

体外结肠发酵对青稞膳食纤维中酚类化合物的含量及抗氧化活性的影响

邹青飞¹, 杨士花², 李永强^{1*}, 黄勇桦¹, 黄佳琦¹, 李 晴¹, 李梓毓¹, 黄艾祥¹

(1. 云南农业大学食品科学技术学院, 云南 昆明 650201; 2. 云南农业大学外语学院, 云南 昆明 650201)

摘 要: 以青稞中的可溶性膳食纤维(soluble dietary fiber, SDF)和不可溶性膳食纤维(insoluble dietary fiber, IDF)为原料, 通过体外结肠发酵, 测定不同时间点酚类化合物的含量和抗氧化活性, 并利用高效液相色谱法对发酵液中的酚类化合物进行定性和定量。结果表明: 在体外结肠发酵48 h过程中, 随着发酵时间的延长, IDF中酚类化合物含量呈逐渐升高趋势, SDF中酚类化合物含量呈先升高后下降趋势, 在结肠发酵第30小时, 酚类化合物含量达到最高, 为 $(50.62 \pm 2.45) \mu\text{mol/g}$; IDF和SDF中酚类化合物的抗氧化活性变化趋势与酚类化合物含量变化相似; 青稞膳食纤维经体外结肠发酵后, 发酵液中酚类化合物分为羟基苯甲酸、羟基肉桂酸和类黄酮, 包括18种酚类化合物。在结肠发酵过程中, IDF和SDF中阿魏酸含量均呈先升高后下降趋势, IDF在发酵第24小时含量最高; SDF在发酵第5小时含量最高。结果表明, 青稞膳食纤维可作为多酚的传递物质, 在结肠发酵过程中缓慢释放多酚化合物, 能够提高多酚含量和抗氧化活性, 促进人体健康。

关键词: 青稞膳食纤维; 体外结肠发酵; 酚类化合物; 抗氧化活性

Effects of *in Vitro* Colonic Fermentation on Phenolic Content and Antioxidant Activity in Dietary Fiber from Highland Barley

ZOU Qingfei¹, YANG Shihua², LI Yongqiang^{1*}, HUANG Yonghua¹, HUANG Jiaqi¹, LI Qing¹, LI Ziyu¹, HUANG Aixiang¹

(1. College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2. College of Foreign Languages, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: In this study, changes in the phenolic content and antioxidant activity in soluble dietary fiber (SDF) and insoluble dietary fiber (IDF) extracted from highland barley were determined during *in vitro* colonic fermentation for up to 48 h. The phenolic compounds in the fermentation broth were qualified and quantified by high performance liquid chromatography (HPLC). The results showed that the content of phenolic compounds in IDF increased gradually with the prolongation of fermentation time while that in SDF increased first and then decreased, reaching the highest level $((50.62 \pm 2.45) \mu\text{mol/g})$ after 30 h. The trend of antioxidant activity was similar to that of phenolic content for both IDF and SDF. A total of 18 phenolic compounds in the fermentation broths were identified, which were classified into three types: hydroxybenzoic acids, hydroxycinnamic acids and flavonoids. The contents of ferulic acid in both IDF and SDF increased first and then decreased during colonic fermentation, which reached the highest level after 24 h in IDF and after 5 h in SDF. This study showed that highland barley dietary fiber could slowly release bound phenolic compounds during colonic fermentation, thereby enhancing the content of free phenolics and antioxidant activity, indicating that highland barley dietary fiber possess potential health benefits.

Keywords: dietary fiber from highland barley; *in vitro* colonic fermentation; phenolic compounds; antioxidant activity

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181207-098

中图分类号: TS201.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2020)02-0094-07

收稿日期: 2018-12-07

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31560428; 31360378); 云岭产业技术领军人才项目(云发改人事(2014)1782号)

第一作者简介: 邹青飞(1994—)(ORCID: 0000-0002-5648-699X), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品科学。

E-mail: 1844166983@qq.com

*通信作者简介: 李永强(1975—)(ORCID: 0000-0001-5675-2234), 男, 副教授, 博士, 研究方向为功能食品与天然产物化学。E-mail: liyongqiang7512@163.com

引文格式:

邹青飞, 杨士花, 李永强, 等. 体外结肠发酵对青稞膳食纤维中酚类化合物的含量及抗氧化活性的影响[J]. 食品科学, 2020, 41(2): 94-100. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181207-098. <http://www.spkx.net.cn>

ZOU Qingfei, YANG Shihua, LI Yongqiang, et al. Effects of *in vitro* colonic fermentation on phenolic content and antioxidant activity in dietary fiber from highland barley[J]. Food Science, 2020, 41(2): 94-100. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181207-098. <http://www.spkx.net.cn>

青稞 (*Hordeum vulgare* Linn. var. *nudum* Hook. f.) 是大麦的一个变种, 属禾本科大麦属。因其籽粒内外稃与颖果分离, 籽粒裸露, 故称裸大麦^[1]。青稞生长在海拔 1 400~4 700 m 的高寒地区, 主要分布在我国的西藏、青海、四川、云南、甘肃、黑龙江等地, 是一种特有的耐寒耐旱农作物, 其生长条件造就了青稞“三高两低”的营养组成, 即高蛋白、高纤维、高维生素、低脂肪和低糖, 而且在抗逆环境下积累了丰富的多酚化合物^[2]。膳食纤维包括能够耐受人消化酶水解的细胞壁多糖、木质素以及与之相结合的物质, 与膳食纤维相结合的物质也被认为是膳食纤维的一部分^[3], 这些物质包括多酚、皂苷类、植酸等化合物。膳食纤维按其溶解性可分为可溶性膳食纤维 (soluble dietary fiber, SDF) 和不可溶性膳食纤维 (insoluble dietary fiber, IDF)^[4]。目前青稞主要用于畜牧饲料、青稞酒、炒面、糌粑、烘焙食品等的加工^[5], 而关于青稞的功能研究较少, 主要集中在多酚、 β -葡聚糖和膳食纤维等方面^[6]。

