酵食品的稳定性和安全性[3−5]。由于发酵食品营养丰富，更易吸收，颇受消费者青睐，市场空间广阔。

蜂产品，是蜜蜂为了生存与繁衍后代，向大自然索取原料后，进行加工的产品，如蜂蜜、蜂花粉、蜂王浆等。蜂产品营养丰富，是食品行业的重要原料，其基础研究和产品开发也是研究热点[6]。随着我国经济的高速发展和健康生活方式的流行，蜂产品中天然活性物质和保健功能恰好迎合消费者喜爱，进一步促进了蜂产品的发展[7−8]。我国是蜂业大国，蜂群数量占世界的 1/8，蜂蜜产量占世界的 1/4，蜂王浆总量占世界 90%[9]。但我国蜂产品的消费水平仅为日本、美国等国家的十几分之一，这与我国蜂产品消费习惯有关，也与我国蜂产品的利用和深加工水平相对落后相关[10]。

发酵蜂产品指以蜂产品为原料，加以其它原料、辅料和添加剂，在适当的温度、湿度、酸碱度和水分等条件下，利用微生物发酵所获得的产品。发酵蜂产品主要依赖微生物的转化作用，改善蜂产品的风味，提高蜂产品的有效成分种类和含量，强化蜂产品的营养功能。发酵蜂产品被认为是新型的健康、营养导向型产品[11]。蜂粮是植物花粉、蜂蜜和蜜蜂唾液的发酵混合物，是天然的发酵蜂产品，也是营养最丰富的蜂产品[12]。已有研究表明，蜂粮不仅含有蜜蜂幼虫生长所需的全部营养物，而且含有大量益生菌，可促进蜜蜂肠道菌群保持稳定和平衡[13]。受天然发酵蜂产品—蜂粮的启发，人们通过微生物发酵了蜂花粉、蜂蜜和蜂王浆，生产了多种发酵蜂产品。但我国发酵蜂产品的规模化、标准化尚未完善，工艺简单，产品质量不稳定，发酵蜂产品的受众窄，市场规模小。因此，改善发酵蜂产品的生产工艺，实现标准化生产，完善发酵蜂产品的评价标准，对提高发酵蜂产品竞争力和相关高附加值产品的开发具有重要意义。

本文对蜂产品和发酵蜂产品的种类，发酵蜂产品的常用菌种，发酵蜂产品的特征、现存问题及改进方法进行综述，以期为发酵蜂产品的发展提供参考。

1 蜂产品的分类及化学成分

按照来源和生产过程，蜂产品可分为 3 类：一是蜜蜂采集天然植物类原料，经复杂的生理生化过程加工而成，如蜂蜜、蜂花粉和蜂胶等；二是由蜜蜂体内某些腺体分泌而来，如蜂王浆、蜂蜡、蜂毒；三是蜜蜂本身，如蜜蜂幼虫、蜂蛹、成虫。蜂产品营养丰富，含多种糖类、蛋白质、酚酸和功能脂类物质，具有提高人体免疫能力、增强记忆力、缓解疲劳等功效，是大自然赋予人们的珍贵礼物，这为进一步通过发酵改善蜂产品的风味和营养功能奠定了坚实的原料基础[12,14−15]。常见蜂产品及其组分见表 1。

2 发酵蜂产品类型及常用菌种

随着发酵业和蜂产业的蓬勃发展，发酵蜂产品的研究也逐渐增多，现已报道的发酵蜂产品包括发酵蜂花粉产品、发酵蜂蜜产品和发酵蜂王浆产品，产品类型有酒类、面包类、乳品类等。大多发酵蜂产品停留在实验室水平，应用到实际生产的种类较少，现市面在售的发酵蜂产品有蜂蜜面包、蜂蜜酒、蜂王浆酒等。下文对发酵蜂产品进行简单介绍。

2.1 发酵蜂花粉产品

目前，关于发酵蜂花粉产品的研究主要集中在工艺参数的优化方面，投入市售的产品较少，引起的关注度较低。刘玳瑶等[27]通过单因素实验和响应面设计优化了发酵柚子蜂花粉酱的生产工艺，制得的蜂花粉酱颜色金黄，口感酸甜，具有独特的花粉香，并增加了其厚重感。蜂花粉本身即为一种良好的益生元，具有促进益生菌增殖、调节宿主免疫力等功效，最早的蜂花粉产品可能为蜂花粉酒[13]。基于当今社会膳食营养补充剂的发展，我国已成为亚洲第一消费市场，蜂花粉和发酵蜂花粉产品也不例外，具有广阔的

表 1 常见蜂产品及其组分

Table 1 Common bee-products and their components

蜂产品	定义	组分	参考文献
蜂蜜	是蜜蜂采集植物花蜜、分泌物或蜜露，与自身分泌物混合后，经酿造而成的天然甜物质。	其中糖类占75%~80%，另含有酚类物质、无机酸、氨基酸、酶类、芳香物质、矿物质、维生素等。	[6,16]
蜂王浆	是年轻工蜂的下咽和下颌腺分泌的一种微酸性(pH3.5~4.5)物质。	含水分60%~70%，碳水化合物7%~18%，蛋白质9%~18%，脂类3%~8%，矿物盐1%~3%和一定量未明确物质。	[16−17]
蜂花粉	是蜜蜂采集植物花蕊中的花粉，添加花蜜及其分泌物混合而成的不规则团状物。	含蛋白质10%~52%，碳水化合物20%~80%(主要为葡萄糖和果糖)，脂类15%~20%，膳食纤维3%~20%，另含有少量微量元素、必须氨基酸等。	[18−21]
蜂毒	指工蜂尾部螫刺毒腺和副腺分泌出的具有芳香气味的淡黄色透明毒液。	干物质中含有肽类70%~80%，灰分3.67%。	[16]
蜂蜡	是工蜂蜡腺分泌的复杂有机化合物。	含有单脂类和羟基脂类71%，游离脂肪酸10%~14.5%，饱和脂肪酸9.1%~10.9%，游离脂肪醇1%~1.25%，肉豆蔻内酯0.6%，着色剂0.3%。	[16,22]
蜂蛹	是胡蜂、黄蜂、黑蜂、土蜂等野蜂的幼虫和蛹。	含粗蛋白41.5%~63.1%、粗脂肪15.7%~26.1%、碳水化合物3.7%~11.6%，另含有丰富的矿物质、维生素、酶类和激素类等活性物质。	[16,23]
蜂胶	是工蜂采集胶源植物的树脂与其上颚腺、蜡腺等分泌物混合而成的具有黏性的固体胶状物。	含树脂树香复合物39%~53%、多酚类12%~17%、多糖2%~3%、蜂蜡19%~35%、杂质(含花粉等)8%~12%。	[24]
蜂粮	是蜜蜂采集的花粉咬碎夯实加蜂蜜之后，在微生物作用下形成的自然发酵产物。	含水分11.4%~15.9%、碳水化合物24%~34%、灰分1.90%~2.54%、蛋白质14.8%~24.3%、脂肪5.9%~11.5%，纤维素2.7%、另含有维生素等。	[11,25−26]

市场前景。吴昊远[28]结合了油松松花粉和乳饮料的优点，研制了油松松花粉乳饮料，较普通乳饮料，该产品的维生素 C 和黄酮含量显著升高，具有更高的营养和功能价值。

2.2　发酵蜂蜜产品

蜂蜜是天然的甜味物质，含有大量的碳水化合物，可为微生物发酵提供充足的碳源。发酵蜂蜜产品的常用微生物为酵母菌和乳酸菌，常见产品有蜂蜜酒、蜂蜜面包和蜂蜜乳等。最常见的发酵蜂蜜产品为蜂蜜酒，我国是世界上最先酿制蜂蜜酒的国家之一，但目前国内蜂蜜酒的销量仅占酒品市场的小部分，并且，早在 80 年代，就已出现英国进口蜂蜜酒，可见，蜂蜜酒的研制和创新势在必行。受传统观念的影响，国内消费者更偏好高度白酒，因此，高度蜂蜜酒和蜂蜜保健酒的酿制可作为蜂蜜酒方面的研究方向。李敏杰等[29]通过优化发酵温度、pH、酵母添加量和通气量，研制了攀枝花土蜂蜜酒，该产品颜色金黄，有蜂蜜的清香和酒的醇厚，该研究可为地方蜂产品的开发提供参考。

2.3　发酵蜂王浆产品

由于蜂王浆口感酸涩，略带辣味[30]，导致其发酵产品较少，仅有蜂王浆酒和蜂王浆发酵乳。因此，发酵蜂王浆产品的研发重点应致力于特殊口感的去除或遮掩，以及耐低 pH 发酵菌种的筛选或改造。Atallah 等[31]将蜂王浆和蜂花粉加入到牛乳和水牛乳中共同发酵，发现和对照组相比，添加了蜂王浆和蜂花粉的发酵乳储存 21 d 后的脱水收缩现象显著降低，产品质地更加均匀。

表 2 列举了常见发酵蜂产品类型及选用菌种。

3　发酵蜂产品的特点

发酵蜂产品的生产应用了微生物发酵技术，发酵产物营养丰富、风味独特。通过发酵技术，可降低蜂产品中的致敏性蛋白，如蜂王浆主蛋白 1（Major royal jelly protein 1，MRJP1）和 2（Major royal jelly protein 2，MRJP2）[51]，蜂花粉中一些分子量为 20~40 kD 的酸性蛋白等。乔琳[52]通过蜂花粉发酵和电泳实验，发现发酵后蜂花粉中 20~40 kD 的致敏性蛋白消失，说明发酵后蜂花粉的致敏性可能被消除。发酵蜂产品的具体特点如下：

提高吸收利用率。通过发酵作用，微生物可将蜂产品中的大分子量蛋白质分解为较小分子量多肽或氨基酸，更易消化吸收[53−54]。Audisio 等[55]研究发现发酵后蜂粮较蜂花粉包含更多的多肽。另外，蜂花粉外壁是一种天然的保护屏障，主要成分是孢粉素，该物质有弹性，坚固，影响蜂花粉内部营养素的释放，使得蜂花粉的营养只有 10%~15% 被人们消化利用，而发酵作用可有效破坏蜂花粉外壁，已有研究发现，通过食用菌深层发酵，蜂花粉破壁率可达 60%~80%[56−57]。

改善口感。通过发酵作用，可提高蜂产品中呈味物质的含量，如酪氨酸、苯丙氨酸和芳香烃等，进而改善口感，提高消费者的可接受度。Mendes-Ferreira 等[58]通过气相色谱串联质谱（Gas Chromatography-Mass Spectrometry，GC-MS）评估了酿酒酵母 UCD522 发酵蜂蜜酒中的 16 种风味物质，证明了酵母代谢产物对蜂蜜酒香味的巨大作用，另发现，添加磷酸二铵（DAP）可促进蜂蜜酒中风味物质的产生。Conte 等[38]研究发现，添加蜂花粉的面包较空白组含有更多呋喃，该物质与令人愉快的香味有关，可改善面包的芳香度。

延长保质期。发酵制品中的大量有益菌对致病菌和腐败菌有竞争性抑制作用，因此，通过发酵作用可延长蜂产品的保质期，是蜂产品贮存的重要方法之一。Kaškonienė等[59]研究发现蜂花粉发酵后，对黄体微球菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑制性提高了 1.08~16.9 倍，对娄地青霉菌的抑制性提高了 1.96~5.52 倍。Yerlikaya 等[35]研究发现，将 10~20 mg/mL 花粉和牛乳共同发酵后，在不影响感官特性的前提下，产品表现出明显抗菌性。

表 2　常见发酵蜂产品类型及选用菌种

Table 2　Types of common fermented bee-products and selected strains

类型	产品类型	菌种	参考文献
发酵蜂花粉产品	蜂花粉饮料	保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌、植物乳杆菌、嗜酸乳杆菌、纳豆芽孢杆菌、红茶菌	[32−33]
	蜂花粉酸奶	嗜酸乳杆菌、动物双歧杆菌、乳酸链球菌、嗜热链球菌、保加利亚乳杆菌	[34−36]
	蜂花粉面包	酵母菌	[37−38]
	蜂花粉酒	葡萄酒酵母	[39]
	蜂花粉酱	嗜热链球菌、保加利亚乳杆菌、干酪乳杆菌、副干酪乳杆菌、乳双歧杆菌、两歧双歧杆菌、嗜酸乳杆菌、植物乳杆菌、瑞士乳杆菌、鼠李糖乳杆菌	[27]
发酵蜂蜜产品	蜂蜜酒	葡萄酒酵母、酿酒酵母、戴尔凯式有孢圆酵母、香槟酵母、德氏乳杆菌	[40−41]
	蜂蜜饮料	酿酒酵母、葡糖醋杆菌、嗜酸乳杆菌、保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌	[42−43]
	蜂蜜发酵乳	嗜热链球菌、保加利亚乳杆菌、嗜酸乳杆菌	[44−45]
	蜂蜜面包	酵母菌	[46]
	复合酵素	酿酒酵母、植物乳杆菌	[47−48]
发酵蜂王浆产品	蜂王浆啤酒	上面酵母、下面酵母	[49]
	蜂王浆发酵乳	嗜酸乳杆菌、加氏乳杆菌、鼠李糖乳杆菌和角双歧杆菌	[31,50]

提高功能性。发酵蜂产品较蜂产品具有更好的功能性，如抗氧化性、抗肿瘤和护肝等[60−61]。Vilma 等[62] 研究发现，采用鼠李糖乳杆菌 LGG 对蜂花粉进行发酵后，其黄酮含量增加 1.6~2.4 倍，总酚类含量增加 1.1~1.4 倍，而黄酮和酚类对抗氧化活性有非常积极的影响。

提高营养价值。发酵蜂产品通过微生物的新陈代谢，可提高蜂产品中部分营养成分的含量，还可能产生蜂产品本身不具备的营养物。Human 等[63] 研究发现，发酵后蜂粮较蜂花粉含有更多的必需氨基酸。

4 发酵蜂产品行业的现存问题

虽然我国是蜂产品产量大国，但国内的新品研发及工艺改进等方面还存在诸多尚未解决的问题，如适合蜂产品发酵的微生物选育、安全与质量标准的起草和实施、加工工艺与配方的优化、蜂产品发酵产物对人体的影响等方面都有待进一步研究。另外，由于地方重视程度、饮食习惯差异等因素的影响，使得发酵蜂产品的工业化进程比较缓慢。针对上述问题，发酵蜂产品的研究可从以下几方面改进：

a.通过调查分析我国居民的消费趋势，研发适应消费者的特色发酵蜂产品，选择更受欢迎的销售方式和渠道。通过研究和探讨国外蜂产品发酵业的实践与经验，学习并借鉴国际先进的科学思路，提高我国发酵蜂产品的综合竞争力，早日实现我国发酵蜂产业的现代化。

b.加大科研投入力度，结合发酵剂制作技术，研究适合蜂产品的特种发酵剂，并保证其稳定性和安全性。通过基因重组技术，开发具有特殊功能性的微生物发酵剂，为功能型发酵蜂产品的开发奠定原料基础。

c.解决高新技术问题，加强自主创新，结合新型干燥、杀菌和分离等技术，开发合理而先进的生产工艺，研制可靠的机械设备，提高机械化水平，扩大生产规模。

d.深入研究发酵蜂产品的功能性及作用机制，结合多组学技术，探讨功能组分的代谢路径及安全性，对其功能性进行科学评价。

e.健全发酵蜂产品的生产和产品标准建设，加强质量控制和市场监测，提高质量安全追溯制度，结合先进的质量控制技术，建造发酵蜂产品的质量控制和应急管理系统，保障发酵蜂产业的健康发展。

5 展望

新时代，随着人们生活水平的提高，饮食习惯发生改变，天然、绿色产品更符合消费者理念，蜂产品正满足人们需求，消费人群逐渐扩大，发酵蜂产品也不例外，具有广阔的市场空间。但是，基于部分蜂产品特殊的物理性质，常用的微生物发酵剂并不适用于全部蜂产品，因此，可应用现代微生物技术，改进发酵剂的生产工艺，制备适合蜂产品的特种发酵剂。另外，发酵是一个复杂的过程，关于蜂产品发酵的代谢机理，以及发酵蜂产品的安全性和功能性，可借助基因重组技术、代谢组学技术和高通量技术进一步深入研究，为发酵蜂产品的健康发展，提供可靠的理论依据。发酵蜂产品的发展不仅可以带动蜂产业的发展，减少蜂产品的浪费，还可以推动乡村振兴的进程，进一步带动我国农业经济和国民经济的发展。

参考文献

[1] 夏傲喃, 李建华, 林祥娜, 等. 发酵食品微生物多样性分析方法研究进展[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(4): 220−224. [XIA A N, LI J H, LIN X N, et al. Research progress on analysis methods of microbial diversity in fermented foods[J]. Food Research and Development, 2021, 42(4): 220−224.]

[2] 程池. 发酵食品[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(15): 2. [CHENG C. Fermented foods[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(15): 2.]

[3] LI L, WANG L, FAN W, et al. The application of fermentation technology in traditional Chinese medicine: A review[J]. The American Journal of Chinese Medicine, 2020, 48(4): 1−23.

[4] BJM A, HK B, MZ C, et al. Effects of metabolite changes during lacto-fermentation on the biological activity and consumer acceptability for dragon fruit juice[J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 121: 108992.

[5] ADESULU-DAHUNSI A T, JEYARAM K, SANNI A I. Probiotic and technological properties of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria isolated from cereal-based nigerian fermented food products[J]. Food Control, 2018, 92: 225−231.

[6] 乔惠田, 黄潇潇, 逯永瑞, 等. 花蜜酒发酵工艺优化及成分分析 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(21): 25−32. [QIAO H T, HUANG X X, TI Y R, et al. Fermentation process optimization and component analysis of nectar wine[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(21): 25−32.]

[7] LI Q Q, WANG K, MARCUCCI M C, et al. Nutrient-rich bee pollen: A treasure trove of active natural metabolites[J]. Journal of Functional Foods, 2018, 49: 472.

[8] 牛德芳, 王波, 陈玉勇, 等. 油菜蜂花粉及其蜂粮的营养成分[J]. 食品工业科技, 2019, 40(9): 218−223. [NIU D F, WANG B, CHEN Y Y, et al. Analysis of the nutrient of rape bee pollen and rape bee bread[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(9): 218−223.]

[9] QI D, MA C, WANG W, et al. Gas chromatography-mass spectrometry analysis as a tool to reveal differences between the volatile compound profile of royal jelly produced from tea and pagoda trees[J]. Food Analytical Methods, 2021, 14(3): 1−15.

[10] 刘黎红, 张锦玉, 刘越强, 等. 长白山蜂产品及其综合开发途径 [J]. 农产品加工 (学刊), 2007(8): 58−59. [LIU L H, ZHANG J Y, LIU Y Q, et al. Changbai mountain bee product and synthetical exploitation approach[J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2007(8): 58−59.]

[11] KIELISZEK M, PIWOWAREK K, KOT A M, et al. Pollen and bee bread as new health-oriented products: A review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2017, 71: 170−180.

[12] SMUGAKOGUT M, PABISZCZAK A, DYMKOWSKA-MALESA M, et al. Preparation of beebread caviar from buckwheat honey through immobilization with sodium alginate[J]. Molecules,

2020, 25(19): 4483.
[13] 延莎, 赵柳微, 吴黎明. 蜂粮及发酵蜂花粉产品的研究进展[J]. 中国食物与营养, 2019, 25(7): 9−15. [YAN S, ZHAO L W, WU L M. Research advancement on bee bread and fermented bee pollen food[J]. Food and Nutrition in China, 2019, 25(7): 9−15.]
[14] MAUR CIO S, VASSYA B, KUROPATNICKI A K. Medical benefits of honeybee products[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2017, 2017: 2702106.
[15] SEÇILMIŞ Y, SILICI S. Bee product efficacy in children with upper respiratory tract infections[J]. The Turkish Journal of Pediatrics, 2020, 62(4): 634−640.
[16] 赵家平. 蜂产品简介 [J]. 特种经济动植物, 1999, 2(4): 17-18. [ZHAO J P. Bee product introduction[J]. Special Economic Animal and Plant, 1999, 2(4): 17-18.]
[17] 王艺, 刘帆, 臧梦璐, 等. 超声波处理对蜂王浆蛋白功能和结构的影响[J]. 食品工业科技, 2019, 40(10): 50−56. [WANG Y, LIU F, ZANG M L, et al. Effects of ultrasound treatment on the functional properties and structure of royal jelly proteins[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(10): 50−56.]
[18] LI S, YANG G, YAN J, et al. Polysaccharide structure and immunological relationships of RG-I pectin from the bee pollen of *Nelumbo nucifera*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 111: 660−666.
[19] CHEN X, WU R, ZHU Y, et al. Study on the inhibition of Mfn1 by plant-derived miR5338 mediating the treatment of BPH with rape bee pollen[J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2018, 18(1): 1−6.
[20] THAKUR M, NANDA V. Composition and functionality of bee pollen: A review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 98: 82−106.
[21] LORINI A, ROSA C, OLIVEIRA L T, et al. Chemical composition and microbiological quality of bee pollen[J]. Scientia Agraria Paranaensis, 2020, 19(3): 229−235.
[22] 张琳, 肖建辉, 涂瑾, 等. 利用蜂蜡制备菜籽油基凝胶油的研究[J]. 中国油脂, 2019, 44(2): 129−132. [ZHANG L, XIAO J H, TU J, et al. Preparation of rapeseed oil organogel with beeswax [J]. China Oils and Fats, 2019, 44(2): 129−132.]
[23] 平丽娟, 方晟, 毛建卫, 等. 微波真空冷冻干燥蜂蛹工艺的研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(1): 194−197. [PING L J, FANG S, MAO J W, et al. Study on microwave vacuum freeze-drying process of honeybee pupae[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(1): 194−197.]
[24] 金平, 张宇, 王会, 等. 蜂胶的化学成分及药理作用[J]. 吉林中医药, 2018, 38(4): 432−434. [JIN P, ZHANG Y, WANG H, et al. Chemical composition and pharmacological action of propolis [J]. Jilin Journal of Chinese Medicine, 2018, 38(4): 432−434.]
[25] 张娟, 王顺喜, 李丹, 等. 基于响应面法对蜂粮液态发酵条件的优化[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(22): 189−196. [ZHANG J, WANG S X, LI D, et al. Optimization of liquid fermentation conditions of bee bread based on response surface method[J]. Food Research and Development, 2019, 40(22): 189−196.]
[26] KHALIFA S, ELASHAL M, KIELISZEK M, et al. Recent insights into chemical and pharmacological studies of bee bread[J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 97: 300−316.
[27] 刘玳瑶, 程冰晓, 刘然, 等. 乳酸菌发酵柚子蜂花粉酱加工工艺的研究[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(3): 76−84. [LIU D Y, CHENG B X, LIU R, et al. Study on the processing technology of pomelo bee pollen sauce fermented by lactic acid bacteria[J]. Food Research and Development, 2020, 41(3): 76−84.]
[28] 吴昊远. 油松松花粉乳饮料的研制和品质研究 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2020. [WU H Y. Research on the development and quality study of pine pollen milk beverage[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2020.]
[29] 李敏杰, 熊亚. 攀枝花土蜂蜜酒发酵条件的优化[J]. 食品工业, 2021, 42(1): 170−174. [LI M J, XIONG Y. Optimization of conditions for mead fermentation of panzhihua[J]. The Food Industruy, 2021, 42(1): 170−174.]
[30] 朱作艺, 张玉, 王君虹, 等. 蜂王浆蛋白肽的制备及其降血糖和抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(17): 45−57. [ZHU Z Y, ZHANG Y, WANG J H, et al. Preparation, hypoglycemic and antioxidative activity of peptide from royal jelly protein [J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(17): 45−57.]
[31] ATALLAH A A, MORSY K M. Effect of incorporating royal jelly and bee pollen grains on texture and microstructure profile of probiotic yoghurt[J]. Journal of Food Processing and Technology, 2017, 8(9): 1−4.
[32] UȚOIU E, MATEI F, TOMA A, et al. Bee collected pollen with enhanced health benefits, produced by fermentation with a kombucha consortium[J]. Nutrients, 2018, 10(10): 1365.
[33] UTOIU E, OANCEA A, STANCIUC A M, et al. Prebiotic content and probiotic effect of kombucha fermented pollen[J]. AgroLife Scientific Journal, 2018, 7(2): 149−156.
[34] POP C, VLAIC R, FĂRCAŞ A, et al. Influence of pollen, chia seeds and cranberries addition on the physical and probiotics characteristics of yogurt[J]. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca: Food Science and Technology, 2015, 72(1): 141−142.
[35] YERLIKAYA, OKTAY. Effect of bee pollen supplement on antimicrobial, chemical, rheological, sensorial properties and probiotic viability of fermented milk beverages[J]. Mljekarstvo, 2014, 64(4): 268−279.
[36] ZLATEV Z, TANEVA I, BAYCHEVA S, et al. A comparative analysis of physico-chemical indicators and sensory characteristics of yogurt with added honey and bee pollen[J]. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 2018, 24(1): 132−144.
[37] CONTE P, DEL C A, BALESTRA F, et al. Bee pollen as a functional ingredient in gluten-free bread: A physical-chemical, technological and sensory approach[J]. LWT-Food Science and Technology, 2018, 90: 1−7.
[38] CONTE P, CARO A D, URGEGHE P P, et al. Nutritional and aroma improvement of gluten-free bread: Is bee pollen effective?[J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 118: 108711.
[39] AMORES-ARROCHA A, SANCHO-GALÁN P, JIMÉNEZ-CANTIZANO A, et al. Bee pollen as oenological tool to carry out red winemaking in warm climate conditions[J]. Agronomy, 2020,

