高杰,曾馨俞,薛艺璇,等. 基底物质对大豆分离蛋白/黄原胶复合膜结构和性能的影响 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 1−9. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110158

GAO Jie, ZENG Xinyu, XUE Yixuan, et al. Effects of Matrices on the Structure and Properties of Composite Films of Soy Protein Isolates/Xanthan Gum[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 1−9. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110158

·特邀主编专栏—生物基材料在食品包装领域的应用（客座主编:任海伟、徐丹、王建国）·

基底物质对大豆分离蛋白/黄原胶复合膜结构和性能的影响

高　杰[1],曾馨俞[1],薛艺璇[1],赵　萍[1,*],赵　瑛[2],刘小春[1],汪　瑞[1],刘　冰[1],何海宁[3]

（1.兰州理工大学生命科学与工程学院,甘肃兰州 730050;
2.甘肃省农业科学院生物技术研究所,甘肃兰州 730070;
3.甘肃省商业科技研究所有限公司,甘肃兰州 730010）

摘　要: 本文研究大豆分离蛋白（SPI）和黄原胶（XG）与不同基底添加物成膜的结构和性能。以 SPI 和 XG 为基材，加入海藻酸钠（SA）、羧甲基纤维素（CMC）、明胶（GEL）、果胶（PEC）和琼脂（Agar）制备复合膜，对复合膜厚度、机械性能、透氧性和不透明度进行测定，并对其结构进行表征。结果表明，添加 1.5 g 不同添加物的复合膜厚度显著增高（P<0.05），拉伸强度最大为 SPI/XG-Agar 膜 5.90±0.32 MPa（P<0.05），透氧性显著降低（P<0.05），不透明度最低为 SPI/XG-Agar 膜 0.45±0.09 Abs_{600}/mm（P<0.05）。SEM 显示，SPI/XG-Agar 复合膜表面平坦光滑且无颗粒，而其他复合膜表面有颗粒和褶皱。红外光谱显示，基材之间均有良好的相容性。SPI/XG-Agar 复合膜的拉伸强度、不透明度及 SEM 结果优于其他复合膜。

关键词: 大豆分离蛋白,黄原胶,复合膜,机械性能,添加物

中图分类号: TS206.4　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2024)21−0001−09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110158　　本文网刊:

Effects of Matrices on the Structure and Properties of Composite Films of Soy Protein Isolates/Xanthan Gum

GAO Jie[1], ZENG Xinyu[1], XUE Yixuan[1], ZHAO Ping[1,*], ZHAO Ying[2], LIU Xiaochun[1], WANG Rui[1], LIU Bing[1], HE Haining[3]

（1.School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China;
2.Institute of Biotechnology, Gansu Academy of Agricultural Science, Lanzhou 730070, China;
3.Gansu Institute of Business and Technology, Lanzhou 730010, China）

Abstract: The structures and properties of the composite films formed by soy protein isolate (SPI) and xanthan gum (XG) with different other matrices were investigated. The composite films were prepared with SPI and XG by adding sodium alginate (SA), carboxymethyl cellulose (CMC), gelatin (GEL), pectin (PEC) and agar (Agar), respectively. The thickness, mechanical properties, oxygen permeability and opacity of the composite films were measured, and their structures were characterized. The results showed that the thicknesses of composite films with 1.5 g of different other matrices were significantly higher (P<0.05) than the film of SPI/XG, and the maximum tensile strength was 5.90±0.32 MPa for SPI/XG-Agar film (P<0.05), the oxygen permeabilities of them were significantly reduced (P<0.05), and the lowest opacity was 0.45±0.09 Abs_{600}/mm for SPI/XG-Agar film (P<0.05). The photograph of SEM showed that the surface of SPI/XG-Agar composite film was flat, smooth and free of particles, while the other composite films were with particles and folds on the

收稿日期: 2023−11−16

基金项目: 陇原青年人才项目。

作者简介: 高杰（1998−）,男,硕士研究生,研究方向:生物资源综合利用,E-mail:846451032@qq.com。

*** 通信作者:** 赵萍（1964−）,女,硕士,教授,研究方向:农产品加工与副产物综合利用,E-mail:pingzhaogdqg@163.com。

surface. The infrared spectroscopy analysis showed that there was good compatibility between all the matrices. The results of tensile strength, opacity and SEM for the SPI/XG-Agar film were superior to other films.

Key words: soy protein isolate; xanthan gum; composite film; mechanical property; matrices

大豆分离蛋白(Soy protein isolate, SPI)、黄原胶(Xanthan gum, XG)、海藻酸钠(Sodium alginate, SA)、羧甲基纤维素(Carboxymethylcellulose, CMC)、明胶(Gelatin, GEL)、果胶(Pectin, PEC)和琼脂(Agar)均是良好的成膜材料。SPI 具有质优价廉、来源丰富、成膜良好等特点,其分子结构为紧密卷曲的球状,在水中相对稳定,但 SPI 膜具有机械强度低、阻隔性能较差、易溶于水、容易吸湿[1],且易滋生细菌的特点,导致其应用十分有限[2−4]。XG 又称汉生胶,是一种由革兰氏阴性菌弯曲黄单胞菌 NRRL B-1459 产生的胞外多糖,可作为稳定剂、增稠剂和乳化剂等[5],然而关于 SPI 和 XG 复合膜的研究较少。SA 是从褐藻或马尾藻中提取的一种天然多糖物质,具有良好的生物降解性、凝胶性、成膜性和相容性[6]。可与蛋白、多糖和脂类等大分子物质复合制成具有良好性能的复合膜[7]。Zhu 等[8] 在 SPI/SA 复合膜的基础上研究不同添加量的硬脂酸对复合膜的影响,发现硬脂酸能改善膜的水蒸气渗透性和接触角,但断裂伸长率、水蒸气透过率显著下降。CMC 具有良好水溶性[9],它由一个疏水多糖主链和亲水羧基组成,使其具有两亲性[10]。Han 等[11] 在 SPI 的基础上添加 CMC,使复合膜具有更强的拉伸强度,并降低了水蒸气渗透性,但透明度显著下降。GEL 经胶原蛋白水解而成,三股螺旋结构经水解后变为单链分子。在其结构中可以观察到大量的氨基(-NH_2)、羧基(-COOH)和羟基(-OH)[12],使 GEL 膜具有很强的机械和阻隔性能,其结构中存在的不同氨基酸容易吸收紫外辐射并保护包装食品免受氧化损伤[13]。Bai 等[14] 研究不同添加比的 GEL 和 SPI 对复合膜的影响,发现在 SPI 基质中加入 10%~30% 的明胶,薄膜具有良好的视觉性能、高表面疏水性、力学性能和显著的隔水性,但复合膜仍然具有高度的水敏感性。PEC 是一种存在于自然界中的天然可溶性的复杂的阴离子多糖,广泛存在于植物的初生细胞层和细胞壁[15],常用作胶凝剂、稳定剂及饮品中的增稠剂[16],且来源广泛。Amado 等[17] 研究 SPI 与不同高氧基 PEC 及 pH 对复合膜的影响,表明随着高甲氧基 PEC 的添加比例增高,改善了复合膜的机械性能,但复合膜的水溶性增加。Agar 是红藻类(红藻科)的胶状产物,是加工相同主链结构的相关多糖的异质复杂混合物,具有可再生性和生物降解性[18−19],以及巨大的胶凝能力,是一种安全无毒,且成膜性好的可食性多糖。Tian 等[20] 将 Agar 加入到 SPI 中制膜,发现 Agar 与 SPI 之间存在氢键相互作用,具有优越的力学性能,但随着 Agar 的添加比例增加,复合膜表面出现的褶皱越多。SPI 与 XG 以及 SA、CMC、GEL、PEC、Agar 都具有良好的相容性,但单一基质或两者结合制成的复合膜均无法满足食品包装要求。将三种成膜基材结合起来,利用其相互作用可提高复合膜的相关性能。

目前,物理、化学、酶法、纳米改性方法存在操作复杂、安全性低和成本高等问题,二元复合膜仍有结构和性能的不足,而三元复合制备复合膜的研究鲜有报道。本研究以 SPI 和 XG 为基材,分别与 SA、CMC、GEL、PEC、Agar 制备三元共混改性复合膜,并对其进行结构和性能测定,以揭示基材之间的相互作用以及对复合膜的性能影响,以期为 SPI 膜应用发展提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

SPI(蛋白质含量≥90%) 购自哈尔滨高科技大豆食品有限公司;黄原胶 购自国药集团化学试剂有限公司;焦磷酸钠、甘油 购自上海迈瑞尔技术有限公司;海藻酸钠 购自成都市科龙化工试剂厂;羧甲基纤维素 购自天津市元力化工有限公司;明胶 购自上海明胶厂;果胶 购自北京索莱宝科技有限公司;琼脂 购自中国北京兰杰柯科技有限公司。

STA449F3 同步热分析仪 德国 NETZSCH 公司;Nexus 870 红外光谱仪 美国 Nicolet 仪器公司;ESCALAB 250Xi X 射线光电子能谱仪 中国赛默飞世尔科技公司;JSM-5600LV 扫描电子显微镜 日本电子光学公司;AD300L-H 高速分散均质机 中国上海昂尼仪器仪表有限公司;102-2A 电热鼓风干燥箱 中国北京科伟永兴仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 不同基底材料复合膜的制备 按一定比例分别称取 1.5 g SPI、0.018 g 的黄原胶、2 g 甘油和 0.009 g 的焦磷酸钠,加入 70 mL 去离子水,再分别加入 1.5 g 的 SA、CMC、GEL、PEC 和 Agar,用高速分散均质机 8000 r/min 搅拌 5 min,得到均匀的混合溶液。将混合溶液置于 100 ℃ 烘箱烘烤 1 h,取出放至室温,使用超声细胞破碎仪超声处理,功率 360 W,超声 30 min,得到均匀透明的膜液,在培养皿中倒入 20 mL 膜液均匀流延在培养皿上成膜,膜厚度约 0.1~0.5 mm,放置在 50 ℃ 烘箱干燥 48 h 成膜。揭下的复合膜放入真空袋中密封,室温下保存,备用。

1.2.2 复合膜物理性能测定

1.2.2.1 复合膜厚度测定 参考 Liu 等[21] 的方法测定膜厚度。使用千分尺随机测量膜样品上 10 个位置的厚度,精确到 0.001 mm,计算平均值。

1.2.2.2　复合膜机械性能测定　参考 Rachtanapun 等[22] 的方法稍作修改，测量薄膜的拉伸强度（Tensile stress, TS）和断裂伸长率（Elongation at break, EAB），将膜切成 3.2×9.5 cm 的条带，初始夹具距离为 40 mm，以 30 mm/min 的速度进行拉伸，至复合膜破裂。TS 和 EAB 的计算公式如下：

$$TS(MPa)=\frac{F}{D\times L} \quad 式（1）$$

式中：TS 为拉伸强度，MPa；F 为最大力，N；D 为膜的厚度，mm；L 为样品膜宽度，mm。

$$EAB(\%)=\frac{L-L_0}{L_0}\times 100 \quad 式（2）$$

式中：EAB 为断裂伸长率，%；L_o 为薄膜的最初长度，mm；L 为薄膜拉伸断裂前的最终长度，mm。

1.2.2.3　复合膜含水率及水溶性测定　参考 Chen 等[23] 的方法测定复合膜的含水率（Moisture content, MC）及水溶性（Water solubility, WS）。计算公式如下：

$$MC(\%)=\frac{M_1-M_2}{M_1}\times 100 \quad 式（3）$$

式中：M_1 为复合膜初始重量；M_2 为烘干后复合膜重量。

$$WS(\%)=\frac{W_1-W_2}{W_1}\times 100 \quad 式（4）$$

式中：W_1 为烘干后复合膜重量；W_2 为浸泡烘干后复合膜重量。

1.2.2.4　复合膜水蒸气透过率测定　参考 Li 等[24] 的方法稍作修改，称取 5 g 无水 $CaCl_2$ 装入 40 mm×25 mm 称量瓶中，用橡皮筋将复合膜固定于瓶口处，测定膜的水蒸气透过率（Water vapor permeability, WVP）。计算公式如下：

$$WVP(g\cdot mm\cdot m^{-2}\cdot s^{-1}\cdot Pa^{-1})=\frac{\Delta m\times d}{A\times\Delta p\times t} \quad 式（5）$$

式中：WVP 为水蒸气透过率；Δm 为水分透过质量，g；d 为膜厚，mm；A 为水蒸气透过的面积，m^2；t 为间隔时间，s；Δp 为膜两侧的压强差，Δp=3179 Pa。

1.2.2.5　复合膜透氧性测定　参考 Zhou 等[25] 的方法测定复合膜的透氧性（Oxygen permeability, OP）。计算公式如下：

$$OP(g\cdot s^{-1}\cdot m^{-2})=\frac{m_t-m_0}{t\times A} \quad 式（6）$$

式中：OP 为复合膜的透氧性；m_t 为薄膜的最终质量，g；m_0 为初始质量，g；t 为时间间隔，s；A 为称量瓶瓶口面积，m^2。

1.2.2.6　复合膜透光率测定　用紫外-可见分光光度计检测样品的透光率，扫描范围为 200~800 nm。

1.2.2.7　复合膜颜色　参考 Yong 等[26] 的方法测定复合膜的色差。计算公式如下：

$$\Delta E=\sqrt{\Delta L^{*2}+\Delta a^{*2}+\Delta b^{*2}} \quad 式（7）$$

式中：$\Delta L^*=L^*-L_0^*$、$\Delta a^*=a^*-a_0^*$、$\Delta b^*=b^*-b_0^*$；L^*、a^*、b^*为不同基底复合膜的值；L_0^*、a_0^*、b_0^*为标准白板的值。

1.2.2.8　复合膜不透明度测定　参照 Liu 等[27] 的方法测定复合膜的不透明度（Opacity, O）。计算公式如下：

$$O(Abs_{600}/mm)=\frac{Abs_{600}}{d} \quad 式（8）$$

式中，O 为不透明度；Abs_{600} 为复合膜在 600 nm 处的吸光度；d 为膜的厚度，mm。

1.2.2.9　复合膜热重分析　参考 Riahi 等[28] 的方法，精确称量 6 mg 样品置于陶瓷坩埚中，以 10 ℃/min 的加热速率从 30 ℃ 升温至 600 ℃，以氮气作为保护气体。

1.2.3　复合膜结构的表征

1.2.3.1　复合膜扫描电镜分析　参考 Salarbashi 等[29] 的方法对复合膜进行扫描电镜分析。测试条件：抽真空 30 s，喷金 20 s，加速电压为 20 kV，放大倍数 2000×。

1.2.3.2　复合膜傅里叶变换红外光谱分析　参考 Vicentini 等[30] 的方法使用傅里叶变换红外光谱仪对薄膜进行光谱表征，扫描范围设置 400~4000 cm^{-1}，每个样品重复扫描 32 次，分辨率为 0.1 cm^{-1}。

1.2.3.3　复合膜 X-射线衍射分析　参考 Huang 等[31] 的方法对复合膜进行 X-射线衍射分析。测试条件：模式为 $2\theta/\theta$，步长为 0.02°/min，扫描范围为 5°~100°。

1.3　数据处理

实验数据表示为平均值±标准偏差（Mean±SD），数据处理和分析使用 IBM SPSS 23.0 和 Excel 进行。采用单因素方差分析（ANOVA）来检验实验结果。P<0.05，为差异有统计学意义。使用 Origin 2023 b 绘图，每组实验重复 3 次。

2　结果与分析

2.1　复合膜物理性能

2.1.1　薄膜的厚度及机械性能　厚度是影响食品包装膜的机械性能和水蒸气透过率的重要因素[26]。如图 1A 可知，SPI/XG 膜的厚度最小，SPI/XG-Agar 膜的厚度最大，加入不同基底材料后，复合膜的厚度都显著增加（P<0.05），厚度大小顺序为 SPI/XG-Agar 膜 >SPI/XG-PEC 膜 >SPI/XG-CMC 膜 >SPI/XG-SA 膜>SPI/XG-GEL 膜>SPI/XG 膜，这表明膜的厚度主要与成膜基质有关，造成不同复合膜厚度之间的差异可能是不同基材与 SPI/XG 的胶体性质以及组分之间的相互作用[32]。

食品包装薄膜需要优良的性质来保证食品的运输及安全性，TS 和 EAB 是衡量机械性能的重要参数，可用于评价包装膜的实用性[33]。由图 1B 可知，不同基底材料的复合膜的 TS 和 EAB 具有显著差异

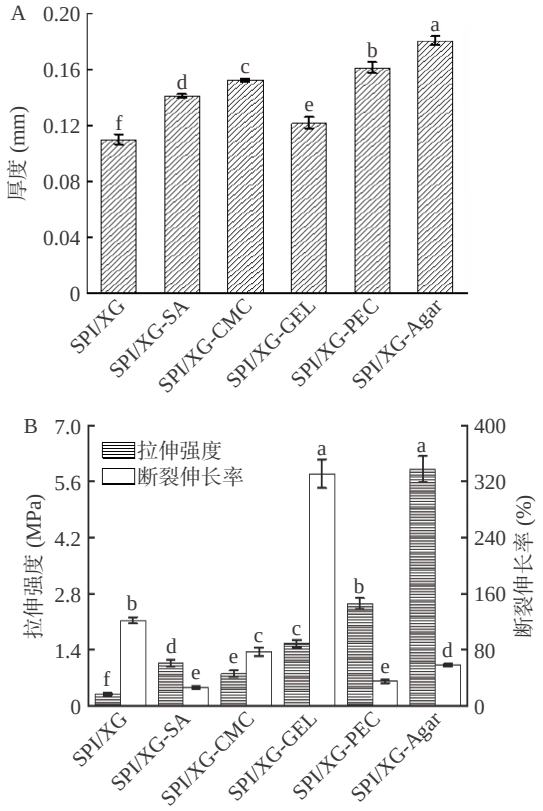


图 1　不同基底材料膜的厚度(A)和机械性能(B)

Fig.1　Thickness (A) and mechanical properties (B) of the films with different matrices

注: 图中不同小写字母表示差异显著 $P<0.05$; 图 2、图 3 同。

($P<0.05$)。不同基底复合膜的 TS 大小依次为 SPI/XG-Agar 膜>SPI/XG-PEC 膜>SPI/XG-GEL 膜>SPI/XG-SA 膜>SPI/XG-CMC 膜>SPI/XG 膜。膜的 TS 大小与膜分子结晶结构以及氢键有着密切的关系[34]。SPI/XG-Agar 膜表现出最高的抗拉强度, 其抗拉强度的提高可能是由于 SPI 与 Agar 之间分子间氢键的形成, 以及复合膜紧凑均匀的三维结构, 而其 EAB 相较于其他基底材料低的原因可能是 Agar 占据了更多的空隙位点, 减少了水分子与基质的交联[35]。而 SPI/XG 膜的 TS 最低可能是因为没有添加其他基材相互作用, 导致拉伸强度低。从 EAB 来看, SPI/XG-GEL 膜的 EAB 最大, 而 SPI/XG-SA 膜的 EAB 最低。不同基底复合膜的 EAB 大小顺序为 SPI/XG-GEL 膜>SPI/XG 膜>SPI/XG-CMC 膜>SPI/XG-Agar 膜>SPI/XG-PEC 膜>SPI/XG-SA 膜, 其中 SPI/XG-GEL 膜的 EAB 最大, 可能是 GEL 大分子松弛, SPI/XG 与 GEL 相互作用的结果[36−37]。SPI/XG-SA 膜 EAB 最低可能与 MC 的降低和蛋白质链间空间位阻相互作用的增加有关, 原因是 SPI 和海藻酸钠能够形成良好的网络结构, 增强了蛋白质链之间的空间位阻, 这导致 EAB 降低[38]。

2.1.2　复合膜的含水率及水溶性　包装薄膜的水分含量与控制微生物繁殖生长和包装内食品的质量密切相关[39]。由图 2A 可知, MC 最大的为 SPI/XG-Agar 膜达到了 58.73%, 而 SPI/XG-CMC 膜的 MC 最低为 49.35%。SPI/XG-CMC 膜、SPI/XG-GEL 膜的 MC 相较于 SPI/XG 膜、SPI/XG-SA 膜、SPI/XG-PEC 膜和 SPI/XG-Agar 膜低, 可能是因为复合膜成膜基质之间形成更多的氢键, 使得复合膜内部结构更稳定, 抑制了与水分子之间的相互作用, 使 MC 显著降低[40]。

WS 可用以评价复合膜的耐水性和物理阻隔性, 对于水活度高的产品需要提高薄膜的水不溶性以保证薄膜的完整性及食品的最佳状态。由图 2B 可知, WS 较低的有 SPI/XG-CMC 膜、SPI/XG-GEL 膜和 SPI/XG-Agar 膜, 而最高的为 SPI/XG-SA 膜, 其 WS 高的原因可能是 SA 具有很大的亲水性、内部结构松散且 SA 与 SPI/XG 间的相互作用较弱, 从而增加薄膜的 WS[41−42]。

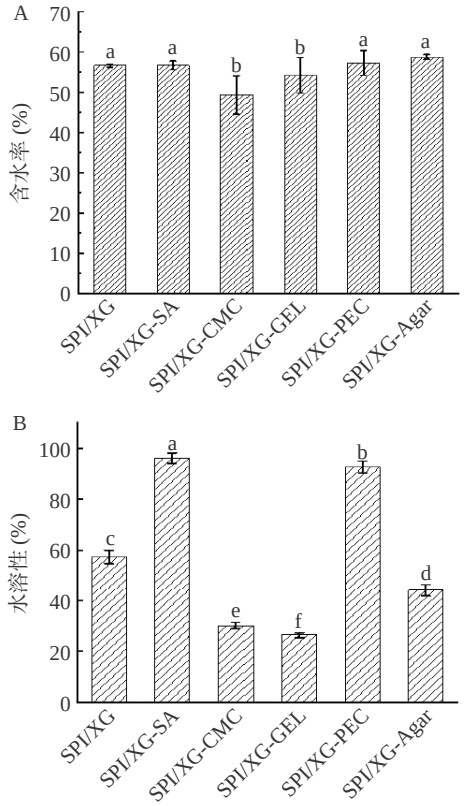


图 2　不同基底材料膜的水分含量(A)和水溶性(B)

Fig.2　Moisture contents (A) and water solubilities (B) of the films with different matrices

2.1.3　复合膜的水蒸气透过率及透氧性　WVP 是包装膜的一个关键特性。因为食品在储存过程中需要减少与外界的水汽交换[43], 而水蒸气的传递行为包括水的吸附和水的扩散。由图 3A 可知, WVP 最大的是 SPI/XG-Agar 膜, 而 WVP 最小的是 SPI/XG-CMC 膜, 可能是 SPI/XG 与 CMC 发生了交联反应, 从而使水蒸气通过膜的曲径比其他膜更长以及疏水性更强[44], 而其他基材与 SPI/XG 交联具有亲水性, 导致 WVP 高, 这也与 Galus 等[32] 的研究结果相似。

OP 对于维持食品质量极为重要, 因为食品在流通过程中容易被氧化。由图 3B 可知, SPI/XG 膜的

OP 值最高，这可能是由于 SPI 的主要组成为球蛋白，导致形成的蛋白网络结构松散，从而 OP 值高。而其他膜的 OP 值比 SPI/XG 膜低的原因可能是在 SPI 和 XG 的基础上加入了其他的基底材料，使 SPI 和 XG 与相应的基底材料进行结合，形成了大量的氢键，使膜具有亲水性，这使得它们对氧和其他非极性化合物具有阻隔性，从而使其他膜相较于 SPI/XG 膜的 OP 值低。

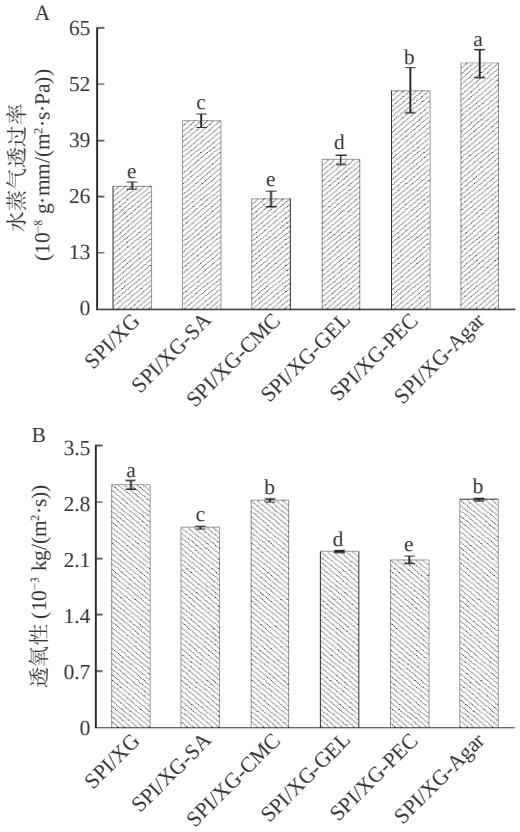


图 3　不同基底材料膜的水蒸气透过率(A)和透氧性(B)

Fig.3　WVPs (A) and OPs (B) of the films with different matrices

2.1.4　复合膜的透光率　食品的外观是影响消费者购买的最重要评价指标。良好的透明度可以确保食品的真实性质得到反映。紫外线会引起许多光化学反应，对食物有害，特别是光敏食品[45]。而如果包装膜具有紫外-可见光阻隔性能，则能有效保护包装食品免受光辐射的影响[46]。不同基底材料膜的透光率如图 4 所示。在波长为 350 nm 时，SPI/XG-Agar 膜的透光率最高达到 40.03%，而 SPI/XG-PEC 膜的透光率最低为 0.99%。其大小顺序为 SPI/XG-Agar 膜>SPI/XG 膜>SPI/XG-GEL 膜>SPI/XG-CMC 膜>SPI/XG-SA 膜>SPI/XG-PEC 膜。在波长为 300 nm 时，6 种膜的透光率均接近于 0，这表明 6 种材料都具有一定的防紫外线性能。而在波长为 600 nm 时，SPI/XG-Agar 膜的透光率最高为 83.17%，SPI/XG-PEC 膜的透光率最低为 24.03%。其大小顺序为 SPI/XG-Agar 膜 >SPI/XG 膜 >SPI/XG-CMC 膜 >SPI/XG-SA 膜>SPI/XG-GEL 膜>SPI/XG-PEC 膜。综上所述，SPI/XG-Agar 膜相对于其他基材的抗紫外能力弱，但在可见光范围的透光率远远高于其他基材。造成这样的原因可能是 Agar 和 SPI/XG 相容性较好，形成均匀的网络，并且光线更容易通过[36]。而其他膜的透光率较低可能是基材存在多种结构，从而吸收紫外线/可见光[46]。虽然 SPI/XG-PEC 膜的透光率最低，但仍可以清晰地显示其背后的文本。

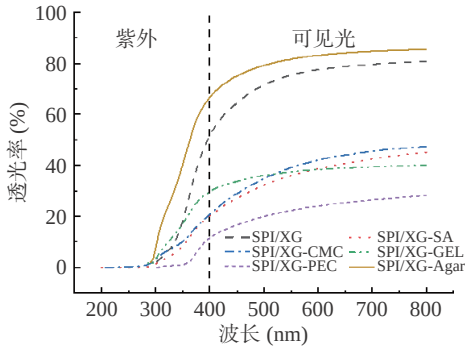


图 4　不同基底材料膜的透光率

Fig.4　Transmittances of the films with different matrices

2.1.5　复合膜的颜色及不透明度　颜色是食品包装膜的重要表现特性，会直接影响消费者对于包装食品的接受度。表 1 列出了不同膜的颜色参数及不透明度。从表中可以看出 SPI/XG-SA 膜、SPI/XG-GEL 膜和 SPI/XG-PEC 膜的 L^*没有显著差异(P>0.05)，但 a^*、b^*和 ΔE 具有显著差异(P<0.05)。相比 SPI/XG-GEL 膜，SPI/XG-SA 膜和 SPI/XG-PEC 膜的 b^*值较大，偏黄色，这主要是因为它们的基质有轻微的黄色。ΔE 值大小表示感觉色差程度，当 ΔE 值大于 3 时，人的视觉器官对于色差就会感觉明显，而表中

表 1　复合膜的颜色参数及不透明度

Table 1　Color parameters and opacities of the composite films

膜	L^*	a^*	b^*	ΔE	不透明度(Abs_{600}/mm)
SPI/XG	88.108±2.226^{ab}	0.834±0.465^{c}	11.886±4.941^{ab}	11.742±5.076^{b}	1.163±0.075^{d}
SPI/XG-SA	85.206±2.351^{c}	1.860±0.549^{a}	13.616±3.386^{a}	14.426±3.990^{a}	2.953±0.115^{c}
SPI/XG-CMC	87.200±1.545^{b}	1.429±0.382^{b}	10.464±0.952^{b}	10.716±1.181^{b}	3.120±0.285^{bc}
SPI/XG-GEL	85.293±1.791^{c}	0.003±0.190^{d}	3.517±0.708^{d}	6.038±1.156^{c}	3.330±0.262^{b}
SPI/XG-PEC	84.931±0.773^{c}	0.779±0.121^{c}	7.662±0.710^{c}	9.760±0.917^{b}	3.873±0.057^{a}
SPI/XG-Agar	88.757±0.510^{a}	0.567±0.084^{c}	4.077±0.818^{d}	5.473±0.793^{c}	0.447±0.093^{e}

注：表中的数值均表示为平均值±标准偏差；同列不同小写字母表示有显著性差异(P<0.05)。

6 种膜的 Δ*E* 均大于 5，表明膜的色差都很明显。同时，从表中可以看出，SPI/XG-Agar 膜的透明度最高，而 SPI/XG-PEC 膜的透明度最低，透明度的差异主要与膜内部结构相关[47]。

2.1.6　复合膜的热重分析　热重分析（Thermogravimetric analysis，TGA）是指在一定的升温速率条件下，对样品进行连续检测，得到样品的质量变化和温度之间的函数关系，可反映材料的热稳定性。各复合膜的 TGA，如图 5A 所示，可划分为三个阶段，第一主要的降解阶段（35~120 ℃）是由于复合膜中吸收的游离水和结合水的损失以及氢键的断裂[48]，样品质量损失率约为 10%。第二降解阶段（120~196 ℃）中，可归因于甘油的降解、焦磷酸钠的热分解[49]，样品质量损失率约为 20%；第三阶段的降解表现为两种情况，第一种情况膜在（196~256 ℃）时出现第三个波谷（图 5B），分别是 SPI/XG-CMC 膜、SPI/XG-SA 膜、SPI/XG-PEC 膜和 SPI/XG-Agar 膜，样品质量损失率约为 20%，其最大分解速率时的温度分别为 225.78、220.57、203.58 和 248.32 ℃，造成它们提前产生波谷的原因可能是添加的基底材料开始热分解；第二种情况是 SPI/XG 膜、SPI/XG-GEL 膜（196~390 ℃），它们的最大分解速率时的温度分别为 307.31 ℃ 和 315.9 ℃，这两种膜的质量减轻主要是膜内主要材质开始分解且质量快速损失，主要是蛋白质主链的分解以及相应材质的分解，样品质量损失率约为 40%。其中第一种情况的膜进行了第四次降解阶段（256~414 ℃），它们的最大分解速率时的温度与第二种情况的第三次降解的最高分解速率时的温度近似，这表明第一种情况膜中添加的基质比 SPI 更早热分解。

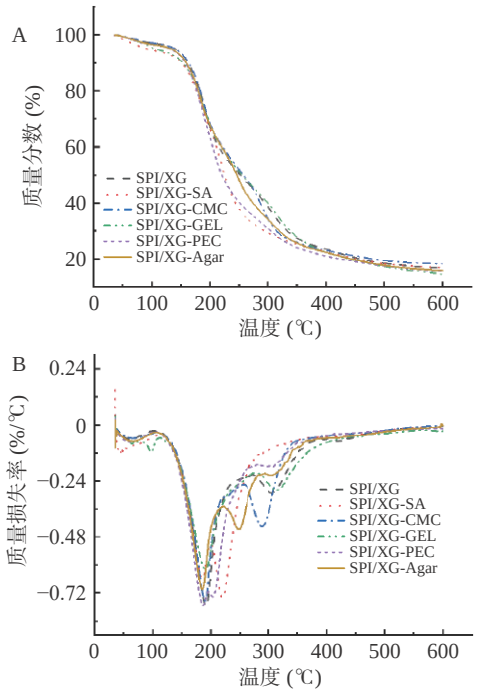


图 5　不同基底材料膜的热失重曲线（A）和热失重速率曲线（B）

Fig.5　Curves of TGAs (A) and the rates of TGA (B) of the films with different matrices

2.2　复合膜结构的表征

2.2.1　复合膜的扫描电镜分析　扫描电镜（Scanning electron microscopy，SEM）可以清晰地观察出复合膜结构、形态、尺寸、分布等信息，从而根据共混高聚物中两相断裂性质的差异来判断材料间的相容性[50]。生物相容性较好时复合膜表面应呈现平整光滑的图像，若相容性不好，可能会观察到明显的分界或表面颗粒析出[51]。图 6（A~E）有明显的颗粒物，说明复合膜基质间相容性较差，同时，图 6（D 和 E）出现褶皱，也代表 GEL 和 PEC 与 SPI 的相容性较差。图 6（F）中没有明显颗粒且无褶皱，同时薄膜表面较为平坦光滑，表明 Agar 与 SPI 的相容性较好，

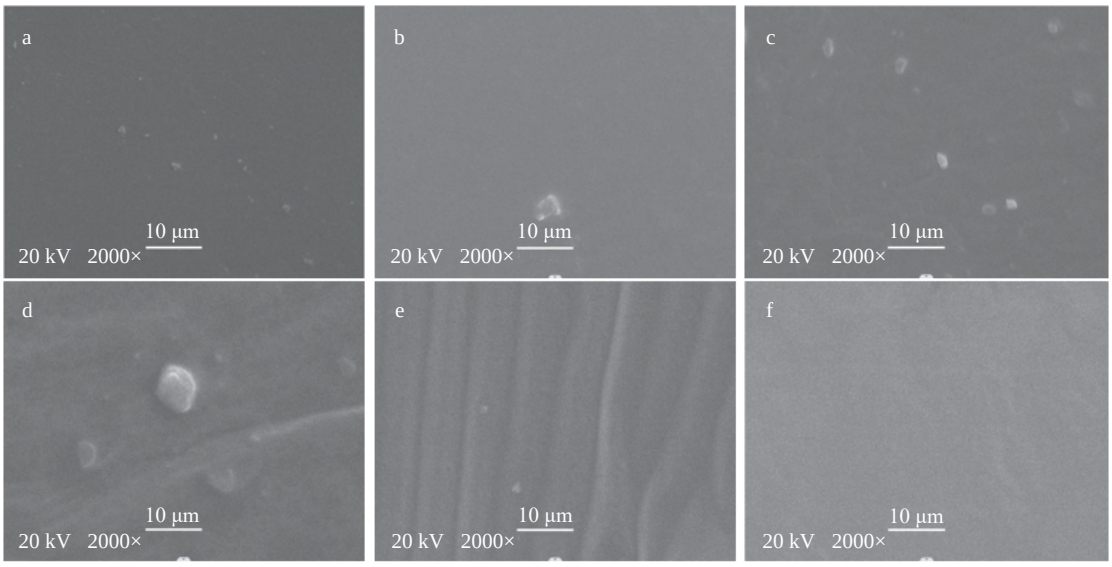


图 6　不同基底材料膜的表面扫描电镜显微图

Fig.6　SEM photographs of films with different matrices

注：a，SPI/XG 膜；b，SPI/XG-SA 膜；c，SPI/XG-CMC 膜；d，SPI/XG-GEL 膜；e，SPI/XG-PEC 膜；f，SPI/XG-Agar 膜。

形成较为致密的结构，这也从机械性能有所体现。

2.2.2　复合膜的红外光谱分析　傅里叶红外变换光谱分析是一种微区分技术，根据光谱中出现的峰的位置反映测试样品的化学结构[52]。同时，红外光谱可以反映复合薄膜基质之间的相互作用情况，不同成膜基质混合会使复合膜的峰型发生移动和变化[53]。如图 7 所示，所有膜都在 3280 cm^{-1} 左右出现强宽峰，这是由于-OH 键的伸缩振动[54]。在 2900 cm^{-1} 附近出现波峰是因为 C-H 键的伸缩振动，以及在 1600 cm^{-1} 左右出现波峰是由于 C=O 键的伸缩振动。加入其他基底材料后，吸收峰(3281 cm^{-1} 和 2932 cm^{-1})向高波数偏移，这可能是 SPI/XG 与不同基材之间存在氢键相互作用，SPI 和 XG 分子链上的活性位点可能是羰基中的氧原子[20]。SPI/XG 膜、SPI/XG-GEL 膜、SPI/XG-PEC 膜和 SPI/XG-Agar 膜有明显的三个酰胺特征峰：1652 cm^{-1} 处出现 C=O 伸缩振动峰(酰胺 I 带)、1549 cm^{-1} 处出现 N-H 弯曲峰(酰胺 II 带)、1413 cm^{-1} 处出现 N-H 弯曲振动峰和 1200 cm^{-1} 处出现 C-N 伸缩振动峰(酰胺 III 带)[38]，说明复合膜基质已成功地与增塑剂甘油结合。SPI/XG-PEC 膜在 1750 cm^{-1} 处的峰与酯的 C-O 和 C=O 键有关。所有膜在波数 1032 cm^{-1} 左右出现波峰是由于 SPI 与甘油发生氢键作用。结果表明，各曲线具有极高的相似性，基质之间相容性良好。

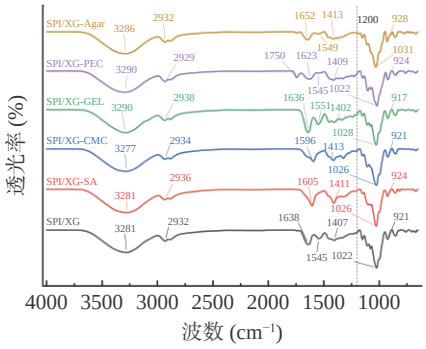


图 7　不同基底材料膜的 FTIR 图

Fig.7　FTIR diagrams of the films with different matrices

2.2.3　复合膜的 X-射线衍射分析　通过 X 射线衍射研究样品的结晶度。结晶度较高的聚合物表现出更尖、更高的峰，而更低、更宽的峰则代表聚合物存在非晶态区域，即无定形区域[55]。如图 8 所示，在 2θ 为 20°左右时，SPI 膜有强的衍射峰，代表了 SPI 二级结构的-β-折叠[56]。而 SPI/XG-SA 膜、SPI/XG-GEL 膜和 SPI/XG-Agar 膜的强衍射峰在 15°左右出现，膜的强衍射峰位置不同，表明成膜物质之间发生了交联，SA、GEL 和 Agar 的加入影响了 SPI/XG 的结晶行为，从而改变了其非晶结构。而 CMC 和 PEC 的加入并没有改变 SPI/XG 的晶体结构。

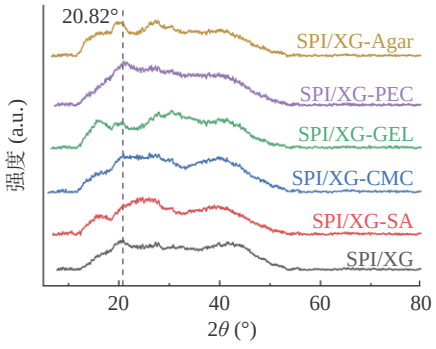


图 8　不同基底材料膜的 XRD 图

Fig.8　XRD diagrams of the films with different matrices

3　结论

本文以 SPI/XG 为成膜基质，添加 SA、CMC、GEL、PEC 和 Agar 等不同类型的基底材料制膜，对不同类型的复合膜的物理性能、阻隔性能等进行了测试。结果表明，基于不同成膜基质制备的复合膜的水溶性、不透明度、颜色外观、拉伸强度等性能表现具有较大的差异。通过对膜进行红外光谱分析发现，5 种基底材料在成膜基质中分散较好，且基底材料中大量的羟基与成膜基质之间形成了氢键作用。此外，Agar 对复合膜的微观结构有一定的影响，能够改善膜材料的相容性，从而改善复合膜的机械性能。其中，通过上述测试发现，SPI/XG-Agar 膜不透明度为最低，颜色透明度高，外观和机械性能较为优异，因此 SPI/XG-Agar 膜，在食品包装领域具有一定的应用潜力。

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

参考文献

[1] OU S Y, KWOK K C, KANG Y J. Changes in *in vitro* digestibility and available lysine of soy protein isolate after formation of film[J]. Journal of Food Engineering, 2004, 64(3): 301−305.

[2] 王晨, 秦烨, 王志平. 大豆分离蛋白膜改性研究进展[J]. 食品工业, 2019, 40(3): 244−248. [WANG C, QIN Y, WANG Z P. Research advances in modification of soy protein isolate film[J]. Food Industry, 2019, 40(3): 244−248.]

[3] 毕会敏, 徐柠檬, 范方宇. 花青素/大豆分离蛋白智能包装膜特性及鱼肉新鲜度监测[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(7): 232−240. [BI H M, XU N M, FAN F Y. Characteristics of smart packaging films of anthocyanin/soy protein isolate and monitoring of fish meat freshness[J]. Food and Fermentation Industry, 2023, 49(7): 232−240.]

[4] 尹兴, 朱俊南, 陈林, 等. 可食性大豆分离蛋白膜的制备及其性能研究[J]. 包装工程, 2020, 41(23): 83−89. [YIN X, ZHU J N, CHEN L, et al. Preparation and properties of edible soy protein isolate film[J]. Packaging Engineering, 2020, 41(23): 83−89.]

[5] ELELLA M H, GODA E S, GAB A M A, et al. Xanthan gum-derived materials for applications in environment and eco-friendly materials: A review[J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2021, 9(1): 104702.

[6] 李瑞, 刘华, 高梦祥, 等. 不同添加剂对海藻酸钠复合膜性能的影响[J]. 塑料工业, 2023, 51(8): 122−130,146. [LI R, LIU H, GAO M X, et al. Effects of different additives on properties of sodi-

um alginate composite film[J]. China Plastics Industry, 2023, 51(8): 122−130,146.]
[7] 任邦来, 秦娜娜. 不同浓度海藻酸钠处理对油桃保鲜效果的影响[J]. 中国食物与营养, 2016, 22(9): 38−41. [REN B L, QIN N N. Effects of coating with different concentrations of sodium alginate on nectarine fresh-keeping[J]. China Food and Nutrition, 2016, 22(9): 38−41.]
[8] ZHU X, CHEN H, HE M, et al. Effect of stearic acid on properties of soy protein isolate/sodium alginate films[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2022, 53(5): 406−412.
[9] 姚曜, 孙振炳, 李晓宝, 等. 羧甲基纤维素复合膜的研究现状[J]. 包装工程, 2022, 43(1): 10−16. [YAO Y, SUN Z B, LI X B, et al. Research status of carboxymethyl cellulose composite film[J]. Packaging Engineering, 2022, 43(1): 10−16.]
[10] TOĞRUL H, ARSLAN N. Carboxymethyl cellulose from sugar beet pulp cellulose as a hydrophilic polymer in coating of mandarin[J]. Journal of Food Engineering, 2004, 62(3): 271−279.
[11] HAN J, SHIN S H, PARK K M, et al. Characterization of physical, mechanical, and antioxidant properties of soy protein-based bioplastic films containing carboxymethylcellulose and catechin[J]. Food Science and Biotechnology, 2015, 24(3): 939−945.
[12] 杨帅帅. 功能性明胶复合膜的制备及表征[D]. 西宁: 青海民族大学, 2018. [YANG S S. Preparation and characterization of functional gelatin composite films[D]. Xining: Qinghai Minzu University, 2018.]
[13] 梁宇雯. 纳米银/明胶抗菌膜制备及其性能研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2022. [LIANG Y W. Preparation of nano-silver/gelatin antibacterial film and properties[D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2022.]
[14] BAI H, XU J, LIAO P, et al. Mechanical and water barrier properties of soy protein isolate film incorporated with gelatin[J]. Journal of Plastic Film & Sheeting, 2012, 29(2): 174−188.
[15] 任雯琪. 高强度果胶基食品包装薄膜的制备及性能研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2023. [REN W Q. Preparation and performance of high-strength pectin-based food packaging film[D]. Xi'an: Shaanxi University of Science and Technology, 2023.]
[16] 黄晟. 果胶修饰鱼明胶制备高性能亲水胶体及其应用研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2022. [HUANG S. Pectin-modified fish gelatin to prepare high-performance hydrophilic colloids and its application[D]. Nanchang: Nanchang University, 2022.]
[17] AMADO L R, SILVA K D S, MAURO M A. Effects of interactions between soy protein isolate and pectin on properties of soy protein-based films[J]. Journal of Applied Polymer Science, 2019, 137(21): 48732.
[18] MOSTAFAVI F S, ZAEIM D. Agar-based edible films for food packaging applications-A review[J]. International Journal of Biological Macromolecule, 2020, 159: 1165−1176.
[19] 王文娇. 淀粉/琼脂-花青素 pH 响应型包装膜的制备及其性能研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2023. [WANG W J. Preparation and properties of starch/agar-anthocyanin pH responsive packaging films[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2023.]
[20] TIAN H, XU G, YANG B, et al. Microstructure and mechanical properties of soy protein/agar blend films: Effect of composition and processing methods[J]. Journal of Food Engineering, 2011, 107(1): 21−26.
[21] LIU Y, QIN Y, BAI R, et al. Preparation of pH-sensitive and antioxidant packaging films based on kappa-carrageenan and mulberry polyphenolic extract[J]. International Journal of Biological Macromolecule, 2019, 134: 993−1001.
[22] RACHTANAPUN P, KLUNKLIN W, JANTRAWUT P, et al. Characterization of chitosan film incorporated with curcumin extract[J]. Polymers, 2021, 13(6): 963.
[23] CHEN H Z, ZHANG M, BHANDARI B, et al. Novel pH-sensitive films containing curcumin and anthocyanins to monitor fish freshness[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 100: 105438.
[24] LI N, YANG X, LIN D. Development of bacterial cellulose nanofibers/konjac glucomannan-based intelligent films loaded with curcumin for the fresh-keeping and freshness monitoring of fresh beef[J]. Food Packaging and Shelf Life, 2022, 34: 100989.
[25] ZHOU S, LI N, PENG H, et al. The development of highly pH-sensitive bacterial cellulose nanofibers/gelatin-based intelligent films loaded with anthocyanin/curcumin for the fresh-keeping and freshness detection of fresh pork[J]. Foods, 2023, 12(20): 3719.
[26] YONG H, WANG X, BAI R, et al. Development of antioxidant and intelligent pH-sensing packaging films by incorporating purple-fleshed sweet potato extract into chitosan matrix[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 90: 216−224.
[27] LIU Z, LIN D, LOPEZ S P, et al. Characterizations of bacterial cellulose nanofibers reinforced edible films based on konjac glucomannan[J]. International Journal of Biological Macromolecule, 2020, 145: 634−645.
[28] RIAHI Z, PRIYADARSHI R, RHIM J W, et al. Gelatin-based functional films integrated with grapefruit seed extract and TiO_2 for active food packaging applications[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 112: 106314.
[29] SALARBASHI D, TAFAGHODI M, BAZZAZ B S F, et al. pH-sensitive soluble soybean polysaccharide/SiO_2 incorporated with curcumin for intelligent packaging applications[J]. Food Science & Nutrition, 2021, 9(4): 2169−2179.
[30] VICENTINI N M, DUPUY N D, LEITZELMAN M, et al. Prediction of cassava starch edible film properties by chemometric analysis of infrared spectra[J]. Spectroscopy Letters, 2005, 38(6): 749−767.
[31] HUANG J, LIU J, CHEN M, et al. Immobilization of roselle anthocyanins into polyvinyl alcohol/hydroxypropyl methylcellulose film matrix: Study on the interaction behavior and mechanism for better shrimp freshness monitoring[J]. International Journal of Biological Macromolecule, 2021, 184: 666−677.
[32] GALUS S, LENART A. Development and characterization of composite edible films based on sodium alginate and pectin[J]. Journal of Food Engineering, 2013, 115(4): 459−465.
[33] RAMBABU K, BHARATH G, BANAT F, et al. Mango leaf extract incorporated chitosan antioxidant film for active food packaging[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 126: 1234−1243.
[34] 彭勇, 李云飞, 项凯翔. 绿茶多酚提高壳聚糖包装膜的抗氧化性能[J]. 农业工程学报, 2013, 29(14): 269−276. [PENG Y, LI Y F, XIANG K X. Adding green tea polyphenols enhances antioxidant of chitosan film[J]. Journal of Agricultural Engineering, 2013, 29(14): 269−276.]
[35] YOSHIDA C M P, MACIEL V B V, MENDONÇA M E D, et al. Chitosan biobased and intelligent films: Monitoring pH variations[J]. LWT, 2014, 55(1): 83−89.
[36] 冯永莉. TG 酶交联大豆蛋白—明胶可食性膜的性质及机理研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2022. [FENG Y L. Properties and mechanism of transglutaminase-crosslinked soy protein isolate-gelatin edible film[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and

Technology, 2022. ］
［37］ CAO N, FU Y, HE J. Preparation and physical properties of soy protein isolate and gelatin composite films［J］. Food Hydrocolloids, 2007, 21(7): 1153−1162.
［38］ YE Q, HAN Y, ZHANG J, et al. Bio-based films with improved water resistance derived from soy protein isolate and stearic acid via bioconjugation［J］. Journal of Cleaner Production, 2019, 214: 125−131.
［39］ LI K K, YIN S W, YANG X Q, et al. Fabrication and characterization of novel antimicrobial films derived from thymol-loaded zein-sodium caseinate (SC) nanoparticles［J］. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(46): 11592−11600.
［40］ ZHAI X, SHI J, ZOU X, et al. Novel colorimetric films based on starch/polyvinyl alcohol incorporated with roselle anthocyanins for fish freshness monitoring［J］. Food Hydrocolloids, 2017, 69: 308−317.
［41］ WANG X J, ULLAH N, SUN X C, et al. Development and characterization of bacterial cellulose reinforced biocomposite films based on protein from buckwheat distiller's dried grains［J］. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 96: 353−360.
［42］ 周佳豪, 熊熊, 刘成国, 等. 纳米纤维素添加量及干燥温度对海藻酸钠可食用膜性能的影响［J］. 食品研究与开发, 2020, 41(20): 45−50. ［ZHOU J H, XIONG X, LIU C G, et al. Effect of the amount of nanocelluose and drying temperature on the properties of sodium alginate edible films［J］. Food Research and Development, 2020, 41(20): 45−50. ］
［43］ ZHENG T, YU X, PILLA S. Mechanical and moisture sensitivity of fully bio-based dialdehyde carboxymethyl cellulose crosslinked soy protein isolate films［J］. Carbohydrate Polymers, 2017, 157: 1333−1340.
［44］ SU J F, HUANG Z, YUAN X Y, et al. Structure and properties of carboxymethyl cellulose/soy protein isolate blend edible films crosslinked by Maillard reactions［J］. Carbohydrate Polymers, 2010, 79(1): 145−153.
［45］ GOUDARZI V, SHAHABI G I, BABAEI G A. Preparation of ecofriendly UV-protective food packaging material by starch/TiO_2 bio-nanocomposite: Characterization［J］. International Journal of Biological Macromolecule, 2017, 95: 306−313.
［46］ PERALTA J, BITENCOURT C C M, MACIEL V B V, et al. Aqueous hibiscus extract as a potential natural pH indicator incorporated in natural polymeric films［J］. Food Packaging and Shelf Life, 2019, 19: 47−55.
［47］ VILLALOBOS R, CHANONA J, HERNÁNDEZ P, et al. Gloss and transparency of hydroxypropyl methylcellulose films containing surfactants as affected by their microstructure［J］. Food Hydrocolloids, 2005, 19(1): 53−61.
［48］ OUN A A, RHIM J W. Characterization of carboxymethyl cellulose-based nanocomposite films reinforced with oxidized nanocellulose isolated using ammonium persulfate method［J］. Carbohydrate Polymers, 2017, 174: 484−492.
［49］ 阳晖. 仙草胶对可食性蛋白膜功能特性的影响及作用机理［D］. 广州: 华南农业大学, 2016. ［YANG H. Effects of hsian-tsao gum upon functional properties of edible protein-based films and their mechanism［D］. Guangzhou: South China Agricultural University, 2016. ］
［50］ ALIZADEH S M, TAVASSOLI M, MOHAMMADIAN E, et al. pH-responsive color indicator films based on methylcellulose/chitosan nanofiber and barberry anthocyanins for real-time monitoring of meat freshness［J］. International Journal of Biological Macromolecule, 2021, 166: 741−750.
［51］ 向飞, 夏玉婷, 肖满, 等. 纳米粒子对多糖基复合膜微观结构的影响研究进展［J］. 食品工业科技, 2021, 42: 358−363. ［XIANG F, XIA Y T, XIAO M, et al. Review of the influence of nanoparticles on the microstructure of polysaccharide based blend films［J］. Food Industry Science and Technology, 2021, 42: 358−363. ］
［52］ 李庆钊, 林柏泉, 赵长遂, 等. 基于傅里叶红外光谱的高温煤焦表面化学结构特性分析［J］. 中国电机工程学报, 2011, 31: 46−52. ［LI Q Z, LIN B Q, ZHAO C S, et al. Chemical structure analysis of coal char surface based on Fourier-transform infrared spectrometer［J］. Chinese Journal of Electrical Engineering, 2011, 31: 46−52. ］
［53］ 刘全娇. 鱼皮明胶—海藻酸钠复合膜的制备、性质和应用研究［D］. 合肥: 合肥工业大学, 2018. ［LIU Q J. Research on the preparation, properties and application of fish skin gelatin-sodium alginate composite films［D］. Hefei: Hefei University of Technology, 2018. ］
［54］ SUN X, WU Q, PICHA D H, et al. Comparative performance of bio-based coatings formulated with cellulose, chitin, and chitosan nanomaterials suitable for fruit preservation［J］. Carbohydrate Polymers, 2021, 259: 117764.
［55］ KHAMRAI M, BANERJEE S L, KUNDU P P. Modified bacterial cellulose based self-healable polyeloctrolyte film for wound dressing application［J］. Carbohydrate Polymers, 2017, 174: 580−590.
［56］ CHEN J, CHEN X, ZHU Q, et al. Determination of the domain structure of the 7S and 11S globulins from soy proteins by XRD and FTIR［J］. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2013, 93(7): 1687−1691.

李铃东, 陈军, 邓利珍, 等. 不同酶解路线大米蛋白肽的制备、表征及抗氧化活性 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 10−19. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023090011

LI Lingdong, CHEN Jun, DENG Lizhen, et al. Preparation, Characterization and Antioxidant Activity of Rice Protein Peptides with Different Enzymatic Hydrolysis Routes[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 10−19. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023090011

·研究与探讨·

不同酶解路线大米蛋白肽的制备、表征及抗氧化活性

李铃东[1], 陈　军[1,2,3], 邓利珍[1,2], 耿　勤[1], 李　俶[1,2], 刘成梅[1], 戴涛涛[1,2,*]

（1.食品科学与资源挖掘全国重点实验室, 南昌大学, 江西南昌 330047;
2.江西南大国创院食品科技有限公司, 江西南昌 330200;
3.江西恒顶食品有限公司, 江西宜春 331100）

摘　要: 为探究双酶不同酶解路线制得大米蛋白肽的性质差异，研究采用胰蛋白酶（A）和碱性蛋白酶（B）按不同酶解路线对大米蛋白进行酶解，制备了 5 种大米蛋白肽（A^1B^1、A^1B^2、A^2B^1、$A^{1*}B^2$、A^2B^{1*}），对其水解度、基本成分、氨基酸组成、微观结构、二级结构、分子量分布、风味和体外抗氧化活性等进行分析。结果表明，A^2B^1 组的蛋白含量最高达到 90.69%，肽含量高达 72.73%；各路线的水解度大于 17.60%，水解较为完全；微观结构均由不规则块状变为球体状，A^1B^2 组和 $A^{1*}B^2$ 组球体壁较厚，A^2B^1 组和 A^2B^{1*}组球体壁较薄，A^1B^1 组为球体碎片；各路线的必需氨基酸含量比大米蛋白低，A^1B^2 组必需氨基酸含量最高；二级结构以多种构象并存，各路线二级结构均以 β-转角为主，占二级结构的 44.62%~47.18%；各路线酶解产物多为低分子量的多肽，分子量低于 5 kDa 的多肽占 92.09%~93.71%；A^1B^2 样品鲜味最强，涩味最弱，A^2B^1 样品咸味和苦味最弱；相比于 A^1B^1 组、A^1B^2 组和 $A^{1*}B^2$ 组，A^2B^1 组和 A^2B^{1*}组的抗氧化活性更强。通过对双酶不同酶解路线大米蛋白肽的性质研究，综合基本成分、肽含量、氨基酸组成、风味和抗氧化活性评价，A^2B^1 组的品质最佳。

关键词: 大米蛋白肽, 双酶, 不同酶解路线, 表征, 抗氧化活性

中图分类号: TS201.2　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2024)21−0010−10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023090011

本文网刊:

Preparation, Characterization and Antioxidant Activity of Rice Protein Peptides with Different Enzymatic Hydrolysis Routes

LI Lingdong[1], CHEN Jun[1,2,3], DENG Lizhen[1,2], GENG Qin[1], LI Ti[1,2], LIU Chengmei[1], DAI Taotao[1,2,*]

（1.State Key Laboratory of Food Science and Resources, Nanchang University, Nanchang 330047, China;
2.International Institute of Food Innovation Co., Ltd., Nanchang University, Nanchang 330200, China;
3.Jiangxi Hengding Food Co., Ltd., Yichun 331100, China）

Abstract: In order to explore the properties differences of rice protein peptides prepared using different enzymatic hydrolysis routes of double enzymes, rice protein was enzymatically hydrolyzed by trypsin (A) and alkaline protease (B) according to different enzymatic hydrolysis routes to obtain five rice protein peptides (A^1B^1, A^1B^2, A^2B^1, $A^{1*}B^2$, A^2B^{1*}). The properties of protein peptides including the hydrolysis, basic components, amino acid composition, microstructure, secondary structure, molecular weight distribution, flavor and antioxidant activity *in vitro* were analyzed. The results indicated that the protein content of A^2B^1 group was the highest, reaching 90.69% and the peptide content was 72.73%. The hydrolysis degree of five rice protein peptides was greater than 17.60%, the degree of hydrolysis was relatively high, and

收稿日期: 2023−09−05

基金项目: 国家自然科学基金青年基金（32101948）。

作者简介: 李铃东（1998−）, 男, 硕士研究生, 研究方向: 植物蛋白开发与利用, E-mail: lingdong0510@163.com。

*** 通信作者:** 戴涛涛（1991−）, 男, 博士, 讲师, 研究方向: 农副产品综合利用, E-mail: ncubamboo@163.com。

the microstructure changed from irregular block to sphere. The A^1B^2 group and $A^{1*}B^2$ group had thicker spheroid walls, A^2B^1 group and A^2B^{1*} group had thinner spheroid walls, and A^1B^1 group was spheroid fragments. The essential amino acid content of five rice protein peptides was lower than that of rice protein, and the A^1B^2 group had the highest essential amino acid content. The secondary structure coexisted with a variety of conformations, and the secondary structures of five rice protein peptides were mainly β-turn, and it accounted for 44.62%~47.18%. Most of the enzymatic hydrolysates of five rice protein peptides were polypeptides with low molecular weight, and the polypeptides with molecular weight less than 5 kDa accounted for 92.09%~93.71%. A^1B^2 samples had the strongest umami and the weakest astringency, and A^2B^1 samples had the weakest saltiness and bitterness. Compared with A^1B^1, A^1B^2 and $A^{1*}B^2$, A^2B^1 and A^2B^{1*} groups had stronger antioxidant activity. Taking together, the quality of A^2B^1 group was the best based on the evaluation of basic components, peptide content, amino acid composition, flavor and antioxidant activity.

Key words: rice protein peptide; double enzyme; different enzymatic hydrolysis routes; characterization; antioxidant activity

中国是世界上稻谷产量最丰富的国家，据国家统计局统计，中国 2022 年稻谷产量高达 2.085 亿吨。大米蛋白(rice protein, RP)是稻谷中第二丰富的成分，约占稻谷质量的 8%。作为公认优质营养的植物蛋白，RP 具有高消化率、高生物价、低过敏性和合理的氨基酸配比等优点[1−2]，营养价值远高于其他谷类植物蛋白[3]，可以与动物蛋白相媲美[4]。因此，RP 是一种极具开发价值的植物蛋白资源，具有广阔的应用前景。蛋白肽作为蛋白的高附加值产品，不仅营养价值高，易被人体消化吸收，而且还具有抗氧化、降血压、降血糖、降血脂、降胆固醇和免疫调节等多种生物活性[5]。所以将优质营养的 RP 制备成高附加值产品大米蛋白肽具有重大研究意义和发展前景。

将蛋白转化为肽的方法主要有微生物发酵法、水解法和酶法。其中微生物发酵法存在发酵时间长和易受微生物感染等安全性问题；酸碱水解法不仅反应难以控制，而且会产生致癌性和毒性物质，破坏氨基酸，造成营养损失；而酶法没有上述缺点，同时具有安全性高、反应条件温和、重复性好和成本低等特点[6]。因此，酶法是制备蛋白肽的常用方法。目前，许多科研学者对酶水解 RP 制备大米蛋白肽的工艺和大米蛋白肽的生物活性开展了大量研究，发现大米蛋白肽具有更好的溶解性、乳化性和起泡性等功能特性[7−8]，以及良好的抗氧化、降血压和抗疲劳等生物活性[9−11]。且现有研究表明，双酶水解法比单酶水解法效率高、效果好[12−13]，不过双酶水解法不同的酶解路线制备的蛋白肽的性质会有所差异[14−15]。然而双酶不同酶解路线制备的大米蛋白肽的性质差异研究尚未见报道。

因此，本研究以 RP 为原料，经双酶不同酶解路线酶解制得大米蛋白肽，对其水解度、基本成分、肽含量、氨基酸组成、微观结构、二级结构、分子量分布、电子舌、体外抗氧化活性等进行分析，以明晰双酶不同酶解路线制备的大米蛋白肽的组成、结构和抗氧化活性差异。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

大米蛋白(蛋白含量≥85%)　江西恒顶食品有限公司；胰蛋白酶(A)(200 U/mg)　合肥博美生物科技有限公司；碱性蛋白酶(B)(200 U/mg)　宁夏夏盛实业集团有限公司；0.1 mol/L 盐酸标准液、0.1 mol/L 氢氧化钠标准液、1-苯胺-8-萘磺酸(ANS)　Sigma 试剂有限公司；DPPH(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼)、$FeCl_3$、三氯乙酸　上海阿拉丁生化科技股份有限公司；高效凯氏定氮催化剂片　郑州和顺电子科技有限公司；其他试剂　分析纯，均购自上海麦克林生化有限公司。

K9860 全自动凯氏定氮仪　济南海能未来技术有限公司；PAL-1 数字折光仪　日本爱拓；916 型恒定 pH 电位滴定仪　瑞士 Metrohm 仪器公司；DELTA 320 pH 计　上海梅特勒-托利多仪器有限公司；HH-6 数显恒温水浴锅　常州聚辉仪器制造有限公司；L-8900 全自动氨基酸分析仪　日本日立公司；TU-1901 紫外分光光度计　北京普析通用仪器有限责任公司；F-7000 荧光分光光度计　日本 Hitachi 公司；Quanta200F 场发射扫描电子显微镜　德国卡塞尔公司；GPC-20A 凝胶渗透色谱仪　日本岛津公司；Nicolet-5700 傅里叶变换红外光谱仪　美国 Thermo 公司；MDRP-5 离心式喷雾干燥塔　无锡现代喷雾干燥设备有限公司；SA402B 电子舌　日本 INSENT 公司。

1.2　实验方法

1.2.1　大米蛋白肽的制备　以 RP 为原料，用纯净水配制 10%(m/m)浓度的 RP 溶液，电动搅拌器搅拌分散均匀，55 ℃ 水浴搅拌 30 min，然后根据不同酶解路线酶的加入顺序将胰蛋白酶(A)和碱性蛋白酶(B)加入 RP 溶液中。根据前期预实验结果，确定了双酶不同酶解路线的酶解条件，各路线酶解过程中控制双酶的总添加量(2%)、添加比例(A 酶:B 酶=2:1)和酶解温度(55 ℃)不变，不同酶解路线大米蛋白肽的具体制备方法如下：

A^1B^1 组：调节 pH 至 8.0，添加 2% 的组合酶，酶

解反应 5 h。

A^1B^2 组：调节 pH 至 8.0，添加 1.33% 的 A 酶，酶解反应 4 h；再将 pH 调至 8.5，加入 0.67% 的 B 酶，酶解反应 1 h。

A^2B^1 组：调节 pH 至 8.5，添加 0.67% 的 B 酶，酶解反应 1 h；再将 pH 调至 8.0，加入 1.33% 的 A 酶，酶解反应 4 h。

$A^{1*}B^2$ 组：调节 pH 至 8.0，添加 1.33% 的 A 酶，酶解反应 4 h；将温度迅速升至 95 ℃，灭酶 10 min，立刻冷却至 55 ℃，再调节 pH 至 8.5，加入 0.67% 的 B 酶，酶解反应 1 h。

A^2B^{1*}组：调节 pH 至 8.5，添加 0.67% 的 B 酶，酶解反应 1 h；将温度迅速升至 95 ℃，灭酶 10 min，立刻冷却至 55 ℃，再调节 pH 至 8.0，加入 1.33% 的 A 酶，酶解反应 4 h。

各组酶解反应完成后，先进行灭酶处理（95 ℃水浴 10 min），然后离心（4800 r/min、20 min），取上清液喷雾干燥成粉，制得不同酶解路线大米蛋白肽。

1.2.2 蛋白回收率的测定 参照 GB 5009.5-2016，采用凯氏定氮法分别测定 RP 和制备的蛋白酶解上清液中总蛋白质质量，按公式（1）计算蛋白回收率。

$$蛋白回收率(\%)=\frac{A_0}{A}\times 100 \qquad 式（1）$$

式中：A_0 为 RP 酶解上清液中总蛋白质质量，g；A 为 RP 中总蛋白质质量，g。

1.2.3 水解度的测定 采用甲醛滴定法测定蛋白水解度[16]，取蛋白酶解上清液 5 mL 于烧杯中，加入 60 mL 蒸馏水，用 0.1 mol/L NaOH 标准溶液滴定至 pH8.2，加入 20 mL 甲醛溶液（pH8.2），记录将其 pH 滴至 9.2 时所消耗的 NaOH 标准溶液的体积，用蒸馏水做空白对照，按公式（2）计算蛋白水解度。

$$DH(\%)=\frac{C\times(V_1-V_2)\times V}{5\times M\times N\times h_{tot}}\times 100 \qquad 式（2）$$

式中：DH 为蛋白水解度，%；C 为氢氧化钠标准溶液浓度，0.1 mol/L；V_1 为样品溶液滴定所消耗的 NaOH 标准溶液的体积，mL；V_2 为空白溶液滴定所消耗的 NaOH 标准溶液的体积，mL；V 为酶解上清液的总体积，mL；5 为取样体积，mL；M 为样品质量，g；N 为原料中蛋白质含量，%；h_{tot} 为每克底物蛋白质肽键的毫摩尔数，这通常是一个经验值，RP 的 h_{tot} 值为 7.40 mmol/g[17]。

1.2.4 基本成分 根据 GB 5009.3-2016 的直接干燥法测定水分含量；根据 GB 5009.4-2016 的第一法（食品中总灰分的测定）测定灰分含量；根据 GB 5009.5-2016 的凯氏定氮法测定蛋白质含量；根据 GB 5009.6-2016 的索氏抽提法测定脂肪含量。

1.2.5 溶解性的测定 称取 1.000 g 样品溶于 20 mL PBS 溶液（10 mmol/L）中，调整溶液 pH 至 7.0，室温搅拌 30 min 后离心（4800 r/min、20 min），取上清液待用。使用凯氏定氮仪测定上清液中蛋白的含量。蛋白的溶解性采用氮溶指数（NSI）表示，按公式（3）进行计算[18]。

$$NSI(\%)=\frac{m_1}{m_0}\times 100 \qquad 式（3）$$

式中：NSI 为氮溶指数，%；m_0 为样品中蛋白质质量，g；m_1 为上清液中蛋白质质量，g。

1.2.6 微观结构的测定 取少量样品于双面导电胶上，除去多余样品，使其均匀分布、呈现稀薄一层，用离子溅射仪在样品上喷金 1 min，形成导电层，然后置于电子扫描显微镜中观察样品的形貌，在加速电压为 5.0 kV 的条件下，在 500 倍和 1000 倍的放大倍数下对样品进行拍照观察[19]。

1.2.7 可溶性固形物含量的测定 使用数字折光仪测定蛋白酶解液的可溶性固形物含量。

1.2.8 肽含量的测定 参照胡武瑶等[20] 的方法做适当调整。准确称取 0.5 g 样品，加入 10 mL 15% 三氯乙酸（TCA）溶液，混匀静置以沉淀其中的蛋白质，4000 r/min 离心 10 min，收集上清液备用，采用凯氏定氮法测定上清液中蛋白质含量。检验结果根据样品的干燥失重，折算成干基，即为酸溶蛋白的含量。

称取 0.02~0.03 g 样品，精确至 0.0001 g，采用 3.5% 磺基水杨酸溶液将样品溶解均匀。随后将样品溶液转移至 50 mL 容量瓶中，并采用蒸馏水定容。将样品溶液离心（4000 r/min，5 min），取上清液过 0.45 μm 滤膜，将滤液转移至 50 mL 容量瓶中，采用蒸馏水定容，并摇匀。然后按照 GB/T 5009.124-2016 规定的方法，采用全自动氨基酸分析仪测定样品中游离氨基酸的含量。

肽含量按公式（4）进行计算[20]。

$$肽含量(\%)=A_1-A_2 \qquad 式（4）$$

式中：A_1 为样品中酸溶蛋白的含量，%；A_2 为样品中游离氨基酸的含量，%。

1.2.9 氨基酸组成的测定 根据 Xie 等[21] 的方法对样品氨基酸组成进行分析。将 1.0 g 样品、10 mL 盐酸溶液（6 mol/L）和 1.0 g 苯酚加入密封管中，氮气处理 15 min，封口。在 110 ℃ 的电热鼓风恒温箱内水解 24 h，取出冷却至室温。打开密封管，将水解后的样品转移到一个 50 mL 的容量瓶中，采用蒸馏水定容，经滤纸过滤。取 1.0 mL 过滤后的样品，在 60 ℃ 水浴中蒸发至干燥，然后用 3~5 mL 盐酸溶液（0.02 mol/L）稀释干燥样品。稀释后的样品用 0.22 μm 滤膜过滤，然后使用全自动氨基酸分析仪进行分析。

1.2.10 表面疏水性的测定 根据 Yang 等[10] 的方法稍作修改，以 8-苯胺基-1-奈磺酸（ANS）为荧光探针，采用日立 F7000 荧光光谱仪进行分析。将样品溶于 PBS 溶液（10 mmol/L）中配制成浓度在 0.05~2.00 mg/mL 的溶液。取 3 mL 样品，向其中加入 20 μL ANS 溶液（8 mmol/L）后进行测定。激发波长

为 390 nm，发射波长为 400~600 nm，激发狭缝 5.0 nm，发射狭缝 5.0 nm。以最大荧光强度为纵坐标，蛋白浓度（mg/mL）为横坐标绘图，初始斜率即为蛋白质的表面疏水性。

1.2.11　内源荧光光谱的测定　根据黄金梅[22]的方法，采用日立 F7000 荧光光谱仪对蛋白内源荧光进行分析。将样品溶于 PBS 溶液（10 mmol/L）配制成浓度为 0.1 mg/mL 的溶液进行测量。荧光的关键参数为：激发波长 290 nm，发射波长 300~500 nm。

1.2.12　二级结构的测定　称取约 1 mg 样品和 140 mg 干燥的溴化钾置于玛瑙研钵中混合研磨均匀，放入锭剂成型器中，加压处理得到一定直径及厚度的透明薄片，采用傅里叶红外光谱仪测定波数范围 4000~400 cm^{-1} 内的吸收光谱，分辨率 4 cm^{-1}，扫描次数 32 次。红外吸收曲线用 OMNIC 8.0 和 PeakFitv 4.12 软件进行分析[9]。

1.2.13　分子量分布的测定　根据 Liu 等[23]描述的方法进行适当修改，通过使用凝胶色谱系统（GPC）、TSK gel GMPWXL 水相凝胶色谱柱（柱温 35 ℃）、RID-20 示差折光检测器来分析蛋白质的分子量分布，标准样品采用窄分步聚乙二醇（PEO）。首先将蛋白溶解在 0.2 mol/L $NaNO_3$（含 0.05%NaN_3）的流动相中，充分水化，蛋白浓度稀释至 10 mg/mL 左右，过 0.45 μm 的滤膜，以 0.6 mL/min 的恒定流速洗脱滤液。

1.2.14　电子舌分析　采用电子舌智能味觉分析系统，客观评价样品的苦味、咸味、鲜味和涩味[24]。分别称取 0.5 g 样品，用 30 mL 去离子水充分溶解后转移到容量瓶定容到 100 mL，定容后样品为电子舌待测液。数据采集前，对电子舌进行传感器活化，Sensor check 自检等操作，确保传感器的稳定性和检测数据的可靠性与稳定性。将 100 mL 待测液置于电子舌专用容器中，选择合适的传感器和测试模式。每个样品测定 4 次后，选取 3 次稳定的电子舌响应值进行后续分析。电子舌参数：检测温度 25 ℃，pH 在 2 至 8 之间，检测时间 30 s。

1.2.15　抗氧化活性的测定

1.2.15.1　DPPH 自由基清除能力的测定　根据赵佳佳[25]的方法测定样品的 DPPH 自由基清除率，并稍作修改。取 1 mL 不同浓度的样品溶液加入到 3 mL DPPH 溶液（50 μg/mL，用 95% 乙醇配制）中，涡旋振荡 5 s，室温下避光静置 30 min，在 517 nm 下测定样品体系吸光度值。以谷胱甘肽做阳性对照，样品对 DPPH 自由基的清除率按公式（5）计算。

$$\text{DPPH自由基清除率}(\%)=\left(1-\frac{A_1-A_2}{A_3}\right)\times 100 \quad \text{式（5）}$$

式中：A_1 为样品溶液与 DPPH 溶液体系的吸光度值；A_2 为样品溶液与 95% 乙醇体系的吸光度值；A_3 为水与 DPPH 溶液体系的吸光度值。

1.2.15.2　还原能力的测定　根据卢知浩等[26]的方法测定样品的还原能力。取 1 mL 不同浓度的样品溶液，依次加入 2.5 mL 0.2 mol/L PBS 溶液（pH6.6）和 2.5 mL 1% 铁氰化钾溶液混匀，50 ℃ 下反应 20 min，冰水浴冷却加入 2.5 mL 10% 三氯乙酸溶液，静置沉淀 10 min。取上清液 2.5 mL，加入 0.5 mL 0.1% 三氯化铁溶液和 2.5 mL 去离子水混匀，50 ℃ 下水浴 10 min，以蒸馏水调零并在 700 nm 下测定吸光度。以蒸馏水作空白对照，谷胱甘肽作阳性对照。

1.3　数据处理

所有试验平行进行 3 次，试验结果以平均值±标准差表示。利用 IBM SPSS Statistics 25 和 Origin 2021 进行数据分析和图表绘制。

2　结果与分析

2.1　蛋白的回收率和水解度

由图 1 可知，酶解路线不同，制备的大米蛋白肽的蛋白回收率和水解度不同，不同酶解路线的蛋白回收率与水解度呈正相关，水解度越大，蛋白回收率越高，此结果与高瑞[27]的研究一致。蛋白回收率和水解度从大到小依次为 $A^1B^2 > A^2B^1 > A^{1*}B^2 > A^2B^{1*} > A^1B^1$。$A^1B^2$ 组蛋白回收率和水解度最高，分别为 71.50% 和 20.85%；A^1B^1 组蛋白回收率和水解度最低，分别为 56.32% 和 17.60%。A^1B^2 组和 A^2B^1 组的蛋白回收率和水解度高于 $A^{1*}B^2$ 组和 A^2B^{1*}组，这可能是因为 A^1B^2 组和 A^2B^1 组酶解过程中无灭酶操作，使得第一种酶仍能在加入第二种酶后的酶解阶段起作用，促使 RP 被水解得更为彻底。A^1B^2 组和 $A^{1*}B^2$ 组的蛋白回收率和水解度分别高于 A^2B^1 组和 A^2B^{1*}组，这可能是 RP 在酶解之初裸露的 A 酶作用位点比 B 酶多，RP 经 A 酶先作用后，暴露出更多有利于 B 酶的作用位点。A^1B^1 组蛋白回收率和水解度最低，这可能是由于两种酶同时存在造成酶之间相互限制，例如竞争同一作用位点或者两种酶的作用位点靠近时由于空间位阻使得一种酶不能及时发挥作用，导致两种酶均不能充分发挥作用。夏易玄[24]

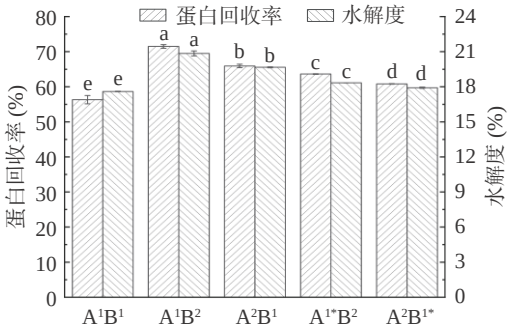


图 1　不同酶解路线大米蛋白肽的蛋白回收率和水解度

Fig.1　Protein recovery and hydrolysis of rice protein peptides with different enzymatic hydrolysis routes

注：不同小写字母表示同一指标不同数据间差异显著（$P<0.05$）；图 2、图 4、图 7 同。

的研究也显示双酶分步酶解的蛋白回收率比双酶同步酶解高。从生产经济上考虑，A^1B^2 组工艺最佳，其次为 A^2B^1 组。

2.2 基本成分

由表 1 可知，不同酶解路线大米蛋白肽的基本成分不同。RP 经酶解后蛋白质和脂肪含量基本降低，水分和灰分含量增加。蛋白质含量是评判大米蛋白肽品质的重要指标，蛋白质含量越高，大米蛋白肽品质越好[20]。以蛋白质含量为指标来评价，A^2B^1 组品质最佳，蛋白质含量高达 90.69%。A^1B^2 组和 $A^{1*}B^2$ 组蛋白质含量显著低于其他组($P<0.05$)，灰分含量高于 6%，这可能是因为在第一酶解阶段，A 酶比 B 酶更易作用于 RP，使得溶液的 pH 下降幅度更大，而为了达到第二酶解阶段酶的作用 pH，加入的酸碱溶液差值大于第一阶段，也就是说 A^1B^2 组和 $A^{1*}B^2$ 组在酶解过程中加入了更多的酸碱溶液，使得大米蛋白肽中灰分含量上升，同时导致蛋白含量下降。

表 1 RP 及不同酶解路线大米蛋白肽的基本成分

Table 1 Basic components of rice protein and rice protein peptides with different enzymatic hydrolysis routes

样品	成分(%)			
	蛋白质(以干基计)	水分	灰分	脂肪
RP	89.80±0.27^a	4.05±0.05^f	2.24±0.06^f	0.79±0.08^a
A^1B^1	87.10±1.04^b	5.91±0.02^e	2.80±0.08^e	0.12±0.02^{bc}
A^1B^2	80.67±0.26^c	6.07±0.04^d	7.95±0.10^b	0.06±0.01^c
A^2B^1	90.69±0.68^a	7.59±0.02^a	3.15±0.01^d	0.16±0.03^{bc}
$A^{1*}B^2$	78.54±0.27^d	6.95±0.05^b	8.83±0.16^a	0.14±0.01^{bc}
A^2B^{1*}	88.44±0.52^b	6.73±0.05^c	3.50±0.05^c	0.13±0.02^{bc}

注：表中数据为平均值±标准差，同一列不同小写字母表示数据间具有显著性($P<0.05$)；表2、表4同。

2.3 溶解性

蛋白的溶解性在食品加工中具有重要意义，溶解性的好坏影响着蛋白质的其他功能性质，如凝胶性、起泡性和乳化性等[28]。由图 2 可知，未经酶解的 RP 的氮溶指数极低(约 1%)，溶解性很差，这正是其多种功能性质较差的主要原因。经酶水解后，大米蛋白肽的氮溶指数明显增加，不同酶解路线大米蛋白肽的氮溶指数均在 95% 左右，各组之间无显著性差异($P>0.05$)。这一结果说明各路线的水解程度较高，RP 水解比较彻底，水解得到的肽段均能较好地溶于水中，继续酶解只是作用于原本能溶的肽段生成也能溶解的小肽，溶解性并不会增加。由此可知，当蛋白水解程度较高时，酶解路线的不同不会对大米蛋白肽的溶解性造成影响。

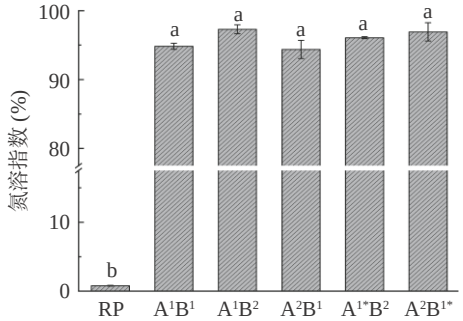


图 2 RP 及不同酶解路线大米蛋白肽的溶解性

Fig.2 Solubility of rice protein and rice protein peptides with different enzymatic hydrolysis routes

2.4 微观结构

由图 3 可知，RP 为不规则块状，且颗粒大小差别较大，经酶水解后，不规则块状的 RP 变为了球体状的大米蛋白肽，颗粒体积显著减小，且大小分布也更为均一。不同酶解路线大米蛋白肽的微观形貌与 RP 截然不同，这可能是因为加工方式不同所致，RP 为气流干燥后粉碎所得，不同酶解路线大米蛋白肽为喷雾干燥所得。A^1B^2 组和 $A^{1*}B^2$ 组球体壁较厚，A^2B^1 组和 A^2B^{1*}组球体壁较薄，而 A^1B^1 组基本为碎片和破碎球，颗粒大小最为均一，这可能是因为喷雾前各路线酶解溶液的固形物含量不同所致，固形物含量越高，粉体比重越大，体现在微观形貌上即为球体壁越厚，A^1B^1、A^1B^2、A^2B^1、$A^{1*}B^2$ 和 A^2B^{1*} 酶解溶液的固形物含量依次为 7.9%、9.8%、8.7%、9.2% 和 8.7%。由此可知，A^1B^2 组和 $A^{1*}B^2$ 组的粉体性质更好，A^2B^1 组和 A^2B^{1*}组其次，A^1B^1 组最差。此外，蛋白分子变小，会使得蛋白分子与水分子接触位点变多，有利于蛋白在溶液中溶解，导致溶解性增加[29]。此结论与溶解性的结果相符合。

2.5 肽含量

肽含量是评价大米蛋白肽品质的关键指标，肽

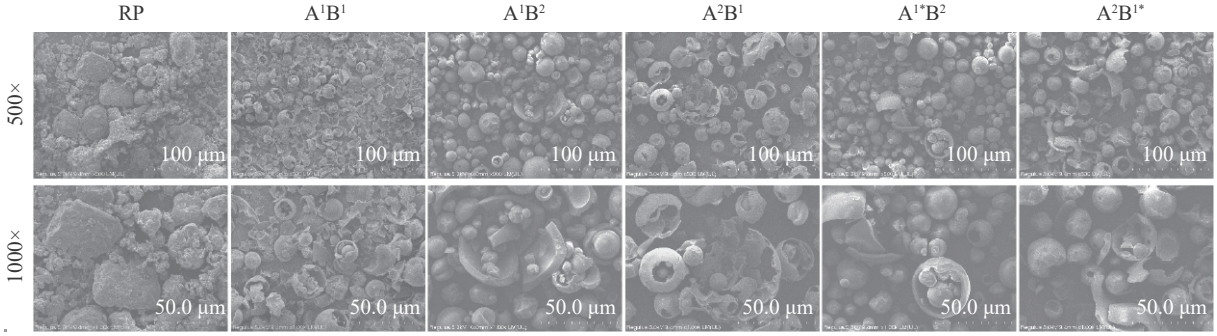


图 3 RP 及不同酶解路线大米蛋白肽的微观结构

Fig.3 Microstructure of rice protein and rice protein peptides with different enzymatic hydrolysis routes

含量越高，大米蛋白肽品质越好[20]。由表 2 可知，不同的酶解路线会影响大米蛋白肽的品质。肽含量结果表明，不同酶解路线大米蛋白肽的肽含量在 70%左右。以肽含量为指标来评价，A^2B^1 组品质最佳，肽含量高达 72.73%，其次为 A^2B^{1*}组和 A^1B^1 组。通过对比表 1 蛋白质含量可知，各路线大米蛋白肽的酸溶蛋白超过总蛋白的 93.57%，这说明 RP 经酶水解后多为小分子酸溶性肽。因为大分子蛋白在酸性条件下易沉淀，而小分子蛋白水解物易溶于酸性溶液[30]。游离氨基酸结果表明，不同酶解路线大米蛋白肽的游离氨基酸含量在 10.55%~14.35% 之间，而 RP 中几乎没有游离氨基酸(0.011%)存在，这说明 RP 经酶水解产生了大量游离氨基酸。

表 2　不同酶解路线大米蛋白肽的肽含量

Table 2　Peptide content of rice protein peptides with different enzymatic hydrolysis routes

样品	含量(%)		
	酸溶蛋白	游离氨基酸	肽含量
A^1B^1	84.16±0.94^a	14.35±2.18^a	69.81±1.24^{ab}
A^1B^2	79.37±0.20^b	11.31±1.70^a	68.06±1.49^b
A^2B^1	84.86±0.52^a	12.13±2.06^a	72.73±1.54^a
$A^{1*}B^2$	77.74±0.84^b	10.55±1.71^a	67.19±0.88^b
A^2B^{1*}	83.57±0.39^a	12.82±2.02^a	70.76±1.63^{ab}

2.6　氨基酸组成

由表 3 可知，RP 和不同酶解路线大米蛋白肽具有相似的氨基酸组成和含量，其中天冬氨酸、谷氨酸和精氨酸含量较高，占总氨基酸含量的 35.44%~38.35%，是 RP 和不同酶解路线大米蛋白肽的主要氨基酸。不同酶解路线的必需氨基酸含量比 RP 低，A^1B^2 组必需氨基酸含量为 32.03%，营养价值最高，其次为 A^2B^{1*}组、A^2B^1 组和 $A^{1*}B^2$ 组。限制性氨基酸(赖氨酸)含量增加，更接近于婴儿配方食品中赖氨酸的推荐值(395 mg/g N)，使其有望成为婴幼儿食品中的蛋白替代物。不同酶解路线的疏水性氨基酸含量有所降低，降幅在 4.8%~9.6% 之间。有研究表明，肽的抗氧化活性与疏水氨基酸含量有关，疏水性氨基酸含量越高，抗氧化能力越强[31]。

2.7　表面疏水性

由图 4 可知，不同酶解路线大米蛋白肽的表面疏水性比 RP 低，A^1B^1 组表面疏水性最低，其次为 A^2B^1 组。结合图 1 可知，不同酶解路线的表面疏水性随先水解度的增加而增加，这可能是随着水解度的增加，蛋白结构被逐渐展开，疏水基团逐渐暴露。但当水解度达到一定程度后，表面疏水性随水解度的增

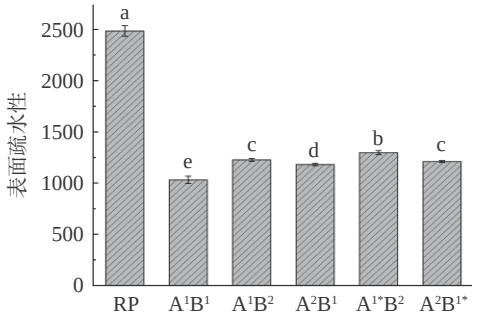


图 4　RP 及不同酶解路线大米蛋白肽的表面疏水性

Fig.4　Surface hydrophobicity of rice protein and rice protein peptides with different enzymatic hydrolysis routes

表 3　RP 及不同酶解路线大米蛋白肽的氨基酸组成

Table 3　Amino acid composition of rice protein and rice protein peptides with different enzymatic hydrolysis routes

氨基酸	含量(g/100 g蛋白)					
	RP	A^1B^1	A^1B^2	A^2B^1	$A^{1*}B^2$	A^2B^{1*}
Asp(天冬氨酸)	8.81±0.02^d	10.48±0.07^a	9.94±0.02^c	10.44±0.09^a	10.26±0.05^b	10.27±0.03^b
Thr(苏氨酸)	3.55±0.08^a	3.62±0.04^a	3.63±0.10^a	3.68±0.04^a	3.61±0.06^a	3.69±0.10^a
Ser(丝氨酸)	5.01±0.05^b	5.19±0.06^a	5.06±0.07^{ab}	5.18±0.11^{ab}	5.13±0.12^{ab}	5.20±0.03^a
Glu(谷氨酸)	18.29±0.01^e	18.56±0.02^c	18.47±0.02^d	19.29±0.06^a	19.00±0.10^b	19.14±0.14^{ab}
Gly(甘氨酸)	4.34±0.03^c	5.25±0.04^a	4.92±0.06^b	5.31±0.04^a	5.30±0.02^a	5.27±0.07^a
Ala(丙胺酸)	5.58±0.03^b	5.80±0.06^a	5.66±0.05^b	5.86±0.08^a	5.81±0.03^a	5.88±0.09^a
Cys(半胱氨酸)	3.75±0.07^a	2.92±0.07^c	3.17±0.06^{bc}	3.25±0.05^b	3.29±0.04^b	3.10±0.11^{bc}
Val(缬氨酸)	6.05±0.04^c	6.23±0.03^b	6.28±0.05^{ab}	6.36±0.04^a	6.22±0.05^b	6.36±0.02^a
Met(蛋氨酸)	2.33±0.12^a	1.63±0.10^{bc}	1.80±0.03^b	1.76±0.09^b	1.70±0.05^{bc}	1.82±0.06^b
Ile(异亮氨酸)	4.27±0.07^{ab}	4.20±0.03^b	4.35±0.08^a	4.41±0.08^a	4.31±0.07^a	4.32±0.05^a
Leu(亮氨酸)	8.22±0.01^a	6.97±0.05^c	7.45±0.05^b	7.06±0.05^c	7.10±0.05^c	7.12±0.09^c
Tyr(酪氨酸)	5.88±0.01^a	4.49±0.09^c	4.92±0.09^b	4.32±0.08^d	4.46±0.06^c	4.47±0.02^c
Phe(苯丙氨酸)	5.89±0.07^a	4.45±0.04^d	5.02±0.03^b	4.57±0.07^d	4.77±0.08^c	4.59±0.11^{cd}
Lys(赖氨酸)	2.85±0.09^c	3.72±0.07^a	3.48±0.04^b	3.59±0.03^a	3.67±0.09^a	3.56±0.07^a
His(组氨酸)	2.24±0.02^a	2.25±0.02^a	2.26±0.04^a	2.29±0.03^a	2.28±0.02^a	2.32±0.09^a
Arg(精氨酸)	8.34±0.02^c	9.31±0.02^a	8.72±0.06^b	7.46±0.10^f	8.02±0.06^d	7.78±0.07^e
Pro(脯氨酸)	4.60±0.02^c	4.94±0.02^b	4.86±0.07^b	5.18±0.08^a	5.08±0.02^a	5.11±0.05^a
必需氨基酸(%)	33.17±0.07^a	30.81±0.05^d	32.03±0.05^b	31.43±0.06^c	31.38±0.06^c	31.47±0.07^c
疏水氨基酸(%)	37.13±0.05^a	34.77±0.06^c	35.33±0.06^b	33.57±0.07^f	34.17±0.05^d	33.88±0.07^e

注：表中数据为平均值±标准差，同一行不同小写字母表示数据间具有显著性(P<0.05)。

加反而下降，A^1B^2 和 A^2B^1 呈现的就是这一现象，这可能是在进一步酶解过程中，蛋白酶作用于外露的疏水基团，使得蛋白表面疏水性降低[22]；同时，酶解后的产物可能由于疏水相互作用而发生聚集，使得暴露在水环境中的疏水基团量降低，蛋白表面疏水性下降[32]。

2.8 内源荧光

蛋白分子中的芳香族氨基酸（色氨酸 Trp、酪氨酸 Tyr 和苯丙氨酸 Phe）残基是产生荧光的天然发生团，这三种氨基酸残基的内源荧光对其所处微环境非常敏感[33]。因此，可以通过观察蛋白的最大荧光强度和最大吸收波长来判断蛋白质三级结构的变化。RP 和不同酶解路线大米蛋白肽的内源荧光光谱如图 5 所示，与 RP 相比，不同酶解路线大米蛋白肽的荧光强度都明显增大，这说明 RP 经酶水解，使得更多的芳香族氨基酸残基暴露在溶剂中[34]。不同酶解路线大米蛋白肽之间的荧光强度存在明显差异，荧光强度从小到大依次为 RP、A^1B^1、A^2B^1、$A^{1*}B^2$、A^1B^2、A^2B^{1*}。相比于 RP，不同酶解路线大米蛋白肽的最大吸收波长发生了不同程度的红移，这说明 RP 经酶水解后，芳香族氨基酸所处微环境的极性增加[35]。以上结果说明 RP 经酶水解后其三级结构发生了改变。A^1B^1 组对蛋白三级结构的影响最小，其次为 A^2B^1 组，这归因于酶解后芳香族氨基酸残基的含量和所处微环境不同。

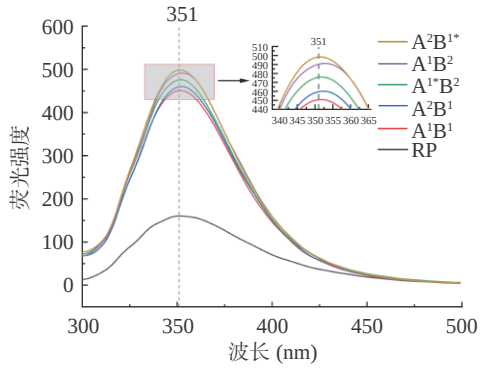


图 5 RP 及不同酶解路线大米蛋白肽的内源荧光

Fig.5 Endogenous fluorescence of rice protein and rice protein peptides with different enzymatic hydrolysis routes

2.9 二级结构

傅里叶红外光谱中 1600~1700 cm^{-1} 为酰胺 I 区，主要是 C=O 的伸缩振动，常用来反映蛋白质的二级结构，其中 1610~1640 cm^{-1} 为 β-折叠，1640~1650 cm^{-1} 为无规则卷曲，1650~1660 cm^{-1} 为 α-螺旋，1660~1695 cm^{-1} 为 β-转角[36]。由表 4 可知，RP 经酶水解后 β-折叠和无规则卷曲的相对含量下降，α-螺旋和 β-转角的相对含量上升，这说明 RP 经酶水解后，蛋白质结构展开，有序稳定的 β-折叠结构被破坏，转变成为相对灵活和舒展的 β-转角结构。不同酶解路线大米蛋白肽的二级结构以 β-转角为主，占二级结构的 44.62%~47.18%，各路线之间无显著差异（P>0.05）。二级结构组成结果说明不同的酶解路线会影响大米蛋白肽的二级结构，β-折叠和 β-转角结构受影响较大，α-螺旋和无规则卷曲结构受影响较小，且各二级结构之间变化趋势不一，马晓雨[37] 的研究结果也呈现这一现象。

表 4 RP 及不同酶解路线大米蛋白肽的二级结构变化

Table 4 Secondary structure changes of rice protein and rice protein peptides with different enzymatic hydrolysis routes

样品	二级结构组成(%)			
	α-螺旋	β-折叠	β-转角	无规则卷曲
RP	20.77±0.18^c	31.62±0.49^a	27.41±0.67^b	20.21±0.97^a
A^1B^1	24.21±0.31^{ab}	12.41±0.68^c	47.16±0.93^a	17.69±0.15^b
A^1B^2	22.60±0.61^b	15.71±0.27^b	45.57±1.37^a	16.12±1.70^b
A^2B^1	23.29±0.27^{ab}	16.12±0.17^b	44.62±0.62^a	15.98±0.18^b
$A^{1*}B^2$	24.99±0.03^a	11.97±0.07^c	47.18±0.04^a	15.86±0.00^b
A^2B^{1*}	24.73±1.34^{ab}	12.20±1.23^c	45.64±2.38^a	17.42±0.18^b

2.10 分子量分布

现有研究表明，分子量越小的肽，越容易被人体消化吸收，同时可能具有更高的生物活性[38]。由图 6(a)可知，不同酶解路线大米蛋白肽的峰型相似，峰较宽，这说明得到的大米蛋白肽分子量分布相近，包含分子量大小不等的多肽。由图 6(b)可知，不同酶解路线大米蛋白肽中分子量小于 5 kDa 的多肽占 92.09%~93.71%，分子量小于 2 kDa 的多肽占 58.18%~61.81%，这说明 RP 经酶水解得比较彻底。总体而言，不同酶解路线大米蛋白肽的分子量分布和多肽占比相似度较高，这可能是因为各路线水解程度较高，RP 水解产物组成高度相似所致。

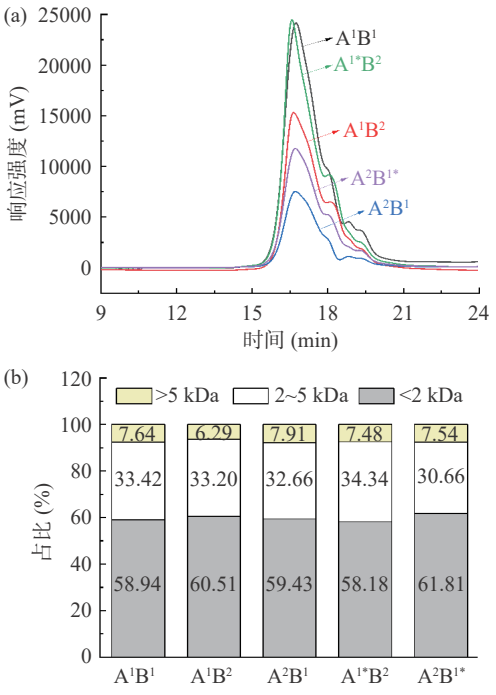


图 6 不同酶解路线大米蛋白肽的分子量分布(a)和占比(b)

Fig.6 Molecular weight distribution (a) and proportion (b) of rice protein peptides with different enzymatic hydrolysis routes

2.11　电子舌

传统的味觉评价主要采用感官评价法，易受主观、环境等因素影响；而电子舌分析能够将检测到的味觉信号转换为味觉测定值，具有客观、准确、重现性好等优势[39]。风味强弱根据响应值大小来评判，响应值越大，风味越强。由图 7 可知，不同酶解路线大米蛋白肽的苦味、鲜味、咸味和涩味均有明显区别。不同酶解路线大米蛋白肽之间苦味和涩味的响应值变化较小，口感上区别甚微，这可能是各路线 RP 水解产物中苦味肽和涩味肽含量相近。不同酶解路线大米蛋白肽之间鲜味和咸味的响应值变化较大，A^1B^2 组和 $A^{1*}B^2$ 组鲜味和咸味显著强于其他组，这说明 RP 先经 A 酶水解，再经 B 酶水解能够产生更多的鲜味肽和咸味肽。考虑人们对苦味、咸味和涩味比较敏感，所以从风味上来评价，A^2B^1 组大米蛋白肽应更易被消费者所接受。

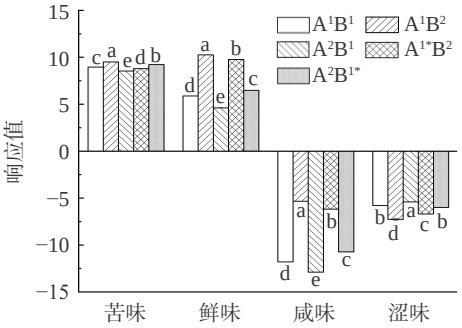


图 7　不同酶解路线大米蛋白肽的风味评价

Fig.7　Flavor evaluation of rice protein peptides with different enzymatic hydrolysis routes

2.12　抗氧化活性

由图 8(a)可知，随着肽浓度的增加，DPPH 自由基清除率呈现上升趋势。通过计算可知谷胱甘肽、A^1B^1、A^1B^2、A^2B^1、$A^{1*}B^2$ 和 A^2B^{1*}的 IC_{50} 依次为 0.7、7.6、8.7、6.6、6.8 和 6.4 mg/mL，不同酶解路线大米蛋白肽的 DPPH 自由基清除能力远低于谷胱甘肽。由图 8(b)可知，不同酶解路线大米蛋白肽和谷胱甘肽的吸光度值随浓度的增加而增加。同一吸光度值下，样品浓度越低，还原能力越强。当吸光度值为 0.5 时，谷胱甘肽、A^1B^1、A^1B^2、A^2B^1、$A^{1*}B^2$ 和 A^2B^{1*}的浓度依次为 0.4、8.0、10.0、7.8、8.6 和 8.0 mg/mL。结合上述两个结果可知，A^2B^1 组和 A^2B^{1*}组的抗氧化活性较强，这说明 RP 先经 B 酶水解，再经 A 酶水解得到的大米蛋白肽具有较好的抗氧化活性。柳芬芬[40]研究指出蛋白质中的疏水性氨基酸含量与抗氧化活性有关，疏水性氨基酸含量越高，抗氧化活性越强。本研究结果显示各样品的抗氧化活性与其疏水性氨基酸含量无明显关系，说明肽的抗氧化活性不仅与疏水性氨基酸含量有关，可能还与肽的序列有关[41]。

3　结论

胰蛋白酶(A)和碱性蛋白酶(B)不同酶解路线会

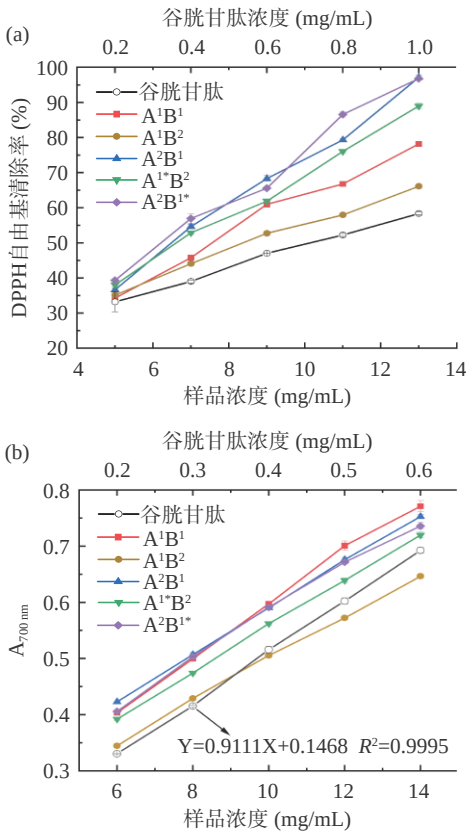


图 8　谷胱甘肽、不同酶解路线大米蛋白肽的 DPPH 自由基清除率(a)和还原能力(b)

Fig.8　DPPH radical scavenging rate (a) and reducing ability (b) of glutathione and rice protein peptides with different enzymatic hydrolysis routes

影响大米蛋白肽的蛋白回收率、水解度、基本成分、微观结构、肽含量、氨基酸组成、表面疏水性、二级结构、三级结构、风味和抗氧化活性，对溶解性和分子量分布无显著影响。从基本成分、肽含量、氨基酸组成、风味和抗氧化活性综合评价，A^2B^1 组大米蛋白肽品质最好。各路线的微观结构存在明显区别，A^1B^2 组和 $A^{1*}B^2$ 组球体壁较厚，A^2B^1 组和 A^2B^{1*}组球体壁较薄，A^1B^1 组基本为碎片和破碎球，较为均一。各路线的二级结构以 β-转角为主，占二级结构的 44.62%~47.18%；三级结构差异显著，A^1B^1 组对蛋白三级结构的影响最小，其次为 A^2B^1 组。根据电子舌结果可知，A^2B^1 组咸味和苦味最弱，更容易被人们所接受。结合 DPPH 自由基清除能力和还原能力分析，A^2B^1 组和 A^2B^{1*}组的抗氧化活性最强。本研究为不同品质大米蛋白肽的酶解路线选择提供了理论依据和数据参考。今后可深层次探究不同酶解路线对大米蛋白肽序列和生物活性的影响。

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

参考文献

[1] LIU K L, ZHENG J B, CHEN F S. Heat-induced changes in the physicochemical properties and *in vitro* digestibility of rice pro-

tein fractions[J]. Journal of Food Science and Technology-Mysore, 2021, 58(4): 1368−1377.
[2] JAYAPRAKASH G, BAINS A, CHAWLA P, et al. A narrative review on rice proteins: Current scenario and food industrial application[J]. Polymers, 2022, 14(15): 3003.
[3] YANG J J, MENG D, WU Z J, et al. Modification and solubility enhancement of rice protein and its application in food processing: A review[J]. Molecules, 2023, 28(10): 4078.
[4] 徐兴凤. 酶解大米谷蛋白性质以及多糖对其影响的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2016. [XU X F. Study on the properties of limited enzymatic hydrolysis rice gluten and the effects of polysaccharides on its properties[D]. Nanchang: Nanchang University, 2016.]
[5] ASHAOLU T J, SUTTIKHANA I. Plant-based bioactive peptides: A review of their relevant production strategies, *in vivo* bioactivities, action mechanisms and bioaccessibility[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2023, 58(5): 2228−2235.
[6] WEN C T, ZHANG J X, ZHANG H H, et al. Plant protein-derived antioxidant peptides: Isolation, identification, mechanism of action and application in food systems: A review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 105: 308−322.
[7] 唐诚业, 秦琴, 颜正飞, 等. 产大米蛋白水解酶的菌株筛选、酶学性质及制备大米寡肽[J]. 微生物学报, 2021, 61(5): 1200−1210. [TANG C Y, QIN Q, YAN Z F, et al. Screening of rice proteolytic protease-producing strain for preparing ricee oligopeptides[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(5): 1200−1210.]
[8] 李颖慧. 碎米酶联微滤制备淀粉糖、大米蛋白、大米肽的研究及工艺优化[D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2021. [LI Y H. Study on the preparation of starch sugar, rice protein and rice peptide by enzyme-linked microfiltration from broken rice and its optimization[D]. Jinan: Qilu University of Technology, 2021.]
[9] ONSAARD W, KATE-NGAM S, ONSAARD E. Physicochemical and antioxidant properties of rice bran protein hydrolysates obtained from different proteases[J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2023, 17(3): 2374−2385.
[10] YANG X, WANG L L, ZHANG F Y, et al. Effects of multimode S-type ultrasound pretreatment on the preparation of ACE inhibitory peptide from rice protein[J]. Food Chemistry, 2020, 331: 127216.
[11] MAESTRI E, MARMIROLI M, MARMIROLI N. Bioactive peptides in plant-derived foodstuffs[J]. Journal of Proteomics, 2016, 147: 140−155.
[12] 宋明洋, 刘晓兰. 双酶法制备豌豆肽及其抗氧化活性[J]. 食品工业, 2020, 41(4): 108−112. [SONG M Y, LIU X L. Preparation and antioxidant activity of pea peptides by two-stage enzymatic hydrolysis[J]. Food Industry, 2020, 41(4): 108−112.]
[13] 赵婉宏. 玉米降血糖活性肽制备及其对糖尿病斑马鱼体内糖脂代谢影响[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2022. [ZHAO W H. Preparation of corn hypoglycemic active peptide and its effect on glucose and lipid metabolism in diabetic zebrafish[D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2022.]
[14] 刘铭, 刘玉环, 王允圃, 等. 制备、纯化和鉴定生物活性肽的研究进展及应用[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(4): 244−251. [LIU M, LIU Y H, WANG Y P, et al. Research progress on production, purification and identification of bioactides and its challenges in application[J]. Food and Fermentation Industry, 2016, 42(4): 244−251.]
[15] 王宇飞. 小麦醇溶蛋白的分离、改性及其结构与致敏性的研究[D]. 太原: 中北大学, 2022. [WANG Y F. Study of isolation and modification of wheat gliadin and its structure and allergenicit[D]. Taiyuan: North University of China, 2022.]
[16] 徐珊珊. 小麦面筋蛋白美拉德肽的制备及风味特性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2018. [XU S S. Preparation and flavor characteristics of maillard peptides derived from wheat gluten[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2018.]
[17] LI X, XIONG H, YANG K W, et al. Optimization of the biological processing of rice dregs into nutritional peptides with the aid of trypsin[J]. Journal of Food Science and Technology-Mysore, 2012, 49(5): 537−546.
[18] SHAHBAL N, JING X, BHANDARI B, et al. Effect of enzymatic hydrolysis on solubility and surface properties of pea, rice, hemp, and oat proteins: Implication on high protein concentrations[J]. Food Bioscience, 2023, 53: 102515.
[19] 刘文颖, 冯晓文, 程青丽, 等. 大米低聚肽的制备和结构表征及体外抗氧化作用[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2021, 49(11): 47−56. [LIU W Y, FENG X W, CHENG Q L, et al. Preparation, structure characterization and *in vitro* antioxidant activity of rice oligopeptides[J]. Journal of South China University of Technology (Natural Science Edition), 2021, 49(11): 47−56.]
[20] 胡武瑶, 黄晶, 黄莹, 等. 基于主要成分分析不同大米肽的品质与综合评价[J]. 食品工业, 2023, 44(1): 289−295. [HU W Y, HUANG J, HUANG Y, et al. Quality and comprehensive evaluation of different rice peptides based on main component analysis[J]. Food Industry, 2023, 44(1): 289−295.]
[21] XIE H X, HUANG J M, WOO M W, et al. Effect of cold and hot enzyme deactivation on the structural and functional properties of rice dreg protein hydrolysates[J]. Food Chemistry, 2021, 345(10): 128784.
[22] 黄金梅. 米渣分步酶解过程变化及米渣肽抗氧化稳定性研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2019. [HUANG J M. Study on the changes of rice dreg by double step enzymatic hydrolysis and antioxidant stability of rice dreg peptide[D]. Nanchang: Nanchang University, 2019.]
[23] LIU W Y, LU J, GAO F, et al. Preparation, characterization and identification of calcium-chelating atlantic salmon (*Salmo salar* L.) ossein oligopeptides[J]. European Food Research and Technology, 2015, 241(6): 851−860.
[24] 夏易玄. 豌豆肽的制备、脱苦及抗氧化活性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2022. [XIA Y X. The study of preparation, debittering and antioxidant activity of pea peptides[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2022.]
[25] 赵佳佳. 3 种大米蛋白肽的制备及其抗氧化活性比较[J]. 食品科技, 2018, 43(12): 191−195. [ZHAO J J. Preparation of three rice protein peptides and comparison of antioxidant activities[J]. Food Technology, 2018, 43(12): 191−195.]
[26] 卢知浩, 赵晓涵, 裴晨皓, 等. 玉米低聚肽和小麦低聚肽及其金属螯合物的抗氧化和抗过敏活性[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(14): 35−40. [LU Z H, ZHAO X H, PEI C H, et al. Antioxidant effect and antiallergic activity of corn oligopeptides, wheat oligopeptides and their mineral chelate[J]. Food and Fermentation Industry, 2023, 49(14): 35−40.]
[27] 高瑞. 大米酒糟蛋白的提取及改性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2022. [GAO R. Study on extraction and modification of rice wine lees protein[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2022.]
[28] AL-DOURY M K W, HETTIARACHCHY N S, HORAX R. Rice-endosperm and rice-bran proteins: A review[J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 2018, 95(8): 943−956.

［29］ 崔沙沙. 低水解度的大米蛋白溶解性与结构变化的关系［D］. 南昌：南昌大学, 2016. ［CUI S S. The relationship between solubility and structural of low degree of hydrolysis's rice protein［D］. Nanchang: Nanchang University, 2016.］
［30］ 寇茜茜, 韩坤, 岳远瑞, 等. 发酵豆粕质量评价的综合分析［J］. 饲料研究, 2023, 46(8): 130−134. ［KOU X X, HAN K, YUE Y R, et al. Comprehensive analysis of quality assessment of fermented soybean meal［J］. Feed Research, 2023, 46(8): 130−134.］
［31］ 谷红, 王远丽, 毛绍春, 等. 不同酶制备豌豆蛋白水解物及其抗氧化活性研究［J］. 食品科技, 2023, 48(5): 231−236. ［GU H, WANG Y L, MAO S C, et al. Preparation of pea protein hydrolysate with different enzymes and its antioxidant activity［J］. Food Technology, 2023, 48(5): 231−236.］
［32］ AVRAMENKO N A, LOW N H, NICKERSON M T. The effects of limited enzymatic hydrolysis on the physicochemical and emulsifying properties of a lentil protein isolate［J］. Food Research International, 2013, 51(1): 162−169.
［33］ VERA A, VALENZUELA M A, YAZDANI-PEDRAM M, et al. Conformational and physicochemical properties of quinoa proteins affected by different conditions of high-intensity ultrasound treatments［J］. Ultrasonics Sonochemistry, 2019, 51: 186−196.
［34］ SPONTON O E, PEREZ A A, CARRARA C, et al. Effect of limited enzymatic hydrolysis on linoleic acid binding properties of beta-lactoglobulin［J］. Food Chemistry, 2014, 146: 577−582.
［35］ WANG Y Y, WANG C Y, WANG S T, et al. Physicochemical properties and antioxidant activities of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) seed protein hydrolysates obtained with different proteases［J］. Food Chemistry, 2021, 345(9): 128765.
［36］ TANG S Q, DU Q H, FU Z. Ultrasonic treatment on physicochemical properties of water-soluble protein from *Moringa oleifera* seed［J］. Ultrasonics Sonochemistry, 2021, 71: 105357.
［37］ 马晓雨. 基于大米蛋白酶解物构建的叶黄素纳米输送体系的制备及性质研究［D］. 南昌：南昌大学, 2019. ［MA X Y. Fabrication and characterization of lutein nano-delivery system based on rice protein hydrolysate［D］. Nanchang: Nanchang University, 2019.］
［38］ SINGH B P, VIJ S, HATI S. Functional significance of bioactive peptides derived from soybean［J］. Peptides, 2014, 54: 171−179.
［39］ HUANG J L, HUANG B H, ZUO S S, et al. Taste evaluation of various sweeteners by electronic tongue［J］. Food Science, 2020, 41(20): 227−233.
［40］ 柳芬芳. 绿豆蛋白及水解物的理化、功能及抗氧化特性研究［D］. 济南：齐鲁工业大学, 2022. ［LIU F F. Study on physicochemical, functional and antioxidant properties of mung bean protein and its hydrolysate［D］. Jinan: Qilu University of Technology, 2022.］
［41］ ALEMAN A, GIMENEZ B, PEREZ-SANTIN E, et al. Contribution of Leu and Hyp residues to antioxidant and ACE-inhibitory activities of peptide sequences isolated from squid gelatin hydrolysate［J］. Food Chemistry, 2011, 125(2): 334−341.

于鑫迪, 刘静雅, 任秀梅, 等. 功能性牦牛酸奶制备、贮藏期内品质及降嘌呤活性研究 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 20−29. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023090042
YU Xindi, LIU Jingya, REN Xiumei, et al. Preparation, Quality and Purine-lowering Activity of Functional Yak Yoghurt during Storage Period[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 20−29. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023090042

·研究与探讨·

功能性牦牛酸奶制备、贮藏期内品质及降嘌呤活性研究

于鑫迪[1], 刘静雅[1], 任秀梅[2], 陈炼红[1,*]
（1.西南民族大学食品科学与技术学院, 四川成都 610000;
2.四川省甘孜藏族自治州畜牧业科学研究所, 四川甘孜 626000）

摘　要: 为研发一款降嘌呤的功能性牦牛酸奶，以副干酪乳杆菌 259 和商业发酵剂为发酵菌株，通过单因素实验优化牦牛酸奶菌株接种量，观察牦牛酸奶后熟期及贮藏期品质变化，利用气相色谱-质谱联用技术（GC-MS）解析后熟期和贮藏贮藏期的风味物质变化，高效液相色谱法（HPLC）测定牦牛酸奶的降嘌呤活性。结果表明：牦牛酸奶后熟 24 h 时，副干酪乳杆菌 259 接种量 5% 时感官评分最优，活菌数 3.1×10^8 CFU/mL，酸度为 96°T，对黄嘌呤氧化酶（xanthine oxidase，XOD）的抑制率为 51.51%。5% 接种量副干酪乳杆菌 259 的牦牛酸奶在贮藏期 28 d 内活菌数高于 10^7 CFU/m L，酸度低于 105.4°T，随贮藏时间增加，pH 及持水力逐渐降低，感官品质、硬度、内聚力、黏度、稠度以及对 XOD 抑制活性先上升后下降；牦牛酸奶后熟期主要风味物质是醇类、酯类、酮类、芳香杂环类以及含硫化合物，贮藏期比后熟期增加了酸类物质；醇类化合物的相对含量和数量最多，赋予酸奶水果香气、花香和甜味；贮藏期牦牛酸奶对肌苷和鸟苷的降解率先上升后下降，最高可达 84.6% 和 86.5%。由此可见，副干酪乳杆菌 259 发酵的牦牛酸奶品质较好，可抑制黄嘌呤氧化酶活性，有效降解肌苷鸟苷，在预防和辅助治疗高尿酸血症上有较好的应用潜力。

关键词: 牦牛酸奶, 质构品质, 风味物质, 黄嘌呤氧化酶, 肌苷, 鸟苷
中图分类号: TS252.54　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2024)21−0020−10
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023090042
本文网刊:

Preparation, Quality and Purine-lowering Activity of Functional Yak Yoghurt during Storage Period

YU Xindi[1], LIU Jingya[1], REN Xiumei[2], CHEN Lianhong[1,*]
（1.College of Food Science and Technology, Southwest Minzu University, Chengdu 610000, China;
2.Ganzi Tibetan Autonomous Prefecture Institute of Animal Husbandry Science, Ganzi 626000, China）

Abstract: In order to develop a purine-reducing functional yak yoghurt, *Lactobacillus paracasei* 259 and commercial starter was used as the fermentation strain in this experiment. The inoculation amount of yak yoghurt strain was optimized by single factor experiment, and the quality changes of yak yoghurt during post-ripening period and storage period were observed. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was used to analyze the changes of flavor substances during post-ripening period and storage period, and the purine-lowering activity of yak yoghurt was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The results showed that the post-ripening time of yak yoghurt was 24 h, the sensory score was the best when the inoculation amount of *Lactobacillus paracasei* 259 was 5%, the number of viable bacteria was 3.1×10^8 CFU/mL, the acidity was 96°T, and the inhibition rate of xanthine oxidase (XOD) was 51.51%. Yak yogurt with 5% inoculum of *Lactobacillus paracasei* 259 had a viable bacterial count higher than 10^7 CFU/mL during 28 d

收稿日期: 2023−09−06
基金项目: 西南民族大学大学生创新创业训练计划项目（S202210656121）。
作者简介: 于鑫迪（2002−）, 女, 大学本科, 研究方向: 食品加工, E-mail: 2446249209@qq.com。
*** 通信作者:** 陈炼红（1967−）, 女, 硕士, 教授, 研究方向: 民族食品资源开发, E-mail: lianhong_chen@163.com。

of storage, and the acidity was lower than 105.4°T. With the increase of storage time, the pH and water holding capacity decreased gradually, and the sensory quality, hardness, cohesion, viscosity, consistency and XOD inhibitory activity increased first and then decreased. The main flavor substances in yak yogurt after ripening were alcohols, esters, ketones, aromatic heterocycles and sulfur compounds. The acids increased at storage period compared to the post-ripening period. The relative content and quantity of alcohols were the highest, which gave the yogurt a fruity, floral and sweet flavor. The degradation of inosine and guanosine in yak yogurt during the storage period firstly increased and then decreased, up to 84.6% and 86.5%, respectively. It can be seen that yak yogurt fermented by *Lactobacillus paracasei* 259 is of better quality, inhibits xanthine oxidase activity, effectively degrades inosine guanosine, and has good potential for application in the prevention and adjunctive treatment of hyperuricemia.

Key words: yak yoghurt; texture quality; flavor compounds; xanthine oxidase; inosine; guanosine

高尿酸血症（hyperuricemia, HUA）由人体内嘌呤代谢紊乱或排泄异常导致尿酸生成过多而形成[1]。HUA 也会引起一些并发症，如：冠心病[2]、高血压[3]、糖尿病[4] 和慢性肾脏病[5] 等。目前临床用于降尿酸药物主要有别嘌醇、非布司他和苯溴马隆，但长期使用药物，患者会出现胃肠道不适、肝功能异常、血液系统损害以及潜在的心脏相关性死亡风险[6−8]，严重威胁身体健康。

食疗法对于身体的伤害程度较小，但食疗法通过控制嘌呤食物的摄入降低尿酸是有限的。易康祺等[9] 证明控制高血压饮食模式对降低高尿酸血症患病的风险具有积极作用。已有研究表明，益生菌可降低高尿酸血症小鼠体内的尿酸含量[10−11]。孟迎平等[12] 研究发现益生菌能预防尿酸积累。用含有益生菌 *Lactobacillus gasseri* PA-3 的酸奶干预患者饮食，能够降低受试者的血清尿酸水平[13−14]。因此，可以将益生菌加入食疗中，研究一款功能性食品对降解嘌呤、缓解高尿酸血症具有重要的现实意义。

牦牛乳营养丰富，富含人体所必需的氨基酸，与普通牛乳相比维生素 A、干物质、蛋白质、微量元素和矿物质含量极为丰富[15]，而且牦牛酸奶更易被乳糖不耐症患者消化吸收[16]。目前牦牛奶市场销售面很窄，未能发挥其最大价值。将牦牛乳发酵成酸奶，不仅可以弱化膻味，还能优化营养价值，使维生素、氨基酸等含量更丰富[17]。

本课题组前期从传统牦牛乳中筛选出副干酪乳杆菌 259，且体内外试验验证其具有强降解嘌呤核苷能力。本文以此发酵菌株研发一款降解嘌呤的牦牛酸奶，通过单因素实验确定牦牛酸奶菌株最佳接种量，分析牦牛酸奶贮藏过程中品质变化，GC-MS 法检测牦牛酸奶后熟过程以及贮藏期的香味物质变化，高效液相色谱法测定牦牛酸奶对肌苷和鸟苷的降解率。以上研究对于开发具有降嘌呤功效的乳酸菌，以及缓解高尿酸血症具有一定的指导意义。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

牦牛乳全脂营养奶粉（蛋白质 24 g/100 g、脂肪 26.2 g/100 g、碳水化合物 44.5 g/100 g）　华羚乳品股份有限公司；副干酪乳杆菌 259　由西南民族大学课题组提供；商业发酵剂（含保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌、嗜热乳杆菌、植物乳杆菌和干酪乳杆菌）　川秀公司；MRS 琼脂培养基、MRS 肉汤培养基　青岛海博生物技术有限公司；甲醇（色谱纯）、无水乙醇、氢氧化钠、氯化钠、磷酸氢钠、磷酸二氢钾、氢氧化钠（均为分析纯）　购于阿拉丁生化科技股份有限公司；黄嘌呤、黄嘌呤氧化酶（xanthine oxidase, XOD）、肌苷、鸟苷　均为分析纯，上海源叶生物科技有限公司。

Agilent 1260 高效液相色谱仪　安捷伦科技（中国）有限公司；GCMS-TQ8040 气相色谱-质谱联用仪、Rtx-5MS 毛细管色谱柱　日本岛津公司；TA. XT. Plus 质构分析仪　英国 Stable Micro System 公司；V-1000 紫外分光光度计　上海翱艺仪器有限公司；Centrifuge 5424R 高速冷冻离心机　德国艾本德股份公司；HH-6 数显恒温水浴锅　国华（常州）仪器制造有限公司；PL-303 分析天平　梅特勒-托利多集团；DHP-9052 恒温培养箱　上海齐欣科学仪器有限公司；PHS-3C pH 计　上海仪电科学仪器股份有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　菌种的活化与制备　将冷冻保存的副干酪乳杆菌 259 室温解冻，解冻后吸取 200 μL 接种于 5 mL MRS 肉汤培养基中，37 ℃ 培养 24 h，吸取 1 mL 已活化的菌种于 5 mL MRS 肉汤培养基中，37 ℃ 培养 24 h，活菌数为 10^8 CFU/mL。按一定比例（2%、3%、4%、5%、6%）加入到已杀菌复原乳中。

1.2.2　牦牛酸奶制备工艺流程　工艺流程如图 1 所示。

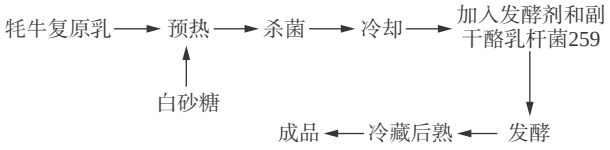


图 1　牦牛酸奶制备工艺流程

Fig.1　Yak yoghurt production process

1.2.3　牦牛酸奶工艺操作要点　牦牛复原乳：将牦牛奶粉与水混合均匀，牦牛奶粉∶水=1∶7；预热：将牦牛复原乳水浴加热至 40 ℃，同时加入 6% 白砂糖；杀

菌：牦牛乳置于水浴锅中搅拌加热至 68 ℃ 后持续 30 min；冷却：灭菌后的牦牛乳再冷却至 41 ℃；发酵：添加 0.2% 商业发酵剂及副干酪乳杆菌 259，37 ℃ 恒温培养箱发酵 5 h 至凝乳；冷藏后熟：凝乳后的成品置于 4 ℃ 冰箱中，冷藏 24 h。

1.2.4 副干酪乳杆菌 259 接种量优化试验 按 1.2.2 工艺流程，分别以 2%、3%、4%、5%、6% 的菌种量接种副干酪乳杆菌 259，进行滴定酸度、活菌数和 XOD 抑制活性的测定及感官评价，选择适宜的接种量水平。

1.2.5 感官评价 参考于素素等[18]感官评价方法，取 10 瓶后熟 24 h 的牦牛酸奶，请 10 名食品专业人员进行感官鉴定，小组成员由 5 名男性和 5 名女性(20~35 岁)组成，从色泽、风味、口感、组织状态四方面进行评定，满分为 100 分，评分标准见表 1。

表 1 牦牛酸奶感官评分标准

Table 1 Sensory evaluation criteria of yak yoghurt

指标	指标特征	评分
色泽(15分)	呈均匀乳白或微黄色	12~15
	淡黄色	8~11
	浅灰色或灰白色	4~7
	异常颜色	0~3
风味(30分)	风味纯正，牦牛酸奶滋味气味明显	24~30
	风味均一，香气略淡	16~23
	香气较淡、稍有酒精发酵味	8~15
	有酒精发酵味或其他不良气味	0~7
口感(20分)	稠度适宜，酸甜适度	16~20
	稠度适宜，微酸或微甜	11~15
	偏稠或偏稀，偏酸或偏甜	6~10
	偏稠或偏稀，过酸或过甜	0~5
组织状态(35分)	爽滑可口、无颗粒感、无乳清析出	27~35
	细腻度较差、无颗粒感、少量乳清析出	18~26
	有颗粒感、有气泡、乳清析出	9~17
	颗粒感严重、有大量气泡、乳清析出严重	0~8

1.2.6 牦牛酸奶理化指标测定方法

1.2.6.1 牦牛酸奶滴定酸度检测 参考 GB 5009.239-2016 中食品酸度的测定方法[19]。

1.2.6.2 牦牛酸奶活菌数检测 取搅拌均匀的样品 0.5 mL 于 4.5 mL 无菌生理盐水中，进行梯度稀释，选取适当的稀释倍数以平板涂布法接种于 MRS 琼脂培养基，37 ℃ 恒温培养 24 h 后计数[20]。

1.2.6.3 牦牛酸奶 XOD 抑制活性检测 参考苏日娜[21]的方法制备样品。底物溶液配制：精密称量黄嘌呤 0.057 g，用 1.5% 质量浓度的氢氧化钠溶液溶解得到 a 液；配制 2.7% 质量浓度的磷酸二氢钾溶液为 b 液；a 和 b 混匀加蒸馏水稀释至 500 μmol/L；XOD 溶液的配制：取 XOD 用 PBS 缓冲液(0.1 mol/L，pH7.4)溶解配制浓度 5 U/L 的酶溶液。

反应体系体积为 1 mL，依次加入样品 200 μL，5 U/L 的 XOD 溶液 400 μL，40 ℃ 孵育 30 min，加入 500 μmol/L 黄嘌呤溶液 400 μL，40 ℃ 孵育 15 min，在 295 nm 处测定吸光度值。实验分别设置样品组、空白组、酶组和底物组，样品组含样品、酶和底物；空白组含底物和样品，不含酶；酶组含酶和底物，不加样品；底物组只含底物。XOD 抑制率计算公式为：

$$抑制率(\%)=\left(1-\frac{样品OD值-空白OD值}{酶OD值-底物OD值}\right)\times 100$$

1.2.6.4 牦牛酸奶 pH 检测 参考于茜等[22]方法，样品恢复至室温后，取灭菌玻璃棒搅拌均匀，用 PHS-3C pH 计测定样品 pH。

1.2.6.5 牦牛酸奶质构特性检测 使用 TA-XT Plus 质构仪，采用 TPA 模式测定牦牛酸奶硬度、稠度、内聚性和黏度，测量条件如下[18]：探头 P/0.5，测前速度为 1.0 mm/s，测试速度为 10.0 mm/s，测后速度为 5.0 mm/s，压缩距离 30 mm。

1.2.6.6 牦牛酸奶持水力检测 参考罗湘蓉等[23]方法，并稍作修改。离心管中加入 10 mL 牦牛酸奶样品，6000 r/min，15 min，静置 10 min，弃去上清液。计算公式为：

$$M(\%)=\frac{w_3-w_1}{w_2-w_1}\times 100$$

式中：w_1 为离心管质量，w_2 为加样后离心管质量，w_3 为离心后弃去上清液离心管质量；M 为持水力，%。

1.2.7 牦牛酸奶贮藏期理化指标测定 取 4 ℃ 条件下贮藏 1、3、5、7、10、14、18、21、24、28 d 的牦牛酸奶，测定指标同 1.2.5、1.2.6。并分析上述指标贮藏期内的动态变化。

1.2.8 GC-MS 技术检测牦牛酸奶中挥发性风味物质 参考李安等[24]方法稍作修改。取 5 mL 样品于 20 mL 的顶空瓶内，加入 2 g 氯化钠。样品预孵化 30 min(60 ℃)，然后用 50/30 μm DVB/CAR/PDMS 萃取头吸附 30 min(60 ℃)，解吸 20 min。

气相色谱(GC)条件：采用 Rtx-5MS 毛细管色谱柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm)，载气 He 流速为 1.0 mL/min。升温程序：起始柱温 45 ℃，维持 1 min，以 3 ℃/min 的速度升到 180 ℃，再以 6 ℃/min 速度升到 220 ℃，维持 10 min，进样口温度为 250 ℃。

质谱(MS)条件：全扫描，采集质量范围 50~500 m/z；电子电离源：70 eV，离子源温度：250 ℃。

定性定量方法：牦牛酸奶中风味物质的鉴定以其保留时间和 NIST 08 标准库匹配定性，最终选取匹配度大于 800 的结果。用各物质的峰面积归一化法计算挥发性风味物质的相对含量(%)。

1.2.9 牦牛酸奶贮藏期降解核苷能力的测定 色谱条件：液相色谱仪安捷伦 1260，C_{18} 色谱柱(3.5 μm，4.6 mm×150 mm)；流动相为 0.01 mol/L KH_2PO_4 溶液∶甲醇=90∶10(V/V)，流速为 1.0 mL/min，柱温为

30 ℃，测定波长为 260 nm。

按色谱条件每 3 d 进行测定，通过保留时间对牦牛酸奶中剩余肌苷和鸟苷进行定性，并以峰面积外标法定量。取 2 mL 肌苷-鸟苷溶液（2 mmol/L）加入到 2 mL 牦牛酸奶中，37 ℃，160 r/min 摇动 1 h。在 4 ℃，10000 r/min，离心 10 min 后，取上清液沸水中处理 5 min 以结束反应，4 ℃，10000 r/min，10 min 离心后，用 0.22 μm 针孔滤头过滤，通过 HPLC 分析测定肌苷和鸟苷的含量[25]。

肌苷和鸟苷降解率计算公式如下：

$$降解率(\%)=\frac{n-X}{n}\times 100$$

式中：n：降解前肌苷或鸟苷的含量（mmol），X：降解后肌苷或鸟苷的含量（mmol）。

1.3　数据处理

各试验数据重复测定 3 次，采用 SPSS 26 进行数据统计方差及显著性分析（P<0.05），采用 Origin 2021 绘图，采用 SIMCA14.1 进行主成分分析及偏最小二乘法分析。

2　结果与分析

2.1　副干酪乳杆菌 259 接种量优化

以 1.2.4 制备的酸奶为检测样品。由图 2A 可知，随着副干酪乳杆菌 259 接种量增加，牦牛酸奶酸度逐渐增加，接种量为 5%~6% 变化较大，这可能是由于接种量过大，导致发酵速度过快产酸较多[26]。感官评分（图 2B）随接种量先增加后降低，说明当接种量为 5% 时牦牛酸奶的接受度最高。图 2C 可知活菌数先增多，当接种量为 5%~6% 时开始减少，这可能是由于乳杆菌生长随着产酸量增加而受到抑制。对 XOD 的抑制率先增大再减小（图 2D）。

综合以上指标，当接种量为 5% 时，活菌数达到 3.1×10^8 CFU/mL，滴定酸度 96°T，感官品质达到最优，酸奶爽滑可口、无颗粒感、口感丰富、无乳清析出，因此选取副干酪乳杆菌 259 接种量为 5% 制备的酸奶进行后续指标的测定。

2.2　牦牛酸奶在贮藏期间品质变化

以副干酪乳杆菌 259 接种量为 5% 的牦牛酸奶发酵冷藏后熟 24 h 为检测样品，分别贮藏不同时间。

由图 3A 知，1~7 d 牦牛酸奶的 pH 变化较小，贮藏 10 d 后出现较大幅度下降。随酸奶贮藏时间延长，乳酸菌持续发酵，pH 持续降低，邱爽等[27] 发现一般酸奶适口的 pH 为 4.2~4.7。贮藏期间牦牛酸奶的酸度不断升高，21 d 后酸度较大幅度上升，是由于乳酸菌还在继续产酸[28]，这与 pH 呈下降趋势相关联，与刘文星等[29] 研究结果一致。酸度范围在 97~106°T，研究表明，酸奶最佳酸度为 80~120°T[27]。图 3B 感官评价可知酸奶在前 7 d 的品质最好，随后感官评分开始下降，这是由于牦牛酸奶的酸度升高，导致感官下降，21 d 开始其口感变差。

由图 3C 可知，随贮藏时间延长，牦牛酸奶的持水力逐渐下降。可能原因是随 pH 下降，酸奶的凝胶结构被破坏或者菌种在代谢过程中需要水的参与，导致持水力下降[28]。在贮藏期间，牦牛酸奶对 XOD 的抑制率先上升再下降，崔方超等[30] 研究发现对 XOD 产生抑制作用的是乳酸菌代谢产物中的有机酸类物质，因此牦牛酸奶对 XOD 的抑制率上升可能是因为副干酪乳杆菌 259 在发酵过程中活菌数不断增加，代谢产物增加，所以对 XOD 的抑制活性不断增加；而

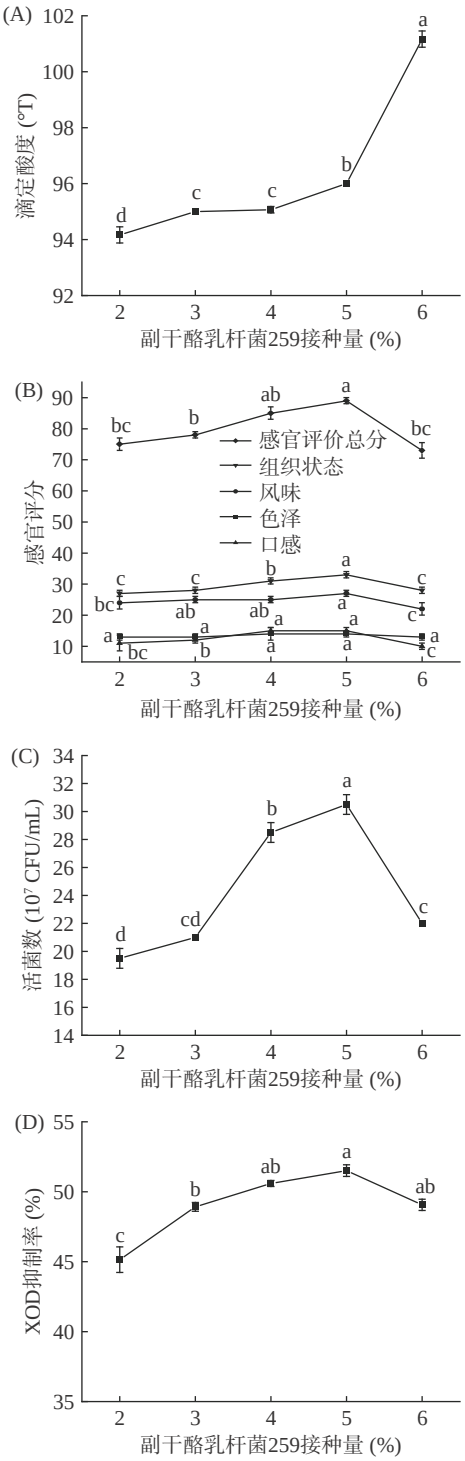


图 2　副干酪乳杆菌 259 接种量对牦牛酸奶品质的影响

Fig.2　Effect of *Lactobacillus paracasei* 259 inoculation on the quality of yak yoghurt

注：图中不同小写字母不同表示差异显著（P<0.05），图 3 同。

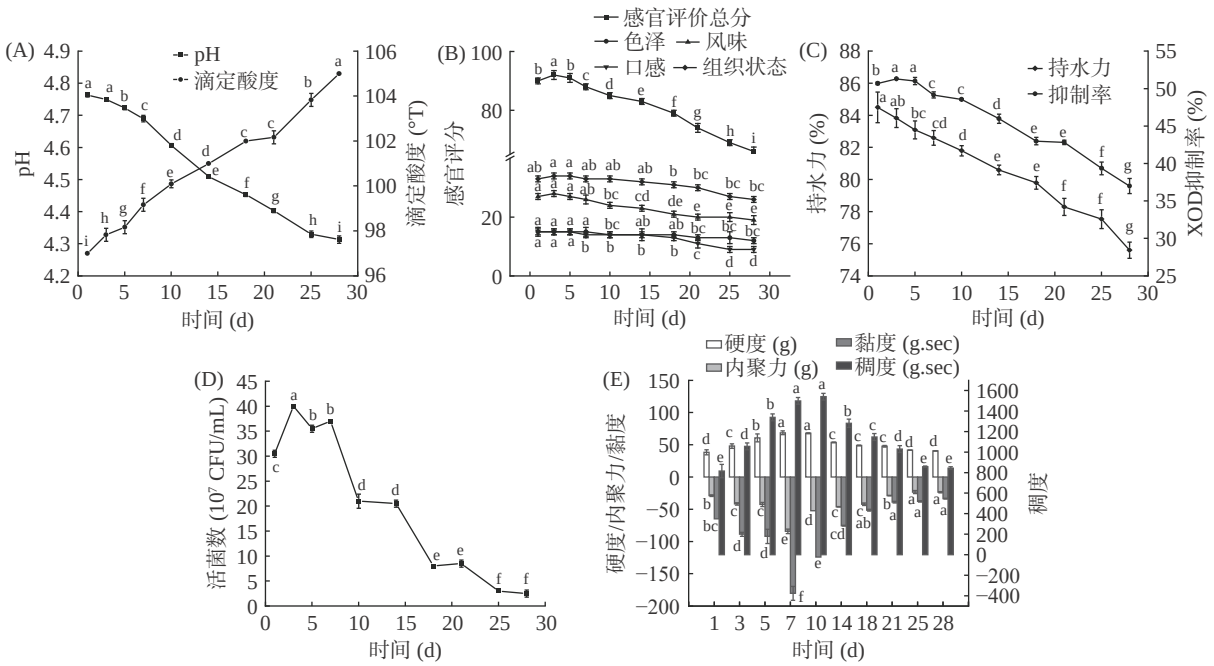


图 3 贮藏期间牦牛酸奶品质的变化

Fig.3 Quality changes of yak yoghurt in storage period

随着贮藏时间增加, 活菌数减少, 乳酸菌代谢产物随之减少, 副干酪乳杆菌 259 对 XOD 的抑制活性下降。

贮藏期间, 活菌数的变化趋势为先上升后下降(图 3D), 第 1 d, 活菌数为 3×10^8 CFU/mL, 而在第 3 d 时, 活菌数达到最多为 4×10^8 CFU/mL, 在第 28 d 时活菌数为 3×10^7 CFU/mL, 但是仍高于国家标准中规定的 1×10^6 CFU/mL。活菌数变化与于素素等[18]研究结果一致, 可能是因为有机酸的增加抑制了菌的增长。

牦牛酸奶的硬度、内聚力、黏度在 1~7 d 上升, 在 7~28 d 逐渐下降。稠度在 1~10 d 增加, 在 10~28 d 逐渐下降(图 3E)。硬度、内聚力、黏度、稠度的升高, 可能是胞外多糖的含量逐渐升高, 与蛋白质基质相互作用, 形成稳定的三维网状结构; 随后硬度、内聚力、黏度、稠度下降, 可能是酸奶稳定性减弱, 酪蛋白凝胶聚集结构不稳定, 导致乳清析出[31]。综上, 建议牦牛酸奶的货架期为 21 d, 在前 21 d 牦牛酸奶的品质较优, 其功能性较佳。

2.3 GC-MS 技术检测牦牛酸奶中挥发性风味物质

2.3.1 后熟期间牦牛酸奶中挥发性风味物质

2.3.1.1 后熟期间牦牛酸奶中挥发性风味物质组成分析

采用 GC-MS 技术对后熟期间牦牛酸奶样品中的挥发性风味物质进行测定, 并用偏最小二乘法分析, 结果见表 2。

表 2 GC-MS 鉴定牦牛酸奶后熟期间主要挥发性风味物质

Table 2 GC-MS identification of the main volatile flavor substances during post-ripening of yak yoghurt

序号	化合物	保留时间(min)	相对含量(%)				
			8 h	12 h	16 h	20 h	24 h
醇类	异戊醇	9.28	17.92±0.10^{d}	18.16±0.45^{c}	21.91±0.22^{b}	16.49±0.36^{d}	22.23±0.40^{a}
	正己醇	14.66	7.46±0.06^{d}	7.56±0.08^{b}	7.44±0.09^{d}	7.52±0.06^{c}	10.44±0.47^{a}
	3-甲硫基丙醇	28.82	1.33±0.22^{c}	1.34±0.06^{c}	1.06±0.05^{d}	1.39±0.09^{b}	1.58±0.13^{a}
	苯甲醇	34.55	1.23±0.02^{b}	1.24±0.02^{b}	0.94±0.06^{d}	1.04±0.13^{c}	1.42±0.13^{a}
	苯乙醇	35.64	2.63±0.01^{c}	2.67±0.14^{b}	2.06±0.05^{e}	4.59±0.12^{a}	2.27±0.23^{d}
酯类	乙酸乙酯	2.55	8.15±0.04^{d}	8.26±0.09^{b}	8.58±0.15^{a}	6.40±0.08^{e}	8.18±0.21^{c}
	硝酸异戊酯	9.78	0.57±0.01^{c}	0.58±0.03^{b}	–	0.81±0.04^{a}	–
酮类	5-甲基-2-己酮	8.44	0.36±0.01^{b}	0.37±0.02^{a}	–	–	–
	环己酮	11.88	–	–	2.09±0.08^{a}	1.70±0.06^{b}	–
	2-甲基环戊酮	11.88	1.87±0.04^{c}	1.90±0.10^{b}	–	–	2.39±0.12^{a}
	2-壬酮	15.77	1.89±0.03^{b}	1.91±0.15^{a}	1.38±0.13^{d}	0.76±0.07^{e}	1.83±0.04^{c}
	2-十一酮	24.04	0.95±0.02^{d}	0.97±0.07^{c}	1.15±0.12^{a}	0.93±0.11^{e}	1.02±0.04^{b}
醛类	2-甲基十一醛	15.97	–	–	–	0.64±0.01^{a}	–
	苯乙醛	25.89	0.71±0.05^{a}	0.71±0.05^{a}	0.49±0.01^{b}	0.29±0.02^{d}	0.43±0.04^{c}
其他	二甲基砜	35.40	–	–	1.00±0.10^{b}	1.95±0.03^{a}	0.84±0.05^{c}

注: 同行小写字母不同表示差异显著(P<0.05), 表中“–”表示未检出; 表3同。

后熟期间牦牛酸奶中共检测到 15 种风味物质。其中醇类物质为主要香味物质，异戊醇和正己醇的相对含量最高，且持续增加，在 24 h 时分别达到 22.23%±0.40% 和 10.44%±0.47%，异戊醇具有香蕉的香甜味[32]，正己醇具有青草香[33]。苯乙醇、苯甲醇有花香气味[34]，相对含量为 0.9%~5%。3-甲硫基丙醇在整个后熟期相对含量为 1%~1.6%，低浓度的 3-甲硫基丙醇有烤奶酪香气[35]。

其次相对含量较高的是酯类，乙酸乙酯相对含量在 16 h 时达到 8.58%±0.15%，可提供苹果的香气[36]。酮类物质中 2-壬酮为牦牛酸奶关键风味物质，后熟期相对含量在 0.7%~2%，呈现奶油香气和果香，使得酸奶风味更醇厚[37]。16、20 h 检出环己酮（薄荷味[38]）；2-甲基环戊酮（干酪奶香[39]）24 h 相对含量达 2.39%±0.12%

另外，酸奶后熟 16 h 时检出二甲基砜，可能是因为牛奶蛋白加热变性后引起半胱氨酸中的巯基暴露，随着后熟时间增加，暴露的巯基发生 Strecker 降解产生[40]，二甲基砜具有抗炎[41]、抗氧化、抗癌、抗肿瘤[42]、促进生长、滋养皮肤以及提升毛发质量等作用，被广泛应用于保健食品中[43]，对于本功能性酸奶可起到其他辅助功能作用。因此，后熟期间牦牛酸奶风味主要以醇类酯类为主要呈味物质，呈现出一定的水果香和奶油香气。

2.3.1.2　后熟期间牦牛酸奶中挥发性风味物质相关性分析　第 1 主成分贡献率为 49%，第 2 主成分贡献率为 30%。由图 4 可知，8 h 与 12 h 的挥发性风味物质组成最为相似，与苯甲醇和苯乙醛呈相关性，主要表现为花香和水果香气；16 h 的酸奶与挥发性风味物质的相关性均不显著，未呈现较高相关性；20 h 与 2-甲基十一醛和苯乙醇呈较高的相关性，主要表现为花香味；24 h 与正己醇呈较高的相关性，主要表现为青草香。后熟 12 h 其挥发性风味物质呈现出较强的水果香与花香，使牦牛酸奶风味更加醇厚。

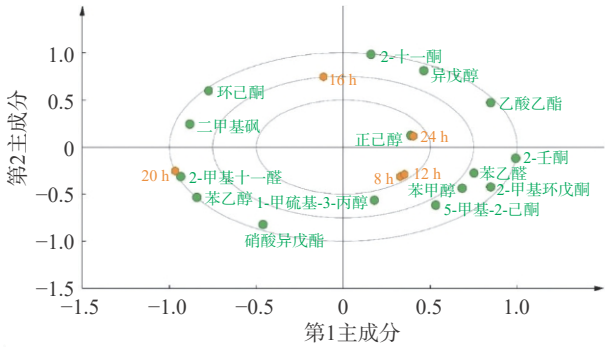


图 4　牦牛酸奶后熟期间挥发性风味物质的 O2PLS 分析

Fig.4　O2PLS analysis of volatile flavor substances in yak yoghurt during post-ripening period

2.3.2　贮藏期牦牛酸奶中挥发性风味物质

2.3.2.1　贮藏期牦牛酸奶中挥发性风味物质组成分析　由表 3 可知，贮藏期牦牛酸奶中共检测到 18 种风味物质。醇类物质相对含量最高，其次为酯类、酮类、芳香族化合物、酸类、醛类和有机硫化物。与后熟期相比，增加了酸类物质和芳香族化合物。

醇类物质中，1 d 时异戊醇相对含量最高为 15.76%±0.25%，后随时间增加而下降，异戊醇表现为苹果白兰地香气[44] 和杂醇油气味，异戊醇相对含量减少的原因可能是由于醇类化合物通过一系列反应转化成酸类化合物[45]；正己醇相对含量不断增加，

表 3　GC-MS 鉴定牦牛酸奶贮藏期主要挥发性风味物质

Table 3　GC-MS identification of the main volatile flavor substances in yak yoghurt during the storage period

种类	化合物	保留时间(min)	相对含量(%)				
			1 d	7 d	14 d	21 d	28 d
醇类	异戊醇	9.28	15.76±0.25^{a}	12.76±0.09^{b}	11.63±0.10^{c}	11.22±0.02^{d}	9.44±0.11^{e}
	正己醇	14.66	7.75±0.07^{d}	8.47±0.22^{c}	7.62±0.07^{e}	8.95±0.07^{b}	10.89±0.01^{a}
	3-甲硫基丙醇	28.83	1.36±0.09^{b}	1.13±0.16^{d}	1.20±0.04^{c}	–	1.43±0.05^{a}
	苯甲醇	34.53	1.56±0.08^{c}	1.48±0.13^{d}	1.57±0.02^{c}	2.35±0.13^{a}	1.98±0.05^{b}
	苯乙醇	35.62	2.59±0.25^{b}	2.49±0.08^{c}	2.56±0.08^{b}	1.83±0.05^{d}	2.63±0.06^{a}
酯类	乙酸乙酯	2.55	6.02±0.25^{a}	5.50±0.05^{c}	5.72±0.06^{b}	–	4.48±0.01^{d}
	乙酸丁酯	5.25	4.45±0.08^{a}	4.13±0.23^{c}	4.19±0.07^{b}	3.85±0.02^{d}	3.81±0.06^{d}
	硝酸异戊酯	9.77	0.59±0.02^{c}	0.76±0.06^{b}	0.60±0.04^{c}	0.43±0.02^{d}	1.10±0.01^{a}
	丁位辛内酯	37.15	1.30±0.16^{a}	–	0.83±0.02^{b}	0.49±0.01^{c}	–
酮类	2-庚酮	8.24	6.28±0.18^{b}	3.00±0.09^{d}	3.57±0.05^{c}	9.08±0.03^{a}	2.02±0.03^{e}
	环己酮	11.90	–	0.84±0.02^{a}	–	–	–
	苯乙酮	26.05	–	0.78±0.01^{a}	0.67±0.07^{c}	0.75±0.03^{b}	–
芳香族	对二甲苯	6.89	0.50±0.04^{b}	0.43±0.04^{c}	–	0.40±0.06^{c}	0.58±0.06^{a}
酸类	乙酸	32.18	1.07±0.04^{c}	1.36±0.10^{b}	13.26±0.14^{a}	0.67±0.04^{d}	0.43±0.03^{e}
醛类	正己醛	5.47	1.01±0.02^{b}	0.89±0.01^{c}	1.02±0.01^{d}	–	1.69±0.07^{a}
	苯甲醛	21.24	0.83±0.04^{c}	–	–	10.16±0.13^{a}	3.73±0.18^{b}
	苯乙醛	25.89	–	0.79±0.07^{b}	0.56±0.02^{c}	0.49±0.06^{d}	1.25±0.04^{a}
其他	二甲基砜	35.40	0.91±0.05^{a}	0.86±0.02^{b}	0.54±0.03^{c}	0.35±0.10^{d}	0.32±0.03^{e}

28 d 时可达 10.89%±0.01%, 表现为不良气味[46], 影响酸奶的风味; 苯甲醇在贮藏期相对含量逐渐增高, 21 d 时达 2.35%±0.13%, 21 d 后开始减少, 苯乙醇在 28 d 时相对含量达到最高为 2.63%±0.06%。

与后熟期相比, 贮藏期风味物质增加了正己醛、苯甲醛等醛类物质。苯甲醛相对含量先增加后减少, 21 d 相对含量最高为 10.16%, 高浓度苯甲醛具有水果香气[47], 可为酸奶提供较好的风味; 酮类物质中, 2-庚酮赋予牦牛酸奶奶油香气和果香, 是牦牛乳的代表性挥发性风味物质[48], 在 21 d 相对含量最高为 9.08%±0.03%, 28 d 相对含量最低。

21 d 至 28 d 期间, 正己醇相对含量持续增加而苯甲醛和 2-庚酮含量降低使其风味品质变差。其次乙酸乙酯和乙酸丁酯的含量随时间增加而降低, 含量在 3%~7%。整个贮藏期间, 二甲基砜相对含量不断减少, 乙酸乙酯、乙酸丁酯等酯类物质在贮藏期含量降低, 可能与脂肪或脂肪酸的热降解和氧化相关[49]。

贮藏期产生果香和奶香的主要物质含量增加, 主要集中在 21 d 最高, 随后其含量下降产生不良气味使牦牛酸奶风味下降, 因此在 21 d 前牦牛酸奶风味较好。

2.3.2.2 贮藏期牦牛酸奶中挥发性风味物质相关性分析 第 1 主成分贡献率为 41%, 第 2 主成分贡献率为 33%。由图 5 可知, 1 d 与异戊醇、乙酸丁酯和二甲基砜呈相关性, 主要表现为水果香气; 7 d 与环己酮呈较高相关性, 主要表现为薄荷味; 14 d 与乙酸呈较高相关性, 主要表现为酸味; 21 d 与苯甲醛和 2-庚酮有相关性, 主要表现为奶油香和果香; 28 d 与对二甲苯和苯乙醛呈较高相关性, 主要表现为微量甜味。贮藏期牦牛酸奶主要风味物质表现为奶油香和果香。

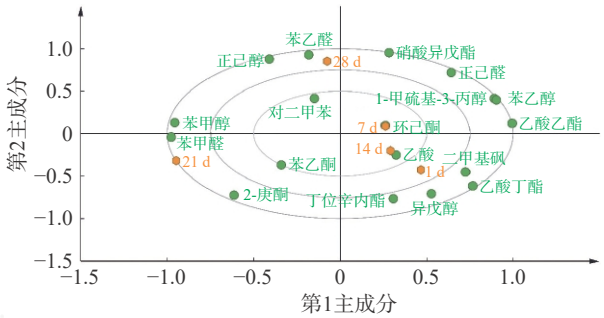


图 5 牦牛酸奶贮藏期挥发性风味物质的 O2PLS 分析

Fig.5 O2PLS analysis of volatile flavour substances in yak yoghurt during storage period

2.4 高效降解核苷能力的测定

2.4.1 肌苷和鸟苷标准曲线的建立 参考李杰等[50]方法, 首先通过肌苷和鸟苷标准溶液的梯度稀释, 采用 HPLC 建立标准曲线, 以峰面积、相应浓度为纵坐标、横坐标绘制标准曲线, 肌苷的标准曲线为 y=30382x+108.87, 决定系数 R^2为 0.9998; 鸟苷的标准曲线为 y=41620x+129.23, 决定系数 R^2为 0.9998。由图 6 可知, 肌苷保留时间为 4.688 min, 鸟苷保留时间 5.068 min, 色谱峰出峰完整且完全分离, 故此条件可以检测肌苷和鸟苷的含量。

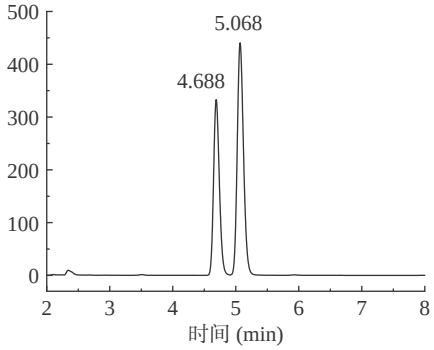


图 6 肌苷、鸟苷的液相色谱保留时间

Fig.6 Liquid chromatographic retention time of inosine and guanosine

2.4.2 贮藏期牦牛酸奶对肌苷、鸟苷降解率的测定 肌苷、鸟苷为尿酸底物, 经转化水解为黄嘌呤, 最终由 XOD 转化生成尿酸, 因此减少肌苷和鸟苷摄入量, 可以降低尿酸水平[51]。副干酪乳杆菌 259 牦牛酸奶可以与肌苷和鸟苷反应, 由图 7 可知降解率在贮藏期最高可达到 84.6% 和 86.5%。与 Lu 等[25]研究结果基本一致。贮藏期酸奶对肌苷和鸟苷的降解率不稳定, 1~6 d 有小幅度降低可能是由于活菌数突然增多, 微生物利用酸奶中小分子物质发生生物转化[52], 随后抑制率升高, 总体趋势在 18 d 达到最高, 随后下降, 可能原因是随时间延长酸度增加, 有机酸的增加抑制乳酸菌生长[53], 限制了副干酪乳杆菌 259 对肌苷和鸟苷的降解率。

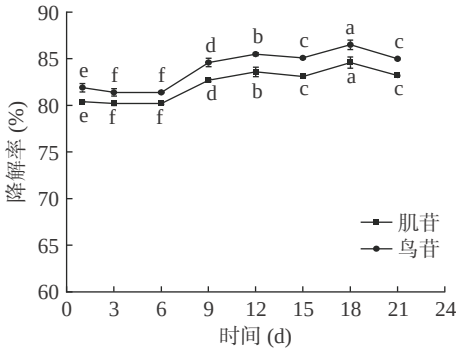


图 7 贮藏期牦牛酸奶对肌苷、鸟苷的降解率

Fig.7 Degradation rate of inosine and guanosine in yak yoghurt during storage period

3 结论

本实验对功能性牦牛酸奶制备、贮藏期内品质及降嘌呤活性研究, 后熟 24 h 的酸奶检测结果表明, 副干酪乳杆菌 259 最佳接种量为 5%, 活菌数为 3.1×10^8 CFU/mL, 酸度为 96°T, 对黄嘌呤氧化酶的抑制率为 51.51%。贮藏期内牦牛酸奶活菌数高于 10^7 CFU/mL, 酸度低于 105.4°T, 随贮藏时间增加, pH 及持水力逐渐降低, 感官品质、硬度、内聚力、黏

度、稠度以及对 XOD 抑制活性先上升后下降，在前 21 d 具有良好的品质。后熟期与贮藏期的牦牛酸奶挥发性风味物质种类含量明显不同，检测出有醇类、酯类、酮类、芳香杂环类、酸类、醛类以及含硫化合物，其中醇类化合物的相对含量和数量最多，主要表现为水果香气、花香和甜味，随着贮藏时间延长，能够增加香味的挥发性物质含量降低，具有不良气味的挥发性物质增多，21 d 开始品质下降。副干酪乳杆菌 259 牦牛酸奶对肌苷和鸟苷的降解率分别在贮藏 18 d 时最高达到 84.6% 和 86.5%，所以含副干酪乳杆菌 259 的牦牛酸奶对降解嘌呤起到有效作用，具有预防和辅助治疗高尿酸血症的潜力。

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

参考文献

[1] 石慧, 梁晓珊, 黄丽文, 等. 一种高尿酸血症大鼠模型诱导方法的改良和效果评价研究[J]. 中国应用生理学杂志, 2020, 36(3): 223−227. [SHI Hui, LIANG Xiaoshan, HUANG Liwen, et al. The optimization and assessment of the method for inducing hyperuricemia in rats[J]. Chinese Journal of Applied Physiology, 2020, 36(3): 223−227.]

[2] FREEDMAN D S, WILLIAMSON D F, GUNTER E W, et al. Relation of serum uric acid to mortality and ischemic heart disease. The NHANES I epidemiologic follow-up study[J]. Am J Epidemiol, 1995, 141(7): 637−644.

[3] WANG J, TIAN Q Q, CHEN J R, et al. Hyperuricemia and risk of incident hypertension: A systematic review and meta-analysis of observational studies[J]. PLoS One, 2014, 9(12): e114259.

[4] LÜ Q, MENG X F, HE F F, et al. High serum uric acid and increased risk of type 2 diabetes: A systemic review and meta-analysis of prospective cohort studies[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e56864.

[5] MADERO M, SARNAK M J, WANG X, et al. Uric acid and long-term outcomes in CKD[J]. Am J Kidney Dis, 2009, 53(5): 796−803.

[6] AYOUB I, ALMAANI S, BRODSKY S, et al. Revisiting medullary tophi: A link between uric acid and progressive chronic kidney disease[J]. Clinical Nephrology, 2015, 85(2): 109−109.

[7] 朱楠, 侯杰, 李洁, 等. 降尿酸药物别嘌醇、非布司他和苯溴马隆的严重不良反应综述[J]. 中国合理用药探索, 2021, 18(6): 6−9. [ZHU Nan, HOU Jie, LI Jie, et al. A review of serious adverse reactions of urate lowering drugs allopurinol, febuxostat and benzbromarone[J]. Chinese Journal of Rational Drug Use, 2021, 18(6): 6−9.]

[8] MURRELL G A, RAPEPORT W G. Clinial pharmacokinetics of allopurinol[J]. Clin Pharmacokinet, 1986, 11(5): 343−353.

[9] 易康祺, 崔淑衡, 郁雨婷, 等. 社区居民控制高血压饮食模式与高尿酸血症的关联研究[J]. 中国慢性病预防与控制, 2023, 31(1): 26−30. [YI Kangqi, CUI Shuheng, YU Yuting, et al. Study on association between the dietary approaches to stop hypertension (DASH) diet and hyperuricemia among community residents[J]. Chinese Journal of Prevention and Control of Chronic Diseases, 2023, 31(1): 26−30.]

[10] LI M, YANG D, MEI L, et al. Screening and characterization of purine nucleoside degrading lactic acid bacteria isolated from Chinese Sauerkraut and evaluation of the serum uric acid lowering effect in hyperuricemic rats[J]. PLoS One, 2014, 9(9): e105577.

[11] 牛春华, 肖茹雪, 赵子健, 等. 植物乳杆菌 UA149 的降尿酸作用[J]. 现代食品科技, 2020, 36(2): 1−6,217. [NIU Chunhua, XIAO Ruxue, ZHAO Zijian, et al. Serum uric acid lowering effect of *Lactobacillus plantarum* UA149 on hyperuricemic rats[J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(2): 1−6,217.]

[12] 孟迎平, 冯杰, 魏华, 等. 肠道菌群对饮食诱导的高尿酸血症的调控研究进展[J]. 食品工业科技, 2022, 43(18): 465−473. [MENG Yingping, FENG Jie, WEI Hua, et al. Research progress on the regulation of intestinal flora on diet-induced hyperuricemia[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(18): 465−473.]

[13] TSUKUBA, INTERNATIONAL, CLINICAL, et al. Placebo controlled double blind parallel randomized study to test the uratelowering effect of yogurt containing *Lactobacillus gasseri* PA-3 in adult males with marginal hyperuricemia[J]. Gout and Nucleic Acid Metabolism, 2016, 40(1): 21−31.

[14] YAMANAKA H, TANIGUCHI A, TSUBOI H, et al. Hypouricaemic effects of yoghurt containing *Lactobacillus gasseri* PA-3 inpatients with hyperuricaemia and/or gout: A randomised, double-blind, placebo-controlled study[J]. Modern Rheumatology, 2019, 29(1): 146−150.

[15] 张建华, 李文浩. 黑枸杞牦牛奶酪制品的加工工艺研究[J]. 中国奶牛, 2022(12): 49−53. [ZHANG Jianhua, LI Wenhao. Research on the processing technology of yak cheese products with black wolfberry[J]. China Dairy Cattle, 2022(12): 49−53.]

[16] 吴海玥, 张艳. 普洱茶牦牛酸奶加工工艺研究[J]. 青海畜牧兽医杂志, 2022, 52(4): 23−27. [WU Haiyue, ZHANG Yan. Study on processing technology of Pu'er tea yak yogurt[J]. Qinghai Journal of Animal Husbandry and Veterinary, 2022, 52(4): 23−27.]

[17] 杨洁, 薛建岗, 陈永福, 等. 西藏地区两种传统发酵乳的氨基酸含量分析[J]. 中国奶牛, 2013(8): 50−53. [YANG Jie, XUE Jiangang, CHEN Yongfu, et al. Analysis of amino acid content of two traditional fermented milk in Tibet[J]. China Dairy Cattle, 2013(8): 50−53.]

[18] 于素素, 杨佳杰, 马向阳, 等. 含发酵乳杆菌 HY01 牦牛酸奶工艺优化及主体风味成分动态解析[J]. 食品科学, 2021, 42(2): 105−113. [YU Susu, YANG Jiajie, MA Xiangyang, et al. Process optimization and dynamic analysis of main flavor components of yak yogurt containing *Lactobacillus fermentum* HY01[J]. Food Science, 2021, 42(2): 105−113.]

[19] 国家卫生和计划生育委员会. GB 5009.239-2016 食品酸度的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 3−8. [National Health and Family Planning Commission. GB 5009.239-2016 Determination of food acidity[S]. Beijing: China Standard Press, 2016: 3−8.]

[20] 王雪杭, 李瑞东, 蒋云龙, 等. 植物乳杆菌胞外多糖协同鱼明胶改善低脂酸奶品质特性[J]. 食品科学, 2023, 44(10): 73−81. [WANG Xuehang, LI Ruidong, JIANG Yunlong, et al. *Lactobacillus plantarum* extracellular polysaccharide synergises with fish gelatin to improve the quality characteristics of low-fat yoghurt[J]. Food Science, 2023, 44(10): 73−81.]

[21] 苏日娜. 藏药高原荨麻降尿酸、抗良性前列腺增生物质基础及作用机制研究[D]. 南昌: 江西中医药大学, 2019. [SU Rina. Study on the material basis and mechanism of reducing uric acid and anti-benign prostatic hyperplasia of Tibetan medicine plateau nettle[D]. Nanchang: Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, 2019.]

[22] 于茜, 李理. Alcalase 蛋白酶及碳源对大豆酸奶流变学特性的影响[J]. 食品与机械, 2014, 30(4): 21−23,29. [YU Qian, LI Li. Effects of Alcalase protease and carbon source on the rheological properties of soybean yogurt[J]. Food and Machinery, 2014, 30(4): 21−23,29.]
[23] 罗湘蓉, 黄宝莹, 范安妮, 等. 草莓香精对发酵乳品质的影响[J]. 现代食品, 2018(2): 117−120. [LUO Xiangrong, HUANG Baoying, FAN Anni, et al. The effect of strawberry flavor on the quality of fermented milk[J]. Modern Food, 2018(2): 117−120.]
[24] 李安, 邢军, 马龙, 等. GC-MS 比较三种发酵乳的挥发性化合物[J]. 中国乳品工业, 2020, 48(2): 12−17. [LI An, XING Jun, MA Long, et al. GC-MS comparison of volatile compounds in three fermented milks[J]. China Dairy Industry, 2020, 48(2): 12−17.]
[25] LU Lianghua, LIU Tiantian, LIU Xiaoling, et al. Screening and identification of purine degrading *Lactobacillus fermentum* 9-4 from Chinese fermented rice-flour noodles[J]. Food Science and Human Wellness, 2022, 11(5): 1402−1408.
[26] WANG J, GUO Z, ZHANG Q, et al. Effect of probiotic *Lactobacillus casei* Zhang on fermentation characteristics of set yogurt[J]. International Journal of Dairy Technology, 2010, 63(1): 105−112.
[27] 邱爽, 宋铮, 张璟琳, 等. 细菌素 bifidocin A 对凝固型发酵乳品质及贮藏性能的影响[J]. 中国食品学报, 2020, 20(9): 156−165. [QIU Shuang, SONG Zheng, ZHANG Jinglin, et al. The effect of bifidocin A on the quality and storage performance of coagulated fermented milk[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(9): 156−165.]
[28] 崔斐. 甘蔗酸奶加工工艺及其品质研究[D]. 南宁: 广西大学, 2021: 48. [CUI Fei. Study on the processing technology and quality of sugarcane yogurt[D]. Nanning: Guangxi University, 2021: 48.]
[29] 刘文星, 刘忠义, 惠丹阳, 等. 低温贮藏时间对黄浆水酸奶稳定性的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2023, 51(3): 132−142. [LIU Wenxing, LIU Zhongyi, HUI Danyang, et al. The effect of low temperature storage time on the stability of yellow syrup yoghurt[J]. Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition), 2023, 51(3): 132−142.]
[30] 崔方超, 韩瑜娟, 李婷婷, 等. 乳酸菌代谢物中黄嘌呤氧化酶抑制剂的筛选[J]. 中国食品学报, 2022, 22(8): 11−21. [CUI Fangchao, HAN Yujuan, LI Tingting, et al. Screening of xanthine oxidase inhibitors in lactic acid bacteria metabolites[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(8): 11−21.]
[31] 王鑫磊, 王萌, 闫春晓, 等. 马乳酒样乳杆菌 ZW3 对酸奶风味及质构的影响[J]. 食品科学, 2022, 43(10): 119−123. [WANG Xinlei, WANG Meng, YAN Chunxiao. Effects of *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 on flavor and texture of yogurt[J]. Food Science, 2022, 43(10): 119−123.]
[32] XU Y, ZHAO J, LIU X, et al. Flavor mystery of Chinese traditional fermented Baijiu: The great contribution of ester compounds[J]. Food Chem, 2022, 369: 130920.
[33] 鲍忠定. 吹扫捕集-GC/MS 法测定不同酒龄绍兴酒中挥发性化合物[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2008. [BAO Zhongding. Determination of volatile compounds in Shaoxing wine of different ages by purge and Trap-GC/MS[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2008.]
[34] 尤宇漫, 徐岩, 范文来, 等. 金种子馥合香白酒香气成分分析[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(9): 291−297. [YU Y M, XU Y, FAN W L, et al. Analysis of the aroma composition of Jinshi Fuhixiang liquor[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(9): 291−297.]
[35] 方颂平, 刘飞翔, 邢爽, 等. 白酒饮后舒适度评价及其与主要风味成分相关性分析[J]. 食品科学技术学报, 2024, 42(3): 70−80. [FANG Songping, LIU Feixiang, XING Shuang, et al. Evaluation of post-drinking comfort of white wine and its correlation analysis with main flavor components[J]. Journal of Food Science and Technology, 2024, 42(3): 70−80.]
[36] CHUA J Y, LIU S Q. Effect of single amino acid addition on growth kinetics and flavor modulation by *Torulaspora delbrueckii* in soy (tofu) whey alcoholic beverage fermentation[J]. Food Research International, 2020, 135: 109283.
[37] TIAN H X, SHI Y H, ZHANG Y, et al. Screening of aroma-producing lactic acid bacteria and their application in improving the aromatic profile of yogurt[J]. Food Biochem, 2019, 43(10): e12837
[38] 杨镰, 王天杨, 吴宝珠, 等. 基于 GC-IMS 结合多元统计模型分析不同酵母菌发酵对豆汤酱挥发性化合物的影响[J]. 食品工业科技, 2024, 45(14): 282−289. [YANG Xian, WANG Tianyang, WU Baozhu, et al. Analysis of the effect of different yeast fermentation on volatile compounds in bean soup sauce based on GC-IMS combined with multivariate statistical modeling[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(14): 282−289.]
[39] 贺子玉, 何心, 胡楠, 等. 发酵辣椒中的微生物及其风味物质研究进展[J]. 现代食品科技, 2023, 39(8): 334−342. [HE Ziyu, HE Xin, HU Nan, et al. Progress of research on microorganisms and their flavour substances in fermented chilli peppers[J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(8): 334−342.]
[40] AL-ATTABI Z, D'ARCY B R, DEETH H C. Volatile sulphur compounds in UHT milk[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2009, 49(1): 28−47.
[41] KIM Y H, KIM D H, LIM H, et al. The anti-inflammatory effects of methylsulfonylmethane on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in murine macrophages[J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2009, 32(4): 651−656.
[42] KARABAY A Z, AKTAN F, SUNGUROGLU A, et al. Methylsulfonylmethane modulates apoptosis of LPS/IFN-gamma-activated RAW264.7 macrophage-like cells by targeting p53, Bax, Bcl-2, cytochrome c and PARP proteins[J]. Immunopharmacology and Immunotoxicology, 2014, 36(6): 379−389.
[43] 郭丹, 张黎梦, 印遇龙, 等. 二甲基砜的生物学功能及其在宠物营养与食品中的应用[J]. 饲料工业, 2023, 44(11): 87−92. [GUO Dan, ZHANG Limeng, YIN Yulong, et al. Biological function of dimethyl sulfone and its application in pet nutrition and food[J]. Feed Industry, 2023, 44(11): 87−92.]
[44] 罗晓凤, 李涛, 张亚楠. 顶空固相微萃取-GC/MS 法分析栝楼瓤的香气成分[J]. 华西药学杂志, 2022, 37(6): 655−657. [LUO Xiaofeng, LI Tao, ZHANG Yanan. Analysis of aroma components in *Trichosanthes kirilowii* pulp by headspace solid phase microextraction-GC/MS[J]. West China Journal of Pharmaceutical Sciences, 2022, 37(6): 655−657.]
[45] 贺红军, 邹慧, 孙宁, 等. 紫薯酸奶和普通酸奶挥发性风味物质差异性研究[J]. 现代食品科技, 2014, 30(8): 225−230. [HE Hongjun, ZOU Hui, SUN Ning, et al. Study on the difference of volatile flavor substances between purple sweet potato yogurt and ordinary yogurt[J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(8): 225−230.]
[46] 齐琳, 王帅, 苏晨, 等. 乳酸菌发酵核桃酸乳不良气味的形成与分析[J]. 食品科学, 2022, 43(14): 234−241. [QI Lin, WANG Shuai, SU Chen, et al. The formation and analysis of the bad odor of

walnut yoghurt fermented by lactic acid bacteria[J]. Food Science, 2022, 43(14): 234−241.]
[47] 李婷, 田佳乐, 刘洋, 等. 基于固相微萃取-气相色谱-质谱与电子鼻技术分析发酵乳中的挥发性风味物质[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(10): 233−241. [LI Ting, TIAN Jiale, LIU Yang, et al. Analysis of volatile flavor compounds in fermented milk based on solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry and electronic nose technology[J]. Food and Fermentation Industry, 2020, 46(10): 233−241.]
[48] 马瑞娟, 许英瑞, 薛元泰, 等. 牦牛乳风味物质及影响因素研究进展[J]. 食品工业科技, 2020, 41(10): 363−368. [MA Ruijuan, XU Yingrui, XUE Yuantai, et al. Progress of research on yak milk flavour substances and influencing factors[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(10): 363−368.]
[49] 顾军强, 钟葵, 周素梅, 等. 不同热处理燕麦片风味物质分析[J]. 现代食品科技, 2015, 31(4): 282−288,62. [GU Junqiang, ZHONG Kui, ZHOU Sumei, et al. Analysis of flavor substances of oatmeal with different heat treatments[J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(4): 282−288,62.]
[50] 李杰, 张鹏霞, 周健, 等. 传统泡菜中高效降解核苷乳酸菌的筛选及其特性研究[J]. 食品与发酵工业, 2024, 50(12): 227−233. [LI Jie, ZHANG Pengxia, ZHOU Jian, et al. Screening and characterization of efficient nucleoside-degrading lactic acid bacteria in traditional pickles[J]. Food and fermentation industry, 2024, 50(12): 227−233.]
[51] 任宇杰, 单成俊, 王英, 等. 降解嘌呤核苷乳酸菌的筛选及益生特性探索[J]. 微生物学通报, 2023, 50(2): 541−552. [REN Yujie, DAN Chengjun, WANG Ying, et al. Screening of purine nucleoside-degrading lactic acid bacteria and exploration of their probiotic properties[J]. Microbiology China, 2023, 50(2): 541−552.]
[52] 李幸. 冠突散囊菌发酵绿茶莓茶潜在体外降尿酸活性的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2022. [LI Xing. Study on the potential *in vitro* uric acid-lowering activity of green tea berry tea fermented with *Aspergillus coronarius*[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2022.]
[53] 刘向蕾. 酸奶贮藏期间乳酸菌含量及 pH 值变化的测定分析[J]. 科技信息, 2009, 310(26): 184,186. [LIU Xianglei. Determination and analysis of lactic acid bacteria content and pH value changes during yogurt storage[J]. Science and Technology Information, 2009, 310(26): 184,186.]

陈卫军, 朱巧岚, 汪海洋, 等. 超声预处理对酪蛋白酸钠-EGCG 相互作用及其复合物抗氧化活性的影响 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 30−36. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023100201
CHEN Weijun, ZHU Qiaolan, WANG Haiyang, et al. Effects of Ultrasound Pretreatment on Sodium Caseinate-EGCG Interactions and the Antioxidant Activity of Their Complexes[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 30−36. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023100201

· 研究与探讨 ·

超声预处理对酪蛋白酸钠-EGCG 相互作用及其复合物抗氧化活性的影响

陈卫军[1], 朱巧岚[1], 汪海洋[2], 刘东红[2]
（1.成都大学食品与生物工程学院, 四川成都 610106;
2.浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 浙江杭州 310058）

摘　要: 采用荧光分光光度计、紫外分光光度计等研究了超声预处理对酪蛋白酸钠-表没食子儿茶素没食子酸酯（(-)-epigallocatechin-3-gallate，EGCG）相互作用及其复合物抗氧化活性的影响，并从蛋白质结构变化上探究了其作用机理。结果表明：EGCG 对酪蛋白酸钠内源荧光的淬灭形式为静态淬灭。超声预处理后酪蛋白酸钠同 EGCG 之间的结合常数由 9.51×10^3 L·(mol/L)$^{-1}$ 提高至 7.48×10^4 L·(mol/L)$^{-1}$，结合位点数由 0.871 提高至 1.067，分别提高了 7.87 倍和 22.50%，说明二者结合能力增强。同酪蛋白酸钠相比，超声预处理酪蛋白酸钠无规卷曲含量增加，内源荧光强度和表面疏水性指数增强，结构的改变促进了其同 EGCG 的结合。酪蛋白酸钠-EGCG 复合物的形成可以抑制 EGCG 的降解、提高其抗氧化稳定性，而超声预处理能增强复合物的这一作用。

关键词: 酪蛋白酸钠, 表没食子儿茶素没食子酸酯, 超声, 相互作用, 抗氧化活性
中图分类号: TS201.2　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2024)21−0030−07
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023100201
本文网刊:

Effects of Ultrasound Pretreatment on Sodium Caseinate-EGCG Interactions and the Antioxidant Activity of Their Complexes

CHEN Weijun[1], ZHU Qiaolan[1], WANG Haiyang[2], LIU Donghong[2]
（1.College of Food and Biological Engineering, Chengdu University, Chengdu 610106, China;
2.School of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China）

Abstract: The interaction between sodium caseinate and (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and the antioxidant activity of their complexes as influenced by ultrasound pretreatment were studied by a fluorescence spectrophotometer and an ultraviolet spectrophotometer, and its mechanism was also investigated base on the changes in protein structure. The results showed that the quenching of the endogenous fluorescence of sodium casein induced by EGCG was a static nature. With ultrasound pretreatment, the apparent binding constant between sodium caseinate and EGCG increased from 9.51×10^3 L·(mol/L)$^{-1}$ to 7.48×10^4 L·(mol/L)$^{-1}$ and the number of binding sites between sodium caseinate and EGCG increased from 0.871 to 1.067, indicating an increase of 7.87 times and 22.50%, respectively. The results revealed that ultrasound pretreatment could enhance the binding capacity of sodium caseinate for EGCG. Compared with sodium caseinate, ultrasound pretreated sodium caseinate showed higher random coil content, fluorescence intensity and surface hydrophobicity. These ultrasound-induced conformational changes promoted the binding between sodium casein and EGCG. Complexing with sodium caseinate could inhibit the degradation of EGCG and improve its antioxidant stability, and better protection was obtained by complexing EGCG with ultrasound pretreated sodium caseinate.

Key words: sodium caseinate; (-)-epigallocatechin-3-gallate; ultrasound; interaction; antioxidant activity

收稿日期: 2023−10−25
基金项目: 四川省自然科学基金（2022NSFSC1617, 2022NSFSC1764）。
作者简介: 陈卫军（1986−）, 男, 博士, 副教授, 研究方向: 功能因子稳态化技术与食品营养, E-mail: cwj19860417@163.com。

表没食子儿茶素没食子酸酯((-)-epigallocatechin-3-gallate, EGCG)是绿茶中的主要儿茶素，不仅具有广泛的抗菌活性[1]，还是一种优良的抗氧化剂，其清除烷基过氧自由基的能力比 L-抗坏血酸和 β-胡萝卜素高一个数量级[2]。此外，大量研究发现 EGCG 对预防癌症[3]、心血管疾病[4]、阿尔茨海默病[5]、神经退行性疾病[6]、肥胖[7]、非酒精性脂肪肝[8] 等均具有显著作用。因此，EGCG 在食品和医药领域的应用潜力巨大。因其具有多种生物活性，EGCG 不仅可以作为抗氧化剂和抗菌剂应用于食品中，以抑制脂质氧化并延长食品保质期，还可以作为功能性配料用于开发功能食品，为消费者的健康提供益处[9]。

EGCG 虽然具有多种生理活性，但对 pH、温度、氧浓度、光或金属离子等环境因素敏感[10]。水体系中的 EGCG 在 pH 小于 4 时非常稳定，而当 pH 大于 6 时非常不稳定[11]。Fe^{2+}等金属离子能直接导致 EGCG 氧化或催化溶解氧对 EGCG 的氧化作用[12]，而溶解氧浓度或温度升高、光照等因素也会加速 EGCG 的降解[13]。EGCG 的氧化和聚合产物会导致原本无色的水溶液转变为黄棕色，从而对一些食品体系色泽产生不利影响[14]。此外，由于 EGCG 的稳定性和肠道吸收较差，其口服生物利用度低[15]。这些理化和生物学性质极大地限制了 EGCG 在食品中的应用。因此，采取有效措施克服 EGCG 的这些局限是推动其应用的关键。

采用食品递送体系对 EGCG 进行包埋或负载，是改善其稳定性和生物利用度的一种有效途径[16]。近年来，基于蛋白质-多酚非共价复合物的递送体系因其制作简单、效果好而受到广泛关注。据报道，将食物蛋白同 EGCG 结合可以显著提高其稳定性、生物可及性以及抗肿瘤活性[17]。蛋白质结构是影响其与多酚相互作用的重要因素，结构变化可能导致亲和力改变。研究发现，加热[14]、pH 偏移[18] 和超声[19] 处理可以通过改变乳清蛋白结构来提高其同 EGCG 的结合能力，进而增强对 EGCG 的保护作用。酪蛋白无规卷曲含量达 30%~35%，且脯氨酸含量高，是 EGCG 的优良载体材料[20]。但由于酪蛋白水溶性较差，实际食品生产中常使用水溶性更好的酪蛋白酸钠。作为一种经济、安全和生态友好的技术，超声是蛋白质改性常用的方法之一[21]。然而，超声预处理对酪蛋白酸钠和 EGCG 相互作用的影响仍未见报道。因此，本实验研究了超声预处理对酪蛋白酸钠与 EGCG 的结合能力和所形成复合物抗氧化活性的影响，并对其机理进行了探索。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

酪蛋白酸钠(BR 级)、2,4,6-三(2-吡啶基)-1,3,5-三嗪(TPTZ)　阿拉丁试剂有限公司；EGCG(90%)　上海源叶生物技术有限公司；2,2-二苯基-1-苦基肼基(DPPH)、8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)　Sigma-Aldrich 公司；甲醇(色谱级)　Tedia 公司；其他化学试剂(分析纯)　国药集团上海化学试剂有限公司。

JY92-IIDN 超声波细胞粉碎机　宁波新芝生物科技股份有限公司；DC-1006 低温恒温槽　宁波赛福实验仪器有限公司；J1500 圆二色谱仪　日本 JASCO 公司；Cary Eclipse 荧光分光光度计　美国瓦里安公司；UV-2550 紫外可见分光光度计　日本岛津公司；e2695 高效液相色谱　美国 Waters 公司。

1.2　实验方法

1.2.1　超声预处理　将酪蛋白酸钠溶于 pH6.5 的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS, 0.01 mol/L)中，搅拌 2 h 后制备得到浓度为 10 mg/mL 的溶液。将该溶液预热至 60 ℃ 后，在超声功率 200 W 条件下处理 30 min(预实验优化结果)，然后迅速冷却至室温。采用的变幅杆直径为 10 mm，占空比设置为 50%。

1.2.2　荧光淬灭分析　以 PBS(0.01 mol/L, pH6.5)将超声预处理和未处理的酪蛋白酸钠溶液稀释至 0.2 mg/mL，然后与不同浓度的 EGCG 溶液(现配现用)等体积混合，混合液中 EGCG 浓度分别为 0、2.5、5、7.5、10、15、20 μmol/L。采用荧光分光光度计获得混合液在 280 nm 激发波长下 300~500 nm 范围内的发射光谱。参考文献 [22] 的方法分析酪蛋白酸钠-EGCG 之间的淬灭类型、结合位点数和结合常数。

1.2.3　超声预处理对酪蛋白酸钠结构的影响

1.2.3.1　圆二色谱分析　以 PBS(0.01 mol/L, pH6.5)将超声预处理和未处理的酪蛋白酸钠溶液稀释至 0.25 mg/mL，然后采用文献 [18] 所述方法测定分析样品的 α-螺旋、β-折叠、β-转角和无规卷曲含量。

1.2.3.2　内源荧光光谱分析　以 PBS(0.01 mol/L, pH6.5)将超声预处理和未处理的酪蛋白酸钠溶液稀释至 0.2 mg/mL，然后采用荧光分光光度计测定样品在 280 nm 激发波长下 300~500 nm 范围内的发射光谱。

1.2.3.3　表面疏水性分析　以 PBS(0.01 mol/L, pH 6.5)将超声预处理和未处理的酪蛋白酸钠溶液稀释至 0.005、0.01、0.05、0.1、0.5 mg/mL。然后采用文献 [23] 所述 ANS 荧光探针法测定其表面疏水性指数。

1.2.4　酪蛋白酸钠-EGCG 复合物的制备　将超声预处理和未处理的酪蛋白酸钠溶液(10 mg/mL)分别同 EGCG 溶液(0.5 mg/mL，现配现用)等体积混合，室温下搅拌均匀即为酪蛋白酸钠-EGCG 复合物溶液。

1.2.5　复合物抗氧化活性测定　向 EGCG 溶液(0.25 mg/mL，现配现用)、酪蛋白酸钠溶液(5 mg/mL)、超声预处理酪蛋白酸钠溶液(5 mg/mL)、复合物溶液(蛋白质浓度 5 mg/mL，EGCG 浓度 0.25 mg/

mL)中加入 0.02% 叠氮化钠,然后在室温下放置 7 d,每天取样分析其抗氧化活性。

DPPH 自由基清除活性测定:以无水乙醇配制 0.2 mol/L 的 DPPH 溶液,取 4.9 mL 同 0.1 mL 样品溶液混合,室温下避光反应 0.5 h,测定反应液在 517 nm 处的吸光值(A)。以 0.1 mL PBS 同 4.9 mL DPPH 溶液的混合液作为空白,测定其在 517 nm 处的吸光值(A_c)。按下式计算其 DPPH 自由基清除率(%):

$$清除率(\%)=\left(1-\frac{A}{A_c}\right)\times 100 \qquad 式(1)$$

三价铁还原能力(FRAP)测定:将 0.1 mL 样品溶液同 4.9 mL TPTZ 工作液(现配现用,配制方法参考文献 [23])混合后于 37 ℃ 下振荡反应 10 min,然后测定反应液在 593 nm 下的吸光度。

1.2.6 EGCG 稳定性分析 向 EGCG 溶液(0.25 mg/mL)和复合物溶液(蛋白浓度 5 mg/mL,EGCG 浓度 0.25 mg/mL)中加入 0.02% 叠氮化钠,然后在室温下放置 7 d,每天取样分析 EGCG 含量变化。样品溶液以无水乙醇稀释 10 倍,14000 r/min 离心 10 min,上清液过 0.22 μm 滤膜后采用文献 [17] 所述高效液相色谱法分析 EGCG 含量。

1.3 数据处理

所有处理均设置 3 组平行,采用 SPSS 软件以 Duncan 法进行显著性分析,显著水平为 $P<0.05$。采用 Origin 2018 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 超声预处理对酪蛋白酸钠-EGCG 相互作用的影响

如图 1 所示,随着 EGCG 添加浓度的增加,酪蛋白酸钠和超声预处理酪蛋白酸钠的荧光强度均逐渐降低,说明二者之间发生了相互作用,对蛋白质的内源荧光产生了淬灭效应。这可能是因为 EGCG 的芳香环同蛋白质的酪氨酸残基结合所致[22]。从图 1 还可以看到,EGCG 的添加使得酪蛋白酸钠和超声预处理酪蛋白酸钠的最大发射波长均发生了一定程度的红移,说明 EGCG 同荧光基团残基之间的相互作用使后者微环境的极性增加[22]。

多酚对蛋白质内源荧光的淬灭作用既能通过形成配合物(静态猝灭)导致,也能通过发生碰撞(动态猝灭)来实现。采用 Stern-Volmer 方程($F_0/F=1+K_q\times\tau_0\times[Q]=1+K_{sv}\times[Q]$,$F_0$ 和 F 为不添加和添加淬灭剂时的最大荧光强度;[Q] 为淬灭剂浓度(μmol/L);K_q 为荧光猝灭速率常数;τ_0 为没有猝灭剂时物质的荧光平均寿命(一般为 10^{-8} s);K_{sv} 为 Stern-Volmer 猝灭常数)分析其淬灭类型,所得拟合曲线及淬灭常数分别如图 2 和表 1 所示。两条曲线的决定系数 R^2 分别为 0.998 和 0.999,拟合度较好。对于酪蛋白酸钠和超声预处理酪蛋白酸钠,其荧光猝灭速率常数

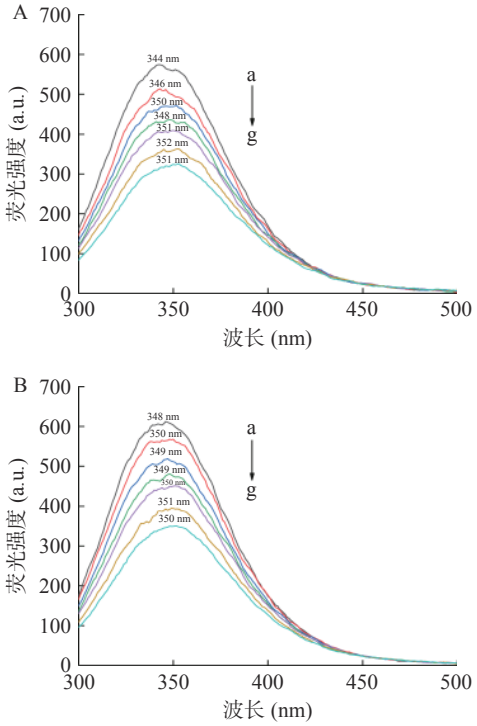


图 1 EGCG 对酪蛋白酸钠(A)和超声预处理酪蛋白酸钠(B)内源荧光的淬灭作用

Fig.1 Quenching effect of EGCG on the fluorescence spectra of sodium caseinate (A) and ultrasound pretreated sodium caseinate (B)

注:a~g:0、2.5、5.0、7.5、10.0、15.0、20 μmol/L EGCG。

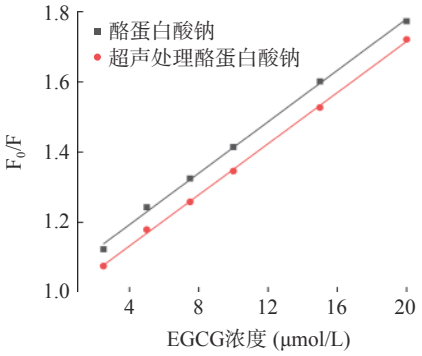


图 2 EGCG 与不同样品相互作用的 Stern-Volmer 曲线

Fig.2 Stern-Volmer curves of the interactions between EGCG and different samples

表 1 EGCG 对不同样品的淬灭速率常数和决定系数

Table 1 Quenching rate constants and determination coefficients of EGCG for different samples

样品	Stern-Volmer猝灭常数(L·(mol/L)$^{-1}$·s^{-1})	荧光猝灭速率常数(L·(mol/L)$^{-1}$·s^{-1})	R^2
酪蛋白酸钠	3.64×10^4	3.64×10^{12}	0.998
超声处理酪蛋白酸钠	3.66×10^4	3.66×10^{12}	0.999

分别为 3.64×10^{12} 和 3.66×10^{12} L·(mol/L)$^{-1}$·s^{-1},均大于最大动态猝灭速率常数(2×10^{10} L·(mol/L)$^{-1}$·s^{-1}),说明 EGCG 是以静态淬灭的方式对酪蛋白酸钠内源荧光产生淬灭作用[22],而超声预处理不会改变其淬灭方式。

根据双对数曲线方程($\lg[(F_0-F)/F]=n\lg[Q]+$

lgK_a)来计算静态猝灭的结合常数(K_a)和结合位点数(n)，所得拟合曲线和结果如图 3 和表 2 所示。两条曲线的决定系数 R^2 分别为 0.998 和 0.997，线性拟合度高。超声预处理后，EGCG 同酪蛋白酸钠的结合常数由 9.51×10^3 L·(mol/L)$^{-1}$ 提高至 7.48×10^4 L·(mol/L)$^{-1}$，结合位点数由 0.871 提高至 1.067，分别提高了 7.87 倍和 22.50%。说明超声预处理可以提高酪蛋白酸钠同 EGCG 之间的结合能力。Zhang 等[24]研究也发现超声处理能够增强牛血清白蛋白对表儿茶素没食子酸酯的结合力，而 Chen 等[19]研究也证实超声处理后，乳清分离蛋白同 EGCG 之间的结合常数和结合位点数均显著提高。

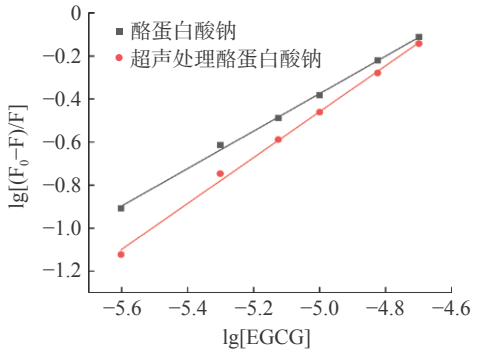


图 3　EGCG 与不同样品相互作用的双对数 Stern-Volmer 曲线

Fig.3　Double logarithmic Stern-Volmer curves of the interactions between EGCG and different samples

表 2　EGCG 对不同样品的表观结合常数(K_a)和结合位点数(n)

Table 2　Apparent binding constant (K_a) and the number of binding sites (n) of EGCG for different samples

样品	K_a (L·(mol/L)$^{-1}$)	n	R^2
酪蛋白酸钠	9.51×10^3	0.871	0.998
超声处理酪蛋白酸钠	7.48×10^4	1.067	0.997

2.2　超声预处理强化酪蛋白酸钠-EGCG 相互作用的机理分析

蛋白质结构是影响其同多酚相互作用的主要因素之一，相对疏水、具有开放构象和柔性结构的蛋白质，同多酚之间具有较强的结合[25]。为了揭示超声预处理强化酪蛋白酸钠-EGCG 相互作用的机理，本实验分析了超声预处理对酪蛋白酸钠二级结构、三级结构和表面疏水性的影响。由图 4 可知，超声预处理后酪蛋白酸钠圆二色谱图负吸收峰明显降低，说明其二级结构发生了改变。采用 Dichroweb 在线数据库分析二级结构组成，发现超声预处理后酪蛋白酸钠的 α-螺旋和 β-转角含量分别降低了 6.00% 和 2.77%，而无规卷曲含量增加了 4.94%。说明酪蛋白酸钠分子刚性结构减弱，柔性结构增加[26]。据报道，蛋白质的柔性开放结构(存在于蛋白质的无规卷曲中)在其同 EGCG 的结合过程中发挥了重要作用[20]。因此，超声预处理后酪蛋白酸钠二级结构中无规卷曲含量增加，蛋白分子柔性结构增加、无序程度增强，有利于其同 EGCG 的结合。

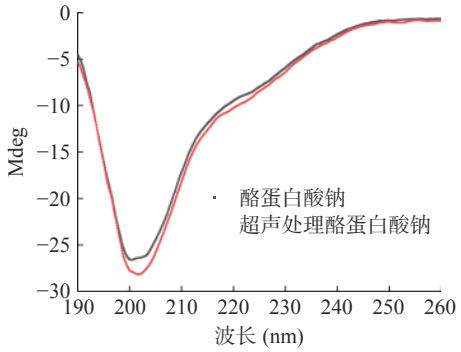


图 4　超声预处理对酪蛋白酸钠圆二色谱的影响

Fig.4　Effect of ultrasound pretreated on the circula dichroism spectra of sodium caseinate

超声预处理对酪蛋白酸钠内源荧光光谱的影响如图 5 所示。相较于酪蛋白酸钠，超声预处理酪蛋白酸钠的荧光强度明显增强，且最大发射波长发生了 4 nm 的红移。说明超声预处理后，部分蛋白质分子内部的荧光基团暴露至表面，且荧光基团微环境极性增强[27]。这可能是因为超声处理破坏了部分蛋白质分子内部的疏水相互作用，导致蛋白质分子折叠展开所致[28]。超声预处理后酪蛋白酸钠表面疏水性的变化也证实了该推测。由图 6 可知，超声预处理后酪蛋白酸钠的表面疏水性指数由 631.89 显著($P<$

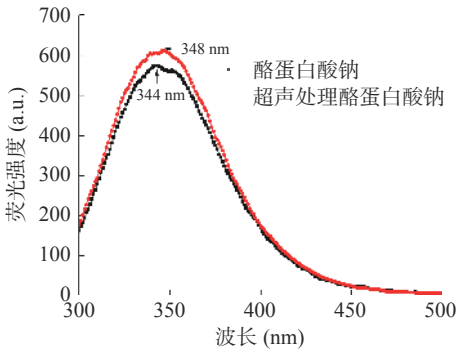


图 5　超声预处理对酪蛋白酸钠内源荧光光谱的影响

Fig.5　Effect of ultrasound pretreated on the fluorescence emission spectra of sodium caseinate

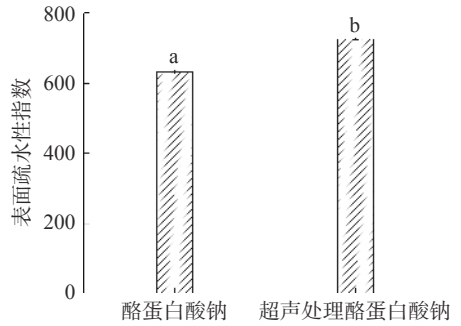


图 6　超声预处理对酪蛋白酸钠表面疏水性的影响

Fig.6　Effect of ultrasound pretreated on the surface hydrophobicity of sodium caseinate

注：图中不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

0.05)提高至 726.31, 说明有更多的疏水基团暴露至分子表面。Yildirim-Elikoglu 等[29] 指出, 氢键和疏水相互作用是蛋白质和多酚之间的主要结合作用。因此, 超声预处理后酪蛋白酸钠分子表面暴露有更多的疏水基团, 不仅能增强其同 EGCG 的疏水相互作用, 还有利于二者间氢键的形成[30], 进而增强二者之间的结合。

蛋白质的大小、构象、二级结构、三级结构和氨基酸组成等特征是影响其同多酚结合的重要因素。据报道, 碱性残基和脯氨酸含量较高、相对疏水、具有开放构象和柔性结构的蛋白质, 同多酚之间具有较强的结合[25]。因此, 超声预处理主要通过改变酪蛋白酸钠分子结构, 使其柔性结构和表面疏水性增加, 进而增强其同 EGCG 的相互作用。

2.3 超声预处理对酪蛋白酸钠-EGCG 复合物抗氧化活性的影响

室温下储藏 7 d 过程中, 酪蛋白酸钠、超声预处理酪蛋白酸钠、EGCG、酪蛋白酸钠-EGCG 复合物和超声预处理酪蛋白酸钠-EGCG 复合物的抗氧化活性变化如图 7 所示。从图中可以看到, 酪蛋白酸钠的抗氧化活性很低, 而超声预处理对其抗氧化活性没有明显影响。EGCG 同酪蛋白酸钠形成复合物后, 赋予其良好的抗氧化活性。由于 EGCG 的降解,

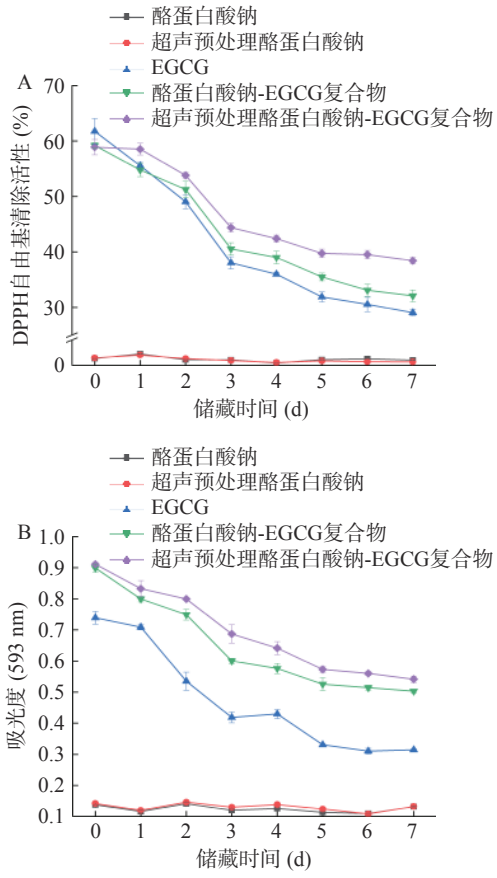


图 7 储藏期间样品的抗氧化活性变化

Fig.7 Changes in the antioxidant activities of samples during storage

注: A: DPPH 自由基清除活性评价; B: FRAP 评价。

EGCG 溶液的抗氧化活性随着储藏时间的延长而快速降低。相较于 EGCG 溶液, 复合物溶液抗氧化活性的下降速率明显变缓。该结果同相关文献报道[13]一致, 说明蛋白质同多酚形成复合物后可以对后者的抗氧化活性提供保护作用。

从图 7 还可以看到, 超声预处理酪蛋白酸钠-EGCG 复合物抗氧化活性的降低速率要低于酪蛋白酸钠- EGCG 复合物抗氧化活性的降低速率。储藏 7 d 后, 酪蛋白酸钠-EGCG 复合物的 DPPH 自由基清除活性和三价铁还原能力分别降低了 45.78%±1.19% 和 44.01%±0.67%, 而超声预处理酪蛋白酸钠-EGCG 复合物仅降低了 34.75%±0.74% 和 40.59%±1.05%。这可能是因为超声预处理后的蛋白质同 EGCG 的结合能力增强(2.1 已证实)。据报道, 采用热[14]、pH 偏移[18] 和超声[19] 等方式改性蛋白质, 均能赋予蛋白-EGCG 复合物更好的抗氧化活性稳定性。

复合物的抗氧化活性主要源于 EGCG, 因此本研究进一步分析了储藏期间样品中 EGCG 含量的变化。如图 8 所示, EGCG 在纯溶液中降解很快, 7 d 后保留率仅为 17.41%±0.18%。相较于纯溶液, 复合物溶液中 EGCG 的降解速率明显较低。该结果同抗氧化活性变化趋势一致。储藏 7 d 后, 酪蛋白酸钠-EGCG 复合物和超声预处理酪蛋白酸钠-EGCG 复合物溶液中 EGCG 的保留率分别为 20.40%±1.16% 和 25.45%±0.14%。说明超声预处理可以增强复合物对 EGCG 的保护作用。这可能是因为超声预处理酪蛋白酸钠能够结合更多的 EGCG 分子, 进而对其产生更好的保护作用[21]。

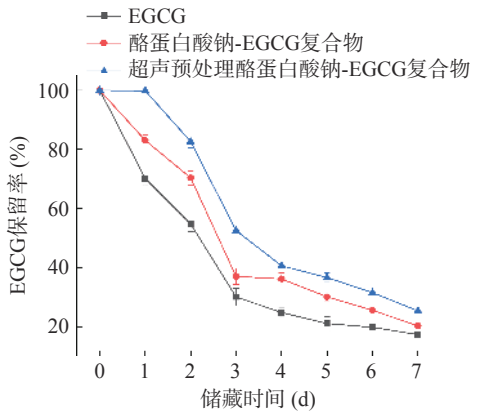


图 8 储藏期间复合物对 EGCG 的保护作用

Fig.8 Protective effect of the complexes on EGCG during storage

3 结论

本实验系统研究了超声预处理对酪蛋白酸钠-EGCG 相互作用及其复合物抗氧化活性的影响, 并对其机理进行了探索。结果表明超声预处理能增强酪蛋白酸钠同 EGCG 之间的相互作用。超声预处理使酪蛋白酸钠二级结构中 α-螺旋降低、无规卷曲含量增加, 内源荧光强度和表面疏水性指数增强, 导致其分子柔性结构和表面疏水基团增加, 从而增强其

同 EGCG 的相互作用。酪蛋白酸钠同 EGCG 形成复合物后，可以对后者产生保护作用，抑制储藏过程中 EGCG 抗氧化活性的降低。而超声预处理后，酪蛋白酸钠同 EGCG 的结合能力更强，该作用进一步增强。本研究可为超声波在酪蛋白酸钠基 EGCG 及其他多酚传递体系的设计和强化提供新思路。

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

参考文献

[1] 季天晨. 生物基原料与 EGCG 接枝共聚物的合成及性能研究[D]. 无锡: 江南大学, 2022. [JI T C. Study on the synthesis and properties of EGCG grafted Bio-based raw materials[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2022.]

[2] NAKAO M, TAKIO S, ONO K. Alkyl peroxyl radical-scavenging activity of catechins[J]. Phytochemistry, 1998, 49(8): 2379−2382.

[3] GAN R Y, LI H B, SUI Z Q, et al. Absorption, metabolism, anti-cancer effect and molecular targets of epigallocatechin gallate (EGCG): An updated review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2018, 58(6): 924−941.

[4] KON M, ISHIKAWA T, OHASHI Y, et al. Epigallocatechin gallate stimulated histamine production and downregulated histamine H1 receptor in oral cancer cell lines expressing histidine decarboxylase[J]. Journal of Oral Biosciences, 2022, 64(1): 120−130.

[5] FANG M, ZHANG Q, WANG X, et al. Inhibition mechanisms of (-)-epigallocatechin-3-gallate and genistein on amyloid-beta 42 peptide of alzheimer's disease via molecular simulations[J]. ACS Omega, 2022, 7(23): 19665−19675.

[6] RAPOSO D, MORGADO C, PEREIRA-TERRA P, et al. Nociceptive spinal cord neurons laminae I-III exhibit oxidative stress damage during diabetic neuropathy which is prevented by early antioxidant treatment with epigallocatechin-gallate (EGCG)[J]. Brain Research Bulletin, 2015, 110: 68−75.

[7] ZHU M, ZHOU F, OUYANG J, et al. Combined use of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and caffeine in low doses exhibits marked anti-obesity synergy through regulation of gut microbiota and bile acid metabolism[J]. Food & Function, 2021, 12: 4105−4116.

[8] CHEN C, LIU Q, LIU L, et al. Potential biological effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on the treatment of nonalcoholic fatty liver disease[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2018, 62(1): 1700483.

[9] NIKOO M, REGENSTEIN J M, GAVLIGHI H A. Antioxidant and antimicrobial activities of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and its potential to preserve the quality and safety of foods[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2018, 17(3): 732−753.

[10] RODRIGUES C F, ASCENCAO K, SILVA F A M, et al. Drug-delivery systems of green tea catechins for improved stability and bioavailability[J]. Current Medicinal Chemistry, 2013, 20(37): 4744−4757.

[11] LI N, TAYLOR L S, FERRUZZI M G, et al. Kinetic study of catechin stability: Effects of pH, concentration, and temperature[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(51): 12531−12539.

[12] YASUDA M, MATSUDA C, OHSHIRO A, et al. Effects of metal ions (Cu^{2+}, Fe^{2+} and Fe^{3+}) on HPLC analysis of catechins[J]. Food Chemistry, 2012, 133(2): 518−525.

[13] CHEN W J, LÜ R L, MUHAMMAD A I, et al. Fabrication of (-)-epigallocatechin-3-gallate carrier based on glycosylated whey protein isolate obtained by ultrasound Maillard reaction[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2019, 58: 104678.

[14] SHPIGELMAN A, COHEN Y, LIVNEY Y D. Thermally-induced beta-lactoglobulin-EGCG nanovehicles: Loading, stability, sensory and digestive-release study[J]. Food Hydrocolloids, 2012, 29(1): 57−67.

[15] SINGH B N, SHANKAR S, SRIVASTAVA R K. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Mechanisms, perspectives and clinical applications[J]. Biochemical Pharmacology, 2011, 82(12): 1807−1821.

[16] SAHADEVAN R, SINGH S, BINOY A, et al. Chemico-biological aspects of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) to improve its stability, bioavailability and membrane permeability: Current status and future prospects[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2023, 63(30): 10382−10411.

[17] WU M, JIN J, JIN P, et al. Epigallocatechin gallate-beta-lactoglobulin nanoparticles improve the antitumor activity of EGCG for inducing cancer cell apoptosis[J]. Journal of Functional Foods, 2017, 39: 257−263.

[18] CHEN W J, WANG W J, MA X B, et al. Effect of pH-shifting treatment on structural and functional properties of whey protein isolate and its interaction with (-)-epigallocatechin-3-gallate[J]. Food Chemistry, 2019, 274: 234−241.

[19] CHEN W J, WANG H Y, WANG W J, et al. Binding affinity and antioxidant activity of the complex of (-)-epigallocatechin-3-gallate and whey protein isolate: Effect of ultrasound pretreatment [J]. Journal of Food Process Engineering, 2020, 43: e13081.

[20] BOHIN M C, VINCKEN J P, VAN DER HIJDEN H T W M, et al. Efficacy of food proteins as carriers for flavonoids[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(16): 4136−4143.

[21] SHEN X, FANG T, GAO F, et al. Effects of ultrasound treatment on physicochemical and emulsifying properties of whey proteins pre- and post-thermal aggregation[J]. Food Hydrocolloids, 2017, 63: 668−676.

[22] 高瑾, 梁宏闪, 赵靖昀, 等. 玉米醇溶蛋白-多酚相互作用及复合物制备与表征[J]. 食品科学, 2022, 43(2): 8−17. [GAO J, LIANG H S, ZHAO J Y, et al. Interactions between zein and polyphenols and characterization of their complexes[J]. Food Science, 2022, 43(2): 8−17.]

[23] 陈卫军, 刘东红, 李云成, 等. 制备方法对乳清分离蛋白-绿原酸共价接枝物结构和功能性质的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(13): 43−50. [CHEN W J, LIU D H, LI Y C, et al. Effect of preparation methods on the structural and functional properties of whey protein isolate-chlorogenic acid conjugates[J]. Food Science, 2021, 42(13): 43−50.]

[24] ZHANG Q A, FU X Z, GARCIA MARTIN J F. Effect of ultrasound on the interaction between (-)-epicatechin gallate and bovine serum albumin in a model wine[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2017, 37: 405−413.

[25] BOURVELLEC C, RENARD C M G C. Interactions between poly-phenols and macromolecules: Quantification methods and mechanisms[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2012, 52(1-3): 213−248.

[26] 涂宗财, 包中宇, 王辉, 等. 超声波对大豆分离蛋白结构及其

形成谷氨酰胺转氨酶改性凝胶性质的影响[J]. 食品科学, 2015, 36(15): 15−19. [TU Z C, BAO Z Y, WANG H, et al. Effect of ultrasonic treatment on structure and gel properties induced by transglutaminase of soybean protein isolate[J]. Food Science, 2015, 36(15): 15−19.]

[27] 熊文飞, 李亚, 王立峰. 卵白蛋白-壳聚糖静电相互作用对蛋白质结构和热特性的影响[J]. 食品工业科技, 2021, 42(24): 55−59. [XIONG W F, LI Y, WANG L F. Electrostatic interaction of valbumin-chitosan on the effects of protein structure and thermal properties[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(24): 55−59.]

[28] JIANG L, WANG J, LI Y, et al. Effects of ultrasound on the structure and physical properties of black bean protein isolates[J]. Food Research International, 2014, 62: 595−601.

[29] 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, 2018, 34(7): 665−697.

[30] SHPIGELMAN A, ISRAELI G, LIVNEY Y D. Thermally-induced protein-polyphenol co-assemblies: Beta lactoglobulin-based nanocomplexes as protective nanovehicles for EGCG[J]. Food Hydrocolloids, 2010, 24(8): 735−743.

梁鑫富, 董庆亮. 光谱法结合分子对接技术研究柠檬苦素与牛血清白蛋白的相互作用 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 37−44. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023100285
LIANG Xinfu, DONG Qingliang. Spectroscopic Method Combined with Molecular Docking Technique to Study the Interaction of Limonin with Bovine Serum Albumin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 37−44. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023100285

·研究与探讨·

光谱法结合分子对接技术研究柠檬苦素与牛血清白蛋白的相互作用

梁鑫富[1,2,3], 董庆亮[2,3,*]
（1.广西大学轻工与食品工程学院, 广西南宁 530000;
2.北部湾大学食品工程学院, 广西钦州 535000;
3.广西高校北部湾海产品高值化利用与预制食品重点实验室, 广西钦州 535000）

摘　要: 为研究柠檬苦素（Limonin，LM）与牛血清白蛋白（Bovine serum albumin，BSA）相互作用，本文采用紫外光谱法、荧光光谱法及分子对接技术研究 LM 与 BSA 的相互作用机制。结果表明：LM 能有效淬灭 BSA 的内源荧光，其淬灭类型为静态淬灭；两者发生相互作用可形成 1 个结合位点，分子间作用力主要为氢键和范德华力，该相互作用过程为自发反应；紫外光谱及同步荧光光谱表明，LM 与 BSA 发生相互作用后，可以增加 BSA 上酪氨酸（Tyr）、色氨酸（Trp）残基微环境的疏水性；通过竞争位点实验及分子对接，发现 LM 与 BSA 的结合位点在 site Ⅰ附近，LM 可以与 BSA 上的 Trp-213 形成氢键，与 Tyr-340/451 等残基之间存在范德华力。

关键词: 柠檬苦素, 牛血清白蛋白, 相互作用, 荧光光谱, 分子对接
中图分类号: TS201.2　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2024)21−0037−08
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023100285
本文网刊:

Spectroscopic Method Combined with Molecular Docking Technique to Study the Interaction of Limonin with Bovine Serum Albumin

LIANG Xinfu[1,2,3], DONG Qingliang[2,3,*]
（1.College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning 530000, China;
2.Food Engineering College, Beibu Gulf University, Qinzhou 535000, China;
3.Guangxi College and University Key Laboratory of High-value Utilization of Seafood and Prepared Food in Beibu Gulf, Qinzhou 535000, China）

Abstract: In order to study the interaction between limonin (LM) and bovine serum albumin (BSA), in this paper, the interaction mechanism between LM and BSA was explored by ultraviolet (UV) spectroscopy, fluorescence spectroscopy and molecular docking technology. The results showed that LM could significantly quench the endogenous fluorescence of BSA, displaying a static quenching type. In addition, LM formed a binding site with BSA by hydrogen bonding and van der Waals forces, demonstrating a spontaneous interaction mechanism. Meanwhile, UV spectroscopy and synchronous fluorescence spectroscopy showed that the interaction between LM and BSA could increase the hydrophobicity of tyrosine (Tyr) and tryptophan (Trp) residue microenvironment on BSA. Through competition site experiments and molecular docking, it was found that the binding site between LM and BSA was near site Ⅰ, and LM could form hydrogen bonds with Trp-213 on BSA, and there were van der Waals forces between LM and Tyr-340/451 residues.

Key words: limonin; bovine serum albumin; interaction; fluorescence spectrum; molecular docking

收稿日期: 2023−11−03
基金项目: 广西科技厅科技基地和人才专项（桂科 AD20159019）; 北部湾大学高层次人才科研启动经费项目（2019KYQD10）。
作者简介: 梁鑫富（1997−）, 男, 硕士研究生, 研究方向: 天然活性成分开发及应用, E-mail: 1093398615@qq.com。
*** 通信作者:** 董庆亮（1980−）, 男, 博士, 副教授, 研究方向: 天然活性成分开发及应用, E-mail: dql80@163.com。

柠檬苦素(Limonin, LM)亦被称为黄柏内酯或吴茱萸内酯, 是主要存在于芸香科(Rutaceae)及楝科(Meliaceae Juss.)等植物中的四环三萜类化合物, 同时也是植物中重要的次生代谢产物之一。LM 结构中含有 4,4,8-三甲基-17-呋喃基甾体特征骨架, 其中 C-3、C-4、C-7、C-16 和 C-17 上连有含氧的官能团, C-14 和 C-15 位上均有氧桥环[1], 其结构如图 1 所示。大量动物临床研究表明, LM 具有多种生理活性功能, 如抗肿瘤、抗病毒、抗氧化、抗肥胖、镇痛消炎、抗焦虑、镇静及改善睡眠等[2], 但是 LM 水溶性较差并且其结构易受环境因素影响发生不同程度的降解[3], 大大限制了 LM 的进一步应用和开发。目前关于 LM 的研究主要集中在生理活性研究上, 但是其在人体内如何转运及其与相关载体蛋白的相互作用的研究较少。

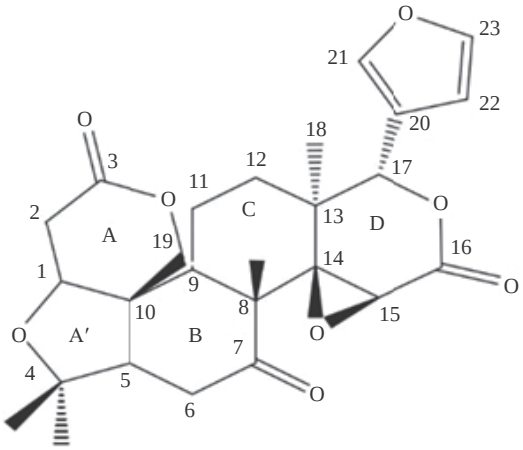


图 1 柠檬苦素的结构

Fig.1 Structure of limonin

人血清白蛋白(Human serum albumin, HSA)是血液中的多功能转运蛋白, 能可逆结合小分子物质并将其运送到人体需要的各个部位[4], 是人体重要的转运载体蛋白之一。牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)在序列和构象上与 HSA 具有高度同源性和相似性, 且来源丰富、获取成本低、溶解性好, 因此被广泛应用于小分子物质与血清蛋白的研究中[4−5]。BSA 由 3 个同源结构域(Ⅰ~Ⅲ)构成, 每个结构域包含 2 个结构亚域 A 和 B, 其中结构亚域ⅡA 和ⅢA 的疏水空腔中有结合位点 Sudlow's sites Ⅰ和Ⅱ[6]。紫外光谱法和荧光光谱法是研究蛋白与小分子物质相互作用的重要手段, 而随着计算机模拟技术的高速发展, 分子对接技术也逐步被应用在蛋白与小分子相互作用机制的研究中。因此, 本实验应用紫外光谱法、荧光光谱法以及分子对接技术来研究 LM 与 BSA 之间的相互作用机制, 有助于了解 LM 在人体内如何转运、分布及消除等情况, 同时还能为构建 LM 的蛋白基递送载体研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

BSA(纯度≥98 %, 低脂肪酸)、华法林(纯度≥98 %) 上海麦克林生化科技股份有限公司; LM(纯度≥98 %)、布洛芬(纯度≥98 %) 上海源叶生物科技有限公司; 二甲基亚砜(DMSO)、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠 均为 AR, 上海麦克林生化科技股份有限公司。

DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器 郑州长城科工贸有限公司; HH-4 数显恒温水浴锅 常州普天仪器制造有限公司; Evolution 201 型紫外-可见分光光度计、Lumina 型荧光分光光度计 美国赛默飞世尔公司。

1.2 实验方法

1.2.1 溶液配制 将 BSA 溶于 PBS 缓冲液(0.01 mol/L, pH7.4)中, 配成浓度为 1×10^{-5} mol/L 的 BSA 储备液; 将 LM 溶于 DMSO 中, 配制成浓度为 1×10^{-3} mol/L 的 LM 储备液, 置于棕色玻璃瓶中; 用 PBS 缓冲液配制浓度为 5×10^{-4} mol/L 的华法林和布洛芬储备液; 储备液均是当天配当天用。

1.2.2 紫外光谱测定 参考李琳等[7]研究方法, 并稍加改进。准确吸取 3 mL PBS 缓冲液和 1 mL BSA 储备液置于 5 mL 棕色玻璃瓶中, 然后加入 LM 储备液, 再用 PBS 缓冲液补足至 5 mL 并混合均匀, 最终混合液中 BSA 浓度均为 2×10^{-6} mol/L, LM 的浓度分别为 0、4×10^{-5}、8×10^{-5}、12×10^{-5}、16×10^{-5}、20×10^{-5} mol/L, 将混合液置于 298 K 水浴锅中反应 30 min, 使用紫外-可见光分光光度计进行紫外光谱扫描, 扫描范围为 200~400 nm, 波长间隔为 1 nm。

1.2.3 荧光光谱测定 样品制备与 1.2.2 一致, 将混合液置于 298、304、310 K 水浴锅中反应 30 min。荧光分光光度计的参数设置如下: 激发波长为 280 nm, PMT 电压为 500 V, 激发和发射狭缝宽度均为 5 nm, 扫描范围为 300~450 nm。

1.2.4 判断荧光淬灭类型 荧光淬灭过程可分为静态淬灭和动态淬灭等, 其中静态淬灭是指淬灭剂与蛋白之间形成不发光的基态配合物, 使其荧光强度减弱, 蛋白分子结构会发生改变, 当温度升高时, 复合物稳定性减弱, 淬灭常数就会下降; 而动态淬灭是指淬灭剂与蛋白之间相互碰撞, 使其荧光强度减弱, 蛋白分子结构不会发生改变, 若温度上调, 碰撞数目的有效离子增加, 增强电子转移, 淬灭常数就会升高。为了确定 LM 对 BSA 的荧光淬灭类型, 可以通过 Stern-Volmer 方程[8]公式(1)计算淬灭常数的变化, 以判断其淬灭类型。

$$\frac{F_0}{F}=1+K_q\tau_0[Q]=1+K_{sv}[Q] \qquad 式(1)$$

式中: F_0 和 F 分别为无 LM 和有 LM 存在时 BSA 的荧光强度; K_q 为淬灭速率常数(L/(mol·s)); τ_0 为荧光寿命, 在没有淬灭剂的情况下, BSA 的荧光寿命值为 10^{-8} s; [Q] 为 LM 的浓度(mol/L); K_{sv} 为淬灭常数(L/mol)。

1.2.5　结合常数及结合位点计算　采用双对数方程公式(2)计算 LM 和 BSA 相互作用的结合常数 K_a(L/mol)和结合位点数 n[9]。

$$\lg\left(\frac{F_0-F}{F}\right)=\lg K_a+n\lg[Q] \qquad 式（2）$$

1.2.6　热力学性质和作用力判断　研究表明，小分子与蛋白发生相互作用的主要作用力包括氢键、静电相互作用力、范德华相互作用力和疏水相互作用等，可根据 Van't Hoff 方程(3)和热力学公式(4)计算 LM 与 BSA 相互作用的热力学性质及相互作用力类型[10]。

$$\ln K_a=-\frac{\Delta H}{RT}+\frac{\Delta S}{R} \qquad 式（3）$$

$$\Delta G=\Delta H-T\Delta S \qquad 式（4）$$

式中：ΔH 为焓变（kJ/mol）；ΔS 为熵变(J/(mol·K))；ΔG 为吉布斯自由能(kJ/mol)；T 为温度(K)；R 为理想气体常数，8.314 J/(mol·K)。

1.2.7　同步荧光测定　样品制备与 1.2.2 一致，然后将混合液置于 298 K 水浴锅中反应 30 min，荧光分光光度计的参数设置如下：PMT 电压均为 500 V，激发和发射狭缝宽度均为 5 nm，激发波长与发射波长差(Δλ)为 15 nm 时，扫描范围为 250~350 nm；激发波长与发射波长差为 60 nm 时，扫描为 300~400 nm。

1.2.8　竞争结合位点实验　a.样品制备与 1.2.2 一致，然后将混合液置于 298 K 水浴锅中反应 30 min，荧光分光光度计的参数设置如下：激发波长为 295 nm，PMT 电压为 500 V，激发和发射狭缝宽度均为 5 nm，扫描范围为 300~450 nm[11−12]。b.取 1 mL BSA 储备液置于 5 mL 棕色玻璃瓶中，先加入 20 μL 华法林/布洛芬储备液进行反应；后续操作和 1.2.2 一致，按照测定内源荧光光谱的参数测定该体系的内源荧光光谱并利用公式(2)计算该体系中的 K_a 值[13−14]。

1.2.9　分子对接　LM 与 BSA 的分子对接用 Autodock 4.2 软件进行。LM 的三维结构从 Pubchem 数据库(https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)中获取，其结构优化按 Autodock 软件默认要求进行并保存成 PDBQT 文件。BSA 晶体结构从 PDB 数据库(https://www.rcsb.org/)获取，其 ID 为：4F5S，先使用 PyMol 软件对 BSA 晶体结构进行去除杂分子和水分子，然后再使用 Autodock 4.2 软件对 BSA 进行加氢原子、计算电荷、设置原子类型并保存成 PDBQT 文件。在 Autodock 4.2 软件的 Grid 版块进行预测整个蛋白中的活性位点；设置对接时，将 BSA 选为刚性，LM 为柔性，通过 Genetic Algorithm Parameters 算法进行分子对接；对接结束后，选择结合自由能最低的构象，使用 PyMol 软件对蛋白与受体的相互作用力分析[15]。

1.3　数据处理

利用数据处理软件 Origin 2021 和 Excel 2016 进行数据统计及图表绘制；分子对接结果可视化用 PyMol 软件和 Discovery Studio 软件。

2　结果与分析

2.1　紫外光谱分析

BSA 分子构象的改变导致其微环境的变化，从而导致紫外吸收光谱的变化，包括吸收光谱中的红移或蓝移[16]。BSA 在紫外吸收光谱中主要表现为两个特征吸收峰，其中 208 nm 附近的强烈特征吸收峰反映 BSA 的肽链骨架信息，而 278 nm 附近的特征吸收峰是由 BSA 的酪氨酸(Tyrosine, Tyr)和色氨酸(Tryptophan, Trp)等残基的苯环 π→π*跃迁产生[17]。LM 在紫外吸收光谱上，仅在 200 nm 附近有末端吸收峰，而最大吸收波长出现在 210 nm 附近，常将 210 nm 作为检测波长，采用高效液相色谱法对 LM 进行定量分析等[18−19]。不同浓度 LM 与 BSA 相互作用的紫外吸收光谱结果如图 2 所示，随着 LM 浓度的不断增加，BSA 的特征吸收峰强度逐渐增加，表明 LM 与 BSA 发生了相互作用；而 BSA 特征吸收峰发生红移(208-213 nm，278-280 nm)，可能是疏水性的 LM 与 BSA 发生相互作用后，诱导 BSA 构象发生变化，BSA 上 Tyr 残基和 Trp 残基周围微环境极性下降，疏水性增强所导致[20]。研究表明，动态猝灭不引起蛋白质吸收峰波长改变，而静态猝灭则会导致吸收峰波长改变[4,21]，因此，初步判断 LM 对 BSA 的淬灭过程为静态淬灭。

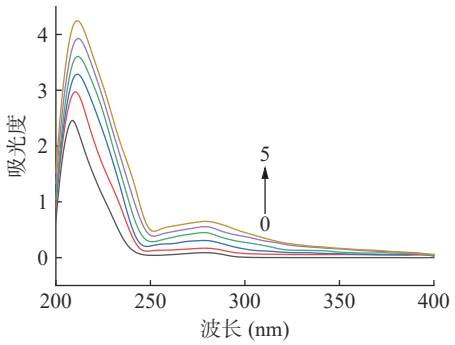


图 2　LM 与 BSA 相互作用的紫外吸收光谱

Fig.2　UV absorption spectra of the interaction between LM and BSA

注：0~5 分别代表 LM 浓度为 0、4×10^{-5}、8×10^{-5}、12×10^{-5}、16×10^{-5}、20×10^{-5} mol/L，图 3~图 5 同。

2.2　荧光光谱分析

荧光光谱技术已经被广泛应用于蛋白-小分子配体之间相互作用的研究中，而 BSA 分子中的内源性荧光大部分来自 Trp 和 Tyr 等[22]。298、304、310 K 时，不同浓度的 LM 与 BSA 相互作用的内源荧光光谱如图 3 所示，BSA 在 342 nm 处有强烈的荧光发射峰，随着 LM 浓度的不断增加，BSA 的荧光强度逐渐降低并且出现蓝移(342-337 nm)，这表明 LM 与 BSA 发生相互作用可使 BSA 的内源荧光发生淬灭，并且导致 BSA 的构象发生改变，荧光团周围微环境的极性降低，疏水性增强，这与前面紫外光谱结果一致；含有三萜类物质的大叶冬青提取物[23] 以及苦丁

茶冬青提取物[24]在与 BSA 相互作用研究中也发生了相似的内源荧光光谱变化。此外，不同温度下添加同一浓度的 LM 对 BSA 的淬灭率也不同，当固定 LM 添加浓度为 8×10^{-5} mol/L 时，298 K 下的淬灭率为 44%、304 K 下的淬灭率为 34%、310 K 下的淬灭率为 27%，表明环境温度升高不利于 LM 与 BSA 的结合。

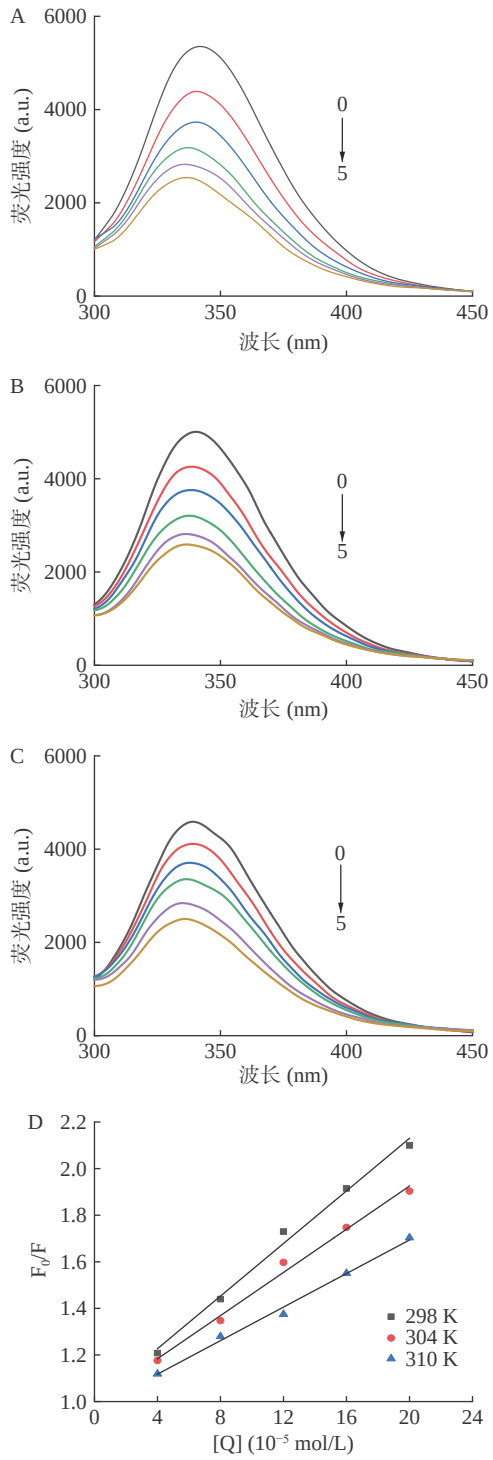


图 3 不同温度下 LM 与 BSA 相互作用的荧光光谱(A, 298 K; B, 304 K; C, 310 K)及其 Stern-Volmer 曲线(D)

Fig.3 Fluorescence spectra of the interaction between LM and BSA at different temperatures (A, 298 K; B, 304 K; C, 310 K) and their Stern-Volmer curves (D)

2.2.1 荧光淬灭类型分析 不同温度下 LM 与 BSA 相互作用的 Stern-Volmer 曲线如图 3D 所示，所有曲线均呈线性，即淬灭剂 LM 的加入可促使 BSA 的荧光强度均匀淬灭，据此可初步判断猝灭剂 LM 与 BSA 之间只存在一种结合类型[25]。不同温度下 LM 与 BSA 相互作用的淬灭速率常数及淬灭常数如表 1 所示，不同温度下的 K_q 均大于各类剂对生物大分子最大扩散控制的碰撞猝灭速率常数 2.0×10^{10} L/(mol·s)[26]，并且随着温度的升高，K_{sv} 逐渐降低，表明 LM 与 BSA 之间的淬灭过程为静态淬灭，即淬灭剂 LM 与大分子 BSA 形成了稳定的复合物。

表 1 不同温度下 LM 与 BSA 相互作用的淬灭速率常数及淬灭常数

Table 1 Quenching rate constants and quenching constants of the interaction between LM and BSA at different temperatures

T(K)	K_q(10^{11} L·mol^{-1}·s^{-1})	K_{sv}(10^3 L·mol^{-1})	R^2
298	5.652	5.652	0.9918
304	4.622	4.622	0.9915
310	3.420	3.420	0.9901

2.2.2 结合常数及结合位点计算 研究表明，当 K_a 的范围在 10^5~10^7 L·mol^{-1} 时，表明小分子物质与蛋白之间存在较强的结合力；当 K_a 的范围在 10^2~10^4 L·mol^{-1} 时，表明小分子物质与蛋白之间存在低到中等的结合力[27]。由表 2 可知，不同温度下 LM 与 BSA 的 K_a 均在 10^3~10^4 L·mol^{-1} 之间，表明 LM 与 BSA 之间存在中等的结合力。随着温度升高，K_a 随之降低，表明 LM 与 BSA 之间的稳定性受温度控制，再次证实 LM 与 BSA 之间的淬灭过程为静态淬灭。而不同温度下，LM 与 BSA 的 n 值均等于 1，表明两者之间有一个结合位点，即 LM 与 BSA 相互作用形成的复合物为 1∶1 型。此外，结合位点 n 值随着温度的上升而下降，表明在结合过程中温度的影响非常重要[28]，这与前面温度升高不利于 LM 对 BSA 荧光淬灭的结果一致。

表 2 不同温度下 LM 与 BSA 的结合常数及结合位点

Table 2 Binding constants and binding sites of LM and BSA at different temperatures

T(K)	K_a(10^3 L·mol^{-1})	n	R^2
298	9.007	1.053	0.9944
304	6.823	1.039	0.9948
310	5.739	1.004	0.9894

2.2.3 热力学性质分析和作用力类型 研究表明，可以根据吉布斯自由能ΔG、焓变ΔH 和熵变ΔS 的大小判断小分子与蛋白的结合过程及小分子与蛋白之间的主要作用力，当ΔG 小于零时，表明该结合过程是自发的；当ΔH 和ΔS 均大于零时，主要作用力表现为疏水相互作用，当ΔH 和ΔS 均小于零时，主要作用力表现为氢键或范德华力等[29]。由表 3 可知，LM 与 BSA 之间的ΔG 均小于零，并且ΔH 和ΔS 也均小于零，表明 LM 与 BSA 之间的结合是自发的，结合过

程为放热反应，范德华力和氢键作用是结合过程中的主要作用力。

表 3　不同温度下 LM 与 BSA 相互作用的热力学参数

Table 3　Thermodynamic parameters of the interaction between LM and BSA at different temperatures

T(K)	ΔH(kJ·mol^{-1})	ΔS(J·mol^{-1}·K^{-1})	ΔG(kJ·mol^{-1})
298			−22.49
304	−28.94	−21.62	−22.36
310			−22.23

2.2.4　同步荧光光谱分析　同步荧光光谱可以更清晰地反映小分子结合对蛋白质氨基酸残基微环境的影响，其中 Δλ=15 nm 和 Δλ=60 nm 时，分别表示 Tyr 和 Trp 残基的特征信息[30]。由图 4 可知，BSA 中的 Tyr 和 Trp 残基分别在 302、343 nm 处有最大特征吸收峰，随着 LM 的加入，BSA 上的 Tyr 和 Trp 残基荧光均发生淬灭，并且最大特征吸收峰都发生轻微蓝移，表明 LM 的加入可导致 BSA 上的 Tyr 和 Trp 残基周围微环境的极性下降，疏水性上升，和前面紫外光谱、内源荧光光谱结论一致。此外，随着 LM 浓度的升高，Trp 残基荧光淬灭效率远比 Tyr 残基荧光淬灭效率大，初步判断 LM 导致 BSA 发生荧光淬灭的主要原因可能是 Trp 残基的荧光发生了淬灭。

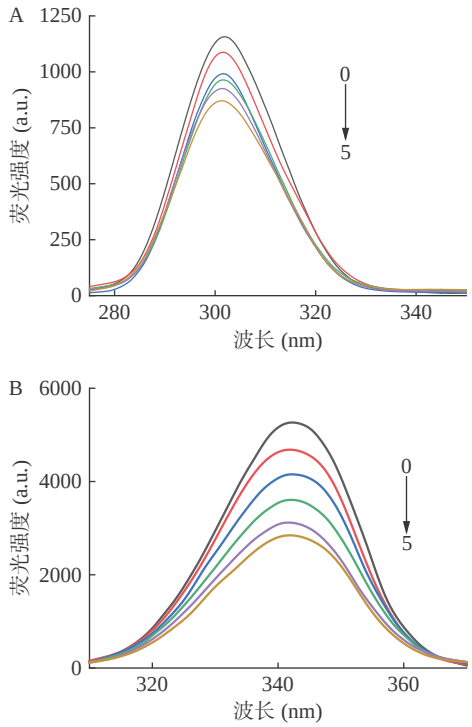


图 4　LM 与 BSA 相互作用的同步荧光光谱

Fig.4　Synchronous fluorescence spectrum of the interaction between LM and BSA

注：A 代表 Δλ=15 nm，B 代表 Δλ=60 nm。

2.3　竞争位点试验分析

研究表明，BSA 的结合位点 sites Ⅰ中含有 Trp 残基和 Tyr 残基，而结合位点 sites Ⅱ中只含有 Tyr 残基[6,11−12]，当激发波长为 280 nm 时，BSA 中的 Trp 和 Tyr 残基均被激发，而在激发波长为 295 nm 时，仅有 Trp 残基被激发，因此可利用这一特性，比较不同激发波长下 LM 对 BSA 的内源荧光光谱，进而初步判断 LM 与 BSA 的结合位点。由图 5(A)可知，当激发波长为 295 nm 时，随着 LM 浓度的升高，BSA 的荧光强度逐渐降低，并且出现蓝移，和前面同步荧光光谱结论一致。由图 5(B)可知，LM 导致 BSA 发生荧光淬灭，主要是 LM 导致 BSA 中的 Trp 残基发生淬灭，并且初步判断 LM 与 BSA 相互作用的结合位点在 sites Ⅰ附近。

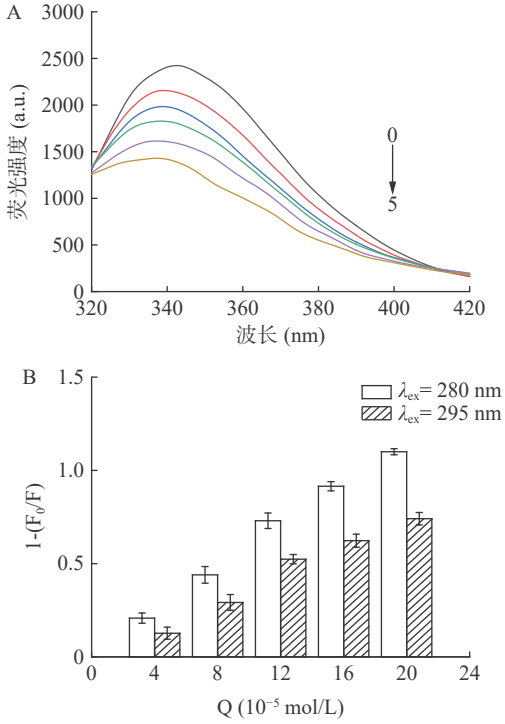


图 5　激发波长为 295 nm 下 LM 与 BSA 相互作用荧光光谱(A)及不同激发波长下 LM 对 BSA 的淬灭率情况(B)

Fig.5　Fluorescence spectra of the interaction between LM and BSA at an excitation wavelength of 295 nm (A) and the quenching rate of LM on BSA at different excitation wavelengths (B)

为了进一步验证 LM 与 BSA 的结合位点在 sites Ⅰ附近，选用荧光探针华法林和布洛芬进行验证，其中华法林可以与结合位点 sites Ⅰ特异性结合，布洛芬可与结合位点 sites Ⅱ特异性结合[31−32]。由表 4 可知，加入荧光探针华法林后，该体系的 K_a 为 6.173×10^3 L·mol^{-1}，而加入荧光探针布洛芬后，该体系的 K_a 为 9.013×10^3 L·mol^{-1}，表明荧光探针华法林对 LM 与 BSA 的相互作用产生较大影响，即 LM

表 4　荧光探针对结合体系结合常数的影响

Table 4　Effect of fluorescent probe on binding constants of the binding system

荧光探针	K_a(10^3 L·mol^{-1})	R^2
空白	9.007	0.9944
华法林	6.173	0.9883
布洛芬	9.013	0.9906

与 BSA 的结合位点在 sites Ⅰ附近。

2.4 分子对接结果分析

分子对接技术可以弥补光谱法的不足，能更直观、充分地认识小分子与大分子间的结合特性[33]。研究表明，分子对接结果的结合能量越低，大分子与小分子之间的结合越紧密[34]，分子对接结果显示 LM 与 BSA 的最低结合能量为−5.36 kJ/mol，表明 LM 可以与 BSA 紧密结合。运用 PyMol 软件及 Discovery Studio 软件对最低结合能下的分子对接结果进行可视化，由图 6 可知，LM 上的呋喃环与 BSA 上的 Trp-213 形成了一个常规氢键；LM 在 C-7 上的含氧官能团及在 C-19 上的氢原子与 BSA 上的 Lys-294、Glu-443 形成了两个较弱的碳氢键；LM 与 BSA 上的 Arg-194、Lys-221 和 Tyr-340/451 等 9 个残基之间存在范德华力，表明范德华力和氢键参与了 LM 与 BSA 的相互作用，这与前面热力学分析结果一致。此外，还发现 LM 能与 BSA 上的 Arg-217、Val-342、Pro-446、Cys-447 及 Asp-450 等残基之间形成 Alkyl 键、Pi-Alkyl 键、Pi-Anion 键等。其中 Trp-213、Tyr-340/451 等残基位于 BSA 的结构亚域ⅡA 中，即分子对接结果再次证明 LM 与 BSA 的结合位点位于 sites Ⅰ附近。

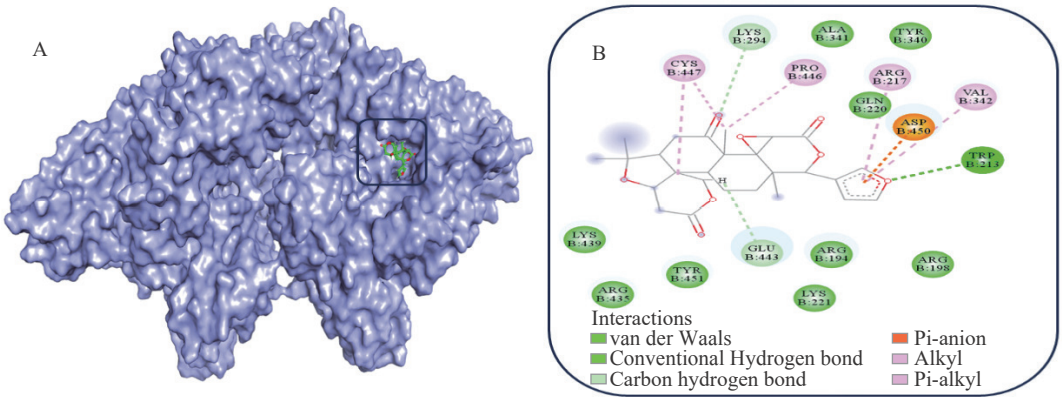


图 6 LM 与 BSA 结合位点(A)及结合位点 2D 相互作用(B)

Fig.6 Binding site (A) and its 2D interaction (B) between LM and BSA

3 结论

本文采用了紫外光谱法、荧光光谱法及分子对接技术研究了 LM 与 BSA 的相互作用。紫外光谱结果表明，LM 与 BSA 发生相互作用后，BSA 在紫外光谱上的特征吸收峰发生了红移(208-213 nm，278-280 nm)。荧光光谱结果表明，LM 导致 BSA 发生荧光淬灭，淬灭类型为静态淬灭，而 LM 与 BSA 发生相互作用是自发反应过程，该过程的主要作用力是范德华力和氢键，并且两者只有一个结合位点。同步荧光光谱结果表明，LM 与 BSA 发生相互作用后，增加了 BSA 中 Tyr 和 Trp 残基微环境的疏水性，并且 Trp 的荧光猝灭效率大于 Tyr 的荧光猝灭效率。竞争位点实验及分子对接结果表明，LM 与 BSA 的结合位点在 site Ⅰ附近，LM 可以与 BSA 上的 Trp-213 形成氢键，与 Tyr-340/451 等残基之间存在范德华力，在分子水平上揭示了 LM 与 BSA 的相互作用。

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

参考文献

[1] 晏敏, 周宇, 贺肖寒, 等. 柑橘籽中柠檬苦素及类似物的生物活性研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(2): 290−296. [YAN M, ZHOU Y, HE X H, et al. Research progress on the biological activity of limonin and its analogues in citrus seeds[J]. Food and Fermentation Industry, 2018, 44(2): 290−296.]

[2] 李韶静, 汤建华. 木果楝属柠檬苦素类似物及其生物活性的研究进展[J]. 中草药, 2022, 53(10): 3178−3194. [LI S J, TANG J H. Research progress on limonin analogues of the genus Melia and their biological activities[J]. Chinese Herbal Medicine, 2022, 53(10): 3178−3194.]

[3] 罗喜荣, 任荣, 钱志瑶, 等. HPLC 法测定柠檬苦素的平衡溶解度和表观油水分配系数[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(10): 1711−1714. [LUO X R, REN R, QIAN Z Y, et al. HPLC determination of equilibrium solubility and apparent oil/water partition coefficient of limonin[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2013, 33(10): 1711−1714.]

[4] 吕艳芳, 梁倩倩, 郭雨晴, 等. 分子对接和光谱法研究原儿茶醛和阿魏酸与牛血清白蛋白的互作机理[J]. 食品科学, 2021, 42(14): 24−31. [LÜ Y F, LIANG Q Q, GUO Y Q, et al. Molecular docking and spectroscopic studies on the interaction mechanism between protocatechualdehyde and ferulic acid with bovine serum albumin[J]. Food Science, 2021, 42(14): 24−31.]

[5] GELAMO E L, SILVA C H T P, IMASATO H, et al. Interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants: Spectroscopy and modelling[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2002, 1594(1): 84−99.

[6] MARUYAMA T, LIN C C, YAMASAKI K, et al. Binding of suprofen to human serum albumin. Role of the suprofen carboxyl group[J]. Biochem Pharmacol, 1993, 45(5): 1017−1026.

[7] 李琳, 婺鸣, 李冰, 等. 杂环胺与牛血清白蛋白的相互作用研

究[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2020, 48(11): 123−130. [LI L, WU M, LI B, et al. Interaction studies between heterocyclic amines and bovine serum albumin[J]. Journal of South China University of Technology (Natural Science Edition), 2020, 48(11): 123−130.]
[8] KUMARI M, MAURYA J K, TASLEEM M, et al. Probing HSA-ionic liquid interactions by spectroscopic and molecular docking methods[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2014, 138: 27−35.
[9] ZHANG Z, YANG M, YI J, et al. Comprehensive insights into the interactions of two emerging bromophenolic DBPs with human serum albumin by multispectroscopy and molecular docking[J]. ACS Omega, 2019, 4(1): 563−572.
[10] LI T, HU P, DAI T, et al. Comparing the binding interaction between beta-lactoglobulin and flavonoids with different structure by multi-spectroscopy analysis and molecular docking[J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2018, 201: 197−206.
[11] 王会镇, 赵雨, 姚小军, 等. 1-(4-甲氧基苯基)-3-(2-噻吩基)-2-丙烯酮与牛血清白蛋白的相互作用研究[J]. 化学试剂, 2021, 43(11): 1569−1574. [WANG H Z, ZHAO Y, YAO X J, et al. Interaction of 1-(4-methoxyphenyl)-3-(2-thienyl)-2-propenone with bovine serum albumin[J]. Chemical Reagents, 2021, 43(11): 1569−1574.]
[12] 吴明火, 李尚春, 王丽梅, 等. 邻苯二甲酸二环己酯与牛血清白蛋白相互作用研究[J]. 分析科学学报, 2022, 38(3): 321−326. [WU M H, LI S C, WANG L M, et al. Study on the interaction between dicyclohexyl phthalate and bovine serum albumin[J]. Journal of Analytical Science, 2022, 38(3): 321−326.]
[13] RAHMAN N, KHALIL N. Characterization of sulfasalazine-bovine serum albumin and human serum albumin interaction by spectroscopic and theoretical approach[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2023, 300: 122865.
[14] ABUBAKAR M, KANDANDAPANI S, MOHAMED S B, et al. Shedding light on the molecular interaction between the Hepatitis B virus inhibitor, clevudine, and human serum albumin: Thermodynamic, spectroscopic, microscopic, and *in silico* analyses[J]. Journal of Molecular Liquids, 2022, 368: 120737.
[15] 吕艳芳, 张紫卿, 梁倩倩, 等. 光谱法和分子对接研究高儿茶酚与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 中国食品学报, 2022, 22(12): 72−81. [LÜ Y F, ZHANG Z Q, LIANG Q Q, et al. Spectroscopy and molecular docking to study the interaction of catechols with bovine serum albumin[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(12): 72−81.]
[16] HU Y, LIU Y, ZHAO R, et al. Spectroscopic studies on the interaction between methylene blue and bovine serum albumin[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 2006, 179(3): 324−329.
[17] POLET H, STEINHARDT J. Binding-induced alterations in ultraviolet absorption of native serum albumin[J]. Biochemistry (Easton), 1968, 7(4): 1348−1356.
[18] 李阳, 安琪, 宋悦, 等. HPLC 法测定不同产地柑橘第一次生理落果中活性成分的含量[J]. 食品工业科技, 2022, 43(19): 364−371. [LI Y, AN Q, SONG Y, et al. HPLC was used to determine the content of active ingredients in the first physiological fruit drop of citrus from different origins[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(19): 364−371.]
[19] 孟鹏, 郑宝东. 超高效液相色谱法快速并同时检测金柑中柠檬苦素和诺米林[J]. 中国食品学报, 2013, 13(2): 177−181. [MENG P, ZHENG B D. Ultra-performance liquid chromatography (UPLC) was used for the rapid and simultaneous detection of limonin and nomiline in kumquats[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2013, 13(2): 177−181.]
[20] 顾佳丽, 王思宇, 杨丹, 等. 光谱法研究甲苯达唑与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 分析科学学报, 2020, 36(6): 857−862. [GU J L, WANG S Y, YANG D, et al. The interaction between mebendazole and bovine serum albumin was studied by spectroscopy[J]. Journal of Analytical Science, 2020, 36(6): 857−862.]
[21] LIU B, XUE C, WANG J, et al. Study on the competitive reaction between bovine serum albumin and neomycin with ponceau S as fluorescence probe[J]. Journal of Luminescence, 2010, 130(11): 1999−2003.
[22] GU J, LIU H, HUANG X, et al. Investigation of the separate and simultaneous bindings of warfarin and fenofibrate to bovine serum albumin[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 236: 123978.
[23] 焦安妮, 于敏, 关玥, 等. 大叶冬青皂苷与牛血清蛋白的相互作用研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(19): 8−14. [JIAO A N, YU M, GUANG Y, et al. Study on the interaction between saponins from *Ilex magnolia* and bovine serum proteins[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(19): 8−14.]
[24] 胡夏恬, 倪帅帅, 焦安妮, 等. 苦丁皂苷 L、苦丁皂苷 N 与牛血清白蛋白的相互作用研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(9): 55−60. [HU X T, NI S S, JIAO A N, et al. Study on the interaction between kudingsaponin L, kudingsaponin N and bovine serum albumin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(9): 55−60.]
[25] 韩忠保, 吴雨杭, 米媛媛, 等. 荧光光谱法结合分子对接研究人血清白蛋白对齐墩果酸与熊果酸的异构体识别作用[J]. 光谱学与光谱分析, 2019, 39(7): 2190−2195. [HAN Z B, WU Y H, MI Y Y, et al. Fluorescence spectroscopy combined with molecular docking study on the recognition of isomers of oleanolic acid and ursolic acid by human serum albumin[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2019, 39(7): 2190−2195.]
[26] WARE W R. Oxygen quenching of fluorescence in solution: A n experimental study of the diffusion process[J]. Journal of Physical Chemistry (1952), 1962, 66(3): 455−458.
[27] 杨雯雁, 马秀兰, 张宇. 荧光光谱法结合分子对接研究邻苯二甲酸单环己酯与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 分析试验室, 2023, 42(9): 1236−1241. [YANG Y W, MA X L, ZHANG Y. Fluorescence spectroscopy combined with molecular docking study on the interaction between monocyclohexyl phthalate and bovine serum albumin[J]. Analysis Laboratory, 2023, 42(9): 1236−1241.]
[28] HU Y, OUYANG Y, DAI C, et al. Site-selective binding of human serum albumin by palmatine: Spectroscopic approach[J]. Biomacromolecules, 2010, 11(1): 106−112.
[29] ROSS P D, SUBRAMANIAN S. Thermodynamics of protein association reactions: Forces contributing to stability[J]. Biochemistry, 1981, 20(11): 3096−3102.
[30] AZIMI O, EMAMI Z, SALARI H, et al. Probing the interaction of human serum albumin with norfloxacin in the presence of high-frequency electromagnetic fields: Fluorescence spectroscopy and circular dichroism investigations[J]. Molecules, 2011, 16(12):

9792−9818.
［31］ 赵旭红, 夏彩芬, 周紫薇, 等. 花青素对牛血清白蛋白的光谱特性及构象的影响[J]. 食品工业科技, 2021, 42(7): 57−62. ［ZHAO X H, XIA C F, ZHOU Z W, et al. Effect of anthocyanins on the spectral characteristics and conformation of bovine serum albumin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(7): 57−62.］
［32］ 刘晓娟, 邓培渊, 范春丽, 等. 环氧虫啶与人血清白蛋白的相互作用[J]. 农药学学报, 2024, 26(1): 160−167. ［LIU X J, DENG P Y, FAN C L, et al. Studies of the interaction between cycloxaprid and human serum albumin[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2024, 26(1): 160−167.］
［33］ WANG T, WANG N, YU Y, et al. Study of soybean protein isolate-tannic acid non-covalent complexes by multi-spectroscopic analysis, molecular docking, and interfacial adsorption kinetics[J]. Food Hydrocolloids, 2023, 137: 108330.
［34］ HU Y, XU S, ZHU X, et al. Study on the interaction between methyl violet and bovine serum albumin by spectral analyses[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2009, 74(2): 526−531.

王震霄, 廖一, 于佳晔, 等. 超声处理制备大豆油体复合乳液及运载 β-胡萝卜素研究 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 45−53. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110055
WANG Zhenxiao, LIAO Yi, YU Jiaye, et al. Preparation of Soybean Oil Body Complex Emulsions by Ultrasonic Treatment and Transport of β-Carotene[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 45−53. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110055

· 研究与探讨 ·

超声处理制备大豆油体复合乳液及运载 β-胡萝卜素研究

王震霄[1], 廖　一[1], 于佳晔[1], 齐宝坤[1], 王　帅[1], IRINA Sergeeva[2], 李　杨[3,*]
（1.东北农业大学食品学院, 黑龙江哈尔滨 150030;
2.克麦罗沃国立大学植物基食品技术系, 俄罗斯克麦罗沃 650000;
3.黑龙江省中蒙俄农产品生物加工及装备研发联合实验室（国际合作）,
东北农业大学食品学院, 黑龙江哈尔滨 150030）

摘　要: 本研究以大豆油体为原料，将其作为乳化剂，通过超声技术制备大豆油体复合乳液，优化超声处理条件，并将油体复合乳液用于运载脂溶性生物活性物质。通过对乳液的理化性质研究，揭示超声处理增强油体复合乳液稳定性的机理并考察油体复合乳液对 β-胡萝卜素的运载效果。结果表明，通过超声处理成功制备大豆油体复合乳液，乳液氧化稳定性和贮藏稳定性在功率为 450 W（10 min）时最好，此时乳液平均粒径为 1537 nm，液滴形状呈圆形且分布均匀。傅里叶变换红外光谱结果表明，超声引起的空化效应增加了湍流和剪切力等物理作用，使油体蛋白的多肽链部分打开，蛋白中的氢键网络发生重新排列，蛋白质二级结构发生改变：α-螺旋结构相对含量减少，β-折叠结构相对含量增多。电泳结果表明蛋白质亚基组成没有显著变化，但随着超声强度的增加，增强了外源蛋白在液滴界面的吸附。贮藏结果显示经过功率为 450 W 的超声处理可以抑制乳液中氧化产物的产生，提高乳液的氧化稳定性。通过超声处理可成功制备大豆油体-β-胡萝卜素乳液，其中在 450 W 条件下 β-胡萝卜素的包封率最高（94.9%），且经过 11 d 室温贮藏后保留率为 81.8%。本研究为大豆油体作为乳化剂运载脂溶性生物活性物质的应用提供参考。

关键词: 油体, 超声, 运载体, β-胡萝卜素, 天然乳化剂
中图分类号: TS214.2　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2024)21−0045−09
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110055
本文网刊:

Preparation of Soybean Oil Body Complex Emulsions by Ultrasonic Treatment and Transport of β-Carotene

WANG Zhenxiao[1], LIAO Yi[1], YU Jiaye[1], QI Baokun[1], WANG Shuai[1], IRINA Sergeeva[2], LI Yang[3,*]
（1.College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;
2.Department of Plant-Based Food Technology, Kemerovo State University, Kemerovo 650000, Russia;
3.Heilongjiang Province China Mongolia Russia Joint R & D Laboratory for Bio-processing and Equipment for Agricultural Products (International·Cooperation), College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China）

Abstract: In this study, soybean oil bodies were used as raw materials and emulsifiers to prepare soybean oil body complex emulsions by ultrasonication, to optimise the ultrasonication conditions and to use the oil body complex emulsions for the transport of fat-soluble bioactives. The mechanism of ultrasonic treatment to enhance the stability of oil-body complex

收稿日期: 2023−11−08
基金项目: 国家自然科学基金面上项目（32172141）。
作者简介: 王震霄（1999−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 粮食、油脂及植物蛋白工程, E-mail: wang_zhenxiao@163.com。
*** 通信作者:** 李杨（1981−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 粮食、油脂及植物蛋白工程, E-mail: yangli@neau.edu.cn。

emulsions was revealed through the study of the physicochemical properties of the emulsions. The effect of oil-body complex emulsions on the transport of β-carotene was also examined. As a result, soybean oil body complex emulsion was successfully prepared by ultrasonication, and the oxidative and storage stability of the emulsion was best at a power of 450 W (10 min). At this time, the average particle size of emulsion was 1537 nm, and the shape of droplets was round and evenly distributed. The results of Fourier transform infrared spectroscopy indicated that the ultrasound-induced cavitation effect increased the physical forces, such as turbulence and shear forces. This caused partial unfolding of the protein polypeptide chains in oil bodies, leading to the rearrangement of hydrogen bond networks within the proteins. Consequently, the protein secondary structure changed: The relative content of α-helix structures decreased and the relative content of β-sheet structures increased. The electrophoresis results showed that there were no significant changes in the composition of protein subunits. But with the ultrasound intensity increased, the adsorption of extrinsic proteins at the droplet interface was enhanced. The results of storage stability showed that ultrasonic treatment (450 W) could inhibit the generation of oxidation products and improved the oxidation stability of emulsions. The soybean oil body-β-carotene emulsions could be successfully prepared by ultrasonic treatment, and the encapsulation rate of β-carotene was the highest (94.9%) at 450 W, and the retention rate was 81.8% after 11 days of room temperature storage. This study provides insights into the application of soybean oil bodies as emulsifiers for the delivery of fat-soluble bioactive substances.

Key words: oil body; ultrasound; carriers; β-carotene; natural emulsifier

β-胡萝卜素是一种脂溶性天然色素，主要存在于红橙色果蔬等的植物叶绿体中，着色能力强，具有抗氧化、抗癌、增强免疫力和防止衰老引起的退化性疾病等功能[1]，广泛应用于食品加工工业中[2−3]。β-胡萝卜素含有多个双键，由于这种高度不饱和结构，对光、热、氧化降解等条件敏感，化学稳定性差，生物利用率低，限制了其在食品中的应用[4−5]。近年来，孙瑞瑞[6]制备的阿拉伯胶和明胶微胶囊可明显提高 β-胡萝卜素的贮藏稳定性及生物利用率。周叶红等[7]分别用 β-环糊精及改性后的 β-环糊精包埋 β-胡萝卜素，结果发现包埋后的 β-胡萝卜素的稳定性和抗氧化能力均提高。Jain 等[8]以单硬脂酸甘油酯和明胶作为原料制备成的固体脂质纳米颗粒包埋 β-胡萝卜素，可提高其生物利用率和抗癌特性。虽然目前运载 β-胡萝卜素的方法很多，但仍然存在很多问题：例如 β-环糊精的水溶性不理想，固体脂质纳米颗粒的包埋率较低并且成本较高等，因此需要开发新型的运载体系，提高 β-胡萝卜素包埋率和保留率的同时降低成本，真正实现 β-胡萝卜素的高效利用。

油体（Oil body，OB）是植物组织中用来贮存和保护甘油三酯的细胞器，直径约为 0.5~2.0 μm，其核心是甘油三酯，表面由单层磷脂和内源蛋白质（油体蛋白、油体钙蛋白和油体固醇蛋白）组成[9]，在通常情况下，油体的提取涉及到植物种子的湿磨，该过程破坏储存液泡并释放蛋白质（α、α′、β 和 Bd 30 K 等），这些释放的液泡中的蛋白被称为外源蛋白[10]。由于油体这一天然的结构，其表面膜中的磷脂和蛋白质都包含疏水区域与亲水区域，因此油体可作为天然的乳化剂[11]。除此之外，植物油体中还含有必需脂肪酸、维生素 E 和植物甾醇等营养物质，提高了其作为乳化剂的应用价值。Francisca 等[12]用甘蓝型油菜油体制备虾青素微胶囊，为稳定和输送虾青素提供了一种新的选择；王钧渤[13]用高压均质制备的核桃油体运载 β-胡萝卜素体系具有较好的稳定性，但对生物活性物质的包封率和保留率还不明确，包封率的提升对提高生物活性物质的生物利用率具有重要意义。

超声作为一种非热加工的物理方法，在食品加工中应用广泛，样品经过超声处理，可以改变乳液中蛋白质的物理化学性质[14]，这主要与超声处理产生的空化效应、剪切力、动态搅拌等作用有关[15]。Li 等[16]经过研究发现超声处理促进了鸡肌原纤维蛋白在油滴表面的吸附，还有助于形成更小、更均匀的乳化油滴，提高乳液的稳定性。Lin 等[17]还发现经过超声预处理的大豆分离蛋白对槲皮素的包埋率显著提高。因此超声有利于促进蛋白质与油脂之间的相互作用，帮助制备生物活性物质运载体。

因此，本文通过水提取法富集大豆油体，将油体作为乳化剂，利用超声技术制备油体复合乳液，分析超声功率对油体界面蛋白及大豆油体复合乳液稳定性的影响，并考察超声处理制备的大豆油体复合乳液对 β-胡萝卜素的包埋效果，实现脂溶性生物活性物质的高效利用，并拓展油体在运载体系中的应用。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大豆（东农 68 号） 东北农业大学农学院；β-胡萝卜素（纯度 98%） 上海源叶生物科技有限公司；大豆油 九三食品有限公司；其他化学试剂均为分析纯。

IKA T18 数显型高速分散机 德国 IKA 公司；Zetasizer Nano ZS90 纳米粒度电位仪 英国马尔文公司；JY92-ⅡN 超声波细胞破碎仪 宁波新芝生物科技股份有限公司；UV-2600 紫外-可见分光光度计 日本岛津公司；Nicolet 6700 红外光谱仪 美国珀金埃尔默仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 油体的提取 参照 Tzen 等[18]的方法，将大豆清洗后在 4 ℃ 下浸泡 20~24 h，然后将大豆与蒸馏

水（1∶8, w/v）混合，用磨浆机研磨，将所得浆液用 4 层纱布过滤除去不溶性成分，然后向浆液中加入蔗糖（蔗糖:浆液，1∶8, w/v），混合溶液在冰水浴的条件下搅拌溶解，调节 pH 为 11.0，离心（8000 r/min, 30 min）后将其转移到分液漏斗中，分离得到富含油体的乳化层。将得到的乳化层再次分散到 20% 的蔗糖溶液中，分散均匀后调节 pH 为 11，离心条件相同，上述步骤重复三次。最后，收集富含油体的乳化层，将其分散到去离子水中（1∶8, w/v）调节 pH 为 11，离心得到最终的油体，于 4 ℃ 冰箱中保存备用。

1.2.2　油体复合乳液的制备　将提取的油体中加入去离子水至油体乳液浓度为 10% 作为水相，大豆油作为油相，将油相与水相（1∶9, v/v）混合，乳液总体积为 15 mL，高速剪切（10000 r/min, 2 min）后，在 20 kHz 和 150 W（振幅：23%）、300 W（振幅：46%）、450 W（振幅：69%）、600 W（振幅：92%）频率下，使用直径 6.36 mm 的钛探头对乳液进行超声处理，每次功率输出持续 10 min（定时脉冲持续时间：3 s；间隔：2 s），最终制备成油体复合乳液，并将其储存在 4 ℃ 的冰箱中备用。

1.2.3　粒径、电位的测定　测定油体复合乳液的粒径和 ζ-电位时，为了减少多重散射，将不同超声功率下制备的油体复合乳液用磷酸缓冲盐溶液（Phosphate buffer saline, PBS）进行稀释（粒径稀释 1000 倍，ζ-电位稀释 500 倍），在 25 ℃ 下测定其平均粒径和电位，分散相的折射率为 1.456，连续相的折射率为 1.330。

1.2.4　油体复合乳液稳定性的测定

1.2.4.1　油体复合乳液的乳析指数　参照康梦雪等[19]的方法，并稍作改动。新制样品在室温下放置 7 d 之后，乳液分为两层，测量并计算乳析指数（CI），公式为：

$$CI(\%) = \frac{H_S}{H_T} \times 100 \qquad 式（1）$$

式中：H_S 为乳清层的高度；H_T 为乳液的总高度。

1.2.4.2　油体复合乳液的氧化稳定性　将新制样品置于培养箱中，温度设置为 45 ℃，利用紫外-可见分光光度计进行测定。参考 Zhao 等[20]的方法测定氢过氧化值（Hydroperoxide value, POV），并稍作修改。将样品与异辛烷/异丙醇（2/1, v/v）混合，在快速混匀器上振荡 30 s，随后将乳液离心（5000 r/min, 10 min），得到上层有机相，再加入甲醇/正丁醇（2/1, v/v）、硫氰酸盐和 Fe^{2+} 水溶液，充分混合均匀，在黑暗环境下反应 20 min，然后在 510 nm 处测定样品的吸光度，根据标准曲线确定氢过氧化物浓度。参考 Zhang 等[21]的方法测定硫代巴比妥酸值（Thiobarbituric acid reactive substance, TBARS），并稍作改动。取样品与硫代巴比妥酸测试液混合，在快速混匀器上振荡 10 s 以充分混匀，在 100 ℃ 下加热 30 min，冷却后过 0.22 μm 滤膜，在 532 nm 处测定样品的吸光度，根据标准曲线确定硫代巴比妥酸浓度。

1.2.5　超高分辨率显微镜观察　参考 Liao 等[22]的方法，并稍作改动。将制备好的样品用 PBS 缓冲溶液（pH7.4, 10 mmol/L）稀释 10 倍，配制好 1.0% 尼罗蓝染液和 0.1% 尼罗红染液，分别加入到样品中，避光 30 min，尼罗蓝和尼罗红分别在 488 nm Ar/Kr 和 633 nm He/Ne 激光下激发，在超高分辨率显微镜 60×的放大倍数下观察。

1.2.6　油体界面蛋白提取　根据 Ding 等[23]的方法从油体复合乳液中提取油体界面蛋白，并稍作改动。将 1.2.2 制备的乳液在 4 ℃ 下离心（9000 r/min, 30 min），获得乳化层和清液，以 1∶3（v/v）的比例将得到的乳化层与丙酮混合摇匀，离心（4 ℃、10000×g）15 min，离心完成后收集下层物质，上述过程重复三次，将脱脂后的样品冷冻干燥。

1.2.7　傅里叶变换红外光谱　将 1.2.6 中提取的油体界面蛋白样品（2 mg）和纯 KBr（198 mg）研磨成细粉，压成颗粒，并通过 FTIR 光谱测定，光谱采集在 4000~500 cm^{-1} 波数范围内，共累积 32 次扫描。

1.2.8　十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳　将 1.2.6 中提取的油体界面蛋白样品配制成浓度为 3 mg/mL，将蛋白质样品（45 μL）与还原性（含 β-巯基乙醇）缓冲溶液（15 μL）混合，在 100 ℃ 下加热 5~7 min，分别在 80 V 和 120 V 下进行电泳，完成后染色 30 min，再脱色，用凝胶成像仪观察蛋白质条带。

1.2.9　油体运载 β-胡萝卜乳液的制备　取 10% 大豆油体乳液作为水相，β-胡萝卜素含量为 0.1%（w/v）溶于大豆油中作为油相，油相与水相的比例为 1∶9，高速剪切（10000 r/min, 2 min）后，在相同超声条件下制备大豆油体运载 β-胡萝卜素乳液，所有的样品均用铝箔纸包裹，置于 4 ℃ 的冰箱中保存。

1.2.9.1　β-胡萝卜素包埋率的测定　首先进行标准曲线的绘制。精准称取 0.01 g β-胡萝卜素，用正己烷定容到 100 mL 容量瓶中得到初次样液，取 1 mL，再用正己烷定容到 10 mL 容量瓶为第二次样液，分别取 0.5、1、2、3、4、5 和 6 mL 置于容量瓶中，定容至 10 mL，在 450 nm 处使用紫外可见分光光度计测定吸光度。

将 β-胡萝卜素乳液和正己烷以 1∶3 的比例混合，在快速混匀器上振荡 30 s，离心（10000×g, 5 min）。离心结束后取上层清液定容于 10 mL 棕色容量瓶中，在 450 nm 处测定吸光度。β-胡萝卜素在乳液中的包埋率由下式计算：

$$包埋率(\%) = \frac{M_1 - M_0}{M_1} \times 100 \qquad 式（2）$$

式中：M_0 和 M_1 分别表示游离 β-胡萝卜素和乳液中总 β-胡萝卜素含量。

1.2.9.2　油体运载 β-胡萝卜素乳液的贮藏稳定性　参照吴子涵等[24]的方法，并稍作改动。在室温下将

β-胡萝卜素乳液贮藏 11 d，分别在第 1、3、5、7、9、11 d 取部分乳液测定其保留率。将乳液与乙醇和正己烷(1∶2，v/v)混合，在快速混匀器上振荡 30 s，取上清液，上述操作重复三次，定容，在 450 nm 处测定吸光度。结果以保留率表征其贮藏稳定性，公式为：

$$保留率(\%)=\frac{A}{A_0}\times 100 \qquad 式（3）$$

式中：A 为贮藏一定时间后乳液中 β-胡萝卜素的浓度(μg/mL)，A_0 为最初乳液中 β-胡萝卜素的浓度(μg/mL)。

1.2.9.3 光学显微镜观察 取新鲜制得的大豆油体运载 β-胡萝卜素乳液 1 mL，将乳液稀释 5 倍，在光学显微镜 40×的放大倍数下观察。

1.3 数据处理

上述所有测试至少进行三次，结果表示为平均值±标准差，采用 SPSS 25.0 分析软件进行数据分析，作图使用 Origin 2021 软件。

2 结果与分析

2.1 大豆油体复合乳液的平均粒径和 ζ-电位分析

图 1 列出了在不同超声功率条件下制备的大豆油体复合乳液的平均粒径和 ζ-电位。经过超声处理后，大豆油体复合乳液的平均粒径先减小后增大，这是由于超声处理过程中产生的超微束和紊流作用力以及空化效应导致平均粒径降低，因此超声有助于提高乳液的稳定性[25]。当超声功率为 600 W 时，可能是由于高功率超声使乳液结构被破坏，油体表面蛋白分子间的相互作用力减小，小颗粒进一步聚集，导致平均粒径增大[26]。

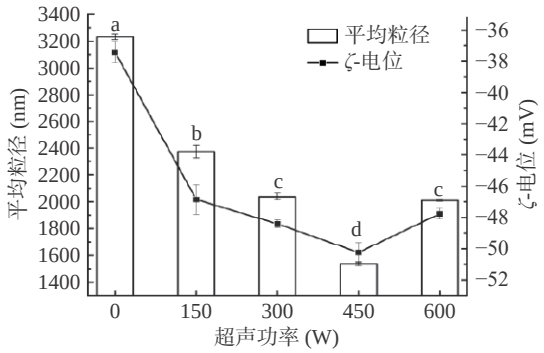


图 1 不同超声功率制备的大豆油体复合乳液的平均粒径和 ζ-电位

Fig.1 Mean particle size and ζ-potential of soybean oil body composite emulsions prepared with different ultrasonic powers

注：小写字母不同表示差异显著($P<0.05$)，图 2、图 7 同。

ζ-电位测定带电粒子表面的电势电位情况，其有效表面电荷决定粒子间的分散和聚集状态，从而表征体系的稳定性。从图中可以看出，经过超声处理后的乳液 ζ-电位绝对值变大，通过超声处理可以使更多带有负电荷的氨基酸在蛋白质分子表面暴露[27]，粒子表面负电荷增多，粒子之间相互排斥，抑制进一步聚集，提高乳液体系的稳定性，这一现象与平均粒径结果一致。当样品进行高功率(600 W)超声处理时，可能与高功率超声产生的高声场和强空化效应促进了高活性自由基的形成有关，导致部分带电荷氨基酸氧化损失，ζ-电位绝对值降低[28]。

2.2 大豆油体复合乳液的稳定性分析

2.2.1 大豆油体复合乳液的乳析指数 通过乳析指数测定大豆油体复合乳液的贮藏稳定性，通过不同超声处理的大豆油体复合乳液的 CI 如图 2 所示(由于新制备的乳液乳析指数都是 0，因此没有在图 2 中体现)。未经处理的乳液的乳析指数显著高于经过超声处理的油体复合乳液，表明经过超声处理的油体复合乳液具有良好的贮藏稳定性，这与 ζ-电位结果一致，可能是由于通过超声处理可以暴露更多带有负电荷的氨基酸到蛋白质分子表面，粒子间相互排斥力增大，抑制进一步聚集，提高系统的稳定性，但由于贮藏时间的进一步延长，小液滴逐渐融合成大液滴，由于密度的作用油滴逐渐上浮，在宏观上出现析油现象，导致乳液外观出现分层现象。随着超声功率的增加，乳液的乳析指数先降低后升高，在超声功率为 450 W 时最低(15.2%)，与对照组(0 W)相比，其他乳液均出现微小的乳析现象，证明了乳析指数的结论。

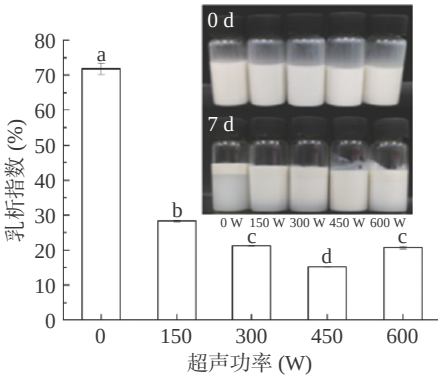


图 2 不同超声功率制备的大豆油体复合乳液的乳析指数

Fig.2 Emulsion index of soybean oil body composite emulsions prepared with different ultrasonic powers

2.2.2 大豆油体复合乳液的氧化稳定性分析 脂类氧化降解在食品中是常见的现象，决定了食品的安全性和可接受性，通过测定脂质初级氧化产物(氢过氧化物)和次级氧化产物(TBARS)的浓度，说明乳液的氧化稳定性。在 45 ℃ 的加速氧化条件下，不同超声功率下处理的大豆油体复合乳液在第 1、3、5、7 d 的氢过氧化物和 TBARS 产物的浓度如图 3 所示。从图中明显看出，大豆油体复合乳液的氢过氧化物和 TBARS 产物浓度随储存时间的延长而增加。在相同时间内，与对照组(0 W)相比，当超声功率为 150、300 和 450 W 时，油体复合乳液的氢过氧化物和 TBARS 产物的浓度显著降低($P<0.05$)，氧化作用受到抑制，提高了乳液的氧化稳定性，超声功率为 450 W 时抑制效果最佳，可能是由于经过超声处理蛋白质分子结构重排，在脂滴周围形成致密的界面膜，从而抑

制脂质氧化[29]。当超声功率为 600 W 时，抑制氧化产物生成作用减弱，可能是由于超声作用产生的强烈空化效应促进了高活性自由基的形成，使乳液进一步氧化[30]。因此，在 450 W 的超声功率下进行超声处理可以提高乳液的氧化稳定性。

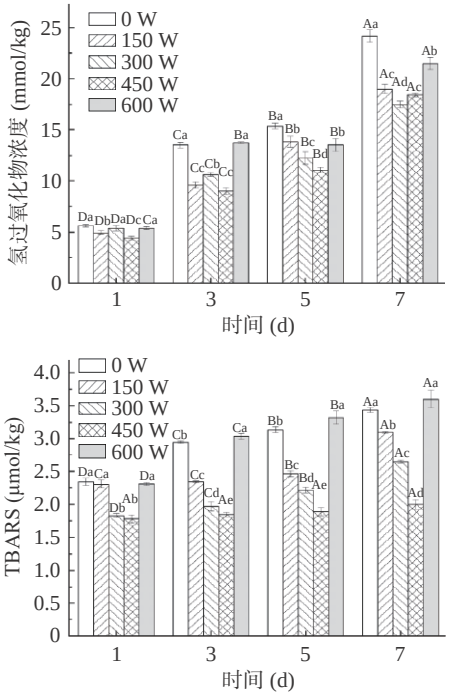


图 3　不同超声功率制备的大豆油体复合乳液的氧化稳定性

Fig.3　Oxidative stability of soybean oil body composite emulsions prepared with different ultrasonic powers

注：大写字母不同表示同一样品在储存不同天数生成的氧化产物数值差异显著，小写字母表示同一储存天数不同样品生成的氧化产物数值差异显著（P<0.05）。

2.3　大豆油体复合乳液的微观结构

超高分辨率显微镜可以清晰地观察超声制备的大豆油体复合乳液的微观结构，结果如图 4 所示，其中乳液中的绿色荧光表示油脂（图 4A），红色荧光表示蛋白质（图 4B），图 4C 表示两者的叠加。从图中可以看出，当乳液未经过超声处理时，油脂的圆环结构明显，且液滴大小极不均匀，可能是油体不均匀地堆积在油水界面处。而经过功率为 150、300、450 W 的超声处理后，大豆油体复合乳液油相在内部，油相基本上为球形或椭圆形，油体蛋白在油滴表面形成一个封闭环，表明经过超声处理已成功制备 O/W 乳液。随着超声功率的增加，颗粒先减小后增大，这与平均粒径的结果一致，可能是由于平均粒径减小，液滴的表面积增加，导致乳液油水界面处的吸附蛋白质增加，形成更均匀的乳化油滴，乳液的稳定性提高[31]。而当超声功率为 600 W 时，图中乳液液滴部分呈不规则圆形，部分油体蛋白未形成封闭环结构，颗粒变大，可归因于高功率超声处理产生的热量及其振动作用导致部分乳液液滴结构被破坏，影响了乳液体系的稳定性。

2.4　傅里叶变换红外光谱分析

傅里叶红外光谱结果如图 5A 所示。从图中可以看出，光谱在 3200~3600 cm^{-1} 范围出现一个强峰，这与氢键的 O-H 基团拉伸振动有关，样品经过超声处理，峰值发生移动，表明氢键的形成[32]。1600~1700 cm^{-1} 区域代表酰胺 I 带，归因于 C=O 和 C-N 基团的伸缩振动，1500~1600 cm^{-1} 区域代表酰胺 II 带，取决于 N-H 基团和 C-N 基团的弯曲、伸缩振动[33]。图中随着超声功率的增加，酰胺 Ⅱ 谱带发生红移，表明脂肪中的 C=O 基团与油体蛋白中的 N-H 或 O-H 基团形成氢键。酰胺Ⅲ谱带在 1200~1300 cm^{-1} 区域，该谱带从 1237 cm^{-1} 移动到 1240 cm^{-1}，这与蛋白质氨基酸侧链上的化学取代基有关[34]。三个谱带都出现了明显偏移，因此经过超声后油体界面蛋白的二级结构会发生变化。

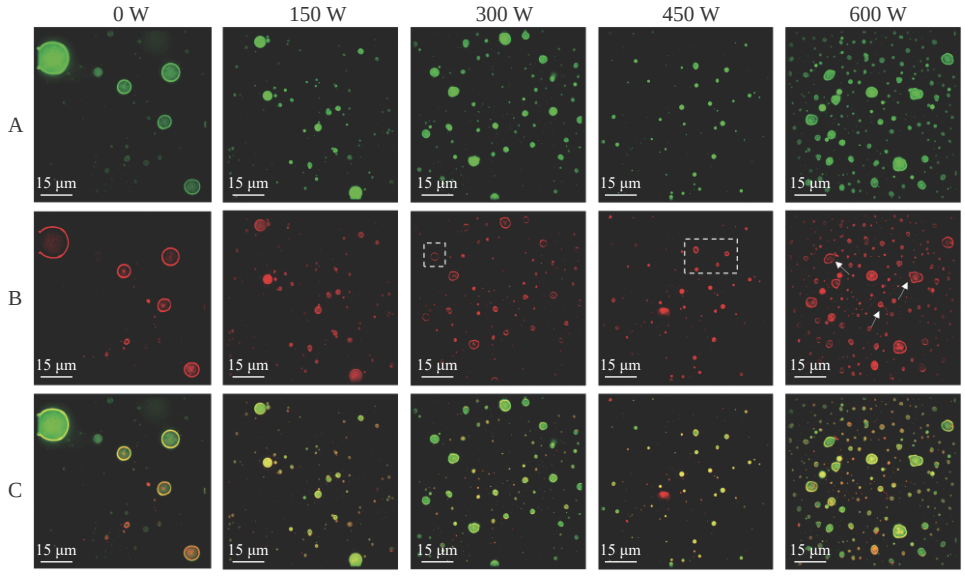


图 4　不同超声功率制备的大豆油体复合乳液的微观结构

Fig.4　Microstructure of soybean oil body composite emulsions prepared with different ultrasonic powers

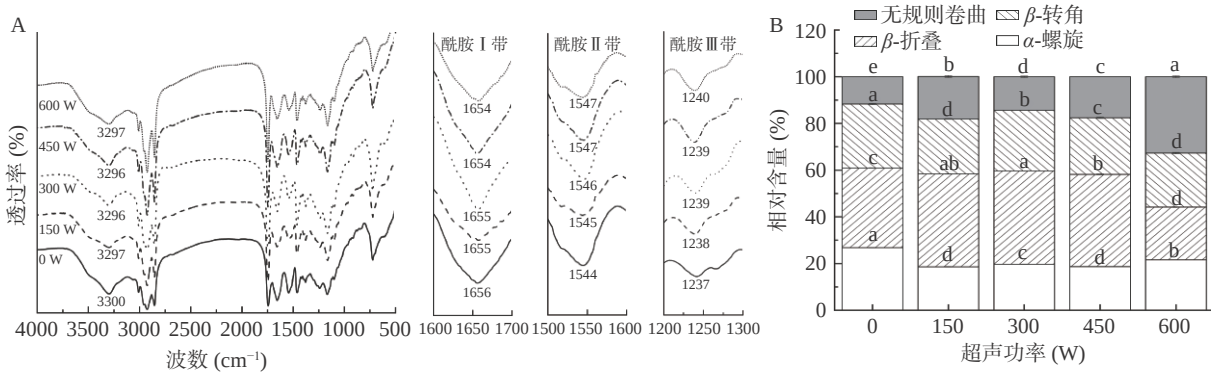


图 5 不同超声功率制备的大豆油体复合乳液中界面蛋白的傅里叶红外光谱图(A)和二级结构(B)

Fig.5 FTIR spectra (A) and secondary structures (B) of interfacial proteins in soybean oil body composite emulsions prepared with different ultrasonic powers

注: 小写字母不同表示不同超声功率导致的二级结构含量差异显著(P<0.05)。

采用高斯面积法拟合和计算样品中的蛋白质, 确定二级结构的类型及相对含量, 结果如图 5B 所示。经过不同超声功率处理后, 各个二级结构的相对含量发生变化, 当超声功率增加到 450 W 时, 油体界面蛋白的 α-螺旋结构相对含量减少, β-折叠结构相对含量增多, 可能是由于超声引起的空化效应, 增加了湍流和剪切力等物理作用, 使油体蛋白的多肽链部分打开, 暴露出更多的疏水性氨基酸区域, 多肽中氢键网络发生重新排列[35], 有利于油体蛋白和脂质通过氢键结合发生相互作用, β-折叠相对含量的增加使乳液界面蛋白的空间结构变大, 使乳液更加稳定[36]。当超声功率为 600 W 时, α-螺旋和无规则卷曲结构相对含量与其他样品相比显著增加(P<0.05), 油体界面蛋白结构刚性结构减弱, 分子无序性增加, 部分乳液结构被破坏, 导致蛋白质聚集, 在油-水界面的吸附性减弱[37]。

2.5 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)揭示超声处理后大豆油体复合乳液界面蛋白的分子量分布, 如图 6 所示。图中经过超声处理的电泳条带具有相似的特征, 表明超声没有改变大豆油体复合乳液界面蛋白的亚基组成[38]。当提取 pH 为 11.0 时外源蛋白对油体的吸附能力减弱, 因此图中各个条带的外源蛋白含量较少[39]。与未经过超声处理的乳液相比, 经过超声处理的大豆油体复合乳液界面蛋白中的内源性蛋白条带明显。从表 1 中可以看出, 经过 150 W 和 300 W 超声处理的油体复合乳液界面蛋白电泳条带的外源蛋白光密度值较低, 有研究表明油体中的外源蛋白在储存过程中极易氧化, 外源蛋白过多会降低油体的氧化稳定性, 并且外源蛋白形成的是一种多孔的蛋白层结构, 游离相中的促氧化剂可以轻松通过外源蛋白层接触油体, 因此外源蛋白层对油体并不能起到保护和抗氧化的作用[20]。当超声强度为 450 W 和 600 W 时, 外源性蛋白质分子条带颜色变深, 可能是由于超声波产生的空化和湍流效应, 增强了外源蛋白在界面的吸附性[40]。

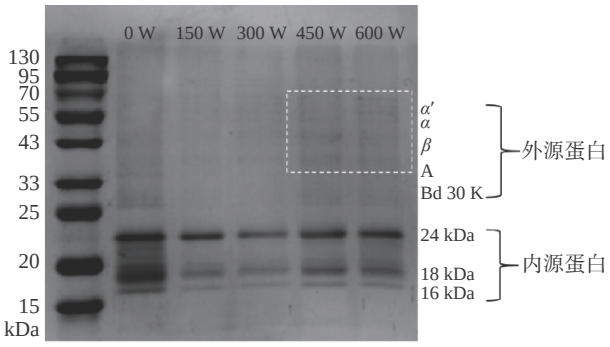


图 6 不同超声功率制备的大豆油体复合乳液界面蛋白的 SDS-PAGE

Fig.6 SDS-PAGE of interfacial proteins from soybean oil body complex emulsions prepared at different ultrasonic powers

表 1 不同超声功率制备的大豆油体复合乳液界面蛋白电泳条带外源蛋白的光密度值

Table 1 Optical density values of extrinsic proteins of the interfacial protein electrophoretic bands of soybean oil-body composite emulsions prepared with different ultrasonic powers

蛋白质种类及总和	光密度值				
	0 W	150 W	300 W	450 W	600 W
外源蛋白	60120	54792	38808	60192	113544
	7272	11592	16200	14040	20304
	2088	13680	17064	10800	18792
	27504	13752	21024	37008	17784
	20880	18648	15696	29952	14760
总和	117864	112464	108792	151992	185184

2.6 大豆油体运载 β-胡萝卜素乳液的包封率

不同超声功率制备的大豆油体运载 β-胡萝卜素乳液的包封率如图 7 所示。包封率随着超声功率的增加显示出先升高后降低的趋势, 当超声功率为 450 W 时, 大豆油体复合乳液对 β-胡萝卜素的包封率为 94.9%, 与对照组(0 W)相比提高了 9.3%, 油体复合乳液经过超声处理后平均粒径减小, 乳液液滴分布更均匀, 乳液界面蛋白 β-折叠结构相对含量增加, 乳液稳定性提高, 包封率升高。当超声功率为 600 W 时, 可能由于在高功率超声产生的热量及其振动作用下,

部分乳液液滴结构被破坏，导致包封率降低。与 Xu 等[41]制备的脂质体对 β-胡萝卜素的包封率（92.49%）相比，本研究中包封率相对较高。结果表明，通过超声处理可成功制备大豆油体运载 β-胡萝卜素乳液，并提高了大豆油体对 β-胡萝卜素的包封率。

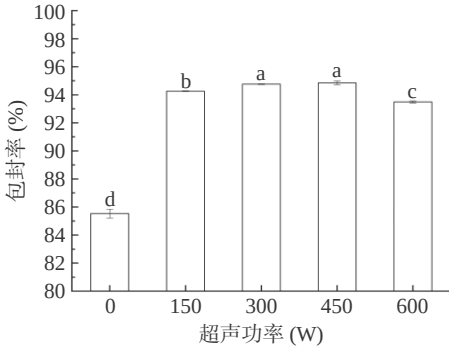


图 7　不同超声功率制备的大豆油体运载 β-胡萝卜素乳液的包封率

Fig.7　Encapsulation rates of soybean oil body transported β-carotene emulsions prepared at different ultrasonic powers

2.7　大豆油体运载 β-胡萝卜素乳液的贮藏稳定性

减少 β-胡萝卜素的降解对提高其生物利用率具有重要意义，因此测定了在室温贮藏过程中不同超声功率处理的大豆油体乳液运载 β-胡萝卜素的保留率。如图 8 所示，从图中明显看出，经过 11 d 室温贮藏后，β-胡萝卜素在乳液中的含量随贮藏时间的增加而降低，与对照组（0 W）相比，经过超声处理的乳液中 β-胡萝卜素的保留率较高且降解速度较慢，说明超声处理可以提高大豆油体乳液中 β-胡萝卜素的保留率，其中在 450 W 的超声功率下乳液中 β-胡萝卜素的保留率最高（81.8%），相较于对照组（0 W）提高了 53.2%。当超声功率为 600 W 时，由于乳液在高功率超声产生的振动作用下结构被破坏，油脂析出导致保留率降低。因此，经过 450 W 超声处理后的大豆油体复合乳液可以更好地保护和稳定 β-胡萝卜素。

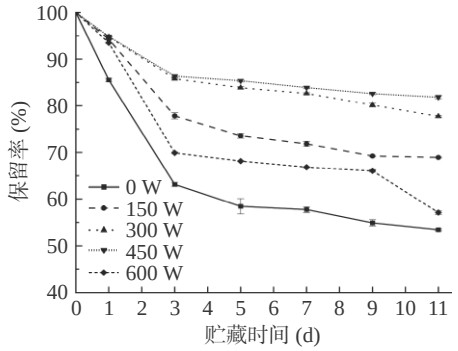


图 8　不同超声功率制备的大豆油体运载 β-胡萝卜素乳液的贮藏稳定性

Fig.8　Storage stability of β-carotene emulsions transported by soybean oil bodies prepared at different ultrasonic powers

2.8　大豆油体运载 β-胡萝卜素乳液的光学显微镜图

通过乳液的微观结构可以较为直观地观察乳液液滴的分布状态，图 9 为不同超声功率制备的大豆油体运载 β-胡萝卜素乳液的光学显微镜微观图。从图中可以看出，乳液液滴形状呈圆形或椭圆形，与对照组（0 W）相比，超声处理提高了乳液液滴的分散性。随着超声功率不断增加，乳液液滴尺寸先减小后增大，液滴尺寸的减小可能是由于超声处理产生的空化力引起的，促进了小颗粒尺寸的形成[42]。这与本实验中平均粒径的研究结果一致。其中在超声功率为 300 W 和 450 W 条件下制备的乳液液滴较小，形成了更均匀的乳化油滴，当超声功率为 600 W 时，乳液液滴大小不一，部分乳液结构被破坏，与超高分辨率显微镜观察到的结果一致。

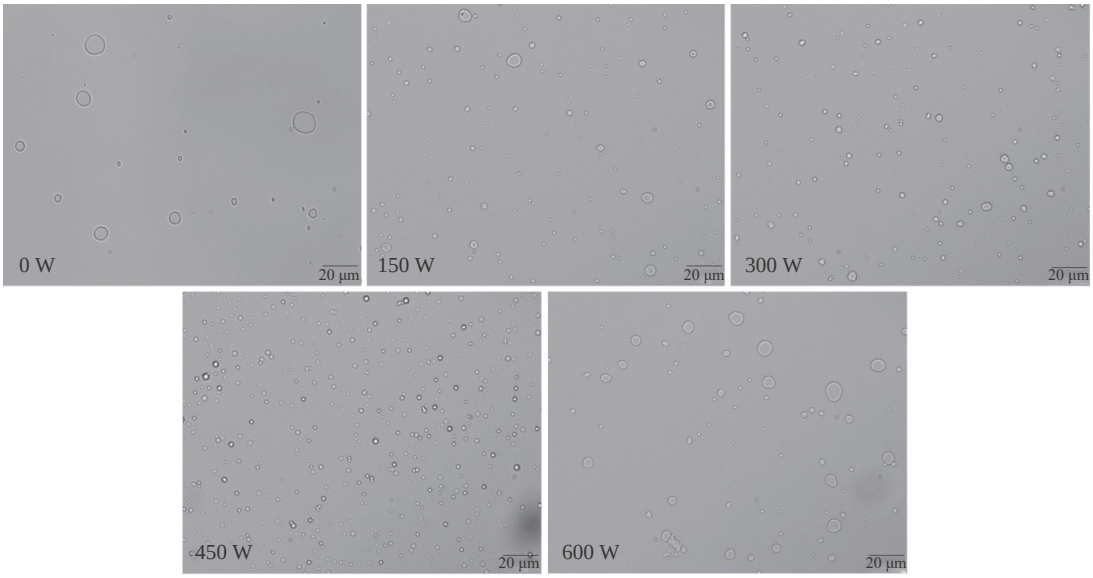


图 9　不同超声功率制备的大豆油体运载 β-胡萝卜素乳液的光学显微镜图

Fig.9　Optical micrographs of β-carotene emulsions transported by soybean oil bodies prepared at different ultrasonic powers

3　结论

本研究揭示了超声功率对大豆油体复合乳液理化性质的影响。经过超声处理成功制备出大豆油体复合乳液，且当超声功率为 450 W 时，乳液的平均粒

径较小，ζ-电位绝对值较高。傅里叶变换红外光谱和 SDS-PAGE 表明，经过超声处理油体界面蛋白二级结构中 β-折叠结构相对含量增多，二级结构发生改变，但蛋白质亚基组成没有变化。此外，当超声功率为 450 W 时，与对照组（0 W）相比，大豆油体复合乳液的贮藏稳定性和氧化稳定性都提高，油体复合乳液对 β-胡萝卜素的包封率为 94.9%，经过 11 d 时间贮藏后保留率高于对照组。本实验结果为大豆油体在包埋脂溶性生物活性物质中的应用以及利用超声技术提高生物活性物质的包封率和保留率提供理论依据。

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

参考文献

[1] ASEMI Z, ALIZADEH S A, AHMAD K, et al. Effects of beta-carotene fortified synbiotic food on metabolic control of patients with type 2 diabetes mellitus: A double-blind randomized cross-over controlled clinical trial[J]. Clinical Nutrition, 2016, 35(4): 819−825.

[2] 曲蒽名, 楚杰, 韩利文, 等. β-胡萝卜素提取方法、生理功能及应用研究进展[J]. 中国食物与营养, 2017, 23(8): 37−41. [QU H M, CHU J, HAN L W, et al. Research progress on extraction methods, physiological function and application of β-carotene[J]. China Food and Nutrition, 2017, 23(8): 37−41.]

[3] DE PAZ E, MARTÍN Á, ESTRELLA A, et al. Formulation of β-carotene by precipitation from pressurized ethyl acetate-on-water emulsions for application as natural colorant[J]. Food Hydrocolloids, 2012, 26(1): 17−27.

[4] LU Y, MAO L, HOU Z, et al. Development of emulsion gels for the delivery of functional food ingredients: From structure to functionality[J]. Food Engineering Reviews, 2019, 11(4): 245−258.

[5] CHAARI M, THEOCHARI I, PAPAOLIMITRIOU V, et al. Encapsulation of carotenoids extracted from halophilic Archaea in oil-in-water (O/W) micro- and nano-emulsions[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2018, 161(161): 219−227.

[6] 孙瑞瑞. 紫苏 β-胡萝卜素的超临界 CO_2 萃取及其微胶囊产品的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2017. [SUN R R. Supercritical CO_2 extraction of β-carotene from *Perilla frutescens* and its microencapsulated products[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2017.]

[7] 周叶红, 马学文, 梁文婷, 等. β-环糊精及衍生物与 β-胡萝卜素包合物性质[J]. 应用化学, 2016, 33(7): 827−833. [ZHOU Y H, MA X W, LIANG W T, et al. Properties of β-cyclodextrin and derivatives encapsulated with β-carotene[J]. Applied Chemistry, 2016, 33(7): 827−833.]

[8] JAIN A, SHARMA G, THAKUR K, et al. Beta-carotene-encapsulated solid lipid nanoparticles (BC-SLNs) as promising vehicle for cancer: An investigative assessment[J]. AAPS PharmSciTech, 2019, 20(3): 100.

[9] HOU J, FENG X, JIANG M, et al. Effect of NaCl on oxidative stability and protein properties of oil bodies from different oil crops[J]. LWT, 2019, 113(113): 108263.

[10] CHEN Y, ONO T. Simple extraction method of non-allergenic intact soybean oil bodies that are thermally stable in an aqueous medium[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(12): 7402−7407.

[11] IWANAGA D, GRAY D A, FISK I D, et al. Extraction and characterization of oil bodies from soy beans: A natural source of pre-emulsified soybean oil[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(21): 8711−8716.

[12] FRANCISCA A, MÓNICA R, IGNACIO J, et al. Oil bodies as a potential microencapsulation carrier for astaxanthin stabilisation and safe delivery[J]. Journal of Microencapsulation, 2014, 31(5): 488−500.

[13] 王钧渤. 两种油体乳液及运载 β-CE 乳液的稳定性与体外消化研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2021. [WANG J B. Stability and *in vitro* digestion of two oil emulsions and transported β-CE emulsions[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2021.]

[14] SU Y J, CHEN J H, ZHANG S W, et al. Effect of power ultrasound pre-treatment on the physical and functional properties of reconstituted milk protein concentrate[J]. Journal of Food Engineering, 2014, 124(124): 11−18.

[15] ZHOU L, ZHANG J, XING L, et al. Applications and effects of ultrasound assisted emulsification in the production of food emulsions: A review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 110(110): 493−512.

[16] LI K, FU L, ZHAO Y Y, et al. Use of high-intensity ultrasound to improve emulsifying properties of chicken myofibrillar protein and enhance the rheological properties and stability of the emulsion[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 98(98): 105275.

[17] LIN J, AGNES Y K Y, YIGE Z, et al. Improved *in vitro* bioaccessibility of quercetin by nanocomplexation with high-intensity ultrasound treated soy protein isolate[J]. Food Chemistry, 2023, 406(406): 135004.

[18] TZEN J T C, PENG C C, CHENG D J, et al. A new method for seed oil body purification and examination of oil body integrity following germination[J]. Journal of Biochemistry, 1997, 121(4): 762−768.

[19] 康梦雪, 孙禹凡, 宋晗钰, 等. pH 值偏移大豆油体-姜黄素复合乳液的物理特性及稳定性[J]. 食品科学, 2023, 44(4): 1−8. [KANG M X, SUN Y F, SONG H Y, et al. Physical properties and stability of pH-shifted soybean oleosomes-curcumin composite emulsions[J]. Food Science, 2023, 44(4): 1−8.]

[20] ZHAO L, CHEN Y, YAN Z, et al. Physicochemical and rheological properties and oxidative stability of oil bodies recovered from soybean aqueous extract at different pHs[J]. Food Hydrocolloids, 2016, 61(61): 685−694.

[21] ZHANG H, FAN Q, LI D, et al. Impact of gum arabic on the partition and stability of resveratrol in sunflower oil emulsions stabilized by whey protein isolate[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2019, 181(181): 749−755.

[22] LIAO Y, SUN Y, PENG X, et al. Effects of tannic acid on the physical stability, interfacial properties, and protein/lipid co-oxidation characteristics of oil body emulsions[J]. Food Hydrocolloids, 2023, 135(135): 108230.

[23] DING J, WEN J, WANG J, et al. The physicochemical properties and gastrointestinal fate of oleosomes from non-heated and heated soymilk[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 100(C): 105418.

[24] 吴子涵, 陈泽平, 刘震宇, 等. 大豆蛋白纤维聚集体 Pickering 乳液提高 β-胡萝卜素的包埋稳定性[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(21): 152−159. [WU Z H, CHEN Z P, LIU Z Y, et al. Improvement of β-carotene encapsulation stability by Pickering emulsion of soy protein fibre aggregates[J]. Food and Fermentation In-

dustry, 2022, 48(21): 152−159.]
[25] JAMBRAK A R, LELAS V, MASON T J, et al. Physical properties of ultrasound treated soy proteins[J]. Journal of Food Engineering, 2009, 93(4): 386−393.
[26] ARZENI C, MARTíNEZ K, ZEMA P, et al. Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality[J]. Journal of Food Engineering, 2012, 108(3): 463−472.
[27] TAHA A, HU T, ZHANG Z, et al. Effect of different oils and ultrasound emulsification conditions on the physicochemical properties of emulsions stabilized by soy protein isolate[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2018, 49(49): 283−293.
[28] TAO Y, SUN D W. Enhancement of food processes by ultrasound: A review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2015, 55(4): 570−594.
[29] HU J N, ZHENG H, CHEN X X, et al. Synergetic effects of whey protein isolate and naringin on physical and oxidative stability of oil-in-water emulsions[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 101(C): 105517.
[30] NA L, TONG W, XINRUN Y, et al. Effect of high-intensity ultrasonic treatment on the emulsion of hemp seed oil stabilized with hemp seed protein[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2022, 86(86): 106021.
[31] KINSELLA J E. Functional properties of soy proteins[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1979, 56(3Part1): 242−258.
[32] KHAN A, WANG C, SUN X, et al. Preparation and characterization of whey protein isolate-DIM nanoparticles[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(16): 3917.
[33] REN X, HOU T, LIANG Q, et al. Effects of frequency ultrasound on the properties of zein-chitosan complex coacervation for resveratrol encapsulation[J]. Food Chemistry, 2019, 279(279): 223−230.
[34] JUN S, TENGMEI L, FENG Z, et al. Tea polyphenols on emulsifying and antioxidant properties of egg white protein at acidic and neutral pH conditions[J]. LWT, 2022, 153(153): 112537.
[35] WANG T, CHEN X, WANG W N, et al. Effect of ultrasound on the properties of rice bran protein and its chlorogenic acid complex[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2021, 79(79): 105758.
[36] SUN Y, ZHONG M, WU L, et al. Loading natural emulsions with nutraceuticals by ultrasonication: Formation and digestion properties of curcumin-loaded soybean oil bodies[J]. Food Hydrocolloids, 2022, 124(124): 107292.
[37] 白银, 高悦, 王中江, 等. 射流空化对大豆分离蛋白的理化性质及结构的影响[J]. 食品科学, 2020, 41(7): 110−116. [BAI Y, GAO Y, WANG Z J, et al. Effects of jet cavitation on the physicochemical properties and structure of soybean isolates[J]. Food Science, 2020, 41(7): 110−116.]
[38] HUANG L, DING X, DAI C, et al. Changes in the structure and dissociation of soybean protein isolate induced by ultrasound-assisted acid pretreatment[J]. Food Chemistry, 2017, 232(232): 727−732.
[39] CHEN Y M, ZHAO L P, CAO Y Y, et al. Oleosins (24 and 18 kDa) are hydrolyzed not only in extracted soybean oil bodies but also in soybean germination[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(4): 956−965.
[40] QAYUM A, LI M, SHI R, et al. Laccase cross-linking of sonicated α-lactalbumin improves physical and oxidative stability of CLA oil in water emulsion[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2021, 71(71): 105365.
[41] XU T, ZHANG J, JIN R, et al. Physicochemical properties, antioxidant activities and *in vitro* sustained release behaviour of co-encapsulated liposomes as vehicle for vitamin E and β-carotene[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2022, 102(13): 5759−5767.
[42] O'SULLIVAN J, MURRAY B, FLYNN C, et al. The effect of ultrasound treatment on the structural, physical and emulsifying properties of animal and vegetable proteins[J]. Food Hydrocolloids, 2016, 53(53): 141−154.

吕燕, 陈军, 胡秋连, 等. 基于 pH 驱动法利用植物蛋白提升橙皮苷稳定性及生物利用率 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 54−64. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110196

LÜ Yan, CHEN Jun, HU Qiulian, et al. Enhancement of Hesperidin Stability and Bioavailability Using Plant Proteins Based on pH-Driven Approach[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 54−64. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110196

· 研究与探讨 ·

基于 pH 驱动法利用植物蛋白提升橙皮苷稳定性及生物利用率

吕　燕[1], 陈　军[1,2], 胡秋连[3], 吕成良[1], 耿　勤[1], 邓利珍[1,2], 韩嘉龙[1], 李　俶[1,2], 戴涛涛[1,2,*]

（1.南昌大学 食品科学与资源挖掘全国重点实验室, 江西南昌 330047;
2.江西南大国创院食品科技有限公司, 江西南昌 330200;
3.江西省认证总院食品检验检测研究院, 江西南昌 330052）

摘　要: 采用 pH 驱动法制备橙皮苷与不同植物蛋白（大米蛋白、豌豆蛋白、豌豆/大米复合蛋白）的复合物，以提高橙皮苷的水溶性、环境稳定性以及生物利用率，并采用扫描电镜、动态散射光、X 射线衍射技术等手段表征复合物的形成，同时使用高效液相色谱法测定橙皮苷含量以分析复合物环境稳定性和生物利用率。结果表明，三种植物蛋白均能提高橙皮苷水溶性，其中豌豆/大米复合蛋白提升了 19.6 倍，使橙皮苷在水中溶解度达到 340.78 μg/mL。橙皮苷-豌豆/大米复合蛋白复合物环境稳定性基本优于单一植物蛋白，其中热稳定效果最好，在 80 ℃ 加热 2 h 橙皮苷保留率在 65.09%。体外消化结果表明橙皮苷-豌豆/大米复合蛋白复合物的生物利用率最高，约为游离橙皮苷的 5.22 倍。本研究为提升橙皮苷稳定性和生物利用度提供了新思路，有助于拓展橙皮苷的应用范围。

关键词: 橙皮苷, 植物蛋白, pH 驱动法, 稳定性, 生物利用率

中图分类号: TS201.7　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2024)21−0054−11

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110196　　本文网刊:

Enhancement of Hesperidin Stability and Bioavailability Using Plant Proteins Based on pH-Driven Approach

LÜ Yan[1], CHEN Jun[1,2], HU Qiulian[3], LÜ Chengliang[1], GENG Qin[1], DENG Lizhen[1,2], HAN Jialong[1], LI Ti[1,2], DAI Taotao[1,2,*]

（1.State Key Laboratory of Food Science and Resources, Nanchang University, Nanchang 330047, China;
2.International Institute of Food Innovation Co., Ltd., Nanchang University, Nanchang 330200, China;
3.Food Inspection and Testing Research Institute of Jiangxi General Institute of Testing and Certification, Nanchang 330052, China）

Abstract: Complexes of hesperidin with different plant proteins (rice protein, pea protein, pea/rice complex protein) were prepared by pH-driven method to improve the water solubility, environmental stability, and bioavailability of hesperidin. The complexes were characterized by scanning electron microscopy, dynamically scattered light, and X-ray diffraction. Meanwhile, the high performance liquid chromatography was used to determine the hesperidin content to analyze the environmental stability of complexes and bioavailability of hesperidin. The results showed that three plant proteins were able to improve the water solubility of hesperidin, among which the pea/rice complex protein improved 19.6-fold, and the solubility of hesperidin in water reached 340.78 μg/mL. The environmental stability of hesperidin-pea/rice complex protein complex was basically better than that of single plant protein, in which the heat stabilization was the most effective, and the

收稿日期: 2023−11−21

基金项目: 江西省重点研发计划（重点项目）（20212BBF61008）。

作者简介: 吕燕（1998−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品工程, E-mail: ly66778899313@163.com。

*** 通信作者:** 戴涛涛（1991−）, 男, 博士, 讲师, 研究方向: 植物蛋白高值化利用与开发, E-mail: ncubamboo@163.com。

retention of hesperidin was at 65.09% after heating at 80 ℃ for 2 h. The *in vitro* digestion results showed that the bioavailability of hesperidin in hesperidin-pea/rice complex protein complex was the highest, which was about 5.22-fold of free hesperidin. This study provided a new idea to enhance the stability and bioavailability of hesperidin and helped to expand the application of hesperidin.

