

产乳酸芽孢杆菌发酵液对山药护色及多糖免疫活性的影响

曾丽萍¹, 田文妮¹, 夏雨², 黎攀¹, 杜冰^{1,*}

(1. 华南农业大学 食品学院, 广东 广州 510642; 2. 咀香园健康食品(中山)有限公司, 广东 中山 528437)

摘要:结合单因素试验和响应面法优化产乳酸芽孢杆菌发酵时间、发酵液添加量、护色时间对山药多糖得率和山药相对褐变度的影响,并对比该护色液和亚硫酸钠护色液对于山药中酶促褐变和山药多糖免疫活性的影响。结果表明,最佳护色工艺为采用添加10%发酵时间为34h的产乳酸芽孢杆菌发酵液配制的护色液、护色时间为1h,在此条件下,多糖得率为12.44%,相对褐变度为43.05%。该护色工艺能够有效抑制山药中多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)和过氧化物酶(peroxidase, POD)活性。该工艺护色后的山药多糖刺激小鼠巨噬细胞RAW264.7分泌肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素1(interleukin-1, IL-1 β)的水平显著高于传统亚硫酸钠护色后的山药多糖。说明,采用该工艺护色后山药多糖的免疫活性显著优于采用亚硫酸钠护色后的山药多糖。

关键词:山药;多糖;护色;免疫调节;RAW264.7细胞

Optimization of A Fermented Color-Protective Agent by *Bacillus* sp. and Its Effect on Immunomodulatory Activity of Polysaccharide for *Dioscorea opposita* Thunb

ZENG Li-ping¹, TIAN Wen-ni¹, XIA Yu², LI Pan¹, DU Bing^{1,*}

(1. College of Food, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China;
2. Juxiangyuan Health Food(Zhongshan)Co., Ltd., Zhongshan 528437, Guangdong, China)

Abstract: The present study optimized the processing conditions of a fermented color-protective agent by *Bacillus* sp. DU-106 with response surface methodology, and analyzed its effects on the polysaccharide yield, browning index, and immunomodulatory activity of polysaccharide for *Dioscorea opposita* Thunb. The result showed that the optimum processing conditions of color-protective agent were obtained as follow: the fermentation time 34 h; the amount of color-protective agent 10%; soaking time 1 h, yielding rate as high as 12.44% and the browning index only 43.05%. This color-protective agent inhibited of polyphenol oxidase (PPO) and peroxidase (POD) activity. The secretion levels of TNF- α and IL-1 β of RAW264.7 by polysaccharide from the *Dioscorea opposita* Thunb by using color-protective agent were significantly higher than those of polysaccharide from the *Dioscorea opposita* Thunb by using sulfur color-protect, indicating polysaccharide from the *Dioscorea opposita* Thunb by using color-protective agent possessed higher immunomodulatory activity.

基金项目:广东省省级科技计划项目(2016B090918093)

作者简介:曾丽萍(1994—),女(汉),硕士研究生,研究方向:食品加工与保藏。

*通信作者:杜冰(1973—),男(汉),副教授,博士,研究方向:食品新原料的开发。

[10] 段小群,焦杨,张士军,等.玉郎伞多糖对过氧化氢诱导大鼠原代肝细胞损伤的保护作用[J].时珍国医国药,2007(7):1592-1593

[11] Han D, Matsumaru K, Rettori D, et al. Utric acid-induced necrosis of cultured mouse hepatocytes: inhibition of mitochondrial function and oxidative stress[J]. Biochemical Pharmacology, 2004, 67(3): 439-440

[12] Shishido S, Koga H, Harada M, et al. Hydrogen peroxide overproduc-

tion in megamitochondria of troglitazone-treated human hepatocytes[J]. Hepatology, 2003, 37(1): 136-138

[13] Lee HS, Won NH, Kim KH, et al. Antioxidant effects of aqueous extract of *Terminalia chebula* in vivo and in vitro[J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2005, 28(9): 1639-1640

收稿日期:2018-12-13

Key words: *Dioscorea opposita* Thunb; polysaccharide; color-protection; immunomodulatory regulate; RAW264.7 cell

引文格式:

曾丽萍,田文妮,夏雨,等.产乳酸芽孢杆菌发酵液对山药护色及多糖免疫活性的影响[J].食品研究与开发,2019,40(8):44-51

ZENG Liping, TIAN Wenni, XIA Yu, et al. Optimization of A Fermented Color-Protective Agent by *Bacillus* sp. and Its Effect on Immunomodulatory Activity of Polysaccharide for *Dioscorea opposita* Thunb [J]. Food Research and Development, 2019, 40(8):44-51

山药,薯蕷科,又称薯蕷、白山药等。山药富含多种营养及功能活性物质,如多糖、尿囊素等。山药多糖是山药中的主要活性成分,具有增强免疫力、抗氧化、抗肿瘤等作用^[1-2]。但由于山药水分含量高,难以长时间保存,因此往往需要对山药进行干制处理,能够有效延长山药的贮藏期^[3-4]。山药在加工中极易产生褐变,影响其品质。目前常用于山药护色的褐变抑制剂主要是含硫护色剂,其中亚硫酸盐不仅能够有效抑制酶促反应,还能抑制非酶褐变,从而延缓或者抑制褐变的发生,因此尤其受到广泛的应用。尽管采用含硫护色剂能够取得很好的护色效果,但是产品中可能存在的残硫量超标的问题,严重影响产品品质,还可能带来食品安全问题^[5]。因此,选用合适的非硫护色剂能够有效保障山药加工的品质。

