

核桃内生真菌 LTS-6-6 代谢产物的体外抗氧化活性及对油脂氧化稳定性的影响

赵谌董¹, 庞俊倩¹, 赵鑫丹¹, 郝苑汝¹, 翟梅枝^{1,2*}

(1. 西北农林科技大学林学院, 陕西杨凌 712100) (2. 陕西省核桃工程技术研究中心, 陕西杨凌 712100)

摘要: 以核桃内生真菌 LTS-6-6 为研究对象, 通过 ABTS 自由基清除法、羟基自由基清除法及 Fe³⁺还原能力测定等明确其代谢产物不同极性萃取物的体外抗氧化活性; 采用 Schaal 烘箱法, 以油脂过氧化值、酸值作为指标, 测定添加高活性萃取物对菜(籽)油氧化稳定性的影响。研究表明, 4 种萃取物中, 乙酸乙酯萃取物 (Ethyl acetate extract, EAE) 显示出较强的抗氧化活性, 其对 ABTS 自由基、羟基自由基有较强清除能力 (清除率≥80%), 清除率高出石油醚萃取物 (Petroleum ether extract, PEE) 71.39%; EAE 总酚和总黄酮含量为 643.71 mg 没食子酸/g 和 102.05 mg 芦丁/g。添加 0.02% EAE 处理的菜(籽)油, 在 70 °C 下储藏 8 d 的过氧化值、酸值分别为 5.88 mmol/kg、达到 0.85 mg/g。由阿伦尼乌斯公式预测, 在菜(籽)油中添加 0.02% EAE 时, 20 °C 下储藏期为 256 d, 与空白组相比, 延长 192 d, 说明添加 EAE 有效抑制了菜(籽)油氧化酸败。

关键词: 核桃内生真菌; 萃取物; 抗氧化活性; 氧化稳定性; 货架期

文章编号: 1673-9078(2022)04-43-51

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.4.0596

In Vitro Antioxidant Activity of the Metabolites of Walnut Endophytic Fungus LTS-6-6 and Their Effects on Oil Oxidation Stability

ZHAO Chendong¹, PANG Junqian¹, ZHAO Xindan¹, HAO Yuanru¹, ZHAI Meizhi^{1,2*}

(1.College of Forestry, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

(2.Shanxi Walnut Engineering Technology Research Center, Yangling 712100, China)

Abstract: Taking the walnut endophytic fungus LTS-6-6 as the research object, the *in vitro* antioxidant activities of different-polarity extracts of its metabolites were determined by the ABTS free radical scavenging method, the hydroxyl free radical scavenging method and the Fe³⁺ reduction ability assay; The Schaal oven method was used to determine the effect of adding highly active extracts on the oxidation stability of rapeseed oil using the peroxide value and acid value of oil as indicators. The research results showed that among the four extracts, ethyl acetate extract (EAE) showed a stronger antioxidant activity, and exhibited strong scavenging abilities for ABTS radical and hydroxyl radical (scavenging rate ≥ 80%). The clearance rate of EAE was higher (by 71.39%) than that of petroleum ether extract (PEE). The contents of total phenols and flavonoids in EAE were 643.71 mg gallic acid/g and 102.05 mg rutin/g. The peroxide value and acid value of the rapeseed oil treated with 0.02% EAE and stored at 70 °C for 8 days were 5.88 mmol/kg and 0.85 mg/g, respectively. As predicted by the Arrhenius formula, the rapeseed oil with 0.02% EAE had a storage period of 256 days at 20 °C, which was 192 days longer than that of the blank group, indicating that the addition of EAE effectively inhibited the oxidative rancidity of rapeseed oil.

引文格式:

赵谌董,庞俊倩,赵鑫丹,等.核桃内生真菌 LTS-6-6 代谢产物的体外抗氧化活性及对油脂氧化稳定性的影响[J].现代食品科技,2022,38(4):43-51

ZHAO Chendong, PANG Junqian, ZHAO Xindan, et al. *In vitro* antioxidant activity of the metabolites of walnut endophytic fungus LTS-6-6 and their effects on oil oxidation stability [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(4): 43-51

收稿日期: 2021-06-07

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31370552)

作者简介: 赵谌董 (1997-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 林产资源利用, E-mail: 603106953@qq.com; 共同第一作者: 庞俊倩 (1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 林产资源利用, E-mail: 410747672@qq.com

通讯作者: 翟梅枝 (1963-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 植物资源化学和林木遗传改良, E-mail: plum-zhai@163.com

Key words: endophytic fungi of walnut; extract; antioxidant activity; stabilization of edible oil; shelf life

随着食品工业发展,天然抗氧化剂作为有效防止油脂氧化酸败的重要手段被人们所重视。植物中富含抗氧化活性成分,是天然抗氧化剂的主要来源。植物内生真菌是指部分或全部生活史存活于健康植物组织内部,但不会引发宿主植物表现出明显感染症状,并能产生与宿主植物体中相同或相似化合物的真菌^[1]。胡萝卜苷作为抗氧化活性物质,具有消炎、抗肿瘤等作用。姚丽娜等^[2]从杜仲叶片中分离提取出槲皮素、咖啡酸和胡萝卜苷等抗氧化活性物质。吴聪慧等^[3]从杜仲叶片分离出一株内生真菌 *Alternaria* sp., 从其发酵液乙酸乙酯萃取物中检测出甘露醇、胡萝卜苷等抗氧化活性物质,与叶片中含有相同成分。植物内生真菌不仅可生产抗氧化活性物质,而且其代谢产物生产周期短、不受季节和地域影响。因此植物内生真菌已成为人们获取天然抗氧化物质的重要来源,具有开发新型食品抗氧化剂的潜力^[4]。

核桃 (*Juglans regia* L.), 胡桃科 (*Juglandaceae*) 胡桃属 (*Juglans*) 落叶乔木,其青皮、壳、仁、叶等部位广泛应用于制药与食品方面^[5],被称为世界“四大干果”之一。核桃作为高营养价值食品,其抗氧化能力受到较多关注。核桃叶、青皮、分心木和内种皮等不仅具有较强的清除自由基能力,其不同部位还富含多酚和黄酮类抗氧化活性物质。Ivo 等^[6]通过 DPPH 自由基清除能力测定核桃青皮水提物的半抑制浓度 (Half-inhibitory concentration, IC_{50}) 均低于 1 mg/mL,赵鑫丹等^[7]研究表明,核桃内种皮提取物对 DPPH 和 ABTS 自由基的清除能力 IC_{50} 分别为 0.009 mg/mL 和 0.021 mg/mL,表明核桃青皮、内种皮提取物有较好的自由基清除能力,具有较好的抗氧化能力。Pereira 等^[8]发现核桃叶片中含有槲皮素 3-半乳糖苷、绿原酸和香豆酸等抗氧化活性物质,景援朝等^[9]从核桃分心木乙醇提取物中分离得到胡桃苷、没食子酸、儿茶素和胡萝卜苷等抗氧化活性物质,表明核桃的叶片和分心木中富含多种抗氧化活性物质,具有较好的抗氧化能力。因此充分利用核桃资源,在开发天然抗氧化剂方面有着非常广阔的前景。