10(5): 634.
[40] BARRY J, METZ M, HUGHEY J, et al. Two novel strains of *Torulaspora delbrueckii* isolated from the honey bee microbiome and their use in honey fermentation[J]. Fermentation, 2018, 4(2): 22.
[41] SAMANIEGO-SÁNCHEZ C, MARÍN-GARCÍA G, QUESADA-GRANADOS J J. A new fermented beverage from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) molasses: Analysis of physicochemical properties and antioxidant capacity, and comparison with other industrial alcohol products[J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 128: 109505.
[42] 王虹玲, 段笑影, 曹冬冬, 等. 蜂蜜西瓜皮汁乳酸发酵饮料的工艺优化[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(3): 117−122. [WANG H L, DUAN X Y, CAO D D, et al. Process optimization of lactic acid fermentation beverage in honey watermelon rind[J]. Food Research and Development, 2020, 41(3): 117−122.]
[43] 徐伟, 杜娇, 杜鹃, 等. 多菌株发酵型蜂蜜醋饮料的减肥降脂功能性研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(24): 334−337. [XU W, DU J, DU J, et al. Effect of multi strain symbiotic fermentation of honey vinegar beverage on weight reduction and lipid-lowering function[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(24): 334−337.]
[44] ABDERREZAK K, HAYAT A C, FETTA K, et al. Effect of pomegranate peel and honey fortification on physicochemical, physical, microbiological and antioxidant properties of yoghurt powder [J]. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, 2020, 19(1): 99−108.
[45] MACHADO T A D G, DE OLIVEIRA M E G, CAMPOS M I F, et al. Impact of honey on quality characteristics of goat yogurt containing probiotic *Lactobacillus acidophilus*[J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 80: 221−229.
[46] 解殿伟, 王慧俐, 吴祖芳. 响应面法优化蜂蜜甜面包制作工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2020, 377(4): 115−120. [XIE D W, WANG H L, WU Z F. Optimization of honey sweet bread making process by response surface methodology[J]. Food Research and Development, 2020, 377(4): 115−120.]
[47] 张旭普, 白俊岩, 刘腾云, 等. 糙米酵素混菌发酵工艺优化[J]. 食品与机械, 2017, 194(12): 186−191. [ZHANG X P, BAI J Y, LIU T Y, et al. Optimization on mixed fermentation process with brown rice fermen[J]. Food and Machinery, 2017, 194(12): 186−191.]
[48] MA D, HE Q, DING J, et al. Bacterial microbiota composition of fermented fruit and vegetable juices (jiaosu) analyzed by single-molecule, real-time (SMRT) sequencing[J]. CyTA-Journal of Food, 2018, 16(1): 950−956.
[49] LI S, JIANG Z, THAMM L, et al. 10-Hydroxy-2-decenoic acid as an antimicrobial agent in draft keg-conditioned wheat beer[J]. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 2010, 68(2): 114−118.
[50] ALU'DATT M H, RABABAH T, OBAIDAT M M, et al. Probiotics in milk as functional food: Characterization and nutraceutical properties of extracted phenolics and peptides from fermented skimmed milk inoculated with royal jelly[J]. Journal of Food Safety, 2015, 35(4): 509−522.
[51] THIEN F C K, LEUNG R, BALDO B A, et al. Asthma and anaphylaxis induced by royal jelly[J]. Clinical & Experimental Allergy, 2010, 26(2): 216−222.
[52] 乔琳. 蜂花粉固态发酵营养强化剂的研制 [D]. 天津: 天津科技大学, 2005. [QIAO L. Study on nutrition reinforcer preparation of the bee pollen by solid-state fermentation[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2005.]
[53] GILLIAM M. Microbiology of pollen and bee bread: The yeasts[J]. Apidologie, 1979, 10(1): 43−53.
[54] LOPER G M, STANDIFER L N, THOMPSON M J, et al. Biochemistry and microbiology of bee-collected almond (*Prunus dulcis*) pollen and bee bread. I- fatty acids, sterols, vitamins and minerals[J]. Apidologie, 1980, 11(1): 63−73.
[55] AUDISIO M C, TERZOLO H R, APELLA M C. Bacteriocin from honeybee beebread *Enterococcus avium*, active against listeria monocytogenes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(6): 3373−3375.
[56] BREED M D. Bee products: Properties, applications, and apitherapy[J]. Bioscience, 1998, 48(9): 774−776.
[57] BROOKS J, SHAW G. Sporopollenin: A review of its chemistry, palaeochemistry and geochemistry[J]. Grana, 1978, 17(2): 91−97.
[58] MENDES-FERREIRA A, COSME F, BARBOSA C, et al. Optimization of honey-must preparation and alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* for mead production[J]. 2010, 144(1): 193-198.
[59] KAKONIEN V, ADAKEVIIŪT V, KAKONAS P, et al. Antimicrobial and antioxidant activities of natural and fermented bee pollen[J]. Food Bioscience, 2020, 34: 100532.
[60] FILIPA S, RICARDO C, LILLIAN B, et al. Flavonoid composition and antitumor activity of bee bread collected in northeast portugal[J]. Molecules, 2017, 22(2): 1−12.
[61] URCAN A C, MARGHITAS L A, DEZMIREAN D S, et al. Chemical composition and biological activities of beebread – Review[J]. Bulletin of University of Agricultural Sciences & Veterinary Medicine Cluj Napoca Animal Science & Biotechnologies, 2017, 74(1): 1−9.
[62] VILMA K, AGNĖ K, PAULIUS K, et al. The impact of solid-state fermentation on bee pollen phenolic compounds and radical scavenging capacity[J]. Chemical Papers, 2018, 72(8): 2115−2120.
[63] HUMAN H, NICOLSON S W. Nutritional content of fresh, bee-collected and stored pollen of *Aloe greatheadii* var. *davyana* (Asphodelaceae)[J]. Phytochemistry, 2006, 67(14): 1486−1492.

袁冬雪, 常婧瑶, 殷永超, 等. 油凝胶替代动物脂肪在肉制品中应用的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 467−474. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021070277

YUAN Dongxue, CHANG Jingyao, YIN Yongchao, et al. Recent Advances in the Application of Oleogel as Fat Replacers in Meat Products[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 467−474. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021070277

· 专题综述 ·

油凝胶替代动物脂肪在肉制品中应用的研究进展

袁冬雪, 常婧瑶, 殷永超, 孔保华, 刘　骞*

（东北农业大学食品学院, 黑龙江哈尔滨 150030）

摘　要: 动物脂肪对肉制品的多汁性以及风味起着重要作用，但其含有大量的饱和脂肪酸和胆固醇，过量摄入会对人体造成潜在的危害。然而，单纯地降低肉制品中的脂肪含量会对产品的品质产生负面影响。因此，如何降低肉制品中的脂肪含量并保持产品的品质已经成为肉类工业中亟待解决的问题。以植物油为主的油凝胶具有较好的脂肪酸组成，而且油凝胶具有与动物脂肪相似的性质，能够在一定程度上赋予肉制品润滑、醇厚的口感以达到替代肉制品中动物脂肪含量并保持最终产品的品质特性的目的。因此，本文全面综述了油凝胶的制备方法和形成机理，以及不同种类的油凝胶替代动物脂肪在肉制品中的应用情况，以期为生产新型健康的低饱和脂肪酸含量和低胆固醇含量的肉制品提供理论依据。

关键词: 油凝胶, 动物脂肪, 肉制品, 品质

中图分类号: TS251.5　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0467−08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021070277

本文网刊:

Recent Advances in the Application of Oleogel as Fat Replacers in Meat Products

YUAN Dongxue, CHANG Jingyao, YIN Yongchao, KONG Baohua, LIU Qian*

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

Abstract: Although animal fat plays an important role in the juiciness and flavor of meat products, excessive intake will cause potential harm to the human body because it contains a large amount of saturated fatty acids and cholesterol. However, simply reducing the fat content in meat products will have a negative impact on the quality of the products. Therefore, how to reduce the fat content in meat products and maintain product quality has become an urgent problem in the meat industry. The vegetable oil-based oleogel not only has superior fatty acid composition but also has similar properties to animal fat. Moreover, the oleogel can confer meat products the smooth and mellow taste, which can effectively reduce the content of animal fat without destroying the original quality characteristics of the products. Therefore, this article comprehensively reviews the formation mechanism and preparation methods of oleogel, as well as the application of different types of oleogel in the field of low-fat meat products. This article may provide further insights for the production of new and healthy meat products with low saturated fatty acid content and low cholesterol content.

Key words: oleogel; animal fat; meat products; quality

动物脂肪在肉制品加工的过程中对产品的嫩度及多汁性起着重要的作用[1]。然而, 动物脂肪中含有大量的饱和脂肪酸和胆固醇[2], 已有很多证据表明, 过多的摄入饱和脂肪酸和胆固醇会对人体健康造成潜在的威胁[3]。因此降低肉制品中的动物脂肪含量势在必行。然而, 单纯地降低肉制品中的动物脂肪含

收稿日期: 2021−07−23

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）。

作者简介: 袁冬雪（1997−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 畜产品加工工程, E-mail: y18800433749@163.com。

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

量，会对最终产品的品质造成不利的影响。Hyuk 等[4]研究发现，与传统配方的香肠相比，低脂配方的乳化肠的硬度、弹性等质构参数显著降低，蒸煮损失明显提高，乳化稳定性有所下降。近年来，有很多专家学者利用植物油来替代肉制品中的动物脂肪，以达到降低产品中饱和脂肪酸和胆固醇含量的目的，但是在肉制品加工的过程中直接加入植物油，会对肉糜的流变特性产生显著的负面影响，同时也降低了肉糜本身的粘度。Youssef 等[5]研究表明，利用菜籽油完全替代牛脂肪虽然能明显地降低乳化肉糜制品中的饱和脂肪酸和胆固醇的含量，但却出现了严重的“漏油”现象，使得产品的质地坚硬，大大降低了产品的整体可接受性。造成这种现象的主要原因是由于植物油的液滴直径远远小于动物脂肪颗粒，而较小的直径增大了油滴的比表面积，从而导致肉蛋白形成过于致密的网络结构，最终使产品失去柔嫩多汁的特点。由此可见，在降低肉制品中动物脂肪含量的同时又能保持最终产品的品质特性已经成为肉品科学领域亟待解决的问题和研究热点。

近年来，利用植物油和凝胶剂制备固体结构化的油凝胶来替代肉制品中的动物脂肪越来越受到人们的关注。油凝胶是指将凝胶剂（乙基纤维素、植物甾醇、生物蜡、单甘油酯、脂肪酸等）添加在液态植物油中，经过加热、搅拌溶解以及冷却等一系列加工过程，凝胶剂分子以自组装或结晶的方式形成一维聚集体，这些聚集体再相互缠结形成三维的网络结构，油脂分子陷落其中，使整个体系呈现凝胶化状态[6]。油凝胶中的植物油不饱和脂肪酸含量高达 80%，饱和脂肪酸和胆固醇的含量极低，而且在凝胶化过程中，植物油的脂肪酸组成没有发生任何变化，所以利用油凝胶来替代肉制品中的动物脂肪能够满足人们对健康的追求[7]；与此同时，油凝胶呈现出凝胶或结晶等固体状态，具有与动物脂肪相似的理化特性和感官特性，在替代肉制品中的动物脂肪的同时，又能保持产品的良好品质。在肉品科学领域中，利用油凝胶替代肉制品中的动物脂肪已经取得了一定的进展。本文全面综述了油凝胶的制备方法和形成机理，以及不同种类的油凝胶替代动物脂肪在肉制品中的应用情况，以期为生产新型健康的低饱和脂肪酸含量和低胆固醇含量的肉制品提供理论依据。

1 油凝胶的制备方法及形成机理

1.1 油凝胶的制备方法

油凝胶是由液体油和凝胶剂经过一系列的加工步骤制得的具有三维网络结构的凝胶状态的物质[8]。常用的凝胶剂包括：乙基纤维素、生物蜡、植物甾醇、单硬脂酸甘油酯（单甘油酯）、脂肪酸及其衍生物、蛋白质以及亲水胶体等。其中，在肉制品中应用较多的有：乙基纤维素、生物蜡、植物甾醇和单甘油酯。油凝胶的制备方法包括：直接分散法、乳液模板法、溶剂交换法和物理吸附法（图 1）。

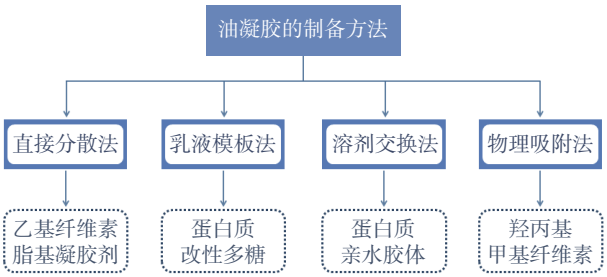


图 1 油凝胶的制备方法

Fig.1 Preparation method of oleogel

直接分散法的制备过程通常先将凝胶剂分散到高于其熔点的油相中，然后在剪切或者静置的状态下使整个混合体系冷却，此时凝胶剂形成结晶或自组装形成网络，液体油被截留在其中，从而产生油凝胶[9]；而对于部分亲水性凝胶剂聚合物（蛋白质、多糖等），其在油相（疏水性溶剂）中的分散有限，因此无法通过直接分散法来制备油凝胶[10]。所以，乳液模板法的制备流程需要先引入水相，在乳化剂的作用下与油相形成乳液模板，而这一类凝胶剂可以作为乳液模板中的乳化剂，当液体油与凝胶剂充分结合后，再将乳液模板进行干燥以除去其中的水相，最终形成油凝胶[11]；溶剂交换法同样需要先引入水相，在水介质中使蛋白质等凝胶剂的疏水基团暴露，使得凝胶剂在疏水相互作用和二硫键的作用下形成稳定的网络结构。然后加入中间溶剂（如丙酮等）替代混合体系中的水，当水被中间溶剂替代完成后，缓慢地加入液体油，直至所有的中间溶剂被油取代[12]；物理吸附法则是指将聚合物凝胶剂先溶解在水中，然后在常温或低温的状态下干燥成粉末，形成多孔材料，这种多孔材料可以吸附大量的液体油从而形成油凝胶[13]。其中，在肉制品中应用较多的是直接分散法，表 1 是利用直接分散法制备油凝胶的具体参数和流程。

1.2 油凝胶的形成机理

1.2.1 乙基纤维素油凝胶形成机理 乙基纤维素是一种半结晶状的纤维素聚合物的衍生体，其中纤维素主链羟基末端的部分氢原子被乙氧基取代[25]。乙基纤维素是一种食品级的高分子聚合物，无毒无害，而且价格低廉，因此，乙基纤维素油凝胶在食品科学领域中被广泛研究[26]。乙基纤维素作为凝胶剂形成油凝胶的主要原因是其在油相中可以通过分子间的氢键自组装形成“珊瑚”状的三维凝胶网络，如图 2 所示，使得液体油被截留在乙基纤维素形成的网络结构中，从而形成较为稳定的油凝胶结构[14,27]。这类油凝胶的形成条件是将混合体系加热至聚合物的玻璃化转变温度（通常为 140 ℃）使乙基纤维素分散在油相中，当混合体系冷却时，通过聚合物链之间的氢键形成一个三维网络。因此，乙基纤维素油凝胶的机械性能与温度有着密切的关系。Davidovich-Pinhas 等[28]研究发现凝固温度对乙基纤维素油凝胶的凝胶强度有着显著的影响。这是因为不同的凝固温度下，乙基

表 1　制备油凝胶的具体参数和流程

Table 1　Specific parameters and process of preparing oleogel

凝胶剂	油相	制备流程	参考文献
乙基纤维素	菜籽油	将乙基纤维素和菜籽油的混合体系加热至150 ℃，同时磁力搅拌，待凝胶剂完全溶解，冷却诱导油凝胶形成	[14]
	橄榄油	将乙基纤维素和橄榄油混合系统在30 min内加热至140 ℃，继续加热10 min，同时进行机械搅拌，待乙基纤维素完全溶解，冷却以诱导油凝胶	[15]
	亚麻籽油	将乙基纤维素和亚麻籽油加热到130 ℃，同时用磁力搅拌器搅拌。乙基纤维素全部溶解后开始冷却，直至形成油凝胶	[16]
巴西棕榈蜡	大豆油	将巴西棕榈蜡和大豆油在150 ℃下加热至巴西棕榈蜡完全溶解，然后在水浴中迅速冷却	[17]
米糠蜡	大豆油	将米糠蜡和大豆油混合体系加热至90 ℃，持续2 h后停止加热，然后将混合体系每隔7 min搅拌30 min	[18]
蜂蜡	芝麻油	将蜂蜡和芝麻油在水浴中真空加热至70 ℃，待凝胶剂完全溶解，将混合体系进行冷却	[19]
植物甾醇	亚麻籽油	在搅拌下加热植物甾醇和亚麻籽油，当温度达到80 ℃时持续30 min，然后将混合物在室温下冷却，直到形成凝胶	[20]
	葵花籽油	将植物甾醇和葵花籽油混合体系在连续搅拌下加热至100 ℃，持续约20~30 min，然后在室温下冷却20 min	[21]
单甘油酯	葵花籽油	在磁力搅拌下，将单甘油酯和葵花籽油的混合体系在90 ℃下加热15 min，然后冷却至室温	[22]
	葵花籽油	将单甘油酯和葵花籽油在75 ℃加热30 min，并以400 r/min的速度持续搅拌，然后冷却获得油凝胶	[23]
	大豆油	将单甘油酯和大豆油加热至85 ℃，并以500 r/min的速度持续搅拌，凝胶剂溶解后，混合体系在85 ℃保持30 min，然后在20 ℃下冷却24 h以形成油凝胶	[24]

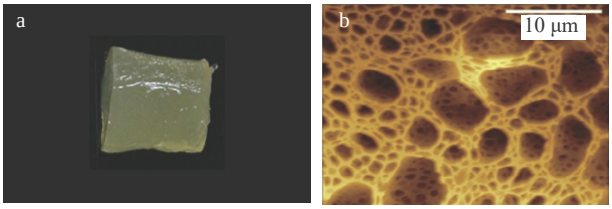


图 2　乙基纤维素油凝胶宏观结构(a)和微观结构(b)[27−28]

Fig.2　Macrostructure (a) and microstructure (b) of ethylcellulose oleogel[27−28]

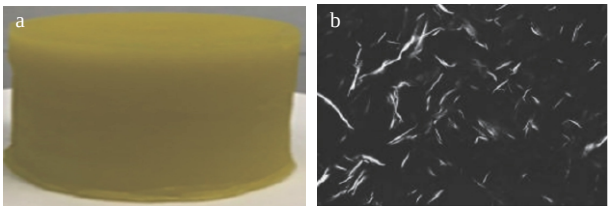


图 3　天然生物蜡油凝胶宏观结构(a)和微观结构(b)[33−34]

Fig.3　Macrostructure (a) and microstructure (b) of natural biological wax oleogel [33−34]

纤维素聚合物通过氢键的结合能力不同，较高的凝固温度使得交联的过程变得更缓慢有序，从而产生更加稳定的网络结构；除此之外，表面活性剂的添加也有助于形成更加稳定致密的油凝胶结构。Liu 等[29] 证明脱水山梨醇单棕榈酸酯可以通过改变乙基纤维素分子之间及其与溶剂分子之间的相互作用，从而产生网络结构更加致密稳定的乙基纤维素油凝胶。

1.2.2　生物蜡油凝胶形成机理　以天然生物蜡为基质的油凝胶已经被 FDA 认定为是一种可以安全使用在食品加工中的脂肪替代物[30]。生物蜡按照来源的不同可分为植物源生物蜡(向日葵蜡、米糠蜡、巴西棕榈蜡、小烛树蜡等)和动物源生物蜡(蜂蜡、虫胶蜡等)，其中，在肉制品中应用较多的有米糠蜡、蜂蜡、巴西棕榈蜡等[31]。天然生物蜡可以通过形成结晶或发生聚集产生网络结构，从而限制了液体油的移动，并使得整个混合体系呈现出凝胶的状态[32]。图 3 是由蜂蜡诱导橄榄油、亚麻籽油和鱼油形成的油凝胶，呈现稳定的圆柱状(图 3a)[33]。与乙基纤维素油凝胶不同的是，生物蜡油凝胶的微观结构呈现出倾向于一维或二维的“针状”或“血小板状”的晶体结构(图 3b)[34]。天然生物蜡中含有大量的不同碳链长度的蜡酯、游离脂肪酸、脂肪醇和碳氢化合物，因此通过改善工艺参数就能够改变天然生物蜡的成核与结晶速率，从而为不同的食品制备出不同性状的油凝胶。

