

# 油用牡丹籽种皮多酚的提取及抗氧化和体外发酵特性

孙兆岳, 崔文玉, 程安玮\*

(湖南农业大学食品科学技术学院, 湖南长沙 410128)

**摘要:** 采取超声辅助提取油用牡丹籽种皮中的多酚, 以多酚提取量为测定指标, 通过单因素试验及响应面分析获得最优的工艺条件, 进一步测定牡丹籽种皮多酚的抗氧化活性和体外发酵特性。结果表明, 超声波提取牡丹籽种皮多酚的最优工艺参数为: 乙醇体积分数 60%、料液比 1:40、超声功率为 480 W, 提取时间 50 min, 多酚提取量为 83.11 mg GAE/g。牡丹籽种皮多酚的 DPPH、ABTS<sup>+</sup> 自由基清除以及 FRAP 的 IC<sub>50</sub> 分别为 8.19、5.83、16.46 mg GAE/g, 具有良好的抗氧化活性。体外发酵试验证明, 牡丹籽壳多酚均可降低正常组和肥胖组中发酵液的 pH 值, 增加短链脂肪酸含量, 且对肥胖组的影响更加明显。这表明从油用牡丹籽种皮中分离的多酚具有明显的体外抗氧化活性, 有降低肠道体外发酵液 pH 值, 增加短链脂肪酸的功效。

**关键词:** 油用牡丹籽种皮; 多酚; 响应面法; 体外发酵; 短链脂肪酸

文章编号: 1673-9078(2024)05-162-170

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.5.0616

## Extraction of Polyphenols from Oil Peony Seed Coats and Their Antioxidant and *in Vitro* Fermentation Characteristics

SUN Zhaoyue, CUI Wenyu, CHENG Anwei\*

(College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

**Abstract:** Ultrasonic-assisted extraction of polyphenols from oil peony seed coats (OPSCP) was conducted, and the extraction yield was used as an evaluation index to optimize extraction conditions through single-factor experiments and response surface analysis. In addition, the antioxidant activity and *in vitro* fermentation characteristics of OPSCP were determined. The results showed that the optimal conditions of ultrasonic-assisted extraction of OPSCP are as follows: ethanol 60% *V/V*, solid-liquid ratio of 1:40, ultrasonic power of 480 W, and extraction time of 50 min. The polyphenol extraction yield equaled 83.11 mg GAE/g under the optimal conditions. The IC<sub>50</sub> of DPPH, ABTS<sup>+</sup> radical scavenging rate, and FRAP values of OPSCP in DPPH, ABTS, and FRAP assays were 8.19 mg GAE/g, 5.83 mg GAE/g, and 16.46 mg GAE/g, respectively, indicating good antioxidant activity. *In vitro* fermentation experiments showed that OPSCP can reduce the pH of the fermentation broth and increase the content of short-chain fatty acids (SCFAs) for both the normal and obese groups, with

引文格式:

孙兆岳, 崔文玉, 程安玮. 油用牡丹籽种皮多酚的提取及抗氧化和体外发酵特性[J]. 现代食品科技, 2024, 40(5): 162-170.

SUN Zhaoyue, CUI Wenyu, CHENG Anwei. Extraction of polyphenols from oil peony seed coats and their antioxidant and *in vitro* fermentation characteristics [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(5): 162-170.

收稿日期: 2023-05-24

基金项目: 国家重点研发计划课题 (2022YFD1301101-1), 湖南省科技创新团队 (2021RC4060)

作者简介: 孙兆岳 (1999-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品资源开发与利用, E-mail: 846506460@qq.com

通讯作者: 程安玮 (1975-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 生物活性物质与功能食品, E-mail: anweich@hunau.edu.cn

a more pronounced effect observed in the obese group. This study indicates that the polyphenols from oil peony seed coats exhibit significant *in vitro* antioxidant activity and have the effect potential to lower the pH and increase SCFAs in intestinal fermentation broth *in vitro*.

**Key words:** oil peony seed coat; polyphenols; response surface methodology; *in vitro* fermentation; short-chain fatty acids

油用牡丹属毛茛科植物 (*Paeonia suffruticosa* Andr.), 作为新木本油料资源, 其种子含油量 25% 以上。为提高出油率和保证油的品质, 牡丹籽榨油过程中需将种皮先脱除。牡丹籽种皮作为榨油过程中的副产物, 约占牡丹籽质量的 1/3<sup>[1]</sup>。牡丹籽粕、牡丹叶、牡丹籽种皮中都含有丰富的多酚<sup>[2]</sup>, 采用超临界 CO<sub>2</sub> 萃取法证实牡丹籽粕中多酚含量为 18.58 mg/g<sup>[3]</sup>。

植物多酚具有抗氧化、抗炎、调节机体免疫等多种活性<sup>[4-6]</sup>。还具有维护肠道微生态平衡的功能, 主要是多酚化合物可为肠道微生物提供代谢底物, 促进益生菌生长, 抑制肠内有害菌的生长发挥抗菌活性<sup>[7]</sup>。肠道微生物能够将大分子多酚代谢成更具生物活性的小分子代谢物, 而酚类代谢物也可促进肠道微生物生长繁殖<sup>[8]</sup>。肠道微生物主要代谢产物短链脂肪酸 (SCFAs) 可作为肠细胞的主要能量来源, 提高机体免疫力<sup>[9]</sup>。多酚与肠道菌群存在着双向调节作用, 一方面多酚可以影响肠道菌群的组成, 另一方面, 肠道菌群可以促进多酚代谢并产生其他活性物质, 进而发挥抗氧化性作用<sup>[10]</sup>。

目前对牡丹籽种皮的研究很少, 已有的研究主要在牡丹籽种皮中的芍药苷、多糖等活性物质<sup>[11]</sup>。本研究以“凤丹”牡丹籽种皮为原料, 优化多酚的超声波提取工艺, 并对抗氧化活性以及体外模拟发酵特性进行研究, 以期油用牡丹籽种皮的高效利用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 原料与试剂

