

[引用格式] 梁嘉进, 欧丽明, 洪金玲, 等. 植物乳杆菌发酵辅助提取琯溪蜜柚果皮黄酮工艺优化及其神经保护活性[J]. 集美大学学报(自然科学版), 2026, 31(4): 408-422. DOI: 10.19715/j.jmuzr.2026.04.03.

植物乳杆菌发酵辅助提取琯溪蜜柚果皮黄酮 工艺优化及其神经保护活性

梁嘉进¹, 欧丽明¹, 洪金玲¹, 胡 阳^{1,2,3}, 倪 辉^{1,2,3}, 陈艳红^{1,2,3}, 何 凡^{1,2,3}

(1. 集美大学海洋食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021; 2. 福建省食品微生物与酶工程重点实验室, 福建 厦门 361021; 3. 厦门市食品生物工程技术研究中心, 福建 厦门 361021)

[摘要] 为了优化植物乳杆菌发酵辅助提取琯溪蜜柚果皮黄酮的工艺, 并评价提取物的体外神经保护活性, 以总黄酮提取量为指标, 在单因素实验基础上, 采用 Box-Behnken 响应面法优化发酵工艺参数; 利用高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 分析黄酮组分; 并通过皮质酮 (corticosterone, CORT) 诱导的 PC12 细胞损伤模型, 从细胞活力、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 释放和活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平等方面评价柚皮苷的神经保护作用。结果表明, 最佳发酵工艺条件: 料液比 (g:mL) 为 1:31, 接种量为 1.0%, 发酵时间为 25 h; 发酵提取物的主要成分为柚皮苷, 约占总黄酮的 75% 以上; 发酵提取物主成分柚皮苷能呈剂量依赖性地拮抗 100 $\mu\text{mol/L}$ CORT 诱导的神经毒性, 在 20 ~ 80 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内显著提高 PC12 细胞存活率, 有效抑制 LDH 的释放, 并显著降低胞内 ROS 的水平。这证实了植物乳杆菌发酵技术能高效富集琯溪蜜柚中的黄酮, 且所得产物具有显著的抗氧化及神经保护活性。

[关键词] 琯溪蜜柚; 植物乳杆菌发酵; 响应面优化; 柚皮苷; 神经保护

[中图分类号] TS 255

[文章编号] 1007-7405(2026)04-0408-15 [DOI] 10.19715/j.jmuzr.2026.04.03

Optimization of *Lactobacillus plantarum*-Assisted Extraction of Flavonoids from Guanxi Honey Pomelo Peel and Their Neuroprotective Activities

LIANG Jiajin¹, OU Liming¹, HONG Jinling¹, HU Yang^{1,2,3},
NI Hui^{1,2,3}, CHEN Yanhong^{1,2,3}, HE Fan^{1,2,3}

(1. College of Ocean Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Fujian Provincial Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering, Xiamen 361021, China;

3. Research Center of Food Biotechnology of Xiamen City, Xiamen 361021, China)

Abstract: To optimize the fermentation-assisted extraction process of flavonoids from Guanxi honey pome-

[收稿日期] 2025-07-24

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (U1805235); 厦门市科技计划青年基金项目 (3502Z20227056); 福建省中青年教师教育科研项目 (JAT200238)

[通信作者] 何凡, 博士, 副教授, 从事农产品加工及食品风味方向研究, E-mail: fanhefood@jmu.edu.cn; 陈艳红, 硕士, 高级实验师, 从事食品分析方向研究, E-mail: 200461000099@jmu.edu.cn

lo peel using *Lactobacillus plantarum* and evaluate the *in vitro* neuroprotective activity of the extract, the total flavonoid yield was used as an indicator. On the basis of single-factor experiments, Box-Behnken response surface methodology was employed to optimize the fermentation parameters. The flavonoid components were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). A corticosterone (CORT)-induced PC12 cell injury model was established to assess the neuroprotective effect of naringin by detecting cell viability, lactate dehydrogenase (LDH) release rate, and reactive oxygen species (ROS) levels. The results showed that the optimal fermentation conditions were as follows: solid-to-liquid ratio (g/mL) of 1:31, inoculation amount of 1.0%, and fermentation duration of 25 h. Naringin was identified as the predominant constituent in fermented extract, accounting for more than 75% of total flavonoids. Naringin, the major component of fermented extract, antagonized 100 $\mu\text{mol/L}$ CORT-induced neurotoxicity in a dose-dependent manner. Within the concentration range of 20-80 $\mu\text{mol/L}$, it significantly elevated the survival rate of PC12 cells, effectively inhibited LDH leakage, and markedly reduced intracellular ROS accumulation. It was verified that fermentation with *Lactobacillus plantarum* could efficiently enrich flavonoids in Guanxi honey pomelo, and the resulting product possesses remarkable antioxidant and neuroprotective activities.

Keywords: Guanxi honey pomelo; *Lactobacillus plantarum* fermentation; response surface optimization; naringin; neuroprotection

0 引言

琯溪蜜柚是福建省平和县的地理标志农产品, 年产量巨大^[1]。然而, 在产业化过程中, 约占果实质量 30%~40% 的琯溪蜜柚果皮常被视为农业废弃物直接丢弃, 这造成了极大的生物资源浪费和严重的环境负荷问题^[2-3]。琯溪蜜柚果皮中黄酮类化合物的组成与甜橙类水果不同 (甜橙类水果以橙皮苷为主)^[4], 它主要以柚皮苷、野漆树苷等黄酮糖苷形式存在, 其中柚皮苷含量极高, 约占总黄酮的 75% 以上^[5-7]。这种以柚皮苷为主的化学成分谱与葡萄柚相似, 具有较强的抗氧化、抗炎、抗菌活性和保护神经作用, 具有极高的药用开发潜力^[8-10]。

目前, 柚皮黄酮类物质的提取方法主要有水提法、碱提法、有机溶剂提取法、超临界流体萃取法、微波辅助提取法、超声波辅助提取法等, 但这些方法常存在能耗高、溶剂残留或提取不完全等缺点^[11-15]。植物乳杆菌发酵辅助提取技术作为一种绿色生物转化手段, 能利用微生物分泌的复合酶系破坏植物细胞壁的致密结构, 显著降低传质阻力, 从而大幅提高黄酮的得率和生物利用度^[16]。

长期的应激状态会导致体内皮质酮 (corticosterone, CORT) 水平持续且异常升高, 高浓度的 CORT 通过诱发严重的氧化应激反应, 导致海马皮层神经元损伤与凋亡, 这是抑郁症神经可塑性受损的核心机制之一^[17]。已有研究表明, 柑橘果皮中的多甲氧基黄酮 (如川陈皮素、橘皮素等) 通过降低神经炎症因子和抗氧化起到神经保护作用^[18]。柚皮苷是蜜柚果皮中含量最多的黄酮成分^[19], 尽管柚皮苷的抗氧化特性已被证实^[20], 但其能否直接拮抗 CORT 诱导的神经毒性进而发挥抗抑郁作用尚需深入探究。基于此, 本研究旨在建立一种基于植物乳杆菌发酵的高效提取工艺, 通过单因素及响应面实验优化发酵参数, 最大程度提高琯溪蜜柚果皮黄酮的提取率; 同时利用 CORT 诱导 PC12 细胞构

建体外神经损伤模型^[17], 探究柚皮苷的神经保护活性, 为琯溪蜜柚资源的深加工利用和天然抗抑郁功能因子的开发提供理论依据与技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