多酚是一种植物次生代谢产物, 具有抗氧化、抗炎、抗癌、抗菌等作用, 能够预防心血管疾病、癌症、高血压、II型糖尿病等^[7]。多酚按溶解度分为总可溶性多酚和不可溶键合多酚, 不可溶键合多酚能与膳食纤维、蛋白质等大分子通过各种化学键形成膳食纤维-多酚复合物 (dietary fiber-polyphenol complex, DF-PC)^[8-9]。研究发现, 膳食纤维中含有游离多酚和不可溶键合多酚, 谷物中约95%的不可溶键合多酚会与细胞壁多糖连接, 形成DF-PC^[10]。纯多酚在体内的保留时间较短, 从摄入到代谢完成大约需要4 h, 且在2 h左右出现波峰; DF-PC在消化过程中可以缓慢释放多酚化合物, 持续保持人体具有较高的多酚水平, 较长时间发挥其抗氧化活性, 能够促进人体健康。多酚经人体摄入后在胃肠道消化过程中会发生降解或转化, 摄入的多酚不能完全被人体吸收利用^[11]。多酚在膳食中含量很高, 但它们在体内生物有效性较低, 只有5%~10%的多酚 (主要是游离态多酚) 在小肠中被吸收, 90%~95%的多酚 (主要是结合态多酚) 会进入结肠^[12], 在结肠微生物菌群的作用下进一步降解为活性较高的小分子代谢产物, 一部分被人体重新吸收和利用, 另一部分则排出体外^[13-14]。

体外结肠发酵是基于体内结肠发酵的仿生模拟而建立的模型, 两者之间有一定的相关性, 既能从一定程度

上反映摄入物质的消化利用情况, 又具有简便易行的特点^[15]。该方法一般需要先进行体外胃肠道消化, 然后利用消化残渣进行结肠发酵^[16-17]。研究发现, 在体外模拟胃肠道消化过程中, 多酚化合物在各种消化酶的作用下会逐渐释放, 不但提高了多酚化合物含量, 而且能够提高其抗氧化活性^[18-20]。结肠发酵一般利用人或动物粪便作为接种物^[16], 在发酵过程中, 接种物中的微生物会进一步促进不可溶键合多酚的释放, 不但能提高游离多酚的含量和抗氧化活性, 也会提高其生物有效性。研究表明, 枣籽经过体外胃肠消化和结肠发酵后, 其抗氧化活性和生物有效性得到提高^[16]。Campos-Vega等^[17]发现多酚在模拟胃肠消化和结肠发酵过程中, 其含量和抗氧化活性提高, 生物有效性增强。目前, 利用体外结肠发酵研究青稞膳食纤维中酚类化合物的含量及抗氧化活性的文献鲜见报道。因此, 本实验以青稞膳食纤维为原料, 通过体外模拟胃肠消化和结肠发酵, 对青稞膳食纤维中多酚含量、黄酮含量、体外抗氧化活性进行研究, 以期科学评价青稞的功能活性及保健食品开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

云黑青稞购自云南香格里拉兵松村; 猪粪便采自云南省普洱市景谷朱源家庭养殖农场, 采粪便所用猪没有胃肠道疾病且6个月内没有使用过抗生素。

猪胃蛋白酶、猪 α -淀粉酶、猪胰液素、猪黏液素、胆汁盐、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)、福林-酚试剂、Trolox 美国Sigma公司; 没食子酸、原儿茶酸、儿茶素、绿原酸、对羟基苯甲酸、表儿茶素、咖啡酸、香草酸、丁香酸、香草醛、表没食子儿茶素、对香豆酸、阿魏酸、杨梅素、槲皮素、反式肉桂酸、山柰酚、芹菜素 北京北纳创联生物技术研究院; 三吡啶基三嗪 (2,4,6-tris(2-pyridyl)-S-triazine, TPTZ)、2,2'-联氨-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸 (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid, ABTS)、三氯乙酸 (trichloroacetic acid, TCA)、2-(N-吗啉)乙磺酸-水合物 (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid, MES)、三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐

(tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride, Tris-HCl)、FeCl₃、H₂O₂、FeSO₄、NaOH、HCl、乙醇、磷酸盐缓冲溶液、抗坏血酸 上海晶纯生化科技股份有限公司; 糖化酶、碱性蛋白酶 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

MF-304型不锈钢五谷杂粮磨粉机 广州雷迈机械设备有限公司; TGL-20M型台式高速冷冻离心机 湖南湘立科学仪器有限公司; RE-5205型旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; A360型紫外-可见分光光度计 翱艺仪器(上海)有限公司; LGJ-12真空冷冻干燥机 郑州南北仪器设备有限公司; TS-211B型恒温摇床培养箱 上海天呈实验仪器制造有限公司; YXQ-LS型立式蒸汽灭菌器 上海博讯实业有限公司医疗设备厂。

1.3 方法

1.3.1 样品前处理

使用磨粉机将云黑青稞磨成粉, 过50目筛后密封于-20℃冰箱保存。

1.3.2 青稞中IDF与SDF的提取

参照李永强^[8]、张会香^[21]、Guo Weiwei^[10]的方法并进行适当修改。提取膳食纤维时, 按料液比为1:15(g/mL)加入MES-TRIS缓冲溶液并搅拌均匀, 之后分别加入耐高温 α -淀粉酶、碱性蛋白酶、糖化酶进行酶解, 反应结束后, 将酶解液于4 000 r/min离心15 min, 离心后沉淀为IDF; 上清液取出, 按1:4的比例加入一定量的95%乙醇溶液, 于0~4℃冰箱中沉淀过夜; 之后取下层浑浊液于4 000 r/min离心15 min, 所得沉淀为SDF, 将IDF、SDF冷冻干燥后于-80℃冰箱避光储存备用。

1.3.3 总可溶性与不可溶键合多酚的提取

参照Chandrasekara^[22]的方法并进行适当修改。IDF与SDF首先用70%丙酮溶液进行提取, 离心得上清液和残渣, 上清液即为总可溶性多酚; 残渣先用4 mol/L NaOH溶液在充氮气条件下水解4 h, 然后用6 mol/L HCl溶液调pH值为2, 离心后所得上清液用乙醚和乙酸乙酯按照1:1:1(V/V)萃取3次, 得到不可溶键合多酚。