近年来,随着核桃研究的深入,从其中发现了丰富的内生真菌。Wang 等^[10]从核桃的根、枝、叶、果实四个部位分离得到 64 株核桃内生真菌,鉴定后归为 17 属,其中交链孢霉属 (*Alternaria*) 为优势类群。惠建超等^[11]从核桃的不同组织部位分离得到 643 株内生真菌,鉴定后归为 30 属,其中交链孢霉属 (*Alternaria*) 为优势类群,占菌株总数的 27.06%; 茎叶核菌属

(*Ectostroma*) 和花核菌属 (*Anthina*) 为亚优势类群,分别占菌株总数的 12.13%和 8.09%。核桃内生真菌的多样性为研究核桃内生真菌抗氧化活性提供依据,庞俊倩等^[12]前期研究表明,核桃内生真菌 LTS-6-6 菌株代谢产物对 DPPH 自由基有较好清除能力,初筛为高活性抗氧化菌株,表明核桃内生真菌是寻找天然抗氧化剂的良好资源。本研究以高活性菌株 LTS-6-6 为研究对象,研究其代谢产物各萃取物的抗氧化活性及对菜(籽)油的氧化稳定性的影响,为核桃内生真菌代谢产物作为油脂抗氧化剂的开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

核桃内生真菌交链孢霉属 (*Alternaria*) LTS-6-6, 自蓝田核桃幼果青皮中分离,由西北农林科技大学核桃研究中心实验室提供。

市售菜(籽)油。

1.2 试剂及仪器

芦丁、没食子酸、维生素 C, 东京化成工业株式会社; 水杨酸, 成都市科隆化学品有限公司; 亚硝酸钠, 广东省化学试剂工程技术研究开发中心; 三氯化铁, 洛阳昊华化学试剂有限公司; 碘化钾, 广东光华科技股份有限公司; 硫代硫酸铵, 广东省化学试剂工程技术研究开发中心; 2,2-二氮-双(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐 (ABTS)、2,4,6-三(2-吡啶基)三嗪 (TPTZ), 上海源叶生物制药有限公司; TBHQ, 阿拉丁生化试剂有限公司。

UV-1200 紫外可见分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; SKY-2102C 恒温震荡培养箱, 上海苏坤实业有限公司; SHB-III 循环式多用真空泵, 郑州长城科工贸有限公司; KH-500DE 数控超声波清洗器, 昆山禾创超声仪器有限公司; H1850 台式高速离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; XMTD-8222 电热鼓风干燥箱, 上海精宏实验设备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 不同极性萃取物制备

取菌株 LTS-6-6 于 PDA 培养基上 28 °C 活化培养 4~6 d 后, 接种至 PDB 培养基中, 置于 28 °C 恒温摇床中 180 r/min 培养 7 d。发酵液经过滤后依次用等体积石油醚、乙酸乙酯和正丁醇三种溶剂分别进行多次萃取,

各萃取液浓缩至浸膏状后, 分别得到石油醚萃取物 (Petroleum ether extract, PEE)、乙酸乙酯萃取物 (Ethyl acetate extract, EAE)、正丁醇萃取物 (Butyl alcohol extract, BAE) 及萃余物 (Water extract, WTE), 根据旋蒸后萃取物重量将各浓缩萃取物配成 10 mg/mL 的溶液, 备用。

1.3.2 抗氧化活性测定

1.3.2.1 ABTS 自由基清除能力的测定

参照白海娜等^[13]的方法。室温黑暗中将 7 mmol/L ABTS 原液与 2.45 mmol/L 过硫酸钾按 2:1 比例混合反应 12~16 h 得 ABTS 自由基储备液。将储备液与过硫酸钾混合摇匀, 获得 ABTS 自由基溶液, 加入到浓度分别为 0.001、0.005、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.1 mg/mL 的样品中测定吸光度, 对照为 Vc, 每组试验平行操作测定 3 次, 取平均值。按下式计算 ABTS 自由基清除率, 通过线性方程计算 IC₅₀。

ABTS 自由基清除率的计算公式为:

$$\text{清除率}/\% = [1 - (A - A_0) / A_1] \times 100\%$$

式中:

A—30 °C 下反应 6 min 样品溶液后于 734 nm 波长下测吸光度;

A₀—用 4 mL 无水乙醇代替 ABTS 自由基溶液的吸光度值;

A₁—用 1 mL 蒸馏水代替样品的吸光度值。

1.3.2.2 羟基自由基的清除能力的测定

采用水杨酸法, 参照 Zhao 等^[14]的方法。将 1 mL 浓度为 6 mmol/L 的硫酸亚铁溶液和 1 mL 6 mmol/L 的水杨酸溶液混合后, 加入 1 mL 1 mg/mL 样品溶液和 1 mL 0.1% H₂O₂ 溶液, 对照为 Vc, 每组实验平行操作测定 3 次, 取平均值, 按下式计算羟基自由基清除率, 通过线性方程计算 IC₅₀。

羟基自由基清除率的计算公式为:

$$\text{清除率}/\% = [1 - (A - A_0) / A_1] \times 100\%$$

式中:

A—加入样品溶液后的吸光度值;

A₀—未加双氧水的吸光度值;

A₁—未加试样的吸光度值。

1.3.2.3 总还原力

采用 FRAP 法, 参照 Léon W Nitiema 等^[15]的方法。将 10 mmol/L TPTZ 溶液与 20 mmol/L 三氯化铁溶液等体积混合后, 加入 10 倍体积 0.1 mol/L 醋酸钠缓冲液 (pH=3.6), 得到 FRAP 溶液。以 Vc 标品质量浓度 (mg/mL) 为横坐标, 吸光度值为纵坐标。回归方程为: $Y=66.341X-0.0005$, $R^2=0.9998$ 。

