

谢虹,王雪铭,张红艺,等.甜叶菊有效成分动态积累分析及水提液澄清工艺初探[J].食品工业科技,2022,43(1):253-260. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080224

XIE Hong, WANG Xueming, ZHANG Hongyi, et al. Dynamic Accumulation Analysis on the Effective Components and Preliminary Clarification Process Study on the Water Extract of *Stevia rebaudiana* Bertoni[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(1): 253-260. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080224

甜叶菊有效成分动态积累分析及 水提液澄清工艺初探

谢虹¹,王雪铭²,张红艺²,陈云¹,梁建生¹

(1.扬州大学生物科学与技术学院,江苏扬州 225009;

2.巴州正达绿源生物科技有限公司,新疆和静 841303)

摘要:为了探索甜叶菊有效成分积累规律,本研究采用高效液相色谱法测定了在2018年7月24日至10月16日甜叶菊谱星6号叶中甜菊糖苷、绿原酸类和类黄酮含量的变化;采用壳聚糖季铵盐、壳聚糖盐酸盐、白色聚合氯化铝、黄色聚合氯化铝、硫酸亚铁+氢氧化钙等5种絮凝剂对甜叶菊水提液进行澄清处理,通过分析水提液澄清率及3种甜菊糖苷和6种绿原酸类在澄清液中的保留率,探索甜叶菊水提液的澄清方法。结果表明,甜叶菊叶片生物量积累呈上升趋势;各甜菊糖苷的含量变化幅度小;绿原酸类和类黄酮成分的积累与生长期密切相关,含量呈现降低-升高-稳定-降低的动态变化趋势。甜菊糖苷、绿原酸类和类黄酮的含量在9月18日至10月2日时段达到最高值,分别为168.74、73.78和14.88 mg/g。结合产量和有效成分两方面因素,确定新疆巴州甜叶菊最佳采收期为9月中旬至10月初。不同的絮凝剂对甜叶菊水提液的澄清效果不同,采用壳聚糖盐酸盐絮凝处理水提液中9种有效成分的保留率最高,以0.45 g/L壳聚糖盐酸盐在45℃条件下澄清率达到89.39%。壳聚糖盐酸盐可以作为适宜的絮凝剂应用于甜叶菊水提液中甜菊糖苷和绿原酸类的分离纯化。

关键词:甜叶菊,甜菊糖苷,绿原酸类,类黄酮,动态积累,絮凝剂

中图分类号:TS242.9

文献标识码: B

文章编号:1002-0306(2022)01-0253-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080224

本文网刊:



Dynamic Accumulation Analysis on the Effective Components and Preliminary Clarification Process Study on the Water Extract of *Stevia rebaudiana* Bertoni

XIE Hong¹, WANG Xueming², ZHANG Hongyi², CHEN Yun¹, LIANG Jiansheng¹

(1.College of Bioscience and Biotechnology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;

2.Ba Zhou Zheng Da Lv Yuan Biological Technology Co., Ltd., Hejing 841303, China)

Abstract: To explore the general law of dynamic accumulation of the effective components in *Stevia rebaudiana* Bertoni, the contents of steviol glycosides, chlorogenic acids and flavonoids were investigated during the growth period. The leaf samples of *Stevia rebaudiana* Bertoni cultivar Puxing 6 from July 24 to October 16, 2018 were used as the subjects of high performance liquid chromatography analysis. In order to study clarification methods through analyzing the clarification rate and retention rate of three steviol glycosides and six chlorogenic acids, water extract of *Stevia rebaudiana* Bertoni was clarified by using five kinds of flocculants such as chitosan hydrochloride, chitosan quaternary ammonium, polyaluminum chloride (white), polyaluminum chloride (yellow) and ferrous sulfate plus calcium hydroxide. The results indicated that biomass showed an increased trend, and the contents of steviol glycosides showed a small fluctuation. The accumulation of chlorogenic acids and flavonoids was closely related to the growth period, and the contents presented decreased-increased-stabilized-decreased trend. The contents of steviol glycosides, chlorogenic acids and flavonoids reached the highest value from September 18 to October 2, which were 168.74, 73.78 and 14.88 mg/g respectively. According to the production and effective components, the optimal harvest time of *Stevia rebaudiana* Bertoni in Bazhou district of Xinjiang province should

收稿日期: 2021-08-23

基金项目: 国家自然科学基金(32071947)。

作者简介: 谢虹(1968-),女,硕士,讲师,研究方向:天然产物研究与开发,E-mail: xiehong@yzu.edu.cn。

be from mid-September to early October. Different flocculants presented different clarification effects on water extract, and flocculating treatment of chitosan hydrochloride showed the highest retention rate of nine indicative components. The optimum condition obtained for chitosan hydrochloride were the dosage of 0.45 g/L and 45 °C temperature, and a clarification rate reached 89.39%. Chitosan hydrochloride could be used as a suitable flocculant for separation and purification of steviol glycosides and chlorogenic acids in water extract of *Stevia rebaudiana* Bertoni.