琯溪蜜柚购于福建省漳州市平和县。

植物乳杆菌购于山东中科嘉亿生物工程有限公司; 芦丁购于国药集团化学试剂有限公司, 分析纯; 无水乙醇购于上海沃凯生物技术有限公司, 分析纯; 亚硝酸钠、九水合硝酸铝、氢氧化钠购于西陇科学股份有限公司, 分析纯; 甲醇购于西格玛奥德里齐 (上海贸易有限公司), 分析纯; 柚皮苷购于上海源叶生物科技有限公司, 分析纯; Gibco™ BASIC RPMI 1640 Medium L4391 购于 Gibco 公司; CORT 购于上海源叶有限公司, 分析纯; CCK-8 细胞增殖试剂盒 (UE-C6005) 购于苏州优逸兰迪生物科技有限公司; CheKine™ ROS 含量检测试剂盒 (KTB1912) 购于 Abbkine 公司; LDH 试剂盒 (A020-2-2) 购于南京建成生物工程研究所; 大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞 (高分化) BNCC100235 购于北纳生物。

FW100 型高速万能粉碎机, 郑州科丰仪器设备有限公司; LMQ-J 型立式高压灭菌锅, 山东新华医疗器械股份有限公司; LMQ-J 型电热式恒温水浴锅, 天津欧诺仪器仪表有限公司; LRH-250 型生化培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; Epoch 2T 型酶标仪, 美国伯腾仪器有限公司; SHB-III 型循环式水用真空泵, 郑州长城科工贸有限公司; LC-20AT 型高效液相色谱仪, 日本岛津公司; HERAcell vios 160i 型二氧化碳培养箱, 赛默飞世尔科技公司; TCSP8 型激光共聚焦显微镜, Leica。

1.2 实验方法

1.2.1 柚皮粉的制备与预处理

将新鲜柚子表皮 (不含有白囊) 削下, 于 60 ℃ 下烘干 (水分质量分数 < 8%), 使用高速万能粉碎机磨粉, 过 60 目筛网得到柚皮粉。精确称取一定量的柚皮粉原料与超纯水置于三角瓶中, 用 16 层纱布及牛皮纸进行封口, 于 121 ℃ 下灭菌 15 min。将植物乳杆菌放置于 MRS 肉汤培养液中, 37 ℃ 条件下进行活化, 按照一定接种量接种到已灭菌的原料中混匀, 于 37 ℃ 条件下在恒温培养箱中静置发酵一定时间。发酵结束后进行高压灭菌 (121 ℃) 20 min 终止发酵, 趁热过滤得到发酵液。

1.2.2 植物乳杆菌发酵辅助提取工艺的单因素实验

1) 发酵料液比的优化。称取 1.0 g 柚皮粉 5 份, 按照料液比 (g:mL) 分别为 1:20、1:25、1:30、1:35、1:40 加入超纯水, 灭菌后冷却至室温, 按照 1.0% 的接种量接入活化后的植物乳杆菌, 于 37 ℃ 条件下发酵 24 h。发酵结束后, 利用高压灭菌法终止发酵, 趁热进行抽滤。收集滤液并用超纯水定容至 50 mL, 取 2 mL 测定黄酮含量。

2) 发酵接种量的优化。称取 1.0 g 柚皮粉 5 份, 按照料液比 (g:mL) 为 1:30 加入超纯水, 灭菌后冷却至室温, 再分别以 0.6%、0.8%、1.0%、1.2%、1.4% 的接种量接入活化后的植物乳杆菌, 于 37 ℃ 条件下发酵 24 h。发酵结束后, 利用高压灭菌法终

止发酵,趁热进行抽滤。收集滤液并用超纯水定容至 50 mL,取 2 mL 测定黄酮含量。

3) 发酵时间的优化。称取 1.0 g 柚皮粉 5 份,按照料液比 (g:mL) 为 1:30 加入超纯水,灭菌后冷却至室温,按照 1.0% 的接种量接入活化后的植物乳杆菌,于 37 ℃ 条件下分别发酵 8、16、24、32、40 h。发酵结束后测定 pH 值,利用高压灭菌法终止发酵,趁热进行抽滤。收集滤液并用超纯水定容至 50 mL,取 2 mL 测定黄酮含量。

1.2.3 响应面优化实验设计

在单因素实验结果基础上,采用 Box-Behnken 设计方案,以料液比 (A)、接种量 (B)、发酵时间 (C) 为考察因素,以柚皮黄酮得率为响应值,使用 Design-Expert 8.06 软件优化柚皮总黄酮的提取工艺参数。响应面因素和水平设计见表 1。

表 1 响应面因素与水平设计
Tab. 1 Factors and levels design of response surface experiment

水平	因素		
	料液比(A)/(g:mL)	接种量(B)/%	发酵时间(C)/ h
-1	1:35	0.8	16
0	1:30	1.0	24
1	1:25	1.2	32

1.2.4 黄酮含量的测定

称取 0.025 g 芦丁标准样品,用体积分数为 70% 的乙醇溶液溶解并定容至 50 mL,制成质量浓度为 500 mg/L 的标准溶液,然后分别稀释至 0、60、120、180、240、300、360、420 mg/L 的不同浓度水平。各吸取 2 mL 标准溶液,首先分别加入 1 mL 5% (质量分数) 的 NaNO₂ 溶液,混匀后静置 5 min; 然后再分别加入 1 mL 10% (质量分数) 的 Al(NO₃)₃ 溶液,混匀后静置 5 min; 最后再分别加入 4 mL 4% (质量分数) 的 NaOH 溶液,摇匀,用超纯水定容至 10 mL,混匀后静置 15 min,在波长为 510 nm 下测定吸光度值。以芦丁标准液浓度 (x) 为横坐标,溶液吸光度值 (y) 为纵坐标绘制芦丁标准曲线,求得线性回归方程为 $y = 0.0012x + 0.0448$, $R^2 = 0.9998$ 。取 2 mL 发酵液,按照芦丁标准曲线的制作方法测定吸光度值,并根据

$$D_1 = \frac{c \times V_0}{m}$$

(1)

计算发酵液中的黄酮含量。其中: D_1 为黄酮质量比 (mg/g); c 为线性回归方程计算出来的发酵液黄酮质量浓度 (g/L); V_0 为测定时的定容体积 (mL); m 为称取样品的质量 (g)。

1.2.5 植物乳杆菌发酵对柚皮黄酮提取含量的影响和组分分析过程

称取 5 份 1.0 g 柚皮粉,按料液比 (g:mL) 为 1:30 加入超纯水,经灭菌并冷却至室温后,以 1.0% 的接种量接入活化后的植物乳杆菌。样品于 37 ℃ 条件下分别发酵 8、16、24、32、40 h。发酵结束后,采用高压灭菌法终止发酵,趁热抽滤,滤液用超纯水定容至 50 mL。实验重点选取 24 h 发酵液测定黄酮提取量,以未接种植物乳杆菌的样品为对照,评价发酵处理对提取率的提升效果。同时,为深入探究发酵对活性成分的转化作

用,采用高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 对未发酵空白组和所有发酵时间点的样品进行同步检测,以分析发酵前后黄酮组分的差异和含量的动态变化规律。