1.2.3　植物甾醇油凝胶形成机理　植物甾醇(麦角甾醇、豆甾醇、γ-谷维素、β-谷甾醇等)是植物中的一种活性成分，具有降低血液胆固醇水平、促进饱腹感等功能[35]。目前，在肉品科学领域中比较常见的是由 γ-谷维素和 β-谷甾醇形成的油凝胶。图 4a 是 Moschakis 等[21] 利用葵花籽油制备的存储了 21 d 的植物甾醇油凝胶(总甾醇浓度从左至右分别为：5%、10%、15%、20%)，从图中可以清楚地观察到，植物甾醇油凝胶的稳定性非常强，而且当总甾醇浓度为 5% 时的油凝胶的透明度较高。通常情况下，γ-谷维素和 β-谷甾醇在冷却的过程中一般不能立即形成凝胶结构，需要借助机械外力(例如剪切)来促进凝胶的形成[36]。并且，γ-谷维素和 β-谷甾醇都不能单独地进行自组装形成油凝胶，需要按照一定比例将二者结合进行“共结晶”，以形成稳定的油凝胶，如图 4b 所示[37]。这主要是因为 γ-谷维素上的羰基与 β-谷甾醇上的羟基通过分子间氢键作用形成弯曲的“楔形”空心结构，这些空心结构相互堆积并交联截留住液体油最终形成凝胶结

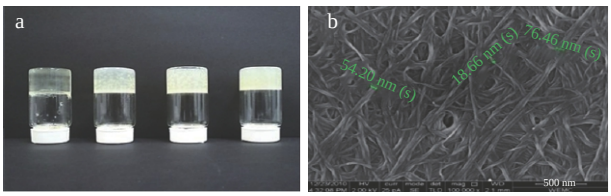


图 4　植物甾醇油凝胶宏观结构(a)和微观结构(b)[21,37]

Fig.4　Macrostructure (a) and microstructure (b) of phytosterol oleogel[21,37]

构，因此，由 γ-谷维素和 β-谷甾醇形成的油凝胶非常稳定和透明[38]。

1.2.4 单甘油脂油凝胶形成机理 单甘油酯具有疏水性的尾部和亲水性的头部，作为乳化剂在食品加工中已经被广泛应用[39]。基于这种特殊结构，单甘油酯可以通过将疏水性的尾部暴露于脂质介质中和亲水性的头部在内部连接，在疏水介质中形成反向的双分子层，双分子层的连续积累形成三维网状立体结构，从而诱导油凝胶的形成[40]；除此之外，单甘油酯同样也可以在冷却的过程中通过自组装形成结晶的网络，从而截留更多的液体油（图 5a）[34]。因此，与其他凝胶剂相比，单甘油酯通常可以诱导形成更加稳定、强度更高的油凝胶，图 5b 是 Eda 等[41] 利用单硬脂酸甘油酯和聚甘油硬脂酸酯诱导的油凝胶，均呈现较强的凝胶状态。然而，研究表明不同单甘油酯添加量将直接影响油脂凝胶的物理性质和晶体结构，通常需要 6% 以上的单甘油酯才能够形成稳定的油凝胶[42]。刘盼盼等[43] 研究不同含量的单甘油酯与大豆油形成的油凝胶的机械性能时发现，单甘油酯在大豆油中的临界成胶含量为 7%，而且随着单甘油酯含量的增加，油凝胶的硬度和持油性也随之提高。这表明，单甘油酯的含量对最终油凝胶的性质有着重要的影响。

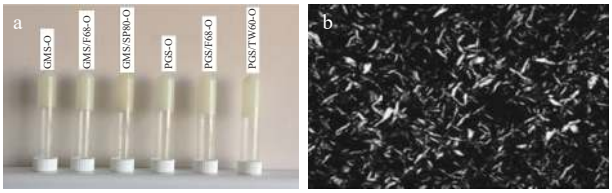


图 5 单甘油酯油凝胶宏观结（a）和微观结构（b）[34,41]

Fig.5 Macrostructure (a) and microstructure (b) of monoglyceride oleogel[34,41]

2 油凝胶替代动物脂肪在肉制品中的应用

2.1 乙基纤维素油凝胶替代动物脂肪在肉制品中的应用

乙基纤维素是纤维素的衍生物，纤维素是植物细胞壁中的一种结构性多糖，也是地球上最丰富的聚合物之一，因此乙基纤维素与其他低分子量有机凝胶剂相比价格较为低廉，已经在肉品科学领域中得到了广泛的研究[44]。Zetzl 等[45] 利用直接分散法诱导乙基纤维素和菜籽油形成油凝胶，并部分替代法兰克福香肠中的牛肉脂肪，与完全用牛肉脂肪制成的对照产品相比，含有油凝胶的法兰克福香肠在咀嚼性和硬度方面没有显著差异。通过观察法兰克福香肠肉糜的微观结构，发现用油凝胶制备的肉糜与对照组肉糜中的油滴的大小差异不显著。Youssef 等[5] 假设肉制品的硬度在很大程度上取决于脂肪球直径的大小。在肉制品的生产过程中，脂肪球被截留在盐溶性蛋白质中，特别是肌球蛋白和肌动蛋白，它们在脂肪球周围形成界面蛋白膜。直径较小的脂肪球需要更多的界面蛋白膜，界面蛋白膜的增强增加了产品的硬度。因此，用油凝胶生产的法兰克福香肠的质地与传统配方几乎无异。Barbut 等[46] 将用乙基纤维素和菜籽油制备的油凝胶替代早餐香肠中的猪肉脂肪，通过研究最终产品的理化特性及感官特性，发现用油凝胶替代猪肉脂肪的产品的粘性与传统配方产品几乎无异，但其弹性有所降低，当在油凝胶中加入山梨糖醇酐单硬脂酸酯时，最终产品的硬度等质构特性极为相似，证明在利用乙基纤维素油凝胶替代动物脂肪时，可以添加适量的辅料以达到更好的替代效果。

乙基纤维素油凝胶不仅可以替代肉制品中的动物脂肪，并保持其良好品质，还可以改善产品的脂肪酸组成，增强产品的营养特性。同时，由于乙基纤维素油凝胶具有良好的热稳定，在一定程度上能够改善产品的硬度，使产品具有良好的质构特性。Joaquin 等[47] 利用乙基纤维素与两种植物油（橄榄油和亚麻籽油）制备油凝胶，并替代猪肉汉堡中的脂肪，通过研究最终产品的理化特性及感官特性，发现乙基纤维素油凝胶的汉堡中健康的脂肪酸的含量更高，而且其硬度明显高于对照组。然而含有乙基纤维素油凝胶的汉堡的脂肪氧化程度较高，这可能是因为这类油凝胶在制备的过程中需要较高的温度，对于脂肪的氧化产生促进作用。Barbut 等[48] 还将乙基纤维素诱导的菜籽油凝胶用于替代法兰克福香肠中的牛肉脂肪，分析油凝胶对产品中牛肉脂肪的替代效果，发现含有油凝胶的法兰克福香肠的粘性和弹性等质构参数与对照组相差不大，但是硬度值明显高于对照组。通过观察肉糜的光学显微镜照片，发现处理组的脂肪球的直径远小于对照组，使得处理组肉糜的抗压能力增强，这也解释了为什么含有油凝胶的法兰克福香肠的硬度明显高于对照组；除此之外，含有油凝胶的法兰克福香肠的蒸煮损失明显低于对照组，这可能是在相同体积的肉糜中较小的脂肪球以高密度聚集在一起，防止在加热过程（即蛋白质凝胶化过程）中水从基质中渗出。总之，乙基纤维素油凝胶不会给肉制品的品质特性带来负面影响，同时还可以改变产品中的脂肪酸组成，降低产品的胆固醇含量，因此利用乙基纤维素油凝胶替代肉制品中的动物脂肪是可行的。但是，乙基纤维素油凝胶在制备的过程中温度较高，这可能会破坏油凝胶中的部分营养成分并加速脂肪的氧化，可以考虑通过添加适量的抗氧化剂或者优化油凝胶制备方法加以避免，但还需要进一步的研究和开发。

2.2 生物蜡油凝胶替代动物脂肪在肉制品中的应用

天然生物蜡凝胶剂由不同的正构烷烃、脂肪醇和脂肪酸组成，是目前使用最多的凝胶因子[49]。天然生物蜡主要来源于植物（向日葵蜡、米糠蜡、巴西棕榈蜡、小烛树蜡等）和动物（蜂蜡、虫胶蜡等），目前在肉制品中应用较多的有米糠蜡、蜂蜡、巴西棕榈蜡[50]。Franco 等[51] 利用蜂蜡采用直接分散法制备亚麻籽油凝胶，并分析油凝胶替代猪肉背脂对法兰克福香肠主要品质参数的影响，发现含有油凝胶香肠的脂

肪酸组成得到明显的改善，饱和脂肪酸和胆固醇的含量显著降低；与对照组相比，油凝胶香肠的粘性和咀嚼性等质构参数也有所增加。Maryam 等[19] 利用不同浓度的蜂蜡诱导芝麻油形成油凝胶并部分替代牛肉汉堡中的动物脂肪，通过分析牛肉汉堡的品质特性，发现处理组的蒸煮损失明显降低，这是因为油凝胶起到防止水分流失的作用；感官评价的结果显示，含有油凝胶的牛肉汉堡的整体可接受度更高，这可能与油凝胶中芝麻油的特殊味道和气味有关。但是含有油凝胶的汉堡的氧化稳定性较差，这主要归因于蜂蜡油凝胶的组成和生产方法，油凝胶的在制备过程中温度较高会形成自由基，加速氧化反应的进行。Martins 等[52] 利用蜂蜡诱导亚麻籽油形成油凝胶，并研究不同含量的油凝胶对肉基馅饼中的动物脂肪的替代效果，发现含有油凝胶的产品的脂肪酸组成得到了明显的改善，多不饱和脂肪酸含量显著增加，n-6/n-3 的比值明显降低；而且油凝胶含量为 30% 的肉基馅饼的整体可接受性也与对照组无异，但是硬度及粘结性等质构参数有所降低，相关研究表明，蜂蜡油凝胶属于抗剪切性较差的油凝胶。但考虑到最终产品的品质及营养特性，利用蜂蜡油凝胶来替代肉制品中的动物脂肪仍然具有较大的潜力。

除动物蜡油凝胶外，利用植物蜡油凝胶替代肉制品中的动物脂肪也有研究。Taylor 等[53] 用米糠蜡和大豆油通过直接分散法制备油凝胶，将其作为动物脂肪替代品应用到法兰克福香肠中，研究用油凝胶替代猪脂肪对法兰克福香肠的理化特性和感官性能的影响，发现用米糠蜡油凝胶制备的法兰克福香肠的脂肪酸组成得到明显的改善，必需多不饱和脂肪酸（亚油酸和 α-亚麻酸）含量显著增高，n-6/n-3 的比值明显降低。Rodrigo 等[18] 以米糠蜡为胶凝剂，用直接分散法诱导大豆油制备油凝胶，并将其用于替代博洛尼亚香肠中的猪肉脂肪，通过研究最终产品的品质特性，发现含有油凝胶的香肠的产量、乳化稳定性、质构特性以及感官特性与对照组相差不大；而且油凝胶改善了博洛尼亚香肠的脂肪酸组成，使得最终产品的营养特性显著提高。因此，利用米糠蜡诱导植物油凝胶以替代肉制品中的动物脂肪是可行的。Arezou 等[17] 研究利用巴西棕榈蜡和大豆油制备的油凝胶对牛肉汉堡中的动物脂肪的替代潜力，发现利用油凝胶替代汉堡中的动物脂肪会使得其硬度以及咀嚼性等质构参数显著增加，其整体可接受性也与对照组相当。综上所述，利用天然生物蜡诱导的油凝胶替代肉制品中的动物脂肪具有很大的潜力，但是由于部分生物蜡油凝胶的抗剪切能力较低，会导致最终产品的硬度降低，可以考虑与其他凝胶剂复配使用，最大程度地保持肉制品原来的品质特性，但仍需进一步研究。

2.3　植物甾醇油凝胶和单甘油酯油凝胶替代动物脂肪在肉制品中的应用

相比于乙基纤维素和天然生物蜡，植物甾醇和单甘油酯作为凝胶剂诱导形成油凝胶在肉制品中的研究与应用相对较少，但随着肉品科学不断的研究和发展，已有很多专家学者证明了植物甾醇油凝胶和单甘油酯油凝胶作为肉制品中的动物脂肪替代物具有较高的可行性[42]。目前，在肉制品中应用的较多的植物甾醇是 γ-谷维素和 β-谷甾醇。Martins 等[20] 用 γ-谷维素和 β-谷甾醇诱导亚麻籽油制备油凝胶，并利用油凝胶分别替代猪肉饼中 25% 和 75% 的动物脂肪，通过研究最终产品的理化特性和感官特性，发现油凝胶的加入明显地改善了猪肉饼的脂肪酸组成，ω-6/ω-3 的比值显著降低，而且对于两种脂肪替代程度，掺入油凝胶的肉饼与对照肉饼在质地参数如硬度、粘结性和咀嚼性方面没有差异，当油凝胶替代猪肉饼中 25% 的动物脂肪时，其整体感官可接受度较好。Franco 等[54] 研究利用 γ-谷维素、β-谷甾醇和亚麻籽油制备的油凝胶对干发酵香肠中的动物脂肪的替代潜力，通过分析最终产品的营养及品质特性，发现油凝胶明显地改善干发酵香肠的脂肪酸组成，PUFA/SFA 的比值增高，n-6/n-3 的比值显著降低，而且含有油凝胶的香肠的硬度、弹性等质构参数与对照组相差不大，整体感官可接受度明显高于对照组。Panagiotopoulou 等[55] 利用 γ-谷维素和 β-谷甾醇诱导葵花籽油形成油凝胶，并部分替代法兰克福香肠中的猪肉脂肪，通过研究最终产品的理化特性及感官特性，发现含有油凝胶的法兰克福香肠在硬度、弹性等质构参数上与对照没有显著区别，酸碱度和氧化水平也与对照组相差不大。感官分析显示，所有处理组的香肠的总体可接受性与对照组相似。因此，利用植物甾醇油凝胶来替代肉制品中的动物脂肪并保持其原来的良好品质具有较大的潜力。

单甘油酯具有降低血液中游离脂肪酸、甘油三酯和胰岛素水平等功能，同时也可以作为凝胶剂形成稳定的油凝胶，近年来被专家学者广泛研究[56]。Ana 等[57] 利用单甘油酯和葵花籽油替代博洛尼亚香肠中的不同的猪肉脂肪含量，并对博洛尼亚香肠的理化、工艺和感官特性进行分析，利用油凝胶替代博洛尼亚香肠中的脂肪时，产品的颜色明显变浅；与此同时，质构仪数据显示含有油凝胶的香肠的硬度较大；利用扫描电镜观察香肠的界面蛋白膜的形态和脂肪置换后蛋白基质的结构，发现随着猪肉脂肪量的减少，产品的网络结构变得更加紧密均匀，这在一定程度上为油凝胶能够增加博洛尼亚香肠的硬度提供强有力的证明。总之，利用单甘油酯诱导的油凝胶来替代肉制品中的动物脂肪具有很大的潜力。

3　结论与展望

肉制品中的动物脂肪中含有大量的饱和脂肪酸和胆固醇，随着人们健康意识的提高，肉类工业亟待寻找一种合适的动物脂肪替代物来降低产品中的饱和脂肪酸和胆固醇的含量。在众多动物脂肪替代物中，植物油凝胶因其独特的性质而被广泛研究和应

用。不同凝胶剂诱导的油凝胶能明显地改善肉制品的脂肪酸组成，降低产品的胆固醇的含量，并且作为动物脂肪替代物应用在肉制品中已经取得了一定的进展。但相关研究表明，部分植物油凝胶替代动物脂肪后，会导致产品硬度降低，出于对产品的质量要求，在今后的工作中，可以将不同的凝胶剂进行复配以更好地保持产品的品质；除此之外，油凝胶在制备的过程中温度较高，导致油凝胶中的脂肪氧化，将其应用于肉制品中会促进肉质品的脂肪氧化甚至产生气味。因此，在未来的研究和生产中，可以考虑加入抗氧化剂和优化油凝胶制备的方法，以取得更好的替代效果，但还需进一步的研究。

参考文献

[1] PINTADO T, MUOZ-GONZALEZ I, SALVADOR M, et al. Phenolic compounds in emulsion gel-based delivery systems applied as animal fat replacers in frankfurters: Physico-chemical, structural and microbiological approach[J]. Food Chemistry, 2020, 340: 128095.

[2] 孟彬, 于福满, 王小乔, 等. 低脂肪低亚硝酸盐肉制品研究进展[J]. 肉类研究, 2011, 25(9): 43−46. [MENG B, YU M F, WANG X Q, et al. Research progress of low-fat and low-nitrie meat products[J]. Meat Research, 2011, 25(9): 43−46.]

[3] 董学文, 张苏苏, 李大宇, 等. 脂肪替代物在肉制品中应用研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(6): 1961−1966. [DONG X W, ZHANG S S, LI D Y, et al. Research progress of the application of fat substitutes in meat products[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2017, 8(6): 1961−1966.]

[4] HYUK C K, DONG-MIN S, JONG H Y, et al. Evaluation of gels formulated with whey proteins and sodium dodecyl sulfate as a fat replacer in low-fat sausage[J]. Food Chemistry, 2020, 337: 127682.

[5] YOUSSEF M K, BARBUT S. Effects of protein level and fat/oil on emulsion stability, texture, microstructure and color of meat batters[J]. Meat Science, 2009, 82(2): 228−233.

[6] 冯旸旸, 徐敬欣, 于栋, 等. 乳液凝胶替代动物脂肪在肉制品中应用的研究进展[J]. 食品科学, 2019, 40(21): 236−242. [FENG Y Y, XU J X, YU D, et al. Recent advances in the application of emulsion gels as fat replacers in meat products[J]. Food Science, 2019, 40(21): 236−242.]

[7] 柯翔宇, 崔梦楠, 高彦祥, 等. 简述油凝胶及其在食品中的应用[J]. 食品科技, 2019, 44(10): 116−121. [KE X Y, CUI M N, GAO Y X, et al. A review of oleogels and application in food[J]. Food Science and technology, 2019, 44(10): 116−121.]

[8] FRANCISCO J C, LORENA S S, RICARD B, et al. Novel applications of oil-structuring methods as a strategy to improve the fat content of meat products[J]. Trends in Food Science & Technology, 2015, 44(2): 177−188.

[9] SINGH A, AUZANNEAU F I, ROGERS M A. Advances in edible oleogel technologies —A decade in review[J]. Food Research International, 2017, 97(7): 307−317.

[10] BASCUAS S, MORELL P, HERNANDO I, et al. Recent trends in oil structuring using hydrocolloids[J]. Food Hydrocolloids, 2021: 106612.

[11] 曹振宇, 刘泽龙, 张慧娟. 食用植物油脂凝胶化技术研究进展[J]. 中国油脂, 44(8): 57. [CAO Z Y, LIU Z L, ZHANG H J. Advance in technology of edible vegetable oil-gelling[J]. China Oils and Fat, 44(8): 57.]

[12] SCHOLTEN E. Edible oleogels: how suitable are proteins as a structurant?[J]. Current Opinion in Food Science, 2019, 27: 36−42.

[13] MARTINS A J, VICENTE A A, PASTRANAET L M, et al. Oleogels for development of health-promoting food products[J]. Food Science and Human Wellness, 2020, 9(1): 31−39.

[14] SULLIVAN C M, DAVIDOVICH-PINHA M, WRIGHT A, et al. Ethylcellulose oleogels for lipophilic bioactive delivery-effect of oleogelation on *in vitro* bioaccessibility and stability of beta-carotene[J]. Food & Function, 2017, 8(4): 1438−1451.

[15] GIACINTUCCI V, MATTIA C, SACCHETTI G, et al. Ethylcellulose oleogels with extravirgin olive oil: The role of oil minor components on microstructure and mechanical strength[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 84(11): 508−514.

[16] LAREDO T, BARBUT S, MARANGONIA G. Molecular interactions of polymer oleogelation[J]. Soft Matter, 2011, 7(6): 2734−2743.

[17] AREZOU K A, TABIAZAR M, ROUFEGARINEJAD L, et al. Preparation and characterization of carnauba wax/adipic acid oleogel: A new reinforced oleogel for application in cake and beef burger[J]. Food Chemistry, 2020, 333(9): 127446.

[18] RODRIGO T, JONA S P, NURIA 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-Food Science and Technology, 2020, 131: 109659.

[19] MARYAM M, SOLTANIZADEH N, GOLI S. Production of sesame oil oleogels based on beeswax and application as partial substitutes of animal fat in beef burger[J]. Food Research International, 2018, 108(6): 368−377.

[20] MARTINS A J, LORENZO J M, FRANCO D, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids-enriched hamburgers using sterol-based oleogels[J]. European Journal of Lipid Science and Technology, 2019, 121(11): 1900111.

[21] MOSCHAKIS T, PANAGIOTOPOLOU E, KATSANIDIS E. Sunflower oil organogels and organogel-in-water emulsions (part I): Microstructure and mechanical properties[J]. LWT-Food Science and Technology, 2016, 73: 153−161.

[22] ANA C F, PAULA K O, ANA P B, et al. Role of the oil on glyceryl monostearate based oleogels[J]. Food Research International, 2019, 120: 610−619.

[23] PALLA C, VICENTE J D, CARRIN M E, et al. Effects of cooling temperature profiles on the monoglycerides oleogel properties: A rheo-microscopy study[J]. Food Research International, 2019, 125: 108613.

