

分类号: Q81

单位代码: 10363

密级: 公开

学号: 2220520129

富含 Amadori(Fru-Arg)化合物蓝莓浓缩汁制备
及其功能活性研究

ENRICHED WITH AMADORI (FRU-ARG)
COMPOUNDS AND STUDY OF ITS FUNCTIONAL
ACTIVITY

学生姓名:	姜心豪
校内导师:	张玉红
校外导师:	蒋洪洲
专 业:	生物与医药
研究方向:	食品工程

论文答辩日期: 2025 年 5 月 15 日

安徽工程大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

学位论文作者签名：姜少豪

日期：2025年 5 月 17 日

安徽工程大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权安徽工程大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密 ☐，在 年解密后适用本版权书。

本学位论文属于

不保密 ☒。

学位论文作者签名：姜少豪

指导教师签名：张玉红

日期：2025 年 5 月 17 日

日期：2025 年 5 月 17 日

富含 Amadori(Fru-Arg)化合物蓝莓浓缩汁制备 及其功能活性研究

摘 要

Amadori 化合物作为美拉德反应关键中间体，近年来因其具有多种生物活性特征而被广泛研究。与晚期糖基化终产物 (AGEs) 的致病性不同，Amadori 化合物 (如 Fru-His、Fru-Arg) 可以螯合金属离子，清除自由基等显著的抗氧化活性。其结构中的 α -氨基酮能直接中和 $\cdot\text{OH}$ 、 ABTS^+ 等活性氧物质。在功能性食品开发中，Amadori 化合物的热稳定性与 pH 耐受性使其成为一种理想的抗氧化剂。相较于传统多酚类物质，Amadori 化合物在模拟胃肠消化中保留率达 78.5%，且与 VE/VC 具有协同增效作用。值得注意的是，烘焙咖啡中发现的咖啡因-Amadori 复合物不仅提升了咖啡的 DPPH 清除率，更赋予产品独特焦糖风味，进一步验证了其在食品品质与功能活性方面的研究价值。

本文以探究蓝莓汁浓缩过程中发生美拉德反应从而产生 Amadori 化合物，进而提高蓝莓汁的抗氧化活性。通过真空脱水合成 Fru-Arg，并进行分离纯化及鉴定，测定了 Fru-Arg 体外抗氧化能力以及对氧化损伤细胞的保护作用，对蓝莓浓缩汁工艺进行优化。主要结论如下：

- (1) 利用 ABTS 清除能力、DPPH 清除能力、 Fe^{3+} 还原能力和羟

基自由基清除能力四种方法，以抗坏血酸当量，测定了 0-10 mmol/L 浓度范围的 Fru-Arg 体外抗氧化活性，结果表明 Fru-Arg 的体外抗氧化能力呈浓度依赖性，且 ABTS 清除能力相对较高。并通过细胞模型进一步验证 Fru-Arg 的抗氧化能力。在 0-10 mmol/L 浓度范围内，Fru-Arg 对细胞即无损伤，也无促进增长作用。通过 H₂O₂ 诱导 HEK-293 细胞建立氧化损伤细胞模型，随后得出 0-10 mmol/L 浓度范围内，Fru-Arg 对氧化损伤细胞有显著的保护作用，呈浓度依赖性，且能有效清除细胞内活性氧（ROS），并通过调节细胞内抗氧化酶活性来降低细胞氧化带来的损害，减少细胞内丙二醛的产生。

（2）测定蓝莓汁中营养成分与氨基酸种类。其中精氨酸含量最高，在蓝莓加热浓缩过程中，其营养成分含量（总酚，黄酮，还原糖，可溶性蛋白，花色苷）显著下降，美拉德反应产物（Fru-Arg，5-HMF）显著升高，且抗氧化活性也明显提高。说明在蓝莓浓缩汁中发挥主要抗氧化作用的可能是 Fru-Arg 与 5-HMF 等美拉德反应产生的活性物质。

（3）优化蓝莓汁真空浓缩工艺，通过对浓缩真空度，浓缩温度，浓缩时间的调控，分析提高 Amadori 化合物浓度并减少 5-HMF 生成的条件，根据单因素结论设计正交实验得出蓝莓浓缩汁最佳工艺为-0.075 MPa，90℃，90 min，并验证了真空热浓缩对蓝莓汁体外抗氧化能力有显著提高。

关键词：Amadori 化合物，Fru-Arg，HEK-293 细胞，抗氧化活性，蓝莓浓缩汁

PREPARATION OF BLUEBERRY JUICE CONCENTRATE ENRICHED WITH AMADORI (FRU-ARG) COMPOUNDS AND STUDY OF ITS FUNCTIONAL ACTIVITY

ABSTRACT

Amadori compounds, as key intermediates of the Meladic reaction, have been extensively studied in recent years due to their diverse bioactive profiles. Unlike the pathogenicity of advanced glycosylation end products (AGEs), Amadori compounds (e.g., Fru-His, Fru-Arg) can chelate metal ions, scavenge free radicals, and other significant antioxidant activities. The α -amino ketone in its structure can directly neutralize reactive oxygen species such as $\bullet$ OH and ABTS⁺. The thermal stability and pH tolerance of Amadori compounds make them an ideal antioxidant in functional food development. Compared to conventional polyphenols, Amadori compounds showed 78.5% retention in simulated gastrointestinal digestion and synergistic effects with VE/VC. Notably, the caffeine-Amadori complex found in roasted coffee not only enhanced the DPPH scavenging rate of the coffee, but also conferred a unique caramel flavor to the product, which further validated its research value in terms of food quality and functional activity.

In this paper, we investigated the occurrence of Meladic reaction during the concentration of blueberry juice to produce Amadori compounds, which in turn improved the antioxidant activity of blueberry juice. Fru-Arg was synthesized by vacuum dehydration, isolated, purified and identified, and the in vitro antioxidant capacity of Fru-Arg as well as its protective effect on oxidatively damaged cells were determined to optimize the blueberry juice concentrate process. The main conclusions are as follows:

(1) The in vitro antioxidant activity of Fru-Arg in the concentration range of 0-10 mmol/L was determined using four methods, namely ABTS scavenging capacity, DPPH scavenging capacity, Fe^{3+} reducing capacity and hydroxyl radical scavenging capacity, in ascorbic acid equivalents, and the results showed that the in vitro antioxidant capacity of Fru-Arg was concentration-dependent, and the scavenging capacity of ABTS was prominent. And the antioxidant capacity of Fru-Arg was further verified by cell modeling. In the concentration range of 0-10 mmol/L, Fru-Arg had neither damaging nor growth-promoting effects on cells. A cell model of oxidative damage was established in HEK-293 cells induced by H_2O_2 , and it was subsequently concluded that Fru-Arg had a significant protective effect on oxidatively damaged cells in the concentration range of 0-10 mmol/L in a concentration-dependent manner, and it could effectively scavenge the intracellular reactive oxygen species (ROS), and reduce the

oxidative damage by regulating the activity of intracellular antioxidant enzymes, and reduce the production of malondialdehyde in the cell. Malondialdehyde production.

(2) Determination of nutrients and amino acid species in blueberry juice. The content of arginine was the highest, and during the process of blueberry heating and concentration, the content of nutrients (total phenols, flavonoids, reducing sugars, soluble proteins, anthocyanins) decreased significantly, and the products of the meladic reaction (Fru-Arg, 5-HMF) increased significantly, and the antioxidant activity was also increased significantly. This suggests that the main antioxidant effect in blueberry juice concentrate may be the active substances produced by the meladic reaction of Fru-Arg and 5-HMF.

(3) Optimize the vacuum concentration process of blueberry juice, analyze the conditions to increase the concentration of Amadori compounds and reduce the generation of 5-HMF through the regulation of concentration vacuum, concentration temperature and concentration time, design orthogonal experiments based on the conclusion of the one-way conclusion that the optimal process of blueberry juice concentration is - 0.075 MPa, 90 °C, 90 min, and verified that the vacuum concentration has a significant increase in the in vitro antioxidant capacity of blueberry juice. capacity of blueberry juice in vitro.

KEY WORDS: Amadori compounds, Fru-Arg, HEK-293 cells, antioxidant, blueberry juice concentrate

目 录

摘 要.....	I
ABSTRACT.....	III
第 1 章 绪论.....	1
1.1 蓝莓概述.....	1
1.1.1 蓝莓简介.....	1
1.1.2 蓝莓的营养价值.....	2
1.1.3 蓝莓加工食品的研究现状.....	2
1.2 浓缩果汁概述.....	4
1.2.1 浓缩果汁发展现状.....	4
1.2.2 果汁浓缩技术研究现状.....	4
1.2.3 蓝莓浓缩汁的研究现状.....	5
1.3 果汁非酶促褐变的研究.....	5
1.3.1 美拉德反应.....	6
1.3.2 Amadori 化合物研究现状.....	7
1.3.3 抗氧化研究方法概述.....	8
1.4 立题背景与意义.....	9
1.5 主要研究内容.....	9
第二章 Fru-Arg 的制备及其抗氧化活性研究	11
2.1 前言.....	11
2.2 材料与仪器.....	12
2.2.1 实验材料与试剂.....	12
2.2.2 实验设备.....	13
2.3 实验方法.....	13

2.3.1 Fru-Arg 的制备与纯化	13
2.3.2 Fru-Arg 的液相色谱-质谱分析	14
2.3.3 Fru-Arg 抗氧化活性测定	14
2.3.4 细胞培养及 Fru-Arg 对细胞活性的影响	14
2.3.5 HEK-293 细胞氧化应激模型的建立	14
2.3.6 Fru-Arg 对氧化损伤细胞的保护作用	14
2.3.7 Fru-Arg 对 HEK-293 细胞中 ROS 的影响	15
2.3.8 Fru-Arg 对细胞中抗氧化酶含量的影响	15
2.3.9 统计分析.....	15
2.4 结果与分析.....	15
2.4.1 Fru-Arg 的合成与纯化	15
2.4.2 Fru-Arg 液相色谱-质谱分析	17
2.4.3 Fru-Arg 抗氧化活性测定	18
2.4.4 Fru-Arg 对 HEK-293 细胞活力的影响.....	19
2.4.5 HEK-293 细胞氧化应激模型的建立	20
2.4.6 Fru-Arg 对氧化损伤细胞的保护作用	20
2.4.7 Fru-Arg 对 HEK-293 细胞中 ROS 的影响	21
2.4.8 Fru-Arg 对细胞中抗氧化酶含量的影响。	23
2.5 本章小结.....	23
第三章 蓝莓浓缩汁成分检测与功能分析.....	25
3.1 前言.....	25
3.2 材料与仪器.....	25
3.2.1 实验原料与试剂.....	25
3.2.2 实验仪器.....	26
3.3 实验方法.....	27

3.3.1 蓝莓浓缩汁的制备.....	27
3.3.2 游离氨基酸的测定.....	27
3.3.3 浓缩过程中营养成分变化.....	27
3.3.4 体外抗氧化能力测定.....	29
3.3.5 数据分析.....	30
3.4 结果与分析.....	30
3.4.1 蓝莓汁中的营养成分.....	30
3.4.2 浓缩过程中营养成分变化.....	31
3.4.3 浓缩过程中抗氧化活性变化.....	36
3.4.4 相关性分析.....	37
3.5 本章小结.....	39
第四章 富含 Amadori(Fru-Arg)化合物蓝莓浓缩汁工艺研究.....	40
4.1 前言.....	40
4.2 材料与仪器.....	40
4.2.1 实验原料与试剂.....	40
4.2.2 实验仪器.....	40
4.3 实验方法.....	41
4.3.1 蓝莓汁制备.....	41
4.3.2 不同浓缩真空度对蓝莓浓缩汁的影响.....	41
4.3.3 不同浓缩时间对蓝莓浓缩汁的影响.....	41
4.3.4 不同浓缩温度对蓝莓浓缩汁的影响.....	41
4.3.5 正交试验设计.....	41
4.3.6 抗氧化能力测定.....	42
4.3.7 数据分析.....	42
4.4 结果与分析.....	42

4.4.1 不同条件对浓缩汁色泽的影响.....	42
4.4.2 真空度对浓缩汁的影响.....	43
4.4.3 时间对浓缩汁的影响.....	44
4.4.4 不同浓缩温度对浓缩汁中 Fru-Arg、5-HMF 和褐变程度的影响.....	45
4.4.5 蓝莓浓缩汁的工艺优化.....	45
4.4.6 蓝莓浓缩汁的抗氧化能力测定.....	47
4.5 本章小结.....	47
第五章 结论与展望.....	49
5.1 结论.....	49
5.2 展望.....	50
参考文献.....	51
攻读学位期间发表的学术论文.....	61
致谢.....	62

第 1 章 绪论

1.1 蓝莓概述

1.1.1 蓝莓简介

蓝莓（Blueberry），属于杜鹃花科越橘属植物，为多年生灌木。蓝莓的颜色呈深蓝色，是自然界少有的蓝色果实，经过转色期以后的蓝莓外形呈椭圆型，其直径大约为 5-16 毫米，成熟后的蓝莓表面会覆盖一层看似蜡质的白色果粉，这是蓝莓天然的保护层，其能有效的锁住水分。蓝莓的品种主要分为三大类，高丛蓝莓、矮丛蓝莓和兔眼蓝莓（因其颜色与兔眼相似而得名），而高丛蓝莓又可分为南高丛、北高丛和半高丛（由高丛蓝莓与矮丛蓝莓杂交而来），高丛蓝莓耐寒性一般，果实较大，适合于温带气候种植，矮丛蓝莓耐寒性强，果实较小，适合于北方种植，兔眼蓝莓适合亚热带气候，其果实甜度高。蓝莓口感酸甜，在小浆果中由于其独特的口感和极高的营养价值而获得高度评价，也被称为“浆果之王”^[1]。蓝莓作为公认的“护眼水果”，是因为其抗氧化的价值极高。众所周知，蓝莓中最核心的营养成分就是其果皮中的花色苷。花色苷是一种水溶性的色素，其能自由穿过血脑屏障，直接作用于视网膜和中枢神经，有较好的缓解视觉疲劳和提高夜间视力的功能。由于蓝莓极高的营养价值，近年来，学者们对于蓝莓的研究不断深入。也得益于现代农业技术的发展，蓝莓种植产业也迅速发展。蓝莓起源于北美洲，如今已扩展至各大洲。而智利与秘鲁凭借其独特的南半球地理位置的优势，以反季节供应模式成为了南半球的主要产区。在健康消费的趋势下，我国蓝莓市场规模逐年扩大。根据 2024 年蓝莓产业发展报告，我国蓝莓栽培面积 143.82 万亩，总产量为 78 万 t，目前已经成为全球范围内蓝莓最大产区。以辽东半岛，云贵高原和长白山为主，我国的蓝莓产区主要分布在贵州、辽宁、山东、四川、安徽、云南、吉林等省。联合国粮农组织（FAO）将蓝莓与三文鱼、绿茶、燕麦、菠菜并列为“21 世纪人类健康食品”，全球年消费量持续攀升，已成为绿色农业经济的重要支柱。

1.1.2 蓝莓的营养价值

蓝莓作为全球公认的“超级水果”，富含多种营养物质，也使其具有极高的药用保健价值。蓝莓的核心成分花色苷是一类水溶性天然色素，属于类黄酮化合物，除蓝莓之外也常见于紫甘蓝、黑枸杞和紫薯等深色果蔬中。目前对于花色苷的研究非常之多，朱金艳等^[2]发现蓝莓中的花色苷有 14 种，不同品种的蓝莓，其花色苷种类也可能存在一定的差异性。由于花色苷独特的分子结构，使得其抗氧化能力相对较高，研究发现，相较于天然抗氧化剂维生素 C 与维生素 E^[3]，花色苷表现出比两者更强的抗氧化能力，其能高效清除体内的自由基，以减缓细胞氧化损伤，从而延缓衰老并降低炎症、心血管疾病等慢性病风险。除花色苷外，蓝莓中黄酮类物质还包括杨梅素和槲皮素等。槲皮素具有较强的抗炎特性，并且其能激活 AMPK 通路，增强胰岛素敏感性，对 II 型糖尿病防治具有潜在价值，而杨梅素也具有抗氧化、抗炎、等多种生物活性，并且对 DSS 诱导的小鼠结肠炎有一定的保护作用。蓝莓中也含有多种多酚类物质，如绿原酸与鞣花酸等酚酸类物质^[4]。除此之外，蓝莓中也富含多种氨基酸、维生素和有机酸等营养物质。经检测蓝莓中的氨基酸高达 19 种之多，含八种人体必需氨基酸，且不同蓝莓品种氨基酸含量和种类差异极大，受地区的影响较大。蓝莓中的维生素主要有维生素 C、维生素 E 和维生素 K 等，这些维生素对蓝莓的抗氧化功能活性也作出了巨大贡献。蓝莓果实中的有机酸以柠檬酸和苹果酸为主，占总酸含量的 80%，其余还有奎宁酸、琥珀酸和酒石酸等，正因为有了这些酸味物质，蓝莓在口感方面才有了这种独特的酸甜风味。蓝莓中也含有大量的果胶，其是蓝莓中核心的膳食纤维，对降低糖尿病、高血糖和高血脂等疾病起到了不可忽视的作用。除此之外，蓝莓中也含有钾、钙、镁、磷等矿物质及锌、铜、硒等微量元素。正因这些营养物质，赋予了蓝莓抗氧化防衰老、抗炎抗菌、改善视力、降低心血管疾病和抗癌等多种功能活性。

1.1.3 蓝莓加工食品的研究现状

由于蓝莓的不耐储藏与运输方面的问题，每年都会导致大量的蓝莓鲜果被浪费，而失去其经济价值。如今，由于蓝莓种植面积的扩大以及人们对蓝莓营养价值的重视，越来越多的蓝莓加工副产品出现在市场上，并且已经不只是简单的物

理加工方式,已经出现了通过生物技术、分子提取等技术开发出的蓝莓高附加值产品。

目前主流的蓝莓加工产品还是以蓝莓果汁、蓝莓果干以及蓝莓果酱为主,因为这些加工方式相对简单,且加工技术成熟,此类加工的蓝莓产品不仅使用方便而且还能作为风味改善的原料加入到其他食品中,对于公司而言此类产品生产成本较低且受众广,其性价比更高。郭弘璇^[5]利用冷冻干燥法,并添加麦芽糊精得到一款蓝莓果粉,其极大程度的保留了蓝莓原有的营养成分,抗氧化保持率为96.45%。为蓝莓粉的加工提供了新思路。和丽媛^[6]以蓝莓原液和玫瑰原液为原料(配比为6:4),并添加4.5 g/100 mL 白糖,12 mg/100 mL 柠檬酸,0.16 g/100 mL 卡拉胶,得到一款蓝莓-玫瑰复合饮料,在解决蓝莓货架期问题的同时,又丰富了可食性玫瑰的产品。吕芳楠等^[7]利用不同干燥方式对7个不同品种的蓝莓进行蓝莓果干的制备,对其干燥前后的营养物质及抗氧化活性的变化进行测定,通过系统聚类分析得出圆蓝品种为最佳干燥品种,真空干燥为最佳干燥方式。

基于科技的发展以及技术的创新,越来越多的精加工蓝莓产品被报道,例如蓝莓果酒与果醋、蓝莓酵素、花青素胶囊以及蓝莓相关的微胶囊化产品。阳志锐等^[8]利用不同酵母进行混菌发酵蓝莓酒,通过正交实验进行工艺优化,得到一款不论在口感、观感还是抗氧化能力方面都优于单菌发酵的发酵蓝莓酒。陈祖玉等^[9],以总酸含量为指标,对蓝莓果醋发酵工艺进行优化,得到一款酸甜适中,醋香浓郁并保留一定蓝莓果香且具有一定抗氧化活性的蓝莓果醋。Kawabata 等^[10]通过对患者服用花青素胶囊与叶黄素的组合物,发现其在保证安全的前提下,可以改善人类乏力和精神疲劳的主观症状,且无副作用。Wang 等^[11]通过使用纤维素纳米晶体,作为大离子交联剂制备了蓝莓花青素提取物负载壳聚糖微胶囊,并得出纤维素纳米晶体是一种很有前途的交联剂,可形成稳定的蓝莓花青素负载壳聚糖微胶囊。随着消费者对功能性食品需求的增长,蓝莓加工从传统的果酱、果汁向高附加值产品延伸,同时在加工过程中最大化保留活性成分、提升生物利用度成为核心研究方向。

1.2 浓缩果汁概述

1.2.1 浓缩果汁发展现状

浓缩果汁的基本制作原理就是通过去除多余水分，保留果汁中的营养物质。这样既可以减小原汁的体积，减少运输成本，也能降低果汁的水分活度以抑制微生物的生长，提高果汁的货架期，果蔬类产品常常因为其容易腐烂，货架期短等原因而被大量浪费掉，将其榨汁浓缩后能避免其大量浪费又解决了果蔬的季节性限制等问题。浓缩果汁可作为风味添加剂与其他食品进行复配，得到复合型饮料，这样即能做到节约成本又能丰富产品的类型^[12]。浓缩果汁目前在食品工业中占据重要的市场，目前浓缩果汁的研究主要侧重于营养的保留、加工效率的提升及功能性创新。随着消费者对天然、健康与绿色食品需求的增长，浓缩果汁加工技术正从传统加热蒸发向绿色高效的方向转型。