称取 0.075 g 柚皮苷标准品,用色谱级甲醇溶解并定容至 25 mL,制成质量浓度为 3 g/L 的柚皮苷标准品溶液,然后稀释成 0、0.3、0.7、1.1、1.5、1.9 g/L 的梯度浓度进行液相色谱分析。色谱条件为:色谱柱选择 Alltima TM C18 柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 以甲醇(A)-超纯水(B)为流动相;流动相的流速选择 0.8 mL/min;进样体积为 10 μL。梯度洗脱条件为:0 ~ 5 min, 80% B; 5 ~ 20 min, 80% ~ 30% B; 20 ~ 25 min, 30% ~ 50% B; 25 ~ 26 min, 50% ~ 80% B; 26 ~ 30 min, 80% B; 柱温为 35 ℃;检测波长为 283 nm。以柚皮苷浓度 (x) 为横坐标,峰面积 (y) 为纵坐标绘制标准曲线,求得回归曲线方程为 $y = 19\,282x - 82\,540$, $R^2 = 0.995\,8$ 。根据柚皮苷标准曲线和

$$D_2 = c_1 \times \frac{V_1}{m_1} \times \frac{1}{1000} \quad (2)$$

计算发酵液中的柚皮苷含量。其中: D_2 为柚皮苷质量比 (mg/g); c_1 为由标准曲线得到的发酵液中柚皮苷的质量浓度 (mg/L); V_1 为发酵液的定容体积 (mL); m_1 为发酵液所代表试样的质量 (g)。

1.2.6 体外神经保护活性评价

1.2.6.1 PC12 细胞培养与传代

在 RPMI-1640 完全培养基中进行 PC12 细胞培养,培养基内补加 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 和 1% 青霉素-链霉素双抗溶液。细胞置于 37 ℃、5% CO₂ 和饱和湿度的恒温培养箱中进行培养。当细胞汇合度达到约 90% 时进行传代,具体过程为:弃去陈旧培养基,使用 PBS 洗涤一次,加入 0.25% 胰蛋白酶消化约 1 min,随后加入新鲜完全培养基终止消化。轻轻吹打制成单细胞悬液后离心,重悬并按比例接种至新培养瓶中。

1.2.6.2 CORT 诱导神经损伤模型的构建

选取对数生长期的 PC12 细胞,调整细胞密度为 1×10^5 个/孔接种于 96 孔板,置于培养箱中培养至细胞完全贴壁。弃去上清液,分别加入含有不同浓度梯度 CORT (0、25、50、100、200、400、800 μmol/L) 的 RPMI-1640 培养基,继续培养 24 h。随后每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,避光孵育 30 min。使用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度值 (A),并计算细胞存活率,计算公式为:

$$\text{细胞存活率} = \frac{A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}}{A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}} \times 100\% \quad (3)$$

其中: $A_{\text{空白组}}$ 为无细胞的含培养基与 CCK-8 溶液的吸光度值; $A_{\text{对照组}}$ 为无药物处理的含细胞与培养基溶液的吸光度值; $A_{\text{实验组}}$ 为药物处理的含细胞与培养基溶液的吸光度值。

1.2.6.3 药物安全浓度筛选及神经保护作用评价

选取对数生长期 PC12 细胞,调整细胞密度为 1×10^5 个/孔接种于 96 孔板,培养 24 h 至细胞贴壁。实验过程分为柚皮苷细胞毒性测试和柚皮苷神经保护作用 2 部分。

- 1) 柚皮苷细胞毒性测试。移除旧培养基, 加入含不同浓度 (0、5、10、20、40、80、160、320 $\mu\text{mol/L}$) 柚皮苷的培养基处理 24 h, 以评估药物本身的安全性。
- 2) 柚皮苷神经保护作用。移除旧培养基, 加入含有 100 $\mu\text{mol/L}$ CORT 和不同浓度柚皮苷 (0 ~ 320 $\mu\text{mol/L}$) 的培养基共孵育 24 h。处理结束后, 每孔加入 10 μL CCK-8 试剂, 孵育 30 min 后测定溶液在 450 nm 处的吸光度值, 随后按照式 (3) 计算细胞存活率。

1.2.6.4 细胞膜完整性检测

选取对数生长期 PC12 细胞, 调整密度为 1×10^5 个/孔接种于 96 孔板, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育 24 h。待细胞贴壁后, 移除旧培养基, 实验分为正常对照组 (无药物处理)、模型组 (100 $\mu\text{mol/L}$ CORT 单独处理) 和给药组 (100 $\mu\text{mol/L}$ CORT + 不同浓度 (20、40、80 $\mu\text{mol/L}$) 柚皮苷)。各组细胞共孵育 24 h 后, 按照 LDH 检测试剂盒说明书进行操作, 通过酶标仪测定各孔上清液中 LDH 的活性水平 (以吸光度值表示), 以此评估细胞膜的完整性及受损程度。

1.2.6.5 细胞内氧化应激水平检测

将 PC12 细胞接种于 24 孔板中, 常规培养 24 h。实验分为正常对照组 (无药物处理)、模型组 (100 $\mu\text{mol/L}$ CORT 单独处理) 和给药组 (100 $\mu\text{mol/L}$ CORT + 不同浓度 (20、40、80 $\mu\text{mol/L}$) 柚皮苷)。药物作用 24 h 后, 弃去培养基, 用 PBS 清洗细胞 1 次。每孔加入终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 DCFH-DA 荧光探针工作液, 置于培养箱内避光孵育 30 min。孵育结束后, 使用 PBS 缓冲液轻柔清洗 3 次以去除未进入细胞内的探针。随后置于激光共聚焦扫描显微镜下观察并采集图像 (激发波长为 504 nm, 发射波长为 529 nm), 通过荧光强度分析细胞内 ROS 的积聚情况。

1.3 数据处理

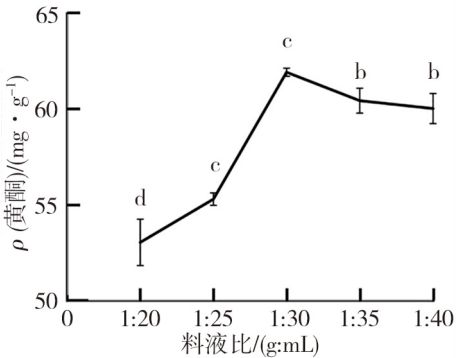
实验均重复 3 次, 实验数据均用 SPSS 23.0 处理软件进行分析, 结果采用平均值 $\pm$ 标准差表示。绘图采用 Origin 21 软件进行绘制。

2 结果与分析

2.1 发酵辅助提取工艺参数的优化

2.1.1 料液比对黄酮含量的影响

料液比对发酵液中黄酮含量的影响结果如图 1 所示。可见, 当植物乳杆菌发酵柚皮时, 在一定范围内, 料液比对黄酮含量的影响总体呈现先增加后下降的趋势, 在料液比 (g:mL) 为 1:30 时, 发酵液中的黄酮质量比达到最大值 (61.94 $\pm$ 0.34) mg/g。出现这种情况可能是随着发酵液体积的增加, 在黄酮量达到饱和状态后, 继续增大用量会增加杂质的浸出, 使黄酮纯度下降^[21]; 同时会使单位体积溶液中的黄酮浓度降低, 导致测定和提取出的黄酮含



说明: 图中不同的字母表示数值间的差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 下同。

图 1 料液比对发酵液中黄酮含量的影响

Fig.1 Effect of solid-liquid ratio on the content

量降低^[22]，这也与本研究的结果一致。

2.1.2 接种量对黄酮含量的影响

植物乳杆菌接种量对发酵液中黄酮含量的影响结果如图 2 所示。可见，在一定范围内，随着接种量的增加，黄酮含量不断增加，当接种量为 1.0% 时，黄酮质量比达到了最大值 (63.15 ± 0.89) mg/g；当接种量超过 1.0% 后，黄酮质量比却随着接种量的增加而下降。出现这种情况可能是由于在微生物发酵辅助提取时，若接种量不足，微生物生长较慢，影响其产纤维素酶和果胶酶的性能，导致黄酮提取不充分。所以在一定范围内，黄酮含量随着接种量的增加而增加；若接种量过大，黄酮会被微生物当作营养物质分解利用，导致黄酮含量降低^[23-24]。

