

# 黑曲霉发酵制备荔枝果壳原花青素工艺优化及其对HaCaT细胞的增殖和迁移作用

董丽红<sup>1</sup>, 郑德瑜<sup>1</sup>, 张名位<sup>1</sup>, 张瑞芬<sup>1</sup>, 黄菲<sup>1</sup>, 马勤<sup>1</sup>, 赵东<sup>1</sup>, 郭朝万<sup>2</sup>, 贾栩超<sup>1\*</sup>

(1. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 农业农村部功能食品重点实验室, 广东省农产品加工重点实验室, 广东广州 510610) (2. 广东丸美生物技术股份有限公司, 广东广州 510530)

**摘要:** 采用黑曲霉对荔枝果壳进行发酵, 研究发酵时间、接种量、料液比对荔枝果壳原花青素 (LPPC) 得率的影响, 优化荔枝果壳发酵工艺条件, 分析发酵前后荔枝果壳中原花青素、总酚和总黄酮含量以及单体酚的组成和含量的变化, 评价发酵前后 LPPC 的抗氧化活性以及对 HaCaT 增殖和迁移作用。通过单因素结合正交试验优化确定最佳工艺条件为发酵时间 7 d, 接种量 2.0% (V/V), 料液比 1:10.0 (g/mL), 在该发酵工艺条件下测得 LPPC 得率为 3.77% (m/m)。与未发酵相比, 发酵后荔枝果壳中原花青素、总酚和总黄酮含量分别提高了 112.75%、53.86% 和 73.02%, 鉴定出 7 种主要单体酚含量均显著增加; 且发酵后 LPPC 的 ABTS 和 FRAP 抗氧化活性显著增强。发酵前后 LPPC 在 10、20、40 μg/mL 质量浓度时对 HaCaT 细胞无增殖作用, 但能显著提高划痕细胞迁移能力, 且发酵后 LPPC 的细胞迁移率较发酵前分别提高了 7.89%、40.89% 和 75.37%。因此黑曲霉发酵能显著增加荔枝果壳中可提取的原花青素含量, 提高其抗氧化活性, 有效促进角质细胞划痕创伤愈合, 研究结果为 LPPC 应用于表皮损伤修复功能方面提供理论依据。

**关键词:** 荔枝果壳; 黑曲霉发酵; 原花青素; 细胞划痕; 迁移率; 创伤愈合

文章编号: 1673-9078(2024)12-82-90

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.12.1519

## Optimization of the Fermentation Process Using *Aspergillus niger* to Prepare Proanthocyanidins from Litchi Husks and Their Effects on the Proliferation and Migration of HaCaT Cells

DONG Lihong<sup>1</sup>, ZHENG Deyu<sup>1</sup>, ZHANG Mingwei<sup>1</sup>, ZHANG Ruifen<sup>1</sup>, HUANG Fei<sup>1</sup>, MA Qin<sup>1</sup>, ZHAO Dong<sup>1</sup>, GUO Chaowan<sup>2</sup>, JIA Xuchao<sup>1\*</sup>

(1. Sericultural & Agri-Food Research Institute Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of

引文格式:

董丽红, 郑德瑜, 张名位, 等. 黑曲霉发酵制备荔枝果壳原花青素工艺优化及其对 HaCaT 细胞的增殖和迁移作用 [J]. 现代食品科技, 2024, 40(12): 82-90.

DONG Lihong, ZHENG Deyu, ZHANG Mingwei, et al. Optimization of the fermentation process using *Aspergillus niger* to prepare proanthocyanidins from litchi husks and their effects on the proliferation and migration of HaCaT cells [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(12): 82-90.

收稿日期: 2023-12-19

基金项目: 广州市科技计划项目 (202103000055; 2023B01J2004); “十四五”广东省农业科技创新十大主攻方向“揭榜挂帅”项目 (2023SDZG04); 广东特支计划项目 (2019BT02N112); 广东省农业科学院农业优势产业学科团队建设项目 (202108TD)

作者简介: 董丽红 (1991-), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 天然活性物质开发与利用, E-mail: dolify@163.com

通讯作者: 贾栩超 (1989-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 天然活性物质开发与利用, E-mail: jiaxuchao@gdaas.cn

Functional Foods, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangdong Key Laboratory of Agricultural Products Processing, Guangzhou 510610, China)(2.Guangdong Marubi Biotechnology Co. Ltd., Guangzhou 510530, China)

**Abstract:** *Aspergillus niger* was used to ferment litchi husk, and the effects of fermentation time, inoculum amount and solid-to-solvent ratio on the yield of proanthocyanidins (LPPC) from litchi husk by were investigated, and the process conditions for the fermentation of litchi husk were optimized. The changes in the contents of proanthocyanidins, total polyphenols and total flavonoids and the composition and content of monomeric phenolics in litchi husk before and after fermentation were analyzed. The antioxidant activity of LPPC before and after fermentation and the effect of LPPC on the proliferation and migration of HaCaT cells were evaluated. The optimum process conditions determined through single factor experiments combined with the orthogonal test were: fermentation time, 7 days; inoculum amount, 2% (*V/V*); solid-to-solvent ratio 1:10 (g/mL). The yield of LPPC prepared under such process conditions was 3.77% (*m/m*). Compared with those of the unfermented sample, the contents of procyanidins, total polyphenols and total flavonoids of the fermented litchi husk increased by 112.75%, 53.86% and 73.02%, respectively, the contents of the seven main monomeric phenolics increased significantly, and the antioxidant activity of LPPC as ABTS scavenging capacity and FRAP significantly increased after fermentation. Before and after fermentation at a mass concentration of 10, 20 or 40  $\mu\text{g/mL}$ , LPPC had no effect on the proliferation of HaCaT cells, but significantly promoted cell migration, with the cell migration rate for the LPPC after fermentation increasing by 7.89%, 40.89% and 75.37%, respectively, compared with that for the unfermented sample. Therefore, the fermentation with *Aspergillus niger* can significantly increase the content of proanthocyanidins from litchi husk, thereby increasing the antioxidant capacity and promoting wound healing by keratinocytes. The research results will provide a theoretical basis for the application of LPPC in epidermal repair after skin injury.

