

王家皓, 黄蕾洁, 符茜, 等. 南苜蓿叶总黄酮提取及抑菌抗氧化活性[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(17): 201–205, 214.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.17.040

南苜蓿叶总黄酮提取及抑菌抗氧化活性

王家皓^{1,2}, 黄蕾洁¹, 符茜¹, 张 扬¹, 郑丽雪¹

(1. 常熟理工学院生物与食品工程学院, 江苏常熟 215500; 2. 江苏大学食品与生物工程学院, 江苏镇江 212013)

摘要:以南苜蓿为原料, 通过复合酶解协同乙醇法提取其叶片中的总黄酮。采用响应面分析法优化其最佳提取工艺, 进一步考察南苜蓿叶总黄酮对大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的抑制性能, 再通过对羟基自由基的清除能力、DPPH 自由基的清除能力测定其抗氧化性能。结果表明最佳提取工艺为: 复合酶用量 3.0%, 酶解时间 15.7 min, 酶解温度 39.0 ℃。在此条件下, 南苜蓿叶总黄酮得率达到 (1.9 ± 0.3)%。抑菌试验结果表明, 南苜蓿叶总黄酮对大肠杆菌 ATCC 25922 最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, 简称 MIC) 为 0.15 mg/mL, 对金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 MIC 为 0.20 mg/mL。南苜蓿叶总黄酮对羟基自由基和 DPPH 均表现出一定的清除能力, 当样品浓度为 1.0 mg/mL 时, 清除率分别为 54.75%、88.48%, 对 DPPH 自由基、羟自由基半数抑制浓度 IC₅₀ 分别为 0.368、0.947 mg/mL。

关键词: 南苜蓿; 叶片; 总黄酮; 提取工艺; 复合酶解法; 抑菌活性; 抗氧化活性; 清除率; 最低抑菌浓度; 半数抑制浓度
中图分类号: TS201.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)17-0201-05

南苜蓿是豆科苜蓿属的一二年生草本植物, 别称草头、金花菜, 主要分布于我国江浙一带^[1]。它在我国有悠久的栽培历史, 最早作为绿肥和饲料引用栽培^[2]。南苜蓿对生长环境要求不高, 所以其产量很大, 而且生长快速。南苜蓿具有清热凉血、治疗黄疸、降低胆固醇含量^[3]等多种养生调理作用, 营养价值极高, 其嫩芽中蛋白质含量在 28.5% 以上, 富含 18 种氨基酸以及丰富的维生素、矿物质、微量元素等, 具有高蛋白、高膳食纤维、低脂肪特征, 加之口感清爽、甘甜, 广泛用于蔬菜食用^[4]。

目前, 针对南苜蓿的研究主要有 3 个方面: 一是种质资源评价与遗传多样性研究^[5-6]; 二是功能因子生理活性研究^[7-8]; 三是化学成分提取鉴定。晏小云等从南苜蓿乙醇提取物中发现以芹菜素为代表的黄酮功能因子, 但其生理作用机制尚不清楚, 研究相对不够深入^[1]。本研究首次采用复合酶解协同乙醇法提取南苜蓿叶 (主要食用部位) 中的总黄酮, 在单因素试验基础上, 采用响应面分析法对提取工艺进行优化, 进一步分析其抗菌及抗氧化性

能, 为苏南地区南苜蓿资源的综合开发利用奠定一定的理论基础与试验数据支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

主要试验材料有南苜蓿 (常熟当地 10 月产)、芸香苷标准品、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、果胶酶、纤维素酶、无水乙醇、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH)、磷酸盐缓冲液、绿矾 (FeSO₄ · 7H₂O)、邻二氮菲、三氯乙酸、三氯化铁、抗坏血酸, 均购于生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

1.2 仪器与设备

主要试验仪器有 PL602E/02 型电子天平 [梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司]、DHG-9037A 型恒温干燥箱 (上海浦东荣丰科学仪器有限公司)、HH-11-2-S 型水浴锅 (上海新苗医疗器械制造有限公司)、722-UV 型紫外分光光度计 (上海高致精密仪器有限公司)、HK-20B 1000g 型粉碎机 (广州市旭朗机械设备有限公司)、SHB-IIA 型离心机 (临海市永昊真空设备有限公司)。

