

江和栋, 黄艺, 潘小军, 等. 破壁灵芝孢子的体外模拟消化特性研究 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(12): 405–412. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022080229

JIANG Hedong, HUANG Yi, PAN Xiaojun, et al. Digestibility of Broken *Ganoderma lucidum* Spores by Simulation *in Vitro* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(12): 405–412. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022080229

· 营养与保健 ·

破壁灵芝孢子的体外模拟消化特性研究

江和栋¹, 黄 艺¹, 潘小军¹, 陈 媛¹, 董欢欢¹, 李广焱^{2,3}, 邓泽元², 李红艳^{2,*}

(1. 江西中医药大学药学院, 江西南昌 330004;

2. 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 江西南昌 330047;

3. 南昌同心紫巢生物工程有限公司, 江西南昌 330052)

摘 要: 为探究破壁灵芝孢子在口腔和胃肠道中的消化吸收情况以及对肠道环境的影响。以机械碾压法、微波法和超声法破壁的灵芝孢子 (*Ganoderma lucidum* spore, GLS) 为研究对象, 经体外模拟人体口腔、胃、小肠消化系统及透析模型, 随后将消化后的底物进行体外发酵。测定消化各个阶段的灵芝孢子失质量率、多糖和三萜化合物释放量、生物可接受率和透析率以及小肠消化底物在 0、6、12、24、48 h 体外发酵过程中 pH 变化。结果显示, 胃和小肠是灵芝孢子的主要消化场所, 破壁组平均失质量率达到 23.84%, 其中机械碾压组更易被消化, 其失质量率为 29.46%。97% 的多糖在胃肠液中溶出, 机械碾压组多糖的生物可接受率具有最高水平, 为 87.33%。三萜只在破壁组小肠模拟消化中有微量溶出, 平均约 1.50±0.04 mg/g, 95.2% 的三萜随沉淀进入结肠。体外发酵结果显示, 发酵液 pH 在 0~12 h 持续下降, 并在 12 h 基本到达发酵终点。对比三种破壁灵芝孢子的消化特性, 机械碾压法破壁的品质可观, 不失为企业规模化破壁生产的优选。综上所述, 破壁有利于提高灵芝孢子的有效成分在人体消化环境内释放量和生物可接受率, 促进结肠发酵产酸, 有助于调节人体肠道环境。

关键词: 破壁灵芝孢子, 体外模拟消化, 多糖, 生物可接受率

中图分类号: Q939.99

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)12-0405-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022080229



本文网刊:

Digestibility of Broken *Ganoderma lucidum* Spores by Simulation *in Vitro*

JIANG Hedong¹, HUANG Yi¹, PAN Xiaojun¹, CHEN Yuan¹, DONG Huanhuan¹, LI Guangyan^{2,3},
DENG Zeyuan², LI Hongyan^{2,*}

(1. School of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China;

3. Nanchang Tong Xin Zi Chao Biological Engineering Co., Ltd., Nanchang 330052, China)

Abstract: To investigate the digestion and absorption of wall-broken *Ganoderma lucidum* spores in the oral and gastrointestinal tracts and the effects on the intestinal environment. In this study, wall-broken *Ganoderma lucidum* spore (GLS) by mechanical milling, microwave and ultrasonic methods were subjected to *in vitro* simulation of human oral, gastric and small intestinal digestive systems and dialysis models, followed by *in vitro* fermentation of the digested substrate. The loss rate, release of polysaccharides and triterpenoids, bioacceptability and dialysis rate of *Ganoderma lucidum* spore at each stage of digestion as well as the pH changes of the small intestine digested substrate during 0, 6, 12, 24 and 48 h *in vitro* fermentation were measured. The results showed that the stomach and small intestine were the main digestion sites of *Ganoderma lucidum* spores, and the average mass loss rate of the broken wall group reached 23.84%, among which the mechanically milled group was more easily digested with a mass loss rate of 29.46%. 97% of the

收稿日期: 2022-08-23

基金项目: 江西省中医药管理局科技计划项目 (2022B1009); 大学生创新创业训练计划项目 (4014/215 2200395); 江西中医药大学科研基金资助项目; 大学生创新创业训练计划项目 (4014/2152200391)。

作者简介: 江和栋 (1995-), 男, 硕士, 助教, 研究方向: 天然产物与功能食品, E-mail: 1608807845@qq.com。

* 通信作者: 李红艳 (1986-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 天然产物, E-mail: lihongyan@ncu.edu.cn。

polysaccharides were dissolved in the gastrointestinal fluid, and the bioacceptability of polysaccharides in the mechanically milled group had the highest level of 87.33%. Triterpenes were only minimally soluble in the simulated digestion of the small intestine in the wall-breaking group, averaging about 1.50±0.04 mg/g, and 95.2% of the triterpenes entered the colon with the precipitation. The *in vitro* fermentation results showed that the pH value of the fermentation broth decreased continuously from 0 to 12 h and reached the end of fermentation at 12 h. Comparing the digestive characteristics of the three types of wall-broken *Ganoderma lucidum* spores, the quality of the mechanical milling method of wall-broken was considerable, and it was a preferable choice for enterprise scale wall-broken production. In conclusion, wall-breaking was conducive to increasing the release and bioacceptability of the active ingredients of *Ganoderma lucidum* spores in the human digestive environment, promoting colonic fermentation and acid production, and helping to regulate the human intestinal environment.