**Key words:** litchi pericarp; *Aspergillus niger* fermentation; procyanidins; cell scratch; migration rate; wound healing

荔枝 (*Litchi chinensis* Sonn.) 是一种具有较高营养和经济价值的亚热带特色水果, 主产于中国及越南、印度、泰国等东南亚国家<sup>[1]</sup>。据统计, 2023年我国荔枝种植面积约 790 万亩, 总产量近 330 万 t<sup>[2]</sup>。荔枝果壳是荔枝加工中主要副产物, 约占鲜果重量的 15%, 通常作为废弃物直接处理掉, 造成资源浪费<sup>[3]</sup>。据中医记载, 荔枝果壳可除湿止痢、生津止血, 具有很高的药用价值。大量研究表明, 荔枝果壳富含原花青素且以自然界罕见的 A 型为主, 包括表儿茶素、原花青素 A1、原花青素 A2 以及原花青素三聚体等<sup>[4]</sup>。文献报道, 荔枝果壳原花青素具有显著的降血脂、抗动脉粥样硬化<sup>[5]</sup>以及改善糖尿病<sup>[6]</sup>等生理活性, 也表现出良好的抑制黑色素沉着<sup>[7]</sup>、减少皱纹<sup>[8]</sup>、抗紫外损伤<sup>[9]</sup>等皮肤保护作用。因此, 开展荔枝果壳原花青素等功能成分的提取和利用研究, 以开发功能性食品和化妆品等高附加值产品, 对延长荔枝产业链和促进荔枝经济可持续发展具有重要意义。

目前原花青素的提取常采用溶剂法。周玮婧等<sup>[10]</sup>采用体积分数为 80% (*V/V*) 乙醇提取荔枝果壳中原花青素, 其质量约占果壳鲜重的 1.3%。然而, 大部分原花青素是以糖苷键或酯键结合到细胞

壁上, 难以被水溶性有机试剂提取<sup>[11]</sup>。结合超声、微波<sup>[12]</sup>和高压<sup>[13]</sup>等物理技术虽然能够增加荔枝果壳中原花青素的溶出, 提高提取得率, 但这些方法存在操作复杂、设备要求高、易破坏活性成分等缺点, 难以实现工业化应用。酶水解提取法具有反应温和, 对活性成分破坏小等优点, 但与物理辅助技术相比提取效率有所降低<sup>[12-14]</sup>。微生物发酵法实现产酶与酶解过程的合一, 省去酶制剂的生产成本, 避免了酶解过程中酶活降低而影响提取效率, 是利用农副产物制备高活性成分的有效途径<sup>[15]</sup>。研究发现, 泡盛曲霉发酵荔枝果壳能释放出不可提取的原花青素、黄酮等酚类物质<sup>[16,17]</sup>。然而有报道, 与泡盛曲霉相比, 黑曲霉产纤维素酶、木聚糖酶等酶活更高, 对基质纤维结构的破坏作用更强, 从而释放出更多的结合态多酚<sup>[18]</sup>。目前, 黑曲霉发酵葡萄渣<sup>[19]</sup>、樱桃渣<sup>[20]</sup>、柑橘皮<sup>[21]</sup>、芒果籽<sup>[22]</sup>等水果副产物促使结合态多酚转化为游离态的研究报道较多, 但尚未见黑曲霉发酵荔枝果壳的报道。

因此, 本研究以荔枝果壳原花青素 (Litchi Pericarp Procyanidins, LPPC) 的得率为指标, 通过单因素和正交试验优化黑曲霉发酵荔枝果壳的工艺条件, 并采用人永生角质形成细胞 (HaCaT) 模型, 以细

胞增殖和迁移能力为指标, 通过细胞划痕实验评价发酵前后 LPPC 对细胞创伤愈合的作用, 旨在为 LPPC 应用于表皮损伤修复功能方面提供理论依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

“妃子笑”荔枝, 广州天平水果批发市场; 黑曲霉 (*Aspergillus niger* GIM 3.576), 广东省微生物菌种保藏中心; HaCaT 细胞, 武汉普诺赛生命科技有限公司。

马铃薯葡萄糖琼脂 (Potato Dextrose Agar, PDA) 培养基, 广东环凯微生物科技有限公司; Dulbecco's 改良 Eagle 培养基 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM)、胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS), 美国 Gibco 公司; 4-二甲基氨基肉桂醛 (4-(dimethylamino) cinnamaldehyde, DMAC), 上海麦克林生化有限公司; 低聚原花青素 (UV $\geq$ 95%)、没食子酸、儿茶素、表儿茶素、原花青素 B1、原花青素 A1、原花青素 A2、芦丁和山柰酚 -3-O- 芸香糖苷标准品, 上海源叶生物科技有限公司; 总抗氧化能力检测试剂盒 (ABTS 法、FRAP 法), 上海碧云天生物技术有限公司。

### 1.2 仪器与设备

MJX-250B-Z 霉菌培养箱, 上海博迅医疗生物仪器股份有限公司; HeraCell 240i 二氧化碳培养箱, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; Infinite M200pro 多功能酶标仪, 瑞士 Tecan 公司; LC-20 高效液相色谱仪、UV-1800 紫外可见分光光度计, 日本岛津有限公司; EYELAN-1100 旋转蒸发仪, 东京理化器械株式会社。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 黑曲霉菌液的制备

将保藏的黑曲霉菌丝挑取一环均匀涂布到 PDA 培养基上, 置于 30 ℃ 的霉菌培养箱中培养 4 d 后, 用 10 mL 无菌水淋洗培养基表面的菌丝, 将液体吸入至装有灭菌脱脂棉的纯化柱中过滤掉菌丝体, 得到孢子悬液, 然后用血球计数板计数, 制成浓度为 10<sup>7</sup> CFU/mL 的黑曲霉菌液, 备用。

#### 1.3.2 黑曲霉发酵制备 LPPC 的单因素条件优化

##### 1.3.2.1 发酵时间对 LPPC 得率的影响

取 10 g 新鲜荔枝果壳, 按料液比 1:10.0 (g/mL)

加入 100 mL 蒸馏水, 以 8 000 r/min 均质 2 min 后, 121 ℃ 灭菌 15 min, 冷却至室温后, 以接种量 1.0% (V/V) 加入 1.0 mL 黑曲霉菌液并摇匀, 置于 30 ℃ 的霉菌培养箱分别培养 0、3、4、5、6、7 d, 每天搅拌一次促进发酵热的释放。提取并测定发酵荔枝果壳中原花青素含量, 以 LPPC 得率为指标, 确定最佳发酵时间。