现有研究表明,加工过程中不同的处理手段可能影响山药多糖的得率和山药多糖的活性^[6],但目前多集中与研究提取方式对于山药多糖的影响。护色方式对于山药多糖的影响上未见报道。因此找寻合适的非硫护色剂对山药进行护色,并探究其对山药多糖的含量和活性的影响尤其重要。本研究采用产乳酸芽孢杆菌发酵液为原料,制备新型护色剂对山药多糖进行护色,并探究其与传统含硫护色对山药多糖活性的影响,为山药的护色工艺的进一步研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

山药:河南焦作;产乳酸芽孢杆菌 DU-106 筛选自传统发酵奶酪,现由华南农业大学新资源食品与功能性原料评价及研究中心鉴定及保藏;葡萄糖标准品:sigma 试剂公司;DMEM (dulbecco's modified eagle medium, DMEM)培养基:美国 Gibco 公司;无水乙醇:广州化学试剂厂;CCK-8 试剂盒:日本同仁化学研究所;细胞因子(TNF- α 、IL-1 β 、IL-6)试剂盒:欣博盛生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

HH-4 数显恒温水浴锅:常州市华普达数学仪器有限公司;ANKE TDL-5-A 离心机:上海安亭分析仪器有限公司;752-N 紫外分光光度计:上海精密仪器有限公司;Labserv K3 酶标仪:赛默飞世尔科技(中国)有限公司;DHP-600 电热恒温培养箱:北京市永光明医疗仪器厂;FA2004A 分析天平:上海精天电子仪器有限公司;HH-8 数显恒温水浴锅:金坛市富华仪器有限公司;WYT 手持糖量计:早州中友光学仪器有限公司;VD-650 桌上式洁净式工作台:苏州净化设备有限公司;SHZ-III 循环水真空泵:上海亚荣生化仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 原料处理

挑选大小一致、无创伤、无病虫害的块茎,用清水洗净、淋干,迅速切成 2 mm 左右厚的薄片,分别用不同的护色液处理一定时间后,置于 70 °C 烘箱中烘干至恒重,得干山药片备用。

1.3.2 发酵护色液的制备

1.3.2.1 产乳酸芽孢杆菌发酵液制备

分别称取乳清粉 20 g、葡糖糖 10 g、硫酸镁 1 g、磷酸氢二钾 2 g、硫酸锰 0.5 g 溶解于一定量的水中,定容至 1 L,分装灭菌,得发酵培养基。

将产乳酸芽孢杆菌接种至发酵培养基中,接种量为 0.1%,置于 180 r/min, 37 °C 摇床中液体发酵一定时间后取出,取出后采用 0.22 μ m 滤膜过滤,得产乳酸芽孢杆菌发酵液。

1.3.2.2 混合

将 1.3.2.1 所得的产乳酸芽孢杆菌发酵液按照一定要求加水混合均匀,得发酵护色液。

1.3.3 护色工艺单因素

按照 1.3.2 的方法分别考察发酵液发酵时间、发酵液添加量、护色时间 3 个因素对山药的相对褐变度和多糖含量的影响。当探究发酵时间变化对相对褐变度和多糖含量影响时,发酵液添加量为 10%,护色时间

为 1 h;探究发酵液添加量的影响时,发酵液发酵时间均为 36 h,护色时间 1 h;探究护色时间的影响时,发酵液发酵时间为 36 h,发酵液添加量为 10%。

1.3.4 响应面优化

在单因素试验的基础上,利用响应面分析法对护色工艺进行进一步的优化。根据 Box-Behnken 试验设计原理^[7],选取发酵液发酵时间(A)、发酵液添加量(B)、护色时间(C)3个因素为自变量,以多糖得率(Y1)和相对褐变度(Y2)为响应值,进行三因素三水平的响应面分析,得到最佳护色工艺。试验因素与水平设计见表 1。

表 1 响应面分析因素与水平

Table 1 Coded levels and corresponding actual levels of independent variables used for Box-Behnken design

水平	A 发酵时间/h	B 发酵液添加量/%	C 护色时间/h
-1	24	0.12	0.5
0	36	0.16	1
1	48	0.20	1.5

1.3.5 山药多糖的提取

将干山药片经粉碎机粉碎后过 20 目,精密称取适量处理后的干山药片,按料液比 1:60(g/mL),沸水浸提 2 h 两次,抽滤合并滤液,用 3 倍体积的 95%乙醇,醇沉过夜,沉淀物用 75%乙醇洗涤两遍后,用 50 mL 水把沉淀物洗入回流瓶中,加入 25%盐酸 15 mL,沸水回流水解 2.5 h,水解液定容至 100 mL,取 1 mL 测定多糖含量。