[24] CHEN C, ZHANG C, ZHANG Q, et al. Study of monoglycerides enriched with unsaturated fatty acids at sn-2 position as oleogelators for oleogel preparation[J]. Food Chemistry, 2021(5):

129534.
[25] GOMEZ-ESTACA J, MARIA H A, HERRANZ B, et al. Characterization of ethyl cellulose and beeswax oleogels and their suitability as fat replacers in healthier lipid ptés development[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 87(2): 960−969.
[26] DAVIDOVICH-PINHAS M, BARBUT S, MARANGONI A G. The role of surfactants on ethylcellulose oleogel structure and mechanical properties[J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 127: 355−362.
[27] MANZOCCO L, BASSO F, PLAZZOTTA S, et al. Study on the possibility of developing food-grade hydrophobic bio-aerogels by using an oleogel template approach[J]. Current Research in Food Science, 2021(20): 115−120.
[28] DAVIDOVICH-PINHAS M, GRAVELLE A J, BARBUT S, et al. Temperature effects on the gelation of ethylcellulose oleogels[J]. Food Hydrocolloids, 2015, 46(4): 76−83.
[29] LIU N, LU Y, ZHANG Y, et al. Surfactant addition to modify the structures of ethylcellulose oleogels for higher solubility and stability of curcumin[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 165: 2286−2294.
[30] ISSARA U, PARK S, LEE S, et al. Health functionality of dietary oleogel in rats fed high-fat diet: A possibility for fat replacement in foods[J]. Journal of Functional Foods, 2020, 70: 103979.
[31] PATEL A R, NICHOLSON R A, MARANGONI A G. Applications of fat mimetics for the replacement of saturated and hydrogenated fat in food products[J]. Current Opinion in Food Science, 2020, 33: 61−68.
[32] LOPEZ-PEDROUSO M, LORENZO J M, GULLON B, et al. Novel strategy for developing healthy meat products replacing saturated fat with oleogels[J]. Current Opinion in Food Science, 2020, 40: 40−45.
[33] GOMEZ-ESTACA J, PINTADO T, JIMENEZ-COLMENERO F, et al. Assessment of a healthy oil combination structured in ethyl cellulose and beeswax oleogels as animal fat replacers in low-fat, PUFA-enriched pork burgers[J]. Food & Bioprocess Technology, 2019, 12(6): 1068−1081.
[34] PATEL A R, DEWETTINCK K. Edible oil structuring: An overview and recent updates[J]. Food & Function, 2016, 7(1): 20−29.
[35] AGREGAN R, BARBA F J, GAVAHIAN M, et al. Fucus vesiculosus extracts as natural antioxidants for improvement of physicochemical properties and shelf life of pork patties formulated with oleogels[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2019, 99(10): 4561−4570.
[36] SINTANG M, DANTHINE S, BROWN A, et al. Phytosterols-induced viscoelasticity of oleogels prepared by using monoglycerides[J]. Food Research International, 2017, 100(1): 832−840.
[37] SAWALHA H, DEN A R, VENEMA P, et al. Organogel-emulsions with mixtures of β-sitosterol and γ-oryzanol: Influence of water activity and type of oil phase on gelling capability[J]. Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(13): 3462−3470.
[38] COTABARREN I M, CRUCES S, PALLA C A. Extrusion 3D printing of nutraceutical oral dosage forms formulated with monoglycerides oleogels and phytosterols mixtures[J]. Food Research International, 2019, 126(12): 108676.1−108676.11.
[39] ALEJANDRE M, ASTIASARAN I, ANSORENA D, et al. Using canola oil hydrogels and organogels to reduce saturated animal fat in meat batters[J]. Food Research International, 2019, 122(8): 129−136.
[40] KOUZOUNIS D, LAZARIDOU A, KATSANIDIS E. Partial replacement of animal fat by oleogels structured with monoglycerides and phytosterols in frankfurter sausages[J]. Meat Science, 2017, 130(8): 38−46.
[41] EDA K U, EMIN Y. Preparation and characterization of glycerol monostearate and polyglycerol stearate oleogels with selected amphiphiles[J]. Food Structure, 2021, 28: 100192.
[42] FRANCESCA R L, DOMENICO G, NOEMI B, et al. Stabilization of meat suspensions by organogelation: A rheological approach[J]. European Journal of Lipid Science and Technology, 2012, 114(12): 1381−1389.
[43] 刘盼盼, 许苗苗, 祁文静, 等. 不同单硬脂酸甘油酯含量的大豆油油凝胶性能和微观结构分析[J]. 南京农业大学学报, 2018, 41(3): 547−554. [LIU P P, XU M M, QI W J, et al. Analysis of properties and micro-structure of soybean oil oleogels containing different 1-stearoyl-rac-glycerol contents[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2018, 41(3): 547−554.]
[44] 胡起华, 马传国, 陈小威, 等. 乙基纤维素油凝胶及其在食品中应用的研究进展[J]. 中国油脂, 2020, 45(1): 115−120. [HU Q H, MA C G, CHEN X W, et al. Advance in ethyl cellulose-based organogel and its application in foods[J]. China Oils and Fat, 2020, 45(1): 115−120.]
[45] ZETZL A K, MARANGONI A G, BARBUT S. Mechanical properties of ethylcellulose oleogels and their potential for saturated fat reduction in frankfurters[J]. Food & Function, 2012, 3(3): 327−337.
[46] BARBUT S, WOOD J, MARANGONI A. Quality effects of using organogels in breakfast sausage[J]. Meat Science, 2016, 122(12): 84−89.
[47] JOAQUIN G E, PINTADO T, JIMENEZ-COLMENERO J, et al. The effect of household storage and cooking practices on quality attributes of pork burgers formulated with PUFA- and curcumin-loaded oleogels as healthy fat substitutes[J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 119: 108909.
[48] BARBUT S, WOOD J, MARANGONI A. Potential use of organogels to replace animal fat in comminuted meat products[J]. Meat Science, 2016, 122: 155−162.
[49] 汪鸿, 孙立斌, 张亮, 等. 小烛树蜡油凝胶的性质及作用机理研究[J]. 中国粮油学报, 2021: 232−236. [WANG H, SUN L B, ZHANG L, et al. Properties and mechanism of candelilla wax oleogel[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2021: 232−236.]
[50] SILVA S, AMARAL J T, RIBEIRO M, et al. Fat replacement by oleogel rich in oleic acid and its impact on the technological, nutritional, oxidative, and sensory properties of Bologna-type sausages[J]. Meat Science, 2019, 149(3): 141−148.
[51] FRANCO D, MARTINS A J, CERQUEIRA M A, et al.

Strategy towards replacing pork backfat with a linseed oleogel in frankfurter sausages and its evaluation on physicochemical, nutritional, and sensory characteristics[J]. Foods, 2019, 8(9): 366.

[52] MARTINS A J, LORENZO J M, FRANCO D, et al. Characterization of enriched meat-based pate manufactured with oleogels as fat substitutes[J]. Gels, 2020, 6(2): 17.

[53] TAYLOR L W, NURIA C A, KENNETH J P, et al. Replacement of pork fat in frankfurter-type sausages by soybean oil oleogels structured with rice bran wax[J]. Meat Science, 2018, 145(11): 352−362.

[54] FRANCO D, MARTINS A J, LOPEZ-PEDROUSO M, et al. Evaluation of linseed oil oleogels to partially replace pork backfat in fermented sausages[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2020, 100(1): 218−224.

[55] PANAGIOTOPOULOU E, MOSCHAKIS T, KATSANIDIS E. Sunflower oil organogels and organogel-in-water emulsions (part II): Implementation in frankfurter sausages[J]. LWT - Food Science and Technology, 2016: 351−356.

[56] GOLDSTEIN A, SEETHARAMAN K. Effect of a novel monoglyceride stabilized oil in water emulsion shortening on cookie properties[J]. Food Research International, 2011, 44(5): 1476−1481.

[57] ANA F C, PAGLARINI C, POLLONIO M, et al. Glyceryl monostearate-based oleogels as a new fat substitute in meat emulsion[J]. Meat Science, 2020, 174(10): 108424.

李彤, 乌日娜, 张其圣, 等. 酱腌菜中微生物及与产品风味品质关系研究进展 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 475−483. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021070300

LI Tong, WU Rina, ZHANG Qisheng, et al. Research Progress of Microorganisms in Pickles and Their Relationship with Flavor and Quality of Products[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 475−483. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021070300

· 专题综述 ·

酱腌菜中微生物及与产品风味品质关系研究进展

李　彤[1], 乌日娜[1], 张其圣[2], 王芳芳[3], 刘春丽[4], 丁瑞雪[1], 闫丹丽[1], 武俊瑞[1,*]

（1.沈阳农业大学食品学院, 辽宁省食品发酵技术工程研究中心, 沈阳市微生物发酵技术创新重点实验室, 辽宁 沈阳 110866;
2.四川东坡中国泡菜产业技术研究院, 四川省食品发酵工业研究设计院有限公司, 四川 成都 611130;
3.沈阳榆园食品工业有限公司, 辽宁 沈阳 110172;
4.锦州小菜有限责任公司, 辽宁 锦州 121013）

摘　要: 酱腌菜是中国传统发酵食品，在中国已有几千年的历史。酱腌菜因其独特的风味品质和益生作用在世界范围内作为健康食品受到广泛关注。近年来，随着下一代高通量测序技术、第三代测序技术、宏基因组学以及宏转录组学等分子生物学技术在发酵食品研究中的广泛应用，有关酱腌菜中的微生物群落多样性及其作用机制方面的研究取得了重要进展，然而，相关归纳总结还不够全面。因此，本文重点对近年来酱腌菜中的微生物与风味物质形成的关系及风味物质的形成机制、酱腌菜中微生物的控制与利用等方面取得的最新研究进展进行了归纳总结，并阐述了酱腌菜中微生物的多样性以及益生作用，以期为深入研究酱腌菜风味物质形成机制、提升酱腌菜产品风味品质，从而实现传统酱腌菜的现代化加工提供参考。

关键词: 酱腌菜, 微生物多样性, 风味形成机制, 益生作用, 功能性微生物

中图分类号: TS255.53　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0475−09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021070300

本文网刊:

Research Progress of Microorganisms in Pickles and Their Relationship with Flavor and Quality of Products

LI Tong[1], WU Rina[1], ZHANG Qisheng[2], WANG Fangfang[3], LIU Chunli[4], DING Ruixue[1], YAN Danli[1], WU Junrui[1,*]

（1.College of Food, Shenyang Agricultural University, Liaoning Food Fermentation Technology Engineering Research Center, Shenyang Key Laboratory of Microbial Fermentation Technology Innovation,Shenyang 110866, China;
2.Sichuan Dongpo China Kimchi Industry Technology Research Institute, Sichuan Food Fermentation Industry Research and Design Institute Co., Ltd., Chengdu 611130, China;
3.Shenyang Yuyuan Food Industry Co., Ltd., Shenyang 110172, China;
4.Jinzhou Xiaocai Co., Ltd., Jinzhou 121013, China）

Abstract: Pickle is a traditional Fermented food in China, which has a history of thousands of years. Pickles have attracted wide attention as a health food in the world because of their unique flavor, quality and probiotics. In recent years, as the next generation of high-throughput sequencing technologies, the third generation sequencing technology, acer genomics and transcriptome study etc are widely used in the study of molecular biology technology in fermented food. Researches on the

收稿日期: 2021−07−26

基金项目: 国家自然科学基金面上项目（31972047）; 辽宁省自然科学基金地区联合基金项目（2020-MZLH-34）; 沈阳市中青年科技创新领军人才项目（RC200495）; 沈阳市科技创新平台项目（21-103-0-14, 21-104-0-28）。

作者简介: 李彤（1997−）, 女, 硕士, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: lt171827@163.com。

*** 通信作者:** 武俊瑞（1977−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: junruiwu@126.com。

microbial community diversity and function mechanism in the pickles have made significant progress, however, the relevant generalizations are not comprehensive enough. Therefore, this paper focuses on the relationship between microorganisms in pickles and the formation of flavor substances in recent years, the formation mechanism of flavor substances, summarizes the control and utilization of microorganisms in pickles and other aspects of the latest research progress, and describes the diversity and probiotics of microorganisms in pickles. It is expected to provide reference for further study on the formation mechanism of the flavor substances of pickles, improve the flavor quality of pickles, and realize the modern processing of traditional pickles.

Key words: pickled vegetables; microbial diversity; flavor formation mechanism; probiotics; functional microorganism

酱腌菜是指以新鲜蔬菜为主要原料，经微生物发酵而成的各种蔬菜制品，其历史悠久，文化底蕴深厚。早在商周时期，就有关于酱腌菜的记载，《周礼·天官》记载：“大羹不致五味也，铏羹加盐菜矣”。此文中的“羹”便是用咸肉或咸菜做成的汤，这是我国对酱腌菜最早的记载[1]，此后，历朝历代对酱腌菜均有详细的记载和论述。起初酱腌菜的出现是为了延长蔬菜的贮藏期，弥补蔬菜季节性不足的问题，后来因为酱腌菜口感清脆，风味独特，对人体健康有利而倍受消费者青睐。

近年来，随着分子生物学技术的发展，国内外研究学者已经对酱腌菜中的微生物群落以及风味成分进行了深入研究，研究发现，酱腌菜中的优势微生物对人体具有多种益生作用，并且与风味物质的形成具有重要相关性。一方面，酱腌菜中的微生物利用蔬菜汁液中的营养物质，代谢生成有机酸、游离氨基酸、甘糖醇以及酯类、醇类及含硫化合物等风味物质，赋予酱腌菜产品独特的香气和滋味[2]。另一方面，酱腌菜中的微生物，尤其是乳酸菌，已被鉴定为益生菌的丰富来源库，可促进人体健康[3]。因此，本文重点对酱腌菜中微生物对风味物质形成的影响机制进行了阐释，并对酱腌菜中微生物的多样性、益生作用及微生物的利用与控制：如新型杀菌技术、真空包装技术、新型发酵剂的选用、新型生物防腐剂的利用等方面取得的最新研究进展进行了全面归纳总结。

1 酱腌菜中微生物群落组成研究进展

最初，国内外学者们主要采用微生物分离培养的方法来研究酱腌菜中的微生物群落。然而环境中可培养的微生物不足总量的 20%，因此，利用传统的分离培养法不足以揭示酱腌菜中的微生物群落组成[4]。近年来，由于分子生物学技术的发展，学者们在分子水平上更全面、深入地对酱腌菜中的微生物群落进行了研究。表 1 是根据国内外学者采用高通量测序、宏基因组学等研究方法分析出的酱腌菜发酵过程中的核心微生物群落的归纳总结。

由表 1 可知，细菌是酱腌菜中最主要的微生物，含量丰富，种类多样。在属水平上，明串珠菌属、乳杆菌属、乳球菌属、片球菌属、魏斯氏菌属、微球菌属、单胞菌属、盐单胞菌、芽孢杆菌属、不动杆菌属、葡萄球菌属、弧菌属等是多种酱腌菜发酵过程中存在的优势细菌群落。其中，魏斯氏菌属、明串珠菌属、弧菌属、片球菌属等为酱腌菜发酵初期的主要优势菌属，乳杆菌属和葡萄球菌属等为酱腌菜发酵中期和后期的主要优势菌属[10]。不同种类酱腌菜发酵过程中起主导作用的优势菌属不同，这可能是由于蔬菜原料和发酵方式的不同，如：魏斯氏菌属是辣椒发酵

表 1 酱腌菜发酵过程中的核心微生物群落

Table 1 The core microbial community in the fermentation of pickles

酱腌菜	属水平上的主要微生物群落		参考文献
	主要细菌群落	主要真菌群落	
榨菜(芥菜茎)	*Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Arcobacter*, *Vibrio*, *Halomonas*, *Bacillus*, *Leuconostoc*, *Acinetobacter*, *Weissella*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Sphingomonas*, *Idiomarina*,	*Debaryomyces*, *Guehomyces*, *Kazachstania*, *Sterigmatomyces*, *Sporidiobolus*	[5−7]
发酵萝卜	*Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Marinospirillum*, *Idiomarina*, *Bacillus*, *Halanaerobium*, *Halomonas*	*Kazachstania*, *Pichia*, *Candida*, *Millerozyma*	[8−9]
发酵豇豆	*Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Weissella*, *Pseudomonas*, *Vibrio*	*Starmerella*, *Sugiyamaella*, *Millerozyma*	[10−11]
东北酸菜	*Lactobacillus*, *Serratia*, *Leuconostoc*, *Pseudomonas*, *Pediococcus*, *Enterobacter*, *Lactococcus*, *Weissella*, *Klebsiella*	*Candida*, *Cladosporium*, *Gibberella*, *Aspergillus*	[12]
发酵辣椒	*Weissella*, *Lactobacillus*, *Tatumella*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Brachybacterium*, *Microbacterium*	*Aspergillus*	[13−15]
发酵卷心菜	*Pediococcus*, *Streptococcus*, *Acinetobacter*, *Staphylococcus*, *Serratia*, *Lactococcus*, *Gluconacetobacter*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Achromobacter*, *Pediococcus*	*Candida*, *Periconia*, *Rhodococcus*, *Pantoea*	[16]
发酵竹笋	*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Weissella*, *Cyanobacteria_norank*, *Aerococcus*, *Marinobacterium*		[17]
雪里蕻	*Lactobacillus*, *Halanaerobium*, *Halomonas*, *Pseudomonas*, *Weissella*		[18−19]
发酵黄瓜	*Pediococcus*, *Lactococcus*, *Pantoea*, *Acinetobacter*, *Leuconostoc*, *Citrobacter*, *Raoultella*, *Pseudomonas*		[20]

前期的优势菌属，并随着发酵的进行，其含量逐渐降低，魏斯氏菌属的存在的原因可能是辣椒发酵中加入的辣椒和大蒜[15]；葡萄球菌属在发酵辣椒和发酵卷心菜发酵中期和后期占主导地位，这可能归因于葡萄球菌属的耐盐特性[13,16]。

除细菌外，酱腌菜中还存在毕赤酵母、德巴利氏酵母属、假丝酵母属、汉逊酵母属、*Millerozyma* 等相对丰度较高的酵母菌[21]，酵母菌能在缺氧条件下进行酒精发酵，产生的乙醇与有机酸形成酯，从而增加酱腌菜的香味。与细菌群落相似，不同酱腌菜发酵过程中起主导作用的酵母菌也具有特异性，如：*Millerozyma* 在豇豆酱腌菜和萝卜酱腌菜发酵中期丰度较高，但其在酱腌菜发酵中的作用有待进一步分析[9−10]；球拟假丝酵母是豇豆酱腌菜发酵后期的主导菌属，其在豇豆酱腌菜所有微生物中丰度最高[10]，据报道，球拟假丝酵母能显著提高威代尔冰酒中甘油和酒精的产量[22]。

由上述可知，腌菜中的微生物群落主要以细菌为主，尤其是乳酸菌，其次是酵母菌，这与 Xie 等[23]研究的中国东北自然发酵豆酱中的微生物群落结构相似，而与发酵面制品、葡萄酒等以酵母菌为主的微生物群落结构相差很大[24]。

2　酱腌菜中微生物的益生作用

酱腌菜是分离筛选益生菌的优质来源，如乳杆菌属、明串珠菌属、片球菌属和魏斯氏菌属等乳酸菌是参与酱腌菜发酵过程的主要益生菌，具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、免疫调节活性、降低脂肪及胆固醇、抑制病原菌等益生作用。对酱腌菜产品中益生菌的益生作用的研究不仅有助于功能性发酵食品的研发，而且可以为疾病的诊断和治疗提供新的手段。

2.1　抗炎及免疫调节活性

炎症是机体免疫系统对刺激的一种防御反应，这些刺激可能激活炎症信号通路，如核因子(NF-kB)、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)、Janus 激酶信号转导子和转录激活子(JAK-STAT)通路、这些通路是许多慢性疾病的病理基础[25]。研究发现，作为酱腌菜中的益生菌，乳酸菌及其代谢产物对多种炎症及免疫反应具有调节功能[3]。Le 等[26] 发现芥菜酱腌菜中的植物乳杆菌通过降低细胞中白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)和环氧化酶 2(COX2)的表达水平而显著抑制促炎因子 NO 的产生，对脂多糖诱导的小鼠巨噬细胞炎症反应发挥抑制作用。Masashi 等[25] 研究表明，从泡菜中分离的植物乳杆菌对由 2，4-二硝基氯苯(DNCB)诱导的小鼠皮炎具有抑制作用。

2.2　抗氧化、抗癌活性

从酱腌菜中分离筛选的优势益生菌菌株通过上调 Nrf2 等具有抗氧化作用的转录调控因子的表达发挥抗氧化、抗癌作用。Qian 等[27] 发现从四川泡菜中分离的一株植物乳杆菌，能显著上调 nNOS、Mn-SOD、Nrf2 等因子的表达，下调 iNOS(诱导型一氧化氮合酶)在小鼠肝脏和脾脏的表达，进而拮抗 D-半乳糖诱导的小鼠氧化和衰老，说明该植物乳杆菌是具有抗氧化、抗衰老作用的优质乳酸菌。Thiruvengadam 等[28] 从印度酸菜中筛选和鉴定出了副干酪乳杆菌，其产生的胞外多糖具有自由基和过氧化氢清除能力等抗氧化能力，说明副干酪乳杆菌及其多糖可用于抗氧化剂的开发。Liu 等[29] 从四川泡菜中分离和鉴定的发酵乳杆菌菌株上调了舌癌组织中 Nrf2、HO-1、GST 和 Bax 等具有抗氧化应激作用的转录调控因子的表达，进而降低舌癌对免疫系统和氧化平衡的影响，增强了抗氧化能力，从而具有预防舌癌的作用。

2.3　降低脂质、胆固醇作用

国内外研究表明：含有乳酸菌的发酵食品具有降低胆固醇能力，长期服用乳酸菌发酵食品可以预防心血管疾病的发生[30]。马长路等[31] 从自然发酵的传统东北发酵酸菜中分离出了具有降胆固醇能力的植物乳杆菌。Zhu 等[32] 从四川泡菜中分离的一株植物乳杆菌能通过 PPAR-α 信号通路有效抑制高脂饮食诱导的小鼠肥胖。Wang 等[33] 从东北酸菜中分离出的戊糖乳杆菌可通过 AMPK 信号通路改善高脂饮食诱导的高脂血症。因此酱腌菜中的优势乳酸菌可通过对体内信号通路的调节调控心血管疾病的发生。

2.4　其他有益功能

酱腌菜中的微生物还具有缓解便秘、预防糖尿病、改善非酒精性脂肪肝等作用。Li 等[34] 发现从泡菜中分离的一株植物乳杆菌能有效缓解便秘，具有良好的益生菌潜力和应用价值。Huang 等[35] 从酸菜中筛选鉴定出一种植物乳杆菌，其代谢产生的胞外多糖能有效抑制胰腺 α-淀粉酶的活性，在预防和缓解糖尿病方面具有潜在的应用价值。Park 等[36] 发现从韩国发酵卷心菜中分离的两株植物乳杆菌对高脂肪高糖饮食诱导的大鼠非酒精性脂肪肝具有控制作用，是非酒精性脂肪性肝病的潜在治疗剂。

3　酱腌菜中微生物与风味品质形成的关系及机制研究

近年来，利用转录组学、宏基因组学等对酱腌菜中的微生物的代谢研究表明，在酱腌菜发酵过程中，首先是由微球菌属等环境微生物启动发酵，然后是以明串珠菌为主导的同型乳酸发酵，最后是以乳杆菌属为主导的异性乳酸发酵[19]，整个代谢过程形成了有机酸、游离氨基酸、游离糖以及挥发性风味物质等多种代谢产物，因此，酱腌菜中的微生物与风味品质的形成具有重要关系，是风味物质形成的最重要的途径。

3.1　酱腌菜中微生物对风味形成的影响机制

如图 1 所示，在酱腌菜发酵过程中，微生物在体内酶的作用下，通过碳水化合物代谢、氨基酸代谢、脂肪代谢三种途径，将酱腌菜中的脂肪、蛋白质和碳水化合物等大分子营养物质分解为游离脂肪酸、葡