##### 1.3.2.2 接种量对 LPPC 得率的影响

取 10 g 新鲜荔枝果壳, 按料液比 1:10.0 (g/mL) 加入 100 mL 蒸馏水, 以 8 000 r/min 均质 2 min 后, 121 ℃ 灭菌 15 min, 冷却至室温后, 分别以接种量 0.1%、0.5%、1.0%、2.0%、3.0% (V/V) 加入不同体积黑曲霉菌液并摇匀, 置于 30 ℃ 的霉菌培养箱中培养 6 d, 每天搅拌一次促进发酵热的释放。提取并测定发酵荔枝果壳中原花青素含量, 以 LPPC 得率为指标, 确定最佳接种量。

##### 1.3.2.3 料液比对 LPPC 得率的影响

取 10 g 新鲜荔枝果壳, 分别按料液比 1:5.0、1:7.5、1:10.0、1:12.5、1:15.0 (g/mL) 加入不同体积蒸馏水, 以 8 000 r/min 均质 2 min 后, 121 ℃ 灭菌 15 min, 冷却至室温后, 以接种量 2.0% (V/V) 加入不同体积黑曲霉菌液并摇匀, 置于 30 ℃ 的霉菌培养箱中培养 6 d, 每天搅拌一次促进发酵热的释放。提取并测定发酵荔枝果壳中原花青素含量, 以 LPPC 得率为指标, 确定最佳料液比。

#### 1.3.3 黑曲霉发酵制备 LPPC 的正交试验优化

在 1.3.2 单因素试验的基础上, 进一步采用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验对发酵时间、接种量和料液比进行优化, 以 LPPC 得率为指标, 确定出荔枝果壳的最佳发酵工艺, 各因素水平设计见表 1。

表 1 正交试验因素与水平设计

Table 1 Orthogonal experimental design

水平	因素		
	(A) 发酵时间/d	(B) 接种量/%	(C) 料液比/(g/mL)
1	5	1.0	1:10.0
2	6	2.0	1:12.5
3	7	3.0	1:15.0

#### 1.3.4 LPPC 的提取

荔枝果壳发酵后收集发酵液, 将残渣加入 100 mL 体积分数为 70% (V/V) 的乙醇, 于 60 ℃ 水浴提取 40 min, 过滤, 重复 3 次。合并发酵液和滤液, 45 ℃ 下旋转蒸发浓缩至干, 加入无水甲醇复溶并定容至 50 mL, 即得到发酵 LPPC 的提取液。以未接种发

酵的荔枝果壳为对照, 得到未发酵 LPPC 的提取液。

### 1.3.5 原花青素、总酚和总黄酮含量的测定

原花青素含量的测定采用 DMAC 法<sup>[23]</sup>。称取 0.05 g DMAC 溶解于 50 mL 含有 12.5% (V/V) 浓盐酸的 70% (V/V) 乙醇溶液配制 DMAC 反应液。于 96 孔板中依次加入 70 μL 发酵或未发酵 LPPC 提取液和 210 μL DMAC 反应液, 以酸化乙醇代替 DMAC 作试剂空白组, 无水甲醇代替提取液作样品空白组, 室温避光反应 25 min, 640 nm 处测定吸光值。以低聚原花青素为标准品 (质量浓度为 0.01~0.10 mg/mL), 绘制标准曲线, 其线性回归方程为  $y=4.868x+0.070$ ,  $R^2=0.999 1$ 。原花青素含量以每克荔枝果壳中所含低聚原花青素当量 (Procyanidins Equivalents, PE) 表示, 单位为 mg PE/g FW, 以质量分数表示 LPPC 得率。计算公式如下:

$$Y = \frac{C \times n \times V}{m \times 1\ 000} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

$Y$ —原花青素得率;

$C$ —待测液中原花青素质量浓度, mg/mL;

$n$ —样品稀释倍数;

$V$ —提取液体积, mL;

$m$ —称取新鲜荔枝果壳质量, g。

总酚含量的测定采用福林酚试剂法<sup>[24]</sup>, 以没食子酸为标准品绘制标准曲线, 其线性回归方程为  $y=3.043 1x+0.049 1$ ,  $R^2=0.999 5$ 。总酚含量以每克荔枝果壳中所含没食子酸当量 (Gallic Acid Equivalents, GAE) 表示, 单位为 mg GAE/g FW。

总黄酮含量的测定采用三氯化铝法<sup>[24]</sup>, 以芦丁为标准品绘制标准曲线, 其线性回归方程为  $y=0.614 7x+0.039 8$ ,  $R^2=0.999 0$ 。总黄酮含量以每克荔枝果壳中所含芦丁当量 (Rutin Equivalents, RE) 表示, 单位 mg RE/g FW。

### 1.3.6 单体酚类化合物组成及含量的测定

参考文献<sup>[24]</sup>的方法并稍加改动。色谱柱 Zorbax SB-C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 柱温 40 °C; 流速 1.0 mL/min; 进样体积 10 μL; 流动相 A 为 0.1% (V/V) 的冰乙酸, 流动相 B 为乙腈; 洗脱梯度: 0~20 min, 5%~17% B; 20~30 min, 17%~24% B; 30~40 min, 24%~35% B; 40~45 min, 35%~40% B; 检测波长 254 nm。通过儿茶素、表儿茶素、原花青素 B1、原花青素 A1、原花青素 A2、芦丁以及山柰酚 -3-*O*- 芸香糖苷标准品吸收峰保留时间对比定性,

峰面积外标法定量。

### 1.3.7 抗氧化活性的测定

采用 ABTS 试剂盒测定发酵前后 LPPC 的 ABTS 抗氧化活性, 以 Trolox 为标准品, 根据标准曲线计算样品的 ABTS 值, 以每克荔枝果壳中所含 Trolox 当量 (TEAC) 表示, 单位为 μmol TEAC/g FW。

采用 FRAP 试剂盒测定发酵前后 LPPC 的 FRAP 抗氧化活性, 以 FeSO<sub>4</sub> 为标准品, 根据标准曲线计算样品的 FRAP 值, 以每克荔枝果壳中所含 FeSO<sub>4</sub> 当量表示, 单位为 μmol FeSO<sub>4</sub>/g FW。