Key words: *Stevia rebaudiana* Bertoni; steviol glycosides; chlorogenic acids; flavonoids; dynamic accumulation; flocculant

甜叶菊(*Stevia rebaudiana* Bertoni)是一种发源于南美洲的多年生草本植物^[1],我国于 1977 年试种成功后,甜叶菊种植面积居世界首位,近年来主要集中在安徽、甘肃和新疆等地种植^[2]。甜菊糖苷(Steviol glycosides, SGs)是甜叶菊叶中含量最高的一类二萜类化合物的总称,具有甜度高、热量低、性质稳定等特点,可作为“甜味剂”应用于食品和药品领域^[3-4]。甜叶菊所含有的 SGs 达 30 多种,各糖苷虽结构相似但性质各异。甜菊苷(Stevioside, ST)的甜度是蔗糖的近 200 倍,有明显的后苦味;瑞鲍迪苷 A(Rebaudioside A, RA)的甜度为蔗糖甜度的 350 倍,但其甜味呈现较慢,有一定的后苦味;瑞鲍迪苷 D(Rebaudioside D, RD)和瑞鲍迪苷 M(Rebaudioside M, RM)的甜度是蔗糖甜度的 350 倍,苦涩后味明显减少,最接近蔗糖的感官特征^[5-8]。酚类是甜叶菊中另一类含量较高的化合物,总量可达甜叶菊干叶质量的 15.12%,其中绿原酸类含量达 12.85%^[9]。绿原酸类亦被称为咖啡酰奎宁酸类,包括单咖啡酰奎宁酸、二咖啡酰奎宁酸和三咖啡酰奎宁酸^[10],主要从绿咖啡豆、金银花和杜仲叶中提取,生产成本较高^[11]。研究表明,甜叶菊中二咖啡酰奎宁酸(异绿原酸 A)占比最高,咖啡豆、金银花、杜仲中以单咖啡酰奎宁酸(绿原酸)为主要组成成分,而绿原酸类的抗氧化活性随着其分子结构中咖啡酰基数量的增加而增强^[12]。除了绿原酸类外,甜叶菊还含有多种类黄酮化合物,含量达 2.27%^[9]。以往关于甜叶菊原料的品质评价和采收期的研究,以 ST 和 RA 的含量为考察指标^[13-15],将 SGs、绿原酸类和类黄酮同时作为质量评估指标的研究报道较少。

尽管我国拥有丰富的甜叶菊资源,但目前对甜叶菊的利用主要集中在 SGs 的生产上^[2]。SGs 的制备工艺主要包括水浸提、澄清除杂、大孔吸附树脂选择性吸附、离子交换树脂去除离子和结晶等工序^[4]。甜叶菊水提液含有大量蛋白质、色素和可溶性多糖等杂质,为了提高 SGs 产品的质量和延长树脂的使用寿命,对水提液进行除杂预处理是 SGs 分离纯化的必要环节。工业化生产通常采用硫酸亚铁作为絮凝剂,以氢氧化钙作为助凝剂进行酸碱中和反应形成絮凝沉淀,从而除去甜叶菊水提液中 80% 的杂质^[16]。研究表明,酚类化合物随 SGs 一同浸出,但在澄清过程中随废渣被处理^[17]。如能在 SGs 生产工艺的基础上同时采用大孔吸附树脂提取绿原酸类化合物,可以降低生产成本,提高甜叶菊的综合利用效率。

本实验以新疆巴州地区产甜叶菊叶为研究材

料,通过探讨其中 SGs、绿原酸类和类黄酮的积累规律,为甜叶菊的规范化栽培和合理采收提供依据;以甜叶菊水提液的澄清率和 9 种有效成分保留率为指标对澄清工艺进行考察,为甜叶菊水提液同时保留 SGs 和绿原酸类的除杂预处理提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