“凤丹”油用牡丹籽种皮, 来自山东菏泽, 自然晾干后粉碎过 60 目筛, 备用。没食子酸标准品、氯化血红素、维生素 K<sub>1</sub>、AB-8 大孔吸附树脂, 上海源叶试剂公司; 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH), 2,2-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸 (ABTS), 2,4,6-三吡啶基-1,3,5-三嗪 (TPTZ), 麦克林生化科技有限公司; 福林酚及其他化学试剂

均为分析纯, 国药集团化学试剂有限公司。

#### 1.1.2 仪器与设备

FW 100 高速粉碎机, 天津市泰斯特仪器有限公司; KQ-800DE 数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; H1850 台式离心机, 湘仪公司; RE-52AA 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; YQX-II 型厌氧培养箱, 上海龙跃仪器设备有限公司; 安捷伦 8860 气相色谱仪, 美国安捷伦科技有限公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 牡丹籽种皮多酚的提取

称取牡丹籽种皮粉末 1.00 g, 与一定浓度的乙醇溶液, 按照一定料液比进行混合, 在一定功率下进行超声辅助提取后, 3 500 r/min 离心 8 min, 得到多酚粗提液。

### 1.2.2 牡丹籽种皮粗提液多酚含量的测定

采用 Folin-Ciocaltue 法<sup>[12]</sup>测定。取 2 mL 的蒸馏水和 200 μL 福林酚试剂混匀, 加入稀释后的多酚提取液, 吹打均匀后静置 3 min 加入质量浓度为 20% 的 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液 900 μL 并混匀, 在暗处放置 2 h 后在 765 nm 处测定吸光值。以没食子酸为标样, 在 0.00~10.00 μg/mL 范围内绘制标准曲线 ( $y=0.0871x+0.1181$ ,  $R^2=0.9941$ ), 计算提取液中多酚的含量, 以没食子酸当量 (mg GAE/g) 表示。

### 1.2.3 多酚粗提物的纯化及测定

多酚粗提液的纯化: 将 1.2.1 中的多酚粗提液旋转蒸发得到浓缩液, 浓缩液过 AD-8 填充柱, 用体积分数为 60% 的乙醇洗脱, 洗脱液浓缩冷冻干燥后得到多酚纯化物, 干燥保存。

多酚纯度测定方法: 称取一定量多酚纯化物, 溶解, 测定多酚含量, 按照公式 (1) 计算纯度。

$$P = \frac{M_1}{M_2} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

$P$ ——多酚纯度;

$M_1$ ——经过 1.2.2 法测定的多酚含量, mg;

$M_2$ ——称取的多酚纯化物质量, mg。

### 1.2.4 牡丹籽种皮中多酚抗氧化活性的测定

DPPH 自由基清除能力的测定：取多酚提取液 0.5 mL 与 2.5 mL DPPH 溶液 (200 μmol/L) 混匀后避光反应 60 min, 765 nm 处测定吸光值<sup>[13]</sup>。按照公式 (2) 计算清除率。

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

式中：

Y—DPPH 自由基清除率；

$A_0$ —初始吸光度；

$A_1$ —添加多酚提取液时的吸光度。下同。

ABTS<sup>+</sup> 自由基清除能力的测定：取 3 mL ABTS 应用液与 0.1 mL 的多酚提取液，避光反应 6 min 后在 734 nm 处测定吸光度<sup>[14]</sup>。按照公式 (3) 计算清除率。

$$Z = \frac{A_0 - A_1}{A_1} \times 100\% \quad (3)$$

式中：

Z—ABTS<sup>+</sup> 自由基清除率。

FRAP 还原力的测定：取 4.9 mL FRAP 试剂和 0.1 mL 多酚提取液，混合均匀后在 37 °C 水浴加热 10 min, 在 593 nm 下测定吸光值<sup>[15]</sup>。按照公式 (4) 计算清除率。

$$B = \frac{A_1 - A_0}{A_1} \times 100\% \quad (4)$$

式中：

B—FRAP 还原力。

同时，按照上述方法测定 VE 的 DPPH 自由基清除率、ABTS<sup>+</sup> 自由基清除率，以清除自由基的半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>) 表示。IC<sub>50</sub> 表示自由基清除率为 50% 时所需要的样品浓度。

### 1.2.5 肠道菌群体外静态厌氧培养试验

参考并改进 Chait 等<sup>[16]</sup> 的体外发酵方法，研究牡丹籽种皮多酚体外发酵特性。无菌含氮培养基 1 L 配方：蛋白胨 2.00 g, 酵母提取粉 2.00 g, NaCl 0.10 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.04 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.01 g, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.01 g, NaHCO<sub>3</sub> 2.00 g, 氯化血红素 0.05 g, L- 半胱氨酸 0.50 g, 猪胆汁酸盐 0.50 g, Tween-80 2 mL, 维生素 K<sub>1</sub> 10 μL。

采集正常人群 (BMI 18.5~23.9) 以及肥胖人群 (BMI > 28) 各 3 人 (2 男 1 女身体健康，且在采集粪便样品前 1 个月未服用过抗生素) 的新鲜全便，分为正常组以及肥胖组，在厌氧培养箱中进行处理。将每组 3 人的粪便样品等量混合，称取 15 g 混合粪

便样品，加入 135 mL 无菌 PBS 缓冲液 (pH 值 7.4) 涡旋振荡 4 min, 在厌氧培养箱中用 4 层纱布进行过滤，分别得到含有正常人群以及肥胖人群粪便的 PBS 混合液。然后在 2 个分装有 1 170 mL 无菌含氮培养基的试剂瓶中各加入 130 mL 粪便 PBS 混合液，涡旋振荡 4 min, 得到分别含有正常人群和肥胖人群肠道菌群的混合培养基。试验设四个处理组，分别为正常添加组 (N 组)、正常空白组 (A 组)、肥胖添加组 (F 组)、肥胖空白组 (B 组)。

将培养基以每瓶 30 mL 分装 84 瓶，其中 N 组与 F 组每瓶分别加入多酚提取物 120 mg, 放入 37 °C 厌氧恒温培养箱中静态厌氧培养，在培养 0、2、4、6、12、24、48 h 时，分别取出 3 瓶发酵液，测定 pH 值后置于 -80 °C 保存，用于测定 SCFAs 含量测定。