### 1.3.8 LPPC对HaCaT细胞增殖和迁移的影响

#### 1.3.8.1 细胞培养

参照文献<sup>[9]</sup>的方法进行 HaCaT 细胞复苏与传代培养, 取对数生长期的细胞进行后续实验。

#### 1.3.8.2 细胞增殖实验

取对数生长期 HaCaT 细胞以 10<sup>4</sup> 个 / 孔接种于 96 孔培养板, 用含 10% FBS (V/V) 的 DMEM 培养 24 h 后, 弃去培养液, 用 100 μL PBS 洗涤 2 次, 分别加入 100 μL 含不同质量浓度 (0 (即对照组)、12.5、25、50、100、200 μg/mL) 的发酵或未发酵 LPPC 的无血清 DMEM, 培养 24 h。参照 CCK-8 试剂盒说明书, 测定各组细胞活力, 以细胞存活率表示。

#### 1.3.8.3 细胞划痕实验

取对数生长期 HaCaT 细胞以 4×10<sup>4</sup> 个 / 孔接种于安装 Culture-Insert2 Well 的 24 孔板, 用含 10% (V/V) FBS 的 DMEM 培养 24 h 后, 用镊子夹去 Culture-Insert2 Well, 形成 HaCaT 细胞划痕。弃去培养液, 每孔用 1 mL PBS 清洗 3 次后, 分别加入 1 mL 含不同质量浓度 (0 (即对照组)、10、20、40 μg/mL) 的发酵或未发酵 LPPC 的无血清 DMEM, 培养 24 h。倒置显微镜下观察 0、24 h 细胞的愈合情况, 拍照并使用 Image J 软件分析划痕面积, 按下列公式计算细胞迁移率。

$$M = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

$M$ —细胞迁移率;

$A_0$ —0 h 细胞划痕面积;

$A_1$ —24 h 细胞划痕面积。

### 1.4 数据分析

所有实验数据均至少 3 次重复, 采用“平均值 ± 标准差”表示。采用 GraphPadPrism 9.5 软件进

行作图和统计学分析, 组内采用单因素方差分析和 Tukey 检验, 组间采用独立样本  $t$  检验。

## 2 结果与讨论

### 2.1 单因素试验结果

#### 2.1.1 发酵时间对LPPC得率的影响

由图 1 可知, 发酵时间对 LPPC 得率有显著影响。在 0~3 d 时得率无显著变化, 随着发酵时间的延长得率逐渐升高, 在第 6 天时达到最高, 这可能是因为是在发酵初期菌种数量较少导致酶活无变化, 之后菌体进入指数生长期, 黑曲霉产酶活力不断增强, 改变了荔枝果壳的紧密结构, 促使更多的原花青素从细胞壁中释放<sup>[25]</sup>; 但当发酵时间继续延长时, LPPC 得率反而显著降低 ( $P < 0.05$ ), 可能是由于发酵后期营养物质缺乏, 原花青素被黑曲霉代谢转化为其他物质<sup>[26]</sup>。因此确定较佳发酵时间 6 d。

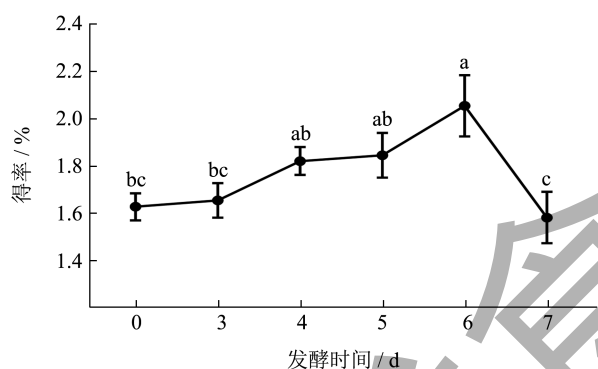


图 1 发酵时间对 LPPC 得率的影响

Fig.1 Effect of fermentation time on LPPC yield

注: 不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 下同。

#### 2.1.2 接种量对LPPC得率的影响

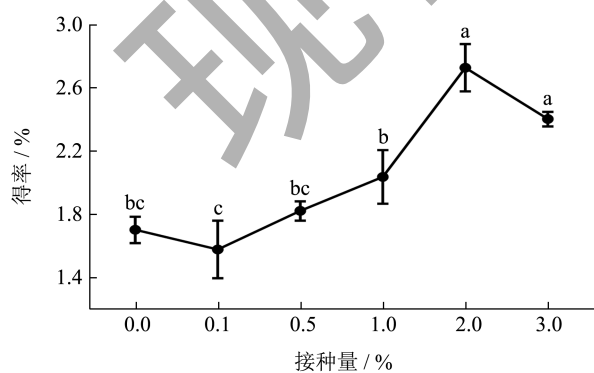


图 2 接种量对 LPPC 得率的影响

Fig.2 Effect of inoculation amount on LPPC yield

由图 2 可知, 发酵接种量对 LPPC 得率有显著

影响。接种量为 2.0% ( $V/V$ ) 时, LPPC 得率最高。这是因为较大的接种量能缩短菌丝体繁殖到达高峰的时间, 提高产酶效率, 增加原花青素得率, 但接种量过大会导致菌丝体生长过快而加速进入衰亡期, 影响产酶能力, 同时营养物质消耗过快, 可能导致原花青素被降解转化<sup>[27]</sup>。因此确定较佳的接种量为 2.0% ( $V/V$ )。

#### 2.1.3 料液比对LPPC得率的影响

由图 3 可知, 随着加水体积量的增大, LPPC 得率先上升后下降。当料液比增加到 1:12.5 ( $g/mL$ ) 时, LPPC 得率达到最高。因为发酵对培养基中的含水量有一定要求, 水分含量过低或过高, 均会使菌种和原料基质接触不充分, 影响黑曲霉生长及产酶速度<sup>[19]</sup>。因此确定较佳的料液比为 1:12.5 ( $g/mL$ )。

