

不同大麦多酚的抗氧化及降脂能力差异研究

雷月馨,程张晨,陈瑾,贺禹丰,肖香

江苏大学 食品与生物工程学院,江苏 镇江 212013

摘要: 分别采用微生物(植物乳植杆菌 dy-1)发酵和酶法(硫酸酯酶)水解制备大麦多酚,解析其酚类化合物组分,并从抗氧化及降脂能力两方面研究不同酚类化合物组分对大麦多酚生物活性的影响。结果表明:酶解大麦多酚和发酵大麦多酚的总酚含量分别为 78.35 μg GAE/mL 和 146.56 μg GAE/mL。在这两种大麦多酚中,香草醛、苯甲酸、2,4-二羟基苯甲酸、表儿茶素和水杨酸等组分的绝对含量存在显著差异。在总酚含量相同的条件下,香草醛、绿原酸和没食子酸是酶解大麦多酚的特征组分,而苯甲酸、3,4-二甲氧基苯甲酸和表儿茶素是发酵大麦多酚的特征组分。相较于酶解大麦多酚,发酵大麦多酚的 DPPH 和 ABTS⁺ 自由基清除率分别提高了 36.8% 和 13.3%。在 20 μg GAE/mL 总酚含量下,发酵大麦多酚和酶解大麦多酚均能有效减少秀丽隐杆线虫体内的脂肪累积,并使甘油三酯(TG)含量分别降低了 23.3% 和 27.9%。此外,两种大麦多酚均能促进秀丽隐杆线虫的运动行为,加速其脂质消耗,并通过抑制 SBP-1 信号通路的异常激活发挥降脂作用,其中酶解大麦多酚对胰岛素/胰岛素样生长因子信号通路的抑制更加显著($P<0.05$)。因此,在总酚含量相同的条件下,大麦多酚的组分差异显著影响其抗氧化和降脂能力。

关键词: 微生物发酵;酶法水解;大麦多酚;抗氧化能力;降脂能力;秀丽隐杆线虫

中图分类号: TS201.4 **文献标识码:** A

0 引言

大麦是我国重要的粮食作物,富含膳食纤维、多酚、维生素等生物活性物质,符合现代人群的饮食营养需求。临床研究^[1-2]表明,长期摄入大麦可有效改善糖尿病、代谢综合征患者的疾病表型。大麦多酚是指大麦中具有若干酚性羟基结构的植物成分的总称,主要包括酚酸和黄酮两类化合物,以结合态或游离态两种形式存在于籽粒中,是大麦类

食物发挥健康效应的重要物质基础^[3]。大麦多酚的生物学功效与其分子结构、存在形式等密切相关,例如,大麦中黄烷醇比阿魏酸具有更强的抗氧化能力^[4]。相较于结合态多酚,大麦游离态多酚的抗氧化能力更为突出^[5]。在日常饮食中,多酚类化合物通常以混合物的形式被人体摄入,而多酚混合物的生物学功效不仅与总酚含量有关,还受酚类化合物组分的影响。然而,现有研究主要关注食物中总酚、结合态/游离态多酚的生物学功效,很少研究

收稿日期:2024-09-14;修回日期:2024-11-28

基金项目:江苏省重点研发计划项目(BE2022053);国家自然科学基金青年科学基金项目(32302047);中国博士后科学基金面上项目(2023M731378);镇江市创新能力建设计划—学科类重点实验室建设项目(SS2024005)

作者简介:雷月馨(2000—),女,四川省成都市人,江苏大学硕士研究生,主要研究方向为食品营养与健康。E-mail:leiyuexin181@163.com

通信作者:肖香(1980—),女,江苏省镇江市人,江苏大学教授,博士,主要研究方向为食品营养与健康。E-mail:xiaoxiang1@aliyun.com

组分模式对多酚生物学功效的影响^[6-8]。因此,在总酚含量一致的条件下,比较不同大麦多酚的生物学功效,更符合精准营养的指导原则。

微生物发酵和酶法水解是大麦膳食纤维(Raw Barley Dietary Fiber, RBDF)生物加工的两种主要方法。研究^[9]表明,相较于酵母发酵处理,酶法处理能够更高效地促进苦荞多酚释放。在实际生产中,微生物发酵工艺成本更低,因此应用范围更广。前期研究^[10]发现,植物乳植杆菌 dy-1 (*Lactiplantibacillus plantarum* dy-1)可促进 RBDF 中结合态多酚转化为游离态多酚,而利用植物乳植杆菌 dy-1 编码的硫酸酯酶对 RBDF 进行酶解,同样得到类似的结果^[11]。基于此,本研究拟分别采用微生物发酵和酶法水解对 RBDF 进行处理,基于高效液相色谱技术,明确所制备大麦多酚混合物的组分特征,并评估其抗氧化及降脂能力,以期为大麦功能性组分的开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

大麦粗麸,江苏瑞牧生物科技有限公司;植物乳植杆菌 dy-1(菌株编号 CGMCC NO. 6016)由江苏大学实验室自行分离保藏;N2 野生型秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*)、大肠杆菌 OP50 菌株,均保存于江苏大学实验室;耐高温 α -淀粉酶(2100 U/mL)、糖化酶(100000 U/mL),上海源叶生物有限公司;碱性蛋白酶(2.4 AU/mL),诺维信生物技术有限公司;纯化硫酸酯酶(1000 U/mg),江苏大学实验室制备;绿原酸、香豆酸、没食子酸、咖啡酸、阿魏酸、水杨酸等酚酸标准品,美国 Sigma-Aldrich 公司;醋酸、醋酸钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、过二硫酸钾、 H_2O_2 溶液、 $FeSO_4$ 、福林酚试剂、葡萄糖、叠氮化钠、正己烷、乙醇、盐酸、乙酸乙酯、异丙醇,均为分析纯,甲醇、乙腈、甲酸,均为色谱纯,国药集团化学试剂有限公司;MRS 培养基,青岛高科技工业园海博生物技术有限公司;NGM 培养基,山东拓普生物工程有 限 公 司;2,2'-联氮-双二(3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS),上海麦克林生化科技股份有限公司;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼

(DPPH),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;总抗氧化(FRAP)能力检测试剂盒,上海碧云天生物科技股份有限公司;甘油三酯(TG)试剂盒,南京建成生物科技股份有限公司;油红 O 染色液,上海生工生物有限公司;反转录试剂盒 PrimeScriptTM RT reagent Kit、实时荧光定量 PCR 试剂盒 SYBR[®] Premix Ex TaqTM,日本 Takara 公司。

1.2 主要仪器与设备

LC-20AD 型高效液相色谱仪,日本岛津株式会社;ZORBAX SB-AQ 型色谱柱,美国安捷伦公司;ZQTY-70 N 型摇床,上海知楚仪器有限公司;HWS-26 型电热恒温水浴锅,上海安普实验科技股份有限公司;LRH-250 型生化培养箱,上海一恒仪器有限公司;FD-8 型冷冻干燥机,北京博医康有限公司;5430R 型台式高速离心机,德国 Eppendorf 公司;DW-86 L 型超低温冰箱,青岛海尔集团;B040234 型酶标仪,美国 Thermo Scientific 公司;SW-CJ-1D 型超净工作台,苏州净化设备有限公司;LDZH-100 L 型灭菌锅,上海三申医疗器械有限公司;CFX96 型荧光定量 PCR 仪,美国 BIO-RAD 公司;85-2 控温磁力搅拌器,江苏金怡仪器科技有限公司;旋转蒸发器,上海申生科技有限公司;Ci-S 型正置显微镜,日本尼康仪器公司。