1.3.4 体外胃肠道消化和结肠发酵

1.3.4.1 体外胃消化

参照Spínola等^[23]的方法并经适当修改。分别称取1 g SDF和IDF置于锥形瓶中, 加入15 mL蒸馏水和10 mL 0.85% NaCl溶液, 水浴10 min, 当样品中心温度达37℃时加入1 mL猪 α -淀粉酶, 37℃水浴消化5 min, 调节pH值至2.0, 再加1 mL猪胃蛋白酶, 样品冲氮气于37℃、100 r/min避光条件下振荡消化2 h, 所得悬浊液进行胃肠实验。

1.3.4.2 体外肠消化

参照Gayoso等^[24]的方法并经适当修改。经胃消化后的悬浊液, 调节pH值为6.5, 然后依次加入4 mL胆汁盐、4 mL猪胰液素和1 mL猪黏液素, 样品充氮气于37℃、100 r/min避光条件下振荡消化3 h, 消化液于12 000 r/min离心30 min后得到上清液和残渣, 残渣加入25 mL蒸馏水再次离心, 所得残渣冻干后充氮气避光保存于-80℃冰箱, 用于结肠发酵。

1.3.4.3 体外结肠发酵

参照Sirisena^[16]、Chandrasekara^[25]的方法并进行适当修改。在每个锥形瓶中加入135 mL厌氧培养基, 然后于121℃条件下灭菌15 min, 冷却。之后加入冻干的胃肠消化残渣, 混匀后充氮气, 于4℃冰箱水合16 h。

接种物制备: 实验前将3头猪粪便按1:1:1混合均匀, 用1 mol/L pH 7.2的磷酸盐缓冲液按1:10(g/mL)进行稀释, 使用3层纱布过滤, 滤液备用。

水合结束后将含胃肠消化残渣的培养基从冰箱取出室温放置2 h, 于每个培养基中加入15 mL粪便滤液进行接种。设置3个实验组: a.空白组: 粪便+体外结肠培养基; b. IDF组: IDF+粪便+体外结肠培养基; c. SDF组: SDF+粪便+体外结肠培养基。锥形瓶充氮气后放入厌氧袋, 向厌氧袋中充氮气并放入指示剂和去氧剂, 将装有培养基的厌氧袋放置于37℃的CO₂培养箱中进行发酵, 分别发酵0、5、10、24、30 h和48 h。发酵结束后, 于4℃、11 000 r/min离心10 min, 收集上清液, 测定多酚含量、类黄酮含量和体外抗氧化活性, 并进行酚类化合物的组成分析。

1.3.5 多酚含量测定

采用福林-酚法^[26]测定, 以阿魏酸浓度/(μ mol/L)为x, 吸光度为y, 绘制标准曲线: $y = 1.289x - 0.003$ ($R^2 = 0.9988$), 多酚含量测定结果以阿魏酸物质的量当量表示, 单位为 μ mol/g。

1.3.6 黄酮含量测定

采用AlCl₃比色法^[25]测定。以儿茶素浓度/(μ mol/L)为x, 吸光度为y, 绘制标准曲线: $y = 2.5459x - 0.01143$ ($R^2 = 0.9998$), 黄酮含量测定结果以儿茶素物质的量当量表示, 单位为 μ mol/g。

1.3.7 体外抗氧化活性测定

1.3.7.1 DPPH自由基清除能力的测定

参考罗恒国^[27]、黄佳琦^[28]等方法并经适当修改。取适量的结肠发酵液与4 mL DPPH的甲醇溶液充分混合后, 避光反应10 min, 在517 nm波长处测定吸光度, 并根据标准曲线计算DPPH自由基清除能力。DPPH自由基清除率计算公式如下:

$$\text{DPPH自由基清除率}/\% = \frac{(c-c_b) - (s-s_b)}{c-c_b} \times 100 \quad (1)$$

式中： s 为结肠发酵液加DPPH-甲醇溶液吸光度； s_b 为结肠发酵液加甲醇溶液吸光度； c 为DPPH-甲醇溶液吸光度； c_b 为甲醇溶液吸光度。

利用阿魏酸绘制标准曲线，标准方程为： $y=451.75x+32.31$ ($R^2=0.9987$)，其中： y 为DPPH自由基清除率/%； x 为阿魏酸浓度/ ($\mu\text{mol/L}$)。DPPH自由基清除能力以每克样品中相当于阿魏酸的物质的量表示，单位为 $\mu\text{mol/g}$ 。

1.3.7.2 铁离子还原/抗氧化能力测定

参考罗恒国^[27]、黄佳琦^[28]等方法并经适当修改。取3 mL的铁离子溶液与适量的结肠发酵液充分混合，于37℃反应4 min，用乙醇做空白，在593 nm波长处测定吸光度。用 FeSO_4 标准储备液绘制标准曲线。标准曲线方程为： $y=6.24x+0.0005$ ($R^2=0.9984$)，其中： y 为吸光度； x 为硫酸亚铁浓度/ (mmol/L)；铁离子还原能力以每克样品中相当于 Fe^{2+} 的物质的量表示，单位为 mmol/g 。

1.3.7.3 H_2O_2 清除能力测定

参考罗恒国^[27]、黄佳琦^[28]等方法并经适当修改。取适量的结肠发酵液加入0.5 mL 40 mmol/L的 H_2O_2 和0.75 mL 45 mmol/L pH 7.4磷酸钠缓冲溶液，在30℃暗反应40 min，用乙醇作为空白，于230 nm波长处测定吸光度。 H_2O_2 清除率计算公式如下：

$$\text{H}_2\text{O}_2\text{清除率}/\% = \left(1 - \frac{s-s_b}{c-c_b}\right) \times 100 \quad (2)$$

式中： s 为结肠发酵液加 H_2O_2 溶液和磷酸盐缓冲溶液吸光度； s_b 为结肠发酵液加磷酸盐缓冲溶液吸光度； c 为 H_2O_2 溶液加磷酸盐缓冲溶液吸光度； c_b 为磷酸盐缓冲溶液吸光度。