Key words: broken *Ganoderma lucidum* spores; *in vitro* digestion; polysaccharide; bioaccessibility

灵芝孢子(*Ganoderma lucidum* spores, GLS)为灵芝成熟时掉落的生殖细胞, 含括灵芝全部的遗传活性物质, 主要有效成分为灵芝三萜、灵芝多糖、有机锗、腺苷、多肽和丰富的微量元素^[1], 具有抑制肿瘤^[2]、保肝^[3]、清除自由基、降血糖、抗氧化^[4-5]、提高机体耐缺氧能力、保护神经系统及提高免疫力^[6-7]等功能。灵芝孢子壁为双层壁含有硅、钙和几丁质, 这三者的结合使得孢壁结构坚固且抗性较强, 因此研究破壁是否利于灵芝孢子中的营养成分的释放及消化吸收大有裨益^[8-9]。目前灵芝孢子粉破壁技术大致包括物理法、机械法、化学法、生物酶法和综合法^[10-12], 相对比生物酶法或化学法, 机械法和物理法具备高效、无有机溶剂残留、破壁率高和成本低等优势, 更加适合规模化生产, 因此广泛被国内的保健食品生产企业所采用。破壁可以提高灵芝孢子营养物的释放, 这已经得到业内研究学者实验研究的证实, 但迄今为止不同方法破壁的灵芝孢子在人体服用后的消化吸收情况和对肠道的调节作用是否存在差异却鲜有报道, 缺乏实验数据支撑。

由于动物和人体实验存在研究时间长、成本高等缺点, 建立体外模拟消化模型对破壁灵芝孢子再口腔、胃、小肠消化和生物可接受率的评价与人体或动物模型结果有良好的相关性^[13]。体外模拟消化不仅可以在一定程度上模拟人体环境, 而且 pH 环境和消化酶更接近人体环境, 具有经济、操作简便、易于控制的优点。为了揭开不同破壁方法对灵芝孢子在人体胃肠道中的消化吸收特性的影响, 本试验展开了体外模拟消化实验, 由于灵芝孢子粉的抗癌、降血糖、抗氧化、护肝和抗肿瘤等药用价值主要集中于灵芝多糖和灵芝三萜^[14]。因此, 本试验以机械碾压法、微波法和超声法破壁的灵芝孢子为原料, 选择多糖和三萜含量为考察指标, 研究灵芝孢子粉活性成分的消化吸收情况, 并利用人肠道菌群体外发酵模型^[15]共同探索破壁对灵芝孢子的消化吸收及肠道健康的影响, 该研究结果对于优化灵芝孢子粉破壁工艺和提高其健康功能品质具有一定的理论指导意义。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

灵芝孢子 南昌同心紫巢生物科技有限公司提

供; α -淀粉酶(酶活为 1500 U/mL)、猪胃蛋白酶(酶活为 1500 U/mL)、胰酶(酶活为 800 U/mL)、胆酸(分析纯) 阿拉丁公司; 碳酸铵、氢氧化钠、二水氯化钙、三水醋酸钠、乙酸、六水氯化铁、氯化钾、碳酸氢钠、氯化钠、六水氯化镁、磷酸二氢钾 分析纯, 西陇化工股份有限公司; 苯酚、福林酚 分析级, 上海荔达生物科技有限公司; 无水甲醇、无水乙醇 分析纯, 西陇科学股份有限公司; 透析袋 分子量截止为 10 kDa, 上海源叶生物科技有限公司。

精密 pH 计 上海仪电科学仪器股份有限公司; HH-4 数显恒温水浴锅 常州市华普达教学仪器有限公司; N-1100 旋转蒸发仪 上海爱朗仪器有限公司; KQ3200DE 型数控超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司; AL104 电子天平 梅特勒-托利多仪器有限公司; TDL-5-A 离心机 上海安亭科学仪器厂; BioTek 酶标仪 美国伯腾仪器有限公司; LDZX-50KBS 立式压力蒸汽灭菌器 上海申安医疗器械厂; DSY-III 氮吹仪 北京金科精华苑科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品制备 机械碾压组灵芝孢子制备: 设置机械研磨破壁机条件为转速为 800~1200 r/min, 功率为 1000~1500 W, 振动频率为 900 Hz, 振幅为 2~4 cm, 重复 10 次, 一次 5 min, 方法参考唐永康等^[16]。

微波破壁组灵芝孢子制备: 采用条件料液比 20:1 (mL/g), 微波功率 280 W, 微波时间 90 s, 对灵芝孢子进行处理后, 采用真空冷冻干燥, 于-20 ℃ 冰箱避光保存备用, 方法参考羌校君等^[17]。

超声破壁组灵芝孢子制备: 采用条件料液比为 20:1 (mL/g)、超声功率 400 W、超声时间 25 min, 对灵芝孢子进行处理, 采用真空冷冻干燥, 于-20 ℃ 冰箱避光保存备用, 方法参考马超等^[18]。样品编号及对应的消化阶段所需要添加的消化液见表 1。

1.2.2 模拟消化液配制 表 2 是模拟唾液 (Simulated saliva fluid, SSF)、模拟胃液 (Simulated gastric fluid, SGF) 和模拟肠液 (Simulated intestinal fluid, SIF) 的配制成分^[19], 其中 NaOH 和 HCl 为 pH 调节液, 各储备液均定容至 500 mL 备用。配制浓度 44.1 g/L 的 $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$, 在消化阶段再添加, 在模

表 1 样品编号
Table 1 Sample number

模拟消化 阶段	添加消化液	未破壁 组	机械碾 压组	微波破 壁组	超声破 壁组
第一阶段	SSF	R1	C1	M1	U1
第二阶段	SSF+SGF	R2	C2	M2	U2
第三阶段	SSF+SGF+SIF	R3	C3	M3	U3
第四阶段	SSF+SGF+SIF+透析	R4	C4	M4	U4

表 2 消化储备液
Table 2 Stock solutions of simulated digestion fluids

组成成分	各组分浓度(g/L)	储备液体积(mL)		
		SSF(pH7)	SGF(pH3)	SIF(pH7)
KCL	37.3	15.1	6.9	6.8
KH ₂ PO ₄	68	3.7	0.9	0.8
NaHCO ₃	84	6.8	12.5	42.5
NaCl	117	—	11.8	9.6
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	30.5	0.5	0.4	1.1
(NH ₄) ₂ CO ₃	48	0.06	0.5	—
NaOH	40	—	—	—
HCl	219	0.09	1.3	0.7

拟口腔、胃、肠道消化过程中分别加入适量 CaCl₂ (H₂O)₂ 使其浓度保持为 1.5、0.15、0.6 mmol/L。

1.2.3 体外模拟口腔液消化 精确称取表 2 中 16 个 GLS 样品, 每个 1 g 于 50 mL EP 管中, 加入 8.5 mL 的 SSF 充分混匀, 再加入 0.5 mL 酶活为 1500 U/mL 的 α-唾液淀粉酶, 25 μL 浓度为 0.3 mol/L 的 CaCl₂ 溶液和 975 μL 蒸馏水, 充分混匀后在 37 ℃ 的水浴振荡器中避光振荡 5 min。将 R1、C1、M1、U1 消化液于 90 ℃ 条件下加热 1 min, 使消化酶失活, 5000 r/min 离心 5 min 后, 收集上清液和沉淀, 真空冷冻干燥处理, 于-20 ℃ 冰箱保存, 剩余 12 个样品继续进行胃液消化。