2.1.3 发酵时间对黄酮含量和体系 pH 值的影响

如图 3 所示，在植物乳杆菌发酵过程中，植物乳杆菌一直处于利用营养物质产酸的状态，pH 值随着发酵时间的延长而不断下降；而植物乳杆菌发酵时间对黄酮含量的影响却整体呈现先增加后下降的趋势，当发酵时间为 24 h 时，黄酮质量比达到了最大值 (62.95 ± 0.84) mg/g。这可能是发酵初期黄酮提取量随着时间的延长而增加，其主要原因是微生物产生的破壁酶及水解酶不断积累，使得柚皮中的黄酮不断从植物组织中释放出来^[25]。当发酵时间超过一定的值时，由于糖类物质大量转化成酸^[26]，体系中的营养物质不足，导致微生物分解利用黄酮类物质，使发酵产物中黄酮总量下降^[27]。

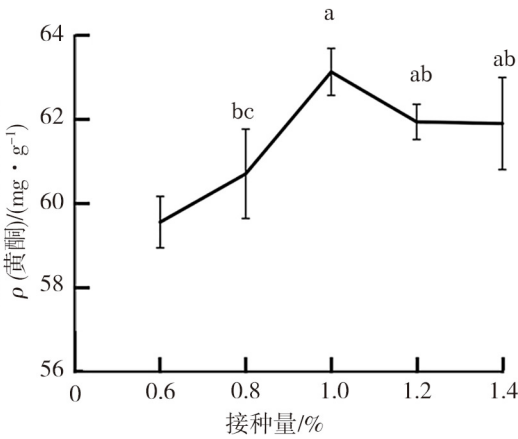


图 2 接种量对发酵液中黄酮含量的影响
Fig.2 Effect of inoculum size on the content of flavonoids in fermentation broth

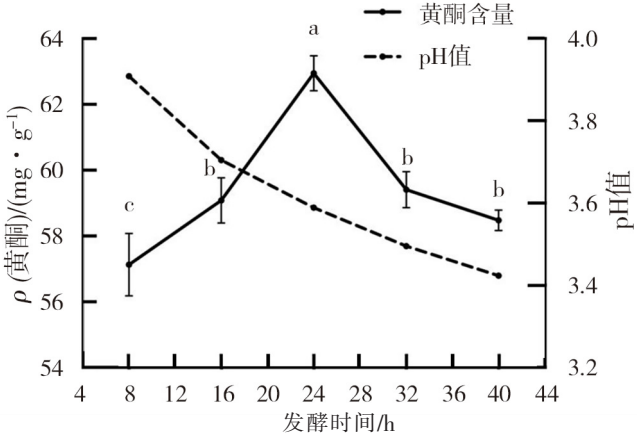


图 3 发酵时间对发酵液中黄酮含量和 pH 值的影响
Fig.3 Effect of fermentation time on the content of flavonoids and pH value in fermentation broth

2.1.4 响应面设计及结果

以发酵液中黄酮含量为响应值，采用 Box-Behnken 设计方案优化了柚皮黄酮的发酵提取工艺。响应面设计及结果见表 2，方差分析结果见表 3。利用 Design-Expert 8.0.6 软件对表 2 中的实验数据进行多元回归拟合分析，以发酵液中黄酮含量 (Y) 为响应值，得到针对料液比 (A)、接种量 (B) 和发酵时间 (C) 的二次多项回归方程为： $Y = 63.80 +$

$2.00A + 1.91B + 1.13C - 0.4150AB + 1.18AC - 0.7725BC - 2.45A^2 - 2.01B^2 - 4.10C^2$ 。

表 2 响应面设计与结果

Tab. 2 Response surface design and experimental results

编号	料液比(A)/(g:mL)	接种量(B)/%	发酵时间(C)/h	黄酮质量比/(mg·g ⁻¹)
1	1:35	1.0	32	58.23
2	1:29	0.8	32	59.61
3	1:25	1.2	24	60.19
4	1:25	1.0	32	60.97
5	1:35	1.0	16	58.99
6	1:25	1.0	16	58.41
7	1:29	1.0	24	63.23
8	1:25	0.8	24	58.78
9	1:35	0.8	24	58.98
10	1:29	1.0	24	63.64
11	1:29	1.2	16	58.41
12	1:22	1.0	24	64.10
13	1:29	1.0	24	63.99
14	1:29	0.8	16	57.81
15	1:35	1.2	24	58.21
16	1:29	1.0	24	63.23
17	1:29	1.2	32	58.94

表 3 方差分析

Tab. 3 Analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	<i>F</i>	<i>P</i>	显著性
模型	86.130 0	9	9.570 0	85.180 0	<0.000 1	**
A	1.940 0	1	1.940 0	17.270 0	0.004 3	**
B	0.040 6	1	0.040 6	0.361 5	0.566 6	
C	2.130 0	1	2.130 0	18.980 0	0.003 3	**
AB	1.190 0	1	1.190 0	10.570 0	0.014 0	*
AC	2.760 0	1	2.760 0	24.530 0	0.001 7	**
BC	0.403 2	1	0.403 2	3.590 0	0.100 0	
A ²	18.050 0	1	18.050 0	160.620 0	<0.000 1	**
B ²	26.900 0	1	26.900 0	239.460 0	<0.000 1	**
C ²	24.610 0	1	24.610 0	219.070 0	<0.000 1	**
残差	0.786 8	7	0.112 4			
失拟项	0.116 2	3	0.038 7	0.231 1	0.870 6	
纯误差	0.670 3	4	0.167 6			
总和	86.910 0	16				

注: * 表示具有统计学意义($P < 0.05$); ** 表示极具有统计学意义($P < 0.01$)。

由方差分析（表 3）可知，该模型极显著（ $P < 0.000\ 1$ ），失拟项不显著（ $P > 0.05$ ），说明模型对实验数据的拟合程度良好，受未知因素干扰小。决定系数 $R^2 = 0.991\ 0$ ，校正决定系数 $R^2_{\text{adj}} = 0.979\ 3$ ，两者均接近于 1，表明该模型能解释 99.10% 的响应值变化，具有较高的可信度。此外，信噪比为 22.758，远大于 4，这进一步证实了模型具有良好的精确度，可用于后续的预测与分析。通过对比各因素的 F 值大小发现，各因素对黄酮含量影响的主次顺序为：发酵时间（C）>料液比（A）>接种量（B）。在模型各主要项中，一次项 A、C，交互项 AB、AC，以及所有二次项（ A^2 、 B^2 、 C^2 ）对结果的影响均显著（ $P < 0.05$ ）或极显著（ $P < 0.01$ ），而接种量（B）和交互项 BC 的影响则不显著。结合图 4 的响应面图分析，料液比与发酵时间的响应曲面最为陡峭，等高线呈明显的椭圆形，表明二者的交互作用对黄酮含量的影响极为显著；料液比与接种量的曲面坡度次之，表现为显著交互作用；接种量与发酵时间的曲面则相对平缓，交互作用不明显。这一结果与方差分析中各交互项的显著性水平一致。

