

非水相酶促合成不同链长的对香豆酸酯及其自由基清除能力

尹霞, 辛璇, 李晓凤

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 酶促酯交换反应常用于改善酚酸的亲脂性。本研究采用酶促酯交换策略, 将脂肪酸链以羧基的形式引入对香豆酸中, 成功地在非水介质中合成了一系列新的对香豆酸衍生物。在最佳反应条件下, 脂肪酶 Nov.435 40 mg/mL, 溶剂为吡啶:环己烷=1:9, 底物摩尔比=1:10, 温度 50 °C, 转速 180 r/min, 对香豆酸甲酯的转化率可达 98%。进一步的研究表明, 20 μM 时 p-CA 对 DPPH 自由基(醇溶体系)的清除活性为 56.34%, 对香豆酸月桂酯、对香豆酸癸酯、对香豆酸辛酯、对香豆酸己酯、对香豆酸丁酯和 TBHQ 在相同浓度下对 DPPH 自由基的清除活性分别为 73.91%、70.32%、68.90%、60.62%、43.65%和 67.51%。其中, 对香豆酸月桂酯的 DPPH 自由基清除活性明显高于 p-CA 和 TBHQ, 但低于 Trolox。结论: 非水相酶促合成的不同链长对香豆酸酯具有良好的清除自由基能力。因此, 合成的具有不同抗氧化活性的酯类衍生物有望应用于不同的食品、药物和化妆品体系中, 为酯类衍生物的合成提供有益的指导。

关键词: 非水相; 脂肪酶; 不同链长; 自由基; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2021)07-40-45

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.7.0217

Enzymatic Synthesis of Different Chain Lengths of Coumarate and Capacity of Scavenging Radical

YIN Xia, XIN Xuan, LI Xiao-feng

(School of Food Sciences and Engineering South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Enzymatic transesterification is often used to improve the lipophilicity of phenolic acids. In this study, a series of new derivatives of p-coumaric acid were successfully synthesized in non-aqueous medium by introducing fatty acid chain into p-coumaric acid in the form of carboxyl group by enzymatic transesterification strategy. Under the optimal reaction conditions: the lipase NOV.435 of 40 mg/mL, the solvent of pyridine: cyclohexane of 1:9, the molar ratio of substrate of 1:10, temperature of 50 °C, the rotation speed of 180 r/min, the conversion rate was reached to 98%. In addition, further study showed that the scavenging activity of p-Ca against DPPH radical (alcohol-soluble system) was 56.34% at 20 μM, and the scavenging activity against DPPH radical of lauryl coumarate, p-decyl coumarate, p-octyl coumarate, p-hexyl coumarate, p-butyl coumarate and TBHQ at the same concentration was 73.91%, 70.32%, 68.90%, 60.62%, 43.65% and 67.51%, respectively. Obviously, the scavenging activity of laurel ester against coumarate was higher than those of p-Ca and TBHQ. Conclusion: coumarate has good free radical scavenging ability by enzymatic synthesis of different chain lengths in non-aqueous phase. Therefore, the synthesized ester derivatives with different antioxidant activities will be expected to be used in different food, drug and cosmetic systems, and provide beneficial guidance for the synthesis of ester derivatives.

Key words: non-aqueous phase; lipase; different chain lengths; free radicals; antioxidant

引文格式:

尹霞,辛璇,李晓凤.非水相酶促合成不同链长的对香豆酸酯及其自由基清除能力[J].现代食品科技,2021,37(7):40-45

YIN Xia, XIN Xuan, LI Xiao-feng. Enzymatic synthesis of different chain lengths of coumarate and capacity of scavenging radical [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(7): 40-45

收稿日期: 2021-03-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21978101); 广州市科技计划民生科技项目(201803020031)

作者简介: 尹霞(1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 生物催化

通讯作者: 李晓凤(1977-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 生物催化

对香豆酸(PCA)是一种广泛存在于水果和蔬菜中的植物酚酸, 如苹果、葡萄、柑橘、菠菜和谷类, 在一些中药中也有丰富的含量^[1-4]。它具有丰富的生物活性, 包括清除自由基、抑制脂质过氧化、保护机体免受氧化性心脏损伤^[5]、抗炎活性^[6]。然而, 据报道, 对