1.3.6 多糖含量测定

采用苯酚硫酸法测定山药多糖含量^[8-9]。

以葡萄糖标准品绘制标准曲线,以葡萄糖当量为横坐标,吸光度值为纵坐标,作回归曲线,线性回归方程为: $y=9.8656x+0.0123$, $R^2=0.999$ 。

1.3.7 相对褐变度测定

褐变度测定方法参考刘丽芳^[10],采用相对褐变度^[11]来表述山药的褐变程度。相对褐变度按下式计算:

$$\text{相对褐变度}/\% = \frac{A_{\text{护色}} \times 10}{A_{\text{空白}}} \times 100$$

式中: $A_{\text{护色}}$ 为经护色液处理后的样品按照褐变度测定方法处理后在 420 nm 下的吸光度值; $A_{\text{空白}}$ 为经清水处理后的样品按照褐变度测定方法处理后在 420 nm 下的吸光度值。

1.3.8 多酚氧化酶(polyphenol oxidase,PPO)和过氧化物酶(peroxidase,POD)活性测定

将山药块茎用清水洗净、淋干后迅速切成 2 mm 左右薄片,分别用 A:对照组(蒸馏水);B:0.1%亚硫酸

钠(含硫对照);C:发酵护色液(经由响应面分析优化所得最佳工艺)浸泡护色 1 h,参照赵喜亭等^[12]的方法提取粗酶液并测定 PPO 和 POD 酶活。

1.3.9 山药多糖免疫活性试验

1.3.9.1 RAW264.7 细胞的培养与模型的建立

参考 chen 等^[13]的方法培养 RAW264.7 细胞,略有调整。其中调整细胞密度为 1.0×10^5 个/mL 在 96 孔板每孔加入 100 μ L 的细胞悬浮液,培养 24 h 后,然后按不同组别将入 100 μ L 的梯度浓度(2 000、1 000、500、250、125、62.5、31.25 μ g/mL)的山药多糖培养液孵育 24 h,分别为空白对照组:含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基和实验组:含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中加入不同质量浓度的经由不同护色处理的山药中提取的粗多糖。其中,清水处理山药多糖组(CYH):加入从清水浸泡处理的山药中提取的粗多糖;亚硫酸钠处理山药多糖组(CYN):加入经亚硫酸钠护色处理的山药中提取的粗多糖;发酵液处理山药多糖组(CYF):加入发酵护色液护色处理的山药中提取的粗多糖。实验组加入的山药多糖均直接溶解于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基后,过 0.22 μ m 的无菌滤膜并重复 3 次。

1.3.9.2 CCK-8 法检测细胞增殖活性

参照 chen 等^[14]的方法,采用 CCK-8 法检测细胞增殖活性,其中细胞增殖率按下式计算:

$$\text{细胞增殖率}/\% = \frac{OD_{\text{实验组}}}{OD_{\text{空白对照组}}} \times 100$$

式中: $OD_{\text{实验组}}$ 为实验组在 450 nm 波长下的 OD 值; $OD_{\text{空白对照组}}$ 为空白对照组在 450 nm 下的 OD 值。

1.3.9.3 细胞因子分泌水平测定

根据 ELISA 试剂盒说明检测细胞培养基中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α ,TNF- α)、细胞白介素(interleukin,IL)-1 β 、细胞白介素(interleukin,IL)-6 的含量。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 发酵液发酵时间对山药褐变及多糖含量的影响

发酵时间对山药褐变及多糖含量的影响如图 1 所示。

由图 1 可知,随着发酵时间的延长,山药多糖的含量呈现先上升后下降,而山药的相对褐变度呈现先下降后上升。其中当发酵时间为 36 h,多糖含量最高为 12.22%,此时山药的相对褐变度为 51.43%。而在 48 h 时,相对褐变度则达到最低点为 43.81%,此时山药多糖的含量为 11.01%。综合考虑,选定 36 h 为最佳发酵

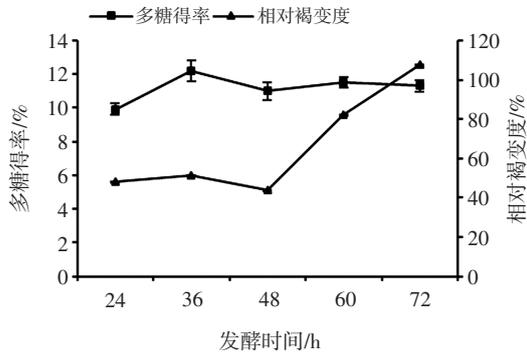


图1 发酵时间对山药褐变及多糖含量的影响

Fig.1 Effect of fermentation time on polysaccharide yield and browning index

液发酵时间。

2.1.2 发酵液添加量对山药褐变度及多糖含量的影响

发酵液添加量对山药褐变及多糖含量的影响如图2所示。

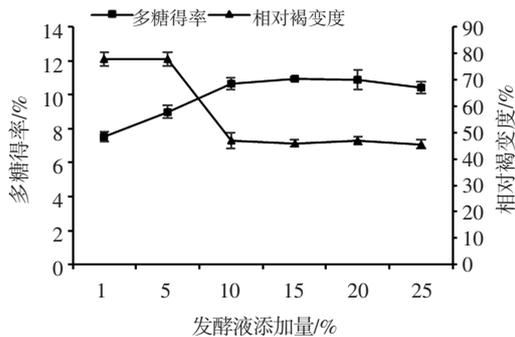


图2 发酵液添加量对山药褐变及多糖含量的影响

Fig.2 Effect of the additive amount of color-protective agent on polysaccharide yield and browning index