#### 1.2.5.1 pH 值的测定

用 pH 计直接进行测定。

#### 1.2.5.2 SCFAs 含量测定

样品处理：取 4.5 mL 发酵液，加入 0.8 mL pH 值为 2 的盐酸溶液，混合均匀并震荡，室温静置 20 min, 10 000 r/min 离心 10 min, 转移上清液至新的离心管，沉淀再次加入 0.8 mL 盐酸溶液，重复以上操作，合并两次的上清液混匀，经 0.22 μm 滤器过滤后，取 0.40 mL 上清加入 1.40 mL 盐酸溶液、0.20 mL 的 100 μg/mL 正丁醇混合制样，上机进行 GC 检测。

气相色谱条件：

色谱柱：DB-WAX；载气：N<sub>2</sub>, 25 mL/min；燃气：H<sub>2</sub>, 30 mL/min；进样口温度：220 °C；检测口温度：250 °C；柱温：60 °C；进样量：2 μL；升温程序：初始温度 60 °C，以 10 °C/min 升温至 160 °C，保持 1 min。

### 1.3 数据统计与分析

所有测定重复 3 次，结果用平均值 ± 标准差 (X ± D) 进行表示，结果保留两位小数。差异显著性用 SPSS Statistics 27 进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 油用牡丹籽种皮多酚提取的单因素实验

选择超声时间、乙醇体积分数、料液比、超声功率四个单因素条件，研究对牡丹籽种皮多酚提取量的影响。如图 1a, 随着超声时间的延长，牡丹籽种皮中多酚提取量呈现先上升后下降的趋势，在

50 min 时达到最大, 为 69.77 mg GAE/g。如图 1b, 多酚的提取量随着乙醇体积分数增加呈现先上升后下降的趋势, 当乙醇体积分数为 60% 时牡丹籽种皮中多酚提取量最大, 为 113.32 mg GAE/g。超声的震动作用可使原料与提取溶剂充分接触, 接触面积增大, 有利于多酚的溶出; 同时随着提取溶剂浓度的增加, 溶质与溶剂间质量浓度差增大, 更多的多酚类物质可以溶解到溶剂中<sup>[17]</sup>。在料液比为 1:40 (图 1c), 超声功率为 480 W (图 1d) 时, 牡丹籽种皮中多酚提取量最高, 分别为 88.61、81.11 mg GAE/g。可能的原因是随着提取剂用量的增大, 部分脂溶性杂质渗出, 阻碍多酚扩散、渗透<sup>[18]</sup>; 随着超声功率的增大, 多酚的提取量呈现先上升后下降的趋势。张红玉等<sup>[19]</sup>在 100 W 的条件下进行超声辅助提取, 牡丹籽外壳中多酚提取量为 57.50 mg GAE/g。但过高的超声功率或者过长超声时间会破坏多酚的结构, 使得溶出的多酚提取量有降低的趋势<sup>[20]</sup>。

## 2.2 油用牡丹籽种皮多酚提取工艺的优化

### 2.2.1 响应面因素以及水平的选取

在完成单因素试验的基础上, 根据 Box-

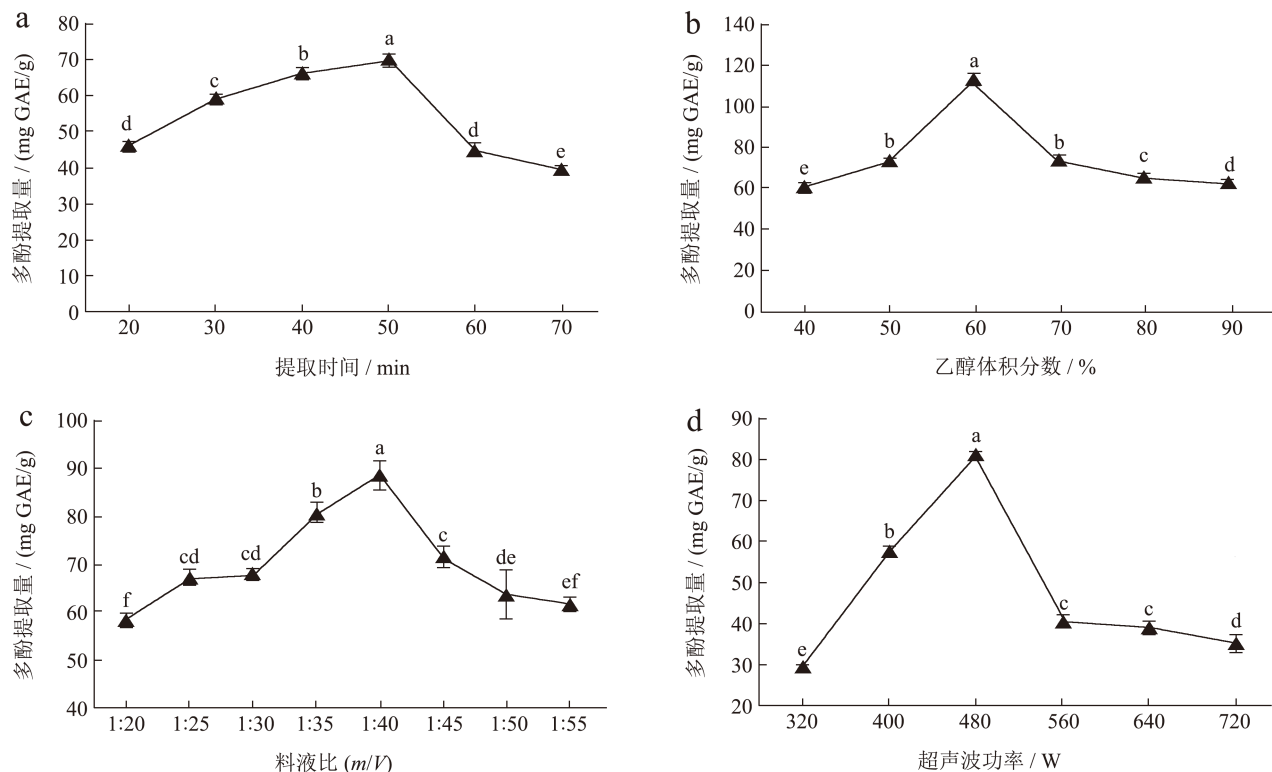


图 1 各单因素对牡丹籽种皮多酚提取量的影响

Fig.1 Effect of single factors on the extraction of polyphenols from peony seed coat