1.2.2 果汁浓缩技术研究现状

目前，对于果汁浓缩方面的工业技术主要还是采用比较简便的热浓缩、真空冷冻浓缩技术，还有基于分子筛原理的反渗透和膜浓缩技术。果汁浓缩技术的研究正向着效率高、能耗低与高营养保留的方向发展。而传统加热蒸发工艺因其会破坏大量的果汁中原有的营养物质，因此加热浓缩的技术逐渐被非热加工技术所替代，膜分离技术与冷冻浓缩技术逐渐成为果汁工业浓缩技术的主流。膜分离技术通过反渗透低温下，去除果汁中的水分，其可以保留 90% 以上营养物质，且能耗较传统方法降低了 60%，但膜污染与高成本仍是最大的问题所在。真空冷冻浓缩技术通过对果汁提前低温冷冻，然后通过真空使果汁中的冰直接升华从而实现果汁的浓缩目的，此方法不经过加热，对营养物质做到了最大程度上的保留，尤其适用于蓝莓等花青素含量高的果汁，但其缺点就是设备的投资与能耗较大，不利于大规模的应用。郑自奋等^[13]通过不同的浓缩方法（膜浓缩、冻融浓缩和真空浓缩）对甘子汁进行了浓缩，分析其对营养物质的保留以及抗氧化活性和稳定性的影响，结果表明其中冻融浓缩对甘子汁中维生素 C 的保留率为 94.88%，总酚含量保留率为 91.51%，且冻融浓缩的 ABTS 自由基清除能力与 DPPH 自由基清除能力显著高于其他两种浓缩方式，且果汁的稳定性更强。卢靖辉等^[14]通过加热浓缩、真空浓缩和联合冷冻浓缩等 5 种浓缩方法对枸杞汁进行了浓缩处理，并以

其类胡萝卜素、总酚和总黄酮等营养物质的保留率和 DPPH 自由基清除能力与 Fe^{3+} 还原能力作为指标进行了对比分析, 最后得出结论, 真空浓缩相较于其他浓缩方式能有效的保留总酚、总黄酮等营养成分, 显著减少类胡萝卜素的降解, 且抗氧化能力与色泽的保护能力也显著高于其他浓缩方式, 因此, 真空浓缩是制备枸杞浓缩汁的优势方法。Mastello 等^[15]利用不同浓缩方法对橙汁进行浓缩, 最后分析其浓缩方式对挥发性成分的影响发现, 冷冻浓缩橙汁能有效的保留橙汁的原有风味。张敬^[16]选用聚醚砜、聚偏氟乙烯和聚砜三种不同纳滤膜对哈密瓜汁进行浓缩处理, 发现截留分子量为 400 的聚醚砜纳滤膜对哈密瓜汁的浓缩效果最好。而目前也有报道出, 利用联合微波技术进行浓缩果汁的研究^[17], 还有报道利用欧姆加热联合真空浓缩技术对番茄汁进行浓缩, 结果显示欧姆真空浓缩法在低温条件下能够最大限度的保留番茄汁中的营养成分和口感, 且能减少能耗^[18]。如今在果汁浓缩技术的创新上有很多报道, 但其都各有利弊, 因此对于果汁浓缩的技术还需要更进一步的研究, 在保证食品安全的前提下, 最大程度上保留果汁原有的营养成分与果汁原有风味物质以及减少浓缩工艺的能源消耗。

1.2.3 蓝莓浓缩汁的研究现状

蓝莓作为一种小浆果类的水果虽然其营养价值丰富, 但其也存在果蔬类食品不耐储藏, 采后易腐败等缺点, 对果农造成极大的经济损失, 而近年来对蓝莓的保鲜技术也在日益精进, 有通过动态气调和超低氧等气调保鲜技术, 还有通过制备果实纳米活性包膜等材料保鲜技术, 除此之外, 通过基因编辑技术改变果实软化相关基因以提高蓝莓货架期。但这些高端技术就目前来说普遍成本较高, 难以做到规模化应用。因此将蓝莓进行加工成不同的副产品是目前的主流方法。蓝莓经过挑选去除其中烂果等杂质, 通过压榨浓缩等工序制成浓缩果汁, 用于蓝莓汁的贮藏, 为各种蓝莓风味的产品提供原料。

1.3 果汁非酶促褐变的研究

果汁的褐变主要包括酶促褐变和非酶促褐变两类。酶促褐变主要是由多酚氧化酶与多酚类底物接触, 在氧气中催化多酚氧化聚合形成褐色或黑色的醌类色素。而非酶促反应褐变主要包括美拉德反应、抗坏血酸褐变和酚类物质氧化缩合反应。美拉德反应主要是由于果汁中的葡萄糖、果糖与游离氨基酸在加热或长期贮藏时

发生,首先生成 Amadori 化合物最后形成类黑精导致果汁褐变与风味变化。抗坏血酸在氧气、金属离子的催化下经过一系列反应最后生成黄色至褐色色素。多酚在金属离子催化下氧化为醌类,进一步聚合形成褐色沉淀。

1.3.1 美拉德反应

美拉德反应是食品加工以及贮藏中至关重要的非酶促褐变反应,其是由食物中的还原糖(如葡萄糖和果糖)与食物中的游离氨基酸或含有游离氨基酸的蛋白质或多肽,在一定温度条件下或长期储存的条件下发生的一系列复杂化学反应。这一过程始于 1912 年法国化学家 Louis-Camille Maillard 的发现,现被广泛认为是食物色泽、风味形成的关键因素,同时也与营养损失、Amadori 化合物生成与美拉德反应后期的一些潜在有害物质的生成相关。美拉德反应主要分为初始阶段、中期阶段和终末阶段。初始阶段:还原糖的羰基与含氨基化合物(氨基酸、肽类)的游离氨基发生亲核加成反应,生成不稳定的 Schiff 碱,随后, Schiff 碱通过分子内重排形成热力学更稳定的 Amadori 化合物(醛糖参与)或 Heyns 产物(酮糖参与)^[19]。此阶段的产物无色或颜色较淡且无挥发性,是美拉德反应中第一个相对稳定的产物,其作为美拉德反应的关键中间体为后续反应提供了底物。中期阶段:进入中期阶段后,以 Amadori 化合物/Heyns 化合物为反应底物,在加热催化下,不同的 pH 条件发生不同的反应。在酸性条件下($\text{pH} < 5$ 时), Amadori 产物通过 1,2-烯醇化反应形成 5-羟甲基糠醛(5-HMF, 过高浓度可能存在潜在危害);碱性条件下($\text{pH} > 7$)则发生 Strecker 降解,中间体裂解为 α -二羰基化合物(如丙酮醛、丁二酮)及 Strecker 醛(如苯乙醛、异戊醛),进一步生成呋喃、吡嗪等低分子化合物,此类物质为食品的风味做出巨大贡献。终末阶段:通过多步聚合反应将活性中间体转化为高分子色素: α -二羰基与 Strecker 醛经醛醇缩合形成共轭烯酮,继而与胺类物质环化生成吡咯、吡啶等含氮杂环,最终生成大分子棕色物质类黑精。美拉德反应的三阶段为食品加工中的色泽-风味-营养平衡提供了理论框架。通过调控反应条件,可以优化产物的组成,在抑制有害物质(丙烯酰胺、HMF)生成的同时,最大化产生风味物质与活性功能价值。另外,终末阶段的产物二羰基化合物还会与氨基酸进行反应生成晚期糖基化产物,研究发现,这些物质与糖尿病等密切相关^[20]。

1.3.2 Amadori 化合物研究现状

近年来,食物在加热过程中发生的美拉德反应备受关注^[21]。而 Amadori 化合物是美拉德反应的中间产物,在美拉德反应产物中,其属于相对比较稳定的一种,近年来,在食品科学、生物医学与化学等多个领域都有过相关报道,且在基础机制研究与实际应用中都取得了显著的进展。目前对于 Amadori 化合物的研究大都集中在烤烟上,因其作为风味物质的前体物质,对烤烟风味的影响极大。在之前的研究中,也有报道出 Amadori 化合物与生成晚期糖基化产物有关,揭示了其与糖尿病、神经退行性疾病等慢性病发展有一定的关系。如今,由于 Amadori 化合物的一些功能活性被报道出来,渐渐的,食品加工领域中,研究者们也开始对其关注。Amadori 化合物不仅是食品色泽、风味形成的重要前体物质,也具有一定的功能活性。研究人员更多的开始研究如何通过对其生成的条件进行调控(如温度,反应 pH 等),以达成在富集 Amadori 化合物的同时,减少美拉德后期的一些有害物质的产生(如 5-HMF、丙烯酰胺和晚期糖基化终末产物)。目前在食品领域的报道中表明 Amadori 化合物具有较好的功能活性,如抗氧化、抗炎、金属离子螯合作用、血管紧张素转化酶(ACE)抑制作用等功能活性^[22-26],且研究者在大蒜、番茄粉、洋葱、梨膏等果蔬制品中检测出 Amadori 化合物^[27, 28]。

(1) 抗氧化能力: Amadori 化合物一般含有氨基、羟基等活性基团,能直接捕获体内的自由基(如羟自由基,超氧阴离子),通过电子转移或提供氢原子来阻止氧化反应^[29]。此外,Amadori 化合物可通过螯合金属离子(如 Fe^{2+} 、 Cu^{+})抑制 Fenton 反应,减少羟自由基的生成,从而保护脂质、蛋白质等生物大分子免受氧化损伤。崔和平^[30]研究发现 Amadori 化合物具有较好的 Fe^{2+} 螯合能力,以减少脂质氧化。Mossine 等^[31]研究发现 Fru-His 能螯合 Cu^{+} ,具有一定的抗氧化能力。Kenjiro 等^[32]在大蒜中分离出 Fru-Arg,并发现其对过氧化氢有较好清除能力,抗氧化效果显著。此外,Feng 等^[22]发现在虾副产品中发生美拉德反应生成的产物对人 HepG2 细胞氧化应激有抑制作用。

(2) 抗炎能力: Amadori 化合物的抗炎能力机制与其在生物体内的分子调控作用有关,主要通过干预炎症信号通路、调节免疫细胞功能及抑制炎症介质的生成等途径实现。Hui 等^[33]通过脂多糖激活的小鼠 BV-2 小胶质细胞模型,探究了 Fru-Arg 对神经炎症的作用。结果显示, Fru-Arg 不仅能有效阻断脂多糖诱导

的一氧化氮生成,还可通过调节氧化应激相关蛋白,抑制小胶质细胞的过度活化,从而缓解神经炎症反应。Oh 等^[34]发现 Amadori 化合物可抑制巨噬细胞分泌促炎因子 TNF- α ,并在肠上皮 Caco-2 细胞中显著降低 IL-8 与 IL-1 β 的基因转录水平。

(3) 降血压能力: Amadori 化合物的降血压活性原理是通过抑制血管紧张素转换酶 (ACE) 活性,减少血管紧张素 II 的生成来实现。其主要机制是通过以酶活性中心的金属离子螯合,使酶失活,从而达到降血压效果。Zhou 等^[35]通过酶抑制动力学揭示了果糖-组氨酸 Fru-His 对血管紧张素转化酶 (ACE) 的抑制机制,证明该化合物以竞争性抑制的方式发挥作用。通过分子对接表明, Fru-His 通过氢键与 ACE 活性中心锌离子的配位作用实现对 ACE 催化功能阻断作用。

1.3.3 抗氧化研究方法概述

抗氧化活性评价是功能食品与天然产物研究领域的核心内容,其研究方法随着分析技术的进步不断改进。目前,抗氧化研究主要是以体外化学模型与细胞生物学模型两类方法进行,研究者一般通过体外化学模型筛选出抗氧化效果比较好的模型,然后进一步在细胞模型中进行验证。体外化学模型基于自由基清除、氧化还原反应等原理,通过方便简洁的化学实验快速测定目标物质的抗氧化能力。其中, DPPH 自由基清除能力实验操作比较简单,因此成为实验室最常用的初筛手段,通过测定 517 nm 处吸光值变化可测定出样品的供氢能力^[36]; ABTS 法则通过模拟生理 pH 环境下的自由基清除过程,更适用于水溶性成分的抗氧化活性测定^[37]。此外, FRAP 法通过铁离子还原能力反映样品的电子转移效率^[38],而 ORAC 法则动态监测过氧自由基的抑制过程^[39]。但是,化学方法虽能高效表答抗氧化剂的抗氧化活性,却难以模拟生物体内复杂的代谢过程及在细胞复杂环境中的调节作用。

因此,通过细胞模型的来表达样品抗氧化能力的研究逐渐成为机制探索的重要方法。细胞模型通过外源性氧化应激诱导(如 H₂O₂、AAPH)建立细胞氧化损伤模型,进而测定抗氧化剂对细胞中活性氧 (ROS) 水平、线粒体功能及内源性抗氧化系统的调控作用。如, DCFH-DA 荧光探针可以反映出细胞内 ROS 的含量, JC-1 染色通过线粒体膜电位的衰减程度表达出氧化损伤的亚细胞靶点。在分子机制层面,研究者通过检测超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 等抗氧化酶活性,结合 Nrf2/ARE 信号通路的关键蛋白表达分析,可

系统阐明抗氧化成分对细胞防御网络的激活作用。

1.4 立题背景与意义

蓝莓富含多酚类物质、黄酮类化合物、维生素及矿物质等活性成分，具有抗氧化、抗炎、调节代谢和改善认知功能等生理作用，是天然功能性食品的重要原料。蓝莓浓缩汁作为其深加工产品，既保留了蓝莓的营养特性，又延长了保质期，但加工过程中活性成分的变化、热敏性物质（如花青素、维生素 C）的稳定性以及加工副产物的生成尚未明确。浓缩过程中高温和长时间热处理可能导致部分抗氧化成分（如维生素 C、花青素）的降解，但与此同时，美拉德反应可能生成具有功能潜力的中间产物（如 Amadori 化合物），这些产物对浓缩汁整体抗氧化能力的贡献及其与健康功效的关系仍缺乏系统研究。此外，浓缩工艺参数（如温度、时间、真空度）对有害物质 5-HMF 生成的调控机制尚未明确。

针对上述问题，本研究以蓝莓浓缩汁加工过程中活性成分的动态变化规律，分析美拉德反应产物（如 Amadori 化合物）的生成及其对抗氧化功能的作用。通过优化浓缩工艺参数，探索抑制有害物质生成、最大限度提高抗氧化活性的调控，并验证浓缩汁的抗氧化功能特性。为蓝莓浓缩汁的功能性评价提供科学依据，推动高附加值产品的开发，同时为果蔬深加工行业的质量控制与工艺革新提供理论指导。

1.5 主要研究内容

（1）Fru-Arg 的合成及抗氧化活性研究。利用真空脱水浓缩的方法，在水相体系中合成 Fru-Arg，并通过离子交换树脂分离纯化 Fru-Arg 粗品，最后利用 HPLC-ELSD 与 UHPLC -Q- Exactive MS 进行进行鉴定。得到 Fru-Arg 样品后，首先通过体外化学法表达 Fru-Arg 抗氧化功能活性，建立 HEK-293 氧化损伤细胞模型，利用 Fru-Arg 对氧化损伤细胞的保护作用来表达细胞内抗氧化活性。

（2）蓝莓汁浓缩过程中营养成分及抗氧化活性变化。测定蓝莓汁中氨基酸种类及含量，测定蓝莓汁浓缩过程中总酚、黄酮、还原糖、可溶性蛋白、花色苷、Fru-Arg 和 5-HMF 等营养成分的含量以及褐变程度的变化。通过相关性分析确定蓝莓浓缩汁中营养成分对抗氧化能力的贡献。

(3) 蓝莓汁真空加热浓缩工艺的优化。通过单因素实验调控浓缩真空度、浓缩温度及浓缩时间三个因素，测定不同条件下对 Fru-Arg 与 5-HMF 含量及褐变程度的影响，确定正交实验方案，最终得到蓝莓汁真空热浓缩的最佳工艺，提高蓝莓浓缩汁的抗氧化功能活性。

第二章 Fru-Arg 的制备及其抗氧化活性研究

2.1 前言

美拉德反应(MR)是还原糖与氨基化合物之间发生的一系列复杂的非酶促褐变反应,在食品化学中扮演着重要角色,影响食品的风味、色泽和营养特性。除了其在烹饪中的意义外,该反应还生成了一系列中间产物和晚期糖基化终末产物(AGEs),其中 Amadori 化合物(ACs)作为关键的早期中间体备受关注^[40],Amadori 化合物是在美拉德反应初期通过 Schiff 碱重排形成的,是一个相对比较稳定的美拉德反应中间产物。

近年来,关于 ACs 报道出了其多种生理功能活性,包括抗氧化活性、抗炎症、降血糖能力、血管紧张素转换酶抑制活性、金属离子螯合能力以及止咳作用等^[21, 34, 35, 41-46],使他们成为应用于功能性食品领域的潜在抗氧化剂。ACs 结构多样性取决于氨基酸和糖的前体物质,在不同食品中各类氨基酸含量也有较大差异,其中,由葡萄糖(Glc)和精氨酸(Arg)结合形成的 Fru-Arg 在抗氧化研究中展现出显著潜力。研究表明,Fru-Arg 清除 ABTS 自由基能力与 Vc 或 Trolox 几乎相同,并且其结构相较于 Vc 更加稳定,不易降解。

往往一些具有功能活性的天然大分子抗氧化肽在体外化学法抗氧化活性筛选后,会继续在细胞模型中进一步表征其抗氧化活性及抗氧化机制,在此类氧化应激抑制活性研究中,通常使用 H₂O₂ 诱导的氧化应激细胞模型。其中人胚肾细胞(HEK-293 细胞)较为广泛应用,HEK-293 细胞作为一种人胚肾细胞系,其生物学特性与正常人体细胞具有高度相似性。基于这一特点,利用 H₂O₂ 诱导 HEK-293 细胞建立的氧化损伤模型能够较好地模拟机体内真实的氧化应激状态。该模型在研究细胞氧化应激相关机制方面具有重要价值,可为深入探索这一生物学过程提供可靠的实验依据^[47]。本文利用真空脱水技术在水相中合成 Fru-Arg 样品^[48],并通过 HPLC-ELSD 以及 UHPLC-Q Exactive MS 进行分析。以 Vc 做当量测定 Fru-Arg 体外抗氧化活性(ABTS⁺清除率、DPPH·清除率、Fe³⁺还原能力、羟自由基清除率),并通过构建 H₂O₂ 诱导的 HEK-293 细胞氧化损伤模型,系统评估 Fru-Arg 对氧化应激损伤细胞的保护作用,旨在为 Fru-Arg 作为功能性抗氧化剂

在食品领域的开发与应用提供理论依据。

2.2 材料与仪器

2.2.1 实验材料与试剂

表 2-1 实验材料与试剂

Table 2-1 Experimental reagents and materials

试剂名称	规格	厂家
D-(+)-无水葡萄糖	AR	国药集团化学试剂有限公司
L-(+)-抗坏血酸	AR	国药集团化学试剂有限公司
过硫酸钾	AR	国药集团化学试剂有限公司
水杨酸	AR	国药集团化学试剂有限公司
氯化铁	AR	国药集团化学试剂有限公司
L-精氨酸	AR	国药集团化学试剂有限公司
2,3,5-氯化三苯基四氮唑 (TTC)	AR	上海源叶生物科技有限公司
ABTS	AR	上海阿拉丁生化科技有限公司
DPPH	AR	上海阿拉丁生化科技有限公司
TPTZ	AR	上海阿拉丁生化科技有限公司
Dowex 50WX4 离子交换树脂	/	京百灵威科技有限公司
SPE 氨基小柱	/	天津 BOJIN 科技有限公司
人胚肾细胞 (HEK-293)	/	海星生物科技有限公司
胎牛血清 (优级)	/	塞维尔生物科技有限公司
胰蛋白酶消化液	/	塞维尔生物科技有限公司
人胚肾细胞 (HEK-293)	/	海星生物科技有限公司
胎牛血清 (优级)	/	塞维尔生物科技有限公司
胰蛋白酶消化液	/	塞维尔生物科技有限公司
青霉素-链霉素	/	塞维尔生物科技有限公司
丙二醛 (MDA) 测定试剂盒	/	南京建成生物工程研究所
总超氧化物歧化酶 (T-SOD) 测定试剂盒	/	南京建成生物工程研究所
过氧化氢 (CAT) 测定试剂盒	/	南京建成生物工程研究所
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	/	碧云天生物技术有限公司

2.2.2 实验设备

表 2-2 实验设备
Table 2-2 Experimental equipment

实验设备	型号	厂家
冷冻干燥机	LGJ-12	北京松源华兴科技有限公司
生物安全柜	BSC-1100	博科控股集团有限公司
超声波提取仪	KQ3200D	昆山市超声仪器邮箱公司
超高效液相色谱质谱仪	UHPLC -Q- Exactive MS	赛默飞（美国）
反相色谱柱	ACQUITY UPLC HSS T3	沃特世（美国）
二氧化碳培养箱	311GP	赛默飞（美国）
荧光倒置显微镜	Ix73-dp74	日本奥林巴斯（olympus）