由图2可知,随着发酵液添加量的增加,山药多糖得率增加,当发酵液添加量为10%后,多糖含量无明显变化。而山药的相对褐变度则随着发酵液添加量增加不断下降,直至发酵液添加量为10%后,再增加发酵液的添加量,山药的相对褐变度无显著变化。当发酵液添加量为10%时,山药多糖的得率为10.63%,而相对褐变度为46.95%。综合考虑,选定最佳发酵液添加量为10%。

产乳酸芽孢杆菌的主要发酵产物为乳酸,发酵液的添加量不同,护色液的酸度等均发生变化。因此,发酵液的添加量对山药多糖的得率和相对褐变度均有影响,在一定范围内,多糖得率和护色效果均随着发酵液添加量的增加而增加。这可能是因为酸性溶液能够降低多酚氧化酶的活性,同时也能够减少氧气在酸溶液中的溶解度,能够有效减缓酶促褐变,达到护色的效果^[15]。同时,王宗军^[16]认为,多糖结构中均含有不稳定的

“H”,可能自身易被氧化,造成多糖的损失,而刘静等^[17]的研究表明护色剂在一定程度上能够起到排氧的作用,能够抑制多糖被氧化,在一定程度上,发酵液添加量越大,说明其中包含的产乳酸芽孢杆菌的发酵产物越多,排氧程度越高,因此多糖得率越多。但是当发酵液添加量增大10%,再增大发酵液添加量对山药护色及对多糖含量的影响不显著。

2.1.3 护色时间对山药褐变度及多糖含量的影响

以添加10%的发酵时间为36h的发酵液制备得到护色液为护色剂,探究不同护色时间对山药多糖的得率与山药相对褐变度的影响如图3所示。

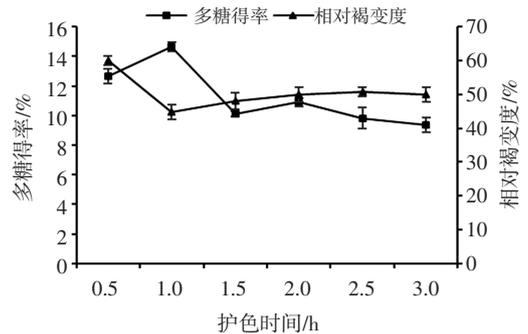


图3 护色时间对山药褐变及多糖含量的影响

Fig.3 Effect of soaking time on polysaccharide yield and browning index

由图3可知,随着护色时间的延长,山药多糖得率先增加后减少,其中护色时间为1h时,山药多糖的得率最高,但当护色时间继续延长,其多糖含量变化不明显。而山药相对褐变度则随着护色时间的延长呈现先下降后上升,当护色时间为1h时,山药的相对褐变度最低,其后延长护色试验,山药的相对褐变度变化不明显。综合考虑,选定1h为最佳护色时间。

2.2 发酵护色液制备工艺条件的优化

在单因素试验的基础上,选用响应面分析法对发酵护色液制备工艺条件进行优化选取了不同的水平进行中心组合试验,其中发酵时间、发酵液添加量和护色时间为自变量,多糖得率和相对褐变度均为响应值,试验方案设计及其结果见表2,多糖得率回归模型方差分析见表3,相对褐变度回归模型方差分析见表4。

运用 Design Expert8.0 软件对表中的试验结果进行整理分析,回归拟合,得到的回归方程预测模型如下:

$$Y1=12.69-0.21A-0.18B+0.071C-0.20AB+0.33AC+0.075BC-0.21A^2-1.40B^2-0.81C^2$$

$$Y2=+41.92-1.61A-1.20B+5.59C+0.82AB-0.63AC+7.89BC+1.96A^2+6.82B^2+13.07C^2$$

从表3可以看出,一次项中A(发酵时间)和B(发酵液添加量)对多糖得率的线性效应显著(P<0.05),

表2 响应面优化试验设计及结果

Table 2 Experimental design with experimental values of polysaccharide yield and browning index for response surface analysis

序号	因素			响应值	
	A 发酵时间	B 发酵液添加量	C 护色时间	Y1 多糖含量/%	Y2 相对褐变度/%
1	0	1	-1	10.09	48.74
2	-1	1	0	11.21	49.75
3	0	0	0	12.83	42.42
4	1	0	1	11.68	61.36
5	-1	0	-1	12.32	51.26
6	-1	0	1	11.61	65.15
7	-1	-1	0	11.23	55.56
8	0	-1	-1	10.53	65.15
9	0	-1	1	10.72	59.09
10	0	0	0	12.66	41.92
11	0	0	0	12.44	42.93
12	1	0	-1	11.08	50.00
13	0	0	0	12.64	41.16
14	0	0	0	12.89	41.16
15	0	1	1	10.58	74.24
16	1	-1	0	11.37	50.00
17	1	1	0	10.54	47.47