1.2.4 体外模拟胃液消化 在 10 mL 上述经口腔消化的 12 个样品溶液中加入 7.5 mL 的 SGF 充分混匀, 再加入 1.6 mL 酶活为 1500 U/mL 的猪胃蛋白酶、0.2 mL 浓度为 1 mol/L 的 HCl 溶液和 695 μL 的蒸馏水, 充分混匀后在 37 ℃ 的水浴振荡器中避光振荡 2 h。将 R2、C2、M2、U2 消化液于 90 ℃ 条件下加热 1 min, 使消化酶失活, 5000 r/min 离心 5 min 后, 收集上清液和沉淀, 冻干保存, 剩余 8 个样品继续进行肠液消化。

1.2.5 体外模拟肠液消化 20 mL 上述经胃消化的 8 个样品溶液中加入 11 mL 的 SIF 充分混匀, 再加入 5.0 mL 酶活为 800 U/mL 的猪胰酶、2.5 mL 的胆酸、40 μL 浓度为 0.3 mol/L 的 CaCl₂ 溶液、0.15 mL 浓度为 1 mol/L 的 NaOH 溶液和 1.31 mL 蒸馏水, 充分混匀后在 37 ℃ 的水浴振荡器中避光振荡 2 h。将 R3、C3、M3、U3 消化液于 90 ℃ 条件下加热 1 min, 使消化酶失活, 5000 r/min 离心 5 min 后, 收集上清液和沉淀, 冻干保存, 剩余 4 个样品进行透析。

1.2.6 体外模拟小肠吸收 参考陈月^[20]方法进行。将连续经体外模拟口腔、胃和小肠消化后的四个样品混合液转移到 20 cm 的透析袋。然后用塑料夹子密封透析袋, 将其置于含有 500 mL 磷酸盐缓冲溶液 (pH7.4) 的烧杯中。透析系统在 37 ℃ 的水浴中避光进行 2 h。透析后, “出”部分(透析膜外)代表潜在的可吸收部分。“进”的部分(存留在透析膜中)被认为是不可吸收的部分, 可能进一步到达结肠。

1.2.7 评价指标 生物可接受率是指经胃和小肠消化后可吸收和利用的营养物总量与动物摄入的总量之比^[21]。胃蛋白酶消化后, 测量溶液的吸光度, 以得到胃液消化后灵芝孢子的残留多糖或三萜含量。胰酶消化后, 测量溶液的吸光度以获得灵芝孢子中多糖或三萜的生物可接受性。

$$\text{口腔液消化失质量率(\%)} = \frac{M_0 - M_1}{M_0} \times 100$$

$$\text{胃液消化失质量率(\%)} = \frac{M_1 - M_2}{M_1} \times 100$$

$$\text{肠液消化失质量率(\%)} = \frac{M_2 - M_3}{M_2} \times 100$$

$$\text{生物可接受率(\%)} = \frac{m_0 - m_1}{m_0} \times 100$$

$$\text{透析率(\%)} = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100$$

式中: M_0 表示 GLS 样品进行消化前的质量, mg; M_1 表示第一阶段消化后的质量, mg; M_2 表示第二阶段消化后的质量, mg; M_3 表示第三阶段消化后的质量, mg; m_0 表示 GLS 样品消化前多糖/三萜的总质量, mg; m_1 表示第三阶段消化后的可溶性多糖或三萜的质量, mg; m_2 表示第四阶段消化后透析膜内部分中的可溶性多糖或三萜的质量, mg。

1.2.8 总多糖含量的测定 参考江和栋等^[22]方法进行。取适量不同阶段消化后的残渣或真空冷冻干燥的消化液样品, 以提取料液比为 1:20 g/mL, 提取温度为 35 ℃, 提取时间为 1.5 h, 提取功率为 450 W 的条件下提取多糖, 再离心(4200 r/min, 10 min)取上清液浓缩至原体积的 1/4。将上清液用 95% 乙醇醇沉(4 ℃, 12 h), 离心(4200 r/min, 6 min), 收集沉淀即粗多糖, 用水定容到 50 mL, 此溶液为样品测定液。然后分别吸取 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 的 100 mg/L 的标准葡萄糖工作溶液至 20 mL 具塞试管中, 并用蒸馏水补至 1 mL, 取 1 mL 梯度浓度的葡萄糖标准品或 1 mL 样液加入 5% 苯酚 1 mL, 快速补加硫酸 5 mL(垂直于液面加入, 勿接触试管壁), 静置 10 min 后振荡均匀, 置于 30 ℃ 水浴 20 min, 取适量反应液用酶标仪在波长 490 nm 处测定吸光度, 绘制标准曲线并计算提取率^[23]。

$$W(\%) = \frac{M_1 V_1}{M_2 V_2} \times 0.9 \times 10^{-4}$$

式中: W 为样品中多糖含量, %; V_1 为样品的定容体积, mL; V_2 为吸取样品测定液比色测定的体积, mL; M_1 为样液中多糖含量, μg ; M_2 为样品质量, g; 0.9 为校正系数校正糖的微克数。

1.2.9 总三萜含量的测定 参考江和栋等^[24]方法, 取适量不同阶段消化后的残渣或真空冷冻干燥的消化液样品, 以乙醇体积分数 80%, 固液比 1:23 g/mL, 超声功率 540 W, 提取温度 40 °C, 提取时间 60 min 的条件提取三萜, 提取液离心(4200 r/min, 10 min)取上清液, 50 °C 真空旋转蒸发浓缩去除氯仿, 用甲醇配制成 0.2~2.0 mg/mL 浓度的样品待测液, 于 546 nm 处测定吸光度, 以齐墩果酸为对照品绘制标准曲线并计算三萜含量^[17]。

$$W(\%) = \frac{V_1 C}{V_2 M} \times 10^{-4}$$

式中: W 为样品的三萜含量, %; C 为样液中三萜含量, μg ; V_1 为样品的定容体积, mL; V_2 为吸取样品测定液比色测定的体积, mL; M 为样品质量, g。