1.3.3 总酚和总黄酮含量测定

1.3.3.1 总酚含量

采用福林酚法, 参照 FranciscVasile D 等^[16]的方法。向福林酚试剂中加入样品后, 加入 1.4 mol/L 碳酸钠溶液, 常温避光下水浴反应 2 h, 波长 760 nm 下测定吸光度值, 以没食子酸质量浓度 (mg/g) 为横坐标, 760 nm 处吸光度为纵坐标。回归方程为:

$$Y=0.0132X+0.0097, R^2=0.9999.$$

1.3.3.2 总黄酮含量

采用铝盐显色法, 参照张新国等^[17]的方法。将亚硝酸钠溶液和硝酸铝溶液混合后, 加入 0.3 mL 10% 的硝酸铝溶液, 以 60% 乙醇定容。波长 510 nm 下测定吸光度值, 以芦丁质量浓度 (mg/g) 为横坐标, 510 nm 处吸光度为纵坐标。回归方程为: $Y=1.0046X+0.0005$, $R^2=0.9998$ 。

1.3.4 EAE 对油脂氧化稳定性影响

1.3.4.1 过氧化值和酸值测定

采用 Schaal 烘箱法加速油脂氧化酸败, 过氧化值测定根据 GB/T 5009.227-2016 《食品安全国家标准食品中过氧化值的测定》方法, 计算公式如下:

$$POV = (V - V_0) \times C \times 1000 / 2m$$

式中:

POV—样品的过氧化值, mmol/kg;

V—样品消耗硫代硫酸钠标准滴定溶液体积, mL;

V₀—空白消耗硫代硫酸钠标准滴定溶液体积, mL;

C—硫代硫酸钠标准滴定溶液浓度, mol/L;

m—样品质量, g;

1000—换算系数。

酸值测定根据 GB/T 5009.229-2016 《食品安全国家标准食品中酸价的测定》方法, 计算公式如下:

$$X = (V - V_0) \times C \times 56.1 / m$$

式中:

X—样品的酸值 (以 KOH 计), mg/g;

V—样品消耗 KOH 标准滴定溶液体积, mL;

V₀—空白样消耗 KOH 标准滴定溶液体积, mL;

C—KOH 标准滴定的实际浓度, mol/L;

m—样品质量, g。

1.3.4.2 货架期预测

参考 Kim 等^[18]的方法, 采用 Schaal 烘箱法, 进行加速氧化试验。将样品于 70 °C 烘箱中密封储存, 测定 8 d 内每 24 h 的过氧化值和酸值。根据阿伦尼乌斯经验公式, 反应温度每升高 10 °C, 反应速度提高 1 倍^[19], 如公式所示: $K_{(T+10^\circ\text{C})} / K_T = 2$ 。但反应速率常数 (K) 与油脂货架期 (Q) 呈反相关, 即反应速率常数 (K) 越大, 油脂酸败氧化速度越快, 油脂的货架期越短, 如公式所示: $Q_{(T)} / Q_{(T+10^\circ\text{C})} = 2$ 。储藏温度与

油脂货架期的关系见表 1 所示。

表 1 温度与货架期系数的关系

Table 1 Relationship between temperature and shelf life coefficient

温度	70 °C	60 °C	50 °C	40 °C	30 °C	20 °C
货架期系数	1	2	4	8	16	32

1.3 数据分析

采用 Origin 2018 软件绘图,所有试验设置 3 组平行,采用 SPSS 23.0 软件进行单因素方差分析法和皮尔逊相关系数法分析。

2 结果与分析

2.1 菌株 LTS-6-6 发酵产物不同极性萃取物的

体外抗氧化活性

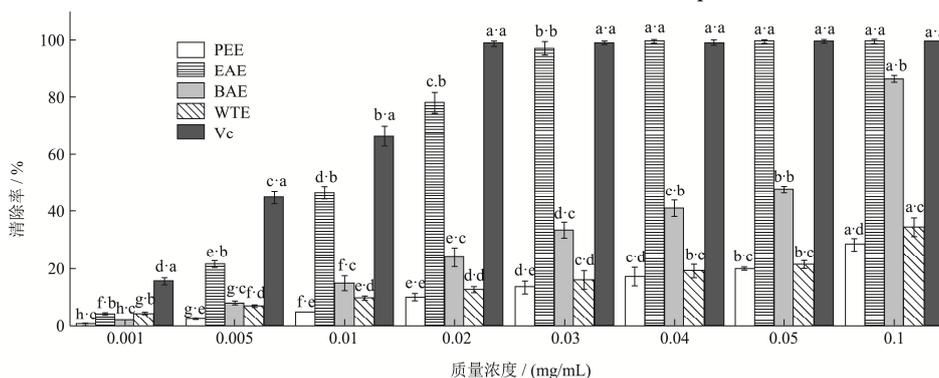


图 1 不同极性萃取物对 ABTS 自由基的清除率

Fig.1 ABTS radical scavenging rate of extracts with different polarity

注: 图中间隔号左边字母表示不同浓度下相同处理组差异分析结果, 右边字母为相同浓度下不同处理组差异分析结果。不同字母表示差异显著 ($p<0.05$), 相同字母表示差异不显著 ($p>0.05$)。图 2、3 同。

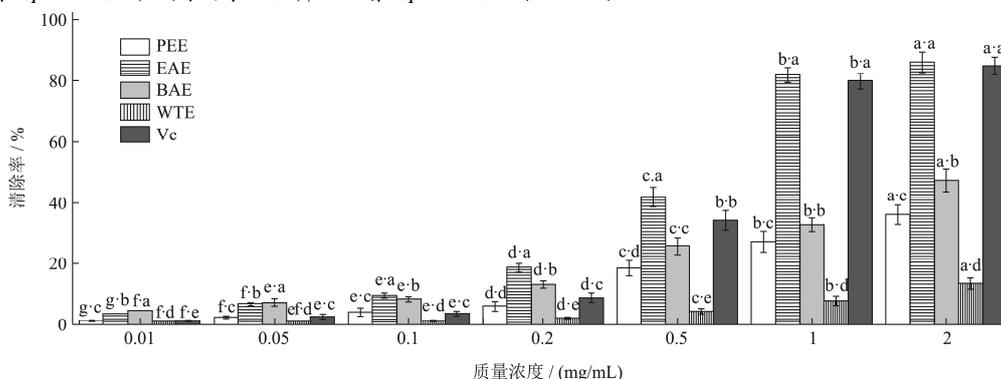


图 2 不同极性萃取物对羟基自由基的清除率

Fig.2 Hydroxyl radical scavenging rate of extracts with different polarity

由图 1 还可以看出,在 0.001~0.04 mg/mL 内,不同浓度 EAE 的 ABTS 自由基清除率均有显著差异 ($p<0.05$); 4 种萃取物中, EAE 的 ABTS 自由基清除能力优于其余萃取物。当浓度为 0.03 mg/mL 时, EAE

