

柴达木大肥菇菌丝胞内酚酸的提取工艺优化及抗氧化活性分析

陈雅楠¹, 胡世成¹, 焦迎春^{1,2}, 陈启和³

(1. 青海大学农牧学院, 青海西宁 810016) (2. 青海-甘肃食品研发与检测联合实验室, 青海西宁 810016)

(3. 浙江大学食品科学与营养系, 浙江杭州 310058)

摘要:以柴达木大肥菇(*Agaricus bitorquis* (Quél.) Sacc)菌丝体为原料, 基于超声波辅助提取手段, 采用单因素和 Box-Behnken 法优化酚酸提取工艺, 以大孔树脂纯化粗酚酸, 并采用 5 种经典的体外抗氧化体系对纯化前后 2 种酚酸进行活性评价。结果表明: 超声波功率 130 W, 乙醇浓度 90%, 提取温度 61 °C, 提取时间 30 min, 液料比 40:1 (mL/g) 为最佳提取工艺; 体外抗氧化试验结果显示, 在高浓度条件下, 纯化酚酸 (PPA) 组对 DPPH、ABTS 自由基清除率分别高于对照组 (Vc) 4.31%、3.69%, 也分别高于粗酚酸组 (CPA) 27.45%、32.45%, 且 PPA 组的 IC₅₀ 值分别低于 Vc 组 18.57%、5.20%, 也分别低于 CPA 组 40.78%、42.52%, 其强弱顺序为: PPA>Vc>CPA; PPA 组对羟自由基和超氧阴离子自由基清除率分别高于粗酚酸组 (CPA) 8.56%、30.09%, 且 PPA 组的 IC₅₀ 值也分别低于 CPM 组 17.39%、53.57%, 强弱顺序为: PPA>CPA; PPA 组还原能力高出 CPM 组 51.05%; PPA 组相对于 CPA 组具有较强的抗氧化活性。综上, 柴达木大肥菇纯化酚酸具有较强的抗氧化活性, 是天然抗氧化剂的良好来源。

关键词: 柴达木大肥菇; 酚酸; 提取; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2020)10-236-246

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.10.0356

Extraction Process Optimization and Antioxidant Activity Analysis of Phenolic Acids from *Agaricus bitorquis* (Quél.) Sacc Mycelium

CHEN Ya-nan¹, HU Shi-cheng¹, JIAO Ying-chun^{1,2}, CHEN Qi-he³

(1.College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining 810016, China) (2.Qinghai-Gansu Food

Research and Development and Testing Joint Laboratory, Qinghai University, Xining 810016, China)

(3.Department of Food Science and Nutrition, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: The process of ultrasonic-assisted extraction was optimized by single factor experiment and Box-Behnken methods to extract phenolic acid from the mycelium of *Agaricus bitorquis* (Quél.) Sacc. The crude phenolic acid was isolated by macroporous adsorbent resins, and the antioxidant activity of two kinds phenolic acid was evaluated with five classical antioxidant assessment system. Results showed that the optimal conditions were as follows: ultrasonic power of 130W, ethanol concentration of 90%, extraction temperature of 61 °C, extracting time of 30 minutes, and liquid/solid ratio of 40: 1(mL/g).The antioxidant activity experiment *in vitro* showed that the free radical scavenging capacity of DPPH and ABTS in purified phenolic acid (PPA) group were higher than those of Vc group (4.31% and 3.69%) and CPA group (27.45% and 32.45%) ($p<0.05$), and the half inhibitory concentrations in PPA group were lower than those of Vc group (18.57% and 5.20%) and CPA group (40.78% and 42.52%). The order of antioxidant ability was: PPA>Vc>CPA. The scavenging capacity of hydroxyl radicals and superoxide anion

引文格式:

陈雅楠,胡世成,焦迎春,等.柴达木大肥菇菌丝胞内酚酸的提取工艺优化及抗氧化活性分析[J].现代食品科技,2020,36(10):236-246

CHEN Ya-nan, HU Shi-cheng, JIAO Ying-chun, et al. Extraction process optimization and antioxidant activity analysis of phenolic acids from *Agaricus bitorquis* (Quél.) Sacc mycelium [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(10): 236-246

收稿日期: 2020-04-18

基金项目: 青海省国际合作项目 (2018-HZ-801); 国家自然科学基金地区项目 (31960471)

作者简介: 陈雅楠 (1993-), 女, 硕士, 研究方向: 食品加工与安全

通讯作者: 焦迎春 (1973-), 女, 教授, 研究方向: 食药真菌工程; 共同通讯作者: 陈启和 (1975-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物安全与生物技术

radicals in PPA group were higher than those of the CPA group (8.56% and 30.09%), and the half inhibitory concentrations in PPA group were lower than those of CPA group (17.39% and 53.57%). The order of antioxidant ability was: PPA>CPA. The reducing power of PPA group was comparable to that of Vc group, which was higher than that of CPA group (51.05%). The antioxidant activity of phenolic acid was increased with the increment of the sample concentration. In conclusion, this study revealed that the purified phenolic acid from the mycelium of *Agaricus bitorquis* (Quél.) Sacc have potent antioxidant effects, it could be used as a good source of natural antioxidant.

Key words: *Agaricus bitorquis* (Quél.) Sacc.; phenolic acid; extraction; antioxidation

柴达木大肥菇[*Agaricus bitorquis* (Quél.) Sacc.]学名为双层环伞菌, 俗称沙菇、大蘑菇, 主要分布于青藏高原柴达木盆地, 子实体的整个生活史都发生于戈壁草滩 50~60 cm 下^[1]。柴达木大肥菇作为高原珍稀食用菌不仅含有蛋白质、氨基酸、脂肪、膳食纤维、矿物质元素等营养成分, 而且含有酚酸、多糖及三萜等活性物质^[2], 极具开发价值。迄今, 柴达木大肥菇人工栽培还没能获得解决, 不能规模化种植和推广, 同时由于其自然生长环境的逐步恶化, 野生柴达木大肥蘑菇产量越来越少。有研究表明, 液体培养法获得的柴达木大肥菇菌丝体与子实体具有相似的营养成分和食用价值, 课题组于 2019 年获得了关于柴达木大肥菇菌丝体及多糖生产的发明专利, 这些为菌丝体替代子实体的开发和利用提供了坚实的保障。目前针对柴达木大肥菇功效成分的研究多见于多糖的耐疲劳^[3]、抗氧化^[4]及抗缺氧^[5]方面, 有关酚酸的研究并未见其报道。酚酸分离的常见方式有机溶剂提取、酶提取、超声波辅助提取等, 超声波辅助提取法相比于其他方法, 具有减少能耗、提高效率等优点, 被广泛应用。

生物体的氧化属于正常的生理过程, 羟基、过氧化氢和超氧阴离子等可以通过多种方式产生机体活性氧(ROS), 过量的 ROS 会产生氧化应激等反应, 可能会危害到身体健康^[6], 而大多数合成抗氧化剂对人体都有潜在的危害^[7], 无副作用的天然抗氧化剂的寻找显得尤为重要。鉴于此, 本文研究立足于青藏高原特色食用菌资源如-柴达木大肥菇, 利用超声波辅助法提取柴达木大肥菇菌丝酚酸, 以酚酸得率为响应指标, 采用单因素与 Box-Behnken 法优化提取工艺。同时, 围绕纯化前后的酚酸, 采用 DPPH 自由基、ABTS 自由基、羟自由基、超氧阴离子自由基清除及还原能力五个抗氧化评级方法, 综合解析柴达木大肥菇酚酸抗氧化功效, 旨在为柴达木大肥菇菌丝酚酸的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

