

# 酒糟结合多酚的抗氧化活性及对 $\alpha$ -淀粉酶荧光特性的影响

汤夕瑶<sup>1,2</sup>, 刘宇佳<sup>2\*</sup>, 朱杰<sup>1</sup>, 李琳<sup>2</sup>, 杨金易<sup>1</sup>, 王弘<sup>1\*</sup>

(1. 华南农业大学食品学院, 广州 510642; 2. 东莞理工学院生命健康技术学院, 中国轻工业健康食品开发与营养调控重点实验室, 东莞 523808)

**摘要:** **目的** 优化酒糟中结合多酚提取工艺, 并探究其抗氧化活性及对 $\alpha$ -淀粉酶荧光特性的影响。**方法** 以酿酒后废弃的啤酒糟为原料, 用超声辅助酸解法提取其中的结合多酚, 利用单因素实验分别比较不同超声功率、硫酸体积浓度和料液比对酒糟结合多酚的多酚含量、总黄酮含量、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, DPPH $\cdot$ )清除率、2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐阳离子自由基[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ammonium salt anion radical, ABTS $^{\cdot+}$ ]清除能力、铁离子还原/抗氧化能力的影响, 并分析各抗氧化指标间的相关性; 探究各最优提取条件下, 酒糟结合多酚对 $\alpha$ -淀粉酶荧光淬灭性的影响。**结果** 提取功率500 W、酸体积浓度8%及料液比1:50 (g/mL)条件下所得酒糟结合多酚中总酚和总黄酮含量最高, 分别为2.177 mg GAE/g和2.831 mg RE/g。相关性分析结果表明, 酸浓度的提高可能增加酒糟中脂溶性多酚化合物的溶出, 而令水溶性多酚化合物的相对含量减少。荧光光谱结果显示, 连续加入酒糟结合多酚后,  $\alpha$ -淀粉酶的最大发射波长略有蓝移, 瑞利散射强度和荧光峰的相对强度均有不同程度的降低。**结论** 提取所得酒糟结合多酚具有一定抗氧化活性, 在一定范围内提升超声功率可以显著提高酒糟结合多酚的提取率。酒糟结合多酚的加入导致 $\alpha$ -淀粉酶的构空间象发生了变化, 两者之间的相互作用增加了 $\alpha$ -淀粉酶中氨基酸残基的疏水性, 荧光淬灭方式为静态淬灭。本研究为酒糟中结合多酚类化合物的开发利用提供了一定的理论基础。

**关键词:** 酒糟; 结合多酚;  $\alpha$ -淀粉酶; 抗氧化活性; 荧光光谱

## Antioxidant activity of bound polyphenols from distiller's grains and the effects on fluorescence characteristics of $\alpha$ -amylase

TANG Xi-Yao<sup>1,2</sup>, LIU Yu-Jia<sup>2\*</sup>, ZHU Jie<sup>1</sup>, LI Lin<sup>2</sup>, YANG Jin-Yi<sup>1</sup>, WANG Hong<sup>1\*</sup>

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. School of Life and Health Technology, China National Light Industry Key Laboratory of Healthy Food Development and Nutrition Regulation, Dongguan University of Technology, Dongguan 523808, China)

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(31901682)、东莞理工学院高层次人才(创新团队)科研启动项目(KCYCXPT2017007)、广东省创新强校创新团队项目(2021KCXTD035)

**Fund:** Supported by the National Natural Science Foundation of China (31901682), the ISTI, Dongguan University of Technology, China (KCYCXPT2017007), and the Foundation for Innovation Team in Higher Education of Guangdong, China (2021KCXTD035)

\***通信作者:** 刘宇佳, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品分子互作。E-mail: yujiali@dgut.edu.cn

王弘, 博士, 教授, 主要研究方向为食品安全与营养。E-mail: gzwhongd@163.com

\***Corresponding author:** LIU Yu-Jia, Ph.D, Associate Professor, School of Life and Health Technology/China National Light Industry Key Laboratory of Healthy Food Development and Nutrition Regulation, Dongguan 523808, China. E-mail: yujiali@dgut.edu.cn

WANG Hong, Ph.D, Professor, College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China.

E-mail: gzwhongd@163.com

**ABSTRACT: Objective** To optimize the extraction process of bound polyphenols in distiller's grains, and explore the antioxidant activity and the effects on fluorescence characteristics of  $\alpha$ -amylase. **Methods** Using discarded beer lees after brewing as raw materials, ultrasound assisted acid hydrolysis was used to extract bound polyphenols. Single factor experiments were conducted to compare the effects of different ultrasonic power, sulfuric acid volume concentration, and solid-liquid ratio on the polyphenol content, total flavonoid content, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH $\cdot$ ) clearance ability, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ammonium salt anion radical (ABTS $^{\cdot-}$ ) clearance ability and ferric ion reducing antioxidant power of bound polyphenols from distiller's grains, and the correlation between various antioxidant indicators were analyzed. The effect of distiller's grains bound polyphenols on the fluorescence quenching of  $\alpha$ -amylase was determined under various optimal extraction conditions. **Results** Under the conditions of ultrasonic power of 500 W, acid volume concentration of 8%, and solid-liquid ratio of 1:50 (g/mL), the total phenolic and total flavone content in the bound polyphenols of distiller's grains were the highest, at 2.177 mg GAE/g and 2.831 mg RE/g, respectively. The correlation analysis results indicated that an increase in acid concentration might enhance the dissolution of lipid soluble polyphenols in distiller's grains, while reducing the relative content of water-soluble polyphenols. The fluorescence spectrum results had shown that after continuous addition of distiller's grains bound polyphenols, the maximum emission wavelength of  $\alpha$ -amylase was slightly blue shifted, and the intensity of Rayleigh scattered rays and the relative intensity of fluorescence peak were reduced to varying degrees. **Conclusion** The extracted distiller's grains bound polyphenols have certain antioxidant capacities, and increasing ultrasonic power within a certain range can significantly improve the extraction rate of distiller's grains bound polyphenols. And the addition of distiller's grains bound polyphenols can result in changes of the spatial construction of  $\alpha$ -amylase, and the interaction between enzyme and bound polyphenols has increased the hydrophobicity of amino acid residues in  $\alpha$ -amylase. Besides, the type of fluorescence quenching is static quenching. This study provides a theoretical basis for the development and utilization of bound polyphenols in distiller's grains.