1.3 试验菌种

试验菌种主要有大肠杆菌 (*Escherichia coli*) ATCC 25922、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) ATCC 25923, 菌种保藏于常熟理工学院生物与食品工程学院发酵工程中心。

收稿日期: 2019-09-26

基金项目: 常熟理工学院大创项目; 常熟理工学院重点毕业课题。

作者简介: 王家皓 (1997—), 男, 江苏南通人, 硕士研究生, 主要从事天然产物的研究开发。E-mail: 1272527669@qq.com。

通信作者: 郑丽雪, 硕士, 高级实验师, 主要从事食品生物技术与天然产物的研究开发。E-mail: lixue9418@163.com。

1.4 培养基

LB 培养基:10 g 胰蛋白胨,5 g 酵母提取物,10 g 氯化钠,1 L 蒸馏水,pH 值为 7.2~7.4。

1.5 试验方法

1.5.1 南苜蓿预处理 将南苜蓿叶置于 70 ℃ 烘箱内干燥至恒质量,取出用粉碎机粉碎,过 20 目筛网,得到南苜蓿叶粉末,用袋子密封好放在通风干燥处避光保藏,备用。

1.5.2 标准曲线的制备 参考余勇等的方法^[8]制作芸香苷标准曲线。以芸香苷浓度为横坐标、吸光度为纵坐标,绘制出标准曲线。本试验中得到线性回归方程为 $y = 12.595x - 0.0068$, $r^2 = 0.9987$,表明在一定范围内吸光度与浓度的线性关系良好。

1.5.3 南苜蓿叶总黄酮的提取 称取 2.5 g 干燥后的南苜蓿叶粉末置于 50 mL 烧杯中,先加复合酶液 25 mL,放入一定温度的水浴锅中酶解一定时间,之后转移至 80 ℃ 水浴锅中灭酶 10 min,取出后用乙醇加至 50 mL,再放入 40 ℃ 水浴锅中提取 10 min,取出后用真空抽滤机抽滤,滤液即为含有南苜蓿总黄酮的提取液。

1.5.4 南苜蓿叶总黄酮含量的测定 吸取 0.5 mL 南苜蓿叶总黄酮提取液置于 25 mL 比色管中,按“1.5.2”节下方法测吸光度。根据芸香苷标准曲线回归方程,计算南苜蓿叶总黄酮的含量,然后计算得率。

$$\text{总黄酮得率} = \frac{C \times 25 \times 50 \times 100}{V \times m \times 1\,000} \times 100\%。$$

式中:C 表示待测液总黄酮含量,mg/mL;V 表示吸取的提取液的体积,mL;m 表示提取用的样品质量,g。

1.5.5 单因素试验 选取复合酶添加量、酶解温度、酶解时间等 3 个因素,考察各因素对南苜蓿叶总黄酮得率的影响。在进行单因素试验时,固定复合酶添加量为 1%、酶解温度为 40 ℃、酶解时间为 10 min,分别改变所对应的设定因素,复合酶添加量为 1%、2%、3%、4%、5%;酶解温度为 30、35、40、45、50 ℃;酶解时间为 5、10、15、20、25 min。

1.5.6 响应面试验 根据前期的单因素试验结果进行试验设计,然后进行响应面分析,确定最佳提取工艺。试验因素水平及相关情况见表 1。

1.5.7 抑菌活性测定 采用梯度稀释分析的方法确定南苜蓿叶总黄酮对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度(MIC)^[11]。

表 1 南苜蓿叶总黄酮提取工艺的 Box - Behnken 试验因素水平

水平	A:复合酶添加量 (%)	B:酶解时间 (min)	C:酶解温度 (℃)
-1	2	10	30
0	2	15	40
1	4	20	50

在无菌操作条件下,将各浓度梯度的南苜蓿叶总黄酮提取液各吸取 2 mL,分别置于不同培养皿中,加入预先准备好的 LB 培养基,充分混匀,凝固后在平板中分别加入 0.2 mL 大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的菌悬液,涂布均匀,以无菌水和 5% 苯甲酸钠为阴性和阳性对照,将平板置于 37 ℃ 培养箱中培养 24 h,每个浓度做平行试验 3 次。以不长菌的最低浓度作为南苜蓿叶总黄酮的 MIC。