柴达木大肥菇菌丝体(湿粉)由青海大学食品科学

实验室提供。没食子酸、Vc 标准品、ABTS, 北京索莱宝科技有限公司; DPPH, 上海晶纯生化科技股份有限公司(阿拉丁); 无水乙醇、十二烷基硫酸钠、铁氰化钾、三氯化铁、铁氰化钾、磷酸二氢钠、氢氧化钠、磷酸氢二钠、氯化钠、三氯乙酸、硫酸亚铁、氯化亚铁、过氧化氢、水杨酸、盐酸、邻苯三酚(均为分析纯), 湖北永阔科技有限公司。

1.2 主要仪器设备

LKTC-B1-T 数显恒温水浴锅, 国华电器有限公司; DSH-50-5 分析天平, 上海越平科学仪器有限公司; SB-3200TDT 超声波清洗机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 752N 紫外-可见分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; RE-52AA 旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂。

1.3 试验方法

1.3.1 菌丝体酚酸的提取

准确称取 1.00 g 菌丝体(湿重)于具塞三角瓶中, 加入乙醇溶液, 摇匀并封紧, 置于超声波仪处理, 抽滤, 收集滤液, 浓缩得菌丝体粗酚酸, 冷冻后备用。

1.3.2 菌丝体酚酸的纯化

采用 D101 型大孔树脂, 对菌丝体酚酸粗提物进行层析纯化。酚酸粗提物上样浓度为 10.00 mg/mL, 以无水乙醇溶液洗脱, 上样液和洗脱液流速均为 1.50 mL/min, 收集液浓缩后得菌丝体纯化酚酸, 冷冻干燥后备用。

1.3.3 标准曲线的绘制

在 10.00 mL 容量瓶中加入精密称取的没食子酸标准品 4.00 mg, 加入无水乙醇使其完全溶解, 定容至刻度线水平, 取 1.00 mL 该溶液至 10.00 mL 容量瓶中后用无水乙醇稀释并定容至刻度线, 可得 40.00 mg/L 的对照品溶液^[8]。分别取 0.10、0.20、0.40、0.60 和 0.80 mL 没食子酸对照品溶液, 稀释得到质量浓度为 10.00、20.00、30.00、40.00、60.00 L 和 80.00 $\mu\text{g/mL}$ 的标准溶液, 用无水乙醇做空白对照。准确量取标准样品 1.00 mL、无水乙醇 1.00 mL、0.3% 十二烷基硫酸钠溶液 1.00 mL、0.6% 三氯化铁溶液 1.00 mL、0.9%

铁氰化钾溶液 0.90 mL, 然后用 0.10 mol/L 的盐酸溶液定容至 25.00 mL, 显色后于暗处静置 20 min, 测定 720 nm 处的吸光度值(A)。以没食子酸标准样品浓度为横坐标, 吸光度值为纵坐标绘制标准曲线, 求得线性回归方程为: $y=1.2678x-0.0215$, $R^2=0.9964$ 。

1.3.4 测定酚酸含量及提取率

精确吸取酚酸样品 1.00 mL, 按照标准体系测定酚酸含量。通过回归方程计算酚酸浓度 (mg/mL), 每组做 3 个平行样, 按式 (1) 计算酚酸得率:

$$\text{酚酸提取率}/(\text{mg/g}) = \frac{c \times V}{m} \quad (1)$$

式中: c 为酚酸浓度 (mg/mL); V 为滤液体积 (mL); m 为菌丝体的质量 (g)。

1.3.5 试验设计

1.3.5.1 单因素试验设计

分别考察超声波功率、提取时间、提取温度、乙醇浓度、液料比因素对酚酸提取率的影响。

1.3.5.2 响应面试验

根据 Box-Behnken 试验设计原理, 以单因素试验为基础, 选取超声波功率、提取温度、乙醇浓度 3 个因素, 采用 3 因素 3 水平的响应面实验设计与优化分析方法^[9]。

1.3.6 抗氧化试验

1.3.6.1 DPPH 自由基清除能力的测定

DPPH 自由基清除能力的测定参照文献方法^[10]。分别量取不同浓度的样品各 2.00 mL 于 25.00 mL 试管中, 加入 2.00 mmol/L 的 DPPH-乙醇溶液 2.00 mL, 置于暗处放置 20 min 后, 在 517 nm 处测定吸光度。阳性对照为 Vc。DPPH 自由基的清除率按照下式 (2) 计算:

$$\text{DPPH清除率}/\% = \left[1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0} \right] \times 100\% \quad (2)$$

式中: A_0 为只加 DPPH-乙醇溶液的吸光度; A_1 为样品和 DPPH-乙醇溶液的吸光度; A_2 为样品溶液的吸光度。

1.3.6.2 ABTS 自由基清除能力测定

参照谢佳涵等^[11]的方法测定 ABTS 自由基清除能力。将 7.40 mmol/L ABTS 溶液与 2.60 mmol/L 过硫酸钾溶液按体积比 1:1 混匀, 室温避光静置 12 h, 使用前用无水乙醇稀释, 使吸光度在 734 nm 波长处为 0.70 ± 0.02 , 得到 ABTS 工作液。配制不同质量浓度样液分别取 1.00 mL, 加入 ABTS 工作液 3.00 mL, 混匀避光静置 10 min, 于 734 nm 波长处测定吸光度。阳性对照为 Vc。按公式 (3) 计算 ABTS 自由基清除率。

$$\text{ABTS自由基清除率}/\% = \left[\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right] \times 100\% \quad (3)$$

式中: A_1 为样品和 ABTS 工作液的吸光度; A_0 为只加 ABTS 工作液的吸光度。

1.3.6.3 羟自由基清除能力的测定

参照罗敬文等^[12]的方法测定羟自由基清除能力。分别量取不同浓度的样品各 2.00 mL 于 25.00 mL 试管中, 各加入 6.00 mmol/L 的硫酸亚铁溶液 2.00 mL 和 6.00 mmol/L 的过氧化氢溶液 2.00 mL, 摇匀后静置 10 min; 再加入 6.00 mmol/L 的水杨酸-乙醇溶液 2.00 mL, 加入蒸馏水定容至 10.00 mL, 在 37 °C 下水浴 15 min 后于 510 nm 处测定吸光度。阳性对照为 Vc。羟自由基的清除率按照下式 (4) 计算:

$$\text{羟自由基清除率}/\% = \left[1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0} \right] \times 100\% \quad (4)$$

式中: A_0 为加无水乙醇、硫酸亚铁、过氧化氢和水杨酸-乙醇反应体系光度; A_1 为样品、硫酸亚铁、过氧化氢和水杨酸-乙醇反应体系的吸光度; A_2 为样品、硫酸亚铁和蒸馏水反应体系光度溶液的吸光度。

1.3.6.4 超氧阴离子自由基清除能力测定

超氧阴离子自由基清除能力测定参照李珍等^[13]的方法。取 50.00 mmol/L TrisHCl 4.50 mL (用 NaOH 溶液调节溶液 pH 值至 8.20), 在 25 °C 水浴中加热 20 min, 加入不同质量浓度的样品溶液 2.00 mL, 加入 25.00 mmol/L 邻苯三酚溶液 0.40 mL (用 8.00 mmol/L HCl 配制), 震荡摇匀, 在 25 °C 水浴中加热 4 min, 以 2 滴 8.00 mol/L HCl 终止反应, 在 320 nm 紫外条件下测定吸光度。阳性对照为 Vc。超氧阴离子自由基的清除率按照下式 (5) 计算:

$$\text{超氧阴离子自由基清除率}/\% = \left[1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0} \right] \times 100\% \quad (5)$$