2.3 实验方法

2.3.1 Fru-Arg 的制备与纯化

Fru-Arg 在水相系统中制备。分别称取葡萄糖（Glc, 3.6007 g, 0.02 mol）和精氨酸（Arg, 1.7424 g, 0.01 mol），以 1:2 的摩尔比（共 30 mmol）充分溶解在 40 mL 超纯水中。将溶液转移到 100 mL 圆底烧瓶中，控制真空泵在 -0.08 MPa 的真空条件下，使用旋转蒸发仪在 80℃ 条件下加热 120 min。当反应结束后，立即将样品在冰水浴中冷却，并用超纯水将样品重新溶解至 40 mL。

Fru-Arg 的纯化参考 zhou^[48]的方法并进行，使用 Dowex 50WX4 离子交换树脂（氢型）从反应混合溶液中分离出 Fru-Arg。首先用超纯水将树脂中的非极性和弱极性的葡萄糖和美拉德中后期产物等杂质洗脱出柱，然后用 0.2 mol/L 的氨水对柱中的 Fru-Arg 进行洗脱。收集 TTC 反应（2, 3, 5-三苯基氯化四氮唑）阳性样品^[49, 50]，使用 SPE 小柱（氨基）对洗脱样品进行脱色，之后采用液相色谱蒸发光散射检测器（HPLC-ELSD）进一步进行检测，保留仅出现单峰的洗脱液样品，最后将所得样品进行真空冷冻干燥得到淡黄色粉末，并计算得率，公式如下：

$$\text{Amadori 化合物得率} = \frac{\text{纯化后所得 Amadori 化合物摩尔量}}{\text{氨基酸原料初始摩尔量}} \times 100\% \quad (\text{式 2-1})$$

2.3.2 Fru-Arg 的液相色谱-质谱分析

使用超高效液相色谱串联四极杆轨道离子阱质谱 (UHPLC-Q Exactive MS) 系统对纯化后的 Fru-Arg 进行结构表征, 分析方法参考 Tang 等^[51], 并作出一些修改。

2.3.3 Fru-Arg 抗氧化活性测定

测定了 Fru-Arg 的体外抗氧化能力, 以抗坏血酸做当量, 并以 Arg 抗氧化能力做对照, ABTS 自由基清除活性参考 Huang 等^[52]方法进行测定, DPPH 自由基清除能力的测定按照 Benjakul^[53]所提出的方法进行, Fe^{3+} 还原能力 (FRAP) 按照 Yin^[54]的描述进行测量, 羟基自由基清除活性测定根据 Wu^[55]的方案进行。

2.3.4 细胞培养及 Fru-Arg 对细胞活性的影响

HEK-293 细胞生长于添加了 10% (v/v) 胎牛血清和 1% (v/v) 青霉素-链霉素溶液的 DMEM 培养基中, 维持在 37°C、5% CO₂ 的条件下, 当细胞生长到约 80% 时, 使用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞进行细胞传代, 本研究中使用的所有细胞都在二十代以内进行传代培养。

细胞毒性实验参考 Liu 等^[47], 将密度为 5.0×10^4 cells/ml 的 HEK-293 细胞接种于 96 孔板中, 用 90 μL 的 DMEM 完全培养基培养 24 h。然后加入 10 μL 不同浓度溶于 DMEM 中的 Fru-Arg (终浓度为 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 mmol/mL), 并用相同浓度梯度 Arg 作为对照组, 再次培养 24 h 后, 使用 CCK-8 方法检测细胞活率。

2.3.5 HEK-293 细胞氧化应激模型的建立

HEK-293 细胞氧化应激模型根据 Liu 等^[56]的方法并稍作修改, 按照 2.6 中的方法进行细胞培养 24 h, 然后分别加入 10 μL 终浓度为 200, 400, 600, 800, 1000, 1200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 , 继续培养 12 h 以诱导细胞氧化应激, 并使用 CCK-8 方法检测细胞活率。

2.3.6 Fru-Arg 对氧化损伤细胞的保护作用

参考 Zhang 等^[57]的方法, 将密度为 5.0×10^4 cells/mL 的细胞接种于 96 孔板, 每孔接种 80 μL , 培养 24 h 后, 空白组加入 10 μL DMEM 培养基, 保护组加入

10 μL 不同浓度溶于 DMEM 培养基的 Fru-Arg (终浓度 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 mmol/mL, 同时做一组相同浓度梯度 Arg 作为 Fru-Arg 的对照组, 损伤组加入 10 μL DMEM 培养基, 培养 24 h。最后空白组加入 10 μL PBS, 保护组和损伤组加入 400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 再培养 12 h。最后使用 CCK-8 方法检测细胞活率。

2.3.7 Fru-Arg 对 HEK-293 细胞中 ROS 的影响

参考 Ren 等^[58]的方法并略加修改, 将密度为 5.0×10^5 cells/mL 的细胞接种于 6 孔板, 每孔终体积 500 μL , 按照 2.8 中方法进行培养。处理后, 吸出培养基, 加入 500 μL 浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ DCFH-DA, 孵育 20min。最后用 PBS 冲洗细胞 2 次以去除多余的 DCFH-DA 探针, 并立即在荧光显微镜下观察并采集细胞荧光图像。

2.3.8 Fru-Arg 对细胞中抗氧化酶含量的影响

按照 2.9 中方法培养细胞。处理后, 用细胞裂解液 RIPA 消化细胞 10 min (冰浴)。刮取细胞, 10000 r/min 离心 10 min, 收集细胞悬液。最后根据试剂盒说明书进行 MDA、T-SOD 和 CAT 指标进行检测。

2.3.9 统计分析

每组实验至少重复进行三次。使用 IBM SPSS Statistics 26 进行数据分析, 差异显著性通过单因素方差分析 ($P < 0.05$), 并使用 Origin 2021 软件进行绘图。

2.4 结果与分析

2.4.1 Fru-Arg 的合成与纯化

Amadori 化合物作为一种美拉德反应中间产物, 多被人们用于风味物质的研究, 近来, Amadori 化合物被发现具有多种功能活性而被用于功能性食品中。Amadori 化合物是由还原糖中的羰基与氨基酸发生加成反应再通过 Amadori 重排后产生, 同时具有糖和氨基酸的特性, 是美拉德反应中较为稳定的化合物, 目前人工合成并分离 Amadori 化合物多种方法, 如甲醇回流法, 真空脱水合成法和乳液合成法等^[59-61]。由于真空脱水合成法的污染小、产率高, 且适合应用于食品行业中等众多优点, 已经被广泛应用。由于 Amadori 化合物的种类多, 且纯化复

杂，在市场上很难购买到我们所需要的 Fru-Arg。因此本文运用真空脱水合成的方法，在水相体系中合成 Fru-Arg。

实验参考周仁杰的方法^[19]选用 L-精氨酸与葡萄糖在 90℃，-0.08 MPa，120 min 条件下合成 Fru-Arg，通过 Dowex 50WX4 离子交换树脂（200-400 目，氢型）吸附，洗出多余糖等中后期反应物后，再用氨水洗脱出 Fru-Arg。对洗脱出的样品进行检测。使用 HPLC-ELSD 检测器进行检测，用葡萄糖和 L-精氨酸做对照，保留仅出现单峰且出峰时间与葡萄糖和 L-精氨酸不同的样品。

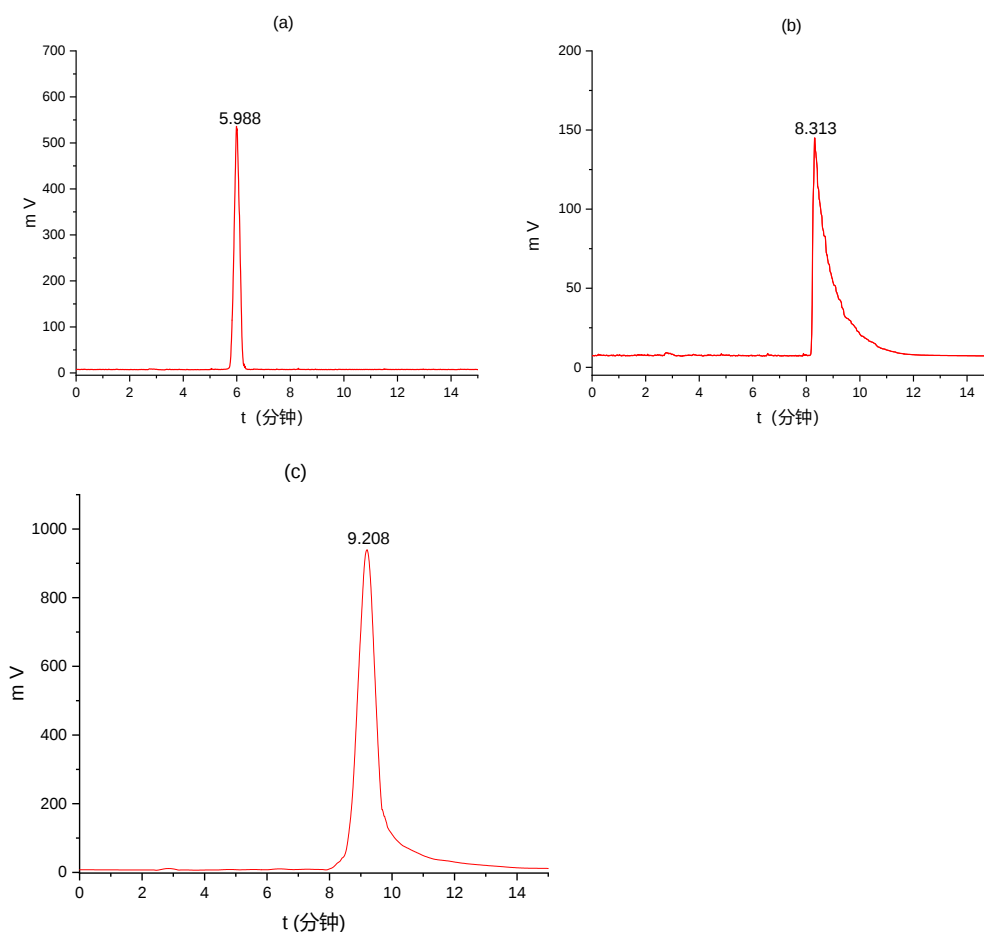


图 2-1 不同样品 HPLC-ELSD 色谱图。(a)葡萄糖；(b)精氨酸；(c)Fru-Arg

Fig. 2-1 HPLC-ELSD chromatograms of different samples(a) glucose ;(b)Arg;(c) Fru-Arg

样品在相同条件下进行液相检测，通过图 2-1（a）可以看出葡萄糖的出峰时间为 5.988 min，出峰时间较早，能明显与 Arg 和 Fru-Arg 区分。图 2-1（b）为精氨酸色谱图，出峰时间为 8.313 min，图 2-1（c）为 Fru-Arg，出峰时间为 9.208 min，相对于 Arg 出峰时间晚一些。因此，对于收集到的样品洗脱液我们保留仅出现单峰且出峰时间在 9.208 min 的试管。收集洗脱液并进行 48 h 的冷冻干燥处

理，最后得到淡黄色粉末 1.2641g，得率为 37.62%。相较于 Tang 等^[62]，合成率较低，可能原因是纯化步骤的差异所导致。

2.4.2 Fru-Arg 液相色谱-质谱分析

为了进一步确定我们所得到的样品为 Fru-Arg，对上述纯化后的样品进行 UHPLC-Q Exactive MS 分析。得到如下图所示，图（a）为 Fru-Arg 总离子流色谱图，图（b）为 Fru-Arg 二级质谱图。图（a）中仅出现一个单峰，保留时间为 0.78 min，目标物质峰面积高于 95%。根据周仁杰^[19]报道的关于 Amadori 化合物质谱碎裂规律与 Fru-Arg 分子质量为 336 可以看出，图（b）质谱图中出现响应值最高为 337 m/z 的碎片离子为 $[M+H]^+$ ，319 m/z 为 $[M+H-H_2O]^+$ ，其中母离子 $[M+H]^+$ 的碎片例子信号最强，这也与周仁杰^[19]报道的 12 种 Amadori 化合物质谱碎裂规律中唯一一个母离子 $[M+H]^+$ 响应值最强的化合物为 Fru-Arg 一致（其余 11 种都为母离子损失一个水分子的 $[M+H-H_2O]^+$ 离子的质谱响应值最强）。结合总离子流色谱图与质谱图可以推出，分离纯化后的样品为单一组分，且其分子量为 336，即所得样品成分为 Fru-Arg。

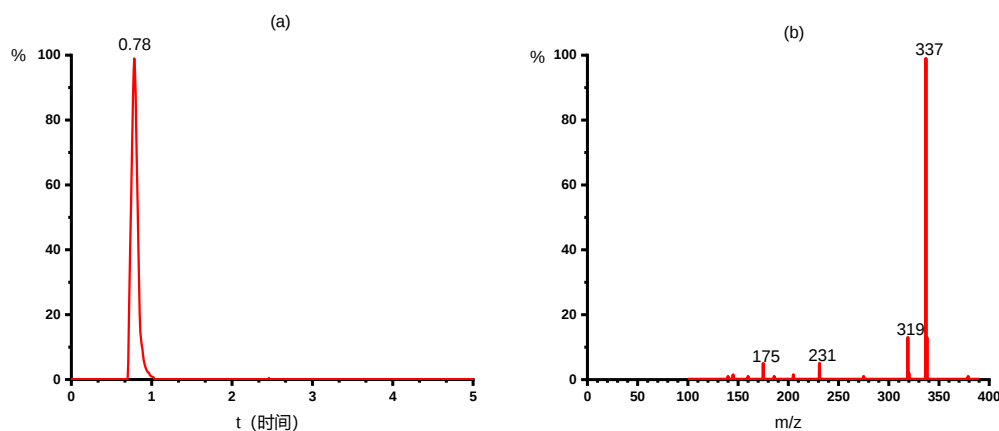


图 2-2 Fru-Arg 液质图 (a) 总离子流色谱图 (b) 质谱图
Fig. 2-2 Fru-Arg liquid map(a) Total ion chromatogram (b) Mass spectra

2.4.3 Fru-Arg 抗氧化活性测定

近年来, Amadori 化合物的功能活性如抗氧化活性, 抗炎能力, 金属离子螯合能力被大量报道^[31, 34, 44], 因此以 0-10 mmol/L 的 Fru-Arg 对 ABTS、DPPH、FRAP 和 $\cdot\text{OH}$ 四种抗氧化能力变化进行探究, 并以相同浓度 Arg 作为对照组, 以抗坏血酸 (AA) 做标准曲线 (ABTS: $y=1.0476x+0.011$, $R^2=0.9998$; DPPH: $y=0.8986x+0.0516$, $R^2=0.9983$; FRAP: $y=1.535x+0.0979$, $R^2=0.9975$; $\cdot\text{OH}$: $y=0.5178x+0.0517$, $R^2=0.9931$), 抗氧化能力表示为 $\mu\text{mol AAE/L}$ 样品。

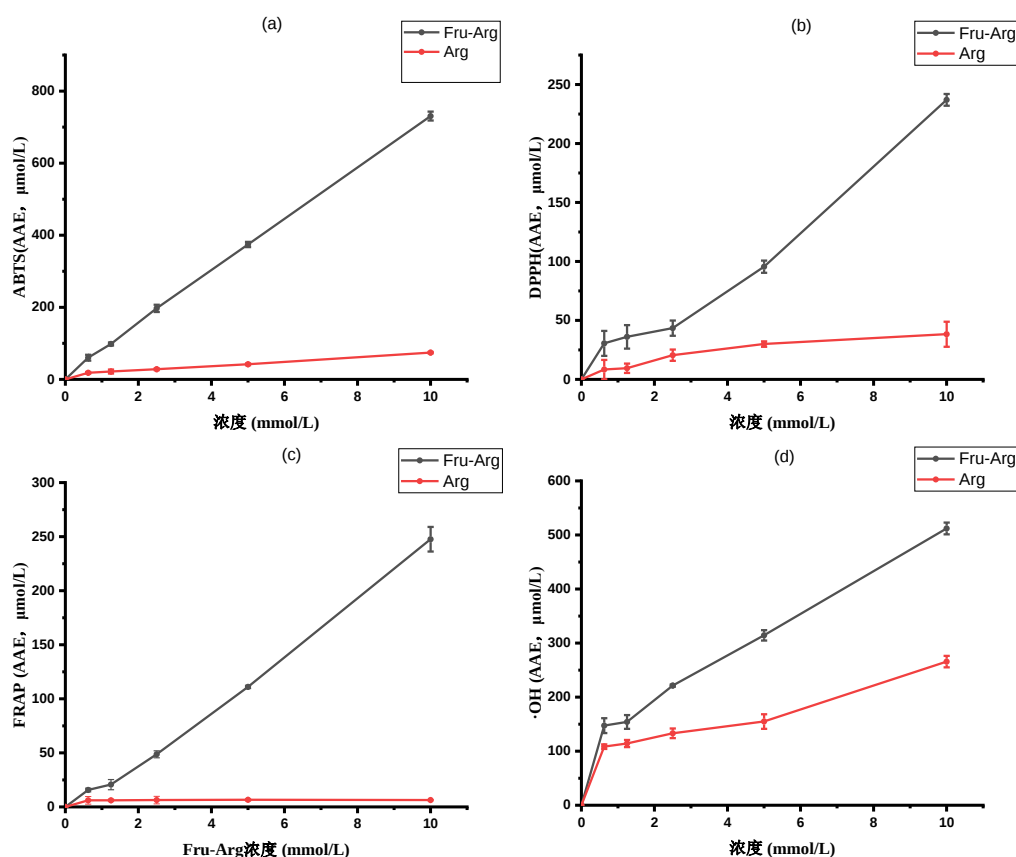


图 2-3 0-10 mmol/L Fru-Arg 抗氧化能力。(a) ABTS; (b) DPPH; (c) FRAP; (d) $\cdot\text{OH}$
Fig. 2-3 0-10 mmol/L Fru-Arg Antioxidant capacity(a)ABTS(b)DPPH(c)FRAP(d) $\cdot\text{OH}$

如图 2-3 所示, Fru-Arg 表现出较高的抗氧化能力, 且显著优于 Arg, 这可能是由于 Fru-Arg 的糖基部分与氨基酸残基之间起到了协同作用, 促使其抗氧化能力显著高于其前提物质 Arg。在水溶液体系中 Amadori 化合物因其分子结构中存在大量未结合的羰基官能团, 能够发挥高效电子转移介质的作用, 通过向活性自由基提供电子促进其转化为更加稳定的中间产物, 进而有效抑制自由基的链式反应^[63]。图 (a) 为 ABTS 清除能力, Fru-Arg 的抗氧化能力表现出明显的浓度依赖性。根据余佳浩^[64]的报道, 在其测定的 8 种 Amadori 化合物中 Fru-Arg 的 ABTS

清除能力最高,且随反应时间的增加,ABTS 自由基清除能力增加,反应 60 min 时,其 ABTS 清除能力与抗坏血酸接近。其余三种抗氧化能力随着 Fru-Arg 浓度的升高也都表现出显著的上升趋势。

2.4.4 Fru-Arg 对 HEK-293 细胞活力的影响

对于 Amadori 化合物的功能活性已经有大量的研究报道,而对于其抗氧化活性大家往往却只是停留在体外的一些化学方法,很少有人利用细胞模型去更加深入的去研究 Amadori 化合物的活性功能,因此为了进一步探究 Fru-Arg 的抗氧化活性,我们选择人胚胎肾细胞(HEK-293)作为细胞模型,利用 H_2O_2 诱导 HEK-293 细胞达到氧化应激状态,探究 Fru-Arg 对氧化应激状态下细胞的保护作用。这类细胞氧化应激模型常常被用于探究一些多肽的抗氧化活性中,如 Liu 等^[47]探究了蛋清多肽对双氧水诱导的 HEK-293 氧化应激模型的保护作用, Luan 等^[65]在秋刀鱼中分离出的抗氧化肽对双氧水诱导的 HEK-293 细胞氧化损伤的保护作用,并且利用分离得到的多种抗氧化肽与髓过氧化物酶进行分子对接,来预测其中抗氧化活性比较好的抗氧化肽分子,结果发现,在多肽中 Arg 残基发挥了很大的作用。而对于一些大分子多肽,过高的浓度可能存在对细胞的损伤作用^[66],因此,首先测定了 0-10 mmol/L 的浓度下,Arg 和 Fru-Arg 对 HEK-293 细胞活力的影响。

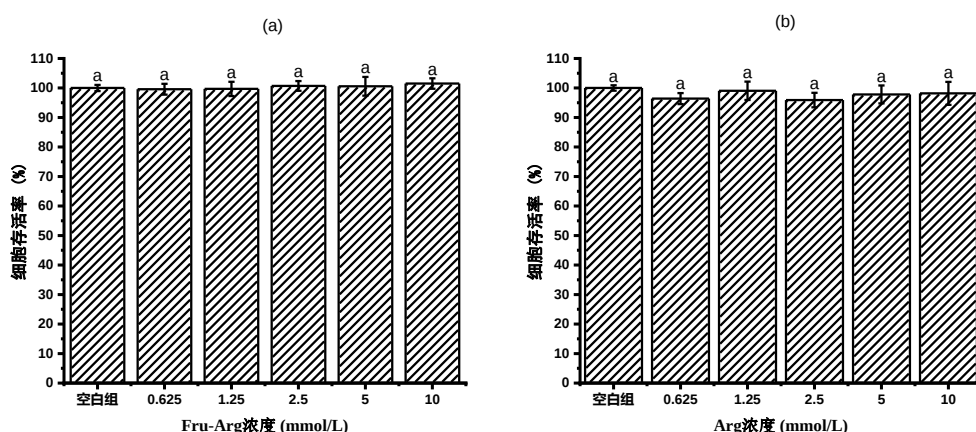


图 2-4 不同浓度样品对 HEK-293 细胞活力的影响 (a) Fru-Arg; (b) Arg

Fig. 2-4 Effect of different concentrations of samples on HEK-293 cell viability(a)Fru-Arg(b)Arg