香豆酸的亲水性是一个严重的缺点,因此限制了它们在脂肪和油脂系统^[7]中的抗氧化作用。为了克服这一限制,报道了通过酯化向酚酸中添加脂肪族侧链基团,验证了酚酸的改性后抗氧化活性增强,从而产生有价值的具有潜在乳化作用的酚类脂类,提高抗氧化性能。

迄今为止,已有报道称酚酸的酰化大多是通过化学催化或生物催化实现的,但传统的化学催化存在选择性差、试剂毒性大、条件苛刻等明显缺点。众所周知,酶催化可以克服化学催化的缺点,具有环境友好、副作用少、选择性高等明显优势^[8,9]。尽管对香豆酸的酯化化学合成反应有报道,但催化效率低,且合成产物的抗氧化活性几乎没有研究^[10]。

酚酸的抗氧化能力在总体上已经得到了充分的证明,特别是在亲脂体系中,对香豆酸具有显著的抗氧化能力,可与 BHA/BHT^[11]相媲美。与此同时,许多报道表明,酚酸作为抗氧化剂的效果是通过酯化而增强的^[12]。固定化脂肪酶是合成各种酚类酯的最常用酶之一。在这种背景下,通过酶催化不同链长对香豆酸,可以充分增加改性后化合物的稳定性和抗氧化活性,特别是油脂系统的抗氧化活性,然而,直接与不同的酚酸的酯化脂肪酸醇非常低效,通过与对香豆酸甲酯与醇进行酯交换可以达到更高的转化率^[13]。

因此,通过固定化脂肪酶,以对香豆酸甲酯和不同的脂肪醇为原料合成了一系列对香豆酸酯衍生物,为对香豆酸的改性提供了一种简便有效的途径。考察了脂肪酶种类、溶剂、含水量、底物摩尔比、温度和反应时间对催化性能的影响。在最佳条件下,合成了不同链长 PCA 酯类衍生物。在清除自由基实验中表现出良好的抗氧化能力,有望在不同的食品、药物和化妆品体系中得到应用,也为酯类衍生物的合成提供了有益的指导。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

甲基反式对香豆酸酯(纯度>98%)和 1-辛醇均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;Novozym 435、Lipozyme 40086、Lipozyme TLIM、Lipase PSIM 均购自丹麦诺维信公司;Lipase AY 30、Lipex Evity 100 t、AMANO Lipase PS 均购自日本天野酶公司。

1.2 主要仪器

KH-2000 型薄层色谱扫描仪,上海科贺生化科技有限公司;高效液相色谱-质量光谱仪(LC-MS),(Bruker Co.,德国)等。

1.3 试验方法

1.3.1 脂肪酶催化对香豆酸甲酯的酯交换反应

将甲基反式对香豆酸酯(20 mM)、脂肪醇(1000 mM)和固定化脂肪酶(40 mg/mL)分别置于吡啶/环己烷(4:6)(V/V)中,在活化分子筛(4Å,10% W/W)的存在下进行。随后,将反应混合物在 50 °C 下 180 r/min 的搅拌器上孵育 4 d。在规定的间隔从反应混合物中提取 20 μL,用甲醇稀释 50 倍,高效液相色谱(HPLC)分析,每个反应重复三次。为获得高纯度的产品,反应液体与甲醇通过减压蒸馏纯化,然后分成不同的组件通过薄层色谱洗脱液己烷/EA(85:15, V/V) 0.3 mm 层硅胶通过紫外灯(254 nm)观察产物及其条带,如果需要,炭化后喷洒 30%(V/V)硫酸加热(200 °C)紧随其后。在真空干燥条件下,所有产品均为黄色粉末,通过高效液相色谱分析,其纯度超过 95%。