Key words: hesperidin; plant protein; pH-driven method; stability; bioavailability

橙皮苷是橙皮素与芸香糖形成的糖苷，即橙皮素-7-O-芸香糖苷，为二氢黄酮衍生物[1]，大量存在于柑橘类水果（芸香科）中。橙皮苷以其广泛的生物活性而闻名，包括降低毛细血管渗透性和脆弱性、抗氧化、抗炎、抗菌、抗癌和抗过敏等[2−3]。但由于该化合物的水溶性极差[4−5]，其在水中的溶解度仅有 0.02 mg/mL，限制了其在水中的溶解速率，导致生物利用度相当低，极大地限制了其在食品、医药、化妆品等工业产品中的应用[6]。目前对橙皮苷的研究大多集中于脱糖基、甲基化等改性处理或微胶囊、乳液等包封运载的方式来提升其溶解性和生物利用率，但成功率低并且成本过高，因此探索出简便快捷且有效的方式十分重要。

pH 驱动法，也称为 pH 转换法，是多酚类化合物封装方法之一，它是一种绿色、无有机溶剂、低能耗且易于扩展的技术。PAN 等[7] 根据生物聚合物（蛋白质）的“解离-重折叠”和植物多酚从碱性环境到酸性环境的“去质子化-质子化”开发了该方法，并成功地将水溶性差的姜黄素包封在酪蛋白胶束中，这是因为姜黄素在水溶液中的溶解度强烈依赖于 pH。大量研究表明，生物活性化合物通过与蛋白的非共价结合制备复合粒子可以改善生物活性化合物的溶解性、生物利用度和抗氧化活性[8]。目前，大多研究集中于将动物蛋白与溶解性依赖 pH 的酚类化合物复合来改善酚类化合物的性质。XU 等[9] 报道了通过 pH 驱动方法制备负载白藜芦醇的乳清分离蛋白纳米粒子在不同 pH 条件下的超声处理，发现 pH12.0 的超声处理后有最高的包封率和负载量，这可能是由于在 pH12.0 条件下超声处理的蛋白质具有最高的表面疏水性。KEVIJ 等[10] 采用 pH 驱动法将乳清分离蛋白与姜黄素复合制备姜黄素-蛋白聚合物粒子，该方法显著提高了姜黄素的水溶性、热稳定性和光稳定性，且在 pH3.0 时的稳定性高于 pH7.0 时的稳定性。同时乳清分离蛋白-姜黄素聚合物粒子在模拟肠道条件下也显示出高的抗氧化活性和缓释特性。PENG 等[11] 基于纳米包封技术并结合 pH 驱动法制备姜黄素酪蛋白酸钠纳米粒子，所得的酪蛋白酸钠聚合物粒子具有高负载率（27%），并且提升了姜黄素的水分散性。ZHOU 等[12] 采用酪蛋白酸盐通过 pH 驱动法来稳定百里酚，其负载能力高达 45.9%。然而，使用植物蛋白通过 pH 驱动法来提升酚类化合物的性质研究报道较少，且复合植物蛋白在提升酚类化合物稳定性的方面研究更为少见。

近年来，植物蛋白因其安全、环保、来源广泛、价格低廉等优点，逐渐部分或完全取代了动物蛋白。大米蛋白和豌豆蛋白均是低过敏性植物蛋白[13−14]。研究表明大米蛋白和豌豆蛋白可作为运载体结合生物活性小分子从而提升活性物质的性质。MA 等[15] 研究发现大米蛋白与叶黄素通过非共价相互作用形成纳米颗粒，显著提高了叶黄素的溶解度，荧光光谱分析表明二者具有很强的亲和力。豌豆蛋白与蜂胶形成微粒，对蜂胶的抗氧化性和抗菌活性均有显著保护作用[16]。豌豆蛋白与葡萄籽原花青素通过氢键形成胶体复合物，提高了葡萄籽原花青素的储藏稳定性[17]。但由于大米蛋白的赖氨酸含量较低，是其第一限制性氨基酸，单一大米蛋白无法充分地满足人体的蛋白质需求，而豌豆蛋白富含赖氨酸。因此将大米蛋白与豌豆蛋白复合，不仅可以解决大米蛋白氨基酸不均衡以及溶解度差的缺点，还能提升大米蛋白的功能性质。HU 等[18] 研究发现豌豆/大米复合蛋白与甜菜苷通过疏水相互作用复合后可以显著提升甜菜苷的热稳定性，在 80 ℃ 加热 60 min 后，甜菜苷的降解率从 93.74% 降至 56.48%，表明复合植物蛋白对甜菜苷具有一定的热保护作用。

综上所述，本研究以豌豆蛋白、大米蛋白、豌豆/大米复合蛋白为原料通过 pH 驱动法分别与橙皮苷复合，通过扫描电镜、动态散射光、X 射线衍射技术表征橙皮苷-蛋白复合物的形成，探究并比较不同蛋白对橙皮苷环境稳定性的影响，提高橙皮苷的水溶性和生物利用率，为拓展橙皮苷在食品等领域的应用提供理论依据和指导。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

橙皮苷　纯度：95%，上海源叶生物科技有限公司；大米蛋白　纯度：83.4%，江西恒顶食品有限公司；豌豆蛋白　纯度：82.8%，烟台双塔食品股份有限公司；氢氧化钠、0.1 mol/L 盐酸标准液　阿拉丁试剂有限公司（中国上海）。

RT-10 磁力搅拌器　德国 IKA 公司；Zetasizer Nano ZS 纳米粒度仪　英国 Malvern 公司；SU8100 扫描电子显微镜　日本 Hitachi 公司；D8 Advance X-射线衍射　德国 Bruker 公司；1260 series 高效液相色谱仪　美国 Agilent 公司；ME303E 电子分析天平　上海梅特勒-托利多仪器有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　橙皮苷-蛋白复合物的制备　参照 HU 等[18] 的方法处理植物蛋白，分别将豌豆蛋白、大米蛋白和豌豆/大米复合蛋白（质量比=1∶1）溶解在蒸馏水中，

并用 1 mol/L 氢氧化钠溶液将 pH 调节至 12.0。搅拌 1 h 后，用 0.1 mol/L 盐酸溶液将 pH 重新调节至 7.0。以 4800 r/min 离心 30 min 后，取上清液备用。经 pH 循环处理后的豌豆蛋白、大米蛋白和豌豆/大米复合蛋白的溶解度分别从 12.2、0.5、4.1 mg/mL 提升到 99、31.2、36.4 mg/mL。将经 pH 循环制备的豌豆蛋白(PP)、大米蛋白(RP)、豌豆/大米复合蛋白(PP-RP)用蒸馏水稀释至 10 mg/mL，磁力搅拌 2 h 充分水化后使用 3 mol/L 的氢氧化钠溶液将蛋白溶液调到 pH12.0，磁力搅拌 80 min 后分别加入一定量的橙皮苷粉末使橙皮苷浓度分别为 0.5、1、2、3、4 mg/mL，继续搅拌 20 min，使用 2 mol/L 的盐酸溶液将 pH 调到 7.0 并持续搅拌 30 min，后经 4800 r/min 离心 20 min 后取上清液分别制得橙皮苷-豌豆蛋白复合物(PP-H)、橙皮苷-大米蛋白复合物(RP-H)和橙皮苷-豌豆/大米复合蛋白复合物(PP-RP-H)。

1.2.2 橙皮苷浓度测定 采用高效液相色谱法对橙皮苷-蛋白复合物进行检测，色谱柱为 Agilent C_{18} 分析柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)；流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液，流动相 B 为乙腈，采用紫外可见光检测器，紫外检测波长为 283 nm，柱温为 35 ℃，进样量为 20 μL，一个梯度程序的跑样时间为 30 min，流速为 1 mL/min。应用以下梯度程序：0~1 min，85% A；1~5 min，85%~75% A；5~15 min，75%~60% A；15~25 min，60%~50% A；25~30 min，50%~85% A[19]。

1.2.3 橙皮苷-蛋白复合物的基本性质表征

1.2.3.1 包封率和载药量的测定 参考 TIAN 等[8]的方法稍作修改，取 1 mL 橙皮苷-蛋白复合物与 29 mL 甲醇溶液混合均匀，涡旋 2 min，然后在 4800 r/min 离心 15 min。离心后取上清液。使用高效液相色谱法测定上清液中橙皮苷对应的峰面积。将橙皮苷标准品溶解于甲醇溶液中配制橙皮苷标准溶液，采用高效液相色谱法测定其峰面积，建立标准曲线用于计算稀释上清液中的橙皮苷浓度，利用下述公式计算包封率和载药量。

$$包封率(\%)=\frac{C_1}{C_0}\times 100 \quad 式（1）$$

$$载药量(\%)=\frac{C_1}{C_2}\times 100 \quad 式（2）$$

式中：C_1 表示离心后上清液橙皮苷的浓度，mg/mL；C_0 表示制备橙皮苷-蛋白复合物时添加的橙皮苷浓度，mg/mL；C_2 表示蛋白浓度，mg/mL。

1.2.3.2 保留率和溶解浓度的测定 将贮藏 3 d 后的三种橙皮苷-蛋白复合物分别在 4800 r/min 条件下离心 30 min，取上清液并采用 1.2.2 方法进行橙皮苷浓度测定，通过以下公式计算保留率：

$$保留率(\%)=\frac{C_3}{C_0}\times 100 \quad 式（3）$$

式中，C_3 表示贮藏 3 d 后的样品离心后上清液橙皮苷的浓度；C_0 表示橙皮苷-蛋白复合物贮藏前的橙皮苷初始浓度。

将橙皮苷添加量为 2 mg/mL 所制备好的橙皮苷-蛋白复合物采用 1.2.2 方法对其橙皮苷浓度进行测定，所得橙皮苷浓度即为橙皮苷实际溶解浓度。

1.2.3.3 橙皮苷-蛋白复合物粒径及电位的测定 通过马尔文纳米粒度电位仪在室温下测定橙皮苷-蛋白复合物的粒径、电位，蛋白质和水的折射率分别为 1.45 和 1.33。为避免多次散射效应，同时产生足够大的信号，在测定之前，橙皮苷-蛋白复合物采用去离子水进行适当稀释[20]。

1.2.3.4 橙皮苷-蛋白复合物表面形态的测定 将橙皮苷-蛋白复合物冻干，采用扫描电镜对冻干后的橙皮苷-蛋白复合物进行微观形态的观察。取少量样品均匀平铺于双面导电胶上，经过离子溅射镀膜仪将样品镀金至 250~500 nm 的水平，在 Quanta 200 扫描电镜中观察颗粒形貌结构，工作电压为 3 kV，放大倍数为 25000 倍[20]。

1.2.3.5 X 射线衍射(XRD)分析 采用 XRD 技术分别考察橙皮苷、蛋白和橙皮苷-蛋白复合物的结晶形态。发射和接收狭缝分别设置为 1°和 0.1 mm，扫描速度为 2°/min，扫描范围(2θ)为 5°~50°[21]。

1.2.4 橙皮苷-蛋白复合物环境稳定性研究

1.2.4.1 热稳定性 考察温度对橙皮苷-蛋白复合物热稳定性的影响，将橙皮苷-蛋白复合物在 20~90 ℃的温度下处理 2 h，测定处理后的橙皮苷-蛋白复合物平均粒径的变化以及经 4800 r/min 离心 20 min 后上清液的橙皮苷保留率。

$$保留率(\%)=\frac{C_H}{C_0}\times 100 \quad 式（4）$$

式中：C_H 表示样品加热后橙皮苷所剩浓度，mg/mL；C_0 表示未处理样品的初始橙皮苷浓度，mg/mL。

1.2.4.2 pH 稳定性 使用 HCl 和 NaOH 溶液，将橙皮苷-蛋白复合物的 pH 调至 2.0~8.0，平衡 12 h 后，用激光纳米粒度仪测定其平均粒径和表面电位变化，并用摄像机记录外观变化。

1.2.4.3 离子稳定性 参照彭盛峰[22]的方法，在一价阳离子和二价阳离子中各自选取一种食品工业中最常见的阳离子，分别为 NaCl 和 $CaCl_2$，然后向橙皮苷-蛋白复合物中加入不同浓度 NaCl 溶液和 $CaCl_2$ 溶液，在室温下平衡 1 h 后，测定处理后经 4800 r/min 离心 20 min 的上清液橙皮苷保留率的变化，用摄像机记录离子处理后的外观变化。

$$保留率(\%)=\frac{C_I}{C_0}\times 100 \quad 式（5）$$

式中：C_I 表示样品加入阳离子后橙皮苷所剩浓度，mg/mL；C_0 表示未处理样品的初始橙皮苷浓度，mg/mL。

1.2.4.4　贮藏稳定性　将橙皮苷-蛋白复合物溶液贮藏在 4 ℃ 和 25 ℃ 中，考察贮藏时间对橙皮苷-蛋白复合物的稳定性影响，测定一个月内平均粒径以及经 4800 r/min 离心 20 min 后上清液的橙皮苷保留率的变化，用摄像机记录贮藏前后的外观变化。

$$保留率(\%)=\frac{C_S}{C_0}\times 100 \qquad 式（6）$$

式中：C_S 表示样品贮藏一段时间后上清液橙皮苷所剩浓度，mg/mL；C_0 表示未处理样品的初始橙皮苷浓度，mg/mL。

1.2.5　体外消化　体外消化实验参照 ZHANG 等[23]的方法略做修改。在消化前将配制好的消化液进行灭菌操作，保持无菌状态。

口腔阶段：将 7.5 mL 橙皮苷-蛋白复合物与 7.5 mL 配制好的模拟口腔液（氯化钠 1.594 mg/mL、硝酸铵 0.328 mg/mL、氯化钾 0.202 mg/mL、磷酸二氢钾 0.636 mg/mL、柠檬酸钾 0.308 mg/mL、尿酸钠 0.021 mg/mL、尿素 0.198 mg/mL、乳酸钠 0.146 mg/mL、口腔粘膜蛋白 3.0 mg/mL）混合，将 pH 调至 6.8，37 ℃ 下 100 r/min 振荡 10 min。

胃阶段：在上述溶液中加入含有胃蛋白酶（3.2 mg/mL）、氯化钠（2 mg/mL）和盐酸（7 mL/L）的模拟胃液（1∶1 v/v）。将混合溶液的 pH 调至 2.0，在 37 ℃ 水浴中以 100 r/min 振荡 2 h，模拟人胃内消化情况。

小肠阶段：胃消化后，将溶液的 pH 调至 7.0，然后加入 2.5 mL 胰酶（24 mg/mL）、2.5 mL 脂肪酶（24 mg/mL）、3.5 mL 胆盐（全部溶解于 5 mmol/L 磷酸盐缓冲液溶液，pH7.0）和 1.5 mL 模拟肠液（36.7 mg/mL 氯化钙、218.7 mg/mL 氯化钠），在 37 ℃ 条件下以 100 r/min 消化 2 h，采用电位滴定仪监测 pH 保持在 7.0，模拟人小肠消化情况。

分别取胃消化、肠消化后的终产物，按照 1.2.2 的方法测定橙皮苷体外消化后的含量。

参考彭盛峰[22]的方法，完成模拟体外消化后，将消化液离心（4800 r/min，30 min）后取上清液，用液相色谱分析橙皮苷含量，上清液被认为是包含了已吸收的橙皮苷的混合胶束部分。橙皮苷的转化率和生物可接受率通过以下公式计算：

$$转化率(\%)=\frac{C_C}{C_0}\times 100 \qquad 式（7）$$

$$生物可接受率(\%)=\frac{C_M}{C_C}\times 100 \qquad 式（8）$$

$$生物利用率(\%)=转化率\times 生物可接受率\times 100 \qquad 式（9）$$

式中：C_C 表示食糜（经过口腔、胃、肠三个消化阶段后得到的最终全部产物）中橙皮苷的浓度，mg/mL；C_0 表示初始样品橙皮苷的浓度，mg/mL；C_M 表示混合胶束（上清液中的全部混合物）中橙皮苷的浓度，mg/mL。

1.3　数据处理

所有实验均至少重复三次，采用 IBM SPSS Statistics 26 统计学分析软件对数据进行方差分析和显著性差异检验，不同字母表示存在显著性差异（P<0.05）。采用 Origin 2021 软件进行绘图。

2　结果与分析

2.1　橙皮苷-蛋白复合物的包封率及载药量

如图 1（A）所示，随橙皮苷浓度的增加，三种植物蛋白的包封率呈现下降的趋势，分别由 19.18%、73.89%、60.29% 下降到 12.23%、9.01%、13.07%。TIAN 等[8]也报道了类似现象，这可能是由于橙皮苷的添加浓度高于蛋白包封能力的范围，导致很多橙皮苷没有与蛋白结合，从而出现包封率随橙皮苷浓度增高而下降的趋势。由图 1（B）可以看到在橙皮苷浓度大于 0.5 mg/mL 时，载药量基本呈现上升的趋势。PP-H 和 PP-RP-H 在橙皮苷浓度为 4 mg/mL 时，载药量仍有显著提升（P<0.05），而 RP-H 无显著性变化（P>0.05），表明 PP 与 PP-RP 的载药能力高于 RP。除橙皮苷浓度为 0.5 mg/mL 外，PP-RP-H 的包封率及载药量均优于两种单一蛋白。由图 1（A）可观察到在橙皮苷浓度为 0.5 mg/mL 以及 1 mg/mL 时的包封率显著高于其他橙皮苷浓度（P<0.05），但由图 2（B）可以看到，在 4 ℃ 条件下贮藏 3 d 后这两种浓度出

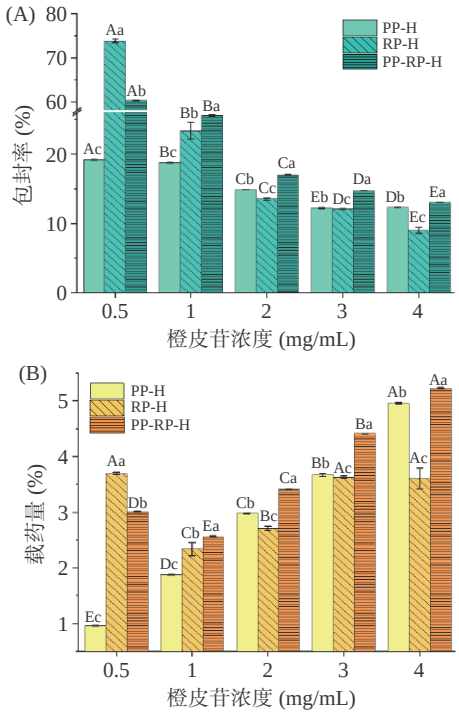


图 1　橙皮苷浓度对橙皮苷-蛋白复合物包封率（A）和载药量（B）的影响

Fig.1　Effect of hesperidin concentration on the encapsulation rate (A) and drug loading (B) of hesperidin-protein complexes

注：大写字母表示相同蛋白对应不同橙皮苷浓度间的显著性（P<0.05）；小写字母表示相同橙皮苷浓度对应不同蛋白间的显著性（P<0.05）；图 2 同。

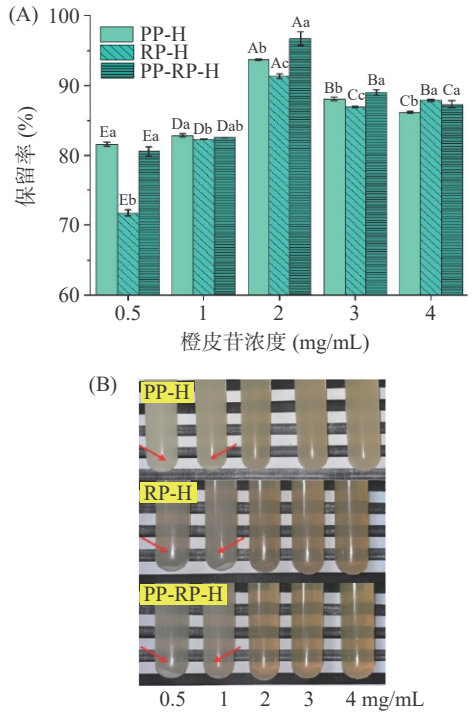


图 2　橙皮苷浓度对复合物贮藏 3 d 后橙皮苷保留率(A)的影响以及外观形貌(B)的变化

Fig.2　Effect of hesperidin concentration on hesperidin retention after three days of storage of the complexes (A) and changes in appearance and morphology (B)

现明显的沉淀，且由图 2(A)可以看到橙皮苷保留率下降到 82.8% 以下，其中在橙皮苷浓度为 2 mg/mL 时保留率最高，即此时橙皮苷-蛋白复合物最为稳定，并且 PP-RP 的橙皮苷保留率高于另两种蛋白，在 96.73% 左右，TIAN 等[8] 报道了高含量橙皮苷复合物的包封率和载药量在 24 h 内保持稳定，而低含量橙皮苷复合物的包封率和载药量在储存过程中显著下降，并表明高浓度的橙皮苷可以改善复合物的稳定性。由图 3 可知经高效液相色谱分析得到在橙皮苷添加浓度为 2 mg/mL 时，PP-H、RP-H 和 PP-RP-H 三种复合物最终上清液橙皮苷浓度分别为 298.06、

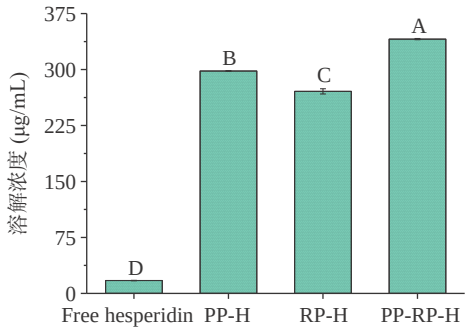


图 3　橙皮苷添加浓度为 2 mg/mL 时的实际溶解浓度

Fig.3　Actual dissolved concentration of hesperidin added at a concentration of 2 mg/mL

注：不同字母表示存在显著性差异(P<0.05)；图 4、图 11 同。

270.76 和 340.78 μg/mL，相较于游离橙皮苷在水中溶解度(17.40 μg/mL)，最高提升了近 19.6 倍，表明三种蛋白均对橙皮苷的水溶性有显著的提升效果，这可能是因为处理后的植物蛋白的溶解度远高于橙皮苷，蛋白表面疏水基团与橙皮苷的疏水基团结合后形成新的复合物阻断了橙皮苷在水中的自结晶从而使得橙皮苷的水溶性大幅提升[24−25]。其中当橙皮苷浓度为 2 mg/mL 时，PP-RP-H 复合物包封率和载药量最高，分别为 17.04%、3.41%，且经 3 d 贮藏后 PP-RP-H 橙皮苷的保留率也最高，为 96.73%，表明复合蛋白对橙皮苷的负载效果要优于单一蛋白，不同蛋白包封效果不同的原因可能是蛋白之间分子量及结构的不同[22]。

2.2　橙皮苷-蛋白复合物的结构表征

2.2.1　粒径与电位　由图 4 可知，橙皮苷与不同蛋白复合均在橙皮苷浓度为 2 mg/mL 时平均粒径最小，分别为 147.93、150.33、144.90 nm，其 PDI 值较小，均在 0.7 以下，分别为 0.28、0.25、0.57。PDI 值(多分散系数)越小表明样品粒径尺寸越均一，反之表明粒径分布不均匀，部分发生聚集现象，表明橙皮苷浓度为 2 mg/mL 时，复合物在水中分散最为均匀稳

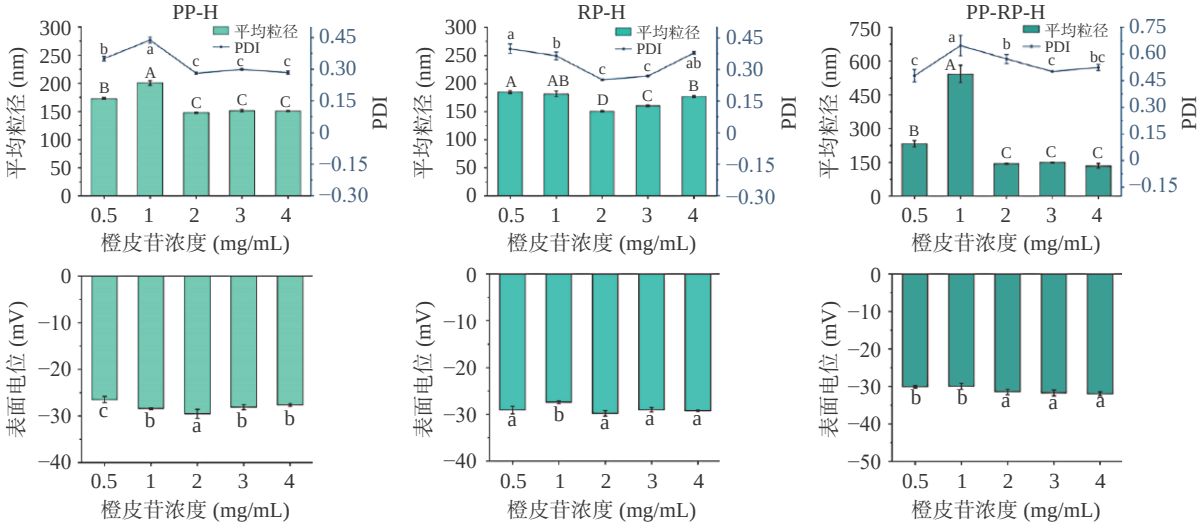


图 4　橙皮苷浓度对橙皮苷-蛋白复合物平均粒径、PDI 值以及电位的影响

Fig.4　Effect of hesperidin concentration on the average particle size, PDI value, and potential of hesperidin-protein complexes

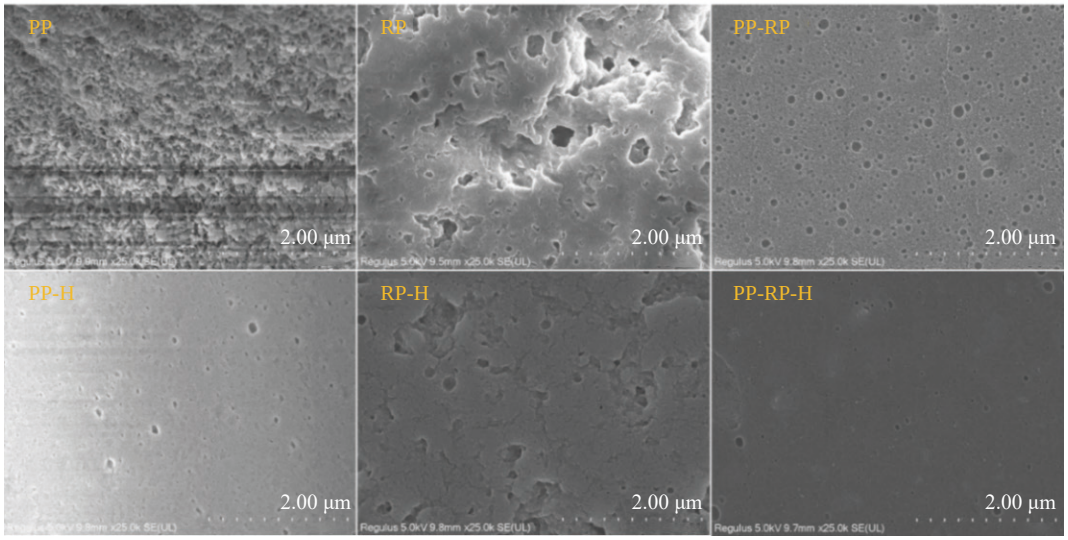


图 5　不同植物蛋白以及橙皮苷-蛋白复合物的微观结构

Fig.5　Microstructure of different plant proteins as well as hesperidin-protein complexes

定。一般情况下，电位绝对值越大，带有相同电荷粒子之间的静电斥力越大，纳米粒子越不容易发生聚集沉淀，有利于维持体系的稳定[26]。橙皮苷浓度为 2 mg/mL 时电位的绝对值最大，分别为−29.53、−29.77、−31.47 mV，说明橙皮苷浓度为 2 mg/mL 时形成的复合物最为稳定，与 3 d 贮藏后的橙皮苷保留率结果一致，因此后续实验均使用橙皮苷浓度为 2 mg/mL 的复合物作为研究对象。

2.2.2　蛋白质以及橙皮苷-蛋白复合物的表面形态　橙皮苷与蛋白复合后，会改变蛋白表面形态，如图 5 所示，通过扫描电子显微镜在放大 25000 倍的条件下观测前处理后的蛋白以及橙皮苷-蛋白复合物的表面形态，发现在与橙皮苷复合后三种蛋白的表面均由原来的粗糙多孔变得平滑且孔隙结构明显减少，说明橙皮苷与蛋白复合后改变了蛋白的表面形态，也进一步说明了橙皮苷与蛋白的成功复合。

2.2.3　X 射线衍射(XRD)分析　通过采用 X 射线衍射技术来考察橙皮苷在复合物中的晶体结构的变化，如图 6 所示，橙皮苷在 2θ 衍射角 5°~30°的范围内具有多个尖锐的衍射峰，表明在该范围内橙皮苷的结晶度较高，蛋白质仅在 20°附近有一个宽且平坦光滑的

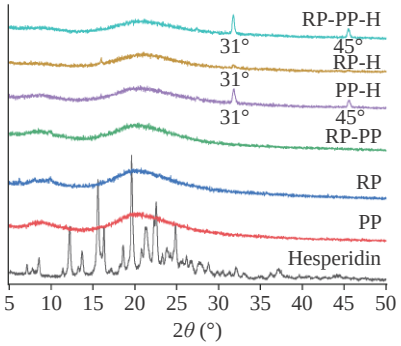


图 6　橙皮苷、植物蛋白和橙皮苷-蛋白复合物的 XRD 图

Fig.6　XRD patterns of hesperidin, phycobiliprotein and hesperidin-protein complexes

峰，表明蛋白质主要以无定形状态存在。橙皮苷与蛋白复合之后，可以明显地观察到原本存在的尖锐的特征结晶峰全部消失了，说明成功将橙皮苷包埋在蛋白质的疏水腔并有效地抑制了橙皮苷的结晶，使橙皮苷由结晶态变为无定形态，并且发现橙皮苷-蛋白复合物的衍射图谱在 31°和 45°产生了新的衍射峰，这可能是由于使用 pH 驱动法将橙皮苷与蛋白复合的过程中使用了 NaOH 和 HCl 从而引入了 NaCl，产生的新衍射峰恰好是 NaCl 的特征峰，KEVIJ 等[10] 和 ZHAN 等[27] 也报道了类似的现象。总体而言，植物蛋白均有效抑制了橙皮苷的结晶，不同的植物蛋白没有显著区别。

2.3　橙皮苷-蛋白复合物的环境稳定性

2.3.1　热稳定性　由于橙皮苷为黄酮苷类化合物，其在水溶液中可能发生水解，酚羟基可能被氧化破坏，而温度会加速降解反应的进程，因此探究橙皮苷复合物的热稳定性具有重要意义。由图 7(A)可以看出经过不同温度加热 2 h 后，不同蛋白对与橙皮苷的保护效果不同，橙皮苷保留率总体趋势均为先下降后上升，在温度超过 80 ℃ 时橙皮苷保留率有所提升，可能是因为在 90 ℃ 时蛋白发生了热变性从而形成了热聚集体将部分橙皮苷再次包封[28]，根据彭盛峰[22] 的研究发现，随着加热温度的升高姜黄素的保留率降低，这是由于加热过程中部分姜黄素与蛋白发生解吸附导致保留率下降，与此同时泄露率呈现先上升后下降的趋势，这可能是由于蛋白的热聚集作用导致 90 ℃ 条件下再次包埋部分游离姜黄素。其中 PP-RP 的热保护效果优于另两种蛋白，80 ℃ 时 PP-H、RP-H、PP-RP-H 的橙皮苷保留率分别为 54.57%、55.37%、65.09%。由图 7(B)可以看出热处理后的复合物的平均粒径先上升后下降，PP-H、RP-H、PP-RP-H 的粒径分别由最初的 154.83、133.83、149.33 nm 上升到在 80 ℃ 条件下的粒径 218.60、256.97、

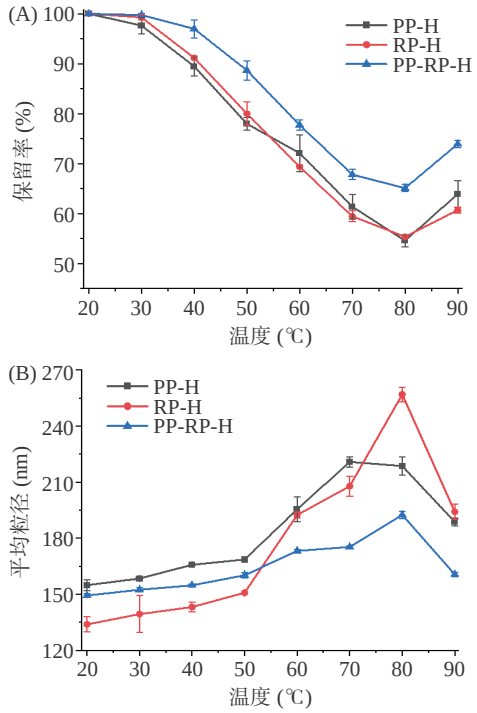


图 7 橙皮苷-蛋白复合物在不同加热温度下的橙皮苷保留率(A)和平均粒径(B)的变化

Fig.7 Changes in hesperidin retention (A) and average particle size (B) of hesperidin-protein complexes at different heating temperatures

192.47 nm, 其中 PP-RP-H 的粒径变化最小, 表明该复合物的热稳定性优于 PP-H 和 RP-H。

2.3.2 pH 稳定性 考察橙皮苷-蛋白复合物在不同 pH 条件下理化性质的变化, 以反映不同 pH 对其稳定性的影响。如图 8(A)所示, 随着 pH 由 2.0 升高到 8.0, 三种复合物的表面电位逐渐下降, 由带正电变为带负电, 其中 RP-H、PP-RP-H 两种复合物的电位变化较 PP-H 小。通过图 8(C)可以明显看到出现絮凝和沉淀现象, 这是由于蛋白在等电点附近稳定性较差, 而三种蛋白的等电点均在 pH 为 4.0~5.0 之间。如图 8(B)所示, 由于蛋白在等电点附近产生沉淀导致三种复合物的粒径在 pH 为 4.0 和 5.0 极度增大, 在 pH2.0 强酸的条件下 PP-H、RP-H、PP-RP-H 三者平均粒径分别为 328.47、129.07、172.27 nm, 在 pH8.0 弱碱条件下平均粒径分别为 193.80、247.77、201 nm, 相较于在 pH7.0 中性条件下的平均粒径 149.33、153.70、151.23 nm, RP-H 和 PP-RP-H 的粒径变化相比 PP-H 较大, 在强酸和弱碱条件下相比 PP 较为稳定。

2.3.3 离子稳定性 考察橙皮苷-蛋白复合物在不同离子浓度下的稳定性, 选取食品工业中较常用的 NaCl 和 $CaCl_2$ 分别作为考察一价阳离子和二价阳离子对离子稳定性影响的离子种类。如图 9 所示, 橙皮苷-蛋白在 0~1000 mmol/L NaCl 浓度下, 三种复合物的橙皮苷保留率均较高, 其中 PP-H 的稳定性优于另外两种复合物, 其在 1000 mmol/L NaCl 浓度下橙皮苷保留率为 95.96%。RP 的稳定性较差, 不仅保留率最低且在高浓度的 NaCl 条件下出现了沉淀现象。在 0~150 mmol/L $CaCl_2$ 条件下, 可以看出 PP-RP-H 最稳定, 其橙皮苷的保留率为 92.95%, 明显高于另两种复合物, 且从图 9(D)可以看出 PP-H 和 RP-H 在高浓度 $CaCl_2$ 条件下, 出现了明显的沉淀现象, 这可能是由于 Ca^{2+} 与蛋白结合, 降低了表面电位, 发生了桥接, 导致沉淀。此外, 盐溶液浓度升高, 溶液中离子强度增加, 极性增强, 蛋白质可能发生

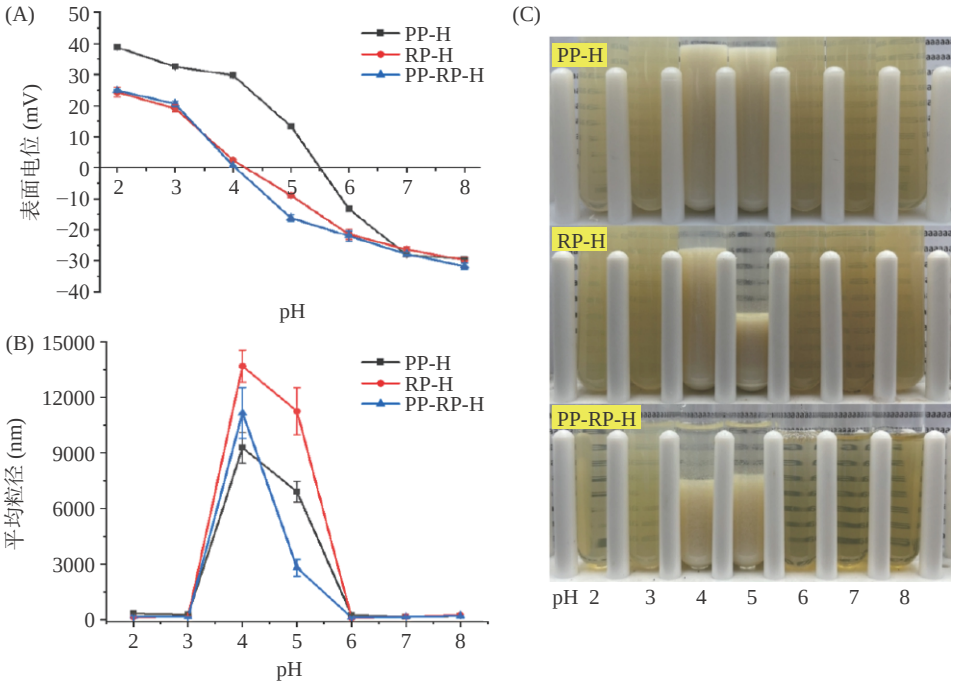


图 8 橙皮苷-蛋白复合物在不同 pH 下的表面电位(A)、平均粒径(B)和外观形貌(C)的变化

Fig.8 Changes in surface potential (A), average particle size (B) and appearance morphology (C) of hesperidin-protein complexes at different pH

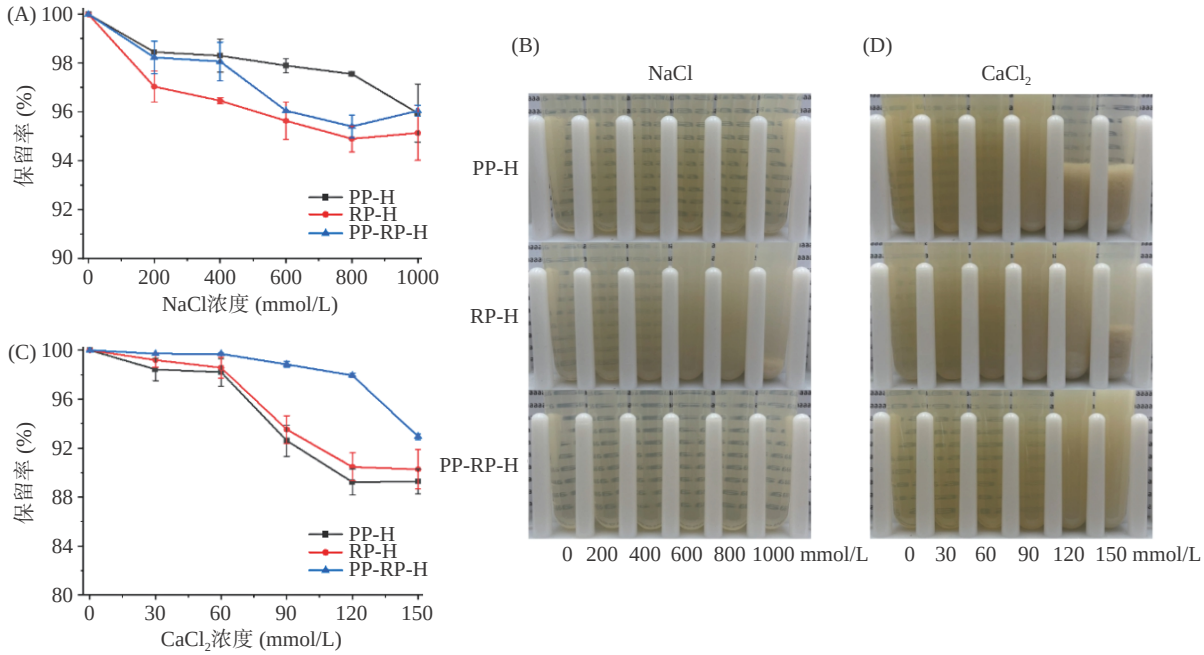
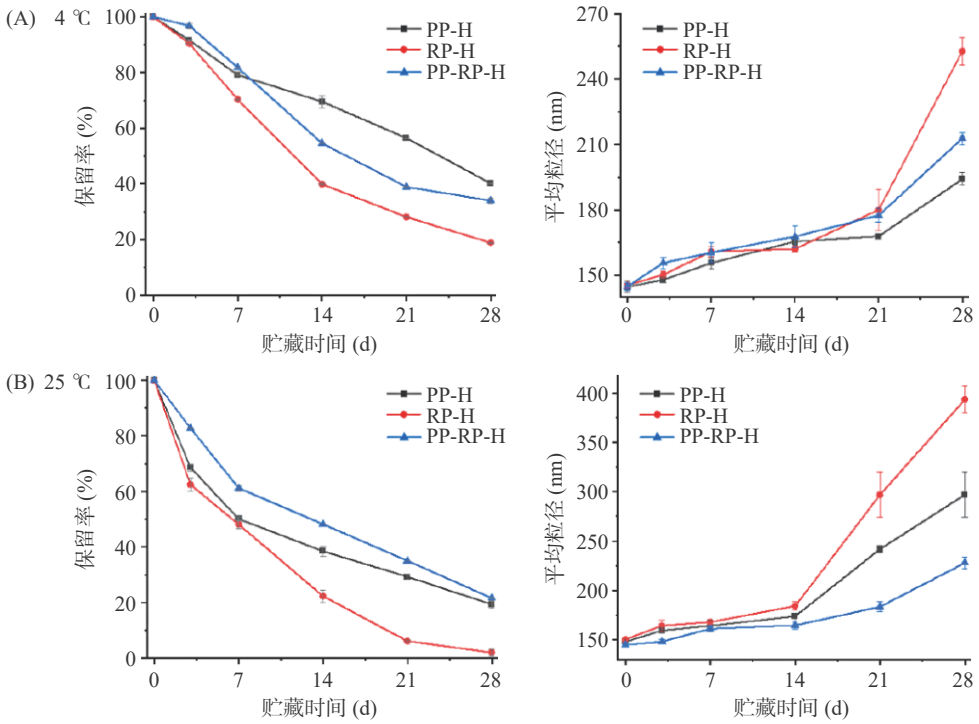


图 9　橙皮苷-蛋白复合物在不同 NaCl 浓度条件下的橙皮苷保留率(A)、外观形貌(B)和不同 $CaCl_2$ 浓度条件下的橙皮苷保留率(C)、外观形貌(D)的变化

Fig.9　Changes of hesperidin-protein complexes in hesperidin retention (A), appearance and morphology (B) at different NaCl concentrations and hesperidin retention (C), appearance and morphology (D) at different $CaCl_2$ concentrations

“盐析”现象，同时蛋白质包被的颗粒由于静电排斥的屏蔽而在高盐浓度下聚集[29−30]。

2.3.4　贮藏稳定性　随着贮藏时间延长，橙皮苷-蛋白复合物会发生降解、沉淀，橙皮苷与蛋白部分发生解吸附，导致橙皮苷在水溶液中的保留率下降，通过探究在不同温度下贮藏时间对橙皮苷-蛋白复合物的影响，来对比稳定性的优劣。如图 10(A)所示，在 4 ℃条件下贮藏时复合物的稳定性为 PP-H>PP-RP-H>RP-H，贮藏 28 d 后 PP-H 的橙皮苷保留率最高，为 40.22%，且粒径变化最小，由 144.80 nm 增加到 194.17 nm，PP-RP-H 和 RP-H 在 28 d 贮藏后，橙皮苷保留率分别为 34.07% 和 18.87%，粒径分别从 144.90 nm 和 145.50 nm 增加到 212.87 nm 和 252.90 nm。如图 10(B)所示，在 25 ℃条件下贮藏时复合物的稳定性为 PP-RP-H>PP-H>RP-H，贮藏 28 d 后 PP-RP-H 的橙皮苷保留率最高，为 21.65%±0.11%，且粒径变化最小，由 144.90 nm 增加到 227.93 nm，PP-H 和 RP-H 在 28 d 贮藏后，橙皮苷保



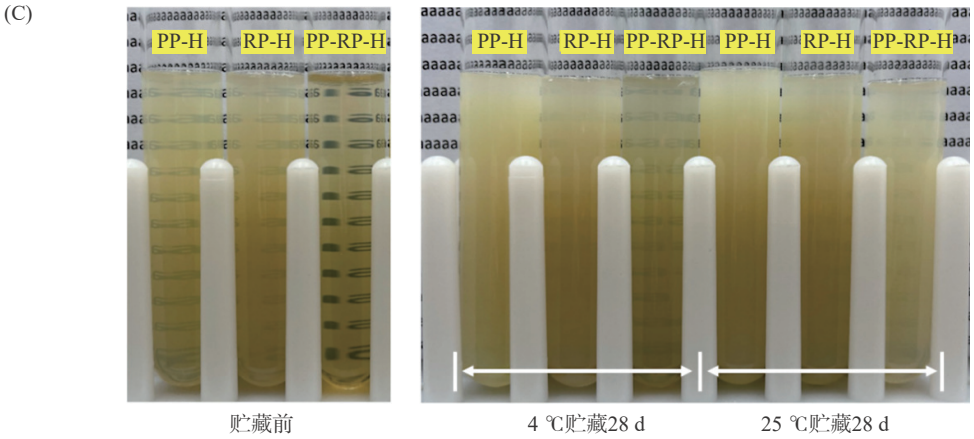


图 10 贮藏时间对橙皮苷-蛋白复合物在 4 ℃(A)及 25 ℃(B)条件下橙皮苷保留率和平均粒径的影响、贮藏前后的外观形貌(C)

Fig.10 Effect of storage time on the retention of hesperidin and average particle size of hesperidin-protein complexes at 4 ℃ (A) and 25 ℃ (B), appearance and morphology before and after storage (C)

留率分别为 19.40% 和 2.09%, 粒径分别从 147.93 nm 和 150.33 nm 增加到 296.93 nm 和 393.30 nm。

2.4 体外消化

橙皮苷是由黄酮环与鼠李糖和葡萄糖糖基单糖连接组成, 由于糖苷键的存在, 降低了橙皮苷的溶解性, 使其不容易透过生物膜被肠道吸收利用, 造成生物利用率低[31−34]。通过体外消化模拟来考察橙皮苷-蛋白复合物的生物利用率, 体外消化结果以转化率、生物可接受率和生物利用率三个指标来评估, 转化率主要是表现酚类活性物质经体外消化过程后仍保持其活性的质量比[21,35], 生物可接受率是指在经消化后活性物质释放在消化液中可被小肠吸收的部分占消化液中总量的比例[36−37], 生物利用率是指在经消化后活性物质释放在消化液中可被小肠吸收的部分占摄入总量的比例。由图 11 所示, PP-H、RP-H、PP-RP-H 的转化率分别为 22.76%、8.45%、26.66%, 游离橙皮苷的转化率为 86.81% 高于橙皮苷-蛋白复合物, 这是由于游离的橙皮苷是以晶体的形式存在, 其晶核相较于水分散性较好的橙皮苷-蛋白复合物与水相接触的表面积小, 因此相较于复合物更不易被降解, 所以转化率显著高于橙皮苷-蛋白复合物。由于橙皮苷-蛋白复合物的水溶性远高于游离橙皮苷, 因此复合物的生物可接受率显著高于游离橙皮苷, PP-H、RP-H、PP-RP-H 的生物可接受率分别为 91.33%、90.44%、88.63%, 差异较小, 三种复合物的生物可接受率几乎是游离橙皮苷(5.22%±0.03%)的 17 倍左右。经计算可得, 游离橙皮苷、PP-H、RP-H、PP-RP-H 的生物利用率分别为 4.53%±0.03%、20.79%±0.14%、7.64%±0.01%、23.63%±0.02%, 其中 PP-RP-H 的生物利用率最高约为游离橙皮苷的 5.22 倍, 这是由于无定型形态的复合物粒径小且与水接触的表面积更大, 从而更易被吸收。以上结果说明, 三种植物蛋白均能在不同程度上提高橙皮苷的生物利用率, 其中豌豆/大米复合蛋白的效果最好。

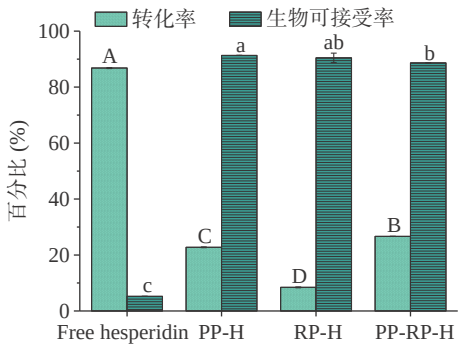


图 11 游离橙皮苷、橙皮苷-蛋白复合物经过体外消化后的转化率和生物可接受率

Fig.11 Transformation and bioaccessibility of free hesperidin, hesperidin-protein complexes after *in vitro* digestion

3 结论

本研究以经过前处理后的高溶豌豆蛋白、大米蛋白以及豌豆/大米复合蛋白为原料, 采用 pH 驱动法成功制备出三种橙皮苷-蛋白复合物。结果表明, 复合蛋白的包封率、载药量优于另两种单一蛋白, 当橙皮苷浓度在 2 mg/mL 时复合物比较稳定, 且在该浓度下复合蛋白的增溶效果最好, 是游离橙皮苷水中溶解度的 19.6 倍。扫描电镜、X 射线衍射技术的结果验证了橙皮苷与蛋白成功复合, 由难溶的结晶态变为水溶性较好的无定型形态。通过对环境稳定性的测定比较三种蛋白的稳定效果, 结果表明橙皮苷-豌豆/大米蛋白复合物的热稳定性最好, 豌豆蛋白和复合蛋白与橙皮苷形成的复合物在强酸和弱碱条件下较为稳定, 三种复合物均有较好离子稳定性, 其中橙皮苷-豌豆复合物的钠离子稳定性最好, 橙皮苷-豌豆/大米复合蛋白的钙离子稳定性最好, 在 4 ℃ 贮藏条件下, 贮藏稳定性效果豌豆蛋白>豌豆/大米复合蛋白>大米蛋白, 在 25 ℃ 贮藏条件下, 复合物的稳定性豌豆/大米复合蛋白>豌豆蛋白>大米蛋白。体外消化结果表明橙皮苷-豌豆/大米复合蛋白复合物的生物利用率最高, 约为游离橙皮苷的 5.22 倍。这些研究为利用蛋白质以及 pH 驱动法来提升橙皮苷稳定性及生物利用率提供了实践基础, 拓宽了提高橙皮苷的

水溶性、稳定性以及生物利用率的思路与方法，对促进橙皮苷在食品、医药中的应用以及产品开发具有重要意义。

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

参考文献

[1] JIANG H H, HU X, PAN J H, et al. Effects of interaction between hesperetin/hesperidin and glutenin on the structure and functional properties of glutenin[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 155(3): 32−41.

[2] DING Z, SUN G Y, ZHU Z M. Hesperidin attenuates influenza A virus (H1N1) induced lung injury in rats through its anti-inflammatory effect[J]. Antiviral Therapy, 2018, 23(7): 611−615.

[3] HASANIN A H, MATBOLI M, SELEEM H S. Hesperidin suppressed hepatic precancerous lesions via modulation of exophagy in rats[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2020, 121(2): 1295−1306.

[4] ANWER M K, AL-SHDEFAT R, JAMIL S, et al. Solubility of bioactive compound hesperidin in six pure solvents at (298.15 to 333.15) K[J]. Journal of Chemical and Engineering Data, 2014, 59(6): 2065−2069.

[5] OLIVEIRA R M M, DANIEL J F D, DE AGUIAR I, et al. Structural effects on the hesperidin properties obtained by chelation to magnesium complexes[J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 2013, 129: 35−42.

[6] LI Z, JIANG H, XU C M, et al. A review: Using nanoparticles to enhance absorption and bioavailability of phenolic phytochemicals[J]. Food Hydrocolloids, 2015, 43: 153−164.

[7] PAN K, LUO Y, GAN Y, et al. pH-Driven encapsulation of curcumin in self-assembled casein nanoparticles for enhanced dispersibility and bioactivity[J]. Soft Matter, 2014, 10(35): 6820−6830.

[8] TIAN Y, XU G, CAO W W, et al. Interaction between pH-shifted beta-conglycinin and flavonoids hesperetin/hesperidin: Characterization of nanocomplexes and binding mechanism[J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 140(2): 32.

[9] XU Y Z, WU J L, WANG S Y. Comparative study of whey protein isolate and gelatin treated by pH-shifting combined with ultrasonication in loading resveratrol[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 117: 106694.

[10] KEVIJ H T, MOHAMMADIAN M, SALAMI M. Complexation of curcumin with whey protein isolate for enhancing its aqueous solubility through a solvent-free pH-driven approach[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2019, 43(12): 14227.

[11] PENG S F, ZHOU L, CAI Q Z, et al. Utilization of biopolymers to stabilize curcumin nanoparticles prepared by the pH-shift method: Caseinate, whey protein, soy protein and gum arabic[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 107(6): 105963.

[12] ZHOU W, ZHANG Y, LI R Y, et al. Fabrication of caseinate stabilized thymol nanosuspensions via the pH-driven method: Enhancement in water solubility of thymol[J]. Foods, 2021, 10(5): 1074.

[13] HOU F, DING W, QU W, et al. Alkali solution extraction of rice residue protein isolates: Influence of alkali concentration on protein functional, structural properties and lysinoalanine formation[J]. Food Chemistry, 2017, 218: 207−215.

[14] GE J, SUN C X, CORKE H, et al. The health benefits, functional properties, modifications, and applications of pea (*Pisum sativum* L.) protein: Current status, challenges, and perspectives[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2020, 19(4): 1835−1876.

[15] MA X Y, CHEN X X, MA M Y, et al. Lutein transport systems loaded with rice protein-based self-assembled nanoparticles[J]. Food Bioscience, 2021, 42: 101061.

[16] JANSEN-ALVES C, MAIA D S V, KRUMREICH F D, et al. Propolis microparticles produced with pea protein: Characterization and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 87: 703−711.

[17] DAI T T, LI T, LI R Y, et al. Utilization of plant-based protein-polyphenol complexes to form and stabilize emulsions: Pea proteins and grape seed proanthocyanidins[J]. Food Chemistry, 2020, 329: 127219.

[18] HU T, CHEN J, HE X M, et al. Complex plant protein prepared from rice protein and pea protein: Improve the thermal stability of betanin[J]. Food Research International, 2023, 164: 112341.

[19] 王幻. 橙皮素单葡萄糖苷的酶法合成、分离纯化及其应用[D]. 广州：华南理工大学, 2019. [WANG H. Synthesis, purification and application of hesperetin-7-O-glucoside by enzymatic method[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2019.]

[20] 胡婷, 韩嘉龙, 耿勤, 等. 动物蛋白与植物蛋白对甜菜苷的热保护作用机制研究[J]. 食品工业科技, 2023, 44(7): 10−18. [HU T, HAN J L, GENG Q, et al. Study of the thermal protection mechanism of animal proteins and plant proteins on betanin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(7): 10−18.]

[21] CHENG C, PENG S F, LI Z L, et al. Improved bioavailability of curcumin in liposomes prepared using a pH-driven, organic solvent-free, easily scalable process[J]. Rsc Advances, 2017, 7(42): 25978−25986.

[22] 彭盛峰. pH 驱动法制备姜黄素食品运载体及其生物利用率[D]. 南昌：南昌大学, 2019. [PENG S F. The preparation and bioavailability of curcumin loaded food delivery system by pH-driven method[D]. Nanchang: Nanchang University, 2019.]

[23] ZHANG Z, GU M, YOU X, et al. Encapsulation of bifidobacterium in alginate microgels improves viability and targeted gut release[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 116: 106634.

[24] WORANUCH S, YOKSAN R. Preparation, characterization and antioxidant property of water-soluble ferulic acid grafted chitosan[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 96(2): 495−502.

[25] JIANG H H, FEI X Y, ZHANG G W, et al. Complexing with fibrillated glutenin and orange peel pectin improves the aqueous dispersion and storage stability of hesperitin/hesperidin[J]. Food Hydrocolloids, 2023, 145: 109138.

[26] CHEN Y F, ZHAO Z L, XIA G B, et al. Fabrication and characterization of zein/lactoferrin composite nanoparticles for encapsulating 7,8-dihydroxyflavone: Enhancement of stability, water solubility and bioaccessibility[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 146: 179−192.

[27] ZHAN X Y, DAI L, ZHANG L, et al. Entrapment of curcumin in whey protein isolate and zein composite nanoparticles using pH-driven method[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 106: 105839.

[28] MESSION J L, SOK N, ASSIFAOUI A, et al. Thermal denaturation of pea globulins (*Pisum sativum* L.)-molecular interactions leading to heat-induced protein aggregation[J]. Journal of

Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(6): 1196−1204.
[29] LIU W L, LIU W, YE A Q, et al. Environmental stress stability of microencapsules based on liposomes decorated with chitosan and sodium alginate[J]. Food Chemistry, 2016, 196: 396−404.
[30] 陈霞, 姜晓雷, 李明达, 等. 离子强度和 pH 对大麦中热稳定蛋白稳定性的影响[J]. 食品工业科技, 2010, 31(12): 87−89,175.
[CHEN X, JIANG X L, LI M D, et al. Effect of ionic strength and pH on stability of heat-stable protein in the barley[J]. Science and Technology of Food Industry, 2010, 31(12): 87−89,175.]
[31] ARTS I C W, SESINK A L A, FAASSEN-PETERS M, et al. The type of sugar moiety is a major determinant of the small intestinal uptake and subsequent biliary excretion of dietary quercetin glycosides[J]. British Journal of Nutrition, 2004, 91(6): 841−847.
[32] ERLUND I, KOSONEN T, ALFTHAN G, et al. Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers[J]. European Journal of Clinical Pharmacology, 2000, 56(8): 545−553.
[33] HOLLMAN P C H, KATAN M B. Dietary flavonoids: Intake, health effects and bioavailability[J]. Food and Chemical Toxicology, 1999, 37(9-10): 937−942.
[34] NEMETH K, PLUMB G W, BERRIN J G, et al. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell beta-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans[J]. European Journal of Nutrition, 2003, 42(1): 29−42.
[35] PENG S F, LI Z L, ZOU L Q, et al. Enhancement of curcumin bioavailability by encapsulation in sophorolipid-coated nanoparticles: An *in vitro* and *in vivo* study[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(6): 1488−1497.
[36] PENG S F, LI Z L, ZOU L Q, et al. Improving curcumin solubility and bioavailability by encapsulation in saponin-coated curcumin nanoparticles prepared using a simple pH-driven loading method[J]. Food & Function, 2018, 9(3): 1829−1839.
[37] FERNANDEZ G E, CARVAJAL L I, PEREZ G A. *In vitro* bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency[J]. Nutrition Research, 2009, 29(11): 751−760.

张红勐，白艳，秦晓绍，等. 不同加工工艺对金花茶花茶品质的影响 [J]. 食品工业科技，2024, 45(21)：65−73. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110241

ZHANG Hongmeng, BAI Yan, QIN Xiaoshao, et al. Effects of Different Processing Technologies on the Quality of *Camellia nitidissima* Chi Flower Tea[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 65−73. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110241

·研究与探讨·

不同加工工艺对金花茶花茶品质的影响

张红勐[1]，白　艳[1]，秦晓绍[2]，杨自云[1]，陈龙清[1]，吴　田[1,*]

（1.西南林业大学园林园艺学院，云南昆明 650224；
2.红河五里冲生态茶叶有限公司，云南红河 661199）

摘　要：以开花期‘红河 1 号’金花茶茶花为材料，研究烘干、晒干、干燥剂干燥、蒸汽杀青+烘干、萎凋+烘干等五种加工工艺对其制品感观品质和主要生化成分的影响。结果表明，不同加工工艺对金花茶茶花的感官品质和主要生化成分均有不同程度的影响，其中感官品质以萎凋+烘干工艺制得的产品最好，感官评分达 87.68 分，表现为花茶色泽均匀，花型饱满，香气清香，滋味鲜爽；蒸汽杀青+烘干较好，感官评分达 85.53 分；晒干在外形方面较差，仅 80.25 分；干燥剂干燥在汤色方面较差，仅 82.13 分；烘干工艺的产品感官评分最差，总分仅 80.78 分，表现为花朵产生色变，花瓣皱缩，气味刺鼻，滋味苦涩。主要生化成分中水浸出物、可溶性糖、游离氨基酸、儿茶素与黄酮类化合物含量以萎凋+烘干的工艺最高，含量分别为 43.01%、6.26%、2.76%、5.07 mg/g、2.47 mg/g，晒干的均最低；矿质元素含量以萎凋+烘干的工艺最高，总含量达 5279.33 mg/kg，烘干及干燥剂干燥的较低。因此，萎凋+烘干工艺最适合加工金花茶，为后续金花茶花茶产品的生产及金花茶茶花资源的合理开发利用提供了理论依据。

关键词：金花茶，花朵，加工工艺，品质成分

中图分类号：TS272.4　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1002−0306(2024)21−0065−09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110241　　本文网刊：

Effects of Different Processing Technologies on the Quality of *Camellia nitidissima* Chi Flower Tea

ZHANG Hongmeng[1]，BAI Yan[1]，QIN Xiaoshao[2]，YANG Ziyun[1]，CHEN Longqing[1]，WU Tian[1,*]

（1.College of Landscape Architecture and Horticulture Sciences, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China；
2.Honghe Wulichong Ecological Tea Co., Ltd., Honghe 661199, China）

Abstract: Using flowers of 'Honghe No.1' (*Camellia nitidissima* Chi) as the materials, in this study, the effects of five processing technologies, including baking, sunning, desiccant drying, steaming+baking, and withering+baking, on the organoleptic quality of the products and the main biochemical compositions. The results showed that different processing technologies had different degrees of influence on the sensory quality and the main biochemical composition of *C. nitidissima*, in which the sensory quality of the products produced by the process of withering+baking was the best, the sensory score was 87.68 with the uniform flower color, full flower, fragrant aroma, and fresh taste. The process of steaming+baking was the second, the sensory score was 85.53. Sunning in the appearance of poor, and the score was only 80.25. Desiccant drying was worse in terms of soup colour, and the score was only 82.13. The sensory score of the baking was the worst, with a total score of only 80.78, which showed that the flowers were discolored, the petals were shriveled, the smell was pungent and the taste was bitter. The contents of main biochemical components, including water extract, soluble sugar, free amino acids, catechins, and flavonoids, were the highest by the process of withering+baking, the contents were 43.01%, 6.26%, 2.76%, 5.07 mg/g, 2.47 mg/g respectively, while the lowest by the process of sunning. The contents

收稿日期：2023−11−23

基金项目：云南省教育厅科学研究基金资助项目（2024Y587）；国家重点研发计划课题（2019YFD1001005）。

作者简介：张红勐（2000−），男，硕士研究生，研究方向：植物遗传育种与种质资源，E-mail: zhm20002022@163.com。

*** 通信作者：**吴田（1980−），女，博士，教授，研究方向：分子植物育种，E-mail: wutianpotato@swfu.edu.cn。

of minerals expect were the highest by the process of withering+baking, the total content was 5279.33 mg/kg, while they were at a low level by the process of baking or desiccant drying. Therefore, the withering+baking process was the most suitable for processing *C. nitidissima*, which would provide a theoretical basis for the subsequent production of *C. nitidissima* and the rational development and utilization of *C. nitidissima* resources.

Key words: *Camellia nitidissima* Chi (*C. nitidissima*); flower; processing technologies; quality component

花茶是将植物的花朵或果实冲泡而成的茶，是中国特有的一类再加工茶。我国花茶生产历史十分悠久，至今已有七百多年的历史，且生产地十分广泛，主要有广西、福建、云南、四川和重庆等地[1]。我国花茶产业发展良好，具有广阔的发展前景。目前，在茶叶市场占据一定地位的著名花茶有茉莉花茶、菊花茶、金银花茶、桂花花茶、玫瑰花茶等。而随着花茶产业不断发展，近些年来有许多新的元素加入到花茶产业，金花茶就是近年来的后起之秀。金花茶（*Camellia nitidissima* Chi，*C. nitidissima*）是山茶科山茶属中唯一开黄花的植物类群，适宜生长在温暖、阴凉潮湿的环境，享有“植物界大熊猫”和“茶族皇后”的美誉[2−3]。金花茶不仅是珍贵的观赏植物，还具有较高的药用保健价值。金花茶能够散发出怡人的清香，偏向于茶的味道，闻起来令人神清气爽，泡开之后会有一种非常浓郁的茶味，同时又带有花的气息，深受人们的喜爱。

金花茶富含茶多酚、黄酮类化合物、多糖、皂苷及多种矿质元素，对人体有重要保健作用。茶多酚具有较强的抗氧化作用，抗氧化成分主要由儿茶素单体 EGCG 体现，其还原性甚至可达 L-异坏血酸的 100 倍，儿茶素类化合物是茶多酚的主要成分，占茶多酚总量的 65%~80%，儿茶素可视为影响茶多酚功效的关键活性成分[4−5]。黄酮类化合物主要有芦丁、山奈酚、槲皮素、杨梅素、木犀草素、花旗松素，使金花茶具有消除自由基、抗氧化作用[6]，金花茶还具有一定的防癌、治癌的功效[7−8]，能预防人体动脉粥样硬化，有利于降低血脂[9] 和控制血压[10]，有利于降低血糖等[11]。

金花茶的叶子和花均能加工成各种产品，其中以花朵加工成花茶最为常见。目前大部分金花茶花朵的加工都只是简单晒干或炒干，且耗时长、产品易变质、产品质量低。不同加工工艺对金花茶花茶品质的影响尚不明确，为此，参照杜仲雄花茶[12]、茉莉花茶[13]、茶树花[14] 等花茶的加工工艺，以‘红河 1 号’金花茶盛花期花朵为材料，研究烘干、晒干、干燥剂干燥、蒸汽杀青+烘干、萎凋+烘干五种不同加工工艺对水浸出物、可溶性糖、游离氨基酸、儿茶素类、黄酮类化合物、矿质元素的含量以及感官品质的影响，旨在为金花茶茶花资源的综合利用及产品开发提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

实验材料为‘红河 1 号’金花茶盛花期花朵　保存于西南林业大学树木园（25°03’47.20”N，102°46’7.43”E，海拔 1891 m），主要采摘花开后 2 至 3 d 的花，此时能看到金花茶花蕊，但又未完全盛开。此品种特性为：叶革质，长椭圆形；花腋生，黄色，平均单朵花重 5.6 g，盛产期产花量 630.5 g/m^2；磷酸二氢钾　分析纯，西陇化工股份有限公司；十二水合磷酸氢二钠（优级纯）、水合茚三酮（分析纯）　广东光华科技股份有限公司；硫酸亚铁　分析纯，天津市风船化学试剂科技有限公司；L-谷氨酸　优级纯，上海埃博商贸有限公司；儿茶素类、黄酮类各标准品　HPLC 级，成都曼思特生物科技有限公司；甲醇　HPLC 级，美国 Tedia 公司；食用硅胶干燥剂　东莞鼎兴实业有限公司。

ICP-OES 电感耦合离子光谱仪　德国斯派克分析仪器公司；ZEEnit.700P 火焰原子吸收分光光度计　德国耶拿分析仪器股份公司；756CRT 紫外可见光光度计　上海菁华科技仪器有限公司；1290 液相色谱仪　美国 Agilent 公司；835-50 型高速氨基酸分析仪　日本日立公司；101 型电热恒温干燥箱　上海市崇明实验仪器厂；K6600-A 多功能全波长酶标仪　北京凯奥科技发展有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 加工工艺　将新鲜金花茶样品分别在 35、50、65、80 ℃ 的温度条件下放入恒温干燥箱中进行分组干燥，以获得最适宜的烘干温度及其所需的烘干时间。通过预实验确定最适宜的烘干温度及时间后，将新鲜金花茶花朵分别进行晒干（将花单层摊在竹席上，于阳光下曝晒至恒重）、烘干（将花单层摊在烘盘上，于 50 ℃ 烘箱烘干至恒重）、干燥剂干燥（将花单层平铺于塑料箱，再铺一层食用硅胶干燥剂干燥至恒重）、蒸汽杀青+烘干（蒸锅中的水沸腾后，将花单层摊在蒸笼，保持水沸状态蒸汽杀青 2 min，冷却至室温，于 50 ℃ 烘箱烘干至恒重）、萎凋+烘干（将花单层摊在竹席上，在室内通风干燥处萎凋至含水量 70% 左右，于 50 ℃ 烘箱烘干至恒重）。

1.2.2 金花茶花茶制备与审评　参考《GB/T 23776-2018 茶叶感官审评方法》略作改动：按金花茶花茶与沸水 1∶50 的质量体积比、95±2 ℃ 热水冲泡 3 min，稍冷却后，过滤，由经过培训的 7 名人员组成审评小组，从茶叶外形、汤色、滋味、香气进行打分（表 1）。外形包括花色、花型、花香、脆性等分项，总分 100 分，冲泡后金花茶的感官指标包括汤色、滋味、香气等，分别 100 分，按照外形×20%+汤色×25%+滋味×30%+香气×25% 计算得出各工艺所制金花茶花

茶的总分。评价干制金花茶花茶的外形、色泽、花香等外观品质及花茶冲泡后汤色、滋味、香味等感官品质。

表 1　金花茶的感官评分标准

Table 1　Sensory scoring criteria for *C. nitidissima*

感官指标	评判标准	评分
外形	花色金黄，花朵完整，无异味，花瓣不掉落	70~100
	花色黄色，花朵较完整，有轻微异味，花瓣较少掉落	40~69
	花色黄褐色，花朵不完整，异味明显，花瓣易掉落	1~39
汤色	浅黄色，清澈通透	70~100
	浅黄色，稍有浑浊，欠透亮	40~69
	浅黄褐色，浑浊，暗淡	1~39
滋味	醇和，宜人，有回甘，无异味	70~100
	味道淡薄，略有苦涩，无异味	40~69
	苦涩，口感差，有异味	1~39
香味	淡雅清香，沁人心脾，持久，无异味	70~100
	香味淡薄，几乎无芳香味，不持久	40~69
	香味复杂，刺鼻，异味明显	1~39

1.2.3　内含成分检测方法

1.2.3.1　水浸出物测定　参照 GB/T 8305-2013 测定供试金花茶样品的水浸出物。

1.2.3.2　可溶性糖含量测定　测定方法参照国家检测标准(GB/T 5009.8-2016)，采用高效液相色谱法测定。色谱条件：流动相为乙腈∶水=70∶30(v/v))，流速：1.0 mL/min，柱温：35 ℃，示差折光检测器：温度 35 ℃，进样量：20 μL，色谱柱：Inertsil ODS-SP (250 mm×4.6 mm，5 μm)。

1.2.3.3　游离氨基酸含量测定　测定方法参照国家检测标准(GB/T 30987-2020)，用 0.02 mol/L HCl 反复超声波提取茶花干样，离心，过滤，得到提取液。提取液经过 9% 磺基水杨酸沉淀蛋白质后，采用高速氨基酸分析仪分析游离氨基酸的含量。氨基酸的分析条件为：色谱柱为 NQ 2619(26 mm×150 mm)，柱温 53 ℃，洗脱液 pH 分别为 2.3、3.3、4.3、4.9 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液，流速 0.225 mL/min。氨基酸的检测采用茚三酮柱后衍生方法进行检测，检测波长 570 nm。

1.2.3.4　儿茶素检测　儿茶素含量测定参考国家检测标准(GB/T8313-2013)，将浸提所得供试液过 0.45 μm 滤膜，用于 HPLC 分析。分析条件如下：Agilent TC-C1s(2)分析柱(4.6 mm×250 mm，5 μm)，柱温 30 ℃，检测波长 280 nm，流速 1.0 mL/min；流动相 A 为 0.5% 冰醋酸+3% 乙腈+96.5% 超纯水，流动相 B 为 0.5% 冰醋酸+30% 乙腈+69.5% 超纯水；洗脱梯度：前 35 min 内 B 相由 30% 线性增加至 85%，接着以 30%B 保持 5 min，进样量 10 μL。

1.2.3.5　黄酮类检测　测定方法采用李轲等[15]的高效液相色谱法略作改动，精密称取 0.5 g 粉碎后的金花茶花至 50 mL 烧瓶中，加入 10 mL 的 70% 乙醇溶液，超声提取 30 min 后，8000 r/min 离心 10 min，倾出上清液于 25 mL 容量瓶，重复操作 1 次；用 70% 乙醇溶液定容至 25 mL，过 0.45 μm 有机膜，供液相色谱测定。色谱柱为 Inertsil ODS-SP(250 mm×4.6 mm，5 μm)。流速 0.3 mL·min^{-1}，进样量为 20 μL。流动相：0.1% 甲酸水溶液(A)和乙腈(B)。洗脱程序：0~1.5 min，5%B；1.5~11 min，5%~40%B；11~14 min，40%~95%B；14~16.5 min，95%B；16.5~16.8 min，95%~5%B；16.8~20 min，5%B。温度为 40 ℃。标品包括：芦丁、杨梅素、槲皮素、木犀草素、山柰酚和花旗松素。

1.2.3.6　矿质元素含量测定　测定方法参照行业标准(LY/T 1270-1999)，采用湿灰化法测定 Ca、Zn、Mn、Cu、Fe、Mg 含量，试样加硝酸与高氯酸混合酸(1∶4)10 mL，放置数小时或过夜，随后消煮至大量冒白烟为止。取下冷却后定容至 50 mL，摇匀后过滤，滤液待测，同时进行空白测定。

1.3　数据处理

所有样品均 3 次重复，实验结果均以平均值±标准偏差(mean±S.D.)表示。采用 SPSS 20.0 软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA)、显著性检验(Duncan 新复极差法)，采用 Excel 2010 软件进行数据统计、图表制作。

2　结果与分析

2.1　不同加工工艺下金花茶花茶的外观评价

通过试验得出干燥剂干燥金花茶花需要 3 d 左右，干燥后的花朵颜色金黄且花型饱满(图 1A)；晒干金花茶花所需时间最长，需 5~7 d，并且受天气制约严重，晒干后的花朵外观明显变黑且花瓣萎缩严重(图 1E)；烘干的金花茶花于 35 ℃ 烘干，花朵颜色及外形状况好但所需时间过长，需 44 h 左右，而 80 ℃ 烘干所需时间短，仅 8 h 左右，但花整体颜色变褐且具有明显焦糊味，于 65 ℃ 烘干相较于 50 ℃ 所需时间较短，但烘干后花朵品相较差，故只使用烘干工艺的干燥金花茶花无法同时保证时间短以及品相较好(表 2)；通过在烘干花朵前采用蒸汽杀青或萎凋的方式可以减少干燥时间，使用萎凋+烘干(50 ℃)的工艺干燥花朵仅需 18~22 h，使用蒸汽杀青+烘干(50 ℃)的工艺干燥花朵仅需 12~16 h，这两种方法所需时间大大缩短且花朵品相良好(图 1B、D)。

表 2　不同烘干温度下的金花茶花茶外观评价

Table 2　Evaluation of appearance of *C. nitidissima* under different temperatures

烘干温度(℃)	花瓣	花蕊	萼片	评价	时间(h)
35	根部1/4黄褐色，其余黄色	黄色	青绿色	品相较好	44
50	根部1/3黄褐色，其余深黄色	黄褐色	青绿色	品相较好	30
65	根部1/3褐色，其余深黄色	黄褐色	绿色	品相较差	18
80	整花为黄褐色	褐色	深绿色	品相差	8

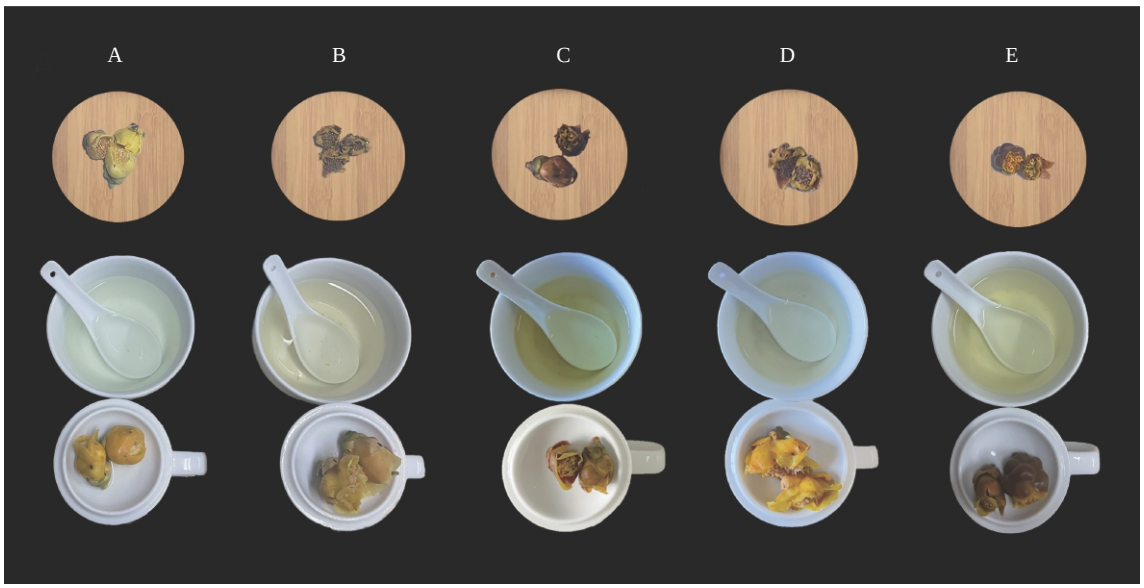


图 1 不同加工工艺下金花茶花茶冲泡前后对比

Fig.1 Before and after brewing of *C. nitidissima* with different processing technologies

注: A、B、C、D、E 五列分别为干燥剂干燥、蒸汽杀青+烘干、烘干、萎凋+烘干、晒干的冲泡前后对比。

2.2 感官评价结果分析

五种加工工艺下金花茶的外形、汤色、口感和香味均存在一定的差异, 尤其是萎凋+烘干和烘干差异显著(P<0.05)。萎凋+烘干的感官评分总分最高, 达 87.68 分(表 3), 能够保持金花茶的色泽和花香, 冲泡后汤色金黄(图 1D)、香味持久、口感宜人。蒸汽杀青+烘干的金花茶感官评分较好, 总分为 85.53 分, 冲泡后汤色明亮(图 1B)、口感柔和、香气浓郁。晒干的金花茶花色不鲜亮, 花瓣松散且耗时较长, 冲泡后汤色(图 1E)、口感及香味适中, 总分 84.42 分, 位居五种加工工艺的第四位。干燥剂干燥法成本较高, 且冲泡后口感粗浓、略有刺鼻味, 但由于花朵保持良好、冲泡后汤色清澈(图 1A), 感官评分总分达 85.73 分。烘干金花茶感官评分最低, 仅 80.78 分, 严重影响金花茶的颜色、形状和花香等品质, 冲泡后汤色深暗(图 1C), 喝起来有焦苦味。

金花茶花茶感官品质综合评分的高低顺序为萎凋+烘干>干燥剂干燥>蒸汽杀青+烘干>晒干>烘干。这可能是因为萎凋使花朵中所含酶的活性增强, 内含成分发生适度物理、化学变化, 减少花朵中的青涩味; 且萎凋过程中自然蒸发部分水分, 增强其韧性, 保持了茶花的完整性; 而工艺中的烘干技术, 则最大限度保持加工前的色泽与香气。加工后所得产品外形完整、色泽黄、香气浓郁、成茶滋味醇而不苦涩。这也与茶树花茶[16]、祁门红茶[17] 中的研究结果一致, 表明萎凋在花茶加工工艺中具有重要作用。

2.3 水浸出物含量分析

在五种加工工艺下, '红河 1 号'金花茶茶花干样品水浸出物含量从高到低的顺序依次为萎凋+烘干、干燥剂干燥、烘干、蒸汽杀青+烘干、晒干。其中, 萎凋+烘干的加工工艺中的水浸出物含量高达 43.01%, 且与其他加工工艺呈显著差异(P<0.05), 而晒干中的水浸出物含量仅为 35.60%(图 2)。烘干与干燥剂干燥水浸出物含量无显著差异(P>0.05)。萎凋+烘干工艺在水浸出物含量上表现最佳, 内含物质更为丰富。

2.4 可溶性糖含量分析

在五种加工工艺下, 烘干、干燥剂干燥、萎凋+烘干的可溶性糖含量无显著差异(P>0.05), 但这三种加工工艺下可溶性糖含量显著高于蒸汽杀青+烘干和晒干(P<0.05), 且萎凋+烘干的可溶性糖含量最高, 达 6.26%, 干燥剂干燥和烘干的可溶性糖含量也较高, 分别为 6.19%、6.14%, 而晒干的加工工艺可溶性糖含量最低, 仅为 3.79%(图 3)。萎凋+烘干工艺在可

表 3 不同加工工艺下金花茶花茶的感官评分

Table 3 Sensory score of *C. nitidissima* under different processing technologies

加工工艺	外形(20%)	汤色(25%)	滋味(30%)	香味(25%)	总分
萎凋+烘干	83.63±2.39^{ab}	88.00±1.93^{b}	90.88±1.55^{a}	86.75±1.83^{a}	87.68±0.99^{a}
蒸汽杀青+烘干	82.63±1.85^{bc}	86.13±2.53^{c}	87.00±2.33^{ab}	85.50±2.00^{ab}	85.53±0.97^{b}
晒干	80.25±1.28^{c}	89.75±3.20^{a}	83.63±1.19^{c}	83.38±3.58^{b}	84.42±1.72^{b}
干燥剂干燥	91.75±1.75^{a}	82.13±2.03^{cd}	85.13±2.10^{bc}	85.25±1.39^{ab}	85.73±1.28^{b}
烘干	79.25±2.19^{d}	79.13±1.55^{d}	82.38±2.88^{d}	81.75±2.05^{c}	80.78±8.60^{c}

注: 同列不同字母表示差异显著(P<0.05)。

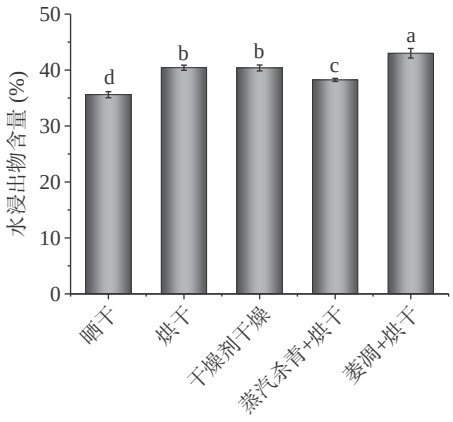


图 2　不同加工工艺下金花茶花茶中水浸出物含量

Fig.2　Content of water extract in *C. nitidissima* under different processing technologies

注：图中不同字母表示差异显著（P<0.05）；图 3~图 7 同。

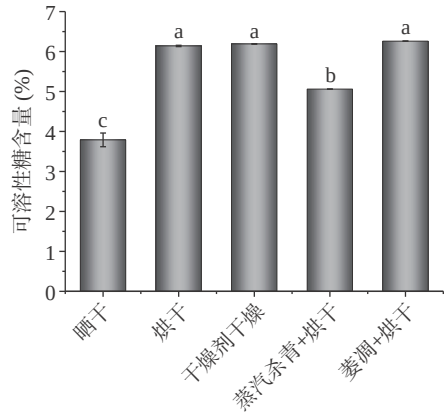


图 3　不同加工工艺下金花茶花茶中可溶性糖含量

Fig.3　Content of soluble sugar in *C. nitidissima* under different processing technologies

溶性糖含量上表现最佳，提高了花茶品质的稳定性。

2.5　游离氨基酸含量分析

五种加工工艺制成的金花茶茶花干样品游离氨基酸总量各不相同，烘干、蒸汽杀青+烘干、萎凋+烘干与晒干和干燥剂干燥存在显著性差异（P<0.05）。其中，萎凋+烘干的游离氨基酸总量最高，达 2.76%，烘干和蒸汽杀青+烘干的游离氨基酸含量分别为 2.67%、2.58%，而晒干和干燥剂干燥的游离氨基酸总量最低，仅为 1.46%、1.49%（图 4）。萎凋+烘干工艺在游离氨基酸含量上表现最佳，具有更高的营养价值。

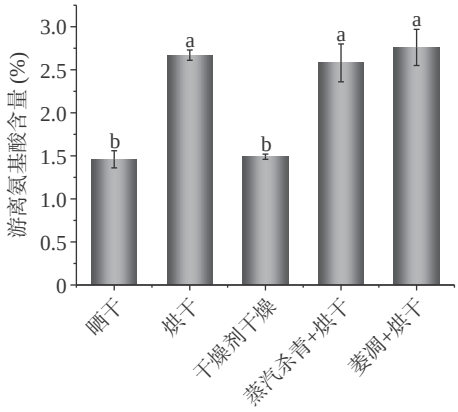


图 4　不同加工工艺下金花茶花茶中游离氨基酸含量

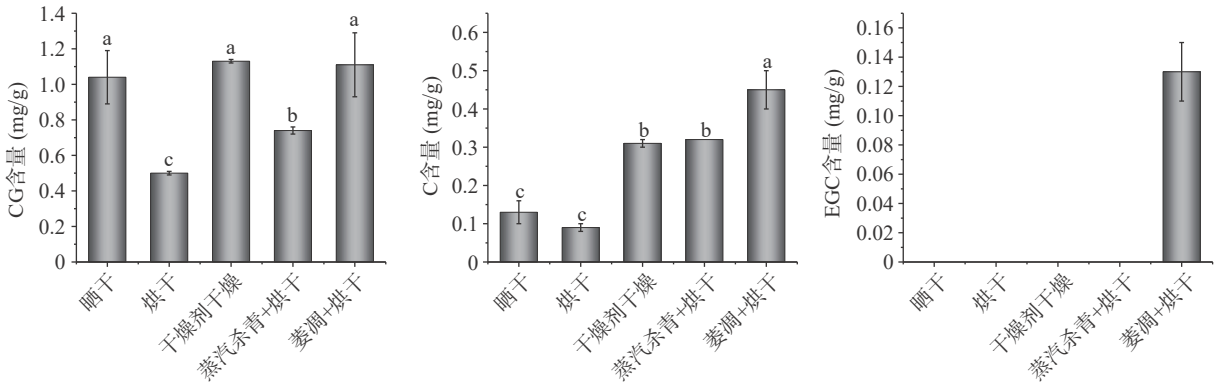
Fig.4　Content of free amino acid in *C. nitidissima* under different processing technologies

2.6　儿茶素含量分析

不同加工工艺下各组分含量均存在显著性差异（图 5），且 EGC 仅在萎凋+烘干的加工工艺下检测到。C、EGC、GCG、ECG、EC、EGCG 含量均是萎凋+烘干最高，含量分别为 0.45、0.13、0.53、0.61、1.48、0.40 mg/g，且与其他加工工艺含量存在显著性差异（P<0.05），萎凋+烘干中 CG 含量也较高，为 1.11 mg/g。GC 含量最高的为烘干，达 2.40 mg/g；烘干的加工工艺下 CG、C、GCG、ECG、EC 含量均为最低，仅为 0.50、0.09、0.06、0.25、0.76 mg/g。儿茶素总量最高的加工工艺是萎凋+烘干，达 5.07 mg/g。最低是的是晒干，仅为 2.62 mg/g。

2.7　黄酮类化合物含量分析

不同加工工艺下槲皮素、木犀草素、山柰酚含量均较少；花旗松素、芦丁和杨梅素含量均存在显著性差异（P<0.05）（图 6）。其中花旗松素是烘干的加工工艺含量最高，达 0.96 mg/g，萎凋+烘干的含量次之，为 0.90 mg/g，晒干的含量最少，仅 0.14 mg/g。芦丁含量最高的加工工艺为干燥剂干燥，达 1.67 mg/g，含量最低的为烘干，仅 0.97 mg/g。杨梅素含量最高的加工工艺为萎凋+烘干，为 0.46 mg/g，含量最低的为干燥剂干燥，仅 0.13 mg/g。黄酮类化合物总量最高的加工方式是萎凋+烘干，为 2.47 mg/g，最低的是晒干，为 1.67 mg/g。



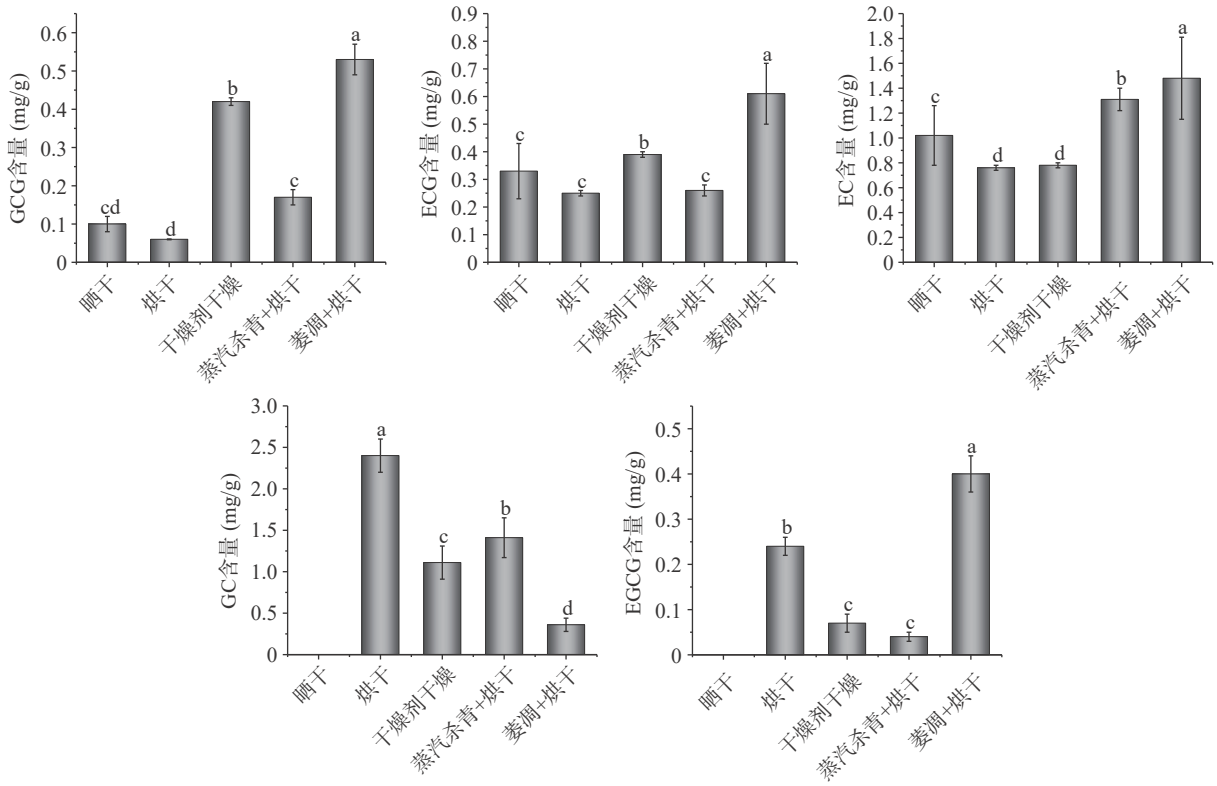


图 5 不同加工工艺下金花茶花茶中儿茶素含量

Fig.5 Catechin content in *C. nitidissima* under different processing technologies

注: CG、C、EGC、GCG、ECG、EC、GC、EGCG 分别为儿茶素没食子酸酯、儿茶素、表没食子儿茶素、没食子儿茶素没食子酸酯、表儿茶素没食子酸酯、表儿茶素、没食子儿茶素、表没食子儿茶素没食子酸酯。

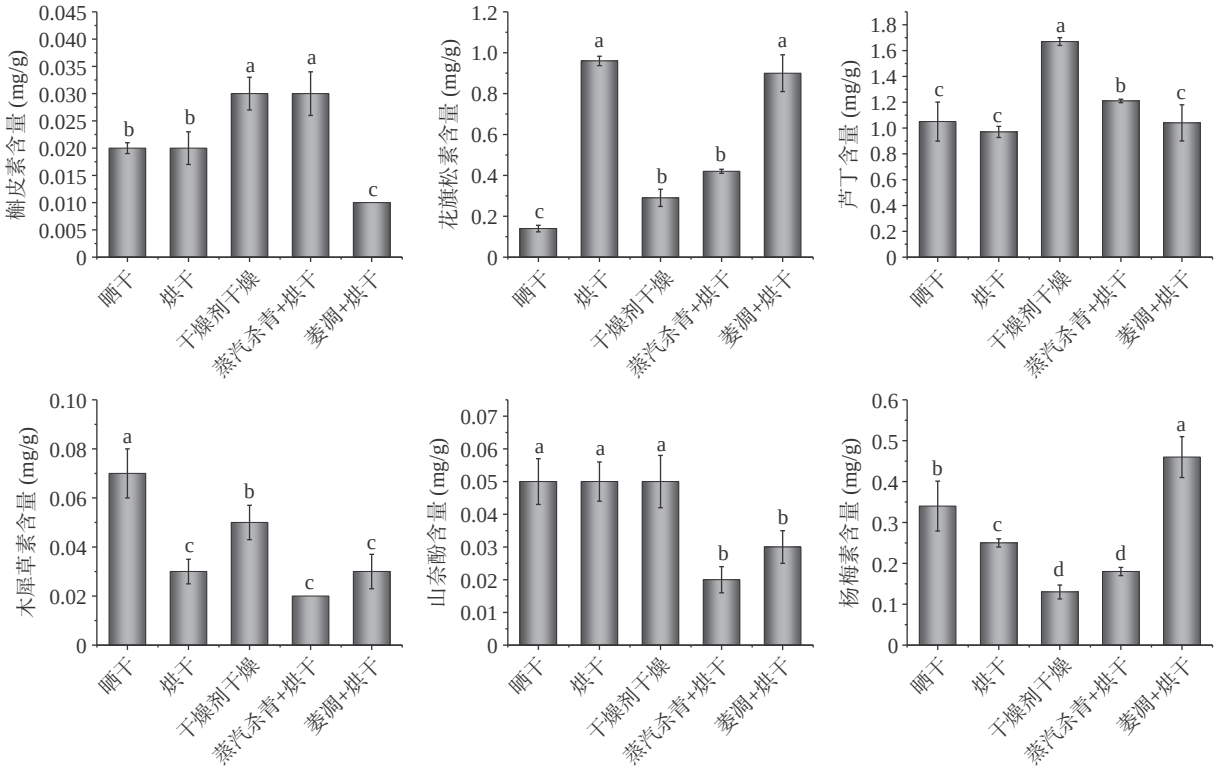


图 6 不同加工工艺下金花茶花茶中黄酮类化合物含量

Fig.6 Flavonoid content in *C. nitidissima* under different processing technologies

2.8 矿质元素含量分析

不同加工工艺中的矿质元素含量也不同, 皆呈显著性差异(P<0.05)(图 7)。除 Zn 含量, Ca、Mg、Mn、Cu、Fe 含量最高的是萎凋+烘干的加工工艺, 且与其他加工工艺呈显著性差异(P<0.05), 含量分别为 2803.00、2250.00、74.60、7.43、133.30 mg/kg。

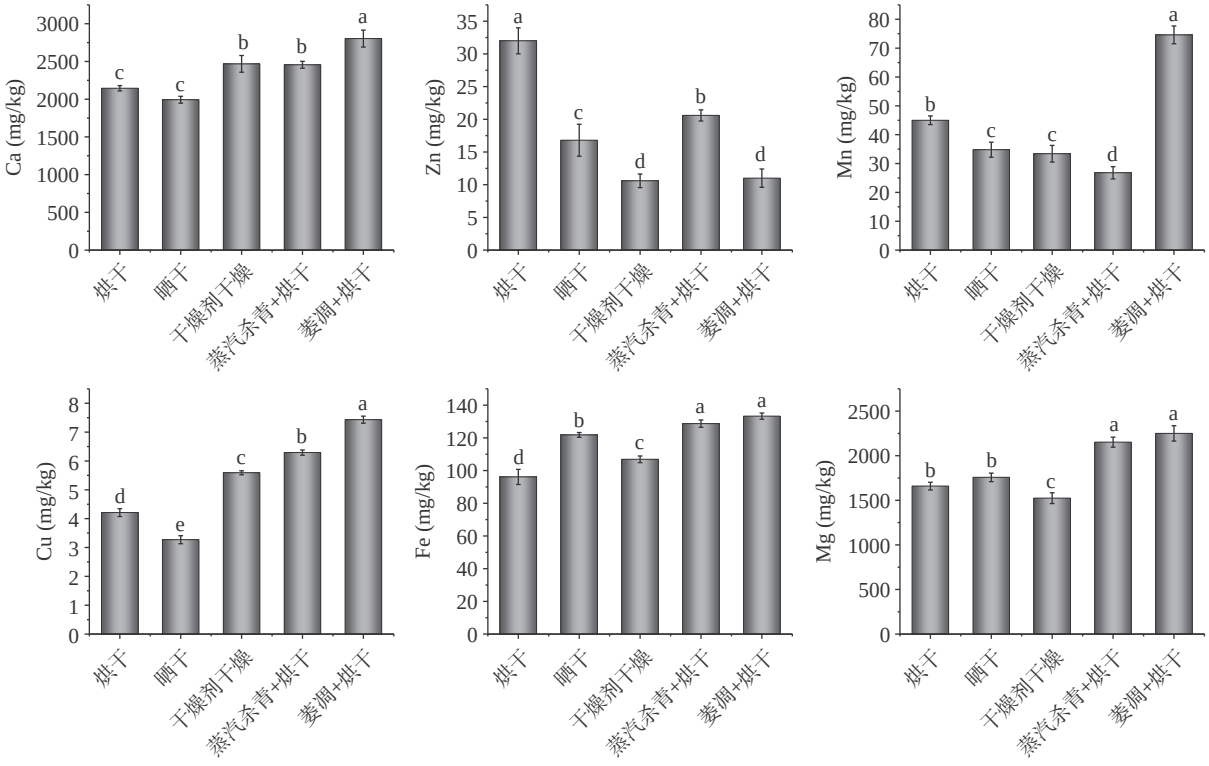


图 7　不同加工工艺下金花茶花茶中矿质元素含量

Fig.7　Mineral element content in *C. nitidissima* under different processing technologies

Ca、Cu 含量最低的是晒干，仅 1993.00、3.27 mg/kg。Mg 含量最低的是干燥剂干燥，为 1524.00 mg/kg。Mn 含量最低的是蒸汽杀青+烘干，仅为 26.80 mg/kg。Fe 含量最低的是烘干，仅 96.10 mg/kg。Zn 含量最高的加工工艺是烘干，达 32.00 mg/kg，最低的是干燥剂干燥，含量仅 10.60 mg/kg。

3　讨论与结论

感官品质、内含成分、加工效率都是衡量金花茶花茶加工工艺优劣的重要指标，也是确定加工工艺是否能在生产实践中应用的前提。本试验采用萎凋+烘干、蒸汽杀青+烘干、干燥剂干燥、晒干以及烘干五种不同的加工方式对金花茶花朵进行处理，综合各项指标，以萎凋+烘干的加工工艺最佳。从金花茶花茶感官品质方面，综合评分的高低顺序为萎凋+烘干>干燥剂干燥>蒸汽杀青+烘干>晒干>烘干。花茶加工过程中的萎凋和烘干对其品质的影响至关重要。萎凋使花朵中的酶活性增强，从而引发内部物理和化学变化，这些变化使得花朵青涩味减轻，提升口感和品质。同时，萎凋过程中水分自然蒸发，增强花瓣韧性，有利于保持完整性[18]。通过烘干，可最大限度保留花朵干燥前色泽与香气。在烘干过程中，花朵水分逐渐减少，内部物质发生变化，使色泽更为金黄，香气更加浓郁。经过萎凋和烘干处理，花茶品质显著提升。

从金花茶茶花内含成分方面来看，萎凋+烘干的加工工艺花朵在水浸出物、可溶性糖和游离氨基酸的含量均为最高。在儿茶素、黄酮类化合物含量方面，萎凋+烘干的加工工艺高于其他四种加工工艺，儿茶素是构成茶多酚的重要成分，金花茶中茶多酚具有很好的抗氧化功能，儿茶素含量与金花茶的抗氧化活性关系尤为密切，是金花茶抗氧化功能的物质基础[19]。黄酮类化合物也具有抗氧化、降血糖、抗癌等功效，对人体有益[20]。本试验结果表明，萎凋+烘干的加工工艺有利于保留金花茶中儿茶素及黄酮类化合物等活性物质。这与洪艳等[21]的研究认为萎凋更有利于保留其茶多酚及黄酮类化合物的结果是一致的。

从金花茶茶花不同加工工艺的优缺点看，萎凋+烘干也是五种加工工艺中的最佳选择。烘干和晒干个别内含成分含量较高，但烘干会导致挥发性香气的流失，晒干所需时间较长且受天气限制，过程中可能会有灰尘及异物，使二者的感官品质下降[22]。干燥剂干燥在外形保持以及内含成分含量方面较好，但在滋味口感方面表现较差。蒸汽杀青+烘干在内含成分含量方面较好，且蒸汽杀青耗时短，但蒸汽杀青后含水量较高，直接影响了花朵颜色。萎凋在茶叶制作过程中起着重要的作用，萎凋过程中发生的一系列生化反应，严重影响着茶叶中氨基酸和香气挥发物的含量，影响茶叶风味的形成，适度的萎凋可以使大部分挥发性物质的相对含量达到峰值[23]。而烘干这一干燥方式对香气的形成也有着促进作用，烘干过程中的热物理化学作用，如美拉德(Maillard)反应和史崔克(Strecker)降解，产生一些 N、O 杂环化合物，使茶叶具有烘炒香，热物理化学作用又使萜烯类发生一系列分子内重排及环化反应，产生多种类高含量的萜烯类芳香物质[24]。萎凋+烘干的加工工艺可以使金花

茶花朵中的芳香类物质及其他挥发性物质相对含量增加从而提升感官品质。

在金花茶茶花加工优化改进领域，萎凋+烘干的加工工艺仍存在可提升的空间。金花茶花在萎凋+烘干加工过程中，其褐变相对较为严重，可通过使用化学或生物护色方法进行优化。化学方法主要为应用 PPO 抑制剂，如半胱氨酸和蛋白质[25]，以及不含硫护色剂，如柠檬酸、抗坏血酸、草酸等[26]，这些护色剂能够抑制酶的褐变且对人体无毒害，目前在食品加工中的应用已越来越广泛。生物护色方法采用具有护色作用的植物提取液作为天然护色剂，如壳聚糖、蜂胶、橙皮甙等[27]，一些蔬菜汁和精油也能抑制褐变[28−29]。护色剂的应用能有效改善加工后金花茶花的色泽，不仅提升其外观品质，同时增加内含成分的含量[26,30]。可通过筛选和复配不同类型的护色剂[31]，探寻最适合金花茶花的护色方案。同时，还需深入研究护色剂的使用浓度、处理时间和温度等条件，确保护色效果的同时，不影响金花茶花茶的口感和营养成分。通过护色工艺的应用，进一步优化萎凋+烘干的加工工艺，提升金花茶花茶的品质。

综上所述，萎凋+烘干的加工工艺操作简便、成本较低，通过该工艺获得的金花茶花茶产品外观品质较高，感官评价方面表现优异，且内含成分含量最高。因此可广泛应用于金花茶花茶的生产。本研究为后续金花茶花茶产品的生产提供了科学依据。

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

参考文献

[1] 王东旭. 花茶健康功能作用研究进展[J]. 中国茶叶加工, 2022(1): 58−61. [WANG D X. Research progress on health effects of scented tea[J]. China Tea Processing, 2022(1): 58−61.]

[2] 刘青, 李月, 杨润梅, 等. 金花茶组植物资源现状与现代研究进展[J]. 中国现代中药, 2021, 23(4): 727−733. [LIU Q, LI Y, YANG R M, et al. Yellow *Camellia*: Resource status and research progress in modern studies[J]. Modern Chinese Medicine, 2021, 23(4): 727−733.]

[3] WANG Z N, SUN B, YANG R, et al. Flavonoids and other phenolics from *Camellia nitidissima* Chi flowers[J]. Natural Product Research, 2023, 37(2): 180−187.

[4] LIN J N, LIN H Y, YANG N S, et al. Chemical constituents and anticancer activity of yellow *Camellias* against MDA-MB-231 human breast cancer cells[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(40): 9638−9644.

[5] YANG R, WANG W X, CHEN H J. The inhibition of advanced glycation end-products by five fractions and three main flavonoids from *Camellia nitidissima* Chi flowers[J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2018, 26(1): 252−259.

[6] CHENG C J, HOU X T, HAO E W, et al. Integrated molecular network and HPLC-UV-FLD analysis to explore antioxidant ingredients in *Camellia nitidissima* Chi[J]. Journal of Food Science, 2021, 86(4): 1296−1305.

[7] YANG R, GUAN Y, WANG W X, et al. Antioxidant capacity of phenolics in *Camellia nitidissima* Chi flowers and their identification by HPLC Triple TOF MS/MS[J]. PLoS One, 2018, 13(4): e0195508.

[8] DAI L, LI J L, LIANG X Q, et al. Flowers of *Camellia nitidissima* cause growth inhibition, cell-cycle dysregulation and apoptosis in a human esophageal squamous cell carcinoma cell line[J]. Molecular Medicine Reports, 2016, 14(2): 1117−1122.

[9] 宁恩创, 秦小明, 杨宏. 金花茶叶水提物的降脂功能试验研究[J]. 广西大学学报: 自然科学版, 2004(4): 350−352. [NING E C, QIN X M, YANG H. The experimental study on regulating serum lipid of water soluble extractive from the leave of *Camellia chrysantha* (Hu) Tuyama[J]. Journal of Guangxi University (Natural Science Edition), 2004(4): 350−352.]

[10] HE D Y, ZHANG P, SAI X, et al. Hypolipidemic activity of *Camellia euphlebia* flower extract in high-fat-fed mice[J]. Plant Foods for Human Nutrition, 2017, 72(4): 372−379.

[11] HE D Y, LI X Y, SAI X et al. *Camellia nitidissima* CW Chi: A review of botany, chemistry, and pharmacology[J]. Phytochemistry Reviews, 2018, 17(2): 327−349.

[12] 董娟娥, 付卓锐, 马希汉, 等. 不同干燥方法对杜仲雄花茶品质的影响[J]. 农业机械学报, 2011, 42(8): 131−137. [DONG J E, FU Z R, MA X H, et al. Effects of different drying methods on quality of *Eucommia ulmoides* male flower tea[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2011, 42(8): 131−137.]

[13] 余莲. 高品质茉莉花茶的加工工艺技术[J]. 中国茶叶, 2017, 39(3): 28−29. [YU L. High quality *Jasmine* tea processing technology[J]. China Tea, 2017, 39(3): 28−29.]

[14] 黄燕芬, 魏成熙, 何嵩涛, 等. 加工工艺对茶树花主要生化成分和感观品质的影响[J]. 西南农业学报, 2013, 26(2): 510−513. [HUANG Y F, WEI C X, HE S T, et al. Effects of processing technic on main biochemical components and sensory quality of tea tree flowers[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2013, 26(2): 510−513.]

[15] 李轲, 田玉洁, 田雨晴, 等. 高效液相色谱法测定黄芩中 12 种黄酮类成分的含量[J]. 中国农学通报, 2023, 39(33): 140−146. [LI K, TIAN Y J, TIAN Y Q, et al. Determination of twelve flavonoid components in *Scutellaria baicalensis* by HPLC[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2023, 39(33): 140−146.]

[16] 石兴云, 刘伊琦, 念波, 等. 云南茶树花茶加工工艺与化学成分研究[J]. 保鲜与加工, 2019, 19(3): 70−77. [SHI X Y, LIU Y Q, NIAN B, et al. Study on processing technology and chemical compounds of flower tea of *Camellia sinensis* in Yunnan[J]. Storage and Process, 2019, 19(3): 70−77.]

[17] 丁勇, 徐奕鼎, 王烨军, 等. 祁门红茶初制中萎凋与初烘工艺研究[J]. 中国农学通报, 2010, 26(9): 110−114. [DING Y, XU Y D, WANG H J, et al. Study on withering and first drying technology at primary processing of keemun black tea[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2010, 26(9): 110−114.]

[18] 钟兴刚, 黄怀生, 黎娜, 等. 汝城白毛茶白茶加工工艺研究[J]. 江西农业学报, 2020, 32(6): 76−80. [ZHONG X G, HUANG H S, LI N, et al. Study on processing technology of Rucheng Baimaocha white tea[J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2020, 32(6): 76−80.]

[19] 宁恩创, 韦璐, 秦小明, 等. 金花茶多酚的抗氧化活性研究[J]. 食品科技, 2010, 35(8): 108−111. [NING E C, WEI L, QIN X M, et al. Study on the antioixidation activity of polyphenols from

Camellia chrysantha（Hu）[J]. Food Science and Technology, 2010, 35(8): 108−111.]
[20] 张佩霞, 于波, 邹春萍, 等. 金花茶黄酮类化合物的生物学功能及提取分离测定方法研究进展[J]. 广东农业科学, 2019, 46(1): 13−20. [ZHANG P X, YU B, ZOU C P, et al. Research progress in biological functions and methods of extraction, seperation, determination of flavonoids from *Camellia nitidissima*[J]. Guangdong Agricultural Science, 2019, 46(1): 13−20.]
[21] 洪艳, 吴阳, 王晓闻. 萎凋及杀青对酸浆叶茶活性成分的影响[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2014, 34(3): 266−268. [HONG Y, WU Y, WANG X W. Effects of withering and fixing on the active components in the *Physalis* leaf tea[J]. Journal of Shanxi Agricultural University(Natural Science Edition), 2014, 34(3): 266−268.]
[22] 桂青, 王秀全, 黄坚雄, 等. 不同干燥方式对五指毛桃品质的影响[J]. 食品工业科技, 2023, 44(6): 58−65. [GUI Q, WANG X Q, HUANG J X, et al. Effect of different drying processes on the quality of *Ficus hirta* Vahl[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(6): 58−65.]
[23] QIAO D H, ZHU J Y, MI X Z, et al. Effects of withering time of fresh leaves on the formation of flavor quality of Taiping Houkui tea[J]. LWT - Food Science and Technology, 2023, 182(8): 114833.
[24] HE J H, WU X H, ZHOU Y, et al. Effects of different preheat treatments on volatile compounds of *Camellia*（*Camellia oleifera* Abel.）seed oil and formation mechanism of key aroma compounds[J]. Journal of Food Biochemistry, 2021, 45(3): e13649.
[25] HAMDAN N, LEE C H, WONG S L, et al. Prevention of enzymatic brow ning by natural extracts and genome editing: A review on recent progress[J]. Molecules, 2022, 27(3): 1101.
[26] 赵时珊, 施建斌, 隋勇, 等. 不同护色处理和干燥方式对芦笋粉品质的影响[J]. 食品工业科技, 2023, 44(11): 54−64. [ZHAO S S, SHI J B, SUI Y, et al. Effects on different color protection and drying methods treatment on the quality of asparagus powder[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(11): 54−64.]
[27] 杜传来, 王佳红, 郁志芳. 天然果蔬保鲜剂的研究与应用[J]. 食品工业科技, 2004(5): 135−138. [DU C L, WANG J H, YU Z F, et al. Research and application of natural fruit and vegetable preservative[J]. Science and Technology of Food Industry, 2004(5): 135−138.]
[28] LOZANO-DE-GONZALEZ P G, BARRETT D M, WROLSTAD R E, et al. Enzymatic browning inhibited in fresh and dried paale rings by pineapple juice[J]. Journal of Food Science, 1993(58): 399−404.
[29] PONCE A G, DEL VALLE C E, ROUR S I, et al. Natural essential oile as reducing ends of peroxidase activity in leafy vegetables[J]. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie, 2004(37): 199−204.
[30] 戴亚峰, 王东慧, 卿鹏程, 等. 霍山石斛花的热风干燥特性、品质及其护色应用研究[J]. 食品与发酵工业, 2021, 45(3): 193−197. [DAI Y F, WANG D H, QING P C, et al. Study on the characteristics, quality and color protection application of *Dendrobium huoshanense* flower during hot-air drying processes[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 45(3): 193−197.]
[31] 刘畅. 金花茶花护色工艺优化及其贮藏稳定性研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2020. [LIU C. The optimization of color protection process and storage stability of *Camellia nitidissima* flowers[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2020.]

邵家起, 邓乾春, 李康昱, 等. 双蛋白天然共生颗粒 Pickering 纳米乳液的稳定性分析 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 74−84. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110249

SHAO Jiaqi, DENG Qianchun, LI Kangyu, et al. Stability Analysis of Pickering Nanoemulsion Covered by Dual-protein Natural Symbiotic Particles[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 74−84. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110249

· 研究与探讨 ·

双蛋白天然共生颗粒 Pickering 纳米乳液的稳定性分析

邵家起[1,2], 邓乾春[1,2], 李康昱[2], 肖军霞[1], 向　霞[2], 郑　畅[2], 彭登峰[2,*]

（1.青岛农业大学食品科学与工程学院, 山东青岛 266109;
2.中国农业科学院油料作物研究所, 农业农村部油料加工重点实验室, 油料脂质化学与营养湖北省重点实验室, 湖北武汉 430062）

摘　要: 利用双蛋白天然共生颗粒制备 Pickering 纳米乳液并对其物化稳定性进行分析，以此拓宽其在食品领域中的应用潜力。本研究采用碱提取-等电点沉淀法（Alkali extraction-isoelectric point precipitation，AE）和盐提取-透析法（Salt extraction-dialysis，SE）从大豆-亚麻籽混合粕中富集大豆蛋白（Soy protein）和亚麻籽蛋白（Flaxseed protein），制备双蛋白天然共生颗粒（Natural particles，SFNPs）。首先，利用外观观察、原子力显微镜（Atomic force microscopy，AFM）、圆二色谱和拉曼光谱对两种双蛋白共生颗粒进行表征；其次，将其作为颗粒稳定剂制备 Pickering 纳米乳液，并对其物理和化学稳定性进行表征。结果表明 AE-SFNPs 的尺度更为均一，且具有良好的分散性。与 SE-SFNPs 相比，AE-SFNPs 的二级结构中 β-折叠占比更高，达 51.25%，具有更加致密有序和良好柔性的结构特性。2 种双蛋白天然共生颗粒均可制备出 Pickering 纳米乳液。在 28 d 的贮藏期间，AE-SFNPs 稳定乳液的粒径仅增加了约 14 nm，电位基本稳定在-34 mV 左右，而 SE-SFNPs 稳定乳液的粒径增加了约 12 倍，电位降低了 1.32 倍。贮藏至第 28 d 时，AE-SFNPs 的稳定性指数（Turbiscan stability index，TSI，5.83），远小于 SE-SFNPs 的 TSI 值（55.13）。尤其是，AE-SFNPs 制备的 Pickering 纳米乳液表现出了比酪蛋白酸钠（食品领域加工常用乳化剂）制备的纳米乳液更佳的物理稳定性和化学稳定性。因此，AE-SFNPs 可作为一种天然高效植物蛋白基颗粒稳定剂制备 Pickering 纳米乳液，为丰富纳米乳液的工业化应用提供了新的解决策略。

关键词: 植物基双蛋白, 共生提取, 天然颗粒, 界面重构, Pickering 纳米乳液

中图分类号: TS201.1　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2024)21−0074−11

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110249

本文网刊:

Stability Analysis of Pickering Nanoemulsion Covered by Dual-protein Natural Symbiotic Particles

SHAO Jiaqi[1,2], DENG Qianchun[1,2], LI Kangyu[2], XIAO Junxia[1], XIANG Xia[2], ZHENG Chang[2], PENG Dengfeng[2,*]

（1.College of Food Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China;
2.Key Laboratory of Oilseeds Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Hubei Engineering Research Center of Oils and Plant Proteins, Oil Crops Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430062, China）

Abstract: Pickering nanoemulsions were prepared using dual-protein natural symbiotic particles and their physicochemical stability was analyzed to broaden their potential application in the food industry. This study employed alkali extraction-isoelectric point precipitation (AE) and salt extraction-dialysis (SE) to enrich soy protein and flaxseed protein from

收稿日期: 2023−11−23

基金项目: 新疆自治区重大科技专项（2022A02004）; 中国农业科学院“青年英才”引进工程院级人才; “武汉黄鹤英才”产业领军创新类人才项目。

作者简介: 邵家起（1995−）, 男, 硕士, 研究方向: 油料蛋白资源利用, E-mail: jqshao0716@163.com。

*** 通信作者:** 彭登峰（1988−）, 男, 博士, 特聘研究员, 研究方向: 油料蛋白资源利用, E-mail: dfpengfood@outlook.com。

soybean-flaxseed mixed meal for fabricating dual-protein symbiotic natural particles (SFNPs). First, two dual-protein symbiotic particles were characterized using appearance observation, AFM, circular dichroism, and Raman spectroscopy. Then, Pickering nanoemulsions were prepared with them as particle stabilizers and characterized for their physical and chemical stability. Results demonstrated that AE-SFNPs had a higher uniformity of size and better dispersibility. AE-SFNPs also showed a higher proportion (as high as 51.25%) of β-sheet in its secondary structure, endowing it a more tightly ordered and flexible structure compared with SE-SFNPs. Moreover, both AE-SFNPs and SE-SFNPs could be used to generate Pickering nanoemulsion. During 28 days of storage, the particle size of the stabilized emulsion of AE-SFNPs increased only about 14 nm and its ζ-potential was stabilized at about -34 mV. In contrast, the particle size of the stabilized emulsion of SE-SFNPs increased about 12 fold, and its ζ-potential was decreased 1.32 fold. The stability index (TSI, 5.83) of the AE-SFNPs was much smaller than the TSI value (55.13) of the SE-SFNPs when stored until the 28th day. Notably, the Pickering nanoemulsion stabilized by AE-SFNPs exhibited higher physical and chemical stability than that prepared by sodium caseinate (a common emulsifier used in food processing). Therefore, AE-SFNPs can serve as a natural and efficient plant protein-based particle stabilizer to prepare Pickering nanoemulsion. This work provides a new strategy to enhance the industrial application of nanoemulsions.

Key words: plant based dual-protein; symbiotic extraction; natural particles; interfacial remodeling; Pickering nanoemulsion

纳米乳液是指一种平均液滴大小分布为 100~500 nm 范围的乳液，因其比传统乳液具备更高的稳定性、溶解性和生物利用率等优势，近年来在食品领域引起了广泛关注[1−3]。选择合适的乳化剂是形成和稳定纳米乳液的关键因素之一，目前，合成表面活性剂因其出色的乳化性能，通常被用于制备纳米乳液[4−5]。然而，考虑到合成表面活性剂潜在的安全问题以及消费者对天然成分的日益青睐，开发更绿色、更健康的食品级成分作为乳化剂来替代合成表面活性剂非常重要[6]。

大豆蛋白因其来源广泛、成本低、具备良好的两亲性等优势，常被用作天然乳化剂[7]，但由于其分子量大、柔性较差等结构问题，导致在高能乳化过程中蛋白质易发生变性和聚集，表现出较差的界面特性，进而导致大豆蛋白基纳米乳液稳定性较差[8−10]。如何利用大豆蛋白基天然乳化剂制备粒径小、分散性好、稳定性高的纳米乳液是亟待克服的难题。目前研究报道引入其他蛋白质与大豆蛋白形成复合物颗粒，可以有效调节其在油/水界面上的界面特性，进而改善大豆蛋白的乳化性能[10−12]。本团队前期实现了亚麻籽蛋白与大豆蛋白的共生富集，与单独大豆蛋白相比，共生纳米颗粒的乳化性提高了 1.36 倍以上，与酪蛋白酸钠乳化性能相当[13]，具备代替动物基蛋白在食品加工中的应用潜力，但目前有关双蛋白共生颗粒的应用场景有限，鉴于纳米乳液被越来越多的工业产品所采用，包括食品配料、药品、护理品和包装等[9]，探究共生颗粒在制备高稳定性纳米乳液的潜能具有重要意义。

Pickering 纳米乳液属于纳米乳液的范畴，其乳滴尺寸为纳米级，油-水界面由颗粒所覆盖，兼具 Pickering 乳液和纳米乳液的双重优势[14−15]，不仅具备高稳定性、低粘度和半透明性的特征优势[16]，而且大大减少了表面活性剂的使用，更符合绿色、可持续发展的理念[17]。因此，在之前的研究基础上[13]，本工作利用高压微射流对碱提取-等电点沉淀法（Alkali extraction-isoelectric point precipitation, AE）和盐提取-透析法（Salt extraction-dialysis, SE）获得的双蛋白天然颗粒（Natural particles, SFNPs）稳定的 Pickering 乳液进行处理，试图制备 Pickering 纳米乳液，并尝试对其物化稳定性和稳定机制进行初步探究。本研究有望为植物基蛋白颗粒稳定的纳米乳液在食品领域中的应用提供新的研究策略。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

大豆（品种：油 6019#）　中国农业科学院油料作物研究所；亚麻籽（品种：张亚 2#）　中国甘肃省农业科学院；亚麻籽油（食品级）　北京红井源有限公司；酪蛋白酸钠　北京沃凯生物科技有限公司；其他试剂均为分析纯。

M-110E 高压微射流纳米均质机　德国 Microfluidicsgon 公司；T25 高速剪切均质机　德国 IKA 公司；ZetaSizer Nano-ZS 纳米粒度及 Zeta 电位仪　英国马尔文仪器公司；Thermo Fischer DXR 拉曼光谱仪、FEI Talos F200C 低温冷冻透射电镜　美国赛默飞世尔科技公司；J-1500 圆二色光谱仪　日本 JASCO 公司；F7000 荧光分光光度计　日本日立公司；Turbiscan Lab 多重光散射仪　法国 Formulaction 仪器公司；Bruker Dimension Icon 原子力显微镜　布鲁克（北京）科技有限公司；SU8010 低温冷冻扫描电镜　日立科学仪器（北京）有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　大豆蛋白-亚麻籽蛋白天然共生颗粒的制备

首先，通过将大豆和亚麻籽进行冷榨、粉碎和索氏抽提去残油，获得脱脂豆粕和脱脂亚麻籽粕。然后，在前期实验室工作的基础上，将脱脂豆粕和脱脂亚麻籽粕按照 8∶2（w/w）的比例进行混合，通过以下两种提

取方法获得不同样品[13]:

碱提取-等电点沉淀法: 将混合粕按 1∶10(w/v)的比例分散在超纯水中。在室温下, 适度搅拌 2 h, 并用 2 mol/L NaOH 调节 pH 维持在 9.0, 以 8000×g 的转速离心 30 min, 收集上清液。随后, 用 2 mol/L HCl 调节 pH 至 4.0 后, 在相同条件下再次离心, 收集沉淀。将收集的沉淀按照 1∶5 的比例在超纯水中复溶, 并调节 pH 至 7.0。最后, 进行冷冻干燥, 获得大豆蛋白-亚麻籽蛋白天然共生颗粒(AE-SFNPs)(蛋白含量为 78.17%, 蛋白得率为 31.90%)。

盐提取-透析法: 将混合粕按 1∶10(w/v)的比例分散在 0.3 mol/L $CaCl_2$ 溶液中。在室温下, 适度搅拌 2 h, 并用 2 mol/L NaOH 或 HCl 调节 pH 维持在 5.6, 以 8000×g 的转速离心 30 min, 收集上清液。在 4 ℃ 下用超纯水中透析 48 h(截留分子量: 3 kDa, 电导率达到~20 μs/cm)。最后, 将透析后的上清液进行冷冻干燥, 获得大豆蛋白-亚麻籽蛋白天然共生颗粒(SE-SFNPs)(蛋白含量为 83.93%, 蛋白得率为 28.70%)。上述所得组分均储存在 4 ℃ 冰箱保存备用。

1.2.2 大豆蛋白-亚麻籽蛋白天然共生颗粒的表征

1.2.2.1 外观和原子力显微镜观察 制备 1%(w/v)的样品溶液: 称取 0.1 g 样品粉末溶于 10 mL 超纯水中, 适度搅拌并调节 pH 至 7.0。首先, 数码相机对外观进行拍照; 然后, 将 5 μL 的样品(10 μg/mL)置于云母板上, 自然条件下干燥后, 通过原子力显微镜观察样品形貌(图片视野选择为 5 μm×5 μm)[18]。

1.2.2.2 圆二色谱测定 制备浓度为 0.4 mg/mL 的样品溶液: 首先, 称取 0.4 g 样品粉末溶于 100 mL 超纯水中, 适度搅拌并调节 pH 至 7.0, 获得 4 mg/mL 样品储备液; 然后, 取适量样品储备液用超纯水将其稀释至 0.4 mg/mL。在带宽 1.0 nm 和光径 100 mm 条件下利用圆二色光谱仪(CD)获取 190~240 nm 的远紫外圆二色谱。同时, 使用 CD Pro 软件分析 α-螺旋、β-折叠、β-转角和无规卷曲的含量[19]。

1.2.2.3 拉曼光谱的测定 将样品粉末直接平铺在载玻片上进行拉曼光谱测定, 激发光波长为 785 nm, 激光功率 150 mW, 扫描范围 400~2000 cm^{-1}, 扫描时间 60 s/次, 分辨率 1 cm^{-1}。以苯丙氨酸(1003±1 cm^{-1})作为归一化因子。进行了三次平行测定, 数据由 OMNIC 进行基线校正和平滑处理, 并使用 Peakfit 4.12 软件进行蛋白质酰胺 I 带的峰值拟合。数据以平均值±标准差表示。分析了酪氨酸(I_{850}/I_{830})和色氨酸(I_{760})残基微环境和二硫键(500~550 cm^{-1})构象[20]。

1.2.2.4 荧光光谱的测定 制备 0.4 mg/mL 的样品溶液: 首先, 称取 0.4 g 样品粉末溶于 100 mL 超纯水中, 适度搅拌并调节 pH 至 7.0, 获得 4 mg/mL 样品储备液; 然后, 取适量样品储备液用超纯水将其稀释至 0.4 mg/mL。使用 F7000 荧光分光光度计进行分析, 采用石英比色皿, 光程为 1 cm。激发波长为 290 nm, 发射波长为 300~400 nm。激发和发射狭缝宽度均设置为 2.5 nm, 电压为 650 V, 扫描速度为 1200 nm/min[21]。

1.2.3 Pickering 纳米乳液的制备 首先, 称取适量 1.2.1 中制备的蛋白质样品溶于超纯水, 调节 pH 至 7.0, 磁力搅拌 2 h, 制备浓度为 1%(w/v)样品溶液; 将组分溶液与亚麻籽油以 19∶1(v/v)的比例混合, 用高速剪切均质机在 15000 r/min 下分散 5 min 获得粗乳, 再用微射流在 10000 psi 下均质 4 次获得亚麻籽油 Pickering 纳米乳液。为了探究蛋白样品的应用潜力, 选用食品领域常用的酪蛋白酸钠, 将利用上述相同步骤制备的纳米乳液作为对照组。为防止在储藏实验中微生物污染引起试验数据误差, 乳液制备完成之后向乳液中添加 0.02%(w/v)叠氮化钠用来抑制微生物的生长。最后将乳液分装于 5 mL 样品瓶中并用封口膜密封, 置于室温 25 ℃ 下避光储藏 28 d, 分别于第 0、3、7、14、21 和 28 d 取样对相关指标进行测定。

1.2.4 Pickering 纳米乳液界面微观结构表征

1.2.4.1 低温冷冻透射电镜 利用低温冷冻透射电镜(Cryo-TEM)观察 Pickering 纳米乳液液滴的微观形态。将 5 μL 乳液液滴置于多孔碳涂层铜网网格上, 用滤纸轻轻吸干以除去多余的液体。然后, 将铜网迅速浸入−180 ℃ 的液态乙烷中, 形成一个理想的没有冰晶的玻璃化样品。在成像之前, 铜网储存在液氮中。将样品在−180 ℃ 阶段温度和 120~200 kV 工作电压下进行扫描[22]。

1.2.4.2 低温冷冻扫描电镜 利用低温冷冻扫描电镜(Cryo-SEM)观察 Pickering 纳米乳液液滴的界面膜结构。取 3.0 μL 乳液在液氮中冷冻, 转移到冷冻制备室中(−140 ℃)。然后将其切割成横截面, 在−60 ℃ 下升华 15 min。在 10 mA 溅射镀膜 1200 s 后, 用低温冷冻扫描电子显微镜进行观察[23]。

1.2.5 Pickering 纳米乳液界面结构形成原因探究 利用 ZetaSizer Nano-ZS 纳米粒度仪分别测定样品在经过高速剪切(制备粗乳条件: 15000 r/min, 5 min)以及微射流(制备 Pickering 纳米乳液条件: 10000 psi, 4 次)后的粒度分布情况, 以进一步探究 AE-SFNPs 和 SE-SFNPs 稳定 Pickering 纳米乳液界面结构形成的原因。

1.2.6 Pickering 纳米乳液的稳定性研究

1.2.6.1 外观形貌、粒径和 ζ-电势 以超纯水溶液为分散剂, 将 Pickering 纳米乳液以 1∶200 的比例进行稀释, 使用纳米粒度及 Zeta 电位仪测定第 0、3、7、14、21 和 28 d 乳液的电位和粒径, 并用数码相机拍摄纳米乳液室温下避光贮藏 28 d 的外观变化。

1.2.6.2 动力学稳定性测定 采用 Turbiscan Lab 多重光散射仪监测储藏过程中 Pickering 纳米乳液的动

力学稳定性。仪器采用波长为 880 nm 的脉冲近红外光源进行扫描，将装有 20 mL 乳液的专用样品瓶轻放至仪器测试槽中，设置测试温度 25 ℃，分别在第 0、3、7、14、21 和 28 d 对乳液进行一次扫描，记录稳定性指数(Turbiscan stability index, TSI)[24]。

1.2.6.3　纳米乳液储藏过程中氢过氧化物测定　采用紫外分光光度计法对乳液体系中氢过氧化物含量进行测定[25]。具体方法如下：0.3 mL 乳液与 1.5 mL 破乳剂(异辛烷∶异丙醇=3∶1)混合，涡旋振荡 10 s，重复 3 次，每次间隔 20 s 进行乳液破乳，5000×g 离心 10 min 获得油相。取 200 μmol/L 上层有机相于 10 mL 离心管中，并加入 2.8 mL 甲醇/丁醇(2∶1)混合液，紧接着加入 30 μL Fe^{2+}和 3.14 mol/L 硫氰酸铵(1∶1, v/v)混合液，振荡均匀，暗反应 20 min 后在 510 nm 波长下使用紫外分光光度计测定吸光度。

1.2.6.4　纳米乳液储藏过程中 TBARS 测定　采用紫外分光光度计对乳液体系中的丙二醛含量进行测定[26]。具体方法如下：在耐高温螺盖玻璃皂化管中加入 1 mL 乳液并与 2 mL TBA 试剂混合，振荡均匀，沸水浴 15 min，冷却至室温，5000×g 离心 15 min，在 532 nm 波长下使用紫外分光光度计测定吸光度。使用 1,1,3,3-四乙氧基丙烷配制标准溶液绘制标准曲线，单位为 mmol TEP/kg 油。

1.3　数据处理

所有试验均重复 3 次，数据以“平均值±标准误差”形式表示。利用软件 SPSS Statistics 26 的单因素方差分析法评估平均值之间的差异，$P<0.05$ 表示存在显著性差异。利用软件 Origin 2021 和软件 Visio 2021 进行图表绘制。

2　结果与分析

2.1　大豆蛋白-亚麻籽蛋白天然共生颗粒性质分析

2.1.1　外观观察和原子力显微镜(AFM)分析　图 1 显示了浓度为 1%(w/v)的 AE-SFNPs 和 SE-SFNPs 在 pH7.0 条件下溶液的外观状态，AE-SFNPs 澄清透亮，说明分散体系较为均一，而 SE-SFNPs 的外观偏

图 1　AE-SFNPs 和 SE-SFNPs 在 pH7.0 的条件下的溶液外观

Fig.1　Appearance of AE-SFNPs and SE-SFNPs solutions at pH7.0

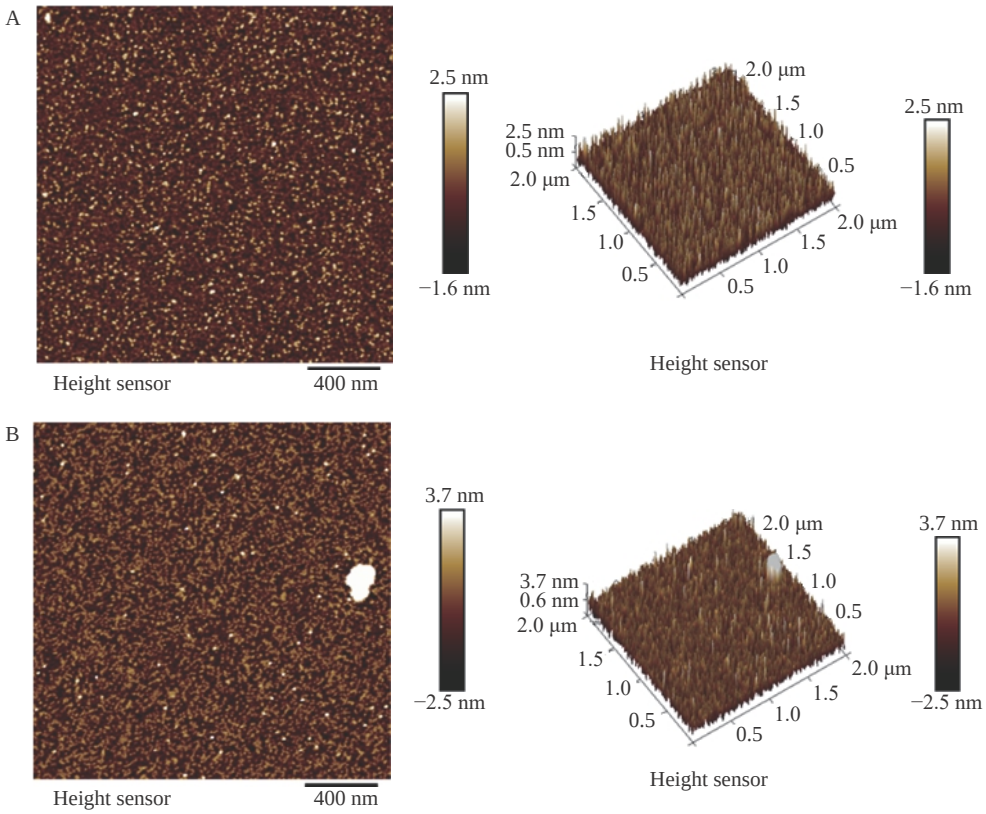


图 2　AE-SFNPs(A)和 SE-SFNPs(B)的原子力显微镜图

Fig.2　AFM image of AE-SFNPs (A) and SE-SFNPs (B)

浑浊，表明盐提-透析法得到的 AE-SFNPs 分散性较差，两种不同提取方法制备得到 SFNPs 的分散状态明显不同可能与其颗粒尺寸有关。由前期的研究可知，AE 法制备的双蛋白天然共生颗粒的平均粒径为 160.53 nm，远小于 SE 法制备的共生颗粒(359.03 nm)[13]。同时，两者的原子力显微镜图像进一步显示 AE-SFNPs 和 SE-SFNPs 均呈现类似球形的颗粒态，AE-SFNPs 的尺度小，分散相对均一(图 2A)，而 SE-SFNPs 的尺度不均一，且有较大蛋白聚集体产生(图 2B)，远大于 AE-SFNPs 的颗粒尺寸，这与两者粒径的测定结果相一致。

2.1.2 圆二色谱(CD)分析 由图 3A 可以看出，AE-SFNPs 和 SE-SFNPs 的 CD 光谱图存在明显差异，代表其二级结构的不同。为了得到具体的二级结构含量，利用 CD Pro 软件进一步计算了 α-螺旋、β-折叠、β-转角、无规则卷曲在 AE-SFNPs 和 SE-SFNPs 中的占比，如图 3B 所示，AE-SFNPs 的 α-螺旋占比仅 8.25%，比 SE-SFNPs 少 4.15%，而其 β-折叠占比 51.25%，比 SE-SFNPs 显著多 5.75%(P<0.05)，这表明 β-折叠在 AE-SFNPs 的二级结构中占比更大，而 α-螺旋占比少。据报道，β-折叠比 α-螺旋具有更强的灵活性[27]，因此，AE-SFNPs 的柔性可能更强。

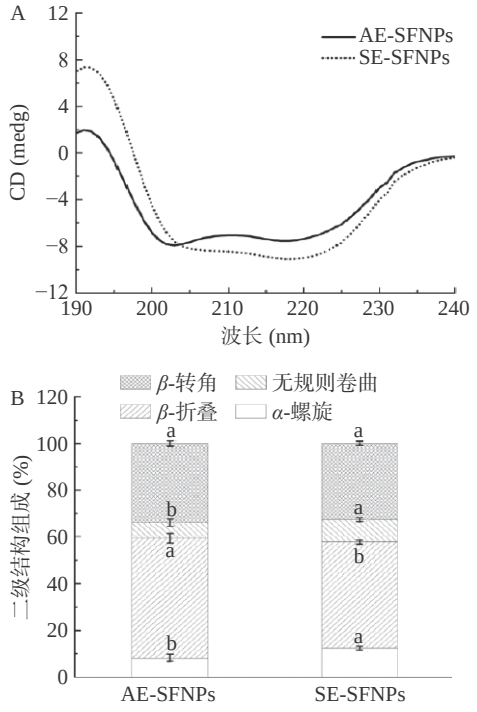


图 3 AE-SFNPs 和 SE-SFNPs 的 CD 光谱图(A)和二级结构(B)

Fig.3 CD spectra (A) and secondary structure (B) of AE-SFNPs and SE-SFNPs

注：图中不同字母表示数据间存在显著性差异(P<0.05)。

2.1.3 拉曼光谱分析 两种提取方法制备得到的 SFNPs 在波长 400~2000 cm^{-1} 的拉曼光谱如图 4 所示，根据已有的相关特征峰的研究[28]，在图 4 中分别标注出了 AE-SFNPs 和 SE-SFNPs 的拉曼特征峰，即二硫键伸缩振动 S-S、色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、酰胺Ⅲ带和酰胺Ⅰ带拉曼特征峰。由图 4 可以看出，与 SE-SFNPs 相比，AE-SFNPs 的色氨酸和酪氨酸的吸收峰较强，而且二硫键伸缩振动 S-S 的吸收峰强度也有差异，这反映出不同提取方法制备的 SFNPs 的疏水微环境、二硫键构型存在显著差异性。因此，对上述 AE-SFNPs 和 SE-SFNPs 的拉曼光谱进行分析，根据蛋白质分子结构对应吸收峰的相对强度，进一步获得了 SFNPs 的氨基酸侧链和二硫键的相关信息。

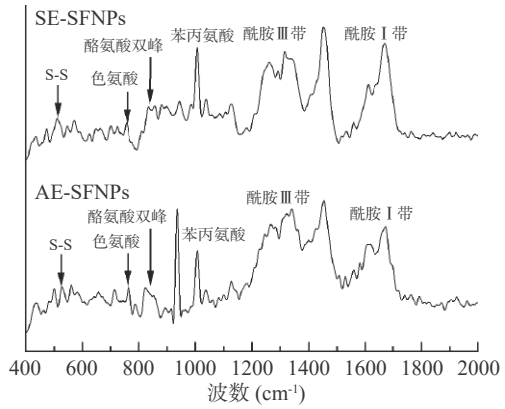


图 4 AE-SFNPs 和 SE-SFNPs 的拉曼光谱图

Fig.4 Raman spectra of AE-SFNPs and SE-SFNPs

AE-SFNPs 和 SE-SFNPs 的酪氨酸费米共振线(I_{850}/I_{830})和色氨酸(I_{760})残基分析结果见表 1。通过对比 AE-SFNPs 和 SE-SFNPs 的 I_{850}/I_{830} 比值，发现 AE-SFNPs 的 I_{850}/I_{830} 比值(1.090)更接近 1.25~1.40 的范围，表明其酪氨酸残基更倾向于“暴露态”，而 SE-SFNPs 的 I_{850}/I_{830} 的比值(0.840)更接近 0.3~0.5 的范围，这表明其酪氨酸残基更趋向于“包埋态”[29]。因此，AE-SFNPs 结构内部的酪氨酸疏水基团的暴露可以赋予其更高的表面疏水性[30]。此外，研究表明 I_{760} 越大，色氨酸残基微环境极性就越强，进而导致色氨酸残基由“包埋态”向“暴露态”转变[31]。显然，AE-SFNPs 的 I_{760} 相对较大，表明 AE-SFNPs 的色氨酸残基的“暴露态”趋向性更大，这可能是由于其蛋白质分子的展开程度较大引起的；而 SE-SFNPs 的 I_{760} 较小，可能与其大聚集体的形成有关，导致色氨酸残基大多被包埋在分子内部[30]。

表 1 AE-SFNPs 和 SE-SFNPs 的酪氨酸(I_{850}/I_{830})和色氨酸(I_{760})的包埋/暴露情况

Table 1 Encapsulation/exposure of tyrosine (I_{850}/I_{830}) and tryptophan (I_{760}) of AE-SFNPs and SE-SFNPs

样品	I_{850}/I_{830}	I_{760}
AE-SFNPs	1.090±0.068^{b}	0.552±0.091^{b}
SE-SFNPs	0.840±0.032^{a}	0.355±0.028^{a}

注：同列数据中不同字母表示差异显著(P<0.05)；表2~表4同。

AE-SFNPs 和 SE-SFNPs 的二硫键构型(g-g-g/g-g-t/t-g-t 模式)的结果见表 2，AE-SFNPs 和 SE-

SFNPs 均以 g-g-g 构型为主，这与之前 g-g-g 构型二硫键在大豆蛋白中所占比例最大(~42%)的研究结果一致[30]。但是在本研究中 AE-SFNPs 和 SE-SFNPs 二硫键中 g-g-g 构型的总占比相对减少约 6%，而 g-g-t 构型/t-g-t 构型的总占比表现出不同程度的增加，这也进一步证实了与亚麻籽蛋白的共生富集对大豆蛋白二硫键构型有着显著影响。此外，AE-SFNPs 和 SE-SFNPs 中二硫键 g-g-t 和 t-g-t 构型的相对含量具有显著性差异(P<0.05)，结合氨基酸侧链的分析可知，疏水基团“暴露态”的趋向性可能与 t-g-t 构型占比的相对增加和 g-g-t 构型占比的相对减少有关。

表 2　AE-SFNPs 和 SE-SFNPs 的二硫键构型的含量(%)
Table 2　Content of disulfide bond conformations of AE-SFNPs and SE-SFNPs (%)

样品	g-g-g	g-g-t	t-g-t
AE-SFNPs	36.738±3.803^{a}	29.542±4.922^{a}	33.720±1.119^{b}
SE-SFNPs	36.003±1.447^{a}	33.409±2.816^{b}	30.587±2.263^{a}

2.1.4　荧光光谱分析　通常，蛋白质的荧光光谱主要来源于色氨酸残基的荧光发射，可以用来表征蛋白质极性和构象的变化[21]。如图 5 所示，通过比较 AE-SFNPs 和 SE-SFNPs 的荧光光谱，发现 AE-SFNPs 的荧光强度强于 SE-SFNPs，这可能与蛋白质之间的相互作用力(氢键、疏水相互作用等)有关，导致蛋白质的结构变得更加伸展，使得更多的色氨酸残基暴露在极性环境中[32]。这一观察结果与氨基酸侧链的分析结果相一致，SE-SFNPs 因有较大蛋白聚集体的形成，使蛋白质分子表面的色氨酸残基大多被包埋进结构内部，导致其荧光强度较低。

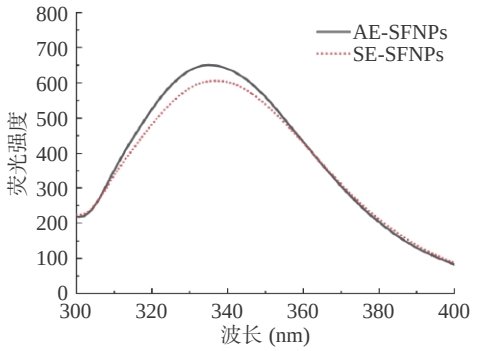


图 5　AE-SFNPs 和 SE-SFNPs 的荧光光谱
Fig.5　Fluorescence spectra of AE-SFNPs and SE-SFNPs

综上所述，外观状态、颗粒尺度和 AFM 结果表明 AE-SFNPs 比 SE-SFNPs 具有更为均一的颗粒尺度和良好的分散性，结合团队之前的工作基础，猜测一方面可能与两者的氨基酸组成以及亚基组成不同相关[13]；另一方面与不同提取过程对蛋白聚集状态的影响有关。CD 光谱分析表明，AE-SFNPs 二级结构中 β-折叠占比更多、α-螺旋占比更少，使其具有更灵活的结构；拉曼光谱和荧光光谱分析表明，AE-SFNPs 的酪氨酸残基和色胺酸残基比 SE-SFNPs 更倾向于“暴露态”，且 AE-SFNPs 的荧光强度高于 SE-SFNPs，从而使得 AE-SFNPs 的疏水性氨基酸更易于暴露在分子表面，具有更高的表面疏水性。接下来利用 AE-SFNPs 和 SE-SFNPs 作为颗粒乳化剂制备了 Pickering 纳米乳液，并对其油-水界面形态、乳滴微观结构以及乳液在贮藏期间的物理稳定性和化学稳定性以及稳定机制进行初步表征与阐述。

2.2　Pickering 纳米乳液的界面形态

为了揭示 AE-SFNPs 和 SE-SFNPs 在油-水界面上的微观结构和组装行为，利用 Cryo-TEM 和 Cryo-SEM 观察了 Pickering 纳米乳液的界面膜形态。图 6 和图 7 分别显示了由两种双蛋白天然共生颗粒 AE-SFNPs 和 SE-SFNPs 稳定的 Pickering 纳米乳液的 Cryo-TEM 和 Cryo-SEM 图像。结果显示，两种颗粒稳定的乳液尺度均为纳米级，乳液界面均被类似球形的颗粒所覆盖，说明两种共生颗粒均可吸附于油-水界面。此处制备的乳液与蛋白稳定的普通型纳米乳液不同，其界面是由纳米尺度的颗粒来稳定，即属于新型乳液：Pickering 纳米乳液。这在 Persson 等[15] 和 Han 等[17] 的报道中也发现了相似的研究结果，即纳米乳滴被密集堆积的颗粒稳定。相较于普通纳米乳液而言，吸附于 Pickering 纳米乳液表面的固体颗粒会在油/水界面处发生不可逆吸附[15]，形成刚性较强的油-水界面膜，来进一步增强乳液液滴间的空间排斥，能够有效防止乳液液滴间的聚结与歧化[33]。由图 6 和图 7 可知，与 SE-SFNPs 相比，吸附于乳滴界面的 AE-SFNPs 的颗粒大小分布较为均匀，排列更加密集有序，进而形成光滑、紧密的界面膜结构，具有更强的阻止乳液聚结和歧化的能力，有利于粒径较小、均一稳定的 Pickering 纳米乳液的形

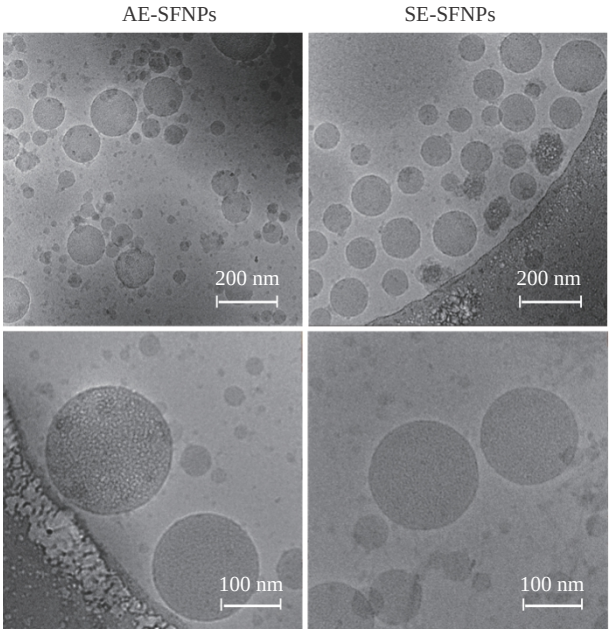


图 6　Pickering 纳米乳液的 Cryo-TEM 图像
Fig.6　Cryo-TEM images of Pickering nanoemulsion
注：从上到下放大倍数依次为 73000、120000。

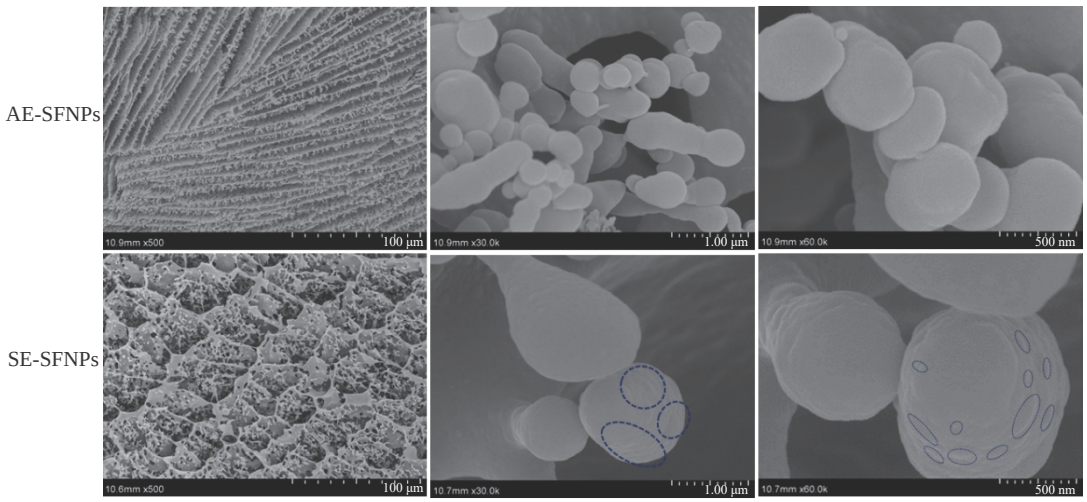


图 7 Pickering 纳米乳液的 Cryo-SEM 图像

Fig.7 Cryo-SEM image of Pickering nanoemulsion

注: 从左到右放大倍数依次为 500、30000、60000。

成[34]。而 SE-SFNPs 稳定的 Pickering 纳米乳液的界面膜存在着明显的大小不均的颗粒状结构, 经 Nano Measurer 软件计算可得, 吸附在界面上的颗粒大至 400 nm, 小至几十纳米(如图 7 虚线框选部分所示), 这将导致颗粒排列有序性降低, 因此, 形成的界面膜较为粗糙, 致密性较差, 其防止乳滴之间聚结和歧化的能力较弱。

从界面结构来看, 吸附在界面膜上的 AE-SFNPs 和 SE-SFNPs 的颗粒尺度与前文分析的关于天然共生颗粒的颗粒尺度和 AFM 的结果差异较大, 这可能归因于 SFNPs 在高能乳化制备乳液的过程中, 经高速剪切和微射流处理后的颗粒大小和分布的差异化表现。

2.3 Pickering 纳米乳液界面结构形成原因探究

通常, Pickering 纳米乳液的形成以高能乳化为主: 即先用高速剪切制备粗乳, 然后将粗乳通过高压均质或微射流进行处理获得 Pickering 纳米乳液[14]。为了进一步探究 AE-SFNPs 和 SE-SFNPs 稳定 Pickering 纳米乳液的形成与稳定机制, 测定了 AE-SFNPs 和 SE-SFNPs 经过高速剪切(制备粗乳条件: 15000 r/min, 5 min)和微射流处理(制备 Pickering 纳米乳液条件: 10000 psi, 4 次)的粒度分布情况, 结果如图 8 所示。随着外界能量输入的增加, 与经高速剪切后的粒度分布相比, 经高压微射流处理的 AE-SFNPs 的粒度分布向粒径小的方向移动且粒径分布范围变窄, 双峰转变为单峰(图 8A), 表明在高速剪切与高压微射流的过程中进一步产生了粒径更小且均一的 AE-SFNPs(大部分约 10 nm)。粗乳在形成 Pickering 纳米乳液的过程中, 乳滴的比表面积增大, 较小的 AE-SFNPs 吸附于油-水界面, 重构乳液界面, 进而形成了更加致密、均匀的油-水界面层[34−35], 与乳液界面的微观形态结果相一致(图 6 和图 7)。SE-SFNPs 的粒度分布也在向较小的方向移动且粒径分布范围变窄, 但还是表现为双峰, 且其粒度分布主要在 30~90 nm 以及 170~660 nm 的范围, 表明 SE-SFNPs 在外加能量的作用下尺度分布仍然不均匀, 有较大颗粒聚集体的存在, 这种情况可能导致在形成 Pickering 纳米乳液的界面重构过程中 SE-SFNPs 颗粒分布不均匀, 容易导致多颗粒聚结并堆积在界面层[15], 形成的界面膜致密性较差, 这与乳液界面的微观形态结果相一致(图 6 和图 7)。

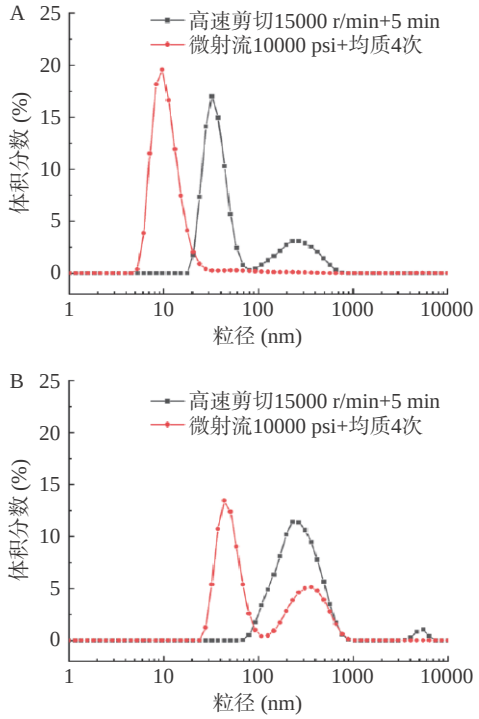


图 8 AE-SFNPs(A)和 SE-SFNPs(B)溶液的粒径分布情况

Fig.8 Particle size distribution of AE-SFNPs (A) and SE-SFNPs (B) solutions

2.4 Pickering 纳米乳液的稳定性分析

2.4.1 外观形貌、粒径和 ζ-电位分析 使用 AE-SFNPs 和 SE-SFNPs 作为颗粒乳化剂制备 Pickering 纳米乳液, 为了探究其应用潜力, 选用食品领域常用的蛋白类乳化剂, 即酪蛋白酸钠稳定的纳米乳液作为对照。

3 种乳液的长期稳定性在室温下避光贮藏连续监测了 28 d，在这期间乳液的外观形貌、粒径和 ζ-电位的变化情况如图 9 和表 3 所示。在贮藏初期，由 AE-SFNPs、SE-SFNPs 和酪蛋白酸钠制备的乳液在外观上均呈现为均匀、不透明的乳白色液体，乳液粒径均为纳米级(~200 nm)；贮藏 7 d 时，由 SE-SFNPs 制备的 Pickering 纳米乳液发生明显的“乳析”现象(见图 9 红框)，另外两组未发生此现象。SE-SFNPs 的乳液粒径也随之表现出了明显的增长趋势，由 201.13 nm 增大至 851.10 nm。SE-SFNPs 稳定的乳液随着贮藏时间的延长发生了更加剧烈的乳析，贮藏至第 28 d 时的乳液粒径比新鲜乳液的增大了约 11.9 倍，电位的绝对值降低了 6.24 mV。此外，由酪蛋白酸钠制备的纳米乳液在贮藏至 21 d 时也表现出了轻微的“乳析”现象，对应表 1 中乳液粒径增大和电位降低的变化趋势，即贮藏至第 28 d 时，乳液粒径增大约 1.68 倍，电位的绝对值降低了 11.63 mV，电位的降低可能是随着贮藏时间的推移，油脂发生了不同程度的氧化，产生的氢过氧化物随之分解的醇、醛等产物可能会中和羟基离子，进而导致乳液的电位绝对值出现了降低趋势[36−37]。尤其是，AE-SFNPs 制备的 Pickering 纳米乳液，在 28 d 的贮藏过程中，未出现“乳析”现象，粒径基本稳定在 230±10 nm，电位稳定在-33±2 mV，表现出比酪蛋白酸钠稳定的纳米乳液更高的抗絮凝和聚结稳定性，这可能主要归因于 AE-SFNPs 在制备 Pickering 纳米乳液的过程中表现出良好的界面重构行为，形成了致密、均匀的界面膜结构(图 6 和图 7)，有效阻止了乳滴的聚结和歧化[14]，显著提高了 Pickering 纳米乳液的贮藏稳定性。

2.4.2　动力学稳定性　稳定性指数是计算样品两次扫描之间差异的关键参数，可以用于评估样品的不稳定动力学与储存时间的关系[24]。当 TSI<0.5 时，意味着样品在较长时间内表现出稳定状态，未发生明显变化。在 1.0<TSI<3.0 时，说明样品没有明显的不稳定发生。但在 TSI>3.0 时，可以观察到絮凝或沉积物产生的现象[38]。图 10 显示了 AE-SFNPs、SE-SFNPs 和对照组酪蛋白酸钠稳定的乳液在贮藏期间(0、3、7、14、21 和 28 d)的 TSI 变化，随着贮藏时间的延长，TSI 值越大，说明乳液体系中乳液粒径和乳滴聚集的变化越大，进而表明乳液体系的稳定性越差[39]。结果显示，SE-SFNPs 的 TSI 值随时间的延长增幅越来越大，28 d 时已高达 55.13，说明其稳定性最差，与图 9 的结果相一致。酪蛋白酸钠和 AE-SFNPs 稳定的乳液的 TSI 值在贮藏期间增幅较小，储存至第

图 9　SFNPs 稳定的 Pickering 纳米乳液与对照组的外观变化

Fig.9　Changes in the appearance of Pickering nanoemulsions stabilized by SFNPs and control group

注：均在室温避光保存 28 d；表 3~表 4、图 10 同。

表 3　SFNPs 稳定的 Pickering 纳米乳液与对照组的粒径和 ζ-电位变化

Table 3　Changes in particle size and ζ-potential of Pickering nanoemulsions stabilized by SFNPs and control group

贮藏天数(d)	粒径(nm)			ζ-电位(mV)		
	酪蛋白酸钠	AE-SFNPs	SE-SFNPs	酪蛋白酸钠	AE-SFNPs	SE-SFNPs
0	181.17±2.06^{a}	227.17±2.53^{a}	201.13±2.51^{a}	−46.81±0.85^{ab}	−35.28±0.60^{a}	−25.74±0.24^{a}
3	180.63±0.84^{a}	224.63±5.88^{ab}	225.43±18.57^{a}	−44.65±2.37^{b}	−33.40±0.41b^{c}	−26.29±0.88^{a}
7	178.70±2.34^{a}	231.53±6.31^{ab}	851.10±61.44^{b}	−47.65±1.65^{ab}	−33.27±0.14c	−26.29±0.88^{a}
14	187.70±2.65^{b}	230.43±2.25^{ab}	1779.33±84.61^{c}	−48.65±2.37^{a}	−34.42±0.74^{ab}	−21.56±1.03^{b}
21	212.30±1.61^{c}	233.13±2.10^{b}	2219.67±114.61^{d}	−44.65±2.37^{b}	−33.24±0.91^{c}	−20.01±1.02^{c}
28	303.53±5.80^{d}	241.07±2.60^{c}	2401.67±74.10^{e}	−35.18±0.54^{c}	−32.84±0.54^{c}	−19.50±0.30^{c}

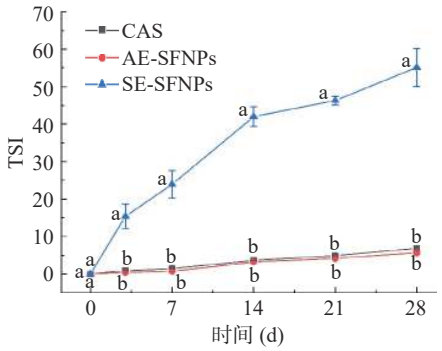


图 10 SFNPs 稳定的 Pickering 纳米乳液与对照组的 TSI 变化

Fig.10 Changes in TSI of Pickering nanoemulsions stabilized by SFNPs and control group

注：图中同一贮藏时间下标注的不同字母表示数据间存在显著性差异（P<0.05）。

28 d 时，AE-SFNPs 的 TSI 值仅为 5.83，小于酪蛋白酸钠的 TSI 值（6.50），表明 AE-SFNPs 制备的 Pickering 纳米乳液的稳定性强于酪蛋白酸钠制备的纳米乳液，具有较好的动力学稳定性。

2.4.3 Pickering 纳米乳液的化学稳定性分析 表 4 显示了 AE-SFNPs、SE-SFNPs 和酪蛋白酸钠制备的乳液的氢过氧化物（初级氧化产物）和 TBARS（次级氧化产物），用于分析乳液的化学稳定性。随着贮藏时间的延长，观察到所有组的氢过氧化物和 TBARS 水平均发生显著变化（P<0.05）。贮藏至 28 d 时，乳液中氢过氧化物大小顺序：SE-SFNPs>AE-SFNPs≈酪蛋白酸钠；TBARS 含量大小顺序：SE-SFNPs>酪蛋白酸钠>AE-SFNPs，表明 AE-SFNPs 稳定的 Pickering 纳米乳液的氧化稳定性相对较好，且变化较小，原因可能是由于亚麻籽油与 AE-SFNPs 经高速剪切和微流化处理后，使得大部分油脂被包埋在乳液液滴内部，界面结构紧实，有效减少了外界氧气或其他促氧物质与油脂的接触位点，从而进一步减缓了氧化速度，提升了化学稳定性[40]。

基于实验结果，图 11 总结了双蛋白天然共生颗粒稳定 Pickering 纳米乳液的潜在作用机制。AE-SFNPs 在高速剪切和高压微射流的过程中产生了颗粒尺度更小、分散更均匀的纳米颗粒，粗乳在形成 Pickering 纳米乳液的过程中，乳滴的比表面积随之粒径的减小而增大，这时颗粒较小的 AE-SFNPs 快

表 4 SFNPs 稳定的 Pickering 纳米乳液与对照组的氢过氧化物和 TBARS 浓度变化

Table 4 Changes in hydroperoxide and TBARS concentrations in SFNPs-stabilized Pickering nanoemulsions and control group

贮藏天数(d)	氢过氧化物(mmol/kg Oil)			TBARS(mmol/kg)		
	酪蛋白酸钠	AE-SFNPs	SE-SFNPs	酪蛋白酸钠	AE-SFNPs	SE-SFNPs
0	0.416±0.001^{a}	0.469±0.076^{a}	0.970±0.007^{a}	0.020±0.006^{a}	0.032±0.003^{a}	0.045±0.004^{a}
3	0.510±0.002^{b}	0.564±0.162^{a}	1.017±0.094^{ab}	0.026±0.003^{b}	0.078±0.001^{c}	0.058±0.002^{a}
7	0.597±0.076^{c}	0.951±0.077^{b}	1.286±0.035^{bc}	0.030±0.001^{b}	0.077±0.001^{c}	0.094±0.001^{c}
14	0.781±0.023^{d}	1.192±0.035^{c}	1.518±0.031^{c}	0.034±0.001^{c}	0.074±0.001^{c}	0.076±0.002^{b}
21	1.971±0.020^{e}	2.586±0.053^{d}	2.538±0.023^{d}	0.051±0.001^{d}	0.068±0.002^{b}	0.140±0.014^{d}
28	2.422±0.035^{f}	2.434±0.120^{d}	5.585±0.263^{e}	0.105±0.001^{e}	0.086±0.002^{d}	0.236±0.002^{e}

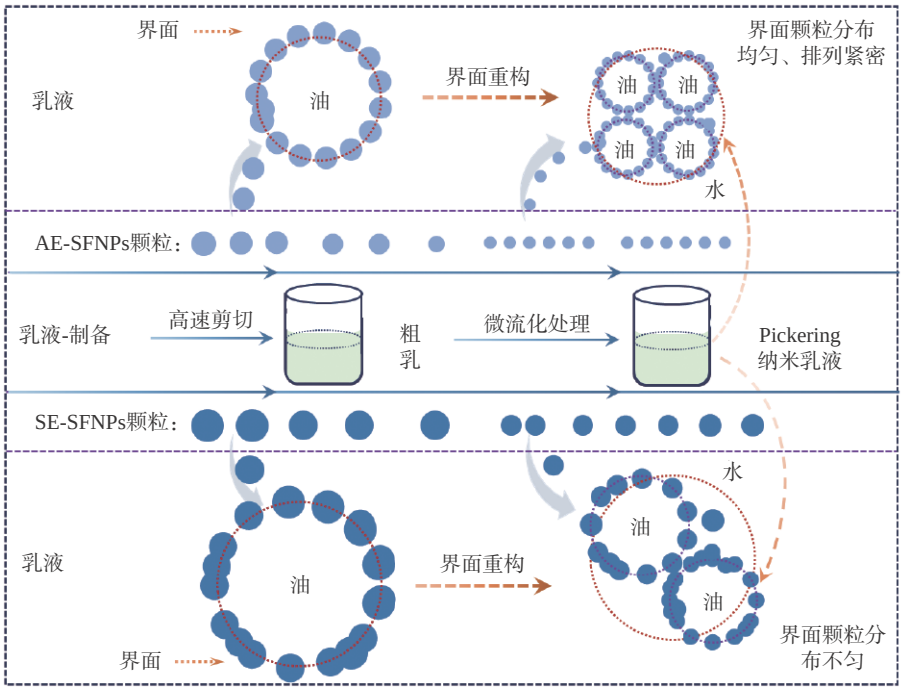


图 11 SFNPs 基 Pickering 纳米乳液的界面稳定机制

Fig.11 Interfacial stabilization mechanism of SFNPs-based Pickering nanoemulsion

速地吸附于油-水界面，以重构 Pickering 纳米乳液的界面层结构，进而形成了更加致密、均匀的油-水界面层，有效阻止了乳滴的聚结和歧化，赋予了其更高的稳定性[14,41]。而 SE-SFNPs 因尺度分布不均匀，在重构 Pickering 纳米乳液界面时，形成的界面膜致密性较差，导致乳液稳定性较差。

3　结论

本研究通过碱提取-等电点沉淀法和盐提取-透析法从大豆-亚麻籽混合粕中直接制备双蛋白天然共生颗粒（SFNPs），并将其作为颗粒稳定剂制备 Pickering 纳米乳液。研究发现，在高能乳化前，AE-SFNPs 表现出比 SE-SFNPs 更小的粒径、更好的分散性和结构柔性。经高能乳化，AE-SFNPs 制备的 Pickering 纳米乳液表现出比 SE-SFNPs 更小的粒径、更均匀的分散性以及更佳的物理稳定性和化学稳定性，也优于酪蛋白酸钠制备的纳米乳液。因此，AE-SFNPs 是一种天然高效的植物蛋白基颗粒稳定剂。本研究为大豆蛋白基纳米乳液的制备提供了新的解决策略。

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

参考文献

[1] WILSON R J, LI Y, YANG G, et al. Nanoemulsions for drug delivery[J]. Particuology, 2022, 64: 85−97.

[2] PRIMOZIC M, DUCHEK A, NICKERSON M, et al. Formation, stability and *in vitro* digestibility of nanoemulsions stabilized by high-pressure homogenized lentil proteins isolate[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 77: 126−141.

[3] MCCLEMENTS D J, RAO J. Food-grade nanoemulsions: Formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2011, 51: 285−330.

[4] 李季楠, 吴艳, 胡浩, 等. 食品纳米乳液的研究进展[J]. 食品与机械, 2019, 35(2): 217−225. [LI Jinan, WU Yan, HU Hao, et al. Research progress of food nanoemulsions[J]. Food and Machinery, 2019, 35(2): 217−225.]

[5] XIA J, SUN X, JIA P, et al. Multifunctional sustainable films of bacterial cellulose nanocrystal-based, three-phase pickeringnanoemulsions: A promising active food packaging for cheese[J]. Chemical Engineering Journal, 2023, 466: 143295.

[6] JIN W, XU W, LIANG H, et al. 1-Nanoemulsions for food: Properties, production, characterization, and applications[M]. GRUMEZESCU A M. Emulsions. Academic Press, 2016: 1−36.

[7] LI Y, LIU B, JIANG L, et al. Interaction of soybean protein isolate and phosphatidylcholine in nanoemulsions: A fluorescence analysis[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 87: 814−829.

[8] PENG X Q, XU Y T, LIU T, et al. Molecular mechanism for improving emulsification efficiency of soy glycinin by glycation with soy soluble polysaccharide[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(46): 12316−12326.

[9] XU J, MUKHERJEE D, CHANG S K C. Physicochemical properties and storage stability of soybean protein nanoemulsions prepared by ultra-high pressure homogenization[J]. Food Chem, 2018, 240: 1005−1013.

[10] CHEN N N, YANG B Y, WANG Y, et al. Improving the colloidal stability and emulsifying property of flaxseed 11S globulin by heat induced complexation with soy 7S globulin[J]. LWT-Food Sci Technol, 2022, 161: 113364.

[11] ZHANG X Y, QI B K, XIE F Y, et al. Emulsion stability and dilatational rheological properties of soy/whey protein isolate complexes at the oil-water interface: Influence of pH[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 113: 106391.

[12] XIAO Y Z, REN W, WEI F, et al. Rice glutelins and *β*-conglycinin or glycinin forming binary structures with different structural and functional properties[J]. Food Biophysics, 2021, 16(4): 532−543.

[13] SHAO J, YANG J, JIN W, et al. Regulation of interfacial mechanics of soy protein via co-extraction with flaxseed protein for efficient fabrication of foams and emulsions[J]. Food Research International, 2024, 175: 113673.

[14] GAUTHIER G, CAPRON I. Pickering nanoemulsions: An overview of manufacturing processes, formulations, and applications[J]. JCIS Open, 2021, 4: 100036.

[15] PERSSON K H, BLUTE I A, MIRA I C, et al. Creation of well-defined particle stabilized oil-in-water nanoemulsions[J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2014, 459: 48−57.

[16] MCCLEMENTS D J. Advances in edible nanoemulsions: Digestion, bioavailability, and potential toxicity[J]. Progress in Lipid Research, 2021, 81: 101081.

[17] HAN W, LIU T X, TANG C H. Use of oligomeric globulins to efficiently fabricate nanoemulsions: Importance of enhanced structural stability by introducing trehalose[J]. Food Hydrocolloids, 2023, 141: 108695.

[18] LI K Y, ZHANG X R, HUANG G Q, et al. Complexation between ovalbumin and gum arabic in high total biopolymer concentrations and the emulsifying ability of the complexes[J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2022, 642: 128624.

[19] YANG J, DUAN Y, GENG F, et al. Ultrasonic-assisted pH shift-induced interfacial remodeling for enhancing the emulsifying and foaming properties of perilla protein isolate[J]. Ultrason Sonochem, 2022, 89: 106108.

[20] ZHANG X, HUANG L X, NIE S Q, et al. FTIR characterization of the secondary structure of insulin encapsulated within liposome[J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2003, 12(1): 11−14.

[21] LIAO X, WANG S, LI Y, et al. Effects of "nine steaming nine sun-drying" on proximate composition, protein structure and volatile compounds of black soybeans[J]. Food Research International, 2022, 155: 111070.

[22] MACHADO A H E, LUNDBERG D, RIBEIRO A J, et al. Preparation of calcium alginate nanoparticles using water-in-oil (W/O) nanoemulsions[J]. Langmuir, 2012, 28(9): 4131−4141.

[23] GUO Y, WU C, DU M, et al. In-situ dispersion of casein to form nanoparticles for Pickering high internal phase emulsions[J]. LWT, 2021, 139: 110538.

[24] WANG L, YU X, GENG F, et al. Effects of tocopherols on the stability of flaxseed oil-in-water emulsions stabilized by different emulsifiers: Interfacial partitioning and interaction[J]. Food Chemistry, 2022, 374: 131691.

[25] KIRALAN S S, DOĞU-BAYKUT E, KITTIPONGPITTAYA K, et al. Increased antioxidant efficacy of tocopherols by surfactant solubilization in oil-in-water emulsions[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(43): 10561−10566.
[26] CHEN F, LIANG L, ZHANG Z P, et al. Inhibition of lipid oxidation in nanoemulsions and filled microgels fortified with omega-3 fatty acids using casein as a natural antioxidant[J]. Food Hydrocolloids, 2017, 63: 240−248.
[27] LIU H, ZHANG H, LIU Q, et al. Solubilization and stable dispersion of myofibrillar proteins in water through the destruction and inhibition of the assembly of filaments using high-intensity ultrasound[J]. Ultrason Sonochem, 2020, 67: 105160.
[28] 吕博, 李明达, 张毅方, 等. 用拉曼光谱分析低压均质处理对大豆分离蛋白结构的影响[J]. 现代食品科技, 2018, 34(10): 58−63. [LÜ Bo, LI Mingda, ZHANG Yifang, et al. Effect of low-pressure homogenization treatment on the structure of soybean isolate proteins analyzed by Raman spectroscopy[J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(10): 58−63.]
[29] WONG H W, CHOI S M, PHILLIPS D L, et al. Raman spectroscopic study of deamidated food proteins[J]. Food Chemistry, 2009, 113(2): 363−370.
[30] 齐宝坤, 赵城彬, 江连洲, 等. 热处理对大豆 11S 球蛋白表面疏水性的影响及拉曼光谱分析[J]. 食品科学, 2018, 39(18): 15−20. [QI Baokun, ZHAO Chengbin, JIANG Lianzhou, et al. Effect of heat treatment on surface hydrophobicity of soybean 11S globulin and Raman spectroscopy[J]. Food Science, 2018, 39(18): 15−20.]
[31] 王中江, 江连洲. 大豆分离蛋白在不同 pH 下的拉曼光谱分析[J]. 食品工业科技, 2012, 33(11): 63−66. [WANG Zhongjiang, JIANG Lianzhou. Raman spectroscopic analysis of soybean isolates at different pH[J]. Food Industry Science and Technology, 2012, 33(11): 63−66.]
[32] WANG Y R, YANG Q, FAN J L, et al. The effects of phosphorylation modification on the structure, interactions and rheological properties of rice glutelin during heat treatment[J]. Food Chemistry, 2019, 297: 124978.
[33] SIHLER S, SCHRADE A, CAO Z, et al. Inverse pickering emulsions with droplet sizes below 500 nm[J]. Langmuir, 2015, 31(38): 10392−10401.
[34] YANG J, DUAN Y Q, ZHANG H H, et al. Ultrasound coupled with weak alkali cycling-induced exchange of free sulfhydryl-disulfide bond for remodeling interfacial flexibility of flaxseed protein isolates[J]. Food Hydrocolloids, 2023, 140: 108597.
[35] QIAN C, MCCLEMENTS D J. Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: Factors affecting particle size[J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(5): 1000−1008.
[36] MCCLEMENTS D J, JAFARI S M. Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: A review[J]. Advances in Colloid and Interface Science, 2018, 251: 55−79.
[37] 程晨, 黄凤洪, 黄庆德, 等. 脂质伴随物对多不饱和脂肪酸乳液稳定性的影响研究进展[J]. 中国油料作物学报, 2019, 41(5): 816−824. [CHENG Chen, HUANG Fenghong, HUANG Qingde, et al. Research progress on the effect of lipid concomitants on the stability of polyunsaturated fatty acid emulsions[J]. Chinese Journal of Oilseed Crops, 2019, 41(5): 816−824.]
[38] JIN W, PAN Y, WU Y, et al. Structural and interfacial characterization of oil bodies extracted from *Camellia oleifera* under the neutral and alkaline condition[J]. LWT, 2021, 141: 110911.
[39] CHENG C, YU X, MCCLEMENTS D J, et al. Effect of flaxseed polyphenols on physical stability and oxidative stability of flaxseed oil-in-water nanoemulsions[J]. Food Chemistry, 2019, 301: 125207.
[40] 闫馨月, 贾亦佳, 孙诗艳, 等. 火麻油复合纳米乳液的制备及稳定性研究[J]. 食品与生物技术学报, 2022, 41(6): 84−90. [YAN Xinyue, JIA Yijia, SUN Shiyan, et al. Preparation and stability of composite nanoemulsions of hemp oil[J]. Journal of Food and Biotechnology, 2022, 41(6): 84−90.]
[41] HAN W, LIU T X, TANG C H. Transforming monomeric globulins into pickering particles to stabilize nanoemulsions: Contribution of trehalose[J]. Food Hydrocolloids, 2023, 141: 108687.

王金晶, 冯乐乐, 沈思宇, 等. 葡萄籽原花青素对小麦面团流变特性及面条品质的影响 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 85−92. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023120024
WANG Jinjing, FENG Lele, SHEN Siyu, et al. Effect of Grape Seed Procyanidins on Rheological Properties of Wheat Dough and Noodles Quality[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 85−92. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023120024

· 研究与探讨 ·

葡萄籽原花青素对小麦面团流变特性及面条品质的影响

王金晶[1], 冯乐乐[1], 沈思宇[1], 张佳伦[2], 王志伟[1], 张　晔[1,*], 王田心[1,*], 王　浩[1,*]
（1.天津科技大学食品营养与安全国家重点实验室, 食品科学与工程学院, 天津 300457;
2.河北玉桥食品有限公司, 河北石家庄 051530）

摘　要: 为扩大小麦粉的应用范围和改善面条品质，本研究在小麦粉中添加 0.25%、0.50%、0.75%、1.00%（w/w）的葡萄籽原花青素（GSP），测定了面团的流变特性、水分分布、质构特性，以及面条的蒸煮特性、消化特性和感官特性，使用扫描电子显微镜（SEM）观察了添加原花青素后面条的微观结构，分析了原花青素对小麦面筋蛋白结构特性的影响。结果表明，随原花青素添加量（0~0.75%，w/w）的增大，面团的弹性模量（G'）和粘性模量（G"）（G'>G"）、硬度、弹性、粘附性上升，最大拉伸阻力和拉伸距离分别增大了 7.22 g 和 11.16 mm，面团的流变特性和质构特性有所改善；横向弛豫时间 T_2 左移，自由水含量下降，说明面团的持水性增强。面条的耐煮性提高，水解率与血糖生成指数（GI）明显下降，从未添加 GSP 时的 68.45 降低到 61.73（添加量为 1.00%）；在 GSP 添加量为 0.75% 时面筋蛋白中二硫键含量最高，游离巯基含量最低，感官评分最高，面条具有软弹、劲道、口感爽滑的特点。综上，GSP 可以通过改善面筋蛋白网络结构和降低面条的 GI 值，提高产品食用品质，可作为一种潜在的天然面粉改良剂。

关键词: 小麦粉, 葡萄籽原花青素（GSP）, 质构特性, 蒸煮特性, 消化特性, 感官品质
中图分类号: TS213.2　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2024)21−0085−08
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023120024
本文网刊:

Effect of Grape Seed Procyanidins on Rheological Properties of Wheat Dough and Noodles Quality

WANG Jinjing[1], FENG Lele[1], SHEN Siyu[1], ZHANG Jialun[2], WANG Zhiwei[1], ZHANG Ye[1,*], WANG Tianxin[1,*], WANG Hao[1,*]
（1.State Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, College of Food Science and Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;
2.Hebei Yuqiao Food Co., Ltd., Shijiazhuang 051530, China）

Abstract: To improve the application of wheat flour and the quality of noodles, in this study, 0.25%, 0.50%, 0.75%, 1.00% (w/w) grape seed proanthocyanins (GSP) were added to wheat flour. Rheology, moisture distribution and texture quality of the dough, as well as the cooking, digestive and sensory properties of the noodles were determined. The microstructure of the noodles added GSP was observed by scanning electron microscopy (SEM) to analyze the effect of GSP on the structure of wheat gluten proteins. As the results shown, with the addition of GSP rising (0~0.75%, w/w), the modulus of elasticity (G'), viscosity (G") (G'>G"), hardness, springiness and adhesiveness of the dough increased, The maximum tensile resistance and stretching distance increased by 7.22 g and 11.16 mm, respectively. It demonstrated that the rheology and

收稿日期: 2023−12−08
作者简介: 王金晶（1999−）, 女, 硕士, 研究方向: 粮油科学与工程, E-mail: un0007@mail.tust.edu.cn。
*** 通信作者:** 张晔（1989−）, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品添加剂与功能配料, E-mail: tyouyou@tust.edu.cn。
王田心（1985−）, 男, 博士, 讲师, 研究方向: 食品添加剂与功能配料, E-mail: wtxwang@tust.edu.cn。
王浩（1979−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品添加剂与功能配料, E-mail: wanghao@tust.edu.cn。

texture quality were improved. The lateral relaxation time T_2 shifted to the lower and the free water content declined, which exhibited the water-holding capability was enhanced. The cooking resistance of the noodles was improved, and the hydrolysis rate and glycemic index (GI) were obviously decreased which reduced from 68.45 with no additional GSP to 61.73 (1.00% addition). At the addition of GSP of 0.75%, the highest disulfide bond content and the lowest free thiol group content occurred, moreover, the score of sensory quality was the highest. The noodles exhibited the soft, chewy, and smooth mouthfeel. In conclusion, GSP could enhance the edible quality of the product by improving the structure of the gluten protein network and lowering the glycemic index (GI) value of noodles, which illustrated GSP could be used as a potential natural flour improver.

Key words: wheat flour; grape seed proanthocyanins (GSP); textural properties; cooking properties; digestive properties; sensory quality

小麦是世界各地广泛种植的重要谷类作物，以其为基础的面制品因具有营养美味、制作方便等特点而广受欢迎，其中富含蛋白质、维生素、膳食纤维等多种营养物质[1]。随着社会经济的发展以及人民生活水平的提高，消费者对面条从品质提升逐步转向营养健康的需求。一方面通过提升面团的质构和流变特性，使面条的嚼劲、弹性、口感等有所提升；另一方面通过对面条消化特性的改善可以达到降糖、保健、对慢性病起到预防和辅助食疗的作用[2]。面粉改良剂是可以起到营养强化主食作用，不仅可以提高面团品质，还能增强产品的稳定性，延长食品货架期[3]。目前市面上的改良剂主要可分为人工改良剂和天然改良剂，随着人民对食品健康和安全的追求，天然且安全的面粉改良剂研发和生产在未来有较大的发展前景。

多酚作为一种天然改良剂，常添加到面粉中开发强化小麦产品，如茶多酚面包，紫薯粉强化馒头等[4]。研究表明，多酚可与蛋白相互作用并影响面团中面筋网络的形成[5]。其中原花青素因其天然、安全且生物兼容性好，可作为增筋剂应用于食品领域[6]，主要分布在银杏、葡萄等植物的皮、壳、籽、核中。葡萄籽原花青素(GSP)由不同数量儿茶素、表儿茶素和表儿茶素没食子酸酯 C_4-C_8 或 C_4-C_6 键聚集而成的多聚体，具有降低血糖、降脂、抗氧化的生物活性[7]。在面团体系中，由于葡萄籽原花青素的相对分子质量相较于茶多酚、表儿茶素等其他酚类物质更大，拥有更多的结合位点，通过二硫键、氢键、疏水相互作用等方式，更容易与面筋蛋白及其他成分发生交联结合[8]。适量添加 GSP 对面团以及面条的最终品质有显著影响，这与胡思[9] 关于茶多酚应用到生鲜面条的结果是一致的。

目前，在面制品中多酚的应用大多集中在茶多酚和单宁酸等物质，Tian 等[10] 研究了茶多酚中典型儿茶素单体对面筋及其结构和理化性质的影响，表明儿茶素单体在提高面筋强度方面发挥关键的作用，加强了谷蛋白以及富含醇溶蛋白面筋网络结构的紧凑程度。魏建林等[11] 研究了单宁酸对小麦粉面筋的改善效果，得出单宁酸可以起到增筋作用，能够改善面团的加工特性。现有文献大多仅研究多酚对小麦面筋蛋白网络结构的影响，缺少其对面条血糖生成指数(Glycemic index，GI)调控、改善消化性能的数据，同时，以葡萄籽原花青素作为面粉改良剂的研究较少。因此，本研究通过从面团的流变特性、水分分布、质构特性，面条的蒸煮特性、消化特性和感官特性等方面进行分析，综合评估原花青素对面条食用品质特性的影响，为葡萄籽原花青素成为潜在的面粉改良剂，提供一定的理论依据和技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

小麦粉　中粮利金(天津)粮油股份有限公司；葡萄籽原花青素(95%)　天津市尖峰天然产物研究开发有限公司；白面包　市售；猪胰腺 α-淀粉酶(50 U/mg)　Sigma 化学有限公司；糖化酶(100 U/mg)、DNS 试剂　北京索莱宝生物科技有限公司；其余化学试剂均为分析级　上海麦克林生化科技股份有限公司。

HMJ-D4 型和面机　北京利仁科技股份有限公司；UVmini-1240 型紫外可见分光光度计　日本岛津有限公司；FD-1-50 真空冷冻干燥机　北京博医实验仪器有限公司；TA-XT Plus 质构仪　英国 Stable Micro System 公司；Rotational Rheometer MARS 60 型动态流变仪　德国哈克公司；MicroMR-25 型低场核磁共振仪(Low Field-Nuclear Magnetic Resonance，LF-NMR)　上海纽迈电子科技有限公司；SU151 型扫描电子显微镜(SEM)　日本日立高新技术公司等。

1.2 实验方法

1.2.1 样品制备　面团样品的制备：将葡萄籽原花青素(GSP)分别以 0.25%、0.50%、0.75%、1.00% 的质量比例添加至 100 g 小麦粉中作为实验组，以不添加 GSP 的小麦粉作为空白组，将面粉样品放进和面机中，接着加入 45 mL 蒸馏水，30 ℃ 搅拌 6 min，得到的面团在 25 ℃ 下静置 15 min[12]。

面条样品的制备：将面团在面条机滚轴重复通过 5 次(先在 1 档 2 mm 辊轴压碾 2 次，再在 2 档 1.5 mm 辊轴压碾 1 次，最后在 3 档 1 mm 辊轴压碾 2 次)，将得到的面皮通过细面刀，得到宽度为 3 mm，厚度为 1 mm 的实验组及空白组面条，将面条装于

PE 自封袋，并放在 4 ℃ 冰箱中备用。

1.2.2　流变特性　采用动态流变仪对面团样品的流变学特性进行表征[13]。将 2.0 g 面团放置在 MARS 60 型流变仪上间距 3 mm、直径 20 mm 的平行板上，在 0.02% 的恒定剪切应变（线性粘弹性范围内）条件下，以 0.01~10 Hz 的频率范围内进行扫频，测定了面团样品的储能模量（G'）和损耗模量（G"）。

1.2.3　水分分布　使用低场核磁共振仪（LF-NMR）中的 CPMG 脉冲序列，测定面团样品的横向弛豫时间（T_2）[14]。实验中的测量参数为：TW（ms）=2000.00，TE（ms）=0.1，SW（kHz）=333.33，NS=8，NECH=12000。

1.2.4　质构特性

1.2.4.1　TPA 特性　使用 TA-XT Plus 仪器的 P/100 探头对面团的应力松弛进行测定。当面团变形度达到 75% 时，应变保持 60 s。利用 Maxwell-Kelvin 三元模型进行拟合面团应力松弛曲线，测试的前、中、后速度分别为 1、1、10 mm/s[15]。

1.2.4.2　单轴拉伸特性　面团的单轴拉伸特性使用 TA-XT Plus 仪器的 A/KIE 探头进行测定[14]。试验中的触发力为 5 g，距离为 50.0 mm，前、中、后速度分别为 2.0、0.08、10.0 mm/s，得到最大拉伸阻力和拉伸距离。每个样品至少进行 7 次测量。

1.2.5　蒸煮特性

1.2.5.1　最佳蒸煮时间　参照钱晶晶[16]的方法并稍作修改，在锅中加入 500 mL 蒸馏水，将面条计时用小火烹煮 2 min 后，每隔 10 s 捞出一根面条，观察用小刀切开的面条截面是否有白芯，当白芯刚好消失时，即刻记录为最佳蒸煮时间。

1.2.5.2　断条率　断条率是指煮熟后断裂的面条数量与总面条数的比值，是反映面条蒸煮之后品质特性的重要指标，断条率较低，则说明该面条耐煮，并且口感较好。取 40 根面条在水持续沸腾的情况下，至最佳蒸煮时间捞出。断条率计算公式如下[17]。

$$\text{断条率}(\%) = \frac{N}{40} \times 100$$

式中：N 为煮断的面条根数。

1.2.6　消化特性　根据 Englyst 等[18]的方法进行修改，测定面条样品的体外消化特性，以白面包作为对照组，绘制淀粉水解曲线并计算血糖生成指数。

1.2.6.1　熟面条粉末的制备　将制备好的生面条在最佳蒸煮时间下煮熟，−50 ℃ 条件下冻干 24 h、研磨后过 120 目筛，空白组和样品组如 1.2.1 设定。

1.2.6.2　葡萄糖含量的测定　按照任婧等[19]的 DNS 法测定，制备梯度浓度葡萄糖标液（0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 mg/mL），在 540 nm 波长处测定吸光度，绘制标准曲线。

1.2.6.3　总淀粉含量的测定　根据 GB/T 20378-2006 测定。

1.2.6.4　糊化处理　称取 200 mg 熟面条粉末于 50 mL 离心管中，溶解于 5 mL 醋酸钠缓冲溶液（0.2 mol/L，pH5.2），于 95 ℃ 糊化 20 min 后置于 37 ℃ 水浴恒温振荡器中冷却保温。

1.2.6.5　淀粉水解率和血糖生成指数的测定　将 16 mL α-淀粉酶溶液（40 mg/mL）和 4 mL 糖化酶溶液（5 mg/mL）充分混合，并置于 37 ℃ 水浴恒温振荡器中保温，待混酶溶液温度为 37 ℃ 时，即将其加入到上一步处理好的淀粉糊化溶液中。混酶溶液添加完后即刻开始计时，取不同时间点（10、20、30、40、60、90、120、180 min）的反应液各 1 mL，置于装有 4 mL 无水乙醇的离心管（10 mL）中灭活，于 4000 r/min 离心 20 min 后取上清液，煮沸 5 min 后立即冰浴，计算水解率并绘制曲线。公式如下：

$$\text{水解率}(\%) = \frac{Gt \times 25 \times 0.9}{TS}$$

$$GI = 39.71 + 0.549 \times HI$$

式中，Gt 为 t 时间后淀粉水解产生的葡萄糖含量（mg）；TS 为样品中的总淀粉含量（mg）；酶解指数 HI 是淀粉水解曲线下面积与白面包水解曲线下面积之比（%）；GI 为血糖生成指数。

1.2.7　二硫键和游离巯基含量的测定　将制备好的面团放入温水中搓洗，得到的面筋蛋白在-50 ℃ 冻干 24 h，研磨并过 100 目筛。参照 Zhang 等[20]的方法测定面筋蛋白样品中二硫键和游离巯基的水平。称取样品（2 mg/mL）悬浮于 10.0 mL Tris-甘氨酸缓冲液（pH8.0）中，其中含有盐酸胍（5.0 mol/L）、尿素（8.0 mol/L）和乙二胺四乙酸二钠（EDTA，1.5% w/v），将三氯乙酸溶液（TCA，12% w/v）添加至样品缓冲液中，静置 60 min 使其充分反应。随后取 200 μL 的 5,5'-二硫代-（2-硝基）苯甲酸（DTNB，0.1% w/w）与 5 mL 的样品溶液混合，静置 30 min，5000 r/min 离心 10 min，在 412 nm 处测定上清液的吸光度，用该缓冲液作为空白，计算游离巯基含量。总巯基含量与游离巯基含量的测定方法一致，在缓冲液中额外添加二硫苏糖醇（DTT，0.5% w/v）。二硫键含量由总巯基和游离巯基计算所得，公式如下：

$$SH(\mu mol/g) = \frac{A_{412} \times D}{\varepsilon \times b \times C}$$

$$SS(\mu mol/g) = \frac{N_2 - N_1}{2}$$

式中，SH 表示巯基含量（μmol/g）；SS 表示二硫键含量（μmol/g）；ε 为 DTNB 的摩尔吸光系数（1.36×10^4 L/mol·cm）；b 是光池路径长度（cm）；A_{412} 是样品在 412 nm 处的吸光度；D 是稀释倍数；C 为样品浓度（mg/mL）；N_1 是游离巯基含量（mol/g）；N_2 是总巯基含量（mol/g）。

1.2.8　扫描电子显微镜（SEM）　将制备好的生面条在−50 ℃ 冻干 24 h，备用。使用 SU151 扫描电子显

表 1 感官评价标准

Table 1 Sensory evaluation criteria

评价指标	满分	评分标准
色泽	20分	面条光亮(16~20分); 亮度一般(11~15分); 亮度差(1~10分)
表观状态	20分	表面光滑、有明显透明质感(16~20分); 表面较光滑、透明质感不明显(11~15分); 表面粗糙、明显膨胀(1~10分)
适口性	20分	软硬适中得分为(16~20分); 稍偏硬或软(11~15分); 太硬或太软(1~10分)
韧性	20分	韧性好(16~20分); 韧性一般(11~15分); 韧性差(1~10分)
食味	20分	具有小麦香味(16~20分); 基本无异味(11~15分); 有异味(1~10分)

微镜(SEM)观察其横断面的微观结构。将冻干的生面条自然掰断, 粘在导电胶上, 镀一层导电金膜后进行观察。电镜测定条件: 在 15 kV 加速电压下喷金处理 30 s, 在 300×放大倍数下观察[21]。

1.2.9 感官评价 根据 GB/T 35875-2018 对最佳蒸煮条件下的面条进行感官评分[22], 由 20 名经过培训的评价人员(男、女各 10 名, 年龄组成为 20~40 岁), 对各组面条进行品尝, 评价过程均独立完成、互不交流, 从色泽、表观状态、适口性、韧性、食味等面条的 5 个方面(表 1)进行评估打分。

1.3 数据处理

除另有说明, 所有实验至少重复 3 次, 结果以平均值±标准偏差表示, 数据使用 Origin 作图及 SPSS 进行显著性分析(P<0.05), 采用 Duncan 模型进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 葡萄籽原花青素对面团流变特性的影响

由图 1 可知, 面团的弹性模量(G')和粘性模量(G")随着 GSP 添加量的增大而增大, 且在频率测定范围内, G'始终高于 G", 表明面团体系具有典型的粘弹特性[23]。与空白组相比, G'和 G"均随 GSP 添加量的增加而增加, 当 GSP 添加量为 0.75% 时, G'和 G"达到最大值, 继续添加 GSP 后 G'和 G"又有所降低, 这与 Hayta 等[24] 研究结果保持一致。面筋网络主要是由大分子的麦谷蛋白通过非共价作用而形成[25], 在小麦粉中添加 GSP 后, 与面筋蛋白发生交联结合, 多个基团被激活, 导致相邻蛋白质之间相互作用增强, 形成的三维网络结构连续且更加致密, 面团的延伸性能得到提升。但在过量添加 GSP 后面团 G'和 G"下降, 粘弹性降低是因为 GSP 在面团的形成过程中与水分竞争面筋蛋白的结合位点, 结合水的能力下降所导致的[26]。GSP 的添加能改善面筋蛋白的流变特性, 对面筋蛋白网络结构的形成起促进作用, 从而增强面团的粘弹性。

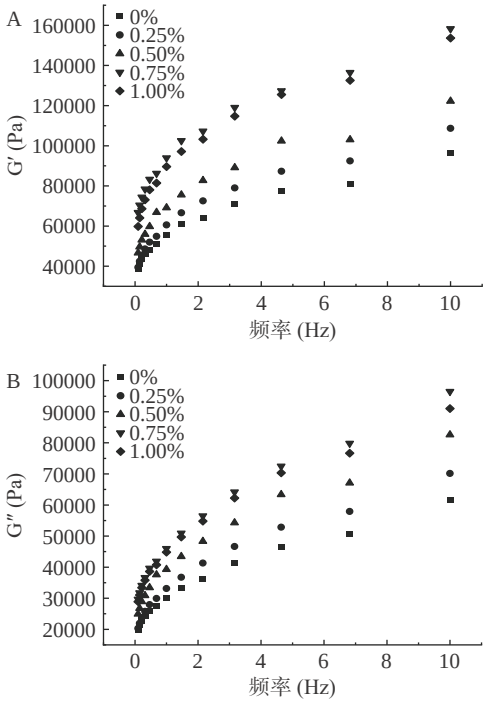


图 1 不同 GSP 添加量对面团流变特性的影响

Fig.1 Effect of different GSP addition on rheological properties of dough

注: A 为添加 GSP 面团的弹性模量 G'; B 为添加 GSP 面团的粘性模量 G"。

2.2 葡萄籽原花青素对面团水分分布的影响

小麦粉中的主要成分与水之间的相互作用会影响面团的可塑性和功能性, 且与面团的结构特性密切相关。利用 LF-NMR 检测出新鲜面团样品中的水分状态主要有三类: 结合水、半结合水和自由水, 如图 2 所示, 峰值 T_{21}、T_{22} 和 T_{23} 分别是它们的横向弛豫时间[27](见表 2)。添加 GSP 的面团中的主要水分状态是半结合水。添加 GSP 的样品与空白组相比横向弛豫时间 T_2 显著降低(P<0.05), T_2 值越小, 表明面团中水与大分子结合越紧密, 结合水和半结合水较多, 自由水较少; 反之, 表明面团中水与大分子结合松散, 自由水含量较多[28]。由表 2 可知, T_{22} 随 GSP 添加量的增加而减小, T_{22} 时峰值面积占总面积的比例

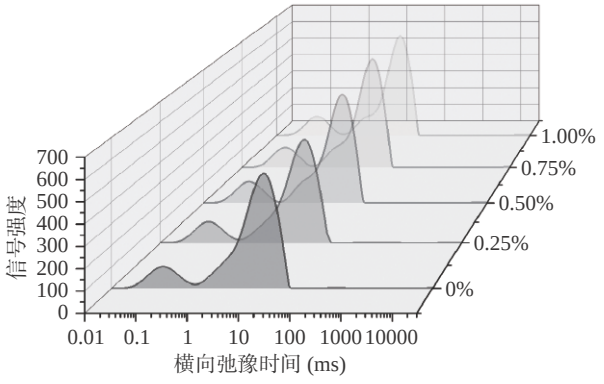


图 2 不同 GSP 添加量面团的水分分布

Fig.2 Water distribution of dough with different GSP addition

表 2　不同 GSP 添加量对面团水分分布的影响

Table 2　Effects of different GSP addition on water distribution of dough

GSP添加量(%)	T_{21}(ms)	T_{22}(ms)	T_{23}(ms)	A_{21}(%)	A_{22}(%)	A_{23}(%)
0	0.14±0.02^{a}	15.11±0.53^{a}	370.76±1.83^{a}	14.15±0.69^{b}	84.51±0.24^{c}	0.34±0.06^{a}
0.25	0.14±0.01^{a}	14.36±0.07^{b}	368.97±1.15^{b}	14.99±0.65^{a}	84.67±0.39^{b}	0.34±0.04^{a}
0.50	0.13±0.01^{a}	14.36±0.10^{b}	366.11±3.17^{c}	14.75±0.31^{a}	85.02±0.36^{b}	0.24±0.05^{b}
0.75	0.12±0.00^{a}	12.92±0.45^{c}	365.94±2.28^{bc}	14.18±0.15^{b}	85.65±0.16^{a}	0.17±0.01^{c}
1.00	0.11±0.01^{a}	13.51±0.89^{c}	364.44±2.10^{c}	14.73±0.26^{a}	85.11±0.26^{b}	0.17±0.00^{c}

注：表中数据为平均值±标准差，同列肩标字母不同表示数值之间具有显著性差异（P<0.05）；表3~表5同。

表 3　不同 GSP 添加量对面团 TPA 特性的影响

Table 3　Effects of different GSP addition on TPA characteristics of dough

添加量(%)	硬度(g)	弹性	粘附性(g·s)	咀嚼性	回复性
0	4823.20±69.17^{d}	0.27±0.01^{c}	−30.00±3.01^{c}	551.33±1.32^{a}	0.16±0.01^{a}
0.25	5377.36±92.85^{c}	0.29±0.01^{b}	−26.32±5.72^{c}	549.46±2.15^{ab}	0.16±0.02^{a}
0.50	5615.39±28.19^{bc}	0.30±0.02^{b}	−21.38±2.28^{bc}	548.00±1.07^{b}	0.15±0.01^{a}
0.75	5817.17±40.41^{b}	0.34±0.01^{a}	−16.54±2.99^{ab}	552.61±1.36^{a}	0.15±0.01^{a}
1.00	6198.86±176.04^{a}	0.33±0.02^{ab}	−11.83±1.59^{a}	547.39±2.67^{b}	0.14±0.01^{b}

A_{22} 增大，表明 GSP 增强了水与非水基质的相互作用，影响面团中水分分布，且提高了面条的保水性。推测 GSP 可能嵌入到淀粉-蛋白质面筋网络中，形成相对稳定的三维结构，更有效地限制水分子的运动，缩短弛豫时间，因此添加 GSP 更有利于面条质量的稳定性，这与 Han 等[29] 的研究结果一致。

2.3　葡萄籽原花青素对面团质构特性的影响

2.3.1　原花青素对面团 TPA 特性的影响　如表 3 所示，随着 GSP 添加量从 0.25% 增加到 1.00%，与空白组相比，添加 GSP 后面团的硬度、弹性、粘附性均显著提高（P<0.05），说明 GSP 明显增强了面团的凝胶强度；回复性仅在 1.00% GSP 添加量时显著降低（P<0.05），咀嚼性的变化与 GSP 添加量相关性不高。上述结果可能是由于 GSP 与蛋白质和淀粉发生共价和非共价相互作用，形成较强的疏水作用力和氢键，使面团形成了较强的凝胶网络[30−31]。这表明适当添加 GSP 能够改善面团的硬度、弹性和咀嚼性，总体上改善了面团的 TPA 特性。

2.3.2　葡萄籽原花青素对面团拉伸特性的影响　拉伸特性的测定结果见表 4。与空白组相比，随着 GSP 添加量从 0.25% 上升到 1.00%，面团的最大拉伸阻力、拉伸距离都有显著增大（P<0.05）；当添加量为 0.75% 时，其最大拉伸阻力和拉伸距离均达到最大值。拉伸阻力越大说明面团需要更大的力来拉伸，说明适量添加 GSP 对面团的拉伸性能有提升的作用，添加量为 0.75% 时效果最好，更加利于面条制品的制作，这与李华等[32] 的研究结果一致。当 GSP 添加量为 1.00% 时，跟 0.75% 相比有所下降，可能是因为 GSP 添加量过高抑制了二硫键的形成，对面筋网络结构反而造成一定程度的破坏[31]。

表 4　不同 GSP 添加量对面团拉伸特性的影响

Table 4　Effect of different GSP addition on tensile properties of dough

添加量(%)	最大拉伸阻力(g)	拉伸距离(mm)
0	38.60±0.31^{c}	19.71±0.08^{c}
0.25	40.60±0.07^{bc}	20.87±0.17^{c}
0.50	41.87±0.97^{bc}	26.88±0.69^{b}
0.75	45.82±2.08^{a}	30.87±1.12^{a}
1.00	44.10±2.31^{ab}	27.46±1.32^{b}

2.4　葡萄籽原花青素对面条蒸煮特性的影响

GSP 对面条蒸煮特性的影响见表 5。随着面条中 GSP 添加量的增大，其最佳蒸煮时间有明显增长，这表明 GSP 的加入增强了与面粉中成分之间的相互作用，可提高葡萄籽原花青素面条的耐煮性。断条率仅在添加量为 1.00% 时与空白组相比有显著升高（P<0.05），造成这一结果的主要原因是添加量过高之后反而减弱了 GSP 与面筋蛋白和二硫键的相互作用，因此，GSP 添加量过多会导致面筋网络结构的相互作用减弱，从而降低面筋的筋力，使得面条在蒸煮过程中断条率增大，这一结果与刘孙鹏[33] 的结果是一致的，但仍满足面条制作标准断条率≤5% 的要求。

表 5　不同 GSP 添加量对面条蒸煮特性的影响

Table 5　Effect of different GSP addition on cooking characteristics of noodles

添加量(%)	最佳蒸煮时间(min)	断条率(%)
0	3.86±0.10^{d}	0.00±0.00^{b}
0.25	4.33±0.18^{c}	0.83±1.43^{ab}
0.50	4.54±0.10^{bc}	1.67±1.43^{ab}
0.75	4.67±0.13^{ab}	2.50±0.00^{ab}
1.00	4.78±0.08^{a}	3.33±1.43^{a}

2.5　葡萄籽原花青素对面条消化特性的影响

GSP 对面条淀粉水解率的影响及面条的血糖生成指数分别见图 3 和表 6。由图 3 可看出，在面粉中添加 GSP 制成面条后，面条的淀粉水解率明显低于空白组，且随 GSP 添加量的增加而减小。水解率降低一是由于 GSP 通过改变面筋蛋白的网络结构来抑

制淀粉的消化，二是 GSP 与淀粉发生相互作用，占据了淀粉和消化酶的结合位点，阻碍淀粉的水解，进而降低淀粉的消化率[34]。由表 6 可知，随 GSP 添加量的增多，GI 值显著降低（P<0.05），空白组 GI 值为 68.45，当 GSP 添加量达到 1.00% 时，面条的 GI 值最低，为 61.73。这是因为淀粉的低水解率导致面条在体内不易被消化，从而降低了 GI 值。

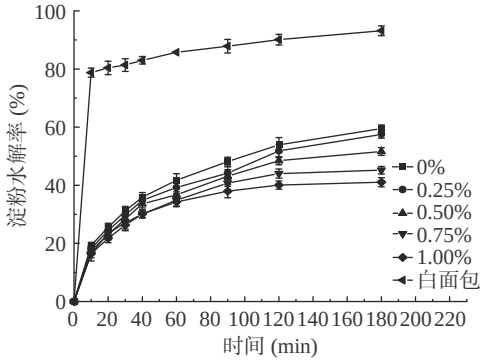


图 3 不同 GSP 添加量对面条消化特性的影响

Fig.3 Effect of different GSP addition on digestion characteristics of noodles

表 6 不同 GSP 添加量对面条血糖生成指数的影响

Table 6 Effect of different GSP addition on glycemic index of noodles

添加量（%）	0	0.25	0.50	0.75	1.00
GI	68.45±0.05^a	67.06±0.04^b	65.35±0.13^c	63.25±0.05^d	61.73±0.11^e

注：表中数据为平均值±标准差，同行肩标字母不同表示数值之间具有显著性差异（P<0.05）。

2.6 葡萄籽原花青素对游离巯基和二硫键含量的影响

由图 4 可知，随着 GSP 添加量的增加，面筋蛋白中二硫键的含量先增大后减小，游离巯基的变化趋势与之相反。当原花青素添加量为 0.75% 时，二硫键含量最高，游离巯基含量最低，与空白组相比有显著差异（P<0.05），说明 GSP 的添加促进了面筋蛋白分子中的游离巯基向二硫键的转化，然而 GSP 添加量为 1.00% 时，二硫键含量下降，游离巯基含量增多，表明 GSP 通过游离巯基和二硫键的交换反应，促进面筋蛋白网络的形成，使得面筋蛋白结构更紧密，但过量添加时，GSP 因通过竞争结合位点而抑制两者间的相互转化[7]。

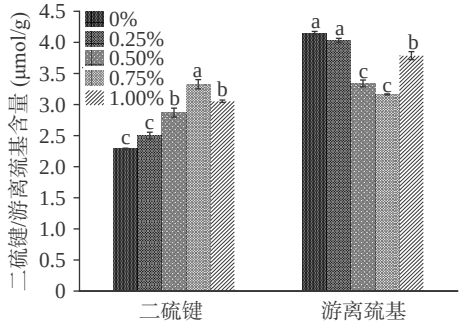


图 4 不同 GSP 添加量对二硫键和游离巯基含量的影响

Fig.4 Effect of different GSP addition on disulfide bond (SS) and the free thiol group (-SH)

注：图中字母不同表示数值之间具有显著性差异（P<0.05）；图 6 同。

2.7 葡萄籽原花青素对生面条微观结构的影响

麦谷蛋白作为整个面筋网络的坚实骨架支撑起整个结构，呈现连续的纤维状，而醇溶蛋白穿插在麦谷蛋白中，当淀粉颗粒浸入一个发达的面筋网络中，淀粉颗粒嵌入其中填充面筋网络，以维持面筋蛋白基质结构的稳定性[35]。从图 5 中可以看出，由于 GSP 添加量比例的提高，面筋蛋白的网络结构越来越致密，孔洞也相应减少；当 GSP 添加量为 0.75% 时，面筋蛋白的结构最为致密，这可能是因为 GSP 中的多酚类物质可以通过羟基、氢键、疏水作用力等方式与

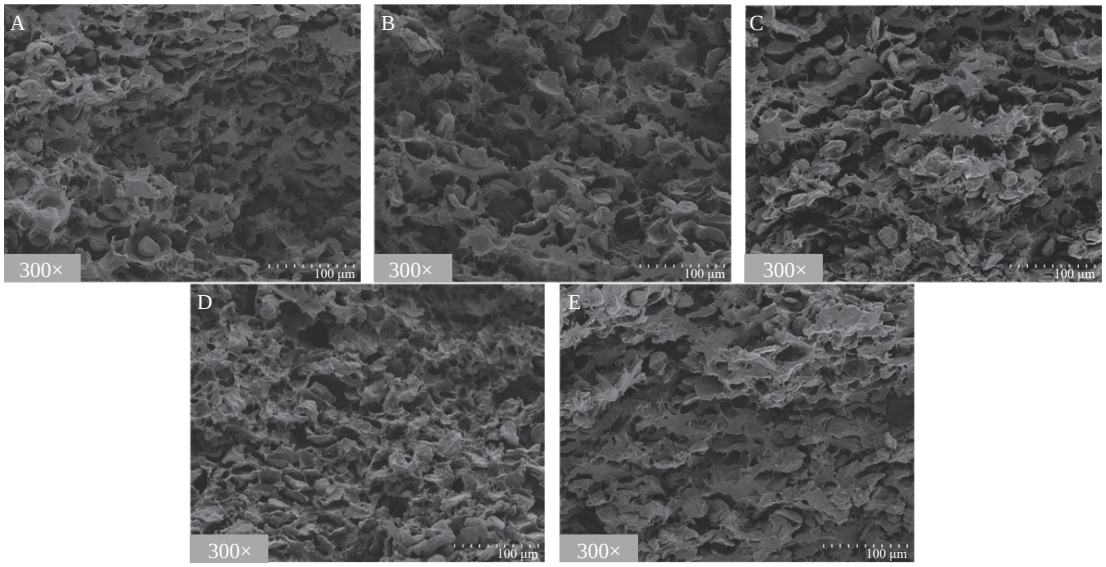


图 5 不同 GSP 添加量对面条微观结构的影响（300×）

Fig.5 Effect of microstructure on noodles with different GSP addition (300×)

注：A 为空白组；B~E 分别为 GSP 添加量 0.25%、0.50%、0.75%、1.00%。

面筋蛋白交联，较小的球状醇溶蛋白通过非共价键嵌入到麦谷蛋白形成的面筋骨架中，对面筋蛋白网络的形成起到了促进作用[30]。这与之前一项研究的结果相似，绿茶中的多酚和其他物质可以促进面筋网络结构的形成[29]。然而当添加量达到 1.00% 时，其结构又变得相对疏松，表明过量添加 GSP 会抑制面筋网络的形成，这与二硫键含量逐渐降低的结果相吻合。

2.8　葡萄籽原花青素对面条感官评价的影响

如图 6 所示，GSP 添加到小麦粉中，对面条的感官特性都产生了影响，除了韧性以外其他的指标都随添加量的增大先升高后降低，尤其是当 GSP 添加量为 0.75% 时，面条的感官评价总分最高为 92.30 分，相比其他组有显著差异（P<0.05），面条口感顺滑且软弹劲道，而添加量为 1.00% 时，面条的感官评价分反而降低，说明适量添加 GSP 可以有效提升面条的食用品质，添加量在 0.75% 时品质最佳。

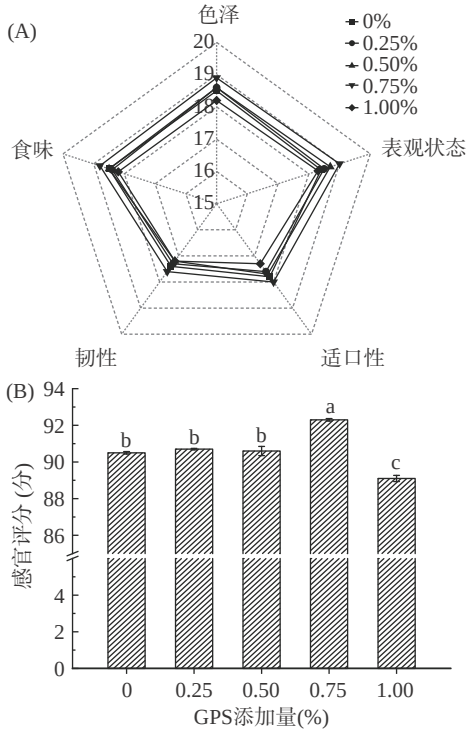


图 6　不同 GSP 添加量的面条感官评分雷达图（A）和感官评分（B）

Fig.6　Sensory rating radar (A) and sensory rating (B) on noodles with different GSP addition

3　结论

本文通过在小麦粉中添加 GSP 改善了面条的品质特性。面团的流变特性在随 GSP 添加量（0~0.75%）的增加而上升；面团水分分布的横向弛豫时间左移说明 GSP 的添加有利于面条质量的稳定性；面条的最佳蒸煮时间延长，即 GSP 的加入能够提高面条耐煮性，断条率只有在 1.00% 时有显著升高，但仍符合面条标准；硬度、弹性、粘附性、最大拉伸阻力和拉伸距离有所增大。随 GSP 添加量增加，面条 GI 从 68.45（添加量为 0）降到了 61.73（添加量为 1.00%），并且面条的淀粉水解率明显低于空白组，且随 GSP 添加量增加而下降；感官特性在 GSP 添加量为 0.75% 时，对面条食用品质特性的改善效果最佳，面条感官评分最高为 92.30 分。综上所述，适量添加 GSP 可以促进面筋网络的形成，同时降低面条的血糖生成指数，从而提升面条的食用品质，表明 GSP 作为具有潜质的面粉改良剂，可应用于面条生产和面制品行业。

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

参考文献

[1] GRAZYNA C, DARIUSZ D, URSZULA G, et al. Dandelion flowers as an additive to wheat bread: Physical properties of dough and bread quality[J]. Applied Sciences, 2022, 13(1): 477−477.

[2] 刘爱红, 李晓云, 陈洁. 魔芋保健面条的配方探究[J]. 湖北农业科学, 2021, 60(22): 139−142. [LIU A H, LI X Y, CHEN J. Konjac care formula of noodles to explore[J]. Journal of Hubei Agricultural Science, 2021, 60(22): 139−142.]

[3] 苏坤明. 营养强化米粉的制备及其品质评价[D]. 南昌: 南昌大学, 2012. [SU K M. Preparation and quality evaluation of nutritionally fortified rice flour[D]. Nanchang: Nanchang University, 2012.]

[4] 赵时珊, 蔡芳, 隋勇, 等. 紫薯-中筋复配粉的理化特性及其馒头制品品质分析[J]. 现代食品科技, 2023, 39(7): 209−217. [ZHAO S S, CAI F, SUI Y, et al. Physicochemical properties of purple sweet potato and middle gluten compound powder and analysis on quality of steamed bun products[J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(7): 209−217.]

[5] GIRARD A L, AWIKA J M. Effects of edible plant polyphenols on gluten protein functionality and potential applications of polyphenol-gluten interactions[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2020, 19(4): 2164−2199.

[6] ROOPCHAND D E, GRACE M H, KUHN P, et al. Efficient sorption of polyphenols to soybean flour enables natural fortification of foods[J]. Food Chemistry, 2012, 131(4): 1193−1200.

[7] 李瑞丽, 张玎婕, 赵琪, 等. 响应面法优化超声辅助浸提葡萄籽原花青素[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(15): 53−60. [LI R L, ZHANG D J, ZHAO Q, et al. Optimization of ultrasonic assisted extraction of grape seed proanthocyanidins by response surface method[J]. Food Research and Development, 2021, 42(15): 53−60.]

[8] 陈圣雄. 葡萄籽粉对面条品质的影响及其机理的研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2022. [CHEN S X. Study on effect of grape seed powder on noodle quality and its mechanism[D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2022.]

[9] 胡思. 茶多酚与面筋蛋白相互作用对生鲜面品质影响的研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2016. [HU S. Effect of interaction between tea polyphenols and gluten protein on quality of fresh noodles[D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2016.]

[10] TIAN C, ZHEN T Y, MA M, et al. Contribution of catechin monomers in tea polyphenols to the structure and physicochemical properties of wheat gluten and its sub-fractions[J]. Journal of Cereal Science, 2021, 101: 103306.

[11] 魏建林, 左文杰, 姚望. 单宁酸对小麦粉面筋改良效果的研究与优化[J]. 粮食科技与经济, 2018, 43(6): 70−72. [WEI J L, ZUO W J, YAO W. Tannins to wheat flour gluten effect of improve-

ment and optimization[J]. Journal of Food Science and Technology and Economy, 2018, 43(6): 70−72.]
[12] CHEN J R, XIAO J H, TU J, et al. The alleviative effect of sweet potato protein hydrolysates on the quality deterioration of frozen dough bread in comparison to trehalose[J]. LWT, 2023, 175: 114505.
[13] ZHU J C, LIU Z P, CHEN L. Impact of protein network restructured with soy protein and transglutaminase on the structural and functional characteristics of whole-grain highland barley noodle[J]. Food Hydrocolloids, 2022, 133: 107909.
[14] YANG Y L, GUAN E Q, ZHANG T J, et al. Behavior of wheat flour dough at different pretreated temperatures through rheological characteristics and molecular interactions of proteins[J]. Food Chemistry, 2023(404): 134188.
[15] GU Y J, QIAN X J, SUN B H, et al. Effects of gelatinization degree and boiling water kneading on the rheology characteristics of gluten-free oat dough[J]. Food Chemistry, 2023, 404: 134715.
[16] 钱晶晶. 添加剂对速冻熟面品质影响及其流变学特性研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2011. [QIAN J J. Effect of additives on quality and rheological properties of quick-frozen cooked noodles [D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2011.]
[17] 李刚凤, 田亚容, 李瑞琳, 等. 天麻面条抗氧化品质及体外淀粉消化性研究[J]. 粮食与油脂, 2022, 35(8): 121−125. [[LI G F, TIAN Y R, LI R L, et al. Study on antioxidant quality and starch digestibility of *Gastonia* noodles *in vitro*[J]. Food and Oil, 2022, 35(8): 121−125.]
[18] ENGLYST H N N, KINGMAN S M M, CUMMINGS J H H. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions[J]. European Journal of Clinical Nutrition, 1992, 46(Suppl 2): S33−50.
[19] 任婧, 李景富, 张佳, 等. 基于 3,5-二硝基水杨酸比色法建立一种快速测定总糖含量的方法[J]. 黑龙江科学, 2017, 8(10): 66−69. [REN J, LI J F, ZHANG J, et al. A rapid method for the determination of total sugar content based on 3,5-dinitrosalicylic acid colorimetry[J]. Heilongjiang Science, 2017, 8(10): 66−69.]
[20] ZHANG M L, MA M, YANG T B, et al. Dynamic distribution and transition of gluten proteins during noodle processing[J]. Food Hydrocolloids, 2022, 123: 107114.
[21] HONG T T, ZHANG Y, XU D, et al. Effect of sodium alginate on the quality of highland barley fortified wheat noodles[J]. LWT, 2021, 140: 110719.
[22] 张林华, 张红玉, 谢凯文, 等. 探究后处理工艺对藜麦挤压面条品质的影响[J]. 中国粮油学报, 2024, 39(4): 110−118. [ZHANG L H, ZHANG H Y, XIE K W, et al. Explore post-treatment technology impact on quinoa extrusion noodle quality[J]. Chinese Journal of Grain and Oil, 2024, 39(4): 110−118.]
[23] KUANG J W, MA W H, PU H Y, et al. Control of wheat starch rheological properties and gel structure through modulating granule structure change by reconstituted gluten fractions[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 193(Pt B): 1707−1715.
[24] HAYTA M, SCHOFIELD J D. Dynamic rheological behavior of wheat glutens during heating[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2005, 85(12): 1992−1998.
[25] 汲言山, 赵友梅, 秦礼谦. 小麦蛋白质的加热效应[J]. 郑州粮食学院学报, 1993(1): 15−20. [JI Y S, ZHAO Y M, QIN L Q. Heating effect of wheat protein[J]. Journal of Zhengzhou Grain University, 1993(1): 15−20.]
[26] 皮俊翔. 茶多酚对面筋蛋白网络结构影响机制的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2021. [PI J X. Tea polyphenols of gluten network structure influence mechanism research[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021.]
[27] YU X L, WANG Z H, ZHANG Y Q, et al. Study on the water state and distribution of Chinese dried noodles during the drying process[J]. Journal of Food Engineering, 2018, 233: 81−87.
[28] LI M, LUO L J, ZHU K X, et al. Effect of vacuum mixing on the quality characteristics of fresh noodles[J]. Journal of Food Engineering, 2012, 110(4): 525−531.
[29] HAN C W, MA M, ZHANG H H, et al. Progressive study of the effect of superfine green tea, soluble tea, and tea polyphenols on the physico-chemical and structural properties of wheat gluten in noodle system[J]. Food Chemistry, 2020(308): 125676.
[30] JIANG T, WANG H, XU P H, et al. Effect of grape seed proanthocyanidin on the structural and physicochemical properties of bread during bread fermentation stage[J]. Current Research in Food Science, 2023, 7: 100559.
[31] LI Y Q, LI X, JIANG X T, et al. Effect of anthocyanins on mechanical and physicochemical properties of wheat dough[J]. Journal of Cereal Science, 2023, 110: 103652.
[32] 李华, 张珂. 茶多酚 EGCG 对面条面团流变学特性的影响研究[J]. 中国食品添加剂, 2017(6): 133−137. [LI H, ZHANG K. Effect of tea polyphenol EGCG on rheological properties of noodle dough[J]. Chinese Food Additives, 2017(6): 133−137.]
[33] 刘孙鹏. 添加多酚提取物对传统发酵拉制挂面品质的影响研究[D]. 成都: 成都大学, 2022: 21−23. [LIU S P. Study on the effect of polyphenol extract on the quality of traditional fermented pulled noodles[D]. Chengdu: Chengdu University, 2022: 21−23.]
[34] 李驰, 姚佳, 韩乔, 等. 马铃薯淀粉消化特性及多酚对其影响研究进展[J]. 食品科技, 2022, 47(12): 221−227. [LI C, YAO J, HAN Q, et al. Potato starch digestibility and the influence of polyphenols research progress[J]. Journal of Food Science and Technology, 2022, 47(12): 221−227.]
[35] HAN C W, MA M, LI M, et al. Further interpretation of the underlying causes of the strengthening effect of alkali on gluten and noodle quality: Studies on gluten, gliadin, and glutenin[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 103: 105661.

赵晨晨, 吕家慧, 刘畅, 等. 不同粒径多花黄精粉物理特性及体外模拟胃肠消化特性研究 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 93−102. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023120331
ZHAO Chenchen, LÜ Jiahui, LIU Chang, et al. Physical Properties and *in Vitro* Simulated Gastrointestinal Digestion Characteristics of *Polygonatum cyrtonema* Hua Powder with Different Particle Sizes[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 93−102. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023120331

· 研究与探讨 ·

不同粒径多花黄精粉物理特性及体外模拟胃肠消化特性研究

赵晨晨[1], 吕家慧[1], 刘　畅[1], 童若楠[1], 王梦锦[1], 刘　恒[1], 邢丽花[1,2], 于　娇[3], 耿璐娜[4,5], 俞年军[1,2,5,*]
(1.安徽中医药大学药学院, 安徽合肥 230012;
2.省部共建安徽道地中药材品质提升协同创新中心, 安徽合肥 230012;
3.亳州学院, 安徽亳州 236800;
4.安徽敬道生物科技有限公司, 安徽亳州 236814;
5.直接口服中药饮片亳州市重点实验室, 安徽亳州 236000)

摘　要: 为探究超微粉碎处理对多花黄精粉特性的影响, 本文采用粉碎过筛处理制备不同粒径（50、100、200、325 目）多花黄精粉末, 并用扫描电子显微镜及傅里叶红外光谱对其物理特性开展研究, 同时模拟体外胃肠消化过程。结果表明, 经过粉碎及过筛处理后, 多花黄精粉粒径大小具有显著性差异（P<0.05）。粉碎过程仅破坏了粉体的表面结构, 并未破坏粉体的分子结构。多花黄精粉的休止角、溶解度随粒径的减小不断增加, 而堆密度、润湿时间、持水力不断下降。此外, 粉碎度为 200 目（75 μm, 超微粉Ⅰ）的粉体活性物质多糖含量为 15.37%, 显著高于其他样品（P<0.05）。体外模拟胃肠消化过程中, 粉碎度为 200 目（75 μm, 超微粉Ⅰ）的粉体多糖释放量最高, 且具有一定体外抗氧化能力。综上, 多花黄精粉碎时粉体过 200 目筛时, 多糖释放量最高。本实验为多花黄精粉末的产业化应用提供了理论依据。

关键词: 多花黄精, 超微粉, 粒径, 粉体特性, 模拟胃肠消化, 抗氧化
中图分类号: TS219　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2024)21−0093−10
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023120331
本文网刊:

Physical Properties and *in Vitro* Simulated Gastrointestinal Digestion Characteristics of *Polygonatum cyrtonema* Hua Powder with Different Particle Sizes

ZHAO Chenchen[1], LÜ Jiahui[1], LIU Chang[1], TONG Ruonan[1], WANG Mengjin[1], LIU Heng[1], XING Lihua[1,2], YU Jiao[3], GENG Luna[4,5], YU Nianjun[1,2,5,*]
(1.School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China;
2.MOE-Anhui Joint Collaborative Innovation Center for Quality Improvement of Anhui Genuine Chinese Medicinal Materials, Hefei 230012, China;
3.Bozhou University, Bozhou 236800, China;
4.Anhui Jingdao Biotechnology Co., Ltd., Bozhou 236814, China;
5.Bozhou Key Laboratory of Direct Oral Chinese Medicine Slices, Bozhou 236000, China)

Abstract: To investigate the functional effects of superfine grinding treatment on *Polygonatum cyrtonema* Hua powder, in this study, the sample was ground and sieved by pharmacopoeia test sieves (50, 100, 200 and 325 mesh) to prepare *P. cyrtonema* Hua powder with different particle sizes. Its physical properties were studied using scanning electron microscopy

收稿日期: 2023−12−27
基金项目: 安徽省重大科技专项项目（202003a07020011）; 直接口服中药饮片亳州市重点实验室开放基金项目（ZFYP20211205）。
作者简介: 赵晨晨（1997−）, 男, 硕士, 研究方向: 中药资源评价, E-mail: 1731681134@qq.com。
*** 通信作者:** 俞年军（1965−）, 男, 硕士, 教授, 研究方向: 中药资源评价, E-mail: ynj2005288@sina.com。

and Fourier transform infrared spectroscopy, while the *in vitro* gastrointestinal digestion process was simulated. The results showed that the particle size of *P. cyrtonema* Hua powder exhibited a significant difference (P<0.05) following grinding and sieving treatment. The grinding process only destroyed the surface structure of the powder, but did not destroy the molecular structure of the powder. The angle of repose and solubility of *P. cyrtonema* Hua powder exhibited a continuous increase with decreasing particle size, while bulk density, wettability and water holding capacity showed a decreasing trend. Additionally, the polysaccharide content of the sample with 200 mesh (15.37%) was significantly higher than that of other samples (P<0.05). Moreover, the polysaccharide release content of the powder with 200 mesh (75 μm, ultrafine powder Ⅰ) during *in vitro* gastrointestinal digestion was higher than that of other powders. Ultrafine powder Ⅰ also had a certain antioxidant ability. In summary, when the powder of *P. cyrtonema* Hua is sieved by 200 mesh sieve, the content of polysaccharide released is the highest. This experiment provides a theoretical basis for the practical application of *P. cyrtonema* Hua powders.

Key words: *Polygonatum cyrtonema* Hua; superfine powder; particle size; powder properties; simulate gastrointestinal digestion; antioxidants

多花黄精(*Polygonatum cyrtonema* Hua)为百合科黄精属多年生草本植物,在我国主要分布于四川、贵州、安徽等地,其中安徽省为其主要产区之一[1]。多花黄精(*P. cyrtonema* Hua)同滇黄精(*Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl.)、黄精(*Polygonatum sibiricum* Red.)为中药黄精的基源植物,其干燥根茎即为中药黄精,为药食同源,应用历史悠久,具有补气养阴、健脾、润肺、益肾的功效[2]。黄精主要成分包含多糖、甾体皂苷类、黄酮类等[3−6],其中多糖为黄精的主要质量评价指标,2020 版《中国药典》记载黄精多糖含量不得低于 7.0%。黄精药材具有增强免疫[7]、抗衰老[8]、抗炎[9]、抗氧化[10]、抗糖尿病[11]、抗抑郁[12]等作用,具有很高的药用及保健价值。

超微粉碎是采用现代物理或化学方法对材料进行微粉化的一种手段,可以使产品粒度达到微米级。研究表明超微粉碎技术可以提高药材活性成分的溶出率及其生物利用率,厚朴、铁皮石斛等研究印证了中药材经过超微粉碎,具有提高中药成分溶出度、生物利用度及增强疗效等优势[13−14]。目前,黄精粉的研究焦点主要是探讨通过清蒸、酒蒸、九蒸九晒等多种传统加工方法处理后,不同粒径黄精粉在粉体物理特性以及体外溶出度方面的对比研究[15−17]。此外,黄精的超细粉末可以通过调节肠道微生物及其代谢产物来改善 MH 大鼠的血压和血脂代谢异常状况,从而有助于缓解相关的代谢紊乱问题[18],但有关多花黄精不同粒径粉体的外观形貌、溶解度、体外模拟胃肠消化过程及其活性变化的考察方面的研究较少。因此,本实验通过粉碎过筛处理制备不同粒径的多花黄精粉末,对不同粒径粉末的粒度分布、微观结构、粉体学性质、多糖含量进行考察,并通过模拟体外胃肠消化系统评价不同粒径多花黄精粉在胃肠消化过程中多糖的释放规律,采用 DPPH 自由基和羟自由基清除能力考察其抗氧化能力变化,为多花黄精的产品开发及利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

多花黄精(批号 20220508) 安徽省青阳县九华中药材科技有限公司,经安徽中医药大学俞年军教授鉴定为多花黄精 *Polygonatum cyrtonema* Hua 干燥根茎,符合《中华人民共和国药典(2020 版)》一部各项规定;D-无水葡萄糖 中国食品药品鉴定研究院;其他试剂均为分析纯。

Nicolet IS5 傅里叶红外光谱仪、Multiskan FC 多功能酶标仪 美国赛默飞世尔科技公司;Ultra plus 场发射扫描电镜 德国卡尔蔡司公司;Mastersizer 2000 激光粒度仪 英国马尔文仪器有限公司;UV-5100 紫外可见分光光度计 上海元析仪器有限公司;HC-1000Y 多功能粉碎机 永康市诺邦富贸易有限公司;GT100X 球磨仪 北京格瑞德曼仪器设备有限公司;S400 pH 计 梅特勒-托利多集团。

1.2 实验方法

1.2.1 多花黄精粉体制备及粒径测定 将多花黄精样品于多功能粉碎机中粉碎,过药典三号筛(50 目,355 μm)得多花黄精粗粉。将粗粉在球磨仪中(2000 r/min, 1 min),多次研磨依次分级过筛 100 目(150 μm)、200 目(75 μm)、325 目(45 μm),得到多花黄精细粉、超微粉Ⅰ、超微粉Ⅱ。经 Mastersizer 2000 激光粒度仪采用湿法测定粒径,分散剂为乙醇,超声辅助分散。记录 D10、D50、D90,并根据公式(1)计算粒度分布跨度值 span。

$$\text{span} = \frac{D90 - D10}{D50} \quad \text{式(1)}$$

1.2.2 多花黄精不同粉体微观结构的测定

1.2.2.1 微观形态观察 取制备好的 50、100、200、325 目多花黄精粉体适量,分别固定于载物台上,将样品置于 Ultra plus 场发射扫描电子显微镜下进行形貌特征观察。加速电压 2 kV,放大倍数为 500~5000 倍。

1.2.2.2 傅里叶变换红外光谱(FT-IR)分析 取制备好的 50、100、200、325 目多花黄精粉体,按照粉末∶溴化钾(1∶100)比例混合,研磨、压片,然后放入 Thermo Nicolet IS5 红外光谱仪中扫描。样品扫描波数为 4000~400 cm^{-1},扫描次数为 32 次,分辨率为 4 cm^{-1}。

1.2.3　多花黄精不同粉体理化特性

1.2.3.1　休止角与堆密度测定　多花黄精粉休止角及堆密度的测定参考吴其国等[15]的方法，并稍作修改。将漏斗固定于铁架台上，下放一张绘图纸，漏斗底端距离纸平面约 5 cm。将 10 g 多花黄精粉倒入漏斗中，使其垂直下落至纸平面，自然堆积，待其形成直径最大的圆锥体为止，记录此时圆锥体的直径(D)和高度(H)。各样品平行操作 3 次，取平均值。休止角按照公式(2)计算：

$$\tan\theta = \frac{2H}{D} \qquad 式（2）$$

式中：H 为圆锥体的高度，cm；D 为圆锥体的直径，cm。

精密称定量筒质量(M_1)，将一定体积多花黄精粉末通过漏斗匀速倒入量筒，精密称定此时量筒的质量(M_2)，并记录粉末体积(V)。各样品平行操作 3 次，取平均值。堆密度按照公式(3)计算：

$$\rho(g/mL) = \frac{M_2 - M_1}{V} \qquad 式（3）$$

式中：M_1 为量筒的质量，g；M_2 为量筒加粉末的质量，g；V 为粉末体积，mL。

1.2.3.2　润湿性、持水力的测定　多花黄精粉润湿性及持水力的测定参考张珍林等[19]的方法。向直径为 10 cm 的培养皿中加入 50 mL 水，然后加入 0.1 g 多花黄精粉，记录粉末被水完全润湿的时间 t(s)。各样品平行操作 3 次，取平均值。参考此结果进行不同粒径多花黄精粉的润湿性比较。

精密称定多花黄精粉末 0.1 g(M_1)，置 15 mL 离心管中，加入 10 mL 水，并于 60 ℃ 恒温水浴 30 min，再冰水浴 30 min，4000 r/min 离心 15 min，弃去上清液，称定样品湿重(M_2)。各样品平行操作 3 次，取平均值。持水力按照公式(4)计算：

$$持水力(\%) = \frac{M_2 - M_1}{M_1} \times 100 \qquad 式（4）$$

式中：M_1 为粉末质量，g；M_2 为粉末湿重，g。

1.2.3.3　溶解性测定　多花黄精粉溶解性的测定参考蔡肖等[20]方法并稍作修改。精密称定多花黄精粉 0.5 g，加入 100 mL 超纯水，恒温(分别 40、70、100 ℃)磁力搅拌 30 min，减压抽滤，残渣烘干后称量。各样品平行操作 3 次，取平均值。溶解度按照公式(5)计算：

$$溶解度(\%) = \left(1 - \frac{M_2}{M_1}\right) \times 100 \qquad 式（5）$$

式中：M_1 为多花黄精粉末质量，g；M_2 为烘干后残渣质量，g。

1.2.4　多花黄精不同粉体多糖含量测定

1.2.4.1　溶液的制备　按照徐如静等[21]的实验方法制备多花黄精供试品溶液、葡萄糖对照品溶液及 5% 苯酚溶液。葡萄糖对照品溶液制备：称取 105 ℃ 干燥至恒重的 33.00 mg D-无水葡萄糖，用超纯水溶解，定容至 100 mL，即得 0.33 mg/mL 的对照品溶液；供试品溶液制备：取圆底烧瓶，各加入 0.25 g 多花黄精不同粒径粉末，加 80% 乙醇 150 mL，水浴回流 1 h，趁热滤过，残渣用 80% 热乙醇洗涤 3 次。将残渣及滤纸置圆底烧瓶中，加水 150 mL，水浴回流，滤过，残渣及烧瓶用超纯水洗涤 4 次，合并滤液及洗液，纯水定容至 250 mL。5% 苯酚溶液制备：精密称取 5.00 g 苯酚，溶解于 100 mL 超纯水中，得到 5% 苯酚溶液。

1.2.4.2　标准曲线的建立　参照徐如静等[21]的实验方法建立葡萄糖的标准曲线：精密量取对照品溶液 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mL 于试管中，各加入超纯水至 2.0 mL，精密加入 5% 苯酚溶液 1 mL 和浓硫酸 7 mL，沸水浴 30 min 后冰水浴 10 min，摇匀，490 nm 处测定其吸光度。

1.2.4.3　多糖含量测定　分别取不同粒径的多花黄精粉末(各 6 份)，按照 1.2.4.1 中供试品溶液制备方法制备样品溶液。精密吸取样品溶液 1.0 mL，按照 1.2.4.2 项下苯酚-硫酸法进行显色，在 490 nm 波长下测定吸光度，并根据所建立的标准曲线计算多花黄精不同粒径粉末多糖含量。

1.2.5　多花黄精不同粉体体外模拟胃、肠消化模型建立

1.2.5.1　体外胃消化模拟　采用洪晴悦[22]和杨明琛等[23]方法稍作修改建立体外模拟胃消化模型。称取 3.10 g NaCl、0.17 g $CaCl_2$、1.12 g KCl、0.60 g $NaHCO_3$，超纯水溶解，定容至 1 L，并用 1 mol/L HCl 调节 pH 为 2.0。向上述溶液中加入 1.60 g 胃蛋白酶(10000 U/g)，溶解，静置过夜后，即得胃消化液。分别取 100 mL 的胃消化液，加入不同粒径多花黄精粉末 0.20 g，于 37 ℃，20 r/min 恒温水浴条件下，避光孵育 2 h。孵育过程中，分别在 5、10、15、30、45、60、90、120 min 时移取消化液 3 mL，沸水浴 2 min，灭酶活，待测多糖含量。

1.2.5.2　体外肠道消化模拟　采用洪晴悦[22]和王宗玄等[24]方法稍作修改建立体外模拟肠消化模型。称取 0.54 g NaCl、0.35 g $CaCl_2$、0.66 g KCl，超纯水溶解，定容至 1 L，并用 1 mol/L NaOH 调节 pH 为 7.0。向上述溶液中加入 0.41 g 胰蛋白酶(2500 U/mg)，溶解，即得肠道消化液。取胃消化模拟 45 min 的样品，向其中加入 50 mL 肠道消化液，于 37 ℃，20 r/min 恒温水浴条件下，避光孵育 1.5 h。孵育过程中，分别在 0、5、10、15、30、45、60、90 min 时移取消化液 3 mL，沸水浴 2 min，灭酶活，待测多糖含量。

1.2.6　多花黄精不同粉体经体外模拟胃肠消化后多糖释放量测定　对照品溶液的制备同 1.2.4.1，精密称定 33.00 mg D-无水葡萄糖，100 mL 超纯水溶解，即得。

标准曲线的建立：同“1.2.4.2 标准曲线的建立”，精密量取对照品溶液 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 于试管中，各加入超纯水至 2.0 mL，加入 5% 苯酚溶液 1 mL 和浓硫酸 7 mL，沸水浴 30 min 后冰水浴 10 min，摇匀，490 nm 处测定其吸光度。

供试品溶液的制备：取各阶段的消化液样品，离心（4000 r/min，15 min），取上清夜。每组精密量取 0.5 mL 溶液稀释到 5.0 mL，即得供试品溶液。

含量测定：精密量取供试品溶液 1.0 mL，采用苯酚-硫酸法测定各消化液中多糖含量。方法同标准曲线的建立步骤。

1.2.7 多花黄精不同粉体经体外模拟胃肠消化后抗氧化活性比较

1.2.7.1 DPPH 自由基清除率的测定 参照关媛等[25]和陈丽叶等[26]的方法，并稍作修改。取 1.2.5.1 和 1.2.5.2 胃肠消化液样品，离心（4000 r/min，15 min），取上清液。取 2 mL 上清液，加入 0.1 mmol/L 的 DPPH-乙醇溶液 2 mL，充分混匀，37 ℃ 黑暗条件下静置 30 min。以维生素 C 作为阳性对照。在 517 nm 处测定样品溶液的吸光度，并根据公式(6)计算。

$$\text{DPPH·清除率}(\%)=\frac{[A_0-(A_1-A_2)]}{A_0}\times 100 \quad \text{式（6）}$$

式中：A_0：DPPH-乙醇溶液的吸光度；A_1：样品和 DPPH-乙醇溶液的吸光度；A_2：样品溶液的吸光度。

1.2.7.2 羟自由基清除率的测定 参照陈丽叶等[26]的方法，并稍作修改。取 1.2.5.1 和 1.2.5.2 胃肠消化液样品，离心（4000 r/min，15 min），取上清液。在试管中分别加入 1 mL 上清液、1 mL $FeSO_4$ 溶液（9 mmol/L）和 1 mL H_2O_2 溶液（9 mmol/L），摇匀，室温放置 10 min，然后加入 1 mL 水杨酸-乙醇溶液（9 mmol/L），摇匀，37 ℃ 水浴 30 min，取出，冷却至室温，3000 r/min 离心 20 min。以维生素 C 作为阳性对照。在 510 nm 处测定样品溶液的吸光度，并根据公式(7)计算。

$$\text{羟自由基清除率}(\%)=\frac{[A_0-(A_1-A_2)]}{A_0}\times 100 \quad \text{式（7）}$$

式中：A_0：空白对照组的吸光度（消化液代替样品）；A_1：样品组吸光度；A_2：样品对照组的吸光度（水代替水杨酸）。

1.3 数据处理

实验数据均为 3 次平行实验，实验结果以平均值±标准差表示。采用 Graphpad prism 及 SPSS 17.0 软件进行作图及统计分析，$P<0.05$ 表示数据具有统计学显著差异。

2 结果与分析

2.1 多花黄精不同粉体粒径分布

由表 1 结果所示，多花黄精粉体依次分别通过 50、100、200 和 325 目筛获得的粗粉、细粉、超微粉Ⅰ、超微粉Ⅱ的粒径有显著性差异（$P<0.05$）。与粗粉相比，细粉、超微粉Ⅰ、超微粉Ⅱ的 D50 由 333.72 μm 降低到 16.70 μm。随着粒径的减小，多花黄精粉的体积平均粒径显著降低（$P<0.05$），由 333.55 μm 减小到 20.27 μm；而比表面积显著升高（$P<0.05$）。span 为跨度值，其数值越小，表明粒径分布越窄，粒径越均匀。不同粒径粉体的 span 值具有显著性差异（$P<0.05$），以粗粉的分布均匀性最佳，超微粉Ⅰ的粒径均匀性相对较差。超微粉Ⅰ的颗粒均匀性相对较差可能与粉体过筛的筛网目数有关，其过筛范围是 200~325 目，相对其他粉体来说跨度相对较大。这一结果与粉碎对核桃青皮粉的粒径影响一致，过 100 和 200 目筛的核桃青皮粉较过 40、60、80 目粉体的颗粒均匀性相对较差[27]。实验结果表明粉碎处理能够有效提高粉体的粉碎程度，且不同粉体的粒径具有显著性差异。

2.2 多花黄精不同粉体结构特征

2.2.1 扫描电子显微镜微观形态观察 通过场发射扫描电镜检测了多花黄精粉的形貌和表面特征（图 1）。随着粉体粒径不断变小，粉体的颜色由黄色逐渐变为灰白色。A（粗粉）和 B（细粉）颗粒尺寸较大，形状不规则，粉末特性较为完整。C（超微粉Ⅰ）和 D（超微粉Ⅱ）相较于粗粉和细粉，颗粒尺寸明显变小，且粉末之间有轻微聚集。粉碎程度增大，其比表面积随之增大，从而增加了粉末的表面能，在粉末表面产生了大量极性基团。因此，表面凝聚力增加，从而使粉末更容易吸附和团聚[28]。粉末的粉碎程度能够有效地改变其表面结构[29]。以上结果表明，粉碎程度增加会在一定程度上破坏多花黄精的组织结构，影响其物理化学性质，可能影响有效成分的溶出。

2.2.2 红外光谱（FT-IR）分析 不同粒径多花黄精粉末在 4000~400 cm^{-1} 范围内的 FT-IR 光谱特征如图 2 所示。超微粉碎后，不同粒径多花黄精粉的峰位置和形状基本相似。说明超微粉碎对多花黄精粉

表 1 不同多花黄精粉体的粒径大小

Table 1 Particle size of different *P. cyrtonema* Hua powder

样品	D10（μm）	D50（μm）	D90（μm）	体积平均粒径（μm）	比表面积（$m^2·g^{-1}$）	span
粗粉	207.81±1.44^a	333.72±2.05^a	485.76±3.16^a	333.55±2.09^a	0.05±0.01^d	0.83±0.01^c
细粉	15.29±0.21^b	104.62±1.16^b	208.94±2.85^b	109.18±1.16^b	0.17±0.01^c	1.85±0.01^b
超微粉Ⅰ	6.81±0.02^c	25.91±0.15^c	72.95±0.67^c	33.71±0.22^c	0.45±0.01^b	2.56±0.03^a
超微粉Ⅱ	5.98±0.43^c	16.70±0.01^d	37.48±1.62^d	20.27±0.32^d	0.56±0.03^a	1.89±0.12^b

注：同列不同字母代表有统计学显著性差异（$P<0.05$）。

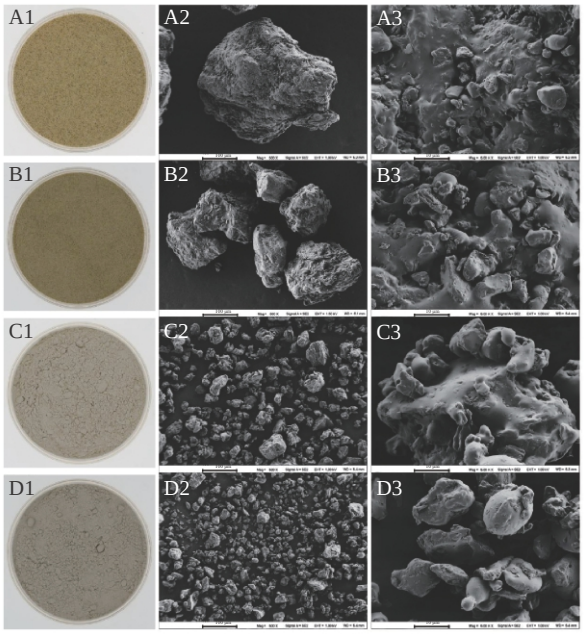


图 1　不同粒度多花黄精粉末的照片和扫描电镜图像

Fig.1　Photos and SEM images of *P. cyrtonema* Hua powder with different particle sizes

注：A1~D1：多花黄精粉末照片，A2~D2：多花黄精粉末电镜扫描图像（500×），A3~D3：多花黄精粉末电镜扫描图像（5000×）。

中的官能团没有明显影响。在波数 3394 cm^{-1} 处出现一个圆滑的峰，是由纤维素和半纤维素中-OH 的伸缩振动产生的[27]。2924 cm^{-1} 附近的吸收峰由多糖类亚甲基上的 C-H 的收缩振动产生；在 1631 cm^{-1} 附近出现的吸收峰可能是 C=O 的特征峰，表明多花黄精粉中糖醛酸含有较多[30]；在 1023 cm^{-1} 处出现的强吸收峰可能是 C-O 的特征峰[31]。这与超细粉碎对蘑菇[28]、方竹笋[30]、三七[32] 等的研究结果一致，超细粉碎没有改变主要特征峰，未改变粉体的分子结构。

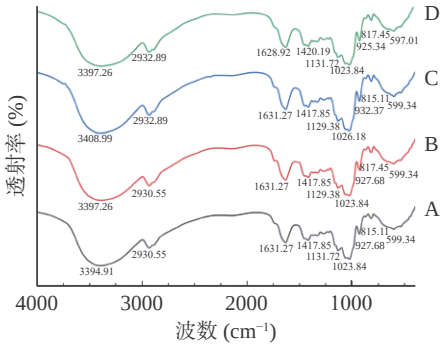


图 2　不同粒径多花黄精粉末的傅里叶红外光谱图

Fig.2　Fourier infrared spectra of *P. cyrtonema* Hua powder with different particle sizes

注：A：粗粉，B：细粉，C：超微粉Ⅰ，D：超微粉Ⅱ。

2.3　多花黄精不同粉体物理特性

休止角是评价粉体流动性的一个重要因素，休止角数值越小，表明粉体的流动性越好[33]。由表 2 可知，多花黄精粉体随着粒径不断变小，粉体的休止角呈不断变大的趋势，由粗粉休止角 24.52°增大至超微粉Ⅱ 55.25°，且不同粒径粉体之间的休止角均具有显著性差异（P<0.05）。多花黄精粉体粒径越小，休止角不断增大的原因可能是随着粉体粒径的减小，粉体的比表面积增大，粉体黏着性增大，使得粉体流动性变差，从而导致休止角变大[34]。这一结果与扫描电镜结果相一致，随着粒径变小，粉体间具有一定的聚集现象。

表 2　不同粒径多花黄精粉体的物理特性

Table 2　Physical properties of *P. cyrtonema* Hua powder with different particle sizes

样品	粗粉	细粉	超微粉Ⅰ	超微粉Ⅱ
休止角（°）	24.52±1.62^{d}	31.24±0.80^{c}	44.19±1.39^{b}	55.25±1.14^{a}
堆密度（g/mL）	0.799±0.00^{a}	0.755±0.01^{b}	0.515±0.01^{c}	0.414±0.01^{d}
润湿性（s）	286.33±1.70^{a}	169.33±0.94^{b}	140.67±1.70^{c}	84.00±1.63^{d}
持水力（%）	3.47±0.53^{a}	3.38±0.22^{a}	3.16±0.18^{a}	1.75±0.09^{b}

注：同行不同字母代表样品间的显著差异（P<0.05）。

堆密度是反映粉体学性质的一个重要指标，与粉体的黏着力和流动性有一定的关系，对于制剂有重要意义[35]。多花黄精随着粉体粒径不断变小，堆密度也呈现逐渐变小的趋势，由粗粉堆密度 0.799 g/mL 变小至超微粉Ⅱ 0.414 g/mL，且不同粒径粉体之间的堆密度均具有显著性差异（P<0.05）。这可能是由于多花黄精粉体粒径减小时，粉体间的黏着性增大，出现架空、空洞等堆积效应，导致粉体间空隙增大，从而使堆密度降低[36]。相较于粗粉，超微粉粉体间空隙增大，具有较好的填充性能，在直接压片时具有更好的可压性和塑性[37]。

润湿性是与固体制剂溶解性和崩解性有关的重要的物理性质，也是评价粉末加工性能的一个重要指标。在平行条件下，粉体完全润湿所需要的时间越短，则对应粉体的润湿性越好[38]。多花黄精随着粉体粒径不断变小，粉体完全润湿所需要的时间呈现不断变少的趋势，由粗粉的 286.33 s 变小为超微粉Ⅱ的 84.00 s，且不同粒径粉体之间的润湿性均具有显著性差异（P<0.05）。超微粉的润湿性强于粗粉和细粉，这也说明超微粉拥有更好的速溶性。

多花黄精随着粉体粒径不断变小，持水力也呈现逐渐变小的趋势，由粗粉持水力 3.47% 变小至超微粉Ⅱ 1.75%，且粗粉、细粉、超微粉Ⅰ间持水力无显著性差异（P>0.05）。结果表明，随着粉体粒径减小，多花黄精粉体的持水能力逐渐下降，超微粉Ⅱ持水能力显著性降低（P<0.05）。可能是由于粉体粒径过小时，粉体颗粒之间产生黏附聚合作用，导致粉体与水接触不充分，从而造成持水力的下降。这与敖婧芳等[27] 对核桃青皮的研究结果一致，随着粒径的减小，核桃青皮粉的持水力均有所下降。

为揭示温度和粉体粒径与溶解度的关系，考察了多花黄精不同粒径粉体在 40、70、100 ℃ 时的溶解度变化。结果如图 3 所示，在相同温度下，多花黄精粉的溶解度随着粉体粒径的减小而不断增加，可能是由超微粉碎后粉体的比表面积增加以及颗粒和溶

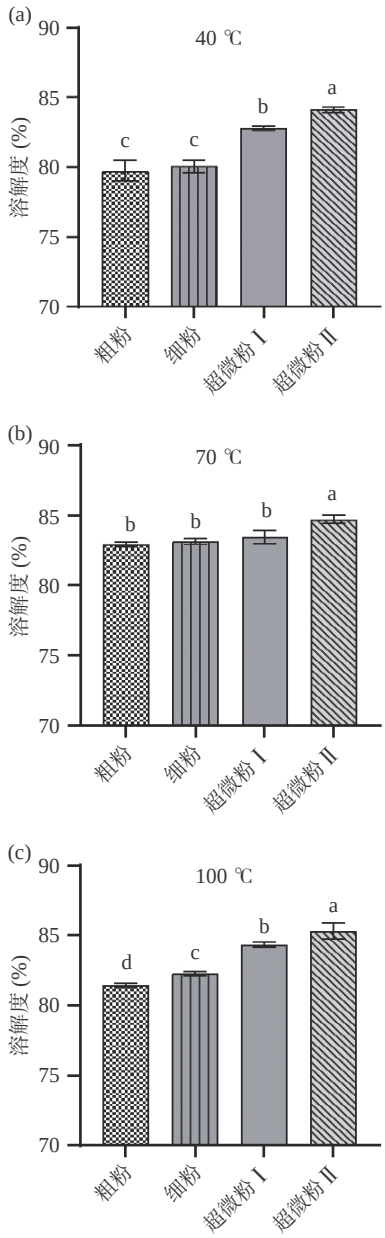


图 3 不同粒径多花黄精粉体的溶解度

Fig.3 Solubility of *P. cyrtonema* Hua powder with different particle sizes

注：不同字母代表有统计学显著性差异（P<0.05）；图 4、图 7 同。

剂之间的相互作用增加引起的。在 40 ℃ 时，多花黄精粉体从粗粉到超微粉Ⅱ的溶解度由 79.76% 增加至 84.13%，粗粉同细粉间溶解度无显著性差异（P>0.05），同超微粉Ⅰ及超微粉Ⅱ的溶解度有显著性差异（P<0.05）；而在 100 ℃ 时，不同粒径粉体间溶解度均有显著性差异（P<0.05）。当温度由 40 ℃ 增加至 100 ℃ 时，粗粉的溶解度先升高至 82.9% 然后保持平稳，以 70 ℃ 时溶解度最高；细粉的溶解度先升高至 83.12% 然后保持平稳，以 70 ℃ 时溶解度最高；超微粉Ⅰ和超微粉Ⅱ的溶解度均不断升高，超微粉Ⅰ溶解度提高至 84.33%，超微粉Ⅱ溶解度提高至 85.31%。文献报道，在相同温度下，60、100、300 目蘑菇粉随着粒径减小，溶解度增加；当温度由 30 ℃ 上升到 90 ℃ 时，不同粒径蘑菇粉的溶解度均呈现增加的趋势[28]。研究结果表明粉体的溶解度同温度和粒径有密切关系。

2.4 多花黄精不同粉体多糖含量

以葡萄糖浓度为横坐标，吸光度为纵坐标，建立线性回归方程，方程为 y=0.071x+0.3316（R^2=0.9993）。由图 4 可知，在 45~355 μm 粒径范围内，随着多花黄精粉体粒径不断减小，水溶性多糖含量先升高后降低，其中多花黄精超微粉Ⅰ水溶性多糖含量最高（15.37%），且同粗粉、细粉、超微粉Ⅱ有显著性差异（P<0.05）。这可能是由于一定程度的超微粉碎降低了多花黄精粉体的平均粒径，增强细胞的破裂程度，释放出更多的水溶性多糖。而当粉碎时间过长，剧烈的机械作用力可能严重破坏了细胞结构，导致水溶性多糖含量下降。丁强等[39]对茯苓的研究结果表明随着茯苓粉末粒径的减小，有效成分水溶性总多糖的含量先增加后略有下降。

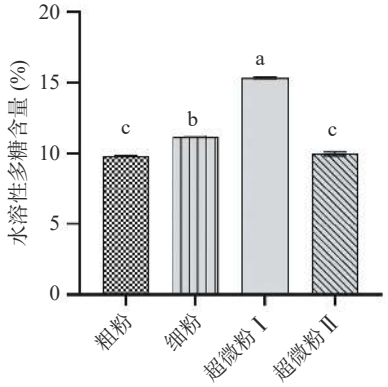


图 4 不同粒径多花黄精粉体水溶性多糖含量

Fig.4 Polysaccharide content of *P. cyrtonema* Hua powder with different particle sizes

2.5 多花黄精不同粉体体外模拟胃肠消化液中多糖释放量变化

绘制标准曲线，建立线性回归方程：y=0.0609x+0.0115，R^2=0.9994。由回归方程的结果可知，此方法具有较好的线性，可用于测定不同粒径多花黄精粉体胃肠溶出液中的多糖的含量。

2.5.1 体外模拟胃消化液中多糖释放量 不同粒径多花黄精粉末在体外模拟胃消化过程中多糖的溶出曲线如图 5 所示。在 5~120 min 内，随着体外胃消化模拟时间的延长，多花黄精细粉、超微粉Ⅰ、超微粉Ⅱ的多糖溶出量均呈现先增加，后下降再逐渐趋于平稳的趋势，这可能是多花黄精细粉、超微粉Ⅰ、超微粉Ⅱ溶出的多糖在胃液中部分消化，随着消化时间增加多糖的溶出速度和消化速度逐渐持平，故多糖得率趋于平稳；而粗粉的多糖溶出量是先下降，后上升再趋于平稳，表明粗粉在消化液中多糖溶出慢，而溶出的多糖同时被胃部消化一部分，随着消化时间增加，溶出多糖增加，因此多糖含量先下降后上升最后趋于平稳。在模拟胃液消化的 5~120 min 每个时间

节点，超微粉Ⅰ的多糖溶出量均最高，其次是超微粉Ⅱ、细粉、粗粉。由此表明，多花黄精粉体的粒径大小对其体外模拟胃消化过程中多糖的溶出有影响，以超微粉Ⅰ的模拟胃消化效果最佳。

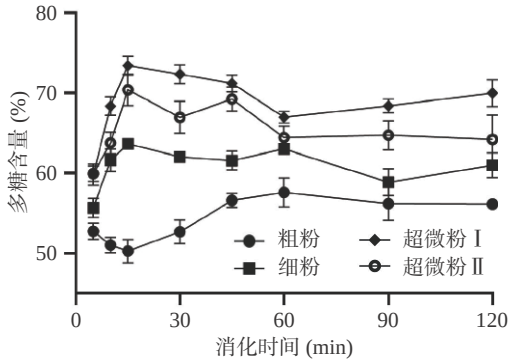


图 5　体外胃消化模拟液中多糖含量

Fig.5　Polysaccharide content in simulated gastric digestion solution *in vitro*

2.5.2　体外模拟肠道消化液中多糖释放量　不同粒径多花黄精粉末在体外模拟肠道消化过程中多糖的溶出曲线如图 6 所示。在 0~90 min 模拟体外肠道消化过程中，随着模拟时间的延长，不同粒径多花黄精粉末的多糖溶出量变化趋势一致。其中，超微粉Ⅰ的多糖溶出量最高，其次是超微粉Ⅱ、细粉、粗粉。消化 90 min 时，粗粉、细粉、超微粉Ⅰ、超微粉Ⅱ的肠消化液中多糖含量分别为 64.51%、66.69%、75.09%、72.09%。此结果与多花黄精粉末在体外模拟胃部消化过程中多糖溶出结果一致，超微粉Ⅰ的多糖溶出量最高。多花黄精粉体的粒径大小对其体外模拟肠道消化多糖溶出有影响，以超微粉Ⅰ的模拟肠消化效果最佳。本实验结果表明粉体的粒径大小与体外模拟胃肠道消化过程中活性物质的释放有关，聂梅梅等[40] 对怀山药研究表明在胃肠消化过程中，随着粒径的变小，超微粉的多糖释放量大于粗粉，与本实验结果一致。

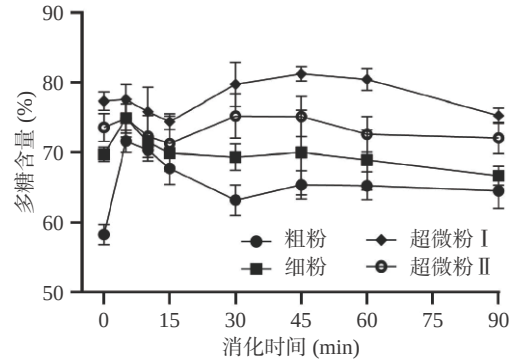


图 6　体外肠道消化模拟液中多糖含量

Fig.6　Polysaccharide content in simulated intestinal digestion solution *in vitro*

2.6　多花黄精不同粉体经胃肠消化后抗氧化活性

不同粒径多花黄精粉经体外模拟胃肠消化后对 DPPH 自由基和羟自由基的清除能力如图 7 所示。

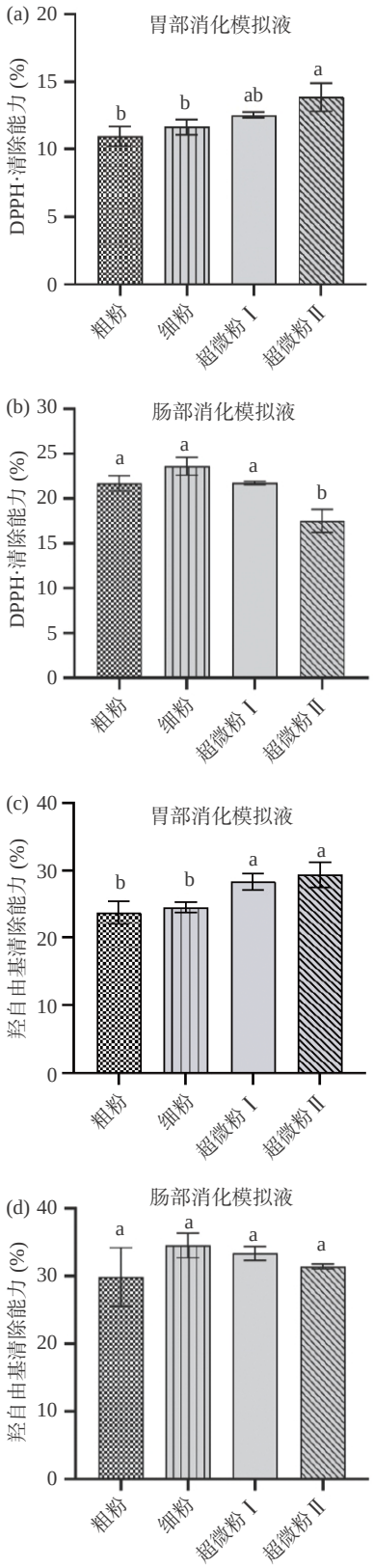


图 7　不同粒径多花黄精粉末体外消化液抗氧化能力

Fig.7　Antioxidant capacity of extracorporeal digestive solution of *P. cyrtonema* Hua powder with different particle sizes

阳性对照组 V_C 对 DPPH 自由基清除率为 95.86%，对羟自由基清除率为 98.45%。由图 7 可知，不同粒径多花黄精粉经模拟胃肠道消化后，对 DPPH 自由基及羟自由基均有一定的清除能力，以模拟肠道消化后抗氧化活性较强。不同粒径多花黄精粉经模拟胃

部消化后，其对 DPPH 自由基及羟自由基的清除能力随着粒径减小呈现不断上升的趋势，超微粉Ⅰ及超微粉Ⅱ抗氧化活性最高；超微粉Ⅰ及超微粉Ⅱ对 DPPH 自由基清除率分别为 12.52% 和 13.86%，对羟自由基清除率分别为 28.34% 和 29.37%。经模拟肠道消化后，不同粒径多花黄精粉对 DPPH 自由基及羟自由基的清除能力随着粒径减小呈现先上升再下降的趋势。综合不同粒径粉体胃肠消化液对 DPPH 自由基及羟自由基的清除能力，认为超微粉Ⅰ抗氧化活性相对较高。粉体的粒径与其经模拟体外消化后的抗氧化能力有关，这一研究结果与绿茶粉粒径大小同模拟人体消化后抗氧化活性变化一致，随着粒径的变小，胃肠消化液对 DPPH 自由基的清除能力均呈现先上升后下降的趋势，分别以 74.85 μm 和 34.62 μm 最高[41]。

超微粉Ⅰ粉末中多糖及其在胃肠消化液中多糖释放量均高于其他粒径粉体，但是其对 DPPH 自由基及羟自由基的清除能力并未明显高于其他粒径粉体，结果表明粉体中多糖含量同其胃肠消化液的抗氧化活性不呈正相关。粉体胃肠消化液是一个混合的组分，其抗氧化活性是反应体系中所有抗氧化物质共同发挥作用的结果，多花黄精胃肠消化液的抗氧化活性可能与消化液中黄精多糖浓度有一定关系，但同时也可能受到其他的成分影响，具体机制有待进一步探究。

3 结论

本文采用粉碎及过筛处理制备了 4 种不同粒径的多花黄精粉体，研究了不同粒径粉体的物理特性、活性成分多糖含量、模拟体外胃肠消化特性及其抗氧化能力。实验结果表明，粉碎及过筛处理后，多花黄精粉体粒径显著下降(P<0.05)。SEM 及 FT-IR 结果表明粉碎处理，仅破坏了粉体的表面结构，并未破坏粉体的分子结构。随着粉体粒径的减小，多花黄精粉的休止角变大，而堆密度、润湿时间、持水力不断下降；粉体粒径的大小及温度的高低同其溶解度有直接关联，可以显著影响粉体溶解度的大小。超微粉Ⅰ的活性物质多糖含量显著高于其他粒径粉末(P<0.05)，其在经模拟体外胃肠消化过程中多糖释放量最高且其具有抗氧化能力，表明一定范围内的微粉碎能够提高多花黄精活性成分的溶出及其抗氧化活性。本实验为微粉碎在多花黄精产品产业化应用提供了理论依据。

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

参考文献

[1] 程鹤. 安徽多花黄精种质资源调查及质量评价研究[D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2022. [CHENG H. Investigation and quality evaluation of *Polygonatum cyrtonema* Hua germplasm resources in Anhui Province[D]. Hefei: Anhui University of Chinese Medicine, 2020.]

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 306. [Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China[M]. Volume Ⅰ. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 306.]

[3] 施吉祥, 徐希明, 余江南. 黄精多糖提取工艺、结构及药理活性研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2019, 38(2): 36−42. [SHI J X, XU X M, YU J N. Review: Extraction method, structural identification and pharmacological activity of *Polygonatum sibiricum* polysaccharide[J]. Chinese Wild Plant Resources, 2019, 38(2): 36−42.]

[4] 汪娟, 梁爽, 陈应鹏, 等. 黄精属植物非皂苷类化学成分研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2016, 18(1): 74−78. [WANG J, LIANG S, CHEN Y P, et al. Research advances in non-saponain chemical constituents of *Polygonatum genus*[J]. Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2016, 18(1): 74−78.]

[5] 宁火华, 袁铭铭, 邬秋萍, 等. 多花黄精化学成分分离鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(22): 77−82. [NING H H, YUAN M M, WU Q P, et al. Identification of chemical constituents from *Polygonatum cyrtonema*[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2018, 24(22): 77−82.]

[6] 陶爱恩, 张晓灿, 杜泽飞, 等. 黄精属植物中黄酮类化合物及其药理活性研究进展[J]. 中草药, 2018, 49(9): 2163−2171. [TAO A E, ZHANG X C, DU Z F, et al. Research progress on flavonoids in plants of *Polygonatum* Mill. and their pharmacological activities[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2018, 49(9): 2163−2171.]

[7] LIU N, DONG Z H, ZHU X S, et al. Characterization and protective effect of *Polygonatum sibiricum* polysaccharide against cyclophosphamide-induced immunosuppression in Balb/c mice[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 107(Pt A): 796-802.

[8] LUAN Y, JIANG Y, HUANG R, et al. Polygonati Rhizoma polysaccharide prolongs lifespan and healthspan in *Caenorhabditis elegans*[J]. Molecules, 2023, 28(5): 2235.

[9] HE L L, YAN B X, YAO C Y, et al. Oligosaccharides from *Polygonatum cyrtonema* Hua: Structural characterization and treatment of LPS-induced peritonitis in mice[J]. Carbohydr Polym, 2021, 255: 117392.

[10] LI L, THAKUR K, LIAO B Y, et al. Antioxidant and antimicrobial potential of polysaccharides sequentially extracted from *Polygonatum cyrtonema* Hua[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 114: 317−323.

[11] 徐君, 王秋丽, 俞年军, 等. 多花黄精生品及九蒸品粗多糖降糖功效对比研究[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(1): 391−394. [XU J, WANG Q L, YU N J, et al. Comparative study on the hypoglycemic effect of crude polysaccharides from raw materials and nine-steam-nine-bask processing Polygonati Rhizoma[J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine, 2022, 37(1): 391−394.]

[12] SHEN F M, XIE P, LI C T, et al. Polysaccharides from *Polygonatum cyrtonema* Hua reduce depression-like behavior in mice by inhibiting oxidative stress-calpain-1-NLRP3 signaling axis[J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 2566917.

[13] 何云山, 谭周进. 超微技术对铁皮石斛粗多糖浸出的影响[J]. 现代农业科技, 2020(4): 214−215. [HE Y S, TAN Z J. Effect of ultramicro technique on extraction of crude polysaccharides from *Dendrobium officinale*[J]. Modern Agricultural Science and

Technology, 2020(4): 214−215.]
[14] 褚洪标, 张洋萍, 肖琳, 等. 厚朴不同粒径粉体溶出行为比较研究[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(12): 2220−2227. [CHU H B, ZHANG Y P, XIAO L, et al. Comparative study of basic chemical dissolubility of *Magnolia officinalis* powders with different sizes[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2015, 35(12): 2220−2227.]
[15] 吴其国, 胡叶青, 范珍, 等. 不同粒径九蒸九晒九华黄精粉粉体学性质及体外溶出度比较[J]. 邵阳学院学报(自然科学版), 2019, 16(2): 76−82. [WU Q G, HU Y Q, FAN Z, et al. The micromeritics properties and in vitro dissolution comparison of Jiu Hua Rhizoma polygnoati powder with different particle size steamed and shined nine times[J]. Journal of Shaoyang University (Natural Science Edition), 2019, 16(2): 76−82.]
[16] 吴其国, 赵玉民, 胡叶青, 等. 清蒸和酒蒸九华黄精不同粒径粉的粉体学性质比较[J]. 山西中医学院学报, 2019, 20(4): 264−266, 271. [WU Q G, ZHAO Y M, HU Y Q, et al. Comparison of micromeritics properties on water steamed and wine steamed Jiuhua *Polygonatum sibiricum* powder of different particle sizes[J]. Journal of Shanxi University of Chinese Medicine, 2019, 20(4): 264−266, 271.]
[17] 吴其国, 胡叶青, 李文艳. 清蒸和酒蒸九华黄精不同粒径粉的体外溶出度考察[J]. 佛山科学技术学院学报(自然科学版), 2019, 37(2): 35−38. [WU Q G, HU Y Q, LI W Y. *In vitro* dissolution of different particle sizes powder of Jiu Hua Rhizoma polygonati steamed in water and rice wine[J]. Journal of Foshan University (Natural Science Edition), 2019, 37(2): 35−38.]
[18] SU J, WANG Y J, YAN M Q, et al. The beneficial effects of *Polygonatum sibiricum* Red. superfine powder on metabolic hypertensive rats via gut-derived LPS/TLR4 pathway inhibition[J]. Phytomedicine, 2022, 106: 154404.
[19] 张珍林, 殷智超. 响应面设计优化霍山石斛超细粉体的制备工艺[J]. 皖西学院学报, 2017, 33(5): 15−20. [ZHANG Z L, YIN Z C. Response surface design optimization of preparation process for ultrafine powder of *Dendrobium huoshanense*[J]. Journal of West Anhui University, 2017, 33(5): 15−20.]
[20] 蔡肖, 刘军玲, 邢丽花, 等. 霍山石斛超微粉物理特性及石斛多糖中单糖分析[J]. 中国食品添加剂, 2023, 34(10): 143−152. [CAI X, LIU J L, XING L H, et al. Physical properties of *Dendrobium huoshanense* superfine powder and analysis of monosaccharides in *Dendrobium* polysaccharides[J]. China Food Additives, 2023, 34(10): 143−152.]
[21] 徐如静, 梁娟, 俞年军, 等. 九华黄精炮制前后多糖类成分结构变化研究[J]. 安徽中医药大学学报, 2021, 40(2): 91−96. [XU R J, LIANG J, YU N J, et al. Structural change of polysaccharide constituents from *Polygonatum cyrtonema* in Jiuhua mountain after processing[J]. Journal of Anhui University of Chinese Medicine, 2021, 40(2): 91−96.]
[22] 洪晴悦. 不同热加工对青稞主要生物活性成分和体外消化与肠菌发酵特性的影响[D]. 重庆: 西南大学, 2021. [HONG Q Y. Effects of different thermal processing on main bioactive components, *in vitro* digestion and fermentation characteristics of Qingke [D]. Chongqing: Southwest University, 2021.]
[23] 杨明琛, 袁梦欣, 陆维, 等. 黄精多糖体外消化特性及对Ⅱ型糖尿病小鼠肠道菌群的调节作用[J]. 现代食品科技, 2021, 37(8): 14−21. [YANG M C, YUAN M X, LU W, et al. *In vitro* digestion properties of *Polygonatum sibiricum* polysaccharide and its regulatory action on the gut microbiota in T2DM mice[J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(8): 14−21.]
[24] 王宗玄, 桑若杰, 李旭燕, 等. 不同谷物粉的粉体特性及血糖生成指数体外评价[J]. 现代食品科技, 2023, 39(8): 165−170. [WANG Z X, SANG R J, LI X Y, et al. Characteristics of different cereal powders and *in vitro* evaluation of their glycemic index[J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(8): 165−170.]
[25] 关媛, 严淑昕, 钱少林, 等. 桂郁金多糖结构表征及其体外抗氧化活性研究[J]. 中成药, 2023, 45(12): 4166−4170. [GUAN Y, YAN S X, QIAN S L, et al. Structural characterization and *in vitro* antioxidant activity of *Curcuma kwangsiensis* polysaccharides[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2023, 45(12): 4166−4170.]
[26] 陈丽叶, 常希光, 冯晓光, 等. 山药多糖的体外抗氧化活性[J]. 食品科学, 2021, 42(19): 122−128. [CHEN L Y, CHANG X G, FENG X G, et al. *In vitro* antioxidant activity of Chinese yam polysaccharides[J]. Food Science, 2021, 42(19): 122−128.]
[27] 敖婧芳, 沈荷玉, 王军, 等. 不同粒径对核桃青皮粉物理特性及功能特性的影响[J]. 食品工业科技, 2024, 45(13): 91−98. [AO J F, SHEN H Y, WANG J, et al. Physical and functional characteristics of walnut green husk powder with different particle sizes [J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(13): 91−98.]
[28] GONG P, HUANG Z H, GUO Y X, et al. The effect of superfine grinding on physicochemical properties of three kinds of mushroom powder[J]. Journal of Food Science, 2022, 87(8): 3528−3541.
[29] MING J, CHEN L, HONG H, et al. Effect of superfine grinding on the physico-chemical, morphological and thermogravimetric properties of *Lentinus edodes* mushroom powders[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2015, 95: 2431−7.
[30] 史早, 张甫生, 杨金来, 等. 超微粉碎对方竹笋全粉理化特性及微观结构的影响[J]. 食品工业科技, 2021, 42(24): 40−47. [SHI Z, ZHANG F S, YANG J L, et al. Effect of superfine grinding on physicochemical properties and microstructure of *Chimonobambusa quadrangularis* shoot powders[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(24): 40−47.]
[31] SUN J, WANG N, WANG C Y, et al. Effects of superfine pulverization technology on the morphology, microstructure, and physicochemical properties of *Apium graveolens* L. root[J]. Microsc Res Tech, 2022, 85(7): 2455−2466.
[32] WU Z G, AMEER K, JIANG G H. Effects of superfine grinding on the physicochemical properties and antioxidant activities of Sanchi (*Panax notoginseng*) flower powders[J]. Journal of Food Science and Technology, 2021, 58(1): 62−73.
[33] 冉欢, 夏晓霞, 雷小娟, 等. 双酶协同酶解处理对冬枣粉理化特性及结构特征的影响[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(11): 240−246. [RAN H, XIA X X, LEI X J, et al. Dual enzyme synergetic enzymatic hydrolysis and its effect on physicochemical properties and structural characteristics of *Ziziphus jujuba* Mill. powder [J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(11): 240−246.]
[34] 张珍林, 殷智超. 霍山石斛超细粉体特性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(8): 1328−1332. [ZHANG Z L, YIN Z C. Characteristics investigation of *Dendrobium huoshanense* ultrafine powder[J]. Natural Product Research and Development, 2017, 29 (8): 1328−1332.]
[35] 程芬, 王盛民, 詹源文, 等. 矿物药超高压射流粉碎可行性研究[J]. 湖北农业科学, 2012, 51(4): 804−806. [CHEN F, WANG S M, ZHAN Y W, et al. Study on the feasibility of smashing mineral medicine by hyper high pressure water jets[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2012, 51(4): 804−806.]

［36］ 周葵, 张雅媛, 游向荣, 等. 不同粒径青香蕉粉的粉体特性[J]. 食品工业科技, 2018, 39(7): 6−9,14. ［ZHOU K, ZHANG Y Y, YOU X R, et al. Properties of green banana powder in different particle sizes[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(7): 6−9,14.］
［37］ 孙强. 当归超微粉直接压片工艺及其片剂质量标准研究[D]. 天津: 天津大学, 2007. ［SUN Q. Study on direct compression technique and quality control of angelica sinensis micropowder tablet[D]. Tianjin: Tianjin University, 2007.］
［38］ 马爽. 刺五加叶超微粉粉体特征及其抗氧化、降糖活性研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2022. ［MA S. Study on characteristics, antioxidant, and hypoglycemic activity of ultrafine power of *Acanthopanax senticosus* leaves[D]. Harbin: Harbin University of Commerce, 2022.］
［39］ 丁强, 吴嬗嬗, 耿璐娜, 等. 茯苓微粉的粉体特征、多糖含量及抗氧化性研究[J]. 食品工业, 2023, 44(2): 141−145. ［DING Q, WU C C, GONG L N, et al. Comparison of powder properties, polysaccharide contents and *in vitro* antioxidant activity of *Poria cocos* powders with different particle sizes[J]. The Food Industry, 2023, 44(2): 141−145.］
［40］ 聂梅梅, 肖亚冬, 李大婧, 等. 超微粉碎对怀山药粉抗氧化和体外消化性的影响[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(21): 224−228. ［NIE M M, XIAO Y D, LI D J, et al. Effects of superfine grinding on antioxidant and digestive characteristics of Chinese yam powder[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2020, 48(21): 224−228.］
［41］ SHU Y, LI J, YANG X P, et al. Effect of particle size on the bioaccessibility of polyphenols and polysaccharides in green tea powder and its antioxidant activity after simulated human digestion[J]. Journal of Food Science and Technology, 2019, 56(3): 1127−1133.

檀茜倩, 王丹, 麻冰玉, 等. 芽孢杆菌发酵对虾酱品质和菌群的影响 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 103−110. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023120182

TAN Xiqian, WANG Dan, MA Bingyu, et al. Effect of *Bacillus* Fermentation on the Quality and Bacteria Diversity of Shrimp Paste[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 103−110. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023120182

·生物工程·

芽孢杆菌发酵对虾酱品质和菌群的影响

檀茜倩, 王　丹, 麻冰玉, 李学鹏, 步　营, 吕欣然, 崔方超, 王当丰, 励建荣*
（渤海大学食品科学与工程学院/海洋研究院, 辽宁锦州 121000）

摘　要: 为了研究解淀粉芽孢杆菌 Y11 和贝莱斯芽孢杆菌 Y12 作为发酵剂对在较低盐分添加情况下发酵虾酱对虾酱品质和菌群变化的影响，利用毛虾为原料，以 10%（w/w）作为食盐添加量，对不同发酵阶段虾酱的感官、风味、丙二醛（MDA）含量、挥发性盐基氮（TVB-N）以及细菌菌群结构进行了分析，比较单菌、混菌发酵的虾酱品质及菌群多样性变化。结果表明两种芽孢杆菌混菌发酵的虾酱与单菌和自然发酵相比，感官、颜色和风味等评定值更高；其 pH 在发酵过程中没有发生显著变化，在 7.5~8.0 之间；MDA 值随发酵时间延长由 0.98 mg/kg 降低为 0.33 mg/kg，TVB-N 值在发酵 10 d 时最低为 33.32 mg/100 g。对发酵虾酱扩增子测序结果显示，接入发酵剂后在发酵初期对菌群的相对丰度影响较大，在发酵后期，*Alkalibacterium*、*Atopostipes*、*Staphylococcus* 和 *Tetragenococcus* 在不同组别中的相对丰度较高。研究结果为芽孢杆菌作为发酵剂在虾酱以及相关海产品发酵领域的应用提供理论依据。

关键词: 芽孢杆菌, 虾酱, 混菌发酵, 微生物多样性, 发酵剂
中图分类号: TS264　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2024)21−0103−08
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023120182
本文网刊:

Effect of *Bacillus* Fermentation on the Quality and Bacteria Diversity of Shrimp Paste

TAN Xiqian, WANG Dan, MA Bingyu, LI Xuepeng, BU Ying, LÜ Xinran, CUI Fangchao, WANG Dangfeng, LI Jianrong*

（College of Food Science and Engineering/Institute of Marine Science and Technology, Bohai University, Jinzhou 121000, China）

Abstract: The low-salt fermented shrimp pastes with 10% (w/w) salt addition were made using acetes chinensis as the substrates and *Bacillus amyloliquefaciens* Y11 and *Bacillus velezensis* Y12 as fermentation starter cultures to investigate the impact of *Bacillus amyloliquefaciens* Y11 and *Bacillus velezensis* Y12 on the quality and bacterial community diversity. Sensory evaluation, flavor analysis, MDA content, TVB-N value, and bacterial community were examined to compare the quality and microbial diversity changes of shrimp paste fermented using single-strain and mixed-strain fermentation methods. The results revealed that shrimp paste subjected to mixed-strain fermentation using two *Bacillus* strains exhibited higher sensory evaluation scores, color, and flavor assessment than the single-strain and natural fermentation shrimp paste. For the shrimp paste fermented with mixed *Bacillus* strains, the pH was between 7.5 and 8.0, and remained relatively stable throughout the fermentation process. The MDA content decreased from 0.98 mg/kg to 0.33 mg/kg with an increased fermentation time, and the lowest TVB-N value (33.32 mg/100 g) was observed after 10 days of fermentation. Amplicon sequencing of the fermented shrimp paste indicated the addition of starter cultures had a significant impact on the relative abundance of bacterial communities in the early stage of fermentation. At the end of fermentation, the relative abundance of *Alkalibacterium*, *Atopistipes*, *Staphylococcus*, and *Tetragonococcus* was relatively high in different groups. These findings

收稿日期: 2023−12−18
基金项目: 辽宁省海洋经济发展专项（2021-84）。
作者简介: 檀茜倩（1985−）, 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食品营养与安全, E-mail: tanxiqian@163.com。
*** 通信作者:** 励建荣（1964−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品营养与安全, E-mail: lijr6491@163.com。

provide a theoretical foundation for utilizing *Bacillus* strains as fermentation agents in producing shrimp paste and other related seafood products.

Key words: *Bacillus*; shrimp paste; mixed-strain fermentation; microbial diversity; starter culture

虾酱是具有一定营养价值的传统发酵食品之一[1], 一般以毛虾、虾头或者虾肉为原料。这些原料在内源酶及微生物共同作用下, 经过一段时间发酵, 其中的蛋白质和脂肪发生水解, 转化为多肽、氨基酸和有机酸等具有生物活性的物质, 同时也形成虾酱特征风味[2−5]。虾酱中微生物群落复杂, 涉及到乳酸菌、芽孢杆菌等多种菌群参与[6−8]。菌株在发酵过程中产生的蛋白酶或脂肪酶等代谢物能促进虾组织的水解, 进而加速发酵过程; 产生的抑菌物质则可在一定程度上防止腐败发生, 从而减少虾酱中盐分的添加[9]。发酵温度、时间、调味料的添加以及是否接种发酵剂都会对虾酱微生物群落组成产生影响[10−14]。

芽孢杆菌是革兰氏阳性杆菌, 依靠鞭毛运动, 属于好氧或兼性厌氧菌, 能产生孢子。芽孢杆菌对外界环境的适应能力较强, 能在比较不利的温度和 pH 范围下存活。芽孢杆菌及其分泌的多种代谢物具有抑菌、抗氧化等功效[15]。部分芽孢杆菌因为具有产胞外蛋白酶、酯酶和甲壳素酶的能力, 可以用作发酵剂发酵虾酱[16]。研究表明芽孢杆菌在虾酱发酵的过程中对菌群和风味的变化起到了非常重要的作用[17−18]。也有研究表明从传统发酵虾酱中筛选出的枝芽孢菌 ZV10-1 和尼泊尔葡萄球菌 JS11 组合作为发酵菌株发酵虾酱, 采用顶空气相色谱-离子迁移谱/质谱(HS-GC-IMS/MS)方法鉴定出虾酱中含有 95 种挥发性化合物, 其指纹图谱与传统虾酱相似, 芳香和支链醛的含量却有所增加, 更有助于产生宜人香气[19]。植物乳杆菌和解淀粉芽孢杆菌混合发酵也可以缩短发酵周期, 改善虾酱颜色, 并可增加其中的谷氨酸含量[17]。但对芽孢杆菌作为发酵剂对虾酱细菌菌群的影响较少, 还有待进一步研究。

基于目前的研究状况, 本研究以前期从自然虾酱中分离的具抑菌和抗氧化功能、产蛋白酶和脂肪酶并且具有溶血安全性的解淀粉芽孢杆菌 *B. amyloliquefaciens* Y11 和贝莱斯芽孢杆菌 *B. velezensis* Y12 为发酵剂[20], 参考目前低盐虾酱的盐分含量[21], 以 10%(w/w)作为虾酱制作食盐添加量, 研究单菌和混菌发酵对虾酱品质和微生物菌群变化的影响, 为虾酱发酵的方法开发提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

毛虾 锦州凌西市场; 氯化钠、甲基红、溴甲酚绿、氧化镁 天津市致远化学试剂有限公司; 三氯乙酸、氢氧化钠 天津市永晟精细化工有限公司; 2-硫代巴比妥酸 国药集团化学试剂有限公司; 其他试剂均为国产分析纯; 解淀粉芽孢杆菌 Y11、贝莱斯芽孢杆菌 Y12 从传统自然发酵虾酱中分离, 保存于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC), 保藏号分别为 CGMCC No.27124、CGMCC No.27125。

FSH-2A 高速均质机 常州越新仪器制造有限公司; FE20 pH 计 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; DK-8D 恒温水浴锅 上海一恒科技有限公司; UV-2250 紫外-可见光光度计 尤尼柯仪器有限公司; PEN3 电子鼻 德国 AIRSENCE 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 虾酱制作 选定前期从自然虾酱中分离解淀粉芽孢杆菌 *B. amyloliquefaciens* Y11 和贝莱斯芽孢杆菌 *B. velezensis* Y12 为发酵剂, 将毛虾清洗搅碎后接入发酵剂(1%, v/v), 区别于传统发酵中 20%~30% 高盐添加量, 参考目前已有制作低盐虾酱所采用的 12%(w/w)的盐分含量(其盐分含量在 8 周发酵时间内在 10%~13% 区间波动)[21], 本研究所采用的盐分添加量为 10%(w/w), 分别设置 A、B、C、M 四组。其中 A 组接入发酵剂解淀粉芽孢杆菌 Y11; B 组接入发酵剂贝莱斯芽孢杆菌 Y12; C 组为对照组(不接入菌株作为发酵剂)采取自然发酵方式; M 组为同时接入发酵剂解淀粉芽孢杆菌 Y11 和贝莱斯芽孢杆菌 Y12(1∶1, v/v)进行混菌发酵, 于室温(20 ℃左右)进行。在 F1(发酵的起始阶段)、F2(发酵 10 d)、F3(发酵 80~90 d)、F4(发酵 120~130 d)对四组样品分别取样(图 1)。

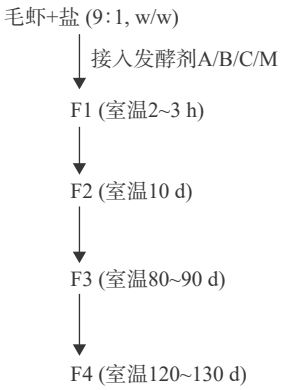


图 1 发酵虾酱制作过程

Fig.1 Preparation process of fermented shrimp paste

1.2.2 虾酱感官评价 邀请 10 位从事食品方向的专业人员成立感官评价小组, 对不同发酵虾酱样品进行感官评价。具体过程分别将不同的虾酱样品置于白色盘子中, 打乱样品顺序进行感官评价, 每组样品评分间隔 10 min, 评分过程禁止讨论。打分以虾酱的色泽、气味、质地状态为依据, 满分 10 分, 具体打分标准见表 1[22]。

表 1　感官评价标准

Table 1　Sensory evaluation standard

指标	标准	分值
色泽	粉红色	2.1~3.0
	暗红色	1.1~2.0
	红色变淡，显示灰色	0~1.0
气味	鲜香无腥味	3.1~4.0
	有一定鲜香气味、有少许腥味、无臭味	2.1~3.0
	鲜香味道一般、有腥味、无臭味	1.1~2.0
	以腥味为主、无鲜香味、有臭味	0~1.0
质地	质地黏稠、细腻	2.1~3.0
	质地较稀	1.1~2.0
	质地稀、不均匀	0~1.0

1.2.3　虾酱颜色测定　分别将不同虾酱样品置于白色盘子中，采用色差计对所取样品进行测定，得到样品 L^*、a^*、b^*值，评价不同发酵时间段单菌、混菌发酵与自然发酵状态下虾酱样品颜色的变化。

1.2.4　虾酱 pH 测定　以 GB 5009.237-2016《食品安全国家标准 食品 pH 值的测定》为参照进行适当修改。在超净台中称取 5 g 发酵虾酱样品放置于无菌烧杯中，加入 45 mL 去离子水，均质 5 min，将烧杯盖上无菌保鲜膜，放置于 4 ℃ 冰箱中静置 30 min 后，用 pH 计对样品进行检测，每组样品测定三次。

1.2.5　虾酱电子鼻分析　称取发酵虾酱样品 10 g 于无菌烧杯中密封，采用电子鼻对烧杯内气体进行分析。调节电子鼻软件取样间隔为 1 s，检测时间为 120 s，最终选择 110 s 至 115 s 稳定的数值进行分析，采用 WinMuster 软件处理电子鼻测定各个样品的响应值。电子鼻传感器如表 2 所示。

表 2　电子鼻传感器

Table 2　Sensors of the electronic nose

传感器	传感器特征
R1	对芳香化合物敏感
R2	对氮氧化合物敏感
R3	对芳香化合物和氨敏感
R4	对氢化合物敏感
R5	对烷烃敏感
R6	对碳氢化合物敏感
R7	对硫化氢敏感
R8	对醇类敏感
R9	对有机硫化物和芳香化合物敏感
R10	对烷烃敏感

1.2.6　虾酱中丙二醛（MDA）含量测定　依据 GB 5009.181-2016《食品安全国家标准 食品中丙二醛的测定》方法，称取 10 g 发酵虾酱样品于 150 mL 无菌烧杯中，加入 25 mL 的无菌去离子水，用高速均质机将其搅碎，再加入 25 mL 10% 三氯乙酸，搅匀后常温下静置 30 min。用双层滤纸进行过滤后，用移液枪吸取 5 mL 上清液于试管中，以加入 5 mL 的三氯乙酸为对照，吸取 5 mL 的 0.02 mol/L 硫代巴比妥酸溶液，放置于 90 ℃ 的水浴锅中反应 30 min 后取出，冷却至室温取部分上清液于比色皿中，使用紫外分光光度计在 $OD_{532\ nm}$ 处测定吸光度。

1.2.7　虾酱挥发性盐基氮（TVB-N）含量测定　以 GB 5009.228-2016《食品安全国家标准 食品中挥发性盐基氮的测定》方法中的自动凯氏定氮法为参考进行适当修改。将标准硼酸溶液和氢氧化钠溶液加入自动凯氏定氮仪中，加入 30 mL 去离子水进行空白试样测定，记录取得的空白值。将发酵虾酱样品搅碎，称取 10 g 发酵样品和 1 g 氧化镁置于凯氏定氮仪的蒸馏管底部，设置参数后对发酵虾酱样品进行 TVB-N 值的测定。

1.2.8　虾酱菌群多样性分析　按照发酵时间点分别对虾酱样品进行取样，使用 Ezup 柱基因组 DNA 纯化试剂盒提取总基因组 DNA。获取的 DNA 样品用干冰寄送至诺禾致源（北京）使用 Illumina HiSeq 平台对 16S rRNA 基因进行测序。探究发酵虾酱细菌菌群结构。

1.3　数据处理

每组实验独立重复 3 次，实验结果采用平均值±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，使用 SPSS 22.0 和 Graphpad Prism 9 进行数据分析和绘图，采用双因素方差分析，$P<0.05$ 具有显著性。

2　结果与分析

2.1　虾酱感官评价

对发酵过程中虾酱样品进行感官评价（如图 2），随着发酵时间延长，不同组别虾酱样品的感官评分整体呈现下降趋势，主要是由于腥味增加以及胺味的产生，F4 阶段样品的感官评分最差，但所有样品整体感官评分值大于 3 分，在可接受范围内。F1 阶段为发酵起始阶段，此时虾酱样品的色泽在不同组别间主要都以粉红色为主，鲜香味道比较明显，质地黏稠、细腻；F2 阶段感官评价整体值略有降低，腥味逐渐产生，此时混菌发酵 M 组鲜香味道更浓，颜色呈现粉红色，并且感官评价显著优于 *B. amyloliquefaciens* Y11 发酵组（$P<0.05$），与 *B. velezensis* Y12 发酵组无显著

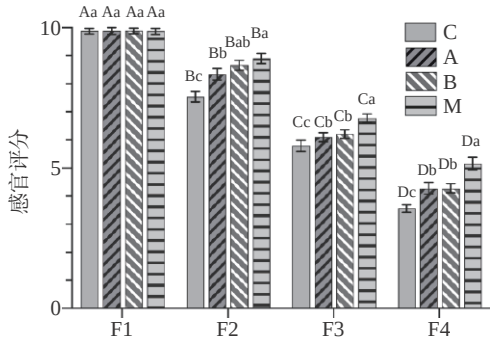


图 2　发酵过程中虾酱样品感官评价

Fig.2　Sensory evaluation of shrimp paste during fermentation

注：不同大写字母表示不同发酵阶段虾酱样品的显著性差异（$P<0.05$）；不同小写表示同一发酵阶段接种不同发酵剂虾酱样品的显著性差异（$P<0.05$）；图 3、图 5、图 6 同。

差异；在随后的 F3 和 F4 发酵阶段，虾酱感官评分持续下降，不仅质地变稀，同时颜色变得暗沉；F3 和 F4 发酵阶段内，自然发酵组虾酱感官评分最低，采用 *B. amyloliquefaciens* Y11 和 *B. velezensis* Y12 单独作为发酵剂的 A 组和 B 组则显著优于自然发酵组（P<0.05），混菌发酵 M 组感官评价最优。发酵时间是影响虾酱风味的一个非常重要的因素。随着发酵时间的延长虾酱中氨基酸态氮和多肽含量增加，醛、酮、酯、吡嗪和呋喃类挥发性化合物的含量增加都会在一定程度上影响虾酱的风味[23]。但是发酵时间过长，原料过度分解容易产生一些不被消费者接受的风味，并且一些腐败菌和致病菌的繁殖也给虾酱的食用安全带来了风险。发酵剂的加入则可以缩短发酵时间，促进风味物质的形成[19]。本研究所采用两种芽孢杆菌混菌发酵可以使虾酱在比较短时间内达到消费者感官可接受水平。

2.2 虾酱颜色变化分析

通过色差计对不同样品的色差值进行分析，L^*值表示明暗程度、a^*值表示红绿程度、b^*值表示黄蓝程度[1]。研究结果（表 3）表明，F1 阶段，单菌发酵 A 组 L^*显著低于其他各组（P<0.05），而单菌发酵 B 组的 a^*、b^*与其他各组相比更高。在 F2 阶段，混菌发酵 M 组的 L^*、a^*、b^*均高于其他各组，单菌发酵 B 组和自然发酵组在 L^*、a^*没有显著差异，其 b^*最低。在 F3 阶段，混菌发酵 M 组的 L^*、a^*、b^*仍显著高于其他各组（P<0.05），单菌发酵 A 和 B 组 a^*值、b^*值与自然发酵组差异不大。F4 阶段，各组样品 L^*、a^*、b^*值基本呈现下降的趋势，此结果与感官评价的结果基本一致。有研究表明，虾酱颜色变化与美拉德产物和虾青素含量变化有关，美拉德产物的形成会使虾酱显现出棕色；虾酱的粉红色泽则受到虾青素含量的影响，在发酵初期由于干燥和盐渍脱水，虾青素得到浓缩[24]，同时虾青素一般与虾青蛋白结合存在，而发酵过程产生的酶等可破坏两者结合的化学键，虾青素得到释放[9]，含量增加，使得虾酱呈现出粉红色泽；但是虾青素的化学性质不稳定，在光和氧等外界条件的影响下会发生分解[25]，这会导致随着发酵时间的延长，虾酱的颜色变得暗沉。因此颜色变化的差异也能在一定程度上反映虾酱发酵的状态，证实加入发酵剂发酵可以在一定程度上加速发酵的进程，混菌发酵效果更为明显。

表 3 虾酱样品不同发酵阶段颜色变化

Table 3 Color changes of shrimp paste at different fermentation stages

不同发酵阶段	组别	L^*	a^*	b^*
F1	C组	53.51±0.60^a	10.49±1.12^b	11.61±0.89^b
	A组	52.46±0.64^b	9.92±0.71^c	10.52±0.46^c
	B组	53.67±2.07^a	11.50±0.81^a	13.37±0.44^a
	M组	53.48±0.70^a	10.31±0.05^b	13.33±1.19^a
F2	C组	51.64±2.04^c	11.85±0.58^c	11.29±0.83^b
	A组	52.73±1.15^b	12.06±0.46^b	12.01±0.60^a
	B组	51.12±1.26^c	11.66±0.83^c	10.92±0.83^c
	M组	53.18±1.49^a	13.13±0.42^a	12.67±0.91^a
F3	C组	48.76±0.63^b	11.94±0.57^b	10.97±0.41^b
	A组	48.07±1.44^b	11.16±0.94^b	10.70±0.91^b
	B组	47.47±0.90^c	11.53±0.46^b	10.91±0.50^b
	M组	52.12±0.43^a	12.17±0.44^a	12.14±0.16^a
F4	C组	47.39±0.84^b	9.41±0.32^c	9.99±0.36^c
	A组	47.98±1.67^b	10.50±0.92^b	10.79±0.98^b
	B组	47.37±1.62^b	11.32±0.58^a	11.76±0.59^a
	M组	48.83±1.29^a	9.70±0.79^c	10.81±0.81^b

注：不同小写字母代表同一发酵阶段内接种或不接种发酵剂虾酱样品间显著性差异（P<0.05）。

2.3 虾酱 pH 变化分析

发酵过程中虾酱样品 pH 变化如图 3。在发酵 F1 阶段，混菌发酵 M 组、单菌发酵 B 组和自然发酵组 C 组发酵虾酱样品 pH 没有明显变化；F2 阶段，pH 整体较 F1 阶段有所上升，自然发酵组和解淀粉芽孢杆菌 Y11 发酵的 A 组 pH 略高于 B 组；F3 阶段较前两个阶段 pH 下降较为明显，原因可能是由于新鲜的毛虾体内的糖原会随着发酵时间的增加而分解成酸类物质，使其 pH 下降；而 F4 阶段样品的 pH 整体与 F1 阶段 pH 没有显著差异（P>0.05），可能是由于发酵剂的添加影响了虾酱中菌群的代谢活动所产生的生物胺等碱类物质的含量[26]，发酵剂 *B. amyloliquefaciens* Y11、*B. velezensis* Y12 和样品中内在微生物生长和繁殖，产生了挥发性化合物如氨等，所带来的影响主要为嗜碱菌等在虾酱发酵过程中的急剧增加，使 pH 出现升高。综合分析可知 *B. amyloliquefaciens* Y11 对 pH 的影响较为明显。总体来说，本研究发酵虾酱 pH 在整体发酵期间内基本保持稳定。其他相关研究也发现虾酱的 pH 在 7.5 左右[27]，这也与本研究所分析结果一致。

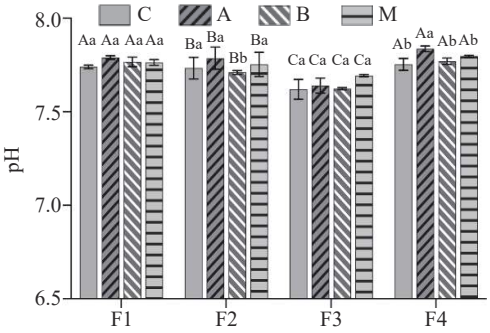


图 3 发酵过程中虾酱样品 pH 的变化

Fig.3 pH changes of shrimp paste during fermentation

2.4 虾酱电子鼻分析

虾酱电子鼻分析结果如图 4 所示。在 F1 阶段，各组样品在 R7（含硫化合物）和 R2（氮氧化合物）检测器响应值较高，不同样品之间存在差别，其中 A1 组的信号最强。在 F2~F4 阶段，R7 和 R2 检测器依然有比较高的响应值，含硫化合物信号强度最高，从 F2 阶段开始，其他检测器的响应值明显增高，说明虾酱中风味由于发酵的作用开始变得多样化。可

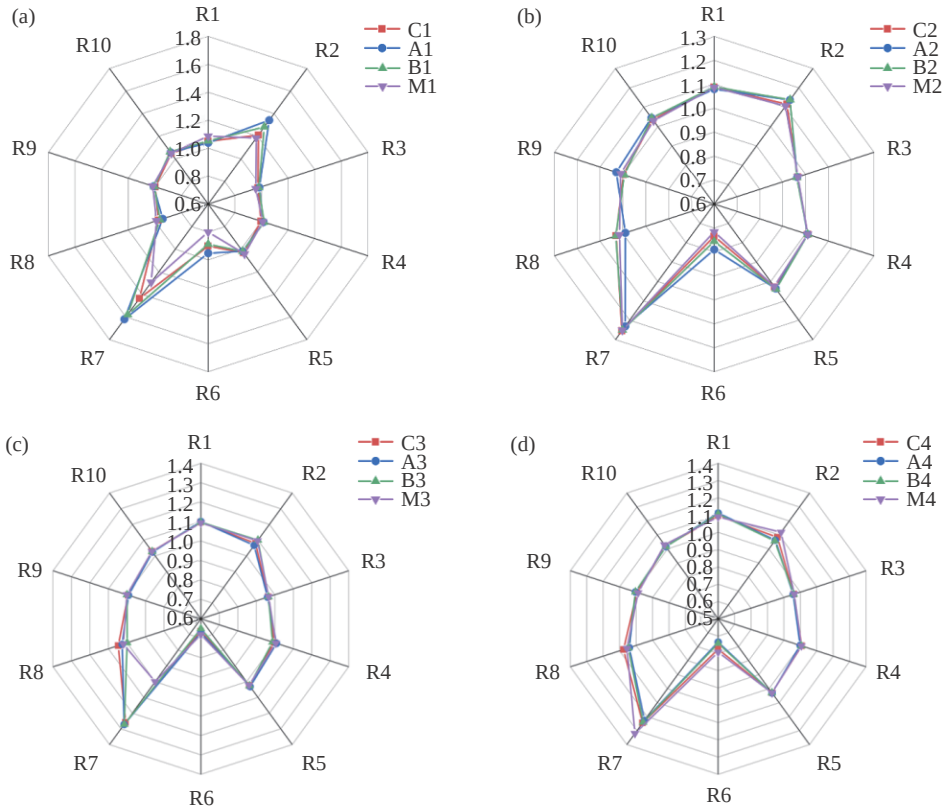


图 4　电子鼻检测不同发酵阶段各个虾酱样品的风味雷达图

Fig.4　Radar fingerprint of the different shrimp pastes in different fermentation stages detected by electronic nose

注：a~d 分别代表 F1~F4 发酵阶段。

以检测到芳香化合物、碳氢化合物和烷烃等物质，氨类物质的检测的信号强度（R3）与其他检测器相比较低，F2 阶段，各样品电子鼻数据相差不大。F3 阶段，M 组样品 R7（含硫化合物）检测器响应值相比于其他样品有所降低，但是在 F4 阶段又发生升高。总的来说，电子鼻不能很好地区分不同发酵虾酱样品的气味差异。

2.5　虾酱 MDA 值测定

MDA 含量可以用来评估发酵食品中脂肪氧化程度（图 5）。在不同的发酵阶段，整体上混菌发酵 M 组、单菌发酵 A 组、B 组和自然发酵组 C 组 MDA 值呈现下降趋势，其中 F3 阶段和 F4 阶段 MDA 值不存在显著差异；除 F1 阶段外，在其他发酵阶段内，接种和不接种发酵剂的各个虾酱样品之间的 MDA 值不存在显著差异（P>0.05），说明在发酵过程中，发生的氧化程度较低，是否接种发酵剂对 MDA 值变化影响不大。在实验中也发现，在发酵初期（F1），接入混菌发酵的 M 组虾酱样品 MDA 值高于其他组，约为 0.98 mg/kg，但是在其他各个发酵阶段 M 组虾酱样品的 MDA 值发生下降，在 F4 阶段降低为 0.33 mg/kg，这可能与菌株的代谢活性有关。脂质氧化产物硫代巴比妥酸（TBARS）等与肉和油中的酸败和异味形成有关，但是另一些物质苯甲醛、苯乙醛和 3-甲基丁醛则具有麦芽味、焦糖味，有可能参与改善虾酱风味[19]，因此需要合理优化发酵条件，将脂质氧化控制在一个合理的范围内。

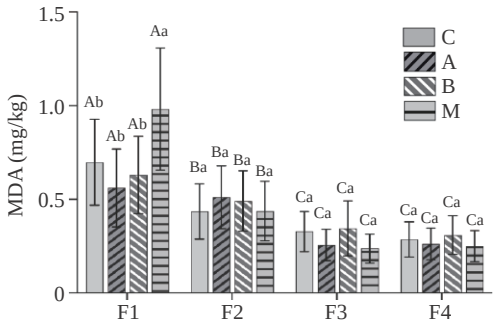


图 5　发酵过程中虾酱 MDA 值的变化

Fig.5　MDA value changes of shrimp paste during fermentation

2.6　虾酱挥发性盐基氮值测定

虾酱在不同发酵阶段下 TVB-N 值变化见图 6，在发酵前期 F1 阶段，混菌发酵组 M 组、单菌发酵组 A 组、B 组和自然发酵组 C 组 TVB-N 值没有显著差异；F2 阶段，TVB-N 值与 F1 阶段相比无显著变化，单菌发酵和混菌发酵虾酱的 TVB-N 值发生下降，解淀粉芽孢杆菌 Y11 和贝莱斯芽孢杆菌 Y12 以及两种芽孢杆菌混菌发酵的 TVB-N 值分别为 22.12、37.52、33.32 mg/100 g；在 F3 阶段，TVB-N 值较前两个阶段相比，显著上升（P<0.05），自然发酵组和两个单菌发酵组的 TVB-N 无显著差异（P>0.05），混菌发酵虾酱样品 TVB-N 值则显著增加（P<0.05），说明混菌发酵相对于单菌和自然发酵加速了

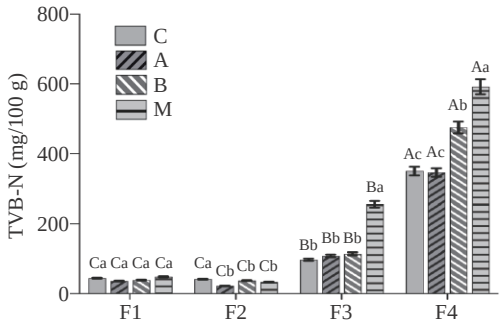


图 6　发酵过程中虾酱样品 TVB-N 含量的变化

Fig.6　TVB-N content changes in shrimp paste during fermentation

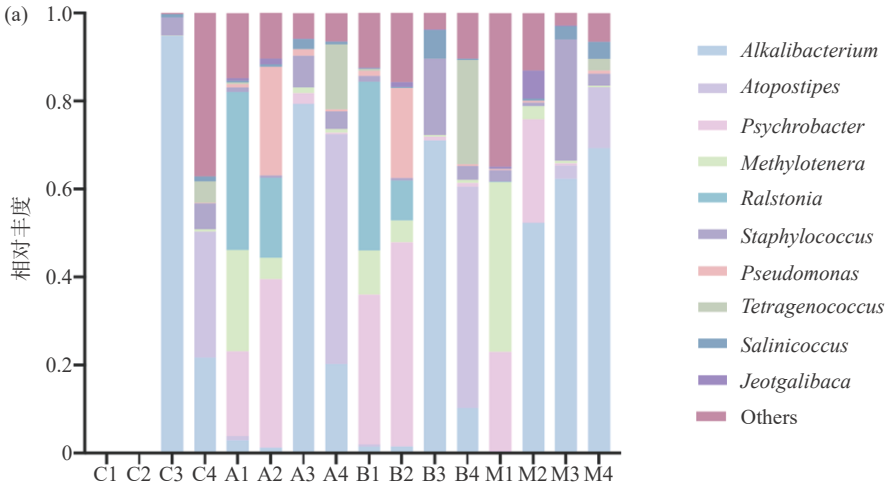
发酵的过程，促进了对蛋白的分解和利用。有研究报道表明盘锦、荣成、寿光、大连、唐山、秦皇岛、烟台等地的不同虾酱样品的 TVB-N 值在 200~430 mg/100 g 之间[8]，一般市售农家制作虾酱成熟的发酵周期普遍为 3~6 个月，这也与本研究自然发酵虾酱在 120~130 d 的 TVB-N 值一致。但在 F4 发酵阶段混菌发酵组 M 组 TVB-N 值较高，为 591.92±21.55 mg/100 g，进一步说明芽孢杆菌混菌发酵提高了发酵速度。有研究表明较高的 TVB-N 是由于生物胺类物质增加引起的，例如尸胺、腐胺、组胺等的存在，由于生物胺会引发过敏和中毒，会带来一定的食用安全隐患[28]。根据《食品安全国家标准鲜(冻)畜、禽产品》(GB 2707-2016)规定，TVB-N 值在海水虾中的最大限量值为 30 mg/100 g。虾酱中的 TVB-N 值普遍偏高，结合本研究对 F2 阶段样品 TVB-N 值的观察，接入一定芽孢杆菌发酵剂发酵 10 d 左右的虾酱比较适宜食用，需要对虾酱发酵的工艺再进行优化。

2.7　虾酱微生物群落变化分析

采用扩增子测序对虾酱的细菌微生物多样性进行分析(图 7)，在属水平前 10 种微生物主要有：*Alkalibacterium*(嗜盐嗜碱菌)、*Atopostipes*(肉杆菌)、*Psychrobacter*(嗜冷杆菌)、*Jeotgalibaca*(咸海鲜芽孢杆菌)、*Methylotenera*(甲基营养型反硝化菌)、*Ralstonia*(罗尔斯通菌)、*Staphylococcus*(葡萄球菌)、*Pseudomonas*(假单胞菌)、*Tetragenococcus*(金黄色四联球菌)、*Salinicoccus*(盐水球菌)，为虾酱发酵过程中的主要优势菌群。

研究结果表明，对于自然发酵虾酱 F1、F2 阶段采用本实验方法和相同取样量没有检测到菌群的存在，可能由于其中菌群的丰度较低以及样品 DNA 降解的原因；在 F3 发酵阶段 *Alkalibacterium* 丰度最高，菌群多样性较低，在 F4 阶段，菌群多样性增高，说明自然发酵虾酱菌群丰度和多样性的增加需要时间较长。A、B 和 M 组在 F1 阶段，可检测到多个属的菌群存在，但菌群丰度有所不同。单菌发酵 A 组、B 组 *Ralstonia*、*Psychrobacter*、*Methylotenera* 三种微生物占比较高，混菌发酵组 M 组 *Psychrobacter*、*Methylotenera* 两种微生物相对丰度较高，*Ralstonia* 微生物相对于 A 组、B 组较低，但整体的微生物相对丰度分布的趋势较为相近。在 F2 阶段中，单菌发酵组 A 组、B 组中 *Psychrobacter* 微生物相对丰度仍在增加，但 *Ralstonia* 在此阶段有明显的减少趋势，*Methylotenera* 也在相对减少，但在混菌发酵组 M 中，与 A 组、B 组不同的是，*Alkalibacterium* 在第二阶段呈现出迅速增加的状态。在发酵时间达到 80~90 d 时，A 组、B 组中 *Alkalibacterium*、*Staphylococcus* 逐渐占据优势地位。在 F4 阶段，除了一些无法鉴定的菌种，在不同组别中 *Alkalibacterium*、*Atopostipes*、*Staphylococcus* 和 *Tetragenococcus* 的相对丰度都较高。

虾酱中细菌群落的构成与地域和发酵工艺有关，同时也在很大程度上决定了虾酱的品质和风味。研究发现泰国虾酱中，在发酵初级阶段，*Salimicrobium* spp.(53.6%)和 *Salinicoccus* spp.(44.0%)丰度最高，随着发酵时间的延长，菌群的多样性和丰度也发生变化，*Alkalibacterium*、*Macrococcus caseolyticus*、*Jeotgalicoccus psychophillus* 和 *Staphylococcus* spp.等则逐渐占据优势[24]。可以分泌氨肽酶的细菌



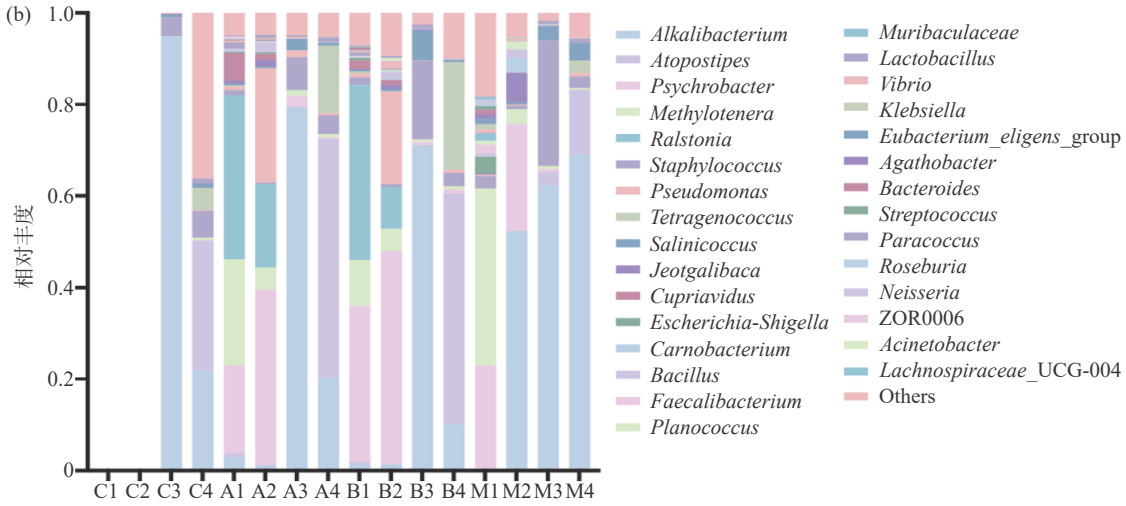


图 7　属水平相对丰度 Top10(a)和 Top30(b)

Fig.7　Relative abundance of genus Top10 (a) and Top30 (b)

注：横坐标大写字母 A、B、M、C 分别对应解淀粉芽孢杆菌 Y11、贝莱斯芽孢杆菌 Y12、两种芽孢杆菌混合发酵和自然发酵，数字 1~4 分别对应 F1~F4 四个不同发酵阶段；Others 表示图中所列属之外的其他所有属的相对丰度之和。

的存在由于可通过水解提高与滋味形成有关的二肽和三肽的含量，因此对虾酱滋味的形成非常重要。*Alkalibacterium* spp.、*Jeotgalicoccus* spp.、*Lentibacillus* spp.、*Salimicrobium* spp.、*Salinicoccus* spp.和 *Staphylococcus* spp.等菌株的存在都与水产品风味肽的形成有关，包括 γ-Glu-Val-Gly 和 γ-Glu-Val 等[6]。另外 *Tetragenococcus* 以及 *Pseudomonas* 与非有机硫化物、氮氧化物以及长链烷烃的形成有关，*Psychrobacter* 等与酯类等芳香化合物的形成有关[10,29]。菌群组成与电子鼻初步分析结果较为一致，同时混菌发酵菌群在 F1 阶段与自然发酵虾酱菌群 C4 组成类似，也进一步证实了混菌发酵可以缩短虾酱制作时间，可以在较短时间内获得类似自然发酵虾酱风味。

3　结论

本研究以 *B. amyloliquefaciens* Y11、*B. velezensis* Y12 菌作为发酵剂，探究单菌和混菌发酵在四个不同时间段对发酵虾酱样品的理化指标及菌群结构变化的影响。结果表明加入混菌发酵 M 组、单菌发酵 A 组、B 组发酵虾酱样品与自然发酵组 C 组相比，其理化指标如感官、颜色等，化学指标如 MDA 值、TVB-N 值以及菌群结构变化等都存在一定的差别。其中对混菌发酵的样品来说，在 10~80 d 品质较好，120 d 左右混菌发酵虾酱样品的品质指标变化较大，可能会具有一些潜在食用安全隐患。综上分析，研究表明加入发酵剂可使发酵虾酱的品质及菌群结构发生改变，但要控制接入发酵剂的含量及发酵时间的长短。本研究对芽孢杆菌菌株作为发酵剂在发酵虾酱中的应用提供理论依据。

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

参考文献

[1] LI W Y, LU H Q, HE Z H, et al. Quality characteristics and bacterial community of a Chinese salt-fermented shrimp paste[J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 136: 110358.

[2] CHEN G, CHEN C C, LEI Z H. Meta-omics insights in the microbial community profiling and functional characterization of fermented foods[J]. Trends in Food Science & Technology, 2017, 65: 23−31.

[3] CHEOK C Y, SOBHI B, ADZAHAN N M, et al. Physico-chemical properties and volatile profile of chili shrimp paste as affected by irradiation and heat[J]. Food Chemistry, 2017, 216: 10−18.

[4] FAITHONG N, BENJAKUL S, PHATCHARAT S, et al. Chemical composition and antioxidative activity of Thai traditional fermented shrimp and krill products[J]. Food Chemistry, 2010, 119(1): 133−140.

[5] KLEEKAYAI T, HARNEDY P A, O'KEEFFE M B, et al. Extraction of antioxidant and ACE inhibitory peptides from Thai traditional fermented shrimp pastes[J]. Food Chemistry, 2015, 176: 441−447.

[6] PHEWPAN A, PHUWAPRISIRISAN P, TAKAHASHI H, et al. Microbial diversity during processing of Thai traditional fermented shrimp paste, determined by next generation sequencing[J]. LWT-Food Science and Technology, 2019, 122: 108989.

[7] LI W Y, MI S, LIU X C, et al. Variations in the physicochemical properties and bacterial community composition during fermentation of low-salt shrimp paste[J]. Food Research International, 2022, 154: 111034.

[8] SANG X, MA X X, HAO H S, et al. Evaluation of biogenic amines and microbial composition in the Chinese traditional fermented food grasshopper sub shrimp paste[J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 134: 109979.

[9] CAI L Y, WANG Q J, DONG Z J, et al. Biochemical, nutritional, and sensory quality of the low salt fermented shrimp paste [J]. Journal of Aquatic Food Product Technology, 2017, 26(6): 706−718.

[10] YAO Y P, ZHOU X Y, HADIATULLAH H, et al. Determination of microbial diversities and aroma characteristics of Beitang shrimp paste[J]. Food Chemistry, 2021, 344: 128695.