式中: A_0 为加 Tris-HCl、邻苯三酚和 2 滴 8.00 mol/L 盐酸反应体系的吸光度; A_1 为加 Tris-HCl、样品溶液、邻苯三酚和滴 8.00 mol/L 盐酸反应体系的吸光度; A_2 为 Tris-HCl 和样品溶液反应体系的吸光度。

1.3.6.5 还原能力的测定

还原能力的测定根据陈惠卿等^[14]报道的方法稍作修改。分别量取不同浓度的样品各 1.00 mL 于 25.00 mL 试管中, 加入磷酸缓冲液 (0.20 mol/L, pH 6.60) 2.50 mL 和 1% 的铁氰化钾溶液 2.50 mL, 于 50 °C 下水浴 20 min 后, 加入 10% 的三氯乙酸溶液 2.50 mL; 以 2000 r/min 离心 10 min 后, 取 2.50 mL 上清液, 各加入蒸馏水 2.50 mL 和 0.1% 的三氯化铁溶液 0.50 mL, 混匀后静置 10 min; 于 700 nm 处测定吸光度 A。用 1.00 mL 无水乙醇替样品, 按照以上方法测定吸光度 A_0 作空白组, 样品的还原能力通过 $A-A_0$ 判定, 值越大表示样品的还原能力越强。阳性对照为 Vc。

1.4 数据处理

响应面实验采用 Design-Expert 8.0.5 软件设计, 实验设置重复 3 组, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。利用 SPSS. statistic 22 软件对数据进行处理及误差分析, 检验 $p < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与讨论

2.1 柴达木大肥菇菌丝体酚酸提取单因素试验与分析

2.1.1 超声波功率对酚酸提取率的影响

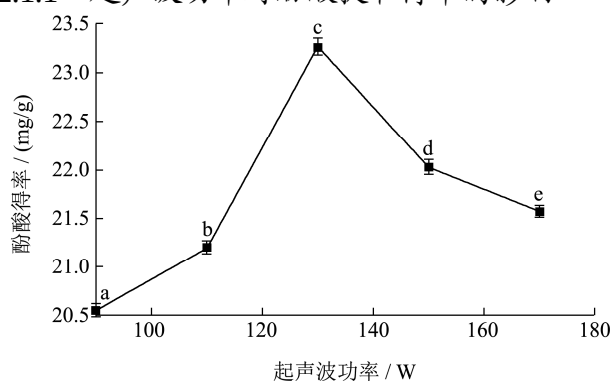


图1 超声波功率对酚酸得率的影响

Fig.1 Effect of ultrasonic power on yield of phenolic acid

注: 图中组内不同小写字母表示存在显著性差异 ($p < 0.05$), 下同。

分别以超声波功率 90、110、130、150 和 170 W, 液料比 20:1 mL/g, 乙醇浓度 80%, 在 30 °C 条件下提取 15 min, 计算酚酸提取率。结果如图 1 可知, 酚酸得率随着超声波功率先增大后下降, 当超声波功率为 130 W 时, 酚酸得率最高为 23.27 mg/g, 与超声功率为 90 W 的酚酸得率相比, 是它的 1.13 倍。这与黄艳等^[15]提取松毛菇多酚时也发现类似结果。可能原因是超声波对细胞壁有一定破碎作用, 并且随功率增大而增强, 这导致菌丝细胞内酚酸物质快速溶出, 其溶出率显著增加; 当超声波功率增加至细胞承受的高限值时, 细胞破碎, 胞内物质会全部释放到体系中, 酚酸溶出率达到最高水平; 而后再增加超声波功率, 此时体系中酚酸已到达饱和状态, 过大的超声波功率还会影响酚酸的稳定性, 导致酚酸提取率下降^[15]。因此, 本研究确定最佳超声波功率为 130 W。

2.1.2 提取时间对酚酸提取率的影响

分别以提取时间 20、25、30、35 和 40 min, 超声波功率 130 W, 其他条件同上, 进行超声辅助提取。结果如图 2 可知, 酚酸得率随着提取时间先增加后降

低, 在提取 30 min 时, 酚酸得率达到最高值为 26.32 mg/g, 与提取时间为 20 min 的酚酸得率相比, 是它的 1.05 倍。这比王治宝等^[8]在提取蒙古口蘑总酚酸得率高 1.59 倍。可能与超声波较强的剪切作用有关, 长时间作用会破坏酚酸的分子结构, 导致酚酸的降解转化, 从而影响提取效果^[15]。因此, 确定 30 min 为合适的超声波处理时间。

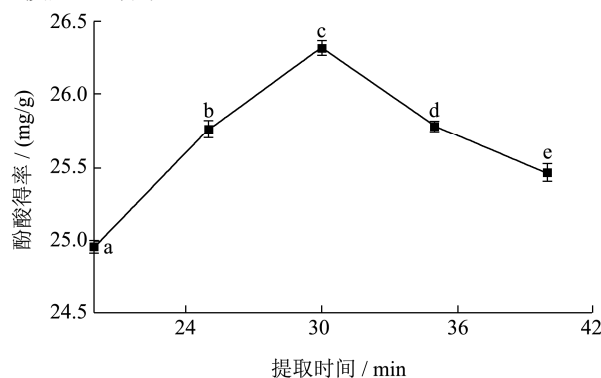


图2 提取时间对酚酸得率的影响

Fig.2 Effect of extraction time on yield of phenolic acid

2.1.3 提取温度对酚酸提取率的影响

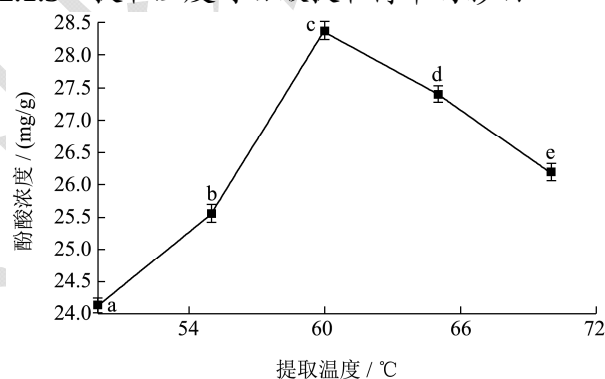


图3 提取温度对酚酸得率的影响

Fig.3 Effect of extraction temperature on yield of phenolic acid

分别以提取温度 50、55、60、65 和 70 °C, 超声波功率 130 W, 其他条件同上, 超声波处理 30 min, 计算酚酸提取率。结果如图 3, 酚酸得率先迅速升高后下降, 在提取温度 60 °C 时, 酚酸得率最高为 28.38 mg/g, 与提取温度为 50 °C 的酚酸得率相比, 是它的 1.18 倍。这比吴燕等^[16]在提取丁香叶总酚酸得率高 21.02 倍。表明在低温范围内, 提取温度的升高有利于酚酸得率的提高, 而后随着温度的升高, 菌体细胞组织破坏, 使溶液中酚酸处于过饱和状态, 导致大量的酚酸在高温下变性, 酚酸含量降低, 提取率下降^[13]。因此, 提取温度以 60 °C 为最佳。

2.1.4 乙醇浓度对酚酸提取率的影响

分别以乙醇浓度 80、85、90、95 和 100%, 提取温度 60 °C, 在超声波功率 130 W 条件下, 提取 30 min。由图 4 可知, 酚酸得率先升高后降低, 当乙醇浓度 90%

时, 酚酸得率最高为 33.48 mg/g, 与乙醇浓度为 80% 的相比, 酚酸得率是它的 1.10 倍。尹敏等^[17]在提取冬虫夏草菌丝体多酚时也发现类似结果。其原因可能与菌丝体酚酸的极性有关, 高浓度的乙醇溶液有利于酚酸的溶出, 但过高的乙醇浓度易使菌丝体中部分酚酸变性^[17], 降低酚酸的有效含量。因此, 确定 90%乙醇浓度为最佳。