1.2.10 体外肠道微生物发酵

1.2.10.1 配制生长培养基 参考秦永^[25]方法进行, 称取 KCl 4.5 g、NaCl 4.5 g、 NaHCO_3 1.5 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.7 g、 KH_2PO_4 0.5 g、 K_2HPO_4 0.5 g、胆盐 0.4 g、 CaCl_2 0.08 g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005 g、L-半胱氨酸 $\text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.8 g、阿拉伯半乳聚糖 2 g、木聚糖 1 g, 加 1 mL Tween 80 和 4 mL 刃天青溶液(0.025 %, w/v), 用蒸馏水配成 1 L 肠道菌群生长培养基, 配好后用灭菌锅 121 °C 灭菌 15 min。

1.2.10.2 人体粪便菌悬液的配制 参考 Yu 等^[26]方法进行, 选取 3 名 20~30 岁健康志愿者(志愿者知情并同意, 符合伦理学), 志愿者要求在粪便收集前三个月内无肠胃消化系统疾病、未注射或服用抗生素相关药物、取样前 5 日内饮食中避免摄食坚果、水果、茶、蔬菜、和酒精等。粪便样品在 1 h 内收集完成, 将采集的粪便样品立即储存于厌氧罐中, 在厌氧环境中用 10%(v/v)的 PBS 缓冲液稀释, 然后用双层无菌纱布过滤得到 10%(w/v)的粪便菌悬液。

1.2.10.3 体外模拟发酵 模拟人体肠道环境, 参照 Yu 等^[26]方法进行, 每个样品发酵总体积为 40 mL。在每个 EP 管中加 18 mL 生长培养基, 18 mL 粪便菌悬液, 10% 的样品。样品组中每个 EP 管中加 0.5 g 灵芝孢子胃肠消化液残渣和 4 mL 的 PBS 缓冲液。阴性对照组中不加灵芝孢子消化残渣, 其余条件与样品组相同。将 EP 管置于厌氧培养箱中, 37 °C 条件下振荡培养(200 r/min)48 h, 并在 0、6、12、24、48 h 后收集 4 mL 发酵液, 加 0.4 mL 乙腈终止反应, 收集离心上清液于-80 °C 冰箱冻存待分析。

1.2.10.4 发酵液 pH 的测定 将不同时间收集的发酵液于 4200 r/min 条件下离心 8 min 得上清液, 用精密 pH 计测定发酵液 pH 并记录数据。

1.3 数据处理

实验数据表示为平均值 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD, $n=3$)。实验数据采用 SPSS 统计软件进行分析, 方差分析(ANOVA)用于显著性分析, 以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 体外模拟消化过程中的消化规律

四组灵芝孢子体外模拟消化过程中分别在人工唾液、胃液和肠液中的消化情况如表 3 所示, 从表中可得, 胃肠道是消化的主要场所, 胃蛋白酶、胰酶和胆汁可以促进孢子粉内容物的释放^[20]。灵芝孢子在口腔内停留时间非常短暂并缺少搅拌作用, 因此消化效果非常有限, 失质量率为 0.67%~1.55%。破壁组平均失质量率达到 23.84%, 远高于未破壁组的 9.95%, 可见破壁对灵芝孢子的消化性质存在一定的影响。这是由于不同破壁方法对灵芝孢子粒径有一定的改变, 进而影响其消化效率, 与未破壁组相比, 三个破壁组各阶段消化液的失质量率具有显著性差异($P<0.05$), 其中机械碾压法的消化效果较其他两种效果更佳, 达到了 29.46%, 据文献报道不同粒径对消化特性产生影响, 舒阳^[27]以不同粒径绿茶粉为研究对象, 对其溶出规律及体外消化特性展开研究, 结果表明不同粒径绿茶粉的内含成分(除咖啡碱外)含量和消化特性均存在显著差异($P<0.05$)。本研究中, 不同破壁组之间存在显著性差异, 说明不同破壁方法处理对灵芝孢子壁的破坏程度可能存在差异, 因此在体外模拟消化过程中的消化吸收规律不一致。

表 3 体外模拟消化各阶段灵芝孢子粉的失质量率
Table 3 Loss of mass in *Ganoderma lucidum* spore powder at various stages of digestion in vitro

组别	第一阶段失质量率 (%)	第二阶段失质量率 (%)	第三阶段失质量率 (%)
未破壁组	0.67 $\pm$ 0.03 ^c	8.23 $\pm$ 0.27 ^d	9.95 $\pm$ 0.35 ^c
机械碾压组	1.55 $\pm$ 0.05 ^a	20.05 $\pm$ 1.26 ^a	29.46 $\pm$ 1.99 ^a
微波破壁组	0.87 $\pm$ 0.11 ^{bc}	13.57 $\pm$ 0.79 ^c	19.92 $\pm$ 0.86 ^b
超声破壁组	1.02 $\pm$ 0.05 ^b	16.42 $\pm$ 1.08 ^b	22.14 $\pm$ 1.17 ^b

注: 同列中不同字母表示有显著性差异($P<0.05$); 表4~表6同。

2.2 体外模拟消化过程中多糖和三萜的释放规律

表 4、表 5 为灵芝孢子在体外模拟口腔、胃、肠消化过程中多糖和三萜的释放量和残留量的变化, 通过透析这一动力学模型来模拟小肠吸收过程, 考察破壁灵芝孢子营养物质在小肠的吸收利用情况。对其综合分析, 在第一阶段模拟口腔消化过程中, 四组样品消化液中未检出三萜化合物, 多糖呈现少量溶出, 四组样品消化液中多糖含量分别为 0.25、1.13、0.82、0.95 mg/g, 其中破壁组的平均值约为未破壁组的 3.86 倍。第二阶段的模拟胃液消化过程中多糖大量溶出, 四组样品消化液中多糖含量分别为 5.64、11.13、8.75、10.10 mg/g, 其中破壁组的平均值约为未破壁组的 1.77 倍, 是第一阶段破壁组的 10.22 倍, 可见胃