1.3 实验方法

1.3.1 不同大麦多酚制备 1)脱脂大麦麸皮制备。参考 X. W. Zhang 等^[12]的方法,将大麦粗麸进行除杂处理,过 30 目筛后得到大麦麸皮,于-20℃超低温冰箱中保存,备用;将大麦麸皮和正己烷按照 $m(\text{大麦麸皮/g}):V(\text{正己烷/mL})=1:5$ 混合,振荡脱脂 3 h 后抽滤,保留大麦麸皮残渣,重复上述操作 3 次;将大麦麸皮残渣和蒸馏水按照 $m(\text{大麦麸皮残渣/g}):V(\text{水/mL})=1:10$ 混合,于 95℃条件下水浴 10 min,用 0.1 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液调节 pH 值至 6.5;加入体积分数为 0.3%的耐高温 α -淀粉酶,于 95℃条件下搅拌 20 min,冷却至室温,用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液调节 pH 值至 7.5;再加入体积分数为 0.5%的碱性蛋白酶,于 60℃条件下搅拌 60 min,冷却至室温,用 0.1 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液调节 pH 值至 4.5;最后加入体积分数为

0.2%的糖化酶,于60℃条件下搅拌30 min,即得脱脂大麦麸皮。

2) RBDF 制备。将脱脂大麦麸皮置于沸水浴中煮沸8 min以灭酶,冷却至室温,于8000 r/min条件下离心15 min,弃去上清液,用体积分数为80%的乙醇溶液多次洗涤沉淀,以除去其中的游离态多酚;继续用蒸馏水反复洗涤沉淀至中性,冷冻干燥后研磨,过80目筛,得到只含结合态多酚的RBDF,于-20℃超低温冰箱保存,备用。

3) 发酵大麦膳食纤维(Fermented Barley Dietary Fiber, FBDF) 制备。参考课题组前期研究^[13]方法,将植物乳植杆菌dy-1、RBDF和水按照 $V(\text{植物乳植杆菌 dy-1/mL}) : m(\text{RBDF/g}) : V(\text{水/mL}) = 1:4:28$ 混匀,于31℃、220 r/min条件下发酵24 h后,再于80℃灭菌10 min,冷冻干燥后研磨,过80目筛,即得FBDF,于-20℃超低温冰箱保存,备用。

4) 酶解大麦膳食纤维(Enzymatic Hydrolysis Dietary Fiber, EBDF) 制备。参考课题组前期研究^[11]方法,将10 g RBDF与0.4 g纯化硫酸酯酶混合,用磷酸盐缓冲液(50 mmol/L, pH值为7.0)定容至100 mL,混匀,于40℃条件下水浴酶解8 h,煮沸灭活10 min,冷冻干燥后研磨,过80目筛,即得EBDF,于-20℃超低温冰箱保存,备用。

5) 大麦多酚提取。参考课题组前期研究^[14]方法,称取100 mg FBDF或EBDF,加入3 mL 200 mmol/L的HCl溶液,振荡涡旋至全部悬浮;然后加入5 mL乙酸乙酯进行萃取,于4000 r/min条件下离心10 min,收集乙酸乙酯层溶液至圆底烧瓶中,重复萃取2次;将圆底烧瓶中的溶液在40℃条件下旋蒸至干,加入1 mL甲醇,超声溶解后,分别制得发酵大麦多酚和酶解大麦多酚,于-80℃超低温冰箱保存,备用。

1.3.2 总酚含量测定 采用Folin-Ciocalteu法^[15]测定大麦多酚的总酚含量,并通过没食子酸校准曲线进行定量,结果以没食子酸当量($\mu\text{g GAE/mL}$)表示。

1.3.3 酚类化合物组成及含量测定 取0.5 mL大麦多酚,经0.22 μm 有机相滤膜过滤后,利用高效液相色谱仪对酚类化合物的组成及含量进行测定。

色谱条件如下:ZORBAX SB-AQ型色谱柱(250 mm×4.6 mm×5 mm),配备紫外检测器,检测波长范围为200~400 nm;流动相A为含0.1%甲酸的水溶液,流动相B为纯乙腈;流速为1 mL/min,进样量为20 μL ,柱温为30℃。流动相梯度程序设置为:0~10 min,3%乙腈;10~20 min,3%~80%乙腈;20~30 min,80%~3%乙腈;30~35 min,3%乙腈。

1.3.4 抗氧化能力测定 1) DPPH自由基清除率测定。参考高超^[16]的方法,将0.2 mmol/L DPPH-乙醇溶液稀释,制备DPPH工作液,使其在波长517 nm处的吸光度为0.5~0.6;取10 μL 大麦多酚溶液(总酚含量为3 $\mu\text{g GAE/mL}$,下同)于96孔板中,加入190 μL DPPH工作液后摇匀,室温下避光反应30 min,于517 nm处测定吸光度。

$$\text{DPPH 自由基清除率} = \left(1 - \frac{A - A_0}{A_1}\right) \times 100\%$$

式中, A 为加入待测液后DPPH的吸光度, A_0 为待测液的吸光度, A_1 为未加待测液时DPPH的吸光度。

2) ABTS⁺自由基清除率测定。参考赵甜甜等^[17]的方法,首先将5 mL 7 mmol/L ABTS溶液与88 μL 140 mmol/L过二硫酸钾溶液混匀后,室温避光反应12~16 h,制备ABTS⁺储备液;然后用无水乙醇稀释ABTS⁺储备液制备ABTS⁺工作液,确保其在734 nm处的吸光度为0.70±0.02;取20 μL 大麦多酚溶液于酶标板中,加入180 μL ABTS⁺工作液后摇匀,在室温下避光反应30 min,于734 nm处测定吸光度。

$$\text{ABTS}^+ \text{ 自由基清除率} = \left(1 - \frac{B - B_0}{B_1}\right) \times 100\%$$

式中, B 为加入待测液后ABTS⁺的吸光度, B_0 为待测液的吸光度, B_1 为未加待测液时ABTS⁺的吸光度。

3) ·OH自由基清除率测定。参考谭翠^[18]的方法,将1 mL大麦多酚溶液、2 mL 1.8 mmol/L FeSO₄溶液、1.5 mL 1.8 mmol/L水杨酸溶液和0.1 mL体积分数为0.3%的H₂O₂溶液混合均匀,在37℃条件下反应30 min,于510 nm处测定吸光度。

$$\cdot\text{OH 自由基清除率} = \left(1 - \frac{C - C_0}{C_1}\right) \times 100\%$$

式中, C 为加入待测液后 $\cdot\text{OH}$ 的吸光度, C_0 为无 H_2O_2 的空白吸光度, C_1 为未加待测液时反应液的吸光度。

4) 总抗氧化(FRAP)能力测定。根据 FRAP 能力检测试剂盒说明书,主要步骤如下:在 96 孔板中依次加入 180 μL 新配制的 FRAP 工作液,再加入 5 μL 不同浓度(0.15 mmol/L、0.3 mmol/L、0.6 mmol/L、0.9 mmol/L、1.2 mmol/L 和 11.5 mmol/L)的 FeSO_4 标准溶液或 5 μL 大麦多酚溶液,于 37 $^\circ\text{C}$ 条件下反应 5 min,于 593 nm 处测定吸光度。结果以 FeSO_4 的浓度表示。