2.1.1 不同极性萃取物对 ABTS 自由基的清除效果

由图 1 可以看出,在供试浓度范围内 5 种处理组均可不同程度地清除 ABTS 自由基。当供试浓度为 0.001 mg/mL 时, PEE、BAE 的 ABTS 自由基清除率与 WTE、EAE 的 ABTS 自由基清除率均有显著差异 ($p<0.05$)。在 0.005~0.03 mg/mL 内,相同浓度下,处理间的 ABTS 自由基清除率均有显著差异 ($p<0.05$); 浓度为 0.04 mg/mL、0.1 mg/mL 时, ABTS 自由基清除率在 4 种萃取物处理间均有显著差异 ($p<0.05$), 清除率分别依次为: EAE (98.05%、99.65%) >BAE (41.21%、86.21%) >WTE (19.28%、34.41%) >PEE (17.25%、28.42%), 且都显示 EAE 与 Vc 的 ABTS 自由基清除率无显著差异 ($p>0.05$); 浓度为 0.05 mg/mL 时, PEE、WTE 两处理间的 ABTS 自由基清除率无显著差异 ($p>0.05$), 二者与其余处理均有显著差异 ($p<0.05$)。

与 Vc 的 ABTS 自由基清除率有显著差异 ($p<0.05$), 二者清除率分别为 96.82%和 99.10%。在 0.04~0.1 mg/mL 浓度内,不同浓度 EAE 的 ABTS 自由基清除率无显著差异 ($p>0.05$), 且 ABTS 自由基清除率在相

同浓度 EAE 与两处理间无显著差异 ($p>0.05$)。各处理的 IC_{50} 依次为: Vc ($9 \mu\text{g/mL}$) <EAE ($13 \mu\text{g/mL}$) <BAE ($41 \mu\text{g/mL}$) <WTE ($106 \mu\text{g/mL}$) <PEE ($131 \mu\text{g/mL}$)。

综上所述, EAE 具有较强的 ABTS 自由基清除能力。

2.1.2 不同极性萃取物对羟基自由基的清除效果

由图 2 可以看出, 在供试浓度范围内 5 种处理均可不同程度地清除羟基自由基, PEE、EAE 在不同浓度处理间清除率均有显著差异 ($p<0.05$), 且 EAE 的羟基自由基清除能力优于其余萃取物。在 $0.01\sim 2 \text{ mg/mL}$ 浓度范围内, 各萃取物不同浓度之间的羟基自由基清除率均有显著差异 ($p<0.05$); 当 BAE 浓度为 0.05 和 0.1 mg/mL 时, 其羟基自由基清除率无显著差异 ($p>0.05$), 分别为 7.6% 和 8.0% ; WTE 的羟基自由基清除率在 0.05 mg/mL 与 0.01 mg/mL 、 0.1 mg/mL 浓度间无显著差异 ($p>0.05$), 0.01 mg/mL 与 0.1 mg/mL 处理间羟基自由基清除率有显著差异 ($p<0.05$)。

由图 2 还可看出, 在相同浓度下各处理均呈现随着处理浓度的增大, 对羟基自由基清除率也逐渐增大的趋势。当浓度 $\leq 0.05 \text{ mg/mL}$ 时, 4 种萃取物中 BAE 的羟基自由基清除率高于其余萃取物; 在 $0.1\sim 2 \text{ mg/mL}$ 时, 相同浓度下的羟基自由基清除率依次为: EAE>BAE>PEE>WTE。当浓度 $\leq 0.5 \text{ mg/mL}$ 时, EAE 处理的羟基自由基清除率均显著高于 Vc 处理的清除率 ($p<0.05$), 当浓度 $\geq 1 \text{ mg/mL}$ 时, 两处理间无显著差异 ($p<0.05$)。表明在此浓度范围内二者的羟基自由基清除能力接近, 二者的羟基自由基清除率分别为 86.17% 和 85.05% 。EAE、Vc 的 IC_{50} 分别为 0.832

mg/mL 、 0.976 mg/mL 。在 2.0 mg/mL 时 5 个处理的羟基自由基清除率依次为: EAE (86.17%) >Vc (85.05%) >BAE (47.45%) >PEE (36.23%) >WTE (13.40%)。

综上所述, EAE 为高活性萃取物, 可以有效清除羟基自由基。

2.1.3 不同极性萃取物的 FRAP 总还原力

FRAP 通常用来表示样品的还原能力, 吸光度值越大其还原能力越强^[20]。由图 3 可以看出, 随着质量浓度的增大, 反应后溶液的吸光度值也不断增大。在 0.005 mg/mL 时, PEE、BAE 处理组的吸光度值无显著差异 ($p>0.05$), 但两者分别与 WTE、EAE 处理组的吸光度值有显著差异 ($p<0.05$)。 0.01 mg/mL 时, PEE、BAE 处理组的吸光度值之间无显著差异 ($p>0.05$), PEE、BAE 分别与 WTE、EAE 处理组的吸光度值有显著差异 ($p<0.05$)。 0.015 mg/mL 时, WTE、PEE、BAE、EAE 各处理间的吸光度值均有显著差异 ($p<0.05$)。相同浓度各萃取物吸光度值依次为: EAE>BAE>PEE>WTE。相同浓度下 EAE 的吸光度值均高于其余萃取物的吸光度值, 说明 EAE 总还原力高于其余萃取物, 具有较强抗氧化能力。这与潘峰等^[21]研究结果一致。相同处理时, PEE、BAE、EAE 在不同浓度间吸光度值均有显著差异 ($p<0.05$)。浓度 $\leq 0.015 \text{ mg/mL}$ 时, 不同浓度的 WTE 处理之间无显著差异 ($p>0.05$), 浓度 $\geq 0.015 \text{ mg/mL}$ 时, 不同浓度的 WTE 处理之间均有显著差异 ($p<0.05$)。