注: 同图不同字母表示具备显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

Behnken 的中心组合实验设计原理, 固定超声提取时间为 50 min。选取乙醇体积分数 (A, 50%、60%、70%)、料液比 (B, 1:35、1:40、1:45 g/mL)、超声波功率 (C, 400、480、560 W) 为影响因素, 多酚提取量 (R) 为指标, 进行三因素三水平的响应面分析。

### 2.2.2 响应面法优化试验设计与分析

响应面法优化设计及结果见表 1。

对表 1 中实验数据进行响应面回归分析, 得到拟合方程:

$$Y = 80.70 - 1.23A + 7.92B - 7.95C - 1.59AB - 7.25AC - 3.37BC - 11.97A^2 - 20.24B^2 - 10.85C^2$$

对回归方程进行方差分析, 结果见表 2。模型的  $P < 0.01$ , 表明该模型具有极显著性。模型的确定系数  $R^2$  为 0.996 0, 调整系数  $R^2_{adj}$  为 0.990 8, 表明该模型具有极显著性。失拟性检验结果为不显著, 说明该实验设计的结果可靠。因此, 该模型可以用来预测一定条件下牡丹籽种皮多酚的提取率。AC、BC 和  $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$  有极显著性, 这表明各个因素对牡丹籽种皮多酚提取量影响不是一个简单的线性关系, 而是由多个因素共同影响的结果。

表 1 响应面优化试验设计及结果

Table 1 Response surface optimization test design and results

| 试验号 | A/% | B/(g/mL) | C/W | R/(mg GAE/g) |
|-----|-----|----------|-----|--------------|
| 1   | 60  | 1:40     | 480 | 80.26        |
| 2   | 50  | 1:35     | 480 | 40.88        |
| 3   | 60  | 1:40     | 480 | 80.88        |
| 4   | 70  | 1:35     | 480 | 40.56        |
| 5   | 50  | 1:40     | 400 | 58.50        |
| 6   | 60  | 1:45     | 400 | 69.79        |
| 7   | 50  | 1:40     | 560 | 58.69        |
| 8   | 60  | 1:45     | 560 | 45.59        |
| 9   | 60  | 1:40     | 480 | 81.00        |
| 10  | 70  | 1:40     | 560 | 42.75        |
| 11  | 70  | 1:45     | 480 | 52.91        |
| 12  | 50  | 1:45     | 480 | 59.61        |
| 13  | 60  | 1:35     | 400 | 46.90        |
| 14  | 70  | 1:40     | 400 | 71.58        |
| 15  | 60  | 1:40     | 480 | 82.93        |
| 16  | 60  | 1:35     | 560 | 36.16        |
| 17  | 60  | 1:40     | 480 | 78.40        |

表 2 方差分析

Table 2 Analysis of variance

| 方差来源           | 平方和       | 自由度 | 均方        | F       | P        |
|----------------|-----------|-----|-----------|---------|----------|
| 模型             | 4 404.071 | 9   | 489.341 3 | 191.49  | <0.000 1 |
| A              | 12.184 94 | 1   | 12.184 94 | 4.768 4 | 0.065 3  |
| B              | 502.304 2 | 1   | 502.304 2 | 196.57  | <0.000 1 |
| C              | 505.403 4 | 1   | 505.403 4 | 197.78  | <0.000 1 |
| AB             | 10.145 07 | 1   | 10.145 07 | 3.9701  | 0.086 6  |
| AC             | 210.465 6 | 1   | 210.465 6 | 82.363  | <0.000 1 |
| BC             | 45.301 41 | 1   | 45.301 41 | 17.728  | 0.004 0  |
| A <sup>2</sup> | 603.134 1 | 1   | 603.134 1 | 236.03  | <0.000 1 |
| B <sup>2</sup> | 1 724.761 | 1   | 1 724.761 | 674.96  | <0.000 1 |
| C <sup>2</sup> | 495.372 7 | 1   | 495.372 7 | 193.85  | <0.000 1 |
| 残差             | 17.887 27 | 7   | 2.555 324 |         |          |
| 失拟             | 7.324 737 | 3   | 2.441 579 | 0.924 6 | 0.505 9  |
| 纯误差            | 10.562 53 | 4   | 2.640 632 | 191.49  | <0.000 1 |
| 总和             | 4 421.959 | 16  |           |         |          |

注: P<0.05, 显著性; P<0.01, 极显著性。

2.2.3 响应曲面分析

图 2 结果表明各因素之间存在一定的交互作

用。如图 2a, 当提取剂浓度较低时, 可适当提高超声功率以增加提取量; 当超声功率较低时, 可适当提高提取剂浓度, 增加多酚提取量。从图 2b 中可以看出, 当料液比不变时, 超声功率对于多酚提取量有一定的影响。料液比较低时, 随着料液比的不断增大, 多酚提取量不断增大; 当料液比过大时, 随着料液比的增大, 多酚提取量随着料液比的增大而减小。由图 2c 可知, 当乙醇体积分数固定时, 随着液料比增大, 多酚提取量先上升, 之后缓慢下降; 同样, 当液料比固定时, 随着乙醇体积分数增大, 多酚提取量也先上升而后下降。