1.3.2 高效液相色谱分析

反应混合物在 4.6 mm A 250 mm Zorbax bs-c18 柱(Agilent Technologies Co., Massachusetts)上使用 Waters 600E 泵和 Waters 2996 UV/光电二极管阵列检测器(Waters Corp., Massachusetts)在 308 nm 处进行分析。流动相采用甲醇和水的混合物(85:15, V/V)流速为 0.9 mL/min。对香豆酸 1、反式对香豆酸甲酯 2、丁基酯 3a、己基酯 3b、辛酯 3c、癸酯 3d、月桂酯 3e 的保留时间分别为 2.65、3.33、5.06、7.46、12.30、22.12、42.08 min。转化率和初始速率分别由方程式 1 和方程式 2 计算,其中 A₀ 和 A_t 分别为反应前和反应后对香豆酸甲酯的峰面积;C₀ 和 C_t 分别为反应前后对香豆酸甲酯的浓度(mmol/L);t 是反应时间(h)。

$$\text{conversion (\%)} = (A_t - A_0) / A_0 \times 100\%$$

$$V_0 (\text{mmol} / \text{L} * \text{h}) = (C_t - C_0) / t$$

1.3.3 不同链长对香豆酸酯抗氧化能力测定

为了评价 p-CA 酯类衍生物^[14]清除 DPPH 自由基的能力,对 Blois 方法进行了轻微修改。以乙醇为溶剂,制备浓度为 2×10⁻⁴ mol/L 的 DPPH 自由基溶液。溶液保存在 4 °C 的冰箱中供以后使用。将 0.5 mL p-CA 酯衍生物加入 4 mL 2×10⁻⁴ mol/L DPPH 自由基溶液中摇匀,室温静置 30 min。然后测量 517 nm 处的吸收值 A_i。同时测定 4 mL 2×10⁻⁴ mol/L DPPH 自由基溶解在 0.5 mL 60%乙醇混合物中的吸光度 A₀。清除 DPPH 的百分率计算公式如下:

$$\text{DPPH 清除效果(\%)} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100\%$$

式中, A₀ 为控制反应的吸光度, A₁ 为 p-CA 或其他清除剂存在时的吸光度。

1.3.4 统计分析

所有检验均为 3 个平行，数据以均数±标准差表示。采用杜基多重比较检验来确定参数平均值之间的显著差异。使用 SPSS 17.0 软件 (SPSS, Inc., Chicago, IL) 分析数据。 $p < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 反应产物分析

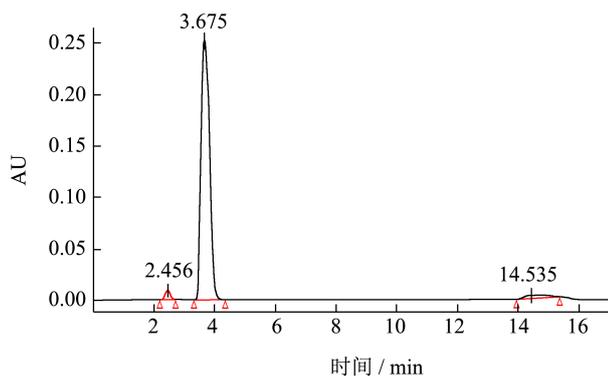


图 1 对香豆酸甲酯的标液液相色谱图

Fig.1 Standard liquid chromatography of methyl coumarate

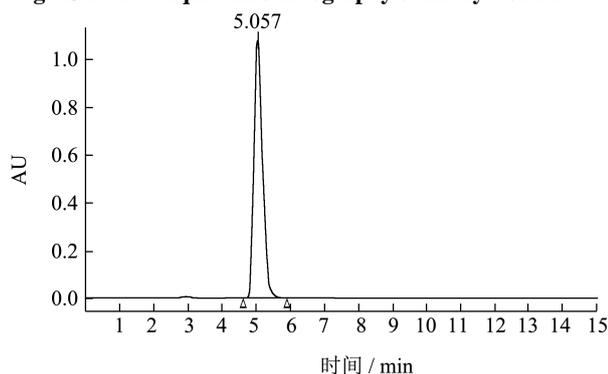


图 2 脂肪酶 Novozym435 催化转化合成对香豆酸丁酯液相色谱图

Fig.2 HPLC diagram of catalyzed conversion of Novozym435 to butyl p-coumarate

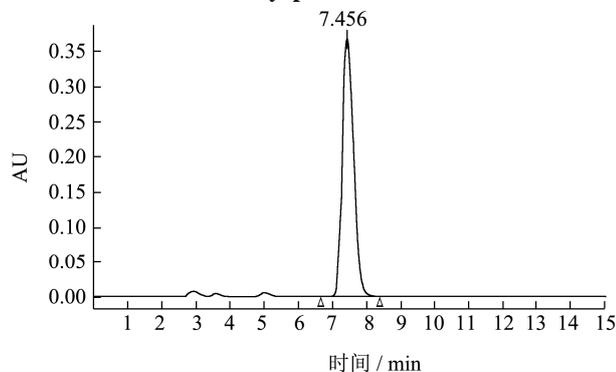


图 3 脂肪酶 Novozym435 催化转化合成对香豆酸己酯液相色谱图

Fig.3 HPLC diagram of catalytic conversion of Novozym435 to p-coumarate hexyl ester