[11] LÜ X R, LI Y, CUI T Q, et al. Bacterial community succession and volatile compound changes during fermentation of shrimp paste from Chinese Jinzhou region[J]. LWT-Food Science and Technology, 2019, 122: 108998.
[12] NAKAMURA A, KONDO A, TAKAHASHI H, et al. Microbiological safety and microbiota of Kapi, Thai traditional fermented shrimp paste, from different sources[J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 154: 112763.
[13] 班雨函, 米思, 韩军, 等. 香辛料对低盐虾酱中生物胺和风味的影响[J]. 中国食品学报, 2023, 23(12): 153−166. [BAN Y H, MI S, HAN J, et al. Effect of spices on biogenic amine and flavor in low-salt shrimp paste[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2023, 23(12): 153−166.]
[14] YU J, LU K, DONG X F, et al. *Virgibacillus* sp. SK37 and *Staphylococcus nepalensis* JS11 as potential starters to improve taste of shrimp paste[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 154: 112657.
[15] RHAYAT L, MARESCA M, NICOLETTI C, et al. Effect of *Bacillus subtilis* strains on intestinal barrier function and inflammatory response[J]. Frontiers in Immunology, 2019, 10: 564.
[16] PONGSETKUL J, BENJAKUL S, SUMPAVAPOL P, et al. *Bacillus subtilis* K-C3 isolated from Thai salted shrimp paste (Kapi): Its extracellular enzymes and use as a starter culture in Kapi production[J]. Journal of Food Biochemistry, 2018, 42(6): e12649.
[17] PRIHANTO A A, NURDIANI R, JATMIKO Y D, et al. Physicochemical and sensory properties of terasi (an Indonesian fermented shrimp paste) produced using *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. Microbiological Research, 2021, 242: 126619.
[18] PONGSETKUL J, BENJAKUL S, BOONCHUEN P. *Bacillus subtilis* K-C3 as potential starter to improve nutritional components and quality of shrimp paste and corresponding changes during storage at two alternative temperatures[J]. Fermentation, 2023, 9(2): 107.
[19] YU J, LU K, ZI J W, et al. *Halophilic bacteria* as starter cultures: A new strategy to accelerate fermentation and enhance flavor of shrimp paste[J]. Food Chemistry, 2022, 393: 133393.
[20] 檀茜倩, 王丹, 程笑笑, 等. 虾酱源芽孢杆菌的筛选及其益生特性[J]. 中国食品学报, 2023, 23(12): 51−60. [TAN X Q, WANG D, CHENG X X, et al. Screening and probiotic characteristics of shrimp paste originated *Bacillus* spp.[J]. Journal of Chinese institute of Food Science and Technology, 2023, 23(12): 51−60.]
[21] YANG B B, LIU Y L, SANG Y X, et al. Bacterial diversity and physicochemical properties of low-salt shrimp paste fermented at different temperatures[J]. LWT-Food Science and Technology, 2023, 187: 115277.
[22] CHUKEATIROTE E, ARFARITA N, NIAMSUP P, et al. Phenotypic and genetic characterization of *Bacillus* species exhibiting strong proteolytic activity isolated from terasi, an indonesian fermented seafood product[J]. Journal of Northeast Agricultural University (English Edition), 2015, 22(4): 15−22.
[23] 栾宏伟, 朱文慧, 祝伦伟, 等. 不同发酵时间对乌虾酱风味的影响[J]. 食品工业科技, 2020, 41(12): 75−87. [LUAN H W, ZHU W H, ZHU L W, et al. Effect of different fermentation time on the flavor of shrimp paste[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(12): 75−87.]
[24] PONGSETKUL J, BENJAKUL S, VONGKAMJAN K, et al. Changes in volatile compounds, ATP-related compounds and antioxidative properties of Kapi, produced from *Acetes vulgaris*, during processing and fermentation[J]. Food Bioscience, 2017, 19: 49−56.
[25] YAO Q M, MA J Q, CHEN X M, et al. A natural strategy for astaxanthin stabilization and color regulation: Interaction with proteins[J]. Food Chemistry, 2023, 402: 134343.
[26] SANG X, LI K X, ZHU Y L, et al. The impact of microbial diversity on biogenic amines formation in grasshopper sub shrimp paste during the fermentation[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 782.
[27] PONGSETKUL J, BENJAKUL S, BOONCHUEN P. Changes in volatile compounds and quality characteristics of salted shrimp paste stored in different packaging containers[J]. Fermentation, 2022, 8(2): 69.
[28] FENG C, TEUBER S, GERSHWIN M E. Histamine (Scombroid) fish poisoning: A comprehensive review[J]. Clinical Reviews in Allergy & Immunology, 2016, 50(1): 64−69.
[29] CHE H X, YU J, SUN J Y, et al. Bacterial composition changes and volatile compounds during the fermentation of shrimp paste: Dynamic changes of microbial communities and flavor composition[J]. Food Bioscience, 2021, 43: 101169.

金璐, 吴越, 陈志刚. 过氧化氢对鲜湿粉条中优势腐败菌阿氏芽孢杆菌的抑菌活性及机制 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 111−120. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024010127
JIN Lu, WU Yue, CHEN Zhigang. Antibacterial Activity and Mechanism of Hydrogen Peroxide against the Dominant Strain *Bacillus aryabhattai* in Fresh and Wet Vermicelli[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 111−120. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024010127

·生物工程·

过氧化氢对鲜湿粉条中优势腐败菌阿氏芽孢杆菌的抑菌活性及机制

金　璐, 吴　越, 陈志刚*
（南京农业大学食品科技学院, 江苏南京 210095）

摘　要: 为抑制鲜湿粉条中微生物的腐败变质以及探索绿色高效的保鲜剂，本研究系统探究了过氧化氢（H_2O_2）作为一种绿色保鲜剂对鲜湿粉条的优势腐败菌的抑菌机制。首先通过高通量测序确定鲜湿粉条中的优势腐败菌为阿氏芽孢杆菌（*Bacillus aryabhattai*），再采用抑菌活性实验对 H_2O_2 对 *B. aryabhattai* 的抑菌圈直径（Inhibition zone diameter，IZD）、最小抑菌浓度（Minimum inhibitory concentration，MIC）、最小杀菌浓度（Minimum bactericidal concentration，MBC）和生长曲线的影响进行分析；同时进行抑菌机制实验观察 H_2O_2 对 *B. aryabhattai* 的细胞膜、细胞壁的破坏作用及胞内功能成分的外泄。结果表明，当 H_2O_2 浓度由 250 μg/mL 提高至 1000 μg/mL，IZD 增大了 8 mm，H_2O_2 的 MIC 和 MBC 均为 250 μg/mL。通过生长曲线发现当 H_2O_2 浓度高于 250 μg/mL 时能在 24 h 内完全抑制住细菌的生长。抑菌机制实验表明 H_2O_2 的浓度增加会显著提高菌液上清液中核酸、蛋白质的含量（P<0.05），同时破坏了 *B. aryabhattai* 的细胞壁和细胞膜结构，导致碱性磷酸酶（Alkaline phosphatase，AKP）和 *β*-半乳糖苷酶（*β*-Galactosidase，*β*-GAL）泄露到细胞外，且与 H_2O_2 呈浓度依赖性。因此，250 μg/mL H_2O_2 能够有效抑制鲜湿粉条中的优势腐败菌 *B. aryabhattai*。本研究可为鲜湿粉条的货架期延长、市值提升提供一定的理论依据和生产指导。

关键词: 鲜湿粉条, 过氧化氢, 阿氏芽孢杆菌, 抑菌活性, 抑菌机理
中图分类号: TS201.3　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2024)21−0111−10
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024010127
本文网刊:

Antibacterial Activity and Mechanism of Hydrogen Peroxide against the Dominant Strain *Bacillus aryabhattai* in Fresh and Wet Vermicelli

JIN Lu, WU Yue, CHEN Zhigang*
（College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China）

Abstract: To inhibit microbial spoilage in fresh and wet vermicelli and explore green and efficient preservatives, this study systematically investigated the antibacterial mechanism of hydrogen peroxide (H_2O_2), a green preservative, against the predominant spoilage bacteria in fresh and wet vermicelli. Firstly, the predominant spoilage bacteria in fresh and wet vermicelli were identified as *Bacillus aryabhattai* through high-throughput sequencing. Then, the influence of H_2O_2 on the inhibition zone diameter (IZD), the minimum inhibitory concentration (MIC), the minimum bactericidal concentration (MBC) and the growth curve of *B. aryabhattai* were analyzed through antibacterial activity assays. Simultaneously, the mechanism of antibacterial action experiments was conducted to observe the effects of H_2O_2 on the disruption of cell membrane and cell wall of *B. aryabhattai*, as well as the leakage of intracellular functional components. The results showed that increasing the concentration of H_2O_2 from 250 μg/mL to 1000 μg/mL resulted in an 8 mm increased IZD. Additionally, MIC and MBC of H_2O_2 were both 250 μg/mL. The growth curve analysis revealed that bacterial growth was completely inhibited within 24 hours when the concentration of H_2O_2 was higher than 250 μg/mL. The mechanism of antibacterial

收稿日期: 2024−01−15
基金项目: 江苏省农业产业技术体系项目（JATS-2023-434）。
作者简介: 金璐（1999−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 农产品贮藏与加工, E-mail: 1109052407@qq.com。
*** 通信作者:** 陈志刚（1971−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 农产品加工, E-mail: zgchen@njau.edu.cn。

action experiments indicated that increasing concentrations of H_2O_2 significantly raised the concentrations of nucleic acids and proteins in the supernatant of the bacterial liquid (P<0.05), while also disrupting the cell wall and membrane structure of *B. aryabhattai*, leading to the leakage of alkaline phosphatase (AKP) and β-galactosidase (β-GAL) outside the cells, and it exhibited a concentration-dependent relationship with H_2O_2. Therefore, H_2O_2 at 250 μg/mL effectively inhibited the activity of *B. aryabhattai* in fresh and wet vermicelli. This study provides a theoretical basis and production guidance for extending the shelf life and increasing the market value of fresh and wet vermicelli.

Key words: fresh and wet vermicelli; hydrogen peroxide; *Bacillus aryabhattai*; bacteriostatic activity; bacteriostatic mechanism

鲜湿粉条能快速复水，方便食用，且口感爽滑细腻，适配多种调味料，受到亚洲广大食客的青睐[1−2]，其生产无需耗能干燥，节省约 70% 能源，符合食品绿色生产[3−5]。同时，新型的铺浆式生产方式无需添加硫酸铝铵、硫酸铝钾等含铝添加剂[6]，从原料处把控食品安全，生产绿色食品。

过氧化氢（H_2O_2）是一种高效、可降解的抑菌剂[7]，GB 2760-2014《食品添加剂使用标准》规定其可以作为食品加工助剂添加到食品中，但在使用时需严格注意添加剂量及残留量，GB 5009.226-2016《食品中过氧化氢残留量的测定》规定其在食品中的残留量应小于 3 mg/kg[8−9]。H_2O_2 具有广谱高效的灭菌活性，在食品中使用后会降解成 H_2O 和 O_2，对环境无害，是一种“绿色”的灭菌剂[10−11]。H_2O_2 无色无味，目前其在食品中的使用主要集中在果蔬保鲜[11]、食品表面杀菌[12]、食品冰微生物控制[13] 和食品的改性上[14]。虽然目前 H_2O_2 已经使用在很多领域中，如食品、化妆品、医疗器械中[15]，但是关于 H_2O_2 对微生物的具体作用机理仍较为模糊。目前 H_2O_2 的研究机理主要在生物体外，如 H_2O_2 会使核酸的磷酸二酯键断裂[16]，氧化蛋白质[17]，而关于 H_2O_2 对细胞的生物灭活性的影响鲜少报道。

鲜湿粉条因水分含量高，故易发生腐败变质，而芽孢杆菌属（*Bacillus*）是鲜湿粉条中的主要微生物[18]，其易在各类含有大量淀粉基质的谷物上生长，如红薯、玉米、水稻等。该菌的肆虐生长会造成大量的粮食损失，不仅降低粮食的营养价值也会导致巨大的经济损失，同时也会损害人体健康[19]。阿氏芽孢杆菌（*Bacillus aryabhattai*）属于芽孢杆菌属，其在全球均有分布，在我国主要在农田和森林中被发现。*B. aryabhattai* 有很强的抗逆性，且部分菌株自己形成了一系列的活性氧防御系统[20]。目前，关于鲜湿粉条优势腐败菌鉴定及抑菌鲜有研究，通过高通量测序可以对鲜湿粉条优势腐败菌群进行分析汇总，帮助科研人员筛选出样品中的优势菌株，从而为 H_2O_2 在鲜湿粉条中的保鲜应用提供理论指导。

本研究以鲜湿粉条为研究对象，对比未添加 H_2O_2 组和添加 0.25‰、0.5‰、1‰（w/w）H_2O_2 组的高通量测序结果，筛选到一株优势菌株 *B. aryabhattai*，进一步用该菌株作为指示菌进行 H_2O_2 的抑菌活性和抑菌机制的研究。并进一步通过抑菌圈直径（Inhibition zone diameter, IZD）、最小抑菌浓度（Minimum inhibitory concentration, MIC）、最小杀菌浓度（Minimum bactericidal concentration, MBC）、抑菌生长曲线来判断 H_2O_2 对目标菌株的抑菌活性；再对其核酸、蛋白质、碱性磷酸酶（Alkaline phosphatase, AKP）和 β-半乳糖苷酶（β-Galactosidase, β-GAL）泄露量进行测定，通过扫描电镜（Scanning electron microscope, SEM）和透射电镜（Transmission electron microscope, TEM）观察不同浓度的 H_2O_2 对 *B. aryabhattai* 的细胞壁和细胞膜结构的影响。本研究对 H_2O_2 对湿态粉条中优势菌株的抑菌机理进行了较为全面的研究，有望为 H_2O_2 延长湿态淀粉类制品货架期和市值提供一定理论依据和生产指导。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

阿氏芽孢杆菌　由本课题组在河南省盛田农业有限公司生产的湿态粉条中分离筛选获得，经鉴定为阿氏芽孢杆菌，与甘油 1∶1（v/v）混合保存于−80 ℃超低温冰箱中；甘薯淀粉（水分 13.51%，灰分 0.15%，蛋白质 0.10%，直链淀粉 25.2%）　秦皇岛十八里食品有限公司；食盐（NaCl）　中国盐业集团有限公司；过氧化氢（35%）　食品级，河南亿丰化工有限公司；过氧化氢标准溶液（1000 μg/mL）　北京迈瑞达科技有限公司；氨苄青霉素溶液（100 mg/mL）　上海玻尔化学试剂有限公司；碱性磷酸酶试剂盒、总蛋白定量测定试剂盒　南京建成生物工程研究所；β-半乳糖苷酶活性测定试剂盒　上海百生跃生物科技有限公司；营养琼脂（Nutrient agar, NA）、营养肉汤（Nutrient broth, NB）、平板计数琼脂（Plate count agar, PCA）　海博生物。

SU8010 扫描电子显微镜　日本日立公司；DW-HL678 超低温冰箱　美菱生物医疗；LCSH-150C 恒温培养箱　南京联泽科学仪器有限公司；H1650-W 台式微量高速离心机　长沙湘仪离心机仪器有限公司；BioscreenC 全自动细菌生长仪　上海谓载商贸发展有限公司；H7650 透射电子显微镜　日本日立公司；SHZ-82A 气浴恒温振荡器　金坛市科析仪器有限公司；NanoDrop2000 紫外可见分光光度计　美国赛默飞世尔科技公司；SW-CJ-ID 单人净化工作台　苏州净化公司；SHX-250B 生化培养箱　常州冠军仪器制造有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　鲜湿粉条的制备　本文所用的粉条通过铺浆式生产，由河南省盛田农业有限公司协助生产，每次生产原料红薯淀粉 75 kg。工厂生产工艺[18]：原料热水制芡→打粉团→调成匀浆→抽真空→蒸熟→冷却、脱离→室温老化→低温老化→定长切丝→包装。具体步骤见图 1。

对照组样品（CK）在制作过程中仅加 5‰（w/w，下同）食盐，H_2O_2 组加 5‰食盐和 0.25‰、0.5‰、1‰ H_2O_2。处理后，将样品在 28±1 ℃ 的培养箱中贮藏 90 d。

1.2.2　总菌落数分析　在样品贮藏前一周内及之后 90 d 内每隔一周对总菌落计数，按微生物检验标准（GB 4789.2-2022）测定[21]。将鲜湿红薯淀粉样品（25 g）加入 0.85%（w/w）无菌生理盐水（225 mL）中，混合均匀。在无菌生理盐水中连续稀释（10^{-1}~10^{-5}）后，每 1 mL 稀释液接种到 PCA 培养基中。平板在 37 ℃ 孵育 48±2 h 以测定总有氧活菌计数（Total aerobic viable count, TAVC）。

1.2.3　高通量测序　当对照组样品细菌超过 5 lg CFU/g（根据粉条的微生物标准 GB 2713-2015）[22]，经液氮冷冻磨后将样品委托给上海美吉生物医药科技有限公司进行其 DNA 的提取及高通量测序工作。采用 16S rRNA 基因 V3-V4 高变区合成引物，338F（5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3'）和 806R（5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'）进行 PCR 扩增；20 μL 反应体系：Mix 10 μL、引物各 0.8 μL、模板 0.8 μL，dd H_2O 补足 20 μL。PCR 反应条件：95 ℃ 3 min；95 ℃ 30 s，54 ℃ 30 s，72 ℃ 45 s，30 个循环；72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物于 2% 琼脂糖凝胶电泳检测，PCR 产物目的条带大小正确，浓度合适后使用 NEXTFLEX Rapid DNA-Seq Kit 进行建库，利用 Illumina 公司 Miseq PE300 平台测序[23]。

1.2.4　H_2O_2 残留量的测定　根据《食品安全国家标准 食品中过氧化氢残留量的测定》（GB 5009.226-2016）中的钛盐比色法测定鲜湿粉条中 H_2O_2 的残留量[9]。

1.2.5　活化菌株及菌悬液的制备　根据 1.2.3 确定后续抑菌实验中使用的目标菌株为 *B. aryabhattai*，将分离纯化筛选出的菌株 28 ℃ 培养 24 h 后接种到营养肉汤中扩大培养，取菌悬液与甘油 1∶1（v/v）保存在−80 ℃ 冰箱中。为了后续实验的使用，将菌种保藏液按 1‰（v/v）加入 NB 培养基中以 28 ℃，180 r/min 振荡培养 18~24 h 获得对数生长期的菌悬液。

1.2.6　H_2O_2 对 *B. aryabhattai* 的抑菌效果

1.2.6.1　MIC 和 MBC 的测定　根据 Cui 等[24] 的方法进行 MIC 的测定。取 1.2.5 的菌悬液，采用倍比微量稀释法在 96 孔板中进行 MIC 的测定，封盖后于 28 ℃ 静置培养 1 d，取出后观察每孔中液体的澄清度，浓度最大的澄清液体孔所对应的抑菌液浓度为 MIC。阳性对照只加菌液，阴性对照只加 NB 培养基。

将浓度大于等于 MIC 的孔洞吸出 100 μL 吹打均匀的液体涂布在 NA 平板上，在 28 ℃ 孵育 24 h 后，没有细菌生长的浓度定义为 MBC[25]。

1.2.6.2　抑菌圈测定　采用双层琼脂打孔法评估 H_2O_2 对 *B. aryabhattai* 的抑菌圈大小的影响[26]。将 1.2.5 的菌悬液稀释到吸光度在 600 nm 处为 0.5 左右时按 1‰加进 NB 固体培养基中（加入 2% 琼脂的 NB 液体培养基）。在平板上铺一层琼脂培养基，凝固后放置牛津杯，然后将加入菌液的 NB 固体培养基避开牛津杯倾注在平板上。凝固后取出牛津杯，向形成的孔洞中添加 200 μL 抑菌液，之后置于 4 ℃ 冰箱 4 h 扩散抑菌液，然后再放置于 28 ℃ 培养箱 18~24 h 后用游标卡尺量取抑菌圈大小（重复 3 次均有抑菌作用，视为对该病原菌有抑制作用）。阴性对照组为无菌生理盐水，阳性对照组为氨苄青霉素。抑菌圈大小代表的抗菌效果参考表 1[27]。

1.2.6.3　生长曲线测定　本实验使用全自动生长曲线仪测定浓度为 4×MIC、2×MIC、1×MIC、1/2×MIC、

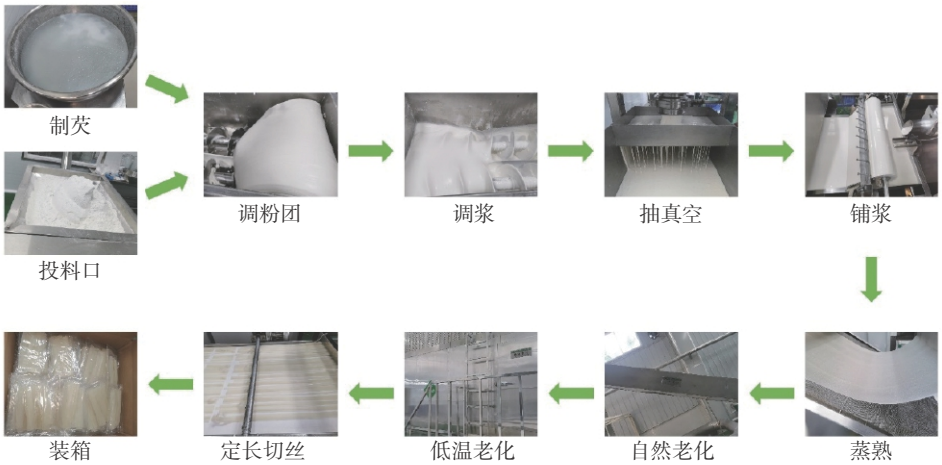


图 1　工业规模化鲜湿粉条的生产工艺

Fig.1　Production process of fresh and wet vermicelli on industrial scale

表 1 抑菌作用判断标准

Table 1 Antibacterial judgment criteria

抑菌圈直径 IZD(mm)	判定结果
≤7	无抑菌作用
>7	有抑菌作用
7<IZD<10	钝敏
10<IZD<20	中敏
>20	高敏

1/4×MIC 的 H_2O_2 抑菌液对筛选出菌株的生长曲线的影响，仪器设定每次测定间隔 30 min，培养时间 24 h，温度 28 ℃，振荡速度为一般，振荡完成后静置 10 s 并测定 600 nm 处的吸光度值。每个样品设置三个平行，阴性对照组仅加 NB。根据吸光度值随时间变化作图判断菌株生长情况[28]。

1.2.7 H_2O_2 对 *B. aryabhattai* 的抑菌机制

1.2.7.1 碱性磷酸酶的测定 使用 AKP 试剂盒测定 *B. aryabhattai* 在经 2×MIC、1×MIC、1/2×MIC 的 H_2O_2 处理 8 h 后破损释放在菌液上清液中的 AKP 的活性。单位定义：每克酶蛋白在 37 ℃ 与基质作用 15 min 产生 1 mg 酚为 1 个金氏单位，即 7.14 U/L。

1.2.7.2 *β*-半乳糖苷酶的测定 *β*-GAL 作为细胞膜完整性的一个检测指标，使用 *β*-GAL 活性测定试剂盒对 *B. aryabhattai* 在经 2×MIC、1×MIC、1/2×MIC 的 H_2O_2 处理 8 h 后细胞破损释放到上清液中的 *β*-GAL 浓度变化进行检测。1 个酶活性单位(U)定义为 37 ℃、pH7.0 的条件下，每分钟生成 1 μmol 对硝基苯酚所需要的酶量。

1.2.7.3 胞内核酸外泄测定 每隔 2 h 取样离心(3000 r/min，10 min)，取出上清液后，用 0.22 μm 的针头式过滤器过滤后用紫外分光光度计测定其在 260 nm 处的吸光度值，重复三次取平均值。

1.2.7.4 胞内蛋白质外泄测定 每隔 2 h 取样离心后获得上清液，用总蛋白定量测定试剂盒测定其蛋白质含量，取 10 μL 样品液和标准液，加入 250 μL 的工作液，混匀后于 37 ℃ 水浴加热 30 min，在 562 nm 处测定其吸光度值，之后按照试剂盒说明书计算得到上清液中的总蛋白浓度(μg/mL)。

1.2.7.5 *B. aryabhattai* 的微观结构测定 将 1.2.5 的菌悬液离心得到菌体，加入终浓度为 0×MIC 和 1×MIC 的 H_2O_2，在 28 ℃，180 r/min 条件下处理 4 h 后，4 ℃、5000 r/min 条件下离心 10 min，之后再用磷酸盐缓冲液清洗三次，一部分用 2.5% 的戊二醛固定，经乙醇梯度洗脱后，离心取沉淀的菌体加入一定的醋酸异戊酯，液体混匀后沾取少许菌液滴在特定金属上，晾干喷金后用扫描电镜观察其表面结构。另一部分样品收集完菌体沉淀后加入 2.5% 戊二醛固定过夜后，经过脱水、渗透、包埋、切片及染色处理，通过透射电镜观测其内部结构[29]。

1.3 数据处理

所有实验均设置 3 个重复，数据用 SPSS 18.0 进行显著性分析(One-way ANOVA)，以 $P<0.05$ 作为差异显著性的判断标准，数据结果以均值±标准差(Standard deviation, SD)表示。使用 Origin 2021 进行作图。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 H_2O_2 对鲜湿粉条的影响

未添加和添加 H_2O_2 的鲜湿粉条分别进行贮藏期实验，细菌生长情况及 H_2O_2 残留量结果见表 2。对照组在 3 d 内发生腐败变质，而 H_2O_2 组在 90 d 的贮藏期内未检测出腐败微生物的生长。同时对照组和 H_2O_2 组的粉条形态进行对比(图 2A~2D)，可以看到 1‰ H_2O_2 组孔洞较多(图 2D)，而 0.25‰和 0.5‰ H_2O_2 组表面光滑无明显孔洞。在后续贮藏

表 2 不同浓度 H_2O_2 对鲜湿粉条储藏期内细菌生长的影响(lg CFU/g)及其残留量

Table 2 Effects of different concentrations of H_2O_2 on bacterial growth during the storage period of fresh and wet vermicelli (lg CFU/g) and its residual levels

处理	贮藏时间(d)		H_2O_2残留量(mg/kg)
	3	90	
CK	5.56±0.05	–	<3
0.25‰ H_2O_2	<1	<1	<3
0.50‰ H_2O_2	<1	<1	<3
1.00‰ H_2O_2	<1	<1	<3

注：“<1”表明该次测定所统计样品中未检测到菌落；“–”表明超出测定范围，多不可计；“<3”依据GB 5009.226-2016的钛盐比色法的定量限为 3 mg/kg。

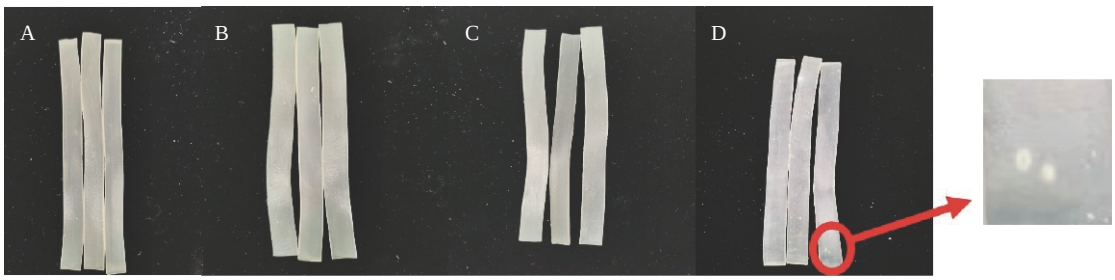


图 2 鲜湿粉条样品图片对比

Fig.2 Comparison of the fresh and wet vermicelli samples

注：A~D 分别为 CK、0.25‰、0.5‰、1‰过氧化氢组及其局部放大的样品图片。

中发现 1‰ H_2O_2 组鲜湿粉条出现裂纹，组织结构逐渐被破坏，故建议在使用 H_2O_2 对鲜湿粉条进行保鲜时选择 0.25‰和 0.5‰的浓度，但出于对大生产这种较复杂环境的保证[30]，建议采取 0.5‰的 H_2O_2。同时基于 GB 5009.226-2016[9] 对 H_2O_2 组的 H_2O_2 残留量进行测定，发现残留量均未检出，符合 GB 2760-2014 对其残留量的尽量去除的要求[8]。说明 H_2O_2 对鲜湿粉条有很好的延长货架期的效果，且无添加残留。

2.2　鲜湿粉条中细菌群落的分布

对鲜湿粉条的对照组进行细菌的高通量测序，结果如图 3A、3B 所示。对照组细菌在属水平上的样本群落组成结构结果如图 3A 所示，芽孢杆菌属（*Bacillus*）是对照组的主要优势菌，其次为类芽胞杆菌属（*Paenibacillus*）、芽孢乳杆菌属（*Sporolactobacillus*）、鞘脂杆菌属（*Pedobacter*）、无色杆菌属（*Achromobacter*）。*Bacillus* 会在含有大量淀粉的经济作物上生长[19]，而阿氏芽孢杆菌（*Bacillus aryabhattai*）则是芽孢杆菌属中优势菌株中丰度最高的菌株（图 3B），故考虑选择 *B. aryabhattai* 作为抑菌机理的研究菌株。*B. aryabhattai* 分布较广，在我国主要存在于农田和森林中[31]，其来源可能是红薯淀粉原料的污染。基于以上因素，本研究筛选出 *B. aryabhattai* 为指示菌进行 H_2O_2 的抑菌机理的研究。

2.3　H_2O_2 对 *B. aryabhattai* 的抑菌效果

最小抑菌浓度是反映抗菌药物抑菌活性的重要指标[32]。不同浓度的 H_2O_2 作用于 *B. aryabhattai* 培养物的浑浊度如表 3 所示，当 H_2O_2 的浓度在 250 μg/mL 及以上时能完全抑制 *B. aryabhattai* 的生长，孔洞非常澄清，而浓度在 125 μg/mL 时，孔洞开始浑浊，并在之后更低的浓度保持着浑浊的孔洞。由于 MIC 测定是根据孔洞在 18~24 h 后的浑浊度决定的，所以根据表 3 结果可以判定 250 μg/mL 为 H_2O_2 的 MIC。而在之后将 1×MIC 浓度及以上浓度的孔洞中的液体进行涂布计数，发现均没有菌落生长，故 MIC 浓度即为 MBC 浓度，即 250 μg/mL 是 H_2O_2 对 *B. aryabhattai* 的 MIC 的同时也是 MBC，高于 Cui 等[33] 关于 H_2O_2 对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的 MIC 分别是 50 μg/mL 和 100 μg/mL 的结论。*B. aryabhattai* 本身可能具有较高的抗氧化应激的能力[20]，故这可能是导致 H_2O_2 对 *B. aryabhattai* 的 MIC 高于金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的原因。

表 3　不同浓度 H_2O_2 对 *B. aryabhattai* 的 MIC

Table 3　MIC of different concentrations of H_2O_2 against *B. aryabhattai*

H_2O_2浓度（μg/mL）	*B. aryabhattai*	H_2O_2浓度（μg/mL）	*B. aryabhattai*
1000.00	−	31.25	+
500.00	−	15.63	+
250.00	−	7.81	+
125.00	+	阳性对照	+
62.50	+	阴性对照	−

注："−"培养基清澈，*B. aryabhattai*未生长；"+"*B. aryabhattai*生长正常，培养基浑浊；阳性对照组为含菌NB培养基，阴性对照组为无菌培养基。

抑菌剂在琼脂平板上会均匀扩散，从而抑制细菌的生长产生透明的圆圈，通过此来直观地体现 H_2O_2 的抑菌活性[34]。从表 4 中可以看出阴性对照组抑菌圈直径为 0 mm，而经 MIC 浓度的 H_2O_2 处理的 *B. aryabhattai* 的抑菌圈直径为 13.73±0.47 mm，呈中度敏感，且当 H_2O_2 浓度不断上升时，抑菌圈直径也随之增长（图 4），说明 H_2O_2 的抑菌活性是随着浓度的上升而不断提高的，呈浓度依赖性，直到浓度为 1000 μg/mL 时 *B. aryabhattai* 高度敏感。而阳性对照氨苄青霉素组的浓度在 0.25~1 mg/mL 之间的抑菌圈直径均大于 20 mm，呈高度敏感，透明圈的直径越大，则该抑菌剂对该菌株的抑制作用就越强[26]，说明 *B. aryabhattai* 对氨苄青霉素更为敏感。产生这个结果有两个原因，一是因为研究表明革兰氏阳性菌对青霉素的敏感程度高于革兰氏阴性菌[35]，二是因为

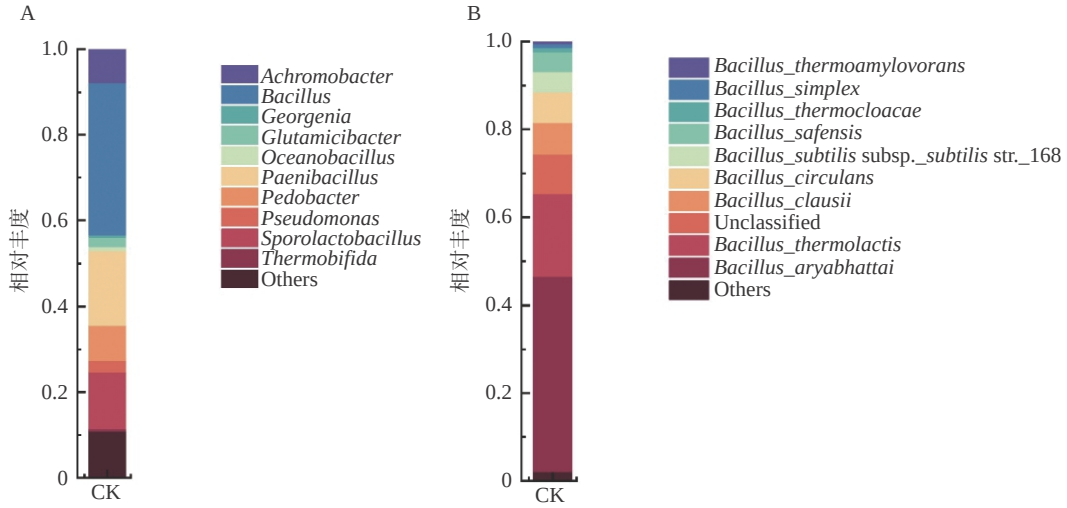


图 3　对照组的菌群分布

Fig.3　Distribution of the control group bacteria

注：A. CK 中细菌在属水平上的相对丰度分布；B. CK 中芽孢杆菌属在种水平上的相对丰度分布。

表 4 不同浓度的 H_2O_2 及氨苄青霉素对 *B. aryabhattai* 的抑菌圈大小

Table 4 IZD of different concentrations of H_2O_2 and ampicillin against *B. aryabhattai*

菌株	H_2O_2浓度（μg/mL）	IZD(mm)	氨苄青霉素浓度(μg/mL)	IZD(mm)
B. aryabhattai	0	0^{a}	0	0^{A}
	250	$13.73±0.47^{b}$	250	$21.72±0.68^{B}$
	500	$18.53±0.44^{c}$	500	$28.66±0.39^{C}$
	1000	$21.73±0.70^{d}$	1000	$31.70±0.63^{D}$

注：IZD 表示抑菌圈直径；小写字母表示过氧化氢组各浓度之间的显著性差异（$P<0.05$），大写字母表示氨苄青霉素组各浓度之间的显著性差异（$P<0.05$）。

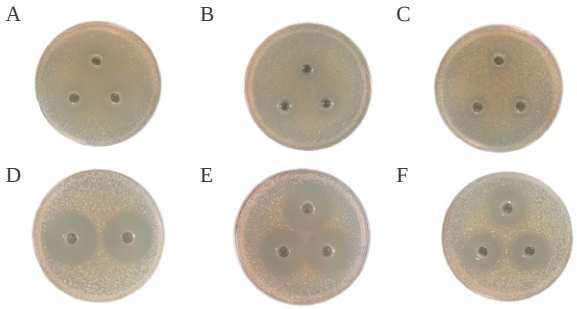


图 4 H_2O_2 和氨苄青霉素对 *B. aryabhattai* 的抑菌圈的影响

Fig.4 Effects of H_2O_2 and ampicillin on the inhibition zone diameter of *B. aryabhattai*

注：A. 1000 μg/mL H_2O_2；B. 500 μg/mL H_2O_2；C. 250 μg/mL H_2O_2；D. 1000 μg/mL 氨苄青霉素；E. 500 μg/mL 氨苄青霉素；F. 250 μg/mL 氨苄青霉素（D、E、F 是阳性对照）。

芽孢杆菌属于过氧化氢酶阳性菌，过氧化氢酶阳性细菌释放的胞内过氧化氢酶催化了 H_2O_2 的水解[36]，细菌产生的过氧化氢酶被认为是影响 H_2O_2 功效的最主要因素之一[7]。综上所述，H_2O_2 对 *B. aryabhattai* 的抑菌效果是有效的。

2.4 不同浓度 H_2O_2 对 *B. aryabhattai* 的生长曲线影响

生长曲线可用于展示微生物生长情况和新陈代谢规律，因此不同 H_2O_2 添加量下 *B. aryabhattai* 的生长曲线可反映其抑菌动力学[37]。为了初步了解 H_2O_2 对 *B. aryabhattai* 生长情况的影响，测定了该菌株 24 h 内的生长情况，结果如图 5 所示。未加 H_2O_2 的对照组在 24 h 内的生长遵循 S 型生长曲线，说明未被 H_2O_2 处理的 *B. aryabhattai* 的生长情况正常，其在大约 4 h 后进入对数生长期，14 h 后开始进入细菌生长平稳期。从图 5 中可以看出在生长 14 h 时，对照组 $OD_{600\ nm}$ 值分别是 H_2O_2 终浓度为 1/4×MIC（62.5 μg/mL）和 1/2×MIC（125 μg/mL）的 $OD_{600\ nm}$ 值的 2.75 倍和 8.68 倍，说明细菌早期生长阶段被不同程度抑制，对数生长期延后，当生长达到稳定期时与对照组没有显著区别（$P>0.05$），说明低浓度 H_2O_2 的抑制作用主要作用于细菌的前期生长，从而推迟细菌快速生长的时间。然而，观察 H_2O_2 终浓度为 1×MIC（250 μg/mL），2×MIC（500 μg/mL）和 4×MIC（1000 μg/mL）的生长曲线可知，在当前 H_2O_2 浓度下的 *B. aryabhattai* 在 24 h 内没有生长，表明细菌的生长完全被抑制。

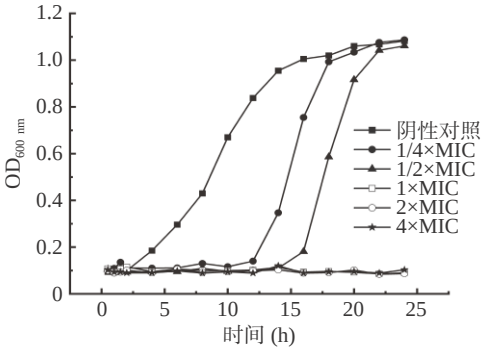


图 5 不同浓度 H_2O_2 对 *B. aryabhattai* 生长曲线的影响

Fig.5 Effects of different concentrations of H_2O_2 on the growth curve of *B. aryabhattai*

2.5 不同浓度 H_2O_2 对 *B. aryabhattai* 细胞壁及细胞膜的影响

AKP 是一种存在于细胞壁、细胞膜之间的酶，细菌的细胞壁因物理或化学因素被破坏时，其就会通过破损的细胞壁泄露到外面[38]，本研究通过检测 AKP 泄漏量来探索 H_2O_2 对 *B. aryabhattai* 细胞壁的破坏程度，AKP 含量越高表明细胞壁被破坏的越严重。由图 6A 可知，对照组的 AKP 含量很低，泄漏量是可以忽略不计。与对照组相比，当实验组浓度为 1×MIC、2×MIC 时，*B. aryabhattai* 胞外 AKP 活性显著增加（$P<0.05$），分别增加到 1.75、3.56 金氏单

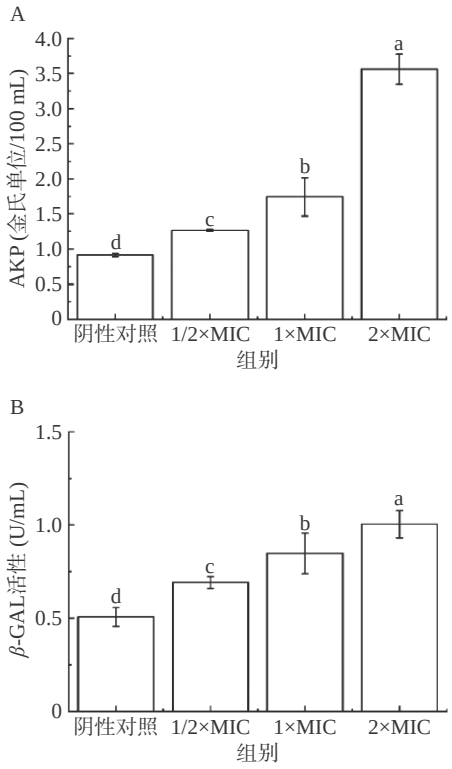


图 6 不同浓度 H_2O_2 处理 *B. aryabhattai* 胞外 AKP(A)和 β-GAL(B)活性的变化

Fig.6 Changes of extracellular AKP and β-GAL activity in *B. aryabhattai* treated with different concentrations of H_2O_2

注：不同字母标注表示显著性差异，$P<0.05$。

位/100 mL。实验组浓度为 2×MIC 时，*B. aryabhattai* 胞外 AKP 活性显著大于 1/2×MIC 处理组 1.27 金氏单位/100 mL（P<0.05），几乎是其的三倍。说明 H_2O_2 浓度越高，*B. aryabhattai* 胞外 AKP 活性越大，这表明 *B. aryabhattai* 细胞壁的破坏程度与 H_2O_2 浓度呈正相关，且呈现浓度依赖性。已经有研究证明 H_2O_2 能够穿透细胞壁，导致细胞死亡[39]。基于以上结果可以得出结论，H_2O_2 会增加细菌细胞壁的通透性，H_2O_2 的抑菌机制有一部分是通过破坏 *B. aryabhattai* 的细胞壁实现的。

β-GAL 在细胞内膜遭受损伤时，会外溢到细胞外，故可以用该酶的含量上的变化来推算细菌细胞膜的受损状况[40]。由图 6B 可知，经过 8 h 的作用后，*β*-GAL 在对照组中的泄漏量依然很微小，而实验组（1/2×MIC、1×MIC、2×MIC 组）上清液中 *β*-GAL 的含量均显著高于对照组（P<0.05），说明 H_2O_2 会影响 *B. aryabhattai* 内膜的完整性，可能是由于 H_2O_2 产生的羟基自由基会攻击膜中的多不饱和脂肪酸，并引发脂质过氧化[41]。同时，随着 H_2O_2 浓度的提升，*β*-GAL 的泄漏量也在逐渐增大，说明 *B. aryabhattai* 的 *β*-GAL 的泄露对 H_2O_2 呈浓度依赖性。

2.6　胞内核酸、蛋白质外泄的测定

核酸和蛋白质是细菌细胞膜和细胞质中的基础物质，是重要的单元结构物质，菌体内核酸、蛋白质等内容物的泄露可反映细胞膜的完整性[42]。为了阐述 H_2O_2 对 *B. aryabhattai* 的抑制作用，研究了 H_2O_2 对 *B. aryabhattai* 的细胞膜通透性和完整性的影响。图 7A 为细胞内核酸泄漏到胞外的浓度变化情况，2 h 时各处理组与对照组差异较小，说明细胞膜损伤不严重，核酸泄漏不明显。各处理组菌体在 8 h 内核酸泄漏量均随着时间的增长而不断增加，说明 H_2O_2 对细胞膜有持续的破坏作用（图 7A）。核酸泄漏量也随着 H_2O_2 浓度的提升而显著增加（P<0.05），说明 H_2O_2 使细胞膜结构发生改变，增强其通透性，导致功能成分外泄，从而抑制菌体生长。

从图 7B 中可以看出，未添加 H_2O_2 的菌悬液中可溶性蛋白含量极低，且在 8 h 内维持在一个较低的水平，这些微量蛋白很可能是 *B. aryabhattai* 正常生理活动产生的外分泌蛋白[43]，说明 *B. aryabhattai* 细胞膜在较长时间内具有良好的完整性，胞内蛋白没有发生明显的泄露。所有加入 H_2O_2 的实验组 2 h 后的胞外蛋白质含量均显著增加，与对照组相比差异显著（P<0.05），并且增加量与 H_2O_2 浓度呈浓度依赖性，随着浓度的增大而增加（图 7B）。同时，由图 7B 可知，随着 H_2O_2 作用时间延长，细胞蛋白质泄露量增加，说明添加 H_2O_2 对 *B. aryabhattai* 的蛋白质泄漏量也呈时间依赖性。研究表明 H_2O_2 可能对细胞膜上的蛋白质发生选择性氧化，H_2O_2 作用会导致产生羟基自由基的芬顿反应，从而使体内的 DNA、蛋白质和膜脂氧化[44]。综上所述，H_2O_2 可导致细胞内

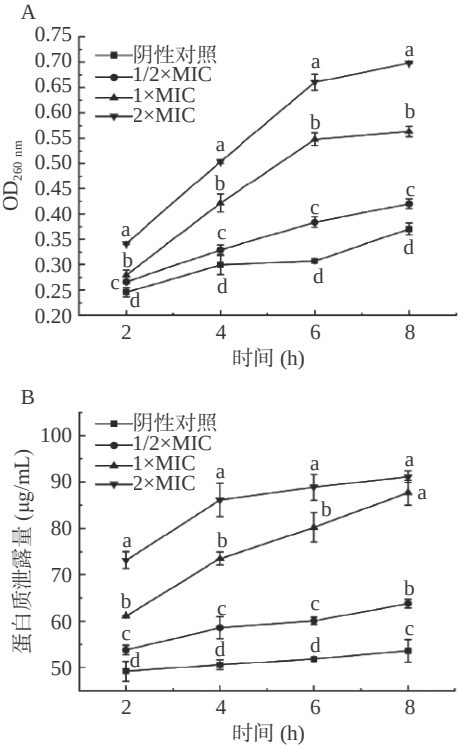


图 7　不同浓度 H_2O_2 对 *B. aryabhattai* 的核酸（A）和蛋白质（B）泄露的影响

Fig.7　Effects of different concentrations of H_2O_2 on the leakage of nucleic acids (A) and proteins (B) of *B. aryabhattai*

注：不同字母标注表示同一时间不同浓度间有显著性差异，P<0.05。

蛋白质和核酸的明显渗漏，破坏细胞结构，引起细胞功能紊乱。

2.7　不同浓度 H_2O_2 对 *B. aryabhattai* 的微观结构影响

图 8A~D 是用扫描电镜拍摄的 *B. aryabhattai* 的细菌形态，从图 8A、8B 可以看出，对照组 *B. aryabhattai* 的菌体形态饱满正常，杆状结构清晰，边界光滑，细胞间无粘附，而在 *B. aryabhattai* 被 1×MIC（250 μg/mL）的 H_2O_2 处理后菌体形态发生肉眼可见的异变，细胞完全变形，表面崎岖不平，边界不清晰且细胞相互粘附，细胞壁和细胞膜有所缺失（图 8C）。再放大倍数至 20000 倍后（图 8D）观察到了菌体表面塌陷破碎，部分出现孔洞，说明 *B. aryabhattai* 的完整度遭到了严重破坏。这与李靖[45] 研究发现 H_2O_2 会导致大肠杆菌细胞壁暂时性孔隙样病变或塌陷的结论一致。总的来说，1×MIC（250 μg/mL）的 H_2O_2 通过破坏 *B. aryabhattai* 细胞壁、细胞膜结构，达到抑菌效果。

采用透射电镜分别对 0×MIC（0 μg/mL）和 1×MIC（250 μg/mL）浓度的 H_2O_2 处理 4 h 的 *B. aryabhattai* 超薄切片进行观察。如图 8E、8F 所示，未经 H_2O_2 作用的 *B. aryabhattai* 细胞整体结构相对正常，切面结构清晰，胞质均匀；细胞壁完整，厚度均一；细胞膜结构正常，未见明显质壁分离，细胞未出现破损现象。而在 1×MIC（250 μg/mL）H_2O_2 处理 4 h 后，*B.*

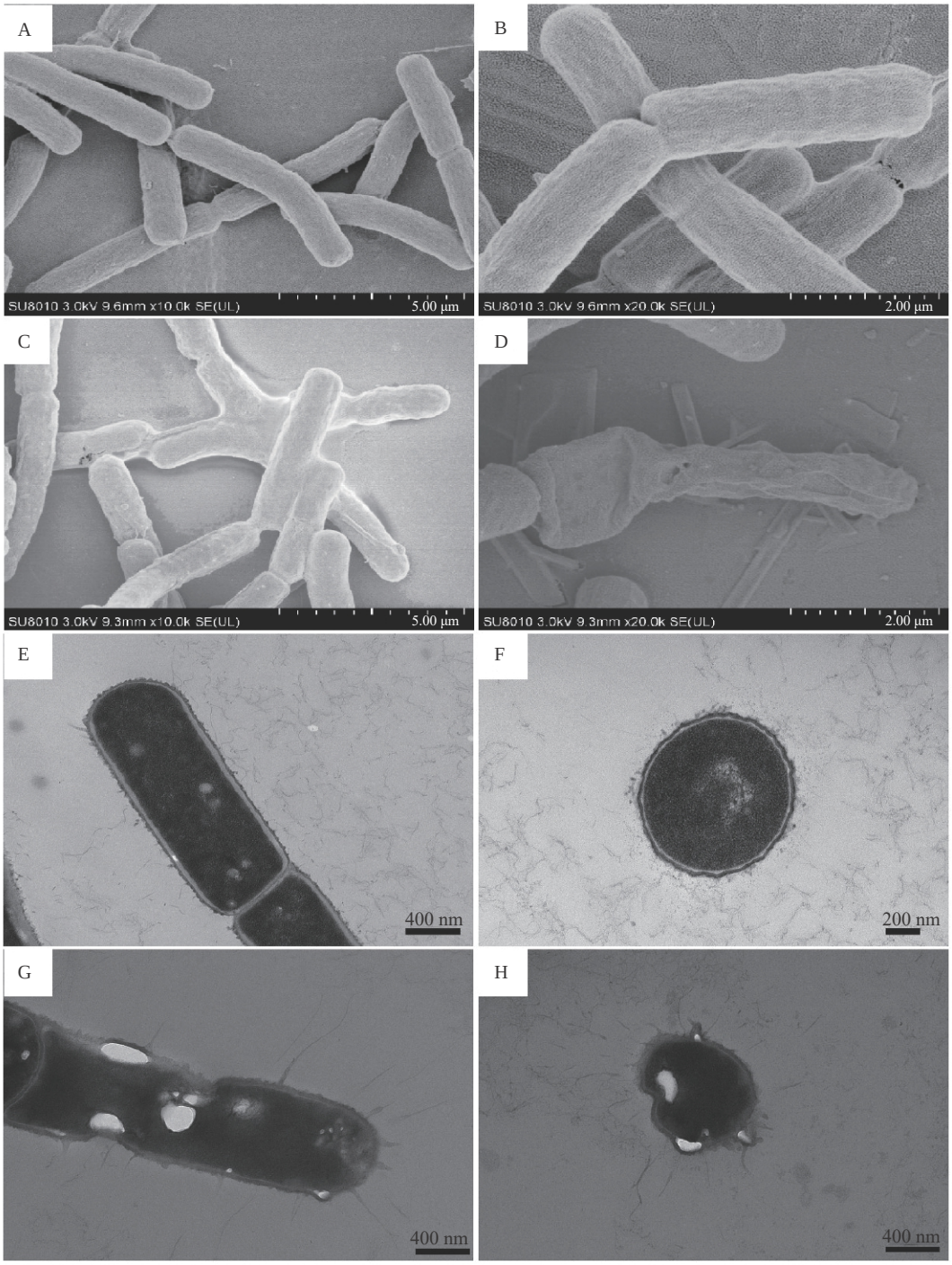


图 8　SEM 和 TEM 观察 *B. aryabhattai* 形态及内部结构

Fig.8　Morphology and internal structure of *B. aryabhattai* observed by SEM and TEM

注：A、B：阴性对照下 *B. aryabhattai* 的外部形态（10000×、20000×）；C、D：1×MIC H_2O_2 处理 4 h 的 *B. aryabhattai* 外部形态（10000×、20000×）；E、F：阴性对照下 *B. aryabhattai* 的内部结构（12000×、20000×）；G、H：*B. aryabhattai* 被 H_2O_2 处理 4 h 后的内部结构（15000×）。

aryabhattai 与外界环境的边界变得模糊；细胞壁完整，局部结构模糊，轻微凹陷厚薄不均匀；细胞膜结构模糊，局部明显质壁分离，形成较大的空洞；细胞质的分布不再均匀，部分细胞质与细胞膜出现分离现象（图 8G、8H），可能是因为 H_2O_2 导致了物质泄露[46]。这表明 1×MIC 的 H_2O_2 可对 *B. aryabhattai* 的细胞壁、细胞膜造成一定破坏，并且导致细胞质内部形成较大空洞。

3　结论

本研究对铺浆式生产的鲜湿粉条添加 0.25‰、0.5‰、1‰的 H_2O_2 并贮藏 90 d，发现所有 H_2O_2 组未发生腐败且无 H_2O_2 残留，其中 0.5‰的 H_2O_2 鲜湿粉条没有产生裂纹和孔洞，且能适应工厂大生产的环境，达到保鲜要求。同时对对照组的腐败细菌进行高通量测序发现，芽孢杆菌属为优势属，*B. aryabhattai* 是芽孢杆菌属中物种丰富度最高的菌种，故选用筛选

出的 *B. aryabhattai* 为抑菌机理实验的指示菌进行 H_2O_2 抑菌实验。结果表明，H_2O_2 对 *B. aryabhattai* 的最小抑菌浓度是 250 μg/mL，且该浓度下，*B. aryabhattai* 对 H_2O_2 呈中度敏感，生长曲线实验表明 1×MIC 的 H_2O_2 在 24 h 内能完全抑制住 *B. aryabhattai* 的生长。此外，H_2O_2 能通过影响细胞壁、细胞膜的通透性，破坏膜蛋白，导致细胞结构损伤和蛋白质、核酸和各种酶（AKP、β-GAL）等功能成分的释放，这些变化均与 H_2O_2 呈浓度依赖性，且 SEM 和 TEM 观察发现在 1×MIC 的 H_2O_2 处理后细胞出现黏连、孔洞和质壁分离现象。因此，本研究表明 H_2O_2 可以作为鲜湿粉条中优势腐败菌 *B. aryabhattai* 的有效抑制剂，为其在鲜湿粉条的工厂大生产中的应用及绿色保鲜方面提供一定的理论基础。

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

参考文献

[1] FENG Y Y, MU T H, ZHANG M, et al. Effects of different polysaccharides and proteins on dough rheological properties, texture, structure and *in vitro* starch digestibility of wet sweet potato vermicelli[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 148: 1−10.

[2] XIE L H, TANG S Q, LUO J, et al. Physiochemical properties of rice starch for production of vermicelli with premium quality[J]. Journal of Food Science and Technology, 2017, 54: 3928−3935.

[3] CAI H L, YANG S, JIN L, et al. A cost-effective method for wet potato starch preservation based on hurdle technology[J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 121: 108958.

[4] KUMAR M, SHIMPY, SAHDEV R K, et al. Natural convective greenhouse vermicelli drying: Thermo-environ-econo-kinetic analyses[J]. Sustainable Energy Technologies and Assessments, 2023, 55: 103002.

[5] YANG S, ZHANG M N, SHAN C S, et al. Evaluation of cooking performance, structural properties, storage stability and shelf life prediction of high-moisture wet starch noodles[J]. Food Chemistry, 2021, 357: 129744.

[6] YANG S, JIN L, XU X H, et al. Long-term storage and temperature induced quality changes of industrial-scale wet starch noodles[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 153: 112504.

[7] ABDELSHAFY A M, HU Q N, LUO Z S, et al. Hydrogen peroxide from traditional sanitizer to promising disinfection agent in food industry[J]. Food Reviews International, 2023, 33: 2191690.

[8] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 2760-2014 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准[S]. 北京：中国标准出版社, 2014. [National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. GB 2760-2014 National food safety standard, standard for the use of food additives[S]. Beijing: China Standard Press, 2014.]

[9] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 5009.226-2016 食品安全国家标准 食品中过氧化氢残留量的测定[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 5009.226-2016 National food safety standard, the determination of hydrogen peroxide residue in food[S]. Beijing: China Standard Press, 2016.]

[10] MCEVOY B, ROWAN N J. Terminal sterilization of medical devices using vaporized hydrogen peroxide: A review of current methods and emerging opportunities[J]. Journal of Applied Microbiology, 2019, 127(5): 1403−1420.

[11] BAYOUMI Y A. Improvement of postharvest keeping quality of white pepper fruits (*Capsicum annuum*, L.) by hydrogen peroxide treatment under storage conditions[J]. Acta Biologica Szegediensis, 2008, 52(1): 7−15.

[12] KURE C F, LANGSRUD S, MORETRO T. Efficient reduction of food related mould spores on surfaces by hydrogen peroxide mist[J]. Foods, 2021, 10(1): 55.

[13] BARBACCIA P, LIPOCELLI L, MOSCHETTI G, et al. Application of hydrogen peroxide to improve the microbiological stability of food ice produced in industrial facilities[J]. Applied Sciences-Basel, 2022, 12(1): 210.

[14] WANG H O, LIU S H, ZHOU X J, et al. Treatment with hydrogen peroxide improves the physicochemical properties of dietary fibres from Chinese yam peel[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2020, 55(3): 1289−1297.

[15] MCEVOY B, EVELAND R. Vaporized hydrogen peroxide: A well-known technology with a new application[J]. Biomedical Instrumentation & Technology, 2020, 54(s1): 74−79.

[16] BRUDZYNSKI K, ABUBAKER K, ST-MARTIN L, et al. Re-examining the role of hydrogen peroxide in bacteriostatic and bactericidal activities of honey[J]. Frontiers in Microbiology, 2011, 2(213): 1−9.

[17] GREEN M C, DUBNICKA L J, DAVIS A C, et al. Thermodynamics and kinetics for the free radical oxygen protein oxidation pathway in a model for β-structured peptides[J]. Journal of Physical Chemistry A, 2016, 120(16): 2493−2503.

[18] YANG S, SHAN C S, XU Y Q, 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.

[19] JANISZEWSKA D, ZLOCH M, POMASTOWSKI P, et al. Implications of sample preparation methods on the MALDI-TOF MS identification of spore-forming bacillus species from food samples: A closer look at *Bacillus licheniformis*, *Peribacillus simplex*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Bacillus flexus*, and *Bacillus marisflavi*[J]. ACS Omega, 2023, 8(38): 34982−34994.

[20] PARK Y G, MUN B G, KANG S M, et al. *Bacillus aryabhattai* SRB02 tolerates oxidative and nitrosative stress and promotes the growth of soybean by modulating the production of phytohormones[J]. PLOS ONE, 2017, 12(3): 173203.

[21] 中华人民共和国国家卫生健康委员会国家市场监督管理总局. GB 4789.2-2022 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定[S]. 北京：中国标准出版社, 2022. [National Health Commission of the People's Republic of China, State Administration for Market Regulation. GB 4789.2-2022 National food safety standard, food microbiology examination, determination of total colony count[S]. Beijing: China Standard Press, 2022.]

[22] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 2713-2015 食品安全国家标准 淀粉制品[S]. 北京：中国标准出版社, 2015. [National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. GB 2713-2015 National food safety standard, starch products[S]. Beijing: China Standard Press, 2015.]

[23] HE F, LI C, LIU L. Effect of continuous cropping of konjac

(*Amorphophallus konjac*) on soil bacterial communities as evaluated by Illumina high-throughput sequencing[J]. Archives of Agronomy and Soil Science, 2023, 69(10): 1878−1892.
[24] CUI H, WU J, LI C, et al. Improving anti-listeria activity of cheese packaging via nanofiber containing nisin-loaded nanoparticles[J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 81: 233−242.
[25] CHEN Y N, LI H-L, HUANG J J, et al. Antimicrobial activities and mechanism of sturgeon spermary protein extracts against *Escherichia coli*[J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 1021338.
[26] FAN Y, LI J, REN X, et al. Preparation, characterization, bacteriostatic efficacy, and mechanism of zinc/selenium-loaded sodium humate[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2023, 107(24): 7417−7425.
[27] 陈曦, 李欣翼, 陈发顺, 等. 5 株解淀粉芽孢杆菌的益生特性及抑菌活性研究[J]. 中国畜牧兽医, 2023, 50(5): 2082−2091. [CHEN X, LI X Y, CHEN F S, et al. Probiotic characteristics and antibacterial activity study of five strains of *Amylolytic bacillus*[J]. Chinese Animal Husbandry and Veterinary, 2023, 50(5): 2082−2091.]
[28] 杨瑞冬, 李伯海, 王元弛, 等. *Lactobacillus buchneri* IMAU80233 高密度发酵工艺优化[J]. 食品科学, 2019, 40(22): 147−154. [YANG R D, LI B H, WANG Y C, et al. Optimization of high-density fermentation process for *Lactobacillus buchneri* IMAU80233[J]. Food Science, 2019, 40(22): 147−154.]
[29] WIJESUNDARA N M, RUPASINGHE H P V. Bactericidal and anti-biofilm activity of ethanol extracts derived from selected medicinal plants against streptococcus pyogenes[J]. Molecules, 2019, 24(6): 1165.
[30] 何江燕. 紫菜鲜粉条贮藏过程中品质劣变规律研究及年产 1500 吨紫菜鲜粉条工厂设计[D]. 南京: 南京农业大学, 2023. [HE J Y. Quality deterioration of wet *Porphyra yezoensis* vermicelli and factory design of 1500-ton annual production[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2020.]
[31] 吴昕尧. 阿氏芽孢杆菌(*Bacillus aryabhatta*)普鲁兰酶异源表达、酶学性质研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2022. [WU X Y. Heterologous expression and enzymatic properties study of pullansin from *Bacillus aryabhattai*[D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2022.]
[32] YANG D, ZHU R, XU H X, et al. Antibacterial mechanism of taxifolin and its application in milk preservation[J]. Food Bioscience, 2023, 53: 102811.
[33] CUI Y, OH Y J, LIM J, et al. AFM study of the differential inhibitory effects of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) against Gram-positive and Gram-negative bacteria [J]. Food Microbiology, 2012, 29(1): 80−87.
[34] ASHOKA G B, SHIVANNA M B. Metabolite profiling, *in vitro* and *in silico* assessment of antibacterial and anticancer activities of *Alternaria alternata* endophytic in *Jatropha heynei*[J]. Archives of Microbiology, 2023, 205(2): 61.
[35] SHUKLA A, KHAN E, TANDON P, et al. Study of vibrational spectra and hydrogen bonding network in dimeric and tetrameric model of ampicillin using DFT and AIM approach[J]. Journal of Molecular Structure, 2017, 1131: 225−235.
[36] WU Y, JIANG S, FU Z. Employment of teicoplanin-coated magnetic particles for quantifying gram-positive bacteria via catalase-catalyzed hydrolysis reaction of H_2O_2[J]. Talanta, 2020, 211: 120728.
[37] ZHOU Q, HU Z, DU L, et al. Inhibition of *Enterococcus faecalis* growth and cell membrane integrity by *Perilla frutescens* essential oil[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2020, 17(9): 547−554.
[38] WANG F, WEI F, SONG C, et al. *Dodartia orientalis* L. essential oil exerts antibacterial activity by mechanisms of disrupting cell structure and resisting biofilm[J]. Industrial Crops and Products, 2017, 109: 358−366.
[39] MILLS J, HORVATH K M, BRIGHTWELL G. Antimicrobial effect of different peroxyacetic acid and hydrogen peroxide formats against spores of *Clostridium estertheticum*[J]. Meat Science, 2018, 143: 69−73.
[40] SHI C, CHE M, ZHANG X, et al. Antibacterial activity and mode of action of totarol against *Staphylococcus aureus* in carrot juice[J]. Journal of Food Science and Technology, 2018, 55: 924−934.
[41] LAPORTE A, LORTZ S, SCHAAL C, et al. Hydrogen peroxide permeability of cellular membranes in insulin-producing cells[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2020, 1862(2): 183096.
[42] KOHANSKI M A, DWYER D J, COLLINS J J. How antibiotics kill bacteria: From targets to networks[J]. Nature Reviews Microbiology, 2010, 8(6): 423−435.
[43] BERGER E, CRAMPTON M C, NXUMALO N P, et al. Extracellular secretion of a recombinant therapeutic peptide by *Bacillus halodurans* utilizing a modified flagellin type III secretion system[J]. Microbial Cell Factories, 2011, 10: 62.
[44] SAMANTHA L S, LUCY O, KATIE L, et al. Heterogeneous Fenton's-like catalyst potentiation of hydrogen peroxide disinfection: An investigation into mechanisms of action[J]. Journal of Applied Microbiology, 2023, 134(3): 17.
[45] 李靖. EGCG 消毒剂对枯草芽孢杆菌的抑制效果及作用机理研究[D]. 北京: 北京建筑大学, 2023. [LI J. Study on the inhibitory effect and mechanism of EGCG disinfectant on *Bacillus subtilis*[D]. Beijing: Beijing University of Civil Engineering and Architecture, 2023.]
[46] LIN L, ZHANG X, ZHAO C, et al. Liposome containing nutmeg oil as the targeted preservative against *Listeria monocytogenes* in dumplings[J]. RSC Advances, 2016, 6(2): 978−986.

管立军, 朱玲, 王崑仑, 等. 祖先序列重建增强 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶的热稳定性 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 121−128. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024010227
GUAN Lijun, ZHU Ling, WANG Kunlun, et al. Ancestral Sequence Reconstruction Enhances Thermal Stability of D-Allulose 3-Epimerase[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 121−128. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024010227

· 生物工程 ·

祖先序列重建增强 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶的热稳定性

管立军[1,2], 朱　玲[1,2], 王崑仑[1,2], 李家磊[1,2], 高　扬[1,2], 严　松[1,2], 张馨笛[1,2], 陈　晴[1,2], 季妮娜[3], 李　波[1,2,*]
(1.黑龙江省农业科学院食品加工研究所, 黑龙江哈尔滨 150086;
2.黑龙江省食品加工重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150086;
3.黑龙江省农业科学院大豆研究所, 黑龙江哈尔滨 150086)

摘　要: 为解决现有 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶（DAEase）热稳定性差的产业问题，本文采用系统发育指导的大数据挖掘、合理修饰和祖先序列重建策略（ASR），重建了具有不同催化结构域 DAEase 的祖先序列，构建了表达载体，通过重组表达与分子对接筛选出了 DAEase A13 并进行酶学性质表征，此外，还基于结构分析与分子动力学模拟揭示了 DAEase A13 热稳定性增强的分子机制。结果表明，基于 ASR 策略所构建的 A13 70 ℃ 时半衰期可达 8.4 h，其热稳定性较野生（WT）酶显著增强，最大转化率为 31%，催化活性也略高于 WT 酶。立体结构模拟与分子动力学模拟揭示了 ASR A13 中大量氢键和疏水作用的增加维持了高温下酶分子结构的稳定性，是其热稳定性增强的主要因素。研究结果证实了 ASR 策略可以改造 DAEase 使其稳定性、活性和混杂性增强，可以为 D-阿洛酮糖工业生产提供良好的生物催化剂。

关键词: 祖先序列重建, D-阿洛酮糖, D-阿洛酮糖 3-差向异构酶, 热稳定性
中图分类号: TS201.1　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2024)21−0121−08
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024010227
本文网刊:

Ancestral Sequence Reconstruction Enhances Thermal Stability of D-Allulose 3-Epimerase

GUAN Lijun[1,2], ZHU Ling[1,2], WANG Kunlun[1,2], LI Jialei[1,2], GAO Yang[1,2], YAN Song[1,2], ZHANG Xindi[1,2], CHEN Qing[1,2], JI Nina[3], LI Bo[1,2,*]
(1.Food Processing Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China;
2.Heilongjiang Province Key Laboratory of Food Processing, Harbin 150086, China;
3.Soybean Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)

Abstract: To solve the problem of poor thermal stability of the current D-allulose 3-epimerase (DAEase), the ancestor sequences of DAEase with different catalytic domains were reconstructed by big data mining, reasonable modification and ancestor sequence reconstruction (ASR) strategy under the guidance of phylogenetic information. The expression vectors of the ancestor sequences were constructed, and DAEase A13 with significantly enhanced thermal stability was screened by recombinant expression and molecular docking, and its enzymatic properties were characterized. In addition, the molecular mechanism of thermal stability enhancement of DAEase A13 was revealed based on structural analysis and molecular dynamics. The results showed that the half-life of A13 constructed based on ASR strategy could reach 8.4 h at 70 ℃, indicating that its thermal stability was significantly enhanced compared with that of wild-type (WT) enzyme. The maximum conversion rate of A13 reached 31%, indicating that the catalytic activity of A13 was slightly higher than that of

收稿日期: 2024−01−24
基金项目: 黑龙江省省属科研院所科研业务费基础项目（CZKYF2022-1-B021）; 国家自然科学基金资助项目（31600642）。
作者简介: 管立军（1983−）, 男, 博士, 研究员, 研究方向: 食品工程与营养, E-mail: qqaipphh@sina.com。
*** 通信作者:** 李波（1980−）, 男, 博士, 研究员, 研究方向: 食品工程与营养, E-mail: blnky@163.com。

WT enzyme. The structural and molecular dynamics analysis revealed that the increase in hydrogen bonding and hydrophobic interaction in ASR A13 was the main factor responsible for maintaining the stability of the enzyme's molecular structure at high temperatures. The results showed that ASR strategy could modify DAEases to enhance the stability, activity or hybridity, which could provide superior biocatalyst sources for various industrial applications of functional sugars.

Key words: ancestral sequence reconstruction; D-allulose; D-allulose 3-epimerase; thermostability

祖先序列重建技术(Ancestral sequence reconstruction, ASR)是一种允许从同源野生型基因的集合推断“祖先”基因的方法, 能够为解析生物酶结构与功能关系的演化过程提供新思路[1−3]。ASR 通过使用已有蛋白质序列的数据集进行多重序列比对来构建系统发育树, 基于精确的系统发育分析开发的算法来推断目标序列的祖先序列[2,4]。ASR 产生的祖先生物酶通常具有更高的稳定性[5] 或更广的底物谱[6], 在一些情况下可以两者同时实现[7−9]。Joho 等[8] 成功应用 ASR 获得了热稳定性和催化活性显著提高的分解 PET 塑料的 PET 酶。Gumulya 等[9] 通过 ASR 技术重建了底物谱扩大且稳定性显著增强的新型 P450 酶。与传统方式相比, ASR 具有多重优势, 包括突变的随机性足够大且远离活性位点[10]、筛选范围更小[11−13] 以及重构过程并不依赖目标酶的详细结构信息[14−16]。目前, 尚未有将 ASR 应用于差向异构酶的改造的相关报道。

D-阿洛酮糖是一种公认安全的稀有糖, 其相对甜度可以达到蔗糖的 70%, 但热量仅为 0.2 kcal/g[17−18]。此外, D-阿洛酮糖具有多种生理作用, 如抗肥胖、抗高血糖、抗糖尿病、抗氧化和神经保护作用[19−21]。因此, D-阿洛酮糖在食品和医药等行业具有重要的应用价值[22−23]。D-阿洛酮糖 3-差向异构酶(DAEase)是基于 Izumoring 策略由 D-果糖生物合成 D-阿洛酮糖的关键酶, 其催化最适温度为 55~65 ℃[24−26]。目前所报道的 DAEases 大多具有较高的底物特异性和催化活性, 但热稳定性较差, 无法在实际生产的工业条件下应用[27]。Zhang 等[28] 筛选了来源于 *Treponema primitia* ZAS-1 的 DAEase (TpDAE), 它在 70 ℃ 条件下催化 500 g/L D-果糖转化 D-阿洛酮糖的产率为 137.5 g/L, 转化率为 27.5%, 但孵育 1 h 后活性完全丧失。此外, 来源于 *Clostridium cellulolyticum* 的 DAEase 在 60 ℃ 条件下的半衰期仅为 10 min[29], 来源于 *Christensenellaceae.minuta* 的 DAEase 在 50 ℃ 条件下半衰期为 40 min[30]。因此, 获得高催化活性和热稳定性的 DAEase 是当前该领域的研究热点。

本研究基于具有较高催化活性的 TpDAE 蛋白序列开展祖先序列重建策略研究, 重建了具有不同催化结构域的祖先序列。此后, 通过基因合成获得了序列重建的 DAEase(A1 和 A13)基因序列, 构建了重组表达质粒与大肠杆菌重组表达菌株, 对重建后的 DAEase 进行纯化与表征, 其中 A13 较野生(WT)酶热稳定性显著增强。基于结构分析与分子动力学模拟实验探索了 DAEase 稳定性和催化活性增强的内在机制。以上研究表明, 祖先序列重建策略可以筛选出具有优良性能的差向异构酶, 能为具有新特性的稀有糖生物转化酶的半理性工程设计提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

Escherichia coli JM109、*Escherichia coli* BL21(DE3)、pET22b(+) 均为实验室保存; Nde I、Xho I 大连宝生物 Takara 公司; 质粒小提试剂盒、小量 DNA 胶纯化回收试剂盒 Omega Bio-Tek 公司; Luria-Bertani(LB)培养基: 准确称取酵母浸粉 5 g, 蛋白胨 10 g 和 NaCl 10 g, 溶于 1000 mL 蒸馏水中, 121 ℃ 高压灭菌 20 min; 所有化学品均为分析级 均来自 Sigma-Aldric 公司或生工生物工程(上海)股份有限公司。

HYG-II 型回旋式恒温调速摇床柜 上海欣蕊自动化设备有限公司; DYCZ-24D 型核酸电泳仪 北京市六一仪器厂; Agilent 1260 型高效液相色谱仪 上海莱睿科学仪器有限公司; Agilent 1260 Infinity 蒸发光散射检测器 安捷伦科技有限公司; 碳水化合物 ES 柱-w(5 μm, 4.6×250 mm) 赛默飞世尔科技公司。

1.2 实验方法

1.2.1 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶的系统发育推断与祖先序列重建 本研究利用 FireProtASR(https://loschmidt.chemi.muni.cz/fireprotasr)进行系统发育推断和祖先序列重建。将 TpDAE 的氨基酸序列输入 FireProtASR 进行分析, FireProtASR 通过 SwissProt 和 Catalytic Site Atlas 对 DAEase 的氨基酸序列进行保守性评估, 其 Y6、E152、E158、D185、H211、R217 和 E246 催化残基选为保守区域。FireProtASR 首先利用 PSI-BLAST 对 NCBI 数据库的 DAEase 进行筛选以获取其同源性序列; 其次通过 ClustalΩ 对同源序列进行多序列比对并利用 IQTREE 软件包推断其系统发育树; 然后将多序列比对结果和建立的系统发育树输入 RAxML 算法进一步扩展其系统发育树; 最后将系统发育树和多序列比对结果导入到使用 Lazarus 方法的 PALM 软件包中以重建其祖先序列。FireprotASR 算法采用局部加权回归共识法处理误差, 其进行 50 次自举以验证系统进化树, 引导程序输出值的范围为 5~100, 大多数 ASR 节点的引

导值大于 70，表明节点的置信度较高。采用 Discovery Studio 2019 对重建的 ASR DAEase 进行分子对接实验。

1.2.2　A1 和 A13 的克隆过表达和蛋白纯化　祖先序列重建后的 DAEase 及其后代的编码基因由金唯智生物科技有限公司合成，插入 pET22b(+)载体的 Nde I 和 Xho I 限制性内切酶位点之间构建重组载体，测序验证后备用。将重组质粒转入 *E. coli* BL21(DE3)中，接种于含有 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 固体培养基筛选阳性转化子。

从平板上挑取长势良好的阳性转化子接种至含有 50 μg/mL 卡那霉素的 200 mL LB 培养基，37 ℃ 220 r/min 条件下培养。当菌体密度(OD_{600})达到 0.6~0.8 时，加入 0.2 mmol/L 异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导其蛋白表达。在 16 ℃ 110 r/min 下进一步培养 12 h，使 DAEase 缓慢表达。在 4 ℃ 5000 r/min 条件下离心 15 min 收集菌体，用 0.85% 生理盐水洗涤两次。

细胞在 Lysis buffer(50 mmol/L Tris-HCl，10 mmol/L 咪唑，500 mmol/L NaCl 和 1 mmol/L DTT，pH7.5)中超声破碎 10 min，在 4 ℃ 10000 r/min 条件下离心 30 min 去除细胞碎片。将上清液与 Ni-NTA 树脂充分结合后加入重力柱，用 10 mL Lysis buffer 和 Elution buffer(50 mmol/L Tris-HCl，500 mmol/L 咪唑，500 mmol/L NaCl 和 1 mmol/L DTT，pH7.5)分别洗涤，Elution buffer 洗脱后的流通液即为 His 标记的重组蛋白溶液。利用 SDS-PAGE 检验蛋白表达及纯化效果，并通过 Nanodrop 2000 测定纯化后的蛋白浓度，用于后续活性测定。

1.2.3　A13 性质的表征　在 40~80 ℃ 下反应确定温度对祖先序列重建后 DAEase A13 活性的影响。pH 稳定性：在不同缓冲液(MES：pH5.5~7.0，PBS：7.0~8.0，Tris-HCl：8.0~9.0，CAPS：pH9.0~10.0)中孵育 A13，通过 1.2.4 活性测定方法确定 pH 曲线以评估其 pH 稳定性。热稳定性：将纯化后的 A13 分别在 50、60、70 和 80 ℃ 条件下孵育，在不同的时间间隔，从孵育混合物中提取适当的样品，采用 1.2.4 酶活性测定方法确定残余活性。半衰期：在最佳反应条件下，以未孵育处理的酶为空白对照，测定其残余活性。DAEase 的失活符合一级动力学模型[31]，所有反应均在三个独立实验中进行，其半衰期计算公式如下：

$$K_c = (2.0303/T)/\lg(E_0/E)$$

$$t_{1/2} = 0.693/K_c$$

式中：K_c 为衰减常数；E_0 为初始酶活性；E 为 T(温度)下 DAEase 的残余活性。

1.2.4　酶活性测定　反应液总体积为 1.0 mL，含有 1 μmol/L A13、50 g/L D-果糖和 1 mmol/L $CoCl_2$ 的 Tris-HCl 缓冲液(pH7.5)。将反应液在沸水中孵育 10 min 后终止反应，测定其活性。在此条件下，每分钟催化生成 1 μmol D-阿洛酮糖的酶量被定义为一个酶活性单位。利用 HPLC 法测定 A13 在反应样品中产生的 D-阿洛酮糖的量。

1.2.5　高效液相色谱(HPLC)法检测 D-阿洛酮糖　测定酶促反应中由 D-果糖转化为 D-阿洛酮糖的量以测定酶的活性。使用碳水化合物 ES 柱-w(5 μm，4.6×250 mm)和 1260 Infinity 蒸发光散射检测器进行分离和检测，HPLC 条件为：75% 乙腈和 25% 去离子水作为流动相等度洗脱，进样量为 10 μL，流速为 1.0 mL/min，柱温为 40 ℃，载气压力 30 psi，漂移管温度为 55 ℃[32]。测定重复三次。

1.2.6　分子动力学模拟　基于梭状芽孢杆菌(*Clostridia bacterium*)D-阿洛酮糖 3-差向异构酶(PDB ID：7X7W)的晶体结构，使用 SWISS-MODEL 在线服务器(https://swissmodel.expasy.org/)建模，生成同源的 TpDAE 和 A13 的三维模型，并通过 PyMoL(http://www.pymol.org)进行可视化分析。将预测的模型提交至 SAVES 在线服务器(https://saves.mbi.ucla.edu/)，利用 Ramachandran 图对模型的 3D 结构参数进行评估。TpDAE 和 A13 的氨基酸交互网络分析通过 RING 服务器(https://ring.biocomputingup.it/submit)进行，蛋白质表面疏水性分析使用在线网站 Expasy(https://web.expasy.org/protscale)。

基于以上结构，开展分子动力学模拟分析，比较 TpDAE 及其祖先序列重建后 A13 的性质以阐明其热稳定性提高的分子机制。将系统的初始配置保持一致，使用 AMBER 14 软件包和 AMBER99SB 力场进行分子动力学(MD)模拟。最初的结构被放置在一个充满水分子的十二面体盒子，蛋白质分子与盒子边缘间隔为 1 nm，利用 Na^+或 Cl^-中和系统的电荷。随后，为了消除潜在的不良接触，使整个系统能量最小化。在能量最小化后，整个系统在 100 ps 内从 0 逐渐加热到 343 K(70 ℃)。最后，在 Langevin 算法控制的温度为 343 K 和压力为 1.0 atm 条件下进行 30 ns 的分子动力学模拟，时间步长为 2 fs。

1.3　数据处理

所有实验数据均以 3 次实验结果的平均数±标准误差(mean±SE)表示。Origin 9.0 软件进行绘图。

2　结果与分析

2.1　D-阿洛酮糖 3-差向异构酶的祖先序列重建

通过 $FireProt^{ASR}$ 共检索出 110 个 DAEase 的同源序列，并在系统发育树中生成了 110 个 ASR 序列(图 1)。祖先酶通常从系统发育树的节点中预测，将根节点的祖先 DAEase 指定为 A1，一般认为 A1 是最好的祖先[9]，其可能表现出最大的进化差异，因此本研究将 A1 作为候选。事实上，通过祖先序列重建不可能确定哪个序列在进化过程中是正确的，而只能推断最可能的祖先。在重建的基础上，对重建的节

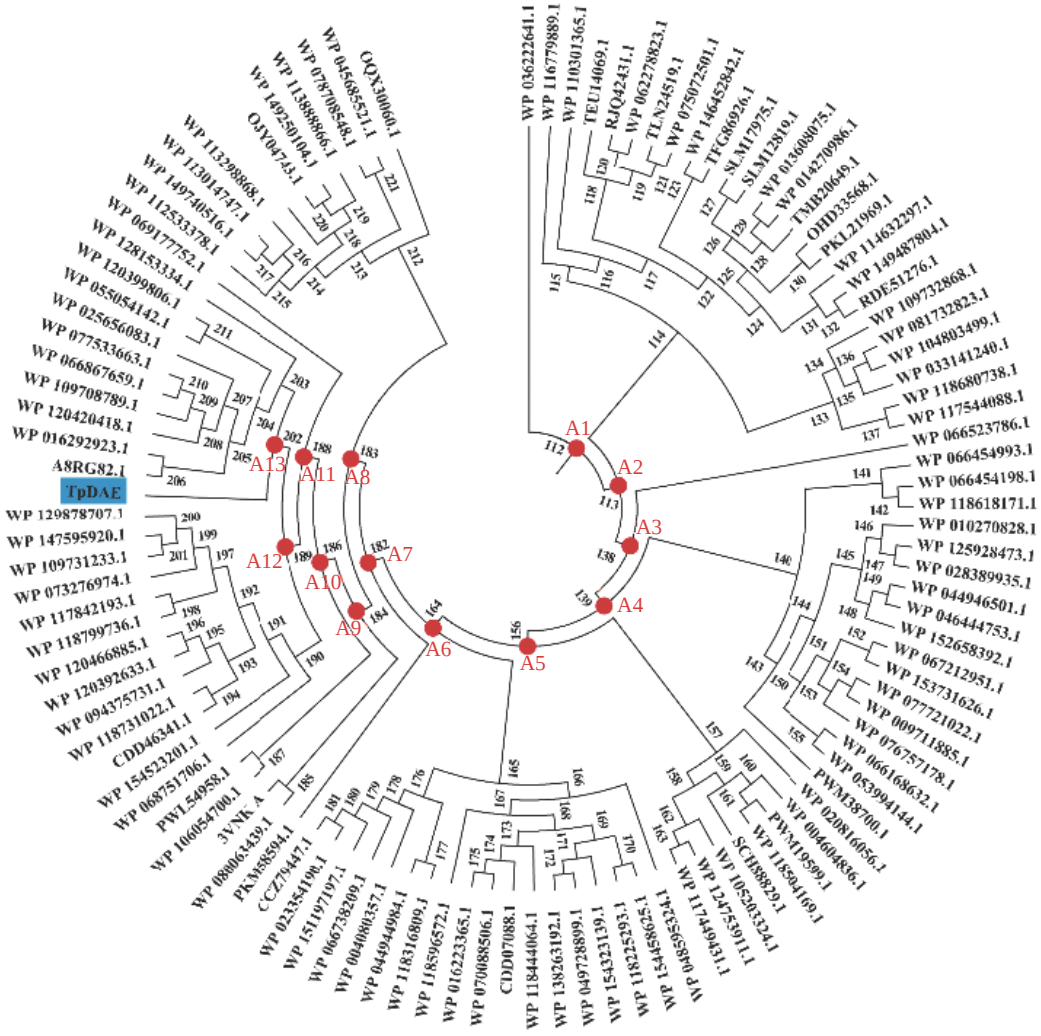


图 1 利用祖先序列重建策略复活祖先 DAEase

Fig.1 Resurrection of ancestral DAEase employing ancestral sequence reconstruction strategy

注: 红色为 ASR DAEase, 蓝色为野生型 TpDAE。

表 1 祖先酶 A13 与野生酶 TpDAE 的序列差异

Table 1 Sequence differences between A13 and TpDAE

位点	2	45	48	52	61	62	71	73	74	81	82	96	104	120	125
A13	Q	V	S	D	V	T	A	G	E	N	R	G	R	L	A
TpDAE	K	T	E	E	I	I	T	S	Q	P	A	K	K	K	E
位点	133	135	140	145	177	182	224	225	229	232	238	242	257	268	273
A13	E	I	A	R	H	V	C	I	A	H	R	T	Q	E	I
TpDAE	K	V	K	C	S	I	S	L	E	Q	N	S	S	D	A

点 ASR DAEase 进行分子对接实验, 以此作为预筛选过程后再对符合预期的 ASR DAEase 进行表征。分子对接实验中, A13 的分子对接值(-CDOCKER_ENERGY)为 8.15, 与 TpDAE 的 8.21 接近, 推测其具有与 TpDAE 相似的催化潜力, 同样作为候选进行后续表征实验, 祖先酶 A13 与野生酶 TpDAE 的序列差异共计 30 个位点, 见表 1。

2.2 ASR DAEase 的表达和纯化

本研究利用 pET22b(+)质粒在 *E. coli* BL21(DE3)中成功表达了 A1 和 A13, 理论分子量均为 33.56 kDa。重组蛋白在 C 端含有额外的 His×6 标签(HHHHHH), 采用 Ni-NTA 亲和层析法纯化从菌体裂解物中纯化目标蛋白。A1 在 *E. coli* BL21(DE3)中虽然实现了重组表达, 但几乎没有可溶性表达, 这可能是由于重建后祖先酶具有特殊的折叠方式。A13 在 *E. coli* BL21(DE3)中成功实现了可溶性表达, 纯化后的 A13 在 SDS-PAGE 凝胶上呈清晰的条带, 表观分子质量约为 35 kDa, 但存在一些非特异性吸附杂蛋白(图 2)。以上结果表明 DAEase 是可以直接从系统进化树中成功复活并实现可溶性表达的, 因此选择具有可溶表达且具有高热稳定性潜力的 A13 进行各酶学性质的定量表征。

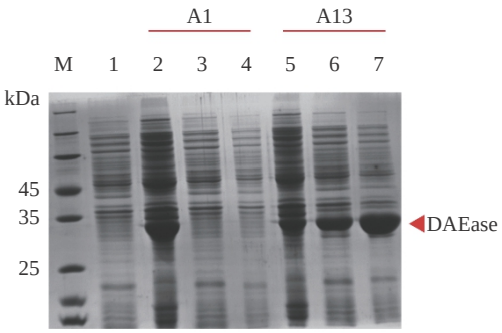


图 2　在 *E. coli* BL21(DE3)中表达纯化的 A1 和 A13 的 SDS-PAGE 分析

Fig.2　SDS-PAGE analysis of the expressed and purified A1 and A13 in *E. coli* BL21 (DE3)

注：M：标准 Marker；泳道 1：阴性对照（*E. coli* BL21(DE3)）；泳道 2：A1 菌体破碎悬液；泳道 3：A1 离心后上清部分；泳道 4：纯化的 A1；泳道 5：A13 菌体破碎悬液；泳道 6：A13 离心后的上清部分；泳道 7：纯化的 A13。

2.3　A13 的酶学性质表征

温度是影响酶催化反应的重要因素之一。一方面高温条件可以增加底物的溶解度，加速酶促反应进程，另一方面高温条件可以提高平衡转化率并降低微生物污染。包括稀有糖在内的工业生产通常需要生物酶制剂在相对较高的温度下能够保持较高的活性。本研究在 40~80 ℃ 的温度范围内研究了温度对 A13 的活性影响，结果表明 A13 的最适温度为 70 ℃(图 3A)，比活性为 355.5 U/mg，相同条件下与 TpDAE 的最适温度和比活性基本一致[28]。A13 在 65~75 ℃ 之间具有很高活性，并在该温度范围内保持其最大活性的 85% 以上，在 50~80 ℃ 的温度范围均显示超过 70% 相对活性，在此范围之外，相对活性急剧降低(图 3A)。这些数据表明 A13 具有成为优质生物催化剂的潜力。图 3B 显示了 pH 对 A13 活性和稳定性的影响，在 pH8.0 的 PBS 缓冲液中，A13 显示出最高活性，并在 6.0~10.0 的 pH 范围内超过 70% 相对活性。已报道的大多数 DAEase 在碱性条件下(pH7.5~9.0)表现出最佳活性，但酸性条件下碳水化合物的非酶褐变会减弱，可保证产品质量的稳定。A13 在 pH6.0 时的相对活性为 75% 以上，在工业生产中具有很强的应用潜力。

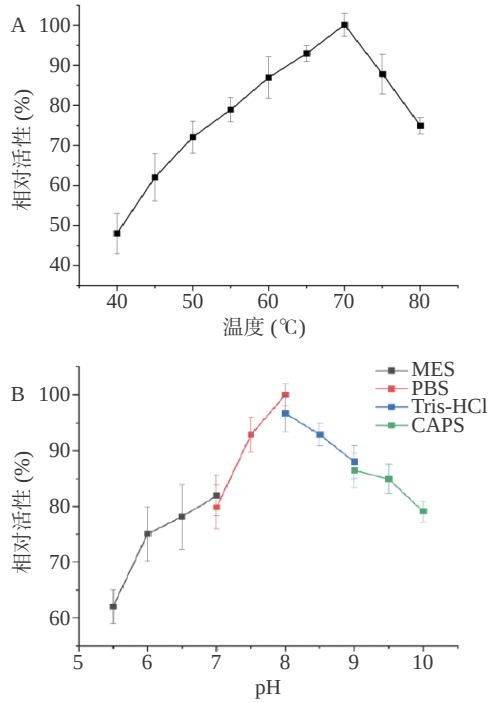


图 3　温度(A)和 pH(B)对 A13 活性的影响

Fig.3　Effect of temperature and pH on the activities of A13

2.4　A13 的热稳定性与半衰期

迄今为止报道的大多数 DAEase 的最适反应温度介于 55~70 ℃ 之间，但在最适温度条件下的半衰期较短，难以满足工业生产需求[33]。如图 4 所示，A13 在 60 ℃ 以下是相对稳定的，在 60 ℃ 孵育 24 h 后，其相对活性仍可保持在 70% 以上；在最适温度 70 ℃ 条件下孵育 4 h，可以保持 80% 的初始活性，表现出比现有的大多数 DAEase 具有更优异的热稳定性，这与 ASR 的预期结果一致。此外，本研究通过测定 A13 的半衰期对其热稳定性进行了表征，作为蛋白质耐热性指标，A13 在其最适温度 70 ℃ 条件下的半衰期为 8.4 h，是 TpDAE 在相同温度下半衰期 0.28 h 的 30 倍，表明祖先序列重建后 A13 的热稳定性相较于 WT 酶显著增强。使用定向进化或蛋白质工程很难实现酶热稳定性的显著增强，但基于对酶分子非保守功能空间序列筛选重建的 ASR 在热稳定性增强方面具有广泛的应用前景[34−36]。

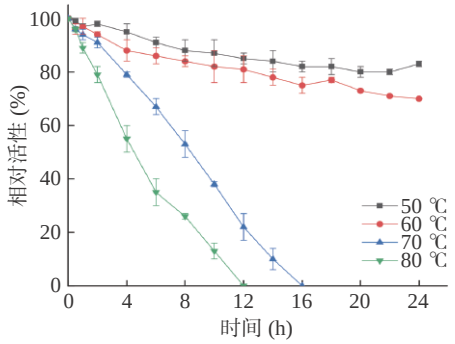


图 4　A13 的热稳定性

Fig.4　Thermostability properties of A13

2.5　D-果糖向 D-阿洛酮糖的生物转化

为了评估 A13 催化 D-果糖生物转化为 D-阿洛酮糖的能力，在 500 mL 含有 1 μmol/L A13、D-果糖和 1 mmol/L $CoCl_2$ 的 PBS 缓冲液(50 mmol/L，pH8.0)中进行 D-阿洛酮糖的酶促生产，D-果糖的浓度分别为 100、300 和 500 g/L。如图 5 所示，其达到平衡所需的时间分别为 60、210 和 360 min，最大转化率为 31%(155 g/L)，而 TpDAE 在相同条件下达到平衡所需的时间分别为 60、180 和 360 min，最大转化率为 27.5%，表明祖先序列重建后 A13 具有良好的催化活性。

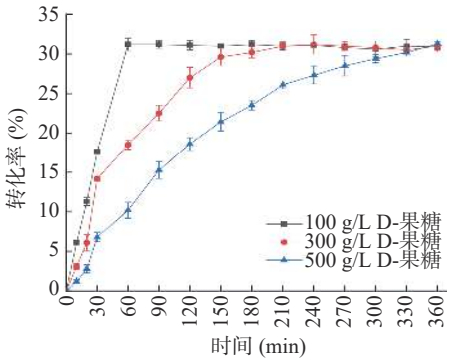


图 5　纯化的 A13 催化 D-果糖生产 D-阿洛酮糖

Fig.5　Purified A13 catalyses the production of D-Allulose from D-fructose

2.6　TpDAE 和 A13 的结构分析及分子动力学模拟

TpDAE 的热稳定性较差，在 70 ℃ 时半衰期仅为 0.28 h[8]，而祖先序列重建后 A13 的半衰期大幅提高，本研究通过立体结构分析及分子动力学模拟实验解析了 A13 的耐热性分子机制，模型质量分析全局得分为 0.88，模型合理。基于 RING 服务器[37] 分析的氨基酸交互网络结果显示 TpDAE 和 A13 的序列一致性为 89.5%(图 6)，A13 和 TpDAE 相互作用网络中涉及的氨基酸数均为 295 个，但涉及到的氨基酸残基以及作用方式存在很大差异。A13 含有 562 个氢键和 22 个 π-π 堆叠，远超过 TpDAE 中的 359 个氢键和 15 个 π-π 堆叠，在高温下数量更多的氢键和 π-π 堆叠具有更强的分子间作用力，可以保持酶分子固有结构[38−39]，因而 A13 较 TpDAE 具有良好的热稳定性。

通过分析 TpDAE 和 A13 的结构发现，与 TpDAE 相比 A13 的 loop 结构中对热稳定性起到贡献的氨基酸残基数量更多。在 TpDAE 的 224 位的 Ser 变为 A13 中的 Cys(图 7D)，推测 Cys224 参与蛋白质内二硫键的形成，通过减小蛋白质未折叠态的熵值来维持蛋白质的稳定[40]。在 45 号位、71 号位和 120 号位的亲水性的 Thr 和 Lys 分别变为了疏水性的 Val、Ala 和 Leu，这些疏水基团使得疏水相互作用增强，因而蛋白质抵抗热变性的能力就越强[41](图 7A，B，C)。TpDAE 和 A13 的蛋白质表面疏水性分析结果显示 A13 在 45、71 和 120 位附近的表面疏水性同 TpDAE 相比明显增加，且整体结构的疏水性也得到了增强(图 8)。

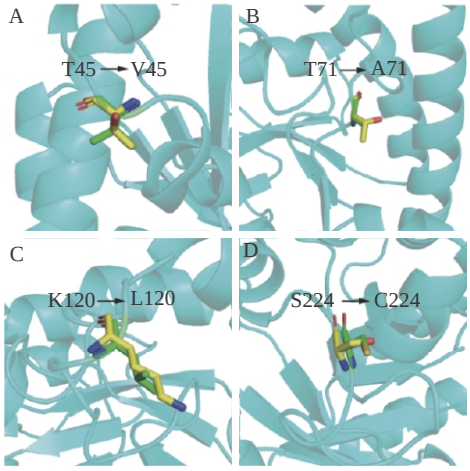


图 7　A13 和 TpDAE 在 loop 位置的结构比对

Fig.7　Structure comparison of A13 and TpDAE in the loop position

注：A~D 表示不同位置 loop 的氨基酸残基比较；绿色的棒状结构表示 TpDAE，黄色的棒状结构表示 A13。

为了研究在高温催化条件下的 A13 与 TpDAE

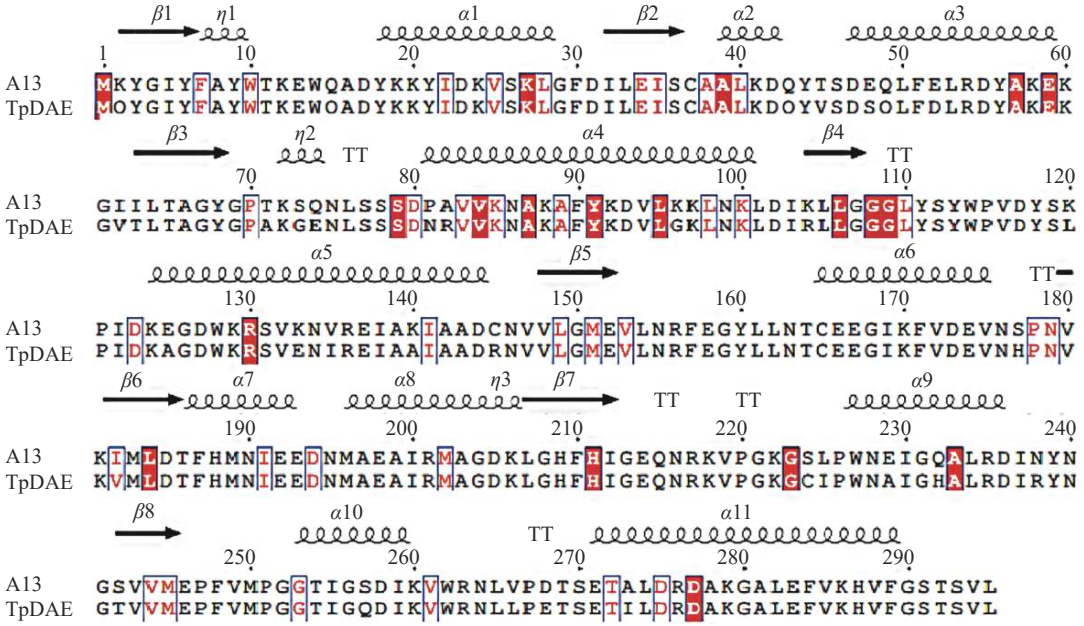


图 6　A13 和 TpDAE 的序列比对结果

Fig.6　Sequence alignment results of A13 and TpDAE

注：黑色波浪线和箭头分别代表 α-螺旋和 β-链，η1、η2、η3 指无规卷曲；TT 代表 β-转角的一种形式；在所有序列中，相同的氨基酸残基以红色突出显示，高度保守和相似的氨基酸残基以蓝色框出。

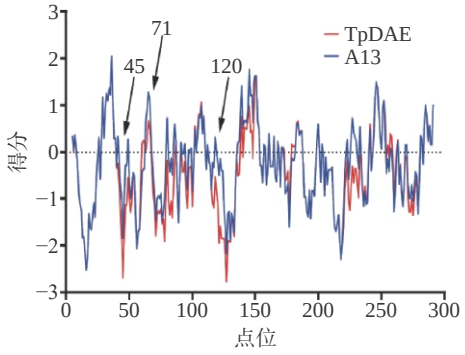


图 8　TpDAE 和 A13 的蛋白质表面疏水性

Fig.8　Protein surface hydrophobicity of TpDAE and A13

构象变化，在 70 ℃ 条件下对 A13 和 TpDAE 进行了 30 ns 的分子动力学模拟（图 9）。均方根偏差（RMSD）是估计蛋白质构象热波动的一个重要参数，蛋白质的热稳定性与其 RMSD 值呈负相关，而 RMSD 值与蛋白质刚性呈正相关[42]。在前 3 ns，TpDAE 和 A13 的 RMSD 值迅速增加至 1.8 Å和 1.3 Å，此后 A13 的 RMSD 值稳定在 1.2~1.6 Å的范围内直至模拟结束（t=30 ns）。在 20 ns 时，TpDAE 的 RMSD 值达到了最高值 2.1 Å，而在相同条件下，A13 的 RMSD 值仍稳定在 1.3 Å。分子模拟轨迹显示，在 70 ℃ 条件下 A13 的平均 RMSD 值变化约为 0.5 Å，变化平缓，表明其整体构象稳定，活性位点结构紧凑，热稳定性较好；TpDAE 的平均 RMSD 值变化约为 0.9 Å，变化幅度较大，表明其结构更为疏松，推测高温可能会导致其活性位点形变，使其酶活性降低甚至丧失。Wei 等[43] 通过综合计算辅助重新设计来提高用于 D-阿洛糖合成的 L-鼠李糖异构酶的热稳定性，所得组合突变体 M2-4 在 75 ℃ 下的半衰期延长了 5.7 倍，分子动力学模拟研究表明在 348 K 时，M2-4 的 RMSD 值变化较小，超过 100 ns 时的平均 RMSD 为 0.17 Å，整体构象稳定，相比之下，WT 的 RMSD 曲线在开始时急剧增加，60 ns 后波动稳定，总体构象波动较大，平均 RMSD 为 0.23 Å，引入 M2-4 的变异使柔性区域硬化，导致在高温下稳定折叠。本文分子动力学模拟结果解释了 A13 在高温下能表现出更强的稳定性催化性能的分子机制，证明了祖先序列重建策略的可靠性。

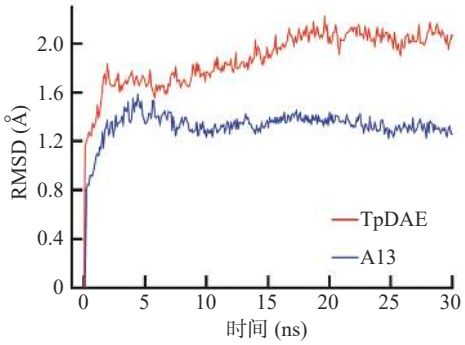


图 9　A13 和 TpDAE 在 70 ℃ 下的均方根偏差（RMSD）曲线

Fig.9　Root mean square deviation (RMSD) profile for A13 and TpDAE as per time at 70 ℃

3　结论

传统高性能的酶基因的挖掘受到筛选方式和样品发掘等因素的限制。ASR 与其他工程方法不同，它基于对非保守功能空间的筛选来生成新序列，在给定准确的序列比对的前提下，许多输出都具有很高的功能性。本研究通过祖先序列重建获取的 DAEase A13 是一种很有前途的工业生物催化剂，其表现出与 TpDAE 相似的表达水平和催化活性，但热稳定性显著提高，证明了 ASR 策略的有效性与可行性，它可以改造出具有良好生物催化性能的酶分子。此外，祖先序列重建可能有助于识别调节酶活性的关键位点以避免改造的盲目性和实验工作量。本研究利用 ASR 充实了对新型 DAEase 生物催化剂的挖掘工作，实现了在 DAEase 新型酶基因挖掘技术上的探索。

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

参考文献

[1] GUMULYA Y, GILLAM E M. Exploring the past and the future of protein evolution with ancestral sequence reconstruction: The 'retro' approach to protein engineering[J]. Biochemical Journal, 2017, 474(1): 1−19.

[2] MERKL R, STERNER R. Ancestral protein reconstruction: techniques and applications[J]. Biological Chemistry, 2016, 397(1): 1−21.

[3] SELBERG A G A, GAUCHER E A, LIBERLES D A. Ancestral sequence reconstruction: From chemical paleogenetics to maximum likelihood algorithms and beyond[J]. Journal of Molecular Evolution, 2021, 89(3): 157−164.

[4] RISSO V A, SANCHEZ-RUIZ J M, OZKAN S B. Biotechnological and protein-engineering implications of ancestral protein resurrection[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2018, 51: 106−115.

[5] WHITFIELD J H, ZHANG W H, HERDE M K, et al. Construction of a robust and sensitive arginine biosensor through ancestral protein reconstruction[J]. Protein Science, 2015, 24(9): 1412−1422.

[6] WILDING M, PEAT T S, KALYAANAMOORTHY S, et al. Reverse engineering: Transaminase biocatalyst development using ancestral sequence reconstruction[J]. Green Chemistry, 2017, 19: 5375−5380.

[7] BABKOVA P, SEBESTOVA E, BREZOVSKY J, et al. Ancestral haloalkane dehalogenases show robustness and unique substrate specificity[J]. Chembiochemistry, 2017, 18(14): 1448−1456.

[8] JOHO Y, VONGSOUTHI V, SPENCE M A, et al. Ancestral sequence reconstruction identifies structural changes underlying the evolution of *Ideonella sakaiensis* petase and variants with improved stability and activity[J]. Biochemistry, 2023, 62(2): 437−450.

[9] GUMULYA Y, BAEK J M, WUN S J, et al. Engineering highly functional thermostable proteins using ancestral sequence reconstruction[J]. Nature Catalysis, 2018, 1: 878−888.

[10] SPENCE M A, KACZMARSKI J A, SAUNDERS J W, et al. Ancestral sequence reconstruction for protein engineers[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2021, 69: 131−141.

[11] FOLEY G, MORA A, ROSS C M, et al. Engineering indel

and substitution variants of diverse and ancient enzymes using graphical representation of ancestral sequence predictions (GRASP)[J]. PLoS Computational Biology, 2022, 18(10): e1010633.
[12] GOLDENZWEIG A, GOLDSMITH M, HILL S E, et al. Automated structure and sequence-based design of proteins for high bacterial expression and stability[J]. Molecular Cell, 2016, 63(2): 337−346.
[13] YANG Z. PAML 4: Phylogenetic analysis by maximum likelihood[J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1586−1591.
[14] CHEN X, DOU Z, LUO T, et al. Directed reconstruction of a novel ancestral alcohol dehydrogenase featuring shifted pH-profile, enhanced thermostability and expanded substrate spectrum[J]. Bioresource Technology, 2022, 363: 127886.
[15] PRAMANIK S, CONTRERAS F, DAVARI M D, et al. Protein engineering by efficient sequence space exploration through combination of directed evolution and computational design methodologies[J]. Protein Engineering, 2021: 153−176.
[16] YU H, DALBY P A. Coupled molecular dynamics mediate long- and short-range epistasis between mutations that affect stability and aggregation kinetics[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018, 115(47): e11043−e11052.
[17] FUKADA K, ISHII T, TANAKA K, et al. Crystal structure, solubility, and mutarotation of the rare monosaccharide D-psicose[J]. Bulletin of the Chemical Society of Japan, 2010, 83: 1193−1197.
[18] MU W, ZHANG W, FENG Y, et al. Recent advances on applications and biotechnological production of D-psicose[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 94(6): 1461−1467.
[19] SHINTANI T, YAMADA T, HAYASHI N, et al. Rare sugar syrup containing D-allulose but not high-fructose corn syrup maintains glucose tolerance and insulin sensitivity partly via hepatic glucokinase translocation in wistar rats[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(13): 2888−2894.
[20] ZHANG W, FANG D, XING Q, et al. Characterization of a novel metal-dependent D-psicose 3-epimerase from *Clostridium scindens* 35704[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e62987.
[21] ZHANG W, YU S, ZHANG T, et al. Recent advances in D-allulose: Physiological functionalities, applications, and biological production[J]. Trends in Food Science and Technology, 2016, 54: 127−137.
[22] KIM S E, KIM S J, KIM H J, et al. D-Psicose, a sugar substitute, suppresses body fat deposition by altering networks of inflammatory response and lipid metabolism in C57BL/6J-ob/ob mice[J]. Journal of Functional Foods, 2017, 28: 265−274.
[23] SUNA S, YAMAGUCHI F, KIMURA S, et al. Preventive effect of D-psicose, one of rare ketohexoses, on di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)-induced testicular injury in rat[J]. Toxicology Letters, 2007, 173(2): 107−117.
[24] IZUMORI K. Bioproduction strategies for rare hexose sugars[J]. Naturwissenschaften, 2002, 89(3): 120−124.
[25] KIM H J, HYUN E K, KIM Y S, et al. Characterization of an agrobacterium tumefaciens D-psicose 3-epimerase that converts D-fructose to D-psicose[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(2): 981−985.
[26] CHEN Z, GAO X D, LI Z. Recent advances regarding the physiological functions and biosynthesis of D-allulose[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 881037.
[27] ZHANG W, WEI M, SUN X, et al. Fine-tuning of carbon flux and artificial promoters in *Bacillus subtilis* enables high-level biosynthesis of D-allulose[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(43): 13935−13944.
[28] ZHANG W, ZHANG T, JIANG B, et al. Biochemical characterization of a D-psicose 3-epimerase from *Treponema primitia* ZAS-1 and its application on enzymatic production of D-psicose[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2016, 96(1): 49−56.
[29] MU W, CHU F, XING Q, et al. Cloning, expression, and characterization of a D-psicose 3-epimerase from *Clostridium cellulolyticum* H10[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59: 7785−7792.
[30] WANG Y, RAVIKUMAR Y, ZHANG G, et al. Biocatalytic synthesis of D-allulose using novel D-tagatose 3-epimerase from *Christensenella minuta*[J]. Frontiers in Chemistry, 2020, 8: 622325.
[31] SAKODA M, HIROMI K. Determination of the best-fit values of kinetic parameters of the Michaelis-Menten equation by the method of least squares with the Taylor expansion[J]. The Journal of Biochemistry, 1976, 80(3): 547−555.
[32] QI H, WANG T, LI H, et al. Sequence- and structure-based mining of thermostable D-allulose 3-epimerase and computer-guided protein engineering to improve enzyme activity[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(47): 18431−18442.
[33] PATEL S N, KAUSHAL G, SINGH S P. A novel D-allulose 3-epimerase gene from the metagenome of a thermal aquatic habitat and D-allulose production by *Bacillus subtilis* whole-cell catalysis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2020, 86(5): e02605−19.
[34] CHEN S, XU Z, DING B, et al. Big data mining, rational modification, and ancestral sequence reconstruction inferred multiple xylose isomerases for biorefinery[J]. Science Advances, 2023, 9(5): 1−16.
[35] THOMSON R E S, CARRERA-PACHECO S E, GILLAM E M J. Engineering functional thermostable proteins using ancestral sequence reconstruction[J]. Journal of Biological Chemistry, 2022: 102435.
[36] LIVADA J, VARGAS A M, MARTINEZ C A, et al. Ancestral sequence reconstruction enhances gene mining efforts for industrial ene reductases by expanding enzyme panels with thermostable catalysts[J]. ACS Catalysis, 2023, 13(4): 2576−2585.
[37] PIOVESAN D, MINERVINI G, TOSATTO S C. The RING 2.0 web server for high quality residue interaction networks[J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(W1): W367−374.
[38] TOMPA D R, GROMIHA M M, SARABOJI K. Contribution of main chain and side chain atoms and their locations to the stability of thermophilic proteins[J]. Journal of Molecular Graphics & Modelling, 2016, 64: 85−93.
[39] WANG Q, CEN Z, ZHAO J. The survival mechanisms of thermophiles at high temperatures: An angle of omics[J]. Physiology (Bethesda), 2015, 30(2): 97−106.
[40] HARADA T, KURIMOTO E, TOKUHIRO K, et al. Disulfide bond formation in refolding of thermophilic fungal protein disulfide isomerase[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2001, 91(6): 596−598.
[41] DIAS C L, ALA-NISSILA T, WONG-EKKABUT J, et al. The hydrophobic effect and its role in cold denaturation[J]. Cryobiology, 2010, 60(1): 91−99.
[42] BADIEYAN S, BEVAN D R, ZHANG C. Study and design of stability in GH5 cellulases[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2012, 109(1): 31−44.
[43] WEI M, GAO X, ZHANG W, et al. Enhanced thermostability of an L-rhamnose isomerase for D-allose synthesis by computation-based rational redesign of flexible regions[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(42): 15713−15722.

张笑莹, 钟婉滢, 马凤, 等. 苦荞蛋白降血脂肽的酶解制备、氨基酸组成及活性研究 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 129−139. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110029
ZHANG Xiaoying, ZHONG Wanying, MA Feng, et al. Preparation, Amino Acid Composition and Activity of Tartary Buckwheat Protein Lipid-lowering Peptide[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 129−139. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110029

· 工艺技术 ·

苦荞蛋白降血脂肽的酶解制备、氨基酸组成及活性研究

张笑莹[1], 钟婉滢[1], 马　凤[1], 叶灏铎[1], 苗建银[1,*], 李　静[2], 巩发永[2]
（1.华南农业大学食品学院, 广东省功能食品活性物重点实验室, 广东广州 510642;
2.攀西特色作物研究与利用四川省重点实验室, 西昌学院, 四川西昌 615013）

摘　要: 以苦荞麦为原料提取苦荞蛋白，以胰脂肪酶抑制率为指标，通过单因素和响应面优化试验筛选出苦荞蛋白降血脂肽的酶解条件，同时对苦荞蛋白降血脂肽的氨基酸组成和降血脂活性进行研究。结果表明，用菠萝蛋白酶酶解苦荞蛋白得到的降血脂肽对胰脂肪酶的抑制活性更高，其最佳酶解条件为酶解时间 2.1 h，酶解温度 62.0 ℃，底物浓度 3.23%，pH7.0 和酶底比 0.4%，在此条件下酶解物的胰脂肪酶抑制率为 81.22%±0.16%。氨基酸分析结果显示，苦荞蛋白降血脂肽中必需氨基酸占比 27.82%，疏水性氨基酸占比 32.11%，酸性氨基酸占比 35.86%，精氨酸与赖氨酸的比值为 2.28。苦荞蛋白肽显示出良好的体外降血脂活性，其牛磺胆酸钠结合率、胆固醇酯酶抑制率和胰脂肪酶抑制率的 EC_{50}/IC_{50} 值分别为 9.136、3.902 和 0.051 mg/mL。研究结果为苦荞麦资源的高值化利用和苦荞蛋白活性肽的开发提供了新思路和理论依据。

关键词: 苦荞蛋白, 酶解, 响应面优化, 降血脂肽, 氨基酸组成, 活性评价
中图分类号: TS201.1　　**文献标识码:** B　　**文章编号:** 1002−0306(2024)21−0129−11
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110029
本文网刊:

Preparation, Amino Acid Composition and Activity of Tartary Buckwheat Protein Lipid-lowering Peptide

ZHANG Xiaoying[1], ZHONG Wanying[1], MA Feng[1], YE Haoduo[1], MIAO Jianyin[1,*], LI Jing[2], GONG Fayong[2]
（1.College of Food Science, South China Agricultural University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Nutraceuticals and Functional Foods, Guangzhou 510642, China;
2.Panxi Crops Research and Utilization Key Laboratory of Sichuan Province, Xichang College, Xichang 615013, China）

Abstract: Tartary buckwheat was used as raw material to extract tartary buckwheat protein, and the enzymatic hydrolysis conditions of tartary buckwheat protein lipid-lowering peptides were screened by single factor and response surface optimization experiments using the inhibition rate of pancreatic lipase as index. The amino acid composition and lipid lowering activity of lipid-lowering peptides were studied. The results showed that the lipid-lowering peptides obtained from tartary buckwheat protein with bromelain had higher inhibitory activity on pancreatic lipase. The optimal enzymatic hydrolysis conditions were hydrolysis time 2.1 h, hydrolysis temperature 62.0 ℃, substrate concentration 3.23%, pH7.0 and enzyme substrate ratio 0.4%. Under these conditions, the inhibitory rate of pancreatic lipase was 81.22%±0.16%. Amino acid analysis showed that essential amino acids, hydrophobic amino acids and acidic amino acids accounted for 27.82%, 32.11%, 35.86%, and the ratio of arginine to lysine was 2.28. The EC_{50}/IC_{50} values of sodium taurine cholic acid binding rate, cholesterol esterase inhibition rate and pancreatic lipase inhibition rate were 9.136, 3.902 and 0.051 mg/mL, respectively. The results provided a new idea and theoretical basis for the high-value utilization of tartary buckwheat

收稿日期: 2023−11−06
基金项目: 攀西特色作物研究与利用四川省重点实验室资助课题（SZKF2206）; 广东省自然科学基金项目（2023A1515010006）。
作者简介: 张笑莹（1999−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: gigle_1999@163.com。
*** 通信作者:** 苗建银（1981−）, 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品科学, E-mail: miaojy8181@scau.edu.cn。

resources and the development of tartary buckwheat protein active peptides.

Key words: tartary buckwheat protein; enzymatic hydrolysis; response surface optimization; lipid-lowering peptides; amino acid composition; evaluation of activity

高脂血症是一种由血脂异常导致的疾病[1], 和肥胖有着直接关系, 一般都是由于体内脂肪堆积引起脂代谢异常[2], 主要表现为体内胆固醇和甘油三酯的水平过高[3]。近三十年来, 我国高脂血症患病率逐年增加, 据报道, 我国成年人总体患病率达到 35.6%[4], 2017 年全球约 390 万人死于高胆固醇血症[5]。当人体血脂水平过高时, 会引发一系列心脑血管疾病, 其中动脉粥样硬化是世界范围导致死亡的主要原因之一[6−7]。常见的高脂血症治疗药物有奥利司他(Orlistat)、辛伐他汀等。其中他汀类药物能够降低血液中的低密度脂蛋白浓度和降低胆固醇水平, 但是会导致患者患糖尿病的风险 [8−9]。奥利司他能够有效抑制脂肪酸合成酶, 降低机体对脂肪的吸收, 但是服用奥利司他可能产生胃肠道功能紊乱、肝衰竭等副作用[10−11]。其他一些降血脂药物也存在不同的副作用[12]。因此寻找天然来源的降血脂活性成分成为近年来的研究热点。目前, 在茶叶蛋白肽[13]、油菜籽蛋白肽[12]、啤酒糟肽[14] 的研究中, 均发现了其良好的降血脂活性。

苦荞又名万年荞、荞叶七, 广泛种植在亚洲国家, 我国是世界苦荞栽植面积最大和产量最多的国家[15], 苦荞中独特的蛋白质组成和结构, 使其具有一定的保健功能。研究表明苦荞蛋白具有抗疲劳[16]、降胆固醇[17]、抗氧化[18]、调节肠道菌群[19−20]、抗乳腺肿瘤[21]、抗菌[22] 等活性。近年来, 也有关于苦荞抗氧化肽[23−25] 和抗菌肽[26−27] 等活性肽的研究。苦荞蛋白已被证明具有一定的降血脂能力, 研究表明, 苦荞蛋白能够降低大鼠血清低密度脂蛋白胆固醇水平, 升高血清高密度脂蛋白胆固醇水平, 且能够降低肝脏脂质积累[28]; 苦荞蛋白可通过吸附胆酸与胆固醇来调节血脂代谢[29]; 还被证明可通过改善高脂小鼠肠道菌群结构失衡, 进而调节小鼠血脂代谢紊乱[30]。但对于进一步探究小分子苦荞降血脂肽的研究相对较少, 因此探究最佳的苦荞降血脂肽制备工艺以及探究其降血脂功效十分必要。

本研究以苦荞麦为原料, 通过碱提酸沉法提取蛋白, 并以胰脂肪酶抑制活性为检测指标, 通过单因素、响应面法对苦荞蛋白降血脂肽的制备方法进行工艺优化, 并分析最优条件下制备的苦荞蛋白降血脂肽的氨基酸组成以及对其降血脂活性进行评价。本研究将为苦荞蛋白的高值开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

西荞 8 号　西昌学院提供; 木瓜蛋白酶(8×10^5 U/g)、胰蛋白酶(4000 U/g)、胃蛋白酶(3000NF U/g)、菠萝蛋白酶(6×10^5 U/g)、中性蛋白酶(2×10^5 U/g)、碱性蛋白酶(2×10^5 U/g)　南宁庞博生物工程有限公司; 月桂酸-4-硝基苯酯　天津市富宇精细化工有限公司; 4-硝基苯丁酸酯　西安市晶博生物科技有限公司; 牛磺胆酸钠(STC)、胆固醇酯酶(15 万 U/g)　上海源叶生物科技有限公司; 胰脂肪酶(来自猪胰腺)(3~9 万 U/g)　上海阿拉丁生物科技公司; Tris-HCl 溶液(pH8.2, 100 mmol/L)　广州亿涛生物科技有限公司; Triton X-100　北京索莱宝科技有限公司; 其他试剂均属于分析纯。

2300 多功能酶标仪　PerkinElmer 公司; S-433D 全自动氨基酸分析仪　塞卡姆公司; SC-3610 低速离心机　安徽中科中佳科学仪器有限公司; DH5000BII 电热恒温培养箱　天津泰斯特仪器有限公司; FD-1 型冷冻干燥机　海门市其林贝尔仪器制造有限公司; PHS-3C pH 计　上海力辰邦西仪器科技公司; DH9-9245A 烘箱　广州市深华生物技术有限公司; HH-6 数显恒温水浴锅　常州朗越仪器制造有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 苦荞蛋白的提取　苦荞麦粉碎, 过 100 目筛, 按照料液比 1∶5(g/mL)加入石油醚脱脂 2 h, 重复脱脂两次后, 在通风橱中挥干得到苦荞脱脂粉备用。基于碱提酸沉的原理, 参考钟婉滢等[31] 的方法并作略微改动, 苦荞粉与水的比例为 1∶10(g/mL), 用 0.1 mol/L NaOH 溶液调节溶液的 pH 至 9.0, 45 ℃恒温水浴下搅拌提取 2 h, 以 4000 r/min 离心 20 min, 分离上清液, 用 0.1 mol/L HCl 溶液调节上清液的 pH 至 4.4, 并在 4 ℃ 静置 2 h, 使蛋白沉淀, 4000 r/min 离心 20 min 后, 所得沉淀即为苦荞粗蛋白, 并将沉淀冷冻干燥备用。

1.2.2 酶解法制备苦荞蛋白降血脂肽　配制浓度为 3% 的苦荞粗蛋白溶液, 用低浓度的盐酸和氢氧化钠溶液调节至最适 pH, 在水浴锅中孵育至最适温度后加入一定量的酶溶液启动酶解反应, 在最适温度下恒温酶解后于 95 ℃ 条件下灭酶, 冷却后 8000 r/min 离心 20 min, 上清液即为含有苦荞蛋白降血脂肽的酶解液。

1.2.3 胰脂肪酶抑制率的测定　参考叶灏铎等[32] 的方法并略作修改, 制备 1 mg/mL 含 0.05 mol/L 醋酸钠和 1% Triton X-100 的月桂酸-4-硝基苯酯溶液作为反应底物, 配制好的溶液加热溶解, 完全混匀后冷却至室温备用。于 2 mL 试管中依次加入反应底物、样品溶液、反应缓冲液(pH8.2, 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液), 最后加入胰脂肪酶溶液(5 mg/mL)启动反应, 加样比例为 5∶2∶4∶3。在 37 ℃ 下恒温孵育 2 h 后,

420 nm 波长下测吸光值。同时设置不含酶样品组和不含样品空白组。按下式计算胰脂肪酶抑制率：

$$胰脂肪酶抑制率(\%)=\left(1-\frac{A-A_1}{A_0}\right)\times 100 \quad 式（1）$$

式中：A 为样品组的吸光值；A_1 为不含酶样品组的吸光值；A_0 为不含样品空白组的吸光值。

1.2.4　单因素实验

1.2.4.1　蛋白酶的筛选　分别选用胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、中性蛋白酶、胰蛋白酶和碱性蛋白酶对苦荞粗蛋白进行酶解，在 3% 的苦荞蛋白溶液中，以酶底比 0.3% 分别加入酶，并在各自酶的最适温度和 pH 下酶解 3 h。以胰脂肪酶抑制率为检测指标，筛选出最优蛋白酶。各酶水解的条件见表 1。

表 1　各酶最适的水解条件

Table 1　Suitable hydrolysis conditions for each enzyme

酶的种类	pH	温度(℃)	时间(h)
胃蛋白酶	2.0	40	3
木瓜蛋白酶	6.0	55	3
菠萝蛋白酶	7.0	55	3
中性蛋白酶	7.0	55	3
胰蛋白酶	8.0	50	3
碱性蛋白酶	9.5	55	3

1.2.4.2　酶解时间对苦荞蛋白降血脂肽活性的影响　选用菠萝蛋白酶进行酶解，考察酶解时间（1、2、3、4、5 h）对苦荞蛋白降血脂肽胰脂肪酶抑制活性的影响，同时固定酶解温度 55 ℃，底物浓度 3%，酶底比 0.2%，pH7.0，确定酶解最佳时间。

1.2.4.3　酶解温度对苦荞蛋白降血脂肽活性的影响　选用菠萝蛋白酶进行酶解，考察酶解温度（45、50、55、60、65 ℃）对苦荞蛋白降血脂肽胰脂肪酶抑制活性的影响，同时固定酶解时间 3 h，底物浓度 3%，酶底比 0.2%，pH7.0，确定酶解最佳温度。

1.2.4.4　酶解 pH 对苦荞蛋白降血脂肽活性的影响　选用菠萝蛋白酶进行酶解，考察酶解 pH（6.0、6.5、7.0、7.5、8.0）对苦荞蛋白降血脂肽胰脂肪酶抑制活性的影响，同时固定酶解温度 55 ℃，酶解时间 3 h，底物浓度 3%，酶底比 0.2%，确定酶解最佳 pH。

1.2.4.5　酶底比对苦荞蛋白降血脂肽活性的影响　选用菠萝蛋白酶进行酶解，考察酶底比（0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%）对苦荞蛋白降血脂肽胰脂肪酶抑制活性的影响，同时固定酶解温度 55 ℃，酶解时间 3 h，底物浓度 3%，pH7.0，确定酶解最佳酶底比。

1.2.4.6　底物浓度对苦荞蛋白降血脂肽活性的影响　选用菠萝蛋白酶进行酶解，考察底物浓度（1%、2%、3%、4%、5%）对苦荞蛋白降血脂肽胰脂肪酶抑制活性的影响，同时固定酶解温度 55 ℃，酶解时间 3 h，酶底比 0.2%，pH7.0，确定酶解最佳底物浓度。

1.2.5　响应面优化试验　在单因素实验基础上，以胰脂肪酶抑制率为响应值，采用 Box-Behnken 试验设计，对酶解工艺进行三因素三水平的响应面试验设计，响应面试验因素与水平设计见表 2。

表 2　响应面优化试验因素与水平设计

Table 2　Experimental factors and levels design of response surface optimization

因素	水平		
	−1	0	1
A酶解时间(h)	1	2	3
B酶解温度(℃)	55	60	65
C底物浓度(%)	2	3	4

1.2.6　苦荞蛋白降血脂肽活性分析

1.2.6.1　苦荞蛋白降血脂肽对胆酸盐的结合能力　制定牛磺胆酸钠标准曲线，分别取 1 mmol/L 牛磺胆酸钠溶液 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL，用磷酸缓冲溶液（pH6.3）定容至 2.5 mL，再加入 60% 的硫酸溶液，其比例为 1:3（2.5 mL:7.5 mL），于 70 ℃ 水浴 30 min，取出后迅速冰浴冷却，并在 387 nm 波长处测定吸光值，绘出标准曲线，得出牛磺胆酸钠的标准曲线方程为 y=0.1585x+0.0797（R^2=0.992）。

参考李成龙[33] 的方法做出略微改动。分别取 1 mL 0.01 mol/L HCl 溶液和 1 mL 不同浓度的样品溶液（0.1、0.25、0.5、1、2、4 mg/mL）于 10 mL 离心管中，水浴 37 ℃ 条件下振荡 1 h，以模拟胃酸环境，后用低浓度的 NaOH 溶液调节 pH 至 6.3，加入 1 mmol/L 牛磺胆酸钠标准溶液 5 mL，37 ℃ 水浴 1 h，4000 r/min 离心 20 min 后，取 2.5 mL 上清液和 7.5 mL 60% 硫酸溶液在 70 ℃ 下恒温水浴反应 30 min，静置冷却，于 387 nm 波长处测定每组吸光值。根据制定的标准曲线，计算反应后牛磺胆酸钠的剩余量。胆酸盐结合率根据下式计算，并求出 EC_{50}：

$$胆酸盐结合率(\%)=\frac{A-B}{A}\times 100 \quad 式（2）$$

式中：A 是胆酸盐加入量，μmol；B 是胆酸盐剩余量，μmol。

1.2.6.2　苦荞蛋白降血脂肽对胰脂肪酶的抑制作用　参考 1.2.3 中胰脂肪酶抑制率的测定方法，并计算 IC_{50}。

1.2.6.3　苦荞蛋白降血脂肽对胆固醇酯酶的抑制作用　参照 Baba 等[34] 的方法并略作改动。制备 5 μg/mL 的胆固醇酯酶溶液；用磷酸钠缓冲溶液（0.01 mol/L，pH7.0）配制成含有 0.1 mol/L NaCl、5.16 mol/L 牛磺胆酸钠的反应缓冲溶液；反应底物为用反应缓冲液配制成浓度为 5 mmol/L 的 4-硝基苯丁酸酯溶液；用反应缓冲液配制不同浓度的样品溶液（0.1、0.25、0.5、1、2、4 mg/mL）。在 96 孔板中加入样品溶液和反应底物各 50 μL，孵育后，加入胆固醇酯酶溶液 50 μL 启动反应，振摇 5 min 充分混匀后

在 37 ℃ 下反应 30 min, 在 405 nm 处测吸光值, 空白管中的样品溶液、空白对照管中的酶液和样品溶液、样品对照管中的酶液均用缓冲溶液替代。根据下式计算胆固醇酯酶抑制率, 并求出 IC_{50}:

$$胆固醇酯酶抑制率(\%)=\left(1-\frac{C-D}{A-B}\right)\times 100 \quad 式（3）$$

式中: A 为空白管的吸光值; B 为空白对照管的吸光值; C 为样品管的吸光值; D 为样品对照管的吸光值。

1.2.7 氨基酸组成测定 采用 GB 5009.124-2016《食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定》[35], 测定最优苦荞蛋白降血脂肽中各种氨基酸的组成及含量。

1.3 数据处理

所得数据经 Prism 8.0.2、Origin2019b 软件进行绘图, 经 SPSS 21.0、Excel 2021 软件进行统计处理, 结果以平均数±标准差（SD）表示, 使用 ANOVA 法分析样本之间的差异显著性（$P<0.05$）。每项实验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

由于不同蛋白酶的酶切位点不同, 酶解同一蛋白质所生成肽段的活性会有一定差异。此外, 不同的酶解条件会对酶解效果产生较大的影响, 因此可以通过筛选蛋白酶和控制酶解条件来提高酶法水解的效果[36]。

2.1.1 蛋白酶的筛选 选用实验室常用的 6 种蛋白酶对苦荞蛋白进行水解, 以胰脂肪酶抑制率作为降血脂活性指标来筛选出最优蛋白酶。结果如图 1 所示, 经菠萝蛋白酶酶解后的苦荞蛋白降血脂肽的胰脂肪酶抑制活性显著高于其他五种蛋白酶（$P<0.05$）, 抑制率达到 71.67%±0.74%, 说明菠萝蛋白酶切割苦荞蛋白产生的多肽序列对胰脂肪酶有较强的抑制作用。这可能是由于不同的酶具有不同的专一性, 酶的酶切位点不同, 切割出来的肽段长度有差异, 肽段中的氨基酸组成各异, 对胰脂肪酶的抑制活性也就有差异[37]。后续将使用菠萝蛋白酶对苦荞蛋白进行酶解。

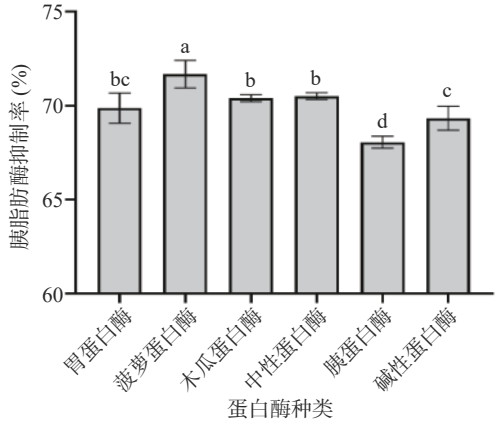


图 1 不同酶对苦荞蛋白酶解物胰脂肪酶抑制率的影响

Fig.1 Effect of different enzymes on pancreatic lipase inhibition rate of tartary buckwheat protease hydrolysate

注: 不同字母表示组间存在显著性差异（$P<0.05$）, 图 2~图 6, 图 8~图 10 同。

2.1.2 酶解时间对苦荞蛋白降血脂肽活性的影响 酶解时间的长短会影响蛋白的水解程度, 水解度低可能导致切割的肽链过长, 其生物活性无法表达出来; 水解度过高可能导致活性肽段被进一步水解, 降低其生物活性[38]。图 2 显示的是苦荞蛋白降血脂肽在不同酶解时间下对胰脂肪酶抑制率的影响, 可见, 随着酶解时间的增加, 酶解出的苦荞蛋白降血脂肽对胰脂肪酶的抑制作用呈现先增后减的趋势, 当酶解时间为 2 h 时, 胰脂肪酶抑制率达到 73.68%±0.40%, 显著高于其他处理组（$P<0.05$）。这可能是由于酶解 2 h 时, 酶与底物反应更充分, 此时切割出的高降血脂活性的多肽含量最多, 但随着酶解时间增加, 蛋白酶可能继续作用在高活性肽上, 导致原有的高活性肽段结构被破坏, 酶解液降血脂活性下降[39]。因此, 选择酶解时间为 2 h 进行下一步酶解工艺优化试验。

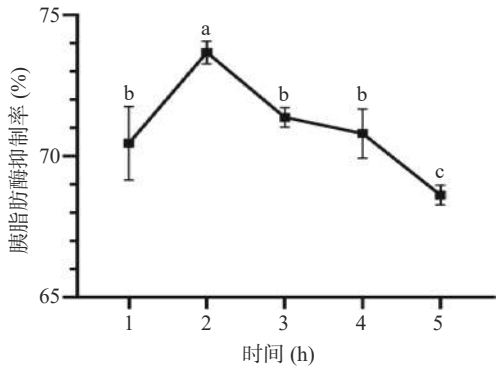


图 2 酶解时间对苦荞蛋白降血脂肽胰脂肪酶抑制率的影响

Fig.2 Effect of enzymatic hydrolysis time on pancreatic lipase inhibition rate of tartary buckwheat protein lipid-lowering peptide

2.1.3 酶解温度对苦荞蛋白降血脂肽活性的影响 由图 3 可知, 温度过高或过低均不利于苦荞蛋白降血脂肽的胰脂肪酶抑制活性, 其活性随温度的上升呈

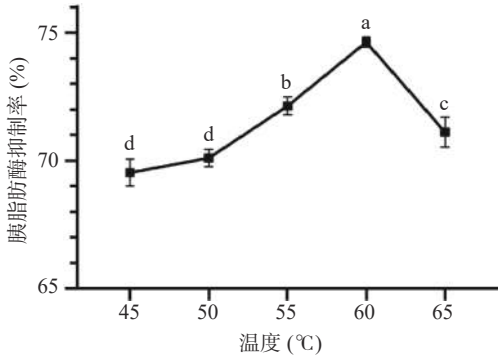


图 3 酶解温度对苦荞蛋白降血脂肽胰脂肪酶抑制率的影响

Fig.3 Effect of enzymatic hydrolysis temperature on pancreatic lipase inhibition rate of tartary buckwheat protein lipid-lowering peptide

现先上升后下降的趋势，60 ℃ 达最高值，为 74.63%±0.16%。可能是由于当温度达到 60 ℃ 时，菠萝蛋白酶的酶解效率较大，在一定的时间内切割出更多的高活性肽段，而过高和过低的温度都会对酶活力产生不利影响，温度过低时分子扩散速率较慢，酶与底物不能充分作用，酶解速率较慢，一定时间内产生的高活性肽浓度较低；温度过高则可能导致酶活力下降，导致水解效果变差[40]。因此，选择酶解温度为 60 ℃ 进行下一步酶解工艺优化试验。

2.1.4　酶解 pH 对苦荞蛋白降血脂肽活性的影响

图 4 显示的是不同 pH 条件下酶解制备的苦荞蛋白降血脂肽胰脂肪酶抑制活性，pH 在 6.0~7.0 之间时，随着 pH 的增大，其胰脂肪酶抑制率也增大，在 pH 达到 7.0 时抑制率为 72.56%±0.41%，显著高于其他处理组（P<0.05）。说明在中性条件下最利于菠萝蛋白酶与底物的结合。当 pH 大于 7.0 时，随着 pH 的增大，胰脂肪酶抑制率逐渐减小，可见 pH 是影响酶活力的一个重要因素，pH 过大过小都会影响酶活力[41]。因此，选择 pH7.0 为最佳酶解 pH。

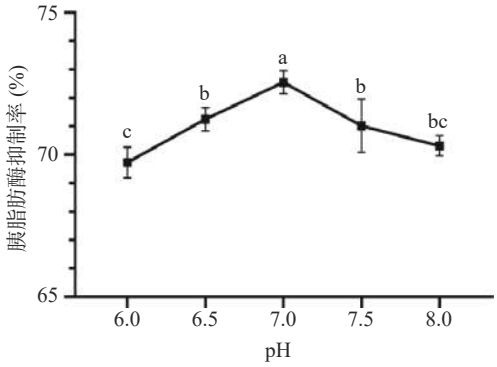


图 4　酶解 pH 对苦荞蛋白降血脂肽胰脂肪酶抑制率的影响

Fig.4　Effect of enzymatic hydrolysis pH on pancreatic lipase inhibition rate of tartary buckwheat protein lipid-lowering peptide

2.1.5　酶底比对苦荞蛋白降血脂肽活性的影响　由图 5 可见，酶底比越高，苦荞蛋白降血脂肽的胰脂肪酶抑制活性有着先增大后减小的趋势，其中当酶底比为 0.4% 时抑制率最高，达到 73.21%±0.88%，继续增大酶底比，苦荞蛋白降血脂肽的活性略微下降。当加酶量较少时，酶解未达到饱和状态，底物不能被菠萝蛋白酶充分酶解，导致产生的活性多肽含量较低，但过量的酶可能会导致底物过度水解，降低多肽的活性[42]。因此，确定最佳酶底比为 0.4%。

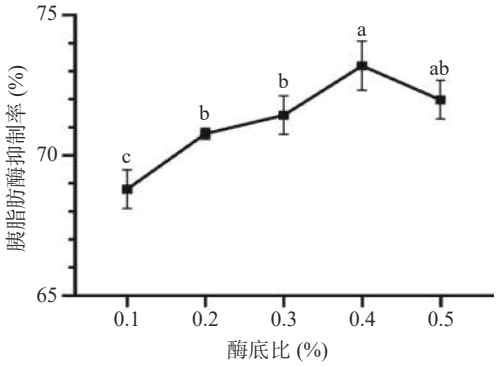


图 5　酶底比对苦荞蛋白降血脂肽胰脂肪酶抑制率的影响

Fig.5　Effect of enzyme to substrate ratio on pancreatic lipase inhibition rate of tartary buckwheat protein lipid-lowering peptide

2.1.6　底物浓度对苦荞蛋白降血脂肽活性的影响

从图 6 可以看出，当底物浓度为 1%~3% 时，苦荞蛋白降血脂肽的胰脂肪酶抑制活性随着底物浓度的增大而增大，在 3%~5% 时开始逐渐下降，当底物浓度达到 3% 时，苦荞蛋白降血脂肽的活性最大，达到 72.46%±0.20%。这可能是由于底物的量较少时，酶解作用后产生的高活性肽段数量少；当底物浓度过大时，可能会导致分子扩散受阻，酶解速率降低，所得活性产物浓度较低[43−44]，底物浓度过大也可能增大底物之间的相互作用，导致底物与酶的作用位点受阻，从而使酶促反应受到限制[45]。因此，选择底物浓度为 3% 进行后续酶解工艺优化试验。

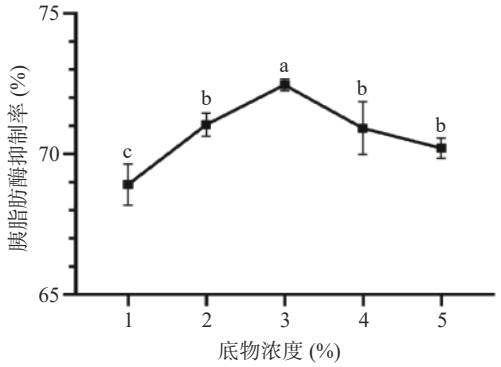


图 6　底物浓度对苦荞蛋白降血脂肽胰脂肪酶抑制率的影响

Fig.6　Effect of substrate concentration on pancreatic lipase inhibition rate of tartary buckwheat protein lipid-lowering peptide

2.2　响应面优化试验

在单因素实验基础上，选取酶解时间、酶解温度、底物浓度三个因素，利用 Design-expert 8.0 软件中 Box-Behnken 试验设计原理，以胰脂肪酶抑制率为响应值，进行三因素三水平的响应面试验设计，并对响应值进行了回归分析。响应面试验分析结果见表 3。

使用 Design-Expert 8.0.6 软件对表 3 中的数据进行多元回归拟合分析，得到胰脂肪酶抑制率 Y 对 A、B、C 三个因素的回归方程：$Y=80.57+0.27A+0.27B+0.55C-0.26AB+0.28AC-0.44BC-1.89A^2-0.22B^2-0.92C^2$。

表 4 显示了对回归模型的方差分析和显著性检验。模型的显著性<0.0001，表示模型极显著，失拟项为 0.9417 不显著，表明该模型有效，试验方法合理，结果可靠[46]。其中 F 值为检验统计量，P 值为显著性检验结果，F 值的大小反映了变量对响应值的影响大小[47]。因此可知，该试验中，底物浓度对苦荞蛋白

表 3 响应面设计方案及结果

Table 3 Scheme and results of the response surface experiment

试验号	因素			Y: 胰脂肪酶抑制率(%)
	A酶解时间	B酶解温度	C底物浓度	
1	0	−1	−1	78.252
2	1	0	1	78.956
3	0	0	0	80.952
4	0	0	0	80.184
5	0	0	0	80.261
6	−1	0	−1	77.124
7	0	0	0	80.879
8	0	0	0	80.568
9	−1	−1	0	77.671
10	0	1	−1	79.597
11	0	−1	1	80.136
12	1	0	−1	77.189
13	1	1	0	78.715
14	−1	0	1	77.767
15	−1	1	0	78.795
16	1	−1	0	78.635
17	0	1	1	79.732

表 4 回归模型方差分析

Table 4 Variance analysis for response surface quadratic model

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值(Prob>F)	显著性
模型	25	9	2.78	36.64	<0.0001	**
A-酶解时间	0.57	1	0.57	7.54	0.0287	*
B-酶解温度	0.58	1	0.58	7.59	0.0283	*
C-底物浓度	2.45	1	2.45	32.34	0.0007	**
AB	0.27	1	0.27	3.59	0.0998	
AC	0.32	1	0.32	4.17	0.0806	
BC	0.76	1	0.76	10.09	0.0156	*
A^2	15.08	1	15.08	198.9	<0.0001	**
B^2	0.21	1	0.21	2.74	0.1416	
C^2	3.54	1	3.54	46.72	0.0002	**
残差	0.53	7	0.076			
失拟项	0.045	3	0.015	0.12	0.9417	不显著
纯误差	0.49	4	0.12			
总和	25.54	16				

注: P<0.05, 差异显著, 以*表示; P<0.01, 差异极显著, 以**表示。

降血脂肽胰脂肪酶抑制作用的影响最大, 酶解温度次之, 最后是酶解时间。根据 P 值大小可知, 酶解时间、酶解温度的一次项对样品的胰脂肪酶抑制率有显著影响(P<0.05), 底物浓度对其有极显著影响(P<0.01)。

通过 Design-Expert 8.0.6 软件得到响应面曲线图, 以评价因素的两两交互作用对胰脂肪酶抑制率的影响[48], 从图 7 响应面曲线可以看出三个因素之间的交互作用对胰脂肪酶的抑制作用都是先上升后下降, 说明在试验范围内存在最大值。BC 两因素的两两交互作用的响应面投影中心为椭圆, 说明两因素交互作用影响显著, AC 两因素的响应面投影接近圆形, 说明两因素交互作用不显著, 与方差分析的结果一致。在一定的酶解时间下, 随着底物浓度和酶解温度的增加, 曲面颜色快速变化, 说明底物浓度和酶解温度的交互作用对胰脂肪酶抑制率的影响较大。

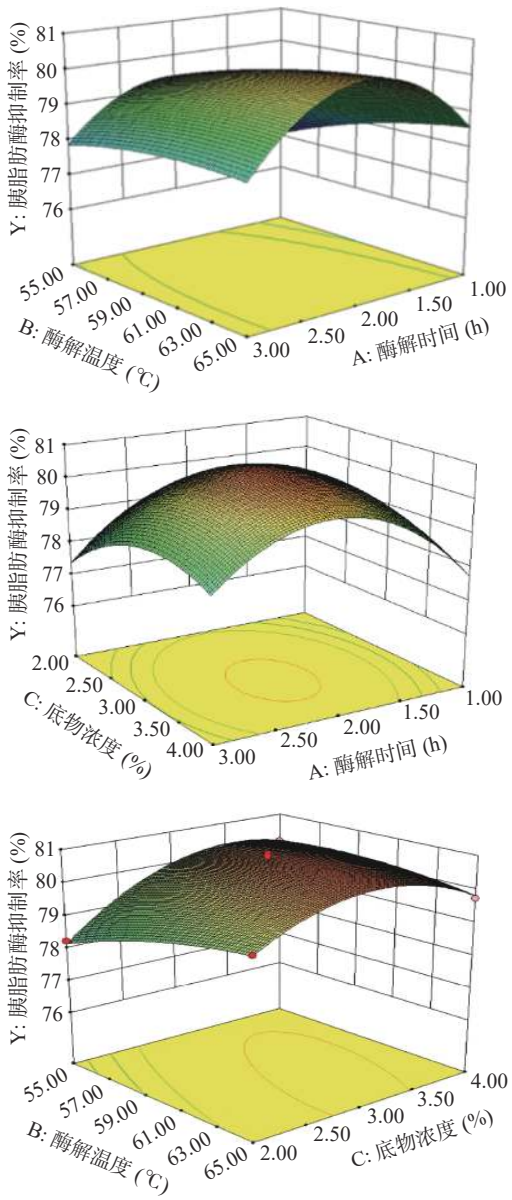


图 7 酶解时间、酶解温度、底物浓度对胰脂肪酶抑制率的影响

Fig.7 Effects of enzymolysis time, enzymolysis temperature and substrate concentration on pancreatic lipase inhibition rate

通过对这一模型进行响应面分析, 得出了最佳的酶解条件: 酶解时间为 2.06 h, 酶解温度为 61.7 ℃, 底物浓度为 3.23%, 该条件下的胰脂肪酶抑制率的预测值为 80.69%。结合实际条件, 将工艺调整为酶解时间 2.1 h, 酶解温度为 62.0 ℃, 底物浓度 3.23%, 并同时在 pH7.0, 酶底比 0.4% 的条件下进行验证实验, 得到苦荞蛋白降血脂肽的胰脂肪酶抑制率为 81.22%±0.16%, 与预测值接近, 故得出此模型有较高的可行性。后续采用最优酶解工艺下制备的苦荞蛋白降血脂肽进行功能活性分析。

2.3 苦荞蛋白降血脂肽活性分析

2.3.1 苦荞蛋白降血脂肽对牛磺胆酸钠的吸附作用

脂质积累会导致肝脏中胆固醇增多, 但当机体中的胆酸盐被物质结合后, 会促进肝脏中的胆固醇向胆酸盐的转化, 达到降脂效果[49−51]。因牛磺胆酸钠是一类

较难被吸附的结合型胆酸盐[52]，因此选择其作为苦荞蛋白降血脂肽的降血脂能力指标更具有说服力。如图 8 所示，在浓度 0.1~4 mg/mL 的情况下，苦荞蛋白降血脂肽的牛磺胆酸钠结合率呈现出一种剂量效应依赖关系，当浓度为 4 mg/mL 时，其结合率达到 48.79%±0.58%（P<0.05），计算得到其 EC_{50} 值为 9.136 mg/mL（表 5）。相比汉麻籽多肽分子量<1 ku 的组分在浓度为 4 mg/mL 时的牛磺胆酸钠结合率为 27.12%±0.01%[53]、米糠多肽分子量<5 kDa 时浓度在 10 mg/mL 的牛磺胆酸钠结合率为 45.28%±1.39%[54]，苦荞蛋白降血脂肽表现出更好的胆酸盐结合能力。

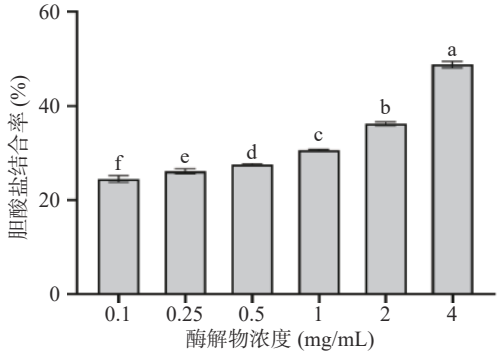


图 8　不同浓度苦荞蛋白降血脂肽的牛磺胆酸钠结合率

Fig.8　Sodium taurocholate binding rate of different concentrations of tartary buckwheat protein lipid-lowering peptide

表 5　苦荞蛋白降血脂肽降血脂活性评价

Table 5　Evaluation of lipid-lowering activity of tartary buckwheat protein lipid-lowering peptide

活性指标	EC_{50}/IC_{50}（mg/mL）
牛磺胆酸钠结合率	9.136
胰脂肪酶抑制率	0.051
胆固醇酯酶抑制率	3.902

2.3.2　苦荞蛋白降血脂肽对胰脂肪酶的抑制作用

膳食脂肪摄入人体后，需要被脂肪酶水解才能被人体吸收，而胰脂肪酶在脂代谢中起关键作用[55]。对胰脂肪酶进行抑制可进一步抑制人体对脂肪的吸收[56]。如图 9 所示，当苦荞蛋白降血脂肽的浓度不断增加，其对胰脂肪酶的抑制作用随之上升。当苦荞蛋白降血脂肽的浓度为 4 mg/mL 时，对胰脂肪酶的抑制率最高，为 66.31%±0.60%（P<0.05），并计算出其 IC_{50} 为 0.051 mg/mL（表 5）。相比燕麦麸皮肽的胰脂肪酶抑制率 IC_{50} 为 0.085 mg/mL[57] 和苋菜蛋白酶解物的胰脂肪酶抑制率 IC_{50} 为 0.38~0.66 mg/mL[58]，苦荞蛋白降血脂肽的胰脂肪酶抑制活性更高。

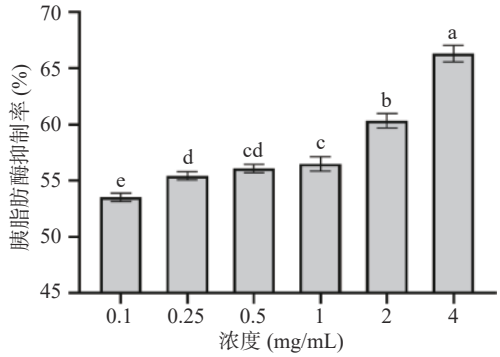


图 9　不同浓度苦荞蛋白降血脂肽的胰脂肪酶抑制率

Fig.9　Pancreatic lipase inhibition rate of different concentrations of tartary buckwheat protein lipid-lowering peptide

2.3.3　苦荞蛋白降血脂肽对胆固醇酯酶的抑制作用

胆固醇酯酶将膳食胆固醇转化为胆固醇并储藏在肝脏中，通过抑制胆固醇酯酶，可以减少人体对胆固醇的吸收[34]。图 10 为不同浓度的苦荞蛋白降血脂肽对胆固醇酯酶的抑制结果，随着苦荞蛋白降血脂肽浓度的增加，对胆固醇酯酶的抑制能力显著增加，在 4 mg/mL 时，对胆固醇酯酶的抑制率最高，达到 52.22%±1.10%（P<0.05）。经计算其 IC_{50} 值为 3.902 mg/mL（表 5），低于亚麻籽降血脂肽的 IC_{50} 为 4.57 mg/mL[59] 和藜麦多肽的 IC_{50} 为 4.73 mg/mL[31]，表明苦荞蛋白降血脂肽具有较好的胆固醇酯酶抑制能力。

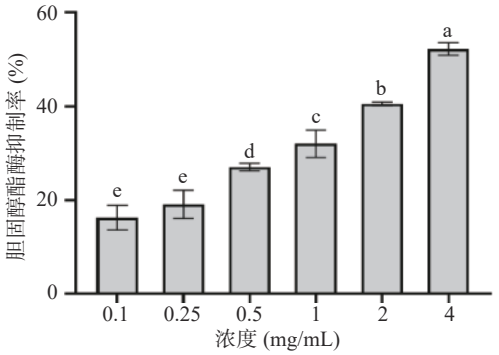


图 10　不同浓度苦荞蛋白降血脂肽的胆固醇酯酶抑制率

Fig.10　Cholesterol esterase inhibition rate of different concentrations of tartary buckwheat protein lipid-lowering peptide

2.4　氨基酸组成成分分析

苦荞蛋白降血脂肽的氨基酸分析色谱图如图 11 所示，氨基酸组成分析结果如表 6 所示。采用酸水解法处理样品，除色氨酸被全部破坏外，共检测出 17 种氨基酸，其总量为 74.09 g/100 g。苦荞蛋白降血脂肽具有丰富的氨基酸组成，其中必需氨基酸占比 27.82%，疏水性氨基酸占比 32.11%，酸性氨基酸占比 35.86%。大量的研究证实，疏水性氨基酸对降胆固醇活性有着显著的影响，对于胆酸盐的结合能力也发挥着重要的作用[60]。苦荞蛋白降血脂肽中含有大量疏水氨基酸，其对牛磺胆酸钠的结合和对胆固醇酯酶的抑制有着良好效果（表 5）可能与之有一定关系。有研究指出，在具有降血脂功能的多肽中，酸性氨基酸的含量较多[61]，本研究中酸性氨基酸 Asp 和 Glu 分别占比 10.36% 和 25.51%。一些研究发现，精

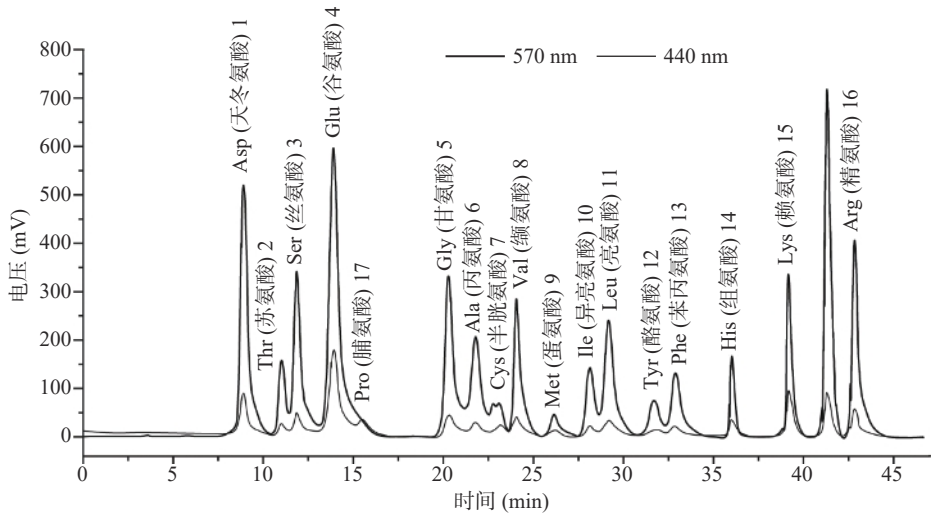


图 11 苦荞蛋白降血脂肽氨基酸分析色谱图

Fig.11 Amino acid chromatogram of tartary buckwheat protein lipid-lowering peptide

表 6 苦荞蛋白降血脂肽的氨基酸组成

Table 6 Amino acid composition of tartary buckwheat protein lipid-lowering peptide

氨基酸名称	含量(g/100 g)	相对百分含量(%)
天冬氨酸(Asp)	7.67±0.93	10.36
苏氨酸(Thr)*	2.49±0.48	3.36
丝氨酸(Ser)	3.83±0.31	5.17
谷氨酸(Glu)	18.90±0.88	25.51
甘氨酸(Gly)#	4.00±0.06	5.40
丙氨酸(Ala)#	3.31±0.18	4.46
半胱氨酸(Cys)	1.48±0.76	1.99
缬氨酸(Val)*#	3.77±0.30	5.09
甲硫氨酸(Met)*#	0.70±0.77	0.94
异亮氨酸(Ile)*#	2.72±0.67	3.67
亮氨酸(Leu)*#	4.25±0.96	5.74
酪氨酸(Tyr)	2.38±0.53	3.21
苯丙氨酸(Phe)*#	3.11±0.13	4.20
组氨酸(His)	1.87±0.20	2.52
赖氨酸(Lys)*	3.57±0.98	4.81
精氨酸(Arg)	8.13±0.04	10.97
脯氨酸(Pro)#	1.93±0.16	2.60
必需氨基酸(*EAA)	20.61	27.82
疏水性氨基酸(#HAA)	23.79	32.11
酸性氨基酸 (AAA)	26.57	35.86

注: *EAA: 必需氨基酸; #HAA: 疏水性氨基酸; AAA: 酸性氨基酸(Asp、Glu)。

氨酸与赖氨酸的比值提高会使血清中胆固醇的水平降低[62], 在苦荞蛋白降血脂肽中, Arg/Lys 的值为 2.28, 这在一定程度上促进了其降血脂作用。综上, 本研究所发现的苦荞蛋白降血脂肽具有多层面的降脂潜能, 但其特定的多肽组成及氨基酸序列仍需进一步解析。

3 结论

本研究以苦荞麦作为原料提取苦荞蛋白, 并利用单因素和响应面试验, 以胰脂肪酶抑制活性为主要检测指标, 筛选出制备苦荞蛋白降血脂肽的最佳酶解工艺: 酶解时间 2.1 h, 酶解温度为 62.0 ℃, 底物浓度 3.23%, pH7.0, 酶底比 0.4%, 此条件下制备的苦荞蛋白降血脂肽的胰脂肪酶抑制率达到 81.22%±0.16%。苦荞蛋白降血脂肽表现出良好的牛磺胆酸钠结合能力、胰脂肪酶抑制能力和胆固醇酯酶抑制能力, 显示出其良好的降血脂活性。苦荞蛋白降血脂肽含有丰富的疏水性氨基酸(32.11%)和酸性氨基酸(35.86%), 这对其降胆固醇和结合胆酸盐的能力有积极作用, Arg/Lys 的比值为 2.28, 也在一定程度上促进了苦荞蛋白降血脂肽的降血脂能力。本研究为苦荞麦资源的高值化利用提供了新思路, 后续将进一步对苦荞降血脂肽的分离纯化、结构鉴定和降脂作用机制方面展开深入研究。

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

参考文献

[1] SUNGMIN L, BUHYUN Y. Hypolipidemic roles of casein-derived peptides by regulation of trans-intestinal cholesterol excretion and bile acid synthesis[J]. Nutrients, 2020, 12(10): 3058−3058.

[2] XIANG H, WATERHOUSE D, LIU P, et al. Pancreatic lipase-inhibiting protein hydrolysate and peptides from seabuckthorn seed meal: preparation optimization and inhibitory mechanism[J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 134: 109870−109870.

[3] 侯珮琳, 赵肖通, 张彦青, 等. 绿豆蛋白降血脂水解物的制备及纯化工艺[J]. 食品工业科技, 2020, 41(9): 186−192. [HOU Peilin, ZHAO Xiaotong, ZHANG Yanqing, et al. Preparation and purification of hydrolysate of mung bean protein for reducing blood lipids[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(9): 186−192.]

[4] 成人高脂血症食养指南[J]. 2023 年版. 全科医学临床与教育, 2023, 21(7): 581-583. [Dietary guidelines for adults with hyperlipidemia [J]. 2023 edition. General Medicine Clinical and Education, 2023, 21(7): 581-583.]

[5] TADDEI C, ZHOU B, BIXBY H, et al. Repositioning of the global epicentre of non-optimal cholesterol[J]. Nature, 2020, 582(7810): 73−77.

［6］ 夏峰. 浅析高血脂可诱发多种疾病对人体的危害[J]. 医学信息(中旬刊), 2011, 24(9): 4341−4342. ［XIA Feng. Analysis on the harm of hyperlipidemia inducing various diseases to human body [J]. Medical Information (Mid-Day), 2011, 24(9): 4341−4342. ］
［7］ CASSAR A, HOLMES D R, RIHAL C S, et al. Chronic coronary artery disease: Diagnosis and management[J]. Mayo Clinic Proceedings, 2009, 84(12): 1130−1146.
［8］ 李建飞, 王智勇, 宋明哲, 等. 不同剂量阿托伐他汀钙治疗老年不稳定型心绞痛并高脂血症患者的治疗效果分析[J]. 中国实用医药, 2020, 15(7): 123−125. ［LI Jianfei, WANG Zhiyong, SONG Mingzhe, et al. Analysis of effect of different doses of atorvastatin calcium on elderly patients with unstable angina pectoris and hyperlipidemia[J]. China Practical Medicine, 2020, 15(7): 123−125. ］
［9］ LIN P, SHEN N, YIN F, et al. Sea cucumber-derived compounds for treatment of dyslipidemia: A review[J]. Frontiers in Pharmacology, 2022, 13: 1000315−1000315.
［10］ 蒋琪, 贺婷婷, 石玉华. 奥利司他治疗肥胖型多囊卵巢综合征的研究进展[J]. 中华生殖与避孕杂志, 2019, 39(9): 5. ［JIANG Qi, HE Tingting, SHI Yuhua. Research progress of orlistat in treatment of obese polycystic ovary syndrome[J]. Chinese Journal of Reproduction and Contraception, 2019, 39(9): 5. ］
［11］ PRITI M, N B W, HINA K, et al. A comparative investigation into novel cholesterol esterase and pancreatic lipase inhibitory peptides from cow and camel casein hydrolysates generated upon enzymatic hydrolysis and *in-vitro* digestion[J]. Food Chemistry, 2022, 367: 130661.
［12］ YANG F Y, HUANG J Q, HE H Y, et al. Study on the hypolipidemic activity of rapeseed protein-derived peptides[J]. Food Chemistry, 2023, 423: 136315.
［13］ YE H D, XU Y, SUN Y N, et al. Purification, identification and hypolipidemic activities of three novel hypolipidemic peptides from tea protein[J]. Food Research International, 2023, 165: 112450−112450.
［14］ FERREIRA M R, GARZÓN A G, OLIVA M E, et al. Lipid-lowering effect of microencapsulated peptides from brewer's spent grain in high-sucrose diet-fed rats[J]. Food Bioscience, 2022, 49: 101981−101981.
［15］ 范昱. 中国苦荞种质资源性状评价和荞麦属植物亲缘关系分析[D]. 成都: 成都大学, 2019. ［FAN Yu. Evaluation of tartary buckwheat germplasm resources in China and genetic relationship analysis of *Fagopyrum* mill genus plants[D]. Chengdu: Chengdu University, 2019. ］
［16］ 张超, 卢艳, 郭贯新, 等. 苦荞麦蛋白质抗疲劳功能机理的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2005(6): 78−82. ［ZHANG Chao, LU Yan, GUO Guanxin, et al. Study on antifatigue of buckwheat protein[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2005(6): 78−82. ］
［17］ TOMOTAKE H, SHIMAOKA I, KAYASHITA J, et al. Stronger suppression of plasma cholesterol and enhancement of the fecal excretion of steroids by a buckwheat protein product than by a soy protein isolate in rats fed on a cholesterol-free diet[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2001, 65(6): 1412−1414.
［18］ 何晓兰, 雷霆雯, 许庆忠, 等. 不同方法提取苦荞蛋白的体外抗氧化活性研究[J]. 安徽农业科学, 2017, 45(25): 134−135. ［HE Xiaolan, LEI Tingwen, XU Qingzhong, et al. Study on antioxidant activity *in vitro* of tartary buckwheat proteins extracted by different methods[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2017, 45(25): 134−135. ］
［19］ 李恩伟. 苦荞蛋白对肠道有害菌生长抑制机理研究[J]. 食品工业科技, 2017, 38(15): 306−310. ［LI Enwei. Effect of tartary buckwheat protein on the growth of harmful bacteria in intestinal [J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(15): 306−310. ］
［20］ 周小理, 路远, 周一鸣, 等. 苦荞蛋白对益生菌生长及其胆酸盐耐受能力的影响[J]. 现代食品科技, 2016, 32(9): 121−126. ［ZHOU Xiaoli, LU Yuan, ZHOU Yiming, et al. Effects of tartary buckwheat protein on the growth and bile salts tolerance of probiotics[J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(9): 121−126. ］
［21］ GUO X, YAO H. Fractionation and characterization of tartary buckwheat flour proteins[J]. Food Chemistry, 2005, 98(1): 90−94.
［22］ 陈英娇. 苦荞蛋白酶解物的制备及抗菌活性的研究[D]. 上海: 上海师范大学, 2015. ［CHEN Yingjiao. Enzymatic preparation and research on the antibacterial activity of tartary buckwheat protein hydrolysates[D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2015. ］
［23］ 江含秀, 曾芳, 邬晓霞, 等. 不同品种苦荞蛋白的复合酶解及其多肽抗氧化活性[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(9): 43−51. ［JIANG Hanxiu, ZENG Fang, WU Xiaoxia, et al. Doble enzymatic hydrolysis of tartary buckwheat proteins of different varieties and the antioxidant activity of the polypeptides[J]. Food Research and Development, 2023, 44(9): 43−51. ］
［24］ 马萌, 陶婷, 马挺军. 苦荞多肽的纯化、结构与体外抗氧化活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2022, 34(12): 2011−2017. ［MA Meng, TAO Ting, MA Tingjun. Study on purification, structure and *in vitro* antioxidant activity of buckwheat peptides[J]. Natural Product Research and Development, 2022, 34(12): 2011−2017. ］
［25］ 蒋彤, 王亚雯, 李裕倩, 等. 苦荞低聚肽体外抗氧化活性及其对运动小鼠自由基代谢与疲劳恢复的影响[J]. 营养学报, 2022, 44(1): 79−85. ［JIANG Tong, WANG Yawen, LI Yuqian, et al. Antioxidant capacity of tartary buckwheat oligopeptides and its effect on free radical metabolism and fatigue recovery in exercise training mice[J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2022, 44(1): 79−85. ］
［26］ 杜晶晶. 苦荞抗菌肽 FtAMP 的分子特征及抗菌活性的研究[D]. 太原: 山西大学, 2018. ［DU Jingjing. Study on molecular characteristics and antibacterial activity of buckwheat antimicrobial peptide-FtAMP[D]. Taiyuan: Shanxi University, 2018. ］
［27］ 陈旋, 杨国琴, 高书彦, 等. 响应曲面优化苦荞多肽固态发酵工艺及其抗菌活性研究[J]. 食品与发酵科技, 2018, 54(1): 30−38. ［CHEN Xuan, YANG Guoqin, GAO Shuyan, et al. Preparation optimization of tartary buckwheat peptide by solidstate fermentation using response surface methodology and antimicrobial activity[J]. Food and Fermentation Science & Technology, 2018, 54(1): 30−38. ］
［28］ 刘靖. 苦荞蛋白对脂质代谢的调控作用及其作用机制研究[D]. 成都: 成都大学, 2022. ［LIU Jing. Effects of tartary buckwheat protein onlipid metabolism and its mechanism[D]. Chengdu: Chengdu University, 2022. ］
［29］ 王宏. 苦荞蛋白对小鼠血脂代谢紊乱与肠道菌群调节作用的研究[D]. 上海: 上海应用技术大学, 2016. ［WANG Hong. Preventive effect of tartary buckwheat protein on the dyslipidemia and intestinal flora in mouse[D]. Shanghai: Shanghai University of Applied Technology, 2016. ］
［30］ 刘泰驿. 基于代谢组学与微生物组学的苦荞蛋白降脂机理的研究[D]. 上海: 上海应用技术大学, 2017. ［LIU Taiyi. Study on lipid lowering mechanism of tartary buckwheat protein based on intestinal flora and metabolomics abstract[D]. Shanghai: Shanghai University of Applied Technology, 2017. ］

[31] 钟婉滢, 苗建银, 叶灏铎, 等. 藜麦蛋白肽的酶解制备及体外降血脂与降尿酸活性研究[J]. 食品工业科技, 2023, 44(23): 156−166. [ZHONG Wanying, MIAO Jianyin, YE Haoduo, et al. Enzymatic preparation of quinoa protein peptides and its lipid-lowering and uric acid-lowering activity *in vitro*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(23): 156−166.]
[32] 叶灏铎, 苗建银, 李龙星, 等. 勐库大叶茶蛋白降血脂肽的酶解制备及活性分析[J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 212−221. [YE Haoduo, MIAO Jianyin, LI Longxing, et al. Preparation and activity of hypolipidemic peptides from Mengkudayecha protein by enzymatic hydrolysis[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 212−221.]
[33] 李成龙. 发酵酸肉降血脂肽的分离纯化、特性研究及其对血管内皮细胞的影响[D]. 重庆: 西南大学, 2016. [LI Chenglong. Purification of blood lipid lowering peptides from fermented sour meat and studing of physicochemical properties and its effects on vascular endothelial cells[J]. Chongqing: Southwest University, 2016.]
[34] BABA W N, PRITI M, BINCY B, et al. New insights into the cholesterol esterase- and lipase-inhibiting potential of bioactive peptides from camel whey hydrolysates: Identification, characterization, and molecular interaction[J]. Journal of Dairy Science, 2021, 104(7): 7393−7405.
[35] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定 GB 5009.124-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. [National Health and Family Planning Commission, State Food and Drug Administration. Determination of amino acids in food of national standard for food safety GB 5009.124-2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.]
[36] 拉升·再尼西, 李伟, 敬思群, 等. 酶解法制备葵花籽粕 ACE 抑制肽[J]. 食品工业, 2018, 39(9): 32−35. [LASHENG·Zainixi, LI Wei, JING Siqun, et al. Preparation of ACE inhibitory peptides from sunflower seed meal by enzymolysis method[J]. Food Industry, 2018, 39(9): 32−35.]
[37] 徐倩, 戴遥, 赵永慧, 等. 酶法制备鱼降血压肽的工艺优化及其组分分析[J]. 食品工业科技, 2018, 39(20): 151−157. [XU Qian, DAI Yao, ZHAO Yonghui, et al. Optimization of preparation of hypotensive peptide from platycephalus indicus by enzymatic method and its component analysis[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(20): 151−157.]
[38] 许春平, 姜宇, 曾颖, 等. 不同酶解条件对烟叶蛋白水解度和抗氧化性的影响[J]. 轻工学报, 2017, 32(6): 56−62. [XU Chunping, JIANG Yu, ZENG Ying, et al. Effects of different enzymolysis conditions on the protein degree and antioxidant activity of tobacco leaf[J]. Journal of Light Industry, 2017, 32(6): 56−62.]
[39] 周丽丽, 吴跃梅, 王素英. 响应面法优化酶解藻蓝蛋白制备抗肥胖肽[J]. 中国食品学报, 2017, 17(5): 99−107. [ZHOU Lili, WU Yuemei, WANG Suying. Optimization of enayme of anti-obesity from phycocyanin by response surface methodology[J]. Chinese Journal of Food Science, 2017, 17(5): 99−107.]
[40] 罗小雨, 周仿, 费烨, 等. 响应面法优化苦荞水溶性清蛋白水解工艺及其抗氧化活性研究[J]. 食品科技, 2019, 44(3): 239−244. [LUO Xiaoyu, ZHOU Fang, FEI Ye, et al. Optimization for hydrolysis of tartary buckwheat water-soluble albumin by response surface methodology and its antioxidant activity[J]. Food Science and Technology, 2019, 44(3): 239−244.]
[41] 黄文, 余可楠, 廖婉雯, 等. 响应面法优化罗非鱼鳞钙结合肽酶解工艺及其特性表征[J]. 食品工业科技, 2021, 42(21): 190−196. [HUANG Wen, YU Kenan, LIAO Wanwen, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis of tilapia scale calcium binding peptides by response surface methodology and its structural characterization[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(21): 190−196.]
[42] KARANGWA E, ZHANG X, MUREKATETE N, et al. Effect of substrate type on sensory characteristics and antioxidant capacity of sunflower Maillard reaction products[J]. European Food Research and Technology, 2015, 240(5): 939−960.
[43] 杨晓月. 核桃粕降血脂肽的制备及其降血脂作用研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2021. [YANG Xiaoyue. Preparation of hypolipidemic peptide from walnut meal and its hypolipidemic effect[D]. Xi'an: Shaanxi Normal University, 2021.]
[44] 唐诵泽. 降胆固醇核桃多肽的制备及其活性研究[D]. 晋中: 山西农业大学, 2020. [TANG Songze. Study on the preparation and activity of hypocholesterolemic peptide from walnut[D]. Jinzhong: Shanxi Agricultural University, 2020.]
[45] 宁诗文, 崔珊珊, 尚宏丽. 响应面法优化大黄花鱼肉蛋白水解工艺及多肽抗氧化性研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(13): 219−226. [NING Shiwen, CUI Shanshan, SHANG Hongli. Optimization of the protein hydrolysis process by response surface method and the antioxidant properties of polypeptides in largy yellow croaker[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(13): 219−226.]
[46] 张可欣, 屠康, 李心悦. 响应面法优化荸荠山药猪肉丸配方[J]. 食品工业, 2023, 44(5): 47−51. [ZHANG Kexin, TU Kang, LI Xinyue. Optimization of formulation of water chestnut, yam and pork balls by response surface methodology[J]. Food Industry, 2023, 44(5): 47−51.]
[47] 伦琦, 乔镜澄, 杨江南, 等. 响应面分析法优化银杏叶黄酮类化合物的提取工艺[J]. 食品安全导刊, 2023(12): 137−140. [LUN Qi, QIAO Jingcheng, YANG Jiangnan, et al. Study on optimization of extraction technology by response surface methodology of flavonoids from *Ginkgo biloba* leaves[J]. China Food Safety Magazine, 2023(12): 137−140.]
[48] 唐杏雨, 理俊霞, 王浩琳, 等. 响应面法优化黑水虻幼虫蛋白肽的制备工艺[J]. 现代畜牧科技, 2023(4): 6−11. [TANG Xingyu, LI Junxia, WANG Haolin, et al. Optimization of preparation process of black soldier fly larval protein peptides by response surface method[J]. Modern Animal Husbandry Science & Technology, 2023(4): 6−11.]
[49] 孟晓雪, 卫育良, 梁萌青, 等. 鱼类胆固醇营养需求研究进展[J]. 动物营养学报, 2021, 33(2): 719−728. [MENG Xiaoxue, WEI Yuliang, LIANG Mengqing, et al. Progress in cholesterol nutritional requirements of fish[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2021, 33(2): 719−728.]
[50] XUE Z H, GAO X D, JIA Y J, et al. Structure characterization of high molecular weight soluble dietary fiber from mushroom *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler and its interaction mechanism with pancreatic lipase and bile salts[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 153(15): 1281−1290.
[51] 胡凯, 黄惠华. 不同茶浸提液对胆酸盐的结合及其降血脂机理的研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(8): 105−107. [HU Kai, HUANG Huihua. Study on the ability of bile salt-binding among different tea extracts *in vitro*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 32(8): 105−107.]
[52] DEBRUYNE P R, BRUYNEEL E A, LI X, et al. The role of bile acids in carcinogenesis[J]. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2001, 480: 359−369.
[53] 魏连会, 宋淑敏, 董艳, 等. 汉麻籽多肽的氨基酸营养组成与

体外结合胆酸盐能力的研究[J]. 中国粮油学报, 2020, 35(1): 62−66. [WEI Lianhui, SONG Shumin, DONG Yan, et al. Evaluation of amino acid nutritional composition and *in vitro* binding of bile salts power of hemp seed polypeptide[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2020, 35(1): 62−66.]

[54] 吴章毅, 乔惠钰, 陈红. 米糠多肽的制备和体外降血脂、降血糖活性分析及结构鉴定[J]. 粮食与油脂, 2023, 36(7): 54−59. [WU Zhangyi, QIAO Huiyu, CHEN Hong. Preparation of rice bran polypeptide and *in vitro* hypolipidemic and hypoglycemic activity analysis and structure identification[J]. Cereals & Oils, 2023, 36(7): 54−59.]

[55] 孙茹欣. 驼血降血脂生物活性肽的制备与鉴定[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2021. [SUN Ruxin. Preparation and identification of lipid-lowering bioactive peptides in camel blood[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2021.]

[56] 龚受基, 滕翠琴, 梁东姨, 等. 六堡茶茶褐素体外降脂功效研究[J]. 茶叶科学, 2020, 40(4): 536−543. [GONG Shouji, TENG Cuiqin, LIANG Dongyi, et al. *In vitro* study on hypolipidemic effect of heabrownins Liupao tea[J]. Journal of Tea Science, 2020, 40(4): 536−543.]

[57] RAMAK E, ISSAKA S, WILLIAM W, et al. Antioxidant, pancreatic lipase, and *α*-amylase inhibitory properties of oat bran hydrolyzed proteins and peptides[J]. Journal of Food Biochemistry, 2021, 46(4): e13762−e13762.

[58] FEYISOLA F A, PRITI M, CHEE-YUEN G, et al. Identification and characterization of cholesterol esterase and lipase inhibitory peptides from amaranth protein hydrolysates[J]. Food Chemistry: X, 2021, 12: 100165.

[59] 刘晓静. 亚麻籽肽降胆固醇作用的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2020. [LIU Xiaojing. Study on cholesterol-lowering effect of flaxseed peptide[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2020.]

[60] PRADOS I M, MARINA M L, GARCIA M C. Isolation and identification by high resolution liquid chromatography tandem mass spectrometry of novel peptides with multifunctional lipid-lowering capacity[J]. Food Research International, 2018, 111: 77−86.

[61] GUADALUPE G A, ESTEBAN C R, ESTEFANIA A M, et al. Isolation and identification of cholesterol esterase and pancreatic lipase inhibitory peptides from brewer's spent grain by consecutive chromatography and mass spectrometry[J]. Food & Function, 2020, 11(6): 4994−5003.

[62] YANG X Y, ZHONG D Y, WANG G L, et al. Effect of walnut meal peptides on hyperlipidemia and hepatic lipid metabolism in rats fed a high-fat diet[J]. Nutrients, 2021, 13(5): 1410.

陈晓乐, 韩笑, 宫建泉, 等. 表面活性剂改良牛蒡多糖粒径工艺优化及其结构表征 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 140−147. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110030

CHEN Xiaole, HAN Xiao, GONG Jianquan, et al. Particle Size Optimization and Structural Characterization of *Arctium lappa* L. Polysaccharides Improved by Surfactant[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 140−147. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110030

· 工艺技术 ·

表面活性剂改良牛蒡多糖粒径工艺优化及其结构表征

陈晓乐[1,2], 韩　笑[3], 宫建泉[3], 李玲玉[2], 朱文卿[2], 郑振佳[2,*]

（1.山东省德州市农业科学研究院, 山东德州 253015;
2.山东农业大学食品科学与工程学院, 山东省高等学校食品营养与健康重点实验室, 山东泰安 271018;
3.烟台百脉山生物科技有限公司, 山东烟台 265200）

摘　要: 使用表面活性剂对牛蒡多糖粒径进行改良，通过单因素和响应面法优化得到最优的表面活性剂改良工艺条件，通过紫外光谱、红外、粒径和扫描电镜等对改良前后的牛蒡多糖进行结构表征。结果表明：牛蒡多糖粒径的最优改良工艺条件为：表面活性剂种类为吐温-80（Tween-80），浓度为 0.5%，涡旋时间 16 s，pH5.67，此条件下得到牛蒡多糖粒径为 6.19±0.14 nm。傅里叶红外光谱分析显示表面活性剂改良并未改变牛蒡多糖的结构，紫外光谱显示改良后多糖在 280 nm 处出现了一个细微的波动，推测可能是表面活性剂在该波段的紫外吸收。粒径分析对比表明改良后的牛蒡多糖粒径较改良前显著减小。扫描电镜结果显示改良后牛蒡多糖呈现出更为有序的球状结构，大小较均一。本研究可为制备粒径可控的多糖体系提供理论依据。

关键词: 牛蒡多糖, 表面活性剂, 结构改良, 粒径
中图分类号: TS201.1　　**文献标识码:** B　　**文章编号:** 1002−0306(2024)21−0140−08
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110030
本文网刊:

Particle Size Optimization and Structural Characterization of *Arctium lappa* L. Polysaccharides Improved by Surfactant

CHEN Xiaole[1,2], HAN Xiao[3], GONG Jianquan[3], LI Lingyu[2], ZHU Wenqing[2], ZHENG Zhenjia[2,*]

（1.Dezhou Academy of Agricultural Sciences, Dezhou 253015, China;
2.College of Food Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Key Laboratory of Food Nutrition and Healthy in Universities of Shandong, Taian 271018, China;
3.Yantai Baimaishan Biotechnology Co., Ltd., Yantai 265200, China）

Abstract: Using surfactants to improve the particle size of *Arctium lappa* L. polysaccharides, and the optimal process conditions were obtained by single factor and response surface method. The structure of *Arctium lappa* L. polysaccharides before and after improvement was characterized by UV, Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), particle size, and scanning electron microscopy. The results showed that the optimal process conditions for improving the particle size of *Arctium lappa* L. polysaccharides were as follows: The surfactant was Tween-80, the concentration was 0.5%, the vortex time was 16 s, and the pH was 5.67, under these conditions, the particle size of *Arctium lappa* L. polysaccharides was 6.19±0.14 nm. FT-IR analysis showed that the modification with surfactants did not change the structure of *Arctium lappa* L. polysaccharides. The UV spectrum showed a slight fluctuation at 280 nm, which might be attributed to the UV

收稿日期: 2023−11−06
基金项目: 山东省重点研发计划（2022TZXD0020）; 百脉山科技研发基金（BMS202301）。
作者简介: 陈晓乐（1998−）, 女, 硕士, 助理农艺师, 研究方向: 果蔬加工与功能食品, E-mail: C18854881522@163.com。
*** 通信作者:** 郑振佳（1985−）, 男, 博士, 副教授, 研究方向: 果蔬加工与功能食品, E-mail: zhengzhenjia@sdau.edu.cn。

absorption of surfactants in this wave band. The particle size analysis showed that the grain size of improved *Arctium lappa* L. polysaccharides decreased significantly compared with unimprovement. The scanning electron microscopy results showed that the improved *Arctium lappa* L. polysaccharides exhibited a more ordered spherical structure and more uniform sizes. This study can provide a theoretical basis for the preparation of a polysaccharide system with controlled particle size.

Key words: *Arctium lappa* L. polysaccharides; surfactant; structural improvement; particle size

牛蒡多糖是牛蒡重要的活性成分之一，具有抗肿瘤[1]、降血糖血脂[2]、增强免疫力[3−4]、抵抗肝损伤[5]及预防氧化损伤[6]等活性，能够被结肠微生物降解，具有粘膜粘附性[7]，可作为载体负载功能性成分，靶向运输到作用部位[8]。作为靶向递送材料，多糖为无定形状态，粒径不可控，装载效率不稳定，因此研制粒径可控的多糖载体对于提升其对功能性成分装载率具有重要意义。

表面活性剂是一类能够改变溶液性质的具有较高表面活性的物质，分为阳离子型、阴离子型和非离子型三类，代表性表面活性剂有季铵盐类化合物、十二烷基硫酸钠（SDS）、柠檬酸、吐温（Tween）和司班（Span）等，可以使界面张力或溶剂的表面张力显著下降，从而减小溶剂平均粒径[9]。Tween-20 可以使玉米蛋白纳米颗粒粒径从 140 nm 降至 90 nm 左右，对姜黄素的包封率从 47.1% 提高至 85.7%，且包封率与表面活性剂浓度呈正相关[10]。十二烷基硫酸钠对羧甲基-己酰基壳聚糖纳米颗粒聚集体的形成和尺寸分布有一定影响，可以使其粒径从 123.6±4.2 nm 降低到 73.8±2.6 nm[11]。随着 Span-80 添加量的增加，海藻酸钠微胶囊的粒径逐渐减小，当 Span-80 添加量为 1.5% 时粒径最小，为 168±18 μm，海藻酸钠微胶囊的包埋率随 Span-80 添加量的增加呈先上升后下降的趋势，当 Span-80 添加量为 1.0% 时包埋率最高为 86.5%[12]。ZHAO 等[13] 通过放大微反应器系统研究了表面活性剂、流速比、流速和溶剂浓度对芹菜素粒径的影响，制备得到纳米芹菜素的最小粒径为 116 nm，回收率为 95.3%，纯度提高 0.88%，证明了高效、高通量、粒径可控的纳米药物制备方法的可行性。具有广泛尺寸分布的载体可能无法控制功能性成分释放速度，从而导致剂量过量或剂量不足问题[14]，表面活性剂的加入可以制备粒径可控的载体，优化载体装载性能。

本文使用表面活性剂对牛蒡多糖粒径进行优化，考察了表面活性剂种类、Tween-80 浓度、涡旋时间和 pH 对牛蒡多糖粒径的影响，并对改良前后的多糖进行结构表征，探究表面活性剂对多糖粒径的优化特性，为提高牛蒡多糖的装载效率和装载性能，研制以牛蒡多糖为载体的靶向递送材料提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

牛蒡多糖　实验室前期制备，纯度为 95.71%，核磁鉴定结构为 α-D-吡喃葡萄糖基-(1→2)-[β-D-呋喃果糖基-(1→2)]$_{10}$-β-D-呋喃果糖基[15]；盐酸、氢氧化钠　分析纯，天津市科密欧化学试剂有限公司；透析袋（500 Da）　怡康科贸生物试剂耗材试验有限公司；Tween-80、Span-80、SDS　北京索莱宝科技有限公司。

Zetasizer-Nano-ZS 激光纳米粒度分析仪　英国马尔文公司；S210 pH 计　梅特勒-托利多仪器有限公司；QL-901 旋涡混合器　江苏海门市麒麟医用仪器厂；UV2450 分光光度计　日本岛津公司；Nicolet-iS 10 傅里叶变换红外光谱　美国赛默飞世尔科技公司；SUPRATM 55 热场发射扫描电子显微镜　德国蔡司公司。

1.2　实验方法

1.2.1　表面活性剂改良牛蒡多糖

1.2.1.1　表面活性剂种类对牛蒡多糖粒径的影响　固定牛蒡多糖溶液浓度为 10 g/L，自然 pH（5~6），涡旋时间 10 s，表面活性剂浓度为多糖溶液体积的 0.5%，分别加入 Tween-80、Span-80 和 SDS，通过旋涡混合器混合均匀，4 ℃ 透析 24 h 得到多糖悬浮液，真空冷冻干燥后测定粒径、电位，考察表面活性剂种类对多糖粒径的影响[16]。

1.2.1.2　Tween-80 浓度对牛蒡多糖粒径的影响　固定牛蒡多糖溶液浓度为 10 g/L，自然 pH（5~6），涡旋时间 10 s，Tween-80 浓度分别为多糖溶液体积的 0、0.3%、0.5%、0.7%、1.0% 和 2.0%，参考“1.2.1.1”进行实验。

1.2.1.3　涡旋时间对牛蒡多糖粒径的影响　固定牛蒡多糖溶液浓度为 10 g/L，自然 pH（5~6），Tween-80 浓度为多糖溶液体积的 0.5%，涡旋时间分别为 5、10、15、20 和 25 s，参考“1.2.1.1”进行实验。

1.2.1.4　pH 对牛蒡多糖粒径的影响　固定牛蒡多糖溶液浓度为 10 g/L，Tween-80 浓度为多糖溶液体积的 0.5%，涡旋时间 10 s，反应 pH 分别为 4、5、6 和 7，参考“1.2.1.1”进行实验。

1.2.1.5　响应面试验　根据单因素实验结果，选取 Tween-80 浓度（A）、涡旋时间（B）及 pH（C）三个试验参数，以多糖粒径为响应值，采用 Box-Behnken 设

表 1　响应面试验因素与水平

Table 1　Factors and levels of response surface experiment

水平	因素		
	A Tween-80浓度（%）	B涡旋时间（s）	C pH
−1	0.3	10	5
0	0.5	15	6
1	0.7	20	7

计试验方案，优化各试验因素。响应面试验设计因素与水平见表 1。

1.2.2 改良后牛蒡多糖的结构表征

1.2.2.1 紫外光谱分析 将牛蒡多糖配制成 1 mg/mL 水溶液，使用全波长紫外-可见光分光光度计对样品进行全波长扫描，波长范围为 200~800 nm[17]。

1.2.2.2 傅里叶变换红外光谱分析 采用傅里叶变换红外光谱-衰减全反射光谱技术对样品进行分析[18]。将约 5 mg 牛蒡多糖粉末放置在锥形附件板上并压实，在 4000~500 cm^{-1} 波数范围内进行扫描分析，仪器扫描次数为 64 次，分辨率 4 cm^{-1}。

1.2.2.3 粒径测定 采用激光纳米粒度分析仪测定样品的粒径大小，设定散射角为 90°，折光指数 1.330，测定温度 25 ℃，保温 2.0 min，每个样品均重复三次[19]。

1.2.2.4 扫描电镜分析 将干燥的样品表面喷一层薄薄的金并置于观察台，在 10 kV 加速电压和 1000× 放大倍数下观察表面形貌[20]。

1.3 数据处理

每组实验均重复 3 次，采用 Design Expert 8.0.6 进行数据统计分析，采用 Origin 2017 软件绘图。使用 SPSS 25.0 统计软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)，使用 Waller-Duncan(W)进行多重比较分析。$P<0.05$ 为有显著性差异、$P<0.01$ 为有极显著性差异。

2 结果与分析

2.1 表面活性剂改良牛蒡多糖

2.1.1 表面活性剂种类对牛蒡多糖粒径和电位的影响 牛蒡多糖及其添加 Tween-80、Span-80 和 SDS 的粒径分布情况见图 1。牛蒡多糖粒径为 80~110 nm，而添加 Tween-80 的牛蒡多糖粒径在 6~10 nm 之间，是几种纳米颗粒样品中粒径最小的，这说明 Tween-80 对牛蒡多糖粒径大小的调节作用明显。添加 Span-80 和 SDS 制备的牛蒡多糖粒径大小在 80~110 nm 之间，无明显变化。Tween-80 和 SDS 的亲水疏水平衡值(HLB)分别为 15 和 40，属于亲水性表面活性剂，更容易在晶核表面作用，减少晶核聚集，从而形成粒径较小的纳米颗粒[16]。SDS 的亲水疏水平衡值高于 Tween-80，但是添加 Tween-80 制备的牛蒡多糖粒径小于添加 SDS 制备的多糖粒径。推测主要是由于 SDS 属于阴离子型表面活性剂，与带负电荷的牛蒡多糖相互作用，二者之间会产生一定的静电排斥力，导致表面活性剂在晶核表面的堆积数量降低，减少对纳米颗粒粒径的控制作用[21]。Tween-80 作为小分子表面活性剂具有更高的表面活性并形成较小的纳米颗粒，并且由于 Tween-80 分子的大聚氧乙烯(亲水性)头基引起的空间排斥，阻碍多糖分子链之间的相互结合与碰撞，能使纳米颗粒具有更好的稳定性[22]。

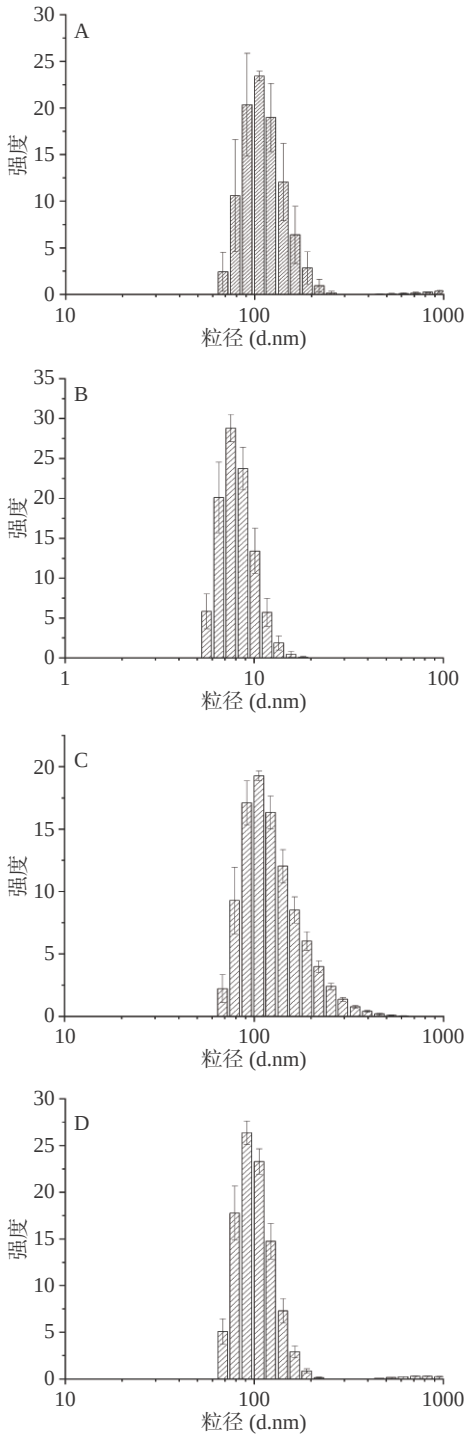


图 1 牛蒡多糖(A)以及使用 Tween-80(B)、Span-80(C)和 SDS(D)改良后牛蒡多糖粒径

Fig.1 Particle size of *Arctium lappa* L. polysaccharides (A) and *Arctium lappa* L. polysaccharides improved by Tween-80 (B), Span-80 (C) and SDS (D)

添加 0.5% 的不同种类表面活性剂后牛蒡多糖的电位分布图见图 2。牛蒡多糖空白样品 Zeta 电位绝对值为 23.53 mV，带有较多的负电荷。然而添加 Span-80、Tween-80 和 SDS 改良的牛蒡多糖 Zeta 电位绝对值减小至 22.4、18.5 和 21.8 mV，加入表面活性剂后多糖 Zeta 电位绝对值减小，可能是由于表面活性剂吸附在牛蒡多糖表面，使多糖表面存在巨大的空间位阻，降低电荷密度[16]。考虑添加表面活性

剂后多糖粒径分布情况，选择 Tween-80 进行下一步实验。

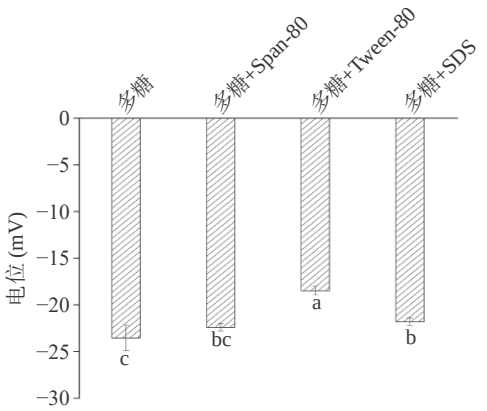


图 2　牛蒡多糖以及使用 Tween-80、Span-80 和 SDS 改良的牛蒡多糖电位

Fig.2　Potential of *Arctium lappa* L. polysaccharides and *Arctium lappa* L. polysaccharides improved by Tween-80, Span-80 and SDS

注：不同字母表示差异性显著（P<0.05，n=3）；图 3~图 5 同。

2.1.2　Tween-80 浓度对牛蒡多糖粒径的影响　Tween-80 浓度对牛蒡多糖粒径影响见图 3。当 Tween-80 浓度小于多糖溶液体积的 0.5% 时，牛蒡多糖粒径缓慢减小，当 Tween-80 添加量达到多糖溶液体积的 0.5% 时，多糖粒径明显减小，这可能是由于 Tween-80 的加入提高了溶液的稳定性，阻碍多糖分子链之间的相互结合与碰撞，因此当加入少量 Tween-80 时，制得的多糖粒径低于不加表面活性剂时的多糖粒径[23]，继续增加 Tween-80 的添加量，多糖的粒径始终稳定在 6~10 nm 范围内。因此，Tween-80 的最佳添加量为 0.5%。

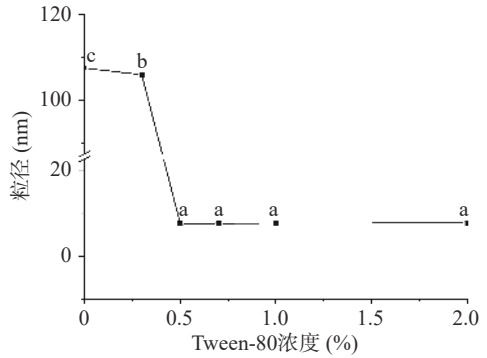


图 3　Tween-80 浓度对牛蒡多糖粒径的影响

Fig.3　Effect of Tween-80 concentration on the particle size of *Arctium lappa* L. polysaccharides

2.1.3　涡旋时间对牛蒡多糖粒径的影响　涡旋时间对牛蒡多糖粒径的影响见图 4。随着涡旋时间的增加，牛蒡多糖粒径呈现先减小后增大的趋势，当涡旋时间为 15 s 时，粒径达到最小值 6.73 nm，这可能是因为多糖受到一定剪切力，粒径减小[24]。但当涡旋时间继续增加时，粒径开始增加，25 s 时粒径达到 7.79 nm，这可能是因为随着涡旋时间延长，出现部分聚合现象，体系稳定性下降[25]。因此最佳涡旋时间为 15 s。

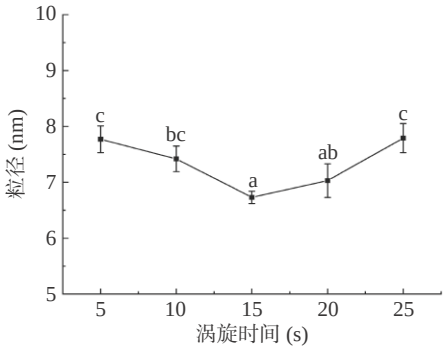


图 4　涡旋时间对牛蒡多糖粒径的影响

Fig.4　Effect of vortex time on the particle size of *Arctium lappa* L. polysaccharides

2.1.4　pH 对牛蒡多糖粒径的影响　pH 对牛蒡多糖粒径的影响见图 5。随着 pH 的增大，牛蒡多糖粒径呈现先减小后增大的趋势，但整体变化幅度较小，说明表面活性剂钝化了牛蒡多糖的 pH 敏感性[26]。pH 为 4~5 时，牛蒡多糖的粒径由 7.72 nm 减小到 7.36 nm，而 pH 为 6 时，多糖粒径达到最小值 7.29 nm，当 pH 继续增加时，粒径开始增加，pH 为 7 时粒径增加至 7.75 nm，这与姜婷婷等[27]的研究结果相似，因此最佳 pH 为 6。

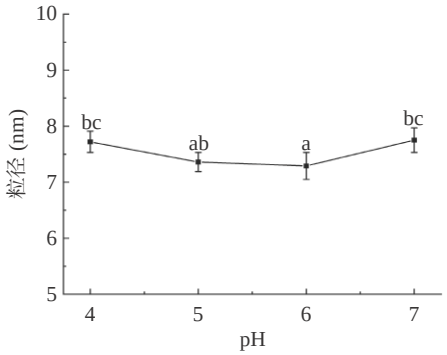


图 5　pH 对牛蒡多糖粒径的影响

Fig.5　Effect of pH on the particle size of *Arctium lappa* L. polysaccharides

2.1.5　响应面试验结果　由 Design Expert 8.0.6.1 软件对试验数据进行回归分析，得到粒径（Y）对 Tween-80 浓度（A）、涡旋时间（B）和 pH（C）的三元二次回归方程为 $Y=7.62-8.88A-2.47B+2.15C+5.58AB-1.30AC-1.90BC+15.62A^2+2.04B^2+2.47C^2$。对回归模型进行方差分析，该模型差异性极显著（$P$<0.0001），失拟项不显著（$P$>0.05），决定系数 R^2 为 0.9962，校正后决定系数 R^2_{Adj} 为 0.9914，说明该回归方程拟合度和可信度均较高，可利用此模型对改良后牛蒡多糖粒径进行预测。响应面试验结果见表 2，方差分析结果见表 3。

由表 3 可知，一次项 A、B、C，二次项 A^2、B^2、C^2，交互项 AB、BC 对粒径的影响极其显著（P<0.01）；交互项 AC 对粒径的影响显著（P<0.05）。因此，最终

表 2 响应面试验结果

Table 2 Response surface test results

试验号	A Tween-80浓度(%)	B涡旋时间(s)	C pH	粒径(nm)
1	0.50	10	7	18.2
2	0.70	15	5	15.02
3	0.30	20	6	25
4	0.50	15	6	7.2
5	0.50	15	6	8.2
6	0.30	10	6	41.7
7	0.30	15	7	39
8	0.30	15	5	31.8
9	0.50	15	6	8.1
10	0.70	20	6	20.02
11	0.50	15	6	7.7
12	0.50	15	6	6.91
13	0.70	15	7	17.02
14	0.50	10	5	10.4
15	0.50	20	5	9.85
16	0.50	20	7	10.06
17	0.70	10	6	14.42

表 3 回归模型方差分析

Table 3 Analysis of variance of regression model

来源	平方和	自由度	均方	*F*值	*P*值	差异性
模型	1974.51	9	219.39	206.47	<0.0001	极显著
A	630.48	1	630.48	593.36	<0.0001	**
B	48.96	1	48.96	46.07	0.0003	**
C	37.02	1	37.02	34.84	0.0006	**
AB	124.32	1	124.32	117.00	<0.0001	**
AC	6.76	1	6.76	6.36	0.0397	*
BC	14.40	1	14.40	13.55	0.0078	**
A^2	1027.66	1	1027.66	967.15	<0.0001	**
B^2	17.53	1	17.53	16.49	0.0048	**
C^2	25.59	1	25.59	24.08	0.0017	**
总残差	7.44	7	1.06			
失拟项	6.18	3	2.06	6.58	0.0502	不显著
绝对误差	1.25	4	0.31			
总和	1981.95	16				
R^2=0.9962	R^2_{Adj}=0.9914					

注: **表示*P*<0.01, 差异极显著; *表示*P*<0.05, 差异显著。

确定回归模型为 $Y=7.62-8.88A-2.47B+2.15C+5.58AB-1.30AC-1.90BC+15.62A^2+2.04B^2+2.47C^2$。

2.1.6 响应面结果分析 响应面及等高线图如图 6 所示。表面活性剂浓度、涡旋时间和 pH 对牛蒡多糖

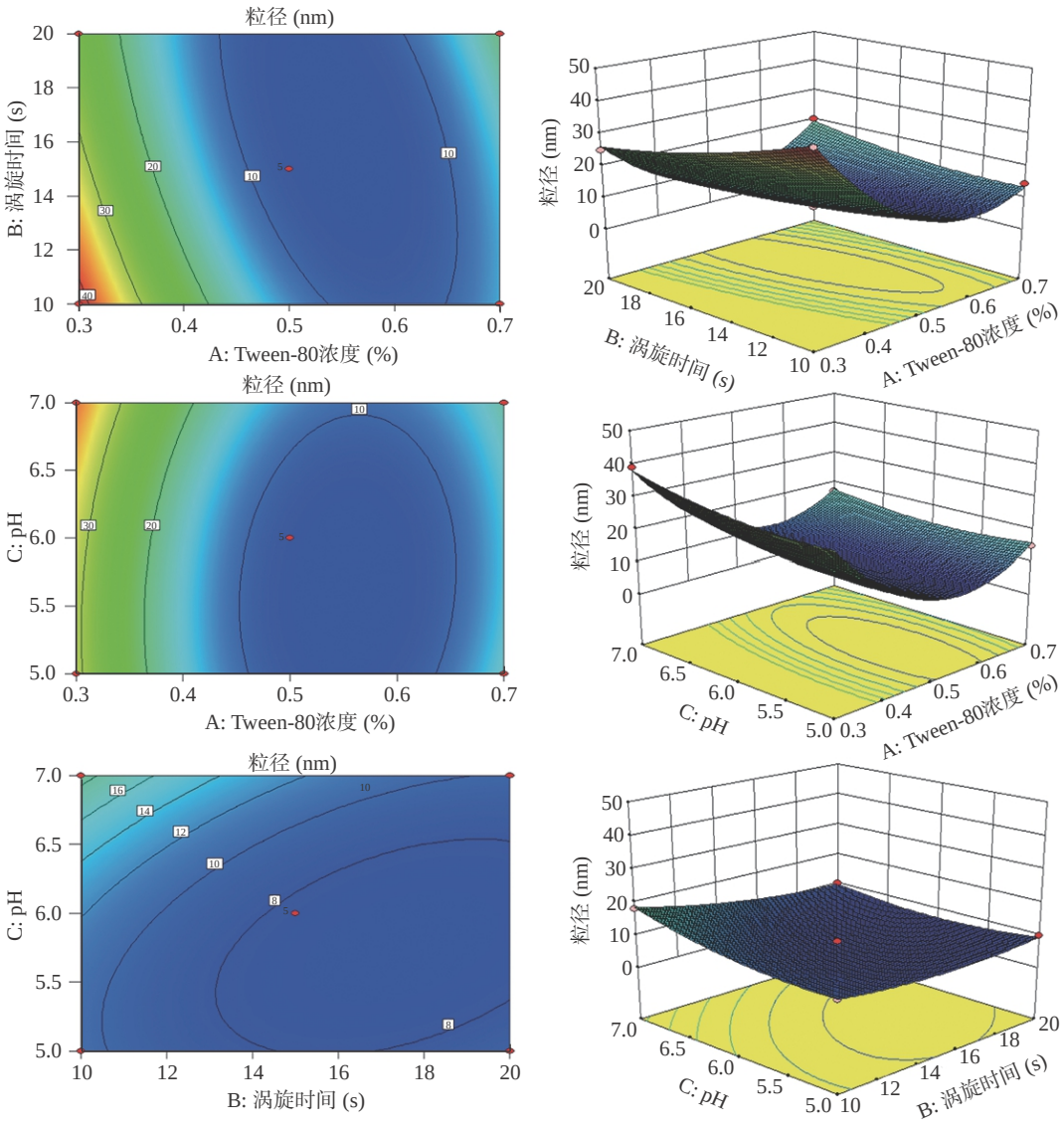


图 6 各因素交互作用对牛蒡多糖粒径影响的响应面图

Fig.6 Response surface diagram of the interaction of various factors on the particle size of *Arctium lappa* L. polysaccharides

粒径存在一定的交互作用，响应面曲线越陡，交互作用越强；陡峭程度越低，交互作用越弱[28]。表面活性剂浓度与涡旋时间、涡旋时间与 pH 的交互作用极强，对牛蒡多糖粒径影响极显著（$P<0.01$）；表面活性剂浓度与 pH 的交互作用较强，对牛蒡多糖粒径的影响较显著（$P<0.05$）。由图 6 可以看出：AB 的交互作用最强，BC 次之，AC 交互作用最弱。

2.1.7　验证实验　通过回归模型的分析，以牛蒡多糖粒径为评价指标，最优的表面活性剂改良工艺条件为：表面活性剂种类为 Tween-80，Tween-80 浓度为 0.55%，涡旋时间为 15.56 s，pH5.67，在此条件下，模型预测牛蒡多糖粒径为 6.02 nm。考虑实际操作简便，将工艺条件调整为表面活性剂为 0.5% 的 Tween-80，涡旋时间为 16 s，pH5.67，此条件下得到牛蒡多糖粒径为 6.19±0.14 nm（图 7），实际值与理论值基本相符，说明模型对表面活性剂改良牛蒡多糖粒径工艺条件参数优化稳定可靠。

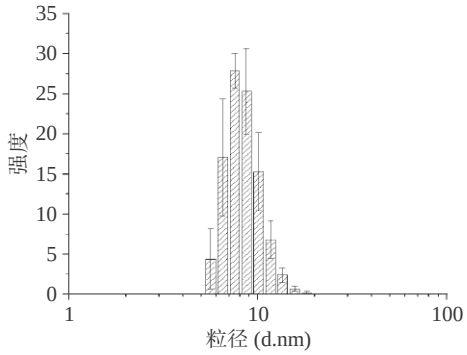


图 7　表面活性剂改良后牛蒡多糖粒径

Fig.7　Particle size of *Arctium lappa* L. polysaccharides improved by surfactant

2.2　改良前后牛蒡多糖的结构表征

2.2.1　紫外光谱分析　改良前后牛蒡多糖的紫外光谱图见图 8。改良前牛蒡多糖在 260 和 280 nm 处没有紫外吸收，说明其不含核酸和蛋白质[29]。改良后多糖在 280 nm 处信号略有增强，推测出现波动可能是表面活性剂在该波段的紫外吸收。

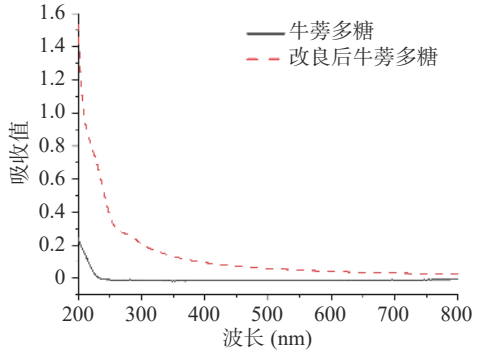


图 8　改良前后牛蒡多糖的紫外光谱

Fig.8　Ultraviolet spectra of *Arctium lappa* L. polysaccharides before and after improvement

2.2.2　傅里叶变换红外光谱分析　改良前后牛蒡多糖的傅里叶变换红外光谱如图 9 所示，改良前后多糖的特征吸收峰存在一定差异。在 3200~3300 cm^{-1} 处的拉伸振动是因为 O-H 的存在[30]，2920~2930 cm^{-1} 处是因为 C-H 的拉伸振动[31]，1650 cm^{-1} 处的吸收峰可能归因于 C=O 键和 N-H 键的偏差振动或结合水的振动[32]，1350~1450 cm^{-1} 处的吸收峰是 CH_2/CH_3 中的 C-H 变形振动、O-H 弯曲振动或者 COO-对称拉伸振动造成的[33]，1000~1200 cm^{-1} 范围内的特定键一般认为是多糖环或糖苷键 C-O-C、C-O-H 和 O-C-O 的拉伸振动[34]，933 cm^{-1} 和 935 cm^{-1} 处对应 α-D-呋喃果糖基[35]，在 818 cm^{-1} 处的吸收峰为长链菊粉的特征指纹区域，表明存在带有 β 构型糖苷键的呋喃糖[36]。改良后牛蒡多糖在 3280 cm^{-1} 处的峰强降低，这可能与多糖分子内和分子间氢键相互作用减弱有关。

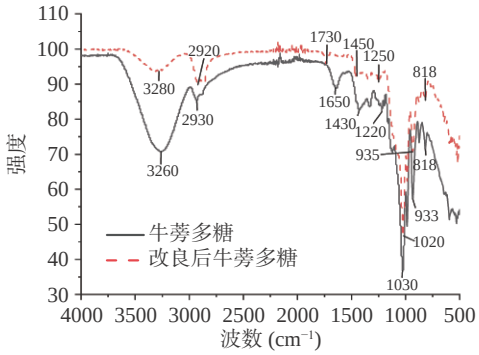


图 9　改良前后牛蒡多糖傅里叶红外图谱

Fig.9　FT-IR spectra of *Arctium lappa* L. polysaccharides before and after improvement

2.2.3　粒径分析　由图 10 可知，牛蒡多糖粒径分布

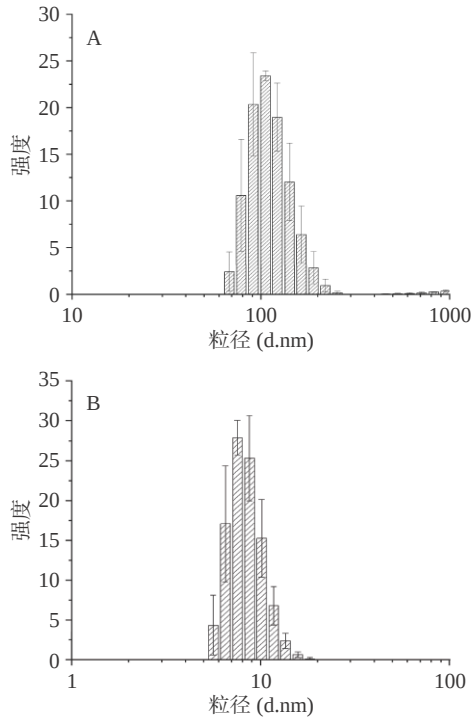


图 10　牛蒡多糖（A）和改良后牛蒡多糖（B）的粒径分布谱

Fig.10　Particle size distribution spectrum of *Arctium lappa* L. polysaccharides (A) and improved *Arctium lappa* L. polysaccharides (B)

在 80~110 nm 范围内，改良后牛蒡多糖粒径在 6~10 nm 范围内，与响应面优化结果一致。表明 Tween-80 具有较高的表面活性，对牛蒡多糖粒径具有一定的优化作用，且改良后牛蒡多糖粒度分布较窄，说明改良后牛蒡多糖稳定性更好[22]。

2.2.4 扫描电镜分析 改良前后的牛蒡多糖扫描电镜图像如图 11 所示。牛蒡多糖为堆积球状结构，但存在一定孔隙；而改良后多糖呈现出更为有序的球状结构，球状更加突出，孔隙减小，大小较均一，表面更加光滑。形态差异可能会影响物质的特性，球状结构更突出的改良后多糖与细胞表面的接触更多[37]，有利于其作为靶向运输材料装载功能性成分。

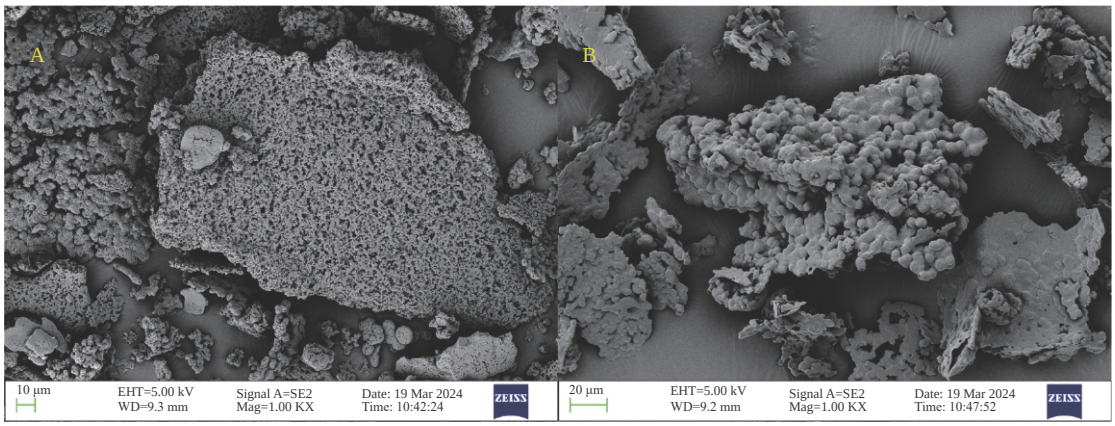


图 11 牛蒡多糖(A)和改良后牛蒡多糖(B)的电镜图

Fig.11 Electron microscope images of *Arctium lappa* L. polysaccharides (A) and improved *Arctium lappa* L. polysaccharides (B)

3 结论

在牛蒡多糖粒径的改良过程中，各因素对粒径的影响大小为：Tween-80 浓度>涡旋时间>pH。通过响应面法优化后得到最佳制备工艺为：表面活性剂种类为 Tween-80，浓度为 0.5%，涡旋时间 16 s，pH5.67，在此条件下得到牛蒡多糖粒径为 6.19±0.14 nm。表面活性剂的加入并没有改变多糖的结构，但因为表面活性剂具有更高的表面活性，更容易在晶核表面作用，减少晶核聚集，从而形成较小的粒径，并使多糖具有更好的稳定性。研究表明表面活性剂可以显著减小牛蒡多糖粒径，为制备更小粒径的牛蒡多糖提供理论依据。

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

参考文献

[1] GU Y, QI C, SUN X, et al. Arctigenin preferentially induces tumor cell death under glucose deprivation by inhibiting cellular energy metabolism[J]. Biochemical Pharmacology, 2012, 849(4): 468−476.

[2] 魏东. 牛蒡抗氧化、降血脂保健功能研究[J]. 食品科学, 2008, 29(2): 380−382. [WEI D. Study of health protection on antioxidation and reducing blood lipid of *Arctium lappa* L.[J]. Food Science, 2008, 29(2): 380−382.]

[3] KARDOŠOVÁ A, EBRINGEROVÁ A, ALFÖLDI J, et al. A biologically active fructan from the roots of *Arctium lappa* L., var. Herkules[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2003, 33(1-3): 135−140.

[4] 魏东. 牛蒡多糖对小鼠免疫调节作用的研究[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(9): 1892−1893. [WEI D. Effect of *Arctium lappa* L. polysaccharide on mice immune modulation[J]. Journal of Anhui Agriculture, 2006, 34(9): 1892−1893.]

[5] 张波, 徐永杰. 牛蒡菊糖对亚慢性酒精肝损伤作用的研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(8): 329−331. [ZHANG B, XU Y J. Preventive effects of burdock oligo-saccharide on alcoholic liver injury[J]. Science and Technology of Food Industry, 2010, 31(8): 329−331.]

[6] 鲁政, 张静, 高兆兰, 等. 牛蒡菊糖和菊芋菊糖对酒精诱导大鼠慢性氧化损伤的防治作用[J]. 食品科学, 2010, 31(5): 270−273. [LU Z, ZHANG J, GAO Z L, et al. Protective effect of burdock inulin and jerusalem artichoke inulin against chronic alcohol-induced oxidative injury in mice[J]. Food Science, 2010, 31(5): 270−273.]

[7] 刘欣欣, 左翠玲, 孙丽娜, 等. 天然多糖做为纳米载体用于治疗炎症性肠病的研究进展[J]. 现代食品科技, 2023, 39(10): 1−10. [LIU X X, ZUO C L, SUN L N, et al. Research progress on the use of natural polysaccharides as nanocarriers in the treatment of inflammatory bowel disease[J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(10): 1−10.]

[8] KHARE T, PALAKURTHI S S, SHAH B M, et al. Natural product-based nanomedicine in treatment of inflammatory bowel disease[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(11): 3956.

[9] 张永威, 易成林, 江金强, 等. 大分子颗粒乳化剂研究进展[J]. 高分子通报, 2011(12): 73−86. [ZHANG Y W, YI C L, JIANG J Q, et al. Progress in the studies of macromolecular particulate emulsifiers[J]. Polymer Bulletin, 2011(12): 73−86.]

[10] 褚翔宇, 王小永. 玉米蛋白/吐温-20 复合纳米颗粒对姜黄素的包载作用[J]. 化学通报, 2018, 81(7): 625−629. [CHU X Y, WANG X Y. Effect of zein/Tween-20 composite nanoparticles on the properties of encapsulated curcumin[J]. Chemistry Bulletin, 2018, 81(7): 625−629.]

[11] RENGIFO A F C, SANTOS S C, LIMA V R, et al. Aggregation behavior of self-assembled nanoparticles made from carboxymethyl-hexanoyl chitosan and sodium dodecyl sulphate surfactant in water[J]. Journal of Molecular Liquids, 2019, 278: 253−261.

［12］ 周紫薇, 项郑昊, 周化岚, 等. 乳化法制备毕赤酵母微胶囊的条件优化[J]. 工业微生物, 2021, 51(6): 14−22. ［ZHOU Z W, XIANG Z H, ZHOU H L, et al. Optimization conditions for preparation of *Komagataella phaffii* microcapsule by emulsificaton[J]. Industrial Microbiology, 2021, 51(6): 14−22.］
［13］ ZHAO S F, WEI Y M, YU P J, et al. High throughput preparation and particle size control strategy of nano apigenin by a scale-up microreactor[J]. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2024, 133: 207−218.
［14］ CHU Y F, JO Y J, CHEN L Y. Size-controllable core/shell whey protein microgels with narrow particle size distribution fabricated by a facile method[J]. Food Hydrocolloids, 2022, 124: 107316.
［15］ 陈晓乐, 李文文, 陈锵, 等. 牛蒡中性多糖结构分析与抗炎活性评价[J]. 食品工业科技, 2023, 44(12): 45−54. ［CHEN X L, LI W W, CHEN Q, et al. Structure analysis and anti-inflammatory activity evaluation of neutral polysaccharides from *Arctium lappa* L.[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(12): 45−54.］
［16］ LI X J, QIN Y, LIU C Z, et al. Size-controlled starch nanoparticles prepared by self-assembly with different green surfactant: The effect of electrostatic repulsion or steric hindrance[J]. Food Chemistry, 2016, 199: 356−363.
［17］ 汤陈鹏, 吕峰, 王蓉琳. 孔石莼多糖锌结构表征与体外降血糖活性[J]. 食品科学, 2020, 41(7): 52−58. ［TANG C P, LÜ F, WANG R L. Structural characterization and hypoglycemic activity *in vitro* of *Ulva pertusa* polysaccharides-zinc complex[J]. Food Science, 2020, 41(7): 52−58.］
［18］ 李玲玉, 邱志常, 朱姗姗, 等. 响应面法优化牛蒡多糖超声辅助提取工艺与抗氧化活性评价[J]. 食品科技, 2020, 45(11): 197−204, 211. ［LI L Y, QIU Z C, ZHU S S, et al. Optimization of polysaccharides from *Arctium lappa* L. by ultrasound-assisted extraction using response surface methodology and its antioxidant activities[J]. Food Science and Technology, 2020, 45(11): 197−204, 211.］
［19］ 侯惠静, 张晓燕, 陈建波, 等. BSA-葡聚糖-叶黄素纳米颗粒的制备及其抗氧化活性[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(20): 137−145. ［HOU H J, ZHANG X Y, CHEN J B, et al. Preparation of BSA-dextran-lutein nanoparticle and its anti-oxidative properties[J]. Food Research and Development, 2020, 41(20): 137−145.］
［20］ YIN J Y, CHAN B C, YU H, et al. Separation, structure characterization, conformation and immunomodulating effect of a hyperbranched heteroglycan from Radix Astragali[J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 87(1): 667−675.
［21］ HU K, MCCLEMENTS D J. Fabrication of surfactant-stabilized zein nanoparticles: A pH modulated antisolvent precipitation method[J]. Food Research International, 2014, 64: 329−335.
［22］ WALIA N, ZHANG S T, WISMER W, et al. A low energy approach to develop nanoemulsion by combining pea protein and Tween 80 and its application for vitamin D delivery[J]. Food Hydrocolloids for Health, 2022, 2: 100078.
［23］ 董琰. 直链淀粉纳米颗粒的制备及性质研究[D]. 长春: 吉林大学, 2014. ［DONG Y. Preparation and properties of amylose nanoparticles[D]. Changchun: Jilin University, 2014.］
［24］ 葛艳争, 石爱民, 冯新玥, 等. 加工条件对食品级 Pickering 乳液稳定性的影响[J]. 中国食品学报, 2021, 21(11): 280−289. ［GE Y Z, SHI A M, FENG X Y, et al. The effect of processing conditions on the stability of food-grade Pickering emulsion[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(11): 280−289.］
［25］ 杨琳, 郑华, 江伟烽, 等. 鸡肉蛋白水解物 Pickering 乳液凝胶制备技术及特性分析[J]. 肉类研究, 2023, 37(7): 8−16. ［YANG L, ZHENG H, JIANG W F, et al. Preparation and characterization of chicken breast protein hydrolysate-stabilized Pickering emulsion gel[J]. Meat Research, 2023, 37(7): 8−16.］
［26］ 冯孟熙, 汪兰. 不同 pH 溶液制备亚麻籽胶组成和功能特性的差异比较[J]. 中国调味品, 2023, 48(9): 197−202. ［FENG M X, WANG L. Difference comparison of composition and functional properties of flaxseed gum prepared with solutions at different pH values[J]. China Condiment, 2023, 48(9): 197−202.］
［27］ 姜婷婷, 郑丽丽, 艾斌凌, 等. *β*-乳球蛋白-多酚纳米颗粒稳定的百香果籽油 Pickering 乳液及其性质[J]. 食品科学, 2024, 45(10): 80−88. ［JIANG T T, ZHENG L L, AI B L, et al. Preparation and properties of passion fruit seed oil Pickering emulsion by *β*-lactoglobulin polyphenols nanoparticles[J]. Food Science, 2024, 45(10): 80−88.］
［28］ 任洪飞, 逄梦玉, 隋昕怡, 等. 反复冻融法制备灵芝多糖工艺优化、结构表征及抗氧化活性分析[J]. 食品工业科技, 2024, 45(8): 11−20. ［REN H F, PANG M Y, SUI X Y, et al. Freeze-thaw extraction optimization, structural features and antioxidant activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(8): 11−20.］
［29］ TIAN R, ZHANG Y Z, CHENG X B, et al. Structural characterization, and *in vitro* hypoglycemic activity of a polysaccharide from the mushroom *Cantharellus yunnanensis*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023(253): 127200.
［30］ PENG Y Q, ZHANG Z H, CHEN W Y, et al. Structure characterization, *α*-glucosidase inhibitory activity and antioxidant activity of neutral polysaccharide from apricot (*Armeniaca Sibirica* L. Lam) kernels[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023(238): 124109.
［31］ ZOU S, ZHANG X, YAO W B, et al. Structure characterization and hypoglycemic activity of a polysaccharide isolated from the fruit of *Lycium barbarum* L.[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80(4): 1161−1167.
［32］ XIA F, CAO S L, WANG M W, et al. Optimizing extraction, structural characterization, and *in vitro* hypoglycemic activity of a novel polysaccharide component from *Lentinus edodes*[J]. Food Bioscience, 2023(55): 103007.
［33］ YUAN L L, QIU Z C, YANG Y M, et al. Preparation, structural characterization and antioxidant activity of water-soluble polysaccharides and purified fractions from backened jujube by an activity-oriented approach[J]. Food Chemistry, 2022(385): 132637.
［34］ ZOU M, CHEN Y L, SUN-WATERHOUSE D X, et al. Immunomodulatory acidic polysaccharides form *Zizyphus jujuba* cv. Huizao: Insights into their chemical characteristics and modes of action[J]. Food Chemistry, 2018(258): 35−42.
［35］ 胡彦波, 翟丽媛, 刘扬, 等. 薇菜多糖的分离纯化及体外抗氧化活性[J]. 食品科学, 2022, 43(1): 59−66. ［HU Y B, ZHAI L Y, LIU Y, et al. Isolation, purification and antioxidant activity of polysaccharides from *Osmunda japonica*[J]. Food Science, 2022, 43(1): 59−66.］
［36］ ZHENG D T, HUANG C X, LI B, et al. Effect of a novel shell material-Starch-protein-fatty acid ternary nanoparticles on loading levels and *in vitro* release of curcumin[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 192: 471−478.
［37］ PETKOVA N T, SHEROVA G, DENEV P P. Characterization of inulin from dahlia tubers isolated by microwave and ultrasound-assisted extractions[J]. International Food Research Journal, 2018, 25(5): 1876−1884.

修禹旸, 赵国良, 李志江, 等. 麸曲制作工艺优化及对黄酒品质的影响 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 148−156. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110052

XIU Yuyang, ZHAO Guoliang, LI Zhijiang, et al. Optimization of Bran-koji Production and Its Impact on Huangjiu Quality[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 148−156. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110052

· 工艺技术 ·

麸曲制作工艺优化及对黄酒品质的影响

修禹旸[1], 赵国良[1], 李志江[1,2,*], 毛　健[3,4,*]

（1.黑龙江八一农垦大学食品学院, 黑龙江大庆 163319;
2.黑龙江省杂粮加工及质量安全工程技术研究中心, 黑龙江大庆 163319;
3.江南大学食品学院, 粮食发酵与食品生物制造国家工程研究中心, 江苏无锡 214122;
4.江南大学（绍兴）产业技术研究院, 浙江绍兴 312000）

摘　要: 为明确麸皮种类和固态发酵条件对接种青霉菌 *Penicillium oxalicum* M1816 麸曲的酶活力影响，将酶活力最高条件下的麸曲应用于黄酒生产，评价了其对黄酒酚类物质含量、理化及感官指标的影响。结果表明，当麸皮直径 20 目时，麸曲的酶活力表现为玉米麸皮>小麦麸皮>燕麦麸皮>黑麦麸皮。选择玉米麸皮制作麸曲，酶活力最高的制曲条件为：冰醋酸调节培养基 pH 为 6.5，麸曲初始含水量为 85%（V/W），培养温度为 30 ℃，培养时间为 120 h。与工厂黄酒相比，添加玉米麸曲生产的玉米麸曲黄酒中酚酸总量为 116.48 mg/L，相比对照组（55.53 mg/L）提高了约 1.1 倍，挥发性酚类化合物 4-乙基苯酚、4-乙基愈创木酚、4-乙烯基愈创木酚、愈创木酚和香兰素均显著增加（P<0.05），黄酒药香明显增强，理化指标均符合黄酒国家标准。本研究明确了利用青霉菌制备玉米麸曲的最佳工艺条件，玉米麸曲可有效提高玉米麸曲黄酒酚酸类物质含量，为具有药香气特征且富含酚类物质的黄酒酿制提供了技术参考。

关键词: 黄酒, 谷物麸皮, 固态发酵, 酚酸, 青霉菌, 感官评价

中图分类号: TS261.4　　**文献标识码:** B　　**文章编号:** 1002−0306(2024)21−0148−09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110052

本文网刊:

Optimization of Bran-koji Production and Its Impact on Huangjiu Quality

XIU Yuyang[1], ZHAO Guoliang[1], LI Zhijiang[1,2,*], MAO Jian[3,4,*]

（1.College of Food Science, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China;
2.Heilongjiang Engineering Research Center for Coarse Cereals Processing and Quality Safety, Daqing 163319, China;
3.School of Food Science and Technology, Jiangnan University, National Engineering Research Center for Cereal Fermentation and Food Biomanufacturing, Wuxi 214122, China;
4.Jiangnan University (Shaoxing) Industrial Technology Research Institute, Shaoxing 312000, China）

Abstract: The effects of bran types and solid-state fermentation conditions on the enzyme activity of bran-koji inoculated with *Penicillium oxalicum* M1816 were investigated, and the bran-koji with the highest enzyme activity was applied to Huangjiu production to evaluate its effects on the phenolic content, physicochemical indexes, and sense of Huangjiu. The results showed that when the diameter of bran was 20-mesh, the enzyme activity of bran-koji was corn bran>wheat bran>oat bran>rye bran. The highest enzyme activity in corn bran-koji was achieved under the following conditions: Glacial acetic acid was used to adjust the pH of the solid medium to 6.5, the initial moisture content of the bran-koji was 85% (V/W), the incubation temperature was 30 ℃, and the incubation time was 120 h. Compared with factory Huangjiu, the

收稿日期: 2023−11−08

基金项目: 国家重点研发计划项目课题“基于微生物组和现代工程学技术的黄酒和食醋绿色智能酿造产业化示范研究”（课题编号: 2022YFD2101204）。

作者简介: 修禹旸（1999−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学与工程, E-mail: 1504520836@qq.com。

*** 通信作者:** 李志江（1977−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品科学与工程, E-mail: lizhijiang@126.com。

毛健（1970−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: maojian@jiangnan.edu.cn。

total amount of phenolic acids in the Huangjiu produced by adding corn bran-koji was 116.48 mg/L, which increased to 1.1-folds in comparison with that of the Huangjiu produced by adding no-corn bran-koji (55.53 mg/L). The volatile phenolic compounds of 4-ethylphenol, 4-ethylguaiacol, 4-vinylguaiacol, guaiacol, and vanillin were increased significantly (P<0.05), the medicinal aroma of the Huangjiu was obviously enhanced, and the physicochemical indexes were all in accordance with the national standard of Huangjiu. The optimal fermentation condition of corn bran-koji with *Penicillium* spp. was confirmed, and corn bran-koji could improve the contents of phenolic acids in Huangjiu. The research provides a technical reference for the brewing of Huangjiu with medicinal aroma characteristics and rich in phenolic substances.

Key words: Huangjiu; grain bran; solid-state fermentation; phenolic acid; *Penicillium*; sensory evaluation

黄酒是我国最古老的发酵酒之一，其风味独特，富含功能性成分，深受消费者喜爱。传统的黄酒酿制方法通常以糯米、大米为原料，加入麦曲做糖化发酵剂，在多种微生物如细菌、霉菌等的共同作用下进行发酵[1]。麸曲是以粮食谷物的麸皮为原料，经蒸煮高温灭菌后，接种特定微生物，经培养烘干后得到的散曲，常用于白酒酿造[2]。在白酒发酵过程中，麸曲中所含的微生物代谢产生大量的酯类、醇类、醛类和酚类等风味化合物，赋予白酒浓郁的香气[3−4]。然而，传统的黄酒酿造通常只依靠麦曲进行糖化发酵，鲜有将其他谷物制作麸曲并用于黄酒发酵生产的研究报道。

谷物麸皮富含以酚酸为主的酚类物质，如阿魏酸、香草酸和咖啡酸等[5]，具有抗氧化、抗炎活性及细胞保护能力，近年来受到研究者的广泛关注[6−7]。通常情况下，谷物麸皮中的主要酚酸以酯键或醚键的形式与细胞壁中的多糖结合。因此，如何有效提取谷物麸皮中的结合态酚酸，使其最终释放至产品中，是当前研究的重点。现已有多种谷物处理方法用于提取酚酸，例如物理加工法[8]、酸碱水解法[9]、酶法[10]及微生物发酵法[11]，其中微生物发酵法因高效性和环境友好性受到了研究者青睐，在制药、酿造等领域展开了深入研究[12]。微生物发酵法即指通过菌种发酵产生的酶类物质分解麸皮的纤维和细胞壁，如纤维素酶、阿魏酸酯酶等，将结合型酚酸转化为游离型酚酸。研究发现，采用好食脉孢菌发酵小麦麸皮能显著提高阿魏酸酯酶活力[13]，利用筛选出的优势曲霉菌株 *Aspergillus niger* 固态发酵小麦麸皮，使阿魏酸释放量提高至 4.05 mg/g 麦麸[14]，当添加黑曲霉、里氏木霉及米曲霉时，发酵后的小麦麸皮释放的游离酚酸含量显著增加[15]。微生物发酵可以有效促进谷物麸皮中的酚酸释放，但上述研究大多采用小麦麸皮为研究对象，对于其他谷物麸皮如玉米、燕麦的研究较少。因此，利用麸曲生产黄酒，并探究酚酸在黄酒发酵中的变化规律，对黄酒功能性和感官品质提升具有重要意义。

近年来，随着市场竞争的加剧和产业发展需要，黄酒产品多样化、高端化趋势明显，而单一麦曲生产的黄酒风味同质化严重。本研究以接种青霉菌 *Penicillium oxalicum* M1816 的高产酶强化麸曲为对象，探究了麸皮种类和固态发酵条件对麸曲的酶活力影响，并将酶活力最高条件下的麸曲应用于黄酒生产，评价了其对黄酒酚类物质含量、理化指标及感官的影响，为谷物麸皮的开发利用及富含酚类物质黄酒的生产提供技术参考。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

玉米麸皮、燕麦麸皮、黑麦麸皮、小麦麸皮、大米　均为当季市售；青霉菌 *P. oxalicum* M1816、酵母菌 B661　江南大学(绍兴)产业技术研究院保藏菌株；黄酒麦曲　浙江古越龙山绍兴酒股份有限公司提供；液化酶(2×10^4 U/mL)、糖化酶(1×10^5 U/mL)　上海源叶生物科技有限公司；阿魏酸、4-乙烯基愈创木酚、4-乙基愈创木酚、香草醛、香草酸、丁香酸、反香豆酸、咖啡酸、绿原酸和没食子酸等标准品　阿拉丁试剂有限公司；YPD(Yeast extract peptone dextrose)固体培养基　上海哈灵生物科技；乙腈、甲醇(均为色谱纯试剂)、磷酸、氢氧化钠、可溶性淀粉、无水葡萄糖、碘化钾、三氯乙酸、磷酸二氢钠等分析纯试剂　国药集团有限公司。

PHS-25 型 pH 计　梅特勒-托利多仪器有限公司；JIDI-21D 高速离心机　安徽中科中佳有限公司；CH1015 恒温水浴锅　浙科仪器设备有限公司；JC-100-SE 恒温恒湿培养箱　施都凯仪器设备有限公司；UV-1800 紫外可见光分光光度计　浙江普津仪器有限公司；BKQ-B50II 灭菌锅　济南童鑫有限公司；SHP-160 生化培养箱　常州普天仪器制造有限公司；Agilent 8890-7000D 气相色谱质谱联用仪并配备 PAL3 CTC 三合一自动进样器、安捷伦 1260 高校液相色谱仪　美国安捷伦公司。

1.2　实验方法

1.2.1　青霉菌 *P. oxalicum* M1816 强化麸曲的制作及参数优化　以一定直径的新鲜谷物麸皮为麸曲制备的培养基，利用调酸剂调节培养基初始 pH，控制培养基初始含水量，于 121 ℃ 灭菌 30 min，冷却至室温后在无菌操作台摇散料块，接种 5% 的 *P. oxalicum* M1816(2×10^5 spores/g)孢子液并摇匀，在曲筐内恒温发酵培养一定时长。培养期结束后，采用低温烘干，并在无菌环境下粉碎曲饼，装于经 121 ℃ 灭菌 30 min 的牛皮纸袋内封口，用于分析麸曲中的酶活力(4 ℃ 保存)。

1.2.1.1　调酸剂种类对麸曲中的酶活力影响　采用

单因素实验方法，选取直径为 20 目的玉米、小麦、黑麦和燕麦四类麸皮，分别用冰醋酸、乳酸和柠檬酸调节培养基初始 pH 为 5.0，初始含水量为 80%(V/W)，在曲筐内于 32 ℃ 培养箱中发酵培养 96 h，测定麸曲中阿魏酸酯酶、纤维素酶和木聚糖酶活力。

1.2.1.2 麸皮种类和直径对麸曲中的酶活力影响 在最优调酸剂处理条件下，调整玉米、小麦、黑麦和燕麦四类麸皮直径为 10 目、20 目和 30 目，分别测定麸曲中阿魏酸酯酶、纤维素酶和木聚糖酶活力。

1.2.1.3 麸曲制作参数优化 选择最优的调酸剂、麸皮种类和直径，采用单因素实验方法优化麸曲制作参数。固定条件为培养基初始含水量为 75%(V/W)，在曲筐内于 30 ℃ 培养箱中发酵培养 96 h，调节初始 pH 分别为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0 和 7.5，评价麸曲中阿魏酸酯酶、纤维素酶和木聚糖酶活力，优化培养初始 pH。在最优的培养基初始 pH、30 ℃ 条件下培养 96 h，调整麸曲初始含水量分别为 70%、75%、80%、85%、90% 和 95%(V/W)，评价麸曲中的酶活力，优化初始含水量。在最优的培养基初始 pH、初始含水量 85%(V/W)条件下培养 96 h，调整麸曲培养温度分别为 24、26、28、30、32 和 34 ℃，优化麸曲发酵温度。在最优的培养基初始 pH、初始含水量为 85%(V/W)条件下于 30 ℃ 培养麸曲，调整麸曲培养时间分别为 48、72、96、120、144 和 168 h，优化麸曲发酵时间。

1.2.2 麸曲中的酶活力测定 准确称取 5 g 麸曲(计算时换算成绝干麸曲，DW)，置于 250 mL 灭菌的三角瓶中，加入 60 mL 的醋酸-醋酸钠缓冲溶液(pH4.6，100 mmol/L)，置于 30 ℃ 恒温摇床中 180 r/min 浸提 1 h，12000 r/min 离心 15 min，取上清液作为待测粗酶液[16]。以阿魏酸甲酯(Methyl ferulic acid，MFA)为底物测定麸曲中的阿魏酸酯酶活力[17]，纤维素酶[18] 和木聚糖酶[19] 活力测定分别参照国家标准 NY/T 912-2020 和 GB/T 23874-2009。

1.2.3 黄酒酿造

1.2.3.1 酿酒酵母的活化与扩培 配制一定量的 YPD 培养基，115 ℃ 灭菌 20 min 备用。在无菌操作台将甘油保藏管中的 B661 酵母菌接种(接种量 5‰)到 YPD 培养基中，置于 28 ℃，150 r/min 条件下，培养 24 h。将常压下蒸熟摊凉的米饭与水按照 1∶4 的比例混合，然后加入 1‰的糖化酶、1‰的液化酶和 10% 的黄酒麦曲混合均匀后在 55~65 ℃ 温度糖化 4~5 h，糖化结束后测定其外观糖度不得低于 12°Bx，115 ℃ 灭菌 20 min，接入 5% 的 B661 酵母种子培养液，置于 28 ℃，150 r/min 条件下，培养 24 h，培养成熟后即得扩培酒母。

1.2.3.2 落缸与工厂黄酒发酵 参考工厂黄酒酿造工艺，以大米质量为基准，将蒸熟的大米、水、扩培酒母、黄酒麦曲分别按照 150%、125%、11.4% 和 13.6% 比例混合均匀落缸发酵。前发酵温度为 28 ℃，发酵时间 5 d，头耙搅拌时间为发酵第 8 h，之后每 24 h 搅拌开耙一次；后发酵温度为 15±1 ℃，发酵时间为 360 h，期间每 48 h 搅拌开耙一次。

1.2.3.3 麸曲黄酒酿造 参照工厂黄酒酿造工艺的基础上，在黄酒发酵的落缸阶段添加原料质量 2.0% 的青霉菌 *P. oxalicum* M1816 强化麸曲，发酵参数与工厂黄酒相同，以不添加强化麸曲的工厂黄酒为对照组(Control)。

1.2.4 指标检测 当工厂黄酒和麦曲黄酒发酵结束时取样，每次取样前搅拌均匀，于 10000 r/min，4 ℃ 离心取上清液用于理化指标、酚酸、挥发性酚类物质含量的测定及感官评测。

1.2.4.1 黄酒酚酸的测定 酚酸标准曲线的构建[20]：采用 HPLC 方法测定，色谱柱为 XBridge™ C_{18} (4.6×250 mm，5 μm)；流动相 A：0.118% 磷酸水溶液；流动相 B：乙腈，梯度洗脱(0~5 min，B 相维持 5% 不变；5~65 min，B 相从 5% 线性改变至 30%；65~66 min，B 相从 30% 线性改变至 5%；66~80 min，B 相维持 5% 不变)；流速：1.0 mL/min；柱温：30.0 ℃；检测波长：280 nm；进样量：10 μL。

黄酒中酚酸的提取：取 10 mL 黄酒样品，加入 30 mL 无水甲醇，在温度 30 ℃，功率 30 W 下超声 30 min 提取游离酚酸，12000 r/min 离心 10 min。移去上清液，重复三次提取，合并上清液，用 0.45 μm 微孔滤膜过滤。将过滤后的上清液放置于旋转蒸发仪中，设置 45 ℃，在真空条件下蒸干，并用甲醇定容至 10 mL。使用 0.22 μm 滤膜过滤后保存于−80 ℃，测定黄酒中酚酸含量[10]。

1.2.4.2 黄酒挥发性酚类化合物的测定 利用 HS-SPME 结合 GC-MS 方法对黄酒中的挥发性酚类化合物进行定量分析[21−22]。HS-SPME 方法：取 2 mL 样品于 15 mL 顶空瓶中，依次加入 2 g NaCl、4 mL 超纯水、10 μL 2-辛醇溶液(无水乙醇溶解，101.8 mg/L)作为内标，由 PAL3 CTC 系统自动进样。加热温度 50 ℃，平衡时间 10 min，样品吸附时间 40 min，进样口解析时间 5 min；色谱柱为 SH-Rtx-Wax 极性毛细管柱(30 m×2.25 mm×0.25 μm)；GC 参数：进样口温度 250 ℃，不分流模式，载气：氦气(>99.999%)，恒定流量 1 mL/min，柱箱升温程序：40 ℃ 保持 2 min，5 ℃/min 升温至 230 ℃，保持 10 min；MS 参数：电离方式 EI，电离能量 70 eV，离子源温度 230 ℃，传输线温度 250 ℃，采用 MS1 全扫描模式，扫描范围 30~350 m/z。通过建立挥发性酚类化合物的标准曲线进行定量分析，测定两种黄酒中挥发性酚类化合物含量。

1.2.4.3 黄酒理化指标测定 两种黄酒中的酒精度、总酸和氨基酸态氮的测定，参照国家标准(GB/T 13662-2018 黄酒，半干型传统黄酒)。还原糖含量测定，采用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)比色法[23]。

1.2.4.4　黄酒感官评价　10 位（4 位男性，6 位女性，年龄范围 20~30 岁之间）经过专业训练的品酒人员进行感官分析，感官分析小组在对样品进行分析前经过三轮的闻香训练过程。第一轮训练中，感官分析小组分别对近 30 种香气标准品进行闻香训练，每次 30 min，连续一个月。第二轮训练中，感官分析小组分别对不同黄酒样品进行感官分析，熟悉黄酒的香气特征。第三轮训练中，以王栋等[24−25]绘制的黄酒风味轮为基础，感官分析小组对 7 种黄酒香气描述语进行 10 分制打分训练（表 1）。在 20 ℃ 室温环境下，两种黄酒以三位随机数字编码的形式由感官分析人员进行香气分析，以 0~10 分计[24]。

表 1　黄酒感官评分表

Table 1　Sensory evaluation table of Huangjiu

感官属性	定义	评分标准（0分表示无滋味，10分表示滋味强烈）
花香	类似花朵的花香味	0~10分
果香	苹果或橘子等香甜水果香气	0~10分
烟熏香	愈创木酚香气	0~10分
麦曲香	生麦曲块浸提液的气味	0~10分
酵母味	酵母溶于水的味道	0~10分
香草味	香草醛的味道	0~10分
中药香	4-乙烯基愈创木酚的味道	0~10分

1.3　数据处理

所有实验均重复三次，采用 Excel 2019 处理原始数据。采用 SPSS 26.0 软件，通过 Duncan 分析比较多组间的统计学差异，$P<0.05$ 为差异显著。采用 Origin 2020 绘制图表。

2　结果与分析

2.1　麸曲制作工艺优化

2.1.1　不同类型调酸剂调节的 pH 对麸曲酶活力的影响　环境 pH 对微生物的生长具有显著影响，其通过改变微生物细胞膜内外的电荷差，改变细胞膜的通透性，进而影响细胞对营养物质吸收，影响酶在代谢过程中的活性，且强酸和强碱会对一般微生物造成致死作用，因此控制发酵环境的 pH 具有十分重要的意义。食品级酸度调节剂是一类常见的酸，可以有效地调节食品中的酸度[26]，常见的有柠檬酸、乳酸和醋酸。实验利用柠檬酸、乳酸和醋酸三种调酸剂分别调节麸皮的 pH 为 5，以探究不同类型调酸剂对麸曲中酶活力的影响。由表 2 可知，对于不同麸皮制作的麸曲，当利用冰醋酸调酸时，玉米麸曲、小麦麸曲和燕麦麸曲中的三种酶活力均显著高于其它调酸剂（$P<0.05$）。仅黑麦麸曲中的阿魏酸酯酶（623.16 mU/g）和纤维素酶（126.36 U/g）的酶活力弱于乳酸调酸剂，这可能与黑麦麸皮中结构及酚酸的特异性组成有关，乳酸对黑麦麸皮中的阿魏酸酯酶和纤维素酶有更好的激活作用。冰醋酸是一种天然有机酸，对人体和环境的影响较小、价格相对较低，且相较于其它调酸剂，麸曲表现的酶活力更高，有利于微生物降解谷物麸皮。综上所述，选择使用冰醋酸调节麸曲发酵 pH。

2.1.2　麸皮种类与直径对麸曲酶活力的影响　青霉菌属于真菌，代谢类型为异养需氧型，在通气良好的条件下更适宜生长[27]。麸皮直径过细，会影响麸曲的通风透气性能，而直径过粗，原料结合不充分，导致发酵效果不佳。由表 3 可知，麸皮直径为 20 目时，玉米、黑麦和燕麦麸曲中的阿魏酸酯酶、木聚糖酶和纤维素酶活力均显著高于 10 目及 30 目麸曲（$P<0.05$）。麸皮的主要成分是纤维素和木质素，这些成分组成比例是相对稳定的，麸皮直径大小在对酶活力和微生物的生长和作用中的影响较小。而不同谷物

表 2　不同酸调节 pH 对四种麸曲酶活力的影响

Table 2　Effects of pH with different acid regulators on the enzyme activity of four bran-koji

酶的类型	玉米			小麦			黑麦			燕麦		
	冰醋酸	柠檬酸	乳酸	冰醋酸	柠檬酸	乳酸	冰醋酸	柠檬酸	乳酸	冰醋酸	柠檬酸	乳酸
阿魏酸酯酶（MFA, mU/g）	2946.76±28.41^{a}	2334.66±32.37^{c}	2695.87±21.17^{b}	1245.25±748.34^{a}	1203.37±43.67^{c}	1238.12±46.79^{b}	623.16±42.86^{b}	612.23±33.94^{c}	1245.25±48.34^{a}	673.25±30.66^{a}	638.38±32.25^{b}	609.26±29.46^{c}
木聚糖酶（U/g）	640.64±16.77^{a}	515.5±13.72^{b}	504.57±12.33^{c}	540.44±16.02^{a}	523.23±11.22^{b}	456.07±18.28^{c}	432.64±16.77^{a}	342.23±13.72^{b}	340.64±16.77^{b}	541.23±16.77^{a}	515.5±16.72^{b}	502.57±16.33^{c}
纤维素酶（U/g）	226.06±16.25^{a}	220.24±12.69^{b}	191.38±9.72^{c}	195.32±12.46^{a}	181.31±9.63^{b}	168.43±11.19^{c}	126.36±10.25^{b}	120.24±12.69^{c}	226.06±16.25^{a}	140.76±13.75^{a}	125.37±11.23^{b}	122.58±7.67^{b}

注：同行不同小写字母分别表示四种麸曲组内差异显著（$P<0.05$）。

表 3　麸皮直径对麸曲酶活力的影响

Table 3　Effects of bran diameter on the enzyme activity of bran-koji

酶的类型	10目麸曲酶活力				20目麸曲酶活力				30目麸曲酶活力			
	玉米	小麦	黑麦	燕麦	玉米	小麦	黑麦	燕麦	玉米	小麦	黑麦	燕麦
阿魏酸酯酶（MFA, mU/g）	2880.28±55.76^{a}	1165.85±23.65^{b}	583.64±19.42^{d}	647.86±14.65^{c}	2960.57±35.73^{a}	1252.51±34.32^{b}	632.64±31.63^{d}	672.23±28.65^{c}	2611.64±28.53^{a}	1265.83±34.85^{b}	612.64±19.63^{d}	631.86±14.65^{c}
木聚糖酶（U/g）	623.69±43.19^{a}	501.43±22.64^{c}	411.54±18.53^{d}	512.75±22.96^{b}	664.35±21.34^{a}	529.43±27.22^{c}	429.53±12.84^{d}	537.62±29.65^{b}	632.86±26.19^{a}	481.85±24.83^{c}	402.64±11.43^{d}	504.75±17.31^{b}
纤维素酶（U/g）	210.06±17.84^{a}	176.44±10.94^{b}	107.67±6.83^{d}	121.45±12.66^{c}	231.73±32.29^{a}	197.43±11.73^{b}	123.53±9.41^{d}	146.61±9.58^{c}	220.46±24.24^{a}	165.58±12.89^{b}	114.53±8.37^{d}	132.65±14.74^{c}

注：同行不同小写字母分别表示不同目数时组内差异显著（$P<0.05$）。

麸皮的组成成分比例差异巨大，当直径为 20 目时，麸曲培养基初始含水量为 80%、发酵时间为 96 h、用冰醋酸调节培养基 pH 为 5 时，对比玉米麸曲、小麦麸曲、燕麦麸曲和黑麦麸曲发现，玉米麸曲发酵效果最佳，阿魏酸酯酶、木聚糖酶及纤维素酶活力最高分别为 2960.57 mU/g、664.35 U/g 和 231.73 U/g（P<0.05），故后续麸曲发酵条件的优化以直径 20 目的玉米麸皮为实验对象。

2.2 玉米麸曲固态发酵产酶条件的参数优化

2.2.1 初始 pH 的优化 在酸性浓度的影响下，当微生物细胞膜上的电荷性质发生变化时，影响细胞正常的物质代谢活动和酶的功能[28]。由图 1 可知，当固定初始含水量、温度和发酵时间条件时，pH 为 5.0~6.5 时，随着 pH 升高阿魏酸酯酶、木聚糖酶及纤维素酶活力也随之上升。青霉菌 *P. oxalicum* M1816 作为高产阿魏酸酯酶、木聚糖酶和纤维素酶的菌株，其生物活性决定了酶活力的高低。pH 升高，酸度减弱，青霉菌 *P. oxalicum* M1816 逐渐达到其最适产酶 pH。而 pH 过高抑制了青霉菌 *P. oxalicum* M1816 生物活力，致使在 pH 为 6.5~7.5 时酶活力呈下降趋势[16]。当玉米麸曲初始 pH 为 6.5 时，玉米麸曲阿魏酸酯酶、木聚糖酶及纤维素酶活力达到最高分别为 3028.83 mU/g、703.41 U/g 和 238.62 U/g（P<0.05），综上分析可得最佳麸曲制作的初始 pH 为 6.5。

2.2.2 初始含水量的优化 水分是微生物生长必需的培养条件之一，水分含量过于低时，微生物的生长就会中断；当水分含量过高时，麸皮之间没有缝隙导致麸曲结成团状，空气无法充分进入到麸曲中，阻碍微生物的生长[29]。由图 2 可知，当固定初始 pH、温度和发酵时间相同情况下，随着玉米麸曲初始含水量的增加，酶活力呈现先增加后减少的趋势。培养基水分上升，青霉菌 *P. oxalicum* M1816 生长代谢旺盛，逐渐达到最高酶活力。但如果水分过多会导致麸曲粘连结块，微生物缺乏氧气致使生长受阻，麸曲酶活力下降[16]。当玉米麸曲初始含水量为 85% 时，玉米麸曲阿魏酸酯酶、木聚糖酶及纤维素酶活力达到最高分别为 3678.22 mU/g、751.18 U/g 和 265.23 U/g

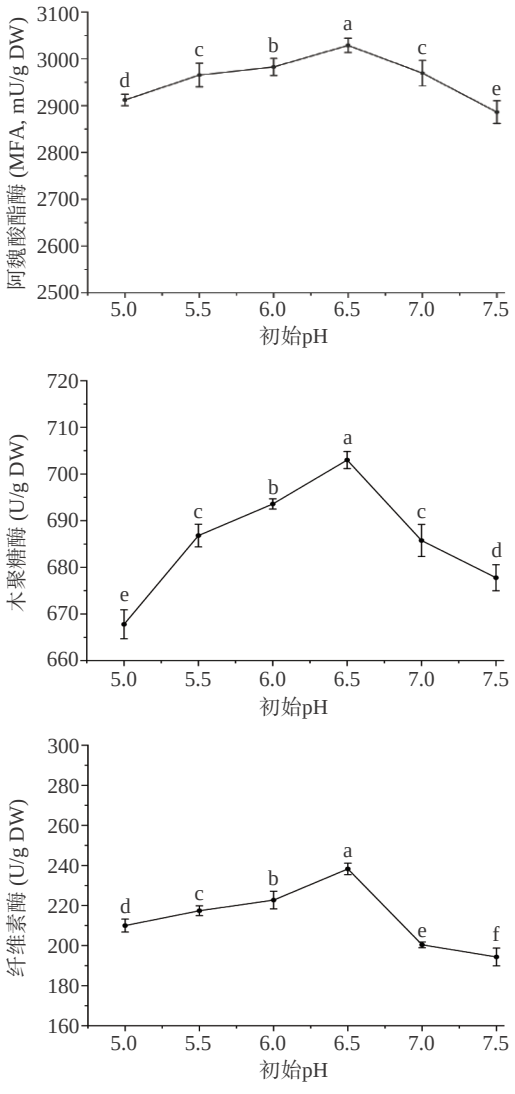


图 1 初始 pH 对玉米麸曲酶活力的影响

Fig.1 Effects of initial pH on the enzyme activity of corn bran-koji

注：图中不同小写字母表示差异显著（P<0.05）；图 2~图 4 同。

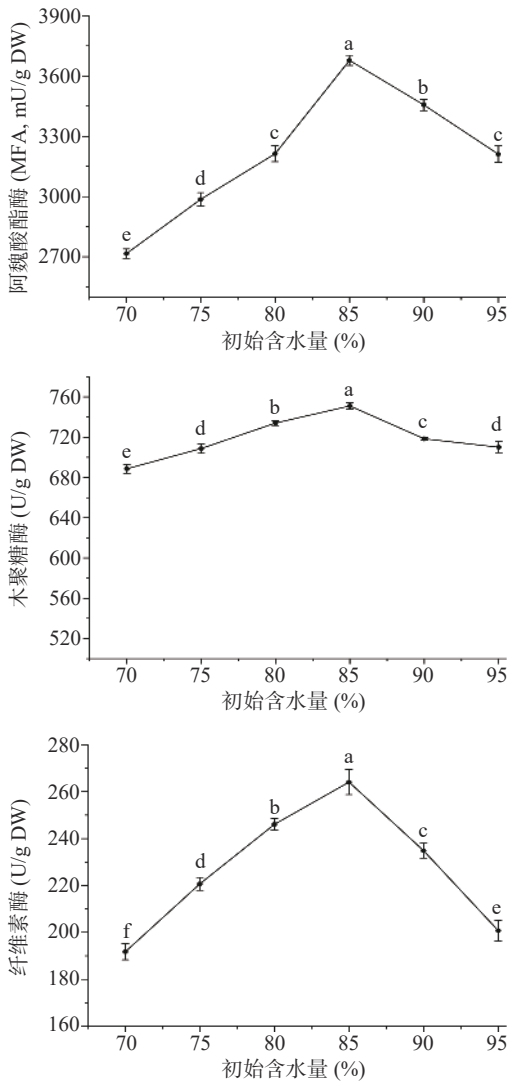


图 2 初始含水量对玉米麸曲酶活力的影响

Fig.2 Effects of initial moisture content on the enzyme activity of corn bran-koji

（P<0.05），综上分析最适初始含水量为 85%（V/W）。

2.2.3　发酵温度的优化　温度是影响微生物生长代谢的关键因素，随着温度的升高，细胞的生化反应和生长速度明显加快，当温度升高超过一定的临界值，会对微生物产生不良影响，严重时会导致细胞死亡[30]。如图 3 所示，当麸曲固态发酵温度从 24 ℃ 上升到 30 ℃ 时，玉米麸曲阿魏酸酯酶、木聚糖酶及纤维素酶活力均达到了最高值（P<0.05），分别为 3667.63 mU/g、756.92 U/g 和 264.81 U/g，这可能是由于随着温度的升高，青霉菌 *P. oxalicum* M1816 生长和代谢活动逐渐活跃，但如果温度过高，青霉菌 *P. oxalicum* M1816 的生物量和产酶量降低。故麸曲制作最适发酵温度为 30 ℃。

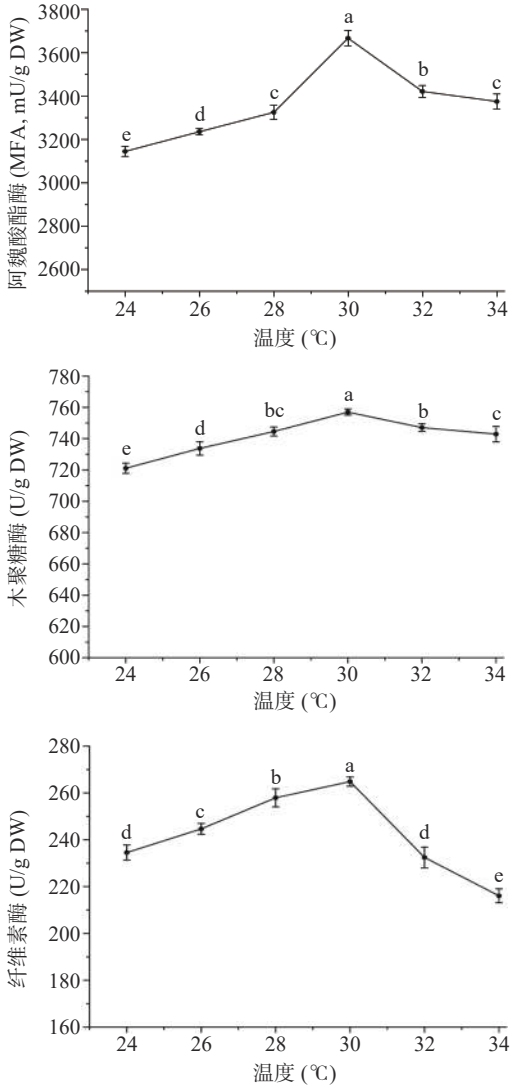


图 3　不同发酵温度对玉米麸曲酶活力的影响

Fig.3　Effects of different fermentation temperatures on the enzyme activity of corn bran-koji

2.2.4　发酵时间的优化　微生物的生长有着固定的发展周期，培养时间太短，会导致菌体生长数目较少，产酶量较少；随时间的延长，微生物逐步老化失去活力，养分逐步耗费殆尽，有害产物也一直积聚，使酶活力下降[31]。因此在实际生产中，必须优化微生物产酶最高的时间，以此减少生产成本。由图 4 可知，随着麸曲发酵时间的延长，玉米麸曲酶活力呈先增长后下降的趋势。在 120 h 时，玉米麸曲阿魏酸酯酶、木聚糖酶及纤维素酶活力均达到最高值（P<0.05），分别为 3802.23 mU/g、792.64 U/g 和 286.83 U/g。故麸曲制作最佳的发酵时间为 120 h。

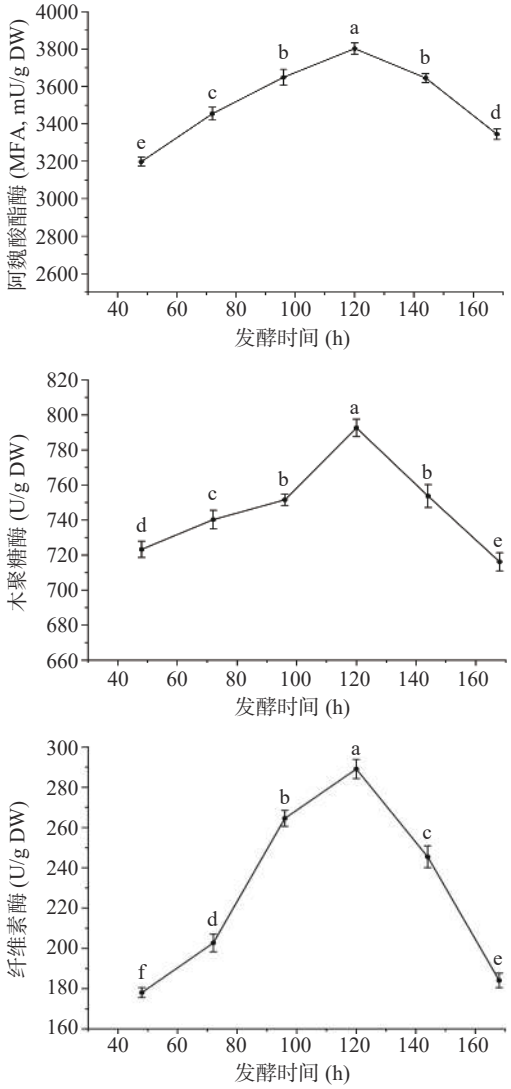


图 4　不同发酵时间对玉米麸曲酶活力的影响

Fig.4　Effects of different fermentation time on the enzyme activity of corn bran-koji

2.3　添加玉米麸曲对黄酒质量的影响

2.3.1　玉米麸曲对黄酒酚酸含量的影响　在黄酒酿造过程中，添加经上述最优条件下生产的玉米麸曲通过发酵生产玉米麸曲黄酒。当黄酒发酵结束后，玉米麸曲黄酒的酚酸总量为 116.48 mg/L，与未添加玉米麸曲的工厂黄酒酚酸总量（55.53 mg/L）相比，添加玉米麸曲共同发酵能显著提高玉米麸曲黄酒中的酚酸含量（P<0.05），其中阿魏酸（55.76 mg/L）、咖啡酸（7.64 mg/L）、绿原酸（34.04 mg/L）提升最为明显（P<0.05）（表 4）。麸曲中的青霉菌 *P. oxalicum* M1816 代谢产生高活性的阿魏酸酯酶、木聚糖酶及纤维素酶，降解玉米麸皮，促进了结合态酚酸的释放，同时这

些酶也可以同步降解麦曲及大米原料中的细胞壁，促进酚酸类物质释放，并最终在发酵过程转移至黄酒酒体中，共同提高了玉米麸曲黄酒中酚酸的含量[12]。

表 4 工厂黄酒及玉米麸曲黄酒发酵结束后酚酸含量
Table 4 Phenolic acid contents at the end of fermentation of factory Huangjiu and corn bran-koji Huangjiu

酚酸类型	工厂黄酒(mg/L)	玉米麸曲黄酒(mg/L)
阿魏酸	1.17±0.34^{b}	55.76±6.34^{a}
香草醛	0.17±0.03^{b}	1.43±0.34^{a}
香草酸	32.95±5.61^{a}	1.12±0.13^{b}
咖啡酸	0.53±0.06^{b}	7.64±0.89^{a}
绿原酸	1.54±0.67^{b}	34.04±3.92^{a}
没食子酸	19.11±3.05^{a}	11.34±2.19^{b}
反香豆酸	0.15±0.03^{b}	1.12±0.22^{a}
丁香酸	0.22±0.04^{b}	4.38±0.78^{a}
合计	55.53±6.34^{b}	116.48±6.89^{a}

注：同行字母不同表示差异显著(P<0.05)；表6同。

2.3.2 玉米麸曲对黄酒理化特性的影响 测定工厂黄酒和玉米麸曲黄酒各项理化指标，结果如表 5 所示。其中，工厂黄酒酒精度为 15.89%vol，还原糖含量为 15.21 g/L，总酸为 4.34 g/L，氨基酸态氮含量为 0.67 g/L，均符合传统半干型黄酒国家标准(GB/T 13662-2018 黄酒)。玉米麸曲黄酒氨基态氮含量为 1.32 g/L，比工厂黄酒高约 1 倍，酒精度及还原糖均显著高于工厂黄酒(P<0.05)。可能是由于 *P. oxalicum* M1816 代谢产生较高的纤维素酶和木聚糖酶活力，将原料中的部分纤维素、木聚糖等降解成为还原糖，从而提高了玉米麸曲黄酒的酒精度和还原糖含量。

表 5 黄酒理化指标
Table 5 Physicochemical indexes of various Huangjiu

黄酒类型(发酵20 d)	酒精度(%vol)	还原糖(g/L)	氨基酸态氮(g/L)	总酸(g/L)
工厂黄酒	15.89±0.51^{b}	15.21±0.22^{b}	0.67±0.03^{b}	4.34±0.32^{b}
玉米麸曲黄酒	16.84±0.46^{a}	15.63±0.26^{a}	1.32±0.12^{a}	5.02±0.62^{a}

注：同列字母不同表示差异显著(P<0.05)。

2.3.3 玉米麸曲对黄酒中挥发性酚类化合物的影响 酚类物质是存在于大部分酒中的风味物质，对酒风味品质控制具有重要意义[32]。利用 HS-SPME 结合 GC-MS 检测黄酒中的挥发性酚类化合物(表 6)，与工厂黄酒相比，玉米麸曲黄酒中的挥发性酚类物质均显著增加(P<0.05)，主要有 4-乙烯基愈创木酚、愈创木酚、4-乙基苯酚和香兰素等。与工厂黄酒相比，玉米麸曲黄酒中的愈创木酚提高了 33.4 倍、4-乙烯基愈创木酚提高了 0.67 倍、4-乙基愈创木酚提高了 2.32 倍、4-乙基苯酚提高了 3.07 倍、香兰素提高了 0.29 倍。大部分谷物酚类在发酵、蒸馏过程中分解或残留在酒糟内，而在发酵过程中，玉米麸曲中的酚酸经微生物降解，会转变成一部分对香气有益的挥发性酚类物质，如 4-乙基愈创木酚和 4-甲基愈创木酚等。已有多项研究表明，阿魏酸在高温或阿魏酸脱羧酶的作用下可转化形成 4-乙烯基愈创木酚[33−34]，最终这些挥发性酚类物质可能赋予黄酒独特的烟熏和药香等。

表 6 黄酒中挥发性酚类物质含量
Table 6 Contents of volatile phenols in Huangjiu

酚酸类型	工厂黄酒(μg/L)	玉米麸曲黄酒(μg/L)
愈创木酚	1.43±0.12^{b}	49.19±2.16^{a}
4-乙烯基愈创木酚	21.76±4.23^{b}	36.33±4.34^{a}
4-乙基愈创木酚	3.45±0.56^{b}	11.45±2.04^{a}
4-乙基苯酚	102.87±3.67^{b}	419.06±5.34^{a}
香兰素	339.07±3.49^{b}	437.76±4.22^{a}

2.3.4 玉米麸曲对黄酒感官的影响 由图 5 感官结果可知，添加玉米麸曲的黄酒中药香(6.9)、烟熏香(7.2)及香草香(5.7)强度显著高于工厂黄酒，这与上述挥发性酚类物质定量的结果相一致。愈创木酚呈强烈烟熏似香甜香气且略有草药和苯酚气味，4-乙基愈创木酚呈现香辛料和草药香气，4-乙烯基苯酚具有苯酚样化学和药物香气[35]。相比工厂黄酒，玉米麸曲黄酒中的果香(6.0→5.2)和花香(6.0→5.5)强度稍有下降。从工厂黄酒和玉米麸曲黄酒中均闻到了丰富的香草香、麦曲香和酵母味，这是由于黄酒发酵过程中添加酵母菌和黄酒麦曲共同发酵。在发酵结束后，添加玉米麸曲黄酒中的香兰素含量升高，香兰素具有香荚兰豆香气及浓郁的奶香，可能导致了添加玉米麸曲黄酒的香草味显著增强[25]。

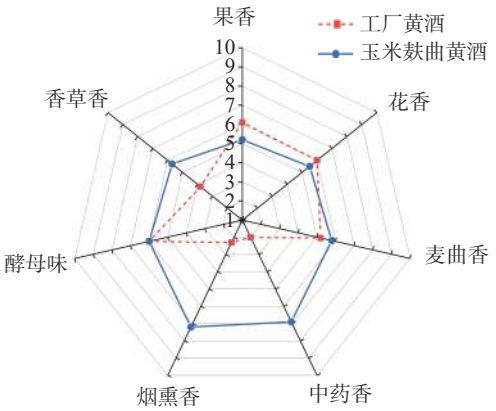


图 5 工厂黄酒和玉米麸曲黄酒的香气雷达图
Fig.5 Aroma radar map of factory Huangjiu and corn bran-koji Huangjiu

3 结论

接种青霉菌 *P. oxalicum* M1816 的高产酶强化麸曲，弥补了单一麦曲作为糖化发酵剂风味单一及酚酸含量低的不足。本研究进一步筛选多种谷物麸皮制曲，并优化制曲条件，发现玉米麸皮制曲表现出了高活性的酶活力，最优制曲发酵条件为：直径 20 目，冰醋酸调节固态培养基 pH 为 6.5，麸曲初始含水量为 85%(V/W)，培养温度为 30 ℃，培养时间为 120 h。将该条件下的玉米麸曲用于酿制玉米麸曲黄酒，相比未添加麸曲的工厂黄酒，酚酸总量(116.48 mg/L)提

高了约 1.1 倍，挥发性酚类物质如 4-乙基苯酚、4-乙基愈创木酚、4-乙烯基愈创木酚、愈创木酚、香兰素均显著增加（$P<0.05$），感官结果表明这些挥发性酚类物质可能为黄酒的药香、烟熏和香草香做出了重要贡献。在市场竞争加剧和黄酒高质量产业发展战略的背景下，健康和风味多元化是黄酒发展的必然趋势。本研究为谷物麸皮的开发利用及高产酶强化麸曲的工业应用提供了基础数据，也为特征香型的黄酒产品开发提供了一定思路。但是，关于添加麸曲的黄酒酚酸的代谢通路仍需进一步研究确定。

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

参考文献

［1］ 陈双. 中国黄酒挥发性组分及香气特征研究[D]. 无锡：江南大学, 2013. ［CHEN S. Characterization of the volatile and aroma profile of Chinese rice wine[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2013.］

［2］ 傅金泉. 中国酒曲技术的发展与展望[J]. 酿酒, 2002, 29(2): 7−9. ［FU J Q. Development and prospect of Jiuqu technology in China[J]. Liquor Making, 2002, 29(2): 7−9.］

［3］ 彭思婕, 张立强, 郭佳, 等. 加热熟化小麦制曲对清香型白酒风味的影响研究[J]. 酿酒科技, 2022, 6: 30−37,44. ［PENG S J, ZHANG L Q, GUO J, et al. Effect of making Daqu with heat-treated wheat on the flavor of Qingxiang Baijiu[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2022, 6: 30−37,44.］

［4］ DONG W W, YANG Q, LIAO Y X, et al. Characterisation and comparison of the microflora of traditional and pure culture Xiaoqu during the Baijiu liquor brewing process[J]. Journal of The Institute of Brewing, 2020, 126(2): 213−220.

［5］ 石松业, 温纪平, 刘远晓. 小麦麸皮多糖提取、结构及生物活性研究进展[J]. 食品工业科技, 2023, 44(13): 466−473. ［SHI S Y, WEN J P, LIU Y X. Recent advances in wheat bran polysaccharides: Extraction, structure and bioactivities[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(13): 466−473.］

［6］ 任雪荣, 齐景伟, 刘娜, 等. 微生物发酵对麦麸水溶性多酚含量、组成及抗氧化活性的影响研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(3): 104−109. ［REN X R, QI J W, LIU N, et al. Effect of microbial fermentation on content, composition and antioxidant activity of water-soluble polyphenols in wheat bran[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(3): 104−109.］

［7］ 熊乐文, 张龙霏, 李佳, 等. 金银花酚酸类成分的提取优化及其成分分布[J]. 中药材, 2022, 45(8): 1939−1945. ［XIONG L W, ZHANG L F, LI J, et al. Extraction optimization and its distribution of phenolic acid in *Lonicera japonica* Thunb.[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2022, 45(8): 1939−1945.］

［8］ CENGIZ M F, BABACAN U, AKINCI E, et al. Extraction of phenolic acids from ancient wheat bran samples by ultrasound application[J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2021, 96(1): 134−141.

［9］ FERRI M, HAPPEL A, ZANAROLI G, et al. Advances in combined enzymatic extraction of ferulic acid from wheat bran[J]. New Biotechnology, 2020, 56: 38−45.

［10］ WANG J, SUN B, CAO Y, et al. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran[J]. Food Chemistry, 2007, 106(2): 804−810.

［11］ 孙晓明, 辛嘉英, 王艳, 等. 微生物发酵产阿魏酸酯酶及释放阿魏酸研究概述[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(1): 201−206. ［SUN X M, XIN J Y, WANG Y, et al. Summary on the conditions of ferulic acid esterase and ferulic acid production by microorganism fermentation[J]. Food Research and Development, 2019, 40(1): 201−206.］

［12］ KOISTINEN V M, NORDLUND E, KATINA K, et al. Effect of bioprocessing on the *in vitro* colonic microbial metabolism of phenolic acids from rye bran fortified breads[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(9): 1854−1864.

［13］ 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, 2020. ［SUN X M. Ferulic acid and its derivatives release from wheat bran by *Neurospora sitophila* fermentation[D]. Harbin: Harbin University of Commerce, 2020.］

［14］ 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, 2019. ［YIN Z N. Study on mechanism of active component released by solid-state fermentation of wheat bran[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2019.］

［15］ 凌阿静, 李小平, 刘柳, 等. 真菌发酵对麦麸酚酸及其抗氧化活性的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(4): 136−142. ［LING A J, LI X P, LIU L, et al. Effect of fungal fermentation on wheat bran phenolic acids contents and antioxidant activity[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2019, 38(4): 136−142.］

［16］ 张晶. 黄酒麦曲中产阿魏酸功能菌群解析及 *Penicillium oxalicum* M1816 在黄酒中的强化应用[D]. 无锡：江南大学, 2022. ［ZHANG J. Analysis of functional microbiota for ferulic acid production in Huangjiu wheat Qu and bioaugmentation of *Penicillium oxalicum* M1816 in Huangjiu[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2022.］

［17］ ZHANG S B, PEI X Q, WU Z L. Multiple amino acid substitutions significantly improve the thermostability of feruloyl esterase A from *Aspergillus niger*[J]. Bioresource Technology, 2012, 117(10): 140−147.

［18］ 中华人民共和国农业农村部. 饲料添加剂 纤维素酶活力的测定 分光光度法：NY/T 912-2020[S]. 北京：中国农业出版社, 2021. ［Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. Determination of cellulase activity in feed additives-spectrophotometry: NY/T 912-2020[S]. Beijing: China Agriculture Press, 2021.］

［19］ 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. 饲料添加剂 木聚糖酶活力的测定 分光光度法：GB/T 23874-2009[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, Standardization Administration of the People's Republic of China. Determination of xylanase activity in feed additives-spectrophotometry: GB/T 23874-2009[S]. Beijing: Standards Press of China, 2009.］

［20］ 杨春霞. 高效液相色谱法测定枸杞中 9 种酚酸化合物含量[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(20): 148−153. ［YANG C X. Determination of nine kinds of phenolic acids in *Lycium barbarum* L. using high-performance liquid chromatography[J]. Food Research and Development, 2021, 42(20): 148−153.］

［21］ 姚烨岑, 郭明, 叶博, 等. 新型水果时尚黄酒中风味物质的 GC-MS 检测分析及指纹图谱构建[J]. 酿酒科技, 2022, 4: 127−131. ［YAO Y C, GUO M, YE B, et al. GC-MS analysis and fingerprinting of flavor substances in a new-type fruit Huangjiu[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2022, 4: 127−131.］

［22］ MO X, FAN W, XU Y. Changes in volatile compounds of

Chinese rice wine wheat Qu during fermentation and storage[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2009, 115(4): 300−307.
[23] 刘彩华, 曾嘉童, 包竹君, 等. 3, 5-二硝基水杨酸比色法测定芒果的可溶性糖含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(9): 2892−2900. [LIU C H, ZENG J T, BAO Z J, et al. Determination of soluble sugar content in *Mangifera indica* Linn. by 3, 5-dinitrosalicylic acid colorimetry[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2022, 13(9): 2892−2900.]
[24] 王栋, 经斌, 徐岩, 等. 中国黄酒风味感官特征及其风味轮的构建[J]. 食品科学, 2013, 34(5): 90−95. [WANG D, JING B, XU Y, et al. Sensory flavor characteristics of Chinese yellow rice wine and construction of flavor wheel[J]. Food Science, 2013, 34(5): 90−95.]
[25] 王蒙, 周志磊, 姬中伟, 等. 黄酒感官质量评价体系研究——以绍兴黄酒为例[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(8): 7−13. [WANG M, ZHOU Z L, JI Z W, et al. Research on sensory quality evaluation system of Huangjiu: Taking Shaoxing rice wine as an example[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(8): 7−13.]
[26] 孙宝国. 孙宝国院士专访: 躲不开的食品添加剂[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(19): 3. [SUN B G. Exclusive interview of Sun Baoguo: Unavoidable additives[J]. Food Research and Development, 2013, 34(19): 3.]
[27] 赵君哲. 食品的 pH 值与微生物控制[J]. 肉类工业, 2015, 406(2): 40−42. [ZHAO Z Z. pH Value and microbial control of food[J]. Meat Industry, 2015, 406(2): 40−42.]
[28] 霍佳欢, 李双民, 温晓蕾, 等. 不同培养条件对栗仁菌核青霉菌生长的影响[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(23): 129−132. [HUO J H, LI S M, WEN X L, et al. Various culture conditions on the growth of *Penicillium sclerotiorum* in chestnut kernel[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2021, 49(23): 129−132.]
[29] 侯海峰, 李群伟, 李晓梅. 温度和湿度对黄绿青霉菌生长和产毒的影响[J]. 中国地方病防治杂志, 2010, 25(2): 104−106. [HOU H F, LI Q W, LI X M, et al. Effect of temperature and water activity on growth and toxin production of *Penicillium citreoviride*[J]. Chinese Journal of Control of Endemic Diseases, 2010, 25(2): 104−106.]
[30] 丁丽, 李会荣, 杨智国, 等. 温度、水分含量及贮藏期对玉米、DDGS 及花生粕霉菌与霉菌毒素 B1 的影响[J]. 山东畜牧兽医, 2014, 35(6): 3−4. [DING L, LI H R, YANG Z G, et al. Effects of temperature, water content and storage time on the moulds and mycotoxin B1 in corn, DDGS and peanut meal[J]. Shandong Journal of Animal Science and Veterinary Medicine, 2014, 35(6): 3−4.]
[31] 周涛. 储藏稻谷中霉菌的生长演替规律及霉变稻谷的品质研究[D]. 武汉: 武汉轻工大学, 2020. [ZHOU T. Study on the growth, succession laws of mold and the quality of mildew in stored paddy rice[D]. Wuhan: Wuhan Polytechnic University, 2020.]
[32] 祝贺, 杨涛, 郝哲兵, 等. 酚类对酒的风味影响及白酒酚类控制策略[J]. 食品工业科技, 2019, 40(18): 361−367. [ZHU H, YANG T, HAO Z B, et al. Effect of phenols on liquor flavor and control strategy of phenols in Baijiu[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(18): 361−367.]
[33] 陈青柳. 绍兴机械化黄酒风味形成途径和功能微生物的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2018. [CHEN Q L. Study on the flavor formation and functional microorganism of Shaoxing mechanized Huangjiu[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2018.]
[34] 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(3): 304−311.
[35] 解铜. 绍兴地区传统黄酒的香气特征及其协同作用的研究[D]. 上海: 上海应用技术大学, 2021. [XIE T. Study on aroma characteristics and synergistic mechanism of traditional Huangjiu[D]. Shanghai: Shanghai Institute of Technology, 2021.]

韩亚宏, 郭元亨, 吴祺路, 等. 催化剂 ZIF-67 的制备及合成 D-阿洛酮糖的工艺优化 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 157−163. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110175

HAN Yahong, GUO Yuanheng, WU Qilu, et al. Preparation of Catalyst ZIF-67 and Optimize on the Synthesis of D-Allulose[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 157−163. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110175

· 工艺技术 ·

催化剂 ZIF-67 的制备及合成 D-阿洛酮糖的工艺优化

韩亚宏[1,2], 郭元亨[2,3,4,*], 吴祺路[2], 丁长河[1], 杨　凯[2], 钱承敬[2], 王小艳[1,2,3,4,*]

（1.河南工业大学粮油食品学院, 河南郑州 450001;
2.中粮营养健康研究院有限公司, 北京 102209;
3.中粮生物科技股份有限公司, 北京 100005;
4.吉林中粮生化有限公司玉米深加工国家工程研究中心, 吉林长春 130033）

摘　要: 为降低 D-阿洛酮糖的生产成本，本研究旨在开发一款易回收、可重复使用的 D-阿洛酮糖无机催化剂，并优化该催化剂生产 D-阿洛酮糖的工艺。本文利用 Co^{2+}和 2-甲基咪唑在水相中合成沸石咪唑酯骨架材料（Zeolitic imidazolate framework-67，ZIF-67），并对其进行表征；并以 pH（A）、催化温度（B）、催化时间（C）展开单因素实验；进一步采用响应面法对其催化工艺进行优化。ZIF-67 呈现菱形十二面体的结构，催化性能良好，Design Expert 13 预测最优反应条件为 pH11.1、温度 80.0 ℃、催化时间 11.2 min。此条件下，ZIF-67 催化活性为 1003.5 μmol·min^{-1}·g^{-1}。本文首次开发一款 D-阿洛酮糖无机催化剂 ZIF-67，并通过响应曲面较好地预测出 ZIF-67 合成 D-阿洛酮糖的最佳反应条件，也为 D-阿洛酮糖工业化生产开辟了新途径。

关键词: 沸石咪唑酯骨架材料（ZIF-67）, 无机催化剂, 响应曲面法, D-阿洛酮糖
中图分类号: TS202.1　　**文献标识码:** B　　**文章编号:** 1002−0306(2024)21−0157−07
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110175
本文网刊:

Preparation of Catalyst ZIF-67 and Optimize on the Synthesis of D-Allulose

HAN Yahong[1,2], GUO Yuanheng[2,3,4,*], WU Qilu[2], DING Changhe[1], YANG Kai[2], QIAN Chengjing[2], WANG Xiaoyan[1,2,3,4,*]

（1.College of Food Science and Technology, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China;
2.Nutrition & Health Research Institute, COFCO Corporation, Beijing 102209, China;
3.COFCO Biotechnology Co., Ltd., Beijing 100005, China;
4.National Engineering Research Center of Corn Deep Processing, Jilin COFCO Biochemistry Co., Ltd., Changchun 130033, China）

Abstract: To reduce the manufacturing cost of D-allulose, a recyclable and reusable inorganic catalyst was developed for D-allulose production, and process using this catalyst to produce D-allulose also was optimized in this article. Zeolitic imidazolate framework-67 (ZIF-67) was synthesized using Co^{2+} and 2-methylimidazole in aqueous phase. Then the structure of ZIF-67 was characterized. The single factor test was carried out to select suitable value of pH (A), catalytic temperature (B) and reaction time (C). Based on the results of single factor experiments, the catalytic process was optimized

收稿日期: 2023−11−20
基金项目: “十四五”国家重点研发计划重点专项-玉米淀粉及其多元化衍生物产品精细化加工成套技术开发（2021YFD2101002）。
作者简介: 韩亚宏（1999−）, 女, 硕士, 研究方向: 食品加工工程, E-mail: 604943104@QQ.com。
*** 通信作者:** 郭元亨（1984−）, 男, 博士, 高级工程师, 研究方向: 生化分离工程, E-mail: guoyuanheng@cofco.com。
王小艳（1980−）, 女, 博士, 正高级工程师, 研究方向: 合成生物学, E-mail: wangxiaoyan@cofco.com。

using response surface methodology. The results showed that ZIF-67 had a rhombic dodecahedral structure and exhibited excellent catalytic performance. The Design Expert 13 software predicted the optimal reaction condition was pH11.1, 80.0 ℃ and 11.2 min. Under these conditions, the catalytic activity of ZIF-67 was 1003.5 μmol·min^{-1}·g^{-1}. A D-allulose inorganic catalyst was developed and the optimal reaction condition was carried out using response surface methodology in this paper. It also opens up a new path for the industrial production of D-allulose.

Key words: zeolitic imidazolate framework-67 (ZIF-67); inorganic catalyst; response surface methodology; D-allulose

D-阿洛酮糖是自然存在的稀有糖，被认定为 GRAS 物质[1]，口感更接近蔗糖，甜度达到蔗糖的 70%，热量仅 0.4 kcal·g^{-1}[2]，具有改善食品风味[3]、降低血糖血脂[4−5] 以及保护神经[6] 等功效。随着国内外研究人员对 D-阿洛酮糖安全性做出的大量研究，对其许可使用的国家地区也逐年增多，使得 D-阿洛酮糖需求量也随之增大。目前，D-阿洛酮糖主要的人工制备方法是生物酶转化法，所需核心酶为 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶（D-allulose 3-epimerase，DAE）[7]，酶技术虽然具有高度专一性、反应条件温和、催化速率极快等优点，但也存在易失活、难回收、无法重复利用、反应结束后需要灭活处理、酶蛋白在反应体系中难以分离等不足之处。因此，合成一款抗逆性强、不易失活、反应结束后分离简单的无机催化剂是突破行业发展瓶颈的关键因素。

ZIF-67 是类沸石咪唑酯骨架（Zeolitic imidazolate frameworks，ZIFs）中的一种，属于多孔晶体材料[8]，结构类似于硅铝酸盐沸石[9]。ZIF-67 可在水相或有机相中合成[10−11]，操作简单，耗材量小，具备良好的催化作用[12−14]、热稳定性和化学稳定性[15−16]。通过控制合成工艺可调节 ZIF-67 的微观结构和平均粒径[17]，所制得的 ZIF-67 具有孔径可调[18−19]、结构稳定性高[20] 等特点。已有报道称 ZIF-67 可作为酶的固定化材料[21−24]，且可用于固定 DAE[25]。然而，研究人员却忽略了 ZIF-67 本身具有催化剂性能，导致 D-阿洛酮糖生产工艺中既未降低酶的发酵成本，又增加了 ZIF-67 的制作成本，其本质是同一功能（催化）的重复使用，并不能对产业发展提供实质性帮助。ZIF-67 作为无机催化剂，可直接催化 D-果糖合成 D-阿洛酮糖，节省了酶的成本，简化了 D-阿洛酮糖后续的分离纯化工作，有效地降低 D-阿洛酮糖总体生产成本。

本文制备水相无机催化剂 ZIF-67，催化 D-果糖转化为 D-阿洛酮糖。以响应曲面法优化 ZIF-67 的催化性能，同时进一步研究了 ZIF-67 的反应动力学和 D-阿洛酮糖的转化率，为阿洛酮糖行业的发展提供了新方法。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

六水合硝酸钴、2-甲基咪唑、磷酸、氢氧化钠、D-果糖　均为分析纯，国药集团化学试剂有限公司；所有高效液相色谱检测涉及溶剂均为色谱纯。

Integral 10/5 纯水/超纯水一体化系统　德国默克集团；1260 Infinity 高效液相色谱仪　配有示差折光检测器（RID）及 CS 色谱数据处理系统，安捷伦科技有限公司；SS-550 扫描电子显微镜　苏州普今生物科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 水相 ZIF-67 制备　将 2 mL 0.04 mol/L 六水合硝酸钴溶液置于烧杯中，搅拌充分，缓慢加入等体积的超纯水，充分混匀。继续缓慢加入 2 mL 1.2 mol/L 2-甲基咪唑溶液，混匀后，持续搅拌 2 h，再静置 4 h。将所得液体 6000 r/min 离心 20 min，并水洗三次，弃上清，冻干 24 h，得到 ZIF-67 粉末。

1.2.2 扫描电子显微镜分析　通过扫描电子显微镜（SEM）观察 ZIF-67 材料的形貌结构，对 ZIF-67 的微观结构进行表征。

1.2.3 D-阿洛酮糖检测方法　配制 250 mL 的 10.00 mg/mL D-阿洛酮糖标准液，依次稀释成浓度为 8.00、6.00、4.00、2.00、1.00、0.50、0.25 mg/mL 的 D-阿洛酮糖溶液，高效液相色谱法（HPLC）测定峰面积，并绘制标准曲线。检测 D-阿洛酮糖色谱条件如下：色谱柱为 Waters sugar-PakI（6.5 mm×300 mm，10 μm），进样量为 10 μL，柱温为 80 ℃，RID 检测温度为 55 ℃，流动相为纯水，流速为 0.4 mL/min，D-阿洛酮糖出峰时间为 22 min。

绘制标准曲线，所得回归方程见式（1），R^2=0.9999。

$$Y = 202978.81X \quad \text{式（1）}$$

式中：Y 表示 D-阿洛酮糖峰面积；X 表示 D-阿洛酮糖质量浓度，mg/mL。

1.2.4 ZIF-67 的催化活性测定　80 ℃ 的反应条件下，1 g ZIF-67 在 1 min 内将底物转化为产物的数量定义为 1 个催化活性单位（μmol·min^{-1}·g^{-1}）。制备 300 g/L D-果糖溶液，氢氧化钠溶液调节 pH11.0。取待测 ZIF-67 粉末 0.1 g，加入果糖溶液 4.9 mL，80 ℃ 反应 10 min。HPLC 检测 D-阿洛酮糖生成量。根据前述定义计算待测样品的催化活性，其催化活性按式（2）和式（3）计算。

$$m(mg) = V_1 \times k \times \frac{Y}{a} \quad \text{式（2）}$$

式中：m 表示催化反应中生成的 D-阿洛酮糖的质量，mg；V_1 表示总体积（ZIF-67 用量+底物），mL；k 表示高效液相色谱检测时溶液稀释倍数；Y 表示 D-阿洛酮糖峰面积；a 表示常数。

$$E(\mu mol\cdot min^{-1}\cdot g^{-1}) = \frac{n\times m\times 1000}{M\times t\times m_0} \qquad 式（3）$$

式中：E 表示 ZIF-67 的催化活性，μmol·min^{-1}·g^{-1}；n 表示稀释倍数；m 表示催化反应中生成的 D-阿洛酮糖的质量，mg；M 表示 D-阿洛酮糖的摩尔质量，g/mol；t 表示反应时间，min；m_0 表示催化反应中 ZIF-67 质量，mg。

1.2.5　单因素实验　为了研究反应条件 pH 对 ZIF-67 无机催化活性的影响，使用氢氧化钠溶液和磷酸缓冲溶液调节反应液的 pH，分别在 pH 为 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 的条件下，55 ℃ 反应 60 min，之后进行 HPLC 检测 D-阿洛酮糖的生成量，计算 ZIF-67 的催化活性；为研究反应条件温度对 ZIF-67 无机催化活性的影响，分别于温度为 30、40、50、60、70、80、90、100 ℃ 的条件下，pH11 时反应 60 min，计算 ZIF-67 的催化活性；为研究反应条件时间对 ZIF-67 无机催化活性的影响，分别置于 pH11、温度 80 ℃ 条件下反应 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60 min，计算 ZIF-67 的催化活性。

1.2.6　响应面试验　依据单因素实验结果进行 Box-Behnken Design（BBD）中心组合试验设计，以 pH（A）、温度（B）、时间（C）三个因素为变量，ZIF-67 催化活性 Y（μmol·min^{-1}·g^{-1}）为其响应值，设计 3 因素 3 水平试验。BBD 中心组合试验设计因素和水平详见表 1。按优化后得到最佳反应条件进行催化反应，并计算其催化活性。

表 1　BBD 中心组合设计因素和水平

Table 1　Factors and levels of BBD center combination design

因素	变量	水平		
		−1	0	+1
A	pH	10	11	12
B	温度（℃）	70	80	90
C	时间（min）	5	10	15

1.2.7　ZIF-67 的反应动力学　以 D-果糖（浓度为 60~270 g/L）为底物，在最适条件下进行催化反应，研究 ZIF-67 的反应动力学。根据 Lineweaver-Burk 双倒数法计算 ZIF-67 的反应动力学参数：v_{max}（最大反应速度）、K_m（米氏常数）。

1.2.8　催化 D-果糖转化为 D-阿洛酮糖的平衡转化率　为了研究 ZIF-67 无机催化的平衡转化率，在温度为 30~100 ℃ 时，以 300 g/L D-果糖为底物，pH11 的条件下催化反应 2 h，进行 HPLC 检测 D-阿洛酮糖的转化率。以 D-果糖为底物，催化反应达到平衡时所产生的 D-阿洛酮糖占溶液中干物质的百分比，记为其平衡转化率。

1.2.9　ZIF-67 的操作稳定性　以 300 g/L D-果糖为底物，在最适条件下进行催化反应，反应后离心回收 ZIF-67，多批次重复催化。HPLC 检测并计算其催化活性。以第一次测得催化活性为 100%，重复使用后的催化活性与之相比，计算其相对催化活性，以百分数表示。

1.3　数据处理

每组实验设置 3 个平行，响应面试验数据使用 Design Expert 13 软件进行处理，其他数据图表均使用 Origin 2021 软件处理。

2　结果与分析

2.1　SEM 结果

从图 1A 放大 10000 倍的扫描电镜结果中发现，ZIF-67 呈现出菱形十二面体的形态，有两个对称顶点，且共享三个等边平面，ZIF-67 形态结构规则、均一。此外，ZIF-67 粒径进行正态检验，P>0.05，表明粒径数据符合正态分布。ZIF-67 平均粒径约为 0.47 μm，说明其比表面积大，催化速率快；其标准差为 0.09，分散程度集中，正态分布曲线较为陡峭，如图 1B 所示。

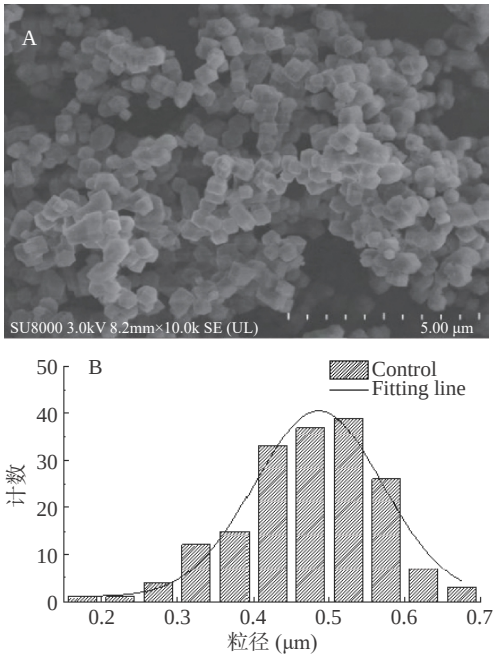


图 1　ZIF-67 的 SEM（A）和晶粒大小分布图（B）

Fig.1　SEM (A) and grain size (B) images of ZIF-67

2.2　单因素实验结果

如图 2A，pH 在 3~12 范围内，ZIF-67 的催化活性随着 pH 的增大而呈现先缓慢升高后快速降低的趋势，当 pH11 时，ZIF-67 的催化活性最高。当 pH 低于 11 时，ZIF-67 催化活性缓慢升高的原因是 ZIF-67 在酸性环境中表面被酸腐蚀，部分 Co^{2+} 溶解，导致结构不稳定，催化效率低。另外，D-果糖在稀酸条件下相当稳定，不易发生反应。当 pH 高于 11 时，强碱环境使 ZIF-67 的结构稳定，但也能消耗底物产生大量的副产物，使含有羰基的果糖转化为含有醛基的葡萄糖和甘露糖，增加了底物的损耗和减少了 D-阿洛酮糖的生产。

如图 2B 所示，80 ℃ 进行 ZIF-67 催化反应时，ZIF-67 的催化活性最高。当温度在 30~80 ℃ 时，

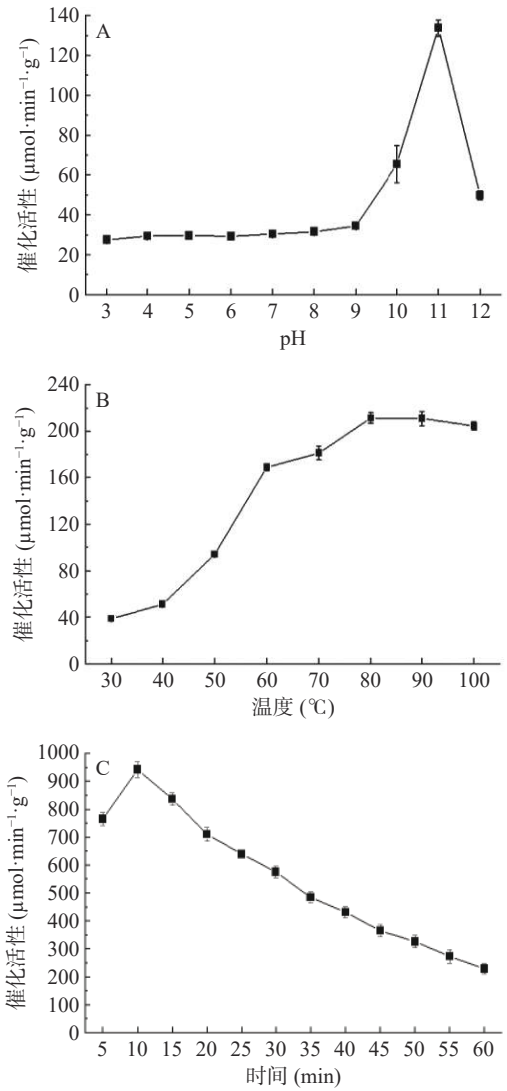


图 2 pH(A)、温度(B)、时间(C)对 ZIF-67 催化活性的影响

Fig.2 Effects of pH (A), temperature (B), time (C) on catalytic activity of ZIF-67

ZIF-67 的催化活性随着催化温度的升高而升高，这是由于增大催化反应温度，能加快催化反应效率。当温度超过 80 ℃ 时，随着催化温度的升高，催化反应加快进行而达到平衡状态，D-阿洛酮糖的含量不变，ZIF-67 的催化活性趋于平稳状态。但高温易使 D-果糖发生非酶褐变反应，且在碱性环境中还会加速褐变反应，致使溶液变色。

当催化反应 10 min 时，ZIF-67 的催化活性最高，如图 2C 所示。在催化反应的最初阶段，随着时间增加至 10 min 时，ZIF-67 的催化活性呈现快速升高的趋势。在催化反应时间 10~60 min 范围内，ZIF-67 的催化活性逐渐降低，这是由于随着时间的增加，底物产生大量葡萄糖等副产物而损耗，D-阿洛酮糖的产量减少，ZIF-67 的催化能力降低。

因此，本研究选择 pH11、温度 80 ℃、反应 10 min 继续优化，进行响应面法分析。

2.3 响应面设计与分析

2.3.1 BBD 中心组合试验设计与结果分析 在单因素实验结果的基础上，以 pH(A)、温度(B)、时间(C)三个因素为变量，催化活性 Y(μmol·min^{-1}·g^{-1})为其响应值，试验结果见表 2。使用 Design Expert 13 软件进行响应面分析，得到多元二次响应面回归拟合方程如下。

$$Y=-84617.748+12357.301A+337.217B+668.852C-9.615AB-31.600AC-3.039BC-507.467A^2-1.230B^2-3.402C^2$$

表 2 响应面试验结果

Table 2 Results of response surface experiment

试验号	A pH	B温度(℃)	C时间(min)	Y催化活性(μmol·min^{-1}·g^{-1})
1	10	70	10	115.4
2	12	70	10	557.1
3	10	90	10	358.3
4	12	90	10	415.4
5	10	80	5	117.7
6	12	80	5	615.6
7	10	80	15	499.5
8	12	80	15	365.4
9	11	70	5	504.9
10	11	90	5	926.1
11	11	70	15	945.7
12	11	90	15	759.2
13	11	80	10	922.0
14	11	80	10	1016.0
15	11	80	10	1037.0
16	11	80	10	959.2
17	11	80	10	1026.1

回归模型方差分析结果见表 3。模型 $P<0.0001$，失拟项 $P=0.4918>0.05$，模型在 $\alpha=0.01$ 的水平上回归显著，失拟项不显著，说明模型选择正确，该拟合度良好，可以利用该模型进行后续优化实验[26−28]。模型中，A、AB、AC、BC、A^2、B^2、C^2 对 Y 值影响极显著，其他两项 B、C 对 Y 值影响显著，最后得到影响 ZIF-67 催化活性的因素顺序为：pH>反应时间>反应温度。模型 $F=74.03$，$P<0.0001$，

表 3 BBD 试验回归模型方差分析结果

Table 3 Analysis of variance results of BBD experimental regression model

来源	平方和	自由度	均方和	F值	P值	显著性
模型	1.597E+06	9	1.774E+05	74.03	<0.0001	极显著
A	93009.84	1	93009.84	38.81	0.0004	**
B	14103.60	1	14103.60	5.88	0.0457	*
C	20553.78	1	20553.78	8.58	0.0221	*
AB	36979.29	1	36979.29	15.43	0.0057	**
AC	99856.00	1	99856.00	41.66	0.0003	**
BC	92324.82	1	92324.82	38.52	0.0004	**
A^2	1.084E+06	1	1.084E+06	452.42	<0.0001	**
B^2	63745.08	1	63745.08	26.60	0.0013	**
C^2	30451.48	1	30451.48	12.71	0.0092	**
残差	16776.70	7	2396.67			
失拟项	7037.07	3	2345.69	0.9634	0.4918	不显著
净误差	9739.63	4	2434.91			
总和	1.614E+06	16				

注：**表示影响极显著，$P<0.01$；*表示影响显著，$P<0.05$。

R^2=0.9896，R^2_{Adj}=0.9762，且 R^2_{Adj} 与 R^2_{Pred} 的差值小于 0.2，则回归模型对催化工艺解释充分。C.V.= 7.47%，精密度为 24.21，数值均在合理范围内，表明试验的可信度和精确度高，试验设计合理[29]。整体分析，回归模型表明 ZIF-67 催化活性的实测值与预测值之间具有较好的拟合度，该模型能真实地反映试验结果，可信度较高，可用于实际 ZIF-67 催化活性的预测与分析。

2.3.2　两因素交互对 ZIF-67 催化活性的影响　对 3 种因素进行响应曲面和等高线图分析，两因素交互作用对 ZIF-67 催化活性的影响如图 3 所示。

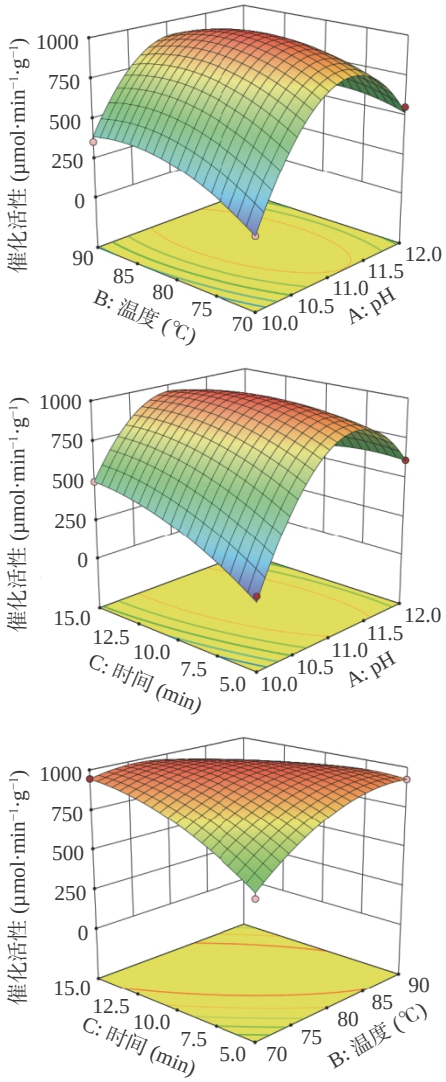


图 3　两两因素交互作用对 ZIF-67 催化活性影响的响应曲面

Fig.3　Response surface plot showing the interaction effect of various factors on catalytic activity of ZIF-67

由图 3 可知，当反应时间处于中心水平，pH 较高时，随着反应温度的增加，ZIF-67 的催化活性先升高后降低，且存在极大值点，反之亦然。这是由于 ZIF-67 耐高温，结构稳定，在 80 ℃ 反应条件下能将 D-果糖催化为 D-阿洛酮糖。同理可得，当反应温度处于中心水平，反应时间较低时，ZIF-67 的催化活性随着 pH 增加而呈现出先上升后下降的变化趋势，这均与单因素结果一致。此外，图 3 响应曲面的等高线均为椭圆，两因素之间的交互作用显著[30]。同时，pH 和反应时间的响应曲面的倾斜程度较大，说明了其对 ZIF-67 催化活性的影响程度也较大，反应温度和反应时间的次之，这与方差分析结果一致。

2.3.3　响应面模型验证实验　利用软件多元二次回归拟合方程求解，pH11.1，反应温度 80.0 ℃，反应条件 11.2 min 为 ZIF-67 的最佳反应条件，模型理论 ZIF-67 催化活性最高为 1001.7 μmol·min^{-1}·g^{-1}。在此条件下进行模型验证实验，利用上述最佳反应条件进行 3 次平行验证，计算得到实际 ZIF-67 的催化活性为 1003.5 μmol·min^{-1}·g^{-1}，相对误差仅为 0.18%。

2.4　ZIF-67 的反应动力学

本研究还测定了 ZIF-67 在不同底物浓度条件下的初始反应速率 v_0，在最适条件下进行催化反应。以底物浓度的倒数为横坐标作图，结果详见图 4，通过计算得出：v_{max} 为 0.31 μmol·min^{-1}·g^{-1}、K_m 值为 266.80 mmol/L。K_m 值越小，表明 ZIF-67 与 D-阿洛酮糖的亲和力越强。对于部分酮糖 3-差向异构酶（如 *Desmospora* sp. DPEase[31] 的 K_m 值为 549 mmol/L）来说，ZIF-67 的 K_m 值相对较小，说明其与 D-阿洛酮糖的亲和力较强。

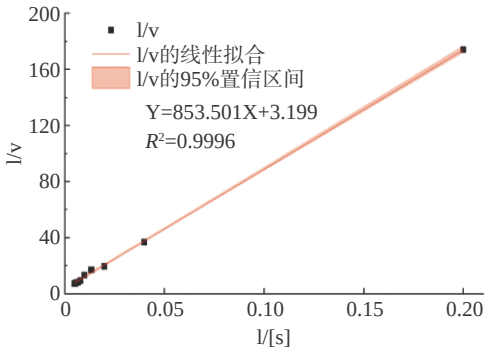


图 4　双倒数作图结果

Fig.4　Result of double reciprocal plot

2.5　D-阿洛酮糖的平衡转化率

为了测定 D-果糖与 D-阿洛酮糖的平衡转化率，以 300 g/L D-果糖为底物，在 pH11 条件下进行催化反应 2 h，测定 D-阿洛酮糖的转化率最高为 18.8%，

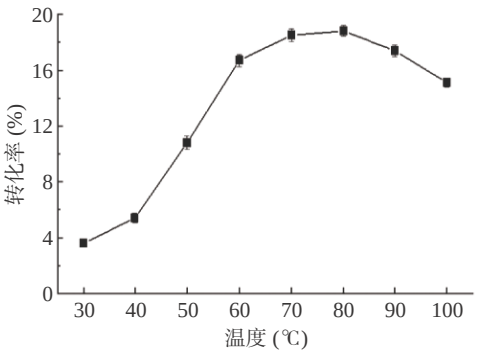


图 5　不同温度下 D-阿洛酮糖的平衡转化率

Fig.5　Bioconversion rate of D-allulose at different tempertures

结果如图 5 所示。在不同温度下检测 D-阿洛酮糖的转化率范围为 3.6%~18.8%, ZIF-67 的转化率受温度影响较大。

2.6 ZIF-67 的操作稳定性

杨家明[25]将 ZIF-67 用于 DAE 的固定化研究, 当 65 ℃ 反应 5 次时, 仅维持 56% 的催化活性, 除了部分酶的失活及损失外, 还需考虑 ZIF-67 本身催化作用的影响。本研究以 300 g/L D-果糖为底物, 在最适条件下进行连续催化反应, 第 5 次使用时, ZIF-67 的相对催化活性仍高于 60%, 表明 ZIF-67 具有良好的操作稳定性, 且易回收, 结果如图 6 所示。

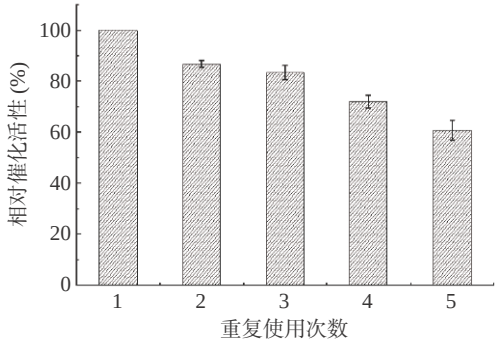


图 6 ZIF-67 的操作稳定性

Fig.6 Operational stability of ZIF-67

3 结论

本文首次开发了一款水相合成的易回收的 ZIF-67 催化剂, 基于单因素实验, 利用响应曲面法分析得到 ZIF-67 的最适催化条件为 pH11.1、催化温度 80.0 ℃、催化时间 11.2 min, 其最大催化活性为 1003.5 μmol·min^{-1}·g^{-1}。进一步研究了 ZIF-67 的反应动力学和 D-阿洛酮糖的平衡转化率, ZIF-67 的 K_m 值较小, 表明 ZIF-67 与 D-阿洛酮糖的亲和力较强, 而且 D-阿洛酮糖的转化率高达 18.8%。研究结果对淀粉糖产业链中 D-阿洛酮糖的工业化生产具有重大意义, 有效地降低 D-阿洛酮糖总体生产成本, 为 D-阿洛酮糖工业化生产开拓了新方法。

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

参考文献

[1] ZHU Z L, LI L, ZHANG W, et al. Improving the enzyme property of D-allulose 3-epimerase from a thermophilic organism of *Halanaerobium congolense* through rational design[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2021, 149: 109850.

[2] 卫娜, 韩诗蕾. 低热量甜味剂阿洛酮糖的生理功效研究进展[J]. 现代食品, 2021(17): 26−28. [WEI N, HAN S L. Researches progress on the physiological functions of low-calorie sweetener allulose[J]. Modern Food, 2021(17): 26−28.]

[3] BOLGER A M, RASTALL R A, ORUNA-CONCHA M J, et al. Effect of D-allulose, in comparison to sucrose and D-fructose, on the physical properties of cupcakes[J]. LWT, 2021, 150: 111989.

[4] 温宇威, 张涛, 沐万孟, 等. D-阿洛酮糖 3-差向异构酶的异源表达和酶学性质[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(3): 286−289. [WEN Y W, ZHANG T, MU W M, et al. Heterologous expression and enzymatic characterization of D-psicose 3-epimerase[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2018, 37(3): 286−289.]

[5] KIMURA T, KANASAKI A, HAYASHI N, et al. D-allulose enhances postprandial fat oxidation in healthy humans[J]. Nutrition, 2017, 43-44: 16−20.

[6] 谢来超. D-阿洛酮糖的理化特性及研究进展[J]. 饮料工业, 2022, 25(6): 71−77. [XIE L C. Physicochemical properties and research development of D-psicose[J]. Beverage Industry, 2022, 25(6): 71−77.]

[7] IZUMORI K. Izumoring: A strategy for bioproduction of all hexoses[J]. Journal of Biotechnology, 2006, 124(4): 717−722.

[8] BANERJEE R, PHAN A, WANG B, et al. High-throughput synthesis of zeolitic imidazolate frameworks and application to CO_2 capture[J]. Science, 2008, 319(5865): 939.

[9] SHOMAL R, DU W, SULAIMAN A. Immobilization of lipase on metal-organic frameworks for biodiesel production[J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2022, 10(2): 107265.

[10] YANG H M, WANG S C, LIU Y X, et al. ZIF-67 grows in chitosan-rGO hydrogel beads for efficient adsorption of tetracycline and norfloxacin[J]. Separation and Purification Technology, 2024, 330: 125208.

[11] LI Y, ZHOU K, HE M, et al. Synthesis of ZIF-8 and ZIF-67 using mixed-base and their dye adsorption[J]. Microporous and Mesoporous Materials, 2016, 234: 287−292.

[12] REDDY B V, DADHICH A S, BABU M S. Rapid room temperature synthesis and CO_2 uptake performance of nanocrystalline ZIF-67 and Ni@ZIF-67[J]. Inorganic Chemistry Communications, 2023, 150: 110455.

[13] ZHAO Z J, DING L, RICHARD H, et al. MXene assisted preparation of well-intergrown ZIF-67 membrane for helium separation[J]. Journal of Membrane Science, 2022, 652: 120432.

[14] DYMERSKA A G, ŚRODA B, ZIELIŃSKA B, et al. *In situ* insight into the low-temperature promotion of ZIF-67 in electrocatalytic oxygen evolution reaction[J]. Materials & Design, 2023, 226: 111637.

[15] 侯俊英, 侯传源, 李建昌, 等. 石蜡/ZIF-8@ZIF-67 定形相变材料的储热性能[J]. 农业工程学报, 2023, 39(13): 222−229. [HOU J Y, HOU C Y, LI J C, et al. Thermal storage properties of paraffin/ZIF-8@ZIF-67 shape-stable phase change materials[J]. Tran-sactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2023, 39(13): 222−229.]

[16] LI W J, LI Y M, REN H, et al. Improving the bioactivity and stability of embedded enzymes by covalent organic frameworks[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2023, 15(37): 43580−43590.