用阿魏酸绘制标准曲线，标准曲线方程为： $y=47.338x+32.772$ ($R^2=0.9984$)，其中： y 为 H_2O_2 清除率/%； x 为阿魏酸浓度/ ($\mu\text{mol/L}$)； H_2O_2 清除能力以每克样品中相当于阿魏酸的物质的量表示，单位为 $\mu\text{mol/g}$ 。

1.3.7.4 总抗氧化能力测定

参考罗恒国^[27]、黄佳琦^[28]等方法并经适当修改。提前配制ABTS工作液，取适量的结肠发酵液与1.9 mL ABTS工作液室温反应6 min，用乙醇溶液作空白，于734 nm波长处测定吸光度，并根据标准曲线计算ABTS阳离子自由基清除能力。ABTS阳离子自由基清除率计算公式如下：

$$\text{ABTS阳离子自由基清除率}/\% = \left(1 - \frac{s-s_b}{c-c_b}\right) \times 100 \quad (3)$$

式中： s 为结肠发酵液加ABTS工作液吸光度； s_b 为结肠发酵液加乙醇溶液吸光度； c 为ABTS工作液吸光度； c_b 为乙醇溶液吸光度。

利用Trolox绘制标准曲线，标准曲线方程为： $y=103.95x+1.5663$ ($R^2=0.9984$)，其中： y 为ABTS阳离子自由基清除率/%； x 为Trolox浓度/ (mmol/L)；ABTS阳离子自由基清除能力以每克样品中相当于Trolox的物质的量表示，单位为 $\mu\text{mol/g}$ 。

1.3.7.5 还原能力测定

参考罗恒国^[27]、黄佳琦^[28]等方法并经适当修改。吸取适量的结肠发酵液，加入2.5 mL磷酸盐缓冲溶液，2.5 mL 1%铁氰化钾溶液，混合均匀后加入2.5 mL 10% TCA溶液，于4 000 r/min离心10 min；取上清液1 mL加入0.5 mL 0.1% FeCl_3 溶液和2.5 mL蒸馏水，用乙醇溶液作空白，于700 nm波长处测定吸光度。用抗坏血酸绘制标准曲线，标准曲线方程为： $y=0.0801x+0.1579$ ($R^2=0.9916$)，其中： y 为吸光度； x 为抗坏血酸浓度/ ($\mu\text{mol/L}$)；还原能力以每克样品中相当于抗坏血酸的物质的量表示，单位为 $\mu\text{mol/g}$ 。

1.3.8 体外结肠过程中酚类化合物的组成分析

利用高效液相色谱法对IDF和SDF在结肠发酵过程中酚类化合物进行组成分析。色谱条件：色谱柱Agilent Zorbax SB-C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm)；流速0.8 mL/min；柱温30℃；检测器为二极管检测器，检测波长280 nm；梯度洗脱程序：0 min，5%甲醇（95%水含0.5%甲酸）；20 min，95%甲醇（5%水含0.5%甲酸）；21 min，5%甲醇（95%水含0.5%甲酸）；25 min，5%甲醇（95%水含0.5%甲酸）。

1.4 数据统计分析

所有实验至少重复3次，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。运用SPSS 18.0软件，通过单因素方差分析和Tukey多重比较对数据进行显著性差异分析 ($P<0.05$)；运用Excel 2007软件作图。

2 结果与分析

2.1 IDF和SDF中总可溶性和不可溶键合多酚含量

表1 IDF和SDF中总可溶性和不可溶键合多酚的含量
Table 1 Contents of total soluble and insoluble-bound phenolics in IDF and SDF

化合物	多酚含量		黄酮含量	
	IDF	SDF	IDF	SDF
总可溶性	10.15±0.19	1.63±0.05	0.72±0.02	0.13±0.01
不可溶键合	14.30±0.04	5.90±0.67	0.79±0.05	0.26±0.04
合计	24.45±2.28	7.53±2.38	1.51±0.05	0.39±0.07

对IDF和SDF中总可溶性多酚、总可溶性黄酮、不可溶键合多酚和不可溶键合黄酮进行测定,结果见表1。IDF和SDF中总多酚含量分别为 (24.45 ± 2.28) 、 $(7.53 \pm 2.38) \mu\text{mol/g}$,总黄酮含量分别为 (1.51 ± 0.05) 、 $(0.39 \pm 0.07) \mu\text{mol/g}$ 。

2.2 体外结肠发酵液中酚类化合物的含量

表2 IDF和SDF体外结肠发酵液中多酚和黄酮的含量变化
Table 2 Changes in contents of phenolics and flavonoids in colonic fermentation broths of IDF and SDF *in vitro*