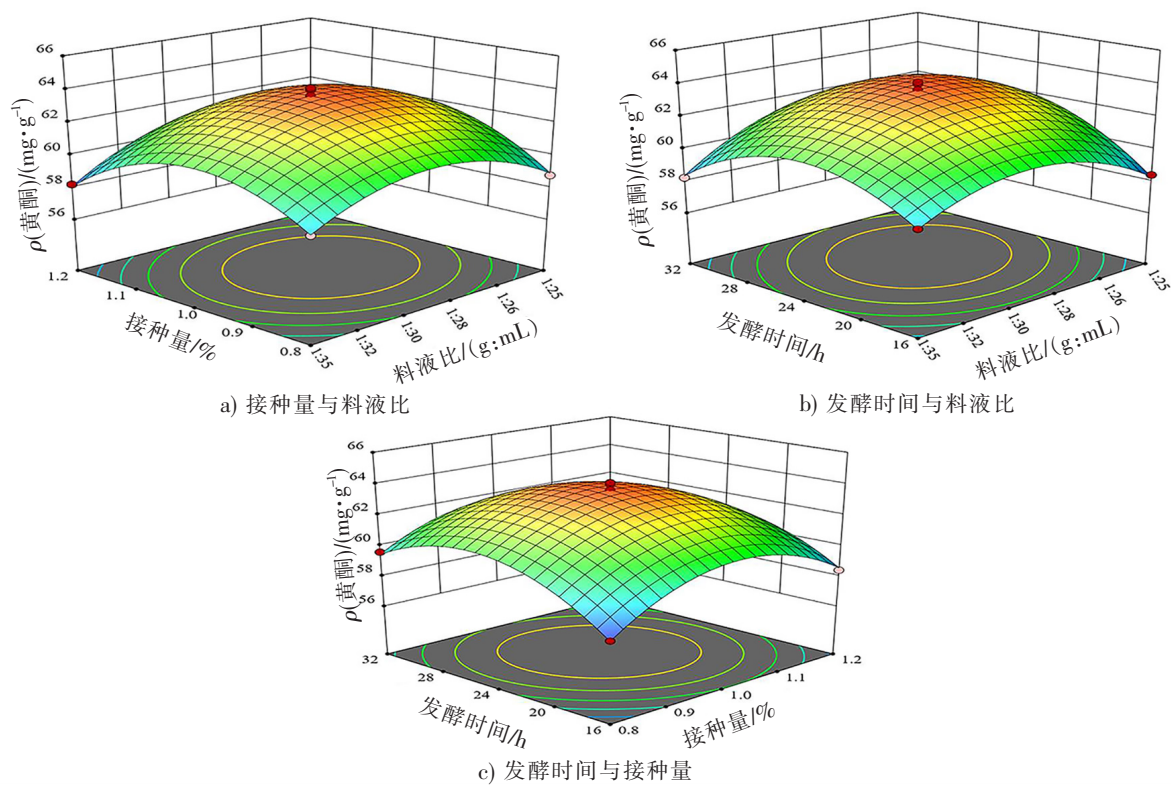


图 4 两两因素交互作用对发酵液中黄酮含量影响的响应面图
Fig.4 Response surface plot of the influence of two-two factor interaction on the content of flavonoids in fermentation broth

使用软件分析，得到最佳理论工艺参数，即料液比（g:mL）为 1:30.82、接种量为 1.01%、发酵时间为 24.75 h，预测黄酮的质量比为 63.68 mg/g。为了便于实际操作，将工艺参数料液比（g:mL）修正为 1:31、接种量 1.0%、发酵时间 25 h。在此条件下进行 3 次平行验证实验，测得黄酮质量比的平均值为 (63.89 ± 1.26) mg/g。实测值与预测值高度吻合，证明了该响应面模型在优化琯溪蜜柚果皮黄酮发酵提取工艺中的有效性与准确性。

2.2 植物乳杆菌发酵对黄酮提取效率和成分的影响

在料液比 (g:mL) 为 1:30、接种量为 1.0% 和发酵时间为 24 h 的条件下, 植物乳杆菌发酵对琯溪蜜柚柚皮黄酮提取率有显著的提高, 发酵组黄酮的提取量高达 62.29 mg/g, 显著高于未发酵空白组的 54.56 mg/g, 且二者均优于超声波乙醇辅助提取法 (49 mg/g)^[28] 和酶法辅助浸提法 (34 mg/g)^[29]。本研究整体提取水平较高 (包括空白组), 可能在于实验前的高温高压灭菌处理起到了高效的水热提取作用, 相较于超声波辐射压强产生的机械效应可能伴随的黄酮结构物理损伤, 或单一酶法 (β -葡萄糖苷酶) 对复杂细胞壁破壁能力的局限性, 高温高压能更有效软化植物组织基质并增加孔隙度。而发酵组在此基础上黄酮提取量的进一步大幅提升, 则主要归因于植物乳杆菌在代谢过程中分泌的纤维素酶、蛋白酶和淀粉酶等复合酶系。这种多酶协同作用比单一酶更能彻底瓦解由纤维素和果胶交织的致密细胞壁屏障, 不仅大幅降低了传质阻力, 促进胞内活性成分渗出, 还能将结合态黄酮转化为溶解度更高的游离态, 从而实现了优于物理或化学手段的提取效果。

由图 5 可知, 无论是否经植物乳杆菌发酵处理, 提取液中的核心成分始终为柚皮苷。通过比较两组液相色谱发现, 发酵组的柚皮苷特征峰的峰高显著高于空白组, 这证实了发酵工艺能有效促进柚皮苷的释放。作为柑橘属植物 (如柚子、葡萄柚) 中含量最丰富的黄酮类化合物, 柚皮苷也是造成其苦味的主要来源^[30], 在柚皮鉴定出的 39 种黄酮类化合物中的含量也最高^[31]。刘要鑫等^[3]研究分析了 7 种柚类幼果总黄酮和柚皮苷含量, 结果显示, 各种柚类中柚皮苷占黄酮总量的 75% 以上, 进一步说明了柚皮苷是主要的黄酮类成分。