1.5.8 抗氧化活性的测定

1.5.8.1 对 DPPH· 自由基清除能力的测定 将提取得到的南苜蓿叶总黄酮溶液配成 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL 不同含量的样品溶液,参照 Cai 等的方法^[10]进行 DPPH· 自由基清除能力测定。

1.5.8.2 对羟基自由基清除能力的测定 将提取得到的南苜蓿叶总黄酮溶液配成 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL 不同含量的样品溶液,参照许建本等的方法^[11]进行羟基自由基清除能力的测定。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 复合酶添加量的影响 在本试验中,复合酶质量之比为 1 g:1 g,由图 1 可知,当增加复合酶使用量时,南苜蓿叶总黄酮得率逐渐上升;当在复合酶添加量为 3% 时,南苜蓿叶总黄酮得率最高,为 1.49%;但随着复合酶添加量增加,得率没有持续升高反而出现了下降,这可能是因为酶添加量过多,此时底物完全被酶包围,植物细胞壁中的纤维素和果胶在酶的作用下产生的水解产物对黄酮类物质的吸附性较强^[12],所以复合酶添加量过多反而会使南苜蓿叶总黄酮得率降低。

2.1.2 复合酶酶解温度的影响 由图 2 可知,当温度小于 40 ℃ 时,随着温度的升高,南苜蓿叶总黄酮得率增大,是因为温度升高,分子运动速度加快,使得细胞内成分更容易溶出^[13];当温度大于 40 ℃ 时,随温度升高,南苜蓿叶总黄酮得率减小,这是因为酶本质上是蛋白质,酶蛋白会因为温度升高而变性

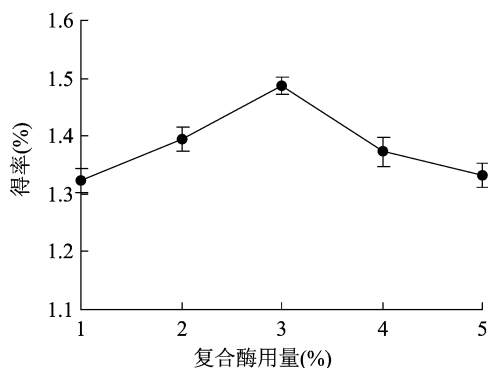


图1 复合酶用量对南苜蓿叶总黄酮得率的影响

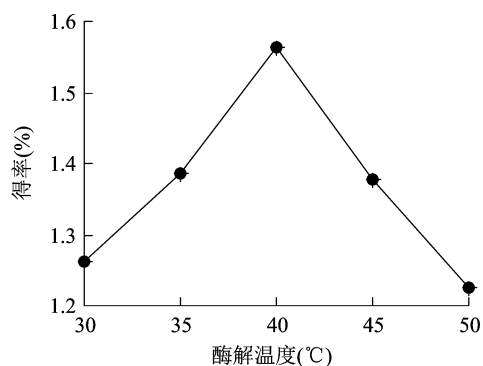


图2 酶解温度对南苜蓿叶总黄酮得率的影响

失活,因而浸提效果变差^[14]。

2.1.3 复合酶酶解时间的影响 由图3可知,总黄酮得率在酶解时间为15 min时最佳,达到1.45%,在酶解时间为5~15 min内,南苜蓿叶总黄酮得率随着酶解时间的延长而变高;之后随着酶解时间进一步延长,得率有下降趋势。

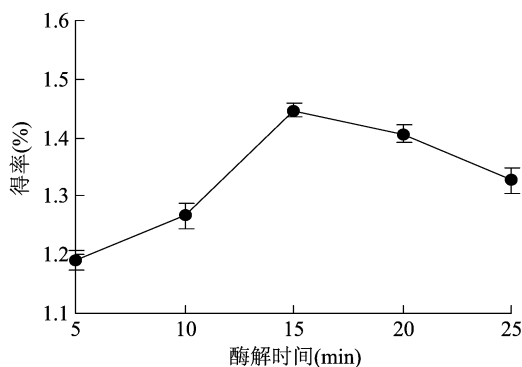


图3 酶解时间对南苜蓿叶总黄酮得率的影响

2.2 响应面分析法优化南苜蓿叶总黄酮提取工艺

2.2.1 回归模型的建立及方差分析 通过对各试验点的响应值进行回归分析,得到总黄酮得率(y)回归模型方程为: $y = 1.99 + 0.00375A + 0.045B - 0.061C - 0.078AB + 0.001AC - 0.013BC - 0.2A^2 - 0.17B^2 - 0.31C^2$ 。南苜蓿叶总黄酮提取工艺的响应面分析结果和回归方程方差结果分析见表2、表3。