甜叶菊叶 新疆巴州正达绿源生物科技有限公司种植基地(东经 82°28'~87°52',北纬 42°06'~43°33')采收,甜叶菊水浸提用实验材料为 10 月初公司大面积采收的干叶;RA 对照品, Tokyo 化学工业有限公司;ST、木犀草素-7-O-葡萄糖苷、槲皮素-3-O-鼠李糖苷 对照品, Solarbio 生物科技有限公司;瑞鲍迪苷 B(Rebaudioside B, RB)、瑞鲍迪苷 C(Rebaudioside C, RC)、杜克苷 A(Dulcoside A, DA)、甜茶苷(Rubusoside, Ru)、甜菊双糖苷(Steviolbioside, SBio) 对照品, ChromaDex 公司;新绿原酸、隐绿原酸、1,3-二咖啡酰奎宁酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 对照品,成都曼思特生物科技有限公司;绿原酸、芹菜素-7-O-葡萄糖苷、芦丁 对照品,成都瑞芬思生物科技有限公司;槲皮素-7-O-葡萄糖苷 对照品,上海源叶生物科技有限公司;槲皮素-3-O-木糖苷、山奈酚-3-O-鼠李糖苷、山奈酚-3-O-阿拉伯糖苷 对照品,四川省维克奇生物科技有限公司;以上对照品均为色谱纯(质量分数均 ≥ 98%);RD、RM 对照品(质量分数为 95%),新疆巴州正达绿源生物科技有限公司;甲酸 色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司;磷酸(色谱纯)、甲醇(分析纯)、磷酸二氢钠(分析纯) 国药集团化学试剂有限公司;乙腈 色谱纯,瑞典欧普森公司;壳聚糖季铵盐、壳聚糖盐酸盐(脱乙酰度 ≥ 90%) 南通绿神生物工程有限公司;聚合氯化铝(白色和黄色) 河南众邦环保科技有限公司;硫酸亚铁、氢氧化钙 分析纯,上海凌峰化学试剂有限公司。

1200 高效液相色谱仪 安捷伦科技有限公司;Sepax GP-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm) 苏州赛分科技有限公司;AL204 电子天平、320pH 计 梅特勒-托利多公司;SP-2001 分光光度计 美国 Hoefer 公司;DHG-9141A 电热鼓风干燥箱 德国美墨尔特公司;5804R 冰冻离心机 德国艾本德公司;纯化水器 南京优普环保设备有限公司;AP-01P 真空抽滤装置 天津奥特赛恩斯仪器有限公司;KQ-100TDE 高频数控超声波清洗器 昆山市超声仪器

有限公司;JB300-D 强力电动搅拌机 上海标本模型厂;HH-4 水浴锅 金坛城东新瑞仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 甜叶菊采集 2018 年 5 月 15 日完成甜叶菊谱星 6 号扦插苗的移栽定植, 种植密度 1 万株/666.7 m², 于 7 月 24 日(70 d)、8 月 7 日(84 d)、8 月 21 日(98 d)、9 月 4 日(112 d)、9 月 18 日(126 d)、10 月 2 日(140 d)、10 月 16 日(154 d)每隔 14 d 采摘 1 次叶片, 每次选取高度相近的 5 个单株, 采摘方式为全株采摘, 5 个叶样本在 55 ℃ 烘箱干燥 24 h, 每个叶样本分别称重和粉碎后过 40 目筛备用。

1.2.2 甜叶菊甲醇浸提液的制备 称取不同时期采收制备的叶粉末 0.50 g, 加入 30 mL 甲醇, 室温超声(80 kHz)辅助浸提 30 min, 6000 r/min 离心 6 min, 取上清液, 沉淀重复超声浸提 2 次, 合并上清液并用甲醇定容至 100 mL, 得到甲醇浸提液, 用以考察甜叶菊中有效成分的动态积累规律。每个样本同时取 3 份进行超声辅助浸提。

1.2.3 甜叶菊水提液制备温度的考察 每份称取大面积采收干叶制备的粉末 15.00 g, 加入 300 mL 纯化水, 分别在 25、45、65、85 ℃ 温度下搅拌浸提 60 min, 分别离心, 取上清液, 补足纯化水至 300 mL。测定各温度条件下浸提液中指标成分的含量, 以选择适宜的浸提温度。每个温度下取 2 份叶粉末同时搅拌浸提。

1.2.4 甜叶菊水提液的制备 取一定量的甜叶菊干叶(不粉碎), 按料液比 1:20(g/mL)加纯化水, 浸泡 30 min, 在 65 ℃ 下搅拌浸提 60 min, 减压抽滤, 即得深褐色甜叶菊水提液。

1.2.5 最佳絮凝剂的选择 设置 5 组, 每组 2 份, 每份甜叶菊水提液 400 mL。25 ℃ 条件下, 在每组水提液中分别加入 1% 壳聚糖季铵盐溶液 16 mL、1% 壳聚糖盐酸盐溶液 16 mL、白色聚合氯化铝 7.20 g、黄色聚合氯化铝 7.20 g、硫酸亚铁 3.60 g + 氢氧化钙 1.80 g(pH9.50), 先以 300 r/min 的转速搅拌 30 s, 再以 100 r/min 搅拌 20 min, 静置 10 min, 分别取各澄清液过滤, 取滤液测定 pH、吸光度和指标成分含量。

1.2.6 壳聚糖盐酸盐投加量对澄清效果的影响 设置 5 组, 每组 2 份, 每份甜叶菊水提液 400 mL。25 ℃ 条件下, 每组水提液分别按 0.35、0.45、0.55、0.65、0.75 g/L(壳聚糖盐酸盐质量/水提液体积)的投加量加入壳聚糖盐酸盐溶液, 按“1.2.5”项下的条件进行澄清操作, 计算澄清率。