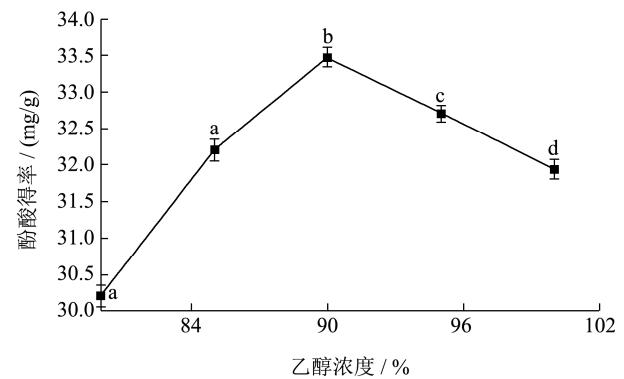


图4 乙醇浓度对酚酸得率的影响

Fig.4 The effect of ethanol concentration on the yield of phenolic acid

2.1.5 液料比对酚酸提取得率的影响

分别以液料比 20:1、30:1、40:1、50:1、60:1 mL/g, 乙醇浓度 90%, 提取温度 60 ℃, 在超声波功率为 130 W 条件下提取 30 min, 计算酚酸提取得率。结果如图 5 可知, 酚酸得率先升高后保持平稳下降, 当液料比为 40:1 mL/g 时, 酚酸得率最大为 38.22 mg/g, 与液料比为 20:1 mL/g 的酚酸得率相比, 是它的 1.41 倍。这比牛真真等^[18]提取山楂核总酚酸得率高 7.60 倍。原因可

能与有效成分的溶解度有关, 当溶剂浓度超过一定水平时, 细胞中醇溶性物质的溶出会远远超过酚酸, 且酚酸会在高水平溶剂量条件下被迅速稀释, 导致酚酸得率快速降低^[17]。因此, 确定液料比以 40:1 mL/g 为最佳。

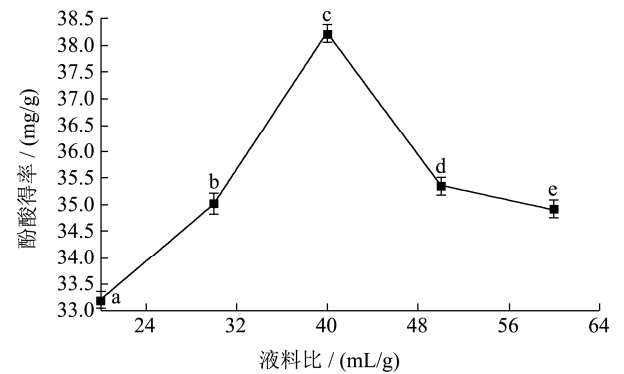


图5 料液比对酚酸得率的影响

Fig.5 The effect of material liquid ratio on the yield of phenolic acid

2.2 响应面优化实验与分析

在单因素试验的基础上, 采用 Design-Expert 8.0.5 软件进行三因素三水平的响应面试验设计对酚酸提取工艺进行进一步优化, 试验方案及结果见表 1, 对数据进行 Forward 模式多元二次回归拟合, 得到菌丝体中酚酸提取量预测值的二次多项回归方程:

$$Y=-4.76A^2-4.71B^2-1.69C^2+39.00-0.35AB-0.35AC-0.32BC+0.14A+0.29B+0.37C$$

表1 响应面试验结果

Table 1 Response surface test results

试验号	乙醇浓度/%	超声波功率/W	提取温度/℃	酚酸得率/(mg/g)
1	-1 (80)	-1 (110)	0 (60)	25.79
2	+1 (100)	-1 (110)	0 (60)	26.61
3	-1 (80)	+1 (150)	0 (60)	27.15
4	+1 (100)	+1 (150)	0 (60)	26.55
5	-1 (80)	0 (130)	-1 (50)	28.63
6	+1 (100)	0 (130)	-1 (50)	29.78
7	-1 (80)	0 (130)	+1 (70)	30.02
8	+1 (100)	0 (130)	+1 (70)	29.79
9	0 (90)	-1 (110)	-1 (50)	31.63
10	0 (90)	+1 (150)	-1 (50)	32.78
11	0 (90)	-1 (110)	+1 (70)	33.05
12	0 (90)	+1 (150)	+1 (70)	32.92
13	0 (90)	0 (130)	0 (60)	38.90
14	0 (90)	0 (130)	0 (60)	39.12
15	0 (90)	0 (130)	0 (60)	38.96

表 2 响应面结果方差分析

Table 2 Result of the response surface regression model						
方差来源	平方和	自由度	均方	F	Prod>F	显著性
模型	290.77	9	32.31	1610.95	<0.0001	***
A	0.17	1	0.17	8.29	0.0346	*
B	0.67	1	0.67	33.36	0.0022	**
C	1.09	1	1.09	54.55	0.0007	**
AB	0.50	1	0.50	25.11	0.0041	**
AC	0.48	1	0.48	23.98	0.0045	**
BC	0.41	1	0.41	20.25	0.0064	**
A ²	222.10	1	222.10	11074.51	<0.0001	***
B ²	82.07	1	82.07	4092.39	<0.0001	***
C ²	10.50	1	10.50	523.33	<0.0001	***
残差	0.10	5	0.020			
失拟项	0.075	3	0.025	1.93	0.3590	
纯误差	0.026	2	0.013			
总差	290.87	14				

注: ** $p<0.01$, 差异极显著; * $p<0.05$, 差异显著。

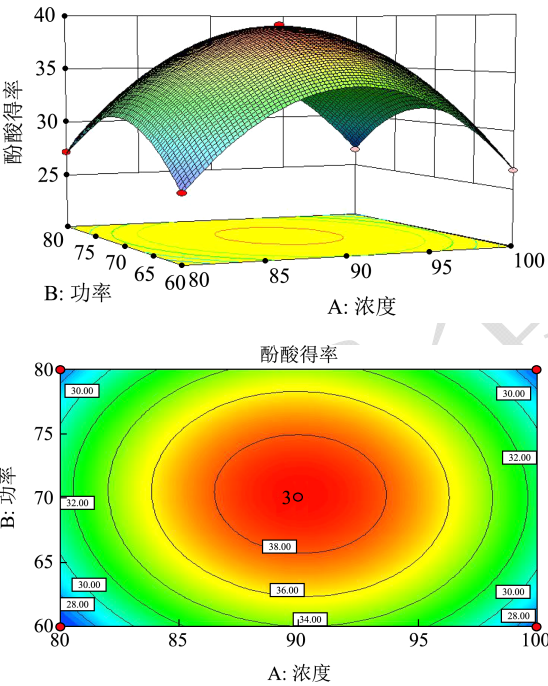


图 6 浓度与功率交互影响的等高线

Fig.6 Contour line of correlation between ethanol concentration and ultrasonic power

对回归模型进行方差分析, 其结果表明回归模型极显著, 此模型可解释 99.97% 的变异, 失拟值不显著 ($p>0.05$), 说明本试验模型能较好地拟合真实数据的变化。此外回归方程系数显著性检验可知, 模型的一次项 C ($p<0.01$) 差异极显著, B ($p<0.05$) 差异显著, A ($p>0.05$) 差异不显著; 二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 ($p<0.01$) 差异极显著。