综合分析认为, EAE 无论在 ABTS 自由基清除能力和羟基自由基清除能力, 还是在 FRAP 总还原能力方面, 均强于其余萃取物, 说明 EAE 为高活性萃取物, 具有开发成新型抗氧化剂的潜力。

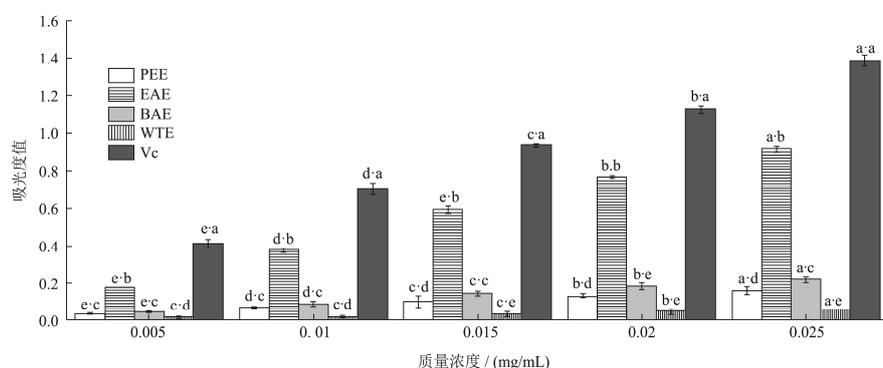


图 3 不同极性萃取的吸光度值

Fig.3 Absorbance value of extraction with different polarity

2.2 抗氧化活性与总酚和总黄酮含量相关性分析

菌株 LTS-6-6 发酵产物的不同极性萃取物中总酚和总黄酮含量见图 4。

由图 4 可以看出, 就总酚含量而言, 4 种萃取物之间均存在显著差异 ($p<0.05$), 总酚含量依次为 EAE

(643.71 mg 没食子酸/g) > PEE (183.42 mg 没食子酸/g) > BAE (97.70 mg 没食子酸/g) > WTE (36.55 mg 没食子酸/g), 且 EAE 的总酚含量达到 WTE 的 17.61 倍。就总黄酮含量而言, EAE 与其他 3 种萃取物之间差异显著, 总黄酮含量依次: EAE (102.05 mg 芦丁/g) > PEE (34.33 mg 芦丁/g) > BAE (13.58 mg 芦丁/g) > WTE (12.11 mg 芦丁/g)。EAE 总黄酮含量 102.05 mg 芦丁/g, 为 WTE 的 8.43 倍。由此可看出, 不同萃取物中总酚和总黄酮含量的顺序与 ABTS 自由基清除率、羟基自由基清除率和还原能力有所不同。PEE 的总酚和总黄酮含量大于 BAE, 但自由基清除率和总还原能力则为 BAE > PEE。说明 BAE 中除多酚和黄酮类物质之外, 其他抗氧化活性物质与之具有协同增效作用。

对抗氧化能力与总酚、总黄酮含量的相关性分析, 结果见表 2。从表 2 可以看出, 高活性菌株 LTS-6-6 代谢产物的体外抗氧化活性和酚类、黄酮类物质呈正相关。其中 ABTS 自由基清除率与总酚含量显著相关 ($p < 0.05$), 但与总黄酮含量相关性不显著 ($p > 0.05$);

表 2 总酚、总黄酮含量和抗氧化能力的皮尔逊相关系数

Table 2 Pearson's correlation coefficient with total phenol content and total flavonoid from LTS-6-6 and antioxidant capacities

相关性	ABTS ⁺ 清除率	OH·清除率	总还原力	总酚含量	总黄酮含量
ABTS ⁺ 清除率	1				
OH·清除率	0.85**	1			
总还原力	0.76**	0.68*	1		
总酚含量	0.62*	0.67*	0.96**	1	
总黄酮含量	0.58	0.66*	0.93**	0.99**	1

注: **表示相关性极显著 ($p < 0.01$), *表示相关性显著 ($p < 0.05$)。

表 3 不同处理组对菜(籽)油的过氧化值

Table 3 Different treatment group on peroxide value of rapeseed oil

处理 (mmol/kg)	天数/d						
	0	1	2	3	4	5	6
TBHQ	2.23±0.08 ^{d-a}	2.68±0.13 ^{c-bcd}	2.83±0.17 ^{c-de}	2.91±0.12 ^{bc-cd}	3.2±0.17 ^{ab-de}	2.80±0.15 ^{bc-d}	3.41±0.23 ^{a-d}
Vc	2.32±0.05 ^{e-a}	2.74±0.21 ^{d-bc}	3.02±0.06 ^{d-bcd}	3.42±0.29 ^{c-def}	3.73±0.15 ^{b-bc}	3.81±0.153 ^{ab-c}	4.36±0.15 ^{a-c}
0.01	2.33±0.07 ^{f-a}	2.90±0.10 ^{e-b}	3.22±0.12 ^{e-b}	3.89±0.09 ^{d-b}	4.53±0.10 ^{c-e}	5.09±0.08 ^{b-b}	5.97±0.11 ^{a-b}
0.02	2.41±0.06 ^{g-a}	2.77±0.13 ^{f-bc}	3.05±0.12 ^{e-bc}	3.55±0.18 ^{d-ef}	3.71±0.15 ^{c-b}	3.92±0.12 ^{b-bc}	4.27±0.06 ^{a-c}
0.03	2.33±0.06 ^{f-a}	2.70±0.24 ^{e-bcd}	2.79±0.35 ^{e-cde}	3.01±0.34 ^{d-cde}	3.44±0.20 ^{c-bcd}	3.76±0.20 ^{b-c}	4.15±0.09 ^{a-c}
0.04	2.30±0.11 ^{e-a}	2.48±0.13 ^{e-cd}	2.63±0.27 ^{de-de}	3.03±0.27 ^{cd,cde}	3.21±0.30 ^{bc-cde}	3.45±0.23 ^{ab-c}	3.68±0.32 ^{a-d}
0.05	2.31±0.13 ^{e-a}	2.32±0.29 ^{de-d}	2.29±0.39 ^{de-e}	2.74±0.61 ^{de-e}	2.79±0.61 ^{cd,e}	3.22±0.34 ^{bc-cd}	3.39±0.44 ^{a-d}
CK	2.30±0.13 ^{e-a}	3.31±0.28 ^{e-a}	5.42±0.25 ^{d-A}	9.32±0.32 ^{c-A}	13.6±0.13 ^{b-A}	13.9±0.17 ^{b-A}	24.77±0.10 ^{a-A}