[17] CHEN B L, YANG Z X, ZHU Y Q, et al. Zeolitic imidazolate framework materials: Recent progress in synthesis and applications[J]. Journal of Materials Chemistry A, 2014, 2(40): 16811−16831.

[18] SUN X X, ZHOU N R, LIU M M. Adsorption desulfurization over porous carbons derived from ZIF-67 and AC[J]. Journal of Solid State Chemistry, 2023, 322: 123985.

[19] 赵娅敏, 孙乐乐, 刘倩, 等. MWCNTs/ZIF-67 复合材料的制备及其催化性能研究[J]. 化工新型材料, 2023, 51(4): 126−130. [ZHAO Y M, SUN L L, LUI Q, et al. Preparation and catalytic property of MWCNTs/ZIF-67 composite[J]. New Chemical Materials, 2023, 51(4): 126−130.]

［20］ 申学建. 谷胱甘肽/酶/ZIF-67 杂化纳米催化剂的制备及其催化性能的研究[D]. 天津：天津科技大学, 2022. ［SHEN X J. Glutathione/enzyme/ZIF-67 preparation of hybrid nanocatalyst and study on its catalytic properties[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2022.］
［21］ RAFIEI S, TANGESTANINEJAD S, HORCAJADA P, et al. Efficient biodiesel production using a lipase@ZIF-67 nanobioreactor[J]. Chemical Engineering Journal, 2018, 334: 1233−1241.
［22］ MA W J, JIANG Q, YU P, et al. Zeolitic imidazolate framework-based electrochemical biosensor for *in vivo* electrochemical measurements[J]. Analytical Chemistry, 2013, 85(15): 7550−7556.
［23］ LIANG K, RICCO R, DOHERTY C M, et al. Biomimetic mineralization of metal-organic frameworks as protective coatings for biomacromolecules[J]. Nature Communications, 2015, 6(1): 7240.
［24］ WANF Z B, REN D J, YU H Y, et al. Study on improving the stability of adsorption-encapsulation immobilized Laccase@ZIF-67[J]. Biotechnology Reports, 2020, 28: e00553.
［25］ 杨家明. D-阿洛酮糖 3-差向异构酶的表达、性质鉴定与初步应用研究[D]. 广州：华南理工大学, 2022. ［YANG J M. Expression, characterization and primary application of D-allulose 3-epimerase[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2022.］
［26］ LIU Y Y, SUN Y, LI H L, et al. Optimization of ultrasonic extraction of polysaccharides from *Flammulina velutipes* residue and its protective effect against heavy metal toxicity[J]. Industrial Crops Products, 2022, 187: 115422.
［27］ SARFARAZI M, JAFARI S M, RAJABZADEH G, et al. Development of an environmentally-friendly solvent-free extraction of saffron bioactives using subcritical water[J]. LWT, 2019, 114: 108428.
［28］ FAVIER L, SIMION A, HLIHOR R M, et al. Intensification of the photodegradation efficiency of an emergent water pollutant through process conditions optimization by means of response surface methodology[J]. Journal of Environmental Management, 2023, 328: 116928.
［29］ MIAO J N, SHI W, ZHANG J Q, et al. Response surface methodology for the fermentation of polysaccharides from *Auricularia auricula* using *Trichoderma viride* and their antioxidant activities[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 155: 393−402.
［30］ ZHAO Z Y, BERMUDEZ S C, ILYAS A, et al. Optimization of negatively charged polysulfone membranes for concentration and purification of extracellular polysaccharides from *Arthrospira platensis* using the response surface methodology[J]. Separation and Purification Technology, 2020, 252: 117385.
［31］ 何伟伟. D-阿洛酮糖 3-差向异构酶在枯草芽孢杆菌中的高效表达及应用研究[D]. 无锡：江南大学, 2016. ［HE W W. Efficient expression of D-psicose 3-epimerase in *Bacillus subtilis* and its application[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2016.］

康桥, 孙越, 刘梦瑶, 等. 金铃子果皮多糖超声辅助提取工艺优化及其抗氧化和降糖活性研究 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 164−173. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023120028
KANG Qiao, SUN Yue, LIU Mengyao, et al. Optimization of the Ultrasonic-assisted Extraction Process of Polysaccharides from the Peels of Wild Bitter Melon (*Momordica charantia* Linn. Var. *Abbreviata* Ser.) and a Preliminary Study on Their Antioxidant and Hypoglycemic Activities[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 164−173. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023120028

· 工艺技术 ·

金铃子果皮多糖超声辅助提取工艺优化及其抗氧化和降糖活性研究

康　桥[1,2,3], 孙　越[2,3], 刘梦瑶[2,3], 赵保龙[2,3], 李贺贺[2,3], 王柏文[2,3], 赵东瑞[2,3], 孙宝国[1,2,3,*], 孙金沅[2,3,*]
（1.北京工商大学食品与健康学院, 北京 100048;
2.老年营养与健康教育部重点实验室, 北京 100048;
3.北京食品营养与人类健康高精尖创新中心, 北京 100048）

摘　要: 本研究拟探究金铃子多糖的提取工艺、理化性质、抗氧化和降糖活性。以新鲜金铃子果实的果皮为原料, 基于单因素实验结果, 对超声辅助提取（UAE）过程中的液料比、超声时间和超声功率进行 Box-Behnken 响应面优化, 并以最佳条件进行超声萃取。分级醇沉得到两个多糖组分 WBP50 和 WBP75, 对其理化性质、体外抗氧化和降血糖能力进行评价。结果表明: 在液料比 16 mL/g, 超声时间 16 min, 超声功率 312 W 的条件下, 金铃子粗多糖实际得率 8.33%±0.13%; WBP50 和 WBP75 的总糖、蛋白质、总酚、总黄酮和糖醛酸含量分别为 76.73%/73.38%、4.78%/0.35%、0.36%/0.25%、2.06%/0.86% 和 72.85%/49.58%; WBP50 和 WBP75 平均分子量分别为 27.59 kDa 和 23.20 kDa, 主要由半乳糖醛酸、半乳糖、鼠李糖、阿拉伯糖、葡萄糖组成; 两种金铃子多糖对 DPPH、$ABTS^{+}$和羟基自由基的清除能力分别为 11.28/11.40 μg Trolox/mg、40.87/44.42 μg Trolox/mg 和 52.47/99.89 U/mg。在降血糖方面, WBP50 和 WBP75 都具有一定的 α-淀粉酶活性抑制能力和较强的 α-葡萄糖苷酶活性抑制能力, 在浓度 750 μg/mL 时对 α-葡萄糖苷酶的抑制率可高达 93.34%±1.11% 和 79.04%±0.76%。超声辅助提取金铃子多糖的工艺具有省时方便、高效率耗能低的优点, 且所提取的金铃子多糖具有天然的抗氧降糖功能活性, 本研究为未来金铃子多糖的结构解析及功能活性作用机制研究奠定基础, 为金铃子多糖的降糖产品开发及高值化利用提供理论参考。

关键词: 金铃子, 多糖, 响应面试验, 抗氧化活性, α-葡萄糖苷酶
中图分类号: TS201.1　　**文献标识码:** B　　**文章编号:** 1002−0306(2024)21−0164−10
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023120028
本文网刊:

Optimization of the Ultrasonic-assisted Extraction Process of Polysaccharides from the Peels of Wild Bitter Melon (*Momordica charantia* Linn. Var. *Abbreviata* Ser.) and a Preliminary Study on Their Antioxidant and Hypoglycemic Activities

KANG Qiao[1,2,3], SUN Yue[2,3], LIU Mengyao[2,3], ZHAO Baolong[2,3], LI Hehe[2,3], WANG Bowen[2,3], ZHAO Dongrui[2,3], SUN Baoguo[1,2,3,*], SUN Jinyuan[2,3,*]
（1.School of Food and Health, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China;
2.Key Laboratory of Geriatric Nutrition and Health, Ministry of Education, Beijing 100048, China;
3.Beijing Advanced Innovation Center for Food Nutrition and Human Health, Beijing 100048, China）

收稿日期: 2023−12−08
基金项目: 国家重点研发计划项目（2022YFF0606800）。
作者简介: 康桥（1993−）, 女, 博士, 研究方向: 多糖功能活性研究, E-mail: conniekangqiao@hotmail.com。
*** 通信作者:** 孙宝国（1961−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 白酒风味化学, E-mail: sunbg@btbu.edu.cn。
孙金沅（1983−）, 女, 博士, 研究员, 研究方向: 白酒风味化学, E-mail: sunjinyuan@btbu.edu.cn。

Abstract: This study intends to explore the extraction process, physical and chemical properties, antioxidant and hypoglycemic activities of polysaccharides from wild bitter melon (WBM). Using the peel of fresh WBM fruit as raw material, based on the single factor experimental results, the liquid-to-material ratio, ultrasonic time and ultrasonic power in the ultrasound-assisted extraction (UAE) process were optimized by Box-Behnken response surface. Two polysaccharide components of WBP50 and WBP75 were obtained through UAE of the optimal conditions and gradient alcohol precipitation, and their physical and chemical properties, *in vitro* antioxidant and hypoglycemic abilities were evaluated. The results showed that: under the conditions of liquid-to-material ratio of 16 mL/g, ultrasonic time of 16 min, and ultrasonic power of 312 W, the actual yield of crude WBM polysaccharide (WBP) was 8.33%±0.13%. The total sugar, protein, total phenols, total flavonoids, and uronic acid contents of WBP50 and WBP75 were 76.73%/73.38%, 4.78%/0.35%, 0.36%/0.25%, 2.06%/0.86% and 72.85%/49.58%, respectively. The average molecular weights were 27.59 kDa and 23.20 kDa, respectively. WBPs were mainly composed of galacturonic acid, galactose, rhamnose, arabinose, and glucose. The DPPH, $ABTS^+$ and hydroxyl radicals scavenging abilities of WBP50 and WBP75 were 11.28/11.40 μg Trolox/mg, 40.87/44.42 μg Trolox/mg, and 52.47/99.89 U/mg, respectively. Regarding hypoglycemic ability, both WBPs had certain *α*-amylase inhibitory ability and strong *α*-glucosidase inhibitory ability. The *α*-glucosidase inhibition rate of WBP50 and WBP75 reached 93.34%±1.11% and 79.04%±0.76% at a concentration of 750 μg/mL. The UAE of WBP has the advantages of time saving, convenience, high efficiency and low energy consumption, and the extracted WBPs have natural antioxidant and hypoglycemic functional activities. This study lays the foundation for future structural analysis and functional mechanism research of WBPs and provides theoretical references for developing hypoglycemic products and high-value utilization of WBPs.

Key words: wild bitter melon; polysaccharide; response surface test; antioxidant activity; *α*-glucosidase

随着经济水平的提高，人们的饮食结构发生改变，不健康的饮食方式也愈发普遍，由此引起了高脂血症、糖尿病、脂肪肝、肥胖、动脉硬化性心脑血管病等一系列慢性疾病[1]。我国目前 18 岁及以上居民出现胰岛素抵抗等糖尿病前期征兆的比率为 13.4%，糖尿病患病率为 11.9%[2−3]。糖代谢紊乱的主要诱因是肥胖和高脂饮食等非先天性因素，相较于药物，食疗具有安全性高、取材便利等优势。许多药食同源类的植物具有良好的调节血糖的功能，如绿茶、芦荟等，而苦瓜更是家喻户晓的一种天然降糖食材[4−5]。

金铃子（*Momordica charantia* L. Var. *Abbreviata* Ser），俗名癞葡萄或山苦瓜，为苦瓜的变种，与苦瓜的生物遗传相似性在 80%~98%[6]，在东亚和东南亚各国均有种植，于明清时期传入我国[7]，由于其独特的外形与果穰清甜的味道深受大众喜爱。研究发现，金铃子整果或其有机溶剂提取物具有较强的降血糖和改善糖脂紊乱的功能[8−10]。饮食中加入金铃子可有效增强败血症小鼠的脂肪代谢，改善血糖，并减轻小鼠的炎症压力[8]。Wu 等[10] 的研究发现金铃子的水提物与醇提物具有 DPPH 自由基清除能力与铁螯合能力。但目前对金铃子的研究中缺乏对其具体功能成分的提取分离、结构解析及功能探究。多糖是广泛存在于植物细胞中的天然功能成分，苦瓜多糖具有调节糖代谢紊乱的功能活性[11]，而针对金铃子多糖的提取工艺与活性研究却鲜有报道。金铃子的主要部分黄色果皮虽有较强的功能活性却味苦无法食用，因此探究并提取其果皮的多糖可以有助于提升金铃子的食用和药用价值。

超声波辅助提取法具有简单省时、耗能低的优势，在植物多糖及其他功能成分提取方面应用广泛[12]。目前尚无关于金铃子多糖的制备工艺条件的研究报道。参考苦瓜多糖的制备，新鲜苦瓜作为原料相较于干粉的多糖提取率更高[13]，并且有利于多糖的规模化生产[14]。因此，本文通过响应面法对超声辅助提取金铃子多糖的各参数进行工艺优化，首次探究了金铃子多糖的体外抗氧化及降血糖活性，以期为金铃子的高值化利用及降糖产品开发提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

金铃子果实　青岛琅琊台集团股份有限公司，采收于 2022 年 11 月，完全成熟时开始提取；苯酚、硫酸、乙醇、甲醇、乙腈、三氯甲烷、正丁醇、N,N-二甲基甲酰胺、1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮（PMP）、三氟乙酸（TFA）　均为分析纯，国药集团化学试剂有限公司；单糖标准品　上海麦克林生化科技股份有限公司；葡聚糖标品（分子量为 3620、12600、30200、63300、126000、287000、496000 Da）、氨基磺酸、氢氧化钾、咔唑、氯化钠、溴化钾　Sigma-Aldrich 公司；BCA 蛋白浓度测定试剂盒　北京索莱宝科技有限公司；总黄酮试剂盒、总酚试剂盒　上海碧云天生物技术有限公司；DPPH 试剂盒、ABTS 试剂盒、羟基自由基试剂盒　南京建成生物科技有限公司；*α*-淀粉酶（14 U/mg）、可溶性淀粉、3,5-二硝基水杨酸（DNS）、阿卡波糖、*α*-葡萄糖苷酶（50 U/mg）、硝基苯酚吡喃葡萄糖苷（PNPG）　上海源叶生物科技有限公司。

XH-300A 电脑微波超声波组合合成萃取仪　北京祥鹄科技发展有限公司；FD-1B-80 冷冻干燥机　南京普森仪器设备有限公司；IKA T18 digital ULTRA-TURRAX 数显型高速分散机　德国 IKA 有限公司；

RE-52AA 旋转蒸发仪　上海亚荣生化仪器厂; UV-2700 紫外分光光度计、LC-20AD 型液相色谱、BL-2200 H 电子分析天平　岛津(上海)实验器材有限公司; Nicolet 6700 傅里叶红外光谱仪(FT-IR)　美国热电 Fisher 科技有限公司; SpectraMax M2e 多功能酶标仪　美国 Molecular Devices 公司; 1260 Infinity II 高效液相色谱-示差折光仪　安捷伦科技(中国)有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　金铃子粗多糖制备　为后期计算金铃子多糖的提取率, 首先参考 Yang 等[13] 的方法检测金铃子干重率, 取少量黄色果皮称重, 放入烘箱中恒温 105 ℃烘干 6 h, 至重量稳定不变后称重, 计算其干重率。

将金铃子黄色果皮切块, 加入纯水后均质, 超声提取多糖, 离心(10000 r/min, 15 min)后将上清液旋蒸浓缩, 冷却至室温, 加入分析级乙醇至 75% ABV, 4 ℃过夜静置 12 h, 后离心收集沉淀物, 纯水复溶, 定容至 10 mL。

1.2.2　单因素实验　称取适量新鲜金铃子黄色果皮放入 100 mL 烧杯中, 按液料比 5∶1 mL/g 加入去离子水均质(15000 r/min, 15 min), 在 50 ℃以 200、250、300、350、400 W 功率超声提取 10 min, 提取结束后离心(10000 r/min, 15 min, 20 ℃), 将上清液旋蒸浓缩(50 ℃、0.0 MPa), 冷却至室温, 加入乙醇至 75%, 4 ℃醇沉过夜。离心(10000 r/min, 15 min, 20 ℃)后得到沉淀, 用去离子水复溶至 20 mL, 苯酚硫酸法测其含糖量[15] 并计算粗多糖提取率; 在最佳超声功率、液料比 5∶1 mL/g 的条件下考察超声时间 5、10、15、20、25 min 对粗多糖提取率的影响; 在最佳超声功率、超声时间的条件下考察液料比 5∶1、10∶1、15∶1、20∶1 和 25∶1 mL/g 对粗多糖提取率的影响。参考 Yang 等[13] 的方法计算新鲜金铃子果皮粗多糖的提取率:

$$DW(\%)=\frac{W_d}{W_0}\times 100 \qquad 式(1)$$

$$X(\%)=\frac{C\times V}{DW\times W} \qquad 式(2)$$

式中: DW 为金铃子干重率, %; W_0 为金铃子湿重, g; W_d 为干燥后金铃子重量, g; X 为金铃子粗多糖的提取率, %; C 为由标准曲线计算所得的多糖浓度, g/L; V 为复溶时定容体积, L; W 为称取的金铃子果皮重量, g。

1.2.3　响应面设计试验　根据单因素实验结果, 以金铃子粗多糖提取率为响应值, 采用 Design Expert 8.0 软件根据 Box-Behnken 设计原则进行实验, 优化金铃子粗多糖的超声辅助提取工艺, 因素水平设计表如表 1 所示。

表 1　响应面优化设计因素水平表

Table 1　Response surface optimization test factor level

水平	A: 液料比(mL/g)	B: 超声时间(min)	C: 超声功率(W)
−1	10∶1	10	250
0	15∶1	15	300
1	20∶1	20	350

1.2.4　金铃子粗多糖的纯化　在响应面优化后的最佳条件下超声辅助提取金铃子粗多糖, 离心浓缩后对上清液进行分级醇沉(50%、75%)。去离子水复溶后用 Sevage 法去除蛋白质与色素, 即将多糖溶液与 Sevage 试剂(三氯甲烷∶正丁醇=3∶1, V/V)按 3∶1 比例混合振荡, 离心取上层水相, 重复至两相界面处无明显蛋白质残留, 旋蒸浓缩去除残留的 Sevage 试剂。将多糖溶液转移至 3500 Da 透析袋, 在 4 ℃去离子水中透析 48 h, 真空冷冻干燥后得到两个金铃子多糖组分 WBP50 和 WBP75, 称重后计算多糖得率。

$$纯化多糖得率(\%)=\frac{m}{DW\times W} \qquad 式(3)$$

式中: DW 为金铃子干重率, %; W 为称取的金铃子果皮重量, g; m 为多糖重量, g。

1.2.5　化学组成分析

1.2.5.1　多糖含量　采用苯酚硫酸法检测多糖含量[15], 绘制标准曲线 y=0.9278x+0.0589 (R^2=0.9994), x 为半乳糖醛酸标准品浓度, 单位为 mg/mL, y 为吸光度值。

1.2.5.2　糖醛酸含量　采用硫酸咔唑法[16] 测定, 以半乳糖醛酸为标准品, 绘制标准曲线 y=1.2208x+0.0339 (R^2=0.9924), x 为糖醛酸浓度, 单位为 mg/mL, y 为吸光度值。

1.2.5.3　蛋白质含量　采用 BCA 试剂盒测定, 以牛血清白蛋白(BSA)为标准品, 按试剂盒说明书定量金铃子多糖中的蛋白质含量, 绘制标准曲线 y=2.4201x+0.6857(R^2=0.991), x 为蛋白质含量, 单位为 mg/mL, y 为吸光度值。

1.2.5.4　总酚含量　采用商用总酚试剂盒, 以没食子酸为标准品, 按试剂盒说明书定量金铃子多糖中的总酚类含量, 绘制标准曲线 y=0.0052x+0.0519 (R^2=0.995), x 为总酚含量, 单位为 mg/mL, y 为吸光度值。

1.2.5.5　总黄酮含量　采用总黄酮试剂盒, 以芦丁为标准品, 按试剂盒说明书定量金铃子多糖中的黄酮类含量, 绘制标准曲线 y=0.0011x+0.0453(R^2=0.9989), x 为黄酮类含量, 单位为 mg/mL, y 为吸光度值。

1.2.6　分子量分布及单糖组成

1.2.6.1　分子量分布　采用高效液相凝胶色谱法(HPGPC)[17], 将金铃子多糖用 0.1 mol/L 的 NaCl 溶液配制成 8 mg/mL 的样品溶液, 0.45 μm 水系膜过滤后进样。色谱条件: 凝胶色谱柱为 TSK-Gel G4000 PWXL (7.8 mm×300 mm), 流动相为 0.1 mol/L

NaCl 溶液，流速为 0.5 mL/min，洗脱时间 40 min，进样量为 10 μL，柱温为 35 ℃。5 mg/mL 的葡聚糖标品溶液进样后以其分子量对数值为纵坐标，出峰时间为横坐标拟合得到标准曲线，y=−0.6986x+14.949（R^2=0.9953），y 为分子量对数（log Mw），x 为保留时间（min）。

1.2.6.2　单糖组成　采用 PMP 柱前衍生化 HPLC 法并稍加改进[18]，精确称取 10 mg 多糖样品至安培瓶中，加入 2.0 mL TFA（2 mol/L），充氮封管，于 120 ℃ 酸解 4 h。取出加入甲醇氮吹挥干 TFA，加 3.0 mL 水复溶。精确吸取 250 μL 样品溶液或混标溶液到 5 mL EP 管中，加入 250 μL NaOH（0.6 mol/L），500 μL PMP-甲醇溶液（0.4 mol/L），70 ℃ 反应 1 h。冷却后加入 500 μL HCl（0.3 mol/L）中和，再加入 1 mL 三氯甲烷涡旋混匀，离心（3000 r/min，10 min）取上清液，萃取 3 次后用 0.45 μm 滤膜过滤后进样。色谱条件：色谱柱 Xtimate C_{18} 柱（4.6 mm×200 mm），流动相 A 为 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液（pH6.70），流动相 B 为乙腈，比例为 83% 和 17%，检测波长为紫外 250 nm，柱温为 30 ℃，进样量为 20 μL，流速为 1.0 mL/min，检测时间 50 min。

1.2.7　紫外及红外光谱分析

1.2.7.1　紫外光谱分析　参考 Tan 等[18] 的方法，配制浓度为 2 mg/mL 的两种金铃子多糖溶液，在 200~600 nm 波长范围内扫描多糖溶液的紫外吸收光谱。

1.2.7.2　红外光谱分析　采用溴化钾（KBr）压片法[19]，将金铃子多糖分别与干燥 KBr 混合（1∶200），研磨后压片，在 450~4000 cm^{-1} 范围内扫描红外光谱。

1.2.8　体外活性分析

1.2.8.1　抗氧化活性　采用 DPPH、ABTS 及羟基自由基检测试剂盒测定两种多糖对 DPPH、$ABTS^+$及羟基自由基的清除能力。

1.2.8.2　α-淀粉酶抑制活性　参考 Wu 等[20] 的方法，向 100 μL 的多糖溶液（12.5、25、50、125、250、500 μg/mL）中加入 100 μL 的 α-淀粉酶（30 U/mL，pH6.8 PBS），37 ℃ 振荡孵育 10 min。加入 200 μL 淀粉溶液（0.5%，w/v）后继续 37 ℃ 孵育 10 min。取 100 μL 混合液，加入 400 μL DNS 试剂，沸水浴加热 5 min。冷却后在 540 nm 处测紫外吸光值。以阿卡波糖为阳性对照。

$$\alpha\text{-淀粉酶抑制活性}(\%)=\left(1-\frac{A_{sample}-A_{control}}{A_{blank}-A_{control}}\right)\times 100$$

式（4）

式中：A_{sample} 为样品、淀粉溶液、α-淀粉酶和 DNS 试剂的反应液的吸光值；$A_{control}$ 为 PBS、淀粉溶液和 DNS 试剂的反应液的吸光值；A_{blank} 为 PBS、淀粉溶液、α-淀粉酶和 DNS 试剂的反应液的吸光值。

1.2.8.3　α-葡萄糖苷酶抑制活性测定　参考 Wu 等[20] 的方法，向 200 μL 的多糖溶液（50、125、250、500、750、1000 μg/mL）加入 40 μL 的 α-葡萄糖苷酶（0.5 U/mL，pH6.8 PBS），30 ℃ 振荡孵育 10 min。加入 100 μL PNPG（4 mmol/L，pH6.8 PBS）后继续在 37 ℃ 孵育 10 min。冷却后在 405 nm 处测紫外吸光值。以阿卡波糖为阳性对照。

$$\alpha\text{-葡萄糖苷酶抑制活性}(\%)=\left(1-\frac{A_{sample}-A_{control}}{A_{blank}-A_{control}}\right)\times 100$$

式（5）

式中：A_{sample} 为样品、PNPG、α-葡萄糖苷酶的反应液的吸光值；$A_{control}$ 为 PBS 和 PNPG 的反应液的吸光值；A_{blank} 为 PBS、PNPG、α-葡萄糖苷酶的反应液的吸光值。

1.3　数据处理

上述实验进行三次重复。使用 Excel 2016（Microsoft）进行数据初步分析，使用 SPSS 17.0（SPSS Inc.，Chicago，IL，USA）对单因素实验结果进行单因素方差分析（one-way ANOVA）和 Tukey's test 检验，对抗氧化实验结果进行 *t*-test 分析，显著性水平 P<0.05。数据以平均值±标准偏差形式表示。使用 Design Expert 8.0 软件进行响应面试验设计和数据分析。使用 OriginPro 9.0 进行绘图。

2　结果与分析

2.1　单因素实验结果

2.1.1　超声功率对金铃子粗多糖提取率的影响　超声功率是影响超声辅助提取多糖提取率的重要因素之一，如图 1 所示，多糖提取率随着超声功率的增长呈现先升高后下降的趋势，在超声功率达到 300 W 时提取率为最高。超声通过空化效应和机械效应促进植物组织破碎，从而提高多糖的溶解度[21]。而粗多糖提取率在超声功率达到 300 W 后逐渐下降可能是由于较高的超声功率导致大量无用气泡产生，导致散射衰减增加，空化强度降低，提取率下降[19]。也可能是大功率的机械效应使得糖苷键断裂，破坏多糖结构，也会降低提取率。单因素实验结果表明金铃子粗多糖提取的最佳超声功率为 300 W。

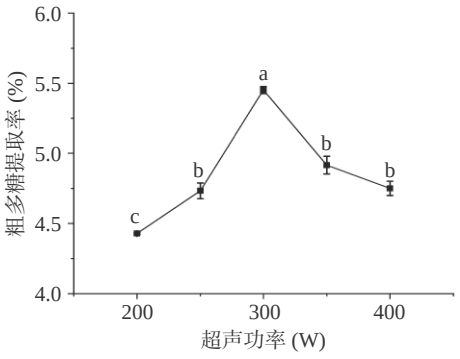


图 1　超声功率对金铃子粗多糖提取率的影响

Fig.1　Effect of ultrasonic power on the extraction rate of crude polysaccharides from wild bitter melons

注：不同小写字母表示具有显著差异（P<0.05），图 2~图 3 同。

2.1.2 超声时间对金铃子粗多糖提取率的影响 超声处理可以增加植物细胞壁破裂的机会，从而促进了更多多糖的释放。而超声时间过长可能导致目标多糖发生热降解，反而降低提取效率。如图 2 所示，多糖提取率随着超声时间的增长呈现先缓慢升高后下降的趋势，在超声时间达到 15 min 时提取率为最高。刚开始随着超声时间增加，超声引起的空化效应和热效应增大，所以多糖的溶解度和在水中的扩散速率越大。15 min 后由于超声波具有较强的机械剪切作用，长时间超声可能会使多糖结构遭到破坏，使得提取率下降[21]。单因素实验结果表明金铃子粗多糖提取的最佳超声时间为 15 min。

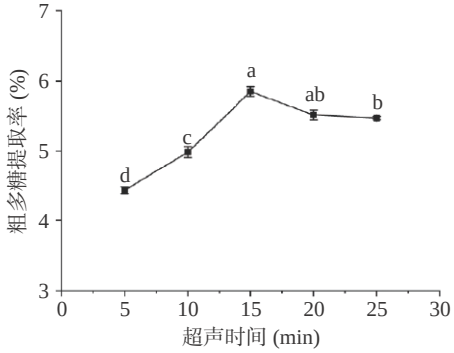


图 2 超声时间对金铃子粗多糖提取率的影响

Fig.2 Effect of ultrasonic time on the extraction rate of crude polysaccharides from wild bitter melons

2.1.3 液料比对金铃子粗多糖提取率的影响 适度提升液料比可以使更多的溶剂更有效地渗透植物材料，有助于提高多糖的提取率。如图 3 所示，金铃子粗多糖的提取率随着液料比的变化呈现先升高后下降的趋势，在液料比为 15 mL/g 时提取率为最高。刚开始由于增加液料比会提升植物组织内外的多糖浓度差，从而增加多糖的扩散和溶出速率，多糖提取率随着液料比的增加而提升。而在达到最佳液料比后加大水量，反而可能会延长后续浓缩时长，增加多糖被破坏的几率，从而导致提取率下降。单因素实验结果表明金铃子粗多糖提取的最佳液料比为 15∶1 mL/g。

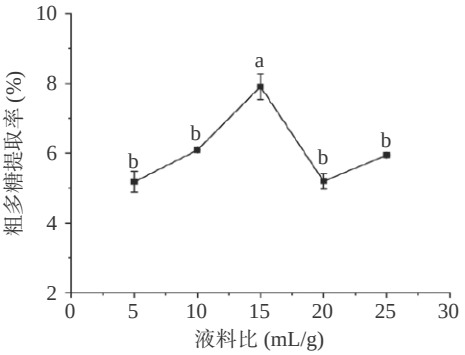


图 3 液料比对金铃子粗多糖提取率的影响

Fig.3 Effect of liquid-solid ratio on the extraction rate of crude polysaccharides from wild bitter melons

2.2 响应面优化试验

响应面试验结果如表 2 所示。以 A 液料比、B 超声时间、C 超声功率为自变量，以金铃子粗多糖提取率为响应值 Y，利用 Design Expert 8.0 软件对试验数据进行二次响应面分析及拟合，得到回归方程为：$Y=8.55+1.00A+0.90B+0.58C-0.81AB+0.34AC+0.46BC-1.67A^2-1.95B^2-1.53C^2$。

表 2 金铃子粗多糖提取响应面优化试验设计与结果

Table 2 Response surface test design and results of crude WBP extraction optimization

试验号	A 液料比	B 超声时间	C 超声功率	Y 提取率(%)
1	1	1	0	6.09
2	0	0	0	9.10
3	0	−1	1	4.41
4	0	1	−1	4.80
5	−1	0	1	4.54
6	−1	0	−1	3.72
7	1	−1	0	5.32
8	0	1	1	6.54
9	0	0	0	8.04
10	−1	−1	0	2.14
11	1	0	−1	5.47
12	0	−1	−1	4.50
13	0	0	0	8.03
14	−1	1	0	6.16
15	1	0	1	7.65
16	0	0	0	9.05
17	0	0	0	8.53

如表 3 所示，回归模型对金铃子粗多糖提取率的影响达到极显著水平（$P<0.001$）；失拟项 $P=0.3251>0.05$，不显著，模型选用合理；模型的决定系数 $R^2=0.9633$，表明该回归模型具有较好的拟合效果及良好的代表性；模型的校正决定系数 $R^2_{adj}=0.9161$，使用该模型可解释 91.61% 的多糖提取率的变化，表明该回归模型能够准确预测实际值，实验误差小，可用于分析和预测超声辅助提取金铃子多糖的流程和工艺优化。由 P 值可知，A^2、B^2、C^2 达到极显著水平

表 3 金铃子粗多糖提取率二项式回归模型的方差分析

Table 3 Variance analysis of quadratic regression model for the extraction rate of crude WBP

来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	63.20	9	7.02	20.40	0.0003	***
A	7.93	1	7.93	23.05	0.0020	**
B	6.53	1	6.53	18.97	0.0033	**
C	2.70	1	2.70	7.84	0.0266	*
AB	2.65	1	2.65	7.71	0.0275	*
AC	0.47	1	0.47	1.38	0.2793	ns
BC	0.83	1	0.83	2.41	0.1643	ns
A^2	11.75	1	11.75	34.13	0.0006	***
B^2	16.05	1	16.05	46.63	0.0002	***
C^2	9.92	1	9.92	28.82	0.0010	***
失拟项	1.31	3	0.44	1.59	0.3251	ns
残差	1.10	4	0.28			ns

注：*表示影响显著（$P<0.05$），**表示影响非常显著（$P<0.01$），***表示影响极显著（$P<0.001$），ns表示不显著。

（P<0.001），A、B 达到非常显著水平（P<0.01），C、AB 达到显著水平（P<0.05）。各因素对金铃子粗多糖提取率影响为液料比最大，超声时间和超声功率次之。

如图 4 所示，AB 具有显著交互作用，其曲面有极大值且坡面较陡峭，等高线图呈椭圆形，另外从图中可看出 AC、BC 也存在一定的交互作用，但并不显著，与表 3 中金铃子粗多糖提取率二项式回归模型方差分析的结论一致。

通过 Design-Expert 8.0 软件对二项式模型进行预测，超声辅助提取金铃子粗多糖的最佳工艺参数为：液料比 16.37 mL/g、超声功率 312.469 W、超声时间 16.017 min。在此条件下，金铃子粗多糖提取率的理论值可达 8.852%。考虑实验的可操作性，将最优工艺条件修正为液料比 16 mL/g，超声功率 312 W，超声时间 16 min。在最优条件下重复 3 次平行实验，得到提取率平均值为 8.33%±0.13%，与理论值的相对误差为 5.92%，表明本模型下可以取得较好的金铃子粗多糖提取率。

2.3　金铃子多糖的制备

两个多糖组分 WBP50、WBP75 得率分别是 4.77%±0.23% 和 1.42%±0.08%，WBP50 呈韧性很强

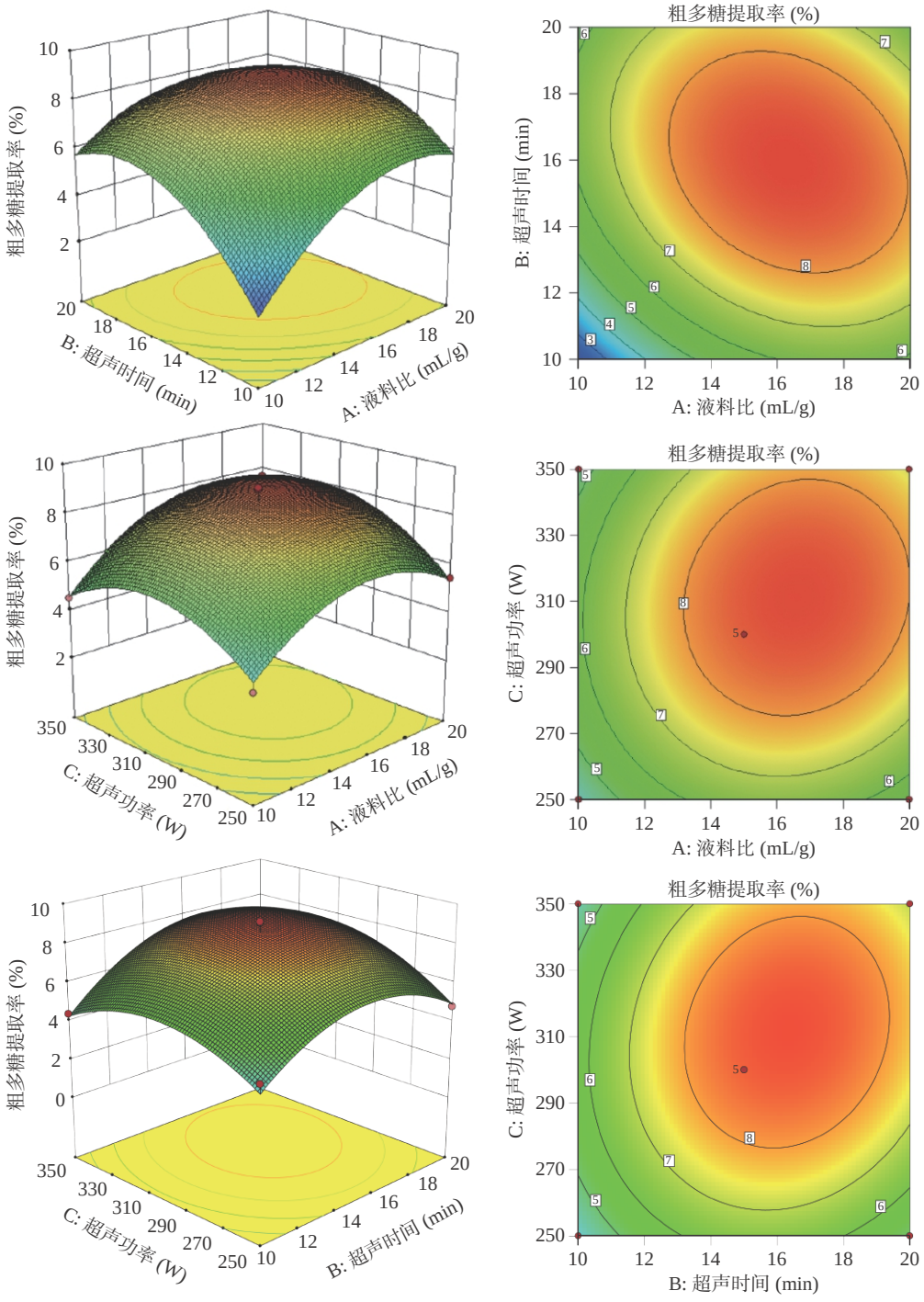


图 4　不同因素相互作用对金铃子粗多糖提取率影响的响应面和等高线图

Fig.4　Response surface and contour map of the interaction of different factors on the extraction rate of crude WBP

的白色柳絮状, WBP75 呈更具粉末感的白色棉花状。

2.4 金铃子多糖的化学组成

金铃子多糖的化学组成结果见表 4, 根据预实验结果发现多糖中的糖醛酸含量较高, 如大多数研究中以葡萄糖作为总糖检测标准品会造成误差, 因此本研究以半乳糖醛酸作为总糖检测的标准品。通过苯酚硫酸法检测金铃子多糖的总糖含量, WBP50 和 WBP75 的总糖含量分别为 76.73%、73.38%, 纯度均较高, 可以用于之后的结构检测和功能活性研究。采用 BCA 蛋白试剂盒检测到蛋白质含量分别为 4.78%、0.35%, 蛋白质去除较为彻底; 采用商用试剂盒检测到金铃子多糖的总酚和总黄酮含量较少, 分别为 0.36%、0.25% 和 2.06%、0.86%, 也进一步说明多糖纯度较高, 其后续体现的生物活性主要是其中的多糖组分发挥作用; 通过硫酸咔唑法检测到金铃子多糖的糖醛酸含量较高, WBP50 和 WBP75 的糖醛酸含量分别为 72.85% 和 49.58%, 表示结构中的酸性基团含量较高。果胶是广泛存在于植物细胞壁的一类酸性多糖, 主要由半乳糖醛酸单元组成, 具有调节肠道菌群、增强免疫等生理活性[22−23]。果胶多糖的糖醛酸含量可高达 50%~80%, 其含量主要取决于果胶来源和提取工艺[24−25]。鉴于金铃子果皮中提取的多糖具有极高的糖醛酸含量, 它们很可能属于果胶多糖的范畴。

表 4 金铃子多糖的化学组成

Table 4 Chemical composition of polysaccharides from wild bitter melons

化学组成	WBP50	WBP75
总糖(%)	76.73±2.40	73.38±2.02
蛋白质(%)	4.78±0.02	0.35±0.04
总酚(%)	0.36±0.02	0.25±0.02
总黄酮(%)	2.06±0.07	0.86±0.01
糖醛酸(%)	72.85±0.02	49.58±0.01

2.5 分子量分布及单糖组成

2.5.1 分子量分布 本研究采用 HPGPC 检测金铃子多糖的纯度与平均分子量, 如图 5 所示, WBP50 主峰的保留时间为 15.857 min; WBP75 主峰的保留时间为 16.030、15.425 和 18.259 min, 根据标准曲线(R^2=0.9953)计算得平均分子量分别为 27.59 kDa 和 23.20 kDa, 符合分级醇沉先大后小的规律; 由此可知两种多糖并未达到均一, 如需分析其结构则需要进一步分离纯化。

2.5.2 单糖组成 本研究采用 PMP 柱前衍生化 HPLC 法检测金铃子多糖的单糖组成, 结果见表 5。金铃子多糖的主要单糖组成与苦瓜多糖较为相似[26], 但是各单糖的含量较为不同。与 Gao 等[27] 对苦瓜多糖的研究相似的是, 金铃子多糖中的半乳糖醛酸的含量同样很高, 这与 2.4 中测得糖醛酸含量较高结果一致。在低浓度乙醇沉淀下得到的多糖糖醛酸含量较高, 随着乙醇浓度增加, 糖醛酸的含量逐渐减少[28]。

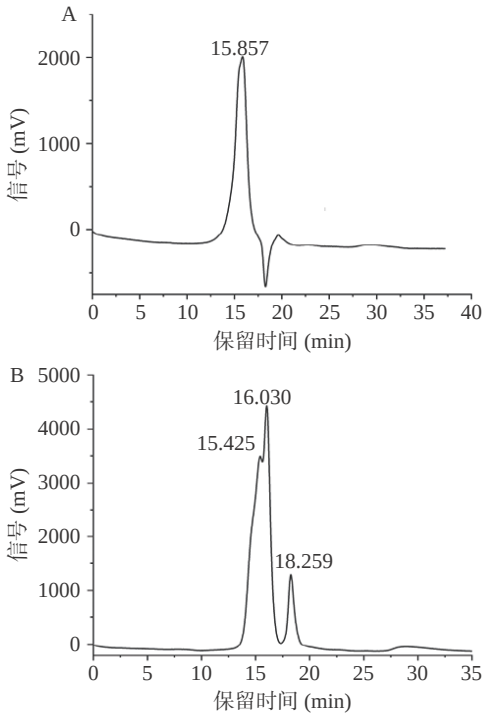


图 5 金铃子多糖 WBP50(A)和 WBP75(B)的分子量分布

Fig.5 Molecular weight distribution of WBP50 (A) and WBP75 (B)

表 5 金铃子多糖的单糖分布

Table 5 Monosaccharide composition of WBPs

单糖组成(摩尔比)	WBP50	WBP75
甘露糖	6.77	3.33
核糖	1.00	1.00
鼠李糖	49.10	24.06
葡萄糖醛酸	14.87	12.48
半乳糖醛酸	347.96	77.11
葡萄糖	21.45	30.60
半乳糖	54.59	85.15
木糖	15.09	25.57
阿拉伯糖	31.52	34.83
岩藻糖	5.86	2.42

2.6 紫外及红外光谱分析

2.6.1 紫外光谱分析 多糖不具备紫外吸收特征, 因此通常采用紫外光谱检测多糖纯度, 是否在提取过程中有蛋白质残留。如图 6 所示, WBP75 于 260 nm 和 280 nm 处并没有明显的紫外吸收峰, 表明 WBP75 几乎不含核酸和蛋白质, 纯度较高, 蛋白质去除较为彻底; 而 WBP50 于 280 nm 有紫外吸收峰, 这与 2.4 中化学组成测定结果基本一致。如需进一步分析 WBP50 多糖结构则需继续分离纯化。

2.6.2 红外光谱分析 一般采用红外光谱法解析多糖的初级结构, 通过得到的红外特征峰来识别多糖的各种官能团, 确定多糖具有哪些糖苷键类型与构型。如图 7 所示, WBP50 和 WBP75 显示出多个多糖的典型信号峰: 在 3399/3401 cm^{-1} 和 2930/2910 cm^{-1}

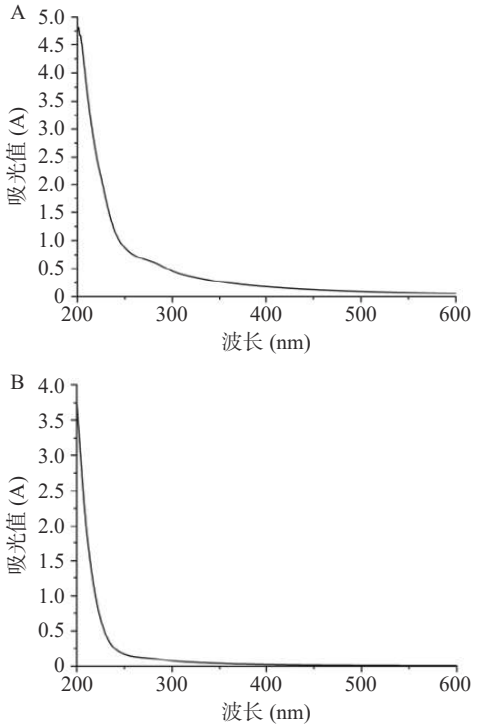


图 6　金铃子多糖 WBP50(A)和 WBP75(B)的紫外光谱结果

Fig.6　UV-Vis spectra of WBP50 (A) and WBP75 (B)

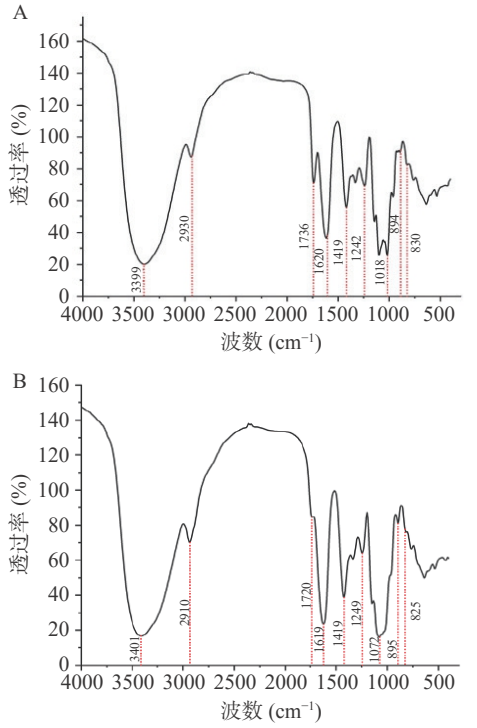


图 7　金铃子多糖 WBP50(A)和 WBP75(B)的红外光谱结果

Fig.7　FT-IR spectra of WBP50 (A) and WBP75 (B)

处的吸收峰分别代表多糖上 O-H 键和 C-H 键的伸缩振动信号[29]；1620/1619 cm^{-1} 和 1419 cm^{-1} 处的吸收峰分别代表多糖上羧基与 C-H 键的弯曲振动，再次证明其为酸性多糖[30]；1242/1249 cm^{-1} 附近的吸收峰代表多糖上羧基内 C=O 键的伸缩振动[31]，也有可能为 S=O 键的伸缩振动，该多糖可能具有硫酸根[30]；1018/1072 cm^{-1} 处的吸收峰代表多糖上吡喃环的 C-O-C 键和羟基[32]；894/895 cm^{-1} 处的吸收峰对应 β-构型，而 830/825 cm^{-1} 处的吸收峰对应 α-构型，表示该多糖同时具有 α-和 β-端基碳[33]。

2.7　体外活性分析

2.7.1　抗氧化活性　氧化应激与人体糖脂代谢紊乱密切相关，是导致胰岛素抵抗和高血糖症的重要原因之一[34]，因此抗氧化活性也是挖掘天然降血糖功能因子的重要指标。如表 6 所示，金铃子多糖 WBP50 和 WBP75 对 DPPH、ABTS$^+$和羟自由基均具有一定的清除能力，分别为 11.28/11.40 μg Trolox/mg、40.87/44.42 μg Trolox/mg 和 52.47/99.89 U/mg。U 为抑制羟自由基能力单位：规定每毫升样品在 37 ℃ 下反应 1 min，使反应体系中 H_2O_2 浓度降低 1 mmol/L 为 1 U。WBP75 的抗氧化能力更高，分级醇沉多糖具有分子量先大后小的规律，WBP75 的高抗氧活性可能由于其分子量比 WBP50 更低[35]。

表 6　金铃子多糖 WBP50 和 WBP75 的抗氧化活性

Table 6　Antioxidant activities of WBP50 and WBP75

样品	DPPH自由基清除能力(μg Trolox/mg)	ABTS$^+$自由基清除能力(μg Trolox/mg)	羟自由基清除能力(U/mg)
WBP50	11.28±0.43^a	40.87±0.21^a	52.47±0.89^b
WBP75	11.40±0.51^a	44.42±1.35^a	99.89±0.19^a

注：同列不同字母上标表示在P<0.05水平上具有显著性差异。

2.7.2　降糖活性　α-淀粉酶和 α-葡萄糖苷酶能水解淀粉和糖原的 α-1,4-糖苷键，以及低聚糖的 α-1,6-糖

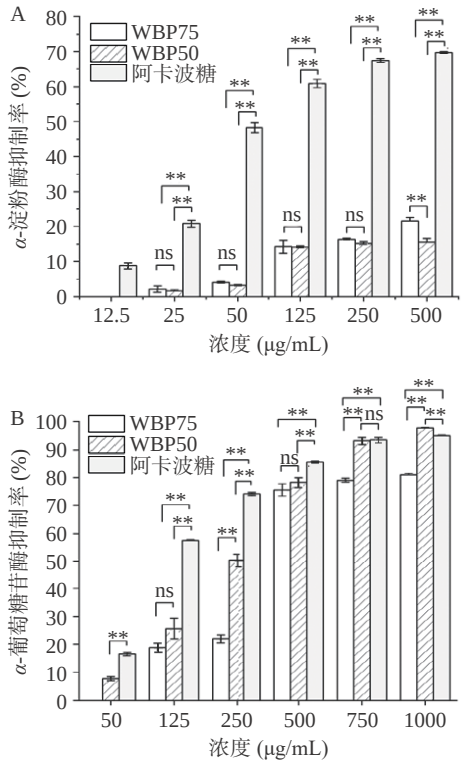


图 8　金铃子多糖的 α-淀粉酶抑制能力(A)和 α-葡萄糖苷酶抑制能力(B)

Fig.8　α-Amylase inhibitory ability (A) and α-glucosidase inhibitory ability (B) of WBPs

注：*、**分别表示具有显著性差异(P<0.05, P<0.01)，ns 表示差异不显著。

苷键，帮助人体将食用的碳水化合物转化成葡萄糖被肠道吸收[36]。而对于两种消化酶活性的抑制作用一直是体外降血糖活性的重要评价指标，降低碳水化合物分解成葡萄糖的转化速率，从而减缓餐后血糖上升。如图 8 所示，两种多糖具有一定的 α-淀粉酶抑制能力和较强的 α-葡萄糖苷酶抑制能力。WBP50 和 WBP75 在浓度 500 μg/mL 时的 α-淀粉酶抑制率分别为 15.54%±0.95% 和 21.58%±0.93%；α-葡萄糖苷酶抑制率分别为 78.45%±1.49% 和 75.62%±2.23%。WBP50 在浓度 750 μg/mL 时对 α-葡萄糖苷酶的抑制率可达 93.34%±1.11%，与阳性对照无显著性差异（$P>0.05$），而在 1000 μg/mL 时对 α-葡萄糖苷酶的抑制率显著高于阳性对照（$P<0.01$）。研究表明，α-淀粉酶和 α-葡萄糖苷酶的抑制活性与多糖中游离羧基和羟基的存在有关，游离羧基和羟基可能与消化酶的氨基酸残基相互作用，从而导致酶失活[37]。高糖醛酸含量的多糖一般具有较强的抗氧化及降血糖活性[38]，金铃子多糖的体外抗氧化与降糖活性可能与其高糖醛酸含量高度相关。由此可见金铃子多糖是一种具有降血糖潜力的天然植物多糖。

3 结论

本文以金铃子鲜果为原料，对三个影响金铃子粗多糖提取率的显著条件液料比、超声时间和超声功率进行了单因素实验，并进一步通过响应面试验对多糖制备条件进行了优化，获得最佳液料比 16 mL/g，超声时间 16 min，超声功率 312 W，该条件下粗多糖的提取率可达 8.33%±0.13%。在最佳提取条件下进行超声辅助萃取、分级醇沉、去蛋白、透析冻干后得到两个多糖组分 WBP50 和 WBP75，并且检测了其总糖、蛋白质、总酚、总黄酮和糖醛酸含量。两个多糖组分的平均分子量分别为 27.59 kDa 和 23.20 kDa，主要由半乳糖醛酸、半乳糖、鼠李糖、阿拉伯糖、葡萄糖组成。两个金铃子多糖组分均为酸性多糖，都具有一定的抗氧化能力，而 WBP75 具有更强的羟基自由基清除能力；在降糖活性方面，两种多糖的 α-葡萄糖苷酶抑制能力都较强，因此具有开发成降血糖的功能性食品的潜力。本研究局限于金铃子多糖的提取工艺优化与体外活性初探，缺乏对多糖结构的解析以及进一步的体内活性评价和作用机制研究，这将会是今后研究的重点内容。

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

参考文献

[1] PAN X F, WANG L M, PAN A. Epidemiology and determinants of obesity in China[J]. Lancet Diabetes Endocrinol, 2021, 9: 373−392.

[2] 中国居民营养与慢性病状况报告(2020 年)[R]. 国家卫生和计划生育委员会疾病预防控制局. 北京: 人民卫生出版社, 2020. [Report on Chinese residents' chronic diseases and nutrition (2020)[R]. National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. Beijing: People's Medical Publishing House, 2020.]

[3] International diabetes federation. IDF diabetes atlas (10th edition)[R]. Brussels: Belgium, 2021.

[4] NAZARIAN S Z, SEWELL R D E, LORIGOOINI Z, et al. Medicinal plants with multiple effects on diabetes mellitus and its complications: A systematic review[J]. Curr Diab Rep, 2018, 18(10): 72.

[5] BEIDOKHTI M N, JAGER A K. Review of antidiabetic fruits, vegetables, beverages, oils and spices commonly consumed in the diet[J]. J Ethnopharmacol, 2017, 201: 26−41.

[6] HSIAO C Y, CHEN Y M, HSU Y J, et al. Supplementation with Hualian No. 4 wild bitter gourd (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* Ser.) extract increases anti-fatigue activities and enhances exercise performance in mice[J]. J Vet Med Sci, 2017, 79(6): 1110−1119.

[7] FU A, ZHENG Y, GUO J, et al. Telomere-to-telomere genome assembly of bitter melon (*Momordica charantia* L. var. *abbreviata* Ser.) reveals fruit development, composition and ripening genetic characteristics[J]. Horticulture Research, 2022, 10(1): 1−16.

[8] CIOU S Y, HSU C C, KUO Y H, et al. Effect of wild bitter gourd treatment on inflammatory responses in BALB/c mice with sepsis[J]. Biomedicine (Taipei), 2014, 4(3): 7−13.

[9] HUANG T N, LU K N, PAI Y P, et al. Role of GLP-1 in the hypoglycemic effects of wild bitter gourd[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, 2013(625892): 1−13.

[10] WU S J, NG L T. Antioxidant and free radical scavenging activities of wild bitter melon (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* Ser.) in Taiwan[J]. LWT-Food Science and Technology, 2008, 41(2): 323−330.

[11] TSAI C H, CHEN E C, TSAY H S, et al. Wild bitter gourd improves metabolic syndrome: A preliminary dietary supplementation trial[J]. Nutr J, 2012, 11(4): 1−3.

[12] JIA S, SHEN M, ZHANG F, et al. Recent advances in *Momordica charantia*: Functional components and biological activities[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(2555): 1−25.

[13] YANG J K, YU Y B, WANG C, et al. Production, physicochemical characteristics, and *in vitro* biological activities of polysaccharides obtained from fresh bitter gourd (*Momordica charantia* L.) via room temperature extraction techniques[J]. Food Chemistry, 2021, 337: 127798.

[14] 杨税. 基于苦瓜多糖规模化提取影响因素的考察及工艺的优化[J]. 药学研究, 2020, 39(11): 641−675. [YANG S. Investigation and optimization of the factors influencing the scale extraction of polysaccharide from *Momordica charantia*[J]. Journal of Pharmaceutical Research, 2020, 39(11): 641−675.]

[15] XIE S Z, ZHANG W J, LIU W, et al. Physicochemical characterization and hypoglycemic potential of a novel polysaccharide from *Polygonatum sibiricum* Red through PI3K/Akt mediated signaling pathway[J]. Journal of Functional Foods, 2022, 93: 1−12.

[16] LI J B, KISARA K, DANIELSSON S, et al. An improved methodology for the quantification of uronic acid units in xylans and other polysaccharides[J]. Carbohydrate Research, 2007, 342(11): 1442−1449.

[17] TAN M H, CHANG S L, LIU J N, et al. Physicochemical properties, antioxidant and antidiabetic activities of polysaccharides from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seeds[J]. Molecules,

2020, 25(17): 1−18.
[18] TAN M H, ZHAO Q S, ZHAO B. Physicochemical properties, structural characterization and biological activities of polysaccharides from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seeds[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 193: 1635−1644.
[19] CAO W Y, WANG C X, MAYHESUMU X, et al. Isolation, structural elucidation, antioxidant and hypoglycemic activity of polysaccharides of *Brassica rapa* L[J]. Molecules, 2022, 27(9): 1−16.
[20] WU D T, HE Y, HU M X, et al. Structural characteristics and biological activities of a pectic-polysaccharide from okra affected by ultrasound assisted metal-free Fenton reaction[J]. Food Hydrocolloids, 2022, 122: 107085.
[21] LI P C, XUE H K, XIAO M, et al. Ultrasonic-assisted aqueous two-phase extraction and properties of water-soluble polysaccharides from *Malus hupehensis*[J]. Molecules, 2021, 26(8): 1−13.
[22] 沈宇, 李野, 张翼, 等. 植物果胶多糖结构与免疫活性研究进展[J]. 中医药学报, 2021, 49(5): 107−110. [SHEN Y, LI Y, ZHANG Y, et al. Research progress on structure and immune activity of plant pectin polysaccharides[J]. Acta Chinese Medicine and Pharmacology, 2021, 49(5): 107−110.]
[23] 易建勇, 赵圆圆, 毕金峰, 等. 果胶精细结构与其肠道微生物酵解特性的构效关系[J]. 中国食品学报, 2021, 21(11): 337−348. [YI J Y, ZHAO Y Y, BI J F, et al. The structure-fuction relaitonship between pectin and intestinal micobial fermentation characteristics[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(11): 337−348.]
[24] LIANG W L, LIAO J S, QI J R, et al. Physicochemical characteristics and functional properties of high methoxyl pectin with different degree of esterification[J]. Food Chemistry, 2022, 375: 131806.
[25] RODSAMRAN P, SOTHORNVIT R. Microwave heating extraction of pectin from lime peel: Characterization and properties compared with the conventional heating method[J]. Food Chemistry, 2019, 278: 364−372.
[26] 严学迎, 梁秋萍. 苦瓜多糖的制备、理化特征及降血糖作用[J]. 中国食品添加剂, 2023, 34(3): 135−141. [YAN X Y, LIANG Q P. Preparation, physicochemical characteristics and hypoglycemic effect of polysaccharides from *Momordica charantia*[J]. China Food Additives, 2023, 34(3): 135−141.]
[27] GAO H, WEN J J, HU J L, et al. Polysaccharide from fermented *Momordica charantia* L. with *Lactobacillus plantarum* NCU116 ameliorates type 2 diabetes in rats[J]. Carbohydr Polym, 2018, 201: 624−633.
[28] 胡润锋, 李浚哲, 李鹏飞, 等. 桑叶多糖结构特征及其对 α-葡萄糖苷酶活性的抑制作用[J]. 林业工程学报, 2022, 7(6): 100−106. [HU R F, LI J Z, LI P F, et al. Study on the structure of mulberry leaf polysaccharide and its inhibitory activity of α-glucosidase[J]. Journal of Forestry Engineering, 2022, 7(6): 100−106.]
[29] LI Q, YU N, WANG Y, et al. Extraction optimization of *Bruguiera gymnorrhiza* polysaccharides with radical scavenging activities[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 96(1): 148−155.
[30] 王威振, 杨盼盼, 逯永瑞, 等. 龙牙百合多糖的超声辅助提取及其抗氧化、降血脂活性分析[J]. 食品工业科技, 2023, 44(18): 251−257. [WANG W Z, YANG P P, TI Y R, et al. Ultrasound-assisted extraction and analysis of antioxidation and hypolipidemia activities of polysaccharides from *Lilium brownii* var. *viridulum*. [J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(18): 251−257.]
[31] 王静杰, 杜鑫, 钟强, 等. 超声辅助酶法制备海参性腺多糖的结构特性及抗氧化活性[J]. 食品科学, 2021, 42(21): 97−104. [WANG J J, DU X, ZHONG Q, et al. Structural characteristics and antioxidant activity of polysaccharides prepared from sea cucumber gonad by ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis[J]. Food Science, 2021, 42(21): 97−104.]
[32] 毛美林, 邓子言, 李万晴, 等. 一种榆黄蘑菌丝体多糖的结构表征及其降血糖作用[J]. 食品科学, 2023, 44(11): 115−123. [MAO M L, DENG Z Y, LI W Q, et al. Structural characterization and hypoglycemic effect of a polysaccharide from *Pleurotus citrinopileatus* mycelia[J]. Food Science, 2023, 44(11): 115−123.]
[33] ZHANG X, LIANG Z, WATERHOUSE G I N, et al. Structural characteristics, anticoagulant and antithrombotic mechanism of a novel polysaccharide from Rosa Chinensis Flos[J]. Food Science and Human Wellness, 2023, 12(2): 407−415.
[34] AVIGNON A, HOKAYEM M, BISBAL C, et al. Dietary antioxidants: Do they have a role to play in the ongoing fight against abnormal glucose metabolism?[J]. Nutrition, 2012, 28(7-8): 715−721.
[35] ZHU J X, ZHOU H, ZHANG J Y, et al. Valorization of polysaccharides obtained from dark tea: Preparation, physicochemical, antioxidant, and hypoglycemic properties[J]. Foods, 2021, 10(10): 1−21.
[36] LI X, WANG X H, DONG Y, et al. Preparation, structural analysis, antioxidant and digestive enzymes inhibitory activities of polysaccharides from *Thymus quinquecostatus* Celak. leaves[J]. Industrial Crops and Products, 2022, 175.
[37] FANG C C, CHEN G J, KAN J Q. Comparison on characterization and biological activities of *Mentha haplocalyx* polysaccharides at different solvent extractions[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 154: 916−928.
[38] WANG L, ZHANG P, CHEN Y X, et al. Physicochemical characterization and *in vitro* biological activities of water-extracted polysaccharides fractionated by stepwise ethanol precipitation from *Rosa roxburghii* Tratt fruit[J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2022, 16(1): 38−48.

黄怡忱, 华梓延, 张格文, 等. 嗜热链球菌 FUA329 发酵制备石榴汁酸奶的工艺优化及其品质特性 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 174−181. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023120204
HUANG Yichen, HUA Ziyan, ZHANG Gewen, et al. Process Optimization and Quality Evaluation of Pomegranate Juice Yogurt Fermented with *Streptococcus thermophilus* FUA329[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 174−181. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023120204

· 工艺技术 ·

嗜热链球菌 FUA329 发酵制备石榴汁酸奶的工艺优化及其品质特性

黄怡忱[1], 华梓延[1], 张格文[1], 刘　姝[1], 侯晓月[1], 池可心[2], 杨　光[1], 周　翔[3], 房耀维[1,*]
(1.江苏海洋大学海洋食品与生物工程学院, 江苏连云港 222005;
2.AB SCIEX 分析仪器贸易有限公司, 上海 200000;
3.连云港市食品药品检验检测中心, 江苏连云港 222069)

摘　要: 微生物发酵转化鞣花酸生成具有多种生物活性的尿石素 A，显著提高富含鞣花酸食品的营养价值。本研究通过单因素与响应面试验优化获得菌株 FUA329 发酵石榴汁酸奶的最佳工艺，以嗜热链球菌 CGMCC1.8748 为对照，对石榴汁酸奶的菌种活力、流变特性及抗氧化活性进行分析，并利用高效液相色谱法测定菌株 FUA329 发酵石榴汁酸奶中的尿石素 A 含量。结果表明：嗜热链球菌 FUA329 发酵制备石榴汁酸奶的最佳工艺为石榴汁添加量为 15.79%，蔗糖添加量为 7.08%，发酵剂接种量为 3.04%，发酵时间 7 h，发酵温度 37 ℃，综合感官评分 79.4 分；在最佳工艺条件下，菌株 FUA329 发酵石榴汁酸奶的酸度（82.5±1.3）°T，乳清析出量 9.6%±0.97%，色差 68.17±2.75，菌种活力 2.01±0.31（OD_{600}）。抗氧化活性方面，菌株 FUA329 发酵石榴汁酸奶的 DPPH 自由基清除率、$ABTS^{+}$自由基清除率和超氧阴离子自由基清除率分别为 82.87%±1.48%、88.20%±2.10% 和 76.92%±1.02%，明显优于菌株 FUA329 原味酸奶以及嗜热链球菌 CGMCC1.8748 发酵石榴汁酸奶。此外，菌株 FUA329 发酵石榴汁酸奶 7 h，尿石素 A 含量达到 3.31 μmol/L。研究为利用嗜热链球菌 FUA329 发酵制备功能性石榴汁酸奶奠定理论基础。

关键词: 石榴汁, 嗜热链球菌 FUA329, 尿石素 A, 酸奶, 工艺优化
中图分类号: TS252.54　　**文献标识码:** B　　**文章编号:** 1002−0306(2024)21−0174−08
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023120204
本文网刊:

Process Optimization and Quality Evaluation of Pomegranate Juice Yogurt Fermented with *Streptococcus thermophilus* FUA329

HUANG Yichen[1], HUA Ziyan[1], ZHANG Gewen[1], LIU Shu[1], HOU Xiaoyue[1], CHI Kexin[2], YANG Guang[1], ZHOU Xiang[3], FANG Yaowei[1,*]
(1.College of Marine Food and Bioengineering, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China;
2.AB SCIEX Analytical Instrument Trading Co., Ltd., Shanghai 200000, China;
3.Lianyungang City Food and Drug Testing Center, Lianyungang 222069, China)

Abstract: Metabolizing ellagic acid (EA) to urolithin A with numerous bioactivities significantly improve the nutritional value of food rich in EA. In the present study, *Streptococcus thermophilus* FUA329 was applied to prepare pomegranate juice yogurt. The best process formula was investigated through single-factor experiments and response surface methodology. With *S. thermophilus* CGMCC1.8748 as control, the viability of strain, rheological properties and antioxidant activity of pomegranate juice yogurt fermented with strain FUA329 were evaluated. The content of urolithin A in

收稿日期: 2023−12−19
基金项目: 江苏省高等学校自然科学研究重大项目（20KJA550001）; 江苏省“333 高层次人才培养工程”; 江苏省研究生科研实践创新计划（KYCX2023-126）; 江苏省大学生创新创业训练计划（SY202311641638001）。
作者简介: 黄怡忱（1997−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: 847303615@qq.com。
*** 通信作者:** 房耀维（1978−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: foroei@163.com。

pomegranate juice yogurt fermented with strain FUA329 were analyzed by high-performance liquid chromatography. The results showed that the optimal fermentation conditions for preparing pomegranate juice yogurt by *S. thermophilus* FUA329 were 15.79% pomegranate juice content, 7.08% sucrose content and 3.04% starter inoculum size, fermentation at 37 ℃ for 7 h and comprehensive sensory score was 79.4 points. Under the optimal conditions, the results of basic indicators showed that yogurt acidity was (82.5±1.3)°T, whey precipitation was 9.6%±0.97%, color difference was 68.17±2.75, bacterial activity was 2.01±0.31 (OD_{600}). In terms of antioxidant activity, DPPH radical, $ABTS^+$ radical and superoxide anion radical scavenging rates of fermented pomegranate juice yogurt by strain FUA329 were 82.87%±1.48%, 88.20%±2.10% and 76.92%±1.02%, respectively, which was significantly better than plain yogurt fermented by strain FUA329 and pomegranate juice yogurt fermented by *S. thermophilus* CGMCC1.8748. In addition, urolithin A content was 3.31 μmol/L in fermented pomegranate juice yogurt by strain FUA329 after 7 h. The results of this study would provide a theoretical basis for fermenting a functional pomegranate juice yogurt, and lay a foundation for the development and utilization of *S. thermophilus* FUA329.

Key words: pomegranate juice; *Streptococcus thermophilus* FUA329; urolithin A; yogurt; process optimization

肌肉衰退引起的机体功能障碍增加老年人衰弱、跌倒、骨折与失能风险，严重损害老年人的健康和生活质量[1]。随着我国老龄化的逐年加剧，这一问题给家庭和社会造成了越来越沉重的负担。目前，积极应对人口老龄化已上升为国家战略。国家卫生健康委等 15 个部门联合印发《“十四五”健康老龄化规划》，明确指出要针对老年人肌肉衰退实施积极预防和干预。但是，目前缺乏缓解肌肉衰退的有效方法。因此，探索显著有效地延缓老年人肌肉衰退的方法刻不容缓。

鞣花酸具有抗氧化、减少胆固醇和油脂累积等生物学活性[2]。由于溶解度低，难以被直接吸收利用，经肠道菌代谢后生成不同种类的尿石素[3]。其中，尿石素 A(Uro-A)是目前唯一临床显示可通过线粒体自噬改善肌肉功能的化合物，还具有抗癌、抗炎、改善认知障碍、减缓动脉粥样硬化等生物学活性，且对人类健康无风险[4−6]。但是，30 岁以上人群中，约 50% 的人不能产生尿石素 A[7]。因此，2018 年，美国食品药品监督管理局批准尿石素 A 为营养补充剂。2021 年，Amazentis 公司将化工合成的 Uro-A 开发为抵抗肌肉衰退的营养补充剂，受到消费者青睐。目前，Uro-A 的工业制备只有化工合成法[8]。如果制备富含 Uro-A 的食品，则可以让人们在享受美食的同时，补充 Uro-A，抵抗肌肉衰退，增强健康水平。

酸奶中的蛋白质和钙等营养素更容易被老年人吸收利用，增强全身免疫力，并具有调节肠道菌群、降低胆固醇、抗肿瘤、增强免疫力和延缓衰老等功效[9]。石榴中富含鞣花单宁，含量达到 0.35~0.75 mg/g[10]。利用可以转化鞣花酸生成尿石素 A 的安全菌株发酵制备石榴汁酸奶，将水解石榴中鞣花单宁生成的鞣花酸转化为尿石素 A，提升酸奶的营养价值。本研究室分离报道了一株具有转化鞣花酸生成尿石素 A 的嗜热链球菌 FUA329，菌种保藏号为 CGMCC NO.24963，研究表明该菌株具有良好的安全性和益生性[11−13]。本研究利用嗜热链球菌 FUA329 发酵制备含有尿石素 A 的石榴汁酸奶，对发酵条件进行优化，为开发具有营养保健功效的功能性酸奶提供实验支持。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

嗜热链球菌 FUA329　由本实验室保藏；脱脂乳粉　上海光明乳业股份有限公司；蔗糖　东莞市金仙峰实业有限公司；嗜热链球菌 CGMCC1.8748　购自中国普通微生物菌种保藏管理中心；石榴　采摘于江苏海洋大学苍梧校区；BHI 培养基　广东环凯微生物科技有限公司；DPPH 自由基清除率试剂盒、超氧阴离子自由基清除率试剂盒　南京建成生物工程研究所；$ABTS^+$自由基清除能力检测试剂盒　北京索莱宝科技有限公司；甲酸、乙腈　分析纯，上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

UV-1000 型紫外分光光度计　上海翱艺仪器有限公司；PB-10 pH 计　上海仪电科仪公司；WSC-S 色差仪　上海仪电物理光学仪器有限公司；XW-80A 漩涡混合器　上海青浦泸西仪器厂；MCR 102 模块化智能型高级流变仪　上海恪瑞仪器科技有限公司；Agilent1200 高效液相色谱仪　美国安捷伦科技公司。

1.2　实验方法

1.2.1　酸奶制作　石榴汁的制备[14]：取新鲜石榴洗净切块，破壁机打碎，石榴汁在 4 ℃、5000×g 离心 10 min，取上清液，用 500 mL 真空式过滤器过滤除菌。

石榴汁酸奶的制备[15]：脱脂牛奶中加入蔗糖和 15% 的石榴汁，85 ℃，杀菌 10 min，室温冷却至 40 ℃；无菌状态下分别接种嗜热链球菌 FUA329 和嗜热链球菌 CGMCC1.8748，菌液浓度 OD_{600} 为 2.7(3%, V/V)，搅拌均匀，罐装在玻璃瓶中于 37 ℃ 发酵 7 h；凝固后放 4 ℃ 冰箱冷藏。以不加石榴汁的酸奶为对照。

1.2.2　单因素实验　首先进行预实验，初步确立利用嗜热链球菌 FUA329 发酵石榴汁酸奶配方工艺参数。预实验中以脱脂牛奶的添加量为标准，石榴汁添

加量 20%、蔗糖添加量 8%、发酵时间 6 h、发酵剂接种量 3% 制作出的酸奶，经感官评定产品酸甜较为合理，口感较为细腻，石榴汁酸奶也具有一定的黏稠感。基于预实验结果，进行石榴汁酸奶的单因素优化实验。

1.2.2.1 发酵时间对酸奶感官评分的影响 以脱脂牛奶的添加量为标准，在石榴汁的添加量为 20%、蔗糖添加量为 8%、发酵剂接种量 3% 的情况下，探究发酵时间为 5、6、7、8、9 h 对酸奶感官评分的影响。实验中每个单因素变量确定最佳条件后，接下来就按照最优条件进行下一因素的确定。

1.2.2.2 石榴汁的添加量对酸奶感官评分的影响 以脱脂牛奶的添加量为标准，在蔗糖添加量为 8%、发酵时间 7 h、发酵剂接种量 3% 的情况下，探究石榴汁添加量为 5%、10%、15%、20%、25% 对酸奶感官评分的影响。

1.2.2.3 蔗糖的添加量对酸奶感官评分的影响 以脱脂牛奶的添加量为标准，在石榴汁的添加量为 15%、发酵时间 7 h、发酵剂接种量 3% 的情况下，探究蔗糖添加量为 5%、6%、7%、8%、9% 对酸奶感官评分的影响。

1.2.2.4 发酵剂接种量对酸奶感官评分的影响 以脱脂牛奶的添加量为标准，在石榴汁的添加量为 15%、蔗糖添加量为 7%、发酵时间 7 h 的情况下，探究发酵剂接种量 1%、2%、3%、4%、5% 对酸奶感官评分的影响。

1.2.3 响应面优化试验 在发酵时间为 7 h 的基础上选取对发酵效果影响较显著的石榴汁添加量(A)、蔗糖添加量(B)和发酵剂接种量(C)三因素，根据 Box-Benhnken 设计试验，以产品综合感官评分(Y)为响应值，采用响应面法对发酵条件进行优化，试验设计水平见表 1。

表 1 响应面试验因素和水平

Table 1 Factors and levels of response surface test

水平	因素		
	A石榴汁添加量(%)	B蔗糖添加量(%)	C发酵剂接种量(%)
−1	10	6	2
0	15	7	3
1	20	8	4

1.2.4 嗜热链球菌 FUA329 和嗜热链球菌 CGMCC 1.8748 发酵制备石榴汁酸奶的基础指标测定

1.2.4.1 感官评价 选取 10 名具有食品评价经验的人组成感官评定组，其中 7~10 岁男女各 1 名，每增加 10 岁，男女各增加 1 名，对发酵后成品酸奶的外观颜色、气味、口感、状态、酸甜度进行评价，满分为 100 分，每项分值为 20 分，最终结果为总分的平均值[16]。石榴汁酸奶感官评价标准见表 2。

1.2.4.2 酸度的测定 按照 GB 5009.239-2016 进行测定。

表 2 酸奶样品感官评分标准

Table 2 Sensory scoring criteria for yogurt samples

评价指标	评分标准	分值
外观颜色	呈乳白色或稍带黄色，色泽均匀一致	14~20
	呈微黄色或稍带红色，色泽不均匀	7~13
	颜色异常，出现灰暗或红色等其他颜色	0~6
气味	奶香味浓郁，有乳酸菌发酵后的香气	14~20
	奶香气味微弱，稍有奶腥味或稍带异味	7~13
	有鱼腥味，酒精发酵气味或其他不良气味	0~6
口感	口感细腻，爽口	14~20
	口感略粗糙，不爽口	7~13
	口感非常粗糙，有颗粒状物且不爽口	0~6
状态	均匀，无气泡，几乎无乳清析出，黏稠度适宜，状态稳定	14~20
	不均匀，有微量气泡，有明显乳清析出，黏度稀，且不太稳定	7~13
	凝乳不良，有气泡，乳清严重析出，黏度很稀，非常不稳定	0~6
酸甜度	酸甜适口	14~20
	酸味重或者不适口	7~13
	有苦味，涩味或其他不良滋味	0~6

1.2.4.3 乳清析出量的测定 取 10 g 发酵后的酸奶置于 120 目的漏斗中自然放置 2 h，收集滤液后称量[17]。

$$乳清析出率(\%)=\frac{析出后质量}{酸奶样品质量}\times 100$$

1.2.4.4 色度的测定 取发酵后的酸奶搅拌均匀，室温放置 30 min。称取 30.0 g 酸奶样品置于培养皿，轻微晃动使酸奶均匀铺在培养皿底部，用色度计进行检测[18]。

1.2.4.5 菌种活力的测定 样品在 4 ℃、3500×g 的条件下离心 10 min，向离心后的沉淀中加入 5 mL 灭菌生理盐水，与 MTT 染色液混匀，37 ℃ 培养条件下染色 30 min，4 ℃、12000×g 离心 10 min，DMSO 悬浮沉淀物，用酶标仪测定 600 nm 下 OD 值[19−20]。

1.2.4.6 抗氧化能力检测 DPPH 自由基清除率、$ABTS^+$自由基清除率和超氧阴离子自由基清除率均采用试剂盒进行测定。

1.2.4.7 流变学分析 酸奶样品在室温下放置 15 min，采用 MCR 102 流变仪测定表观黏度，转子型号 P60/Ti02150138。实验参数设定为：流动-斜坡模式，温度 4 ℃，平衡时间 5 min，剪切速率 0.01~100 s^{-1}[21]，取 50 个点进行测试。

1.2.4.8 高效液相色谱测定鞣花酸和尿石素 A 色谱柱为 ZORBAX SB-C_{18}(250×4.6 mm，5.0 μm)(Agilent Technologies，Santa Clara，CA，USA)。以 1% 甲醇(A)和乙腈(B)为流动相。流速 1.0 mL/min，进样量 5 μL，紫外检测器(UA)305 nm，柱温 30 ℃。洗脱条件：梯度洗脱，洗脱梯度曲线：0~15 min，0~20% B；15~20 min，20%~70% B；20~21 min，70%~95% B；21~24 min，95%~100% B；24~25 min，100%~20% B[22]。

1.3　数据处理

每组实验均为三个平行，通过 Excel 2010 对数据进行整理，利用 SPSS 23.0 软件对数据进行显著性分析，采用 Origin 软件进行图的绘制，响应面优化试验数据采用 Design-ExpertV8.0.6 进行分析。

2　结果与分析

2.1　单因素实验结果

2.1.1　发酵时间对菌株 FUA329 发酵酸奶感官评分的影响　在制作酸奶过程中发酵时间对酸奶感官品质影响较大，发酵时间短则酸奶黏稠度低影响口感，若发酵时间过长则发酵菌株可能会失活。由图 1 可以看出，在发酵时间在 5~9 h 之间，产品感官评分呈现先增加后下降的趋势，当发酵时间为 7 h 时，产品状态均一，色泽光亮，感官评分达 79.2。当发酵时间达到 9 h 时，产品出现轻微的乳清分离，影响品质。这可能是在发酵过程中，随着发酵时间的延长酸奶的酸度不断下降，从而造成酸奶中酪蛋白等其他蛋白质分子稳定性下降，进而出现蛋白质絮集、乳清分离的现象[23]，因此后续选择发酵时间 7 h 进行下一步实验。

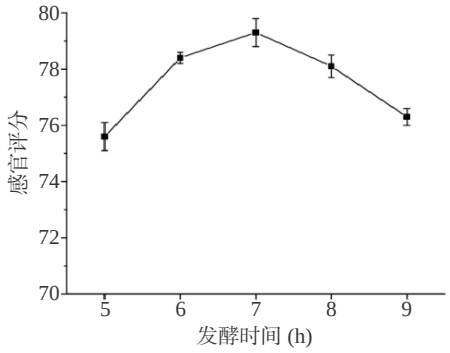


图 1　发酵时间对感官评分影响

Fig.1　Effect of fermentation time on sensory scores

2.1.2　石榴汁添加量对菌株 FUA329 发酵酸奶感官评分的影响　石榴汁含有大量单宁物质，添加量过大则口感酸涩，添加量过少则鞣花酸等多酚类物质含量较少。随着石榴汁添加量的不断提升，感官评分呈现先增高后下降的趋势。当石榴汁添加量为 15% 时，发酵后的酸奶风味达到最佳，口味适宜（图 2），因此选择石榴汁 15% 添加量进行下一步实验。

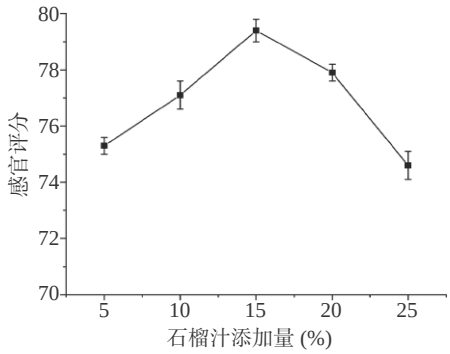


图 2　石榴汁添加量对感官评分影响

Fig.2　Effect of pomegranate juice addition on sensory scores

2.1.3　蔗糖添加量对菌株 FUA329 发酵酸奶感官评分的影响　蔗糖添加量在 5%~9% 之间，酸奶的感官评分先上升后下降，当蔗糖添加量为 7% 时，产品口感酸甜适中（图 3）。蔗糖的加入会丰富酸奶的口感，增加酸奶的黏稠度，但是蔗糖添加过量可能会逐渐掩盖酸奶的酸味，使酸奶尝起来口味偏甜，同时蔗糖添加量过多，还会影响产品菌株的发酵能力，造成产品品质下降，失去酸奶中的特有风味。

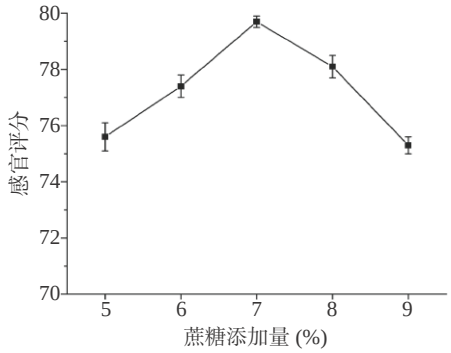


图 3　蔗糖添加量对感官评分影响

Fig.3　Effect of sucrose addition on sensory scores

2.1.4　发酵剂接种量对菌株 FUA329 发酵酸奶感官评分的影响　产品发酵剂的接种量的多少主要取决于发酵剂的种类，不同类型的发酵剂接种量有所不同。酸奶的感官评分随发酵剂接种量的增加呈现先增高后下降的趋势，当发酵剂接种量在 3% 时，发酵出的酸奶质地柔顺，酸甜适中；当发酵剂接种量增大到 5% 时，发酵出的酸奶口感较酸，适口度差，感官评分低（图 4）。在酸奶发酵过程中大量的发酵剂在发酵初期就使产品达到较高的酸度，同时随着发酵时间的延长菌株还在不断增长，后酸化现象严重，因此造成产品的适口度较差，感官品质下降[24]。

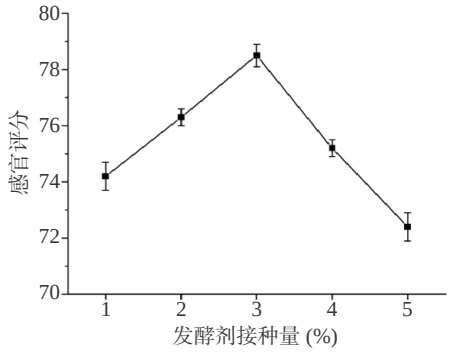


图 4　发酵剂接种量对感官评分影响

Fig.4　Effect of inoculating amount of fermentation agents on sensory scores

2.2　响应面试验

2.2.1　FUA329 发酵石榴汁酸奶响应面试验结果分析　基于单因素实验结果，菌株 FUA329 发酵石榴汁酸奶在 7 h 时产品状态达到最佳，感官评分最高，

因此，控制发酵时间 7 h，发酵温度 37 ℃，以石榴汁添加量、蔗糖添加量、发酵剂接种量进行响应面优化试验，结果如表 3 所示；运用 Design-Expert 软件对响应值进行回归拟合，得到回归方程为：$Y=79.5+0.30A+0.21B+0.11C-0.075AB-0.23AC-0.05BC-0.90A^2-1.23B^2-1.12C^2$，并对所得的回归方程进行方差分析，结果如表 4 所示。

表 3 响应面试验设计及结果

Table 3 Experimental design and results of response surface methodology

试验号	A石榴汁添加量	B蔗糖添加量	C发酵剂接种量	Y感官评分
1	0	0	0	79.5
2	1	−1	0	77.4
3	0	0	0	79.6
4	−1	0	−1	76.6
5	1	1	0	77.7
6	0	0	0	79.4
7	0	1	−1	77.3
8	0	−1	−1	77.0
9	1	0	1	77.9
10	0	0	0	79.3
11	0	0	0	79.7
12	−1	0	1	77.5
13	−1	−1	0	76.9
14	1	0	−1	77.9
15	−1	1	0	77.5
16	0	1	1	77.4
17	0	−1	1	76.9

表 4 回归模型方差分析

Table 4 Variance analysis of regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	*F*值	*P*值	显著性
模型	18.21	9	2.02	43.24	<0.0001	**
A	0.72	1	0.72	15.39	<0.0057	**
B	0.36	1	0.36	7.72	0.0273	*
C	0.10	1	0.10	2.16	0.1847	
AB	0.023	1	0.023	0.48	0.5104	
AC	0.020	1	0.020	4.33	0.0760	
BC	0.001	1	0.001	0.21	0.6579	
A^2	3.41	1	3.41	72.90	<0.0001	**
B^2	6.32	1	6.32	1325.05	<0.0001	**
C^2	5.33	1	45.33	113.90	<0.0001	**
残差	0.33	7	0.047			
失拟项	0.23	3	0.076	3.03	0.1559	不显著
纯误差	0.10	4	0.025			
总和	18.54	16				
	R^2=0.9813		R^2_{Adj}=0.9572			

注：“*”表示差异显著(0.01<*P*<0.05)，“**”表示差异极显著(*P*<0.01)。

由表 4 可知，本试验回归模型 *F* 值为 43.24，*P*<0.01，极其显著；失拟项(*P*=0.1559)，不显著；说明本试验的回归模型显著性和稳定性较好。其中该模型中 A 极显著，对产品感官评分影响较大，B 显著，同样对产品感官评分具有影响；二次项 A^2、B^2、C^2 极显著；交互项 AB、BC、AC 不显著。因此三个因素对酸奶感官评分的影响顺序为 A(石榴汁添加量)>B(蔗糖添加量)>C(发酵剂接种量)。

发酵酸奶响应面等高线图如图 5 所示，对响应面结果分析得出石榴汁酸奶的最佳工艺条件为石榴汁添加量 15.79%、蔗糖添加量 7.08%、发酵剂接种量 3.04%。

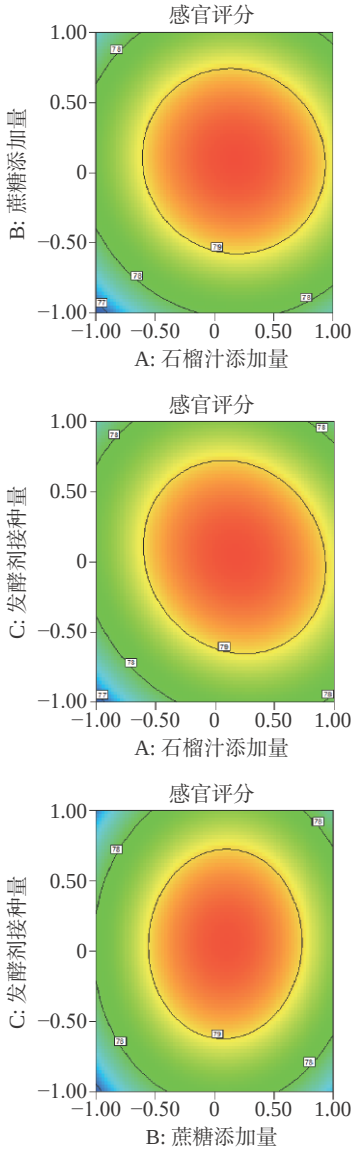


图 5 不同因素之间的交互作用

Fig.5 Interaction between different factors

2.3 验证实验

为检验模型的可靠性，在发酵工艺条件为石榴汁添加量为 15.79%，蔗糖添加量为 7.08%，发酵剂接种量为 3.04% 下，进行三次平行实验。所测得的产品感官评分为 79.4±1.7，与模型理论值 79.5 接近，因此基于响应面优化的石榴汁酸奶工艺参数优化较准确可靠。

2.4 嗜热链球菌 FUA329 石榴汁酸奶基础指标测定结果

酸度、乳清析出量、色差、菌种活力是衡量酸奶品质的重要指标。由表 5 可知嗜热链球菌 FUA329 发酵酸奶的感官评分、滴定酸度与嗜热链球菌 CGMCC1.8748 发酵酸奶的差异不显著，两株菌的产

表 5　酸奶样品基础指标对比

Table 5　Comparison of basic indicators of yogurt samples

酸奶种类	感官评分	滴定酸度(°T)	乳清析出量(%)	色差	菌种活力OD_{600}
嗜热链球菌FUA329原味酸奶	75.7±1.9^{b}	76.3±1.2^{b}	12.25±0.85^{b}	91.97±2.97^{a}	1.78±0.03^{c}
嗜热链球菌FUA329石榴汁酸奶	79.5±1.7^{a}	82.5±1.3^{a}	9.6±0.97^{d}	68.17±2.75^{b}	2.01±0.03^{a}
嗜热链球菌CGMCC1.8748原味酸奶	76.1±1.5^{b}	75.7±1.3^{b}	13.56±0.82^{a}	92.97±2.14^{a}	1.87±0.02^{b}
嗜热链球菌CGMCC1.8748石榴汁酸奶	78.9±1.6^{a}	80.8±1.4^{a}	10.7±0.72^{c}	68.22±1.95^{b}	1.96±0.01^{a}

注：同列不同小写字母表示存在显著性差异(P<0.05)；表6同。

表 6　酸奶样品抗氧化能力对比

Table 6　Comparison of antioxidant capacity of yogurt samples

	DPPH自由基清除率(%)	$ABTS^{+}$自由基清除率(%)	超氧阴离子自由基清除率(%)
嗜热链球菌FUA329原味酸奶	66.32±1.36^{c}	66.70±1.90^{c}	54.13±0.81^{c}
嗜热链球菌FUA329石榴汁酸奶	82.87±1.48^{a}	88.20±2.10^{a}	76.92±1.02^{a}
嗜热链球菌CGMCC1.8748原味酸奶	63.99±1.46^{c}	60.90±1.21^{c}	52.27±1.17^{c}
嗜热链球菌CGMCC1.8748石榴汁酸奶	73.50±1.39^{b}	83.80±1.73^{b}	68.64±1.23^{b}

酸能力和风味物质产生水平差异不显著(P>0.05)。嗜热链球菌 FUA329 发酵石榴汁酸奶乳清析出量显著低于热链球菌 CGMCC1.8748 发酵酸奶以及未添加石榴汁的原味酸奶(P<0.05)。这可能是由于石榴汁中含有大量酚类物质，多酚和蛋白质之间相互作用可形成稳定的配合物，增加了酪蛋白网络稳定性和持水能力[25]。粉色的石榴汁造成石榴汁酸奶的色差值显著低于原味酸奶(P<0.05)。嗜热链球菌 FUA329 发酵石榴汁酸奶的菌种活力显著高于原味酸奶(P<0.05)，初步表明石榴汁可以促进嗜热链球菌 FUA329 活力。

2.5　嗜热链球菌 FUA329 石榴汁酸奶抗氧化能力检测结果

嗜热链球菌 FUA329 发酵的两种酸奶与嗜热链球菌 CGMCC1.8748 发酵的两种酸奶的 DPPH 自由基清除率、$ABTS^{+}$自由基清除率、超氧阴离子自由基清除率结果如表 6 所示。嗜热链球菌 FUA329 菌株发酵石榴汁酸奶的 DPPH、$ABTS^{+}$、超氧阴离子自由基清除率显著高于嗜热链球菌 CGMCC1.8748 发酵石榴汁酸奶(P<0.05)；石榴汁酸奶抗氧化活性显著高于原味酸奶(P<0.05)，可能是石榴汁中含有的具有抗氧化活性的多酚、蛋白质所致[26−27]。

2.6　嗜热链球菌 FUA329 石榴汁酸奶流变学检测结果

表观黏度可从侧面反映样品的结构及稳定性，是感官评价的重要组成部分[28]。两种菌发酵酸奶的表观黏度都随剪切速率的增长而下降。石榴汁酸奶的黏度随剪切速率的变化曲线如图 6 所示。嗜热链球菌 FUA329 和 CGMCC1.8748 发酵后的石榴汁酸奶黏度在受外界干扰方面差异不显著。两种酸奶剪切应力变化均呈现剪切变稀的曲线特征，剪切应力都随剪切速率的增大而增大，但是当剪切速率达到一定值时，剪切应力增长速率变得缓慢，表明二者流变特性相近。

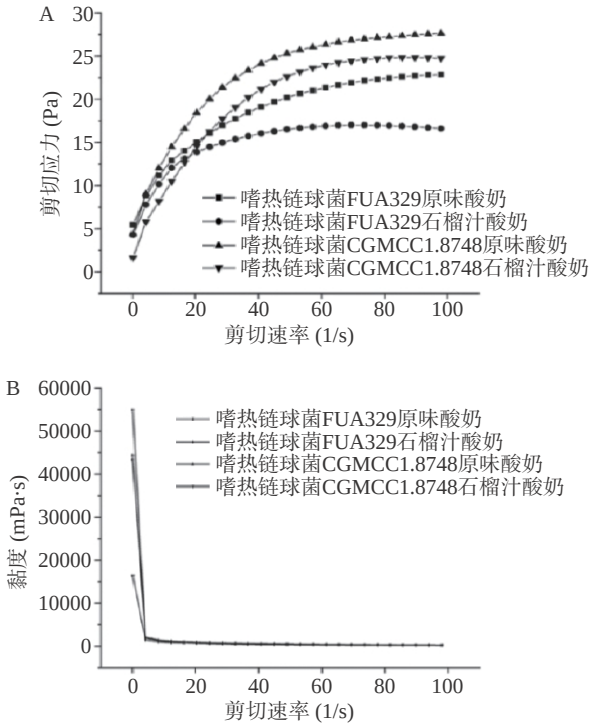


图 6　石榴汁酸奶剪切应力(A)及黏度曲线(B)

Fig.6　Shear stress (A) and viscosity curve (B) of pomegranate juice yogurt

2.7　嗜热链球菌 FUA329 石榴汁酸奶发酵前后尿石素 A 检测结果

尿石素 A 比鞣花酸具有更高的生物利用度，且具有缓解肌肉衰退等多种生物学活性，因此，转化食品中的鞣花酸生成尿石素 A 可显著提高食品的保健功效[29]。采用高效液相色谱法测定嗜热链球菌 FUA329 石榴汁酸奶中的鞣花酸代谢产生尿石素 A 的含量，检测结果如图 7 所示。嗜热链球菌 FUA329 发酵 7 h 后石榴汁酸奶中的尿石素 A 含量为 3.31 μmol/L，鞣花酸转化为尿石素 A 的转化率为 35.7%。嗜热链球菌 FUA329 转化石榴汁中鞣花酸生成尿石素 A 的最佳时间为 48 h[30]。本研究酸奶最

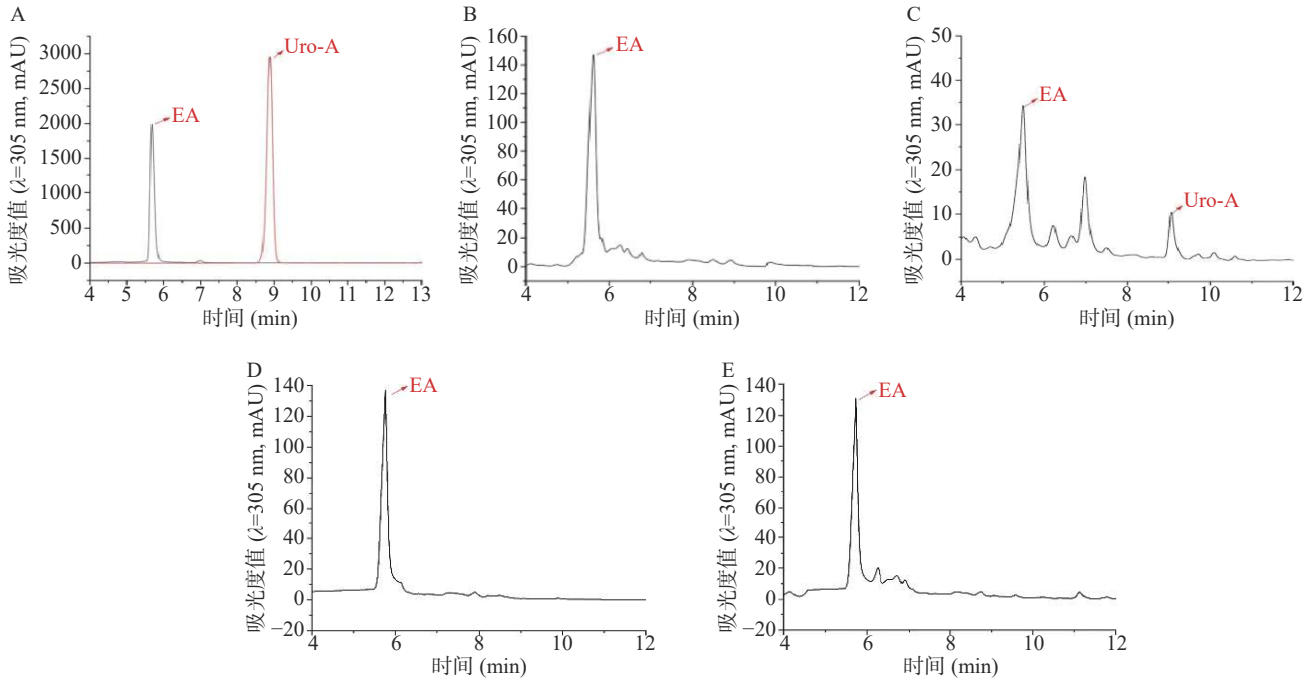


图 7 高效液相色谱测定嗜热链球菌 FUA329、嗜热链球菌 CGMCC1.8748 发酵石榴汁酸奶对鞣花酸和尿石素 A 含量的影响

Fig.7 Effect of pomegranate juice yogurt fermented by *S. thermophilus* FUA329 and *S. thermophilus* CGMCC1.8748 on the content of ellagic acid and urolithin A determined by high performance liquid chromatography

注：A. 鞣花酸和尿石素 A 标准品；B. 菌株 FUA329 未发酵石榴汁酸奶；C. 菌株 FUA329 发酵 7 h 的石榴汁酸奶；D. 菌株 CGMCC1.8748 未发酵石榴汁酸奶；E. 菌株 CGMCC1.8748 发酵 7 h 的石榴汁酸奶。

佳发酵时间为 7 h，因此，鞣花酸转化生成尿石素 A 的转化率偏低。

3 结论

通过单因素结合响应面试验优化获得了嗜热链球菌 FUA329 发酵制备石榴汁酸奶的发酵工艺。嗜热链球菌 FUA329 与嗜热链球菌 CGMCC1.8748 发酵添加和不添加石榴汁酸奶在风味和品质上差异不显著。菌株 FUA329 发酵石榴汁酸奶的 DPPH 自由基清除率、$ABTS^{+}$自由基清除率和超氧阴离子自由基清除率显著高于菌株 FUA329 发酵原味酸奶以及嗜热链球菌 CGMCC1.8748 发酵石榴汁酸奶（$P<0.05$）。嗜热链球菌 FUA329 发酵石榴汁酸奶 7 h，尿石素 A 含量达到 3.31 μmol/L，鞣花酸转化为尿石素 A 的转化率为 35.7%。本研究为利用嗜热链球菌 FUA329 制备功能性石榴汁酸奶提供了一定的参考数据。

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

参考文献

[1] JONES G, TRAJANOSKA K, SANTANASTO A J, et al. Genome-wide meta-analysis of muscle weakness identifies 15 susceptibility loci in older men and women[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 654.

[2] ZHANG X M, FANG Y W, YANG G, et al. Isolation and characterization of a novel human intestinal *Enterococcus faecium* FUA027 capable of producing urolithin A from ellagic acid[J]. Front Nutr, 2022, 9: 1039697.

[3] GARCIA-VILLALBA R, GIMERNEZ-BASTIDA J A, CORTES-MARTIN A, et al. Urolithins: A comprehensive update on their metabolism, bioactivity, and associated gut microbiota[J]. Mol Nutr Food Res, 2022, 66(21): e2101019.

[4] D'AMICO D, ANDREUX P A, VALDES P, et al. Impact of the natural compound urolithin A on health, disease, and aging[J]. Trends Mol Med, 2021, 27(7): 687−699.

[5] SINGH A, D'AMICO D, ANDREUX P A, et al. Urolithin A improves muscle strength, exercise performance, and biomarkers of mitochondrial health in a randomized trial in middle-aged adults[J]. Cell Rep Med, 2022, 3(5): 100633.

[6] SINGH R, CHANDRASHEHARAPPA S, BODDULURI S R, et al. Enhancement of the gut barrier integrity by a microbial metabolite through the Nrf2 pathway[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 89.

[7] CORTES-MAETIN A, GARCIA-VILLALBA R, GONZALEZ-SARRIAS A, et al. The gut microbiota urolithin metabotypes revisited: The human metabolism of ellagic acid is mainly determined by aging[J]. Food Funct, 2018, 9(8): 4100−4106.

[8] ZHANG M, CUI S, MAO B, et al. Ellagic acid and intestinal microflora metabolite urolithin A: A review on its sources, metabolic distribution, health benefits, and biotransformation[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2023, 63(24): 6900−6922.

[9] DENNIS A, ROBERT W. Yogurt, cultured fermented milk, and health: A systematic review[J]. Nutrition Reviews, 2021, 79(5): 599−614.

[10] LIPINSKA L, KLEWICKA E, SOJKA M. The structure, occurrence and biological activity of ellagitannins: A general review[J]. Acta Sci Pol Technol Aliment, 2014, 13(3): 289−299.

[11] LIU Q T, LIU S, YE Q W, et al. A novel *Streptococcus thermophilus* FUA329 isolated from human breast milk capable of producing urolithin A from ellagic acid[J]. Foods, 2022, 11: 3280.

［12］ LIU Q T, BIAN Y Y, MU S T, et al. Genomic and phenotypic-based safety assessment and probiotic properties of *Streptococcus thermophilus* FUA329, a urolithin A-producing bacterium of human milk origin[J]. Genomics, 2023, 115(6): 110724.
［13］ XIA M J, HUA Z Y, ZHAO Y, et al. Improvement of urolithin A yield by *in vitro* cofermentation of *Streptococcus thermophilus* FUA329 with human gut microbiota from different urolithin metabotypes[J]. J Agric Food Chem, 2024, 72(6): 3008−3016.
［14］ 刘方方. 发酵石榴汁抗氧化性和抗过敏性研究[D]. 扬州：扬州大学, 2014. ［LIU F F. Study on antioxidant and antiallergic properties of fermented pomegranate juice[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2014.］
［15］ 邱蓝昊, 蔡东山, 李吴凡, 等. 魔芋葡甘聚糖在搅拌型酸奶中的应用[J]. 中国食品添加剂, 2021, 32(8): 90−94. ［QIU L H, CAI D S, LI W F, et al. Application of konjac glucomannan in stirred yoghurt[J]. Chinese Food Additives, 2021, 32(8): 90−94.］
［16］ 田佳乐. 不同复配比例酸奶发酵剂的筛选及其发酵特性研究[D]. 呼和浩特：内蒙古农业大学, 2022. ［TIAN J L. Study on screening and fermentation characteristics of yoghurt starter with different compounding ratios[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2022.］
［17］ 雷娟. 水果酸奶加工工艺研究[J]. 中国食品, 2023, 18: 78−80. ［LEI J. Research on processing technology of fruit yogurt[J]. Chinese Food, 2023, 18: 78−80.］
［18］ MEHAYA F M, EI-SHAZLY A I, EI-DEIN A N, et al. Evaluation of nutritional and physicochemical characteristics of soy yogurt by *Lactobacillus plantarum* KU985432 and *Saccharomyces boulardii* CNCMI-745[J]. Scientific Reports, 2023, 13(1): 13026.
［19］ 何玉婷. 开菲尔源优质乳酸菌的分离、筛选与酸乳复合菌种发酵剂的研制[D]. 镇江：江苏大学, 2020. ［HE Y T. Isolation and screening of high-quality lactic acid bacteria from Kefir source and development of starter culture of acid-emulsion complex bacteria[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2020.］
［20］ 刘梦瑶. 宁夏黄果枸杞酚类物质分析及抗氧化、体外消化和发酵特性研究[D]. 杨凌：西北农林科技大学, 2021. ［LIU M Y. Analysis of phenolic substances and antioxidant, *in vitro* digestion and fermentation characteristics of *Lycium barbarum* in Ningxia[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2021.］
［21］ MARINA H, MIRA R, ZORANA M, et al. Fortification of goat milk yogurt with goat whey protein concentrate-Effect on rheological, textural, sensory and microstructural properties[J]. Food Bioscience, 2023, 56: 103393.
［22］ XIA M J, MU S T, FANG Y W, et al. Enetic an probiotic characteristics of urolithin A producing *Enterococcus faecium* FUA027[J]. Foods, 2023, 12(5): 1021.
［23］ PHU Y T, TAI B T, HON W C, et al. Effects of storage and yogurt matrix on the stability of tocotrienols encapsulated in chitosan-alginate microcapsules[J]. Food Chemistry, 2018, 241: 79−85.
［24］ 刘飞. 石榴汁粉对酸奶发酵及其品质影响的研究[D]. 合肥：合肥工业大学, 2019. ［LIU F. Study on the effect of pomegranate juice powder on yogurt fermentation and its quality[D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2019.］
［25］ 何齐, 李雪, 冯倩, 等. 赛里木传统酸奶品质评价及风味物质分析[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(13): 175−182. ［HE Q, LI X, FENG Q, et al. Quality evaluation and flavor substance analysis of Saimu traditional yoghurt[J]. Food Research and Development, 2023, 44(13): 175−182.］
［26］ 赵永波, 杜玲玲, 刘璐, 等. 贮藏及消化对蓝莓酸奶中酚类物质稳定性及抗氧化活性影响[J]. 食品科学, 2018, 39(9): 53−59. ［ZHAO Y B, DU L L, LIU L, et al. Effects of storage and digestion on the stability and antioxidant activity of phenols in blueberry yogurt[J]. Food Science, 2018, 39(9): 53−59.］
［27］ 赵晓明, 宋菲, 张玉锋, 等. 功能性椰子植物酸奶贮藏过程中功能成分及活性的变化[J]. 食品工业科技, 2023, 44(1): 347−355. ［ZHAO X M, SONG F, ZHANG Y F, et al. Changes of functional components and activities of functional coconut vegetable yogurt during storage[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(1): 347−355.］
［28］ SADIGHBATHI S, AMIRI S, DARIS P, et al. Development and properties of functional yoghurt enriched with postbiotic produced by yoghurt cultures using cheese whey and skim milk[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1276268.
［29］ ZHANG M W, CUI S M, MAO B Y, et al. Ellagic acid and intestinal microflora metabolite urolithin A: A review on its[J]. Taylor & Francis, 2023, 63(24): 6900−6922.
［30］ LIU Q T, HUA Z Y, CHEN M, et al. Changes in polyphenols and antioxidant properties of pomegranate peels fermented by urolithin A-producing *Streptococcus thermophilus* FUA329[J]. ACS Food Science&Technology, 2023, 3(8): 1383−1392.

李静, 张梦圆, 彭方军, 等. 加工方式对小龙虾尾及加工液中重金属含量的影响 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 182−189. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022090158

LI Jing, ZHANG Mengyuan, PENG Fangjun, et al. Effects of Cooking Methods on Heavy Metal Levels in Crayfish Tail and Cooking Juice[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 182−189. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022090158

·食品安全·

加工方式对小龙虾尾及加工液中重金属含量的影响

李　静[1], 张梦圆[1], 彭方军[1], 杜红英[1,2,*]

（1.华中农业大学食品科技学院, 湖北武汉 430070;
2.国家大宗淡水鱼加工技术研发分中心（武汉）, 湖北武汉 430070）

摘　要: 本文研究了不同加工方式下小龙虾加工液（汤汁）中重金属积累，及其对可食部位（虾尾）重金属水平的影响。在水煮、油炸及调味三种加工方式下，采用电感耦合等离子光谱仪（ICP-OES）检测虾尾及不同阶段小龙虾加工液中 As、Ba、Cd、Cr、Cu、Hg、Mn、Ni 及 Pb 九种重金属的水平。利用单因子污染指数判断虾尾重金属污染程度，通过相关性分析探究加工液中重金属积累对虾尾的影响。结果表明：小龙虾水煮液中观察到了高浓度的 Mn 和 Cu 元素，油炸小龙虾后加工液中有毒元素 As 和 Cr 的浓度分别增加了 88.8% 和 80.7%，小龙虾调味液中 Mn 浓度与空白相比增加了约 5.4 倍，随着加工复杂程度的深入，加工液中大多数重金属水平都会随加工工序逐渐积累。相关性分析表明，加工液中重金属与虾尾中某些重金属浓度显著正相关（P<0.05），在水煮及调味加工过程中虾尾易受 Mn 的污染。

关键词: 小龙虾, 加工方式, 重金属污染, 加工液, ICP-OES
中图分类号: TS254.1　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2024)21−0182−08
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022090158
本文网刊:

Effects of Cooking Methods on Heavy Metal Levels in Crayfish Tail and Cooking Juice

LI Jing[1], ZHANG Mengyuan[1], PENG Fangjun[1], DU Hongying[1,2,*]

（1.College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;
2.National R & D Branch Center for Conventional Freshwater Fish Processing (Wuhan), Wuhan 430070, China）

Abstract: In order to explore the accumulation of heavy metals in crayfish cooking juice and its effect on the level of heavy metals in edible parts (crayfish tail) under different cooking methods. The levels of nine heavy metals As, Ba, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Ni, and Pb in crayfish tails and cooking juice at different stages were detected by inductively coupled plasma spectrometer (ICP-OES) under three different cooking methods: Boiling, frying and seasoning. The single factor pollution index was used to judge the heavy metal pollution degree of crayfish tails, and the influence of heavy metal accumulation in cooking juice on crayfish tails was explored by correlation analysis. The results showed that high concentrations of Mn and Cu were observed in the crayfish boiling juice, the concentrations of toxic elements As and Cr increased by 88.8% and 80.7% in the crayfish frying oil, respectively. Furthermore, the concentration of Mn in the crayfish seasoning sauce increased by about 5.4 times compared with the control. With the increase of complexity of cooking method, the level of most heavy metals in the cooking juice would accumulate gradually with the processing process. The correlation analysis revealed that there was a significant positive correlation between heavy metals in the cooking juice and certain metals in

收稿日期: 2022−09−19
基金项目: 国家重点研发计划项目（2019YFC1606003）。
作者简介: 李静（1997−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 水产品加工, E-mail: lijing719666@163.com。
*** 通信作者:** 杜红英（1978−）, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 水产品加工、贮藏及生物大分子互作, E-mail: hydu@mail.hzau.edu.cn。

crayfish tails (P<0.05), and crayfish tails were susceptible to Mn contamination during the boiling and seasoning cooking process.

Key words: crayfish; cooking methods; heavy metals contamination; cooking juice; ICP-OES

小龙虾（*Procambarus clarkii*）即克氏原螯虾，是一种栖息在淡水水域中的甲壳类动物，原产于南美，20 世纪初引入我国[1]，由于其味道鲜美且含有丰富的营养成分[2]，逐渐成为我国最受欢迎的水产品之一。目前小龙虾的销售主要以加工成品为主，其在加工过程中会产生大量汤汁（即加工液），小龙虾加工液形成是一个动态的变化，除了水、油及调味品等物质外，小龙虾自身的成分（如蛋白质、脂肪等）也会在脱水过程中溶解在加工液中，因此成分较为复杂。随着我国小龙虾产业加工量不断提高，小龙虾的经济效益和良好发展趋势受到了越来越多的关注，除产品本身外，如何提高小龙虾加工液的产品附加值也成了产业发展的新趋势。目前，对小龙虾加工液的研究多集中在其营养价值及风味[3−4]，但有关加工液中有害物质，如重金属的研究却寥寥无几。部分研究证实了加工液中重金属积累的现象，如 Houlbreque 等[5] 在烹饪贻贝后的加工液中观察到了较高浓度的 Cd 元素，煮沸过的螃蟹汤汁中 Hg 和 Pb 浓度有所上升[6]。因此研究小龙虾加工液中重金属的水平不仅与其能否高值化利用相关，重金属浓度过高时甚至存在污染虾尾的可能，对消费者造成潜在风险。

重金属主要指密度超过 5 g/m^3 且其毒性对人类健康影响较大的金属[7]。即使在非常低的剂量下，汞、镉、铬和铅等有毒金属也会造成神经毒性和肾毒性，甚至诱发癌症[8]。铜、锌、镍、锰等人体必需的微量元素如果过量，也可能会对人体造成伤害[9]。研究表明，小龙虾在加工过程中所使用的加工器具及调味品都可能会成为加工液潜在的重金属污染来源。其中，不锈钢炊具广泛应用于食品加工中，尽管容器都覆盖着表面涂层，以减少容器向食品中转移重金属，但金属离子仍可能会浸出到食品体系中[10]；香料/调味品也可能在加工过程中成为金属的载体[11]。然而，作为代谢器官，小龙虾的肝胰腺及外骨骼更容易富集重金属[12]，如砷[13] 等，这部分器官中的重金属在加工过程是否会随汁液溶解释放的研究目前还鲜少报道。

因此，本文旨在分析在水煮、油炸及调味三种加工方式下，小龙虾加工液中 As、Ba、Cd、Cr、Cu、Hg、Mn、Ni 及 Pb 九种重金属的积累及其主要污染来源，探究加工液中重金属水平对小龙虾尾的影响，以期为小龙虾安全加工及加工液的高值化利用提供参考。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

小龙虾（*Procambarus clarkii*）　于 2021 年 7 月购自华中农业大学市场，平均养殖周期约为 2 个月，个体重量为 25.7~40.2 g，平均重量 35.5±3.7 g；长度为 8.4~11.7 cm，平均长度 9.8±1.5 cm。经超纯水清洗后密封在聚乙烯袋中并做好标记，置于−18 ℃ 冻藏；低芥酸菜籽油　上海佳格食品有限公司；生姜、花椒、干辣椒　武汉中百仓储超市；啤酒　华润雪花啤酒有限公司；豆瓣酱　四川天味食品有限公司；硝酸、过氧化氢　分析纯，国药集团化学试剂有限公司；所有试剂均为分析纯。

304 不锈钢二层蒸煮锅及 32 cm 精铁炒锅　广州美厨智能家居科技股份有限公司；BSA224S 分析天平　赛多利斯科学仪器有限公司；DNP-9022A 电热恒温干燥箱　上海索普仪器有限公司；FBKH-50 mL 高压反应釜、KH-50 mL 聚四氟乙烯消解罐　西安常仪仪器设备有限公司；QSJ1 粉碎机　中山优益电器实业有限公司；RE-100 L 旋转蒸发仪　郑州长征仪器制造有限公司；Varian（720-ES）电感耦合等离子发射光谱仪（ICP-OES）　安捷伦科技有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　小龙虾加工及加工液的制备　随机挑选 96 只小龙虾，样本被均分为四组，除作为空白组的生样品外其余三组样本采用不同的加工方式烹制，所有操作均在符合 GB 29601-2013《不锈钢器皿》的容器中进行，制备方式如下：a.水煮加工：小龙虾于盛有沸水（W∶V，1∶2）的蒸煮锅中煮制 15 min，而后收集加工产生的小龙虾水煮液，并设蒸馏水及煮沸 15 min 后的空白沸水为对照；b.油炸加工：小龙虾于盛有 180 ℃ 菜籽油（W∶W，2∶1）中油炸 5 min 后收集油炸液，并设生油及油炸 5 min 后的空白熟油为对照；c.调味加工：小龙虾于菜籽油（W∶W，2∶1）中油炸 5 min 后弃去煎炸液，加入调味品（生姜 5 g、花椒 3 g、干辣椒 5 g 和蚕豆酱 150 g）翻炒混匀，与 660 mL 啤酒共同煮沸 15 min，收集加工后的小龙虾调味液；保持相同的油料比，加工方式不变，在不添加小龙虾的条件下制备空白调味液为对照。

1.2.2　小龙虾的消化　加工结束后，用塑料镊子从小龙虾壳中取出可食用部分（小龙虾尾），在 65 ℃ 下干燥至恒重，并利用粉碎机进行均质。将均质后的样品直接密封保存在干净的自封袋中并做好标记，空白组处理方式同上。

参考 Xiong 等[14] 的方法并稍作修改。准确称取均质后的小龙虾尾干样品（0.5 g）置于 50 mL 聚四氟乙烯消解罐中，加入 5 mL HNO_3（65%）和 1 mL H_2O_2（30%）。将消解罐置于高压釜中消解 10 h，并对消化阶段的加热方式进行优化，分 4 个阶段阶梯式加热：第一阶段低温 50 ℃ 1 h，第二阶段 70 ℃ 1 h，第三阶段 100 ℃ 1 h，第四阶段 120 ℃ 7 h。加热结

束后将样品置于电热板上进行赶酸，待样品冷却至室温后转移到 25 mL 聚四氟乙烯容量瓶中，用 HNO_3(1%)定容。

1.2.3 加工液的消化

1.2.3.1 水煮加工液的消化 蒸馏水及沸水的消解参考 Dey 等[15] 的方法，准确量取 200 mL 水样于 250 mL 的锥形瓶中，加入 2 mL 65% HNO_3 酸化，在电热板上加热浓缩至 25 mL 以下，用 HNO_3(1%)定容至 25 mL。

200 mL 小龙虾水煮液先于旋转蒸发瓶中旋转浓缩至 20 mL(称量前后体积计算浓缩倍数)，取浓缩后的液体试样 5 mL 于聚四氟乙烯消解内罐中，旋紧高压反应釜，于 120 ℃ 消解 5 h 后置于电热板上进行赶酸，样品冷却至室温后转移至 25 mL 容量瓶中，用 HNO_3(1%)定容。

1.2.3.2 含油脂成分的加工液消解(油炸加工液和调味加工液) 含油脂成分的样品脂肪含量较高，消解较为特殊。消解方法参考倪张林等[16] 的研究并稍作修改，采用硝酸—过氧化氢体系进行湿法消解。准确称取 0.5 g 的样品于锥形瓶中，加入 15 mL 浓硝酸及 2 mL 过氧化氢(30%)，于通风橱中静置 24 h，次日于电热板上加热，当瓶内硝酸剩余 5 mL 左右时，取下锥形瓶冷却，加入适当硝酸继续加热，期间视反应情况补加适量过氧化氢催化，直至消解液清亮为止。然后赶酸至近干，冷却后，用 HNO_3(1%)少量多次洗涤定容至 25 mL。

1.2.4 重金属含量的测定 As、Ba、Cd、Cr、Cu、Hg、Mn、Ni、Pb 九种重金属含量的测定参考 GB 5009.268-2016《食品安全国家标准 食品中多元素的测定》，利用电感耦合等离子体发射光谱仪(ICP-OES)测定消化后样品中的重金属含量。质量控制(QA/QC)体系包括空白、8 个平行样品与 3 次重复测定，以及符合国家标准 GSB 04-1767-2004 的认证标准物质。ICP-OES 的可重复性测量值通常≥97%。对重金属标准品进行加标和消解以检查回收率，空白样品不加标，以控制制备方法的可靠性。

1.2.5 单因子污染指数 通过单因子污染指数法分析和评估加工前后小龙虾尾中重金属污染程度。

单因子污染指数 P_i 计算公式如下[17]：

$$P_i = \frac{C_i}{S_i}$$

式中，P_i 为单因子污染指数；C_i 为虾尾中某种重金属含量(mg/kg)；S_i 为某种重金属的允许限量(mg/kg，参考 GB 2762-2017《食品安全国家标准 食品中污染物限量》甲壳类水产品重金属限量标准)，如表 1 所示。

单因子污染指数评价标准如下：P_i<0.2 时，该样品中重金属的含量为正常背景水平，当 0.2≤P_i<0.6，该样品即为轻度污染水平；当 0.6≤P_i<1.0，该样品为中度污染水平；当 P_i≥1.0 则该样品为重度污染水平，即该测定样品对人体有潜在的危害。

表 1 GB 2762-2017 甲壳类水产品重金属允许限量标准

Table 1 Limit standards of crustacean aquatic products heavy metal in GB 2762-2017

重金属	As	Cd	Cr	Hg	Pb
标准(mg/kg)	0.5	0.5	2	0.5	0.5

1.3 数据处理

本文采用 Excel 2010 及 SPSS 23.0 进行数据分析，Prism9.0 进行作图。所有试验数据为 5 个平行试验的平均值，用平均值±标准差表示。Pearson 相关系数用于分析变量的相关性，单因素方差分析检验不同样品间的差异，进行 LSD 多重比较。在 95% 置信水平下，P<0.05 代表具有显著性差异；P>0.05 代表差异不显著。

2 结果与分析

2.1 不同加工方式对小龙虾尾中重金属的影响

2.1.1 不同加工方式对虾尾中重金属含量的影响

不同加工方式下小龙虾尾中重金属水平的测定结果如图 1 所示。加工后虾尾中重金属 Cu、Cd 和 Ni 的浓度较生样品显著增加(P<0.05)，不同加工方式(水煮、油炸、调味)间重金属浓度也存在明显差异。以干重计，水煮样品中平均 Cd(0.06±0.03 mg/kg)含量与生样品相比增加了 50.00%，油炸虾尾中 Cu(41.30±6.07 mg/kg)含量与生样品相比增加了 40.86%，Ni(2.00±0.65 mg/kg)浓度大约是生样本的 3 倍。这与之前的研究结果一致，Bao 等[18] 发现，螃蟹在蒸制、煮制、油炸三种加工方式下，其蟹肉与原始样品相比，铜含量都增加了 20%~30%。贻贝在 105 ℃ 条件下蒸 15 min，铜浓度升高了 36%~38%[19]。Wiech 等[20] 发现煮沸整只新鲜螃蟹后其爪肉 Cd 浓度比生爪肉高约 10 倍。一般认为水产品在烹饪后重金属浓度增加的主导因素是烹制过程中水分、碳水化合物及蛋白质等物质的流失[6]，这些变化具有“浓缩”效应，降低了样品的实际干重，导致每单位重量的样品重金属浓度增加[21]。

调味样品中 Cd(0.28±0.05 mg/kg)及 Mn(30.96±3.80 mg/kg)的浓度显著高于未调味生样品(P<0.05)。调味品可能是部分重金属的载体，在加工时污染小龙虾腹肌。类似的，Kosker 等[11] 对土耳其销售的加工即食贻贝中金属含量进行的一项调查显示，酿贻贝中 Cr、As 和 Cd 的水平含量要高于生贻贝，作者认为酿贻贝中高含量的 Cr 来自大米和香料。

上述结果表明，加工前后虾尾中重金属水平变化可能取决于金属类型、加工方式及加工中的外来添加物等因素，这与 Rodriguez 等[22] 的观点类似。

2.1.2 不同加工方式下虾尾中重金属污染水平评价

尽管在水煮、油炸及调味三种加工方式下虾尾中部分重金属浓度升高或降低，但所有样品的重金属水

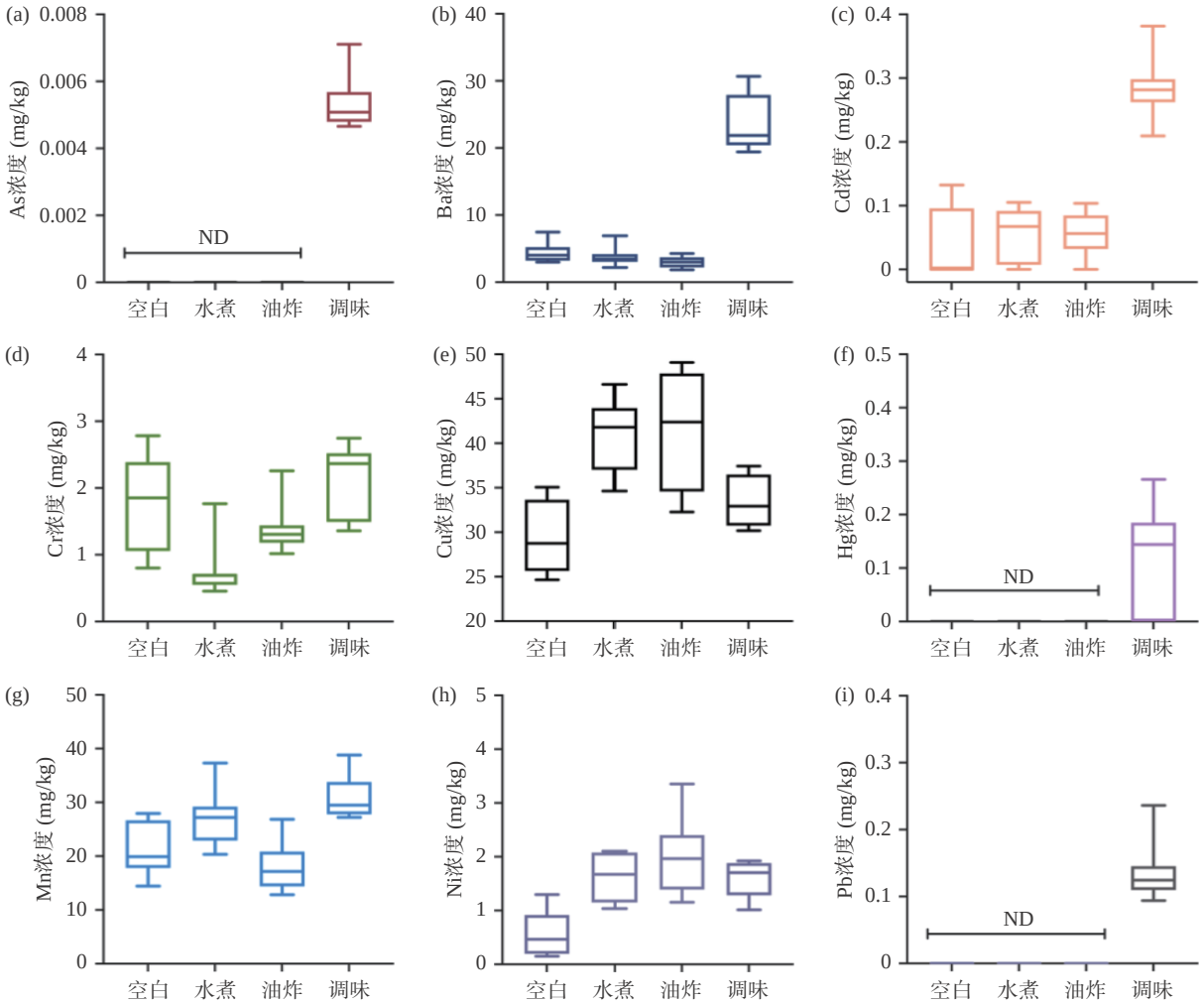


图 1　不同加工条件下小龙虾尾中九种重金属浓度箱线图(干重)

Fig.1　Box-plots of nine heavy metals levels in crayfish tail under different cooking methods (dry weight)

注: ND 表示未检出。

平均未超过国家标准(GB 2762-2017)对甲壳类水产品中 As、Cd、Cr、Hg、Pb 五种重金属污染物的最高限量。因此，选择利用单因子污染指数法进一步分析和评估加工前后小龙虾尾中的重金属污染程度。由于 GB 2762-2017 规定的重金属限量标准为鲜、冻状态的甲壳类水产品，因此利用水分含量计算重金属浓度在干重与湿重之间的转换比值[2]。不同加工方式下虾尾重金属单因子污染评价见表 2。

表 2　不同加工方式下虾尾重金属单因子污染评价

Table 2　Pollution index of heavy metals in crayfish tail under different cooking methods

指标		空白	水煮	油炸	调味
水分含量(%)		79.76	74.03	73.47	65.42
重金属P	P_{As}	/	/	/	0.042
	P_{Cd}	0.015	0.023	0.023	0.116
	P_{Cr}	0.184	0.078	0.141	**0.218**
	P_{Hg}	/	/	/	0.046
	P_{Pb}	/	/	/	0.056

注: 粗体表明样品存在污染。

三种加工方式下虾尾中 Cd 污染指数较生样品均明显升高，调味虾尾中五种重金属的污染指数 P_i 均高于水煮、油炸两种简单加工，其中 Cr 存在轻度污染现象。P_i 表明，随着加工复杂程度的深入，虾尾更容易受到外界的重金属污染。一般来说简单加工食品受重金属污染的风险要低于复杂加工食品[23]。

因此，为探究除小龙虾自身发生的物理/化学变化外，影响虾尾中重金属浓度变化的因素，有必要进一步检测不同加工方式下加工液中重金属的浓度，研究加工器具、调味品等重金属含量较高的物质是否会导致加工液重金属浓度升高，间接污染虾尾。

2.2　水煮加工液中重金属含量变化

对水煮加工条件下蒸馏水、沸水及小龙虾水煮液三种加工液中 As、Ba、Cd、Cr、Cu、Hg、Mn、Ni 和 Pb 九种重金属水平进行检测，结果如图 2 所示。

蒸馏水及沸水在体积浓缩近十倍后，检测到了痕量重金属元素。蒸馏水中所检测到的九种重金属浓度均远低于 GB 5749-2002《生活饮用水卫生标准》，表明加工用水带来的重金属风险可忽略不计。与蒸馏水相比，沸水中 Ba、Mn、Pb 三种重金属浓度显著提高(P<0.05)，但均未超过国标限量值。沸水中重金属浓度增高可能是由于不锈钢中重金属的溶出，Chiavari 等[24] 对不锈钢中 Cr、Ni 和 Mn 三种重金属

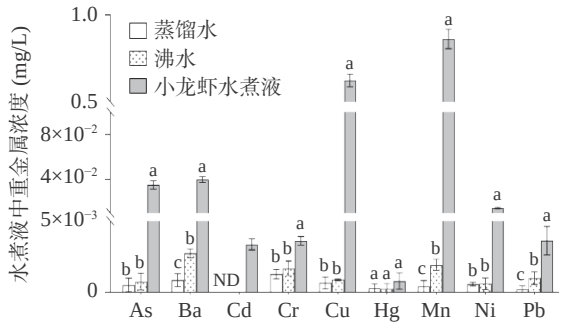


图 2 不同阶段下水煮加工液中重金属的浓度

Fig.2 Concentration of heavy metals in boiling processing liquid at different stages

注: 不同字母 a、b、c 表示组内存在显著性差异, $P<0.05$; ND: 未检出; 图 3、图 4 同。

释放量的研究显示, 不锈钢最外层表面氧化物中含有大量 Mn 元素, 相比于其他元素, 在钢制材料中 Mn 优先于 Ni、Cr 溶解, 且 XPS 信号表明 Mn 是从最外层开始溶解。Pb 元素在水煮加工时也有少量溶出, 这与卢莉璟等[25] 的研究结果类似, 在加热煮沸、高压蒸汽灭菌下短时处理时, 不锈钢中 Pb 元素表现出了前期快速迁移的趋势。Ba 在不锈钢中的研究较少, 但在本研究中观察到了显著上升的现象(尽管浓度仍远低于国标中的限量标准), 猜测可能是不锈钢受到了 Ba 的污染, 或是加工器具在烹饪其他食品时留下了污染。尽管 Cr、Cd 及 Ni 是不锈钢材质中的主要重金属, 但煮沸这一过程没有发现明显从不锈钢中溶解的现象。这可能是由于本实验中的水煮这一工序的加工时间较短, 而不锈钢中观察到 Cr 的迁移情况大多数发生在长时间的加工条件下[26−27], 因而水煮加工不会产生过多 Cr 迁移的现象。此外, 加工液的 pH 也是重要因素, 根据 Koo 等[27] 的研究, 不锈钢中有毒金属的释放高度依赖于体系的 pH, 重金属在酸性介质中的释放量远高于以水或脂肪(如: 植物油等)为烹饪介质的加工体系。综上, 水煮加工条件下, 加工用水及加工器具对小龙虾加工带来的重金属风险较小。

与沸水相比, 小龙虾水煮液中观察到 As、Ba、Cd、Cr、Cu、Mn、Ni 及 Pb 浓度显著升高($P<0.05$), 且观察到了高浓度的 Cu(0.62±0.03 mg/L)和 Mn(0.86±0.05 mg/L)。这与之前的研究结果一致, Abd-Elghany 等[6] 在煮沸螃蟹后观察到样品中重金属残留物的减少, 并在其汤汁样品中观察到相应重金属的增加。由于蒸馏水及沸水中重金属含量较低, 表明加工用水及锅具对加工液重金属污染影响较少, 同时虾尾处于相对封闭的虾壳内, 因此小龙虾水煮液中重金属的主要污染源可能是小龙虾重金属含量较高的肝胰腺及外骨骼。肝胰腺是小龙虾的解毒器官, 能够作为短暂的金属储存器[28], 小龙虾肝胰腺及外骨骼中 As[13]、Cu[29] 等元素的积累普遍高于虾肉组织。同时, 肝胰腺构造较为特殊, 其主要由疏水性脂肪组织和蛋白质构成[18], 因此肝胰腺中高浓度的重金属极易伴随脂肪、蛋白质等物质溶解于水煮液中, 造成加工液重金属污染。Bao 等[18] 发现在水煮螃蟹肝胰腺后, 肝胰腺中镉和砷浓度下降了 50%~60%, 表明存在肝胰腺中部分重金属溶解在加工液中的现象。

2.3 油炸加工液中重金属含量变化

对油炸加工条件下生油、熟油及小龙虾油炸液三种加工液中 As、Ba、Cd、Cr、Cu、Hg、Mn、Ni 和 Pb 九种重金属水平进行检测, 结果如图 3 所示。

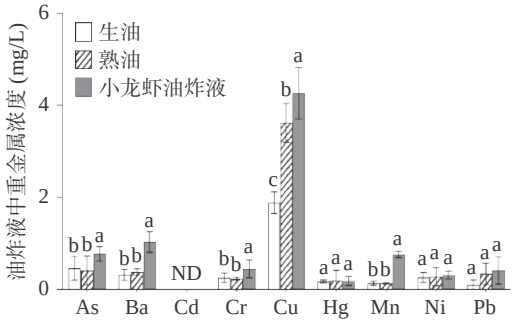


图 3 不同阶段下油炸加工液中重金属的浓度

Fig.3 Concentration of heavy metals in frying processing liquid at different stages

熟油中 Cu 元素含量相比于生油增加了 92.2%, 其余重金属水平无明显差异($P>0.05$)。加工器具可能造成了二者 Cu 元素浓度的差异, 尽管油炸加工时间较短, 但加工体系温度较高, 且油作为加热介质时其导热性要高于水, 使得不锈钢中金属分子的活化能变大, 分子更容易发生迁移[30], 且温度越高迁移速率越快。

小龙虾油炸液中, As、Ba、Cr、Cu、Mn 的浓度相比于熟油显著上升($P<0.05$), 小龙虾油炸液中 As 浓度增加了 88.8%, Cr 浓度(0.24±0.03 mg/L)增加了 80.7%, Mn 浓度(0.76±0.059 mg/L)相较于熟油增加了 4.75 倍, Cu 浓度(4.26±0.79 mg/L)增长了 17.7%, 与水煮液中部分重金属变化趋势相似。表明在食品加工过程中, 烹饪体系中存在重金属的迁移现象[31]。

2.4 调味加工液中重金属含量变化

对空白调味液及小龙虾调味液中重金属 As、Ba、Cd、Cr、Cu、Hg、Mn、Ni 和 Pb 的含量进行了测定, 结果如图 4 所示。

与空白相比, 小龙虾调味液体系中 Mn 元素浓度升高了约 5.4 倍, Cu 元素浓度升高了 45.02%, 而 Cr 含量却降低了 46.34%。重金属浓度的变化表明小龙虾的调味加工是一个动态变化过程, 伴随部分重金属向调味液体系溶解的同时, 可能存在小龙虾自身也吸收了部分调味液中重金属的现象。

此外, 小龙虾调味液中重金属浓度普遍高于其水煮液及油炸液, 这可能是由于调味品本身就具有较高的重金属含量, 在调味液中检测到了较高浓度的砷, 超过了国家标准 GB 2762-2017《食品中污染物限量》有关调味品中总 As≤0.5 mg/kg 的限量标准, 表

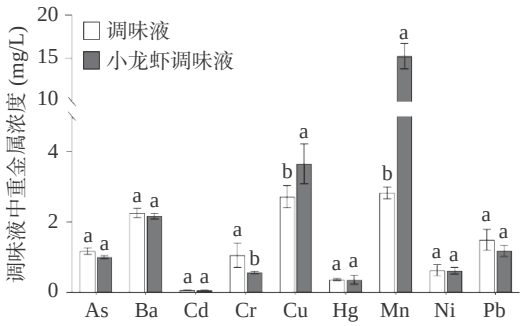


图 4　不同阶段下调味加工液中重金属的浓度

Fig.4　Concentration of heavy metals in seasoning processing liquid at different stages

明调味品在加工过程中存在污染小龙虾尾的风险。类似的，Wei 等[23] 对北京市售的不同类别食品中重金属的含量进行了系统研究，结果表明在谷物、肉类等类别的食品中，调味品（如食用油、盐、酱油、醋、辣椒、胡椒）中 Mn（54.65 mg/kg）、Cd（0.4 mg/kg）含量最高。Reinholds 等[32] 调查了商业调味品中有毒重金属 Cd、Pb、As、Cr 的含量，约 68% 的样品中 Cr 含量超出了 WHO 限值（2.0 μg/g）。

2.5　加工液与虾尾间重金属含量的相关性分析

表 3 为小龙虾加工液中重金属与虾尾中重金属含量的相关性分析，进一步分析加工液中重金属是否会污染虾尾。水煮加工条件下，虾尾中 Mn 元素与加工液中 Mn 元素（r=0.987）存在极显著正相关（P<0.01），表明加工液中重金属与虾尾中重金属存在关联，且这部分重金属主要来自小龙虾肝胰腺（及外骨骼）。肝胰腺中高浓度的重金属极易伴随脂肪、蛋白质等物质溶解于水煮液中，这部分重金属又可能会被虾尾吸收。尽管不锈钢器具是一类由 Cd、Cu、Ni 等重金属组成的合金[33]，但由于小龙虾加工时间较短且加工体系 pH 趋于中性，合金表面重金属溶出水平较低（如图 2、图 3），因此加工器具对虾尾的污染较小。

调味加工下，Ba 与 Cu（r=0.967）存在极显著正相关（P<0.01），Cu 与 Cu（r=0.908）、Mn 与 Cu（r=0.906）、Hg 与 Hg（r=0.920）、Mn 与 Mn（r=0.934）、Ba 与 Mn（r=0.907）存在显著正相关（P<0.05）。除肝胰腺（及外骨骼）及烹饪用具外，调味品也是调味加工中重金属的重要来源。比如加工过程中使用的辣椒、蚕豆（豆瓣酱的原料）等具有从土壤中吸收和富集微量金属的潜力[34]，且辣椒更容易积累 Cd[35]，Mn 在自然中的浓度相对较高，是天然存在的[14]，因此极易富集在调味作物中。Cu、Ba 及 Mn 等元素间的显著相关性暗示了重金属在烹饪过程中的密切关联。同样，在水果产品的加工过程中也观察到了重金属间的强关联性[36]，这可能是由于食品加工过程中污染源的相似性。

综上，相关性分析表明加工液中重金属存在污染虾尾的现象，重金属污染源能够通过污染加工液的方式，间接污染小龙虾制品。在水煮及调味加工中都观察到了 Mn 元素间的显著正相关。

表 3　小龙虾加工液中重金属与虾尾重金属浓度的相关性分析

Table 3　Correlation coefficient of heavy metal concentration in abdominal muscle and in processing liquid

重金属元素	As	Ba	Cd	Cr	Cu	Hg	Mn	Ni	Pb
				水煮加工（水煮加工液与虾尾）					
Ba	–	0.331	0.855	0.543	0.426	–	−0.703	0.561	–
Cd	–	0.281	−0.041	0.741	0.300	–	0.147	0.270	–
Cr	–	0.668	0.535	0.697	0.775	–	−0.293	0.686	–
Cu	–	0.169	0.768	0.58	0.275	–	−0.608	0.420	–
Mn	–	−0.554	**−0.897***	−0.157	−0.495	–	**0.987****	−0.749	–
Ni	–	0.531	−0.237	0.122	0.498	–	0.271	0.303	–
				油炸加工（油炸加工液与虾尾）					
Ba	–	−0.389	–	−0.287	−0.834	–	−0.898	−0.063	–
Cr	–	0.161	–	−0.145	−0.677	–	−0.243	−0.673	–
Cu	–	−0.357	–	−0.057	0.372	–	−0.133	0.596	–
Mn	–	−0.530	–	−0.163	−0.220	–	−0.557	0.370	–
Ni	–	0.334	–	0.068	−0.678	–	−0.237	−0.426	–
				调味加工（调味加工液与虾尾）					
As	0.209	−0.320	0.862	0.248	−0.389	0.386	−0.196	−0.011	0.651
Ba	−0.635	0.165	−0.229	0.051	**0.967****	−0.292	**0.907***	0.124	**−0.887***
Cd	−0.484	0.692	−0.512	−0.728	0.535	0.237	0.473	0.411	−0.754
Cr	0.506	−0.713	0.173	0.585	−0.148	−0.256	−0.096	−0.622	0.345
Cu	−0.494	0.135	−0.402	−0.002	**0.908***	−0.315	0.829	0.007	**−0.885***
Hg	−0.192	0.527	0.516	−0.699	−0.198	**0.920***	−0.024	0.578	0.186
Mn	−0.693	0.132	0.183	0.100	**0.906***	−0.083	**0.934***	0.241	−0.706
Ni	−0.065	0.031	−0.223	0.154	−0.063	−0.347	−0.172	0.030	−0.024
Pb	−0.386	−0.264	0.212	0.516	0.668	−0.379	0.674	−0.086	−0.409

注：**：P<0.01，极显著相关；*：P<0.05，显著相关。

3 结论

本文研究了小龙虾在水煮、油炸及调味三种加工方式下虾尾及加工液中 9 种重金属的积累，并利用相关性分析探究加工液中重金属污染对虾尾的影响。结果表明随着加工复杂程度的深入，加工液中大多数重金属水平都会随加工工序逐渐积累，水煮、油炸两种加工方式下，烹饪器具及加工用水(油)对加工液中重金属积累的影响较小，仅在油炸加工下观察到熟油中 Cu 浓度与生油相比呈现高增长；调味加工下，调味品是加工液中 As 元素的主要来源。在加工小龙虾后，加工液重金属变化较为显著，小龙虾水煮液中观察到了高浓度的 Mn 和 Cu 元素，油炸小龙虾后加工液中有毒元素 As 和 Cr 的浓度分别增加了 88.8% 和 80.7%，小龙虾调味液中 Mn 浓度与空白相比增加了约 5.4 倍。单因子污染指数及相关性分析表明随着加工复杂程度的深入，虾尾更容易受到外界的重金属污染。综上，本研究对小龙虾的加工及健康饮食等方面的研究提供了思路，为副产物加工液的高值化利用提供了理论基础。但本文未探究小龙虾肝胰腺在不同加工方式下重金属浓度的变化，肝胰腺是否为加工液主要的污染源还需进一步研究。

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

参考文献

[1] 陈旭妍. 湖北省小龙虾产业可持续发展研究[D]. 武汉: 华中师范大学, 2019. [CHEN X Y. Study on sustainable development of crayfish industry in Hubei Province[D]. Wuhan: Central China Normal University, 2019.]

[2] TAN Y F, PENG B, WU Y L, et al. Human health risk assessment of toxic heavy metal and metalloid intake via consumption of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) from rice-crayfish co-culture fields in China[J]. Food Control, 2021, 128: 108181.

[3] 徐文思, 胡诗雨, 邓娟丽, 等. 小龙虾加工水煮液营养成分与风味物质分析[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(14): 279−286. [XU W S, HU S Y, DENG J L, et al. Analysis of nutrient and flavor compounds in boiled crayfish waste water[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(14): 279−286.]

[4] 杨祺福, 徐文思, 胡思思, 等. 基于 HS-SPME-GC-MS 的小龙虾加工水煮液中挥发性风味成分萃取条件优化[J]. 食品与机械, 2022, 38(2): 57−63. [YANG Q F, XU W S, HU S S, et al. Optimization of extraction conditions for volatile flavor compounds in crayfish boiled liquid based on HS-SPME-GC-MS[J]. Food Machinery, 2022, 38(2): 57−63.]

[5] HOULBREQUE F, HERVE-FERNANDEZ P, TEYSSIE J L, et al. Cooking makes cadmium contained in Chilean mussels less bioaccessible to humans[J]. Food Chemistry, 2011, 126(3): 917−921.

[6] ABD-ELGHANY S M, ZAHER H A, ELGAZZAR M M, et al. Effect of boiling and grilling on some heavy metal residues in crabs and shrimps from the Mediterranean Coast at Damietta region with their probabilistic health risk assessment[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2020, 93: 103606.

[7] 邵阳阳, 董燕婕, 范丽霞, 等. 基于纳米材料的电化学适配体传感器在食品重金属检测中的研究进展[J]. 食品工业科技, 2021, 42(19): 418−428. [SHAO Y Y, DONG Y J, FAN L X, et al. Review on nanomaterial-based electrochemical aptasensors for heavy metal detection in food[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(19): 418−428.]

[8] IKEM A, AYODEJI O J, WETZEL J. Human health risk assessment of selected metal(loid)s via crayfish (*Faxonius virilis*; *Procambarus acutus acutus*) consumption in Missouri[J]. Heliyon, 2021, 7(6): e07194.

[9] ZHOU M Y, WU Q Q, WU H, et al. Enrichment of trace elements in red swamp crayfish: Influences of region and production method, and human health risk assessment[J]. Aquaculture, 2021, 535: 736366.

[10] DALIPI R, BORGESE L, CASAROLI A, et al. Study of metal release from stainless steels in simulated food contact by means of total reflection X-ray fluorescence[J]. Journal of Food Engineering, 2016, 173: 85−91.

[11] KOSKER A R, GUNDOGDU S, AYAS D, et al. Metal levels of processed ready-to-eat stuffed mussels sold in Turkey: Health risk estimation[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2022, 106: 104326.

[12] GORETTI E, PALLOTTINI M, RICCIARINI M I, et al. Heavy metals bioaccumulation in selected tissues of red swamp crayfish: An easy tool for monitoring environmental contamination levels[J]. Science of the Total Environment, 2016, 559: 339−346.

[13] GEDIK K, KONGCHUM M, DELAUNE R D, et al. Distribution of arsenic and other metals in crayfish tissues (*Procambarus clarkii*) under different production practices[J]. Science of the Total Environment, 2017, 574: 322−331.

[14] XIONG B, XU T, LI R P, et al. Heavy metal accumulation and health risk assessment of crayfish collected from cultivated and uncultivated ponds in the middle reach of Yangtze River[J]. Science of the Total Environment, 2020, 739: 139963.

[15] DEY M, AKTER A, ISLAM S, et al. Assessment of contamination level, pollution risk and source apportionment of heavy metals in the Halda River water, Bangladesh[J]. Heliyon, 2021, 7(12): e08625.

[16] 倪张林, 汤富彬, 屈明华. 不同前处理方法测定植物油中重金属的研究[J]. 中国油脂, 2012, 37(7): 85−87. [NI Z L, TANG F B, QU M H. Determination of heavy metals content in vegetable oils with different preprocessing methods[J]. China Oils and Fats, 2012, 37(7): 85−87.]

[17] ADEBIYI F M, ORE O T, OGUNJIMI I O. Evaluation of human health risk assessment of potential toxic metals in commonly consumed crayfish (*Palaemon hastatus*) in Nigeria[J]. Heliyon, 2020, 6(1): e03092.

[18] BAO C, CAI Q, YING X Y, et al. Health risk assessment of arsenic and some heavy metals in the edible crab (*Portunus trituberculatus*) collected from Hangzhou Bay, China[J]. Marine Pollution Bulletin, 2021, 173: 113007.

[19] BARBOSA V, MAULVAULT A L, ALVES R D, et al. Effects of steaming on contaminants of emerging concern levels in seafood[J]. Food and Chemical Toxicology, 2018, 118: 490−504.

[20] WIECH M, VIK E, DUINKER A, et al. Effects of cooking and freezing practices on the distribution of cadmium in different tissues of the brown crab (*Cancer pagurus*)[J]. Food Control, 2017, 75: 14−20.

［21］ 宋佳芳，柯可，李高平，等. 2 种加工方式对牡蛎中 Pb、Cd、Cu 和 Zn 元素生物利用度影响[J]. 食品工业，2019，40(3)：100−103. ［SONG J F, KE K, LI G P, et al. Effect of 2 kinds of cooking methods on bioaccessibility Cu and Zn in oyster (*Ostreagigas thunberg*)[J]. The Food Industry, 2019, 40(3): 100−103. ］
［22］ RODRIGUEZ E J, MORALES M C, PAREJA C J, et al. Food safety risk assessment of metal pollution in crayfish from two historical mining areas: Accounting for bioavailability and cooking extractability[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019, 185(C): 109682.
［23］ WEI J X, CEN K. Assessment of human health risk based on characteristics of potential toxic elements (PTEs) contents in foods sold in Beijing, China[J]. Science of the Total Environment, 2020, 703: 134747.
［24］ CHIAVARI C, BERNARDI E, BALIJEPALLI S K, et al. Influence of low-temperature carburising on metal release from AISI316L austenitic stainless steel in acetic acid[J]. Journal of Food Engineering, 2014, 137: 7−15.
［25］ 卢莉璟，董玉杰，徐莉，等. 食品接触用不锈钢材料中镍、铅元素的迁移规律[J]. 食品与发酵工业，2022，48(5)：150−156. ［LU L J, DONG Y J, XU L, et al. Migration law of nickel and lead from food-contact stainless steel to food[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(5): 150−156. ］
［26］ KAMERUD K L, HOBBIE K A, ANDERSON K A. Stainless steel leaches nickel and chromium into foods during cooking [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(39): 9495−9501.
［27］ KOO Y J, PACK E C, LEE Y J, et al. Determination of toxic metal release from metallic kitchen utensils and their health risks[J]. Food and Chemical Toxicology, 2020, 145: 111651.
［28］ ANTON A, SERRANO T, ANGULO E, et al. The use of two species of crayfish as environmental quality sentinels: The relationship between heavy metal content, cell and tissue biomarkers and physico-chemical characteristics of the environment[J]. Science of the Total Environment, 2000, 247(2): 239−251.
［29］ ZHAO D, ZHANG X, LIU D, et al. Cu accumulation, detoxification and tolerance in the red swamp crayfish *Procambarus clarkii*[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019, 175: 201−207.
［30］ 董玉杰，卢莉璟，徐莉，等. 食品接触用不锈钢材料中铬元素迁移规律[J]. 食品与发酵工业，2022，48(13)：254−260，276. ［DONG Y J, LU L J, XU L, et al. Migration regularity of Cr from food-contact stainless steel[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(13): 254−260, 276. ］
［31］ LEE J G, HWANG J Y, LEE H, et al. Effects of food processing methods on migration of heavy metals to food[J]. Applied Biological Chemistry, 2019, 62(1): 64.
［32］ REINHOLDS I, PUGAJEVA I, BAVRINS K, et al. Mycotoxins, pesticides and toxic metals in commercial spices and herbs [J]. Food Additives and Contaminants. Part B, Surveillance, 2017, 10(1): 5−14.
［33］ ZAFFORA A, DI-FRANCO F, SANTAMARIA M. Corrosion of stainless steel in food and pharmaceutical industry[J]. Current Opinion in Electrochemistry, 2021, 29: 100760.
［34］ KHAN Z I, AHMAD K, SIDDIQUE S, et al. Correction to: A study on the transfer of chromium from meadows to grazing livestock: An assessment of health risk[J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2020, 27(33): 42193−42193.
［35］ UGULU I, AKHTER P, KHAN Z I, et al. Trace metal accumulation in pepper (*Capsicum annuum* L.) grown using organic fertilizers and health risk assessment from consumption[J]. Food Research International, 2021, 140: 109992.
［36］ ABBASI H, SNAH M H, MOHIUDDIN M, et al. Quantification of heavy metals and health risk assessment in processed fruits products[J]. Arabian Journal of Chemistry, 2020, 13(12): 8965−8978.

张雯雯, 胡亚东, 孙文珂, 等. 基于近红外光谱与深度学习的紫菜水分无损检测 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 190−197. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023100153

ZHANG Wenwen, HU Yadong, SUN Wenke, et al. Non-destructive Detection of Water Content in *Porphyra* Based on Near-infrared Spectroscopy and Deep Learning[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 190−197. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023100153

· 分析检测 ·

基于近红外光谱与深度学习的紫菜水分无损检测

张雯雯[1], 胡亚东[2], 孙文珂[3], 潘明轩[2], 沈照鹏[3], 周兴虎[2], 钱　津[2], 王　鹏[3,*]

（1.中国海洋大学海德学院, 山东青岛 266104;
2.江苏省沿海开发集团有限公司, 江苏省沿海开发投资有限公司, 江苏海洋生物资源创新中心, 江苏南京 210019;
3.中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东青岛 266104）

摘　要: 为探索近红外光谱结合深度学习网络对紫菜水分定量检测的可行性，本研究检测并收集了 479 组干条斑紫菜的光谱数据和水分含量数据，分别使用四种方法对其中的光谱数据进行了预处理，并在全波段下建立了四种传统定量水分预测模型和一种卷积神经网络（Convolution Neural Networks，CNN）深度学习水分预测模型。对比五种模型预测结果后发现，在 S-G 平滑结合二阶导数的预处理方法下所建立的 CNN 模型预测效果最佳，其预测均方根误差（Root-Mean-Square Error of Prediction，RMSEP）值为 0.456，预测集决定系数（Coefficient of Determination of Prediction，R_p^2）值为 0.990，优化后，该模型的 RMSEP 值降至 0.342，R_p^2 值可以达到 0.994（>0.8），同时，外部验证相对误差（Ratio of Performance to Deviation for Validation，RPD）值达 6.155（>3），证明了模型实际应用于农业和食品工业的可能性。该 CNN 模型能够快速、准确、无损地预测条斑紫菜的水分含量，提高了紫菜水分检测的效率和准确性，为相关干制水产品的质量控制提供了重要的参考依据。

关键词: 条斑紫菜, 水分含量, 近红外光谱, 深度学习, 卷积神经网络

中图分类号: TS201.1　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2024)21−0190−08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023100153

本文网刊:

Non-destructive Detection of Water Content in *Porphyra* Based on Near-infrared Spectroscopy and Deep Learning

ZHANG Wenwen[1], HU Yadong[2], SUN Wenke[3], PAN Mingxuan[2], SHEN Zhaopeng[3], ZHOU Xinghu[2], QIAN Jin[2], WANG Peng[3,*]

（1.Haide College, Ocean University of China, Qingdao 266104, China;
2.Jiangsu Coast Development Group Co., Ltd., Jiangsu Jinniu Industry & Trade Co., Ltd., Jiangsu Inovation Center of Marine Resources, Nanjing 210019, China;
3.College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266104, China）

Abstract: In order to explore the feasibility of combining near-infrared (NIR) spectroscopy and deep learning network for quantitative moisture detection, the dried *Porphyra* was divided into 479 groups, which detected the NIR spectra and moisture content. Four traditional quantitative moisture prediction models and a convolution neural networks (CNN) deep-learning moisture prediction model were finally established at full spectrum by preprocessing and analyzing the experimental data. After comparing the prediction results of the five models, it was found that the CNN model established

收稿日期: 2023−10−23

基金项目: 江苏省沿海开发集团有限公司江苏海洋生物资源创新中心自主立项项目（2023YHTZZZ01）。

作者简介: 张雯雯（2002−）, 女, 大学本科, 研究方向: 食品科学与工程, E-mail: wwz_mail_02@163.com。

*** 通信作者:** 王鹏（1980−）（ORCID: 0000−0002−2337−5812）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 海洋应用微生物, E-mail: pengwang@ouc.edu.cn。

by the preprocessing method of S-G smoothing combined with the second derivative had the best prediction effect. Its root-mean-square error of prediction (RMSEP) value was 0.456 and the coefficient of determination of prediction (R_p^2) value was 0.990. After optimization, the RMSEP value of the model was reduced to 0.342 and the R_p^2 value could reach 0.994 (>0.8). At the same time, the ratio of performance to deviation for validation (RPD) was 6.155 (>3), which proved the possibility of practical application of the model in agriculture and food industry. The CNN model could predict the moisture content quickly, accurately, and non-destructive, improve the efficiency and accuracy of moisture detection, and provide an important reference for the quality control of related dry aquatic products.

Key words: *Porphyra*; moisture content; near infrared spectroscopy; deep learning; convolution neural networks

条斑紫菜（*Porphyra yezoensis*）隶属于红藻门（Rhodophyta）、原红藻纲（Protoflorideophy-ceae）、红毛菜目（Bangiales）、红毛菜科（Bangiaceae）、紫菜属（*Pyropia*）[1]，是一种重要的海洋经济作物。条斑紫菜主要分布于黄海、渤海、东海北部沿岸，其主产区在长江以北沿海的山东、江苏两省[2]。作为海洋农业和出口创汇的主导品种之一，我国每年生产的条斑紫菜有 70% 销往国外，出口量占国际紫菜市场贸易总量的 50% 以上[3]。条斑紫菜营养丰富，若干燥不到位，极易在运输和贮存环节因水分含量过高而导致腐败变质[4−5]。因此有必要在紫菜烘干工艺之后、封装工艺之前[6−7]，对生产线上的所有紫菜产品的水分进行在线监测，从而及时去除不合格的产品。但目前常用的水分检测方法主要为直接烘干法[8−9]，该法耗时且损耗样品，不适用于大批量检测，也不能满足生产现场对水分检测的快速、无损等测定要求[10]。在国际紫菜标准的制定中，水分是评价紫菜质量的重要参数之一，若缺少高效精准的水分检测技术，将不利于我国紫菜的质量管理，从而进一步影响我国紫菜进出口贸易发展[11]。在此背景下，近年来，大批新型水分检测技术应运而生。以测试简易、分析快速为特点的近红外光谱技术便是其中之一[12]。

近红外光谱是介于可见光和中红外光之间的电磁波谱，其波长范围为 780~2526 nm[13]，它能反映 O-H、C-H、N-H、S-H 等不同化学键的信息[14]，这使得近红外光谱应用于紫菜水分检测成为可能。目前，近红外分析技术在紫菜质量检测方面已有较多应用。Guan 等[15] 利用近红外光谱技术建立了紫菜最佳收获时间的识别模型；Wu 等[16] 采用偏最小二乘法结合无信息变量消除算法构建了紫菜蛋白含量近红外检测模型。除利用传统定量分析模型之外，部分研究将近几年以突出的特征提取能力而得到广泛应用的深度学习模型引入近红外光谱检测领域，如方明明等[17] 基于卷积神经网络建立了苹果脆片水分近红外预测模型；Benmouna 等[18] 基于近红外光谱和一维卷积神经网络建立了富士苹果的质量检测模型。而利用深度学习算法对紫菜质量进行检测的相关研究仍较为欠缺。本文为探索深度学习模型对于紫菜近红外光谱的特征学习能力和水分的回归分析能力，对相关光谱预处理方法进行了优化，同时在全波段下比较了传统定量模型与深度学习模型的预测效果，并通过调整模型超参数进一步挖掘深度学习模型的预测潜力。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

干紫菜薄片　实验共选取 479 组干条斑紫菜样本，样品采购自赣榆、秦皇岛、青岛、威海等全国各主要产地，分别来自于 2022 年年末一茬和 2023 年四茬紫菜样品（表 1）。测定时，每组取 10 张条斑紫菜作为平行样，每张紫菜的尺寸为 19 cm×21 cm。

表 1　紫菜样品批次统计
Table 1　Batch statistics of *Porphyra* samples

紫菜样品批次	数目
2022年年末	145
2023年头茬	150
2023年二茬	54
2023年三茬	49
2023年五茬	81

MicroNIR 1700ES VIAVI 近红外光谱仪　美国 VIAVI，采用集成真空钨灯作为照明光源，波长范围为 908~1676 nm，样品工作距离（即样品与探头距离）范围为 0~15 mm；LRH-70 恒温干燥箱　上海一恒科学仪器有限公司；ME203E 电子天平　上海梅特勒-利特多有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　紫菜水分检测　按照 GB 5009.3-2016《食品安全国家标准 食品中水分的测定》中直接测定法对干条斑紫菜样本进行水分测定。

1.2.2　光谱采集　如图 1 所示，将每张样品均分为 4×5 的 20 份均等区域，竖立置于样品台上。分别采集每组样品每张条斑紫菜片四个角落和中间 2 点，共 6 个点的光谱数据，以消除紫菜不均匀性所造成的误差。

采样方式为漫反射积分球模式，波长范围为 900~1650 nm、光谱分辨率为 6.2 nm、样品工作距离为 3 mm、信噪比为 23000（扫描次数为 100 次，采集后取平均值）、工作温度为 25 ℃。预热设备 15 min，校正暗电流并以聚四氟乙烯白板为参比。

1.3　数据处理

1.3.1　样本集划分　目前最常用的样本集划分方法是基于光谱变量的 Kennard-Stone（K-S）法以及在

图 1 近红外光谱采集装置图

Fig.1 Schematic diagram of near-infrared acquisition device

注: a.薄片型干条斑紫菜样品; b.MicroNIR 1700ES 探测头; c.标准白板; d.外接平板与内置软件。

K-S 法的基础上提出的 Sample set Partitioning based on joint X-Y distances(SPXY)法。本文采用 SPXY 法, 相对于 K-S 法该法能够同时考量理化值和光谱两个变量, 有效覆盖了多维向量空间, 并增加了样本之间的差异性和代表性[19−20]。通过 SPXY 法, 本文将 2022 年年末和 2023 年头茬、二茬和三茬采集的紫菜数据集划分训练集和测试集。同时, 因 2023 年采集的五茬紫菜水分含量分布最广泛, 故将其作为外部验证集评价最终模型的预测能力。

1.3.2 光谱数据预处理 在进行近红外光谱检测时, 环境背景噪声和仪器误差会降低光谱数据的解释性, 进而影响建模精度。因此, 必须对已获取的光谱信息进行预处理操作。本研究采用多元散射校正(Multiplicative Scatter Correction, MSC)、标准正态变量校正(Standard Normal Variate Correction, SNV)、一阶导数校正(First Derivative Correction, FD)、二阶导数校正(Second Derivative Correction, SD)和 S-G 平滑(Savitzky-Golay, S-G)共五种单类方法和四种组合方法对光谱数据进行预处理。对于不同预处理方法, 统一建立卷积神经网络模型, 并通过决定系数 R_p^2 的大小评价各预处理方法的效果。

1.3.3 深度学习预测模型的建立 卷积神经网络(Convolution Neural Networks, CNN)是一个多层非全连接的深度神经网络[21], 其特点是通过卷积层和池化层的多次反复交替学习来提取数据特征。相比于普通全连接神经网络, 卷积神经网络凭借其降低模型复杂度、高效处理数据等优势, 近年来被应用于目标检测、图像分类等计算机视觉领域。

CNN 基本架构由输入层、卷积层、池化层、全连接层和输出层堆叠而成, 本研究使用的 CNN 结构如图 2 所示, 由 3 层一维卷积层(conv1d)、2 层最大池化层(maxpooling1d)和 2 个全连接层(dense)组成。

1.3.4 传统定量模型的建立 本文同时选用多元线性回归(Multiple Linear Regression, MLR)法、偏最小二乘(Partial Least Squares, PLS)法、支持向量回归(Support Vector Regression, SVR)和人工神经网络(Artificial Neural Network, ANN)共四种传统定量校正方法进行预测模型的建立, 并将其与卷积神经网络所建立的模型相比较, 探究使用卷积神经网络建立紫菜水分预测模型的优势。

用于建立模型的数据分析软件为开源 Python 3.10.9 与相关数据科学包, 数据科学包包括: scikit-learn 0.22.1、scipy 1.4.1、Numpy 1.19.4、pandas 1.0.1、Matplotlib 3.1.3、TensorFlow 2.11.0 等。

1.3.5 模型评价标准 引入预测决定系数(Coefficient of Determination of Prediction, R_p^2)、外部验证相对误差值(Ratio of Performance to Deviation for Validation, RPD)和预测均方根误差(Root-Mean-Square Error of Prediction, RMSEP)3 个指标对预测模型进行评价。其中, 决定系数值 R_p^2 越接近于 1, 说明模型的拟合效果越好; RPD 值用于外部验证, 其值越大则预测模型的效果越好; RMSEP 的值越低,

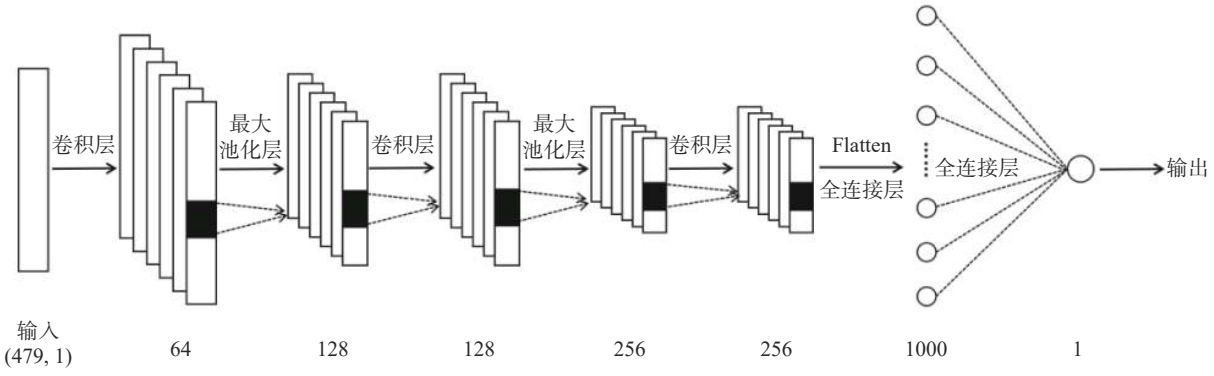


图 2 CNN 基本架构模式图

Fig.2 CNN basic architecture model diagram

说明模型预测的准确率越高。R_p^2、RPD 及 RMSEP 计算公式如下。

$$R_p^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^{n}(y_{i,actual} - y_{i,predicted})^2}{\sum_{i=1}^{n}(y_{i,actual} - \bar{y}_{i,predicted})^2}$$

$$RPD = \frac{1}{\sqrt{1 - R_p^2}}$$

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(y_{i,actual} - y_{i,predicted})^2}{n-1}}$$

式中，$y_{i,actual}$ 为验证集样品水分实际测定值；$y_{i,predicted}$ 为验证集样品水分预测值；n 为验证集的样品数。

2　结果与分析

2.1　样品水分检测结果

采用规定方法对紫菜水分进行测定，得到样品水分含量频率分布直方图和正态分布曲线见图 3。由图可见 2022 年年末一茬紫菜以及 2023 年四茬紫菜的水分含量数据均呈正态分布，且数据集具有代表性，适合进行模型训练及验证。

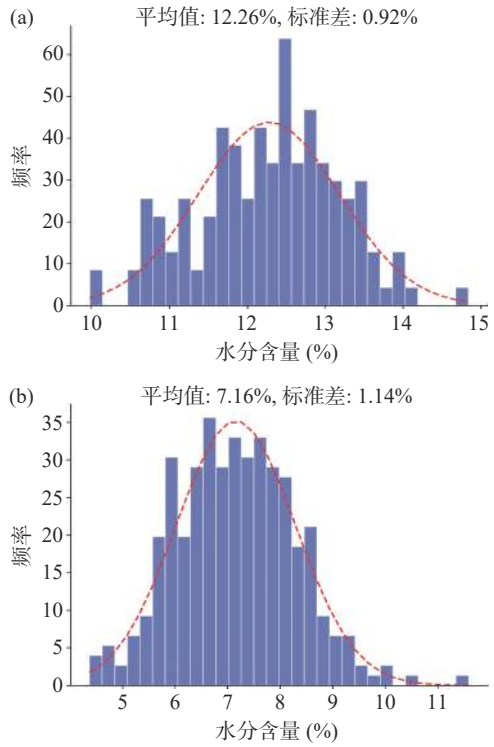


图 3　2022 年紫菜水分含量分布图(a)和 2023 年紫菜水分含量分布图(b)

Fig.3　Distribution of water content of samples in 2022 (a) and 2023 (b)

2.2　光谱采集结果

使用近红外光谱仪对紫菜样品进行光谱采集，得到光谱数据如图 4 所示。由于光谱数据受随机噪声、样品表面散射及光程变化等因素的影响，吸收光谱线带较宽，特征吸收峰不明显，无法直接建模分析。

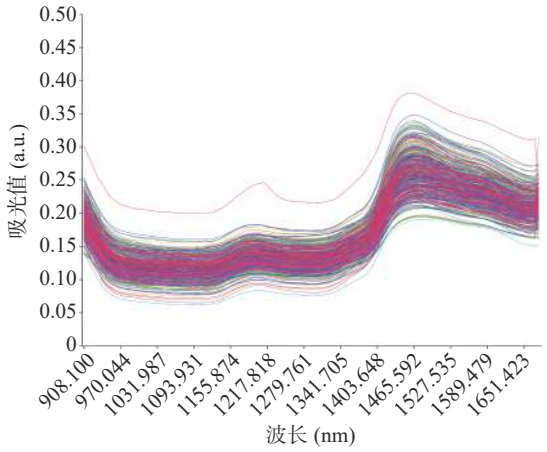


图 4　紫菜样品近红外光谱采集

Fig.4　Near-infrared spectrum acquisition of samples

2.3　光谱数据预处理结果

将采集到的光谱数据输入 CNN 模型进行训练之前，需要先对数据进行预处理。本文共选择 MSC、SNV、FD、SD 和 S-G 平滑共 5 种单类预处理方法，并在此基础上进行优化。本文所选五种方法对于光谱数据的预处理效果各有不同，其中，MSC 和 SNV 法可以消除样品因颗粒分布不均或颗粒大小不同而导致的散射[22]；S-G 平滑法可用于消除光谱中的随机噪声[23]；一、二阶导数变换能够消除光谱中基线的平移和漂移，提高分辨率和灵敏度[24]。

由图 5(f)可以看出，除 MSC 之外，其他四种单类预处理方法处理后的数据相对于未经过预处理的数据来说所建模型的预测效果表现均有提升。经过预处理后，模型的 RMSEP 值均有所降低，且 R_p^2 值均有所升高。从图 5(d)可以看出，经过 MSC 处理后的光谱特征峰并不明显，同时线带宽度大，散射影响未被有效清除，故造成其模型训练效果并不理想。

为探索两种预处理方法组合使用的方式对于模型训练的叠加效果，本研究采用了 S-G 平滑+FD、S-G 平滑+SD、SNV+FD、SNV+SD 共四种组合预处理方法，以达到“清除随机噪声+消除基线平移”或“清除散射影响+消除基线平移”的双重效果。由图 5(f)可以看出，经过组合方法处理过的数据所建模型的预测效果显著优于单类方法数据所建模型。其中，通过 S-G 平滑+SD 处理所得到的模型决定系数 R_p^2 值最高，为 0.990；同时其预测均方根误差 RMSEP 最小，为 0.456，表明利用该方法预处理后的光谱数据能够较好地适用于 CNN 模型的特征识别。由图 5(h)也可以看出，在 S-G 平滑方法上进行二阶导数的操作可以明显突出特征吸收峰，同时在一定程度上清除毛刺噪声。

2.4　传统定量模型结果比对

根据 1.3.1 中的样本集划分方法，将 2022 年和 2023 年采集的三茬紫菜(2023 年五茬紫菜除外，2023 年五茬紫菜单独作为验证集)按照 5∶1 的比例划分为训练集和测试集。样本集划分结果见表 2。

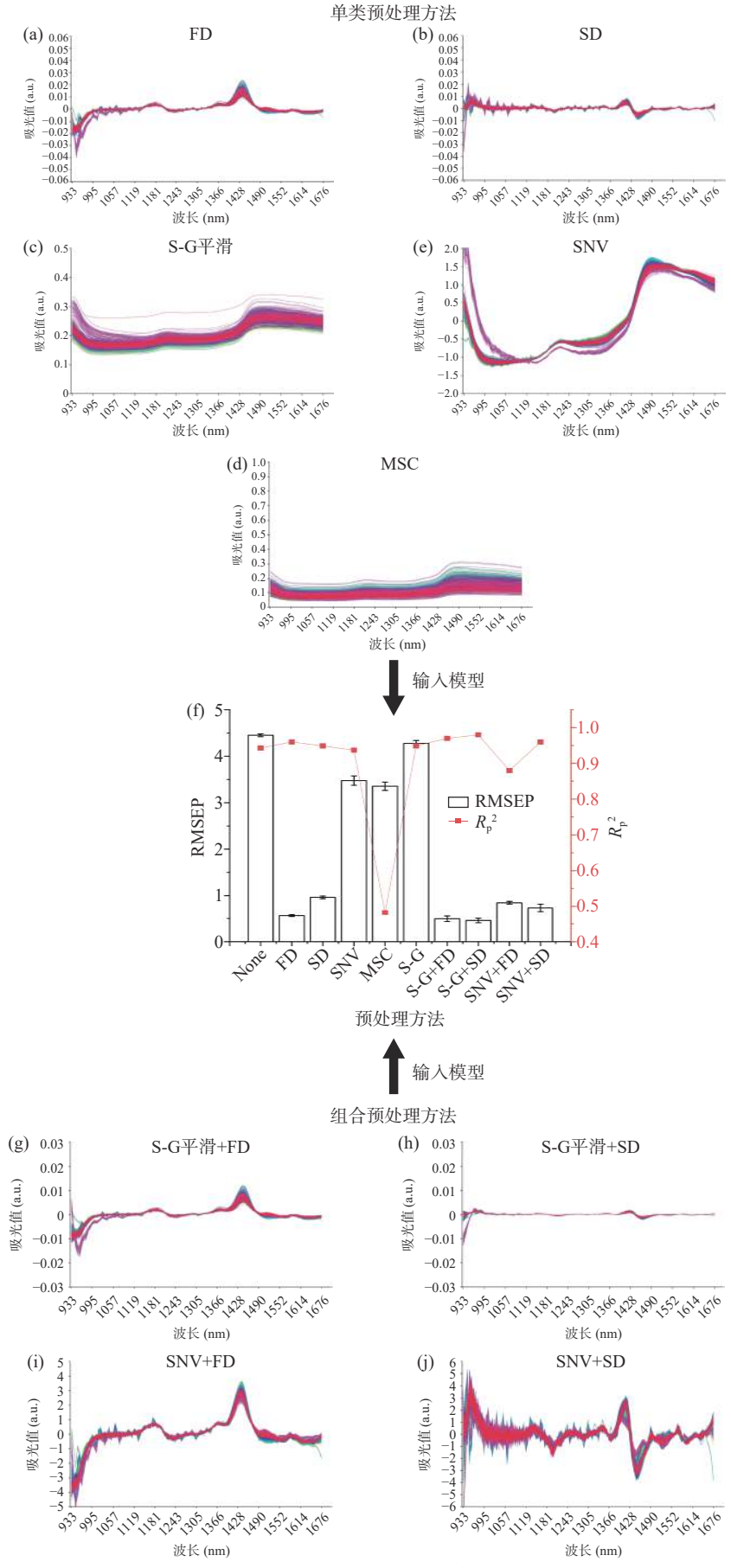


图 5 通过不同方法预处理后的近红外光谱及其建立的 CNN 模型的预测结果

Fig.5 NIR spectra pretreated by different methods and the prediction results of the established CNN model

注:(a)FD 处理;(b)SD 处理;(c)S-G 平滑处理;(d)MSC 处理;(e)SNV 处理;(f)不同预处理方法下建立水分含量预测模型的结果;(g)S-G 平滑+FD 处理;(h)S-G 平滑+SD 处理;(i)SNV+FD 处理;(j)SNV+SD 处理。

表 2　样本集划分结果

Table 2　Results of sample set partitioning

样本集	样本数目
训练集	332
测试集	66
验证集	81

不同的模型对应有不同的最佳预处理方法，本研究在利用不同方法预处理光谱数据后，分别输入四种传统定量分析模型（SVR、PLS、MLR、ANN）进行水分含量预测，表 3 是四种传统模型及 CNN 模型各自所对应的三种最佳预处理方法处理后所得到的模型预测效果。

表 3　最佳预处理方法下不同建模方法建立水分含量预测模型的结果

Table 3　Results of water content prediction models established by different modeling methods under the optimal pretreatment method

模型	预处理方法	RMSEP	R_p^2
MLR	FD	0.629	0.974
	SD	0.632	0.974
	S-G+FD	0.629	0.974
SVR	FD	0.556	0.980
	S-G+FD	0.553	0.980
	S-G+SD	0.556	0.980
ANN	FD	1.341	0.879
	SD	1.339	0.883
	S-G+FD	1.440	0.859
PLS	FD	0.753	0.963
	SD	0.715	0.967
	S-G+FD	0.764	0.962
CNN	FD	0.562	0.980
	S-G+FD	0.494	0.985
	S-G+SD	0.456	0.990

在四种传统定量分析模型中，SVR 模型的预测优势十分显著。在利用 S-G 平滑+FD 预处理后，其预测误差 RMSEP 降至 0.553，R_p^2 值达到 0.980，与 Li 等[25]基于土壤光谱数据所建立的 SVR 模型（R_p^2 值为 0.674）相比，预测准确率更高且模型稳定性强。同时根据 Williams 等[26]的研究结果，模型决定系数 R_p^2 大于 0.8 时，可认为模型在农业和食品工业实际可用，本文 SVR 模型的 R_p^2 为 0.980，说明基于传统化学计量学方法的条斑紫菜水分定量模型建立成功。

将 SVR 模型与深度学习类模型 CNN 对比，可以看出在 S-G 平滑+SD 预处理后的 CNN 模型，虽然没有经过优化调整，但其 RMSEP 值比 SVR 模型低 0.097，决定系数 R_p^2 比 SVR 模型高，模型预测效果更好。此 CNN 模型相较于 Liu 等[27]基于组合传统定量模型——偏最小二乘和支持向量机（PLS-SVR）所建立的龙香梨水分定量模型（R_p^2 值为 0.760）来说，表现出更好的预测性能。因此，可以看出深度学习在建立水分预测模型的方面相较于传统化学计量法具有明显优势。

2.5　CNN 模型分析

根据 2.3 中对于预处理方法的评价，本研究选择 SG+SD 的方法作为 CNN 模型最终的预处理方法。并在此基础上，通过调整 CNN 模型的学习率和迭代次数来进一步优化 CNN 的最终预测效果。

2.5.1　学习率对模型预测效果的影响　学习率在模型训练中起着关键作用。过大的学习率会导致训练过程不稳定、振荡，并使模型难以收敛，预测误差大[28]；过小的学习率则会使模型出现训练速度缓慢，陷入局部最优解等问题[29]。

由图 6 可知，当学习率逐渐减小时，模型 RMSEP 值逐渐减小，R_p^2 值逐渐增大，这是因为当学习率逐渐减小时，模型的步长减小，可以更精确地搜索参数空间，从而更有可能找到最优解[30]。而当学习率降至 0.00001 时，过小的步长导致模型在参数空间中移动的速度变慢，使模型陷入局部最优解，无法达到全局最优解，故 RMSEP 值和 R_p^2 值变化趋势发生相反的变化，模型的预测性能会下降。根据训练结果，对于此 CNN 模型来说，其学习率在 0.0001 左右时预测效果最好。

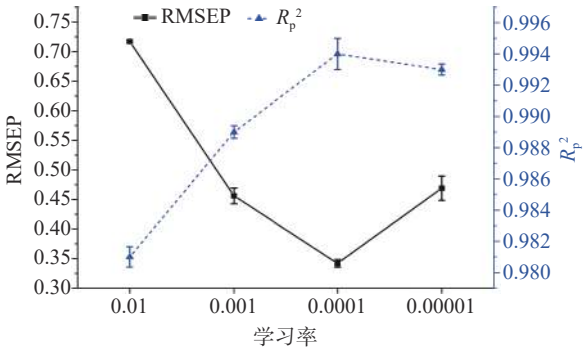


图 6　学习率对水分含量预测模型的影响

Fig.6　Influence of learning rate on moisture content prediction model

2.5.2　迭代次数对模型预测效果的影响　迭代次数是模型训练过程中的重要参数，对训练效果产生显著影响。适当的迭代次数可以帮助模型更好地理解数据模式，提高训练精度[29]；然而，过多的迭代次数可能引发过拟合问题，导致模型在训练集上表现良好但无法泛化到新数据[31]。

由图 7 可知，随着迭代次数的增加，模型可以逐渐减少在训练数据上的预测误差，从而使 RMSEP 值逐渐减小；同时，模型也可以更好地拟合训练数据的目标值，使得 R_p^2 值逐渐增大。当迭代次数增加到 1200 时，模型可能过度学习了训练数据中的噪声和随机变动，而忽略了真实的数据模式和规律，造成过拟合，预测性能下降[31]。

为了平衡模型的拟合能力和泛化能力，本模型最终确定合适的迭代次数大致为 800 左右。

最终通过反复训练可得，当学习率为 0.0001，迭代 800 次后模型训练效果最好，其预测均方根误差

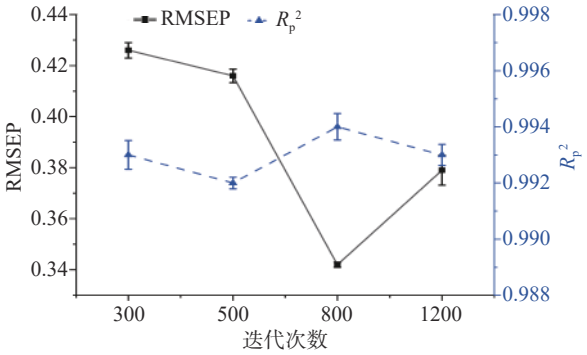


图 7 迭代次数对水分含量预测模型的影响

Fig.7 Influence of epochs on moisture content prediction model

RMSEP 降低到 0.342，决定系数 R_p^2 达到了 0.994，说明在全波段下构建 CNN 水分预测模型可行。

相较于谈爱玲等[32]基于 1D-CNN 和串行融合光谱预处理方法所建立的水分预测模型（R_p^2 为 0.906）和沈晔[33]通过复杂的特征波段提取后建立的干贝水分定量分析模型（R_p^2 为 0.967）来说，本研究所建立的深度学习模型虽未经过特定的特征波段提取环节，但训练效果并未逊于前者。只经过简单光谱预处理并基于全波段所建立的 CNN 模型整体拟合度较优，特征选择较为准确。

2.6 外部验证

在对比了不同模型的预测效果后，最后将 2023 年采集的第五茬紫菜光谱数据输入 CNN 模型，进行外部验证，验证结果见图 8。Jiang 等[34]发现外部验证相对误差值 RPD 越大则预测模型的效果越好，当 RPD>3 时则表明模型可以用在生产实践中的检测。经测验，该 CNN 模型的 RPD 值为 6.155，说明该 CNN 模型可以在实际使用场景中拥有较好的预测效果，可以实现快速准确地预测条斑紫菜水分含量。

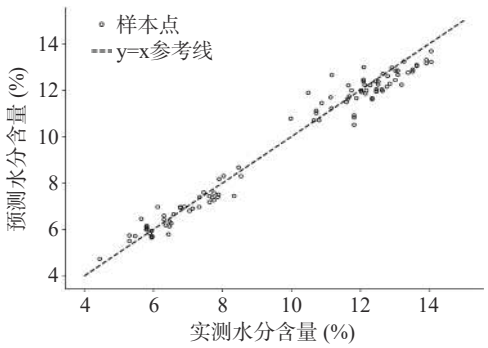


图 8 外部样本模型验证结果

Fig.8 Verification results of external sample model

3 结论

本文分别采用多元线性回归、偏最小二乘、支持向量回归、人工神经网络和卷积神经网络基于近红外光谱全波段建立了紫菜水分预测模型。结果表明，在四种传统定量水分预测模型中，SVR 模型的预测效果最佳，经过 S-G 平滑+FD 预处理后，其预测误差 RMSEP 降至 0.553，R_p^2 值达到 0.980。对比传统定量水分预测模型和深度学习模型来看，在 S-G 平滑+SD 的预处理方法下所建立的 CNN 模型预测效果最佳，其 RMSEP 值为 0.456，R_p^2 值为 0.990，优化后，该模型的 RMSEP 值降至 0.342，R_p^2 值可以达到 0.994，大于 0.8，同时外部验证 RPD 值为 6.115，大于 3，充分证明了全波段卷积神经网络（CNN）模型实际用于农业和食品工业中的可能性。同时，也可以看出深度学习模型在通过近红外光谱识别干紫菜中的非主要成分，即水分时所展现出的巨大潜力。在实际生产现场中，厂家可在条斑紫菜烘干工艺结束后的生产线上安装内置有该模型的近红外光谱仪，对烘干结束后的紫菜样品实时进行水分监测，从而实现对紫菜品质的高效控制和管理。

此次实验所测量的波长范围较小，故如游离 OH 组合频波段（1920~1980 nm）[24]等可能与本次实验相关的波段没有被包含到数据集中。同时，近年来集成学习和融合策略的概念逐渐被应用于近红外光谱分析领域中。因此，之后的研究应当基于更完整的光谱进行建模，并结合集成模型的应用，探讨更精准的预测效果的实现。

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

参考文献

[1] 曹荣, 胡梦月, 谭志军, 等. 基于电子舌和气相色谱-离子迁移谱分析坛紫菜与条斑紫菜的风味特征[J]. 食品科学, 2021, 42(8): 186−191. [CAO R, HU M Y, TAN Z J, et al. Flavor characteristics of *Porphyra haitanensis* and *Porphyra yezoensis*: A comparison study using electronic tongue and gas chromatography-ion mobility spectrometry[J]. Food Science, 2021, 42(8): 186−191.]

[2] 侍江春, 肖宇雪, 俸贵强, 等. 不同干条斑紫菜和烤条斑紫菜光合色素含量分析[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(23): 169−177. [SHI J C, XIAO Y X, FENG G Q, et al. Analysis of photosynthetic pigment content of different dried and roasted laver[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(23): 169−177.]

[3] 于宁, 戴卫平, 高永刚, 等. 中国紫菜国际贸易现状及主要问题研究[J]. 中国渔业经济, 2018, 36(5): 39−45. [YU N, DAI W P, GAO Y G, et al. Analysis and countermeasures of Chinese laver international trade[J]. Chinese Fisheries Economics, 2018, 36(5): 39−45.]

[4] 赵炜. 探讨干紫菜质量安全卫生控制体系的建立[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(23): 134−137. [ZHAO W. Discussion on the establishment of quality safety and sanitary control system of dried seaweed[J]. Food Research and Development, 2014, 35(23): 134−137.]

[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(2): 215−225. [LIN 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[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(2): 215−225.]

[6] 陈洋, 张建, 陈炳屹, 等. 条斑紫菜加工技术研究进展[J]. 特种经济动植物, 2022, 25(3): 113. [CHEN Y, ZHANG J, CHEN B Y, et al. Research progress on processing technology of *Porphyra striata*[J]. Special Economic Animals and Plants, 2022, 25(3): 113.]

[7] 冯智银. 条斑紫菜干紫菜加工技术[J]. 渔业现代化, 2002(5): 29−30. [FENG Z Y. Processing technology of dried laver[J]. Fishery Modernization, 2002(5): 29−30.]
[8] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. GB/T 23597-2022 干紫菜质量通则[S]. 2022: 12. [State Administration for Market Regulation, National Standardization Administration. GB/T 23597-2022 General principles of quality of dried laver[S]. 2022: 12.]
[9] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. GB 5009.3-2016 食品安全国家标准 食品中水分的测定[S]. 2016: 12. [National Health Commission of the People's Republic of China. GB 5009.3-2016 Determination of moisture in food of National Standard for Food Safety[S]. 2016: 12.]
[10] 周熙, 秦文. 浅谈食品水分含量快速检测法[J]. 现代测量与实验室管理, 2007(3): 15−17,21. [ZHOU X, QIN W. Rapid detection of food moisture content[J]. China Inspection Body & Laboratory, 2007(3): 15−17,21.]
[11] 王联珠, 殷邦忠, 戴卫平, 等. 紫菜国际标准制定对我国紫菜产业的影响[J]. 渔业科学进展, 2013, 34(6): 143−148. [WANG L Z, YIN B Z, DAI W P, et al. The impact of formulation of international standards for laver products on Chinese laver industry[J]. Progress in Fishery Sciences, 2013, 34(6): 143−148.]
[12] 王会, 卢雅婷. 近红外水分测定仪的发展及在食品水分检测中的应用[J]. 农业工程, 2016, 6(1): 58−61. [WANG H, LU Y T. Development of near infrared moisture measuring instrument and its application in food moisture detection[J]. Agricultural Engineering, 2016, 6(1): 58−61.]
[13] 刘爽, 柴春祥. 近红外光谱技术在水产品检测中的应用进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(21): 8590−8596. [LIU S, CHAI C X. Application progress of near infrared spectroscopy in aquatic products detection[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(21): 8590−8596.]
[14] AFARA I O, PRASADAM I, ARABSHAHI Z, et al. Monitoring osteoarthritis progression using near infrared (NIR) spectroscopy[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 11463.
[15] GUAN X C, CHEN X J, JIANG J. Integration of modified uninformative variable elimination and successive projections algorithm for determination harvest time of laver by using visible and near infrared spectra[J]. African Journal of Agricultural Research, 2011, 6(27): 5987−5991.
[16] WU D, CHEN X, ZHU X, et al. Uninformative variable elimination for improvement of successive projections algorithm on spectral multivariable selection with different calibration algorithms for the rapid and non-destructive determination of protein content in dried laver[J]. Analytical Methods, 2011, 3(8): 1790−1796.
[17] 方明明, 刘静. 基于回归卷积神经网络的近红外光谱苹果脆片品质评价方法研究[J]. 食品科技, 2020, 45(7): 303−308,16. [FANG M M, LIU J. Evaluation method of apple chips quality by near infrared spectroscopy based on regressive convolutional neural network[J]. Food Science and Technology, 2020, 45(7): 303−308, 16.]
[18] BENMOUNA B, GARCÍA-MATEOS G, SABZI S, et al. Convolutional neural networks for estimating the ripening state of fuji apples using visible and near-infrared spectroscopy[J]. Food and Bioprocess Technology, 2022, 15(10): 2226−2236.
[19] 门昌骞, 孟晓超, 姜高霞, 等. 一种利用 SPXY 采样的标签噪声主动清洗方法[J]. 小型微型计算机系统, 2021, 42(9): 1865−1870. [MEN C Q, MENG X C, JIANG G X, et al. Active label noise cleaning method based on SPXY sampling[J]. Journal of Chinese Computer Systems, 2021, 42(9): 1865−1870.]
[20] WANG S F, HAN P, CUI G L, et al. The NIR detection research of soluble solid content in watermelon based on SPXY algorithm[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2019, 39(3): 738.
[21] LU M Y, YANG K, SONG P F, et al. The study of classification modeling method for near infrared spectroscopy of tobacco leaves based on convolution neural network[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2018, 38(12): 3724−3728.
[22] 陈方方, 丁跃武, 杨友, 等. 近红外光谱样本集划分以及预处理的方法研究[J]. 甘肃科技, 2023, 39(1): 46−50. [CHEN F F, DING Y W, YANG Y, et al. Research on near infrared spectroscopy sample set partitioning and preprocessing[J]. Gansu Science and Technology, 2023, 39(1): 46−50.]
[23] SAVITZKY A, GOLAY M J E. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures[J]. Analytical Chemistry, 1964, 36(8): 1627−1639.
[24] 褚小立, 刘慧颖, 燕泽程. 近红外光谱分析技术实用手册[M]. 北京: 机械工业出版社, 2016: 956. [CHU X L, LIU H Y, YAN Z C. 近红外光谱分析技术实用手册[M]. Beijing: China Machine Press, 2016: 956.]
[25] LI X X, ZHU C G, FU Z T, et al. Rapid detection of soil moisture content based on UAV multispectral image[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2020, 40(4): 1238.
[26] WILLIAMS P C, NORRIS K H. Near-infrared technology in the agricultural and food industries[J]. Starch-Stärke, 1988, 40(10): 408.
[27] LIU D, WANG E, WANG G, et al. Nondestructive determination of soluble solids content, firmness, and moisture content of "Longxiang" pears during maturation using near-infrared spectroscopy[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2022, 46(3): e16332.
[28] SHIRISH KESKAR N, MUDIGERE D, NOCEDAL J, et al. On large-batch training for deep learning: Generalization gap and sharp minima[J/OL]. 2016, arXiv:1609.04836 https://ui.adsabs.harvard.edu/abs/2016arXiv160904836S. 10.48550/arXiv.1609.04836.
[29] HEATON J. Ian Goodfellow, Yoshua Bengio, and Aaron Courville: Deep learning: The MIT Press, 2016, 800 pp, ISBN: 0262035618[J]. Genetic Programming and Evolvable Machines, 2017, 19: 305−307.
[30] BOUTAMI S, ZHAO N, FAN S. Determining the optimal learning rate in gradient-based electromagnetic optimization using the Shanks transformation in the Lippmann-Schwinger formalism [J]. Optics Letters, 2020, 45(3): 595−598.
[31] SRIVASTAVA N, HINTON G, KRIZHEVSKY A, et al. Dropout: A simple way to prevent neural networks from overfitting[J]. Journal of Machine Learning Research, 2014, 15(1): 1929−1958.
[32] 谈爱玲, 王晓斯, 楚振原, 等. 基于近红外光谱融合与深度学习的玉米成分定量建模方法[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(23): 213−219. [TAN A L, WANG X S, CHU Z Y, et al. Research on quantitative modeling method of maize composition based on near infrared spectrum fusion and deep learning[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(23): 213−219.]
[33] 沈晔. 基于高光谱成像技术的干贝水分含量快速检测研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2017. [SHEN Y. Rapid determination of the moisture content in dried scallop based on hyperspectral imaging [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2017.]
[34] JIANG H, ZHOU Y, ZHANG C, et al. Evaluation of dual-band near-infrared spectroscopy and chemometric analysis for rapid quantification of multi-quality parameters of soy sauce stewed meat[J]. Foods, 2023, 12(15): 2882.

石吴娟, 滕建文, 夏宁, 等. 百香果皮细胞壁多糖的顺序提取与理化性质分析 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 198−207. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110001

SHI Wujuan, TENG Jianwen, XIA Ning, et al. Sequential Extraction and Physicochemical Property Analysis of Cell Wall Polysaccharides from the Passion Fruit Peels[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 198−207. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110001

· 分析检测 ·

百香果皮细胞壁多糖的顺序提取与理化性质分析

石吴娟, 滕建文*, 夏　宁, 韦保耀, 黄　丽
（广西大学轻工与食品工程学院, 广西南宁 530000）

摘　要: 本文采用水、反式-1,2-环己二胺四乙酸（CDTA）、Na_2CO_3 和不同浓度的 NaOH 溶剂从百香果皮中依次提取出 5 种细胞壁多糖，并分析其组成、结构和物理特性。结果表明，水提取多糖得率最高，占果皮醇不溶物干重的 9.04%。其次为 4 mol/L NaOH 提取多糖（8.15%）、0.05 mol/L CDTA 提取多糖（7.38%）、0.05 mol/L Na_2CO_3 提取多糖（5.36%）和 1 mol/L NaOH 提取多糖（3.89%）。水提取多糖和 0.05 mol/L CDTA 提取多糖为以同型半乳糖醛酸聚糖为主的果胶类多糖，其分子量分别为 198.46 kDa 和 73.67 kDa。而 0.05 mol/L Na_2CO_3 提取多糖具有高的鼠李半乳糖醛酸聚糖占比（53.47%）和最低的分子量（30.29 kDa）。1 mol/L NaOH 提取多糖和 4 mol/L NaOH 提取多糖属于木糖、葡萄糖、甘露糖和半乳糖等组成的半纤维素类多糖。五种多糖溶液均呈现出剪切稀化特征，其中 0.05 mol/L Na_2CO_3 提取多糖表现出最高的表观粘度，并呈现弹性行为，其弹性模量 G′大于粘性模量 G″。水提取多糖和 0.05 mol/L CDTA 提取多糖分别在角频率 1.10 和 0.43 rad/s 附近出现凝胶向溶胶的转变。此外，0.05 mol/L Na_2CO_3 提取多糖展现出卓越的乳化能力和稳定性。半纤维素类多糖具有较低的粘度和更高的热稳定性。综上，百香果皮含有丰富的细胞壁多糖，且不同多糖在制备乳液和改善食品质构方面展示出不同的潜力。该研究为深度提取和开发果皮多糖提供参考。

关键词: 百香果皮, 细胞壁多糖, 果胶, 半纤维素, 理化性质
中图分类号: TS209　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2024)21−0198−10
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110001
本文网刊:

Sequential Extraction and Physicochemical Property Analysis of Cell Wall Polysaccharides from the Passion Fruit Peels

SHI Wujuan, TENG Jianwen*, XIA Ning, WEI Baoyao, HUANG Li
（College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning 530000, China）

Abstract: This study sequentially extracted five cell wall polysaccharides from passion fruit peels using water, cyclohexane-trans-1,2-diamine tetra-acetate (CDTA), Na_2CO_3, and NaOH at varying concentrations. The composition, structure, and physical properties of these polysaccharides were investigated. The results demonstrated that water-extracted polysaccharides yielded the highest content, accounting for 9.04% of the dry weight of the peel's alcohol-insoluble residue. This was followed by polysaccharides extracted with 4 mol/L NaOH (8.15%), 0.05 mol/L CDTA (7.38%), 0.05 mol/L Na_2CO_3 (5.36%), and 1 mol/L NaOH (3.89%). Water-extracted and 0.05 mol/L CDTA-extracted polysaccharides were dominated by homogalacturonan, with molecular weights of 198.46 kDa and 73.67 kDa, respectively. The 0.05 mol/L Na_2CO_3-extracted polysaccharides had a high percentage of rhamnogalacturonan (53.47%) and the most negligible molecular weight (30.29 kDa). The polysaccharides extracted with 1 mol/L NaOH and 4 mol/L NaOH were hemicellulosic in nature, primarily composed of xylose, glucose, mannose, and galactose. All polysaccharides exhibited shear-thinning

收稿日期: 2023−11−03
基金项目: 广西重点研发计划项目（桂科 AB22035020）。
作者简介: 石吴娟（1997−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 亚热带水果加工及其副产品综合利用, E-mail: 2278262799@qq.com。
*** 通信作者:** 滕建文（1969−）, 男, 硕士, 教授, 研究方向: 亚热带水果加工及其副产品综合利用, E-mail: tjw1027@gxu.edu.cn。

flow behaviors in aqueous solutions. The 0.05 mol/L Na_2CO_3-extracted polysaccharides showed the highest apparent viscosity and demonstrated elastic behavior, with the elastic modulus G′ exceeding the viscous modulus G″. The water-extracted polysaccharides and the 0.05 mol/L CDTA-extracted polysaccharides exhibited a gel-to-sol transition at angular frequencies near 1.10 and 0.43 rad/s, respectively. The 0.05 mol/L Na_2CO_3-extracted polysaccharides displayed relatively excellent emulsifying ability and emulsion stability. Hemicellulosic polysaccharides exhibited lower viscosity and higher thermal stability. Thus, passion fruit peels contained abundant cell wall polysaccharides, with different polysaccharides showing varied potential for emulsification and food texture improvement. This study provides valuable insights for the in-depth development of the extraction and use of peel polysaccharide fractions.

Key words: passion fruit peel; cell wall polysaccharides; pectin; hemicellulose; physicochemical property

百香果（*Passiflora edulis* f. *edulis*）是一种营养丰富且风味独特的热带水果，主要用于鲜食、调味和生产果汁饮料等[1]。百香果皮占鲜果质量约 50% 以上，含有大量的碳水化合物等生物活性物质。然而，百香果汁加工产业中，大量果皮被丢弃，给环境带来巨大压力，同时造成资源浪费。百香果皮富含细胞壁多糖，其中果胶、半纤维素和纤维素是果皮中主要的膳食纤维成分[2]。果胶具有强大的保水、形成凝胶能力，在商业上常被用作增稠稳定剂和胶凝剂[3]。已有研究表明果胶和纤维素不仅是维持细胞壁机械强度的重要组分，也是影响食品质地和流变特性的主要成分[4]。因此，百香果皮既可作为生产果胶的新来源，也可用于开发新的富含膳食纤维的功能食品配料。

果胶、半纤维素和纤维素是果蔬初级细胞壁中最主要的多糖聚合物。其中，纤维素含量最高，为 1,4-β-D-吡喃葡萄糖单元连接而成的均质多糖[5]。果胶是以半乳糖醛酸为主的异质大分子多糖，主要由同型半乳糖醛酸聚糖（homogalacturonan, HG）、鼠李半乳糖醛酸聚糖Ⅰ（rhamnogalacturonan Ⅰ, RG-Ⅰ）和鼠李半乳糖醛酸聚糖Ⅱ（rhamnogalacturonan Ⅱ, RG-Ⅱ）等结构域组成[6]。半纤维素是主要由葡甘露聚糖和木聚糖组成的短支链杂多糖，通过氢键或共价键与纤维素、果胶等紧密结合构成细胞壁骨架，又通过阿魏酸与木质素交联形成结构复杂且有抗性的木质纤维素[7]。因此，传统单一的酸或碱提取不能将细胞壁多糖分离完全。通常先采用水、螯合剂（如 1,2-环己二胺四乙酸（CDTA）等）和弱碱（如 Na_2CO_3）等不同溶剂系统依次分离出与细胞壁基质多糖不同程度结合的果胶，再以不同浓度的强碱破坏半纤维素和纤维素之间的强氢键，以溶解出堆积在纤维素微纤维表面的半纤维素类聚糖[8]。顺序提取是研究细胞壁多糖原始状态的常用方法，也是研究不同细胞壁多糖组分功能及应用的途径。目前，采用顺序提取已成功分离出番茄渣[9] 和笋壳[10] 等副产物中的细胞壁多糖，这为进一步探究不同细胞壁多糖组分在结构和理化特性方面的优势提供了参考。

现有研究已利用超声、微波、高速剪切等技术，改善了百香果皮多糖的提取率[11]，但果皮中不同细胞壁多糖组成和结构及其可能带来的理化特性差异尚未可知。因此，本文采用顺序提取从百香果皮中分离出水提取多糖、0.05 mol/L CDTA 提取多糖、0.05 mol/L Na_2CO_3 提取多糖、1 mol/L NaOH 提取多糖和 4 mol/L NaOH 提取多糖 5 种细胞壁多糖组分，分析其基本组成和结构特征，并对其流变性、乳化性和热稳定性能等物化特性进行表征，为百香果皮多糖在食品加工中的应用提供理论基础，也为其他果蔬副产物细胞壁多糖开发利用提供参考。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

紫皮百香果皮　广西和谊食品有限公司；金龙鱼玉米胚芽油　益海嘉里有限公司；单糖标准品　优级纯，扬州市博瑞糖生物公司；葡聚糖标准品　优级纯，日本 SHOWA DENKO 公司；1,2-环己二胺四乙酸（CDTA）、硼氢化钠　分析纯，上海源叶生物科技有限公司；间羟基联苯、半乳糖醛酸、牛血清白蛋白　分析纯，北京索莱宝科技有限公司；其他试剂均为国产分析纯。

ICS5000 离子色谱仪、Nicolet™ iS™ 10 傅里叶变换红外光谱仪　赛默飞公司；LC-10A 高效液相色谱仪　日本岛津公司；Zetasizer Nano ZS90 纳米粒度仪　英国马尔文仪器公司；Bettersize 2600 激光粒度分析仪　丹东百特仪器公司；STA 449F5 TGA / DTA 同步热分析仪　德国 NETZSCH 公司；Discovery HR20 混合型流变仪　杭州汉泽仪器有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　果皮多糖含量测定

1.2.1.1　醇不溶物的制备　百香果皮清洗干净后经 55 ℃ 热风干燥 24 h，粉碎后过 80 目筛得到果皮粉（passion fruit peel, PFP），其水分含量为 6.22%±0.45%。将 PFP 按 1∶20（w/v）与 70% 乙醇混合，室温静置 1 h，真空抽滤收集不溶物，以 70% 乙醇重复洗涤 6 次，经 55 ℃ 干燥得到醇不溶物（alcohol insoluble residues, AIR）。参考 Xu 等[12] 的方法测定果皮总果胶、半纤维素和纤维素含量。

1.2.1.2　总果胶含量测定　10 mg AIR 均匀分散于 4 mL 水中，加入 8 mL 浓硫酸，冰浴搅拌 1 h，用 100 mL 去离子水稀释，离心，收集上清定容。取 0.4 mL 上清与 5 mL 的 0.125 mol/L 四硼酸钠-硫酸

溶液混合，沸水浴 10 min 后迅速冷却，加入 75 μL 0.15 g/100 mL 间羟基联苯（溶于 0.5 g/100 mL NaOH 溶液），混匀，测定 520 nm 处吸光度。以不同浓度半乳糖醛酸（2~100 μg/mL）绘制标准曲线，采用间羟基联苯法测定上清中半乳糖醛酸含量，果皮总果胶结果以 g/100 g AIR 表示。

1.2.1.3 半纤维素含量测定 20 mg AIR 分散在 20 mL 100 mmol/L 磷酸钠缓冲液（含 20 mmol/L EDTA，pH6.5），煮沸 1 h，过滤，沉淀洗涤洗两次后，分散在 20 mL 4 mol/L NaOH（含有 20 mmol/L NaB_4），室温下放置 24 h，过滤，收集滤液。以半乳糖为标准品，采用蒽酮-硫酸法（620 nm）测定滤液中半纤维素的含量，结果以 g/100 g AIR 表示。

1.2.1.4 纤维素含量测定 20 mg AIR 与 10 mL 乙酸∶硝酸∶去离子水（4∶1∶2，v/v/v）混合煮沸 1 h，6000 r/min 离心 20 min。沉淀溶解在 10 mL 的 67% 硫酸中，在室温下放置 24 h，离心，收集滤液。以葡萄糖为标准品，采用蒽酮-硫酸法（620 nm）测定滤液中纤维素的含量，结果以 g/100 g AIR 表示。

1.2.1.5 木质素含量测定 果皮粉与石油醚置于索式抽提器中抽提 6 h，60 ℃ 烘 12 h 后得预处理果皮粉。取 1 g 预处理果皮粉置于 560 ℃ 的马弗炉中灼烧至恒重，计算灰分的质量分数 X。采用 Hao 等[13]的方法测定木质素含量。1 g 预处理果皮粉与 12 mL 70% 的 H_2SO_4 溶液混匀，40 ℃ 水解 1 h，加入水 198 mL，100 ℃ 回流 1 h。混合液用已恒重的砂芯漏斗（M_0）过滤，不溶物于 60 ℃ 条件下干燥至恒重（M_1）。再按式（1）计算木质素的质量分数。

$$\text{木质素含量}(\%)=\left(\frac{M_1-M_0}{M}\right)\times 100-X \qquad \text{式（1）}$$

式中，M：果皮粉质量，g；M_0：恒重砂芯漏斗质量，g；M_1：砂芯漏斗和不溶物恒重后质量，g；X，果皮粉中灰分质量分数。

1.2.2 果皮细胞壁多糖的顺序提取 参考 Yu 等[14]的方法，并稍作修改。如图 1 所示，将 10 g AIR 和 300 mL 去离子水混匀，室温下磁力搅拌 4 h，并提取两次，6000×g 离心 10 min，收集两次上清液即为水提取多糖（water-soluble polysaccharides，WEP）粗提液。

提取 WEP 后的沉淀加入 0.05 mol/L CDTA 溶液（含 0.1 mol/L 乙酸钠，pH6.5），用于分离 CDTA 提取多糖（CDTA-extracted polysaccharides，CEP）。提取 CEP 后的沉淀加入 0.05 mol/L Na_2CO_3（含有 0.025 mol/L $NaBH_4$），4 ℃ 放置 4 h 后，提取两次，取出，于室温下分离 Na_2CO_3 提取多糖（Na_2CO_3-extracted polysaccharides，NEP）。

提取 NEP 后的沉淀加入 1.0 mol/L NaOH（含 0.025 mol/L $NaBH_4$），用于分离 1.0 mol/L NaOH 提取多糖（1 mol/L NaOH-extracted polysaccharides，1M-NEP）。提取 1M-NEP 后的沉淀加入 4.0 mol/L NaOH（含 0.025 mol/L $NaBH_4$），用于分离 4.0 mol/L NaOH 提取多糖（4 mol/L NaOH-extracted polysaccharides，4M-NEP）。最终的残渣经去离子水洗涤至中性后，冻干保存。

调节所有多糖上清液的 pH 至 6.5 后，加入 3 倍体积的 95% 乙醇进行醇沉。收集多糖沉淀，并用无水乙醇洗涤两次，以去离子水进行复溶。除 CEP 以外的组分，经透析（3500 Da）48 h 后，采用 55 ℃ 旋蒸减压浓缩，通过冻干得到各多糖组分。而 CEP 复溶后，先用 0.1 mol/L NaCl 溶液透析（3500 Da）24 h，再用去离子水透析 24 h，再浓缩，冻干。多糖的得率通过式（2）计算：

$$\text{得率}(\%)=\frac{\text{多糖质量}}{\text{果皮粉质量(或AIR 质量)}}\times 100 \qquad \text{式（2）}$$

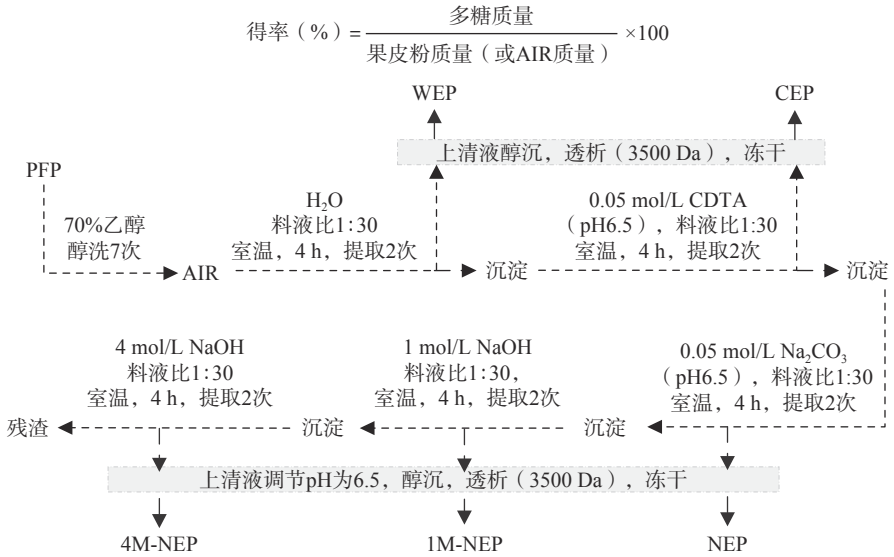


图 1 PFP 细胞壁多糖的顺序提取流程

Fig.1 Sequential extraction procedure of PFP cell wall polysaccharides

1.2.3　五种细胞壁多糖基本组成测定

1.2.3.1　化学组成测定　分别采用考马斯亮蓝法、间羟基联苯法和苯酚-硫酸法[15]测定细胞壁多糖中蛋白质、半乳糖醛酸和中性糖的含量，并以牛血清白蛋白、半乳糖醛酸、葡萄糖分别为各测定方法的标准品。

1.2.3.2　酯化度测定　0.1 g WEP、CEP 和 NEP 溶于 100 mL 新煮沸并冷却的水，加 5 滴酚酞，0.02 mol/L NaOH 溶液滴定至粉红色，记录初始滴定所用 0.02 mol/L NaOH 溶液体积 V_1。向样液中加入 20 mL 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液皂化 15 min，加入 20 mL 0.1 mol/L 的 HCl 溶液混匀，再用 0.02 mol/L NaOH 溶液滴定至粉红色，记录消耗的 0.02 mol/L NaOH 溶液体积 V_2[16]。酯化度的计算公式如下：

$$酯化度(\%) = \frac{V_2}{V_1 + V_2} \times 100 \qquad 式（3）$$

式中，V_1，初始滴定所用 0.02 mol/L NaOH 溶液体积，mL；V_2，第 2 次滴定所用 0.02 mol/L NaOH 溶液体积，mL。

1.2.4　单糖组成测定　参考 Peng 等[10]的方法测定样品中单糖组成。5 mg 多糖与 2 mL 3 mol/L 三氟乙酸混匀，120 ℃ 环境下水解 3 h。经氮气吹干，加入 5 mL 超纯水并涡旋混匀。再次加水稀释 20 倍后，12000 r/min 离心 5 min，取上清液进行分析。采用 Dionex CarbopacTM PA20（3 mm×150 mm）色谱柱。流动相：A：H_2O；B：15 mmol/L NaOH；C：15 mmol/L NaOH 和 100 mmol/L NaOAc。流速为 0.3 mL/min，进样量为 25 μL，柱温为 30 ℃，检测器为电化学检测。洗脱梯度：0~20 min，A-98.8%，B-1.2%；20~30 min，A-50%，B-50%；30.1~46.1 min，C-100%；46.1~50.1 min，B-100%；50.1~80 min，A-98.8%，B-1.2%。

1.2.5　分子量测定　采用 HPGPC 测定多糖分子量[10]，并稍作修改。配制 2 mg/mL 多糖溶液，过 0.22 μm 的水系微孔滤膜后进行分析。色谱条件：流动相：0.05 mol/L NaCl 溶液（WEP）；0.2 mol/L NaOH-NaCl 溶液（CEP、NEP、1M-NEP、4M-NEP）；色谱柱：BRT105-103-101 串联凝胶柱（8 mm×300 mm）；流速：0.8 mL/min；柱温：40 ℃；进样量：25 μL；检测器：示差检测器 RID-10A；分析时间：60 min。

1.2.6　红外光谱测定　将多糖与 KBr 以 1∶100（w/w）混合，充分研磨后压制成片，并进行红外光谱扫描，扫描参数如下：500 cm^{-1} 至 4000 cm^{-1}，分辨率为 4 cm^{-1}，扫描 32 次。

1.2.7　流变特性测定　配制 2%（w/v）的多糖水溶液，4 ℃ 放置过夜，使其充分溶胀水合。使用流变仪测定多糖在 0.1~1000 s^{-1} 的静态流动行为，并利用 Ostwald-de Waele 模型式（4）进行拟合，计算 K 和 n。通过应变扫描确定多糖的线性粘弹区。在线性黏弹区内，角频率为 0.1~200 rad/s，分别设置 1%（WEP、NEP、CEP）和 0.5%（1M-NEP、4M-NEP）的应变测定多糖的动态流变特性[17]。

$$\tau = K\gamma^n \qquad 式（4）$$

式中，τ 为剪切应力，Pa；K 为稠度系数，Pa·s^n；γ 为剪切速率，s^{-1}；n 为流动指数。

1.2.8　乳化能力和乳化稳定性测定　参考 Zhang 等[18]的方法制备多糖的乳液，并稍作修改。7 mL 玉米胚芽油与 14 mL 2%（w/v）多糖水溶液混合，高速剪切分散机以 10000 r/min 均质 2 min 后，75 W 超声 2 min，然后室温下 4600×g 离心 5 min，分别记录离心前后乳化层体积 V_0 和 V_1。将乳液在 80 ℃ 下孵育 1 h，在室温下以 4600×g 离心 5 min，记录乳液原始体积 V_2 和离心后乳化层体积 V_3。多糖的乳化能力和乳化稳定性分别按照式（5）和（6）计算。

$$乳化能力(\%) = \frac{V_1}{V_0} \times 100 \qquad 式（5）$$

$$乳化稳定性(\%) = \frac{V_3}{V_2} \times 100 \qquad 式（6）$$

式中，V_0、V_1 分别为离心前后乳化层的体积，mL；V_2：乳液原始体积，mL；V_3 为加热离心后乳化层的体积，mL；

1.2.9　乳液粒径及 Zeta 电位测定　用激光粒度分布仪测定 1.2.8 制备乳液的粒径，记录乳液体积加权平均直径 $D_{4,3}$ 和 $D_{3,2}$。H_2O 和油相的折射率分别为 1.33 和 1.47。用去离子水将 1.2.8 处五种多糖及其制备的乳液稀释 100 倍后，测定其 Zeta 电位。

1.2.10　热稳定性测定　称取 5 mg 样品，使用同步热分析仪评估其热稳定性。温度范围 50~600 ℃；加热速率 10 ℃/min；使用氮气作为吹扫气体，流速为 30 mL/min[18]。

1.3　数据处理

所有实验重复三次。运用 Excel 2019 分析数据的平均值和方差，SPSS 27.0.1 进行差异显著性检验（P<0.05）。Origin2023b 作图。

2　结果与分析

2.1　百香果皮多糖含量分析

如 表 1 所示，100 g 果皮粉经过 70% 乙醇洗涤除去可溶性糖和色素等物质后，获得 73.53 g AIR。果胶是 PFP 最主要的可溶性多糖，其总含量为 27.05 g/100 g AIR。不溶性膳食纤维中，纤维素的含量为 45.72 g/100 g AIR，其次是半纤维素（16.88 g/100 g AIR）和木质素（13.26 g/100 g AIR），这与陈良云[19]和 Yapo 等[2]的研究结果相近。与副产物柑橘皮来源的主要商业果胶（其果胶、半纤维素、纤维素和木质素含量分别为 23.02%~34.00%、10.20%~11.04%、25.10%~37.10% 和 4.30%~7.52%）[20]相比，百香果

表 1 PFP 的多糖含量

Table 1 Polysaccharides content of PFP

醇不溶物（g/100 g干果皮）	PFP的多糖含量(g/100 g AIR)			
	总果胶	半纤维素	纤维素	木质素
73.53±1.16	27.05±1.95	16.88±0.28	45.72±2.42	13.26±0.49

皮中果胶占比低，纤维素与木质素占比相对较高。木质素与其他细胞壁多糖通过共价键交联形成木质素-碳水化合物复合体，阻碍细胞壁多糖的溶出[21]。

2.2 PFP 细胞壁多糖的提取结果与理化性质分析

2.2.1 顺序提取结果及其基本组成 通过顺序提取从 AIR 中分离出五种细胞壁多糖。如图 2 所示，以醇不溶物（AIR）干重计算，WEP 得率最高（9.04%），呈片层状；而 4M-NEP 得率次之（8.15%），为质地棉软的粉末状。CEP、NEP 和 1M-NEP 呈现质地较硬的不规则小碎片状，得率分别是 7.38%、5.36% 和 3.89%，其余为果皮残渣（45.33%）。与茶枝柑皮顺序提取结果[22] 相似，且 WEP 和 4M-NEP 是 PFP 中顺序提取得率相对较高的多糖。由表 2 可知，WEP、CEP、NEP 半乳糖醛酸含量均大于 65%，其中 WEP 和 CEP 的酯化度分别为 88.57% 和 61.72%，属于高酯果胶。五种多糖可分为富含半乳糖醛酸的果胶类多糖（WEP、CEP、NEP）和富含中性糖的半纤维素类多糖（1M-NEP、4M-NEP），且两类多糖的总得率分别为 21.78% 和 12.04%，分别低于果皮中总果胶和半纤维素含量，这种偏差的出现可能是部分多糖在多次分离提取过程中产生损失，以及紧密结合在残余果皮残渣上未被提取出来[23]。相对于 4M-NEP，1M-NEP 中的糖醛酸和蛋白质含量更高，可能是 1 mol/L NaOH 破坏半纤维素与其他细胞壁成分之间的共价键和氢键以及离子和疏水相互作用，从而使细胞壁中的果胶和蛋白质共提取出来[22]。

2.2.2 单糖组成分析 采用不同的溶剂提取可能获得具有不同单糖组成和结构的多糖。如表 3 所示，GalA、Rha、Gal 和 Ara 是 WEP、CEP 和 NEP 中最主要的单糖（累计分别占三种多糖总单糖的 92.8%、93.75% 和 94.32%）。这说明 WEP、CEP 和 NEP 是以半乳糖醛酸为主的果胶类多糖，且主要由同型半乳糖醛酸（HG）和鼠李糖半乳糖醛酸聚糖 Ⅰ（RG-Ⅰ）两大结构域组成。此外，少量 Fuc 和 Man 的存在说明这三种多糖中可能还含有鼠李半乳糖醛酸聚糖 Ⅱ（RG-Ⅱ）结构域[24]。除了 Rha 外，Gal 和 Ara 是 NEP 中最丰富的中性糖，且 NEP 中 RG-Ⅰ结构域占比达 53.47%。因此 NEP 中可能含有丰富的半乳聚糖、阿拉伯聚糖或阿拉伯半乳聚糖侧链，这可能是在碱性条件下提取破坏了果胶 HG 区，留下大量的中性糖侧链附着在 RG-Ⅰ骨架上所致[25]。GalA-Rha 和 2Rha+Gal+Ara 可以推测 HG 和 RG-Ⅰ在果胶多糖中的占比，Rha/Gal、(Ara+Gal)/Rha 和 GalA/(Fuc+Rha+Ara+Gal+Xyl) 分别表示果胶支链分支程度、RG-Ⅰ的分支程度和果胶主链的分支程度[26]。WEP 和 CEP 的 HG 占比分别为 78.59% 和 67.72%，即 HG 结构域占主要部分，而 NEP 中 RG-Ⅰ占比最高。WEP、CEP 和 NEP 中 GalA 含量逐渐降低，中性糖含量依次增高，且 HG、(Ara+Gal)/Rha 和 GalA/(Fuc+Rha+Ara+Gal+Xyl) 值依次减小，同时 RG-Ⅰ

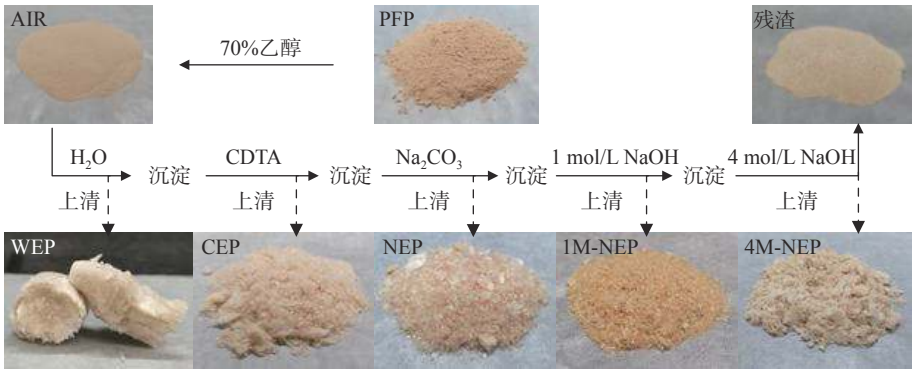


图 2 PFP 细胞壁多糖的顺序提取结果

Fig.2 Sequential extraction results of PFP cell wall polysaccharides

表 2 PFP 细胞壁多糖的基本组成

Table 2 Basic components of PFP cell wall polysaccharides

指标	WEP	CEP	NEP	1M-NEP	4M-NEP
得率(% AIR)	9.04±0.45^{a}	7.38±0.68^{b}	5.36±0.08^{c}	3.89±0.07^{d}	8.15±1.12^{b}
得率(% PFP)	6.65±0.33^{a}	5.43±0.01^{b}	3.94±0.06^{c}	1.65±0.16^{d}	5.18±0.01^{b}
半乳糖醛酸含量(% DW)	74.96±1.86^{ab}	77.92±2.49^{a}	66.57±5.92^{c}	6.00±0.62^{d}	1.82±0.11^{e}
中性糖含量(% DW，以葡萄糖计)	26.61±1.90^{c}	24.37±1.34^{c}	23.54±1.80^{c}	66.20±0.25^{b}	84.37±1.21^{a}
蛋白质含量(% DW)	5.01±0.45^{d}	6.69±0.30^{c}	7.46±0.20^{c}	21.53±0.49^{a}	9.77±0.59^{b}
酯化度(%)	88.57±1.92^{a}	61.72±1.00^{b}	–	–	–

注：“–”，表示未检测到；同一指标的不同小写字母代表有显著性（P<0.05）差异。

表 3　PFP 细胞壁多糖的单糖组成摩尔比(%)

Table 3　Monosaccharide molecular ratio of PFP cell wall polysaccharides (%)

单糖摩尔比		WEP	CEP	NEP	1M-NEP	4M-NEP
	半乳糖醛酸(GalA)	81.19	74.81	56.32	2.17	0.66
	葡萄糖醛酸(GlcA)	0.96	1.34	1.02	0.35	0.13
	鼠李糖(Rha)	2.60	7.10	15.47	1.60	0.38
	阿拉伯糖(Ara)	3.84	5.82	9.28	2.93	0.22
	半乳糖(Gal)	5.17	6.02	13.25	14.23	14.61
	葡萄糖(Glc)	3.21	2.02	1.70	31.33	31.83
	木糖(Xyl)	1.42	1.24	1.26	34.88	23.72
	甘露糖(Man)	1.12	0.67	0.57	9.14	26.93
	岩藻糖(Fuc)	0.41	0.73	0.78	3.31	1.53
	盐酸氨基葡萄糖(GlcN)	0.07	0.25	0.35	0.05	–
糖率比	HG	78.59	67.72	40.85	–	–
	RG-Ⅰ	14.21	26.03	53.47	–	–
	Rha/GalA	0.03	0.09	0.27	–	–
	(Ara+Gal)/Rha	3.47	1.67	1.46	–	–
	GalA/(Fuc+Rha+Ara+Gal+Xyl)	6.04	3.58	1.41	–	–
	Man/Xyl	–	–	–	0.26	1.14

注：“–”，表示未检出；HG=GalA-Rha：推测HG结构域的占比；RG-Ⅰ=2Rha+Gal+Ara：推测RG-Ⅰ结构域的占比；Rha/Gal、(Ara+Gal)/Rha和GalA/(Fuc+Rha+Ara+Gal+Xyl)分别表示果胶支链分支程度、RG-I的分支程度和果胶主链的分支程度。

和 Rha/GalA 依次增大。这说明随着顺序提取的进行，得到的果胶类多糖组分含有更多的 RG-Ⅰ结构域，主链分支程度降低，侧链分支程度升高。因此 WEP 可能是具有主链长、分支度高和侧链短等特点，且酯化度高的 HG 果胶；NEP 可能是 RG-Ⅰ侧链长且分支程度高的 RG 果胶；而 CEP 是居于两者之间的 HG 果胶。

Glc、Xyl、Man 和 Gal 是 1M-NEP 和 4M-NEP 中主要的单糖，并分别累积占总单糖的 89.59% 和 97.08%。强碱提取多糖中可能含有木葡聚糖、木聚糖和甘露聚糖[27] 等结构单元。Yapo 等[2] 认为，果皮中半纤维素组分主要由木葡聚糖和葡甘露聚糖组成。Man/Xyl 表示甘露聚糖在半纤维素中的贡献[27]。1M-NEP 的 Man/Xyl 值为 0.26，小于 4M-NEP 的 1.14，且 Man 在 4M-NEP 中的占比更高。此外，1M-NEP 中含有少量的 GalA(2.17%)、Ara(2.93%)和 Rha(1.60%)，即 1M-NEP 中有少量的果胶共存，这可能来自果胶中与半纤维素共价结合的 RG-Ⅰ侧链部分[27]，这可能也是果胶提取结果小于分析结果的原因。

2.2.3　果皮细胞壁多糖的分子量分布　如图 3 所示(39 min 及 41 min 处的峰为流动相峰，即 NaCl 和 NaOH 峰)，不同溶剂提取下的多糖峰形和出峰时间不同。除 4M-NEP 外，其他四种多糖均呈现对称峰形。随着顺序提取的进行，果胶类多糖重均分子量逐渐减小，WEP、CEP 和 NEP 的重均分子量依次约为 198.46、73.67 和 30.29 kDa。半纤维素类多糖 1M-NEP 和 4M-NEP 的重均分子量分别为 31.76 和 21.28 kDa，1M-NEP 分子量较为集中，而 4M-NEP 在 53.00 kDa 处有一个肩峰(峰面积占比为 35.44%)。这可能是高浓度的碱有助于从细胞壁中释放分子量更大的半纤维素聚合物[22]。结合单糖组成分析，WEP 和 CEP 是以半乳糖醛酸为主的线性大分子果胶多糖，NEP 是富含长的中性糖侧链的较小分子量果胶多糖。

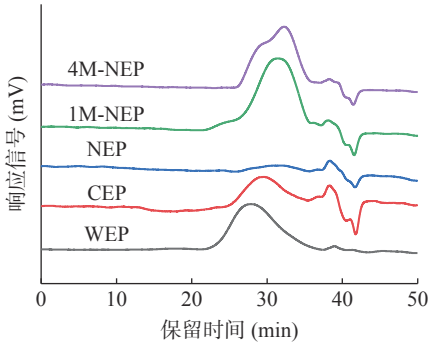


图 3　PFP 细胞壁多糖的分子量分布

Fig.3　Molecular weight distribution of PFP cell wall polysaccharides

2.2.4　红外光谱分析　如图 4 所示，五种多糖在 3426 cm^{-1} 呈现出宽的吸收峰表明存在氢键拉伸振动[22]，而在 2950 和 1360 cm^{-1} 附近的吸收峰表明存

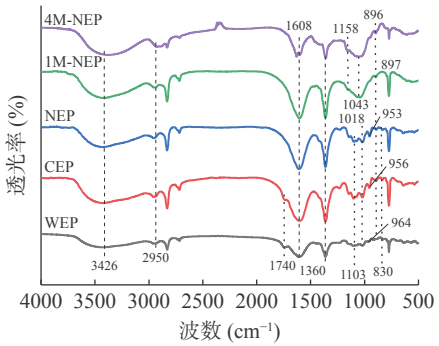


图 4　PFP 细胞壁多糖的傅里叶红外光谱图

Fig.4　FTIR spectrum of PFP cell wall polysaccharides

在 C–H 拉伸振动[28]。在 1800~400 cm^{-1} 内特定光谱波数可以区分细胞壁不同多糖成分[29]。WEP 和 CEP 在 1740 cm^{-1} 附近有吸收峰，是果胶质子化羧基中酯化羰基(C=O)的拉伸振动[30]。在弱碱性条件下，NEP 可能发生脱酯化，从而导致吸收峰的减弱或消失。在 1103 和 1018 cm^{-1} 附近为果胶中半乳糖醛酸羧基特征拉伸振动，其中较强的信号表明 GalA 含量相对较高[31]。Guo 等[31] 的研究中，在 970~950 cm^{-1} 之间的峰是果胶中 RG-I 的特征吸收带。WEP、CEP 和 NEP 分别在 964、956 和 953 cm^{-1} 都有特征吸收峰，且峰强度为 NEP>CEP>WEP，这与表 3 中 RG-Ⅰ占比结果相对应。

1M-NEP 和 4M-NEP 在 1200~1000 cm^{-1} 处具有特定的宽且大的吸收带，其主要由糖苷键(C-O-C)振动和侧基(C-OH)的拉伸振动重叠，其中两个条带位于 1158 和 1043 cm^{-1} 处，是典型的木聚糖糖苷键(C-O-C)吸收带[32]，也是区别于其他三种果胶多糖的吸收峰之一。另外，不同多糖间在糖苷键上略有差异，WEP、CEP 和 NEP 在 896 和 830 cm^{-1} 附近的红外吸收峰分别对应果胶多糖 β-糖苷键和半乳糖醛酸之间 α-糖苷键的吸收[33]。在 897 和 896 cm^{-1} 处的小尖峰分别是来自半纤维素 1M-NEP 和 4M-NEP 中连接吡喃木糖单元之间的 β-糖苷键[34]。以上说明，1M-NEP 和 4M-NEP 是区别于其他三种果胶的半纤维素类多糖。

2.2.5 流变特性分析 图 5A 显示了在稳定剪切条件下，2%(w/v)浓度多糖的流变行为。五种多糖水溶液的表观粘度随剪切速率的增加而降低，均表现出假塑性流体特征。随着剪切力的增大，多糖大分子之间相互作用和链间纠缠被破坏，并与流动方向趋向一致，从而导致多糖粘度降低[4]。NEP 初始表观粘度最高，约是 CEP 和 WEP 的 4 倍和 40 倍。随着顺序提取的进行，果胶的线性度 RG-Ⅰ主链分支程度变小，但中性糖含量更高，从而侧链更长，及果胶链之间的键合作用和分子间的相互作用力增强[26]，果胶类多糖的粘弹性得以改善。1M-NEP 与 WEP 有相似的初始粘度，但粘度随着剪切速率增大反而急速下降；4M-NEP 粘度最低，且随剪切速率变化很小，可能是半纤维素中大分子之间相互作用弱且果胶的含量很低，从而无法产生增稠效果[8]。五种多糖表观粘度大小顺序为 NEP>CEP>WEP>1M-NEP>4M-NEP，且 1M-NEP 和 4M-NEP 粘度远低于果胶类多糖，这与茶枝柑果皮多糖[22] 和黄精多糖[15] 相似。将流动曲线数据拟合到幂律流变模型中，五种多糖的流动指数 n 值均小于 1(表 4)且 R^2 具有高回归系数的值(≥0.99)。n 值越小，多糖聚合物的假塑性越强；稠度系数 K 值越大，黏稠度更大[17]。NEP 的 n 值最小，K 值最大，表明其假塑性最强，因此具有应用做果冻等凝胶类食品的潜力，而有较高黏稠性的 CEP 和 WEP 可用作增稠稳定剂。

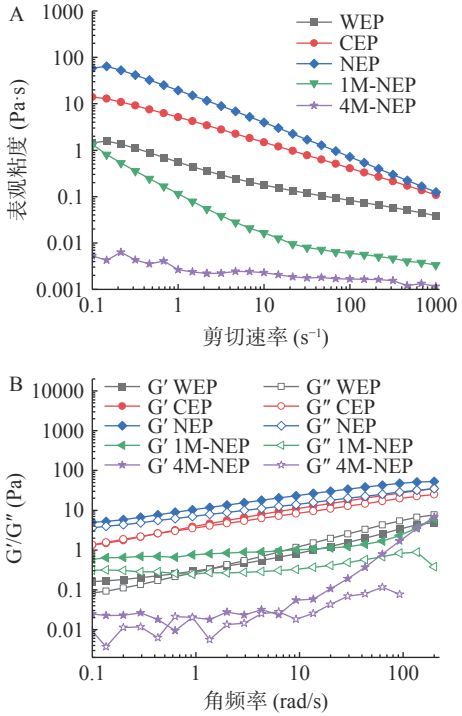


图 5 五种多糖的静态流变(A)和动态流变曲线(B)

Fig.5 Static rheological (A) and dynamic rheological curves (B) of five polysaccharides

表 4 五种多糖表观粘度的幂律方程参数

Table 4 Ostwald de Waele equation parameters of the apparent viscosity of five polysaccharides

参数	WEP	CEP	NEP	1M-NEP	4M-NEP
K(Pa·s^n)	0.1443	2.1057	28.7809	0.0102	0.0016
n	0.7136	0.4652	0.2762	0.7662	0.8891
R^2	0.9983	0.9998	0.9924	0.9980	0.9987

多糖是粘弹性物质，通过动态振荡扫描可以表征多糖溶液的动态流变学行为(图 5B)。在 0.1 至 100 rad/s 内，五种多糖的弹性模量 G′和粘性模量 G″随角频率的增大。NEP 和 1M-NEP 的 G′都高于 G″，表明两者在 2%(w/v)浓度下以弹性为主，属于凝胶。相对于 WEP，虽然 NEP 和 CEP 的分子量小，但粘度和弹性更强，这可能跟低线性度和高 RG-Ⅰ占比(表 3)有关[35]，即 RG-Ⅰ中丰富的中性糖侧链可以增加聚合物链的缠结和相互作用，从而增强果胶的粘弹性[36]。WEP 和 CEP 在低角频率下，G′高于 G″，保持弱凝胶状；在角频率为 1.10 和 0.43 rad/s 附近，WEP 和 CEP 出现 G′和 G″模量的交叉，即存在凝胶-溶胶过渡点，这与柑橘果胶[37] 相似。增大角频率，果胶中分子链间的氢键和疏水相互作用不足以抵抗高频率振荡作用[38]，胶体内部结构崩塌，从而由粘弹性固体向液体转化，WEP 和 CEP 呈现粘行为。这种行为表明 WEP 和 CEP 具有良好的粘弹性，有助于食品工业流体运输和食物在摄入过程中的顺利下咽。

2.2.6 多糖乳液乳化活性和乳化稳定性分析 在 2%(w/v)浓度下的果胶类多糖水溶液具有弱凝胶性状，特别是 CEP 和 NEP 溶液较粘稠，制备乳液时易

形成乳凝胶[39]。而 1M-NEP 和 4M-NEP 由于无法完全溶解（图 7B 小瓶中显示 1M-NEP 和 4M-NEP 稀释至 1%（w/v）浓度时，底部仍分别有黄褐色和灰白色不溶物），因此可能部分形成 Pickering 乳液。NEP 和 4M-NEP 有相似的乳化能力，且均显著强于其他三种多糖乳化能力（如图 6A、B）。与樱桃果胶[18] 相似，果胶类多糖乳活性和乳化稳定性依次为 NEP>CEP>WEP，这可能与果胶的粘度和结构有关。连续相粘度的增加会抑制油滴的流动，阻碍油滴的聚集与融合，从而维持乳液的长期稳定[40]。同时，高度支链化的 RG-I 结构通过氢键和分子缠绕形成界面膜，形成的空间位阻效应可以阻碍液滴聚结并减缓乳化[41]。NEP 的粘度和 RG-Ⅰ占比均大于 CEP，因此乳液更稳定。

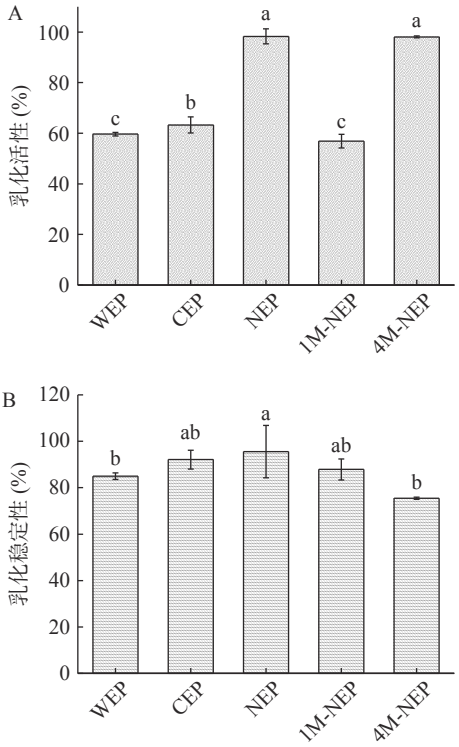


图 6　五种 PFP 多糖乳液的乳化活性和乳化稳定性

Fig.6　Emulsifying activity and emulsion stability of five PFP polysaccharide emulsions

注：同一指标的不同字母代表显著性（P<0.05）差异；图 7 同。

2.2.7　多糖乳液的粒径及 Zeta 电位分析　NEP 乳液的积加权平均直径 $D_{4,3}$ 和面积加权平均直径 $D_{3,2}$ 值（图 7A）相差最小且 $D_{4,3}$ 值最小，说明 NEP 乳液颗粒的小且粒度分布集中，因此越趋于稳定，而 4M-NSP 乳液与其相反，这与乳化稳定性结果相对应。相对 4M-NEP 乳液，1M-NEP 乳液的粒径较小，可能与其较高的蛋白质含量有关，高的水溶性蛋白有助于降低界面活性[42]。越大的 Zeta 电位绝对值意味着胶体之间的静电排斥力更大，其分散性越好，溶液更稳定。4M-NEP 溶液及其乳液 Zeta 电位绝对值最小，其稳定性最差。WEP 乳液的 Zeta 电位绝对值小于 CEP 和 NEP（图 7B），可能是酸性多糖的乳液在电位

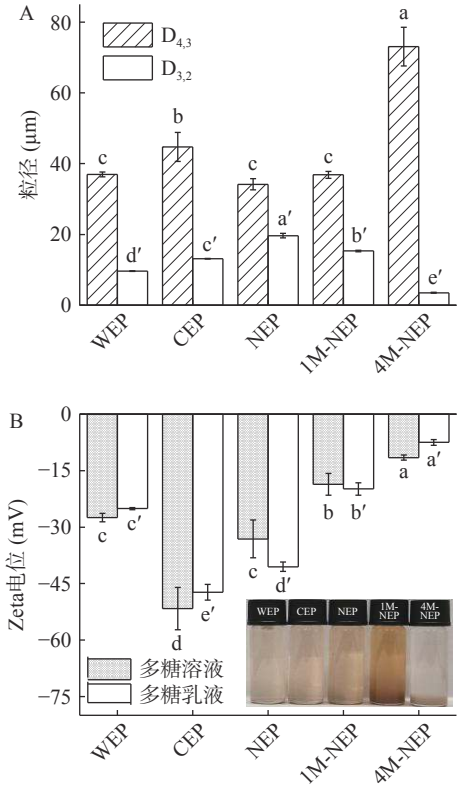


图 7　五种 PFP 多糖及其乳液的电位及粒径

Fig.7　Zeta potential and particle size of five PFP polysaccharides and their emulsions

绝对值小于 30 mV 时倾向于凝结或絮凝，从而难以维持稳定的乳液体系[41]，这也可能导致 WEP 的乳化稳定性低于 CEP 和 NEP。

2.2.8　热稳定性分析　多糖在食品加工的应用与热性能息息相关。热重（thermogravimetric，TG）曲线中（图 8A），五种多糖在 50~200 ℃ 和 200~400 ℃ 两个出现明显的失重阶段，分别对应多糖中水分的挥发以及多糖的热解[43]。在第一阶段，五种多糖的重量损失为 NEP>CEP>WEP>1M-NEP>4M-NEP，可能是果胶类多糖具有更强的保水能力。差示热重（differential thermogtavimetric，DTG）曲线中（图 8B），CEP 和 NEP 在 250 ℃ 附近呈现出最大的失重，温度高于 WEP（225 ℃），且此时剩余多糖重量同样高于 WEP，这可能是较高的 RG-Ⅰ占比和果胶主链分支程度增强了其热稳定性[41]。在 325 ℃ 附近，多糖迅速分解导致 1M-NEP 和 4M-NEP 出现最大失重率。此时，WEP 出现第二个分解峰，可能是高分子量果胶降解所致[28]。高于 550 ℃ 后，五种果皮多糖重量变化趋向于平缓和稳定，并进入生物质碳化阶段，最终 WEP、CEP、NEP、1M-NEP 和 4M-NEP 的残余重量分别为 26.10%、32.31%、35.64%、23.59% 和 21.00%。五种多糖的不同组成和结构可能导致其在热解过程中表现出不同的热力学特性[28]。基于最高失重温度，半纤维素类多糖热稳定高于果胶类多糖。综合水分损失和灼烧后的残余量分析，NEP 稳定性最佳。

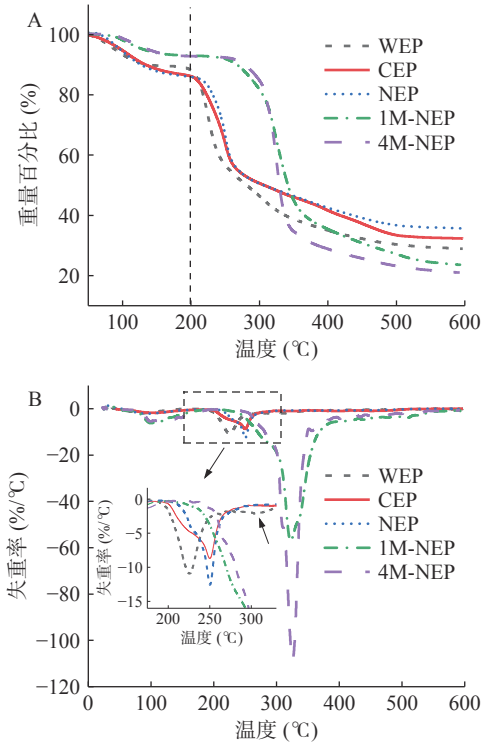


图 8 五种多糖的 TG(A)和 DTG 曲线(B)

Fig.8 TG (A) and DTG curves (B) of five PFP polysaccharides

3 结论

百香果皮是富含纤维素和果胶类细胞壁多糖的副产物。通过顺序提取从果皮中分离出富含半乳糖醛酸的果胶类多糖(WEP、CEP 和 NEP)和高中性糖含量的半纤维素类多糖(1M-NEP 和 4M-NEP)。低剪切速率下,果胶中分子链的纠缠和分子间氢键的相互作用使得 WEP、CEP 和 NEP 表现出高粘度状态;WEP 和 CEP 是具有较高线性 HG 的大分子量多糖,可形成弱凝胶。相对于 WEP,丰富的 RG-Ⅰ结构域和长的侧链使得较低分子量的 CEP 和 NEP 形成更强的凝胶网络。在五种多糖中,NEP 呈现相对较好的乳化活性和乳化稳定性。1M-NEP 和 4M-NEP 具有较低粘度和制备乳液的潜力。不同多糖在结构和物理特性存在差异,但其基础结构与功能特性之间的关系有待进一步探究。

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

参考文献

[1] FONSECA A M A, GERALDI M V, JUNIOR M R M, et al. Purple passion fruit (*Passiflora edulis* f. *edulis*): A comprehensive review on the nutritional value, phytochemical profile and associated health effects[J]. Food Research International, 2022, 160: 111665.

[2] YAPO B M, KOFFI K L. The polysaccharide composition of yellow passion fruit rind cell wall: Chemical and macromolecular features of extracted pectins and hemicellulosic polysaccharides[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2008, 88(12): 2125−2133.

[3] LIU J, BI J, MCCLEMENTS D J, et al. Impacts of thermal and non-thermal processing on structure and functionality of pectin in fruit-and vegetable-based products: A review[J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 250: 116890.

[4] XU Q X, SHI J J, ZHANG J G, et al. Thermal, emulsifying and rheological properties of polysaccharides sequentially extracted from *Vaccinium bracteatum* Thunb leaves[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 93: 1240−1252.

[5] ZAINAL S H, MOHD N H, SUHAILI N, et al. Preparation of cellulose-based hydrogel: A review[J]. Journal of Materials Research and Technology, 2021, 10: 935−952.

[6] CUI J, ZHAO C, FENG L, et al. Pectins from fruits: Relationships between extraction methods, structural characteristics, and functional properties[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 110: 39−54.

[7] PENG P, PENG F, BIAN J, et al. Isolation and structural characterization of hemicelluloses from the bamboo species *Phyllostachys incarnata* Wen[J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 86(2): 883−890.

[8] VILLARREAL M R, NAVARRO D A, PONCE N M A, et al. Perennial halophyte *Salicornia neei* Lag. cell wall composition and functional properties of its biopolymers[J]. Food Chemistry, 2021, 350: 128659.

[9] LI Q, LI J, LI H, et al. Physicochemical properties and functional bioactivities of different bonding state polysaccharides extracted from tomato fruit[J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 219: 181−190.

[10] PENG X, LIU J, TANG N, et al. Sequential extraction, structural characterization, and antioxidant activity of polysaccharides from *Dendrocalamus brandisii* bamboo shoot shell[J]. Food Chemistry: X, 2023, 17: 100621.

[11] ZHAO L, WU L, LI L, et al. Physicochemical, structural, and rheological characteristics of pectic polysaccharides from fresh passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* L.) peel[J]. Food Hydrocolloids, 2023, 136: 108301.

[12] XU C, LI Y. Correlation of viscoelastic behavior with water state and ultrastructure in hot air-dried carrots[J]. Food Control, 2015, 50: 23−30.

[13] HAO Y, CHEN F, WU G, et al. Impact of postharvest nitric oxide treatment on lignin biosynthesis-related genes in wax apple (*Syzygium samarangense*) fruit[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(45): 8483−8490.

[14] YU C, AHMADI S, SHEN S, et al. Structure and fermentation characteristics of five polysaccharides sequentially extracted from sugar beet pulp by different methods[J]. Food Hydrocolloids, 2022, 126: 107462.

[15] LI L, LIAO B Y, THAKUR K, et al. The rheological behavior of polysaccharides sequential extracted from *Polygonatum cyrtonema* Hua[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 109: 761−771.

[16] 丁宁, 艾连中, 赖凤羲, 等. 百香果皮果胶的分子特征及 Ca^{2+} 与 Zn^{2+} 致流变变化的研究[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(14): 77−84. [DING N, AI L Z, LAI F X, et al. Study on molecular properties and Ca^{2+} and Zn^{2+} induced rheological changes of passion fruit peel pectin[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(14): 77−84.]

[17] 段瑞冰, 李洁, 刘纪红, 等. 两种不同质地的莲藕碱溶性果胶组分热降解规律及流变学差异[J]. 食品科学, 2022, 43(24): 7−15. [DUAN R B, LI J, LIU J H, et al. Differences in thermal degrada-

tion and rheological properties of alkali-soluble pectin fraction in two kinds of lotus rhizome with different textures[J]. Food Science, 2022, 43(24): 7−15.]
[18] ZHANG S K, INWATERHOUSE G, CUI T T, et al. Pectin fractions extracted sequentially from *Cerasus humilis*: Their compositions, structures, functional properties and antioxidant activities[J]. Food Science and Human Wellness, 2023, 12(2): 564−574.
[19] 陈良云. 紫果西番莲果皮膳食纤维制备工艺及其性质研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2014. [CHEN L Y. Study on preparation and properties of dietary fiber of the peel of *Passiflora edulis* Sims[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2014.]
[20] SURI S, SINGH A, NEMA P K. Recent advances in valorization of citrus fruits processing waste: A way forward towards environmental sustainability[J]. Food Science and Biotechnology, 2023, 30: 1601−1626.
[21] 韦亚楠. 木瓜果多糖分离过程中细胞壁骨架成分的结构变化研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2023. [WEI Y N. The structural changes of cell wall skeleton components during the isolation of polysaccharide from Chinese quince fruits[D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2023].]
[22] PENG Z, TIAN S, LI H, et al. Extraction, characterization, and antioxidant properties of cell wall polysaccharides from the pericarp of *Citrus reticulata* cv. *Chachiensis*[J]. Food Hydrocolloids, 2023, 136: 108237.
[23] PENG J, BI J, YI J, et al. Characterization of tissue specific differences in cell wall pectic polysaccharides of carrot root[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2021, 45(4): e15331.
[24] YU M, XIA Y D, ZHOU M P, et al. Effects of different extraction methods on structural and physicochemical properties of pectins from finger citron pomace[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 258: 117662.
[25] CUI J, REN W, ZHAO C, et al. The structure-property relationships of acid-and alkali-extracted grapefruit peel pectins[J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 229: 115524.
[26] LIN Y, AN F, HE H, et al. Structural and rheological characterization of pectin from passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) peel extracted by high-speed shearing[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 114: 106555.
[27] HOUBEN K, JOLIE R P, FRAEYE I, et al. Comparative study of the cell wall composition of broccoli, carrot, and tomato: Structural characterization of the extractable pectins and hemicelluloses[J]. Carbohydrate Research, 2011, 346(9): 1105−1111.
[28] QIN Z, LIU H M, LV T T, et al. Structure, rheological, thermal and antioxidant properties of cell wall polysaccharides from Chinese quince fruits[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 147: 1146−1155.
[29] SZYMANSKA-CHARGOT M, ZDUNEK A. Use of FT-IR spectra and PCA to the bulk characterization of cell wall residues of fruits and vegetables along a fraction process[J]. Food Biophysics, 2013, 8: 29−42.
[30] TENG H, HE Z, LI X, et al. Chemical structure, antioxidant and anti-inflammatory activities of two novel pectin polysaccharides from purple passion fruit (*Passiflora edulia* Sims) peel[J]. Journal of Molecular Structure, 2022, 1264: 133309.
[31] GUO R, TIAN S, LI X, et al. Pectic polysaccharides from purple passion fruit peel: A comprehensive study in macromolecular and conformational characterizations[J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 229: 115406.
[32] XU F, GENG Z C, SUN J X, et al. Fractional and structural characterization of hemicelluloses from perennial ryegrass (*Lolium perenne*) and cocksfoot grass (*Dactylis glomerata*)[J]. Carbohydrate Research, 2006, 341(12): 2073−2082.
[33] ZHANG X X, NI Z J, ZHANG F, et al. Physicochemical and antioxidant properties of *Lycium barbarum* seed dreg polysaccharides prepared by continuous extraction[J]. Food Chemistry: X, 2022, 14: 100282.
[34] BIAN J, PENG F, PENG P, et al. Isolation and fractionation of hemicelluloses by graded ethanol precipitation from *Caragana korshinskii*[J]. Carbohydrate Research, 2010, 345(6): 802−809.
[35] ZHANG H, CHEN J, LI J, et al. Extraction and characterization of RG-I enriched pectic polysaccharides from mandarin citrus peel[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 79: 579−586.
[36] NGOUÉMAZONG D E, KABUYE G, FRAEYE I, et al. Effect of debranching on the rheological properties of Ca^{2+}-pectin gels[J]. Food Hydrocolloids, 2012, 26(1): 44−53.
[37] YAN J K, WANG C, QIU W Y, et al. Ultrasonic treatment at different pH values affects the macromolecular, structural, and rheological characteristics of citrus pectin[J]. Food Chemistry, 2021, 341: 128216.
[38] MORALES-CONTRERAS B E, WICKER L, ROSAS-FLORES W, et al. Apple pomace from variety *"Blanca de Asturias"* as sustainable source of pectin: Composition, rheological, and thermal properties[J]. LWT, 2020, 117: 108641.
[39] KAVYA M, RANJIT JACOB A, NISHA P. Pectin emulsions and emulgels: Bridging the correlation between rheology and microstructure[J]. Food Hydrocolloids, 2023, 143: 108868.
[40] JIA Y, DU J, LI K, et al. Emulsification mechanism of persimmon pectin with promising emulsification capability and stability[J]. Food Hydrocolloids, 2022, 131: 107727.
[41] DENG Z, PAN Y, CHEN W, et al. Effects of cultivar and growth region on the structural, emulsifying and rheological characteristic of mango peel pectin[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 103: 105707.
[42] ZHANG W, FAN X, GU X, et al. Emulsifying properties of pectic polysaccharides obtained by sequential extraction from black tomato pomace[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 100: 105454.
[43] PAN X, ZHAO W, WANG Y, et al. Physicochemical and structural properties of three pectin fractions from muskmelon (*Cucumis melo*) and their correlation with juice cloud stability[J]. Food Hydrocolloids, 2022, 124: 107313.

温欣, 肖亚冬, 聂梅梅, 等. 基于主成分分析的不同品种蓝莓脆粒品质综合评价 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 208−217. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110019

WEN Xin, XIAO Yadong, NIE Meimei, et al. Evaluation of Crispy Grain Quality of Different Varieties of Blueberries Based on Principal Component Analysis[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 208−217. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110019

· 分析检测 ·

基于主成分分析的不同品种蓝莓脆粒品质综合评价

温　欣[1,2], 肖亚冬[1,*], 聂梅梅[1], 李大婧[1], 刘春菊[1], 牛丽影[1], 包怡红[2], 唐冬妹[3,*]

（1.江苏省农业科学农产品加工研究所, 江苏南京 210014;
2.东北林业大学生命科学学院, 黑龙江哈尔滨 150040;
3.苏州优尔食品有限公司, 江苏苏州 215105）

摘　要: 为了筛选适宜加工蓝莓脆粒的品种，开展了冻干蓝莓脆粒品质评价研究。该研究以江苏省内 8 个南高丛和兔眼蓝莓品种果实为原料，采用真空冷冻干燥技术制备为蓝莓脆粒，测定含水率、总糖、DPPH 自由基清除率、硬度等其 18 项品质指标，并采用主成分分析方法进行脆粒品质综合评价。结果表明：不同品种蓝莓脆粒的品质指标中糖酸比和总酸变异系数较大，其变异系数分别为 57.89% 和 40.25%。通过主成分分析确定葡萄糖含量、花色苷含量、总黄酮含量、总抗氧化活性 AEAC、干样含水率、产出率和硬度可作为评价蓝莓脆粒品质的代表性指标；建立综合品质评价模型，并依据各品种的综合品质得分进行排序，得分排名前三位的蓝莓品种分别为莱克西、灿烂和顶峰，其余品种得分均为负值，说明这三种蓝莓较适宜进行干制加工，其中莱克西品种最适宜加工为蓝莓脆粒。研究结果为江苏省内蓝莓干制加工专用品种筛选和品质分析提供了依据。

关键词: 蓝莓脆粒, 主成分分析, 品种, 评价模型

中图分类号: TS255　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2024)21−0208−10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110019

本文网刊:

Evaluation of Crispy Grain Quality of Different Varieties of Blueberries Based on Principal Component Analysis

WEN Xin[1,2], XIAO Yadong[1,*], NIE Meimei[1], LI Dajing[1], LIU Chunju[1], NIU Liying[1], BAO Yihong[2], TANG Dongmei[3,*]

（1.Institute of Agro-product Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China;
2.College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China;
3.Youi Food Co., Ltd., Suzhou 215105, China）

Abstract: In order to select the varieties suitable for processing blueberry crispy, the quality evaluation of freeze-dried blueberry crispy was carried out. In this study, eight Highbush blueberries and Rabbiteye blueberries varieties in Jiangsu Province were used as raw materials, and were prepared as blueberry crispy by vacuum freeze-drying, and 18 quality indexes such as water content, total sugar, scavenging ability of DPPH free radical, hardness, etc, were determined, and the quality of the blueberry crispy was comprehensively evaluated by principal component analysis. The results showed that the coefficients of variation of sugar-acid ratio and total acid of different varieties of blueberry crispy were larger, with the value of 57.89% and 40.25%, respectively. Principal component analysis showed that the glucose content, anthocyanoside content, total flavonoid content, total antioxidant activity of AEAC, moisture content of dry samples, output rate and

收稿日期: 2023−11−06

基金项目: 江苏省现代农业-重点及面上项目（BE2020338）; 江苏省农业自主创新项目（CX(21)2026）。

作者简介: 温欣（1999−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品微生物, E-mail: wx99074@163.com。

*** 通信作者:** 肖亚冬（1988−）, 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 果蔬加工, E-mail: xiaoyadong2016@163.com。

唐冬妹（1974−）, 女, 本科, 工程师/总经理, 研究方向: 食品加工, E-mail: Helen@youi.cn。

hardness were determined as representative indexes for the evaluation of the quality of blueberry brittle grains. Then, the comprehensive quality evaluation model was established. Based on the comprehensive quality score of each variety, the top three blueberry varieties were Legacy, Brightwell and Climax, and the others varieties had negative scores. This indicated that these three kinds of blueberries were more suitable for dry processing as blueberry crispy, among which the Legacy variety was the better. The results of the study provide a basis for the screening and quality analysis of blueberry varieties for dry processing.

Key words: blueberries crisp; principal component analysis (PCA); assortment; assessment model

蓝莓（*Vaccinium* spp.）是杜鹃花科越橘属植物，在亚洲和欧洲等地均有引种[1]。蓝莓富含多种营养成分，如维生素、花青素、黄酮类、多酚类等成分[2−4]，有“浆果之王”的美称。研究表明蓝莓花青素是很好的抗氧化剂[5]，有抗肿瘤增殖能力、降血糖和降血脂的作用[6−7]，还可以改善肠道健康[8]，有益于人类的认知能力和情绪[9]。2020 年，我国蓝莓产量达到 28.5 万吨居全球第三，且蓝莓需求量巨大，极具生产潜力和经济价值[10]。

蓝莓鲜果皮薄多汁，易受机械损伤，导致其受病原菌侵害，引起腐烂变质，影响蓝莓的综合品质，从而影响储藏及销售[11]。干燥技术是使果蔬降低水分、延长贮藏期的加工方式之一[12]，真空冷冻干燥（freeze drying，FD）是新型的干燥技术，利用低温低压下水分由固态直接升华原理实现干燥，有着更高的干燥效率，更好地保持食品感官品质和营养成分[13]。本研究团队最新研究报道了不同真空冷冻干燥程序中的温度设定对蓝莓干制特性和品质的影响，确定较优真空冷冻干燥程序为：0 ℃（2 h）→5 ℃（2 h）→10 ℃（2 h）→20 ℃（2 h）→30 ℃（2 h）→40 ℃（2 h）→50 ℃（12 h），在此条件下获得蓝莓脆粒收缩率最小，营养成分保留率较高[14]。

蓝莓脆粒干制品的品质受很多因素的影响，包括品种、外观色泽、理化性质和加工特性等，因此针对此问题，通过蓝莓脆粒干制品综合评价，筛选适宜加工的品种尤为重要。目前，主成分分析方法已广泛应用于果蔬原料甄选和各类食品加工品质评价的研究中[15]。主成分分析通过降维处理多个指标，从中筛选出较少的指标进行整体产品品质评价[16]。乌凤章等[17] 以 26 个高丛蓝莓品种果实为对象，使用主成分分析筛选出优质的蓝莓品种。宋江峰等[18] 以 18 个菜用大豆品种为对象，使用主成分分析和聚类分析筛选出优质的菜用大豆品种。Zhang 等[19] 通过主成分分析探究三种干燥方式对猕猴桃的理化指标和能耗的影响，结果表明真空冷冻干燥与热风干燥联合处理时间短耗能低，且使猕猴桃保持优秀的感官品质。然而，不同品种选择对冻干蓝莓脆粒品质影响的研究还未报道。

因此，本研究以江苏省内 8 个南高丛和兔眼蓝莓品种果实为原料，采用真空冷冻干燥技术制备蓝莓脆粒，测定其 18 项品质指标，比较分析了不同品种蓝莓脆粒品质特性，确定代表性品质指标，采用主成分分析法建立蓝莓脆粒品质综合评价体系，为蓝莓脆粒品质合理评价和筛选适宜加工品种提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

同一品种选取成熟度一致、色泽均匀、无病虫害的新鲜蓝莓　来源于南京市甘露山蓝莓专业合作社，采收时间为 2023 年 6 月 15 日，采摘后及时置于实验室 4 ℃ 冷藏库备用。蓝莓品种可分为兔眼（Rabbiteye blueberries）、南高丛（Highbush blueberries）2 个系列，样品为莱克西（Legacy）、珠宝（Jewel）、薄雾（Misty）、绿宝石（Emerald）、天后（Primadonna）、灿烂（Brightwell）、杰兔（Coastal）、顶峰（Climax）八个品种，如表 1 所示；1,1-二苯基-2-三硝基苯肼（DPPH）、Trolox　上海化成工业发展有限公司；总抗氧化能力（T-AOC）检测试剂盒　南京建成生物工程研究所；乙腈、乙酸锌、亚铁氰化钾、冰乙酸、次甲基蓝、氢氧化钠、Folin 酚试剂、乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、盐酸、醋酸、葡萄糖、醋酸钠　分析纯，国药集团化学试剂有限公司；没食子酸　标准品，上海源叶生物科技有限公司；偏磷酸　上海麦克林生化科技有限公司；磷酸二氢钾、磷酸氢二钾　分析纯，南京荣胜达实验仪器有限公司。

表 1　蓝莓品种信息

Table 1　Blueberry varieties information

样品名称	成熟期特性	品种
莱克西（Legacy）	中晚熟	南高丛
珠宝（Jewel）	极早熟	南高丛
薄雾（Misty）	中熟	南高丛
绿宝石（Emerald）	早熟	南高丛
天后（Primadonna）	早熟	南高丛
灿烂（Brightwell）	早熟	兔眼
杰兔（Coastal）	早熟~中熟	兔眼
顶峰（Climax）	早熟	兔眼

CM-700d1 全自动色差计　日本柯尼卡美能达公司；CT3 质构仪　英国 CNS Farmell 公司；UV-6300 型紫外可见分光光度计　上海美谱达仪器有限公司；BLK-FD-0.5 真空冷冻干燥机　江苏博莱客冷冻科技发展有限公司；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；H-2050R 台式高速冷冻离心机、TG16-WS 台式高速离心机　长沙湘仪离心机仪器有限公司；BS-224-S 万

分之一分析天平　赛多利斯科学仪器(北京)有限公司; HH-8 恒温水浴锅　金坛市环保仪器厂; KH-7200-DB 型数控超声波清洗器　昆山禾创超声仪器有限公司; Epoch 全自动酶标仪　BioTek 公司; pH 计　梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　蓝莓脆粒制作　将采摘的蓝莓鲜果清洗后, 置于托盘中放−20 ℃ 冰箱预冻至少 6 h, 然后经真空冷冻干燥保存备用。真空冷冻干燥流程具体如下: 当冷阱温度达到−35 ℃ 时, 将预冻蓝莓放入冻干仓中并关闭仓门, 关闭“冷阱制冷”, 打开“冻干仓制冷”; 待物料温度降至−30 ℃ 后维持 2 h, 关闭“冻干仓制冷”, 打开“冷阱制冷”; 设置干燥工艺参数[14], 待冷阱温度降至−40 ℃ 时开启“真空泵”, 真空压力下降至 50 Pa 以下时, 打开“加热自动”, 开启“循环泵”和“加热开关”, 开始干燥; 待物料温度与辐射板温度一致后干燥结束。

1.2.2　鲜样百粒重　每次称取 100 个蓝莓果实质量, 重复 3 次, 计算平均值。

1.2.3　含水率　参照 GB 5009.3-2016, 采用直接干燥法[20]。

1.2.4　产出率　随机选取新鲜蓝莓, 称取其鲜果质量 m_1; 经过真空冷冻干燥后, 称量蓝莓脆粒质量 m_2, 冻干后与冻干前质量的百分比即为产出率[21]。公式如下:

$$产出率(\%)=\frac{m_1}{m_2}\times 100$$

1.2.5　营养成分测定

1.2.5.1　葡萄糖、果糖含量　参照 GB 5009.8-2023, 采用高效液相色谱法[22]。

1.2.5.2　维生素 C 含量　参照刘胜辉等[23]、刘霞等[24]的方法, 稍作修改, 取 2.5 g 蓝莓于研钵中, 加入少量 4 ℃ 预冷的 0.25% 的偏磷酸浸提, 冰浴快速研磨后, 将匀浆用 0.25% 的偏磷酸定容至 25 mL, 在 4 ℃ 条件下 10000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 上清液经微孔滤膜(水系, 0.45 μm)过滤后待测。

色谱条件: 色谱柱为 ZORBAX 300SB-C_{18} (4.6 mm×250 mm, φ5 μm), 流动相为 0.03 mol/L 正磷酸, 流速为 0.8 mL/min, 柱温 25 ℃, 检测波长 240 nm, 进样量为 20 μL, 根据标准曲线计算样品中 V_C 的含量。

1.2.5.3　总糖含量　采用苯酚-硫酸法测定总糖含量[25]。

1.2.5.4　总酸含量　参照 GB 12456-2021, 采用 pH 计电位滴定法[26]。

1.2.5.5　糖酸比　糖酸比用总糖含量与总酸含量之比表示。

1.2.5.6　总酚含量　采用 Folin-Ciocalteu 比色法测定总酚含量[27]。将真空冷冻干燥的蓝莓经研磨后制得蓝莓粉, 准确称取蓝莓粉 5 g 加入 70% 的乙醇溶液研磨成匀浆, 80 ℃ 水浴回流提取 2 h, 离心, 取上清液转入 50 mL 的容量瓶中, 回流提取 2 次, 合并所有上清液, 定容至刻度, 制成样液, 测定蓝莓中总多酚含量。绘制没食子酸标准曲线。将待测液适当稀释。吸取 1.0 mL 样品液于试管中。其他按标准溶液测定方法操作, 测定吸光度, 重复实验 3 次。总酚含量以相当没食子酸毫克数表示(mg GAE/g d.w.)。

$$总酚含量(mg\ GAE/g\ d.w.)=\frac{m_1\times V_1\times N\times 10^{-3}}{m_2\times V_2\times(1-\omega)}$$

式中: m_1—从标准曲线上查得样品测定液中的含量, 单位为微克(μg); m_2—样品质量, 单位为克(g); V_1—样品定容体积, 单位为毫升(mL); V_2—比色测定时所移取样品测定液的体积, 单位为毫升(mL); N—稀释倍数; ω—样品含水率, %。

1.2.5.7　总黄酮含量　总黄酮含量测定采用 $NaNO_2$-$Al(NO_3)_3$-NaOH 法, 参照董怡等[28]的方法, 以芦丁为标准品, 绘制芦丁总黄酮标准曲线。移取浸提液 2 mL 于试管中, 用 50% 乙醇补至 3 mL, 加 0.5 mL 5% 亚硝酸钠溶液, 混匀后静置 6 min, 再加 0.5 mL 10% 硝酸铝溶液, 摇匀后静置 6 min, 再加 4 mL 4% 氢氧化钠溶液, 加蒸馏水至 10 mL, 摇匀, 放置 10 min, 以空白对照在 509 nm 处测定吸光值, 重复实验 3 次。总黄酮含量以毫克芦丁当量表示即 mg Rutin/g d.w.。

$$黄酮含量(mg\ Rutin/g\ d.w.)=\frac{m_1\times V_1\times N\times 10^{-3}}{m_2\times V_2\times(1-\omega)}$$

式中: m_1—从标准曲线上查得样品测定液中的含量, 单位为微克(μg); m_2—样品质量, 单位为克(g); V_1—样品定容体积, 单位为毫升(mL); V_2—比色测定时所移取样品测定液的体积, 单位为毫升(mL); N—稀释倍数; ω—样品含水率, %。

1.2.5.8　花色苷含量　采用 pH 示差法[29]。称取 1 g 蓝莓粉, 用 0.1%~80% 乙醇提取液反复多次浸提、离心, 保留上清液, 直至样品褪成无色为止。将上清液过滤并定容到 100 mL。取 1 mL 提取液, 分别用 pH1.0 和 4.5 的缓冲液, 在 510 nm 和 700 nm 处测量吸光度值并计算花色苷含量。

1.2.6　抗氧化能力测定

1.2.6.1　DPPH 自由基清除率　准确称取蓝莓粉 1 g 于 50 mL 离心管中, 使用 80%(v/v)的乙醇超声浸提 30 min(功率 100 W、温度为 30 ℃), 8000 r/min 室温离心 15 min, 重复一次, 合并上清液, 定容 50 mL。加 0.1 mL DPPH 80% 乙醇溶液, 避光反应 30 min, 在 517 nm 处测定吸光度, 并以相同体积的溶剂代替蓝莓样品液为对照, 结果以 DPPH 自由基清除率(%)表示[30]。

$$DPPH自由基清除率(\%)=\frac{A_0-A_1}{A_0}\times 100$$

式中: A_0 为对照组的吸光值; A_1 为样品组的吸

光值。

1.2.6.2　ABTS$^+$自由基清除率　准确称取蓝莓粉 0.5 g，加入 5 mL 生理盐水，冰浴条件下匀浆，4 ℃，12000 r/min，离心 5 min，取上清液测定。移取 10 μL 样品液于 96 微孔板中，加入 20 μL 过氧化物酶应用液（由过氧化物酶，pH4.5 醋酸缓冲液组成，测定前以 1∶9 比例混合），170 μL ABTS 工作液。室温反应 6 min，405 nm 处测定吸光值，并以相同体积的蒸馏水代替蓝莓样品液为对照。结果以 ABTS$^+$自由基清除率(%)表示。

$$\text{ABTS}^+\text{自由基清除率}(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

式中：A_0 为对照组的吸光值；A_1 为样品组的吸光值。

1.2.6.3　总抗氧化活性 AEAC　使用总抗氧化能力（T-AOC）检测试剂盒（比色法）。

1.2.7　硬度、脆度、断裂数　参考文献中方法并作适当修改[31]。采用 CT3 质构仪对蓝莓脆粒的硬度和脆度进行测定。选用 TA4/1000 探头，测试类型为压缩，目标值：5.0 mm，测试速度：0.5 mm/s，以坐标图中出现的最大压力峰值表示硬度，单位为 g；以下压探头第一次冲向样品过程中在坐标图上出现的第一个明显压力峰值表示脆度，单位为 g；一次压缩循环后出现是锯齿峰的个数表示断裂数，单位个。取 5 个平行样，重复测定 3 次。

1.3　数据处理

使用 Excel 2016 进行数据处理，因各评价指标具有不同的量纲及数量级，为避免对结果造成影响，在数据分析前须对原始数据进行标准化处理。标准化的数据通过 SPSS 22.0 进行描述性统计分析、相关性分析和主成分分析得到方差贡献分析表和经过方差极大正交旋转后的主成分载荷矩阵。如无特殊备注，每组实验取 3 个平行样，重复测定 3 次。

2　结果与分析

2.1　不同品种蓝莓脆粒真空冷冻干燥品质评价研究

8 种蓝莓脆粒的品质指标测定结果如表 2 所示。不同蓝莓品种鲜样百粒重差别较大，各品种百粒重范围为 80.05~136.51 g，其中顶峰蓝莓的百粒重量最大，但与灿烂蓝莓的百粒重无显著性差异（P>0.05），薄雾、珠宝、天后均属于小型果，百粒重较小，且三者之间无显著性差异（P>0.05）。

含水率作为加工品质的重要指标之一，对产品的贮藏及口感有重要意义，各干制产品的含水率范围为 8.72%~15.32%，说明不同蓝莓品种真空冷冻干燥后其含水率差异较大，其中珠宝、薄雾和绿宝石 3 个品种的水分含量超过了 10%，可能是因为这三个品种在干燥后更易吸潮，若取样过程中不能保证环境温度和湿度，会导致其含水率迅速增加。

产出率对产品的成本和市场价值有重要影响，优质的产品通常具有较高的产出率。各产品的产出

表 2　不同品种蓝莓冻干脆粒品质指标

Table 2　Quality indexes of different varieties freeze-dried blueberry crisps

品种	莱克西	顶峰	薄雾	绿宝石	天后	灿烂	杰兔	珠宝
鲜样百粒重(g)	111.56±3.92^{b}	136.51±2.90^{a}	84.76±5.04^{d}	92.08±2.44^{c}	80.14±6.57^{d}	134.28±4.73^{a}	107.84±3.34^{b}	80.05±5.57^{d}
产出率(%)	15.71±0.13^{cd}	18.96±0.13^{b}	13.38±0.13^{e}	16.10±0.02^{c}	15.35±0.13^{d}	21.18±0.13^{a}	18.62±0.04^{b}	15.43±0.13^{d}
含水率(%)	9.17±0.08^{e}	9.61±0.10^{d}	12.29±0.01^{b}	11.92±0.13^{c}	8.72±0.10^{f}	9.10±0.23^{e}	9.32±0.12d^{e}	15.32±0.50^{a}
葡萄糖含量(g/100 g)	34.69±2.69^{a}	31.71±1.26^{bc}	30.31±0.69^{cd}	28.27±1.17^{d}	32.19±1.62^{abc}	28.36±0.16^{d}	24.17±0.81^{e}	34.07±1.66^{ab}
果糖含量(g/100 g)	33.53±1.65^{a}	31.19±0.83^{b}	30.69±0.31^{b}	28.33±0.64^{c}	33.95±0.33^{a}	28.67±0.85^{c}	24.04±0.25^{d}	32.79±0.88^{a}
维生素C含量(mg/100 g)	602.53±20.46^{e}	484.69±26.23^{f}	666.45±26.23^{d}	757.33±26.23^{c}	742.19±26.23^{c}	802.77±26.23^{b}	893.65±26.23^{a}	560.43±26.23^{e}
总糖含量(g/100 g)	93.80±7.23^{a}	93.75±2.94^{a}	90.63±0.50^{a}	89.77±0.97^{a}	94.28±1.69^{a}	74.02±6.69^{b}	54.05±3.51^{c}	76.90±10.06^{b}
总酸含量(g/100 g)	2.61±0.18^{e}	4.32±0.32^{d}	7.09±0.49^{b}	7.95±0.18^{a}	2.51±0.49^{e}	4.12±0.18^{d}	5.81±0.37^{c}	6.88±0.32^{b}
糖酸比	36.08±4.62^{a}	21.75±0.94^{b}	12.81±0.84^{cd}	11.30±0.16^{d}	38.61±7.68^{a}	18.07±2.11^{bc}	9.35±1.14^{d}	11.24±1.94^{d}
总酚含量(mg GAE/g)	12.11±0.03^{b}	11.63±0.01^{c}	11.51±0.03^{d}	12.23±0.01^{a}	10.83±0.02^{g}	11.26±0.03^{e}	11.22±0.04e^{f}	11.19±0.01^{f}
总黄酮含量(mg Rutin/g)	28.27±0.99^{a}	24.10±0.42^{c}	24.73±0.91^{c}	26.97±0.65^{b}	17.44±0.33^{e}	21.03±0.72^{d}	24.27±0.74^{c}	17.35±0.23^{e}
花色苷含量(mg/g)	7.88±0.03^{a}	6.32±0.08^{d}	4.70±0.10^{g}	6.17±0.04^{e}	6.64±0.05^{c}	4.69±0.03^{g}	4.94±0.05^{f}	6.96±0.16^{b}
DPPH自由基清除率(%)	72.59±4.69^{a}	61.51±1.92^{b}	60.18±6.43^{b}	55.53±8.87^{b}	41.47±3.93^{c}	57.84±4.28^{b}	54.74±3.32^{b}	53.54±2.90^{b}
ABTS$^+$自由基清除率(%)	92.26±0.85^{b}	93.02±0.19^{a}	92.80±0.09^{ab}	92.64±0.25^{ab}	92.59±0.28^{ab}	93.02±0.09^{a}	92.91±0.00^{ab}	92.80±0.34^{ab}
AEAC (mg AA/100 g)	966.07±3.96^{a}	768.71±72.05^{bc}	956.67±17.40^{a}	813.05±46.68^{b}	780.71±17.60^{b}	713.63±9.83^{cd}	746.84±20.37^{bcd}	684.23±6.51^{d}
硬度(g)	2222.46±284.80^{b}	1583.29±440.38^{d}	1836.29±532.09^{cd}	1697.00±443.85^{cd}	1636.56±468.99^{cd}	2659.43±647.77^{a}	1964.53±339.23^{bc}	1629.13±254.94^{cd}
脆度(g)	1189.23±607.82^{b}	720.86±470.97^{c}	808.43±670.70^{bc}	856.00±482.78^{bc}	719.44±323.14^{c}	1609.43±646.86^{a}	1052.80±566.37^{bc}	754.00±464.04^{c}
断裂数(个)	17.2±3.8^{bc}	19.5±2.2^{ab}	15.1±3.3^{c}	15.4±3.6^{c}	18.2±2.5^{ab}	20.6±2.1^{a}	19.4±3.2^{ab}	8.8±3.9^{d}

注：同行相同字母表示差异不显著，不同字母表示差异显著（P<0.05）。

率范围为 13.38%~21.18%，其中，灿烂的产出率最高，其次为顶峰和杰兔，薄雾产出率最低。

葡萄糖和果糖是蓝莓中主要的还原糖组分，莱克西、天后和珠宝三个蓝莓品种中葡萄糖、果糖的含量较高，且各品种之间无显著性差异（P>0.05），杰兔品种中二者含量最低。与冷冻干燥后的野生蓝莓相比，葡萄糖的含量较低，果糖含量差别不大，这可能是由于不同的生长环境所致[32]。与还原糖含量不同，有 5 个蓝莓品种中的总糖含量无显著性差异（P>0.05），分别为天后、莱克西、顶峰、薄雾和绿宝石，杰兔品种总糖含量最低，剩余两个品种总糖含量分别为 74.02 g/100 g 和 76.90 g/100 g。

不同品种蓝莓脆粒总酸含量差异较大，含量最高的为绿宝石，7.95 g/100 g，其次为薄雾、珠宝和杰兔；含量最低的为天后，2.51 g/100 g，与莱克西蓝莓脆粒总酸含量无显著性差异（P>0.05）。天后蓝莓脆粒糖酸比最大，莱克西蓝莓次之，二者之间无显著性差异（P>0.05）；杰兔蓝莓糖酸比最低，且与薄雾、绿宝石和珠宝蓝莓脆粒之间无显著性差异（P>0.05），说明不同品种蓝莓脆粒糖酸比表现出与其总糖含量呈正比、与总酸含量呈反比的关系。

酸甜口感是影响消费者选择一种水果干制产品的重要指标，主要通过其总糖含量、总酸含量和糖酸比来反映。由表 2 可知，不同品种蓝莓脆粒总糖含量范围为 54.05~94.28 g/100 g、总酸含量范围为 2.51~7.95 g/100 g、糖酸比含量范围为 9.35~38.61。其中，天后总糖含量最高，莱克西、顶峰、薄雾、绿宝石与其含量无显著性差异（P>0.05），杰兔总糖含量最低；总酸含量与总糖含量之间并无明显的反比关系，绿宝石总酸含量最高，其次为薄雾和珠宝，莱克西和天后总酸含量较低，二者之间无显著性差异（P>0.05）；糖酸比最高的为天后，莱克西与其无显著性差异（P>0.05），然后依次为顶峰和灿烂，其余品种糖酸比之间无显著性差异（P>0.05）。综上，天后和莱克西品种属于糖含量高、酸含量低，甜酸度高的品种，绿宝石则为糖含量高、酸含量高，糖酸度却较低的品种。

不同品种蓝莓脆粒总酚含量范围为 10.83~12.23 mg GAE/g，其中，绿宝石总酚含量最高，莱克西次之，天后总酚含量最低，不同品种之间具有显著性差异（P<0.05）。不同品种蓝莓脆粒总黄酮含量范围为 17.35~28.27 mg Rutin/g，莱克西总黄酮含量最高，绿宝石次之，天后和珠宝含量最低。不同品种蓝莓脆粒花色苷含量范围为 4.69~7.88 mg/g，莱克西中花色苷含量最高，珠宝次之，薄雾和灿烂品种中花色苷含量最低。综上可知，8 个蓝莓品种中莱克西生物活性物质含量整体较高。

理论上，生物活性物质含量越高，果蔬产品的抗氧化活性越强。由表 2 可知，在不同测定方式下获得的不同蓝莓品种抗氧化活性清除率略有不同。DPPH 自由基清除率最高的为莱克西，天后最低，其余品种无显著性差异（P>0.05）；不同品种之间 $ABTS^+$ 自由基清除率差异较小。总抗氧化活性结果表明，莱克西 AEAC 最高，薄雾次之，且二者之间无显著性差异（P>0.05）；珠宝最低，与灿烂、杰兔之间无显著性差异（P>0.05）。这与之前报道一致，真空冷冻干燥能较好地保留蓝莓干制品抗氧化活性[33]。

硬度、脆度是产品口感的重要指标，优质的产品具有酥脆的口感。硬度越大，样品越有嚼劲，但硬度过大则口感变差，脆度峰值越小表示口感越脆[34]。各个品种中，硬度值的范围为 1583.29~2659.43 g，不同品种之间具有显著性差异（P<0.05），其中，灿烂硬度值最大，莱克西次之，顶峰最小。不同品种蓝莓脆粒脆度值范围为 719.44~1609.43 g，与硬度值一致，灿烂脆度值也最大，莱克西次之，而其余品种脆度值之间无显著性差异（P>0.05）。质构指标中的断裂数能够直观反映其酥脆性，不同品种蓝莓脆粒的断裂数范围为 8.8~20.6 个，说明各品种蓝莓脆粒酥脆性差异较大，其中灿烂断裂数最多，顶峰、杰兔、天后三个品种蓝莓脆粒的断裂数与之无显著性差异（P>0.05），珠宝断裂数最少，其余品种之间无显著性差异（P>0.05）。

2.2 冻干蓝莓脆粒评价指标筛选

2.2.1 冻干蓝莓脆粒评价指标主成分分析 每个主成分的方差即特征值，表示对应成分能够描述原有信息的多少。按主成分理论分析，若前 r 个主成分的累计贡献率达到了 80% 的原则，则这 r 个主成分即能反映足够的信息。由表 3 可知，第一主成分贡献率为 27.024%，第二主成分贡献率为 19.244%，第三主成分贡献率为 18.969%，第四主成分贡献率为 14.182%，第五主成分贡献率为 14.133%，累计贡献率为 93.552%，满足了达到 80% 的原则，可以用前 5 个主成分代替原来 19 个指标评价冻干蓝莓脆粒的理化和感官品质，达到了减少评价指标的目的。结果如表 3、表 4 所示。

表 3 方差贡献分析

Table 3 Variance contribution analysis

成分	提取平方和载入			旋转平方和载入		
	特征根	方差百分比(%)	累计(%)	特征根	方差百分比(%)	累计(%)
1	6.158	34.211	34.211	4.864	27.024	27.024
2	4.497	24.985	59.196	3.464	19.244	46.268
3	3.122	17.346	76.541	3.414	18.969	65.236
4	1.769	9.826	86.368	2.553	14.182	79.418
5	1.293	7.184	93.552	2.544	14.133	93.552

注：提取方法：主成分分析，旋转方法：具有Kaiser标准化的正交旋转法，表4同。

如表 4 所示，依据主成分载荷矩阵，可以看出第一主成分以还原糖含量的影响为主，其次为 V_C 含量和花色苷含量，第一主成分主要指向蓝莓脆粒的营养品质；第二主成分以活性物质和抗氧化活性的影响为主，主要指向产品的功能成分；第三主成分以含水率、总酸含量影响为主，主要指向产品的感官品质；第四主成分以产品的鲜样百粒重影响为主，其次为产

表 4　主成分载荷矩阵

Table 4　Principal component load matrix

评价指标	成分				
	1	2	3	4	5
鲜样百粒重	−0.030	0.295	0.415	0.789	0.341
含水率	0.127	−0.077	−0.965	−0.095	−0.179
产出率	−0.280	−0.126	0.322	0.755	0.423
葡萄糖含量	0.978	0.006	−0.115	−0.143	−0.045
果糖含量	0.932	−0.121	0.042	−0.241	−0.126
V_C含量	−0.817	−0.218	0.241	−0.309	0.320
总糖含量	0.675	0.306	0.209	−0.180	−0.403
总酸含量	−0.485	0.173	−0.794	−0.012	−0.279
糖酸比	0.639	−0.069	0.708	−0.286	0.054
总酚含量	0.098	0.923	−0.124	−0.029	0.002
总黄酮含量	−0.186	0.965	0.132	−0.050	0.030
花色苷含量	0.809	0.116	0.010	−0.228	−0.071
DPPH自由基清除率	0.251	0.835	−0.063	0.193	0.365
$ABTS^+$自由基清除率	−0.458	−0.333	−0.148	0.754	−0.102
AEAC	0.177	0.716	0.187	−0.518	−0.061
硬度	−0.160	0.135	0.240	0.098	0.916
脆度	−0.209	0.113	0.222	0.172	0.916
断裂数	−0.326	0.124	0.871	0.305	0.149

出率和 $ABTS^+$自由基清除率，主要指向产品的加工成本和价值；第五主成分以硬度值和脆度值的影响为主，表明产品的质构品质。结合各主成分的贡献率，表明对冻干蓝莓脆粒品质影响较大的指标有葡萄糖含量、果糖含量、花色苷含量、V_C 含量、总黄酮含量、总酚含量、DPPH 自由基清除率、总抗氧化活性 AEAC、干样含水率、总酸含量、鲜样百粒重、产出率、$ABTS^+$自由基清除率、硬度和脆度。

2.2.2　蓝莓脆粒品质指标描述性和相关性分析　变异系数的差异反映了生物主要性状在进化保守性或遗传可塑性方面的不同，在进行品种资源评价及筛选时应作为重要因素予以考虑。采用 SPSS 22.0 对 8 种冻干蓝莓脆粒的 18 项品质指标数据进行统计分析，变异系数公式如下：

变异系数(%) = 标准差/平均值×100

由表 5 可知，除总酚含量和 $ABTS^+$自由基清除率外，其余品质指标的变异系数均大于 10%，说明不同品种蓝莓脆粒的品质指标差别较大。其中，糖酸比的变异系数最大，为 57.89%，说明不同品种的风味特征差异很大；总酸的变异系数为 40.25%，说明不同品种蓝莓风味特征中的酸含量差异较大；另外，不同品种蓝莓脆粒的鲜样百粒重、含水率、脆度和断裂数的变异系数均大于 20%，说明各品种间感官品质差异也很大。蓝莓脆粒的产出率最小值为 13.38%，最大值为 21.18%，表明不同品种蓝莓经过真空冷冻干燥制作为脆粒休闲食品之后，产品的产出率具有明显的差异，而产出率是评价加工品质的重要指标。

为确定各评价指标间可能存在的相关性，对冻干蓝莓脆粒的各品质评价指标进行相关性分析。由于不同品质评价指标的量纲不一致，在数据分析之前需将原始数据进行标准化，然后用 SPSS 22.0 软件进行相关性分析，结果如表 6 所示。

由表 6 可知，产出率与鲜样百粒重呈极显著正相关($P<0.01$)，说明蓝莓鲜果的重量高低显著影响其干制产品的产出率，这是评价其加工品质的重要指标；果糖含量与葡萄糖含量呈极显著正相关($P<0.01$)，V_C 含量与葡萄糖含量呈显著负相关($P<0.05$)，总糖含量与果糖含量呈显著正相关($P<0.05$)，表明蓝莓脆粒中还原糖含量在总糖含量中占比较高，可直接反映蓝莓中的总糖含量，并且两种主要还原糖含量具有一

表 5　冻干蓝莓脆粒品质指标测定数据分布

Table 5　Data distribution of blueberry crisps quality evaluation indexes

品质指标	最小值	最大值	均值	极差	标准差	变异系数(%)
鲜样百粒重(g)	80.05	136.51	103.40	56.46	22.98	22.23
产出率(%)	13.38	21.18	16.84	7.8	2.52	14.97
含水率(%)	8.72	15.32	10.68	6.6	2.31	21.60
葡萄糖含量(g/100 g)	24.17	34.69	30.47	10.52	3.47	11.39
果糖含量(g/100 g)	24.04	33.95	30.40	9.91	3.31	10.88
V_C含量(mg/100 g)	484.69	893.65	688.76	408.96	135.53	19.68
总糖含量(g/100 g)	54.05	94.28	83.40	40.23	14.23	17.07
总酸含量(g/100 g)	2.51	7.95	5.16	5.44	2.08	40.25
糖酸比	9.35	38.61	19.90	29.26	11.52	57.89
总酚含量(mg GAE/g)	10.83	12.23	11.50	1.4	0.48	4.16
总黄酮含量(mg Rutin/g)	17.35	28.27	23.02	10.92	4.07	17.69
花色苷含量(mg/g)	4.69	7.88	6.04	3.19	1.17	19.31
DPPH自由基清除率(%)	41.47	72.59	57.18	31.12	8.74	15.28
$ABTS^+$自由基清除率(%)	92.26	93.02	92.76	0.76	0.25	0.27
总抗氧化活性AEAC(mg AA/100 g)	684.23	966.07	803.74	281.84	105.03	13.07
硬度(g)	1583.29	2659.43	1903.59	1076.17	372.85	19.59
脆度(g)	719.44	1609.43	963.77	889.99	310.32	32.20
断裂数(个)	8.8	20.6	16.78	11.80	3.77	22.47

表 6 冻干蓝莓脆粒标准化数据间的相关系数

Table 6 Correlation coefficients of standardized data of freeze-dried blueberry crisps

品质指标	鲜样百粒重	含水率	产出率	葡萄糖含量	果糖含量	V_C含量
鲜样百粒重	1					
含水率	−0.564	1				
产出率	0.846**	−0.490	1			
葡萄糖含量	−0.204	0.260	−0.457	1		
果糖含量	−0.283	0.147	−0.494	0.960**	1	
V_C含量	−0.075	−0.348	0.273	−0.810*	−0.700	1
总糖含量	−0.131	−0.017	−0.476	0.699	0.776*	−0.622
总酸含量	−0.371	0.753*	−0.258	−0.367	−0.447	0.097
糖酸比	0.047	−0.581	−0.127	0.579	0.689	−0.225
总酚含量	0.195	0.064	−0.129	0.097	−0.038	−0.242
总黄酮含量	0.318	−0.234	−0.036	−0.194	−0.300	0.005
花色苷含量	−0.182	0.087	−0.338	0.783*	0.703	−0.581
DPPH自由基清除率	0.492	−0.063	0.063	0.223	0.029	−0.385
$ABTS^+$自由基清除率	0.411	0.072	0.592	−0.513	−0.511	0.112
AEAC	−0.148	−0.141	−0.584	0.265	0.270	−0.175
硬度	0.530	−0.420	0.535	−0.222	−0.249	0.409
脆度	0.577	−0.419	0.633	−0.290	−0.329	0.448
断裂数	0.698	−0.942**	0.639	−0.463	−0.361	0.398

品质指标	总糖含量	总酸含量	糖酸比	总酚含量	总黄酮含量	花色苷含量
鲜样百粒重						
含水率						
产出率						
葡萄糖含量						
果糖含量						
V_C含量						
总糖含量	1					
总酸含量	−0.255	1				
糖酸比	0.582	−0.895**	1			
总酚含量	0.369	0.245	−0.070	1		
总黄酮含量	0.151	0.134	−0.073	0.870**	1	
花色苷含量	0.505	−0.382	0.596	0.303	0.028	1
DPPH自由基清除率	0.154	−0.068	0.018	0.716*	0.755*	0.201
$ABTS^+$自由基清除率	−0.470	0.309	−0.606	−0.424	−0.322	−0.721*
AEAC	0.529	−0.099	0.327	0.548	0.677	0.170
硬度	−0.318	−0.325	0.072	0.054	0.190	−0.309
脆度	−0.386	−0.288	0.014	0.072	0.182	−0.303
断裂数	−0.090	−0.551	0.318	−0.043	0.278	−0.355

品质指标	DPPH自由基清除率	$ABTS^+$自由基清除率	AEAC	硬度	脆度	断裂数
鲜样百粒重						
干样含水率						
产出率						
葡萄糖含量						
果糖含量						
V_C含量						
总糖含量						
总酸含量						
糖酸比						
总酚含量						
总黄酮含量						
花色苷含量						
DPPH自由基清除率	1					
$ABTS^+$自由基清除率	−0.252	1				
AEAC	0.571	−0.631	1			
硬度	0.404	0.029	0.066	1		
脆度	0.366	0.082	−0.053	0.986**	1	
断裂数	0.080	0.211	0.047	0.459	0.473	1

注: *表示在0.05水平上(双侧)显著相关; **表示在0.01水平上(双侧)极显著相关。

致性关系；蓝莓脆粒中糖酸比与总酸含量呈极显著负相关（$P<0.01$），说明不同蓝莓品种中糖含量总体较高，其总酸含量能够决定其糖酸比。总黄酮含量与总酚含量呈极显著正相关（$P<0.01$），DPPH 自由基清除率与总黄酮含量呈显著正相关（$P<0.05$），表明不同蓝莓品种中其总黄酮含量越高，DPPH 自由基清除率也越高，但并未获得黄酮或总酚含量与蓝莓脆粒总抗氧化活性之间的相关性。

休闲脆粒产品质构参数是其加工品质的重要评价指标，不同品种蓝莓经干燥后制作为脆粒休闲食品，其硬度值和脆度值之间具有显著差异（见表 2），且二者之间呈极显著正相关（$P<0.01$），这与其他果蔬休闲食品结果有所不同；蓝莓脆粒的断裂数与其干样含水率呈极显著负相关（$P<0.01$），说明若蓝莓脆粒的含水率高，则其酥脆性就会较差。另外，本研究通过标准化数据获得不同品种蓝莓脆粒产品的总酸含量其与干样含水率呈显著正相关（$P<0.05$）。

根据表 6 可知，多数加工品质指标之间具有显著的关系，表明有些指标可以用与之显著相关的指标代替。根据目前休闲干制品的品质评价现状，主要考虑冻干蓝莓脆粒的营养品质、生物活性和质构等方面的指标。根据产品的营养品质，选择具有代表性的葡萄糖含量作为核心指标，根据产品的质构和加工成本，将干样含水率、产出率和硬度作为核心指标，同时考虑到产品的活性物质含量和抗氧化能力，选择花色苷含量、总黄酮含量及总抗氧化活性作为核心指标。

综上所述，结合主成分与相关性分析结果，选择 7 个评价指标作为冻干蓝莓脆粒品质评价的核心指标，即葡萄糖含量、花色苷含量、总黄酮含量、总抗氧化活性、干样含水率、产出率和硬度。

2.2.3　冻干蓝莓脆粒核心指标评价标准建立　根据葡萄糖含量、花色苷含量、总黄酮含量、总抗氧化活性 AEAC、干样含水率、产出率和硬度这 7 个核心指标数值的分布情况，考虑实际应用的需求，以平均值为中心将各指标相应划分为 4 个级别，其中Ⅰ级为优，Ⅱ级为良，Ⅲ级为中，Ⅳ级为差，建立蓝莓脆粒加工品质指标评价标准，具体见表 7。

2.3　蓝莓脆粒品质评价模型建立

2.3.1　核心指标权重确定　根据方差贡献表、主成分载荷值，将筛选的核心评价指标葡萄糖含量、花色苷含量、总黄酮含量、总抗氧化活性 AEAC、干样含水率、产出率和硬度进行标准化，计算出在综合得分模型中的系数，然后采用归一化法确定各个指标的权重。各指标的权重如表 8 所示。由表可知，核心指标葡萄糖含量、花色苷含量、总黄酮含量、总抗氧化活性 AEAC、干样含水率、产出率和硬度的权重系数分别为 0.223、0.207、0.215、0.154、−0.280、0.218、0.263，说明干样含水率对产品的影响最大，其次为硬度、葡萄糖含量、产出率和总黄酮含量。

2.3.2　评价模型建立　将蓝莓脆粒的核心指标经过标准化处理后，得到数学模型：

Z=0.223×葡萄糖含量+0.207×花色苷含量+0.215×总黄酮含量+0.154×AEAC−0.280×干样含水率+0.218×产出率+0.263×硬度

蓝莓脆粒品质的综合得分如表 9 所示。莱克西的得分为 1.4240，综合得分最高，其次为灿烂。得分

表 7　冻干蓝莓脆粒加工品质评价标准

Table 7　Processing quality evaluation standards of freeze-dried blueberry crisps

分类	分类值						
	葡萄糖含量（g/100 g）	花色苷含量（g/mg）	总黄酮含量（mg Rutin/g）	AEAC（mg AA/100 g）	含水率（%）	产出率（%）	硬度（g）
Ⅰ	≥32.58	≥6.96	≥25.64	≥884.90	≤9.7	≥19.01	≥2281.51
Ⅱ	30.47~32.58	6.04~6.96	23.02~25.64	803.74~884.90	9.7~10.68	16.84~19.01	1903.59~2281.51
Ⅲ	27.32~30.47	5.36~6.04	20.18~23.02	743.98~803.74	10.68~13	15.11~16.84	1743.44~1903.59
Ⅳ	≤27.32	≤5.36	≤20.18	≤743.98	≥13	≤15.11	≤1743.44

注：以平均值为中心，最大值=（平均值+最大值）/2，最小值=（平均值+最小值）/2。

表 8　冻干蓝莓脆粒核心指标权重分布

Table 8　Distribution for main indexes of freeze-dried blueberry cirsps

核心评价指标	主成分1	主成分2	主成分3	主成分4	主成分5	综合系数	指标权重
葡萄糖含量	0.978	0.006	−0.115	−0.143	−0.045	0.098	0.223
花色苷含量	0.809	0.116	0.01	−0.228	−0.071	0.092	0.207
总黄酮含量	−0.186	0.965	0.132	−0.05	0.03	0.095	0.215
AEAC	0.177	0.716	0.187	−0.518	−0.061	0.068	0.154
干样含水率	0.127	−0.077	−0.965	−0.095	−0.179	−0.124	−0.280
产出率	−0.28	−0.126	0.322	0.755	0.423	0.096	0.218
硬度	−0.16	0.135	0.24	0.098	0.916	0.116	0.263
特征值	4.864	3.464	3.414	2.553	2.544		
贡献率	27.024	19.244	18.969	14.182	14.133		

为正的品质还有顶峰，其余得分均为负值。根据综合得分可以初步确定蓝莓脆粒中具有良好品质的品种为莱克西和灿烂。

表 9 蓝莓脆粒品质综合得分

Table 9 Comprehensive quality scores of freeze-dried blueberry crisps

品种	得分	排名
莱克西	1.4240	1
顶峰	0.2227	3
薄雾	−0.4752	7
绿宝石	−0.2559	6
天后	−0.1903	4
灿烂	0.4880	2
杰兔	−0.2553	5
珠宝	−0.9580	8

3 结论

本研究通过冷冻干燥处理蓝莓鲜果，测定八种不同品种蓝莓的 18 项品质指标及加工指标，结合主成分与相关性分析的结果，建立蓝莓脆粒核心指标评价标准，为蓝莓鲜果深加工的品种筛选提供了理论依据。结论如下：

糖酸比和总酸的变异系数较大，为 57.89% 和 40.25%，说明不同品种的风味特征差异很大。且除总酚含量和 ABTS$^+$自由基清除率外，其余品质指标的变异系数均大于 10%，其中糖酸比说明不同品种蓝莓脆粒的品质指标差别较大。产出率与鲜样百粒重、果糖含量与葡萄糖含量、总黄酮含量与总酚含量、硬度值和脆度值呈极显著正相关(P<0.01)，蓝莓脆粒中糖酸比与总酸含量、断裂数与其干样含水率呈极显著负相关(P<0.01)。

结合主成分与相关性分析结果，选择 7 个评价指标作为冻干蓝莓脆粒品质评价的核心指标，即葡萄糖含量、花色苷含量、总黄酮含量、总抗氧化活性、干样含水率、产出率和硬度。将 7 个指标进行标准化，发现干样含水率对产品影响最大，将蓝莓脆粒的核心指标经过标准化处理后，建立数学模型，莱克西的得分最高为 1.4240，其次是灿烂和顶峰，其余得分均为负值。其中莱克西品种最适宜加工为蓝莓脆粒。研究结果为江苏省内蓝莓干制加工专用品种筛选和品质分析提供了依据。

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

参考文献

[1] 张卫明. 一带一路经济植物[M]. 南京: 东南大学出版社, 2017: 392. [ZHAGN W M, Economic plants in one belt and one road[M]. Nanjing: Southeast University Press, 2017: 392.]

[2] 李殿鑫, 戴远威, 陈伟, 等. 蓝莓的营养价值及保健功能研究进展[J]. 农产品加工, 2018(4): 69−70,74. [LI D X, DAI Y W, CHEN W, et al. Research progress on nutritional value and health function of blueberry[J]. Farm Products Processing, 2018(4): 69−70,74.]

[3] 李亚东, 张志东, 吴林. 蓝莓果实的成分及保健机能[J]. 中国食物与营养, 2002(1): 27−28. [LI Y D, ZHANG Z D, WU L. Blueberry fruit composition and health functions[J]. Food and Nutrition in China, 2002(1): 27−28.]

[4] WU Y Q, HAN T Y, YANG H, et al. Known and potential health benefits and mechanisms of blueberry anthocyanins: A review[J]. Food Bioscience, 2023, 55: 103050.

[5] ZORITA D, LOREDANA F L, DUMITRITA O R, et al. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin rich extracts from blueberry and blackcurrant juice[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(2): 2352−2365.

[6] DANIELA H B, CHAI Z, HUTABARAT R P, et al. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of blueberry anthocyanins by AMPK activation: *In vitro* and *in vivo* studies[J]. Redox Biology, 2021, 46: 102100.

[7] AZARI H, MOROVATI A, BAHGRAM P G, et al. Beneficial effects of blueberry supplementation on the components of metabolic syndrome: A systematic review and meta-analysis[J]. Food Function, 2022, 13: 4875−4900.

[8] TRAVICA N, NATHAN M D, NENAD N, et al. The effect of blueberry interventions on cognitive performance and mood: A systematic review of randomized controlled trials[J]. Brain Behavior and Immunity, 2020, 85: 96−105.

[9] DELLA L C M, OLIVEIRA L A, DIAS K A, et al. Scientific evidence for the beneficial effects of dietary blueberries on gut health: A systematic review[J]. Molecular Nutrition Food Research, 2023, 67: 15.

[10] 李亚东, 盖禹含, 王芳, 等. 2021 年全球蓝莓产业数据报告[J]. 吉林农业大学学报, 2022, 44(1): 1−12. [LI Y D, GAI Y H, WANG F, et al. Global blueberry industry report 2021[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2022, 44(1): 1−12.]

[11] 刘宇航, 陈影影, 曹玉婷, 等. 蓝莓鲜果采后病害类型及保鲜技术研究进展[J]. 保鲜与加工, 2021, 21(11): 144−150. [LIU Y H, CHEN Y Y, CAO Y T, et al. Research progress on postharvest disease types and preservation technology of blueberry fruit[J]. Storage and Process, 2021, 21(11): 144−150.]

[12] FENG L, XU Y Y, XIAO Y D, et al. Effects of pre-drying treatments combined with explosion puffing drying on the physicochemical properties, antioxidant activities and flavor characteristics of apples[J]. Food Chemistry, 2021, 338: 128015.

[13] XU Y Y, XIAO Y D, CAMEL L, et al. A comparative study of drying methods on physical characteristics, nutritional properties and antioxidant capacity of broccoli[J]. Drying Technology, 2020, 38(10): 1378−1388.

[14] 于蕊, 杨慧珍, 李大婧, 等. 真空冷冻干燥不同升温程序对蓝莓干燥特性及品质影响[J]. 核农学报, 2024, 38(1): 84−92. [YU R, YANG H Z, LI D J, et al. Effects of different heating procedures on the drying characteristics and quality of blueberry during vacuum freeze drying[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2024, 38(1): 84−92.]

[15] 秦力悦, 石萍萍, 李荣辉, 等. 基于主成分分析和聚类分析的烘烤类澳洲坚果果仁综合品质评价[J]. 食品工业科技, 2022, 44(18): 331−341. [QIN L Y, SHI P P, LI R H, et al. Comprehensive quality evaluation of roasted kernels in macadamia nuts based on principal component analysis and cluster analysis[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 44(18): 331−341.]

［16］邹雪梅，卜庆状，张馨予，等. 蓝莓果实品质分析与评价研究进展[J]. 辽宁农业科学，2023(5)：66−71. ［ZHOU X M, BU Q Z, ZHANG X Y, et al. Progress in analyzing and of fruit quality of blueberry[J]. Liaoning Agricultural Sciences, 2023(5): 66−71.］
［17］乌凤章，张润梅，尹泽宇，等. 基于主成分分析的高丛蓝莓品种果实品质综合评价[J]. 农业工程学报，2022，38(22)：262−269. ［WU F Z, ZHANG R M, YIN Z Y, et al. Comprehensive quality evaluation of highbush blueberry cultivars based on principal component analysis[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2022, 38(22): 262−269.］
［18］宋江峰，刘春泉，姜晓青，等. 基于主成分与聚类分析的菜用大豆品质综合评价[J]. 食品科学，2015，36(13)：12−17. ［SONG J F, LIU C Q, JIANG X Q, et al. Comprehensive evaluation of vegetable soybean quality by principal component analysis and cluster analysis[J]. Food Science, 2015, 36(13): 12−17.］
［19］ZHANG L H, QIAO Y, WANG C, et al. Effects of freeze vacuum drying combined with hot air drying on the sensory quality, active components, moisture mobility, odors, and microstructure of kiwifruits[J]. Journal of Food Quality, 2019, 19: 1−11.
［20］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 standards for food safety Determination of moisture in foods[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.］
［21］邓婷婷，肖亚冬，刘春泉，等. 不同品种冻干无核葡萄脆粒品质评价[J]. 食品工业科技，2020，41(2)：298−306. ［DENG T T, XIAO Y D, LIU C Q, et al. Quality evaluation of different varieties of freeze-dried seedless grape crisp[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(2): 298−306.］
［22］国家卫生健康委员会，国家市场监督管理总局. GB 5009.8-2023 食品中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖的测定[S]. 北京：中国标准出版社，2024. ［National Health Commission of the People's Republic of China, State Administration for Market Regulation. GB 5009.8-2023 Determination of fructose, glucose, sucrose, maltose, lactose in foods[S]. Beijing: Standards Press of China, 2024.］
［23］刘胜辉，臧小平. 高效液相色谱法测定水果中的抗坏血酸[J]. 生命科学仪器，2005，3(4)：38−40. ［LIU S H, ZANG X P. The determination of the ascorbic acid in fruits by HPLC[J]. Life Science Instruments, 2005, 3(4): 38−40.］
［24］刘霞，江宁，刘春泉，等. 不同干燥方式对黑毛豆仁品质的影响[J]. 食品科学，2011，32(18)：59−62. ［LIU X, JIANG N, LIU C Q, et al. Effects of drying methods on the quality of black edmame [J]. Food Science, 2011, 32(18): 59−62.］
［25］郭金龙，陈有君，孙国琴，等. 苯酚-硫酸法测定杏鲍菇多糖方法的研究[J]. 食品科学，2008，29(12)：555−558. ［GUO J L, CHEN Y J, SUN G Q, et al. Study on phenol-sulfuric acid method for determination of polysaccharide content in *Pleurotus eryngii*[J]. Food Science, 2008, 29(12): 555−558.］
［26］中国人民共和国国家卫生健康委员会，国家市场监督管理总局. GB 12456-2021 食品安全国家标准 食品中总酸的测定[S]. 北京：中国标准出版社，2021. ［National Health Commission of the People's Republic of China, State Administration for Market Regulation. GB 12456-2021 National standards for food safety Determination of total acid in foods[S]. Beijing: Standards Press of China, 2021.］
［27］李静，聂继云，毋永龙. Folin-Ciocalteus 法测定马铃薯中的总多酚[J]. 中国马铃薯，2014，28(1)：27−30. ［LI J, NIE J Y, WU Y L. Determination of total polyphenols in potato using folin-ciocalteus method[J]. Chinese Potato Journal, 2014, 28(1): 27−30.］
［28］董怡，林恋竹，赵谋明. 光果甘草叶总黄酮测定方法[J]. 食品科学，2014，28(1)：27−30. ［DONG Y, LIN L Z, ZHAO M M. Determination of total flavonoids in leaves of *Glycyrrhiza glabra* L. by spectrophotometry[J]. Food Science, 2014, 28(1): 27−30.］
［29］FANG Y L, MENG J F, ZHANG A, et al. Influence of shriveling on berry composition and antioxidant activity of cabernet sauvignon grapes from Shanxi vineyards[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2011, 91(4): 749−751.
［30］RAMIERZ J E, ZAMBRANO R, SEPULVDA B, et al. Anthocyanins and antioxidant capacities of six chilean berries by HPLC–HR-ESI-TOF-MS[J]. Food Chemistry, 2015, 176: 106−114.
［31］GUO J, LIU C J, LI Y, et al. Effect of sucrose and citric acid on the quality of explosion puffing dried yellow peach slices[J]. Drying Technology, 2021, 40: 2783−2793.
［32］SHAIMA A H, ZAHIR A A, MOSTAFA W, et al. Polyphenol and flavonoid stability of wild blueberry (*Sideroxylon mascatense*) during air-and freeze-drying and storage stability as a function of temperature[J]. Foods, 2023, 12(4): 871.
［33］许文静，陈昌琳，邓莎，等. 不同前处理方式对冻干蓝莓粉品质特性的影响[J]. 食品工业科技，2023，44(6)：89−95. ［XU W J, CHEN C L, DENG S, et al. Effects of different pretreatment methods on quality characteristics of freeze-dried blueberry powder[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(6): 89−95.］
［34］李原，毕金峰，马有川，等. 打孔和划痕预处理对蓝莓粒真空冷冻干燥特性及品质的影响[J]. 食品科学技术学报，2023，41(2)：175−186. ［LI Y, BI J F, MA Y C, et al. Effects of punching and cutting epidermis pretreatment on freeze drying characteristics and qualities of blueberry[J]. Journal of Food Science and Technology, 2023, 41(2): 175−186.］

曾雨, 杨晓迪, 胡卓炎, 等. 不同品种荔枝壳中原花青素的鉴定及其体外抗氧化活性研究 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 218−226. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110041
ZENG Yu, YANG Xiaodi, HU Zhuoyan, et al. Identification of Procyanidins in the Pericarps of Different Litchi Cultivars and Their *in Vitro* Antioxidant Activities[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 218−226. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110041

· 分析检测 ·

不同品种荔枝壳中原花青素的鉴定及其体外抗氧化活性研究

曾　雨, 杨晓迪, 胡卓炎, 赵　雷, 王　凯, 刘旭炜*
（广东省食品质量安全重点实验室, 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642）

摘　要: 为筛选适合开发天然抗氧化产品的荔枝优良品种，本研究对 7 个不同品种荔枝壳中总酚、总原花青素、总黄酮含量及 A 型低聚原花青素组分进行了分析，采用 DPPH、$ABTS^+$自由基清除法及 FRAP 法测定其体外抗氧化活性。结果表明，褐毛荔果壳提取物中所含抗氧化活性成分如总酚、总原花青素、总黄酮以及总 A 型低聚原花青素含量均为最高。经电喷雾液质联用四级杆飞行时间质谱（HPLC-Q-TOF-MS/MS）分析鉴定，得到所含物质的一级及二级质谱。质谱结果显示荔枝壳中含有的低聚原花青素组分主要为表儿茶素、原花青素 A_2、原花青素 A_4、A 型三聚体及四聚体，不同品种荔枝壳中原花青素含量具有差异性（$P<0.05$）。褐毛荔果壳提取物表现出较强的自由基清除活性（DPPH·：1144.60 μmol Trolox/g DW，$ABTS^{+}$·：2905.56 μmol Trolox/g DW，FRAP：868.84 μmol Trolox/g DW）。经皮尔逊相关性分析，原花青素单体、二聚体、三聚体含量与抗氧化活性具有显著相关性（$P<0.05$）。综合分析，与其他品种相比，褐毛荔果壳提取物中 A 型低聚原花青素含量最高，体外抗氧化活性方面表现最佳，可作为开发天然抗氧化产品的新型潜在原料加以利用。

关键词: 岭南水果, 荔枝, A 型原花青素, 聚合度, 生物活性
中图分类号: O657.63; TS209　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2024)21−0218−09
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110041
本文网刊:

Identification of Procyanidins in the Pericarps of Different Litchi Cultivars and Their *in Vitro* Antioxidant Activities

ZENG Yu, YANG Xiaodi, HU Zhuoyan, ZHAO Lei, WANG Kai, LIU Xuwei*
（Guangdong Provincial Key Laboratory of Food Quality and Safety, College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China）

Abstract: To screen eminent litchi varieties suitable for the development of natural antioxidant products, the total phenol, total proanthocyanidin, total flavonoid contents and A-type oligomeric procyanidin fractions in the pericarps of seven diverse litchi cultivars were analyzed. The *in vitro* antioxidant activities including DPPH, $ABTS^+$ free radical scavenging and FRAP were determined. The results demonstrated that the total phenols, total proanthocyanidins, total flavonoids as well as total A-type oligomeric procyanidins contained in the pericarp extract of 'Hemaoli' were the highest. In addition, the primary and secondary mass spectra of the contained substances were analyzed and identified by electrospray liquid-mass spectrometry with quadrupole time-of-flight mass spectrometry (HPLC-Q-TOF-MS/MS). The mass spectrometry results demonstrated that the oligomeric procyanidin fractions contained in litchi pericarps were mainly epicatechin, procyanidin A_2, procyanidin A_4, A-type trimer and tetramer. Moreover, the content of A-type oligomeric procyanidins in litchi pericarp varied significantly ($P<0.05$) among diverse cultivars. The pericarp extract of 'Hemaoli' possessed potent free radical scavenging activity (DPPH·: 1144.60 μmol Trolox/g DW, $ABTS^{+}$·: 2905.56 μmol Trolox/g DW, FRAP: 868.84 μmol

收稿日期: 2023−11−08
基金项目: 国家自然科学基金（32202022）; 香江学者计划（XJ2023050）。
作者简介: 曾雨（1999−）, 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品工程, E-mail: zengyu0303@163.com。
*** 通信作者:** 刘旭炜（1991−）, 男, 博士/博士后, 副教授, 研究方向: 果蔬加工与组分相互作用, E-mail: xuwei.liu@scau.edu.cn。

Trolox/g DW). The contents of A-type procyanidin monomer, dimer and trimer were significantly correlated with antioxidant activity by Pearson's correlation analysis (P<0.05). In summary, a comprehensive analysis indicated that the pericarp extract of 'Hemaoli' contained the highest content of A-type oligomeric procyanidins as well as remarkable antioxidant activity compared to other cultivars. Therefore, 'Hemaoli' could be utilized as a novel potential material for the development of natural antioxidant products.