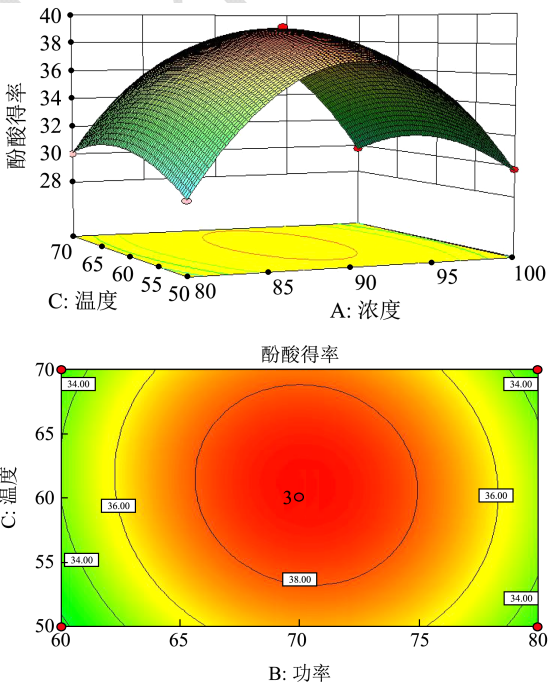


图 7 浓度与温度交互影响的等高线

Fig.7 Contour line of correlation between ethanol concentration and temperature

利用 Design-Expert 8.0.5 软件绘制各因素响应曲面和等高线图, 因素对响应值影响的显著性顺序为: 超声波功率>提取温度>乙醇浓度, 将不显著的因素保持低水平状态, 显著因素保持在最优代码水平上, 因此获得的酚酸提取最优条件为: 乙醇浓度 90.07%、超声波功率 131 W、提取温度 61.06 °C, 在此条件下酚酸得率预测最大值为 39.02 mg/g。以最优提取工艺进

行了三组验证实验, 获得酚酸得率实测值为 39.09 mg/g, 与预测值接近。与王淑芳等^[19]研究优化小麦酚酸提取工艺后的得率相比, 是它 37.05 倍; 与蒲忠慧等^[20]研究优化川芎酚酸提取工艺后的得率相比, 是它的 0.88 倍。

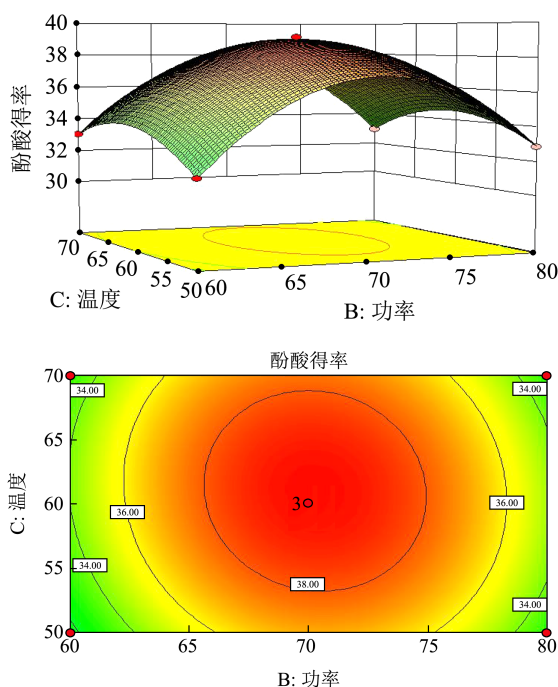


图8 功率与温度交互影响的等高线

Fig.8 Contour line of correlation between ethanol ultrasonic power and temperature

2.3 柴达木大肥菇菌丝体酚酸体外抗氧化活性研究结果

2.3.1 柴达木大肥菇菌丝体酚酸对 DPPH 自由基的清除能力

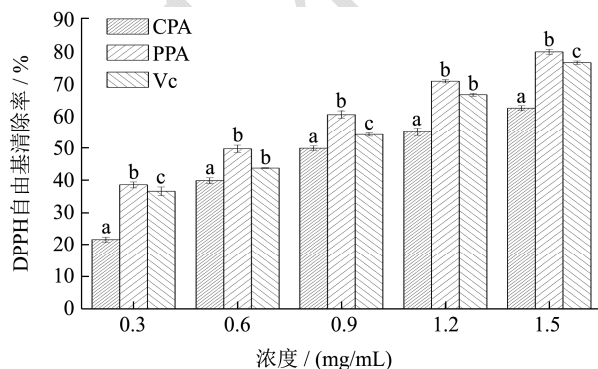


图9 菌丝体酚酸的 DPPH 清除能力

Fig.9 DPPH free radical scavenging capacity of phenolic acid in mycelium

DPPH 法是一种评价天然抗氧化剂抗氧化活性的常用体系。天然抗氧化剂的 DPPH 清除率越高, 显示

其抗氧化能力越强^[21]。由图 9 结果可知, 各酚酸试验组对 DPPH 清除率随着浓度增加而增大, PPA 组对 DPPH 清除率最高。当浓度为 1.50 mg/mL 时, PPA 组清除率达到最大值 79.84%; 与阳性对照 (Vc) 组比较, PPA 组清除率相当于 Vc 组的 104.31%, 显示出较高的抗氧化活性 ($p < 0.05$); 与 CPA 组相比, PPA 组清除率相当于该组的 127.45%, 差异显著 ($p < 0.05$)。由表 3 可知, PPA、CPA 及 Vc 组对 DPPH 的清除率与其浓度均呈正相关, 并具有良好的线性关系, 其中 PPA 组的 IC_{50} 值只是 Vc 组的 82.43%、CPA 组 59.22%, PPA 组的 IC_{50} 值最小为 0.61 mg/mL, 清除 DPPH 自由基能力最大。综上, 各酚酸试验组对 DPPH 清除率强弱顺序为: PPA>Vc>CPA, 即 PPA 组对 DPPH 自由基的清除作用最好。与杨美莲^[22]和 Zan^[23]等朝鲜蓟叶酚酸提取物对 DPPH 清除能力呈现剂量依赖上升的结果一致, 在相同浓度下纯化后的酚酸对 DPPH 的清除能力均明显强于粗酚酸, 与赵艳红等^[24]石榴皮酚酸结果类似。

表 3 DPPH 清除率与酚酸浓度的线性关系

Table 3 Linear relationship between DPPH clearance and phenolic acid concentration

样品	线性方程	R^2	$IC_{50}/(mg/mL)$
CPA	$y=32.433x+16.57$	0.9386	1.03
PPA	$y=34.567x+28.75$	0.9983	0.61
Vc	$y=34.3x+24.63$	0.9932	0.74

2.3.2 柴达木大肥菇菌丝体酚酸对 ABTS 自由基清除作用

ABTS 是一种常用的检测天然产物抗氧化活性的方法。在清除 ABTS 自由基反应中, 抗氧化剂通过抑制蓝绿色的 ABTS 自由基的产生来评价抗氧化性^[25]。由图 10 结果可知, 各酚酸试验组对 ABTS 清除率随着浓度升高而增大, PPA 组对 ABTS 清除率最高。当浓度为 1.50 mg/mL 时, PPA 组清除率达到最大值 (75.82 ± 0.69)%; 与 Vc 组比较, PPA 组清除率是 Vc 的 103.69%, 差异显著 ($p < 0.05$); 与 CPA 组相比, PPA 组清除率相当于该组的 132.45%, 明显高于 CPA 组 ($p < 0.05$)。由表 4 结果可知, PPA、CPA 及 Vc 组对 ABTS 的清除率与其浓度均呈正相关, 具有较好的线性关系, 其中 PPA 组的 IC_{50} 值分别相当于 Vc 组、CPA 组的 94.80%、57.48%, PPA 组的 IC_{50} 值最低为 0.73 mg/mL, 清除 ABTS 自由基的能力最高。综上, 各酚酸试验组对 ABTS 清除率强弱顺序依次为: PPA>Vc>CPA, 即 PPA 组对 ABTS 自由基的清除效果最好。与朱洁^[25]等研究了大孔吸附树脂对梨幼果酚酸的 ABTS 自由基清除能力的结果一致, 即纯化酚酸