C(护色时间)对多糖得率的线性效应不显著($P>0.05$),二次项中, B^2 、 C^2 影响均极显著($P<0.01$), AC 影响显著($P<0.05$), AB 、 BC 、 A^2 影响不显著($P>0.05$)。此模型显著性检测 P 值小于 0.000 1, 极显著, 失拟项 P 值为 0.349 4, 不显著。模型的相关系数为 0.980 5, 调整复相关指数为 0.955 5。因此, 说明模型的拟合程度好, 试验误差小。根据 F 值大小可知, 在试验范围内各因素对多

糖得率的影响因素大小依次为 A (发酵时间) $>B$ (发酵液添加量) $>C$ (护色时间)。

从表 4 可以看出, 一次项中 C (护色时间)对相对褐变度的线性效应极显著($P<0.01$), A (发酵时间)和 B (发酵液添加量)对相对褐变度的线性效应显著($P<0.05$), 二次项中, B^2 、 C^2 、 BC 影响均极显著($P<0.01$), A^2 影响显著($P<0.05$), AB 、 AC 影响不显著($P>0.05$)。此模型显著性检测 P 值小于 0.000 1, 极显著, 失拟项 P 值为 0.053 9, 不显著。模型的相关系数为 0.990 1, 调整复相关指数为 0.979 5。因此, 说明模型的拟合程度好, 试验误差小。根据 F 值大小可知, 在试验范围内各因素对多糖得率的影响因素大小依次为 C (护色时间) $>A$ (发酵时间) $>B$ (发酵液添加量)。

通过回归模型分析可知, 以多糖得率为指标, 护色最佳工艺为, 采用发酵时间为 33.93 h 的产乳酸芽孢杆菌发酵液, 发酵液添加量为 12%, 护色时间为 0.94 h。在此条件下, 模型预测山药多糖的得率为 12.78%, 相对褐变度为 41.74%。考虑到在实际应用中操作简便, 将工艺条件修正为采用发酵时间为 34 h 的产乳酸芽孢杆菌发酵液、发酵液添加量为 10%、护色时间为 1 h; 在此条件下, 多糖得率为 12.44%, 相对褐变度为 43.05%, 实际值与理论值基本相符, 说明模型对采用产乳酸芽孢杆菌配制护色液工艺条件参数优化可靠可行, 具有一定的应用价值。

2.3 不同护色剂对山药 PPO 和 POD 活性的影响

不同护色剂对山药中 PPO 和 POD 的酶活性及护色效果的影响如图 4 所示。

表3 多糖得率回归模型方差分析

Table 3 Analysis of variance of regression model of polysaccharide yield

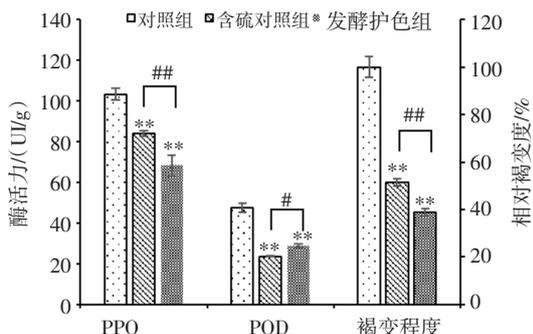
来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	13.29	9	1.48	39.18	< 0.000 1	**
A 发酵时间	0.36	1	0.36	9.59	0.017 4	*
B 发酵液添加量	0.26	1	0.26	6.78	0.035 2	*
C 护色时间	0.04	1	0.04	1.08	0.333 7	
AB	0.16	1	0.16	4.35	0.075 4	
AC	0.43	1	0.43	11.38	0.011 9	*
BC	0.02	1	0.02	0.60	0.465 0	
A ²	0.18	1	0.18	4.74	0.065 9	
B ²	8.23	1	8.23	218.51	< 0.000 1	**
C ²	2.79	1	2.79	73.94	< 0.000 1	**
残差	0.26	7	0.04			
失拟项	0.14	3	0.05	1.47	0.349 4	
误差	0.13	4	0.03			
总和	13.55	16				

注: * 表示影响显著($P<0.05$); ** 表示影响极显著($P<0.01$)。

表 4 相对褐变度回归模型方差分析
Table 4 Analysis of variance of regression model of browning index

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	1 532.00	9	170.22	86.01	< 0.000 1	**
A 发酵时间	20.73	1	20.73	10.48	0.014 3	*
B 发酵液添加量	11.51	1	11.51	5.82	0.046 7	*
C 护色时间	249.73	1	249.73	126.18	< 0.000 1	**
AB	2.69	1	2.69	1.36	0.281 5	
AC	1.59	1	1.59	0.81	0.399 3	
BC	249.10	1	249.10	125.86	< 0.000 1	**
A ²	16.13	1	16.13	8.15	0.024 5	*
B ²	195.74	1	195.74	98.90	< 0.000 1	**
C ²	719.06	1	719.06	363.33	< 0.000 1	**
残差	13.85	7	1.98			
失拟项	11.43	3	3.81	6.29	0.053 9	
误差	2.42	4	0.61			
总和	1 545.86	16				