**KEY WORDS:** distiller's grains; bound polyphenols;  $\alpha$ -amylase; antioxidant activity; fluorescence spectrum

## 0 引言

酒糟是酿酒行业以五谷杂粮为原料, 经过蒸煮、糖化发酵、蒸馏后剩余的固体残渣<sup>[1]</sup>。我国酒糟产量达 5866 万 t/年, 酒糟的不及及时处理将造成资源浪费及环境污染<sup>[2]</sup>。由于发酵不完全等各种原因, 酒糟中残存有未能完全利用的淀粉、蛋白质、氨基酸、维生素、酚类化合物等<sup>[3]</sup>, 这些丰富的发酵副产物可以进行多方面的综合利用, 如用于生产动物饲料、微生物蛋白、食用醋、食用菌和有机肥, 以及提取有机酸、木糖醇等<sup>[3]</sup>。

糖尿病是全球流行的一种慢性代谢综合征, 是仅次于心血管疾病和肿瘤的第三大疾病。近年来许多相关研究表明, 通过清除生物体内过量自由基、提高生物体抗氧化能力和减少胰岛细胞损伤等可以降低高血糖水平, 达到缓解或治疗糖尿病的效果<sup>[4-5]</sup>。另外, 通过抑制  $\alpha$ -淀粉酶的活性从而延缓淀粉消化也是缓解餐后血糖升高、控制糖尿病患者血糖水平的有效方法之一<sup>[6]</sup>。多酚是植物中常见的活性成分之一, 其不仅具有很强的自由基清除能力, 还能通过抑制氧化酶和络合过渡金属离子等, 从而起到抗氧化作用, 是目前最常用的天然抗氧化剂之一<sup>[7]</sup>。另外现有研究

表明, 多酚类化合物可以通过抑制  $\alpha$ -淀粉酶的活性从而延缓淀粉消化, 这对多酚类物质在抗糖尿病方面的活性研究亦十分重要<sup>[8]</sup>。酒糟中的酚类物质有游离态和结合态两种形式, 游离态酚类物质易溶于水和有机溶剂<sup>[9]</sup>, 而结合态酚类物质通过糖苷键、酯键等与植物细胞壁成分(如膳食纤维、蛋白质等)相结合, 较难萃取<sup>[10]</sup>, 这也是结合多酚类物质提取率和利用率不高的原因。但研究证明, 相较于游离酚, 结合多酚可在结肠中释放更强的生物活性<sup>[11]</sup>。酸法、碱法和酶法是体外释放结合多酚的常用方法。结合态酚类化合物因其独特的结构可以用特定的酶进行处理, 从而通过特异性水解的方式来释放结合态酚类化合物, 但是酶试剂的成本很高, 而且很难保存。碱法提取会水解结合多酚类物质与膳食纤维连接的醚键、酯键<sup>[12]</sup>。研究表明, 采用硫酸提取结合酚的效果显著优于其他酸溶剂和强碱溶剂, 这是由于强酸提取可以更有效地水解糖苷键, 使结合多酚从细胞壁中释放出来<sup>[13]</sup>。

本研究通过超声辅助酸溶剂提取技术提取酒糟中的结合多酚, 并研究其抗氧化活性及对  $\alpha$ -淀粉酶的荧光淬灭, 从分子互作角度探讨酒糟中结合酚类物质抑制  $\alpha$ -淀粉酶活性的机制, 以为酒糟中结合酚类物质的高效开发和利用

提供一定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

100%浅色焦香大麦麦芽(*Hordeum vulgare* L., 德国维耶曼麦芽有限公司); 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)、无水乙醇、2,4,6-三(2-吡啶基)三嗪[2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine, TPTZ]、硝酸铝、亚硫酸钠、氢氧化钠(分析纯, 上海麦克林生化科技有限公司); 2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ammonium salt, ABTS]、过硫酸钾、芦丁(分析纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 乙酸钠、乙酸、盐酸、硫酸(分析纯, 天津市大茂化学试剂厂); 无水氯化铁、没食子酸(分析纯, 南通默克化学试剂有限公司); 福林酚、碳酸钠[分析纯, 福晨(天津)化学试剂有限公司]; 猪胰腺 $\alpha$ -淀粉酶(>10 U/mg, 美国 Sigma-Aldrich 公司); 抗坏血酸(分析纯, 北京百灵威科技有限公司)。

### 1.2 仪器与设备

XW-G2 麦芽粉碎机(德州鑫威机械科技有限公司); FW100 高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司); ME104E 分析天平(感量 0.1 mg, 上海梅特勒-托利多仪器有限公司); HH-2 数显恒温水浴锅(常州澳华仪器有限公司); TGL-16GB 高速离心机(上海安亭科学仪器厂); DHG-9030A 鼓风烘箱(上海一恒科学仪器有限公司); JY92-IIN 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司); CV200 真空离心浓缩仪(北京吉艾姆科技有限公司); MX-S 涡旋混合仪[拓赫机电科技(上海)有限公司]; F-7000 荧光光谱仪(日本株式会社日立制作所); FA2104 多功能微孔板检测仪(瑞士 TECAN 公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 酒糟的制备

准确称取麦芽 400 g, 加入 1480 mL 去离子水, 在 55℃ 下反应 5 min 后升温至 63℃ 反应 20 min; 后继续升温至 68℃ 反应 30 min; 完成后再升温至 72℃ 反应 20 min; 最后升温至 78℃ 反应 5 min, 反应完成后取滤渣在 50℃ 下烘干。

#### 1.3.2 酒糟中游离酚的提取

参考 ALONSO-RIANO 等<sup>[14]</sup>的方法并适当修改。将烘干后的滤渣粉碎并过筛(60 目), 按 1:25 (g/mL) 的料液比加入体积浓度为 55% 的乙醇溶液作溶剂进行提取。将反应物放于设置好 60℃ 的水浴锅内并避光保温 1 h, 且每隔 0.5 h 充分振荡 1 次。反应完成后取出烧杯, 待冷却后进行离心和抽滤, 保存上清液, 并将滤渣冷冻干燥后于 -20℃ 条件下密封保存。

#### 1.3.3 酒糟中结合多酚的提取

##### (1) 酒糟结合多酚提取工艺

称取去除游离酚所得的滤渣, 分别加入 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液 100 mL, 在 50℃ 下恒温水浴 1 h。然后在恒定超声功率下超声处理 20 min。离心(5000 r/min, 2 min)后滤除固体, 得到酒糟结合多酚样液, 将上清液冷却后倒入 100 mL 容量瓶内定容, 并于 -80℃ 条件下密封保存直至分析。

##### (2) 单因素实验

以超声功率为 500 W、料液比 1:50 (g/mL)、酸体积分数为 4% 为基本条件。分别考察超声功率(100、200、300、400、500 W)、硫酸体积分数(2%、4%、6%、8%、10%)、料液比[1:20、1:30、1:40、1:50、1:60 (g/mL)]对提取液多酚质量分数、抗氧化活性及 $\alpha$ -淀粉酶荧光淬灭能力的影响。