表 4 体外模拟消化各消化阶段中溶出的多糖和三萜含量

Table 4 Contents of dissolved polysaccharides and triterpenes in various stages of digestion *in vitro*

组别	第一阶段		第二阶段		第三阶段		第四阶段	
	三萜(mg/g)	多糖(mg/g)	三萜(mg/g)	多糖(mg/g)	三萜(mg/g)	多糖(mg/g)	三萜(mg/g)	多糖(mg/g)
未破壁组	ND	0.25±0.00 ^c	ND	5.64±0.11 ^d	ND	5.02±0.54 ^d	ND	4.06±0.01 ^c
机械破壁组	ND	1.13±0.02 ^a	ND	11.13±0.89 ^a	1.51±0.06 ^a	10.48±0.48 ^a	ND	8.37±0.08 ^a
微波破壁组	ND	0.82±0.04 ^b	ND	8.75±1.30 ^c	1.61±0.06 ^a	9.79±0.25 ^b	ND	7.65±0.12 ^{ab}
超声破壁组	ND	0.95±0.02 ^{ab}	ND	10.10±1.53 ^b	1.38±0.10 ^b	8.53±0.55 ^c	ND	6.51±0.11 ^b

注: ND表示未检测出;表4同。

表 5 体外模拟消化后沉淀中多糖和三萜的残余量

Table 5 *In vitro* simulated residual amount of active substance in the precipitate after digestion

组别	灵芝孢子原粉		第一阶段		第二阶段		第三阶段	
	三萜含量(mg/g)	多糖含量(mg/g)	三萜含量(mg/g)	多糖含量(mg/g)	三萜含量(mg/g)	多糖含量(mg/g)	三萜含量(mg/g)	多糖含量(mg/g)
未破壁组	ND	5.58±0.36 ^c	ND	5.25±0.27 ^c	ND	0.55±0.02 ^b	ND	ND
机械破壁组	34.83±1.32 ^a	11.23±0.53 ^b	33.81±2.32 ^a	9.26±0.65 ^b	30.9±0.96 ^a	1.22±0.03 ^c	30.1±0.80 ^b	0.24±0.01 ^a
微波破壁组	29.76±0.98 ^c	13.45±0.27 ^a	30.43±1.85 ^{ab}	10.82±0.04 ^b	27.2±0.55 ^b	2.53±0.09 ^b	25.6±1.13 ^b	0.15±0.04 ^b
超声破壁组	31.11±1.21 ^b	14.21±0.15 ^a	32.54±1.04 ^a	11.83±0.96 ^a	28.1±1.00 ^b	1.65±0.06 ^a	27.5±1.28 ^a	0.09±0.01 ^c

的消化环境对灵芝孢子多糖的消化起到重要作用。随后进入第三阶段肠消化后多糖出现少量损失,四组样品的多糖含量平均减少 3.93%,这可能是由于多糖在肠液中消化酶参与催化的作用下,导致被分解为小分子化合物,故测定的结果偏低^[28]。但意外的是微波破壁组增加了 1.04 mg/g,这可能由于微波对灵芝孢子壁的破坏有限,口腔液和胃液未能充分的将多糖物质溶出,而在肠消化液的作用下提高了多糖的溶出。三萜类物质在第一二消化阶段中未被检测出来,由于三萜为脂溶性化合物,在未破壁的情况下,口腔和胃的消化液作用有限,只有在肠消化过程中有平均 1.50 mg/g 的溶出,这和三萜的脂溶性质有着密切联系,难以被消化液溶出^[29]。

结合表 4 和表 5 分析,破壁组平均约含有 95.2% 的三萜依然留存在沉淀中,只有少量溶出,未破壁组未见溶出,会进一步到达结肠,或通过肠道菌群作用被消化利用。破壁组平均约含有 97.5% 的多糖被溶出,未破壁组约有 43.5% 的多糖溶出。马才仁卓玛^[30]对蜂花粉破壁前后营养成分及其胃肠消化特性进行分析,结果发现胃肠消化液不会影响花粉形态和破壁率,并有助于可溶性多糖的释放。肖兴英等^[31]对未破壁蜂花粉进行体外模拟和小鼠体内消化试验,结果显示消化过程无法破壁,五种蜂花粉经破壁后更有利于营养成分的释放和消化吸收。因此相较于未破壁组,破壁组进行消化时,有利于灵芝孢子营养物质在消化过程中的溶出,提高了在消化过程各阶段的多糖的释放量。吴伟^[32]研究对比未破壁和破壁蜂花粉消化前后的花粉粒形态以及各营养素含量变化,破壁促进了花粉壁内部营养物质释放和蜂花粉中营养素的消化吸收。这与本研究结论较为一致。胃肠消化环境复杂,相较于未破壁组,破壁可使灵芝孢子中内容物更加充分地 and 消化液接触,间接提高灵芝孢子多糖

和三萜的消化利用率。

2.3 透析模型中多糖的生物可接受率和透析率

表 6 为灵芝孢子经胰酶消化,透析袋透析后的多糖生物可接受率和透析率。四组灵芝孢子样品进行到第四阶段体外模拟消化,四组灵芝孢子多糖的生物可接受率为未破壁组 41.83%、破壁组 71.08%~87.33% 显著高于未破壁组($P<0.05$)。这与丁玉峰等^[33]的结论一致:通过体外模拟胃肠道消化对其多酚的生物利用度进行评估,体外肠胃道消化促进了有效物质的释放,提高了生物利用度。另外,三组破壁组之间也存在显著性差异,其中机械碾压破壁法对于提高多糖的生物可接受率较其他两种破壁法更有优势。

表 6 灵芝孢子多糖的生物可接受率和透析率
Table 6 Bioacceptability and dialysis rates of *Ganoderma lucidum* spores polysaccharides

组别	透析前多糖含量(mg/g)	透析后多糖含量(mg/g)	生物可接受率(%)	透析率(%)
未破壁组	5.02±0.54 ^d	4.06±0.01 ^d	41.83±1.86 ^d	19.12±0.87 ^a
机械破壁组	10.48±0.48 ^a	8.37±0.08 ^a	87.33±2.51 ^a	20.13±1.20 ^a
微波破壁组	9.79±0.25 ^b	7.65±0.12 ^b	81.58±2.77 ^b	21.86±0.68 ^a
超声破壁组	8.53±0.55 ^c	6.51±0.11 ^c	71.08±1.62 ^c	23.68±0.96 ^a