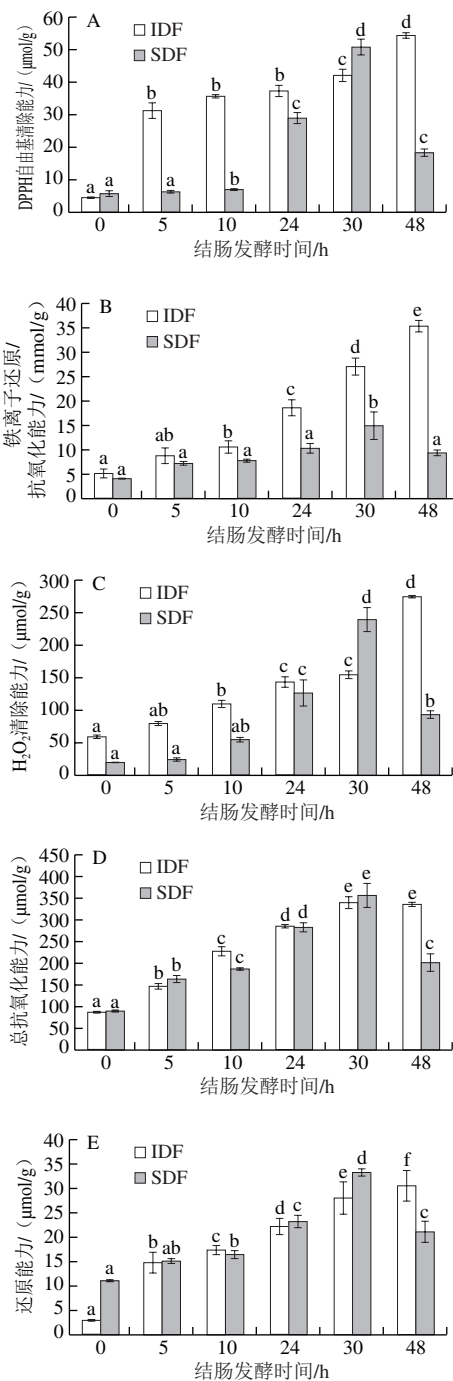
结肠发酵时间/h	多酚含量/ $(\mu\text{mol/g})$		黄酮含量/ $(\mu\text{mol/g})$	
	IDF	SDF	IDF	SDF
0	2.55 ± 1.58^a	5.98 ± 0.98^a	0.35 ± 0.03^a	0.18 ± 0.06^a
5	30.95 ± 2.42^b	6.38 ± 0.41^a	0.38 ± 0.07^a	0.28 ± 0.03^a
10	35.53 ± 0.51^b	6.84 ± 0.41^a	0.41 ± 0.08^a	0.35 ± 0.08^a
24	37.05 ± 1.75^b	28.76 ± 1.93^c	0.63 ± 0.02^b	0.58 ± 0.06^b
30	41.90 ± 1.81^c	50.62 ± 2.45^d	0.72 ± 0.06^b	0.69 ± 0.09^b
48	54.00 ± 1.02^d	18.30 ± 1.11^b	1.51 ± 0.18^c	0.23 ± 0.02^a

注:同列肩标小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。

如表2所示, IDF在结肠发酵过程中多酚含量随着发酵时间的延长呈逐渐升高的趋势,当结肠发酵第30小时多酚含量最高,为 $(54.00 \pm 1.02) \mu\text{mol/g}$; SDF在结肠发酵过程中多酚含量随着发酵时间的延长呈先升高后降低的趋势,当结肠发酵第30小时多酚含量达到最高,为 $(50.62 \pm 2.45) \mu\text{mol/g}$ 。黄酮含量的变化趋势与多酚相似, IDF在结肠发酵过程黄酮含量呈逐渐升高趋势,结肠发酵第48小时,黄酮含量最高,为 $(1.51 \pm 0.18) \mu\text{mol/g}$; SDF在结肠发酵过程中黄酮含量呈先升高后降低趋势,结肠发酵第30小时,黄酮含量最高,为 $(0.69 \pm 0.09) \mu\text{mol/g}$ 。结合表1可知, IDF中含有丰富的不可溶键合多酚,可能与膳食纤维的结合强度较强有关,在结肠微生物的作用下,不可溶键合多酚被缓慢释放出来,导致多酚含量呈增加趋势,甚至高于化学法提取的多酚^[29]; SDF中不可溶键合多酚相对较少,可能与膳食纤维的结合强度较弱、稳定性较差有关,在结肠发酵第30小时,多酚被全部释放,之后随着发酵时间的延长,在结肠微生物的作用下,多酚可能被分解代谢,导致含量下降。

2.3 体外结肠发酵液中酚类化合物的体外抗氧化活性

如图1所示,在体外结肠发酵过程中,随着发酵时间的延长, IDF中酚类化合物的体外抗氧化活性呈逐渐升高的趋势,在第48小时达到最高,说明在结肠微生物的作用下, IDF-PC中化学键逐渐被打断,多酚得到释放,同时可能被进一步分解代谢,形成活性更高的小分子代谢产物,导致抗氧化能力增强^[29]。SDF中酚类化合物的体外抗氧化活性呈先升高后下降趋势,在第30小时达到最高,说明结肠发酵第30小时, SDF-PC中酚类化合物在结肠微生物作用下全部得到释放,然后随发酵时间的延长,酚类化合物在结肠微生物的作用下,可能进一步被分解或转化为小分子代谢产物,导致抗氧化活性降低。

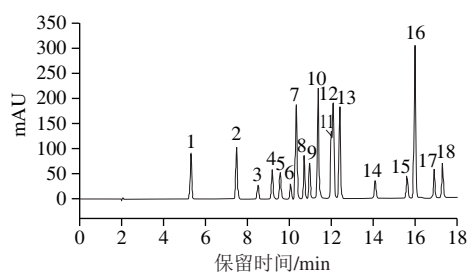


A. DPPH自由基清除能力; B.铁离子还原/抗氧化能力;
C. H_2O_2 清除能力; D.总抗氧化能力; E.还原能力。
同种样品间小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。

图1 IDF和SDF在体外结肠发酵液中酚类化合物的体外抗氧化活性
Fig. 1 Antioxidant activities of *in vitro* colonic fermentation broths of IDF and SDF

2.4 体外结肠发酵液中酚类化合物组成

利用高效液相色谱测定了IDF和SDF在结肠发酵不同时间段酚类化合物的组成,通过对比18种标准品的保留时间和峰面积,确定样品中酚类化合物的组成及含量(图2)。



1.没食子酸; 2.原儿茶酸; 3.儿茶素; 4.绿原酸; 5.对羟基苯甲酸; 6.表儿茶素; 7.咖啡酸; 8.香草酸; 9.丁香酸; 10.香草醛; 11.表没食子儿茶素; 12.对香豆酸; 13.阿魏酸; 14.杨梅素; 15.槲皮素; 16.反式肉桂酸; 17.山柰酚; 18.芹菜素。

图2 多酚标准品高效液相色谱图

Fig. 2 Chromatograms of mixed standards of phenolic compounds

表3 IDF在体外结肠发酵液中酚类化合物的含量*

Table 3 Contents of phenolic compounds in *in vitro* colon fermentation broth of IDF*