#### 1.3.4 总酚含量测定

总酚含量测定采用福林酚法, 参照 CONDE-HERNÁNDEZ 等<sup>[15]</sup>的方法。于 765 nm 处测定吸光度  $A_1$ 。样品中总酚含量以没食子酸当量计算。将吸光度值  $A_1$  代入没食子酸标准曲线方程得样品总酚浓度  $C_1$ 。按照公式(1)计算总酚含量:

$$\text{总酚含量}/(\text{mg GAE/g})=C_1 \times V/m \quad (1)$$

式中:  $C_1$  为样品总酚质量浓度(mg/mL);  $V$  为样品体积(mL);  $m$  为样品质量(g)。

#### 1.3.5 总黄酮含量测定

参考张立攀等<sup>[16]</sup>的研究方法。在 510 nm 处测定吸光度值  $A_1$ , 样品中总黄酮含量以芦丁计算。将吸光度值  $A_1$  代入芦丁标准曲线方程得样品总黄酮浓度  $C_1$ 。按照公式(2)计算总黄酮含量:

$$\text{总黄酮含量}/(\text{mg RE/g})=C_1 \times V/m \quad (2)$$

式中:  $C_1$  为样品总黄酮质量浓度(mg/mL);  $V$  为样品体积(mL);  $m$  为样品质量(g)。

#### 1.3.6 抗氧化能力测定

##### (1) DPPH·清除能力测定

分别取样品溶液 100  $\mu$ L 于 1.5 mL 离心管中, 再依次加入 950  $\mu$ L DPPH 溶液, 混匀, 室温下黑暗处反应 30 min, 反应完成后在 517 nm 波长处测定吸光度(每种样液做 3 个平行), 以等体积乙醇替代 DPPH 溶液为空白组。按照公式(3)计算 DPPH·清除率:

$$\text{清除率}/\%=(A_0-A_1)/A_0 \times 100 \quad (3)$$

式中:  $A_0$  表示空白组吸光度;  $A_1$  表示样品组吸光度。

##### (2) ABTS<sup>+</sup>·清除能力测定

在棕色离心管中分别加入样品溶液 0.50 mL, 然后加入 1.5 mL 80%乙醇溶液, 再加入 2 mL 的 ABTS 工作溶液, 充分涡旋, 静置 6 min, 在 734 nm 波长下测吸光度  $A_1$ , 以 2.00 mL 80%乙醇溶液代替样液作为空白对照在 734 nm 波长下测吸光度  $A_0$ 。按照公式(3)计算 ABTS<sup>+</sup>·清除率。

### (3) 铁离子还原/抗氧化能力测定

分别移取 50  $\mu\text{L}$  样品溶液, 加入铁离子还原/抗氧化能力法(ferric ion reducing antioxidant power, FRAP)工作液 1000  $\mu\text{L}$ , 混合均匀, 在室温黑暗处反应 60 min, 在 593 nm 处测定吸光度  $A_i$ 。样品的总抗氧化能力 FRAP 值以每克干物质中含有 mmol  $\text{Fe}^{2+}$  当量计算。将吸光度值  $A_i$  代入  $\text{FeSO}_4$  标准曲线方程得样品还原铁离子物质的量浓度  $C_i$ 。按照公式(4)计算 FRAP:

$$\text{FRAP}/(\text{mmol Fe}^{2+}/\text{g})=C_i \times V/m \quad (4)$$

式中:  $C_i$  为样品还原铁离子物质的量浓度(mmol/mL);  $V$  为样品体积(mL);  $m$  为样品质量(g)。

### 1.3.7 $\alpha$ -淀粉酶荧光淬灭测定

根据姚林锋等<sup>[17]</sup>的方法进行适当的改动。样品的荧光图谱通过荧光分光光度计测定。向 2 mL 浓度为  $1.0 \times 10^{-4}$  mol/L 的猪胰腺  $\alpha$ -淀粉酶( $M=56.23$  kDa)溶液中连续添加 10  $\mu\text{L}$  酒糟结合多酚, 适度混合溶液并保持 5 min 达到混合平衡。在 300.15 K 温度条件下以激发波长 276 nm, 发射波长 280~500 nm 记录荧光发射强度, 以 1200 nm/min 速度, 扫描三维荧光光谱。激发和发射波长狭缝宽度均为 2.5 nm。通过 Stern-Volmer 方程计算荧光淬灭程度:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{\text{SV}}[Q] = 1 + K_q\tau_0[Q] \quad (6)$$

其中,  $F_0$  和  $F$  分别是不添加结合多酚样品和添加结合多酚样品的荧光强度;  $K_{\text{SV}}$  是 Stern-Volmer 淬灭常数,  $[Q]$  为结合多酚样品的浓度;  $K_q$  是淬灭速率常数,  $\tau_0$  是没有淬灭剂存在条件下的生物大分子的平均荧光淬灭寿命,  $\tau_0=10^{-8}$  s; 结合常数( $K_b$ )和结合位点数( $n$ )通过公式(7)计算。

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K_b + n \lg [Q] \quad (7)$$

## 1.4 数据处理

所有实验均作 3 组平行, 结果以平均值 $\pm$ 标准误差表示, 利用 SPSS 26.0 软件进行单因素方差分析, 利用 Origin 2021 软件进行相关性分析与绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 酒糟结合多酚抗氧化分析

#### 2.1.1 酒糟结合多酚总酚及总黄酮含量分析

总酚含量和总黄酮含量是评价多酚类化合物提取率的有效指标之一, 也是评价植物抗氧化活性的关键参数。所得没食子酸标准曲线回归方程为  $Y=0.0045X+0.0857$  ( $R^2=0.9981$ ), 芦丁标准曲线回归方程为  $Y=0.0034X+0.0496$  ( $R^2=0.9986$ )。不同提取方法下处理得到的酒糟结合多酚总酚含量与总黄酮含量如图 1 所示。

当以超声功率为单因素变量时, 提取物的总酚含量与提取超声功率呈正相关, 当超声功率为 500 W 时, 总酚与总黄酮提取效果最佳, 总酚含量为(1.774 $\pm$ 0.012) mg GAE/g, 总黄酮含量为(2.586 $\pm$ 0.161) mg RE/g, 这是由于超声波功率的增大, 促进了空穴作用, 加速了植物细胞的破碎, 并在溶剂的作用下加速多酚的溶出, 但亦有研究表明, 过高的超声功率会破坏多酚化合物的结构, 从而导致总酚含量下降<sup>[18]</sup>。当以酸浓度为单因素变量时, 在酸体积浓度小于 8% 时, 多酚提取率随酸浓度增加而提高, 总酚提取量最大值为(2.177 $\pm$ 0.050) mg GAE/g, 总黄酮最大提取量为(2.831 $\pm$ 0.035) mg RE/g, 但当酸浓度为 10% 时, 总酚与总黄酮提取率均降低, 这是由于在适量酸浓度范围内时, 酸浓度的增加有助于水解糖苷键, 然而一旦酸过量, 则易导致部分多酚类化合物分解, 从而导致含量下降<sup>[19]</sup>。当仅改变提取料液比时, 料液比为 1:50 (g/mL) 时的总酚提取量最高, 为(1.677 $\pm$ 0.069) mg GAE/g, 当料液比较高时, 酒糟含量较高, 酸溶液不能充分地与其反应, 限制了酚类化合物的溶出, 而当料液比低于 1:50 (g/mL) 时, 继续增加溶剂体积不再提高多酚化合物的提取率, 而料液比为 1:30 (g/mL) 时, 黄酮类化合物的提取量最高, 为(2.477 $\pm$ 0.046) mg RE/g, 继续增加溶剂比例则会使体系溶出更多的非黄酮类物质而导致总黄酮含量提取率下降。由于研究主要针对酒糟多酚产物, 故以总酚与总黄酮含量之和作为参考, 并结合基本提取条件, 确定酒糟结合多酚的最佳提取条件分别为超声功率 500 W、酸体积浓度 8%、料液比 1:50 (g/mL)。