1.3.5 线虫高脂模型建立与实验分组 将秀丽隐杆线虫($n=30$,下同)与 80 μL 大肠杆菌 OP50 菌液、20 μL M9 缓冲液(用于代替大麦多酚)混合后,涂布于 NGM 培养基中,培养 48 h,作为对照组。将秀丽隐杆线虫与 80 μL 大肠杆菌 OP50 菌液、20 μL M9 缓冲液(用于代替大麦多酚)混合后,涂布于高糖 NGM 培养基(含 50 mol/L 葡萄糖)中,培养 48 h,作为模型组。将秀丽隐杆线虫与 80 μL 大肠杆菌 OP50 菌液、20 μL 酶解大麦多酚或发酵大麦多酚(总酚含量分别为 10 μg GAE/mL、20 μg GAE/mL 和 40 μg GAE/mL)混合后,涂布于高糖 NGM 培养基中,培养 48 h,作为酶解组或发酵组。

1.3.6 线虫安全剂量测定 秀丽隐杆线虫作为一种经典的模式生物,其脂肪代谢途径较哺乳动物保守,因此被广泛用于脂质代谢的相关研究^[19]。由于秀丽隐杆线虫培养方式的特殊性,目前无法做到对其个体进行精确定量给药,导致其经常暴露于过量受试物环境中。因此,在评价受试物的生物学功效之前,需要先测定其安全剂量^[20]。使用 M9 缓冲液(含有终浓度为 0.5 mol/L 的叠氮化钠)对秀丽隐杆线虫进行重悬浮,待其因麻醉而身体僵直后,通过正置显微镜对其进行拍照,并利用 Image J 软件测定其体长和体宽,以确定大麦多酚对其作用的安全剂量。

1.3.7 秀丽隐杆线虫体内脂肪累积及 TG 含量测定 1) 脂肪累积测定。将对照组、模型组、酶解组或发酵组的秀丽隐杆线虫用 M9 缓冲液清洗后,用体积分数为 60%的异丙醇溶液对线虫进行脱水固

定,将固定后的线虫置于油红 O 染色液中,避光染色 1 h 后,用 M9 缓冲液清洗线虫,去除多余染色液,通过正置显微镜观察秀丽隐杆线虫的染色结果,并利用 Image J 软件对染色图像进行光密度分析。

2) TG 含量测定。将对照组、模型组、酶解组或发酵组的秀丽隐杆线虫培养 48 h 后,用 M9 缓冲液洗涤 3 次,将洗涤后的线虫转移至离心管中,加入适量 M9 缓冲液,对秀丽隐杆线虫进行超声破碎后离心,待溶液中观察不到明显虫体后,测定 TG 含量。

1.3.8 线虫运动行为测定 选取对照组、模型组、酶解组或发酵组的秀丽隐杆线虫,转移至新的 NGM 培养基中,待其适应并状态稳定后,在正置显微镜下观察各组线虫的运动行为,包括头部摆动频率(1 min 内头部往复摆动的次数)和身体弯曲频率(1 min 内虫体弯曲的次数)。

1.3.9 mRNA 提取及 RT-qPCR 检测 选取对照组、模型组、酶解组或发酵组的秀丽隐杆线虫,使用三级水清洗残留的大肠杆菌后,加入 1 mL Trizol 试剂,经超声破碎虫体,在冰上提取线虫体内的 RNA。按照试剂盒说明书,将提取的 RNA 反转录为 cDNA,并以该 cDNA 为模板,进行实时荧光定量 PCR 操作,检测秀丽隐杆线虫脂肪代谢相关基因表达水平的变化。

PCR 引物由上海生工生物有限公司合成,使用 $\Delta\Delta\text{CT}$ 阈值循环方法进行数据处理,其他基因的表达量以 *act-1* 为内参来表示。引物序列见表 1。

1.4 数据处理

利用 GraphPad Prism 9.5 软件对实验数据进行统计学分析及可视化处理。采用皮尔森相关性系数进行相关性分析。实验结果以(平均值 $\pm$ 标准差)

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

基因	正向引物序列(5' to 3')	反向引物序列(5' to 3')
<i>act-1</i>	TCGGTATGGGACAGAAGGAC	CATCCCAGTTGGTGACGATA
<i>fat-5</i>	CGCTCATATGGGATGCTTGT	CAGGGCGAAGCAGAAGATT
<i>fat-6</i>	GCCCAGAGACGCAATATCTC	CAGCAAAGAGAGCCACGTTA
<i>fat-7</i>	CAACAGCGCTGCTCACTATT	CACCAACGGCTACAACCTGTG
<i>daf-16</i>	CCAGACGGAAGGCTTAAACT	ATTCGCATGAAACGAGAATG
<i>mdt-15</i>	TAAATCAGCGGCAGTGCCTT	CCGGAGTGTTCCTGCTGTC
<i>daf-2</i>	TGGATCTCCATCGCGAAACG	TTTTGGGGGTTTCAGACAAGT
<i>sbp-1</i>	GGCGGCGAAGATTGTGATTTC	CGCTCGGTTTTTGCTCTTCG

表示,通过单因素方差分析比较多组数据之间的平均值,并结合 Tukey 方法进行多重比较检验,组间显著性差异用 * 表示 (* 为 $P<0.05$, ** 为 $P<0.01$, *** 为 $P<0.001$, **** 为 $P<0.0001$)。

2 结果与分析

2.1 不同大麦多酚总酚含量分析

大麦多酚通常以共价或非共价的形式与膳食纤维结合^[21]。利用植物乳植杆菌 dy-1 和硫酸酯酶对大麦膳食纤维进行处理,可将结合态多酚转化为游离态多酚,从而提高多酚的提取效率。发酵大麦多酚的总酚含量 (146.56 ± 4.52) $\mu\text{g GAE/mL}$ 显著高于酶解大麦多酚 (78.35 ± 0.94) $\mu\text{g GAE/mL}$)。不同于单一硫酸酯酶处理,发酵过程中可能存在糖苷水解酶、酯酶、果胶酶、木聚糖酶、酚氧化酶等多种生物酶的共同作用,促进了结合态多酚的释放,进而提高了总酚含量。

2.2 不同大麦多酚酚类化合物组成及含量分析

不同大麦多酚的酚类化合物组成及含量如图 1 所示。由图 1 可知,在大麦多酚中共检测到 14 种酚类化合物,其中,酶解大麦多酚中香草醛、2,4-二羟基苯甲酸、香豆酸、丁香酸和水杨酸的含量较高,发酵大麦多酚中 2,4-二羟基苯甲酸、3,4-二甲氧基苯甲酸、苯甲酸、香豆酸、丁香酸和水杨酸的含量较高;其中,香草醛和苯甲酸在两种大麦

多酚中的含量差异最为显著。这表明不同的生物加工方式不仅会影响结合态多酚的释放效率,还会影响酚类化合物的组成及含量。这种现象可能与生物加工过程中酶的差异有关。研究^[22-23]表明,植物乳植杆菌 dy-1 不仅编码硫酸酯酶,还编码 158 种糖苷水解酶。这些糖苷水解酶能够进一步改变大麦膳食纤维(如 β -葡聚糖等)的微观结构,并降低其相对分子质量,进而促进结合态多酚转变为游离态多酚。