注: 表中间隔号左边字母表示不同处理时间下相同处理组差异分析结果, 右边字母为相同处理时间下不同处理组差异分析结果。不同字母表示差异显著 ($p < 0.05$), 相同字母表示差异不显著 ($p > 0.05$)。表 4 同。

2.3 乙酸乙酯萃取物 (EAE) 对菜(籽)油氧化稳定性的影响

羟基自由基清除率与总酚、总黄酮含量均有显著相关性 ($p < 0.05$); 总还原能力与总酚、总黄酮含量均具有极显著相关性 ($p < 0.01$)。综上可见, 高活性菌株 LTS-6-6 代谢产物的抗氧化活性与其总酚、总黄酮含量密切相关。

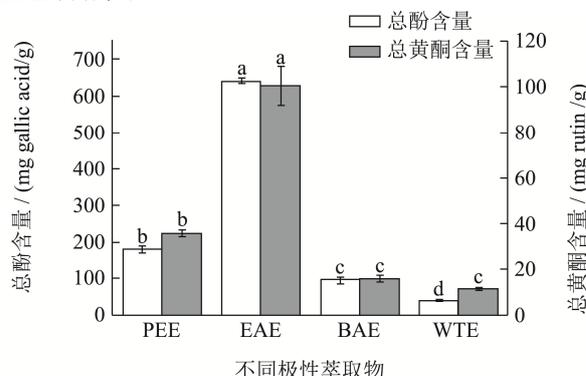


图 4 菌株 LTS-6-6 发酵产物不同极性萃取物的总酚、总黄酮含量

Fig.4 Total phenol content and total flavonoid of different polar extracts from metabolites of LTS-6-6

试菜(籽)油在试验期间的过氧化值见表3。

由表3可知,菜(籽)油处理1~6 d时,空白对照组(Control check, CK)的过氧化值与处理组均有显著或极显著差异,表明处理组可不同程度的抑制菜(籽)油氧化。处理3 d时,CK组的过氧化值9.32 mmol/kg,远大于6.0 mmol/kg(国标阈值);6 d时CK组的过氧化值远超阈值,达到24.77 mmol/kg,但添加0.01%~0.05% EAE处理组均未超过阈值。4~6 d时,添加0.01% EAE处理组与其余处理组的过氧化值均有显著差异($p < 0.05$)。比较添加0.02% EAE和0.02% Vc两个处理组,在相同处理时间内两个处理间的油脂过氧化值均无显著差异($p > 0.05$),表明在此时间范围内,添加相同浓度的EAE和Vc二者的抑制菜(籽)油氧化能力相当,添加0.05% EAE处理组的抗氧化效

果与添加0.02% TBHQ处理组接近,在相同处理时间时,二者的过氧化值无显著差异($p > 0.05$);6 d时其过氧化值分别为3.39 mmol/kg和3.41 mmol/kg,远低于临界值,说明添加0.05% EAE能较好地抑制菜(籽)油的氧化作用。康连虎等^[22]研究显示,加入0.02%石榴籽多酚后其6 d时过氧化值为3.34 mmol/kg,本试验添加0.05% EAE后6 d时过氧化值为3.39 mmol/kg,两者抗氧化效果接近。由此可看出,高活性菌株LTS-6-6发酵产物的乙酸乙酯萃取物(EAE)在抗油脂氧化方面具有较好潜力。

2.3.2 添加抗氧化剂对菜(籽)油酸值的影响

在添加0.02% TBHQ、0.02% Vc、0.01%~0.05% EAE条件下,采用烘箱法(70 °C)加速油脂酸败,供试菜(籽)油在试验期间的酸值变化见表4。

表4 不同处理组对菜(籽)油酸值的影响

Table 4 Effect of different treatment group on acid value of rapeseed oil

处理 (mg/g)	天数/d							
	0	2	4	6	8	10	12	14
TBHQ	0.12±0.01 ^{fa}	0.19±0.02 ^{fa}	0.27±0.08 ^{fc}	0.48±0.07 ^{ec}	0.73±0.11 ^{dc}	0.92±0.09 ^{cc}	1.15±0.11 ^{bd}	1.41±0.13 ^{ae}
Vc	0.12±0.03 ^{ga}	0.24±0.06 ^{ga}	0.33±0.09 ^{fb}	0.56±0.11 ^{ec}	0.85±0.10 ^{dc}	1.15±0.03 ^{cc}	1.46±0.12 ^{bcd}	1.81±0.20 ^{ac}
0.01	0.16±0.02 ^{ga}	0.23±0.26 ^{ga}	0.53±0.18 ^{fab}	0.99±0.09 ^{eb}	1.31±0.22 ^{db}	1.93±0.08 ^{cb}	2.34±0.26 ^{bb}	2.72±0.17 ^{ab}
0.02	0.16±0.01 ^{fa}	0.19±0.16 ^{efa}	0.32±0.22 ^{efbc}	0.63±0.16 ^{dec}	0.85±0.13 ^{cdc}	1.25±0.32 ^{bc}	1.53±0.53 ^{abc}	1.86±0.11 ^{ac}
0.03	0.16±0.01 ^{fa}	0.19±0.05 ^{fa}	0.28±0.05 ^{fc}	0.61±0.11 ^{ec}	0.88±0.11 ^{dc}	1.14±0.13 ^{cc}	1.45±0.17 ^{bcd}	1.79±0.16 ^{acd}
0.04	0.16±0.01 ^{fa}	0.18±0.04 ^{fa}	0.27±0.65 ^{fc}	0.57±0.10 ^{ec}	0.8±0.18 ^{dc}	1.06±0.16 ^{cc}	1.36±0.17 ^{bcd}	1.62±0.13 ^{acde}
0.05	0.16±0.01 ^{ea}	0.17±0.02 ^{ea}	0.22±0.05 ^{ec}	0.53±0.12 ^{dc}	0.78±0.15 ^{cc}	0.92±0.09 ^{cc}	1.28±0.14 ^{bcd}	1.43±0.11 ^{ade}
CK	0.12±0.02 ^{fa}	0.31±0.28 ^{fa}	0.47±0.26 ^{efa}	1.22±0.23 ^{ea}	2.51±0.36 ^{dA}	3.41±0.54 ^{cA}	5.23±0.44 ^{bA}	7.11±0.34 ^{aA}