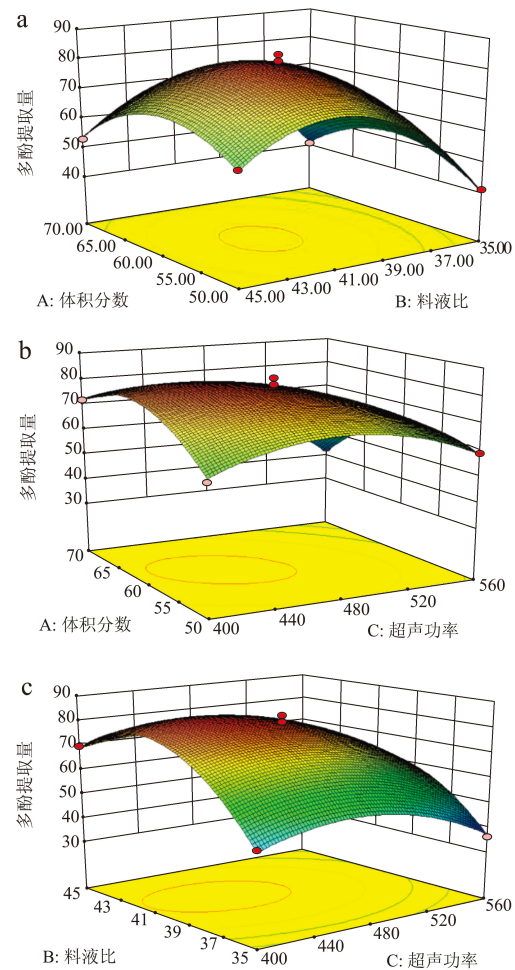


图 2 各因素对牡丹籽种皮多酚提取量的交互影响

Fig.2 Interactive effects of factors on the extraction of polyphenols from peony seed coat

2.2.4 验证试验

利用 Design-Expert 8.0.6 软件, 从上述回归模型中获得超声辅助提取牡丹籽种皮多酚的最优工艺条件为: 乙醇体积分数 60.28%、料液比

1:40.87、超声功率为 449.04 W，此条件下多酚提取量为 83.17 mg GAE/g。为方便实际操作，将该最优工艺参数调整为乙醇体积分数 60%、料液比 1:40、超声功率为 480 W，并依据此条件进行验证，平行测得 3 次所得多酚提取量平均值为 83.11 mg GAE/g，与预测值接近。因此，该模型所得到的最优工艺参数较为可靠，有一定的实际操作参考价值。

在最优工艺条件下提取的牡丹籽种皮多酚提取液，进一步经 AD-8 大孔树脂填充柱分离纯化后，冷冻干燥后的牡丹籽种皮多酚提取物，通过测定多酚纯度由 8.2% 上升至 22.7%，纯度提高了 2.77 倍，用于抗氧化以及体外发酵特性的研究。

### 2.3 油用牡丹籽种皮多酚对抗氧化活性的影响

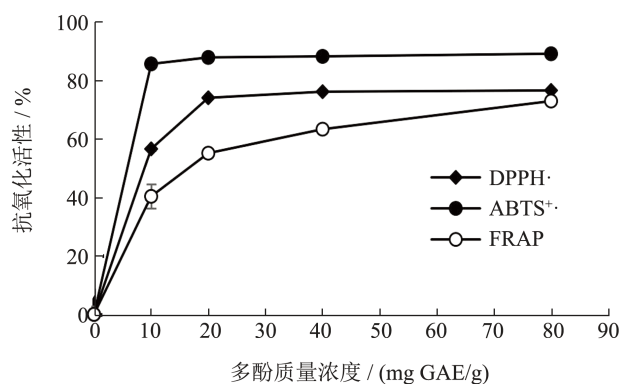


图3 牡丹籽种皮多酚的抗氧化活性  
Fig.3 Effect of polyphenols from peony seed coat on antioxidant activity

通过测定 DPPH 和 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除率以及 FRAP 还原力，对牡丹籽种皮多酚的抗氧化能力进行评估，结果如图 3 所示。牡丹籽种皮多酚具有明显清除 DPPH、ABTS<sup>+</sup> 自由基的能力和 Fe<sup>3+</sup> 还原能力，并且呈剂量依赖关系。通过计算 IC<sub>50</sub> 值分别为 8.19、5.83、16.46 mg GAE/g，蔡如玉等<sup>[21]</sup>对“凤丹”油用牡丹籽多酚抗氧化性进行了研究，结果表明牡丹籽多酚粗提液对 DPPH 和 ABTS<sup>+</sup> 自由基均具有一定的清除效果，且具有较好的量效关系。董然等<sup>[22]</sup>对牡丹籽粕多酚的抗氧化性进行测定，其中对 DPPH 自由基清除的 IC<sub>50</sub> 值为 313.67 μg/mL，对 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除的 IC<sub>50</sub> 值为 243.67 μg/mL，对铁离子还原能力为 438.78 μmol TE/g。经过比较，本实验结果均优于牡丹籽粕多酚。因此表明牡丹籽种皮多酚具有