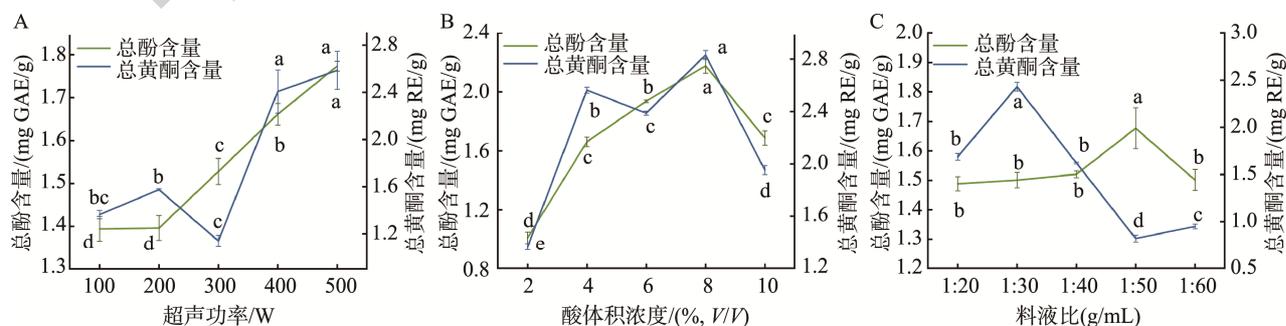


图1 不同单因素变量处理所得酒糟结合多酚的总酚含量与总黄酮含量

Fig.1 Total phenolic content and total flavonoid content of bound polyphenols in distiller's grains under different single factor variable treatments

### 2.1.2 酒糟结合多酚的抗氧化能力分析

抗氧化活性在天然活性物质的生物功能发挥的重要基础,且被认为是减少或延缓衰老和其他氧化应激相关疾病进展的关键<sup>[20]</sup>。DPPH·是一种相对稳定的自由基供体,被广泛用于在极性溶液(通常为乙醇)中测定天然抗氧化剂或植物提取物的体外抗氧化活性<sup>[21]</sup>。而 ABTS<sup>+</sup>·法简单便捷、灵敏度高,是目前常用的水溶性物质抗氧化活性测定方法之一<sup>[22]</sup>。FRAP 法是一种准确、快速、简单的测定物质抗氧化性质强弱程度的常用办法,其原理是抗氧化物质将 Fe<sup>3+</sup>还原为 Fe<sup>2+</sup>,而 Fe<sup>2+</sup>与 TPTZ 结合生成蓝色络合物<sup>[23]</sup>。本研究测得 FeSO<sub>4</sub> 标准曲线回归方程为  $Y=0.6774X+0.1102$  ( $R^2=0.9955$ )。酒糟结合多酚的抗氧化能力结果如表 1 所示。

在超声功率组中,500 W 条件下所得酒糟结合多酚的 ABTS<sup>+</sup>·清除率和 FRAP 结果最优。从表 1 数据来看,随着各单因素变量的递增,各抗氧化指标并无明显的规律变化,因此为了更好地判断酒糟结合多酚的抗氧化活性与总酚、总黄酮含量之间的关系,对各个酒糟结合多酚指标进行相关性分析。另外,各种多酚化合物之间的种类与含量不同会导致各实验组抗氧化指标之间的差异,后续将对各实验组所得酒糟结合多酚的主要成分进行进一步分析。

### 2.1.3 相关性分析

通过分析各单因素组中酒糟结合多酚提取物的总酚、总黄酮、DPPH·清除率、ABTS<sup>+</sup>·清除率和 FRAP 相关性(图 2),探讨各指标之间的相互关系,明确单因素条件对酒糟结合多酚的酚类物质含量和抗氧化指标影响作用。图中深色表示相关性强。结果显示,以超声功率为单因素变量下所得的酒糟结合多酚(图 2A),其总酚含量分别与总黄酮含量

和 FRAP 呈显著正相关( $P<0.01$ ),多酚类物质主要分为黄酮类化合物和酚酸<sup>[24]</sup>,理论上总酚含量的提升也会正向影响黄酮类化合物的含量;以酸体积浓度为单因素变量下所得的酒糟结合多酚(图 2B),总酚含量与总黄酮含量呈极显著正相关,与 DPPH·清除率呈显著正相关,但 ABTS<sup>+</sup>·清除率与总酚、总黄酮含量呈负相关,这可能由于酸浓度的增大令酒糟中脂溶性多酚化合物的相对提取率提高,而易于 ABTS<sup>+</sup>·反应的水溶性化合物相对减少;以料液比为单因素变量下所得的酒糟结合多酚(图 2C)相关性分析结果表明,总黄酮含量与 ABTS<sup>+</sup>·清除率和 FRAP 呈显著相关。通过相关性分析对提取产物的性质进行初步探究,为酒糟结合多酚提取工艺的优化提供数据支持。