1.2.7 体系温度对壳聚糖盐酸盐澄清效果的影响 设置 5 组, 每组 2 份, 每份甜叶菊水提液 400 mL。每组水提液分别于 25、35、45、55、65 ℃ 恒温水浴中, 按 0.45 g/L 投加量加入壳聚糖盐酸盐溶液中, 按

“1.2.5”项下的条件进行澄清操作, 计算澄清率。

1.2.8 SGs 含量的测定 参照 GB 8270-2014《食品添加剂 甜菊糖苷》规定的方法进行含量的测定与计算^[18]。色谱条件: 色谱柱: Sepax GP-C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: A-NaH₂PO₄ 缓冲液(10 mmol/L, pH2.60), B-乙腈, A:B=68:32(V/V); 流速: 0.9 mL/min; 柱温: 40 ℃; 检测波长: 210 nm; 进样量: 20 μL。用 30% 乙腈水溶液将精密称量置于 10 mL 容量瓶中 RD、RM、RA、ST、RC、RB、DA、Ru、SBio 对照品溶解定容, 得到混合对照品溶液, 进入高效液相色谱(High performance liquid chromatography, HPLC)仪用于确定各糖苷在样品中的相对保留时间。精密称取 RA 和 ST 对照品各 10 mg 左右, 置于 25 mL 容量瓶中, 30% 乙腈溶解定容, 将制得混合对照品溶液进入 HPLC 仪 4 针以上, 记录 RA 和 ST 的峰面积并计算各自峰面积的相对标准偏差(Relative standard deviation, RSD), 当 RSD<2%, 将用 30% 乙腈水溶液稀释成合适浓度的待测样品溶液进入 HPLC 仪进行分析。RM 与 ST 分子质量比值为 1.60。

1.2.9 绿原酸类和类黄酮含量测定 参照谢虹等^[19]建立的方法, 以外标法计算甜叶菊中绿原酸类和类黄酮含量。色谱条件: 色谱柱: Sepax GP-C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 0.5% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B), 梯度洗脱程序(0~5 min, 95%~90% A; 5~40 min, 90%~66%A; 40~45 min, 66%~5%A; 45~50 min, 5%~95%A); 柱温: 35 ℃; 流速: 0.9 mL/min; 检测波长: 330 nm; 进样量: 20 μL。因无木犀草素-7-O-芸香糖苷的对照品, 其含量的计算以木犀草素-7-O-葡萄糖苷对照品的峰面积及浓度为基准, 参照文献^[19]的公式计算。

1.2.10 指标成分含量的保留率计算 用 HPLC 分别对澄清前后溶液中的 RA、ST、RC、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 等指标成分含量进行测定, 计算公式如下:

$$\text{指标成分保留率(\%)} = \frac{\text{澄清液中指标成分峰面积}}{\text{水提液中指标成分峰面积}} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

水浸提样品中, 由于 RD 和 RM 极性较大, 在 C₁₈ 色谱柱上保留时间短, 不能与其他杂峰有效分离从而影响定量准确性, 因此以 RA、ST 和 RC 作为衡量 SGs 保留率的指标成分。

1.2.11 甜叶菊水提液澄清率的计算 参照谢捷等^[16]的方法测定水提液澄清率, 以纯化水为参比, 测定经过滤后的甜叶菊水提液在 660 nm 处的吸光度 A₀ 及絮凝剂处理的澄清液经过滤后在 660 nm 处吸光度 A₁, 计算公式如下:

$$\text{澄清率(\%)} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad \text{式(2)}$$