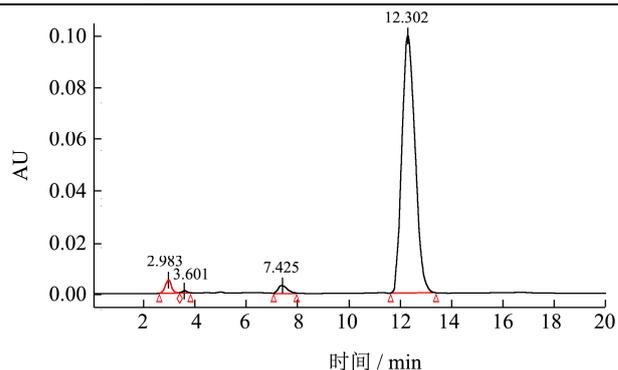


图 4 脂肪酶 Novozym435 催化转化合成对香豆酸辛酯液相色谱图

Fig.4 Diagram of catalytic conversion of Novozym435 to octyl coumarate

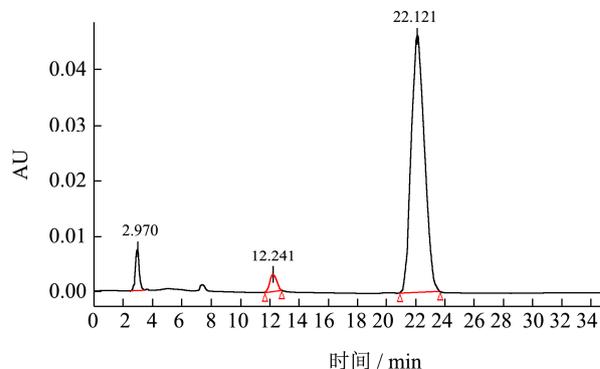


图 5 脂肪酶 Novozym435 催化转化合成对香豆酸癸酯液相色谱图

Fig.5 HPLC diagram of catalytic conversion of Novozym435 to decyl p-coumarate

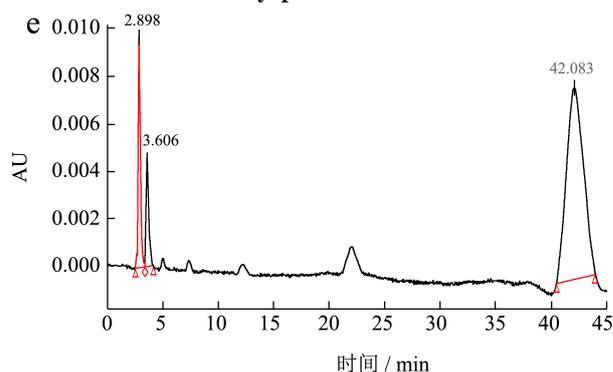


图 6 脂肪酶 Novozym435 催化转化合成对香豆酸月桂酯液相色谱图

Fig.6 HPLC diagram of catalytic conversion of Novozym435 to lauryl p-coumarate

将脂肪酶 Novozym 435 对对香豆酸甲酯催化转酯后的反应液进行高效液相色谱分析，其液相色谱图如图 1~6 所示。

对照图 1 与图 2~6 可知，对香豆酸甲酯发生转酯反应之后的生成的对香豆酸丁酯、对香豆酸己酯、对香豆酸辛酯、对香豆酸癸酯、对香豆酸月桂酯的保留

时间分别为 5.08、7.46、12.30、22.12、42.08 min。

2.2 非水相体系催化转酯反应

2.2.1 脂肪酶对反应体系的影响

表 1 脂肪酶对对香豆酸甲酯酯交换反应的影响

Table 1 Effect of lipase on transesterification of methyl

p-coumarate		
酶种类	初速度/[mmol/(L·h)]	转化率/%
Lipase PSIM	NA	NA
Lipozyme 40086	0.32±0.29 ^a	9.82±1.52 ^a
Lipase AY 30	NA	NA
Lipex Evity 100T	NA	NA
Lipase PS AMANO	NA	NA
Lipozyme TLIM	0.25±0.24 ^b	6.73±1.32 ^b
Novozyme 435	2.46±0.52 ^c	45.20±2.49 ^c