结果如图 2-4 所示,在 0.625-10 mmol/L 的浓度下, Fru-Arg 和 Arg 与空白组对照无显著性差异,说明 Fru-Arg 与 Arg 对 HEK-293 即没有细胞毒性作用,也没有促进细胞生长作用,这也排除了后期实验中可能出现的干扰作用。

2.4.5 HEK-293 细胞氧化应激模型的建立

目前,利用过氧化氢诱导细胞氧化应激模型已成为探究抗氧化生物活性分子的实验室常规手段,过氧化氢会引起细胞的氧化损伤,导致细胞活性降低甚至死亡。因此我们利用不同浓度的过氧化氢来诱导 HEK-293 细胞氧化应激模型。选择 200-1200 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的过氧化氢处理正常细胞 12 h,通过 CCK-8 法测定了细胞存活率。如图所示,随着过氧化氢浓度的升高,细胞存活率显著下降,与不加过氧化氢的对照组相比,400 $\mu\text{mol/L}$ 处理 12 h 后细胞存活率约为 56.07%,在 600 $\mu\text{mol/L}$ 时细胞存活率约为 49.1%,在 1200 $\mu\text{mol/L}$ 时细胞存活率大幅降低仅为 5.06%,几乎即将使细胞活力完全丧失。据研究报告^[67],过氧化氢诱导的细胞氧化损伤模型一般控制细胞活力在 50%左右,细胞活力太低,可能会导致样品很难对细胞起到保护作用,如果细胞活力太高,就可能无法体现出样品对细胞的保护能力,过高或过低都会对后续实验产生一定的影响,从而无法达到样品的真实数据。根据实验所得结果,我们选择了 600 $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢处理 HEK-293 细胞 12 h 来进行细胞氧化损伤模型的建立。

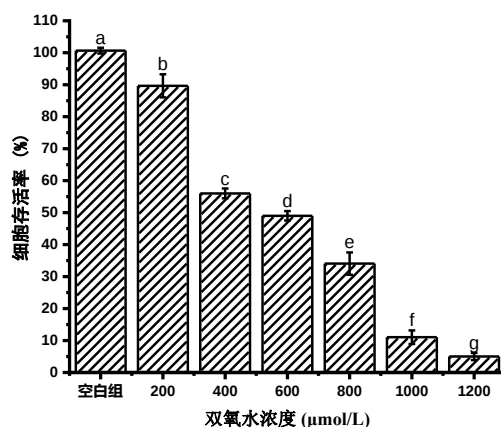


图 2-5 不同浓度 H_2O_2 处理 12 h 对细胞存活率的影响

Fig. 2-5 Effect of different concentrations of H_2O_2 on cell viability after 12 h treatment

2.4.6 Fru-Arg 对氧化损伤细胞的保护作用

细胞的氧化应激会导致细胞内 ROS 自由基的增加,打破 ROS 的平衡,从而使过多的 ROS 对细胞的一系列攻击行为,导致细胞损伤和凋亡。如图 2-6 所示,过氧化氢处理的受损组相较于对照组细胞存活率为 51.65%,不同浓度梯度的 Arg 对氧化应激损伤细胞无明显保护作用 ($P>0.05$),而 Fru-Arg 对氧化应激损伤细

胞有显著的保护作用 ($P < 0.05$), 随着 Fru-Arg 浓度的增加, 氧化损伤细胞的存活率也显著增加, Fru-Arg 为 0.625 mmol/L 时, 细胞存活率为 57.09% 增加了 5.44%, 添加 10 mmol/L Fru-Arg 时细胞存活率达到了 92.31%, 增加了 40.66%, 几乎消除了过氧化氢对细胞的损伤, 细胞存活率对 Fru-Arg 呈现明显的浓度依赖性。这也进一步说明了 Fru-Arg 起到的抗氧化作用可能是糖的残基与精氨酸残基有协同作用, 单纯的 Arg 并不能起到保护过氧化氢引起的细胞氧化损伤, 而 Fru-Arg 对细胞氧化损伤有显著的保护作用。

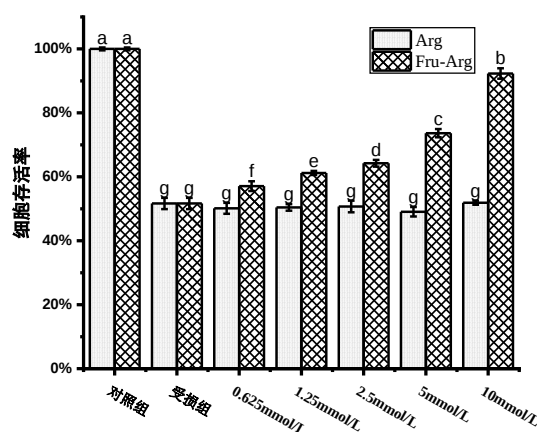


图 2-6 不同浓度样品对细胞氧化应激损伤的保护作用

Fig. 2-6 Protective effect of different concentrations of samples against cellular oxidative stress damage

2.4.7 Fru-Arg 对 HEK-293 细胞中 ROS 的影响

对于细胞内活性氧, 常常需要用 DCFH-DA 荧光探针来表达, DCFH-DA 作为一种亲脂性化合物, 可以轻松经过细胞膜进入细胞内部, 然而 DCFH-DA 本身没有荧光特性, 在其进入细胞后, 会被细胞内的酯酶识别, 并分解成 DCFH。被分解后的 DCFH 在细胞内无法随意的通过细胞膜, 而会被留在细胞内与细胞内 ROS 反应生成 DCF, DCF 具有荧光特性。因此, 细胞内 ROS 越多, 荧光强度越高, 检测细胞的荧光强度就能反应出细胞内的活性氧水平。

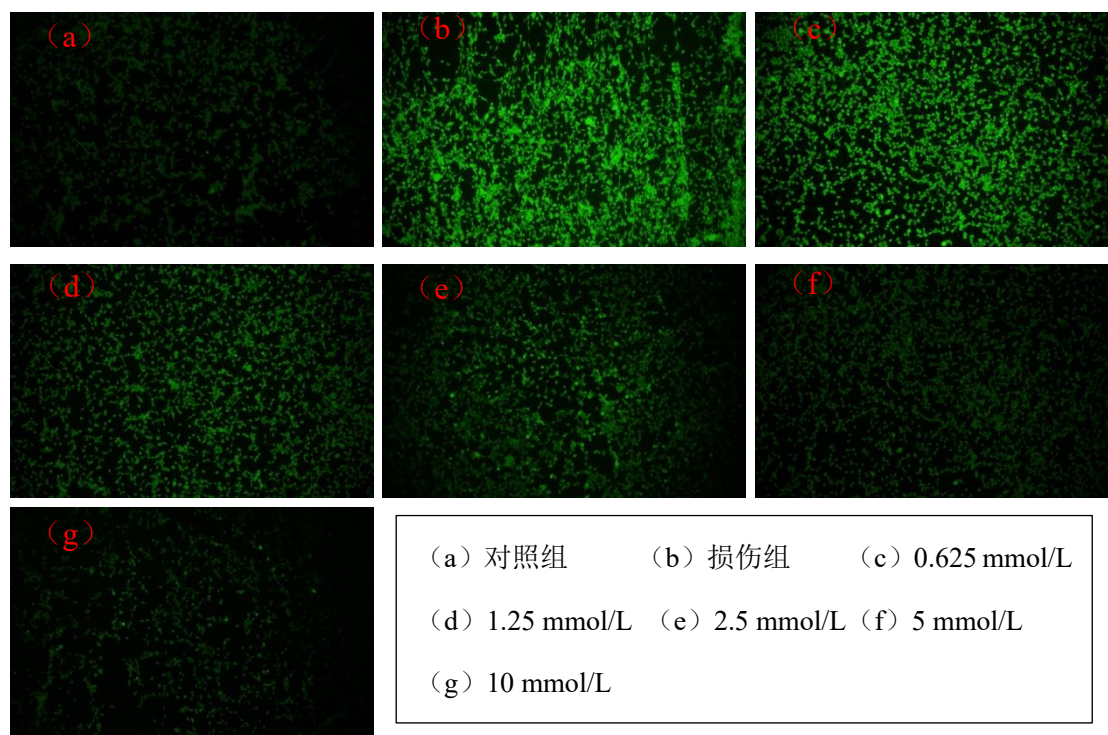


图 2-7 不同浓度 Fru-Arg 处理细胞荧光成像图

Fig. 2-7 Fluorescence imaging of cells treated with different concentrations of Fru-Arg

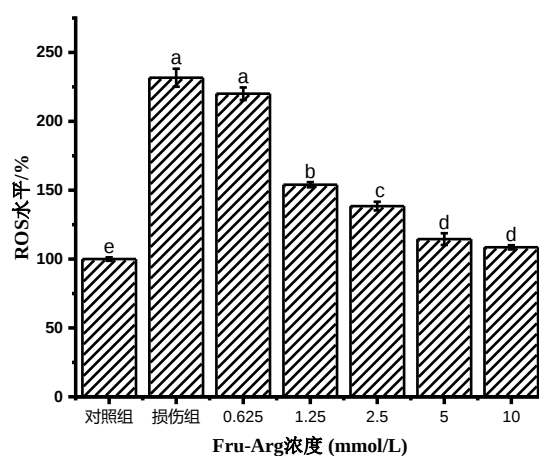


图 2-8 不同浓度 Fru-Arg 处理细胞 ROS 水平

Fig. 2-8 The same concentration of Fru-Arg treated the cells with ROS levels

由图 2-7, 2-8 中可以看出, 损伤组的荧光强度最高, 说明细胞内产生大量 ROS, 导致细胞的凋亡。而对照组中未添加过氧化氢, 所以荧光强度低。Fru-Arg 处理组中随浓度的升高, 荧光强度也随之下降, 说明细胞内的 ROS 减少。这说明 Fru-Arg 对细胞内 ROS 的调控起到了一定的作用。这一结果再次验证了 Fru-Arg 在抗氧化方面的潜力。

2.4.8 Fru-Arg 对细胞中抗氧化酶含量的影响。

超氧化物歧化酶（SOD）和过氧化氢酶（CAT）是细胞内抗氧化系统的核心酶系^[68]，其中 SOD 能清除对细胞有害的超氧根离子自由基生成 H_2O_2 ，而过氧化氢酶则是将 H_2O_2 催化分解为水和氧气。丙二醛（MDA）是反应细胞中脂质氧化的一个重要指标，其氧化反应主要发生在细胞膜上从而破坏细胞膜导致细胞活力下降或凋亡^[69]。

表 2-3 不同浓度 Fru-Arg 对氧化损伤细胞中 SOD、CAT 和 MDA 的影响

Table. 2-3 Effects of different concentrations of Fru-Arg on SOD, CAT and MDA in oxidatively damaged cells

组别	浓度 (mmol/mL)	SOD 活性 (U/mg)	CAT 活性 (U/mg)	MDA 含量 (nmol/mg)
对照组		20.11±1.25 ^a	24.39±0.36 ^a	1.54±0.03 ^d
受损组		8.53±1.05 ^d	7.79±0.61 ^c	3.15±0.19 ^a
	0.625	10.2±0.54 ^d	8.58±1.07 ^c	3.04±0.23 ^a
Fru-Arg	2.5	13.75±0.29 ^c	10.26±0.87 ^c	2.56±0.18 ^b
	10	18.54±0.48 ^b	17.63±0.51 ^b	2.02±0.05 ^c

如表 2-3 所示，受损组中 SOD 和 CAT 显著低于对照组，MDA 含量显著高于对照组，这说明细胞中发生氧化应激反应。在不同浓度保护组中也出现同样的趋势，然而低浓度组与损伤组没有显著性，但高浓度保护组中抗氧化酶都显著高于损伤组，丙二醛含量显著低于损伤组。这说明 Fru-Arg 可能通过调节细胞内抗氧化相关酶的活性来保护氧化损伤细胞。研究发现^[70]抗氧化肽对氧化应激损伤细胞的保护机制是通过调节 Nrf2-keap1 信号通路，来达到保护细胞，减少氧化应激的作用。而 Fru-Arg 可能也是通过此抗氧化信号通路来调节细胞中抗氧化酶的活性，最终达到保护氧化损伤细胞的作用。

2.5 本章小结

本章通过真空脱水的方法合成 Fru-Arg，并对其进行体外的抗氧化活性功能评价，并且通过建立氧化损伤细胞模型，对 Fru-Arg 在 HEK-293 细胞中的抗氧化作用进一步表达。本章节主要结论如下：

（1）利用真空脱水的方法在水相体系中合成 Fru-Arg，并通过离子交换树脂对 Fru-Arg 粗品进行分离纯化，最后经过液相色谱质谱联用仪的鉴定确定了我们所得到的产物为 Fru-Arg。

(2) 通过 ABTS 清除能力、DPPH 清除能力、 Fe^{3+} 还原能力和羟基自由基清除能力，以抗坏血酸当量，测定了 0-10 mmol/L 的 Fru-Arg 体外抗氧化活性，结果表明 Fru-Arg 的体外抗氧化能力呈浓度依赖性，且 ABTS 清除能力相对较高，与抗坏血酸抗氧化能力相当。

(3) 为了进一步探究 Fru-Arg 抗氧化能力，通过细胞模型进行表达。首先对 0-10 mmol/L Fru-Arg 对细胞活性的影响做出测定，发现在此浓度条件下 Fru-Arg 对细胞即无损伤，也无促进增长作用。利用过氧化氢诱导 HEK-293 细胞氧化应激，建立细胞氧化损伤模型。发现 Fru-Arg 对氧化损伤细胞有显著的保护作用，且可以有效清除细胞内活性氧（ROS），并通过调节细胞内抗氧化酶活性来保护细胞减少氧化的损害，减少细胞内丙二醛的产生。表明 Fru-Arg 在抗氧化方面有研究的潜力。

第三章 蓝莓浓缩汁成分检测与功能分析

3.1 前言

蓝莓在我国的研究起步较晚，但是发展速度较快，近年来我国的蓝莓产量增加迅速。蓝莓的口感酸甜适中，而且蓝莓中含有丰富的营养物质，这也是蓝莓具有多种生物活性的原因，因此蓝莓也被誉为“浆果之王”。同时，蓝莓在储存和运输的过程中常常会导致大量的损耗，这也是我国蓝莓产业的一大难题，所以蓝莓采摘后的储存及加工十分重要^[71, 72]。由于人们对健康食品的需求日益增加，对于许多不易储存的水果往往会以浓缩的手段来提高其货架期，以满足人们的需求。蓝莓浓缩汁通过去除其部分水分的同时，尽量保留蓝莓汁中原有的营养物质和风味物质。在提高其储存稳定性的同时也使携带更加的方便。

蓝莓汁在浓缩过程中，由于加热的原因，会使其发生非酶促褐变反应，即美拉德反应。美拉德反应通常在一定的温度条件下发生，其是还原糖与氨基酸或蛋白质之间经过一系列复杂反应，最终产生大分子物质类黑精。近年来，美拉德反应中间产物 Amadori 化合物被报道出具有多种生物活性而被广泛研究。而蓝莓中富含的氨基酸与还原糖正是美拉德反应的基础。

本章通过真空浓缩的加工方式，对蓝莓汁进行浓缩，参考上一章节中制备 Amadori 化合物的真空浓缩方法，控制浓缩真空度为-0.07 MPa，浓缩温度为 90℃，浓缩时间为 120 分钟，测定了蓝莓汁中的营养成分，以及蓝莓汁浓缩过程中多酚、黄酮、还原糖、花色苷、Fru-Arg 和 5-HMF 等营养成分的含量变化。测定其体外抗氧化能力变化并分析不同营养成分与抗氧化能力之间的相关性。

3.2 材料与仪器

3.2.1 实验原料与试剂

表 3-1 实验原料与试剂

Table 3-1 Experimental raw materials and reagents

试剂名称	规格	厂家
蓝莓	/	紫约农业科技集团有限公司
亚硝酸钠	AR	国药集团化学试剂有限公司
硝酸铝	AR	国药集团化学试剂有限公司
福林酚	AR	国药集团化学试剂有限公司
3,5-二硝基水杨酸	AR	国药集团化学试剂有限公司
过硫酸钾	AR	国药集团化学试剂有限公司
冰乙酸	AR	国药集团化学试剂有限公司
无水乙酸钠	AP	国药集团化学试剂有限公司
5-HMF	HPLC	上海源叶生物科技有限公司
三氯化铁	AR	上海阿拉丁生化科技有限公司
芦丁标准品	AR	国药集团化学试剂有限公司
没食子酸标准品	AR	国药集团化学试剂有限公司
抗坏血酸	AR	国药集团化学试剂有限公司

3.2.2 实验仪器

表 3-2 实验仪器

Table 3-2 Experimental instruments

仪器名称	型号	厂家
台式离心机	LGJ-10	北京松源华兴科技发展有限公司
旋转蒸发仪	IKA-RV3	德国艾卡
紫外分光光度计	UV-5200	上海元析仪器设备有限公司
大口径原汁机	JE-31	宁波泰尔斯有限公司
高效液相色谱仪	LC-20A	日本岛津 (Shimadzu)
液相色谱质谱仪	LC/MS-8030	日本岛津 (Shimadzu)
全自动氨基酸分析仪	LA8080	日本日立 (HITACHI)
酶标仪	1510	上海赛默飞世尔仪器有限公司

3.3 实验方法

3.3.1 蓝莓浓缩汁的制备

将蓝莓从-20℃冰箱中取出，去掉坏果、小果等不可食用部分，常温化冻。用大口径原汁机进行破碎榨汁处理，之后 6000 rpm 离心 10 min 取上清得到蓝莓汁。准确称量 30 mL（约 30 g）蓝莓汁倒入 150 mL 圆底烧瓶中，在-0.07MPa 的真空度下，使用旋转蒸发仪在 90℃的条件下分别加热浓缩 20、40、60、80、100、120 min，完成后用纯水恢复到浓缩前质量，4℃冷藏，使用时稀释合适倍数。

3.3.2 游离氨基酸的测定

使用全自动氨基酸分析仪测定蓝莓汁中游离氨基酸含量以及种类，蓝莓汁用 5%的三氯乙酸溶液稀释 10 倍，在 8000 rpm 离心 15 min，取上清液作为样品进行测定^[73]。

3.3.3 浓缩过程中营养成分变化

3.3.3.1 总酚的测定

总酚的测定参考 Shen 等^[74]的方法并略作修改。以没食子酸做当量，配置浓度为 0、0.02、0.04、0.06、0.08、0.1 mg/mL 没食子酸标准溶液，向 96 孔板中加入 30 μ L 不同浓度标准溶液，再依次添加 20 μ L 福林酚试剂静置反应 6 min 后，每孔添加 100 μ L 7%碳酸钠溶液，最后加入超纯水使终体积为 290 μ L。室温下静置反应 60 min 后，使用酶标仪测定 765 nm 处吸光度值。以标准溶液浓度为横坐标，吸光度值为纵坐标，计算标准曲线为 $y=16.873x+0.1092$ ， $R^2=0.9962$ 。取各组样品，步骤同上，测定样品中总酚含量。

3.3.3.2 黄酮的测定

总黄酮测定参考 Wang 等^[75]的方法并略作修改。以芦丁做当量，配置浓度为 0、0.04、0.08、0.12、0.16、0.2 mg/mL 芦丁标准溶液，取 50 μ L 不同浓度芦丁标准溶液加入 96 孔板中，再加入 20 μ L 5%亚硝酸钠溶液，混匀静置反应 6min，之后加入 20 μ L 10%硝酸铝溶液，混匀静置反应 6min，最后加入 200 μ L 4%氢氧化钠，混匀静置反应 20 min，最后在 510 nm 处测定吸光度值。以芦丁标准溶液浓度为横坐标，吸光度值为纵坐标，计算标准曲线为 $y=1.6771x+0.023$ ， $R^2=0.9992$ 。

同样取各组样品，步骤同上，测定样品中黄酮含量。

3.3.3.3 还原糖的测定

还原糖测定参考严燕^[76]的方法并略作修改，配置浓度为 0、0.4、0.8、1.2、1.6、2 mg/mL 的葡萄糖标准溶液，分别取 1 mL 不同浓度葡萄糖标准溶液，分别加入 1 mL 纯水，再加入 1 mL DNS 试剂，沸水浴 5 min 进行显色反应，取出待其冷却后加入 7 mL 纯水，并于 540 nm 处测定吸光度值。以葡萄糖标准溶液浓度为横坐标，吸光度值为纵坐标，计算标准曲线为 $y=0.2445x+0.0417$, $R^2=0.9926$ 。样品中还原糖测定步骤同上。