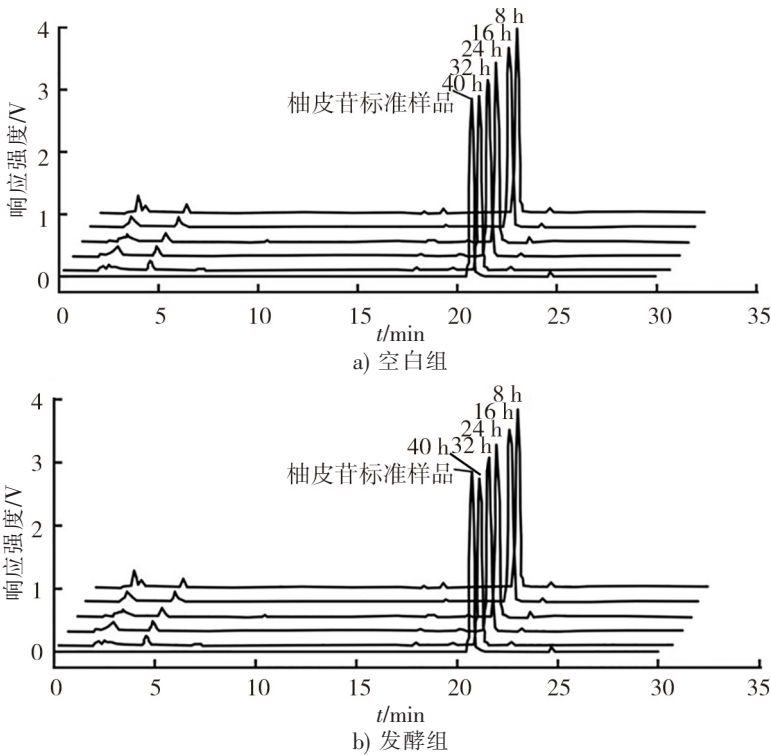


图 5 空白组和发酵组黄酮组分液相色谱对比图

Fig.5 HPLC of flavonoid components in the control group and fermentation group

由图 6 可知，柚皮苷含量随着发酵时间的延长先增加后减少，在 24 h 时其含量达到最高。推测可能是植物乳杆菌在发酵初期产生纤维素酶和果胶酶，使结合态黄酮不断释放，菌体优先利用水解纤维素产生的葡萄糖等还原糖类，而葡萄糖代谢产物抑制了柚苷酶的合成，因此在 24 h 之前柚皮苷含量不断增加。柚苷酶作为诱导酶，其活性受诱导物种类及其浓度的影响，且不同微生物的最佳诱导物也不同。因此，在 24 h 之后，柚皮苷含量下降可能是因为柚皮苷积累达到一定浓度，诱导植物乳杆菌产生相应的酶，水解柚皮苷使其含量开始降低。依据前期的实验结果和文献报道，植物乳杆菌发酵对柚皮苷含量的影响机理推断分子示意图见图 7。

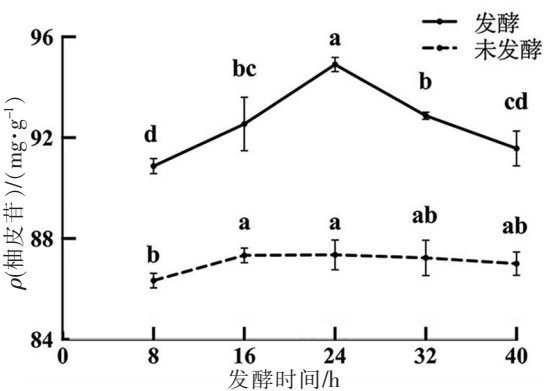


图 6 发酵时间对柚皮苷含量的影响
Fig.6 Effect of fermentation time on the content of naringin

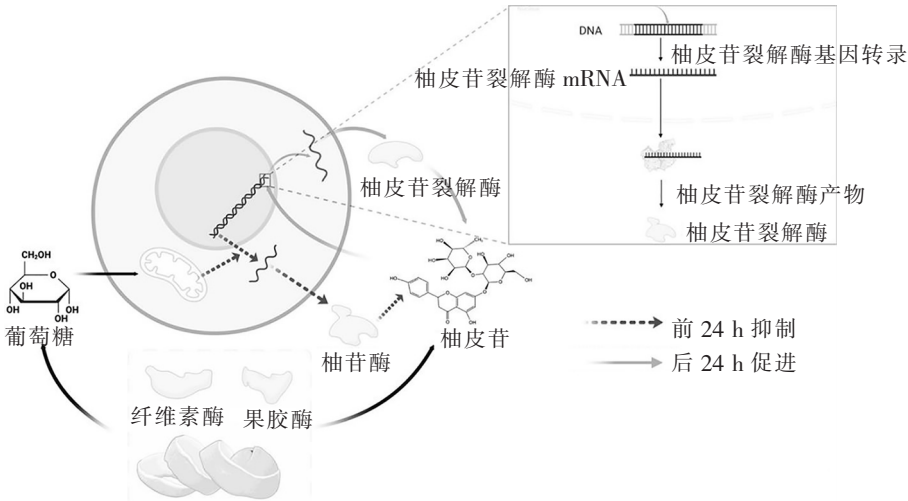


图 7 植物乳杆菌发酵对柚皮苷含量的影响机理推断分子示意图

Fig.7 Schematic diagram for the deduced molecular mechanism underlying the effect of *Lactobacillus plantarum* fermentation on naringin content

2.3 柚皮苷的体外神经保护活性

2.3.1 柚皮苷对 PC12 细胞的安全剂量筛选

由图 8 可知，在不同浓度柚皮苷作用 PC12 细胞 24 h 后，5 ~ 320 $\mu\text{mol/L}$ 的柚皮苷处理的 PC12 细胞存活率均在 100% 以上，说明柚皮苷在这个浓度范围内对细胞的存活率并没有显著影响。

2.3.2 CORT 诱导神经损伤模型的评价

为构建神经损伤模型，用 25 ~ 800 $\mu\text{mol/L}$ CORT 处理 PC12 细胞 24 h，结果如图 9 所示。可见，CORT 呈现显著的神经毒性，细胞存活率随着浓度的升高呈剂量依赖性下降。其中，100 $\mu\text{mol/L}$ CORT 处理组的细胞存活率为 59.71%，该浓度造成了显著的神经损伤，且符合适度损伤模型的构建要求，因此选择 100 $\mu\text{mol/L}$ 作为后续实验的建模浓度。

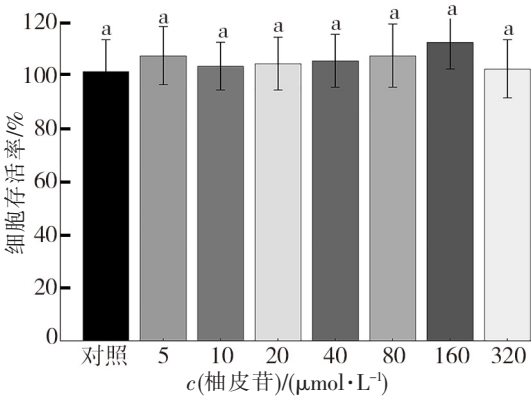


图 8 不同浓度柚皮苷对细胞存活率的影响
Fig.8 Effect of different concentrations of naringin on cell survival rate

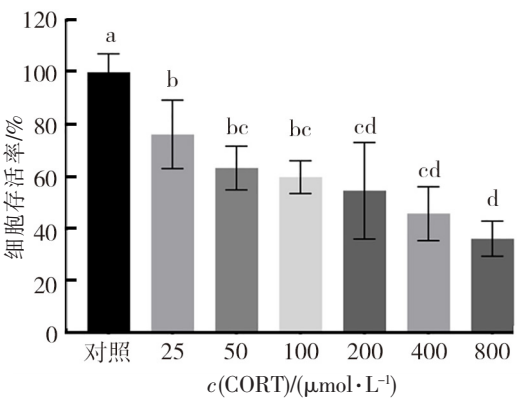


图 9 不同浓度 CORT 对细胞存活率的影响
Fig.9 Effect of different concentrations of CORT on cell survival rate

2.3.3 柚皮苷对 CORT 损伤 PC12 细胞存活率的提升作用

不同浓度柚皮苷对 CORT 诱导的 PC12 细胞存活率的影响如图 10 所示。可见，100 μmol/L CORT 导致细胞存活率显著降低，证实了其具有神经毒性作用。而柚皮苷处理呈剂量依赖性地逆转了这一损伤趋势，在 20 ~ 80 μmol/L 浓度范围内，细胞存活率随着柚皮苷浓度的增加而显著回升，并在 40、80 μmol/L 处理组达到峰值，与正常组不具有统计学意义。而极高浓度（320 μmol/L）并未进一步提升保护效果，反而导致细胞存活率下降。基于上述剂量效应关系，本实验剔除无效低剂量与潜在毒性高剂量，选取 20、40、80 μmol/L 作为后续实验的最佳作用浓度。