表2 南苜蓿叶总黄酮提取工艺的响应面试验设计与结果

试验号	A:复合酶添加量 (%)	B:酶解时间 (min)	C:酶解温度 (°C)	得率 (%)
1	3	15	40	2.07
2	3	15	40	1.97
3	3	10	50	1.42
4	2	15	50	1.37
5	3	10	30	1.51
6	3	15	40	2.06
7	3	20	50	1.48
8	3	20	30	1.62
9	4	20	40	1.57
10	3	15	40	1.96
11	4	15	30	1.56
12	2	20	40	1.77
13	2	10	40	1.52
14	2	15	30	1.52
15	3	15	40	1.89
16	4	10	40	1.63
17	4	15	50	1.45

表3 南苜蓿叶总黄酮提取工艺的方差分析

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.850	9	0.094	23.380	0.000 2
A	1.125×10^{-4}	1	1.125×10^{-4}	0.028	0.872 2
B	0.016	1	0.016	4.010	0.085 3
C	0.030	1	0.030	7.430	0.029 5
AB	0.024	1	0.024	5.950	0.044 8
AC	4×10^{-4}	1	4×10^{-4}	0.099	0.762 2
BC	6.25×10^{-4}	1	6.25×10^{-4}	0.150	0.705 8
A ²	0.170	1	0.170	41.700	0.000 3
B ²	0.120	1	0.120	29.250	0.001 0
C ²	0.420	1	0.420	103.430	<0.000 1
残差	0.028	7	4.039×10^{-3}		
失拟项	5.675×10^{-3}	3	1.892×10^{-3}	0.33	0.802 3
纯误差	0.023	4	5.650×10^{-3}		
总和	0.880	16			

由表3可知,该模型 P 值=0.000 2<0.01,属于差异极显著模型;而失拟项的 P 值为0.802 3>0.05,差异不显著,说明该模型能够预测试验结果的分析;模型的确定系数 R^2 值为0.967 8, R^2_{adj} 为0.926 4,说明该试验所建立的模型拟合良好。

由3个影响因素的 F 值大小可以得出,各因素对南苜蓿叶总黄酮得率的影响大小分别为酶解温度>酶解时间>复合酶添加量。模型中因素一次项酶解温度(C)对南苜蓿叶总黄酮得率有显著影

响,二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 对南苜蓿叶总黄酮得率有极显著影响,交互项中的复合酶添加量(A)与酶解时间(B)对南苜蓿叶总黄酮得率影响显著,其余项均不显著。说明各因素对南苜蓿叶黄酮得率的影响并