较强的抗氧化活性，为开发天然抗氧化剂提供了可能。

### 2.4 体外模拟发酵研究油用牡丹籽种皮多酚对肠道环境的影响

#### 2.4.1 油用牡丹籽种皮多酚对发酵液 pH 值的影响

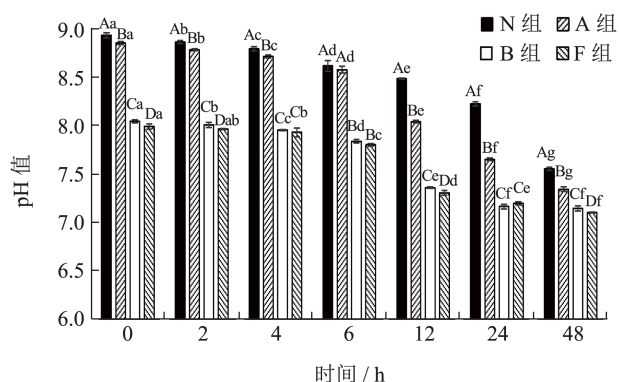


图4 体外发酵过程中各组 pH 值变化

Fig.4 pH change of each group during *in vitro* fermentation

注：图中大写字母表示同一时间点不同组具有显著差异 ( $P < 0.05$ )；小写字母表示同一组不同时间点具有显著差异 ( $P < 0.05$ )。

结肠的 pH 值下降程度可以作为发酵过程中的产酸能力的评价指标<sup>[23]</sup>。人粪便中含有多种微生物，如双歧杆菌、乳酸菌、拟杆菌、肠杆菌等<sup>[24]</sup>，其中肥胖人群与正常人群相比，双歧杆菌属、乳杆菌属、肠球菌属和链球菌属含量低于正常体重人群，而普雷沃菌属含量高于正常体重人群<sup>[25]</sup>，这些肠道微生物通过代谢培养基中的营养物质，产生不同的有机酸、短链脂肪酸等代谢产物，会改变肠道微生物发酵环境的酸碱度。添加油用牡丹籽种皮多酚后对不同发酵体系的 pH 值测定结果如图 4 所示。随着发酵时间的延长，各发酵体系的 pH 值都呈现出下降的趋势。在发酵前 6 h 内，各体系的 pH 值下降较慢，A 组和 N 组 pH 值分别从 8.87 下降到 8.59、8.95 下降到 8.63；B 组和 F 组 pH 值分别从 8.06 下降到 7.85、8.00 下降到 7.81。在 6~48 h 内，各体系 pH 呈现快速下降的趋势，A 组、N 组、B 组和 F 组的 pH 值分别从 8.59 下降到 7.35、8.63 下降到 7.56、7.85 下降到 7.15、7.81 下降到 7.11。从测定结果来看，正常组的 pH 值明显高于肥胖组。无论是正常组还是肥胖组，添加多酚提取物后发酵体系的 pH 有明显降低的趋势，特别是从 12 h 开始，pH 值下降的趋势更加明显。但 N 组与 F 组在 24~48 h

内 pH 值变化不大, 可能是因为发酵后期营养物质开始缺乏, 部分有机酸、SCFAs 作为能量或碳源不断被消耗, 使发酵后期 pH 值下降幅度不大, 且经过 48 h 的发酵, 发酵体系中微生物生长代谢缓慢, 也是导致发酵后期 pH 值变化不明显的原因之一<sup>[26]</sup>。Camil 等<sup>[27]</sup>研究表明, 随着发酵时间的延长, 双歧杆菌属、乳杆菌属、肠球菌属和链球菌属的含量增加, 由于上述菌种属于益生菌, 而益生菌可通过发酵肠道中营养物质而产生大量的 SCFAs, 进一步降低发酵体系的 pH 值。体外发

酵体系中添加的人粪便过滤液, 含有多种肠道菌群及分泌的多种水解酶的作用下, 能进一步降解多酚类物质, 使其它官能团的发生裂解反应, 例如: 脱羟基、脱甲基或脱羧作用, 生成结构更简单的酚类化合物<sup>[28,29]</sup>。研究发现, 发酵体系 pH 值随着发酵时间延长逐渐降低, 而其抗氧化性呈现出不同变化趋势。巴西莓的抗氧化活性在体外结肠发酵过程中呈逐渐升高的趋势<sup>[30]</sup>; 而长黑青稞多酚的抗氧化性在发酵 30 h 时达到峰值, 随后逐渐下降<sup>[31]</sup>。

表 3 短链脂肪酸 (SCFAs) 的含量变化 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

Table 3 Variation in the content of SCFAs

| 处理 | 时间/h | 乙酸                        | 丙酸                        | 丁酸                       | 总 SCFAs 含量               |
|----|------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| A  | 0    | 151.21±0.08 <sup>kl</sup> | 175.20±0.76 <sup>k</sup>  | 57.96±0.77 <sup>a</sup>  | 384.37±1.61 <sup>g</sup> |
|    | 2    | 151.17±1.54 <sup>kl</sup> | 173.48±0.99 <sup>l</sup>  | 55.09±1.30 <sup>b</sup>  | 379.74±3.83 <sup>k</sup> |
|    | 6    | 170.30±0.60 <sup>i</sup>  | 181.72±0.67 <sup>i</sup>  | 40.65±0.77 <sup>c</sup>  | 392.67±2.04 <sup>i</sup> |
|    | 24   | 275.63±2.50 <sup>f</sup>  | 185.64±0.15 <sup>h</sup>  | 33.24±0.82 <sup>d</sup>  | 494.51±3.47 <sup>f</sup> |
|    | 48   | 269.52±0.68 <sup>g</sup>  | 188.68±1.25 <sup>g</sup>  | 21.95±0.96 <sup>hi</sup> | 480.15±2.89 <sup>h</sup> |
| N  | 0    | 149.70±0.76 <sup>lm</sup> | 167.35±0.17 <sup>op</sup> | 27.62±0.71 <sup>f</sup>  | 344.67±1.64 <sup>m</sup> |
|    | 2    | 151.08±0.30 <sup>kl</sup> | 167.03±0.09 <sup>op</sup> | 25.97±0.35 <sup>g</sup>  | 344.08±0.74 <sup>n</sup> |
|    | 6    | 163.13±1.33 <sup>j</sup>  | 176.68±0.51 <sup>j</sup>  | 22.63±0.20 <sup>h</sup>  | 362.44±2.04 <sup>l</sup> |
|    | 24   | 266.58±0.54 <sup>h</sup>  | 200.26±0.61 <sup>f</sup>  | 18.02±0.56 <sup>l</sup>  | 484.86±1.71 <sup>g</sup> |
|    | 48   | 372.74±0.87 <sup>b</sup>  | 224.19±0.76 <sup>b</sup>  | 18.24±0.97 <sup>l</sup>  | 615.17±2.63 <sup>b</sup> |
| B  | 0    | 152.55±0.81 <sup>k</sup>  | 165.45±0.65 <sup>q</sup>  | —                        | 318.00±1.46 <sup>q</sup> |
|    | 2    | 150.34±0.51 <sup>kl</sup> | 165.49±0.07 <sup>q</sup>  | —                        | 315.83±0.58 <sup>r</sup> |
|    | 6    | 171.24±0.90 <sup>i</sup>  | 171.24±0.93 <sup>m</sup>  | —                        | 342.48±1.83 <sup>o</sup> |
|    | 24   | 316.46±0.81 <sup>c</sup>  | 221.52±1.19 <sup>c</sup>  | 19.90±0.37 <sup>jk</sup> | 557.88±2.37 <sup>c</sup> |
|    | 48   | 313.51±0.96 <sup>d</sup>  | 214.80±1.30 <sup>d</sup>  | 19.58±0.39 <sup>k</sup>  | 547.89±2.65 <sup>d</sup> |
| F  | 0    | 145.10±0.78 <sup>n</sup>  | 166.23±0.50 <sup>pq</sup> | —                        | 311.33±1.38 <sup>t</sup> |
|    | 2    | 147.77±0.10 <sup>m</sup>  | 168.00±0.35 <sup>o</sup>  | —                        | 315.77±0.45 <sup>s</sup> |
|    | 6    | 161.00±0.33 <sup>j</sup>  | 169.75±0.28 <sup>n</sup>  | —                        | 330.75±0.61 <sup>p</sup> |
|    | 24   | 281.29±1.18 <sup>c</sup>  | 210.104±0.32 <sup>e</sup> | 21.00±0.11 <sup>ij</sup> | 512.39±1.61 <sup>c</sup> |
|    | 48   | 441.78±0.48 <sup>a</sup>  | 236.65±0.66 <sup>a</sup>  | 30.78±0.32 <sup>e</sup>  | 709.21±1.46 <sup>a</sup> |