注:*表示影响显著(P<0.05);**表示影响极显著(P<0.01)。



**表示与空白组相比差异极显著(P<0.01);#表示与试验组相比差异显著(P<0.05);##表示与试验组相比差异极显著(P<0.01)。

图 4 不同护色液对山药中的 PPO 和 POD 酶活性及山药褐变的影响
Fig.4 Effect of different color protecting on PPO and POD activity and browning index

由图 4 可知,最优的发酵护色液和传统亚硫酸钠两种护色液均能够有效抑制 PPO 和 POD 活性。其中:发酵护色液对于 PPO 的抑制效果显著优于亚硫酸钠护色液,而两种护色液护色后 POD 活性没有显著差异(P>0.05)。通过比较相对褐变度可知,亚硫酸钠护色液和发酵护色液均有明显的护色效果,其中发酵护色液的护色效果显著优于亚硫酸钠护色液。

果蔬的褐变从本质上可分为由于酚类物质在酶的作用下氧化成能聚合形成褐色物质的醌类的酶促褐变,以及其他非酶原因导致的非酶褐变两大类^[18-19]。山药中的褐变以酶促褐变为主,赵喜亭等^[20]研究表明,在山药中,褐变发生的位置与山药中的酚类物质的分布情况相同,其中 PPO、POD 和苯丙氨酸解氨酶(phenylalaninammo-nialyase, PAL)的活性与山药的褐

变度呈正相关,其相关性依次为 PPO >POD >PAL,因此 PPO 是使得山药褐变的主要因素^[21-22]。根据 Li 等^[23]研究成果表明,产乳酸芽孢杆菌的产物中包含有乳酸,其生长稳定期为 36 h~48 h,此时积累的发酵产物最多,而 48 h 时后开始进入衰亡期,采用产乳酸芽孢杆菌发酵液制备护色液,可能是因为产乳酸芽孢杆菌生长过程中的乳酸等发酵产物能够有效的减缓山药中的酶促褐变,以此达到护色效果。因此在本试验中,可能由于发酵护色液对山药中的 PPO 和 POD 具有明显的抑制效果,发酵护色液能够起到明显的护色效果,其中 PPO 与山药褐变的相关性大于 POD,所以发酵护色液的护色效果优于亚硫酸钠护色液的护色效果。

2.4 不同护色剂对山药多糖免疫活性的影响

巨噬细胞能够分泌细胞因子参与调控天然免疫防御和特异性免疫,其在机体防御、自身稳定方面都发挥着重要的作用,如直接杀伤病原微生物、抑制肿瘤细胞生长,消除凋零细胞^[24-25]。不同护色处理后的山药多糖对 RAW264.7 细胞的增殖率的影响如图 5 所示。

由图 5 可知,CYH 在质量浓度为 31.25 μg/mL~1 000.00 μg/mL 时,对细胞增殖率的影响与空白对照组相比无显著差异,说明 CYH 在该浓度下对细胞无毒,但当质量浓度提高至 2 000 μg/mL 时,细胞增殖率有明显的提高,与空白对照组相比存在显著差异(P<0.05)。而 CYN 在质量浓度为 31.25 μg/mL~2 000.00 μg/mL 时,随着多糖浓度的增加,细胞的生长反而受到了抑制,Zhao 等^[26]研究表明,硫处理会促进细胞凋亡,可能的原因是其增加了凋亡相关的基因和蛋白的表达,其中包括 Bax and caspase-8。因此当多糖的

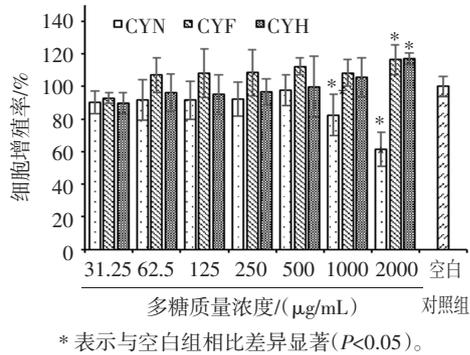


图5 不同护色处理的山药多糖对 RAW264.7 细胞增殖的影响

Fig.5 Effect of *Dioscorea opposita* Thunb polysaccharide of different color protecting on the proliferation of RAW264.7

质量浓度为 1 000 $\mu\text{g/mL}$ ~2 000 $\mu\text{g/mL}$ 时,CYN 显著抑制细胞的增殖。但 CYF 未出现这个情况,相反,CYF 随多糖的质量浓度的增加,细胞增殖率增加。其中,多糖质量浓度为 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 和 2 000 $\mu\text{g/mL}$ 时,CYF 对细胞增殖率显著高于 CYN($P<0.05$),与 CYH 的细胞增殖率相近,说明这可能是山药多糖本身促进细胞的增殖,而采用发酵护色液处理并未对多糖的细胞增殖促进作用产生影响。总体而言,不同护色处理的山药多糖对细胞增殖率的影响不同,在高浓度下(1 000 $\mu\text{g/mL}$ ~2 000 $\mu\text{g/mL}$)CYF 和 CYH 均能显著提高细胞增殖率,但是 CYN 则极显著抑制细胞增殖率,结果表明,经过亚硫酸钠处理的山药所得的山药多糖对细胞增殖具有抑制作用,但采用清水处理和采用发酵护色液处理的山药所提取到的多糖则能对 RAW264.7 的增殖有促进作用。不同护色处理的山药多糖对 RAW264.7 细胞分泌 TNF- α 的影响如图 6 所示。