不是简单的线性关系,而是存在一定的交互作用。

2.2.2 交互作用分析 根据响应面回归方程与方差分析、试验模型,建立响应面试验 3D 结构模型图和等高线图,结果见图 4 至图 6。

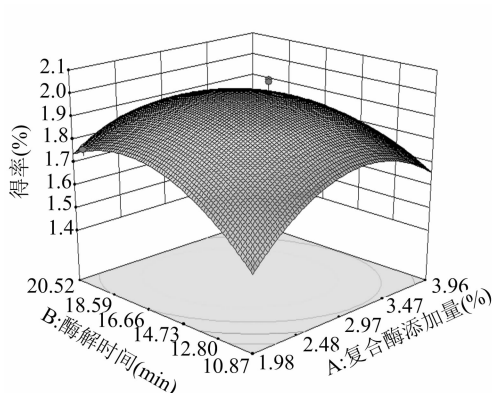


图4 复合酶添加量与酶解时间对南苜蓿叶总黄酮得率交互作用的曲面和等高线

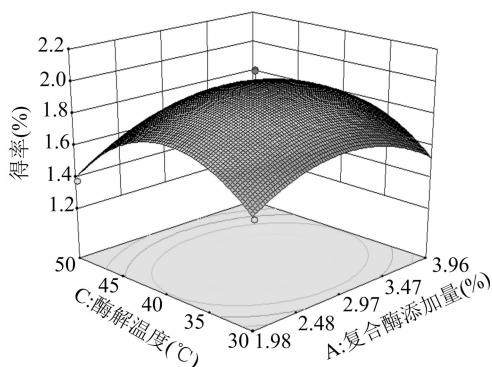
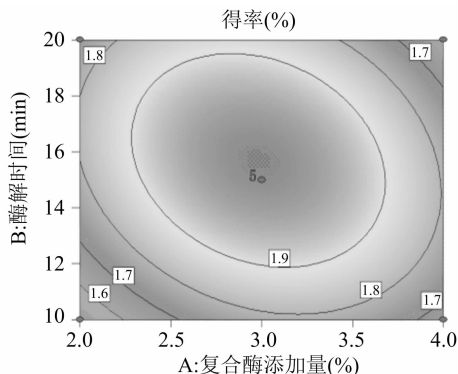


图5 复合酶用量与酶解温度对南苜蓿叶总黄酮得率交互作用的曲面和等高线

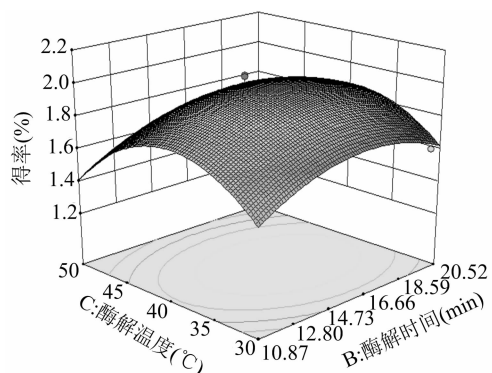
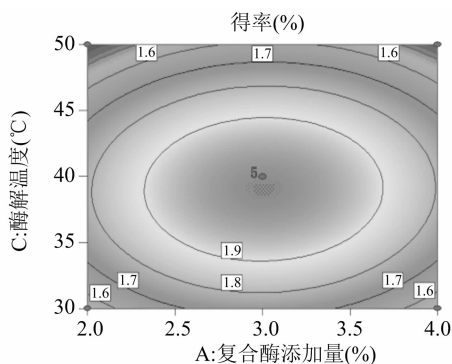


图6 酶解时间与酶解温度对南苜蓿叶总黄酮得率交互作用的曲面和等高线

由图 4 至图 6 可知,两两因素的交互作用对南苜蓿叶总黄酮得率影响作用的 3D 模型开口均是向下的,即当 2 个因素水平均提高时,南苜蓿叶总黄酮得率都升高;当达到一个最高值即峰值时,南苜蓿叶总黄酮得率达到最大;当 2 个因素水平继续升高,南苜蓿叶总黄酮得率则开始下降。通过 Design

Expert 8.0.6 软件的计算可得最佳提取工艺方案为:复合酶用量为 3.0%,酶解时间为 15.7 min,酶解温度为 39.0 ℃,此时的得率为 1.99%。

2.2.3 最佳提取方案验证试验 为验证响应面试验模型的准确性与可靠性,根据上述响应面试验得到的酶辅助乙醇提取南苜蓿叶总黄酮的最佳提取

方案,设定考察因素水平为:复合酶添加量 3.0%,酶解时间 15.7 min,酶解温度 39.0 ℃,对南苜蓿叶进行酶解辅助乙醇提取总黄酮化合物,得到南苜蓿叶总黄酮得率为 $(1.9 \pm 0.3)\%$,与响应面试验结果相符,说明此响应面模型得到的南苜蓿叶总黄酮提取工艺在实践中同样可行。

表 4 南苜蓿叶总黄酮的抑菌活性试验结果

供试菌	不同含量总黄酮的培养基中的菌落结果							5% 苯甲酸钠培养基中的菌落结果
	0 mg/mL	0.05 mg/mL	0.10 mg/mL	0.15 mg/mL	0.20 mg/mL	0.25 mg/mL	0.30 mg/mL	
大肠杆菌	++	++	+	-	-	-	-	-
金黄色葡萄球菌	++	++	+	+	-	-	-	-