### 2.2 酒糟结合多酚对 $\alpha$ -淀粉酶的荧光淬灭能力

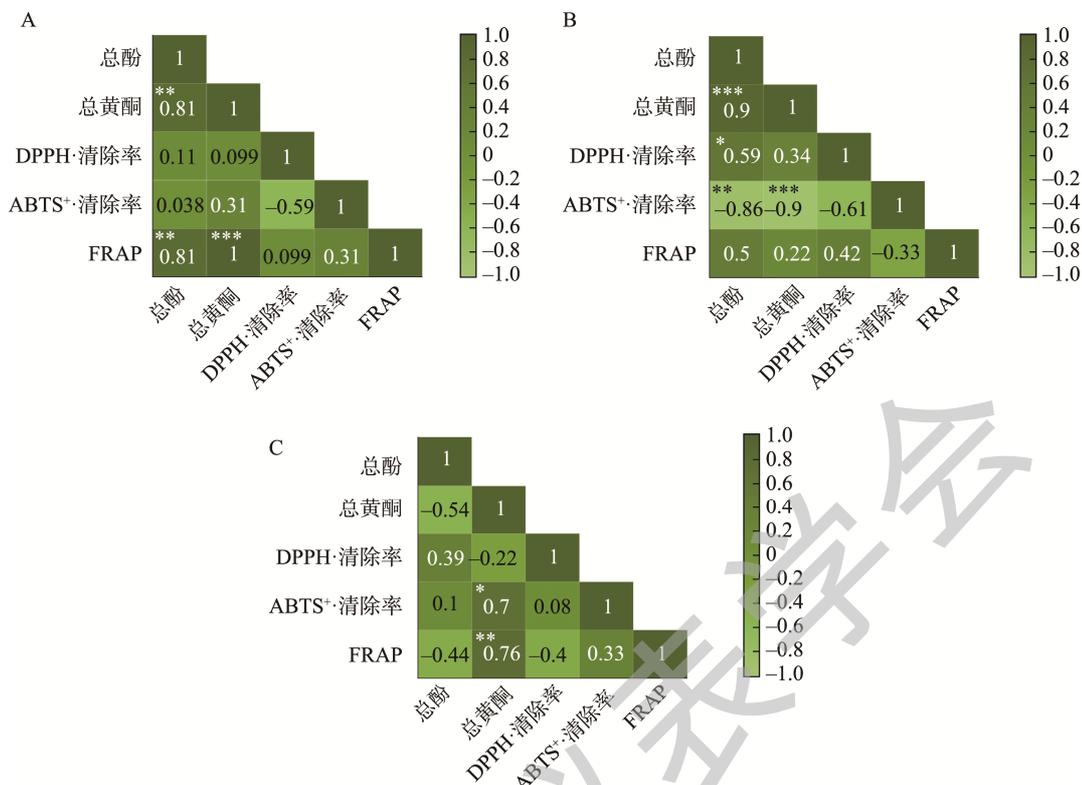
荧光淬灭即具备荧光的物质分子与溶剂或其他溶质分子在体系中发生相互作用并引起荧光强度降低的现象<sup>[25]</sup>。根据前文结果,以总酚含量为评定条件,选择各单因素组别中最优条件所得的样品进行对  $\alpha$ -淀粉酶的荧光淬灭性分析。在不同酒糟结合多酚浓度的条件下, $\alpha$ -淀粉酶与酒糟结合多酚结合的荧光发射光谱如图 3A~C 所示。可以发现,300.15 K 温度下,随着酒糟结合多酚的含量不断增加, $\alpha$ -淀粉酶的荧光强度皆逐渐降低,这表明酒糟结合多酚可以与  $\alpha$ -淀粉酶发生结合从而导致  $\alpha$ -淀粉酶的荧光淬灭。随着酒糟结合多酚含量的增加,最大荧光发射峰位置出现了从 350 nm 到 348 nm 左右的蓝移现象,这可能是因为酒糟结合多酚在一定程度上影响了  $\alpha$ -淀粉酶的高级结构,改变了氨基酸的微环境,导致  $\alpha$ -淀粉酶的内源荧光发生淬灭<sup>[26]</sup>。

表 1 不同单因素变量处理所得酒糟结合多酚的抗氧化能力分析

Table 1 Analysis of antioxidant capacities of combined polyphenols from distiller's grains treated with different univariate variables

单因素变量	DPPH·清除率/%	ABTS <sup>+</sup> ·清除率/%	FRAP/(mmol Fe <sup>2+</sup> /g)	
超声功率/W	100	16.616±1.651 <sup>b</sup>	11.325±1.233 <sup>ab</sup>	2.218±0.179 <sup>bc</sup>
	200	11.721±1.301 <sup>c</sup>	8.629±1.567 <sup>b</sup>	3.312±0.045 <sup>b</sup>
	300	16.512±1.270 <sup>b</sup>	2.632±0.270 <sup>c</sup>	1.050±0.246 <sup>c</sup>
	400	23.519±1.360 <sup>a</sup>	4.712±0.064 <sup>c</sup>	7.646±0.953 <sup>a</sup>
	500	11.371±1.096 <sup>c</sup>	12.314±0.013 <sup>a</sup>	8.580±0.838 <sup>a</sup>
酸体积浓度(% V/V)	2	11.100±0.305 <sup>b</sup>	—	—
	4	14.149±1.786 <sup>b</sup>	1.079±1.669 <sup>b</sup>	—
	6	22.433±3.424 <sup>a</sup>	1.605±0.116 <sup>ab</sup>	—
	8	14.902±0.583 <sup>b</sup>	2.825±1.258 <sup>ab</sup>	1.217±0.086 <sup>b</sup>
	10	18.159±2.272 <sup>ab</sup>	5.483±0.167 <sup>a</sup>	3.454±0.074 <sup>a</sup>
料液比(g/mL)	1:20	12.054±3.521 <sup>a</sup>	3.236±1.233 <sup>bc</sup>	2.526±0.081 <sup>a</sup>
	1:30	19.131±2.217 <sup>a</sup>	9.206±0.372 <sup>a</sup>	1.942±0.024 <sup>b</sup>
	1:40	10.681±2.341 <sup>a</sup>	6.292±1.207 <sup>ab</sup>	0.918±0.180 <sup>c</sup>
	1:50	19.800±1.124 <sup>a</sup>	5.419±1.746 <sup>abc</sup>	0.450±0.089 <sup>d</sup>
	1:60	18.638±3.660 <sup>a</sup>	1.002±1.207 <sup>c</sup>	—