2.3.4 柚皮苷对 CORT 诱导细胞膜损伤的修复作用

LDH 是一种稳定的胞质酶，在正常情况下它无法穿透细胞膜。当细胞膜受损破裂时，LDH 会释放到细胞外，其释放量与膜损伤程度呈正相关^[32]。因此，上清液中 LDH 的活性可以反映细胞膜的完整性。柚皮苷对 CORT 诱导的 PC12 细胞 LDH 释放的影响如图 11 所示。可见，与对照组相比，CORT 模型组细胞上清液中 LDH 含量显著升高（ $P < 0.05$ ），表明 CORT 诱导了严重的细胞膜损伤；给予一定浓度（20、40、80 μmol/L）柚皮苷干预后，LDH 的释放量呈现明显的剂量依赖性下降趋势，其中，20 μmol/L 柚皮苷处理组的 LDH 水平较模型组有所降低，而 40、80 μmol/L 处理组的降低效果更为显著，但二者之间的差异不具有统计学意义。上述结果表明，柚皮苷能有效抑制 CORT 诱导的 LDH 渗漏，保护神经细胞膜的完整性。

2.3.5 柚皮苷对细胞内氧化应激水平的抑制作用

氧化应激介导的 ROS 过量积聚是 CORT 诱发神经毒性的关键机制^[33]。用 DCFH-DA 荧光探针与细胞进行孵育，利用共聚焦显微镜进行拍摄，结果如图 12 所示。可见，正常对照组细胞形态完整且仅呈微弱背景荧光，而模型组胞内绿色荧光强度急剧增强，定量分析结果（图 13）显示，ROS 相对含量显著升高，证实 CORT 破坏了细胞氧化还原稳态，诱导了严重的神经细胞氧化损伤。柚皮苷干预后，细胞荧光强度与 ROS 定量水平随着剂量增加呈现一致性下降趋势，20、40 μmol/L 处理组的 ROS 水平较模型组显著降

低，表现出一定的抗氧化活性；80 $\mu\text{mol/L}$ 高剂量处理组清除胞内活性氧的效果最为显著，统计学差异优于中低剂量组。上述结果表明，柚皮苷能够通过高效清除过量 ROS，减轻氧化应激损伤，从而拮抗 CORT 诱导的神经毒性。

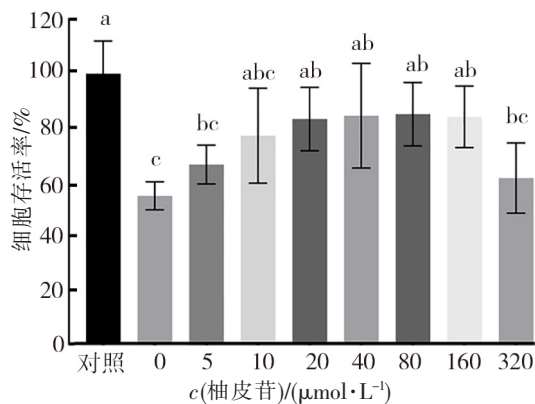


图 10 柚皮苷对 CORT 损伤 PC12 细胞存活率的影响

Fig.10 Effect of naringin on the survival rate of CORT-injured PC12 cells

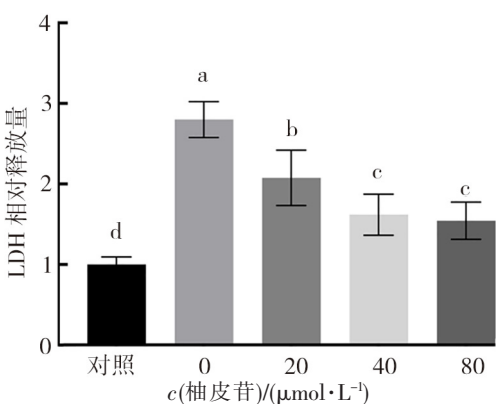


图 11 柚皮苷对 CORT 诱导的 PC12 细胞 LDH 释放的影响

Fig.11 Effect of naringin on LDH release in CORT-induced PC12 cells

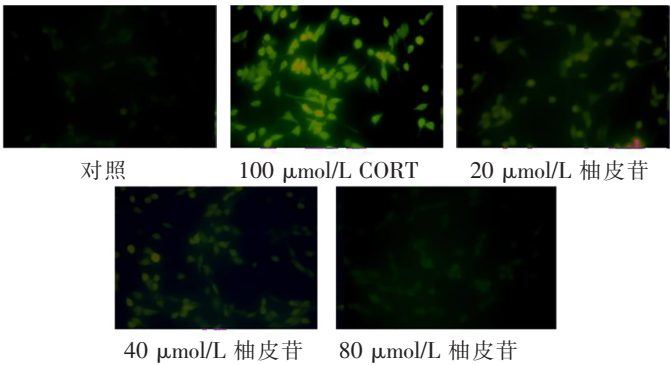


图 12 PC12 细胞 ROS 荧光照片

Fig.12 Fluorescence images of PC12 cells

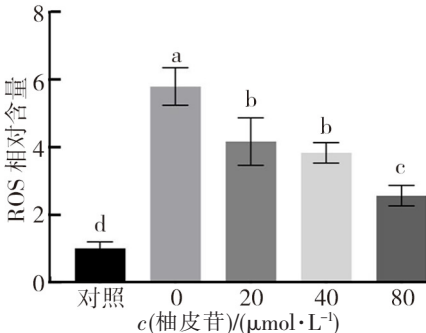


图 13 柚皮苷对 PC12 细胞 ROS 相对含量的影响

Fig.13 The effect of naringin on the relative content of ROS in PC12 cells

3 讨论

植物乳杆菌在代谢过程中能够分泌纤维素酶、半纤维素酶及果胶酶等复合酶系，这些酶协同作用，有效降解了果皮细胞壁中致密的纤维素-果胶网络结构，破坏了细胞壁屏障，从而降低了传质阻力，促进了柚皮黄酮类化合物的高效溶出及释放。

HPLC 分析进一步揭示了发酵过程中活性成分的动态变化规律。虽然发酵并未改变黄酮的主要化学成分，柚皮苷仍为核心成分（占比超过 75%），但其含量在发酵 24 h 时达到峰值后呈现下降趋势。这一现象反映了微生物代谢与产物积累之间的动态平衡，即在发酵前期，菌体产生的破壁酶使结合态柚皮苷释放，此时释放速率大于降解速率；而随着发酵时间的增加及体系 pH 值的降低，柚皮苷可能诱导柚苷酶或其他糖苷水解酶的表达，导致部分柚皮苷被水解为柚皮素或其他代谢产物，引起总含量回落。所以精确控

制发酵时间对于保证提取效率和维持活性成分的稳定至关重要。

在生物活性评价方面,本文证实了发酵提取物的主要成分柚皮苷具有显著的神经保护作用。利用高浓度 CORT 构建的 PC12 细胞损伤模型,模拟了抑郁症病理中的神经毒性环境,实验结果显示, CORT 处理导致细胞存活率下降, LDH 释放增加,以及胞内 ROS 水平剧增,证实了氧化损伤是导致神经细胞死亡的关键因素。柚皮苷干预表现出显著的保护活性,不仅呈剂量依赖性地逆转了细胞活力,还能有效降低 LDH 释放,表明其能维护神经细胞膜的完整性,减少胞浆酶渗漏。更关键的是, ROS 荧光定量分析直接揭示了其作用机制,即柚皮苷能显著清除 CORT 诱导的胞内 ROS 积聚,阻断氧化应激级联反应。这表明,柚皮苷既可以作为天然抗氧化剂直接清除自由基,也可能通过调节胞内抗氧化酶系统来发挥神经保护功效。