3.3.3.4 可溶性蛋白的测定

可溶性蛋白测定参考邢苏徽^[77]的方法并略作修改，配置浓度为 0、0.04、0.08、0.12、0.16、0.2 mg/mL 的牛血清蛋白标准溶液，分别取 1 mL 不同浓度标准溶液，加入 5 mL 考马斯亮蓝 G-250 试剂，混匀静置反应 10 min，于 595 nm 处测定吸光度值。以牛血清蛋白标准溶液浓度为横坐标，吸光度值为纵坐标，计算标准曲线为 $y=2.8523x+0.4975$, $R^2=0.9921$ 。样品中蛋白质测定按上述方法进行。

3.3.3.5 花色苷的测定

花色苷测定参考吕春玲等^[46]的方法并略作修改，首先配置 pH 1.0 和 pH 4.5 缓冲液，向两试管中分别加入 1 mL 样品，再向两样品液中分别加入 3 mL pH 1.0 缓冲液和 pH 4.5 缓冲液，混匀平衡 30 min 后，以纯水做空白，分别测定 520 nm 处和 700 nm 处的吸光度值。使用 pH 示差法计算样品中花色苷含量。

花色苷含量计算公式：

$$\text{花色苷含量(mg/mL)} = \frac{(A_{520} - A_{700})_{\text{pH}1.0} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH}4.5} \times \text{DF} \times M_r}{\varepsilon \times 1} \quad (\text{式 3-1})$$

A—吸光度值

DF—稀释倍数

Mr—矢车菊素-3-葡萄糖苷的相对分子质量 449.2

ε —矢车菊素-3-葡萄糖苷平均摩尔消光系数值 26900

3.3.3.6 Fru-Arg 的测定

Fru-Arg 的制备与分离纯化方法同 2.3.1，样品中 Fru-Arg 测定参考李硕等^[78]的方法进行测定，将得到的 Fru-Arg 样品配置成不同浓度溶液（50 ppm、25 ppm、12.5 ppm、6.25 ppm、3.125 ppm）使用 LC/MS 进行标准曲线绘制（ $y=1307.4x+1309$ ，

$R^2=0.9993$), 样品测定前稀释并用 $0.22\ \mu\text{m}$ 水系滤膜过滤。

3.3.3.7 5-HMF 的测定

5-羟甲基糠醛测定参考崔宇擎等^[79]的方法并稍作修改, 将 5-HMF 标准品配置成不同浓度标准溶液 (50、25、12.5、6.25、3.125 $\mu\text{g/mL}$) 使用高效液相色谱法绘制标准曲线, 样品测定前稀释并用 $0.22\ \mu\text{m}$ 水系滤膜过滤。色谱条件如下:

色谱柱为 C18 ($4.6\ \text{mm}\times 250\ \text{mm}$, $5\ \mu\text{m}$), 流动相为乙腈:水 (10:90), 流速为 $1.0\ \text{mL/min}$, 进样量 $10\ \mu\text{L}$, 柱温为 30°C , 紫外检测器波长为 $280\ \text{nm}$ 。

标准曲线计算: $y=153908x+34722$, $R^2=0.9998$

3.3.3.8 褐变程度的测定

褐变程度的测定参考 Pham 等^[80]的方法, 使用分光光度计测定样品在 $420\ \text{nm}$ 处吸光度值用以表示样品褐变程度。

3.3.4 体外抗氧化能力测定

ABTS 自由基清除能力参考孟想等^[81]的方法并略作修改, 配制 ABTS 试剂母液, 摇匀后避光静置 12-16 h。使用前用 PBS 缓冲液将 ABTS 母液稀释合适倍数使其在 $734\ \text{nm}$ 处的吸光度值为 0.7 ± 0.02 , 以此作为工作液。将 $10\ \mu\text{L}$ 的样品稀释液加入 96 孔板中, 再加入 $200\ \mu\text{L}$ ABTS 工作液后混匀, 避光反应 15 min 测定其在 $734\ \text{nm}$ 处吸光度值。并以抗坏血酸 (AA) 做当量, 绘制标准曲线, 抗氧化能力以 $\mu\text{mol AAE/L}$ 表示。

DPPH 自由基清除能力参考 Herald 等^[82]的方法并略作修改, 首先用甲醇配置浓度为 $100\ \mu\text{mol/L}$ 的 DPPH 工作液, 向 96 孔板中加入 $10\ \mu\text{L}$ 样品稀释液, 再加入 $200\ \mu\text{L}$ DPPH 工作液混匀, 避光反应 15 min, 空白对照组为 $10\ \mu\text{L}$ 的甲醇中加入 $200\ \mu\text{L}$ DPPH。随后测定其在 $517\ \text{nm}$ 处的吸光度值。并以抗坏血酸 (AA) 做当量, 绘制标准曲线, 抗氧化能力以 $\mu\text{mol AAE/L}$ 表示。

Fe^{3+} 还原能力 (FRAP) 测定参考 Kim^[83]的方法, 首先配置 FRAP 试剂, 将 $0.3\ \text{mol/L}$ 的醋酸钠缓冲液、 $0.01\ \text{mol/L}$ 的 TPTZ 溶液和 $0.02\ \text{mol/L}$ 的三氯化铁溶液以 10:1:1 的比例混合配制成 FRAP 工作液, 向 96 孔板中加入 $10\ \mu\text{L}$ 样品和 $200\ \mu\text{L}$ FRAP 工作液混匀, 避光反应 30 min 后测定其在 $593\ \text{nm}$ 处的吸光度值。并以抗坏血酸 (AA) 做当量, 绘制标准曲线, 抗氧化能力以 $\mu\text{mol AAE/L}$ 表示。

羟自由基清除能力参考雷佳佳等^[84]的方法并略作修改, 向 96 孔板中依次加

入 50 μL 硫酸亚铁溶液 (9 mmol/L)、50 μL 水杨酸乙醇溶液 (9 mmol/L) 混匀, 最后再加入 100 μL H_2O_2 溶液, 37°C 避光反应 30 min 后测定其在 510 nm 处的吸光度值。并以抗坏血酸 (AA) 做当量, 绘制标准曲线, 抗氧化能力以 $\mu\text{mol AAE/L}$ 表示。

3.3.5 数据分析

每组实验至少重复进行三次。使用 IBM SPSS Statistics 26 进行数据分析, 差异显著性通过单因素方差分析 ($P < 0.05$), 并使用 Origin 2021 软件进行绘图。

3.4 结果与分析

3.4.1 蓝莓汁中的营养成分

由表 3-3 可知, 蓝莓汁中含有多种营养成分, 其中总酚的含量为 4.32 ± 0.02 mg/mL, 黄酮的含量为 3.09 ± 0.09 mg/mL, 总酚和黄酮类大都属于多酚类物质, 常见于水果和蔬菜中, 且营养价值较高, 近年来对于其抗氧化与抗炎症等活性功能报道较多。还原糖含量为 18.34 ± 1.26 mg/mL, 是蓝莓汁中含量最多的营养成分。可溶性蛋白含量为 0.54 ± 0.01 mg/mL, 蛋白可能会参与风味的形成。花色苷的含量为 0.32 ± 0.01 mg/mL, 低于刘慧等^[85]的报道, 这可能是由于加工工艺的不同和蓝莓品种的差异所导致。对于蓝莓汁中的 Fru-Arg 和 5-HMF 都未检测到, 这说明蓝莓汁中未发生美拉德反应, 应该是蓝莓汁在处理的过程中一直处于低温, 未能达到美拉德反应的条件。

表 3-3 蓝莓汁中营养成分含量
Table 3-3 The nutrient content of blueberry juice

营养成分	含量
总酚 (mg/mL)	4.32 ± 0.02
黄酮 (mg/mL)	3.09 ± 0.09
还原糖 (mg/mL)	18.34 ± 1.26
可溶性蛋白 (mg/mL)	0.54 ± 0.01
花色苷 (mg/mL)	0.32 ± 0.01
Fru-Arg (mg/L)	ND
5-HMF ($\mu\text{g/mL}$)	ND

由表 3-4 可以看出, 蓝莓汁中的氨基酸种类比较丰富, 总含量为 217.07 ± 3.55 mg/100 mL, 其中 Arg 含量最高, 为 118.28 ± 3.37 mg/100 mL, 占氨基酸总量

的 54.49%。这与汪平^[86]的研究结果一致, Arg 含量远超其他氨基酸, 但与吴志昇^[87]的研究结果不同, 这可能与蓝莓的品种和蓝莓产地、气候等天然因素有关。其次 Thr、Glu 和 Ala 含量也相对其他氨基酸较高。

表 3-4 蓝莓汁中氨基酸组成及含量

Table 3-4 Amino acid composition and content in blueberry juice

氨基酸	含量 (mg/100 mL)
Asp	9.33±0.65 ^d
Thr	40.81±2.26 ^b
Ser	10.73±1.51 ^{cd}
Glu	13.27±1.64 ^c
Gly	1.41±0.05 ^f
Ala	12.35±1.11 ^{cd}
Val	4.03±0.25 ^e
Ile	1.27±0.06 ^f
Phe	1.19±0.04 ^f
Lys	2.94±0.09 ^{ef}
His	3.59±0.12 ^{ef}
Arg	118.28±3.37 ^a
Pro	1.57±0.03 ^f
总计	217.07±3.55

3.4.2 浓缩过程中营养成分变化

由图 3-1 可以看出, 蓝莓汁在浓缩过程中, 总酚含量随着加热时间的增加显著降低, 浓缩前 40 min 降低幅度较大, 从 4.32 ± 0.023 mg/mL 下降到 3.43 ± 0.049 mg/mL 这可能是由于加热温度较高, 蓝莓汁中多酚大量降解, 而 40 min 后下降较缓慢, 到 120 min 时含量为 3.23 ± 0.031 mg/mL, 这可能是由于蓝莓汁中与多酚有关的酶活性发生变化所导致^[88]。

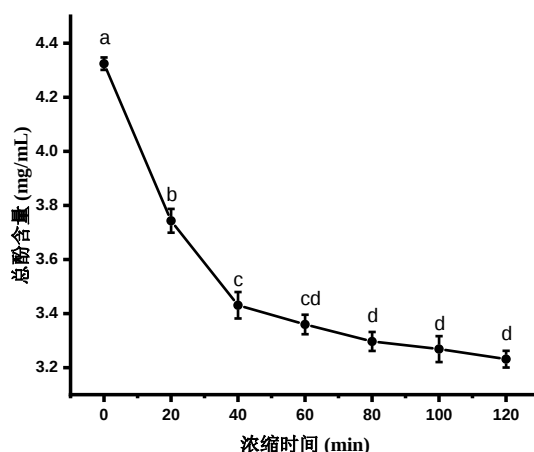


图 3-1 蓝莓汁浓缩过程中总酚含量变化

Fig.3-1 Changes in total phenolic content during blueberry juice concentration

如图 3-2 所示,黄酮含量在浓缩过程中显著下降,从开始的 3.09 ± 0.09 mg/mL 下降到 1.22 ± 0.06 mg/mL,这与夏晓雨等^[89]的研究一致,高温可以灭菌的同时黄酮损失较多。研究表明黄酮极易分解,主要是由于黄酮中酚羟基等结构不稳定所导致^[90]。

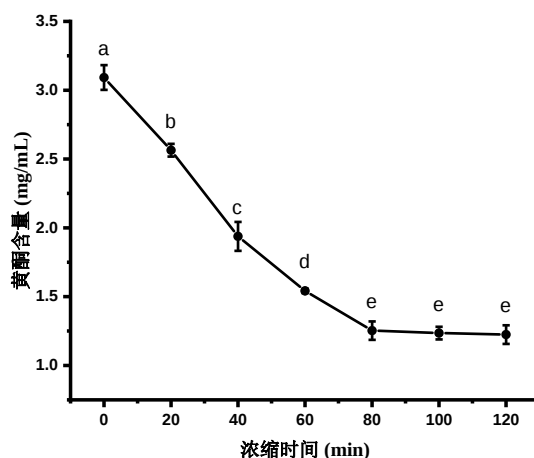


图 3-2 蓝莓汁浓缩过程中黄酮含量变化

Fig.3-2 Changes in flavonoid content during blueberry juice concentration

如图 3-3 所示,还原糖在浓缩的前 20 min 没有明显的下降趋势,从 18.34 ± 0.21 mg/mL 下降到 17.68 ± 0.36 mg/mL,20 min 后明显呈下降趋势,从 17.68 ± 0.36 mg/mL 下降到 8.14 ± 0.26 mg/mL。出现这种趋势的原因可能是由于前 20 min 时蓝莓汁中的水分含量较高,美拉德反应较为缓慢,且加热使其中的多糖水解为单糖,导致前期还原糖下降趋势不明显。后期还原糖的下降说明开始发生美拉德反应与氨基酸发生反应生成 Amadori 化合物等美拉德反应产物。加热使还原糖

发生反应导致含量下降，这与邵春霖等^[91]研究一致。

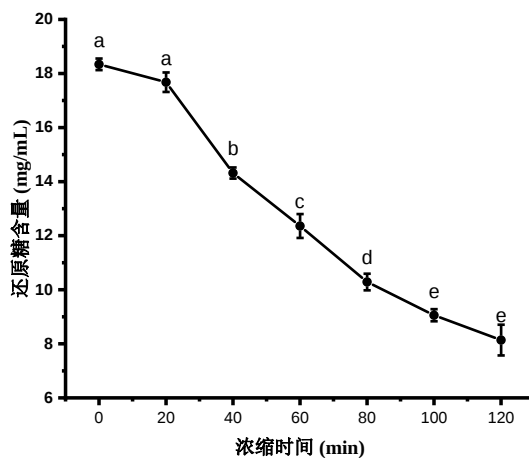


图 3-3 蓝莓汁浓缩过程中还原糖含量变化

Fig.3-3 Changes in reducing sugar content during blueberry juice concentration

如图 3-4 所示，在蓝莓汁浓缩过程中蛋白质含量呈下降趋势，从开始的 0.62 ± 0.02 mg/mL 下降到 0.02 ± 0.01 mg/mL，下降幅度较大。由于蛋白质受热易变性，在 90°C 条件下，蛋白质更易水解成多肽以及游离氨基酸，所以导致蛋白质含量显著下降，然而蛋白降解为游离氨基酸也为 Amadori 化合物的生成提供了原料，使其与蓝莓汁中过剩的还原糖发生美拉德反应，产生其他活性更好的美拉德反应中间产物。

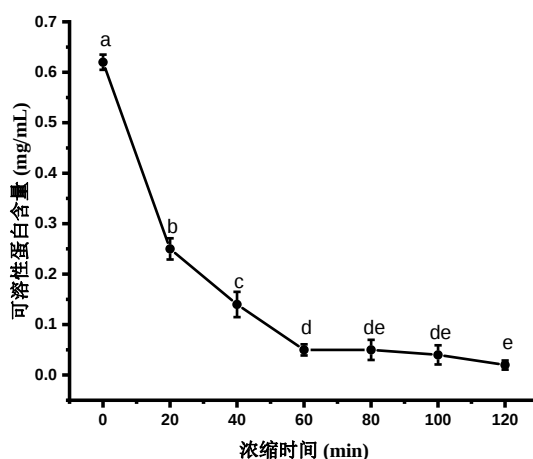


图 3-4 蓝莓汁浓缩过程中可溶性蛋白含量变化

Fig.3-4 Changes in soluble protein content during blueberry juice concentration

由图 3-5 中我们可以看出，加热导致蓝莓汁中花色苷的降解，由开始的 0.32 ± 0.02 mg/mL 下降到 0.05 ± 0.01 mg/mL，呈显著下降的趋势。相较于其他水果，蓝莓中的花色苷含量较高，但都主要集中于蓝莓果皮上，且花色苷极易降解，光

照、高温和 pH 对花色苷的影响较大。有研究发现^[92]，相较于普通热浓缩，真空加热浓缩对于花色苷的降解有抑制作用，这可能是由于真空状态下减少了花色苷与氧气的接触，减少花色苷发生氧化，同时随着水分的蒸发，浓缩汁中的 pH 降低，低 pH 的环境也能提高花色苷的稳定性。说明相对于其他加热浓缩的方法，真空浓缩对于花色苷的降解有一定的减缓作用。

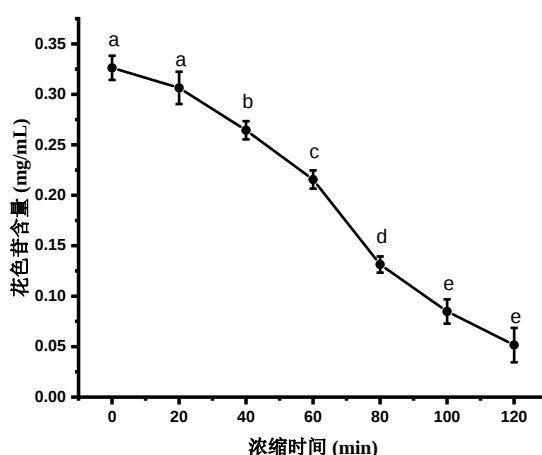
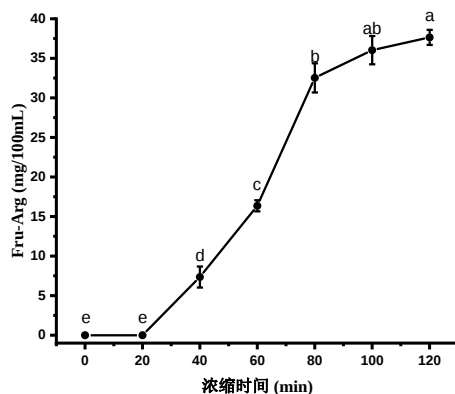


图 3-5 蓝莓汁浓缩过程中花色苷含量变化

Fig. 3-5 Changes in anthocyanin content during blueberry juice concentration

如下图 3-6 所示，Fru-Arg 在蓝莓汁浓缩过程中呈上升趋势，120 min 时增加到 37.64 ± 0.94 mg/100 mL。然而在 20 min 的样品中未检测到 Fru-Arg，20 min 后 Fru-Arg 开始增加，20-80 min 增长速度明显较快，80-120 min 增长速度明显减慢。这说明在前 20 min，蓝莓汁中水分含量较高，在蓝莓汁中可能还未达到 Arg 与还原糖发生美拉德反应的最佳条件。根据报道^[93]，浓缩前期会产生少量 Amadori 化合物，这可能是由于蓝莓汁中其他少量的氨基酸与还原糖发生美拉德反应产生了 Amadori 化合物，而 Arg 在蓝莓汁中虽然含量较高，但可能未达到反应的最佳条件，所以导致 20 min 时未检测到 Fru-Arg，这可能主要是与反应物中的水分活度有关^[94]。在 20-80 min 时 Fru-Arg 开始大幅度增加，说明此时反应体系中水分含量减少，水分活度达到 Fru-Arg 的最佳合成条件，80 min 后增加速度

开始减缓,说明此时美拉德反应可能进入中后期,Amadori 化合物继续反应,导



致 Fru-Arg 增长速率变慢。

图 3-6 蓝莓汁浓缩过程中 Fru-Arg 含量变化

Fig. 3-6 Changes in Fru-Arg content during blueberry juice concentration

由图 3-7 可以看出,随着浓缩时间的增加,蓝莓汁中的 5-羟甲基糠醛 (5-HMF) 也随之增加,5-HMF 从 $0.00 \pm 0.00 \mu\text{g/mL}$ 增加到 $20.89 \pm 1.03 \mu\text{g/mL}$,前 80 min 增加幅度较为缓慢,80 min 后开始大幅度增加。5-HMF 作为美拉德反应中期产物,其大幅度增加说明 80 min 后 Amadori 化合物继续反应环化生成 5-HMF。研究表明^[95],5-HMF 对人体存在不利影响,在一些经过热加工的食品中常常被检测到,因此 5-HMF 的含量也被作为一些热加工食品的质量检测指标。根据国际果汁联合会(IFFJP)要求,浓缩果汁中 5-HMF 含量不得高于 25 mg/kg ^[96]。因此,在浓缩时,要求生成 Amadori 化合物的同时也要关注 5-HMF 的生成量,减少 Amadori 化合物中后期反应的进行。

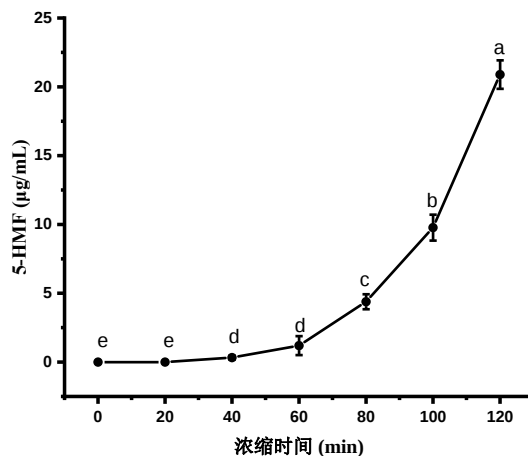


图 3-7 蓝莓汁浓缩过程中 5-羟甲基糠醛含量变化

Fig. 3-7 Changes in the content of 5-HMF during the concentration of blueberry juice