1.3 数据处理

实验数据使用 Microsoft excel 软件和 SPSS

16.0 统计分析软件进行整理与分析,采用 Origin 9 软件进行画图。

2 结果与分析

2.1 甜叶菊叶中有效成分和干物质累积动态

由图 1 可知,甜叶菊谱星 6 号所含糖苷主要包括 RD、RM、RA、ST 和 RC 等 5 种。在取样期内,糖苷总量介于 153.73~168.74 mg/g 之间,其中 RA 含量介于 101.28~115.20 mg/g 之间;RD 含量介于 17.38~22.16 mg/g 之间;RC 含量介于 14.08~17.33 mg/g 之间;ST 含量介于 8.88~11.62 mg/g 之间;RM 含量介于 5.26~9.03 mg/g 之间。由上述结果和图 2a 可知,甜叶菊叶中各糖苷和总糖苷含量相对稳定、波动小,罗庆云等^[14]以 5 个品种甜叶菊叶为研究材料也得出 RA 和 ST 含量在生长发育阶段变化幅度小的结论。与已有研究^[14,20-23]采用的守田系列、新光 3 号、鑫农 4 号、同心、绿源、菊隆、GT-1、GY 系列、鑫丰 3 号、江甜 3 号、谱星 1 号、中山 8 号等甜叶菊品种中 SGs 相比,本研究选用的甜叶菊谱星 6 号中 RA 和 RD 的含量较高,这可能是由于甜叶菊品种的差异所导致的。甜叶菊中 ST、RA、RD 和 RM 均由起始底物甜菊醇经 UGTs(UDP-糖基转移酶, UDP-glycosyltransferases)多步糖苷化反应而形成,首先形成 ST,ST 在 UGT76G1 催化下形成 RA,RA 在 UGT 91D 催化下形成 RD,RD 在 UGT76G1 催化形成 RM^[24]。ST 含量于 112 d 升至最高,此后呈现下降态势,而 RA、RD 和 RM 在 140~154 d 时段含量升至最高;ST、RA、RD 和 RM 在甜叶菊中的动态积累趋势与它们的合成规律相一致。

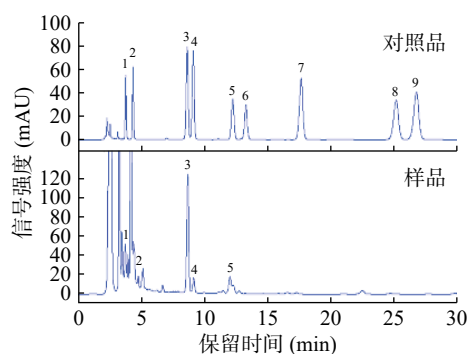


图 1 甜叶菊叶中 SGs HPLC 图

Fig.1 HPLC chromatograms of SGs in the leaf of *Stevia rebaudiana* Bertonii

注: 1.RD; 2.RM; 3.RA; 4.ST; 5.RC; 6.DA; 7.Ru; 8.RB; 9.SBio。

甜叶菊谱星 6 号所含绿原酸类主要包括 3 种单咖啡酰奎宁酸(新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸)和 3 种二咖啡酰奎宁酸(异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C)(图 3),与郭志龙等^[11]和李云聪等^[12]的研究结果相同;异绿原酸 A 占比最高为 46.14%,其次是异绿原酸 C 和绿原酸,分别占 22.21% 和 18.16%。在取样期内,甜叶菊中绿原酸类含量呈现降低-升高-稳定-降低的变化趋势(图 2b),绿原酸类总量介于

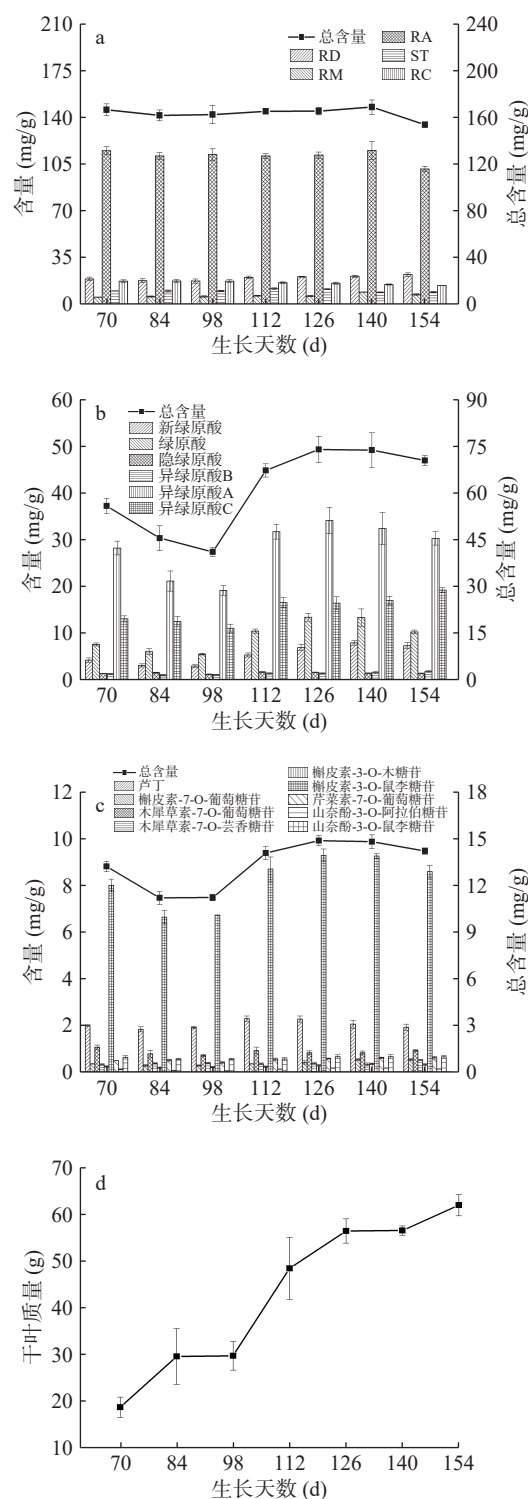


图 2 甜叶菊叶中有效成分和干物质动态积累图

Fig.2 Dynamic accumulation charts of effective components and dry matter in the leaf of *Stevia rebaudiana* Bertonii