酚类化合物	0 h	5 h	10 h	24 h	30 h	48 h
羟基苯甲酸						
没食子酸	0.12±0.06 ^b	0.15±0.16 ^b	0.3±0.10 ^c	0.02±0.01 ^a	0.2±0.03 ^b	0.12±0.12 ^b
原儿茶酸	0.11±0.03 ^a	0.27±0.06 ^d	0.15±0.18 ^a	0.16±0.08 ^a	0.28±0.14 ^a	0.22±0.13 ^a
对羟基苯甲酸	1.17±0.71 ^d	0.35±0.17 ^a	1.34±0.86 ^a	0.47±0.35 ^a	0.51±0.24 ^a	2.61±2.69 ^b
香草酸	0.11±0.06 ^a	0.36±0.07 ^b	0.19±0.04 ^a	0.14±0.06 ^a	0.2±0.08 ^a	0.15±0.06 ^a
丁香酸	0.07±0.06 ^a	0.51±0.07 ^b	0.06±0.09 ^a	0.09±0.07 ^a	0.48±0.17 ^b	0.48±0.15 ^b
香草醛	0.04±0.02 ^a	0.17±0.03 ^a	0.01±0.00 ^a	0.11±0.09 ^a	0.84±0.29 ^b	0.72±0.23 ^b
羟基肉桂酸						
绿原酸	0.49±0.32 ^a	1.68±0.73 ^a	1.61±0.64 ^a	0.99±0.91 ^a	1.03±0.85 ^a	0.95±0.42 ^a
咖啡酸	0.28±0.21 ^d	0.08±0.05 ^{bc}	0.02±0.01 ^a	0.27±0.06 ^d	0.13±0.1 ^c	0.06±0.03 ^{ab}
对香豆酸	0.09±0.01 ^a	0.21±0.05 ^b	0.12±0.04 ^a	0.23±0.06 ^b	0.18±0.13 ^a	0.19±0.04 ^b
阿魏酸	0.07±0.05 ^a	2.02±0.14 ^a	1.78±0.22 ^a	10.53±1.91 ^c	3.55±2.81 ^b	0.81±0.38 ^a
反式肉桂酸	0.00±0.00 ^a	0.02±0.01 ^a	0.01±0.02 ^a	0.33±0.51 ^b	0.03±0.02 ^a	0.11±0.03 ^{ab}
类黄酮						
儿茶素	0.64±0.32 ^a	1.67±0.18 ^c	1.43±0.32 ^{bc}	1.08±0.61 ^{ab}	0.93±0.24 ^a	0.93±0.38 ^a
表儿茶素	1.90±0.01 ^a	3.59±0.23 ^b	1.38±1.31 ^a	2.03±0.76 ^a	3.04±0.63 ^b	3.06±0.26 ^b
表没食子儿茶素	0.05±0.03 ^a	0.57±0.06 ^a	0.18±0.11 ^a	2.36±0.99 ^b	0.39±0.11 ^a	0.27±0.09 ^a
杨梅素	0.07±0.04 ^a	0.38±0.11 ^a	0.69±0.16 ^b	0.84±0.33 ^b	0.40±0.15 ^a	0.82±0.36 ^b
槲皮素	0.36±0.11 ^a	0.29±0.06 ^a	0.13±0.09 ^a	0.16±0.14 ^a	0.26±0.08 ^a	0.72±0.57 ^b
山柰酚	0.01±0.01 ^a	0.14±0.05 ^a	0.03±0.03 ^a	0.56±0.07 ^b	0.22±0.13 ^a	0.5±0.58 ^b
芹菜素	0.00±0.00 ^a	0.25±0.07 ^b	0.01±0.02 ^a	0.03±0.03 ^a	0.13±0.04 ^{ab}	0.23±0.36 ^b

注: 肩标小写字母不同表示差异显著 ($P<0.05$); *.减去空白对照。下同。

从表3、4可看出, 青稞膳食纤维经体外结肠发酵后, 发酵液中有18种酚类化合物, 分为羟基苯甲酸、羟基肉桂酸和类黄酮3类。同时, 在体外结肠发酵过程中, 各种酚类化合物含量有的呈逐渐增加的趋势, 有的呈逐渐减少的趋势, 有的呈先升高后降低的趋势, 没有明显的变化规律。阿魏酸是谷物中含量最丰富的酚类化合物^[9], 可作为生物标志物, 研究多酚在胃肠道和结肠发酵过程中的含量、抗氧化活性和生物有效性^[16-17]。青稞中阿魏酸约占总酚含量的68%, 是含量最高一种酚类化合物^[30]。由表3可知, 在结肠发酵过程中, 随着发酵时间的延长, 阿魏酸的含量呈先升高后下降的趋势, 在第24小时含量最高, 为 $(10.53 \pm 1.91) \mu\text{g/g}$ 。由表4可知, 在

结肠发酵48 h过程中, 阿魏酸的含量呈先升高后降低趋势, 在第5小时含量最高, 为 $(0.72 \pm 0.07) \mu\text{g/g}$ 。在IDF中, 阿魏酸可能与膳食纤维通过化学键结合比较紧密, 在发酵第24小时被完全释放, 含量达到最高; 之后在结肠微生物的作用下, 分解生成其他代谢产物, 导致含量降低^[29]。在SDF中, 阿魏酸可能与膳食纤维结合较弱, 在发酵第5小时被完全释放, 之后在结肠微生物的作用下进一步分解行成其他代谢产物, 导致含量呈逐渐降低的趋势^[31]。

表4 SDF在体外结肠发酵液中酚类化合物的含量*

Table 4 Contents of phenolic compounds in *in vitro* colon fermentation broth of SDF*