4 结论

本研究通过单因素和响应面实验,确定了植物乳杆菌发酵辅助提取琯溪蜜柚果皮黄酮的最佳工艺条件,即料液比(g:mL)为1:31、接种量为1.0%、发酵时间为25 h。在此条件下,黄酮得率达到63.89 mg/g,显著高于未发酵组,同时优于传统的超声波乙醇辅助提取法与酶法辅助浸提法。发酵提取物主要成分柚皮苷能呈剂量依赖性地拮抗100 $\mu\text{mol/L}$ CORT 诱导的神经毒性,在20~80 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内显著提高PC12细胞存活率,有效抑制LDH的释放,并显著降低胞内ROS的水平。未来研究可进一步结合转录组学和体内动物模型,深入解析发酵过程中次级代谢产物的转化网络及其在活体水平的综合药效评价。

[参考文献]

- [1] 赵玉山. 福建平和琯溪蜜柚拥有六个“全国第一”[J]. 中国果业信息, 2023, 40(5): 46.
- [2] 栗方亮, 孔庆波, 张青, 等. 琯溪蜜柚叶片氮素含量多种高光谱估算模型对比研究[J]. 果树学报, 2022, 39(5): 882-891.
- [3] 刘要鑫, 陈香玲, 欧智涛, 等. 几种柚类幼果总黄酮和柚皮苷含量分析[J]. 南方园艺, 2021, 32(3): 5-9.
- [4] Nogata Y, Sakamoto K, Shiratsuchi H, et al. Flavonoid composition of fruit tissues of citrus species[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2006, 70(1): 178-192.
- [5] Xi W P, Fang B, Zhao Q Y, et al. Flavonoid composition and antioxidant activities of Chinese local pummelo (*Citrus grandis* Osbeck.) varieties[J]. Food Chemistry, 2014, 161: 230-238.
- [6] Zhang M X, Duan C Q, Zang Y Y, et al. The flavonoid composition of flavedo and juice from the pummelo cultivar (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) and the grapefruit cultivar (*Citrus paradisi*) from China[J]. Food Chemistry, 2011, 129(4): 1530-1536.
- [7] Chen Q Y, Wang D, Tan C, et al. Profiling of flavonoid and antioxidant activity of fruit tissues from 27 Chinese local citrus cultivars[J]. Plants, 2020, 9(2): 196.
- [8] Yi L Z, Ma S S, Ren D B. Phytochemistry and bioactivity of citrus flavonoids: a focus on antioxidant, anti-inflammatory, anti-cancer and cardiovascular protection activities[J]. Phytochemistry Reviews, 2017, 16(3): 479-511.
- [9] Koohpayeh A, Palla M, Ghasemi M. Flavonoids against depression: a comprehensive review of literature[J]. Frontiers in Pharmacology, 2024, 15: 1411168.

- [10] Popović F, Šćepanović A, Đorđević J, et al. Flavonols in action: targeting oxidative stress and neuroinflammation in major depressive disorder[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(8): 6888.
- [11] Zhang H F, Zhang X, Yang X H, et al. Microwave assisted extraction of flavonoids from cultivated *Epimedium sagittatum*: extraction yield and mechanism, antioxidant activity and chemical composition[J]. Industrial Crops and Products, 2013, 50: 857-865.
- [12] Nishad J, Saha S, Dubey A K, et al. Optimization and comparison of non-conventional extraction technologies for *Citrus paradisi* L. peels: a valorization approach[J]. Journal of Food Science and Technology-Mysore, 2019, 56(3): 1221-1233.
- [13] 代德财. 超临界流体萃取技术在天然药物提取中的应用探讨[J]. 现代食品, 2018(10): 167-168.
- [14] Pinela J, Prieto M A, Carvalho A M, et al. Microwave-assisted extraction of phenolic acids and flavonoids and production of antioxidant ingredients from tomato: a nutraceutical-oriented optimization study[J]. Separation & Purification Technology, 2016, 164: 114-124.
- [15] 李玉芬, 韩高伟, 王桂林, 等. 生姜中黄酮提取工艺研究进展[J]. 农业技术与装备, 2021(2): 65-66, 68.
- [16] 杨立启. 益生菌发酵柑橘全果汁中抗氧化活性和挥发性物质研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2019: 26.
- [17] Pariante C M, Lightman S L. The HPA axis in major depression: classical theories and new developments[J]. Trends in Neurosciences, 2008, 31(9): 464-468.
- [18] 杨芯瑜, 张硕, 王晨, 等. 柑橘果皮中多甲氧基黄酮类成分的药理作用研究进展[J]. 中南药学, 2025, 23(10): 2976-2982.
- [19] 方波, 赵其阳, 席万鹏, 等. 十种柚类及柚杂种果实中类黄酮含量的超高效液相色谱分析[J]. 中国农业科学, 2013, 46(9): 1892-1901.
- [20] 杨新荣, 窦霞, 李国峰, 等. 柚皮苷药理作用及机制的研究进展[J]. 中草药, 2022, 53(10): 3226-3240.
- [21] 刘芳, 杨跃寰, 杨王霖. 当归总黄酮提取方法比较及工艺条件优化[J]. 四川理工学院学报(自然科学版), 2014, 27(6): 5-8.
- [22] 董雨卓, 赵馨怡, 孟盼, 等. 灯心草发酵液中总黄酮和多糖的超声波提取工艺研究[J]. 安徽农学通报, 2021, 27(7): 15-17.
- [23] 牛丽亚, 刘宛玲, 肖建辉, 等. 黑曲霉发酵法提取麦胚黄酮工艺的研究[J]. 食品工业, 2015, 36(11): 1-3.
- [24] 刘金龙, 危晶晶, 白敬, 等. 植物乳杆菌发酵强化贝母-雪梨汁抗氧化性能的研究[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(23): 117-123.
- [25] 马波, 孙林歆, 乔友志. 多粘类芽孢杆菌发酵法提取银杏黄酮[J]. 中国调味品, 2020, 45(12): 38-40.
- [26] 李春林, 李春阳. 植物乳杆菌蚕豆发酵饮料的制备与抗氧化性研究[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(7): 86-91.
- [27] 鲁青, 严美婷, 张超凤, 等. 微生物发酵技术同步提取青钱柳多糖和黄酮[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(11): 113-117.
- [28] 晏幸, 戴宇琪, 欧丽明, 等. 琯溪蜜柚柚皮黄酮提取工艺优化[J]. 食品工业科技, 2020, 41(17): 135-140.
- [29] 黄淑安, 丁红霞, 杨远帆, 等. 琯溪蜜柚疏果黄酮酶法辅助提取工艺优化及其抑制酪氨酸酶活性[J]. 食品工业科技, 2024, 45(11): 159-166.
- [30] Csuti A, Sik B, Ajtony Z. Measurement of naringin from citrus fruits by high-performance liquid chromatography: a review[J]. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 2024, 54(3): 473-486.
- [31] Ni H, Chen L F, Yan X, et al. Effects of different drying processes on the flavonoids characteristics of Guanxi honey pomelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) peel by HPLC-Q-TOF-MS analysis[J]. European Food Research and Technology, 2024, 250(7): 1987-1998.
- [32] Garcia-Perez B E, Gonzalez-Reyes C, Alarcon-Aguilar A, et al. An overview of the current state of cell viability assessment methods using OECD classification[J]. Toxics, 2024, 12(11): 796.
- [33] Chang P R, Liou J W, Chen P Y, et al. The neuroprotective effects of flavonoid fisetin against corticosterone-induced cell death through modulation of ERK, p38, and PI3K/Akt/FOXO3a-dependent pathways in PC12 cells[J]. Pharmaceutics, 2023, 15(10): 2376.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)