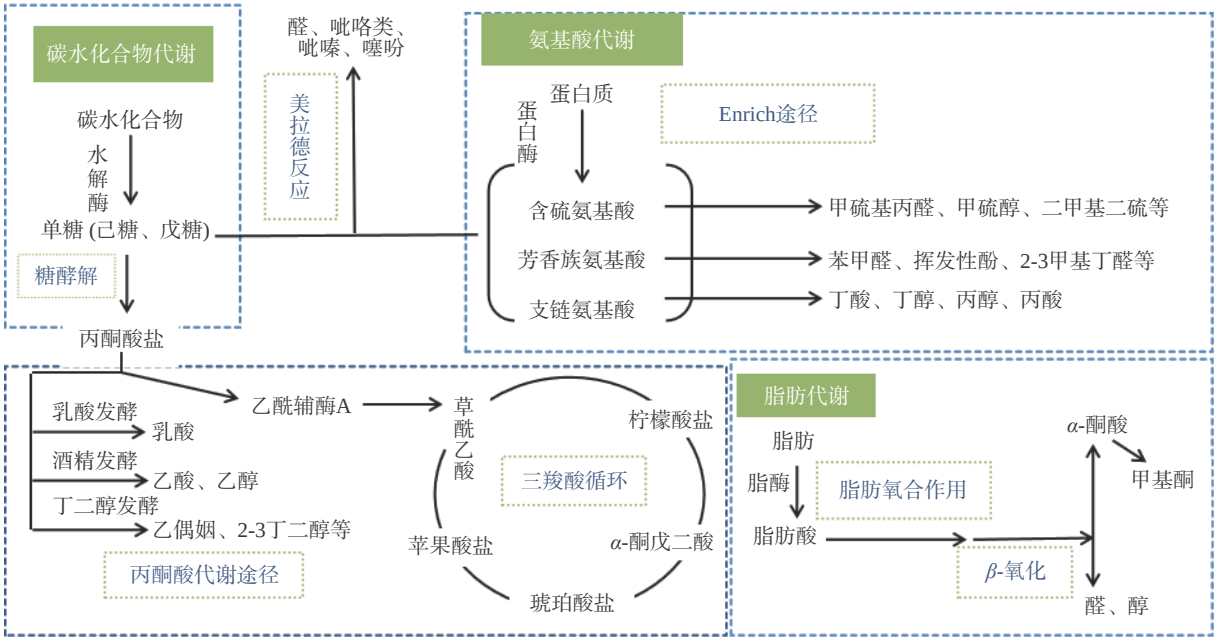


图 1 微生物代谢途径中风味物质的形成机制

Fig.1 Mechanism for the formation of flavor substances in the microbial metabolic pathway

葡萄糖和半乳糖、短链肽等初级代谢产物，并进一步代谢生成多种次级代谢产物，形成酱腌菜独特的风味[37]。碳水化合物代谢是微生物利用酱腌菜汁液中的营养物质在水解酶的作用下，生成单糖，并进一步通过糖酵解途径将单糖转化为丙酮酸，随后，酱腌菜中的乳酸菌、酵母菌等优势微生物通过乳酸发酵、酒精发酵、丁二醇发酵、有机酸发酵将丙酮酸转化成乳酸、乙醇、乙醛、乙偶姻及多种挥发性风味物质。其中，乳酸发酵是最重要的代谢过程，分为同型乳酸发酵和异型乳酸发酵，明串珠菌属、乳球菌属和部分乳杆菌属为异型乳酸发酵的主要乳酸菌，在酱腌菜发酵前期含量丰富，片球菌属、乳杆菌属、魏斯氏菌属等为同型乳酸发酵的主要乳酸菌，在发酵中期和后期含量丰富[38]。乳酸菌通过乳酸发酵产生乳酸，使酱腌菜具有独特的酸味。在榨菜发酵过程中，乳杆菌属和片球菌属可通过丙酮酸代谢途径将丙酮酸分解为乳酸[5]。氨基酸代谢是微生物在转氨酶、脱氢酶、脱羧酶、裂解酶的作用下，通过 Enrich 途径，将支链氨基酸转化为酸类和醇类，将含硫氨基酸转化为含硫化合物，将芳香族氨基酸转化为苯甲醛、挥发性酚等风味成分[39]。由于原辅料的加入，酱腌菜中还存在脂肪代谢，即微生物通过脂肪氧合作用和 β-氧化作用将脂肪酸转化为醛类、酮类、羟基脂肪酸等。综上所述，通过微生物代谢，酱腌菜发酵生成了有机酸、游离氨基酸、糖类以及多种挥发性风味物质。但是微生物的代谢功能与风味形成之间的相关性还需要进一步研究。

3.2 微生物代谢产生有机酸

有机酸是酱腌菜中最重要的呈味物质。在酱腌菜发酵初期，微生物会将蔬菜汁液中的碳水化合物通过糖酵解途径生成丙酮酸等代谢产物，丙酮酸等代谢产物在微生物体内酶的作用下又会进一步被降解为乳酸，如榨菜发酵过程中，片球菌属和乳杆菌属体内含有的 L-乳酸脱氢酶能将丙酮酸分解为 L-乳酸[5]。目前，大量研究表明，乳杆菌属、魏斯氏菌属、片球菌属等优势乳酸菌都与有机酸的生成有关。如有研究发现魏斯氏菌和植物乳杆菌共接种发酵泡菜可以加速泡菜发酵初期非挥发性有机酸的形成[40]。马艺荧[41]研究发现，乳杆菌属和片球菌属是东北酸菜发酵过程中的主要优势菌属，并且与乳酸、乙酸、琥珀酸、草酸等有机酸的产生有关，片球菌属与发酵后期丙酸和戊酸含量的增加有关，使酸菜具有尖酸味儿。酱腌菜中的乳酸菌与有机酸生成的相关性还需要进一步的分析，并且有机酸可能有助于酱腌菜产品的最终风味的形成。

3.3 微生物代谢产生氨基酸

氨基酸是酱腌菜中呈鲜物质的重要贡献者，目前，在腌制蔬菜中已发现的氨基酸达 30 多种[42]。根据氨基酸的呈味特性，可以将其分为鲜味、甜味、苦味、无味四种。天冬氨酸和谷氨酸具有鲜味特征；丝氨酸、半胱氨酸具有甜味特征；亮氨酸，苯丙氨酸具有苦味特征[43]。Wang 等[44] 发现谷氨酰胺、精氨酸、天冬酰胺是辣椒糜发酵过程中含量较高的氨基酸，是苦味和鲜味的来源。在酱腌菜发酵过程中，氨基酸含量随着发酵时间的增加呈现先增加后减少趋势。首先酱腌菜中的微生物利用蛋白质作为氮源，将蛋白质分解为多种氨基酸。如 Xiao 等[16] 发现酱腌菜发酵中期氨基酸浓度普遍升高，产生四种必需氨基酸：缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和赖氨酸。Zhao 等[45] 研究发现泡菜卤水中的植物乳杆菌、布氏乳杆菌和乙醇球菌共同作用可显著增加泡菜中的谷氨酸、甘氨酸含量。Luo 等[46] 发现用明串珠菌、乳杆菌和魏斯氏

菌混合接种发酵酱腌菜，可使产品中乳酸、甘露醇、鲜味和甜味氨基酸含量增加。可见，酱腌菜中氨基酸种类和含量的增加是多菌共同作用的结果。随着发酵的进行，酱腌菜中的微生物也可分解氨基酸产生苯乳酸、乙酸苯酯及苯乙醇等风味物质，如在泡菜发酵后期，微生物含有的谷氨酸脱氢酶可将谷氨酸转化为 γ-氨基丁酸[45]，氨基酸含量逐渐减少并趋于稳定。

3.4　微生物代谢产生游离糖

游离糖既是酱腌菜中重要的呈甜物质，也是微生物代谢的能量来源。发酵初期，异型乳酸发酵会将糖类大分子转化为葡萄糖、果糖等游离糖，使酱腌菜中的游离糖含量上升。如在榨菜发酵前期，明串珠菌会将多余的大分子糖类转化为葡萄糖和甘糖醇。随着微生物的大量繁殖，游离糖又会被分解为醇类、酸类、酯类等挥发性风味物质[47]。故在酱腌菜发酵过程中游离糖含量先短暂增加，后一直呈减少趋势。

3.5　微生物代谢产生挥发性风味物质

酱腌菜中微生物发酵产生的挥发性风味物质有酸类、酮类、醛类、酚类、醇类、酯类、烃类、醚类、含硫化合物等。表 2 是利用气相色谱-质谱联用法（GC-MS）分析的几种酱腌菜产品中的主要挥发性风味物质。

由表 2 可知，利用不同蔬菜种类发酵而成的酱腌菜产品中的风味物质不同。如竹笋经微生物发酵后，生成了乙醇、1-己醇、己醛、甲氧基苯基肟等风味物质，这些风味成分共同构成了酸笋的酸臭味[52]。大叶芥菜发酵过程中生成了具有芳香气味的腈类物质，主要是乙烯乙腈和烯丙基腈，对发酵芥菜的香气成分有很大影响。腈类物质主要是通过硫代葡萄糖苷经芥子酶降解生成的配糖体脱去硫原子而形成[53]。然而，在发酵过程中，新鲜蔬菜中一些原有的风味成分含量逐渐减少，如在芥菜发酵过程中，原本含有的异硫氰酸酯类和醛类物质逐渐被酶和微生物分解[5]，使生成的榨菜辛辣味减弱。

由表 1、表 2 所知，不同种酱腌菜中所含的风味成分不同，主要归因于不同种类蔬菜发酵过程中发挥作用的核心微生物有差别，然而，有研究发现，同种蔬菜发酵过程因加入的优势菌种不同，产生的风味也有差别。如 Liang 等[12] 发现用植物乳杆菌发酵酸菜可以提高酸菜中醇类、酯类、烃类和腈类物质的浓度，而 Zhao 等[54] 用副干酪乳杆菌接种发酵酸菜，发现相比自然发酵，可以加速和增加酸菜中游离糖的消耗，并且生成更多的萜类、酮类和醚类等风味成分。酱腌菜中某些优势菌种的添加可以促进特定风味物质的生成，如有研究发现，将戊糖乳杆菌作为益生菌发酵剂用于葱属植物的发酵，发酵过程中产生了更多的具有强烈的香味和多种健康益处烯丙基硫醇，说明戊糖乳杆菌可以促进烯丙基硫醇的生成[55]。

4　酱腌菜中微生物的控制与利用

微生物发酵是蔬菜腌制过程中是最重要的生物过程，其中，有益微生物利用蔬菜中的蛋白质、糖类等营养物质，代谢产生多种风味物质，赋予酱腌菜清脆、爽口的口感和适宜的酸味。而有害微生物会大量分解糖类产生令人不愉快气味的丁酸、生成有害物质亚硝胺及使产品发霉、变质。因此，为提高酱腌菜的风味品质，对酱腌菜中的有害微生物的控制及功能性微生物的利用显得越来越重要。

4.1　酱腌菜中有害微生物的控制技术

4.1.1　非热杀菌工艺　非热杀菌技术有超高压杀菌、辐照杀菌、臭氧杀菌、低温等离子体杀菌、高密度二氧化碳杀菌。近年来，低温等离子体处理、高密度二氧化碳（DPCD）技术作为新型的非热加工技术在食品保鲜方面显示出了潜力。低温等离子体处理原理是等离子体中存在的活性自由基、带电粒子、紫外线灯与细菌发生物理化学反应，可以有效地破坏细菌、病毒及其他代谢产物，在产品贮藏期间抑制腐败微生物生长，是一种快速、安全、无毒性残留的新型广谱杀菌技术。Zhao 等[56] 发现低温等离子体处理萝卜酱腌菜能够有效地去除酵母菌，尤其是产气酵母菌，同时保留乳酸菌，具有与巴氏杀菌相似的安全品质。高密度二氧化碳（DPCD）杀菌是通过二氧化碳的分子效应和压力来达到杀菌和钝酶的目的，与热杀菌相比，DPCD 技术在低温条件下就能有效杀菌，与超高压相比，能最大限度地保持食品的营养、风味及新鲜度[57]。有研究表明[58]，DPCD 作为一种新型的非热杀菌技术，与热处理相比显著提高了腌制胡萝卜的硬

表 2　酱腌菜产品中的主要挥发性风味物质

Table 2　Main volatile flavor compounds in pickles

酱腌菜	挥发性风味物质	参考文献
发酵辣椒	芳樟醇，4-甲基-1-戊醇，桉树脑，水杨酸甲酯，癸酸，乙酯，α-紫罗兰酮，苯酚，苯乙烯，十一酸，乙酯，2-甲氧基-4-乙烯基苯酚	[2,44,48]
发酵萝卜	哌啶-2-硫酮，二甲基三硫，3-（甲硫基）丙基异硫氰酸酯，二甲基苯甲醛，壬醛	[9]
发酵豇豆	3-辛醇，3-辛烯醇，二甲基己烯，环庚烯乙醇，二甲基苯甲醛，壬醛	[2]
东北酸菜	壬酸乙酯，2-甲基戊酸乙酯，二甲基二硫化物	[49]
糖醋蒜	二烯丙基硫醚，二烯丙基二硫醚，异丁香酚，乙酸丁酯，3-甲基丁醇，丙酮	[50]
雪菜	异硫氰酸酯类，苯甲醛，苯乙醇，二甲基二硫乙酸乙酯，3-丁烯腈，苯酚，乙醇，3-(2,6,6-三甲基-1-环己烯-1-基)丙烯醛	[18,51]
发酵竹笋	乙醇，1-己醇，己醛，甲氧基苯基肟，1-辛烯-3-醇，香叶醇，对甲酚，壬醛，癸醛，(E)-2-壬烯醛，苯乙醇	[52]
榨菜	异硫氰酸酯，己醛，(戊)-2-己烯醛，苯甲醛，苯乙醛，3-丁烯腈，乙醇，(Z)-3-己烯醇，苯乙醇，乙酸乙酯，乙酸丁酯，二甲基二硫化物	[5-7]
发酵大叶芥菜	异硫氰酸烯丙酯，苯甲醛，苯乙醛，β-紫罗酮和6-甲基-3-庚酮，3,5,5-三甲基-1-己烯，乙烯乙腈，烯丙基腈	[53]

度、色泽和 β-胡萝卜素含量。

4.1.2 真空包装技术 目前，酱腌菜常用的包装技术有充气包装、气调包装、罐装、无菌包装、盐溶液包装、真空包装等。因导致酱腌菜腐败变质的微生物多数为好氧性微生物，而在真空条件下大多数好氧细菌和真菌的繁殖受到抑制，因此真空包装是现今酱腌菜生产中应用较广的包装技术，它能延长产品的货架期、防止产品腐败变质、保持产品的色、香、味、形及营养价值。Ge 等[59] 发现，与充气包装和盐溶液包装相比，真空包装能抑制微生物入侵，降低果胶酶活性，使酱腌菜的可溶性果胶含量增加，从而使酱腌菜在贮藏过程中的硬度提高。Zhao 等[60] 发现与传统的盐溶液包装相比，真空包装对生物胺、亚硝酸盐和氨基酸态氮的产生抑制效果最好，这说明真空包装在酱腌菜生产中的应用更具有安全性。

4.2 腌菜中功能性微生物的利用

4.2.1 新型功能性发酵剂的选用 从酱腌菜中分离筛选出的优势菌株可用作发酵剂生产具有目标功能特性的酱腌菜。一是人工接种可用来生产低盐酱腌菜的发酵剂，如 He 等[61] 发现，与酸菜中的弯曲乳杆菌在低盐浓度下生长更占优势，且可滴定酸和乳酸浓度均高于高处理盐浓度的酸菜，可见，该弯曲乳杆菌菌株可作为优良新型发酵剂来生产低盐酱腌菜。二是某些优势菌株作为发酵剂还可降解酱腌菜中的亚硝酸盐，人工接种具有亚硝酸盐还原作用的优势菌株是目前控制酱腌菜中亚硝酸盐含量的新工艺。有研究发现，酸菜中的假单胞菌具有硝酸还原酶基因和亚硝酸盐还原酶基因，其中亚硝酸盐还原酶可介导亚硝酸盐还原为氨，该发现为酸菜中亚硝酸盐的检测乃至消除提供了新的有力依据[62]。Du 等[63] 以干酪乳杆菌作为发酵剂接种发酵酸菜，降低了酸菜发酵过程中的亚硝酸盐浓度。三是选择无毒的不产生生物胺的益生菌作为发酵剂可作为目前酱腌菜生产的新工艺，由微生物分泌的脱羧酶对氨基酸进行脱羧产生生物胺，生物胺含量超标是酱腌菜产品存在的主要问题，具有健康风险。有研究发现从传统家庭自制酱腌菜中分离的一株植物乳杆菌分离物未检测到任何生物胺，说明该植物乳杆菌不产生生物胺，是一种理想的发酵剂，可用于酱腌菜的发酵生产[64]。

4.2.2 新型天然微生物防腐剂的利用 天然微生物防腐剂是一种新型防腐剂，相比化学防腐剂，天然微生物防腐剂具有安全、无毒、价格低廉、易获取等优点。微生物对病原菌的抑制机理是：细菌在代谢过程中会生成细菌素，细菌素是一种具有抑菌活性的多肽或前体多肽，对病原菌具有拮抗作用[65]。目前，已在酱腌菜中分离和鉴定了多种具有抑制病原菌作用的益生菌。Joana 等[66] 分离筛选的植物乳杆菌能产生对单核细胞增生李斯特菌具有抑制作用的细菌素，可作为一种新型天然生物防腐剂。Sungmin 等[65] 从自然发酵泡菜中分离筛选和鉴定了一株产细菌素的解淀粉芽孢杆菌，该菌株产生的细菌素对食源性致病菌单核细胞增生李斯特氏菌具有抑制作用，表明从泡菜中分离的解淀粉芽孢杆菌可被视为候选生物防腐剂，应用于食品加工。另外，Lü等[67] 从泡菜中分离出了具有较强群体猝灭活性的植物乳杆菌，该菌株能够破坏温和气单胞菌（一种革兰氏阴性病原体，其毒力因子的产生和生物膜的形成受群体感应系统的调节）的生物膜结构、降低预制生物膜的厚度，因此，该植物乳杆菌是一种很有前途的群体感应抑制剂，可作为食品加工过程中的新型防腐剂使用。

5 结语与展望

近年来，随着人们生活水平的提高和生活方式的变化，酱腌菜产品的风味品质及对人体的健康问题受到了极高的重视。目前，国内外研究学者已经对酱腌菜中微生物的多样性及其益生作用、微生物与产品风味品质的相关性及作用机制等方面进行了深入研究。在此基础上，研究学者们从酱腌菜中筛选出了多种功能微生物作为发酵剂和天然防腐剂，为生产具有独特风味和营养品质的优质酱腌菜提供了重要参考。

随着宏基因组学、蛋白质组学、转录组学等分子生物学技术的发展，未来对酱腌菜的研究可从以下几个方面进行。一是更加全面深入地探究酱腌菜中微生物的生理特征、遗传特性，揭示酱腌菜中微生物的演替规律以及微生物对风味物质形成的影响机制。在深入研究酱腌菜中微生物与风味品质相关性的基础上，筛选具有特定功能性的优良菌株作为发酵剂生产优质酱腌菜。二是针对目前酱腌菜的加工方式仍然以自然发酵为主，存在生产周期长、产品外观色泽差、产品风味品质不稳定等问题，要更加深入地探讨酱腌菜的新型加工工艺。三是传统工艺制作的酱腌菜常加入大量化学添加剂如甜味剂、色素、防腐剂等，然而，化学添加剂的过量会对人体肾脏造成负担，因此，应选用新型天然原辅料替代化学添加剂，不仅能提高产品营养价值和风味品质，还保证了产品的安全性。另外，为了提高酱腌菜产品的品质与安全性，还应深入研究既能提高检测效率、又能减小检测带来的产品损害的新型检测技术。酱腌菜产品新型检测技术的研究与开发将为酱腌菜产业的升级以及现代化加工提供新的理论支撑。

参考文献

[1] 洪光住. 我国各类型酱腌菜起源史[J]. 中国调味品，1987(1)：24−27. [HONG G Z. The origin history of pickles in China[J]. China Condiment, 1987(1): 24−27.]

[2] RAO Y, QIAN Y, TAO Y F, et al. Characterization of the microbial communities and their correlations with chemical profiles in assorted vegetable Sichuan pickles[J]. Food Control, 2020, 113: 107174.