2.4 酵解产物 pH 测定

灵芝孢子经体外模拟口腔、胃、肠消化结束后的底物在模拟肠道发酵过程中的 pH 变化如图 1, 结果表示,体外发酵过程中,空白组和各组灵芝孢子发酵液 pH 都呈下降趋势,空白组由于本身存在残余的食物发酵,因此 pH 也呈现一定的下降,但其余四组灵芝孢子组的下降趋势更为明显。随着发酵时间的延长,灵芝孢子组的 pH 均从 6.55 附近降至 5.83 左右;其中 0~12 h 之间 pH 降低趋势明显,12~48 h 降低趋势减弱,趋于平缓,pH 无明显降低,因此判断 12 h 基本到达发酵终点。与未破壁组相比,灵芝孢子破壁组

在 0~6 h 阶段 pH 下降趋势更明显, 表现为发酵反应活跃, 且破壁组之间 pH 无明显差异。

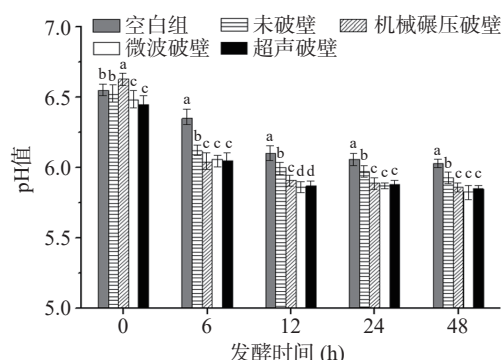


图1 体外模拟肠道发酵产酸过程中灵芝孢子发酵液 pH

Fig.1 pH value of *Ganoderma lucidum* spore powder fermentation broth during simulated intestinal acid production in vitro

注: 同一发酵时间的不同字母表示有显著性差异 ($P < 0.05$)。

当发酵进行到 12 h, 机械破壁组 pH 略高于微波组和超声组, 这可能与微波和超声的高能量传递相关, 使灵芝孢子中的大分子分解为小分子, 更有利于发酵产酸。郑慧等^[34] 研究结果表明在体外模拟后肠发酵过程, 蜂花粉粉碎粒径越小, 发酵液的 pH 越低, 发酵产酸特性越好, 且粉碎粒径对产生乙酸、丙酸的促进作用强于对产生丁酸的促进作用。Sang 等^[35] 的研究表明, 灵芝孢子多糖可以调节肠道微生态, 促进双歧杆菌和乳杆菌的生长, 抑制大肠杆菌的数量, 调节肠道菌群失调, 控制细菌易位并在肠道中恢复良好的微生态环境。体外模拟发酵的人体粪便来自于人体肠道内的新鲜粪便, 含有丰富活跃的肠道细菌。它们可以利用灵芝孢子的肠道消化底物发酵产生短链脂肪酸 (Short chain fatty acid, SCFAs), pH 通常随 SCFAs 的含量提高而下降, 常作评价肠道健康的重要评价指标之一, SCFAs 是胃肠道厌氧微生物的主要发酵代谢产物, 它们可被肠道黏膜有效吸收利用, 为宿主肠道的重要能量来源, 可作为基因表达的调节剂和被特定受体识别的信号分子, 从而对宿主产生诸多积极作用, 如乙酸可作为合成胆固醇的重要底物; 丁酸是肠上皮细胞的主要能量来源; 丙酸能够抑制胆固醇的合成, 抑制癌细胞增长^[30]。经模拟肠消化后灵芝孢子底物中的糖类化合物的种类与含量、分子质量大小、碳链长短可能存在改变, 进而会影响肠道菌群生长和发酵产酸情况^[36]。苗晶因等^[37] 综述食药真菌多糖对肠道菌群的调节作用, 食用菌体外消化降解能够增加 SCFAs, 主要包括乙酸、丙酸和丁酸, 从而降低发酵液的 pH, 有助于改善肠道菌群的组成和多样性, 提高乳酸杆菌属、双歧杆菌和瘤胃球菌属等有益菌的丰度, 降低有害菌, 如梭菌属和大肠杆菌-志贺氏菌属的丰度^[38], 破壁灵芝孢子肠消化产物经醇解后, 对肠道环境起到了积极作用。

3 结论

本实验探究了破壁对灵芝孢子在口腔和胃肠道

中的消化吸收情况以及对肠道环境的影响。比较不同的破壁灵芝孢子经体外模拟人体口腔、胃、小肠消化系统、透析模型和肠道菌群发酵各个消化阶段过程中的有效成分释放情况的差异。与未破壁的灵芝孢子相比, 破壁灵芝孢子粉的多糖和三萜成分更大程度地在消化液中溶出, 生物可接受度和透析率也得到提高。胃和小肠是灵芝孢子的主要消化场所, 其多糖类化合物在胃肠消化液中溶出较为彻底, 达到 97%。三萜类化合物情况却相反, 绝大部分依然保留在沉淀中, 随后进入结肠发酵被肠道菌群再利用。小肠消化结束的底物再进行结肠发酵进行 1~12 h 内, 发酵液的 pH 下降趋势明显, 其原因可能是通过肠道菌群的作用下, 消化底物得到了进一步的利用, 提高了乳酸杆菌属、双歧杆菌等有益菌的丰度, 产生了有利于肠道健康的 SCFAs, 如乙酸、丙酸和丁酸, 从而降低发酵液的 pH, 促进肠道环境的改善。经对比, 机械碾压破壁法在三种破壁方法中表现更佳, 有着较好的消化率、有效成分溶出率和生物可接受度, 结合企业生产的品控要求和维护成本等各个因素, 机械碾压法是一个值得考虑的破壁技术。