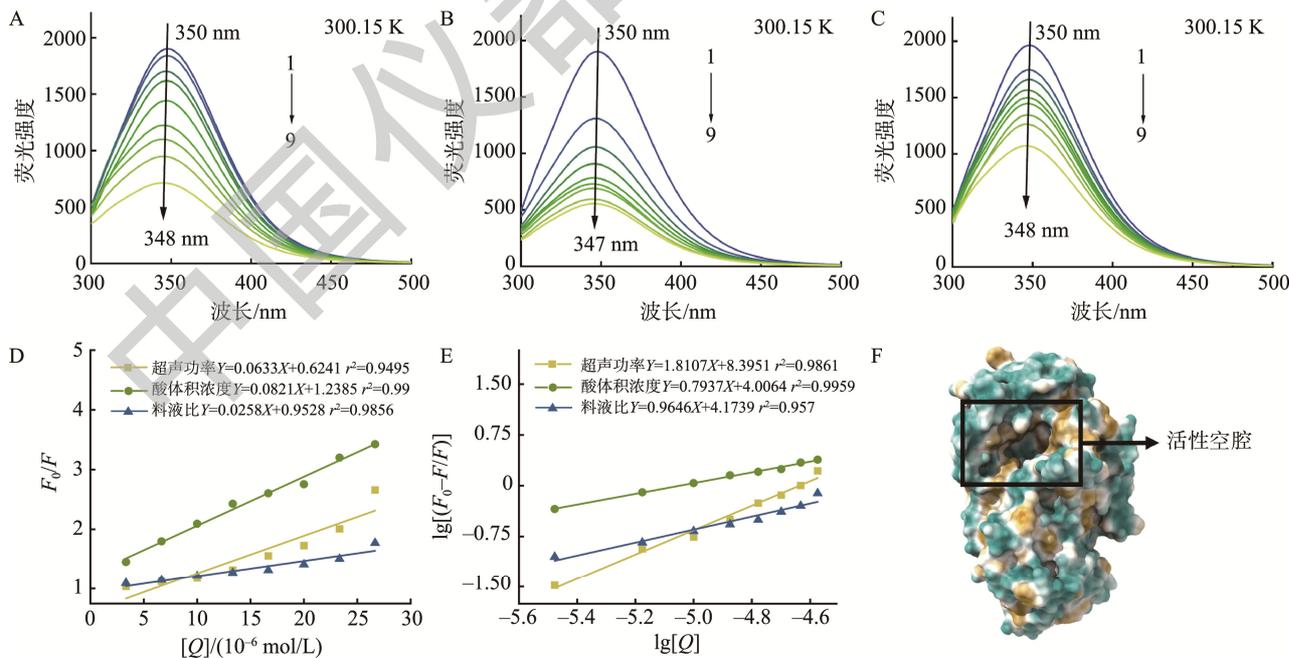
注:上标不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ );—表示值小于等于 0.01。



注: A: 超声功率组; B: 酸体积浓度组; C: 料液比组; \*表示在0.05水平上显著相关, \*\*表示在0.01水平上显著相关, \*\*\*表示在0.001水平上显著相关。

图2 不同单因素变量下所得酒糟结合多酚提取物中总酚、总黄酮及抗氧化指标的相关性分析

Fig.2 Correlation analysis of total phenols, total flavonoids, and antioxidant indicators in the bound polyphenols of distiller's grains under different univariate variables



注: A~C: 依次加入酒糟结合多酚后,  $\alpha$ -淀粉酶在276 nm激发波长下的荧光光谱(A: 超声功率组; B: 酸体积浓度组; C: 料液比组); D: Stern-Volmer荧光淬灭回归曲线分析; E: 荧光结合位点回归曲线分析; F:  $\alpha$ -淀粉酶三维结构图及其活性空腔位置。

图3 不同最优提取条件下所得酒糟结合多酚对 $\alpha$ -淀粉酶的荧光淬灭特性的影响

Fig.3 Effects of bound polyphenols from distiller's grains under different optimal extraction conditions on the fluorescence quenching characteristics of  $\alpha$ -amylase

由图 D~E 可知, 酒糟结合多酚对  $\alpha$ -淀粉酶荧光淬灭的 Stern-Volmer 曲线和双对数曲线具有较好的线性度。各类淬灭剂对生物大分子的最大动态淬灭常数约  $2.0 \times 10^{10} \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$ <sup>[26]</sup>, 根据表 2, 本研究各组所得  $K_q$  远高于该值, 说明酒糟结合多酚对  $\alpha$ -淀粉酶的荧光淬灭类型为静态淬灭, 即酒糟结合多酚与  $\alpha$ -淀粉酶结合生成了不发射光子的配合物<sup>[17]</sup>, 该结果与黄酮类化合物对  $\alpha$ -淀粉酶的荧光淬灭机制相似<sup>[27]</sup>。结合位点数是衡量配体与受体之间相互作用的重要参数之一。由表 2 可知, 酒糟结合多酚平均占据 1~2 个淀粉酶分子上的配体集合位点, 这可能说明  $\alpha$ -淀粉酶与酒糟结合多酚之间的结合方式是比较松散的。

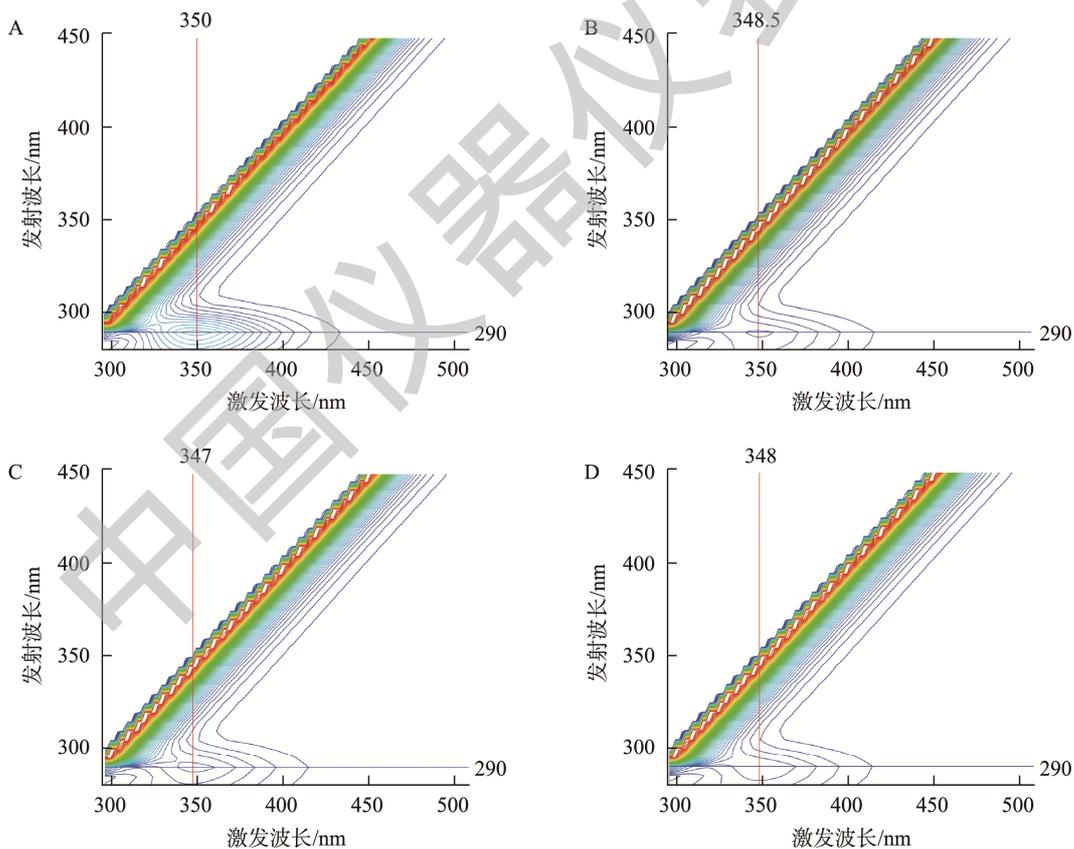
三维荧光光谱是以激发波长、发射波长和荧光强度为坐标的三维空间图谱, 同时, 强度等高线可以用来描述被测组分的分布和浓度, 有利于综合考查样品的组分分布和构型变化特征<sup>[28]</sup>。根据三维荧光光谱等高线图(图 4), 分别比较体系 A 与 B、C、D 的三维荧光光谱瑞利散射特征。左下方的“指纹”形线为  $\alpha$ -淀粉酶荧光峰的典型特