清除 ABTS 自由基的能力强于粗酚酸。

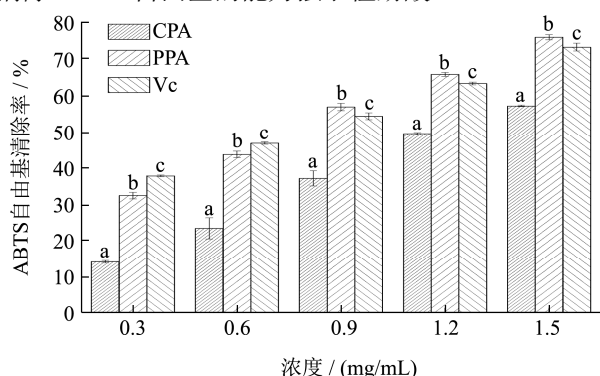


图 10 菌丝体酚酸的 ABTS 自由基清除能力

Fig.10 ABTS free radical scavenging capacity of phenolic acid in mycelium

表 4 ABTS 清除率与酚酸浓度的线性关系

Table 4 Linear relationship between ABTS clearance and phenolic acid concentration

样品	线性方程	R ²	IC ₅₀ /(mg/mL)
CPA	y=37.367x+2.61	0.992	1.27
PPA	y=29x+28.94	0.998	0.73
Vc	y=36.267x+22.24	0.9958	0.77

2.3.3 柴达木大肥菇菌丝体酚酸对羟自由基的清除能力

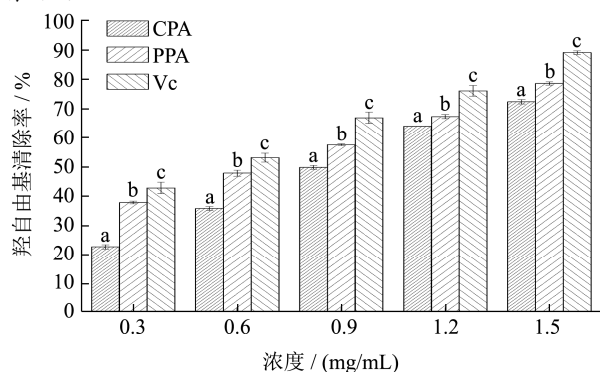


图 11 菌丝体酚酸的羟自由基清除能力

Fig.11 Hydroxyl free radical scavenging capacity of phenolic acid in mycelium

表 5 羟自由基的清除率与酚酸浓度的线性关系

Table 5 Linear relationship between hydroxyl radical scavenging rate and phenolic acid concentration

样品	线性方程	R ²	IC ₅₀ /(mg/mL)
CPA	y=42.533x+10.66	0.9992	0.92
PPA	y=33.7x+24.47	0.9933	0.76
Vc	y=38.533x+30.92	0.9971	0.49

羟自由基是一种活性氧，在细胞内，羟自由基可以穿过细胞膜，与氨基酸、蛋白质和 DNA 等生物分子发生反应，造成组织破坏和细胞死亡，这也是引起衰老和其他疾病的重要因素^[26]。因此，在膳食中寻找

羟自由基清除剂是生物体预防多种疾病最有效的措施之一^[27]。由上图 11 结果可知，酚酸试验组对羟自由基清除率随着浓度升高而增大，PPA 组对羟自由基清除率高于 CPA 组。当浓度为 1.50 mg/mL 时，PPA 组清除率达到最大值为 78.65%；与 Vc 组比较，PPA 组对羟自由基清除率相当于 Vc 组的 88.22% ($p<0.05$)，CPA 组对羟自由基清除率相当于 Vc 组 81.26% ($p<0.05$)；与 CPA 组相比，PPA 组对羟自由基清除率相当于 CPA 组 108.56%，具有显著差异 ($p<0.05$)。由表 5 可知，PPA、CPA 及 Vc 组对羟自由基清除率与其浓度均呈正相关性，其中 PPA 组的 IC₅₀ 值低于 CPA 组 17.39%，其中它的 IC₅₀ 值为 0.76 mg/mL，且清除羟自由基高于 CPA 组。综上，PPA 组对羟自由基的清除效果优于 CPA 组。与吴燕等^[28]研究丁香叶酚酸纯化前后对羟自由基清除效果结论一致。

2.3.4 柴达木大肥菇菌丝体酚酸对超氧阴离子自由基的清除能力影响

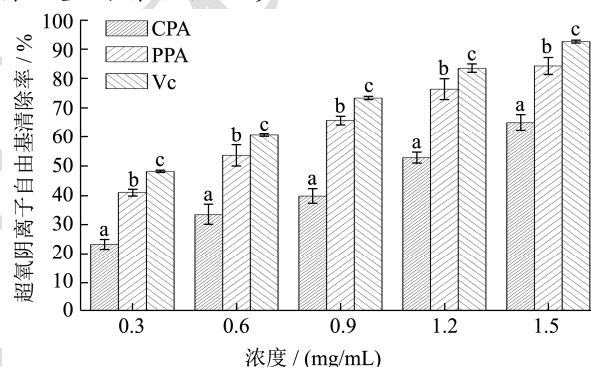


图 12 菌丝体酚酸的超氧阴离子清除能力

Fig.12 Superoxide free radical scavenging capacity of phenolic acid in mycelium

表 6 超氧阴离子清除率与酚酸浓度的线性关系

Table 6 Linear relationship between superoxide anion scavenging rate and phenolic acid concentration

样品	线性方程	R ²	IC ₅₀ /(mg/mL)
CPA	y=34.233x+11.81	0.9866	1.12
PPA	y=36.7x+31.03	0.9922	0.52
Vc	y=37.567x+37.65	0.9948	0.33

超氧阴离子自由基能够转化为其他氧自由基，产生更强的攻击性，从而对组织产生损伤导致各种疾病^[29]。由图 12 结果可知，各酚酸试验组对超氧阴离子清除率随着浓度升高而增大，PPA 组的清除率明显高于 CPA 组。当浓度为 1.50 mg/mL 时，PPA 组清除率达到最大值为 84.34%；与 Vc 组比较，PPA 组清除率是 Vc 组的 91.04% ($p<0.05$)，接近 Vc 组的清除效果，CPA 组清除率是 Vc 组的 69.98% ($p<0.05$)，远低于 Vc 组；与 CPA 组相比，PPA 组清除率相当于该组的

130.09%, PPA 组清除超氧阴离子作用明显强于 CPA 组 ($p<0.05$)。由表 6 可知, PPA、CPA 及 Vc 组对超氧阴离子清除率与其浓度均呈正相关性, PPA 组的 IC_{50} 值低于 CPA 组 53.57%, 其中它的 IC_{50} 值为 0.52 mg/mL, PPA 组清除超氧阴离子效果明显高于 CPA 组。与王晓梅等人^[30]大孔树脂纯化新疆鼠尾草酚酸对超氧阴离子清除能力的结果类似。