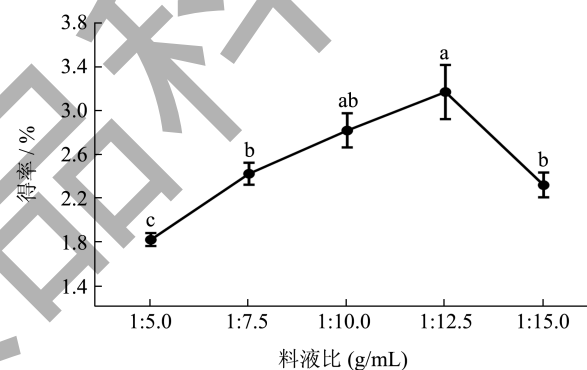


图 3 料液比对 LPPC 得率的影响

Fig.3 Effect of material-liquid ratio on LPPC yield

### 2.2 正交试验结果

根据上述单因素实验结果确定了发酵时间、接种量和料液比 3 个因素的较适宜的水平范围 (表 1), 进一步通过正交试验考察这 3 个因素的交互影响, 确定黑曲霉发酵荔枝果壳制备原花青素的最佳工艺。由表 2 极差分析及表 3 方差分析结果可知, 各因素的影响顺序为接种量 > 发酵时间 > 料液比, 且发酵时间与接种量在各因素水平上有显著差异 ( $P < 0.05$ ), 但料液比的水平差异不显著。确定最佳工艺为  $A_3B_2C_1$ , 即发酵时间 7 d, 接种量 2.0% ( $V/V$ ), 料液比 1:10.0 ( $g/mL$ )。在此最优发酵条件下, 重复 3 次实验验证结果, LPPC 得率平均值为 3.77% ( $m/m$ ), 是乙醇提取法得率 1.77% 的 2.13 倍, 是超高压辅助乙醇提取法得率 2.40% 的 1.57 倍<sup>[13]</sup>, 表明该发酵工艺条件较稳定可靠, 具有实际应用价值。

表 2 正交试验结果

试验号	A	B	C	试验方案	得率/%
1	1	1	1	A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> C <sub>1</sub>	2.03
2	1	2	2	A <sub>1</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub>	2.90
3	1	3	3	A <sub>1</sub> B <sub>3</sub> C <sub>3</sub>	2.65
4	2	1	2	A <sub>2</sub> B <sub>1</sub> C <sub>2</sub>	2.11
5	2	2	3	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>3</sub>	3.58
6	2	3	1	A <sub>2</sub> B <sub>3</sub> C <sub>1</sub>	2.92
7	3	1	3	A <sub>3</sub> B <sub>1</sub> C <sub>3</sub>	2.65
8	3	2	1	A <sub>3</sub> B <sub>2</sub> C <sub>1</sub>	3.97
9	3	3	2	A <sub>3</sub> B <sub>3</sub> C <sub>2</sub>	3.43
k <sub>1</sub>	2.52	2.26	2.97		
k <sub>2</sub>	2.87	3.48	2.81		
k <sub>3</sub>	3.35	3.00	2.96		
R	0.83	1.22	0.16		

表 3 正交试验方差分析

Table 3 Analysis of variance for the experimental results of orthogonal array design

因素	偏差平方和	自由度	F 值	Sig.
A	1.159	2	32.626	0.009
B	2.464	2	69.394	0.003
C	0.048	2	1.355	0.381
误差	0.053	3		
总和	4.403	9		

### 2.3 发酵前后荔枝果壳中原花青素、总酚和总黄酮含量及主要单体酚类化合物变化

由表 4 可知, 经最优条件下黑曲霉发酵后荔枝果壳中原花青素、总酚和总黄酮的含量均显著高于未发酵组 ( $P < 0.05$ ), 其中, 原花青素含量提高了 112.75%, 总酚含量提高了 53.86%, 总黄酮含量提高了 73.02%。进一步分析发酵前后荔枝果壳中主要单体酚类化合物的组成及含量, 结果如图 4 和表 5 所示, 共检测到儿茶素、表儿茶素、原花青素 B1、原花青素 A1、原花青素 A2、芦丁、山柰酚-3-O-芸香糖苷 7 种化合物, 在已有研究中均有报道<sup>[9,28]</sup>。与未发酵组相比, 发酵荔枝果壳中各单体酚类化合物的含量均显著升高 ( $P < 0.05$ ), 且以原花青素 A2、原花青素 A1、芦丁、表儿茶素为主, 分别提高了 1.81 倍、1.82 倍、1.91 倍和 12.00 倍。

上述研究结果表明, 黑曲霉发酵是提高荔枝果壳原花青素得率的有效途径。分析原因, 首先黑曲霉发酵产生的纤维素酶、木聚糖酶和果胶酶破坏荔枝果壳细胞壁纤维素的网状结构, 促进有机试剂的渗透, 增加游离态酚类物质的溶出<sup>[29]</sup>; 然后分泌的酯酶、糖苷酶等断裂结合态酚类物质与纤维素、木质素或多糖结构连接的共价键, 促使结合态原花青素 A2、原花青素 A1、表儿茶素、芦丁等被释放, 从而使可提取的原花青素含量增加<sup>[30]</sup>。另有研究报道, 黑曲霉发酵可以利用表儿茶素/儿茶素单体聚合形成低聚体原花青素<sup>[31]</sup>。Liu 等<sup>[32]</sup>发现黑曲霉发酵普洱茶产生的单宁酶使表儿茶素/儿茶素单体发生聚合, 从而增加原花青素 A2、原花青素 B2、原花青素 B3 等原花青素的含量。提示黑曲霉发酵荔枝果壳中原花青素含量的增加不仅是由结合态转化为可提取的游离态形式, 也可能来源于发酵过程中新生成的原花青素 A2 和 A1 以及多种未鉴定的原花青素低聚体产物。

表 4 发酵前后荔枝果壳中原花青素、总酚和总黄酮含量

Table 4 Total contents of phenolics, flavonoids, and procyanidins in litchi pericarp before and after fermentation

样品	原花青素 (mg PE/g FW)	总酚 (mg GAE/g FW)	总黄酮 (mg RE/g FW)
未发酵	17.72 ± 2.47 <sup>b</sup>	9.32 ± 0.30 <sup>b</sup>	14.68 ± 1.61 <sup>b</sup>
发酵	37.70 ± 1.37 <sup>a</sup>	14.34 ± 0.45 <sup>a</sup>	25.40 ± 1.83 <sup>a</sup>