注: (a)甜菊糖苷动态积累图; (b)绿原酸类动态积累图; (c)类黄酮动态积累图; (d)干物质动态积累图。

40.99~73.78 mg/g 之间,其中异绿原酸 A 含量介于 19.13~34.04 mg/g 之间;异绿原酸 C 含量介于 11.05~19.19 mg/g 之间;绿原酸含量介于 5.53~13.40 mg/g 之间;新绿原酸含量介于 2.98~7.94 mg/g 之间;异绿原酸 B 含量介于 1.05~1.82 mg/g 之间;隐绿原酸含量介于 1.22~1.71 mg/g 之间。由于 1,3-二咖啡酰奎

宁酸在取样期内含量较少为 0.10~0.20 mg/g, 未列入图中。

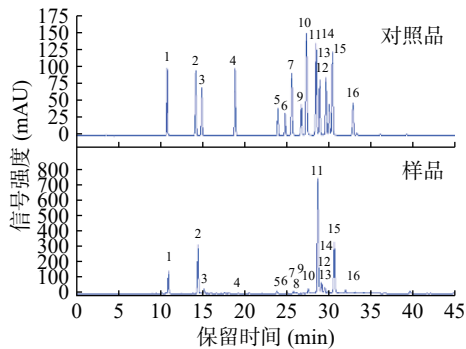


图 3 甜叶菊叶中绿原酸类和类黄酮 HPLC 图
Fig.3 HPLC chromatograms of chlorogenic acids and flavonoids in the leaf of *Stevia rebaudiana* Bertoni

注: 1.新绿原酸; 2.绿原酸; 3.隐绿原酸; 4.1,3-二咖啡酰奎宁酸; 5.芦丁; 6.槲皮素-7-O-葡萄糖苷; 7.木犀草素-7-O-葡萄糖苷; 8.木犀草素-7-O-芸香糖苷; 9.槲皮素-3-O-木糖苷; 10.异绿原酸 B; 11.异绿原酸 A; 12.槲皮素-3-O-鼠李糖苷; 13.芹菜素-7-O-葡萄糖苷; 14.山奈酚-3-O-阿拉伯糖苷; 15.异绿原酸 C; 16.山奈酚-3-O-鼠李糖苷。

甜叶菊谱星 6 号中主要含有 9 种类黄酮的糖苷衍生物(图 3), 其中槲皮素-3-O-鼠李糖苷占比最高, 为 62.43%; 其次是芦丁, 占比为 15.25%。在取样期内, 类黄酮总量同样呈现降低-升高-稳定-降低的变化趋势(图 2c)。类黄酮总量介于 11.20~14.88 mg/g; 其中槲皮素-3-O-鼠李糖苷含量介于 6.64~9.29 mg/g; 芦丁含量介于 1.83~2.29 mg/g; 木犀草素-7-O-葡萄糖苷含量介于 0.71~1.06 mg/g; 山奈酚-3-O-鼠李糖苷含量介于 0.55~0.66 mg/g; 芹菜素-7-O-葡萄糖苷含量介于 0.41~0.62 mg/g; 槲皮素-7-O-葡萄糖苷含量介于 0.28~0.53 mg/g; 木犀草素-7-O-芸香糖苷含量介于 0.32~0.52 mg/g; 槲皮素-3-O-木糖苷含量介于 0.18~0.35 mg/g; 山奈酚-3-O-阿拉伯糖苷的含量介于 0.05~0.17 mg/g。

谱星 6 号绿原酸类和类黄酮含量变化趋势的结果表明, 甜叶菊中酚类积累与生长期密切相关。植物合成次生代谢产物是为了适应环境的需要^[25], 当甜叶菊苗移栽成活后, 应立即打顶促进侧芽生长以增加分枝和叶片的数量。为了抵御微生物的侵染、植食性昆虫及打顶造成的机械损伤, 在 70 d 甜叶菊中酚类含量已达较高水平(68.95 mg/g)。从 70 d 之后, 酚类

含量呈现下降态势, 推测此时段初级代谢相关酶的基因表达活跃, 用于合成构成细胞壁的半纤维素、纤维素和果胶等多糖物质, 因为干叶质量从 70 d 开始呈现增加趋势(图 2d), 在 84~98 d 时段维持在稳定水平, 而酚类含量在 98 d 降至最低。从 98 d 开始, 干叶质量和酚类含量快速增加, 推测与木质素合成相关酶的基因表达变化密切相关。木质素是细胞次生壁主要组成成分, 占生物量的 25%~30%, 以维持细胞一定机械强度^[25]。木质素、绿原酸和类黄酮均为苯丙素生物合成途径的产物, 为了合成木质素, 该途径上游的催化酶例如苯丙氨酸解氨酶基因表达上调为下游分支途径上绿原酸、类黄酮和木质素等的合成提供大量的底物, 从而导致三者在 126~154 d 时段内积累达到最高量。因此, 新疆巴州甜叶菊适宜的采收期在 9 月中旬至 10 月初时段。