Key words: Lingnan fruit; *Litchi chinensis* Sonn.; A-type proanthocyanidins; polymerization; bioactivity

荔枝（*Litchi chinensis* Sonn.），一种广泛种植于中国南部、越南及泰国等地的亚热带水果作物，属于无患子科荔枝属，是自然界为数不多富含 A 型原花青素的水果[1]。A 型原花青素在荔枝果壳、果肉及种子中均有分布，但以果壳中含量最高，可占荔枝壳总原花青素含量的 41.7%，含量远高于 B 型原花青素[2−5]。它是荔枝中主要的功能性物质，具有抗糖尿病[6]、降压[7]、抗动脉粥样硬化[8]、抗炎[9] 等功效。一般来说，聚合度小于 5 的原花青素一般称作低聚原花青素，大于 5 的称为高聚原花青素[10]。研究表明，人体细胞和组织不断受到自由基和活性氧造成的损害的威胁，这些自由基和活性氧是在正常氧气代谢过程中产生的或由外源性损伤引起的[11]。而低聚原花青素拥有强大的抗氧化能力，能有效抑制脂氧合酶、羟基、超氧化物和过氧自由基活性[12]。通过消除体内过多的自由基，低聚原花青素可防止脂质氧化和阻断自由基链反应，从而维持自由基和抗氧化酶之间的动态平衡（氧化稳态），有助于预防由自由基或脂质过氧化引起的各种不良后果，例如皮肤炎症、辐射损伤和细胞老化[13]。低聚原花青素抗氧化能力是维生素 E 的 50 倍，维生素 C 的 20 倍，并且可以被人体小肠迅速吸收，生物利用度>90%[14]。Gong 等[15] 对妃子笑果壳中的原花青素进行分离纯化得到 4 个原花青素组分，DPPH 自由基清除率均要强于维生素 C。Liu 等[5] 从桂味果壳提取出的低聚原花青素、原花青素 A_2 和 A 型三聚体 [epicatechin-(4β→8, 2β→O→7)-epicatechin-(4β→8)-epicatechin] 对羟基自由基均有较强的清除作用，IC_{50} 值分别为 2.60、1.75 和 1.65 μg/mL。谢翀等[16] 从荔枝生理落果中分离纯化的原花青素组分具有较强的 $ABTS^{+}$·和 DPPH·清除能力，在 100 μg/mL 时，清除率可分别达到 92.52% 和 46.98%，总抗氧化能力显著高于维生素 C（P<0.05）。Li 等[17] 则证明了益生菌生物转化是一种将荔枝果皮原花青素转化为更有效抗氧化剂的可行有效的方法。

目前，关于不同品种荔枝果壳中的 A 型低聚原花青素组成、含量以及抗氧化活性研究未见报道。因此，本研究以国内 7 个品种的荔枝为研究对象，用甲醇作为提取溶剂对荔枝壳中低聚原花青素进行提取，利用高效液相质谱（HPLC）对各原花青素组分进行分离，利用高效液相色谱电喷雾四级杆飞行时间质谱（HPLC-Q-TOF-MS/MS）对各原花青素组分进行物质鉴定，深入探究荔枝壳中原花青素组分的组成、含量及抗氧化活性，为荔枝壳的废物利用提供理论依据，为 A 型原花青素的获取探索新的天然植物来源。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

荔枝　试验选取 7 个品种荔枝，包括白糖罂、白蜡、风鸡头、妃子笑、桂味、褐毛荔及仙桃荔。不同品种荔枝达到各自商业采收成熟度时采摘，采摘后于当天立即运回果蔬加工实验室，挑选大小和成熟度一致，且无病虫害及机械损伤的果实进行实验，采样情况见表 1。将荔枝迅速去壳后经−70 ℃ 冷冻干燥 72 h，打粉过 60 目筛网后密封避光储存于−20 ℃ 冰箱中备用；正己烷、无水甲醇　分析纯，上海润捷科技发展有限公司；福林酚（分析纯）、没食子酸（标准品）、表儿茶素（标准品）、原花青素 A_2（标准品）、原花青素 A_4（标准品）　上海源叶生物科技有限公司；香草醛、硫酸　分析纯，上海麦克林生化科技有限公司；甲酸　色谱纯，天津科密欧化学试剂有限公司；乙腈　色谱纯，德国默克公司；二苯基苦基苯肼（DPPH）、硫酸亚铁、水杨酸、2'-联氨-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸（ABTS）、过硫酸钾、氢氧化钠、硝酸铝、亚硝酸钠、碳酸钠、无水乙醇等　均为分析纯，上海国药集团化学试剂有限公司。

表 1　供试荔枝品种以及采样情况

Table 1　Cultivars of litchi and sampling condition

编号	荔枝品种	产地	采样时间	北纬	东经
1	白糖罂	广东高州	2023.06.03	21°55’	110°51’
2	白蜡	广东高州	2023.06.03	21°55’	110°51’
3	风鸡头	广东高州	2023.06.14	21°55’	110°51’
4	妃子笑	广东高州	2023.06.03	21°55’	110°51’
5	桂味	广东高州	2023.06.08	21°55’	110°51’
6	褐毛荔	云南屏边	2023.05.17	22°59’	103°41’
7	仙桃荔	广东徐闻	2023.06.08	22°19’	110°10’

SCIENTZ-10N/A 型真空冷冻干燥机　宁波新芝冻干设备有限公司；1260 Infinity 型高效液相色谱仪、Agilent 6540UHD 型四级杆串联飞行时间质谱联用仪、Zorbox SB-C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm 5-Micron）　美国安捷伦科技有限公司；Uvmini-1240 型紫外分光光度计　日本岛津公司；TD5-II 低速离心机　长沙平凡仪器仪表有限公司；H01-1D 恒温磁力搅拌器　梅颖浦仪器仪表制造有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　荔枝壳多酚化合物的提取　参考 Guyot 等[18] 的方法并稍作修改。将荔枝壳粉末与正己烷按 1∶10

(g/mL)的料液比混合，搅拌过夜，使用 G3 漏斗进行固液分离除去正己烷后，按 1∶10(g/mL)的料液比与含 1% 乙酸的 70% 甲醇溶液混合后在 40 ℃ 下 400 r/min 磁力搅拌提取 40 min，提取三次并将提取液合并，40 ℃ 下真空浓缩除去甲醇后，冷冻干燥 72 h 得荔枝壳多酚提取物，−20 ℃ 条件下冷藏备用。

1.2.2 总酚含量测定 参考 Wang 等[19] 的方法对总酚含量进行测定，以没食子酸为标准品比对。配制 5 g/L 的没食子酸标准储备溶液，用移液管分别移取 0、0.2、0.5、0.8、1.0、1.2、1.5 mL 的没食子酸标准储备溶液于 10 mL 容量瓶中，分别用水定容至刻度，摇匀，得到浓度分别为 0、100、250、400、500、600、750 mg/L 的没食子酸标准工作溶液。用移液管分别移取没食子酸工作液、水(作空白对照用)及稀释后的提取液各 0.1 mL 于 10 mL 刻度比色管内，在每个试管内分别加入 0.5 mL 的福林酚(Folin-Ciocalteu)试剂，摇匀，反应 5 min，继续加入 1.5 mL 20% Na_2CO_3 溶液，再加水定容、摇匀，室温放置 2 h，于 765 nm 处测定吸光值，重复测定 3 次。根据没食子酸工作液的浓度与吸光值制作标准曲线(Y=0.001X+0.0424，R^2=0.9975)，并根据测试液的吸光值计算样品中总酚含量。

1.2.3 总原花青素含量测定 参考 Sun 等[20] 的方法对总原花青素含量进行测定。以表儿茶素为标准品比对。配制 5 g/L 的表儿茶素标准储备溶液，用移液管分别移取 0、0.4、0.5、0.6、0.8、1.0、1.2 mL 的表儿茶素标准储备溶液于 10 mL 容量瓶中，分别用水定容至刻度，摇匀，得到浓度分别为 0、0.2、0.25、0.3、0.4、0.5、0.6 mg/mL 的表儿茶素标准提取溶液。用移液管分别移取表儿茶素工作液、甲醇(作空白对照用)及稀释后的测试液各 1 mL 于 10 mL 刻度比色管内，在每个试管内分别加入 2.5 mL 1% 香草醛-甲醇溶液和 2.5 mL 20% 硫酸-甲醇溶液，振荡混匀，30 ℃ 水浴 20 min，500 nm 下测定吸光值，重复测定 3 次。根据表儿茶素工作液的浓度与吸光值制作标准曲线(Y=0.8676X−0.0001，R^2=0.9994)，并根据测试液的吸光值计算样品中总原花青素含量。

1.2.4 总黄酮含量测定 参考 Zhang 等[21] 的方法对总黄酮含量进行测定。以芦丁为标准品比对。配制 0.1 g/L 的芦丁标准储备溶液，用移液管分别移取 0、2、4、6、8、10 mL 的表儿茶素标准储备溶液于 10 mL 容量瓶中，分别用 30% 乙醇定容至刻度，摇匀，得到浓度分别为 0、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10 mg/mL 的芦丁标准工作溶液。用移液管分别移取芦丁工作液、水(作空白对照用)及稀释后的提取液各 5 mL 于 10 mL 刻度比色管内，在每个试管内分别加入 0.3 mL 5%$NaNO_2$ 溶液和 0.3 mL 10% $Al(NO_3)_3$ 溶液，振荡混匀，放置 5 min，加入 2 mL 1 mol/L NaOH 溶液，30% 乙醇定容至 10 mL，摇匀，放置 5 min。510 nm 下测定吸光值，重复测定 3 次。根据芦丁工作液的浓度与吸光值制作标准曲线(Y=4.715X+0.0101，R^2=0.9979)，并根据测试液的吸光值计算样品中总黄酮含量。

1.2.5 原花青素组分的测定 参考 Xie 等[22] 的方法并稍作修改。使用高效液相色谱(HPLC)系统分析酚类化合物，使用 Zorbox SB-C_{18} 柱，紫外分光光度检测器。进样量为 10 μL，柱温维持 35 ℃，流速 0.7 mL/min，检测波长 280 nm。流动相为含 0.4% (v/v)甲酸水溶液(溶液 A)和乙腈(溶液 B)。洗脱条件如表 2 所示，每个样品重复测定 3 次。

表 2 HPLC 梯度洗脱条件

Table 2 Gradient elution program of HPLC

保留时间(min)	流动相A(%)	流动相B(%)
0	83	17
10	80	20
12	80	20
15	77	23
22	77	23
25	50	50
30	45	55
32	20	80
35	83	17

为进行物质鉴定，所选样品在 Agilent 6540UHD Q-TOF 进行 ESI 负离子分析上进行分析，流动相和洗脱条件与高效液相色谱分析相同。质谱使用 ESI 离子源收集条件：孔板电压−30 V；雾化压力 45 Psi；热毛细管温度 275 ℃；质量范围 m/z 100~1200；干燥气体为氮气。

根据 HPLC-Q-TOF-MS/MS，得到相应出峰时间物质的分子量及碎片离子峰，对各原花青素组分进行定性分析。根据 HPLC 绘制出的各标准品质量浓度与峰面积关系的标准曲线，对各原花青素组分定量分析，标准品包括表儿茶素、原花青素 A_2 及原花青素 A_4。由于缺少对应标准品，本研究样品中 A 型二聚体、三聚体以及四聚体均以原花青素 A_2 当量表示。

1.2.6 DPPH 自由基清除能力测定 参考 Xie 等[22] 的方法并做适当修改。精确称取 7.89 mg DPPH 溶于 95% 乙醇中，定容到 100 mL，配制成浓度为 2×10^{-4} mol/L 的 DPPH 溶液，并在 517 nm 波长处加入 95% 乙醇调节吸光度值为 0.700±0.002，避光待用。称取 0.025 g Trolox(水溶性 V_E，TE)，加入 10 mL 95% 乙醇溶解，定容至 100 mL，配制成 1 mmol/L 的 Trolox 标准母液，用移液管分别移取 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 mL 的 Trolox 标准母液于 5 mL 容量瓶中，分别用 95% 乙醇定容至刻度，摇匀，得到浓度分别为 0、100、200、300、400、500、600、700 μmol/L 的 Trolox 标准工作溶液。取 0.1 mL Trolox 标准工作溶液、稀释后的提取液于 10 mL 棕色容量瓶，并与 3.9 mL DPPH 溶液混合，摇晃均匀，室温(25 ℃)下避光静置反应 30 min，95% 乙醇做空白对照，在 517 nm 处测定吸光值，重复测定 3 次。

根据 Trolox 标准工作液的浓度与吸光值制作标准曲线（Y=−0.0005X+0.6753，R^2=0.9997），并根据提取液的吸光值衡量样品的 DPPH 自由基清除能力。

1.2.7　ABTS$^+$自由基清除能力测定　参考 Wang 等[23]的方法并做适当修改。将 25 mL 7 mmol/L ABTS 水溶液与 0.44 mL 140 mmol/L 的过硫酸钾水溶液混合，并在 4 ℃ 环境下避光放置 12~16 h。之后在 734 nm 波长处加入适量 95% 乙醇将该工作液吸光值调整为 0.700±0.002，得到 ABTS 溶液，避光备用。称取 0.025 g Trolox，加入 10 mL 95% 乙醇溶解，定容至 100 mL，配制成 1 mmol/L 的 Trolox 标准母液，用移液管分别移取 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 mL 的 Trolox 标准母液于 5 mL 容量瓶中，分别用 95% 乙醇定容至刻度，摇匀，得到浓度分别为 0、100、200、300、400、500、600、700 μmol/L 的 Trolox 标准工作溶液。取 0.1 mL Trolox 标准工作溶液、稀释后的提取液于 10 mL 棕色容量瓶，并与 3.9 mL 现配的 ABTS 溶液混合，摇晃均匀，室温（25 ℃）下避光静置反应 30 min，在 734 nm 处测定吸光值，重复测定 3 次。根据 Trolox 标准工作液的浓度与吸光值制作标准曲线（Y=−0.0006X+0.508，R^2=0.9994），并根据提取液的吸光值衡量样品的 ABTS$^+$自由基清除能力。

1.2.8　FRAP 总抗氧化能力测定　参考 Zhou 等[24]的方法并做适当修改，将 250 mL 醋酸缓冲液（pH3.6）、25 mL 10 mmol/L TPTZ、25 mL 20 mmol/L $FeCl_3{\cdot}6H_2O$ 混合均匀（10∶1∶1，v/v/v），放置于 37 ℃ 水浴锅避光预热 10 min，备用，现配现用。称取 0.025 g Trolox，加入 10 mL 95% 乙醇溶解，定容至 100 mL，配制成 1 mmol/L 的 Trolox 标准母液，用移液管分别移取 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 mL 的 Trolox 标准母液于 5 mL 容量瓶中，分别用 95% 乙醇定容至刻度，摇匀，得到浓度分别为 0、100、200、300、400、500、600、700 μmol/L 的 Trolox 标准工作溶液。取 0.1 mL Trolox 标准工作溶液、稀释后的提取液于 10 mL 棕色容量瓶，并与 3.9 mL 现配的 FRAP 溶液混合，摇晃均匀，37 ℃ 下避光静置反应 30 min，在 593 nm 处测定吸光值，重复测定 3 次。根据 Trolox 标准工作液的浓度与吸光值制作标准曲线（Y=0.001X+0.0236，R^2=0.9995），并根据提取液的吸光值衡量样品的 FRAP 值。

1.2.9　相关性分析　对不同品种荔枝壳提取物清除 DPPH·、ABTS$^+$·能力、总抗氧化能力与总酚、总原花青素、总黄酮、总 A 型低聚原花青素含量之间进行相关性分析，采用 Person 进行相关性分析，P<0.05 表示差异有统计学意义。

1.3　数据处理

采用 Origin 2023 软件处理数据并作图，每个样品测定 3 个平行，所有实验均重复 3 次，结果以平均数±标准误差表示。通过 SPSS 26.0 对数据进行显著性分析（P<0.05）。

2　结果与分析

2.1　荔枝壳多酚提取物中主要抗氧化活性成分测定结果

多酚是一类主要由植物合成的次级代谢产物，也是人类饮食中最丰富的抗氧化剂，因其强大的抗氧化能力和调节细胞功能的其他特性而被广泛研究[25−26]。荔枝壳中的多酚也被证明具有抑制亚油酸的过氧化及清除自由基等功能[1]。不同品种荔枝壳中的总酚、总原花青素、总黄酮含量如表 3 所示。不同品种荔枝壳之间的总酚含量差异显著（P<0.05），其含量变化幅度介于 154.13~243.80 mg GAE/g DW，由高到低依次是褐毛荔>白糖罂>凤鸡头>白蜡>妃子笑>仙桃荔>桂味。原花青素是具有各种药理特性的缩合单宁，是类黄酮生物合成途径的最终产物，也是影响荔枝壳提取物抗氧化能力大小的主要物质之一[27−28]。研究结果显示不同荔枝壳的总原花青素含量存在较大的变异系数（>20%），总原花青素含量介于 77.09~158.16 mg EPE/g DW，褐毛荔、白糖罂、凤鸡头三个品种的总原花青素含量较高，分别为 158.16、137.03、127.61 mg EPE/g DW，显著高于其他 4 个品种（P<0.05）；而桂味中总原花青素含量最低，显著低于其他品种（P<0.05）。黄酮类化合物广泛存在于水果、蔬菜和饮料中，人体胃肠吸收的黄酮类化合物及其代谢产物均表现出体内抗氧化活性[11]。研究显示，7 个品种荔枝壳总黄酮含量介于 356.71~476.61 mg RE/g DW，其中褐毛荔、妃子笑总黄酮含量较高，分别为 476.61、433.06 mg RE/g DW，均明显高于其他 5 个品种；而仙桃荔、桂味中总黄酮含量最低，显著低于其他品种（P<0.05）。

表 3　不同品种荔枝壳提取物中总酚、总原花青素和总黄酮含量（干重）

Table 3　Contents of total phenolics, procyanidins and flavonoids in litchi pericarp extracts (dry weight)

品种	总酚 (mg GAE/g)	总原花青素 (mg EPE/g)	总黄酮 (mg RE/g)
白蜡	194.63±5.51^c	117.82±3.13^c	404.18±1.23^c
白糖罂	211.13±2.05^b	137.03±7.56^b	427.55±17.97^{bc}
凤鸡头	198.97±1.84^c	127.61±5.41^b	420.23±0.53^{bc}
妃子笑	177.47±5.33^d	98.61±0.47^d	433.06±2.61^b
桂味	154.13±3.79^f	77.09±1.90^e	356.71±9.27^e
褐毛荔	243.80±0.82^a	158.16±1.96^a	476.61±8.25^a
仙桃荔	164.47±1.31^e	97.84±0.72^d	384.78±6.14^d
平均值	192.09	116.31	415.30
标准误差	26.24	25.36	35.18
变异系数（%）	13.66	21.81	8.47

注：同一列不同字母代表显著性差异（P<0.05）；GAE、EPE、RE分别表示没食子酸、表儿茶素、芦丁。

2.2　不同品种荔枝壳多酚提取物中 A 型低聚原花青素的鉴定与含量分析

原花青素是荔枝中重要的酚类物质之一，研究

表明荔枝果皮多酚中约有 60% 对应于原花青素[29]。为了比较不同品种荔枝壳 A 型低聚原花青素组成和含量并为荔枝壳中原花青素开发利用提供理论依据，采用 HPLC-Q-TOF-MS/MS 对荔枝壳中的原花青素结构进行鉴定。图 1 为荔枝壳中原花青素的液相色谱图，由图可见，所有样品均分离出 3 个大峰及 8 个小峰，分离效果良好，其中 4 min 的色谱峰为溶剂峰。各样品中化合物的出峰时间基本一致，可以初步判断品种差异对化合物的组成没有明确的影响。为了进一步明确物质组成，对荔枝壳中的原花青素组分进行鉴定，在荔枝壳提取物中共鉴定出 12 种原花青素组分(表 4)，包括一种单体、三种 A 型二聚体、四种 A 型三聚体、四种 A 型四聚体，其中保留时间为 8.15 min 的物质，其质荷比(m/z)为 289.0，经与标准品进行外标对照，鉴定其为表儿茶素。而保留时间

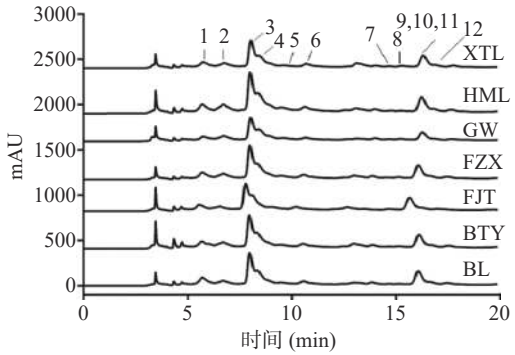


图 1 不同品种荔枝壳提取物的 HPLC 图

Fig.1 HPLC chromatogram of different varieties of litchi pericarp extracts

注：BL、BTY、FJT、FZX、GW、HML、XTL 分别代表白蜡、白糖罂、凤鸡头、妃子笑、桂味、褐毛荔、仙桃荔。

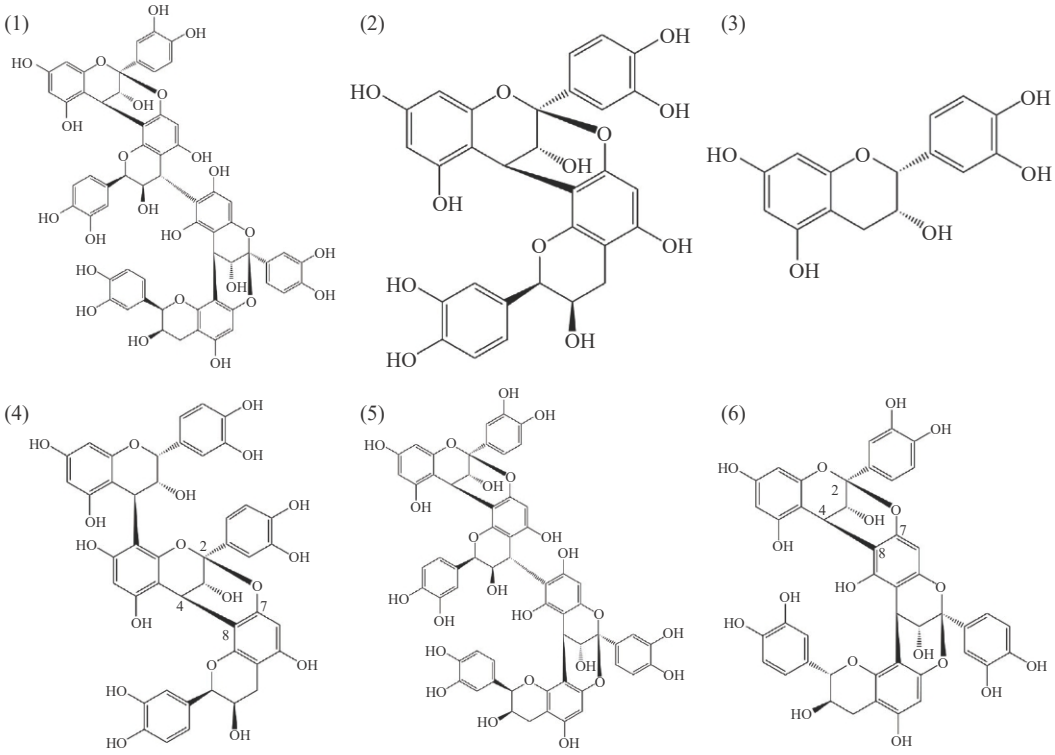
表 4 HPLC-Q-TOF-MS/MS 表征荔枝壳提取物中各原花青素组分

Table 4 HPLC-Q-TOF-MS/MS characterization of procyanidins in the litchi pericarps extracts

编号	保留时间 (min)	质量	分子式	化合物
1	5.90	1152.25	$C_{60}H_{48}O_{24}$	A型四聚体[1]
2	6.89	576.13	$C_{30}H_{24}O_{12}$	A型二聚体[1]
3	8.15	290.08	$C_{15}H_{14}O_6$	表儿茶素
4	8.64	864.19	$C_{45}H_{36}O_{18}$	A型三聚体[1]
5	9.81	1152.25	$C_{60}H_{48}O_{24}$	A型四聚体[2]
6	10.84	864.19	$C_{45}H_{36}O_{18}$	A型三聚体[2]
7	14.06	1152.25	$C_{60}H_{48}O_{24}$	A型四聚体[3]
8	15.21	576.13	$C_{30}H_{24}O_{12}$	原花青素A_4
9	16.25	864.19	$C_{45}H_{36}O_{18}$	A型三聚体[3]
10	16.25	576.13	$C_{30}H_{24}O_{12}$	原花青素A_2
11	16.25	1152.25	$C_{60}H_{48}O_{24}$	A型四聚体[4]
12	17.66	864.19	$C_{45}H_{36}O_{18}$	A型三聚体[4]

为 6.89、15.21、16.25 min 的物质，其 m/z 为 575.1，比 B 型二聚体少 2 个质子，表明其结构中存在一个附加的 C-O-C 键，碎片离子峰为 425.09、289.07 及 125.02，符合 A 型二聚体的裂解途径[30]，并且经与标准品对照，保留时间为 15.21、16.25 min 的化合物分别是原花青素 A_4 和原花青素 A_2。而化合物 4、6、7、12 的 m/z 为 863.1，经二级质谱鉴定确认为 A 型三聚体[29]。保留时间为 5.90、9.81、14.06、16.25 min 的化合物，其 m/z 为 1151.2，其二级质谱包括 863.1、575.1 及 423.0 的碎片离子峰，初步鉴定为 A 型原花青素四聚体[31]。各峰对应各物质分子式如图 2 所示。

为了计算在相同保留时间内同时出峰的原花青素含量，以标准品的质量浓度为横坐标(μg/mL)，色



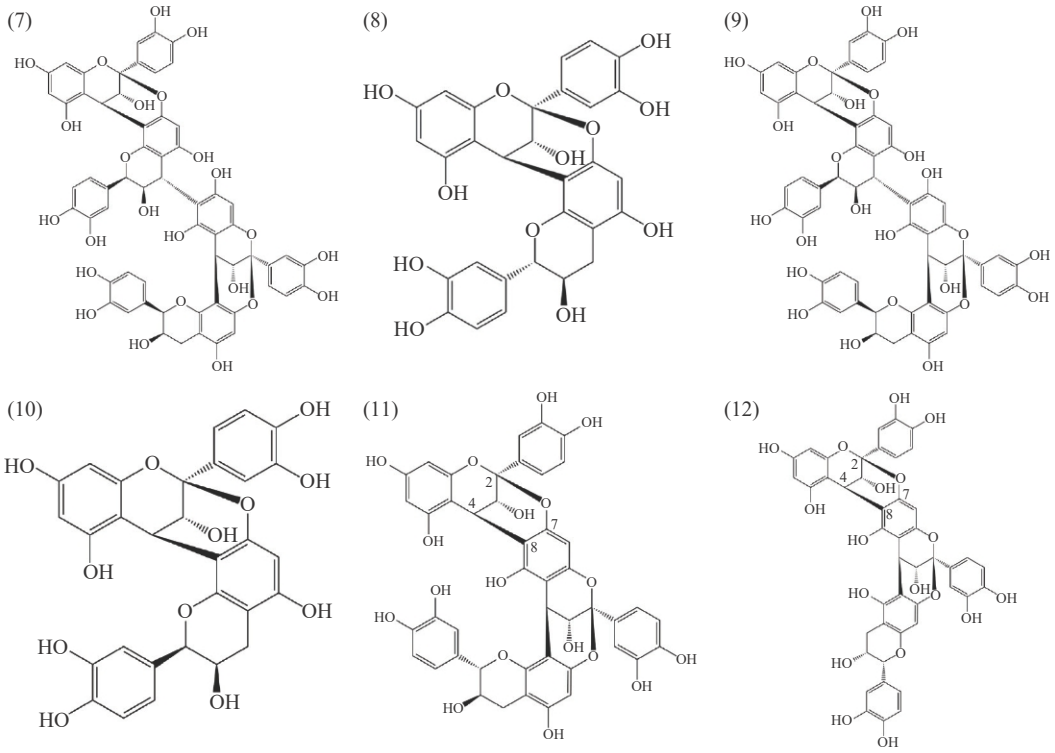


图 2　荔枝壳提取物中在 HPLC 图中各峰所对应的原花青素成分

Fig.2　Proanthocyanidin components corresponding to each peak in HPLC diagram of litchi pericarps extracts

注：(1)A 型四聚体[1]；(2)A 型二聚体[1]；(3)表儿茶素；(4)A 型三聚体[1]；(5)A 型四聚体[2]；(6)A 型三聚体[2]；(7)A 型四聚体[3]；(8)原花青素 A_4；(9)A 型四聚体[4]；(10)原花青素 A_2；(11)A 型三聚体[3]；(12)A 型三聚体[4]。

谱峰面积为纵坐标，得到三种标准品的定量标准曲线，各标品峰面积和浓度线性关系良好，回归方程系数 R^2 均大于 0.9990(表 5)。表 6 为 7 个样品中的 12 种原花青素组分含量以及总 A 型二聚体、三聚体、四聚体、总 A 型原花青素含量。所有样品均含有较高水平的 A 型原花青素，其中表儿茶素、原花青素 A_2、A 型三聚体含量相对较高，为荔枝壳中最主要的原花青素组分。这与 Xie 等[9] 对不同品种荔枝落果原花青素组分鉴定结果一致。总 A 型原花青素含量在 161.12~297.97 mg/g DW 之间，含量从高到低依次为褐毛荔>妃子笑>白蜡>白糖罂>凤鸡头>仙桃荔>桂味。在各原花青素低聚物中，单体表儿茶素含量与原花青素 A_2 含量相当，含量变化幅度分别在 31.53~57.94 mg/g DW 以及 26.74~53.18 mg/g DW 之间。另外，除原花青素 A_4 含量略低于仙桃荔，其他原花青素组分含量均为褐毛荔最高。

表 5　原花青素标准品的回归方程及相关系数

Table 5　Linear regression equations and correlation coefficients of procyanidin standards

原花青素标准品名称	回归方程	回归方程系数(R^2)	线性范围(μg/mL)
表儿茶素	Y=14.30X−159.30	0.9992	50~800
原花青素A_2	Y=7.65X−53.80	0.9998	50~800
原花青素A_4	Y=7.81X−1.90	0.9999	50~800

表 6　不同品种荔枝壳提取物中各 A 型低聚原花青素组分含量(mg/g DW)

Table 6　Content of each A-type procyanidin fraction in the pericarp extracts of different litchi varieties (mg/g DW)

原花青素组分	白蜡	白糖罂	凤鸡头	妃子笑	桂味	褐毛荔	仙桃荔
表儿茶素	44.68±1.12^{b}	45.24±1.72^{b}	36.14±1.47^{c}	44.61±0.45^{b}	31.53±0.63^{d}	57.94±3.70^{a}	38.71±0.86^{c}
原花青素A_2	49.20±0.60^{b}	45.61±0.16^{c}	45.31±2.39^{c}	46.11±1.89^{c}	26.74±0.72^{e}	53.18±0.53^{a}	41.36±1.29^{d}
A型二聚体[1]	17.41±0.04^{c}	15.06±0.72^{d}	15.06±0.24^{d}	20.32±0.43^{b}	17.02±0.07^{c}	30.58±0.45^{a}	17.34±0.17^{c}
原花青素A_4	2.73±0.33^{d}	2.95±0.11^{d}	2.88±0.24^{d}	4.75±0.23^{bc}	4.04±0.46^{c}	5.05±0.72^{ab}	5.83±0.09^{a}
A型三聚体[1]	50.93±2.78^{bc}	54.66±4.17^{b}	46.73±3.07^{cd}	57.21±1.32^{b}	42.56±1.83^{d}	75.31±2.75^{a}	40.83±2.50^{d}
A型三聚体[2]	11.80±0.10^{b}	11.99±0.33^{b}	9.94±0.25^{c}	12.57±1.70^{b}	7.39±0.12^{d}	15.06±0.51^{a}	11.34±0.08^{bc}
A型三聚体[3]	3.10±0.03^{b}	2.92±0.01^{c}	2.91±0.12^{c}	2.95±0.09^{c}	1.99±0.04^{e}	3.30±0.030^{a}	2.71±0.06^{d}
A型三聚体[4]	8.06±0.13^{bc}	8.40±0.24^{ab}	6.29±1.17^{cd}	9.55±0.66^{ab}	3.62±0.45^{e}	9.96±0.99^{a}	5.35±0.80^{de}

续表 6

原花青素组分	白蜡	白糖罂	凤鸡头	妃子笑	桂味	褐毛荔	仙桃荔
A型四聚体[1]	29.68±0.89^{a}	17.07±0.33^{c}	23.24±0.13^{b}	24.66±1.13^{b}	12.55±0.06^{d}	29.29±3.04^{a}	22.45±0.71^{b}
A型四聚体[2]	3.79±0.19^{cd}	4.88±0.35^{bc}	4.74±0.67^{cd}	6.08±0.87^{b}	3.94±0.29^{cd}	7.42±0.42^{a}	3.55±0.26^{d}
A型四聚体[3]	6.90±0.32^{ab}	7.19±0.59^{ab}	3.21±0.65^{c}	7.36±0.75^{a}	5.98±0.16^{b}	7.57±0.70^{a}	4.52±0.49^{c}
A型四聚体[4]	4.52±0.05^{a}	4.23±0.01^{a}	4.21±0.19^{a}	4.27±0.15^{a}	2.75±0.06^{b}	4.33±0.75^{a}	3.90±0.10^{a}
总A型二聚体	69.61±0.97^{b}	63.62±0.79^{c}	63.24±2.70^{c}	71.19±1.26^{b}	48.81±1.52^{d}	87.80±1.28^{a}	64.53±1.54^{c}
总A型三聚体	73.90±2.66^{c}	77.97±3.61^{bc}	65.87±3.39^{d}	82.27±3.27^{b}	55.56±2.12^{e}	103.63±1.56^{a}	60.23±3.29^{de}
总A型四聚体	44.90±0.78^{b}	33.37±0.53^{c}	35.40±1.44^{c}	42.37±0.42^{b}	25.22±0.16^{d}	48.60±2.76^{a}	34.41±0.63^{c}
总A型原花青素	233.09±3.12^{b}	220.20±1.25^{c}	200.65±6.42^{d}	240.44±2.52^{b}	161.12±0.15^{d}	297.97±2.02^{a}	197.89±4.57^{d}

注: 同一行不同字母代表显著性差异(P<0.05); 样品中A型三聚体和四聚体由于缺少相应标准品, 均以原花青素A_2当量表示。

2.3 不同品种荔枝壳多酚提取物的体外抗氧化活性分析

荔枝果壳强大的抗氧化活性与酚类物质有关[32,19]。因此, 采用 DPPH·、$ABTS^{+}$·清除法及铁还原力(FRAP)法评价不同品种荔枝壳提取物的抗氧化能力。结果如图 3 所示。DPPH·清除能力由大到小排序为妃子笑>褐毛荔>仙桃荔>白蜡>白糖罂>桂味>凤鸡头; 而在 $ABTS^{+}$·清除能力由大到小排序为褐毛荔>凤鸡头>白蜡>妃子笑>白糖罂>仙桃荔>桂味; FRAP 法并非针对某种自由基的清除能力, 它所反映的是所测样品的总抗氧化能力, 也就是说, 样品的总抗氧化能力越强, 对自由基的清除能力越高, 其抗氧化能力越强[33], 总抗氧化能力由大到小排序为褐毛荔>白糖罂>白蜡>凤鸡头>仙桃荔>桂味>妃子笑。这些结果表明, 总酚含量越高的品种, 其体外抗氧化活性越强。这可能是因为羟基具有较好的供氢能力, 是酚类物质清除自由基的重要因素[34]。

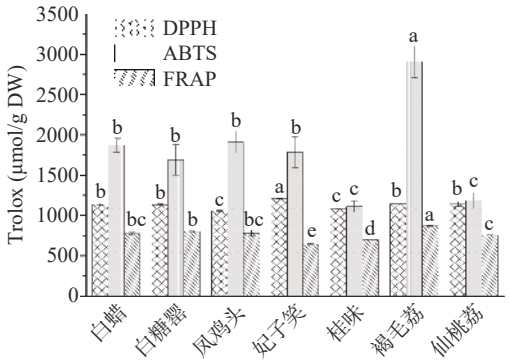


图 3 不同品种荔枝壳 DPPH·、$ABTS^{+}$·清除活性及 FRAP 总抗氧化能力比较

Fig.3 Comparison of DPPH·, $ABTS^{+}$· scavenging activity and FRAP total antioxidant capacity of litchi pericarps of different varieties

注: 不同小写字母表示不同品种间的显著性差异(P<0.05)。

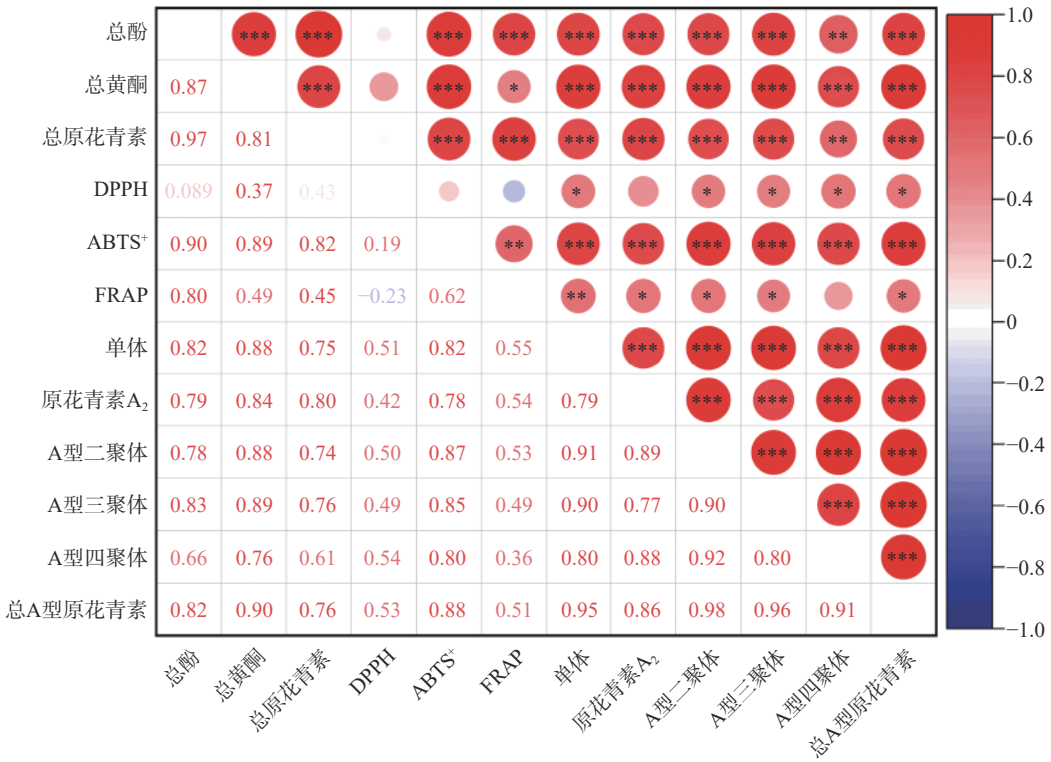


图 4 皮尔逊相关系数热图

Fig.4 Heat map of Pearson's correlation coefficient

注: *在 0.05 水平显著(P<0.05), **在 0.01 水平显著(P<0.01), ***在 0.001 水平显著(P<0.001)。

2.4　荔枝壳多酚提取物中低聚原花青素与抗氧化活性的关联

研究表明，植物的抗氧化活性与其生物活性物质含量之间存在一定的相关性[35]。采用皮尔逊相关系数明晰各指标之间的相关性程度，结果以皮尔逊相关系数热图表示。如图 4 所示，总酚分别与单体（表儿茶素）（r=0.82；P<0.001）、A 型二聚体（r=0.78；P<0.001）、A 型三聚体（r=0.83；P<0.001）、A 型四聚体（r=0.66；P<0.01）、总 A 型原花青素（r=0.82；P<0.001）均呈显著正相关。这表明 A 型原花青素是荔枝壳中主要的酚类化合物，与表 6 的结果相互印证。Li 等[36] 研究表明荔枝壳低聚原花青素中有超过 41.7% 的 A 型原花青素。同时，体外抗氧化活性（DPPH、ABTS$^+$、FRAP）与单体（r≥0.51，P<0.05）、原花青素 A_2（r≥0.54，P<0.05（DPPH 除外））、A 型二聚体（r≥0.50，P<0.05）、A 型三聚体（r≥0.49，P<0.05）、A 型四聚体（r≥0.54，P<0.05（FRAP 除外））、总 A 型原花青素（r≥0.51，P<0.05）含量具有显著正相关性。羟基是影响酚类化合物体外抗氧化活性的重要因素，这也是提取物酚类化合物含量越高其抗氧化活性越好的原因。2 个单体（表儿茶素）的羟基数目比一个 A 型二聚体要多一个，这是由于随着原花青素的聚合形成 C-O-C 键，化合物的羟基减少。因此在相同的浓度下，单体比 A 型原花青素聚合物含有更多的羟基。所以 A 型原花青素的聚合度越高，A 型原花青素表现出与体外抗氧化活性越弱的相关性[37]，这也在本研究中得到验证。

3　结论

对 7 个品种荔枝壳提取物的抗氧化活性成分及体外抗氧化活性进行测定。结果表明 7 个样品的总酚含量在 154.13~243.80 mg/g DW 之间，总原花青素含量在 77.09~158.16 mg/g DW 之间，总黄酮含量在 356.71~476.61 mg/g DW 之间，相比较而言，褐毛荔总酚、总原花青素、总黄酮含量在 7 种荔枝中相对较高。通过 HPLC-Q-TOF-MS/MS 对不同品种荔枝壳样品原花青素组分进行结构鉴定与含量分析，得出 7 个荔枝壳样品中含有的主要原花青素组分为表儿茶素、原花青素 A_2、原花青素 A_4、A 型三聚体及 A 型四聚体，总 A 型原花青素含量介于 161.12~297.97 mg/g DW 之间，褐毛荔含量最高，桂味含量最低。

通过 DPPH·、ABTS$^{+\cdot}$、FRAP 这 3 种体外抗氧化方法来比较不同品种荔枝壳提取物抗氧化活性，综合比较可知妃子笑、褐毛荔、仙桃荔对 DPPH 自由基清除能力较强，褐毛荔、凤鸡头对 ABTS$^+$自由基清除能力较强，FRAP 总抗氧化能力在 7 个品种中也较强。皮尔逊相关分析发现总酚、总原花青素、总黄酮含量以及单体、A 型二聚体、A 型三聚体、A 型四聚体与抗氧化能力间有着显著相关性（P<0.05）。综上，褐毛荔果壳提取物有着较高的 A 型低聚原花青素含量以及较强的综合体外抗氧化活性。

本文表明褐毛荔果壳是 A 型低聚原花青素理想的天然植物来源，而 A 型低聚原花青素又与抗氧化活性具有显著相关性。本研究不仅有利于荔枝加工副产物的再利用，同时为新型功能保健品的开发提供了理论依据和技术指导。

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

参考文献

[1] ZHAO L, WANG K, WANG K, et. al. Nutrient components, health benefits, and safety of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.): A review[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2020, 19(4): 2139−2163.

[2] XU X, XIE H, WANG Y, et. al. A-type proanthocyanidins from lychee seeds and their antioxidant and antiviral activities[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(22): 11667−11672.

[3] LI X, SUI Y, LI S, et. al. A-type procyanidins from litchi pericarp ameliorate hyperglycaemia by regulating hepatic and muscle glucose metabolism in streptozotocin (STZ)-induced diabetic mice fed with high fat diet[J]. Journal of Functional Foods, 2016, 27: 711−722.

[4] LÜ Q, LUO F, ZHAO X, et. al. Identification of proanthocyanidins from litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) pulp by LC-ESI-Q-TOF-MS and their antioxidant activity[J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0120480.

[5] LIU L, XIE B, CAO S, et. al. A-type procyanidins from *Litchi chinensis* pericarp with antioxidant activity[J]. Food Chemistry, 2007, 105(4): 1446−1451.

[6] LI X, SUI Y, XIE B, et. al. Diabetes diminishes a typical metabolite of litchi pericarp oligomeric procyanidins (LPOPC) in urine mediated by imbalanced gut microbiota[J]. Food & Function, 2021, 12(12): 5375−5386.

[7] KESSY H N E, WANG K, ZHAO L, et. al. Enrichment and biotransformation of phenolic compounds from litchi pericarps with angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibition activity[J]. LWT, 2018, 87: 301−309.

[8] RONG S, ZHAO S, KAI X, et. al. Procyanidins extracted from the litchi pericarp attenuate atherosclerosis and hyperlipidemia associated with consumption of a high fat diet in apolipoprotein-E knockout mice[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2018, 97: 1639−1644.

[9] XIE C, WANG K, LIU X, et. al. Characterization and bioactivity of A-type procyanidins from litchi fruitlets at different degrees of development[J]. Food Chemistry, 2023, 405(30): 134855.

[10] LIU X, LE BOURVELLEC C, GUYOT S, et. al. Reactivity of flavanols: Their fate in physical food processing and recent advances in their analysis by depolymerization[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2021, 20: 4841−4880.

[11] PANCHE A N, DIWAN A D, CHANDRA S R. Flavonoids: An overview[J]. Journal of Nutritional Science, 2016, 5: e47.

[12] ZHOU W, ZHAO L, WANG K, et. al. Plant leaf proanthocyanidins: From agricultural production by-products to potential bioactive molecules[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2023, 1: 1−39.

[13] LAI R, XIAN D, XIONG X, et. al. Proanthocyanidins: novel treatment for psoriasis that reduces oxidative stress and modulates Th17 and Treg cells[J]. Redox Report, 2018, 23(1): 130−135.
[14] LU Y, YEAP FOO L. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace[J]. Food Chemistry, 2000, 68(1): 81−85.
[15] GONG E S, GAO N, LI T, et. al. Effect of *in vitro* digestion on phytochemical profiles and cellular antioxidant activity of whole grains[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(25): 7016−7024.
[16] 谢翀, 林琳, 吴戈仪, 等. 荔枝生理落果中 A 型原花青素提取纯化鉴定及抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2022, 43(3): 81−87. [XIE C, LIN L, WU G Y, et al. Extraction, purification, identification of A-type pocyanidine from litchi fruitlet and its antioxidant activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(3): 81−87.]
[17] LI S, CHEN L, YANG T, et al. Increasing antioxidant activity of procyanidin extracts from the pericarp of *Litchi chinensis* processing waste by two probiotic bacteria bioconversions[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(10): 2506−2512.
[18] GUYOT S, MARNET N, DRILLEAU J F. Thiolysis−HPLC characterization of apple procyanidins covering a large range of polymerization states[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(1): 14−20.
[19] WANG H C, HU Z Q, WANG Y, et al. Phenolic compounds and the antioxidant activities in litchi pericarp: Difference among cultivars[J]. Scientia Horticulturae, 2011, 129(4): 784−789.
[20] SUN B, RICARDO-DA-SILVA J M, SPRANGER I. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46(10): 4267−4274.
[21] ZHANG R, ZENG Q, DENG Y, et al. Phenolic profiles and antioxidant activity of litchi pulp of different cultivars cultivated in Southern China[J]. Food Chemistry, 2013, 136(3-4): 1169−1176.
[22] XIE F, LI M, LAN X, et. al. Modification of dietary fibers from purple-fleshed potatoes (Heimeiren) with high hydrostatic pressure and high pressure homogenization processing: A comparative study[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2017, 42: 157−164.
[23] WANG D, LIU X, WANG K, et al. Impact of non-thermal modifications on the physicochemical properties and functionality of litchi pomace dietary fibre[J]. LWT, 2023, 182: 114878.
[24] ZHOU Y, XIE F, ZHOU X, et al. Effects of maillard reaction on flavor and safety of Chinese traditional food: Roast duck[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2016, 96(6): 1915−1922.
[25] XIAO Y, AHMAD T, BELWAL T, et al. A review on protein based nanocarriers for polyphenols: Interaction and stabilization mechanisms[J]. Food Innovation and Advances, 2023, 2(3): 193−202.
[26] XI Y, ZENG X, PU Y, et al. The synergistic effect of dietary cholesterol with fruit tannins in forming kidney stones[J]. Food Innovation and Advances, 2023, 2(2): 163−170.
[27] RAUF A, IMRAN M, ABU-IZNEID T, et al. Proanthocyanidins: A comprehensive review[J]. Biomedicine and Pharmacotherapy, 2019, 116: 108999.
[28] 张瑞芬. 荔枝果壳原花青素的分离鉴定及其抗动脉粥样硬化作用分子机制[D]. 武汉: 华中农业大学, 2017. [ZHANG R F. Separation and identification of litchi pericarp procyanidins and their action mechanism in attenuating atherosclerosis[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2017.]
[29] MIRANDA-HERNÁNDEZ A M, MUÑIZ-MÁRQUEZ D B, WONG-PAZ J E, et al. Characterization by HPLC–ESI–MS^2 of native and oxidized procyanidins from litchi (*Litchi chinensis*) pericarp[J]. Food Chemistry, 2019, 291: 126−131.
[30] SUI Y, LI X, LI S, et al. Characterization and preparation of oligomeric procyanidins from *Litchi chinensis* pericarp[J]. Fitoterapia, 2016, 112: 168−174.
[31] LIN L Z, SUN J, CHEN P, et al. UHPLC-PDA-ESI/$HRMS^n$ profiling method to identify and quantify oligomeric proanthocyanidins in plant products[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(39): 9387−9400.
[32] QI Q, CHU M, YU X, et al. Anthocyanins and proanthocyanidins: Chemical structures, food sources, bioactivities, and product development[J]. Food Reviews International, 2022(2): 1−29.
[33] GUO C, YANG J, WEI J, et al. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay[J]. Nutrition Research, 2003, 23(12): 1719−1726.
[34] WANG H, SUN W, WANG L H, et al. Molecular structures of nonvolatile components in the Haihong fruit wine and their free radical scavenging effect[J]. Food Chemistry, 2021, 353(15): 129298.
[35] PINEDO-ESPINOZA J M, GUTIÉRREZ-TLAHQUE J, SANTIAGO-SAENZ Y O, et al. Nutritional composition, bioactive compounds and antioxidant activity of wild edible flowers consumed in semiarid regions of Mexico[J]. Plant Foods for Human Nutrition, 2020, 75(3): 413−419.
[36] LI S, XIAO J, CHEN L, et al. Identification of A-series oligomeric procyanidins from pericarp of *Litchi chinensis* by FT-ICR-MS and LC-MS[J]. Food Chemistry, 2012, 135(1): 31−38.
[37] ZHOU P, ZHANG L, LI W, et al. *In vitro* evaluation of the anti-digestion and antioxidant effects of grape seed procyanidins according to their degrees of polymerization[J]. Journal of Functional Foods, 2018, 49: 85−95.

陈君然, 朱星宇, 崔瀚元, 等. 新疆肉苁蓉不同品种与部位间活性成分差异及抗氧化活性分析 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 227−233. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110047
CHEN Junran, ZHU Xingyu, CUI Hanyuan, et al. Variations of Active Ingredients and Antioxidant Activities Analysis of *Cistanche deserticola* from Different Breeds and Parts in Xinjiang Province[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 227−233. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110047

· 分析检测 ·

新疆肉苁蓉不同品种与部位间活性成分差异及抗氧化活性分析

陈君然[1], 朱星宇[1], 崔瀚元[2,*], 邢皓然[1], 胡云峰[1], 胡立武[3], 彭旭阳[1], 王　洁[1]
（1.天津科技大学食品科学与工程学院, 天津 300457;
2.天津市农业科学院农产品保鲜与加工与技术研究所, 天津 300000;
3.策勒县国润生物药业有限公司, 新疆策勒县 848300）

摘　要: 本文评估了新疆和田策勒县梭梭肉苁蓉、红柳肉苁蓉的不同部位的活性成分含量及抗氧化能力。结果表明：红柳肉苁蓉的总多酚、总黄酮、总糖、毛蕊花糖苷含量均表现为下部含量最高，中部、上部含量递减。其中红柳肉苁蓉下部的总多酚、总黄酮含量（38.35 mg GAE/g DW、35.61 mg RE/g DW）分别为梭梭肉苁蓉下部的2.47、10.95 倍。梭梭上部松果菊苷含量在两种肉苁蓉不同部位中最高，为 92.93 mg/g DW，两种肉苁蓉下部总三萜含量显著高于上部、中部（P<0.05），梭梭下部总三萜最多，为 6.75 mg OAE/g DW。此外，梭梭肉苁蓉和红柳肉苁蓉均表现出较强的抗氧化性，并且肉苁蓉下部的抗氧化效果最好，其 $IC_{50\ DPPH}$ 分别为 7.15 和 5.95 mg/mL，$IC_{50\ ABTS^{+}}$ 分别为 5.19 和 3.28 mg/mL。相关性分析表明，肉苁蓉中的总多酚、总黄酮、原花青素、总糖、毛蕊花糖苷含量与 $IC_{50\ DPPH}$ 和 $IC_{50\ ABTS^{+}}$ 呈负相关。结果表明，梭梭肉苁蓉上部的松果菊苷含量丰富，红柳肉苁蓉下部的总多酚、总黄酮、总糖、毛蕊花糖苷含量丰富且高于梭梭肉苁蓉对应部位。本文可以为不同产地肉苁蓉标准化及功能性产品深度研发提供理论基础。

关键词: 肉苁蓉, 品种, 部位, 活性成分, 抗氧化
中图分类号: TS201.4　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2024)21−0227−07
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110047
本文网刊:

Variations of Active Ingredients and Antioxidant Activities Analysis of *Cistanche deserticola* from Different Breeds and Parts in Xinjiang Province

CHEN Junran[1], ZHU Xingyu[1], CUI Hanyuan[2,*], XING Haoran[1], HU Yunfeng[1], HU Liwu[3], PENG Xuyang[1], WANG Jie[1]
（1.College of Food Science and Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China;
2.Institute of Agricultural Products Preservation and Processing and Technology, Tianjin Academy of Agricultural Sciences, Tianjin 300000, China;
3.Cele County Guorun Biological Pharmaceutical Co., Cele County 848300, China）

Abstract: In this paper, the content of active ingredients and antioxidant capacity of different parts of Hoxylon and Red Willow *Cistanche deserticola*, from Hotan Cele County, Xinjiang, were evaluated. The results showed that the active substances, including total phenols, total flavonoids, total sugars, and verbascoside of Red Willow *Cistanche deserticola*, were the highest in the lower part of the plant, and decreased in the middle and upper parts. In terms of total phenols and

收稿日期: 2023−11−08
基金项目: 新疆维吾尔自治区重点研发任务专项（2022B02030）。
作者简介: 陈君然（1984−）, 男, 博士, 讲师, 研究方向: 农产品保鲜加工研究, E-mail: junran2876@126.com。
*** 通信作者:** 崔瀚元（1983−）, 男, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 农产品加工, E-mail: 283935986@qq.com。

total flavonoids, the contents of the lower part of Red Willow *Cistanche deserticola* (38.35 mg GAE/g DW, 35.61 mg RE/g DW) were 2.47 and 10.95 times compared to the lower part of Hoxylon *Cistanche deserticola*, respectively. The upper part of Hoxylon *Cistanche deserticola* showed the highest content of echinacoside with 92.93 mg/g DW. And the total triterpene content of the lower part-especially that of Hoxylon *Cistanche deserticola* was significantly higher than the upper and middle part (P<0.05), at 6.75 mg OAE/g DW. In addition, it was found that the antioxidant properties of both Hoxylon and Red Willow *Cistanche deserticola* were strong, and the highest antioxidant capacity was observed in their lower parts ($IC_{50\ DPPH}$: 7.15 and 5.95 mg/mL; $IC_{50\ ABTS^+}$: 5.19 and 3.28 mg/mL, respectively). As shown in the correlation analysis, the contents of total polyphenols, total flavonoids, proanthocyanidins, total sugars, and verbascoside in *Cistanche deserticola* were negatively correlated with $IC_{50\ DPPH}$ and $IC_{50\ ABTS^+}$. The results demonstrated that the content of echinacoside was the most abundant in the upper part of Hoxylon *Cistanche deserticola*. And the lower part of Red Willow *Cistanche deserticola* was rich in total polyphenols, total flavonoids, total sugars and verbascoside, compared to the corresponding part of Hoxylon *Cistanche deserticola*. This paper lays the theoretical groundwork for the standardization and in-depth development of functional products derived from *Cistanche deserticola* from various regions.

Key words: *Cistanche deserticola*; variety; part; active ingredients; antioxidant

肉苁蓉作为中国名贵的药食同源食物之一，在《中国药典》中记录为列当科植物肉苁蓉或管花肉苁蓉干燥带鳞叶的肉质茎[1]。其中，梭梭肉苁蓉寄生在藜科植物梭梭的根部，红柳肉苁蓉寄生在怪柳科植物红柳的根部[2−3]。肉苁蓉作为一种非光合作用的寄生型植物，对生长环境的适应性强，在沙地、河床、盐碱地等胁迫条件下均能生长[4]。新疆和田作为人工种植肉苁蓉的主产区之一，肉苁蓉年产量可达 8000 吨，供应全国市场 90% 以上[5−6]。

现有研究表明，苯乙醇苷类、多糖、环烯醚萜类等是肉苁蓉的主要化学成分[7]，有报道称其中的苯乙醇苷类化合物具有抗氧化、调节肠道菌群[8]、免疫、护肝[9−10] 和神经保护功能[11−12]。FENG 等[13] 发现肉苁蓉总糖苷可抑制 HepG2 细胞线粒体呼吸和糖酵解功能，增加 ROS 水平，抑制细胞增殖。QI 等[14] 研究发现肉苁蓉中的苯乙醇苷类物质可以抑制肿瘤生长并诱导肿瘤组织凋亡和自噬。BAI 等[15] 发现肉苁蓉水提物可以减少炎症、氧化应激和细胞凋亡来减轻庆大霉素引起的大鼠肾功能障碍和结构损伤。肉苁蓉除了针对性治愈某些疾病，也被添加到茶、固体饮料、酒[16] 中作为保健食品食用[17]。保健食品市场的飞速发展带动下肉苁蓉的需求量也随之增多。

由于寄主数量减少以及野生肉苁蓉资源的稀缺，限制了肉苁蓉在市场上的推广[18]。因此，人工种植肉苁蓉成为了解决肉苁蓉资源稀缺问题的关键。但肉苁蓉受不同地理位置的气候、土壤条件及自身生长发育等因素影响，不同产地及不同部位活性成分会存在一定差异，难于区分其品质优劣。基于此，本文以新疆策勒的梭梭肉苁蓉、红柳肉苁蓉为研究对象，重点分析测定了该产区不同寄主肉苁蓉、不同部位的活性成分含量并评价其抗氧化能力，以此为肉苁蓉的深加工与产品研发提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

梭梭肉苁蓉、红柳肉苁蓉　均产于新疆和田策勒县，挑选外皮无损伤的肉苁蓉，清洗后平均分成三部分，命名为上部、中部、下部。将切分后的肉苁蓉冻干，打粉后过 60 目筛，装入密封袋中于 4 ℃ 环境储存备用；没食子酸、芦丁、原花青素、齐墩果酸、无水葡萄糖、毛蕊花糖苷、松果菊苷　标准品，上海源叶生物科技有限公司；甲醇、甲酸　国药集团化学试剂有限公司；甲醇、甲酸为色谱纯，其余试剂均为分析纯。

PL203/01 电子分析天平　梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司；TGL-16M 台式高速冷冻离心机　德国 Eppendorf 公司；DK-98-1 型电热恒温水浴锅　天津泰斯特有限公司；M200 酶标仪　奥地利 Fecan 公司；Agilent-1260 infinity Ⅱ 高效液相色谱系统　美国安捷伦公司；FD-1A-50 真空冷冻干燥机　北京博医康实验仪器有限公司；TU-1810 型紫外可见分光光度计　北京普析通用仪器有限责任公司；康拜恩冰箱　广东科龙电器股份有限公司；SYU-10-300DT 超声清洗机　郑州生元仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1　总多酚含量的测定　采用福林酚法[19] 测定总多酚含量。样品液配制：称取 0.3 g 样品，加入 30 mL 70% 乙醇，经 250 W 超声提取 30 min，4000 r/min 离心 10 min，取上清液稀释 10 倍供后续成分测定备用。取 1.0 mL 样品液，加入 5.0 mL 蒸馏水与 1.0 mL 福林酚试剂，充分混合后，再加入 3.0 mL 7.5% 碳酸钠溶液，避光静置 30 min，记录 760 nm 下的吸光度值，带入标准曲线 y=0.018x−0.0079，R^2=0.9969 计算总多酚含量，结果以没食子酸当量表示（mg GAE/g DW）。

1.2.2　总黄酮含量的测定　参考晏俊玲等[20] 的方法。取样品液 1.0 mL，加入 0.4 mL 5% 的 $NaNO_2$ 静置 6 min，加入 0.4 mL 10% 的 $Al(NO)_3$，静置 6 min，最后加入 4.0 mL 4% 的 NaOH，补充 70% 的乙醇溶液至 10 mL，静置 10 min。在 505 nm 下测定吸光度值，带入标准曲线 y=0.0069x−0.0024，R^2=0.9991 计算总黄酮含量，以芦丁当量表示（mg RE/g DW）。

1.2.3　总糖含量的测定　采用苯酚硫酸法[21] 测定总

糖含量，取肉苁蓉样品以蒸馏水配制成 0.1 mg/mL 的溶液，取样液 2.0 mL，加入 1 mL 苯酚溶液，缓慢加入 5.0 mL 浓硫酸，混匀后，100 ℃ 水浴 30 min，冷却至室温后于 490 nm 波长处测定吸光度值，蒸馏水作为空白对照。带入标准曲线 y=0.0082x−0.002，R^2=0.9993 计算总糖含量，结果以无水葡萄糖当量表示（mg DE/g DW）。

1.2.4　总三萜含量的测定　参考江绍琳等[22]的方法，取 0.4 mL 样品液于试管中，热水浴蒸干后，冷却至室温，加入 0.4 mL 5% 的香草醛-冰醋酸以及 1.6 mL 的高氯酸溶液，60 ℃ 水浴 15 min，冷却后加入 5.0 mL 乙酸乙酯，混匀后静置 15 min，于 560 nm 下测定吸光度值，带入标准曲线 y=0.048x+0.00766，R^2=0.9963 计算总三萜含量，结果以齐墩果酸当量表示（mg OAE/g DW）。

1.2.5　原花青素含量测定　采用香草醛-盐酸法[23]。取 0.5 mL 样品液，加入 3.0 mL 的 4% 香草醛-甲醇溶液和 1.5 mL 的浓盐酸，室温反应 10 min 后于 500 nm 处测定吸光度值，带入标准曲线 y=0.422x+0.0812，R^2=0.9993 计算花青素含量，结果以原花青素当量表示（mg PCE/g DW）。

1.2.6　松果菊苷与毛蕊花糖苷含量测定　参考《中华人民共和国药典》[1]（第一部）中肉苁蓉项目下的方法测定肉苁蓉中松果菊苷和毛蕊花糖苷含量。色谱柱：Alltima C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相：甲醇溶液（A）-0.1% 甲酸溶液（B）；洗脱程序为：0~17 min，26.5%A∶73.5%B；17~20 min，29.5%A∶70.5%B；20~37 min，29.5%A∶70.5%B，柱温 25 ℃，流速为 1.00 mL/min；检测波长为 330 nm；进样量为 10 μL。以物质浓度为横坐标，相应的峰面积为纵坐标，得出松果菊苷的标准曲线 y=17395.5x−11283.4，R^2=0.9999，毛蕊花糖苷的标准曲线 y=13663.1x−15072.6，R^2=0.9998。

1.2.7　抗氧化能力

1.2.7.1　DPPH 自由基清除率测定　参考 SONG 等[24]的方法。样液的配制：取 1.2 g 样品，以无水乙醇为提取溶剂，在 250 W 超声装置中超声 40 min，后于 4500 r/min 条件下离心 15 min 后配制成 40 mg/mL 的样液，留上清液备用。将上清液用无水乙醇稀释成 3、5、10、20、30、40 mg/mL 供后续测定使用。测定方法：在 96 孔板中加入 50 μL 样液及 DPPH 溶液 200 μL，混匀后避光反应 30 min，在 517 nm 波长处测定吸光度。

$$\text{DPPH自由基清除率}(\%)=\left(1-\frac{A_1-A_2}{A_0}\right)\times 100$$

式（1）

式中：A_0 为乙醇与 DPPH 溶液的吸光值；A_1 为样液与 DPPH 溶液的吸光值；A_2 为蒸馏水与样液的吸光值。

1.2.7.2　$ABTS^+$自由基清除率测定　参考 LI 等[25]的方法。将 7 mmol/L 的 ABTS 母液与 2.45 mmol/L 的过硫酸钾按 1∶1 混合后，于黑暗环境下放置 12~16 h，使用前用无水乙醇稀释至在 735 nm 处吸光度为 0.7±0.20，即为 ABTS 工作液。在 96 孔板中加入 50 μL 样液及 ABTS 工作液 200 μL，混匀后室温反应 10 min，在 735 nm 波长处测定吸光度。

$$ABTS^+\text{自由基清除率}(\%)=\left(1-\frac{A_1-A_2}{A_0}\right)\times 100$$

式（2）

式中：A_0 为乙醇与 $ABTS^+$溶液的吸光值；A_1 为样液与 $ABTS^+$溶液的吸光值；A_2 为蒸馏水与样液的吸光值。

1.3　数据处理

所有实验均重复三次进行，结果表示为平均值±标准差。使用 GraphPad Prism 9.5 和 SPSS Statistics 27 软件进行作图与数据分析，使用单因素方差分析对结果进行分析。

2　结果与分析

2.1　肉苁蓉不同品种及部位的总多酚含量

酚类化合物是植物次生代谢产物中的一类生物活性物质，其广泛存在于植物中。如图 1 所示，从不同部位活性成分差异分析来看，梭梭肉苁蓉各部位总多酚含量差异显著（P<0.05），红柳肉苁蓉各部位总多酚含量则无显著差异，其中梭梭肉苁蓉上部总多酚含量最高为 27.90 mg GAE/g DW，梭梭肉苁蓉中部总多酚含量最低为 14.43 mg GAE/g DW。从品种间活性成分差异分析来看，红柳肉苁蓉各部位总多酚含量较高，其上、中、下各部位总多酚含量分别是梭梭肉苁蓉相应部位的 1.36、2.66、2.47 倍。

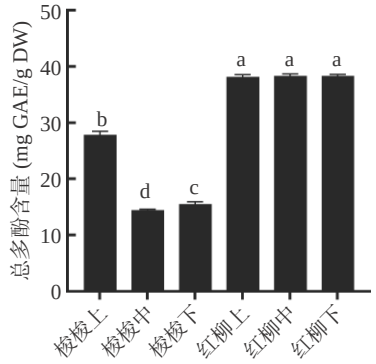


图 1　肉苁蓉不同品种及部位的总多酚含量

Fig.1　Total polyphenol content of different species and parts of *Cistanche deserticola*

注：图中不同字母表示组间差异显著（P<0.05）；图 2~图 9 同。

2.2　肉苁蓉不同品种及部位的总黄酮含量

图 2 为梭梭、红柳肉苁蓉不同部位总黄酮含量。由图可知，红柳肉苁蓉上部、中部、下部的总黄酮含量存在显著差异（P<0.05）。红柳下部总黄酮含量为 35.61 mg RE/g DW，分别是红柳中、上部的

1.66、3.30 倍。而梭梭肉苁蓉上、中、下部总黄酮含量分别为 3.25、1.99、2.52 mg RE/g DW，且均显著低于红柳肉苁蓉相应部位的总黄酮含量（P<0.05）。分析原因可能是肉苁蓉不同部位成分的差异可能与肉苁蓉的寄主有关，也可能是受种植土壤的微生物群落、矿物质含量影响[26]。牛玉清等[27] 对新疆塔克拉玛干沙漠 6 个产地的管花肉苁蓉的成分含量进行了分析，发现肉苁蓉根部中的总多酚、总黄酮含量显著高于中部、上部。这与本文研究结果一致。

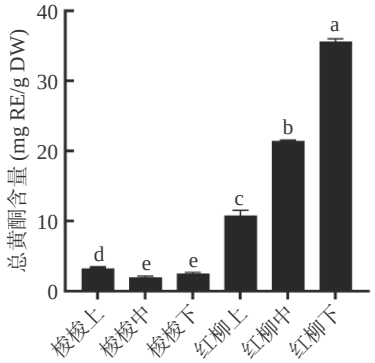


图 2 肉苁蓉不同品种及部位的总黄酮含量

Fig.2 Total flavonoid content of different species and parts of *Cistanche deserticola*

2.3 肉苁蓉不同品种及部位的总糖含量

图 3 表明，红柳肉苁蓉上、中、下部总糖含量存在显著差异（P<0.05），上、中、下部总糖含量依次升高，分别为 56.00、61.11、72.10 mg DE/g DW。梭梭肉苁蓉不同部位间总糖含量差异不显著，含量为 14.16~15.70 mg DE/g DW，且各部位总糖含量均显著低于红柳肉苁蓉相应部位总糖含量（P<0.05）。

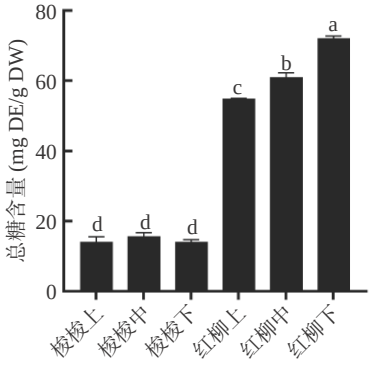


图 3 肉苁蓉不同品种及部位的总糖含量

Fig.3 Total sugar content of different species and parts of *Cistanche deserticola*

2.4 肉苁蓉不同品种及部位的总三萜含量

由图 4 可知，两种样品下部位的总三萜含量均显著高于中部和上部（P<0.05），其中梭梭下部总三萜含量最高为 6.75 mg OAE/g DW。红柳下部的总三萜含量（4.59 mg OAE/g DW）分别是中部、上部的 1.18、1.13 倍。从各部位总三萜含量可以看出，梭梭肉苁蓉总三萜含量显著高于红柳肉苁蓉（P<0.05）。

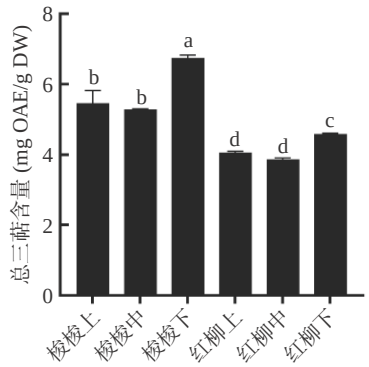


图 4 肉苁蓉不同品种及部位的总三萜含量

Fig.4 Total triterpene content of different species and parts of *Cistanche deserticola*

2.5 肉苁蓉不同品种及部位的原花青素含量

如图 5 所示，梭梭与红柳样品不同部位间的原花青素含量均存在着显著差异（P<0.05）。梭梭肉苁蓉各部位原花青素含量为：梭梭下部（0.546 mg PCE/g DW）>梭梭上部（0.423 mg PCE/g DW）>梭梭中部（0.233 mg PCE/g DW）；红柳肉苁蓉各部位原花青素含量为：红柳下部（0.498 mg PCE/g DW）>红柳中部（0.447 mg PCE/g DW）>红柳上部（0.352 mg PCE/g DW）；梭梭肉苁蓉除中部原花青素含量显著低于红柳肉苁蓉外，其余部位原花青素含量均显著高于红柳肉苁蓉（P<0.05）。

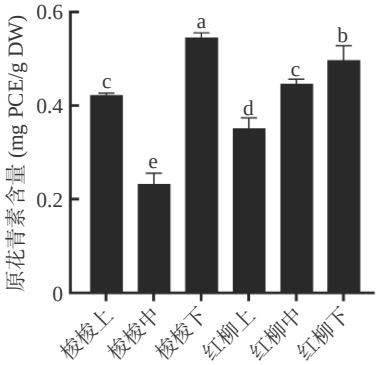


图 5 肉苁蓉不同品种及部位的原花青素含量

Fig.5 Proanthocyanidin content of different species and parts of *Cistanche deserticola*

2.6 肉苁蓉不同品种及部位的毛蕊花糖苷含量

图 6 表明，红柳样品的毛蕊花糖苷含量显著高于梭梭样品（P<0.05），红柳样品和梭梭样品各部位间的毛蕊花糖苷含量差异明显，含量由高到低依次为：红柳下部（265.81 mg/g DW）>红柳中部（168.39 mg/g DW）>红柳上部（61.76 mg/g DW）>梭梭下部（59.74 mg/g DW）>梭梭上部（55.06 mg/g DW）>梭梭中部（35.89 mg/g DW）。

2.7 肉苁蓉不同品种及部位的松果菊苷含量

图 7 为肉苁蓉不同部位的松果菊苷含量。各样品间松果菊苷含量差异也较显著（P<0.05），梭梭肉苁蓉上部松果菊苷含量最高、下部最低，红柳肉苁蓉松果菊苷含量则与之相反，其中梭梭肉苁蓉上部松果菊

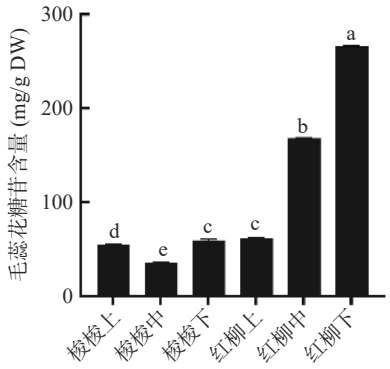


图 6　肉苁蓉不同品种及部位的毛蕊花糖苷含量

Fig.6　Verbascoside content of different species and parts of *Cistanche deserticola*

苷含量最高为 92.93 mg/g DW，分别是红柳肉苁蓉各部位（40.78~57.68 mg/g DW）的 2.27、2.11、1.61 倍；但梭梭肉苁蓉中部和下部松果菊苷含量显著低于红柳肉苁蓉中部和下部松果菊苷含量（P<0.05）。

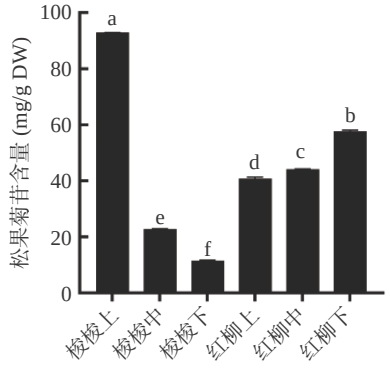


图 7　肉苁蓉不同品种及部位的松果菊苷含量

Fig.7　Echinacoside content of different species and parts of *Cistanche deserticola*

赵岩等[28]对青海管花肉苁蓉不同部位的松果菊苷和毛蕊花糖苷含量进行测定发现，样品根部的毛蕊花糖苷（13.31 mg/g DW）、松果菊苷（79.12 mg/g DW）显著高于中部和顶部。向铃等[29]采用高效液相色谱法对荒漠肉苁蓉、管花肉苁蓉中的毛蕊花糖苷、松果菊苷含量进行了分析，发现管花肉苁蓉含量多于荒漠肉苁蓉，并提出样品的体态和生长年限也可导致成分含量的差异。刘海民等[30]收集不同产地的荒漠肉苁蓉并将样品划分成根部、中部、顶部并分析毛蕊花糖苷和松果菊苷含量，结果表明不同产地样品的成分含量有显著差异，其中根部的毛蕊花糖苷成分含量最为丰富，样品顶部含量最少，松果菊苷含量则相反。这与本文研究结果一致。

2.8　抗氧化活性

2.8.1　DPPH 自由基清除活性　使用 DPPH 法与 ABTS$^+$法来评价两种肉苁蓉各部位的抗氧化活性。由图 8 可见，两种肉苁蓉均表现出一定的 DPPH 自由基清除能力，红柳肉苁蓉的清除能力较强。红柳肉苁蓉上、中、下部位的 IC_{50} 值分别为 9.94、6.57 和 5.95 mg/mL。梭梭肉苁蓉也表现出较好的自由基清除能力，梭梭下部 IC_{50} 值为 7.15 mg/mL，梭梭上部、中部的清除能力最弱（IC_{50} 值分别为 12.14、10.32 mg/mL）。

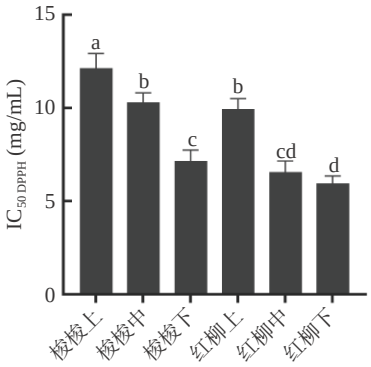


图 8　肉苁蓉不同品种及部位的 DPPH 自由基清除率（IC_{50}）

Fig.8　DPPH radical scavenging rate (IC_{50}) of different species and parts of *Cistanche deserticola*

2.8.2　ABTS$^+$自由基清除活性　如图 9 所示，两种肉苁蓉对 ABTS$^+$自由基的清除能力有显著差异（P<0.05）。红柳肉苁蓉中部、下部的清除能力最强，IC_{50} 值分别为 3.53、3.28 mg/mL，表明红柳肉苁蓉有较强的 ABTS$^+$自由基清除活性。梭梭中、下部（IC_{50} 值分别为 5.42、5.19 mg/mL）与红柳中、下部差异显著（P<0.05），梭梭上部的清除能力最弱，其 IC_{50} 值为 6.81 mg/mL，表明梭梭肉苁蓉对 ABTS$^+$自由基清除能力弱于红柳肉苁蓉。

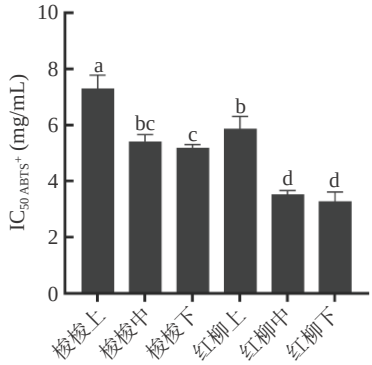


图 9　肉苁蓉不同品种及部位的 ABTS$^+$自由基清除率（IC_{50}）

Fig.9　ABTS$^+$ radical scavenging rate (IC_{50}) of different species and parts of *Cistanche deserticola*

2.9　相关性分析

如图 10 所示，总多酚含量与总糖含量呈显著正相关（P<0.05），与总三萜含量呈显著负相关（P<0.05）；总黄酮含量与总糖含量、毛蕊花糖苷含量分别呈显著正相关（P<0.05）和极显著正相关（P<0.01）；毛蕊花糖苷含量与总糖含量呈显著正相关（P<0.05）；$IC_{50\ ABTS^+}$与毛蕊花糖苷含量呈显著负相关（P<0.05）；$IC_{50\ DPPH}$、$IC_{50\ ABTS^+}$与总多酚含量、总黄酮含量、原花青素含量、总糖含量、毛蕊花糖苷含量均呈负相关，表明肉苁蓉抗氧化活性受总多酚含量、总黄酮含量、原花青素含量、总糖含量、毛蕊花糖苷含量影响。

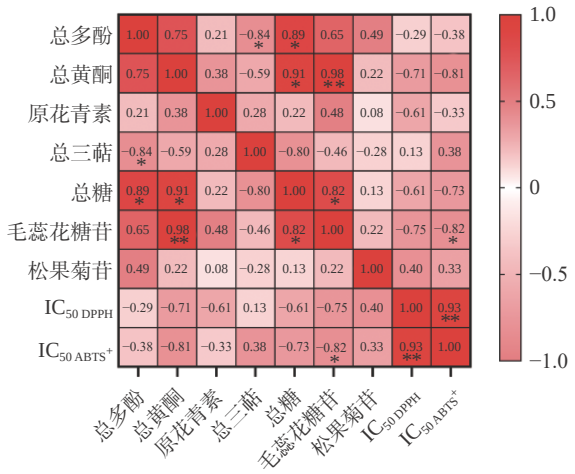


图 10 肉苁蓉活性成分与抗氧化能力的相关性分析

Fig.10 Correlation analysis between active components and antioxidant capacity of *Cistanche deserticola*

注: *表示显著相关(P<0.05), **表示极显著相关(P<0.01)。

3 讨论与结论

本研究对新疆和田地区收获的不同品种肉苁蓉的不同部位的活性成分进行比较分析, 结果表明, 不同品种肉苁蓉的不同部位中活性成分含量均较为丰富。红柳肉苁蓉下部的总黄酮、总糖、毛蕊花糖苷含量最高, 中部、上部的含量依次递减, 梭梭肉苁蓉下部的总三萜、原花青素以及上部的松果菊苷含量最多, 红柳肉苁蓉总多酚含量整体高于梭梭肉苁蓉。刘海民等[30] 对不同产地荒漠肉苁蓉不同部位的活性成分进行测定, 分析发现荒漠肉苁蓉根部的总多酚、总黄酮、总三萜含量相对丰富于中部、上部。赵岩等[28] 在对管花肉苁蓉的研究中也发现了相似的结果, 这也与本文的研究结果一致。此外, 先前的研究表明, 日照时间及温度对果蔬中糖含量的积累起重要作用[31−33], 新疆和田地区作为典型的内陆干旱区, 属于荒漠性气候, 昼夜温差极大, 平均可达 32.7 ℃[34]。独特的环境条件促使果蔬中糖含量的提升, 这也是本文中肉苁蓉糖含量丰富的原因。原花青素广泛存在于自然界中, 与果蔬、花卉的颜色相关联, 一般聚集在植物的果实、种子中, 根、茎、叶中含量较少[35−36]。本研究使用的梭梭、红柳两种肉苁蓉切片后, 由两种肉苁蓉切片颜色来看均为白色, 不具有高原花青素含量果蔬的特征, 可见两种肉苁蓉不同部位的原花青素含量较少。此外, 姬晓惠等[37] 采集新疆古尔班通古特沙漠的肉苁蓉样品, 分为茎上部、茎中部、茎下部, 分析发现茎上部的松果菊苷含量最多, 茎下部的毛蕊花糖苷含量相对丰富。本研究中, 红柳肉苁蓉的毛蕊花糖苷含量整体高于梭梭肉苁蓉, 而梭梭肉苁蓉上部的松果菊苷含量显著高于其他部位(P<0.05), 这与前人的结果一致。推测与肉苁蓉的生长及营养成分运输、寄主植物的特性有关, 但具体机制仍需进一步研究。

综上, 本文研究了新疆梭梭肉苁蓉、红柳肉苁蓉两个品种不同部位的活性成分及其抗氧化能力, 结果表明, 红柳肉苁蓉总多酚、总黄酮、总糖、毛蕊花糖苷含量与梭梭肉苁蓉相比更为丰富, 均是在红柳肉苁蓉的下部含量最多, 中部、上部含量则依次递减。梭梭肉苁蓉总三萜、松果菊苷含量总体较红柳肉苁蓉高, 其中梭梭肉苁蓉下部含总三萜最多、上部含松果菊苷最多。此外, 两种肉苁蓉的不同部位均能表现出较好的自由基清除能力, 其中下部的清除能力强于其他部位。本研究可以为新疆人工种植肉苁蓉食品的深加工与研发提供参考。

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

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020. [National Pharmacopoeia Committee. Chinese pharmacopoeia[M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020.]

[2] 张艳文, 韩文凯, 娜仁, 等. 肉苁蓉及一种常见地方习用品的生药学研究[J]. 时珍国医国药, 2023, 34(7): 1652−1656. [ZHANG Y W, HAN W K, NA R, et al. Pharmacognosy study of *Cistanche* and a common local practice[J]. Shi Zhen Chinese Medicine, 2023, 34(7): 1652−1656.]

[3] 彭旭阳, 陈君然, 崔瀚元, 等. 基于 GC-IMS 分析新疆不同寄主肉苁蓉挥发性物质[J]. 食品工业科技, 2024, 45(9): 272−279. [PENG X Y, CHEN J R, CUI H Y, et al. Analysis of volatile substances in different host *Cistanche* in Xinjiang based on GC-IMS [J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(9): 272−279.]

[4] SUN X, ZHANG L, PEI J, et al. Regulatory relationship between quality variation and environment of in three ecotypes based on soil microbiome analysis[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 6662.

[5] 吴明, 沈飞. 新疆肉苁蓉产业发展现状及对策[J]. 新疆林业, 2022(3): 24−26. [WU M, SHEN F. Industry development status and countermeasures of *Cistanche* in Xinjiang[J]. Xinjiang Forestry, 2022(3): 24−26.]

[6] 尼加提·图尔迪麦麦提, 米合热古丽·库尔班, 马挺军. 肉苁蓉的资源概括和营养保健特性研究进展[J]. 食品工业, 2023, 44(10): 280−283. [NIGATI T E D M T, MIHEZEGURI K E B, MA T J. Review on resources and nutritional and health properties of *Cistanche deserticola*[J]. Food Industry, 2023, 44(10): 280−283.]

[7] WANG F, ZHUO B, WANG S, et al. Atriplex canescens: A new host for *Cistanche deserticola*[J]. Heliyon, 2021, 7(6): e07368.

[8] LI Y, ZHANG Y, SU X, et al. Effects of two kinds of extracts of *Cistanche deserticola* on intestinal microbiota and its metabolism[J]. Foods, 2022, 11(18): 2897.

[9] 王富江, 屠鹏飞, 曾克武, 等. 荒漠肉苁蓉总苷对酒精性肝损伤小鼠的保护作用研究[J]. 药学学报, 2021, 56(9): 2528−2535. [WANG F J, TU P F, ZENG K W, et al. Protective effect of total *Cistanche glycosides* on alcoholic liver injury in mice[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2021, 56(9): 2528−2535.]

[10] WANG H C, LI Y Y, BIAN Y F, et al. Potential hepatoprotective effects of *Cistanche deserticola* Y. C. Ma: Integrated phytochemical analysis using UPLC-Q-TOF-MS/MS, target network analysis, and experimental assessment[J]. Frontiers in Pharmacology, 2022, 13: 1018572.

[11] 王璐, 白雨朦, 李晓宇, 等. 肉苁蓉总苷对阿尔茨海默病模型大鼠学习认知功能和氧化应激的影响[J]. 解剖学杂志, 2020,

43(3)：194−199,275.［WANG L, BAI Y M, LI X Y, et al. Effects of total *Cistanche glycosides* on learning cognitive function and oxidative stress in Alzheimer's disease model rats[J]. Journal of Anatomy, 2020, 43(3)：194−199,275.］
［12］CHOI J G, MOON M, JEONG H U, et al. Cistanches Herba enhances learning and memory by inducing nerve growth factor[J]. Behav Brain Res, 2011, 216(2)：652−628.
［13］FENG D, ZHOU S Q, ZHOU Y X, et al. Effect of total glycosides of *Cistanche deserticola* on the energy metabolism of human HepG2 cells[J]. Front Nutr, 2023, 10：1117364.
［14］QI X, HOU X, SU D, et al. Effect of phenylethanol glycosides from *Cistanche tubulosa* on autophagy and apoptosis in H22 tumor-bearing mice[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2022, 2022：3993445.
［15］BAI R, FAN J, WANG Y, et al. Protective effect of *Cistanche deserticola* on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats[J]. Chin Herb Med, 2023, 15(1)：102−109.
［16］李建辉，黄家扬，卫世乾. 复方肉苁蓉保健酒的制备工艺研究[J]. 河南农业，2023(15)：60−61.［LI J H, HUANG J Y, WEI S Q. Study on preparation technology of compound *Cistanche* health wine[J]. Henan Agriculture, 2023(15)：60−61.］
［17］XU R, CHEN J, CHEN S L, et al. Ma cultivated as a new crop in China[J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2009, 56(1)：137−142.
［18］JIANG L, ZHOU B, WANG X, et al. The quality monitoring of Cistanches Herba (*Cistanche deserticola* Ma)：A value chain perspective[J]. Front Pharmacol, 2021, 12：782962.
［19］刘琦. 大孔树脂对短梗五加多酚的纯化效果及多酚的抗疲劳作用研究[J]. 保鲜与加工，2020, 20(4)：171−177.［LIU Q. Purification effect of macroporous resin on *Acanthopanax sessiliflorus* polyphenols and anti-fatigue effect of polyphenols[J]. Preservation and Processing, 2020, 20(4)：171−177.］
［20］晏俊玲，樊扬，秦川，等. 苦竹笋总黄酮大孔树脂纯化工艺及其体外抗炎活性研究[J]. 食品与发酵工业，2020, 46(23)：184−192.［YAN J L, FAN Y, QIN C, et al. Study on purification process of total flavonoids from bamboo shoots with macroporous resin and its anti-inflammatory activity *in vitro*[J]. Food and Fermentation Industry, 2020, 46(23)：184−192.］
［21］邹月. 莼菜酶解多糖的制备及其在酸奶中的应用研究[D]. 成都：西华大学，2022.［ZOU Y. Preparation of enzymatically hydrolyzed polysaccharide from water shield and its application in yogurt[D]. Chengdu：Xihua University, 2022.］
［22］江绍琳，江绍玫，曾令聪. 分光光度法快速测定灵芝中总三萜含量[J]. 江西农业大学学报，2006(4)：634−636.［JIANG S L, JIANG S M, ZENG L C. Rapid determination of total triterpenoids in *Ganoderma lucidum* by spectrophotometry[J]. Journal of Jiangxi Agricultural University, 2006(4)：634−636.］
［23］谭永鹏，李映伟，程建华. 超声细胞破碎法提取黑果枸杞原花青素[J]. 食品工业，2021, 42(12)：26−31.［TAN Y P, LI Y W, CHENG J H. Extraction of proanthocyanidins from *Lycium barbarum* by ultrasonic cell fragmentation[J]. Food Industry, 2021, 42(12)：26−31.］
［24］SONG H F, ZHANG Q B, ZHANG Z S, et al. *In vitro* antioxidant activity of polysaccharides extracted from *Bryopsis plumosa*[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80(4)：1057−1061.
［25］LI W, ZHANG Y, DENG H, et al. *In vitro* and *in vivo* bioaccessibility, antioxidant activity, and color of red radish anthocyanins as influenced by different drying methods[J]. Food Chem X, 2023, 18：100633.
［26］MIAO Y, ZHANG X, PEI J, et al. Adaptive bacterial and fungal matching between a parasitic plant and its host：A case of *Cistanche deserticola* and *Haloxylon ammodendron*[J]. Industrial Crops and Products, 2023, 191：115932.
［27］牛玉清，赵岩，于鑫淼，等. 新疆管花肉苁蓉生物活性物质及产地差异分析[J]. 轻工学报，2022, 37(6)：25−33.［NIU Y Q, ZHAO Y, YU X M, et al. Analysis of bioactive substances and origin differences of *Cistanche tubulosa* in Xinjiang[J]. Journal of Light Industry, 2022, 37(6)：25−33.］
［28］赵岩，于鑫淼，魏玉萍，等. 青海管花肉苁蓉不同部位的功能性成分及其抗氧化活性[J]. 食品工业科技，2022, 43(11)：318−325.［ZHAO Y, YU X M, WEI Y P, et al. Functional components and antioxidant activities of different parts of *Cistanche tubulosa*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(11)：318−325.］
［29］向玲，梅小乐，罗华秀，等. 不同种、产地、生长期的肉苁蓉中苯乙醇苷类含量比较[J]. 食品工业，2022, 43(9)：124−129.［XIANG L, MEI X L, LUO H X, et al. Comparison of phenylethanol glycosides in *Cistanche deserticola* of different species, places and growing periods[J]. Food Industry, 2022, 43(9)：124−129.］
［30］刘海民，赵岩，于鑫淼，等. 我国不同产地荒漠肉苁蓉品质分析及其综合评价[J]. 食品工业科技，2023, 44(8)：341−350.［LIU H M, ZHAO Y, YU X M, et al. Quality analysis and comprehensive evaluation of *Cistanche deserticola* from different origins in China[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(8)：341−350.］
［31］白鹏威，邹志荣，杨振超，等. 不同温度和光照处理对番茄果实不同部位糖含量的影响[J]. 西北农业学报，2010, 19(3)：184−187.［BAI P W, ZOU Z R, YANG Z C, et al. Effects of different temperature and light treatments on sugar content in different parts of tomato fruit[J]. Acta Agriculturae Sinica of Northwest China, 2010, 19(3)：184−187.］
［32］任雷，邹志荣，李鹏飞. 不同温度对甜瓜糖分积累与蔗糖代谢酶的影响[J]. 北方园艺，2010(7)：12−16.［REN L, ZOU Z R, LI P F. Effects of different temperature on sugar accumulation and sucrose metabolism enzymes in melon[J]. Northern Horticulture, 2010(7)：12−16.］
［33］王会鱼，王国霞，李春阁，等. 不同产地灰枣中主要活性成分比较分析[J]. 安徽农业科学，2019, 51(11)：152−155,165.［WANG H Y, WANG G X, LI C G, et al. Comparative analysis of main active components in ash jujube from different producing areas[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2019, 51(11)：152−155,165.］
［34］许红军，李彦荣，崔拥民，等. 新疆和田沙漠腹地日光温室环境测试与分析[J]. 农业工程学报，2018, 34(S1)：60−65.［XU H J, LI Y R, CUI Y M, et al. Test and analysis of solar greenhouse environment in the hinterland of Hotan Desert, Xinjiang[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2018, 34(S1)：60−65.］
［35］王芳，陈梦颖，李晓怡，等. 原花青素的食用安全性研究进展[J]. 沈阳药科大学学报，2023, 40(10)：1394−1400.［WANG F, CHEN M Y, LI X Y, et al. Research progress on food safety of proanthocyanidins[J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 2023, 40(10)：1394−1400.］
［36］ZHAO Y, JIANG C, LU J, et al. Research progress of proanthocyanidins and anthocyanidins[J]. Phytotherapy Research, 2023, 37(6)：2552−2577.
［37］姬晓慧，李鸿辉，李桂芳，等. 新疆古尔班通古特沙漠不同地区荒漠肉苁蓉功效物质评价[J]. 广东农业科学，2018, 45(10)：112−117.［JI X H, LI H H, LI G F, et al. Evaluation of functional substances of *Cistanche deserticola* in different areas of the Gurbantünggüt Desert in Xinjiang[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2018, 45(10)：112−117.］

李嘉灏, 曾瑶英, 熊玉帛, 等. 基于 HS-SPME-GC-MS 及电子舌对预制梅菜扣肉关键性风味与过熟味评价分析 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 234−245. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110208
LI Jiahao, ZENG Yaoying, XIONG Yubo, et al. Evaluation and Analysis of Key Flavor and Warmed-over Flavor of Pre-prepared Steamed Pork with Preserved Vegetable Based on HS-SPME-GC-MS Combined with Electronic Tongue[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 234−245. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110208

· 分析检测 ·

基于 HS-SPME-GC-MS 及电子舌对预制梅菜扣肉关键性风味与过熟味评价分析

李嘉灏[1,2], 曾瑶英[1,2], 熊玉帛[1,2], 佘杰海[1,2], 余焯均[1,2], 郭航宇[3], 熊　雯[4], 龚　林[4], 周文化[1,2,*]
（1.特医食品加工湖南省重点实验室, 湖南长沙 410004;
2.中南林业科技大学食品科学与工程学院, 湖南长沙 410004;
3.湖南口味王食品有限公司, 湖南益阳 415300;
4.湖南省嘉品嘉味生物科技有限公司, 湖南津市 415600）

摘　要: 为探究预制梅菜扣肉关键性风味特征以及油脂氧化程度对其过熟味（warmer-over flavor，WOF）的影响，以不同品牌预制梅菜扣肉为研究对象，采用顶空固相微萃取气相色谱质谱联用技术（headspace-solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry，HS-SPME-GC-MS）和电子舌定量检测挥发性风味化合物及味觉指标方法，通过气味活度值（odor activity value，OAV）及主成分分析对预制梅菜扣肉关键性风味因子进行筛选及分析，采用酸价、过氧化值及 TBA 值分析其油脂氧化程度及其过熟味。结果表明，7 种预制梅菜扣肉共鉴定出 85 种挥发性化合物，预制梅菜扣肉关键性风味物质为：烷烃类 16 种、萜烯类 19 种、醇类 7 种、醛类 22 种、酮类 3 种、酯类 13 种、酚类 3 种、其他类 2 种；OAV 共筛选出 23 种关键挥发性化合物，预制梅菜扣肉关键性风味物质：OAV>10 的物质分别为 1-辛烯-3-醇、己醛、庚醛、辛醛、壬醛、(E,E)-2,4-壬二烯醛、癸醛、(E)-2-癸烯醛、(E,E)-2,4-癸二烯醛、1-辛烯-3-酮。电子舌及过熟味感官评价结果表明，7 种预制梅菜扣肉味觉以咸味、鲜味及鲜味回味为主；其过熟味主要呈现出亚麻籽油味和酸败味。7 种预制梅菜扣肉油脂氧化指标较高且差异显著（$P<0.05$），结合相关性分析，产生过熟味的主要因子物质 (E)-2-癸烯醛、2-庚酮、壬醛、1-辛烯-3-酮、(E,E)-2,4-癸二烯醛、己醛、戊醛、庚醛、(E)-2-庚烯醛及辛醛与酸价、过氧化值及 TBA 值呈正相关。综上所述，7 种预制梅菜扣肉其关键风味因子与过熟味之间存在较大联系，且推测预制梅菜扣肉过熟味的产生与其油脂氧化程度较高有关。本研究获得的关键风味因子物质、电子舌味觉指标及过熟味感官评价指标，为预制梅菜扣肉风味质量体系的建立及过熟味控制的研究提供了依据。

关键词: 预制梅菜扣肉, HS-SPME-GC-MS, 电子舌, OAV, 关键性风味, 过熟味
中图分类号: TS251.7　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2024)21−0234−12
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110208
本文网刊:

Evaluation and Analysis of Key Flavor and Warmed-over Flavor of Pre-prepared Steamed Pork with Preserved Vegetable Based on HS-SPME-GC-MS Combined with Electronic Tongue

LI Jiahao[1,2], ZENG Yaoying[1,2], XIONG Yubo[1,2], SHE Jiehai[1,2], YU Zhuojun[1,2], GUO Hangyu[3], XIONG Wen[4], GONG Lin[4], ZHOU Wenhua[1,2,*]
（1.Hunan Key Laboratory of Processed Food for Special Medical Purpose, Changsha 410004, China;
2.College of Food Science and Engineering, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China;

收稿日期: 2023−11−21
基金项目: 长沙市科技计划重大专项（kh2301028）; 长沙市自然科学基金项目（kq2014150）; 湖南省创新引领计划（2021GK4022, 2021GK4024）。
作者简介: 李嘉灏（1998−）, 男, 硕士, 研究方向: 食品加工技术与品质控制, E-mail: Li1030943625@163.com。
*** 通信作者:** 周文化（1969−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 农产品加工与贮藏, E-mail: 1479674265@qq.com。

3.Kouweiwang Food Limited Company of Hunan Province, Yiyang 415300, China；
4.Jiapin Jiawei Biotechnology Limited Company of Hunan Province, Jinshi 415600, China）

Abstract: In order to study the key flavor characteristics and the influence of oxidation degree of oil on warmed-over flavor of pre-prepared steamed pork with preserved vegetable. The volatile flavor compounds and taste indexes of different brands of pre-prepared steamed pork with preserved vegetable were quantitatively detected by headspace-solid phase micro-extraction-gas chromatography-mass spectrometry and electronic tongue. The key flavor factors of pre-prepared steamed pork with preserved vegetable were screened and analyzed by odor activity value (OAV) and principal component analysis. Acid value, peroxide value and TBA value were used to analyze the oxidation degree of oil and warmed-over flavor of different brands of pre-prepared steamed pork with preserved vegetable. Results showed that a total of 85 volatile compounds were identified from 7 kinds of pre-prepared steamed pork with preserved vegetable, including 16 alkanes, 19 terpenes, 7 alcohols, 22 aldehydes, 3 ketones, 13 esters, 3 phenols and 2 others. A total of 23 key volatile compounds were screened by OAV, and the substances with OAV>10 were 1-octene-3-ol, hexanal, heptanal, octanal, nonanal, (E,E)-2,4-nonadienal, capric aldehyde, (E)-2-decenal, (E,E)-2,4-decenal and 1-octene-3-ketone, which were the key flavor substances for pre-prepared steamed pork with preserved vegetable. The results of electronic tongue and overripe taste evaluation showed that the taste of 7 kinds of pre-prepared steamed pork with preserved vegetable were mainly salty, umami and aftertaste. Its overripe taste mainly presented linseed oil taste and rancidity taste. The oil oxidation indexes of 7 kinds of pre-prepared steamed pork with preserved vegetable were higher and the differences were significant (P<0.05). The correlation analysis showed that the main factors that produce warmed-over flavor were (E)-2-decenal, 2-heptanone, nonylaldehyde, 1-octene-3-ketone, (E,E)-2,4-decenal, hexal, pentaldehyde, heptanal, (E)-2-heptenal and octanal, which were positively correlated with acid value, peroxide value and TBA value. In summary, the key flavor factors of the 7 kinds of pre-prepared steamed pork with preserved vegetable were related to overcooked taste, and it was speculated that the overcooked taste of pre-prepared steamed pork with preserved vegetable was related to the higher oxidation degree of oil. The key flavor factors, electronic tongue and overripe taste evaluation indexes obtained in this study provide the basis for the establishment of flavor quality system and overripe taste control of pre-prepared steamed pork with preserved vegetable.

Key words: pre-prepared steamed pork with preserved vegetable; HS-SPME-GC-MS; electronic tongue; OAV; key flavor; warmed-over flavor

梅菜扣肉（steamed pork with preserved vegetable），是一道中华民族民间传统菜肴，因其肉质软烂、肥而不腻、风味独特等特点，深受广大消费者喜爱[1−2]。但由于梅菜扣肉制作工艺繁琐、耗时耗力，往往只在节日或宴席上出现。近年来，随着食品工业化进程以及生产技术的提升，同时在“后疫情时代”、“宅经济”、“懒人经济”等现象带动下，预制菜迎来井喷式发展[3]，因其贮藏期长且食用便捷，极大满足且丰富了食客日常用餐需求[4−5]。但预制菜往往因风味不佳得不到消费者的青睐，其风味劣变的原因较为复杂，主要原因是预制菜在生产、贮藏和复热过程中，脂肪会氧化均裂生成己醛、庚醛、癸醛、1-辛烯-3-醇等物质，浓度高时呈现酸败味或令人恶心等气味，这些异味常被称作过熟味（warmer-over flavor, WOF），导致预制菜风味劣变[6−10]。目前国内也逐渐重视过熟味的研究，杨姣等[11]研究发现鱼糜制品在温度过高和时间过长会产生过熟味，张凯华等[12−13]研究发现猪耳朵制品和预制猪肉饼在不同复热条件和时间下产生的过熟味含量不同，适当的复热条件可降低过熟味关键因子含量。因此在预制菜加工过程中除了生产、保鲜技术的提升，还应重点关注其风味的变化，但目前国内外对于预制梅菜扣肉风味及过熟味的研究报道较为鲜见。

目前分析食品风味的技术主要有顶空固相微萃取气质联用和电子舌等，顶空固相微萃取结合气相色谱质谱联用技术（headspace-solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry, HS-SPME-GC-MS）具有样本需求量小、操作简便、灵敏度高等优点[14]，可用于检测挥发性有机物，广泛应用于茶叶[15]、火腿[16]、大豆油[17]、剁辣椒[18]、食醋[19]、饼干[20]等食品领域挥发性风味成分的鉴定中；电子舌（electronic tongue）可快速、无损对食品进行检测分析，在食品行业应用广泛[21]。食品的风味是由气味和滋味相互搭配而成，GC-MS 结合电子舌可以更好地评价食品的整体风味；气味活度值（odor activity value, OAV）是挥发性物质浓度与其阈值的比值，通过结合 GC-MS 可用于评价挥发性物质对整体风味的贡献[11]，但在预制菜领域上的研究未全面应用。

本试验以市售不同品牌预制梅菜扣肉为研究对象，通过顶空固相微萃取气相色谱质谱联用仪技术检测其挥发性有机物、感官评价、电子舌作为风味检测手段，结合 OAV、主成分分析及聚类分析确定预制梅菜扣肉关键性挥发性成分及过熟味物质种类。同时结合酸价、过氧化值及 TBA 值探究梅菜扣肉脂肪氧化程度与过熟味关键因子之间关联性，以期为预制梅菜扣肉风味质量体系的建立及过熟味控制的研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

冷藏预制梅菜扣肉(生产日期均为同一天) 市售超市,冷链运输至中南林业科技大学后 4 ℃ 保存,具体信息见表 1;冰乙酸、异辛烷、碘化钾、硫代硫酸钠、重铬酸钾、异丙醇、乙醚、甲基叔丁基醚、95% 乙醇、酚酞、百里香酚酞、碱性蓝 6B、无水硫酸钠、无水乙醚、石油醚 湖南国伦美生物科技有限公司。

表 1 不同品牌预制梅菜扣肉信息

Table 1 Information of different brands of pre-prepared steamed pork with preserved vegetable

品牌	产地	配料	外观
HBS	山东	五花肉、梅干菜、食用植物油、食用盐、味精、酿造酱油(含焦糖色)、香辛料	
NLE	湖南	猪肉、梅干菜、辣椒、食用盐、白砂糖、蚝油、饮用水、酿造酱油(含焦糖色)、黄豆酱、料酒、香辛料、食品添加剂(谷氨酸钠、乳酸链球菌素、红曲红)	
WS	广东	带皮猪肉、梅干菜、食用盐、豆豉、味精、大豆油、酿造酱油(含焦糖色)、调味料酒、香辛料、食品添加剂(辣椒红)、食用香精香料	
CZT	湖北	五花肉、梅干菜、酿造酱油(含焦糖色)、黄酒、味精、食用盐、白砂糖、香辛料	
YR	安徽	猪肉、梅干菜、水、酿造酱油(含焦糖色)、黄酒(含焦糖色)、白砂糖、食用盐、食用葡萄糖、浓香型白酒、生姜、味精、香葱	
CCX	湖南	五花肉、梅干菜、辣椒、蚝油、酿造酱油(含焦糖色)、豆豉、味精、食用盐、白砂糖、香辛料	
CCL	湖南	五花肉、梅干菜、辣椒、蚝油、酿造酱油(含焦糖色)、味精、食用盐、白砂糖、香辛料、食用香精	

08-2T 恒温磁力搅拌器 上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司;57330-U 固相微萃取装置 美国 Supelco 公司;DH-360AB 电热恒温培养箱 北京中兴伟业仪器有限公司;57348-U 固相微萃取针(50/30 μm DVB/CAR/PDMS) 美国 Supelco 公司;7890A-5975C 气相色谱质谱联用仪、HP-5MS 气相色谱柱(60 m×250 μm×0.25 μm) 美国 Agilent 公司;SA-402B 味觉分析系统(电子舌) 日本 Insent 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 实验样品的制备 将预制梅菜扣肉置于 25 ℃ 恒温箱自然解冻 4 h 至完全解冻,并将解冻后的预制梅菜扣肉从包装袋中取出置于容器中备用。

1.2.2 梅菜扣肉过熟味感官分析评价 参照张凯华等[12]方法稍作修改,选取 20 名食品专业技术人员(男∶女=1∶1,年龄 22~30 岁)组成感官评价小组,并对小组成员根据过熟味气味及相关标准进行培训,具体评定指标见表 2,评价前将解冻的样品沸水浴复热 30 min 后在 30 ℃ 条件下恒温放置 30 min,每个样品评价时间隔 3 min,且每个样品重复 3 次,感官评价结果取平均值并绘制过熟味感官雷达图。

表 2 过熟味感官评价标准

Table 2 Sensory evaluation criteria for warmed-over flavor

过熟味指标	评分参考	评分细则		
		0分	1~4分	5分
湿纸板味	10 g纸箱碎屑溶于100 mL水中的气味	没有风味	风味逐渐增强	风味最强
亚麻籽油味	50 g亚麻籽油在水中加热15 min的气味			
硫化味	橡皮筋的气味			
酸败味	植物油严重氧化的气味			
金属味	0.1 g/L硫化亚铁溶液的气味			

1.2.3 梅菜扣肉挥发性成分测定

1.2.3.1 萃取方法 将解冻好的样品用机器绞碎成肉糜,称取 5 g 梅菜扣肉肉糜置于 20 mL 顶空萃取瓶中,加入 100 μL 2,4,6-三甲基吡啶(0.05 mg/mL)作为内标物,密封,置于 85 ℃ 水浴中,磁力搅拌速度 500 r/min,平衡 20 min 后,插入萃取针萃取 30 min。萃取针使用前,在气质进样口活化 20 min(250 ℃)。

1.2.3.2 GC-MS 条件 GC 条件:进样口温度 250 ℃,气质接口温度 280 ℃,载气(He)流速 1.5 mL/min,分流比 4∶1。升温程序:初始 50 ℃,保持 1 min,以 5 ℃/min 升温到 100 ℃ 保持 2 min;4 ℃/min 升温到 180 ℃ 保持 3 min;5 ℃/min 升温到 250 ℃ 保持 5 min。

MS 条件:离子源温度 230 ℃,四级杆温度 150 ℃,EI 电离 70 eV,全扫描 m/z 35~550。

1.2.3.3 定性分析 使用 NIST 20 质谱数据库检索,与标准谱对比进行定性分析,选取相似度大于 80% 的挥发性风味成分定性。

1.2.3.4 定量分析 采用内标法进行定量分析,根据已知内标物 2,4,6-三甲基吡啶的含量并依据挥发物峰面积与含量成正比原理来计算出未知挥发性物质的含量,按公式(1)计算:

$$C_X = \frac{C_0 \times V_0 \times S_X}{S_0 \times m} \quad \text{式(1)}$$

式中:C_X 为未知化合物的含量(μg/kg);C_0 为内标物的质量浓度(μg/μL);V_0 为内标物进样体积(μL);S_X 为未知化合物的峰面积(AU·min);S_0 为添加的内标物峰面积(AU·min);m 为试样的质量(kg)。

1.2.4　电子舌检测条件　电子舌传感器特性见表 3，将解冻的样品用机械绞碎成肉糜，称取 10 g 梅菜扣肉肉糜于烧杯中，倒入 120 mL 纯水，浸提 20 min 后冷冻离心 5 min（2 ℃，9000 r/min），将上清液抽滤后倒入 100 mL 电子舌专用烧杯中检测。每个样品重复测定 5 次，单次采集时间为 120 s，采取传感器信号强度在 120 s 的稳定数据作为输出值进行分析。

表 3　电子舌传感器

Table 3　Electronic tongue sensor

传感器	味觉信息	
	基本味	回味
鲜味传感器 AEE	鲜味（氨基酸、核苷酸、有机酸引起的鲜味）	丰富度（持续的鲜味）
咸味传感器 CT0	咸味（氯化钠等无机盐引起的咸味）	—
酸味传感器 CA0	酸味（柠檬酸、乳酸、酒石酸、醋酸等引起的酸味）	—
苦味传感器 C00	苦味（苦味物质引起的味道，在低浓度下被感知为鲜味回味）	苦味回味（含有咖啡因等食品的苦味）
涩味传感器 AE1	涩味（涩味物质引起的味道，低浓度下感知为刺激性回味）	涩味回味（含有单宁、生物碱等食品呈现的涩味）
甜味传感器 GL0	甜味（糖等甜味剂引起的甜味）	—

1.2.5　过氧化值的测定　参照 GB 5009.227-2016《食品中过氧化值的测定》中的滴定法测定过氧化值。

1.2.6　酸价的测定　参考 GB 5009.229-2016《食品中酸价的测定》中的冷溶剂指示剂滴定法测定酸价。

1.2.7　硫代巴比妥酸值的测定　参考 GB 5009.181-2016《食品中丙二醛的测定》中的分光光度法测定硫代巴比妥酸值。

1.2.8　OAV 值的计算　通过计算气味活度值（odor activity value，OAV）来评估挥发性物质的贡献，OAV≥1 的化合物通常被认为对整体风味特征具有很大贡献[22]，按公式（2）计算：

$$OAV = \frac{C_x}{T_x} \qquad 式（2）$$

式中：C_x 为挥发性风味物质含量（μg/kg）；T_x 为该风味物质在水中的嗅味感觉阈值（μg/kg）。

1.3　数据处理

GC-MS 采用工作站自带数据处理软件进行处理；电子舌及其余数据采用 Microsoft Excel 2016 和 SPSS 22.0 统计软件进行 ANOVA 单因素方差分析、差异显著性分析、主成分分析、聚类热图分析及相关性分析，显著性水平取 P<0.05，并采用 Origin 2021 进行相应绘图。

2　结果与分析

2.1　感官评价分析结果

如图 1 所示，7 种预制梅菜扣肉制品过熟味（WOF）以亚麻籽油味和酸败味为主，略带轻微金属味和硫化味，几乎无湿纸板味，而梅干菜和猪肉原有的青香味和肉香味较淡。HBS 和 CCL 的亚麻籽油味及酸败味得分最高且分别为 4.04 分、2.86 分和 3.89 分、3.06 分，与其他组差异显著（P<0.05），与顶空固相微萃取气质联用仪检测出其己醛、庚醛和壬醛等低级醛类含量高有关，油脂氧化生成的低级醛是肉类产生异味的主要原因[23−24]。预制梅菜扣肉金属味和硫化味得分都在 1~2 分之间，各组别之间差异不大，湿纸板味得分在 1 分以下感知度较弱且差异不显著。

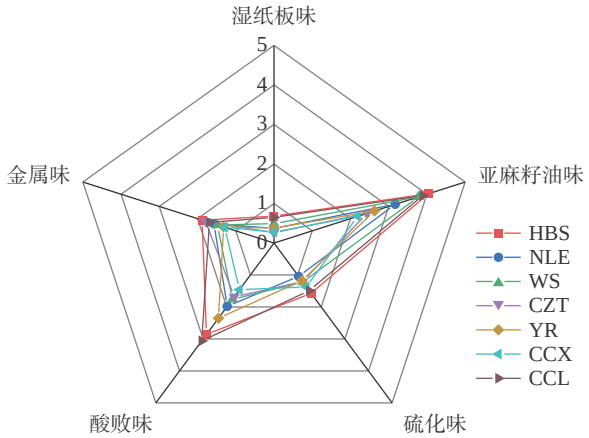


图 1　不同品牌预制梅菜扣肉过熟味感官雷达图

Fig.1　Sensory radar charts of warmed-over flavor of different brands of pre-prepared steamed pork with preserved vegetable

2.2　挥发性风味化合物分析结果

如表 4~表 5 所示，基于顶空固相微萃取结合气质联用技术（HS-SPME-GC-MS）对 7 种市售预制梅菜扣肉的挥发性物质进行检测，7 组样品（HBS、NLE、WS、CZT、YR、CCX、CCL）中共鉴定出 85 种挥发性物质，其中烷烃类 16 种、萜烯类 19 种、醇类 7 种、醛类 22 种、酮类 3 种、酯类 13 种、酚类 3 种、其他类 2 种，共有 17 种挥发性物质在 7 组样品中均有出现。7 组预制梅菜扣肉挥发性物质总含量分别为 1265.27、1189.62、1154.97、1073.13、1242.9、1128.03 和 1268.07 μg/kg，不同组间差异显著（P<0.05），其中醛类物质含量相对较高，HBS 组和 CCL 组醛类物质超过总含量的 50%。

烷烃类化合物主要可能来源于脂肪酸中烷氧自由基均裂而产生[25]。不同品牌预制梅菜扣肉烷烃类种类及含量分别为 11 种（226.42 μg/kg）、9 种（117.84 μg/kg）、10 种（79.72 μg/kg）、9 种（101.31 μg/kg）、6 种（102.98 μg/kg）、9 种（177.84 μg/kg）和 7 种（99.35 μg/kg），烷烃类化合物嗅觉阈值往往较低[26]，对预制梅菜扣肉整体风味贡献不大。

萜烯类化合物主要来源于天然植物中，分子式为异戊二烯单倍数（$(C_5H_8)_n$）的烃类，多以游离态或酸、酯等形式存在于生物体中[27]，其阈值较低，多呈现出木质、水果和花草香味，对风味贡献相对较大[28]。NLE、WS、YR 和 CCX 组的萜烯类化合物种

表 4 不同品牌预制梅菜扣肉挥发性成分比较

Table 4 Comparison of volatile compositions of different brands of pre-prepared steamed pork with preserved vegetable

序号	化合物名称	分子式	含量(μg/kg)						
			HBS	NLE	WS	CZT	YR	CCX	CCL
	烷烃类								
1	己烷(hexane)	C_6H_{14}	7.24±1.94	–	–	–	–	–	–
2	庚烷(heptane)	C_7H_{16}	4.83±0.93^{a}	2.45±0.33^{b}	1.34±0.11^{bc}	1.46±0.39^{bc}	1.48±0.22^{bc}	4.53±1.39^{a}	1.04±0.17^{c}
3	癸烷(decane)	$C_{10}H_{22}$	50.65±3.36^{a}	22.26±1.92^{cd}	12.63±2.77^{d}	31.29±10.26^{bc}	34.25±7.88^{b}	18.51±2.96^{b}	18.03±6.27^{e}
4	3,8-二甲基癸烷(3,8-dimethyldecane)	$C_{12}H_{26}$	12.28±4.34^{a}	–	–	–	–	9.35±2.38^{a}	–
5	3-甲基十一烷(3-methylundecane)	$C_{12}H_{26}$	–	–	4.59±1.98^{b}	6.74±2.21^{a}	–	–	–
6	3-乙基-2,6,10-三甲基十一烷(3-ethyl-2,6,10-trimethylundecane)	$C_{16}H_{34}$	–	–	5.52±1.63	–	–	–	–
7	正十二烷(dodecane)	$C_{12}H_{26}$	28.66±6.18^{bcd}	23.1±2.82^{cd}	20.09±3.77^{d}	16.96±5.21^{d}	31.62±2.56^{bc}	56.85±10.37^{a}	37.91±7.41^{b}
8	正十三烷(tridecane)	$C_{13}H_{28}$	10.83±3.48^{a}	–	–	6.43±2.67^{b}	–	–	–
9	3-甲基十三烷(3-methyltridecane)	$C_{14}H_{30}$	–	–	–	8.21±3.14^{a}	–	–	2.76±0.27^{b}
10	正十四烷(tetradecane)	$C_{14}H_{30}$	59.01±15.34^{a}	18.58±4.52^{b}	11.23±1.75^{b}	12.38±4.64^{b}	–	21.75±4.99^{b}	23.92±3.33^{b}
11	正十五烷(pentadecane)	$C_{15}H_{32}$	25.8±5.27^{a}	23.88±2.94^{ab}	10.07±2.61^{c}	8.59±0.94^{c}	19.01±4.54^{b}	–	–
12	正十六烷(hexeadecane)	$C_{16}H_{34}$	12.78±1.44^{a}	3.56±0.31^{d}	8.34±2.67^{b}	8.37±1.88^{b}	5.82±1.12^{cd}	13.76±0.67^{a}	6.47±1.18^{bc}
13	正十七烷(heptadecane)	$C_{17}H_{36}$	8.69±3.33^{bc}	14.07±2.12^{a}	5.83±0.43^{bc}	–	4.04±1.23^{c}	17.82±4.18^{a}	9.22±3.31^{b}
14	正十八烷(octadecane)	$C_{18}H_{38}$	–	3.84±0.41^{b}	4.69±0.97^{b}	–	–	10.19±3.41^{a}	–
15	正十九烷(nonadecane)	$C_{19}H_{40}$	–	6.05±0.68^{b}	–	–	–	9.32±1.22^{a}	–
16	正二十四烷(tetracosane)	$C_{24}H_{50}$	5.61±1.04	–	–	–	–	–	–
	共计		226.42±4.29^{a}	117.84±6.70^{c}	79.72±1.30^{d}	101.31±20.07^{c}	102.98±7.98^{c}	177.84±12.26^{b}	99.35±13.72^{c}
	萜烯类								
17	柠檬烯(limonene)	$C_{10}H_{16}$	37.68±3.88^{bc}	46.36±10.43^{b}	26.54±3.18^{c}	66.53±6.99^{a}	34.87±5.78^{bc}	24.62±2.72^{c}	70.58±14.14^{a}
18	四氢双环戊二烯(tetrahydrodicyclopentadiene)	$C_{10}H_{16}$	28.88±2.98^{b}	16.16±3.33^{c}	19.24±2.11^{c}	33.74±4.44^{b}	32.99±9.27^{b}	35.07±3.24^{b}	47.78±3.17^{a}
19	α-蒎烯(α-pinene)	$C_{10}H_{16}$	–	6.44±2.12^{b}	–	–	9.94±2.52^{a}	–	2.36±0.24^{c}
20	莰烯(camphene)	$C_{10}H_{16}$	–	12.46±2.98^{b}	6.10±1.22^{c}	2.72±0.42^{d}	15.7±0.76^{a}	–	–
21	β-水芹烯(β-phellandrene)	$C_{10}H_{16}$	–	45.55±10.31^{b}	35.02±3.43^{b}	–	67.51±14.54^{a}	–	–
22	α-姜黄烯(α-curcumene)	$C_{15}H_{22}$	8.12±1.21^{de}	9.81±0.34^{cd}	15.03±4.21^{b}	4.76±0.54^{e}	23.89±2.58^{a}	12.38±2.99^{bc}	6.44±1.11^{de}
23	α-姜烯(α-zingiberene)	$C_{15}H_{24}$	2.45±0.15^{d}	10.98±2.14^{b}	13.56±1.87^{a}	–	7.9±1.84^{c}	–	–
24	β-倍半水芹烯(β-sesquiphellandrene)	$C_{15}H_{24}$	–	4.16±0.33^{b}	5.59±1.52^{ab}	–	7.31±1.67^{a}	5.99±1.08^{a}	–
25	β-石竹烯(β-caryophyllene)	$C_{15}H_{24}$	–	–	24.57±2.98^{a}	6.33±1.02^{c}	–	14.20±1.44^{b}	–
26	α-香柠檬烯(α-alpha-bergamotene)	$C_{15}H_{24}$	–	–	9.94±2.26	–	–	–	–
27	γ-红没药烯(γ-bisabolene)	$C_{15}H_{24}$	–	0.98±0.08^{bc}	5.04±0.78^{a}	0.45±0.04^{c}	1.43±0.22^{b}	–	–
28	β-红没药烯(β-bisabolene)	$C_{15}H_{24}$	–	6.56±1.22^{b}	8.91±1.54^{a}	–	6.92±1.61^{b}	0.98±0.12^{c}	–
29	β-蒎烯(β-pinene)	$C_{15}H_{24}$	2.21±0.32^{d}	–	10.76±3.11^{b}	–	15.14±2.42^{a}	6.98±1.44^{c}	–
30	香树烯(alloaromadendrene)	$C_{15}H_{24}$	–	–	–	–	3.52±0.32	–	–
31	萜品油烯(terpinolene)	$C_{10}H_{16}$	–	–	0.92±0.25^{a}	–	–	–	0.43±0.12^{b}
32	γ-榄香烯(γ-cyclohexane)	$C_{15}H_{24}$	–	0.25±0.09	–	–	–	–	–
33	α-佛手柑烯(α-bergamotene)	$C_{15}H_{24}$	–	–	2.34±0.08^{b}	–	–	15.13±1.54^{a}	–
34	α-穆罗林烯(α-muurolene)	$C_{15}H_{24}$	–	–	–	–	–	13.76±2.16	–
35	δ-杜松烯(δ-cadinene)	$C_{15}H_{24}$	–	5.87±0.42^{b}	–	–	–	15.39±0.99^{a}	–
	共计		79.35±1.12^{f}	165.58±8.18^{c}	183.55±3.75^{b}	114.54±7.20^{e}	227.13±12.91^{a}	144.45±6.71^{d}	127.59±17.03^{e}
	醇类								
36	乙醇(ethanol)	C_2H_6O	121.96±20.55^{b}	203.04±60.12^{b}	117.15±17.12^{b}	332.61±66.53^{a}	310.77±78.43^{a}	170.95±20.62^{b}	178.95±43.65^{b}
37	芳樟醇(linalool)	$C_{10}H_{18}O$	–	–	22.54±1.54^{a}	–	–	10.55±2.89^{b}	–
38	4-萜烯醇(terpinine-4-ol)	$C_{10}H_{18}O$	–	7.88±1.04^{b}	10.13±2.87^{a}	–	–	–	–
39	1-辛烯-3-醇(1-octen-3-ol)	$C_8H_{16}O$	14.02±2.65^{cd}	24.96±5.34^{b}	18.17±1.53^{bc}	36.46±3.98^{a}	9.21±2.11^{d}	23.63±5.35^{b}	33.18±6.23^{a}
40	十五烷醇(pentadecanol)	$C_{15}H_{32}O$	–	3.72±0.44	–	–	–	–	–
41	桉叶油醇(cineole)	$C_{10}H_{18}O$	6.44±0.78^{e}	28.45±6.88^{a}	13.33±2.45^{cd}	–	21.87±3.11^{b}	10.89±2.43^{de}	17.13±1.89^{bc}

续表 4

序号	化合物名称	分子式	含量（μg/kg）						
			HBS	NLE	WS	CZT	YR	CCX	CCL
42	反式-2-十四烯-1-醇（trans-2-tetradecen-1-ol）	$C_{14}H_{28}O$	–	–	9.77±3.65	–	–	–	–
	共计		142.41±20.76^{d}	268.05±52.74^{bc}	191.08±14.12^{cd}	369.07±68.35^{a}	341.86±81.22^{ab}	216.02±22.33^{cd}	229.26±44.31^{cd}
	醛类								
43	戊醛（pentanal）	$C_5H_{10}O$	57.86±6.67^{a}	–	–	–	23.99±5.32^{c}	5.94±0.88^{d}	42.87±10.12^{b}
44	己醛（hexanal）	$C_6H_{12}O$	220.36±25.37^{a}	88.26±7.87^{c}	157.12±26.66^{b}	79.83±18.87^{c}	98.76±14.25^{c}	75.53±13.14^{c}	198.19±29.41^{a}
45	庚醛（heptaldehyde）	$C_7H_{14}O$	77.44±10.97^{a}	55.78±5.01^{bc}	51.59±9.84^{c}	32.10±5.54^{d}	44.13±4.59^{cd}	34.25±8.16^{d}	68.25±7.01^{ab}
46	（E）-2-庚烯醛（trans-2-heptenal）	$C_7H_{12}O$	10.26±2.69^{b}	6.66±1.34^{c}	9.13±1.66^{bc}	–	9.19±2.44^{bc}	–	17.27±1.95^{a}
47	辛醛（octanal）	$C_8H_{16}O$	51.37±5.83^{a}	45.13±10.03^{a}	29.2±2.32^{c}	24.31±5.21^{cd}	32.98±3.34^{bc}	15.67±4.29^{d}	41.93±5.68^{ab}
48	（E）-2-辛烯醛（trans-2-octenal）	$C_8H_{14}O$	2.78±0.31^{c}	–	3.47±0.45^{b}	–	0.98±0.22^{d}	–	5.64±0.65^{a}
49	壬醛（nonanal）	$C_9H_{18}O$	143.17±14.77^{a}	56.41±8.92^{cd}	104.59±5.07^{b}	68.89±3.68^{c}	67.65±8.98^{c}	49.76±2.43^{d}	95.03±12.98^{b}
50	（E,E）-2,4-壬二烯醛（trans,trans-2,4-nonadienal）	$C_9H_{14}O$	37.44±3.03^{b}	–	27.38±3.63^{c}	11.33±0.97^{e}	18.63±3.99^{d}	–	47.45±7.83^{a}
51	癸醛（decanal）	$C_{10}H_{20}O$	11.60±2.92^{a}	2.13±0.34^{b}	11.55±0.97^{a}	–	3.81±0.93^{b}	10.35±1.69^{a}	–
52	（E）-2-癸烯醛（trans-2-decenal）	$C_{10}H_{18}O$	20.56±1.85^{c}	25.33±4.24^{bc}	28.05±6.67^{b}	13.98±0.99^{d}	–	22.56±4.46^{bc}	44.48±2.25^{a}
53	（E,E）-2,4-癸二烯醛（trans,trans-2,4-decadienal）	$C_{10}H_{16}O$	10.71±2.85^{b}	7.03±1.49^{c}	3.41±0.34^{d}	–	–	5.77±0.42^{cd}	16.04±2.39^{a}
54	2-十一烯醛（2-undecenal）	$C_{11}H_{20}O$	4.33±1.32^{de}	2.13±0.69^{e}	8.86±1.81^{b}	–	7.34±0.84^{bc}	11.16±1.76^{a}	6.36±1.55^{cd}
55	苯甲醛（benzaldehyde）	C_7H_6O	75.27±14.03^{a}	45.43±4.66^{b}	44.01±4.85^{b}	17.44±3.02^{d}	27.12±3.69^{cd}	38.86±7.31^{bc}	72.90±5.16^{a}
56	十六烷醛（hexadecanal）	$C_{16}H_{32}O$	–	6.46±1.41^{b}	–	–	–	18.89±2.64^{a}	–
57	十七烷醛（heptadecanal）	$C_{17}H_{34}O$	–	–	–	–	4.76±0.35	–	–
58	十八烷醛（octadecanaldehyde）	$C_{18}H_{36}O$	–	–	–	10.05±1.25	–	–	–
59	二十烷醛（icosanal）	$C_{20}H_{40}O$	–	13.58±2.26^{a}	12.64±3.45^{a}	–	–	–	–
60	肉桂醛（cinnamaldehyde）	C_9H_8O	–	49.25±12.41^{a}	48.64±5.65^{a}	–	26.89±3.66^{b}	–	–
61	3-糠醛（3-furaldehyde）	$C_5H_4O_2$	34.41±3.65^{b}	10.56±2.12^{d}	–	18.01±5.22^{c}	9.98±1.05^{d}	24.68±4.43^{c}	50.39±6.73^{a}
62	糠醛（furfural）	$C_5H_4O_2$	–	6.18±2.46^{a}	3.57±1.23^{b}	–	2.51±0.46^{b}	–	–
63	香叶醛（trans-citral）	$C_{10}H_{16}O$	–	–	–	–	22.07±4.26	–	–
64	橙花醛（citral）	$C_{10}H_{16}O$	–	–	–	–	14.11±1.47	–	–
	共计		757.58±32.84^{a}	420.33±19.69^{d}	543.29±32.19^{c}	275.91±10.81^{e}	414.92±19.92^{d}	313.44±7.85^{e}	706.82±28.36^{b}
	酮类								
65	3-羟基-2-丁酮（acetoin）	$C_4H_8O_2$	–	0.91±0.19^{a}	–	–	–	–	0.79±0.27^{a}
66	2-庚酮（2-heptanone）	$C_7H_{14}O$	–	2.09±0.14^{b}	–	–	–	–	4.78±0.71^{a}
67	1-辛烯-3-酮（1-octen-3-one）	$C_8H_{14}O$	6.80±2.46^{a}	3.24±0.36^{b}	–	–	2.42±0.48^{b}	4.06±0.96^{b}	3.77±0.88^{b}
	共计		6.80±2.47^{b}	6.24±0.31^{b}	–	–	2.42±0.48^{c}	4.06±0.97^{c}	9.35±1.00^{a}
	酯类								
68	乙酸甲酯（methyl acetate）	$C_3H_6O_2$	1.7±0.31^{a}	–	–	–	0.89±0.19^{b}	–	–
69	乙酸乙酯（ethyl acetate）	$C_4H_8O_2$	3.39±0.45^{a}	2.52±0.43^{b}	–	0.63±0.13^{d}	1.40±0.23^{c}	–	1.42±0.49^{c}
70	棕榈酸甲酯（methyl hexadecanoate）	$C_{17}H_{34}O_2$	7.61±1.21^{d}	25.16±2.94^{a}	8.82±0.36^{d}	7.16±0.63^{d}	8.42±1.38^{d}	16.97±3.12^{b}	12.69±1.57^{c}
71	十六酸乙酯（ethyl palmitate）	$C_{18}H_{36}O_2$	–	25.80±4.98^{a}	11.88±1.54^{b}	6.74±1.31^{c}	–	11.59±1.74^{b}	7.74±1.02^{c}
72	三醋酸甘油酯（triacetin）	$C_9H_{14}O_6$	–	39.31±7.84	–	–	–	–	–
73	顺式-13-十八烯酸甲酯（methyl octadec-13-enoate）	$C_{19}H_{36}O_2$	–	–	–	–	–	–	10.38±1.76
74	亚油酸乙酯（ethyl linoleate）	$C_{20}H_{36}O_2$	12.86±3.19^{b}	23.66±2.92^{a}	–	–	–	14.97±2.53^{b}	–
75	油酸甲酯（methyl oleate）	$C_{19}H_{36}O_2$	–	–	6.49±0.86^{b}	9.28±2.47^{a}	–	8.73±1.13^{a}	–
76	油酸乙酯（ethyl oleate）	$C_{20}H_{38}O_2$	–	16.67±2.41^{a}	–	–	12.94±1.58^{b}	–	–
77	2-单棕榈酸甘油（2-palmitoylglycerol）	$C_{19}H_{38}O_4$	–	–	30.88±5.33	–	–	–	–
78	二氢猕猴桃内酯（dihydroactinidiolide）	$C_{11}H_{16}O_2$	–	–	–	–	6.87±1.14^{c}	17.91±4.12^{a}	11.69±1.27^{b}
79	肉豆蔻酸乙酯（ethyl tetradecanoate）	$C_{16}H_{32}O_2$	–	–	–	–	4.56±0.65	–	–
80	顺式-13-十八烷酸甲酯（methyl 13-octadecenoate）	$C_{19}H_{36}O_2$	–	7.61±0.77^{a}	–	0.67±0.25^{b}	–	–	–

续表 4

序号	化合物名称	分子式	含量(μg/kg)						
			HBS	NLE	WS	CZT	YR	CCX	CCL
	共计		25.58±3.06^{e}	140.68±13.09^{a}	58.09±3.57^{c}	24.49±4.58^{e}	35.11±2.16^{de}	70.18±7.85^{b}	43.93±4.04^{d}
	酚类								
81	2,4-二叔丁基苯酚(2,4-di-t-butylphenol)	$C_{14}H_{22}O$	–	–	2.24±0.45^{c}	4.06±1.44^{b}	–	12.13±1.97^{a}	–
82	2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol)	$C_{15}H_{24}O$	15.54±3.41^{c}	4.55±0.53^{de}	1.54±0.24^{e}	8.09±1.66^{d}	–	43.64±5.55^{a}	32.11±8.12^{b}
83	丁香酚(eugenol)	$C_{10}H_{12}O_2$	8.44±2.36^{d}	45.45±3.55^{b}	29.47±6.42^{c}	59.23±12.42^{a}	10.43±0.98^{d}	8.72±2.67^{d}	6.87±1.11^{d}
	共计		23.98±4.67^{d}	50.01±3.93^{b}	33.25±6.09^{cd}	71.37±12.42^{a}	10.43±0.98^{e}	64.49±2.24^{a}	38.98±7.02^{bc}
	其他类								
84	茴香脑(cis-anethol)	$C_{10}H_{12}O$	3.14±0.82^{c}	20.89±3.12^{c}	20.09±2.44^{c}	116.44±23.11^{a}	108.07±12.63^{a}	62.84±4.45^{b}	12.79±2.99^{c}
85	草蒿脑(estragole)	$C_{10}H_{12}O$	–	–	45.89±6.34^{b}	–	–	74.71±12.76^{a}	–
	共计		3.14±0.82^{d}	20.89±3.12^{d}	65.99±8.41^{c}	116.44±23.11^{ab}	108.07±12.63^{b}	137.55±15.47^{a}	12.79±2.99^{d}
	总计		1265.27±39.97^{a}	1189.62±49.71^{bc}	1154.97±30.4^{bcd}	1073.13±90.56^{e}	1242.9±58.55^{ab}	1128.03±22.72^{cd}	1268.07±40.49^{a}

注: 同行不同字母表示含量差异显著(P<0.05)。

表 5 不同品牌预制梅菜扣肉挥发性化合物种类

Table 5 Types of volatile compounds in different brands of pre-prepared steamed pork with preserved vegetable

序号	分类	数量(种)						
		HBS	NLE	WS	CZT	YR	CCX	CCL
1	烷烃类	11	9	10	9	6	9	7
2	萜烯类	5	12	14	6	12	10	5
3	醇类	3	5	6	2	3	4	3
4	醛类	14	15	15	9	17	12	13
5	酮类	1	3	0	0	1	1	3
6	酯类	4	6	4	5	6	5	5
7	酚类	2	2	3	3	1	3	2
8	其他类	1	1	2	1	1	2	1
总计	85	41	53	54	35	47	46	39

类及含量较多且分别为 12 种(165.58 μg/kg)、14 种(183.55 μg/kg)、12 种(227.13 μg/kg)和 10 种(144.45 μg/kg),推测其可能添加的香精香料较多,丰富了预制梅菜扣肉的风味。

醇类化合物具有使人愉悦的气味,一般来源于肉类加工过程中不饱和脂肪酸氧化且阈值较低,具有植物的清香气息,对肉制品整体风味的形成及层次的丰富发挥着重要作用[29]。预制梅菜扣肉共检测出 7 种醇类,包括乙醇、芳樟醇、4-萜烯醇、1-辛烯-3-醇、十五烷醇、桉叶油醇和反式-2-十四烯-1-醇。芳樟醇具有柑橘、柠檬香,4-萜烯醇具有草木香,桉叶油醇具有樟脑、草药香,这三种醇类物质主要来自草果、肉桂及花椒等香辛料,可丰富预制梅菜扣肉风味层次[30−31];十五烷醇和反式-2-十四烯-1-醇可能来源于脂肪氧化的中间产物;1-辛烯-3-醇来源自脂肪氧化,在含量低时具有蘑菇味,含量高时呈现出金属味,可能是产生过熟味的主要因子[17]。

醛、酮类化合物通常由脂质的降解、氧化以及美拉德反应产生,在低浓度时呈现油脂香、青草香、花果香味,但高浓度时具有酸败、刺鼻和令人恶心的气味[32−33]。醛类物质是预制梅菜扣肉的主要挥发性香气成分,共检测出 22 种醛类物质如己醛、庚醛、辛醛等,其阈值较低,对预制梅菜扣肉的风味贡献较大,与其他文献研究表明醛类物质是肉类脂肪的特征风味物质的结论相类似[34−35]。7 种样品醛类物质种类及含量分别为 14 种(757.58 μg/kg)、15 种(420.33 μg/kg)、15 种(543.29 μg/kg)、9 种(275.91 μg/kg)、17 种(414.92 μg/kg)、12 种(313.44 μg/kg)和 13 种(706.82 μg/kg),其中 HBS 组含量最高,YR 组种类最多,结合文献与感官评价结果表明醛类物质含量的高低与过熟味的产生关系较大。而酮类化合物性质相对稳定,其阈值一般高于同分异构体的醛类[36],7 种样品中只检测出了 3 种酮类,相对含量较低。

酯类化合物主要源于脂肪氧化或是酯化反应生成物[37],7 种预制梅菜扣肉共检测出 13 种酯类物质,相对含量较少。酚类、醚类化合物主要来源于香辛料或外源物质中,多呈现花果香、辛香和茴香[38−39],7 种样品中共检测出 3 种酚类和 2 种醚类化合物,对预制梅菜扣肉风味有一定修饰作用。

2.3 电子舌分析结果

如图 2~图 3 所示,预制梅菜扣肉通过电子舌传感器检测出的味觉主要为咸味、鲜味以及鲜味回味,符合梅菜扣肉具有咸鲜味的特点。不同品牌预制梅菜扣肉之间酸味、涩味回味的差异不显著,其余味觉差异显著(P<0.05)。其中 CCX 的苦味和苦味回味最突出,YR 的涩味、涩味回味和甜味最突出,CZT 的鲜味最突出,WS 的鲜味回味最突出,以及 NLE 的咸味最突出。

将不同品牌预制梅菜扣肉味觉通过主成分分析得到图 4,主成分 1 和主成分 2 的累计贡献率为 85.69%,表明主成分 1 和主成分 2 包含预制梅菜扣肉中绝大部分味觉信息,能够代表预制梅菜扣肉味觉的整体信息。主成分分析结果表明,WS 和 CCX 之

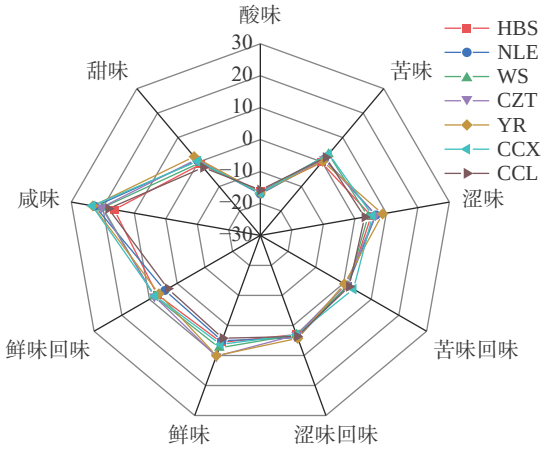


图 2　不同品牌预制梅菜扣肉电子舌味觉雷达图

Fig.2　Radar chart of the electronic tongue taste of different brands of pre-prepared steamed pork with preserved vegetable

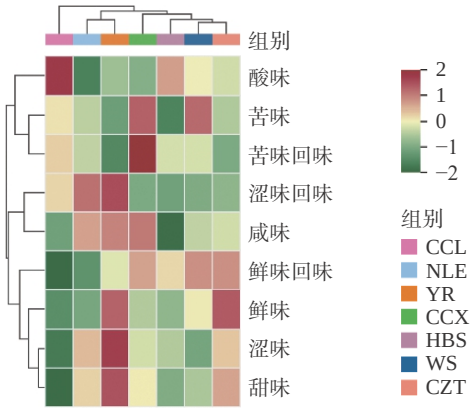


图 3　不同品牌预制梅菜扣肉电子舌滋味聚类热图

Fig.3　Heat map of clustering of electronic tongue taste of different brands of pre-prepared steamed pork with preserved vegetable

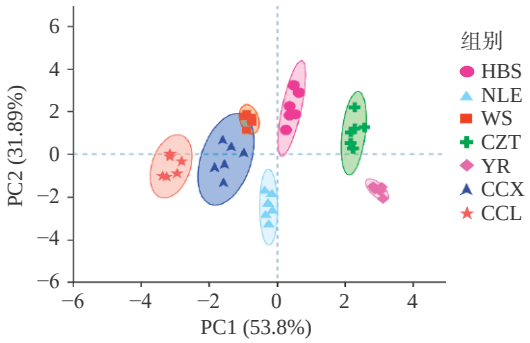


图 4　不同品牌预制梅菜扣肉电子舌味觉主成分分析图

Fig.4　Principal component analysis of electronic tongue taste of different brands of pre-prepared steamed pork with preserved vegetable

间具有部分关联性，其余品牌之间差异较为明显，使用电子舌能较好地区分不同品牌预制梅菜扣肉。

2.4　不同品牌预制梅菜扣肉挥发性风味气味活度值（OAV）分析

HS-SPME-GC-MS 分析所得挥发性风味物质含量往往不能直接反映其对预制梅菜扣肉整体香气贡献的大小，而由其含量与感官阈值共同决定，故采用气味活度值（OAV）来筛选预制梅菜扣肉关键挥发性物质[40]。通常认为 OAV>1 时，该化合物对预制梅菜扣肉风味具有一定影响，OAV 越大，则对预制梅菜扣肉风味的贡献就越大[18]。如表 6 所示，为部分挥发性物质 OAV 和嗅觉阈值，其中 OAV>1 的关键香气物质有 23 种且醛类物质最多，NLE 的关键性香气物质最多，而 CZT 的关键性香气物质最少。

由表 6 可知，7 个品牌预制梅菜扣肉有 7 种共有关键性香气物质，5 个品牌（HBS、NLE、YR、CCX、CCL）预制梅菜扣肉有 12 种共有关键性香气物质。

表 6　不同品牌预制梅菜扣肉挥发性风味物质 OAV

Table 6　OAV of volatile flavor substances in different brands of pre-prepared steamed pork with preserved vegetable

风味物质	嗅觉阈值（μg/kg）[41−43]	OAV							气味描述[17,41−43]
		HBS	NLE	WS	CZT	YR	CCX	CCL	
柠檬烯	10	3.77	4.64	2.65	6.65	3.49	2.46	7.06	柑橘味、橙子味、清香、甜味
α-蒎烯	6	<1	1.07	<1	<1	1.66	<1	<1	清香、木香
β-水芹烯	36	<1	1.27	<1	<1	1.88	<1	<1	薄荷香、松脂香
芳樟醇	6	<1	<1	3.76	<1	<1	1.76	<1	柑橘味、花香、木香、青草香
4-萜烯醇	3	<1	2.63	3.38	<1	<1	<1	<1	辣椒味、木香、泥土气息、霉味
1-辛烯-3-醇	1	14.02	24.96	18.17	36.46	9.21	23.63	33.18	浓厚的、甜的、金属味、蘑菇味
桉叶油醇	1.3	4.95	21.88	10.25	<1	16.82	8.38	13.18	桉树味、草药味、樟脑香
戊醛	20	2.89	<1	<1	<1	1.20	<1	2.14	焦香、清香
己醛	4.5	48.97	19.61	34.92	17.74	21.95	16.78	44.04	强烈的、酸败味、不愉快的、尖刺气息、令人作呕的气味
庚醛	3	25.81	18.59	17.20	10.70	14.71	11.42	22.75	焦香、清香、令人作呕的气味
(E)-2-庚烯醛	13	<1	<1	<1	<1	<1	<1	1.33	青香、脂肪香、奶油香、奶糖香
辛醛	0.7	73.39	64.47	41.71	34.73	47.11	22.39	59.90	青草味、柑橘味
(E)-2-辛烯醛	3	<1	<1	1.16	<1	<1	<1	1.88	清新、黄瓜、脂肪味
壬醛	1	143.17	56.41	104.59	68.89	67.65	49.76	95.03	青香、霉味
(E,E)-2,4-壬二烯醛	0.09	416.00	<1	304.22	125.89	207.00	<1	527.22	令人愉快的、煎炸肥肉样香味
癸醛	0.1	116.00	21.30	115.50	<1	38.10	103.50	<1	肥皂、橘子皮、牛脂香
(E)-2-癸烯醛	0.3	68.53	84.43	93.50	46.60	<1	75.20	148.27	油脂香

续表 6

风味物质	嗅觉阈值（μg/kg）[41−43]	OAV							气味描述[17,41−43]
		HBS	NLE	WS	CZT	YR	CCX	CCL	
(E,E)-2,4-癸二烯醛	0.07	153.00	100.43	48.71	<1	<1	82.43	229.14	柑橘香
2-十一烯醛	0.78	5.55	2.73	11.36	<1	9.41	14.31	8.15	香橙味、树脂味
2-庚酮	1	<1	2.09	<1	<1	<1	<1	4.78	青草味、尖刺气味、令人作呕的气味
1-辛烯-3-酮	0.005	1360.00	648.00	<1	<1	484.00	812.00	754.00	草药、蘑菇、泥土味
丁香酚	6	1.41	7.58	4.91	9.87	1.74	1.45	1.15	辛辣味、丁香、木香
茴香脑	15	<1	1.39	1.34	7.76	7.20	4.19	<1	茴香

注: 仅列出OAV大于1的挥发性风味物质。

其中 1-辛烯-3-醇、己醛、庚醛、辛醛、壬醛、(E,E)-2,4-壬二烯醛、癸醛、(E)-2-癸烯醛、(E,E)-2,4-癸二烯醛、1-辛烯-3-酮的 OAV 都在 10 以上且部分因子 OAV 大于 100, 表明其对预制梅菜扣肉的整体风味贡献极大, 为预制梅菜扣肉关键性风味因子, 根据文献得出这类物质可能是肉制品产生过熟味关键因子[6−10]。

根据预制梅菜扣肉 23 种关键挥发性物质的 OAV 值绘制热图, 并通过层次聚类对其进行分析, 结果如图 5 所示, 能直观表明不同品牌预制梅菜扣肉其 OAV 关键因子之间的差异。聚类分析能根据样本数据特征将相似度较高的样品聚为一类, 7 个品牌的预制梅菜扣肉共分为了 4 大类, 其中 HBS、CCL 聚为一类; WS、CCX 聚为一类; YR、NLE 聚为一类; CZT 单独为一类。将表 4 中不同样品关键性风味物质进行主成分分析, 得到不同品牌预制梅菜扣肉风味成分载荷图, 如图 6 所示, CCX、NLE、HBS 与 YR 位于第一主成分负半轴且距离较近, 表明其风味因子具有部分关联性; WS、CCL 和 CZT 分别位于第一象限和第四象限, 表明其存在显著差异。结合电子舌结果可知, 不同品牌预制梅菜扣肉由于其配方和工艺差异, 导致风味和滋味之间存在明显差异, 但又在特征风味因子上存在相似性。

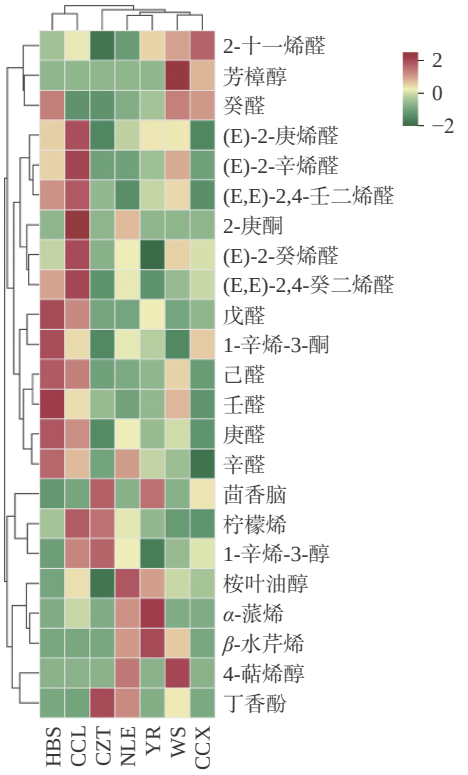


图 5 不同品牌预制梅菜扣肉特征挥发性物质聚类分析热图

Fig.5 Heat map of clustering analysis of volatiles characterizing different brands of pre-prepared steamed pork with preserved vegetable

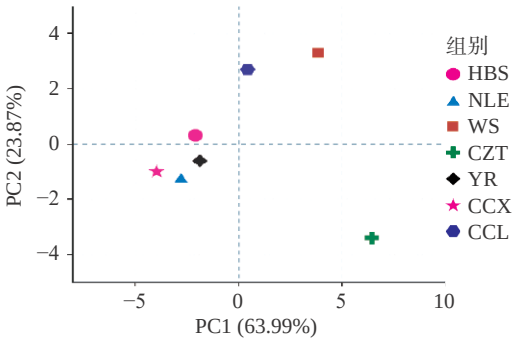


图 6 不同品牌预制梅菜扣肉特征挥发性物质主成分分析

Fig.6 Principal component analysis of volatiles characterizing different brands of pre-prepared steamed pork with preserved vegetable

2.5 油脂氧化指标分析结果

如图 7A 所示, CCL 酸价最高, CZT 最低, 不同品牌预制梅菜扣肉之间酸价差异显著(P<0.05)。除 CZT 以外均已超过国家标准规定食用油酸价<5 mg KOH/g 的最大限量, 间接表明其余 6 种预制梅菜扣肉油脂氧化程度较高。如图 7B 所示, HBS 过氧化值最高, CCL 次之, 而 CZT 最低, 除 NLE、YR 及 WS、CCX 外, 其余预制梅菜扣肉之间过氧化值差异显著(P<0.05)。最新国家标准《GB 19295-2021 速冻面米与调制食品》中规定, 预制菜过氧化值需小于等于 0.25 g/100 g, 仅 WS、CZT 和 CCX 组在限量标准以下, 表明其余 4 组油脂氧化程度明显偏高。

TBA 值是油脂中不饱和脂肪酸氧化分解所产生的衍生物如丙二醛等与 TBARS 反应的产物指标, 可反映油脂氧化程度[44]。如图 7C 所示, 预制梅菜扣肉 TBA 值与酸价、过氧化值的趋势几乎一致, 不同品牌预制梅菜扣肉间 TBA 值差异显著(P<0.05)。结合酸价、过氧化值及 TBA 值结果可知, 不同预制梅菜扣肉其油脂氧化程度差异显著且部分组(如 HBS、CCL)的油脂氧化程度偏高。导致预制菜油脂氧化的因素很多, 原材料的选择、生产过程、产品运

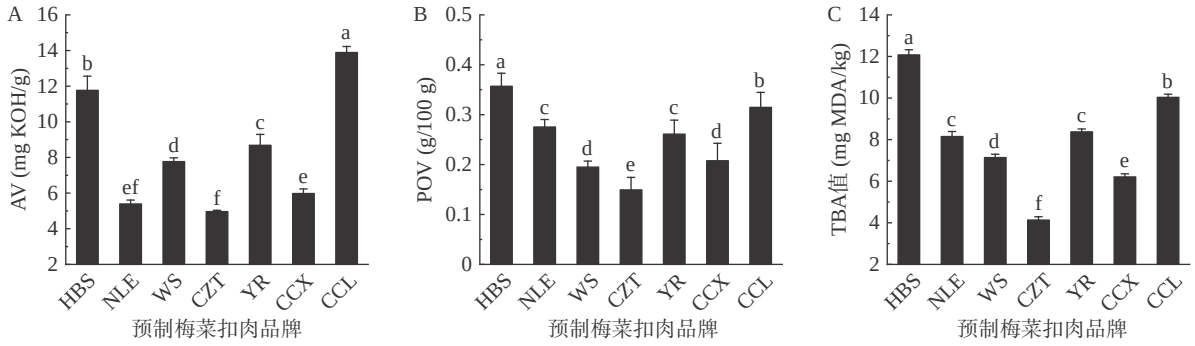


图 7　不同品牌预制梅菜扣肉油脂氧化指标

Fig.7　Lipid oxidation indexes of different brands of pre-prepared steamed pork with preserved vegetable

注：A：酸价，B：过氧化值，C：TBA 值。

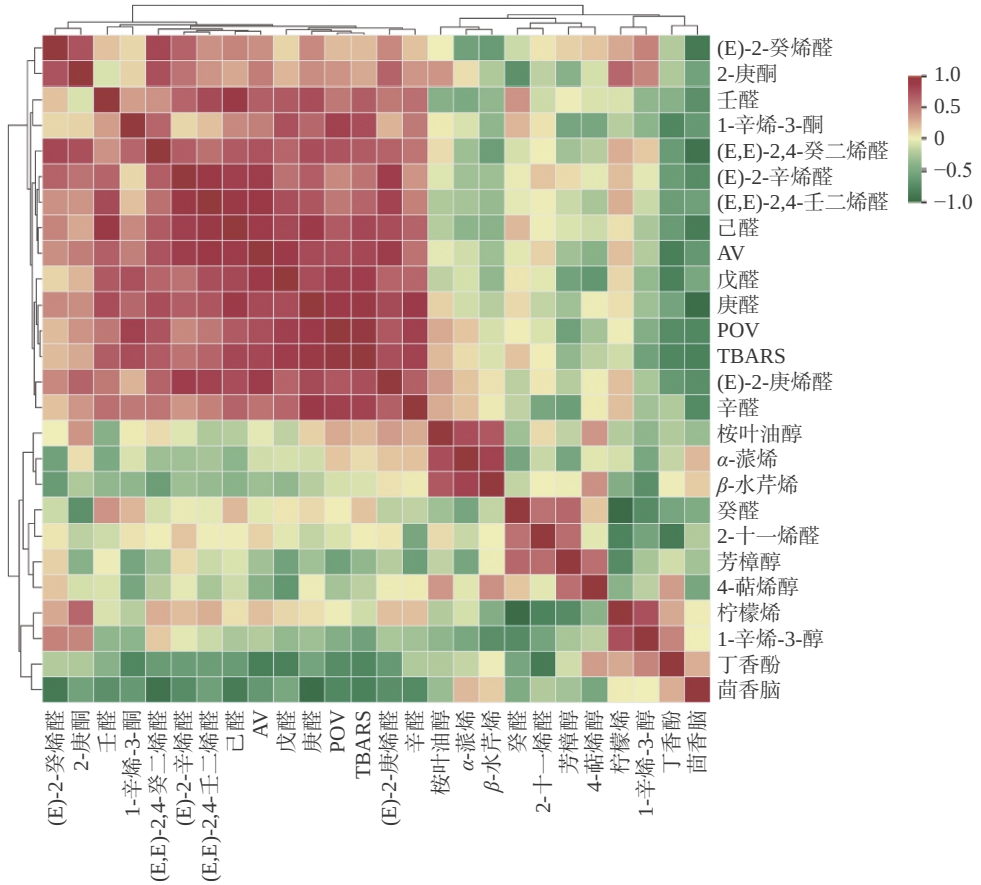


图 8　不同品牌预制梅菜扣肉油脂氧化指标与过熟味因子相关性聚类热图

Fig.8　Clustered heat map of the correlation between lipid oxidation indexes and warmed-over flavor factor of different brands of pre-prepared steamed pork with preserved vegetable

输过程及贮藏环节都极易导致预制菜氧化。

为了进一步分析油脂氧化程度与梅菜扣肉关键挥发性因子和过熟味之间的联系，将氧化指标与关键挥发性因子含量进行相关性分析，并作相关性聚类热图，如图 8 所示，(E)-2-癸烯醛、2-庚酮、壬醛、1-辛烯-3-酮、(E,E)-2,4-癸二烯醛、己醛、戊醛、庚醛、(E)-2-庚烯醛及辛醛与酸价、过氧化值和 TBA 值呈正相关，且其中 1-辛烯-3-酮、(E,E)-2,4-癸二烯醛、己醛、戊醛、庚醛、(E)-2-庚烯醛及辛醛与油脂氧化指标相关性显著，与研究表明的戊醛、己醛、庚醛、壬醛、癸醛、(E,E)-2,4-癸二烯醛等物质是产生过熟味主要因子物质结果一致[6−10]，同时也推测预制梅菜扣肉油脂过度氧化是其产生过熟味的重要原因之一。

3　结论

本研究以 HS-SPME-GC-MS 结合电子舌、OAV、感官评价和油脂氧化指标为研究内容，分析不同品牌预制梅菜扣肉关键性挥发性风味物质及过熟味与脂肪氧化的关联性。通过感官评价结果表明预制梅菜扣肉过熟味(WOF)以亚麻籽油和酸败味为主，带有轻微的硫化味和金属味。不同品牌预制梅菜扣肉共鉴定出 85 种挥发性物质，其中烷烃类 16 种、萜烯类 19 种、醇类 7 种、醛类 22 种、酮类 3 种、酯类 13 种、酚类 3 种、其他类 2 种，醛类挥发性风味物质相对含量较高；预制梅菜扣肉滋味以咸味、鲜味和鲜

味回味为主，且不同品牌预制梅菜扣肉之间风味、滋味差异显著（$P<0.05$）。OAV 共筛选出预制梅菜扣肉中 23 种关键香气物质，1-辛烯-3-醇、己醛、庚醛、辛醛、壬醛、(E,E)-2,4-壬二烯醛、癸醛、(E)-2-癸烯醛、(E,E)-2,4-癸二烯醛、1-辛烯-3-酮是预制梅菜扣肉主要风味因子，也是其产生过熟味的主要原因之一，且与酸价、过氧化值和 TBA 值呈正相关，推测预制梅菜扣肉过熟味的产生可能与其油脂氧化程度较大有关。结合实验表明不同品牌预制梅菜扣肉在原料、工艺选择、生产、运输及贮藏等环节的差异会导致其品质发生不同程度油脂氧化等品质劣变问题，最终使其原有风味散失。如何控制预制菜原有风味保持、品质稳定等问题是预制菜发展的重要方向。通过对预制梅菜扣肉特征挥发性物质的检测及过熟味与油脂氧化关联性的探究，为建立预制梅菜扣肉风味质量体系及过熟味控制的研究提供了理论基础。

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

参考文献

[1] 姜元娇. 梅菜扣肉[J]. 中国蜂业, 2013, 64(6): 63−64. [JIANG Y J. Steamed pork with preserved vegetable[J]. Apiculture of China, 2013, 64(6): 63−64.]

[2] 王翔. 梅菜扣肉的传说[J]. 肉类工业, 2013(7): 56. [WANG X. The legend of steamed pork with preserved vegetable[J]. Meat Industry, 2013(7): 56.]

[3] 孙晓, 杨思羽, 曾帅, 等. 后疫情时代川菜预制菜产业发展路径探索[J]. 四川旅游学院学报, 2023(5): 24−28. [SUN X, YANG S Y, ZENG S, et al. Exploration on the development path of Sichuan prepared dish industry in the post-pandemic era[J]. Journal of Sichuan Tourism University, 2023(5): 24−28.]

[4] 耿伟. 预制菜的安全与控制研究进展浅析[J]. 中国食品, 2023(17): 128−131. [GENG W. An overview of the progress of research on the safety and control of prepared vegetables[J]. China Food, 2023(17): 128−131.]

[5] 李冬梅, 张雪迪, 毕景然, 等. 中式预制菜肴产业的传承与创新[J]. 中国食品学报, 2022, 22(10): 1−8. [LI D M, ZHANG X D, BI J R, et al. Inheritance and innovation of Chinese prepared dishes industry[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(10): 1−8.]

[6] O'SULLIVAN M G, BYRNE D V, JENSEN M T, et al. A comparison of warmed-over flavour in pork by sensory analysis, GC/MS and the electronic nose[J]. Meat Science, 2003, 65(3): 1125−1138.

[7] TIKK K, HAUGEN J E, ANDERSEN H J, et al. Monitoring of warmed-over flavour in pork using the electronic nose-correlation to sensory attributes and secondary lipid oxidation products[J]. Meat Science, 2008, 80(4): 1254−1263.

[8] KIM S Y, LI J, LIM N R, et al. Prediction of warmed-over flavour development in cooked chicken by colorimetric sensor array[J]. Food Chemistry, 2016, 211: 440−447.

[9] LUNGU N S, AFOLAYAN A J, IDAMOKORO E M. Warmed-over flavour profiles, microbial changes, shelf-life and check-all-that-apply sensory analysis of cooked minced pork treated with varying levels of *Moringa oleifera* leaf and root powder[J]. Heliyon, 2022, 8(9): e10616.

[10] KERLER J, GROSCH W. Odorants contributing to warmed-over flavor (wof) of refrigerated cooked beef[J]. Journal of Food Science, 1996, 61(6): 1271−1275.

[11] 杨姣, 安玥琦, 陈雨欣, 等. 鱼糜制品加热过程中过熟味的特征风味成分解析[J]. 现代食品科技, 2020, 36(8): 265−280. [YANG J, AN Y Q, CHEN Y X, et al. Characterization of odorant components in surimi products with warmed-over flavor during the heating process[J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(8): 265−280.]

[12] 张凯华, 臧明伍, 张哲奇, 等. 不同复热方式对猪耳朵制品挥发性风味和脂肪氧化的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(14): 242−248. [ZHANG K H, ZANG M W, ZHANG Z Q, et al. Effect of reheating methods on volatile flavor constituents and lipid oxidation in cooked pig ear[J]. Food Science, 2018, 39(14): 242−248.]

[13] 张凯华, 臧明伍, 张哲奇, 等. 微波复热时间对预制猪肉饼过熟味、脂肪氧化和水分分布特性的影响[J]. 食品科学, 2020, 41(9): 50−56. [ZHANG K H, ZANG M W, ZHANG Z Q, et al. Effect of microwave reheating time on warmed-over flavor, lipid oxidation and water distribution in precooked pork patties[J]. Food Science, 2020, 41(9): 50−56.]

[14] 王洪乾, 寇亚平, 姚晨阳, 等. 基于 HS-SPME-GC-MS 测定 5 种蔷薇属植物花瓣挥发性成分[J]. 植物遗传资源学报, 2023, 24(6): 1626−1638. [WANG H Q, KOU Y P, YAO C Y, et al. Detection of volatile organic compounds in five rose petals based on headspace solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2023, 24(6): 1626−1638.]

[15] 梁子钧, 俞滢, 张磊, 等. 基于 HS-SPME-GC-MS 分析茶树新品系'白云 0492'白茶香气特征成分[J]. 食品科学, 2023, 44(22): 313−321. [LIANG Z J, YU Y, ZHANG L, et al. Analysis of aroma characteristics of new strain 'Baiyun 0492' white tea based on HS-SPME-GC-MS[J]. Food Science, 2023, 44(22): 313−321.]

[16] CHEN C, FAN X, HU Y, et al. Effect of different salt substitutions on the decomposition of lipids and volatile flavor compounds in restructured duck ham[J]. LWT, 2023, 176: 114541.

[17] 吴思雨, 谢萱, 刘雨雯, 等. 基于电子鼻、HS-SPME-GC-MS 和 HS-GC-IMS 评价不同制油工艺对大豆油品质及风味的影响[J]. 食品科学, 2024, 45(4): 183−196. [WU S Y, XIE X, LIU Y W, et al. The effects of different oil production processes on the quality and flavor of soybean oil were evaluated based on electronic nose, HS-SPME-GC-MS and HS-GC-IMS[J]. Food Science, 2024, 45(4): 183−196.]

[18] 何旭峰, 易良键, 郑容, 等. 基于 HS-SPME-GC-MS 对传统剁椒发酵过程中挥发性成分和关键香气物质分析[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(19): 296−303. [HE X F, YI L J, ZHENG R, et al. Analysis of volatile components and key aroma substances in the fermentation process of traditional chopped pepper based on HS-SPME-GC-MS[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(19): 296−303.]

[19] 孙鹤, 刘晓媛, 陈玉婷, 等. 基于 HS-SPME-GC-MS 技术分析酿造食醋中的挥发性成分[J]. 发酵科技通讯, 2023, 52(2): 76−84. [SUN H, LIU X Y, CHEN Y T, et al. Analysis of volatile components in brewing vinegar based on HS-SPME GC-MS[J]. Bulletin of Fermentation Science and Technology, 2023, 52(2): 76−84.]

[20] 杨萌, 秦磊磊, 覃先武, 等. HS-SPME-GC-MS 法分析苏打饼干中挥发性风味成分[J]. 食品工业, 2023, 44(5): 304−307. [YANG M, QIN L L, QIN X W, et al. Analysis of volatile aroma compounds in soda biscuit by HS-SPME-GC-MS[J]. Food Industry, 2023, 44(5): 304−307.]

[21] 张寅, 王保卫, 陈志敏. 电子舌技术在普洱茶年份鉴别中的

应用[J]. 浙江农业科学, 2023, 64(11): 2756−2759. [ZHANG Y, WANG B W, CHEN Z M. Application of electronic tongue technology in the identification of puerh tea vintages[J]. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 2023, 64(11): 2756−2759.]
[22] 张文玉, 李雅, 马赫, 等. 气相色谱-质谱联用结合化学计量法分析不同干燥方式对芫荽风味物质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2024, 50(4): 294−301. [ZHANG W Y, LI Y, MA H, et al. Analysis of effects of different drying methods on flavor substances of coriander using GC-MS combined with stoichiometric method [J]. Food and Fermentation Industries, 2024, 50(4): 294−301.]
[23] SATO K, HEGARTY G R. Warmed-over flavor in cooked meats[J]. Journal of Food Science, 2008, 36(7): 1098−1102.
[24] HIGGINS F M. Effects of alpha-tocopheryl acetate supplementation and salt addition on the oxidative stability (tbars) and warmed-over flavour (wof) of cooked turkey meat[J]. British Poultry Science, 1999, 40(1): 59−64.
[25] 张宁, 陈海涛, 孙宝国, 等. 固相微萃取和同时蒸馏萃取方法比较传统腊牛肉的风味成分[J]. 中国食品学报, 2016, 16(6): 247−258. [ZHANG N, CHEN H T, SUN B G, et al. A comparison of solid-phase microextraction with simultaneous distillation for the analysis of volatile aroma compositions in traditional preserved beef[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2016, 16(6): 247−258.]
[26] 曹伟峰, 张悦妍, 向情儒, 等. 基于 HS-SPME-GC-MS 和 gc-ims 结合电子鼻分析真空冷却对酱牛肉风味的影响[J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 341−348. [CAO W F, ZHANG Y Y, XIANG Q R, et al. Analysis of the effect of vacuum cooling on the flavor of sauce beef based on HS-SPME-GC-MS and GC-IMS combined with electronic nose[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 341−348.]
[27] 师彦平. 单萜和倍单萜化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008. [SHI Y P. Monoterpene and sesquiterpene chemistry[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2008.]
[28] 樊艳. SPME-GC-MS 结合 ROAV 分析腐乳中的主体风味物质[J]. 食品工业科技, 2021, 42(8): 227−234. [FAN Yan. Analysis of main flavor substances in fermented soybean curd by SPME-GC-MS and ROAV[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(8): 227−234.]
[29] 周晓, 周劲松, 刘特元, 等. 基于 HS-SPME-GC-MS 分析循环熬制卤水对风味熟制小鱼干风味的影响[J]. 食品工业科技, 2023, 44(19): 320−328. [ZHOU X, ZHOU J S, LIU T Y, et al. Analysis of the effects in the flavor anchovy during circulating boiling brine based on HS-SPME-GC-MS[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(19): 320−328.]
[30] 李丽, 蒋景龙, 胡佳乐, 等. 不同品种柑橘果皮精油关键香气物质筛选[J]. 食品工业科技, 2023, 44(24): 259−269. [LI L, JIANG J L, HU J L, et al. Screening of key aroma components in essential oils from citrus peels of different cultivars[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(24): 259−269.]
[31] 吴梓仟, 周劲松, 刘特元, 等. 基于 HS-SPME-GC-MS 分析不同卤制条件下卤制液香气差异[J]. 食品工业科技, 2023, 44(24): 311−318. [WU Z Q, ZHOU J S, LIU T Y, et al. Analysis of differences in marinade aroma under different brining conditions based on HS-SPME-GC-MS[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(24): 311−318.]
[32] 尹含靓, 肖何, 邓高文, 等. 基于 HS-SPME-GC-MS 分析风味鱼仔加工过程中风味物质的变化[J]. 中国调味品, 2022, 47(3): 8−13. [YIN H L, XIAO H, DENG G W, et al. Analysis of the changes in volatile flavor components of flavored fish larvae during processing by HS-SPME-GC-MS[J]. China Condiment, 2022, 47(3): 8−13.]
[33] KOHNO Y, MAKINO T, KANAKUBO M. Effect of phase behavior for ionic liquid catalysts with reactants/products on reactivity of esterification from long-chain fatty alcohols and fatty acids [J]. Fluid Phase Equilibria, 2019, 490: 107−113.
[34] GONG H, YANG Z, LIU M, et al. Time-dependent categorization of volatile aroma compound formation in stewed chinese spicy beef using electron nose profile coupled with thermal desorption gc-ms detection[J]. Food Science and Human Wellness, 2017, 6(3): 137−146.
[35] 荀文, 王桂瑛, 赵文华, 等. 基于 HS-SPME-GC-MS 法比较酂鸡和盐津乌骨鸡不同部位挥发性风味成分[J]. 核农学报, 2021, 35(4): 923−932. [XUN W, WANG G Y, ZHAO W H, et al. HS-SPME-GC-MS-based volatile flavor in breast and leg muscle of piao chicken and Yanjin silky fowl[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2021, 35(4): 923−932.]
[36] TOMAC A, COVA M C, NARVAIZ P, et al. Texture, color, lipid oxidation and sensory acceptability of gamma-irradiated marinated anchovy fillets[J]. Radiation Physics and Chemistry, 2015, 106: 337−342.
[37] 廖林, 刘悦, 贺稚非, 等. 基于顶空固相微萃取结合气相色谱-质谱技术的卤烤兔肉丁加工过程中挥发性风味物质变化分析[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(14): 235−243. [LIAO L, LIU Y, HE Z F, et al. Analysis of volatile flavor substances during processing of halogen roast rabbit meat based on headspace solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(14): 235−243.]
[38] ESCUDERO A, ARIAS I, LACAU B, et al. Effects of vineyard 'potential' and grape maturation on the aroma-volatile profile of grenache wines[J]. OENO One, 2019, 53(4): 2381.
[39] 韦友兵, 吴香, 周辉, 等. 萨拉米发酵成熟过程中微生物菌群变化及对风味的影响[J]. 肉类研究, 2018, 32(12): 48−54. [WEI Y B, WU X, ZHOU H, et al. Changes of microbial flora during the fermentation of Salami and their effect on flavor[J]. Meat Research, 2018, 32(12): 48−54.]
[40] 张权, 李金林, 胡明明, 等. 基于电子鼻和 SAFE-GC-MS 分析调味小龙虾挥发性风味特征差异[J/OL]. 食品与发酵工业, 1−14. [2024-08-15]. https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.036446. [ZHANG Q, LI J L, HU M M, et al. Analysis of volatile flavor characteristics of seasoned crayfish based on electronic nose and SAFE-GC-MS[J/OL]. Food and Fermentation Industries, 1−14. [2024-08-15]. https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.036446.]
[41] 韩颖, 易宇文, 何莲, 等. 基于电子鼻和气质联用分析萌芽大蒜挥发性物质差异[J]. 食品工业科技, 2024, 45(5): 243−252. [HAN Y, YI Y W, HE L, et al. Analysis of the difference of volatile substances in sprouted garlic based on electronic nose and GC-MS[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(5): 243−252.]
[42] 刘斌善, 魏晓明, 邵丹青, 等. GC-MS/O 结合香气活性值表征烧麦中关键香气成分及其贮存过程中的变化情况[J]. 食品科学, 2023, 44(6): 268−276. [LIU B S, WEI X M, SHAO D Q, et al. Characterization of the key odorants in Shaomai and their changes during storage by GC-MS/O coupled with OAV[J]. Food Science, 2023, 44(6): 268−276.]
[43] ZHU Y, CHEN J, CHEN X, et al. Use of relative odor activity value (ROAV) to link aroma profiles to volatile compounds: Application to fresh and dried eel (*Muraenesox cinereus*)[J]. International Journal of Food Properties, 2020, 23(1): 2257−2270.
[44] 饶伟丽. 风干肉热风干过程中水分迁移机制研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2018. [RAO W L. Mechanis m of water migration in air-dried meat during hot air drying[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural, 2018.]

邓俊琳, 夏陈, 杨开俊, 等. 青稞全谷物、青稞米和青稞麸皮中多酚化合物的定量分析及抗氧化活性评价 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 246−253. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110217
DENG Junlin, XIA Chen, YANG Kaijun, et al. Quantitative Analysis and Antioxidant Activity of Polyphenolic Compounds in Whole Grain, Rice, and Bran of Hulless Barley[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 246−253. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110217

· 分析检测 ·

青稞全谷物、青稞米和青稞麸皮中多酚化合物的定量分析及抗氧化活性评价

邓俊琳[1], 夏　陈[1], 杨开俊[2], 刘廷辉[2], 陈　建[1], 谢世刚[2], 向卓亚[1], 杨　星[1], 朱柏雨[1], 余鳗游[1,*]
（1.四川省农业科学院农产品加工研究所（四川省农业科学院食物与营养健康研究所）, 四川成都 610066;
2.甘孜藏族自治州农业科学研究所, 四川康定 626000）

摘　要: 为对比分析青稞全谷物、青稞米和麸皮中多酚化合物的含量及其抗氧化活性，以紫青稞和糯青稞为原料，研磨收集青稞全谷物、青稞米和麸皮，提取其中的 β-葡聚糖并检测含量，提取游离酚和结合酚并分析其总多酚、总黄酮含量，并采用 UPLC 定量分析多酚提取物中的原儿茶酸、对羟基苯甲酸、香草酸、咖啡酸、香草醛、对香豆酸、阿魏酸、芥子酸、木犀草素-7-O 葡萄糖醛酸、柯伊利素-7-O 葡萄糖醛酸、木樨草素、柯伊利素、花青素和 8 种阿魏酸二聚体，通过 DPPH、ABTS 评价游离和结合多酚提取物的抗氧化活性。结果表明：β-葡聚糖在全谷物和青稞米中含量较接近，但二者显著高于青稞麸皮（P<0.05）；总多酚含量在紫青稞和糯青稞中均呈现麸皮>全谷物>青稞米，且均表现出总多酚含量在游离酚提取物中高于结合酚提取物；总黄酮含量在紫青稞和糯青稞的游离酚提取物中仍呈现麸皮>全谷物>青稞米，且总黄酮含量呈现游离酚提取物中高于结合酚提取物；经过对 21 种单体酚的定量分析，发现青稞麸皮中检测到的结合多酚种类最多，其次为青稞全谷物，青稞米中最少，所有检测到的多酚中，其含量均呈现为麸皮>全谷物>青稞米，此外，阿魏酸含量在紫青稞和糯青稞麸皮的结合酚提取物中含量远高于其他多酚。紫青稞麸皮的游离酚提取物中检测到高含量的柯伊利素-7-O 葡萄糖醛酸（1780.78 μg/g）和花青素（2137.67 μg/g）。抗氧化实验表明青稞麸皮具有强于青稞全谷物和青稞米的清除 DPPH 和 $ABTS^{+}$自由基的能力。本研究为青稞全谷物以及青稞麸皮的开发利用提供了理论基础。

关键词: 青稞, 多酚, 花青素, UPLC, 抗氧化活性
中图分类号: TS210.1　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2024)21−0246−08
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110217
本文网刊:

Quantitative Analysis and Antioxidant Activity of Polyphenolic Compounds in Whole Grain, Rice, and Bran of Hulless Barley

DENG Junlin[1], XIA Chen[1], YANG Kaijun[2], LIU Tinghui[2], CHEN Jian[1], XIE Shigang[2], XIANG Zhuoya[1], YANG Xing[1], ZHU Boyu[1], YU Manyou[1,*]
（1.Institute of Agri-products Processing Science and Technology/Institute of Food Nutrition and Health, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, China;
2.Ganzi Tibetan Autonomous Prefecture Institute of Agricultural Sciences, Kangding 626000, China）

Abstract: This study focused on the extraction and analysis of β-glucan, free and bound phenols, total phenolic content (TPC), and total flavonoid content (TFC) from whole grain, rice, and bran of purple and glutinous hulless barley, and assessment of the antioxidant activity of extracts. Ultra-high-performance liquid chromatography (UPLC) quantified

收稿日期: 2023−11−21
基金项目: 四川省农业科学院人才引进项目（2024）; 四川省农业科学院-甘孜藏族自治州合作项目（2023）; 四川省农业科学院 1+9 科技攻关项目（1+9KJGG007）。
作者简介: 邓俊琳（1988−）, 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 功能食品研究开发, E-mail: 237251337@qq.com。
*** 通信作者:** 余鳗游（1988−）, 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 功能食品研究开发, E-mail: jiangymy518@163.com。

various phenolic compounds, including protocatechuic aicd, p-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, caffeic acid, vanillin, p-coumaric acid, ferulic acid, sinspic acid, luteolin-7-O-glucuronide, chrysoeriol-7-O-glucuronide, luteolin, chrysoeriol, anthocyanin and 8 types of ferulic acid dimers. The antioxidant activities of free and bound phenolic extracts were evaluated by using DPPH and $ABTS^+$ free radical scavenging assays. The results revealed that β-glucan content was comparable in whole grains and barley rice but significantly higher than that in bran (P<0.05). TPC and TFC were higher in bran than in whole grains or rice, with free phenolic extracts showing higher content than bound phenolic extracts. Bran contained a greater variety and higher content of bound polyphenols, followed by whole grains and rice. Particularly, ferulic acid was abundant in the bound phenolic extracts of bran of both barley types. The free phenolic extract of purple hulless barley bran showed high levels of chrysoeriol-7-O-glucuronic acid (1780.78 μg/g) and anthocyanins (2137.67 μg/g). Antioxidant assays demonstrated that hulless barley bran exhibited a stronger capability to scavenge DPPH and $ABTS^+$ free radicals than whole grains and rice. This study provides a partial theoretical basis for the development and utilization of whole grain of hulless barley and hulless barley bran.

Key words: hulless barley; polyphenol; anthocyanin; UPLC; antioxidant activity

青稞（*Hordeum vulgare* L. var. *nudum* Hook. f），属禾本科大麦属一年生早本植物，是多棱大麦亚种里的多棱裸粒大麦变种群，又名裸大麦、米大麦、元麦，因其成熟以后内外颖壳分离，籽粒裸露而得名[1]。青稞具有生长周期短、耐寒、耐贫瘠等特点，主要生长于世界各地的高原地区，在我国主要分布于西藏、青海、甘肃（甘南）、四川（甘孜州和阿坝州）和云南（迪庆）等地[2]。青稞是一种优质的谷类作物，其组分具有“三高两低”的特点，即高纤维、高蛋白、高维生素和低糖、低脂肪，此外还富含矿物质、维生素，以及 β-葡聚糖、γ-氨基丁酸、植物甾醇、酚酸、黄酮、花青素等功能物质[3]，据报道青稞对糖尿病、心血管疾病、肠道癌等有预防和缓解作用[4−5]。

研究表明全谷物和全谷物制品的食用比单纯摄入能量和营养对人体更加健康，在一定程度上可以缓和慢性疾病的发展，这与其所含的活性成分密切相关，包括膳食纤维、多酚、β 葡聚糖、生育酚、抗性淀粉等[6]。在谷物中多酚类化合物是主要的抗氧化成分，被认为是全谷物发挥作用的主要物质基础[7]。青稞中多酚类化合物主要为酚酸类、黄酮类、二苯乙烯类和木酚素类等，常与有机酸、胺类、脂质、多糖、其他酚类等以糖苷键连接[8]，形成游离型、结合型、酯化型三种形态存在[9]。β-葡聚糖是青稞胚乳和糊粉层细胞壁的主要组成成分，可降低血浆中胆固醇和脂肪含量，从而有效预防高血脂症、高血压症和心血管疾病等，常被作为评价青稞品质的重要指标，是青稞中重要的功能物质，据报道青稞是世界上麦类作物中 β-葡聚糖含量最高的作物[10]。青稞在加工过程中通常去除麸皮而保留胚和胚芽，青稞麸皮中含有 β-葡聚糖、黄酮、多酚、花青素等活性物质[11−13]，但是目前青稞麸皮多用于动物饲料或直接废弃，这导致大量生物活性物质的浪费。已有研究对青稞中活性成分的研究多以化合物定性为主[14−15]，鲜有关于青稞麸皮与青稞全谷物和青稞米定量分析比较研究，本研究团队在前期对青稞中的三种形态多酚做了质谱鉴定，但因缺乏标准品仅对少量多酚单体做定量分析，本实验收集了 21 种多酚单体标准品，对紫青稞和糯青稞两个青稞品种的全谷物、青稞米和麸皮三个部位的游离和结合态多酚提取物进行定量分析，并检测总多酚、总黄酮和 β-葡聚糖含量，同时评价其抗氧化活性，以期为青稞加工，以及青稞中多酚与 β-葡聚糖的利用提供理论基础。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

紫青稞（康青 11 号）、糯青稞（中糯 8 号）　甘孜藏族自治州农业科学研究所提供；甲醇、福林酚试剂、没食子酸、芦丁　上海研生生化试剂有限公司；Megazyme 试剂盒　爱尔兰 Megazyme 公司；原儿茶酸、对羟基苯甲酸、香草酸、咖啡酸、香草醛、对香豆酸、阿魏酸、芥子酸、木犀草素-7-O-葡萄糖醛酸、木樨草素、矢车菊-3-芸香糖，阿魏酸二聚体：8-5 二聚体（8-5-DFA）、8-5（脱羧）二聚体（8-5dc-DFA）、8-8 开环二聚体（8-8nc-DFA）、8-8（芳基萘满）二聚体（8-8c-DFA）、8-8（四氢呋喃）二聚体（8-8thf-DFA）、5-5 二聚体（5-5-DFA）、8-O-4 二聚体（8-O-4-DFA）、5-O-4 二聚体（5-O-4-DFA）　纯度≥98%，北京索莱宝科技有限公司；柯伊利素-7-O-葡萄糖醛酸、柯伊利素　本实验室分离纯化获得，纯度≥98%，经核磁、质谱、红外等鉴定且相关数据已发表论文[16]。

3000FA 型多功能酶标仪　上海闪谱公司；1290 高效液相色谱仪（配备自动进样器、二元泵、柱温箱、DAD 检测器）　美国 Agilent 公司；JNM-III 型实验室用小型碾米机　成都中储粮研究所；UPC-1-10T 型优普系列超纯水机　成都超纯科技有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　青稞全谷物、青稞米、青稞麸皮的制备　称取 20 g 青稞，研磨得 7% 的青稞皮粉，平行三次，合并得青稞皮粉。收集青稞全谷物、研磨后的青稞米、研磨后的皮粉，粉碎过 40 目筛，备用。

1.2.2　β-葡聚糖的提取与测定　青稞粉 0.1 g 于 15 mL 离心管中，加 0.2 mL 50% 乙醇溶液混匀，再加 4 mL 磷酸盐缓冲液（20 mmol/L，pH6.5）混匀，于

沸水浴中加热 5 min, 每隔半分钟取出于漩涡振荡器混匀, 防止其结块。再于 50 ℃ 水浴 5 min, 加 0.2 mL 地衣酶(10 U), 于 50 ℃ 恒温水浴锅中酶解 1 h。加入 5 mL 醋酸钠缓冲液(200 mmol/L, pH4.0)混匀 5 min, 1000 r/min 离心 10 min, 取上清液即为待测样品液, β-葡聚糖含量采用 β-葡聚糖试剂盒法测定, 以 D-木糖为标准品绘制标准曲线(y=0.5096x−0.0073, R^2=0.9959, 线性范围 0~0.6 mg/mL)。

1.2.3 游离酚和结合酚的提取 提取方法参考 Xia 等[9], 略作修改。称取 2.0 g 样品加入 20 mL 80% 丙酮, 30 ℃ 超声 20 min, 6000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 残渣再重复提取 2 次, 合并上清液, 45 ℃ 减压浓缩蒸干, 再用甲醇定容至 5 mL, 得青稞游离酚提取物, −20 ℃ 避光保存。向提取过游离酚的残渣中加入 20 mL 正己烷, 振荡后离心(2000 r/min, 5 min)弃去上清液, 向沉淀物中加入 15 mL 10% 甲醇硫酸溶液, 70 ℃ 下水浴 1 h。用 20 mL 乙酸乙酯萃取 5 次, 离心(4000 r/min, 5 min), 合并乙酸乙酯萃取相, 在 45 ℃ 条件下旋转蒸发至干, 残余物用甲醇定容至 5 mL, 得青稞结合酚提取物, −20 ℃ 避光保存。

1.2.4 总多酚和总黄酮含量测定 采用福林酚法测定总多酚含量, 20 μL 待测液中加入 20 μL 福林酚试剂, 混匀静置 5 min, 加入 80 μL 10% Na_2CO_3 溶液, 室温避光反应 60 min, 于 765 nm 处测吸光值。以没食子酸溶液的质量浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标绘制标准曲线。没食子酸线性回归方程为 y=0.004x+0.082, 线性范围为 8.1~260 μg/mL, R^2=0.9992。$NaNO_2$-$Al(NO_3)_3$-NaOH 比色法测定总黄酮含量, 待测液中加入 10 μL 25%(m/v)$NaNO_2$ 反应 6 min, 再加入 10 μL 10% $AlCl_3$ 反应 5 min, 加入 30 μL 1 mol/L NaOH, 于 510 nm 处测定吸光值, 以芦丁溶液的质量浓度(μg/mL)为横坐标, 吸光值为纵坐标绘制标准曲线, 得到芦丁线性回归方程为 y=0.0013x+0.0655, R^2=0.9993, 线性范围为 29.375~470 μg/mL。

1.2.5 多酚单体和花青素含量测定 应用超高效液相色谱法[9]。提取液经 0.22 μm 微孔水相膜过滤进样分析, 色谱柱安捷伦 Poroshell 120 PFP column (4.6 mm×100 mm, 2.7 μm); DAD 检测器, 多酚检测波长 254、280、320 和 350 nm, 花青素(矢车菊-3-芸香糖)525 nm; 柱温 30 ℃; 流速 0.8 mL/min; 进样量 5 μL。流动相: A 为 0.1% 甲酸水, B 为乙腈, 梯度洗脱: 0~10 min(5%~10% B), 10~20 min(10%~20% B), 20~35 min(20%~40% B), 35~40 min(40%~70% B), 40~45 min(70%~95% B)。称取一定量标准品, 分别用甲醇溶解并定容至 5 mL 作为标准品母液, 以二倍稀释法制备不同浓度梯度标准品溶液, 以质量浓度(μg/mL)为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 得线性方程如表 1 所示。

1.2.6 抗氧化活性评价 采用 DPPH 和 $ABTS^+$自由基清除法测定青稞多酚提物的体外抗氧化活性[17], 100 μL 样品中加入等体积 80% DPPH 甲醇溶液(48 μg/mL), 室温静置 30 min 后于 517 nm 测吸光值, 标准曲线制作: 水溶性维生素 E(Trolox, 母液浓度 56 μg/mL, 无水乙醇配制), 二倍稀释, 以浓度和吸光值绘制曲线, Y=0.021X−0.005, R^2=0.9997, 线性范

表 1 多酚单体和花青素标准品的标准曲线

Table 1 Standard curves of polyphenol monomers and anthocyanin standards

名称	检测波长(nm)	线性回归方程	R^2	线性范围(μg/mL)
8-5-DFA	320	y=11.389x+2.4316	0.9997	1.15625~37
8-5dc-DFA	320	y=39.224x−14.206	0.9999	0.79375~50.8
8-8nc-DFA	320	y=31.932x−3.7233	0.9999	0.778~49.8
8-8c-DFA	320	y=17.158x+2.7055	0.9996	1.01~64.7
8-8thf-DFA	280	y=4.9636x−0.1315	0.9988	3.04~48.7
5-5-DFA	320	y=27.939x−0.0119	0.9998	0.8~51.2
8-O-4-DFA	320	y=30.197x+1.1451	0.9996	0.4875~31.2
5-O-4-DFA	320	y=32.246x−2.7407	0.9996	0.4828~30.9
原儿茶酸	254	y=22.073x−8.3669	0.9999	1.12~280
对羟基苯甲酸	254	y=40.37x+4.554	0.999	0.64~320.9
香草酸	280	y=19.58x+1.253	0.999	1.0~250.2
咖啡酸	320	y=34.67x−21.02	0.999	1.04~267
香草醛	280	y=23.89x−0.690	0.9999	1.2~301.5
对香豆酸	320	y=40.14x−11.39	0.998	0.67~167
阿魏酸	320	y=40.163x−1.3353	0.999	0.5~200
芥子酸	320	y=28.36x−1.624	0.999	0.5~202.8
木犀草素-7-O-葡萄糖醛酸	350	y=11.245x+2.217	0.9999	2~200
柯伊利素-7-O-葡萄糖醛酸	350	y=9.3088x−64.583	0.9999	2.5~225
木樨草素	350	y=10.11x−7.34	0.9999	2~200
柯伊利素	350	y=12.366x+1.0054	0.9999	2.46~246
矢车菊-3-芸香糖	525	y=2.6728x+5.2883	0.9999	0~0.6

围 0.4375~14 μg/mL，DPPH 自由基清除率以 Trolox 当量计算，单位为 mg/g。取 40 μL 样品，加入 160 μL 80% 甲醇 ABTS 溶液（A=0.7 左右），避光反应 6 min 于 734 nm 处测定吸光值，Trolox（母液浓度 56 μg/mL，无水乙醇配制），稀释（28、14、7、5.6、2.8 μg/mL）制作标准曲线，以浓度和吸光值绘制曲线，Y=0.0117X−0.0086，R^2=0.9995，线性范围 2.8~28 μg/mL，$ABTS^+$自由基清除率以 Trolox 当量计算，单位为 mg/g。

1.3　数据处理

所有数据均为 3 次重复实验的平均值，应用 Microsoft Excel 97-2003 和 SPSS 20.0 对数据进行处理和分析，采用 Origin 2021 作图。

2　结果与分析

2.1　青稞全谷物、青稞米和麸皮中 β-葡聚糖含量分析

由图 1 可知，β-葡聚糖在紫青稞和糯青稞的全谷物和青稞米中含量较接近，同时二者显著高于青稞麸皮（P<0.05），这说明 β-葡聚糖既存在于青稞米（胚乳和胚芽）中也存在于麸皮中（果皮、种皮、糊粉层和亚糊粉层），但其含量在青稞麸皮中最少。江春艳等[18]报道 β-葡聚糖是青稞籽粒胚乳细胞壁的主要成分，占细胞壁干重的 75% 左右，此外，张峰等[19]报道 β-葡聚糖存在于糊粉层和亚糊层的交界面。不同颜色青稞的总 β-葡聚糖含量为 5.81%~6.29%，Lin 等[20]认为彩色的青稞具有更高含量的 β-葡聚糖，但本次实验中，β-葡聚糖在糯青稞中含量高于紫青稞，这可能与品种差异有关，有学者认为 β-葡聚糖的含量会因作物的品种和栽培地的不同而存在着极大的差异[21]。

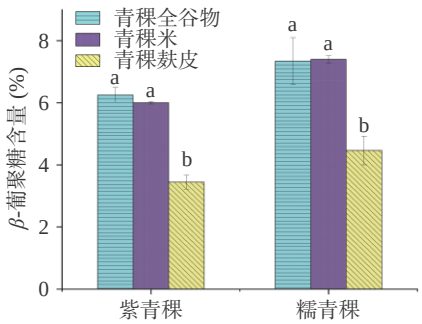


图 1　紫青稞和糯青稞的全谷物、青稞米和麸皮中 β-葡聚糖的含量

Fig.1　Contents of β-glucan in whole grain, rice, and bran from purple and glutinous hulless barley

注：组内不同字母表示差异显著（P<0.05）。

2.2　青稞中总多酚和总黄酮含量分析

由图 2A 和图 2B 可知，游离酚和结合酚提取物中，总多酚含量在紫青稞和糯青稞中均呈现麸皮>全谷物>青稞米，这与 Xia 等[9]、Šimić等[22]和 Feng 等[23]在青稞中的研究结果一致。多酚作为植物次生代谢产物，在植物种子萌发、植物生长和发育、植物抗霜冻和防御病虫害等过程中均起到重要作用[24−25]，在种子中其分布常由外到内依次降低[26]。此外，在紫青稞

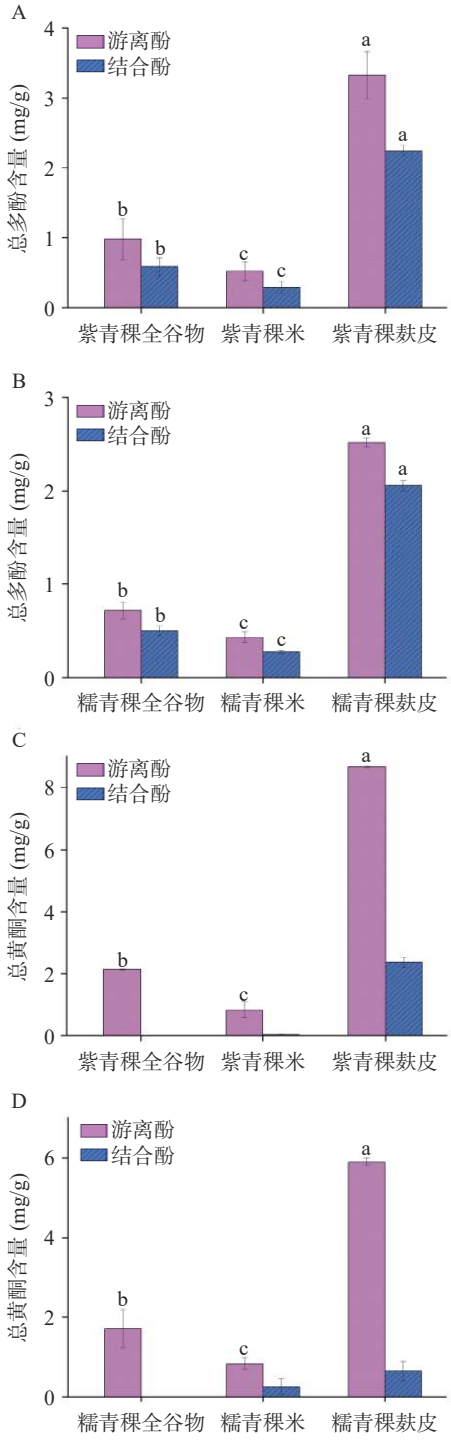


图 2　紫青稞和糯青稞的游离酚与结合酚提取物中总多酚和总黄酮含量

Fig.2　TPC and TFC in free and bound phenolic extracts of purple and glutinous hulless barley

注：组间不同字母表示差异显著（P<0.05）；图 3 同。

和糯青稞中均表现出总多酚含量在游离酚提取物中高于结合酚提取物，这与 Narwal 等[27]和 Deng 等[28]在青稞中发现结合酚含量高于游离酚的结果相反，推测这可能由品种差异造成，不同品种可能具有独特的多酚化合物，比如在表 3 的结果中，紫青稞的 3 种游离酚提取物中均检测到柯伊利素-7-O 葡萄糖醛酸，且在紫青稞麸皮中含量高达 1780.78 μg/g，以及在紫青稞麸皮中检测到高含量的花青素（2137.67 μg/g），

但这两种化合物以及木犀草素-7-O 葡萄糖醛酸、木犀草素、柯伊利素在糯青稞的 3 种提取物中均未检测到。但这一结果与 Xia 等[9] 在青稞分层研磨试验中的结果相似，其将青稞通过研磨由外到内依次分成 5 个组分，发现这 5 个组分中的总多酚含量均呈现在游离酚提取物中高于结合酚提取物，此外 Zhang 等[29] 和 Pradeep 等[30] 在黑米麸皮和小米中也发现相似的结果。

黄酮类化合物是一类以二苯基色原酮（C6-C3-C6）为基本骨架，由两个芳香环（A 环与 B 环）通过中间三碳结构连接而成的植物次生代谢产物，具有优良的抗氧化和抗癌活性[31]。紫青稞和糯青稞的全谷物结合酚提取物中均未检测到总黄酮，这可能是含量过低导致。由图 2C 和图 2D 可知，总黄酮含量在紫青稞和糯青稞的游离酚提取物中仍呈现麸皮>全谷物>青稞米，这一趋势与总多酚在游离酚提取物中的变化趋势一致。Xia 等[9] 也发现青稞最外层组分中黄酮含量最高，由外到内依次降低。黄酮类化合物在多酚中所占比例最大，超过 4000 种天然酚类化合物都归属于此，主要以结合态（黄酮苷）存在，少量以游离态（黄酮苷元）的形式存在于植物体内[32]，但本实验中紫青稞和糯青稞中总黄酮含量均呈现游离酚提取物中高于结合酚提取物，这与 Xia 等[9] 的结果一致，推测这可能与品种差异有关，不同品种含有特异性的黄酮化合物，比如紫青稞麸皮的游离酚提取物中检测到高含量的柯伊利素-7-O 葡萄糖醛酸（1780.78 μg/g）和花青素（2137.67 μg/g），但糯青稞麸皮的游离酚提取物中并未检测到这些物质。

2.3 青稞提取物中多酚化合物的定量分析

2.3.1 青稞结合酚提取物中多酚定量分析 本实验共有 21 种单体酚对照品，由表 2 可知，紫青稞麸皮中检测到 16 种结合酚，糯青稞麸皮中检测到 13 种；紫青稞全谷物检测到 6 种结合酚，糯青稞全谷物中检测到 8 种；紫青稞米中检测到 4 种结合酚，糯青稞米中仅检测到 2 种，这一结果表明青稞麸皮中检测到的结合酚种类最多，其次为青稞全谷物，青稞米中最少，所有检测到的多酚中，其含量均呈现为麸皮>全谷物>青稞米，这一结果与总多酚含量的变化趋势一致。Xia 等[9] 和Šimić等[22] 也在青稞的麸皮中检测到比青稞胚和胚乳中更多种类和含量的结合酚。此外，阿魏酸在紫青稞和糯青稞的结合酚中含量远高于其他多酚，这与其他学者们在青稞和大麦中关于阿魏酸的研究结果一致[33−34]，其次为 8-O-4-DFA、8-8c-DFA、8-8nc-DFA、8-5dc-DFA、对香豆酸等。Martínez 等[34] 在青稞中检测到的主要多酚为阿魏酸（顺和反式），及其二聚体和三聚体、对香豆酸等。目前已知的阿魏酸脱氢二聚体共有 9 种[35]，本实验中在紫青稞麸皮和糯青稞麸皮中均检测到 7 种阿魏酸二聚体，Lyons 等[36] 认为细胞壁的阿魏酰化在一定程度上能够抗病原体和昆虫。阿魏酸（4-羟基-3-甲氧基肉桂酸）是植物多酚中含量最高的酚酸之一，其很少以游离态存在，常与多糖、蛋白质、木质素和膳食纤维等共价结合出现[37]，被认为是谷物细胞壁上含量最高的多酚[38]，研究认为阿魏酸是细胞壁木质化的起点和晶核，其在细胞壁上的沉积导致了植物生长和发育期间细胞壁内大分子的交联以及控制着细胞壁内非随机模式的木素形成[39]。此外，紫青稞和糯青稞在全谷物、青稞米、麸皮中阿魏酸含量均呈现较大差异，这表明阿魏酸含量在青稞中受品种影响较大，这与 Zhu 等[40] 的研究结果一致。除了阿魏酸及其二聚体外，还在青稞麸皮中检测到对香豆酸、香草醛、咖啡酸、香草酸、对羟基苯甲酸、柯伊利素-7-O 葡萄糖醛酸、芥子酸等多酚。

2.3.2 青稞游离酚提取物中多酚定量分析 紫青稞麸皮中发现有柯伊利素-7-O 葡萄糖醛酸、花青素、木犀草素-7-O 葡萄糖醛酸、木犀草素、柯伊利素，但在糯青稞中并未检测到这些化合物，Serafino 等[21] 认为大麦籽粒中黄酮类化合物的含量常与谷粒颜色的深浅成比例，紫色和蓝色大麦籽粒中黄酮含量通常比其他颜色籽粒更高。糯青稞颜色为白色，其含有较高含量的支链淀粉（经检测含量约为 59%，紫青稞支链淀粉含量 46%）。由表 3 可知，紫青稞麸皮中检测到高含量的柯伊利素-7-O 葡萄糖醛酸（1780.78 μg/g），在之前关于青稞游离酚的研究中也发现游离酚中含

表 2 紫青稞和糯青稞的结合酚提取物中多酚含量（μg/g）

Table 2 Contents of polyphenols in bound phenolic extracts of purple and glutinous hulless barley (μg/g)

样品		原儿茶酸	对羟基苯甲酸	香草酸	咖啡酸	香草醛	对香豆酸	阿魏酸	芥子酸	8-5-DFA	5-5-DFA	8-8thf-DFA	柯伊利素-7-O葡萄糖醛酸	8-8c-DFA	8-8nc-DFA	8-O-4-DFA	5-O-4-DFA	8-5dc-DFA
紫青稞	麸皮	13.54±2.51	4.49±0.32	7.08±0.65	7.35±1.46	4.33±0.34	7.19±1.24	158.14±2.43	2.76±0.24	10.76±1.79	2.05±0.28	9.19±0.77	82.55±2.76	30.10±1.75	12.57±1.35	32.54±2.30	–	6.85±0.68
	全谷物	–	–	–	–	–	–	37.91±0.29	–	2.26±0.20	–	–	–	4.82±1.23	2.95±0.69	7.14±1.18	–	2.56±0.02
	青稞米	–	–	–	–	–	–	23.08±1.70	–	–	–	–	–	1.34±0.16	1.62±0.17	2.91±0.42	–	–
糯青稞	麸皮	–	–	3.91±0.82	4.95±0.64	3.79±0.34	7.57±0.10	376.29±0.81	2.27±0.16	28.74±0.94	2.32±0.05	–	–	39.69±1.50	33.19±2.09	65.58±1.20	1.48±0.38	23.07±1.27
	全谷物	–	–	–	–	2.29±0.55	4.02±0.10	176.96±6.39	–	11.27±0.86	–	–	–	16.83±0.64	16.97±0.40	32.11±1.23	–	8.01±0.69
	青稞米	–	–	–	–	–	–	13.73±1.93	–	–	–	–	–	–	–	1.62±0.73	–	–

表 3　紫青稞的游离酚提取物中多酚含量(μg/g)

Table 3　Contents of polyphenols in free phenolic extracts of purple hulless barley (μg/g)

样品	花青素	木犀草素-7-O葡萄糖醛酸	柯伊利素-7-O葡萄糖醛酸	木犀草素	柯伊利素
紫青稞麸皮	2137.67±6.90	144.31±1.16	1780.78±4.06	48.46±2.63	274.59±0.99
紫青稞全谷物	246.77±11.62	21.53±0.03	404.40±1.14	–	41.87±0.55
紫青稞米	–	–	80.28±0.18	–	–

有高含量的柯伊利素-7-O 葡萄糖醛酸[9]。此外，紫青稞麸皮和全谷物中均检测到高含量的花青素 2137.67、246.77 μg/g，但在糯青稞中未检测到，向卓亚等[41]在白青稞麸皮中也未检测到花青素，但在黑青稞中检测到 7.08 mg/g 的花青素含量。王姗姗等[42]对来自西藏地区的 268 份具有不同粒色的青稞种质资源的多酚与花青素含量进行了研究，发现花青素含量由高到低依次为紫青稞>蓝青稞>褐青稞>白青稞，且花青素含量与多酚含量呈线性关系。张毅等[43]认为大麦籽粒颜色与花青素含量之间存在密切关系，可通过籽粒颜色来初步判断花青素含量的高低。

2.4　青稞多酚提取物抗氧化活性评价

由图 3 可知，DPPH 和 $ABTS^+$自由基清除能力在紫青稞提取物中均呈现青稞麸皮>青稞全谷物>青稞米，且游离酚提取物的清除自由基能力强于结合酚提取物，这与本实验中总多酚含量在紫青稞麸皮、全谷物和青稞米中的游离酚提取物与结合酚提取物中的变化趋势相同，多酚被认为是谷物中重要的抗氧化成分[7−8]，因此推测紫青稞麸皮高含量的多酚引起更强的抗氧化活性，Serafino 等[21]和 Arigò等[44]也有相似的研究结果。此外表 2 和表 3 也表明紫青稞麸皮中定量分析到更多种类和更高含量的多酚化合物。

糯青稞提取物中也呈现青稞麸皮抗氧化能力强与青稞全谷物和青稞米，但是在清除 DPPH 自由基的能力方面，糯青稞米强于糯青稞全谷物。糯青稞全谷物的结合酚提取物中未检测到总黄酮(图 2D)，但在糯青稞米的结合酚提取物中检测到总黄酮(0.25 mg/g)，因此推测糯青稞米结合酚检测到的这部分黄酮化合物可能具有较强的清除 DPPH 自由基的能力。黄酮类化合物在体外的抗氧化活性取决于母核结构上的官能团种类、数量和排列位置，进而影响其清除促氧化剂的有效性[45]。此外，糯青稞全谷物和糯青稞米对 DPPH 的清除能力和糯青稞全谷物对 $ABTS^+$自由基的清除能力均呈现游离酚提取物强于结合酚，这与糯青稞的游离酚提取物具有更高含量的总多酚和总黄酮相一致。但糯青稞麸皮的结合酚提取物对 DPPH 和 $ABTS^+$自由基的清除能力强于游离酚提取物，由表 3 可知，紫青稞麸皮游离酚提取物中定量分析到高含量的花青素(2137.67±6.9 μg/g)，但在糯青稞的游离酚提取物中未检测到，因此推测糯青稞麸皮的游离酚提取物中花青素的缺乏，导致其对清除 DPPH 和 $ABTS^+$自由基的能力明显弱于紫青稞麸皮的游离酚提取物，同时也弱于糯青稞麸皮的结合酚提取物。花青素具有缺电子的结构特征，极易受到活

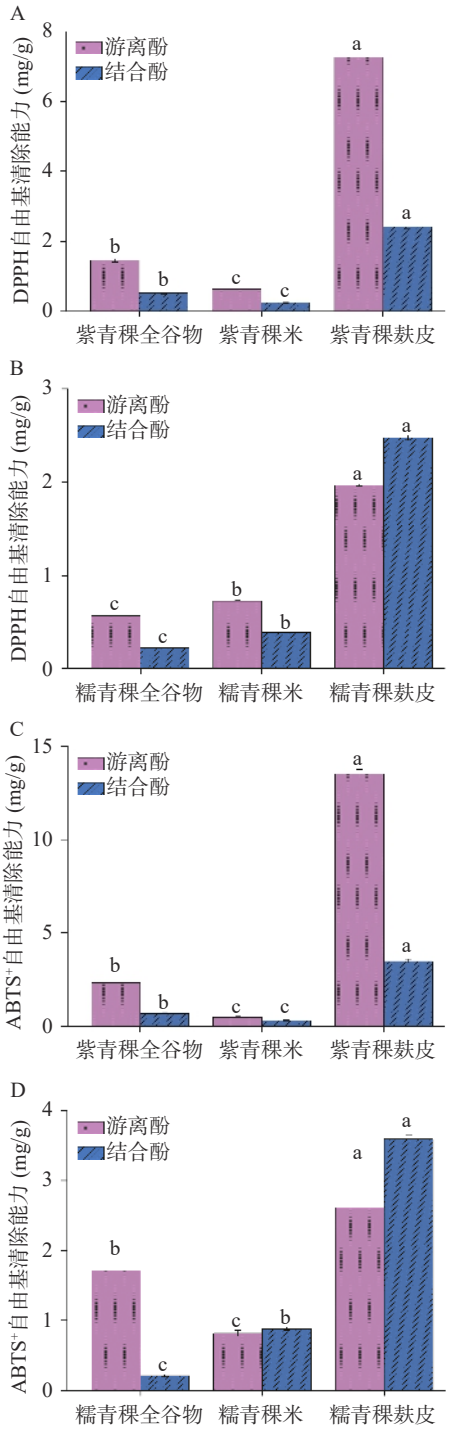


图 3　紫青稞和糯青稞的游离酚与结合酚提取物的抗氧化活性

Fig.3　Antioxidant activities of free and bound phenolic extracts of purple and glutinous hulless barley

性氧负离子和自由基的攻击，研究表明植物花青素的抗氧化作用是 V_C 的 30 倍、V_E 的 50 倍，是目前最好的天然抗氧化剂，其中矢车菊色素的抗氧化作用最强[46]。

3 结论

通过对紫青稞和糯青稞两种青稞的麸皮、全谷物和青稞米进行 β-葡聚糖，多酚化合物定量分析及抗氧化研究，发现青稞中 β-葡聚糖在糯青稞中含量高于紫青稞，在全谷物和青稞米中含量较接近且显著高于青稞麸皮中（$P<0.05$）；其次，青稞中总多酚在紫青稞中含量高于糯青稞，且其含量在两种青稞的游离酚和结合酚提取物中均呈现麸皮>全谷物>青稞米，总黄酮在两种青稞的游离酚提取物中也呈现麸皮>全谷物>青稞米，游离酚提取物中总多酚和总黄酮含量都高于结合酚提取物；通过 UPLC 定量分析发现青稞麸皮中结合酚种类最多，青稞全谷物中次之，青稞米中最少，所有检测到的多酚含量在两种青稞中均呈现麸皮>全谷物>青稞米，此外紫青稞和糯青稞麸皮的结合酚提取物中均检测到高含量的阿魏酸（158.14±2.43、376.29 μg/g），在紫青稞麸皮的游离酚提取物中检测到高含量的柯伊利素-7-O 葡萄糖醛酸（1780.78 μg/g）和花青素（2137.67 μg/g）；最后通过抗氧化实验表明，两种青稞的麸皮的抗氧化活性均远高于全谷物和青稞米。本研究为青稞全谷物以及青稞麸皮的开发利用提供了部分理论基础。

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

参考文献

[1] 谢万宗. 本草纲目药物彩色图鉴[M]. 北京：人民卫生出版社, 2001：221. [XIE W Z. Medicine llustrated handbook of compendium of materia medica[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2001: 221.]

[2] 赵波. 青稞适度加工稳定化关键技术及制品品质改良机制研究[D]. 北京：中国农业科学院, 2021. [ZHAO B. Research on the key technology of hull-less barley moderate process and stabilization and mechanism for improvement of product quality[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2021.]

[3] ZHANG K, YANG J, QIAO Z, et al. Assessment of β-glucans, phenols, flavor and volatile profiles of hulless barley wine originating from highland areas of China[J]. Food Chemistry, 2019, 293: 32−40.

[4] DENG N, ZHENG B S, LI T, et al. Assessment of the phenolic profiles, hypoglycemic activity, and molecular mechanism of different highland barley (*Hordeum vulgare* L.) varieties[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(4): 1175.

[5] GUO T L, HORVATH C, CHEN L, et al. Understanding the nutrient composition and nutritional functions of highland barley (Qingke): A review[J]. Trends in Food Science and Technology, 2020, 103: 109−117.

[6] BORNEOR, LEÓN A E. Whole grain cereals: Functional components and health benefits[J]. Food and Function, 2012, 3(2): 110−119.

[7] VAN HUNG P. Phenolic compounds of cereals and their antioxidant capacity[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2016, 56(1): 25−35.

[8] LIU R H. Whole grain phytochemicals and health[J]. Journal of Cereal Science, 2007, 46(3): 732−737.

[9] XIA C, YANG K, ZHU Y, et al. Distribution of free and bound phenolic compounds, β-glucan, and araboxylan in fractions of milled hulless barley[J]. LWT, 2022, 169: 113935.

[10] 文一. 青稞 β-葡聚糖的降血脂功能研究[D]. 重庆：西南农业大学, 2005. [WEN Y. Studies on antilipemic function of β-glucan from highland barley[D]. Chongqing: Southwest Agricultural University, 2005.]

[11] ZHANG W G, LAN Y L, DANG B, et al. Polyphenol profile and *in vitro* antioxidant and enzyme inhibitory activities of different solvent extracts of highland barley bran[J]. Molecules, 2023, 28(4): 1665.

[12] WIEGE I, SLUKOVÁ M, VACULOVÁ K, et al. Characterization of milling fractions from new sources of barley for use in food industry[J]. Starch-Stärke, 2016, 68(3-4): 321−328.

[13] XIANG Z Y, DENG J L, YANG K J, et al. Effect of processing on the release of phenolic compounds and antioxidant activity during *in vitro* digestion of hulless barley[J]. Arabic Journal of Chemistry, 2022, 14: 103447.

[14] GE X Z, JING L Z, ZHAO K, et al. The phenolic compounds profile, quantitative analysis and antioxidant activity of four naked barley grains with different color[J]. Food Chemistry, 2020, 335: 127655.

[15] YANG Y, FAN B, MU Y W, et al. A comparative metabolomics study of polyphenols in highland barley (*Hordeum vulgare* L.) grains with different colors[J]. Food Research International, 2023, 174: 113672.

[16] 王欣, 杨开俊, 刘廷辉, 等. 黑青稞麸皮的功能因子结构解析及其抗氧化功能研究[J]. 食品科技, 2023, 48(7): 142−148. [WANG X, YANG K J, LIU T H, et al. Structural analysis of functional factors and antioxidant function of black barley bran[J]. Food Science and Technology, 2023, 48(7): 142−148.]

[17] 何扬航, 刘刚, 夏陈, 等. 挤压膨化对青稞中不同形态多酚组成及抗氧化活性的影响[J]. 食品与机械, 2021, 37(3): 36−40. [HE Y H, LIU G, XIA C, et al. Effect of extrusion process on different forms of phenolic compounds and antioxidant activities of hulless barley[J]. Food and Machinery, 2021, 37(3): 36−40.]

[18] 江春艳, 严冬, 谭进, 等. 青稞的研究进展及应用现状[J]. 西藏科技, 2010(2): 14−16. [JIANG C Y, YAN D, TAN J, et al. Research advances and application status of barley[J]. Tibet Science and Technology, 2010(2): 14−16.]

[19] 张峰, 杨勇, 赵国华, 等. 青稞 β-葡聚糖研究进展[J]. 粮食与油脂, 2003(12): 3−5. [ZHANG F, YANG Y, ZHAO G H, et al. Advance on beta-glucan from hull-less barley[J]. Cereals and Oils, 2003(12): 3−5.]

[20] LIN S, GUO H, BU GONG J D, et al. Phenolic profiles, β-glucan contents, and antioxidant capacities of colored Qingke (Tibetan hulless barley) cultivars[J]. Journal of Cereal Science, 2018, 81: 69−75.

[21] SURIANO S, IANNUCCI A, CODIANNI P, et al. Phenolic acids profile, nutritional and phytochemical compounds, antioxidant properties in colored barley grown in southern Italy[J]. Food Research International, 2018, 113: 221−233.

[22] ŠIMIĆ G, HORVAT D, LALIĆ A, et al. Distribution of β-glucan, phenolic acids, and proteins as functional phytonutrients of hulless barley grain[J]. Foods, 2019, 8(12): 680.

[23] FENG Q Q, ZHANG S Q, LIN J Q, et al. Valorization of barley (*Hordeum vulgare* L.) brans from the sustainable perspective: A comprehensive review of bioactive compounds and health benefits

with emphasis on their potential applications[J]. Food Chemistry, 2024, 460: 140772.
[24] WAIN R L, TAYLOR H F. Phenols as plant growth regulators[J]. Nature, 1965, 207: 167−169.
[25] WASTON R R. Polyphenols in plants: Isolation, purification and extract preparation[M]. 2nd ed. Salt Lake City: Academic Press, 2019: 45−58.
[26] 赵广河, 张瑞芬, 苏东晓, 等. 全谷物酚类物质及其抗氧化活性研究进展[J]. 中国食品学报, 2017, 17(8): 183−196. [ZHAO G H, ZHANG R F, SU D X, et al. The advance on polyphenols in whole grains and its antioxidant activity[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2017, 17(8): 183−196.]
[27] NARWAL S, KUMAR D, VERMA R P S. Effect of genotype, environment and malting on the antioxidant activity and phenolic content of Indian barley[J]. Journal of Food Biochemistry, 2016, 40(1): 91−99.
[28] DENG J L, XIANG Z Y, XIA C, et al. Identification and quantification of free, esterified, and insoluble-bound phenolics in grains of hulless barley varieties and their antioxidant activities[J]. LWT-Food Science Technology, 2021, 151: 112001.
[29] ZHANG M W, ZHANG R F, ZHANG F X, et al. Phenolic profiles and antioxidant activity of black rice bran of different commercially available varieties[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(13): 7580−7587.
[30] PRADEEP P M, SREERAMA Y N. Soluble and bound phenolics of two different millet genera and their milled fractions: Comparative evaluation of antioxidant properties and inhibitory effects on starch hydrolysing enzyme activities[J]. Journal of Functional Foods, 2017, 35: 682−693.
[31] SADASIVAM K, KUMARESAN R. Theoretical investigation on the antioxidant behavior of chrysoeriol and hispidulin flavonoid compounds-A DFT study[J]. Computational & Theoretical Chemistry, 2011, 963(1): 227−235.
[32] XIAO J B, CAPANOGLU E, JASSBI A R, et al. Advance on the flavonoid C-glycosides and health benefits[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2016(1): 16.
[33] IDEHEN E, TANG Y, SANG S. Bioactive phytochemicals in barley[J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2017, 25(1): 148−161.
[34] MARTÍNEZ M, MOTILVA M J, LÓPEZ D L H, et al. Phytochemical composition and β-glucan content of barley genotypes from two different geographic origins for human health food production[J]. Food Chemistry, 2018, 245: 61−70.
[35] 张晓民. 禾本科植物细胞壁的木质化和阿魏酰化[J]. 中国野生植物资源, 2011, 30(6): 7−13. [ZHANG X M. Lignification and feruloylation in the cell wall of grass family[J]. Chinese Wild Plant Resources, 2011, 30(6): 7−13.]
[36] LYONS P C, HIPSKIND J, VINCENT J R. Phenylpropanoid dissemi-nation in maize resistant or susceptible to helminthosporium-maydis[J]. Maydica, 1993, 38: 175−181.
[37] SHIYI O, KIN-CHOR K. Ferulic acid: Pharmaceutical functions, preparation and applications in food[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2004, 84(11): 1261−1269.
[38] BUENO-HERRERA M, P´EREZ-MAGARI˜NO S. Validation of an extraction method for the quantification of soluble free and insoluble bound phenolic compounds in wheat by HPLC-DAD [J]. Journal of Cereal Science, 2020, 93: 102984.
[39] RALPH J, GRABBER J H, HATFIELD R D. Lignin-ferulate cross-links in grasses-active incorporation of ferulate polysaccharide esters into ryegrass lignins[J]. Carbohydrate Research, 1995, 275: 167−178.
[40] ZHU Y, LI T, FU X, et al. Phenolics content, antioxidant and antiproliferative activities of dehulled highland barley (*Hordeum vulgare* L.)[J]. Journal of Functional Foods, 2015, 19: 439−450.
[41] 向卓亚, 黄巧莲, 夏陈, 等. 青稞麸皮营养成分及提取物抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2019, 35(12): 163−168. [XIANG Z Y, HUANG Q L, XIA C, et al. Study on the nutrient composition and antioxidant activity of highland barley bran[J]. Food and Machinery, 2019, 35(12): 163−168.]
[42] 王姗姗, 刘小娇, 胡赟, 等. 西藏地区不同粒色青稞多酚及花青素含量分析[J]. 现代农业科技, 2020(19): 217−220. [WANG S S, LIU X J, HU Z, et al. Analysis of content of polyphenols and anthocyanins among different seed color highland barley cultivars from Tibet area[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2020(19): 217−220.]
[43] 张毅, 东强, 冯西博, 等. 不同粒色大麦花青素含量与籽粒颜色关系的研究[J]. 高原农业, 2022, 6(3): 213−219. [ZHANG Y, DONG Q, FENG X B, et al. A study on the relationship between anthocyanin concentration and grain color in barley of different grain colors[J]. Journal of Plateau Agriculture, 2022, 6(3): 213−219.]
[44] ATIGÒ A, ČESLA P, ŠILAROVÁ P, et al. Development of extraction method forcharacterization of free and bonded polyphenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) grown in czech republic using liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2018, 245: 829−837.
[45] CHARLTON N C, MASTYUGIN M, TÖRÖK B, et al. Structural features of small molecule antioxidants and strategic modifications to improve potential bioactivity[J]. Molecules, 2023, 28(3): 1057.
[46] 朱芳, 陈鑫珠, 陆烝, 等. 花青素的生物活性及其在动物应用中的研究进展[J]. 饲料工业, 2024, 45(3): 8−14. [ZHU F, CHEN X Z, LU C, et al. Biological activity and research progress on the application in animal production of anthocyanins[J]. Feed Industry, 2024, 45(3): 8−14.]

岳伟, 王丹, 王盼, 等. 基于电子鼻结合 GC-IMS 分析浅渍黄瓜贮藏过程中的风味变化 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 254−263. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110229
YUE Wei, WANG Dan, WANG Pan, et al. Changes in Flavor Substances of Lightly-pickled Cucumbers during Storage Based on Electronic Nose Combined with GC-IMS[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 254−263. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110229

· 分析检测 ·

基于电子鼻结合 GC-IMS 分析浅渍黄瓜贮藏过程中的风味变化

岳　伟[1], 王　丹[2], 王　盼[2], 赵　爽[2], 赵煜炜[3], 赵文婷[2,*], 赵晓燕[1,2]
（1.北京工商大学食品与健康学院, 北京 100048;
2.北京市农林科学院农产品加工与食品营养研究所, 果蔬农产品保鲜与加工北京市重点实验室, 农业农村部蔬菜采后处理重点实验室, 北京 100097;
3.龙大食品集团有限公司, 山东莱阳 265231）

摘　要: 为研究浅渍黄瓜贮藏过程中风味物质的变化规律，采用电子鼻和气相色谱-离子迁移谱技术（gas chromatography-ion mobility spectrometry，GC-IMS）分析浅渍黄瓜的挥发性化合物。电子鼻和 GC-IMS 分析表明，浅渍黄瓜贮藏过程中风味特征发生了显著变化。GC-IMS 共定性分析出 56 种挥发性化合物（volatile organic compounds，VOCs），包括醇类 10 种、醛类 30 种、酮类 8 种、酯类 5 种、呋喃 1 种、酸类 1 种、烷烃类 1 种。随着贮藏期的延长，醛类、醇类和酮类物质的相对含量显著减少，酯类物质显著增加（P<0.05）。经相对气味活度值（relative odor activity value，ROAV）计算，筛选出 9 种 ROAV≥1 的化合物，被认为是浅渍黄瓜的关键风味化合物。进一步对不同贮藏期样品的关键风味化合物进行偏最小二乘法判别分析，筛选出 6 种变量重要投影值（variable important for the projection，VIP）大于 1 的差异标志物，分别是顺-6-壬烯醛、壬醛、1-戊烯-3-酮、异丁醛、反,顺-2,6-壬二烯醛、反-2-辛烯醛。其中反-2-辛烯醛的相对含量随着贮藏时间的延长而增加，可能是导致后期风味劣变的主要原因。本研究通过对浅渍黄瓜贮藏期间风味变化规律的分析，可为浅渍黄瓜贮藏过程的风味品质评价提供理论依据。

关键词: 浅渍, 黄瓜, GC-IMS, 挥发性有机化合物, ROAV
中图分类号: TS255.3　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2024)21−0254−10
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110229
本文网刊:

Changes in Flavor Substances of Lightly-pickled Cucumbers during Storage Based on Electronic Nose Combined with GC-IMS

YUE Wei[1], WANG Dan[2], WANG Pan[2], ZHAO Shuang[2], ZHAO Yuwei[3], ZHAO Wenting[2,*], ZHAO Xiaoyan[1,2]
（1.School of Food and Health, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China;
2.Institute of Agri-food Processing and Nutrition, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing Key Laboratory of Agricultural Products of Fruits and Vegetables Preservation and Processing, Key Laboratory of Vegetable Postharvest Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100097, China;
3.Longda Food Group Company Limited, Laiyang 265231, China）

Abstract: In order to investigate changes in flavor substances of lightly-pickled cucumbers during storage, volatile compounds were analyzed by electronic nose and gas chromatography-ion mobility spectrometry (GC-IMS). The results showed that flavor characteristics of lightly-pickled cucumbers changed obviously during storage. A total of 56 volatile

收稿日期: 2023−11−22
基金项目: 北京市农林科学院科技创新能力建设专项（KJCX20220417, KJCX201915）; 国家自然科学基金（32101971）; 现代农业产业技术体系建设专项资金项目（CARS-23）。
作者简介: 岳伟（1999−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 果蔬加工与品质保持技术研究, E-mail: yuewei0524@163.com。
*** 通信作者:** 赵文婷（1987−）, 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 农产品加工与副产物利用, E-mail: zhaowenting@iapn.org.cn。

organic compounds (VOCs) were detected by GC-IMS, including 10 alcohols, 30 aldehydes, 8 ketones, 5 esters, 1 furan, 1 acid, and 1 alkane. With the extension of storage period, the relative contents of aldehydes, alcohols and ketones decreased significantly, while the contents of esters increased significantly (P<0.05). Based on relative odor activity value (ROAV≥ 1), 9 key flavor compounds were found. The key flavor compounds were performed by PLS-DA and 6 differential markers were screened (VIP>1), including cis-6-nonenal, nonenal, 1-penten-3-one, isobutyraldehyde, trans-2,cis-6-nonadienal, and trans-2-octenal. Among them, trans-2-octenal increased with the relative extension of storage time, which might be the main off-flavor compound for flavor deterioration. This study can provide a theoretical basis for flavor quality evaluation of lightly-pickled cucumbers during storage.

Key words: lightly-pickled; cucumbers; GC-IMS; volatile organic compounds; ROAV

黄瓜味甘性凉，含有大量的水分、多种维生素和氨基酸等营养物质，风味清新、口感爽脆[1]，是最重要的腌渍菜原料之一。传统腌渍菜含盐量高，无法满足人们低盐健康饮食的需求。“浅渍”蔬菜是一类低盐腌渍菜，最早由日本提出，是将蔬菜进行清洗、切分等处理后，根据个人爱好添加不同调味料，并加入低于 4% 的食盐短期腌渍[2] 后即可食用，又称“一夜渍”。浅渍保留了蔬菜的新鲜品质，含盐量低，具有营养健康的特点，拥有非常好的市场前景。但其货架期较短，贮藏期间品质易发生劣变，尤其是风味品质损失较大，严重限制了浅渍蔬菜产品的产业化开发。

风味是评价浅渍蔬菜的重要指标之一。目前，腌渍蔬菜的风味品质大多通过气相色谱-质谱法（gas chromatography-mass spectrometry，GC-MS）[3−5] 进行定性和定量分析。GC-IMS 是近年来发展起来的一项分析技术，该技术结合了 GC 的高分离能力和 IMS 快速响应、低成本的优势，具有快速检测、高灵敏度和可变体积进样的特点[3]，在食品风味分析中的应用越来越多，然而该技术在腌渍蔬菜风味研究中的应用还非常有限。Liu 等[6] 通过 GC-IMS 结合 PCA 分析不同发酵剂制备酸菜发酵过程中的 VOCs（volatile organic compounds，VOCs）的差异，发现添加乳杆菌发酵的酸菜中含有更多的醇、酯和酸类物质。韩艳秋等[7] 采用 GC-IMS 分析了隔年酸菜与当年酸菜间的挥发性风味化合物差异，通过构建风味指纹图谱，明确了隔年酸菜与当年酸菜各自的特征 VOCs。Han 等[8] 采用 GC-IMS 结合 PCA 对东北酸菜发酵过程中特征 VOCs 进行研究，根据东北酸菜的挥发性 VOCs 含量的差异，对自然发酵和接种发酵的东北酸菜进行了区分。目前，关于 GC-IMS 在浅渍蔬菜的挥发性风味化合物研究中的应用尚未见报道。

本研究以浅渍黄瓜为研究对象，采用电子鼻和 GC-IMS 技术研究其贮藏过程中风味变化规律，结合相对气味活度值、主成分分析以及偏最小二乘法判别分析进行数据分析，明确浅渍黄瓜的关键挥发性风味化合物，为浅渍黄瓜贮藏过程风味品质的评价提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

黄瓜、盐、白砂糖、白醋　北京市海淀区果香四溢超市；海带　北京市海淀区中红连锁超市；双道密封袋　山东青岛华泓星塑胶有限公司；2-丁酮、2-戊酮、2-己酮、2-庚酮、2-辛酮、2-壬酮标准品　山东海能科学仪器有限公司。

HR1609 手持式搅拌机　飞利浦电子香港有限公司；BSA3202S-CW 电子天平　赛多利斯科学仪器北京有限公司；PEN3 电子鼻　德国 AIRSENSE 公司；Flavour Spec®气相离子迁移谱　德国 G.A.S 公司。

1.2　实验方法

1.2.1　浅渍黄瓜制备　将黄瓜进行清洗，切成 3 mm 片状，加入配料（2.5% 盐、1% 白醋、1% 海带、2% 糖）放入双道密封保鲜袋中，均匀揉搓，放入 4 ℃ 冰箱低温腌渍 12 h 后，得到浅渍黄瓜（浅渍 1 d），4 ℃ 条件下贮藏 5 d。分别对腌渍 0、1、2、3、4、5 d 的浅渍黄瓜取样，进行电子鼻、GC-IMS 分析，测定其 VOCs。

1.2.2　电子鼻分析

1.2.2.1　样品预处理　称取 5 g 浅渍黄瓜匀浆置于 20 mL 顶空瓶中，加盖密封后，直接进样检测。

1.2.2.2　检测参数　采样时间间隔为 1 s，传感器自清洗时间为 120 s，传感器归零时间为 5 s，分析采样时间为 180 s，测定时载气流速为 300 mL/min，每个样品重复测定 3 次。PEN3 型电子鼻由 10 种传感器阵列组成，具体信息如表 1 所示。

表 1　电子鼻系统传感器类型及性能描述

Table 1　Sensor type and performance description of electronic nose system

阵列序号	传感器名称	代表物质种类	性能描述
1	W1C	Aromatic	芳香成分-苯类
2	W5S	Broad range	灵敏度大，对氮氧化合物很灵敏
3	W3C	Aromatic	芳香成分灵敏，氨类
4	W6S	Hydrogen	主要对氢化物有选择性
5	W5C	Arom-aliph	短链烷烃芳香成分
6	W1S	Broad-methane	对甲基类灵敏
7	W1W	Sulphur-organic	对硫化物灵敏
8	W2S	Broad-chlor	对醇类、醛酮类灵敏
9	W2W	Sulph-chlor	芳香成分，对有机硫化物灵敏
10	W3S	Methane-aliph	对长链烷烃灵敏

1.2.3　GC-IMS 分析　根据王福成等[9] 的方法稍作修改，并进行测定，每个样品三次平行。具体操作为：

称取 2.0 g 浅渍黄瓜匀浆置于 10 mL 顶空瓶中，按如下条件进行 GC-IMS 分析。

1.2.3.1 自动进样条件 孵化温度 40 ℃，孵化时间 10 min，进样方式为顶空进样，进样体积 1 mL，进样针温度 85 ℃，加热方式为振荡加热，振荡速度为 500 r/min。

1.2.3.2 GC 条件 色谱柱：FS-SE-54-CB；石英毛细管柱（15 m×0.53 mm，0.5 μm）；色谱柱温度：40 ℃，载气：N_2（纯度>99.999%）；载气流速程序：初始 2.0 mL/min，保持 2 min；在 2~10 min 线性增加至 10 mL/min；在 10~20 min 线性增加至 100 mL/min，保持 10 min；总分析时间 30 min。

1.2.3.3 IMS 检测条件 漂移管长度：9.8 cm；管内线性电压：500 V/cm；漂移管温度：45 ℃；漂移气：N_2（纯度≥99.999%）；漂移气流量：150 mL/min；放射源：β 射线（氚，3H）；离子化模式：正离子。

1.2.3.4 定性及定量 使用 10 mg/L 的正酮 C4~C9 为外参计算挥发性化合物的保留指数（retention index，RI），运用 GC×IMS Library Search 软件内置的 NIST 数据库和 IMS 数据库对样品中的挥发性成分进行定性分析。化合物相对含量为归一化后的相对峰面积。

1.2.3.5 ROAV 根据刘登勇等[10]报道，相对气味活度值可用于评价化合物对整体风味的贡献程度。为了便于分析，将对样品总体风味贡献最大的组分的 ROAV 定为 100，其余各组分的 ROAV 按下式计算：

$$ROAV = \frac{C_A}{T_A} \times \frac{T_{stan}}{C_{stan}} \times 100$$

式中：C_A 为化合物 A 的相对百分含量，%；T_A 为化合物 A 的香气阈值，mg/kg，该值可通过查阅文献获得；T_{stan} 为对样品风味贡献最大的组分的香气阈值，mg/kg；C_{stan} 为对样品风味贡献最大的组分的相对百分含量，%。

1.3 数据处理

GC-IMS 通过 Reporter 和 Gallery Plot 等插件构建 VOCs 的二维、三维图谱、差异图谱及指纹图谱。采用 SPSS 17.0 软件对化合物相对含量进行方差分析和显著性分析（P<0.05）；雷达图和条形堆积图由 Origin 2022 软件绘制分析；使用 MetaboAnalyst 5.0 进行主成分分析（principal component analysis，PCA）和偏最小二乘法判别分析（partial least squares-discrimination analysis，PLS-DA）。

2 结果与分析

2.1 电子鼻分析

PEN3 电子鼻系统对测量范围内的样品气味非常敏感，微小的变化会导致传感器响应值的差异[11]。由图 1 雷达图可以看出，10 个传感器中对浅渍黄瓜响应强度较大的传感器有 W1S、W1W、W5S，它们分别对甲基类、硫化物、氮氧化合物灵敏。不同的浅渍

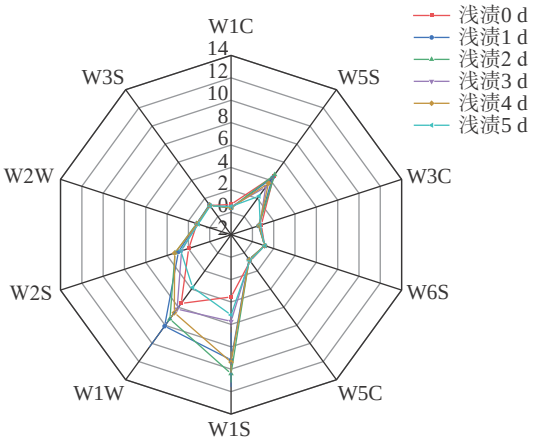


图 1 浅渍黄瓜贮藏过程的电子鼻雷达图

Fig.1 Radar map of lightly-pickled cucumbers during storage by electronic nose

黄瓜样品在 W1S 和 W1W 传感器上差异明显，说明黄瓜中的甲基类化合物和硫化物贮藏期间变化较大。

为了进一步明确不同贮藏期间浅渍黄瓜风味特征的差异，对电子鼻传感器的响应值进行了主成分分析。由图 2 可知，第一主成分（PC1）和第二主成分（PC2）的贡献率分别为 82.0% 和 14.8%，累计贡献率为 96.8%，说明数据变换后能够很好地代表大部分原始数据信息。浅渍 1 d 和 2 d 样品的空间距离较接近，说明风味差别不大；除了这两组样品外，其他样品组间分离明显，表明风味组成差异较大；在 PC2 方向上，随着贮藏时间的延长，样品向负轴方向移动。结果表明，浅渍黄瓜贮藏过程中风味轮廓发生了明显变化。

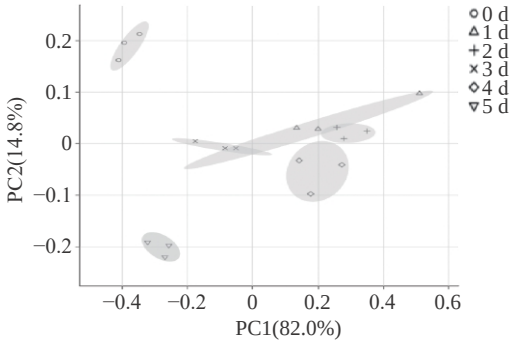


图 2 浅渍黄瓜贮藏过程的电子鼻 PCA 图

Fig.2 PCA diagram of lightly-pickled cucumbers during storage by electronic nose

2.2 GC-IMS 分析

2.2.1 不同贮藏期浅渍黄瓜的 VOCs 采用 GC-IMS 对浅渍黄瓜的贮藏过程中 VOCs 进行测定，图 3A 为不同贮藏时间下浅渍黄瓜 VOCs 的二维谱图，图中纵坐标表示气相色谱的保留时间（retention time，RT），横坐标表示归一化处理后的漂移时间（drift time，DT），红色垂直线表示反应离子峰（reaction ion peak，RIP），RIP 峰右侧的每一个点代表一种 VOC[12]，白色表示浓度较低，红色表示浓度较高，且点的颜色越深表示浓度越大，反之则越低。部分

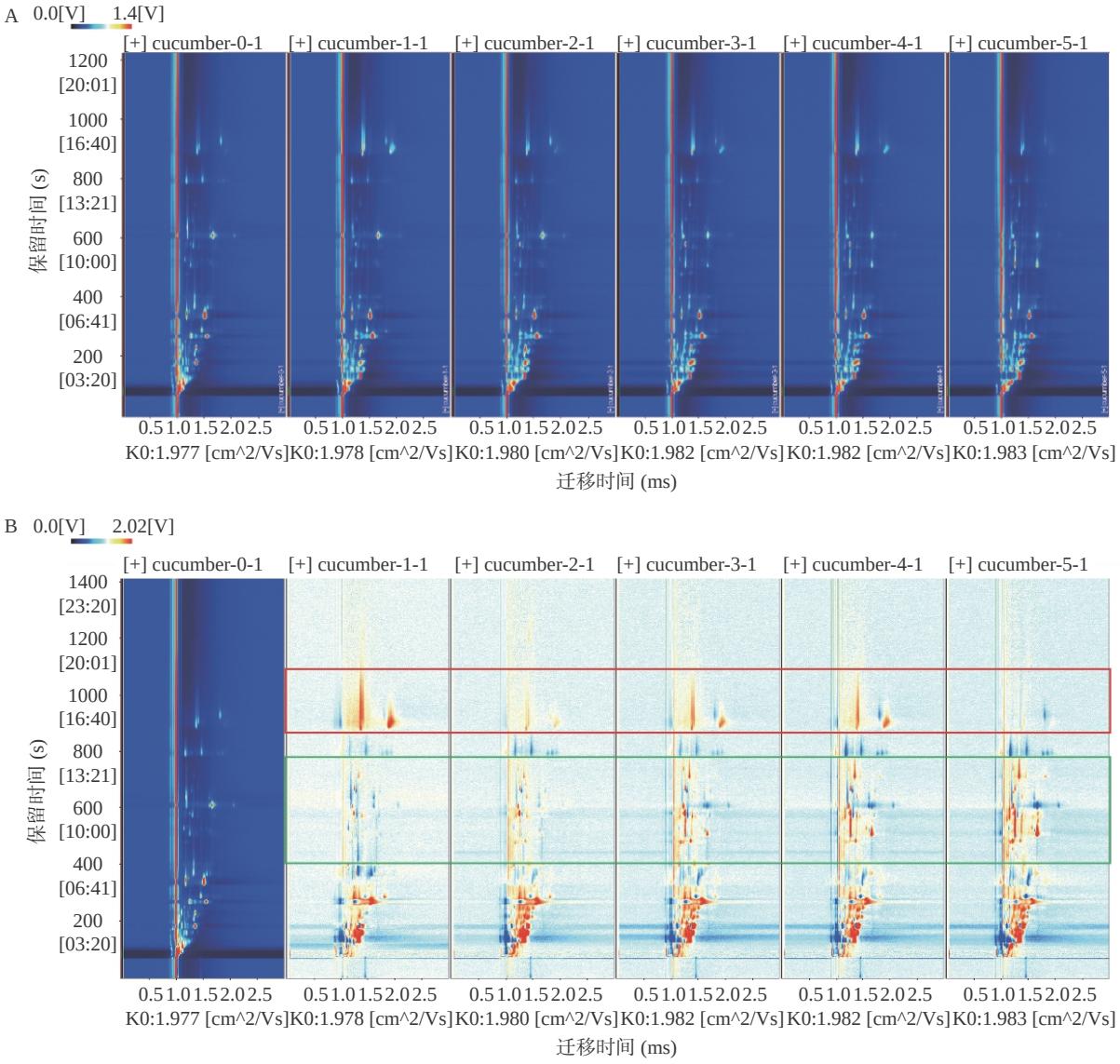


图 3　浅渍黄瓜贮藏过程中 VOCs 的 GC-IMS 二维图谱(A)和差异图谱(B)

Fig.3　GC-IMS two-dimensional profiles (A) and difference profiles (B) of VOCs in lightly-pickled cucumbers during storage

VOCs 含有两个或多个特征点，分别代表性质和浓度不同的二聚体或三聚体[13]，由该谱图可以直观地反映浅渍黄瓜贮藏过程中 VOCs 种类和浓度差异[14]。从图 3A 中可以看出，浅渍黄瓜贮藏过程中 VOCs 的迁移时间在 1.0~2.0 ms，与浅渍 0 d 样品相比，浅渍 1~5 d 样品的 VOCs 差异明显，浅渍后 VOCs 更丰富且部分 VOCs 含量变化较大。

图 3B 是以浅渍 0 d 样品的谱图作为参比，其它谱图扣减参比形成二维差异对比谱图，扣减后的谱图中，相同浓度的物质抵消为白色，红色表示该物质的浓度高于参比，蓝色表示该物质浓度低于参比，且颜色越深表示差异越大。由图可以看出，在保留时间 400~800 s 区间(绿框区域)，VOCs 的种类和含量随着贮藏时间的延长显著增多；在保留时间 800~1100 s 区间(红框区域)，浅渍 1 d 的 VOCs 含量最高，而随着贮藏时间的延长，VOCs 的含量逐渐减少。综合图 3 的结果说明浅渍黄瓜在贮藏过程中 VOCs 发生了明显变化。

2.2.2　不同贮藏期浅渍黄瓜 VOCs 的定性分析　根据保留时间和迁移时间，使用外参正酮 C4~C9 来计算 VOCs 的保留指数，通过 GC-IMS 中自带软件 LAV、内置的 NIST 数据库和 IMS 数据库进行比对，对 VOCs 进行定性分析。如表 2 所示，共定性出 56 种 VOCs，包括醛类 30 种、醇类 10 种、酮类 8 种、酯类 5 种以及呋喃类、酸类、烷烃类各 1 种。醛类是浅渍黄瓜贮藏期间主要的 VOCs，其次是醇类、酮类和酯类。

图 4 为浅渍黄瓜贮藏期间 VOCs 的种类和相对含量变化，由图可知，浅渍 1 d 的黄瓜中醛类化合物相对含量最高，达到 45.21%，在浅渍过程中，其相对含量逐渐降低，醛类化合物阈值较低，对浅渍黄瓜的风味具有重要贡献；浅渍过程中醇类和酮类化合物的相对含量显著降低(P<0.05)，分别从 0 d 的 31.05% 降低至 18.62%，16.02% 降低至 9.98%；酯类化合物在浅渍过程中的相对含量由 9.20% 显著增加至 29.63%(P<0.05)，各类 VOCs 在浅渍期间的相对含

表 2 浅渍黄瓜贮藏过程中 VOCs 的定性定量分析

Table 2 Qualitative and quantitative analysis of VOCs in lightly-pickled cucumbers during storage

中文名称	保留指数	保留时间（s）	迁移时间（ms）	分子式	相对含量(%)					
					浅渍0 d	浅渍1 d	浅渍2 d	浅渍3 d	浅渍4 d	浅渍5 d
醛类					41.07±1.02^{c}	45.21±0.80^{a}	40.34±0.75^{cd}	44.18±0.32^{ab}	42.45±1.78^{bc}	38.45±1.89^{d}
反-2-庚烯醛(D)	947.8	511.224	1.67119	$C_7H_{12}O$	0.47±0.03^{d}	0.44±0.04^{d}	0.48±0.05^{d}	1.01±0.10^{c}	1.69±0.16^{b}	2.81±0.14^{a}
反-2-庚烯醛(M)	953.9	524.266	1.25455	$C_7H_{12}O$	1.36±0.05^{d}	1.45±0.10^{d}	1.43±0.05^{d}	2.31±0.09^{c}	3.07±0.15^{b}	3.89±0.09^{a}
反-2-壬烯醛(D)	1145.5	909.192	1.96316	$C_9H_{16}O$	0.93±0.18^{b}	2.39±0.72^{a}	1.31±0.09^{b}	2.42±0.28^{a}	2.22±0.23^{a}	1.01±0.06^{b}
反-2-壬烯醛(M)	1149.6	918.537	1.41753	$C_9H_{16}O$	1.16±0.18^{c}	1.57±0.23^{b}	1.37±0.07^{bc}	1.76±0.16^{a}	1.81±0.09^{a}	1.15±0.07^{c}
反-2-辛烯醛(D)	1050.4	715.157	1.81485	$C_8H_{14}O$	0.07±0.01^{c}	0.07±0.00^{c}	0.07±0.01^{c}	0.11±0.00^{b}	0.14±0.02^{b}	0.18±0.03^{a}
反-2-辛烯醛(M)	1053.1	719.9	1.33788	$C_8H_{14}O$	0.37±0.03^{e}	0.46±0.00^{de}	0.51±0.05^{d}	0.82±0.05^{c}	0.99±0.09^{b}	1.27±0.08^{a}
反-2-戊烯醛(D)	748.4	231.334	1.36107	C_5H_8O	4.07±0.57^{ab}	4.34±0.36^{a}	4.05±0.15^{ab}	3.62±0.37^{bc}	3.18±0.29^{c}	3.15±0.22^{c}
反-2-戊烯醛(M)	750.8	233.716	1.10861	C_5H_8O	1.97±0.17^{a}	1.50±0.01^{b}	1.27±0.02^{c}	1.37±0.03^{bc}	1.39±0.06^{bc}	1.27±0.07^{c}
反-2,4-庚二烯醛(D)	1005.3	638.089	1.61372	$C_7H_{10}O$	0.63±0.14^{a}	0.22±0.05^{b}	0.25±0.04^{b}	0.25±0.04^{b}	0.21±0.01^{b}	0.21±0.01^{b}
反-2,4-庚二烯醛(M)	1008.2	642.832	1.19421	$C_7H_{10}O$	2.33±0.23^{a}	1.19±0.16^{b}	1.25±0.12^{b}	1.24±0.14^{b}	1.15±0.03^{b}	1.13±0.02^{b}
反,顺-2,6-壬二烯醛(D)	1141.6	900.179	1.89471	$C_9H_{14}O$	0.34±0.03^{d}	1.12±0.32^{b}	0.46±0.06^{d}	0.86±0.09^{bc}	0.76±0.05^{c}	0.31±0.04^{d}
反,顺-2,6-壬二烯醛(M)	1146.7	911.862	1.37534	$C_9H_{14}O$	3.91±0.48^{cd}	5.97±0.58^{a}	4.18±0.19^{c}	5.20±0.13^{b}	5.09±0.23^{b}	3.35±0.17^{d}
顺-4-庚烯醛	889.7	403.395	1.14339	$C_7H_{12}O$	0.23±0.02^{cd}	0.36±0.03^{a}	0.31±0.01^{b}	0.34±0.02^{ab}	0.23±0.03^{c}	0.18±0.03^{d}
顺-6-壬烯醛(D)	1092.7	795.686	1.78522	$C_9H_{16}O$	0.64±0.06^{a}	0.39±0.07^{b}	0.34±0.12^{b}	0.32±0.03^{bc}	0.21±0.02^{c}	0.20±0.02^{c}
顺-6-壬烯醛(M)	1096.7	803.724	1.18573	$C_9H_{16}O$	3.82±0.21^{a}	2.54±0.32^{b}	2.28±0.59^{b}	2.09±0.06^{b}	1.17±0.09^{c}	1.09±0.19^{c}
异丁烯醛	549.2	118.381	1.04465	C_4H_6O	0.84±0.23^{b}	1.16±0.10^{a}	0.93±0.07^{ab}	1.02±0.06^{ab}	1.10±0.04^{a}	0.49±0.11^{c}
2-甲基丁醛(D)	649.5	159.672	1.403	$C_5H_{10}O$	0.24±0.03^{d}	1.13±0.07^{a}	1.20±0.09^{a}	1.08±0.14^{a}	0.90±0.03^{b}	0.34±0.08^{d}
2-甲基丁醛(M)	654.5	162.107	1.17042	$C_5H_{10}O$	0.66±0.08^{d}	0.75±0.06^{cd}	0.81±0.05^{bc}	0.92±0.05^{a}	0.94±0.01^{a}	0.91±0.00^{ab}
异丁醛	610.9	142.296	1.09712	C_4H_8O	0.71±0.13^{a}	0.65±0.05^{a}	0.60±0.04^{a}	0.60±0.07^{a}	0.67±0.01^{a}	0.39±0.10^{b}
苯甲醛(D)	973	566.972	1.15385	C_7H_6O	0.32±0.04^{cd}	0.25±0.02^{d}	0.30±0.00^{cd}	0.37±0.02^{c}	0.49±0.03^{b}	0.83±0.06^{a}
苯甲醛(M)	955	526.638	1.15686	C_7H_6O	0.90±0.17^{a}	0.50±0.15^{b}	0.51±0.05^{b}	0.44±0.05^{b}	0.50±0.03^{b}	0.37±0.03^{b}
丁醛	644.3	157.249	1.27285	C_4H_8O	0.55±0.05^{d}	1.33±0.02^{c}	1.65±0.07^{b}	1.56±0.04^{b}	1.57±0.01^{b}	2.30±0.16^{a}
庚醛(M)	890.7	404.882	1.32371	$C_7H_{14}O$	0.20±0.03^{c}	0.22±0.02^{bc}	0.25±0.02^{ab}	0.28±0.01^{a}	0.14±0.02^{d}	0.23±0.02^{bc}
庚醛(D)	889.6	403.294	1.69624	$C_7H_{14}O$	0.98±0.08^{a}	0.70±0.04^{d}	0.78±0.02^{c}	0.80±0.02^{c}	0.73±0.01^{cd}	0.89±0.03^{b}
己醛(D)	785.9	271.035	1.57188	$C_6H_{12}O$	6.05±0.64^{c}	10.17±0.12^{a}	9.57±0.14^{a}	9.10±0.28^{ab}	8.05±0.75^{b}	6.40±1.03^{c}
己醛(M)	786.7	271.829	1.25176	$C_6H_{12}O$	2.43±0.17^{a}	1.37±0.02^{cd}	1.34±0.07^{d}	1.33±0.02^{d}	1.55±0.08^{bc}	1.71±0.15^{b}
壬醛(D)	1094.5	799.339	1.94415	$C_9H_{18}O$	1.22±0.08^{a}	0.62±0.07^{b}	0.59±0.09^{b}	0.62±0.09^{b}	0.52±0.03^{b}	0.49±0.01^{b}
壬醛(M)	1096.1	802.575	1.48411	$C_9H_{18}O$	3.28±0.21^{b}	1.75±0.09^{c}	1.65±0.14^{c}	1.61±0.15^{c}	1.23±0.16^{d}	1.31±0.10^{d}
戊醛	700.6	188.849	1.17984	$C_5H_{10}O$	0.29±0.02^{d}	0.39±0.03^{c}	0.41±0.03^{bc}	0.45±0.02^{ab}	0.47±0.01^{a}	0.38±0.02^{c}
苯乙醛	1023.5	668.18	1.26057	C_8H_8O	0.10±0.02^{c}	0.21±0.04^{b}	0.19±0.02^{b}	0.28±0.01^{a}	0.28±0.01^{a}	0.21±0.01^{b}
醇类					31.05±0.42^{a}	20.86±0.17^{b}	21.62±0.04^{b}	19.80±0.66^{c}	21.73±0.83^{b}	18.62±0.27^{d}
1-戊醇(D)	764.2	247.325	1.50758	$C_5H_{12}O$	0.12±0.02^{c}	0.12±0.02^{c}	0.22±0.01^{b}	0.23±0.02^{b}	0.28±0.03^{a}	0.29±0.00^{a}
1-戊醇(M)	765.5	248.716	1.25159	$C_5H_{12}O$	0.31±0.03^{c}	0.26±0.04^{c}	0.47±0.01^{b}	0.49±0.03^{b}	0.55±0.03^{a}	0.56±0.01^{a}
1-戊烯-3-醇	673.7	171.658	0.94064	$C_5H_{10}O$	0.30±0.04^{a}	0.16±0.02^{c}	0.18±0.01^{bc}	0.19±0.01^{bc}	0.19±0.00b^{c}	0.21±0.01^{b}
2-己烯醇(D)	848.8	344.878	1.51983	$C_6H_{12}O$	5.55±0.46^{a}	4.45±0.13^{b}	4.17±0.13^{bc}	3.99±0.09^{c}	4.24±0.09^{bc}	3.89±0.03^{c}
2-己烯醇(M)	848.2	344.084	1.17888	$C_6H_{12}O$	16.46±0.73^{a}	11.51±0.14^{b}	11.09±0.29^{b}	9.53±0.47^{c}	10.08±0.35^{c}	8.08±0.39^{d}
异戊醇(D)	734.2	217.76	1.48729	$C_5H_{12}O$	0.08±0.01^{d}	0.07±0.01^{d}	0.15±0.00^{c}	0.21±0.02^{a}	0.20±0.01^{ab}	0.18±0.01^{b}
异戊醇(M)	737.2	220.542	1.24066	$C_5H_{12}O$	0.24±0.00^{d}	0.21±0.02^{d}	0.31±0.02^{c}	0.39±0.03^{ab}	0.41±0.01^{a}	0.37±0.02^{b}
正己醇(D)	868.5	371.875	1.64475	$C_6H_{14}O$	0.53±0.07^{b}	0.27±0.03^{d}	0.41±0.02^{c}	0.38±0.07^{c}	0.55±0.06^{b}	0.54±0.06^{b}
正己醇(M)	871.8	376.639	1.33504	$C_6H_{14}O$	2.81±0.16^{a}	0.96±0.03^{d}	1.63±0.11^{c}	1.61±0.14^{c}	2.15±0.21^{b}	2.30±0.14^{b}
叔丁醇	518	107.846	1.1314	$C_4H_{10}O$	4.65±0.33^{a}	2.85±0.05^{b}	2.99±0.17^{b}	2.78±0.11^{b}	3.08±0.14^{b}	2.20±0.12^{c}
酮类					16.02±0.57^{ac}	10.25±0.53^{c}	11.54±0.26^{b}	9.10±0.21^{de}	8.93±0.21^{e}	9.98±0.75^{cd}
1-戊烯-3-酮	673	171.307	1.07239	C_5H_8O	0.14±0.03^{c}	0.24±0.02^{a}	0.20±0.01^{b}	0.20±0.01^{b}	0.20±0.01^{b}	0.17±0.01^{c}
3-羟基-2-丁酮(D)	724.2	208.716	1.32963	$C_4H_8O_2$	1.00±0.21^{a}	1.10±0.13^{a}	1.11±0.06^{a}	0.53±0.06^{b}	0.50±0.02^{b}	0.93±0.16^{a}
3-羟基-2-丁酮(M)	717.3	202.749	1.05135	$C_4H_8O_2$	3.76±0.28^{a}	3.15±0.15^{c}	3.22±0.22^{bc}	3.03±0.25^{c}	3.27±0.10^{bc}	3.60±0.17^{ab}
3-辛酮(D)	977.6	577.621	1.71716	$C_8H_{16}O$	0.42±0.10^{a}	0.21±0.04^{b}	0.23±0.04^{b}	0.15±0.01^{b}	0.17±0.01^{b}	0.34±0.03^{a}
3-辛酮(M)	977.6	577.621	1.30052	$C_8H_{16}O$	1.17±0.08^{a}	0.57±0.08^{bc}	0.59±0.07^{b}	0.27±0.04^{d}	0.23±0.02^{d}	0.44±0.11^{c}
3-戊酮(D)	699.8	188.194	1.10955	$C_5H_{10}O$	0.92±0.08^{a}	0.30±0.00^{b}	0.35±0.01^{b}	0.19±0.01^{c}	0.19±0.01^{c}	0.29±0.03^{b}
3-戊酮(M)	698	186.803	1.34524	$C_5H_{10}O$	6.54±0.76^{a}	3.14±0.22^{c}	4.36±0.12^{b}	3.50±0.09^{c}	3.27±0.10^{c}	3.25±0.09^{c}
4-甲基-3-戊烯-2-酮	799.6	285.671	1.44908	$C_6H_{10}O$	2.07±0.29^{a}	1.54±0.07^{b}	1.48±0.04^{b}	1.23±0.22^{bc}	1.10±0.09^{c}	0.96±0.25^{c}

续表 2

中文名称	保留指数	保留时间（s）	迁移时间（ms）	分子式	相对含量(%)					
					浅渍0 d	浅渍1 d	浅渍2 d	浅渍3 d	浅渍4 d	浅渍5 d
酯类					9.20±1.08^{d}	21.74±0.38^{c}	23.45±0.44^{bc}	23.17±0.22^{bc}	23.58±0.62^{b}	29.63±1.48^{a}
甲酸丁酯	719.2	204.339	1.2028	$C_5H_{10}O_2$	0.24±0.05^{d}	0.41±0.03^{c}	0.49±0.02^{bc}	0.57±0.06^{ab}	0.60±0.02^{a}	0.53±0.06^{ab}
3-羟基丁酸乙酯	930.3	476.053	1.17496	$C_6H_{12}O_3$	0.22±0.02^{ab}	0.16±0.03^{b}	0.25±0.09^{ab}	0.31±0.07^{a}	0.29±0.07^{a}	0.32±0.03^{a}
乙酸乙酯	605.9	140.194	1.33432	$C_4H_8O_2$	0.59±0.03^{c}	13.33±0.36^{b}	14.60±0.29^{b}	14.21±0.12^{b}	14.11±0.52^{b}	20.61±1.53^{a}
甲酸乙酯(M)	509.8	105.221	1.05276	$C_3H_6O_2$	8.08±1.25^{a}	7.75±0.06^{a}	8.01±0.28^{a}	8.01±0.21^{a}	8.45±0.06^{a}	8.03±0.07^{a}
乙酸己酯	1005.7	638.712	1.38756	$C_8H_{16}O_2$	0.07±0.01^{c}	0.09±0.03^{bc}	0.10±0.00^{b}	0.07±0.00^{bc}	0.13±0.01^{a}	0.14±0.02^{a}
其他					2.66±0.10^{d}	1.90±0.08^{e}	3.06±0.12^{c}	3.75±0.09^{a}	3.28±0.13^{b}	3.32±0.03^{b}
柠檬烯	1063.4	738.93	1.22346	$C_{10}H_{16}$	0.29±0.02^{a}	0.21±0.03^{b}	0.25±0.04^{ab}	0.25±0.03^{ab}	0.22±0.02^{b}	0.26±0.02^{ab}
乙酸	643.1	156.647	1.04805	$C_2H_4O_2$	1.74±0.20^{a}	0.75±0.02^{d}	0.83±0.05^{cd}	0.85±0.08^{cd}	0.96±0.06^{c}	1.25±0.08^{b}
2-戊基呋喃	979.1	581.178	1.2488	$C_9H_{14}O$	0.63±0.07^{e}	0.94±0.08^{d}	1.98±0.06^{b}	2.65±0.07^{a}	2.10±0.09^{b}	1.81±0.12^{c}

注：数据表示为平均值±标准差，同行不同字母表示差异显著（P<0.05）。

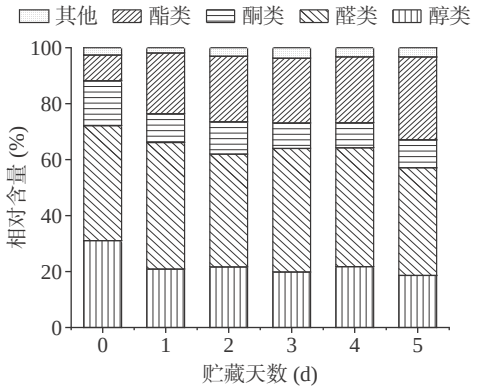


图 4　浅渍黄瓜贮藏过程中 VOCs 的相对含量

Fig.4　Relative content of VOCs in lightly-pickled cucumbers during storage

量变化是区分浅渍黄瓜贮藏阶段的重要标志。

醛类化合物中己醛的相对含量最高，单体和二聚体总相对含量在浅渍 1 d 时高达 11.54%，其具有清香和青草的气味，主要是由 ω-6 不饱和脂肪酸过氧化反应产生。随着浅渍时间的延长，相对含量较高的反,顺-2,6-壬二烯醛和反-2-壬烯醛先增加后降低，二者是新鲜黄瓜风味的重要贡献物质[15]，反,顺-2,6-壬二烯醛对黄瓜风味的作用是反-2-壬烯醛的 10~50 倍[16]。在浅渍终点时，反,顺-2,6-壬二烯醛减少，可能是由于低盐浅渍条件下，盐胁迫导致黄瓜组织自身代谢产生反,顺-2,6-壬二烯醛的能力降低[17−18]。另外，以脂肪酸为前体合成醛类物质的反应要求有氧的参与，添加盐导致氧含量降低，醛类物质合成减少。醛类主要是脂肪酸的氧化和氨基酸的代谢[19]，挥发性强且阈值较低[20]，构成黄瓜的主要风味化合物。

醇类化合物的相对含量在浅渍过程中逐渐下降，从 31.05% 显著降低至 18.62%（P<0.05）。特别是 2-己烯醇和叔丁醇。叔丁醇的相对含量从浅渍初期 4.65% 降低至 2.20%，通常情况下，饱和醇的阈值较高，对风味的整体贡献较小；但有些不饱和醇阈值较低，对风味贡献较大[21]，如 1-戊烯-3-醇的阈值低，具有水果香味。

酮类化合物中相对含量较高的 3-戊酮在浅渍贮藏期间由 7.46% 减少至 3.44%，但由于其阈值较高，对浅渍黄瓜整体风味贡献较小。具有辛辣味的 1-戊烯-3-酮的阈值较低，其相对含量由 0.14% 升高至 0.24%，然后下降至 0.17%，对浅渍黄瓜整体风味具有重要贡献。郭精桐等[22] 研究表明以脂肪酸物质作为前体，通过 LOX 异构体催化的其他生物合成途径产生 1-戊烯-3-酮、1-戊烯-3-醇、反-2-戊烯醛等物质，赋予番茄受消费者喜爱的香气。酮类化合物主要来源于脂质氧化，属于不稳定的中间体，一般被还原成相应的醇，可呈现花香味[23]。通常与奶油香和果蔬香等风味特征相联系[24]。

酯类化合物的相对含量在浅渍过程中由 9.20% 显著升高至 29.63%（P<0.05），在酯类化合物中具有水果香气的乙酸乙酯占比最高，由浅渍 0 d 的 0.59% 显著升高至 20.61%（P<0.05），对整体风味贡献较大。王福成等[9] 在对不同包装方式贮藏黄瓜的风味物质检测中，发现乙酸乙酯在无包装的黄瓜中损失最多。醇和有机酸经非酶催化或微生物的酶促催化反应产生酯类物质，从而导致浅渍贮藏期间酯类化合物的增加、醇类化合物的减少[25]。

2.2.3　不同贮藏期浅渍黄瓜的 VOCs 指纹图谱　为进一步分析浅渍黄瓜贮藏过程中 VOCs 的变化情况，采用 LAV 软件中的 Gallery Plot 插件绘制不同贮藏期浅渍黄瓜 VOCs 的指纹图谱。图谱中每一行代表一个样品，每个样品 3 次重复。从图 5 可以看出，部分 VOCs 在浅渍前后几乎没有变化（绿色框区域），与浅渍 0 d 样品相比，浅渍后有 7 种醛类、3 种醇类、5 种酮类、1 种酸类明显减少（红色框区域），有 9 种醛类、2 种酮类显著增加（黄色框区域），随着贮藏时间的延长，这些物质的相对含量均有不同程度的下降。浅渍 2 d 后，部分醛、酮、醇、酯随着贮藏时间的延长，相对含量增加（粉色框区域），尤其是在 5 d 时，相对含量较高。醛类物质是黄瓜的主要风味化合物，其含量降低说明了黄瓜新鲜风味的损失。不饱和脂肪酸通过脂肪氧合酶途径生成 VOCs 是醛类物质生成的主要途径，因此浅渍黄瓜在贮藏过程中脂质氧

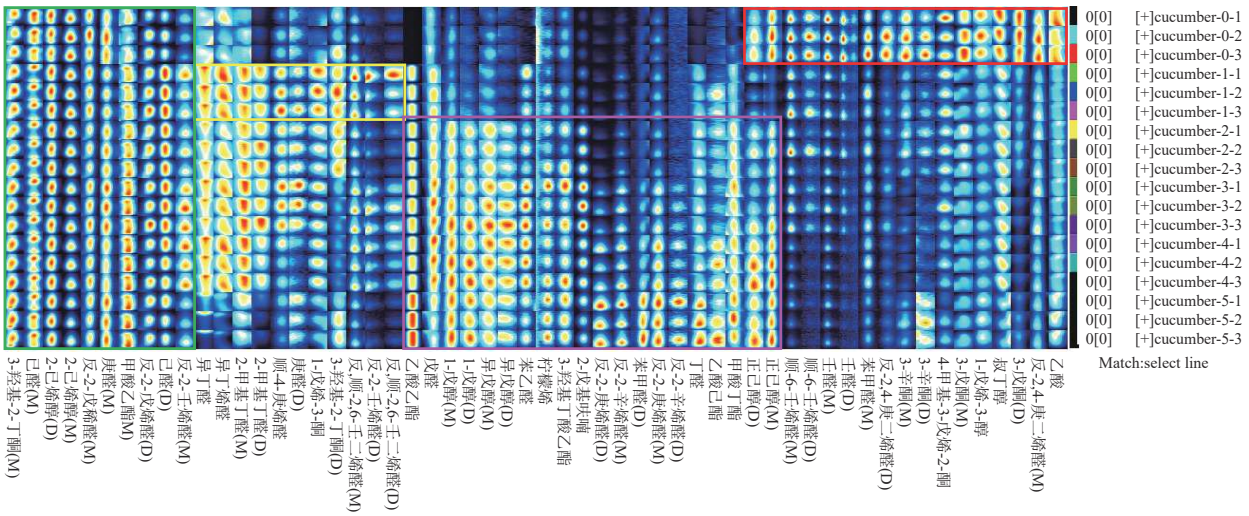


图 5 浅渍黄瓜贮藏过程中 VOCs 的指纹图谱

Fig.5 Gallery plot of VOCs in lightly-pickled cucumbers during storage

化和细胞膜结构破坏可能是导致风味损失的原因，另外醛类物质的减少也可能是由于浅渍黄瓜贮藏过程中微生物的滋长导致，有研究表明假单胞菌增殖会导致己醛含量的明显变化[26]。

2.2.4 ROAV 分析 ROAV 值可用于表征 VOCs 对样品总体风味的贡献，ROAV≥1 的组分为样品的关键性风味化合物，ROAV 值越大，对样品总体风味的贡献也就越大，0.1≤ROAV <1 的组分是样品的修饰

表 3 不同贮藏期浅渍黄瓜 VOCs 的 ROAV

Table 3 ROAV of VOCs in lightly-pickled cucumbers during storage

中文名称	气味描述[27−34]	阈值(mg/kg)[35]	浅渍0 d	浅渍1 d	浅渍2 d	浅渍3 d	浅渍4 d	浅渍5 d
反-2-庚烯醛	皂香、脂肪、杏仁	2.4000	0.0005	0.0005	0.0006	0.0013	0.0025	0.0041
反-2-壬烯醛	黄瓜味、令人不愉快的牛脂味	0.0001	60.6660	52.404	50.664	69.3260	85.8510	92.2100
反-2-辛烯醛	脂肪、鸡肉、黄瓜	0.0027	0.0047	5.5768	6.7839	5.7216	7.7471	7.5510
反-2-戊烯醛	–	1.4000	0.0047	0.0024	0.0035	0.0034	0.0049	0.0048
反-2,4-庚二烯醛	–	0.0570	0.0047	0.0969	0.1726	0.1369	0.2696	0.3033
反,顺-2,6-壬二烯醛	黄瓜味	0.0001	100.0000	100.0000	100.0000	100.0000	100.0000	100.0000
顺-4-庚烯醛	青草味	0.0034	0.2332	0.7970	0.3468	0.7177	0.7256	0.3008
顺-6-壬烯醛	水果香味	0.0001	74.3260	50.547	48.064	49.0980	32.0640	30.1150
异丁烯醛	–	0.0250	0.0782	0.1118	0.0953	0.1161	0.1434	0.0646
2-甲基丁醛	咖啡、麦芽、脂肪味	0.0100	0.2120	0.4552	0.5123	0.5712	0.5958	0.4064
异丁醛	刺激性气味	0.0010	1.6632	1.5785	1.5259	1.6955	2.1874	1.2875
苯甲醛	坚果、苦味	0.0850	0.0336	0.0213	0.0245	0.0270	0.0378	0.0461
丁醛	辛辣味、青草味	0.1000	0.0128	0.0321	0.0421	0.0443	0.0511	0.0749
庚醛	水果香	0.2600	0.0106	0.0085	0.0101	0.0119	0.0110	0.0142
己醛	青草	0.2300	0.0861	0.1212	0.1212	0.1291	0.1357	0.1153
壬醛	油脂香、甜橙香	0.0031	3.3829	1.8480	1.8501	2.0474	1.8287	1.8961
戊醛	杏仁、麦芽、辛辣	0.8500	0.0008	0.0011	0.0012	0.0015	0.0018	0.0014
苯乙醛	蜜甜香	0.0007	0.3269	0.7210	0.6730	1.1038	1.2826	0.9651
1-戊醇	脂肪香	0.1530	0.0065	0.0061	0.0116	0.0134	0.0176	0.0180
1-戊烯-3-醇	水果香味	0.0100	0.0696	0.0395	0.0452	0.0537	0.0626	0.0684
正己醇	草莓、清香味	0.0340	0.2291	0.0875	0.1536	0.1668	0.2578	0.2726
甲酸丁酯	–	0.3700	0.0015	0.0027	0.0034	0.0044	0.0053	0.0047
乙酸乙酯	梨香	0.8800	0.0016	0.0366	0.0424	0.0460	0.0521	0.0764
甲酸乙酯	–	8.1000	0.0023	0.0023	0.0025	0.0028	0.0034	0.0032
乙酸己酯	果香、花香味	0.0170	0.0093	0.0133	0.0151	0.0126	0.0254	0.0262
1-戊烯-3-酮	辛辣味	0.0001	3.2528	5.8718	5.1026	5.6950	6.5950	5.4314
3-辛酮	清香、干酪味	0.0013	2.8597	1.4482	1.6233	0.9143	0.9948	1.9563
3-戊酮	丙酮气味	3.0000	0.0058	0.0028	0.004	0.0035	0.0037	0.0039
2-戊基呋喃	青豆、黄油	0.0190	0.0769	0.1195	0.2665	0.3978	0.3589	0.3105
乙酸	酸味	0.0130	0.3105	0.1385	0.1626	0.1858	0.2401	0.3124

注：“–”表示未查到气味描述，同一种物质的单体和二聚体的含量相加后进行计算[3]。

性风味化合物，对样品总体风味具有修饰作用[27]。反,顺-2,6-壬二烯醛是对黄瓜风味具有重要影响的 VOCs，对浅渍黄瓜的主体风味贡献最大，因此定义反,顺-2,6-壬二烯醛 ROAV=100。根据公式计算得到其他风味化合物的 ROAV 值，如表 3 所示，0.1≤ROAV<1 的 VOCs 有 8 种，分别为反-2,4-庚二烯醛、顺-4-庚烯醛、异丁烯醛、2-甲基丁醛、己醛、正己醇、2-戊基呋喃、乙酸，这些物质为浅渍黄瓜的修饰性风味化合物。浅渍黄瓜中 ROAV≥1 的 VOCs 有 9 种，包括 7 种醛类和 2 种酮类，分别为反,顺-2,6-壬二烯醛、反-2-壬烯醛、顺-6-壬烯醛、反-2-辛烯醛、1-戊烯-3-酮、壬醛、异丁醛、3-辛酮、苯乙醛，这些物质为浅渍黄瓜的关键性风味化合物。

随着浅渍贮藏时间的延长，这些关键性风味化合物中的反-2-壬烯醛（黄瓜味、令人不愉快的牛脂味）、反-2-辛烯醛（脂肪、鸡肉、黄瓜）的 ROAV 分别由浅渍 0 d 的 60.666 增加至 92.2100、0.0047 增加至 7.551；而顺-6-壬烯醛（水果香味）、壬醛（油脂香、甜橙香）、3-辛酮（清香、干酪味）分别由 0 d 的 74.3260 降低至 30.1150、3.3829 降低至 1.8961、2.8597 降低至 1.9563。因此，反-2-壬烯醛、反-2-辛烯醛可能为贮藏后期异味的主要来源，顺-6-壬烯醛、壬醛、3-辛酮等物质随着贮藏期的延长 ROAV 值和相对含量均降低，导致黄瓜新鲜风味的损失。

2.2.5　主成分分析　主成分分析（PCA）作为一种多元统计分析技术，可以简化数据并揭示变量间的相互关系[32]，已被广泛应用于果蔬品质差异分析。为进一步研究浅渍黄瓜贮藏过程风味的变化，对 VOCs 进行 PCA。如图 6 所示，第一主成分（PC1）的贡献率为 67.1%，第二主成分（PC2）的贡献率为 18.0%，累计贡献率达到 85.1%，表明变换后的数据能够较好代表和解释原始数据的大部分特征[31]。由图可以看出，浅渍黄瓜贮藏期间风味差异较显著。结果表明，GC-IMS 的 PCA 分析结果能够较好地区分不同贮藏时间的浅渍黄瓜。

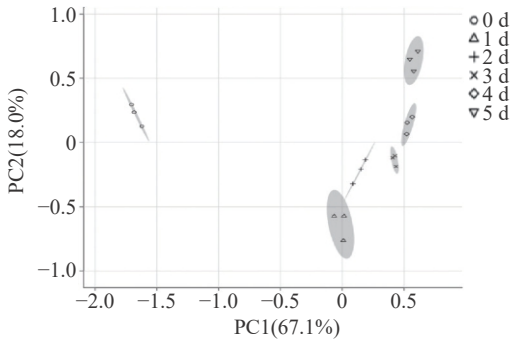


图 6　浅渍黄瓜贮藏过程中 VOCs 的 PCA 分析

Fig.6　PCA of VOCs in lightly-pickled cucumbers during storage

2.2.6　偏最小二乘法判别分析　PLS-DA 是一种基于偏最小二乘回归算法有监督的多元回归统计方法，常用来处理分类和判别问题。通过对主成分适当的旋转，PLS-DA 可以有效地对组间观察值进行区分，并且能够找到导致组间区别的影响变量。为了进一步分析浅渍黄瓜贮藏期间的差异性风味化合物，以浅渍黄瓜的不同贮藏时间为因变量 y，以 9 种关键性风味化合物作为自变量 x 进行 PLS-DA，R^2X=0.90474、R^2Y=0.9954 和交叉验证预测能力 Q^2=0.99142，R^2X 和 R^2Y 分别表示模型所能解释 X 和 Y 矩阵信息的百分比，R^2X−R^2Y<0.3 代表该模型较可靠[33]。如图 7 所示，浅渍 1 d 与浅渍 2 d 样品距离较近，风味相近，3~5 d 样品分离明显，无重叠，说明贮藏后期风味差异较大，这与前期电子鼻结果一致。

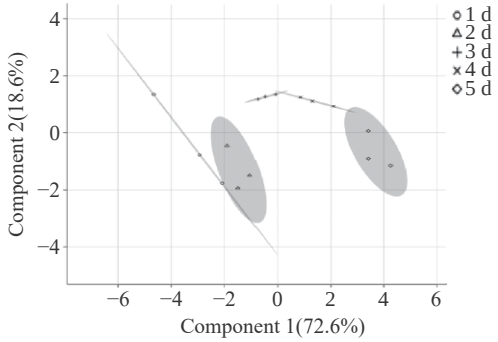


图 7　浅渍黄瓜贮藏过程中关键性风味化合物的 PLS-DA 得分图

Fig.7　PLS-DA score plot of key flavor compounds in lightly-pickled cucumbers during storage

在构建 PLS-DA 基础上，依据 VIP 值来量化每个变量对分类的贡献，筛选 VIP 值大于 1 的 VOCs 为区分不同贮藏期样品的差异标志物[28]。VIP 值越大，VOCs 在不同贮藏期黄瓜样品中的差异越显著。如图 8 所示，共筛选出 6 种 VIP>1 的差异标志物，主要以醛类为主，醛类物质主要是油酸、亚油酸等不饱和脂肪酸的降解和自动氧化而成[36]，分别是顺-6-壬烯醛、壬醛、1-戊烯-3-酮、异丁醛、反,顺-2,6-壬二烯醛、反-2-辛烯醛。随着贮藏时间的延长，顺-6-壬烯醛、壬醛、1-戊烯-3-酮、异丁醛、反,顺-2,6-壬二烯醛含量显著下降。而反-2-辛烯醛可以经亚油酸自氧化生成己醛和 2,4-癸二烯醛，再由 2,4-癸二烯醛在水分介导的逆羟醛反应中产生，具有脂肪、鸡肉、黄瓜味[37]，可能是浅渍黄瓜贮藏后期的主要异味成分。浅

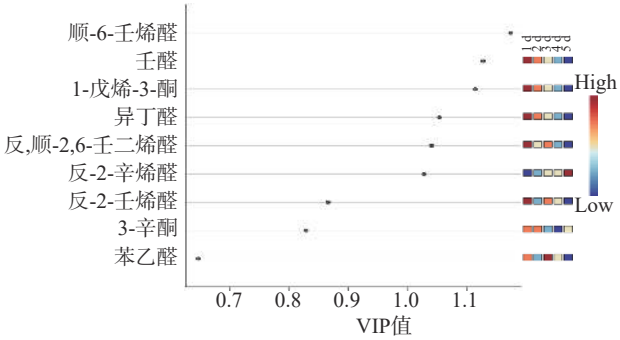


图 8　浅渍黄瓜贮藏过程中 VOCs 的 VIP 图

Fig.8　VIP diagram of VOCs in lightly-pickled cucumbers during storage

渍黄瓜中新鲜风味的损失及异味物质的产生可能是导致浅渍黄瓜风味变化的主要原因。

3 结论

本研究基于电子鼻和 GC-IMS 技术并结合多元统计学分析对浅渍黄瓜贮藏过程中的 VOCs 变化规律进行分析。电子鼻和 GC-IMS 结果均表明浅渍黄瓜贮藏过程中风味特征发生显著变化。GC-IMS 共定性分析出 56 种 VOCs，包括醇类 10 种、醛类 30 种、酮类 8 种、酯类 5 种、呋喃 1 种、酸类 1 种、烷烃类 1 种。随着贮藏期的延长，醛类、醇类和酮类物质的相对含量显著减少，酯类物质显著增加（$P<0.05$）。通过对 VOCs 进行 PCA 分析，发现不同贮藏期样品的风味特征具有显著差异。进一步通过 ROAV 计算，得到 9 种 ROAV≥1 的化合物，是浅渍黄瓜的关键风味化合物，分别是反,顺-2,6-壬二烯醛、反-2-壬烯醛、顺-6-壬烯醛、反-2-辛烯醛、1-戊烯-3-酮、壬醛、异丁醛、3-辛酮、苯乙醛。进一步对不同贮藏期样品的关键风味化合物进行 PLS-DA 分析，筛选出 6 种 VIP>1 的差异标志物，分别是顺-6-壬烯醛、壬醛、1-戊烯-3-酮、异丁醛、反,顺-2,6-壬二烯醛、反-2-辛烯醛，这些物质共同作用导致了浅渍黄瓜贮藏期间的风味变化。其中反-2-辛烯醛具有不良气味，并且随着贮藏时间的延长而增加，可能是导致浅渍黄瓜贮藏后期异味的主要原因。本研究为浅渍蔬菜贮藏期间风味品质的评价提供理论依据。

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

参考文献

[1] 沈文凤, 李晓, 王文亮, 等. 糖醇对低盐腌渍黄瓜品质影响的初步研究[J]. 食品科技, 2019, 44(3): 51−61. [SHEN W F, LI X, WANG W L, et al. Preliminary study on the effect of sugar alcohols on the quality of low-salt pickled cucumbers[J]. Food Science and Technology, 2019, 44(3): 51−61.]

[2] 王聘, 郜海燕, 毛金林, 等. 低盐化在腌渍菜中的研究进展[J]. 保鲜与加工, 2011, 11(4): 38−42. [WANG P, GAO H Y, MAO J L, et al. Advances in the study of hyposalination in pickled vegetables[J]. Storage and Process, 2011, 11(4): 38−42.]

[3] 杨芳, 杨莉, 粟立丹. 基于电子鼻和气相-离子迁移谱对美人椒酱的风味分析[J]. 食品工业科技, 2019, 40(23): 193−198,206. [YANG F, YANG L, LI L D. Flavor analysis of *Capsicum frutescens* L. sauce based on electronic nose and gas chromatograph-lonmobility spectrometer (GC-IMS)[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(23): 193−198,206.]

[4] SHANG Z, YE Z, LI M, et al. Dynamics of microbial communities, flavor, and physicochemical properties of pickled chayote during an industrial-scale natural fermentation: Correlation between microorganisms and metabolites[J]. Food Chemistry, 2022, 377: 132004.

[5] SACCHI R, CORRADO G, BASILE B, et al. Effect of salt addition and fermentation time on phenolics, microbial dynamics, volatile organic compounds, and sensory properties of the PDO table olives of Gaeta (Italy)[J]. Molecules, 2022, 27(22): 8100.

[6] LIU Y, CHEN X, LI F X, et al. Analysis of microbial diversity and metabolites in sauerkraut products with and without microorganism addition[J]. Foods, 2023, 12: 1164.

[7] 韩艳秋, 叶春苗, 王琛, 等. 基于气相色谱-离子迁移谱技术的隔年东北酸菜风味鉴别研究[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(8): 251−257. [HAN Y Q, YE C M, WANG C, et al. Flavor identification of over-year Dongbei Suancai based on GC-IMS[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(8): 251−257.]

[8] HAN Y Q, WANG C, ZHANG X L, et al. Characteristic volatiles analysis of Dongbei Suancai across different fermentation stages based on HS-GC-IMS with PCA[J]. Journal of Food Science, 2022, 87(2): 612−622.

[9] 王福成, 米思, 李劲松, 等. 基于气相色谱-离子迁移谱技术分析不同包装条件对黄瓜风味的影响[J]. 食品工业科技, 2022, 43(8): 296−304. [WANG F C, MI S, LI J S, et al. Analysis of the effect of different packaging conditions on cucumber flavour based on gas chromatography-ion mobility spectrometry technique[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(8): 296−304.]

[10] 刘登勇, 周光宏, 徐幸莲. 确定食品关键风味化合物的一种新方法: “ROAV”法[J]. 食品科学, 2008(7): 370−374. [LIU D Y, ZHOU G H, XU X L. A new method for identifying key flavour compounds in foods: The "ROAV" method[J]. Food Science, 2008(7): 370−374.]

[11] WILSON A D, BAIETTO M. Applications and advances in electronic-nose technologies[J]. Sensors, 2009, 9(7): 5099−5148.

[12] LI M, YANG R, ZHANG H, et al. Development of a flavor fingerprint by HS-GC–IMS with PCA for volatile compounds of *Tricholoma matsutake* Singer[J]. Food Chemistry, 2019, 290: 32−39.

[13] 冯蕾. 基于电子鼻及低场核磁共振的黄瓜与樱桃番茄新鲜度智能检测研究[D]. 无锡: 江南大学, 2019. [FENG L. Research on freshness intelligent recognition of cucumbers and cherry tomatoes based on electronic nose and low-field nuclear magnetic resonance[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2019.]

[14] 曾桥, 吕生华, 段洁, 等. 基于气相离子迁移谱技术分析杜仲叶茯砖茶加工过程中挥发性成分[J]. 食品工业科技, 2021, 42(21): 73−82. [ZENG Q, LÜ S H, DUAN J, et al. The volatile components in the processing of Fuzao tea from *Eucommia* leaves were analyzed based on gas chromatography-ion mobility spectrometry technique[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(21): 73−82.]

[15] ZHANG J, GU X, YAN W, et al. Characterization of differences in the composition and content of volatile compounds in cucumber fruit[J]. Foods, 2022, 11(8): 1101.

[16] 刘春香, 何启伟, 刘拴桃. 黄瓜果实反, 顺-2,6-壬二烯醛与反-2-壬烯醛比值的变化[J]. 莱阳农学院学报, 2003(4): 276−278, 281. [LIU C Q, HE Q W, LIU Q T. Changes in the ratio of trans, cis-2,6-nonadienal to trans-2-nonenal in cucumber fruit[J]. Journal of Laiyang Agricultural College, 2003(4): 276−278,281.]

[17] PALMA-HARRIS C, MCFEETERS R F, FLEMING H P. Fresh cucumber flavor in refrigerated pickles: Comparison of sensory and instrumental analysis[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(17): 4875−7.

[18] 居媛悦. “浅渍”竹笋热烫工艺参数及腌制过程中品质劣变的研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2015. [JU Y Y. The parameters of blanching processing technology and changes of quality during pickling of “low-salt curing” bamboo shoots[D]. Chongqing: Chongqing University, 2015.]

［19］邱月，许蜜蜜，谢雪华，等. 基于 GC-IMS 和化学计量学分析热加工牛肉特征风味物质[J]. 浙江工业大学学报，2023，51(4)：448−455. ［QIU Y，XU M M，XIE X H，et al. GC-IMS and chemometrics-based analysis of characteristic flavour substances in thermally processed beef[J]. Journal of Zhejiang University of Technology，2023，51(4)：448−455.］
［20］YANG Y，WANG B，FU Y，et al. HS-GC-IMS with PCA to analyze volatile flavor compounds across different production stages of fermented soybean whey tofu[J]. Food Chemistry，2021，346：128880.
［21］赵玲，王琳，曹荣，等. 基于 SPME-GC-MS 和电子舌分析不同处理秋刀鱼烤后的风味特征[J/OL]. 食品科学，1−9［2024-09-14］. http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20231010.1057.066.html. ［ZHAO L，WANG L，CAO R，et al. Flavour characteristics of differently treated okonomiyaki after grilling based on SPME-GC-MS and electronic tongue analysis[J]. Food Science，1−9［2024-09-14］. http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20231010.1057.066.html.］
［22］郭精桐，赵圆，孙玉敬. 番茄果实风味及其影响因素的研究进展[J]. 食品科学，2023，44(17)：169−177. ［GUO J T，ZHAO Y，SUN Y J. Recent advances in research on flavor substances in tomato fruit and their influential factors[J]. Food Science，2023，44(17)：169−177.］
［23］陈丽兰，陈祖明，袁灿. 气相色谱-离子迁移谱结合化学计量法分析不同炒制时间对郫县豆瓣酱挥发性化合物的影响[J]. 食品科学，2023，44(14)：283−290. ［CHEN L L，CHEN Z M，YUAN C. Effect of different stir-frying times on volatile compounds in Pixian bean paste by gas chromatography-ion mobility spectrometry coupled with stoichiometric methods[J]. Food Science，2023，44(14)：283−290.］
［24］王斌，许浩，徐俊，等. 内蒙古野葱干的特征挥发性香气成分分析[J]. 食品工业科技，2022，43(24)：296−304. ［WANG B，XU H，XU J，et al. Analysis of characteristic volatile aroma components of dried wild onions from Inner Mongolia[J]. Science and Technology of Food Industry，2022，43(24)：296−304.］
［25］REYES-DÍAZ R，GONZÁLEZ-CÓRDOVA A F，DEL CARMEN ESTRADA-MONTOYA M，et al. Volatile and sensory evaluation of mexican fresco cheese as affected by specific wild lactococcus lactis strains[J]. Journal of Dairy Science，2019，103(1)：242−253.
［26］郑鄢燕，魏亚博，王宇滨，等. 气调贮藏对腐败菌引起的鲜切黄瓜品质、滋味和挥发性物质变化的影响[J]. 食品科学，2021，42(5)：252−261. ［ZHENG Y Y，WEI Y B，WANG Y B，et al. Effect of air-conditioned storage on changes in quality，flavour and volatiles of fresh-cut cucumber caused by spoilage bacteria[J]. Food Science，2021，42(5)：252−261.］
［27］赵泽伟，丁筑红，许培振，等. 基于 SPME-GC-MS 和电子鼻分析方法分析薏仁饮料贮藏过程风味化合物变化[J]. 食品科学，2018，39(14)：276−281. ［ZHAO Z W，DING Z H，XU P Z，et al. The changes of flavor compounds of coix seed beverage during storage were analyzed by SPME-GC-MS and electronic nose analysis[J]. Food Science，2018，39(14)：276−281.］
［28］JIA Y，YUAN B，YANG Y，et al. Flavor characteristics of peeled walnut kernels under two-steps roasting processes[J]. Food Chemistry，2023，423：136290.
［29］杨芳，杨莉，张振宇，等. 基于气相-离子迁移谱对竹燕窝菌汤风味成分的分析[J]. 食品工业科技，2020，41(23)：8−14，24. ［YANG F，YANG L，ZHANG Z Y，et al. Analysis of flavour components of bamboo bird's nest mushroom soup based on gas chromatography-ion mobility spectrometr[J]. Science and Technology of Food Industry，2020，41(23)：8−14，24.］
［30］HUANG G，LIU T，MAO X，et al. Insights into the volatile flavor and quality profiles of loquat（*Eriobotrya japonica* Lindl.）during shelf-life via HS-GC-IMS，E-nose，and E-tongue[J]. Food Chemistry：X，2023，20：100886.
［31］WANG J，ZHANG H Y，SUN Y Q，et al. Study on cut tobacco drying process based on HS-GC/MS：Principal component analysis，similarity analysis，drying conditions，and drying mechanism[J]. Journal of Chemistry，2023，2023.
［32］CH R，CHEVALLIER O，MCCARRON P，et al. Metabolomic fingerprinting of volatile organic compounds for the geographical discrimination of rice samples from China，Vietnam and India[J]. Food Chemistry，2020，334：127553.
［33］李明洁，凌道，李祥雨，等. 基于气相色谱-离子迁移谱分析海鸭蛋腌制过程中蛋清挥发性风味物质的变化[J]. 食品科学，2022，43(18)：200−208. ［LI M J，LING X，LI X Y，et al. Changes of volatile flavour substances in egg whites during pickling of sea duck eggs based on gas chromatography-ion mobility spectrometry analysis[J]. Food Science，2022，43(18)：200−208.］
［34］刘春香，何启伟. 黄瓜芳香物质的研究进展[J]. 园艺学报，2004(2)：269−273. ［LIU C X，HE Q W. Progress in the study of aromatic substances in cucumber[J]. Horticultural Plant Journal，2004(2)：269−273.］
［35］里奥·范海默特. 化合物嗅觉阈值汇编(原书第二版)[M]. 北京：中国科学技术出版社，2018：5. ［L J VAN GEMERT. Compilations of odour threshold values in airwater and other media(second enlarged and revised edition)[M]. Beijing：Science and Technology of China Press，2018：5.］
［36］岳杨，汪超，陈亚淑，等. 植物乳的香气、异味及其影响因素研究进展[J]. 食品科学，2023，44(21)：330−340. ［YUE Y，WANG C，CHEN Y S，et al. Progress in the study of aroma and off-flavour of plant milks and their influencing factors[J]. Food Science，2023，44(21)：330−340.］
［37］张友峰. 浓香菜籽油的香气特征及其关键呈香物质的形成与变化机制[D]. 无锡：江南大学，2022. ［ZHANG Y F. Study on the aroma characteristics and mechanisms of change and formation of key aroma compunds of fragrant rapeseed oil[D]. Wuxi：Jiangnan University，2022.］

咎立峰, 杨香瑜, 张蕾, 等. UPLC-Q-TOF/MS 技术结合网络药理学系统分析君迁子的抗炎活性成分 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 264−274. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023120025
ZAN Lifeng, YANG Xiangyu, ZHANG Lei, et al. Systematic Analysis of Anti-inflammatory Active Components in *Diospyros lotus* Fruit Using UPLC-Q-TOF/MS Combined with Network Pharmacology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 264−274. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023120025

· 分析检测 ·

UPLC-Q-TOF/MS 技术结合网络药理学系统分析君迁子的抗炎活性成分

咎立峰[1,*], 杨香瑜[1], 张　蕾[1], 辛军彩[1], 郭海燕[1], 李海荣[2]
（1.邯郸学院生命科学与工程学院, 河北 邯郸 056005;
2.涉县君迁酒庄有限公司, 河北 邯郸 056400）

摘　要: 目的：初步阐明君迁子果实中抗炎的活性成分及其作用机制。方法：采用超高效液相色谱-串联四级杆-飞行时间质谱（UPLC-Q-TOF/MS）技术测定分析君迁子果实的化学成分，结合网络药理学探究潜在的抗炎活性成分及其作用机制，用分子对接验证网络预测结果。结果：在负离子模式下，依据分子离子峰及二级质谱裂解特征从君迁子果实中共鉴定出 26 个黄酮化合物，包括杨梅素衍生物 10 个、槲皮素衍生物 7 个、山柰酚衍生物 4 个、芹菜素衍生物 2 个、其他黄酮化合物 3 个，其中 12 种化合物为首次在君迁子果实中报道。网络药理学分析显示化合物杨梅素-3-桑布双糖苷、杨梅素-3-(2G-鼠李糖基)-芸香糖甙、桑色素、杨梅素-3-鼠李糖基-(1->2)-鼠李糖苷、异鼠李素-3-O-葡萄糖苷、杨梅素、槲皮素、柚皮素、芹菜素、山柰酚具有潜在的抗炎活性，且发挥抗炎作用主要与 PI3K-Akt、EGFR 络氨酸激酶抑制性耐药和癌症信号通路有关。分子对接显示活性成分与核心靶点对接稳定，且结果与网络药理学预测一致。结论：君迁子提取物中黄酮类化合物具有潜在的抗炎作用，对炎症疾病具有一定的辅助预防作用。

关键词: 君迁子, 抗炎成分, 超高效液相色谱-串联四级杆-飞行时间质谱, 网络药理
中图分类号: TS219　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2024)21−0264−11
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023120025
本文网刊:

Systematic Analysis of Anti-inflammatory Active Components in *Diospyros lotus* Fruit Using UPLC-Q-TOF/MS Combined with Network Pharmacology

ZAN Lifeng[1,*], YANG Xiangyu[1], ZHANG Lei[1], XIN Juncai[1], GUO Haiyan[1], LI Hairong[2]
（1.School of Life Science and Engineering, Handan University, Handan 056005, China;
2.Shexian Junqian Winery Co., Ltd., Handan 056400, China）

Abstract: Objective: It was elucidated the anti-inflammatory active components and their mechanisms of action in the fruits of *Diospyros lotus*. Methods: Ultra-performance liquid chromatography-tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS) was used to qualitatively analyze the chemical constituents of *Diospyros lotus* fruits, and combined with network pharmacology to explore the potential anti-inflammatory active components and their mechanisms of action, and validated the results by molecular docking. Results: A total of 26 flavonoid compounds, including 10 myricetin derivatives, 7 quercetin derivatives, 4 kaempferol derivatives, 2 apigenin derivatives, and 3 other flavonoid compounds, were identified from extract of *D. lotus* fruits based on molecular ion peaks and mass spectrometry cleavage characteristics in negative ion mode, among which 12 compounds were reported for the first time in the fruits. Network pharmacological analysis showed that compounds myricetin 3-sambubioside, myricetin 3-(2G-rhamnosylrutinoside), morin,

收稿日期: 2023−12−08
基金项目: 河北省高等学校科学技术研究项目（ZC2023191）; 邯郸市科学技术研究项目（19112087066）; 邯郸学院校级项目（XZ2023002）。
作者简介/通信作者*: 咎立峰（1980−）, 男, 博士, 副教授, 研究方向: 功能食品活性成分研究, E-mail: tengfei007zlf@126.com。

myricetin 3-rhamnosyl-(1->2)-rhamnoside, isorhamnetin-3-O-glucoside, myricetin, quercetin, naringenin, apigenin and kaempferol had potential anti-inflammatory activities and exerted anti-inflammatory effects mainly related to PI3K-Akt, EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance and cancer signaling pathway. Molecular docking showed that the active components stably docked with the key targets, and the results were consistent with the network pharmacological predictions. Conclusion: Flavonoids in *D. lotus* extracts have potential anti-inflammatory effects and are useful as adjunctive preventive agents in inflammatory diseases.