[3] ROGHAYEH S, FARZANEH S, RANA B, et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory properties of fermented plant

foods[J]. Nutrients, 2021, 13(5): 1516.
[4] WARD D M, WELLER R, BATESON M M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community[J]. Nature, 1990, 345(6270): 63−65.
[5] LIANG H P, CHEN H Y, ZHANG W X, et al. Investigation on microbial diversity of industrial Zhacai paocai during fermentation using high-throughput sequencing and their functional characterization[J]. LWT-Food Science and Technology, 2018, 91: 460−466.
[6] ZHANG C C, ZHANG J M, LIU D. Biochemical changes and microbial community dynamics during spontaneous fermentation of Zhacai, a traditional pickled mustard tuber from China[J]. International Journal of Food Microbiology, 2021, 347: 109199.
[7] YANG J X, LI F Z, ZHANG Y L, et al. Metagenomic analysis of microbial community succession during the pickling process of Zhacai (preserved mustard tuber) and its correlation with Zhacai biochemical indices[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2020, 101(4): 1646−1658.
[8] TANG Y Y, ZHOU X R, HUANG S G, et al. Microbial community analysis of different qualities of pickled radishes by Illumina MiSeq sequencing[J]. Journal of Food Safety, 2019, 39(2): e12596.
[9] YU R, TAO Y F, CHEN X, et al. The characteristics and correlation of the microbial communities and flavors in traditionally pickled radishes[J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 118: 108804.
[10] 魏雯丽, 宫尾茂雄, 吴正云, 等. 基于宏转录组学技术解析工业豇豆泡菜发酵过程中活性微生物群落结构变化[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(10): 60−65. [WEI W L, GONG W M X, WU Z Y, et al. Analysis of community structure changes of active microorganisms during fermentation of industrial cowpea pickles based on metatranscriptomics[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(10): 60−65.]
[11] GUO Z, WANG Y R, XIANG F S, et al. Bacterial diversity in pickled cowpea (*Vigna unguiculata* [Linn.] Walp) as determined by illumina miseq sequencing and culture-dependent methods[J]. Current Microbiology, 2021, 78(4): 1−12.
[12] LIANG H P, HE Z, WANG X Y, et al. Effects of salt concentration on microbial diversity and volatile compounds during suancai fermentation[J]. Food Microbiology, 2020, 91: 103537.
[13] XU X X, WU B B, ZHAO W T, et al. Correlation between autochthonous microbial communities and key odorants during the fermentation of red pepper (*Capsicum annuum* L.)[J]. Food Microbiology, 2020, 91: 103510.
[14] SONG H Y, WHON T W, KIM J, et al. Microbial niches in raw ingredients determine microbial community assembly during kimchi fermentation[J]. Food Chemistry, 2020, 318: 126481.
[15] WANG J, WANG R, XIAO Q, et al. Analysis of bacterial diversity during fermentation of Chinese traditional fermented chopped pepper[J]. Letters in Applied Microbiology, 2019, 69(5): 346−352.
[16] XIAO Y S, XIONG T, PENG Z, et al. Correlation between microbiota and flavours in fermentation of Chinese Sichuan paocai[J]. Food Research International, 2018, 114: 123−132.
[17] 李薇, 吴良如, 索化夷, 等. 基于高通量测序方法研究腌制麻竹笋发酵过程中细菌群落的动态演替[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(24): 9−15. [LI W, WU L R, SUO H Y, et al. Study on the dynamic succession of bacterial community during the fermentation of pickled *Dendrocalamus latiflorus* shoots by high-throughput sequencing[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(24): 9−15.]
[18] ZHANG J M, ZHANG C C, XIN X T, et al. Comparative analysis of traditional and modern fermentation for Xuecai and correlations between volatile flavor compounds and bacterial community[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 631054.
[19] ZHANG J M, ZHANG C C, WU W C, et al. Correlation of the bacterial communities with umami components, and chemical characteristics in Zhejiang Xuecai and fermented brine[J]. Food Research International, 2021, 140: 109986.
[20] PÉREZ-DÍAZ I M, DICKEY A N, FITRIa R, et al. Modulation of the bacterial population in commercial cucumber fermentations by brining salt type[J]. Journal of Applied Microbiology, 2020, 128(6): 1678−1693.
[21] AN F Y, SUN H J, WU J R, et al. Investigating the core microbiota and its influencing factors in traditional Chinese pickles[J]. Food Research International, 2021, 147(5): 110543.
[22] 洪梦楠. *Starmerella bacillaris* 酵母的筛选及其在威代尔冰酒酿造中的应用 [D]. 锦州: 锦州医科大学, 2020. [HONG M N. Screening of *Starmerella bacillaris* yeast and its application in the production of wedale ice wine[D]. Jinzhou Medical University, 2020.]
[23] XIE M X, AN F Y, ZHAO Y, et al. Metagenomic analysis of bacterial community structure and functions during the fermentation of da-jiang, a Chinese traditional fermented food[J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 129(5): 109450.
[24] 王雪薇, 杜展成, 武运, 等. 葡萄酒功能性微生物选育研究进展[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2018, 222(6): 87−91. [WANG X W, DU Z C, WU Y, et al. Research progress on breeding of functional microorganisms in wine[J]. Grape and Wine at Home and Abroad, 2018, 222(6): 87−91.]
[25] MASASHI M, NOBUAKI O, HIROSHIGE K. *Lactiplantibacillus plantarum* 22A-3 isolated from pickle suppresses ovalbumin-induced food allergy in BALB/c mice and 2, 4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2021, 132(3): 271−278.
[26] LE B, ANH P T, YANG S H, et al. Enhancement of the anti-inflammatory effect of mustard kimchi on RAW 264.7 macrophages by the Lactobacillus plantarum fermentation-mediated generation of phenolic compound derivatives[J]. Foods, 2020, 9(2): 181.
[27] QIAN Y, ZHANG J, ZHOU X R, et al. *Lactobacillus plantarum* CQPC11 isolated from Sichuan pickled cabbages antagonizes D-galactose-induced oxidation and aging in mice[J]. Molecules, 2018, 23(11): 3026.
[28] THIRUVENGADAM S, SELVAM P, DURAIRAJ K, et al. Biomedical and therapeutic potential of exopolysaccharides by *Lactobacillus paracasei* isolated from sauerkraut: Screening and characterization[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2021,

28(5): 2943−2950.
[29] LIU B H, ZHANG J, YI R K, et al. Preventive effect of *Lactobacillus fermentum* CQPC08 on 4-nitroquineline-1-oxide induced tongue cancer in C57BL/6 mice[J]. Foods, 2019, 8(3): 93.
[30] 胡勇, 文晓荣, 常自超, 等. 降胆固醇乳酸菌的分离鉴定[J]. 中国乳品工业, 2015, 43(2): 20−23. [HU Y, WEN X Y, CHANG Z C, et al. Isolation and identification of cholesterol lowering lactic acid bacteria[J]. China Dairy Industry, 2015, 43(2): 20−23.]
[31] 马长路, 焦梦丽, 罗红霞, 等. 传统东北酸菜中乳杆菌的分离鉴定及其降胆固醇特性研究[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(21): 209−213. [MA C L, JIAO M L, LUO H X, et al. Isolation and identification of *Lactobacillus* from traditional northeast sauerkraut and its cholesterol lowering characteristics[J]. Food Research and Development, 2019, 40(21): 209−213.]
[32] ZHU K, TAN F, MU J F, et al. Anti-obesity effects of *Lactobacillus fermentum* CQPC05 isolated from Sichuan pickle in high-fat diet-induced obese mice through PPAR-α signaling pathway[J]. Microorganisms, 2019, 7(7): 194.
[33] WANG Y, YOU Y, TIAN Y, et al. *Pediococcus pentosaceus* PP04 ameliorates high-fat diet-induced hyperlipidemia by regulating lipid metabolism in C57BL/6N mice[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(51): 15154−15163.
[34] LI F, ZHOU H, ZHOU X R, et al. *Lactobacillus plantarum* CQPC05 isolated from pickled vegetables inhibits constipation in mice[J]. Applied Sciences, 2019, 9(1): 159.
[35] HUANG Z H, F X, ZHU X Y, et al. An exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* H31 in pickled cabbage inhibits pancreas α-amylase and regulating metabolic markers in HepG2 cells by AMPK/PI3K/Akt pathway[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 143(5): 775−784.
[36] PARK E J, LEE Y S, KIM S M, et al. Beneficial effects of *Lactobacillus plantarum* strains on non-alcoholic fatty liver disease in high fat/high fructose diet-fed rats[J]. Nutrients, 2020, 12(2): 542.
[37] MIN K P, YOUNG S K. Mass spectrometry based metabolomics approach on the elucidation of volatile metabolites formation in fermented foods: A mini review[J]. Food Science and Biotechnology, 2021, 30(7): 881−890.
[38] KIM K H, CHUN B H, BAEK J H, et al. Genomic and metabolic features of *Lactobacillus sakei* as revealed by its pan-genome and the metatranscriptome of kimchi fermentation[J]. Food Microbiology, 2020, 86: 103341.
[39] MARILLEY L, CASEY M G. Flavours of cheese products: Metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains[J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 90(2): 139−159.
[40] XIANG W L, ZHANG N D, LU Y, et al. Effect of *Weissella cibaria* co-inoculation on the quality of Sichuan pickle fermented by *Lactobacillus plantarum*[J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 121: 108975.
[41] 马艺荧. 东北酸菜发酵过程中细菌多样性及有机酸的变化规律 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2019. [MA Y Y. Variation of bacterial diversity and organic acids during fermentation of northeast sauerkraut[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2019.]
[42] 徐娟娣, 刘东红. 腌制蔬菜风味物质组成及其形成机理研究进展[J]. 食品工业科技, 2012, 33(11): 414−417. [XU J D, LIU D H. Research progress on flavor components and formation mechanism of pickled vegetables[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(11): 414−417.]
[43] 李晓. 低盐腌渍黄瓜质构与风味变化的研究 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2019. [LI X. Study on texture and flavor changes of low salt pickled cucumber [D]. Shandong Agricultural University, 2019.]
[44] WANG Y R, ZHOU H, DING S H, et al. Changes in free amino acids of fermented minced peppers during natural and inoculated fermentation process based on HPLC-MS/MS[J]. Journal of Food Science, 2020, 85(9): 2803−2811.
[45] ZHAO N, ZHSNG C, YANG Q, et al. Selection of taste markers related to lactic acid bacteria microflora metabolism for Chinese traditional paocai: A gas chromatography-mass spectrometry-based metabolomics approach[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(11): 2415−22.
[46] LUO Y L, LIU Y L, REN T, et al. Sichuan paocai fermented by mixed-starter culture of lactic acid bacteria[J]. Food Science and Nutrition, 2020, 8(10): 5402−5409.
[47] 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 community structure and its physicochemical factors in mustard tuber fermentation process[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(1): 27−34.]
[48] XU X X, WU B B, ZHAO W T, et al. Shifts in autochthonous microbial diversity and volatile metabolites during the fermentation of chili pepper (*Capsicum frutescens* L.)[J]. Food Chemistry, 2021, 335: 127512.
[49] XIAO Y S, HUANG T, HUANG C, et al. The microbial communities and flavour compounds of Jiangxi yancai, Sichuan paocai and Dongbei suancai: Three major types of traditional Chinese fermented vegetables[J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 121: 108865.
[50] 肖岚, 李娟, 孟金蕾. 腌制对大蒜挥发性风味物质以及生物活性物质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2021(14): 183−189. [Xiao L, Li J, MENG J L. Effects of pickling on volatile flavor compounds and bioactive compounds of garlic[J]. Food and Fermentation Industries, 2021(14): 183−189.]
[51] 刘大群, 张程程. 基于厌氧环境的低盐雪菜挥发性风味物质分析[J]. 食品工业科技, 2018, 39(22): 225−230,234. [LIU D Q, ZHANG C C. Analysis of volatile flavor compounds in low salt sauerkraut based on anaerobic environment[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(22): 225−230,234.]
[52] ZHENG J, ZANG F S, ZHOU C H, et al. Comparison of flavor compounds in fresh and pickled bamboo shoots by GC-MS and GC-olfactometry[J]. Japanese Society for Food Science and Technology, 2014, 20(1): 129−138.
[53] 陈艳, 蒋依琳, 唐玉娟, 等. 大叶芥菜发酵过程中挥发性成

分变化研究[J]. 食品科技，2019，44(11)：90−96. [CHEN Y, JIANG Y L, TANG Y J, et al. Study on the changes of volatile components in the fermentation process of *Brassica juncea*[J]. Food Science and Technology, 2019, 44(11): 90−96.]

[54] ZHAO D, DU R P, PING W X, et al. *Lactobacillus paracasei* HD1.7 used as a starter modulates the bacterial community and metabolome profile during fermentation of Chinese cabbage[J]. Letters in Applied Microbiology, 2018, 67(4): 411−419.

[55] MI J Y, HEE S, YUN K, et al. *Lactobacillus pentosus* SMB718 as a probiotic starter producing allyl mercaptan in garlic and onion-enriched fermentation[J]. Food and Function, 2020, 11(12): 10913−10924.

[56] ZHAO N, GE L H, HUANG Y L, et al. Impact of cold plasma processing on quality parameters of packaged fermented vegetable (radish paocai) in comparison with pasteurization processing: insight into safety and storage stability of products[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2020, 60: 102300.

[57] 刘文营，黄丽燕，卢晓明，等. 高密度二氧化碳技术在食品加工中的应用研究[J]. 食品工业科技，2011，32(12)：509−511,514. [LIU W Y, HUANG L Y, LU X M, et al. Research of the application of dense phase carbon dioxide in food processing [J]. Food Industry Science and Technology, 2011, 32(12): 509−511, 514.]

[58] WANG D, MA Y, SUN X, et al. Effect of dense phase carbon dioxide treatment on physicochemical and textural properties of pickled carrot[J]. CyTA-Journal of Food, 2019, 17(1): 988−996.

[59] GE L H, LAI H M, HUANG Y L, et al. Comparative evaluation of package types in alleviating textural softening and package-swelling of paocai during storage: Insight into microbial invasion, cell wall pectinolysis and alteration in sugar and organic acid profiles[J]. Food Chemistry, 2021, 365: 130489.

[60] ZHAO N, LAI H M, HE W, et al. Reduction of biogenic amine and nitrite production in low-salt paocai by controlled package during storage: A study comparing vacuum and aerobic package with conventional salt solution package[J]. Food Control, 2020, 123: 107858.

[61] HE J L, LI F Z, WANG Y, et al. Fermentation characteristics and bacterial dynamics during Chinese sauerkraut fermentation by *Lactobacillus curvatus* LC-20 under varied salt concentrations reveal its potential in low-salt Suancai production[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2021, 132(1): 33−40.

[62] SONG Q Z, ZHAO F K, WANG B B, et al. Metagenomic insights into Chinese northeast suancai: predominance and diversity of genes associated with nitrogen metabolism in traditional household suancai fermentation[J]. Food Research International, 2021, 139: 109924.

[63] DU R P, SONG G, ZHAO D, et al. *Lactobacillus casei* starter culture improves vitamin content, increases acidity and decreases nitrite concentration during sauerkraut fermentation[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2018, 53(8): 1925−1931.

[64] PRIYANKA V, RAMESHA A, GAYATHRI D, et al. Molecular characterization of non-biogenic amines producing *Lactobacillus plantarum* GP11 isolated from traditional pickles using HRESI-MS analysis[J]. Journal of Food Science and Technology, 2021, 58(6): 2216−2226.

[65] SUNGMIN J, CHAERIN W, IRORITA F J, et al. Bacteriocinogenic potential of Bacillus amyloliquefaciens isolated from kimchi, a traditional Korean fermented cabbage[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2021: 1−18.

[66] JOANA B, HELENA A, BEATRIZ S, et al. Characterization of a *Lactiplantibacillus plantarum* R23 isolated from arugula by whole-genome sequencing and its bacteriocin production ability[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2021, 18(11): 5515.

[67] LÜ X Y, CUI T Q, DU H, et al. *Lactobacillus plantarum* CY 1-1: A novel quorum quenching bacteria and anti-biofilm agent against aeromonas sobria[J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 137: 110439.

贺殷媛, 崔毓萱, 陈凤莲, 等. 大米面包品质改良的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 484−492. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080201

HE Yinyuan, CUI Yuxuan, CHEN Fenglian, et al. Research Progress on Quality Improvement of Rice Bread[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 484−492. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080201

· 专题综述 ·

大米面包品质改良的研究进展

贺殷媛, 崔毓萱, 陈凤莲*, 李欣洋, 窦新棣, 安　然, 张　娜*

（哈尔滨商业大学食品工程学院, 黑龙江哈尔滨 150076）

摘　要: 米粉成分中缺乏面筋蛋白，会使大米面包在制作过程中存在面团难以形成有效的网络结构、不易成型、品质差（持水性、持气性、弹性和内聚性）、老化速率快等缺点，从而影响面包的质构特性以及感官品质等。本文综述了国内外研究人员对大米面包品质改良的研究进展，通过添加外源性物质如乳化剂、蛋白质、酶、亲水胶体、盐类等和运用改良技术，如酸面团发酵技术、发芽技术、挤压膨化等技术，来改善大米面包的综合品质，对大米面包的开发研究具有重要的参考价值。

关键词: 大米面包, 品质改良, 外源性物质, 技术

中图分类号: TS213.3　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2022)14−0484−09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080201

本文网刊:

Research Progress on Quality Improvement of Rice Bread

HE Yinyuan, CUI Yuxuan, CHEN Fenglian*, LI Xinyang, DOU Xinlai, AN Ran, ZHANG Na*

（College of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China）

Abstract: Due to the lack of gluten protein in the components of rice flour, there are some disadvantages in the production process of rice bread, such as difficult in forming an effective network structure, difficult to form, poor in quality (water holding capacity, gas holding capacity, elasticity and cohesion), and fast in aging rate, which will affect the texture characteristics and sensory quality of bread. This article summarizes the research progress of rice bread quality improvement by researchers at home and abroad, by adding exogenous substances such as emulsifier, protein, enzyme, hydrocolloid, salt, etc., and using improved techniques such as sourdough fermentation technology, germination technology, extrusion and other technologies to improve the comprehensive quality of rice bread, which has important reference value for the development and research of rice bread.

Key words: rice bread; quality improvement; exogenous substances; technology

大米是我国主要粮食之一, 且产量在世界居于首位。大米中含有丰富的碳水化合物、蛋白质以及 B 族维生素等, 大米蛋白的生物价、氨基酸构成比例、蛋白质的消化率以及蛋白质净利用率都比小麦、大麦、玉米等禾谷类作物高, 具有较高的营养价值。此外, 大米还具有低致敏性、易于吸收、独特米香味等特点, 因此以大米为原料制作出的食品受到人们的广泛欢迎。

大米中的面筋不足, 导致大米面团形成的空间网络结构以及面团的加工适应性能较差, 容易导致大米面包出现老化、感官品质以及质构特性较差等现象[1−3]。因此, 研究并改进米面包的品质是十分必要的。近年来, 国内外研究人员对大米面包的工艺和品质改良进行了日臻深入的研究[4−8]。大米面包的开发, 不仅提高了大米资源的利用率、大米的附加值, 还弥补了小麦面包营养成分不均衡、易产生乳糜泻过敏症状的缺点, 满足了人们的饮食需求和对食品营养价值的要求[9−10]。本文主要综述了影响大米面包品质的因素和国内外大米面包品质改良的方法, 对大米面包的开发研究具有重要的参考价值。

收稿日期: 2021−08−19

基金项目: 黑龙江省科技重大专项（2020ZX08B02）; 国家自然科学基金项目（32072258）; 中央支持地方优秀青年项目。

作者简介: 贺殷媛（1981−）, 女, 讲师, 研究方向: 食品科学, E-mail: heyinyuan717@163.com。

*** 通信作者:** 陈凤莲（1975−）, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 谷物精深加工及其品质控制, E-mail: finesxm@163.com。

张娜（1979−）, 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品安全与食品化学, E-mail: foodzhangna@163.com。

1　大米面包品质形成及其影响因素

1.1　大米面包品质形成

大米面包通常含义包括两种，分别指不含面粉的原料制成的大米面包以及在面粉中添加米粉制成的大米面包[11]。目前在小麦面粉中添加米粉制作的大米面包较为常见，以米粉和小麦粉为原料制作米面包，不仅解决了大米加工副产品（碎米）的增值利用或谷物不足的问题，还使得面包中的各种氨基酸配比更加合理、蛋白质质量提高。

大米蛋白属于非麸质蛋白，用不含麸质的米粉原料制作大米面包可以减少易由麸质引起的过敏患病人群对含麸质食品的摄入量。最常见的由麸质引起的疾病是乳糜泻，乳糜泻是一种自身免疫病，是由基因易感人群摄入麸质蛋白所引起的；终生食用无麸质食品是解决该疾病的唯一最有效的办法[12]。但由于无麸质大米面包缺乏面筋蛋白，在面包的制作过程中，制成的面团不易形成有序的网络结构，面团的黏度、弹性、内聚性、延展性、保水性和吸水率等物性特征存在缺陷，导致面包的体积、硬度、口感、咀嚼性、组织结构以及感官特性受到影响。

1.2　影响大米面包品质的因素

影响大米面包品质的因素主要有原料性质（如大米种类、直链淀粉含量、大米粉的溶解性、米粉的粒径等）和加工技术等。国内吴娜娜等[13]将直链淀粉含量不同的五种糙米磨粉后与谷朊粉制成米面包，研究表明随着直链淀粉含量的升高，米面包的耐咀嚼性、比容增大，面包芯硬度、粘性、内聚性以及回复性减小，综合指标显示直链淀粉含量大于 19% 的糙米制作的米面包品质较好。路飞等[14]研究了 7 种大米粉（软米、香糯 1 号、辽河五、千米糯、辽粳 294、371、稻花香）的特性对大米面包感官及质构特性的影响，试验中通过建立大米直链淀粉含量、溶解度和膨胀度与比容、硬度、弹性、咀嚼性和感官评分的回归分析模型，为大米面包的品质的预测提供了依据。Yano 等[15]研究了直链淀粉含量对米面包烘焙品质的影响，研究表明用粗粉（粒度为 132~200 μm）制得的米面包随直链淀粉含量的增大而增大，但当直链淀粉含量小于 7% 时，面包中心部位容易出现塌陷。Hera 等[16]研究了面团水化程度和米粉粒度分布对无麸质大米面包品质及比体积显著增加；提高面团的含水率，面包的比体积也稳定增加。在综合考虑到面包体积以及粉粒结构的情况下，粗粉制得的面团的水化程度为 90%~110% 时制成的无麸质米面包品质最佳。在制作米面包时，不仅要考虑到原料颗粒的大小、面团的水合作用程度以及直链淀粉含量对面包的焙烤品质的影响，同时大米中直链淀粉的长度对大米面包结构的影响也不容忽视，选择高直链淀粉的大米粉原料对制作高品质的米面包很重要。

制粉方法按研磨时的加水量分为干法、半干法以及湿法粉碎，按研磨方式则可分为锤磨、低温磨以及球磨粉碎等，采用不同的制粉方法会对米粉粒径、破损淀粉含量、淀粉颗粒状态等有显著影响，从而会对大米面包的品质产生影响[17]。因此，选择合适的制粉方法对生产大米面包至关重要。Luo 等[18]研究了低温冲击磨制备的糙米粉对无麸质米面包品质的影响，在制备的米粉平均粒径相近的情况下，低温冲击磨制备的米粉损伤淀粉含量比传统的干磨制备的米粉损伤淀粉含量少，较低的损伤淀粉含量有助于改善米面包的品质。王娜等[19]通过对微粉粒径、微粉破损淀粉含量、面团电镜扫描结构、面团动态流变特性、面包比容以及质构进行比较得出，湿法粉碎获得的糙米粉破损淀粉含量较少，干法粉碎获得的米粉制成的面团结构致密，弹性升高，黏性增大，面包比容和弹性减小，硬度和咀嚼性增强。Wu 等[20]研究了湿磨法、旋流碾磨法和超细碾磨法等三种方法对制得的米粉性质和无麸质米面包品质的影响，得出碾磨方式对米粉的破损淀粉含量、淀粉颗粒状态、糊化温度和吸收焓有显著影响，与超细碾磨法和旋风碾磨法相比，湿磨法制备的淀粉颗粒完整性高，损伤淀粉含量低。如图 1，淀粉损伤含量的降低会使大米面包获得较高的比体积、更强的网络结构、相对柔软的面包质地和均匀多孔的细胞结构[21]。由以上研究结果得出，经过不同的制粉方法获得的米粉中损伤淀粉的含量以及米粉颗粒的大小对大米面包的比体积、硬度、等有着显著影响，具有较低的损伤淀粉和较高的完整淀粉颗粒的米粉更适合制作米面包。

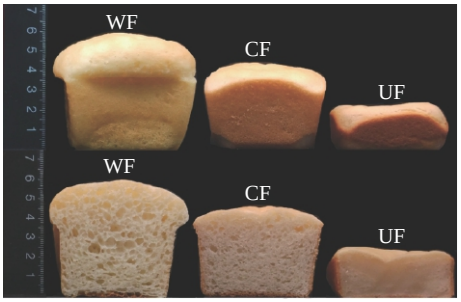


图 1　不同碾磨方法制得的大米面包的整体和横截面图[20]

Fig.1　Whole and cross-sectional views of rice bread made by different milling methods[20]

注：湿磨面粉（wet-milled flour, WF）；旋风磨面粉（cyclone-milled flour, CF）；超细面粉（ultrafine-milled flour, UF）。

大米面包的制作加工技术也会对最终产品产生影响，研究发现醒发时间对大米面包的品质具有显著影响。与醒发 1 h 面包相比，醒发 1.5 h 的面包，比容反而降低，成品高度也有一些降低。面包成品剖面图如图 2 所示。