注：表中数据为平均值±标准差；同列不同小写字母表示不同处理之间在 0.05，水平存在显著差异 (n=3)。

以脂肪酶 PSIM、Lipozyme 40086、脂肪酶 AY 30、Lipex Evity 100T、脂肪酶 PS AMANO、Lipozyme TLIM、Novozyme 435 等 7 种固定化脂肪酶对香豆酸甲酯酯交换反应进行筛选，结果见表 1。在 7 种脂肪酶中，Novozym 435 在有机溶剂中反应 12 h 后底物转化率 (45.20%) 和初反应速率 [2.46 mmol/(L·h)] 最好，而其他脂肪酶几乎不能催化对香豆酸甲酯的酯交换反应。因此，本研究选择 Novozym 435 作为合成对香豆酸酯衍生物的生物催化剂。

2.2.2 有机溶剂对反应体系的影响

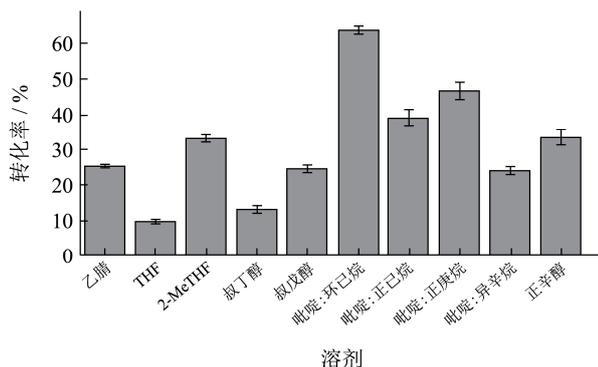


图 7 有机溶剂对 Novozym 435 催化合成对香豆酸辛酯的影响
Fig.7 Effect of organic solvents on octyl coumarate catalyzed by Novozym 435

对于对香豆酸甲酯的酯交换反应，溶剂在反应体系中的作用非常重要，有机溶剂的组成对脂肪酶的活性和固体底物的溶解有很大的影响。虽然对香豆酸甲酯在大多数有机溶剂中都能溶解，但本实验表明，疏水体系反应中酯交换反应的转化率更高，尤其是环己烷 (如图 7)。

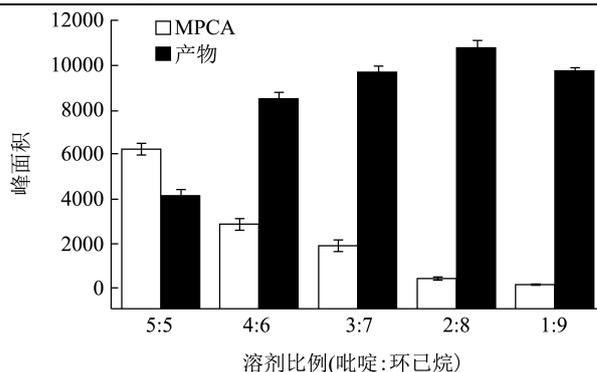


图 8 不同溶剂对比对转化率的影响

Fig.8 Influence of different solvent ratio on conversion rate

可以认为，疏水溶剂的加入降低了反应体系的极性，从而通过阻止水剥离来减弱极性溶剂对脂肪酶的失活作用。这与“疏水溶剂有利于脂肪酶活性的维持”的理论是一致的。结果表明，由环己烷和吡啶组成的二元溶剂是最适合该反应的反应介质，提供了期望的酯衍生物，在 24 h 转化率为 63.62%。此外，为了进一步提高转化率，还研究了吡啶与环己烷的对比对酯交换反应的影响。实验结果进一步证实了它在疏水体系中具有较高的转化率，当吡啶与环己烷的比例为 1:9 时，反应速率和转化率达到最大，转化率可达到 98% (如图 8)。