2.3 不同大麦多酚酚类化合物组分差异分析

基于总酚含量的检测结果,对两种大麦多酚进行适当稀释,使其总酚含量相同,均为 3 $\mu\text{g GAE/mL}$ 。在此条件下,计算两种大麦多酚中各酚类化合物,即酚类化合物组分的相对丰度,结果如图 2 所示。由图 2 可知,在两种大麦多酚中,丁香酸、水杨酸、2,4-二羟基苯甲酸、咖啡酸、原儿茶酸、阿魏酸和儿茶素的相对丰度类似;酶解大麦多酚中含有更多的香草醛、绿原酸和没食子酸,而发酵大麦多酚中含有更多的苯甲酸、3,4-二甲氧基苯甲酸和表儿茶素。类比食物中蛋白质的质量评价,除考查蛋白质总量外,还需评估蛋白质的氨基酸评分;同样,对于食物中多酚的质量评价,除考查多酚总量外,还需要考虑其酚类化合物的组分特征。目前,对于总酚含量相同但组分不同的大麦多酚的生物学功效的研究较有限,因此,下文将进一步考查这两种大麦多酚的抗氧化及降脂能力差异。

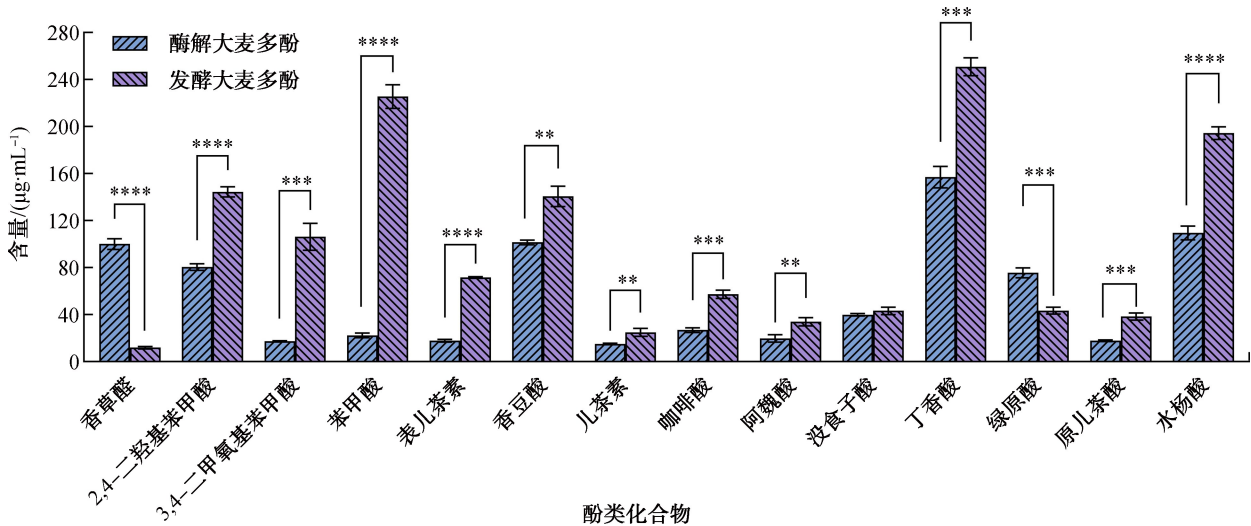


图 1 不同大麦多酚的酚类化合物组成及含量

Fig. 1 Composition and content analysis of different-treated barley polyphenols

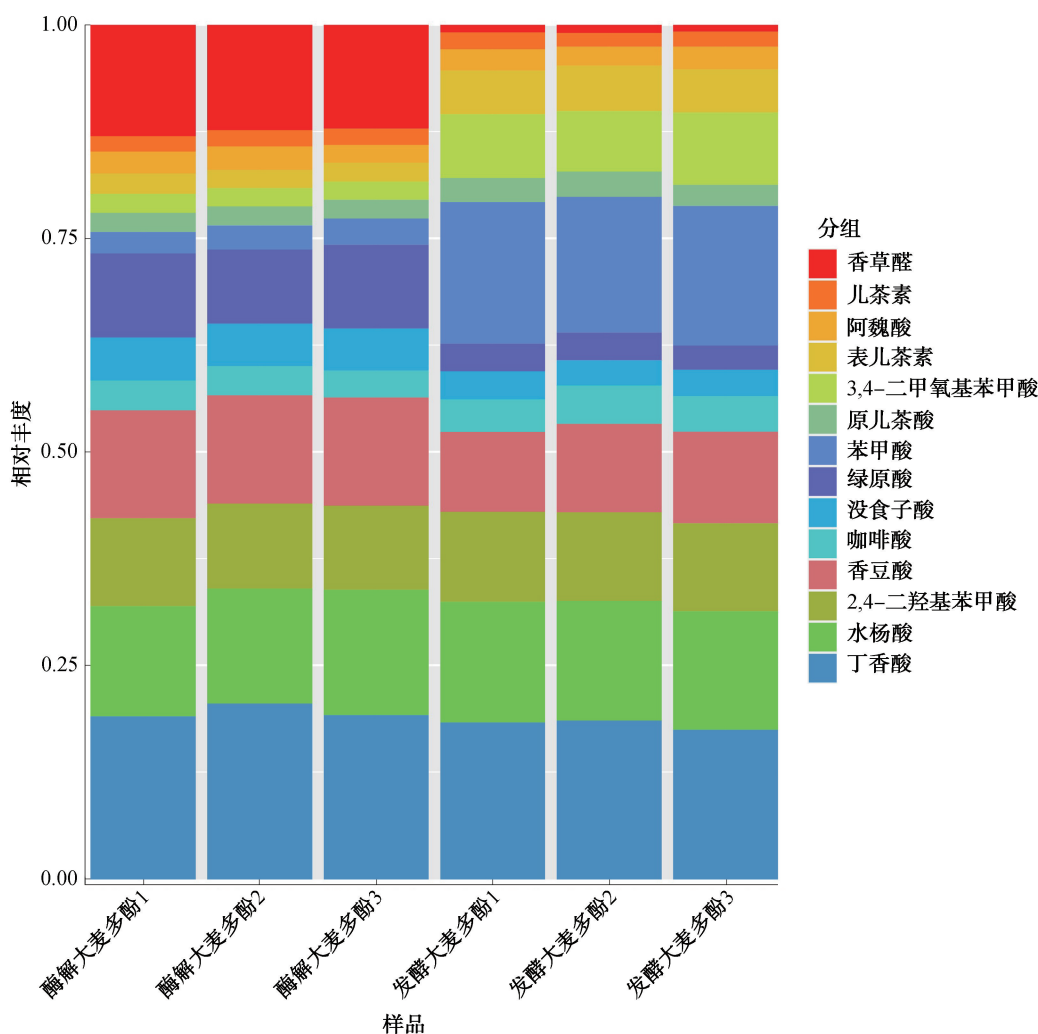


图 2 不同大麦多酚的酚类化合物组分

Fig. 2 Composition patterns analysis of different-treated barley polyphenols

2.4 不同大麦多酚抗氧化能力分析

酚类化合物的抗氧化能力与其自由基清除能力密切相关^[24]。在总酚含量相同的条件下,不同大麦多酚的抗氧化能力如图 3 所示。由图 3 可知,与酶解大麦多酚相比,发酵大麦多酚的 DPPH 和 ABTS⁺ 自由基清除率分别提高了 36.8% 和 13.3%,但其 ·OH 自由基清除能力较差。两种大麦多酚的总抗氧化能力无显著差异。总体而言,发酵大麦多酚的自由基清除能力更强,因此具备更出色的抗氧化潜力。将不同酚类化合物相对丰度与大麦多酚的自由基清除能力进行相关性分析,结果表明,苯甲酸、3,4-二甲氧基苯甲酸和表儿茶素的相对丰度与 DPPH、ABTS⁺ 自由基清除率呈显著正相关;香豆酸、香草醛、绿原酸和没食子酸的相对丰度与 ·OH 自由基清除率呈显著正相关。谢宁轩等^[25] 研究发