图 3-8 为蓝莓汁浓缩过程中 420 nm 处的吸光度值，美拉德反应褐变程度常常以 420 nm 处的吸光度值作为参考^[97]，以 A_{420} 来表示。蓝莓汁在浓缩过程中 A_{420} 的变化与 5-HMF 的增长趋势表现相似，在前 60 min 增长较缓慢，从 0.24 ± 0.01 增加到 0.31 ± 0.00 ，增加了 0.07 ± 0.01 ，而后 60 min 从 0.31 ± 0.00 增加到 0.83 ± 0.01 ，增加了 0.52 ± 0.01 。这也表明美拉德反应中后期产生的类黑精类物质开始大量生成。

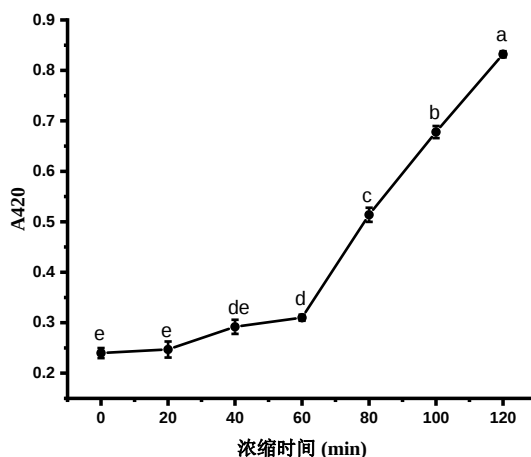


图 3-8 蓝莓汁浓缩过程中褐变程度变化

Fig. 3-8 The degree of browning changes during blueberry juice concentration

3.4.3 浓缩过程中抗氧化活性变化

如图 3-9 所示，蓝莓汁浓缩过程中 ABTS 自由基清除率在前 60 min 变化不大，从 $1210.53 \pm 19.27 \mu\text{mol AAE/L}$ 增加到 $1287.56 \pm 9.31 \mu\text{mol AAE/L}$ ，在 60 min 后，ABTS 清除率开始大幅增加，120 min 时增加到 $1473.61 \pm 8.89 \mu\text{mol AAE/L}$ 。DPPH 也表现出相似趋势，前期缓慢增加，后期大幅增加。前 60 min 从 $364.92 \pm 7.01 \mu\text{mol AAE/L}$ 增加到 $395.46 \pm 7.85 \mu\text{mol AAE/L}$ ，120 min 时增加到 $517.61 \pm 5.59 \mu\text{mol AAE/L}$ 。 Fe^{3+} 还原能力与羟自由基清除能力表现出类似趋势，在前 40 min 出现小幅度降低，之后到 120 min 开始增加，FRAP 值从 $1377.77 \pm 20.83 \mu\text{mol AAE/L}$ 增加到 $1647.07 \pm 26.66 \mu\text{mol AAE/L}$ ，羟自由基清除能力从 $539.51 \pm 0.76 \mu\text{mol AAE/L}$ 增加到 $551.87 \pm 0.66 \mu\text{mol AAE/L}$ 。总体来看，导致蓝莓汁浓缩前 40 min 缓慢增加或小幅降低可能原因是由于浓缩前期，蓝莓汁中的一些多酚、黄酮等活性物质由于受热迅速降解而 Amadori 化合物合成缓慢所导致。浓缩时随时间的增加，蓝莓汁中原有活性物质基本都是呈下降趋势，而蓝莓汁在浓

缩后抗氧化活性显著增加,说明蓝莓汁中原有活性物质并不是导致抗氧化升高的原因,而是浓缩后期美拉德反应产生的活性物质提高了浓缩汁的抗氧化能力。这在其他果汁或果粉中也出现类似的结果^[98, 99]。

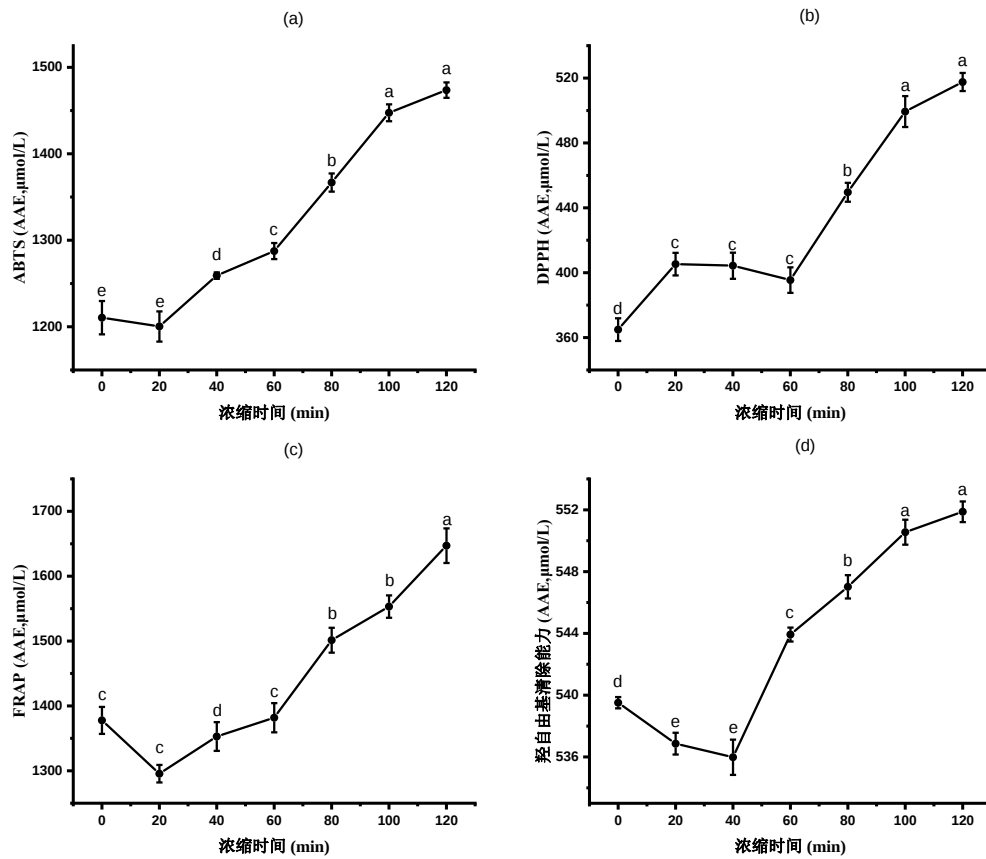


图 3-9 蓝莓汁浓缩过程中抗氧化活性变化。(a) ABTS; (b) DPPH; (c) FRAP; (d) $\cdot\text{OH}$

Fig. 3-9 Changes in antioxidant activity during blueberry juice concentration(a)ABTS; (b)DPPH; (c)FRAP;(d) $\cdot\text{OH}$

3.4.4 相关性分析

将不同程度蓝莓浓缩汁中的主要功能活性成分(Fru-Arg, 5-HMF, 总酚, 黄酮, 花色苷)和体外抗氧化能力进行比较。用相关性分析来进一步表达蓝莓浓缩汁中的主要抗氧化成分。

由图 3-10 可以看出, Fru-Arg 和 5-HMF 与 ABTS、DPPH、FRAP、 $\cdot\text{OH}$ 这四种抗氧化能力呈显著相关 ($P<0.05$), 且 Fru-Arg 对 ABTS 和 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力最高, 相关系数明显高于 5-HMF。而在蓝莓浓缩汁中总酚、黄酮和花色苷的四种抗氧化能力的相关系数明显低于 Fru-Arg 和 5-HMF。这也说明在蓝莓浓缩汁中 Fru-Arg 这类 Amadori 化合物和 5-HMF 等美拉德反应的产物对体外抗氧化能力发挥了重要作用。

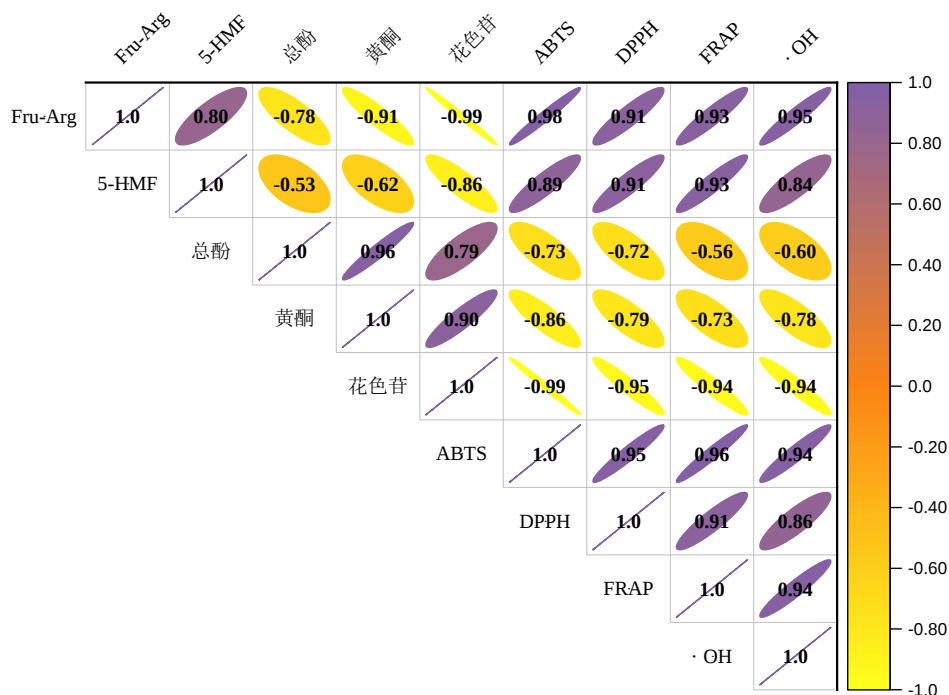


图 3-10 不同浓缩时间蓝莓汁中功能成分与抗氧化活性的相关性分析

Fig. 3-10 Correlation analysis of functional components and antioxidant activity in blueberry juice at different concentration times

注: 紫色表示正相关, 黄色表示负相关, 且颜色越深表示相关性越大

3.5 本章小结

为了进一步探究 Fru-Arg 在果汁中的应用及其抗氧化能力,本章节利用蓝莓汁作为原料,测定了蓝莓汁中的营养成分以及氨基酸种类和含量,利用真空浓缩的方法(真空度-0.07MPa,温度为 90°C,浓缩时间 0-120 min)在蓝莓汁中合成 Fru-Arg,并对蓝莓汁浓缩过程中营养成分变化与抗氧化能力变化进行测定,最后对蓝莓浓缩汁中营养成分与抗氧化活性间的相关性进行分析。主要研究结论如下:

(1) 蓝莓汁中各营养成分含量为总酚(4.32 ± 0.02 mg/mL)、黄酮(3.09 ± 0.09 mg/mL)、还原糖(18.34 ± 1.26 mg/mL)、可溶性蛋白(0.54 ± 0.01 mg/mL)、花色苷(0.32 ± 0.01 mg/mL),蓝莓汁中未检测到 Fru-Arg 与 5-HMF。蓝莓汁中氨基酸总含量为 217.07 ± 8.55 mg/100mL,其中 Arg 含量最高为 118.28 ± 8.37 mg/100mL,占总氨基酸的 54.49%。

(2) 蓝莓汁浓缩过程中,各类营养成分变化为总酚(4.32 ± 0.023 mg/mL- 3.23 ± 0.031 mg/mL)、黄酮(3.09 ± 0.09 mg/mL- 1.22 ± 0.06 mg/mL)、还原糖(18.34 ± 0.21 mg/mL- 8.14 ± 0.26 mg/mL)、可溶性蛋白(0.62 ± 0.02 mg/mL- 0.02 ± 0.01 mg/mL)、花色苷(0.32 ± 0.02 mg/mL- 0.05 ± 0.01 mg/mL) Fru-Arg (0.00 ± 0.00 mg/100mL- 37.64 ± 0.31 mg/100mL)、5-HMF (0.00 ± 0.00 μ g/mL- 20.89 ± 1.03 μ g/mL)、 A_{420} (0.24 ± 0.01 - 0.83 ± 0.01),其中黄酮、多酚、还原糖、可溶性蛋白和花色苷含量呈下降趋势,Fru-Arg、5-HMF 和 A_{420} 含量呈上升趋势。

(3) 蓝莓汁在浓缩后 ABTS、DPPH、FRAP、羟基自由基清除能力整体提高,且趋势大致相同,都呈现出前 60 min 缓慢提高,60 min-120 min 大幅提高的趋势。通过相关性分析得出,蓝莓浓缩汁中 Fru-Arg 与 5-HMF 的抗氧化能力相关性明显高于其他功能活性成分(总酚,黄酮,花色苷)。

第四章 富含 Amadori(Fru-Arg)化合物蓝莓浓缩汁工艺研究

4.1 前言

随着国家经济的发展壮大,人们的生活水平需求随之提高,这在饮食方面尤为突出。蓝莓在我国的市场从遥不可及已然成为随处可见的水果,如今,蓝莓的加工产品也已数不胜数,例如市场上的蓝莓果干、蓝莓酱、蓝莓汁以及蓝莓酒等蓝莓加工产品。蓝莓的加工产品都有一个共同的优点,就是解决了蓝莓鲜果的不耐储藏和运输不便的问题,极大程度上提高了蓝莓的货架期,解决了季节性限制。如今,也出现了多种果汁浓缩工艺,如热浓缩、真空冷冻浓缩、膜浓缩以及各种联合方法浓缩等^[14,100-102],在蓝莓汁的浓缩工艺中,真空热浓缩是一种比较常用的手段。在真空状态中,氧气含量较少,可以使蓝莓汁中的一些活性物质减少与空气中的氧气接触,而发生的氧化反应,加热可以使蓝莓汁发生美拉德反应,浓缩的同时又能产生各种风味物质,丰富了产品的风味特性。

本章在第二章的基础上,对蓝莓汁的真空浓缩工艺做了优化,通过控制浓缩温度,浓缩时间以及浓缩真空度的调节,测定了浓缩时产生的功能活性物质 Amadori (Fru-Arg) 化合物以及美拉德反应中间产物 5-HMF,以 Fru-Arg 含量作为指标,通过单因素以及正交实验确定最佳方案的同时考虑 5-HMF 的含量要求以及危害。最后通过体外抗氧化实验,对蓝莓汁的体外抗氧化能力进行评价。

4.2 材料与仪器

4.2.1 实验原料与试剂

实验原料与试剂同 3.2.1

4.2.2 实验仪器

CR-10 Plus 色差仪(日本柯尼卡美能达有限公司),其他仪器同 3.2.2

4.3 实验方法

4.3.1 蓝莓汁制备

蓝莓汁制备方法同 3.3.1

4.3.2 不同浓缩真空度对蓝莓浓缩汁的影响

采用旋转蒸发仪，调节转速为 70 r/min，探究浓缩温度为 90℃，浓缩时间为 80 min 的条件下，不同真空度（-0.04 MPa，-0.05 MPa，-0.06 MPa，-0.07 MPa，-0.08 MPa）对 Fru-Arg、5-HMF、褐变程度和色泽的影响。

4.3.3 不同浓缩时间对蓝莓浓缩汁的影响

控制旋转蒸发仪，调节转速为 70 r/min，探究浓缩温度为 90℃，真空度为-0.07 MPa 的条件下，不同浓缩时间（40 min，60 min，80 min，100 min，120 min）对 Fru-Arg、5-HMF、褐变程度和色泽的影响。

4.3.4 不同浓缩温度对蓝莓浓缩汁的影响

控制旋转蒸发仪，调节转速为 70 r/min，探究浓缩时间为 80 min，真空度为-0.07 MPa 条件下，不同浓缩温度（60℃，70℃，80℃，90℃，100℃）对 Fru-Arg、5-HMF、褐变程度和色泽的影响。

4.3.5 正交试验设计

蓝莓浓缩汁的工艺优化：在单因素实验的基础上，以 Fru-Arg 的含量为指标，以浓缩真空度（A）、浓缩温度（B）、浓缩时间（C）为调控因素，采用三水平三因素的正交试验设计，对蓝莓汁浓缩工艺进行优化。正交实验设计表如下：

表 4-1 正交实验设计表

Table 4-1 Orthogonal Experimental Design Table

水平	A	B	C
	A 真空度 (MPa)	B 温度 (°C)	C 时间 (min)
1	0.065	85	70
2	0.07	90	80
3	0.075	95	90

4.3.6 抗氧化能力测定

选用正交实验中最优方法生产的蓝莓浓缩汁进行 Fru-Arg 及抗氧化能力测定，方法同 3.3。

4.3.7 数据分析

实验数据分析同 3.4.4。

4.4 结果与分析

4.4.1 不同条件对浓缩汁色泽的影响

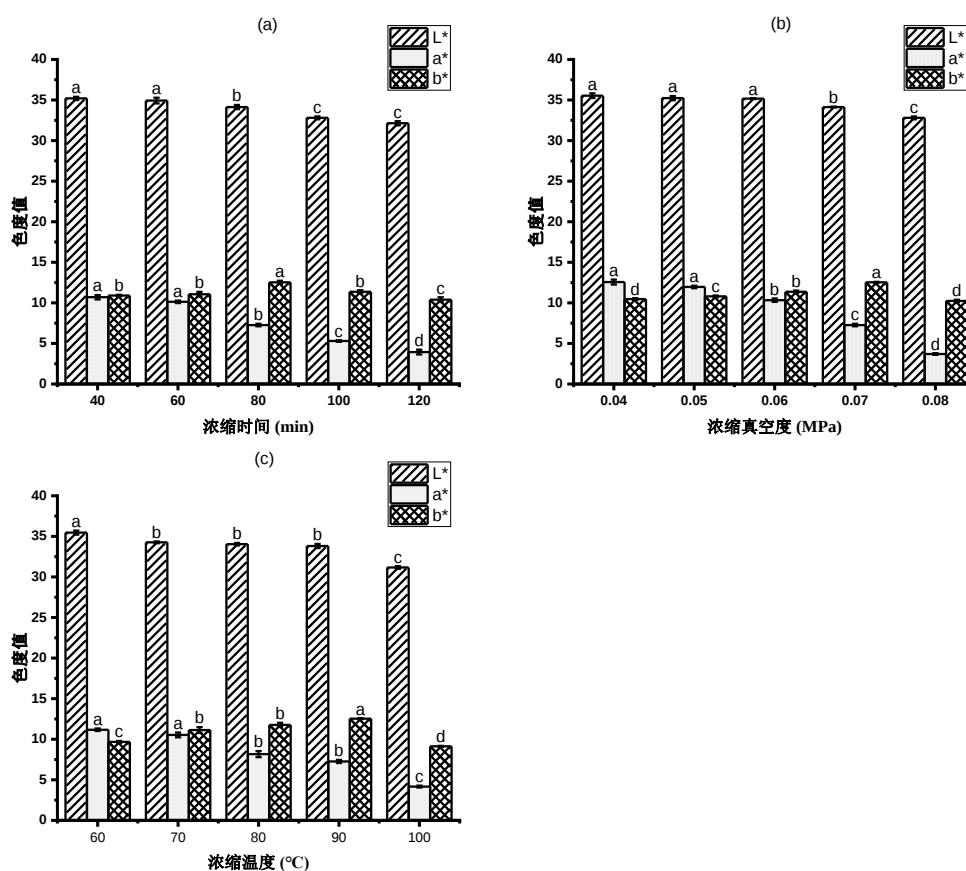


图 4-1 不同浓缩条件对色度的影响 (a) 时间 (b) 真空度 (c) 温度

Fig. Effect of different concentration conditions on chromaticity. (a)time(b) vacuum (c) temperature

如图所示，浓缩不同时间时，L*值（透明度）有显著的变化，随时间的增加而降低，a*值（红绿值）也出现明显的下降趋势，b*（黄蓝值）先上升，后下降。说明随时间的增加浓缩汁中的透明度下降，并且长时间的加热破坏了红色相关色素，导致 a*下降，而在短时间加热时产生美拉德反应中期一些黄色物质导致黄色

上升，而超过 80 min 时黄色物质进一步反应生成美拉德反应后期的类黑精导致黄色下降。在随着浓缩真空度的升高和加热温度的升高，浓缩汁的色度值出现了几乎相同的趋势。

4.4.2 真空度对浓缩汁的影响

如图 4-2 (a) 所示，控制浓缩温度为 90℃，浓缩时间为 80 min，通过调节真空度 (-0.04 MPa, -0.05 MPa, -0.06 MPa, -0.07 MPa, -0.08 MPa)，观察到 Fru-Arg 随着真空度的升高，其含量也随之增加，到 -0.08 MPa 时增加缓慢，与 -0.07 MPa 相比无显著性。图 4-2 (b) 所示，5-HMF 随真空度的升高，含量快速升高，-0.08 MPa 时含量达到 32.7 $\mu\text{g/mL}$ ，已经超过规定的最大值。图 4-2 (c) 中可以看出，在真空度上升到 -0.07 MPa 时， A_{420} 值开始上升，褐变程度开始增加，-0.08 MPa 时显著升高。这一结果说明真空度为 -0.08 MPa 时可能美拉德反应更多的进入后期，Fru-Arg 增长速率变缓，Amadori 化合物开始进一步反应，生成 5-HMF 导致其含量快速升高。