注: 同列不同的小写字母表示具有显著差异 ( $P < 0.05$ ), 下同。

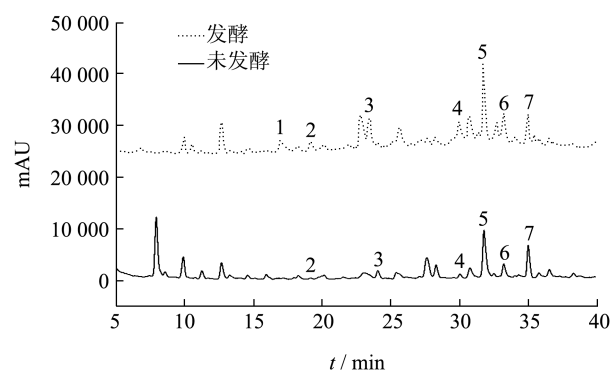


图 4 发酵前后荔枝果壳中主要单体酚类化合物的高效液相图

Fig.4 High liquid chromatogram of individual phenolic compounds in litchi pericarp before and after fermentation

注: 1. 原花青素 B1; 2. 儿茶素; 3. 表儿茶素; 4. 原花青素 A1; 5. 芦丁; 6. 原花青素 A2; 7. 山柰酚-3-O-芸香糖苷。

表 5 发酵前后荔枝果壳中主要单体酚类化合物的组成及含量 (mg/g FW)

Table 5 The composition and contents of individual phenolic compounds in litchi pericarp before and after fermentation (mg/g FW)

样品	原花青素 B1	儿茶素	表儿茶素	原花青素 A1	芦丁	原花青素 A2	山柰酚-3-O- 芸香糖苷
未发酵	—	0.06 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.11 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.39 ± 0.02 <sup>b</sup>	1.29 ± 0.36 <sup>b</sup>	3.11 ± 0.24 <sup>b</sup>	0.05 ± 0.00 <sup>b</sup>
发酵	0.35 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.15 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.43 ± 0.13 <sup>a</sup>	1.10 ± 0.12 <sup>a</sup>	3.75 ± 0.41 <sup>a</sup>	8.74 ± 0.21 <sup>a</sup>	0.16 ± 0.01 <sup>a</sup>

注：“—”表示未检测到。

## 2.4 发酵前后LPPC的ABTS和FRAP抗氧化活性

如图 5 所示, 与未发酵 LPPC 组相比, 发酵 LPPC 组的 ABTS 和 FRAP 抗氧化活性均显著提高, 分别提高了 1.88 倍和 2.81 倍 ( $P < 0.001$ ), 这与原花青素含量变化趋势一致。已有研究表明, 原花青素的抗氧化能力不仅与其总含量有关, 还与其单体组成和聚合度有关<sup>[33]</sup>。发酵后 LPPC 中原花青素 A2、原花青素 A1、表儿茶素等主要单体酚含量显著增加, 而这些原花青素低聚体已被证实具有更高的抗氧化活性<sup>[34]</sup>。提示黑曲霉发酵可能通过增加荔枝果壳中可提取的原花青素含量以及降低其聚合度, 从而显著提高 LPPC 的抗氧化能力。

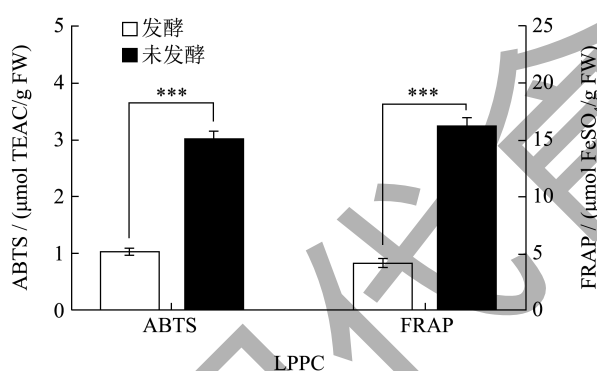


图 5 发酵前后 LPPC 的 ABTS 和 FRAP 抗氧化活性

Fig.5 Effect of LPPC on HaCaT cell viability before and after fermentation

注: \*\*\*表示  $P < 0.001$ 。

## 2.5 发酵前后LPPC对HaCaT细胞增殖的影响

由图 6 可知, 随着药物质量浓度的增大, HaCaT 细胞活力呈逐渐下降的趋势。与对照组相比, 50  $\mu\text{g/mL}$  未发酵 LPPC 组的细胞活力显著下降至 84.34% ( $P < 0.05$ ), 开始表现为抑制增殖作用; 100  $\mu\text{g/mL}$  发酵 LPPC 的细胞活力显著下降至 81.48% ( $P < 0.05$ ), 亦表现出抑制增殖作用。0~50  $\mu\text{g/mL}$  未发酵或发酵 LPPC 对 HaCaT 细胞既无促进也无抑制增殖作用。因此, 选择 10、20、40  $\mu\text{g/mL}$  发

酵或未发酵 LPPC 进行后续的细胞划痕实验。

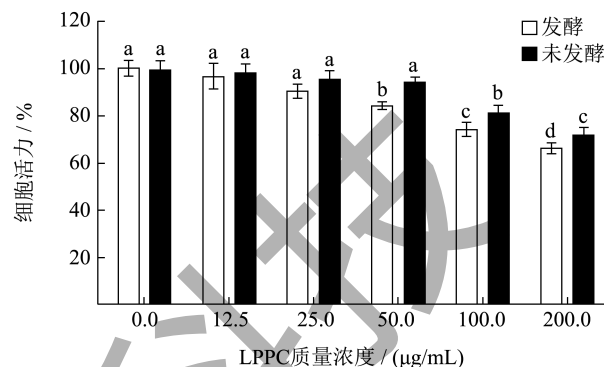


图 6 发酵前后 LPPC 对 HaCaT 细胞活力的影响

Fig.6 Effect of LPPC on HaCaT cell viability before and after fermentation

## 2.6 发酵前后LPPC对HaCaT细胞迁移的影响

细胞划痕实验是一种体外研究创伤愈合的常用实验方法, 创伤愈合是细胞增殖和迁移两种不同功能共同作用的结果<sup>[35]</sup>。在本研究中, 由于发酵前后 LPPC 对 HaCaT 细胞无增殖作用, 则只考虑 LPPC 对 HaCaT 细胞迁移能力的影响。而采用无血清培养短时间 (24 h 内) 条件, 可减少血清对细胞增殖和药物作用的干扰, 同时也能保证细胞正常存活<sup>[36]</sup>。由图 7 可知, 与对照组相比, 未发酵和发酵 LPPC 组的细胞迁移率均显著增加 ( $P < 0.05$ ), 促进角质细胞划痕愈合。与未发酵 LPPC 组相比, 10、20、40  $\mu\text{g/mL}$  发酵 LPPC 组的细胞迁移率均有增加, 分别提高了 7.89% ( $P > 0.05$ )、40.89% ( $P < 0.01$ ) 和 75.37% ( $P < 0.001$ ), 且呈浓度依赖性, 但未发酵组各质量浓度之间无显著差异。结果表明, 发酵能更好地促进 LPPC 对 HaCaT 细胞迁移作用, 提高表皮角质细胞损伤修复能力。