现,发酵青稞多酚的苯甲酸和表儿茶素含量显著提高,并表现出更强的 DPPH、ABTS⁺ 自由基清除能力和 FRAP 铁还原能力。唐双庆等^[26] 研究发现,发酵豆类提取物中的表儿茶素含量与 DPPH 自由基清除率呈正相关,而香草酸含量与 DPPH、ABTS⁺ 自由基清除率的相关性较低。这些结果说明,发酵大麦多酚中较高的苯甲酸和表儿茶素相对丰度可能是其自由基清除能力更强的重要原因。然而,目前尚缺乏对大麦中香草醛、香豆酸、没食子酸、苯甲酸、3,4-二甲氧基苯甲酸、表儿茶素等酚类化合物抗氧化能力的直接比较研究。因此,以上推测仍需进一步验证。此外,由于大麦多酚是由多种酚类化合物组成的混合体系,应进一步考虑不同酚类化合物分子间的相互作用对混合体系抗氧化能力产生的潜在影响。

2.5 不同大麦多酚对秀丽隐杆线虫脂质累积的影响

2.5.1 不同大麦多酚的秀丽隐杆线虫安全剂量分析 研究^[27-28]表明,多酚不仅具有抗氧化作用,还能调节脂质代谢。不同大麦多酚对秀丽隐杆线虫体长和体宽的影响如图 4 所示。由图 4 可知,在 40 $\mu\text{g GAE/mL}$ 总酚含量下,两种大麦多酚均导致秀丽隐杆线虫体长和体宽降低,而在 10 $\mu\text{g GAE/mL}$ 和 20 $\mu\text{g GAE/mL}$ 总酚含量下,两种大麦多酚对秀丽隐杆线虫体长和体宽均未产生显著影响。因此,对于秀丽隐杆线虫个体发育,总酚含量不高于 20 $\mu\text{g GAE/mL}$ 的剂量范围是安全的。此外,在同一质量浓度下,两种大麦多酚对线虫体长和体宽的影响无显著差异,表明不同大麦多酚对秀丽隐杆线虫个体发育的影响与其酚类化合物组分差异相关性不大。

2.5.2 不同组分大麦多酚对秀丽隐杆线虫脂质累积的影响 在安全剂量范围内,使用较高的大麦多酚总酚含量(20 $\mu\text{g GAE/mL}$),以期获得更好的减脂效果。油红 O 染色液可将秀丽隐杆线虫体内的脂滴染成红色,从而直观反映脂肪累积情况^[29]。不同大麦多酚对秀丽隐杆线虫脂肪累积的影响如图 5 所示。由图 5 可知,模型组秀丽隐杆线虫体内红色区域颜色加深且面积显著增大,表明脂肪累积显著增加。与模型组相比,两种大麦多酚均能有效减少秀丽隐杆线虫体内的脂肪累积,但两者之间的减脂效果无显著性差异。

通过测定秀丽隐杆线虫体内 TG 含量,能够定量分析其体内的脂质水平。不同大麦多酚对秀丽隐杆线虫 TG 含量的影响如图 6 所示。由图 6 可知,模型组秀丽隐杆线虫体内 TG 含量显著高于对照组,而酶解大麦多酚和发酵大麦多酚分别使秀丽

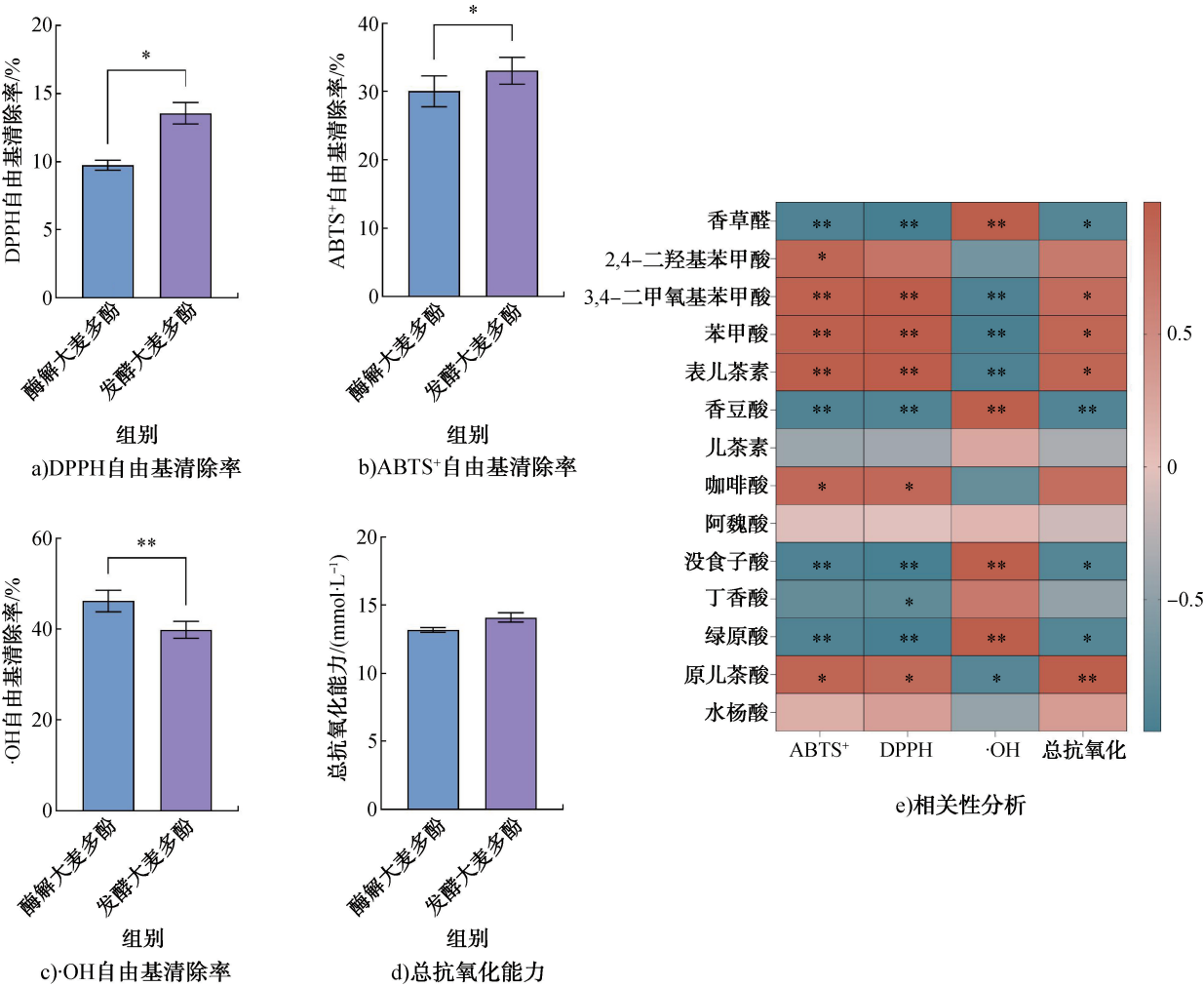


图 3 不同大麦多酚的抗氧化能力及相关性分析

Fig. 3 The antioxidant capacities of different-treated barley polyphenols and correlation analysis