征。加入酒糟结合多酚后,  $\alpha$ -淀粉酶的瑞利散射起始位置及荧光峰位置均无明显变化, 而瑞利散射线的强度和荧光峰的相对强度均有不同程度的降低, 且“指纹”形线处等高线间距的加宽, 表明酒糟结合多酚的加入对  $\alpha$ -淀粉酶荧光峰的淬灭作用更为明显, 证明了酒糟结合多酚与  $\alpha$ -淀粉酶之间的相互作用增加了结合位点处氨基酸残基的微环境, 导致了  $\alpha$ -淀粉酶空间构象发生了改变, 这与荧光淬灭结果一致。

表 2 酒糟结合多酚对  $\alpha$ -淀粉酶的荧光淬灭数据  
(反应温度: 300.15 K)

Table 2 Data of fluorescence quenching of  $\alpha$ -amylase by distiller's grains bound polyphenols (reaction temperature: 300.15 K)

组别	$K_{sv}/(10^4 \text{ L}/\text{mol})$	$K_q/[10^{12} \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})]$	$n$
超声功率组	6.33	6.33	1.811
酸体积浓度组	8.21	8.21	0.794
料液比组	2.58	2.58	0.965



注: A:  $\alpha$ -淀粉酶的三维荧光等高线图; B~D 分别是超声功率组、酸体积浓度组和料液比组的  $\alpha$ -淀粉酶-酒糟结合多酚体系的三维荧光等高线图。

图 4 300.15 K 下  $\alpha$ -淀粉酶与  $\alpha$ -淀粉酶-酒糟结合多酚体系的三维荧光等高线图

Fig.4 Three-dimensional fluorescence contour line diagram of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -amylase-distiller's grains bound polyphenol system at 300.15 K

### 3 讨论与结论

本研究发现在一定程度上提高超声功率、酸体积浓度和降低料液比可以显著提升酒糟结合酚的提取量, 过酸的环境与过高的物料比例则降低提取量。酒糟中酚类物质含量与该物质的抗氧化能力之间存在这一定的关联性, 酚类物质越丰富, 该物质的抗氧化活性越强<sup>[29]</sup>。酚类物质结构中芳香环上的羟基可以提供氢与其有密切关系, 羟基提供的氢可有效清除氧自由基, 即有还原作用。但研究也表明, 并不是所有的酚类物质都具有相同的自由基清除功效, 且有抗氧化作用的物质对不同种自由基也存在选择性作用<sup>[30]</sup>。酒糟中的其他成分, 如: 维生素 C、维生素 E、矿物质锌、铜, 对酒糟的抗氧化作用强度的影响仍然未知, 酒糟中天然抗氧化成分的协同增效作用也有待进一步深入研究。

以  $\alpha$ -淀粉酶和各组最优条件提取所得的酒糟结合多酚为对象, 通过荧光光谱仪探究酒糟结合多酚与  $\alpha$ -淀粉酶的相互作用, 发现随着酒糟结合多酚的加入,  $\alpha$ -淀粉酶的最大发射波长略有蓝移, 瑞利散射强度和荧光峰的相对强度均有不同程度的降低, 由此可见多酚的加入导致  $\alpha$ -淀粉酶的构空间象发生了变化。两者之间的相互作用改变了  $\alpha$ -淀粉酶与多酚结合位点处氨基酸残基的微环境, 荧光淬灭方式为静态淬灭。

本文研究了酒糟中结合多酚的抗氧化性及其与  $\alpha$ -淀粉酶相互作用的荧光特性, 但酒糟结合多酚中含有大量多酚化合物, 具体是哪些多酚化合物起作用仍不明确, 有待进一步实验探究, 后续可通过高效液相色谱-质谱联用分析与分子对接技术对酒糟结合酚中明确的多酚化合物进行更具体的抗氧化特性及  $\alpha$ -淀粉酶抑制活性探究。本研究为酒糟中结合多酚类物质的开发利用提供一定的理论基础, 同时也为酒糟资源的二次利用开辟新的途径。