2.3.5 柴达木大肥菇菌丝体酚酸还原能力

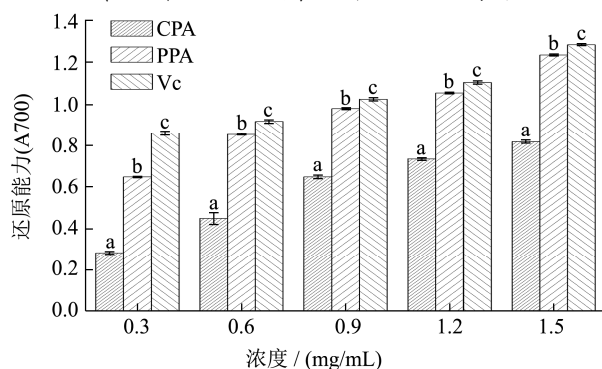


图 13 菌丝体酚酸的还原能力

Fig.13 Reduction capacity of phenolic acid in mycelium

还原力可以参与多种抗氧化反应, 可以破坏自由基链式反应和过氧化物的降解^[31]。PPA、CPA 及 Vc 组的还原能力如图 13 所示, 各酚酸试验组的还原能力随着浓度升高而增大, PPA 组的清除率明显高于 CPA 组。当浓度为 1.50 mg/mL 时, PPA 组还原能力为 1.23; 与 Vc 组比较, PPA 组还原能力是 Vc 组的 99.68%, 显示与 Vc 组一致的强还原能力 ($p<0.05$); 与 CPA 组相比, PPA 组还原能力相当于该组的 151.05%, 明显高于 CPA 组 ($p<0.05$), 表明 PPA 组具有较强还原能力。与巫永华等^[32]山楂叶酚酸提取物纯化前后还原能力效果的研究结论一致。

3 结论

本研究采用单因素试验和 Box-Behnken 试验对柴达木大肥菇菌丝体酚酸的提取工艺进行了优化, 得到最佳工艺参数是乙醇浓度为 90%, 超声波功率为 130 W, 提取时间为 30 min, 提取温度为 61 °C, 液料比为 40:1 mL/g, 在此条件下的酚酸提取得率达 39.09 mg/g, 与预测值一致。这与牛真真^[18]和王淑芳^[19]提取酚酸得率相比, 分别是它们的 7.60 倍、37.05 倍; 与蒲忠慧^[20]提取酚酸得率相比, 是它的 0.88 倍。体外抗氧化试验结果表明, 在高浓度条件下, 与对照组比较, 纯化酚酸组清除 DPPH、ABTS 自由基能力高出 4.31%、3.69%; 纯化酚酸的还原能力与对照组接近; 与粗酚酸组相比, 纯化酚酸组清除 DPPH、ABTS 自由基能力高出 27.45%、32.45%; 纯化酚酸组清除羟自由基及

超氧阴离子自由基作用高出 8.56%、30.09%; 纯化酚酸组还原能力高出粗酚酸组 51.05%。纯化酚酸组对 DPPH、ABTS、羟自由基、超氧阴离子自由基清除作用与还原能力均表现出浓度依赖特征, 其中纯化酚酸组对 DPPH、ABTS 自由基清除作用的 IC_{50} 值分别低于对照组 18.57%、5.20%, 分别低于粗酚酸组 40.78%、42.52%; 纯化酚酸组清除羟自由基、超氧阴离子自由基作用的 IC_{50} 值分别低于粗酚酸组 17.39%、53.57%。综上所述, 纯化酚酸对 DPPH、ABTS 自由基的清除作用最佳, 显示出比 Vc 组更强的清除自由基功效, 在清除羟自由基、超氧阴离子自由基方面, 具有远强于粗酚酸的清除作用, 可作为天然抗氧化剂首选来源, 广泛应用于健康及功能食品行业。

参考文献

- [1] 王燕云. 青海高原野生大肥菇生物学特性的研究[D]. 青海: 青海师范大学, 2016: 1-5
WANG Yan-yun. A study on the biological characteristics of wild *Agaricus bitorquis* Qinghai Plateau [D]. Qinghai: Qinghai Normal University, 2016: 1-5
- [2] 罗春燕. 柴达木大肥菇子实体营养成分分析与评价[J]. 中国食用菌, 2015, 34(3): 25-27
LUO Chun-yan. Nutrition ingredient analysis and evaluation on *Agaricus bitorquis* (Quél.) Sacc. fruit body [J]. Edible Fungi of China, 2015, 34(3): 25-27
- [3] 焦迎春, 旷惠, 吴嘉南, 等. 柴达木大肥菇多糖对小鼠的抗疲劳作用[J]. 现代食品科技, 2018, 34(8): 24-30
JIAO Ying-chun, KUANG Hui, WU Jia-nan, et al. The anti-fatigue activities of polysaccharides extracted from the *Agaricus Bitorquis* (Quél.) Sacc. Chaidam [J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(8): 24-30
- [4] KUANG Huai, JIAO Ying-chun, WANG Wei, et al. Characterization and antioxidant activities of intracellular polysaccharides from *Agaricus bitorquis* (Quél.) Sacc. Chaidam ZJU-CDMA-12 [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 18: 1-14
- [5] 焦迎春, 余梅, 张燕, 等. 超声波辅助提取柴达木大肥菇多糖工艺优化及其抗缺氧活性研究[J]. 现代食品科技, 2019, 35(1): 114-120, 251
JIAO Ying-chun, YU Mei, ZHANG Yan, et al. Optimization of polysaccharide from *Agaricus bitorquis* mushroom by ultrasonic-assisted extraction method and its anti-hypoxia activity [J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(1): 114-120, 251
- [6] LIANG Xiao-xia, GAO Ying-ying, PAN Yan, et al.