隐杆线虫体内 TG 含量降低了 27.9%和 23.3%。酶解组与发酵组秀丽隐杆线虫体内的 TG 含量无显著差异,这一结果与上文油红 O 染色结果一致。郭鑫^[30]研究了生育酚和芝麻酚在不同条件下对秀丽隐杆线虫脂质累积的影响,发现芝麻酚的降脂效果优于生育酚。这表明不同组分的多酚混合物可能具有不同的降脂功效。尽管本研究中所制备的酶解大麦多酚与发酵大麦多酚的降脂效果相似,其作用机制可能存在差异,仍需进一步研究以阐明其具体调控途径。

2.5.3 不同大麦多酚对秀丽隐杆线虫运动行为的

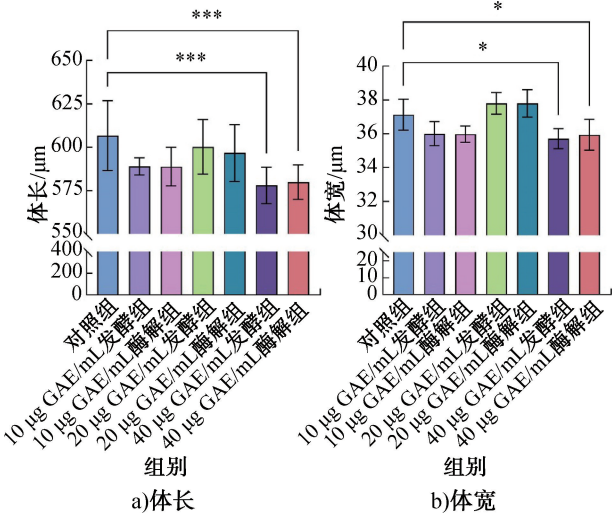


图 4 不同大麦多酚对秀丽隐杆线虫体长和体宽的影响

Fig. 4 The effects of different-treated barley polyphenols on the length and width of *C. elegans*

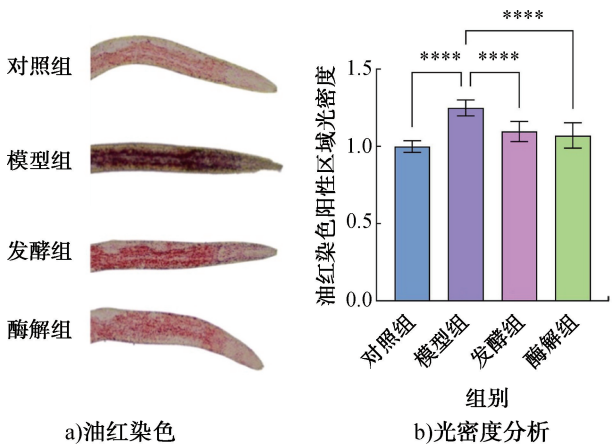


图 5 不同大麦多酚对秀丽隐杆线虫脂肪累积的影响

Fig. 5 The effects of different-treated barley polyphenols on lipid droplet accumulation in *C. elegans*

影响 为了进一步分析不同大麦多酚的潜在降脂途径,本研究考查了不同大麦多酚对秀丽隐杆线虫运动行为的影响,结果如图 7 所示。由图 7 可知,相较于对照组,模型组秀丽隐杆线虫的头部摆动频率和身体弯曲频率均显著降低,表明高脂条件下秀丽隐杆线虫的运动行为受到抑制。经两种大麦多酚处理后,秀丽隐杆线虫的头部摆动频率和身体弯曲频率均得到显著恢复。秀丽隐杆线虫的运动频率与其脂肪消耗速度密切相关,提高运动频率可促进脂肪消耗,从而减少脂质累积^[31]。因此,两种大麦多酚可

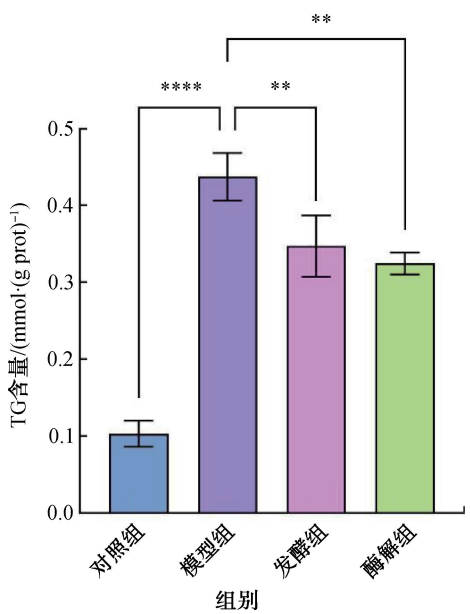


图 6 不同大麦多酚对秀丽隐杆线虫 TG 含量的影响

Fig. 6 Effects of different-treated barley polyphenols on TG content in *C. elegans*

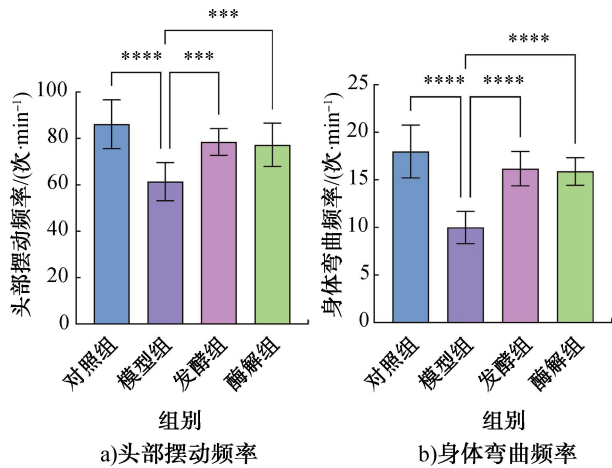


图 7 不同大麦多酚对秀丽隐杆线虫运动行为的影响

Fig. 7 Effects of different-treated barley polyphenols on the movement behavior of *C. elegans*

通过增强秀丽隐杆线虫的运动行为,促进其脂肪消耗,从而减少脂质累积。

2.5.4 不同大麦多酚对秀丽隐杆线虫脂质代谢的影响 秀丽隐杆线虫的脂质累积受脂质代谢的调控,其体内参与脂肪氧化、合成和分解的基因多达

数百个^[32]。分析这些基因的相对表达量变化,有助于寻找关键的脂质代谢通路。基于 RT-qPCR 技术,分析了不同处理组秀丽隐杆线虫体内关键脂质代谢基因(*fat-5*、*fat-6*、*fat-7*、*sbp-1*、*mdt-15*、*daf-2* 和 *daf-16*)的相对表达量,结果如图 8 所示。由图 8 可知,