Key words: *Diospyros lotus*; anti-inflammatory components; ultra-performance liquid chromatography-tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS); network pharmacology

君迁子（*Diospyros lotus* L.），俗称黑枣，是柿树科落叶乔木的果实，广泛分布于河北、山西、山东等北方山区[1]。在河北省涉县栽培历史悠久，2017 年获得了国家地理标志保护产品的称号，是传统"黑五类"补肾食品配方之一。君迁子果实经脱涩处理后可鲜食，或可用于酿酒、制醋、发酵果饮以及营养保健产品[2]。古代医书记载君迁子能入脾胃经，具有祛痰、止渴、补中养气、安神及明目的功效。适量食用君迁子对贫血、血小板减少、肝炎、乏力、失眠等症状有一定的疗效，但过量食用可能会导致胃胀[3]。现代科学发现，君迁子果实中含有山柰酚、槲皮素、杨梅素等多种黄酮类成分[4−5]，这些成分具有良好的抗氧化、抗炎、抗肿瘤、镇静和抑制 HIV-1 病毒等生理活性[6−9]。Gao 等[10] 通过 HPLC-ECD 分析发现，杨梅素类物质是君迁子果实中主要的黄酮类成分，含量在 2.75~5.28 μg/g 之间。无核君迁子果实因其独特的食疗保健价值而深受消费者喜爱，然而，关于君迁子果实中抗炎活性成分的报道却不多，为了深入了解涉县无核君迁子果实的药效物质基础，有必要对其果实中的抗炎活性成分进行系统分析。

君迁子果实中成分丰富多样，利用传统分离、鉴定方法步骤繁琐、耗时耗力，UPLC-Q-TOF/MS 技术在功能食品活性成分结构解析、药效物质基础研究等方面显示出独特的优势，可以快速鉴定其中化合物的结构[11]。网络药理学是通过系统生物学的研究方法，借助统计学、复杂网络等多种手段，在分子水平上诠释功能食品中活性成分的理化和生物学性质，为探索功能食品复杂作用模式提供新的视角[12]。

本研究采用 UPLC-Q-TOF/MS 技术结合网络药理学策略对君迁子果实中的抗炎活性成分及其作用机制进行系统分析，并采用分子对接技术对核心成分和关键靶点基因进行验证分析，以期为无核君迁子在功能食品领域的深入开发利用提供参考。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

无核君迁子　涉县君迁酒庄有限公司，3~5 ℃冷藏放置备用；乙腈、甲酸　色谱级，美国 Fisher 公司；石油醚、乙醇　分析纯，天津奥普升化工有限公司；LX-38 植提树脂　上海一基实业有限公司。

ACQUITY UPLC I-Class/Xevo G2-XS QTOF 超高效液相色谱仪　美国 Waters 公司；N-1200BV-W 型旋转蒸发仪　济南凯尼自动化科技有限公司；Milli-Q Reference 超纯水仪　默瑞（上海）生物科技有限公司；DFY-500A 高速万能粉碎机　上海比朗仪器制造有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　君迁子成分分析

1.2.1.1　样品制备　将君迁子在 45 ℃ 真空干燥，并粉碎至 20~40 目，用 3 L 质量分数 80% 的乙醇萃取君迁子粉（100 g）3 次，萃取温度 45 ℃，每次 1.5 h。萃取液合并过滤，真空浓缩至水悬液，浓缩温度 40~45 ℃。石油醚与水悬液体积比 1:1 萃取 3 次脱脂，脱脂后水液采用 LX-38 植提树脂分离，并用 85% 乙醇解吸得到解吸液，解吸液在 40~45 ℃ 旋转蒸发仪负压条件下浓缩至无醇状态，将浓缩液冷冻干燥，得君迁子提取物粉末 4.6 g。分析前用适量甲醇溶解，溶液过 0.22 μm 微孔过滤器，转移到自动进样瓶中待测。

1.2.1.2　色谱条件　Waters BEH Amide（100 mm×2.1 mm, 1.7 μm）色谱柱，柱温选择 40 ℃；流动相由 A 和 B 两相组成，A 相为 0.1% 甲酸乙腈溶液，B 相为 0.1% 甲酸水溶液，梯度如下：0~5 min：10%~100% A，5~25 min：100% A，25~25.1 min：100%~10% A，25.1~30 min：10% A；流速 0.2 mL/min；进样量 10 μL。

1.2.1.3　质谱条件　通过比较正、负离子 2 种扫描模式，发现在负离子模式下质谱响应更强，故本实验采用电喷雾离子源（ESI）负离子模式下定性分析，参数如下：毛细管电压：3.0 kV；锥孔电压：40 V；离子源温度：100 ℃；锥孔气流速：50 L/h；脱溶剂温度：450 ℃；脱溶剂气（N_2）流速：800 L/h；扫描范围：m/z 50~1200。

1.2.2　君迁子抗炎靶点预测

1.2.2.1　活性成分抗炎靶点筛选　鉴定出的化合物在 PubChem 数据库（https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/）中查询 Canonical SMILES 号，未查询到的化合物利用 Chem Draw 绘制其结构式保存为 SDF 格式，通过 Open Babel 转换获得 Canonical SMILES 号。将获得的 SMILES 号上传至 Swiss Target Prediction 数据库（http://www.swisstargetprediction.ch/）获取作用靶点，筛选标准为 Probability>0。同时，在 Gene Cards 数据库（https://www.genecards.org/）中检索抗

炎疾病靶点。将化合物作用靶点与抗炎靶点采用 Venny(http://www.liuxiaoyuyuan.cn/) 构建韦恩图，得到君迁子活性成分抗炎作用靶点。

1.2.2.2 抗炎作用靶点 PPI 网络分析 将君迁子活性成分潜在抗炎作用靶点导入 STRING 数据库(http://www.string-db.org/)，选择“Multiple Protein”，物种选择“Homo Spaiens”，以 P<0.05 为筛选条件，获得潜在靶点的相互作用关系，采用 Cytoscape 3.8.0 软件可视化构建靶点蛋白互作网络图。

1.2.2.3 GO 和 KEGG 富集分析 DAVID 数据库(https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp)用于基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析，以 P<0.05 为筛选条件，获得分析结果。

1.2.2.4 活性成分-靶点-信号通路分析 基于 Cytoscape 3.8.0 软件构建“君迁子活性成分-靶点”和“活性成分-靶点-通路”网络，得到君迁子抗炎的主要活性成分和重要通路。活性成分、靶点和通路用节点来表示，边表示活性成分与靶点、炎症与靶点之间的相互关系。

1.2.3 核心成分和关键靶点的分子对接 对君迁子中筛选出来的潜在活性成分与关键靶点进行分子对接验证。在 PDB 数据库(https://www.rcsb.org/)输入蛋白质 uniport 的 entry 号查找 3D 结构，下载并保存。利用 Chem 3D 对主要活性成分进行优化，即能量最小化计算。运用 PyMOL、Autodock 软件对蛋白进行去水、去配体、配体可选转键和表面电荷获取等预处理操作。使用 Autodock Vina 完成分子对接，并在 CMD 命令符下运行，用 PyMOL 软件进行分子的可视化处理。

1.3 数据处理

采用 Mass Lynx V4.1 软件对各成分的分子离子峰和 MS^2 质谱裂解碎片及特征碎片进行分析，并结合 PubChem 数据库和相关文献报道鉴定化合物结构。

2 结果与分析

2.1 君迁子提取物的化学成分

2.1.1 成分分析 采用 UPLC-Q-TOF/MS 负离子模式下系统分析涉县无核君迁子提取物的化学成分，总离子基峰色谱图如图 1 所示，采集样品数据并用 Mass Lynx V4.1 软件分析，结合文献报道和在线数据库，共鉴定出 26 个黄酮类化合物，包括杨梅素衍生物 10 个、槲皮素衍生物 7 个、山奈酚衍生物 4 个、芹菜素衍生物 2 个、其他黄酮化合物 3 个，鉴定结果详细信息见表 1 所示，其中 12 种化合物为首次在君迁子果实中报道。

2.1.2 成分鉴定 在 ESI-MS 负离子模式下，君迁子黄酮化合物产生 $[M-H]^-$分子离子峰，主要苷元包括杨梅素、槲皮素，糖链由葡萄糖、鼠李糖等 1~3 个糖组成，糖基位置多为苷元的 3 位或 7 位。

DL1：分子离子峰 m/z 611.1968 $[M-H]^-$，MS^2 谱中连续失去分子量 120 Da 碎片产生离子 m/z 491.1536 $[M-H]^-$、m/z 371.0860 $[M-H]^-$，离子 m/z 491.1536 进一步失去 CH_2O 产生碎片 m/z 461.1076，推测该化合物连接 2 分子己糖，同时产生碎片 m/z 317.1377，并进一步失去中性分子 CO 产生强吸收碎片 m/z 289.0046，母核发生 RDA 裂解产生 m/z 151.0086 离子，查阅 PubMed 数据库，鉴定化合物为杨梅素-3-桑布双糖苷(Myricetin-3-sambubioside)。

DL2：分子离子峰 m/z 655.1411 $[M-H]^-$，该化合物的 MS^2 谱中出现明显的离子 m/z 479.1012，即与分子离子峰相差 1 分子葡萄糖苷酸(176 Da)，进一步失去 1 分子葡萄糖苷(162 Da)产生离子 m/z 317.0283，母核继续失去中性分子 CO 和 CO_2 产生碎片 m/z 289.0499、245.0512，母核发生 RDA 裂解产生碎片 m/z 179.0083、151.0137、125.0336、107.0158，参考文献报道[13]，鉴定该成分为杨梅素-3-葡萄糖醛酸-8-

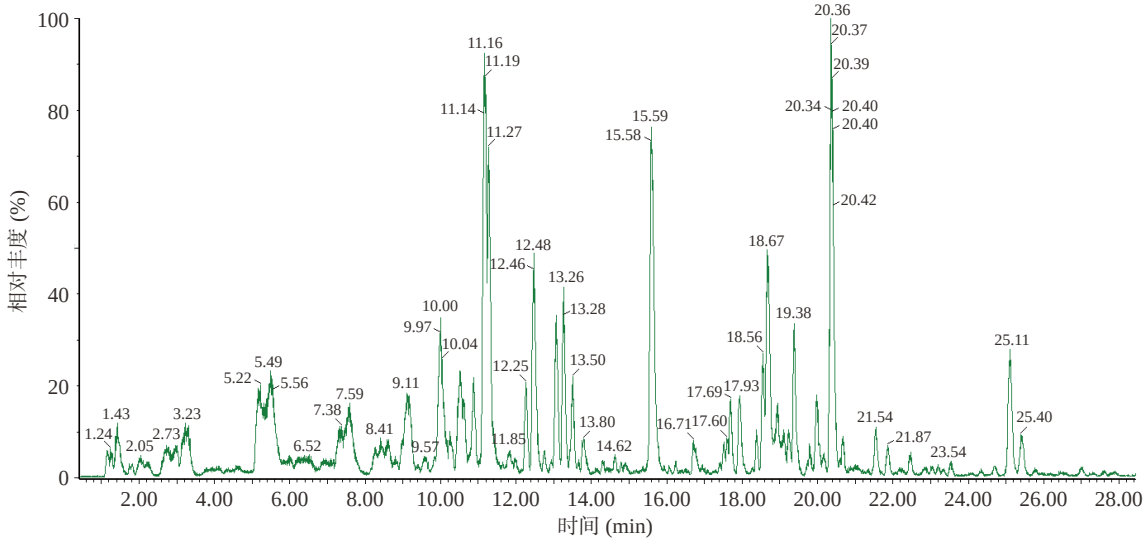


图 1 负离子模式下 UPLC-Q-TOF-MS 分析君迁子的总离子流图

Fig.1 Total ion chromatogram of *Diospyros lotus* by UPLC-Q-TOF-MS in negative ion mode

表 1　君迁子果实中化学成分的鉴定结果

Table 1　Identification results of chemical constituents from *Diospyros lotus* fruit

序号	出峰时间tR(min)	分子式	分子离子(m/z)	特征离子(m/z)	化合物
1*	3.23	$C_{26}H_{28}O_{17}$	611.1968	317.1377	杨梅素-3-桑布双糖苷Myricetin-3-sambubioside
2*	5.22	$C_{27}H_{28}O_{19}$	655.1411	317.0283	杨梅素-3-葡萄糖醛酸-8-葡萄糖苷Myricetin-3-glucuronide-8-glucoside
3*	7.59	$C_{33}H_{40}O_{21}$	771.2378	317.0392	杨梅素-3-(2G-鼠李糖基)-芸香糖甙Myricetin-3-(2G-rhamnosylrutinoside)
4	8.82	$C_{27}H_{30}O_{17}$	625.1686	316.0449	杨梅素-3-O-芸香糖苷Myricetin-3-O-rutinoside
5	9.11	$C_{21}H_{20}O_{13}$	479.1057	316.0376	杨梅素-3-O-葡萄糖苷Myricetin-3-O-glucoside
6*	9.57	$C_{26}H_{28}O_{16}$	595.1684	317.0101	杨梅素-7-木糖基-(1->2)-鼠李糖苷Myricetin-7-xylosyl-(1->2)-rhamnoside
7	10.00	$C_{15}H_{10}O_{7}$	301.0153	301.0153	桑色素Morin
8	10.24	$C_{27}H_{30}O_{16}$	609.1741	300.0358	槲皮素-3-O-芸香糖苷Quercetin-3-O-rutinoside
9*	10.52	$C_{27}H_{30}O_{16}$	609.1791	317.0247	杨梅素-3-鼠李糖基-(1->2)-鼠李糖苷Myricetin-3-rhamnosyl-(1->2)-rhamnoside
10	10.61	$C_{21}H_{20}O_{12}$	463.0827	317.0320	杨梅素-3-O-鼠李糖苷Myricetin-3-O-rhamnoside
11	10.88	$C_{21}H_{20}O_{12}$	463.1100	300.0429	槲皮素-3-O-葡萄糖苷Quercetin-3-O-glucoside
12*	11.27	$C_{22}H_{22}O_{12}$	477.1629	315.0994	异鼠李素-3-O-葡萄糖苷Isorhamnetin-3-O-glucoside
13*	11.66	$C_{23}H_{22}O_{13}$	505.1256	300.0429	槲皮素-3-O(6"-乙酰基-葡萄糖苷)Quercetin-3-O-(6"-acetyl-glucoside)
14	12.25	$C_{21}H_{20}O_{11}$	447.1174	300.0429	槲皮素-3-O-鼠李糖苷Quercetin-3-O-rhamnoside
15*	12.48	$C_{21}H_{18}O_{14}$	493.0837	317.0465	杨梅素-7-O-葡萄糖醛酸苷Myricetin-7-O-glucuronide
16	13.06	$C_{15}H_{10}O_{8}$	317.0465	317.0465	杨梅素Myricetin
17	13.50	$C_{21}H_{20}O_{12}$	463.1100	301.0437	槲皮素-7-O-葡萄糖苷Quercetin-7-O-glucoside
18	13.67	$C_{21}H_{20}O_{10}$	431.1211	285.0543	山柰酚-7-O-鼠李糖苷Kaempferol-7-O-rhamnoside
19*	14.31	$C_{21}H_{20}O_{12}$	463.2377	299.9968	槲皮素-3'-O-葡萄糖苷Quercetin-3'-O-glucoside
20*	14.62	$C_{21}H_{18}O_{11}$	445.1025	269.0576	芹菜素-7-O-葡萄糖苷酸Apigenin-7-O-glucuronide
21*	14.79	$C_{24}H_{22}O_{14}$	533.3359	284.1183	山柰酚-3-O-6-丙二酰基葡萄糖苷Kaempferol-3-O-(6-malonyl-glucoside)
22	15.59	$C_{15}H_{10}O_{7}$	301.0327	301.0327	槲皮素Quercetin
23	17.51	$C_{15}H_{12}O_{5}$	271.0761	271.0761	柚皮素Naringenin
24	17.60	$C_{15}H_{10}O_{5}$	269.1483	269.1483	芹菜素Apigenin
25	17.93	$C_{15}H_{10}O_{6}$	285.0543	285.0543	山柰酚Kaempferol
26*	21.54	$C_{21}H_{18}O_{12}$	461.2395	285.2236	山柰酚-3-O-葡萄糖醛酸苷Kaempferol-3-O-glucuronide

注：*表示君迁子果实中首次发现。

葡萄糖苷(Myricetin-3-glucuronide-8-glucoside)。

DL3：分子离子峰 m/z 771.2378 $[M-H]^-$，MS^2 谱中产生碎片 m/z 479.1057，进一步失水产生碎片 m/z 461.1472，m/z 479.1057 失去碎片(120 Da)产生强吸收碎片 m/z 359.1671，同时产生 m/z 317.0392、289.0464，母核发生 RDA 裂解产生 m/z 151.0137、125.0291、107.0137 典型碎片离子，参考相关报道[14]，鉴定化合物为杨梅素-3-(2G-鼠李糖基)-芸香糖苷[Myricetin-3-(2G-rhamnosylrutinoside)]。

DL4：分子离子峰 m/z 625.1686 $[M-H]^-$，MS^2 谱中失去 1 分子鼠李糖苷(146 Da)产生碎片 m/z 479.1012，继续失去 1 分子葡萄糖苷(162 Da)得到特征碎片 m/z 316.0449、m/z 317.0429，且相对丰度 m/z 316.0449 明显高于 m/z 317.0429，说明糖苷键主要以均裂方式断裂，鉴定为 3-O 糖基取代，参照相关报道[15] 鉴定化合物为杨梅素-3-O-芸香糖苷(Myricetin-3-O-rutinoside)。

DL5：分子离子峰 m/z 479.1057 $[M-H]^-$，MS^2 谱中失去 1 分子葡萄糖苷(162 Da)产生显著的特征离子 m/z 316.0376、m/z 317.0429，且相对丰度 m/z 316.0376 明显高于 m/z 317.0429，推测糖苷位置为 3-O 糖基取代，参考相关报道[16] 鉴定该化合物为杨梅素-3-O-葡萄糖苷(Myricetin-3-O-glucoside)。

DL6：分子离子峰 m/z 595.1684 $[M-H]^-$，MS^2 谱中分别失去 1 分子木糖苷(132 Da)和 1 分子鼠李糖苷(146 Da)产生离子 m/z 463.1056 和 m/z 317.0101、m/z 316.1869，且相对丰度 m/z 317.0101 明显高于 m/z 316.1869，推测糖苷位置为 7-O 糖基取代，查阅 PubMed 数据库，鉴定该成分为杨梅素-7-木糖基-(1->2)-鼠李糖苷(Myricetin-7-xylosyl-(1->2)-rhamnoside)。

DL7：分子离子峰 m/z 301.0153 $[M-H]^-$，MS^2 谱中连续失去中性分子 CO 或 CO_2 产生离子 m/z 284.0045$[M-H_2O]^-$、273.0177$[M-H-CO]^-$、257.0226$[M-H-CO_2]^-$、245.0162$[M-H-2CO]^-$、229.0266$[M-H-CO_2-CO]^-$，母核发生 RDA 裂解产生黄酮特征碎片 m/z 179.0111、151.0086，且 m/z 179.0111 相对丰度较弱，参考文献 [17]，推测其为桑色素(Morin)。

DL8：分子离子峰 m/z 609.1741 $[M-H]^-$，MS^2 谱中分子离子失去 1 分子鼠李糖苷(146 Da)产生碎片 m/z 463.1011，进一步失去 1 分子葡萄糖苷(162 Da)得到特征苷元离子 m/z 301.0153 和 m/z 300.0358，且 m/z 300.0358 的相对丰度强于 m/z 301.0153，说明糖苷键主要以均裂方式断裂，参照有关报道[18] 鉴定化合物为槲皮素-3-O-芸香糖苷(Quercetin-3-O-rutinoside)。

DL9: 分子离子峰 m/z 609.1791 [M-H]⁻, 发现 MS^2 谱中失去 2 分子鼠李糖苷(146 Da)产生离子 m/z 463.1011 和 m/z 317.0247, 母核进一步裂解产生碎片 m/z 301.0437、283.0428、273.0380、255.0408、209.0029、179.0083、151.0137、125.0291, 该化合物的 2 个糖基相同, 无法确定糖的连接方式, 但碎片离子 463.1011 的丰度较弱, 推测 2 个鼠李糖基可能连接在一起, 查阅 PubMed 数据库, 鉴定其为杨梅素-3-鼠李糖基-(1->2)-鼠李糖苷(Myricetin-3-rhamnosyl-(1->2)-rhamnoside)。

DL10: 分子离子峰 m/z 463.0827, MS^2 谱中产生明显的特征碎片 m/z 317.0320、301.0544、285.0543、273.0746、255.0441, RDA 裂解产生 m/z 179.0056、151.0086、125.0291, 参考文献 [4] 鉴定化合物为杨梅素-3-O-鼠李糖苷(Myricetin-3-O-rhamnoside)。

DL11: 分子离子峰 m/z 463.1100, MS^2 谱中产生 m/z 300.0429 和 m/z 301.0437 明显的特征碎片, 其中 m/z 300.0429 明显强于 m/z 301.0437, 推测糖苷键主要以均裂方式断裂, 参考相关报道[19] 鉴定为槲皮素-3-O-葡萄糖苷(Quercetin-3-O-glucoside)。

DL12: 分子离子峰 m/z 477.1629 [M-H]⁻, MS^2 谱中产生离子 m/z 357.0994 [M-H-120Da]⁻以及糖环的交叉环切除反应产生离子 m/z 387.1287, 失去 1 分子葡萄糖(162 Da)得到特征碎片 m/z 315.0994, 进一步裂解产生碎片 m/z 151.0086、107.0518。查阅文献 [19] 鉴定化合物为异鼠李素-3-O-葡萄糖苷(Isorhamnetin-3-O-glucoside)

DL13: 分子离子峰 m/z 505.1256 [M-H]⁻, MS^2 谱中失去 1 分子乙酰基(42 Da)产生离子 m/z 463.1011, 进一步失去 1 分子葡萄糖(162 Da)产生 m/z 300.0429、301.0437 特征碎片, 且丰度 m/z 300.0429 强于 m/z 301.0437, 查阅数据库 PubMed 并参照文献 [20], 鉴定化合物为槲皮素-3-O(6"-乙酰基-葡萄糖苷)[Quercetin-3-O-(6"-acetyl-glucoside)]。

DL14: 分子离子峰 m/z 447.1174 [M-H]⁻, MS^2 谱中失去 1 分子鼠李糖苷(146 Da)产生明显的特征碎片 m/z 300.0429 和 m/z 301.0508, 且相对丰度 m/z 300.0429 强于 m/z 301.0508, 母核进一步裂解产生碎片 m/z 271.0357、219.0776、151.0086, 结合文献 [21], 鉴定化合物为槲皮素-3-O-鼠李糖苷(Quercetin-3-O-rhamnoside)。

DL15: 分子离子峰 m/z 493.0837 [M-H]⁻, MS^2 谱中失去 1 分子葡萄糖醛酸苷(176 Da)产生显著特征苷元碎片 m/z 317.0465, 并进一步裂解产生 m/z 299.0296、273.0515、255.0376、245.0611、227.0451, 参考文献 [22] 鉴定化合物为杨梅素-7-O-葡萄糖醛酸苷(Myricetin-7-O-glucuronide)。

DL16: 分子离子峰 m/z 317.0465 [M-H]⁻, MS^2 谱失去 1 分子羟基和 CO 分别产生碎片 m/z 300.0394、273.0481, 母核发生 C 环跨环开裂产生离子 m/z 179.0083, 进而失去中性分子 CO 得到离子 m/z 151.0086, 连续失去 CO 和 CO_2 后产生离子 m/z 107.0539, 查阅数据库并参考文献 [4], 鉴定化合物为杨梅素(Myricetin)。

DL17: 分子离子峰 m/z 463.1100 [M-H]⁻, MS^2 谱失去 1 分子葡萄糖苷(162 Da)产生 m/z 301.0437, 槲皮素 RDA 裂解产生碎片 m/z 179.0056、151.0086, 根据以上信息鉴定化合物为槲皮素-7-O-葡萄糖苷(Quercetin-7-O-glucoside)。

DL18: 分子离子峰 m/z 431.1211 [M-H]⁻, MS^2 谱失去 1 分子鼠李糖苷(146 Da)产生 m/z 285.0543、m/z 284.0493, 且相对丰度 m/z 285.0543>m/z 284.0493, 山奈酚母核裂解产生碎片 m/z 151.0061, 根据以上信息鉴定化合物为山奈酚-7-O-鼠李糖苷(Kaempferol-7-O-rhamnoside)。

DL19: 分子离子峰 m/z 463.2377 [M-H]⁻, MS^2 谱分子离子峰失去 1 分子葡萄糖苷(162 Da)产生 m/z 299.9968 和 m/z 301.0544, 其中 m/z 299.9968 相对丰度明显高于 m/z 301.0544, 说明 C 环的糖苷键主要以均裂方式断裂。根据以上信息并参照文献报道[23], 鉴定化合物为槲皮素-3'-O-葡萄糖苷(Quercetin-3'-O-glucoside)。

DL20: 分子离子峰 m/z 445.1025 [M-H]⁻, MS^2 谱分子离子峰失去 1 分子葡萄糖苷酸(176 Da)产生明显的特征离子 m/z 269.0576 [M-H-glucuronide]⁻, 母核进一步失去中性分子 CO 和 CO_2 产生碎片 m/z 241.0620 和 m/z 225.1243, 根据以上信息并参照文献 [22] 鉴定化合物为芹菜素-7-O-葡萄糖苷酸(Apigenin-7-O-glucuronide)。

DL21: 分子离子峰 m/z 533.3359 [M-H]⁻, MS^2 谱分子离子峰失去 1 分子丙二酰基(86 Da)和 1 分子葡萄糖苷(162 Da)产生明显的特征离子 m/z 285.0543 和 m/z 284.1183, 相对丰度 m/z 284.1183 高于 m/z 285.0543, 母核进一步失去羟基产生碎片 m/z 269.0979, 根据以上信息参照相关报道[22], 鉴定化合物为山奈酚-3-O-6-丙二酰基葡萄糖苷[Kaempferol-3-O-(6-malonyl-glucoside)]。

DL22: 分子离子峰 m/z 301.0327 [M-H]⁻, MS^2 产生 m/z 273.0549 [M-H-CO]⁻、257.0555 [M-H-CO_2]⁻、245.0579 [M-H-2CO]⁻、229.0638 [M-H-CO_2-CO]⁻, C 环跨环开裂产生明显离子 m/z 179.0083、151.0111、107.0200, 根据以上信息并参照相关报道[4], 鉴定化合物为槲皮素(Quercetin)。

DL23: 分子离子峰 m/z 271.0761 [M-H]⁻, MS^2 谱中产生 m/z 243.1867 [M-H-CO]⁻、227.1407 [M-H-CO_2]⁻, 母核开裂产生明显离子 m/z 151.0137、107.0158, 根据以上信息并参照相关报道[24], 鉴定化合物为柚皮素(Naringenin)。

DL24: 分子离子峰 m/z 269.1483 [M-H]⁻, MS^2 谱产生离子 m/z 251.1392 [M-H-H_2O]⁻, 分子离子失

去中性分子 CO 和 CO_2 产生碎片 m/z 241.0620 和 m/z 225.1611，C 环裂解产生离子 m/z 151.0162，根据以上信息并参考相关报道[25]，鉴定化合物为芹菜素（Apigenin）。

DL25：分子离子基峰 m/z 285.0543 $[M-H]^-$，MS^2 谱通过基峰 C 环脱掉 CO 产生 m/z 257.0653，进一步失去水和 CO 后形成 m/z 239.0447、229.0607；山奈酚母核发生 RDA 裂解产生丰度较低碎片 m/z 151.0111、107.0158，参照相关报道[26]，鉴定化合物为山柰酚（Kaempferol）。

DL26：分子离子峰 m/z 461.2395 $[M-H]^-$，MS^2 谱分子离子峰失去 1 分子葡萄糖酸（176 Da）产生典型碎片离子 m/z 285.2236，根据质谱裂解特征并参考相关报道[27]，鉴定为山柰酚-3-O-葡萄糖醛酸苷（Kaempferol-3-O-glucuronide）。

2.2　活性成分网络药理分析

2.2.1　活性成分靶点预测　利用 Swiss Target Prediction 数据库对鉴定出的 26 个化合物进行靶点预测，得到 924 个抗炎靶点基因，进一步与人类基因库对比筛选去重之后，得到 185 个活性成分靶点基因。将活性成分靶点基因与 Gene Cards 数据库里筛选得到的 4402 个抗炎靶点基因进行交集并创建韦恩图，见图 2 所示，交集得到 69 个君迁子活性成分潜在的抗炎作用靶点。

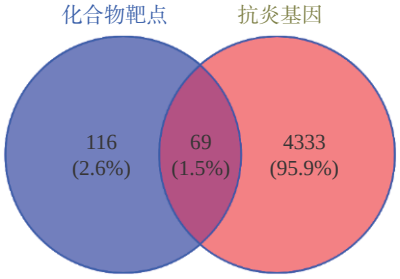


图 2　活性成分抗炎靶点韦恩图

Fig.2　Venn diagram of anti-inflammatory targets and active ingredients

2.2.2　活性成分-炎症靶点 PPI 互作网络构建　通过构建基于 STRING 数据库的蛋白质互作网络（PPI），并使用 Cytoscape 软件可视化分析并绘制蛋白质网络关系图。见图 3，网络包含 69 个节点和 487 条边，平均节点度为 14.1，平均介数为 0.658。其中度值前 10 的关键靶点基因分别为 *AKT1*、*ESR1*、*BCL2*、*EGFR*、*SRC*、*MMP9*、*PARP1*、*GSK3B*、*MCL1*、*PPARG*。

2.2.3　GO 和 KEGG 富集分析　为解释君迁子黄酮化合物抗炎所涉及的过程，将 69 个潜在靶点导入 DAVID 数据库进行 GO 和 KEGG 富集分析。GO 分析发现 265 个明显的生物结果，主要包括 167 个生物过程（BP）、37 个细胞组分（CC）、61 个分子功能（MF）。分别取排名前 10 的结果绘制气泡图，

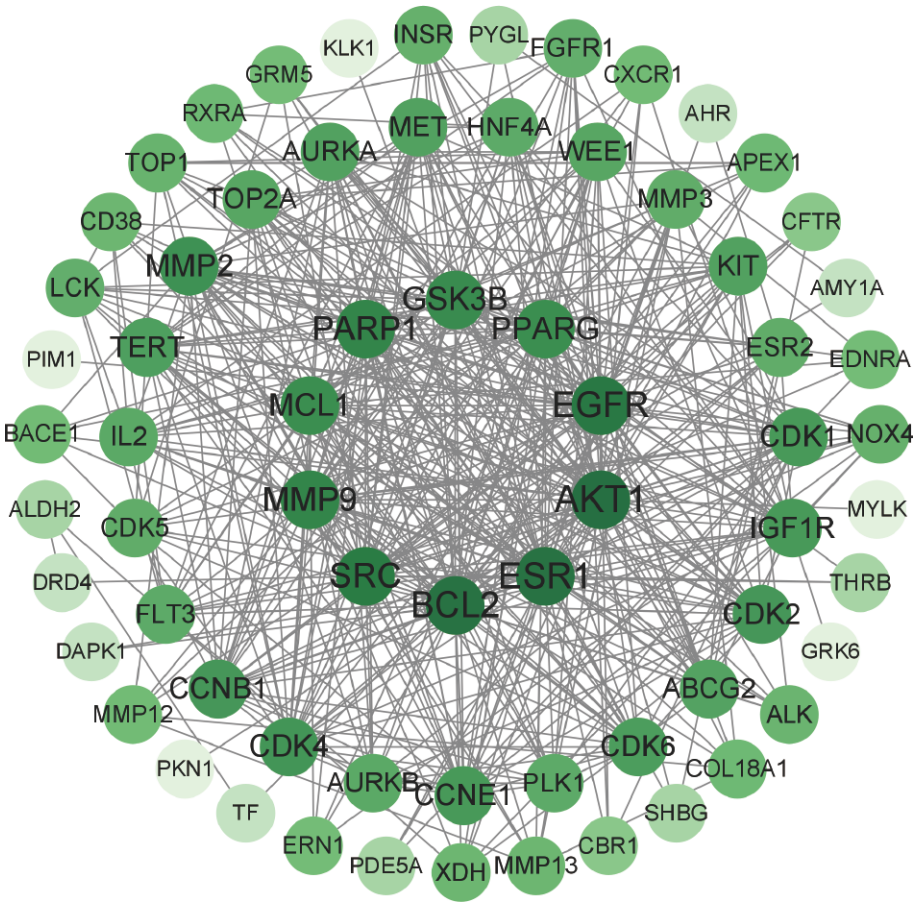


图 3　蛋白质靶点 PPI 网络图

Fig.3　PPI network diagram of protein targets

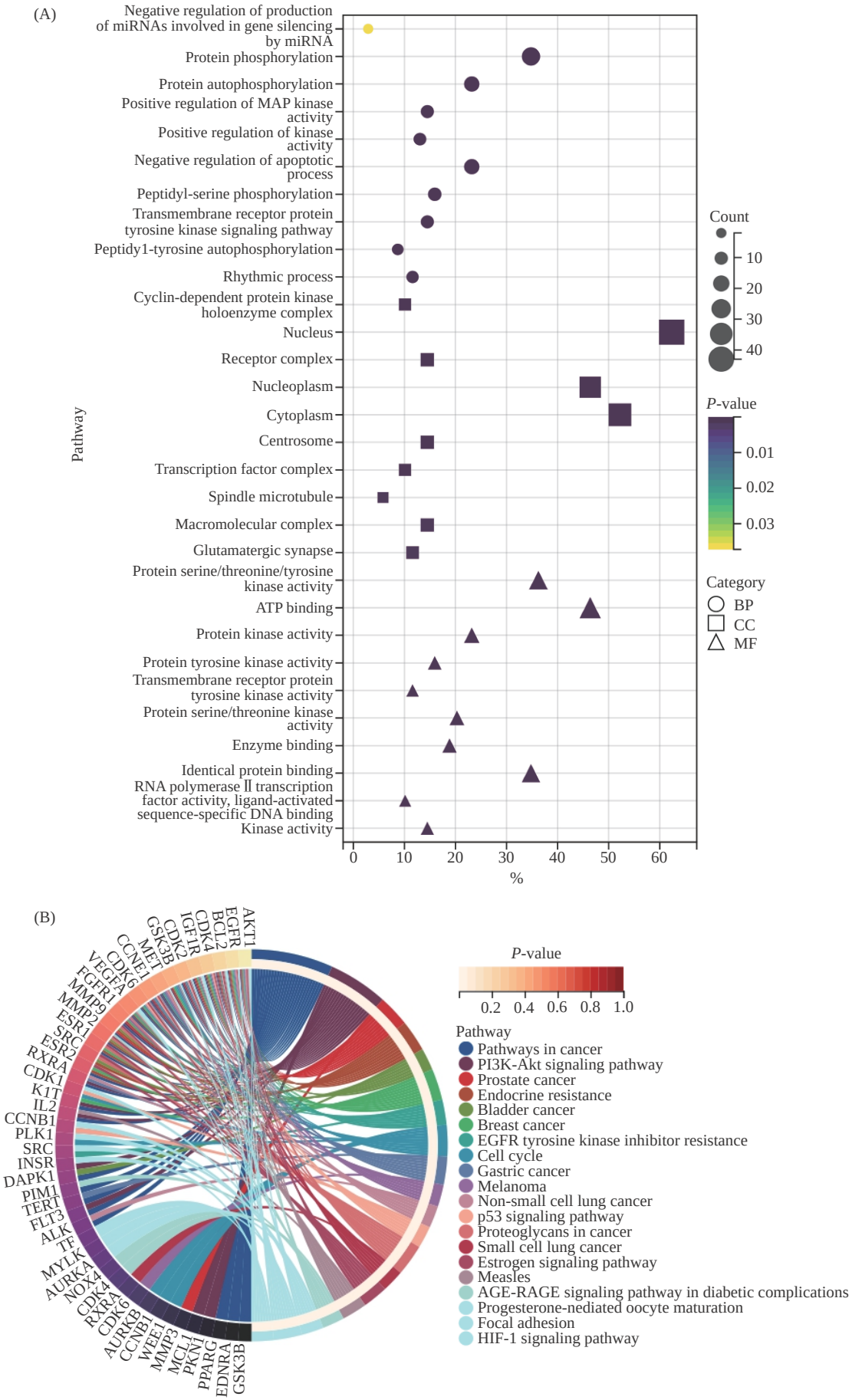


图 4　富集分析图

Fig.4　Enrichment analysis plot

注:(A)基因本体富集分析;(B)京都基因与基因组百科全书路径富集分析。

如图 4A 所示。在生物过程中主要涉及蛋白磷酸化（Protein phosphorylation）、蛋白自身磷酸化（Protein autophosphorylation）、细胞凋亡过程负向调控（Negative regulation of apoptotic process）等；细胞组分中，主要包括受体复合物（Receptor complex）、细胞质（Cytoplasm）、细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶全酶复合物（Cyclin-dependent protein kinase holoenzyme complex）、大分子复合物（Macromolecular complex）等；分子功能主要与蛋白丝氨酸/苏氨酸/络氨酸激酶活性（Protein serine/threonine/tyrosine kinase activity）、ATP 结合（ATP binding）、蛋白络氨酸激酶活性（Protein tyrosine kinase activity）、蛋白激酶活性（Protein kinase activity）、相同蛋白的结合（Identical protein binding）等相关。

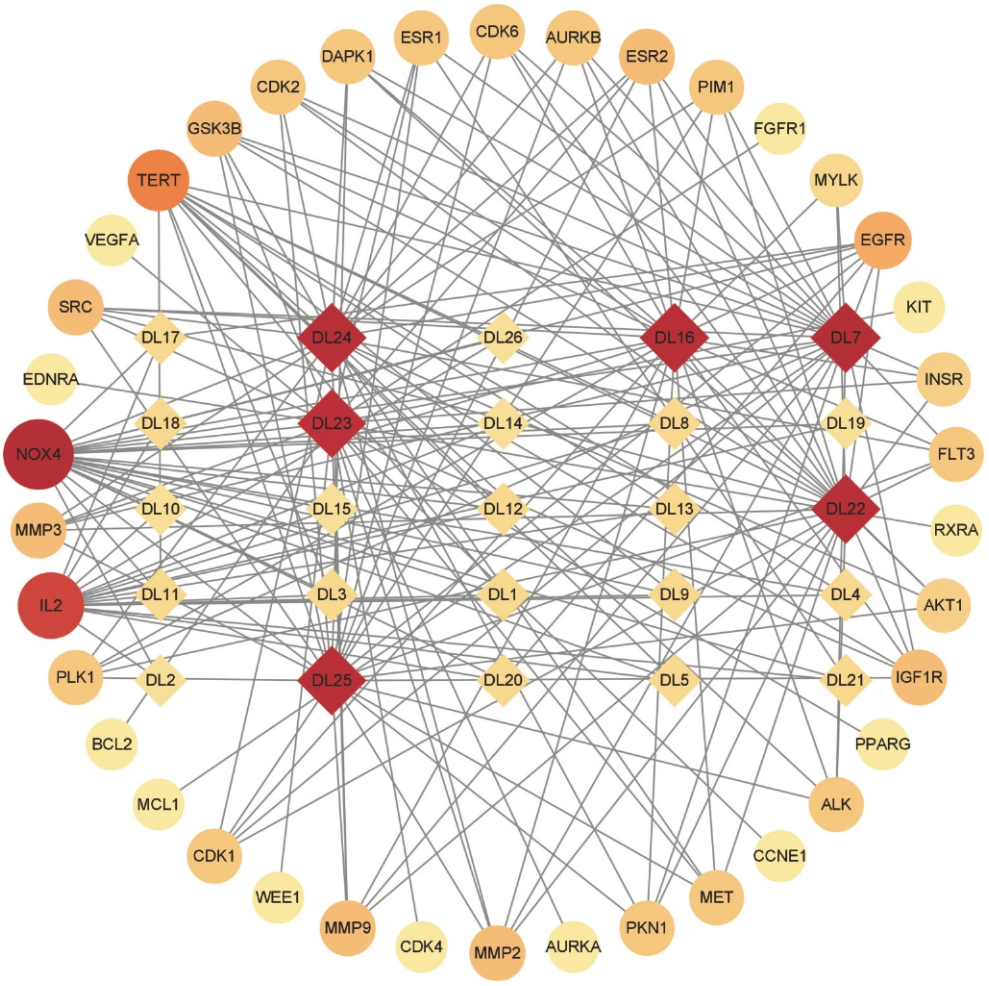
KEGG 通路富集分析得到 72 条潜在的信号通路，选取排名靠前的输出圆图进行分析，如图 4B 所示。结果显示君迁子黄酮化合物抗炎作用明显富集的信号通路主要包括 PI3K-Akt 信号通路（PI3K-Akt signaling pathway）和癌症通路（Pathways in cancer），这两者占比最大，*GSK3B*、*EDNRA*、*PPARG*、*PKN1*、*MCL1* 是其主要基因。

2.2.4　构建成分-靶点与成分-靶点-通路网络图　采用 Cytoscape 软件构建君迁子的成分-靶点和成分-靶点-信号通路，其中“方形”表示化学成分，“圆形”表示抗炎作用靶点，“六边形”表示通路，由图 5A 可知，成分-靶点网络包括 63 个节点、189 条边，平均介数值为 6.000，其中杨梅素-7-木糖基-(1->2)-鼠李糖苷（DL6）与炎症靶点没有节点。通过比较成分-靶点网络中各成分的度值，杨梅素-3-桑布双糖苷（DL1）、杨梅素-3-（2G-鼠李糖基）-芸香糖甙（DL3）、桑色素（DL7）、杨梅素-3-鼠李糖基-(1->2)-鼠李糖苷（DL9）、异鼠李素-3-O-葡萄糖苷（DL12）、杨梅素（DL16）、槲皮素（DL22）、柚皮素（DL23）、芹菜素（DL24）、山柰酚（DL25）节点较大，可视为抗炎的重要活性成分。*AKT1*、*EGFR*、*ESR1*、*BCL2*、*SRC*、*MMP9*、*MCL1*、*GSK3B*、*PPARG* 等靶点基因节点较大，可以视作抗炎的重要靶点。成分-靶点-信号通路网络包括 83 个节点、366 条边，平均介数值为 8.819，见图 5B 所示，包括 25 种成分、38 个靶点，20 条通路，其中 PI3K-Akt 信号通路（PI3K-Akt signaling pathway）、EGFR 络氨酸激酶抑制性耐药（EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance）和癌症通路（Pathways in cancer）可以视作抗炎的重要通路。

2.3　分子对接验证

将 10 个核心化合物杨梅素-3-桑布双糖苷（DL1）、杨梅素-3-（2G-鼠李糖基）-芸香糖甙（DL3）、桑色素（DL7）、杨梅素-3-鼠李糖基-(1->2)-鼠李糖苷（DL9）、异鼠李素-3-O-葡萄糖苷（DL12）、杨梅素

(A)



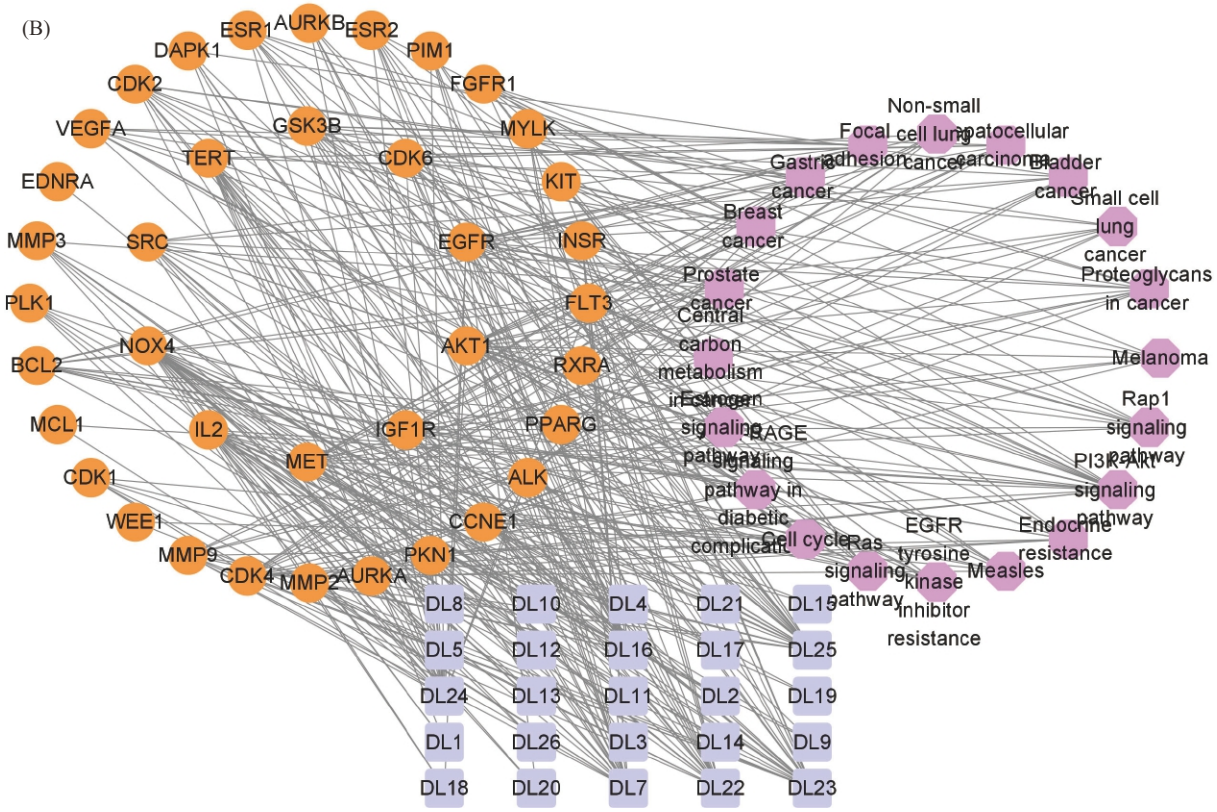


图 5 活性成分-靶点(A)和活性成分-靶点-通路(B)网络图

Fig.5 Cytoscape construction of component-targets (A) and component-targets-pathway (B) network

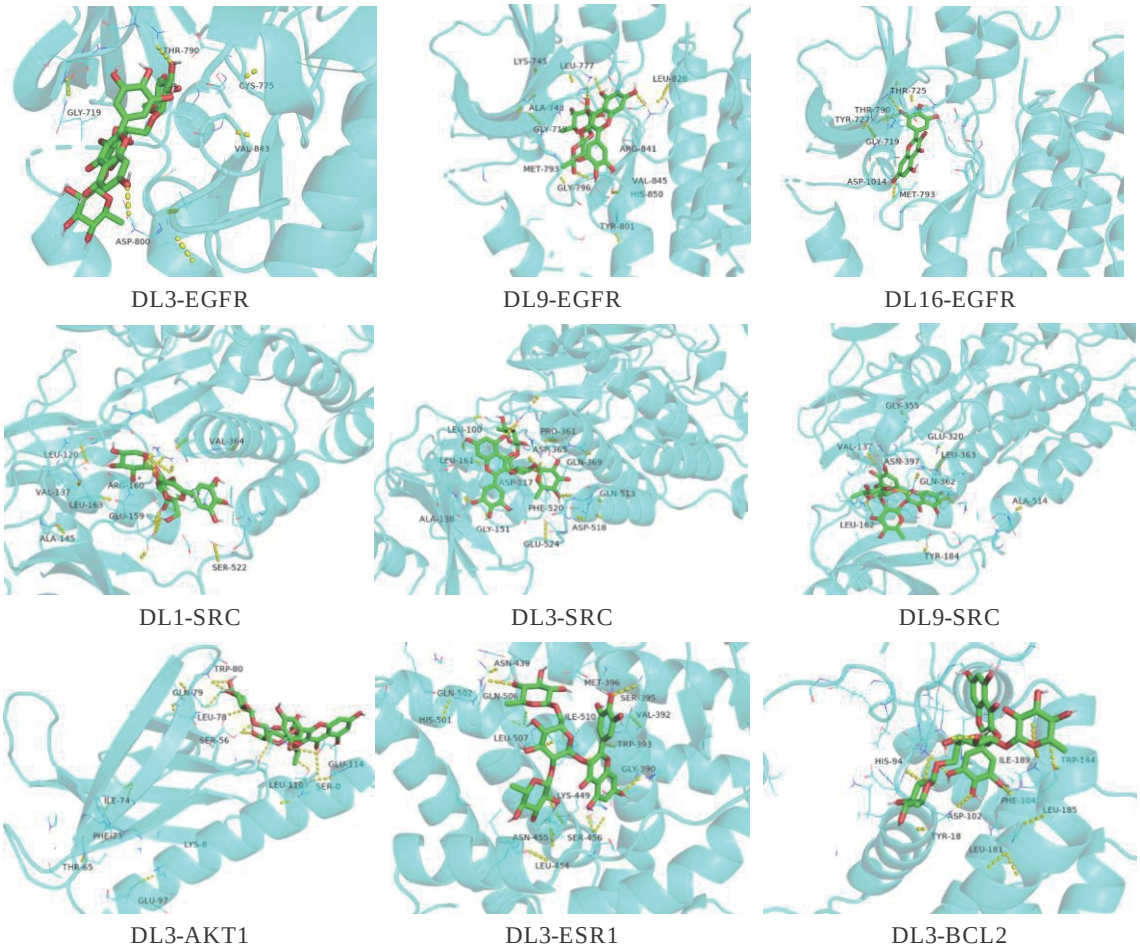


图 6 核心成分与关键靶点分子对接结果

Fig.6 Molecular docking results between core components and key targets

（DL16）、槲皮素（DL22）、柚皮素（DL23）、芹菜素（DL24）、山柰酚（DL25）与 5 种关键靶点 EGFR（PDB ID：1INO）、SRC（PDB ID：1O43）、AKT1（PDB ID：1UNM）、ESR1（PDB ID：1BYQ）、BCL2（PDB ID：1G5M）进行分子对接验证，蛋白质与化合物缔合的紧密程度可以用结合能来表示，较低的结合能将导致更稳定的结合构象和更可能的相互作用。一般认为活性成分与靶蛋白的结合能小于−5.0 kcal/mol 表明结合能力良好，而小于−7.0 kcal/mol 视作有较强的结合作用[28]。对接结果显示，关键靶点均可自发结合，且核心成分与关键靶点的结合活性较好，构象稳定，结合能见表 2 所示，所有核心化合物与关键靶点结合能均小于−5.0 kcal/mol，对接的功能基团是相应碳链上的羧基、羟基及酯基。用 PyMOL 软件进行分子的可视化处理，部分结果见图 6，其中杨梅素-3-（2G-鼠李糖基）-芸香糖甙（DL3）与 EGFR、SRC、AKT1、ESR1、BCL2 结合最为稳定。同时杨梅素-3-鼠李糖基-（1->2）-鼠李糖苷（DL9）与 EGFR、杨梅素-3-鼠李糖基-（1->2）-鼠李糖苷（DL9）与 SRC、杨梅素（DL16）与 EGFR、杨梅素-3-桑布双糖苷（DL1）与 SRC 结合能值较低，匹配的稳定性较高。根据分子对接结果，推测君迁子是通过多种成分共同作用于核心靶点发挥抗炎作用，尤其是杨梅素及其衍生物在抗炎活性方面发挥更为重要的作用。

表 2　核心化合物与关键靶点的分子对接结合能结果
Table 2　Molecular docking binding energy results between core compounds and key targets

化合物	结合能（kcal/mol）				
	EGFR	SRC	AKT1	ESR1	BCL2
DL1	−8.7	−8.9	−7.0	−7.5	−7.1
DL3	−9.0	−9.9	−7.2	−8.2	−9.0
DL7	−8.6	−8.1	−6.4	−7.5	−8.2
DL9	−9.0	−9.0	−7.1	−7.4	−8.7
DL12	−8.7	−7.8	−6.0	−5.9	−6.8
DL16	−9.1	−8.0	−6.5	−8.0	−8.1
DL22	−8.9	−8.3	−6.2	−7.3	−7.9
DL23	−8.4	−7.9	−6.2	−7.4	−8.1
DL24	−8.7	−8.0	−6.2	−6.2	−8.0
DL25	−7.6	−7.9	−6.3	−7.3	−7.2

众多研究[29−31]发现杨梅素及其苷类化合物具有较强的抗氧化、抗炎及心脏保护功能，通过减少细胞凋亡来预防心肌炎疾病的发生，槲皮素类成分一般具有不同程度的保肝、抗炎、抗氧化等多种药理活性，同时发现槲皮素和苷类化合物的抗炎活性主要是 B 环和 C 环上的 OH 基团贡献较大。

3　结论

本研究采用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱对涉县君迁子果实中的黄酮化合物进行了系统分析，共从君迁子果实中鉴定出 26 个黄酮化合物，结合网络药理学预测了君迁子提取物抗炎的活性成分，发现杨梅素-3-桑布双糖苷、杨梅素-3-（2G-鼠李糖基）-芸香糖甙、桑色素、杨梅素-3-鼠李糖基-（1->2）-鼠李糖苷、异鼠李素-3-O-葡萄糖苷、杨梅素、槲皮素、柚皮素、芹菜素、山柰酚具有潜在的抗炎活性，EGFR、SRC、AKT1、ESR1、BCL2 可能是其中发挥抗炎作用的关键靶点，且通过 PI3K-Akt 信号通路、EGFR 络氨酸激酶抑制性耐药和癌症通路等关键信号通路发挥抗炎作用。将核心靶点与活性化合物进行了分子对接，发现核心靶点与君迁子中多种化合物结合良好，特别是杨梅素及其苷类化合物，结合程度更为稳定。但因时间有限以上预测结果尚未通过体内及分子水平的验证，后续将进一步完善。本研究探究无核君迁子的抗炎成分及其作用机制的预测结果，为君迁子果实的抗炎药效物质基础及在功能食品开发利用方面提供理论依据。

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

参考文献

[1] YANG Y, YANG T T, JING Z B, et al. Genetic diversity and taxonomic studies of date plum (*Diospyros lotus* L.) using morphological traits and SCoT markers[J]. Biochem Syst Ecol, 2015, 61: 253−259.

[2] LI X H, JIANG Z Y, SHEN Y Y, et al. *In vitro* regeneration and agrobacterium tumefaciens-mediated genetic transformation of *D. lotus* (*Diospyros lotus* L.)[J]. Sci Hortic-amsterdam, 2018, 236: 229−237.

[3] 滕宁宁, 王明, 吴一飞, 等. 君迁子药学研究概况[J]. 辽宁中医药大学学报, 2010, 12(9): 81−82. [TENG N N, WANG M, WU Y F, et al. Overview of pharmacological research of *Diospyros lotus* L.[J]. LiaoNing Univ of TCM, 2010, 12(9): 81−82.]

[4] LOIZZO M R, SAID A, TUNDIS R, et al. Antioxidant and antiproliferative activity of *Diospyros lotus* L. extract and isolated compounds[J]. Plant Foods Hum Nutr, 2009, 64(4): 264−270.

[5] UDDIN G, RAUF A, SIDDIQUI B S, et al. Anti-nociceptive, anti-inflammatory and sedative activities of the extracts and chemical constituents of *Diospyros lotus* L.[J]. Phytomedicine, 2014, 21(7): 954−959.

[6] RAUF A, UDDIN G, KHAN H, et al. Anti-tumour-promoting and thermal-induced protein denaturation inhibitory activities of *β*-sitosterol and lupeol isolated from *Diospyros lotus* L.[J]. Nat Prod Res, 2016, 30(10): 1205−1207.

[7] ZHANG Z P, MA J, HE Y Y, et al. Antioxidant and hypoglycemic effects of *Diospyros lotus* fruit fermented with *Microbacterium flavum* and *Lactobacillus plantarum*[J]. Biosci Bioeng, 2018, 125(6): 682−687.

[8] RASHED K, ZHANG X J, LUO M T, et al. Anti-HIV-1 activity of phenolic compounds isolated from *Diospyros lotus* fruits[J]. Phytopharmacology, 2012, 3(2): 199−207.

[9] RAUF A, UDDIN G, SIDDIQUI B S, et al. Bioassay-guided isolation of novel and selective urease inhibitors from *Diospyros lotus*[J]. Chin J Nat Medicines, 2017, 15(11): 865−870.

[10] GAO H, CHENG N, ZHOU J, et al. Antioxidant activities and phenolic compounds of date plum persimmon (*Diospyros lotus* L.) fruits[J]. Food Sci & Tech, 2014, 51(5): 950−956.

[11] LIN S, YUE X, OUYANG D, et al. The profiling and identi-

fication of chemical components, prototypes and metabolites of Runzao-zhi-yang capsule in rat plasma, urine and bile by an UPLC-Q-TOF/MSE-based high-throughput strategy[J]. Biomed Chromatogr, 2018, 12: e4261.

[12] YU G, WANG W, WANG X, et al. Network pharmacology-based strategy to investigate pharmacological mechanisms of Zuojinwan for treatment of gastritis[J]. BMC Complement Altern Med, 2018, 18: 292.

[13] ROSSO M D, PANIGHEL A, VEDOVA A D, et al. Characterization of non-anthocyanic flavonoids in some hybrid red grape extracts potentially interesting for industrial uses.[J]. Molecules, 2015, 20(10): 18095−18106.

[14] MANGURO L O A, WAGAI S O, LEMMEN P. Flavonol and iridoid glycosides of *Ajuga remota* aerial parts[J]. Phytochem, 2006, 67(8): 830−837.

[15] ZDUNIC G, GODEVAC D, ŠAVIKIN K, et al. Isolation and identification of phenolic compounds from *Hypericum richeri* Vill. and their antioxidant capacity[J]. Nat Prod Res, 2011, 25(3): 175−187.

[16] ZHOU Z, LI N, ZHANG H F, et al. Simultaneous quantitative analysis of 11 flavonoid derivatives with a single marker in persimmon leaf extraction and evaluation of their myocardium protection activity[J]. Nat Med, 2019, 73(2): 404−418.

[17] CHEN W P, HU P F, BAO J P, et al. Morin exerts antiosteoarthritic properties: An *in vitro* and *in vivo* study[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2012, 237(4): 380−386.

[18] CAO J G, XIA X, CHEN X F, et al. Characterization of flavonoids from *Dryopteris erythrosora* and evaluation of their antioxidant, anticancer and acetylcholinesterase inhibition activities [J]. Food Chem Toxicol, 2013, 51: 242−250.

[19] WEI Y, XIE Q Q, FISHER D, et al. Separation of patuletin-3-O-glucoside, astragalin, quercetin, kaempferol and isorhamnetin from *Flaveria bidentis* (L.) Kuntze by elution-pump-out high-performance counter-current chromatography[J]. Chromatogr A, 2011, 1218(36): 6206−6211.

[20] YOO S K, KIM J M, LEE U, et al. Immature persimmon suppresses amyloid beta (Aβ) mediated cognitive dysfunction via tau pathology in ICR mice[J]. Curr Issues Mol Biol, 2021, 43(1): 405−422.

[21] ELLOUMI W, MAHMOUDI A, ORTIZ S, et al. Wound healing potential of quercetin-3-O-rhamnoside and myricetin-3-O-rhamnoside isolated from *Pistacia lentiscus* distilled leaves in rats model[J]. Biomed Pharmacother, 2022, 146: 112574.

[22] FUAD A R, SALEH A L, JEHAD A, et al. Analysis of phenolic and flavonoids of wild *Ephedra alata* pant extracts by LC/PDA and LC/MS and their antioxidant activity[J]. Afr J Tradit Complement Altern Med, 2017, 14(2): 130−141.

[23] 梁永红, 侯奕, 姚慧莹, 等. 三脉菝葜抗肿瘤活性组分化学成分研究[J]. 中华中医药杂志, 2022, 27(3): 1704−1709. [LIANG R H, HOU Y, YAO H Y, et al. Study on chemical constituents of antitumor active components of *Smilax chinensis* L[J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2022, 27(3): 1704−1709.]

[24] WANG Q Y, OU Y J, HU G M, et al. Naringenin attenuates non-alcoholic fatty liver disease by down-regulating the NLRP3/NF-κB pathway in mice[J]. Br J Pharmacol, 2020, 177(8): 1806−1821.

[25] WANG M Q, FIRRMAN J, LIU L S, et al. A review on flavonoid apigenin: Dietary intake, ADME, antimicrobial effects, and interactions with human gut microbiota[J]. Biomed Res Int, 2019, 2019: 1−18.

[26] KLUSKA M, JUSZCZAK M, ŻUCHOWSKI J, et al. Kaempferol and its glycoside derivatives as modulators of etoposide activity in HL-60 cells[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(7): 3520.

[27] 昝立峰, 杨香瑜, 郭海燕, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术分析黄刺玫果的化学成分[J]. 食品工业科技, 2021, 42(23): 251−258. [ZAN L F, YANG X Y, GUO H Y, et al. Characterization of chemical constituents from fruits of *Rosa xanthina* by UPLC-Q-TOF-MS[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(23): 251−258.]

[28] HUANG Z Z, DU X, MA C D, et al. Identification of antitumor active constituents in *Polygonatum sibiricum* flower by UPLC-Q-TOF-MSE and network pharmacology[J]. ACS Omega, 2020, 5(46): 29755−29764.

[29] MARQUARDT P, SEIDE R, VISSIENNON C, et al. Phytochemical characterization and *in vitro* anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial activity of *Combretum collinum* fresen leaves extracts from Benin[J]. Molecules, 2020, 25(2): 288.

[30] LI H G, CHEN J X, XIONG J H, et al. Myricetin exhibits anti-glioma potential by inducing mitochondrial-mediated apoptosis, cell cycle arrest, inhibition of cell migration and ROS generation[J]. BUON, 2016, 21(1): 182−190.

[31] ZHENG Y Z, DENG G, LIANG Q, et al. Antioxidant activity of quercetin and its glucosides from *Propolis*: A theoretical study [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 7543.

陆智，李亚贤，刘凤松，等. QuEChERS 结合 UPLC-MS/MS 同时测定植物固体饮料中 13 种真菌毒素 [J]. 食品工业科技，2024，45(21)：275−282. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023120099
LU Zhi, LI Yaxian, LIU Fengsong, et al. Simultaneous Determination of 13 Mycotoxins in Plant Solid Beverages by UPLC-MS/MS Combined with Modified QuEChERS[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 275−282. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023120099

·分析检测·

QuEChERS 结合 UPLC-MS/MS 同时测定植物固体饮料中 13 种真菌毒素

陆　智，李亚贤，刘凤松，高　智，李亚杰*
（无限极（中国）有限公司，广东广州 510405）

摘　要：本研究建立了一种基于 QuEChERS 前处理结合超高效液相色谱串联质谱（UPLC-MS/MS）定量分析的高通量检测方法，用于测定植物固体饮料中的 13 种真菌毒素。样品均质加水溶解后，采用 QuEChERS 法进行前处理，以 2% 甲酸-乙腈溶液超声提取，十八烷基硅烷键合硅胶（C_{18}）进行除杂净化。提取液经 Kinetex F5 色谱柱分离后，采用串联质谱多反应监测模式（MRM）进行检测，基质匹配标准曲线法进行定量。结果显示，13 种真菌毒素在测试范围内均呈现良好的线性关系（r>0.9916），检出限在 0.04~16.9 μg/kg 之间，定量限在 0.12~38.2 μg/kg 之间，精密度（RSD）小于 9.0%，且在植物固体饮料中的加标回收率在 82.2% 到 103.3% 之间。利用该方法对 18 份植物固体饮料样品进行筛查，其中检出 4 份样品含有真菌毒素，包括脱氧雪腐镰刀菌烯醇和伏马毒素 B_3。该方法具有操作简便、成本低、灵敏度高和准确度高的优势，可满足植物固体饮料中多种真菌毒素的高通量筛查。

关键词：QuEChERS，超高效液相色谱串联质谱法，真菌毒素，植物固体饮料，高通量
中图分类号：O656.31　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1002−0306(2024)21−0275−08
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023120099
本文网刊：

Simultaneous Determination of 13 Mycotoxins in Plant Solid Beverages by UPLC-MS/MS Combined with Modified QuEChERS

LU Zhi，LI Yaxian，LIU Fengsong，GAO Zhi，LI Yajie*
（Infinitus (China) Company Ltd., Guangzhou 510405, China）

Abstract: This work aimed to develop a high-throughput analytical method based on QuEChERS coupled with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) for the determination of 13 mycotoxins in plant-solid beverages. The samples were homogenized and dissolved in water. QuEChERS method was used for pretreatment, ultrasonic extraction with 2% formic acid-acetonitrile solution, and purification with octadecylsilane bonded silica gel (C_{18}). The extraction solution was then separated by a Kinetex F5 column, detected by a tandem mass spectrometry detector in multiple reaction monitoring mode (MRM), and quantified by matrix-matched standard calibration. The optimum conditions achieved limits of detections (LODs) in the range of 0.04~16.9 μg/kg, with correlation coefficient over 0.9916. The limit of quantifications (LOQs) were in the range 0.12~38.2 μg/kg. The recoveries in real plant-solid beverages ranged from 82.2% to 103.3%, with relative standard deviations (RSDs) below 9.0%. Moreover, the proposed method was applied to analyze mycotoxins in 18 plant-solid beverage samples, a positive detection rate of 4/18 was obtained, and the detected analytes included deoxynivalenol and fumonisin B3. This proposed method has the advantages of simple operation, low cost, high sensitivity and accuracy, which can be used for the high-throughput screening of multiple mycotoxins in plant-solid beverages.

Key words: QuEChERS; ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; mycotoxins; plant solid beverages; high-throughput

收稿日期：2023−12−13
作者简介：陆智（1981−），男，博士，高级工程师，研究方向：食品、保健食品等质量安全研究，E-mail: lukchi@qq.com。
*** 通信作者：**李亚杰（1990−），女，硕士，工程师，研究方向：食品质量安全、毒理研究，E-mail: lyjsunny@163.com。

植物固体饮料是以植物及其提取物为主要原料经加工制成的冲泡型饮料，因携带方便、风味独特、具有营养或保健功能等独特优势而备受消费者青睐[1]。在行业逐渐加速发展的同时，其质量安全问题也日益凸显。植物固体饮料原料在种植收获、初加工及储存运输等环节均可能受到真菌毒素的污染，致使最终产品受到污染。长期食用残留真菌毒素的植物固体饮料，会产生细胞毒性、致畸性、致癌性、致突变性等多种毒性[2−4]，给消费者的身体健康造成严重危害。因此，对植物固体饮料中的真菌毒素进行监测和防控显得尤为重要。

目前，国家标准方法以及文献报道的真菌毒素的检测方法主要采用薄层色谱法(TLC)[5]、酶联免疫吸附法(ELISA)[6−7]、高效液相色谱法(HPLC)[8] 和超高效液相色谱串联质谱法(UPLC-MS/MS)[9−12] 等，薄层色谱法在真菌毒素检测方面应用历史较为久远，但在大范围的检测中已逐步被其他新型检测方法代替[13]，酶联免疫吸附法是基于抗原-抗体反应原理的一种常见免疫检测技术，方法简便，特异性强[14]，多用于快速定性筛查，而高效液相色谱法和超高效液相色谱串联质谱法因其准确度和灵敏度高的特点，是目前应用于真菌毒素检测最普遍的方法。高效液相色谱法适用于检测化学性质相近的真菌毒素，难以实现多种类真菌毒素同时测定。超高效液相色谱串联质谱法不仅分离性能好，定性能力强，且兼具高准确度和高灵敏度，适用于多种真菌毒素的定性定量分析[15−16]。

可靠的样品前处理净化方法是提高检测准确度和灵敏度的关键，目前净化技术主要有固相萃取柱[17]、多功能净化柱[18]、免疫亲和柱[19−20] 以及 QuEChERS 方法[21] 等。而其中 QuEChERS 法最初是为检测蔬菜和水果中农药残留而开发的，随后在真菌毒素、环境污染物等方向检测也迅速流行起来[22]。近年来，有关 QuEChERS 结合 UPLC-MS/MS 技术实现多种真菌毒素同时检测的研究也有所报道。徐子婷等[23] 采用 QuEChERS-SPE 液质联用法测定调味面制品中 12 种真菌毒素，通过 SPE 与 QuEChERS 二次净化方式实现 12 种真菌毒素检测，李媛等[24] 采用 QuEChERS 结合 UPLC-MS/MS 法测定土鳖虫及其成方制剂中 9 种真菌毒素，RAUSCH 等[25] 基于 QuEChERS 开发的测定谷物中 38 种天然和改性真菌毒素。这些已经报道的方法因基质的不同所采取的前处理方式也略有差别，适用范围也仅限于研究中的食品种类，无法直接应用于其他食品类型，并且有的方法使用的同位素内标定量法检测成本较高，不利于大批量检测。

本研究利用 QuEChERS 前处理结合 UPLC-MS/MS 技术的优势，并参考和借鉴文献中有关多种真菌毒素同时分析的样品前处理以及分析条件的基础上，进一步优化和改进提取、净化以及色谱质谱等条件，建立植物固体饮料中 13 种真菌毒素同时测定的简便、快速、灵敏、高通量检测方法，以提高检测效率和降低分析成本，为监测和评估植物固体饮料中多种真菌毒素的污染风险提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

实验用 18 份植物固体饮料样品　市售；黄曲霉毒素 B_1(Aflatoxin B_1, AFB_1)、黄曲霉毒素 B_2(Aflatoxin B_2, AFB_2)、黄曲霉毒素 G_1(Aflatoxin G_1, AFG_1)、黄曲霉毒素 G_2(Aflatoxin G_2, AFG_2)标准品　25 μg/mL 青岛普瑞邦(Pribolab)生物工程有限公司；10 μg/mL 伏马毒素 B_1(Fumonisin B_1, FB_1)、伏马毒素 B_2(Fumonisin B_2, FB_2)、伏马毒素 B_3(Fumonisin B_3, FB_3)标准品、100 μg/mL T-2 毒素(T-2 toxin, T-2)标准品　上海安谱璀世标准技术服务有限公司；杂色曲霉素(Sterigmatocystin, ST)标准品　100 μg/mL，北京坛墨质检科技有限公司；桔青霉素(Citrinin, CIT)、玉米赤霉烯酮(Zearalenone, ZEN)标准品　98.00%，TRC-CANADA(加拿大多伦多研究化学)；赭曲霉毒素 A(Ochratoxin A, OTA)标准品　100 μg/mL，上海安谱实验科技股份有限公司；脱氧雪腐镰刀菌烯醇(Deoxynivalenol, DON)标准品　200 μg/mL，o2si smart solutions；乙腈、甲醇　色谱纯，西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司；甲酸、乙酸铵、无水硫酸镁($MgSO_4$)、氯化钠　分析纯，广州化学试剂有限公司；十八烷基硅烷键合硅胶(C_{18})、乙二胺-N-丙基硅烷化硅胶(primary secondary amine, PSA)、石墨化碳黑吸附剂(graphitized carbon black adsorbent, GCB)　分析纯，上海安谱实验科技股份有限公司。

AB SCIEX Q-Trap 5500 超高效液相色谱-质谱仪　美国 Applied Biosystem 公司；N-EVAP112 氮吹仪　美国 Organomation 公司；H1850R 离心机　湖南湘仪离心机仪器有限公司；WIGGENS Vortex 涡旋振荡仪　北京桑翌实验仪器研究所；S22H 超声波清洗机　致微(厦门)仪器有限公司；Milli-Q 超纯水仪　美国密理博公司。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液配制　真菌毒素单标(AFB_1、AFB_2、AFG_1、AFG_2 浓度为 0.2 mg/L；FB_1、FB_2、FB_3 浓度为 1 mg/L；T-2、ST、OTA、ZEN 浓度为 10 mg/L；DON 浓度为 20 mg/L；CIT 浓度为 100 mg/L)储备溶液配制于乙腈溶液中，分别移取一定体积的 13 种真菌毒素单标溶液并用乙腈稀释配制得到混合标准溶液(其中 AFB_1、AFB_2、AFG_1、AFG_2 浓度为 0.05 mg/L；FB_1、FB_2、FB_3、T-2、ST、OTA、ZEN 浓度为 0.5 mg/L；CIT、DON 浓度为 5 mg/L)。所有储备溶液均储存在−20 ℃ 冰箱中避光保存。

1.2.2 样品前处理　样品前处理方法借鉴和参考文献已报道的方法[23−25] 并进行适当调整和改进：称取

2 g 植物固体饮料样品置于 50 mL 离心管中，加入 5 mL 水，涡旋 5 min，再加入 10 mL 2% 的甲酸乙腈溶液，涡旋 3 min 后超声提取 30 min；加入 1 g 氯化钠，涡旋 3 min，于 12000 r/min 条件下离心 5 min。吸取 6 mL 上清液置于内含 1 g $MgSO_4$、200 mg C_{18} 填料的 10 mL 离心管中，涡旋振荡 3 min，于 12000 r/min 下离心 5 min；移取 2.5 mL 上清液在 40 ℃ 氮气条件下吹干，用 1 mL 10% 甲醇水溶液溶液复溶，涡旋振荡 3 min，于 14000 r/min 条件下离心 30 min，上清液上机测定。

1.2.3　色谱条件　所用色谱柱为 Kinetex F5 色谱柱（2.6 μm, 2.1×100 mm i.d., Phenomenex）。流动相 A 相为 0.1% 甲酸-5 mmol/L 乙酸铵水溶液，B 相为甲醇。流动相流速为 0.4 mL/min；柱温箱温度设为 40 ℃；进样体积为 5 μL；流动相梯度洗脱程序见表 1。

表 1　流动相梯度洗脱程序

Table 1　Mobile phase gradient elution procedure

时间(min)	流动相A(%)	流动相B(%)
0	95	5
6.0	80	20
8.0	80	20
15.0	10	90
18.0	10	90
18.1	95	5
20.0	95	5

1.2.4　质谱条件　电离采用电喷雾离子源（Electron spray ionization, ESI），检测采用多反应监测（Multiple reaction monitoring, MRM）模式，扫描采用正、负离子两种方式同时进行。其他相关质谱参数设置为：电喷雾电压为 5500 V，离子源温度为 550 ℃；气帘气压力为 275.8 kPa，碰撞气档位于中档；喷雾气压力为 344.8 kPa，辅助加热气压力为 344.8 kPa，接口加热为开。13 种真菌毒素的质谱参数见表 2。

表 2　13 种真菌毒素质谱参数

Table 2　Mass spectrometry parameters of 13 mycotoxins

分析物	母离子	去簇电压(V)	子离子	碰撞能量(eV)
AFB_1	313.1 (+H)	150	285.0*/241.0	31/45
AFB_2	315.1 (+H)	150	287.0*/259.0	35/40
AFG_1	329.0 (+H)	150	243.0*/283.0	37/34
AFG_2	331.0 (+H)	150	245.0*/285.0	40/37
FB_1	722.4 (+H)	110	334.3*/352.3	59/54
FB_2	706.4 (+H)	117	336.4*/354.3	57/49
FB_3	706.4 (+H)	115	336.2*/354.4	54/47
T-2	489.2 ($+NH_4^+$)	210	245.1*/387.1	36/26
ST	325.0 (+H)	210	281.0*/309.9	50/33
CIT	251.0 (+H)	160	233.0*/191.0	21/35
OTA	402.0 (−H)	−150	358.1*/211.0	−27/−37
DON	297.0 (+H)	120	203.0*/157.0	18/27
ZEN	317.1 (−H)	−100	175.0*/273.1	−34/−27

注：*为定量离子。

1.3　数据处理

方法重复性及回收率试验均为 6 次平行试验，数据采用 Analyst1.7.2 软件处理分析，通过 WPS 对数据进行统计分析和绘图。

2　结果与分析

2.1　质谱条件优化

取适当浓度（0.1~1 μg/L）的每种真菌毒素的标准溶液直接进样，分别在正、负离子模式下通过全扫描模式寻找和确定各真菌毒素的母离子。确定母离子质荷比之后，利用子离子扫描模式对母离子进行二级质谱碎裂，寻找和选择两个响应好且稳定的碎片离子作为子离子，组成 MRM 离子对，进行去簇电压和碰撞能量的优化，确定各真菌毒素的质谱参数。实验发现 OTA 和 ZEN 在负离子模式下响应更好，分子离子峰为 $[M-H]^-$；其它 11 种真菌毒素在正离子模式下响应更好，其中 T-2 分子离子峰为 $[M+NH_4]^+$，其余均为 $[M+H]^+$。13 种真菌毒素的 MRM 质谱参数如表 2 所示。

2.2　液相条件优化

影响色谱分离的主要因素有色谱柱、洗脱液、添加剂（如甲酸、乙酸和乙酸铵等）、洗脱梯度、流速和柱温等。本研究比较了 Kinetex F5 色谱柱（2.6 μm, 2.1×100 mm i.d., Phenomenex）、Ultra AQ C_{18} 色谱柱（3 μm, 2.1×100 mm i.d., RESTEK）和 Luna Omega C_{18} 色谱柱（1.6 μm, 2.1×100 mm i.d., Phenomenex）对 13 种真菌毒素的分离效果。由图 1 可知，在使用 Luna Omega C_{18} 色谱柱时，CIT 不出峰、DON 峰型较差（图 1A）且 FB_2 和 FB_3 分离效果不好；使用 Ultra AQ C_{18} 色谱柱时，DON、OTA、T-2 这三种真菌毒素均不出峰（图 1B）；使用 Kinetex F5 色谱柱时，13 种真菌毒素均能在 20 min 内出峰，且峰型对称（图 1C）。所以选择 Kinetex F5 色谱柱作为分析色谱柱进行后续实验。

为了得到较好的分离效率和较高的检测灵敏度，对流动相的组成及梯度进行了优化，包括对使用的有机相种类以及添加剂（盐类、有机酸）种类和浓度进行对比优化。本文对比了乙腈-水，甲醇-水、甲醇-0.1% 甲酸水作为流动相体系对 13 种真菌毒素分离效果的影响。如图 2 所示，13 种真菌毒素在使用甲醇-水体系比使用乙腈-水体系的条件下保留时间更晚，峰形更对称和尖锐，响应更高，因此后续选择甲醇作为有机相。并且发现在甲醇-水流动相体系下，未检测到伏马毒素的信号；而在甲醇-0.1% 甲酸水流动相体系下，可以检测到很强的伏马毒素的信号，说明甲酸可以显著增强伏马毒素的信号。为了寻找 13 种真菌毒素能同时分离检测的流动相体系，进一步考察了不同水相（包括 0.01% 甲酸水、0.05% 甲酸水、0.01% 甲酸-5 mmol/L 乙酸铵和 0.1% 甲酸-5 mmol/L 乙酸铵等）对分离效果的影响。由图 3 可知，伏马毒素在添加甲酸的情况下，信号强度随着甲

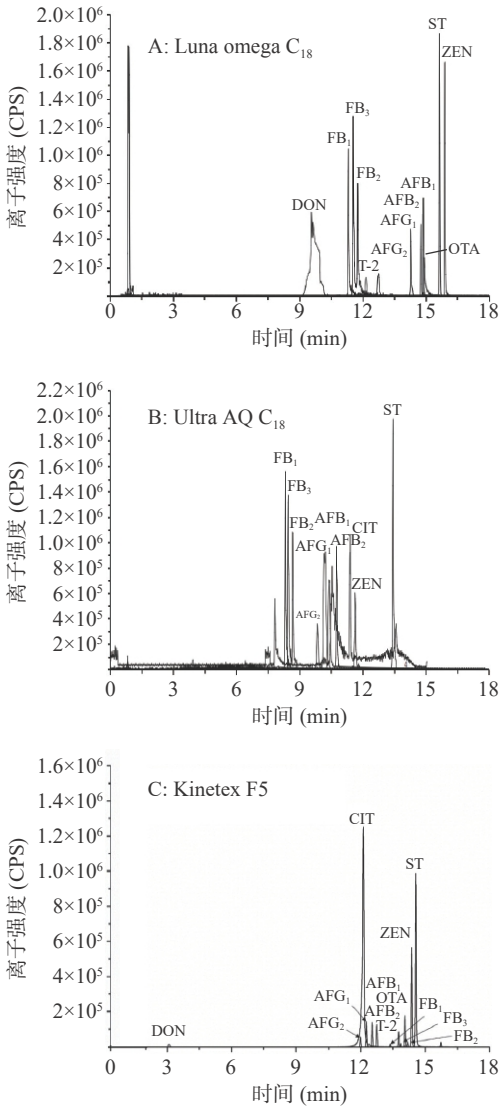


图 1 色谱柱的选择

Fig.1 Selection of the column

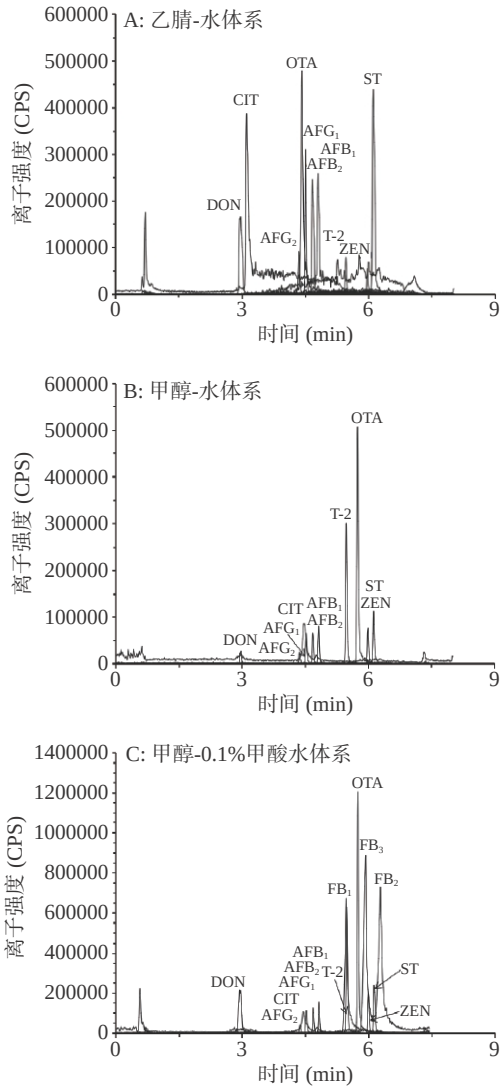


图 2 流动相的选择

Fig.2 Selection of mobile phase

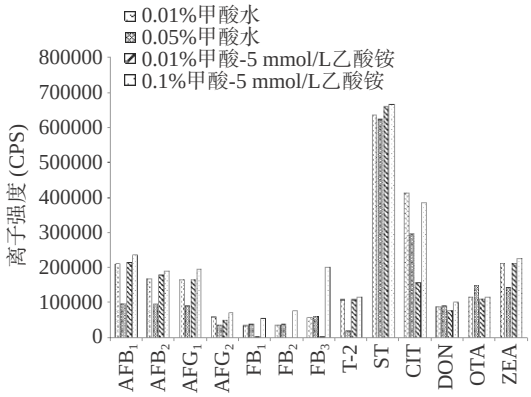


图 3 不同流动相对 13 种真菌毒素离子强度的影响

Fig.3 Effect of different flow relative to the response strength of 13 mycotoxins

酸浓度的增加而增加; 并且添加乙酸铵比不添加乙酸铵情况下各分析物分离效果更好。因此后续实验选择流动相为: A 相为 0.1% 甲酸-5 mmol/L 乙酸铵水溶液, B 相为甲醇, 质谱检测模式为正离子模式和负离子模式同时进行监测, 流动相洗脱梯度见表 1。

2.3 前处理条件优化

2.3.1 提取溶剂优化 不同真菌毒素结构差异大, 有的水溶性强, 有的脂溶性强, 极性差异大, 提取溶剂的优化需要兼顾所有分析物均能同时得到有效的提取。目前文献报道的多种真菌毒素的提取溶剂主要采用甲醇或乙腈与水的混合溶液, 其中乙腈与水的混合溶液对真菌毒素的提取效率更高, 对杂质的提取效率更低, 适用范围更广[26−27], 因此选择乙腈与水的混合溶液作为提取溶剂, 采用先加入水后加入乙腈的方式对实际样品进行提取。

当采用先加入水后加入乙腈的方式对样品进行提取之后, 需要加入氯化钠进行盐析分层, 使目标分析物进入有机相, 去除极性较强的水溶性杂质(留在水相中)。部分真菌毒素含有羧基基团包括伏马毒素类、桔青霉素和赭曲霉毒素 A, 水溶性强, 需要在提取溶剂中加入酸使羧基质子化, 提高这些目标分析物的疏水性, 促进酸性真菌毒素在盐析分层过程中更多地分配至有机相。因此提取溶剂采用加入甲酸的方式, 提高这些酸性真菌毒素的提取效率。在提取溶剂乙腈中加入不同甲酸浓度(1%、2%、5%、10%)进行

考察，结果发现当使用 2% 甲酸乙腈作为提取溶剂时，13 种真菌毒素的回收率达到 77.4%~106.4% 范围(表 3)，因此后续实验选择 2% 甲酸乙腈作为提取溶剂。

表 3　不同提取剂下真菌毒素的回收率(%, n=6)

Table 3　Recoveries rate of mycotoxins by different extractants (%, n=6)

毒素	回收率			
	1%甲酸乙腈	2%甲酸乙腈	5%甲酸乙腈	10%甲酸乙腈
AFB_1	82.7	87.6	76.2	68.6
AFB_2	86.3	98.1	89.4	82.5
AFG_1	103.6	106.4	102.9	88.6
AFG_2	99.7	105.7	84.0	110.8
FB_1	73.4	77.4	88.2	97.9
FB_2	70.6	85.2	56.8	76.4
FB_3	77.1	86.3	89.4	83.6
T-2	79.2	104.2	75.2	83.3
ST	80.8	77.4	66.4	66.1
CIT	81.2	78.3	71.2	69.5
DON	67.2	79.4	71.8	77.6
OTA	93.8	92.6	76.0	95.5
ZEA	87.1	82.8	73.5	66.7

2.3.2　净化填料优化　实际样品经过提取与盐析过程之后，提取液不仅含有目标分析物，也同时含有疏水性较强的杂质例如脂质等，这些杂质不仅会影响痕量真菌毒素的检测，也会造成色谱和质谱系统的污染。为了减少样品基质的干扰，降低基质效应，采用 QuEChERS 法对提取液进行进一步地净化除杂。QuEChERS 法常用的净化填料包括 C_{18}、PSA、GCB 和中性氧化铝等。参考和借鉴文献 [28−30] 所优化的净化填料配比，对以下三组净化填料进行了考察：1 g $MgSO_4$+200 mg C_{18}；300 mg $MgSO_4$+150 mg C_{18}+150 mg PSA；900 mg $MgSO_4$+300 mg C_{18}+150 mg PSA+30 mg GCB。结果发现，使用净化填料包含 PSA 时对伏马毒素类和桔青霉素均有较强吸附，检测不到目标物信号；使用净化填料同时包含 PSA 和 GCB 时，对黄曲霉毒素类、伏马毒素类、桔青霉素、杂色曲霉素、OTA 和 ZEN 均具有较强吸附，其中 ZEN 回收率为 49.1%，而其余真菌毒素均未检测到质谱信号。当使用 1 g $MgSO_4$ 和 200 mg C_{18} 作为净化填料时，13 种真菌毒素的回收率最优，达到 86.5%~105.6% 范围，因此选择 1 g $MgSO_4$ 和 200 mg C_{18} 作为 QuEChERS 净化填料对提取液进行净化和除杂。

2.4　方法学评价

2.4.1　线性范围和检出限　在最优的前处理以及色谱质谱条件下对线性进行考察。为降低或消除基质效应对检测结果的影响，采用基质匹配标准曲线法进行定量分析。称取空白植物固体饮料，分别加入一系列不同浓度的 13 种真菌毒素混合标准储备液，按照 1.2.2 节所述的步骤进行样品前处理，配制不同线性范围的系列基质混合标准溶液(质量浓度为 0.1~5.0 μg/L 的 AFB_1、AFB_2、AFG_1、AFG_2；1.0~50 μg/L 的 FB_1、FB_2、FB_3、T-2、ST、OTA、ZEN；10~500 μg/L 的 CIT、DON)，进行 UPLC-MS/MS 分析。以添加的真菌毒素的浓度为横坐标，真菌毒素的质谱信号强度为纵坐标，建立 13 种真菌毒素的工作曲线，结果如表 4 所示。13 种真菌毒素工作曲线的线性关系良好，相关系数(r)均大于 0.9916。以 3 倍和 10 倍的信噪比确定方法的检出限和定量限，13 种真菌毒素的检出限和定量限分别介于 0.04~16.9 μg/kg 和 0.12~38.2 μg/kg 之间，可以满足实际样品的检测需求。

2.4.2　回收率和精密度　为了考察所建立方法的回收率和精密度，取空白植物固体饮料样品，在标准曲线的中低浓度范围内，选取三个浓度水平添加 13 种真菌毒素的混合标准溶液至空白样品中，按照 1.2.2 节所述的步骤进行样品前处理后，进行 UPLC-MS/MS 测定。如图 4 所示，在各目标分析物的离子通道中同一保留时间没有干扰峰，说明没有内源性杂质的干扰，表明所建立的方法选择性较好。精密度是通过对添加标准品的植物固体饮料样品进行 6 次平行定量实验，以测定结果的相对标准偏差(RSD)计算

表 4　13 种真菌毒素的线性、检出限及定量限

Table 4　Linear、detection limit and quantitation linit of 13 mycotoxins

分析物	线性范围(μg/L)	线性方程	相关系数(r)	检出限(μg/kg)	定量限(μg/kg)
AFB_1	0.1~5.0	$y=1.29\times10^5x+3.64\times10^3$	0.9994	0.08	0.32
AFB_2	0.1~5.0	$y=1.49\times10^5x+3.53\times10^3$	0.9990	0.10	0.36
AFG_1	0.1~5.0	$y=1.4\times10^5x+8.51\times10^3$	0.9998	0.09	0.35
AFG_2	0.1~5.0	$y=4.71\times10^4x+7.25\times10^3$	0.9994	0.12	0.37
FB_1	1.0~50	$y=2.94\times10^3x+6.05\times10^3$	0.9992	1.52	4.46
FB_2	1.0~50	$y=2.16\times10^3x+1.84\times10^4$	0.9967	1.33	4.06
FB_3	1.0~50	$y=4.12\times10^3x+9.25\times10^3$	0.9916	1.38	4.24
T-2	1.0~50	$y=1.05\times10^4x+4.09\times10^3$	0.9991	1.37	4.17
ST	1.0~50	$y=1.78\times10^5x+747$	1.0000	0.05	0.13
OTA	1.0~50	$y=3.74\times10^4x-1.51\times10^4$	1.0000	1.55	3.70
ZEN	1.0~50	$y=7.4\times10^4x-1.06\times10^3$	0.9998	0.04	0.12
CIT	10~500	$y=2.75\times10^4x+209$	0.9965	4.35	11.1
DON	10~500	$y=802x+5.87\times10^3$	0.9998	16.9	38.2

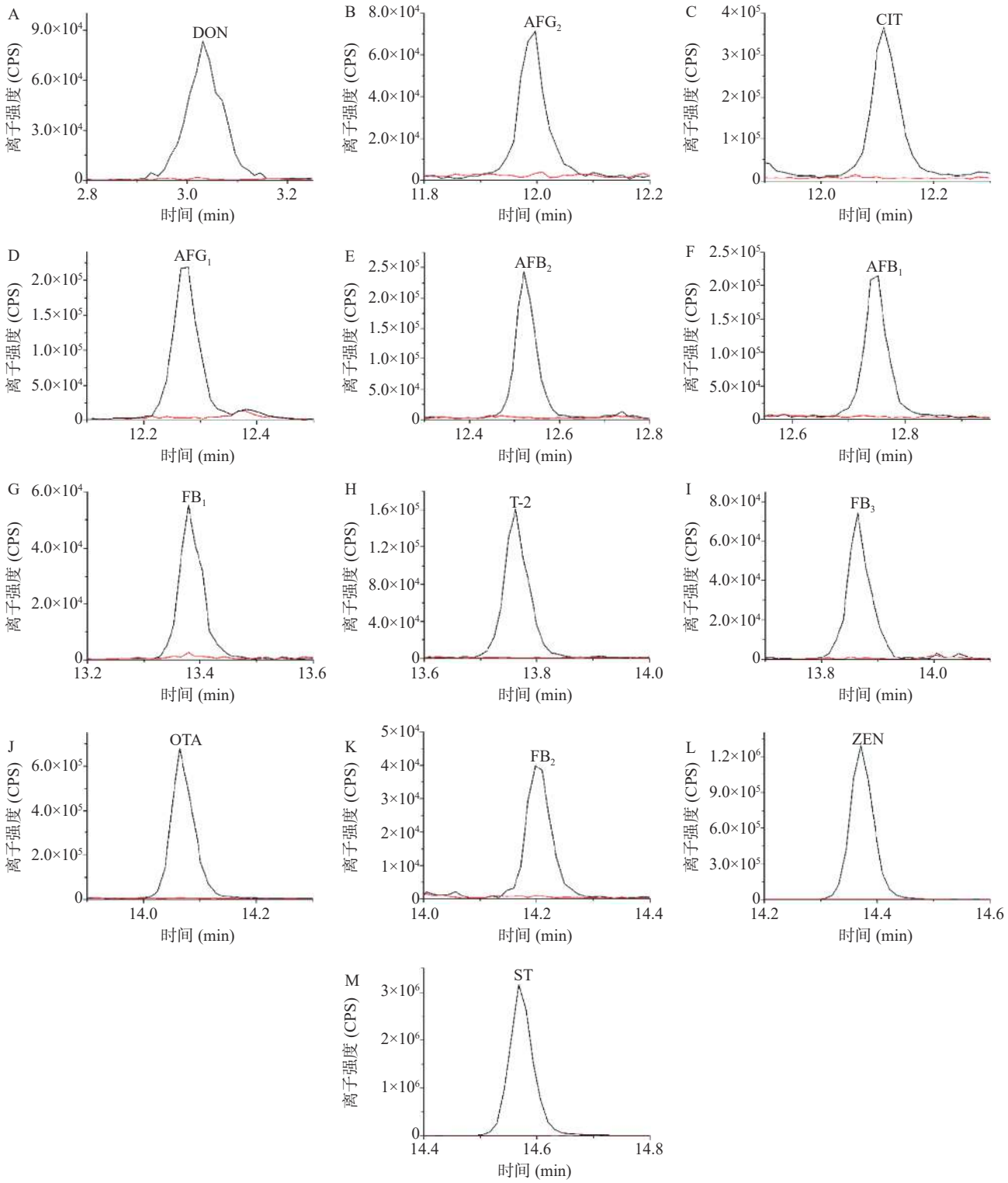


图 4 13 种真菌毒素的空白样品和加标样品提取离子流色谱图

Fig.4 Extracted ion chromatogram of 13 mycotoxins from blank and spiked samples

注: A-DON, B-AFG_2, C-CIT, D-AFG_1, E-AFB_2, F-AFB_1, G-FB_1, H-T-2, I-FB_3, J-OTA, K-FB_2, L-ZEN, M-ST; 图中红线表示空白样品, 黑线表示加标样品。

的。如表 5 所示, 13 种真菌毒素的平均回收率在 82.2%~103.3% 范围之间, 精密度在 0.9%~9.0% 范围之间, 表明该方法较为准确, 且重现性较好, 符合植物固体饮料中多种真菌毒素的测定要求。

2.5 实际样品的检测

利用所建立的 QuEChERS 前处理结合 UPLC-MS/MS 分析方法对 18 份植物固体饮料样品中的真菌毒素进行检测, 共 4 份样品检出真菌毒素, 其中 3 份样品检出 DON, 含量分别为 7447、7453、7640 μg/kg; 1 份检出 FB_3, 含量为 2.50 μg/kg。通过对比查看样品的配料表, 检出 DON 的 3 份样品中, 可能是由于其原料中的陈皮或部分中药材储存不当以及生产

表 5　13 种真菌毒素的回收率和精密度(n=6)

Table 5　Recovery and precision of 13 mycotoxins (n=6)

分析物	加标量(μg/kg)	回收率(%)	RSD(%)
AFB_1	0.5	92.5	7.7
	1.0	100.8	2.7
	5.0	98.7	2.5
AFB_2	0.5	94.9	0.9
	1.0	91.3	6.5
	5.0	103.3	1.3
AFG_1	0.5	95.9	2.7
	1.0	94.0	3.9
	5.0	99.5	1.6
AFG_2	0.5	98.5	3.7
	1.0	93.7	9.0
	5.0	101.4	0.9
FB_1	5.0	97.7	3.9
	10	88.6	6.9
	50	99.1	6.1
FB_2	5.0	88.0	4.1
	10	94.8	1.2
	50	97.3	1.4
FB_3	5.0	86.6	2.1
	10	94.0	1.3
	50	93.1	1.3
T-2	5.0	89.7	6.9
	10	86.1	5.0
	50	102.4	3.8
ST	5.0	92.0	1.7
	10	85.6	1.9
	50	82.2	4.7
OTA	5.0	91.0	4.8
	10	86.4	3.2
	50	91.6	8.5
ZEN	5.0	96.8	2.6
	10	90.1	5.3
	50	94.1	5.6
CIT	50	94.5	1.1
	100	89.4	1.5
	500	92.2	1.4
DON	50	94.5	1.2
	100	96.1	2.2
	500	95.3	1.5

过程中导致的真菌毒素污染。检测结果表明，植物固体饮料存在一定的真菌毒素污染风险，应给予关注和重视。

3　结论

本研究通过对样品前处理的提取溶剂与净化条件以及色谱质谱条件进行改进和优化，建立基于 QuEChERS 样品前处理结合 UPLC-MS/MS 检测的方法用于同时测定植物固体饮料中的 13 种真菌毒素，方法前处理简单迅速，有效解决了植物固体饮料这类复杂基质的提取及净化问题。利用该方法对 18 份植物固体饮料样品进行检测，在 4 份样品中检出两种真菌毒素(DON 和 FB_3)，因此需要加强植物固体饮料中真菌毒素的监测与防护，保障消费者的健康安全。总的来说，本研究所提出的方法具有操作简便快速、成本低、覆盖真菌毒素种类多、准确度高和灵敏度高等优势，适用于植物固体饮料中多种真菌毒素的高通量检测，为监测和评估真菌毒素污染风险提供有效的技术支撑。

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

参考文献

[1] 欧阳新华. 我国固体饮料产业的安全问题与监管建议[J]. 食品安全导刊, 2022, 16(32): 22−24. [OUYANG X H. Safety problems and supervision suggestions of solid beverage industry[J]. China Food Safety Magazine, 2022, 16(32): 22−24.]

[2] ALSHANNAQ A, YU J H. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2017, 14(6): 632.

[3] KESKIN E, EYUPOGLU O E. Determination of mycotoxins by HPLC, LC-MS/MS and health risk assessment of the mycotoxins in bee products of Turkey[J]. Food Chemistry, 2023, 400: 134086.

[4] DO T H, TRAN S C, LE C D, et al. Dietary exposure and health risk characterization of aflatoxin B1, ochratoxin A, fumonisin B1, and zearalenone in food from different provinces in Northern Vietnam[J]. Food Control, 2020, 112: 107108.

[5] 徐一达, 袁晓, 王海鸣, 等. 色谱法检测真菌毒素的研究进展[J]. 粮油食品科技, 2018, 26(6): 54−61. [XU Y D, YUAN X, WANG H M, et al. Research progress in detection of mycotoxins by chromatography[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2018, 26(6): 54−61.]

[6] YAN J X, HU W J, YOU K H, et al. Biosynthetic mycotoxin conjugate mimetics-mediated green strategy for multiplex mycotoxin immunochromatographic assay[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(7): 2193−2199.

[7] 王海彬, 李培武, 张奇, 等. 粮油产品真菌毒素抗体制备研究进展[J]. 中国油料作物学报, 2012, 34(3): 336−342. [WANG H B, LI P W, ZHANG Q, et al. A review on progress of preparation of antibodies against mycotoxins in foodstuff and oilseeds[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2012, 34(3): 336−342.]

[8] 吴定芳, 王磊, 戴佩珍, 等. 高效液相色谱法测定茶叶中 6 种真菌毒素[J]. 分析仪器, 2023, 54(1): 32−38. [WU D F, WANG L, DAI P Z, et al. Simultaneous detection of six mycotoxins in tea by HPLC with purification on immunoaffinity column[J]. Analytical Instrumentation, 2023, 54(1): 32−38.]

[9] AREO O M, ABAFE O A, GBASHI A S, et al. Detection of multi-mycotoxins in rooibos and other consumed teas in South Africa by a modified QuEChERS method and ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Food Control, 2023, 143: 109255.

[10] ZHOU H Y, YAN Z, YU S, et al. Development of a novel UPLC-MS/MS Method for the simultaneous determination of 16 mycotoxins in different tea categories[J]. Toxins, 2022, 14(3): 169.

[11] 韦迪哲, 王蒙, 翟文磊. 基于磁性 ZIF-67 纳米材料的 QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱技术同时检测小麦中 17 种真菌毒素[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(23): 7563−7572. [WEI D Z, WANG M, ZHAI W H. Simultaneous determination of 17 kinds of mycotoxins in wheat by QuEChERS-ultrra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry based on magnetic ZIF-67 nanomaterials[J]. Journal of Food & Quality, 2022, 13(23): 7563−7572.]

[12] QIU N N, SUN D L, ZHOU S, et al. Rapid and sensitive UHPLC-MS/MS methods for dietary sample analysis of 43 mycotoxins

in China total diet study[J]. Journal of Advanced Research, 2022, 39: 15−47.
[13] 黄铭仕. 关于粮油中真菌毒素检测技术分析及其应用探讨[J]. 现代食品, 2020, 6(18): 162−164. [HUANG M S. Analysis and application of mycotoxin detection technology in cereals and oils[J]. Modern Food, 2020, 6(18): 162−164.]
[14] 李靖靖. 酶联免疫吸附法在食品安全检测中的应用[J]. 食品安全导刊, 2023, 17(30): 154−156. [LI J J. Application of enzyme-linked immunosorbent assay in food safety detection[J]. China Food Safety Magazine, 2023, 17(30): 154−156.]
[15] 李子琨, 史晓梅, 何卓霖, 等. QuEChERS-高效液相色谱串联质谱法测定粮谷中 20 种真菌毒素[J]. 中国粮油学报, 2023, 38(5): 1−9. [LI Z K, SHI X M, HE Z L, et al. Determination of 20 mycotoxins in grains by QuEChERS and high perfomance of liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2023, 38(5): 1−9.]
[16] 廉慧锋, 赵笑天, 王蓉珍, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定玉米、花生、麦仁中的 9 种真菌毒素[J]. 食品科学, 2010, 31(20): 360−366. [LIAN H F, ZHAO X T, WANG R Z, et al. Simultaneous determination of 9 kinds of mycotoxins in maize, peanut and wheat by ultrra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food Science, 2010, 31(20): 360−366.]
[17] TANG Z T, HAN Q R, YU G, et al. Fe_3O_4@PDA/MIL-101(Cr) as magnetic solid-phase extraction sorbent for mycotoxins in licorice prior to ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis[J]. Food Science & Nutrition, 2022, 10: 2224−2235.
[18] 孙卫明, 王权帅. 多功能净化柱-超高效液相色谱-串联质谱法测定挂面、方便面中 4 种真菌毒素[J]. 中国卫生检验杂志, 2021, 31(6): 662−665. [SUN W M, WANG Q S. Determination of 4 kinds of mycotoxins in dried noodles and instant noodles by multi-functional columns-ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2021, 31(6): 662−665.]
[19] 张烁, 周爽, 裴晓燕, 等. 免疫亲和柱结合超高效液相色谱-串联质谱法测定牛奶中的 16 种真菌毒素比较研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(3): 234−242. [ZHANG S, ZHOU S, PEI X Y, et al. Comparative study of immunoaffinity columns combined with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determination of 16 kinds of mycotoxins in milk[J]. Journal of Food & Quality, 2023, 14(3): 234−242.]
[20] 陈悦铭, 黄景初, 徐婷, 等. 多功能免疫亲和柱净化-超高效液相色谱串联质谱法快速检测咖啡豆中的 11 种真菌毒素[J]. 食品工业科技, 2021, 42(16): 285−293. [CHEN Y M, HUANG J C, XU T, et al. Rapid determination of 11 mtcotoxins in coffee bean through multifunctional purification and immunoaffinity column coupled to high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(16): 285−293.]
[21] 程晓宏, 杨清华, 杨娟, 等. QuEChERS 技术在食品安全中的应用进展[J]. 食品工业, 2022, 43(2): 264−269. [CHENG X H, YANG Q H, YANG J, et al. Advances in application of QuEChERS for food safety[J]. The Food Industry, 2022, 43(2): 264−269.]
[22] PERESTRELO R, SILVAP, PORTO-FIGUEIRA P, et al. QuEChERS - fundamentals, relevant improvements, applications and future trends[J]. Anal Chim Acta, 2019, 1070: 1-28.
[23] 徐子婷, 郝莉花, 马静, 等. QuEChERS-SPE-超高效液相色谱-串联质谱法测定调味面制品中的 12 种真菌毒素[J]. 食品工业科技, 2022, 43(6): 311−319. [XU Z T, HAO L H, MA J, et al. Determination of 12 mycotoxins in seasoning flour products by QuEChERS-SPE-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(6): 311−319.]
[24] 李媛, 张楠, 张亚锋, 等. QuEChERS 结合 UHPLC-MS 同时测定土鳖虫及其成方制剂中 9 种真菌毒素含量[J]. 中国现代中药, 2022, 24(1): 142−146. [LI Y, ZHANG N, ZHANG Y F, et al. Simultaneous determination of nine mycotoxins in eupolyphaga steleophaga and six kinds of chinese medicinal prerations containing eupolyphaga steleophaga by UHPLC-MS combined with QuEChERS[J]. Modern Chinese Medicine, 2022, 24(1): 142−146.]
[25] RAUSCH A K, BROCKMEYER R, SCHWERDTLE T. Development and validation of a QuEChERS-based liquid chromatography tandem mass spectrometry multi-Method for the determination of 38 native and modified mycotoxins in cereals[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(16): 4657−4669.
[26] 崔东伟. 谷物及其制品中真菌毒素的检测技术研究[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2022. [CUI D W. Research on precise detection technology of mycotoxins in grains and their products[D]. Shenyang: China Medical University, 2022.]
[27] 戴海蓉, 梁思慧, 王春民, 等. 同时检测食品中多种类真菌毒素的研究进展[J]. 中国食品学报, 2022, 22(8): 398−415. [DAI H R, LIANG S H, WANG C M, et al. Research progress on simultaneous detection of multiple mycotoxins in food[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(8): 398−415.]
[28] 俊超, 秦学磊, 吴圣江, 等. QuEChERS 前处理方法在食品检测中的应用进展[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(24): 206−212. [JUN C, QIN X L, WU S J, et al. Progress in the applications of the QuEChERS method in the food determination process[J]. Food Research and Development, 2021, 42(24): 206−212.]
[29] 蒋林惠, 周易枚, 陈煜, 等. QuEChERS 结合 LC-MS/MS 法在粮谷有机污染物检测中的研究进展[J]. 粮食与食品工业, 2021, 28(3): 64−68. [JIANG L H, ZHOU Y M, CHEN Y, et al. Research progress in the detection of grains'organic pollutants by QuEChERS &LC-MS/MS[J]. Cereal & Food Industry, 2021, 28(3): 64−68.]
[30] 唐振涛, 于刚, 刘菲, 等. 超高效液相色谱-三重四级杆质谱同时检测苦荞中 10 种真菌毒素[J]. 安徽农业科学, 2021, 49(1): 188−193. [TANG Z T, YU G, LIU F, et al. Simultaneous determination of 10 mycotoxins in buckwheat with ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2021, 49(1): 188−193.]

王辉, 周汉琛, 刘亚芹, 等. 渥堆时间对黟县黑茶滋味品质及非挥发性代谢物的影响 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 283−291. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024050302
WANG Hui, ZHOU Hanchen, LIU Yaqin, et al. Influence of Pile Fermentation Time on the Sensory Flavor and Non-volatile Compounds of Yixian Dark Tea[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 283−291. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024050302

· 分析检测 ·

渥堆时间对黟县黑茶滋味品质及非挥发性代谢物的影响

王　辉, 周汉琛, 刘亚芹, 杨霁虹, 张晓磊, 徐玉婕, 雷攀登*
（安徽省农业科学院茶叶研究所, 安徽黄山 245000）

摘　要: 为探究渥堆进程中影响黟县黑茶滋味品质变化的关键节点，本研究通过感官评价、氨基酸分析仪、液相色谱及液相色谱质谱联用仪，分析了不同渥堆时间下（0、3、6、9、12、15 和 18 h）其滋味品质及代谢物的变化。结果表明，渥堆 9 h 后茶汤苦味开始降低、收敛性和厚度增加、陈醇风味凸显。儿茶素类物质总量在渥堆期间显著降低，而没食子酸含量则显著增加；咖啡碱含量在渥堆 18 h 后降低了 14.7%；游离氨基酸总量在渥堆后期（15~18 h）呈现上升趋势；黄酮醇及单糖苷的黄酮苷类物质含量在渥堆中期（9~12 h）显著增加（P<0.05）；双糖苷的黄酮苷类物质含量则在渥堆中后期呈上升趋势。关键滋味物质分析显示（VIP>1，DOT>1），杨梅素-3-O-半乳糖苷、紫云英苷、异槲皮苷、槲皮素-3-O-芸香糖苷、表没食子儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素没食子酸酯及咖啡碱是影响黟县黑茶品质变化的重要呈味物质，其中，前三种糖苷类物质在渥堆 9~12 h 含量显著增高；表没食子儿茶素、表儿茶素在 9~12 h 期间含量显著降低；表没食子儿茶素没食子酸酯、咖啡碱在渥堆后呈现显著降低；槲皮素-3-O-芸香糖苷在渥堆中期（9~12 h）显著下降，在渥堆 15 h 后显著增加，是渥堆后期茶汤涩感增加的重要因子。本研究结果为后续黟县黑茶渥堆工艺优化及探究其滋味品质形成机制提供了重要理论参考。

关键词: 黟县黑茶, 渥堆, 感官评价, 滋味成分, 液相色谱质谱
中图分类号: TS272.5　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2024)21−0283−09
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024050302
本文网刊:

Influence of Pile Fermentation Time on the Sensory Flavor and Non-volatile Compounds of Yixian Dark Tea

WANG Hui, ZHOU Hanchen, LIU Yaqin, YANG Jihong, ZHANG Xiaolei, XU Yujie, LEI Pandeng*
（Tea Research Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Huangshan 245000, China）

Abstract: In order to investigate the key nodes affecting the changes of Yixian dark tea flavor and quality during the Pile fermentation, in this study, the sensory quality and non-volatile profiles of Yixian dark tea samples at different pile fermentation periods (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 h) were investigated by sensory evaluation, amino acids analyzer, liquid chromatography and liquid chromatography mass spectrometry. The results showed that the intensity of bitterness in dark tea infusions declined after 9 h of pile fermentation, along with the increasing intensities of astringency, thickness and stale-mellow. Total catechins showed a significant decrease in concentrations during pile fermentation. In contrast, the concentration of gallic acid increased. Concentration of caffeine reduced by 14.7% compared to the original concentration after 18 h of pile fermentation. Total amino acids concentration showed an increasing tendency in the later period of pile fermentation. Concentrations of flavonoids and its mono-glycosides increased after 9~12 hours, while its di-glycosides showed an increasing tendency after 12 hours of pile fermentation. The analysis of key taste substances (VIP>1, DOT>1) showed that myricetin-3-O-galactoside, astragalin, isoquercitrin, quercetin-3-O-rutinose, epigallocatechin, epicatechin,

收稿日期: 2024−06−06
基金项目: 黄山市科技计划项目（2022KN-07）; 黟科科技助力乡村振兴计划项目（2021KN-03）; 国家现代农业产业技术体系建设专项（CARS-19）。
作者简介: 王辉（1988−）, 男, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 茶叶加工与品质化学研究, E-mail: 499575741@qq.com。
*** 通信作者:** 雷攀登（1983−）, 男, 硕士, 副研究员, 研究方向: 茶叶加工与生物化学研究, E-mail: lpteagle@126.com。

epigallocatechin gallate, and caffeine were the most important flavor presenting substances affecting the quality changes of Yixian dark tea. Among them, the content of the first three glycosides increased significantly from 9~12 hours of stacking; The contents of epigallocatechin and epicatechin were significantly reduced during 9~12 hours. Epigallocatechin gallate and caffeine showed a significant decrease after pile fermentation; Quercetin-3-O-rutinoside decreased significantly in the middle stage (9~12 hours) and increased significantly after 15 hours. It was an important factor in the increase of astringency of tea broth in the late stage of pile fermentation. This study give a theoretical basis for improving the tea processing of Yixian dark tea and understanding the formation mechanism of its key flavor.

Key words: Yixian dark tea; pile fermentation; sensory; taste compounds; liquid chromatography mass spectrometry

黑茶是我国六大茶类之一，其产量在 2022 年占比可达到 13% 左右[1]。最新国际标准（ISO20715:2023《Tea-Classification of tea types. International standard》）表明，黑茶是一类具有渥堆工艺的茶产品，且主要分为两大类型，其一为熟普洱茶（Ripen pu-erh tea），其毛茶主要是通过晒青工艺制成，后通过渥堆发酵制成黑茶产品；其二为其他黑茶（Other dark teas），主要包括六堡茶、青砖茶、茯砖茶、康砖茶和安茶，此外日本的酸茶 Goishicha、Awaban-cha 以及缅甸的发酵茶 Lahpet-so 也属于此类。第二大类黑茶主要是通过杀青、揉捻、渥堆发酵、干燥等制成黑毛茶，再经其他工艺制成黑茶产品[2]。黟县黑茶主产于黄山市黟县及周边区域，按其加工工艺，应归属于第二大类黑茶。与其他黑茶产品相比，黟县黑茶是采用黟县及周边地区的群体种嫩梢为鲜叶原料，其渥堆发酵程度相对较轻[3]。

渥堆发酵是黑茶品质形成的重要工序，在此工序期间发生了滋味物质的大量转化，包括降解、氧化、聚合、缩聚和结构修饰等反应，是区别其他茶类的关键工序[4−5]。Jiang 等[6] 的研究表明，黑茶工艺使得游离氨基酸物质保留较少，只保留了鲜叶中的 15%。与其他六大茶类相比较。鲜叶原料、渥堆时间及温度的不同，使得不同产区黑茶内含物质变化差异较大[7]。Li 等[8] 对湖南黑毛茶的分析表明，渥堆 12 h 黑毛茶样品中水浸出物、茶多酚、类黄酮、氨基酸和可溶性糖等物质含量均呈现显著下降。Li 等[9] 在普洱茶的渥堆发酵研究中指出有微生物参与的渥堆发酵，可突显陈醇风味，无微生物参与的渥堆发酵，以甜醇风味为主；山奈酚、槲皮素、鞣花酸、没食子酸等化合物含量在普洱茶渥堆中的变化较大，是影响其风味不同的关键化合物。Wang 等[10] 研究藏茶的渥堆发酵显示，适度渥堆有利于黑茶醇厚品质的形成，尤其是没食子酸、表没食子儿茶素没食子酸酯、邻苯三酚和表儿茶素-3-O-没食子酸盐是品质变化的关键化合物。

黟县黑茶呈现甜醇爽口，收敛性弱的品质特征，与安化黑茶[11]、青砖黑茶[12] 的特征风味具有较明显差异，其品质形成可能与环境、茶树资源及工艺密切相关。目前，黟县黑茶在加工过程中代谢物的变化研究还未有报道。本实验拟通过研究其渥堆进程中感官品质与滋味物质的变化规律，着重分析不同渥堆进程中感官滋味与代谢物的变化，以探究影响黟县黑茶滋味变化的关键贡献化合物，为后续提升该类黑茶品质及探究其特征风味形成机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

7 种儿茶素类物质标准品：没食子酸（Gallic acid, GA）、儿茶素（Catechin, C）、表儿茶素（Epicatechin, EC）、表没食子儿茶素（Epigallocatechin, EGC）、表儿茶素没食子酸酯（Epicatechin gallate, ECG）、表没食子儿茶素没食子酸酯（Epigallocatechin gallate, EGCG）、没食子儿茶素没食子酸酯（Gallocatechin gallate, GCG）、咖啡碱标准品，黄酮醇及其苷类物质：槲皮素、杨梅素、槲皮素-3-O-芸香糖苷、杨梅素-3-O-半乳糖苷、槲皮素-3-O-葡萄糖苷、紫云英苷（别名：山奈酚-3-O-葡萄糖苷）、山奈酚-3-O-芸香糖苷、芹菜素-8-C-葡萄糖苷　上海源叶生物科技有限公司；咖啡碱（Caffeine, CAF）标准品　北京海岸鸿蒙标准物质技术有限责任公司；游离氨基酸标准品　美国 Sigma-Aldrich 公司；茶氨酸标准品　北京百灵威科技有限公司；氨基酸流动相（试剂 A、试剂 B、试剂 C、试剂 D）　德国赛卡姆公司；茚三酮　上海麦克林生化科技有限公司。

40 型杀青机、40 型揉捻机　浙江上洋机械有限公司；60 型斗式烘干机　浙江春江茶叶机械有限公司；S-433D 氨基酸分析仪　德国 Sykam 公司；Chromaster 高效液相色谱仪　日本日立公司；UHPLC-Q-Exactive/MS Q Exactive Plus 超高效液相色谱-四极杆-静电轨道阱质谱仪　美国赛默飞世尔科技公司；三重四级杆液质联用仪（LC-QQQ/MS）　日本岛津公司；C_{18} 色谱柱（1.9 μm, 2.1×100 mm）　美国沃特世科技有限公司；ZORBAX SB-C_{18}（3 mm×150 mm, 1.8 μm）色谱柱　Agilent 公司；计算机液晶显示器　美国 View Sonic 公司；图像传感器 CCD 摄像头及支架、底座　YUESHI 公司；便携式摄影棚（80 cm×80 cm×80 cm, 配有白色 PVC 背景布、LED 灯片）　德普公司。

1.2 实验方法

1.2.1 黑茶样品制备　选用安徽省农业科学院茶叶研究所试验茶园基地舒茶早鲜叶（一芽二、三叶）为原料，采用黑茶加工方法，基本工艺流程[13]：鲜叶→摊放（4 h）→杀青（320 ℃, 90 s）→热揉捻（10 min）→渥

堆→毛火(120 ℃, 10 min)→摊凉(1 h)→足火(90 ℃, 30 min)。渥堆在控温、控湿培养箱进行，温度 45 ℃，含水量 58%，取不同渥堆时间样进行图像采集，同时制备成干茶样 100 g，样品编号：CK(渥堆 0 h)、B3(渥堆 3 h)、B6(渥堆 6 h)、B9(渥堆 9 h)、B12(渥堆 12 h)、B15(渥堆 15 h)、B18(渥堆 18 h)。

1.2.2　图像采集与色泽参数提取　图像采集与色泽参数提取分析，参考文献中的方法[14]。为保证采集图像数据的一致性，利用计算机图像系统，设置同一参数，在同一位置进行图像采集。根据渥堆叶采集的图像与实物接近度，设定图像采集参数：饱和度 38、对比度 100、红色 24、绿色 32、蓝色 41，取 30 g 渥堆叶平铺白色 A4 纸上，放于摄像头下方，保证渥堆叶填满摄像头镜头，同时保持与摄像头距离相同。茶汤图像采集设定参数：饱和度 50、对比度 85、红色 25、绿色 32、蓝色 33，将泡好的茶汤冷却 10 min，统一盛放于白色审评杯中，置于摄像头下方，保证茶汤中心置于摄像镜头中心位置，同时保持与摄像头距离相同。

基于 Adobe Color CC 图像处理技术，提取茶汤图像色泽参数，即将茶汤图片依次上传到 Adobe Color CC 后移动光标至茶汤区域，快速读取对应的色泽参数亮度(L^*)、红绿度(a^*)、黄蓝度(b^*)值。

1.2.3　感官审评与茶汤制备　茶汤的制备参照 GB/T 23776-2018《茶叶感官审评标准》，以茶(散茶)审评方法制备茶汤：准确称取 3 g 茶样，置于审评杯中，注满 150 mL 沸水，加盖浸泡 5 min 后滤出茶汤。本研究将感官滋味分成陈醇(带有陈香和木香的醇感、口感协调)、苦味(入口和回味苦度的强弱)、涩味(入口和回味涩度的强弱)、浓厚度(内含物质多、滋味足)、爽口度(入口和回味的滑爽度)等 5 个评价因子[15]，构建评分标准及评语定义，并进行评分(10 分制)，由 5 位茶叶感官审评专家依据滋味审评标准，分别对 6 个评价因子打分。感官评价标准分别是：0<弱≤2；2<较弱≤4；4<一般≤6；6<较强≤8；8<强≤10。

1.2.4　儿茶素、咖啡碱含量分析　儿茶素及咖啡碱分析参考文献中方法[16]，步骤如下：准确称取 0.25 g 黑茶样，加入 8 mL 沸水，于 90 ℃ 水浴 7 min 后收集茶汤。此步骤重复 3 次后，将茶汤混合用于后续分析。分析前，提取液利用超纯水稀释 4 倍，后采用 0.22 μm 水系膜过滤。每个样品重复 3 次。

Ulti Mate 3000 超高效液相色谱仪，检测条件：C_{18} 色谱柱(1.9 μm, 2.1×100 mm)，检测波长：278 nm，柱温：35 ℃，流动相：A 相：2% 乙酸；B 相：乙腈。梯度洗脱条件：0~3 min(95% A)，3~5 min(80% A)，5~18 min(95% A)，流速：0.2 mL/min，进样量 5 μL。

儿茶素类物质和咖啡碱定性鉴定依据标准品出峰时间；化合物定量(mg/g)依据已绘制的儿茶素、咖啡碱标准曲线计算，如下：GA(y=29985x+265.87, R^2=1)；EC(y=4254.3x+1512.4, R^2=0.9995)；EGC(y=1682.5x−741.81, R^2=0.9999)；EGCG(y=13434x−7428.5, R^2=0.9995)；GCG(y=9148.2x−1287.2, R^2=0.9998)；CAF(y=28586x−6782, R^2=1)；C(y=8076.5x−652.4, R^2=0.9999)；ECG(y=19849x+756.49, R^2=0.9999)。

1.2.5　游离氨基酸含量测定　游离氨基酸分析参考文献中方法[17−18]。流动相梯度为：0~1 min(80% A, 20% B)；1~3 min(79% A, 21% B)；3~8 min(61% A, 39% B)；8~20 min(43% A, 57% B)；20~24 min(43% A, 57% B)；24~36 min(100% B)；36~42 min(100% C)；42~47 min(76% C, 24% D)；47~61 min(76% C, 24 % D)；61~61.1 min(100% D)；61.1~68 min(100% D)；68~68.1 min(100% A)；68.1~84 min(100% A)。检测波长分别为 570 nm 和 440 nm。每个样品重复 3 次。

游离氨基酸定性以标准品出峰时间为基准；游离氨基酸定量(mg/g)以样品中的峰面积与标准品峰面积之比计算相对含量。

1.2.6　黄酮醇及其苷类物质测定　黄酮醇及其苷类物质分析采用 LC-QQQ/MS。参考文献中方法[19]，准确称取 60 mg 样品，加入 4 mL 80% 预冷甲醇，超声 10 min；10000 r/min 离心 5 min 后取上清液。分析前采用 0.22 μm 有机系滤头过滤样品用于上样。分析色谱柱为 ZORBAX SB-C_{18}(3 mm×150 mm, 1.8 μm)，流动相及运行梯度与文献中方法一致[20]。化合物提取离子分别为：槲皮素(m/z 301)、杨梅素(m/z 317)、槲皮素-3-O-芸香糖苷(m/z 609)、杨梅素-3-O-半乳糖苷(m/z 479)、槲皮素-3-O-葡萄糖苷(m/z 463)、紫云英苷(m/z 447)和山奈酚-3-O-芸香糖苷(m/z 593)。

1.3　数据处理

本实验利用 Excel 软件进行数据统计；利用 TBtools V 1.046 进行热图绘制；利用 SPSS19.0 软件中的 Duncan 计算法对样品数据进行显著性差异分析(P<0.05)；利用 SIMCA 14.0 软件对样品主成分进行聚类分析(Partial Least Squares-Discriminant-Analysis, PLS-DA)。

2　结果与分析

2.1　渥堆中感官品质评价与汤色分析

利用图像采集系统，对渥堆中叶色、汤色图像进行采集(图 1A)，同时利用 Adobe Color CC 图像处理技术对茶汤 L^*(明亮度)、a^*(红色/绿色)、b^*(黄色/蓝色)值进行测定[14]。结果显示，随着渥堆时间增加，叶色逐渐由绿色向黄色转变，其中渥堆 0~6 h 期间叶色以绿色为主，汤色呈现出黄绿色；渥堆 6~9 h 期间，叶色转变较大，茶汤转为绿黄色；18 h 后，叶色变暗，汤色呈黄色。L^*值代表茶汤亮度，a^*值为负数时可表示茶汤以绿色为主，而 b^*值为正数时表明茶汤黄色值上升。汤色 L^*、a^*、b^*值显示，未渥堆样品茶汤明亮度最高，随着渥堆的进行，相较于未渥堆样

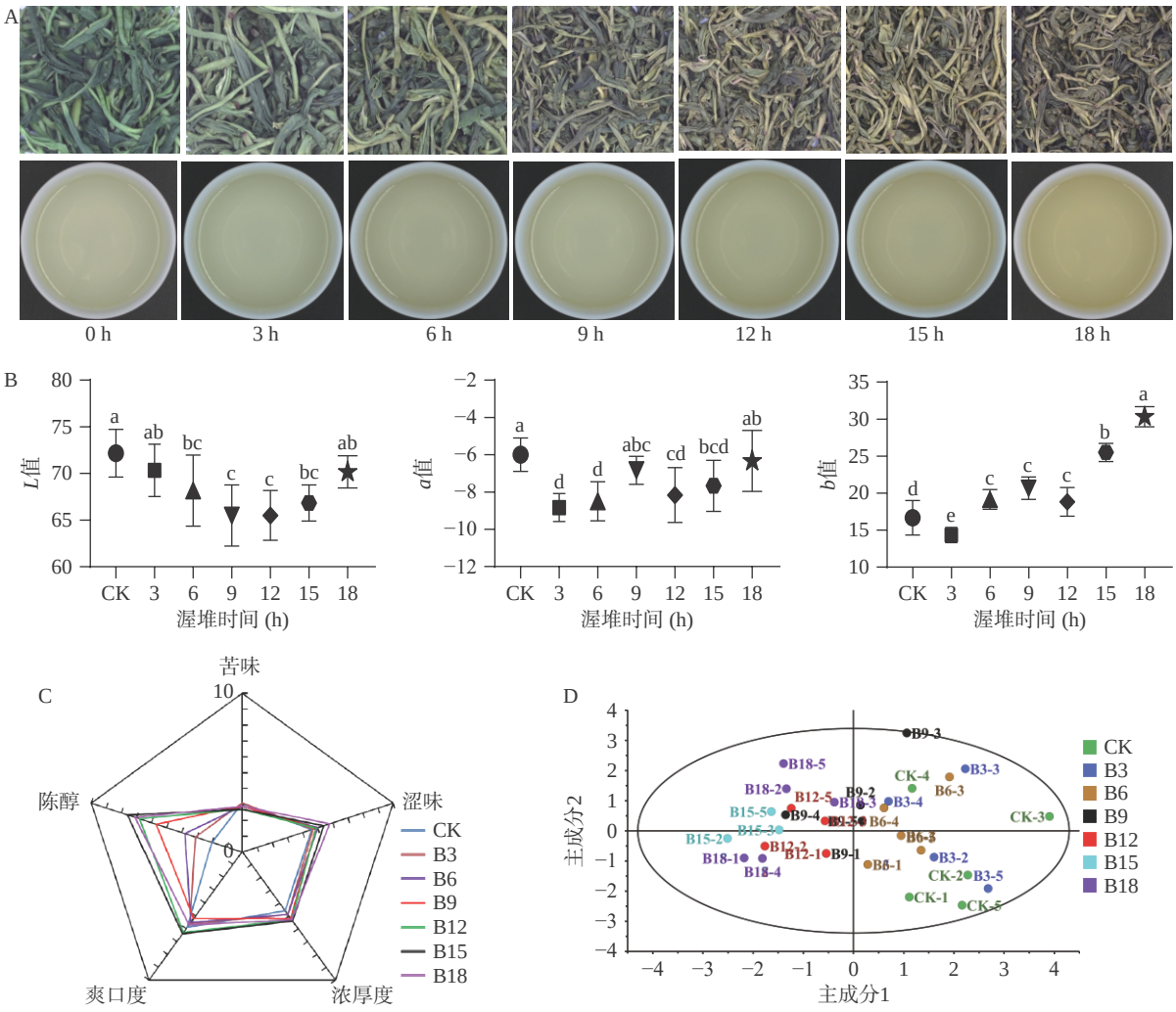


图 1　黟县黑茶渥堆期间叶色、茶汤颜色及感官品质变化

Fig.1　Changes of sensory quality during pile fermentation from Yixian dark tea

注：A 叶色与汤色变化；B 汤色 L^*、a^*、b^*值；C 感官滋味风味变化轮；D 感官品质得分的主成分分析（R^2X=1, R^2Y=0.219, Q^2=−0.329）；图 B 中不同小写字母表示差异显著 P<0.05。

品，9~15 h 茶汤亮度降低，在后期略有增加；渥堆中茶汤 a^*值呈现下降趋势，与 CK 相比，3~6 h 和 12~15 h 降低达到显著性（P<0.05）；b^*值在渥堆中呈现显著增加趋势（P<0.05），在渥堆 18 h 后，达到最高值。这表明随着渥堆进行，茶汤中呈黄色特征的化合物显著增加，使得茶汤黄色度值增加。

通过对感官属性描述词的收集、分类、归纳和整理，可用于描述产品的风味特征[21−22]。本文将黑茶滋味分成陈醇、苦味、涩味、浓厚度、爽口度、总分（综合品质）等 6 个评价因子，建立了黟县黑茶渥堆期间的风味变化轮（图 1C）。结果显示，渥堆期间黟县黑茶茶汤陈醇风味变化较大，在初期其茶汤陈醇风味得分较低，且变化不明显，而渥堆 9 h 后，陈醇风味得分增加明显（P<0.05）。陈醇风味是黑茶区别于其他茶类的重要风味特征[23]。相关性分析表明，陈醇风味与渥堆时间呈显著正相关（r=0.97, P<0.05），这表明渥堆显著促进了黟县黑茶特征风味的形成。渥堆期间，茶汤涩味得分在 3~12 h 期间的波动较小，而渥堆后期（15~18 h），茶汤涩感开始上升；茶汤爽口度在渥堆中期（12~15 h）评分较高；茶汤浓厚度、苦味得分在渥堆进程中的波动较小。基于感官品质得分值进行 PLS-DA 聚类分析（图 1D），结果显示，渥堆 0~9 h 的样品聚于轴的一侧，而渥堆 12~18 h 的样品聚于另一侧，这表明渥堆 9 h 后黟县黑茶风味品质呈现较大变化。

2.2　渥堆期间主要滋味成分变化分析

儿茶素、咖啡碱是茶叶中重要的滋味成分，分别占干重的 12%~24%、2%~4%，与茶汤滋味的苦涩度密切相关[24−25]。滋味成分分析结果显示（表 1、图 2A），儿茶素总量、C、EGCG、GCG、ECG 等在渥堆期间呈现降低趋势；GA、EGC、EC 等在渥堆期间呈现显著性变化，表现出先降后升的趋势（P<0.05）。此外，酯型儿茶素比非酯型儿茶素变化剧烈，其中没食子酸含量在渥堆 9 h 后显著增加（P<0.05），可能来源于酯型儿茶素的降解[26]。已有研究显示，在普洱茶的湿热发酵中，儿茶素类物质可发生降解转化反应，比如 EGCG 可降解转化成 EGC 和 GA[9,27−28]。儿茶素类物质的异构化也可发生在渥堆进程中，比如黄烷-3-醇的 C-2 位置易发生异构化反应，使得表型儿茶素

表 1　黟县黑茶渥堆中滋味物质含量变化

Table 1　Changes in flavor substance content the pile fermentation of Yixian dark tea

物质	物质含量(mg/g)						
	渥堆0 h(CK)	渥堆3 h(B3)	渥堆6 h(B6)	渥堆9 h(B9)	渥堆12 h(B12)	渥堆15 h(B15)	渥堆18 h(B18)
GA	0.34±0.00^{b}	0.24±0.02^{c}	0.29±0.03^{bc}	0.47±0.03^{a}	0.48±0.06^{a}	0.51±0.05^{a}	0.53±0.04^{a}
C	1.09±0.03^{b}	1.48±0.07^{a}	1.11±0.14^{b}	0.72±0.02^{c}	0.67±0.01^{cd}	0.55±0.01^{de}	0.52±0.04^{e}
EGC	36.23±0.96^{a}	31.98±2.65^{ab}	27.35±2.46^{b}	27.45±2.69^{b}	27.29±4.98^{b}	29.68±3.70^{ab}	30±2.07^{ab}
EC	13.52±0.57^{a}	13.07±1.02^{a}	11.14±1.01^{a}	11.46±1.09^{a}	10.63±1.60^{a}	11.84±1.59^{a}	11.88±0.80^{a}
非酯型儿茶素	51.18±1.49^{a}	46.78±3.67^{ab}	39.89±3.43^{b}	40.09±3.80^{b}	39.07±6.56^{b}	42.58±5.34^{ab}	42.93±2.87^{ab}
EGCG	38.28±1.99^{a}	39.63±5.13^{a}	35.25±7.35^{ab}	34.40±4.20^{abc}	33.13±6.56^{abc}	24.61±6.16^{bc}	22.17±1.55^{c}
GCG	2.89±0.08^{a}	2.65±0.32^{ab}	2.53±0.82^{ab}	2.02±0.12^{bc}	1.71±0.12^{c}	0.47±0.08^{d}	0.36±0.06^{d}
ECG	7.85±0.52^{ab}	8.41±1.29^{a}	7.33±1.96^{ab}	7.58±0.88^{ab}	7.42±1.58^{ab}	5.10±1.48^{bc}	4.27±0.56^{c}
酯型儿茶素	49.02±2.59^{a}	50.69±6.69^{a}	45.12±10.09^{ab}	44.00±5.18^{ab}	42.26±8.25^{ab}	30.19±7.71^{bc}	26.79±2.15^{c}
儿茶素总量	100.2±3.42^{a}	97.46±10.03^{ab}	85.01±10.8^{abc}	84.08±8.97^{abc}	81.33±14.4^{abc}	72.77±13.04^{bc}	69.72±2.81^{c}
咖啡碱	31.37±0.64^{a}	29.21±1.82^{a}	28.12±2.84^{a}	29.11±2.69^{a}	27.98±3.76^{a}	27.47±3.73^{a}	26.75±1.64^{a}
天冬氨酸	2.56±0.02^{ab}	2.46±0.03^{b}	2.48±0.22^{b}	2.58±0.04^{ab}	2.61±0.10^{ab}	2.70±0.02^{a}	2.66±0.02^{ab}
苏氨酸	0.37±0.01^{a}	0.36±0.01^{a}	0.35±0.04^{a}	0.36±0.01^{a}	0.40±0.05^{a}	0.37±0.00^{a}	0.35±0.01^{a}
丝氨酸	0.64±0.01^{a}	0.58±0.01^{a}	0.59±0.05^{a}	0.61±0.01^{a}	0.70±0.13^{a}	0.60±0.02^{a}	0.59±0.01^{a}
谷氨酸	3.69±0.03^{a}	3.39±0.06^{a}	3.45±0.31^{a}	3.70±0.10^{a}	3.45±0.36^{a}	3.68±0.07^{a}	3.50±0.06^{a}
茶氨酸	19.87±1.01^{a}	20.80±1.03^{a}	19.67±2.87^{a}	19.61±0.78^{a}	20.65±0.64^{a}	21.44±0.41^{a}	21.38±1.15^{a}
脯氨酸	0.35±0.00^{a}	0.28±0.02^{b}	0.30±0.05^{ab}	0.34±0.01^{ab}	0.31±0.04^{ab}	0.34±0.01^{ab}	0.33±0.01^{ab}
甘氨酸	0.11±0.00^{a}	0.11±0.00^{a}	0.11±0.01^{a}	0.11±0.00^{a}	0.11±0.01^{a}	0.12±0.00^{a}	0.12±0.00^{a}
丙氨酸	0.36±0.01^{ab}	0.34±0.00^{b}	0.35±0.03^{b}	0.35±0.01^{b}	0.37±0.05^{ab}	0.41±0.00^{a}	0.41±0.01^{a}
鲜甜氨基酸总量	27.95±1.08^{a}	28.32±1.17^{a}	27.3±3.58^{a}	27.67±0.81^{a}	28.59±0.98^{a}	29.66±0.38^{a}	29.34±1.13^{a}
缬氨酸	0.50±0.01^{a}	0.47±0.01^{a}	0.48±0.05^{a}	0.51±0.02^{a}	0.51±0.06^{a}	0.53±0.01^{a}	0.51±0.01^{a}
异亮氨酸	0.45±0.03^{ab}	0.37±0.01^{b}	0.39±0.04^{b}	0.44±0.02^{ab}	0.44±0.09^{ab}	0.46±0.02^{ab}	0.52±0.02^{a}
亮氨酸	0.43±0.07^{abc}	0.31±0.01^{d}	0.33±0.04^{cd}	0.38±0.02^{bcd}	0.37±0.08^{bcd}	0.44±0.02^{ab}	0.48±0.00^{a}
酪氨酸	0.23±0.13^{a}	0.33±0.05^{a}	0.34±0.03^{a}	0.31±0.04^{a}	0.33±0.03^{a}	0.33±0.02^{a}	0.30±0.02^{a}
苯丙氨酸	0.61±0.03^{b}	0.65±0.03^{b}	0.64±0.08^{b}	0.65±0.03^{b}	0.75±0.05^{a}	0.67±0.01^{ab}	0.52±0.02^{c}
组氨酸	0.13±0.01^{ab}	0.12±0.01^{abc}	0.12±0.02^{abc}	0.11±0.01^{bc}	0.10±0.02^{c}	0.15±0.02^{a}	0.11±0.01^{bc}
赖氨酸	0.51±0.01^{a}	0.48±0.03^{a}	0.48±0.07^{a}	0.48±0.03^{a}	0.48±0.06^{a}	0.49±0.03^{a}	0.46±0.04^{a}
精氨酸	1.53±0.26^{ab}	1.10±0.04^{b}	1.07±0.12^{b}	1.49±0.48^{ab}	2.31±1.19^{a}	0.85±0.08^{b}	0.89±0.09^{b}
苦味氨基酸总量	4.39±0.35^{a}	3.83±0.1^{a}	3.85±0.41^{a}	4.38±0.6^{a}	5.29±1.49^{a}	3.92±0.06^{a}	3.78±0.16^{a}
氨基酸总量	32.34±1.28^{a}	32.15±1.25^{a}	31.16±3.99^{a}	32.05±0.73^{a}	33.88±2.38^{a}	33.59±0.42^{a}	33.13±1.07^{a}
	物质含量(mg/kg)						
杨梅素	4.27±0.82^{c}	3.87±0.50^{c}	4.00±0.57^{c}	7.87±0.82^{b}	13.87±1.15^{a}	3.47±0.82^{c}	6.80±0.57^{b}
槲皮素	3.73±0.19^{d}	3.33±0.68^{d}	6.00±0.33^{c}	8.00±0.57^{b}	11.87±0.82^{a}	4.53±0.75^{cd}	6.13±0.68^{c}
槲皮素3-O-葡萄糖苷	27.87±1.47^{b}	43.47±23.87^{ab}	33.07±1.86^{b}	41.07±6.71^{b}	63.87±0.82^{a}	43.60±3.53^{ab}	44.27±0.82^{ab}
槲皮素-3-O-芸香糖苷	52.53±0.19^{c}	49.73±3.87^{bc}	55.87±2.07^{bc}	38.00±5.07^{d}	39.33±1.61^{d}	62.13±3.64^{ab}	67.60±3.22^{a}
紫云英苷	33.33±7.31^{b}	28.53±1.47^{b}	76.40±43.87^{a}	49.60±3.85^{ab}	65.47±3.30^{ab}	48.80±5.44^{ab}	46.80±1.73^{ab}
山萘酚-3-O-芸香糖苷	54.67±4.96^{d}	47.20±3.44^{d}	67.87±6.06^{c}	82.8±7.16^{b}	103.87±3.92^{a}	86.40±7.07^{b}	86.53±4.46^{b}
杨梅素-3-O-半乳糖苷	106.27±42.72^{d}	134.00±1.31^{d}	145.60±4.61^{cd}	270.40±11.36^{b}	354.67±2.22^{a}	175.60±15.00^{c}	184.80±4.27^{c}
芹菜素-8-C-葡萄糖苷	12.00±1.42^{c}	10.53±0.82^{c}	16.13±1.15^{b}	16.8±1.5^{ab}	17.73±2.49^{ab}	17.73±1.32^{ab}	20.00±1.18^{a}
黄酮醇及其苷类物质总量	294.67±59.07^{d}	320.67±35.96^{d}	404.93±60.51^{c}	514.53±37.00^{b}	670.67±16.35^{a}	442.27±37.58^{c}	462.93±16.90^{bc}

注：同行不同小写字母表示样品间存在显著差异(P<0.05)。

转换为非表型儿茶素[29−30]。儿茶素类物质的总量在渥堆进程中整体呈现下降趋势，比如渥堆 6 h 后，该类物质总量下降了 15%；渥堆 6~12 h 期间儿茶素物质变化较为缓慢，而随着渥堆时间延长，在 15 h 后总含量下降到 72.5%。咖啡碱在渥堆初期略有降低，但未达到显著水平(P>0.05)。

氨基酸是茶汤中的重要滋味物质，赋予了茶汤鲜爽的特征[31−32]。游离氨基酸总量在渥堆前期(0~9 h)变化较小，在渥堆 12 h 后增加了 4.76%，不同类型的游离氨基酸含量在渥堆期间的变化较为明显(图 2A)。相对未渥堆样品，游离氨基酸在渥堆 0~6 h 期间呈现降低趋势，而在 9~12 h 期间略有增加，天冬氨酸、丙氨酸、茶氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甘氨酸、缬氨酸等在渥堆 15、18 h 后含量增加明显，其中茶氨酸含量增加最多，而精氨酸在渥堆 15、18 h 后含量下降。具有鲜甜属性的游离氨基酸在渥堆 12 h 后呈现上升趋势，与感官评价相对一致。

黄酮醇类物质是茶汤中重要的呈味物质，且阈值普遍较低，且多以糖苷形式存在[33−34]。液相色谱-质谱联用仪测定了渥堆期间 8 种黄酮醇及其苷类物

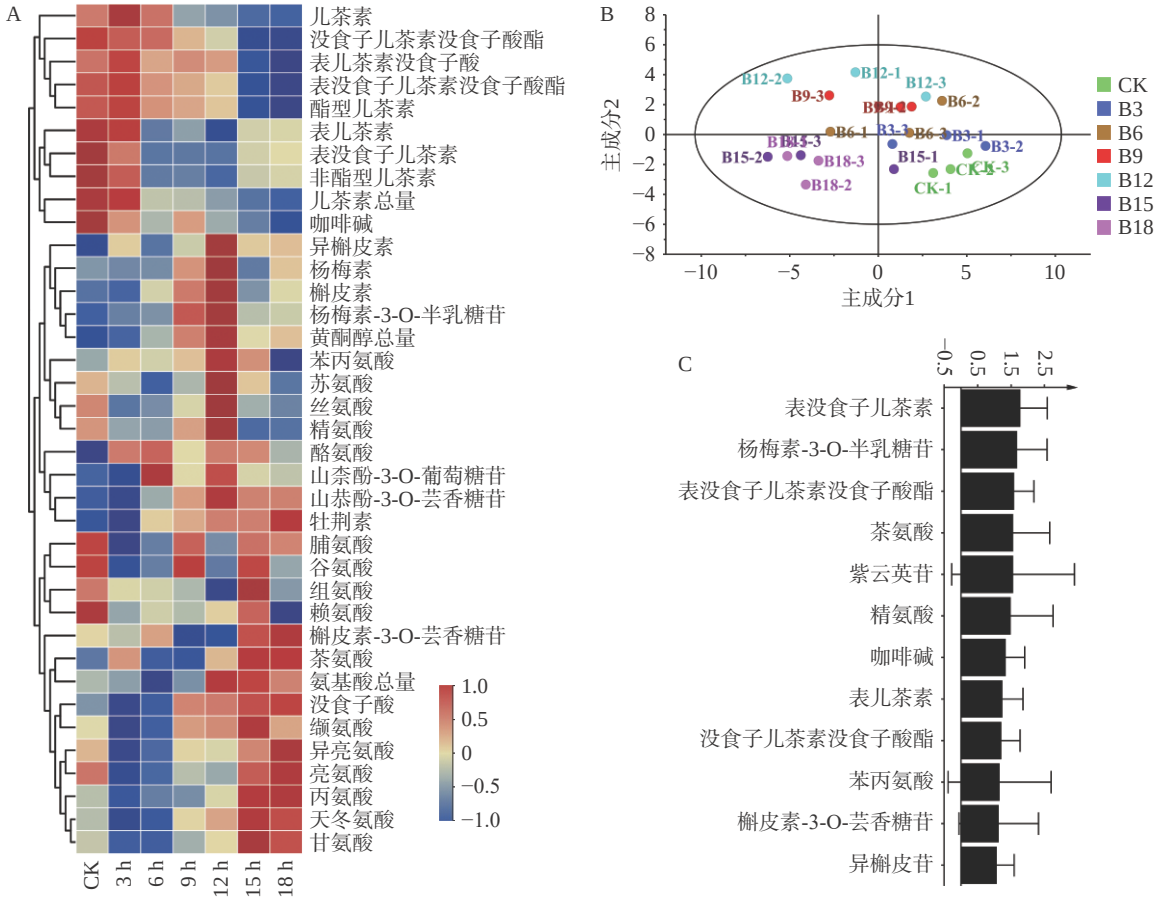


图 2　黟县黑茶渥堆中样品呈味物质变化热图及主成分分析

Fig.2　Heat map and principal component analysis of odor change in pile fermentation from Yixian dark tea

注: A 滋味物质热图; B 样品 PLS-DA 聚类分析; C VIP>1 的关键物质。

质的含量变化(表 1)。结果显示, 黄酮醇类(杨梅素、槲皮素)含量均在渥堆 6 h 后开始上升; 渥堆 12 h 样品中二者的含量为最高, 其中杨梅素含量由 4.27 mg/kg 上升至 13.87 mg/kg, 而槲皮素由 3.73 mg/kg 上升至 11.87 mg/kg。研究显示, 类黄酮糖苷的生成有利于增加该类物质的水溶性, 使得其利于植物中的储藏[35], 且随着糖苷元的增加, 此类物质多具有苦涩味属性。

黄酮醇苷类物质在渥堆期间整体呈现上升趋势, 其中单糖苷类物质在渥堆中期显著增加, 在渥堆后期呈现明显下降趋势(P<0.05); 双糖苷类的黄酮苷在渥堆后期略有降低。但槲皮素-3-O-芸香糖苷在渥堆 9~12 h 样品中的含量为最低, 降低了 27.6%, 后随着渥堆时间增加, 该物质含量显著上升(P<0.05), 具柔和的收敛性, 对茶汤滋味品质贡献较大, 尤其是对茶汤甜醇度具有显著的负面影响[36]。结合感官审评结果, 表明黟县黑茶渥堆 9 h 和 12 h 样品茶汤爽口度上升, 可能与该物质含量显著下降密切相关。相关性分析显示, 渥堆期间槲皮素-3-O-芸香糖苷与槲皮素含量变化具有显著负相关性(r=−0.85, P<0.05), 推测渥堆期间黄酮醇类物质与其糖苷类存在相互转化。Lin 等[37] 研究表明, 槲皮素-3-O-芸香糖苷可水解为异槲皮苷、槲皮素。

2.3　黟县黑茶渥堆期间差异代谢物筛选

热图聚类分析表明(图 2A), 儿茶素类物质及咖啡碱聚为一类; 该类物质在渥堆期间呈现降低趋势, 尤其是非酯型儿茶素类。其他滋味成分聚为一类, 在渥堆中期和后期整体表现出上升趋势, 其中杨梅素及其糖苷、山柰酚糖苷等物质含量均在渥堆中期显著上升, 并随着渥堆进行, 呈现下降趋势; 槲皮素糖苷、没食子酸、茶氨酸及天冬氨酸等化合物含量均在渥堆后期增加较多。

通过 PLS-DA 对七组样品中滋味成分进行聚类分析(图 2B), 拟合参数 R^2_X=0.992, R^2_Y=0.922, Q^2=0.22, 200 次的交叉检验验证(R^2=0.677, Q^2=−0.835), Q^2 回归直线与纵轴的截距小于 0, 说明模型不存在过度拟合现象, 模型较为可靠。结果显示, 渥堆 0、3、6 h 样品聚于一侧, 而渥堆 9 h 后的样品逐渐聚于另一侧, 这与感官评价得分结果相一致。进一步通过关键变量(VIP>1.0), 分析影响渥堆进程的关键滋味物质(图 2C), 共鉴定出 12 种化合物(VIP>1.0), 分别是表没食子儿茶素、杨梅素-3-O-半乳糖苷、表没食子儿茶素没食子酸酯、茶氨酸、紫云英苷(山柰酚-3-O-葡萄糖苷)、精氨酸、咖啡碱、表儿茶素、没食子儿茶素没食子酸酯、苯丙氨酸、槲皮素-3-O-芸香糖苷、异槲皮苷。

表 2　不同渥堆时间样品中物质的滋味活度值及与苦、涩味的相关性分析

Table 2　Analysis of taste activity values of substances in samples with different woke times and their correlation with bitterness and astringency

物质	阈值[38,40](mg/L)	滋味	DOT							相关性(r)	
			CK	B3	B6	B9	B12	B15	B18	苦味	涩味
槲皮素-3-O-芸香糖苷	0.0007	柔涩	1500.95	1420.95	1596.19	1085.71	1123.81	1775.24	1931.43	0.02	0.71
山萘酚-3-O-芸香糖苷	0.15	柔涩	7.29	6.29	9.05	11.04	13.85	11.52	11.54	–	–
异槲皮苷	0.3	柔涩	1.86	2.9	2.2	2.74	4.26	2.91	2.95	−0.65	0.19
杨梅素-3-O−半乳糖苷	1.3	柔涩	1.63	2.06	2.24	4.16	5.46	2.7	2.84	−0.68	0.06
紫云英苷	0.3	柔涩	2.22	1.9	5.09	3.31	4.36	3.25	3.12	−0.64	0.21
EGC	498.72	苦	1.45	1.28	1.10	1.10	1.09	1.19	1.20	–	–
	79.56	涩感	9.11	8.04	6.88	6.90	6.86	7.46	7.54	–	−0.33
EC	249.63	苦	1.08	1.05	0.89	0.92	0.85	0.95	0.95	–	–
	249.63	涩感	1.08	1.05	0.89	0.92	0.85	0.95	0.95	–	−0.34
EGCG	100.84	苦味	7.59	7.86	6.99	6.82	6.57	4.88	4.40	–	–
	73.34	涩感	10.44	10.81	9.61	9.38	9.03	6.71	6.05	–	−0.96
ECG	79.63	苦味	1.97	2.11	1.84	1.90	1.86	1.28	1.07	–	–
	59.72	涩感	2.63	2.82	2.46	2.54	2.49	1.71	1.43	–	–
CAF	155.00	苦味	4.05	3.77	3.63	3.76	3.61	3.54	3.45	0.69	−0.85

滋味活度值(DOT)是用来描述物质呈味强度的指标，可以用来衡量物质对人味觉感知的程度[38]。一般认为滋味成分的 DOT>1.0，表示该物质对滋味有显著贡献[39]。本研究结果显示共有 10 种滋味物质 DOT 值大于 1(表 2)，分别是槲皮素-3-O-芸香糖苷、异槲皮苷、杨梅素-3-O-半乳糖苷、紫云英苷、表没食子儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素没食子酸酯、咖啡碱、山萘酚-3-O-芸香糖苷、表儿茶素没食子酸酯等物质。结合主成分分析，表明槲皮素-3-O-芸香糖苷、异槲皮苷、杨梅素-3-O-半乳糖苷、紫云英苷、表没食子儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素没食子酸酯及咖啡碱等 8 种滋味物质，可能是影响渥堆进程变化的关键滋味物质，其中，杨梅素-3-O-半乳糖苷与异槲皮苷在 9~12 h 含量最高，槲皮素-3-O-芸香糖苷、表没食子儿茶素、表儿茶素在 9~12 h 含量最低，表没食子儿茶素没食子酸酯、咖啡碱在渥堆中呈现降低。相关性分析显示(表 2)，槲皮素-3-O-芸香糖苷与涩味呈现正相关性，这与上述分析较为一致，推测是渥堆中影响涩感变化的重要因子；咖啡碱与苦味呈现正相关性，推测是渥堆中影响苦味降低的重要因子。

3　结论

本研究基于茶叶感官评价标准、茶叶中主要呈味物质分析，探究了黟县黑茶渥堆进程中的滋味品质及物质代谢谱的变化。感官评价表明渥堆对黟县黑茶风味形成具有重要影响，其增加了茶汤陈醇风味和柔涩感，降低了苦味。滋味成分分析表明，儿茶素类物质在渥堆期间总体呈现降低趋势；游离氨基酸类在渥堆前期变化较小，在渥堆中期略有增加，特别是具有鲜甜属性的游离氨基酸在渥堆 12 h 后呈现上升趋势；黄酮醇及其苷类物质在渥堆期间变化较为剧烈，达到显著水平(P<0.05)，多数黄酮醇类物质及总量在渥堆 9~12 h 含量最高。相反，与甜醇属性呈负相关、与涩感正相关的槲皮素-3-O-芸香糖苷在渥堆 9~12 h 期间显著降低。感官与滋味的聚类显示，渥堆呈现 0~9 h、9~12 h、12~18 h 三个变化阶段，推荐在黟县黑茶加工中，渥堆 9~12 h 有利于获得较佳的风味品质。该研究为指导黟县黑茶渥堆生产及滋味品质调控提供了重要的参考价值和理论基础。黟县黑茶作为新创制黑茶产品，其特征品质与其他类黑茶的差异性，及其特征品质成分的形成与茶树资源、加工的相关性还有待深入研究。

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

参考文献

[1] 姜仁华. 统筹做好“茶文章”[N]. 经济日报, 2023-9-25(11). [JIANG R H. Doing a good job of "tea article"[N]. Economic Daily News, 2023-9-25(11).]

[2] Tea-Classification of tea types. International standard(ISO 20715: 2023)[S].

[3] 王辉, 刘亚芹, 雷攀登, 等. 渥堆对黑茶色泽形成的作用及适度判别分析[J]. 中国茶叶加工, 2022(4): 29−38. [WANG H, LIU Y Q, LEI P D, et al. Effect of pile-fermentation on the color formation of dark tea and its moderate discrimination analysis[J]. China Tea Processing, 2022(4): 29−38.]

[4] GE Y, BIAN X, WU J L, et al. Dynamic profiling of phenolic acids during Pu-erh tea fermentation using derivatization liquid chromatography-mass spectrometry approach[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(16): 4568−4577.

[5] LONG P, WEN M, ZHANG L, et al. Untargeted and targeted metabolomics reveal the chemical characteristic of Pu-erh tea (*Camellia assamica*) during pile fermentation-fermentation[J]. Food Chemistry, 2020, 311: 125895.

[6] JIANG H, YU F, QIN L, et al. Dynamic change in amino acids, catechins, alkaloids, and gallic acid in six types of tea pro-

cessed from the same batch of fresh tea (*Camellia sinensis* L.) leaves[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2019, 77: 28−38.
[7] 安会敏, 陈圆, 李适, 等. 六大茶类加工关键工序及风味物质研究进展[J]. 中国茶叶加工, 2023(4): 5−14. [AN H M, CHEN Y, LI S, et al. Research progress on key processes and flavor substances of six basic tea types[J]. China Tea Processing, 2023(4): 5−14.]
[8] LI Q, XIAO L Z, LIU Z H, et al. Biochemical components associated with microbial community shift during the pile fermentation of primary dark tea[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1509.
[9] LI T H, ZHANG Y Y, NING J M, et al. Effects of microbial action and moist-heat action on the nonvolatile components of Pu-Erh tea, as revealed by metabolomics[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70: 15602−15613.
[10] WANG Z Q, LI H Y, LIU Y T, et al. Landscapes of the main components, metabolic and microbial signatures, and their correlations during pile fermentation of Tibetan tea[J]. Food Chemistry, 2023, 430: 136932.
[11] HUANG X, LI Y, ZHOU F, et al. Insight into the chemical compositions of Anhua dark teas derived from identical tea materials: A multi-omics, electronic sensory, and microbial sequencing analysis[J]. Food Chemistry, 2024, 441: 138367.
[12] LIU P P, FENG L, CHEN J, et al. Unlocking the secrets of Qingzhuan tea: A comprehensive overview of processing, flavor characteristics, and health benefits[J]. Trends in Food Science and Technology, 2024, 147: 104450.
[13] 陈慧, 杨丽玲, 陈金华, 等. 控温渥堆对黑毛茶香气品质的影响[J]. 茶叶科学, 2022, 42(5): 717−730. [CHEN H, YANG L L, CHEN J H, et al. Effect of Temperature-controlled pile-fermentation on aroma quality of primary dark tea[J]. Journal of Tea Science, 2022, 42(5): 717−730.]
[14] 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 W J, MA S C, SHI J, et al. Comparative study on three quantitative analysis methods for the color Liupao tea infusion[J]. Food Science, 2021, 42(16): 155−161.]
[15] 刘盼盼, 郑鹏程, 陈军海, 等. 青砖茶渥堆工艺优化及风味物质分析[J]. 中国食品学报, 2021, 8(21): 224−233. [LIU P P, ZHENG P C, CHEN J H, et al. Pile-fermentation process optimization and flavor components analysis of Qingzhuan tea[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 8(21): 224−233.]
[16] 刘亚芹, 王辉, 杨霁虹, 等. 基于滋味成分变化的祁门红茶发酵程度差异研究[J]. 茶叶通讯, 2022, 49(2): 193−201. [LIU Y Q, WANG H, YANG J H, et al. Research on the difference of the fermentation degree of Keemun black tea based on the changes of taste components[J]. Journal of Tea Communication, 2022, 49(2): 193−201.]
[17] 周汉琛, 王辉, 雷攀登, 等. '柿大茶'品系间芳香类物质、儿茶素及游离氨基酸差异分析[J]. 热带亚热带植物学报, 2018, 26(3): 302−308. [ZHOU H C, WANG H, LEI P D, et al. Analysis of aromatics, catechins and free amino acids in different strains of 'Shida Tea'[J]. Journal of Tropical and Subtropical Botany, 2018, 26(3): 302−308.]
[18] YANG J H, ZHOU H C, LIU Y Q, et al. Chemical constituents of green teas processed from albino tea cultivars with white and yellow shoots[J]. Food Chemistry: Molecular Sciences, 2022, 5: 100−143.
[19] 周汉琛, 杨霁虹, 刘亚芹, 等. 茎和叶对祁门红茶品质的贡献分析[J]. 食品科学, 2023, 44(24): 220−228. [ZHOU H C, YANG J H, LIU Y Q, et al. Contribution of stems and leaves to the quality of Keemun black tea[J]. Food Science, 2023, 44(24): 220−228.]
[20] ZHUANG J H, DAI X L, ZHU M Q, et al. Evaluation of astringent taste of green tea through mass spectrometry-based targeted metabolic profiling of polyphenols[J]. Food Chemistry, 2020, 305: 125507.
[21] 陈国和, 胡腾飞, 刘仲华, 等. 普洱茶与茯砖茶风味轮的构建及应用[J]. 茶叶科学, 2023, 43(5): 631−644. [CHEN G H, HU T F, LIU Z H, et al. Construction of flavor wheel and quantitative sensory description analysis of Pu'er tea and Fu Brick tea[J]. Journal of Tea Science, 2023, 43(5): 631−644.]
[22] 欧阳建, 黄纯勇, 李适, 等. 黄金茶绿茶风味轮及滋味分类模型的构建[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(24): 139−146. [OUYANG J, HUANG C Y, LI S, et al. Construction of flavor wheel and taste classification model for Huangjincha green tea[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(24): 139−146.]
[23] 李适, 刘仲华, 黄建安, 等. 不同年份茯砖茶感官品质研究[J]. 茶叶科学, 2016, 36(5): 500−504. [LI S, LIU Z H, HUANG J A, et al. Organoleptic quality analysis of Fuzhuan brick teas in different storage years[J]. Journal of Tea Science, 2016, 36(5): 500−504.]
[24] 张英娜, 许勇泉, 尹军峰, 等. 烘青绿茶苦涩味及其滋味贡献物质分析[J]. 茶叶科学, 2015, 35(4): 377−383. [ZHANG Y N, XU Y Q, YIN J F, et al. Analysis of the bitter and astringent taste of baked green tea and their chemical contributors[J]. Journal of Tea Science, 2015, 35(4): 377−383.]
[25] 刘忠英, 杨婷, 戴宇樵, 等. 基于分子感官科学的茶叶滋味研究进展[J]. 食品工业科技, 2021, 42(4): 337−343,355. [LIU Z Y, YANG T, DAI Y Q, et al. Research progress of tea taste based on molecular sensory science[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(4): 337−343,355.]
[26] ZHU M Z, LI N, ZHOU F, et al. Microbial bioconversion of the chemical components in dark tea[J]. Food Chemistry, 2019, 312: 126043.
[27] NI H, CHEN F, JIANG Z D, et al. Biotransformation of tea catechins using *Aspergillus niger* tannase prepared by solid state fermentation on tea byproduct[J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 60(2): 1206−1213.
[28] LI J, WU S, JIANG Y, et al. Chemical profile of a novel ripened Pu-erh tea and its metabolic conversion during Pile fermentation[J]. Food Chemistry, 2022, 6(1): 378.
[29] WU L Y, HUANG X J, LIU S R, et al. Understanding the formation mechanism of Oolong tea characteristic non-volatile chemical constitutes during manufacture process by using integrated widely-targed metabolome and DIA proteome analysis[J]. Food Chemistry, 2020, 310: 125941.
[30] WANG Z Q, LI H Y, HUANG W M, et al. Landscapes of the main components, metabolic and microbial signatures, and their correlations during pile-fermentation of Tibetan tea[J]. Food Chemistry, 2024, 430: 136932.
[31] JABEEN S, ALAM S, SALEEM M, et al. Withering timings affect the total free amino acids and mineral contents of tea leaves during black tea manufacturing[J]. Arabian Journal of Chemistry, 2019, 12(8): 2411−2417.
[32] 张翔, 陈学娟, 王聪明, 等. 蒙顶甘露茶滋味特征及主要呈味成分贡献率分析[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2020, 42(4): 783−791. [ZHANG X, CHEN X J, WANG C M, et al. Analysis on

taste characteristics and main component contribution of Mengding Ganlu tea[J]. Journal of Yunnan University: Natural Sciences Edition, 2020, 42(4): 783−791.]
[33] 周闯, 林智, 戴伟东, 等. 基于代谢组学的‘铁观音’和‘水仙’品种茶叶化学成分解析[J]. 食品科学, 2024, 45(4): 171−182. [ZHOU C, LIN Z, DAI W D, et al. Chemical composition analysis of 'Tieguanyin' and 'Shuixian' teas using metabolomics method[J]. Food Science, 2024, 45(4): 171−182.]
[34] ZHANG L, CAO Q Q, GRANATO D, et al. Association between chemistry and taste of tea: A review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 101: 139−149.
[35] GUO T, PAN F, CUI Z, et al. FAPD: An astringency threshold and astringency type prediction database for flavonoid compounds based on machine learning[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(9): 4172−4183.
[36] LI J, YAO Y, WANG J, et al. Rutin, γ-aminobutyric acid, gallic acid, and caffeine negatively affect the sweet-mellow taste of Congou black tea infusions[J]. Molecules, 2019, 24(23): 4221.
[37] LIN S, ZHU Q, WEN L, et al. Production of quercetin, kaempferol and their glycosidic derivatives from the aqueous-organic extracted residue of litchi pericarp with *Aspergillus awamori*[J]. Food Chemistry, 2014, 145(4): 220−227.
[38] LIU Z Y, YANG T, DAI Y Q, et al. Research progress of tea taste based on molecular sensory science[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(4): 337−343,355.
[39] 彭艾婧. 基于感官组学的名优绿茶浓、涩、鲜、甜滋味特征研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2021: 15−24. [PENG A Q. Study on taste characteristics of strong feeling, astringency, umami and sweetness of famous green teas based on sensory omics[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2021: 15−24.]
[40] 毛世红. 基于风味组学的工夫红茶品质分析与控制研究[D]. 重庆: 西南大学, 2018: 61−70. [MAO S H. Quality analysis and control of Congou black tea based on sensomics[D]. Chongqing: Southwest University, 2018: 61−70.]

甘可凡, 钱婧, 章建浩, 等. 低温等离子体协同复合精油对牛肉贮藏保鲜的影响 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 292−301. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110230

GAN Kefan, QIAN Jing, ZHANG Jianhao, et al. Effect of Cold Plasma Synergistic Composite Essential Oils on Beef Storage and Freshness Preservation[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 292−301. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110230

· 贮运保鲜 ·

低温等离子体协同复合精油对牛肉贮藏保鲜的影响

甘可凡[1], 钱　婧[2], 章建浩[1,*], 严文静[1,*]

（1.南京农业大学食品科技学院, 江苏南京 210095;
2.东南大学公共卫生学院, 江苏南京 210009）

摘　要: 本研究采用低温等离子体（Cold Plasma，CP）技术协同复合精油（肉桂精油和丁香精油）对生鲜牛肉进行保鲜处理，并探究 CP 处理后复合精油抗氧化性的变化，分析了协同处理对牛肉菌落总数、假单胞菌数、表观色泽、pH 值、总挥发性盐基氮含量（Total Volatile Basic Nitrogen, TVB-N）、脂质氧化、质构及气味的影响。结果表明：CP 协同复合精油处理可有效降低贮藏期内牛肉表面的菌落总数和假单胞菌数，将货架期延长 6 d；同时，复合精油的存在能够减缓 TVB-N 增加和脂质氧化，协同处理组 a^*值在贮藏中后期始终保持较高水平且显著高于对照组（P<0.05）；此外，CP 协同复合精油处理可较好地保持贮藏期内牛肉 pH 值在 5.6 左右；在质构方面，协同处理对牛肉内聚性和弹性无显著影响，但会造成牛肉硬度和咀嚼性上升；感官评价结果表明，协同处理组牛肉整体可接受性最佳。综上，CP 协同复合精油处理可有效延长牛肉货架期，且协同处理组能够保持较好的感官品质。

关键词: 牛肉, 低温等离子体, 复合精油, 贮藏期, 品质

中图分类号: TS251.5+2　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2024)21−0292−10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110230　　本文网刊:

Effect of Cold Plasma Synergistic Composite Essential Oils on Beef Storage and Freshness Preservation

GAN Kefan[1], QIAN Jing[2], ZHANG Jianhao[1,*], YAN Wenjing[1,*]

（1.College of Food Science and Technology, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China;
2.School of Public Health, Southeast University, Nanjing 210009, China）

Abstract: In this study, cold plasma (CP) technology combined with composite essential oils (cinnamon and clove essential oils) treatment was applied to preserve fresh beef. Changes in the antioxidant properties of composite essential oils after CP treatments were investigated. What's more, the effects of synergistic treatments on the total viable bacteria count, *Pseudomonas* spp. count, apparent color, pH value, total volatile basic nitrogen (TVB-N), lipid oxidation, texture, and odor of beef were analyzed. The results showed that the CP combined with essential oils treatment was effective in reducing the total number of colonies and *Pseudomonas* spp. on the surface of beef during the storage period, and extending the shelf life for 6 d. Moreover, the presence of essential oils led to a slower lipid oxidation rate and reduced TVB-N values. The a^* value in the synergistic treatment group was significantly higher than that in the control group in the middle and late storage period (P<0.05). In addition, the synergistic treatment could better maintain the stability of the pH value of beef at about 5.6 during storage. In terms of texture, the synergistic treatment had no significant effect on the cohesion and elasticity of beef, but caused an increase in the hardness and chewiness. The results of the sensory evaluation indicated that the overall

收稿日期: 2023−11−22

基金项目: 国家重点研发计划项目（2022YFD2100503）; 国家重点研发计划项目（2021YFD2100503）; 烟台市科技计划项目（2023ZDCX027）。

作者简介: 甘可凡（1997−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 畜产品加工与质量控制, E-mail: gkf118109@163.com。

*** 通信作者:** 章建浩（1961−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 畜产品加工与质量控制, E-mail: nau_zjh@njau.edu.cn。

严文静（1986−）, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品安全, E-mail: ywj1103@njau.edu.cn。

acceptability of beef after synergistic treatment was the best. In conclusion, the CP combined with composite essential oils treatment could effectively prolong the shelf-life of beef and maintain better sensory qualities.

Key words: beef; cold plasma; composite essential oil; storage period; quality

牛肉因其营养价值高和口感丰富等特点深受消费者喜爱，是目前我国肉品消费市场的主流肉类之一。然而牛肉水分含量较高，蛋白质和脂肪等营养物质丰富，在加工和运输过程中极易受到污染[1]，引起腐败菌的滋生，腐败菌除了破坏食品营养组分，导致食品感官性状异常之外，在其代谢过程中还会产生多种有毒物质，如胺类、吲哚、粪臭素和亚硝胺等，严重时还可导致急性中毒、伤口感染和脑膜炎等疾病，危害消费者健康[2−3]；同时，牛肉品质劣变导致货架期短，造成行业损失。因此，开发一种既能保证牛肉品质又能延长货架期的保鲜技术是市场的迫切需求[4−6]。

低温等离子体（Cold Plasma, CP）技术作为一种新兴的广谱灭菌技术，其产生的活性成分主要有活性氧、活性氮、震动激发的分子和电子等[7]，能够有效杀灭多种类型的细菌、真菌类病原菌、芽孢、病毒和酵母菌[8−11]，具有温度低、效率高、操作简单等优点；同时，低温等离子体技术作为非热杀菌技术，在肉及肉制品加工中能最大程度地保证产品原有的品质和风味，延长保质期。然而，等离子体产生的活性物质可能会促进肉品的脂质氧化。植物精油和低温等离子体的结合可以减少处理时间、降低对产品品质的不良影响。Cui 等[12] 将低温等离子体与柠檬草精油结合应用于猪里脊肉保鲜，结果表明协同处理可显著降低猪肉表面单增李斯特菌数量，同时对猪肉的感官属性的潜在影响降至最低。植物精油是植物中天然存在的低分子质量活性物质的混合物，具有天然绿色和高挥发性等优点，抑菌效果良好，可在食品加工领域代替合成防腐剂[13−14]。而单一精油成分作为食品防腐剂时通常效力低，目前有大量研究表明，许多精油在组合使用时表现出协同活性，具有更好的抑菌效果[15]。杨柳等[16] 发现将肉桂精油和丁香精油 1∶1 复配后对大肠杆菌和黑曲霉菌的抑菌效果极佳，且在相同的温度和 pH 条件下较单一精油的抑菌性能更稳定。

因此，本研究将复合精油与等离子技术相结合，利用精油的抗氧化性质缓解等离子体对牛肉造成的脂质氧化。本文采用天然复合精油协同 CP 技术对生鲜牛肉进行保鲜处理，探究 CP 处理对复合精油的抑菌性能、总酚含量和 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼（1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH）自由基清除率的影响，并进一步对贮藏期内牛肉的菌落总数、假单胞菌菌落数、pH 值、色差、TBARS、TVB-N 和质构等指标进行测定，为植物精油与低温等离子体技术结合在肉品杀菌保鲜方向的应用提供理论参考。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

牛背最长肌　购自南京市卫岗菜市场；假单胞菌菌种　由牛肉表面分离纯化鉴定获得；肉桂精油　上海源叶生物科技有限公司；丁香精油　上海麦克林科技有限公司；没食子酸　上海阿拉丁生物科技有限公司；DPPH　上海化成工业发展有限公司；PCA/TSA/TSB 培养基　青岛海博生物技术有限公司；CFC 假单胞菌选择性培养基　青岛海博生物技术有限公司。

CPCS-I 高压电场低温等离子体冷杀菌设备　南京苏曼等离子体科技有限公司；CR-400 滤镜式色差计　日本 Minolta 公司；数显式 pH 测试仪　梅特勒-托利多仪器有限公司；UV-2006 紫外分光光度计　日本岛津公司；KH-400KDB 型数控超声波清洗器　昆山禾创超声仪器公司；BSC-250 恒温培养箱　上海博讯实业有限公司；FOSS Kjeltec 8400 自动凯式定氮仪　丹麦福斯集团。

1.2　实验方法

1.2.1　肉桂、丁香复合精油浸泡液制备　参考钱婧等[17] 方法略作改进，用体积分数 20% 乙醇溶液分别配制 0.05%、0.10%、0.15%、0.20% 浓度的复合精油浸泡液。将肉桂精油和丁香精油以体积比 1∶1 混合加入 20 mL 无水乙醇中，超声（频率 40 kHz，功率 400 W）至分散，再加入 80 mL 无菌去离子水，继续超声 10 min，直至精油完全分散。

1.2.2　CP 协同肉桂、丁香复合精油的抑菌实验　牛肉样品在 4 ℃ 条件下贮藏至腐败后，用生理盐水将其表面菌洗脱，选取合适稀释梯度后涂布于 PCA 培养基表面，28 ℃ 恒温培养箱中培养 48 h。挑选不同大小、形态、光泽及颜色不同的单菌落接种于 TSB 培养基中，28 °C 振荡培养 12 h，再次划线培养挑选单菌落，重复 2~3 次，最后将对数生长期菌液与等体积的 50%（体积分数）甘油水溶液混匀，置于−80 ℃ 冰箱中冻存保藏菌种。将样本菌液送至北京六合华大基因科技有限公司进行测序比对，确认该菌为莓实假单胞菌（*Pseudomonas fragi*）。

从−80 ℃ 冰箱中取出保藏的假单胞菌菌种在 TSA 培养基上划线培养活化（28 ℃，24 h），选取 3~5 个典型单菌落接种到 TSB 中，于 28 ℃、180 r/min 的条件下摇床培养 12 h，取活化好的菌液在 4 ℃ 条件下 7500 r/min 离心 10 min，去除上清，用生理盐水重悬三次，将菌液浓度调整至约 10^8 CFU/mL 备用。

将菌液转移至无菌 6 孔板中，菌液与复合精油按体积比 5∶1 混合，轻微混匀后将孔板放入聚丙烯

包装盒(14 cm×8.5 cm×3.7 cm)内。将包装好的孔板置于低温等离子体设备内处理,处理电压为 160 kV,处理时间为 30 s。对照组为只用不同浓度精油处理,实验组为精油联合 CP 处理。处理完 2 h 后,进行假单胞菌菌落数测定。

1.2.3 CP 处理对复合精油总酚含量影响 参考 Ahmed 等[18] 和万文侠等[19] 方法略作改进,用 40% 乙醇溶液配制 0.1 mg/mL 没食子酸,取 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 配制好的没食子酸-乙醇溶液于具塞玻璃管中,分别加入 6 mL 超纯水和 0.5 mL 的 1 mol/L 福林酚试剂,振荡后避光静置 10 min。用 0.1 g/mL 的 Na_2CO_3 溶液分别定容至 10 mL,混匀后置于暗室反应 2 h,测定其在 763 nm 波长处吸光度,绘制该浓度梯度下的标准曲线。

在 6 孔板中加入 5 mL 不同浓度的复合精油溶液,置于聚丙烯包装盒内,放入低温等离子体设备中处理,处理电压为 160 kV,处理时间为 30 s。吸取 0.1 mL 经等离子体处理后的复合精油,加入 6 mL 超纯水和 0.5 mL 福林酚试剂,振荡避光静置 10 min 后,用 0.1 g/mL 的 Na_2CO_3 溶液定容至 10 mL,置于暗室使其充分反应 2 h,测定其吸光度值。样品所含总酚含量以每克样品所含没食子酸质量计。将只采取复合精油处理组标记为对照组,复合精油联合 CP 处理组标记为 CP 组。

1.2.4 CP 处理对复合精油 DPPH 自由基清除率的影响 参考 El Hachlafi 等[20] 的方法略作改进,称取 8 mg DPPH 溶于 100 mL 无水乙醇,即得 0.2 mmol/L 的 DPPH-乙醇溶液,即配即用。将 1 mL CP 处理前后的复合精油溶液与等体积的 DPPH 乙醇溶液混匀,暗反应 30 min 并测定 517 nm 处吸光度,同时测定 DPPH 溶液与空白溶剂混合后的吸光度值。将只采取复合精油处理组标记为对照组,复合精油联合 CP 处理组标记为 CP 组。清除率按式(1)计算:

$$\text{DPPH自由基清除率}(\%)=\left(1-\frac{A_1}{A_0}\right)\times 100$$

式中:A_1 为精油溶液与 DPPH 溶液反应吸光度值,A_0 为空白溶剂与 DPPH 溶液反应吸光度值

1.2.5 样品的处理 将牛肉切成 30 mm×20 mm×8 mm 左右的方块,随机分为 4 组,进行如下处理:第 1 组为对照组,不做任何处理,置于聚丙烯包装盒(14.0 cm×8.5 cm×3.7 cm)内,标记为 CK 组;第 2 组为等离子体处理组,在第 1 组包装基础上利用等离子体设备在 160 kV 电压下处理 5 min,标记为 CP 组;第 3 组为复合精油处理组,将分割好的牛肉在质量分数为 0.15% 的肉桂、丁香复合精油中浸泡 1 min,沥干表面水分后置于聚丙烯包装盒中,标记为 EO 组;第 4 组为协同处理组,在第 3 组包装的基础上利用等离子体设备在 160 kV 电压下处理 5 min,标记为 CP+EO 组。按上述条件处理后将样品放入 4 ℃ 冰箱中贮藏,在贮藏期的第 1、4、7、10 和 13 d 每天随机抽取 3 盒样品进行各项指标检测。

1.2.6 菌落总数及假单胞菌计数 参照 GB 4789.2-2022《食品微生物学检验菌落总数测定》。样品处理后,在 4 ℃ 条件下贮藏,分别在 1、4、7、10、13 d 对样品的微生物进行检测。

将 10 g 待测样品与 90 mL 无菌生理盐水置于无菌密封袋中,用拍打式均质器匀速拍打 1 min 后,取混合液按梯度进行 10 倍稀释,选取合适梯度吸取 1 mL 菌液,分别加入平板计数琼脂和 CFC 假单胞菌选择性培养基混匀,在 37 ℃ 下培养 48 h 后进行菌落总数和假单胞菌计数。

1.2.7 色差的测定 参照 Qian 等[7] 方法测定,选用 CIE 标准光源 D65,用标准白板瓷砖校准(L^*=95.35,a^*=0.01,b^*=2.30),每个样品测定三次并记录 L^*、a^*、b^*值的平均值。

1.2.8 pH 值的测定 按照国标 GB 5009.237-2016《食品 pH 值的测定》进行测定。

1.2.9 挥发性盐基氮(TVB-N)测定 按照国标 GB 5009.228-2016《食品中挥发性盐基氮的测定》中自动凯式定氮仪进行测定。

1.2.10 硫代巴比妥酸值(TBARS)测定 按照 GB 5009.181-2016《食品中丙二醛的测定》中分光光度法测定。

1.2.11 质构 参照吴梦迪等[21] 的方法略作改进,将贮藏第 1 d 的牛肉样品剪成 1 cm^3 的方块,选用 TMS 38.1 mm perspex 圆柱形探头,TPA 模式,测试速度 60 mm/min,形变量 40%,测定不同处理组牛肉的硬度、内聚性、弹性和咀嚼性。

1.2.12 电子鼻 参照郭进等[22] 方法略作改进,称取 5±0.1 g 样品,绞碎置于 20 mL 顶空瓶中,于 37 ℃ 顶空萃取 30 min。洗气时间 120 s,自动调零 5 s,进样时间 100 s,气体流速 400 mL/min,每个样品平行测定 3 次。

1.2.13 感官评定 参考 GB/T 22210-2008《肉和肉

表 1 牛肉品质感官评定标准

Table 1 Sensory evaluation standards of beef quality

指标	评定标准	得分
色泽	肌肉色泽鲜艳有光泽	8~10
	色泽较鲜红或较有光泽	4~7
	色泽暗红或无光泽	1~3
气味	有牛肉特有的气味,无其他异味	8~10
	有牛肉的一般气味,稍有异味	4~7
	有异味,不可接受	1~3
组织状态	按压后马上恢复原状	8~10
	按压后一段时间可慢慢恢复	4~7
	按压后凹凸明显不可恢复	1~3
整体可接受度	整体可接受度高	8~10
	整体可接受度较高	4~7
	整体不可接受	1~3

制品感官评定规范》，评审总人数 12 人，其中男女各 6 人，按表 1 标准对样品进行感官评定。

1.3　数据处理

所有实验重复 3 次，采用 IBM SPSS Statistics 20.0 软件进单因素方差分析及相关性分析。采用 Duncan's 多重比较法进行显著性分析（P<0.05），总酚含量和 DPPH 自由基清除率结果采用 t 检验法进行显著性分析。

2　结果与分析

2.1　低温等离子体协同复合精油对假单胞菌的抑菌效果

由图 1 可知，当复合精油浓度为 0%（溶液介质为 20% 乙醇）时，该处理未对假单胞菌菌落数造成影响，且联合等离子体处理仅降低其菌落数 0.63 lg CFU/g。随着复合精油浓度的提高，假单胞菌存活率逐渐降低，但当复合精油浓度增至 0.2% 时，菌落数仅降低了 2.24 lg CFU/g。当 0.1% 复合精油协同低温等离子体处理后，假单胞菌菌落数由 8.10 lg CFU/g 降至 3.52 lg CFU/g；随着复合精油浓度增至 0.15%~0.2% 时，未有菌落数检出，表明 0.15% 以上浓度的精油协同低温等离子体处理可完全杀灭假单胞菌，故选取 0.15% 复合精油用于后续试验。Cui 等[12] 发现 10 mg/mL 柠檬草精油可以破坏单增李斯特菌的细胞膜，导致细胞内成分的损失，包括 DNA、蛋白质和 ATP；此外，将 5 mg/mL 柠檬草精油和低温氮气等离子体联合处理猪里脊肉后，可使其表面接种的单增李斯特菌菌落数降低 2.8 lg CFU/g，呈现较好的抗菌效果。因此，等离子体的协同处理可降低精油浓度且提高杀菌效率。

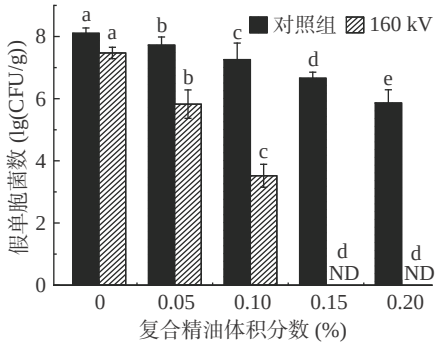


图 1　CP+EO 处理对假单胞菌抑菌效果的影响

Fig.1　Inhibitory effect of CP+EO treatment on *Pseudomonas* spp.

注：不同字母表示不同精油浓度、协同处理在 P<0.05 有显著性差异；ND 表示未检出。

2.2　CP 处理对复合精油总酚含量及 DPPH 自由基清除率的影响

由表 2 可知，精油的总酚含量和 DPPH 自由基清除率（即抗氧化能力）随着复合精油浓度的增加而提高，且二者之间呈正比关系，与 Liu 等[23] 在研究红豆杉针叶精油总酚含量和抗氧化活性中的结论一致。当精油经 CP 处理后，其总酚含量从 0.25~0.75 mg/g 降至 0.19~0.67 mg/g，其 DPPH 自由基清除率从 93.28%~97.48% 降至 92.48%~95.29%，发现等离子体处理并不会对 0.15% 精油的总酚含量和 DPPH 自由基清除率造成显著影响（P>0.05）。Yoo 等[24] 发现当采用丁香油和等离子体对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌进行协同杀菌时，等离子体处理并未对丁香油活性成分和抗氧化性能造成影响，这与本文结论一致。但 Hemmati 等[25] 发现绿茶粉经大气低温等离子体处理后其总酚含量显著降低，并指出等离子体中活性氧物质如臭氧会通过破坏芳香环以降解酚类化合物，随着处理时间的增加其抗氧化活性降低。这可能归因于不同等离子体设备处理功率有所差异，且处理时间对抗氧化活性物质影响较大。在本研究中，CP 处理未对 0.15% 复合精油中的总酚含量和 DPPH 自由基清除率造成显著影响，且协同处理显著提高杀菌效率，进一步证实了 CP 协同复合精油处理的可行性。

表 2　CP 处理对复合精油总酚含量和 DPPH 自由基清除率的影响

Table 2　Effect of CP treatment on total phenolic content and DPPH radical scavenging of composite essential oils

复合精油体积数(%)	总酚含量(mg/g)		DPPH自由基清除率(%)	
	对照组	CP组	对照组	CP组
0.05	0.25±0.01^{a}	0.19±0.01^{a}	93.28±0.23^{a}	92.48±0.34^{a}
0.1	0.47±0.01^{a}	0.41±0.02^{a}	94.84±0.18^{a}	93.75±0.17^{b}
0.15	0.59±0.02^{a}	0.53±0.01^{a}	95.61±0.47^{a}	94.71±0.82^{a}
0.2	0.75±0.02^{a}	0.67±0.01^{b}	97.48±1.06^{a}	95.29±0.66^{b}

注：同行小写字母不同，表示对照组与CP组之间差异显著（P<0.05）。

2.3　CP+EO 处理对牛肉贮藏过程中菌落总数和假单胞菌菌落数的影响

微生物是衡量生鲜肉品质的重要指标，细菌的增长繁殖不仅会分解肉中的蛋白质等营养成分，降低营养价值，还会产生硫化氢等刺激性物质，破坏感官品质，故抑制细菌生长对延长生鲜肉货架期具有重要意义[26]。由图 2 可知，在贮藏第 1 d，CK 组牛肉菌落总数为 4.23 lg CFU/g，经 EO、CP 和 CP+EO 处理后分别降至 3.77、3.52 和 2.80 lg CFU/g，各处理组之间均有显著差异（P<0.05）。根据健康肉全链条质量管理规范规定，生鲜牛肉菌落总数要求低于 6 lg CFU/g，但当贮藏至第 4 d 时，CK 组菌落总数达到 5.82 lg CFU/g，即将超出规范要求，EO 组和 CP 组菌落总数则分别在贮藏期第 7 和 10 d 时增至 6.45 和 6.51 lg CFU/g，已超出标准。CP+EO 组牛肉贮藏至第 10 d 时，其菌落总数为 5.69 lg CFU/g，仍低于标准界限，直至第 13 d 才超过标准限定值，与对照组相比延长货架期 6 d 以上。此外，在贮藏第 1 d 时（图 3），CK 组牛肉中假单胞菌数为 3.57 lg CFU/g，经协同处理后，显著降至 2.64 lg CFU/g。且协同处理在贮藏过程中呈现更佳的抑菌性能，在贮藏末期第 13 d 时，

CK 组、EO 组、CP 组和 CP+EO 组牛肉的假单胞菌数分别为 7.22、7.16、6.61 和 5.93 lg CFU/g。综上可知, CP 和 EO 处理虽会抑制牛肉中微生物的生长, 但二者协同处理效果更显著。

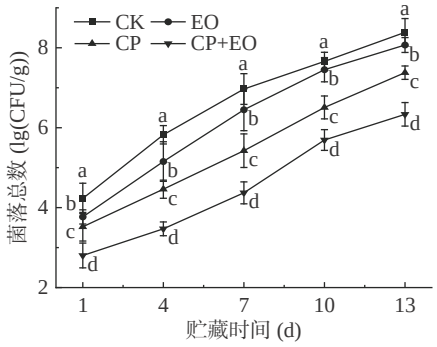


图 2 CP 协同复合精油处理对贮藏期内牛肉菌落总数的影响

Fig.2 Effect of CP combined with essential oil blend on the total bacterial count of beef during storage

注: 不同字母表示同一贮藏时间、不同处理组在 P<0.05 水平下有显著性差异, 图 3~图 6 同。

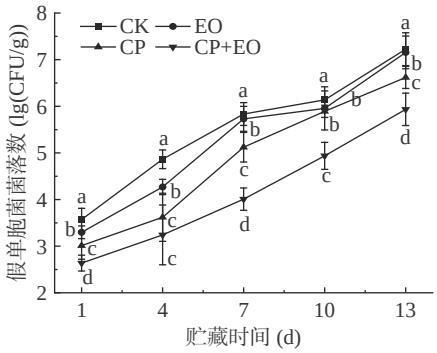


图 3 CP 协同复合精油处理对贮藏期内牛肉假单胞菌菌落数的影响

Fig.3 Effect of CP combined with essential oil blend on *Pseudomonas* count of beef during storage

2.4 CP+EO 处理对牛肉表面色差的影响

从表 3 中可知, CK 组 L^*值在第 1 至 10 d 内呈下降趋势, 在贮藏期第 13 d 有所回升, 这可能归因于贮藏后期 CK 组样品表面微生物生长繁殖情况严重, 测定时受到样品腐败的干扰。EO 组 L^*值在贮藏前 7 d 保持稳定, 随后快速降低, CP 组则在贮藏中期呈现该特点, 协同处理组 L^*值在整个贮藏期保持稳定。L^*值受肉样表面水分含量的影响, 样品表面水分含量较多时 L^*值较大, 随着水分减少慢慢降低[27]。a^*值则与样品中的肌红蛋白密切相关[28], 在贮藏前期, CK 组和 EO 组 a^* 值无显著差异(P>0.05), 而 CP 组 a^*值显著低于 CK 组、EO 组和 CP+EO 组(P<0.05), 表明等离子体处理对牛肉颜色产生了较为明显的影响, 肌红蛋白会与等离子体产生的活性物质过氧化氢反应生成胆红蛋白或巯基肌红蛋白, 从而导致低温等离子体处理过程中红度值的下降[29]; 在贮藏中后期, CK 组和 EO 组的 a^*值迅速降低, 而 CP 组和 CP+EO 组能较好地保持肉色, 且贮藏中后期的 CP+EO 组样品 a^*值始终显著高于 CP 组(P<0.05)。此外, CK 组 b^*值在贮藏过程中呈现降低趋势, 而 EO、CP 和 CP+EO 组 b^*值在贮藏期内有先增加再降低的趋势。有文献指出, b^*值出现此变化的原因可能是在低 pH 值状态下 Fe^{2+}会加速向 Fe^{3+}转化, 一些配体(如 NO^-、N_3^-、Cl^-)可与 Fe^{3+}结合, 不同配体的结合产生不同颜色, 中心铁原子失去产生电子的肌红蛋白后被氧化(Fe^{3+}), 铁血红蛋白($MbFe^{3+}$)在 550 nm(黄色光谱区)的吸收峰减少, 在视觉上与 b^*值相关[30], 因此处理时间越长黄度值下降越明显[31]。

2.5 CP+EO 处理对牛肉 pH 值的影响

pH 值可作为评价牛肉新鲜程度的重要参考指标, 故进一步测定不同处理组牛肉在贮藏过程中的 pH 值变化[32]。从图 4 中可知, 在贮藏第 1 d, CK 组、EO 组、CP 组和 CP+EO 组牛肉的 pH 值分别为 5.45、5.43、5.44 和 5.39, CP+EO 组显著低于 CK 组(P<0.05), 有研究表明[33], pH 值的降低归因于等离子体处理产生的酸性物质, 如 NO_x。此外, 复合精油中肉桂酸等

表 3 CP 协同复合精油处理对贮藏期牛肉颜色的影响

Table 3 Effect of CP combined with essential oil blend on aberration of color of beef during storage

指标	处理组	贮藏时间(d)				
		1	4	7	10	13
L^*	CK	37.71±0.24^b	31.99±0.18^c	29.46±0.15^c	24.98±0.75^d	27.00±0.31^c
	EO	36.60±0.11^c	35.40±0.23^a	35.77±0.57^a	27.96±0.26^c	29.19±0.53^b
	CP	39.00±0.64^a	32.47±0.27^b	35.09±0.08^{ab}	31.84±0.47^b	26.20±0.23^c
	CP+EO	36.15±0.89^c	35.50±0.14^a	34.69±0.67^b	37.38±0.08^a	33.31±0.68^a
a^*	CK	20.38±0.30^a	18.83±0.31^a	12.54±1.18^c	6.13±0.91^c	3.82±0.20^d
	EO	20.65±0.49^a	19.06±0.67^a	18.07±1.06^a	8.52±0.16^b	8.41±0.48^c
	CP	12.40±1.10^c	12.85±0.55^c	11.44±0.54^c	8.03±0.48^b	12.88±0.3^b
	CP+EO	16.69±0.25^b	17.32±0.13^b	14.73±0.18^b	16.65±0.21^a	14.62±0.48^a
b^*	CK	11.48±0.26^a	10.87±0.24^a	9.31±0.29^b	5.58±0.43^d	5.58±0.18^c
	EO	10.63±0.16^b	11.05±0.41^a	12.15±0.12^a	7.15±0.43^c	5.50±0.43^c
	CP	8.46±0.10^c	9.11±0.13^b	10.10±1.09^a	8.67±0.21^b	8.59±0.34^b
	CP+EO	5.78±0.15^d	10.68±0.49^a	9.35±0.27^b	10.57±0.29^a	10.47±0.39^a

注: 每列中不同小写字母表示同一贮藏时间下不同处理组样品存在显著性差异(P<0.05), 表4同。

酸性物质对牛肉样品 pH 值也有一定影响。随着贮藏时间的延长，CK 组 pH 值明显上升，在第 4、7、10 和 13 d 分别增至 5.64、5.99、6.48 和 7.32，但 EO 组、CP 组和 CP+EO 组样品在贮藏末期仍保持在 5.67、5.65 和 5.53。这可能归因于微生物在牛肉贮藏过程中滋长，将肉中蛋白质分解成碱性含氮物质，导致 pH 值升高[34]。

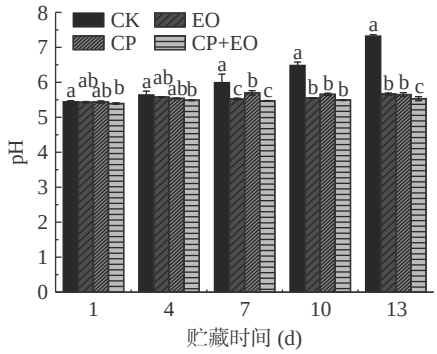


图 4　CP 协同复合精油处理对贮藏期内牛肉 pH 值的影响

Fig.4　Effect of CP combined with essential oil blend on pH value of beef during storage

2.6　CP+EO 处理对牛肉贮藏期内 TVB-N 含量的影响

在生鲜肉新鲜程度的评价指标中，TVB-N 是具有重要意义的指标之一，一般鲜肉中 TVB-N 含量小于 15 mg/100 g，介于 15~20 mg/100 g 则为次鲜肉，超过 20 mg/100 g 可判定为腐败变质肉，不可食用[35]。由图 5 可知，随着贮藏时间的延长，各组 TVB-N 含量随之增加。在贮藏第 1 d，CK 组、EO 组、CP 组和 CP+EO 组 TVB-N 含量分别为 4.11、3.99、3.54 和 3.14 mg/100 g；在贮藏过程中，EO 组和 CP 组 TVB-N 含量始终显著低于 CK 组（P<0.05），CP+EO 组 TVB-N 含量始终显著低于其他组（P<0.05）。肉制品在贮藏过程中由于微生物的脱羧、脱氨基等作用，产生大量的游离氨基酸以及挥发性盐基氮等物质，从而导致腐败[36]，其整体变化与菌落总数呈现相同趋势。CP 和 EO 以及协同处理均可抑制牛肉中微生物的生长繁殖，抑制牛肉中 TVB-N 含量上升[37]。CK 组、EO 组和 CP 组在贮藏第 10 d 时超过或即将达到国家限定标准，CP+EO 组则在贮藏期第 13 d 仍未超过限量标准，与 CK 组相比货架期延长 6 d 以上。

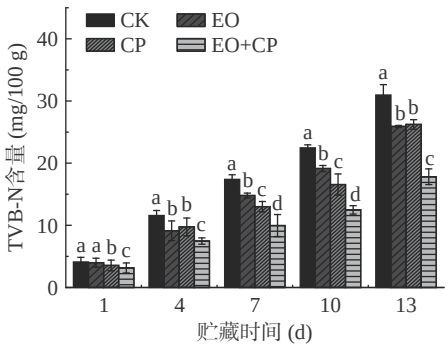


图 5　CP 协同复合精油处理对贮藏期内牛肉 TVB-N 含量的影响

Fig.5　Effect of CP combined with essential oil blends on TVB-N of beef during storage

2.7　CP+EO 处理对牛肉贮藏期内 TBARS 值的影响

脂质氧化是肉类食品酸败和风味变差的主要原因[32]，丙二醛（Malondialdehyde，MDA）是脂质氧化的主要二次产物，因此测定 TBARS 值评估 CP 处理协同复合精油对牛肉脂质氧化的影响。如图 6 所示，在贮藏第 1 d 时，CK 组、EO 组、CP 组和 CP+EO 组样品的 TBARS 值分别为 0.23、0.21、1.38 和 0.76 mg MDA/kg，在整个贮藏期间，所有组 TBARS 值均在积累增加。Ripoll 等[38] 提出 TBARS 值对腐败酸味的阈值在 2.5 mg/kg 以上，本研究中，EO 组始终未超过阈值，CP 组在贮藏第 7 d 时超过阈值，在贮藏前 10 d，CK 组 TBARS 值显著低于 CP+EO 组（P<0.05），但在第 13 d，两组 TBARS 值分别达到 2.45 和 2.44 mg MDA/kg，无显著差异且均将达到腐败酸味阈值（P>0.05）。此外，CP 组 TBARS 值始终显著高于其他组（P<0.05），而 EO 组 TBARS 值始终显著低于其他组（P<0.05），CP+EO 组相较于单纯 CP 处理组脂质氧化得到明显缓解，这表明 CP 处理会加速牛肉的脂质氧化，而精油的存在可促使脂质氧化现象减弱。Zhu 等[39] 在研究肉豆蔻精油和冷源氮气等离子体联合处理猪肉糜时发现，冷源氮气等离子体工艺会加速肉糜脂质氧化，二者协同作用后此现象得到显著改善，且同时发现肉豆蔻精油包封脂质体的抗氧化作用提高，表明精油可延缓脂质氧化，这与本研究结果一致。

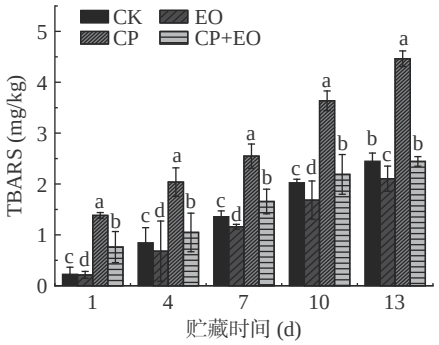


图 6　CP 协同复合精油处理对贮藏期内牛肉 TBARS 值的影响

Fig.6　Effect of CP combined with essential oil blends on TBARS of beef during storage

2.8　CP+EO 处理对牛肉质构特性的影响

从表 4 中可知，不同处理组牛肉的内聚性和弹性无显著差异（P>0.05）。在肌肉硬度方面，CP 组牛肉硬度显著高于 EO 组（P<0.05），但与 CK 组无显著差异（P>0.05）；此外 CP+EO 组与 CP 组硬度值也无显著差异（P>0.05）。咀嚼性是指拒绝一个固体食物时从咀嚼开始到吞咽为止所做的功，其变化趋势与硬度值相似，因此等离子体处理会促使牛肉硬度增大，咀嚼性上升，但与 CK 组相比无显著变化（P>0.05）。孙运金等[40] 发现当等离子体处理牛肉 120 s 后，牛

肉的硬度、弹性、内聚性和咀嚼性没有显著变化，这可能与等离子体是表面处理有关，不会对牛肉内部结构产生显著影响。

表 4　CP 协同复合精油处理对贮藏期内牛肉质构的影响
Table 4　Effect of CP combined with essential oil blends on structure of beef during storage

处理组	硬度(N)	内聚性	弹性(mm)	咀嚼性(mJ)
CK	16.58±3.58^{bc}	0.49±0.06^{a}	2.13±0.07^{a}	16.24±4.63^{ab}
EO	15.15±0.23^{c}	0.45±0.04^{a}	1.94±0.38^{a}	13.63±0.81^{b}
CP	20.23±3.37^{ab}	0.46±0.03^{a}	2.06±0.15^{a}	18.52±3.43^{ab}
CP+EO	21.11±0.90^{a}	0.49±0.05^{a}	2.15±0.37^{a}	20.98±3.57^{a}

2.9　CP+EO 处理对牛肉气味的影响

电子鼻主要是利用其特殊的气体传感器对样品中的气体分子进行识别与分析，模拟人的嗅觉，定性分析测定食品的风味。图 7 为贮藏期第 1 d 的气味分析图，其中图 7A 为电子鼻检测传感器数据雷达图，4 组样品的 W5S、W1S、W1W、W2S、W2W 传感器响应值变化显著，分别对氮氧化合物、甲烷类、无机硫化物、醇类和醛酮类以及有机硫化物敏感。其中 W5S、W2S 传感器响应值差异最明显，表明 EO 和 CP+EO 处理后氮氧化合物和醇类、醛酮类物质增加。如图 7B 所示，第 1 和第 2 主成分贡献率分别为 98.73% 和 1.16%，总贡献率达 99.89%，涵盖了样品的大部分信息，可代表不同处理组牛肉样品的电子鼻整体信息。从覆盖区域看，CK 组与 CP 处理组几近重叠，EO 处理组与 CP+EO 处理组也有重叠，表明 CP 处理对牛肉样品气味变化影响不显著。而 CK 组与 EO 组和 CP+EO 组完全区分，表明精油的添加对牛肉的气味有显著影响。黄名正等[41] 研究发

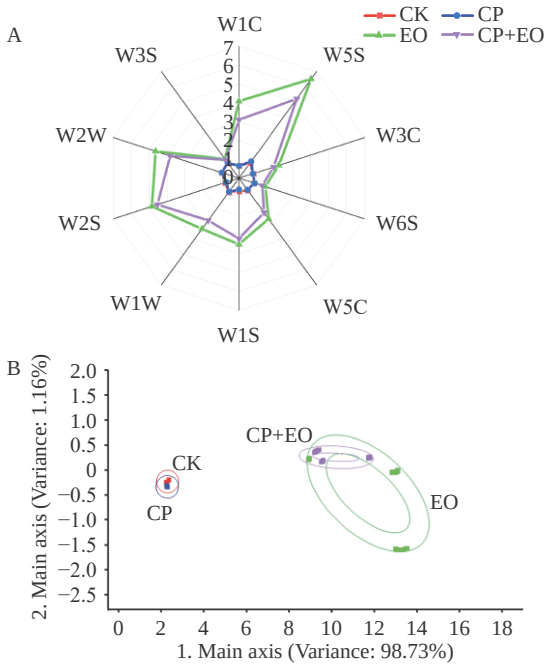


图 7　不同处理组牛肉气味电子鼻 PCA 分析

Fig.7　PCA analysis of beef odor e-nose in different treatment groups

现，采用生姜精油对鸡肉进行保鲜时，未涂膜组和涂膜组样品气味有显著差异(P<0.05)，但涂膜处理更有利于贮藏期内鸡肉风味和口感的保持。综上 CP 协同复合精油处理对牛肉风味有一定影响，相关成分含量变化有待后续进一步研究。

2.10　CP+EO 处理对牛肉贮藏过程中感官品质的影响

由图 8 可知，在贮藏期第 1 d，CP 处理和 EO 处理分别对牛肉色泽和气味评分造成一定影响，但总体各组间感官评分差异较小，各处理组牛肉能保持较好

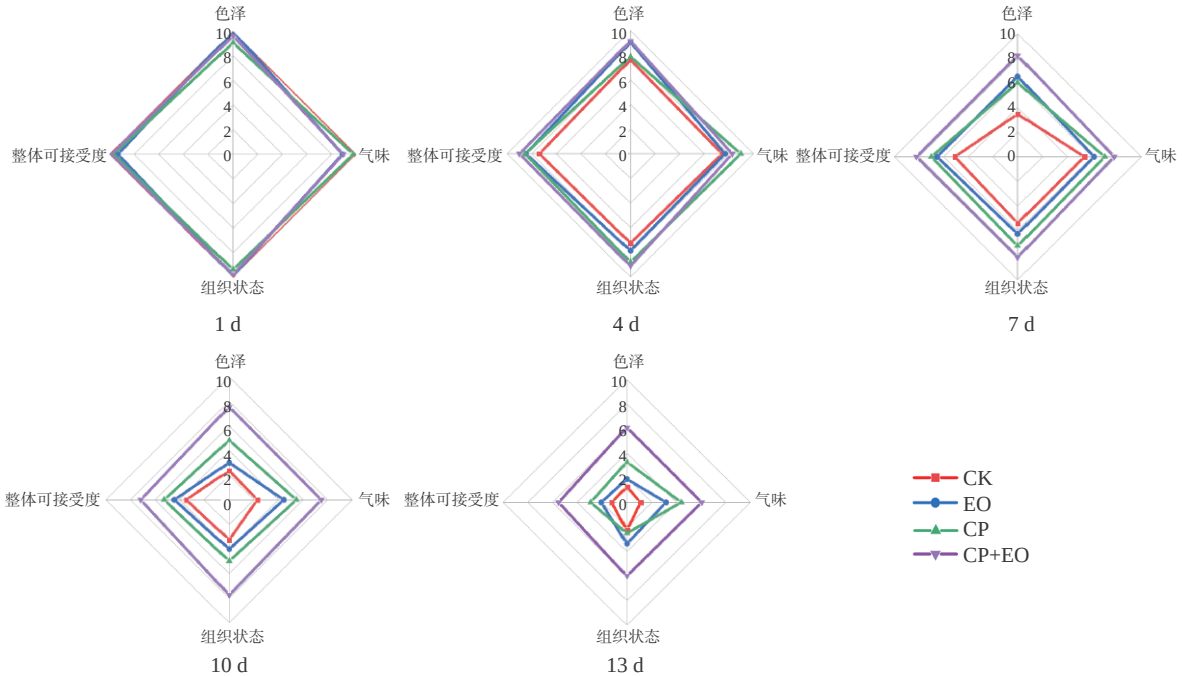


图 8　不同处理对牛肉贮藏期间感官品质的影响

Fig.8　Effect of different treatments on the sensory quality of beef during storage

表 5　CP 协同复合精油处理牛肉品质指标的相关性

Table 5　Correlation of beef quality indexes in synergistic CP treatment with composite essential oils

指标	菌落总数	a^*	pH	TVB-N	TBARS	感官评价	硬度	内聚性	弹性	咀嚼性
菌落总数	1	0.203	0.658*	0.816**	−0.441	−0.900**	−0.581*	−0.085	−0.072	−0.538
a^*		1	0.288	0.623*	0.506	−0.26	0.331	0.04	0.279	0.319
pH			1	0.650*	−0.085	−0.549	−0.442	0.174	0.064	−0.363
TVB-N				1	0.109	−0.686*	−0.219	−0.075	−0.11	−0.307
TBARS					1	0.597*	0.727**	−0.123	0.059	0.418
感官评价						1	0.555	−0.128	−0.001	0.325
硬度							1	0.096	0.285	0.832**
内聚性								1	0.175	0.259
弹性									1	0.214
咀嚼性										1

注：*在0.05水平（双尾）显著相关；**在0.01水平（双尾）极显著相关。

的色泽及气味等感官品质。贮藏 4 d 后，CK 组感官品质下降严重，其余组总体评分相近；贮藏 7 d 后，CK 组牛肉表面产生明显菌斑，气味刺鼻，色泽严重变暗，感官品质劣变明显，已不被消费者接受，而 EO 组和 CP 组整体品质相近，EO 组整体可接受度略低于 CP 组，CP+EO 组总体评价较高，各项仍保持在 8 分以上。直至贮藏末期第 13 d，除 CP+EO 组外，各组整体接受度均降至 4 分以下，CP+EO 组各项评分仍保持在 6 分左右，其色泽、气味、组织状态和整体可接受度均明显优于其他处理组，CK 组、EO 组和 CP 组均已腐败。结合微生物数量、TBARS 值、TVB-N 值和感官评价结果，认为 CP+EO 处理可将牛肉货架期延长 6 d。

2.11　相关性分析

本研究通过计算相关系数评价两个变量之间的线性关系，从而衡量两个因素的相关密切程度，为等离子体协同复合精油处理在牛肉保鲜上的应用提供理论依据。从表 5 可知，TVB-N 含量与菌落总数呈极显著正相关（P<0.01），相关性系数为 0.816，与 pH 值呈显著正相关（P<0.05），相关性系数为 0.650，与感官评分呈显著负相关（P<0.05），相关性系数为 −0.686；挥发性盐基氮等物质是由于微生物在肉样表面大量生长繁殖，分解蛋白质所产生的，微生物的生长又严重影响样品的 pH 值与感官，因此采用等离子体协同复合精油处理控制样品表面微生物对牛肉保鲜具有重要意义。

等离子体处理后样品 TBARS 值有明显增加，同时发现咀嚼性和 TBARS 值与硬度值呈极显著正相关（P<0.01），相关性系数分别为 0.832 和 0.727，这表明 TBARS 值可能是导致牛肉变硬的原因之一，因此复合精油的加入缓解了等离子体处理对牛肉脂质氧化，也在一定程度上改善了牛肉的硬度和咀嚼性。

3　结论

复合精油协同 CP 处理具有显著抑菌效果，且通过测定经 CP 处理后的复合精油总酚含量和 DPPH 自由基清除率发现 CP 处理并未对复合精油的抗氧化性能造成影响。协同处理可有效抑制牛肉贮藏期间菌落总数的上升，延长牛肉贮藏期 6 d，在贮藏末期牛肉样品 TVB-N 含量由对照组的 30.97 mg/100 g 降低至 17.87 mg/100 g，同时 pH 值始终维持在 5.6 左右。协同处理对 CP 处理造成的脂质氧化现象也有所改善，且牛肉的质构及表观品质未发生明显变化，保持较好的感官品质；电子鼻结果表明，复合精油的存在会促使牛肉气味发生变化，后续将进一步优化 CP 处理参数和精油浓度，以降低精油对风味带来的影响。

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

参考文献

[1] TURGIS M, HAN J, BORSA J, et al. Combined effect of natural essential oils, modified atmosphere packaging, and gamma radiation on the microbial growth on ground beef[J]. Journal of Food Protection, 2008, 71(6): 1237−1243.

[2] 张雨霈. 冷鲜猪肉优势菌群分析及噬菌体防腐效果评价[D]. 泰安：山东农业大学, 2022. [ZHANG Y P. Analysis of dominant bacteria in chilled pork and evaluation of bacteriophage antiseptic effect[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2022.]

[3] MORTAZAVI S M H, KAUR M, FARAHNAKY A, et al. The pathogenic and spoilage bacteria associated with red meat and application of different approaches of high CO_2 packaging to extend product shelf-life[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2023, 63(12): 1733−1754.

[4] LIAO X, LIU D, XIANG Q, et al. Inactivation mechanisms of non-thermal plasma on microbes: A review[J]. Food Control, 2017, 75: 83−91.

[5] HUANG M, ZHANG M, BHANDARI B. Recent development in the application of alternative sterilization technologies to prepared dishes: A review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2019, 59(7): 1188−1196.

[6] DEL RIO D, STEWART A J, PELLEGRINI N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress[J]. Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD, 2005, 15(4): 316−328.

[7] QIAN J, ZHAO Y, YAN L, et al. Improving the lipid oxidation of beef patties by plasma-modified essential oil/protein edible

composite films[J]. LWT, 2022, 154: 112662.
[8] GURURANI P, BHATNAGAR P, BISHT B, et al. Cold plasma technology: Advanced and sustainable approach for wastewater treatment[J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2021, 28(46): 65062−65082.
[9] AFSHARI R, HOSSEINI H. Non-thermal plasma as a new food preservation method, its present and future prospect[J]. Archives of Advances in Biosciences, 2014, 5(1): 116-120.
[10] JOSHI S G, COOPER M, YOST A, et al. Nonthermal dielectric-barrier discharge plasma-induced inactivation involves oxidative DNA damage and membrane lipid peroxidation in *Escherichia coli*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2011, 55(3): 1053−1062.
[11] MISRA N N, JO C. Applications of cold plasma technology for microbiological safety in meat industry[J]. Trends in Food Science & Technology, 2017, 64: 74−86.
[12] CUI H, WU J, LI C, et al. Promoting anti-listeria activity of lemongrass oil on pork loin by cold nitrogen plasma assist[J]. Journal of Food Safety, 2017, 37(2): e12316.
[13] 杜杰, 王银桂. 植物精油在肉类保藏中的应用[J]. 肉类工业, 2016(3): 39−44. [DU J, WANG Y G. Application of plant essential oils in meat preservation[J]. Meat Industry, 2016(3): 39−44.]
[14] 张鹏禹, 任小云, 肖作兵, 等. 植物精油在肉制品中的抑菌应用研究进展[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(2): 107−110. [ZHANG P Y, REN X Y, XIAO Z B, et al. Research progress on antibacterial application of plant essential oil in meat products[J]. Food Research and Development, 2013, 34(2): 107−110.]
[15] CALO J R, CRANDALL P G, O'BRYAN C A, et al. Essential oils as antimicrobials in food systems–A review[J]. Food Control, 2015, 54: 111−119.
[16] 杨柳, 张一, 王磊, 等. 香辛料精油复配抑菌效果研究[J]. 中国调味品, 2016, 41(4): 57−60. [YANG L, ZHANG Y, WANG L, et al. Study on antibacterial effect of spice essential oil compound[J]. China Condiment, 2016, 41(4): 57−60.]
[17] 钱婧, 王晨, 严文静, 等. 天然精油协同等离子体对盐水鸭杀菌保鲜及脂质氧化的调控[J]. 肉类研究, 2022, 36(11): 23−28. [QIAN J, WANG C, YAN W J, et al. Regulation of natural essential oil synergistic plasma on sterilization and preservation and lipid oxidation of saltwater duck[J]. Meat Research, 2022, 36(11): 23−28.]
[18] AHMED A F, ATTIA F A K, LIU Z, et al. Antioxidant activity and total phenolic content of essential oils and extracts of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) plants[J]. Food Science and Human Wellness, 2019, 8(3): 299−305.
[19] 万文侠, 曾林, 叶兆伟, 等. 不同生长时期迷迭香精油及抗氧化剂含量变化研究[J]. 信阳农林学院学报, 2022, 32(2): 98−102. [WAN W X, ZENG L, YE Z W, et al. Changes in rosemary essential oil and antioxidant content at different growth stages[J]. Journal of Xinyang Agriculture and Forestry University, 2022, 32(2): 98−102.]
[20] EL HACHLAFI N, BENKHAIRA N, AL-MIJALLI S H, et al. Phytochemical analysis and evaluation of antimicrobial, antioxidant, and antidiabetic activities of essential oils from Moroccan medicinal plants: Mentha suaveolens, lavandula stoechas, and ammi visnaga[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2023, 164: 114937.
[21] 吴梦迪, 马海乐, 刘会敏. 不同模式超声波辅助低温腌制对牛肉品质的影响[J]. 食品与机械, 2023, 39(9): 177−182,233. [WU M D, MA H L, LIU H M. Effect of different modes of ultrasonic-assisted low-temperature curing on beef quality[J]. Food & Machinery, 2023, 39(9): 177−182,233.]
[22] 郭进, 孙学颖, 杜梅, 等. 不同犊牛肉加工产品中挥发性风味成分分析[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(12): 177−184. [GUO J, SUN X Y, DU M. Analysis of volatile flavor components in different veal processed products[J]. Food Research and Development, 2022, 43(12): 177−184.]
[23] LIU Z, FAN W, XIE Q. Chemical composition, total phenolic content, and antioxidant activity of the essential oils extracted from the needle of ten *Pinus* taxa[J]. Journal of Chemistry, 2022, 2022: e7440906.
[24] YOO J H, BAEK K H, HEO Y S, et al. Synergistic bactericidal effect of clove oil and encapsulated atmospheric pressure plasma against *Escherichia coli* O157: H7 and *Staphylococcus aureus* and its mechanism of action[J]. Food Microbiology, 2021, 93: 103611.
[25] HEMMATI V, GARAVAND F, KHORSHIDIAN N, et al. Impact of cold atmospheric plasma on microbial safety, total phenolic and flavonoid contents, antioxidant activity, volatile compounds, surface morphology, and sensory quality of green tea powder[J]. Food Bioscience, 2021, 44: 101348.
[26] ABDEL-NAEEM H H S, EBAID E M S M, KHALEL K H M, et al. Decontamination of chicken meat using dielectric barrier discharge cold plasma technology: The effect on microbial quality, physicochemical properties, topographical structure, and sensory attributes[J]. LWT, 2022, 165: 113739.
[27] 王安然. 超声处理对牛肉品质的影响及机理研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2018. [WANG A R. Effect and mechanism of ultrasonic treatment on beef quality[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2018.]
[28] 明丹丹, 张一敏, 董鹏程, 等. 牛肉肉色的影响因素及其控制技术研究进展[J]. 食品科学, 2020, 41(1): 284−291. [MING D D, ZHANG Y M, DONG P C, et al. Research progress on influencing factors of beef meat color and its control technology[J]. Food Science, 2020, 41(1): 284−291.]
[29] WANG X, WANG Z, ZHUANG H, et al. Changes in color, myoglobin, and lipid oxidation in beef patties treated by dielectric barrier discharge cold plasma during storage[J]. Meat Science, 2021, 176: 108456.
[30] BREWER S. Irradiation effects on meat color–A review[J]. Meat Science, 2004, 68(1): 1−17.
[31] YONG H I, LEE S H, KIM S Y, et al. Color development, physiochemical properties, and microbiological safety of pork jerky processed with atmospheric pressure plasma[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2019, 53: 78−84.
[32] SUWANDY V, CARNE A, VAN DE VEN R, et al. Effect of pulsed electric field treatment on the eating and keeping qualities of cold-boned beef loins: Impact of initial pH and fibre orientation[J]. Food and Bioprocess Technology, 2015, 8(6): 1355−1365.
[33] XU H, ZHU Y, YU B, et al. Comparative analysis of helium and air surface micro-discharge plasma treatment on the microbial reduction and quality attributes of beef slices[J]. Meat Science, 2023, 204: 109259.
[34] LUO J, XU W, LIU Q, et al. Dielectric barrier discharge cold plasma treatment of pork loin: Effects on muscle physicochemical properties and emulsifying properties of pork myofibrillar protein [J]. LWT, 2022, 162: 113484.
[35] 章建浩, 乔维维, 黄明明, 等. 低温等离子体处理对牛肉品质的影响[J]. 现代食品科技, 2018, 34(11): 194−199,150. [ZHANG J H, QIAO W W, HUANG M M, et al. Effect of low temperature

plasma treatment on beef quality[J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(11): 194−199,150.］
［36］ 黄明明, 乔维维, 章建浩, 等. 低温等离子体冷杀菌对生鲜牛肉主要腐败菌及生物胺抑制效应研究[J]. 食品科学技术学报, 2018, 36(4): 17−23. ［HUANG M M, QIAO W W, ZHANG J H, et al. Study on the inhibitory effect of low-temperature plasma cold sterilization on the main spoilage bacteria and biogenic amines in fresh beef[J]. Journal of Food Science and Technology, 2018, 36(4): 17−23.］
［37］ 李欣欣, 李大宇, 赵子瑞, 等. 低温等离子体处理功率对酱牛肉贮藏品质的影响[J]. 吉林大学学报(工学版), 2020, 50(5): 1934−1940. ［LI X X, LI D Y, ZHAO Z R, et al. Effect of low temperature plasma treatment power on storage quality of sauce beef [J]. Journal of Jilin University(Engineering Science), 2020, 50(5): 1934−1940.］
［38］ RIPOLL G, ALCALDE M J, HORCADA A, et al. Suckling kid breed and slaughter weight discrimination using muscle colour and visible reflectance[J]. Meat Science, 2011, 87(2): 151−156.
［39］ ZHU Y, LI C, CUI H, et al. Plasma enhanced-nutmeg essential oil solid liposome treatment on the gelling and storage properties of pork meat batters[J]. Journal of Food Engineering, 2020, 266: 109696.
［40］ 孙运金, 仇俊, 翟国臻, 等. 等离子体处理对生鲜牛肉杀菌保鲜效果及营养品质的影响[J]. 印刷与数字媒体技术研究, 2022(2): 122−131. ［SUN Y J, QIU J, ZHAI G Z, et al. Effect of plasma treatment on sterilization and preservation effect and nutritional quality of fresh beef[J]. Printing and Digital Media Technology Study, 2022(2): 122−131.］
［41］ 黄名正, 莫皓然, 李鑫, 等. 生姜精油-明胶涂膜对鸡肉贮藏期风味品质的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(14): 136−143. ［HUANG M Z, MO H R, LI X, et al. Effect of ginger essential oil-gelatin coating on the flavor quality of chicken during storage[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2023, 14(14): 136−143.］

王斌, 袁晓, 林冲, 等. 外源褪黑素处理对采后火龙果贮藏品质和活性氧清除能力的影响 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 302−309. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023120053
WANG Bin, YUAN Xiao, LIN Chong, et al. Effects of Exogenous Melatonin Treatment on Storage Quality and ROS Scavenging Capacity of Harvested Pitaya Fruit[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 302−309. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023120053

·贮运保鲜·

外源褪黑素处理对采后火龙果贮藏品质和活性氧清除能力的影响

王　斌[1,2], 袁　晓[1,2], 林　冲[1,2], 王欣悦[1,2], 刘堂茂[1,*], 曹秋艳[1,*]
（1.广东省粤北食药资源利用与保护重点实验室/韶关学院生物与农业学院, 广东韶关 512005;
2.韶关市园艺韶关学院工程技术研究中心, 广东韶关 512005）

摘　要: 为研究外源褪黑素（melatonin，MT）处理对采后火龙果的保鲜效果，以不同浓度（0.05、0.10 和 0.50 mmol/L）MT 处理采后火龙果果实，并测定其贮藏品质和活性氧清除能力。结果表明：外源 MT 处理的保鲜效果与其浓度有关，相较于 0.05 mmol/L 和 0.50 mmol/L，0.10 mmol/L MT 处理能显著地抑制果实鳞片黄化，降低失重率，延缓总可溶性固形物和可滴定酸含量的下降，降低腐烂率。0.10 mmol/L MT 处理还显著地提高了过氧化氢酶、过氧化物酶和抗坏血酸过氧化物酶活性及总抗氧化能力，增强对 DPPH·和超氧阴离子自由基的清除能力。以上结果表明 MT 处理通过提高抗氧化酶活性及时清除衰老过程中产生的活性氧，缓解活性氧对采后火龙果造成的氧化损伤。

关键词: 火龙果, 贮藏品质, 褪黑素, 采后处理, 活性氧清除能力
中图分类号: S667.9　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2024)21−0302−08
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023120053
本文网刊:

Effects of Exogenous Melatonin Treatment on Storage Quality and ROS Scavenging Capacity of Harvested Pitaya Fruit

WANG Bin[1,2], YUAN Xiao[1,2], LIN Chong[1,2], WANG Xinyue[1,2], LIU Tangmao[1,*], CAO Qiuyan[1,*]
（1.Guangdong Provincial Key Laboratory of Utilization and Conservation of Food and Medicinal Resources in Northern Region/College of Biology and Agriculture, Shaoguan University, Shaoguan 512005, China;
2.Engineering and Technology Research Center of Shaoguan Horticulture in Shaoguan University, Shaoguan 512005, China）

Abstract: To investigate preservative effects of exogenous melatonin (MT) treatment on pitaya fruit, different concentrations (0.05, 0.10, and 0.50 mmol/L) of MT were used to treat harvested pitaya fruit, and the storage quality and scavenging capacity of reactive oxygen species (ROS) of MT treatment were measured. The results showed that preservative effects of MT depended on treatment concentration, and 0.10 mmol/L MT treatment significantly enhanced storage quality in relative to 0.05 mmol/L and 0.50 mmol/L concentrations. 0.10 mmol/L MT treatment effectively inhibited scale yellowing, reduced weight loss, delayed the decline in total soluble solids and titratable acid content, as well as minimized decay rate. Furthermore, 0.10 mmol/L MT treatment significantly enhanced the activities of catalase, peroxidase, and ascorbate peroxidase, along with the total antioxidant capacity, thereby enhancing the scavenging ability to DPPH· and superoxide anion radicals. The above results suggested that MT treatment enhanced antioxidant enzyme activity, facilitating the timely removal of ROS generated during fruit senescence and reducing oxidative damages caused by ROS.

Key words: pitaya fruit; storage quality; melatonin; postharvest treatment; ROS scavenging capacity

收稿日期: 2023−12−08
基金项目: 2022 年韶关市科技计划项目（220609104530752）。
作者简介: 王斌（1991−）, 男, 博士, 副教授, 研究方向: 采后果蔬贮藏与加工, E-mail: b_wang@sgu.edu.cn。
*** 通信作者:** 刘堂茂（1978−）, 男, 硕士, 讲师, 研究方向: 植物艺术, E-mail: 843249682@qq.com。
曹秋艳（1979−）, 女, 博士, 高级实验师, 研究方向: 植物艺术, E-mail: cqiuyan79@163.com。

火龙果（*Hylocereus undulatus*）又名红龙果、仙蜜果，由于含水量和含糖量很高，组织鲜嫩，且采后呼吸代谢速率快，在不采用保鲜技术情况下很快腐烂变质[1]。褪黑素（melatonin，MT）是一种小分子吲哚类色胺，广泛存在于植物体中[2]。MT 在调控植物衰老、提高抗逆性方面具有重要作用，既可作为抗氧化剂直接清除活性氧（reactive oxygen species，ROS），又可作为信号物质调控植物的生长发育和抗逆性[3]。

近几年的研究表明，MT 处理具有延缓采后果蔬衰老和品质劣变的作用[4]。如外源 MT 处理能显著抑制菜心叶片中叶绿素的分解代谢，通过直接调控内源脱落酸（abscisic acid，ABA）合成相关基因的表达，降低内源 ABA 含量，延缓菜心叶绿素降解和叶片黄化[5]；MT 处理还能抑制鲜切芋头、马铃薯、苹果和梨等鲜切果蔬的切面褐变[6]。这些研究表明，MT 处理对多种类型的采后果蔬具有较好保鲜效果。加之其还具有成分天然、对环境友好、安全高效等优点，表明 MT 处理技术具有较强的产业化应用潜力。但 MT 处理的保鲜效果与果蔬种类、采收季节、产地、成熟度、施用方式等因素有关[4]，要在产业中推广应用 MT 保鲜处理技术，十分有必要在不同产区、不同类型的采后果蔬上进行多次试验，以确认 MT 处理的保鲜效果。

在采后火龙果的研究中，MT 处理能延缓鲜切火龙果低温贮藏期间的品质劣变[7]；MT 处理还能在一定程度上提高 20 ℃ 贮藏条件下“紫红龙”火龙果过氧化物酶（peroxidase，POD）、过氧化氢酶（catalase，CAT）和抗坏血酸过氧化物酶（ascorbate peroxidase，APX）等抗氧化酶的活性，延缓果实衰老[8]。但 MT 处理对采后果蔬的保鲜效果呈现出明显的浓度效应，高处理浓度会加速采后果蔬的成熟进程，导致抗病性降低而增加腐烂变质率，而低处理浓度不能激活或启动自身防御反应，不能有效保持贮藏品质[9]。是否 MT 处理对不同贮藏温度下、不同产地来源、不同品种的火龙果具有一个适合产业化处理的通用浓度，值得进一步研究。确定适合不同品种和不同产地来源的火龙果保鲜的通用处理浓度，能保证采后处理效果的可靠性、提高产业化应用效率、减少采后损失。此外，MT 处理对室温贮藏采后火龙果的保鲜作用，是否与其增强对 ROS 的清除能力有关，有待明确。

因此，本研究以广东韶关本地所产的‘台湾大红’红肉火龙果为研究材料，研究了不同浓度 MT 处理对采后火龙果常温（25 ℃）贮藏品质和 ROS 清除活性的影响，以进一步明确外源 MT 处理对采后火龙果的保鲜效果，为 MT 处理技术在常温贮藏火龙果产业中的推广应用奠定一定基础。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

火龙果　品种为‘台湾大红’，采收 9 成熟的火龙果作为供试材料，试验果园位于广东省韶关市曲江区大塘镇东岗岭村庙背，此时的火龙果果实已达到理想的食用状态，总可溶性固形物（total soluble solids，TSS）含量在 11%~14% 左右，火龙果在 1 h 内运回实验室，随即开展试验；RP30 塑料保鲜袋　美国 GLAD 佳能公司；褪黑素、愈创木酚、邻苯三酚　生工生物工程（上海）有限公司；氢氧化钠（NaOH）、二水合磷酸二氢钠、30% 过氧化氢（H_2O_2）、1,1-二苯基-2-苦基肼自由基、乙醇、盐酸、2,4,6-三（2-吡啶基）三嗪、乙酸钠、氯化铁、冰乙酸　阿拉丁生化科技有限公司；酚酞、聚乙烯吡咯烷酮、L-抗坏血酸　麦克林试剂有限公司。

SOP 电子天平　德国赛多利斯（Sartorius）公司；CR-400 色差仪　日本柯尼卡美能达公司；PR-201a 数显折射仪　日本 ATAGO 公司；MIR-554-PC 低温恒温培养箱　松下电器（中国）有限公司；GT300 组织研磨仪　北京格瑞德曼仪器设备有限公司；Sorvall ST 16R 低温冷冻高速离心机　热电实验设备有限公司奥斯特罗德分公司；T2602 可见紫外分光光度计　上海佑科仪器仪表有限公司；SMART-N30UV 全自动超纯水仪　力康生物医疗科技控股有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　褪黑素处理　挑选成熟度和大小基本一致（单果重约 220 g）、果皮色泽均匀、无虫眼，果柄处果皮未被拉伤，其他部位无机械伤的果实作为试验用果。将挑选的果实随机分成四组，每组包含 60 个果（包含 3 个重复，每重复 20 个果）。将四组果实分别在含有 0（对照，CK）、0.05 、0.10 和 0.50 mmol/L MT 的溶液中浸泡处理 30 min，然后装入塑料筐密封包装处理 6 h。处理结束后，再次打开包装袋，用一次性干纸巾吸干果实表面多余水分后再次密封包装，并贮藏在相对空气湿度为 85%~90% 的 25 ℃ 恒温培养箱中。每间隔 2 d 定期测定相关指标，并收集果肉于液氮中速冻处理后，保存于−80 ℃ 冰箱中用于测定抗氧化酶活性和 ROS 清除能力指标。

1.2.2　病情指数和好果率测定　按照 Zhang 等[10] 描述的方法统计采后火龙果自然腐烂情况，并根据给出的公式计算病情指数。将病情严重程度分为 5 级：0 级表示果皮表面没有出现病斑，1 级表示病斑面积小于单果总面积的 25.00%，2 级表示病斑面积占单果总面积的 26.00%~50.00%，3 级表示病斑面积占单果总面积的 51.00%~75.00%，4 级表示病斑面积超过单果总面积的 75.00%。

$$\text{病情指数}=\frac{\sum(\text{腐烂级数}\times\text{对应级数腐烂果实的数量})}{\text{总果数}}$$

$$\text{好果率}(\%)=\frac{\text{未发病的果实数量}}{\text{总果数}}\times 100$$

1.2.3　果皮色度测定　使用色差仪分别测定除鳞片以外的果皮部分和鳞片表面的色度（L^*、a^*和 b^*）

值[11]，在每个果的 3 个不同部位测定，结果以三次测定的平均值表示。由于病斑处的果皮会发黑，测定色度时若果皮表面出现病斑，仅测定未产生病斑果皮的色度。

1.2.4 失重率测定 使用电子天平称量各处理组的果实重量。

$$失重率(\%)=\frac{贮前质量-贮后质量}{贮前质量}\times 100$$

1.2.5 TSS 和可滴定酸含量(titratable acidity, TA)测定 参考曹秋艳等[12]描述的方法测定火龙果果实的 TSS 和 TA 含量。

每处理各称取 5 g 新鲜火龙果果肉榨取汁液，吸取 0.20 mL 滤液用于测定 TSS 含量。TSS 含量由数显折射仪测得，结果以百分比(%)表示。

称取 20 g 新鲜果肉样品于研钵中研磨成匀浆液，将匀浆液转移至 200 mL 的容量瓶中用蒸馏水定容至刻度，用脱脂棉过滤匀浆液。吸取 20 mL 滤液至三角瓶中，以酚酞为指示剂，使用 0.10 mol/L NaOH 溶液滴定果肉 TA 含量，结果以百分数表示。

$$固酸比=\frac{TSS}{TA}$$

1.2.6 抗氧化酶活性测定 称取 1 g 液氮速冻样品在 5 mL 的 0.10 mol/L 磷酸缓冲溶液(pH7.8)中研磨成匀浆液，于 4 ℃、11000 r/min 下离心 15 min，上清液即为酶粗提液。按照 Wang 等[13]的方法测定 CAT、POD 和 APX 活性。

CAT 活性测定：吸取 0.20 mL 酶粗提液至石英比色皿中，加入 2.80 mL 的 1% H_2O_2 溶液，立即记录在 240 nm 波长处反应产物 3 min 内的吸光度值(OD)变化。

APX 活性测定：吸取 0.10 mL 酶粗提液至石英比色皿中，加入 2.90 mL 的反应混合液(含 1 mmol/L AsA 和 0.5% H_2O_2)，于 290 nm 波长下立即测定反应液在 3 min 内 OD 值变化。

POD 活性测定：量取 0.2 mL 酶粗提液至玻璃比色皿杯中，加入 2.80 mL 反应混合液(含 3‰愈创木酚和 2‰ H_2O_2)，测定反应液在 470 nm 波长处 3 min 内 OD 值变化。

以 OD 值每分钟变化 10 表示一个酶活性单位(U)，酶活性结果以每单位活性每千克鲜重(U/kg FW)表示。

1.2.7 活性氧清除能力测定 使用 1.2.6 制备的酶粗提液，按照 Yuan 等[14]的方法测定果肉的总抗氧化能力及对 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH·)和超氧阴离子(superoxide anion, $O_2^{-}\cdot$)自由基的清除能力。

总抗氧化能力测定：吸取 0.20 mL 酶粗提液于离心管中，加入 5 mL 的 FRAP 工作液，混匀后室温条件下避光反应 1 h，于 593 nm 波长处测定反应液的 OD 值。用不同浓度的维生素 E 绘制标准曲线(y=6.51x+0.02, R^2=0.99)，通过标准曲线计算出总抗氧化能力。

DPPH·清除能力测定：吸取 0.50 mL 酶粗提液至离心管中，加入 2 mL 的 0.20 mmol/L DPPH·溶液和 0.50 mL 纯净水，混匀后室温避光反应 30 min，于 517 nm 处测定反应液的 OD 值(A_1)。不含酶粗提液的反应液测得的吸光度值为 A_0，用等量的 95% 乙醇替换 DPPH·溶液，测得的吸光度值为 A_2。

$$DPPH\cdot清除能力(\%)=\left(1-\frac{A_1-A_2}{A_0}\right)\times 100$$

$O_2^{-}\cdot$清除能力测定：将 0.20 mL 酶粗提液与 1.80 mL 的 25 mmol/L 邻苯三酚溶液在 5 mL 离心管中混匀反应 5 min。加入 1 mL 的 8 mol/L 盐酸溶液终止反应，于 320 nm 波长处测定吸光度值 A_1。用无水乙醇代替样品测得的吸光值为 A_0。

$$O_2^{-}\cdot清除能力(\%)=\frac{A_0-A_1}{A_0}\times 100$$

1.3 数据处理

在 Excel 2016 软件中记录和整理实验数据，并绘制柱形图。所有数据至少包含 3 个重复，用 3 个重复求得的平均值表示结果。处理组间的差异显著性在 SPSS 22 软件中使用 Duncan 多重比较和 *T* 检验分析得出，并用小写字母在图片中标注。

2 结果与分析

2.1 褪黑素处理对火龙果采后腐烂的影响

腐烂是引起采后果蔬损失的主要原因之一，也是衡量采后处理技术保鲜效果的关键指标[15]。随贮藏时间增加，病情指数逐渐增加，好果率逐渐降低(图 1)。与 CK 组相比，9 d 时不同浓度 MT 处理的病情指数显著降低(P<0.05)，0.05 mmol/L MT、0.10 mmol/L MT 和 0.50 mmol/L MT 处理组的病情指数分别比 CK 低 58.388%、83.33% 和 47.62%(图 1A)。除 0.05 mmol/L MT 处理组在 3 d 与 CK 组无显著差异外，贮藏期间各浓度 MT 处理组的好果率显著高于 CK 组(P<0.05)(图 1B)。经过 9 d 的贮藏，0.10 mmol/L MT 处理的果实仍表现出完好的外观(图 1C)。张亚琳等[16]报道外源 MT 处理显著降低损伤接种互隔交链孢(*Alternaria alternata*)杏果实的发病率，抑制了病斑直径的增大。本研究的结果显示，MT 处理降低了火龙果的自然腐烂率，抑制了病程进展，0.10 mmol/L MT 处理对火龙果的自然腐烂率抑制效果最明显。结合文献表明 MT 处理既能降低病原菌的致病能力，又能提高果蔬自身抗病性，从而降低自然病害发生率和腐烂率，保持采后火龙果贮藏品质。

2.2 褪黑素处理对火龙果果皮色度的影响

果皮颜色是衡量果蔬新鲜度和品质特性的重要指标，也是直接影响引消费者选购果蔬的重要因素[17]。果皮颜色主要取决于色素种类和含量，在采后果蔬成熟衰老过程中，呈色色素会氧化分解导致果皮

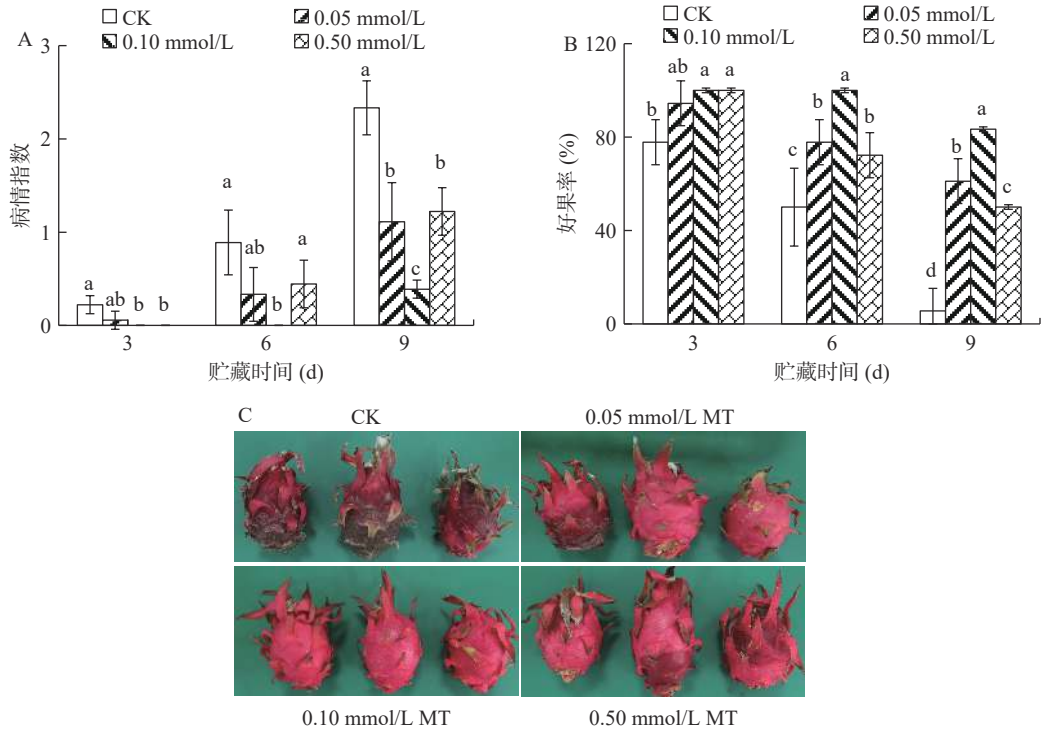


图 1　不同浓度褪黑素处理对火龙果腐烂的影响

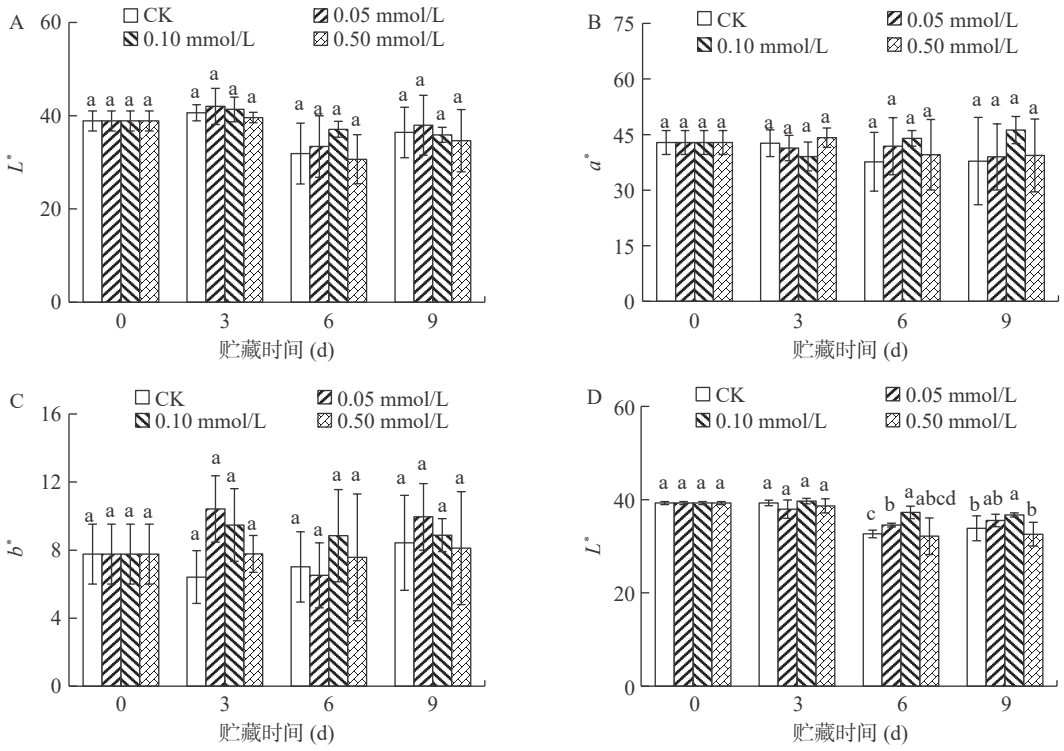
Fig.1　Effects of melatonin (MT) treatments with different concentrations on the decay of pitaya fruit

注：不同小写字母表示同一贮藏时间点不同处理在 $P<0.05$ 水平上差异显著，图 2~图 5 同；照片在贮藏 9 d 时拍摄。

变黄、变暗[18]，从而失去明亮鲜艳的外观。如图 2 所示，火龙果果皮和鳞片表面的 L^*、a^*和 b^*均为正值。在整个贮藏期间，除鳞片之外的果皮色度值总体变化不大，且不同处理间没有显著差异（$P>0.05$）（图 2A~2C），说明在贮藏期间除鳞片以外的果皮色泽并不会发生显著变化。

鳞片的 L^*和 a^*值随贮藏时间整体呈下降趋势，b^*值呈增加趋势（图 2D~2F），说明鳞片色度在贮藏期间发生了明显变化。0.05 和 0.50 mmol/L MT 处理能在一定程度上延缓鳞片 L^*和 a^*值的下降、b^*值的增加，但与 CK 组的差异在多个贮藏时间点处并不显著。0.10 mmol/L MT 处理组的 L^*值和 a^*值显著高于 CK 组（$P<0.05$），b^*值显著低于 CK 组（$P<0.05$）（图 2D~2F），表明 0.10 mmol/L MT 处理能有效抑制鳞片褪色。

一些研究表明，MT 处理可以抑制果蔬色素的降



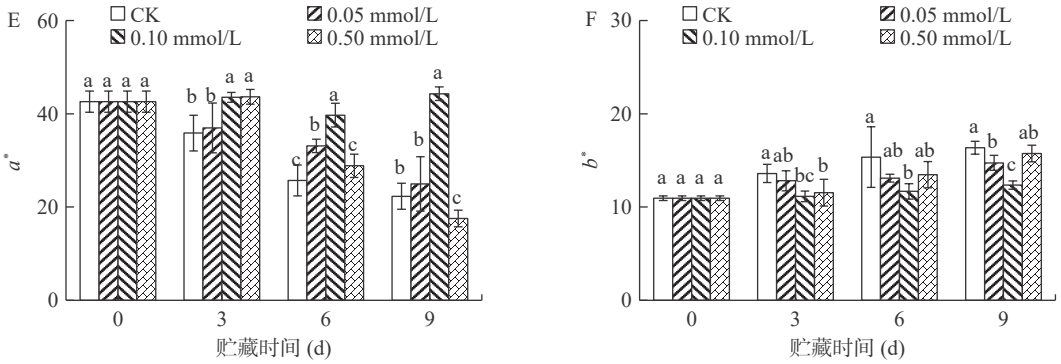


图 2　不同浓度褪黑素处理对火龙果果皮色度的影响

Fig.2　Effects of melatonin (MT) treatments with different concentrations on the color of pitaya fruit peels

注: A~C: 除鳞片以外的果皮色度; D~F: 鳞片色度。

解, 延缓果皮色度变化[19−21]。火龙果果皮中的色素主要以甜菜红素和花青素为主, 伴随着衰老进程甜菜红素等色素发生分解, 导致果皮变黄[22]。本研究中, 0.10 mmol/L MT 处理显著抑制鳞片黄化和亮度的下降, 表明 MT 处理能抑制采后火龙果的衰老进程。相较于鳞片色度变化, 除鳞片之外的果皮部分的色度变化不明显, 表明鳞片能更准确反映火龙果新鲜度。

2.3　褪黑素处理对失重率的影响

果蔬采收后仍是鲜活的生命体, 仍要进行一系列的生理代谢以维持正常的生命状态, 在呼吸作用和蒸腾作用的影响下, 导致果蔬失重和失鲜[23]。各处理组的失重率在贮藏期间逐渐增加, 贮藏后期 CK 组的失重率快速变大, 但不同浓度 MT 处理组的增加速率明显慢于 CK 组(图 3)。与 CK 相比, 0.05 mmol/L 和 0.50 mmol/L MT 处理并没有显著降低失重率(P>0.05), 但 0.10 mmol/L MT 处理组的失重率在整个贮藏期间均显著低于 CK 组(P<0.05)。Ba 等[8] 也得到了相似的结果, 即只有 0.10 mmol/L MT 能显著降低 20 ℃ 下贮藏火龙果的呼吸强度和失重率。本研究进一步确认了不同贮藏温度下, MT 处理对其他产地来源和其他品种火龙果的保鲜效果。失水是引起采后果实失重的主要原因, 表明 MT 处理能抑制采后火龙果失水。

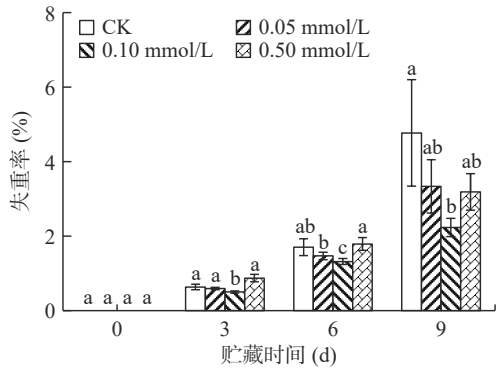


图 3　不同浓度褪黑素处理对火龙果失重率的影响

Fig.3　Effects of melatonin (MT) treatments with different concentrations on weight loss ratio of pitaya fruit

2.4　褪黑素处理对火龙果 TSS 和 TA 含量的影响

可溶性糖是体现果实甜度的主要物质, 采后果

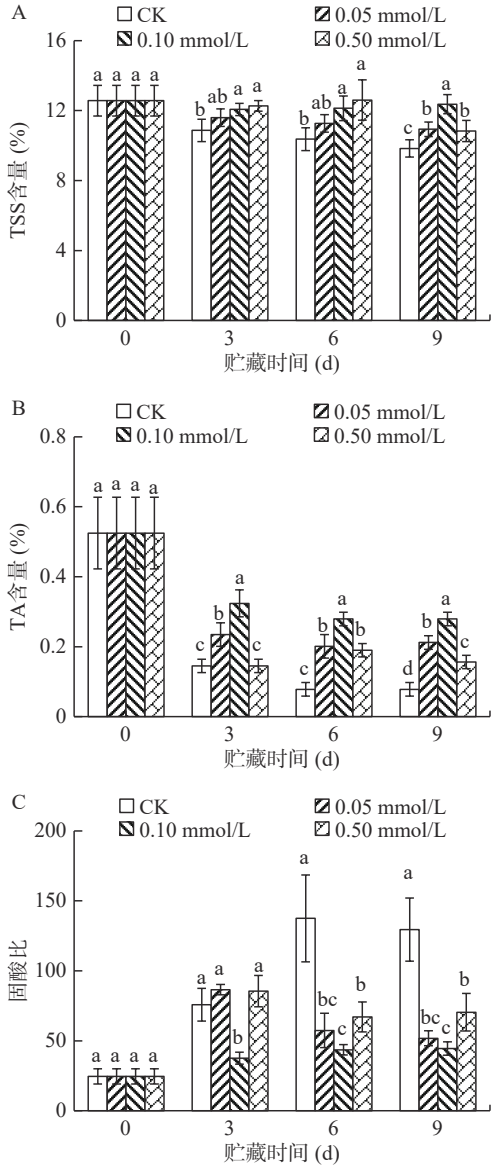


图 4　不同浓度褪黑素处理对火龙果 TSS、TA 含量和固酸比的影响

Fig.4　Effects of melatonin (MT) treatments with different concentrations on contents of TSS, TA and sugar-acid ratio of pitaya fruit

蔬中的 TSS 主要以可溶性糖为主，因此通过测定 TSS 含量可反映可溶性糖含量[24]。CK 和 0.05 mmol/L MT 处理组的 TSS 含量在贮藏期间呈下降趋势（图 4A），TSS 含量分别下降了 21.75% 和 13.00%。0.10 和 0.50 mmol/L MT 处理组的 TSS 含量在贮藏期显著高于 CK 组（P<0.05），表明 MT 处理延缓了 TSS 的分解代谢，保持了采后火龙果食用品质。

有机酸是酸味的主要呈味物质，通过滴定果实中的 TA 含量能反映有机酸含量[25]。所有处理组的 TA 含量在贮藏期间逐渐下降（图 4B），不同浓度 MT 处理组的 TA 含量下降速率明显低于 CK 组。0.05 和 0.10 mmol/L MT 处理组的 TA 含量在整个贮藏期间均显著高于 CK（P<0.05），0.50 mmol/L MT 处理组在 6 d 和 9 d 时显著高于 CK 组（P<0.05），表明 MT 处理维持了较高 TA 含量。0.05 和 0.50 mmol/L MT 处理组的固酸比除 3 d 时与 CK 无显著差异外，其他时间点均显著低于 CK（P<0.05），而 0.10 mmol/L MT 处理组的固酸比在整个贮藏期间均显著低于 CK（P<0.05）（图 4C）。MT 处理降低固酸比是因为其抑制了 TA 分解，使得 TA 含量保持在较高水平。在余甘子果实保鲜研究中也得到了相似结果，MT 处理显著提高了余甘子果实 TSS 和 TA 含量[26]，降低固酸比。

2.5　褪黑素处理对火龙果活性氧清除能力的影响

ROS 自由基具有很强的氧化活性，会伴随着衰老过程合成积累，并对果蔬组织造成严重的氧化损伤，加速果蔬衰老进程和腐烂变质[27]。因此，提高果蔬对 ROS 的清除能力是延缓采后果蔬腐烂变质的重要手段[28]。在其他果蔬的保鲜研究中，外源 MT 处理可能通过诱导抗氧化酶活性和提高内源抗氧化物含量增强对 ROS 的清除能力，从而延缓果实品质劣变[29]。鉴于 0.10 mmol/L 浓度的 MT 处理保鲜效果最好，为此检测了该处理浓度对活性氧清除能力的影响。

如图 5 所示，果实总抗氧化能力先增加后降低，CK 组在 3 d 时达到最高值，而 MT 处理在 6 d 时达到最高值（图 5A）。MT 处理组的总抗氧化能力显著高于 CK 组（P<0.05），在贮藏期间的 3、6 和 9 d 时

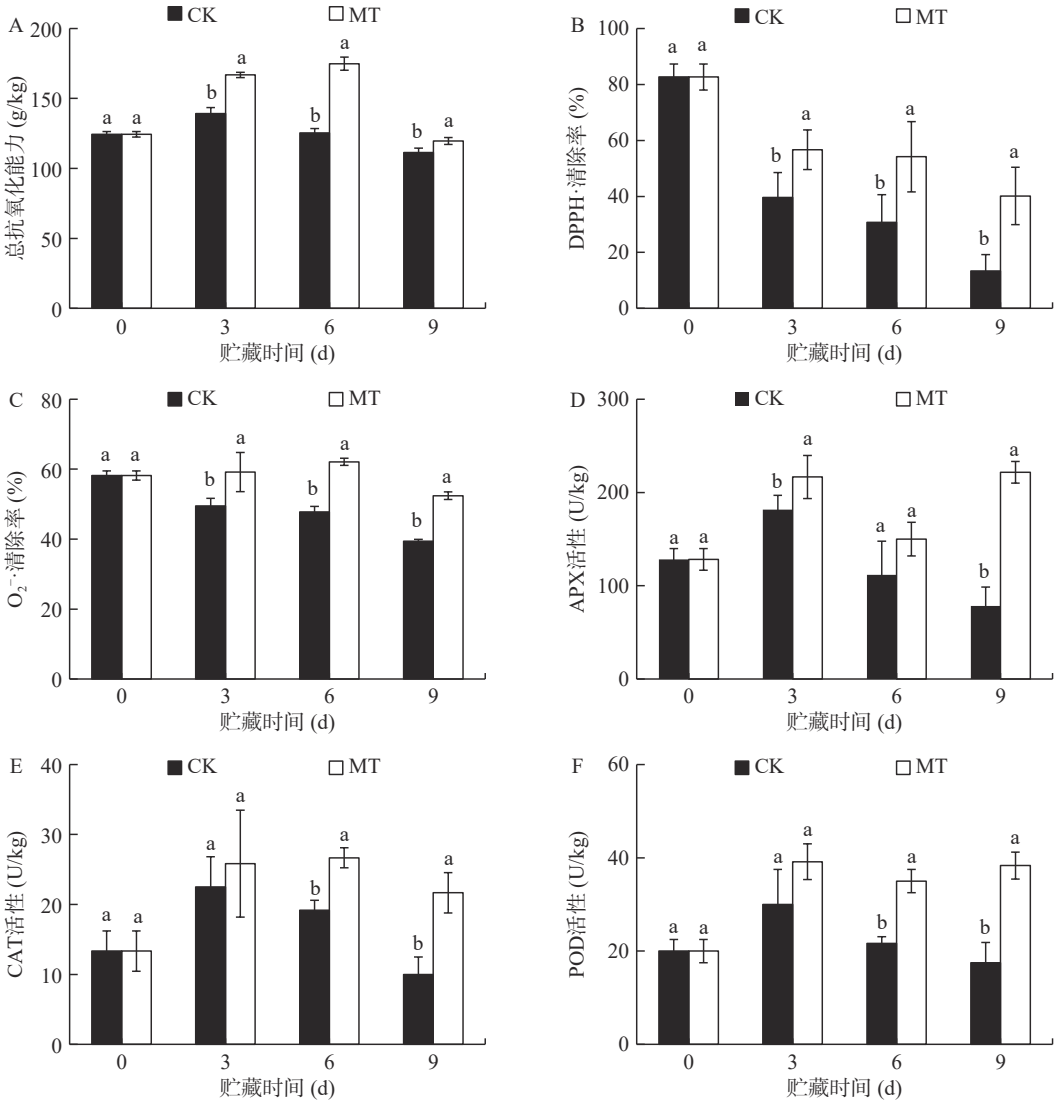


图 5　0.10 mmol/L 褪黑素处理对火龙果活性氧清除能力的影响

Fig.5　Effects of 0.10 mmol/L melatonin (MT) treatment on ROS scavenging capacity of pitaya fruit

分别比 CK 高 19.78%、39.46% 和 7.45%。随着贮藏时间的延长，火龙果果肉对 DPPH·和 O_2^-·的清除能力逐渐下降(图 5B~5C)，这可能与火龙果自身的衰老有关。随着贮藏时间的延长，火龙果逐渐走向衰老，导致对自由基的清除能力变弱。其中，MT 处理组的 DPPH·和 O_2^-·清除能力下降速率明显低于 CK 组(P<0.05)。在第 9 d 时 MT 处理组的 DPPH·和 O_2^-·清除活性分别是 CK 组的 3.00 倍和 1.33 倍，表明 MT 处理增强了火龙果的 ROS 清除能力。

贮藏期间 APX、CAT 和 POD 活性在前 3 d 有所增加，随后降低，但与 CK 组相比，MT 处理组的 APX 活性在 3 d 和 9 d 时显著提高(P<0.05)，CAT 和 POD 活性在 6 d 和 9 d 时显著提高(P<0.05)(图 5D~5F)，表明 MT 处理提高了 APX、CAT 和 POD 活性。MT 处理也能显著提高采后桃果实的超氧化物歧化酶、CAT、POD 和 APX 活性[30]。表明适宜浓度的 MT 处理对采后果蔬抗氧化酶活性具有活化作用，高活性的抗氧化酶能及时清除火龙果贮藏期间产生的 ROS，从而降低 ROS 对采后火龙果造成的氧化损伤。MT 处理影响采后果蔬贮藏品质的作用机制十分复杂，0.05 mmol/L 和 0.50 mmol/L 浓度的 MT 处理对采后火龙果的保鲜效果有限，可能因为低剂量的 MT 处理未能有效激活抗氧化酶活性，而高剂量的 MT 处理对抗氧化酶活性有钝化效应，但仍需进一步研究确认。

3 结论

火龙果果实采后很容易腐烂变质，贮藏期很短。本研究表明，MT 处理能显著地减少火龙果采后贮藏期间的腐烂发生率，抑制采后火龙果鳞片的黄化，降低失重率，延缓 TSS 和 TA 含量下降，表明 MT 处理对采后火龙果具有较好的保鲜效果。相较于 0.05 mmol/L 和 0.50 mmol/L MT 处理组，0.10 mmol/L MT 处理的保鲜效果最好，表明 0.10 mmol/L 的 MT 可能是适合不同贮藏温度和不同品种火龙果的通用处理浓度。0.10 mmol/L MT 处理还能显著地提高 CAT、APX 和 POD 等清除自由基酶系的活性，提高火龙果的总抗氧化能力。进一步从生理层面确认了 0.10 mmol/L 浓度 MT 处理的可靠性，表明 MT 处理通过诱导抗氧化酶活性提高 ROS 清除能力，及时清除贮藏过程中产生的 ROS，减少 ROS 造成的氧化损伤，从而提高采后火龙果贮藏品质。

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

参考文献

[1] LI C, WANG S, WANG J Y, et al. Ozone treatment promotes physicochemical properties and antioxidant capacity of fresh-cut red pitaya based on phenolic metabolism[J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 1016607.

[2] VASEY C, MCBRIDE J, PENTA K. Circadian rhythm dysregulation and restoration: The role of melatonin[J]. Nutrients, 2021, 13(10): 3480.

[3] KHAN T A, FARIDUDDIN Q, NAZIR F, et al. Melatonin in business with abiotic stresses in plants[J]. Physiology and Molecular Biology of Plants, 2020, 26: 1931−1944.

[4] 宋聪慧, 郭水欢, 史小强, 等. 褪黑素调控果蔬采后保鲜研究进展[J]. 食品科学, 2023, 44(3): 228−236. [SONG C H, GUO S H, SHI X Q, et al. Research progress on the regulatory effect of melatonin on postharvest preservation of fruits and vegetables[J]. Food Science, 2023, 44(3): 228−236.]

[5] TAN X L, FAN Z Q, KUANG J F, et al. Melatonin delays leaf senescence of Chinese flowering cabbage by suppressing ABFs-mediated abscisic acid biosynthesis and chlorophyll degradation[J]. Journal of Pineal Research, 2019, 67(1): e12570.

[6] XIAO Y H, XIE J, WU C S, et al. Effects of melatonin treatment on browning alleviation of fresh-cut foods[J]. Journal of Food Biochemistry, 2021, 45(9): e13798.

[7] BA L J, CAO S, JI N, et al. Effects of melatonin treatment on maintenance of the quality of fresh-cut pitaya fruit[J]. International Food Research Journal, 2022, 29(4): 796−805.

[8] BA L, CAO S, JI N, et al. Exogenous melatonin treatment in the postharvest storage of pitaya fruits delays senescence and regulates reactive oxygen species metabolism[J]. Food Science and Technology, 2021, 42: 15221.

[9] 刘祯, 陈贤柔, 缪承杜, 等. 褪黑素在果蔬采后品质劣变中的调控作用[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(2): 146−153. [LIU Z, CHEN X R, MIAO C D, et al. Regulation effects of melatonin on postharvest quality deterioration of fruits and vegetables[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2023, 14(2): 146−153.]

[10] ZHANG H F, PU J, LIU H, et al. Effects of L-cysteine and γ-aminobutyric acid treatment on postharvest quality and antioxidant activity of loquat fruit during storage[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(13): 10541.

[11] 冯慧敏, 朱云娜, 谢景, 等. 紫色与绿色芥菜种质间色素差异及其相关品质评价[J]. 中国蔬菜, 2023(9): 86−97. [FENG H M, ZHU Y N, XIE J, et al. Evaluation of pigments and related qualities between purple and green mustard germplasm[J]. China Vegetables, 2023(9): 86−97.]

[12] 曹秋艳, 李海渤, 冯慧敏, 等. 施用微生物菌肥对无花果鲜食品质和贮藏特性的影响[J]. 江苏农业学报, 2023, 39(3): 807−813. [CAO Q Y, LI H B, FENG H M, et al. Effect of applying microbial fertilizer on fresh-eating quality and storage characteristics of figs[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Science, 2023, 39(3): 807−813.]

[13] WANG B, YUAN X, ZHU Y N, et al. Low-level cadmium exposure induced hormesis in peppermint young plant by constantly activating antioxidant activity based on physiological and transcriptomic analyses[J]. Frontiers in Plant Science, 2023, 14: 1088285.

[14] YUAN X, TANG B L, WANG Y K, et al. Inhibitory effects of peppermint extracts on the browning of cold-stored fresh-cut taro and the phenolic compounds in extracts[J]. Frontiers in Sustainable Food Systems, 2023, 7: 1191396.

[15] GAO C C, ZHANG Y, LI H M, et al. Fruit bagging reduces the postharvest decay and alters the diversity of fruit surface fungal community in 'Yali' pear[J]. BMC Microbiology, 2022, 22(1): 1−12.

[16] 张亚琳, 展晓凤, 马海娟, 等. 外源褪黑素调控活性氧代谢诱

导采后杏果实对黑斑病的抗性[J]. 食品工业科技，2022，43(24)：355−362. [ZHANG Y L, ZHAN X F, MA H J, et al. Melatonin regulates reactive oxygen species metabolism to induce resistance to black spot of postharvest apricot fruit[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(24): 355−362.]

[17] 吴国欣，林跃鑫，欧敏锐. 复配植酸保鲜剂对荔枝果实的保鲜效果[J]. 食品工业科技，2003，24(9)：71−72. [WU G X, LIN Y X, OU M R. The preservation effect of compound phytic acid preservative on litchi fruit[J]. Science and Technology of Food Industry, 2003, 24(9): 71−72.]

[18] SHEWFELT R L, ROSARIO D. The role of lipid peroxidation in storage disorders of fresh fruits and vegetables[J]. Hortscience, 2000, 35(4): 575−579.

[19] SAUD S, JIANG Z Y, CHEN S Y, et al. Interaction of melatonin on post-harvest physiology and quality of horticultural crops [J]. Scientia Horticulturae, 2023, 321: 112286.

[20] MIRANDA S, VILCHES P, SUAZO M, et al. Melatonin triggers metabolic and gene expression changes leading to improved quality traits of two sweet cherry cultivars during cold storage[J]. Food Chemistry, 2020, 319: 126360.

[21] LIU C H, ZHENG H H, SHENG K L, et al. Effects of melatonin treatment on the postharvest quality of strawberry fruit[J]. Postharvest Biology and Technology, 2018, 139: 47−55.

[22] ZHOU Z X, GAO H M, MING J H, et al. Combined transcriptome and metabolome analysis of pitaya fruit unveiled the mechanisms underlying peel and pulp color formation[J]. BMC Genomics, 2020, 21(1): 1−17.

[23] LIU X, LIU D H, CHEN T, et al. Watercore pear fruit respiration changed and accumulated γ-aminobutyric acid (GABA) in response to inner hypoxia stress[J]. Genes (Basel), 2022, 13(6): 977.

[24] 孙佩光，程志号，孙长君，等. 火龙果果实发育过程中淀粉与可溶性糖含量变化及其相关性分析[J]. 中国果树，2022(9)：51−54. [SUN P G, CHEN Z H, SUN C J, et al. Changes of starch and soluble sugar content and correlation analysis in pitaya fruit during its development[J]. China Fruits, 2022(9): 51−54.]

[25] TSEGAY Z T. Total titratable acidity and organic acids of wines produced from cactus pear (*Opuntia-ficus-indica*) fruit and *Lantana camara* (*L. camara*) fruit blended fermentation process employed response surface optimization[J]. Food Science and Nutrition, 2020, 8(8): 4449−4462.

[26] 蒋璇靓，姜雪，陈洪彬，等. 采后褪黑素处理对余甘子果实品质和耐贮性的影响[J]. 热带作物学报，2022，43(6)：1259−1266. [JIANG X L, JIANG X, CHEN H B, et al. Effects of postharvest melatonin treatment on fruit quality and storability of *Phyllanthus emblica* fruit[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2022, 43(6): 1259−1266.]

[27] WEN M, LIN X, YU Y S, et al. Natamycin treatment reduces the quality changes of postharvest mulberry fruit during storage[J]. Journal of Food Biochemistry, 2019, 43(8): e12934.

[28] 王馨，胡文忠，陈晨，等. 活性氧在果蔬采后成熟衰老过程中的作用及几种气体处理对其影响的研究进展[J]. 食品工业科技，2017，38(5)：375−379. [WANG X, HU W Z, CHEN C, et al. The role of reactive oxygen in harvested fruits and vegetables during maturation and senescence and the influences which handled by several gas treatments[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(5): 375−379.]

[29] MAGRI A, PETRICCIONE M. Melatonin treatment reduces qualitative decay and improves antioxidant system in highbush blueberry fruit during cold storage[J]. Journal of Science and Food Agriculture, 2022, 102(10): 4229−4237.

[30] GAO H, ZHANG Z K, CHAI H K, et al. Melatonin treatment delays postharvest senescence and regulates reactive oxygen species metabolism in peach fruit[J]. Postharvest Biology and Technology, 2016, 118: 103−110.

王丽, 闫子康, 杜金, 等. 基于 MFO 优化 BP 神经网络构建冷鲜肉品质预测模型 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 310−321. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023120367
WANG Li, YAN Zikang, DU Jin, et al. Establishment of a Predictive Model for the Quality Assessment of Chilled Meat Using a Moth-Flame Optimization BP Neural Network[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 310−321. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023120367

· 贮运保鲜 ·

基于 MFO 优化 BP 神经网络构建冷鲜肉品质预测模型

王　丽, 闫子康, 杜　金, 王远亮*
（湖南农业大学食品科学与技术学院, 湖南长沙 410128）

摘　要: 为能准确预测冷鲜肉在贮藏中品质的变化规律及质量安全，本文探究贮藏温度（0、4 和 25 ℃）对冷鲜肉菌落总数、TVB-N、pH、水分含量、色度和生物胺含量的影响，确定冷鲜肉的特征品质指标。基于反向传播（Backpropagation，BP）神经网络和飞蛾火焰优化（Moth-Flame Optimization，MFO）BP 神经网络，利用特征指标作为训练数据，构建不同贮藏温度下冷鲜肉的品质预测模型，快速准确评价和预测食品的质量安全。结果表明，不同贮藏温度下冷鲜肉的菌落总数、pH、TVB-N、色泽和生物胺含量随着贮藏时间的延长均呈上升趋势（P<0.05），且各指标在不同贮藏温度下的变化规律不一致，温度越高，腐败变质的速度越快。通过相关性分析得出菌落总数和 TVB-N 为冷鲜肉品质特征指标，以特征指标为训练数据构建 BP 神经网络和 MFO 优化 BP 神经网络模型。结果显示，MFO 优化 BP 神经网络优于单一的 BP 神经网络模型，指标菌落总数和 TVB-N 通过 BP 神经网络模型训练后的 R 值分别为 0.95018、0.94283，通过 MFO 算法优化训练后的 R 值分别为 0.97538、0.98001，更接近于 1，且优化后的 RMSE、MSE 和 MAE 值相对较小，其模型拟合度更好，在整个贮藏期的预测性能更好，准确率更高。因此，MFO 优化 BP 神经网络可用于预测冷鲜肉在贮藏过程中品质的变化规律。

关键词: 冷鲜肉, 松鼠葡萄球菌, 预测模型, 反向传播（BP）神经网络, 飞蛾火焰优化（MFO）BP 神经网络
中图分类号: TS251.5　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2024)21−0310−12　　本文网刊:
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023120367

Establishment of a Predictive Model for the Quality Assessment of Chilled Meat Using a Moth-Flame Optimization BP Neural Network

WANG Li, YAN Zikang, DU Jin, WANG Yuanliang*
（College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China）

Abstract: To quickly and accurately evaluate and predict the quality and safety of food products, in this study, storage temperatures (0, 4 and 25 ℃) were used to investigate the effects on the total number of colonies, TVB-N, pH, moisture content, color, and biogenic amine content of chilled meat. It aimed to accurately predict the pattern of change in the quality of chilled meat in storage, as well as its quality and safety, and determined the characteristic quality indexes of chilled meat. Based on Backpropagation (BP) neural network and Moth-Flame Optimization (MFO) BP neural network, the quality prediction model of chilled meat under different storage temperatures was constructed using characteristic indexes as the training data to quickly and accurately evaluate and predict the quality and safety of food. The results showed that the total number of colonies, pH, TVB-N, color and biogenic amine content of chilled meat under different storage temperatures showed an increasing trend with the extension of storage time (P<0.05), and the pattern of change of each index under

收稿日期: 2023−12−31
基金项目: 湖南省重点研发计划项目（2022NK2035）; 2022 湖南省农业产业技术体系项目（湘农发 2022-67）; 湘沙猪配套系持续选育及健康养殖技术研究项目（2022NK2027）。
作者简介: 王丽（1998−）, 女, 硕士, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: 15285223720@163.com。
*** 通信作者:** 王远亮（1977−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: wangyuanliang@hunau.edu.cn。

different storage temperatures was inconsistent, and the higher the temperature, the faster the rate of corruption and deterioration. Based on the results of this part of the experiment, the total number of colonies and TVB-N as feature indicators were used as training data by the Backpropagation (BP) neural network and Moth-Flame Optimization (MFO) BP neural network to construct a quality prediction model for chilled meat under different storage temperatures. The findings demonstrated that the MFO-optimized BP neural network outperforms the standalone BP neural network model. Specifically, the *R*-values for the colony count and TVB-N indicators achieved through training with the BP neural network model were 0.95018 and 0.94283, respectively. In contrast, the *R*-values obtained through the optimized MFO algorithm reached 0.97538 and 0.98001, respectively, which closely approached 1. Furthermore, the optimized values of RMSE, MSE, and MAE indicated smaller discrepancies, indicating a better fit of the model. Consequently, the MFO-optimized BP neural network exhibited superior prediction performance throughout the entire storage duration, showcasing heightened accuracy. Hence, this model can effectively forecast the patterns of change in chilled meat quality during storage.

Key words: chilled meat; *Staphylococcus sciuri*; prediction model; BP neural network; Moth-Flame optimization BP neural network

冷鲜肉肉质嫩、味鲜美且富含人体所需的营养物质，深受消费者喜爱。在贮藏过程中，由于微生物的繁殖和内源酶的作用，肉中的蛋白质和脂肪会氧化降解，使肉嫩度下降、色泽暗淡、产生异味和酸败等现象，导致肉类变质而引发食品全问题[1−2]。因此，为了确保食品的安全和质量，食品行业需要预测其在贮藏过程中的品质变化，通过数学模型可以快速准确评价和预测食品的质量和安全性[3−5]。

对于传统的预测微生物学模型，通常采用经验数学回归的方法描述微生物的生长失活行为以及环境条件与致病菌特定行为之间的定量关系。传统模型得到的预测结果多为确定性的点估计，但由于可变性的存在，病原体的实际行为通常是一个特定的范围，而不是一个单一的确定值，这使得在复杂环境中很难准确预测[6]。反向传播（Backpropagation，BP）神经网络是由大量神经元作为基本处理单元组成，每个神经元通过接收来自其他 n 个神经元的信号来模拟神经冲突过程，这些信号通过加权连接传输，将接收到的总输入值与神经元的阈值进行比较，然后通过激活函数对输出信号进行处理。对于输入信号，必须传播到隐藏节点，隐藏节点的输出信息通过激活函数传播到输出节点，最后得到输出结果[7]。BP 神经网络作为一种新的食品质量预测模型，具有自适应学习能力、大规模并行处理、适应性强、容错性高以及较强的处理性能，包括优化、模拟和控制等优点，是预测微生物学中一种新型的方式[8]，但 BP 神经网络是随机初始权值和阈值的。而基于飞蛾火焰优化（Moth-Flame Optimization，MFO）BP 神经网络作为一种新型群智能优化算法，算法并行优化能力强，总体特性好，具有收敛速度快、结构简单等优点，能够广泛探索搜索空间，还可以通过找到神经网络最佳的权值和阈值[9]，是一种比较理想的预测模型，MFO 优化 BP 神经网络流程如图 1 所示。目前，BP 神经网络已广泛应用于食品种类和质量的分类、元素含量检测和风险管理等方面[10−11]，且大量研究只采取单一的传统预测模型或 BP 神经网络来进行预测[12−13]，通过算法优化 BP 神经网络并将其预测准确性与单一 BP 神经网络进行比较的研究较少。因此，通过比较 BP 神经网络和 MFO 优化 BP 神经网络对冷鲜肉品质预测中的准确性，并选择合适的模型进行应用，对产品具有重要价值[14−16]。

基于上述背景，本研究通过对冷鲜肉进行表面灭菌再接种松鼠葡萄球菌，探究贮藏温度对冷鲜肉品质的影响。根据数据相关性分析，选择关键指标利用 BP 神经网络和 MFO 优化 BP 神经网络来构建冷鲜肉贮藏期间品质的预测模型，并验证该模型的有效性，为快速准确地预测冷鲜肉在贮藏过程中的品质提供方法和支持，从而对肉类的品质安全进行评价和预测。

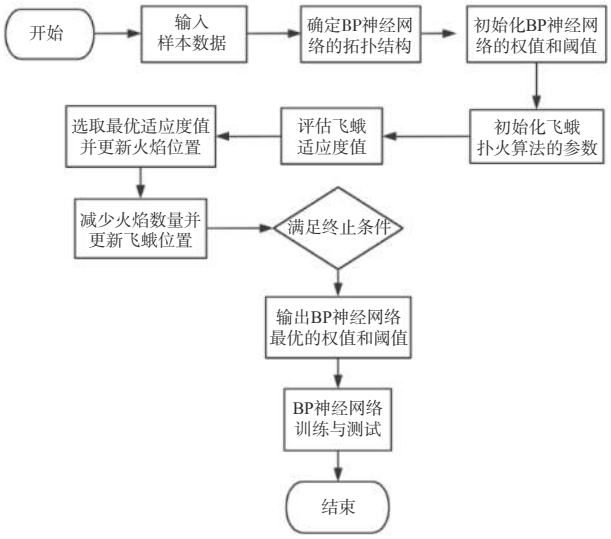


图 1　MFO 优化 BP 神经网络流程图

Fig.1　Flowchart of BP neural network for MFO optimisation

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

新鲜里脊猪肉　湖南省长沙市步步高超市；松鼠葡萄球菌　从冷鲜肉中分离筛选；乙腈　色谱纯，美国天地试剂公司；8 种生物胺标准品　CATO 佳途科技股份有限公司；LB 培养基　青岛海博生物技术有限公司；氯化钠、硼酸、氢氧化铵、三氯乙酸、盐

酸、甲基红、亚甲基蓝、丙酮、氧化镁、氢氧化钠、高氯酸、碳酸氢钠、乙丹磺酰 分析纯，上海国药集团化学试剂有限公司。

ZYS-50B 智能水分含量测定仪 湘仪天平仪器设备有限公司；NR200 色差仪 深圳市三恩时科技有限公司；PHS-3E pH 计 上海仪电科学仪器股份有限公司；Agilent 1260 InfinityII 高效液相色谱仪 安捷伦科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌悬液的制备 将样品进行梯度稀释，选取适宜的浓度涂布于 MSA（甘露醇琼脂培养基），37 ℃培养 48 h，之后根据形态差异挑选不同的单菌落于选择性培养基上进行纯化。再用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌株的 DNA，以 16S rDNA 为模板进行 PCR 扩增，再将 PCR 产物送测序公司进行测序，并将结果与美国国家生物技术信息中心（NCBI）菌种信息进行 BLAST 分析，完成菌种鉴定。综合分析分离与鉴定的菌株，松鼠葡萄球菌对冷却肉的食用品质或安全影响较大，因此，本试验选择机会性食源性病原微生物松鼠葡萄球菌作为研究对象。

将纯化的松鼠葡萄球菌在 LB 培养基斜面上进行平板划线，于 37 ℃培养 48 h。挑取单个菌落接种于 50 mL 的 LB 液体培养基中培养 8 h 左右，再吸取 0.5 mL 于 100 mL LB 液体培养基中扩大培养，使菌液浓度达到 10^6 CFU/mL 时，取 10 mL 菌液以 5000 r/min 的速度离心 15 min，弃去上清液，将菌体沉淀经 500 mL 无菌生理盐水将细菌沉淀物稀释成菌悬液，用于接种无菌肉，使肉初始接种量达到 3~3.5 lg(CFU/g)。

1.2.2 样品制备 将新鲜里脊猪肉分割成 100 g 左右，悬浮于无菌水中 1 min，沥干水分并用 75% 酒精棉将肉表面进行擦拭，再用紫外灭菌照射 10 min，随后将整块肉浸入菌悬液中 30 s 接种，之后将样品进行无菌托盘包装，以未接种松鼠葡萄球菌的新鲜里脊无菌猪肉为对照组，分别置于 0、4 和 25 ℃环境中进行贮藏，每隔 48 h 进行一次取样测定，共贮藏 18 d，检测指标为菌落总数、挥发性盐基氮（TVB-N）、pH、水分含量、色度、生物胺。

1.2.3 菌落总数的测定 按照 GB 4789.2-2022《食品微生物学检验菌落总数测定》执行。

1.2.4 挥发性盐基氮（TVB-N）的测定 按照 GB 5009.228-2016《食品中挥发性盐基氮的测定》执行。

1.2.5 pH 的测定 按照 GB 5009.237-2016《食品 pH 值的测定》执行。

1.2.6 水分含量的测定 按照 GB 5009.3-2016《食品中水分的测定》执行。

1.2.7 色度的测定 根据文献 [17]，使用色差仪测定其色差值 L^*、a^*和 b^*，每次测量前用白板对色差计进行校正。

1.2.8 生物胺的测定 根据文献 [18]，标准曲线的制作：称取生物胺标准品各 50 mg，用 0.4 mol/L 高氯酸为溶剂定容至 50 mL，分别稀释为 1、0.5、0.4、0.25、0.125、0.1 mg/mL 标准混合液。分别取 1 mL 标准混合液于 5 mL 容量瓶中，加入 2 mol/L 的 NaOH 溶液 200 μL、饱和 $NaHCO_3$ 溶液 300 μL、含 10 mg/mL 丙酮的 DNS-Cl 溶液 2 mL，40 ℃水浴衍生 45 min，之后加入 100 μL 氨水，最后用乙腈定容。在上机检测之前过 0.22 μm 有机滤膜。高效液相色谱条件：色谱柱：SHIMADZU C_{18}-AQ；流动相 A：水；流动相 B：乙腈；进样量 20 μL；流速 0.9 mL/min；柱温 35 ℃；紫外检测波长 254 nm。梯度洗脱程序如表 1 所示。

表 1 HPLC 测定生物胺梯度洗脱程序

Table 1 Determination of biogenic amines gradient elution procedure by HPLC

时间(min)	A(%)	B(%)
0	35	65
5	25	75
20	0	100
24	0	100
25	35	65
30	35	65

1.2.9 BP 神经网络及算法优化 MFO-BP 神经网络模型的建立 利用 MATLAB 对 BP 神经网络及 MFO 算法优化 BP 神经网络进行训练建模。为了提高 BP 神经网络的预测精度，在输入层和输出层分别采用 tansig 和 purelin 函数作为激活函数[10]。BP 神经网络及 MFO 优化 BP 神经网络模型的建立包含两个输入层（贮藏温度和贮藏时间）和两个输出层（菌落总数和 TVB-N 含量），通过经验方程和试错法[19]，确定隐藏层神经元的个数为 12，模拟冷鲜肉在不同贮藏温度下的品质变化。为了减少输入样本数据的范围变化，提高模型的稳定性和准确性，数据在通过输入层前应通过 mapminmax 函数进行归一化，之后使用统计方法来评估 BP 神经网络及 MFO 优化 BP 神经网络的预测性能。

1.3 数据处理

使用 IBM SPSS Statistics 26 软件进行统计分析，用 Origin2021 软件绘图，并使用 MATLAB 软件建立 BP 神经网络及 MFO 优化 BP 神经网络模型。数据为 3 次重复试验的平均值，以平均数±标准差表示，$P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 贮藏温度对冷鲜肉菌落总数的影响

菌落总数是评价肉品质量的重要指标，当菌落总数>6 lg(CFU/g)时，即肉超过二级鲜度，达到了腐败标准[20]。如图 2 所示，在贮藏过程中，菌落总数随着时间延长呈上升趋势，接种微生物样品在贮藏温度为 25 ℃时，菌落总数在贮藏第 2 d 达到 7.45 lg(CFU/g)，

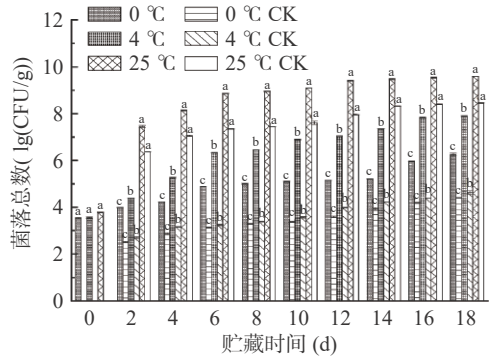


图 2　贮藏温度对冷鲜肉菌落总数的影响

Fig.2　Effect of storage temperature on colony count of chilled meat

注：小写字母不同表示同一贮藏时间下同组间数值存在显著性差异（P<0.05）；图 3~ 图 6、图 8、图 10 同。

即肉已超过二级鲜度。4 ℃ 组则在贮藏第 6 d 超过 6 lg(CFU/g)。而 0 ℃ 组直到第 18 d 才达到腐败标准，为 6.25 lg (CFU/g)。当贮藏结束时，接种微生物样品在 0、4 和 25 ℃ 各组冷鲜肉菌落总数分别达到了 6.25、7.89、9.60 lg(CFU/g)，其对照组分别为 4.40、4.63、8.45 lg(CFU/g)，不同贮藏温度下冷鲜肉中菌落总数的变化具有显著性差异（P<0.05），与对照相比，接种微生物冷鲜肉中的菌落总数含量相对较高。贮藏温度越高，菌落总数增殖越快，这与林建城等[21]、靳玉龙等[22] 研究一致。

2.2　贮藏温度对冷鲜肉挥发性盐基氮含量的影响

挥发性盐基氮(TVB-N)为肉中蛋白质在内源酶和微生物的作用下分解产生的氨、二甲胺、三甲胺等含氮挥发性物质的总和，是判定鲜肉新鲜度的重要指标。通过查找国标和文献可知，当 TVB-N 值超过 15 mg/100 g 时为变质肉[20]。如图 3 所示，冷鲜肉在贮藏过程中的 TVB-N 值随时间的延长呈上升趋势。接种微生物样品在贮藏温度为 25 ℃ 时冷鲜肉于第 2 d 达到 18.48 mg/100 g，已为变质肉，而对照组在第 4 d 才超过 15 mg/100 g。接种微生物样品在 4、0 ℃ 组冷鲜肉 TVB-N 值分别在第 6 d 和第 12 d 达到变质肉标准，且 4、0 ℃ 对照组分别在第 10 d、第 14 d 才达到腐败标准。由此可得，不同贮藏温度下冷鲜肉中 TVB-N 的含量具有显著性差异，且温度越高，酶和微生物的作用强度越大，蛋白质降解速度就越快，从而产生更多的碱性含氮物质，导致 TVB-N 值增加[23−24]。

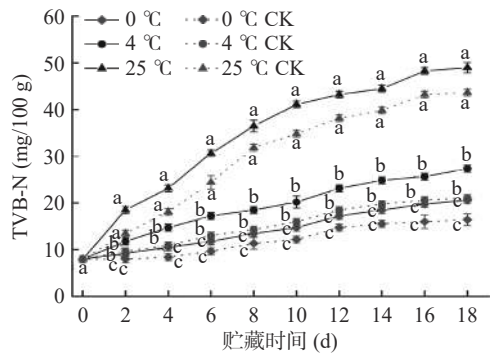


图 3　贮藏温度对冷鲜肉 TVB-N 含量的影响

Fig.3　Effect of storage temperature on TVB-N content of chilled meat

2.3　贮藏温度对冷鲜肉 pH 的影响

pH 也是评价肉质的一个重要指标，冷鲜肉的一级鲜度 pH 为 5.8~6.2，二级鲜度 pH 为 6.3~6.6，而变质肉的 pH 则达到 6.7 以上[20]。如图 4 所示，pH 随时间延长呈先下降后上升的趋势。贮藏结束时，接种微生物样品 25 ℃ 组的 pH 为 6.87，已达到腐败，而对照组的为 6.61，肉达到二级鲜度；接种微生物样品 4 ℃ 组的 pH 为 6.25，仍保持在一级鲜度与二级鲜度之间，而对照组的为 6.08，保持在一级鲜度；接种微生物样品 0 ℃ 组的 pH 均保持在一级鲜度。其主要原因是，动物屠宰后，由于氧气不足，肌糖原在糖酵解酶的作用下进行无氧呼吸，产生乳酸、丙酮酸等，使 pH 降低[25]；在贮藏后期，由于肌肉纤维中的蛋白质水解降解，肉中的蛋白质、氨基酸及其他含氮化合物被内源酶和微生物分解，产生碱性物质，导致 pH 升高[26−27]，且不同贮藏温度条件下冷鲜肉的 pH 具有显著性差异（P<0.05），温度越高，对冷鲜肉的 pH 影响越大。

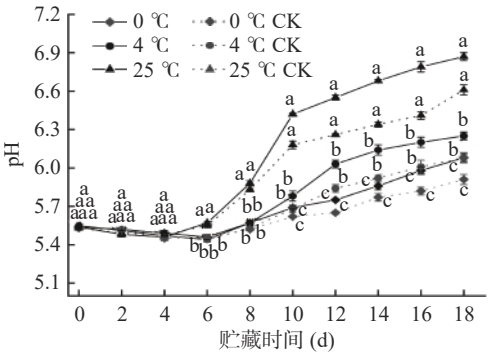


图 4　贮藏温度对冷鲜肉 pH 的影响

Fig.4　Effect of storage temperature on pH of chilled meat

2.4　贮藏温度对冷鲜肉水分含量的影响

肉的水分含量与肉的新鲜度之间存在一定关系，按 GB18394-2020 规定新鲜肉水分含量应≤ 77%。如图 5 所示，冷鲜肉水分含量随贮藏时间延长整体都在 71%~74% 之间变化，无显著差异（P>0.05）。但由于肉品自身性质及微生物作用会影响肉样的最终水分含量[28]，因此，基于水分含量判断肉类新鲜度的方法仍有待探索。

2.5　贮藏温度对冷鲜肉色泽的影响

色泽也是表示肉新鲜度的重要指标[29−30]。由图 6 可得，冷鲜肉的 L^* 随时间延长逐渐增加。其中，4、0 ℃ 条件下 L^* 变化趋势比较缓慢，而 25 ℃ 条件下肉样的 L^* 值上升最快，但在不同贮藏温度下冷鲜肉中色泽的变化具有显著性差异（P<0.05）。在贮藏 18 d 的过程中，第 18 d 时 L^* 值达到最大值。L^* 增加是受蛋白溶解、汁液流失的影响，使冷鲜肉颜色逐渐

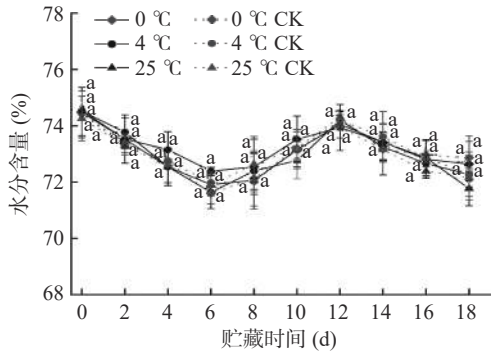


图 5 贮藏温度对冷鲜肉水分含量的影响

Fig.5 Effect of storage temperature on moisture content of chilled meat

变浅[31]。a^*值和 L^*值的变化趋势一致，在 25 ℃ 贮藏条件下，a^*值上升较快。a^*增加是贮藏初期，新鲜肉表面逐渐渗透一部分氧气，肉中肌红蛋白血红素会形成氧合肌红蛋白，且贮藏过程较短，才使肉呈鲜红色。b^*值和 pH 变化趋势一致，也许是由于 pH 的变化引起蛋白质结构改变所致，蛋白质发生氧化会导致色素的结构改变和颜色褪色，还会与食品中的金属离子形成螯合物，促进金属离子催化引发的色素氧化反应，加速食品色泽的劣变。还可能是肌红蛋白中的亚铁离子(Fe^{2+})氧化成高铁离子(Fe^{3+})[32−33]。在贮藏后期，样品表面逐渐变黄，并产生大量粘液，这与 b^*值的增加是一致的，且温度越高，变化越明显。

2.6 贮藏温度对冷鲜肉生物胺含量的影响

生物胺是一种碱性有机含氮化合物，主要由微生物氨基酸脱羧酶作用于氨基酸脱羧而生成[34]。其生物胺含量的变化可反映冷鲜肉的腐败过程，当生物胺达到较高水平时，会产生毒性作用[35−36]。

2.6.1 生物胺标准曲线的绘制 生物胺混合标准品的 HPLC 色谱图如图 7 所示，在 30 min 内分离出 8 种生物胺标准品，并能确定其保留时间，表明该方法可以有效地分离和检测生物胺。线性回归方程和决定系数见表 2。

2.6.2 生物胺含量(尸胺、腐胺、精胺)的变化 由图 8

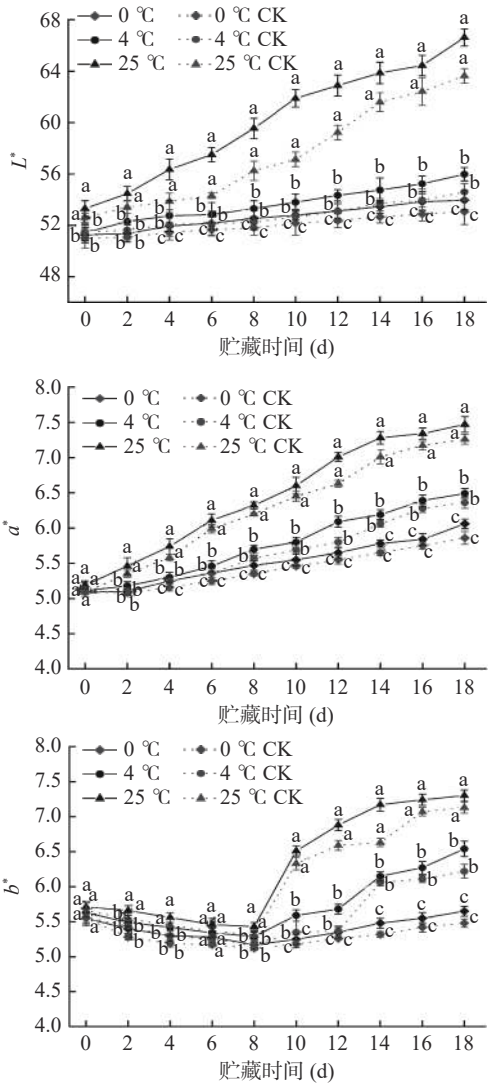


图 6 贮藏温度对冷鲜肉色泽的影响

Fig.6 Effect of storage temperature on color of chilled meat

可知，在贮藏过程中，样品中尸胺含量的变化随着时间的延长而显著增加。不同贮藏温度下冷鲜肉中尸胺含量变化具有一定差异。在贮藏前期温度为 0 ℃ 时，检测不到尸胺，4 ℃ 和 25 ℃ 条件下，冷鲜肉尸胺含量逐渐增加。贮藏结束时，接种微生物样品中尸胺

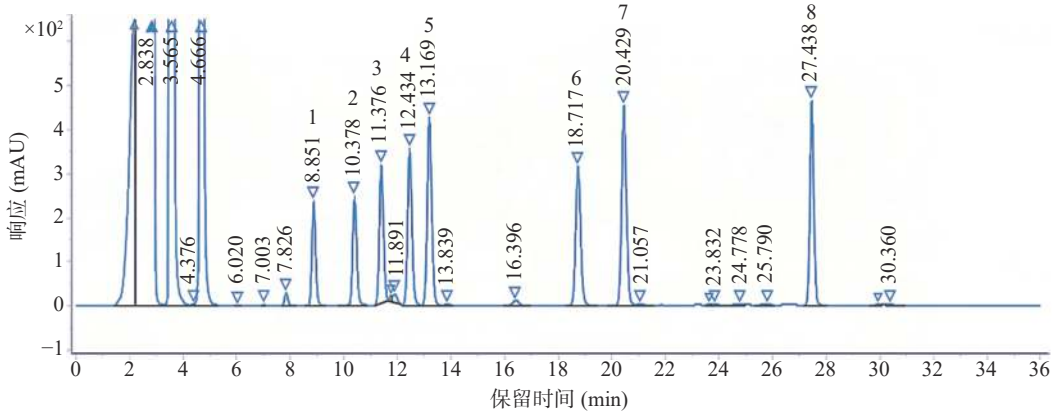


图 7 生物胺混合标准品的 HPLC 色谱图

Fig.7 HPLC chromatogram of biogenic amines mixed standards

注：1-色胺；2-苯乙胺；3-腐胺；4-尸胺；5-组胺；6-略胺；7-亚精胺；8-精胺。

表 2　生物胺的回归方程和决定系数

Table 2　Regression equations and determination coefficients for biogenic amines

生物胺	出峰时间(min)	回归方程	R^2
色胺	8.85	y=22.697x−19.516	0.9999
苯乙胺	10.38	y=24.910x+11.043	0.9998
腐胺	11.38	y=34.063x+103.03	0.9998
尸胺	12.43	y=40.219x+10.992	0.9998
组胺	13.17	y=50.132x−17.824	0.9999
酪胺	18.72	y=40.476x+6.2351	0.9998
亚精胺	20.43	y=56.017x−17.544	0.9999
精胺	27.44	y=45.121x+6.3264	0.9999

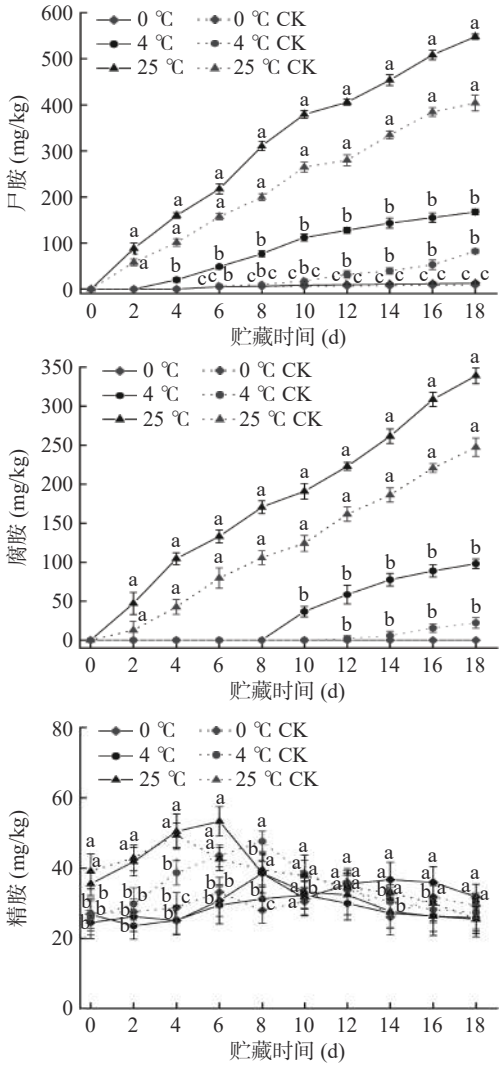


图 8　贮藏温度对冷鲜肉尸胺、腐胺、精胺含量的影响

Fig.8　Effect of storage temperature on the content of cadaverine, putrescine and spermine in chilled meat

含量在 0、4 和 25 ℃ 条件下分别达到 12.96、167.72、547.90 mg/kg，不同贮藏温度下尸胺含量显著增加（P<0.05）。腐胺含量的变化与尸胺含量变化趋势一致，随时间的延长呈上升趋势。接种微生物样品在贮藏温度为 25 ℃ 时，腐胺的含量第 2 d 达到 47.14 mg/kg，而温度为 4 ℃ 时，则第 10 d 才检测到腐胺，为 36.75 mg/kg。当贮藏结束时，接种微生物样品腐胺含量在 4、25 ℃ 条件下分别达到 98.20、338.95 mg/kg，具有显著性差异（P<0.05）。温度为 0 ℃ 时，由于贮藏温度较低未检测到腐胺。与对照相比，接种微生物样品中腐胺含量相对较高。精胺含量随着贮藏天数增加呈先增高后降低的变化趋势，整体都在 20~60 mg/kg 之间变化。研究表明精胺是新鲜肉中天然存在的生物胺，与肉品的腐败变质无关[37]，且不同贮藏温度下样品之间差异不显著（P>0.05），与杨春婷等[34] 研究相似。因此，精胺不能作为评价冷鲜肉新鲜度的指标。

2.6.3　生物胺含量（色胺、组胺、酪胺）的变化　腐胺、尸胺和酪胺是肉中腐败特征性生物胺，因此这三种胺常被用作评价肉类新鲜度的指标[38]。由图 9 可知，当贮藏温度为 25 ℃ 时，样品中色胺、组胺和酪胺含量随时间延长呈逐渐上升趋势。当贮藏结束时，接种微生物样品中色胺、组胺和酪胺含量分别为 73.58、88.20、158.45 mg/kg，而对照组的含量分别为 56.36、74.40、133.07 mg/kg，与对照相比，接种微生物样品中色胺、组胺和酪胺的含量显著增加（P<0.05）。通过对 8 种生物胺含量的检测发现，当贮藏温度为 0 ℃ 时，只检测到尸胺和精胺的含量；温度为 4 ℃ 时，只检测到尸胺、腐胺和精胺的含量；而温度为 25 ℃ 时，检测到了尸胺、腐胺、精胺、色胺、组胺和酪胺的含量，说明贮藏温度越低，越不容易产生生物胺，温度越高，冷鲜猪中生物胺的含量越高。

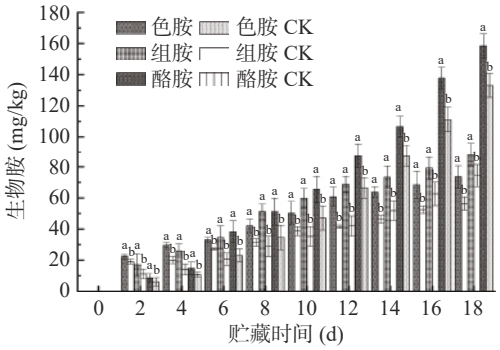


图 9　贮藏温度为 25 ℃ 条件下冷鲜肉色胺、组胺、酪胺含量的变化

Fig.9　Changes in tryptamine, histamine and tyramine contents of chilled meat at storage temperature of 25℃

注：小写字母不同表示 25 ℃ 条件下，同一贮藏时间接种组与对照组数值存在显著性差异（P<0.05）。

2.6.4　生物胺含量总量的变化　食品中的生物胺总量超过 1000 mg/kg 会对人体造成损害[39]。由图 10 可知，不同贮藏温度下冷鲜肉中生物胺总量的变化具有显著性差异，当贮藏温度为 25 ℃ 时，微生物接种的冷鲜肉在贮藏第 16 d 的生物胺总量超过 1000 mg/kg，其余在贮藏 18 d 内均低于 1000 mg/kg。与对照相比，接种微生物冷鲜肉中生物胺的含量相对较高，其接种微生物会加速肉质腐败。

2.7　各指标的相关性分析

皮尔逊积矩相关系数通常用来反映两个随机变量之间的相关密切程度。如表 3、表 4、表 5 所示，

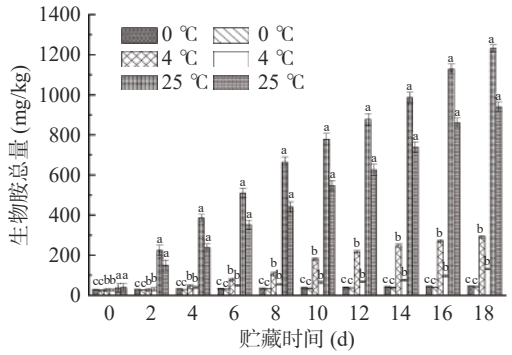


图 10 贮藏温度对冷鲜肉生物胺总量的影响

Fig.10 Effect of storage temperature on total biogenic amines in chilled meat

在不同贮藏温度下，冷鲜肉品质指标除水分含量、精胺和 b^*外的各项指标均呈极显著相关(P<0.01)，贮藏温度为 25 ℃ 条件下的 Pearson 相关系数较高，其相关性较强。其中，菌落总数、TVB-N、尸胺、腐胺、L^*和 a^*与各指标的相关系数均在 0.9 左右，色泽虽是冷鲜肉新鲜度的重要评价指标，但肉的腐败变质不能单凭色泽这一指标来评价，并且色泽在测定时因其主观性对结果的影响较大，还由于贮藏温度为 0 ℃ 和 4 ℃ 时，有些生物胺未能检测出来，且通过相关系数的大小综合得出菌落总数和 TVB-N 是冷鲜肉腐败变质的主要原因。因此，选择菌落总数和 TVB-N 为

表 3 贮藏温度为 0 ℃ 下冷鲜肉各指标的皮尔逊相关系数

Table 3 Pearson's correlation coefficients for each index of chilled meat at storage temperature of 0 ℃

指标	菌落总数	TVB-N	pH	水分含量	尸胺	精胺	L^*	a^*	b^*
菌落总数	1	0.968**	0.845**	−0.586	0.948**	0.709*	0.963**	0.960**	0.375
TVB-N		1	0.925**	−0.347	0.974**	0.734*	0.994**	0.988**	0.390
pH			1	−0.171	0.878**	0.512	0.807**	0.907**	0.673
水分含量				1	−0.363	−0.406	−0.405	−0.398	0.194
尸胺					1	0.735*	0.833**	0.842**	0.313
精胺						1	0.738*	0.695*	−0.135
L^*							1	0.840**	0.348
a^*								1	0.409
b^*									1

注：**表示在0.01水平显著相关，*表示在0.05水平显著相关；表4~表5同。

表 4 贮藏温度为 4 ℃ 下冷鲜肉各指标的皮尔逊相关系数

Table 4 Pearson's correlation coefficients of the indicators of chilled meat at a storage temperature of 4 ℃

指标	菌落总数	TVB-N	pH	水分含量	尸胺	精胺	腐胺	L^*	a^*	b^*
菌落总数	1	0.982**	0.785**	−0.496	0.951**	0.334	0.909**	0.939**	0.936**	0.606
TVB-N		1	0.873**	−0.382	0.975**	0.203	0.910**	0.981**	0.976**	0.715*
pH			1	0.029	0.894**	−0.038	0.911**	0.902**	0.915**	0.901**
水分含量				1	−0.253	−0.200	−0.063	−0.335	−0.249	−0.026
尸胺					1	0.267	0.906**	0.915**	0.939**	0.761*
精胺						1	−0.070	0.065	0.147	−0.330
腐胺							1	0.906**	0.921**	0.731*
L^*								1	0.863**	0.715*
a^*									1	0.712*
b^*										1

表 5 贮藏温度为 25 ℃ 下冷鲜肉各指标的皮尔逊相关系数

Table 5 Pearson's correlation coefficients of the indicators of chilled meat at a storage temperature of 25 ℃

指标	菌落总数	TVB-N	pH	水分含量	尸胺	精胺	腐胺	酪胺	组胺	色胺	L^*	a^*	b^*
菌落总数	1	0.974**	0.835**	−0.576	0.953**	−0.234	0.936**	0.697	0.840**	0.878**	0.929**	0.804**	0.716
TVB-N		1	0.899**	−0.406	0.988**	−0.601	0.969**	0.914**	0.988**	0.984**	0.972**	0.974**	0.784**
pH			1	−0.077	0.912**	−0.721*	0.856**	0.920**	0.921**	0.878**	0.912**	0.924**	0.913**
水分含量				1	−0.372	−0.235	−0.420	−0.322	−0.358	−0.368	−0.321	−0.300	0.071
尸胺					1	−0.688*	0.951**	0.921**	0.954**	0.941**	0.954**	0.950**	0.729*
精胺						1	−0.669	−0.765**	−0.689*	−0.639*	−0.727*	−0.705*	−0.736*
腐胺							1	0.913**	0.928**	0.902*	0.916**	0.926**	0.728*
酪胺								1	0.826**	0.852**	0.821**	0.834**	0.723*
组胺									1	0.872**	0.894**	0.871**	0.848**
色胺										1	0.733*	0.833**	0.842**
L^*											1	0.734*	0.732*
a^*												1	0.724*
b^*													1

关键指标来构建不同贮藏温度下冷鲜肉品质的预测模型。

2.8　BP 神经网络及 MFO 优化 BP 神经网络模型的建立

通过对各指标的相关性分析可知，菌落总数和 TVB-N 是构建冷鲜肉品质预测模型最重要的指标。利用 MATLAB 对 BP 神经网络及 MFO 算法优化 BP 神经网络进行训练建模，模型的建立包含两个输入层（贮藏温度和贮藏时间）和两个输出层（菌落总数、TVB-N 含量）。由于贮藏温度对冷鲜肉品质的影响较大，因此该模型的构建可以准确有效地预测不同贮藏温度下冷鲜肉品质的变化规律。将冷鲜肉在 0、4 和 25 ℃ 贮藏过程中菌落总数和 TVB-N 含量变化的实验数据分别输入 BP 神经网络和 MFO 优化 BP 神经网络进行训练。结果如图 11 和图 12 所示，模型训练结果表明，与 BP 神经网络相比，MFO 优化 BP 神经网络模型在不同贮藏温度下冷鲜肉菌落总数和 TVB-N 的实际值更接近预测值，且通过 MFO 优化后的预测结果更好。

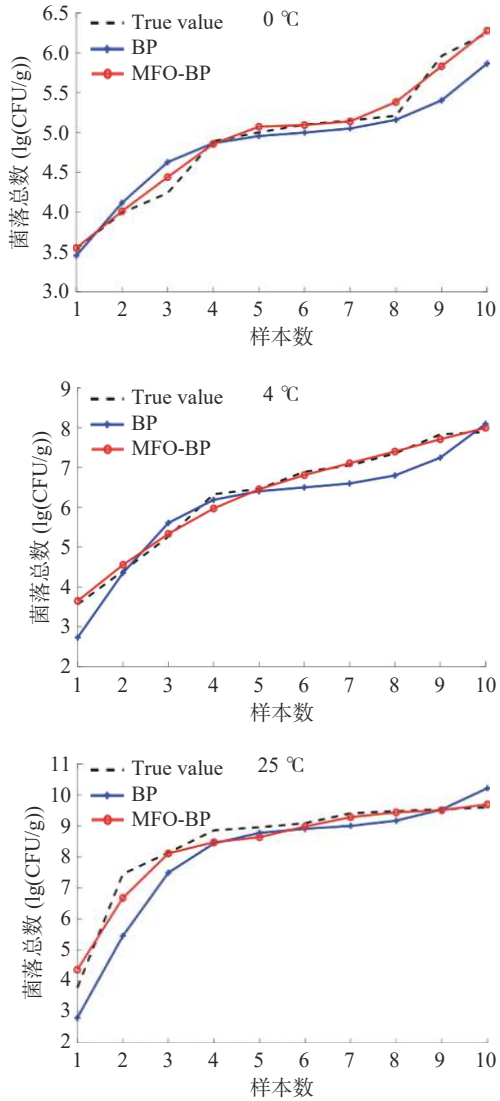


图 11　菌落总数实际值和模型预测值的对比结果

Fig.11　Comparison of the actual values of total colony count and the predicted values of the model

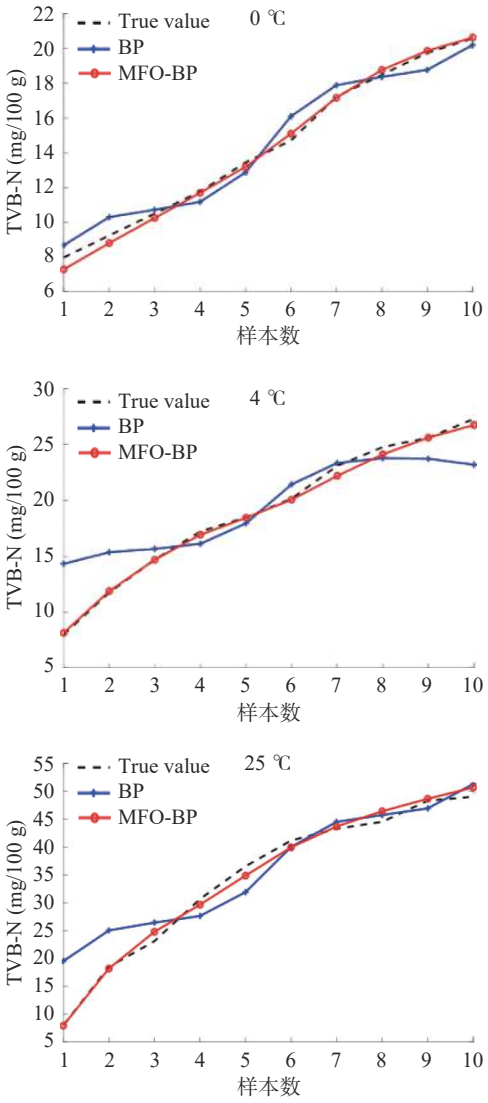


图 12　TVB-N 实际值和模型预测值的对比结果

Fig.12　Comparison results between actual TVB-N values and model predictions

通过 BP 神经网络训练，如图 13 所示，指标菌落总数在整个训练集、测试集和验证集的相关系数分别为 0.95576、0.92574 和 0.9402，而通过 MFO 优化 BP 神经网络训练后，整个训练集、测试集和验证集的相关系数分别为 0.97539、0.98036 和 0.9587，总体得出，MFO 优化 BP 神经网络训练后的 *R* 值更接近于 1，表明模型拟合效果更好。同理，从图 14 可以看出，指标 TVB-N 在整个训练过程中，MFO 优化 BP 神经网络训练后的训练集、测试集和验证集的 R 值均高于 BP 神经网络训练后的 *R* 值，其拟合效果更好。结果表明，建立的 BP 神经网络模型不存在欠拟合状态[13]，且通过 MFO 优化 BP 神经网络训练后的模型与实验数据拟合度更高，其拟合效果更好，并具有更好的准确性和稳定性。

2.9　BP 神经网络及 MFO-BP 神经网络模型的验证

为进一步比较两个模型的准确性和拟合效果，采用均方根误差（Root Mean Squared Error, RMSE）、均方误差（Mean Squared Error, MSE）、平均绝对误

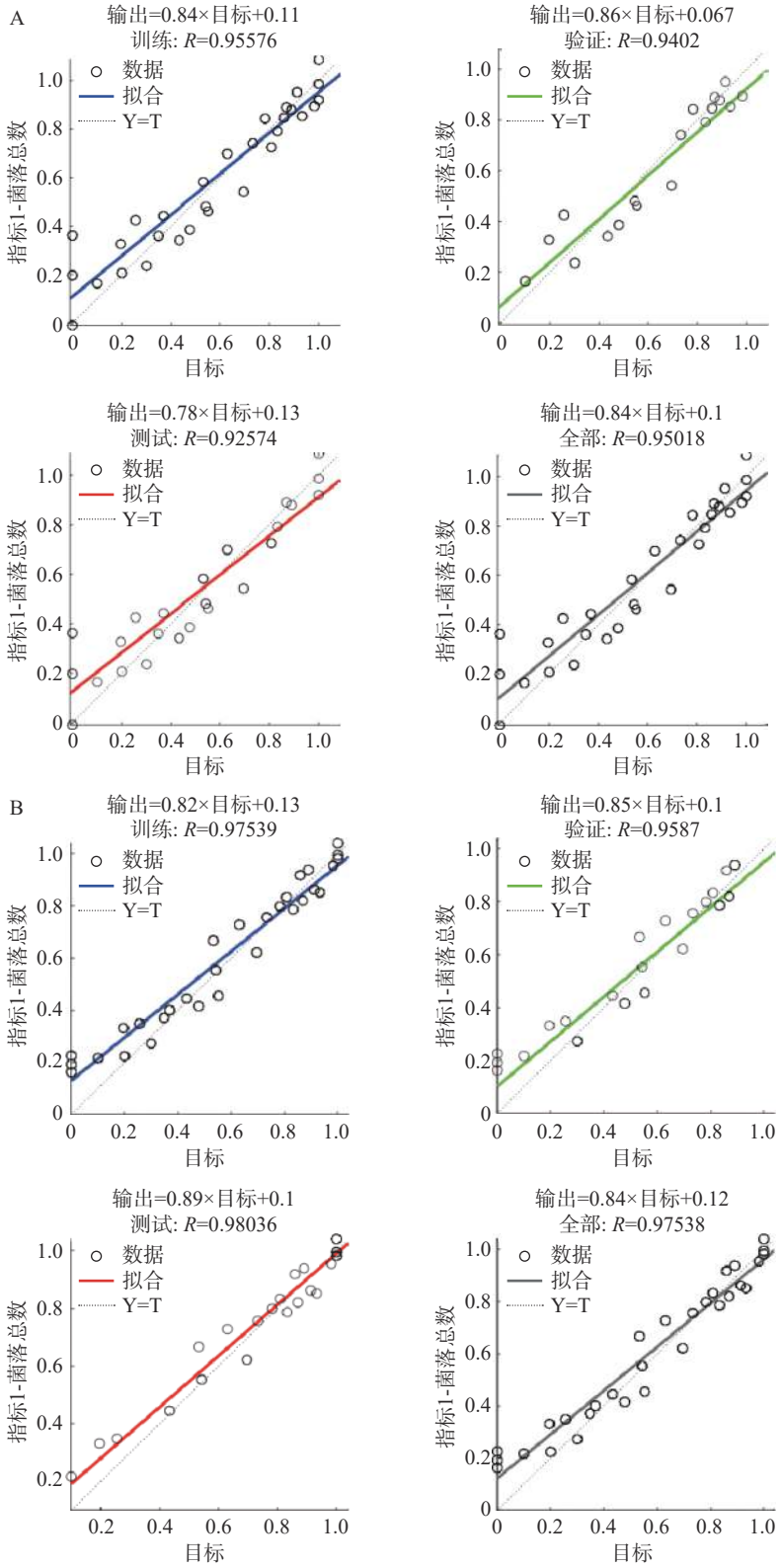


图 13　菌落总数的 BP 神经网络及 MFO 优化 BP 神经网络模型的训练及拟合结果

Fig.13　Training and fitting results of BP neural network and MFO optimised BP neural network model for colony counts

注: A 为 BP 神经网络模型的训练及拟合结果, B 为 MFO-BP 神经网络模型的训练及拟合结果; 图 14 同。

差（Mean Absolute Error, MAE）对模型进行验证[40−41]。RMSE 是表示预测值与真实值之间的平均偏差程度, RMSE 越小, 模型预测越准确。MSE 是参数估计值与真值之差平方的期望值, MSE 的值越小, 说明预测更精确。MAE 即误差绝对值的平均值, 可以准确反映实际预测误差的大小, 评估真实值和预测值的偏离程度, MAE 值越小, 说明模型质量越好, 预测越准确。从表 6 和表 7 中可以看出, 在不同贮藏温度下, MFO 算法优化 BP 神经网络训练的 RMSE、MSE 和 MAE 值与 BP 神经网络模型相比相对较小, 其模型拟合度更好, 模型更准确。由于单一的 BP 神经网络是随机初始权值和阈值的, 通过

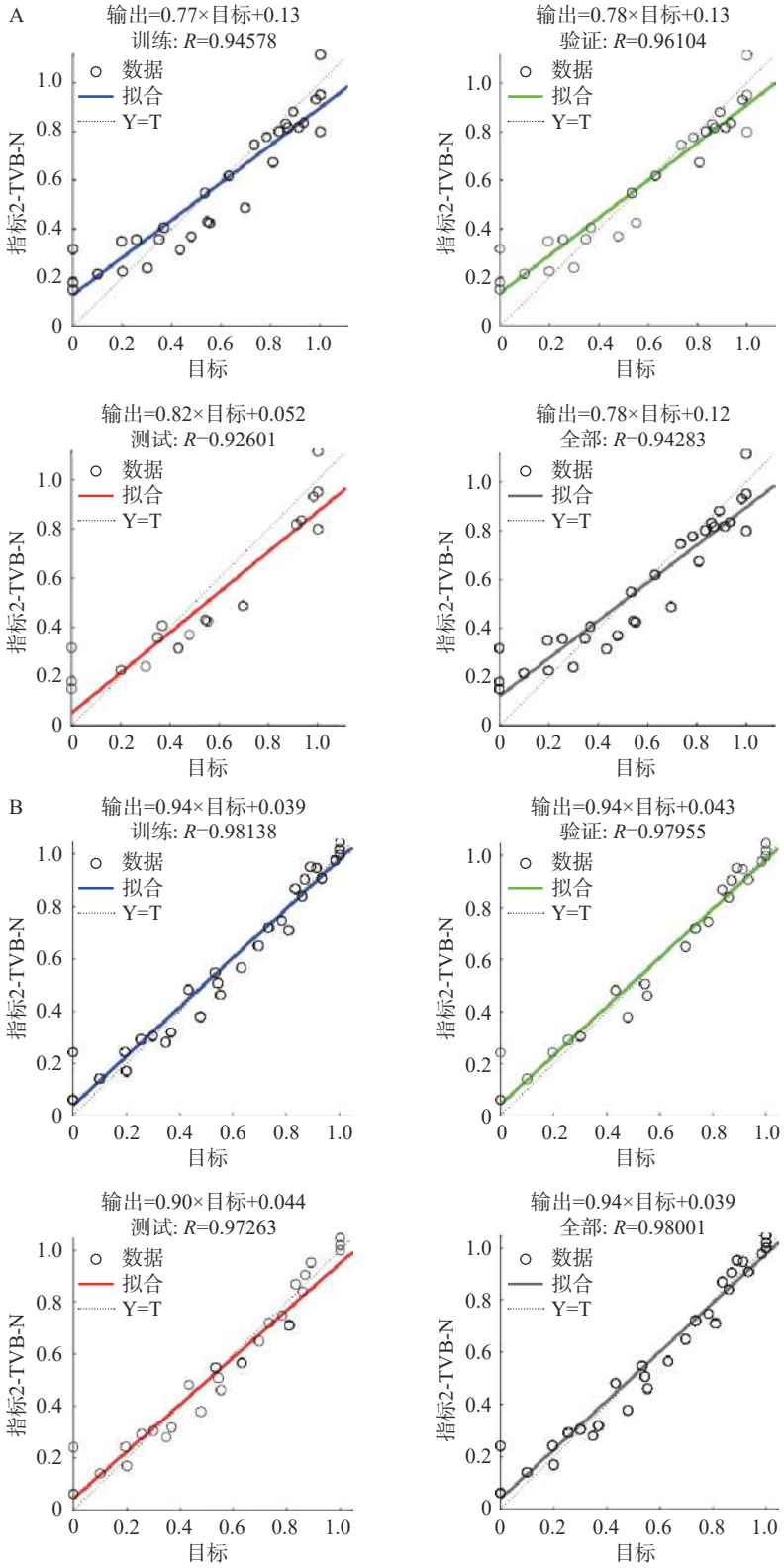


图 14　TVB-N 的 BP 神经网络及 MFO 优化 BP 神经网络模型的训练及拟合结果

Fig.14　Training and fitting results of BP neural network and MFO optimised BP neural network model for TVB-N

表 6　菌落总数的 BP 神经网络及 MFO 优化 BP 神经网络模型的评价

Table 6　Evaluation of BP neural network and MFO optimised BP neural network models for colony counts

预测模型	模型的评价/误差								
	0 ℃ RMSE	0 ℃ MSE	0 ℃ MAE	4 ℃ RMSE	4 ℃ MSE	4 ℃ MAE	25 ℃ RMSE	25 ℃ MSE	25 ℃ MAE
BP神经网络	0.2564	0.0658	0.1865	0.4337	0.1881	0.3606	0.7893	0.6230	0.5738
MFO-BP神经网络	0.0969	0.0094	0.0683	0.1432	0.0205	0.1100	0.3499	0.1224	0.2478

表 7 TVB-N 的 BP 神经网络及 MFO 优化 BP 神经网络模型的评价

Table 7 Evaluation of BP neural network and MFO optimised BP neural network models for TVB-N

预测模型	模型的评价/误差								
	0 ℃ RMSE	0 ℃ MSE	0 ℃ MAE	4 ℃ RMSE	4 ℃ MSE	4 ℃ MAE	25 ℃ RMSE	25 ℃ MSE	25 ℃ MAE
BP神经网络	0.7628	0.5818	0.6669	2.8053	7.8696	2.1054	4.7867	22.9122	3.6359
MFO-BP神经网络	0.3241	0.1050	0.2605	0.4095	0.1677	0.2799	1.2210	1.4908	1.0242

MFO 算法优化 BP 神经网络可以找到网络最佳的权值和阈值，模型预测会更加准确。综上所述，MFO 算法优化 BP 神经网络优于单一的 BP 神经网络模型，在不同贮藏温度下冷鲜肉菌落总数和 TVB-N 的实际值更接近预测值，在整个贮藏期内具有更好的预测性能，且预测精度相对较高。因此，MFO 算法优化 BP 神经网络可用于预测冷鲜肉在贮藏过程中品质的变化规律。

3 结论

通过研究不同贮藏温度（0、4 和 25 ℃）下冷鲜肉品质的变化规律。结果表明，不同贮藏温度下冷鲜肉的菌落总数、pH、TVB-N、色泽和生物胺含量变化速率不一致，且温度越高，冷鲜肉变质越快。通过分析利用特征指标菌落总数和 TVB-N 为训练数据，基于 BP 神经网络和 MFO 优化 BP 神经网络构建不同贮藏温度下冷鲜肉品质的预测模型。结果显示，MFO 优化 BP 神经网络的预测结果要优于单一的 BP 神经网络模型，指标菌落总数和 TVB-N 通过 MFO 算法优化训练后的 R 值更接近于 1，且优化后的 RMSE、MSE 和 MAE 值相对较小，其模型拟合度更好，准确率更高。因此，MFO 优化 BP 神经网络可用于预测冷鲜肉在贮藏过程中品质的变化规律，是一种较为理想的预测模型。

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

参考文献

[1] NOORI S, ZEYNALI F, ALMASI H. Antimicrobial and antioxidant efficiency of nanoemulsion-based edible coating containing ginger (*Zingiber officinale*) essential oil and its effect on safety and quality attributes of chicken breast fillets[J]. Food Control, 2018, 84: 312−320.

[2] KATIYO W, DE KOCK H L, COOREY R, et al. Sensory implications of chicken meat spoilage in relation to microbial and physicochemical characteristics during refrigerated storage[J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 128: 109468.

[3] 王辉, 庄子通, 曾晓房, 等. 鸽肉贮藏品质变化和货架期预测模型[J]. 安徽农业科学, 2023, 51(14): 185−188,224. [WANG Hui, ZHUANG Zitong, ZENG Xiaofang, et al. Storage quality changes and shelf life prediction model of pigeon meat[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2023, 51(14): 185−188,224.]

[4] 牛耀星, 王霆, 毕阳, 等. 温度对金针菇贮藏品质的影响及货架期的预测模型[J]. 食品科学, 2021, 42(1): 264−271. [NIU Yaoxing, WANG Ting, BI Yang, et al. Effect of storage temperature on the quality of *Flammulina velutipes* and shelf life predictive modeling[J]. Food Science, 2021, 42(1): 264−271.]

[5] 段依梦, 宋玉, 曹磊, 等. 温度对高水分稻谷储藏品质的影响及其预测模型研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(19): 304−308, 326. [DUAN Yimeng, SONG Yu, CAO Lei, et al. Effect of temperature on storage quality of high-moisture paddy and lts prediction model[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(19): 304−308, 326.]

[6] 林梓杰, 董庆利. 机器学习在肉类微生物安全中的应用研究进展[J]. 肉类研究, 2022, 36(11): 36−41. [LIN Zijie, DONG Qingli. Progress in application of machine learning in meat microbial safety[J]. Meat research, 2022, 36(11): 36−41.]

[7] ZARRA T, GALANG M G, JR F B, et al. Environmental odour management by artificial neural network-A review[J]. Environment International, 2019, 133(2): 105189.

[8] LOGIST F, HOUSKA B, DIEHL M, et al. Robust multi-objective optimal control of uncertain (bio)chemical processes[J]. Chemical Engineering Science, 2011, 66(20): 4670−4682.

[9] 于佰文, 薛鹏, 姜长泓, 等. 冷蠕成形系统飞蛾火焰算法的优化控制[J]. 现代电子技术, 2020, 43(19): 88−93. [YU Baiwen, XUE Peng, JIANG Changhong, et al. Optimal control of moth-flame algorithm for cold extrusion forming system[J]. Modern Electronic Technology, 2020, 43(19): 88−93.]

[10] TAKAHASHI M B, OLIVEIRA H D, NUNEZ E F, et al. Brewing process optimization by artificial neural network and evolutionary algorithm approach[J]. Journal of Food Process Engineering, 2019, 42(5): 131031.

[11] HAJEH M, BARKHORDAR A. Modelling of solid-phase tea waste extraction for the removal of manganese from food samples by using artificial neural network approach[J]. Food Chemistry, 2013, 141(2): 712−717.

[12] FU Z T, ZHAO S, ZHANG X S, et al. Quality characteristics analysis and remaining shelf life prediction of fresh Tibetan tricholoma matsutake under modified atmosphere packaging in cold chain[J]. Foods, 2019, 8: 136−150.

[13] ZHU N, WANG K, ZHANG S L, et al. Application of artificial neural networks to predict multiple quality of dry-cured ham based on protein degradation[J]. Food Chemistry, 2020, 344(12): 128586.

[14] 范志文, 光翠娥, 干建平. 基于反向传播人工神经网络的酱牛肉中金黄色葡萄球菌的生长模型[J]. 食品与生物技术学报, 2020, 39(7): 83−90. [FAN Zhiwen, GUNAG Cuie, GAN Jianping. Growth model of *Staphylococcus aureus* in sauced beef based on the back propagation artificial neural network[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2020, 39(7): 83−90.]

[15] ALGHOONEH A, ALIZADEH BEHBAHANI B, NOORBAKHSH H, et al. Application of intelligent modeling to predict the population dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* in Frankfurter sausage containing *Satureja bachtiarica* extracts[J]. Microbial Pathogenesis, 2015, 85: 58−65.

[16] GOSUKONDA R, MAHAPATRA A K, LIU X, et al. Application of artificial neural network to predict *Escherichia coli* O157: H7 inactivation on beef surfaces[J]. Food Control, 2015, 47: 606−614.