由表4可知,就不同处理时间而言,添加0.01% EAE时,处理第4 d除与2 d的油脂酸值无显著差异外($p > 0.05$),与其他处理时间的油脂酸值均有显著差异($p < 0.05$);14 d时,添加0.01% EAE的处理组酸值为2.74 mg/g,添加0.02%~0.05% EAE的处理组酸值均小于2 mg/g,表明添加EAE的各处理组均较好抑制油脂酸败。添加0.03%~0.05% EAE时,处理第4 d与2 d及处理前的油脂酸值均无显著差异($p > 0.05$),与处理后第6~14 d的油脂酸值均有显著差异($p < 0.05$)。

菜(籽)油处理6~14 d时,相同处理时间的CK与其他处理间的油脂酸值均有显著或极显著差异,表明处理组均可不同程度地抑制菜(籽)油酸败;处理10 d时,CK组油脂的酸值已超过3.0 mg/g(国标阈值),其余处理组酸值均小于2 mg/g。8~14 d时,CK组与处理组的酸值均有极显著差异($p < 0.01$)。供试时间内,添加0.02% EAE与0.03% EAE、Vc处理组的酸值无显著差异($p < 0.05$),表明添加0.02% EAE与二者抑制菜(籽)油酸败效果相当,14 d时三者的酸

值分别为1.86 mg/g、1.79 mg/g和1.81 mg/g;添加0.05% EAE处理组的抗酸败效果与添加0.02% TBHQ处理组接近,二者酸值无显著差异($p < 0.05$),14 d时酸值分别为1.43 mg/g和1.41 mg/g,远远低于临界值,说明添加0.05% EAE较好的抑制菜(籽)油的酸败作用。康连虎等^[22]研究显示,添加0.02%石榴籽多酚14 d时酸值为2.76 mg/g,与本研究添加0.01% EAE处理14 d的酸值2.72 mg/g接近,说明EAE具有较好的抗油脂酸败作用。

综上所述,在菜(籽)油过氧化值达到6 mmol/kg过程中,其酸值小于3 mg/g,表明菜(籽)油的氧化速率要高于酸败速率。处理14 d内,添加5种浓度EAE均对菜(籽)油酸败氧化产生明显抑制作用,说明EAE作为天然抗氧化剂,在抗油脂氧化酸败方面具有较好潜力。

2.3.3 货架期的预测

不同处理加速氧化在不同时间的过氧化值和酸值及对菜(籽)油货架期预测见图5和表5。

由图5和表5可知,70 °C加速氧化条件下,未添

加抗氧化剂的菜(籽)油,在3 d时过氧化值超到国标阈值,达到9.32 mmol/kg,货架期相当于在20℃下储存64 d;在6 d时,添加0.01% EAE的菜(籽)油过氧化值达到5.78 mmol/kg;在8 d时,添加0.02% EAE的菜(籽)过氧化值达到5.88 mmol/kg;二者均小于国标阈值。说明添加EAE抑制了菜(籽)油的氧化。由阿伦尼乌斯经验公式推知,添加了0.01%或0.02% EAE的菜(籽)油在20℃下的货架期分别192 d、256 d,较对照分别延长了128 d、192 d。

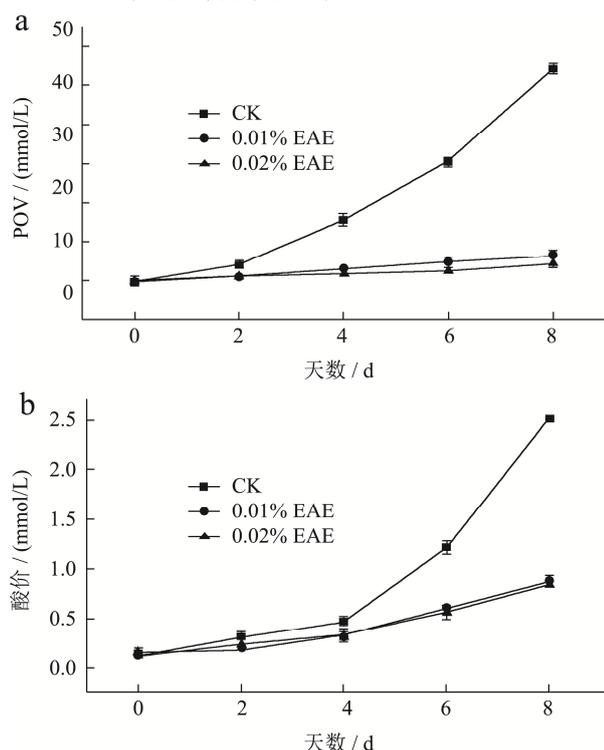


图5 不同处理组菜(籽)油过氧化值(a)和酸值(b)

Fig.5 Peroxidation value (a) and acid (b) value of rapeseed oil in different treatment groups

表5 不同处理组菜(籽)油货架期预测

Table 5 Prediction of the shelf life of rapeseed oil in different treatment groups

处理组	货架期/d	
	70℃	20℃
对照	3	64
添加0.01%EAE	6	192
添加0.02%EAE	8	256

综上所述,添加LTS-6-6发酵产物的乙酸乙酯萃取物(EAE),可降低菜(籽)油过氧化值和酸值,有效抑制油脂酸败氧化。

3 结论

体外抗氧化活性测定显示,核桃内生真菌LTS-6-6代谢产物的4种萃取物中,EAE自由基清除率高于其

余萃取物,EAE对ABTS、羟基自由基清除率达到80%以上,其IC₅₀分别为13 μg/mL和0.832 mg/mL,与阳性对照Vc相当;EAE总酚和总黄酮含量高于其余萃取物,其含量分别为643.71 mg没食子酸/g和102.05 mg芦丁/g;采用Schaal烘箱法加速菜(籽)油酸败氧化表明,不同浓度EAE均对菜(籽)油酸败氧化具有一定抑制作用。由阿伦尼乌斯公式预测,添加0.02% EAE的菜(籽)油,20℃下货架期可达256 d,较对照延长了192 d。综上所述,菌株LTS-6-6代谢产物的高活性萃取物,在体外抗氧化和油脂加速氧化试验中均表现出较强的抗氧化作用,有望作为一种新型抗氧化剂进一步研究与利用。