酚类化合物	0 h	5 h	10 h	24 h	30 h	48 h
羟基苯甲酸						
没食子酸	0.38±0.04 ^b	0.45±0.30 ^c	0.28±0.22 ^b	0.03±0.02 ^a	0.06±0.05 ^a	0.01±0.01 ^a
原儿茶酸	0.20±0.05 ^a	0.17±0.09 ^a	0.21±0.14 ^a	0.14±0.07 ^a	0.16±0.06 ^a	0.15±0.04 ^a
对羟基苯甲酸	0.72±0.15 ^b	0.24±0.19 ^a	0.84±0.66 ^b	0.55±0.09 ^{ab}	0.54±0.14 ^{ab}	0.61±0.13 ^b
香草酸	0.12±0.06 ^a	0.29±0.06 ^c	0.17±0.05 ^b	0.12±0.01 ^a	0.11±0.02 ^a	0.10±0.04 ^a
丁香酸	0.12±0.02 ^a	0.14±0.14 ^a	0.03±0.03 ^a	0.38±0.22 ^b	0.37±0.15 ^b	0.13±0.09 ^a
香草醛	0.07±0.05 ^a	0.07±0.10 ^a	0.04±0.02 ^a	0.52±0.82 ^b	0.08±0.05 ^a	0.04±0.02 ^a
羟基肉桂酸						
绿原酸	0.61±0.49 ^a	1.49±0.46 ^c	1.3±0.46 ^{bc}	1.18±0.79 ^{bc}	0.91±0.46 ^{ab}	0.62±0.47 ^a
咖啡酸	0.04±0.04 ^a	0.05±0.02 ^b	0.01±0.02 ^a	0.02±0.03 ^a	0.01±0.01 ^a	0.02±0.01 ^a
对香豆酸	0.10±0.01 ^b	0.16±0.08 ^b	0.13±0.05 ^b	0.08±0.04 ^a	0.05±0.04 ^a	0.04±0.03 ^a
阿魏酸	0.15±0.05 ^a	0.72±0.07 ^c	0.68±0.19 ^c	0.24±0.15 ^{ab}	0.29±0.12 ^b	0.14±0.06 ^a
反式肉桂酸	0.00±0.00 ^a	0.02±0.02 ^{ab}	0.01±0.01 ^a	0.02±0.01 ^{ab}	0.04±0.04 ^{ab}	0.04±0.06 ^b
类黄酮						
儿茶素	0.96±0.08 ^a	1.23±0.13 ^b	1.14±0.14 ^b	1.17±0.27 ^b	1.07±0.24 ^b	0.47±0.32 ^a
表儿茶素	2.05±0.05 ^b	2.57±0.35 ^b	0.79±0.45 ^a	2.86±0.29 ^b	2.64±0.33 ^b	2.41±0.80 ^b
表没食子儿茶素	0.03±0.02 ^a	0.27±0.08 ^b	0.16±0.11 ^a	0.47±0.06 ^c	0.48±0.12 ^c	0.11±0.13 ^a
杨梅素	0.03±0.02 ^a	0.64±0.27 ^{bc}	0.87±0.13 ^d	0.33±0.07 ^a	0.53±0.33 ^{ab}	0.83±0.12 ^{cd}
槲皮素	0.15±0.06 ^b	0.05±0.06 ^a	0.12±0.12 ^{ab}	0.16±0.06 ^b	0.07±0.05 ^a	0.06±0.03 ^a
山柰酚	0.02±0.01 ^a	0.03±0.02 ^a	0.03±0.04 ^a	0.09±0.04 ^b	0.06±0.05 ^{ab}	0.05±0.05 ^{ab}
芹菜素	0.00±0.00 ^a	0.01±0.01 ^a	0.01±0.01 ^a	0.05±0.02 ^b	0.05±0.04 ^b	0.02±0.02 ^a

3 结论

通过体外结肠发酵, 测定青稞膳食纤维中多酚含量、黄酮含量、多酚组成和体外抗氧化活性, 发现在体外结肠发酵过程中, 随着发酵时间的延长, IDF中多酚和黄酮含量呈逐渐升高趋势, 在第48小时含量最高, 分别为 (54.00 ± 1.02) 、 $(1.51 \pm 0.18) \mu\text{mol/g}$; SDF中多酚和黄酮含量呈先升高后下降趋势, 在第30小时含量最高, 分别为 (50.62 ± 2.45) 、 $(0.69 \pm 0.09) \mu\text{mol/g}$; 膳食纤维中多酚抗氧化活性的变化趋势与含量变化趋势相似, IDF中多酚的抗氧化活性逐渐增强, 在第48小时达到最高; SDF中多酚的抗氧化活性呈先升高后下降趋势, 在第30小时达到最高; 同时, 对体外结肠发酵液中多酚的组成分析可知, 青稞膳食纤维中酚类化合物分为羟基

苯甲酸、羟基肉桂酸和类黄酮, 包括18种酚类化合物, 阿魏酸可作为青稞中酚类化合物的生物标志物, 随着发酵时间的延长, 在IDF和SDF中含量均呈先升高后下降趋势。说明青稞膳食纤维经体外结肠发酵后, 其中的酚类化合物会被逐渐释放出来, 导致多酚含量升高, 抗氧化活性增强, 为青稞功能食品的开发利用提供科学依据。

参考文献:

- [1] 徐廷文. 中国栽培大麦的分类和变种鉴定[J]. 中国农业科学, 1982, 15(6): 39-47.
- [2] 吴昆仑. 青稞功能元素与食品加工利用简述[J]. 作物杂志, 2008(2): 15-17. DOI:10.3969/j.issn.1001-7283.2008.02.005.
- [3] DEVRIES J W. On defining dietary fibre[J]. Proceedings of the Nutrition Society, 2003, 62(1): 37-43. DOI:10.1079/pns2002234.
- [4] 郝邵琳. 第七营养素: 膳食纤维[J]. 食品与药品, 2005(3): 65-67. DOI:10.3969/j.issn.1672-979X.2005.06.029.
- [5] 刘新红, 杨希娟, 党斌, 等. 青稞饼干加工配方的优化研究[J]. 食品工业, 2013, 34(12): 86-89.
- [6] ZHU F, DU B, XU B. Superfine grinding improves functional properties and antioxidant capacities of bran dietary fibre from Qingke (hull-less barley) grown in Qinghai-Tibet Plateau, China[J]. Journal of Cereal Science, 2015, 65. DOI:10.1016/j.jcs.2015.06.006.
- [7] ANCILLOTTI C, CIOFI L, PUCCI D, et al. Polyphenolic profiles and antioxidant and antiradical activity of Italian berries from *Vaccinium myrtillus* L. and *Vaccinium uliginosum* L. subsp. *gaultherioides* (Bigelow) S.B. Young[J]. Food Chemistry, 2016, 204: 176-184. DOI:10.1016/j.foodchem.2016.02.106.
- [8] 李永强. 青稞膳食纤维-多酚复合物的制备方法: ZL201410604115.1[P]. 2016-11-09.
- [9] VITAGLIONE P, NAPOLITANO A, FOGLIANO V. Cereal dietary fibre: a natural functional ingredient to deliver phenolic compounds into the gut[J]. Trends in Food Science & Technology, 2008, 19(9): 451-463. DOI:10.1016/j.tifs.2008.02.005.
- [10] GUO W, BETA T. Phenolic acid composition and antioxidant potential of insoluble and soluble dietary fibre extracts derived from select whole-grain cereals[J]. Food Research International, 2013, 51(2): 518-525. DOI:10.1016/j.foodres.2013.01.008.
- [11] 王月华, 李斌, 孟宪军, 等. 模拟体外消化对蓝靛果提取物花色苷组成及抗氧化能力的影响[J]. 食品科学, 2016, 37(19): 100-105. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201619017.
- [12] MOSELE J I, MACIÀ A, ROMERO M P, et al. Application of *in vitro* gastrointestinal digestion and colonic fermentation models to pomegranate products (juice, pulp and peel extract) to study the stability and catabolism of phenolic compounds[J]. Journal of Functional Foods, 2015, 14: 529-540. DOI:10.1016/j.jff.2015.02.026.
- [13] D'ARCHIVIO M, FILESI C, DI B R, et al. Polyphenols, dietary sources and bioavailability[J]. Annali Dellistituto Superiore Di Sanità, 2007, 43(4): 348-361. DOI:10.1007/978-1-4615-4139-4_19.
- [14] SERRANO J, PUUPPONEN-PIMIÄ R, DAUER A, et al. Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2010, 53(Suppl2): S310-S329. DOI:10.1002/mnfr.200900039.
- [15] 邵鑫. 人体胃肠道微生态消化模拟系统的构建及其稳定性评估[D]. 广州: 暨南大学, 2016: 9-10.
- [16] SIRISENA S, AJLOUNI S, NG K. Simulated gastrointestinal digestion and invitro colonic fermentation of date (*Phoenix dactylifera* L.) seed polyphenols[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2017, 53(Part A): 412-422. DOI:10.1111/ijfs.13599.
- [17] CAMPOS-VEGA R, VÁZQUEZ-SÁNCHEZ K, LÓPEZ-BARRERA D, et al. Simulated gastrointestinal digestion and *in vitro* colonic fermentation of spent coffee (*Coffea arabica*, L.): bioaccessibility and intestinal permeability[J]. Food Research International, 2015, 77: 156-161. DOI:10.1016/j.foodres.2015.07.024.
- [18] 封易成, 牟德华. 体外模拟胃肠消化过程中山楂的活性成分及抗氧化性规律[J]. 食品科学, 2018, 39(7): 139-144. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201807021.
- [19] 从彦丽, 彭梦雪, 刘冬, 等. 柑橘在体外模拟胃肠消化过程中总多酚、总黄酮及总抗氧化活性的变化规律[J]. 食品科学, 2016, 37(17): 96-103. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201617016.
- [20] 郑平, 吴幼茹, 杨继伟, 等. 甘蔗醋发酵产物在体外及模拟人体肠胃环境的抗氧化活性[J]. 食品科学, 2016, 37(11): 242-246. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201611043.
- [21] 张会香, 杨世军, 李子院. 微波法提取雪莲果中SDF和IDF的工艺和特性研究[J]. 食品工业, 2016(10): 163-166.
- [22] CHANDRASEKARA A, SHAHIDI F. Inhibitory activities of soluble and bound millet seed phenolics on free radicals and reactive oxygen species[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2011, 59(1): 428-436. DOI:10.1021/jf103896z.
- [23] SPÍNOLA V, LLORENT-MARTÍNEZ E J, CASTILHO P C. Antioxidant polyphenols of Madeira sorrel (*Rumex maderensis*): how do they survive to *in vitro*, simulated gastrointestinal digestion?[J]. Food Chemistry, 2018, 259: 105-112. DOI:10.1016/j.foodchem.2018.03.112.
- [24] GAYOSO L, ROXO M, CAVERO R Y, et al. Bioaccessibility and biological activity of *Melissa officinalis*, *Lavandula latifolia* and *Origanum vulgare* extracts: influence of an *in vitro* gastrointestinal digestion[J]. Journal of Functional Foods, 2018, 44: 146-154. DOI:10.1016/j.jff.2018.03.003.
- [25] CHANDRASEKARA A, SHAHIDI F. Bioaccessibility and antioxidant potential of millet grain phenolics as affected by simulated *in vitro* digestion and microbial fermentation[J]. Journal of Functional Foods, 2012, 4(1): 226-237. DOI:10.1016/j.jff.2011.11.001.
- [26] LI Q, YANG S H, LI Y Q, et al. Comparative evaluation of soluble and insoluble-bound phenolics and antioxidant activity of two Chinese mistletoes[J]. Molecules, 2018, 23(2): 359-371. DOI:10.3390/molecules23020359.
- [27] 罗恒国, 杨士花, 李晴, 等. 云南省特色水果中多酚化合物含量和抗氧化性的比较[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(9): 104-108. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.014045.
- [28] 黄佳琦, 杨士花, 初雅洁, 等. 老黑谷米色素的提取工艺优化及体外抗氧化活性分析[J]. 食品科学, 2016, 37(2): 19-24. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201602004.
- [29] AJILA C M, RAO U J S P. Mango peel dietary fibre: composition and associated bound phenolics[J]. Journal of Functional Foods, 2013, 5(1): 444-450. DOI:10.1016/j.jff.2012.11.017.
- [30] 罗静, 李玉锋, 胥霞. 青稞中的活性物质及功能研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(9): 300-304. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.016130.
- [31] DELRIO D, RODRIGUEZ-MATEOS A, SPENCER J P E, et al. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases[J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2013, 18(14): 1818-1892. DOI:10.1089/ars.2012.4581.