［17］张莉，孙佳宁，朱明睿，等. 解冻方式对羊肉品质及微观结构的影响［J］. 核农学报，2022，36(8)：1607−1617. ［ZHANG Li, SUN Jianing, ZHU Mingrui, et al. Effects of thawing methods on quality and microstructure of frozen mutton［J］. Acta Agriculturae Nucleatae Sinica, 2022, 36(8): 1607−1617.］
［18］段雨帆，钟媛媛，肖愈，等. 一株具有降生物胺能力葡萄球菌的筛选及其降解特性［J］. 现代食品科技，2023，39(10)：104−112. ［DUAN Yufan, ZHONG Aiai, XIAO Yu, et al. Selection of a biogenic amine-degrading *Staphylococcus* strain and evaluation of lts degradation properties［J］. Modern Food Science & Technology, 2023, 39(10): 104−112.］
［19］SUN Y F, CHANG H T, MIAO Z J. Research on BP neural network model for water demand forecasting and its application［J］. Applied Mechanics & Materials, 2012, 170: 2352−2355.
［20］刘文. 不同贮藏环境下冷鲜猪肉微生物及品质预测模型构建［D］. 武汉：武汉轻工大学，2021. ［LIU Wen. Establishment of microbial and quality prediction model for chilled fresh pork in different storage environments［D］. Wuhan: Wuhan Polytechnic University, 2021.］
［21］林建城，方静，吕田星，等. 不同温度贮藏对黄鳍鲷鱼肉鲜度与品质的影响［J］. 食品研究与开发，2022，43(24)：102−109. ［LIN Jiancheng, FANG Jing, LÜ Tianxing, et al. Effects of storage temperature on the freshness and quality of Yellowfin Seabream *Acanthopagrus latus*［J］. Food Research and Development, 2022, 43(24): 102−109.］
［22］靳玉龙，白婷，刘变芳，等. 冷鲜猪肉中细菌总数 Gompertz 生长预测模型的建立［J］. 肉类工业，2016(5)：22−25. ［JIN Yulong, BAI Ting, LIU Bianfang, et al. Construction of Gompertz growth predictive model of total bacterial count in chilled pork［J］. Meat Industry, 2016(5): 22−25.］
［23］WEN X, LIANG C, ZHANG D, et al. Effects of hot or cold boning on the freshness and bacterial community changes of lamb cuts during chilled storage［J］. LWT, 2022, 170: 114063.
［24］徐慧文，谢晶，汤元睿，等. 冰藏和冷藏条件下金枪鱼品质变化的研究［J］. 食品工业科技，2014，35(13)：321−326. ［XU Huiwen, XIE Jing, TANG Yuanrui, et al. Study on the quality changes of tuna at ice and refrigerated storage［J］. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(13): 321−326.］
［25］SAUVALA M, JOHANSSON P, BJORKROTH J, et al. Microbiological quality and safety of vacuum-packaged white-tailed deer meat stored at 4 ℃［J］. International Journal of Food Microbiology, 2023, 390: 110110.
［26］JASPAL M H, BADAR I H, AMJAD O B, et al. Effect of wet aging on color stability, tenderness, and sensory attributes of *Longissimus lumborum* and *Gluteus medius* muscles from water buffalo bulls［J］. Animals, 2021, 11(8): 2248.
［27］张家源，张洪才，陈舜胜. 鱼精蛋白复配保鲜剂对南美白对虾的保鲜效果［J］. 食品与发酵工业，2020，46(2)：142−149. ［ZHANG Jiayuan, ZHANG Hongcai, CHEN Shunsheng. Study on the fresh-keeping effect of protamine complex preservative on *Penaeus vannamei*［J］. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(2): 142−149.］
［28］顾赛麒，赵勇，谢晶，等. 冷却肉新鲜度变化研究［J］. 食品工业科技，2010，31(1)：102−104. ［GU Saiqi, ZHAO Yong, XIE Jing, et al. Research on the freshness variation of cooled pork［J］. Science and Technology of Food Industry, 2010, 31(1): 102−104.］
［29］李迎楠，刘文营，贾晓云，等. 杀菌温度对清酱肉色泽和风味品质的影响［J］. 肉类研究，2017，31(5)：34−40. ［LI Yingnan, LIU Wenying, JIA Xiaoyun, et al. Effect of sterilization temperature on color and flavor properties of pickled sauced meat［J］. Meat Research, 2017, 31(5): 34−40.］
［30］KONO S, KON M, ARAKI T, et al. Effects of relationships among freezing rate, ice crystal size and color on surface color of frozen salmon fillet［J］. Journal of Food Engineering, 2017, 214: 158−165.
［31］苑闪闪，卢素芳，雷跃磊，等. 不同贮藏温度鳜鱼片品质变化规律［J］. 肉类研究，2023，37(1)：26−30. ［YUAN Shanshan, LU Sufang, LEI Yuelei, et al. Quality changes of mandarin fish fillets under different temperature storage conditions［J］. Meat Research, 2023, 37(1): 26−30.］
［32］ZHUANG Shuai, LI Yan, JIA Shiliang, et al. Effects of pomegranate peel extract on quality and microbiota composition of bighead carp (*Aristichthys nobilis*) fillets during chilled storage［J］. Food Microbiology, 2019, 82: 445−454.
［33］钟萍，陈鲜丽，罗威，等. 不同贮藏温度对鱼肉嫩度和菌落总数的影响研究［J］. 食品研究与开发，2021，42(7)：45−49. ［ZHONG Ping, CHEN Xianli, LUO Wei, et al. Effects of different storage temperature on tenderness and total number of bacterial colonies of fish［J］. Food Research and Development, 2021, 42(7): 45−49.］
［34］杨春婷，赵晓娟，白卫东. 肉类中的生物胺形成及其在肉类新鲜度评价中的应用研究进展［J］. 肉类研究，2017，31(1)：55−59. ［YANG Chunting, ZHAO Xiaojuan, BAI Weidong, et al. Formation of biogenic amines during meat storage and their application in assessment of meat freshness［J］. Meat Research, 2017, 31(1): 55−59.］
［35］TONG R X, PANSS, PAN L Q, et al. Effects of biogenic amines on the immune response and immunoregulation mechanism in hemocytes of *Litopenaeus vannamei in vitro*［J］. Mol Immunol, 2020, 128: 1−9.
［36］SHUKLA S, LEE J S, BAJPAI V K, et al. Toxicological evaluation of lotus, ginkgo, and garlic tailored fermented Korean soybean paste (Doenjang) for biogenic amines, aflatoxins, and microbial hazards［J］. Food Chem Toxicol, 2019, 133: 133110729.
［37］李苗云，张秋会，高晓平，等. 冷却猪肉贮藏过程中腐败品质指标的关系研究［J］. 食品与发酵工业，2008(7)：168−171. ［LI Miaoyuan, ZHANG Qiuhui, GAO xiaoping, et al. Study on the relationship of spoilage quality lndexes of chilled pork during storage［J］. Food and Fermentation Industries, 2008(7): 168−171.］
［38］杨春婷. 基于生物胺的冷鲜猪肉新鲜度评价方法及腐胺传感器研究［D］. 广州：仲恺农业工程学院，2019. ［YANG Chunting. Evaluation method of fresh pork freshness based on biogenic amine and research on putrescine sensor［D］. Guangzhou: Zhongkai University of Agriculture and Engineering, 2019.］
［39］胡鹏，刘叶飞，李福元. 高效液相色谱法测定腊肉中生物胺含量［J］. 现代食品，2022，28(3)：167−170,183. ［HU Peng, LIU Yefei, LI Fuyuan. Determination of biogenic amines in bacon by HPLC［J］. Modern Food, 2022, 28(3): 167−170,183.］
［40］ZHU H, YE Y, HE H, et al. Evaluation of green tea sensory quality via process characteristics and image information［J］. Food and Bioproducts Processing, 2017, 102: 116−122.
［41］牛会敏. 冷却猪肉假单胞菌生长模型比较分析及货架期模型建立［D］. 郑州：河南农业大学，2012. ［NIU Huimin. Comparison of kinetic models fitting *Pseudomonas* and the study of the shelf life of chilled pork［D］. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2012.］

韩舒婷, 华梓延, 房耀维, 等. 嗜热链球菌 FUA329 发酵绿茶浸提液及贮藏特性评价 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 322−328. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024010001
HAN Shuting, HUA Ziyan, FANG Yaowei, et al. Fermentation of Green Tea Extract by *Streptococcus thermophilus* FUA329 and Evaluation of Storage Characteristics[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 322−328. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024010001

·贮运保鲜·

嗜热链球菌 FUA329 发酵绿茶浸提液及贮藏特性评价

韩舒婷[1], 华梓延[1], 房耀维[1], 杨　光[1], 侯晓月[1], 周文梅[2], 唐　明[1], 刘　姝[1,*]
(1.江苏海洋大学海洋食品与生物工程学院, 江苏连云港 222005;
2.连云港市食品药品检验检测中心, 江苏连云港 222005)

摘　要: 为了评价嗜热链球菌发酵对绿茶浸提液及其贮藏特性的影响，本研究利用嗜热链球菌 *Streptococcus thermophilus* FUA329 和嗜热链球菌 *S. thermophilus* ST1.8748（对照组）分别对绿茶浸提液进行发酵，在 4 ℃ 贮藏 0、30、60、120 和 180 d 后，以 pH、活菌数、茶多酚含量、鞣花酸含量、尿石素 A 含量为主要评价指标，结合抗氧化活性，对发酵绿茶浸提液的贮藏品质进行评价。结果表明，相比 *S. thermophilus* ST1.8748 对照组，贮藏期内 *S. thermophilus* FUA329 发酵绿茶浸提液的 pH 在 5.39~5.71 之间；活菌数在 48 h 时最高为 9.97×10^8 CFU/mL；茶多酚含量逐渐降低；鞣花酸含量趋于稳定状态；尿石素 A 在 48 h 时产生，其浓度为 0.664 μmol/L；抗氧化活性始终维持在较高水平。综上所述，*S. thermophilus* FUA329 发酵绿茶浸提液，可以显著延缓绿茶浸提液贮藏过程中品质下降和营养成分损失。

关键词: 绿茶, 嗜热链球菌 FUA329, 尿石素 A, 抗氧化活性, 贮藏特性
中图分类号: TS255.1　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2024)21−0322−07
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024010001
本文网刊:

Fermentation of Green Tea Extract by *Streptococcus thermophilus* FUA329 and Evaluation of Storage Characteristics

HAN Shuting[1], HUA Ziyan[1], FANG Yaowei[1], YANG Guang[1], HOU Xiaoyue[1], ZHOU Wenmei[2], TANG Ming[1], LIU Shu[1,*]
(1.College of Ocean Food and Biochemical Engineering, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China;
2.Lianyungang Food and Drug Inspection and Testing Center, Lianyungang 222005, China)

Abstract: In order to evaluate the effect of *Streptococcus thermophilus* fermentation on green tea extract and its storage characteristics, this study used *Streptococcus thermophilus* FUA329 and *S. thermophilus* ST1.8748 (control group) to conduct experiments on green tea extracts. After fermentation and storage at 4 ℃ for 0, 30, 60, 120 and 180 d, pH, viable bacterial count, tea polyphenol content, ellagic acid content, and urolithin A content were used as the main evaluation indicators, combined with anti-oxidation activity to evaluate the storage quality of fermented green tea extract. The results showed that compared with the *S. thermophilus* ST1.8748 control group, the pH of *S. thermophilus* FUA329 fermented green tea extract during the storage period was between 5.39 and 5.71. The highest number of viable bacteria at 48 h was 9.97×10^8 CFU/mL. The content of tea polyphenols gradually decreased and the ellagic acid content tended to be stable. Urolithin A was produced at 48 h, and its concentration was 0.664 μmol/L. The antioxidant activity was always maintained

收稿日期: 2024−01−01
基金项目: 国家自然科学基金（32102270）; 江苏省高等学校重点自然科学基金（20KJA550001）; 江苏省“333”高层次人才培养工程; 江苏省海洋生物资源与环境重点实验室开放基金（SH20191204）; 江苏省研究生科研实践创新计划（KYCX2023_127）; 江苏省大学生创新创业训练计划（SY202311641638001）。
作者简介: 韩舒婷（1999−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 功能性益生菌资源的开发及应用, E-mail: hanshuting777@163.com。
*** 通信作者:** 刘姝（1978−）, 女, 博士, 教授, 研究方向: 功能性益生菌资源的开发及应用, E-mail: jdliushu@163.com。

at a high level. In summary, *S. thermophilus* FUA329 fermented green tea extract can significantly delay the quality decline and nutrient loss of green tea extract during storage.

Key words: green tea; *Streptococcus thermophilus* FUA329; urolithin A; antioxidant activity; storage characteristics

绿茶（green tea）以其鲜爽的品质和优异的健康功效，深受国内外消费者喜爱，是我国生产量与消费量最高的茶类[1−3]。2022 年，我国绿茶产量 185.38 万吨，中国绿茶内销量 131.1 万吨，其中出口 31.29 万吨[4]。绿茶中的多种多酚类化合物，通常被称为茶多酚（tea polyphenols, TP）[5]。茶多酚具备多种生物活性，如抗氧化[6]、抗癌[7]、预防龋齿[8]、降低血脂、预防心血管疾病[9] 等。鞣花酸（ellagic acid, EA）是绿茶中富含的一种天然多酚，主要以其缩合形式鞣花单宁（ellagitannin, ET）存在。由于鞣花酸溶解度低，导致其生物可利用率较低。人类的肠道微生物群可以将鞣花酸转化为尿石素类物质，主要包括尿石素 A（urolithin A, UA）、尿石素 B（urolithin B, UB）和尿石素 C（urolithin C, UC）[10]。尿石素比鞣花酸更容易吸收，特别是尿石素 A 具有如防止肌肉衰退[11]、抗癌[12]、抗氧化[13]、抗炎[14]、抗脑老化[15]、抗肥胖[16] 等多种生物活性。但是，不同人群肠道微生物转化鞣花酸生成尿石素的能力不同，仅有约 40% 的 30 岁以上的人具有转化鞣花酸生成尿石素 A 的能力[17]，且随着年龄的增长，比例逐年下降。因此，有关公司开发了化工合成的尿石素 A 作为营养补充剂，受到人们的青睐。如果筛选得到转化鞣花酸生成尿石素 A 的菌株，则可以利用微生物发酵制备尿石素 A 弥补工业制备尿石素 A 产品具有副产物及危害环境的不足，也可以制备含有尿石素 A 的饮品如茶饮品，提高发酵茶饮品的保健功效。

另外，绿茶属于不发酵茶，耐贮性不佳，贮藏后容易颜色发暗、口感发涩，品质和营养成分严重降低，导致市场竞争力下降。而绿茶浸提液在贮藏的过程中，主要成分之间会发生氧化络合作用，导致其颜色变褐，并形成沉淀物使其变得浑浊，影响外观品质以及营养价值。因此，绿茶浸提液保鲜技术成为研究热点。绿茶浸提液的保鲜方法主要是通过优化生产工艺以及添加食品添加剂来保证其在贮藏期内的品质[18−19]。但是，大多方法都是采用单因子保鲜方法，各方法都有自己的优缺点，目前的保鲜方法尚未达到市场要求，因此需要开发新型保鲜技术。有研究发现乳酸菌（lactic acid bacteria, LAB）可以利用茶叶鲜叶、茶叶浸提液或茶叶副产物作为发酵底物，合成或降解多种活性成分，用来改善和形成茶叶产品的风味品质，提高产品的功能特性，提高茶叶底物生物转化的利用率，乳酸菌发酵有望成为绿茶浸提液保鲜技术之一[20]。但是，乳酸菌发酵茶叶浸提液用于茶叶浸提液保鲜的研究鲜有报道。如果利用转化鞣花酸生成尿石素 A 的乳酸菌对绿茶浸提液进行发酵，既可以将绿茶浸提液中的鞣花酸转化为尿石素 A，提升绿茶的保健功效，也有望提高绿茶浸提液的保质期，开发新型茶饮品，提升绿茶饮品的市场竞争力。

本研究组报道了源自人母乳的 *S. thermophilus* FUA329，该菌可体外发酵转化鞣花酸生成尿石素 A[21]。本文以绿茶浸提液为原料，利用菌株 *S. thermophilus* FUA329 对其进行发酵，以 *S. thermophilus* ST1.8748 为对照。发酵绿茶浸提液在 4 ℃ 贮藏后，对其 pH、活菌数、茶多酚含量、鞣花酸含量、尿石素 A 含量以及抗氧化活性进行测定，评价发酵绿茶浸提液贮藏过程中品质变化，旨在探讨微生物发酵绿茶新产品开发的可行性，从而为茶叶资源的有效利用和茶产业结构的优化提供科学依据。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

云雾茶　连云港市天源茶业有限公司；嗜热链球菌 *S. thermophilus* FUA329　本研究室保藏；嗜热链球菌 *S. thermophilus* ST1.8748　中国普通微生物菌种保藏管理中心；厌氧基础培养基（anaerobic basal broth, ABB）　上海瑞楚生物技术有限公司；茶多酚标准品、鞣花酸标准品、尿石素 A 标准品　美国 Sigma-Aldrich 公司；甲醇、甲酸、乙腈　色谱纯，上海阿拉丁生化技术公司；硫酸亚铁、酒石酸钾钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾　分析纯，国药集团化学试剂有限公司；DPPH 自由基清除能力试剂盒、ABTS 法总抗氧化能力试剂盒、羟自由基测定试剂盒　南京建成生物工程研究所。

LDZX-50L 立式高压蒸汽灭菌锅　上海申安医疗器械厂；SW-CJ-1FD 超净工作台　苏州市华宇净化设备有限公司；S210 数字 pH 计　瑞士梅特勒-托利多公司；GRX-9203A 微生物恒温培养箱　上海福玛实验设备有限公司；A20 厌氧工作站　英国 Don Whitley Scientific；A51119600DPC 全波长酶标仪　美国 Thermo Scientific 公司；1260 系列高效液相色谱仪　美国 Agilent 公司。

1.2　实验方法

1.2.1　菌株种子液制备　取−80 ℃ 甘油保藏的 *S. thermophilus* FUA329 进行活化，三区划线于 ABB 固体培养基，37 ℃ 倒置培养至长出单菌落，挑单菌落接种于 ABB 液体培养基，在厌氧工作站中 37 ℃ 厌氧发酵 48 h 后作为种子液备用，*S. thermophilus* ST1.8748 种子液制备同上。

1.2.2　绿茶浸提液制备与发酵　取 1 g 绿茶样品，按茶水比 1∶70，80 ℃，浸提 50 min，8 层纱布过滤，滤液过 0.22 μm 滤膜过滤除菌，得到绿茶浸提液。以 3%（V∶V）接种量分别将活化的 *S. thermophilus*

FUA329 菌液以及 *S. thermophilus* ST1.8748 接种至 50 mL 绿茶浸提液中，添加 3% 果葡糖浆，37 ℃ 厌氧培养 24、48、72 h[22]，得到发酵绿茶浸提液样品。

1.2.3 pH 测定 将发酵好的绿茶浸提液在 4 ℃ 下分别放置 0、30、60、120 和 180 d 后，采用 pH 计测定样品 pH。

1.2.4 嗜热链球菌活菌数的测定 嗜热链球菌活菌数测定参照 GB 4789.35-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验》进行。

1.2.5 茶多酚含量的测定 茶多酚含量的测定用酒石酸亚铁比色法[23]。在 25 mL 容量瓶中加入 5 mL 样品、4 mL 水和 5 mL 酒石酸亚铁溶液，混匀，用 pH7.5 磷酸缓冲液定容至 25 mL。按照上述相同步骤，用 5 mL 水替换样品作为空白对照。使用酶标仪在 540 nm 波长下测定吸光值。结果基于茶多酚标准曲线校准表示。准确称取 0.05 g 茶多酚标准品，用纯净水溶解，定容至 10 mL，混匀。分别移取 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mL 至 25 mL 试管中，加水补至 10 mL，再加入 5 mL 酒石酸亚铁溶液，混匀后加入 pH7.5 磷酸缓冲液溶液至 25 mL，充分混合。将上述混合标准溶液在 540 nm 波长下测定吸光值。以吸光度值为纵坐标，茶多酚含量(μg/g)为横坐标，绘制标准曲线，作图得到茶多酚浓度(X)与吸光度值(Y)的线性回归曲线，回归方程为 Y=0.0094X−0.01，决定系数 R^2=0.999，表明线性关系良好。

1.2.6 高效液相色谱法测定鞣花酸以及尿石素 A 的含量 采用高效液相色谱(high performance liquid chromatography，HPLC)法，分析 *S. thermophilus* FUA329 绿茶浸提液发酵后样品的鞣花酸和尿石素 A 的含量。将 1 mL 样品混合有机溶剂(乙腈∶水∶甲酸=80∶19.9∶0.1，V∶V∶V)，然后通过 0.22 μm 的膜过滤器过滤到 HPLC 样品瓶中。色谱分析采用色谱纯乙腈(A 相)和含 1% 甲酸的水溶液(B 相)作为流动相，色谱柱型号为 ZORBAX SB-C_{18}(250×4.6 mm，5 μm，Agilent)，流速为 1 mL/min。柱温 35 ℃，进样体积 20 μL，采用梯度洗脱模式，具体梯度如下：0~15 min，20%~70% A；15~20 min，70%~95% A；20~21 min，95%~100% A；21~24 min，100%~20% A；24~25 min，20%~20% A。在 305 nm 进行色谱分析[24]。

1.2.7 抗氧化活性的测定

1.2.7.1 DPPH 自由基清除率的测定 采用南京建成生物工程研究所 DPPH 自由基清除能力试剂盒(A153-1-1)，步骤参考说明书测定样品 DPPH 自由基清除率。其原理为根据 DPPH 自由基有单电子，在 517 nm 处有强吸收，其醇溶液呈紫色的特性。自由基清除剂与其单电子配对而使其在 517 nm 的光吸收度降低，颜色变浅[25]。

1.2.7.2 ABTS 总抗氧化能力的测定 采用南京建成生物工程研究所 ABTS 法总抗氧化能力试剂盒(A015-2-1)，步骤参考说明书测定样品 ABTS 总抗氧化能力。其原理为体系中的氧化剂会将 ABTS 氧化成绿色的 $ABTS^{+\cdot}$，当存在抗氧化物时，会抑制 ABTS 的氧化，阻止 $ABTS^{+\cdot}$产生。$ABTS^{+\cdot}$在 734 nm 或 405 nm 的波长下会有强烈的吸收峰值，因此，测定吸光度即可直接计算出样品的总抗氧化能力[26]。选择 Trolox 作为参考，它是维生素 E 的类似物，其抗氧化能力与维生素 E 相近。

1.2.7.3 抑制羟自由基能力的测定 采用南京建成生物工程研究所羟自由基测定试剂盒(A018-1-1)，步骤参考说明书。其测定原理为 Fenton 反应是最常见的产生羟自由基的化学反应，H_2O_2 的量和 Fenton 反应产生的·OH 量成正比，当给予电子受体后，用 griess 试剂显色，形成红色物质，其呈色与·OH 的多少成正比关系[27]。

1.3 数据处理

所有实验均为 3 个重复，所有检验数据均以平均±标准差(SD)表示。采用 IBM SPSS Statistics 26 软件进行单因素方差分析(P<0.05)，使用 Origin 2021 软件对相关图像进行绘制。

2 结果与分析

2.1 发酵绿茶浸提液 pH 在贮藏期间的变化

将 *S. thermophilus* FUA329 和 *S. thermophilus* ST1.8748 发酵的绿茶浸提液 4 ℃ 贮藏 0、30、60、120 和 180 d 后，测得 *S. thermophilus* FUA329 发酵样品的 pH 在 5.39~5.71 之间；*S. thermophilus* ST1.8748 发酵样品的 pH 在 4.62~5.50 之间；未发酵样品的 pH 在 4.67~5.93 之间，结果如图 1 所示。随着贮藏时间的延长，*S. thermophilus* FUA329 和 *S. thermophilus* ST1.8748 发酵绿茶浸提液的 pH 均呈下降趋势。未发酵绿茶浸提液的 pH 在贮藏期内显著下降，*S. thermophilus* FUA329 比 *S. thermophilus* ST1.8748 发酵绿茶浸提液的 pH 高。上述 pH 测定结果表明，贮藏过程中，菌株代谢会产生少量有机酸，从而降低绿茶浸提液 pH，与 Ratchadaporn 等[28] 的

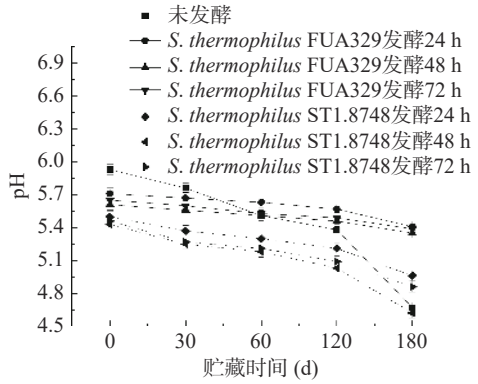


图 1 不同贮藏时间对发酵绿茶浸提液 pH 的影响

Fig.1 Effect of different storage time on pH of fermented green tea extracts

报道相似。贮藏 60 d 后，*S. thermophilus* FUA329 发酵绿茶浸提液的 pH 高于未发酵绿茶浸提液的 pH，分析可能是因为酸性环境的缓冲作用。在贮藏期间 *S. thermophilus* FUA329 发酵绿茶浸提液的 pH 变化最小，说明 *S. thermophilus* FUA329 发酵可以减缓绿茶浸提液在贮藏期间 pH 的变化。

2.2　发酵绿茶浸提液活菌数在贮藏期间的变化

将 *S. thermophilus* FUA329 和 *S. thermophilus* ST1.8748 发酵的绿茶浸提液 4 ℃ 贮藏 0、30、60、120 和 180 d 后，测定样品中活菌数的变化，结果如图 2 所示。*S. thermophilus* FUA329 发酵 48 h 时活菌数在贮藏期间于 30 d 后呈现明显的下降趋势，贮藏 60 d 后，其活菌数由 9.05×10^8 CFU/mL 下降到 7.23×10^8 CFU/mL，活菌数在贮藏 0 d 时最高值达到 9.97×10^8 CFU/mL；而 *S. thermophilus* ST1.8748 发酵 48 h 时活菌数也是如此，贮藏 60 d 后，其活菌数由 7.96×10^8 CFU/mL 下降到 6.14×10^8 CFU/mL，活菌数在贮藏 0 d 时最高值达到 8.97×10^8 CFU/mL。上述结果表明 *S. thermophilus* FUA329 比 *S. thermophilus* ST1.8748 发酵的绿茶活菌数更高，这可能是由于 *S. thermophilus* FUA329 对酸的耐受力更强[29]、生长更缓慢，而这是贮藏期内嗜热链球菌发酵绿茶浸提液能保持较高活菌数量的原因之一。发酵过程中随着贮藏时间的延长，绿茶浸提液中的酚类物质可以通过破坏细胞膜的结构来抑制乳酸菌的生长，导致活菌数减少[30]。

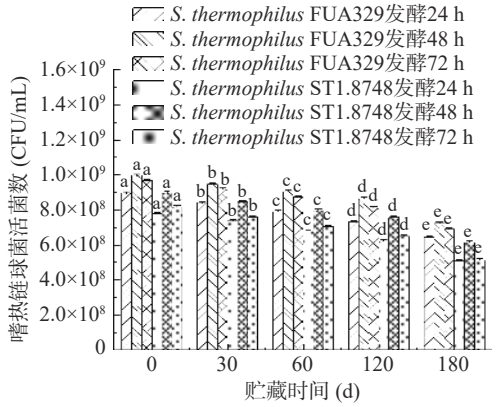


图 2　不同贮藏时间对发酵绿茶浸提液中活菌数的影响

Fig.2　Effect of different storage time on the number of viable bacteria in fermented green tea extracts

注：不同小写字母表示同一样品在不同贮藏时间的显著差异，$P<0.05$；图 5 同。

2.3　发酵绿茶浸提液中茶多酚含量在贮藏期间的变化

对不同贮藏天数的嗜热链球菌发酵绿茶浸提液进行茶多酚含量的测定，结果如图 3 所示。随着贮藏时间的延长，*S. thermophilus* FUA329 和 *S. thermophilus* ST1.8748 发酵绿茶浸提液中茶多酚含量均呈现逐渐降低趋势，*S. thermophilus* FUA329 比 *S. thermophilus* ST1.8748 发酵绿茶浸提液中茶多酚含量的降低趋势缓慢。茶多酚作为一类主要贡献苦涩味的物质[31]。在贮藏过程中变化较活跃，随着贮藏时间的增加其含量显著性降低。由于多酚类结构中存在酚性羟基，极易发生氧化、聚合等化学反应，使得多酚类物质在绿茶浸提液贮藏中更易氧化降解，与 Mirasoli 等[32] 和 Ananingsih 等[33] 的报道相似。贮藏后，与未发酵绿茶浸提液相比，发酵绿茶浸提液中茶多酚含量的减少量较小，其可能原因是在发酵过程中添加了果葡糖浆作为碳源，减少了茶多酚的消耗，最终导致茶多酚含量下降减缓。不同贮藏时间下，*S. thermophilus* FUA329 发酵绿茶浸提液中茶多酚含量的减少量最少，说明 *S. thermophilus* FUA329 发酵对绿茶浸提液中的茶多酚含量的减少有一定减缓作用。

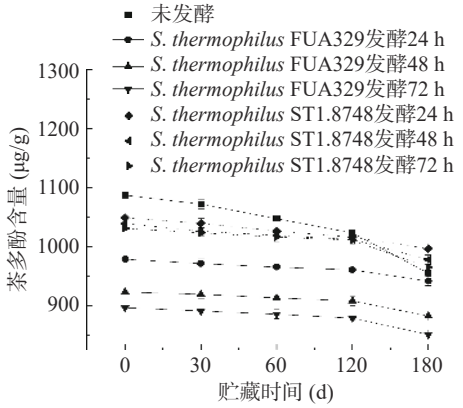


图 3　不同贮藏时间对发酵绿茶浸提液中茶多酚含量的影响

Fig.3　Effect of different storage time on the content of tea polyphenols in fermented green tea extracts

2.4　发酵绿茶浸提液中鞣花酸含量和尿石素 A 含量在贮藏期间的变化

对不同贮藏天数的嗜热链球菌发酵绿茶浸提液进行鞣花酸含量以及尿石素 A 含量的测定，结果如图 4 所示。绿茶浸提液发酵后相比于未发酵组，鞣花酸含量下降，*S. thermophilus* FUA329 和 *S. thermophilus* ST1.8748 发酵绿茶浸提液中鞣花酸含量均随着贮藏时间的延长，呈现逐渐降低趋势。与未发酵绿茶浸提液组相比，*S. thermophilus* FUA329 发酵绿茶浸提液中鞣花酸含量降低的趋势更缓慢。经 HPLC 分析发现，只有 *S. thermophilus* FUA329 发酵的绿茶浸提液能产生尿石素 A，随着贮藏时间的延长，尿石素 A 含量呈现逐渐降低趋势，在发酵 48 h 时其浓度最高为 0.664 μmol/L，经贮藏后由 0.664 μmol/L 变为 0.653 μmol/L，变化量不大。以上结果表明，*S. thermophilus* FUA329 发酵绿茶浸提液可以将鞣花酸转化为尿石素 A，在 48 h 时其浓度最大，不同贮藏时间下，*S. thermophilus* FUA329 发酵绿茶产生的尿石素 A 含量减少不显著。

2.5　发酵绿茶浸提液抗氧化活性在贮藏期间的变化

抗氧化活性测定结果见图 5，采用 DPPH 自由基清除率、ABTS 总抗氧化能力以及羟自由基清除率

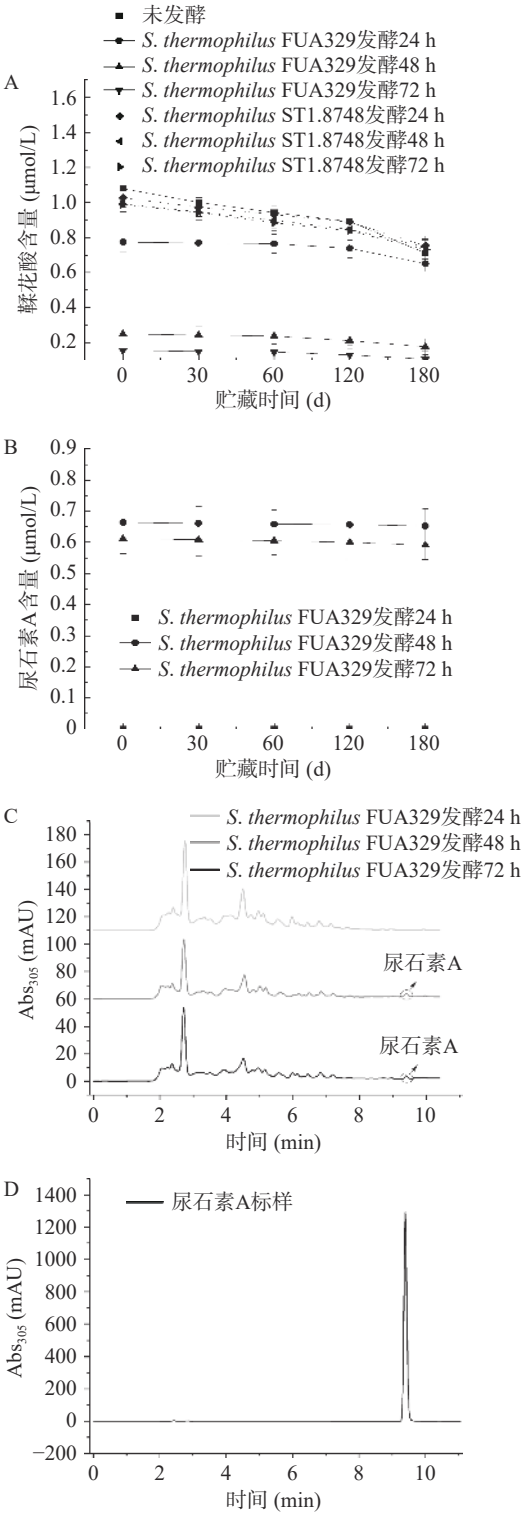


图 4 不同贮藏时间对发酵绿茶浸提液中鞣花酸含量以及尿石素 A 含量的影响

Fig.4 Effect of different storage time on ellagic acid and urolithin A content in fermented green tea extracts

注: A 为不同贮藏时间对发酵绿茶浸提液中鞣花酸含量的影响, B 为不同贮藏时间对发酵绿茶浸提液中尿石素 A 含量的影响, C 为 *S. thermophilus* FUA329 发酵绿茶浸提液在 305 nm 处的 HPLC 分析, D 为在 305 nm 处的尿石素 A 标准品的 HPLC 分析。

三种方法。由图 5 可知, 由 *S. thermophilus* FUA329 发酵的绿茶浸提液经贮藏后, DPPH 自由基清除率、ABTS 总抗氧化能力和羟自由基清除率均在 48 h 时

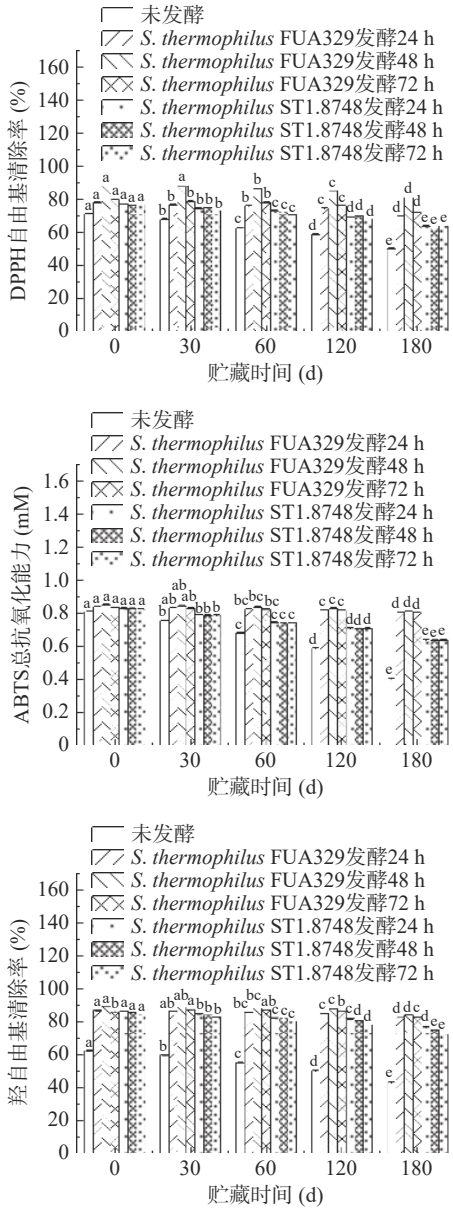


图 5 不同贮藏时间对发酵绿茶浸提液抗氧化活性的影响

Fig.5 Effect of different storage time on antioxidant activity of fermented green tea extracts

注: A 为 DPPH 自由基清除率, B 为 ABTS 总抗氧化能力, C 为羟自由基清除率。

抗氧化活性最强, 总体呈现缓慢下降趋势, 但仍具有较高的抗氧化能力; *S. thermophilus* ST1.8748 发酵绿茶浸提液经贮藏后, DPPH 自由基清除率、ABTS 总抗氧化能力和羟自由基清除率也是总体呈现缓慢下降趋势, *S. thermophilus* FUA329 发酵绿茶浸提液的抗氧化活性普遍高于 *S. thermophilus* ST1.8748 发酵绿茶浸提液。但与未发酵绿茶浸提液相比, 发酵绿茶浸提液的抗氧化能力更高, 这与邓成林等[34] 的研究结果相似。总体而言, 贮藏期内发酵绿茶浸提液的抗氧化能力高于未发酵绿茶浸提液, 未发酵绿茶浸提液的抗氧化活性在贮藏 60 d 后明显衰退。发酵绿茶浸提液的抗氧化能力始终维持在较高的水平, 且不易在贮藏期内产生变化, 贮藏期间, 发酵绿茶浸提液中茶多酚含量的下降是导致发酵绿茶浸提液抗氧化活

性下降的主要原因[35]。清除能力的下降也可能与乳酸菌本身的抗氧化作用密切相关，在贮藏后期，菌株产生的水解酶可进一步将酚类聚合物或复杂酚类物质水解[36]。

3　结论

本研究使用 *S. thermophilus* FUA329 体外发酵绿茶浸提液，将绿茶浸提液中生物利用度较差的鞣花酸转化为人体吸收利用度高，且具有多种生物学活性的尿石素 A，并对不同发酵时间和发酵绿茶浸提液的贮藏品质进行综合评价。结果显示，*S. thermophilus* FUA329 连续发酵绿茶浸提液 48 h 时对延缓贮藏期内品质下降有显著效果，其 pH 在 5.39~5.71 之间，活菌数最高达到 9.97×10^8 CFU/mL，茶多酚含量经发酵后降低趋势减缓，*S. thermophilus* FUA329 发酵绿茶浸提液可以将绿茶浸提液中的鞣花酸转化为尿石素 A；*S. thermophilus* FUA329 发酵绿茶浸提液的抗氧化能力较其他样品更稳定。本研究利用 *S. thermophilus* FUA329 发酵提升了绿茶浸提液的保健功效以及为开发乳酸菌发酵成为新的绿茶浸提液保鲜技术提供实验依据。

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

参考文献

[1] ZISHENG H, MINGCHUN W, HAIWEI Z, et al. LC-MS based metabolomics and sensory evaluation reveal the critical compounds of different grades of Huangshan Maofeng green tea[J]. Food Chemistry, 2022, 374: 131796.

[2] XIANGYANG G, CHITANG H, WILFRIED S, et al. Aroma profiles of green tea made with fresh tea leaves plucked in summer [J]. Food Chemistry, 2021, 363: 130328.

[3] JIANCAI Z, YIN Z, KAI W, et al. Characterization of key aroma compounds and enantiomer distribution in Longjing tea[J]. Food Chemistry, 2021, 361: 130096.

[4] 潘蓉, 余玉庚, 刘兰, 等. 2022 年中国茶叶进出口贸易结构简析[J]. 中国茶叶, 2023, 45(4): 31−35. [PAN Rong, YU Yugeng, LIU Lan, et al. A brief analysis on tea import and export trade in China during 2022[J]. China Tea, 2023, 45(4): 31−35.]

[5] 陈志云, 李杰, 冯雨, 等. 茶多酚生物活性及作用机制研究进展[J]. 食品工业科技, 2024, 45(13): 333−341. [CHEN Zhiyun, LI Jie, FENG Yu, et al. Progress in the study of biological activity and mechanism of action of tea polyphenols[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(13): 333−341.]

[6] CHUNHUI X, LU L, TIANMING Y, et al. *In-vitro* bioactivity evaluation and non-targeted metabolomic analysis of green tea processed from different tea shoot maturity[J]. LWT, 2021, 152: 112234.

[7] SHAFAGH F, KATHY M, JOYCE C, et al. Liver biomarkers in adults: Evaluation of associations with reported green tea consumption and use of green tea supplements in U. S. NHANES[J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP, 2021, 129(prepublish): 105087.

[8] MARTA M, ARTNORA N, MACIEJ J, et al. Impact of green tea (*Camellia sinensis*) on periodontitis and caries. Systematic review and meta-analysis[J]. Japanese Dental Science Review, 2021, 57: 1−11.

[9] LANGE K W. Tea in cardiovascular health and disease: A critical appraisal of the evidence[J]. Food Science and Human Wellness, 2022, 11(3): 445−454.

[10] WAIKIT T, PUIYING C, USHA S, et al. The therapeutic relevance of urolithins, intestinal metabolites of ellagitannin-rich food: A systematic review of *in vivo* studies[J]. Nutrients, 2022, 14(17): 3494.

[11] ZHAO H, SONG G, ZHU H, et al. Pharmacological effects of urolithin A and its role in muscle health and performance: Current knowledge and prospects[J]. Nutrients, 2023, 15(20): 4441.

[12] AL-HARBI S A, ABDULRAHMAN A O, ZAMZAMI M A, et al. Urolithins: The gut based polyphenol metabolites of ellagitannins in cancer prevention, a review[J]. Frontiers in Nutrition, 2021, 8: 647582−647582.

[13] DJEDJIBEGOVIC J, MARJANOVIC A, PANIERI E, et al. Ellagic acid-derived urolithins as modulators of oxidative stress[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2020, 2020: 5194508.

[14] SOOJIN K, JIYEON K, YOUNGCHEON S, et al. Unripe *Rubus occidentalis*, ellagic acid, and urolithin A attenuate inflammatory responses in IL-1β-stimulated A549 cells and PMA-stimulated differentiated HL-60 cells[J]. Nutrients, 2023, 15(15): 3364.

[15] AN L, LU Q, WANG K, et al. Urolithins: A prospective alternative against brain aging[J]. Nutrients, 2023, 15(18): 3884.

[16] BO X, CHEN S X, CAI X B, et al. Urolithin A exerts antiobesity effects through enhancing adipose tissue thermogenesis in mice[J]. PLoS Biology, 2020, 18(3): e3000688.

[17] D'AMICO D, ANDREUX P A, VALDÉS P, et al. Impact of the natural compound urolithin A on health, disease, and aging[J]. Trends in Molecular Medicine, 2021, 27(7): 687−699.

[18] 施林佐, 石琳, 赵玉香, 等. 茶及相关制品贮藏保鲜文献计量学分析与评价[J]. 中国茶叶加工, 2020(4): 5−12,33. [SHI Linzuo, SHI Lin, ZHAO Yuxiang, et al. Bibliometric analysis and evaluation of storage and preservation of tea and related products[J]. China Tea Processing, 2020(4): 5−12,33.]

[19] 李铁汉, 方仕茂, 王玉洁, 等. 绿茶贮藏保鲜技术研究进展[J]. 中国茶叶加工, 2019(2): 27−32,39. [LI Tiehan, FANG Shimao, WANG Yujie, et al. Green tea storage and preservation technology research progress[J]. China Tea Processing, 2019(2): 27−32, 39.]

[20] 陈善敏, 王奕, 常睿, 等. 乳酸菌的健康功效及其在发酵茶叶中的应用进展[J]. 食品科学, 2023(2096-4188): 1−12. [CHEN Shanming, WANG Yi, CHANG Rui, et al. Progress of health benefits of lactic acid bacteria and their application in fermented tea[J]. Food Science, 2023(2096-4188): 1−12.]

[21] LIU Q, LIU S, YE Q, et al. A novel *Streptococcus thermophilus* FUA329 isolated from human breast milk capable of producing urolithin A from ellagic acid[J]. Foods, 2022, 11(20): 3280−3280.

[22] TOLMIE M, BESTER M J, SEREM J C, et al. The potential antidiabetic properties of green and purple tea [*Camellia sinensis* (L.) O Kuntze], purple tea ellagitannins, and urolithins[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2023, 309: 116377.

[23] XUE L J, YING X J, TING G T, et al. Effect of variable selection and rapid determination of total tea polyphenols contents in Fuzhuan tea by near-infrared spectroscopy[J]. CyTA-Journal of Food, 2022, 20(1): 236−243.

[24] CHEN R, LI J, YANG Z, et al. Determination of ellagic acid in wine by solid-phase extraction-ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food Analytical Methods, 2019, 12(5): 1103−1110.
[25] NAGAMALLU R, SRINIVASAN B, NINGAPPA B M, et al. Synthesis of novel coumarin appended bis(formylpyrazole) derivatives: Studies on their antimicrobial and antioxidant activities[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2016, 26(2): 690−694.
[26] HERNÁNDEZ-RUIZ K L, RUIZ-CRUZ S, CIRA-CHÁVEZ L A, et al. Evaluation of antioxidant capacity, protective effect on human erythrocytes and phenolic compound identification in two varieties of plum fruit (*Spondias* spp.) by UPLC-MS[J]. Molecules, 2018, 23(12): 3200.
[27] LIU Y, NIU C F, WANG Y, et al. Preparation, structural characteristics and antioxidant activity of polysaccharide and its metal chelates from the peel of *Dioscorea oppositifolia* L[J]. Natural Product Research, 2023: 1−8.
[28] RATCHADAPORN K, ORAPIN K, NATTA L, et al. Changes in physico-chemical, astringency, volatile compounds and antioxidant activity of fresh and concentrated cashew apple juice fermented with *Lactobacillus plantarum*[J]. Journal of Food Science and Technology, 2018, 55(10): 3979−3990.
[29] QITONG L, YINGYING B, SHUTING M, et al. Genomic and phenotypic-based safety assessment and probiotic properties of *Streptococcus thermophilus* FUA329, a urolithin A-producing bacterium of human milk origin[J]. Genomics, 2023, 115(6): 110724−110724.
[30] LI P, XIE C, ZENG Q, et al. Effect of different hydrophobic soybean isolated peptides and their zinc complexes on the growth and fermentation of *Lactobacillus bulgaricus*[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2023, 58(12): 6411−6420.
[31] 郑瑛珠. 茶叶的主要化学成分及其营养价值[J]. 福建茶叶, 2020, 42(11): 21−22. [ZHENG Yingzhu. The main chemical composition of tea and its nutritional value[J]. Tea in Fujian, 2020, 42(11): 21−22.]
[32] MIRASOLI M, GOTTI R, DI FUSCO M, et al. Electronic nose and chiral-capillary electrophoresis in evaluation of the quality changes in commercial green tea leaves during a long-term storage[J]. Talanta, 2014, 129(21): 32−38.
[33] ANANINGSIH V K, SHARMA A, ZHOU W. Green tea catechins during food processing and storage: A review on stability and detection[J]. Food Research International, 2013, 50(2): 469−479.
[34] 邓成林, 王芙苡, 周金萍, 等. 发酵绿茶饮料工艺优化、抗氧化活性及贮藏品质研究[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(19): 134−142. [DENG Chenlin, WANG Fuyi, ZHOU Jinping, et al. Process optimization, antioxidant activity and storage quality of fermented green tea beverage[J]. Food Research and Development, 2022, 43(19): 134−142.]
[35] 苏小琴, 左小博, 黄伟红, 等. 包装方式对颗粒形绿茶贮藏品质和抗氧化活性的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(11): 293−301. [SU Xiaoqin, ZUO Xiaobo, HUANG Weihong, et al. Effect of packaging method on storage quality and antioxidant activity of granular green tea[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2023, 14(11): 293−301.]
[36] GUMUS S, DEMIRCI A S. Survivability of probiotic strains, *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 and *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079 in grape juice and physico-chemical properties of the juice during refrigerated storage[J]. Food Science and Technology, 2022, 42: e08122.

左一帆, 肖萌, 苏香萍, 等. 副干酪乳杆菌润肠通便及调节肠道菌群作用 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 329−337. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023090175

ZUO Yifan, XIAO Meng, SU Xiangping, et al. Effect to Intestinal Microbiota Regulation and Laxative Function to *Lactobacillus paracasei*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 329−337. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023090175

·营养与保健·

副干酪乳杆菌润肠通便及调节肠道菌群作用

左一帆[1], 肖　萌[1], 苏香萍[1,2,3,*], 邹　坤[1,2], 刘玲彦[4], 谈亚丽[4], 李　啸[4], 杨　静[5], 郑泽江[1]

（1.三峡大学生物与制药学院 天然产物研究与利用湖北省重点实验室, 湖北宜昌 443002;
2.三峡大学 湖北省生物酵素工程技术研究中心, 湖北宜昌 443002;
3.杭州市中策职业学校钱塘学校, 浙江杭州 310020;
4.安琪生物科技股份有限公司, 湖北宜昌 443003;
5.三峡大学国家中医药管理局中药药理科研三级实验室; 三峡大学健康医学院, 湖北宜昌 443002）

摘　要: 本文主要研究了西藏来源副干酪乳杆菌对小鼠便秘的润肠通便作用及其对肠道菌群的影响。首先将 160 只雄性昆明鼠随机分为 A、B 两大组，每组又随机分为空白组、模型组、5 株实验菌株（T1-5、T1-7、T1-9、T1-d、5B-1）组和 6108 对照菌株组做润肠通便实验，每组 10 只，其中 A 组 80 只用于测定小鼠小肠推进率，B 组 80 只用于排便情况测定。然后挑选润肠通便效果好的菌株 T1-5、T1-9、5B-1 进行肠道菌群调节的检测，实验小鼠为雄性 BALB/c 小鼠共 24 只，分为空白组、T1-5 组、T1-9 组和 5B-1 组，每组 6 只。润肠通便实验结果表明：与模型组相比，T1-9 和 5B-1 组小鼠小肠推进率显著高于模型组（P<0.01）；T1-9 组和 5B-1 组首次红便时间显著缩短（P<0.01）；T1-9 组、5B-1 组以及对照菌株 6108 组 6 h 的排便颗粒数显著增加（P<0.05）；T1-9 组和 6108 组的粪便湿重显著提高（P<0.01、P<0.05）。肠道菌群调节实验的测序结果显示，与空白组相比，三组益生菌组 T1-5、T1-9、5B-1 有益菌乳杆菌科、理研菌科丰度明显增加，其中 5B-1 组有益菌普雷沃氏菌科丰度也明显增加。因此菌株 T1-5、T1-9、5B-1 能够促进肠道蠕动，也具有调节肠道菌群结构发挥缓解小鼠便秘的作用。

关键词: 副干酪乳杆菌, 便秘, 润肠通便, 肠道菌群, 16S rDNA

中图分类号: Q939.97　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2024)21−0329−09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023090175　　本文网刊:

Effect to Intestinal Microbiota Regulation and Laxative Function to *Lactobacillus paracasei*

ZUO Yifan[1], XIAO Meng[1], SU Xiangping[1,2,3,*], ZOU Kun[1,2], LIU Lingyan[4], TAN Yali[4], LI Xiao[4], YANG Jing[5], ZHENG Zejiang[1]

（1.Hubei Key Laboratory of Natural Products Research and Development, College of Biological & Pharmaceutical Sciences, China Three Gorges University, Yichang 443002, China;
2.Hubei Biological Enzyme Engineering Technology Research Center, China Three Gorges University, Yichang 443002, China;
3.Hangzhou Zhongce Vocational School Qiantang, Hangzhou 310020, China;
4.Angel Biotechnology Co., Ltd., Yichang 443003, China;
5.Third-grade Pharmacological Laboratory on Traditional Chinese Medicine, State Administration of Traditional Chinese Medicine, China Three Gorges University; College of Medicine and Health Sciences, China Three Gorges University, Yichang 443002, China）

Abstract: The effects of five strains of *Lactobacillus paracasei* from Tibet on constipation and gut microbiota of mice were

收稿日期: 2023−09−18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目（82204237）。

作者简介: 左一帆（1999−）, 男, 硕士研究生, 研究方向: 微生物筛选与发酵, 功能食品活性评价, E-mail: zyf1491741239@163.com。

*** 通信作者:** 苏香萍（1978−）, 女, 硕士, 副教授, 研究方向: 微生物菌种选育与发酵、活性评价, E-mail: xiangpingsu@ctgu.edu.cn。

studied. One hundred and sixty male Kunming mice were randomly divided into two groups: A and B. Each group was randomly divided into a blank subgroup, a model subgroup, five experimental strain (including T1-5, T1-7, T1-9, T1-d, and 5B-1) subgroup and a control strain 6108 subgroup for the laxative function test, with 10 mice in each subgroup. Among them, 80 mice in group A were used to measure the small intestine propulsion rate of mice, and 80 mice in group B were used to measure defecation status. Strains T1-5, T1-9, and 5B-1 with good performance in laxative function test were then selected to detect the regulation of intestinal microbiota and total 24 male BALB/c mice were selected for this experiment, and were divided into a blank subgroup, a T1-5 subgroup, T1-9 subgroup, and 5B-1 subgroup, with 6 mice in each subgroup. The experimental results of the laxative function test showed that: Compared with the model group, the small intestine propulsion rate of mice in T1-9 and 5B-1 groups was significantly higher than that of the model group (P<0.01). The first red stool time was significantly shortened in the T1-9 and 5B-1 groups (P<0.01). The number of fecal particles in the T1-9 group, 5B-1 group, and control strain 6108 group increased significantly at 6 h (P<0.05). The wet weight of feces in the T1-9 and 6108 groups increased significantly (P<0.01, P<0.05). The experimental results of the microbial community sequencing test showed that: compared with the blank group, the abundance of probiotics in the three strain groups T1-5, T1-9, and 5B-1 Lactobacillaceae and Rikenellaceae was significantly increased, including Prevotellaceae in the 5B-1 group. So, the conclusion are as follows: strains T1-5, T1-9 and 5B-1 can promote intestinal peristalsis, regulate the structure of intestinal microbiota, and alleviate constipation in mice.

Key words: *Lactobacillus paracasei*; constipation; laxative function; intestinal microbiota; 16S rDNA

便秘是临床上最常见的功能性胃肠疾病之一，主要表现为：大便结块或硬结，排便不畅，排便次数减少[1]。随着人们生活水平的改善，不健康的生活方式及不良饮食习惯导致便秘的发生率逐年上升。据统计，全世界不同年龄段便秘的患病率从 0.5% 到 44.5% 不等[2]。长期便秘，不仅会导致肛肠类疾病，还会对患者造成精神障碍，严重影响人们的生活质量和身心健康。现代医学治疗便秘的手段有限，主要包括食疗、内服药物治疗、外用润滑剂、灌肠以及手术治疗等，药物治疗往往会产生一系列不良反应，而手术疗法却并不适用于普通便秘患者[3−4]，因此，寻找疗效好且不良反应小的治疗方式极为重要。

副干酪乳杆菌作为益生菌的一种，具有改善宿主的肠道环境、维持菌群结构平衡、提高机体免疫力及抗氧化水平、保护调节肠道黏膜屏障等优点[5]。同时，副干酪乳杆菌在 2010 年就被纳入可食用菌种名单，目前国内外市场对乳杆菌的需求量每年都在稳步增长，对其应用而言具有更强的研发价值。近年来国内外关于副干酪乳杆菌的研究主要集中在调节肠道菌群及缓解便秘[6−14]。其他功效如副干酪乳杆菌 NTU101 乙醇提取物可抵抗牙周炎[15]，PS23 延缓衰老小鼠认知下降[16] 已有相关报道。目前，副干酪乳杆菌部分菌株联合其它益生菌临床已有使用[17−22]，食品中应用主要集中在功能乳制品的添加[23−24]。

乳制品作为益生菌的优良载体，已有上百年历史，有研究表明发酵乳制品中含有一些微生物，可以在人体胃肠道消化过程中存活并定植，发挥改善人体肠道功能的作用[25−29]。从发酵乳中筛选具有优良益生特性的益生菌菌株不仅安全，而且简单易行，具有十分重要的意义。本研究以新分离鉴定于西藏山南市传统发酵乳制品中的副干酪乳杆菌菌株 T1-5、T1-7、T1-9、T1-d、5B-1 为研究对象，西藏地区具有严寒、强紫外和缺氧的特点，在这种环境下有利于筛出抗逆性能较好的菌株。前期研究表明 5 株菌株均具有良好的耐酸、耐胆碱盐、耐人工胃液特性[30]，故本研究参考《允许保健食品声称的保健功能目录非营养素补充剂》(2020 年版)中的检验方法，通过小肠推进率实验、排便颗粒数实验探讨 5 株西藏来源的副干酪乳杆菌对便秘小鼠的润肠通便作用，选取润肠通便效果好的菌株进行肠道菌群调节实验，进一步评价 5 株菌株的促进肠道蠕动、调节肠道菌群能力，寻找更有效的预防便秘菌种，为开发有益人体健康的益生菌提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

本研究实验组为 5 株副干酪乳杆菌，其编号分别为 T1-5、T1-7、T1-9、T1-d、5B-1　由安琪生物科技有限公司提供，5 株实验菌株分离自西藏山南市传统发酵乳制品；6108 对照菌株　购于中国工业微生物菌种保藏中心 CICC；雄性 SPF 级昆明鼠，体重(20±2 g)，雄性 SPF 级 BALB/c 小鼠，体重(20±2 g)，许可证号：SCXK(鄂)2022-0021　均购于湖北省宜昌市三峡大学动物中心，饲养于三峡大学动物实验中心的屏障环境中，饲养环境温度保持在(22±1)℃，相对湿度保持在(55±15)%；盐酸洛哌丁胺胶囊　西安杨森制药有限公司；胭脂红、阿拉伯树胶　上海麦克林生化科技公司；活性炭粉、MRS 肉汤培养基、MRS 改良固体培养基　广东环凯生物科技有限公司。

AL204-IC 电子天平　上海梅特勒-托利多仪器有限公司；ZQLY-180V 电热恒温培养箱　上海知楚仪器有限公司；BCM-1000A 生物洁净工作台　天津市泰斯特仪器有限公司；H1850R 高速台式冷冻离心机　湖南湘仪实验室仪器开发有限公司；SQ510C 高压蒸汽灭菌锅　重庆雅马拓科技有限公司；MX-F 固定式混匀仪　大龙兴创实验仪器股份公司；Lab-1B-50E 真空冷冻干燥机　北京博医康实验仪器有限公

司；Mi Seq 高通量测序系统　美国 Illumina 公司。

1.2　实验方法

1.2.1　实验分组　将雄性昆明鼠分为空白组、模型组、T1-5 组、T1-7 组、T1-9 组、T1-d 组、5B-1 组、6108 组。每组 20 只，共 160 只。实验共分两批次进行，每组 10 只，进行小肠推进率实验和排便颗粒数实验。

将雄性 BALB/c 小鼠随机分为空白组、T1-5 组、T1-9 组和 5B-1 组，每组 6 只，共 24 只，进行肠道菌群调节实验，动物实验伦理批号：20220508C。

菌悬液制备：将活化好的副干酪乳杆菌在 37 ℃条件下于 MRS 肉汤培养基中培养 20 h，4 ℃ 8000 r/min 的条件离心 5 min，除去上清液，使用无菌水清洗菌体沉淀，以相同的条件离心，弃去上清液，重复清洗 2 次，菌体沉淀重悬于无菌水中，使菌液浓度达到 1×10^9 CFU/mL，混合均匀后备用。

造模药物制备：盐酸洛哌丁胺胶囊使用无菌水配制药物浓度为 0.4 mg/mL 和 0.7 mg/mL 的盐酸洛哌丁胺混悬液。

1.2.2　小肠推进率实验　小肠推进率实验按照《允许保健食品声称的保健功能目录非营养素补充剂》(2020 年版)中的通便功能检验方法进行检测。小鼠进驻动物房后适应性饲养 5 d，再随机分成空白组、模型组和实验组。每天测定小鼠的体重调整灌胃量，空白组和模型组给予 1 mL/10 g 的无菌水，实验组分别给予 0.1 mL/10 g·bw 的相应菌悬液。灌胃干预 15 d 后，禁食不禁水 24 h，对小鼠小肠推进率进行测定，模型组小鼠和实验组小鼠灌胃洛哌丁胺混悬液，给药剂量为 4 mg/kg，给药体积为 0.1 mL/10 g·bw，空白组小鼠灌胃无菌水，30 min 后，按照相应的顺序给每只小鼠灌胃 0.5 mL 活性炭溶液，25 min 后断颈牺牲。轻轻剪开小鼠腹腔，取出从幽门至盲肠段，用镊子将其拉直，测量并记录小肠全长和活性炭推进最前端长度，计算每只小鼠的小肠推进率。

小肠推进率(%)=活性炭推进长度/小肠总长度×100

1.2.3　排便颗粒数实验　排便颗粒数实验按照《允许保健食品声称的保健功能目录非营养素补充剂》(2020 年版)中的通便功能检验方法进行检测。具体方法同 1.2.2，与其不同之处是给药剂量为 7 mg/kg，实验第 16 d 各组小鼠每只灌胃 0.5 mL 洋红溶液，记录每只小鼠灌胃洋红溶液的时间，并将其放入干净且垫有吸水纸的笼盒中，小鼠单笼饲养，正常饮水进食，从灌胃洋红开始计时，记录小鼠首粒红便排出的时间、6 h 内排便粒数和排便重量及粪便含水量。

1.2.4　肠道菌群调节实验　肠道菌群调节实验按照《允许保健食品声称的保健功能目录非营养素补充剂》(2020 年版)中保健食品对肠道菌群调节作用的检测方法，小鼠进驻动物房后先适应性饲养 5 d，随机抽取 6 只小鼠无菌采集粪便 3~5 颗，封装冻存于−80 ℃冰箱，作为自身前后对照空白组(A)，再将所有小鼠随机分成空白组(B)、T1-5 组(C)、T1-9 组(D)、5B-1 组(E)。每天测定小鼠的体重调整灌胃量，实验组以 0.1 mL/10 g·bw 的灌胃体积连续灌胃相应菌悬液 15 d，空白组给予蒸馏水。末次灌胃后，同样方法采集各组小鼠粪便，封装后置于−80 ℃冰箱。采样结束后干冰存放转送至北京诺禾致源科技股份有限公司进行测序，使用 DNA 提取试剂盒提取小鼠粪便的总 DNA，并对 DNA 纯度、浓度和完整性进行检测。以稀释后的基因组 DNA 为模板，采用 16S rDNA 扩增选择区域为基因 V3-V4 区特异性序列，根据 PCR 产物浓度进行等量混样，充分混匀后使用 1.8% 浓度的琼脂糖凝胶电泳纯化 PCR 产物。使用 NEB Next® Ultra™ II DNA Library Prep Kit 建库试剂盒进行文库构建，将构建好的文库使用 Qubit/Agilent Bioanalyzer2100 System/Q-PCR 定量；待文库合格后，使用 NovaSeq6000 进行上机测序。

1.3　数据处理

本论文中实验数据均使用 Microsoft Excel 2019 通过“均数±标准差”($\overline{X}$±SD)来表示，并使用 GraphPad Prism 8 分析并绘制图表，组间采用单因素方差分析(one-way ANOVA)，$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2　结果与分析

2.1　小肠推进率实验结果

由表 1 可知，与空白组相比，模型组小肠推进率显著降低($P<0.01$)，说明造模成功。灌胃 6 种副干酪乳杆菌后，各组小肠推进率皆高于模型组，其中菌株 T1-9、5B-1 的小肠推进率显著高于模型组($P<0.01$)，说明灌胃菌株 T1-9、5B-1 能促进便秘小鼠的肠道蠕动。

表 1　副干酪乳杆菌对小鼠肠道推进的影响

Table 1　Effect of *Lactobacillus paracasei* on intestinal propulsion in mice

组别	小肠全长(cm)	活性炭推进长度(cm)	推进率(%)
空白组	54.76±5.06	35.52±7.11$^{\#}$	65.10±13.18$^{\#\#}$
模型组	54.41±4.09	16.02±1.52	29.60±3.67
T1-5	55.57±4.50	23.10±7.28	41.56±12.95
T1-7	52.76±6.42	18.60±5.00	36.01±11.40
T1-9	54.48±6.63	24.77±3.93	45.96±8.07$^{\#\#}$
T1-d	48.91±4.75	21.38±8.28	41.14±15.18
5B-1	52.76±3.97	22.57±4.69	43.12±9.98$^{\#\#}$
6108	52.19±4.52	18.80±6.19	35.86±10.21

注：#表示与模型组相比差异有显著性，$P<0.05$；##表示与模型组相比差异有显著性，$P<0.01$；表2同。

2.2　排便颗粒数实验结果

由表 2 可知，模型组首次排红便时间与空白组小鼠相比显著升高、6 h 排便颗粒数和粪便湿重与空白组小鼠相比显著降低($P<0.01$)，表明便秘模型小鼠造模成功。与模型组相比，T1-9 组和 5B-1 组首粒红便时间显著缩短($P<0.01$)；T1-9 组、5B-1 组以及

对照菌株 6108 组 6 h 排便颗粒数显著增多(P<0.05)；T1-9 组和对照菌株 6108 组的粪便湿重显著增加(P<0.01、P<0.05)；将各组小鼠粪便冻干后称量其粪便干重计算其含水率，各组小鼠粪便含水率与模型组比较无显著性差异(P>0.05)。

表 2 副干酪乳杆菌对小鼠排便情况的影响

Table 2 Effect of *Lactobacillus paracasei* on defecation in mice

组别	首粒红便时间（min）	6 h粪便颗粒数	粪便湿重（g）	含水率（%）
空白组	73.20±26.19$^{\#\#}$	41.00±13.74$^{\#\#}$	0.71±0.22$^{\#\#}$	0.58±0.11
模型组	200.70±64.02	12.60±4.86	0.24±0.13	0.49±0.06
T1-5	195.90±58.56	16.60±12.89	0.31±0.23	0.53±0.09
T1-7	167.44±56.42	19.60±10.28	0.30±0.15	0.55±0.09
T1-9	111.90±31.69$^{\#\#}$	27.30±11.61$^{\#}$	0.51±0.20$^{\#\#}$	0.56±0.11
T1-d	181.20±28.00	19.90±5.93	0.32±0.09	0.46±0.02
5B-1	130.90±54.52$^{\#\#}$	27.10±16.41$^{\#}$	0.39±0.19	0.48±0.11
6108	171.70±57.75	27.80±13.41$^{\#}$	0.48±0.16$^{\#}$	0.46±0.08

《允许保健食品声称的保健功能目录非营养素补充剂》(2020 年版)中的通便功能检验方法中的结果判定表明，6 h 内排粪便重量和粪便颗粒数任一结果阳性，同时小肠运动实验和排首便时间任一结果阳性，可判定该实验结果阳性。小肠推进率实验和排便颗粒数实验结果表明，菌株 T1-9 和 5B-1 能一定程度改善小鼠的便秘症状，促进便秘小鼠的肠道运动，起到一定的润肠通便效果。结合小肠推进率实验，菌株 T1-5 组活性炭推进长度高于 5B-1 组，小肠全长高于 T1-9 和 5B-1 组，推测可能是个体差异性导致 T1-5 组小肠推进率略小于 T1-9 和 5B-1 组。综合分析，选择菌株 T1-5、T1-9 和 5B-1 进行肠道菌群实验。

2.3 肠道菌群实验结果

2.3.1 副干酪乳杆菌对小鼠肠道菌群多样性的影响

2.3.1.1 OUT 组成与分析 Venn 图是根据降噪得到的扩增子序列变体(Amplicon Sequence Variants, ASVs)结果，分析不同组之间共有、特有的 ASVs，图中每个圈代表一个组，圈和圈重叠部分的数字代表组之间共有的 ASVs 个数，没有重叠部分的数字代表每个组的特有 ASVs 个数。由图 1 可知，共检测到 4061 个 ASVs，5 个组之间共有的 ASVs 为 717 个，自身前后对照空白组、空白组、T1-5 组、T1-9 组和 5B-1 组独有的 ASVs 数目分别为 358、439、434、474、446。上述数据表明与自身前后对照空白组相比，在灌胃蒸馏水、副干酪乳杆菌 T1-5、T1-9 以及 5B-1 后，各组独有的 ASVs 数目都有了一定的提高。同时，菌株 T1-9 以及 5B-1 独有的 ASVs 数目高于经蒸馏水干预的空白组。

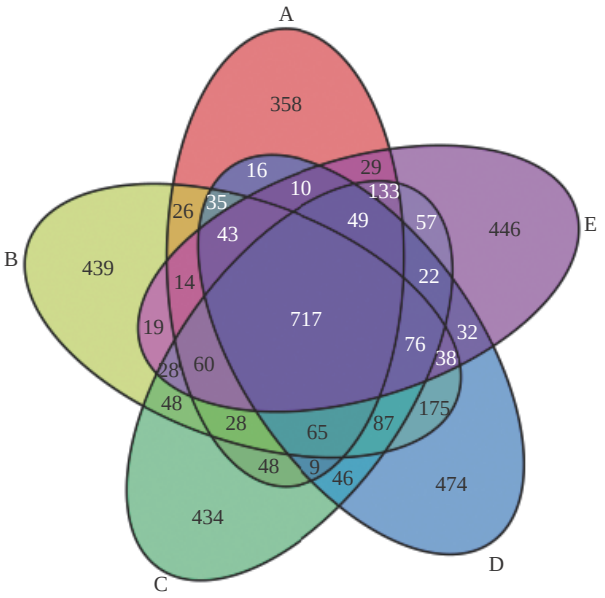


图 1 Venn 图分析

Fig.1 Venn plot analysis

注：(A)自身前后对照空白组，(B)空白组，(C)T1-5 组，(D)T1-9 组，(E)5B-1 组；图 2~图 6、表 3~表 4 同。

2.3.1.2 Alpha 多样性 Alpha 多样性(Alpha Diversity)反映的是样本内的微生物群落多样性，通过对单个样品的多样性分析可以反映样本内的物种丰度(Richness)及物种多样性(Diversity)。Alpha 多样性有多种衡量指标：Chao1、ACE、Shannon、Simpson、Pielou_e、Coverage。Coverage 指数可以反映群落覆盖率，由表 3 可知 Coverage 指数趋近于 1，表明本研究中样本序列基本被测出。ACE 指数和 Chao1 指数能反映出样本中群落种类的丰度，常被用于估计物种总数，由图 2A、图 2B 可知，与自身前后对照空白组相比，空白组和 T1-5 组、T1-9 组、5B-1 组 ACE 指数和 Chao1 指数均呈现升高趋势，说明蒸馏水和益生菌干预的小鼠肠道微生物丰富度都有增加的趋势。Simpson 指数、Shannon 指数和 Pielou_e 指数用于衡量物种多样性，受样品群落中物种丰度和物种均匀度的影响。Simpson 指数和 Shannon 指数值越

表 3 各组小鼠肠道菌群 Alpha 多样性指数

Table 3 Alpha diversity index of intestinal microbiota in each group of mice

组别	ACE	Chao1	Simpson	Shannon	Pielou_e	Coverage
A	700.52±83.00	712.17±84.42	0.95±0.03	6.56±0.58	0.70±0.05	0.9986
B	805.46±67.00	821.42±64.00*	0.98±0.02*	7.45±0.40*	0.78±0.04*	0.9984
C	789.24±72.01	801.62±77.10	0.99±0.01*	7.51±0.27*	0.78±0.02*	0.9985
D	751.06±96.46	757.83±101.56	0.99±0.00*	7.66±0.30*	0.81±0.03*	0.9987
E	714.66±108.80	725.33±106.34	0.99±0.01*	7.54±0.38*	0.80±0.03*	0.9988

注：*表示与自身前后对照空白组(A)相比差异有显著性，P<0.05。

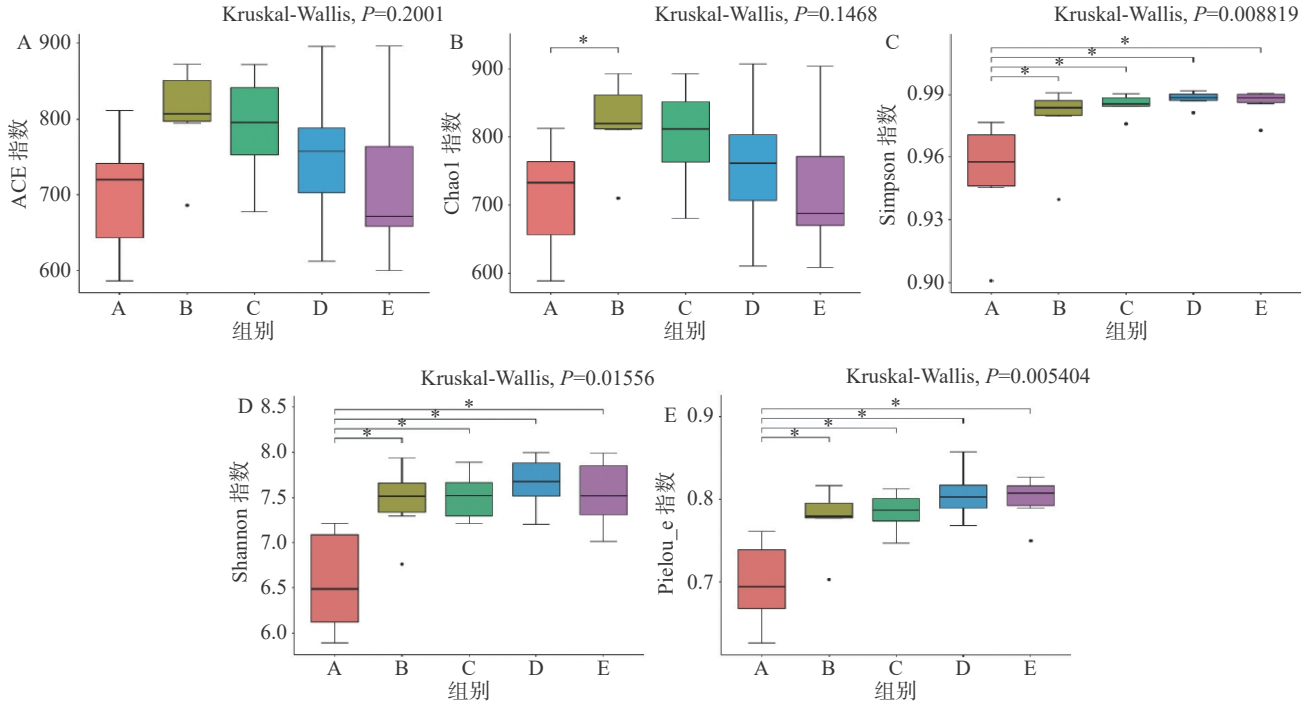


图 2　各组小鼠粪便中菌群 Alpha 多样性指数图

Fig.2　Alpha diversity index of microbial communities in feces of mice in each group

注：A：ACE 指数；B：Chao1 指数；C：Simpson 指数；D：Shannon 指数；E：Pielou_e 指数；*表示与自身前后对照空白组（A）相比差异有显著性，P<0.05。

大，说明样品的物种多样性越高，Pielou_e 指数越大，说明物种的均匀度越高。

由表 3 和图 2 的结果可知，与自身前后对照空白组比较，4 组 Simpson 指数、Shannon 指数和 Pielou_e 指数均显著升高（P<0.05），说明空白组和 T1-5 组、T1-9 组、5B-1 组菌落多样性均显著增加，其中 3 组益生菌组 Pielou_e 指数均高于空白组，表明菌株 T1-5、T1-9、5B-1 干预的小鼠肠道菌群多样性高于蒸馏水干预的同时，经 3 种副干酪乳杆菌干预的小鼠菌群均匀度更大，改善小鼠的肠道菌群效果更显著。

2.3.1.3　Beta 多样性　Beta 多样性是指沿着环境梯度变化的不同群落之间，物种组成的相异性或物种沿环境梯度的更替速率，因此也被称为生境间多样性（Between-Habitat Diversity）。坐标分析（Principal Co-ordinates Analysis，PCoA）可以用于判断物种的组成相似程度，物种组成越相似的样本，其距离越接近。非度量多维尺度分析（Non-metric Multi-Dimensional Scaling，NMDS）能更好地反映生态学数据中的非线性结构，倾向于比对各样本组之间的差异性。由图 3 可知，不同颜色代表不同的样本，其离散程度代表不同样本间的差异性。PCoA 分析结果表明，与自身前后对照空白组相比，空白组和益生菌组的样本明显分离，表明菌群结构出现了一定的差异，说明蒸馏水和 3 种副干酪乳杆菌均能改善小鼠的肠道菌群。同时益生菌各组内的样本离散程度比空白组更小，说明其物种丰度更加均匀；图 3B 中，NMDS 分析结果表明自身前后对照空白组的菌群与

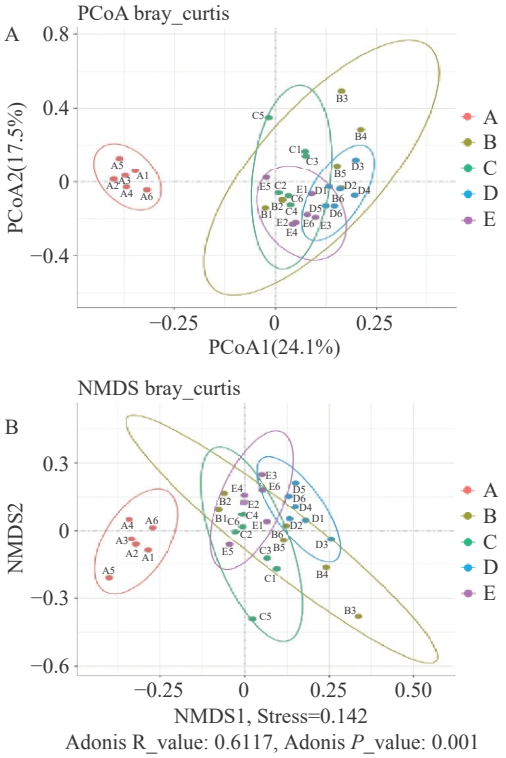


图 3　各组小鼠肠道菌群 PCoA（A）和非度量多维尺度（NMDS）（B）分析

Fig.3　Analysis of intestinal microbiota PCoA (A) and non metric multidimensional scale (NMDS) (B) in each group of mice

其余各组分离，与其他组距离较远，和其他各组间相比具有显著性差异（P<0.001），Stress<0.2 表明可以准确反映样本间差异程度。

2.3.2 各组小鼠肠道菌群物种组成及差异分析

2.3.2.1 门水平物种组成及差异分析 群落柱形图可以解释各组样本的优势物种及其相对丰度，图 4 为小鼠门水平前 10 菌群相对丰度柱状图，并将其他物种合并为 Others 在图中显示，不同颜色代表不同物种，色块长度表示物种所占相对丰度比例。在门水平上，拟杆菌门（Bacteroidota）和厚壁菌门（Firmicutes）是各组的优势物种，其次还有弯曲杆菌门（Campilobacterota）和变形菌门（Proteobacteria）。与自身前后对照空白组相比，空白组拟杆菌门相对丰度显著下降，益生菌组干预后拟杆菌门出现上升趋势，而厚壁菌门相对丰度下降，见图 4。

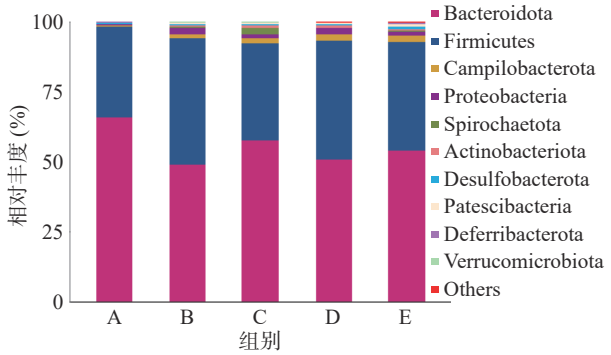


图 4 门水平物种组成及差异分析

Fig.4 Analysis of species composition and differences at the phylum level

表 4 中关于各组小鼠肠道菌群在各级水平上的差异，在门水平上，与自身前后对照空白组相比，空白组和 T1-9 组厚壁菌门、弯曲杆菌门和变形菌门丰度显著提高，差异具有统计学意义（P<0.01），T1-5 组和 5B-1 组弯曲杆菌门和变形菌门丰度显著增加（P<0.01），同时 4 组拟杆菌门丰度都显著减小（P<0.01），其中益生菌组较空白组减少程度较轻，说明 3 株菌株均具有提高菌群的菌落丰度、调节肠道菌群结构的作用。

2.3.2.2 科水平物种组成及差异分析 在科水平上，各组小鼠优势菌群主要是 Muribaculaceae 属于拟杆菌科[31]、毛螺菌科（Lachnospiraceae）、乳杆菌科（Lactobacillaceae）、理研菌科（Rikenellaceae）、颤螺旋菌科（Oscillospiraceae）等，与自身前后对照空白组相比，空白组和益生菌组毛螺菌科、乳杆菌科、拟杆菌科（Bacteroidaceae）、螺旋菌科（Helicobacteraceae）、理研菌科、普雷沃氏菌科（Prevotellaceae）等菌群丰度都明显升高，分布情况见图 5。

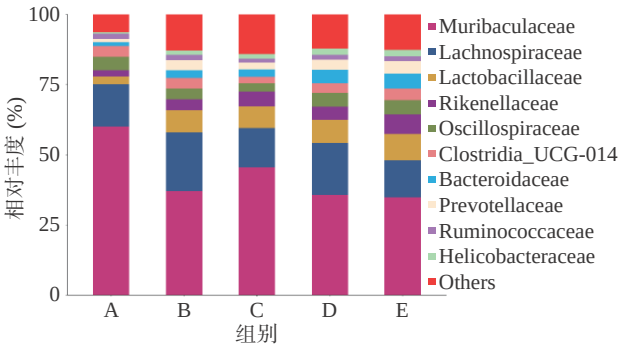


图 5 科水平物种组成及差异分析

Fig.5 Analysis of species composition and differences at the family level

根据《允许保健食品声称的保健功能目录非营养素补充剂》（2020 年版）中调节肠道菌群功能检验方法中的结果判定表明，粪便中双歧杆菌和（或）乳杆菌明显增加，产气荚膜梭菌减少或不增加，肠杆菌、肠球菌无明显变化或肠杆菌和（或）肠球菌明显增加，但增加的幅度低于双歧杆菌或乳杆菌增加的幅度，则判定为实验结果阳性。由表 4 可知，与自身前后对照空白组比较，空白组和 3 组益生菌乳杆菌科丰度显著增加（P<0.01），同时空白组、T1-5 组和 T1-9 组双歧杆菌科丰度显著增加（$P_{B、D}$<0.01、P_C<0.05），5B-1 组双歧杆菌科丰度基本不变。与空白组相比，3 组益生菌组肠杆菌科（Enterobacteriaceae）丰度有

表 4 小鼠粪便中不同微生物级别菌群的影响

Table 4 Effects of different microbial grades on microbial communities in mouse feces

外文名	中文名	A	B	C	D	E
Bacteroidota	拟杆菌门	659121.16±99503.54	489399.13±102819.01**	575692.75±129712.65**##	509555.05±93801.80**	541141.59±81185.53**
Firmicutes	厚壁菌门	324733.36±93884.28	451969.78±86907.48**	348774.40±101775.01##	422954.59±92146.00**	388632.47±78387.66
Campilobacterota	弯曲杆菌门	4083.91±1617.43	15291.97±4088.84**	21132.60±7395.43**	24736.82±5573.87**#	17612.67±5511.09**
Proteobacteria	变形菌门	3720.89±515.78	27433±8626.38**	20134.32±7074.97**	27115.86±14345.58**#	16108.75±5448.03**##
Lactobacillaceae	乳杆菌科	29283.13±10896.18	78691.94±24928.98**	77520.79±31570.32**	81941.78±21313.17**	95170.18±63149.44**
Rikenellaceae	理研菌科	23745.01±4593.56	48164.19±7726.44**	50692.32±13548.76**	43678.37±4876.25*	68888.40±12439.32**#
Prevotellaceae	普雷沃氏菌科	10060.68±2557.40	35947.03±14441.36	23513.80±7134.42	36716.28±11917.00	45649.02±25458.17*
Bifidobacteriaceae	双歧杆菌科	198.79±79.22	1305.12±633.73**	968.04±211.18*	2359.59±963.59**##	267.94±53.98##
Enterobacteriaceae	肠杆菌科	129.65±25.93	207.44±144.37	146.93±65.26	69.15±53.98	164.22±91.06
Muribaculaceae	细菌属	598407.06±100995.26	366994.24±85330.09**	452734.71±107876.25**##	352737.30±71974.74**	345749.28±74746.87**
Lactobacillus	乳杆菌属	29283.13±10896.18	78691.94±24928.98**	77520.79±31570.32**	81941.78±21213.17**	95170.18±63149.32**
Alistipes	别样杆菌属	17787.69±3982.40	29940.02±13576.73	43254.85±13009.33	33604.73±13529.61	51089.91±12232.15*
Bacteroides	拟杆菌属	14235.34±4813.61	27502.64±10834.69	25726.46±9702.80	45830.52±16065.20	53051.91±16794.85**

注：*表示与自身前后对照空白组（A）相比差异有显著性，P<0.05；**表示与自身前后对照空白组（A）相比差异有显著性，P<0.01；#表示与空白组（B）相比差异有显著性，P<0.05；##表示与空白组（B）相比差异有显著性，P<0.01。

一定程度的减小。另外研究发现，与自身前后对照空白组比较，空白组和 3 组益生菌组干预后，有益菌理研菌科丰度显著增加（P_D<0.05、$P_{B、C、E}$<0.01），其中 5B-1 组有益菌普雷沃氏菌科丰度也显著增加（P<0.05），普雷沃氏菌科具有多种作用，包括减轻炎症、消化纤维素、产生短链脂肪酸如乙酸、丁酸等[32]；理研菌科对调节肠道健康有重要作用[33]。综上，3 组益生菌组实验结果均为阳性，能增加有益菌理研菌和普雷沃氏菌丰度，减少有害菌肠杆菌等丰度，表明 3 种菌株均有调节肠道菌群的作用，具有一定开发为有益人体健康益生菌的价值。

2.3.2.3　属水平物种组成及差异分析　在属水平上，各组小鼠优势菌群主要是 *Muribaculaceae*、乳杆菌属（*Lactobacillus*）、毛螺菌属（*Lachnospira*）、另枝菌属（*Alistipes*）、梭菌属（*Clostridia*）、拟杆菌属（*Bacteroides*）、普雷沃菌属（*Prevotella*）、螺杆菌属（*Helicobacter*）等，分布情况见图 6。与自身前后对照空白组相比，空白组和益生菌组另枝菌属、乳杆菌属、拟杆菌属、梭菌科 vadinBB60 属 *Clostridia*、毛螺菌科 NK4A136 属 *Lachnospiraceae* 等菌群丰度显著升高，表明益生菌可以提高各菌群的群落丰度，其中 T1-9 组和 5B-1 组干预后各菌群丰度增加幅度较大。

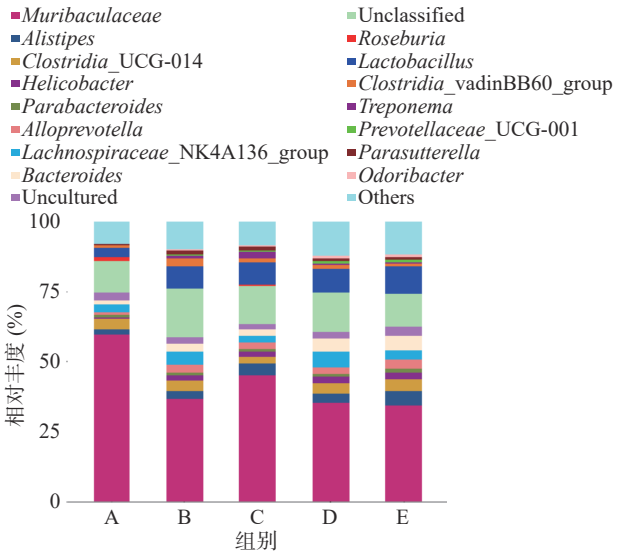


图 6　属水平物种组成及差异分析

Fig.6　Analysis of species composition and differences at the genus level

表 4 中关于各组小鼠肠道菌群在各级水平上的差异，在属水平上，与自身前后对照空白组相比，空白组和 3 组益生菌组乳杆菌属丰度显著增加（P<0.01），*Muribaculaceae* 属丰度显著降低（P<0.01），对应所属门水平拟杆菌门丰度显著降低（P<0.01），推测 3 株副干酪乳杆菌对拟杆菌门菌种有一定的抑制作用。在 3 组益生菌组中，5B-1 组拟杆菌属和别样杆菌属（*Alistipes*）丰度显著增加（P<0.01、P<0.05）。

综合门水平和科水平分析，益生菌干预后各组小鼠肠道菌群均发生改变，提示 3 株副干酪乳杆菌可以调整肠道内菌群结构，增加有益菌丰度，减少有害菌梭菌 UCG-014 属 *Clostridia* 和肠杆菌等丰度，其中菌株 5B-1 调整菌群结构幅度最大，效果更显著。

3　结论

在小肠推进实验中，盐酸洛哌丁胺诱导的便秘模型小鼠体重无明显差别，因此实验对肠动力水平进行检测，发现与模型组相比，菌株 T1-9、5B-1 干预后，首粒红便时间显著减少（P<0.01），6 h 排便颗粒数显著提高（P<0.05）；其中 T1-9 组粪便湿重显著增大（P<0.01）。在小肠推进实验中，6 种副干酪乳杆菌组小肠推进率皆高于模型组，其中菌株 T1-9、5B-1 的小肠活性炭推进效果较好，综上表明菌株 T1-9、5B-1 对促进肠胃蠕动、改善便秘小鼠粪便状态有较为明显的作用。基于此，后续肠道菌群调节实验选择作用明显的菌株 T1-9、5B-1 以及活性炭推进长度较长的菌株 T1-5。

在肠道菌群实验中，门水平、科水平和属水平结果表明 3 株益生菌都能够调节肠道菌群结构，增加有益菌理研菌和普雷沃氏菌等丰度，有害菌梭菌和肠杆菌丰度都有一定程度减少，其中菌株 5B-1 调整菌群结构幅度最大。综上所述，菌株 T1-5、T1-9、5B-1 具有促进肠蠕动、调整肠道菌群结构从而改善便秘的功能。在后续实验中，将对 3 株菌株功效及安全性进行系统研究，为其在食品中及更广泛的应用提供科学支持。

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

参考文献

[1] LACY B E, MEARIN F, CHANG L, et al. Bowel disorders[J]. Gastroenterology, 2016, 150(6): 1393−1407.

[2] WERTH B. Epidemiology of constipation in adults: Why estimates of prevalence differ[J]. Journal of Epidemiological Research, 2019, 5(1): 37−49.

[3] 张升彦, 张磊, 朱良如, 等. 基于肠道菌群的慢性便秘治疗进展[J]. 临床消化病杂志, 2022, 34(2): 149−152. [ZHANG Shengyan, ZHANG Lei, ZHU Liangru, et al. Progress in the treatment of chronic constipation based on gut microbiota[J]. Chinese Journal of Clinical Gastroenterology, 2022, 34(2): 149−152.]

[4] 于淑俊, 张连中, 刘振权. 复合益生菌粉对功能性便秘小鼠润肠通便的作用[J]. 中国微生态学杂志, 2023, 35(2): 142−151. [YU Shujun, ZHANG Lianzhong, LIU Zhenquan. The effect of compound probiotic powder on moistening the intestines and relieving constipation in mice with functional constipation[J]. Chinese Journal of Microbiology, 2023, 35(2): 142−151.]

[5] 张俊, 赵保堂, 杨富民. 副干酪乳杆菌的益生特性及其应用研究进展[J]. 包装与食品机械, 2019, 37(4): 47−52. [ZHANG Jun, ZHAO Baotang, YANG Fumin. Research progress on the probiotic characteristics and application of *Lactobacillus paracasei*[J]. Pack-

aging and Food Machinery, 2019, 37(4): 47−52.]
[6] 和明涓, 鲍悦悦, 倪敏. 干酪乳杆菌治疗功能性便秘的研究进展[J]. 临床医学研究与实践, 2023, 8(23): 191−194. [HE Mingjuan, BAO Yueyue, NI Min, et al. Research progress on the treatment of functional constipation with *Lactobacillus casei*[J]. Clinical Medical Research and Practice, 2023, 8(23): 191−194.]
[7] LU Y, ZHANG J, ZHANG Z, et al. Konjac glucomannan with probiotics acts as a combination laxative to relieve constipation in mice by increasing short-chain fatty acid metabolism and 5-hydroxytryptamine hormone release[J]. Nutrition, 2021, 84(1): 1−13.
[8] 陈建国, 李周勇, 李桂花, 等. 热灭活副干酪乳杆菌 Lc19 对小鼠便秘的缓解作用研究[J]. 中国奶牛, 2019(9): 12−15. [CHEN Jianguo, LI Zhouyong, LI Guihua, et al. Study on the relieving effect of heat-killed *Lactobacillus paracasei* Lc19 on constipated mice[J]. China Dairy Cattle, 2019(9): 12−15.]
[9] 曹永强, 张健, 郑喆, 等. 副干酪乳杆菌 N1115 发酵乳对小鼠便秘的改善作用[J]. 食品科学, 2018, 39(1): 185−191. [CAO Yongqiang, ZHANG Jian, ZHENG Zhe, et al. Improvement effect of fermented milk from *Lactobacillus paracasei* N1115 on constipation in mice[J]. Food Science, 2018, 39(1): 185−191.]
[10] 王晓成, 张明, 陈善斌, 等. 副干酪乳杆菌 L9 对小鼠肠道短链脂肪酸含量的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(13): 238−243. [WANG Xiaocheng, ZHANG Ming, CHEN Shanbin, et al. The effect of *Lactobacillus paracasei* L9 on the content of intestinal short chain fatty acids in healthy mice[J]. Food Science, 2017, 38(13): 238−243.]
[11] 周晓丹, 刘爱萍, 张明, 等. 副干酪乳杆菌 LC-01 对便秘小鼠的通便作用[J]. 乳业科学与技术, 2012, 35(5): 7−11. [ZHOU Xiaodan, LIU Aiping, ZHANG Ming, et al. The laxative effect of *Lactobacillus paracasei* LC-01 in constipated mice[J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2012, 35(5): 7−11.]
[12] BOSNEA L A, KOPSAHELIS N, KOKKALI V, et al. Production of a novel probiotic yogurt by incorporation of *L. casei* enriched fresh apple pieces, dried raisins and wheat grains[J]. Food and Bioproducts Processing, 2017, 102: 62−71.
[13] 田丰伟, 杨震南, 丁历伟, 等. 副干酪乳杆菌 LC01 对人体肠道菌群的调节作用[J]. 中国食品学报, 2018, 18(10): 24−30. [TIAN Fengwei, YANG Zhennan, DING Liwei, et al. The regulatory effect of *Lactobacillus paracasei* LC01 on human intestinal microbiota[J]. Chinese Journal of Food Science, 2018, 18(10): 24−30.]
[14] 陆文伟, 胡文兵, 曹文金, 等. 干酪乳杆菌 LC01 对小鼠肠道菌群和肠道转运调节作用的剂量效应[J]. 食品科学, 2019, 40(15): 211−217. [LU Wenwei, HU Wenbing, CAO Wenjin, et al. Dose effect of *Lactobacillus casei* LC01 on intestinal microbiota and intestinal transport regulation in mice[J]. Food Science, 2019, 40(15): 211−217.]
[15] LIU T H, TSAI T Y, PAN T M. The anti-periodontitis effects of ethanol extract prepared using *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101[J]. Nutrients, 2018, 10(4): 472.
[16] HUANG S Y, CHEN L H, WANG M F, et al. *Lactobacillus paracasei* PS23 delays progression of age-related cognitive decline in senescence accelerated mouse prone 8 (SAMP8) mice[J]. Nutrients, 2018, 10(7): 894.
[17] 胡艳杰, 李卡, 杨家印, 等. 肝移植患者术后益生菌强化的早期肠内营养使用的最佳证据总结[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2020, 27(1): 63−68. [HU Yanjie, LI Ka, YANG Jiayin, et al. Summary of best evidence for early enteral nutrition use enhanced with probiotics in liver transplant patients after surgery[J]. Chinese Journal of Bases and Clinics in General Surgery, 2020, 27(1): 63−68.]
[18] 朴善英, 徐小达. 肠道益生菌辅治对非酒精性脂肪性肝硬化患者糖脂代谢、氧化损伤和肝功能的影响[J]. 中国医学工程, 2019, 27(10): 102−104. [PIAO Shanying, XU Xiaoda. The effect of gut probiotic adjuvant therapy on glucose and lipid metabolism, oxidative damage, and liver function in patients with non-alcoholic fatty liver cirrhosis[J]. China Medical Engineering, 2019, 27(10): 102−104.]
[19] 李萍, 张丽, 黄柳琴. 糜烂性胃炎幽门螺杆菌阳性患者益生菌联合四联疗法治疗后胃肠道微生态变化观察[J]. 现代消化及介入诊疗, 2019, 24(9): 961−964,968. [LI Ping, ZHANG Li, HUANG Liuqin. Observation of changes in gastrointestinal microbiota after probiotic combined with quadruple therapy in *Helicobacter pylori* positive patients with erosive gastritis[J]. Modern Digestion & Intervention, 2019, 24(9): 961−964,968.]
[20] NES I F, JOHNSBORG O. Exploration of antimicrobial potential in LAB by genomics[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2004, 15(2): 100−104.
[21] 应再军. 术前补充益生菌对肠道手术患者术后肠道菌群及肠黏膜屏障功能的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2019, 31(9): 1052−1055. [[YING Zaijun. The effect of preoperative supplementation of probiotics on postoperative gut microbiota and intestinal mucosal barrier function in patients undergoing intestinal surgery [J]. Chinese Journal of Microbiology, 2019, 31(9): 1052−1055.]
[22] 王晓光, 石振东, 王国江. 益生菌联合益生元治疗老年慢性功能性便秘临床分析[J]. 中国临床新医学, 2014, 7(12): 1150−1152. [WANG Xiaoguang, SHI Zhendong, WANG Guojiang. Clinical analysis of probiotics combined with prebiotics in the treatment of elderly chronic functional constipation[J]. Chinese Journal of New Clinical Medicine, 2014, 7(12): 1150−1152.]
[23] SÁNCHEZ E, NIETO J C, VIDAL S, et al. P0088: Fermented milk containing *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CNCM I-1518 reduces bacterial translocation in rats treated with carbon tetrachloride[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 45712.
[24] CHIANG S S, LIAO J W, PAN T M. Effect of bioactive compounds in *Lactobacilli*-fermented soy skim milk on femoral bone microstructure of aging mice[J]. J Sci Food Agric, 2012, 92(2): 328−335.
[25] YILMAZ I, DOLAR M E, OZPINAR H. Effect of administering kefir on the changes in fecal microbiota and symptoms of inflammatory bowel disease: A randomized controlled trial[J]. The Turkish Journal of Gastroenterology, 2019, 30(3): 242−253.
[26] ESLAMI M, YOUSEFI B, KOKHAEI P, et al. Are probiotics useful for therapy of *Helicobacter pylori* diseases?[J]. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 2019, 64: 1−30.
[27] LIU C J, TANG X D, YU J, et al. Gut microbiota alterations from different *Lactobacillus* probiotic-fermented yoghurt treatments in slow-transit constipation[J]. Journal of Functional Foods, 2017, 38: 110−118.
[28] GOMI A, YAMAJI K, WATANABE O, et al. *Bifidobacterium bifidum* YIT 10347 fermented milk exerts beneficial effects on gastrointestinal discomfort and symptoms in healthy adults: A double-blind, randomized, placebo-controlled study[J]. Journal of Dairy Science, 2018, 101(6): 4830−4841.
[29] BARROS C P, GUIMARES J T, ESMERINO E A, et al.

Paraprobiotics and postbiotics: Concepts and potential applications in dairy products[J]. Current Opinion in Food Science, 2020, 32: 1−8.

[30] 王帅静, 李啸, 刘玲彦, 等. 西藏牦牛粪和乳源中益生菌的筛选与鉴定[J]. 中国酿造, 2021, 40(7): 43−48. [WANG Shuaijing, LI Xiao, LIU Lingyan, et al. Screening and identification of probiotics in Tibetan yak manure and milk source[J]. Chinese Brewing, 2021, 40(7): 43−48.]

[31] 韩明明, 詹炜, 黄福勇, 等. 砂滤模式下马口鱼消化道细菌的组成、分类与相关性[J]. 浙江农业学报, 2023, 35(10): 2286−2298. [HAN Mingming, ZHAN Wei, HUANG Fuyong, et al. Composition, classification, and correlation of bacteria in the digestive tract of zebrafish under sand filtration mode[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2023, 35(10): 2286−2298.]

[32] COX L M, YAMANISHI S, SOHN J, et al. Altering the intestinal microbiota during a critical developmental window has lasting metabolic consequences[J]. Cell, 2014, 158(4): 705−721.

[33] CUEVAS-SIERRA A, RIEZU-BOJ J I, GURUCEAGA E, et al. Sex-specific associations between gut *Prevotellaceae* and host genetics on adiposity[J]. Microorganisms, 2020, 8(6): 938.

王磊, 梁峰, 赵宏伟, 等. 含灵芝多糖的复方制剂免疫调节功能及安全性评价 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 338−349. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023100046

WANG Lei, LIANG Feng, ZHAO Hongwei, et al. Immunomodulatory Function and Safety Evaluation of Compound Preparation Containing *Ganoderma lucidum* Polysaccharides[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 338−349. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023100046

·营养与保健·

含灵芝多糖的复方制剂免疫调节功能及安全性评价

王　磊[1], 梁　峰[2], 赵宏伟[1,3,*], 宁德山[1], 尹丽华[4], 叶小敏[4], 尹国骁[4]

（1.无限极（中国）有限公司, 广东广州 510520;
2.广州暨南生物医药研究开发基地有限公司, 广东广州 510632;
3.中国中药协会药食同源物质评价和利用专业委员会, 北京 100061;
4.武汉药品医疗器械检验所, 湖北武汉 430075）

摘　要: 目的：评价含灵芝多糖的复方制剂免疫调节功能及安全性。方法：参照保健食品检验与评价技术规范（2003 版），通过测定正常小鼠淋巴细胞增殖能力、耳肿胀程度、溶血空斑数、吞噬百分率和吞噬指数、自然杀伤（NK）细胞活性，分别从细胞免疫、体液免疫及非特异性免疫综合评价含灵芝多糖的复方制剂免疫调节功能；通过小鼠急性经口毒性试验、细菌回复突变（Ames）试验和大鼠 30 d 喂养试验综合评价其安全性。结果：在细胞免疫试验中，受试物对刀豆蛋白 A（ConA）诱导的淋巴细胞增殖能力和耳肿胀程度均无显著影响（P>0.05）；在体液免疫试验中，受试物低剂量组（0.17 g/kg）、中剂量组（0.33 g/kg）、高剂量组（1.00 g/kg）分别使小鼠抗体生成细胞数目提高 10.98%、12.08%、17.63%（P<0.05）；在非特异性免疫试验中，受试物中剂量组、高剂量组能显著提高单核巨噬细胞的吞噬能力（P<0.05）和 NK 细胞活性（P<0.01）。受试物对雌雄小鼠急性经口剂量最大耐受量（MTD）均大于 42.56 g/kg，属无毒级物质；Ames 试验结果阴性，未见致突变作用；大鼠 30 d 喂养试验中，受试物各剂量组对大鼠体质量、周食物利用率、血常规指标、血液生化学指标及主要脏器系数均未产生显著影响（P>0.05），组织学检查未发现明显病理变化。结论：含灵芝多糖的复方制剂可以调节小鼠免疫功能，作为保健食品食用是安全的。

关键词: 灵芝多糖, 灵芝酸 A, 复方制剂, 安全性, 免疫调节
中图分类号: TS201.4　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2024)21−0338−12
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023100046　　本文网刊:

Immunomodulatory Function and Safety Evaluation of Compound Preparation Containing *Ganoderma lucidum* Polysaccharides

WANG Lei[1], LIANG Feng[2], ZHAO Hongwei[1,3,*], NING Deshan[1], YIN Lihua[4], YE Xiaomin[4], YIN Guoxiao[4]

（1.Infinitus (China) Co., Ltd., Guangzhou 510520, China;
2.Guangzhou Jinan Biomedical Research and Development Center Co., Ltd., Guangzhou 510632, China;
3.Medicine Food Homology Evaluation and Utilization Committee, China Association of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100061, China;
4.Wuhan Institute for Drug and Medical Device Control, Wuhan 430075, China）

Abstract: Objective: To evaluate the immunomodulatory function and safety of compound preparation containing *Ganoderma lucidum* polysaccharides. Methods: According to the Technical Standards for Testing and Assessment of Health Food (2003 Edition), the immunomodulatory function of compound preparation containing *Ganoderma lucidum*

收稿日期: 2023−10−11
作者简介: 王磊（1979−）, 女, 硕士, 高级工程师, 研究方向: 保健食品、食品药品研发, E-mail: Kira.Wang@infinitus-int.com。
*** 通信作者:** 赵宏伟（1977−）, 女, 硕士, 高级工程师, 研究方向: 保健食品、食品研发, E-mail: Lisa.Hongwei.Zhao@infinitus-int.com。

polysaccharides was evaluated comprehensively from cellular immunity, humoral immunity and non-specific immunity by measuring the ability of lymphocyte proliferation, degree of ear swelling, number of hemolytic plaques, phagocytic percentage, phagocytic index and natural killer (NK) cells activity in normal mice. Its safety was evaluated comprehensively by acute oral toxicity test in mice, Ames test and 30 d feeding test in rats. Results: In cellular immunity test, the tested substance had no significant effect on lymphocyte proliferation induced by concanavalin A and degree of ear swelling (P>0.05). In the humoral immunity test, the low dose group (0.17 g/kg), the middle dose group (0.33 g/kg) and the high dose group (1.00 g/kg) could increase the level of antibody-producing cells by 10.98%, 12.08%, 17.63% (P<0.05). In the non-specific immunity test, the middle dose group and the high dose group could significantly increase the phagocytosis ability of mononuclear macrophages (P<0.05) and the activity of NK cells (P<0.01). The maximum tolerance dose (MTD) of the tested substance to the acute oral dose of both male and female mice was more than 42.56 g/kg, which belonged to non-toxic substances. The results of Ames test were negative and no mutagenicity was found. In the 30 d feeding test, each dose group had no significant effect on body weight, weekly food utilization rate, blood routine index, blood biochemical index and main organ coefficient (P>0.05), and no obvious pathological changes were found by histological examination. Conclusion: Compound preparation containing *Ganoderma lucidum* polysaccharides had a positive effect on immunomodulatory function in mice, and it had a good safety as a health food.

Key words: *Ganoderma lucidum* polysaccharides; ganoderic acid A; compound preparation; safety; immunomodulatory

随着社会的发展，我国人口老龄化、亚健康人群年轻化态势逐渐严峻[1]，人们对于非疾病人群的预防保健愈加重视，而增强免疫力是预防疾病的关键[2]。据国际健康策略和管理咨询机构 Lewin 集团的一项循证研究显示，食用保健食品可以调节机体机能，提高人体抵御疾病的能力[3]。在中国及亚洲许多地区，天然中草药具有多年食用历史或药用历史。然而天然中草药存在口感差、携带和使用不便等缺点[4]，为克服这些缺点，本课题组以中医理论为指导进行组方配比筛选，利用减压蒸馏、喷雾干燥等技术制备了一种含灵芝多糖及灵芝酸 A 的复方制剂，具有整体调理、相互协同的保健功效。研究表明，多糖能在免疫器官、免疫细胞、免疫因子多层次进行免疫调节[5]，是一种较为公认的天然免疫调节剂。本方主材灵芝是药食同源的典型代表之一，《神农本草经》载：灵芝“保神，益精气，坚筋骨，好颜色，久服轻身不老延年。”其主要生物活性物质是多糖类和三萜类，2020 版《中国药典》对灵芝成分的含量测定包括灵芝多糖、灵芝三萜及甾醇，日本则以灵芝酸的含量为质控标准，本制剂按保健食品产品技术要求制定总多糖和灵芝酸 A 为标志性成分。Jin 等[6] 研究表明灵芝多糖可以增强大鼠免疫力和抗氧化活性，Pan 等[7] 报道了灵芝酸 A 可通过 JAK-STAT3 信号通路显著抑制酪氨酸磷酸化，能有效缓解神经炎症和阿尔茨海默氏细胞衰老，在人体免疫中发挥重要的药理学作用。薏苡仁多糖是薏苡仁发挥药理活性的重要物质基础，它通过改善先天免疫细胞的募集并刺激准确有效的免疫反应以消除外部生物和受损细胞来缓解结肠炎[8−9]。茯苓多糖是是茯苓的主要药用活性成分，可以增强体液免疫、细胞免疫及黏膜免疫[10−11]。其他中草药如白术[12−13]、菟丝子[14−15]、黄精[16−17]、麦冬[18−19]、甘草[20−21]、枸杞子[22−23]、五味子[24−25]、菊花[26−27] 等皆含有丰富的活性多糖，均被报道具有扶正固体、调节免疫的功效。

在大健康时代背景下，这些中草药作为保健食品原料得到广泛的开发和利用。由于复方制剂成分复杂，其如何发挥功效尚不明确，且预防保健是一个长期缓慢的过程，在长期使用过程中可能会出现一些不良反应或毒副作用，有时还会出现危及生命的并发症[28]。因此本研究根据《保健食品检验与评价技术规范》(2003 版)[29] 有关要求，进行较为系统的评价含灵芝多糖的复方制剂的免疫调节功能及安全性，以期为其合理安全应用提供科学数据支持。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

灵芝、薏苡仁、茯苓、白术、菟丝子、黄精、麦冬、甘草、枸杞子、五味子、菊粉　天方健(中国)药业有限公司；无特定病原体(SPF)级昆明小鼠　雌雄各 10 只，体质量 18~20 g，购自湖南斯莱克景达试验动物有限公司，试验动物生产许可证号：SCXK(湘)2016-0002；SPF 级 SD 大鼠　雌雄各 44 只，体质量 75~90 g，购自北京维通利华试验动物技术有限公司，试验动物生产许可证号：SCXK(京)2016-0006；SPF 级 Balb/C 小鼠　雄性 120 只，体质量 18~20 g，购自南方医科大学实验动物中心，试验动物生产许可证号：SCXK(粤)2016-0041；试验动物环境　温度 20~24 ℃，相对湿度 40%~70%，12 h 的明暗周期的屏障系统(使用许可证号：SYXK(鄂)2014-0077，使用证明号：00270498)，动物试验经武汉药品医疗器械检验所试验动物伦理委员会审批，符合试验动物伦理学要求；Ames 试验标准菌株　鼠伤寒沙门氏菌组氨酸缺陷型 TA97、TA98、TA100、TA102，购自上海康成生物科技有限公司，批号分别为 5281D、5282D、5249D、5280D；小鼠淋巴瘤细胞(YAC-1)　广州暨南生物医药研究开发基地有限公司自传代；哺乳动物肝微粒体酶系统(肝 S9)　Moltox 公司；叠氮化钠　Amresco 公司；2-氨基笏、敌克松、二甲基亚砜　Sigma 公司；1,8-二羟基蒽醌　Aladdin 公司；2,4-

二硝基氟苯(DNFB) 上海麦克林生化科技有限公司; 刀豆蛋白 A、补体、吉姆萨染液、4% 多聚甲醛、鸡红细胞、绵羊红细胞 北京索莱宝科技有限公司; SA 缓冲液 上海源叶生物科技有限公司; 胎牛血清、乳酸脱氢酶(LDH)细胞毒性检测试剂盒 碧云天生物技术有限公司。

BS-820 型全自动生化分析仪 深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司; XT-2000i 型全自动动物血液细胞分析仪 日本希森美康公司; DM2500 型显微照相仪、EG1150 型包埋机、RM2265 型全自动切片机、HI1220 型烤片机、ASP200S 型真空组织脱水机、EG1150C 型包埋冷冻台、HI1210 型摊片机 Leica 公司; Elx800 型酶标仪 Bio-Tek 公司; BS 110S 型电子天平 北京赛多利斯天平有限公司; PB 302 型电子天平 瑞士梅特勒公司; UV-2600 型分光光度计 Shimadzu 公司; PHS-3C 型 pH 计 成都世纪方舟科技有限公司; LT-BIX300L 型低温生化培养箱 立德泰勃(上海)科学仪器有限公司; IM1200 型全自动细胞计数仪 艾力特生物科技(上海)有限公司; ECLIPSE-TI2 型倒置显微镜 尼康仪器有限公司; SW-CJ-1F 型标准型净化工作台 苏州吴江华夏空调净化设备厂; YA28X6T/8 型高压灭菌锅 宁波甬安医疗器械制造有限公司; DHG-9053A 型鼓风干燥箱、DK-24 型恒温水浴锅 上海精宏试验设备有限公司; TS-110X50 型恒温摇床 上海天呈科技有限公司; H-1850R 型台式高速冷冻离心机 湖南湘仪试验仪器开发有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 含灵芝多糖的复方制剂的制备 将检验合格的灵芝、薏苡仁、茯苓、白术、菟丝子、黄精、麦冬、甘草、枸杞子、五味子按质量比 16∶8∶8∶5∶5∶5∶1∶0.5∶0.5∶0.5 称量并投入提取罐内, 加入 10 倍的水煎煮提取 2 h, 滤网过滤后收集滤液, 滤渣重新加 15 倍的水煎煮 4 h, 收集滤液, 合并两次滤液, 旋转蒸发真空浓缩至固形物质量浓度为(35±5)%。浓缩液加入 50 倍质量的菊粉, 搅拌均匀后投入真空带式干燥机, 干燥物料经粉碎后过 80 目筛, 即得含灵芝多糖的复方制剂。主要功效成分及含量: 采用苯酚-硫酸法[30]测得总多糖含量≥14.00 mg/g, 采用液质联用质谱分析(LC-MS/MS)[31]测得灵芝酸 A 含量≥0.25 mg/g。

1.2.2 急性经口毒性试验(最大耐受量试验) 称取受试物 28.37 g, 用蒸馏水溶解至 40.00 mL, 得到最大使用质量浓度为 0.71 g/mL 的供试液。取 SPF 级昆明种小鼠雌雄各 10 只, 适应性饲养一周后, 灌胃前禁食过夜但不禁水, 次日按 20 mL/kg 体积分三次灌胃给予上述供试液, 每次间隔 4 h, 一日内总剂量为 42.56 g/kg, 相当于人摄入量的 1290 倍(以每日口服 2 g、体质量 60 kg 计, 折算剂量则为 0.03 g/kg)。给药后雌雄小鼠分笼饲养, 连续观察 14 d, 记录小鼠的一般状况、中毒症状、死亡状况等[32]。

1.2.3 Ames 试验(平板渗入法) 根据受试物毒性测定结果, 设 5000.00、1000.00、200.00、40.00、8.00 μg/皿 5 个剂量组, 同时设置溶剂对照(DMSO)、自发回变对照(阴性对照)和阳性对照。阳性对照采用敌克松、叠氮化钠、2-氨基芴、1-8 二羟基蒽醌, 剂量分别为 50.00、2.50、10.00、50.00 μg/皿。用经过生物学鉴定合格的 Ames 试验标准菌株 TA97、TA98、TA100、TA102, 在加和不加肝 S9 活化系统条件下, 分别对受试物做平板渗入法 Ames 试验。各菌株每个剂量组做 3 个平行皿, 37 ℃ 培养 48 h, 计算平均回变菌落数。在加或不加 S9 活化系统条件下, 若受试物的回变菌落数是自发回变菌落数的 2 倍以上并有剂量-反应关系者则定为阳性。阴性结果需至少做 2 次测试, 阳性结果至少做 3 次测试[33]。

1.2.4 30 d 喂养试验 选取 SPF 级 SD 大鼠 88 只, 雌雄各半, 按体质量随机分为 4 组, 每组 22 只。根据人体日推荐量的 100、50、25 倍, 受试物设 3 个剂量组, 分别为 3.30、1.65、0.83 g/kg, 另设阴性对照组, 给予等量蒸馏水。各组每天按 10 mL/kg 体积灌胃 1 次, 连续 30 d。动物自由饮食和饮水, 每天观察并记录大鼠的一般表现, 每周称体质量及进食量, 通过公式(1)计算每周食物利用率。试验末期, 将大鼠禁食不禁水 16 h, 腹主动脉采血测定血常规指标血红蛋白(Hb)、红细胞计数(RBC)、白细胞计数(WBC)、白细胞分类计数(DC)及血生化指标丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、白蛋白(ALB)、总蛋白(TP)、尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)、三酰甘油(TG)、总胆固醇(TCHO)、血糖(GLU), 计算白蛋白/球蛋白比值(ALB/GIO)。腹主动脉放血处死, 进行大体解剖, 肉眼观察有无异常, 取肝、肾、脾、睾丸(卵巢)等脏器进行称量, 计算脏体比值, 并对肝、肾、脾、胃、肠、睾丸(卵巢)等脏器固定保存, 进行组织病理学检查[34]。

$$A(\%) = \frac{m}{M} \times 100 \qquad 式(1)$$

式中: A 表示周食物利用率, %; m 表示每周体质量增量, g; M 表示每周饲料摄入量, g。

1.2.5 免疫功能评价试验

1.2.5.1 试验分组与处理 选用 SPF 级雄性 Balb/c 小鼠 120 只, 适应性饲养一周后, 按体质量随机分为 12 组, 每组 10 只。其中 4 组小鼠用于迟发型变态反应试验, 测定耳肿胀程度; 4 组用于抗体生成细胞检测试验和腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞试验, 分别测定溶血空斑数和吞噬百分率及吞噬指数; 4 组小鼠用于脾淋巴细胞转化试验和 NK 细胞活性测定试验, 分别测定淋巴细胞增殖能力和 NK 细胞杀伤活性。根据人体日推荐量的 5、10、30 倍, 受试物设 3 个剂量组, 分别为 0.17、0.33、1.00 g/kg, 另设阴性对照组, 给予等量蒸馏水。受试物每日经口一次给予, 灌胃体积为 10 mL/kg, 连续给药 30 d 后检测各项指

标。动物自由饮食和饮水，每周根据体质量变化调整给药量。

1.2.5.2　脾淋巴细胞转化试验　末次给药后 1 h，颈椎脱臼处死小鼠，无菌取脾脏，研磨制备单细胞悬液，调整细胞密度为 3×10^6 个/mL。将细胞悬液分为 2 组，一组加入 ConA 溶液（终质量浓度为 7.50 μg/mL）作为试验孔，另一组作为对照，每组 2 个重复。于恒温培养箱内 5% CO_2、37 ℃ 孵育培养 72 h。噻唑蓝（MTT）法在波长 570 nm 处酶标仪检测每孔的吸光度（A），脾淋巴细胞的增殖能力为 ConA 组与对照组吸光度差值[35]。

1.2.5.3　迟发型变态反应（DTH）　小鼠给予受试物 30 d 后，腹部脱毛约 3 cm×3 cm，均匀涂抹 50.00 μL 2,4-二硝基氟苯（DNFB）溶液（质量浓度 10.00 mg/mL）致敏。致敏后第 5 d，用 DNFB 溶液 10.00 μL 均匀涂抹于小鼠右耳的两面进行攻击，攻击后 24 h 颈椎脱臼处死小鼠，剪下左右耳壳，用打孔器取下直径 8.00 mm 的耳片，称重。用左右耳质量之差表示 DTH 的程度[36]。

1.2.5.4　抗体生成细胞检测（改良法）　小鼠给予受试物 30 d 后，腹腔注射 2.00% 体积分数的压积绵羊红细胞（SRBC）悬液 0.20 mL，免疫 4 d 后颈椎脱臼处死小鼠，取脾脏并研磨制备成单细胞悬液，调整细胞密度为 5×10^6 个/mL。将 10.00% 体积分数的 SRBC 50.00 μL、脾细胞悬液 20.00 μL 与 0.50% 质量分数的琼脂糖溶液 500.00 μL 混匀，倾倒于琼脂糖玻片上，待凝固后放入恒温培养箱中孵育 1.5 h，加入 SA 缓冲液稀释十倍的补体 500.00 μL，继续孵育 1.5 h，计数溶血空斑数。结果用空斑数/10^6 脾细胞表示[37]。

1.2.5.5　小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞试验　小鼠给予受试物 30 d 后，腹腔注射 2.00% 体积分数的压积 SRBC 悬液 0.20 mL，免疫 4 d 后颈椎脱臼处死小鼠，每只腹腔注射 4.00 mL Hank's 溶液，揉按腹腔 20 次，腹腔壁开口后吸取 0.50 mL 腹腔洗液与等体积 1.00% 体积分数鸡血红细胞悬液混匀。吸取混合液 0.50 mL 滴入玻片的琼脂圈内，置于恒温培养箱中孵育 20 min，用生理盐水将未贴壁的细胞洗掉，4.00% 体积分数的多聚甲醛溶液固定 1 min，吉姆萨液染色 15 min。蒸馏水冲洗、晾干，用 40×显微镜计数巨噬细胞和被吞噬的鸡血红细胞数，按照公式（2）和（3）计算吞噬百分率和吞噬指数[38]。

$$W(\%)=\frac{n_1}{n_0}\times100 \qquad 式（2）$$

$$T=\frac{n_2}{n_0} \qquad 式（3）$$

式中：W 表示吞噬百分率，%；T 表示吞噬指数；n_1 表示吞噬鸡血红细胞的巨噬细胞数；n_2 表示被吞噬的鸡红细胞总数；n_0 表示计数的巨噬细胞数。

1.2.5.6　NK 细胞活性测定（乳酸脱氢酶测定法）　将对数生长期的靶细胞 YAC-1 消化，调整细胞密度为 4×10^5 个/mL。小鼠给予受试物 30 d 后，颈椎脱臼处死小鼠，无菌取脾脏，研磨制备单细胞悬液，调整细胞密度为 2×10^7 个/mL。取靶细胞和效应细胞（脾细胞）各 100.00 μL 加入到 96 孔培养板内，作为反应孔。靶细胞自然释放孔加靶细胞和培养液各 100.00 μL，靶细胞最大释放孔加靶细胞和 1.00% 体积分数的 NP40 各 100.00 μL。上述各试验组均设置 3 个平行孔，恒温培养箱培养 4 h，培养板低速离心 5 min（1000 r/min，离心半径 6 cm），每孔吸取上清 100.00 μL 转至平底的 96 孔培养板内。利用 LDH 检测试剂盒，490 nm 检测每孔的 A。按照公式（4）计算 NK 细胞活性[39]。

$$S(\%)=\frac{A_1-A_0}{A-A_0}\times100 \qquad 式（4）$$

式中：S 表示细胞活性，%；A_1 表示反应孔吸光度；A_0 表示自然释放孔吸光度；A 表示最大释放孔吸光度。

1.3　数据处理

采用 SPSS 19.0 进行统计分析，计量数据用平均值±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，若方差齐，组间比较采用单因素方差分析；若方差不齐，采用秩和检验进行统计分析。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果与分析

2.1　急性经口毒性试验

受试物给予小鼠灌胃后，14 d 观察期内小鼠饮食活动和大小便正常，生长良好，未发现明显中毒症状和死亡，体重增加，体重变化见表 1。试验结束后解剖小鼠进行大体观察，心、肝、肾、脾、肺、肠、胃、性腺等主要脏器未见明显异常。结果表明，受试物对雌雄小鼠最大耐受剂量（MTD）超过 42.56 g/kg，其剂量相当于人体推荐用量的 1290 倍。根据《保健食品检验与评价技术规范》急性毒性剂量分级标准，含灵芝多糖的复方制剂属于无毒物质。

表 1　含灵芝多糖的复方制剂急性经口毒性试验（n=10）
Table 1　Acute oral toxicity test results of compound preparation containing *Ganoderma lucidum* polysaccharides in mice (n=10)

性别	初体重（g）	一周体重（g）	末体重（g）	死亡数（只）	MTD（g/kg）
雄	20.96±0.80	30.71±2.96	35.85±4.98	0	>42.56
雌	22.06±0.97	29.06±1.15	33.14±2.45	0	>42.56

2.2　Ames 试验

Ames 试验是利用营养缺陷型鼠伤寒沙门氏菌来检测受试物的致突变作用。营养缺陷型菌株自身不能合成组氨酸，若在无组氨酸培养基上不能生长，仅有少数自发回复突变的细菌生长，而致突变物可使营养缺陷型菌株诱导突变为野生型菌株，野生型菌株可自身合成组氨酸，因此在无组氨酸培养基上可见大量细菌生长。许多外源性物质是间接诱变剂，需要经

过代谢活化作用才转变为致突变物，因此在试验中加入哺乳动物肝微粒体酶系统（肝 S9）来模拟体内环境，提高检测的灵敏度[33]。表 2 结果显示，在未加肝 S9 活化系统条件下，TA97、TA98、TA100、TA102 自发回变组（阴性对照）的回变菌落数分别 157、42、149、263 CFU/皿，受试物各剂量组均未引起四种测试菌株的回变菌落数明显增加，也没有剂量-反应关系；溶剂对照组也未发现回变菌落数明显改变，表明溶剂是安全的；而四种菌株的阳性诱变剂组的回变菌落数分别对应为 1620、1160、2469、885 CFU/皿，远大于自发回变组的回变菌落数，表明试验系统有效；在添加肝 S9 活化系统条件下试验结果与未添加肝 S9 活化系统试验结果一致。表 3 的重复试验结果与表 2 的试验结果一致。因此，根据 Ames 试验结果判断标准，含灵芝多糖的复方制剂没有致突变作用。

2.3 30 d 喂养试验

2.3.1 一般状况观察 在 30 d 喂养期间，各剂量组动物健康状况良好，饮食排泄正常，未观察到中毒症状，无死亡。如图 1~图 2 所示，受试物各剂量组大鼠每周体质量与阴性对照组相比，差异均无统计学意义（P>0.05）。周食物利用率结果见表 4，受试物各剂量组的雌性及雄性大鼠周食物利用率与阴性对照组对应性别大鼠的周食物利用率相比，差异亦无统计学意义（P>0.05）。上述结果表明含灵芝多糖的复方制剂对大鼠体质量、周食物利用率及一般状况方面没有显著影响。

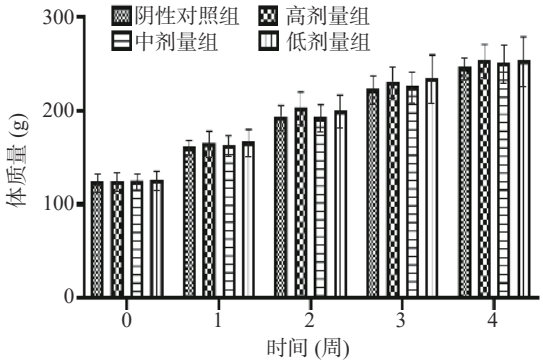


图 1 含灵芝多糖的复方制剂对雌性大鼠体质量的影响（n=11）

Fig.1 Effect of compound preparation containing *Ganoderma lucidum* polysaccharides on body mass of female rats (n=11)

2.3.2 血常规指标 试验末期，采抗凝血检测白细胞计数（WBC）及白细胞分类（中性粒细胞、淋巴细胞、

表 2 含灵芝多糖的复方制剂第一次 Ames 试验回变菌落数（n=3）

Table 2 Number of revertant colonies in the first Ames test of compound preparation containing *Ganoderma lucidum* polysaccharides (n=3)

组别	剂量（μg/皿）	TA97（CFU/皿）		TA98（CFU/皿）		TA100（CFU/皿）		TA102（CFU/皿）	
		−S9	+S9	−S9	+S9	−S9	+S9	−S9	+S9
含灵芝多糖的复方制剂	5000	154±6	150±13	41±11	43±5	155±5	145±7	258±14	271±16
	1000	155±7	161±4	42±7	46±3	143±7	142±10	273±16	266±7
	200	161±7	145±16	42±2	46±1	140±2	149±5	258±17	265±15
	40	160±7	165±16	43±3	46±2	146±6	144±6	263±5	263±13
	8	146±6	145±5	42±6	44±1	148±8	151±9	261±19	264±5
自发回变		157±8	150±22	42±9	42±5	149±12	142±10	263±13	264±9
溶剂对照		142±12	148±19	42±3	42±6	152±8	154±8	266±13	276±11
叠氮化钠	2.5					2469±63			
2-氨基芴	10		1600±51		1140±46		2310±84		
敌克松	50	1620±33		1160±95				885±28	
1-8二羟基蒽醌	50								1150±90

表 3 含灵芝多糖的复方制剂第二次 Ames 试验回变菌落数（n=3）

Table 3 Number of revertant colonies in the second Ames test of compound preparation containing *Ganoderma lucidum* polysaccharides (n=3)

组别	剂量（μg/皿）	TA97（CFU/皿）		TA98（CFU/皿）		TA100（CFU/皿）		TA102（CFU/皿）	
		−S9	+S9	−S9	+S9	−S9	+S9	−S9	+S9
含灵芝多糖的复方制剂	5000	146±16	169±12	37±7	38±3	135±8	140±12	239±11	250±27
	1000	161±8	155±5	41±4	37±4	155±4	142±14	255±28	263±33
	200	155±12	152±18	37±8	40±10	139±10	137±10	254±6	265±5
	40	154±11	161±13	43±4	39±6	143±11	152±15	263±7	251±3
	8	161±8	155±9	37±4	43±6	141±2	141±5	263±10	253±16
自发回变		150±15	163±8	41±6	38±2	146±8	142±13	272±10	246±8
溶剂对照		153±5	157±9	36±9	37±5	154±9	145±13	264±14	269±19
叠氮化钠	2.5					2426±80			
2-氨基芴	10		1569±53		1055±90		2463±36		
敌克松	50	1622±69		1063±59				843±56	
1-8二羟基蒽醌	50								989±86

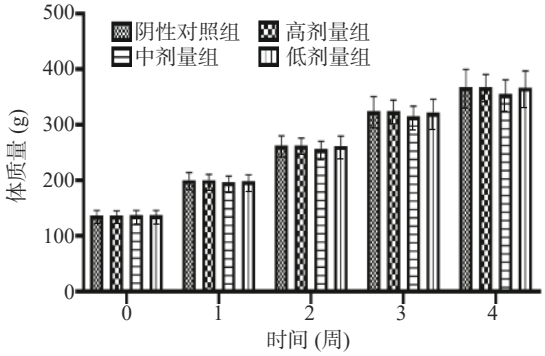


图 2　含灵芝多糖的复方制剂对雄性大鼠体质量的影响（n=11）

Fig.2　Effect of compound preparation containing *Ganoderma lucidum* polysaccharides on body mass of male rats (n=11)

表 4　含灵芝多糖的复方制剂对大鼠周食物利用率的影响（n=11，%）

Table 4　Effect of compound preparation containing *Ganoderma lucidum* polysaccharides on weekly food utilization rate in rats (n=11, %)

性别	时间	阴性对照组	高剂量组	中剂量组	低剂量组
雌性	第1周	34.00±2.10	37.30±6.30	35.30±3.30	37.50±5.70
	第2周	27.90±8.10	30.70±9.40	25.80±8.20	27.00±10.40
	第3周	21.50±12.30	21.20±10.10	25.30±8.70	25.60±14.70
	第4周	17.00±6.40	16.60±7.00	18.60±4.00	13.30±3.60
雄性	第1周	52.00±4.20	50.80±3.10	49.90±1.90	50.70±3.50
	第2周	37.40±5.30	39.40±2.60	36.90±4.40	38.80±6.70
	第3周	36.10±10.20	37.90±6.40	34.70±7.80	36.40±4.00
	第4周	25.00±3.30	25.30±8.60	23.40±4.10	25.60±6.10

单核细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞）、红细胞计数（RBC）、血红蛋白浓度（Hb）等血常规指标。由于大鼠血液学（血常规和血液生化）指标受到动物品系、年龄、来源、饲养环境、取样方法、取样部位、检测仪器与方法、麻醉剂使用等众多因素影响，不同实验室之间动物的相关生物学指标都会有所差异。如表 5 所示，受试物中剂量组雌性大鼠 WBC 为 2.04×10^9/L，中剂量组雌性大鼠单核细胞比例为 3.87%，高剂量组雌性大鼠 Hb 为 128.50 g/L，虽然与阴性对照组雌性大鼠对应的指标相比均有统计学差异（P<0.05），但这些差异的剂量效应关系不明显，且数值仍处于 SD 大鼠正常参考区间内（雌性 WBC：0.80×10^9/L~10.60×10^9/L；单核细胞比例：0.90%~18.00%；Hb：110.00~165.00 g/L）[40]，可以认为这种统计学差异没有临床意义。因此各实验室应该建立本实验室的参考值区间，为结果评判提供参考。其余指标的差异均无统计学意义（P>0.05）。

2.3.3　血液生化学指标　上文提到，不同实验室之间的血液生化学指标也受各种因素影响而有所差异。表 6 所示，受试物各剂量组与阴性对照组相比，雌性大鼠高剂量和中剂量组 ALT 分别下降 5.53、4.70 U/L，高、中、低三个剂量组 AST 分别下降 27.97、20.85、24.25 U/L，高剂量组 ALB 下降 1.40 g/L，高剂量和中剂量组 TP 分别下降 3.77、3.61 g/L；雄性大鼠中、低剂量组 BUN 分别上升 0.83、1.11 mmol/L。虽然与阴性对照组大鼠对应的指标相比均有统计学差异（P<0.05），但这些差异的剂量效应关系不明显，且数值仍处于 SD 大鼠正常参考区间内（雌性 ALT：6.00~114.00 U/L；AST：37.00~205.00 U/L；ALB：29.00~48.00 g/L；TP：54.00~85.00 g/L。雄性 BUN：4.63~10.32 mmol/L）[40]，可以认为这种统计学差异没有临床意义。其余指标的差异均无统计学意义（P>0.05）。

2.3.4　脏器质量和脏体比值　由表 7 可得，受试物各剂量组大鼠肝脏、肾脏、脾脏、卵巢（雌性）、睾丸（雄性）的脏器的绝对质量和相对质量（脏体比值）与阴性

表 5　含灵芝多糖的复方制剂对大鼠血常规指标的影响（n=11）

Table 5　Effect of compound preparation containing *Ganoderma lucidum* polysaccharides on hematological indexes in rats (n=11)

性别	血常规指标	阴性对照组	高剂量组	中剂量组	低剂量组
雌性	WBC（10^9/L）	3.06±0.88	2.61±0.68	2.04±0.64**	3.41±1.19
	中性粒细胞（%）	22.18±9.59	21.90±5.57	22.03±7.80	21.16±7.92
	淋巴细胞（%）	73.31±9.53	72.92±4.24	71.29±7.14	73.61±8.48
	单核细胞（%）	2.44±1.02	2.94±1.15	3.87±2.03*	2.95±1.09
	嗜酸性粒细胞（%）	2.07±0.82	2.25±1.19	2.51±1.20	2.28±0.68
	嗜碱性粒细胞（%）	0.00±0.00	0.00±0.00	3.13±10.24	0.00±0.00
	RBC（10^{12}/L）	6.98±0.22	6.73±0.36	7.02±0.38	6.95±0.37
	Hb（g/L）	133.50±2.90	128.50±4.10*	131.50±6.40	133.10±4.00
雄性	WBC（10^9/L）	4.36±1.18	4.77±1.52	4.29±1.15	4.89±1.57
	中性粒细胞（%）	19.26±5.10	20.05±7.37	19.43±6.17	18.02±6.04
	淋巴细胞（%）	76.26±5.35	74.74±7.28	75.43±5.48	76.92±5.67
	单核细胞（%）	2.68±1.01	3.38±1.37	3.60±1.31	3.50±1.40
	嗜酸性粒细胞（%）	1.79±0.60	1.84±0.89	1.55±0.49	1.56±0.43
	嗜碱性粒细胞（%）	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	RBC（10^{12}/L）	7.10±0.35	7.06±0.29	7.12±0.42	7.21±0.29
	Hb（g/L）	135.40±4.70	136.30±5.00	134.90±5.50	136.80±5.10

注：与阴性对照组比较，*P<0.05，**P<0.01；表6同。

表 6 含灵芝多糖的复方制剂对大鼠血液生化学指标的影响(n=11)

Table 6 Effect of compound preparation containing *Ganoderma lucidum* polysaccharides on blood biochemical indexes in rats (n=11)

性别	生化学指标	阴性对照组	高剂量组	中剂量组	低剂量组
雌性	ALT(U/L)	31.93±4.62	26.40±2.45**	27.23±4.81*	31.09±5.72
	AST(U/L)	143.12±21.55	115.15±11.92**	122.27±28.62*	118.87±11.58**
	ALB(g/L)	31.47±1.66	30.07±1.29*	30.18±1.60	30.88±1.77
	TP(g/L)	58.24±3.93	54.47±1.79**	54.63±2.25*	57.33±3.94
	BUN(mmol/L)	5.98±0.79	6.58±1.18	6.27±1.07	5.89±0.37
	Cr(μmol/L)	29.89±3.01	29.02±3.01	28.33±2.35	29.00±3.07
	TG(mmol/L)	0.54±0.33	0.71±0.45	0.50±0.18	0.80±0.28
	TCHO(mmol/L)	2.04±0.54	2.01±0.20	1.90±0.28	2.10±0.36
	GLU(mmol/L)	5.52±0.79	5.86±0.60	5.55±0.67	6.81±1.53
	ALB/GlO	1.18±0.07	1.23±0.05	1.24±0.07	1.17±0.08
雄性	ALT(U/L)	31.35±4.21	32.82±6.83	32.10±3.61	32.04±4.80
	AST(U/L)	119.19±22.90	124.36±24.51	114.66±18.91	125.14±22.51
	ALB(g/L)	30.07±1.46	30.77±1.94	30.40±2.07	30.39±2.03
	TP(g/L)	58.95±3.03	61.09±5.72	60.08±5.52	59.78±4.82
	BUN(mmol/L)	5.22±0.80	5.34±0.98	6.05±0.97*	6.33±0.91**
	Cr(μmol/L)	25.89±2.91	26.24±2.67	25.64±2.87	26.98±2.93
	TG(mmol/L)	0.82±0.37	0.90±0.33	0.77±0.26	0.80±0.36
	TCHO(mmol/L)	2.20±0.29	2.11±0.32	1.95±0.42	2.07±0.37
	GLU(mmol/L)	5.59±0.94	4.84±0.77	5.46±0.63	5.13±0.82
	ALB/GlO	1.05±0.06	1.02±0.07	1.03±0.06	1.04±0.05

表 7 含灵芝多糖的复方制剂对大鼠脏器质量及脏体比值的影响(n=11)

Table 7 Effect of compound preparation containing *Ganoderma lucidum* polysaccharides on organ mass and organ-body ratio in rats (n=11)

性别	脏器指标		阴性对照组	高剂量组	中剂量组	低剂量组
雌性	肝脏	质量(g)	7.79±0.79	7.82±0.74	7.79±1.02	9.08±2.28
		脏体比值(%)	3.27±0.22	3.20±0.18	3.27±0.55	3.68±1.04
	肾脏	质量(g)	1.85±0.13	1.80±0.17	1.80±0.15	1.87±0.20
		脏体比值(%)	0.78±0.04	0.74±0.03	0.75±0.08	0.76±0.13
	脾脏	质量(g)	0.65±0.07	0.68±0.13	0.61±0.07	0.72±0.14
		脏体比值(%)	0.27±0.03	0.28±0.05	0.26±0.03	0.30±0.07
	卵巢	质量(g)	0.15±0.02	0.15±0.02	0.15±0.02	0.14±0.02
		脏体比值(%)	0.06±0.01	0.06±0.01	0.06±0.01	0.06±0.01
雄性	肝脏	质量(g)	12.38±2.05	11.93±1.48	12.21±1.42	11.69±1.48
		脏体比值(%)	3.47±0.42	3.32±0.27	3.53±0.21	3.34±0.24
	肾脏	质量(g)	2.78±0.38	2.66±0.32	2.56±0.32	2.67±0.31
		脏体比值(%)	0.78±0.07	0.74±0.05	0.74±0.06	0.76±0.05
	脾脏	质量(g)	1.04±0.14	1.00±0.10	0.97±0.16	0.93±0.14
		脏体比值(%)	0.29±0.04	0.28±0.03	0.28±0.05	0.27±0.04
	睾丸	质量(g)	3.39±0.34	3.35±0.23	3.23±0.18	3.17±0.21
		脏体比值(%)	0.96±0.08	0.94±0.06	0.94±0.05	0.91±0.06

对照组比较,差异均无统计学意义(P>0.05)。

2.3.5 大体解剖及组织病理学检查 各组动物大体解剖心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、胃肠等主要脏器未见肉眼可见的中毒症状,脏器外观颜色和大小正常,均未出现明显渗出、增生、水肿、萎缩等病变。通过对各组动物脏器组织病理学检查发现,阴性对照组仅一只雄性大鼠肠粘膜下层出现轻度水肿(图 3A),未见炎性细胞浸润,其他脏器均未见异常病理变化;受试物高剂量组一只雄性大鼠肝脏局部淋巴细胞轻度增生(图 3B);高剂量组两只雌性大鼠肾小球萎缩(图 3C),肾小管内管型增多(图 3D),肾结构正常,肾小管、肾小球及间质均未见异常病理变化;其余大鼠各脏器未见异常病理变化。

各组动物中仅有个别大鼠出现轻度病理改变,且病变性质和程度无明显差异,所有病变类型在大鼠中为常见的自发性病理改变,无明显生物学意义。

综上,大鼠 30 d 喂养试验中通过对大鼠体质量、周食物利用率、血常规指标、血液生化学指标、主要脏器系数、组织病理学检查、一般状况等指标的检测,均未发现含灵芝多糖的复方制剂对大鼠有明显

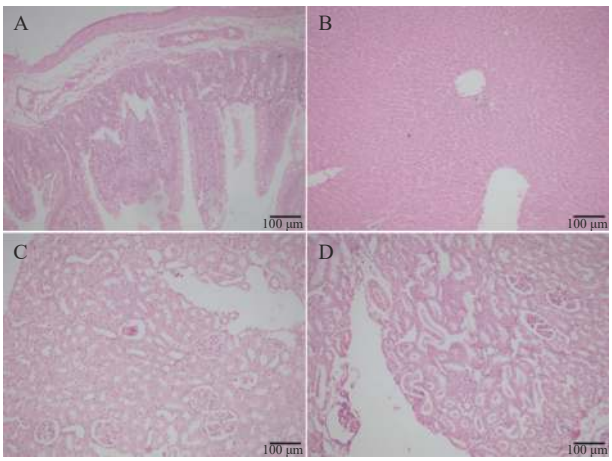


图 3　含灵芝多糖的复方制剂各组大鼠组织病理学变化

Fig.3　Histopathological changes of rats in different dose groups of compound preparation containing *Ganoderma lucidum* polysaccharides

注：A.阴性对照组肠粘膜；B.高剂量组肝脏；C.高剂量组肾小球；D.高剂量组肾小管。

的毒性作用。

2.4　免疫功能评价试验

2.4.1　脾淋巴细胞转化试验　当脾淋巴细胞受到 ConA 刺激后，可出现细胞体积增大、代谢旺盛、蛋白质及核酸合成增加等生物学现象，部分小淋巴细胞可转化为淋巴母细胞并进行有丝分裂，淋巴母细胞中的线粒体水解酶可将 MTT 分解为紫色结晶，其光密度差值能反映机体细胞免疫水平。如图 4 所示，受试物高、中、低三个剂量组 ConA 孔吸光度差值分别 0.81、0.81、0.80，与阴性对照孔的吸光度差值（0.84）相比，差异均无统计学意义（P>0.05）。表明含灵芝多糖的复方制剂不能促进脾淋巴细胞转化为淋巴母细胞，不能提升细胞免疫功能。

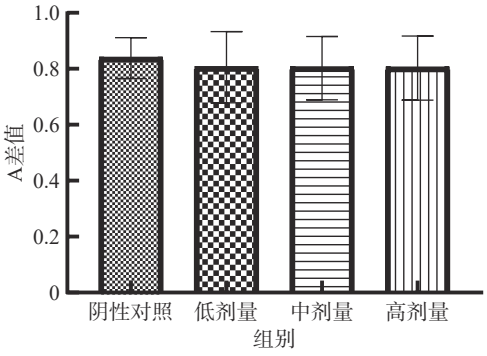


图 4　含灵芝多糖的复方制剂对脾淋巴细胞增殖的影响（n=10）

Fig.4　Effect of compound preparation containing *Ganoderma lucidum* polysaccharides on the proliferation of spleen lymphocytes (n=10)

2.4.2　迟发型变态反应　T 淋巴细胞经抗原 DNFB 刺激后形成致敏淋巴细胞，当再次接触抗原后，主要造成单核细胞浸润及细胞变性坏死为特征的局部变态反应性炎症，具体表现为局部迟发型肿胀，通过检测耳重量差值可以反映迟发型变态反应程度。如图 5 所示，受试物高、中、低三个剂量组左右耳质量差值分别为 14.37、14.96、16.19 mg，与阴性对照组差值（17.09 mg）相比，差异均无统计学意义（P>0.05）。表明含灵芝多糖的复方制剂不能增强迟发型变态反应，不能提升细胞免疫功能。

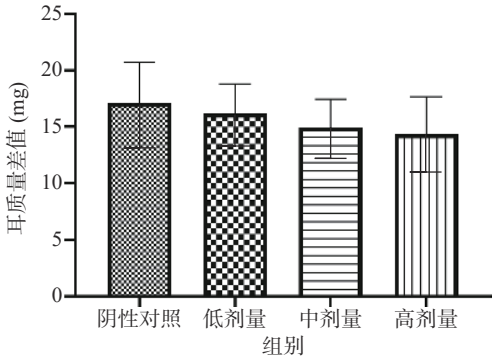


图 5　含灵芝多糖的复方制剂对迟发型变态反应的影响（n=10）

Fig.5　Effect of compound preparation containing *Ganoderma lucidum* polysaccharides on delayed type hypersensitivity (n=10)

2.4.3　抗体生成细胞检测　当脾淋巴细胞接触绵羊红细胞（抗原）后，刺激 B 细胞活化分泌特异性抗体，抗原抗体复合物在补体的参与下使红细胞溶解，在琼脂糖玻片形成一个肉眼可见的溶血空斑，一个空斑即代表一个抗体生成细胞（浆细胞），因此溶血空斑数可反映体液免疫强弱[29]。如图 6 所示，受试物低、中、高剂量组溶血空斑数分别为 453.80、458.30、481.00，与阴性对照组（408.90）相比分别提高 10.98%、12.08%、17.63%，差异均具有统计学意义（P<0.05）。表明含灵芝多糖的复方制剂能增加抗体生成细胞数，具有增强体液免疫的潜力。

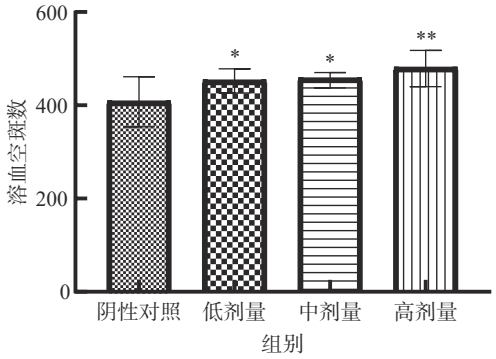


图 6　含灵芝多糖的复方制剂对抗体生成细胞的影响（n=10）

Fig.6　Effect of compound preparation containing *Ganoderma lucidum* polysaccharides on antibody-producing cells (n=10)

注：与阴性对照组比较，*P<0.05，**P<0.01；图 7~图 9 同。

2.4.4　小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞试验　当绵羊红细胞注射入小鼠腹腔，机体固有免疫功能首先发挥作用，静息状态下的巨噬细胞被激活，当再次接触

到异物(鸡红细胞)入侵,活化的巨噬细胞将鸡红细胞吞入,经染色后显微镜下可观察并计数巨噬细胞和被吞噬的鸡血红细胞数,通过公式计算吞噬百分率和吞噬指数可评估巨噬细胞的吞噬能力。如图 7 所示,受试物中、高剂量组吞噬百分率分别为 24.28%、23.81%,与阴性对照组(17.11%)相比分别提高 7.17%、6.70%,差异具有统计学意义(P<0.05)。如图 8 所示,受试物中、高剂量组吞噬指数均为 0.41,与阴性对照组(0.27)相比均提高 0.14,差异具有统计学意义(P<0.05)。表明含灵芝多糖的复方制剂能提高巨噬细胞吞噬能力,具有增强非特异性免疫的潜力。

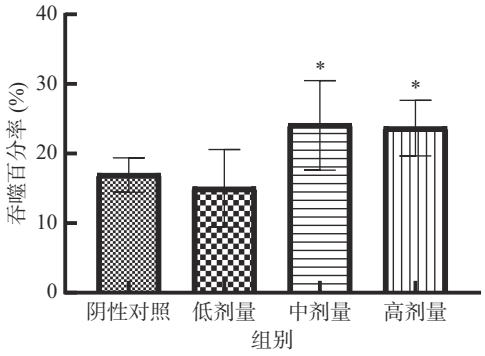


图 7 含灵芝多糖的复方制剂对巨噬细胞吞噬百分率的影响(n=10)

Fig.7 Effect of compound preparation containing *Ganoderma lucidum* polysaccharides on phagocytosis percentage of macrophages (n=10)

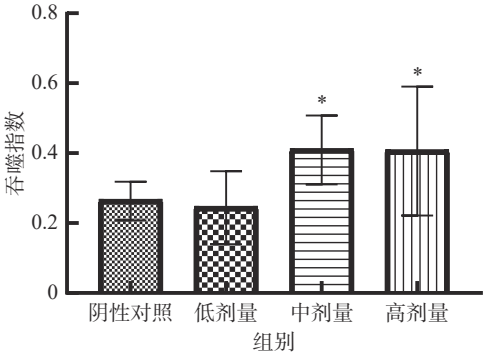


图 8 含灵芝多糖的复方制剂对巨噬细胞吞噬指数的影响(n=10)

Fig.8 Effect of compound preparation containing *Ganoderma lucidum* polysaccharides on phagocytosis index of macrophages (n=10)

2.4.5 NK 细胞活性测定 正常情况下,靶细胞 YAC-1 胞浆内的乳酸脱氢酶(LDH)不能透过细胞膜,当细胞受到 NK 细胞杀伤后,LDH 释放到胞外,经过一系列反应后生成紫红色甲臜化合物,其光密度值可反映 NK 细胞杀伤活性[29]。如图 9 所示,受试物中、高剂量组 NK 细胞活性分别为 54.01%、52.57%,与阴性对照组(36.57%)相比分别提高 17.44%、16.00%,差异具有统计学意义(P<0.01)。表明含灵芝多糖的复方制剂能提高 NK 细胞活性,具有增强非特异性免疫的潜力。

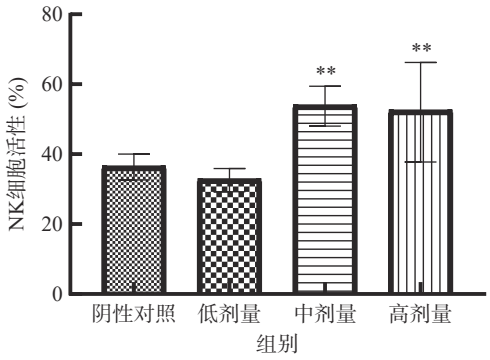


图 9 含灵芝多糖的复方制剂对 NK 细胞活性的影响(n=10)

Fig.9 Effect of compound preparation containing *Ganoderma lucidum* polysaccharides on the activity of NK cells (n=10)

3 讨论与结论

现代医学认为,人的免疫系统由免疫器官、免疫细胞及免疫分子构成,根据防御反应类型可分为非特异性免疫和特异性免疫,具有识别、清除外来病原微生物及体内突变细胞,维持机体内环境平衡稳定的功能[41−43]。免疫力低下时容易受到外界病原微生物入侵或导致过敏反应,患病风险极大增加。传统医学认为“正气存内,邪不可干”和“邪之所凑,其气必虚”,免疫反应本质是正邪相争,正气充实能够祛除外邪,邪气亢盛则导致免疫自稳失调[44],中医从整体观念出发,通过“扶正祛邪”,调节机体阴阳平衡,增强免疫自稳[45]。故此,从现代医学和传统医学的角度均揭示了免疫功能的可调节性质。

体液免疫是特异性免疫的重要组成部分,体液免疫主要是通过浆细胞分泌抗体从而发挥免疫应答作用的。通过对溶血空斑数目或吸光度值的检测,可以反映抗体生成细胞的多少,提示体液免疫的强弱。桑卡娜等[46]研究表明五加芪粉显著提高了小鼠抗体形成细胞水平,具有提升动物体液免疫能力的作用。王溪竹[47]研究发现人参原三醇组皂苷酶解产物能诱导 B 淋巴细胞分化形成抗体生成细胞,发挥免疫调节作用。本研究表明含灵芝多糖的复方制剂低、中、高剂量组分别使小鼠抗体生成细胞数目提高 10.98%、12.08%、17.63%,具有正向调节体液免疫应答的潜力。

非特异性免疫是机体先天具有的免疫功能,是特异性免疫的基础。对病原体入侵最先产生免疫应答的细胞是巨噬细胞,它们是执行非特异性免疫的主要效应细胞[48]。单核-巨噬细胞的吞噬能力是衡量机体非特异性免疫功能的标志之一,当病原体、异物等抗原物质进入机体后,其通过趋化、吞噬、杀灭作用迅速清除,因而对巨噬细胞吞噬鸡红细胞试验的吞噬指数和吞噬百分率检测,可反映吞噬功能的强弱[49]。本研究表明含灵芝多糖的复方制剂中、高剂量组能分别提高吞噬百分率 7.17%、6.70%,吞噬指数均提高 0.14,即可增强吞噬细胞的吞噬能力。NK 细胞不

同于 T、B 两类淋巴细胞，它没有主要组织相容复合体（MHC）限制，不依赖补体和抗体就能够发挥调节免疫及直接杀伤靶细胞的作用，是机体非特异性免疫的重要组成部分。NK 细胞活化后，还能分泌细胞因子发挥免疫调节作用[50]。当靶细胞 YAC-1 受到 NK 细胞杀伤后，胞内乳酸脱氢酶被释放到细胞外，进一步通过氧化还原反应生成有色的甲臜类化合物，检测其吸光度值可反映 NK 细胞活性[29]。本研究表明含灵芝多糖的复方制剂中、高剂量组能使小鼠 NK 细胞活性分别提高 17.44%、16.00%。两项试验结果均表明含灵芝多糖的复方制剂具有增强非特异性免疫的潜力。

此外，为考察含灵芝多糖的复方制剂的食用安全性，本研究采用了小鼠急性经口毒性试验、Ames 试验和大鼠 30 d 喂养试验。结果表明受试物对雌雄小鼠最大耐受剂量（MTD）超过 42.56 g/kg，其剂量相当于人体推荐用量的 1290 倍，急性毒性分级属于无毒物质；受试物 Ames 试验结果阴性，未显示出致突变作用；30 d 喂养试验中，受试物对大鼠体质量、周食物利用率、血常规指标、血液生化学指标及主要脏器系数均未产生显著影响（P>0.05），组织学检查未发现明显病理变化。

综上所述，本研究从细胞免疫、体液免疫及非特异性免疫的角度，较为系统全面地评价了含灵芝多糖的复方制剂免疫调节功能，结果表明了含灵芝多糖的复方制剂是通过增强体液免疫功能和非特异性免疫功能来发挥免疫调节作用的。在毒理学研究中未发现不良反应或毒副作用。因此，含灵芝多糖的复方制剂是一种可以调节机体免疫功能且安全性良好的保健食品。

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

参考文献

[1] 夏淑洁，李灿东. 基于“治未病”理论的中国特色健康管理模式探讨[J]. 中医药导报，2019，25(6)：15-17,23. [XIA S J, LI C D. Discussion on health management model with Chinese characteristics based on the theory of "preventive treatment of diseases"[J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2019, 25(6): 15-17,23.]

[2] ABABNEH M A, HALLOUSH S, ALTAWALBEH S, et al. Knowledge and attitudes towards herbal and dietary products use during the COVID-19 pandemic[J]. Clinical Nutrition Open Science, 2023, 49: 118-129.

[3] 马征. 冬凌草免疫调节作用研究及安全性评价[D]. 长沙：中南大学，2010. [MA Z. Study on immune regulation of *Rabdosia rubescens* and its safety assessment[D]. Changsha: Central South University, 2010.]

[4] 乔海博. 高纯中药复方多糖免疫调节作用及其安全性评价[D]. 石河子：石河子大学，2013. [QIAO H B. The immunomodulatory function and safety evaluation of the high-purity Chinese compound polysaccharide[D]. Shihezi: Shihezi University, 2013.]

[5] 孙帆. 桦褐孔菌多糖提高免疫力活性研究与系列产品开发[D]. 长春：吉林农业大学，2018. [SUN F. Study on the enhancement of immune activity of *Inonotus obliquus* polysaccharides and development of series products[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2018.]

[6] JIN X, RUIZ BEGUERIE J, SZE D M, et al. *Ganoderma lucidum* (Reishi mushroom) for cancer treatment[J]. The Cochrane Database of Systematic Reviews, 2016, 4(4): Cd007731.

[7] PAN K, JIANG Q, LIU G, et al. Optimization extraction of *Ganoderma lucidum* polysaccharides and its immunity and antioxidant activities[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 55: 301-306.

[8] ZHOU Q, YU R, LIU T, et al. Coix seed diet ameliorates immune function disorders in experimental colitis mice[J]. Nutrients, 2021, 14(1): 123.

[9] 王彦芳，杨彬彬，陈倩，等. 薏苡仁多糖通过调控 JAK3/STAT5 通路改善细胞免疫功能的体内外研究[J]. 中华中医药杂志，2021，36(11)：6414-6417. [WANG Y F, YANG B B, CHEN Q, et al. *In vitro* and *in vivo* study of coixan improving cellular immune function by regulating the JAK3/STAT5 pathway[J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2021, 36(11): 6414-6417.]

[10] 王萍，王玉堃，王尚明，等. 茯苓多糖对大鼠免疫功能的影响[J]. 山东畜牧兽医，2022，43(8)：11-14,17. [WANG P, WANG Y K, WANG S M, et al. Effects of *Poria cocos* polysaccharide on the immune function of rats[J]. Shangdong Journal of Animal Science and Veterinary Medicine, 2022, 43(8): 11-14,17.]

[11] TIAN H, LIU Z J, PU Y W, et al. Immunomodulatory effects exerted by *Poria cocos* polysaccharides via TLR4/TRAF6/NF-κB signaling *in vitro* and *in vivo*[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2019, 112: 108709.

[12] LIU C, WANG S, XIANG Z, et al. The chemistry and efficacy benefits of polysaccharides from *Atractylodes macrocephala* Koidz[J]. Frontiers in Pharmacology, 2022, 13: 952061.

[13] XIANG X, CAO N, CHEN F, et al. Polysaccharide of *Atractylodes macrocephala* Koidz (PAMK) alleviates cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice by upregulating CD28/IP3R/PLCγ-1/AP-1/NFAT signal pathway[J]. Frontiers in Pharmacology, 2020, 11: 529657.

[14] WANG Z, FANG J N, GE D L, et al. Chemical characterization and immunological activities of an acidic polysaccharide isolated from the seeds of *Cuscuta chinensis* Lam[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2000, 21(12): 1136-1140.

[15] 张庆平，石森林. 菟丝子对小鼠免疫功能影响的实验研究[J]. 浙江临床医学，2006(6)：568-569. [ZHANG Q P, SHI S L. Study on immunity functions of *Cuscuta chinensis* Lam in mice[J]. Zhejiang Clinical Medical Journal, 2006(6): 568-569.]

[16] ZHAO L, XU C, ZHOU W, et al. *Polygonati rhizoma* with the homology of medicine and food: A review of ethnopharmacology, botany, phytochemistry, pharmacology and applications[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2023, 309: 116296.

[17] SU L L, LI X, GUO Z J, et al. Effects of different steaming times on the composition, structure and immune activity of *Polygonatum* polysaccharide[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2023, 310: 116351.

[18] FAN Y, MA X, MA L, et al. Antioxidative and immunological activities of ophiopogon polysaccharide liposome from the root of *Ophiopogon japonicus*[J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 135: 110-120.

[19] FAN Y, MA X, ZHANG J, et al. Ophiopogon polysaccha-

ride liposome can enhance the non-specific and specific immune response in chickens[J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 119: 219−227.
[20] AYEKA P A, BIAN Y, MWITARI P G, et al. Immunomodulatory and anticancer potential of Gan Cao (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) polysaccharides by CT-26 colon carcinoma cell growth inhibition and cytokine IL-7 upregulation *in vitro*[J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2016, 16: 206.
[21] AYEKA P A, BIAN Y, GITHAIGA P M, et al. The immunomodulatory activities of licorice polysaccharides (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) in CT 26 tumor-bearing mice[J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2017, 17(1): 536.
[22] TIAN X, LIANG T. Extraction, structural characterization, and biological functions of *Lycium barbarum* polysaccharides: A review[J]. Biomolecules, 2019, 9(9): 389.
[23] 田阳, 龚桂萍, 路宇, 等. 枸杞子多糖不同组分的双向免疫调节机制研究进展[J]. 食品科学, 2022, 43(23): 356−366. [TIAN Y, GONG G P, LU Y, et al. Research progress on the dual-directional immunoregulatory effect of different polysaccharide fractions from *Lycium barbarum* fruit[J]. Food Science, 2022, 43(23): 356−366.]
[24] ZHAO T, MAO G, MAO R, et al. Antitumor and immunomodulatory activity of a water-soluble low molecular weight polysaccharide from *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill[J]. Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association, 2013, 55: 609−616.
[25] ZHAO T, FENG Y, LI J, et al. Schisandra polysaccharide evokes immunomodulatory activity through TLR 4-mediated activation of macrophages[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 65: 33−40.
[26] TAO J H, DUAN J A, JIANG S, et al. Polysaccharides from *Chrysanthemum morifolium* Ramat ameliorate colitis rats by modulating the intestinal microbiota community[J]. Oncotarget, 2017, 8(46): 80790−80803.
[27] 郑昌平. 菊花多糖的分离纯化、结构鉴定及其生物活性研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2015. [ZHENG C P. Studies on purification, structural elucidation and bioactivities of polysaccharides from *Chrysanthemum morifolium* flowers[D]. Nanchang: Nanchang University, 2015.]
[28] ALOTIBY A, ALSHAREEF M. Comparison between healthcare professionals and the general population on parameters related to natural remedies used during the COVID-19 pandemic[J]. Journal of Multidisciplinary Healthcare, 2021, 14: 3523−3532.
[29] 中华人民共和国卫生部. 保健食品功能学评价程序和检验方法规范(2003 版)[M]. 北京: 中国标准出版社, 2003. [Ministry of Health of the People's Republic of China. Technical standards for testing assessment of health food (2003 edition)[M]. Beijing: Standards Press of China, 2003.]
[30] 肖志伟, 乐智勇, 朱国雪, 等. 人参多糖检测方法及提取工艺优选[J]. 中国现代中药, 2016, 18(1): 106−109. [XIAO Z W, LE Z Y, ZHU G X, et al. Optimization of detection method and extraction technology of ginseng polysaccharides[J]. Modern Chinese Medicine, 2016, 18(1): 106−109.]
[31] 张佳莉, 李莉. LC-MS/MS 同时测定灵芝胶囊中 7 种三萜酸的含量[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(22): 2852−2857. [ZHANG J L, LI L. Simultaneous determination of contents of 7 triterpenoid acids in Lingzhi capsule by LC-MS/MS[J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2021, 38(22): 2852−2857.]
[32] 廖桢, 温艳, 王利芳, 等. 芯之康牌红曲丹参胶囊动物毒理学安全性评价研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(15): 4112−4118. [LIAO Z, WEN Y, WANG L F, et al. Toxicological safety evaluation of XinZhiKang brand monascus and Radix Salviae Miltiorrhiae combination capsule[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2018, 9(15): 4112−4118.]
[33] ZHANG Y, CHEN Q, LUO X, et al. Mutagenicity and safety evaluation of the water extract of *Camellia oleifera* Abel[J]. Journal of Food Science, 2011, 76(3): T84−89.
[34] LU K H, OU G L, CHANG H P, et al. Safety evaluation of water extract of *Gastrodia elata* Blume: Genotoxicity and 28-day oral toxicity studies[J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2020, 114: 104657.
[35] 李清光, 李世芬, 胡奇, 等. 蝙蝠蛾被毛孢菌丝体的活性成分分析及对小鼠免疫功能的调节作用[J]. 食品科技, 2020, 45(8): 28−32. [LI Q G, LI S F, HU Q, et al. Analysis of active component of *Hirsutella sinensis* andits effect on immune function in mice[J]. Food Science and Technology, 2020, 45(8): 28−32.]
[36] 李雪梅. 石参胶囊对免疫功能的影响研究及毒理学研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2015. [LI X M. Study on immunity functions and toxicology of Shi-shen capsule[D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2015.]
[37] 贾秀秀. 人参林蛙油软胶囊的安全性评价及增强免疫功能研究[D]. 长春: 吉林大学, 2017. [JIA X X. Study on safety evaluation and enhancement of immune function of ginseng forest frog oil soft capsule[D]. Changchun: Jilin University, 2017.]
[38] 王权, 杨婉纯, 凌莉, 等. 灵芝蝙蝠蛾拟青霉菌丝体复合物增强免疫作用研究[J]. 中药材, 2022, 45(5): 1247−1252. [WANG Q, YANG W C, LING L, et al. Study on imunity-enhancing of a compound of *Ganoderma lucidum* and *Paecilomyces hepiali*[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2022, 45(5): 1247−1252.]
[39] 张婷婷, 叶子, 王萌, 等. 参贝咀嚼片的免疫调节活性及其安全性评价[J]. 现代食品科技, 2022, 38(9): 80−91. [ZHANG T T, YE Z, WANG M, et al. Study on immune regulation of ginseng-fritillaria bulb tablet and its safety assessment[J]. Modern Food Science & Technology, 2022, 38(9): 80−91.]
[40] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010. [WEI W, WU X M, LI Y J. Experimental methodology of pharmacology[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2010.]
[41] 史顶聪. 红景天蛹虫草片增强机体免疫力研究[D]. 长春: 长春工业大学, 2020. [SHI D C. Study on enhancing immunity of cordyceps militaris tablet of *Rhodiola rosea*[D]. Changchun: Changchun University of Technology, 2020.]
[42] 朱薇薇. 三株健酒毒理学安全性评价及抗疲劳、调节免疫作用研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2010. [ZHU W W. Study on toxicological safety evaluation and anti-fatigue effect and immune functions of Sam Tung God of wine[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2010.]
[43] 焦春伟, 梁慧嘉, 随晶晶, 等. 蝙蝠蛾拟青霉-蛹虫草复方的安全性评价及调节免疫活性研究[J]. 食品安全导刊, 2022(14): 76−80. [JIAO C W, LIANG H J, SUI J J, et al. Safety evaluation and immunomodulatory activity of a combination of *Paecilomyces hepiali* and *Cordyceps militaris*[J]. China Food Safety Magazine, 2022(14): 76−80.]
[44] 徐晓楠, 方钰发, 王妍. 中医阴阳与免疫的关系初探[J]. 四川中医, 2019, 37(2): 25−27. [XU X N, FANG Y F, WANG Y. Discussing on the relationship between Yin and Yang of traditional Chinese medicine and immunity[J]. Journal of Sichuan of Traditional Chinese Medicine, 2019, 37(2): 25−27.]

［45］ 刘维庆, 陈书保, 沙涛. 中医学与免疫学关系探析[J]. 辽宁中医杂志, 2005(12): 1257−1258. ［LIU W Q, CHEN S B, SHA T. Analysis of the relationship between traditional Chinese medicine and immunology[J]. Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine, 2005(12): 1257−1258.］
［46］ 桑卡娜, 高艳艳, 周德刚. 五加芪粉对小鼠淋巴细胞增殖功能和抗体形成细胞的影响[J]. 中国兽药杂志, 2017, 51(3): 44−47. ［SANG K N, GAO Y Y, ZHOU D G. Influence of Wujiaqi powder on lymphocyte proliferation and antibody-forming cells of mice [J]. Chin J Vet Drug, 2017, 51(3): 44−47.］
［47］ 王溪竹. 人参原三醇组皂苷酶解产物改善记忆及提高免疫力研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2019. ［WANG X Z. Improvement of memory and immunity by enzymatic hydrolysates of protopanaxatriol[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2019.］
［48］ UTHAISANGSOOK S, DAY N K, BAHNA S L, et al. Innate immunity and its role against infections[J]. Ann Allergy Asthma Immunol, 2002, 88(3): 253−265.
［49］ 宫晓燕, 曲晓波, 王泽玉. 扶正除疲颗粒对免疫功能低下动物免疫调节的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2005(8): 929−931. ［GONG X Y, QU X B, WANG Z Y. Influence on immunological regulation of Fuzhengchuyi granule in mice with immune hypofunction[J]. Chin J Clin Pharm Therap, 2005(8): 929−931.］
［50］ 李博, 王春凤, 杨桂连. 自然杀伤细胞在机体免疫中的作用及机制研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2015, 31(5): 719−721. ［LI B, WANG C F, YANG G L. Research progress on the role and mechanism of natural killer cells in immunity[J]. Chinese Journal of Immunology, 2015, 31(5): 719−721.］

廖静如, 严静, 赵文俊, 等. 益生菌发酵栀子对酒精性氧化损伤 HepG2 细胞的保护作用 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 350−357. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110076
LIAO Jingru, YAN Jing, ZHAO Wenjun, et al. Protective Effect of Probiotic-fermented *Gardenia jasminoides* Ellis against Alcoholic Oxidative Damage in HepG2 Cells[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 350−357. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110076

· 营养与保健 ·

益生菌发酵栀子对酒精性氧化损伤 HepG2 细胞的保护作用

廖静如, 严　静, 赵文俊, 陈冬球, 王烈宇, 张琦琳, 杜　冰, 黎　攀*
（华南农业大学食品学院, 广东广州 510642）

摘　要: 探究乳酸芽孢杆菌 DU-106 和植物乳杆菌混合菌发酵栀子对 HepG2 细胞酒精性氧化损伤的影响。采用 CCK-8 法探索最佳酒精性氧化损伤造模浓度和栀子提取液干预浓度，评价发酵栀子水提液对超氧化物歧化酶（SOD）、过氧化物酶（CAT）、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）活力、丙二醛（MDA）、谷胱甘肽（GSH）含量等抗氧化能力指标以及丙氨酸氨基转移酶（ALT）、天冬氨酸氨基转移酶（AST）、乳酸脱氢酶（LDH）等转氨酶类释放量、促炎细胞因子（IL-1β、IL-6、TNF-α）等肝损伤评价指标的影响。结果表明栀子提取液（*Gardenia jasminoides* Ellis extract，GE）和发酵栀子提取液（fermented *Gardenia jasminoides* Ellis extract，FGE）可显著提高酒精诱导 HepG2 细胞活力（$P<0.05$），与模型组（MN）相比，GE 和 FGE 显著提高细胞的抗氧化应激能力，减轻脂质过氧化、减少 GSH 耗竭、降低细胞因子水平（$P<0.01$），减少细胞中 AST、ALT 和 LDH 的释放，改善酒精诱导的 HepG2 细胞膜的受损程度。其中，FGE 具有显著的抗氧化和抗炎特性，在酒精性肝损伤中具有潜在的应用前景，可以保护 HepG2 细胞免受酒精性氧化损伤，为开发具有护肝功能的食品提供了有益的线索。

关键词: 乳酸芽孢杆菌 DU-106, 肝损伤, 氧化应激, 抗炎, HepG2 细胞
中图分类号: TS201.4　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2024)21−0350−08
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110076
本文网刊:

Protective Effect of Probiotic-fermented *Gardenia jasminoides* Ellis against Alcoholic Oxidative Damage in HepG2 Cells

LIAO Jingru, YAN Jing, ZHAO Wenjun, CHEN Dongqiu, WANG Lieyu, ZHANG Qilin, DU Bing, LI Pan*
（College of Food Science, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China）

Abstract: This study was to evaluate the effect of fermented *Gardenia jasminoides* Ellis by a mixture of *Bacillus* sp. DU-106 and *Lactobacillus plantarum* on alcoholic oxidative damage in HepG2 cells. The CCK-8 method was used to explore the optimal alcoholic oxidative damage modelling concentration and the intervention concentration of *Gardenia jasminoides* Ellis extract. The effect of fermented *Gardenia jasminoides* Ellis extract on antioxidant capacity indicators such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) activity, malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH) content, as well as the release of transaminase-like enzymes such as alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and lactate dehydrogenase (LDH), and indicators of evaluation of hepatic injury, such as pro-inflammatory cytokines (IL-1β, IL-6, and TNF-α), were detected. The results showed that *Gardenia jasminoides* Ellis extract (GE) and fermented *Gardenia jasminoides* Ellis extract (FGE) significantly increased the viability of ethanol-induced HepG2 cells ($P<0.05$), and compared with the model group (MN), GE and FGE significantly increased the cellular antioxidative stress, attenuated lipid peroxidation, reduced GSH depletion, lowered cytokine levels ($P<0.01$), reduced the release of AST, ALT and LDH in the cells, and improved ethanol-induced damage to HepG2 cell membranes. Among them,

收稿日期: 2023−11−09
基金项目: 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系（CARS-21）; 广东省重点领域研发计划（No: 2020B020226008）。
作者简介: 廖静如（2000−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品营养与安全, E-mail: 15875401128@163.com。
*** 通信作者:** 黎攀（1990−）, 男, 博士, 副教授, 研究方向: 新资源食品原料有效成分评价, E-mail: lp19900815@scau.edu.cn。

FEG had significant antioxidant and anti-inflammatory properties, which were potentially valuable for protecting HepG2 cells from alcoholic oxidative damage, and the present study provided useful clues for the development of food products with hepatoprotective function.

Key words: *Bacillus* sp. DU-106; liver injury; oxidative stress; anti-inflammatory; HepG2 cells

近年来，随着社会观念的变化和人们生活水平的提高，全球酒精消费量逐年增加[1]。长期酗酒或过量饮酒引起的脂肪肝、肝纤维化、肝硬化、肝炎等酒精性肝病成为全球关注的健康问题[2]。酒精性肝病的发展过程中，酒精代谢会产生大量的乙醛和自由基等有害物质，导致细胞内氧化应激增加，细胞膜的脂质过氧化和蛋白质氧化损伤，最终导致肝细胞的损伤和死亡[3]。预防和治疗酒精性肝损伤的主要机制包括减少氧化应激和细胞凋亡、调节炎症介质的释放、干预炎症信号通路、抑制核转录因子活性以保护肝脏，同时涉及调节肠道菌群平衡、维护肠屏障功能等多途径的干预[4−6]。中草药在护肝研究中备受关注，主要集中在其抗炎和肝保护方面[7]。肝脏是人体最大的内脏器官，承担着多种生理功能，包括新陈代谢、解毒、合成蛋白质等。肝炎、脂肪肝等疾病都与肝脏炎症和损伤密切相关，炎症反应使得肝脏组织遭受破坏，进而导致纤维化、肝硬化甚至肝癌等严重后果，现有研究表明金银花[8]、人参[9]、黄芪[10] 等具有抑制炎症反应的潜力。因此，寻找一种能够减轻酒精性氧化损伤的药食同源物质对于预防和治疗酒精性肝病具有重要意义。

栀子（*Gardenia jasminoides* Ellis），别名黄栀子、山栀子、大红栀，属茜草科栀子属植物栀子的干燥成熟果实，是一种常见的食药同源中药材[11]，现代药理学表明栀子含有栀子苷、西红花苷、黄酮、挥发油等多种活性成分[12−13]，具有清热解毒、抗炎、抗氧化等药理作用[14]。栀子生品苦寒之性较强，用现代炮制方法驱除其苦寒之性对栀子的应用具有重要作用。现有研究报道，益生菌具有保肝利胆、降血糖血脂等功效，采用益生菌发酵中草药，可以降低苦涩味，增加风味，还可以促进一些成分的转化，产生更多的抗氧化、抗炎等其他生物活性的物质，提高生物利用率，更好地减轻氧化应激损伤[15−16]。苦荞提取物经过杏鲍菇发酵具有较好的抗氧化活性，并对小鼠慢性酒精性肝脏、胃黏膜损伤具有明显的保护作用；黑木耳经金黄色葡萄球菌发酵可以显著增强细胞的活性，并保护细胞免受 H_2O_2 的破坏，对急性酒精中毒小鼠的肝脏和胃具有保护作用[17]；乳酸菌发酵黑大麦提高了多酚、黄酮类等抗氧化活性物质含量，具有显著改善肝脏脂肪变性的作用[18]；Zhang 等[19] 研究发现栀子对酒精性肝损伤具有保护作用。然而，目前，栀子及其相关活性物质的研究主要聚焦在抗炎[20]、降血糖[21]、抗抑郁[22]、改善肝损伤[23−24] 等方面，少有研究利用益生菌发酵技术改善其药理作用方面的报道，而益生菌作为一种对人体有益的微生物，已经被广泛应用于食品和医药领域[25]。因此，将益生菌发酵技术应用于栀子的研究可能会提高其药理作用，并产生更多的潜在益处。但目前在这方面的研究还相对较少，需要进一步的探索和研究来验证其效果。

基于此，本文利用酒精诱导建立 HepG2 细胞氧化损伤模型，探讨乳酸芽孢杆菌 DU-106 和植物乳杆菌混合菌发酵栀子对 HepG2 细胞酒精性氧化损伤的保护作用，以期为预防和治疗酒精性肝病提供新的策略和理论依据。通过测定栀子发酵液对 HepG2 细胞活力、细胞损伤程度、氧化应激指标和相关炎症细胞因子水平的影响，评估益生菌发酵栀子在减轻酒精性氧化损伤中的潜力，为益生菌发酵栀子在酒精性肝病防治中的应用提供科学依据。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

栀子　浙江骄栀科技有限公司；乳酸芽孢杆菌 DU-106（*Bacillus* sp. DU-106）、植物乳杆菌（nbk-MA2）　保藏于华南农业大学食品学院新资源食品与功能性原料评价中心；人肝癌 HepG2 细胞　武汉普诺赛生命科技有限公司；无水乙醇（分析纯 99.5%）、胰酶、PBS 缓冲液　上海麦克林生物科技有限公司；CCK-8 检测液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒　碧云天生物技术有限公司；丙氨酸氨基转移酶（ALT）、天冬氨酸氨基转移酶（AST）、乳酸脱氢酶（LDH）、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）、谷胱甘肽（GSH）、超氧化物歧化酶（SOD）、丙二醛（MDA）、过氧化物酶（CAT）试剂盒　南京建成生物工程研究所；白细胞介素-1β（IL-1β）、白细胞介素-6（IL-6）、肿瘤坏死因子-α（TNF-α）试剂盒　上海酶免生物科技有限公司；DMEM 高糖培养基、胎牛血清　上海源培生物科技公司。

PHSJ-3F pH 计　上海仪电科学仪器股份有限公司；SH CO_2 细胞培养箱　上海一恒科学仪器有限公司；HH-4 数显恒温水浴锅　常州市华普达仪器有限公司；ZEISS Lab.A1 显微镜　德国蔡司公司；GL-G Ⅱ 立式冷冻离心机　上海安亭科学仪器厂；Versa-Max 光栅型酶标仪　美国 Melecular Devices 公司。

1.2　实验方法

1.2.1　不同处理方法下栀子提取液的制备　栀子提取液（GE）：挑选外观完整、颜色鲜黄、果皮光滑的栀子果实，用清水清洗干净后，低温冷冻干燥，按料液比 1∶10（w/v）加入无菌水，于温度 20 ℃ 环境中浸泡 3 d，过滤，滤液保存备用。

发酵栀子提取液（FGE）：参考严静等[26] 的方法稍作修改，取一定量的栀子清洗、干燥，取 60 g 栀子于锥形瓶中，料液比 1∶10（w/v），封口，121 ℃ 灭菌

30 min, 冷却后, 在超净工作台中分别添加 2%(w/w)白砂糖; 称量 0.1 g 植物乳杆菌和乳酸芽孢杆菌 DU-106 的混合菌粉(1∶1)添加到 100 mL 0.9% 生理盐水中活化 30 min, 即 1×10^7 CFU/mL, 分别向发酵罐中添加 2% 菌种活化液质量的活化液, 于 28 ℃ 密封发酵 3 d, 发酵结束后过滤, 滤液保存, 备用。

1.2.2 HepG2 细胞培养、传代、冻存与复苏 培养: 将人肝癌细胞 HepG2 培养在含有 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM 培养基中, 在 37 ℃、5% CO_2 的恒温培养箱培养, 待细胞密度达到 85% 时进行传代培养。

传代: 在灭菌的超净工作台内吸弃原培养液, 加入 2 mL 无菌 PBS 缓冲液清洗 3 次, 用 1 mL 胰酶消化 2 min, 加入 1 mL 新鲜培养终止消化, 轻轻吹打数次, 使细胞悬浮。随后将细胞悬液置于无菌 EP 管内, 1000 r/min 离心 5 min, 弃除上清液, 重新加入细胞培养基重悬细胞, 分装至新培养瓶内培养。

细胞冻存与复苏: 冻存按传代培养步骤, 将生长密度达到 95% 的对数生长期细胞, 取细胞悬液装入冻存管中, −80 ℃ 下放置 24 h 后转移到液氮罐长期保存。复苏则将冻存管置于 37 ℃ 水浴锅, 快速解冻后, 将细胞液吸入无菌 EP 管中, 加入等量新鲜培养液混匀, 1000 r/min 离心弃除上清液, 加入 1 mL 新鲜培养基重悬, 将其转移到培养瓶内, 用移液枪吹打培养基, 使细胞均匀分散在培养液中培养。细胞复苏后至少经 3 次传代后才可以进行实验。

1.2.3 酒精诱导 HepG2 细胞氧化损伤模型建立 采用 CCK-8 法对 HepG2 细胞活力进行测定。取对数生长期的 HepG2 细胞悬液 100 μL 接种于 96 孔板(每组平行 3 次), 密度为 1×10^4/孔, 在 37 ℃ 培养箱孵育 24 h, 待细胞贴壁, 弃除原有培养基, 向实验组中分别加入 100 μL 酒精浓度分别为 200、300、400、500、600、700、800、900、1000 mmol/L 的培养液, 向对照组加入 100 μL 的新鲜培养液, 培养 6 h 后, 吸弃培养基, 每孔加入 90 μL 新鲜培养基和 10 μL CCK-8 试剂, 在 37 ℃ 孵育 3 h, 测定其在 450 nm 处的吸光值, 其中调零液为 90 μL 新鲜培养基和 10 μL CCK-8 试剂, 根据公式计算细胞活力:

$$细胞活力(\%)=\frac{A-A_0}{A_1-A_0}\times100$$

式中: A, 实验组的吸光值; A_1, 对照组的吸光值; A_0, 调零组的吸光值。

1.2.4 GE 和 FGE 对 HepG2 细胞活力的影响 取对数生长期的 HepG2 细胞悬液, 按照密度为 1×10^4/孔接种于 96 孔板, 每组平行 3 次, 于 37 ℃ 培养箱孵育 24 h, 待细胞贴壁, 弃除培养基, 向实验组中分别加入 100 μL 的提取液 12.5、25、50、75、100、250、500、750、1000 μg/mL, 向对照组加入 100 μL 的新鲜培养液, 培养 24 h, 取出孔板, 吸弃培养基, 每孔加入 90 μL 新鲜培养基和 10 μL CCK-8 试剂, 在 37 ℃ 孵育 3 h, 测定其在 450 nm 处的吸光值, 其中调零液为 90 μL 新鲜培养基和 10 μL CCK-8 试剂, 计算不同浓度的栀子提取液干预后 HepG2 细胞活力。

1.2.5 GE 和 FGE 对酒精诱导 HepG2 细胞活力的影响 取对数生长期的 HepG2 细胞悬液在 96 孔板中以每孔 1×10^4 个细胞接种, 每组 3 个复孔, 培养孵育 24 h, 待细胞贴壁后, 弃除原有培养液。向实验组分别加入 100 μL 含不同浓度的 GE 和 FGE 培养基干预 24 h, 模型组加入 100 μL 培养基培养 24 h, 吸弃培养基, 每孔用含 600 mmol/L 酒精的新鲜培养基预处理 6 h, 对照组加入 100 μL 新鲜培养基, 培养 30 h。取出孔板, 吸弃培养基, 每孔加入 90 μL 新鲜培养基和 10 μL CCK-8 试剂, 孵育 3 h 后, 在 450 nm 下测定吸光度, 按照公式(1)计算在酒精诱导 HepG2 细胞氧化损伤模型下不同 GE 和 FGE 浓度干预后的细胞活力。

1.2.6 GE 和 FGE 对酒精诱导 HepG2 细胞中 ALT、AST 和 LDH 释放量的影响 取对数生长期的 HepG2 细胞悬液 1 mL 接种于 12 孔板(每组 3 个复孔), 密度为 2×10^5/孔, 孵育 24 h 后, 吸弃培养基, 分别设置对照组、模型组和实验组。对照组仅加入 1 mL 新鲜培养基, 培养 30 h; 模型组加入 1 mL 新鲜培养基培养 24 h, 吸弃培养基, 加入 1 mL 的酒精浓度 600 mmol/L 的新鲜培养基培养 6 h; 样品组加入 1 mL 含 250 和 750 μg/mL GE 和 FGE 的培养基干预 24 h 后, 吸弃培养基, 加入 1 mL 的酒精浓度为 600 mmol/L 的新鲜培养基培养 6 h。培养结束后取出孔板, 取出上清液, 参考试剂盒说明测定 ALT、AST 和 LDH 释放量。

1.2.7 GE 和 FGE 对酒精诱导 HepG2 细胞中抗氧化酶活性和 MDA 含量的影响 取对数生长期的 HepG2 细胞悬液 2 mL 接种于 6 孔板, 每组 3 个复孔, 密度为 1.5×10^6/孔, 孵育 24 h, 待细胞贴壁后, 吸弃原有培养基, 按 1.2.6 分组进行干预细胞, 培养结束后取出孔板, 加入细胞裂解液对细胞进行冰浴裂解, 1000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 参考试剂盒说明书进行测定。

1.2.8 GE 和 FGE 对酒精诱导 HepG2 细胞中 IL-1β、IL-6、TNF-α 的影响 按 1.2.6 处理方法后, 取上清液, 按 ELISA 试剂盒说明书进行测定。

1.3 数据处理

实验结果表示为平均值±标准差($\bar{x}\pm s$), 使用 SPSS 25 软件对数据进行统计学分析, 其中 $P<0.05$ 被认为具有显著性差异, 数据处理采用 Excel 2010、GraphPad Prism 9 软件进行图表绘制。

2 结果与分析

2.1 不同浓度的酒精和栀子提取液对 HepG2 细胞活力的影响

酒精在体内代谢后生成乙醛, 乙醛是酒精代谢

的中间产物，具有较强的氧化性。乙醛可以与细胞内的氧自由基反应，引起 ROS 积累并随后诱导细胞氧化损伤[27]。不同浓度的酒精对 HepG2 细胞活力的影响如图 1A 所示，与对照组相比，酒精浓度为 200 mmol/L 时，对细胞具有促增殖作用，这可能是低浓度的酒精可能通过调节细胞内的氧化还原状态来促进 HepG2 肝细胞的增殖。当酒精浓度在 300~1000 mmol/L 时，细胞存活率呈剂量依赖型下降。当酒精浓度为 600 mmol/L 时，细胞活力为 53.55%±2.03%（P<0.01），达到 IC_{50}，符合构建细胞氧化应激模型细胞活力需在 50%~70% 之间[28]。随着酒精浓度进一步升高到 700 mmol/L 时，细胞活力下降到 41.58%±0.79%，此时酒精对细胞表现为较强的杀伤作用，细胞内氧化损伤严重，导致细胞大量凋亡，故选择 600 mmol/L 作为适宜的酒精浓度，建立酒精诱导 HepG2 细胞氧化损伤模型，进行后续实验。

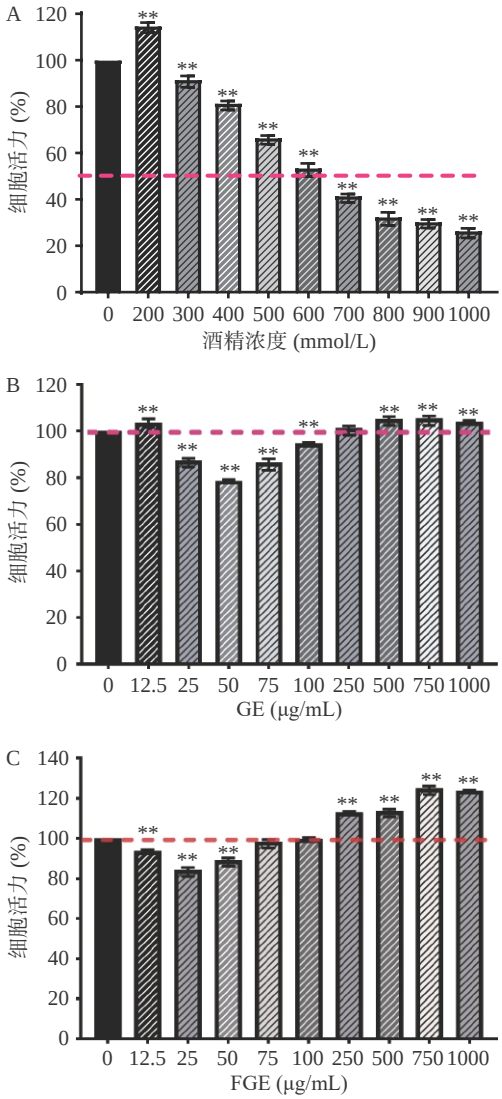


图 1　不同浓度的酒精和栀子提取液对 HepG2 细胞活力的影响

Fig.1　Effect of different concentrations of alcohol and gardenia extract on the viability of HepG2 cells

注：与对照组相比，**表示 P<0.01，差异极显著。

图 1B 和图 1C 分别是不同浓度的 GE 和 FGE 干预对 HepG2 细胞活力的影响，与对照组相比，在低浓度时，GE 和 FGE 对细胞增殖有一定的抑制作用，对于 GE，在 25~100 μg/mL 内具有极显著的抑制作用（P<0.01），在浓度为 250~1000 μg/mL 范围内，对细胞有促增殖作用，并且在一定范围内，浓度越大，促增殖作用越强；当 GE 浓度分别为 250、750 和 1000 μg/mL 时，细胞活力分别为 101.38%±0.91%、105.54%±1%（P<0.01）和 104.07%±0.51%（P<0.01）；对于 FGE，在浓度为 12.5~50 μg/mL 对 HepG2 细胞增殖具有显著抑制作用（P<0.01），浓度为 250~1000 μg/mL 对细胞促增殖作用呈剂量依赖性增强，但 GE 和 FGE 在浓度为 1000 μg/mL 时相比于 750 μg/mL 有抑制趋势，细胞活力分别从 105.54%±1% 下降到 104.07%±0.51%、124.87%±1.23% 下降到 123.69%±0.42%，可能是栀子提取液含有的活性成分超出了细胞的承受范围，导致细胞活力略有降低，这与细胞的应激反应、毒性效应等有关，故实验选择浓度 250、750 μg/mL 作为实验组的低、高剂量，进一步探究不同浓度和处理方法的栀子提取液对酒精诱导的 HepG2 细胞的损伤程度、氧化应激指标和相关炎症细胞因子的影响。

2.2　不同处理方法的栀子提取液对酒精诱导 HepG2 细胞活力的影响

GE 与 FGE 在不同浓度下对酒精诱导的 HepG2 细胞活力影响如图 2 所示。与对照组相比，模型组在酒精的干预后，细胞活力降低到 51.26%±1.92%，差异极显著（P<0.01），与模型组相比，GE 和 FGE 处理后对 HepG2 细胞活力均有不同程度的升高作用，并且表现一定的浓度依赖性，其中经过 750 μg/mL 的 GE 和 FGE 干预后，细胞活力分别达到 82.96%±2.15% 和 86.66%±1.45%，细胞活力相比酒精干预组极显著提高（P<0.01），表明 FGE 可以显著抑制酒精对 HepG2 细胞的毒性作用，缓解酒精诱导的 HepG2 细胞氧化损伤。

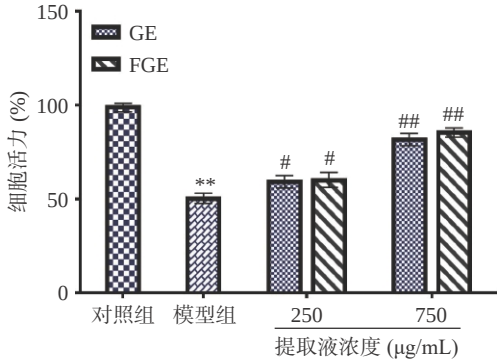


图 2　不同浓度的栀子提取液对酒精诱导 HepG2 细胞活力的影响

Fig.2　Effect of different concentrations of gardenia extract on ethanol-induced HepG2 cell viability

注：与对照组相比，**表示 P<0.01，差异极显著；与模型组相比，#表示 P<0.05，差异具有显著性，**表示 P<0.01，差异极显著。

2.3 不同处理方法的栀子提取液对酒精诱导的 HepG2 细胞中 ALT、AST 和 LDH 释放量的影响

ALT、AST 和 LDH 是一种存在于多种细胞内的酶类物质，在正常细胞状态下，ALT、AST 和 LDH 主要存在于细胞内[29]。当细胞受到损伤后，会引起细胞膜结构的破坏，ALT、AST 和 LDH 会从细胞内释放到细胞外，其在细胞培养液中的活性将增加。酒精诱导 HepG2 细胞氧化损伤模型会导致 ALT、AST 和 LDH 活力水平升高[30−31]，因此，通过检测 AST、ALT 和 LDH 的变化，可以了解酒精对 HepG2 细胞的损伤程度。由图 3 可知，与 CN 组相比，MN 组中 HepG2 细胞经 600 mmol/L 酒精诱导后，ALT、AST 和 LDH 的活力水平分别为 33.57±8.47 U/L、105.36±24.45 U/L 和 4735.68±212.13 U/g prot，分别为 CN 组的 4.21、4.05 和 3.09 倍，提示酒精对 HepG2 细胞造成了一定程度的损伤。在酒精诱导的 HepG2 细胞经过 250、750 μg/mL 的 GE 和 FGE 干预后，AST(GE-L 组差异不显著)和 LDH 的活力极显著低于模型组(P<0.01)，ALT 在 750 μg/mL 活力极显著降低(P<0.01)。AST、ALT 和 LDH 的活力水平都随着干预浓度的升高而降低，呈一定的浓度依赖效应，并且在相同剂量下 FGE 抑制氧化损伤细胞的 ALT、AST 和 LDH 活力的效果优于 GE，由此可见，FGE 能改善酒精诱导的 HepG2 细胞膜的受损程度，与七叶苷原通过降低 AST、ALT 水平抑制酒精对 HepG2 细胞造成的损伤结果相似[32]。

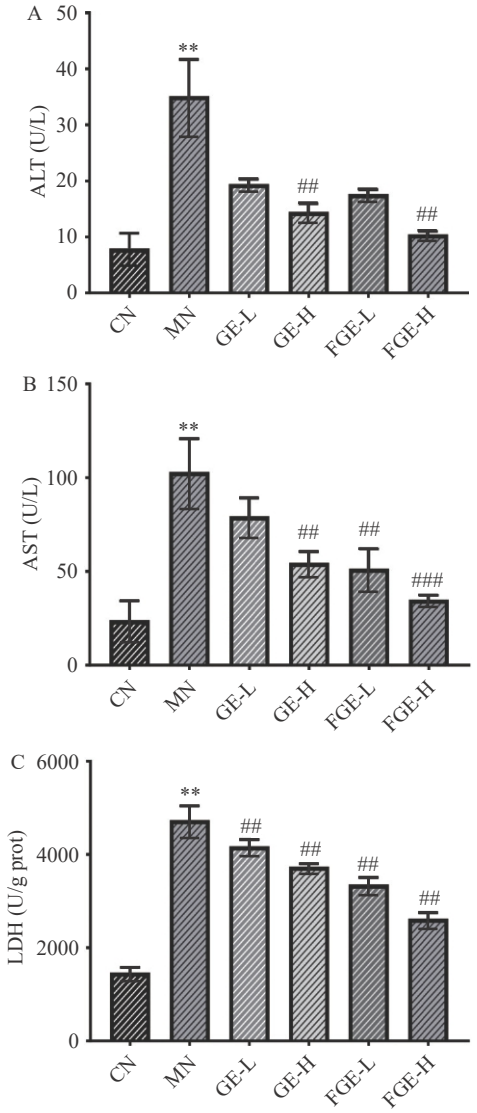


图 3 不同处理方法下栀子提取液对氧化损伤 HepG2 细胞中 ALT、AST 和 LDH 释放量的影响

Fig.3 Effect of gardenia extract on ALT, AST and LDH release in oxidatively damaged HepG2 cells under different treatments

注：与对照组相比，*表示 P<0.05，差异具有显著性，**表示 P<0.01，差异极显著；与模型组相比，#表示 P<0.05，差异具有显著性，##表示 P<0.01，差异极显著，###表示 P<0.001，差异非常显著；图中字母 CN 表示对照组；MN 表示模型组；GE-L 表示未发酵栀子提取液低剂量组；GE-H 表示未发酵栀子提取液高剂量组；FGE-L 表示发酵栀子提取液低剂量组；FGE-H 表示发酵栀子提取液高剂量组；图 4、图 5 同。

2.4 不同处理方法的栀子提取液对酒精诱导的 HepG2 细胞中抗氧化酶活性和 MDA 含量的影响

如图 4 所示，与 CN 组相比，MN 组中的 GSH、GSH-Px、SOD 和 CAT 的酶活力极显著降低(P<0.01)，提示经过酒精诱导损伤后，细胞的氧化还原稳态发生破坏，但在给予 250、750 μg/mL 的栀子提取液预处理后，与 MN 组相比，SOD、GSH、GSH-Px 三种抗氧化酶的活性均有不同程度的提高，并表现出浓度依赖性，CAT 酶活性增加，其中发酵栀子提取液高剂量组的活性极显著提升(P<0.01)。当细胞内的抗氧化防御系统受到破坏时，会产生大量的 ROS，过量的 ROS 攻击脂质物质，促进脂质发生过氧化反应[33]，其中 MDA 是细胞内脂质过氧化反应的主要产物之一，由图 4B 可知，MN 组的 HepG2 细胞受酒精诱导后，MDA 含量显著升至 17.9±0.47 nmol/mg prot(P<0.01)，为 CN 组的 5.5 倍。经提取液干预后，MDA 含量相对于 MN 组极显著降低(P<0.01)，表明栀子提取液和发酵栀子提取液有效减少 MDA 的生成，对酒精诱导的 HepG2 细胞脂质过氧化反应具有一定的抑制作用，并且发酵栀子提取液组改善效果最显著。综上所述，益生菌发酵栀子可以通过提高抗氧化酶的活力、降低 MDA 含量、抑制 GSH 耗竭来发挥对 HepG2 细胞的抗氧化损伤作用，与玉竹多糖对 HepG2 酒精性氧化损伤的研究结果相似[34]，这表明益生菌发酵栀子和玉竹多糖可能含有一些具有抗氧化作用的成分，能够帮助降低细胞内的氧化损伤。

2.5 不同处理方法的栀子提取液对酒精诱导的 HepG2 细胞中炎症因子水平的影响

IL-1β、IL-6、TNF-α 等炎症细胞因子参与调节炎症反应和免疫反应，在酒精摄入引起的肝脏损伤中，通过检测这些指标可以帮助评估酒精氧化损伤下的炎症程度以及对肝脏的影响[35]。由图 5 可知，与 CN 组相比，MN 组细胞的 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平极显著增加(P<0.01)，经低、高剂量 GE 和 FGE 干预后，IL-1β、IL-6、TNF-α 水平极显著下降(P<0.01)，

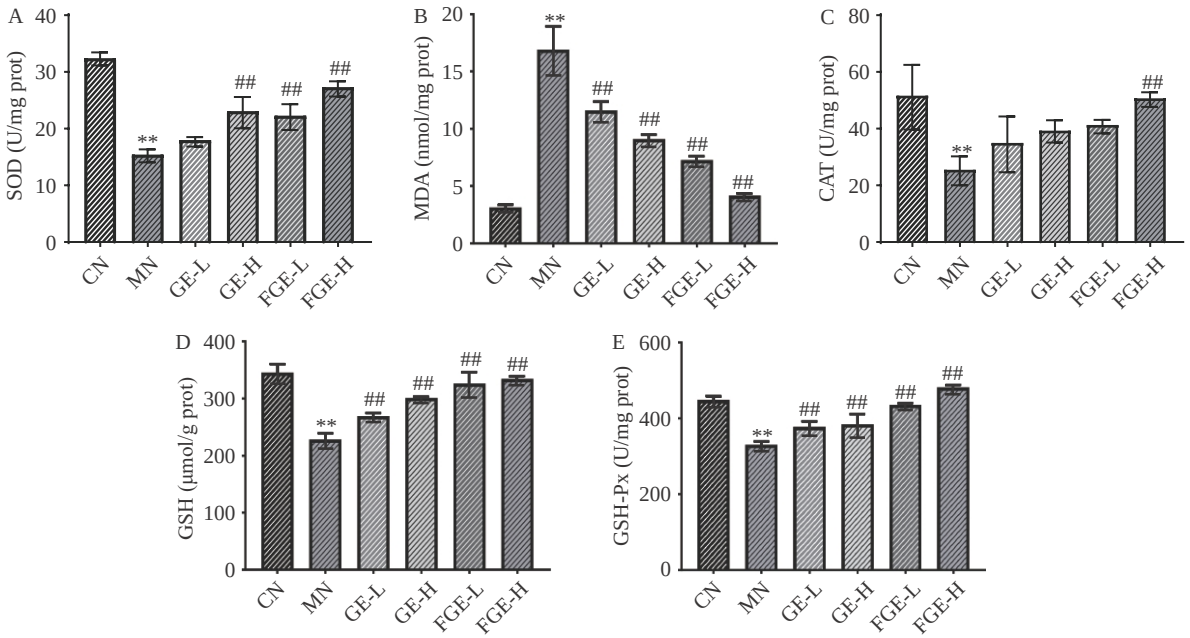


图 4　不同处理方法下栀子提取液对氧化损伤 HepG2 细胞中氧化应激水平的影响

Fig.4　Effect of gardenia extract on the level of oxidative stress in oxidatively damaged HepG2 cells under different treatments

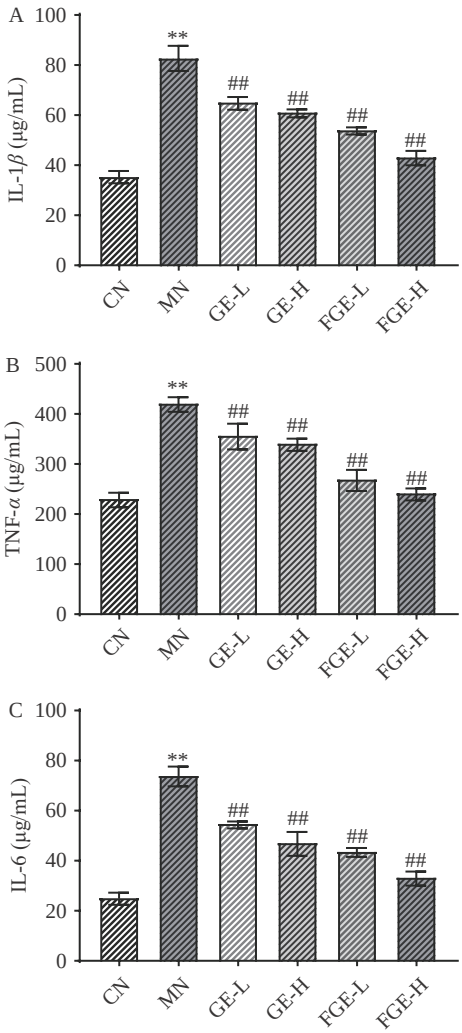


图 5　不同处理方法下栀子提取液对氧化损伤 HepG2 细胞中 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平的影响

Fig.5　Effect of gardenia extract on the level of IL-1β, IL-6 and TNF-α in oxidatively damaged HepG2 cells under different treatments

并且经 FGE 干预的细胞下降最显著，发酵栀子提取液高剂量（FGE-H）组的 IL-1β、IL-6、TNF-α 分别降低到 44.73±1.36、34.73±1.36、247.95±3.39 μg/mL，相比于 MN 组，分别降低了 1.89、2.11、1.75 倍，表明益生菌发酵栀子提取物能抵御酒精性氧化损伤的炎症反应。

3　讨论与结论

栀子，因其富含黄酮、绿原酸、栀子苷和西红花苷等抗氧化成分，在维护肝脏健康方面展现了极大潜力[36]。鉴于这些成分的保健价值，本研究首次探讨了经乳酸芽孢杆菌 DU-106 和植物乳杆菌混合培养发酵处理后的栀子提取液，对酒精诱导的 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用，揭示了该发酵提取液相比未发酵提取液，在缓解酒精诱导的 HepG2 肝细胞氧化损伤方面表现出更显著的保护效果。这一保护作用可能源于发酵过程中产生的有益代谢产物，如有机酸和多肽，它们通过增强抗氧化能力和抑制炎症反应，降低了氧化应激对细胞的损害。相关研究如 Zhao 等[37]的工作，也支持了发酵过程增强生物活性物质效果的观点，他们发现益生菌发酵的马齿苋在抗特应性皮炎方面的效果超过了未发酵样品，原因可能与发酵过程中活性成分的增加有关。此外，发酵提取液在降低 AST、ALT 和 LDH 释放量、减少氧化应激引起 ROS 的产生及炎症因子表达方面的效果，进一步证实了其对酒精性氧化损伤的保护作用。益生菌发酵栀子提取液的应用不仅显著改善了 HepG2 细胞的氧化损伤，也为利用天然植物资源开发新型保健品和治疗策略提供了新思路。尽管我们已初步理解了其保护机制，包括代谢产物的作用和对细胞因子调节的影响，但具体的分子机制仍需进一步研究。未来工作应关注细胞信号传导、细胞凋亡及其调控机制的详细探

索，为发酵栀子提取液在防治酒精性肝疾病中的应用奠定更深入的科学基础。

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

参考文献

[1] LIU L C, WANG Y, ZHANG J, et al. Probiotics in treating with alcoholic liver disease and nonalcoholic fatty liver disease[J]. Food Reviews International, 2021, 39(5): 1−19.

[2] MARICA M, MIRIAM L, PAOLA D. Alcohol or gut microbiota: Who is the guilty?[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20: 456.

[3] MADUSHANI HERATH K H I N, BING S J, CHO J, et al. Sasa quelpaertensis leaves ameliorate alcohol-induced liver injury by attenuating oxidative stress in HepG2 cells and mice[J]. Acta Histochemica: Zeitschrift fur Histologische Topochemie, 2018, 120(5): 477−489.

[4] 刘玲玲, 张鲁宁, 姜胜男, 等. 基于 Keap1/Nrf2/ARE 信号通路探讨丹皮酚改善酒精性肝脑损伤小鼠氧化应激损伤与炎症的作用机制[J]. 安徽中医药大学学报, 2024, 43(2): 73−80. [LIU L L, ZHANG L N, JIANG S N, et al. Mechanism of action of paeonol in improving oxidative stress injury and inflammation in mice with alcohol-induced liver and brain injury: A study based on the Kelch-like ECH-associated protein 1/nuclear factor erythroid 2-related factor 2/antioxidant response element signaling pathway[J]. Journal of Anhui University of Chinese Medicine, 2024, 43(2): 73−80.]

[5] CHEN J C, ZHANG Q, WANG R H, et al. Preliminary study on the effective site and mechanism of action of *Meconopsis quintuplinervia* Regel in alleviating acute alcoholic liver injury in mice[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2023, 308: 116230.

[6] SU Z W, YAN T Y, FENG J, et al. Protective effects and mechanism of polysaccharides from edible medicinal plants in alcoholic liver injury: A review[J] International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24 (22): 16530.

[7] LAM P Y, CHEUNG F, TAN H Y, et al. Hepatoprotective effects of Chinese medicinal herbs: A focus on anti-inflammatory and antioxidative activities[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(4): 465.

[8] 张景媛. 基于生物信息学的茵陈蒿汤和茵栀黄颗粒抑制肝脏炎癌转化机制研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2021. [ZHANG J Y. Bioinformatics-based study on the mechanism of inhibition of hepatic inflammatory cancer transformation by *Artemisia capillaris* soup and gardenia capillaris granules[D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2021.]

[9] 谢建寰, 李冬春, 刘春凤, 等. 人参皂苷 Rg1 对非酒精性脂肪肝大鼠的干预作用[J]. 中成药, 2023, 45(11): 3799−3802. [XIE J H, LI D C, LIU C F, et al. Interventional effects of ginsenoside Rg1 on non-alcoholic fatty liver in rats[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2023, 45(11): 3799−3802.]

[10] 马燕花, 邱晓青, 师霞, 等. 黄芪多糖对非酒精性脂肪性肝炎大鼠 ACE2-[Ang-(1-7)]-Mas 轴及胰岛素抵抗的影响[J]. 中成药, 2019, 41(5): 1012−1017. [MA Y H, QIU X Q, SHI X, et al. Effects of Astragali Radix polysaccharides on ACE2-[Ang-(1-7)]-Mas axis and insulin resistance in non-alcoholic steatohepatitis rats[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2019, 41(5): 1012−1017.]

[11] 饶志, 张帆, 董毓松, 等. 栀子“辨状论质”及其品质因研究进展[J]. 中草药, 2023, 54(6): 1998−2004. [RAO Z, ZHANG F, DONG Y S, et al. The gardenia "discriminates the shape to discuss the quality" and its quality factor research progress[J]. Chinese Herbal Medicine, 2023, 54(6): 1998−2004.]

[12] 陈榕, 何梓烜, 颜烨, 等. 栀子及其主要成分的药理及毒性作用研究进展[J]. 中草药, 2023, 54(18): 6092−6105. [CHEN R, HE Z X, YAN Y, et al. Research progress on pharmacological and toxic effects of Gardeniae Fructus and its main components[J]. Chinese Herbal Medicine, 2023, 54(18): 6092−6105.]

[13] 陈冠宁. 栀子的药物成分及药理作用研究进展[J]. 特种经济动植物, 2022, 25(11): 20−22,32. [CHEN G N. Progress in the study of the pharmaceutical constituents and pharmacological effects of *Gardenia jasminoides*[J]. Special Economic Flora and Fauna, 2022, 25(11): 20−22,32.]

[14] PYUN B J, LEE J Y, KIM Y J, et al. *Gardenia jasminoides* attenuates allergic rhinitis-induced inflammation by inhibiting periostin production[J]. Pharmaceuticals, 2021, 14(10): 986.

[15] 夏琦, 郑宏宇, 孙银玲, 等. 青蒿在发酵中药炮制中的应用及其主要成分生物转化研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(9): 4296−4299. [XIA Q, ZHENG H Y, SUN Y L, et al. Application of Artemisiae Annuae Herba in the processing of fermented traditional Chinese medicine and research progress on biotransformation of its main components[J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2023, 38(9): 4296−4299.]

[16] JOAQUIM C L, ANDREA A G, JORGE G, et al. Exploring the impact of solid-state fermentation on macronutrient profile and digestibility in Chia (*Salvia hispanica*) and Sesame (*Sesamum indicum*) seeds[J]. Foods (Basel, Switzerland), 2022, 11(3): 410.

[17] YU X T, WANG R Y, LAI B, et al. Effect of *Auricularia auricula* fermentation broth on the liver and stomach of mice with acute alcoholism[J]. Food & Function, 2021, 12(1): 191−202.

[18] GUAN Q, DING X W, ZHONG L Y, et al. Beneficial effects of *Lactobacillus*-fermented black barley on high fat diet-induced fatty liver in rats[J]. Food & Function, 2021, 12(14): 6526−6539.

[19] ZHANG H, WEI Z, TONG Y, et al. Spectrum-effect relationship study to reveal the pharmacodynamic substances in Flos Puerariae-Semen Hoveniae medicine pair for the treatment of alcohol-induced liver damage[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2023, 314: 116628.

[20] KIM S H, SHIN M R, LEE A R, et al. Improvement of inflammation through antioxidant pathway of Gardeniae Fructus 50% EtOH extract (GE) from acute reflux esophagitis rats[J]. BioMed Research International, 2020, 2020: 4826176.

[21] 黎砚书, 徐丽瑛, 周艳艳, 等. 栀子黄色素类单体对糖尿病小鼠降血糖作用[J]. 实验动物与比较医学, 2018, 38(5): 387−389. [LI Y S, XU L Y, ZHOU Y Y, et al. Hypoglycaemic effect of gardenia yellow pigment-like monomers in diabetic mice[J]. Laboratory Animal and Comparative Medicine, 2018, 38(5): 387−389.]

[22] 王婷, 赵娜. 栀子提取物对抑郁症小鼠的治疗作用及机制研究[J]. 中国社区医师, 2023, 39(16): 18−21,28. [WANG T, ZHAO N. Therapeutic effect and mechanism of gardenia extracts on depressed mice[J]. Chinese Community Physician, 2023, 39(16): 18−21,28.]

[23] DING J F, CHEN W D. Proteomic investigations of transcription factors critical in geniposide-mediated suppression of alcoholic steatosis and in overdose-induced hepatotoxicity on liver in rats[J]. Journal of Proteome Research, 2019, 18(11): 3821−3830.

[24] LUO Y, GAO F, CHANG R, et al. Metabolomics based com-

prehensive investigation of Gardeniae Fructus induced hepatotoxicity[J]. Food & Chemical Toxicology, 2021, 153: 112250.
[25] 骆雪, 俞伟辉. 复方中草药添加剂对断奶仔猪生长性能、血清生化指标及免疫指标的影响[J]. 饲料研究, 2021, 44(18): 40−43. [LUO X, YU W H. Effects of compound herbal additives on growth performance, serum biochemical indexes and immunological indexes of weaned piglets[J]. Feed Research, 2021, 44(18): 40−43.]
[26] 严静, 蔡易熹, 薛秋艳, 等. 不同处理方式对米荞营养成分及抗氧化活性的影响[J]. 食品工业科技, 2022, 43(5): 121−129. [YAN J, CAI Y X, XUE Q Y, et al. Effects of different treatments on nutritional composition and antioxidant activity of rice buckwheat[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(5): 121−129.]
[27] 王宝宝. 人体内酒精代谢过程及交通执法中酒精检测的方法[J]. 生物学教学, 2023, 48(7): 87−88. [WANG B B. Alcohol metabolism in the human body and methods of alcohol detection in traffic enforcement[J]. Teaching Biology, 2023, 48(7): 87−88.]
[28] 吉正梅, 张晓春, 彭钰迪, 等. 鸭胚源抗氧化肽 TD12 对 HepG2 细胞氧化应激损伤的保护作用[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(18): 141−148. [JI Z M, ZHANG X C, PENG Y D, et al. Protective effect of duck embryo-derived antioxidant peptide TD12 against oxidative stress injury in HepG2 cells[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(18): 141−148.]
[29] 朱平生, 焦炎杰, 付双楠, 等. 酒精致大鼠肝损伤早期血清生物标志物水平的变化规律[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(2): 129−133. [ZHU P S, JIAO Y J, FU S N, et al. Changes of serum biomarkers levels in early stage of alcohol-induced liver injury in rats[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2019, 25(2): 129−133.]
[30] SID B, VERRAX J, CALDERON P B. Role of oxidative stress in the pathogenesis of alcohol-induced liver disease[J]. Free Radical Research, 2013, 47(11): 894−904.
[31] 其布勒, 吉日木图, 明亮. 驼乳对小鼠急性酒精性肝损伤的干预作用[J]. 中国食品学报, 2023, 23(6): 147−158. [QI B L, JI RI M T, MING L. The intervention of camel milks on acute alcoholic liver injury in mice[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2023, 23(6): 147−158.]
[32] LEE J, YANG J, JEON J, et al. Hepatoprotective effect of esculetin on ethanol-induced liver injury in human HepG2 cells and C57BL/6J mice[J]. Journal of Functional Foods, 2018, 40: 536−543.
[33] WANG, X, LIU M, ZHANG C, et al. Antioxidant activity and protective effects of enzyme-extracted *Oudemansiella radiata* polysaccharides on alcohol-induced liver injury[J]. Molecules, 2018, 23: 481.
[34] ZHU Q, WU Y W, WANG X H. Protective effects of *Polygonatum odoratum* polysaccharides on alcohol-induced injury of HepG2 cells and its mechanisms[J]. Chinese Journal of Applied Physiology, 2022, 38(3): 227−232.
[35] 段晓梦, 马心予, 白天宇, 等. 不同药对配伍对栀子引起的肝损伤的保护作用研究[J]. 中南药学, 2023, 21(11): 2901−2907. [DUAN X M, MA X Y, BAI T Y, et al. Protective effect of different formula compatibilities on Fructus Gardeniae induced hepatotoxicity[J]. Central South Pharmacy, 2023, 21(11): 2901−2907.]
[36] CHEN P, CHEN Y, WANG Y R, et al. Comparative evaluation of hepatoprotective activities of *Geniposide, Crocins* and *Crocetin* by CCl4-induced liver injury in mice[J]. Biomolecules & Therapeutics, 2016, 24(2): 156−162.
[37] ZHAO W J, ZHANG Y W, LI W J, et al. Probiotic-fermented *Portulaca oleracea* L. alleviated DNFB-induced atopic dermatitis by inhibiting the NF-κB signaling pathway[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2023, 313: 116613.

孔海军, 张亮, 谌晓安. 阿里红多糖对运动性免疫抑制大鼠肠道菌群及免疫功能的影响 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 358−367. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110215
KONG Haijun, ZHANG Liang, CHEN Xiaoan. Effect of *Fomes officinalis* Ames Polysaccharides on Intestinal Flora and Immune Function in Exercise-induced Immunosuppression Rats[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 358−367. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110215

·营养与保健·

阿里红多糖对运动性免疫抑制大鼠肠道菌群及免疫功能的影响

孔海军[1], 张　亮[2], 谌晓安[3,*]
（1.喀什大学体育学院, 新疆喀什 844000;
2.西藏民族大学体育学院, 陕西咸阳 712082;
3.吉首大学体育科学学院, 湖南湘西 416000）

摘　要: 目的：探讨不同剂量阿里红多糖（*Fomes officinalis* Ames polysaccharides，FOP）对运动性免疫抑制（Exercise-induced immunosuppression，EIS）大鼠肠道菌群及免疫功能的保护作用。方法：50 只 7~8 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为对照组（NC 组）、运动训练组（Ex 组）、运动训练+低剂量 FOP 组（LFOP 组，40 mg/（kg·d））、运动训练+中剂量 FOP 组（MFOP 组，60 mg/（kg·d））和运动训练+高剂量 FOP 组（HFOP 组，80 mg/（kg·d））。Ex 组和各剂量 FOP 组采用 6 周跑台训练构建 EIS 模型，LFOP、MFOP、HFOP 组每次训练后灌胃 FOP。干预结束后，酶联免疫吸附试验检测血清免疫球蛋白 G（Immunoglobulin G，IgG）、免疫球蛋白 M（Immunoglobulin M，IgM）、白介素 6（Interleukin-6，IL-6）、白介素 10（Interleukin-10，IL-10）、干扰素 γ（Interferon-γ，INF-γ）、肿瘤坏死因子 α（Tumor necrosis factor-α，TNF-α）、脂多糖（Lipopolysaccharide，LPS）水平及肠道短链脂肪酸含量；细胞分析仪检测血清 $CD4^+$、$CD8^+$的数量；16S rDNA 检测大鼠肠道菌群结构变化；Western blot 检测结肠组织紧密连接蛋白（Zonula occludens-1，ZO-1）、封闭蛋白（Occludin）、紧密连接蛋白 4（Claudin4）蛋白表达。结果：与 Ex 组比较，LFOP、MFOP、HFOP 组大鼠血清 IgG、IgM、INF-γ、TNF-α、$CD4^+$和 $CD8^+$极显著上升（P<0.01），血清 IL-6、IL-10 和 LPS 水平极显著降低（P<0.01）；肠道短链脂肪酸含量和拟杆菌门、疣微菌门及乳杆菌属、拟杆菌属、毛螺菌属（未分类）、艾克曼菌属相对丰度极显著上升（P<0.01）；结肠组织 ZO-1、Occludin、Claudin4 蛋白表达极显著上调（P<0.01）。此外，MFOP、HFOP 组大鼠脾脏指数、胸腺指数、肠道菌群 α 多样性较 Ex 组极显著上升（P<0.01）。结论：FOP 可能通过减轻炎症改善肠道菌群结构及活性，提高机体免疫功能，进而抑制 EIS 的发生发展。

关键词: 运动性免疫抑制, 肠道菌群, 免疫功能, 阿里红多糖
中图分类号: TS201.4　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2024)21−0358−10
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110215
本文网刊:

Effect of *Fomes officinalis* Ames Polysaccharides on Intestinal Flora and Immune Function in Exercise-induced Immunosuppression Rats

KONG Haijun[1], ZHANG Liang[2], CHEN Xiaoan[3,*]
（1.College of Physical Education, Kashi Unversity, Kashi 844000, China;
2.College of Physical Education, Tibet University for Nationalities, Xianyang 712082, China;
3.College of Physical Education Science, Jishou University, Xiangxi 416000, China）

Abstract: Objective: To investigate the protective effects of different doses of *Fomes officinalis* Ames polysaccharides

收稿日期: 2023−11−21
基金项目: 新疆维吾尔自治区喀什地区科技计划（20200024）;新疆维吾尔自治区高校科技计划（XJEDU2021SY040）。
作者简介: 孔海军（1992−）, 男, 博士研究生, 讲师, 研究方向: 运动生物化学, E-mail: 15275475183@163.com。
*** 通信作者:** 谌晓安（1971−）, 女, 博士, 教授, 研究方向: 运动人体科学, E-mail: 812557453@qq.com。

(FOP) on intestinal flora and immune function in exercise-induced immunosuppression (EIS) rats. Methods: Fifty SPF male SD rats aged 7 to 8 weeks were randomly divided into control group (NC group), exercise training group (Ex group), exercise training+low-dose FOP group (LFOP group, 40 mg/(kg·d)), exercise training+medium-dose FOP group (MFOP group, 60 mg/(kg·d)) and exercise training+high-dose FOP group (HFOP group, 80 mg/(kg·d)). Ex group and FOP group were trained on the treadmill for 6 weeks to construct EIS model. LFOP, MFOP and HFOP groups were given FOP after each training. After the intervention, serum IgG, IgM, IL-6, IL-10, INF-γ, TNF-α, LPS levels and intestinal short-chain fatty acid content were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The number of serum $CD4^+$ and $CD8^+$ was detected by cell analyzer. 16S rDNA was used to detect the structural changes of intestinal flora. Western blot was used to detect the protein expression of ZO-1, Occludin, Claudin4 in the colon tissue. Results: Compared with Ex group, serum IgG, IgM, INF-γ, TNF-α, $CD4^+$ and $CD8^+$ of rats in LFOP, MFOP and HFOP groups were significantly increased (P<0.01), while serum levels of IL-6, IL-10 and LPS were significantly decreased (P<0.01). Intestinal short-chain fatty acid content and the relative abundance of Bacteroidetes, Verrucobacteria and *Lactobacillus*, *Bacteroidetes*, *Spirillum* (not classified) and *Ekmanella* were significantly increased (P<0.01). The expression of ZO-1, Occludin, Claudin4 proteins in colon tissue was significantly up-regulated (P<0.01). In addition, spleen index, thymus index, intestinal flora alpha diversity in MFOP and HFOP groups were significantly increased compared with Ex group (P<0.01). Conclusion: FOP may improved the structure and activity of intestinal flora by reducing inflammation, enhanced the body's immune function, and then inhibited the development of EIS.

Key words: exercise-induced immunosuppression; intestinal flora; immune function; *Fomes officinalis* Ames polysaccharides

研究证实，长期从事高强度运动（70%~80% HRmax，>60 min）可能通过炎症和氧化应激反应、免疫功能障碍以及宿主病原体防御障碍诱导运动性免疫抑制(Exercise-induced immunosuppression，EIS)[1]。动物实验证实[2]，长期高强度运动后的免疫细胞如淋巴细胞、自然杀伤细胞、单核巨噬细胞的数量、密度及活性出现明显下降，中性粒细胞功能减退，免疫器官出现萎缩和结构改变[3]。EIS 的主要征象包括淋巴细胞计数紊乱、自然杀伤细胞活性降低、淋巴细胞转化减低及分泌型免疫球蛋白 A 减少等。现有研究表明，肠道菌群结构及稳定性可能是影响机体免疫功能的重要因素[4]，但 EIS 的发生发展与肠道微生物群的关系尚未明了。此外，运动可调控宿主代谢和免疫功能，是改变肠道微生物群的潜在外部因素[5]。一项对照研究显示[6]，运动是橄榄球运动员肠道微生物群多样性的驱动因素，肠道微生物群多样性与运动员基础免疫能力密切相关。

天然产物多糖提取物可通过免疫系统修饰对个体免疫功能产生有益作用[7]。此外，有研究证实，天然产物多糖提取物可能同时影响宿主肠道菌群结构与免疫系统功能，如，大蒜多糖可以通过调控小鼠菌群-免疫轴促进免疫器官发育，并改善免疫功能与肠道环境[8]。阿里红(*Fomes officinalis* Ames)系多孔菌科层孔菌属植物，是我国西北地区的常见药食同源天然产物，常用于治疗上呼吸道感染、牙周疾病、胃痛、急慢性肾炎、尿道结石、类风湿关节炎等。阿里红富含多糖成分，阿里红多糖(*Fomes officinals* Ames polysaccharides，FOP)的免疫调节[9]、抗肿瘤[10]、抗衰老[11]、抗炎[12] 等功能已得到证实。课题组前期研究发现，FOP 可有效促进机体疲劳恢复，加快自由基清除，并显著改善机体的抗氧化能力及免疫状态[13]。研究证实，EIS 与肠道菌群结构密切相关，EIS 可以引起肠道通透性增加、肠道黏膜炎症反应和微生物群落失调等，进而诱导肠道菌群失衡，可见肠道菌群在免疫调节中也扮演着重要角色[14]。然而，现阶段鲜见 FOP 对 EIS 肠道菌群及免疫功能的干预研究。

本实验采用长期力竭训练构建 EIS 大鼠模型，首先通过检测大鼠血清免疫指标、体重、免疫器官脏器指数及血清炎症反应指标验证 FOP 的抗免疫抑制、抗炎效果，随后检测肠道菌群多态性、肠道菌群结构、血清脂多糖水平及肠道屏障功能。以期系统地验证 FOP 对 EIS 大鼠肠道菌群及免疫功能的干预效果，为天然产物在运动实践中的应用提供实验依据。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

SPF 级雄性 SD 大鼠　50 只，7~8 周龄，平均体重(224.71±19.85)g，北京华阜康生物科技股份有限公司 [SCXK(京) 2019-0008]；阿里红多糖　实验室自制，经硫酸-苯酚法测定多糖含量为 75.81%；免疫球蛋白 G(Immunoglobulin G，IgG)试剂盒、免疫球蛋白 M(Immunoglobulin M，IgM)试剂盒、白介素 6(Interleukin-6，IL-6)试剂盒、白介素 10(Interleukin-10，IL-10)试剂盒、干扰素 γ(Interferon-γ，INF-γ)试剂盒、肿瘤坏死因子 α(Tumor necrosis factor-α，TNF-α)试剂盒　南京建成生物工程研究所；大鼠短链脂肪酸(Short chain fatty acid，SCFA)试剂盒　上海瑞番生物科技有限公司；脂多糖(LPS)酶联免疫试剂盒　上海江莱生物科技有限公司；小鼠抗大鼠 $CD4^+$ R-PE 抗体、小鼠抗大鼠 $CD8^+$ R-PE 抗体　美国 Caltag 公司；RIPA 裂解液、电泳缓冲液、6.6×8.5 cm PVDF 膜　上海碧云天生物技术有限公司；QIAampDNA

粪便 DNA 试剂盒　德国 Qiagen 公司；BCA 蛋白浓度测定试剂盒、紧密连接蛋白（Zonula occludens-1，ZO-1）抗体、闭合蛋白（Occludin）抗体、紧密连接蛋白 4（Claudin4）抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）内参抗体、HRP 标记山羊抗兔 IgG　美国 CST 公司。

ZH-PT/5S 型大鼠跑台　安徽正华生物仪器设备有限公司；imark Bio-Rad 酶标仪　美国 Bio-Rad 公司；BK-3100VET 智能细胞分析仪　山东博科科学仪器有限公司；5424R 高速冷冻离心机　德国艾本德股份公司；BioSpectrometer fluorescence 荧光分光光度计　德国艾本德股份公司；AlphaImager EP 凝胶成像系统　美国 ProteinSimple 公司。

1.2　实验方法

1.2.1　干预药物制备　参考米仁沙·牙库甫等[9]研究中对 FOP 的制备方法，即采用水提醇沉法，经 DEAE-52、Sepharose CL-6B 和 Sephadex G-100 柱层析对粗多糖进行纯化、精制。将精制阿里红多糖产物加水溶解，以硫酸-苯酚法测定得到多糖含量为 78.92%。

1.2.2　动物分组及给药　动物于实验室条件（室内恒温 23±0.5 ℃，空气湿度 50%~55%，光照/黑暗交替循环各 12 h）适应性喂养 3 d 后，随机分为 5 组，每组 10 只，分别为对照组（NC 组）、运动训练组（Ex 组）、运动训练+低剂量阿里红多糖补充组（LFOP 组）、运动训练+中剂量阿里红多糖补充组（MFOP 组）和运动训练+高剂量阿里红多糖补充组（HFOP 组）。运动方案参照覃飞等[3]建立运动性免疫抑制模型大鼠方案：运动干预前 Ex 组及 LFOP、MFOP、HFOP 组进行为期 3 d 跑台适应性训练，正式跑台训练坡度 0°、递增跑速（第 1 周为 10 m/min，第 2 周为 20 m/min，自第 3 周开始，跑台速度每周递增 5 m/min，直至第 6 周达到 40 m/min），运动至力竭，1 次/d，6 次/周，周日休息，共持续 6 周。运动力竭判断标准为大鼠不能以既定强度坚持运动、四肢无力、头部低垂，声光电刺激均无反应。NC 组不接受运动训练干预，正常饲养。LFOP、MFOP、HFOP 组每次训练后 1 h，称体重，分别灌胃 40、60、80 mg/（kg·d）FOP 水溶液 2 mL；Ex 组灌胃等量生理盐水。本研究经喀什地区医共体伦理委员会审批核准（审批编号：（2022）第（55）号）。

1.2.3　动物处置、取样　末次跑台训练后 2 h，按摩大鼠下腹部刺激排便，无菌镊子取新鲜粪便于无菌冻存管中，液氮急速低温后转移至−80 ℃ 超低温冰箱保存备用。随后处死大鼠并取材：10% 水合氯醛麻醉，腹主动脉取血 5 mL，加 EDTA 抗凝，−80 ℃ 保存待测；5 mL 4000 r/min 离心 20 min，取血清，−80 ℃ 保存待测；迅速取大鼠脾脏、胸腺、结肠组织，称重、计算脾脏指数及胸腺指数（脏器指数（%）=脏器重量/体重×100），剔除筋膜及外覆脂肪组织，生理盐水反复漂洗，吸水纸擦干水分，液氮急速低温后−80 ℃ 保存待测。

1.2.4　组织匀浆制备　分别取部分脾脏、胸腺及结肠组织，剪碎，加入 PBS 匀浆介质，2000 r/min 匀浆 2 min，匀浆液转移至离心管，4 ℃、6000 r/min 离心 10 min，取上清−80 ℃ 保存。

1.2.5　酶联免疫吸附试验　取预先制备血清及结肠组织匀浆液，按照酶联免疫吸附法试剂盒说明书检测血清 IgG、IgM、IL-6、IL-10、INF-γ、TNF-α、LPS 水平及结肠组织 SCFA 水平。

1.2.6　血清 $CD4^+$、$CD8^+$检测　取待测血清 100 μL，加 20 μL $CD4^+$-FITC/$CD8^+$-PE 单抗，摇匀、避光、25 ℃ 孵育 1 h，加入红细胞裂解液，PBS 洗涤，智能细胞分析仪检测 $CD4^+$、$CD8^+$的数量，计算 $CD4^+$/$CD8^+$比值。

1.2.7　肠道微生物 DNA 提取及 16S rDNA 测序　取大鼠粪便，采用 Qiagen 粪便基因组 DNA 试剂盒提取大鼠粪便样本 DNA，1% 琼脂糖凝胶电泳验证粪便样本 DNA 完整性。使用通用引物 341F、806R 从提取的 DNA 中扩增细菌核糖体 RNA 基因的 V3-V4 区。F 端序列（5′-3′）：CCTACGGGRSGCAGCAG；R 端序列（5′-3′）：GGACTACHVGGGTWTCTAAT。PCR 反应体系：25 μL（2.5 μL 10×PCR 缓冲液 II+0.5 单位 DNA Polymerase High Fidelity+引物 0.4 μmol/L+10 ng 模板 DNA）。热循环条件：95 ℃ 预变性 2 min；95 ℃ 变性、55 ℃ 退火、72 ℃ 延伸共 30 s，27 个循环；72 ℃ 稳定延伸 5 min；4 ℃ 保存。PCR 反应产物经 Illumina 测序平台上机测序，获得的原始数据经高质量质控及嵌合体去除后得到有效数据。根据不同的相似度水平，对有效数据中所有的序列进行归类获得可操作分类单元（OTU）。根据已有数据对每个 OTU 的代表性序列进行物种注释，得到相应的物种信息和物种丰度分布。

1.2.8　蛋白印迹检测　取大鼠脾脏、胸腺匀浆液，RIPA 法提取组织总蛋白，4 ℃，12000 r/min 离心 20 min；取上清液采用 BCA 法测定蛋白浓度。配制十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶（Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE），浓缩胶恒压 80 V 电泳 30 min，分离胶恒压 110 V 电泳至溴酚蓝到达分离胶底部，20 μg 上样，用电转法将蛋白质转移到 PVDF 膜上。5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h，加入一抗，4 ℃ 摇床孵育过夜；TBST 洗膜 10 min×3 次，加二抗，37 ℃ 孵育 40 min；TBST 洗膜 10 min×5 次。ECL 法显影，凝胶成像系统成像后使用 Quantity One 3.0 软件分析，以甘油醛-3-磷酸脱氢酶（Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）作为内参，计算 ZO-1、Occludin 及 Claudin4 蛋白相对表达量。

1.3　数据处理

采用 SPSS 25.0 统计学软件进行统计分析，数据

以平均数±标准差（$\bar{X}$±SD）表示，数据处理均采用 one-way ANOVA 进行方差分析，P<0.05 为差异显著，P<0.01 为差异极显著。

2　结果与分析

2.1　阿里红多糖对运动免疫抑制大鼠免疫功能、体重及脏器指数的影响

脾脏指数、胸腺指数在一定程度上可反映机体

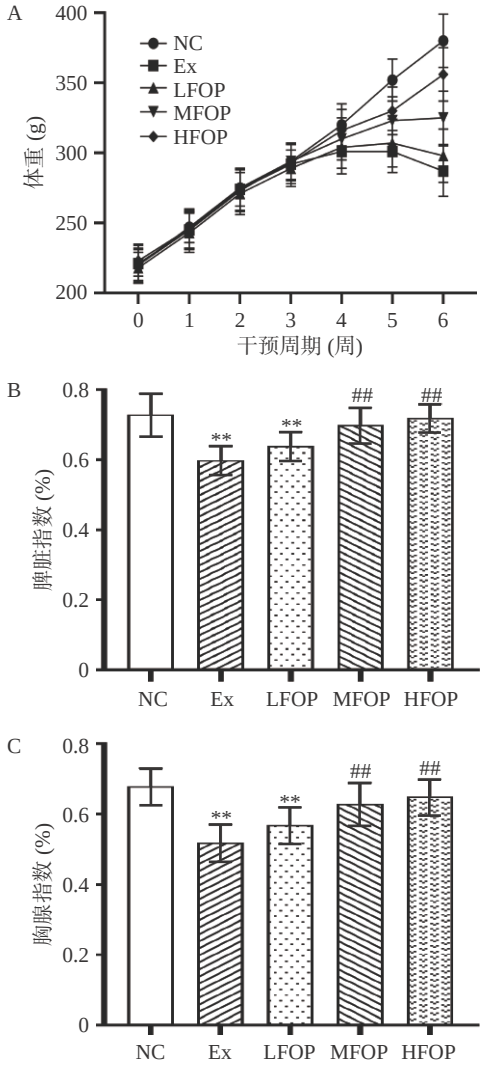


图 1　各组大鼠体重（A）、脾脏指数（B）及胸腺指数（C）

Fig.1　Body weight (A), spleen index (B) and thymus index (C) of rats in each group

注：与 NC 组相比，**代表差异极显著（P<0.01），*代表差异显著（P<0.05）；与 Ex 组相比，##代表差异极显著（P<0.01），#代表差异显著（P<0.05）；图 2~图 5 同。

在特定条件下的免疫状况，一般情况下，外周免疫器官指数下降说明机体免疫性能减弱。长期力竭训练或运动疲劳可导致动物脾脏指数和（或）胸腺指数降低，此外，免疫抑制还可能造成机体生长障碍和体重下降[15]。如图 1 所示，与 NC 组比较，Ex 组大鼠脾脏指数及胸腺指数极显著降低（P<0.01），自第 5 周体重出现下降趋势，且第 5 周、第 6 周体重极显著降低（P<0.01）；补充 6 周 FOP 后，相比较 Ex 组，MFOP、HFOP 组第 5 周、第 6 周体重和免疫器官指数极显著上升（P<0.01）。如斯塔木·托合尼牙孜等[16]研究表明，FOP 可提高免疫抑制小鼠体重及免疫器官指数。以上研究表明，FOP 可改善 EIS 大鼠生长障碍及免疫器官功能。

IgG 和 IgM 是血清免疫球蛋白的重要亚型结构，是反映机体免疫水平的敏感标志物。此外，IgG 和 IgM 也是反映机体运动训练期间免疫功能的敏感指标[17]。如表 1 所示，与 NC 组比较，Ex 组大鼠血清 IgG、IgM 水平极显著降低（P<0.01）；补充 6 周 FOP 后，相比较 Ex 组，LFOP、MFOP、HFOP 组大鼠血清 IgG 和 IgM 水平均极显著上升（P<0.01）。前期研究显示，40~80 mg/（kg·d）FOP 可有效提高运动疲劳小鼠血清免疫球蛋白水平[15]。米仁沙·牙库甫等[9]也发现，FOP 的 FOPS-a、FOPS-b 组分均可促进小鼠脾脏淋巴细胞分泌 IgG。表明 FOP 可改善 EIS 大鼠的免疫功能。

$CD4^+$和 $CD8^+$是 T 淋巴细胞的两类重要亚群，$CD4^+/CD8^+$比例失调可诱导机体免疫平衡失调。研究证实，长期力竭运动可导致 $CD4^+/CD8^+$比值降低，进而限制机体 T 淋巴细胞免疫平衡[18]。如表 1 所示，与 NC 组比较，Ex 组大鼠血清 $CD4^+$、$CD8^+$和 $CD4^+/CD8^+$比值显著或极显著降低（P<0.05，P<0.01）；补充 6 周 FOP 后，相比较 Ex 组，LFOP、MFOP、HFOP 组大鼠血清 $CD4^+$、$CD8^+$和 $CD4^+/CD8^+$比值均显著或极显著上升（P<0.05，P<0.01）。沙依拜·沙比提等[19]研究表明，200 mg/kg FOP 可提高荷瘤小鼠外周血 $CD4^+$ T 淋巴细胞和 $CD4^+/CD8^+$比值。表明 FOP 可改善 EIS 大鼠 T 淋巴细胞免疫平衡。

2.2　阿里红多糖对运动免疫抑制大鼠炎症反应及脂多糖水平的影响

IL-6、IL-10、INF-γ 及 TNF-α 等细胞因子可作为炎症信号蛋白介导免疫细胞增殖、活化、渗透等生

表 1　各组大鼠血清 IgG、IgM 及 T 淋巴细胞亚群标志物（$\bar{X}$±SD，n=10）

Table 1　Serum IgG, IgM, and T lymphocyte subpopulation markers of rats in each group ($\bar{X}$±SD, n=10)

组别	IgG（μg/mL）	IgM（μg/mL）	$CD4^+$（%）	$CD8^+$（%）	$CD4^+/CD8^+$
NC组	12.51±2.39	136.85±16.11	48.17±4.22	27.63±3.45	1.73±0.20
Ex组	7.02±1.47**	67.88±8.05**	26.74±3.95**	16.86±3.72**	1.58±0.17*
LFOP组	9.54±1.42$^{**\#\#}$	87.41±12.07$^{**\#\#}$	37.09±4.14$^{**\#\#}$	22.03±4.51$^{**\#\#}$	1.68±0.19$^{\#}$
MFOP组	11.39±1.66$^{\#\#}$	120.59±10.50$^{*\#\#}$	44.51±5.06$^{*\#\#}$	25.95±3.83$^{\#\#}$	1.71±0.12$^{\#}$
HFOP组	11.05±1.59$^{\#\#}$	109.64±14.7$^{**\#\#}$	43.24±4.67$^{*\#\#}$	23.67±5.02$^{*\#\#}$	1.83±0.14$^{\#}$

注：与NC组相比，**代表差异极显著（P<0.01），*代表差异显著（P<0.05）；与Ex组相比，$^{\#\#}$代表差异极显著（P<0.01），$^{\#}$代表差异显著（P<0.05）；表2同。

表 2 各组大鼠血清炎症反应标志物及脂多糖水平($\bar{X}$±SD, n=10)

Table 2 Serum inflammatory response markers and lipopolysaccharide levels in rats of each group ($\bar{X}$±SD, n=10)

组别	IL-6(pg/mL)	IL-10(pg/mL)	INF-γ(pg/mL)	TNF-α(pg/mL)	LPS(ng/mL)
NC组	124.57±10.71	73.45±8.70	590.23±78.15	35.41±5.07	30.55±4.72
Ex组	242.59±17.36**	148.62±15.63**	402.76±62.35**	21.57±4.93**	64.38±6.08**
LFOP组	204.35±19.06**##	119.91±13.48**##	498.54±50.98**##	27.83±4.90**##	48.84±6.71**##
MFOP组	160.31±16.58**##	91.53±11.34**##	533.09±68.47**##	32.16±4.44*##	37.46±5.53**##
HFOP组	193.82±22.09**##	106.57±14.09**##	516.17±49.45**##	33.52±3.81*##	39.78±5.64**##

物过程，是炎症反应的重要生物标志物[20]。长期力竭训练和(或)运动疲劳可严重抑制细胞免疫功能并激活广泛的炎症反应[3]。如表 2 所示，6 周高强度运动训练后，与 NC 组比较，Ex 组大鼠血清 IL-6、IL-10 水平极显著上升(P<0.01)，血清 INF-γ 及 TNF-α 水平极显著降低(P<0.01)；补充 6 周 FOP 后，相比较 Ex 组，LFOP、MFOP、HFOP 组大鼠血清 IL-6、IL-10 水平极显著降低(P<0.01)，血清 INF-γ、TNF-α 水平极显著上升(P<0.01)。木妮然·吐尔逊江等[12]研究发现，粗提 FOP 及 FOP-a 多糖组分均可有效抑制 Aβ25-35 诱导的 BV-2 细胞炎症反应；前期研究也显示，40~80 mg/(kg·d) FOP 可显著降低 EIS 小鼠血清 IL-6 和 TNF-α 水平[16]。以上结果表明，FOP 可改善 EIS 大鼠炎症反应，进而缓解机体免疫抑制现象。

研究发现，LPS 通过影响核因子 κB 和激活蛋白-1 等转录因子激活炎症细胞因子 TNF-α、IL-1β、IL-6 和 C 反应蛋白的生成[21]。在炎症环境中，LPS 等病原体可诱导一系列急性免疫失衡，并通过介导 T 细胞和巨噬细胞功能调控机体免疫功能[22]。如表 2 所示，6 周高强度运动训练后，与 NC 组比较，Ex 组大鼠血清 LPS 水平极显著上升(P<0.01)；补充 6 周 FOP 后，相比较 Ex 组，LFOP、MFOP、HFOP 组大鼠血清 LPS 水平极显著降低(P<0.01)。目前尚无直接证据证明 FOP 对血清 LPS 的调控作用。但部分侧面证据显示，天然产物多糖提取物可显著降低机体血清 LPS 水平，有报道显示，多糖提取物可抑制 LPS 诱导的多器官炎症反应[23]。也有研究发现，LPS 可通过与巨噬细胞膜表面的 CD14 受体偶联，进而将 LPS 转运至 Toll 样受体 4 及髓样分化蛋白 2 形成蛋白复合体并诱导炎症反应[24]。Yatoo 等[25]研究表明，植物多糖可能通过抑制血清及肠道 LPS 表达减轻炎症反应。由此推测，FOP 可能通过降低 LPS 减轻 EIS 大鼠炎症反应。

2.3 阿里红多糖对运动免疫抑制大鼠肠道菌群多态性的影响

肠道菌群多样性可反映菌群微生态的稳定性和对外界致病菌的抵御能力，α 多样性及 β 多样性是评估肠道菌群多样性的金标准。长期高强度运动可能诱导训练期运动员的胃肠道应激反应，并引发肠道微生物群结构性及代谢性紊乱[26]。EIS 可能造成机体肠道菌群 α、β 多样性降低，且肠道菌群 α、β 多样性与运动训练强度和周期密切相关[27]。大鼠肠道菌群

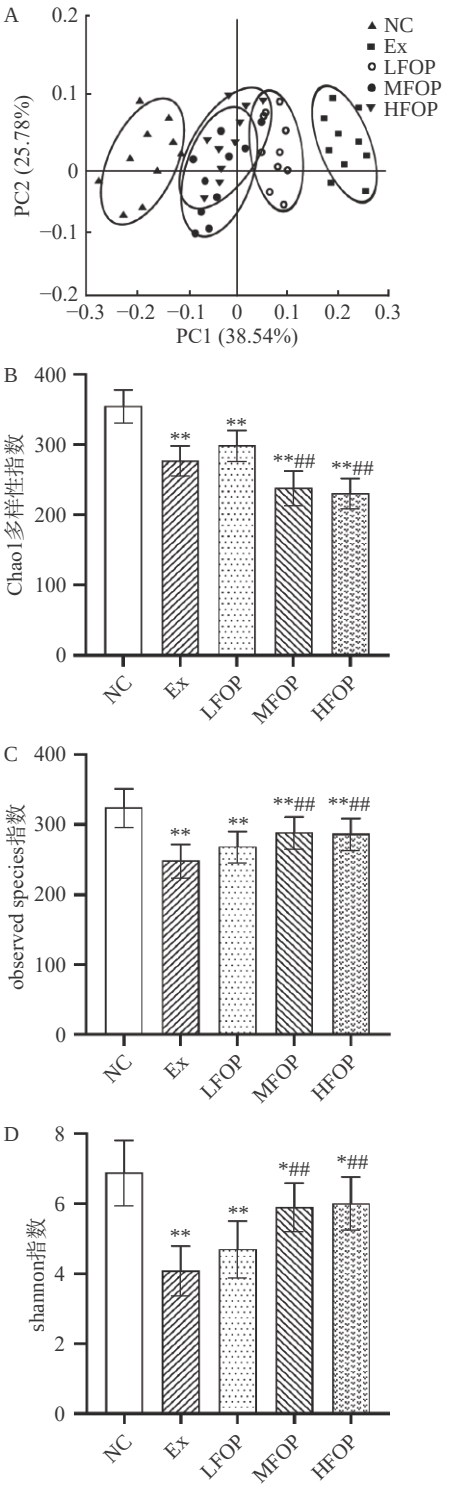


图 2 各组大鼠肠道菌群 β 多样性主坐标分析(A)及 α 结构多样性(B~D)

Fig.2 Principal coordinate analysis of β diversity (A) and α structural diversity (B~D) of gut microbiota in each group of rats

结构 α 多样性分析发现(图 2B~图 2D)，与 NC 组比较，Ex 组大鼠肠道 Chao1、observed species、shannon 指数均极显著降低(P<0.01)，表明 6 周高强度运动训练造成大鼠肠道菌群 α 多样性降低；补充 6 周 FOP 后，相比较 Ex 组，MFOP 和 HFOP 组大鼠肠道 observed species、shannon 指数均极显著上升(P<0.01)，Chao1 指数极显著降低(P<0.01)。主坐标分析(PCoA)结果表明(图 2A)，NC 组样本集中于横坐标的负半轴，Ex 组样本集中于横坐标的正半轴；补充 6 周 FOP 后，FOP 各剂量组样本集中于 NC 组和 Ex 组间，表明各组样本肠道菌群 β 多样性存在显著差异。天然植物性多糖(黄芪多糖[28]、灵芝多糖[29]等)对 EIS 肠道菌群结构的调节效应已得到证实。上述机制仍需进一步研究，FOP 对 EIS 大鼠肠道菌群多样性的影响可能与血清细胞因子功能、巨噬细胞吞噬能力和脾淋巴细胞指数的改善有关。这提示 FOP 有利于改善 EIS 大鼠肠道菌群的相对多样性。

2.4　阿里红多糖对运动免疫抑制大鼠肠道菌群结构的影响

2.4.1　门水平相对丰度　研究显示，长期高强度运动训练或极端饮食条件可影响机体肠道微生物多样性及结构，促进有利于炎症的微生态失调现象，并对机体代谢平衡产生负面影响[30]。Mao 等[31] 研究表明，3 周高强度运动训练可显著降低小鼠肠道拟杆菌门、疣微菌门丰度。大鼠肠道菌群门水平分析发现(图 3)，长期高强度运动训练大鼠拟杆菌门和疣微菌门相对丰度极显著降低(P<0.01)，厚壁菌门和放线菌门相对丰度极显著上升(P<0.01)，该结果与既往研究基本一致。厚壁菌门和放线菌门具有促炎特性，参与调控蛋白质分解时的毒性物质释放，与肠道健康和免疫功能密切相关。拟杆菌门和疣微菌门分别主导胃肠道复杂碳水化合物[32]、多糖类物质(如粘多糖、纤维素)[33]的降解，其相对丰度下降可能直接扰乱机体的能量代谢平衡。由此，长期力竭运动诱导的 EIS 可能与拟杆菌门和疣微菌门相对丰度下降、厚壁菌门和放线菌门相对丰度上升有关。补充 6 周 FOP 后，LFOP、MFOP、HFOP 组大鼠肠道拟杆菌门和疣微菌门相对丰度较 Ex 组极显著上升(P<0.01)，厚壁菌门和放线菌门相对丰度较 Ex 组极显著降低(P<0.01)。天然产物提纯物尤其是多糖类物质可调理免疫抑制大鼠肠道菌群结构，该现象可能与天然产物多糖的生物学活性有关[34]。此外，膳食中多糖成分摄入可促进短链脂肪酸(Short chain fatty acids, SCFAs)合成，其机制可能与拟杆菌门等产 SCFAs 菌群增殖有关，但 FOP 对拟杆菌属的作用效应仍有待进一步验证。提示 FOP 可诱导 EIS 大鼠肠道益生菌增殖并抑制有害菌在肠道中的定殖，从而稳定 EIS 大鼠肠道菌群结构。

2.4.2　属水平相对丰度　力竭运动可能导致肠道中抗炎菌群(如拟杆菌属、栖粪杆菌属和罗斯氏菌属)丰度减少，有害菌群丰度增加，且有害菌丰度与肠道

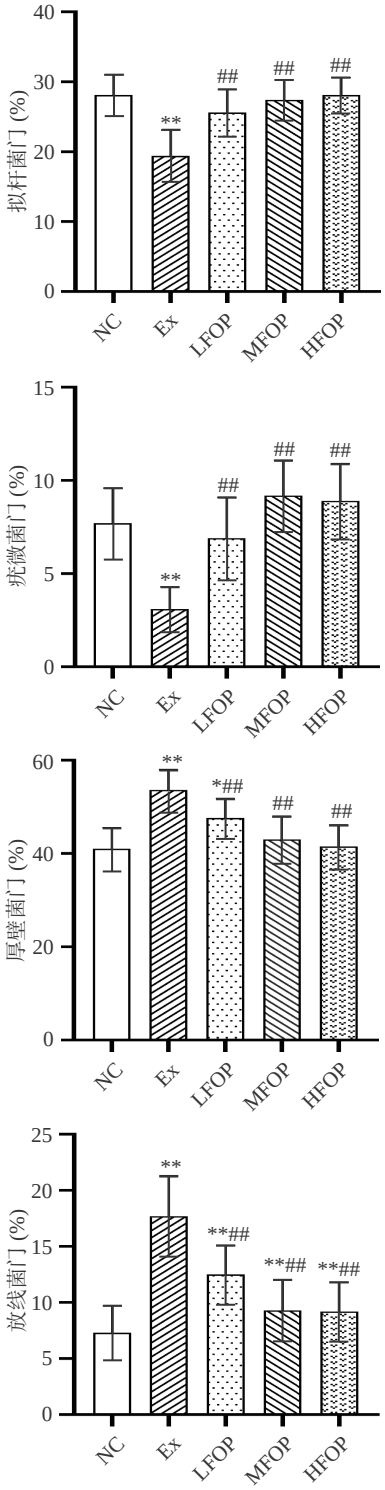


图 3　各组大鼠肠道菌群门水平相对丰度

Fig.3　Relative abundance of phyla level of intestinal flora in each group of rats

通透性密切相关[35]。进一步对大鼠肠道菌群属水平上分析发现(图 4)，Ex 组葡萄球菌属相对丰度极显著上升(P<0.01)，乳杆菌属、毛螺菌属(未分类)、拟杆菌属及艾克曼菌属相对丰度极显著降低(P<0.01)。乳杆菌和艾克曼氏菌为机体肠道内有益菌，可通过激活巨噬细胞活化作用，增强巨噬细胞毒性效果，进而参与机体免疫调节过程[36]。毛螺菌属(未分类)为潜在有益菌，广泛参与多种碳水化合物的代谢调控过程，同时可能与宿主自身免疫稳态密切相关。葡萄球

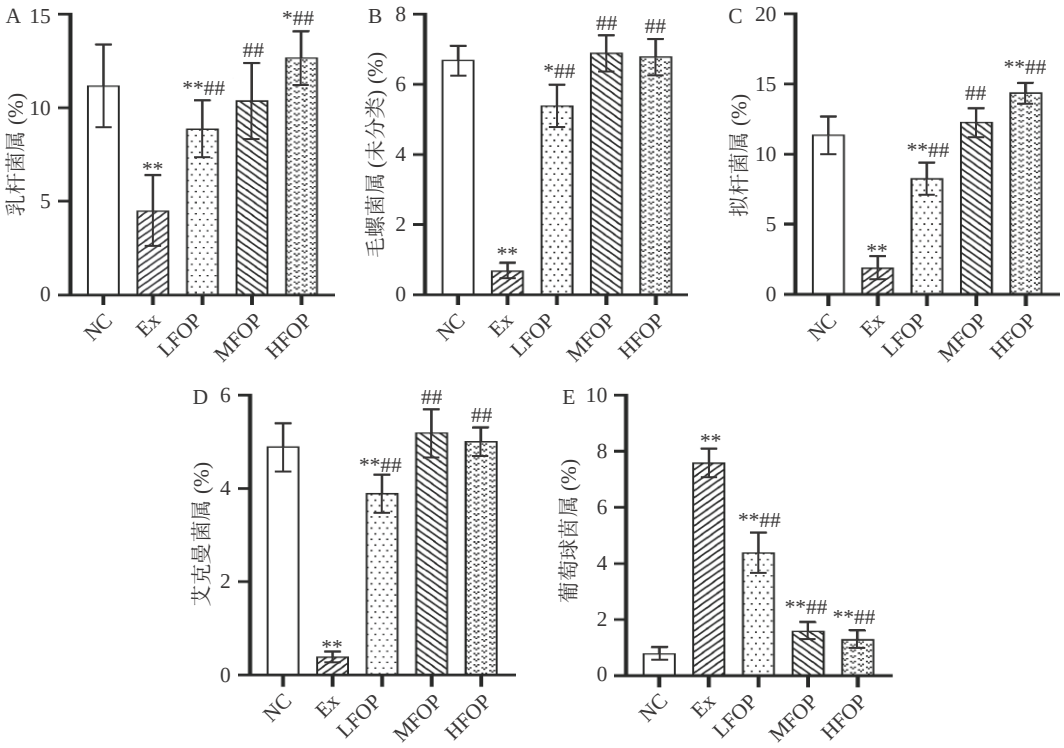


图 4　各组大鼠肠道菌群属水平相对丰度

Fig.4　Relative abundance of genus level of intestinal flora in each group of rats

菌是抗菌物质中毒和病原微生物入侵条件下成为次级的微生物区系的主要细菌，可通过多种途径发起炎症反应并诱导免疫抑制[37]。可见，长期力竭运动可能通过抑制乳杆菌属、毛螺菌属(未分类)、拟杆菌属及艾克曼菌属等有益菌丰度诱导 EIS 反应。补充 6 周 FOP 后，LFOP、MFOP、HFOP 组大鼠肠道乳杆菌属、拟杆菌属、毛螺菌属(未分类)及艾克曼菌属相对丰度较 Ex 组极显著上升(P<0.01)，葡萄球菌属相对丰度较 Ex 组极显著降低(P<0.01)。表明 FOP 可促进 EIS 大鼠肠道有益菌生长，有效恢复长期力竭运动造成的肠道菌群变化，促进肠道菌群属水平结构平衡。

2.5　阿里红多糖对运动免疫抑制大鼠肠屏障功能的影响

高强度运动刺激可通过发起肠道屏障损伤诱导致病性物质内毒素移位，进而引发广泛的肠易激反应[38]。紧密连接蛋白主要由 ZO、Occludin 及 Claudins 构成，其活性与机体肠道组织屏障功能密切相关[39]。Davison 等[40] 研究表明，14 d 高强度运动训练可通过降低青年男性肠道上皮细胞 Occludin、Claudin4 蛋白表达及磷酸化水平增加肠道通透性。本研究发现(图 5)，与 NC 组比较，Ex 组大鼠结肠组织 ZO-1、Occludin、Claudin4 蛋白相对表达量极显

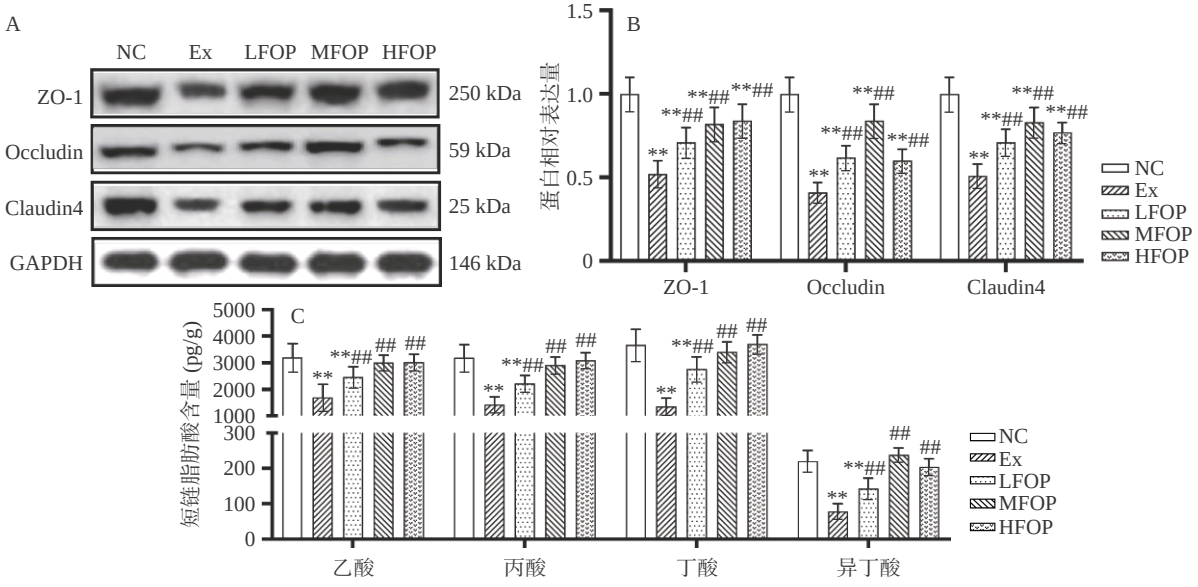


图 5　各组大鼠肠道紧密连接蛋白表达及短链脂肪酸含量

Fig.5　Expression of intestinal tight junction protein and content of short chain fatty acids in each group of rats

著下调(P<0.01)，表明 6 周高强度运动训练提高大鼠肠道通透性并诱导肠屏障功能障碍。本结果与既往研究基本一致。补充 6 周 FOP 后，与 Ex 组比较，LFOP、MFOP、HFOP 组大鼠结肠组织 ZO-1、Occludin、Claudin4 蛋白相对表达量极显著上调(P<0.01)。阿里红黄酮提取物可显著上调小鼠肠组织 ZO、Occludin 和 Claudins 的表达水平[41]，但 FOP 对 EIS 肠道组织紧密连接蛋白的影响尚未明确。提示 FOP 可降低 EIS 大鼠肠道通透性并改善肠屏障功能。

长期高强度训练可抑制 SCFAs 合成并影响肠道细胞能量代谢和增殖能力调控机体肠道屏障功能，同时参与介导肠道菌群结构功能与机体免疫耐受性的调节过程[42]。Ruiz 等[43] 研究表明，高强度急性运动降低 Wistar 大鼠盲肠丙酸、丁酸及戊酸水平。如图 5C 所示，6 周高强度运动训练后，与 NC 组比较，Ex 组大鼠肠道组织乙酸、丙酸、丁酸及异丁酸水平均极显著降低(P<0.01)。上述结果表明，高强度运动训练可能与 SCFAs 水平呈负相关关系，其机制可能与剧烈运动后肠道通透性增加及肠道“渗漏”现象有关。补充 6 周 FOP 后，与 Ex 组比较，LFOP、MFOP、HFOP 组大鼠肠道组织乙酸、丙酸、丁酸及异丁酸水平均极显著上调(P<0.01)。植物性多糖可能通过聚糖降解旁通路上调 SCFAs 生成并促进能源代谢物整合，从而改善机体整体免疫能力。陈亮[44] 研究亦发现，植物性多糖提升免疫抑制小鼠肠道中乙酸、丙酸、丁酸和戊酸等 SCFAs 的含量。综上，FOP 可能有效调节 EIS 大鼠肠道短链脂肪酸合成能力。

3　结论

综上所述，6 周力竭运动造成大鼠免疫功能抑制和炎症反应激活现象，同时诱导肠道菌群多态性、肠道菌群结构及肠道屏障功能紊乱。本研究中，FOP 干预可有效改善 EIS 大鼠免疫功能、抑制炎症反应，提高肠道菌群相对多样性并促进肠道有益菌生长、抑制有害菌定殖，激活肠屏障功能及短链脂肪酸合成能力。因此，FOP 可有效调节 EIS 大鼠肠道菌群及免疫功能。但其具体机制仍有待进一步研究，以期探析 FOP 通过调控肠道菌群结构，为防治 EIS 提供理论及实验依据。

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

参考文献

[1] MOIR H, HUGHES G, POTTER S, et al. Exercise-induced immunosuppression: roles of reactive oxygen species and 5'-AMP-activated protein kinase dephosphorylation within immune cells[J]. Journal of Applied Physiology, 2010, 108(5): 1284−1292.

[2] XIAO W, CHEN P, LIU X, et al. The impaired function of macrophages induced by strenuous exercise could not be ameliorated by BCAA supplementation[J]. Nutrients, 2015, 7(10): 8645−8656.

[3] 覃飞, 赵杰修, 王松涛, 等. 低强度激光对运动性免疫抑制大鼠的干预效果研究[J]. 中国体育科技, 2019, 55(7): 71−80. [QIN F, ZHAO J X, WANG S T, et al. The effect of low power laser on exercise-induced immunosuppression in rats[J]. China Sport Science and Technology, 2019, 55(7): 71−80.]

[4] WANG J, ZHU N, SU X, et al. Gut-microbiota-derived metabolites maintain gut and systemic immune homeostasis[J]. Cells, 2023, 12(5): 793.

[5] HUGHES L, HOLSCHER D. Fueling gut microbes: A review of the interaction between diet, exercise, and the gut microbiota in athletes[J]. Advances in Nutrition, 2021, 12(6): 2190−2215.

[6] BERMON S, PETRIZ B, KAJÉNIENÉ A, et al. The microbiota: an exercise immunology perspective[J]. Exercise Immunology Review, 2015, 21(5): 70−79.

[7] 孟庆龙, 金莎, 刘雅婧, 等. 植物多糖药理功效研究进展[J]. 食品工业科技, 2020, 41(11): 335−341. [MENG Qinglong, JIN Sha, LIU Yajing, et al. Research progress in pharmacological efficacy of plant polysaccharides[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(11): 335−341.]

[8] 赵人杰, 白芯嫣, 项璐, 等. 大蒜多糖对健康小鼠肠道菌群及免疫功能的影响[J]. 中国食品学报, 2023, 23(8): 132−141. [ZHAO Renjie, BAI Xinyan, XIANG Lu, et al. Effects of garlic polysaccharide on intestinal flora and immune function of healthy mice[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2023, 23(8): 132−141.]

[9] 米仁沙·牙库甫, 祖丽胡玛尔·阿卜杜合力力, 木尼萨·迪力夏提, 等. 阿里红多糖组分对小鼠脾淋巴细胞免疫功能的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(16): 4369−4374. [ISHAREN Yakufu, ZULIHUMAER Abuduhelili, MUNISA Dilixiati, et al. Effects of polysaccharide from *Fomes officinals* Ames on immune function of murine splenic lymphocytes[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2018, 9(16): 4369−4374.]

[10] 沙依拜·沙比提, 丛媛媛, 古丽尼歌尔·阿布都米吉提, 等. 阿里红多糖体内抗肿瘤作用及其机制研究[J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(2): 197−203. [SHAYIBAI Shabiti, CONG Yuanyuan, GULINIGEER Abudumijiti, et al. *In vivo* anti-tumor activities of *Fomes officinalis* polysaccharide and the underlying mechanisms [J]. Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica, 2021, 29(2): 197−203.]

[11] 帕丽达·阿不力孜, 如斯塔木·托合尼牙孜, 丛媛媛, 等. 阿里红多糖抗衰老作用研究[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(2): 340−342. [PALIDA Abulizi, ROUSITAMU Tuoheniyazi, CONG Yuanyuan, et al. Study on the anti-aging effect of *Fomes officinalis* Ames polysaccharides[J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2013, 28(2): 340−342.]

[12] 木妮然·吐尔逊江, 依明·尕哈甫, 丛媛媛, 等. 阿里红多糖对 Aβ_(25-35)诱导的小胶质细胞炎症反应的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(22): 5943−5948. [MUNIRAN Tuerxunjiang, YIMING Gahafu, CONG Yuanyuan, et al. Effects of *Fomes officinais* Ames polysaccharides on Aβ_(25-35) induced inflammatory response of microglia[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2018, 9(22): 5943−5948.]

[13] 王凤华, 孔海军, 黄玲. 维药阿里红多糖对运动性免疫抑制改善的作用机制研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2018, 9(22): 5943−5948. [WANG Fenghua, KONG Haijun, HUANG

Ling, et al. Effect of inhibition of Uygur *Fomes officinalis* polysaccharides on antioxidant capacity and exercise immunity[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2018, 9(22): 5943−5948.]
[14] NIEMAN C, SCHERR J, LUO B, et al. Influence of pistachios on performance and exercise-induced inflammation, oxidative stress, immune dysfunction, and metabolite shifts in cyclists: A randomized, crossover trial[J]. PLoS One, 2014, 9(11): e113725.
[15] 孔海军, 王凤华, 孔令生, 等. 维药阿里红多糖对运动疲劳小鼠 Th1/Th2 平衡及 Foxp3 Scurfin 蛋白表达调控研究[J]. 食品与药品, 2017, 19(5): 305−309. [KONG Haijun, WANG Fenghua, KONG Lingsheng, et al. Effects of polysaccharide from *Fomes officinalis* Ames on Th1/Th2 balance and Foxp3 scurfin expression in exercise-induced physical fatigue mice[J]. Food and Drug, 2017, 19(5): 305−309.]
[16] 如斯塔木·托合尼牙孜, 赛力曼·哈德尔, 刘纪杉, 等. 不同产地阿里红多糖的含量比较研究[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(10): 2565−2567. [RUSITAMU Tuoheniyazi, SAILIMAN Hadeer, LIU Jibin, et al. Comparative study on the polysaccharide contents of *Fomes officinalis* Ames from different regions[J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2012, 27(10): 2565−2567.]
[17] 金其贯, 胡要娟, 金爱娜, 等. 不同模式的低氧运动训练对大鼠肠道体液免疫功能的影响[J]. 中国运动医学杂志, 2015, 34(8): 764−769. [JIN Qiguan, HU Yaojuan, JIN Aina, et al. Effect of different modes of hypoxic training on the humoral immune function of intestine in rats[J]. Chinese Journal of Sports Medicine, 2015, 34(8): 764−769.]
[18] DIRKSEN C, HANSEN BR, KOLTE L, et al. T-lymphocyte subset dynamics in well-treated HIV-infected men during a bout of exhausting exercise[J]. Infect Dis (Lond), 2015, 47(12): 919−923.
[19] 沙依拜·沙比提, 米仁沙·牙库甫, 古丽尼歌尔·阿布都米吉提, 等. 阿里红多糖对 S_(180)荷瘤小鼠肿瘤生长的影响[J]. 中药材, 2021, 44(7): 1744−1748. [SHAYIBAI Shabiti, MIRENSHA Yakufu, GULINIGEER Abudumijiti, et al. The effect of *Fomes officinalis* Ames polysaccharides on tumor growth in S180 tumor bearing mice[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2021, 44(7): 1744−1748.]
[20] 姜一弘, 张丹, 张天择, 等. 核因子 κB(NF-κB)信号通路在炎症与肿瘤中作用的研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2018, 34(12): 1130−1135. [JIANG Yihong, ZHANG Dan, ZHANG Tianze, et al. Nuclear factor-κB (NF-κB) research progress on the role of signaling pathways in inflammation and tumors[J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2018, 34(12): 1130−1135.]
[21] CANTINI N, SCHEPETKIN I A, DANILENKO N V, et al. Pyridazinones and structurally related derivatives with anti-inflammatory activity[J]. Molecules, 2022, 27(12): 3749.
[22] VAN N D, NGUYEN T L L, JIN Y, et al. 6'-Sialylactose abolished lipopolysaccharide-induced inflammation and hyper-permeability in endothelial cells[J]. Arch Pharm Res, 2022, 45(11): 836−848.
[23] DONG N, LI X, XUE C, et al. Astragalus polysaccharides alleviates LPS-induced inflammation via the NF-kappaB/MAPK signaling pathway[J]. J Cell Physiol, 2020, 235(7-8): 5525−5540.
[24] CIESIELSKA A, MATYJEK M, KWIATKOWSKA K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling[J]. Cell Mol Life Sci, 2021, 78(4): 1233−1261.
[25] YATOO M I, GOPALAKRISHNAN A, SAXENA A, et al. Anti-Inflammatory drugs and herbs with special emphasis on herbal medicines for countering inflammatory diseases and disorders-A review[J]. Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov, 2018, 12(1): 39−58.
[26] CLARK A, MACH N. Exercise-induced stress behavior, gut-microbiota-brain axis and diet: A systematic review for athletes[J]. Journal of the International Society of Sports Nutrition, 2016, 13(11): 43.
[27] CAI Y, LIU Y, WU Z, et al. Effects of diet and exercise on circadian rhythm: Role of gut microbiota in immune and metabolic systems[J]. Nutrients, 2023, 15(12): 2743.
[28] 胡晓燕, 郝选明. 补充黄芪多糖对递增负荷训练大鼠免疫指标的影响[J]. 武汉体育学院学报, 2012, 46(2): 59−64. [HU Xiaoyan, HAO Xuanming. Effects of *Astragalus* polysaccharide intaking on immune index of rats during long-term incremental exercise[J]. Journal of Wuhan Institute of Physical Education, 2012, 46(2): 59−64.]
[29] 李晓勇. 灵芝多糖对运动疲劳及运动性免疫抑制影响[J]. 中国食用菌, 2020, 39(2): 45−48. [LI Xiaoyong. Effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharide on exercise fatigue and exercise-induced immunosuppression[J]. Edible Fungi of China, 2020, 39(2): 45−48.]
[30] MOTIANI K, COLLADO C, ESKELINEN J, et al. Exercise training modulates gut microbiota profile and improves endotoxemia[J]. Medicine & Science in Sports & Exercise, 2020, 52(1): 94−104.
[31] MAO Y H, WANG M, YUAN Y, et al. Konjac glucomannan counteracted the side effects of excessive exercise on gut microbiome, endurance, and strength in an overtraining mice model[J]. Nutrients, 2023, 15(19): 4206.
[32] 郭慧玲, 邵玉宇, 孟和毕力格, 等. 肠道菌群与疾病关系的研究进展[J]. 微生物学通报, 2015, 42(2): 400−410. [GUO Huiling, SHAO Yuyu, MENGHEBILIGE, et al. Research on the relation between gastrointestinal microbiota and disease[J]. Microbiology, 2015, 42(2): 400−410.]
[33] ZHAI Q, FENG S, ARJAN N, et al. A next generation probiotic, *Akkermansia muciniphila*[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2019, 59(19): 3227−3236.
[34] TANG C, DING R, SUN J, et al. The impacts of natural polysaccharides on intestinal microbiota and immune responses-a review[J]. Food & Function, 2019, 10(5): 2290−2312.
[35] BONOMINI R, PLAZA J, JORQUERA C, et al. Effect of intensity and duration of exercise on gut microbiota in humans: A systematic review[J]. Int J Environ Res Public Health, 2022, 19(15): 9518.
[36] 林璋, 祖先鹏, 谢海胜, 等. 肠道菌群与人体疾病发病机制的研究进展[J]. 药学学报, 2016, 51(6): 843−852. [LIN Zhang, ZU Xianpeng, XIE Haisheng, et al. Research progress in mechanism of intestinal microorganisms in human diseases[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2016, 51(6): 843−852.]
[37] KELLY A M, LEECH J M, DOYLE S L, et al. *Staphylococcus aureus*-induced immunosuppression mediated by IL-10 and IL-27 facilitates nasal colonisation[J]. PLoS Pathog, 2022, 18(7): e1010647.
[38] MCKENNA J, GORINI F, GILLUM L, et al. High-altitude exposures and intestinal barrier dysfunction[J]. American Journal of Physiology-regulatory Integrative and Comparative Physiology,

2022, 322(3): 192−203.
[39] 袁榴翼, 李小锦, 尹清晟, 等. 中药干预肠道菌群改善肠黏膜屏障功能的研究进展[J]. 中草药, 2018, 49(8): 1932−1938. [YUAN Liuyi, LI Xiaojin, YIN Qingsheng, et al. Research progress on Chinese materia medica intervening intestinal flora to improve intestinal mucosal barrier function[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2018, 49(8): 1932−1938.]
[40] DAVISON G, MARCHBANK T, MARCH D S, et al. Zinc carnosine works with bovine colostrum in truncating heavy exercise-induced increase in gut permeability in healthy volunteers[J]. Am J Clin Nutr, 2016, 104(2): 526−536.
[41] 沙爱龙. 阿里红黄酮对衰老模型小鼠的抗衰老作用[J]. 中国应用生理学杂志, 2016, 32(2): 121−123,127. [SHA Ailong. Effects of the *Fomes officinalis* flavonoids on anti-senile action in the aging model mice[J]. Chinese Journal of Applied Physiology, 2016, 32(2): 121−123,127.]
[42] MARTIN C, MARINELLI L, BLOTTIÈRE M, et al. SCFA: Mechanisms and functional importance in the gut[J]. Proceedings of the Nutrition Society, 2021, 80(1): 37−49.
[43] RUIZ P, MASSOT M, RODRÍGUEZ M J, et al. A cocoa diet can partially attenuate the alterations in microbiota and mucosal immunity induced by a single session of intensive exercise in rats [J]. Front Nutr, 2022, 34(9): 861533.
[44] 陈亮. 鼠李糖乳杆菌胞外多糖的分离纯化及其免疫调节作用研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2023: 35−37. [CHEN Liang. Isolation and purification of exopolysaccharide from *Lactobacillus rhamnosus* and its immunomodulatory effects[D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2023: 35−37.]

毛丽旦·马合提江, 王俊龙, 热合巴提·努尔夏提, 等. 基于网络药理学、分子对接及实验探究芹菜素抗胃癌作用 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 368−377. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110270
MAHETIJIANG·Maolidan , WANG Junlong, NUERXIATI·Rehebati , et al. Based on Network Pharmacology, Molecular Docking and Experiments to Explore the Anti-gastric Cancer Effect of Apigenin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 368−377. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110270

·营养与保健·

基于网络药理学、分子对接及实验探究芹菜素抗胃癌作用

毛丽旦·马合提江, 王俊龙, 热合巴提·努尔夏提, 李紫薇*
（伊犁师范大学化学化工学院, 新疆生物质资源清洁转化与高值利用重点实验室, 新疆伊宁 835000）

摘　要: 目的：基于网络药理学与分子对接技术结合 CCK8 法、细胞划痕、细胞侵袭、平板克隆形成实验探讨芹菜素治疗胃癌作用。方法：本文通过 ChEMBL、UniProt、GeneCards 等数据库及 jvenn 获得芹菜素治疗胃癌的潜在靶点，结合蛋白质相互作用（PPI）分析，基因本体（GO）富集分析、京都基因与基因组百科全书（KEGG）通路富集分析进行作用机制探讨，进一步采用 Auto dock 软件进行分子对接，最后通过细胞增殖与毒性实验（Cell counting kit-8，CCK8）验证芹菜素对胃癌细胞的抑制作用。结果：芹菜素治疗胃癌潜在作用靶点为 52 个；GO 分析表明，芹菜素抗胃癌机制可能与调节信号传导、化学突触传递、蛋白水解等有关；KEGG 分析发现其通过调节神经活性配体一受体相互作用、氮代谢等信号通路发挥抗癌作用；分子对接结果显示配体和受体的结合能为 *ACHE*|−9.1|>*MAOA*|−8.8|>*CA2*|−7.4|>*DPP4*|−7.3|>*CA1*|−7.2|=*GRM5*|−7.2|>*ADA*|−6.8|>*CASP3*|−5.8|，表明配体和受体具有良好的结合性。体外实验表明，芹菜素对胃癌细胞系有明显的抑制作用，其可能是通过降低 *MAOA*、*DPP4*、*AChE* 的表达，升高 *CA2* 的表达对胃癌起到抑制作用。结论：芹菜素具有抗胃癌的作用，其发挥作用涉及到的主要靶点有 *AChE*、*CA1*、*CA2*、*CASP3*、*ADA*、*MAOA*、*DPP4*、*GRM5*，展现了芹菜素多成分、多靶点、多途径的优点，为后续研究芹菜素抗胃癌作用提供参考。

关键词: 网络药理学, 分子对接, 芹菜素, 胃癌
中图分类号: TS201.4　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2024)21−0368−10
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110270
本文网刊:

Based on Network Pharmacology, Molecular Docking and Experiments to Explore the Anti-gastric Cancer Effect of Apigenin

MAHETIJIANG·Maolidan ， WANG Junlong， NUERXIATI·Rehebati ， LI Ziwei*
（Xinjiang Key Laboratory of Clean Transformation and High Value Utilization of Biomass Resources, School of Chemistry and Chemical Engineering, Yili Normal University, Yining 835000, China）

Abstract: Objective: Network pharmacology, molecular docking technology, and CCK8, wound healing, cell invasion, plate colony formation assay were used to explore the effect of apigenin in the treatment of gastric cancer. Methods: The ChEMBL, UniProt, and GeneCards databases and jvenn tools were used to obtain the potential anticancer targets of apigenin. Then, the PPI network analysis, gene ontology (GO) enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis of key targets were used to investigate the mechanism, and Auto dock software was used for further molecular docking. Lastly, the inhibitory effect of apigenin on gastric cancer cells was verified through cell counting kit-8 (CCK8) experiments. Results: There were 52 potential targets of apigenin in the treatment of gastric cancer. GO analysis showed that apigenin might exert its anti-gastric cancer mechanism by regulating signal transduction, chemical synaptic transmission, and proteolysis. KEGG analysis showed that apigenin played a role by

收稿日期: 2023−11−26
基金项目: 新疆生物质资源清洁转化与高值利用重点实验室资助项目（XJSWZ202401）; 自治区重点研发计划项目课题（2022B02021-1-2）。
作者简介: 毛丽旦·马合提江（1996−）, 女, 硕士, 研究方向: 天然产物分析, E-mail: mld5177@163.com。
*** 通信作者:** 李紫薇（1970−）, 女, 硕士, 教授, 研究方向: 天然产物分析, E-mail: yili92@163.com。

regulating the neural active ligand receptor interaction, nitrogen metabolism and other signaling pathways. The molecular docking results showed that the binding energy of ligand and receptor was: *AChE*|−9.1|>*MAOA*|−8.8|>*CA2*|−7.4|>*DPP4*|−7.3|>*CA1*|−7.2|=*GRM5*|−7.2|>*ADA*|−6.8|>*CASP3*|−5.8|, indicating that the ligand and receptor had good binding affinity. *In vitro* tests exhibited that apigenin possessed significant inhibitory effect on gastric cancer cell lines, which might be due to its ability to reducing the expression of *MAOA*, *DPP4*, *AChE* and increasing the expression of *CA2*. Conclusion: Apigenin has the effect of anti-gastric cancer, and the main targets involved in its effect are *AChE*, *CA1*, *CA2*, *CASP3*, *ADA*, *MAOA*, *DPP4*, *GRM5*, which shows the advantages of apigenin in multi-component, multi-target, and multi-channel, and provides a reference for the follow-up study of the anti-gastric cancer effect of apigenin.

Key words: network pharmacology; molecular docking; apigenin; gastric cancer

胃癌（Gastric cancer, GC）是一种源于胃黏膜上皮的恶性肿瘤，在我国各种恶性肿瘤中发病率居首位[1]，目前，手术和化疗是常用的治疗方法，但在临床治疗的过程中，大多数抗癌药物具有严重的不良反应，长时间使用会产生一定的耐药性，甚至会发生并发症。因此，研发副作用小，治疗效果好的新型抗胃癌药物具有重要的现实意义。目前，从天然植物中筛选出特异性强的新型靶向抗肿瘤药物，已成为研究开发抗肿瘤药物的重要途径。

芹菜素（Apigenin）为 4,5,7—三羟基黄酮，又称为芹黄素、洋芹素，是一种来源于伞型科植物的小分子可食用[2] 黄酮类化合物，纯品为黄色晶体状粉末[3]。常见的含有芹菜素的果蔬有猕猴桃、葡萄柚、金桔、芹菜、香菜、甘蓝、薄荷等，其中香菜中的芹菜素是芹菜中的 180 倍[4−5]。芹菜素不仅存在于水果和蔬菜中，还存在于各类中草药中，如蒲公英[6]、洋甘菊[7]、芫花[8]。据文献报道，芹菜素具有降糖[9]、降压[10]、抗炎[11]、抗氧化[12]、抑菌[13] 等功效。目前，研究发现，芹菜素能够调控多种肿瘤细胞的生物行为，能够阻滞细胞周期、促进细胞凋亡，抑制肿瘤细胞的侵袭与迁移，且具有毒性小、致突变作用低等优势[5−6]。林沈国等[14] 研究表明芹菜素可以通过抑制细胞增殖、凋亡和分化来抑制乳腺癌。崔昭阳等[15] 用芹菜素对人胃癌细胞 SGC-7901 做了研究，芹菜素通过激活死亡受体参与诱导并对胃癌有一定的治疗作用。崔迎红等[16] 研究了芹菜素对肝癌的作用。目前芹菜素在胃癌中的作用机制研究鲜有报道。

网络药理学作为药理学的一个新领域，是基于主成分通过系统生物学理论构建疾病生物靶点和药物成分之间的网络联系，从而获得治疗疾病的有效成分[17]，是一门基于系统生物学理论、生物系统网络分析和多目标药物分子设计特定信号节点选择的新学科。中医药配方的作用机制具有多个目标和水平的特点。该机制类似于网络药理学的完整性、系统化和全面性，因此网络药理学适合研究中药化合物的药理学机制[18]。

鉴于此，本研究采用网络药理学与分子对接筛选活性成分芹菜素抗胃癌的靶点，对抗人胃癌细胞（AGS、MGC-803）的生物过程与分子机制进行全面阐述并进一步挖掘抗胃癌的关键基因，为以后研究芹菜素提供新的思路和理论数据。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

人胃癌细胞系 AGS、MGC-803　湖州市中心医院细胞库；芹菜素标准品（分析纯）　上海阿拉丁生化科技公司；RPMI-1640 培养液、胎牛血清（Fetal bovine serum, FBS）　美国 Hyclone 公司；磷酸盐缓冲溶液（Phosphate buffered saline, PBS）　白鲨生物科技公司；0.25% 胰酶、青-链霉素双抗（Penicillin-streptomycin, PS）　美国 Gibco 公司；CCK-8 试剂盒、异丙醇、氯仿、多聚甲醛、结晶紫染料　南京诺唯赞生物科技公司；Trizol　福州科净生物科技有限公司；Transwell 细胞小室　耐思生物科技公司。

Heracell Vios 160i CR 二氧化碳培养箱、Multiskan FC 多功能酶标仪、Sorvall LYNX 6000 高速冷冻离心机、ABI7500 荧光定量 PCR 仪　赛默飞世尔科技（中国）有限公司；Primo Vert 倒置相差显微镜　德国蔡司公司。

1.2　实验方法

1.2.1　数据库平台　通过网络药理学分析芹菜素抗胃癌的作用，采用的数据库及网址见表 1。

1.2.2　芹菜素及胃癌相关靶点的预测　以“Apigenin”为关键词在 ChEMBL 数据库中搜索靶蛋白信息，在 UniProt 数据库中将找到的靶点统一转化为基因名。将相关信息导出建立芹菜素靶蛋白列表。以“Gastric cancer”为关键词检索 GeneCards 数据库，将获得的基因名称等相关信息导出建立胃癌靶基因列表，用于后续分析。

1.2.3　PPI 网络的构建及构建成分网络靶点图　将 1.2.2 中得到的芹菜素与胃癌相关靶点输入到 jvenn 中，获得二者的交集靶点。将共同的靶点输入到 STRING 数据库中，选择“Homo sapiens”，设置相互信值 0.400，隐藏游离的靶点，得到 PPI 网络。把下载得到的结果导入到 Cytoscape 3.9.1 软件中，构建芹菜素与胃癌的网络关系图，并设置 between 来选取核心靶点，并调整靶点位置使之更清晰。

1.2.4　GO 功能富集和 KEGG 通路富集分析　将所收集到的交叉靶点导入到 David 数据库中，分别得到生物过程（Biological process, BP）、细胞组成

表 1 网络药理学分析的参照数据库及网址

Table 1 Database and website for network pharmacology analysis

数据库	名称	网址
ChEMBL	药物化学数据库	https://www.ebi.ac.uk/chembl/
GeneCards	人类基因综合数据库	https://www.genecards.org
UniProt	蛋白质信息数据库	https://www.uniprot.org
jvenn	在线韦恩图	https://jvenn.toulouse.inrae.fr/
STRING	蛋白互作数据库	https://cn.string-db.org
David	注释、可视化和综合发现数据库	https://david.ncifcrf.gov
PDB	国际蛋白质结构数据库	https://www.rcsb.org
Bioinformatics	微生信数据平台	http://www.bioinformatics.com.cn

(Cellular component, CC)、分子功能(Molecular function, MF)及信号通路的靶点信息。将这些数据下载并选择前 25 个核心靶点, 导入到微生信平台, 通过 GO 富集分析绘制气泡图和信号通路。

1.2.5 分子对接 1.2.3 中得到的核心靶点前八位, 在 PDB 数据库中查找靶蛋白的 pdb 格式, 导入至 Pymol 软件中进行去除小分子和水的预处理, 后导入至 Autodock Tools 中加氢, 导出为 pdbqt 格式。在 Chem 数据库中搜索并下载芹菜素的 3D 结构为 mol2 格式, 在 Pymol 软件中导出为 pdbqt 格式。使用 Autodock Vina 将二者进行对接, 取结合能绝对值最高的并用 Pymol 做可视化分析。

1.2.6 体外实验 细胞株用含有 10% 的 RPMI-1640 培养液, 置于 37 ℃、5% CO_2, 饱和湿度的培养箱中培养。

1.2.6.1 CCK-8 法检测细胞活力 取细胞汇合度达到 80% 对数生长期的胃癌细胞(AGS, MGC-803), 使用细胞计数仪计数, 细胞计数后, 以 4×10^4/孔的密度接种于 96 孔板中(100 μL/孔), 96 孔板边缘一圈加入 PBS, 避免受到蒸发影响结果; 在培养箱中培养 24 h 后, 弃去旧培养基, 加入 10% 血清的 1640 培养液培养, 培养箱条件为 37 ℃、5% CO_2, 孵育 4 h。空白对照组: 加 10% 血清的 1640 完全培养基; 实验组: 不同浓度的芹菜素标准液(1、2、4、8、16、32 μmol/L), 培养时间为 24 h; 24 h 后从培养箱中取出 96 孔板, 并向其中加入 CCK-8 试剂(0.5 mg/mL) 100 μL, 继续孵育 2~4 h, 颜色明显变化后, 测 450 nm 处的吸光度。

$$细胞生存率(\%)=\left(\frac{A_s-A_b}{A_c-A_b}\right)\times100$$

式中: A_s 为实验孔吸光度(含细胞、培养液、CCK-8 溶液和药物溶液); A_c 为对照孔吸光度(含细胞、培养液、CCK-8 溶液, 不含药物); A_b 为空白孔吸光度(含培养液、CCK-8 溶液, 不含细胞、药物)。

1.2.6.2 细胞划痕法检测细胞愈合能力 取对数生长期的胃癌细胞(AGS, MGC-803), 以每孔 5×10^5 接种于 6 孔板中, 37 ℃、5% CO_2 下培养 24 h; 24 h 后, 吸去培养基, 在细胞培养皿上制造划痕, 同时设置无芹菜素溶液的完全培养基为对照组, 以及不同浓度芹菜素溶液的培养基组, 使用 8 μmol/L 和 16 μmol/L 的芹菜素分别干预 AGS 和 MGC-803 细胞, 经 24 h 给药培养并划痕, 分别在 0、24 h 拍照进行比较。设计三组重复实验。

1.2.6.3 Transwell 实验检测细胞侵袭能力 将处于对数生长期的细胞, 吸去培养基, 加磷酸缓冲盐溶液清洗, 加胰酶消化, 加入 1640 培养液终止消化, 200×g 离心 5 min; 弃去上清, 加入 1640 培养液重悬细胞, 进行细胞计数, 约每孔 5×10^5; 在 12 孔板中加入 500 μL 含 10% FBS 的 1640 培养液, 放入 Transwell 细胞小室, 上室加入 200 μL 细胞悬液, 静置 15 min, 避免细胞脱落, 沉降。静置后再往上室中分别加入 8 μmol/L 和 16 μmol/L 芹菜素的无血清培养液, 再将 12 孔板轻放入培养箱中培养 24 h; 24 h 后, 取出 Transwell 小室吸走培养液, PBS 洗三次。在 12 孔板的干净孔中加入 4% 多聚甲醛 2 mL, 小室底面浸入溶液中固定 10~15 min; 吸去液体, 将 Transwell 小室在盛有 PBS 的 6 cm 皿中刷洗三遍, 不能碰到小室底部。将小室底部浸入结晶紫染色 5~10 min(每孔 1 mL)。纯净水洗小室, 用棉签轻轻擦拭小室的上室, 除去未与细胞结合的结晶紫; 载玻片上加少量 PBS, 再将 Transwell 小室放上去, 滴加 PBS。在显微镜下取 8 个视野观察细胞并计数, 进行比较。

1.2.6.4 平板克隆实验检测细胞的增殖能力 将处于对数生长期的细胞胰酶消化后, 完全培养基(基础培养基+10% 胎牛血清)重悬成细胞悬液, 并计数; 细胞接种于 6 孔板培养板中, 各实验组接种 800 个细胞/孔; 继续培养到 14 d 或绝大多数单个克隆中细胞数大于 500 为止, 中途每隔 3 d 进行换液并观察细胞状态; 克隆完成后, 在显微镜下对细胞进行拍照, 然后 PBS 洗涤 1 次, 每孔加入 1 mL 4% 多聚甲醛固定 30~60 min, PBS 洗涤 1 次; 每孔加入结晶紫染液 1 mL, 染色细胞 10~20 min; PBS 洗涤细胞数次, 晾干, 分别对整个 6 孔板及每个孔进行单独拍照。

1.2.6.5 RT-qPCR 法检测基因表达 引物设计: 下列引物基因由北京擎科生物科技股份有限公司(上海)进行合成。表 2 列出了引物的序列。

RNA 提取: 使用 AGS 细胞和 MGC-803 细胞铺于 6 孔板中, 24 h 后分别给予 8、16 μmol/L 的芹菜

表 2　RT-qPCR 引物序列

Table 2　Sequence of primers for RT-qPCR

引物名称	引物序列(5'→3')
MAOA-F	5'-ACAGCCTGACCGTGGAGAAG-3'
MAOA-R	5'-GAACGGACGCTCCATTCGGA-3'
AChE-F	5'-GGGGTTGCCTGAGATTGGG-3'
AChE-R	5'-CGCAGGGACGACTTTCACA-3'
CA2-F	5'-GCCAAGTATGACCCTTCCCT-3'
CA2-R	5'-TGTCCATCAAGTGAACCCCA-3'
DPP4-F	5'-CTGGGGTAAAGCCAGAATCA-3'
DPP4-R	5'-TGGTGGTGCACACCTGTAGT-'3

表 3　预混液配方

Table 3　Premix formula

试剂名称	体积(μL)
RNase-free dd H_2O	至总体积20
2×One Step SYBR Green Mix	10
One Step SYBR Green Enzyme Mix	1
50×ROX Reference Dye 1	0.4
正向引物	0.4
反向引物	0.4
模版RNA	1

素继续培养 24 h；将细胞从培养箱中取出，吸去培养基，使用 PBS 冲洗三次；每孔加入 500 μL Trizol，充分吹打，使细胞充分裂解，然后转移到 RNase-free 1.5 mL Ep 管中，冰上静置 10 min；每孔加入 100 μL 三氯甲烷，充分振荡 15 s，室温静置 15 min，12000 r/min，4 ℃ 离心 15 min；离心后将上层水相转移到新的 Ep 管中，加等量的异丙醇并混匀，室温静置 10 min，12000 r/min，4 ℃ 离心 15 min；离心后弃上清，加 500 μL 预冷的 75% 乙醇，将沉淀振荡至悬浮，7500 r/min，4 ℃ 离心 10 min；离心后弃上清，离心管倒置于面巾纸上，计时 15 min，后将管口未干的液滴擦干；往 Ep 管中加入 20 μL 的 DEPC 水，充分吹打混合；最后使用核酸分析仪测定 RNA 浓度，吸取 1 μL RNA 进行测定，并分析纯度。

配制预混液：按表 3 顺序将表格中的成分依次加入到 Ep 管中，吹打均匀后离心。

PCR 反应：配制好后轻弹管底将溶液混合，6000 r/min 短暂离心，离心结束后将 96 孔板置于 RT-qPCR 仪上。设置逆转录阶段温度为 50 ℃，3 min；预变性阶段温度为 95 ℃，30 s；PCR 循环反应阶段为 40 个循环，温度设为 95 ℃，10 s 和 60 ℃，30 s；溶解曲线阶段 95 ℃，15 s；60 ℃，60 s；95 ℃，15 s；并缓慢加热至 99 ℃。

1.3　数据处理

每组 3 个复孔重复 3 次，数据分析及绘图使用 Image J 和 GraphPad Prism 9 软件，结果使用平均值±标准差表示，其中，$P<0.05$ 表示有统计学意义。

2　结果与分析

2.1　靶点的获取

以芹菜素作为研究对象，在 ChEMBL 数据库中搜索芹菜素的靶蛋白信息得到了共 339 个靶蛋白，从中筛选出 Confidence 90% 是“active、both”为有效靶蛋白，最后得到 61 个有效靶蛋白。

从 GeneCards 数据库中查询胃癌相关的基因，最后查到胃癌相关靶点总计 15117 个。

2.2　PPI 网络的构建及成分－靶点网络图的构建

芹菜素 61 个有效靶点中交集得出与胃癌共同靶点 52 个，见图 1，然后将共同靶点提交至 STRING 数据库，得到 PPI 网络，见图 2。

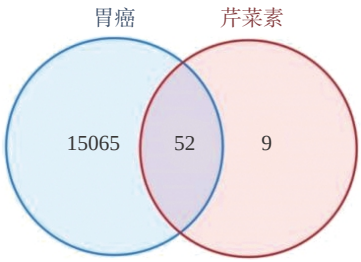


图 1　芹菜素与胃癌的交叉靶点韦恩图

Fig.1　Venn diagram of cross targets between apigenin and gastric cancer

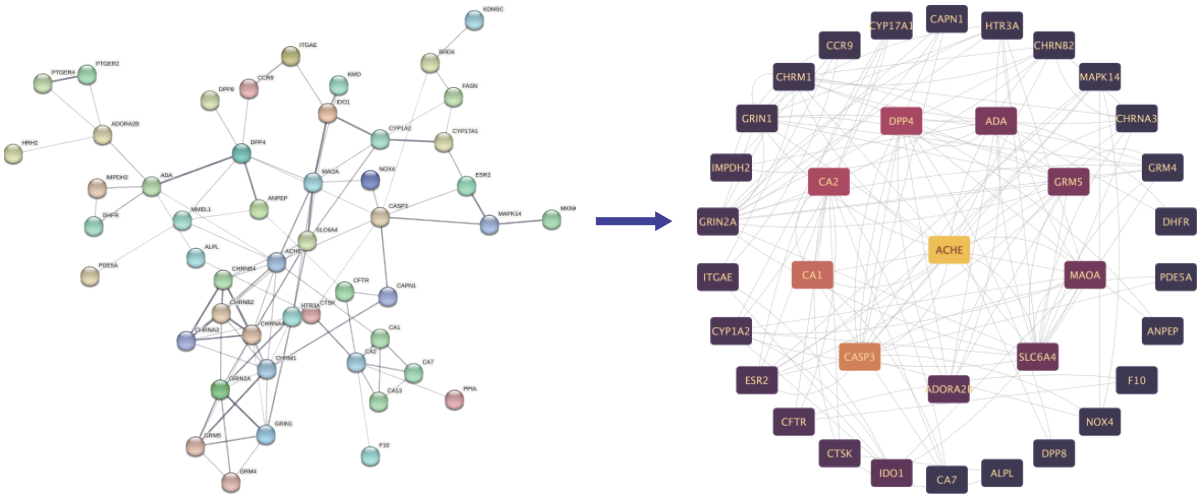


图 2　PPI 网络图与成分-靶点网络图

Fig.2　PPI network diagram and composition-target network diagram

Cytoscape 是一款可以将数据可视化的软件。将芹菜素与胃癌的相交靶点导入到 Cytoscape 3.9.1 软件中，构建成分—靶点网络图。筛选出“Betweenness”值大于 200 的靶点，最终得到芹菜素与胃癌相交靶点：*AChE*、*CASP3*、*CA1*、*CA2*、*DPP4*、*ADA*、*GRM5*、*MAOA*，共八个。成分靶点网络图见图 2。

2.3 Go 功能富集和 KEGG 通路富集分析

图 3 展示了芹菜素治疗胃癌的作用靶点 GO 功能富集结果。这些靶点参与信号传导、化学突触传递、蛋白水解、单碳代谢过程、质膜组成、质膜、突触后膜、配体门控离子通道活性、神经递质受体活性、氧化还原酶的活动等过程。

KEGG 通路富集结果如图 4 所示，神经活性配体—受体相互作用、氮代谢、钙信号通路、代谢途径、神经退行性变的途径—多重疾病、阿尔茨海默病、色氨酸代谢、胆碱能突触、cAMP 信号通路、酒精性肝病、胃酸分泌、酗酒等信号通路有靶点的富

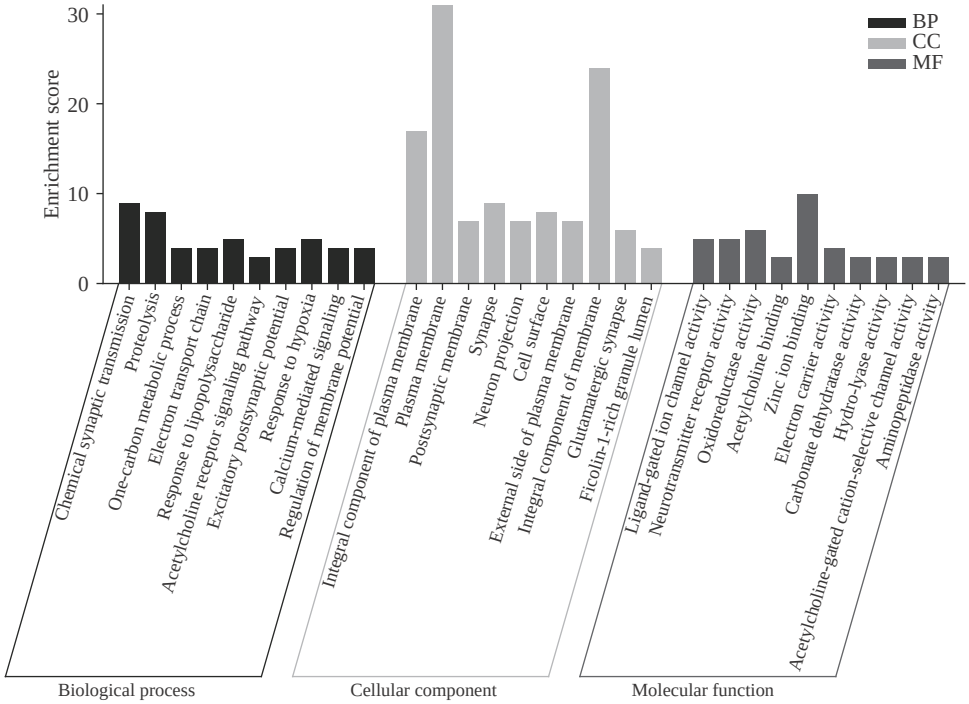


图 3 芹菜素抗胃癌靶点的 GO 分析

Fig.3 GO analysis of apigenin anti-gastric cancer targets

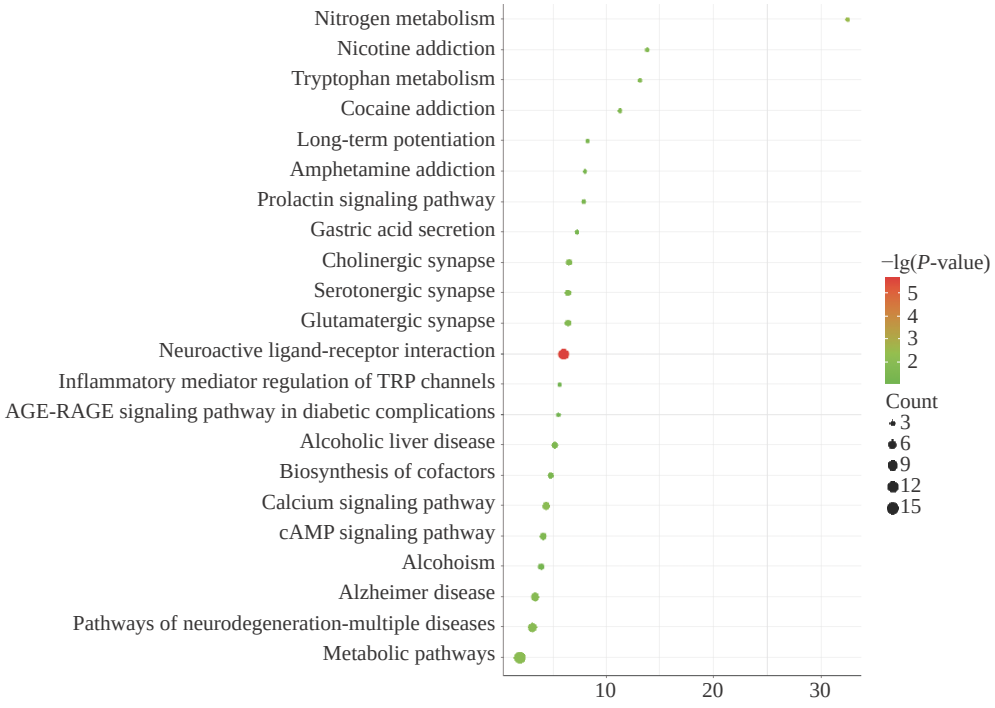


图 4 芹菜素抗胃癌关键靶点的 KEGG 通路富集

Fig.4 KEGG pathway enrichment of apigenin anti-gastric cancer key targets

集。有相关研究发现，化学突触相关的通路 *P* 值越低，癌症存活率越小[19]。其中神经递质参与了多种恶性肿瘤的发生与发展[20]，胆碱能信号抑制 Wnt 信号通路和干细胞的扩增，进而阻断胆碱能抑制胃癌的发生[21]。

2.4　分子对接

胃癌与芹菜素分子对接结果如表 4 所示，分子结合能绝对值的高低反映结合能力的强弱，绝对值排名为：*AChE*|−9.1|>*MAOA*|−8.8|>*CA2*|−7.4|>*DPP4*|−7.3|>*CA1*|−7.2|=*GRM5*|−7.2|>*ADA*|−6.8|>*CASP3*|−5.8|，可知与芹菜素结合紧密。表明芹菜素与胃癌中的以上靶点具有良好的结合能力，分子对接如图 5 所示。

表 4　胃癌靶点与芹菜素分子对接结果

Table 4　Results of molecular docking between gastric cancer targets and apigenin

靶点	结合能(kcal/mol)
AChE	−9.1
CASP3	−5.8
CA1	−7.2
CA2	−7.4
DPP4	−7.3
MAOA	−8.8
ADA	−6.8
GRM5	−7.2

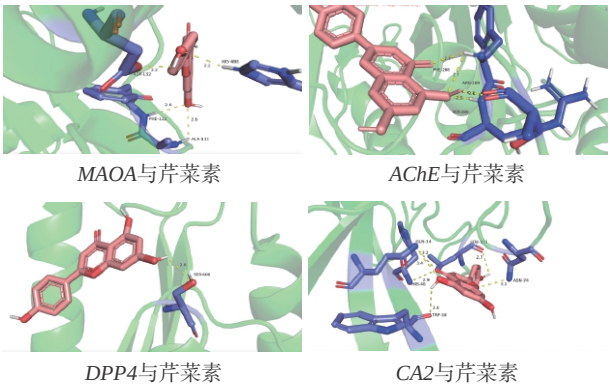


图 5　分子对接图

Fig.5　Molecular docking diagram

2.5　体外实验

2.5.1　芹菜素对人胃癌细胞生存率的影响　芹菜素常见于我们日常的食物里，主要以糖苷的形式存在。多项研究表明，芹菜素通过激活和抑制不同的细胞信号和分子来调节各种细胞过程，包括血管生成、凋亡、转移、自噬、细胞周期和免疫反应[22]。CCK-8 检测细胞生存率在药物毒性检验、肿瘤细胞增殖等多个领域的研究中已经有所应用[23]。如图 6 所示，不同浓度的芹菜素处理的 AGS 细胞与 MGC-803 细胞的细胞活性呈剂量反比，芹菜素的浓度越高，细胞的生存率越低。通过各组之间比较得出，芹菜素可以降低胃癌细胞的存活率。由细胞生存率计算公式得出芹菜素对胃癌细胞系 AGS 的 IC_{50} 为 34.84 μmol/L，对 MGC-803 的 IC_{50} 为 24.86 μmol/L，MGC-803 细胞的 CCK-8 结果中，与对照组相比 8 μmol/L 和 16 μmol/L 浓度的变化较明显，且与自身的 IC_{50} 值的一半也较接近，浓度太高或太低可能会对细胞影响过大产生误差。因此选择 8 μmol/L 和 16 μmol/L 的给药浓度，继续做后续的实验。

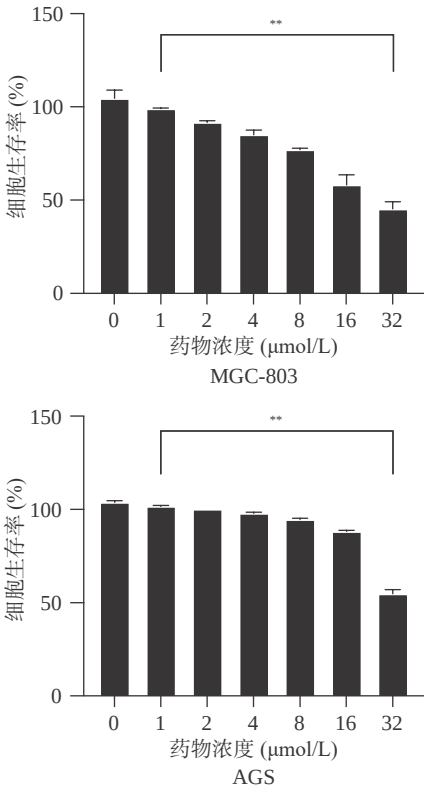


图 6　芹菜素对胃癌细胞 CCK-8 的结果

Fig.6　Results of apigenin on gastric cancer cell CCK-8

注：与对照组相比，**表示 *P*<0.01，差异极显著。

2.5.2　芹菜素对胃癌细胞愈合作用的影响　细胞划痕实验是通过在细胞单层上划痕并通过延时显微镜定期捕获图像，从而研究细胞迁移运动、修复能力和细胞间相互作用的实验室技术[24]。划痕实验结果如图 7、图 9 所示，愈合结果柱状图如图 8、图 10 所示。与对照组相比较，不同给药组的细胞划痕愈合率呈浓度依赖性，浓度越高，愈合率越低。通过该实验推测芹菜素可能通过干扰胃癌细胞的迁移和增殖相关机制，发挥其抑制愈合的效果。可能的作用机制包括调节细胞内的信号通路，如抑制与细胞增殖和迁移密切相关的 PI3K/Akt/mTOR 通路[25]；或者诱导细胞

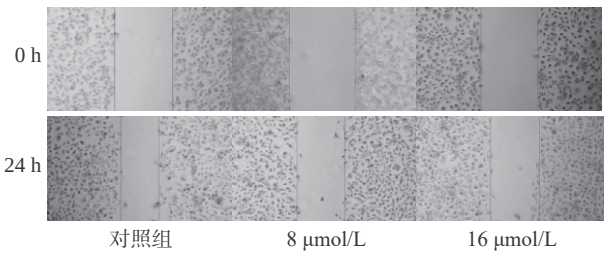


图 7　MGC-803 细胞愈合实验结果

Fig.7　Results of MGC-803 cell healing experiment

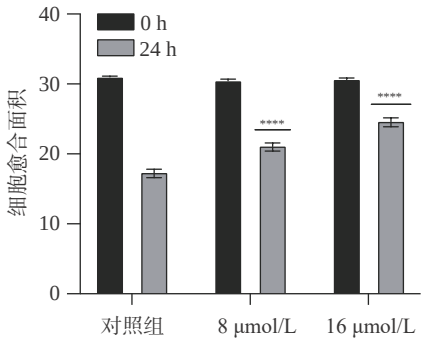


图 8 MGC-803 细胞愈合面积

Fig.8 Histogram of MGC-803 cell healing

注：与对照组相比，****表示 $P<0.0001$，差异高度显著；图 10 同。

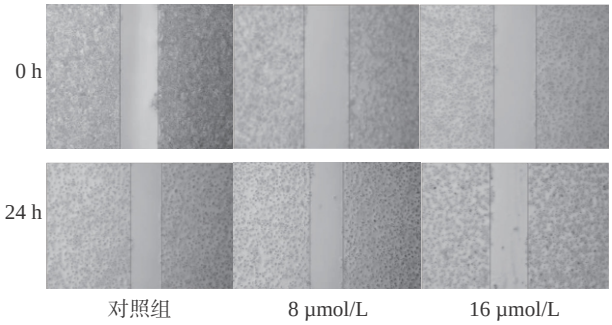


图 9 AGS 细胞愈合实验结果

Fig.9 Results of AGS cell healing experiment

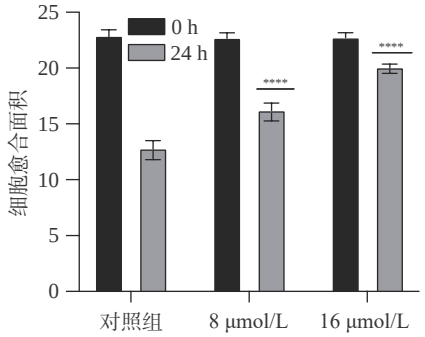


图 10 AGS 细胞愈合面积

Fig.10 Histogram of AGS cell healin

凋亡，减少具有愈合能力的细胞数量。也有研究发现芹菜素可通过激活线粒体信号转导通路诱导人胃癌细胞 BGC-823 凋亡[26]，并且可抑制胃癌细胞 SGC-7901 的增殖来诱导细胞凋亡[15]。

2.5.3 芹菜素对胃癌细胞侵袭的影响 细胞体外侵袭实验主要应用于肿瘤细胞侵袭和转移能力研究，该实验经常使用 Transwell plate 通过穿膜侵袭实验来检测肿瘤细胞的侵袭潜能[27]。图 11 所示，对照组及 8、16 μmol/L 芹菜素分别处理两种胃癌细胞 24 h 后，细胞侵袭数量发生明显变化。MGC-803 对照组细胞侵袭数量 832 个，8 μmol/L 芹菜素组 389 个，16 μmol/L 芹菜素组减少至 82 个；AGS 对照组细胞侵袭数量 632 个，8 μmol/L 芹菜素组 276 个，16 μmol/L 芹菜素组 65 个。上述结果表明芹菜素处理对胃癌细胞的侵袭能力产生明显影响，并存在一定的浓度依赖性。

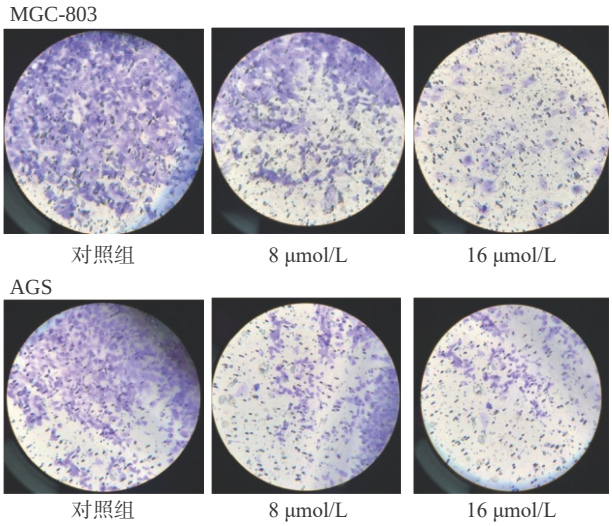


图 11 MGC-803、AGS 细胞侵袭实验结果(200×)

Fig.11 Results of MGC-803, AGS cell invasion experiment (200×)

2.5.4 细胞克隆形成实验 当单个细胞在体外增殖六代以上，其后代所组成的细胞群体，成为集落或群体[28]。实验结果如图 12 所示，与对照组相比，可以看到不同浓度的芹菜素组中的克隆细胞数明显减少直至几乎无，并且每个克隆细胞群的体积也随着芹菜素的浓度增加而减少。

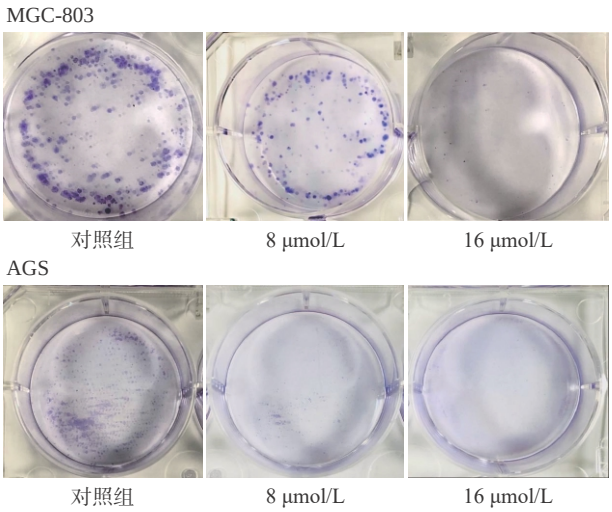


图 12 细胞克隆结果

Fig.12 Results of cell cloning

2.5.5 RT-qPCR 结果 为了进一步验证芹菜素对关键基因的调控作用，采用 RT-qPCR 分析人胃癌细胞系 MGC-803 和 AGS 细胞系中 *MAOA*、*DPP4*、*CA2*、*AChE* 的 mRNA 表达水平。RT-qPCR 结果如图 13~图 14 所示，与对照组相比，使用芹菜素处理后，基因 *CA2* 的表达水平显著上调($P<0.01$)。基因 *MAOA*、*DPP4*、*AChE* 表达水平受到显著抑制，表达降低($P<0.01$)。*MAOA*(单胺氧化酶 A)可通过氧化脱氨

作用降解胺类神经递质[29]，DPP4（二肽基肽酶 4）是广泛表达的跨膜糖蛋白[30]，可作为潜在的泛癌生物标志物[31]。AChE（乙酰胆碱酯酶）也在生物神经传导中起着关键性的作用[32]。AChE 是一种分泌型羧酸酯酶，能够降解神经递质乙酰胆碱成为胆碱和乙酸[33]。AChE 可以使干细胞分化[34]、突触发生[35]、促进细胞生长、在细胞凋亡的过程中起着重要作用[36]。CA（碳酸酐酶）是含有可催化二氧化碳可逆水合作用的含锌金属酶[37]。推测芹菜素可能是通过促进 *CA2* 的表达水平，抑制 *MAOA*、*DPP4*、*AChE* 的表达水平来达到治疗胃癌的作用，且以上四个靶点参与免疫调节，通过物质代谢、炎症反应等相关通路调控肿瘤的发生发展。

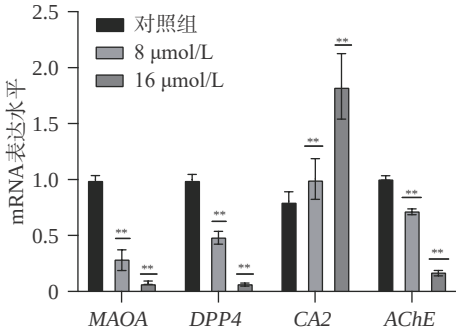


图 13　MGC-803 RT-qPCR 结果

Fig.13　Results of MGC-803 RT-qPCR

注：与对照组相比，**表示 $P<0.01$，差异显著；图 14 同。

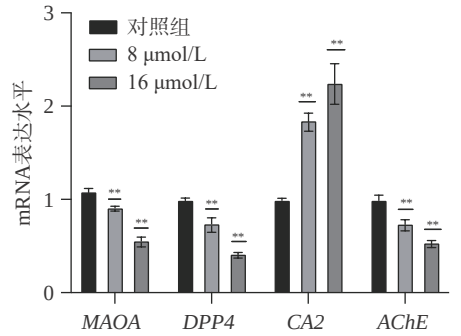


图 14　AGS RT-qPCR 结果

Fig.14　Results of AGS RT-qPCR

3　结论

本文采用网络药理学筛选出芹菜素共 61 个有效靶点，与胃癌交叉靶点有 52 个。芹菜素靶点与抗胃癌靶点 PPI 网络分析为深入研究芹菜素对胃癌细胞的作用机制提供了重要线索，也为开发新的抗胃癌治疗策略提供了潜在的方向；GO 富集分析说明芹菜素抗胃癌的作用与生物学方面有关；KEGG 通路分析表明抗癌机制与神经递质、胆碱能、物质代谢和癌症的发展相关。而芹菜素具体是通过哪一类信号通路抑制胃癌还需进一步的深刻研究。

本文通过网络药理学筛选、分子对接技术，预测了芹菜素治疗胃癌的可能靶点。通过神经递质、胆碱能、物质代谢等相关通路来抗胃癌，体外细胞实验验证了芹菜素能够有效地抑制胃癌细胞 MGC-803 和 AGS 的增殖、迁移、形成群落能力与侵袭，后续可在本研究的基础上，增加动物实验进行验证，进一步明确芹菜素抗胃癌的作用机制。

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

参考文献

[1] 刘德华. 胃癌发生发展相关胃肠道菌群以及 SFRPs 基因的生物信息研究[D]. 合肥：中国科学技术大学，2022. [LIU Dehua, Bioinformatics research on the gastrointestinal microbiota and SFRPs genes related to the occurrence and development of gastric cancer[D]. Hefei: University of Science and Technology of China, 2022.]