注:“++”表示培养基表面菌落生长旺盛;+表示培养基表面有菌落产生;-表示培养基表面无菌落产生。

2.4 南苜蓿叶总黄酮抗氧化活性的测定

2.4.1 对 DPPH·自由基清除能力的测定 由图 7 可以看出,在 0.2 ~ 1.0 mg/mL 的质量浓度范围内,南苜蓿叶总黄酮的浓度与 DPPH·的清除率成正比,即越高清除率越强。根据 Excel 2010 软件分析,南苜蓿叶总黄酮对 DPPH 自由基的半数清除率 IC_{50} 为 0.368 mg/mL,维生素 C 对 DPPH 自由基的半数清除率 IC_{50} 为 0.108 mg/mL。

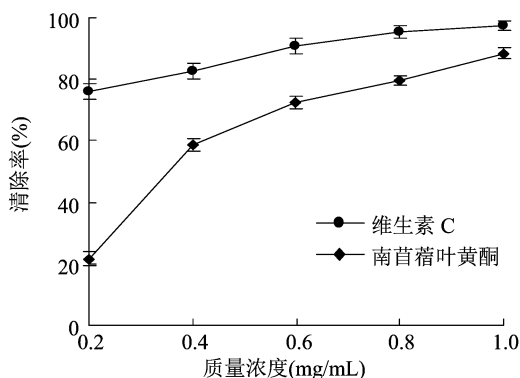


图 7 南苜蓿叶总黄酮提取液与维生素 C 清除 DPPH 自由基的能力

2.4.2 对羟基自由基清除能力的测定 由图 8 可知,质量浓度范围在 0.2 ~ 1.0 mg/mL 时,南苜蓿叶总黄酮清除羟基自由基的能力随着浓度的增加而增加,但最大值不超过 60%;而维生素 C 对于羟基自由基的清除能力基本维持在 70 ~ 90% 之间。根据 Excel 2010 软件分析,南苜蓿叶总黄酮对羟基自由基的 IC_{50} 为 0.947 mg/mL,维生素 C 对羟基自由基的 IC_{50} 为 0.049 mg/mL。抗氧化试验结果表明,南苜蓿叶总黄酮对羟基自由基和 DPPH·均表现出一定的

2.3 抑菌活性的分析

由表 4 可知,南苜蓿总黄酮对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均有抑制效果,按照最低抑菌浓度测试方法标准进行分析,南苜蓿叶总黄酮对大肠杆菌的最低抑菌浓度为 0.15 mg/mL,南苜蓿叶黄酮对金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度为 0.2 mg/mL。

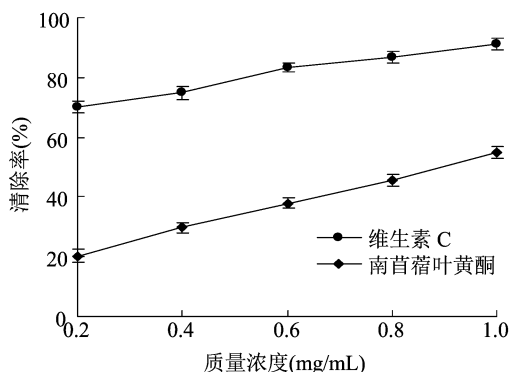


图 8 南苜蓿叶总黄酮提取液与维生素 C 清除羟基自由基的能力

3 结论与讨论

以常熟本地产的南苜蓿叶为原料,首次采用复合酶酶解协同乙醇法提取其中的总黄酮,在单因素试验的基础之上,采用响应面分析法对总黄酮提取工艺进行优化,并对南苜蓿叶总黄酮的抗氧化活性及抑菌作用进行初步探索,为系统、合理、全面地开发南苜蓿资源建立科学依据。试验结果表明,南苜蓿叶总黄酮的最佳提取工艺方案:复合酶添加量为 3.0%,酶解时间为 15.7 min,酶解温度为 39.0 ℃,在此工艺条件下,南苜蓿叶黄酮得率达到 $(1.9 \pm 0.3)\%$ 。抑菌试验结果发现,南苜蓿叶总黄酮对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌等 2 种菌均有明显的抑制作用,对大肠杆菌的 MIC 为 0.15 mg/mL,对金黄色葡萄球菌的 MIC 为 0.2 mg/mL。体外抗氧化试验结果表明,南苜蓿叶总黄酮对羟基自由基和 DPPH 均表现出一定的清除能力,但效果不如维生素 C。