参考文献

- [1] 郑阳. 灵芝孢子化学成分的研究[D]. 吉林: 延边大学, 2017. [ZHENG Y. Study on the chemical composition of *Ganoderma lucidum* spore powder[D]. Jilin: Yanbian University, 2017.]
- [2] SHI Y J, ZHENG H X, HONG Z P, et al. Antitumor effects of different *Ganoderma lucidum* spore powder in cell- and zebrafish-based bioassays[J]. Journal of Integrative Medicine, 2021(1): 43-50.
- [3] CHEN Y S, CHEN Q Z, WANG Z J, et al. Anti-inflammatory and hepatoprotective effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides against carbon tetrachloride-induced liver injury in Kunming mice[J]. Pharmacology, 2019, 103(3-4): 143-150.
- [4] ZHU L. Development of *Ganoderma lucidum* spore powder based proteoglycan and its application in hyperglycemic, antitumor and antioxidant function[J]. Process Biochemistry, 2019, 84(5): 103-111.
- [5] 沐华, 蔡铭, 徐靖, 等. 破壁与去壁灵芝孢子粉的化学成分与抗氧化活性比较[J]. 食品工业科技, 2020, 41(10): 32-37. [MU H, CAI M, XU J, et al. Comparison of chemical composition and antioxidant activity of broken-wall and de-walled *Ganoderma lucidum* spore powder[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(10): 32-37.]
- [6] 包县峰, 徐勇, 刘维明, 等. 灵芝孢子粉生物活性成分及药理作用[J]. 食品工业科技, 2020, 41(6): 325-331. [BAO X F, XU Y, LIU W M, et al. Bioactive components and pharmacological effects of *Ganoderma lucidum* spore powder[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(6): 325-331.]
- [7] 张红雷. 灵芝孢子粉抑制小鼠脾脏淋巴细胞凋亡的研究[D]. 福建: 福建农林大学, 2009. [ZHANG H L. Study on the inhibition of apoptosis of mouse spleen lymphocytes by *Ganoderma lucidum* spore powder[D]. Fujian: Fujian Agriculture and Forestry University, 2009.]
- [8] 王方. 灵芝孢子粉破壁前后质量评价及药效学研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2020. [WANG F. Quality evaluation and pharmacodynamic study of *Ganoderma lucidum* spore powder be-

- fore and after breaking the wall[D]. Changchun: Changchun University of Traditional Chinese Medicine, 2020.]
- [9] 方欢乐, 张洁, 赵玉文, 等. 破壁油菜花粉的抗氧化及抗衰老作用[J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 378–384. [FANG H L, ZHANG J, ZHAO Y W, et al. Antioxidant and anti-aging effects of broken wall rape pollen[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 378–384.]
- [10] 郑慧, 杨思琪, 孙艳, 等. 油菜蜂花粉破壁技术研究进展[J]. 食品与机械, 2021, 37(8): 231–238. [ZHENG H, YANG S Q, SUN Y, et al. Research progress on wall-breaking technology of rape bee pollen[J]. Food and Machinery, 2021, 37(8): 231–238.]
- [11] 杨杭, 刘凤, 练心洁, 等. 灵芝孢子的破壁方法及其药理作用研究进展[J]. 成都大学学报(自然科学版), 2017, 36(4): 364–368. [YANG H, LIU F, LIAN X J, et al. Progress in the research of wall-breaking method of *Ganoderma lucidum* spores and its pharmacological effects[J]. Journal of Chengdu University (Natural Science Edition), 2017, 36(4): 364–368.]
- [12] 王欣宇, 车成来, 林花, 等. 灵芝孢子粉破壁技术的研究进展[J]. 中国林副特产, 2022(6): 23–29. [WANG X Y, CHE C L, LIN H, et al. Research progress of wall-breaking technology of *Ganoderma lucidum* spore powder[J]. Forest By-product and Speciality in China, 2022(6): 23–29.]
- [13] 李诺, 张东杰, 张桂芳, 等. 体外模拟消化技术研究进展[J]. 食品与机械, 2021, 37(3): 201–206. [LI N, ZHANG D J, ZHANG G F, et al. Advances in *in vitro* simulated digestion technology[J]. Food and Machinery, 2021, 37(3): 201–206.]
- [14] 訾鸿威. 超高压提取灵芝多糖及灵芝三萜的工艺研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2020. [ZI H W. Process research on the extraction of *Ganoderma lucidum* polysaccharides and *Ganoderma lucidum* triterpenes by ultra-high pressure[D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2020.]
- [15] 范彬. 人肠道菌群体外模型及潜在应用研究[D]. 北京: 中国人民解放军医学院, 2016. [FAN B. Research on the *in vitro* model of human intestinal bacteria and potential applications[D]. Beijing: Chinese People's Liberation Army Medical College, 2016.]
- [16] 唐永康. 基于超声波与机械粉碎破壁技术的榛子蛋白提取工艺研究[D]. 无锡: 江南大学, 2021. [TANG Y K. Study on the extraction process of hazelnut protein based on ultrasonic and mechanical crushing and wall-breaking technology[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021.]
- [17] 羌校君, 胡丹, 黄甜甜, 等. 灵芝孢子粉加工工艺研究进展[J]. 中国食用菌, 2022, 41(9): 1–6, 15. [QIANG X J, HU D, HUANG T T, et al. Research progress on the processing of *Ganoderma lucidum* spore powder[J]. China Edible Mushroom, 2022, 41(9): 1–6, 15.]
- [18] 马超, 马传贵, 戚俊, 等. 灵芝孢子粉破壁技术及灵芝类保健食品开发研究进展[J]. 中国食用菌, 2020, 39(12): 8–12, 17. [MA C, MA C G, QI J, et al. Research progress on wall-breaking technology of *Ganoderma lucidum* spore powder and development of *Ganoderma lucidum*-based health food[J]. China Edible Mushroom, 2020, 39(12): 8–12, 17.]
- [19] 汪芙蓉. 体外模拟消化对酚类化合物稳定性和抗氧化活性的影响[D]. 南昌: 南昌大学, 2020. [WANG F R. Effect of *in vitro* simulated digestion on the stability and antioxidant activity of phenolic compounds[D]. Nanchang: Nanchang University, 2020.]
- [20] 陈月. 体外模拟消化对苦荞酚类化合物生物利用率的影响[D]. 贵阳: 贵州大学, 2021. [CHEN Y. Effect of *in vitro* simulated digestion on the bioavailability of buckwheat phenolic compounds [D]. Guiyang: Guizhou University, 2021.]
- [21] 杨瑞丽, 郭卓钊, 施奕乔, 等. 青梅酚类物质在体外模拟消化过程中生物接受率和抗氧化活性的变化[J]. 食品与发酵工业, 2022, 25(9): 1–8. [YANG R L, GUO Z Z, SHI Y Q, et al. Changes in bioacceptance and antioxidant activity of phenolics of plum during simulated digestion *in vitro*[J]. Food and Fermentation Industry, 2022, 25(9): 1–8.]
- [22] 江和栋, 牛仙, 万仁口, 等. 灵芝孢子多糖的提取工艺优化及单糖组成、抗氧化活性分析[J]. 中国食品学报, 2021, 21(4): 159–167. [JIANG H D, NIU X, WAN R K, et al. Optimization of extraction process and analysis of monosaccharide composition and antioxidant activity of *Ganoderma lucidum* spores polysaccharide [J]. Chinese Journal of Food Science, 2021, 21(4): 159–167.]
- [23] 罗春萍, 陆友利, 王星星. 苯酚-硫酸法快速测定多糖方法的优化[J]. 化工管理, 2021(3): 90–94. [LUO C P, RU Y L, WANG X X. Optimization of a rapid method for the determination of polysaccharides by phenol-sulfuric acid[J]. Chemical Management, 2021(3): 90–94.]
- [24] 江和栋, 李广焱, 牛仙, 等. 破壁对灵芝孢子粉品质的影响[J]. 食品工业科技, 2020, 41(23): 51–56. [JIANG H D, LI G Y, NIU X, et al. Effect of wall breaking on the quality of *Ganoderma lucidum* spore powder[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(23): 51–56.]
- [25] 秦永. 平卧菊三七二聚绿原酸的提取纯化、消化和代谢及其固体饮料开发[D]. 南昌: 南昌大学, 2017. [QIN Y. Extraction and purification, digestion and metabolism of dimeric chlorogenic acid from *Ping Wol chrysanthemum tragacanth* and its solid beverage development[D]. Nanchang: Nanchang University, 2017.]
- [26] YU Y F, ZHANG B, XIA Y, et al. Bioaccessibility and transformation pathways of phenolic compounds in processed mulberry (*Morus alba* L.) leaves after *in vitro* gastrointestinal digestion and faecal fermentation[J]. Journal of Functional Foods, 2019, 60(8): 103–106.
- [27] 舒阳. 不同粒径绿茶粉理化性质及体外消化研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016. [SHU Y. Research on physicochemical properties and *in vitro* digestion of green tea powder with different particle sizes[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016.]
- [28] HU J L, NIE S P, LI C, et al. Microbial short-chain fatty acid production and extracellular enzymes activities during *in vitro* fermentation of polysaccharides from the seeds of *Plantago asiatica* L. treated with microwave irradiation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(25): 6092–6101.
- [29] MA B, REN W, ZHOU Y, et al. Triterpenoids from the spores of *Ganoderma lucidum*[J]. N Am J Med, 2011, 3(11): 495–498.
- [30] 马才仁卓玛. 蜂花粉破壁前后营养成分及其胃肠消化特性分析[J]. 农业科学, 2018(7): 101–103. [MA Cairen Drolma. Analysis of nutrient composition and its gastrointestinal digestive characteristics of bee pollen before and after breaking the wall[J]. Agricultural Science, 2018(7): 101–103.]
- [31] 肖兴英, 张红城. 破壁对五种蜂花粉消化的影响[C]. 中国食品科学技术学会第十六届年会暨第十届中美食品业高层论坛. 武汉. 2019: 10–13. [XIAO X Y, ZHANG H C. Effect of wall breaking on the digestion of five bee pollen species[C]. The 16th Annual Conference of the Chinese Society of Food Science and Technology and the 10th China-US High Level Forum on Food Industry. Wuhan. 2019: 10–13.]
- [32] 吴伟. 破壁对五种蜂花粉的营养素释放和消化的影响[D].