2　大米面包的品质改良

近年来，国内外对大米面包的品质改良有较多的研究，通过添加一些外源物质如乳化剂、蛋白质、酶、亲水胶体以及盐类等，也有通过运用如酸面团发酵技术、发芽技术、冷冻处理、挤压膨化以及预糊化处理等改良技术改善面包的品质。

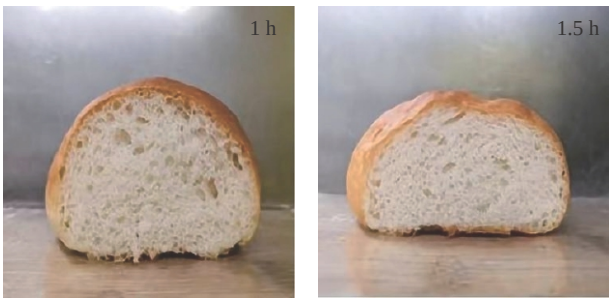


图 2 不同醒发时间的面包剖面图

Fig.2 Bread profiles with different proofing time

2.1 添加外源性物质

2.1.1 乳化剂 在烘焙食品中乳化剂是一种比较常见的添加剂，乳化剂具有改善面团内部组织结构、提高面团柔软性和延展性、增大面团体积、延缓面团老化的作用，并且还能使原辅料混合均匀，形成均质的面团。乳化剂在面包生产中的作用主要取决于乳化剂与面包各成分（油脂、蛋白质、淀粉）之间的相互作用，从而对面包的品质产生影响，如表 1 所示。常用于面包品质改良的乳化剂有硬脂酰乳酸钠（sodium stearyl lactate, SSL）、硬脂酰乳酸钙（calcium stearoyl lactylate, CSL）、单甘油酯二乙酰酒石酸酯（di-acetyl tartaric ester of monoglycerides, DATEM）、蔗糖脂肪酸酯（sucrose ester, SE）、单硬脂酸甘油酯（glycerin monostearate, GM）等。乳化剂 SSL 和 DATEM 具有两亲性和迁移到界面的能力，因此，可以降低表面张力并产生稳定的分散体系[22]，提高面团的稳定性。Nunes 等[23] 研究了卵磷脂（lecithin, LC）、DATEM、蒸馏单甘酯（distilled monoglyceride, DM）及 SSL 添加量在最佳水平下对面糊流变性能及其淀粉老化的影响以及添加低、中、高三个水平剂量的乳化剂对无麸质面包（米粉、马铃薯淀粉）的影响；结果表明，LC 和 DATEM 的添加对面包气孔大小和分布有显著影响，SSL 和 DM 的添加则无显著差异（如图 3）。LC 在较低添加量条件下表现出更细的碎屑结构；DATEM 在高剂量条件下，面包内部的气孔尺寸较小，得到更均匀的面包碎屑。贾洪信等[9] 研究了添加不同量的 GM 对米面包的质构特性以及感官的影响，表明添加一定量的 GM 可以明显改善米面包的感官品质，提高其弹性，降低米面包的硬度、回复性以及黏聚性，同时还能延缓米面包在贮藏过程中质构特性的变化，从而达到提高其贮藏品质的目的，当添加 0.5% 的 GM 时，米面包的综合品质最佳，并且具有很好的抗老化效果。张中义等[24] 研究了乳化剂的种类以及添加量对无麸质面包比容、硬度、色泽及感官品质的影响，结果表明添加乳化剂 SSL、SE、LC、DM 可增加面团持水性，降低面包硬度，增大面包比容，结构松软，气孔均匀，色泽改善，感官品质提高。

通过流变学、烘焙和感官评定发现，乳化剂的添加能够显著提高米面包的硬度、比体积以及感官评分等。在米面包的制作中，可以通过调整乳化剂的种类和添加量来改善大米面包品质低、易老化等问题，以期获得满足消费者要求的高质量面包。另外，为使米面包获得理想的流变性能和可接受的质量，推荐乳化剂与亲水胶体配合使用以获得品质更佳的面包[25]。

2.1.2 蛋白质 在大米面包中添加蛋白质能够强化面筋的网络结构，提高米面包的营养价值，目前常添加的蛋白质有大豆蛋白、卵蛋白、酪蛋白以及乳清蛋白等。张中义等[32] 研究了乳清蛋白对无麸质米面包品质的改善作用，在面团发酵过程中提高乳清蛋白的添加量有利于面团气孔的生成，增加无麸质面包中小气孔及微小气孔的数量，提高面包气孔均匀性，组织状态、色泽等感官品质显著提高。李丹等[10] 在优化大米面包复合改良剂配方中得出乳清蛋白添加量为 5%~15% 适宜。Sahagún 等[33] 研究了大米蛋白、豌

表 1 乳化剂与面包成分的作用机理及对面包品质的影响

Table 1 Mechanism of action between emulsifier and bread ingredients and its influence on bread quality

面包成分	作用机理	对面团的影响	对面包的影响	参考文献
油脂	乳化剂具有双亲性，可在不相溶的两个相界面间迁移，显著降低界面的表面张力，促进油脂均匀混合	增大面团的持气性能，强化面筋的网络结构，面团组织均匀	增大面包的体积，提高面包的柔软度，面包口感细腻	[26−28]
蛋白质	与面筋蛋白结合形成细密牢固的、相互连接的大分子面筋网络结构	提高面团的弹性和韧性，提高面团的流变特性	增大面包的体积、柔软度，防止面包出现塌陷	[27,29−30]
淀粉	与淀粉结合形成不溶性复合物，抑制淀粉重结晶和回生	增强面团的强度	延缓面包老化，增大面包的比容，增大面包芯柔软度	[10,31]

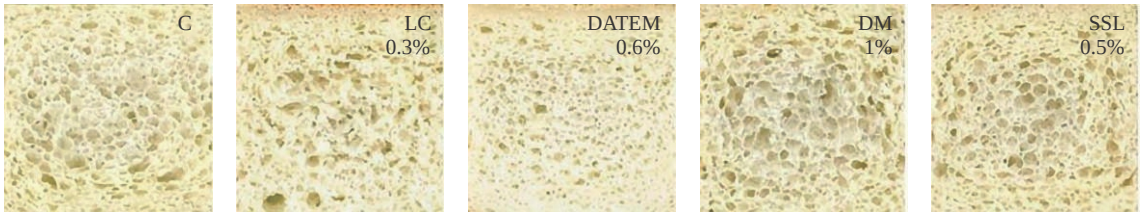


图 3 不同乳化剂在最佳添加量下面包切片图[23]

Fig.3 Slice diagram of bread with different emulsifiers at the optimal addition amount[23]

注：C 为不添加乳化剂；LC 添加量为 0.3%；DATEM 添加量为 0.6%；DM 添加量为 1%；SSL 添加量为 0.5%。

豆蛋白、蛋清蛋白和乳清蛋白等 4 种蛋白质对面团和无麸质面包的影响，通过分析面团流变性和面包的特性（颜色、质地和失重）得出含乳清蛋白的面团水化程度较低，添加蛋白质会使面包表皮的颜色加深，其中含有乳清蛋白的面包皮颜色最深，含动物蛋白的面包硬度较高，尤其是含有乳清蛋白的面包体积最大。李云玲等[34] 研究表明，随着葵花粕分离蛋白的添加量增加，米面包的高径比、体积、感官评分呈先增加后下减少的趋势，在面包中添加葵花粕分离蛋白不仅提高了米面包的营养价值，还改善了米面包的品质。

大豆蛋白（soybean protein isolate, SPI）能够与其他蛋白质作用形成三维网络结构（如图 4），从而起到提高面包品质的作用。Crockett 等[35] 研究表明，在米面包中加入大豆分离蛋白和蛋清蛋白能够明显改善面团的流变性以及面包的品质，并且发现添加大豆分离蛋白和蛋清蛋白能够通过抑制羟丙基甲基纤维素（hydroxypropyl methylcellulose, HPMC）的功能、减少有效水分、减弱 HPMC 与淀粉基质的相互作用和降低泡沫稳定性来降低面团的稳定性，当蛋清蛋白添加量为 15% 时，蛋白固体成为面团中主要的蛋白质支架，提高了大米面包体积。Storck 等[36] 以富含蛋白质的米粉为原料制成米面包，谷氨酰胺转胺酶（transglutaminase, TG）（1.35 U/g 蛋白质）、白蛋白（0.67 g/100 g）和酪蛋白（0.67 g/100 g）组合可获得比体积更大的富蛋白无麸质烘焙食品。

2.1.3　酶　在大米面包的制作中加入酶具有改善面团的流变特性和网络结构，改善面包质构特性的作用。主要的酶制剂有 TG、α-淀粉酶、脂肪酶等。Moore 等[38] 和 Shin 等[39] 的研究表明，TG 的添加可以与蛋白质交联形成稳定的网络结构，网络结构的建立对增大面包的体积、改善面包的外观、面包屑特性和综合品质有显著影响。国外研究学者[40−41] 以无麸质谷物为原料制作米面包，经研究发现微生物 TG 对面包的烘焙性能、整体外观、体积、面包屑硬度和咀嚼性等由明显改善作用。余树玺等在制作米面包的工艺中通过添加 TG 可改善面包在加工过程中的面团的流变特性，面包的综合品质提高[42]。由此可见，TG 的添加在米面包制作中可以改善产品品质。路飞、孟燕楠等[43−44] 研究了 α-淀粉酶、脂肪酶、TG、漆酶 4 种酶制剂对由未糊化处理和预糊化处理的米粉制作的大米面包的感官特性及质构特性的影响，结果表明，4 种酶制剂对两种面包的品质有明显的改善作用，面包的纹理比较疏松、体积和弹性较大、口感以及内部结构等较好。其中，添加漆酶的预糊化处理的面包和添加 TG 的未糊化处理的面包弹性比添加其他酶制剂高，添加 TG、漆酶的糊化处理的面包和添加 α-淀粉酶的未糊化处理的米面包的感官评分比其他酶制剂高。通过 TG 或 TG 与其他酶制剂在米面包中的共同作用，能够提高面包的咀嚼性，增大面包的体积，改善面包的纹理结构以及面包的工艺特性。

此外，葡萄糖氧化酶、蛋白酶等也能很好地改善米面包的品质。葡萄糖氧化酶通过氧化面筋蛋白质中的巯基（-SH）形成二硫键，增强面团的网络结构，提高面包品质[45−46]。蛋白酶能够切断面筋蛋白质中氨基酸之间的肽键，将面筋蛋白质分解为多肽和氨基酸，使面团筋力降低、面团软化、面团的延伸性能以及机械加工性能得到改善[47]。Gujral 等[48] 研究表明添加葡萄糖氧化酶可以增加面团的弹性模量和粘性模量，获得比体积和质地较好的米面包。Hamada 等[49]、Renzetti 等[50] 通过试验得出，经蛋白酶处理的米粉制成的面团粘度增加，面团在烘烤过程中的弹性和稳定性提高，米面包的比体积增大，面包屑硬度降低。Morita 等[51] 研究表明添加了植酸酶、半纤维素和 SE 处理的预发芽糙米的面团性能更佳，大米面包的品质较好。在研究单一酶对面包品质改良作用机理的基础上，进一步研究多种酶对面包品质改良的复合作用，从而获得品质更佳的大米面包。

2.1.4　亲水胶体　亲水性胶体具有强化面团的面筋

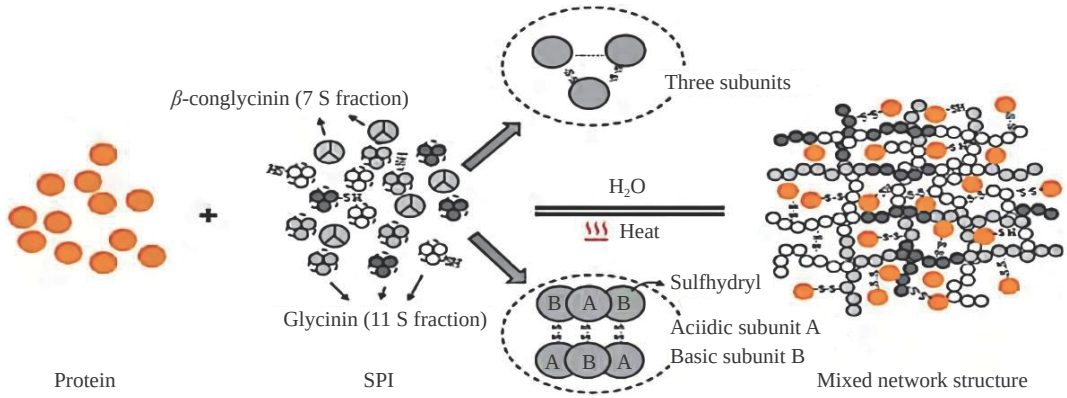


图 4　大豆蛋白与其他蛋白结合对面包品质调控的机理图[37]

Fig.4　Mechanism diagram of the combination of soy protein and other proteins on the regulation of bread quality[37]

注：β-conglycinin（β-伴大豆球蛋白）；Glycinin（大豆球蛋白）；Three subunits（三个子单元）；Sulfhydryl（巯基）；Acidic subunit A（酸性亚单位 A）；Basic subunit B（碱性亚单位 B）；Mixed network structure（混合网络结构）；Heat（加热）；H_2O（水）。

结构，改善面包体积、弹性、组织结构，延缓面包老化以及延长面包货架期的作用[26]。在大米面包中添加亲水胶体可以促进三维空间网络结构的形成，在无麸质面包中添加多糖胶体可以增加面团的粘弹性以及聚集性，以达到提高面包品质的目的，同时在面包中添加亲水胶体还具有提高面包色泽以及延长面包货架期的作用。

大米面包中常使用的亲水胶体包括 HPMC、羧甲基纤维素（carboxymethyl cellulose，CMC）、β-葡聚糖、果胶、黄原胶、瓜尔豆胶、刺槐豆胶、菊粉、卡拉胶和琼脂等。路飞等[52] 研究了羧甲基纤维素钠、海藻酸钠、黄原胶和卡拉胶 4 种添加剂对经预糊化处理的米粉制得的大米面包的感官特性及质构特性的影响，发现加入 4 种添加剂后能增大面包的体积，降低面包硬度，明显改善大米面包的感官品质。张中义等[53] 发现添加 1% 的羧甲基纤维素、果胶、刺槐豆胶、瓜尔多胶、羟丙基甲基纤维素可使无麸质面包的品质改善，比容增大，结构松软，气孔均匀性增大，硬度降低，色泽改善，感官品质提高。郭园等[54] 研究表明，加入 HPMC 和 CMC 后，面包的比容、颜色、硬度和弹性均有改善，失水率略有减小。曹磊等[55] 研究发现，未添加 HPMC 的发芽糙米粉面包的比容小，结构紧密，硬度大，弹性较差；当添加 HPMC 后可改善面包的品质，米面包的比容增大，结构变的松软，硬度降低，弹性增大，感官综合品质提高；当 HPMC 的添加量为 2% 时，面包的比容显著性提高，硬度降低，面包的弹性和内聚性增加，提高了面包的整体接受度，使面包的感官特性有很大改善。综上所述，添加不同的亲水胶体和添加量对面包的品质会表现出不同的影响，因此，在对面包进行品质改良时，应选择合适的亲水胶体以及添加量，从而获得所需要的面包品质。

2.1.5 盐类 在制作米面包时，可以通过添加钠盐、钙盐以及铁盐等来改善面包的质构特性和营养品质。Kiskini 等[56] 研究发现，含有焦磷酸铁和乙二胺四乙酸钠铁的面包的内部结构紧实度更高。Krupa-kozak 等[57] 研究表明，柠檬酸钙具有显著提高面包比体积的作用，添加高剂量柠檬酸钙的面包具有显著的钙富集，与对照组相比，钙强化面包屑更软，更有弹性，面包的适口性更好，从而获得具有良好烘焙性能的产品。Kiskini 等[58] 研究表明，铁对面包品质的影响主要取决于铁的种类，而与铁的溶解度无关。在无麸质面包中，未强化和强化样品之间相比，铁的强化使得样品粘性更强，易碎性更低，颜色与质地之间的相关系数较高，强化样品的感官评分更好。Blanco 等[59] 以米粉为原料制作面包，研究了对几种酸性食品添加剂（醋酸、乳酸、柠檬酸和磷酸一钠）对面包的外观、气味、味道和质构的影响，发现磷酸一钠可以使面包获得更好的质地与较大的体积。王坤等[60−61] 研究了磷酸二氢钠、谷氨酸和乳酸对未糊化的大米面包和经糊化处理的大米面包品质的影响，结果表明添加磷酸二氢钠对米面包的品质有一定的改善效果。

2.1.6 抗性淀粉 根据抗性淀粉（resistant starch，RS）的来源和抗酶解性可将其分为物理包埋淀粉、抗性淀粉颗粒、回生淀粉、化学改性淀粉、直链淀粉-脂肪复合淀粉[62]。抗性淀粉通常被认为是一种益生元，是不被小肠消化吸收的淀粉，在焙烤食品中[63]，抗性淀粉不仅是膳食纤维的强化剂，也是一种很好的结构改良剂。Gounaropoulos 等[64] 研究表明，抗性淀粉的加入对米面包的硬度没有影响，但可以增加面包的弹性、提高面包的孔隙度。在制作面包时，通过合理的选择和添加抗性淀粉不仅能够提高膳食纤维的含量、改善面包风味，还能够提高面包的含水量、口感以及外观品质[65−66]。

2.2 米面包的品质改良技术

2.2.1 酸面团发酵技术 酸面团是将小麦或黑麦粉等谷物粉和水混合均匀后经环境或谷物粉中具有酸化和发酵能力的乳酸菌和酵母发酵后所得到一种面团，还可用于大米、玉米和小米等谷物以及木薯、藜麦和荞麦等的发酵[67]。酸面团中的乳酸菌合成的胞外多糖、发酵产生的有机酸、抗菌物质和芳香物质可以显著改善面团得流变学特性、焙烤产品的质构特性和品质，延长产品的货架期[68]。Novotni 等[69] 以米粉、玉米淀粉等无麸质原料制作酸面团和面包，经研究发现添加酸面团可以增大面包的比体积和降低面包屑硬度，酸面团与部分烘烤冷冻技术的联合应用可降低无麸质面包的血糖指数，提高无麸质面包的品质和货架期。Rühmkorf 等[70] 研究表明，添加乳酸菌能够增加面包的比体积，降低面包的硬度，并且增加面包的水分含量。酸面团发酵技术是一种传统的生产工艺，可通过与现代生产技术相结合，改善面团的的流变特性和焙烤品质，生产出具有更好品质和更加营养健康的大米面包。

2.2.2 发芽技术 大米经发芽处理后，由于多种酶系的作用会使米制品的品质得到很大的改善。吴娜娜等[71] 将未发芽和发芽不同时间的糙米磨粉后分别与定量的谷朊粉混合制成面团和面包，通过测定面团动态流变特性以及微观结构表明，随着糙米发芽时间的增长，面团的弹性和粘性模量逐渐减少，面团的结构逐渐变得松弛，蛋白质的网络结构逐渐增多，发芽 12 h 的糙米粉制成的面包硬度较小，综合感官评分最高，面包的品质最好。李次力等[72] 以发芽糙米为原料研制米面包，发芽糙米与不添加发芽糙米生产的面包相比，体积和纹理结构差异性不大，但米面包风味、营养价值均高于不添加发芽糙米生产的面包。余树玺等[42] 通过单因素实验和正交试验，以感官评价和测定比容相结合的方法对产品的品质进行综合评分，得到了米面包的最佳配方：TG 的质量分数为 0.15%，谷朊粉的质量分数为 12%，发芽糙米粉的质量分数为 22%，水的质量分数为 55%。Cornejo 等研

究了不同萌发时间下米面包的近似物组成、植酸、淀粉、葡萄糖的体外蛋白质消化率和体外酶解淀粉含量以及最相关的生物活性物质和抗氧化活性，发现糙米发芽 48 h 后所制的面包具有较高的营养价值[73]，发芽 24 h 后面包的质地和颜色得到明显的改善[74]（如图 5 所示），面包质地的改善主要与糙米发芽后淀粉酶的活性提高、淀粉降解有关，面包的颜色改善与美拉德反应有关；但当糙米萌发过度时，制得的面包品质会变差。虽然发芽大米经发芽处理后制得的面包品质有很大改善，但在制作面包时要注意大米发芽的时间以及发芽米粉的添加量，否则可能会起到适得其反的效果。

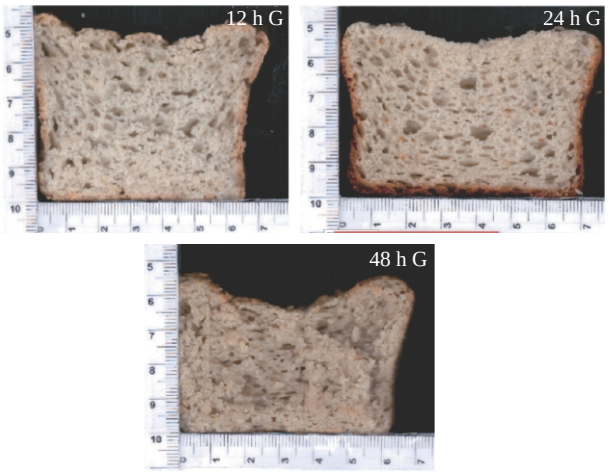


图 5　糙米不同时间发芽制得的面包片横截面图[74]

Fig.5　Cross-sections of bread slices made at different time germination of brown rice[74]

2.2.3　挤压膨化技术　挤压膨化技术属于预糊化技术的一种，经挤压膨化处理后物料中的淀粉、蛋白质、脂肪等会发生变化，使其黏度、水分迁移、溶解性以及糊化特性等物理性质会发生改变，面团的剪切速率、弹性等增大，面包的体积、持水性、持气性增加，硬度降低[1,75−76]。Martínez 等[77] 研究表明，添加挤压米粉增加了面包体积，降低了面包的硬度和硬化速度。Airoldi 等[78] 研究表明，以膨化米粉为原料制作米面包可改善面包的色泽和质地特性。因此，通过挤压膨化技术改变大米的物理性质，从而改善大米面团的流变特性，以期获得感官品质和质构特性具佳的大米面包。

2.2.4　其他改良技术　除酸面团发酵技术、发芽技术以及挤压膨化技术外，还可通过预糊化处理、冷冻面团、微波处理、真空烘烤等来改善大米面包的品质。路飞等[79] 以大米粉和小麦粉为主要原料，结合大米粉预糊化处理技术，采用快速发酵法制作大米面包，结果表明预糊化米粉与小麦粉的比例对米面包的感官评分影响最大，与全麦面包和普通米粉面包相比，使用预糊化处理后的大米粉制作的大米面包的感官评分和硬度指标都较好，口感柔软，具有大米的香气。Ronda 等[80] 研究表明，采用微波加热的方式可以使米粉中的 β-葡萄糖酶的活性丧失，从而使面包中含有更多的 β-葡萄糖，使面包具有更高的营养价值。Mezaize 等[81] 以米粉、玉米粉、荞麦粉和马铃薯淀粉为原料研究了冷冻对面团流变特性和面包品质的影响；实验结果显示，冷冻步骤对无麸质面包有负面影响，面包密度大、面包屑变硬，但面包皮颜色有所改善。

3　结语

以大米为原料制作大米面包，不仅提高了大米的利用率，还提供了一种营养价值丰富、满足过敏人群需求的食品。通过采用添加外源性物质和改良技术的方法来控制面团的质构特性、发酵过程以及烘焙特性以达到改善大米面包的品质、丰富大米面包的种类，获得满足人们要求的烘焙制品。虽然已有很多用于改善米面包品质的研究方法，但了解外源性物质对米面包的品质改良作用机理、利用新技术改良大米面包品质仍面临着诸多挑战。随着科技的进步，运用国内外的研究成果对大米面包进行更深入的研究，为大米面包的品质改良提供了理论依据。同时，在保证大米面包品质良好的基础上，通过添加不同的风味成分，能够使米面包的风味更加多样化，满足更多人的需求，具有较高的社会效益和经济效益。

参考文献

[1] 徐梦雨，武涌，袁娟丽，等. 无麸质面包加工技术改良新进展[J]. 食品工业科技，2020，41(16)：340−345. [XU M Y, WU Y, YUAN J L, et al. New progress in the improvement of gluten-free bread processing technology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(16): 340−345.]