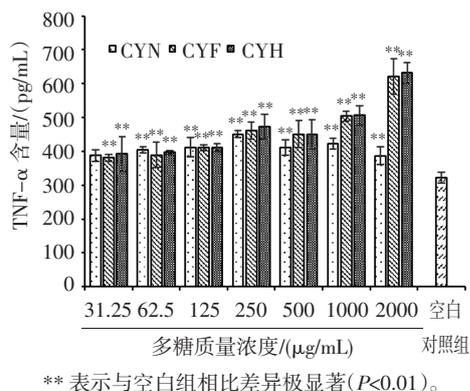


图6 不同护色处理的山药多糖对 RAW264.7 细胞分泌 TNF- α 的影响

Fig.6 Effect of *Dioscorea opposita* Thunb polysaccharide of different color protecting on TNF- α secretion of RAW264.7

由图 6 可知,相对于空白对照组,加入质量浓度为 31.25 $\mu\text{g/mL}$ ~2 000 $\mu\text{g/mL}$ 的 3 种护色处理后的山药多

糖均对 RAW264.7 细胞分泌 TNF- α 的水平有极显著影响($P<0.01$)。其中 CYN 在 31.25 $\mu\text{g/mL}$ ~2 000 $\mu\text{g/mL}$ 的质量浓度下,随之山药多糖的质量浓度的增加,RAW264.7 细胞分泌的 TNF- α 的水平呈现先增加后降低的趋势,在 250 $\mu\text{g/mL}$ 时达到最大值。而 CYF 和 CYH 在质量浓度为 31.25 $\mu\text{g/mL}$ ~2 000 $\mu\text{g/mL}$ 时,RAW264.7 细胞分泌的 TNF- α 的水平随着山药多糖的质量浓度的增加而增加。通过对比可知,3 种处理后的山药多糖均能够提高细胞分泌 TNF- α 的水平,但是 CYN 在高浓度(500 $\mu\text{g/mL}$ ~2 000 $\mu\text{g/mL}$)下对提高 RAW264.7 细胞分泌 TNF- α 的水平有所降低,但是仍然高于空白对照组,而 CYF 和 CYH 对 RAW264.7 细胞分泌 TNF- α 水平存在浓度依赖性,而且两者对于分泌水平的影响相似。通过对比可知,CYN 和 CYF 对于提高 RAW264.7 细胞分泌 TNF- α 的水平具有显著差异,CYF 对于细胞分泌 TNF- α 的提高显著优于 CYN,这可能是因为硫处理减少粗多糖的免疫调节活性可能是与其下调 MAPK 信号通路有关^[26]。不同护色处理的山药多糖对 RAW264.7 细胞分泌 IL-1 β 的影响见图 7。

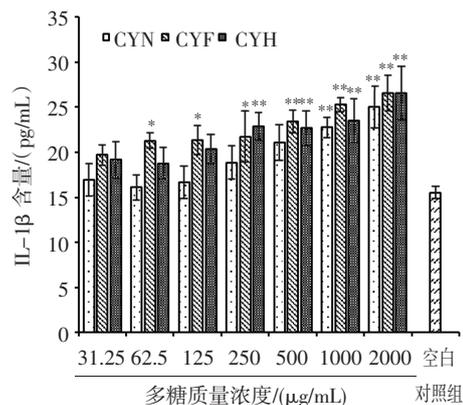


图7 不同护色处理的山药多糖对 RAW264.7 细胞分泌 IL-1 β 的影响

Fig.7 Effect of *Dioscorea opposita* Thunb polysaccharide of different color protecting on IL-1 β secretion of RAW264.7

如图 7 所示,与空白对照组相比,3 种不同护色处理后的山药多糖对小鼠 RAW264.7 细胞分泌 IL-1 β 均有促进作用。CYN 在 1 000 $\mu\text{g/mL}$ ~2 000 $\mu\text{g/mL}$ 的质量浓度下,能够极显著提高 IL-1 β 的分泌水平($P<0.01$),但在小于 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 的质量浓度下无显著影响;CYF 在 62.5 $\mu\text{g/mL}$ ~250 $\mu\text{g/mL}$ 的质量浓度下,能显著提高细胞分泌 IL-1 β 的水平($P<0.05$),在 500 $\mu\text{g/mL}$ ~2 000 $\mu\text{g/mL}$ 的质量浓度则有极显著的影

响 ($P<0.01$);CYH 在 $250\ \mu\text{g/mL}\sim 2\ 000\ \mu\text{g/mL}$ 质量浓度下,能极显著提高细胞分泌 IL- 1β 的水平 ($P<0.01$)。而在本试验浓度下,CYF 对 RAW264.7 细胞分泌 IL- 1β 水平的促进作用明显优于 CYN。