皮肤创伤后会出现急性炎症反应, 导致大量的活性氧产生, 则细胞迁移能力可能与抗氧化作用密切相关<sup>[37]</sup>。原花青素作为天然抗氧化剂, 研究发现富含原花青素的羽衣草和含羞草提取物能够有效促进角质形成细胞、成纤维细胞和内皮细胞的迁移, 具有治疗皮肤伤口的潜力<sup>[38]</sup>。前期研究已证实荔枝果壳低聚原花青素尤其是原花青素 A2 能够通过

增强 HaCaT 细胞内抗氧化能力来改善氧化应激损伤<sup>[9]</sup>。提示 LPPC 可能通过增强角质细胞抵抗氧化应激的能力,减少细胞内活性氧的产生,从而促进创伤愈合。

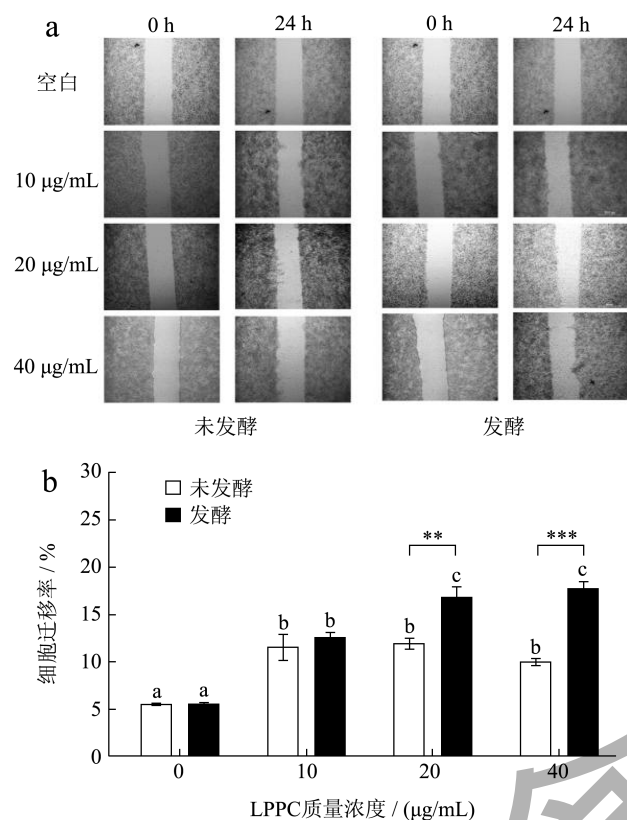


图7 发酵前后 LPPC 对 HaCaT 细胞划痕愈合的影响

Fig.7 Effect of LPPC on wound healing of HaCaT cells scratch before and after fermentation

注: a 为细胞划痕图 ( $\times 10$ ), b 为细胞迁移率。\*\* 表示  $P < 0.01$ , \*\*\* 表示  $P < 0.001$ 。

### 3 结论

本研究采用黑曲霉对荔枝果壳进行发酵,以 LPPC 得率为指标,通过单因素和正交实验优化确定最佳工艺条件为发酵时间 7 d,接种量 2% ( $V/V$ ),料液比 1:10 ( $g/mL$ ),在该条件下测得 LPPC 得率为 3.77% ( $m/m$ )。发酵后荔枝果壳中原花青素、总酚和总黄酮含量以及原花青素 A2、原花青素 A1、表儿茶素等单体酚显著增加,且 LPPC 的 ABTS 和 FRAP 抗氧化活性以及促 HaCaT 细胞迁移能力显著增强。因此,黑曲霉发酵法制备 LPPC,不仅增加原花青素得率,同时提高其抗氧化活性和角质细胞划痕创伤愈合能力,有望作为活性组分应用于皮肤损伤修复化妆品的开发,为实现荔枝的高值化利用提供新途径。

### 参考文献

- 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.
- 陈厚彬,苏钻贤,杨胜男.2023年全国荔枝生产调查与形势分析[J].*中国热带农业*,2023,3:13-22.
- 卢素珊,涂桢楷,赵锡和,等.我国荔枝加工技术研究现状[J].*现代农业装备*,2022,43(2):14-17,48.
- YAO P, GAO Y, SIMAL-GANDARA J, et al. Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.): A comprehensive review of phytochemistry, medicinal properties, and product development [J]. *Food & Function*, 2021, 12(20): 9527-9548.
- RONG S, ZHAO S Q, 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.
- LI X, WU Q, SUI Y, et al. Dietary supplementation of A-type procyanidins from litchi pericarp improves glucose homeostasis by modulating mTOR signaling and oxidative stress in diabetic ICR mice [J]. *Journal of Functional Foods*, 2018, 44: 155-165.
- LOURITH N, KANLAYAVATTANAKUL M, CHAIKUL P, et al. *In vitro* and cellular activities of the selected fruits residues for skin aging treatment [J]. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 2017, 89: 577-589.
- LOURITH N, KANLAYAVATTANAKUL M. Formulation and clinical evaluation of the standardized *Litchi chinensis* extract for skin hyper pigmentation and aging treatments [J]. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 2020, 78(2): 142-149.
- 董丽红,罗牡康,张名位,等.荔枝果壳原花青素对中波紫外线诱导 HaCaT 细胞氧化损伤的保护作用[J].*食品科学*,2022,43(21):233-240.
- 周玮婧,孙智达,谢笔钧,等.荔枝皮原花青素提取、纯化及抗氧化活性研究[J].*食品科学*,2009,30(8):68-71.
- ZENG Y, ZHOU W, YU J, et al. By-products of fruit and vegetables: antioxidant properties of extractable and non-extractable phenolic compounds [J]. *Antioxidants*, 2023, 12(2): 418.
- 邓兆雯,杨继国.超声-微波协同法提取荔枝皮原花青素及其高聚体组成分析[J].*中国食品添加剂*,2020,31(4): 114-123.
- ZHANG R, SU D, HOU F, et al. Optimized ultra-high-pressure-assisted extraction of procyanidins from lychee pericarp improves the antioxidant activity of extracts [J]. *Bioence Biotechnology and Biochemistry*, 2017, 81(8): 1-10.
- LI S, YANG Y, LI J, et al. Increasing yield and antioxidative