[2] 高雨晴. 不同加工处理方法对大米面团及面包品质的影响研究 [D]. 沈阳：沈阳师范大学，2020. [GAO Y Q. Effects of different processing methods on rice dough ang bread quality[D]. Shenyang: Shenyang Normal University, 2020.]

[3] KIM E A, LEE S Y, LEE S Y. Quality characteristics of steamed rice bread prepared with different contents of proteolytic enzyme[J]. Applied Biological Chemistry, 2016, 59(1): 95−102.

[4] 柳富杰，周永升，韦巧艳，等. 米粉面包工艺优化及其品质[J]. 食品工业，2021，42(5)：119−123. [LIU F J, ZHOU Y S, WEI Q Y, et al. Technology optimization and quality of rice flour bread[J]. Food Industry, 2021, 42(5): 119−123.]

[5] 阮雁春，陈礼福，赵佳佳. 碎米粉面包生产工艺的研究[J]. 粮食与油脂，2020，33(8)：27−30. [RUAN Y C, CHEN L F, ZHAO J J. Study on production process of broken rice bread[J]. Journal of Cereals and Oils, 2020, 33(8): 27−30.]

[6] 张峻铭，聂世利，李金源，等. 添加大米粉对面包面团揉混特性和拉伸特性的影响[J]. 农产品加工，2020(4)：22−25. [ZGANG J M, NIE S L, LI J Y, et al. Effects of addition of rice flour on kneading and stretching properties of bread dough[J]. Farm Products Processing, 2020(4): 22−25.]

[7] KIM M, YUN Y, JEONG Y. Effects of corn, potato, and tapioca starches on the quality of gluten-free rice bread[J]. Food Science and Biotechnology, 2015, 24(3): 913−919.

[8] MANCEBO C M, MERINO C, Martínez M M, et al. Mixture

design of rice flour, maize starch and wheat starch for optimization of gluten free bread quality[J]. Journal of Food Science and Technology, 2015, 52(10): 6323−6333.
[9] 贾洪信, 周喜华, 刘素纯. 单甘酯对米粉面包的感官品质及质构特性的影响[J]. 食品科技, 2020, 45(5): 157−162. [JIA H X, ZHOU X H, LIU S C. Effect of monoglycerid on the quality of rice flour bread[J]. Food Science and Technology, 2020, 45(5): 157−162.]
[10] 李丹, 王敏, 唐玲, 等. 响应面优化无麸质大米面包复合改良剂配方的研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(2): 130−137. [LI D, WANG M, TANG L, et al. Optimization of gluten free rice bread composite additives by response surface methodology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(2): 130−137.]
[11] 王立, 吴桐, 易翠平, 等. 无麸质大米面包研究进展[J]. 食品与机械, 2017, 33(3): 199−206. [WANG L, WU T, Yi C P, et al. Research progress of gluten free rice bread[J]. Food and Machinery, 2017, 33(3): 199−206.]
[12] 郑小锋, 杨佳欣, 周波, 等. 无麸质饮食的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(12): 3760−3767. [ZHENG X F, YANG J X, ZHOU B, et al. Research progress of gluten-free diet[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2020, 11(12): 3760−3767.]
[13] 吴娜娜, 李莎莎, 谭斌, 等. 糙米直链淀粉含量对其面包质构和体外消化性质的影响[J]. 中国粮油学报, 2018, 33(4): 33−37. [WU N N, LI S S, TAN B, et al. Effect of amylose content of brown rice on texture properties and *in vitro* digestibility of bread[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2018, 33(4): 33−37.]
[14] 路飞, 马涛, 任文涛, 等. 大米粉特性与大米面包感官及质构特性关系的研究[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(19): 25−28. [LU F, MA T, REN W T, et al. The relationship between characteristics of rice flour material and sensory and textural characteristics of rice bread[J]. Food Research and Development, 2014, 35(19): 25−28.]
[15] YANO H, KODA T, FUJITA N, et al. Effect of amylose content in rice flour on batter rheology and bread baking quality[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2020, 44(6): 1−6.
[16] De la HERA E, ROSELL C M, GOMEZ M. Effect of water content and flour particle size on gluten-free bread quality and digestibility[J]. Food Chemistry, 2014, 151: 526−531.
[17] 余以, 高德, 张萍. 加工工艺对淀粉分子结构及米制品品质影响研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(23): 295−302. [YU Y, GAO D, ZHANG P. Research progress on the effects of processing technology on starch molecular structure and rice product quality[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(23): 295−302.]
[18] LUO S, YAN X, FU Y, et al. The quality of gluten-free bread made of brown rice flour prepared by low temperature impact mill[J]. Food Chemistry, 2021, 348(348): 129032.
[19] 王娜, 吴娜娜, 谭斌, 等. 糙米干法和湿法微粉碎对面团及面包品质的影响[J]. 中国食品学报, 2020, 20(1): 166−171. [WANG N, WU N N, TAN B, et al. Effect of micro-grinding of brown rice flour by dry and wet methods on the quality of dough and bread[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(1): 166−171.]
[20] WU T, WANG L, LI Y, et al. Effect of milling methods on the properties of rice flour and gluten-free rice bread[J]. LWT-Food Science and Technology, 2019, 108: 137−144.
[21] QIN W Y, LIN Z X, WANG A X, et al. Influence of damaged starch on the properties of rice flour and quality attributes of gluten-free rice bread[J]. Journal of Cereal Science, 2021, 101: 103296.
[22] DEMIRKESEN I, MERT B, SUMNU G, et al. Utilization of chestnut flour in gluten-free bread formulations[J]. Journal of Food Engineering, 2010, 101(3): 329−336.
[23] NUNES M H B, MOORE M M, ARENDT E K, et al. Impact of emulsifiers on the quality and rheological properties of gluten-free breads and batters[J]. European Food Research and Technology, 2009, 228(4): 633−642.
[24] 张中义, 孟令艳, 史嘉良, 等. 乳化剂改善无麸质面包焙烤特性的研究[J]. 食品工业, 2011, 32(8): 36−38. [ZHANG Z Y, MENG Y L, SHI J L, et al. Improving of emulsifers on bread quality parameters in gluten-free formulations[J]. Food Industry, 2011, 32(8): 36−38.]
[25] DEMIRKESEN I, MERT B, SUMNU G, et al. Rheological properties of gluten-free bread formulations[J]. Journal of Food Engineering, 2009, 96(2): 295−303.
[26] 宁芊, 游佩琼, 吴先辉, 等. 复配亲水胶体对面团流变特性及全麦面包品质的影响[J]. 食品与机械, 2019, 35(9): 32−38. [NING Q, YOU P Q, WU X H, et al. Effect of compound hydrocolloid on the rheological properties of dough and the quality of whole-wheat bread[J]. Food and Machinery, 2019, 35(9): 32−38.]
[27] 韩天龙, 张秀玲, 邓建平, 等. 食品乳化剂的作用特性及其在面粉制品中作用研究[J]. 现代面粉工业, 2011, 25(6): 26−29. [HAN T L, ZHANG X L, DENG J P, et al. Study on the action characteristics of food emulsifier and its role in flour products[J]. Modern Flour Milling Industry, 2011, 25(6): 26−29.]
[28] 张文福. 食品乳化剂在面包生产中的应用[J]. 食品研究与开发, 2006(4): 185−187. [ZHANG W F. Application of food emulsifier in bread production[J]. Food Research and Development, 2006(4): 185−187.]
[29] 朱明霞, 白婷, 靳玉龙, 等. 杂粮面包的研究进展[J]. 现代食品, 2020(7): 7−12. [ZHU M X, BAI T, JIN Y L, et al. Research progress of bread with coarse cereal[J]. Modern Food, 2020(7): 7−12.]
[30] 杨雪飞, 袁蓓蕾, 罗水忠, 等. 品质改良剂对复合杂粮面包粉流变学特性的影响[J]. 食品科学, 2015, 36(11): 75−80. [YANG X F, YUAN B L, LUO Y H et al. Effects of composite improvers on rheological properties of coarse grain bread flour[J]. Food Science, 2015, 36(11): 75−80.]
[31] PATIL S, ARYA S S. Characterization of gluten free flatbread: Quality improvement by the addition of hydrocolloids and emulsifiers using simplex centroid design[J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2019, 13(1): 821−830.
[32] 张中义, 孟令艳, 晁文, 等. 牛乳蛋白对无麸质面包焙烤特性的改善作用[J]. 食品工业科技, 2012, 33(8): 176−178,182.

［ZHANG Z Y, MENG L Y, CHAO W, et al. Improvement of the quality parameters in gluten-free bread with adding dairy protein[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(8): 176−178, 182.］

［33］ SAHAGÚN M, GÓMEZ M. Assessing influence of protein source on characteristics of gluten-free breads optimising their hydration level[J]. Food and Bioprocess Technology, 2018, 11(9): 1686-1694.

［34］ 李云玲, 朱效兵, 雍雅萍, 等. 葵花粕分离蛋白黑米面包的研制[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(15): 100−104.［LI Y L, ZHU X B, YONG Y P, et al. Development of sunflower meal protein isolate black rice bread[J]. Food Research and Development, 2018, 39(15): 100−104.］

［35］ CROCKETT R, VODOVOTZ Y, IE P. Effects of soy protein isolate and egg white solids on the physicochemical properties of gluten-free bread[J]. Food Chemistry, 2011, 129(1): 84−91.

［36］ STORCK C R, ZAVAREZE E D, GULARTE M A, et al. Protein enrichment and its effects on gluten-free bread characteristics[J]. Lwt-Food Science and Technology, 2013, 53(1): 346−354.

［37］ 何林阳, 杨杨, 陈凤莲, 等. 无麸质面包品质改良研究进展[J]. 食品工业科技, 2021, 42(17): 439−447.［HE L Y, YANG Y, CHEN F L, et al. Recent progress in the gluten-free bread quality improvement[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(17): 439−447.］

［38］ MOORE M M, HEINBOCKEL M, DOCKERY P, et al. Network formation in gluten-free bread with application of transglutaminase[J]. Cereal Chemistry, 2006, 83(1): 28−36.

［39］ SHIN M, GANG D, SONG J. Effects of protein and transglutaminase on the preparation of gluten-free rice bread[J]. Food Science and Biotechnology, 2010, 19(4): 951−956.

［40］ RENZETTI S, BELLO F D, ARENDT E K. Microstructure, fundamental rheology and baking characteristics of batters and breads from different gluten-free flours treated with a microbial transglutaminase[J]. Journal of Cereal Science, 2007, 48(1): 33−45.

［41］ GUSMãO R P, MOURA H V, SILVA H A, et al. Production of prebiotic gluten-free bread with red rice flour and different microbial transglutaminase concentrations: Modeling, sensory and multivariate data analysis[J]. Journal of Food Science and Technology, 2019, 56(6): 2949−2958.

［42］ 余树玺, 何跃, 马良. 发芽糙米米面包的加工工艺研究[J]. 农产品加工 (学刊), 2012(2): 34−38.［YU S X, HE Y, MA L. Processing technology of germinated brown rice bread[J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2012(2): 34−38.］

［43］ 路飞, 孟燕楠, 李哲, 等. 不同酶制剂对预糊处理化大米面包品质的影响[J]. 食品工业, 2017, 38(5): 43−46.［LU F, MENG Y N, LI Z, et al. Effects of different enzymes on the quality of pregelatinized rice bread[J]. Food Industry, 2017, 38(5): 43−46.］

［44］ 孟燕楠, 路飞, 李哲, 等. 不同酶制剂对大米面包感官及质构特性的影响研究[J]. 农业科技与装备, 2016(6): 41−43,46.［MENG Y N, LU F, LI Z, et al. Study on the effects of different enzymes on the sensory and texture characteristics of rice bread[J]. Agricultural Science and Technology and Equipment, 2016(6): 41−43,46.］

［45］ STEFFOLANI M E, RIBOTTA P D, PÉREZ G T, et al. Effect of glucose oxidase, transglutaminase, and pentosanase on wheat proteins: Relationship with dough properties and bread-making quality[J]. Journal of Cereal Science, 2010, 51(3): 366−373.

［46］ NIU M, XIONG L C, ZHANG B J, et al. Comparative study on protein polymerization in whole-wheat dough modified by transglutaminase and glucose oxidase[J]. LWT-Food Science and Technology, 2018, 90: 323−330.

［47］ 王志煌, 郑春椋, 黄静娥, 等. 酶制剂在面包等烘焙产品中的应用[J]. 现代食品, 2020(20): 33−40.［WANG Z H, ZHENG C J, HUANG J E, et al. Application analysis and prospect of baking enzyme preparation[J]. Modern Food, 2020(20): 33−40.］

［48］ GUJRAL H S, ROSELL C M. Improvement of the breadmaking quality of rice flour by glucose oxidase[J]. Food Research International, 2003, 37(1): 75−81.

［49］ HAMADA S, SUZUKI K, AOKI N, et al. Improvements in the qualities of gluten-free bread after using a protease obtained from *Aspergillus oryzae*[J]. Journal of Cereal Science, 2013, 57(1): 91−97.

［50］ RENZETTI S, ARENDT E K. Effect of protease treatment on the baking quality of brown rice bread: From textural and rheological properties to biochemistry and microstructure[J]. Journal of Cereal Science, 2009, 50(1): 22−28.

［51］ MORITA N, MAEDA T, WATANABE M, et al. Pre-germinated brown rice substituted bread: Dough characteristics and bread structure[J]. International Journal of Food Properties, 2007, 10(4): 779−789.

［52］ 路飞, 王坤, 李哲, 单秀峰. 几种不同添加剂对预糊化大米面包品质的影响[J]. 食品工业, 2017, 38(1): 72−75.［LU F, WANG K, SHAN X F. Effects of several different additives on the quality of rice bread[J]. Food Industry, 2017, 38(1): 72−75.］

［53］ 张中义, 孟令艳, 史嘉良, 等. 水溶性胶体对无麸质面包焙烤特性的影响[J]. 食品工业科技, 2012, 33(1): 318−320.［ZHANG Z Y, MENG L Y, SHI J L, et al. Effect of hydrocolloids on bread quality parameters in gluten-free formulations[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(1): 318−320.］

［54］ 郭园, 张中义, 叶君. HPMC、CMC 对无麸质面包特性影响的研究[J]. 现代食品科技, 2011, 27(3): 303−305,309.［GUO Y, ZHANG Z Y, YE J. Effects of HPMC and CMC on the properties of gluten-free bread[J]. Modern Food Science and Technology, 2011, 27(3): 303−305,309.］

［55］ 曹磊, 夏青, 宋玉, 等. 发芽糙米和羟丙基甲基纤维素对面包品质的影响[J]. 食品工业科技, 2017, 38(14): 55−60,70.［CAO L, XIA Q, SONG Y, et al. Effect of germinated brown rice and hydroxypropyl methyl cellulose on the quality of bread[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(14): 55−60,70.］

［56］ KISKINI A, KAPSOKEFALOU M, YANNIOTIS S, et al. Effect of iron fortification on physical and sensory quality of gluten-free bread[J]. Food and Bioprocess Technology, 2012, 5(1): 385−390.

［57］ KRUPA-KOZAK U, TROSZYŃSKA A, BąCZEK N, et al. Effect of organic calcium supplements on the technological charac-

teristic and sensory properties of gluten-free bread[J]. European Food Research and Technology, 2011, 232(3): 497−508.

[58] KISKINI A, KAPSOKEFALOU M, YANNIOTIS S, et al. Effect of different iron compounds on wheat and gluten-free breads[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2010, 90(7): 1136−1145.

[59] BLANCO C A, RONDA F, PANDO V, et al. Improving gluten-free bread quality by enrichment with acidic food additives[J]. Food Chemistry, 2011, 127(3): 1204−1209.

[60] 王坤, 路飞, 孟燕楠, 等. 几种酸味剂对预糊化处理大米面包品质的影响[J]. 食品工业, 2016, 37(6): 146−149. [WANG K, LU F, MENG Y N. Effect of several acidic additives on the qualities of pre-gelatinized rice bread[J]. Food Industry, 2016, 37(6): 146−149.]

[61] 王坤, 路飞, 孟燕楠, 等. 几种酸味剂对大米面包感官特性及质构特性的影响[J]. 沈阳师范大学学报(自然科学版), 2015, 33(3): 365−368. [WANG K, LU F, MENG Y N, et al. Effect of several acidic additives on sensory and textural characteristics of bread[J]. Journal of Shenyang Normal University(Natural Science Edition), 2015, 33(3): 365−368.]

[62] 胡珍珍, 郝宗山, 孟妍, 等. 抗性淀粉的制备、功效及应用的研究进展[J]. 中国食物与营养, 2021, 27(1): 30−35. [HU Z Z, HAO Z S, MENG Y, et al. Preparation, efficacy and application of resistant starch[J]. Food and Nutrition in China, 2021, 27(1): 30−35.]

[63] 吴娜娜, 王娜, 谭斌, 等. 无麸质食品品质改良研究进展[J]. 粮油食品科技, 2015, 23(4): 24−28. [WU N N, WANG N, TAN B, et al. Research progress on qualities improvement of gluten-free foods[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2015, 23(4): 24−28.]

[64] GOUNAROPOULOS G, TSATSARAGKOU K, MANDALA I. Development of gluten free bread containing carob flour and resistant starch[J]. LWT-Food Science and Technology, 2014, 58: 124−129.

[65] 李辰, 李坚斌, 聂卉. 抗性淀粉及其在食品工业中的应用[J]. 中国粮油学报, 2017, 32(1): 141−146. [LI C, LI J B, NIE H. Resistant starch and its application in food industry[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2017, 32(1): 141−146.]

[66] 张志龙. 抗性淀粉在食品中的应用及功效研究进展[J]. 现代食品, 2017(14): 50−52. [ZHANG Z L. Advances in the application and efficacy of resistant starch in food[J]. Modern Food, 2017(14): 50−52.]

[67] VOGELMANN S A, SEITTER M, SINGER U, et al. Adaptability of lactic acid bacteria and yeasts to sourdoughs prepared from cereals, pseudocereals and cassava and use of competitive strains as starters[J]. International Journal Food Microbiol, 2009, 130(3): 205−212.

[68] 周春艳, 张华铮, 陈红兵, 等. 酸面团发酵技术应用研究进展[J]. 食品工业科技, 2014, 35(17): 375−380. [ZHOU C Y, ZHANG H Z, CHEN H B, et al. Progress in application of sourdough fermentation technology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(17): 375−380.]

[69] NOVOTNI D, ČUKELJ N, SMERDEL B, et al. Glycemic index and firming kinetics of partially baked frozen gluten-free bread with sourdough[J]. Journal of Cereal Science, 2012, 55(2): 120−125.

[70] RÜHMKORF C, RÜBSAM H, BECKER T, et al. Effect of structurally different microbial homoexopolysaccharides on the quality of gluten-free bread[J]. European Food Research and Technology, 2012, 235(1): 139−146.

[71] 吴娜娜, 王娜, 谭斌, 等. 发芽糙米粉面团性质及面包品质研究[J]. 粮油食品科技, 2018, 26(4): 1−5. [WU N N, WANG N, TAN B, et al. Study on properties of germinated brown rice flour dough and its bread quality[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2018, 26(4): 1−5.]

[72] 李次力, 王茜. 发芽糙米面包的研制[J]. 食品科学, 2009, 30(18): 436−439. [LI C L, WANG Q. Formulation of germinated brown rice bread[J]. Food Science, 2009, 30(18): 436−439.]

[73] CORNEJO F, CACERES P J, ROSELL C M, et al. Effects of germination on the nutritive value and bioactive compounds of brown rice breads[J]. Food Chemistry, 2015, 173: 298−304.

[74] CORNEJO F, ROSELL C M. Influence of germination time of brown rice in relation to flour and gluten free bread quality[J]. Journal of Food Science and Technology, 2015, 52(10): 6591−6598.

[75] 吉梦莹. 添加挤压膨化燕麦粉对小麦面团性质及面包品质的影响 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017. [JI M Y. Effect of adding extruded oat flours on wheat-oat-dough properties and bread qualities[D]. Yangling: Northwest Agricuture and Forest Science and Technology University, 2017.]

[76] DONG T T, ZHU M K, YU J W, et al. RNA-Seq and iTRAQ reveal multiple pathways involved in storage root formation and development in sweet potato (*Ipomoea batatas* L.)[J]. BMC Plant Biology, 2019, 19(1): 136.

[77] MARTÍNEZ M M, MARCOS P, GÓMEZ M. Texture development in gluten-free breads: Effect of different enzymes and extruded flour[J]. Journal of Texture Studies, 2013, 44(6): 480−489.

[78] AIROLDI C, EL-DASH A A, CLERICI M T P S, et al. Production of acidic extruded rice flour and its influence on the qualities of gluten-free bread[J]. LWT-Food Science and Technology, 2008, 42(2): 618−623.

[79] 路飞, 马涛, 任文涛, 等. 大米面包的生产配方及工艺条件的优化[J]. 沈阳师范大学学报(自然科学版), 2013, 31(4): 482−487. [LU F, MA T, REN W T, et al. Optimization of ingredient and processing technology for rice bread[J]. Journal of Shenyang Normal University (Natural Science Edition), 2013, 31(4): 482−487.]

[80] RONDA F, LAZARIDOU A, BILIADERIS C G, et al. Effect of microwave radiation pretreatment of rice flour on gluten-free breadmaking and molecular size of β-glucans in the fortified breads[J]. Food and Bioprocess Technology, 2017, 10(8): 1412−1421.

[81] MEZAIZE S, CHEVALLIER S, LE-BAIL A M, et al. Gluten-free frozen dough: Influence of freezing on dough rheological properties and bread quality[J]. Food Research International, 2010, 43(8): 2186−2192.