参考文献

- [1] Fu Y, Liu W, Zu Y, et al. Enzyme assisted extraction of luteolin and apigenin from pigeonpea [*Cajanuscajan* (L.) Mill sp.] leaves [J]. Food Chemistry, 2008, 111(2): 508-512
- [2] 姚丽娜.杜仲的化学成分研究[D].天津:天津大学,2010
YAO Lina. Chemical studies on the *Eucommia ulmoides* Oliv [D]. Tianjin: Tianjin University, 2010
- [3] 吴聪慧.杜仲内生真菌 *Alternaria* sp.次生代谢产物化学成分及其生物活性的研究[D].开封:河南大学,2017
WU Conghui. Research on the chemical constituents and biological activities of secondary metabolites of endophytic fungus *Alternaria* sp. from *Eucommia ulmoides* Oliv [D]. Kaifeng: Henan University, 2017
- [4] Kouipou R, Boyom F F. Endophytes from ethno-pharmacological plants: Sources of novel antioxidants- a systematic review [J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2019, 22: 101430
- [5] Ali J, Alireza O, Mahnaz T, et al. A comparative review on the extraction, antioxidant content and antioxidant potential of different parts of walnut (*Juglans regia* L.) fruit and tree [J]. Molecules, 2019, 24: 2133
- [6] Ivo O, Anablea S, Isabel C F R F, et al. Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks [J]. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46(7): 2326-2331
- [7] 赵鑫丹,郝苑汝,庞俊倩,等.核桃(*Juglandaceae*)种仁、叶、花粉抗氧化活性及成分鉴定[J].食品工业科技,2019,40(20): 54-60
ZHAO Xindan, HAO Yuanru, PANG Junqian, et al. Antioxidant activity and compounds identification of kernels, leaves and pollen of walnut (*Juglandaceae*) [J]. Food and Chemical Toxicology, 2019, 40(20): 54-60

- [8] José A P, Ivo O, Anabela S, et al. Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars [J]. Food and Chemical Toxicology, 2007, 45: 2287-2295
- [9] 景援朝,赵焕新,孙永丽,等.分心木化学成分的研究[J].食品与药品,2015,17(2):87-90
JING Yuanchao, ZHAO Huanxin, SUN Yongli, et al. Chemical constituents from *Diaphragma juglandis* Fructus [J]. Food and Drug, 2015, 17(2): 87-90
- [10] Wang X, Li K, Han M, et al. Isolation and identification of endophytic fungi in walnut [J]. IOP Conference Series Earth and Environmental Science, 2020, 508: 012138
- [11] 惠建超,翟梅枝,李梦歌,等.不同陕西生境核桃内生真菌多样性研究[J].河南农业大学学报,2018,52(6):956-966, 982
HUI Jianchao, ZHAI Meizhi, LI Mengge, et al. Diversity of endophytic fungi of *Juglans regia* L. in different environmental niches in Shaanxi [J]. Journal of Henan Agricultural University, 2018, 52(6): 956-966, 982
- [12] 庞俊倩,赵鑫丹,郝苑汝,等.核桃内生真菌抗氧化菌株的筛选及其代谢产物活性研究[J].天然产物研究与开发,2020, 32(1):40-46
PANG Junqian, ZHAO Xindan, HAO Yuanru, et al. Screening and metabolite activities of antioxidant strains from walnut endophytic fungi [J]. Natural Product Research and Development, 2020, 32(1): 40-46
- [13] 白海娜,王振宇,刘瑞海,等.白藜芦醇与黑木耳多糖协同清除 ABTS 自由基活性的研究[J].现代食品科技,2014,30(3): 64-68
BAI Haina, WANG Zhenyu, LIU Ruihai, et al. Synergistic ABTS radical scavenging activity of resveratrol with *Auricularia auricular* polysaccharides [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(3): 64-68
- [14] Zhao J, Ma D, Luo M. *In vitro* antioxidant activities and antioxidant enzyme activities in HepG2 cells and main active compounds of endophytic fungus from pigeon pea [*Cajanuscajan* (L.) Mill sp.] [J]. Food Research International, 2014, 56: 243-251
- [15] Léon W N, Pierre A E D S, Moumouni K, et al. Phytochemical composition and antioxidant activity of *Balanites aegyptiaca*, *Securidaca longepedunculata* and *Acacia gourmaensis* used against seed-borne fungi in Burkina Faso [J]. Current Journal of Applied Science and Technology, 2020, 49(2): 79-87
- [16] Francisc Vasile D, Dan Cristian V, Carmen S. Effects of solid-state fermentation with two filamentous fungi on the total phenolic contents, flavonoids, antioxidant activities and lipid fractions of plum fruit (*Prunus domestica* L.) by-product [J]. Food Chemistry, 2016, 209(1): 27-36
- [17] 张新国,唐鹏,刘英娟,等.6种药用植物内生菌提取物的抗氧化活性研究[J].现代食品科技,2016,32(4):66-74
ZHANG Xinguo, TANG Peng, LIU Yingjuan, et al. Antioxidant activity of endophyte extracts isolated from six medicinal plants [J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(4): 66-74
- [18] Kim G Y, Lee J, Lim S, et al. Effect of antioxidant addition on milk beverage supplemented with coffee and shelf-life prediction [J]. Food Science of Animal Resources, 2019, 39(6): 903-917
- [19] Tinello F, Lante A, Bernardi M, et al. Comparison of OXITEST and RANCIMAT methods to evaluate the oxidative stability in frying oils [J]. European Food research and Technology, 2018, 244(4): 747-755
- [20] 许瑞如,张秀玲,李振,等.桔梗根提取物不同溶剂萃取物的抗氧化活性[J].食品研究与开发,2021,42(1):31-36
XU Ruiru, ZHANG Xiuling, LI Zhen, et al. Antioxidant activity of extracts from different solvents of extract of *Platycodon grandiflorum* roots [J]. Food Research and Development, 2021, 42(1): 31-36
- [21] 潘峰,陈艾萌,朱小庆,等.暗紫贝母内生真菌 *Fusarium* sp. A14 次生代谢产物抗氧化活性研究[J].天然产物研究与开发,2017,29(3):376-381,392
PAN Feng, CHEN Aimeng, ZHU Xiaoqing, et al. Antioxidant activity of secondary metabolites derived from the fungal Endophytic *fusarium* sp. A14 Isolated from *Fritillaria unibracteata* Hsiao et KC Hsia [J]. Natural Product Research and Development, 2017, 29(3): 376-381, 392
- [22] 康连虎,李娜.天然抗氧化剂对菜(籽)油抗氧化作用的研究[J].安徽农学通报,2020,26(5):10-11,114
KANG Lianhu, LI Na. Study on the antioxidative effect of natural antioxidants on rapeseed oil [J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2020, 26(5): 10-11, 114