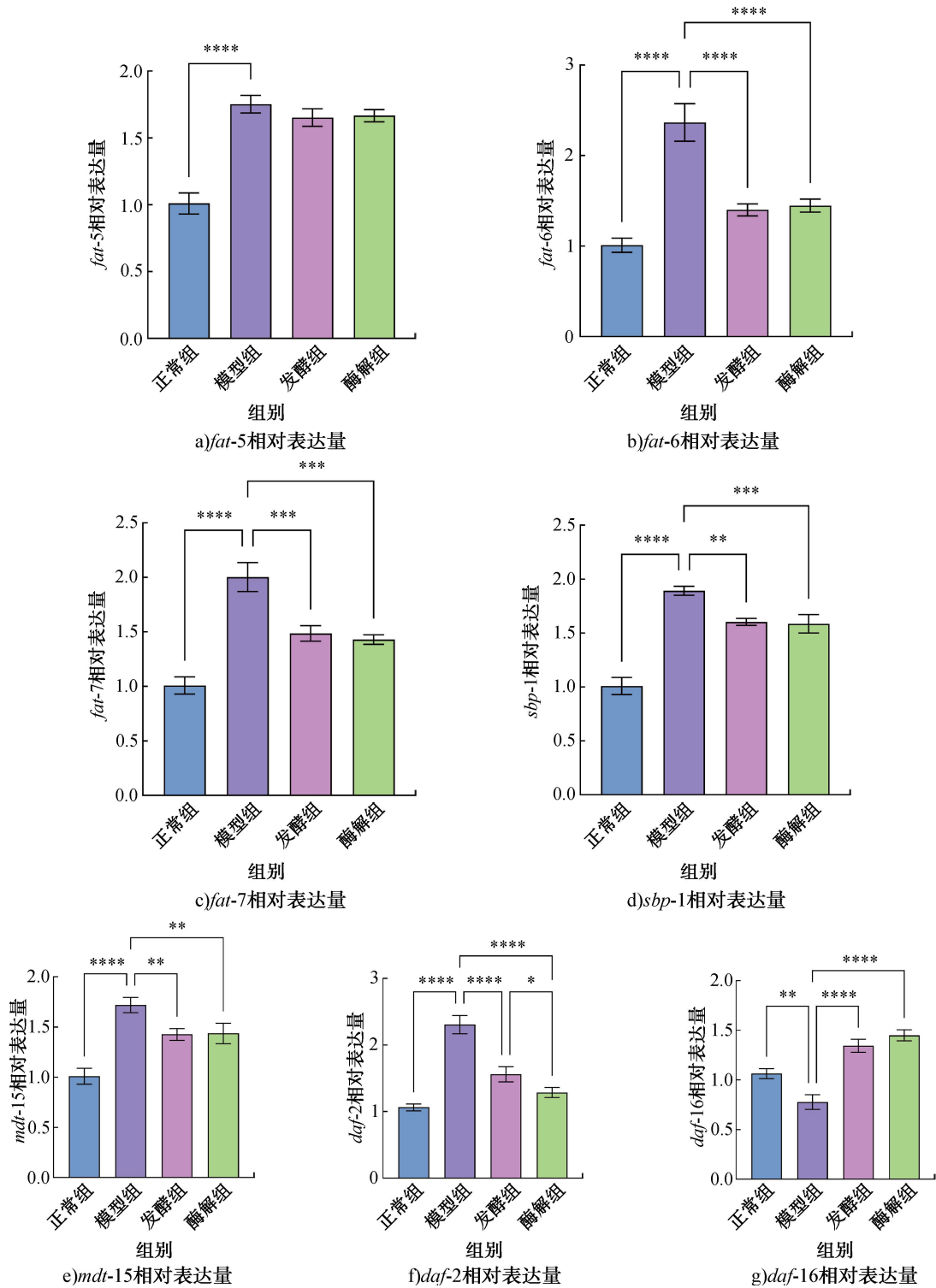


图 8 不同大麦多酚对秀丽隐杆线虫脂质代谢基因表达量的影响

Fig. 8 Effects of different-treated barley polyphenols on lipid metabolism genes expression in *C. elegans*

模型组的 *fat-5*、*fat-6*、*fat-7*、*sbp-1*、*mdt-15* 和 *daf-2* 基因的相对表达量上调,而 *daf-16* 基因的相对表达量下调。两种大麦多酚均能恢复 *fat-6*、*fat-7*、*sbp-1*、*mdt-15*、*daf-2* 和 *daf-16* 的异常表达。在秀丽隐杆线虫体内,固醇反应原件结合蛋白(SBP-1)是调控其脂质代谢的重要因子,其靶基因 *fat-6* 和 *fat-7* 可调控脂肪酸的合成。此外,SBP-1 需要与效应因子 MDT-15 相互作用才能发挥生物学功效^[33-34]。因此,酶解大麦多酚和发酵大麦多酚均可通过抑制 SBP-1 介导的脂质合成通路,缓解高糖造模引发的脂质累积。值得注意的是,酶解组秀丽隐杆线虫体内 *daf-2* 基因的相对表达量显著低于发酵组,而 *daf-16* 基因的相对表达量高于发酵组。*daf-2* 基因是胰岛素/胰岛素样生长因子信号通路调节脂肪代谢的关键基因,可抑制下游 *daf-16* 基因的表达^[35]。高糖造模会导致秀丽隐杆线虫的胰岛素/胰岛素样生长因子信号通路异常激活。相较于发酵大麦多酚,酶解大麦多酚对胰岛素/胰岛素样生长因子信号通路的抑制作用更为显著。香草醛、绿原酸和没食子酸可能是导致这一差异的关键物质基础。

3 结论

本研究分别利用微生物发酵和酶法水解制备了发酵大麦多酚和酶解大麦多酚,并研究了其抗氧化及降脂能力,得到如下结论:香草醛、绿原酸和没食子酸是酶解大麦多酚的特征组分,而苯甲酸、3,4-二甲氧基苯甲酸和表儿茶素是发酵大麦多酚的特征组分。相较于酶解大麦多酚,发酵大麦多酚的 DPPH 和 ABTS⁺ 自由基清除能力更强,具备更突出的抗氧化潜力。两种大麦多酚均能有效减少秀丽隐杆线虫体内的脂质累积,并通过提高秀丽隐杆线虫的运动频率,加速其脂质消耗。此外,两种大麦多酚均能抑制脂质合成通路 SBP-1 的异常激活,相较于发酵大麦多酚,酶解大麦多酚对胰岛素/胰岛素样生长因子信号通路的抑制更为显著。后续研究可基于小鼠等啮齿类动物模型,进一步探究特定多酚组分的体内吸收和代谢情况,深入挖掘其发挥生物学功效的作用靶器官和分子机制。

参考文献:

[1] BOHL M,GREGERSEN S,ZHONG Y Y,et al. Beneficial glycaemic effects of high-amylose barley bread compared to wheat bread in type 2 diabetes[J]. European Journal of Clinical Nutrition,2024,78(3):243-250.

[2] PAN R R,XU T,BAI J,et al. Effect of *Lactobacillus plantarum* fermented barley on plasma glycolipids and insulin sensitivity in subjects with metabolic syndrome[J]. Journal of Food Biochemistry,2020,44(11):e13471.

[3] 邓娜. 青稞全谷物降血糖活性及作用机制研究[D]. 广州:华南理工大学,2021.

[4] GANGOPADHYAY N,RAI D K,BRUNTON N P,et al. Antioxidant-guided isolation and mass spectrometric identification of the major polyphenols in barley (*Hordeum vulgare*) grain [J]. Food Chemistry, 2016, 210:212-220.

[5] JIN H M,DANG B,ZHANG W G,et al. Polyphenol and anthocyanin composition and activity of highland barley with different colors[J]. Molecules,2022,27(11):3411.

[6] DRYER-BEERS E R, GRIFFIN J, MATTHEWS P M, et al. Higher dietary polyphenol intake is associated with lower blood inflammatory markers [J]. The Journal of Nutrition, 2024, 154(8):2470-2480.

[7] 汪雪莲,冯慧祥,薛世华,等. 绿茶茶末多酚的提取、鉴定及其生物活性研究[J]. 轻工学报,2022,37(6):58-67.

[8] 牛玉清,赵岩,于鑫森,等. 新疆管花肉苁蓉生物活性物质及产地差异分析[J]. 轻工学报,2022,37(6):25-33.

[9] 刘颖. 菌酶协同发酵对苦荞多酚物质的释放及其应用研究[D]. 武汉:武汉轻工大学,2023.