3 结论

本文提供了一种优化后的山药的非硫护色方案,与采用亚硫酸盐护色方案相比,本护色方案能够有效抑制山药的褐变,显著降低山药中 PPO 和 POD 活性,同时提高多糖得率和保护山药多糖的活性,尤其与传统含硫护色相比,采用发酵护色液处理的山药中的山药多糖的活性显著优于采用亚硫酸钠处理的,对实际生产具有一定的参考价值。

参考文献:

- [1] 王珺,李玉伟,江姜,等.微波辅助酶法优化怀山药多糖提取工艺的研究[J].食品工业科技,2018,39(11):190-193
- [2] 蒋方程,李傲然,何静仁,等.不同品种山药的营养成分分析及其水提物的体外抗氧化能力研究[J].食品工业科技,2018,39(4):6-11
- [3] 黄艳斌,李星琪,张洵,等.鲜山药片干制过程中的无硫护色剂配方优化[J].食品工业科技,2014(12):324-329
- [4] 聂凌鸿,宁正祥.山药的开发利用[J].中国野生植物资源,2002(5):17-20
- [5] 李霞,李永才,毕阳,等.响应面法优化兰州百合干无硫护色剂配方[J].食品科学,2014(4):16-20
- [6] 李宏睿,姚树林,陈云超,等.山药多糖提取工艺的优化及抗氧化活性的测定[J].安徽农业科学,2011,39(6):3322-3324
- [7] 宋佳敏,王鸿飞,孙滕,等.响应面法优化金蝉花多糖提取工艺及抗氧化活性分析[J].食品科学,2018,39(4):275-281
- [8] 曾丽萍,梁钻好,杨子银,等.银耳多糖提取优化及得率与质构相关性[J].农业工程,2016,6(5):61-64
- [9] 周帅飞,毛淑敏,秦红岩,等.银耳多糖的提取工艺研究[J].安徽农业科学,2013,41(27):11148-11149
- [10] 刘丽芳.硫熏对山药的内在质量影响及无硫护色工艺研究[D].南昌:南昌大学,2016
- [11] 许彬,李慧星,赵婷婷.柠檬酸与五种褐变抑制剂的交互作用对马铃薯护色的影响[J].中国食品添加剂,2015(3):163-169
- [12] 赵喜亭,王会珍,李明军,等.无硫护色剂对鲜切铁棍山药片酶促

褐变的影响及其 PPO 特性研究[J].食品工业科技,2008(2):125-128

- [13] Chen Z E,Wufuer R, Ji J H, et al. Structural Characterization and Immunostimulatory Activity of Polysaccharides from *Brassica rapa* L. [J]. J Agric Food Chem, 2017, 65(44):9685-9692
- [14] Chen G, Fu Y, Yang W, et al. Effects of polysaccharides from the base of *Flammulina Velutipes* stipe on growth of murine RAW264. 7, B16F10 and L929 cells[J]. International journal of biological macromolecules, 2018, 107:2150-2156
- [15] 邹波.果蔬加工过程中的褐变及护色措施[J].黔东南民族职业技术学院学报(综合版),2008(3):23-25
- [16] 王宗君.茶树菇多糖提取与抗氧化性研究[D].南宁:广西大学,2007
- [17] 刘静,李晓英.护色处理对干制茶树菇品质的影响[J].安徽农学通报,2018(12):15-17
- [18] 高海生.果蔬加工过程中褐变及其控制措施的研究进展[J].河北科技师范学院学报,2013,27(4):1-7
- [19] 连毅,李燕.果蔬褐变及其影响因素研究进展[J].食品与药品,2006(10):32-36
- [20] 赵喜亭,王会珍,赵月丽,等.铁棍山药褐变特性研究[J].河南农业科学,2009(7):94-97
- [21] 郁志芳,彭贵霞,夏志华,等.鲜切山药酶促褐变机理的研究[J].食品科学,2003(5):44-49
- [22] 范文广.鲜切山药褐变控制技术研究[D].济南:山东农业大学,2009
- [23] Li P, Tian W, Jiang Z, et al. Genomic characterization and probiotic potency of *Bacillus* sp. DU-106, a highly effective producer of L-lactic acid isolated from fermented yogurt[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9:2216
- [24] Sun H, Zhang J, Chen F, et al. Activation of RAW264.7 macrophages by the polysaccharide from the roots of *Actinidia eriantha* and its molecular mechanisms[J]. Carbohydrate polymers, 2015, 121: 388-402
- [25] Ren Z, Qin T, Qiu F, et al. Immunomodulatory effects of hydrox-yethylated *Herichium erinaceus* polysaccharide on macrophages RAW264.7[J]. International journal of biological macromolecules, 2017, 105:879-885
- [26] Zhao J, Zheng C, Wei H, et al. Proapoptotic and immunotoxic effects of sulfur-fumigated polysaccharides from *Smilax glabra* Roxb. in RAW264.7 cells[J]. Chemico-Biological Interactions, 2018, 292: 84-93

收稿日期:2018-11-14