注: 不同字母表示同种酸 Duncan 检验差异显著,  $P < 0.05$ , —表示未检出。

#### 2.4.2 牡丹籽种皮多酚对SCFAs含量的影响

SCFAs 是人体肠道菌群的发酵产物, 即可以作为肠道黏膜细胞的主要能量来源, 还能减少促炎症因子的产生, 降低肠道炎症、癌症的发生<sup>[23]</sup>。如表 3 所示, 发酵液中测定的 SCFAs 主要包括乙酸、丙酸和丁酸。四个处理组中丙酸、乙酸以及总 SCFAs 含量随着发酵时间总体呈上升趋势。正常组 (A 和 N 组) 中在各个时间点均检

测到丁酸成分, 但随着发酵时间增加有降低的趋势, 其原因可能由于牡丹籽种皮多酚的加入, 导致肠道微生物菌群发生变化, 进而影响到发酵体系中丁酸的含量。肥胖组 (B 和 F 组) 在发酵前 6 h 内没检测到, 但在 24~48 h 内检测到丁酸的含量。添加多酚组相比未添加组, 生成乙酸和丁酸以及总 SCFAs 的含量有明显增加, 其原因可能是酚类代谢物将肠道微生物重塑为更健康的组成模

式, 增加 SCFAs 的产生, 且具有抗肥胖、抗炎症和降低胆固醇的作用<sup>[32]</sup>。添加牡丹籽种皮多酚后, 对肥胖添加 (F) 组中 SCFAs 的产生量要明显高于正常添加 (N) 组, 可能添加牡丹籽种皮多酚对正常人群和肥胖人群的肠道微生物都具有明显的调节作用, 促使产生更多的 SCFAs, 具有增强肠道健康的作用。基于体外厌氧发酵模型也证实柑橘多酚可增加发酵上清液中总 SCFAs 含量显著增加, 特别是乙酸和丁酸的含量, 相应的 pH 值也呈降低趋势<sup>[24]</sup>。Fernando 等<sup>[33]</sup>对肥胖人群与正常体重人群结肠发酵中产生的 SCFAs 进行测定, 表明由于结肠发酵过程中膳食多酚的参与, 导致两种人群的结肠发酵存在一定区别, 肥胖人群会产生更多的 SCFAs, 这与本实验所得到的结论相同。现阶段研究表明, SCFAs 是一把双刃剑, 大多认为 SCFAs 含量升高, 对于肠道健康有一定有益作用<sup>[24,26]</sup>; 但亦有研究发现, 肠道 SCFAs 含量升高, 会促进机体吸收食物残渣的能量, 增加发生肥胖的风险<sup>[34-36]</sup>。体外发酵实验中, 本文中只测定了油用牡丹籽种皮多酚对肠道发酵液中 pH 以及 SCFAs 含量的影响, 后续将分析对肠道微生物菌群的影响以及发酵过程中多酚的抗氧化能力, 并进一步分析他们之间的相关性。

### 3 结论

本文以油用牡丹籽种皮作为原料, 采用超声波辅助乙醇提取多酚, 确立了最佳提取工艺, 并对其抗氧化活性、体外发酵特性进行研究。结论如下:

超声波提取牡丹籽种皮多酚的最优工艺参数为: 乙醇体积分数 60%、料液比 1:40、超声功率为 480 W, 提取时间 50 min。此条件下得到的牡丹籽种皮多酚提取量为 83.11 mg GAE/g, 与预测值 83.17 mg GAE/g 相差很小。牡丹籽种皮多酚对 DPPH·、ABTS<sup>+</sup>· 的清除能力的 IC<sub>50</sub> 值分别为 8.19、5.83 mg GAE/g, Fe<sup>3+</sup> 还原力 IC<sub>50</sub> 为 16.46 mg GAE/g, 表明牡丹籽种皮多酚具有较强的抗氧化性。

体外发酵实验证实, 添加油用牡丹籽种皮多酚提取物后能降低 pH 值, 增加 SCFAs 的含量, 其中主要的是乙酸、丙酸; 肥胖组的 pH 值明显低于正常组, 且肥胖组的 SCFAs 含量明显高于正常组。