北京: 中国农业科学院, 2019. [WU W. Effect of wall breaking on nutrient release and digestion of five bee pollen species[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2019.]

[33] 丁玉峰, 马艳莉, 李素萍, 等. 体外模拟消化对葡萄糖素多酚生物利用度及抗氧化活性的影响[J]. 食品科学, 2021(3): 1-14.

[DING Y F, MA Y L, LI S P, et al. Effect of *in vitro* simulated digestion on bioavailability and antioxidant activity of grape enzyme polyphenols[J]. Food Science, 2021(3): 1-14.]

[34] 郑慧, 郑洵, 王睿捷, 等. 粉碎粒径对油菜蜂花粉在体外模拟消化中多酚含量及发酵产酸的影响[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(7): 59-64. [ZHENG H, ZHENG T, WANG R J, et al. Effects of crushed particle size on polyphenol content and fermentation acid production of rape bee pollen in simulated digestion *in vitro*[J]. Food and Fermentation Industry, 2019, 45(7): 59-64.]

[35] SANG T, GUO C, GUO D, et al. Suppression of obesity and inflammation by polysaccharide from sporoderm-broken spore of

Ganoderma lucidum via gut microbiota regulation[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 256(2): 1019-1025.

[36] 赵晓彤. 体外模拟冬枣发酵前后小分子糖的变化及对肠道细菌的影响[D]. 天津: 天津农学院, 2019. [ZHAO X T. Changes in small molecule sugars and effects on intestinal bacteria before and after fermentation of simulated winter dates *in vitro*[D]. Tianjin: Tianjin Agricultural College, 2019.]

[37] 苗晶因, 王勇, 杨柳, 等. 食药真菌多糖调节肠道菌群研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(13): 5341-5348.

[MIAO J N, WANG Y, YANG L, et al. Research progress on the regulation of intestinal flora by fungal polysaccharides for food and medicine[J]. Journal of Food Safety and Quality Testing, 2021, 12(13): 5341-5348.]

[38] WANG Y, CHEN G, PENG Y, et al. Simulated digestion and fermentation *in vitro* with human gut microbiota of polysaccharides from *Coralline pilulifera*[J]. LWT, 2019(10): 167-174.