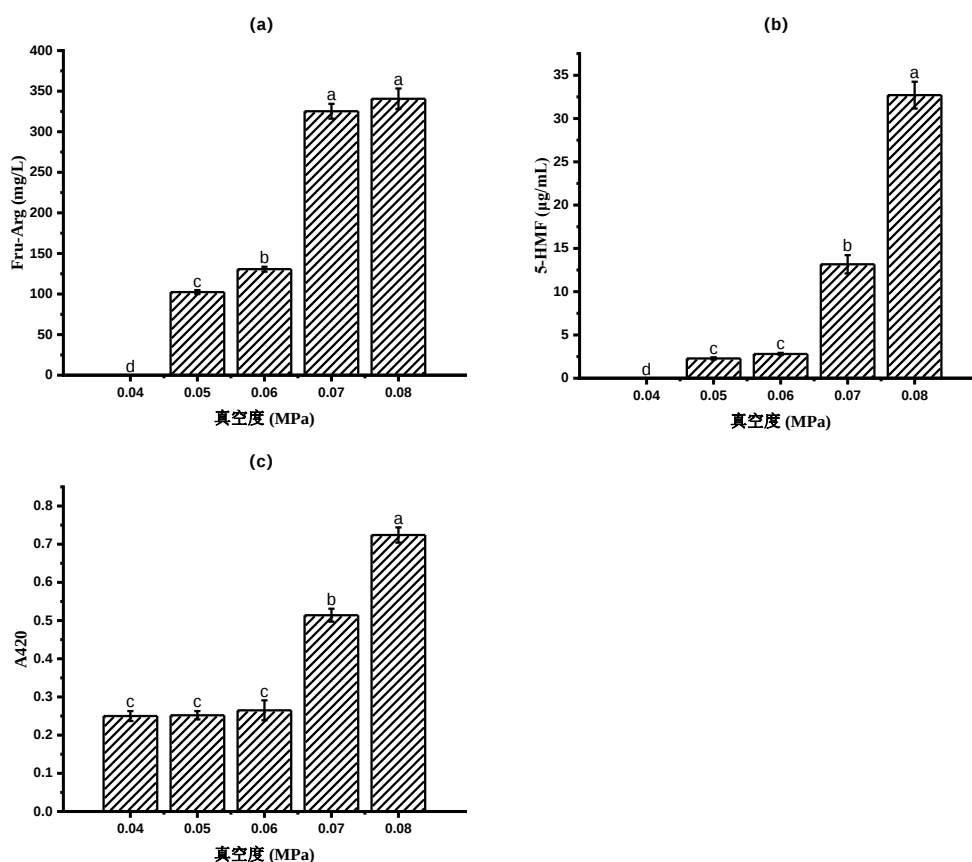


图 4-2 不同真空度对蓝莓汁的影响。(a) Fru-Arg 含量；(b) 5-HMF 含量；(c) A_{420}

Fig. 4-2 Effect of different vacuum degrees on blueberry juice. (a) Fru-Arg; (b) 5-HMF; (c) A_{420}

4.4.3 时间对浓缩汁的影响

如图 4-3 (a) 所示, 控制浓缩温度为 90°C , 浓缩真空度为 -0.07 MPa , 控制浓缩时间 (40 min, 60 min, 80 min, 100 min, 120 min)。可以看出, 随浓缩时间的增加, Fru-Arg 的含量也随之增加, 但 120 min 与 100 min 相比 Fru-Arg 含量增加, 但无显著性差异。且 80 min 以后增加速率明显变慢。图 4-3 (b) 可以看出 5-HMF 随时间的增加, 含量也逐渐升高, 且 80 min 后增加速率加快。图 4-3 (c) 中 A_{420} 同样出现随时间增加而增加的现象。结果表明随时间的增加, 美拉德反应开始时进行 Amadori 化合物等前期产物的合成, 而随着时间的增加, 反应进入后期, Amadori 化合物继续进行美拉德中后期反应, 并大量生成 5-HMF, 使 5-HMF 的含量快速上升, 加快浓缩汁的褐变程度。

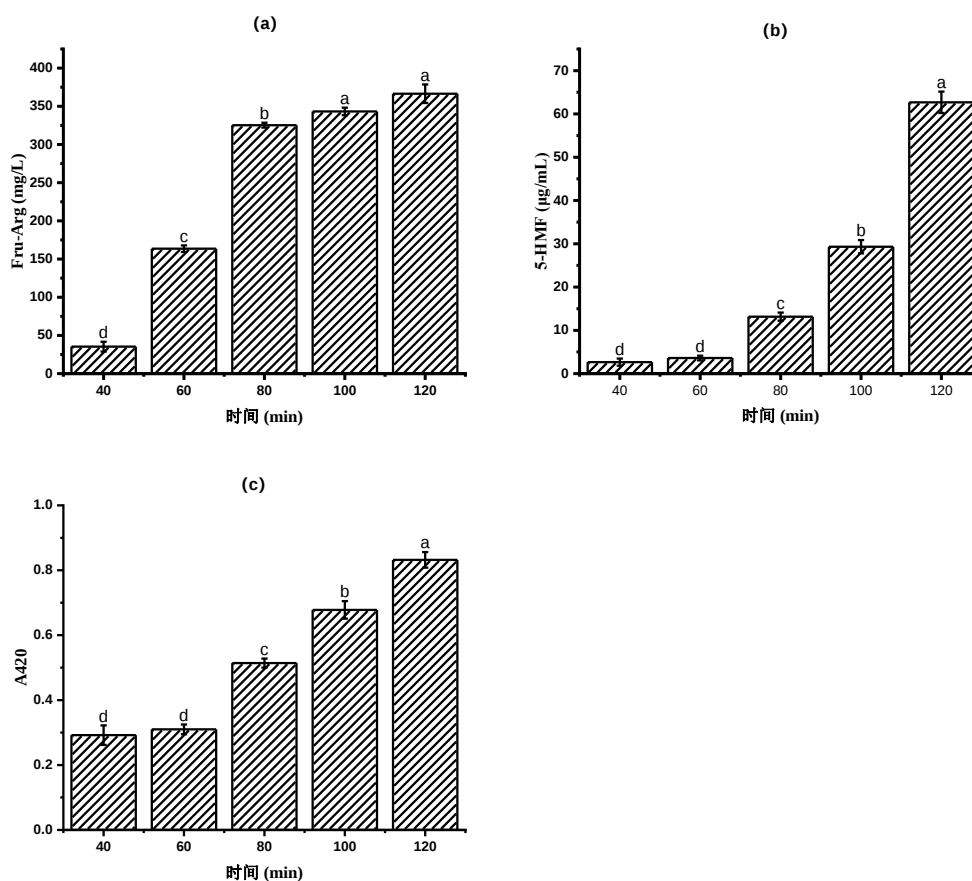


图 4-3 不同时间对蓝莓汁的影响。(a) Fru-Arg 含量; (b) 5-HMF 含量; (c) A_{420}
Fig. 4-3 Effect of different times on blueberry juice. (a) Fru-Arg; (b) 5-HMF; (c) A_{420}

4.4.4 不同浓缩温度对浓缩汁中 Fru-Arg、5-HMF 和褐变程度的影响

如图 4-4 (a) 所示控制真空度为-0.07 MPa, 时间为 80 min 时, 随着温度的升高 (60°C, 70°C, 80°C, 90°C, 100°C), 浓缩汁中 Fru-Arg 的含量也逐渐增加, 然而温度在 100°C 时却出现下降, 说明过高的温度可能会导致 Fru-Arg 的降解, 不利于 Fru-Arg 的富集。图 4-4 (b) 中可以看出温度的升高会导致 5-HMF 含量的增加, 100°C 时 5-HMF 含量大幅增加, 含量为 93.91 μ g/mL, 严重超过规定的最大值, 说明高温会使美拉德反应进入中后期阶段。而 5-HMF 是一种对人体有害的物质, 在 100°C 下 5-HMF 大量生成, 说明 100°C 并不适用于蓝莓浓缩汁的加工。图 4-4 (c) 中可以看出温度达到 90°C 时 A₄₂₀ 的值增加, 100°C 时增加值较大, 说明高温会增加浓缩汁褐变程度, 促进美拉德中后期反应。

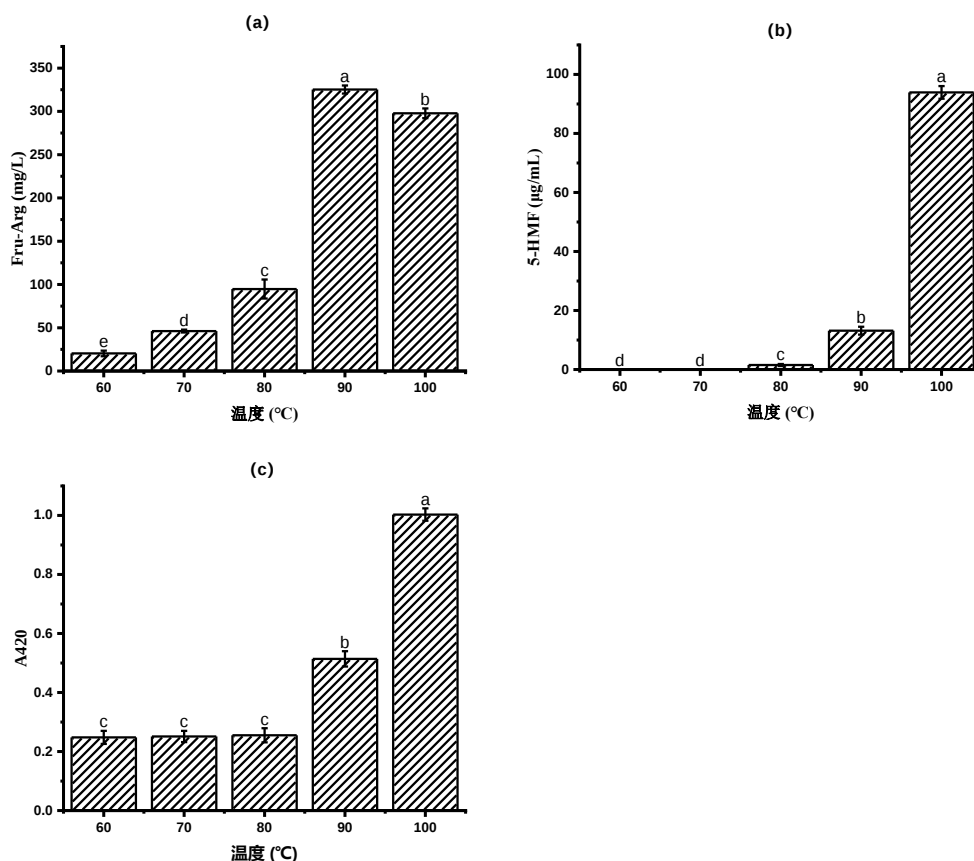


图 4-4 不同浓缩温度对蓝莓汁的影响。(a) Fru-Arg 含量; (b) 5-HMF 含量; (c) A₄₂₀
Fig. 4-4 Effect of different concentration temperatures on blueberry juice.(a) Fru-Arg; (b) 5-HMF;
(c) A₄₂₀

4.4.5 蓝莓浓缩汁的工艺优化

根据单因实验结果, 采用正交实验对蓝莓浓缩汁进行工艺优化。以 Fru-Arg

为指标,探究真空度、温度、时间三个因素对蓝莓浓缩汁的影响。结果见表 4-2。

表 4-2 正交实验结果

Table. 4-2 Orthogonal experimental results

试验号	A	B	C	Fru-Arg 含量 (mg/L)
	真空度	温度	时间	
1	1	1	1	7.02
2	1	2	2	94.74
3	1	3	3	170.76
4	2	1	2	17.7
5	2	2	3	225.36
6	2	3	1	132.54
7	3	1	3	175.53
8	3	2	1	280.02
9	3	3	2	292.26
K ₁	272.52	200.25	419.58	
K ₂	375.6	600.12	404.7	
K ₃	747.81	595.56	571.65	
k ₁	90.84	66.75	139.86	
k ₂	125.2	200.04	134.9	
k ₃	249.27	198.52	190.55	
R	158.43	133.29	55.65	
主次顺序	A>B>C			
最优组合	A ₃ B ₂ C ₃			

由表 4-2 可以看出,正交结果的极差 R 值为 $R_A > R_B > R_C$,即影响蓝莓浓缩汁中 Fru-Arg 含量的次序为真空度>温度>时间,对比表中 K 值可以看出最优组合为 A₃B₂C₃即-0.075 MPa, 90°C, 90 min。按照正交工艺得出的最佳条件制备蓝莓浓缩汁,并测定其中 Fru-Arg 含量分别为 284.76 mg/L 含量略低于实验结果,原因可能是由于误差所导致。测得浓缩汁中 5-HMF 含量为 22.64 μg/mL,并未超过规定值,说明工艺优化方案可行。使蓝莓浓缩汁中 Amadori 化合物等功能活性物质生成的同时,抑制美拉德反应后期有害物质 5-HMF 的大量产生。

4.4.6 蓝莓浓缩汁的抗氧化能力测定

表 4-3 蓝莓浓缩汁抗氧化能力

Table. 4-3 Antioxidant capacity of blueberry juice concentrate

	抗氧化能力 (AAE, $\mu\text{mol/L}$)			
	ABTS	DPPH	FRAP	• OH
蓝莓汁	1210.53 $\pm$ 19.2 ^b	364.92 $\pm$ 7.01 ^b	1377.77 $\pm$ 20.71 ^b	539.51 $\pm$ 0.36 ^b
浓缩汁	1407.44 $\pm$ 8.65 ^a	459.39 $\pm$ 5.82 ^a	1513.37 $\pm$ 17.24 ^a	547.27 $\pm$ 0.45 ^a

对最优工艺蓝莓浓缩汁的体外抗氧化能力进行测定，以抗坏血酸（AA）做当量，结果表示为 AAE $\mu\text{mol/L}$ ，抗氧化结果如表 4-3 所示，浓缩汁的 ABTS、DPPH、FRAP 与羟自由基清除能力均高于蓝莓汁，且效果显著（ $P > 0.05$ ），说明通过真空加热浓缩工艺制备的蓝莓汁可以富集美拉德反应中的 Amadori 化合物等活性物质，且对其抗氧化活性有显著提升，并且控制了浓缩汁中有害物质 5-HMF 的大量生成。为蓝莓汁浓缩工艺方法提供了重要依据。

4.5 本章小结

本章利用单因素实验，探究了不同真空度（-0.04 MPa, -0.05 MPa, -0.06 MPa, -0.07 MPa, -0.08 MPa），不同浓缩温度（60°C, 70°C, 80°C, 90°C, 100°C），不同浓缩时间（40 min, 60 min, 80 min, 100 min, 120 min）对蓝莓浓缩汁中的 Fru-Arg, 5-HMF, A_{420} 和色度的影响，并用正交实验优化了蓝莓浓缩汁工艺，最后测定了最优工艺制备的蓝莓浓缩汁的抗氧化活性。主要结论如下：

（1）在不同条件下，蓝莓浓缩汁的透明度随温度，真空度，时间的增加而降低，红度与透明度出现相同的趋势，然而由于美拉德反应后期产物的生成黄度值呈先上升后下降的趋势。

（2）在不同加工条件下，蓝莓汁中 5-HMF 的含量随真空度，温度，时间的增加而增加，且增加速率也随之加快， A_{420} 作为评判美拉德反应的褐变程度指标，与 5-HMF 表现出同样的趋势。而 Fru-Arg 随真空度，时间的增加其含量也升高，与前两者不同的是，其增长速率在减缓。在不同温度的条件下，100°C 时出现 Fru-Arg 含量出现了下降，说明高温可能导致美拉德后期反应发生，Fru-Arg 开始分解。

（3）根据单因素实验，以正交实验对蓝莓汁浓缩工艺进行了优化，结果表

明，最佳工艺为-0.075 MPa，90℃，90 min。并对最佳工艺生产的蓝莓浓缩汁进行 Fru-Arg、5-HMF 含量测定以及抗氧化能力评价，结果表明真空加热浓缩对蓝莓汁的抗氧化能力有显著提高作用。

第五章 结论与展望

5.1 结论

为了探究蓝莓汁浓缩过程中美拉德反应产物 (Amadori 化合物) 的功能活性, 根据蓝莓中的氨基酸种类及含量, 利用真空脱水技术合成了 Fru-Arg, 验证了 Fru-Arg 的体外抗氧化活性, 并通过细胞模型, 验证了 Fru-Arg 对氧化损伤细胞的保护作用。测定了蓝莓汁在浓缩过程中的营养成分变化与抗氧化能力变化, 并对蓝莓汁的真空浓缩工艺进行了优化。主要结论如下:

(1) 利用 ABTS 清除能力、DPPH 清除能力、 Fe^{3+} 还原能力和羟基自由基清除能力四种方法, 以抗坏血酸当量, 测定了 0-10 mmol/L 的 Fru-Arg 体外抗氧化活性, 结果表明 Fru-Arg 的体外抗氧化能力呈浓度依赖性, 且 ABTS 清除能力相对较高。通过细胞模型进一步验证 Fru-Arg 的抗氧化能力。在 0-10 mmol/L 浓度范围内, Fru-Arg 对细胞即无损伤, 也无促进增长作用。并且 0-10 mmol/L 浓度范围内, Fru-Arg 对氧化损伤细胞有显著的保护作用, 且呈浓度依赖性。Fru-Arg 能有效清除细胞内活性氧 (ROS), 通过调节细胞内抗氧化酶活性来减少氧化对细胞的损害, 并减少细胞内丙二醛的产生。

(2) 蓝莓汁中氨基酸种类丰富, 其中 Arg 含量最高。在蓝莓汁加热浓缩过程中, 其营养成分含量 (总酚, 黄酮, 还原糖, 可溶性蛋白, 花色苷) 显著下降, 美拉德反应产物 (Fru-Arg, 5-HMF) 显著升高。其抗氧化能力也呈显著提高的趋势。说明在蓝莓浓缩汁中发挥主要抗氧化作用的可能是 Fru-Arg 与 5-HMF 等美拉德反应产生的活性物质。

(3) 优化蓝莓汁真空浓缩工艺, 通过对浓缩真空度, 浓缩温度, 浓缩时间的调控, 分析提高 Amadori 化合物含量并减少 5-HMF 生成的条件, 根据单因素实验结果设计正交实验方案, 得出蓝莓汁浓缩的最佳工艺为 -0.075 MPa, 90°C, 90 min, 对最佳工艺生产的蓝莓浓缩汁进行 Fru-Arg、5-HMF 含量测定以及抗氧化能力评价, 结果表明真空加热浓缩对蓝莓汁的抗氧化能力有显著提高作用。

5.2 展望

由于时间与技术不成熟，实验中还存在以下问题：

1. 对于蓝莓浓缩汁中的 Amadori 化合物，只合成了 Fru-Arg 一种来作为标准品，测定其在浓缩汁中的含量，对于其他 Amadori 化合物未能合成或购买到标准品用来检测。

2. 对于 Fru-Arg 对过氧化氢诱导的 HEK-293 氧化损伤细胞的保护作用，后续可以进一步进行深入研究探讨。对其抗氧化通路进行解析，并分析其在抗氧化通路中的具体作用机制。

参考文献

- [1] 刘欢. “浆果之王”蓝莓的营养保健作用研究 [J]. 中国新技术新产品, 2009, (19): 219-228.
- [2] 朱金艳, 王月华, 张建丽. 不同品种蓝莓果的营养成分及花色苷种类研究[J]. 新农业, 2016, (09): 10-4.
- [3] 陈涛. 海南紫大薯花青素体外抗氧化能力及对 TNBS 诱导小鼠结肠炎缓解效果研究[D]. 海南大学, 2016.
- [4] 程安玮, 房凯, 王文亮, 等. 蓝莓多酚的萃取及抗氧化活性研究[J]. 北京工商大学学报(自然科学版), 2012, 30(04): 37-40.
- [5] 郭弘璇. 蓝莓热风干燥工艺及干燥产品糖类化合物研究[D], 北京林业大学, 2014.
- [6] 和丽媛. 蓝莓-玫瑰复合饮料的研制[J]. 轻工科技, 2024, 40(01): 1-3.
- [7] 吕芳楠, 温靖, 徐玉娟, 等. 不同品种蓝莓干的品质比较及干燥方式的选择 [J]. 热带作物学报, 2016, 37(11): 2230-2237.
- [8] 阳志锐, 冉红艳, 吴超群, 等. 混菌发酵蓝莓酒工艺及抗氧化活性评价[J]. 广州化工, 2024, 52(08): 162-166.
- [9] 陈祖玉, 陈思雨, 邱春旺, 等. 蓝莓果醋的发酵工艺优化及其抗氧化活性研究 [J]. 人参研究, 2024, 36(04): 49-53.
- [10] Kawabata F, Tsuji T. Effects of dietary supplementation with a combination of fish oil, bilberry extract, and lutein on subjective symptoms of asthenopia in humans[J]. Biomedical Research-Tokyo, 2011, 32(6): 387-393.
- [11] Wang W, Jung J, Zhao Y. Chitosan-cellulose nanocrystal microencapsulation to improve encapsulation efficiency and stability of entrapped fruit anthocyanins[J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 157: 1246-1253.
- [12] 张宏康, 李笑颜, 吴戈仪, 等. 果汁加工研究进展[J]. 农产品加工, 2019, (02): 86-88.
- [13] 郑自奋, 陈晓维, 邹波, 等. 不同浓缩方式对余甘子汁品质的影响[J]. 食品