- performance of litchi pericarp procyanidins in baked food by ultrasound-assisted extraction coupled with enzymatic treatment [J]. *Molecules*, 2018, 23(9): 2089.
- [15] GULSUNOGLU-KONUSKAN Z, KILIC-AKYILMAZ M. Microbial bioconversion of phenolic compounds in agro-industrial wastes: a review of mechanisms and effective factors [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(23): 6901-6910.
- [16] LIN S, LI Q, YANG B, et al. Transformation of litchi pericarp-derived condensed tannin with *Aspergillus awamori* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(7): 1067.
- [17] 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: 220-227.
- [18] YIN Z, WU W, SUN C, et al. Comparison of releasing bound phenolic acids from wheat bran by fermentation of three *Aspergillus* species [J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2018, 53(5): 1120-1130.
- [19] MEINI M, CABEZUDO I, GALETTO C, et al. Production of grape pomace extracts with enhanced antioxidant and prebiotic activities through solid-state fermentation by *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* [J]. *Food Bioscience*, 2021, 42: 101168.
- [20] DULF F V, VODNAR D C, DULF E H, et al. Liberation and recovery of phenolic antioxidants and lipids in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) pomace by solid-state bioprocessing using *Aspergillus niger* and *Rhizopus oligosporus* strains [J]. *Lwt*, 2018, 87: 241-249.
- [21] MAMY D, HUANG Y, AKPABLI-TSIGBE N D K, et al. Valorization of *Citrus reticulata* peels for flavonoids and antioxidant enhancement by solid-state fermentation using *Aspergillus niger* CGMCC 3.6189 [J]. *Molecules*, 2022, 27(24): 8949.
- [22] TORRES-LEÓN C, RAMÍREZ-GUZMÁN N, ASCACIO-VALDÉS J, et al. Solid-state fermentation with *Aspergillus niger* to enhance the phenolic contents and antioxidative activity of Mexican mango seed: A promising source of natural antioxidants [J]. *Lwt*, 2019, 112: 108236.
- [23] WANG Y, SINGHA, HURST W, et al. Influence of degree-of-polymerization and linkage on the quantification of proanthocyanidins using 4-dimethylaminocinnamaldehyde (DMAC) assay [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(11): 2190-2199.
- [24] 赖婷,刘磊,张名位,等.不同乳酸菌发酵对桂圆肉中酚类物质及抗氧化活性的影响[J].*中国农业科学*,2016, 49(10):1979-1989.
- [25] ESPITIA-HERNÁNDEZ P, RUELAS-CHACÓN X, CHÁVEZ-GONZÁLEZ ML, et al. Solid-state fermentation of sorghum by *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger*: Effects on tannin content, phenolic profile, and antioxidant activity [J]. *Foods*, 2022, 11(19): 3121.
- [26] VALENCIA-HERNÁNDEZ L, WONG-PAZ J, ASCACIO-VALDÉS J. Kinetic study of fungal growth of several tanninolytic strains using coffee pulp procyanidins [J]. *Fermentation*, 2021, 8(1): 17.
- [27] EZEILO U R, WAHAB R A, MAHAT N A. Optimization studies on cellulase and xylanase production by *Rhizopus oryzae* UC2 using raw oil palm frond leaves as substrate under solid state fermentation [J]. *Renewable Energy*, 2020, 156: 1301-1312.
- [28] LIN S, YANG B, CHEN F, et al. Enhanced DPPH radical scavenging activity and DNA protection effect of litchi pericarp extract by *Aspergillus awamori* bioconversion [J]. *Chemistry Central Journal*, 2012, 6(1): 108.
- [29] KIM H, PAN J, HEO W, et al. Effects of cellulase from *Aspergillus niger* and solvent pretreatments on the extractability of organic green tea waste [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(19): 10747-10751.
- [30] 郭孝萱,柳嘉,陆雪娇,等.紫薯发酵前后总酚、总黄酮、花色苷、抗氧化性和抗癌作用比较[J].*中国食品学报*, 2017,17(3):289-295.
- [31] HWANG J, NATARAJAN S B, KIM Y, et al. Biosynthesis of oligomeric anthocyanins from grape skin extracts [J]. *Molecules*, 2017, 22(3): 497.
- [32] LIU M, XIE H, MA Y, et al. High Performance liquid chromatography and metabolomics analysis of tannase metabolism of gallic acid and gallates in tea leaves [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(17): 4946-4954.
- [33] JORDÃO M, GONÇALVES F, CORREIA A, et al. Proanthocyanidin content, antioxidant capacity and scavenger activity of Portuguese sparkling wines (Bairrada Appellation of Origin) [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2010, 90(12): 2144-2152.
- [34] MA Q, XIE H, LI S, et al. Flavonoids from the pericarps of *Litchi chinensis* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(5): 1073-1078.
- [35] HOFMANN E, FINK J, PIGNET A L, et al. Human *in vitro* skin models for wound healing and wound healing disorders [J]. *Biomedicine*, 2023, 11(4): 1056.
- [36] 张泽曦,李墨灵,杜天乐,等.血清含量对HaCaT细胞生长特性及迁移能力的影响[J].*天津中医药大学学报*,2015, 34(6):369-372.
- [37] SHRIVASTAVA R. Clinical evidence to demonstrate that simultaneous growth of epithelial and fibroblast cells is essential for deep wound healing [J]. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2011, 92(1): 92-99.
- [38] CHOI J, PARK Y G, YUN M S, et al. Effect of herbal mixture composed of *Alchemilla vulgaris* and *Mimosa* on wound healing process [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, 106: 326-332.