研究表明, 氮肥能够促进甜叶菊叶干物质、SGs 和酚类积累^[1,26], 机械损伤亦能够刺激植物酚类的合成^[27]。8 月中旬之后, 干叶质量和酚类含量快速增加, 此时需给甜叶菊追肥, 适当增加氮肥的量; 同时在甜叶菊的栽培过程中可以适当增加打顶的次数。当前企业按照含水量<10%、泥沙和枝条等杂质含量<10%、总糖苷含量>13% 的质量标准收购甜叶菊干叶, 本研究建议将绿原酸类含量纳入企业收购干叶标准中。

2.2 甜叶菊水提液澄清工艺初探

2.2.1 不同温度对甜叶菊中指标成分浸提效率的影响 国内工业化生产通常采用常温水浸提甜叶菊叶中的 SGs, 从表 1 可知, 25 ℃ 水提液中 RA、ST 和 RC 的含量已达到 85 ℃ 水提液中 RA、ST 和 RC 的含量的 60%, 但 6 种绿原酸类化合物的含量较低, 表明低温状态下, 绿原酸类化合物的浸提效率不高。随着浸提温度的升高, 新绿原酸、绿原酸及隐绿原酸的含量逐渐增加, 异绿原酸 B、异绿原酸 A 和异绿原酸 C 的含量也显著增加($P<0.05$)。提高温度可以增加甜叶菊中有效成分的浸出率, 但相应地增加了蛋白质、多糖等杂质的溶出^[28]。考虑生物活性成分在高温下易变性失活的特性^[29], 因此选择在 65 ℃ 条件对甜叶菊叶进行水浸提。

2.2.2 不同絮凝剂对甜叶菊水提液澄清效果的影响 从表 2 可知, SGs 工业化生产中采用硫酸亚铁和

表 1 不同温度水提液中指标成分的含量
Table 1 Contents of indicative components in water extract under different temperatures

温度(℃)	含量(mg/g)								
	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	异绿原酸B	异绿原酸A	异绿原酸C	RA	ST	RC
25	1.53±0.03 ^a	7.98±0.28 ^a	1.32±0.05 ^a	0.46±0.14 ^a	3.61±0.07 ^a	0.96±0.05 ^a	83.76±4.31 ^a	8.90±1.06 ^a	10.52±1.32 ^a
45	2.49±0.17 ^b	13.37±0.37 ^b	1.78±0.13 ^b	1.58±0.07 ^b	10.83±0.61 ^b	3.63±0.38 ^b	101.57±3.62 ^b	10.72±0.98 ^b	13.36±2.11 ^{ab}
65	4.97±0.25 ^c	17.11±0.50 ^c	2.49±0.29 ^c	2.96±0.08 ^c	28.81±1.63 ^c	12.35±0.79 ^c	110.07±2.96 ^b	12.25±0.71 ^b	15.97±1.88 ^{bc}
85	7.16±0.36 ^d	21.65±0.63 ^d	2.98±0.62 ^d	3.44±0.17 ^d	35.06±2.02 ^d	21.43±1.64 ^d	125.18±5.30 ^c	14.60±0.16 ^c	18.06±2.55 ^c

注: 同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

表 2 25 ℃ 条件下不同絮凝剂对水提液的澄清效果

Table 2 Clarification effects of different flocculants on water extract under 25 ℃

澄清剂	保留率 (%)									澄清率 (%)	水提液	溶液 pH
	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	异绿原酸 B	异绿原酸 A	异绿原酸 C	RA	ST	RC			
壳聚糖季铵盐	94.68±1.11	93.22±1.01	92.15±0.59	75.22±1.27	76.77±2.21	88.24±0.37	100.00±2.24	100.00±1.35	100.00±1.53	60.18±0.13	深棕色澄清	5.93
壳聚糖盐酸盐	100.00±2.28	100.00±1.69	100.00±1.04	94.80±3.10	98.69±3.61	100.00±4.63	93.43±2.30	70.18±1.60	89.18±2.63	69.56±0.39	棕色澄清	5.73
黄色聚合氯化铝	24.21±0.93	15.67±0.29	17.34±0.52	0.00±0.00	4.64±1.03	3.77±0.45	83.43±2.06	60.38±1.79	28.14±1.97	74.71±0.13	淡绿色澄清	3.75
白色聚合氯化铝	55.46±2.72	54.12±2.71	54.65±1.76	44.76±2.44	38.01±1.17	25.22±0.73	93.87±0.81	91.54±0.33	17.13±0.08	63.88±0.39	浅棕色澄清	3.81
硫酸亚铁+氢氧化钙	0.00±0.00	5.10±0.02	0.00±0.00	0.00±0.00	2.40±0.01	3.06±0.02	86.50±2.12	89.50±0.75	50.46±0.56	88.54±0.00	淡黄色清亮	9.50