(下转第 214 页)

- 204–209.
- [4] Özkaya O, Yildirim D, Dündar Ö, et al. Effects of 1-methylecyclopropene (1-MCP) and modified atmosphere packaging on postharvest storage quality of nectarine fruit [J]. *Scientia Horticulturae*, 2016, 198(1): 454–461.
- [5] Díaz-Mula H M, Zapata P J, Guillén F, et al. Modified atmosphere packaging of yellow and purple plum cultivars. 2. Effect on bioactive compounds and antioxidant activity [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2011, 61(2/3): 110–116.
- [6] Wang Y, Sugar D. Internal browning disorder and fruit quality in modified atmosphere packaged ‘Bartlett’ pears during storage and transit [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2013, 83(1): 72–82.
- [7] Sandhya. Modified atmosphere packaging of fresh produce: current status and future needs [J]. *LWT – Food Science and Technology*, 2010, 43(3): 381–392.
- [8] 何近刚, 冯云霄, 程玉豆, 等. 采后 1-MCP 和 MAP 处理对红富士苹果冷藏和货架期品质的影响 [J]. *食品科学*, 2016, 37(22): 301–306.
- [9] 贾晓辉, 王文辉, 佟伟, 等. 自发气调包装对库尔勒香梨采后生理及贮藏品质的影响 [J]. *中国农业科学*, 2016, 49(24): 4785–4796.
- [10] 徐步前, 余小林. 几种机理性薄膜包装对香蕉贮藏效果的影响 [J]. *园艺学报*, 2002, 29(2): 168–170.
- [11] 及华, 关军锋, 冯云霄, 等. 薄膜包装和乙烯吸收剂对黑宝石李贮藏品质和褐变的影响 [J]. *中国食品学报*, 2010, 10(6): 138–144.
- [12] 滕峥, 杨翠凤, 马雅甜, 等. 不同包装材料对西番莲采后贮藏品质的影响 [J]. *中国南方果树*, 2018, 47(3): 94–97.
- [13] Soliva-Fortuny R C, Martín-Belloso O. Microbiological and biochemical changes in minimally processed fresh-cut conference pears [J]. *European Food Research and Technology*, 2003, 217(1): 4–9.
- [14] 冯志宏, 李建华, 张立新, 等. 贮藏温度和包装对青脆李保鲜效果的影响 [J]. *保鲜与加工*, 2010, 10(4): 25–27.
- [15] 张福平, 陈蔚辉, 刘燕湘, 等. 自发气调袋包装对黄皮采后保鲜效果的研究 [J]. *中国南方果树*, 2016, 45(1): 49–52.
- [16] 苗博英, 张鹏, 翟宏伟, 等. 1-MCP 处理结合冰温贮藏对磨盘柿果实软化衰老的影响 [J]. *保鲜与加工*, 2013, 13(1): 21–24.
- [17] 郭园园, 鲁晓翔, 李江阔, 等. 自发气调包装对青皮核桃采后生理及品质的影响 [J]. *食品科学*, 2014, 35(4): 205–209.
- [18] 敖静, 张昭其, 黄雪梅. 不同薄膜自发气调包装对西兰花的保鲜效果 [J]. *广东农业科学*, 2015, 42(2): 77–81.
- [19] 吉宁, 王瑞, 余慧明, 等. 不同自发气调包装袋对毕节白萝卜的保鲜效果 [J]. *江苏农业科学*, 2019, 47(13): 213–217.
- [20] 曲雪艳, 周庆红, 宋宇, 等. 不同薄膜包装方式对青花菜贮藏品质的影响 [J]. *中国农学通报*, 2010, 26(18): 251–254.
- [21] 朱雁青, 胡花丽, 胡博然, 等. 薄膜包装对石榴采后生理及营养物质含量的影响 [J]. *江苏农业学报*, 2015, 31(5): 1154–1160.
- [22] 刘丹, 聂青玉, 林俊杰, 等. 不同厚度聚乙烯薄膜包装对枇杷贮藏品质的影响 [J]. *保鲜与加工*, 2012, 12(4): 14–16.
- [23] 胡花丽, 李鹏霞, 王毓宁, 等. 薄膜包装限气贮藏对李果实上的保鲜效果 [J]. *西北农业学报*, 2011, 20(3): 138–143.
- [24] 孙玉龙, 李丽梅, 冯云霄, 等. 薄膜包装对黑宝石李冷藏期间品质的影响 [J]. *河北农业科学*, 2009, 13(9): 18–19.
- [25] 刘更生, 林殿科, 樊连梅, 等. 气调贮藏条件下不同包装方式对黄金梨果实采后生理指标的影响 [J]. *植物生理学报*, 2013, 49(8): 771–777.
- [26] 朱向东, 刘倩叶, 刘粉粉. 不同包装对李果实贮藏品质的影响 [J]. *陕西林业科技*, 2007(1): 5–7.
- [27] 魏云潇, 叶兴乾. 果蔬采后成熟衰老酶与保护酶类系统的研究进展 [J]. *食品工业科技*, 2009, 30(12): 427–431.
- [28] 王亚楠, 胡花丽, 古荣鑫, 等. 不同薄膜包装对桑葚采后品质的影响 [J]. *食品科学*, 2014, 35(18): 224–229.