#### 参考文献

- [1] 陶雪, 吕佳顺, 许华杰, 等. 酒糟综合利用研究进展及茅台实践[J]. 中国酿造, 2023, 42(6): 22-27.  
TAO X, LV JS, XU HJ, *et al.* Research progress on comprehensive utilization of distillers' grains and practices of Moutai [J]. China Brew, 2023, 42(6): 22-27.
- [2] 曹新志, 游见明, 熊俐, 等. 郎酒酒糟中总酚的提取与检测方法的优化[J]. 中国酿造, 2011, (7): 137-140.  
CAO XZ, YOU JM, XIONG L, *et al.* Optimization of extraction and detection methods of total phenol from Langjiu liquor vinasse [J]. China Brew, 2011, (7): 137-140.
- [3] 顾翰琦. 酒糟高值化综合利用方式研究现状[J]. 南方农机, 2018, 49(12): 15-16.  
GU HQ. Research status of comprehensive utilization of high value distillers' grains [J]. China Southern Agric Mach, 2018, 49(12): 15-16.
- [4] RAHIMI R, GAVLIGHI HA, SARTESHNIZI RA, *et al.* In vitro antioxidant activity and antidiabetic effect of fractionated potato protein hydrolysate via ultrafiltration and adsorption chromatography [J]. LWT-Food Sci Technol, 2022, 154: 8.
- [5] YUAN C, LIU P, HAN X, *et al.* Hypoglycemic effects of glycosaminoglycan from *Urechis unicinctus* in diabetic mice [J]. J Med Food, 2015, 18(2): 190.
- [6] UUH NJ, SEGURA CM. Combination therapy of bioactive compounds with acarbose: A proposal to control hyperglycemia in type 2 diabetes [J]. J Food Biochem, 2022, 46(10): e14268.
- [7] CHU AJ. Quarter-century explorations of bioactive polyphenols: Diverse health benefits [J]. Front Biosci-Landmark, 2022, 27(4): 38.
- [8] 关惠, 李锋, 李大鹏. 多酚与蛋白质相互作用的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(3): 682-687.  
GUAN H, LI F, LI DP. Research process of interaction between polyphenols and proteins [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(3): 682-687.
- [9] 钟煜钰, 王弘, 杨金易, 等. 植物基原料游离多酚的提取与分离纯化方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(20): 6620-6627.  
ZHONG XY, WANG H, YANG JY, *et al.* Research progress of extraction, separation and purification method of free polyphenols in plant-based raw materials [J]. J Food Saf Qual, 2022, 13(20): 6620-6627.
- [10] DEY TB, CHAKRABORTY S, JAIN KK, *et al.* Antioxidant phenolics and their microbial production by submerged and solid-state fermentation process: A review [J]. Trends Food Sci Technol, 2016, 53: 15.
- [11] PINELO M, ARNOUS A, MEYER AS. Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release [J]. Trends Food Sci Technol, 2006, 17(11): 579-590.
- [12] ZHONG X, ZHANG S, WANG H, *et al.* Ultrasound-alkaline combined extraction improves the release of bound polyphenols from pitahaya (*Hylocereus undatus* 'Foo-Lon') peel: Composition, antioxidant activities and enzyme inhibitory activity [J]. Ultrason Sonochem, 2022, 90: 10.
- [13] 张兴杰. 菠萝蜜膳食纤维中结合多酚的提取工艺优化及其消化降解特性的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2021.  
ZHANG XJ. Study on the optimization of the extraction process of the bound polyphenols in jackfruit dietary fiber, and it characteristics of digestion and fermentation [D]. Nanchang: Nanchang University, 2021.
- [14] ALONSO-RIANO P, DIEZ MT, BLANCO B, *et al.* Water ultrasound-assisted extraction of polyphenol compounds from brewer's spent grain: Kinetic study, extract characterization, and concentration [J]. Antioxidants, 2020, 9(3): 18.
- [15] CONDE-HERNÁNDEZ LA, GUERRERO-BELTRAN JA. Total phenolics and antioxidant activity of piper auritum and porophyllumruderales [J]. Food Chem, 2014, 142: 455-460.
- [16] 张立攀, 王俊朋, 钱佳英, 等. 超声辅助法提取牡丹花中总黄酮和总多酚的工艺优化[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(2): 567-575.  
ZHANG LP, WANG JP, QIAN JY, *et al.* Optimization of the extraction process of total flavonoids and polyphenols from peony flowers by ultrasonic assisted method [J]. J Food Saf Qual, 2022, 13(2): 567-575.
- [17] 姚林峰, 何强. 单宁酸与胰  $\alpha$ -淀粉酶作用特性研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(3): 63-66.  
YAO LF, HE Q. Interaction between tannic acid and pancreatic  $\alpha$ -amylase [J]. Sci Technol Food Ind, 2014, 35(3): 63-66.

- [18] 陈婷, 段宙位. 柠檬皮中多酚的超声辅助提取及其抗氧化性研究[J]. 食品科技, 2023, 48(2): 246–252.  
CHEN T, DUAN ZW. Ultrasonic-assisted extraction and antioxidant activity of polyphenols from lemon peel [J]. Food Sci Technol, 2023, 48(2): 246–252.
- [19] SEKE F, MANHIVI VE, SHOKO T, *et al.* Extraction optimisation, hydrolysis, antioxidant properties and bioaccessibility of phenolic compounds in Natal plum fruit (*Carissa Macrocarpa*) [J]. Food Biosci, 2021, 44(9): 101425.
- [20] WANG M, SUN X, LUO W, *et al.* Characterization and analysis of antioxidant activity of walnut-derived pentapeptide PW5 via nuclear magnetic resonance spectroscopy [J]. Food Chem, 2021, 339: 9.
- [21] LIU J, ZHUANG Y, HU Y, *et al.* Improving the color stability and antioxidation activity of blueberry anthocyanins by enzymatic acylation with *p*-coumaric acid and caffeic acid [J]. LWT-Food Sci Technol, 2020, 130: 8.
- [22] DAWIDOWICZ AL, OLSZOWY M. Antioxidant properties of BHT estimated by ABTS assay in systems differing in pH or metal ion or water concentration [J]. Eur Food Res Technol, 2011, 232(5): 6.
- [23] BERKER KI, GUCLU K, TOR I, *et al.* Comparative evaluation of Fe (III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, Batho-phenanthroline, tripyridyl triazine (FRAP), and ferricyanide reagents [J]. Talanta, 2007, 72(3): 9.
- [24] ABBAS M, SAEED F, ANJUM FM, *et al.* Natural polyphenols: An overview [J]. Int J Food Prop, 2017, 20(8): 11.
- [25] SETT R, PAUL BK, GUCHHAIT N. Deciphering the fluorescence quenching mechanism of a flavonoid drug following interaction with human hemoglobin [J]. J Phys Org Chem, 2022, 35(3): 83–91.
- [26] 范志飞, 曾维才, 戴吉领, 等. 表没食子儿茶素没食子酸酯与猪胰脂肪酶的相互作用[J]. 食品科学, 2013, 34(7): 20–23.  
FAN ZF, ZENG WC, DAI JL, *et al.* Interaction of epigallocatechin-3-gallate with porcine pancreas lipase [J]. Food Sci, 2013, 34(7): 20–23.
- [27] ZHAO Y, WANG M, HUANG G. Structure-activity relationship and interaction mechanism of nine structurally similar flavonoids and alpha-amylase [J]. J Funct Foods, 2021, 86: 10.
- [28] 谭进, 刘绪, 李黎, 等. 荧光光谱法研究乙基麦芽酚与胰  $\alpha$ -淀粉酶相互作用特征[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2009, 46(6): 1870–1876.  
TAN J, LIU X, LI L, *et al.* Studies on the interaction between ethyl matol and  $\alpha$ -amylase by fluorescence spectrophotometry [J]. J Sichuan Univ (Nat Sci Ed), 2009, 46(6): 1870–1876.
- [29] 吴乾, 王艳芳, 蔚沐庭, 等. 红肉苹果果实酚类物质含量及抗氧化性测定[J]. 山西农业科学, 2020, 48(11): 1763–1766.  
WU Q, WANG YF, WEI MT, *et al.* Determination of phenolics content and antioxidant capacity of red-fleshed apple [J]. J Shanxi Agric Sci, 2020, 48(11): 1763–1766.
- [30] LV Q, LONG J, GONG Z, *et al.* Current state of knowledge on the antioxidant effects and mechanisms of action of polyphenolic compounds [J]. Natl Prod Commun, 2021, 16(7): 13.

(责任编辑: 郑丽于梦娇)

### 作者简介



汤夕瑶, 硕士研究生, 主要研究方向为食品加工与安全。

E-mail: T522482558@163.com

刘宇佳, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品分子互作。

E-mail: yujialiu@dgut.edu.cn

王弘, 博士, 教授, 主要研究方向为食品安全与营养。

E-mail: gzwhongd@163.com