- Purification, chemical characterization and antioxidant activities of polysaccharides isolated from *Mycena dendrobii* [J]. Carbohydr Polym, 2019, 23: 45-51
- [7] SONG Qian-qian, JIANG Lian, YANG Xin-quan, et al. Physicochemical and functional properties of a water-soluble polysaccharide extracted from mung bean (*Vigna radiate* L.) and its antioxidant activity [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 138: 874-880
- [8] 王治宝.超声辅助提取蒙古口蘑总酚酸的工艺优化[J].南方农业学报,2015,46(5):866-870
- WANG Zhi-bao. Optimization of ultrasound-assisted extraction process for total phenolic acids from *Tricholoma mongolicum* Imai [J]. Journal of Southern Agriculture, 2015, 46(5): 866-870
- [9] 张丹,王昌利,卜雕雕,等.Box-Behnken 响应面法优化蒲公英酚酸提取工艺[J].中南药学,2019,17(5):667-671
- ZHANG Dan, WANG Chang-li, BU Diao-diao, et al. Optimization of extraction technology of phenolic acids from dandelion by Box-Behnken response surface methodology [J]. Central South Pharmacy, 2019, 17(5): 667-671
- [10] 陈安徽,巫永华,刘恩岐,等.山楂叶多酚的酶法提取及抗氧化活性研究[J].食品科技,2017,42(2):203-208
- CHEN An-hui, WU Yong-hua, LIU En-qi, et al. Enzymatic extraction and antioxidant activity of polyphenols from hawthorn leaves [J]. Food Science and Technology, 2017, 42(2): 203-208
- [11] 谢佳函,刘回民,刘美宏,等.红豆皮多酚提取工艺优化及抗氧化活性分析[J].中国食品学报,2020,20(1):147-157
- XIE Jia-han, LIU Hui-min, LIU Mei-hong, et al. Extraction process optimization and antioxidant activity analysis of polyphenols from azuki bean coats (*Vigna angularis*) [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(1): 147-157
- [12] 罗敬文,司风玲,顾子玄,等.3 种木耳多糖的抗氧化活性与抑菌能力比较分析[J].食品科学,2018,39(19):64-69
- LUO Jin-wen, SI Feng-ling, GU Zi-xuan, et al. Antioxidant and antimicrobial activities of polysaccharides from three species of *Auricularia* [J]. Food Science, 2018, 39(19): 64-69
- [13] 李珍.苹果皮渣多酚提取、纯化及抗氧化活性研究[D].中国农业科学院,2014:14-34
- LI Zhen. Research on extraction、purification and antioxidant effects of polyphenols in apple pomace [J]. Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2014: 14-34
- [14] 陈惠卿,杨安平,任吉君,等.土三七总酚酸抗氧化活性的研究[J].中医药导报,2013,19(11):78-79,82
- CHEN Hui-qing, YANG An-ping, REN Ji-jun, et al. Study on antioxidant activities of total phenolic acid in *Sedum aizoon* L [J]. Guiding Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2013, 19(11): 78-79, 82
- [15] 黄艳,孙怡婷,张见明,等.松毛菇多酚的提取及纯化工艺研究[J].食品研究与开发,2019,40(21):106-114
- HUANG Yan, SUN Yi-ying, ZHANG Jian-ming, et al. Optimization of extraction and purification of polyphenols from *Lyophyllum cinerascens* [J]. Food Research and Development, 2019, 40(21): 106-114
- [16] 吴燕,盛尊来,高凌飞,等.响应面法优化丁香叶总酚酸提取工艺[J].食品工业科技,2015,36(2):286-290
- WU Yan, SHENG Zun-lai, GAO Ling-fei, et al. Optimization of extraction process of total phenolic acids from *Syringa oblata* Lindl. leaves by response surface methodology [J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(2): 286-290
- [17] 尹敏,赵迎春,刘雨阳,等.冬虫夏草菌丝体多酚提取及对 3 种癌细胞抑制作用研究[J].中国食用菌,2017,36(4):48-52
- YIN Min, ZHAO Ying-chun, LIU Yu-yang, et al. Study on polyphenol extraction of *Cordyceps sinensis* mycelium and their inhibitory effect on three kinds of cancer cells [J]. Edible Fungi of China, 2017, 36(4): 48-52
- [18] 牛真真,赵新玲,郭遥遥,等.响应面法优化山楂核总酚酸提取工艺及其降脂活性[J].青岛科技大学学报(自然科学版),2019,40(4):38-45,53
- NIU Zhen-zhen, ZHAO Xin-ling, GUO Yao-yao, et al. Optimization of extraction process of total phenolic acid from *Crataegus Pinnati* Fida seeds by response surface methodology and its lipid-lower activity [J]. Journal of Qingdao University of Science and Technology (Natural Science Edition), 2019, 40(4): 38-45, 53
- [19] 王淑芳,董飞,王刚,等.小麦酚酸提取工艺优化及产区与品种差异对酚酸含量的影响[J].食品科学,2019,40(22):306-312
- WANG Shu-fang, DONG Fei, WANG Gang, et al. Optimization of extraction process for phenolic acid from wheat grains and effect of geographic origin and variety on phenolic acid content [J]. Food Science, 2019, 40(22): 306-312
- [20] 蒲忠慧,彭永珍,彭成,等.川芎总酚酸提取工艺的优化[J].中成药,2018,40(7):1506-1509
- PU Zhong-hui, PENG Yong-zhen, PENG Cheng, et al. Extraction optimization for total phenolic acid from *Ligusticum chuanxiong* [J]. Chinese Traditional Patent

- Medicine, 2018, 40(7): 1506-1509
- [21] 郑满荣,吕晓玲,王建新,等.3 种沙棘油的主要成分及抗氧化能力比较[J].食品研究与开发,2018,39(8):24-29
ZHENG Man-rong, LV Xiao-ling, WANG Jian-xin, et al. Main components and antioxidant activity of three kinds of seabuckthorn oil (*Hippophae rhamnoides* L.) [J]. Food Research and Development, 2018, 39(8): 24-29
- [22] 杨美莲,程桂广,蔡圣宝,等.朝鲜蓟叶多酚提取及抗氧化活性研究[J].现代食品科技,2019,35(4):157-165,21
YANG Mei-lian, CHEN Gui-guang, CAI Sheng-bao, et al. Extraction and antioxidant activity of polyphenols from artichoke leaves [J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(4): 157-165, 21
- [23] Zan M A, Ferraz A B F, Richter M F, et al. *In vivo*, genotoxicity evaluation of an artichoke (*Cynara scolymus* L.) aqueous extract [J]. Journal of Food Science, 2013, 78(2): 367-371
- [24] 赵艳红,李建科,李国荣.石榴皮多酚纯化及其抗氧化活性表征[J].食品科学,2010,31(11):31-37
ZHAO Yan-hong, LI Jian-ke, LI Guo-rong. Purification with macroporous adsorbent resins and *in vitro* antioxidant evaluation of pomegranate peel polyphenols [J]. Food Science, 2010, 31(11): 31-37
- [25] 朱洁,王红宝,孔佳君,等.梨幼果多酚的纯化及其抗氧化性[J].食品科学,2017,38(5):14-20
ZHU Jie, WANG Hong-bao, KONG Jia-jun, et al. Purification and antioxidant activity of polyphenols from young pear fruits [J]. Food Science, 2017, 38(5): 14-20
- [26] 姬妍茹,许博超,杨庆丽,等.黑菊芋多酚提取及抗氧化活性分析[J].食品科学技术学报,2019,37(1):84-89
JI Yan-ru, XU Bo-chao, YANG Qing-li, et al. Extraction and antioxidant activities of polyphenols in black Jerusalem artichoke [J]. Journal of Food Science and Technology, 2019, 37(1): 84-89
- [27] XIANG Cui-fang, WU Xiao-hua, ZHAO Zi-lu, et al. Nonhomologous end joining and homologous recombination involved in luteolin-induced DNA damage in DT40 cells [J]. Toxicology in Vitro, 2020, 65
- [28] 吴燕.丁香叶总酚酸提取工艺的优化及抗氧化活性测定[D].哈尔滨:东北农业大学,2015:30-35
WU Yan. Optimization of extraction process of total phenolic acids from *Folium syringae* leaves and its antioxidant activity research [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2015: 30-35
- [29] 姜宁,刘晓鹏,陈芳,等.厚朴多糖提取工艺及其体外抗氧化活性[J].食品科学,2015,36(6):12-17
JIANG Ning, LIU Xiao-peng, CHEN Fang, et al. Extraction and antioxidant activities of polysaccharides from *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils. barks [J]. Food Science, 2015, 36(6): 12-17
- [30] 王晓梅,王小青,王新玲,等.新疆鼠尾草总酚酸的体外抗氧化活性[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(9):162-165
WANG Xiao-mei, WANG Xiao-qing, WANG Xin-ling, et al. Antioxidant activities of total salvianolic acid from *Salvia deserta in vitro* [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2014, 20(9): 162-165
- [31] 程勇杰,陈小伟,王珍珍,等.树莓酵素与蓝莓酵素有机酸分析及其体外抗氧化性能[J].食品工业科技,2017,38(20):141-145,165
CHEN Yong-jie, CHEN Xiao-wei, WANG Zhen-zhen, et al. Analysis of organic acids and *in vitro* antioxidant activity of raspberry-ferment and blueberry-ferment [J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(20): 141-145, 165
- [32] 巫永华,刘恩岐,张建萍,等.山楂叶多酚的纯化及其抗氧化特性与组分分析[J].食品与发酵工业,2020,46(2):165-172
WU Yong-hua, LIU En-qi, ZHANG Jian-ping, et al. Purification, antioxidant capacity and component analysis of hawthorn leaf polyphenols [J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(2): 165-172

(上接第 181 页)

- [31] 刘波.高温应激与大黄蓼醌提取物对团头鲂生理反应及相关应激蛋白表达的影响[D].南京:南京农业大学,2012
LIU Bo. Effects of high temperature stress and rhubarb extract on physiological responses and expression of related stress proteins [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012
- [32] He R, Xie J, Su H, et al. Effects of different temperatures on muscle nutrient composition and blood biochemical parameters of Chinese sturgeon under water-free preservation conditions [J]. Food Science, 2014, 35(6): 194-199