2.2.3 反应体系条件对转酯反应的影响

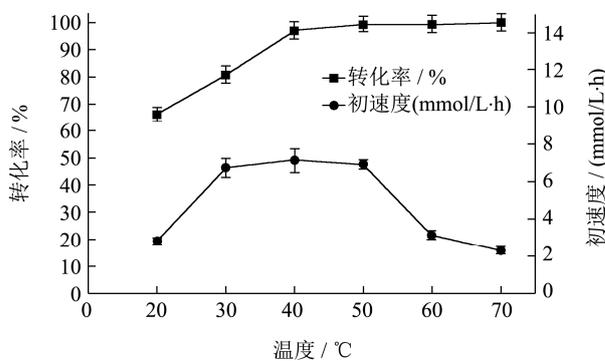


图 9 温度对转酯反应的影响

Fig.9 Influence of temperature on transesterification reaction

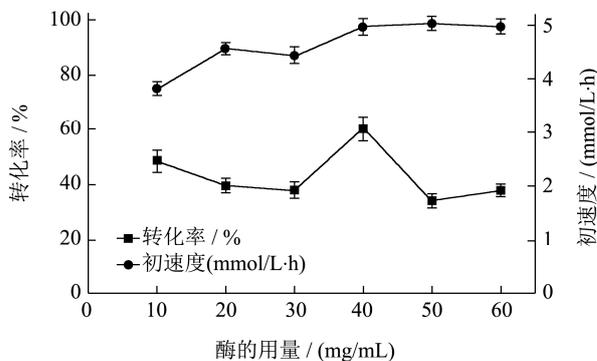


图 10 酶的用量对转酯反应的影响

Fig.10 Influence of enzyme dosage on transesterification reaction

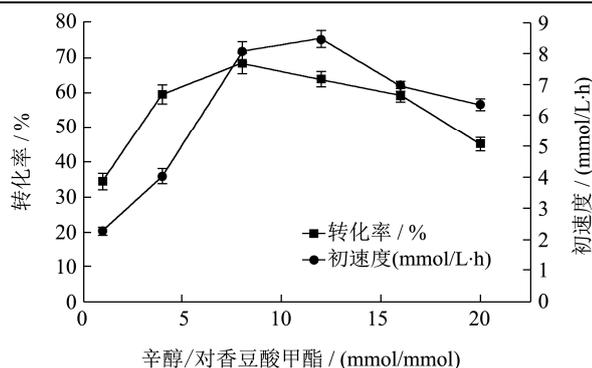


图 11 底物摩尔比对转酯反应的影响

Fig.11 Effect of substrate molar ratio on transester reaction

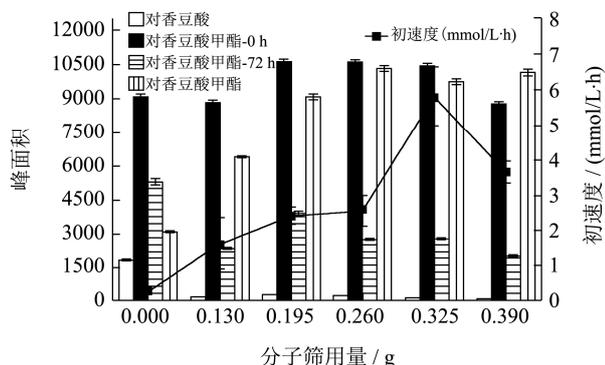


图 12 分子筛用量对转酯反应的影响

Fig.12 Influence of molecular sieve dosage on transesterification reaction

为了进一步优化反应条件，我们依次考察了一些关键变量对脂肪酶催化的香豆酸甲酯酯交换反应的影响，见图 9~12。

图 9 温度、图 10 酶的用量、图 11 底物摩尔比和图 12 分子筛用量对香豆酸酯交换反应的影响。除非另有说明，否则采用以下反应条件：20 mM 反式对香豆酸甲酯、80 mM 1-辛醇、40 mg/mL Novozym 435、2 mL 90%环己烷-吡啶二元溶剂、50 °C、180 r/min、反应时间 24 h。