- 与发酵工业, 2024, 1-12.
- [14] 卢靖辉, 温靖, 赖慧宁, 等. 不同浓缩方式对枸杞汁品质特性的影响[J]. 食品工业科技, 2025, 46(03): 31-40.
- [15] Mastello R, Janzanti N, Monteiro M. Volatile and odoriferous compounds changes during frozen concentrated orange juice processing[J]. Food Research International, 2015, 77: 591-598.
- [16] 张敬. 膜分离技术在哈密瓜浓缩汁加工中的应用研究[D], 新疆农业大学, 2014.
- [17] Fazaeli M, Hojjatpanah G, Emam Z. Effects of heating method and conditions on the evaporation rate and quality attributes of black mulberry (*Morus nigra*) juice concentrate[J]. Journal of Food Science and Technology-mysore, 2013, 50(1): 35-43.
- [18] Fadavi A, Yousefi S, Darvishi H, etc. Comparative study of ohmic vacuum, ohmic, and conventional-vacuum heating methods on the quality of tomato concentrate[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2018, 47: 225-230.
- [19] 周仁杰. Amadori 化合物组分合成调控、生理活性评价及在樱桃番茄粉加工中应用研究[D]. 江南大学, 2022.
- [20] Li H, Yu S. Review of pentosidine and pyrraline in food and chemical models: formation, potential risks and determination[J]. Journal of The Science of Food and Agriculture, 2018, 98(9): 3225-3233.
- [21] Delgado C, Seiquer I, Navarro M, etc. Maillard reaction indicators in diets usually consumed by adolescent population[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2007, 51(3): 341-351.
- [22] Feng J, Berton C, Fogliano V, etc. Maillard reaction products as functional components in oil-in-water emulsions: A review highlighting interfacial and antioxidant properties[J]. Trends in Food Science & Technology, 2022, 121: 129-141.
- [23] Kim D, Chun S, Oh N, etc. Anti-inflammatory activities of Maillard reaction products from whey protein isolate fermented by *Lactobacillus gasseri* 4M13 in

- lipopolysaccharide- stimulated RAW264.7 cells[J]. *Journal of Dairy Science*, 2019, 102(9): 7707-7716.
- [24] Kitts D, Chen X, Jing H. Demonstration of Antioxidant and Anti-inflammatory Bioactivities from Sugar-Amino Acid Maillard Reaction Products[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(27): 6718-6727.
- [25] Nooshkam M, Varidi M, Bashash M. The Maillard reaction products as food-born antioxidant and antibrowning agents in model and real food systems[J]. *Food Chemistry*, 2019, 275: 644-660.
- [26] Yu J, Zhang S, Zhang L. Amadori compounds as potent inhibitors of angiotensin-converting enzyme (ACE) and their effects on anti-ACE activity of bell peppers[J]. *Journal of Functional Foods*, 2016, 27: 622-630.
- [27] Luo Y, Li S, Ho C. Key Aspects of Amadori Rearrangement Products as Future Food Additives[J]. *Molecules*, 2021, 26(14): 4314.
- [28] Moreno F, Corzo M, Castillo M, etc. Changes in antioxidant activity of dehydrated onion and garlic during storage[J]. *Food Research International*, 2006, 39(8): 891-897.
- [29] Vhangani L, Van W. Antioxidant activity of Maillard reaction products (MRPs) in a lipid-rich model system[J]. *Food Chemistry*, 2016, 208: 301-308.
- [30] 崔和平. 美拉德反应中间体的水相制备及其加工风味形成规律研究 [D]. 江南大学, 2019.
- [31] Mossine V, Mawhinney T. Nalpha-(1-deoxy-D-fructos-1-yl)-L-histidine ("D-Fructose-L histidine"): a potent copper chelator from tomato powder [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007, 55(25): 10373-10381.
- [32] Kenjiro R, Nagatoshi I, Hiromichi M, etc. N alpha-(1-deoxy-D-fructos-1-yl)-L-arginine, an antioxidant compound identified in aged garlic extract[J]. *Journal of Nutrition*, 2001, (3): 972S-976S.
- [33] Zhou H, Qu Z, Mossine V, etc. Proteomic Analysis of the Effects of Aged Garlic Extract and Its FruArg Component on Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammatory Response in Microglial Cells[J]. *Plos One*, 2014, 9(11): e113.

- [34] Oh J, Chun S, Kim D, etc. Anti-inflammatory effect of sugar-amino acid Maillard reaction products on intestinal inflammation model in vitro and in vivo[J]. Carbohydrate Research, 2017, 449: 47-58.
- [35] Zhou R, Yang C, Xie T, etc. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of four Amadori compounds (ACs) and mechanism analysis of N-(1-Deoxy-D-fructos-1-yl)-glycine (Fru-Gly)[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 159: 113242.
- [36] Sharma O, Bhat T. DPPH antioxidant assay revisited[J]. Food Chemistry, 2009, 113(4): 1202-1205.
- [37] Nenadis N, Wang L, Tsimidou M, etc. Estimation of Scavenging Activity of Phenolic Compounds Using the ABTS+ Assay[J]. Food Chemistry , 2004, 52(15): 4669-4674.
- [38] Langley E, Simon C, Nutrition. Antioxidant potential of green and black tea determined using the ferric reducing power (FRAP) assay[J]. International Journal of Food Sciences & Nutrition 2000, 51(3): 181-188.
- [39] 续洁琨, 姚新生, 栗原博. 抗氧化能力指数(ORAC)测定原理及应用[J]. 中国药理学通报, 2006, (08): 1015-1021.
- [40] Troise A. Analytical strategies to depict the fate of the Maillard reaction in foods[J]. Current Opinion in Food Science, 2018, 19: 15-22.
- [41] Bolchini S, Angeli L, Ferrentino G, etc. Free radical scavenging kinetics of Maillard reaction products: A glucose-glycine model system[J]. LWT-Food Science and Technology, 2025, 217: 117316.
- [42] Ha K, Jo S, Kang B, etc. In Vitro and In Vivo Antihyperglycemic Effect of 2 Amadori Rearrangement Compounds, Arginyl-Fructose and Arginyl-Fructosyl-Glucose [J]. Journal of Food Science, 2011, 76(8): H188-H193.
- [43] Lu X, Ma R, Zhan J, etc. Effect of dietary intake of advanced glycation end products on biomarkers of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2024, 25: 1-10.
- [44] Yu J, Shan Y, Li S, etc. Potential contribution of Amadori compounds to

- p>antioxidant and angiotensin I converting enzyme inhibitory activities of raw and black garlic[J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 129: 109553.
- [45] Zhou R, Zhu X, Xie T, etc. Amadori compounds (N-(1-Deoxy-D-fructos-1-yl)-amino acid): The natural transition metal ions (Cu^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+}) chelators formed during food processing[J]. LWT-Food Science and Technology, 2024, 191: 115600.
- [46] 吕春玲, 姜绍通, 沈鸿, 等. 浓缩对桑葚汁营养品质的影响[J]. 饮料工业, 2015, 18(05): 8-13.
- [47] Liu J, Chen Z, He J, etc. Anti-oxidative and anti-apoptosis effects of egg white peptide, Trp-Asn-Trp-Ala-Asp, against H_2O_2 -induced oxidative stress in human embryonic kidney 293 cells [J]. Food & Function, 2014, 5(12): 3179-3188.
- [48] Zhou R, Yu J, Li S, etc. Vacuum Dehydration: An Excellent Method to Promote the Formation of Amadori Compounds (ACs,N-(1-Deoxy-d-fructos-1-yl)-amino Acid) in Aqueous Models and Tomato Sauce [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(49): 14584-14593.
- [49] Hansen A, Behrman E. Synthesis of 6-phosphofructose aspartic acid and some related Amadori compounds[J]. Carbohydrate Research, 2016, 431: 1-5.
- [50] Zhang A, Cui H, Hayat K, etc. Accelerated Dissipation of Free and Immobilized Water Facilitating the Intramolecular Dehydration of N-Xylosamine and Conversion Improvement of the Amadori Rearrangement Product of Aspartic Acid-Xylose Reaction.[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(48): 14662-14670.
- [51] Tang W, Cui H, Sun F, etc. N-(1-Deoxy-D-xylulos-1-yl)-glutathione: A Maillard Reaction Intermediate Predominating in Aqueous Glutathione-Xylose Systems by Simultaneous Dehydration-Reaction[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(32): 8994-9001.
- [52] Huang P, Miao J, Li J, etc. Novel Antioxidant Peptides from Pearl Shell Meat Hydrolysate and Their Antioxidant Activity Mechanism[J]. Molecules, 2023, 28(2): 864-873.
- [53] Benjakul S, Visessanguan W, Phongkanpai V, etc. Antioxidative activity of

- caramelisation products and their preventive effect on lipid oxidation in fish mince[J]. Food Chemistry, 2005, 90(1): 231-239.
- [54] Muller L, Frohlich K, Bohm V. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (α TEAC), DPPH assay and peroxyl radical scavenging assay[J]. Food Chemistry, 2011, 129(1): 139-148.
- [55] Wu Q, Zou S, Yan X, etc. Lactiplantibacillus plantarum A72 inoculation enhances Citrus juice quality: A systematic analysis of the strain's fermentation properties, antioxidant capacities, and transcriptome pathways[J]. Food Bioscience, 2025, 64: 105878.
- [56] Liu W, Ren J, Wu H, etc. Inhibitory effects and action mechanism of five antioxidant peptides derived from wheat gluten on cells oxidative stress injury[J]. Food Bioscience, 2023, 56: 103236.
- [57] Zhang Q, Tong X, Li Y, etc. Purification and Characterization of Antioxidant Peptides from Alcalase-Hydrolyzed Soybean (Glycine max L.) Hydrolysate and Their Cytoprotective Effects in Human Intestinal Caco-2 Cells[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(20): 5772-5781.
- [58] Ren Q, Bakker W, Wesseling S, etc. On the Role of ROS and Glutathione in the Mode of Action Underlying Nrf2 Activation by the Hydroxyanthraquinone Purpurin[J]. Antioxidants, 2023, 12(8): 1544.
- [59] Cui H, Hayat K, Jia C, etc. Synergistic Effect of a Thermal Reaction and Vacuum Dehydration on Improving Xylose- Phenylalanine Conversion to N-(1-Deoxy-D-xylulos-1-yl)-phenylalanine during an Aqueous Maillard Reaction[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(38): 10077-10085.
- [60] Troise A, Berton C, Vitaglione P, etc. Formation of Taste-Active Pyridinium Betaine Derivatives Is Promoted in Thermally Treated Oil-in-Water Emulsions and Alkaline pH[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(18): 5180-5188.
- [61] 彤霖. Maillard 反应中间体降低卷烟自由基作用的研究[D], 华中科技大学,

2006.

- [62] Zhan H, Tang W, Cui H, etc. Formation kinetics of Maillard reaction intermediates from glycine-ribose system and improving Amadori rearrangement product through controlled thermal reaction and vacuum dehydration[J]. Food Chemistry, 2020, 311: 125877.
- [63] Li Y, Jiang B, Zhang T, etc. Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH)[J]. Food Chemistry. 2008, 106(2): 444-450.
- [64] 余佳浩. 番茄/辣椒加工过程中美拉德初期反应、番茄红素异构化及生理功效研究[D]. 江南大学, 2019.
- [65] Luan J, Wang L, Yang J, etc. Identification, molecular docking, and protective effects on H₂O₂-induced HEK-293 cell oxidative damage of antioxidant peptides from Pacific saury (*Cololabis saira*) [J]. Food & Function, 2023, 14(1): 160-170.
- [66] Sierra J, Vinas M. Future prospects for Antimicrobial peptide development: peptidomimetics and antimicrobial combinations[J]. Expert Opinion on Drug discovery, 2021, 16(6): 601-614.
- [67] Wang Y, Zhao Y, Wang Y, etc. Antioxidant peptides from Antarctic krill (*Euphausia superba*) hydrolysate: preparation, identification and cytoprotection on H₂O₂-induced oxidative stress[J]. Journal of Functional Foods, 2021, 86: 104701.
- [68] Wen C, Zhang J, Zhang H, etc. Plant protein-derived antioxidant peptides: Isolation, identification, mechanism of action and application in food systems: A review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 105: 308-322.
- [69] Bollati C, Cruz I, Aiello G, etc. Investigation of the intestinal trans-epithelial transport and antioxidant activity of two hempseed peptides WVSPLAGRT (H2) and IGFLIIWV (H3)[J]. Food Research International, 2022, 152: 110720.
- [70] Qin D, Yang F, Hu Z, etc. Peptide T8 isolated from yak milk residue ameliorates H₂O₂-induced oxidative stress through Nrf2 signaling pathway in HUVEC cells [J]. Food Bioscience, 2021, 44: 101408.
- [71] Gu X, Li J, Yang L, etc. Preparation of natural complex waxy structure for the evaluation of preservation performance of blueberry[J]. Food Bioscience, 2023,

- 55: 102990.
- [72] Perkins P, Collins K, Howard L , etc. Blueberry fruit response to postharvest application of ultraviolet radiation[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2008, 47(3): 280-285.
- [73] Fan Y, Yang L, Long K, etc. Analysis of free amino acids and evaluation of the quality of gallnut honeys from different geographical areas[J]. *Acta alimentaria*, 2024, 53(4): 635-647.
- [74] Shen Y, Hu C, Zhang H, etc. Characteristics of three typical Chinese highland barley varieties: Phenolic compounds and antioxidant activities[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2018, 42(2): e12488.
- [75] Wang J, Bian Z, Wang S, etc Effects of ultrasonic waves, microwaves, and thermal stress treatment on the germination of Tartary buckwheat seeds[J]. *Journal of Food Process Engineering*, 2020, 43(10): e13494.
- [76] 严燕. 枇杷膏加工工艺及其抗氧化特性的研究[D]. 福建农林大学, 2012.
- [77] 邢苏徽. 不同加工方式对秀珍菇品质的影响研究 [D]. 扬州大学, 2023.
- [78] 李硕, 张建, 张连富. 水相体系中 Amadori 化合物的合成及检测方法研究[J]. *食品与生物技术学报*, 2020, 39(07): 59-66.
- [79] 崔宇擎, 张华伟, 王喜生, 等. 5-HMF 高效液相色谱检测方法的建立及功能糖与不同产地党参、何首乌和熟地中 5-HMF 含量分析[J]. *中兽医医药杂志*, 2024, 43(01): 13-17.
- [80] Pham H , Bazmawe M, Kebede B, etc. Changes in the Soluble and Insoluble Compounds of Shelf-Stable Orange Juice in Relation to Non-Enzymatic Browning during Storage[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(46): 12854-12862.
- [81] 孟想, 朱雪洋, 张莉方, 等. 萌发处理对黑青稞活性成分组成及抗氧化能力的影响[J] *食品与发酵工业*. 2022, 48(04): 158-164.
- [82] Herald T, Gadgil P, Tilley A. High-throughput micro plate assays for screening flavonoid content and DPPH-scavenging activity in sorghum bran and flour[J]. *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 2012, 92(11): 2326-2331.

- [83] Kim S. Changes in approximate composition, antioxidant activity and melatonin content of rapeseed during germination[J]. Korean Journal of Food Preservation, 2016, 23(6): 839-847.
- [84] 雷佳佳, 黄晓岚, 黄万一, 等. 蒸制和水煮对小龙虾色泽、虾青素含量及抗氧化性的影响[J]. 食品科学, 2024, 45(13): 58-66.
- [85] 刘慧, 刘杰超, 吕真真, 等. 加工工艺对蓝莓汁和蓝莓酒中花色苷及类黄酮的影响[J]. 中国酿造, 2018, 37(08): 158-162.
- [86] 汪平. 不同品种蓝莓理化品质分析及果汁贮藏稳定性研究[D]. 安徽农业大学, 2021.
- [87] 吴志昇, 张立杰, 谢丽雪, 等. 12 个蓝莓品种果实氨基酸含量及组成分析[J]. 中国南方果树, 2023, 52(03): 149-153.
- [88] 刘小莉, 胡根河, 陆卿卿, 等. 热处理条件对蓝莓汁中花色苷和加工特性的影响[J]. 中国食品学报. 2016, 16(01): 161-166.
- [89] 夏晓雨, 王凤娟, 符群, 等. 几种单元操作对蓝莓果汁饮料酚类物质含量及抗氧化活性的影响[J]. 中南林业科技大学学报. 2019, 39(11): 125-131.
- [90] Seleem D, Pardi V, Murata R. Review of flavonoids: A diverse group of natural compounds with anti *Candida albicans* activity in vitro [J]. Archives of Oral Biology, 2017, 76: 76-83.
- [91] 邵春霖, 孟宪军, 毕金峰, 等. 不同干燥方式对蓝莓品质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(11): 109-113.
- [92] 陈姗姗, 张晖, 张超, 等. 真空浓缩对蓝莓花色苷降解的影响[J]. 食品科技, 2012, 37(09): 270-274.
- [93] 李晨妍. 梨膏中 Amadori 化合物的检测、调控及功能研究[D]. 江南大学, 2023.
- [94] Davidek T, Marabi A, Mauroux O, etc. Preparation of activated flavor precursor DFG, N-(1-deoxy-1-fructosylglycine) by combination of vacuum evaporation and closed system heating steps [J]. Food Chemistry, 2018, 244: 177-183.
- [95] Monien B, Engst W, Barknowitz G, etc. Mutagenicity of 5-Hydroxymethylfurfural in V79 Cells Expressing Human SULT1A1: Identification and Mass Spectrometric

- Quantification of DNA Adducts Formed[J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2012, 25(7): 1484-1492.
- [96] Ibarz A, Pagán J, Garza S. Kinetic models for colour changes in pear puree during heating at relatively high temperatures[J]. *Journal of Food Engineering*, 1999, 39(4): 415-422.
- [97] Hong P, Betti M. Non-enzymatic browning reaction of glucosamine at mild conditions: Relationship between colour formation, radical scavenging activity and α -dicarbonyl compounds production[J]. *Food Chemistry*, 2016, 212: 234-243.
- [98] Jiang G, Lee K, Ameer K, etc. Comparison of freeze-drying and hot air-drying on Asian pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai 'Niitaka') powder: changes in bioaccessibility, antioxidant activity, and bioactive and volatile compounds[J]. *Journal of Food Science and Technology-mysore*, 2019, 56(6): 2836-1844.
- [99] Li Z, Yuan Y, Yao Y, etc. Formation of 5-hydroxymethylfurfural in industrial-scale apple juice concentrate processing[J]. *Food Control*, 2019, 102: 56-68.
- [100] Miyawaki O, Kato S, Watabe K. Yield improvement in progressive freeze-concentration by partial melting of ice[J]. *Journal of Food Engineering*, 2012, 108(3): 377-382.
- [101] Onsekizoglu P, Bahceci K, Acar M. Clarification and the concentration of apple juice using membrane processes: A comparative quality assessment[J]. *Journal of Membrane Science*, 2010, 352(1-2): 160-165.
- [102] Sanchez J, Ruiz Y, Raventos M, etc. Progressive freeze concentration of orange juice in a pilot plant falling film[J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2010, 11(4): 644-651.

攻读学位期间发表的学术论文

- [1] 姜心豪, 张亮, 李玉峰, 等. 不同干燥方式对樱桃番茄粉的 Amadori 化合物含量、感官品质和抗氧化活性的影响[J]. 安徽工程大学学报, 2024.09.11(录用)

致谢

提笔至此，思绪万千。三年的硕士求学时光，是学术的探索，亦是生命的丰盈。一路走来，幸得诸多良师益友相伴，在此以最真挚的文字，铭记每一份照亮我前行的温暖。

师恩如海，润泽无声

首先，由衷感谢张国强教授以及张玉红老师。感谢老师为我提供了优越的学习和科研环境，感谢老师在论文选题以及论文撰写等各方面不辞辛劳的指导，给予我极大的鼓励和帮助。除了学业的指导之外，我更感谢老师对我人生的指导，这三年的相处与交流中，我逐渐学到了您从容乐观、严谨谦虚的生活和学术态度。也特别感谢周仁杰老师对我文章的倾力指导。从论文框架到实验设计再到内容细化，您以近乎严苛的学术标准推动我精益求精。是您的指引和帮助让我能顺利完成学业。在此，衷心祝愿各位恩师桃李芬芳，万事顺意。

同门共济，幸甚至哉

感谢课题组的同伴们，遇到你们也是我读研期间的幸运。感谢李峥宏、廖薛羿、朱雪洋师兄，郭玉峰、陶瑾、徐宁莉、张莉芳师姐在实验以及学习中给予我莫大的帮助，同时也感谢同门孙武、宁方方、马明欣、黄杰，师弟钟诚、付爽，师妹章佳欣、裴海汝，感谢小伙伴们在读研期间的陪伴与帮助，在此也祝愿各位前程似锦，愿大家的未来更加美好。

亲情所系，静水流深

最后，我要感谢我的父母和家人，感谢你们这三年来对我的鼓励与支持，在我倍感压力时，你们永远都是我最坚实的后盾，鼓励我，支持我。是你们给了我无限的勇气，让我能够突破自己，迎接新的挑战。你们用双手和肩膀托举着我，让我见识到了更加广阔的世界，也让我成为了更好的自己。愿你们健康，平安，喜乐。

纸短情长，恕不尽言。借此，祝所有相遇，天高海阔，万事胜意，山水有来路，早晚复相逢。