### 参考文献

- [1] 贾楠. 牡丹籽壳油的提取方法及其活性研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2020.
- [2] WANG H K, ZHANG C L, CHEN C. Determination of total polyphenols in cake, leaf and shell of peony seed by Folin-Ciocalteu colorimetric method [J]. Applied Chemical Industry, 2018, 47(8): 1794-1796, 1802.
- [3] 顾仁勇, 陈晓娟. 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取牡丹籽粕多酚工艺及其抗氧化性评价[J]. 中国粮油学报, 2020, 35(4): 71-76.
- [4] ABU H, KHALIL-UR R, NAZISH J, et al. The role of polyphenol (flavonoids) compounds in the treatment of cancer cells [J]. Nutrition and Cancer, 2020, 72(3): 386-397.
- [5] TAHA M, IBRAHIM K, HASSAN B, et al. Polyphenols as promising biologically active substances for preventing SARS-CoV2: A review with research evidence and underlying mechanisms [J]. Food Bioscience, 2021, 40: 100891.
- [6] MARYAM M, ANUPAM B, BAHMAN Y. Polyphenols: Major regulators of key components of DNA damage response in cancer [J]. DNA Repair, 2019, 82: 102679.
- [7] LU F, LIAO X J, HU X S, et al. Research progress of the effects of polyphenols on intestinal microorganisms and discussion of polyphenol indicator bacteria [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(16): 330-335.
- [8] JENNI F, LIU L S, GUSTAVO A A, et al. Analysis of temporal changes in growth and gene expression for commensal gut microbes in response to the polyphenol naringenin [J]. Microbiol Insights, 2018, 11: 1178636118775100.
- [9] MICHAELL, ROBERT F, AIDEN Z. et al. A high-sugar diet rapidly enhances susceptibility to colitis via depletion of luminal short-chain fatty acids in mice [J]. Science Report, 2019, 9(1): 12294.
- [10] TIMOTHY B, EMMA D. Tea compounds and the gut microbiome: findings from trials and mechanistic studies [J]. Nutrients, 2019, 11(10): 2364.
- [11] 姚欢欢. 油用牡丹种子油提取及剩余物综合利用[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2013.
- [12] 崔文玉, 丰程凤, 夏智慧, 等. 蒸汽爆破对葡萄皮渣酚类物质含量及抗氧化活性的影响[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(5): 157-163.
- [13] 张祎敬, 宋贤良, 黄苇, 等. 菠萝蜜果皮多酚提取工艺及其抗氧化和酪氨酸酶抑制作用研究[J]. 食品科技, 2018, 43(1): 215-221.
- [14] 刘茜, 唐洁. 桑葚的提取及其自由基清除活性研究[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(3): 181-183.
- [15] CHEN X L, GUAN W L, HOU D Y, et al. Effects of different drying methods on sensory quality, physicochemical properties of apple flat peach paper [J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(20): 51-59.



- [16] YASMINA A C, AYNUR G, FARIDA B, et al. Simulated gastrointestinal digestion and *in vitro* colonic fermentation of carob polyphenols: Bioaccessibility and bioactivity [J]. LWT-Food Science & Technology, 2020, (117): 117.
- [17] 林小琴,马志慧,何宗明,等.杉木种子多酚提取工艺优化[J].森林与环境学报,2017,37(1):47-53.
- [18] 王纪辉,曾亚军,侯娜,等.曲面响应法优化核桃雄花多酚提取工艺及其组成与抗氧化活性分析[J].南方农业学报,2022,53(10):2997-3008.
- [19] 张红玉,王成章,张宇思,等.超声波提取牡丹籽壳多酚工艺响应面法优化及抗氧化性研究[J].中国油脂,2015, 40 (6):90-94.
- [20] 郑燕菲,刘钰梅,谭义秋,等.山黄皮树枝多酚的提取工艺及抗氧化性[J].粮食与油脂,2022,35(10):114-119.
- [21] 蔡如玉,常世敏,宋春丽.“凤丹”油用牡丹籽壳多酚提取工艺优化及抗氧化活性研究[J].食品与机械,2020, 36(7):181-186.
- [22] 董然,陈玲,王学方,等.牡丹籽粕多酚和黄酮提取工艺优化及其抗氧化和降糖活性研究[J].河南科学,2023, 41(6):819-827.
- [23] ZHANG L, WU T, ZHANG Y L, et al. Release of bound polyphenols from wheat bran soluble dietary fiber during simulated gastrointestinal digestion and colonic fermentation *In vitro* [J]. Food Chemistry, 2023, 402: 134111.
- [24] 唐溶雪.柑橘多酚体外发酵与生物转化应用研究[D].南昌:南昌大学,2021.
- [25] 刘莹,谭寅凤,张金月等.超重肥胖和正常体重人群肠道菌群的差异分析[J].中国临床研究,2022,35(1):21-24.
- [26] HOU A X, CHENG H, LI Z J, et al. Effects of OPO milk fat powder on intestinal microbial fermentation *in vitro* [J]. Food Science, 2019, 40(12): 115-122.
- [27] CAMILA G M, ALINED P G, ANDREA ZD B, et al. Weight loss probiotic supplementation effect in overweight and obesity subjects: A review [J]. Clinical Nutrition, 2020, 39(3): 694-704.
- [28] KAROLINA W, ANNA O, TOMASZ O, et al. Influence of *in vitro* digestion on composition, bioaccessibility and antioxidant activity of food polyphenols-A non-systematic review [J]. Nutrients, 2020, 12(5): 1401.
- [29] ANNA-MARJA A. Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon [J]. Phytochemistry Reviews, 2008, 7(3): 407-429.
- [30] RANDAH M. A, SEHAD N A, GEMMA E W, et al. *In vitro* approaches to assess the effects of acai (*Euterpe oleracea*) digestion on polyphenol availability and the subsequent impact on the faecal microbiota [J]. Food Chemistry, 2017, 234(Nov.1): 190-198.
- [31] 陈壁,黄勇桦,张建平,等.体外模拟胃肠道消化和结肠发酵对长黑青稞多酚生物有效性和抗氧化活性的影响[J].食品科学,2020,41(21):28-35.
- [32] ANDRÉIAQ, CRISTINE R, ROBERSON P, et al. Bioaccessibility and catabolism of phenolic compounds from jaboticaba (*Myrciaria trunciflora*) fruit peel during *in vitro* gastrointestinal digestion and colonic fermentation [J]. Journal of Functional Foods, 2020, 65: 103714.
- [33] JUDLYN F, SU W, RAHAT-ROZENBLOOM S, et al. Adiposity, gut microbiota and faecal short chain fatty acids are linked in adult humans [J]. Nutrition & Diabetes, 2014, 4(6): e121-e121.
- [34] 刘松珍,张雁,张名位,等.肠道短链脂肪酸产生机制及生理功能的研究进展[J].广东农业科学,2013,40(11):99-103.
- [35] GIJSD B, KARENV E, ALBERT K G, et al. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism [J]. Journal of Lipid Research, 2013, 54(9): 2325-2340.
- [36] 费嘉,罗军涛,章小英,等.短链脂肪酸在肠道菌群调节人体能量代谢中的作用[J].中华糖尿病杂志,2018,10(5): 370-373.