图 9 显示了 20~70 °C 不同温度下反应温度对酯交换反应的影响。Novozym 435 是一种耐热酶，温度范围很广（20~110 °C）。较高的温度可能会增加其催化活性。转化率越高，引发速率越高，温度越高。较高的温度增加了底物和酶之间有效碰撞的频率。50 °C 的反应温度足以在 48 h 内使转化率高达 99%。图 10 显示了脂肪酶用量对反式对香豆酸甲酯酯交换反应的影响。事实上，较高的脂肪酶含量为酰基酶中间体的形成提供了更多的活性位点，从而缩短了反应平衡时间。考虑到脂肪酶的成本和效率，40 mg/mL 的 Novozym 435 在经济上更有吸引力，对反应没有不良影响。在优化的反应条件下，快速合成了对香豆酸辛酯，24 h 内转化率达 99%。图 11 显示的摩尔比的增加辛醇/对

香豆酸甲酯从 1 到 20 (mol/mol) 带来显著增加反应速率和转换，而进一步增加疏水性，辛醇过量导致反应效率的下降归因于它们之间的交互酰基供体/对香豆酸甲酯摩尔比率和其他因素影响的酰化反应。由于形成酯的量受反应平衡控制，因此要促进对香豆酸酯的合成，就需要稍过量的醇给体。因此，本研究选用的摩尔比为 1:8。图 12 显示了分子筛用量的影响，由于水解反应是由甲酯和辛酯发生的，因此控制含水率尤为重要。加入 4A 分子筛可以看出，随着分子筛质量的提高，水解反应立即被抑制，反应和转化率显著提高。限制反应介质的含水量，使反应平衡朝着酯交换反应的方向发展，使水解作用降到最低。但在反应介质中有少量的水是必需的，以溶解酶并保持其活性；但如果含水量过高，则会降低反应的产率。

2.3 对香豆酸酯衍生物对自由基清除作用

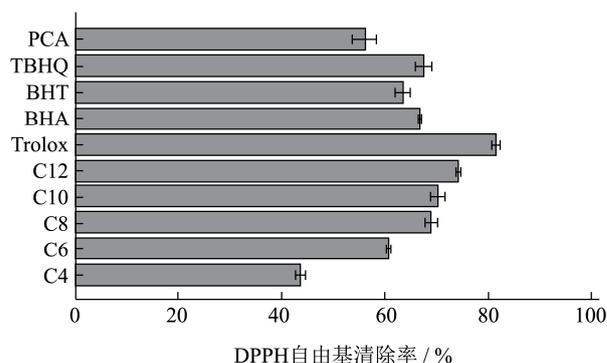


图 13 对香豆酸衍生物和参比抗氧化剂对 DPPH 自由基的清除活性

Fig.13 DPPH radical scavenging activity of coumaric acid derivatives and reference antioxidants

在 DPPH 测定中，抗氧化剂能将稳定的自由基 DPPH 还原为黄色的二苯基-苦基肼。这种方法是基于乙醇中 DPPH 的减少，在存在供氢抗氧化剂的情况下，由于反应中形成了非自由基形式 DPPH-h。DPPH 常作为评价抗氧化剂清除自由基活性的试剂。20 uM 时对香豆酸的 DPPH 自由基清除活性为 56.34%。在相同浓度下，对香豆酸月桂酯、对香豆酸癸酯、对香豆酸辛酯、对香豆酸己酯、对香豆酸丁酯和 TBHQ 的 DPPH 自由基清除活性分别为 73.91%、70.32%、68.90%、60.62%、43.65%和 67.51%。结果表明，对香豆酸月桂酯清除 DPPH 自由基的活性高于对香豆酸和 TBHQ，但低于 Trolox (图 13)。这些数据清楚地表明，对香豆酸是 DPPH 的有效电子或氢原子供体，长链醇的引入大大提高了其抗氧化能力。与同类的酚酸衍生物作对比^[15]，非水相酶合成的长链酯的自由基清除能力与同类型酚酸比较有显著提高，同时该研究表明酚类物质与抗氧化活性上存在相应的量效关系。将对