[10] XIAO X,BAI J,ZHANG J Y,et al. Inhibitory effect of fermented selected barley extracts with *Lactobacillus plantarum* dy-1 on the proliferation of human HT-29 Cells [J]. Journal of Food Biochemistry, 2019, 43(11):e12989.

[11] 程张晨. 植物乳植杆菌 dy-1 中硫酸酯酶对大麦结合态酚的释放作用研究[D]. 镇江:江苏大学,2024.

[12] ZHANG X W, ZHANG M W, DONG L H, et al. Phytochemical profile, bioactivity, and prebiotic potential of bound phenolics released from rice bran dietary fiber during *in vitro* gastrointestinal digestion and colonic fermentation [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(46):12796-12805.

[13] ZHANG J Y,XIAO X,DONG Y,et al. Fermented barley extracts with *Lactobacillus plantarum* dy-1 changes serum metabolomic profiles in rats with high-fat diet-induced obesity [J]. International Journal of Food Sciences and Nutrition,2019,70(3):303-310.

[14] 姚芳,肖香,董英. 大麦乳酸菌发酵液粉中多酚的提取

及其抗氧化性研究[J]. 食品工业科技,2017,38(10): 211-216,235.

[15] 宋丽丽,霍姍浩,胡冉冉,等. 复合乳酸菌固态发酵对脱脂米糠理化性质、生物活性和功能特性的影响[J]. 轻工学报,2024,39(3):21-28.

[16] 高超. 款冬叶黄酮的抗氧化活性研究[J]. 轻工学报, 2020,35(2):17-23.

[17] 赵甜甜,张国治,王赵改,等. 两种市售香椿茶主要活性成分、抗氧化活性及挥发性成分的对比分析[J]. 轻工学报,2023,38(3):35-45.

[18] 谭琛. 发酵大麦 β -葡聚糖的抗氧化作用研究[D]. 镇江:江苏大学,2021.

[19] YUE Y R, LI S D, SHEN P Y, et al. *Caenorhabditis elegans* as a model for obesity research [J]. Current Research in Food Science,2021,4:692-697.

[20] 李鑫萍,李凯玲,段治. 副干酪乳杆菌 VHProbi E12 发酵藿香提取液的抗 UVB 性能研究[J]. 南昌航空大学学报(自然科学版),2024,38(2):69-75.

[21] 刘甜甜,吴晓娟,吴伟. 多酚-膳食纤维相互作用及其影响多酚生物利用率研究进展[J]. 中国粮油学报, 2022,37(7):179-187.

[22] LI J Y, BAI J, YUAN J, et al. Heterologous expression and characterization of an endoglucanase from *Lactobacillus plantarum* dy-1 [J]. Food & Function, 2023, 14 (8): 3760-3768.

[23] CHENG Z C, WU B Q, BAI J, et al. Heterologous expression and enzymatic characteristics of sulfatase from *Lactobacillus plantarum* dy-1 [J]. Food & Function,2024, 15(10):5439-5449.

[24] 吕京京,李璐,张娜. 植物性食物中结合多酚的释放及功能活性的研究进展[J]. 食品工业科技,2025,46(4):404-413.

[25] 谢宁轩,张文刚,党斌,等. 冠突散囊菌发酵对青稞多酚组成及其体外抗氧化及糖脂代谢酶抑制活性的影响[J]. 食品与发酵工业,2024,50(23):87-94.

[26] 唐双庆,鲁慧琪,李秀丽,等. 枯草芽孢杆菌发酵对豆类中酚类物质及抗氧化活性的影响[J]. 中国食品学报,2024,24(1):291-300.

[27] HUANG H R, CHEN J J, AO T X, et al. Exploration of the role of bound polyphenols on tea residues dietary fiber improving diabetic hepatorenal injury and metabolic disorders [J]. Food Research International, 2022, 162:112062.

[28] ARSHAD M, CHAUDHARY A R, MUMTAZ M W, et al. Polyphenol fingerprinting and hypoglycemic attributes of optimized *Cycas circinalis* leaf extracts [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2021, 101 (4): 1530-1537.

[29] 许欢怡,赖美英,刘斌,等. 猴头菇多糖提取及抗氧化和降脂活性研究[J]. 食品科技,2023,48(12):205-213.

[30] 郭鑫. 脂肪酸组成对脂质伴随物在秀丽线虫体内抗氧化和降脂功能影响的研究[D]. 无锡:江南大学,2020.

[31] SUN Q C, YUE Y R, SHEN P Y, et al. Cranberry product decreases fat accumulation in *Caenorhabditis elegans* [J]. Journal of Medicinal Food,2016,19(4):427-433.

[32] WATTS J L, RISTOW M. Lipid and carbohydrate metabolism in *Caenorhabditis elegans* [J]. Genetics,2017, 207(2):413-446.

[33] BAI J, LI J, PAN R R, et al. Polysaccharides from *Volvariella volvacea* inhibit fat accumulation in *C. elegans* dependent on the aak-2/nhr-49-mediated pathway [J]. Journal of Food Biochemistry,2021,45(11):e13912.

[34] YANG F J, VOUGHT B W, SATTERLEE J S, et al. An ARC/Mediator subunit required for SREBP control of cholesterol and lipid homeostasis [J]. Nature, 2006, 442 (7103):700-704.

[35] ZHANG P C, JUDY M, LEE S J, et al. Direct and indirect gene regulation by a life-extending FOXO protein in *C. elegans*: Roles for GATA factors and lipid gene regulators [J]. Cell Metabolism,2013,17(1):85-100.

Study on the differences in antioxidant and lipid lowering activities of different barley polyphenols

LEI Yuexin, CHENG Zhangchen, CHEN Jin, HE Yufeng, XIAO Xiang

School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China

Abstract: Two different barley polyphenols were prepared by fermentation (*Lactiplantibacillus plantarum* dy-1) and enzymatic hydrolysis (sulfatase), respectively. The phenolic compounds composition of fermented barley polyphenols (FBP) and enzymatic hydrolysis barley polyphenols (EBP) were analyzed. The antioxidant abilities and lipid-lowering effects of FBP and EBP were further investigated. The results indicated that total phenol contents of EBP and FBP were 78.35 μg GAE/mL and 146.56 μg GAE/mL, respectively. The absolute contents of vanillin, benzoic acid, 2, 4-dihydroxybenzoic acid, epicatechin and salicylic acid were significantly different between EBP and FBP. Under the condition of the same total phenol content, vanillin, chlorogenic acid, and gallic

acid are characteristic components of the EBP while benzoic acid, 3, 4-dimethoxybenzoic acid and epicatechin are characteristic components of FBP. Compared with EBP, the DPPH and ABTS⁺ free radical scavenging rates of FBP were increased by 36.8% and 13.3%. At 20 μg GAE/mL total phenol content, both FBP and EBP effectively reduced the accumulation of lipid droplets, and reduced the triglyceride content by 23.3% and 27.9%, respectively, in *Caenorhabditis elegans*. In terms of lipid-lowering mechanism, both FBP and EBP could promote the movement of *C. elegans* to accelerate its lipid consumption and inhibit the abnormal activation of the SBP-1 signaling pathway. The effect of EBP on the insulin/insulin-like growth factor signaling pathway was more significant than that of FBP ($P<0.05$). In conclusion, when total phenol content is the same, the composition differences of barley polyphenols could significantly affect their antioxidant ability and lipid-lowering effect.

Key words: microbial fermentation; enzymatic hydrolysis; barley polyphenols; antioxidant capacity; lipid lowering ability; *Caenorhabditis elegans*

[责任编辑:杨晓娟 申慧珊]