(上接第 205 页)

参考文献:

- [1] 晏小云, 殷晓静, 王国凯, 等. 南苜蓿的化学成分研究 [J]. *中国药学杂志*, 2012, 47(6): 415–418.
- [2] 鄂有祥, 张备. 秧草播种期试验研究 [J]. *中国园艺文摘*, 2013, 29(3): 30, 29.
- [3] Ngamukote S, Mäkinen K, Thilawech T, et al. Cholesterol-lowering activity of the major polyphenols in grape seed [J]. *Molecules*, 2011, 16(12): 5054–5061.
- [4] 刘国志. 金花菜种质资源评价及遗传多样性研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2016.
- [5] 于林清. 苜蓿种质资源系统评价与遗传多样性分析 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2009.
- [6] 程静, 吴涛, 宋红萍, 等. 南苜蓿总皂苷对 2 型糖尿病大鼠胰腺功能保护作用的研究 [J]. *中药药理与临床*, 2017, 33(4): 53–56.
- [7] 程静, 程仁丽, 刘忠, 等. 南苜蓿总皂苷对麻醉犬脑血流动力学的研究 [J]. *中国医院药学杂志*, 2015, 35(16): 1478–1481.
- [8] 余勇, 郭磊, 吴明晖, 等. 香榧假种皮总黄酮提取及抗氧化活性研究 [J]. *食品工业*, 2014, 35(12): 23–26.
- [9] 康宏玲, 杨玉红, 康宗利. 昆仑雪菊总黄酮的提取及抑菌和抗氧化分析 [J]. *食品科技*, 2018, 43(6): 236–241.
- [10] Cai H, Xie Z Y, Liu G H, et al. Isolation, identification and activities of natural antioxidants from *Callicarpa kwangtungensis* Chun [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): 113–120.
- [11] 许建本, 苏秀芳, 莫耀芳. 超声波辅助法提取假苹婆树叶总黄酮及其清除羟自由基能力 [J]. *食品工业科技*, 2018, 39(23): 199–202, 209.
- [12] 王晖, 刘佳佳. 银杏黄酮的酶法提取工艺研究 [J]. *林产化工通讯*, 2004, 26(1): 887–888.
- [13] 李佩艳, 王锋, 尹飞, 等. 响应面法优化酶法提取红薯叶总黄酮的工艺 [J]. *食品工业科技*, 2012, 33(1): 275–277, 281.
- [14] Kong K W, Ismail A R, Tan S T, et al. Response surface optimization for the extraction of phenolics and flavonoids from a pink guava puree industrial by-product [J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2010, 45(8): 1739–1745.