香豆酸月桂酯与果肉中的总有机酸的抗氧化能力作对比^[16], 发现其清除率 73.91%明显高于总有机酸 56.21%, 证明其良好的清除自由基能力。

3 结论

本试验研究了Novozym 435 脂肪酶在非水相体系中催化对香豆酸甲酯与几种脂肪醇的酯交换反应, 结果显示: 在非水相中转酯化反应后的产物转化率可达98%并得到该反应最佳条件为, 脂肪酶 Nov.435 40 mg/mL, 溶剂为吡啶: 环己烷=1:9, 底物摩尔比=1:10, 温度 50 °C, 转速 180 r/min。通过 DPPH 自由基清除能力的测定, 合成的对香豆酸月桂酯、对香豆酸癸酯的清除率为 73.91%、70.32%均高于原化合物 56.34%, 表明对香豆酸酯衍生物表现出较好的抗氧化活性。因此, 合成的具有不同抗氧化活性的酯类衍生物有望应用于不同的食品、药物和化妆品体系中, 为其衍生物在食品工业中的应用提供了有益的指导。

参考文献

- [1] Tinikul R, Chenprakhon P, Maenpuen S, et al. Biotransformation of plant-derived phenolic acids [J]. *Biotechnol*, 2018, 632: 13-17
- [2] Dominique Salameh, Cédric Brandam, Wissam Medawar, et al. Highlight on the problems generated by p-coumaric acid analysis in wine fermentations [J]. *Food Chemistry*, 2008, 107: 1661-1667
- [3] Yue Y, Shen P, Xu Y, et al. p-Coumaric acid improves oxidative and osmosis stress responses in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Sci Food Agric*, 2019, 99: 1190-1197
- [4] Figueroa-Espinoza Maria-Cruz, Villeneuve Pierre. Phenolic acids enzymatic lipophilization [J]. *Agric Food Chem*, 2005, 53(8): 2779-2787
- [5] Chatterjee N S, Panda S K, Navitha M, et al. Vanillic acid and coumaric acid grafted chitosan derivatives: improved grafting ratio and potential application in functional food [J]. *Food Sci Technol*, 2015, 52: 7153-7162
- [6] Ismail Kiliç, Yeşim Yeşiloğlu. Spectroscopic studies on the antioxidant activity of p-coumaric acid [J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2013, 115: 719-724
- [7] Lun-Yi Zang, Greg Cosma, Henry Gardner, et al. Effect of antioxidant protection by p-coumaric acid on low-density lipoprotein cholesterol oxidation [J]. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2000, 279: 954-960
- [8] Pragasam S J, Venkatesan V, Rasool M. Immunomodulatory and anti-inflammatory effect of p-coumaric acid, a common dietary polyphenol on experimental inflammation in rats [J]. *Inflammation*, 2013, 36: 169
- [9] Astrid von Gadow, Elizabeth Joubert, Chris F Hansmann. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), α -tocopherol, BHT, and BHA [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, 45: 632-638
- [10] Alan Crozier, Indu B Jaganath, Michael N Clifford. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health [J]. *Nat Prod Rep*, 2009, 26: 1001-1043
- [11] Stamatis H, Sereti V, Kolisis F N. Studies on the enzymatic synthesis of lipophilic derivatives of natural antioxidants [J]. *Amer Oil Chem Soc*, 1999, 76: 1505
- [12] Meyer A S, Donovan J L, Pearson D A, et al. Fruit hydroxycinnamic acids inhibit human low-density lipoprotein oxidation *in vitro* [J]. *Agric Food Chem*, 1998, 46(5): 1783-1787
- [13] Sabally K, Karboune S, Yeboah F K. Lipase-catalyzed esterification of selected phenolic acids with linolenyl alcohols in organic solvent media [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2005, 127: 17
- [14] L R Fukumoto, G Mazza. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48(8): 3597-3604
- [15] 陈金祥. 酚酸抗氧化活性的构效关系及抗氧化机制的研究 [D]. 太原: 中北大学, 2020
CHEN Jin-xiang. Studies on the structural-activity relationship and antioxidant mechanism of phenolic acid [D]. Taiyuan: North University of China, 2020
- [16] 阿依姑丽·艾合麦提, 李珊, 英提扎尔·艾合买提江, 等. 野山杏果肉总有机酸的分离纯化及其清除自由基能力的研究 [J]. *食品科技*, 2017, 42(5): 219-224
AIGUR Iahimeti, LI Shan, INTIZHAR Ahimettijiang, et al. Study on the separation and purification of total organic acids from the pulp of Yeshan apricot and its scavenging ability of free radicals [J]. *Food Science and Technology*, 2017, 42(5): 219-224