[2] MUHAMMAD I, TANWEER A G, MUHAMMAD A, et al. Apigenin as an anticancer agent[J]. Phytother Res, 2020, 34(8): 1812−1828.

[3] 计荣盛，王梓灵，吴婷，等. 芹菜素与氧化苦参碱联合用药抑制非小细胞肺癌的作用及其机制研究[J]. 中国中药杂志，2023，48(3)：752−761. [JI Rongsheng, WANG Ziling, WU Ting, et al. Effect of apigenin in combination with oxymatrine on non-small cell lung cancer and mechanism[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2023, 48(3): 752−761.]

[4] FARIEHA H, NAZISH J, KHALIL UR-R, et al. Identification of hypotensive biofunctional compounds of *Coriandrum sativum* and evaluation of their angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibition potential[J]. Oxid Med Cell Longev, 2018:4643736.

[5] SARA P, MARIKA P, ANTONELLA R, et al. Chemical composition and antioxidant activity of thyme, hemp and coriander extracts: A comparison study of maceration, soxhlet, UAE and RSLDE techniques[J]. Foods, 2020, 9(9): 9091221.

[6] 杨文志，杜跃中，高宇，等. 蒲公英总黄酮的研究进展[J]. 人参研究，2017，15(1)：52−55. [YANG Wenzhi, DU Yuezhong, GAO Yu, et al. The research progress of dandelion flavonoids[J]. Ginseng Research, 2017, 15(1): 52−55.]

[7] 冷新，倪健，游龙泰，等. HPLC 法测定德国洋甘菊中槲皮素、木犀草素及芹菜素含量[J]. 国际中医中药杂志，2018，40(7)：649−652. [LENG Xin, NI Jian, YOU Longtai, et al. Determination of quercetin, luteolin and apigenin in German chamomile by HPLC[J]. International Journal of Traditional Chinese Medicine, 2018, 40(7): 649−652.]

[8] 陈红影，苗培培，郭嫦娥，等. 芫花主要黄酮成分对肝微粒体 UGTs 及 UGT1A1 活性的体外抑制作用[J]. 中国现代应用药学，2017，34(3)：305−310. [CHEN Hongying, MIAO Peipei, GUO Change, et al. *In vitro* inhibitory effect of main flavonoids ingredients of genkwa flos on liver microsomal UGTs and UGT1A1 activities[J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2017, 34(3): 305−310.]

[9] GEETHI P, D NEDRA K, VIDURANGA Y W. Antidiabetic properties, bioactive constituents, and other therapeutic effects of *Scoparia dulcis*[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2016, 2016(8): 8243215.

[10] ZENG Y Z, TIAN G, YAN H, et al. Apigenin ameliorates hypertension-induced cardiac hypertrophy and down-regulates cardiac hypoxia inducible factor-lα in rats[J]. Food Funct, 2016, 7(4): 1992−1998.

[11] PENGFEI C, XIANHAO H, WENQING L, et al. Apigenin exhibits anti-inflammatory effects in LPS-stimulated BV2 microglia through activating GSK3*β*/Nrf2 signaling pathway[J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2020, 42(1): 9−16.
[12] PIYUSH K, DEEP S, MAMTA T, et al. Functionality of apigenin as a potent antioxidant with emphasis on bioavailability, metabolism, action mechanism and *in vitro* and *in vivo* studies: A review[J]. Food Biochem, 2022, 46(4): e13950.
[13] GITIRANA DE SANTANA J D, SANTOS-MAYORGA O A, FLORENCIO J R, et al. *Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae Bercht. & Presl), a natural source of bioactive compounds with antibiotic effect against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Antibiotics (Basel), 2023, 12(3): 622.
[14] 林沈国, 毛怡雯, 赵亚新. 芹菜素抗乳腺癌作用及机制的研究进展[J]. 浙江医学, 2023, 45(2): 213−219. [LIN Shenguo, MAO Yiwen, ZHAO Yaxin. Research progress of apigenin anti-breast cancer effect and mechanism[J]. Zhejiang Medical Journal, 2023, 45(2): 213−219.]
[15] 崔昭阳, 李素娜, 姜旭倩, 等. 芹菜素激活 TRAIL 死亡受体参与诱导胃癌 SGC-7901 细胞凋亡的实验研究[J]. 癌变·畸变·突变, 2021, 33(1): 32−36. [CUI Zhaoyang, LI Suna, JIANG Xuqian, et al. Activation of the TRAIL death receptor by apigenin for induction of apoptosis in the gastric cancer SGC-7901 cells[J]. Carcinogenesis, Teratogenesis & Mutagenesis, 2021, 33(1): 32−36.]
[16] 崔迎红, 陈阿, 许畅, 等. 芹菜素上调 SHP-1 蛋白表达抑制肝癌 MHCC97H 细胞 STAT3 磷酸化及球形成[J]. 湖南师范大学学报(医学版), 2018, 15(5): 1−4. [CUI Yinghong, CHEN E, XU Chang, et al. Inhibition of spheroid formation and STAT3 phosphorylation through up-regulating expression of SHP-1 by apigenin in human liver cancer MHCC97H cells[J]. Journal of Hunan Normal University (Medical science), 2018, 15(5): 1−4.]
[17] 谢孟君. 基于网络药理学和代谢组学技术对补肾活血方防治 DR 的作用机制及配伍机制研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2021. [XIE Mengjun. Study on the action mechanism and compatibility mechanism of bushen huoxue prescription in the prevention and treatment of DR based on network pharmacology and metabonomics[D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2021.]
[18] ZHAO L, ZHANG H, LI N, et al. Network pharmacology, a promising approach to reveal the pharmacology mechanism of Chinese medicine formula[J]. J Ethnopharmacol, 2023, 309(12): 116306.
[19] 金其煌. 乙酰胆碱酯酶在细胞凋亡中的作用及 G418 诱导细胞凋亡的分子机制[D]. 上海: 中国科学院研究生院(上海生命科学研究院), 2004. [JIN Qihuang. The role of acetylcholinesterase in apoptosis[D]. Shanghai: Shanghai Institutes for Biological Sciences, 2004.]
[20] 王飞龙. 神经系统在癌症中的功能研究及生物标志物识别[D]. 长春: 吉林大学, 2022. [WANG Feilong. Function research and biomarker identification of nervous system in cancer[D]. Changchun: Jilin University, 2022.]
[21] 周辉. 神经相关因子在结直肠癌患者中的表达及迷走神经对免疫微环境的影响[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2021. [ZHOU Hui. Expression of eurotransmitters in colorectal cancer and effect of vagus nerve on immune microenvironment[D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2021.]
[22] 黄杰波, 贾海英, 张涛. CAII 与恶性肿瘤的相关研究[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(43): 128−130. [HUANG Jiebo, JIA Haiying, ZHANG Tao. Correlation between CAII and malignant tumors[J]. World Latest Medicine Information, 2019, 19(43): 128−130.]
[23] 金雅晴. 基于网络药理学的抗流感病毒药物研究[D]. 北京: 军事科学院, 2022. [JIN Yaqing. Network-based pharmacology of anti-influenza virus drugs: The case of moslae herba[D]. Beijing: Military science, 2022.]
[24] 关玮, 杨树国, 李健, 等. CCK-8 法在阴道毛滴虫体外增殖检测中的应用研究[J]. 湖北医药学院学报, 2021, 40(6): 591−596. [GUAN Wei, YANG Shuguo, LI Jian, et al. The application of CCK-8 method in the detection of trichomonas proliferation *in vitro*[J]. Journal of Hubei University of Medicine, 2021, 40(6): 591−596.]
[25] 孙悦, 余洋, 吴坤. 芹菜素诱导胃癌 SGC-7901 细胞自噬及其对凋亡的影响[J]. 癌变·畸变·突变, 2017, 29(4): 289−294, 299. [SUN Yue, YU Yang, WU Kun. Effect of apeginin-induced autophagy on apoptosis in human gastric cancer cells SGC-7901[J]. Carcinogenesis, Teratogenesis & Mutagenesis, 2017, 29(4): 289−294, 299.]
[26] 黄暨生. 木犀草素、芹菜素及槲皮素对黑色素瘤自杀基因治疗的增效研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2016. [HUANG Jisheng. Study on synergism of luteolin, apigenin and quercetin on suicide gene therapy of melanoma[D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2016.]
[27] DENNIS K, WOLFGANG W, ULRIKE S S. Real-time cell migration monitoring to analyze drug synergism in the scratch assay using the incucyte system[J]. Methods Mol Biol, 2021, 2294(3): 133−142.
[28] 蒋海鹰, 颜亚晖, 罗庚求, 等. 细胞体外侵袭实验中 Transwell plate 染色技术改良[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2011, 96(6): 644−645. [JIANG Haiying, YAN Yahui, LUO Gengqiu, et al. Improved Transwell plate staining technique in cell invasion *in vitro*[J]. Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 2011, 96(6): 644−645.]
[29] 刘震. SHP2 抑制剂 Batoprotafib 治疗耐药胃肠间质瘤(GIST)的机制研究及 GIST 综合治疗分析[D]. 北京: 北京协和医学院, 2023. [LIU Zhen. SHP2 allosteric inhibitor Batoprotafib inhibits prolifeation of imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor (GIST) and the comprehensive analyses of treatment strategies for GIST[D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2023.]
[30] 黄炳御, 唐旭东. MAOA 与肿瘤关系的研究进展[J]. 生命科学, 2018, 30(5): 545−550. [HUANG Bingyu, TANG Xudong. Progress in the relationship between MAOA and tumor[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2018, 30(5): 545−550.]
[31] 谢云亮, 赵云娟, 李万根. 二肽基肽酶 4 相关信号通路研究新进展[J]. 广东医学, 2018, 39(12): 1901−1905. [XIE Yunliang, ZHAO Yunjuan, LI Wangen. New advances in the study of dipeptidyl peptidase 4 related signaling pathways[J]. Guangdong Medical Journal, 2018, 39(12): 1901−1905.]
[32] 陈静, 张尚暖. 铁死亡相关基因 DPP4 与肿瘤免疫及预后的生物信息学研究[J]. 中国免疫学杂志, 2023, 39(11): 2348−2354, 2360. [CHEN Jing, ZHANG Shangnuan. Bioinformatics study on ferroptosis related gene DPP4 in tumor immunity and prognosis[J]. Chinese Journal of Immunology, 2023, 39(11): 2348−2354,2360.]
[33] 胡太平, 曹建国. 芹菜素诱导人胃癌细胞凋亡作用及机制研究[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2007, 27(1): 6−10,93. [HU Taiping, CAO Jianguo. Study on pro-apoptotic effect of apigenin on

human gastric cancer cells and its underlying mechanisms[J]. International Journal of Pathology and Clinical Medicine, 2007, 27(1): 6-10,93.]
[34] 肖静. 乙酰胆碱酯酶在癌症基因—病毒靶向治疗系统中的抗癌作用[D]. 新乡：河南师范大学, 2014. [XIAO Jing. The anti-tumor effect of acetyl cholinesterase in cacer gene-*viro* targeting therapy system[D]. Xinxiang: Henan Normal University, 2014.]
[35] 张中惠. 神经干细胞调控过程中相关神经分子的定量分析[D]. 上海：华东师范大学, 2022. [ZHANG Zhonghui. Quantitative analysis of ralated neuralmolecules in the regulation of neural stem cells[D]. Shanghai: East China Normal University, 2022.]
[36] 安楠. 运动对成长期大鼠神经肌肉接头发育的影响及机制研究[D]. 北京：北京体育大学, 2009. [AN Nan. Effects and mechanism of activities on neuromuscular junction development in young rats[D]. Beijing: Beijing Sport University, 2009.]
[37] 徐恩斌, 张忠兵, 谢渭芬. 乙酰胆碱酯酶的研究进展[J]. 国外医学(生理、病理科学与临床分册), 2003, 23(1): 73-75. [XU Enbin, ZHANG Zhongbing, XIE Weifen. Research progress of acetylcholinesterase[J]. Foreign Medical Sciences (Section of Pathophysiology and Clinical Medicine), 2003, 23(1): 73-75.]

韩亚楠, 李晓娟, 王珣, 等. 南瓜多糖结构特征、改善糖尿病作用的机制及影响因素研究进展 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 378−386. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110187
HAN Yanan, LI Xiaojuan, WANG Xun, et al. Research Progress on the Structural Characteristics of Pumpkin Polysaccharide, Mechanism and Influencing Factors of Ameliorating Diabetes Mellitus[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 378−386. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110187

· 专题综述 ·

南瓜多糖结构特征、改善糖尿病作用的机制及影响因素研究进展

韩亚楠[1], 李晓娟[2,*], 王　珣[2], 冷春旭[2], 赵　曦[2], 赵　伟[2], 陆　杰[2], 李柱刚[3,*]
（1.黑龙江大学, 生命科学学院, 农业微生物技术教育部工程研究中心, 黑龙江省寒区植物基因与生物发酵重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150080;
2.黑龙江省农业科学院生物技术研究所, 黑龙江省南瓜育种与深加工工程技术研究中心, 黑龙江省作物与家畜分子育种重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150028;
3.黑龙江省农业科学院耕作栽培研究所, 黑龙江哈尔滨 150028）

摘　要: 多糖是南瓜中最主要的天然活性成分之一，结构易变、单糖成分复杂，具有降血糖、抗氧化等多种生物活性。近年来，随着糖尿病发病率上升，南瓜多糖的降糖功效引起学者们的关注，研究内容集中在多糖结构、单糖组分和不同活性作用机制等方面。本文对南瓜多糖的结构特征和改善糖尿病的主要作用机制进行了总结，归纳了南瓜多糖降糖活性影响因素，同时，对南瓜多糖药物活性研究的发展前景进行了展望并提出建议，以期为后续南瓜多糖对糖尿病的研究提供参考依据。

关键词: 南瓜多糖, 糖尿病, 结构特征, 降糖机制
中图分类号: TS201.4　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2024)21−0378−09
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110187
本文网刊:

Research Progress on the Structural Characteristics of Pumpkin Polysaccharide, Mechanism and Influencing Factors of Ameliorating Diabetes Mellitus

HAN Yanan[1], LI Xiaojuan[2,*], WANG Xun[2], LENG Chunxu[2], ZHAO Xi[2], ZHAO Wei[2], LU Jie[2], LI Zhugang[3,*]
（1.Engineering Research Center of Agricultural Microbiology Technology, Ministry of Education & Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Plant Genetic Engineering and Biological Fermentation Engineering for Cold Region & School of Life Sciences, Heilongjiang University, Harbin 150080, China;
2.Biotechnology Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Crop and Livestock Molecular Breeding of Heilongjiang, Engineering Technology Research Center of Pumpkin Breeding and Deep Processing of Heilongjiang, Harbin 150028, China;
3.Institute of Tillage and Cultivation, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150028, China）

Abstract: Polysaccharides are one of the most important natural bioactive ingredients in pumpkin. Pumpkin polysaccharides have variable structure and complex monosaccharide composition, and possess a variety of biological activities such as hypoglycemia and antioxidant. In recent years, with the increasing incidence of diabetes, the hypoglycemic effect of pumpkin polysaccharides has attracted more and more attentions of scholars. The research focuses

收稿日期: 2023−11−20
基金项目: 黑龙江省省属科研院所科研业务费项目（CZKYF2021-2-B009）; 黑龙江省南瓜产业技术协同创新推广体系（岗位专家项目）。
作者简介: 韩亚楠（1998−）, 女, 硕士, 研究方向: 细胞生物学, E-mail: hyn6882@163.com。
*** 通信作者:** 李晓娟（1982−）, 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 作物资源开发与利用, E-mail: xiaojuanli_2011@163.com。
李柱刚（1972−）, 男, 博士, 研究员, 研究方向: 作物资源开发与利用, E-mail: lizhugang@163.com。

on the structure, monosaccharide composition and different mechanism of action of pumpkin polysaccharides. Therefore, this paper systematically summarizes the structural characteristics, mechanisms of hypoglycemic action and influence factors of hypoglycemic activity of pumpkin polysaccharides, and looks forward to its research direction and application prospects, and proposes the suggestions, with a view to providing reference for the subsequent research of pumpkin polysaccharides on diabetes.

Key words: pumpkin polysaccharide; diabetes; structural characteristics; hypoglycemic mechanism

糖尿病是一种常见且严重的慢性代谢性疾病，其发病率不断上升，主要特征为高血糖，严重影响人们生活。因此，糖尿病的治疗方法和预防策略成为研究新方向。除遗传因素外，一些环境因素如饮食结构和习惯、生活方式和运动方式等对糖尿病的病情发展都有影响。临床上针对糖尿病最主要的治疗方式有四类药物：双胍类和噻唑烷二酮类；磺脲类药；阿卡波糖和列汀类。但是这些药物大多为化学合成药物，不宜长期服用，如他汀类药物长期使用过程中，存在横纹肌溶解、肝损和新发糖尿病的风险[1]；胰岛素及胰岛素类似物或磺脲类药物则可能增加糖尿病患者罹患肝癌的风险[2]；磺脲类药物则与痴呆风险增加相关[3]。基于化学药物的副作用，天然成分降糖改善糖尿病的研究已成为现阶段研究重点。

南瓜，葫芦科南瓜属的一个种，南瓜属作物因不同地域分为三大类：中国南瓜（*C. moschata* D.）、印度南瓜（*C. maxima* D.）和美洲南瓜（*C. pepo* L.）[4]。南瓜中含有多种活性物质，如多糖、蛋白质、生物碱、果胶、肽、甾醇等，是优质的保健食品[5−6]。南瓜对抗氧化[7−9]、减肥[10]、修复损伤细胞[11]、抗前列腺增生[12]、抗肿瘤[13]、降血糖[14−16]都有一定功效。南瓜多糖作为南瓜中一种具有重要药理活性的天然产物，以安全无毒害、原材料广泛、价格低、副作用小、有良好的降糖效果[17−19]等优势，引起人们广泛研究，由于多糖结构易变、来源种类都会影响其活性，所以探索出具有高活性南瓜多糖的种类和结构具有重要研究意义。目前关于南瓜多糖的综述主要集中在提取分离纯化方法[20−22]、生理活性及应用方面[23−25]，南瓜多糖生理活性很多，如刘颖等[26]和孙婕等[27]对南瓜多糖抗氧化活性研究进展进行了总结。赵婧等[28]和郑海鹏[29]总结了南瓜多糖降糖活性的研究进展。但随着南瓜多糖降糖作用研究的深入，更多的机制被发现，而影响降糖活性的因素也至关重要。因此，本文将通过综合研究相关文献对南瓜多糖结构特征、降糖机制、降糖活性影响因素进行综述，以期对未来深入研究南瓜多糖与糖尿病治疗关系提供参考，为研发新型治疗糖尿病的药物提供新思路。

1　南瓜多糖的结构特征

南瓜多糖不同提取、纯化方式都会使其结构和理化性质发生改变，南瓜多糖的生物活性与其平均分子量、单糖组成、糖苷键连接类型、糖苷键主链结构密切相关。南瓜多糖具有较高的生物活性，其内部结构十分复杂，因此探究南瓜多糖的结构特征与其生物活性的联系具有重要研究意义。南瓜多糖的主要结构特征（单糖组成[30]、生物活性、分子量、化学结构）见表 1。

1.1　单糖组成

南瓜多糖是由不同单糖以不同比例组合而成。因南瓜品种、生长环境、多糖提取方式的不同，所有单糖具体的组成比例也有所差异。测定南瓜多糖单糖组成的方法有高效液相色谱分析法（HPLC）、气相色谱-质谱（GC-MS）、气相色谱（GC）、傅里叶变换红外光谱（FT-IR）。由表 1 可知，南瓜多糖主要由 4 种单糖 1 种糖醛酸组成，其中单糖成分为阿拉伯糖（arabinose, Ara）、半乳糖（galactose, Gal）、葡萄糖（glucose, Glc）、鼠李糖（rhamnose, Rha），糖醛酸主要成分为葡萄糖醛酸（glucuronic acid, GlcA）。在报道的文献中，均可检测到葡萄糖，大量研究表明，南瓜多糖单糖成分中含量较高的是葡萄糖和半乳糖。Qing 等[15]检测南瓜多糖单糖组成成分最多，高达 9 种，只有 Qing 等[15]和 Chen 等[16]检测到核糖（ribose, Rib），Chen 等[16]和 Zhang 等[17]检测到半乳糖醛酸（galacturonic acid, GalA）。Chen 等[31]和 Thu 等[32]都检测到 5 种单糖组成的南瓜多糖，但单糖比例差异较大。

1.2　平均分子量

南瓜多糖的生物活性、理化性质都与分子量密切相关。南瓜多糖的分子量一般通过高效凝胶渗透色谱法（HPGPC）、高效凝胶过滤色谱法（HPGFC）、高效凝胶排阻色谱（HPSEC）、HPLC 共同组合动态激光光散射（DLLS）方法测定。南瓜多糖的平均分子质量范围一般在 10^3~10^6 Da。Chen 等[14]通过 HPLC 共同组合动态激光光散射（DLLS）方法测得提取得到的两种南瓜多糖的相对分子量为别为 7.67 kDa 和 8.83 kDa。Li 等[33]通过 HPGPC 测得南瓜多糖分子量为 3.5 kDa。Xu 等[34]采用热水浸提法和温和酸碱连续提取法从南瓜中得到不同分子量的南瓜多糖，分别为 48 kDa 和 85 kDa。在南瓜多糖的平均分子量测定结果中，南瓜多糖的提取方法、分离纯化方法、单糖组成、糖苷键连接方式都可能与分子量的差异有关。

1.3　化学结构

多糖糖苷键连接类型不同，会影响其稳定性、生物活性和结构。南瓜多糖主链多由 Glc 组成，也有文献报道侧链存在 Gal。王芬[35]从东升南瓜和镇栗青南瓜，分离纯化后获得多糖纯化组分（DPP1 和

表 1 南瓜多糖结构特征

Table 1 Structural characteristics of pumpkin polysaccharide

多糖名称	单糖组成及摩尔比	生物活性	分子量	化学结构	参考文献
(ATPS-PP-1)	Glc	降血糖	7670 Da	主链: 1→3 Glcp, 在(1→3,4)连接的Glcp的O-3处有分支点; 侧链: 末端Glcp	[14]
(ATPS-PP-2)	Glc∶GlcA∶Gal∶Ara=14.5∶1.6∶1.2∶1	降血糖	—	1→Glcp、(1→3)-Galp、(1→6)-Glcp、(1→3,6)-Glcp、(1→4)-Glcp	[14]
PPP	Rha∶Gal∶Ara∶Glc∶GalA=0.52∶2.24∶4.81∶86.24∶6.20	降血糖	3.386×10^6 g/mol	—	[15]
PPP-Cr(III)	Rha∶Gal∶Ara∶Glc∶GalA=0.27∶1.72∶3.53∶89.63∶4.8	降血糖	1.398×10^6 g/mol	—	[15]
RPP-1	Xyl∶Ara∶Man∶Glc∶Gal∶Rha=1∶1.6∶0.4∶12.7∶2.4∶2.1	抗氧化、降血糖	—	β型糖苷键连接的吡喃多糖; 糖醛酸: 4.32%; 不含蛋白质和核酸	[15]
RPP-2	Xyl∶Ara∶Man∶Glc∶Rha=1∶1.1∶3.4∶13.1∶2.9	抗氧化、降血糖	—	β型糖苷键连接的吡喃多糖; 糖醛酸: 11.18%	[17]
RPP-3	Xyl∶Ara∶Rib∶Fru∶Man∶Glc∶Gal∶Rha∶Fuc=1∶1.7∶1∶1.4∶1.3∶1.3∶2.1∶2.7∶1.2	抗氧化、降血糖	—	呋喃多糖; 糖醛酸: 19.35%; 蛋白质: 0.14%	[17]
RPP-4	Xyl∶Ara∶Rib∶Fru∶Man∶Glc∶Gal∶Rha∶Fuc=1∶2.6∶1.1∶1.4∶2.2∶0.9∶1.8∶3.8∶1.5	抗氧化、降血糖	—	β型糖苷键连接的吡喃多糖; 糖醛酸: 23.14%; 蛋白质: 0.14%	[26]
PP	Man∶Rib∶GlcA∶GalA∶Glc∶Xyl∶Fuc=14.92∶4.290∶1.78∶0.26∶12.58∶11.23∶7.33	降血糖、抗氧化	607600 Da	不含蛋白质和核酸	[26]
PP	Rha∶Ara∶Man∶Glc∶Gal=8.4∶43.7∶1.0∶9.3∶34.3	抗氧化	16619 Da	糖醛酸: 22.85%; 蛋白质: 19.96%	[31]
PP-PE	Glc∶Gal∶Ara∶Man∶Rha=1.00∶0.43∶0.04∶0.07∶0.07	降血糖	24000 Da	(→3,6)-α-Glcp-(1→,→4)-α-Galp-(1→; 1,6-Glcp∶1,3-Glcp=8.72∶1.28	[32]
PPB-RT-HT3	Fuc∶Ara∶Rha∶Gal∶Glc∶Xyl∶Man=0.33∶3.58∶10.55∶4.37∶0.25∶0.36∶0.07	乳化	48044 Da	糖醛酸: 34.97%; 蛋白质: 2.83%; 总多酚: 0.058%	[34]
DPP1	Glc	抗氧化、免疫调节	17400 Da	1,4-Glcp∶1,6-Glcp=34.8∶1; 蛋白含量: 10.63%	[35]
ZPP1	Glc	抗氧化、免疫调节	4030000 Da	T-Glcp∶1,4-Glcp∶1,6-Glcp∶1,3,4,6-Glcp=1.3∶1.1∶1.3∶1; 蛋白含量: 10.89%	[35]
PP	Glc∶Gal∶Rha∶Ara∶Xyl	抗氧化	93100 Da	α、β糖苷键连接	[36]
CMDP-4b	GalA∶Rha∶Gal∶Ara=81.2∶8.1∶4.6∶6.1	免疫调节	319700 Da	由α-1,4-连接的HG主链组成, 具有轻微的乙酰化和高度的甲基酯化, 并在(1→4)-连接-GalA p	[37]

注: —表示参考文献中没有相关内容; 木糖(xylose, Xyl), 阿拉伯糖(arabinose, Ara), 核糖(ribose, Rib), 果糖(fructose, Fru), 甘露糖(mannose, Man), 葡萄糖(glucose, Glc), 半乳糖(galactose, Gal), 鼠李糖(rhamnose, Rha), 岩藻糖(fucose, Fuc), 半乳糖醛酸(galacturonic acid, GalA), 葡萄糖醛酸(glucose acid, GlcA)。

ZPP1), 多糖含量为 77.94% 和 79.27%, 其中 DPP1 和 ZPP1 的糖残基结构分别为 1,4-Glcp 和 1,6-Glcp; T-Glcp、1,4-Glcp、1,6-Glcp 和 1,3,4,6-Glcp, 摩尔比分别为 34.8∶1; 1.3∶1.1∶1.3∶1。DPP1 同时具有 α 和 β 糖苷键, ZPP1 只具有 β 糖苷键; DPP1 和 ZPP1 的分子量分别为 1.74×10^4 Da 和 4.03×10^6 Da。

2 南瓜多糖对糖尿病改善作用的主要机制研究

南瓜多糖是一种杂多糖, 具有多种生物活性[36]。大量文献证明了南瓜多糖可以降低糖尿病动物模型的血糖水平, 对糖尿病并发症也有改善作用[38−40], 可作为治疗糖尿病及其并发症的潜在功能成分[41], 进一步探究南瓜多糖改善糖尿病的作用机制, 可以为将来南瓜多糖在临床应用中的合理使用提供理论依据。已有研究表明, 南瓜多糖可通过多种途径、多种机制共同对糖尿病产生积极影响[41−43], 例如降低胰岛素抵抗、抑制体内 α-淀粉酶和 α-葡萄糖苷酶活性、清除自由基、调节信号通路 PI3K/Akt/GLUT4、调节肠道群落。南瓜多糖改善糖尿病的主要机制见图 1。

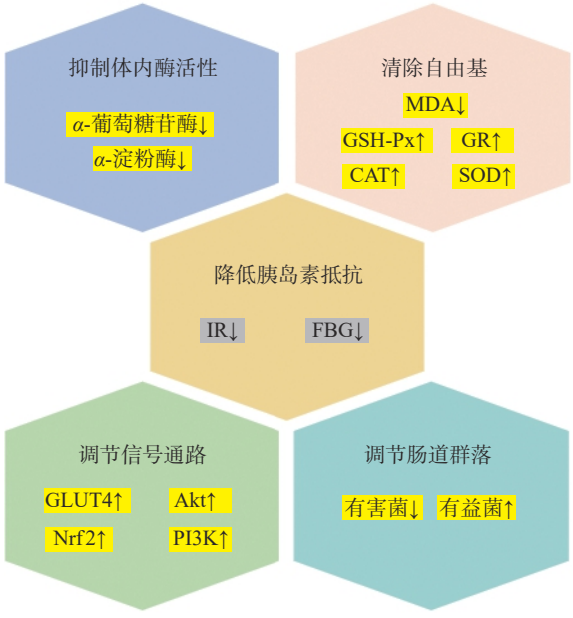


图 1 南瓜多糖降糖机制

Fig.1 Hypoglycemic mechanism of pumpkin polysaccharide

2.1 降低胰岛素抵抗(IR)

Qing 等[15] 研究表明水提粗南瓜多糖治疗能显著改善小鼠 T2DM 症状, 可以降低空腹血糖(FBG)、IR 和血脂水平。糖尿病分为Ⅰ型和Ⅱ型, Ⅱ型糖尿病最为常见且占比巨大。IR 是Ⅱ型糖尿病、心血管疾病等慢性代谢疾病的主要诱因[44]。IR 是胰岛素分泌受损, 从而导致胰岛 β 细胞分泌紊乱、胰岛素促进靶组织对葡萄糖摄取和利用的效率下滑, 导致机体调

节分泌大量胰岛素来平稳血糖值[45]。IR 是影响葡萄糖代谢的一种病理状态。大量研究证明，南瓜多糖可以通过减少炎症、保护胰岛 β 细胞、降低 IR 来改善糖尿病。张高帆等[46] 研究发现南瓜多糖可显著降低四氧嘧啶对胰岛 β 细胞的损伤，还可以降低地塞米松对 IR 作用。Wang 等[47] 研究南瓜多糖降糖效果显著，给四氧嘧啶诱导的小鼠腹腔注射南瓜多糖，给药 7 h 后，发现南瓜多糖糖尿病模型组小鼠血糖含量显著降低，肝糖原和胰岛素水平显著升高，说明南瓜多糖对糖尿病小鼠具有降糖作用和对糖尿病的治疗作用。此外，南瓜多糖还具有提高胰岛细胞增殖活性的潜力，从而保护胰岛 β 细胞[48]。

2.2　抑制体内 α-淀粉酶、α-葡萄糖苷酶活性

高血糖是糖尿病患者的主要特点，糖尿病患者易发生感染性并发症，如糖尿病肾病、视网膜病变和糖尿病足等。因此，糖尿病的治疗主要集中在降低血糖值和并发症。糖尿病患者餐后血糖不稳可能会对胰岛素敏感性有影响。餐后糖尿病患者体内的碳水化合物被水解酶消化分解成单糖，体内 α-淀粉酶、α-葡萄糖苷酶是糖原代谢、体内消化吸收必不可少的酶。目前的治疗方法通过抑制 α-淀粉酶活性，使碳水化合物水解酶活性降低、抑制葡萄糖吸收、降低餐后淀粉消化时间从而降低患者餐后高血糖[49−51]。程龙[49] 对南瓜籽多糖活性进行研究发现 1.0 mg/mL 的多糖 PSP-1 对 α-淀粉酶抑制效果最为明显，因此，多糖 PSP-1 可以通过抑制 α-淀粉酶进行降血糖。刁山山等[50] 对南瓜多糖进行研究，发现采用亚临界水法提取南瓜皮多糖，多糖中总糖含量为 58.00%，糖醛酸含量为 17.41%，蛋白含量为 2.01%，总酚含量为 0.63%，这些物质具有良好的抗氧化能力和抑制 α-淀粉酶与 α-葡萄糖苷酶活性的能力。李雪晖等[51] 采用分子修饰法对南瓜多糖改性并研究其活性，发现通过羧甲基化修饰可以提高南瓜多糖对 α-葡萄糖苷酶的抑制活性，羧甲基化南瓜多糖的降血糖活性也有显著增加。因此，南瓜多糖可以通过抑制 α-淀粉酶、α-葡萄糖苷酶等糖原代谢酶这一机制来改善糖尿病[33,52]。

2.3　清除自由基

在氧化还原反应中没有被氧结合而变成的游离电子被称为自由基。机体在代谢过程中，能够不断产生自由基，机体内自由基过多对胰岛 β 细胞有损伤，胰岛 β 细胞受损也是导致糖尿病因素之一，而超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、谷胱甘肽还原酶(GR)这些酶可以对抗和减轻机体自由基带来的损伤，使机体自由基恢复正常水平[53−55]。Zhang 等[17] 发现南瓜多糖的酸水解产物(PPe-S，混合物)具有显著的抗氧化作用，能够显著增强 SOD、CAT 和 GR 等抗氧化酶的活性，并增加 GSH 水平，降低 MDA 含量，PPe 酸水解得到的 PPe-S-2 对细胞内自由基产生引起的损伤具有显著的保护作用。在糖尿病动物模型中，南瓜多糖作为一类具有抗氧化和增强免疫功能的天然活性物质，可以提高机体 SOD、CAT、GSH-Px 等酶的活性，降低 MDA 水平，使机体自由基恢复正常水平[54−56]。陈雪[57] 在细胞氧化应激损伤模型实验中，证明南瓜多糖可以降低 MDA 含量；提高体内 GSH-Px 活力、SOD 活力和 CAT 活力，可以明显改善细胞活性、缓解氧化带来的损伤、增强细胞的抗氧化能力。因此，南瓜多糖可以通过清除自由基机制，提高或降低某些氧化酶水平来改善糖尿病。

2.4　调控糖代谢相关的信号通路

磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)和蛋白激酶 B(Akt，又称 PKB)是糖尿病通路中的重要信号分子，PI3K 是细胞生长、凋亡、分化和葡萄糖转运中的一种重要激酶，它可以激活 Akt。目前糖尿病分子机制研究中，普遍认为 PI3K/Akt 信号通路是糖代谢调节中的关键一环。当 PI3K/Akt 信号通路被激活后，可通过上调 PI3K、Akt 来达到促进葡萄糖转运蛋白-4(GLUT4)从细胞内转移到细胞膜，增加葡萄糖的摄取的效果[58−59]。Chen 等[16] 采用高脂饲料喂养小鼠，腹腔注射链脲佐菌素诱导 T2DM，结果表明，南瓜多糖均能改善 T2DM 小鼠的血糖耐受性和胰岛素抵抗，此外，核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)、血红素加氧酶-1 和 PI3K 水平上调，Nrf2 和 PI3K 信号通路可能参与降糖机制。冯超等[58] 实验证明，南瓜多糖可以增加 GLUT4 表达，从而促进细胞葡萄糖的摄取与转运，达到改善 IR 的效果，缓解了糖尿病的发展进程。张继媛[59] 发现南瓜多糖通过调节 PI3K/Akt-1 信号水平降低 2 型糖尿病小鼠血糖值，上调机体内 PI3K 水平，增加胰岛素的敏感性，从而改善胰岛素受体和受体后环节的信号转导。综上所述，南瓜多糖可以通过调节 PI3K/Akt/GLUT4 这三种信号通路来改善糖尿病的发展。

2.5　调节肠道群落

肠道菌群影响体内多种生命活动指标，肠道菌群水平对比正常水平升高或降低都会引起人体平衡不稳，极易引发疾病，包括糖尿病。高血糖是糖尿病患者主要特征之一，糖尿病患者的肠道菌群结构和分布与常人是有异的，这是由于菌落所处环境不同造成的差异。研究表明，南瓜多糖可以通过调节肠道菌落增加有益菌比例改善糖尿病相关炎症[36]。张继媛[59] 肠道菌群实验表明，2 型糖尿病小鼠肠道菌群紊乱，有益菌减少、有害菌增加，南瓜多糖可以使小鼠肠道菌群更加接近正常，调节效果较好。Liu 等[60] 和 Liang 等[61] 利用高脂饮食和低剂量 STZ 建立了 2 型糖尿病模型，并探索了南瓜多糖的降血糖潜力。研究发现南瓜多糖不仅改善胰岛素耐量，降低血清葡萄糖(GLU)、总胆固醇(TC)和低密度脂蛋白(LDL-C)水平，提高高密度脂蛋白(HDL-C)水平，从而缓解 2 型糖尿病；而且改变了肠道菌群结构，对拟杆菌、普

氏菌、变形菌、颤螺菌、韦荣氏菌、考拉杆菌、萨特氏菌、嗜胆菌等关键种有选择性富集；其中关键物种与短链脂肪酸产生之间的相关性表明了南瓜多糖对 2 型糖尿病的作用机制。南瓜多糖有利于促进有益菌的增加，调节肠道菌群，通过增加有益菌占比来减少炎症反应，进而减少胰岛素抵抗，缓解糖尿病病症。

3 南瓜多糖降糖生物活性影响因素

有文献表明，南瓜多糖作为一种天然生物活性成分具有良好降血糖效果，可以改善、预防糖尿病发展，对于寻找新型治疗糖尿病的药物有着重要研究意义。但南瓜的种类、南瓜单一多糖类型、南瓜多糖使用剂量、南瓜多糖制备工艺、南瓜多糖改性等都可能影响南瓜多糖的生物活性和治疗效果，因此研究影响南瓜多糖活性的因素将有助于推动南瓜多糖在糖尿病治疗领域的应用。

3.1 南瓜的种类

不同种类的南瓜多糖成分也有所差异，所以降糖效果也有显著差异。孙士咏[62] 对 25 个印度南瓜栽培品种中进行南瓜降糖研究，发现对降低餐后血糖和血清 MDA 含量效果最好的品种是日本红栗、绿栗、龙鑫丹和谢花面；对升高肝糖元含量和胰岛素含量效果最好的品种是日本红栗、谢花面、绿栗和中栗 3 号。王士苗[63] 从 25 个南瓜品种中筛选出活性差异较大的四个品种“十姐妹”、“改良蜜本”、“浙江七叶”、“汕美 2 号”，研究其对糖尿病模型的降血糖作用，发现降低小鼠空腹血糖和 MDA 含量效果最好的品种是“十姐妹”、“汕美 2 号”。因此，具有较好降糖效果的南瓜品种对多糖生物活性的影响有待研究和开发，有助于促进改善糖尿病的发展。

3.2 南瓜单一多糖类型的影响

目前关于南瓜多糖的研究逐渐由南瓜粗糖降糖效果，变成了分离提纯后的单一多糖组成和糖苷键连接支链的不同对降糖效果的影响，例如糖苷键类型 β-1→2、α-1→6 等。并研究不同结构的南瓜多糖对降糖效果的影响。研究证明南瓜分离纯化后糖残基结构不同，南瓜多糖的降糖活性也有明显差异。Li 等[64] 得到一种南瓜的新型天然低分子质量多糖(SLWPP-3)，研究表明，SLWPP-3 分子质量为 3.5 kDa，由鼠李糖、葡萄糖、阿拉伯糖、半乳糖和糖醛酸组成，其质量比为 1∶1∶4∶6∶15，研究表明 SLWPP-3 比大分子粗多糖抑制 α-淀粉酶和 α-葡萄糖苷酶活性更强，说明 SLWPP-3 降糖活性更好。同一种南瓜经分离纯化后也会得到分子量和结构完全不同的南瓜多糖。Jin 等[65] 从南瓜粉中纯化得到 2 个多糖组分，由 1→3 糖苷键连接而成的主链分子量小的 ATPS-PP-1 具有较好的降血糖活性。通过文献总结，单糖组成为阿拉伯糖、葡萄糖、半乳糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸，糖苷键连接支链方式为：1,4-Glcp、1,6-Glcp 的南瓜多糖降血糖活性更好。但目前关于南瓜单一多糖的报道文献较少，了解南瓜单一多糖可以为研究人员提供更多有效的治疗手段，进一步改善糖尿病患者的生活质量。

3.3 南瓜多糖用药量的影响

临床用药的安全有效性在于精准的用药剂量，也是南瓜多糖改善糖尿病的关键因素之一。因南瓜多糖是食品级治疗药物，大部分人对南瓜没有过敏反应，所以没有明确的规定南瓜多糖可用药剂量。目前国内外学者对糖尿病进行研究，采用的实验模型一般是通过注射化学药品四氧嘧啶/地塞米松的大鼠/小鼠模型。与正常鼠相比，南瓜多糖可以明显降低糖尿病模型鼠进食前/进食后血糖值。研究表明，南瓜多糖治疗糖尿病模型鼠的用药大多为 50~1000 μg/mL[38−40]，高剂量(≥500 μg/mL)的南瓜多糖效果更好[14−16]。低剂量如 150 μg/mL 的南瓜多糖降糖效果不是很显著[19]，剂量选择的不同对南瓜多糖降糖效果的影响也是尤为显著的。Thanha 等[66] 研究了南瓜多糖对 α-葡萄糖苷酶和 α-淀粉酶的抑制作用，发现当南瓜多糖浓度呈梯度递增时(5、10、25、50、100 mg/mL)，两种酶酶抑制率和南瓜多糖浓度成正相关，说明南瓜多糖浓度对 α-葡萄糖苷酶和 α-淀粉酶活性影响显著。冯超[67] 发现南瓜多糖在达到 500~1000 μg/mL 时的降糖效果更好，但是这个范围内降糖数值变化不大。因此，了解南瓜多糖在体内肠胃中的消化吸收情况，对南瓜多糖精准用药范围有一定的参考价值，关于南瓜多糖的准确用药剂量也有待研究。

3.4 南瓜多糖制备工艺的影响

目前提取南瓜多糖主要采用的方法为热水浸提法、超声波法、酸碱提取法、酶提取法、超声波-微波辅助法和双水相萃取法。不同制备工艺得到的南瓜多糖，其理化性质也有差异，导致其活性不同，从而影响其预防和改善糖尿病的效果。分离纯化得到的南瓜多糖，其纯度也是研究其化学结构与改善糖尿病及其综合征的影响因素，所以分离纯化过程是制备多糖极为重要的一个环节。Qing 等[15] 分别采用热水提取、水提醇沉、脱蛋白、DEAE-52 纤维素凝胶柱四种方法从南瓜粉中提取南瓜多糖，研究表明热水提取和 DEAE-52 纤维素凝胶柱方法提取的南瓜多糖可以通过抑制葡萄糖摄取、α-淀粉酶和 α-葡萄糖苷酶活性达到更好的降糖效果。Thu 等[32] 用热水萃取法分离南瓜多糖(PP-PE)，PP-PE 由 α-(1→6)-葡聚糖和 α-(1→4)-半乳糖组成，采用胃内注射 100 mg/kg/d 南瓜多糖治疗糖尿病模型小鼠，7 d 后糖尿病模型鼠体内葡萄糖含量明显降低。Saraswathi 等[68] 采用水相辅助法提取南瓜多糖，研究发现，南瓜多糖最佳提取条件是在 55 ℃、pH4.5、酶浓度 4000 U/g 提取 80 min，再经 AEA(1540)提取南瓜多糖，此条件下南瓜多糖活性更高，对 α-淀粉酶抑制活性达到 54.71%，降糖效果更显著。目前南瓜多糖提取方法优缺点详见表 2。为满足今后糖尿病患者的大量需求，超滤法等更高效的分离提纯方法可以在今后南

表 2　南瓜多糖不同提取方法优缺点对比

Table 2　Comparison of the advantages and disadvantages of different extraction methods of pumpkin polysaccharide

提取方法	优点	缺点	提取率	参考文献
超声波-微波辅助	绿色环保 提取率较高 提取时间短	耗能大 设备价格贵 萃取成本高	54.7%	[14]
双水相萃取	环境温和 适用性广 分相时间短	易乳化 试剂消耗大 试剂选择受限	78.34%	[14]
热水浸提	成本低	提取时间长	3.10%	[17]
	操作简单	提取率较低	32.41%	[32]
	反应条件温和	提取纯度较低	29.6%和 17.9%	[34]
	适合工业化生产	可能需多次提取	8.1%	[35]
超声波法	高效省时	耗能大	28.25%	[15]
	适用性广	设备成本高	16.21%	[64]
酸碱提取法	提取率较高	不易过滤	37.45%	[34]
	节省时和试剂	易破坏多糖结构	7.38%	[69]
酶提取	提取率较高 反应条件温和 可回收再利用	成本高 反应单一 反应条件变量多	15.4%	[68]

瓜多糖制备与提取中应用，对南瓜多糖活性影响也有待研究。

3.5　南瓜多糖改性的影响

多糖的改性如南瓜多糖酸水解可以影响其降糖效果。通过处理改变多糖结构，或者南瓜多糖与其他降糖物质结合，都有可能改变南瓜多糖的分子结构，从而影响南瓜多糖在缓解糖尿病方面的生物活性。Chen 等[14] 通过双水相体系结合 DEAE 纤维素-52 柱层析分离纯化南瓜多糖，采用氢氧化钠-碘甲烷反应体系对南瓜多糖进行甲基化修饰，发现修饰后的南瓜多糖生物活性提高，对胰岛 β 细胞的保护作用更强，降糖活性更显著。Zhang 等[17] 在南瓜多糖中加入 Cr(Ⅲ)配合物，PPP-Cr(Ⅲ)配合物含铬 23.77 mg/g，铬复合物可以加速葡萄糖利用和降低胰岛素抵抗。铬复合物与南瓜多糖进行化学修饰后，南瓜多糖活性提高，单糖组成和形态结构都有改变，分子量明显降低，含铬南瓜多糖在糖尿病模型细胞中降血糖活性明显增加。李雪晖等[51] 将南瓜多糖羧甲基化，研究其降血糖能力，结果表明相对未修饰的南瓜多糖而言，羧甲基化南瓜多糖可以提高对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用，证明了羧甲基化南瓜多糖有很好的降血糖活性。Lu 等[70] 研究了南瓜多糖酸水解产物降糖效果，研究证明南瓜多糖酸水解产物可能通过刺激内源性 Gl-1-1 的分泌、减少氧化损害改善糖尿病的发展。但目前，具体哪种结构改变会对南瓜多糖降糖活性产生影响还有待考察。

4　总结与展望

综上所述，南瓜多糖在糖尿病治疗方面展现出了一定的潜力，相较于副作用较大的常规药物，南瓜多糖优势多：开发潜力大、安全性高、原材料广泛、价格低、副作用小、有良好的降糖效果、长期服用无毒害作用。在目前文献报道中，南瓜多糖改善糖尿病的机制主要有：降低体内 IR 水平、抑制酶活性机制、调节自由基机制、调节 PI3K/Akt/GLUT4 信号通路、调节肠道群落等。由于南瓜多糖体内、体外改善糖尿病的作用机制具有关联性，所以今后可以研究上述机制的交叉点，从而更加有效地改善和治疗糖尿病。

目前对南瓜多糖改善糖尿病的研究实验中，大部分研究是基于动物模型进行的，缺乏临床研究数据的获取，未来需要进行更多的临床研究，验证南瓜多糖在治疗糖尿病上的效果；目前关于南瓜多糖的最适提取南瓜种类、工艺没有明确说明，今后可以通过不同品种、不同工艺提取进行南瓜多糖纯度、产量和降糖效果对比，找出最适的南瓜多糖用于开发降糖保健产品；糖尿病的发病机制诸多，而目前报道的南瓜多糖降糖作用机制只是初阶段，未来的研究可以进一步探究南瓜多糖降糖对胰岛素受体、相关信号通路和其他调节机制，另外南瓜多糖的降糖作用机制可以与其他治疗手段相结合，以期为糖尿病的治疗提供更多的支持和指导。

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

参考文献

[1] 徐雷，冯波. 糖尿病患者他汀药物使用获益前景及注意事项[J]. 同济大学学报(医学版)，2023，44(4)：472−475. [XU L, FENG B. Benefit prospects and precautions for using statins in patients with diabetes[J]. Journal of Tongji University (Medical Science)，2023，44(4)：472−475.]

[2] 叶冬，李必迅，巫丽丽，等. 糖尿病及其降糖药物与肝癌发生和发展的关系[J]. 广西医科大学学报，2023，40(6)：1069−1074. [YE D, LI B X, WU L L, et al. The relationship between diabetes

and its hypoglycemic drugs and the occurrence and development of liver cancer[J]. Journal of Guangxi Medical University, 2023, 40(6): 1069−1074.]
[3] ALVIN D K, VESELKO B, ALESSANDRO P, et al. Diabetes, antidiabetic medications and risk of dementia: A systematic umbrella review and meta-analysis[J]. Diabetes, Obesity & Metabolism, 2023, 26(2): 441−462.
[4] 陈学进, 韩涛, 姜立娜, 等. 南瓜属作物遗传转化研究进展[J]. 中国瓜菜, 2020, 33(1): 1−6. [CHEN X J, HAN T, JIANG L N, et al. Research progress on genetic transformation of *Cucurbita* crops[J]. China Cucurbits and Vegetables, 2020, 33(1): 1−6.]
[5] 孙宝强. 初探南瓜的营养保健价值与产品研发进展[J]. 中外食品工业, 2020(15): 11−13. [SUN B Q. Preliminary exploration of the nutritional and health value of pumpkin and product development progress[J]. Global Food Industry, 2020(15): 11−13.]
[6] 李俊星, 杨李益, 云天海. 南瓜加工品开发与利用研究进展[J]. 中国瓜菜, 2018, 31(4): 1−4. [LI J X, YANG L Y, YUN T H. Research progress on the development and utilization of pumpkin processed products[J]. China Cucurbits and Vegetables, 2018, 31(4): 1−4.]
[7] 赵子伟, 解双瑜, 李智, 等. 南瓜籽蛋白肽对小鼠的抗衰老作用[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(8): 17−22. [ZHAO Z W, XIE S Y, LI Z, et al. Anti-aging effects of pumpkin seed protein peptides on mice[J]. Food Research and Development, 2023, 44(8): 17−22.]
[8] ELVIRA-TORALES L, GARCIA-ALONSOL J, PERIAGO M J. Nutritional importance of carotenoids and their effect on liver health: A review[J]. Antioxidants, 2019, 8: 229.
[9] 吴艳丽, 邵珠领, 张宇, 等. 南瓜均一多糖的分离纯化及其抗氧化活性的研究[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(23): 62−70. [WU Y L, SHAO Z L, ZHANG Y, et al. Study on the isolation, purification and antioxidant activity of pumpkin homogeneous polysaccharides[J]. Food Research and Development, 2019, 40(23): 62−70.]
[10] 尉松瑶. 基于网络药理学及分子对接技术对黑籽南瓜减肥作用的机制研究[D]. 长春: 长春工业大学, 2023. [WEI S Y. Study on the mechanism of black seed pumpkins weight loss effect based on network pharmacology and molecular docking technology [D]. Changchun: Changchun University of Technology, 2023.]
[11] 王培宇, 孙培冬. 南瓜籽多肽的制备及其对人体皮肤细胞的体外作用[J]. 中国油脂, 2020, 45(6): 97−101. [WANG P Y, SUN P D. Preparation of pumpkin seed peptides and their *in vitro* effects on human skin cells[J]. China Oils and Fats, 2020, 45(6): 97−101.]
[12] 陈田. 南瓜籽油中植物甾醇分离及对抗前列腺增生的功能研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2019. [CHEN T. Study on the isolation of phytosterols from pumpkin seed oil and its anti-prostatic hyperplasia function[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2019.]
[13] MIDDHA P, WEINSTEIN S J, MÄNNISTÖ S, et al. *β*-Carotene supplementation and lung cancer incidence in the alpha-tocopherol, *β*-carotene cancer prevention study: The role of tar and nicotine[J]. Nicot Tobacco Res: Off JSoc Res Nicot Tobacco, 2019, 21(8): 1045−1050.
[14] CHEN S, KHAN B M, CHEONG K L, et al. Pumpkin polysaccharides: Purification, characterization and hypoglycemic potential[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 139: 842−849.
[15] QING H W, LI Z M, XIN D Z, et al. Sequential extraction, characterization, and analysis of pumpkin polysaccharides for their hypoglycemic activities and effects on gut microbiota in mice[J]. Frontiers in Nutrition, 2021, 8: 8769181.
[16] CHEN X, QIAN L, WANG B, et al. Synergistic hypoglycemic effects of pumpkin polysaccharides and puerarin on type II diabetes mellitus mice[J]. Molecules, 2019, 24(5): 955.
[17] ZHANG W, LI L Y, MA Y, et al. Structural characterization and hypoglycemic activity of a novel pumpkin peel polysaccharide-chromium(III) complex[J]. Foods, 2022, 11(13): 1821.
[18] LINGTE H, ZEEN Y, JIANKUN Y, et al. Preparation and characteristics of pumpkin polysaccharides and their effects on abnormal glucose metabolism in diabetes mice[J]. Food Bioscience, 2023, 54: 102792.
[19] 宿世震, 项东宇. 南瓜多糖对 2 型糖尿病小鼠糖脂代谢影响研究[J]. 亚太传统医药, 2017, 13(1): 15−17. [SU S Z, XIANG D Y. Effects of pumpkin polysaccharide on glucose and lipid metabolism in type 2 diabetic mice[J]. Asia-Pacific Traditional Medicine, 2017, 13(1): 15−17.]
[20] 蒋高华, 彭兴华, 刘永泽, 等. 南瓜多糖的提取、分离纯化方法研究进展[J]. 现代食品, 2020(6): 26−29. [JIANG G H, PENG X H, LIU Y Z, et al. Research progress on extraction, separation and purification of pumpkin polysaccharide[J]. Modern Food, 2020(6): 26−29.]
[21] 鞠丰阳, 李云平. 南瓜多糖的提取工艺研究进展[J]. 科技信息, 2010(34): 105. [JU F Y, LI Y P. Research progress on extraction technology of pumpkin polysaccharide[J]. Science & Technology Information, 2010(34): 105.]
[22] 叶盛英, 郭琪. 南瓜多糖的提取及其药理作用研究概况[J]. 天津药学, 2003(2): 58−60. [YE S Y, GUO Q. Study on extraction and pharmacological action of pumpkin polysaccharide[J]. Tianjin Pharmacy, 2003(2): 58−60.]
[23] 张兰, 王文娟. 南瓜多糖生理活性及应用研究进展[J]. 食品安全导刊, 2021(34): 125−127. [ZHANG L, WANG W J. Research progress on physiological activity and application of pumpkin polysaccharide[J]. China Food Safety Magazine, 2021(34): 125−127.]
[24] 蒋高华, 刘永泽, 彭兴华. 南瓜多糖功能作用及机理的研究进展[J]. 现代食品, 2020(10): 52−55. [JIANG G H, LIU Y Z, PENG X H. Research progress on the functional effects and mechanisms of pumpkin polysaccharides[J]. Modern Food, 2020(10): 52−55.]
[25] 毕新颖, 王建南, 姜玲玲, 等. 南瓜多糖的多重生理效应研究进展[J]. 生物学杂志, 2014, 31(1): 78−81. [BI X Y, WANG J N, JIANG L L, et al. Research progress on multiple physiological effects of pumpkin polysaccharide[J]. Journal of Biology, 2014, 31(1): 78−81.]
[26] 刘颖, 梁盈, 林亲录, 等. 南瓜多糖的提取及其抗氧化活性研究进展[J]. 食品与机械, 2014, 30(3): 239−243. [LI Y, LIANG Y, LIN Q L, et al. Research progress on extraction and antioxidant activity of pumpkin polysaccharide[J]. Food & Machinery, 2014, 30(3): 239−243.]
[27] 孙婕, 尹国友, 张华, 等. 南瓜多糖提取分离纯化及其抗氧化活性的研究进展[J]. 河南城建学院学报, 2010, 19(5): 43−46. [SUN J, YIN G Y, ZHANG H, et al. Research progress on extraction, purification and antioxidant activity of pumpkin polysaccharide[J]. Journal of Henan University of Urban Construction, 2010, 19(5): 43−46.]
[28] 赵婧, 袁驰, 周春丽, 等. 南瓜多糖降血糖作用研究进展[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(7): 108−110,126. [ZHAO J, YUAN C, ZHOU C L, et al. Research progress on hypoglycemic effect of

pumpkin polysaccharide[J]. Food Research and Development, 2014, 35(7): 108−110,126.]
[29] 郑海鹏. 南瓜多糖的单糖组成及降糖作用研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2008(4): 90−93. [ZHENG H P. Research progress on monosaccharide composition and hypoglycemic effect of pumpkin polysaccharide[J]. China Food Additives, 2008(4): 90−93.]
[30] 江璐, 何计国, 范慧红. 南瓜多糖的研究进展[J]. 食品与药品, 2007(8): 51−53. [JIANG L, HE J G, FANG H H. Research progress of pumpkin polysaccharide[J]. Food and Drug, 2007(8): 51−53.]
[31] CHEN L, CHANG X, HAN G, et al. Radical scavenging and low-density lipoprotein cholesterol oxidation inhibitory effects of polysaccharides extracted from Chinese yam, pumpkin, and shiitake[J]. Journal of Food and Nutrition Research, 2020, 8(11): 658−669.
[32] THU T T T, MINH T T Q, YOSHIAKI Y, et al. Molecular structure and anti-diabetic activity of a polysaccharide extracted from pumpkin *Cucurbita pepo*[J]. Journal of Molecular Structure, 2021, 1239: 130507.
[33] LI F, WEI Y, LIANG L, et al. A novel low-molecular-mass pumpkin polysaccharide: Structural characterization, antioxidant activity, and hypoglycemic potential[J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 251: 117090.
[34] XU J, FEI L, JING Z, et al. Structural diversity and physicochemical properties of polysaccharides isolated from pumpkin (*Cucurbita moschata*) by different methods[J]. Food Research International, 2023, 163: 112157.
[35] 王芬. 南瓜多糖的分离纯化、结构鉴定及其生物活性研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2022. [WANG F. Isolation, purification, structural identification and biological activity study of pumpkin polysaccharide[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2022.]
[36] CHEN L, LONG R, HUANG G, et al. Extraction and antioxidant activities *in vivo* of pumpkin polysaccharide[J]. Industrial Crops Products, 2020, 146: 112199.
[37] HUANG L L, ZHAO J, WEI Y L, et al. Structural characterization and mechanisms of macrophage immunomodulatory activity of a pectic polysaccharide from *Cucurbita moschata* Duch.[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 269: 118288.
[38] 刘波, 翟玉荣, 罗建周, 等. 南瓜多糖对糖尿病大鼠模型的影响[J]. 中国处方药, 2017, 15(10): 35−36. [LIU B, ZHAI Y R, LUO J Z, et al. Effect of pumpkin polysaccharide on diabetic rat model[J]. Journal of China Prescription Drug, 2017, 15(10): 35−36.]
[39] LIFE SCIENCE RESEARCH-BIOLOGICAL MACROMOLECULES. Findings on biological macromolecules reported by investigators at chongqing normal university (antioxidant activities of phosphorylated pumpkin polysaccharide)[J]. Chemicals & Chemistry, 2019.
[40] CHEN L, HUANG G. Antioxidant activities of phosphorylated pumpkin polysaccharide[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 125: 256−261.
[41] FEI L, JING Z, YUNLU W, et al. Holistic review of polysaccharides isolated from pumpkin: Preparation methods, structures and bioactivities[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 193(PA): 541−552.
[42] CHEN L, HUANG G. Antioxidant activities of sulfated pumpkin polysaccharides[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 126: 743−746.
[43] 卢傲雪. 南瓜多糖调节氧化应激介导的胰岛 β 细胞凋亡的机制研究[D]. 杭州: 中国计量大学, 2021. [LU A X. Study on the mechanism of pumpkin polysaccharide regulating oxidative stress-mediated apoptosis of pancreatic beta cells[D]. Hangzhou: China Jiliang University, 2021.]
[44] 宁春妹, 赵颖, 安佳秀, 等. 动物胰岛素抵抗的发生机制及治疗[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2022(21): 23−29. [NING C M, ZHAO Y, AN J X, et al. The mechanism and treatment of insulin resistance in animals[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2022(21): 23−29.]
[45] American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2019 abridged forprimary care providers[J]. Clinical Diabetes, 2019, 37(1): 11−34.
[46] 张高帆, 苏东洋, 张拥军, 等. 南瓜多糖对不同糖尿病模型小鼠的降糖作用[J]. 中国食品学报, 2014, 14(2): 23−27. [ZHANG G F, SU D Y, ZHANG Y J, et al. Hypoglycemic effect of pumpkin polysaccharide on mice with different diabetes models[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2014, 14(2): 23−27.]
[47] WANG S, LU A X, ZHANG L, et al. Extraction and purification of pumpkin polysaccharides and their hypoglycemic effect[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 98: 182−187.
[48] CHEN L, LONG R, HUANG G, et al. Extraction and antioxidant activities *in vivo* of pumpkin polysaccharide[J]. Ind Crop Prod, 2020, 146: 112199.
[49] 程龙. 南瓜籽多糖的提取纯化、结构鉴定以及生物活性的测定[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2019. [CHENG L. Extraction, purification, structural identification and biological activity determination of pumpkin seed polysaccharides[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2019.]
[50] 刁山山, 张雨, 冯浩, 等. 亚临界水提取南瓜皮多糖工艺优化及其抗氧化能力[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(23): 90−98. [DIAO S S, ZHANG Y, FENG H, et al. Optimization of subcritical water extraction process of pumpkin peel polysaccharides and its antioxidant capacity[J]. Food Research and Development, 2023, 44(23): 90−98.]
[51] 李雪晖, 罗心雨, 王莹. 羧甲基化南瓜多糖的制备及抗氧化、降血糖活性研究[J]. 食品与机械, 2022, 38(3): 178−183,246. [LI X H, LUO X Y, WANG Y. Preparation of carboxymethylated pumpkin polysaccharide and study on antioxidant and hypoglycemic activities[J]. Food & Machinery, 2022, 38(3): 178−183,246.]
[52] YONGRUI T, WEIZHEN W, XIAOXIAO W, et al. Pumpkin polysaccharide extracted by subcritical water: Physicochemical characterization and anti-diabetic effects in T2DM rats[J]. Molecular Nutrition Food Research, 2022, 66(24): e2200160.
[53] 刘紫萱, 张继媛, 肖萍, 等. 3 种植物活性成分联合改善 2 型糖尿病小鼠氧化应激效果研究[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(8): 5−10. [LIU Z X, ZHANG J Y, XIAO P, et al. Study on the effect of three kinds of plant active ingredients on improving oxidative stress in type 2 diabetic mice[J]. Food Research and Development, 2017, 38(8): 5−10.]
[54] 高鹏, 颜国华. 南瓜多糖对 D-半乳糖致脑老化模型小鼠 SOD、CAT、GSH-PX、MDA 的影响[J]. 吉林中医药, 2015, 35(7): 713−715. [GAO P, YAN G H. Effects of pumpkin polysaccharides on SOD, CAT, GSH-PX and MDA in D-galactose-induced brain aging model mice[J]. Jilin Journal of Chinese Medicine, 2015, 35(7): 713−715.]
[55] HONG Y Z, GUANG T C, GUO L M, et al. Characterization of pumpkin polysaccharides and protective effects on streptozotocin-damaged islet cells[J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2015,

13(3): 199−207.
[56] 朱华杰, 金晖, 张拥军, 等. 南瓜多糖对 ALX 糖尿病模型小鼠氧化应激的影响[J]. 食品科技, 2013, 38(10): 56−59. [ZHU H J, JIN H, ZHANG Y J, et al. Effect of pumpkin polysaccharide on oxidative stress in ALX diabetes model mice[J]. Food Science and Technology, 2013, 38(10): 56−59.]
[57] 陈雪. 南瓜多糖与人参皂苷或芦丁的联合体外抗氧化研究[D]. 天津: 天津农学院, 2019. [CHEN X. *In vitro* antioxidant study of pumpkin polysaccharides and ginsenosides or rutin[D]. Tianjin: Tianjin Agricultural University, 2019.]
[58] 冯超, 尤玲玲, 何庆锋, 等. 苦瓜皂苷、南瓜多糖和苦荞黄酮改善 HepG2/IR 的联合作用研究[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(9): 8−12. [FENG C, YOU L L, HE Q F, et al. Study on the combined effect of bitter melon saponins, pumpkin polysaccharides and tartary buckwheat flavonoids on improving HepG2/IR[J]. Food Research and Developmen, 2015, 36(9): 8−12.]
[59] 张继媛. 三种植物提取物联合改善 2 型糖尿病小鼠糖脂代谢效果及对肠道菌群的影响研究[D]. 天津: 天津农学院, 2017. [ZHANG J Y. Study on the effect of three plant extracts on improving glucose and lipid metabolism in type 2 diabetic mice and affecting intestinal flora[D]. Tianjin: Tianjin Agricultural University, 2017.]
[60] LIU G, LIANG L, YU G, et al. Pumpkin polysaccharide modifies the gut microbiota during alleviation of type 2 diabetes in rats[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 115: 711.
[61] LIANG L, LIU G M, ZHANG F M, et al. Digestibility of squashpolysaccharide under simulated salivary, gastric and intestinal conditions and its impact onshort-chain fatty acid production in type-2 diabetic rats[J]. Carbohyd Polym, 2020, 235(1): 115904.
[62] 孙士咏. 印度南瓜降血糖作用研究及脂溶性成分分析[D]. 新乡: 河南科技学院, 2016. [SUN S Y. Study on the hypoglycemic effect of Indian pumpkin and analysis of fat-soluble components [D]. Xinxiang: Henan Institute of Science and Technology, 2016.]
[63] 王士苗. 不同南瓜品种果实提取物降血糖作用研究[D]. 新乡: 河南科技学院, 2015. [WANG S M. Hypoglycemic effects of fruit extracts from different pumpkin cultivars[D]. Xinxiang: Henan Institute of Science and Technology, 2015.]
[64] LI F, WEI Y, LIANG L, et al. A novel low-molecular-mass pumpkin polysaccharide: Structural characterization, antioxidant activity, and hypoglycemic potential[J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 251: 17090.
[65] JIN X L, PENG B X, DING H H, et al. Purification, structure and biological activity of pumpkin polysaccharides: A review [J]. Food Reviews International, 2023, 39(1): 307−319.
[66] THANHA T T T, QUACHA T T M, YUGUCHI Y, et al. Molecular structure and anti-diabetic activity of a polysaccharide extracted from pumpkin *Cucurbita pepo*[J]. Mol Struct, 2021, 1239: 130507.
[67] 冯超. 苦瓜皂苷与南瓜多糖或苦荞黄酮提取物联合改善Ⅱ型糖尿病代谢紊乱的研究[D]. 天津;天津农学院, 2015. [FENG C. Study on the combination of bitter melon saponin and pumpkin polysaccharide or tartary buckwheat flavonoid extract in improving metabolic disorders in typeⅡdiabetes[D]. Tianjin: Tianjin Agricultural University, 2015.]
[68] SARASWATHI U, MADHAYAN K, KASI G, et al. Optimization of aqueous-assisted extraction of polysaccharides from pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch) and their biological activities[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2021, 28(12): 6692−6700.
[69] YU M, XIAO B, HAO X, et al. Pumpkin polysaccharide preparation, simulated gastrointestinal digestion, and *in vivo* biodistribution[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 141: 1293−1303.
[70] LU A X, YU M G, FANG Z Y, et al. Preparation of the controlled acid hydrolysates from pumpkin polysaccharides and their antioxidant and antidiabetic evaluation[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 121: 261−269.

王芙蓉, 谢中国, 贺江, 等. 三叶木通果实成分、生物活性及保鲜加工研究进展 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 387−396. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110210

WANG Furong, XIE Zhongguo, HE Jiang, et al. Research Progress on Components, Biological Activities, Preservation and Processing of *Akebia trifoliate* (Thunb.) koidz. Fruit[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 387−396. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110210

· 专题综述 ·

三叶木通果实成分、生物活性及保鲜加工研究进展

王芙蓉[1,2,3,4], 谢中国[1,2,*], 贺　江[1], 王穗萍[1]

（1.湖南文理学院生命与环境科学学院, 湖南常德 415000;
2.常德市农业生物大分子研究中心, 湖南常德 415000;
3.农产品高效生产及产品深加工湖南省普通高等学校科技创新团队, 湖南常德 415000;
4.农产品加工与食品安全湖南省高校重点实验室, 湖南常德 415000）

摘　要: 三叶木通是一种具有较高营养、药用和经济价值的植物，可全株入药，藤茎是中药材木通的主要来源，近成熟干燥果实是中药材“预知子”，果肉味道清香甘甜，口感爽滑细嫩，果实含有水分、碳水化合物、蛋白质、脂肪、矿物质、维生素等营养成分和黄酮类、多酚类、三萜及其皂苷、木脂素类、多糖、有机酸等活性成分，具有抗肿瘤、抗菌、抗炎、抗氧化、降血糖等生理功能。为此，本文对三叶木通果实营养及活性成分、生物活性及保鲜加工现状进行了综述，并对三叶木通果实未来的研究方向和应用前景进行了展望，以期为三叶木通果实的综合开发利用及功效成分的精准加工提供理论依据。

关键词: 三叶木通, 活性成分, 生物活性, 作用机制, 应用

中图分类号: TS255.1　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2024)21−0387−10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110210

本文网刊:

Research Progress on Components, Biological Activities, Preservation and Processing of *Akebia trifoliate* (Thunb.) koidz. Fruit

WANG Furong[1,2,3,4], XIE Zhongguo[1,2,*], HE Jiang[1], WANG Suiping[1]

（1.College of Life and Environmental Sciences, Hunan University of Arts and Science, Changde 415000, China;
2.Changde Research Center for Agricultural Biomacromolecule, Changde 415000, China;
3.Science and Technology Innovation Team for Efficient Agricultural Production and Deep Processing at General University in Hunan Province, Changde 415000, China;
4.Agricultural Products Processing and Food Safety Key Laboratory of Hunan Higher Education, Changde 415000, China）

Abstract: *Akebia trifoliate* (Thunb.) koidz. is a significant nutritional, medicinal, and economically valuable fruit. The whole plant of *Akebia trifoliate* (Thunb.) koidz. has medicinal activity. The vines of *Akebia trifoliate* (Thunb.) koidz. are the main source of the traditional Chinese medicine of *Akebiae* caulis. The mature dried fruits of *Akebia trifoliate* (Thunb.) koidz. is the traditional Chinese medicine named as “Yuzhiz”. The flesh fruit tastes sweet, smooth and fine-tender with delicate fragrance. The fruits contain nutrients (water, carbohydrates, proteins, fats, minerals, vitamins, etc.), functional components (flavonoids, polyphenols, triterpenes and their saponins, lignans, polysaccharides, organic acids, etc.), and have physiological activities (anti-tumor, antibacterial, anti-inflammatory, antioxidant, hypoglycemic, etc.). In this paper, the

收稿日期: 2023−11−21

基金项目: 湖南省 2021 年企业科技特派员项目（2021GK5068）; 中央引导地方科技发展资金（2024ZYQ084）; 湖南省科技特派员服务乡村振兴项目（2023NK4183）; 常德市农业生物大分子研究中心开放课题（2020AB09）。

作者简介: 王芙蓉（1982−）, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 农产品精深加工、功能性食品研究, E-mail: xiaorong@huas.edu.cn。

*** 通信作者:** 谢中国（1980−）, 男, 博士, 副教授, 研究方向: 农产品精深加工、功能性食品研究, E-mail: xiezhongguo@huas.edu.cn。

nutritional components, bioactive components, biological activities, preservation, processing of *Akebia trifoliata* (Thunb.) koidz. are reviewed with its research and application prospect. This review will provide theoretical basis for the comprehensive development and precise processing of functional ingredients in *Akebia trifoliata* (Thunb.) koidz.

Key words: *Akebia trifoliate* (Thunb.) koidz.; bioactive components; biological activities; mechanism; application

三叶木通 [*Akebia trifoliate* (Thunb.) koidz.] 是天然的药食两用木通科木通属的落叶木质藤本植物，是我国传统的中草药，其根、藤茎、叶、花、果肉、果皮和果籽中含有多种生物活性成分如黄酮类、多酚类、三萜及其皂苷、木脂素类、多糖、有机酸等[1−2]。三叶木通广泛分布于东亚地区，如中国、朝鲜和日本，在我国广泛分布于长江、黄河流域及秦岭地区，主要分布在湖南、贵州、云南、河南。野生三叶木通的人工栽培技术已经取得突破，在我国四川、湖南、湖北、陕西、河南等省份已开始规模化的种植；湖南的常德、浏阳、怀化等地已经有集中成片驯化种植基地[3−4]。三叶木通的果实又叫八月炸（扎）、八月瓜、合欢果、木通子、牛腰子果、野香蕉等，其近成熟果实干燥后作为常用中药“预知子”。三叶木通果实由果皮、果肉和果籽组成，农历 8 月到 9 月瓜成熟开口，其果实营养丰富、味道甜美。三叶木通果实具有抗氧化、抗菌、抗炎、抗癌等生物活性。作为药食两用的水果植物，果实可以生食、入药，或者加工成果酒、果茶、果脯、果酱、食用油等[2,5]。本文综述了三叶木通果实的营养成分、活性成分、生物活性、保鲜及加工的现状，提出了今后的研究方向和应用前景，为三叶木通果实的高效开发利用提供理论支持和参考。

1 三叶木通果实的成分

1.1 营养成分

三叶木通果实具有很高的营养价值，果肉、果皮和果籽均含有水分、碳水化合物、蛋白质和氨基酸、脂肪和脂肪酸、矿物质和维生素等营养成分。由于种质资源、品种、生长环境和采集时间等因素的影响，三叶木通果实各营养成分含量不一，其营养成分含量见表 1。三叶木通果皮中富含果胶（20.08%±0.20%），主要组成成分是酸性半乳糖醛酸基，其半乳糖醛酸（GalA）含量相当高，可达 83.17%，溶解度大于 80%[8−9]。蛋白质中的氨基酸组成有所差异，果肉中检测出 17 种氨基酸，其中 8 种为必需氨基酸，果皮中检测出 15 种氨基酸，其中 7 种为必需氨基酸，果籽中检测出 17 种氨基酸，8 种为必需氨基酸，它们的氨基酸组成见表 2。果籽中含有丰富的油脂，相关研究结果表明三叶木通果籽的营养价值因为产地的不同存在一定差异[12,14-16]。SU 等[16] 对中国 14 个省份共 25 个代表性分布区的三叶木通的果籽油脂含量和脂肪酸组成进行分析，发现三叶木通果籽富含油脂（30.2%~53.6%），脂肪酸种类有 11 种，主要以油酸（155.9~261.5 mg/g，36.6%~45.2%）、亚油酸（113.8~156.4 mg/g，23.5%~30.8%）、棕榈酸（101.8~149.1 mg/g，20.3%~25.7%）为主。三叶木通果肉、果皮和果籽中含有数种矿物质，它们中矿物质的含量和种类有所不同，均含有钙、镁、磷、钾、铜、铁、锰，在果肉中还检测出锌和钠，果籽中还检测出锌和硒[2−7]。三叶木通果皮中 V_E 的含量为 0.52 mg/100 g，V_C 的含量为 28.02±0.85 mg/100 g，果肉中的 V_C 的含量为 0.72~108 mg/100 g、V_E 的含量为 0.133 mg/100 g、V_{B1} 的含量为 15.4 μg/100 g、V_{B2} 的含量为 15.4 μg/100 g、V_{B6} 的含量为 49.5 μg/100 g[7−8,17]。

表 1 三叶木通果实基本营养成分含量[1-2,4−15]

Table 1 Content of basic nutrients in *Akebia trifoliata* fruit[1-2,4−15]

成分	果肉(%)	果皮(%)	果籽(%)
脂肪	0.13~4.3	2.45±0.21	30.2~53.6
蛋白质	1.0~4.02	8.16±0.11	15.57~29.9
灰分	0.1	5.83±0.03	3.28
水分	68.77~85.74	8.65±0.02	7.35
粗纤维	−	16.00±0.03	17.45
总糖	6.42~15.78	32.61±0.18	2.92
还原糖	5.79~13.64	19.31±0.21	−
可溶性糖	1.94~17.68	−	−
淀粉	−	−	2.33
果胶	−	20.08±0.20	−
总酸	0.059~0.082	−	1.64

注：−表示未检测。

表 2 三叶木通果实的氨基酸组成[1−8]

Table 2 Amino acids composition in *Akebia trifoliata* fruit[1−8]

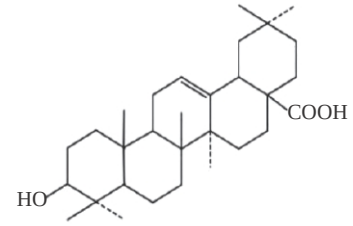
氨基酸种类	果肉(g/100 g)	果皮(g/100 g)	果籽(%)
天冬氨酸(Asp)	0.035~0.075	0.037	4.623
苏氨酸*(Thr)	0.005~0.022	0.017	1.331
丝氨酸(Ser)	0.005~0.04	0.016	2.484
谷氨酸(Glu)	0.035~0.08	0.029	7.783
甘氨酸(Gly)	0.015~0.04	0.017	1.753
蛋氨酸*(Met)	0~0.02	/	0.698
丙氨酸(Ala)	0.01~0.025	0.018	1.882
缬氨酸*(Val)	0.01~0.035	0.018	2.1854
异亮氨酸*(Ile)	0.005~0.03	0.02	1.611
亮氨酸*(Leu)	0.02~0.05	0.027	3.172
酪氨酸*(Tyr)	0~0.02	0.018	2.301
苯丙氨酸*(Phe)	0.015~0.025	0.018	2.2054
赖氨酸*(Lys)	0.01~0.04	0.023	2.8253
组氨酸(His)	0.010~0.04	0.010	2.1797
精氨酸(Arg)	0~0.04	0.025	2.18
脯氨酸(Pro)	0~0.46	0.020	2.18
半胱氨酸(Cys)	0.03	/	1.289

注：带*的表示必需氨基酸，/表示未检出。

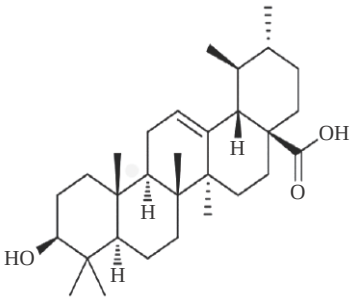
1.2 活性成分

有关三叶木通果实活性成分的研究较多，发现

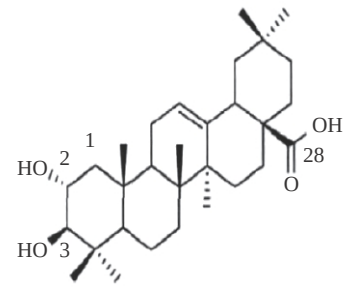
其活性成分的种类和成分复杂。三叶木通果皮、果籽和果肉中含有多糖、多酚、黄酮、三萜及其皂苷等活性物质[17−22]。最新的研究通过超高液相色谱飞行时间高分辨串联质谱（UHPLC-Q-TOF-MS/MS）构建了三叶木通提取物的代谢组学图谱，在果皮、果肉和果籽提取物中分别鉴定了 352、342 和 447 种次级代谢产物，因此果籽的次生代谢产物最丰富，其次是果皮和果肉。次级代谢产物主要有生物碱、木脂素和新木脂素、脂质和类脂分子、苯丙烷类和聚酮类[23]。而其中的生物碱、三萜类和黄酮类化合物及其衍生物可能是提供关键生物活性的主要次生代谢产物[24]。三叶木通的植物化学特征表明，三萜类化合物是其最重要的生物活性化合物，在此研究中，在果肉、果皮和果籽中共鉴定出 45 种三萜类化合物。齐墩果酸（OA）、熊果酸（UA）和山楂酸（MA）是植物中常见的三萜类化合物，三叶木通果籽和果皮中均有上述成分，果肉中仅检出 OA，OA 在果皮中的含量比果籽中的高，但 UA 和 MA 在果籽中的含量比在果皮中的高[23−24]，它们的化学结构式见图 1。三叶木通果肉、果皮和果籽中的活性成分及代谢产物见表 3[17−24]。



齐墩果酸



熊果酸



山楂酸

图 1　三叶木通中的 3 种主要三萜类活性成分的化学结构式

Fig.1　Chemical structures of the three main triterpenoid bioactive components in *Akebia trifoliate*

表 3　三叶木通果肉、果皮和果籽中的活性成分及代谢产物

Table 3　Active ingredients and metabolites in the flesh, pericarp, and seed of *Akebia trifoliata*

活性成分	果肉	果皮	果籽
多糖总酚	3.51±0.03 mg/g	0.18%~0.36% 2.56~74.03 mg/g	122.4±2.15 mg/g
总黄酮	0.01%~0.2%	4.43~52.26 mg/g	85.2±3.12 mg/g
总皂苷	–	33.16~59.03 mg/g	90.9±7.2 mg/g
齐墩果酸	–	0.13%~0.24%	0.57%±0.14%
α-常春藤皂苷	–	0.42%~3.81%	–
常春藤皂苷元	–	0.69%±0.06%	0.57%±0.14%
木通苯乙醇苷B	–	0.03%~0.19%	–
通过UHPLC-Q-TOF-MS/MS测定的代谢产物比例			
生物碱和衍生物	1.66%	1.53%	1.71%
木脂素、新木脂素及其相关化合物	8.14%	9.86%	9.54%
苯型烃	1.66%	2.58%	2.2%
脂质和类脂分子	31.22%	35.05%	33.99%
核苷、核苷酸和类似物	4.07%	1.21%	3.18%
有机酸及其衍生物	10.26%	8.5%	8.18%
有机氮化合物	3.02%	2.43%	1.83%
有机氧化合物	11.92%	12.14%	10.64%
有机杂环化合物	9.8%	10.77%	10.64%
苯丙烷和聚酮类	18.25%	15.93%	18.09%

注：–表示未检测。

2　三叶木通果实的生物活性

2.1　抗肿瘤作用

三叶木通果实、果籽和果皮提取物均具有抗肿瘤作用，通过对三叶木通果实不同部位提取物的抗肿瘤作用研究（表 4）梳理后发现，果实提取物主要通过抑制肿瘤细胞的增殖和促进凋亡发挥抗肿瘤作用，果皮提取物主要通过抑制肿瘤细胞的生长发挥抗肿瘤作用，而果籽提取物可抑制肿瘤细胞增殖、转移和侵袭及促进肿瘤细胞凋亡，而且完全成熟的果籽比未成熟的果籽效果更好，可为临床炮制药材提供指导，但具体的机理还有待研究探讨。三叶木通果实提取物的抗肿瘤临床应用比较多，也取得了一定的进展，但是有关其抗肿瘤的主要活性成分及分子作用机理还有待深入研究，如何挖掘有效成分开发天然抗肿瘤药物还有待探索。

2.2　抗菌作用

WANG 等[23] 从三叶木通果皮中提取分离得到 13 种三萜类化合物，通过测试它们对 5 种细菌（金黄色葡萄球菌、苏云金芽孢杆菌、大肠杆菌、肠炎沙门氏菌和痢疾志贺菌）的抗菌活性，发现 MA、OA 和 2a, 3b-二羟基油酸-13（18）-烯-28 酸对上述的 5 种试验细菌有很强的抗菌活性，最低抑菌浓度（MIC）为 0.9~15.6 μg/mL。CHEN 等[24] 对三叶木通活性成分的抑菌活性和抑菌机理进行了研究，发现生物碱、三萜类化合物和黄酮类化合物是三叶木通果皮、果肉和果籽中提供关键生物活性的主要次级代谢产物，它们在抗菌活性中起着至关重要的作用。研究结果发现三叶木通果皮乙醇提取物（EEPA）对所测试的革兰

表 4 三叶木通果实不同部位提取物抗肿瘤活性

Table 4 Anti-tumor effects of different parts of *Akebia trifoliata* fruit

部位	体内/体外	癌种	作用对象	功效	机制	参考文献
果实水提物	体内	肝癌	H22荷瘤鼠	抑制肿瘤细胞生长和增殖、诱导凋亡	提高荷瘤鼠血清TNF-α和IL-2水平; 阻止突变型(m)P53蛋白的生成, 下调Bcl-2的表达, 阻止PCNA蛋白的表达	[25−26]
果实提取物(乙醇、正丁醇等提取)	体内	肝癌	H22荷瘤鼠、BEL-7404裸鼠	抑制肿瘤的生长	未知	[27]
果实乙醇提取物	体内	肝癌	H22荷瘤小鼠	抑制肿瘤细胞增殖、促进细胞凋亡	抑制PI3K/Akt信号通路(与肿瘤疾病密切相关的通路)的活化	[28]
果籽乙醇提取物	体外	肝癌	SMMC-7721、HepG2、Huh7	抑制肝癌细胞的恶性增殖、侵袭和转移	诱导内质网应激, 显著改变内质网功能相关的基因表达水平; 促进或抑制MMP-9的分泌, 降低或者促进p-FAK的表达	[29−31]
果籽乙醇提取物	体外	肝癌	HepG2	抑制肿瘤细胞的增殖和黏附	促进E-cadherin蛋白的表达; 调节Mdm**2**-p53信号通路	[32−33]
果籽乙醇提取物	体外	肝癌	SMMC-7721	抑制肝癌细胞的增殖, 影响细胞周期, 轻微促进凋亡和坏死, 诱导肿瘤细胞出现衰老特征	诱导内质网应激成分的富集, 通过内质网应激相关基因和副凋亡相关基因表达的调节, 诱导细胞空泡化与内质网应激和副凋亡	[34−35]
果皮果胶	体外	肺癌、血癌	人肺癌A549、人髓系慢性白血病K562-2	抑制肿瘤细胞生长	未知	[36]

氏阳性细菌(金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌)和革兰氏阴性细菌(大肠杆菌、铜绿假单胞菌)均表现出抑菌和杀菌作用, 革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌对 EEPA 的敏感性没有观察到显著差异。主要的抗菌机制是 EEPA 可增加细菌细胞的内容物泄漏, 改变细胞形态, 破坏细胞内部结构, 最终导致细菌代谢功能障碍。三叶木通中最重要的次级代谢产物三萜类化合物 MA、UA 和 OA 对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌和铜绿假单胞菌均表现出不同程度的抗菌活性, 它们在抗菌活性方面没有显示出对革兰氏阳性菌或革兰氏阴性菌的特异性。MA 对四种细菌均表现出最好的抑菌活性。MA、UA 和 OA 对金黄色葡萄球菌抗菌效果最佳, 对金黄色葡萄球菌的抑菌效果为 MA>UA>OA。通过比较三种物质的结构发现, 羟基和甲基的存在对其抗菌活性很重要。

李伟业[37] 的研究结果表明不同处理方式(未处理、干热处理、压榨处理和精制处理)的三叶木通果籽油均能抑制金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和铜绿假单胞菌的生长, 且具有一定的杀菌效果。压榨处理的果籽油抑菌和杀菌效果最佳, 精制的果籽油抑菌和杀菌效果较差, 这主要与油脂精制过程中活性成分损失有关。果籽油对金黄色葡萄球菌的抑制效果要优于大肠杆菌和铜绿假单胞菌, 其中果籽油对金黄色葡萄球菌的对数期、稳定期影响最大, 延长对数期最久、持续时间增长最为明显, 且具有非常明显的剂量依赖性。

以上研究说明三叶木通果皮和果籽中均含有抑菌活性成分, 但有关果籽的抑菌活性成分及抑菌机理还有待进一步深入研究。

2.3 抗氧化作用

抗氧化活性评价的方法有体外实验和体内实验, 体外实验方法主要有自由基清除能力法、还原能力法、金属离子螯合能力法与细胞模型法, 体内实验以大、小鼠模型、人体模型和其他模型(如果蝇模型、秀丽隐杆线虫模型)等为主。

表 5 列出了三叶木通不同部位提取物的体外抗氧化活性。由表 5 可知, 许多学者的研究认为三叶木通提取物的抗氧化活性与其黄酮、多酚类和多糖物质的含量相关, 而多酚和黄酮是提取物呈现抗氧化能力的主要活性成分, 且产地及提取物制备的方法不同也会造成抗氧化能力有所差异[13,39−41]。

三叶木通果实提取物在体内实验中也具有很好的抗氧化作用。WANG 等[42] 发现三叶木通果皮提取物(APE)可降低右旋糖酐硫酸钠(DSS)诱导的小鼠结肠炎氧化应激。DSS 诱导小鼠结肠炎后其肠组织中丙二醛(MDA)水平显著增加, 而过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)活性及总抗氧化能力(T-AOC)水平下降, 而 APE 可降低结肠炎小鼠肠组织 MDA 含量, 提高 CAT、SOD 活性和 T-AOC 水平, 且作用效果呈剂量依赖性。由于氧化应激在炎症发展中起至关重要的作用, 可诱导细胞损伤, 炎症和氧化应激相互促进, 从而使炎症持续并扩散[43]。活性氧(ROS)是生物体中的一种氧化剂, 可在病理条件下产生, 如缺氧或炎症, 对脂质、蛋白质和核酸产生各种氧化损伤, 造成细胞信号转导过程的细微调节或生物分子的损伤和细胞死亡。ROS 超氧化物阴离子(O_2^-)可被 SOD 转化为过氧化氢(H_2O_2), 之后 CAT 或谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)将 H_2O_2 转变成水被清除[44]。清除 ROS 的能力与生物体的抗氧化能力密切相关, 因此, APE 可通过提高机体抗氧化能力减少氧化应激和炎症造成的损害。ZHANG 等[45] 用双水相系统提取三叶木通果实中的多糖(ATFP), 通过纤维素-52 和葡聚糖凝胶 G-200 纯化得到 ATFP-3, 含有 93.24% 的多糖, 多糖主要由葡萄糖(47.55%)和半乳糖(20.39%)组成。ATFP-3 在体外有较强的抗羟基自由基活性, 可显著提高秀丽隐杆线虫在热应激或氧化应激下的存活率, 提高老龄秀丽隐杆线虫抗氧化酶的活性, 减少体内脂褐素的积累和 MDA 含

表 5　三叶木通果实不同部位提取物体外抗氧化活性

Table 5　*In vitro* antioxidant activity of the different parts of *Akebia trifoliata* fruit

提取方法	提取部位	活性成分	抗氧化活性	结论	参考文献
超声波法和回流提取法	果皮、果籽、果肉	多酚、黄酮	DPPH自由基清除能力(DPPH)、$ABTS^{+}$自由基清除能力(ABTS)、铁离子还原能力(FRAP)不同部位抗氧化活性有所差异	多酚、黄酮的含量和抗氧化活性呈强相关	[19]
索氏提取法	果籽(来自湖南、湖北和云南)	湖南产三叶木通籽油黄酮含量最高，多酚和类胡萝卜素以云南产的高于湖南和湖北产的	DPPH抗氧化活性最高的为湖南产三叶木通籽油，ABTS和FRAP抗氧化活性以云南产的三叶木通籽油最高	抗氧化能力与活性成分含量和种类相关	[13]
甲醇溶液超声波辅助提取	果皮、果肉	果皮和果肉中的酚类物质主要成分为没食子酸、儿茶素、绿原酸、阿魏酸、鞣花酸、芦丁和槲皮素，果皮的表儿茶素、绿原酸和总黄酮含量相对较高，果肉的各成分含量低	儿茶素、阿魏酸、总酚和总黄酮对总还原力(TRAP)值贡献极强，阿魏酸、总酚和总黄酮对FRAP值贡献极强，儿茶素、阿魏酸和总酚对$ABTS^{+}$自由基清除能力贡献极强	各部位的抗氧化能力与黄酮类、V_C、多酚和相应酚类成分含量呈强相关的关系	[17]
石油醚脱脂后甲醇抽提	果皮、果籽	富含多酚、黄酮和皂苷，果籽中的含量高于果皮中的	果籽和果皮的提取物均具有较强的DPPH和$ABTS^{+}$自由基清除能力	具有显著的剂量效应	[21]
乙醇粗提，不同溶剂萃取(石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇)	果肉	多酚和黄酮是样品呈现抗氧化能力的主要活性成分	石油醚相萃取物的DPPH自由基清除能力最强，氯仿相的$ABTS^{+}$自由基清除能力和氧化自由基吸收能力最强，乙醇粗提物的FRAP能力最强	与多酚、黄酮含量较高相关	[38]
乙醇提取	果皮	总黄酮、总酚、总皂苷	具有较强的清除DPPH自由基、$ABTS^{+}$自由基能力	总黄酮、总酚、总皂苷的含量与抗氧化活性均呈正相关	[8]
酸提醇沉法	果皮(河南南阳、贵州凯里)	果胶(高酯)	能清除·OH及DPPH自由基，在高浓度时河南南阳三叶木通果胶的抗氧化活性更强	主要与半乳糖醛酸含量及酯化度有关	[36]

量。因此，ATFP-3 可通过提高抗氧化能力减轻老龄化过程中生物膜系统的氧化损伤。CHEN 等[46] 研究发现具有低分子量和高糖醛酸含量的多糖具有优异的羟基自由基清除能力，而 ATFP-3 优异的羟基自由基还原能力也证实了 CHEN 的观点。

综上所述，三叶木通果实提取物在体内外均具有较好的抗氧化作用，主要与其活性成分多酚、黄酮和多糖有关，但其各活性成分的抗氧化活性机制还有待深入研究。

2.4　抗炎作用

炎症是机体对微生物感染、物理损伤和化学刺激等作出的一种生理反应，若控制不好会引起全身炎症，造成器官功能障碍[47]。WANG 等[42] 发现 APE 可降低右旋糖酐硫酸钠(DSS)诱导的小鼠结肠炎，改善上皮屏障破坏，减少一氧化氮(NO)和前列腺素 E_2(PGE_2)的分泌，抑制一氧化氮合酶(iNOS)和环氧合酶-2(COX-2)的表达，通过分析认为 APE 三萜类化合物及其代谢产物是抗炎活性的主要贡献者。之后，WANG 等[48] 研究了 APE 的生物活性和抗炎机制，结果发现酚酸类和萜类化合物是 APE 中的主要生物活性成分，在体外和体内均能通过阻断小鼠单核巨噬细胞白血病细胞(RAW264.7)中诱导型 iNOS 和 COX-2 的表达，抑制 NO 和 PGE_2 的生成，降低 α-肿瘤坏死因子(TNF-α)、白细胞介素-6(IL-6)和白细胞介素-1β(IL-1β)的表达，抑制核转录因子 p-65(p-65)、核转录因子 κB 抑制蛋白 α(IκBα)和丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)包括 [p38 激酶(p38)、细胞外信号调节激酶(ERKs)、应激激活蛋白激酶(JNKs 等)] 蛋白的磷酸化。脂多糖(LPS)常在试验中用来诱导炎症的发生，巨噬细胞在诱导炎症反应中发挥重要作用，LPS 诱导巨噬细胞产生 iNOS 与炎症密切相关，可诱导 NO 产生，而过量 NO 会促进炎症发展，产生能活化自身的 COX，其中 COX-2 是引起炎症反应的关键酶[49]。LPS 还可诱导巨噬细胞启动 NF-κB/MAPK 信号通路，造成炎症因子 TNF-α、IL-6、IL-1β 等以及炎症介质 NO、PGE2 的过量表达和分泌。核因子 κB(NF-κB)是炎症反应中的关键转录因子，NF-κB 被抑制后可下调炎症因子水平，减少炎症反应。NF-κB 由不同的二聚体组成，如 p65、核转录因子 p50(p50)，而 IκBα 是 NF-κB 的抑制蛋白。当细胞受到 LPS 刺激后 IκBα 会发生磷酸化降解，激活 NF-κB。MAPKs 信号通路对炎症因子的释放起着重要的调节作用，由 p38、ERKs 和 JNKs 3 条信号通路组成[50]。由上所知，APE 可通过 NF-κB/MAPK 信号通路抑制细胞因子的产生减轻炎症，表明 APE 是一种防治机体炎症的天然物质。APE 的炎症调节机制见图 2。

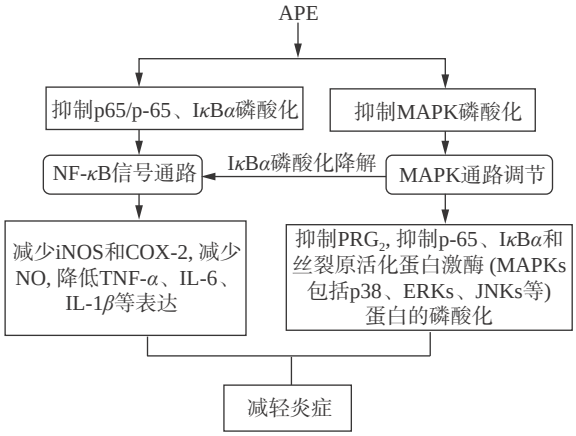


图 2　APE 的炎症调节机制

Fig.2　Anti-inflammatory mechanism of APE

2.5 降血糖

糖尿病是一种以高血糖为特征的慢性内分泌代谢疾病。α-葡萄糖苷酶是造成餐后血糖升高的主要酶之一，通过抑制 α-葡萄糖苷酶的活性，能减缓餐后血糖的升高，缓和糖尿病和并发症的发生[51−53]。罗宗洪等[21] 研究发现三叶木通果皮提取物和果籽提取物均可抑制 α-葡萄糖苷酶的活性，且提取物对 α-葡萄糖苷酶的抑制呈现剂量效应，果籽提取物效果优于果皮提取物，通过分析发现三叶木通果籽中的总酚、总黄酮和总皂苷的含量均高于果皮，且果籽总酚含量显著高于果皮中的。丁林玲等[38] 通过用不同的试剂提取果肉中的活性成分，发现各萃取物均对 α-葡萄糖苷酶具有抑制能力，其中氯仿相和乙酸乙酯相中的活性最强，这与其中的多酚类物质有关。以上研究可为三叶木通果实提取物作为 α-葡萄糖苷酶抑制剂天然来源和降血糖功能食品的开发提供科学依据，但其具体的作用成分和机制有待进一步深入研究。

2.6 其他作用

三叶木通果实除了上述的功能作用外，还发现果籽油具有很好的创伤修复作用[36,54]、三叶木通果实正丁醇提取物和水提取物具有对 CCl_4 致小鼠肝脏损伤的保护作用[55]，三叶木通果肉多糖可延长秀丽隐杆线虫的寿命，具有抗衰老作用[45]。三叶木通果肉不同溶剂萃取物均具有一定的体外抑制乙酰胆碱酯酶能力[38]，三叶木桶果皮提取物可改善炎症小鼠的肠道菌群结构[48]。

3 三叶木通果实的保鲜及加工

三叶木通果实富含对人体有益的营养成分和功能活性成分。通过果实保鲜，果籽功能油脂提取，果肉加工成果汁、果酒、果酱，果皮加工成果茶、果脯和提取果胶等可实现三叶木通果实的全面开发利用。

3.1 三叶木通果实保鲜

三叶木通鲜果属于呼吸跃变型，容易腐烂变质，不利于长途运输和长期贮藏，采收成熟度的确定和保质保鲜的研究非常重要，因为这最终将决定水果品质和贮藏潜力。由于三叶木通果实在完全成熟时纵向开裂，应在果实开裂前收获以确保质量。JIANG 等[56] 通过试验发现用 0.15% 蒙脱土、0.15% 三叶木通果皮提取物和 1.5% 壳聚糖制备的涂膜剂涂膜三叶木通果实，于 5 ℃ 贮藏可延迟果实开裂和成熟 35 d，保鲜效果良好。ZOU 等[57] 的研究发现在三叶木通开花后 148 d 采摘三叶木通果实是长途运输的理想收获成熟期，并且在果实开裂之前消费者接受度更高。蔡芳丽等[6] 对 4 个采收时间（9 月 3 日和 17 日、10 月 1 日和 7 日）的三叶木通果实的物理参数和营养成分进行测定和比较，发现果实在 10 月 1 日达到了生理成熟，果实硬度急剧下降后无明显变化，可溶性糖含量显著升高，此时果实未开裂，果实硬度稍高，有利于长途运输和贮藏，因此，建议在生理成熟期采收。对三叶木通果实的保鲜研究具有重要的现实意义，通过探索合适的成熟期进行科学的保鲜贮藏，可满足市场对优质水果的需求。

3.2 三叶木通果实的加工

3.2.1 果酒和果汁饮料的加工 李朝阁[11] 用三叶木通果实和葡萄为原料，发酵制备的三叶木通-葡萄复合果酒呈深红色，透明澄清、酸度适宜、口感柔滑，兼有八月瓜和葡萄的香味，饮后回味无穷。研究发现三叶木通果酒成品酒清亮澄清，酒色淡黄，酒香浓郁，回味悠长，氨基酸种类较齐全且含量高，有机酸含量丰富，含有酚类物质并具有一定的抗氧化性[58−59]。用三叶木通果肉（冻储果）与百香果复合制作的果汁口感细腻、酸甜适中，色泽、滋味与气味等各个方面均优于三叶木通纯果肉（冻储果）制作的果汁[60]。因此，可将三叶木通果肉开发为营养价值高的果酒和果汁饮料，以解决果实采收高峰期不耐贮藏和运输等问题，同时也能满足消费者对三叶木通产品多样化的需求。

3.2.2 果酱、果粉、果脯的加工 用三叶木通果肉或者果皮和果肉可制作营养健康美味的果酱。张婧等[61] 用三叶木通果皮和果肉为主要原料，采用单因素和正交试验进行优化制作的果酱色泽均匀、口感细腻、酸甜适中，涂抹性较好，富含多酚、黄酮和氨基酸，具备健康、绿色、营养的优点。果皮加工成果粉能较好地保持水果原有的品质，有利于保存，二次加工方便，用途广泛，是一种优良的水果深加工方式。肖彦达等[62] 用麦芽糊精为助干剂，采用喷雾干燥法制备的三叶木通果粉具有较好的溶解性且具有三叶木通天然的香味。

此外，雷颂等[63] 研究了三叶木通果皮制作果脯加工工艺。通过单因素和正交试验优化了烫漂、护色、去苦、糖制和干燥工艺，确定了果脯的最佳加工工艺，其成品色泽金黄、酸甜可口、饱满度好。果皮除了通过适宜的加工工艺制作可口的果脯，还可通过提取果胶在食品、医药、化妆品和印染等领域使用，使果皮副产物得到有效利用。

3.2.3 果茶加工 三叶木通果肉和果皮都可以通过合适的加工工艺制作成果茶。用亚硫酸钠进行护色处理可以增强三叶木通果茶水浸出物的抗氧化性，增加浸出物总量，提升三叶木通果茶的品质[64]。孙晓东等[65] 对三叶木通果皮预处理后与麦冬、玄参和蜂蜜进行复配加工得到的三叶木通果皮茶，果胶含量和低聚糖含量较高，对茶叶品质有提高作用。邓爱华等[66] 用三叶木通的果浆、栀子果粉、蜂蜜、柠檬酸、白糖为原料，通过单因素和正交试验研发的三叶木通果茶具有三叶木通的特有风味、酸甜可口、口感细腻且有一定的保健功能。

3.2.4 果籽加工 三叶木通果籽富含油脂，饱和：单不饱和：多不饱和脂肪酸比例为 1∶1.5∶1，符合世界卫生组织的建议[67]。蔡雪梅等[68] 对三叶木通籽油挥发性风味成分进行鉴定发现有 195 种，包括醇类（30 种）、醛类（20 种）、酮类（16 种）、酯类（29 种）、

酸类（19 种）、吡嗪类（13 种）、烃类（48 种）、呋喃（3 种）以及其他物质（16 种），其中醛类物质是三叶木通籽油中最主要的风味物质。此外，三叶木通果籽中的蛋白质含量较高，氨基酸含量丰富，含有 8 种人体必需氨基酸和 7 种药用氨基酸，氨基酸组成和比例优于花生和玉米[15]。微波辅助酶法提取果籽蛋白质可得到较高的蛋白质产量，其蛋白质持水性、发泡能力和泡沫稳定性较好[69]，三叶木通果籽油还具有抗氧化和修复创伤等作用[13,36]。因此，富含油脂的三叶木通果籽可用于生产食用油和生物燃料[70]，榨油后的油饼可用作食品原料或生产谷蛋白[71]，果籽也可以作为很好的膳食纤维原料的来源[72]。

4　结论与展望

三叶木通是一种药食两用的植物资源，其果实中的果肉、果籽和果皮均含有多种营养成分和生物活性物质，具有抗菌、抗氧化、抗炎、抗肿瘤、降血糖等生物活性作用，因此对人体具有很好的营养和生理调节功能。目前，三叶木通虽然在育种、栽培、资源分布调查方面取得了进展，但是还缺乏优良品种和大规模栽培种植，功效成分的开发利用和精深加工还没有形成产业化，因此今后除加强对三叶木通药用价值和功能作用机理的研究之外，还应加强对三叶木通资源的开发、新品种的选育、种苗繁育、高效栽培技术、贮藏保鲜、精深加工及新产品研发等方面的研究；加强对三叶木通果实中的生物活性成分进行分离鉴定及构效关系的研究，充分挖掘三叶木通的潜在食用和医用价值，为三叶木通的综合开发利用和高效开发提供理论支撑。

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

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2015 年版一部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2015: 63−64. [National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China, Volume I, 2015 edition[S]. Beijing: China Pharmaceutical Science and Technology Press, 2015: 63−64.]

[2] WANG M, GUO X C, SONG J Y. Analysis of the shape characteristics and nutritional components of *Akebia trifoliata* in Qinba Mountains[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 1−18.

[3] 杨西萌，李桂香，潘玉芳，等. 三叶木通种质资源形态学标记的遗传多样性分析[J]. 西南大学学报(自然科学版)，2022，44(9)：32−40. [YANG X M, LI G X, PAN Y F, et al. Genetic diversity of morphological traits of *Akebia trifoliate* germplasm resources[J]. Journal of Southwest University (Natural Science Edition), 2022, 44(9): 32−40.]

[4] 杨玉宁，刘红昌，高尔刚，等. 木通属种质资源物候期、产量和品质差异分析[J]. 南方农业学报，2022，53(1)：134−145. [YANG Y N, LIU H C, GAO E G, et al. Phenological investigation and variation analysis of yield and quality of *Akebia* Decne. germplasm resources[J]. Journal of Southern Agriculture, 2022, 53(1): 134−145.]

[5] 唐成林，杨斌，陶光灿，等. 八月瓜果实营养成分分析和评价[J]. 食品工业科技，2021，42(3)：299−303. [TANG C L, YANG B, TAO G C, et al. Analysis and evaluation of nutritional components in *Akebia trifoliate* fruit[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(3): 299−303.]

[6] 蔡芳丽，邹帅宇，高浦新，等. 不同采收时间三叶木通果实品质变化分析[J]. 植物资源与环境学报，2022，31(1)：83−85. [CAI F L, ZOU S Y, CAO P X, et al. Analysis on quality variations of *Akebia trifoliata* fruit at different harvesting times[J]. Journal of Plant Resources and Environment, 2022, 31(1): 83−85.]

[7] 杨月欣. 中国食物成分表[M]. 北京：北京大学医学出版社，2020. [YANG Y X. Chinese food composition table[M]. Beijing: Peking University Medical Press, 2020.]

[8] 张孟琴，徐路，张俊波，等. 三叶木通果皮主要营养成分、活性成分含量测定及果皮提取物抗氧化活性评价[J]. 食品工业科技，2022，43(10)：388−394. [ZHANG M Q, XU L, ZHANG J B, et al. Determination of contents of the main nutritional components, functional components of *Akebia trifoliata* pericarp and the antioxidant activity of its extracts[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(10): 388−394.]

[9] 李加兴，吴萍，吴越，等. 八月瓜果皮果胶提取工艺优化及其理化特性研究[J]. 食品工业科技，2016，37(1)：275−277,283. [LI J X, WU P, WU Y, et al. Optimization of extraction conditions and analysis of physicochemical property of pectin from *Akebia trifoliata* peel[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(1): 275−277,283.]

[10] 欧阳玉祝，张晓旭，唐项婉，等. 八月瓜果籽油功能成分与抗氧化活性研究[J]. 中国油脂，2015，40(8)：85−88. [OUYANG Y Z, ZHANG X X, TANG X W, et al. Functional components and antioxidant activity of *Akebia trifoliate* seed oil[J]. China Oils Fats, 2015, 40(8): 85−88.]

[11] 李朝阁. 八月瓜酒酿造及籽油、多酚提取和抗氧化性研究[D]. 西安：陕西科技大学，2016. [LI C G. *Akebia trifoliate* wine brewing, extraction of seed oil, polyphenols and its antioxidant activity research[D]. Xi'an: Shaanxi University of Science and Technology, 2016.]

[12] 仲伟敏，马玉华. 三叶木通种子的营养成分分析与评价[J]. 西南农业学报，2016，29(1)：169−173. [ZHONG W M, MA Y H. Analysis and evaluation of nutritional components in *Akebia trifoliate* seeds[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2016, 29(1): 169−173.]

[13] 周娜娜. 三叶木通籽油提取及生物活性研究[D]. 长沙：中南林业科技大学，2018. [ZHOU N N. Research on extraction and bioactivity of *Akebia trifoliate* seed oil[D]. Changsha: Central South University of Forestry and Technology, 2018.]

[14] 周瑜，梁良，石向群，等. 不同种源预知子籽的油脂含量及其油脂脂肪酸组成分析[J]. 中国油脂，2018，43(3)：83−86,89. [ZHOU Y, LIANG L, SHI X Q, et al. Oil content of *Akebiae Fructus* deed from different provenances and its oil fatty acid composition[J]. China Oils and Fats, 2018, 43(3): 83−86,89.]

[15] ZHONG Y C, ZHANG Z Q, CHEN J, et al. Physicochemical properties, content, composition and partial least squares models of *A. trifoliata* seeds oil[J]. Food Chemistry: X, 2021, 12: 100131.

[16] SU S, WU J, PENG X Y, et al. Genetic and agro-climatic variability in seed fatty acid profiles of *Akebia trifoliata* (Lardizabalaceae) in China[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2021, 102: 104064.

[17] 刘永玲，谢国芳，王成，等. 八月瓜叶、果皮和果肉中酚类、

VC 含量及其抗氧化能力分析[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(15): 66−72. [LIU Y L, XIE G F, WANG W, et al. Analysis of phenolic and VC contents and antioxidant activity of leaves, peels and pulp of *Akebia trifoliate*[J]. Food Research and Development, 2019, 40(15): 66−72.]
[18] 石兵艳, 李祥, 刘毅, 等. 八月瓜果皮中常春藤皂苷元水解工艺优化及图谱分析[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(2): 239−245. [SHI B Y, LI Y, LIU Y, et al. Optimization of hydrolysis process and structure map analysis of hederagenin in *Akebia trifoliata* pericarp[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(2): 239−245.]
[19] 陆俊, 罗丹, 张佳琦, 等. 三叶木通不同部位多酚、黄酮含量及抗氧化活性比较[J]. 食品与机械, 2016, 32(8): 132−135,223. [LU J, LUO D, ZHANG J Q, et al. Comparative study on polyphenol, flavonoid and antioxidant activities from different part of *Akebia trifoliate*[J]. Food & Machinery, 2016, 32(8): 132−135,223.]
[20] 金洪光, 李玉全, 李同建, 等. 三叶木通果皮中绿原酸提取工艺的正交试验优选[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(6): 1306−1307. [JIN H G, LI Y Q, LI T J, et al. Optimization of the extraction technology of chlorogenic acid from *Akebia trifoliate* peels by orthogonal test[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2017, 28(6): 1306−1307.]
[21] 罗宗洪, 蔡圣宝, 易俊洁. 八月瓜的化学组成、抗氧化性及 α-葡萄糖苷酶活性抑制研究[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(1): 130−135. [LUO Z H, CAI S B, YI J J. Phytochemical composition, antioxidant activity and α-glucosidase inhibitory ability of *Akebia trifoliate*[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(1): 130−135.]
[22] LUO M, ZHOU D D, SHANG A, et al. Influences of microwave-assisted extraction parameters on antioxidant activity of the extract from *Akebia trifoliata* peels[J]. Foods, 2021, 10(6): 1432.
[23] WANG J, REN H, XU Q L, et al. Antibacterial oleanane-type triterpenoids from pericarps of *Akebia trifoliata*[J]. Food Chemistry, 2015, 168: 623−629.
[24] CHEN J, SUN Z M, CHEN J H, et al. Metabolomic profile and antibacterial bioactivity of *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz pericarp extract[J]. Processes, 2022, 10(7): 1394.
[25] 白雪, 关宝生, 孙艳男, 等. 八月札水提物对 H22 肝癌荷瘤鼠免疫功能的影响[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(7): 1946−1948. [BAI X, GUAN B S, SUN Y N, et al. Effect of the water extract of *Akebia Fructus* on the immune function of in H22 hepatoma bearing mice[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2015, 35(7): 1946−1948.]
[26] 白雪, 崔文超, 王丽敏, 等. 八月札水提物对 H22 荷瘤小鼠突变型 P53、Bcl-2 和增殖细胞核抗原表达的影响[J]. 中国老年学杂志, 2020, 40(2): 374−379. [BAI X, CUI W C, WANG L M, et al. Effect of *Akebia Fructus* on the expression of mP53, Bcl-2 and PCNA in H22 tumor-bearing mice[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2020, 40(2): 374−379.]
[27] 王春玲, 郑作文. 八月札抗肝癌活性部位的筛选[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(7): 784−789. [WANG C L, ZHEN Z W. Screening of anti-hepatocarcinoma active fractions from *Akebiae Fructus*[J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2021, 38(7): 784−789.]
[28] 王春玲, 张瑜, 文晓东, 等. 八月札乙醇提取物通过 PI3K/Akt 通路抑制 H22 细胞增殖并诱导其凋亡[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(9): 73−77,267-268. [WANG C L, ZHANG Y, WEN X D, et al. Ethanol extract of Bayuezha [*Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz.] inhibits proliferation and induces apoptosis of H22 liver cancer mice cell via PI3K/Akt signaling pathway[J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2022, 40(9): 73−77,267-268.]
[29] LU W L, REN H Y, LIANG C, et al. *Akebia trifoliate* (Thunb.) Koidz seed extract inhibits the proliferation of human pepatocellular carcinoma cell lines via inducing rndoplasmic reticulum stress[J]. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: eCAM, 2014, 2014: 192749.
[30] 任红艳, 方肇勤, 梁超, 等. 预知子籽对多种肝癌细胞恶性增殖的抑制作用研究[J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42(3): 459−461,1-2. [REN H Y, FANG Z Q, LIANG C, et al. Inhibitory effect of *Akebia trifoliate* seed on malignant proliferation of various hepatoma cells[J]. Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine, 2015, 42(3): 459−461,1-2.]
[31] LU W L, YANG T, SONG Q J, et al. *Akebia trifoliate* (Thunb.) Koidz seed extract inhibits humanhepatocellular carcinoma cell migration and invasion *in vitro*[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2019, 234: 204−215.
[32] 宋秋佳, 卢文丽, 方肇勤, 等. 预知子种子提取物抑制 HepG2 肝癌细胞的增殖及黏附作用及相关机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(24): 146−151. [SONG Q J, LU W L, FANG Z Q, et al. Inhibitory effect of *Akebia trifoliate* seed extract on proliferation and adhesion of HepG2 cells and corresponding mechanism[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2018, 24(24): 146−151.]
[33] 王枭宇, 卢涛, 梁超, 等. 预知子种子提取物对核糖体蛋白抑制 HepG2 肝癌细胞增殖调控作用研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2019, 26(16): 1156−1162. [WANG X Y, LU T, LIANG C, et al. Regulation effect of *Akebiae trifoliate* seed extract on inhibiting malignant proliferation in HepG2 hepatoma cells[J]. Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment, 2019, 26(16): 1156−1162.]
[34] 卢涛, 许群瑶, 郝尧, 等. 不同成熟度预知子种子对人肝癌细胞恶性增殖的影响实验[J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(1): 193−196. [LU T, XU Q Y, HAO Y, et al. Research of *Akebia* fruit seeds of different maturity levels inhibiting hepatoma carcinoma cells malignant proliferation[J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2018, 36(1): 193−196.]
[35] 卢涛. 预知子种子提取物抑制肝癌细胞增殖和诱导其胞质空泡机制的研究[D]. 上海: 上海中医药大学, 2019. [LU T. A study of *Akebiae fructus* seeds ethanol extract inhibits proliferation of hepatoma cells and induces cytoplasmic vacuoles[D]. Shanghai: Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 2019.]
[36] 张孟琴, 欧根友, 徐路, 等. 不同产地三叶木通果胶的理化性质、抗氧化活性及对癌细胞 A549 和 K562-2 生长的抑制作用[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(22): 128−133. [ZHANG M Q, OU G Y, XU L, et al. Physicochemical properties, antioxidant activities, and inhibitory capabilities of pectins in the pericarps of *Akebia trifoliata* from different regions on cancer cells A549 and K562-2[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(22): 128−133.]
[37] 李伟业. 三叶木通籽油制备及创伤修复研究[D]. 吉首: 吉首大学, 2021. [LI W Y. The preparation of *Akebia trifoliate* seed oil and its effect on wound healing[D]. Jishou: Jishou University, 2021.]
[38] 丁林玲, 谢颖欣, 高伟, 等. 三叶木通果肉提取物的体外抗氧化及抑制 α-葡萄糖苷酶和乙酰胆碱酯酶能力[J]. 南方农业学报, 2021, 52(4): 1058−1065. [DING L L, XIE Y X, GAO W, et al. *In vitro* antioxidant activities, α-glucosidase and acetylcholinesterase inhibition ability of *Akebia trifoliata* pulp extracts[J]. Journal of Southern Agriculture, 2021, 52(4): 1058−1065.]
[39] 苗永美, 简兴, 汪雁, 等. 广东石豆兰不同溶剂提取物抗氧化

及与总黄酮、总酚含量的关系[J]. 核农学报, 2020, 34(5): 1038−1046. [MIAO Y M, JIAN X, WANG Y, et al. Antioxidant activities and their relationship with contents of total flavonoids and total phenols of various solvent extracts from *Bublophyllum kwangtungense*[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2020, 34(5): 1038−1046.]

[40] 郭刚军, 胡小静, 付镓榕, 等. 澳洲坚果青皮不同极性溶剂分步提取物功能成分与抗氧化活性及其相关性分析[J]. 食品科学, 2021, 42(7): 74−82. [GUO G J, HU X J, FU J R, et al. Analysis and correlations of functional components and antioxidant activity of different polar solvent separate-step extracts from macadamia green husk[J]. Food Science, 2021, 42(7): 74−82.]

[41] 杨玉宁, 陈松树, 高尔刚, 等. 3 种木通属植物 21 份种质果实的果皮品质评价[J]. 中药材, 2021, 44(5): 1091−1098. [YANG Y N, CHEN S S, GAO E G, et al. Quality evaluation of pericarp and fruits of twenty-one germplasms in three *Akebia* plants[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2021, 44(5): 1091−1098.]

[42] WANG X Y, YU N X, PENG H L, et al. The profiling of bioactives in *Akebia trifoliata* pericarp and metabolites, bioavailability and *in vivo* antiinflammatory activities in DSS-induced colitis mice[J]. Food & Function, 2019, 10: 3977−3991.

[43] LUGRIN J, ROSENBLATT-VELIN N, PARAPANOV R, et al. The role of oxidative stress during inflammatory processes[J]. Biological Chemistry, 2014, 395(2): 203−230.

[44] SASOT G, MARTINEZ-HUELAMO M, VALLVERDU-QUERALT A, et al. Identification of phenolic metabolites in human urine after the intake of a functional food made from grape extract by a high resolution LTQ-Orbitrap-MS approach[J]. Food Research International, 2017, 100: 435−444.

[45] ZHANG Z H, GAO T, YAN N N, et al. Characterization and anti-aging activity of polysaccharides from *Akebia trifoliata* fruit separated by an aqueous two-phase system[J]. Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands), 2023, 78(1): 154−159.

[46] CHEN G J, LI C F, WANG S S, et al. Characterization of physicochemical properties and antioxidant activity of polysaccharides from shoot residues of bamboo (*Chimonobambusa quadrangularis*): Effect of drying procedures[J]. Food Chemistry, 2019, 292: 281−293.

[47] PERIASAMY S, LIN C H, NAGARAJAN B, et al. Mucoadhesive role of tamarind xyloglucan on inflammation attenuates ulcerative colitis[J]. Journal of Functional Foods, 2018, 47: 1−10.

[48] WANG X Y, YU N X, WANG Z L, et al. *Akebia trifoliata* pericarp extract ameliorates inflammation through NF-*κ*B/MAPK signaling pathways and modifies gut microbiota[J]. Food & Function, 2020, 11(5): 4682−4696.

[49] LI F Y, FU Y H, LIU B, et al. Stevioside suppressed inflammatory cytokine secretion by down regulation of NF-*κ*B and MAPK signaling pathways in LPS-stimulated RAW264.7 cells[J]. Inflammation, 2012, 35(5): 1669−1675.

[50] 王雪, 刘燕, 史玉柱. 基于 NF-*κ*B/MAPK 信号通路探讨天山堇菜七叶内酯对脂多糖诱导 RAW 264.7 细胞的保护作用及机制[J]. 中国药理学通报, 2022, 38(9): 1340−1349. [WANG X, LIU Y, SHI Y Z. The anti-inflammation effects of aesculetin from *Viola tianshanica* Maxim via NF-*κ*B and MAPK signaling pathways in RAW 264.7 cells stimulated by LPS and its mechanism[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2022, 38(9): 1340−1349.]

[51] DI STEFANO E, OLIVIERO T, UDENIGWE C C. Functional significance and structure-activity relationship of food-derived α-glucosidase inhibitors[J]. Current Opinion in Food Science, 2018, 20: 7−12.

[52] TU W J, XUE Y M, NIE D. The prevalence and treatment of diabetes in China from 2013 to 2018[J]. The Journal of the American Medical Association, 2021, 327(17): 1706−1706.

[53] 彭川, 胡学芳, 陈正涛, 等. 中药皂苷类成分的降糖作用及机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(11): 266−275. [PENG C, HU X F, CHEN Z T, et al. Research progress on hypoglycemic effect and mechanism of traditional Chinese medicine saponins[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2023, 29(11): 266−275.]

[54] YU N X, WANG X Y, NING F J, et al. Development of antibacterial pectin from *Akebia trifoliata* var. *australis* waste for accelerated wound healing[J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 217: 58−68.

[55] 张亚平, 周瑜, 金洪光, 等. 八月瓜提取物对四氯化碳诱导小鼠肝损伤的保护作用[J]. 食品工业科技, 2018, 39(3): 301−304. [ZHANG Y P, ZHOU Y, JIN H G, et al. Hepatoprotective effect of *Fructus Akebiae* extract on liver injury induced by carbon tetrachloride in mice[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(3): 301−304.]

[56] JIANG Y L, YIN H, ZHOU X F, et al. Antimicrobial, antioxidant and physical properties of chitosan film containing *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz. peel extract/montmorillonite and its application[J]. Food Chemistry, 2021, 361: 130111−130111.

[57] ZOU S, GAO P, JIA T, et al. Physicochemical characteristics and nutritional composition during fruit ripening of *Akebia trifoliata* (Lardizabalaceae)[J]. Horticulturae, 2022, 8: 326.

[58] 贺江, 李博恩, 段亚丽, 等. 三叶木通果酒抗氧化活性及有机酸组成研究[J]. 食品工业, 2019, 40(2): 181−184. [HE J, LI B E, DUAN Y L, et al. Research on the antioxidant activity and organic acid profile of *Akebia trifoliate* wine[J]. Food Industry, 2019, 40(2): 181−184.]

[59] 王殿东, 潘丽梅, 侯学俊, 等. 一种发酵型八月瓜果酒及其制备方法: CN106635698B[P]. 2016-10-31 [2020-07-21]. [WANG D D, PAN L M, HOU X J, et al. A fermented *Akebia trifoliate* wine and its preparation method: CN106635698B[P]. 2016-10-31 [2020-07-21].]

[60] 李秀彤, 胡海军, 刘冬雪. 八月瓜鲜果营养成分及果汁感官品质分析[J]. 南方农业, 2020, 14(25): 11−14. [LI X T, HU H J, LIU D X. Analysis of nutritional composition and sensory quality of fresh fruit of *Akebia trifoliate*[J]. South China Agriculture, 2020, 14(25): 11−14.]

[61] 张婧, 乐洋, 程莉媛, 等. 八月瓜果酱加工工艺研究[J]. 农产品加工, 2021, 539(21): 37−41,44. [ZHANG J, YUE Y, CHENG L Y, et al. Optimum process of *Akebia trifoliate* jam[J]. Farm Products Processing, 2021, 539(21): 37−41,44.]

[62] 肖彦达, 李加兴, 肖秀凤, 等. 八月瓜果粉喷雾干燥工艺优化及溶解特性研究[J]. 食品与机械, 2015, 31(5): 246−249. [XIAO Y D, LI J X, XIAO X F, et al. Optimization of spray drying technology and analysis of dissolution characteristics on fruit powder from *Akebia trifoliate*[J]. Food & Machinery, 2015, 31(5): 246−249.]

[63] 雷颂, 涂庆会, 张利, 等. 三叶木通果皮制作果脯加工工艺[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(19): 100−104. [LEI S, TU Q H, ZHANG L, et al. Study on preserved *Akebia trifoliate* Kiodz peel processing technology[J]. Food Research and Development, 2016, 37(19): 100−104.]

[64] 何松榆, 战英策, 刘冰舟, 等. 不同护色工艺处理对八月瓜茶品质的影响[J]. 黑龙江农业科学, 2016, 270(12): 94−96. [HE S

Y, ZHAN Y C, LIU B Z, et al. Effects of different color-protection processes on the quality of *Akebia trifoliate* tea[J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, 2016, 270(12): 94−96.]

[65] 孙晓东, 张心伟, 谭书明. 三叶木通果皮茶工艺优化[J]. 贵州农业科学, 2018, 46(11): 134−137,141. [SUN X D, ZHANG X W, TAN S M. Processing technology optimization of *Akebia trifoliate* peel tea[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2018, 46(11): 134−137,141.]

[66] 邓爱华, 李红勇, 王云, 等. 三叶木通果茶加工工艺研究[J]. 广州化工, 2018, 46(1): 120−123. [DENG A H, LI H Y, WANG Y, et al. Study on fabrication of *Akebia trifoliata* fruit tea[J]. Guangzhou Chemical Industry, 2018, 46(1): 120−123.]

[67] World Health Organization (WHO), 2008. Interim summary of conclusions and dietary recommendations on total fat and fatty acids. The Joint FAO/WHO Expert Consultation on Fats and Fatty Acids in Human Nutrition. Geneva.

[68] 蔡雪梅, 陈巍, 李晓, 等. 炒籽时间对八月瓜籽油挥发性风味成分的影响[J]. 中国油脂, 2021, 46(11): 14−20. [CAI X M, CHEN W, LI X, et al. Impact of roasting time on volatile flavor compounds of *Akebia trifoliate* seed oil[J]. China Oils and Fats, 2021, 46(11): 14−20.]

[69] JIANG Y L, ZHOU X F, ZHENG Y R, et al. Impact of ultrasonication/shear emulsifying/microwave-assisted enzymatic extraction on rheological, structural, and functional properties of *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz. seed protein isolates[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 112: 106355.

[70] 刘灿, 江慎华, 徐玲玲, 等. 氢化裂解三叶木通油制备生物柴油的研究[J]. 中国粮油学报, 2015, 30(1): 76−80. [LIU C, JIANG S H, XU L L. Biodiesel prepared by hydrocracking *Akebia trifoliata* oil[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2015, 30(1): 76−80.]

[71] LEI L, ZHAO Q, SELOMULYA C, et al. The effect of deamidation on the structural, functional, and rheological properties of glutelin prepared from *Akebia trifoliata* var. *australis* seed[J]. Food Chemistry, 2015, 178: 96−105.

[72] JIANG Y L, YIN H, ZHENG Y R, et al. Structure, physicochemical and bioactive properties of dietary fibers from *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz. seeds using ultrasonication/shear emulsifying/microwave-assisted enzymatic extraction[J]. Food Research International, 2020, 136: 109348−109348.

赵悦彤, 张世成, 曹冬梅. 预熟杂粮加工方法及风险控制 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 397−408. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110221
ZHAO Yuetong, ZHANG Shicheng, CAO Dongmei. Processing Method and Risk Control of Precooked Coarse Cereals[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 397−408. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110221

· 专题综述 ·

预熟杂粮加工方法及风险控制

赵悦彤[1,2], 张世成[1,2], 曹冬梅[1,2,3,4,*]
（1.黑龙江八一农垦大学食品学院, 黑龙江大庆 163319;
2.黑龙江省农产品加工与质量安全重点实验室, 黑龙江大庆 163319;
3.国家杂粮工程技术研究中心, 黑龙江大庆 163319;
4.黑龙江省杂粮加工及质量安全工程技术研究中心, 黑龙江大庆 163319）

摘　要: 随着人们生活水平及保健意识的提高，近年来杂粮逐渐成为了人们餐桌上高频率出现的食物。杂粮所富含的营养物质与功能成分对膳食健康具有重要意义，同时杂粮对于预防及改善各种慢性疾病也具有一定的疗效。由于杂粮质地较为坚硬，难以煮熟，所以杂粮预熟化处理为当下快节奏的生活提供了便利。近年来，预熟杂粮被广泛研究，预熟化的加工方法也呈多元化发展，但预熟杂粮在生产过程中易受到物理、化学、生物等方面的影响，对风险因子进行有效控制是预防食品安全问题的关键。本文介绍了杂粮预熟化的不同加工方法，针对加工过程各环节可能存在的潜在危害进行风险分析，讨论风险因子的控制措施，为进一步研究预熟杂粮的理化特性及预熟杂粮深加工的研制提供理论参考。

关键词: 预熟杂粮, 风险因子, 食品安全, 质量控制
中图分类号: TS213　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2024)21−0397−12
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110221
本文网刊:

Processing Method and Risk Control of Precooked Coarse Cereals

ZHAO Yuetong[1,2], ZHANG Shicheng[1,2], CAO Dongmei[1,2,3,4,*]
（1.College of Food Science, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China;
2.Key Laboratory of Agro-products Processing and Quality Safety of Heilongjiang Province, Daqing 163319, China;
3.National Coarse Cereals Engineering Research Center, Daqing 163319, China;
4.Heilongjiang Engineering Research Center for Coarse Cereals Processing and Quality Safety, Daqing 163319, China）

Abstract: With the improvement of living standards and increased health awareness, coarse cereals have gradually gained popularity as a high-frequency food in recent years. The abundant nutrients and functional components present in coarse cereals play a crucial role in promoting dietary health and have been proven to be effective in preventing and managing various chronic diseases. Due to the hard texture of coarse cereals, which are difficult to cook, precooking treatment of coarse cereals provides convenience for individuals leading fast-paced lifestyles. In recent years, extensive research has been conducted on precooked coarse cereals, and the processing methods have diversified. Nevertheless, the production process of precooked coarse cereals is susceptible to physical, chemical, and biological influences that can pose risks to food safety. Therefore, effective control of these risk factors is essential for prevention purposes. This paper introduces different processing methods of precooked coarse cereals while conducting risk analysis based on potential hazards at each stage of the processing process. Furthermore, it discusses control measures for these risk factors, which serve as theoretical references for further studies on physicochemical properties of precooked coarse cereals as well as the development of their deep processing.

Key words: precooked coarse cereals; risk factors; food safety; quality control

收稿日期: 2023−11−22
基金项目: 国家重点研发计划项目（2018YFE0206300）; 黑龙江省杂粮生产与加工优势特色学科项目（2022-78）。
作者简介: 赵悦彤（1997−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: z18045622986@163.com。
*** 通信作者:** 曹冬梅（1969−）, 女, 博士, 教授, 研究方向: 农产品加工与食品安全, E-mail: caodong3018@sina.com。

杂粮通常是指除水稻、小麦、玉米、大豆等主粮以外的原粮的统称，包括黑米、薏仁米、高粱、红小豆、绿豆、芸豆等[1]。杂粮中除了含有蛋白质、碳水化合物、矿物质等营养物质，还富含多酚、多糖、β-葡聚糖、植物甾醇、酚酸等多种活性成分[2−4]，对于预防高血压[5]、糖尿病[6]、直肠癌[7]、乳房癌[8] 等多种慢性疾病具有积极的作用。近年来，随着人们对膳食营养的追求不断提高，杂粮产品受到了广大消费者的欢迎，其产品往往以杂粮、杂粮粉、饮料、焙烤食品等形式出现，在市场上有一定的占有率，但产品加工缺乏创新，对于杂粮主食化的需求也无法满足。对杂粮进行预熟化处理能够实现杂粮与大米同煮同熟，符合现代化简约、快速的生活节奏，同时可达到营养均衡的目的。随着杂粮加工方式的多样化发展，杂粮预熟化方法也随之增多，可通过微波法、蒸煮法、挤压膨化法等方法来实现，而后续加工中的干燥方法也较为多变，微波干燥、热风干燥、真空冷冻干燥、高温流化干燥等方法都能较好地完成预熟杂粮的干燥环节。

我国杂粮行业发展起步较晚，加之我国居民大多以精米精面为主食，使我国杂粮产业的发展产生了一定的局限性。有研究表明，精米精面属于高 GI 食物，其摄入量与糖尿病风险具有相关性，且精米精面中的维生素、矿物质、膳食纤维等营养物质也低于杂粮[9]，杂粮中的多种营养成分刚好可以与主粮进行互补。近年来，受疫情因素的影响使消费者对于具有天然功能成分的杂粮产生了旺盛需求，这使得杂粮市场焕发出勃勃生机，预熟杂粮迎来了新的发展起点。除了家庭加工方便、省时之外，预熟杂粮还为餐饮行业提供了便利，对于一些轻食餐饮行业来说，其具有操作简单、出餐快等优点。此外预熟杂粮还可作为预熟杂粮粥、杂粮粉等杂粮深加工产品的前处理步骤。燕之坊、北纯、十六膳、北大荒等企业均生产了预熟杂粮产品，通过淘宝、京东、直播平台等线上销售渠道与线下合作企业同步销售，且销量可观，由此可见预熟杂粮行业的发展趋势较好。

目前，预熟杂粮产品的生产规模和发展水平不一，部分企业还处于初步发展阶段，存在生产技术落后、生产环境不达标、产品质量不一致等问题，且企业都在执行自行制定的企业标准，并没有统一的管理标准。在食品生产、运输、包装、贮存、销售过程中极易产生或混进有毒有害物质，进而引发食品安全事件，损害消费者的身心健康，影响企业形象[10]。针对加工过程中存在的潜在风险，危害分析与关键控制点（Hazard Analysis and Critical Control Point，HACCP）的计划能够从源头上控制潜在危害，是防止食源性疾病发生的有效策略[11]，可以通过制定相应的控制措施来确保产品的质量安全、维护消费者的基本权益。本文概述了杂粮的不同预熟化处理方法，对加工环节存在的潜在危害及风险因子展开分析，并提出相应的控制措施，为预熟杂粮的工艺研究及生产环节的安全控制提供理论支持。

1 预熟杂粮加工方法

1.1 预熟方法

1.1.1 微波熟化 杂粮微波熟化工艺流程如图 1 所示。

图 1 杂粮微波熟化工艺流程图

Fig.1 Process flow chart of microwave ripening of coarse cereals

微波熟化是指微波辐射到物料内部，极性分子在微波的振动下旋转，瞬间产生热量，产生的蒸汽通过梯度扩散使食品内部和外部同时受热，达到预熟的效果[12]。

曹格等[13] 在微波功率 640 W，微波时间 30 s 条件下对红豆进行预熟处理，此时红豆的粘性提高，硬度显著降低，通过模拟大米的蒸煮条件对红豆进行复煮后未出现白芯。但研究发现糊化度过大会导致红豆表皮脱落，淀粉颗粒破裂，影响复水性及感官指标，为保证良好品质须严格把控操作参数。刘佳男等[14] 发现薏仁米经 46.4 ℃ 的水温浸泡 3.9 h，微波功率为 600 W 条件下处理 85 s 可实现与大米同煮同熟，由于微波使薏仁米的结构疏松，颗粒内会形成孔隙，利于复水，使糊化度升高，预熟后薏仁米的表观形态完整，口感更佳。Zhang 等[15] 以糊化度和感官评分为标准，对微波预熟的红小豆进行工艺参数的选取，最佳条件为浸泡时间 7.8 h，微波功率 830 W，微波时间 92 s 时达到较好的预熟效果。李晓蒙[16] 在预熟绿豆的研究中发现 30 ℃ 恒温浸泡 5 h，微波功率为 1800 W，间歇微波 2 min，绿豆与大米共煮时能达到同熟。王立东等[17] 在微波预熟红小豆的研究中发现经 45 ℃ 水温浸泡 9 h，蒸汽加热处理 20 min，微波功率 13.4 kW，微波 17 min 时，预熟红小豆的复水性与感官状态较好，且产品的硬度、破碎力及咀嚼性都有所降低。

微波加热具有加热均匀、加热快、穿透力高、能耗低等优点，常用于预熟食品的生产加工，但微波处理温度过高或时间过长会影响食品中脂肪、蛋白质、碳水化合物、维生素等营养成分的结构[18]，因此应用此方法时需要明确微波预熟的正确操作方法及工艺参数，避免营养成分流失。

1.1.2 蒸煮熟化 杂粮蒸煮熟化工艺流程见图 2。

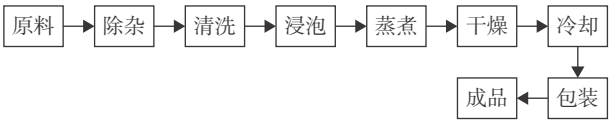


图 2 杂粮蒸煮熟化工艺流程图

Fig.2 Process flow chart of cooking ripening of coarse cereals

蒸煮是指在高压或常压条件下以水为传热介

质，热量通过蒸汽传递到杂粮中使其熟化的方法，此方法在杂粮的预熟化处理中较为普遍。

杜明珠等[19]研究发现，黑豆浸泡 1.5 h，蒸煮压力为 121 ℃，蒸煮 4.8 min 后，其外观形态完整，可以与大米同煮同熟。孙军涛等[20]研究了常压蒸煮与高温高压蒸煮对薏米的预熟效果，结果发现常压蒸煮条件为 40 ℃ 恒温浸泡 2.5 h，物料厚度 0.7 cm，蒸煮 15 min 时薏米的硬度、弹性、胶黏性和咀嚼性等均有明显提升，可与小米同熟；高温高压蒸煮条件为 40 ℃ 恒温浸泡 1 h，蒸煮温度 115 ℃，蒸煮时间 3 min 时也达到了相同的效果。于雷等[21]发现蒸煮压力为 50 kPa、蒸煮时间 4.5 min 时绿豆能与大米同煮同熟，但由于蒸煮过程中温度和压力较高，淀粉分子间的相互作用增强，与脂质的结合减弱，发生淀粉脂质复合物分解，使预熟后的绿豆淀粉含量增加。王俊国等[22]研究了薏米在超高压处理时蒸煮和食用品质的变化，发现蒸煮会改变薏米颗粒的结构，使其糊化度升高，蛋白质变性，从而使口感品质得到改善，研究结果表明 300 MPa 压力蒸煮后的薏米含水率提高、白度增加、透光度略有降低，感观品质、蒸煮品质及食用品质均较好。

蒸煮可以降低杂粮的硬度，且营养物质损失量较少，可以使杂粮保持良好的风味，但蒸煮时间过长或者压力过大会破坏杂粮的表观形状，导致固形物流失[23]，在操作过程中应控制好蒸煮的温度、压力及时间，保证预熟杂粮的良好品质。

1.1.3　挤压膨化法　挤压膨化技术是通过机械摩擦、剪切和压力变换，使物料在螺杆、料筒之间迅速膨胀并形成多孔结构[24]，在预熟杂粮人造米的加工中得到较为广泛的应用，工艺流程如图 3。

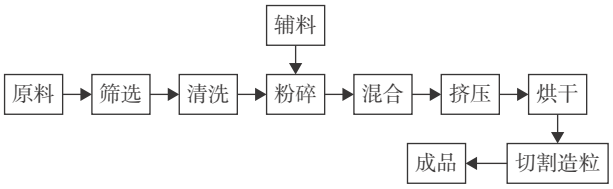


图 3　杂粮挤压膨化法熟化工艺流程图

Fig.3　Process flow chart of coarse cereals curing by extrusion expansion method

张颖等[25]使用挤压膨化法将大米、小麦、玉米、燕麦、鹰嘴豆粉碎，再经挤压温度 160 ℃，水分含量 20%，螺杆转速 160 r/min，进料速度 240 g/min 的条件进行预熟，所制得的重组米口感与外观都较为接近大米。殷明等[26]以大米、小麦、燕麦、玉米为原料，将其粉碎后加水搅拌，放入单螺杆挤压成型机中在机筒温度为 120 ℃，水分含量 24%、螺杆转速为 220 r/min 条件下进行挤压定型，在 80 ℃ 热风干燥 1 h 制得杂粮人造米。蒋卉[27]利用类似的方法，将碎米、燕麦、小麦粉碎后用双螺杆挤压机生产杂粮复合米，研究发现Ⅰ区 65 ℃、Ⅱ区 129 ℃、Ⅲ区 95 ℃、螺杆转速 300 r/min 为最佳工艺，此时产品的品质较好。

挤压膨化法处理的杂粮产品能将人体难以吸收的大分子物质分解为小分子营养物质，能够改善风味、提升产品口感并促进消化吸收[28]。但此方法会破坏杂粮原有的质构与形状，且挤压过程中工艺参数的控制比较复杂，需要严格把控工艺参数，避免影响产品的品质。

1.2　干燥方法

1.2.1　微波干燥　微波干燥是指通过微波对介质材料进行快速加热使食品原料强力脱水的技术[29]，是食品加工领域中新型的干燥方法，近年来被广泛应用于预熟杂粮的生产加工。

涂向辉等[30]通过微波干燥技术对高粱、燕麦、黑米、荞麦、薏仁米、大米等几种速食谷物进行工艺优化，研究表明当干燥功率为 450 W、干燥时间 25 min、复水率为 2.85% 时达到了比较理想的预熟效果。张桂芳等[31]研究发现在微波功率 50 W 干燥 13 min 后预熟绿豆的含水量较低，复水性及感官指标均良好。Shi 等[32]利用微波干燥处理预熟绿豆，经微波功率 300 W，干燥时间 30 min，绿豆呈现出较好的预熟效果，使干燥时间由 120 min 缩短到 25~30 min，而且微波干燥过程中的快速脱水过程限制了糊化淀粉的重新组装和弱 V 型结晶的形成，使绿豆的消化率得到了进一步提高。Divekar 等[33]发现鹰嘴豆、木豆、红扁豆、绿豆、斑豆的微波功率为 600 W、微波干燥时间 56 s 时淀粉糊化效果较好，淀粉糊化有助于提高豆类在蒸煮过程中的吸水率，从而缩短豆类的蒸煮时间。

微波干燥技术不仅具有干燥速度快、节省能源、对食品品质影响小等优点，而且干燥过程中还可以起到杀菌的作用[34]，然而与其他传统干燥方法相比，由于微波干燥技术的干燥速度快，当物料内部温度高于表面温度时，大量水分子从物料中蒸发，而组织中原有水分所占的位置不变，易导致产品产生多孔结构[35]。此外温度过高通常会导致食品产生异味，尤其是在微波干燥的最后阶段，所以利用微波干燥技术处理食品时应考虑工艺参数的控制与优化。

1.2.2　热风干燥　热风干燥是以热风为介质，通过对流循环的方式与物料进行热质交换，使物料内的水分降低，从而达到干燥的目的，是粮食加工常用到的干燥方式[36]。

吴练军[37]以燕麦和小麦为原料研制方便杂粮粥，原料先经 30 min 浸泡，80 ℃ 表面干热处理 10 min，再通过 90 ℃ 的热风干燥处理 90 min，此时样品呈现出较好的复水效果与感官品质。王婷[38]在芸豆预熟化的研究中发现经 50 ℃ 浸泡 30 min，低压蒸煮压力为 50 kPa 时蒸煮 5 min，90 ℃ 的热风干燥处理后，芸豆达到较好的预熟效果，且颗粒外观呈现出相对完整的结构。涂向辉等[39]将粳米与薏仁

米、黑米、荞麦、高粱、燕麦等杂粮进行混合制作方便杂粮米饭，研究发现米粒厚度为 0.6 cm，热风干燥温度为 100 ℃ 处理 70 min 时的复水效果最佳。许晓兰等[40] 在方便杂粮米饭的研究中发现粳米、荞麦、燕麦、高粱、薏仁、黑米的工艺参数为浸泡温度 50 ℃、浸泡时间 80 min、蒸煮米水比例 1∶2、蒸煮时间 35 min、热风干燥温度 100 ℃，此条件下杂粮的表观光滑、完整，口感较好。

热风干燥具有操作简单、成本低、适用性强等特点，但其存在较大的能耗，由于受热不均还易使产品发生褐变等问题，使最终产品质量劣化，可利用热风干燥与其他干燥技术进行联合使用，通过优势互补来解决此类问题的发生[41]。

1.2.3 真空冷冻干燥 真空冷冻干燥技术是一种将原料冷冻到共晶点温度以下，在低压下通过升华的方式将原料中的水分去除的干燥技术，在食品加工业被广泛应用与研究[42]。

赵慧等[43] 研究发现预冻温度−32 ℃ 冷冻 3.5 h，干燥温度 120 ℃，冲调比 1∶5，此条件下得到的冻干燕麦粥的品质达到了企业要求。张智超等[44] 探究了不同干燥方式对薏米品质的影响，研究发现真空冷冻干燥温度为−49 ℃，干燥时间为 5 h、物料厚度为 2.5 cm，由于真空冷冻干燥使物料中的水分直接在冷冻状态下升华，内部呈现多孔性，复煮时的复水性较好，使薏米的硬度降低了约 3 倍，与鼓风干燥和微波干燥相比，薏米的亮度与色泽也保持的更好，能实现与小米同煮共熟。孙军涛等[45] 也得到了类似的结论，利用鼓风干燥、微波干燥和真空冷冻干燥三种干燥方式对预熟红豆的影响进行了研究，结果发现当温度为−49 ℃ 进行真空冷冻干燥 7 h、物料厚度 2.0 cm 时处理的红豆可与小米同煮同熟，且相较于其他两种干燥方式，真空冷冻干燥处理的红豆表观色泽更好。巩僖[46] 研究了真空冷冻干燥对预熟红小豆和预熟芸豆的影响，研究表明经 50 ℃ 浸泡 4 h，红小豆在−25 ℃，芸豆在−35 ℃ 预冻 4 h，再通过−45 ℃ 升华干燥 30 h，50 ℃ 解析干燥 10 h 处理后烹调时间显著缩短，复水后的感官指标较为理想。

真空冷冻干燥技术能使食品中的营养成分更好地保留下来，其对食品内部结构的破坏小，复水效果好，还可以避免因热处理而发生的褐变现象[47]。但真空冷冻干燥存在产品处理时间长、能耗高的缺点，可在预处理阶段对产品进行脱水处理来减少真空冷冻干燥的时间与能耗[48]。

1.2.4 高温流化干燥 高温流化技术主要是指通过拓宽籽粒水分通道，打破吸水障碍，提高吸水性能，使淀粉吸收更多水分，糊化更加彻底，还能改善蒸煮的口感和风味[49]。

滕菲等[50] 在高温流化处理黑米的研究中发现流化温度 155 ℃、流化时间 60 s、进料速度 60 kg/h 是预熟黑米的最佳工艺参数，经过处理后黑米饭的柔软度及黏性等指标显著提高，解决了黑米口感差、异味重等问题。李永富等[51] 通过高温流化技术对红小豆蒸煮品质的影响进行了研究，结果发现经流化温度 215 ℃、流化处理时间 55 s、进料速率 62 kg/h 的条

表 1 预熟杂粮干燥方法处理参数及优缺点

Table 1 Treatment parameters and advantages and disadvantages of precooked coarse cereals drying methods

干燥方法	原料	处理参数	优点	缺点	参考文献
微波干燥	高粱、燕麦、黑米、荞麦、薏仁米、大米	微波干燥功率: 450 W, 干燥时间: 25 min	干燥速度快、节省能源、对食品品质影响小	易使食品产生多孔结构; 温度过高可导致食品产生异味	[30]
	绿豆	浸泡温度: 50 ℃, 浸泡时间: 3 h, 蒸制时间: 20 min, 微波干燥功率: 50 W, 微波干燥时间: 13 min			[31]
	绿豆	微波干燥功率: 300 W, 干燥时间: 30 min			[32]
	鹰嘴豆、木豆、红扁豆、绿豆、斑豆	微波干燥功率: 600 W, 干燥时间: 56 s			[33]
热风干燥	燕麦、小麦	浸泡时间: 30 min, 表面干燥温度: 80 ℃, 表面干燥时间: 10 min, 热风干燥温度: 90 ℃, 干燥时间: 90 min	操作简单、成本低、适用性强	能耗大, 受热不均	[37]
	芸豆	浸泡温度: 50 ℃, 低压蒸煮压力: 50 kPa, 低压蒸煮时间: 5 min, 热风干燥温度: 90 ℃			[38]
	粳米、薏仁米、黑米、荞麦、高粱、燕麦	米粒厚度: 0.6 cm, 热风干燥温度: 100 ℃, 干燥时间: 70 min			[39]
	粳米、燕麦、高粱、黑米、薏仁、荞麦	浸泡温度: 50 ℃, 浸泡时间: 80 min, 蒸煮时间: 35 min, 热风干燥温度: 100 ℃			[40]
真空冷冻干燥	燕麦	预冻温度: −32 ℃, 冷冻时间: 3.5 h, 干燥温度: 120 ℃	更好地保留杂粮中的营养成分; 对食品内部结构的破坏小; 复水效果好; 可避免因热处理而发生的褐变现象	处理时间长、能耗高	[43]
	薏米	真空冷冻干燥温度: −49 ℃, 干燥时间: 5 h, 物料厚度: 2.5 cm			[44]
	红豆	真空冷冻干燥温度: −49 ℃, 干燥时间: 7 h, 物料厚度: 2.0 cm			[45]
	红小豆、芸豆	浸泡温度: 50 ℃, 浸泡时间: 4 h, 预冻温度: (红小豆)−25 ℃, (芸豆)−35 ℃, 预冻时间: 4 h, 升华干燥温度: −45 ℃, 干燥时间: 30 h, 解析干燥温度: 50 ℃, 干燥时间: 10 h			[46]
高温流化干燥	黑米	流化温度155 ℃, 流化时间60 s, 进料速度60 kg/h	干燥速度快、温度分布均匀、热传递效率高	气体与物料接触不充分	[50]
	红小豆	流化温度: 215 ℃, 流化处理时间: 55 s, 进料速率: 62 kg/h			[51]
	红小豆、绿豆、黑米、小麦	流化温度: (红小豆)200 ℃、(绿豆)175 ℃、(黑米)155 ℃、(小麦)150 ℃, 干燥时间: 55 s			[52]

件处理后红小豆的黏度和回生趋势有所降低，由于高温流化可以使淀粉颗粒产生间隙，形成水分通道，使吸水更加充分，糊化更加彻底，同时改善了口感。马万成等[52]基于高温流化技术筛选了红小豆、绿豆、黑米和小麦添加到自热米饭中，流化温度分别为红小豆 200 ℃、绿豆 175 ℃、黑米 155 ℃、小麦 150 ℃，处理时间 55 s，研究表明经高温流化处理的杂粮蒸煮品质得到显著改善，验证了高温流化处理在杂粮预熟的应用中具有很大的潜力。

高温流化技术增大了物料与气体的接触面积，具有干燥速度快、温度分布均匀、热传递效率高等优势，能够有效避免物料局部过热[53]，但干燥时间长或接触效率不足会导致产品与热空气流接触不充分而导致过度干燥或干燥不足，从而产生不均匀的产品质量，须在生产前对操作参数加以控制来避免此类问题的发生[54]。表 1 对预熟杂粮各干燥方法处理参数及优缺点进行了总结。

2　预熟杂粮潜在风险因子分析

2.1　生物性风险因子

2.1.1　真菌毒素污染　杂粮在作物生长、原料采收、加工、运输、贮存等环节极易被真菌毒素污染，不但易引发食物中毒，还会造成经济损失。唐坤甜等[55]对国内大麦主产区的 15 份样品进行了赭曲霉毒素 A 的含量检测，发现所有样品均含有赭曲霉毒素 A，污染水平为 0.011~0.212 μg/kg。Wu 等[56]随机抽取 5 种大麦样品进行玉米赤霉烯酮污染检测，发现检出率为 0.57%，平均污染水平为 11.09 μg/kg。Mogara 等[57]检测了高粱中真菌毒素的含量，发现样品中黄曲霉毒素 B1 的检出率为 19%，平均浓度为 4.75 μg/kg，同时还在高粱样品中检测到了伏马毒素、赭曲霉毒素 A、玉米赤霉烯酮等真菌毒素。杂粮中常见的真菌毒素有黄曲霉毒素、赭曲霉毒素、伏马毒素、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、玉米赤霉烯酮等，这些真菌毒素能够引起许多物种的生化、生理和病理变化，主要包括免疫毒性、致癌性、神经毒性、致畸性、肾毒性、消化不良、肝毒性、发育和生殖毒性等[58]。胡佳薇等[59]对 2013~2016 年陕西省的 55 份燕麦中脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其衍生物的含量进行了测定，发现主要污染毒素为 3-乙酰基-脱氧雪腐镰刀菌烯醇，其检出率达到了 90.9%，平均污染水平为 52.1 μg/kg。表 2 整理了预熟杂粮加工过程中常见真菌毒素的来源、产生环节及主要危害。

2.1.2　细菌污染　预熟杂粮在加工过程中受水质、设备卫生、包装不规范等因素的影响易使细菌繁殖并传播到食品中，造成不同程度的污染，给人体健康带来安全隐患。例如农作物灌溉用水与加工用水中经常含有沙门氏菌，据估计，沙门氏菌每年在全世界引起 9380 万例胃肠炎病例，其中死亡人数达到 155000 人[67]。段江丽等[68]调查了大理市 2010~2013 年 68 份熟制米面致病菌的检出情况，发现有 2 份金

表 2　预熟杂粮加工过程中的真菌毒素来源及主要危害

Table 2　Sources and main hazards of mycotoxins in the processing of precooked coarse cereals

真菌毒素	来源/污染因素	产生环节	主要危害	参考文献
黄曲霉毒素	土壤、作物、空气	作物生长、收割、贮存、运输、销售	对体内多脏器，特别是对肝脏具有严重毒性作用，还会出现胃肠功能障碍、生育能力下降和出血性贫血等问题。	[60]
赭曲霉毒素			致癌、致畸，损伤肝、肾功能，破坏免疫系统，还会导致神经中毒。	[61]
伏马毒素			具有肾毒性、肝毒性、免疫毒性和致癌性。	[62]
玉米赤霉烯酮			损伤机体免疫系统、生殖系统，会引发肝、肾损伤从而导致癌变，对肠道也会产生毒害作用。	[63]
脱氧雪腐镰刀菌烯醇			可引起头晕、恶心、呕吐、腹泻等急性中毒症状，甚至可导致昏迷；具有致癌、致畸、致突变性。	[64]
T-2毒素			引发头晕、恶心、心悸等中毒症状，对神经系统、免疫系统、骨骼、肝脏等部位造成损伤。	[65]
链格孢霉毒素			会引发炎症，还会使机体激素紊乱、免疫失调等；具有潜在致癌性及遗传毒性。	[66]

表 3　预熟杂粮加工过程中的细菌来源及主要危害

Table 3　Sources and main hazards of bacteria in the processing of precooked coarse cereals

细菌	来源/污染因素	产生环节	主要危害	参考文献
沙门氏菌	水质污染	原料清洗、浸泡	引起发烧、恶心、呕吐，严重可导致脑膜炎、骨髓炎等。	[70]
金黄色葡萄球菌	操作人员带入	生产加工、产品包装	可导致肺炎、心包炎、败血症等，严重时会造成中毒休克。	[71]
溶血性链球菌	水质污染、操作人员带入	原料清洗、浸泡、产品包装	引发呼吸道感染、新生儿败血症、细菌性心内膜炎、肾小球炎等。	[72]
肉毒杆菌	环境引入	生产加工	毒性极强，会出现头晕、呼吸困难等症状，严重会导致呼吸麻痹而死亡。	[73]
志贺氏菌	水质污染、环境引入	原料清洗、浸泡、生产加工	引发剧烈腹痛、腹泻、发热，严重者会出现痉挛及休克现象。	[74]
铜绿假单胞菌	土壤引入、操作人员带入	原料验收、生产加工、产品包装	引起皮肤、肺部、呼吸道、消化道等部位的感染。	[75]
蜡样芽孢杆菌	水质污染、土壤引入、环境引入	原料清洗、浸泡、生产加工	出现恶心、呕吐、腹胀、腹痛和腹泻等消化道症状，还可能出现高热、寒战、头晕、乏力和口干等症状。	[76]

黄色葡萄球菌检出，3 份蜡样芽孢杆菌检出，致病菌检出率为 7.35%。罗华等[69] 调查了 2010~2011 年的各类食品中细菌指标的检出情况，发现了 2 件不合格的速冻熟制米面制品，这 2 件速冻熟制米面制品中，金黄色葡萄球菌检出率为 100%。表 3 整理了预熟杂粮加工过程中常见细菌的种类、来源、产生环节及主要危害。

2.2 化学性风险因子

化学性风险因子通常分为内源性与外源性，内源性风险指物体自身所携带的对人体健康造成威胁的物质，外源性风险指由外界因素引起或侵入物质内不断蓄积的对人体有害的物质[77]。在杂豆类杂粮的预熟化加工过程中常伴随的内源性风险包括植物凝集素、胰蛋白酶抑制剂、皂苷、单宁、植酸等抗营养因子[78−79]；外源性风险包括农药残留、重金属残留、洗涤剂残留、包装材料和运输污染等[80]，下面对预熟杂粮潜在的化学性风险问题展开详细论述。

2.2.1 内源性风险　杂豆中的内源性风险以抗营养因子为主，主要包括胰蛋白酶抑制剂、植物凝集素、植酸、单宁、皂苷等，由于作用机制不同会导致人体对谷物中的营养素产生抗性，即部分营养价值丧失，同时会引起机体功能障碍、免疫力低下、代谢性疾病发病率高等问题[81]。据了解，食用含有未完全清除胰蛋白酶抑制剂的谷物会引发食物中毒，另外胰蛋白酶抑制剂还能刺激胰腺分泌过多的胰腺酶，导致内源性必需氨基酸缺乏，甚至会引发胰腺肿大等疾病[82]。有研究表明，植物凝集素会导致严重的肠道损伤，扰乱消化并导致营养缺乏，可以产生 IgG 和 IgM 抗体，导致食物过敏和其他免疫反应，此外，植物凝集素可以与红细胞结合，同时与免疫因子结合会导致血凝和贫血[81]。Thakur 等[83] 发现皂苷通过肠腔内的相互作用减少了葡萄糖和胆固醇等营养物质的摄入，而导致机体内的胆固醇降低。通常情况下加热或其他熟化方法处理后杂粮中的抗营养因子可以去除，但要避免因加热不完全导致抗营养因子未有效去除，还要防止处理时间过长破坏杂粮中的营养成分。

2.2.2 外源性风险

2.2.2.1 农药残留　杂粮在种植过程中因不当或过量使用除草剂、除虫剂等农药会导致作物中的农药残留。有研究表明，目前只有 10%~20% 的农药得到有效利用，其余 5%~30% 通过蒸发进入大气，40%~60% 渗透到土壤和地下水中[84]。大量的农药残留在空气和土壤中，甚至会对第二年种植的农作物带来农药残留的隐患。据统计，世界各国每年登记的农药中毒病例约 400 万起，其中 7.5% 死于农药中毒，中国每年报告近 100 万例农药中毒，死亡率约为 10%[85]。近年来，农药残留超标等问题频繁发生，农药的不规范管理和使用使杂粮及杂粮产品有着潜在的风险，因此原料的采购验收成为了预熟杂粮加工过程中尤为重要的环节。

2.2.2.2 重金属残留　重金属残留也是影响杂粮品质的重要因素，主要包括锌、铜、汞、铬、铅、镉、砷等金属物质，受地理环境、土壤品质的影响，以及在原料运输、贮存等环节都具有被重金属污染的风险。重金属通过饮食暴露在人体骨基质和脂肪组织中具有累积趋势，导致必需营养物质的消耗和中枢神经系统的缺陷，还可能导致宫内发育迟缓、心血管、胃肠道、血液、肝、肾、神经、发育、生殖和免疫系统疾病[86−87]，世界卫生组织的报告显示，世界上每年由铅、镉、汞等重金属污染而导致慢性中毒的大约有 100 万人[88]。李俊生等[89] 发现 9 种粮食样品中大部分重金属含量均低于国家标准规定限量，但镉含量却高出了国标限量。张鑫鑫等[90] 调查了 7 种市售小杂粮重金属污染情况，发现 7 种小杂粮均存在不同程度的重金属检出情况，但都可以通过膳食加工降低重金属的危害，由此可见食品加工的安全控制尤为重要。

2.2.2.3 洗涤剂、消毒剂残留　为保证预熟杂粮产品的质量安全，在加工过程中需要定期对加工设备进行清洗，但清洗设备时若清洗不到位或者冲洗次数较少都会存在洗涤剂残留的风险，影响产品质量。洗涤剂中含有砷、汞、铅等物质，砷的化合物具有毒性，例如三氧化二砷，俗称砒霜，具有剧毒，而铅、汞对于肝肾及神经系统具有毒害作用[91]。此外，洗涤剂中还含有一定比例的工业乙醇，但工业乙醇加工时常常会混入有毒且易挥发的甲醇，甲醇在体内累积会引起中毒反应，摄入量过多可导致死亡[92]。Chahine 等[93] 探究了洗涤剂残留对大鼠的影响，结果发现器皿上残留的洗涤剂虽然不会引起急性病变，但它们可以在相对较长的时间内对大鼠肝脏造成氧化应激和癌症通路的过度表达。

生产车间的消毒环节在食品安全控制中起着重要的作用，对于地面、墙壁等车间环境通常用含氯消毒剂进行消毒处理，但如果发生消毒剂残留，氯气会在空气中挥发，进而污染食品，增加了食品安全隐患。Sciurba 等[94] 在消毒剂对小鼠肠道菌群影响的研究中发现消毒剂对粪便菌群微生物群落的影响微小但显著，且暴露时间越长粪便微生物群的变化越大，实验结果表明消毒剂的使用应被视为可能影响肠道生物群的潜在因素。

2.2.2.4 包装材料　产品包装是预熟杂粮加工过程中的最后环节，预熟杂粮产品通常使用塑料类包装材料，但塑料包装袋中含有树脂，树脂本身无毒性，但老化或降解后会产生危害食品安全的物质[95]。此外，包装材料中的增塑剂、单体和低聚物等添加剂在包装过程中与食品接触时可能会转移到食品中，导致食品的质量和安全性发生变化，且由于香气的吸附和其他成分也会从包装材料转移到食品中，使食品的风味发生变化[96]。Kato 等[97] 研究发现由于包装材料的降解和各种化学反应，可能会产生一些产物，包括邻苯二甲酸酯、烷基酚、己二酸双(2-乙基己基)酯等，它

们被认为是内分泌干扰化学物质，会干扰人体内分泌系统并产生不良的生殖、神经、发育和免疫影响。所以预熟杂粮产品的包装需考虑塑料中多种添加物与产品的反应及变化情况，以最大限度控制塑料包装对产品带来的质量风险。

2.2.2.5　运输过程　运输是预熟杂粮供应链流通不可或缺的一部分，在运输过程中柴油和汽油发动机车辆都会通过排放过量一氧化碳的排气系统污染食物，污染物易沉积在包装材料上或直接附着在食品上，这增加了有害物质沉积在食品上的可能性[98]。此外，预熟杂粮对湿度和温度较为敏感，在运输过程中，如果湿度或温度过高或过低，可能导致杂粮变质、发霉、虫害等问题，影响食品品质。在运输和装卸的过程中，预熟杂粮容易受到挤压和碰撞，特别是在堆放或搬运时，如果操作不当或者包装不牢固，容易导致杂粮的破损和压缩，影响其质量和品相。未来应在运输过程中加大管理及防护力度，选择可靠的物流合作伙伴和合适的运输方式以限制食品污染暴露水平。

2.3　物理性风险因子

物理性风险是指受外来因素干扰而导致的食品风险，这些因素可能对食品的品质、安全性和可食性产生不利影响。预熟杂粮的物理性风险通常来源于收、产、储、运、销等环节。首先，在原料采收时，可能会混入破损粒、虫蚀粒、昆虫、玻璃块、土块、石子等异物，这些异物的存在不仅影响原料的质量，还可能对后续的加工步骤造成不良影响[99]。其次，在加工过程中，由于设备故障、操作不当或者生产车间环境卫生不达标都可能导致食品受到外界物理性污染，例如金属屑、机械润滑油、害虫尸体、残肢、害虫粪便等对食品的品质产生负面影响[100]。此外，操作员工未达到良好操作规范的标准，会使毛发、指甲、皮屑、首饰等混入食品中，不仅污染了食品，甚至影响消费者的消费体验与身心健康。综合而言，控制物理性风险需要生产企业在各个生产环节中加强监管、制定科学合理的操作规程，最大程度地减少物理性风险对食品质量和安全性的影响。

3　预熟杂粮风险控制

预熟杂粮生产过程中任何环节出现问题都会对产品的质量安全造成威胁，为保证产品安全，首先，应贯彻落实国家制定的食品安全管理法规及相应的标准来有效控制预熟杂粮生产过程中各环节存在的潜在风险。其次，生产企业更应加强 HACCP 体系的执行，通过 HACCP 原理进行危害风险识别与评估，对加工过程中的关键控制点进行严格监测、控制，防止预熟杂粮加工环节潜在风险的发生。同时，还需制定相应的加工生产制度，逐步完善生产经营，使预熟杂粮产品品质更加有保障。最后，企业还要实施抽样检测计划，评估产品是否合乎标准，生产环境是否存在安全隐患，对不合格产品及时处理，对现有问题及时纠正并进行短期评估[101]。

3.1　原料验收

原料验收环节是预熟杂粮生产过程中的关键控制点，也是保证预熟杂粮品质安全的先决条件。杂粮采收时原料易存在致病菌、农药残留、重金属残留等风险，因此企业需要制定科学的源头管理系统，以保证预熟杂粮产品的安全品质为目的，制定良好的操作规范和卫生实践计划。企业收购原料时需验证供方提供的包含粮食卫生标准所要求的所有农药残留和重金属残留检测合格的检验报告，检验结果应符合《食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量》(GB 2763-2021)、《食品安全国家标准 食品中污染物限量》(GB 2762-2017)等国家标准。此外，企业要保持原料储存仓库的良好卫生状态，加强通风，定期监测环境样品，还应对采购、检测等技术人员进行系统、专业的培训及考核，在原料验收环节严格把关，并且开展原料追溯管理制度，做到从源头上保证食品安全。

3.2　加工环节

生产加工是控制食品污染的重点环节，为保证加工过程的科学性和规范性，企业应建立预熟杂粮风险控制的闭环管理，规范各生产步骤，提高产品加工的标准化和流程化水平。预熟杂粮加工过程中的管控策略主要包括以下五个方面：一是加强对员工操作规范的培训及个人卫生的检查，制定员工卫生考核制度，定期进行考核，防止因人员操作失误或卫生问题造成食品安全风险；二是加强生产车间环境卫生的管理，加工环境应符合卫生标准操作程序(Sanitation Standard Operating Procedure，SSOP)8 个方面的要求，防止霉菌、蚊虫等风险因子污染产品，生产时对蒸煮、干燥等工艺的温度、时间参数严格把控，定期对加工设备、器具进行清洗、消毒，防止细菌滋生；三是包装材料的选用应符合国家标准要求，包装材料应具有《包装袋杀菌密封性能鉴定合格证》《包装袋辐射物残留合格证》，防止包装材料中的风险因素影响产品品质；四是产品生产完成后对产品进行抽样检测，以及时查验产品是否达到合格标准、产品的贮存环境是否达到卫生标准；五是企业应对产品安全及管理方式进行及时评估，通过短期评估发现问题并及时改正，通过长期评估衡量持续改进的总体进展[102]，保证产品生产的安全状态。

3.3　运输环节

运输过程可能存在由于人为失误或车辆卫生不达标导致预熟杂粮产品出现交叉污染的风险，要从根本上预防运输引发的安全问题，须从食品运输安全管理入手。对此企业应以 HACCP 标准作为预熟杂粮产品运输安全的重要依据，进行潜在危害评估，根据关键控制点控制风险因子，主要控制策略包括：产品运输前应对运输车辆进行充分清洁、消毒，并对产品做好防水、防尘处理，避免预熟杂粮中细菌、霉菌的滋生；对车辆进行合理储存与定期检验，防止运输途

中由于车辆故障导致产品受环境影响使食品发生污染或变质；为确保预熟杂粮产品的安全，从事运输作业的人员包括发货人、装货工人、运输司机等需各司其职，承担运输过程中保证产品质量安全的责任[103]。

3.4 销售环节

为建立消费者信心，实现食品质量安全，企业应建立健全预熟杂粮的质量安全管理制度及食品安全追溯体系，可通过二维码、条形码等技术建立准确、高效的食品追溯系统，记录生产商、生产时间、批次等信息，为追溯预熟杂粮质量安全提供保障[104]，对于不合格产品及时召回并妥善处理，调查不合格原因并进行纠正，最大程度降低产品损失。此外，还应鼓励消费者维护自身合法权益，发现高风险或不合格产品及时举报反馈，对存在问题的产品批次采取追回措施，对于举报者给予奖励，维护消费者的利益，营造绿色、安全、有保障的消费环境[105]。

4 总结与展望

我国作为农业大国，杂粮资源丰富，但我国杂粮大部分都作为原料出口国外，杂粮深加工的发展对于我国食品行业来说还留有较大空白，预熟化处理可作为杂粮发展的重要契机，对于确保粮食质量、提高农产品附加值以及保障食品安全具有重要意义。微波熟化、蒸煮熟化和挤压膨化等加工方法，以及微波干燥、热风干燥、真空冷冻干燥和高温流化干燥等干燥方式在预熟杂粮行业中被广泛研究与应用。然而，预熟杂粮加工领域仍然面临一些挑战，例如技术创新需要不断跟进市场需求，加工过程中的能源消耗问题亟待解决。未来，传统的加工方法会逐渐被先进技术取代，如先进的机械加工、精细化的烘焙技术以及先进的包装技术等都有助于提高加工效率和产品质量，预熟杂粮加工行业在未来的发展中应继续以致力于提高加工效率、优化产品质量作为发展目标。

同时，风险控制在预熟杂粮加工过程中扮演着至关重要的角色，在原料收购、加工、运输、销售等环节依然存在较多的潜在风险。对于预熟杂粮生产企业来说，应加强全链条的风险控制，有效解决原料农药残留、重金属残留等问题，从源头上保证杂粮原料的品质安全，确保一二三产业之间的信息畅通，实现“从农田到餐桌”的融合发展。从监管的角度来看，政府部门应加强对预熟杂粮产业的监督和管理，规范生产企业的生产行为，加强对生产过程和产品质量的监督检查，及时发现和处理违法违规行为。未来预熟杂粮行业的风险管理应从多方面入手，如通过引入智能化生产设备和实施严格的质量管理体系，来有效降低因人为操作不当或生产环境问题而引发的风险。

随着人们对健康、营养和便捷性的需求不断提升，预熟杂粮的加工方式和风险控制将随着市场需求的变化而不断演进和完善，加工技术和设备将更加智能化和自动化，以提高生产效率和产品质量。同时，风险控制方面将更加注重全程质量管理，强化原料采购、生产加工、产品检测等各个环节的监控和管控，以确保预熟杂粮产品的安全、健康和高品质。产业各方应共同努力，推动预熟杂粮加工行业朝着更加健康、环保和可持续的方向发展，为消费者提供更优质的预熟杂粮产品。

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

参考文献

[1] SALEH A S M, WANG P, WANG N, et al. Technologies for enhancement of bioactive components and potential health benefits of cereal and cereal-based foods: Research advances and application challenges[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2019, 59(2): 207−227.

[2] SARWAR M H, SARWAR M F, SARWAR M, et al. The importance of cereals (Poaceae: Gramineae) nutrition in human health: A review[J]. Journal of Cereals and Oilseeds, 2013, 4(3): 32−35.

[3] ZHANG S, HU J, SUN Y, et al. *In vitro* digestion of eight types of wholegrains and their dietary recommendations for different populations[J]. Food Chemistry, 2022, 370: 131069.

[4] WANG Y, QI W, GUO X, et al. Effects of oats, tartary buckwheat, and foxtail millet supplementation on lipid metabolism, oxido-inflammatory responses, gut microbiota, and colonic SCFA composition in high-fat diet fed rats[J]. Nutrients, 2022, 14(13): 2760.

[5] KEENAN J M, PINS J J, FRAZEL C, et al. Oat ingestion reduces systolic and diastolic blood pressure in patients with mild or borderline hypertension: A pilot trial[J]. Journal of Family Practice, 2002, 51(4): 369−370.

[6] WU W, QIU J, WANG A, et al. Impact of whole cereals and processing on type 2 diabetes mellitus: A review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2020, 60(9): 1447−1474.

[7] HE X, WU K, ZHANG X, et al. Dietary intake of fiber, whole grains and risk of colorectal cancer: An updated analysis according to food sources, tumor location and molecular subtypes in two large US cohorts[J]. International Journal of Cancer, 2019, 145(11): 3040−3051.

[8] XIE M, LIU J, TSAO R, et al. Whole grain consumption for the prevention and treatment of breast cancer[J]. Nutrients, 2019, 11(8): 17−69.

[9] 林金雪娇, 李爽, 范志红. 杂粮饭与慢性疾病预防的研究进展[J]. 中国食物与营养, 2020, 26(3): 81−85. [LIN J X J, LI S, FAN Z H. Research progress on mixed whole meals and chronic disease prevention[J]. China Food and Nutrition, 2020, 26(3): 81−85.]

[10] NERIN C, AZNAR M, CARRIZO D. Food contamination during food process[J]. Trends in Food Science & Technology, 2016, 48: 63−68.

[11] IBRAHIM O O. Introduction to hazard analysis and critical control points (HACCP)[J]. EC Microbiology, 2020, 16(3): 1−7.

[12] 陆湛溪. 无损预熟化红芸豆加工工艺研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2020. [LU Z X. Study on processing technology of non-destructive precooked red kidney beans[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2020.]

［13］曹格，陈楚瑶，韩永斌，等. 红豆预熟化工艺及理化性质的研究[J]. 粮油食品科技，2023，31(3)：24−32. ［CAO G，CHEN C Y，HAN Y B，et al. Study on the pre-cooking process and physico-chemical properties of red bean[J]. Cereals，Oils and Foodstuffs Science and Technology，2023，31(3)：24−32.］
［14］刘佳男，于雷，李帅斐，等. 薏仁与大米共煮同熟工艺的研究[J]. 粮食与油脂，2016，29(4)：62−67. ［LIU J N，YU L，LI S F，et al. Optimization of the process of cooking coix seed to reach same maturity when cooked with rice[J]. Grain and Oil，2016，29(4)：62−67.］
［15］ZHANG J，XIE X，ZHANG L，et al. Optimization of microwave precooked conditions for gelatinization of adzuki bean[J]. Foods，2022，11(2)：171.
［16］李晓蒙. 绿豆与大米共煮同熟工艺及其发酵酒的研究[D]. 长春：吉林农业大学，2016. ［LI X M. Study on co-cooking and cooked technology of mung bean and rice and its fermented wine[D]. Changchun：Jilin Agricultural University，2016.］
［17］王立东，张桂芳，包国凤. α-化快熟红小豆制备工艺研究及质构特性分析[J]. 农产品加工，2015(14)：43−46. ［WANG L D，ZHANG G F，BAO G F. Preparing technique of gelatinization fast-cooking red bean and texture properties analysis[J]. Agricultural Products Processing，2015(14)：43−46.］
［18］商红萍. 微波处理对食品营养成分的影响分析研究[J]. 现代食品，2020(1)：118−119，122. ［SHANG H P. Study on the effect of microwave treatment on the nutritional components of food[J]. Modern Food，2020(1)：118−119，122.］
［19］杜明珠，张一凡，付亮，等. 基于预熟化技术对黑豆与大米同煮同熟工艺优化的研究[J]. 农业科技与装备，2018(5)：54−61. ［DU M Z，ZHANG Y F，FU L，et al. Optimization of black beans and rice co-cooking process based on pre-ripening technology[J]. Agricultural Science and Technology and Equipment，2018(5)：54−61.］
［20］孙军涛，郅文莉，张智超，等. 薏米预熟化工艺研究[J]. 食品研究与开发，2021，42(1)：101−106. ［SUN J T，ZHI W L，ZHANG Z C，et al. Study on pre-ripening technology of coix seed[J]. Food Research and Development，2021，42(1)：101−106.］
［21］于雷，乔筱童，李晓蒙，等. 绿豆低压蒸煮工艺的优化研究[J]. 食品科技，2015，40(8)：161−166. ［YU L，QIAO X T，LI X M，et al. Optimization of low-pressure cooking technology of mung beans[J]. Food Science and Technology，2015，40(8)：161−166.］
［22］王俊国，汪鸿，耿浩源，等. 超高压处理对薏仁蒸煮及食用品质的影响[J]. 食品工业，2020，41(6)：36−39. ［WANG J G，WANG H，GENG H Y，et al. Effects of ultra-high pressure treatment on the cooking and quality of barley products[J]. Food Industry，2020，41(6)：36−39.］
［23］关桦楠，吴永存，张娜. 糙米蒸煮品质改良加工技术研究进展[J]. 粮食与油脂，2021，34(12)：26−28，40. ［GUAN H N，WU Y C，ZHANG N. Research progress on cooking quality improvement of brown rice[J]. Grain and Oil，2021，34(12)：26−28，40.］
［24］刘晓松，薛红梅，刘玉美，等. 杂粮营养健康冲调食品的研究[J]. 粮食科技与经济，2019，44(1)：69−73. ［LIU X S，XUE H M，LIU Y M，et al. Study on nutritious and healthy mixed food of miscellaneous grains[J]. Grain Science and Technology and Economy，2019，44(1)：69−73.］
［25］张颖，杨晓勇，王波，等. 营养重组米的研制[J]. 食品与发酵科技，2014，50(6)：36−39. ［ZHANG Y，YANG X Y，WANG B，et al. Development of nutritional recombinant rice[J]. Food and Fermentation Technology，2014，50(6)：36−39.］
［26］殷明，姜勇，王艳丽，等. 新型杂粮人造米的研制[J]. 宁夏农林科技，2013，54(1)：114−117. ［YIN M，JIANG Y，WANG Y L，et al. Development of new artificial rice with miscellaneous grains[J]. Ningxia Agriculture and Forestry Science and Technology，2013，54(1)：114−117.］
［27］蒋卉. 杂粮复合米方便米饭品质改良研究[D]. 武汉：武汉轻工大学，2013. ［JIANG H. Study on quality improvement of instant rice mixed with miscellaneous grains[D]. Wuhan：Wuhan University of Light Industry，2013.］
［28］刘淑婷，王颖，沈琰，等. 豆基杂粮米稀挤压膨化工艺优化[J]. 食品与机械，2019，35(10)：218−222. ［LIU S T，WANG Y，SHEN Y，et al. Optimization of extruded process for bean-based multigrain rice paste[J]. Food and Machinery，2019，35(10)：218−222.］
［29］赵红霞，王应强，马玉荷，等. 微波干燥条件对杏脯干燥特性与品质的影响[J]. 食品与机械，2023，39(4)：123−129. ［ZHAO H X，WANG Y Q，MA Y H，et al. Effects of microwave drying conditions on the drying characteristics and quality of preserved apricots[J]. Food and Machinery，2023，39(4)：123−129.］
［30］涂向辉，朱晶，许晓岚. 速食全谷物蒸米微波干燥工艺优化研究[J]. 农业科技与装备，2020(3)：43−45. ［TU X H，ZHU J，XU X L. Optimization of microwave drying technology for instant whole grain steamed rice[J]. Agricultural Science and Technology and Equipment，2020(3)：43−45.］
［31］张桂芳，张东杰，王立东，等. 速熟绿豆加工工艺的优化[J]. 食品工业科技，2017，38(11)：205−208. ［ZHANG G F，ZHANG D J，WANG L D，et al. Optimization of processing technology of instant mung beans[J]. Food Industry Science and Technology，2017，38(11)：205−208.］
［32］SHI Y，CAO G，LIU Y，et al. Effect of microwave and hot air drying on the quality of quick-cooking mung bean[J]. Food Materials Research，2023，3(1)：8.
［33］DIVEKAR M T，KARUNAKARAN C，LAHLALI R，et al. Effect of microwave treatment on the cooking and macronutrient qualities of pulses[J]. International Journal of Food Properties，2017，20(2)：409−422.
［34］王洪国. 杂粮与大米同熟工艺及产品研究[D]. 天津：天津科技大学，2019. ［WANG H G. Study on co-cooking technology and products of miscellaneous grains and rice[D]. Tianjin：Tianjin University of Science and Technology，2019.］
［35］GUO Q，SUN D W，CHENG J H，et al. Microwave processing techniques and their recent applications in the food industry[J]. Trends in Food Science & Technology，2017，67：236−247.
［36］耿铁，孟斐，杨卫东，等. 不同干燥技术在农产品干燥领域的研究进展[J]. 农产品加工，2022(14)：81−84. ［GENG T，MENG F，YANG W D，et al. Research progress of different drying technologies in the field of agricultural products drying[J]. Agricultural Products Processing，2022(14)：81−84.］
［37］吴练军. 方便杂粮粥配方设计及其工艺优化[D]. 重庆：西南大学，2018. ［WU L J. Formula design and process optimization of instant coarse cereal porridge[D]. Chongqing：Southwest University，2018.］
［38］王婷. 芸豆预熟化工艺及理化性质研究[D]. 长春：吉林农业大学，2017. ［WANG T. Study on pre-ripening technology and physical and chemical properties of kidney beans[D]. Changchun：Jilin Agricultural University，2017.］
［39］涂向辉，朱晶，许晓兰. 响应面分析法优化方便杂粮米饭热风干燥工艺[J]. 沈阳师范大学学报(自然科学版)，2017，35(2)：

198−203. [TU X H, ZHU J, XU X L. Optimization of hot air drying technology for instant coarse cereals rice by response surface analysis[J]. Journal of Shenyang Normal University (Natural Science Edition), 2017, 35(2): 198−203.]
[40] 许晓兰, 朱晶, 任建军. 方便杂粮米饭配方及主要工艺参数的优化设计[J]. 粮食科技与经济, 2015, 40(4): 54−57. [XU X L, ZHU J, REN J J. Optimization design of instant coarse cereal rice formula and main technological parameters[J]. Grain Science and Technology and Economy, 2015, 40(4): 54−57.]
[41] 楚倩倩, 任广跃, 段续, 等. 过热蒸汽和热风干燥在食品领域中的应用对比[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(16): 297−304. [CHU Q Q, REN G Y, DUAN X, et al. Comparison of application of superheated steam and hot air drying in food field[J]. Food and Fermentation Industry, 2022, 48(16): 297−304.]
[42] 王静, 张卫卫, 石勇, 等. 真空冷冻干燥技术对食品品质的影响[J]. 农产品加工, 2018(1): 36−38,42. [WANG J, ZHANG W W, SHI Y, et al. Effect of vacuum freeze-drying technology on food quality[J]. Agricultural Products Processing, 2018(1): 36−38,42.]
[43] 赵慧, 马牧然, 刘菲菲, 等. 冻干燕麦粥加工工艺优化及品质分析[J]. 食品工业, 2023, 44(7): 52−56. [ZHAO H, MA M R, LIU F F, et al. Processing technology optimization and quality analysis of freeze-dried oatmeal[J]. Food Industry, 2023, 44(7): 52−56.]
[44] 张智超, 李学进, 孙军涛, 等. 干燥方式对预熟化薏米品质影响[J]. 粮食与油脂, 2021, 34(4): 18−22,26. [ZHANG Z C, LI X J, SUN J T, et al. Effect of drying methods on the quality of precooked coix seed[J]. Grain and Oil, 2021, 34(4): 18−22,26.]
[45] 孙军涛, 李学进, 张智超, 等. 红豆预熟化干燥工艺研究[J]. 食品科技, 2019, 44(12): 218−223. [SUN J T, LI X J, ZHANG Z C, et al. Study on pre-curing and drying technology of red beans[J]. Food Science and Technology, 2019, 44(12): 218−223.]
[46] 巩僖. 快熟杂豆工艺研究[D]. 大连: 大连工业大学, 2019. [GONG X. Study on the technology of quick-cooked miscellaneous beans[D]. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2019.]
[47] 侯演林, 陈胜慧子, 蒲云峰, 等. 真空冷冻干燥及预处理方法应用研究进展[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(23): 203−208. [HOU Y L, CHEN S H Z, PU Y F, et al. Research progress of vacuum freeze-drying and pretreatment methods[J]. Food Research and Development, 2023, 44(23): 203−208.]
[48] 周頔, 王海鸥, 孙艳辉, 等. 不同前处理和冻结方式对苹果片真空冷冻干燥效率及干制品品质的影响[J]. 现代食品科技, 2016, 32(12): 218−224. [ZHOU D, WANG H O, SUN Y H, et al. Effects of different pretreatment and freezing methods on vacuum freeze-drying efficiency and quality of dried apple slices[J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(12): 218−224.]
[49] 李永富, 高纪儒, 杜艳, 等. 高温流化改善青稞米蒸煮品质及机理研究[J]. 中国粮油学报, 2022, 37(10): 116−123. [LI Y F, GAO J R, DU Y, et al. Study on the mechanism of improving the cooking quality of highland barley rice by high-temperature fluidization[J]. Chinese Journal of Cereals and Oils, 2022, 37(10): 116−123.]
[50] 滕菲, 李永富, 王莉, 等. 高温流化对黑米蒸煮品质的改良效果[J]. 中国粮油学报, 2017, 32(10): 21−27. [TENG F, LI Y F, WANG L, et al. Effect of high temperature fluidization on cooking quality of black rice[J]. Chinese Journal of Cereals and Oils, 2017, 32(10): 21−27.]
[51] 李永富, 介敏, 黄金荣, 等. 基于高温流化技术改良红小豆的蒸煮品质[J]. 食品科学, 2021, 42(9): 64−69. [LI Y F, JIE M, HUANG J R, et al. Improving the cooking quality of adzuki bean based on high-temperature fluidization technology[J]. Food Science, 2021, 42(9): 64−69.]
[52] 马万成, 杜艳, 张晶晶, 等. 基于自热米饭所需的高温流化全谷物筛选及配合技术研究[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(8): 101−108. [MA W C, DU Y, ZHANG J J, et al. Study on high-temperature fluidized whole grain screening and matching technology based on self-heating rice[J]. Food Research and Development, 2021, 42(8): 101−108.]
[53] 贾亚兵. 微波流化床在谷物干燥中的应用研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2018. [JIA Y B. Study on the application of microwave fluidized bed in grain drying[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2018.]
[54] SIVAKUMAR R, SARAVANAN R, PERUMAL A E, et al. Fluidized bed drying of some agro products-a review[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2016, 61: 280−301.
[55] 唐坤甜, 赵彩云, 谷方红. 中国大麦中赭曲霉毒素污染现状初探[J]. 浙江农业科学, 2011(1): 148−150. [TANG K T, ZHAO C Y, GU F H. Preliminary study on ochratoxin pollution in barley in China[J]. Zhejiang Agricultural Sciences, 2011(1): 148−150.]
[56] WU J, ZHAO R, CHEN B, et al. Determination of zearalenone in barley by high-performance liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detection and natural occurrence of zearalenone in functional food[J]. Food Chemistry, 2011, 126(3): 1508−1511.
[57] MOGARA I, SULYOK M, NEGEDU A, et al. 尼日利亚纳萨拉瓦州市售灌木芒果、腰果、秋葵、芝麻和高粱的真菌毒素污染情况研究[J]. 粮油食品科技, 2021, 29(6): 71−82,24-26. [MOGARA I, SULYOK M, NEGEDU A, et al. Study on mycotoxin pollution of shrubs mango, cashew nuts, okra, sesame and sorghum in Salava, Nigeria[J]. Cereals, Oils and Foodstuffs Science and Technology, 2021, 29(6): 71−82,24-26.]
[58] MARC R A. Implications of mycotoxins in food safety[M]. Mycotoxins and Food Safety-Recent Advances. IntechOpen, 2022.
[59] 胡佳薇, 乔海鸥, 田丽, 等. 2013-2016 年陕西省谷物及其制品中真菌毒素的污染状况[J]. 卫生研究, 2017, 46(6): 1013−1015. [HU J W, QIAO H O, TIAN L, et al. Contamination of mycotoxins in cereals and their products in Shaanxi Province from 2013 to 2016[J]. Health Research, 2017, 46(6): 1013−1015.]
[60] KUMAR A, PATHAK H, BHADAURIA S, et al. Aflatoxin contamination in food crops: Causes, detection, and management: A review[J]. Food Production, Processing and Nutrition, 2021, 3: 1−9.
[61] ZHAO T, SHEN X L, CHEN W, et al. Advances in research of nephrotoxicity and toxic antagonism of ochratoxin A[J]. Toxin Reviews, 2017, 36(1): 39−44.
[62] ZHANG H, HU Q B, LIU C L. Toxicity and mechanism of fumonisins[J]. Journal of Northwest A & F University-Natural Science Edition, 2016, 44(1): 162−176.
[63] MAHATO D K, DEVI S, PANDHI S, et al. Occurrence, impact on agriculture, human health, and management strategies of zearalenone in food and feed: A review[J]. Toxins, 2021, 13(2): 92−93.
[64] WEGULO S N. Factors influencing deoxynivalenol accumulation in small grain cereals[J]. Toxins, 2012, 4(11): 1157−1180.
[65] WANG Y, LIU Y, HUANG T, et al. Nrf2: A main responsive element of the toxicity effect caused by trichothecene (T-2) mycotoxin[J]. Toxics, 2023, 11(4): 393−394.
[66] STROKA J, GONALVES C. Mycotoxins in food and feed: An overview[J]. Encyclopedia of Food Chemistry, 2019: 401-419.

[67] LIU H, WHITEHOUSE C A, LI B. Presence and persistence of *Salmonella* in water: The impact on microbial quality of water and food safety[J]. Frontiers in Public Health, 2018, 6: 159.
[68] 段江丽, 胡汝源, 杨红菊. 大理州市售食品细菌性污染情况分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2017, 27(6): 869−871. [DUAN J L, HU R Y, YANG H J. Analysis of bacterial contamination in Dali market available food[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2017, 27(6): 869−871.]
[69] 罗华, 张林, 姜玲. 某地区 2010-2011 年各类食品细菌污染状况分析[J]. 中国农村卫生事业管理, 2013, 33(4): 431−433. [LUO H, ZHANG L, JIANG L. Analysis of bacterial contamination of various foods in a certain area in 2010-2011[J]. China Rural Health Management, 2013, 33(4): 431−433.]
[70] 王学硕, 崔生辉, 邢书霞, 等. 餐饮食品中沙门氏菌的危害分析、污染调查与防控[J]. 中国药事, 2013, 27(9): 974−979. [WANG X S, CUI S H, XING S X, et al. Hazard analysis, pollution investigation and prevention of *Salmonella* in catering food[J]. Chinese Pharmaceutical Affairs, 2013, 27(9): 974−979.]
[71] 王韬, 李红娜, 袁飞. 食源性金黄色葡萄球菌的危害及其快速检测方法研究进展[J]. 中国食品卫生杂志, 2022, 34(4): 856−859. [WANG T, LI H N, YUAN F. The harm of food-borne *Staphylococcus aureus* and its rapid detection methods[J]. China Journal of Food Hygiene, 2022, 34(4): 856−859.]
[72] 李俊红. 病原微生物对人体健康的危害及检测[J]. 农业开发与装备, 2016(4): 43. [LI J H. Harm and detection of pathogenic microorganisms to human health[J]. Agricultural Development and Equipment, 2016(4): 43.]
[73] SHARMA S K, WHITIN R C. Methods for detection of clostridium botulinum toxin in foods[J]. Journal of Food Protection, 2005, 68(6): 1256−1263.
[74] 李静雯, 陈尔凝, 康福英, 等. 食品中志贺氏菌快速检测免疫磁分离样品前处理技术研究[J]. 计量学报, 2023, 44(3): 326−333. [LI J W, CHEN E N, KANG F Y, et al. Study on the pretreatment technology of immuno-magnetic separation samples for rapid detection of *Shigella* in food[J]. Acta Metrology, 2023, 44(3): 326−333.]
[75] MENA K D, GERBA C P. Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water[J]. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 2009, 201: 71−115.
[76] DIETRICH R, JESSBERGER N, EHLING-SCHULZ M, et al. The food poisoning toxins of *Bacillus cereus*[J]. Toxins, 2021, 13(2): 98.
[77] 袁华平, 徐刚, 王海, 等. 食品中的化学性风险及预防措施[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(14): 3598−3602. [YUAN H P, XU G, WANG H, et al. Chemical risk and its preventive measures in food[J]. Journal of Food Safety and Quality Inspection, 2018, 9(14): 3598−3602.]
[78] VIKRAM N, KATIYAR S K, SINGH C B, et al. A review on anti-nutritional factors[J]. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 2020, 9(5): 1128−1137.
[79] SALIM R, NEHVI I B, MIR R A, et al. A review on anti-nutritional factors: Unraveling the natural gateways to human health[J]. Frontiers in Nutrition, 2023, 10: 1215873.
[80] MUNCKE J, ANDERSSON A M, BACKHAUS T, et al. Impacts of food contact chemicals on human health: A consensus statement[J]. Environmental Health, 2020, 19: 1−12.
[81] SAMTIYA M, ALUKO R E, DHEWA T. Plant food anti-nutritional factors and their reduction strategies: An overview[J]. Food Production, Processing and Nutrition, 2020, 2: 1−14.
[82] 李越佳. 豆制品中胰蛋白酶抑制剂活性测定方法的改进[J]. 中国食品添加剂, 2022, 33(7): 212−218. [LI Y J. Improvement of determination method of trypsin inhibitor activity in bean products[J]. China Food Additives, 2022, 33(7): 212−218.]
[83] THAKUR N S, KUMAR P. Anti-nutritional factors, their adverse effects and need for adequate processing to reduce them in food[J]. AgricINTERNATIONAL, 2017, 4(1): 56−60.
[84] 宋佳. 上海市郊区部分果蔬农药残留情况调查及清洗方法研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2015. [SONG J. Investigation on pesticide residues in some fruits and vegetables in Shanghai suburbs and study on cleaning methods[D]. Shanghai: Shanghai Jiaotong University, 2015.]
[85] DUBOVYK V. The use of pesticides and the hazards caused by pesticide residues[C]//LI F, LIU R. Fundamentals and applied problems of modern ecology and protection of the world: The International Scientific and Practical Conference. Sumy: Ivanchenko I. S. Publishing House, 2021: 105−106.
[86] AFONNE O J, IFEDIBA E C. Heavy metals risks in plant foods-need to step up precautionary measures[J]. Current Opinion in Toxicology, 2020, 22: 1−6.
[87] YADAV H, KUMAR R, SANKHLA M S. Residues of pesticides and heavy metals in crops resulting in toxic effects on living organism[J]. J Seybold Rep, 2020, 1533: 9211.
[88] 庞淑婷, 刘颖. 中外谷物及其制品中污染物限量要求分析[J]. 标准科学, 2021(3): 70−76. [PANG S T, LIU Y. Analysis of pollutant limit requirements in cereals and their products at home and abroad[J]. Standard Science, 2021(3): 70−76.]
[89] 李俊生, 郭小瑞, 綦峥. 谷物中重金属来源、检测技术及膳食风险研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(23): 141−147. [LI J S, GUO X R, QI Z. Advances in heavy metal sources, detection techniques and dietary risks in cereals[J]. Journal of Food Safety and Quality Inspection, 2023, 14(23): 141−147.]
[90] 张鑫鑫, 杨燕强, 花锦, 等. 小杂粮中重金属元素调查研究及健康风险评估[J]. 中国口岸科学技术, 2023, 5(3): 44−49. [ZHANG X X, YANG Y Q, HUA J, et al. Investigation and health risk assessment of heavy metals in minor cereals[J]. China Port Science and Technology, 2023, 5(3): 44−49.]
[91] BHAT S A, HASSAN T, MAJID S. Heavy metal toxicity and their harmful effects on living organisms-a review[J]. International Journal of Medical Science and Diagnosis Research, 2019, 3(1): 106−122.
[92] LA TORRE G, VITELLO T, COCCHIARA R A, et al. Relationship between formaldehyde exposure, respiratory irritant effects and cancers: A review of reviews[J]. Public Health, 2023, 218: 186−196.
[93] CHAHINE C R, EL-TERES F F, CHAHINE N R, et al. Effects of dishwashing detergents residues on redox status and cell proliferation in mice liver and kidney[J]. International Journal of Research in Medical Sciences, 2022, 10(8): 1606.
[94] SCIURBA J D, CHLIPALA G E, GREEN S J, et al. Evaluation of effects of laboratory disinfectants on mouse gut microbiota[J]. Comparative Medicine, 2021, 71(6): 492−501.
[95] ALAMRI M S, QASEM A A A, MOHAMED A A, et al. Food packaging's materials: A food safety perspective[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2021, 28(8): 4490−4499.
[96] ONG H T, SAMSUDIN H, SOTO-VALDEZ H. Migration of endocrine-disrupting chemicals into food from plastic packaging ma-

terials: An overview of chemical risk assessment, techniques to monitor migration, and international regulations[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2022, 62(4): 957−979.

[97] KATO L S, CONTE-JUNIOR C A. Safety of plastic food packaging: The challenges about non-intentionally added substances (NIAS) discovery, identification and risk assessment[J]. Polymers, 2021, 13(13): 2077.

[98] 吴林海. 食品安全风险: 引发因素、传导机制、演化特征及治理[J]. 江西社会科学, 2023, 43(9): 176−186. [WU L H. Food safety risk: Triggering factors, transmission mechanism, evolution characteristics and governance[J]. Jiangxi Social Sciences, 2023, 43(9): 176−186.]

[99] SINGH P K, SINGH R P, SINGH P, et al. Food hazards: Physical, chemical, and biological[M]. Food Safety and Human Health. Academic Press, 2019: 15−65.

[100] LEBELO K, MALEBO N, MOCHANE M J, et al. Chemical contamination pathways and the food safety implications along the various stages of food production: A review[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2021, 18(11): 5795.

[101] 金柯男, 朱广潮, 程代, 等. 肉类预制菜的安全与控制研究进展[J]. 现代食品科技, 2023, 39(2): 110−118. [JIN K N, ZHU G C, CHENG D, et al. Research progress on safety and control of pre-prepared meat dishes[J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(2): 110−118.]

[102] TOMPKIN R B. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment[J]. Journal of Food Protection, 2002, 65(4): 709−725.

[103] ACKERLEY N, SERTKAYA A, LANGE R. Food transportation safety: Characterizing risks and controls by use of expert[J]. Food Protection Trends, 2010, 30(4): 212−222.

[104] 韦海燕. 食品供应链质量安全保障体系研究[J]. 食品安全导刊, 2021, (24): 13,15. [WEI H Y. Research on quality and safety guarantee system of food supply chain[J]. Food Safety Guide, 2021, (24): 13,15.]

[105] 成黎. 食品原料安全与初加工食品质量安全控制——以新鲜蔬菜的质量控制为例[J]. 食品科学, 2015, 36(5): 266−273. [CHENG L. Quality and safety control of raw materials and fresh and primarily processed products: Fresh vegetable quality control[J]. Food Science, 2015, 36(5): 266−273.]

李铃东, 陈军, 韩嘉龙, 等. 大米蛋白肽的制备、脱苦及生物活性研究进展 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 409−418. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023120232

LI Lingdong, CHEN Jun, HAN Jialong, et al. Research Progress on the Preparation, Debitterness and Biological Activity of Rice Protein Peptides[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 409−418. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023120232

· 专题综述 ·

大米蛋白肽的制备、脱苦及生物活性研究进展

李铃东[1], 陈　军[1,2,3], 韩嘉龙[1], 宋瑞玉[1], 耿　勤[1], 李　俶[1,2], 刘成梅[1], 戴涛涛[1,2,*]

（1.食品科学与资源挖掘全国重点实验室, 南昌大学, 江西南昌 330047;
2.江西南大国创院食品科技有限公司, 江西南昌 330200;
3.江西恒顶食品有限公司, 江西宜春 331100）

摘　要: 大米蛋白肽因具有高营养价值、高消化率、低过敏性和多种生理调节作用，而受到国内外研究学者的普遍关注。本文结合近年来大米蛋白肽的研究进展，综述了大米蛋白肽的制备方法、分离纯化技术和苦味改善策略等相关研究结果，总结了大米蛋白肽的抗氧化、降血压、免疫调节和降血糖等生物活性，介绍了其在食品领域的应用前景，并对未来的研究方向进行了展望，旨在为大米蛋白肽的开发和实际生产运用提供理论依据。

关键词: 大米蛋白肽, 制备, 分离纯化, 脱苦, 生物活性

中图分类号: TS210.1　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2024)21−0409−10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023120232　　本文网刊:

Research Progress on the Preparation, Debitterness and Biological Activity of Rice Protein Peptides

LI Lingdong[1], CHEN Jun[1,2,3], HAN Jialong[1], SONG Ruiyu[1], GENG Qin[1], LI Ti[1,2], LIU Chengmei[1], DAI Taotao[1,2,*]

（1.State Key Laboratory of Food Science and Resources, Nanchang University, Nanchang 330047, China;
2.International Institute of Food Innovation Co., Ltd., Nanchang University, Nanchang 330200, China;
3.Jiangxi Hengding Food Co., Ltd., Yichun 331100, China）

Abstract: Rice protein peptide has been widely concerned by researchers at home and abroad, because of its high nutritional value, high digestibility, hypoallergenicity and various physiological regulation functions. Based on the research progress of rice protein peptides in recent years, this paper reviews the preparation methods, separation and purification techniques and bitter taste improvement strategies of rice protein peptides. And summarizes the biological activities of rice protein peptides such as antioxidant, blood pressure lowering, immunomodulatory and hypoglycemic activities, introduces its application prospect in the field of food, and prospects the future research direction. The aim is to provide theoretical basis for the development and practical production of rice protein peptide.

Key words: rice protein peptides; preparation; separation and purification; debitterness; biological activity

中国是世界上稻谷产量最丰富的国家, 据国家统计局统计, 中国 2023 年稻谷产量高达 2.066 亿吨。大米蛋白是对来自稻谷中的蛋白质的总称, 约占稻谷质量的 8%, 是稻谷中第二丰富的成分, 主要来源为大米淀粉加工副产物、大米淀粉糖浆加工副产物和米糠。大米蛋白是一种优质营养的植物蛋白, 具

收稿日期: 2023−12−22
基金项目: 江西省“双千计划”创新领军人才长期（青年）项目（jxsq2023101076）。
作者简介: 李铃东（1998−）, 男, 硕士研究生, 研究方向: 植物蛋白开发与利用, E-mail: lingdong0510@163.com。
*** 通信作者:** 戴涛涛（1991−）, 男, 博士, 讲师, 研究方向: 农副产品综合利用, E-mail: ncubamboo@163.com。

有高营养价值、高消化率和低过敏性等特点，其生物价为 77，远高于小麦蛋白(67)和玉米蛋白(60)等常见谷类植物蛋白，可以和酪蛋白(73)、乳清蛋白(104)等动物蛋白相媲美[1−3]。另外，赖氨酸作为大米蛋白等谷类植物蛋白的第一限制性氨基酸，其含量高达 38 mg/g 蛋白质，远超玉米蛋白(25 mg/g 蛋白质)和小麦蛋白(23 mg/g 蛋白质)，这使大米蛋白具有合理的氨基酸配比[1−2]。此外，大米蛋白还具有多种生理调节作用，例如降胆固醇、抗癌变和降血糖等功效[4]。目前，科研学者对大米蛋白展开了一系列研究，使其在食品添加剂、高蛋白营养粉、含蛋白饮品、可食用性涂膜、生物活性肽等方面得到了广泛应用[5]。

2017 年，国家发展改革委员会提出鼓励研究开发功能性蛋白和生物活性肽；且在《2023 研究前沿》报告中，食物蛋白生物活性肽的结构与功能的研究被评为农业科学、植物学和动物学领域的 Top10 前沿热点，表明肽的生物活性研究与开发是发展趋势。肽是一类优质蛋白来源，适合多种人群补充蛋白质，其不仅具有易消化吸收、低致敏性、低渗透压和高溶解性等优点，还具有多种生理调节作用。并且在 GB 29922-2013《食品安全国家标准 特殊医学用途配方食品通则》和 GB 24154-2015《食品安全国家标准 运动营养食品通则》中均指出，肽类可在食品中作为一种蛋白质来源被推荐使用。由此可见，肽类具有较高的实际应用价值。大米蛋白肽是以米渣、米糠或大米蛋白等为原料制成的相对分子质量低于 10 kDa 的肽混合物，属于高附加值产品，具有高营养、易吸收、抗氧化、降血压、免疫调节和抗疲劳等多种生物活性[6]。为了解近年来大米蛋白肽的研究进展，本文介绍了大米蛋白肽的制备方法、分离纯化技术、苦味改善、生物活性以及在健康食品领域的应用前景，以期为大米蛋白肽的制备和生物活性研究提供一定的借鉴。

1 大米蛋白肽的制备与分离纯化

1.1 大米蛋白肽的制备

植物源多肽的制备方法主要有直接提取法、化学合成法、酸碱水解法、微生物发酵法和酶水解法。直接提取法存在化学试剂消耗大、污染环境、设备成本高等缺点，同时天然多肽的量较少，提取率低，难以满足人们的需求，故实际生产上应用限制较多[7]。化学合成法虽能定向合成目的肽，但存在成本较高、副反应多、收益率低等问题，通常不应用于实际的工业生产[8]。酸碱水解法不仅反应难以控制，而且会产生致癌性和毒性物质，破坏氨基酸，造成营养损失，故也难以用于实际生产[9]。微生物发酵法制备的多肽具有口感好、成本低、产率高等优点，但也存在发酵时间长和易受微生物污染等安全性问题，对生产环境和工艺要求较高。而酶水解法具有绿色安全、水解易控制、生产条件温和、生产成本低和易规模化生产等特点，故在实际生产和研究中应用最广[10]。因此，在健康食品领域，大米蛋白肽的制备方法主要有酶水解法和微生物发酵法。

1.1.1 酶水解法　酶水解法更适合于大米蛋白肽的工业化生产，是目前生产和研究上最常用的方法。酶水解法制备大米蛋白肽的关键性工艺是酶解，在酶解过程中，蛋白酶按其特异的酶切位点作用于蛋白质分子，将其切割成不同的肽段。故蛋白酶的选择至关重要，不同的酶其酶活化中心、水解专一性不同，酶解形成的肽段长短、序列和功能特性等不同，如胰蛋白酶是一种特异性蛋白酶，可以对精氨酸和赖氨酸的羧基末端进行高效水解[11]。且即便是相同的酶，不同的酶解条件也会导致水解效率不同。

熊尉杰[12] 以米渣蛋白为底物，研究了碱性蛋白酶、中性蛋白酶、胃蛋白酶和胰蛋白酶四种酶对其酶解能力，研究结果发现碱性蛋白酶酶解效果最好，蛋白提取率(48.5%)和水解度(9.44%)最高。Onsaard 等[13] 利用碱性蛋白酶、风味蛋白酶和 α-胰凝乳蛋白酶对提取的米糠蛋白进行酶解，发现 α-胰凝乳蛋白酶组的酶解度(44%)高于其他蛋白酶组，而碱性蛋白酶组的总必需氨基酸(134.65 mg/kg)含量最高。单独使用一种蛋白酶酶解制备大米蛋白肽，存在酶解时间长、效率低和酶的作用位点单一等缺点。

为了克服单一酶解法的不足，科研学者提出采用两种酶甚至多种酶组合酶解，这一方法不仅能够提高酶解效率，缩短酶解时间，还能提高蛋白肽得率。徐珍珍等[14] 采用碱性蛋白酶与蛋白酶 B 复合来酶解大米蛋白，制备得到蛋白回收率(43.9%)高、肽含量(80.3%)高、风味较好的大米蛋白肽。杨亚强[15] 对比了胰蛋白酶、中性蛋白酶和风味蛋白酶三种酶按不同比例复配酶解米渣蛋白制备大米蛋白肽的效果，研究发现胰蛋白酶与中性蛋白酶和风味蛋白酶的复配比例为 2∶5∶1 时结果最好，水解度、蛋白回收率和短肽含量分别为 15.22%、46.53%、86.00%，氨基酸配比也合理。

另有研究发现，即使是相同的两种酶，不同的酶解路线制备的蛋白肽的性质也会有所差异。目前关于大米蛋白肽的研究较少，李铃东等[16] 对双酶不同酶解路线制备的大米蛋白肽进行研究，结果表明不同的酶解路线会影响大米蛋白肽的蛋白回收率、水解度、基本成分、微观结构、肽含量、氨基酸组成、风味和抗氧化活性。而在其他蛋白肽上有较多研究，如宋永康等[17] 对豆粕蛋白进行双酶分步和同步酶解，研究发现分步酶解的水解度、蛋白质利用率、多肽得率和寡肽得率高于同步酶解。王宇飞[18] 对小麦醇溶蛋白进行双酶不同路线酶解，研究发现同步酶解降低小麦醇溶蛋白致敏性效果更佳。

1.1.2 微生物发酵法　微生物发酵法的实质是微生物生长产生的蛋白酶在起作用，通过微生物蛋白酶的作用将蛋白质水解成长短不一的肽段。与酶水解法

相比，微生物发酵法将微生物产酶和酶解合二为一，省去了蛋白酶的分离提纯步骤，降低了成本。微生物发酵法制备大米蛋白肽的关键工艺包括生产菌种、发酵和后提取，其中生产菌种是关键，如何诱变选育高产菌株是重点。

廖卢艳等[19]以米渣为原料，采用枯草芽孢杆菌发酵制备的肽产物具有较强的还原能力，肽产物浓度为 1 mg/mL 时还原力为 1.907。魏明等[20]利用米曲霉对米糠进行发酵制备米糠肽，其多肽含量为 128.4 mg/g，且对羟基自由基具有较佳的清除能力，当多肽浓度为 2.5 mg/mL 时，对羟基自由基的清除率达 86.2%。刘颖等[21]采用枯草芽孢杆菌和黑曲霉复合发酵米糠制备 ACE 抑制肽，制得肽的 ACE 抑制活性高达 64.48%。然而微生物代谢机理复杂，还会产生大量的初级代谢产物和次级代谢产物，使得蛋白质水解产物的分离纯化难度进一步加大[9]，因此微生物发酵法的大规模工业化应用面临较大的挑战。

1.2　大米蛋白肽的分离纯化

在大米蛋白肽的制备过程中，将水解得到的肽从溶液体系中分离出来是提高纯度的关键步骤。以酶解法来说，大米蛋白经蛋白酶酶解后，溶液中除含有目标产物肽以外，还有一些未酶解完全的不溶性蛋白和其他不溶性固形物，以及一些可溶性盐。通过简单的离心可以去除溶液中的不溶性蛋白和其他杂质，这一工艺在实验室常用的为落地式离心机，工业生产上常用的有卧式离心机、碟式离心机和管式离心机。离心是大米蛋白肽制备中必不可少的分离技术，实现了大米蛋白肽溶液的粗分离。除了最基础的离心之外，大米蛋白肽的分离纯化技术主要包括膜分离技术和色谱分离技术。

膜分离技术是不同粒径分子的混合物在压力差、浓度差和电位差等外界能量位差推动下通过半透膜，从而使其分离、分级、提纯或富集。按照推动力和分离膜孔径的不同可以将膜分离技术分为：微滤、超滤、纳滤、反渗透和电渗析等。膜分离通常在常温下进行，无相态变化、无化学变化、选择性好、适应性强，因而是一种兼备节能、高效、简单、易于操作等特点的高新技术，被公认为是未来最有发展前景的技术之一[22]。其中，超滤以其操作简单、能耗低、环保的优势被广泛应用于大米蛋白水解物或肽的分离纯化。图 1 为蛋白酶解产物的超滤分级流程图。在大米蛋白肽的研究中，采用超滤膜对其进行分

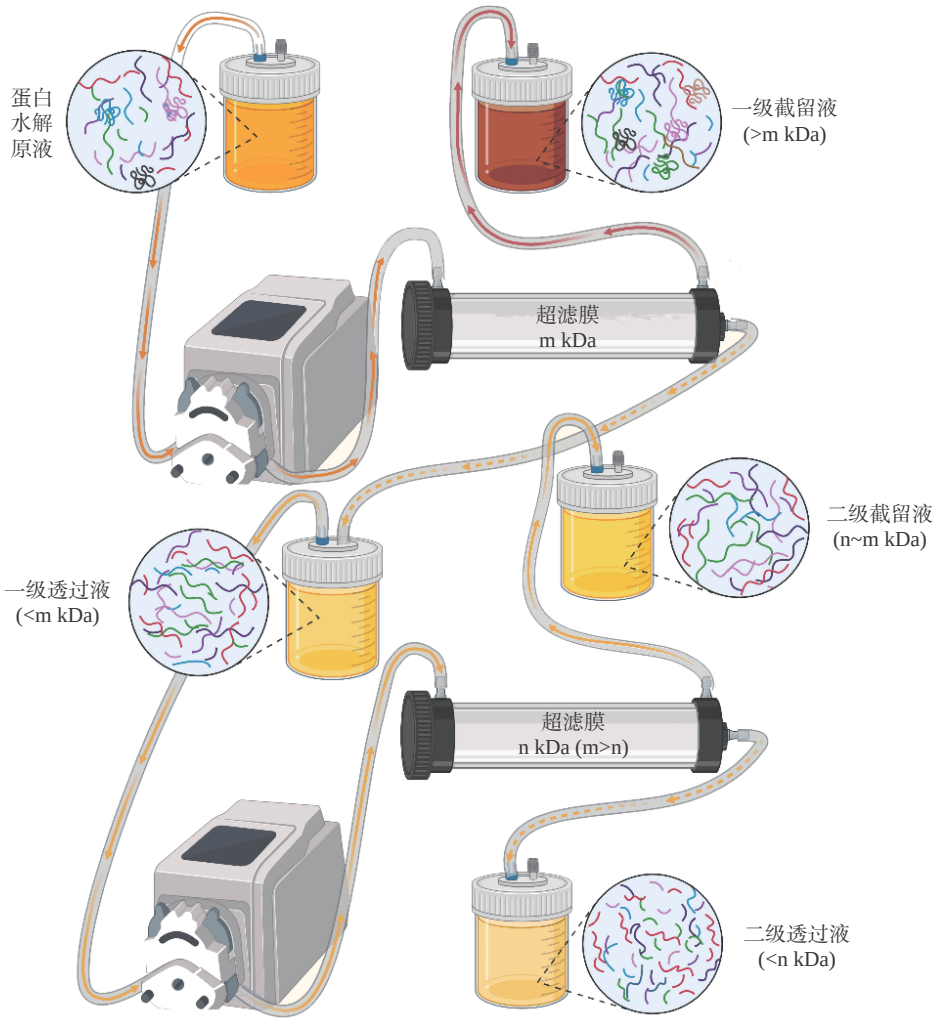


图 1　蛋白水解物的超滤分级流程图

Fig.1　Flow chart of ultrafiltration fractionation of protein hydrolysates

离纯化的报道较多。蔡俊[23]采用分子截留量为 3 kDa 和 10 kDa 的超滤膜分离大米蛋白酶解液，对酶解产物及 3 种大米肽组分的抗氧化活性进行研究，发现分子量小于 3 kDa 的组分抗氧化活性最强。谯飞[24]采用分子截留量为 1 kDa 和 3 kDa 的超滤膜对大米蛋白肽进行分离，研究发现分子量截留量为 1 kDa 超滤膜的截留率高达 89.29%。Song 等[25]采用分子截留量为 1 kDa 和 3 kDa 的超滤膜对双酶法制备的大米蛋白肽进行分离，并对大米蛋白肽和各超滤组分的理化性质和体外生物活性展开研究，结果表明大米蛋白肽和各超滤组分均具有抗氧化活性、血管紧张素转换酶抑制活性、α-葡萄糖苷酶抑制活性和乙醇脱氢酶激活活性。

色谱分离技术是基于待分离物质的溶解性、电荷性、疏水性、分子量大小或亲和特异性等方面的差异而使各组分得以分离的方法。常用于大米蛋白肽分离纯化的色谱分离技术有大孔吸附树脂色谱、离子交换色谱、凝胶渗透色谱和反相高效液相色谱等，以上方法的分离纯化机理各不相同，同时也存在不同的优缺点[26]。在实际操作中，往往采用多种色谱联用来达到高度纯化的目的，表 1 列举了部分常用分离纯化技术的特点。Chen 等[27]采用 DA201-C 大孔吸附树脂对大米蛋白酶解产物进行分离纯化，采用 25%、50%、75% 和 95% 的乙醇进行阶段洗脱，发现 50% 乙醇洗脱组分有较好的 ACE 抑制活性，其半抑制浓度（IC_{50}）为 0.17 mg/mL；刘晶等[28]采用 SuperdexTM Peptide 10/300 GL 凝胶色谱柱和 Zorbax SB-C_{18} 反相高效液相色谱柱对米渣肽进行纯化，得到 1 条具有抗疲劳效果和高抗氧化活性的肽（Gln-Ser-Pro-Glu-Ile）。王戈莎[29]采用 D201 强阴离子交换树脂为载体进行大米多肽和糖的分离，最终蛋白回收率为 98.2%，脱糖率为 84.3%。封张萍[30]采用 DA201-C 大孔树脂脱盐和 Sephadex G-25 凝胶层析对大米 ACE 抑制肽进行分离纯化，得到 ACE 抑制率达 87.07% 的肽组分。

2 大米蛋白肽的苦味及脱除方法

市面上的蛋白肽产品多具有消费者难以接受的苦味，这是由于在加工过程中，产生了一些含有疏水性氨基酸残基的苦味肽，从而导致苦味的产生。为了解决蛋白肽的苦味，许多研究学者对苦味的影响因素展开研究，发现肽的苦味与肽的疏水性、序列、水解度和分子量等[31]有关。Ney[32]提出 Q 值规则来判断肽是否具有苦味，但无法判断苦味的强弱，且只适用于相对分子质量小于 6 kDa 的多肽。多肽 Q 值高于 1400 kcal/mol 时呈现出苦味，低于 1300 kJ/mol 时无苦味。更有研究表明，疏水性氨基酸在肽链末端的占比越高，肽的苦味就越强[33]。Adler-Nissen[34]指出肽的苦味与水解度的关系，在低水解度时无苦味，若继续水解，苦味将随着水解度的增加而增加，但达到某一值后，其苦味又会下降，这是因为在深度水解下，苦味肽被进一步水解成低分子量肽段或游离氨基酸，导致苦味降低。Cho 等[35]研究表明肽的苦味与分子量有关，在一定范围内，肽的苦味随着分子量的下降而上升，而随着分子量的进一步降低，肽的苦味又会下降，这一结果与 Adler-Nissen 提出的苦味与水解度的关系一致。

大米蛋白肽作为典型的植物蛋白肽，也具有令人不适的苦味。目前，降低肽苦味的方法主要有选择性分离法、外切酶法、微生物发酵法和包埋掩盖法等[36]。选择性分离法是指采用萃取、吸附、色谱分离、等电点沉淀和超滤分离等方法来去除蛋白水解物中的疏水性苦味肽，但是该方法会去除疏水性多肽和氨基酸，导致多肽的营养价值和生物活性降低[37]。外切酶法是通过氨肽酶或羧肽酶切断多肽链末端的部分疏水性氨基酸残基实现脱苦，但此法会在脱苦的同时产生游离氨基酸[38]。微生物发酵法是通过自然界中的一些微生物来产生肽酶实现脱苦，如细菌、霉菌、酵母等均具有脱苦的效果[39]，微生物可提供不同的产酶系统且自身能快速生长，具有高脱苦效率的潜力，目前研究仍在集中寻找和筛选安全合适的菌株[37]。包埋掩盖法是指在蛋白水解物中加入掩盖剂，例如 β-环糊精、柠檬酸、苹果酸、甘氨酸、谷氨酸钠等。常用的 β-环糊精具有亲水性外表面和疏水性内腔，通过与氨基酸之间形成包合物包裹疏水性苦味肽，以减低苦味[40]。

目前实际生产中包埋掩盖法是消除肽苦味的便捷且常用的方法，因为该方法可直接将苦味物质包埋起来，防止苦味物质溶解，避免与苦味受体相结合，干扰与神经中枢的联系，从而不表现出苦味。胡炜等[41]通过添加 β-环糊精改善大米蛋白肽的苦味，研究确定 β-环糊精脱苦大米蛋白肽的最佳工艺条件为：每克大米蛋白肽添加 β-环糊精 0.30 g，反应温度

表 1 常见分离纯化技术的特点

Table 1 Characteristics of common separation and purification techniques

分离纯化方法	特点	主要适用范围
膜分离技术	效率高，选择性好，处理过程中样品不易失活且回收率高	初级分离，主要用于不同分子量蛋白多肽的分离
离子交换色谱	分辨率高，交换容量高，色谱可选择的条件多，蛋白多肽的回收率高	高效分离，应用广泛，只需样品在溶液中能形成离子状态
凝胶过滤色谱	实验操作简单，分离条件温和，溶质回收率高，分离过程中蛋白多肽不易变性，能根据样品分子体积大小选择填料	高效分离，通常应用在纯化工艺的后续步骤
反相高效液相色谱	分辨率高，速度快，重复性好，适用面广，灵敏度高	主要用于分子量小于5 kDa，尤其是1 kDa以下非极性多肽的分离纯化

30 ℃，pH 6.0，反应时间 70 min。Qin 等[42] 研究发现来自犬链霉菌 T20 的氨肽酶（ScAP）对大米肽具有显著的脱苦效果，在最佳条件下（50 ℃ 下，添加 0.048% 的 ScAP 反应 6 h），其苦味强度评分降低了 49.0%。胡勤玲等[43] 利用风味酶、活性炭、β-环状糊精对大米蛋白水解液进行脱苦，研究发现这 3 种方法都有较好的脱苦效果。

3　大米蛋白肽的生物活性

大米蛋白肽不仅能为人体提供营养，而且还具有调节机体免疫、促进矿物质吸收、清除体内过多自由基等作用，为人体预防疾病和维持健康具有重要影响。现有研究表明，大米蛋白肽具有多种生物活性，包括抗氧化、降血压、免疫调节、降血糖、抗疲劳和抗癌变等（图 2）。

图 2　大米蛋白肽的生物活性

Fig.2　Biological activity of rice protein peptides

3.1　抗氧化

当人体自由基产生量大于自身清除自由基能力时，会发生氧化应激反应，过量的自由基会造成氧化损伤，氧化损伤与衰老、癌症、心脑血管疾病、阿尔茨海默氏症等神经性退行疾病息息相关[44]。大量研究表明，大米蛋白肽具有较好的抗氧化能力，能清除自由基和螯合金属离子等。有学者研究了不同来源制备的大米蛋白肽的抗氧化特性，赵佳佳[45] 对比三种不同来源的大米蛋白肽的抗氧化活性，发现籼米蛋白肽清除 DPPH 自由基、超氧阴离子自由基和羟基自由基的 IC_{50} 值最低，抗氧化活性最高，而糯米蛋白肽清除自由基的 IC_{50} 值远大于籼米、粳米蛋白肽，抗氧化活性最低。另外关于选用蛋白酶酶解得到的大米蛋白水解物也有较多相关报道，Ren 等[46] 采用不同蛋白酶酶解米糠蛋白，发现胰蛋白酶酶解产物拥有较高的 Fe^{2+} 螯合能力（IC_{50} 为 2.271±0.007 mg/mL）、DPPH 和羟基自由基清除能力（IC_{50} 为 0.191±0.006 和 1.038±0.034 mg/mL）。Zaky 等[47] 采用四种不同的蛋白酶对米糠蛋白进行酶解，研究发现风味蛋白酶酶解 2 h 获得的米糠蛋白水解物具有最高的抗氧化活性。Zhang 等[48] 采用中性蛋白酶酶解大米蛋白，其酶解产物对 DPPH 自由基清除活性远高于经碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶和风味蛋白酶处理的产物。Song 等[25] 对胰蛋白酶和碱性蛋白酶复合制备的大米蛋白肽进行超滤分离，研究发现分子量大于 3 kDa 的组分具有最强的 DPPH 自由基清除活性。同时研究表明分子量不同对于大米蛋白肽的抗氧化能力有所差异。Chen 等[49] 探究分子量对大米蛋白水解物抗氧化能力的影响，研究发现分子量小于 1 kDa 的肽具有更佳的抗氧化活性，其 DPPH 自由基清除能力的 IC_{50} 为 26.7±1.13 mg/mL。此外，有研究对大米蛋白肽开展动物实验和细胞抗氧化实验，Yue 等[50] 的研究发现大米蛋白酶解物补充饮食饲养的果蝇具有更高的平均寿命和更高的超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性。王玉倩[51] 研究发现大米活性肽可以通过调节细胞内的氧化水平延缓 D-半乳糖诱导的小鼠的衰老进程，并且在秀丽隐杆线虫衰老模型中表现出良好的抗衰老功效。Fang 等[52] 通过细胞抗氧化实验、巨噬细胞增值和吞噬功能测定，发现较高浓度的富硒大米蛋白胰蛋白酶酶解物具有较高的抗氧化和免疫调节活性，且富硒大米蛋白肽的抗氧化活性与其免疫调节活性成正相关。

总体而言，关于大米蛋白肽的抗氧化活性研究一直是较为关注的问题，研究人员从蛋白来源、分子量、酶解路线等方面开展研究。目前关于大米蛋白肽抗氧化活性的原因可能是因为大米蛋白肽中的部分组分是其潜在的主要抗氧化成分，通过清除自由基和螯合金属离子来降低氧化应激水平，提高抗氧化酶活性，同时刺激机体中一系列基因的上调表达以激活受体表面的抗氧化通路，这一方法有可能是通过大米蛋白肽上调通路中相关调控因子的蛋白表达水平实现的。但是大米蛋白肽调控机体的抗氧化机能是一个十分复杂的代谢过程，且在实验开展中体外与体内实验存在一定偏差，这是因为一些大分子肽在进入机体后被胃肠道中的消化酶进一步水解，导致部分肽活性丧失，因此大米蛋白肽的抗氧化活性机理仍需进一步深入解析和阐明。

3.2　降血压

血管紧张素 I 转换酶（ACE）是一种多功能锌金属肽酶，在调节血压方面起着重要的生理作用，主要作用于肾素-血管紧张素系统[53]。ACE 能催化血管紧张素从无活性的十肽（血管紧张素 I）转化为强效的血管收缩剂八肽（血管紧张素 II），并使降压血管扩张剂缓激肽失活[54]。目前，ACE 抑制活性被广泛应用于降血压活性的体外评价[55−57]。近年来，大量研究表明大米蛋白肽具有一定的 ACE 抑制活性，具有作为预防和治疗高血压替代疗法的潜力。

Wang 等[58] 的研究表明，用胰蛋白酶水解米糠蛋白获得分子量小于 4 kDa 水解产物的 ACE 抑制

活性(IC_{50} 值为 300 mg/mL)最强，且可显著降低自发性高血压大鼠收缩压和舒张压。Uraipong 等[57] 将米糠蛋白按溶解性划分，并分别采用四种蛋白酶进行水解，结果显示米糠蛋白水解物具有明显的 ACE 抑制活性，其中复合蛋白酶-白蛋白酶解物的 ACE 抑制活性最高，其 IC_{50} 值为 5.2 mg/mL。封张萍[30] 采用胰蛋白酶酶解大米蛋白制备 ACE 抑制肽，通过分离纯化得到 ACE 抑制率达 87.07% 的组分。刘志国等[59] 用多种蛋白酶酶解米糠蛋白，发现胃蛋白酶联合胰蛋白酶酶解的组分 ACE 抑制活性最高。Dong 等[60] 研究发现大米肽能够降低自发性高血压大鼠的收缩压，且呈时间剂量依赖性，大剂量大米肽可使单次灌胃和长期灌胃后大鼠的收缩压分别降低 24.6 mmHg 和 17.2 mmHg。此外，研究发现大米蛋白肽具有降血压作用可能是因为该多肽序列中氨基酸残基序列符合 ACE 抑制活性的构效分析[14]。前人研究发现在多肽序列中含有疏水性氨基酸有利于与 ACE 分子催化活性中心结合，起到 ACE 抑制作用[61]。邹俊哲等[62] 也发现经植物乳杆菌和蛋白酶协同发酵水解得到的大米蛋白水解物具有显著的 ACE 抑制活性，且该多肽序列中的氨基酸均为疏水性氨基酸。

3.3 免疫调节活性

目前研究大米蛋白肽具有免疫调节活性研究主要集中于对动物和细胞模型的免疫调节效果，并主要从分子量、肽序列等角度分析大米蛋白肽的内在作用机制。王璐[63] 通过考察 9 种蛋白酶酶解制备大米蛋白肽的巨噬细胞增殖指数(SI)值、相对分子量分布及活性肽得率，研究结果表明胰蛋白酶是制备大米免疫活性肽的最佳酶。陈月华[64] 通过建立脂多糖(LPS)诱导的 RAW 264.7 细胞炎症模型，从蛋白和基因双层面阐明大米酶解肽 RPHs-C-7-3 对炎症因子的抑制作用，证明了其免疫活性，最后从细胞水平阐述了大米酶解肽 RPHs-C-7-3 的免疫活性机理是通过抑制巨噬细胞内 MAPK 通路中的 EPK 的磷酸化作用来影响该通路，最终实现免疫调节功能。Feng 等[65] 利用胰蛋白酶酶解三种不同类型的富硒糙米蛋白，经过透析和超滤，得到了不同分子量的多肽组分，并采用 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞模型进行体外实验，结果表明，1.0~3.5 kDa 肽段通过抑制 NO、PGE2 和促炎因子的产生表现出有效的抗炎作用。Xu 等[66] 采用胰蛋白酶酶解大米蛋白制备免疫调节肽，并用小鼠腹腔巨噬细胞增殖试验验证了其免疫调节活性，并通过大孔吸附树脂、强阳离子交换色谱、凝胶过滤色谱和反相高效液相色谱对活性最高的肽段进行进一步纯化。经高效液相色谱-电喷雾电离四极杆飞行时间质谱仪鉴定得肽序列为 Tyr-Gly-Ile-Tyr-Pro-Arg(YGIYPR)。结果表明，YGIYPR 在 12.5~100 μg/mL 范围内均能促进巨噬细胞 RAW 264.7 的增殖。Fang 等[67] 同样采用 RAW264.7 细胞模型，从富硒大米蛋白水解物中筛选出具有免疫调节作用的蛋白肽。

大米蛋白肽的免疫调节是一个复杂的作用机理，目前许多研究仍停留在细胞和分子水平开展研究，对于体内实验仍缺乏大量可靠的数据结果支撑。但是上述的研究结果认为经胰蛋白酶水解后得到的产物中可筛选出具有高免疫活性的蛋白肽，并且该大米免疫活性肽主要是通过增强巨噬细胞活性促进细胞活化和增殖，提高其吞噬、杀伤病原体的能力，同时也会影响巨噬细胞中的通路最终实现免疫调节功能。

3.4 降血糖活性

糖尿病是一种由代谢紊乱引起的慢性疾病，以高血糖为主要特征，其中Ⅱ型糖尿病为最常见类型，占糖尿病患者的 90% 以上[68]。糖尿病常见的治疗靶点包括二肽基肽酶-IV(DPP-IV)、胰高血糖素样肽-1(GLP-1)、葡萄糖依赖性促胰岛素多肽(GIP)和葡萄糖转运蛋白(GLUTs)。有研究报道机体餐后高血糖比空腹高血糖危害性更高[69]，而 α-淀粉酶和 α-葡萄糖苷酶是调节餐后血糖水平的关键酶，因此也是治疗糖尿病的靶点之一[70]。目前大多数降血糖相关的研究都旨在通过抑制 α-淀粉酶、α-葡萄糖苷酶和 DPP-IV 来延缓或防止血糖的骤然上升。现有研究表明，大米蛋白肽对 α-葡萄糖苷酶和 DPP-IV 有一定抑制作用，具有潜在降血糖活性。

Hatanaka 等[71] 采用 Umamizyme G 酶水解脱脂米糠，制备了具备 DPP-IV 抑制活性的蛋白水解物，并从中鉴定出两种抑制肽：Leu-Pro 和 Ile-Pro。同时 Hatanaka 等[72] 研究表明大米和米糠蛋白酶解液中的活性肽对 α-葡萄糖苷酶无明显的抑制作用，但两者对 DPP-IV 的 IC_{50} 分别为 1.45 和 1.28 mg/mL，显著低于酒糟水解物的 27.55 mg/mL。而 Uraipong 等[55] 研究发现米糠蛋白体外模拟消化产物具有显著的 α-葡萄糖苷酶抑制活性，这可能是与原料蛋白组成的差异以及水解物的制备方法不同有关。Boonloh 等[73] 通过探究米糠蛋白水解物对高碳水化合物-高脂肪诱导的多发性硬化症大鼠的影响，认为米糠蛋白水解物具有作为一种改善胰岛素抵抗并预防代谢综合征发生的功能性食品潜力。Ishikawa 等[74] 研究表明大米蛋白肽通过抑制 DPP-IV 活性增强了 GLP-1 的分泌，从而有助于降低餐后血糖，但其具体机制尚未明晰。Ina 等[75] 的研究指出大米蛋白水解物对餐后高血糖的抑制作用可能是高分子量肽对葡萄糖的吸附作用和低分子量肽抑制钠依赖性葡萄糖转运蛋白-1 表达的双重作用结果。目前，大米蛋白肽的降血糖作用机制仍未明晰，是否为 Ina 所猜测的双重作用有待进一步研究。

3.5 其他活性

除上述常见的生物活性外，大米蛋白肽的其他生物活性研究如抗癌活性、抗菌活性、降胆固醇活

性、抗皮肤衰老等，在目前的研究中也有少量报道。相关研究表明米糠蛋白水解物显示出潜在的抗癌活性，这主要体现在它们对结肠癌细胞、乳腺癌细胞有较强的生长抑制率[76−77]。并且杨亚强[15]采用复合酶酶解米渣蛋白制备大米蛋白肽，研究发现分子量为3~10 kDa的肽组分对肝癌细胞HepG2的抑制率最高，活性最高。在关于多肽抗菌活性研究方面，Taniguchi等[78]从米糠水解物中纯化出了具有抗菌活性且几乎没有溶血作用的阳离子多肽。另有研究表明以糯米和粳米为原料，采用人造胆汁胶束溶液的方法研究了大米多肽的降胆固醇活性，发现粳米肽的活性约为糯米肽活性的2倍多[29]。同时大米蛋白肽在抗皮肤衰老中表现出较好的前景，李火云等[79]将大米蛋白肽添加到化妆品基质中，研究发现添加量为4.0 g/kg时，连续给受试者使用四周以上，能使脸部皱纹减少11.8%。此外使用糜蛋白酶和胰蛋白酶水解制成的米糠蛋白肽具备一定的酪氨酸酶抑制活性[80]。鞠志远等[81]研究发现YGEGSSEEG可通过抑制细胞凋亡和降低黏附分子表达，发挥对血管内皮细胞的保护作用。Liu等[82]通过碱性蛋白酶水解米渣蛋白，经分离纯化得到分子量小于1 kDa的抗疲劳肽。Song等[25]对胰蛋白酶和碱性蛋白酶复合制备的大米蛋白肽进行超滤分离，研究发现分子量小于1 kDa的组分在低浓度时乙醇脱氢酶激活活性最强。上述研究表明大米蛋白肽在特殊医学用途配方食品和运动营养食品等方面展现出巨大的应用潜力。

4　总结与展望

2023年9月国家卫生健康委员会和国家市场监督管理总局发布了GB 31611《食品安全国家标准 食品加工用植物蛋白肽》，并将于2024年9月正式实施。在此之前，仅有大豆肽（GB/T 22492）、玉米低聚肽（QB/T 4707）和小麦低聚肽（QB/T 5298）这三种植物蛋白肽发布了标准，而对于植物蛋白肽并没有统一的标准，故GB 31611的制定标志着植物蛋白肽开发与利用即将进入高速发展阶段。

大米蛋白肽具有营养价值高、过敏性低、功能性好和生物活性强等特点，可作为食品主料或配料添加到产品中，深得业界学者的认可和消费者的喜爱，应用前景非常广阔，拥有充足的发展空间。据调研大米蛋白肽的应用前景主要可分为以下几方面：a.高蛋白饮品：得益于大米蛋白肽自身的良好溶解性，可以用于制作高植物蛋白含量饮料。b.保健食品：大米蛋白肽所具备良好的生理活性如抗氧化、降血压、降胆固醇和免疫调节等功效，使其在保健食品加工以及开发新型功能饮品等领域具备重大的潜力。c.特殊医学用途配方食品：大米蛋白肽优异的低过敏性能，使其抗原性比大米蛋白低1/100~1/1000，是食品过敏者的福音；并且由于大米蛋白肽的易消化吸收性，可以将其作为康复期的病人、消化功能未成熟婴幼儿和消化系统衰退老人的食品基料，以开发易被这类特殊人群消化吸收的新食品。d.运动营养食品：大米蛋白肽能够增强体能、抗疲劳，有增强肌肉的效果，可以迅速为机体提供能量，促进脂肪代谢和恢复体力，因此可以用于制作运动员或健身人群食用的蛋白质强化食品和能量补给饮品等。

本文对大米蛋白肽的制备方法、分离纯化技术、苦味改善和生物活性进行了综述。总体而言，大米蛋白肽的制备工艺较为成熟，营养价值高、过敏性低和功能性佳，应用前景广阔。然而大米蛋白肽的研究仍存在诸多不足，一是蛋白酶酶解位点广泛，难以实现靶向酶解；二是目标肽含量较低，构效关系未明晰；三是小分子肽的分离纯化技术大多难以实现工业化生产。未来大米蛋白肽的研究可着重从这三方面考虑。此外，可结合现有生物信息学工具识别大米蛋白肽中的活性肽，预测大米蛋白肽的各种物理化学性质和生物活性，以期能够快速准确地制备或提取目的肽。另从QB/T 4707《玉米低聚肽》和QB/T 5298《小麦低聚肽》中可知，研究者通过分析明确了各自的特征性指标，如《玉米低聚肽》中指出AY（由丙氨酸-酪氨酸）为玉米低聚肽的特征性肽段，《小麦低聚肽》中指出谷氨酰胺为小麦低聚肽的特征性指标。然而大米蛋白肽目前还未制定相应的国家标准或企业标准，因此未来也可深入研究大米蛋白肽的共性，旨在找出能够代表大米蛋白肽的特征性指标，为大米蛋白肽的高质量发展提供理论基础。

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

参考文献

[1] 徐兴凤. 酶解大米谷蛋白性质以及多糖对其影响的研究[D]. 南昌：南昌大学, 2016. [XU X F. Study on the properties of limited enzymatic hydrolysis rice gluten and the effects of polysaccharides on its properties[D]. Nanchang: Nanchang University, 2016.]

[2] 潘敏尧. 大米浓缩蛋白的研制及蛋白质改性的研究[D]. 杭州：浙江大学, 2006. [PAN M Y. Studies on extraction of rice protein concentration and modification of rice protein[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2006.]

[3] 杜慧敏. 浓缩乳清蛋白发酵乳制品的制备研究[D]. 长沙：中南林业科技大学, 2021. [DU H M. Study on the preparation of fermented dairy products by concentrated whey protein[D]. Changsha: Central South University of Forestry & Technology, 2021.]

[4] YU Y H, GAINE G K, ZHOU L Y, et al. The classical and potential novel healthy functions of rice bran protein and its hydrolysates[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2022, 62(30): 8454−8466.

[5] GENG X Q, LONG Z, LIU N. Research progress and application of rice dreg protein modification[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(17): 307−314.

[6] 谯飞, 韩雪, 林凯, 等. 大米蛋白肽的生物活性相关研究[J]. 中国甜菜糖业, 2016(4): 35−39. [QIAO F, HAN X, LIN K, et al. A review on biological active peptides in rice[J]. China Beet & Sugar, 2016(4): 35−39.]

[7] 王彦珺, 李姝承, 关长阁, 等. 天然活性多肽的发掘策略和生产技术[J]. 生物工程学报, 2021, 37(6): 2166−2180. [WANG Y J, LI S C, GUAN C G, et al. Functional discovery and production technology for natural bioactive peptides[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(6): 2166−2180.]
[8] 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 L, TIAN J X, ZHANG Z P, et al. Progress on pharmaceutical engineering of peptide-based drugs[J]. CIESC Journal, 2021, 72(7): 3538−3550.]
[9] 乔杨波, 庄蕾, 黄伟华, 等. 植物蛋白多肽的研究进展[J]. 中国调味品, 2021, 46(5): 175−178,197. [QIAO Y B, ZHUANG L, HUANG W H, et al. Research progress of plant protein polpeptides[J]. 中国调味品, 2021, 46(5): 175−178,197.]
[10] 张作达, 吴若娜, 王琴飞, 等. 植物源功能活性多肽研究进展[J]. 中国农学通报, 2022, 38(12): 88−94. [ZHANG Z D, WU R N, WANG Q F, et al. Bioactive peptides based on plants: A review[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2022, 38(12): 88−94.]
[11] PUI Y P, MARTIN-GONZALEZ M F S, NARSIMHAN G. Effect of hydrolysis of soy β-conglycinin on the oxidative stability of O/W emulsions[J]. Food Hydrocolloids, 2014, 35: 429−443.
[12] 熊尉杰. 利用米渣制备大米肽的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2010. [XIONG W J. The study of using rice residues to produce rice peptides[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2010.]
[13] ONSAARD W, KATE-NGAM S, ONSAARD E. Physicochemical and antioxidant properties of rice bran protein hydrolysates obtained from different proteases[J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2023, 17(3): 2374−2385.
[14] 徐珍珍, 于秋生, 陈天祥, 等. 大米蛋白肽的制备与 ACE 抑制活性分析[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(3): 53−58. [XU Z Z, YU Q S, CHEN T X, et al. Preparation of rice protein peptides and the analysis of ACE inhibitory activity[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(3): 53−58.]
[15] 杨亚强. 米渣酶解肽制备与生理活性及其对断奶仔猪生长性能的影响[D]. 南昌: 南昌大学, 2018. [YANG Y Q. Study on preparation and physiological activity of rice residue hydrolyzete and its effect on growth performance of weaned piglets[D]. Nanchang: Nanchang University, 2018.]
[16] 李铃东, 陈军, 邓利珍, 等. 不同酶解路线大米蛋白肽的制备、表征及抗氧化活性[J/OL]. 食品工业科技, 1−15. [2024-08-22]. https://doi.org/10.13386/j. issn1002-0306.2023090011 [LI L D, CHEN J, DENG L Z, et al. Preparation, characterization and antioxidant activity of rice protein peptides with different enzymatic hydrolysis routes[J/OL]. Science and Technology of Food Industry 1−15. [2024-08-22]. https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023090011.]
[17] 宋永康, 黄薇, 林虬, 等. 不同酶解法水解豆粕蛋白的比较研究[J]. 农学学报, 2012, 2(9): 51−55. [SONG Y K, HUANG W, LIN Q, et al. Comparative study of soybean protein hydrolysates prepared in different ways[J]. Journal of Agriculture, 2012, 2(9): 51−55.]
[18] 王宇飞. 小麦醇溶蛋白的分离、改性及其结构与致敏性的研究[D]. 太原: 中北大学, 2022. [WANG Y F. Study of isolation and modification of wheat gliadin and its structure and allergenicit[D]. Taiyuan: North University of China, 2022.]
[19] 廖卢艳, 张喻. 枯草芽孢杆菌发酵米渣制备抗氧化肽发酵工艺条件的优化[J]. 激光生物学报, 2015, 24(4): 368−372. [LIAO L Y, ZHANG Y. Optimized fermentation conditions for research on antioxidant peptides prepared from fermented rice residue by using bacillus subtilis[J]. Acta Laser Biology Sinica, 2015, 24(4): 368−372.]
[20] 魏明, 薛正莲, 赵世光, 等. 米曲霉发酵米糠制取米糠多肽及其抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(19): 114−118. [WEI M, XUE Z L, ZHAO S G, et al. Study on the preparation of peptides from rice bran and antioxidant activity by aspergillus oryzae fermentation[J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(19): 114−118.]
[21] 刘颖, 刘显儒, 窦博鑫, 等. 复合菌液态发酵米糠制备 ACE 抑制肽的预处理[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(11): 129−133. [LIU Y, LIU X R, DOU B X, et al. Pretreatment of rice bran using composite bacteria liquid fermentation to prepare ACE inhibitory peptides[J]. Food and Fermentation Industries, 2013, 39(11): 129−133.]
[22] MARCEL M. Basic principles of membrane technology[M]. U. S. A. and Canda: Kluwer Academic Publishers, 1996: 55−78.
[23] 蔡俊. 大米抗氧化肽的复合酶法制备及理化性质研究[D]. 武汉: 武汉轻工大学, 2016. [CAI J. Preparation and physicochemical properties of rice peptide with antioxidant activity using combined proteases[D]. Wuhan: Wuhan Polytechnic University, 2016.]
[24] 谯飞. 大米蛋白 ACE 抑制肽制备及其膜高效分离技术的研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2016. [QIAO F. The preparation of rice protein ACE inhibitory peptides and the research on its effective separation by membrane technology[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2016.]
[25] SONG R Y, DAI T T, DENG L Z, et al. Ultrafiltration fractionation of rice protein hydrolysates: Physicochemical properties and potential biological activities of different rice protein hydrolysate fractions[J]. Food Bioscience, 2023, 56: 103418.
[26] 刘铭, 刘玉环, 王允圃, 等. 制备、纯化和鉴定生物活性肽的研究进展及应用[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(4): 244−251. [LIU M, LIU Y H, WANG Y P, et al. Research progress on production, purification and identification of bioactides and its challenges in application[J]. Food and Fermentation Industry, 2016, 42(4): 244−251.]
[27] CHEN J W, LIU S S, YE R, et al. Angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory tripeptides from rice protein hydrolysate: Purification and characterization[J]. Journal of Functional Foods, 2013, 5(4): 1684−1692.
[28] 刘晶, 温志英, 韩清波. 米渣肽抗疲劳作用及抗疲劳肽的分离鉴定[J]. 中国粮油学报, 2013, 28(1): 1−5. [LIU J, WEN Z Y, HAN Q B. Anti-fatigue effect of rice residue peptide and separation and identification of anti-fatigue peptide[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2013, 28(1): 1−5.]
[29] 王戈莎. 大米多肽的分离纯化及其抗氧化活性的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008. [WANG G S. The study of isolation and purification of rice peptide and its antioxidant activity[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2008.]
[30] 封张萍. 大米血管紧张素转换酶抑制肽的制备及其活性评价[D]. 杭州: 浙江大学, 2021. [FENG Z P. Preparation and activity evaluation of rice angiotensin converting enzyme inhibitory peptides[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2021.]
[31] 马小刚. 低苦味杏仁蛋白肽水解工艺优化及其特性研究[D]. 阿拉尔: 塔里木大学, 2022. [MA X G. Hydrolysis process optimization and characteristics study of low-bitter almond protein peptides[D]. Alaer: Tarim University, 2022.]
[32] NEY K H. Bitterness of peptides: Amino acid composition and chain length[M]. America: American Chemical Society, 1979: 149−173.

[33] FITZGERALD R J, O'CUINN G. Enzymatic debittering of food protein hydrolysates[J]. Biotechnology Advances, 2006, 24(2): 234−237.
[34] ADLER-NISSEN J. Enzymic hydrolysis of food proteins[M]. New York: Elsevier Applied Science Publishers, 1986: 57−69.
[35] CHO M J, UNKLESBAY N, HSIEH F H, et al. Hydrophobicity of bitter peptides from soy protein hydrolysates[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(19): 5895−5901.
[36] 孙小瑞. 酶解小麦面筋蛋白制备低苦味肽粉的研究[D]. 郑州：河南工业大学, 2023. [SUN X R. Study on enzyme-induced preparation of low bitter peptide powder from wheat gluten[D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2023.]
[37] LIU B, LI N, CHEN F, et al. Review on the release mechanism and debittering technology of bitter peptides from protein hydrolysates[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2022, 21(6): 5153−5170.
[38] 黄磊, 周其洋. 大豆水解蛋白中苦味肽的研究进展[J]. 现代食品, 2022, 28(21): 22−24. [HUANG L, ZHOU Q Y. Research progress of bitter peptides in hydrolysed soybean protein[J]. Modern Food, 2022, 28(21): 22−24.]
[39] 郭兴峰, 魏芳, 周祥山, 等. 苦味肽的形成机理及脱苦技术研究进展[J]. 食品研究与开发, 2017, 38: 207−211. [GUO X F, WEI F, ZHOU X S, et al. Review on the formation mechanism and debittering technology of bitter petides[J]. Food Research and Development, 2017, 38: 207−211.]
[40] 袁帅. 鳕鱼肽的脱苦去腥及其功能活性评价[D]. 无锡：江南大学, 2023. [YUAN S. Debittering and deodorizing of cod peptides and their functional activities evaluation[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2023.]
[41] 胡炜, 张吉, 刘鑫, 等. 利用 β-环状糊精脱除大米蛋白肽苦味研究[J]. 检验检疫学刊, 2018, 28(6): 29−32. [HU W, ZHANG J, LIU X, et al. Study on using β-cyclodextrin to remove bitter taste of rice protein peptides[J]. Journal of Inspection and Quarantine, 2018, 28(6): 29−32.]
[42] QIN Q, TANG C, WU J, et al. A dual-functional aminopeptidase from streptomyces canus T20 and its application in the preparation of small rice peptides[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 167: 214−222.
[43] 胡勤玲, 郑良清, 王申, 等. 基于电子舌对富含 ACE 抑制肽大米蛋白水解物的脱苦评价[J]. 食品科学, 2014, 35(24): 24−28. [HU Q L, ZHENG L Q, WANG S, et al. Using electronic tongue evaluate the effect of ACE inhibitory peptide enrichment on debittering rice protein hydrolyzate[J]. Food Science, 2014, 35(24): 24−28.]
[44] BARNHAM K J, MASTERS C L, BUSH A I. Neurodegenerative diseases and oxidative stress[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2004, 3(3): 205−214.
[45] 赵佳佳. 3 种大米蛋白肽的制备及其抗氧化活性比较[J]. 食品科技, 2018, 43(12): 191−195. [ZHAO J J. Preparation of three rice protein peptides and comparison of antioxidant activities[J]. Food Technology, 2018, 43(12): 191−195.]
[46] REN L K, FAN J, YANG Y, et al. Identification, in silico selection, and mechanism study of novel antioxidant peptides derived from the rice bran protein hydrolysates[J]. Food Chemistry, 2023, 408: 135230.
[47] ZAKY A A, CHEN Z, LIU Y, et al. Preparation and assessment of bioactive extracts having antioxidant activity from rice bran protein hydrolysates[J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2019, 13(4): 2542−2548.
[48] ZHANG J H, ZHANG H, WANG L, et al. Antioxidant activities of the rice endosperm protein hydrolysate: Identification of the active peptide[J]. European Food Research and Technology, 2009, 229(4): 709−719.
[49] CHEN H J, DAI F J, CHEN C Y, et al. Effects of molecular weight fraction on antioxidation capacity of rice protein hydrolysates[J]. Scientific Reports, 2023, 13(1): 3464.
[50] YUE Y, WANG M, FENG Z, et al. Antiaging effects of rice protein hydrolysates on drosophila melanogaster[J]. Journal of Food Biochemistry, 2021, 45(4): 13602.
[51] 王玉倩. 大米活性肽对 D-半乳糖致衰老小鼠氧化应激的保护作用[D]. 长沙：中南林业科技大学, 2019. [WANG Y Q. The protective effect of rice bran active peptide on oxidative stress in D-galactose-induced aging mice[D]. Changsha: Central South University of Forestry & Technology, 2019.]
[52] FANG Y, CHEN X, LUO P, et al. The correlation between *in vitro* antioxidant activity and immunomodulatory activity of enzymatic hydrolysates from selenium-enriched rice protein[J]. Journal of Food Science, 2017, 82(2): 517−522.
[53] FUJITA H, YOKOYAMA K, YOSHIKAWA M. Classification and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins[J]. Journal of Food Science, 2000, 65(4): 564−569.
[54] WANG J P, HU J E, CUI J Z, et al. Purification and identification of a ACE inhibitory peptide from oyster proteins hydrolysate and the anti hypertensive effect of hydrolysate in spontaneously hypertensive rats[J]. Food Chemistry, 2008, 111(2): 302−308.
[55] URAIPONG C, ZHAO J. *In vitro* digestion of rice bran proteins produces peptides with potent inhibitory effects on-glucosidase and angiotensin I converting enzyme[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2018, 98(2): 758−766.
[56] URAIPONG C, ZHAO J. Identification and functional characterisation of bioactive peptides in rice bran albumin hydrolysates[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2016, 51(10): 2201−2208.
[57] URAIPONG C, ZHAO J. Rice bran protein hydrolysates exhibit strong *in vitro*-amylase, glucosidase and ACE-inhibition activities[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2016, 96(4): 1101−1110.
[58] WANG X M, CHEN H X, FU X G, et al. A novel antioxidant and ACE inhibitory peptide from rice bran protein: Biochemical characterization and molecular docking study[J]. Lwt-Food Science and Technology, 2017, 75: 93−99.
[59] 刘志国, 吴琼, 吕玲肖, 等. 酶解米糠蛋白分离提取 ACE 抑制肽及其结构研究[J]. 食品科学, 2007(3): 223−227. [LIU Z G, WU Q, LÜ L X, et al. Acticity detection and structure analysis of ACE inhibitors derived from rice bran protein[J]. Food Science, 2007(3): 223−227.]
[60] DONG J J, WANG S, YIN X Y, et al. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effects of rice peptides[J]. Food Science and Human Wellness, 2022, 11(6): 1539−1543.
[61] WU J P, ALUKO R E, NAKAI S. Structural requirements of angiotensin i-converting enzyme inhibitory peptides: Quantitative structure-activity relationship modeling of peptides containing 4-10 amino acid residues[J]. QSAR & Combinatorial Science, 2006, 25(10): 873−880.
[62] 邹俊哲, 林凯, 杨旭, 等. 植物乳杆菌和蛋白酶协同发酵水解大米蛋白 ACE 抑制肽高活性组分的氨基酸序列分析[J]. 食品研

究与开发, 2019, 40(8): 1−6. [ZOU J Z, LIN K, YANG X, et al. *Lactobacillus plantarum* coupled with proteinases to remove rice protein for the production of ACE inhibitory peptides[J]. Food Research and Development, 2019, 40(8): 1−6.]
[63] 王璐. 从大米蛋白胰蛋白酶酶解物中分离纯化免疫活性肽[D]. 长沙: 长沙理工大学, 2015. [WANG L. Preparation and purification of rice immune active peptide[D]. Changsha: Changsha University of Science & Technology, 2015.]
[64] 陈月华. 大米胰酶水解肽在巨噬细胞 RAW264.7 中的免疫活性研究[D]. 长沙: 长沙理工大学, 2016. [CHEN Y H. Studies on immunoactivities of trypsinized rice peptides in RAW264.7 macrophages[D]. Changsha: Changsha University of Science & Technology, 2016.]
[65] FENG M J, WANG X Y, XIONG H, et al. Anti-inflammatory effects of three selenium-enriched brown rice protein hydrolysates in LPS-induced RAW264.7 macrophages via NF-κB/MAPKs signaling pathways[J]. Journal of Functional Foods, 2021, 76: 104320.
[66] 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.
[67] FANG Y, PAN X, ZHAO E, et al. Isolation and identification of immunomodulatory selenium-containing peptides from selenium-enriched rice protein hydrolysates[J]. Food Chemistry, 2019, 275: 696−702.
[68] VALENZUELA ZAMUDIO F, SEGURA CAMPOS M R. Amaranth, quinoa and chia bioactive peptides: A comprehensive review on three ancient grains and their potential role in management and prevention of Type 2 diabetes[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2022, 62(10): 2707−2721.
[69] HIYOSHI T, FUJIWARA M, YAO Z. Postprandial hyperglycemia and postprandial hypertriglyceridemia in type 2 diabetes [J]. Journal of Biomedical Research, 2017, 33(1): 1−16.
[70] JAGADEESAN G, MUNIYANDI K, MANOHARAN A L, et al. Understanding the bioaccessibility, α-amylase and α-glucosidase enzyme inhibition kinetics of *Allmania nodiflora* (L.) R. Br. ex wight polyphenols during *in vitro* simulated digestion[J]. Food Chemistry, 2022, 372: 131294.
[71] HATANAKA T, INOUE Y, ARIMA J, et al. Production of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides from defatted rice bran [J]. Food Chemistry, 2012, 134(2): 797−802.
[72] HATANAKA T, URAJI M, FUJITA A, et al. Anti-oxidation activities of rice-derived peptides and their inhibitory effects on dipeptidylpeptidase-IV[J]. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2015, 21(4): 479−485.
[73] BOONLOH K, KUKONGVIRIYAPAN V, KONGYINGYOES B, et al. Rice bran protein hydrolysates improve insulin resistance and decrease pro-inflammatory cytokine gene expression in rats fed a high carbohydrate-high fat diet[J]. Nutrients, 2015, 7(8): 6313−6329.
[74] ISHIKAWA Y, HIRA T, INOUE D, et al. Rice protein hydrolysates stimulate GLP-1 secretion, reduce GLP-1 degradation, and lower the glycemic response in rats[J]. Food & Function, 2015, 6(8): 2525−2534.
[75] INA S, HAMADA A, NAKAMURA H, et al. Rice (*Oryza sativa japonica*) albumin hydrolysates suppress postprandial blood glucose elevation by adsorbing glucose and inhibiting Na^+-D-glucose cotransporter SGLT1 expression[J]. Journal of Functional Foods, 2020, 64: 103603.
[76] KANNAN A, HETTIARACHCHY N, JOHNSON M G, et al. Human colon and liver cancer cell proliferation inhibition by peptide hydrolysates derived from heat-stabilized defatted rice bran[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(24): 11643−11647.
[77] KANNAN A, HETTIARACHCHY N S, LAY J O, et al. Human cancer cell proliferation inhibition by a pentapeptide isolated and characterized from rice bran[J]. Peptides, 2010, 31(9): 1629−1634.
[78] TANIGUCHI M, KAMEDA M, NAMAE T, et al. Identification and characterization of multifunctional cationic peptides derived from peptic hydrolysates of rice bran protein[J]. Journal of Functional Foods, 2017, 34: 287−296.
[79] 李火云, 万岳鹏, 曾茜, 等. 大米多肽抗衰老功效研究[J]. 香料香精化妆品, 2015(6): 37−40. [LI H Y, WAN Y P, ZENG X, et al. Study on the anti-aging effects of rice-protein polypeptides[J]. Flavour Fragrance Cosmetics, 2015(6): 37−40.]
[80] OCHIAI A, TANAKA S, TANAKA T, et al. Rice bran protein as a potent source of antimelanogenic peptides with tyrosinase inhibitory activity[J]. Journal of Natural Products, 2016, 79(10): 2545−2551.
[81] 鞠志远, 王丽丽, 刘丽娅, 等. 大米 α-球蛋白肽 YGEGSSEEG 对 TNF-α 诱导的血管内皮细胞损伤的影响[J]. 中国药理学通报, 2018, 34(4): 501−507. [JU Z Y, WANG L L, LIU L Y, et al. Effects of rice peptide YGEGSSEEG on improving endothelial cell injury induced by tumor necrosis factor[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2018, 34(4): 501−507.]
[82] LIU J, WEN Z, HAN Q. Anti-fatigue effect of rice residue peptide and isolation and identification of anti-fatigue peptide[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2013, 28(1): 1−5.

于倩倩, 康帅, 任晓镁, 等. 咪唑喹啉类杂环胺的形成机制及外源物质对其抑制机理研究进展 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 419−427. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024010010

YU Qianqian, KANG Shuai, REN Xiaopu, et al. Research Progress on the Formation Mechanism of Imidazoline Quinoline Heterocyclic Amines and the Inhibition Mechanism of Exogenous Substances on Them[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 419−427. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024010010

· 专题综述 ·

咪唑喹啉类杂环胺的形成机制及外源物质对其抑制机理研究进展

于倩倩[1,2], 康　帅[1,+], 任晓镁[3,*], 李明杨[3,*], 彭增起[4]

（1.塔里木大学食品科学与工程学院, 南疆特色农产品深加工兵团重点实验室, 新疆阿拉尔 843300;
2.雨润集团肉品质量控制与新资源创制全国重点实验室, 江苏南京 210041;
3.黄山学院生命与环境科学学院, 安徽黄山 245041;
4.南京农业大学食品科技学院, 江苏南京 210095）

摘　要: 咪唑喹啉类（Imidazoquinoline，IQ 型）杂环胺是目前已知的公认致突变活性最强的杂环胺（Heterocyclic Amines，HAs），其与多种癌症和神经退行性疾病密切相关。IQ 型 HAs 形成的前体物质是游离氨基酸、还原糖和肌酸/肌酐，其在高温条件下发生一系列化学反应生成的自由基和活性羰基化合物等中间产物是 IQ 型 HAs 形成的基础。在肉制品热加工过程中，外源添加物质能够不同程度地影响 IQ 型 HAs 的形成，外源添加物质抑制 IQ 型 HAs 的作用机制主要包括前体物竞争性抑制机制、自由基清除机制和活性羰基化合物捕获机制 3 种。本文围绕 IQ 型 HAs 的形成过程以及外源物质抑制其形成的作用机制展开论述，明确了 IQ 型 HAs 生成的反应途径，详细阐述了外源物质抑制 IQ 型 HAs 形成的作用机制，为有效控制肉制品热加工过程中 IQ 型 HAs 的形成提供理论指导。

关键词: 热加工肉制品, IQ 型杂环胺, 形成机制, 抑制机理

中图分类号: TS251.1　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2024)21−0419−09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024010010

本文网刊:

Research Progress on the Formation Mechanism of Imidazoline Quinoline Heterocyclic Amines and the Inhibition Mechanism of Exogenous Substances on Them

YU Qianqian[1,2], KANG Shuai[1,+], REN Xiaopu[3,*], LI Mingyang[3,*], PENG Zengqi[4]

（1.College of Food Science and Engineering, Tarim University, Production & Construction Group Key Laboratory of Special Agricultural Products Further Processing in Southern Xinjiang, Alaer 843300, China;
2.National Key Laboratory for Meat Quality Control and New Resource Creation, Yurun Group, Nanjing 210041, China;
3.College of Life and Environment Sciences, Huangshan University, Huangshan 245041, China;
4.College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China）

Abstract: The imidazoquinoline type (IQ-type) is recognized as the most mutagenic activity in heterocyclic amines currently, and closely associated with a variety of cancers and neurodegenerative diseases of human. The precursors of IQ-type HAs are free amino acids, reducing sugars, and creatine/creatinine, and these precursors can undergo a series of chemical reactions at high temperature, and intermediate products such as free radicals and reactive carbonyl compounds

收稿日期: 2024−01−02　　+并列第一作者

基金项目: 国家自然科学基金资助项目（32260603）; 第三师图木舒克市重点领域科技攻关计划项目（KY2023GG04）。

作者简介: 于倩倩（1985−）, 女, 硕士, 研究方向: 肉制品加工与质量控制, E-mail: 552919925@qq.com。
康帅（2000−）, 男, 硕士研究生, 研究方向: 肉制品加工与质量控制, E-mail: 2846002960@qq.com。

*** 通信作者:** 任晓镁（1985−）, 男, 博士, 副教授, 研究方向: 畜产品加工与质量控制, E-mail: alarxp@126.com。
李明杨（1985-）, 女, 硕士, 实验师, 研究方向: 畜产品加工与质量控制, E-mail: lmy564181@163.com。

are formed, which are the basis for the formation of IQ-type HAs. The exogenous substances added to the meat products during the thermal processing affected the IQ-type HAs formation to varying degrees. There are three main action mechanisms of the exogenous substances inhibiting IQ-type HAs, including competitive inhibition mechanism of precursors, free radical scavenging mechanisms, and active carbonyl compounds capturing mechanism. This article focuses on the formation process of IQ-type HAs and the inhibitory mechanism of exogenous substances, and clarified the reaction pathway of IQ-type HAs generation, and elaborated the action mechanism of exogenous substances inhibiting the formation of IQ-type HAs in detail. This paper provides theoretical guidance for effectively controlling the IQ-type HAs formation during the thermal processing of meat products.

Key words: heat-processed meat products; IQ-type heterocyclic amine; formation mechanism; inhibition mechanism

2019 年 5 月我国发布的《中共中央国务院关于深化改革加强食品安全工作的意见》明确指出，要将保障人民群众的食品安全放在首位。我国传统的肉制品热加工方式，如烧烤、油炸、油煎及酱卤等，赋予肉类食品独特的风味和口感，深受消费者青睐，然而在高温加工条件下，杂环胺（Heterocyclic Amines，HAs）也伴随产生。HAs 是畜禽肉和鱼类等富含蛋白质类食物在热加工过程中产生的一大类具有致癌、致畸和致突变作用的多环芳香族化合物，长期摄入会对人体健康造成严重危害[1−2]。在已分离鉴定出的 30 种 HAs 中[3]，咪唑喹啉类（Imidazoquinoline，IQ 型）是公认致突变活性最强的 HAs，早在 1993 年，世界卫生组织的国际癌症研究机构就将 IQ 认定为 2A 级致癌物，将 MeIQ 认定为 2B 级致癌物，美国国家毒理学计划也将 IQ 和 MeIQ 列为潜在的人类致癌物质[4]。有研究表明，IQ 及 MeIQ 等 HAs 的摄入可能导致人体多种器官肿瘤的发生，乳腺、结肠、胃、肝脏、膀胱等均可能是其靶器官[5−6]；同时，IQ 的摄入还与原发性震颤、帕金森病和阿尔茨海默病等神经退行性疾病的发生密切相关[7−8]，严重威胁人类健康[9]。当前，对于 IQ 型杂环胺的形成机制有多种猜想，但相关的具体研究较少。因此，本文围绕 IQ 型 HAs 的形成机制及外源添加物对 IQ 型 HAs 的抑制机理展开综述，从 IQ 的不同生成途径以及外源添加物对 IQ 型 HAs 的前体物竞争性抑制和中间产物抑制等多方面进行阐述，旨在为热加工肉制品中 IQ 型 HAs 的消减及控制提供参考依据。

1 IQ 型 HAs 的形成机制

IQ 型 HAs 主要包括 2-氨基-3-甲基咪唑并 [4,5-f] 喹啉（2-amino-3-methyl-imidazo[4,5-f]quinoline，IQ）和 2-氨基-3,4-二甲基咪唑并 [4,5-f] 喹啉（2-amino-3,4-dimethyl-imidazo[4,5-f]quinoline，MeIQ）

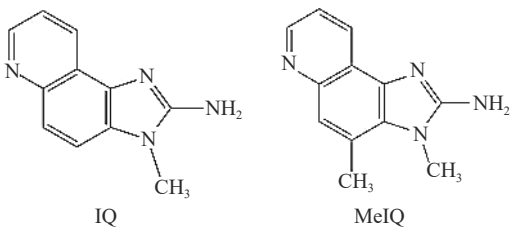


图 1 IQ/MeIQ 化学结构式

Fig.1 Chemical structure formula of IQ/MeIQ

两种，图 1 为 IQ 和 MeIQ 的化学结构式。通过对比两者的化学结构可以看出，其结构高度相似，主要区别在于 MeIQ 的咪唑并喹啉结构中比 IQ 多一个甲基[10]。

HAs 主要在肉制品和高蛋白质食品的热加工过程产生，游离氨基酸、肌酸/肌酐和还原糖是其形成的主要前体物。游离氨基酸和还原糖通过美拉德反应和高温条件下的 Strecker 降解反应产生多种自由基和活性羰基化合物，它们在 HAs 的形成过程中发挥重要作用[11]，并且反应体系中前体物的种类和浓度是影响 HAs 形成的重要因素[3]。

在 IQ 型 HAs 的形成过程中，还原糖和氨基酸发生美拉德反应产生的中间产物进一步与肌酐反应生成 IQ 和 MeIQ[3]，其形成涉及多种自由基和活性羰基化合物的参与（如图 2）。有学者采用 ^{14}C 标记葡萄糖研究发现，IQ 型 HAs 分子结构中的氨基咪唑部分来自肌酐，其余部分则由 Strecker 降解产物吡啶和吡嗪等构成[12−13]。Zamora 等[14−15] 认为 IQ 和 MeIQ 的形成过程可能类似于 2-氨基-1-甲基-6-苯基咪唑 [4,5-b] 吡啶（2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]pyridine，PhIP），均需要活性羰基化合物、肌酐和产氨化合物的共同参与，通过将肌酐与 24 种不同的活性羰基化合物和产氨化合物（或其前体物）进行混合构建化学反应模型，在 180 ℃ 反应 1 h 后测定 IQ 和 MeIQ 的生成情况，结果发现 IQ 和 MeIQ 是由丙烯醛、丁烯醛、肌酐和氨基酸共同反应生成，反应体系中丙烯醛和丁烯醛的不同比例决定了所生成 IQ 型 HAs 种类的差异；同时，在该体系中，产氨化合物为谷氨酰胺，其在加热时释放氨，易与羰基化合物反应发生低聚化和环化反应，进而促进 IQ 型 HAs 的形成。如图 2 所示，其具体途径为：肌酐的 C-5 位与丙烯醛的 C-3 位发生反应，产生的加合物与产氨化合物形成的氨反应生成相应的亚胺，再通过互变异构形成烯胺，烯胺与丁烯醛反应形成加合物，再经一系列的电子重排、脱水和氧化反应形成 IQ；MeIQ 的形成与 IQ 大致相同，其主要区别在于所结合的羰基化合物种类上，在 IQ 和 MeIQ 的形成过程中需要与活性羰基化合物进行两次反应，IQ 生成所需的羰基化合物为丙烯醛和丁烯醛，而 MeIQ 形成过程中两次反应所需的羰基化合物均为丁烯醛[5,15]。

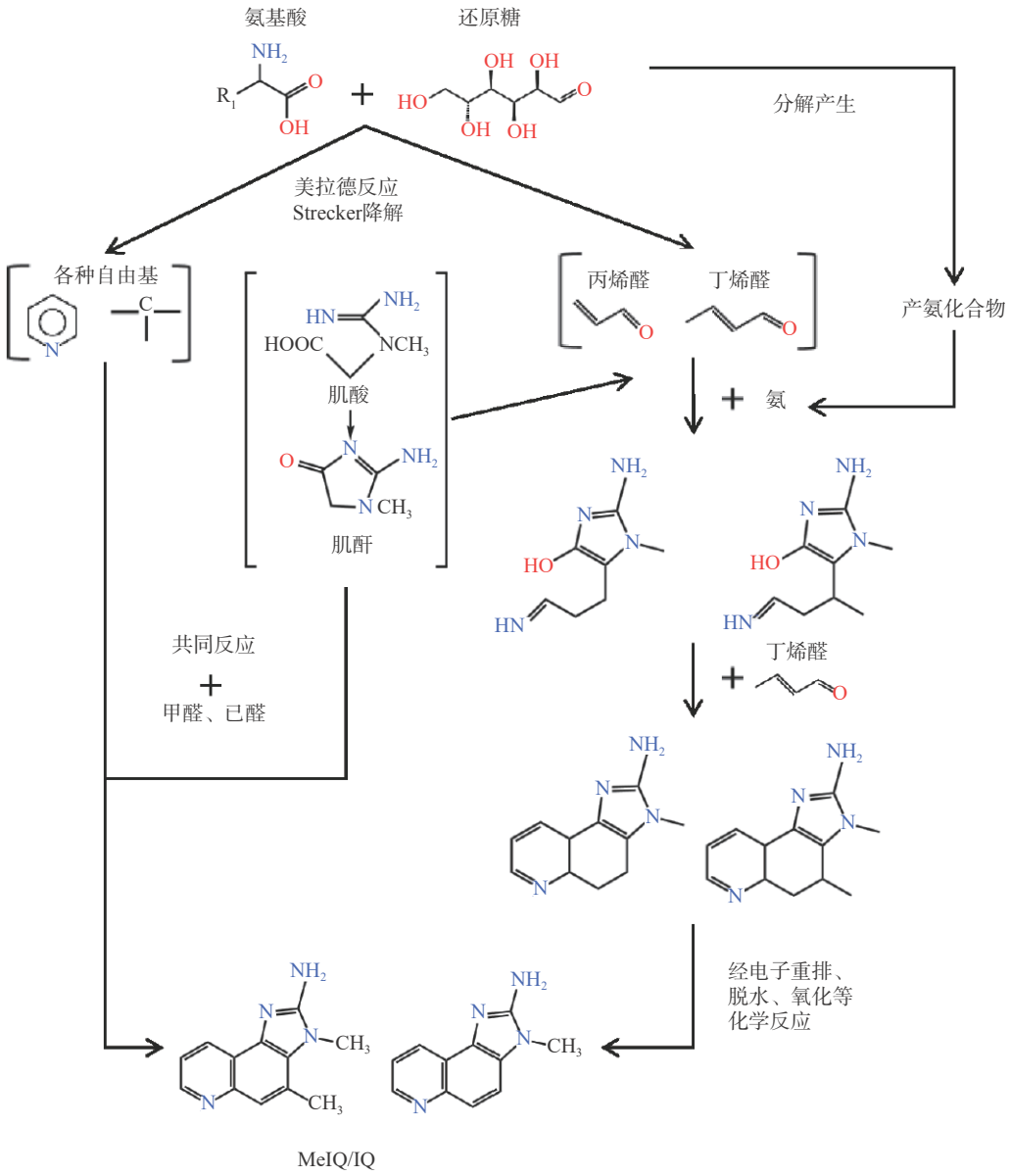


图 2　化学模型体系中 IQ 型 HAs 形成的可能途径

Fig.2　Possible formation pathway of IQ-type HAs in chemical model

也有学者构建了以吡啶/吡嗪、肌酐和醛类为前体物的模型体系，发现在美拉德反应中，由脂质衍生的活性羰基参与羰-酰基胺反应产生吡啶/吡嗪，其后与肌酐/肌酸发生反应形成 IQ 型 HAs[16]；同时，肉制品中的部分物质和美拉德反应的中间产物，如三甲胺和苯乙醛等，在高温加工过程中会分解产生甲醛和乙醛，甲醛和乙醛会与自由基和肌酐发生反应，最终生成 IQ 型 HAs[17−18]。IQ 型 HAs 的形成除了与多种活性羰基化合物密切相关外，美拉德反应过程中产生的多种不稳定自由基也参与其形成。Pearson 等[19]指出烷基吡啶自由基参与了 IQ 型 HAs 的形成，该类自由基与肌酐在加热条件下能够形成 IQ 和 MeIQ。Kato 等[20]在葡萄糖/甘氨酸/肌酐的模型体系中证实了自由基与 HAs 生成的关系，其采用电子自旋共振技术（Electron spin resonance，ESR）对模型体系中的自由基种类进行了分析，从中检测出不稳定美拉德中间产物自由基、吡嗪阳离子自由基和碳中心自由基等的存在，并证实这些自由基参与了反应体系中 IQ 型 HAs 的形成。Kikugawa 等[21]在模型体系中也监测到吡嗪阳离子自由基和碳中心自由基的产生与 IQ 型 HAs 的形成有关。这些研究均证实了活性羰基化合物和自由基是 IQ 型 HAs 形成的必需条件。

游离氨基酸也在 IQ 型 HAs 的形成过程中发挥关键作用，并且不同种类的游离氨基酸产生的 HAs 种类不同。当甘氨酸、丙氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸和苏氨酸分别与葡萄糖和肌酐在模型体系中混合加热后，IQ 和 MeIQ 均被检测到[22]；Szterk 等[23]发现丙氨酸、苯丙氨酸和赖氨酸参与了 IQ 型 HAs 的形成；本课题组前期研究发现，在烤羊肉饼中 IQ 型 HAs 的形成与其前体物之间存在显著的相关性，其中 IQ 的形成与丝氨酸、赖氨酸、精氨酸、肌酐呈极显著相关关系（P<0.01，R^2=0.83~0.95），与苏氨酸、脯氨酸和葡萄糖呈显著相关（P<0.05，R^2=0.72~0.79）；MeIQ 的形成则与苯丙氨酸、赖氨

酸、组氨酸、精氨酸、葡萄糖和肌酐均存在极显著的相关性(P<0.01, R^2=0.73~0.90), 与丝氨酸和半胱氨酸呈显著相关关系(P<0.05, R^2=0.78~0.81)[24]。

2 外源添加物抑制热加工肉制品中 IQ 型 HAs 形成的作用机制

为了尽可能减少热加工肉制品中 IQ 型 HAs 的生成量, 国内外研究人员开展了较为系统全面的研究和探索, 发现通过添加外源物质能够在尽可能满足消费者对肉制品特色风味和口感需求的同时, 有效降低 HAs 的生成[25]。针对不同种类外源添加物抑制 IQ 型 HAs 形成的作用机制, 不同学者秉持的观点有较大差异, 目前主要包括以下 3 种抑制机制观点: a.外源添加物能够通过与 IQ 型 HAs 的前体物形成竞争性抑制, 进而阻断 HAs 的形成; b.外源添加物通过自身良好的抗氧化活性清除反应体系中的自由基, 起到抑制 IQ 型 HAs 的形成; c.外源添加物能够通过捕获反应体系中的活性羰基化合物形成加合物, 进而中断 IQ 型 HAs 的形成通路而抑制其形成。

2.1 前体物竞争性抑制/反应阻断机制

IQ 型 HAs 通常由肌酸/酸酐、氨基酸和还原糖反应产生, 其产生通常伴随前体物的不断消耗, 因此前体物浓度是影响 IQ 型 HAs 形成的重要因素之一[26]。一些外源添加物可以通过与前体物发生反应进而降低反应体系中前体物的浓度而抑制 IQ 型 HAs 的形成(表 1)。Teng 等[26]研究发现, 在 IQ 型 HAs 形成的化学模型体系中, 添加未酰基化花青素的体系中葡萄糖含量为 5.076±0.0061 mg/mL, 而添加酰基化花青素的化学模型体系中葡萄糖含量显著降低至 0.4592±0.0069 mg/mL, 体系中的肌酸/肌酐含量也随着酰基化花青素的增加而显著降低, 而此时体系中 IQ 型 HAs 的生成量也呈降低趋势, 证实了酰基化花青素能够通过竞争性结合葡萄糖和肌酸/肌酐等物质, 干扰体系中的醛醇反应, 进而抑制 IQ 型 HAs 的形成。在 Chu 等[27]的研究中, 也发现了与上述相似的结果。而且, 部分多酚可以与蛋白质进行结合, 通过抑制蛋白质的分解和降低其作为 HAs 前体物的可用性等作用来达到抑制 HAs 的目的。如 Chen 等[28]发现, 四氢大麻酚可以通过与蛋白质结合形成加合物, 减少蛋白质分解产生的氨基酸, 从而使氨基酸浓度降低, 最终抑制了 IQ 的生成。Ding 等[29]也发现绿原酸与表儿茶素可以与还原糖和蛋白质结合, 降低两种物质作为 HAs 前体物的可用性, 进而抑制了 IQ 型 HAs 的形成。同时, 有研究发现酰胺类化合物可以通过前体物竞争性抑制作用控制蛋白质与 HAs 前体物的结合, 进而有效减少了 IQ 型 HAs 的形成[30]。除此以外, 还有少部分文献发现某些传统药材提取物中的活性成分可以通过结合肌酐, 降低肌酐的可用性来降低杂环胺的生成, 如 Cheng 等[31]在显脉旋覆花提取物中检出了对香豆酸, 其将对香豆酸添加在烤牛肉饼中, 降低了 IQ 型 HAs 的含量, 同时其通过制备肌酐探针并于对香豆酸反应证明该类活性成分可以通过亲电作用结合肌酐。

表 1 外源添加物通过竞争性抑制/中断前体物反应抑制杂环胺

Table 1 Exogenous additives inhibit heterocyclic amines by competitive inhibition/interruption of precursor reactions

抑制方式	目标物	外源添加物	文献
前体物竞争性抑制	葡萄糖	酰基化花青素	[26]
前体物竞争性抑制	葡萄糖	槲皮素、L-抗坏血酸	[27]
前体物竞争性抑制	蛋白质/氨基酸	四氢大麻酚	[28]
前体物竞争性抑制	蛋白质	绿原酸/表儿茶素	[29]
前体物竞争性抑制	蛋白质	辣椒素、三舒酰胺、胡椒碱	[30]
前体物竞争性抑制	肌酐	对香豆酸	[31]
降低前体物消耗	氨基酸、肌酐	桑叶提取物	[32]
阻断前体物反应	葡萄糖	没食子酸	[33]

此外, 有研究表明天然植物多酚可以通过降低 HAs 前体物消耗或阻断 HAs 前体物的氧化反应等途径来抑制杂环胺。Xu 等[32]使用包含多种多酚的桑叶提取物对油煎鸭肉中杂环胺进行了抑制能力的相关研究, 发现该提取物可以有效减少 IQ/MeIQ 杂环胺前体物的消耗, 同时表现出了较好的对杂环胺抑制能力。Zhang 等[33]在胡萝卜、芹菜和山药三种蔬菜提取物中检出了一定含量的没食子酸, 并发现得到的提取物可以有效抑制 IQ/MeIQ 杂环胺的生成, 同时三种提取物还能有效降低葡萄糖消耗, 三种蔬菜提取物抑制杂环胺的主要途径可能是通过阻断葡萄糖和某些杂环胺前体物/中间产物的氧化反应。

2.2 自由基清除机制

自由基是加工食品中普遍存在的一种中间产物, 美拉德反应是其形成的重要途径[34], 具有良好自由基清除活性的物质也表现出有效的 HAs 抑制作用。Balogh 等[35]研究发现 1% 浓度的维生素 E 对炸牛肉饼中 IQ 和 MeIQ 的抑制率分别高达 85% 和 78.6%, 其抑制活性可能是直接阻断自由基的产生而实现。也有学者指出, 维生素 E 在高温加热条件下的分解产物能够与一些 HAs 的前体物质发生反应, 可能也是抑制 HAs 形成的原因之一[3]。一些化学抗氧化剂也可以通过阻止某些阳离子自由基的形成、破坏阳离子自由基以及破坏中间产物等途径而抑制 IQ 型 HAs 的形成。Kato 等[20]指出, 含巯基类抗氧化剂是通过自由基清除机制而抑制 IQ 型 HAs 的形成, 该类化合物可以向不稳定的吡嗪阳离子自由基提供氢原子, 将其转化为非自由基的稳定化合物实现对自由基的清除, 进而抑制 IQ 型 HAs 的产生。

多位学者研究发现许多天然物质具有良好的抗氧化活性, 也对自由基表现出较强的清除能力, 例如富含多酚类、生物碱类和萜类等抗氧化活性成分的香辛料提取物、果蔬提取物、中草药植物提取物等, 被广泛应用于肉制品加工中以改善产品的风味和品质, 同时也对 IQ 型 HAs 的形成有显著影响。Khan

等[36]对紫苏籽提取物和多香果提取物抑制 IQ 型 HAs 的形成进行了研究，发现两种提取物对 IQ 均有一定的抑制作用，且混合提取物的抑制效果高于单一提取物，进一步分析可能是因为两种提取物中含有大量的多酚类化合物，其结构中的羟基能够提供电子，终止自由基的链式反应，抑制自由基的生成，进而抑制 IQ 型 HAs 的产生。Tengilimoglu-Metin 等[37]发现山楂提取物中含有多种活性成分，尤其是含有大量的类黄酮化合物，其研究发现山楂提取物可以通过降低脂质氧化程度来降低自由基的生成，从而达到抑制 IQ 型 HAs 的产生。Teng 等[38]对苦苣菜提取物抑制 IQ 型 HAs 的活性进行了研究，证实其含有的多酚类物质可以通过清除自由基抑制 IQ 的生成，抑制率为 39%。Kilic 等[39]发现使用 0.5% 的姜黄粉可以减少鸡肉丸中 MeIQ 的浓度，可能与姜黄粉中的主要成分姜黄素具有清除自由基、抗氧化的活性有关。Kikugawa 等[21]在模型体系中发现表没食子儿茶素没食子酸酯（Epigallocatechin Gallate, EGCG）、芝麻醇、丁基羟基茴香醚能够显著降低吡嗪阳离子自由基和碳中心自由基的 ESR 信号强度，从而抑制 IQ 型 HAs 的产生。

本课题组前期将红柳多酚添加至烤羊肉饼中，借助 ESR 分析发现红柳多酚的添加能够显著降低烤羊肉饼中自由基特征信号峰强度，并且发现红柳多酚对烤羊肉饼自由基的清除活性与其抑制 IQ 和 MeIQ 的形成之间呈极显著正相关关系[40]。此外，有学者报道，多酚类物质还可以通过螯合金属离子清除体系中的自由基[41]，一些多酚类物质通过抑制 Fenton 反应阻止前体物的氧化进程，避免脂质过氧化，抑制自由基生成，进而抑制 IQ 型 HAs 的产生[42−43]，图 3 即为多酚基团螯合铁离子和亚铁离子的反应过程图。

多酚类化合物对自由基清除能力的强弱与其化学结构密切相关，二者存在良好的构效关系，多酚化合物苯环结构上存在的邻苯二酚基结构和邻三羟基结构在清除自由基过程中起重要作用[43−44]。多酚化合物清除体系中自由基的机制是向自由基提供一个氢原子，使其成为相对稳定的化合物，同时形成了一个多酚自由基，而由于苯环本身具有的电子离域作用，多酚自由基的化学结构趋于稳定，反应活性降低，因此多酚自由基是一种能够独立存在于体系中的较为稳定的自由基[45]。根据自由基对细胞和 DNA 的破坏机理[46]可以推测，多酚自由基的毒性相对于常见的脂质自由基和活性氧自由基更低，因此对人体的毒害作用也更小。

2.3　活性羰基化合物捕获机制

活性羰基化合物是一类含有一个或多个羰基基团的、具有一定生物活性的小分子化合物，该类化合物极易与含有巯基或氨基的化合物发生加成反应，其来源广泛，如美拉德反应、脂质和糖类物质的氧化降解等，其中美拉德反应为活性羰基化合物的主要来源[47−48]。美拉德反应会产生 Amadori 或 Heyns 产物，这些产物经分子碎片化或修饰后可以生成活性羰基化合物[48−49]。低浓度的活性羰基化合物与食品的特征性风味紧密联系，而高浓度的活性羰基化合物会引起羰基应激反应，从而促进炎症的发生和糖尿病、癌症以及老年相关疾病的发展[47,50]。

活性羰基化合物参与多种 HAs 的形成，多位学者报道了多酚化合物能够捕获反应体系中的活性羰基化合物进而抑制 HAs 的形成。Cheng 等[51]对 12 种多酚类化合物抑制 HAs 形成的能力研究发现，柚皮素对自由基的清除能力较差，但其对 PhIP 则表现出良好的抑制活性，推测该化合物对 PhIP 的抑制作用不是通过自由基清除机制，而是存在其他的抑制途径；其通过进一步研究发现，柚皮素能够与苯乙醛反应，生成柚皮素-苯乙醛加合物，从而抑制 PhIP 的形成[52]；由此提出了多酚化合物通过捕获反应体系中的活性羰基化合物形成加合物而抑制 HAs 形成的作用机制。随后，国内外多位研究人员均在化学模型体系和真实肉品体系中验证了该作用机制的存在[6]。对于 IQ 型 HAs，其形成过程中需要活性羰基化合物丙烯醛和丁烯醛的参与，多酚化合物可能也通过捕获这两种活性羰基化合物而抑制 IQ 型 HAs 的形成。

丙烯醛是 IQ 形成过程中的重要中间产物，在 IQ 的形成过程中发挥关键作用[5,15]。大量研究表明天然多酚类化合物能够捕获反应体系中产生的丙烯醛，进而形成相应的加合物[53−54]。多酚化合物结构中

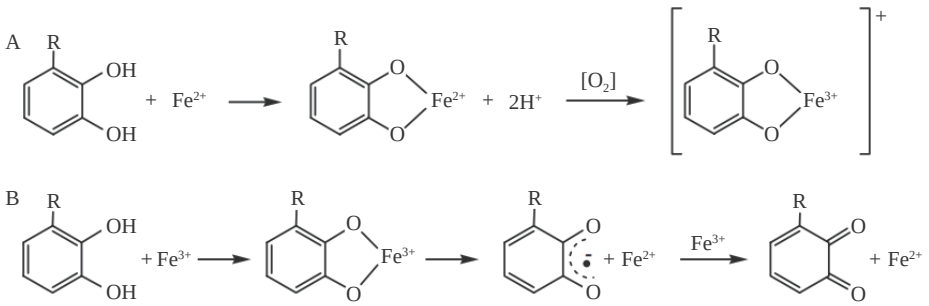


图 3　多酚上邻苯二酚基螯合亚铁离子和铁离子过程[42]

Fig.3　Process of catechol chelating ferrous ions or ferric ions on polyphenols[42]

注：A 为亚铁离子，B 为铁离子。

的间苯三酚基团是捕获丙烯醛的基础结构，部分多酚的活性位点主要是 A 环的 C-6 和 C-8 位，能够与丙烯醛发生 Michael 加成反应，随后 C-5 或 C-7 附近的羟基对末端醛进行亲核攻击，从而形成稳定的环状半缩醛结构[55−56]，具体加成如图 4 所示。

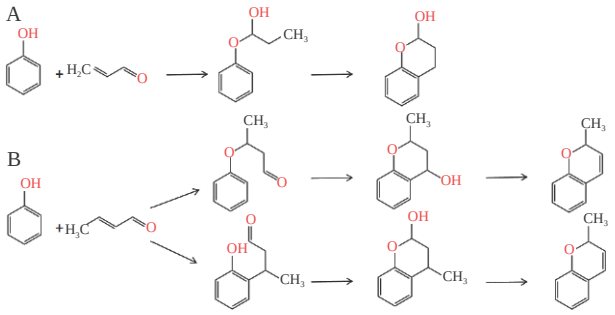


图 4 酚羟基加合丙烯醛和丁烯醛的化学变化过程

Fig.4 Chemical change process between phenolic hydroxyl and acrolein/crotonaldehyde

注：A 为丙烯醛，B 为丁烯醛。

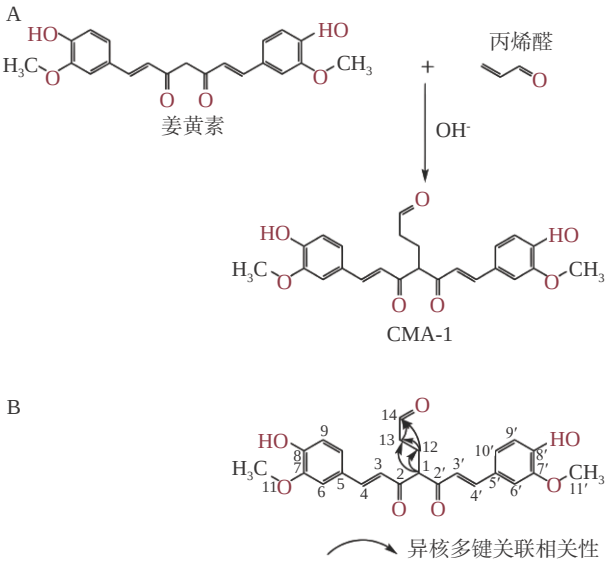


图 5 姜黄素捕获丙烯醛的可能途径及捕获位点分析[58]

Fig.5 Possible pathway of curcumin capturing acrolein and the analysis of the capture site[58]

注：A 为姜黄素捕获丙烯醛的可能途径，B 为捕获位点的关键异核多键关联相关性分析。

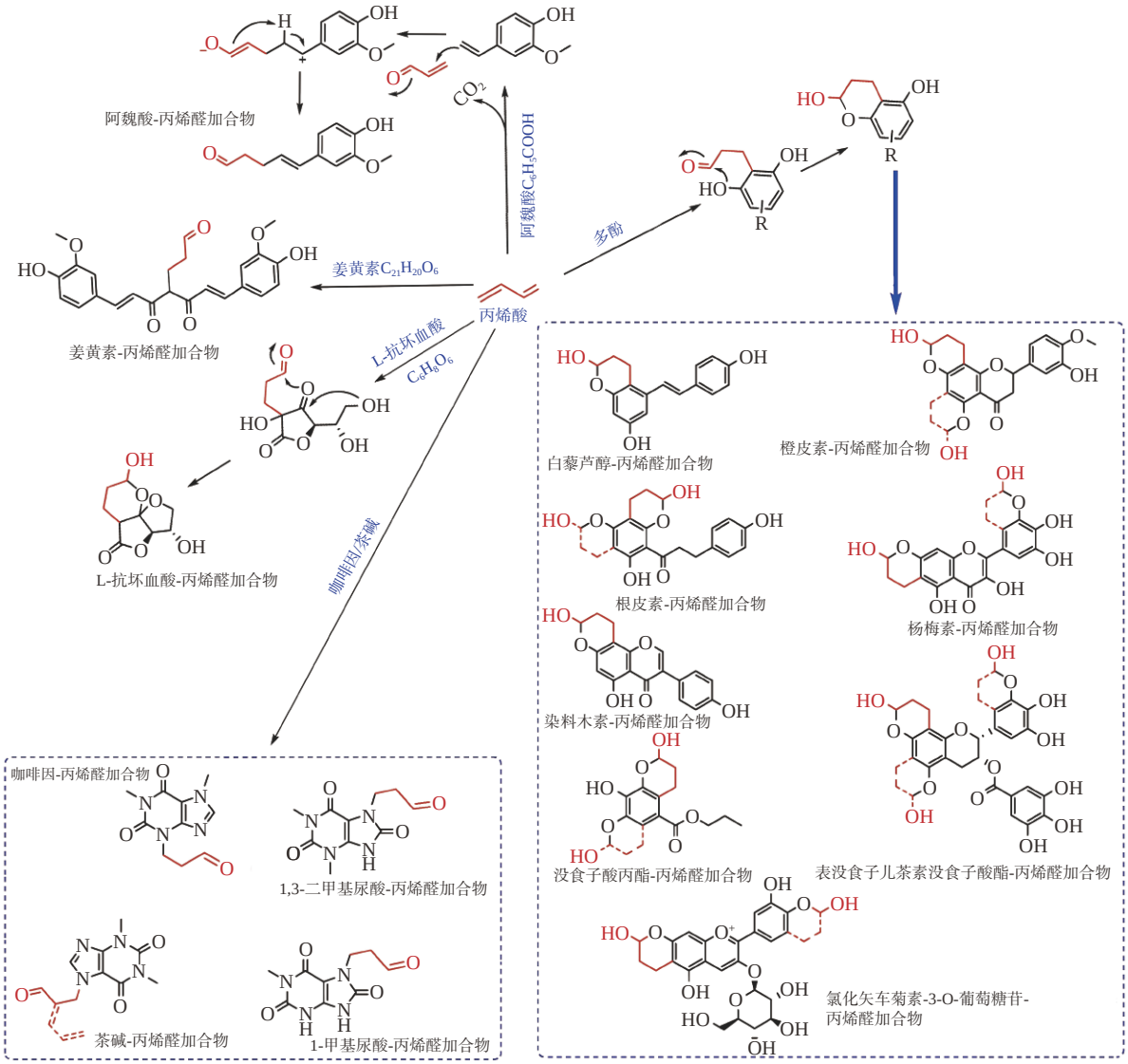


图 6 不同种类外源物质捕获丙烯醛形成的加合物[62]

Fig.6 Different kinds of exogenous substances capture the adducts formed by acrolein[62]

也有一些多酚的加合位点有所不同，如根皮素结合丙烯醛的活性位点位于 C-3 和 C-5 位[54]，杨梅素[57]、白藜芦醇[55] 和 EGCG[53] 等化合物 B 环的 C-2 位可以与丙烯醛发生 Michael 加成反应并与 C-3 位羟基成环，三者在模拟生理条件下，对丙烯醛的捕获率均达 85% 以上。Jiang 等[58] 研究发现姜黄素也可以捕获丙烯醛形成加合物，其在碱性条件下会被激活，并与丙烯醛发生 Michael 加成反应，在 C-1 位和丙烯醛结合，形成姜黄素-丙烯醛加合物（CMA-1），其结构如图 5 所示，当姜黄素（0.03%）与槲皮素（0.014%）联合添加时能够协同抑制烤鸡翅中的丙烯醛生成，且将抑制率提升到 72%，远高于单一多酚的抑制活性。Fodor 等[59] 提出 L-抗坏血酸是与丙烯醛反应的良好 Michael 供体，并且经过烯二醇介导的分子内环化能够形成抗坏血酸-丙烯醛加合物。Wang 等[60] 发现没食子酸丙酯在高温下能有效捕获丙烯醛，并利用蛋糕模型证实了其对真实食品体系中丙烯醛的捕获作用。Liu 等[61] 通过建立多酚-丙烯醛直接反应体系，对包括小豆蔻素、姜黄素、山姜素、乔松素等在内的数种多酚进行了实验，发现小豆蔻素、山姜素、姜黄素和乔松素几种多酚可以与丙烯醛反应形成多酚-丙烯醛加合物。

图 6 总结概括了当前已有报道的不同种类多酚化合物捕获丙烯醛形成相应加合物的结构[62]。此外，部分多酚化合物也能捕获丁烯醛生成加合物[54]，但目前相关研究较少。上述研究表明，在 IQ 型 HAs 的反应体系中，外源添加物也可能通过捕获体系中的活性羰基化合物丙烯醛和丁烯醛，进而实现对 IQ 型 HAs 的抑制。

3　总结与展望

本文系统分析了热加工肉制品中 IQ 型 HAs 的形成机理，并重点阐述了外源添加物对 IQ 型 HAs 形成的抑制机制，分别从前体物竞争性抑制机制、自由基清除机制和活性羰基化合物捕获机制 3 个方面进行了分析和讨论。在实际的肉制品热加工过程中，采用合适的热加工方式，配合合理的外源添加物，进而通过有效清除反应体系中的自由基，捕获活性羰基化合物，实现降低 IQ 型 HAs 的生成量，提升肉类食品加工的精细化水平，为肉类食品的可持续健康发展保驾护航。但与此同时，还有一些问题亟待进一步探讨，例如利用外源添加物清除自由基反应后，其可能形成的多酚自由基的去向尚缺乏更深层次的探究，外源添加物捕获活性羰基化合物后形成的新化合物的毒理学特性也尚不明晰，这些都是值得深究的科学问题。另外，HAs 的种类繁多，而截止目前，仅有个别 HAs 的形成过程相对较为明确，对于其他种类 HAs 的形成机制，以及相应的抑制机制亟待探索研究。

此外，当前对于外源添加物抑制 IQ 型杂环胺的研究主要集中在添加植物基多酚这一范围内，对其他类型的外源添加物研究较少。在其他类型的 HAs，如 PhIP 的研究中，国内外学者尝试使用包括特定种类氨基酸浸泡、添加亲水胶体等方法成功降低了 PhIP 的含量。在过往研究中，有学者提出 IQ 型 HAs 的形成路径与 PhIP 存在部分相似，且有少部分研究也发现亲水胶体、乳化剂和部分黄酮苷可以有效降低 IQ 型 HAs 含量，因此，未来研究中可以借鉴与 IQ 型 HAs 相似结构和形成途径的 HAs 的资料进行深入研究。同时，目前对于 IQ 型 HAs 的研究中，外源添加物的主要成分为多酚、黄酮和类黄酮这些植物基成分，对不同多酚间及不同外源性添加物间的协同作用研究相对较少。因此，多种同类外源物质或不同种类外源添加物间是否具有某种协同效应，其能否对 HAs 的生成产生较显著的影响可能是未来此类研究的重点。

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

参考文献

[1] BELLAMRI M, LE HEGARAT L, VERNHET L, et al. Human T lymphocytes bioactivate heterocyclic aromatic amines by forming DNA adducts[J]. Environmental and Molecular Mutagenesis, 2016, 57(9): 656−667.

[2] PATHAK K V, CHIU T L, AMIN E A, et al. Methemoglobin formation and characterization of hemoglobin adducts of carcinogenic aromatic amines and heterocyclic aromatic amines[J]. Chemical Research in Toxicology, 2016, 29(3): 255−269.

[3] GIBIS M. Heterocyclic aromatic amines in cooked meat products: causes, formation, occurrence, and risk assessment[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2016, 15(2): 269−302.

[4] 张世钰, 高萌, 王未, 等. 植物多酚抑制热加工肉制品中杂环胺形成机制研究进展[J]. 食品科学, 2023, 44(9): 211−220. [ZHANG Shiyu, GAO Meng, WANG Wei, et al. Research progress on the mechanism of plant polyphenols inhibiting the formation of heterocyclic amines in heat-processed meat products[J]. Food Science, 2023, 44(9): 211−220.]

[5] BARZEGAR F, KAMANKESH M, MOHAMMADI A. Heterocyclic aromatic amines in cooked food: A review on formation, health risk-toxicology and their analytical techniques[J]. Food Chemistry, 2019, 280: 240−254.

[6] ZHAO L, PAN F, ZHOU N, et al. Quantitative proteomics and bioinformatics analyses reveal the protective effects of cyanidin-3-O-glucoside and its metabolite protocatechuic acid against 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ)-induced cytotoxicity in HepG2 cells via apoptosis-related pathways[J]. Food and Chemical Toxicology, 2021, 153: 112256.

[7] TAUQEERUNNISA S, JASON R C. Potential role of heterocyclic aromatic amines in neurodegeneration[J]. Chemical Research in Toxicology, 2022, 35: 59−72.

[8] LI Z, CAO P, MENG H, et al. Long-term exposure to 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline can trigger a potential risk of Parkinson's disease[J]. Journal of Hazardous Materials, 2021, 412: 125230.

[9] STAVRIC B. Biological significance of trace levels of mutagenic heterocyclic aromatic amines in human diet: A critical

review[J]. Food and Chemical Toxicology, 1994, 32(10): 977−994.
[10] ZAMORA R, LAVADO-TENA C M, HIDALGO F J. Identification of precursors and formation pathway for the heterocyclic aromatic amine 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline(IQ)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(28): 7474−7481.
[11] SKOG K, JÄGERSTAD K, ARVIDSSON P, et al. Chemistry, formation and occurrence of genotoxic heterocyclic amines identified in model systems and cooked foods[J]. Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A, 1998, 207(6): 419−427.
[12] SKOG K, JAGERSTAD M. Incorporation of carbon atoms from glucose into the food mutagens MeIQx and 4, 8-DiMeIQx using 14C-labelled glucose in a model system[J]. Carcinogenesis, 1993, 14(10): 2027−2031.
[13] SKOG K, JAGERSTAD M. Incorporation of 14C-glucose into mutagenic heterocyclic amines[C]//Labuza T P, Reineccius G A, Monnier V M, et al. In: Woodhead publishing series in food science, technology and nutrition, maillard reactions in chemistry, food and health. Woodhead Publishing, 2005: 147−152.
[14] ZAMORA R, HIDALGO F J. Formation of heterocyclic aromatic amines with the structure of aminoimidazoazarenes in food products[J]. Food Chemistry, 2019, 313: 126128.
[15] ZAMORA R, LAVADOTENA C M, HIDALGO F J. Reactive carbonyls and the formation of the heterocyclic aromatic amine 2-amino-3, 4-dimethylimidazo(4,5-f)quinoline (MeIQ)[J]. Food Chemistry, 2020, 324: 126898.
[16] LEE H, LIN M Y, LIN S T. Characterization of the mutagen 2-amino-3-methylimidazo [4,5-f]quinoline prepared from a 2-methylpyridine/creatinine/acetylformaldehyde model system[J]. Mutagenesis, 1994, 9(2): 157−162.
[17] 侯慧文. 不同烤制程度下羊肉中杂环胺生成规律的研究[D]. 锦州: 渤海大学, 2021: 15−68. [HOU Huiwen. Study on the formation of heterocyclic amines in mutton under different roasting degrees[D]. Jinzhou: Bohai University, 2021: 15−68.]
[18] HAN T, WANG T, HOU H, et al. Raw to charred: Changes of precursors and intermediates and their correlation with heterocyclic amines formation in grilled lamb[J]. Meat Science, 2023, 195: 108999.
[19] PEARSON A M, CHEN C, GRAY J I, et al. Mechanism(s) involved in meat mutagen formation and inhibition[J]. Free Radical Biology and Medicine, 1992, 13(2): 161−167.
[20] KATO T, HARASHIMA T, MORIYA N, et al. Formation of the mutagenic/carcmogenic imidazoquinoxaline- type heterocyclic amines through the unstable free radical Maillard intermediates and its inhibition by phenolic antioxidants[J]. Carcinogenesis, 1996, 17(11): 2469−2476.
[21] KIKUGAWA K. Involvement of free radicals in the formation of heterocyclic amines and prevention by antioxidants[J]. Cancer Letters, 1999, 143(2): 123−126.
[22] BORDAS M, MOYANO E, PUIGNOU L, et al. Formation and stability of heterocyclic amines in a meat flavour model system. Effect of temperature, time and precursors[J]. Journal of Chromatography B, 2004, 802(1): 11−17.
[23] SZTERK A, WASZKIEWICZROBAK B. Influence of selected quality factors of beef on the profile and the quantity of heterocyclic aromatic amines during processing at high temperature[J]. Meat Science, 2014, 96(3): 1177−1184.
[24] 任晓镁. 新疆多枝柽柳皮提取物对烤羊肉饼品质及杂环胺形成的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2020: 135−141. [REN Xiaopu. Effects of Xinjiang *Tamarix ramosissima* bark extract on the quality and heterocyclic amine formation of roast mutton patties[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2020: 135−141.]
[25] ZENG M, LI Y, HE Z, et al. Discrimination and investigation of inhibitory patterns of flavonoids and phenolic acids on heterocyclic amine formation in chemical model systems by UPLC-MS profiling and chemometrics[J]. European Food Research and Technology, 2016, 242(3): 313−319.
[26] TENG H, MI Y N, DENG H T, et al. Acylated anthocyanin inhibited the formation of heterocyclic amines in hybrid chemical model system and its underlying mechanism[J]. Food Chemistry: X, 2023, 17: 100559.
[27] CHU J, LIN S, YUAN Y, et al. Effects of quercetin and l-ascorbic acid on heterocyclic amines and advanced glycation end products production in roasted eel and lipid-mediated inhibition mechanism analysis[J]. Food Chemistry, 2024, 441: 138394.
[28] CHEN Y, XI J. Effects of the non-covalent interactions between polyphenols and proteins on the formations of the heterocyclic amines in dry heated soybean protein isolate[J]. Food Chemistry, 2021, 373: 131557.
[29] DING X, ZHANG D, LIU H, et al. Chlorogenic acid and epicatechin: An efficient inhibitor of heterocyclic amines in charcoal roasted lamb meats[J]. Food Chemistry, 2021, 368: 130865.
[30] XUE C Y, HE Z Y, QIN F, et al. Effects of amides from pungent spices on the free and protein-bound heterocyclic amine profiles of roast beef patties by UPLC-MS/MS and multivariate statistical analysis[J]. Food Research International, 2020, 135: 109299.
[31] CHENG X R, MA J H, ISSOUFOU A , et al. Electrophilic components from Xiaoheiyao (rhizomes of *Inula nervosa* Wall.) alleviate the production of heterocyclic aromatic amines via creatinine inhibition[J]. Food Chemistry, 2023, 404: 134561.
[32] XU Y, CHENG Y, ZHU Z, et al. Inhibitory effect of mulberry leaf (*Morus alba* L.) extract on the formation of free and bound heterocyclic amines in pan-fried muscovy duck (*Cairina moschata*) patties[J]. Food Control, 2023, 144: 109359.
[33] ZHANG S, WANG R, CHU J, et al. Vegetable extracts: Effective inhibitors of heterocyclic aromatic amines and advanced glycation end products in roasted mackerel[J]. Food Chemistry, 2023, 412: 135559.
[34] ALAEJOS M S, AFONSO A M. Factors that affect the content of heterocyclic aromatic amines in foods[J]. Comprehensive Reviews in Food Science & Food Safety, 2011, 10(2): 52−108.
[35] BALOGH Z, GRAY J I, GOMAA E A, et al. Formation and inhibition of heterocyclic aromatic amines in fried ground beef patties[J]. Food and Chemical Toxicology, 2000, 38(5): 395−401.
[36] KHAN I A, LUO J, SHI H B, et al. Mitigation of heterocyclic amines by phenolic compounds in allspice and perilla frutescens seed extract: The correlation between antioxidant capacities and mitigating activities[J]. Food Chemistry, 2021, 368: 130845.
[37] TENGILIMOGLU-METIN M M, AYTUL H, VURAL G, et al. Inhibitory effect of hawthorn extract on heterocyclic aromatic amine formation in beef and chicken breast meat[J]. Food Research International, 2017, 99: 586−595.
[38] TENG H, CHEN Y, LIN X J, et al. Inhibitory effect of the extract from Sonchus olearleu on the formation of carcinogenic heterocyclic aromatic amines during the pork cooking[J]. Food and Chemical Toxicology, 2019, 129: 138−143.
[39] KILIC S, OZ E, OZ F. Effect of turmeric on the reduction of heterocyclic aromatic amines and quality of chicken meatballs[J]. Food Control, 2021, 128: 108189.
[40] REN X, LI M, WANG W, et al. Inhibitory effect of Tamarix

ramosissima extract on the formation of heterocyclic amines in roast lamb patties by retarding the consumption of precursors and preventing free radicals[J]. Foods, 2022, 11: 1000.
[41] LOGANAYAKI N, SIDDHURAJU P, MANIAN S. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity of phenolic extracts from *Helicteres isora* L. and *Ceiba pentandra* L[J]. Journal of Food Science and Technology, 2013, 50(4): 687−695.
[42] NATHAN R, PERRON JULIA L, BRUMAGHIM. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding[J]. Cell Biochemistry and Biophysics, 2009, 53(2): 75−100.
[43] PAULINA M, ANNA S, MAGDALENA M, et al. Overview of the antioxidant and anti-inflammatory activities of selected plant compounds and their metal ions complexes[J]. Molecules, 2021, 26(16): 4886.
[44] KIYOMI K, KAZUYUKI H, KATO T, et al. Effect of food reductones on the generation of the pyrazine cation radical and on the formation of the mutagens in the reaction of glucose, glycine and creatinine[J]. Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2000, 465(1-2): 183−190.
[45] T ANDZI BARHÉ, G R FEUYA TCHOUYA. Comparative study of the antioxidant activity of the total polyphenols extracted from *Hibiscus Sabdariffa* L., *Glycine max* L. Merr., yellow tea and red wine through reaction with DPPH free radicals[J]. Arabian Journal of Chemistry, 2016, 9(1): 1−8.
[46] 石宝明, 迟子涵. 自由基对动物的危害及消除技术研究进展[J]. 饲料工业, 2021, 42(9): 1−6. [SHI Baoming, CHI Zihan. Research progress on the harm of free radicals to animals and elimination technology[J]. Feed Industry, 2021, 42(9): 1−6.]
[47] 胡燕, 袁晓晴. 食品体系中活性羰基物质的研究进展[J]. 粮食与油脂, 2017, 30(5): 1−3. [HU Yan, YUAN Xiaoqing. Research progress of active carbonyl compounds in food systems[J]. Cereals and Oils, 2017, 30(5): 1−3.]
[48] 汤龙, 宋焕禄, 王丽金. 不同分子质量大豆蛋白和鸡肉酶解物的美拉德反应产物风味特征分析[J]. 食品科学技术学报, 2023, 41(3): 148−162. [TANG Long, SONG Huanlu, WANG Lijin. Analysis of flavor characteristics of Maillard reaction products of soybean protein and chicken hydrolysates with different molecular weights[J]. Journal of Food Science and Technology, 2023, 41(3): 148−162.]
[49] LUND M N, RAY C. Control of Maillard reactions in foods: Strategies and chemical mechanisms[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistiy, 2017, 65(23): 4537−4552.
[50] ECHAVARRÍA A P, PAGÁN J, IBARZ A. Melanoidins formed by Maillard reaction in food and their biological activity[J]. Food Engineering Reviews, 2012, 4(4): 203−223.
[51] CHENG K W, CHEN F, WANG M. Inhibitory activities of dietary phenolic compounds on heterocyclic amine formation in both chemical model system and beef patties[J]. Molecular Nutrition and Food Research, 2007, 51(8): 969−976.
[52] CHENG K W, WONG C C, CHO C K, et al. Trapping of phenylacetaldehyde as a key mechanism responsible for naringenin's inhibitory activity in mutagenic 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine formation[J]. Chemical Research in Toxicology, 2008, 21(10): 2026−2034.
[53] ZHU Q, ZHENG Z P, CHENG K W, et al. Natural polyphenols as direct trapping agents of lipid peroxidation-derived acrolein and 4-hydroxy-trans-2-nonenal[J]. Chemical Research in Toxicology, 2009, 22(10): 1721−1727.
[54] ZAMORA R, AGUILAR I, GRANVOGL M, et al. Toxicologically relevant aldehydes produced during the frying process are trapped by food phenolics[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(27): 5583−5589.
[55] HUANG Q J, ZHU Y D, SANG S M, et al. Translating *in vitro* acrolein-trapping capacities of tea polyphenol and soy genistein to *in vivo* situation is mediated by the bioavailability and biotransformation of individual polyphenols[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2020, 64(1): 1900274.
[56] SONG X L, LU Y, LU Y L, et al. Adduct formation of acrolein with cyanidin-3-O-glucoside and its degradants/metabolites during thermal processing or *in vivo* after consumption of red bayberry[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(44): 294−301.
[57] ZHANG D M, JIANG X Y, XIAO L H, et al. Mechanistic studies of inhibition on acrolein by myricetin[J]. Food Chemistry, 2020, 323: 126788.
[58] JIANG X Y, LU Y, LU Y L, et al. Trapping of acrolein by curcumin and the synergistic inhibition effect of curcumin combined with quercetin[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 69(1): 294−301.
[59] FODOR G, ARNOLD R, MOHACSI T, et al. A new role for l-ascorbic acid: Michael donor to α,β-unsaturated carbonyl compounds[J]. Tetrahedron, 1983, 39(13): 2137−2145.
[60] WANG J Q, LU Y L, ZHENG T S, et al. Scavenging of acrolein by food-grade antioxidant propyl gallate in a model reaction system and cakes[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(31): 8520−8526.
[61] LIU J, LU Y, SI B, et al. Synergistic inhibitory effect of multiple polyphenols from spice on acrolein during high-temperature processing[J]. Foods, 2023, 12(12): 2326.
[62] JIANG K, HUANG C H, LIU F, et al. Origin and fate of acrolein in foods[J]. Foods, 2022, 11(13): 1976.