氢氧化钙絮凝的澄清液淡黄清亮,澄清效果最好,但绿原酸类在澄清液中基本无保留。额尔敦巴雅尔等^[30]的研究显示采用硫酸亚铁+氢氧化钙絮凝方法去除甜叶菊水提液中绿原酸类和类黄酮物质效果较为显著,而赵磊等^[17]的研究显示甜叶菊絮凝废渣中富含绿原酸和类黄酮化合物。因此,硫酸亚铁+氢氧化钙不适合作为从甜叶菊水提液中进一步提取分离绿原酸类的絮凝剂。聚合氯化铝属于无机高分子絮凝剂,具有较高的电荷密度,通过电性中和及吸附桥架交联作用促使胶体微粒絮凝沉淀^[31]。白色聚合氯化铝絮凝的澄清液中 RA 和 ST 的保留率较高,但 RC 和 6 种绿原酸类的保留率低;黄色聚合氯化铝的澄清率虽然高于白色聚合氯化铝的澄清率,但 RA、ST 和绿原酸类的保留率更低,尤其是异绿原酸基本无保留。壳聚糖作为阳离子线性高分子絮凝剂,通过螯合、电中和与吸附架桥作用除去植物浸提液中大量杂质^[16]。尽管 RA、ST 和 RC 在壳聚糖季铵盐絮凝处理的澄清液中全部保留,但异绿原酸损失率较大;壳聚糖盐酸盐的澄清效果优于壳聚糖季铵盐的澄清效果,尽管 ST 和 RC 有一定的损失,6 种绿原酸类基本保留在澄清液中。甜叶菊水提液 pH 为 5.82,加入聚合氯化铝和硫酸亚铁+氢氧化钙均使水提液 pH 产生较大变化。因此,选择壳聚糖盐酸盐作为甜叶菊水提液的最适絮凝剂。

2.2.3 壳聚糖盐酸盐投加量对澄清效果的影响 从表 3 可知,25 ℃ 条件下,随着絮凝剂加入量的增大,水提液的澄清率逐渐增加,当添加量超过 0.55 g/L 时,虽有絮状沉淀,但水提液由澄清变为不透明状态。这是因为过量的絮凝剂使胶粒表面发生二次吸附而覆盖了一层絮凝剂,胶粒处于再稳定状态,溶液

表 3 25 ℃ 条件下壳聚糖盐酸盐的投加量对澄清效果的影响

Table 3 Effects of different dosages of chitosan hydrochloride on clarification rate under 25 ℃

投加量 (g/L)	澄清率 (%)	水提液
0.35	67.44±0.55	澄清,有絮状沉淀
0.45	73.64±1.10	澄清,有絮状沉淀
0.55	76.75±0.92	澄清,有絮状沉淀
0.65	80.43±0.37	不透明,有絮状沉淀
0.75	83.43±0.18	不透明,有絮状沉淀

变浑浊^[16]。因此,综合考虑澄清效果和生产成本等因素,选择壳聚糖盐酸盐的合适投加量为 0.45 g/L。

2.2.4 体系温度对壳聚糖盐酸盐澄清效果的影响

由表 4 可知,当水浴温度低于 55 ℃ 时,水提液中的杂质微粒与絮凝剂分子相互碰撞的几率增大,加速了絮凝沉淀的过程^[16],因此,在 45 ℃ 条件下,当加入絮凝剂搅拌 2 min 左右时,水提液出现明显的絮状沉淀且液体呈清亮状态,澄清效果与硫酸亚铁+氢氧化钙组合的效果相当;当温度升至 55 ℃ 时,壳聚糖盐酸盐分子发生老化^[16],澄清率开始下降,65 ℃ 条件下水提液底部虽出现絮状沉淀,但静置 30 min 后液体仍呈浑浊状态。因此,澄清操作温度选择在 45 ℃ 左右为宜。

表 4 体系温度对壳聚糖盐酸盐澄清效果的影响
Table 4 Effects of different flocculation temperatures of chitosan hydrochloride on clarification rate

体系温度 (℃)	澄清率 (%)	水提液
25	74.81±0.81	澄清,有絮状沉淀
35	81.76±0.41	澄清,有絮状沉淀
45	89.39±2.54	清亮,有絮状沉淀
55	86.52±0.86	不透明,有絮状沉淀
65	83.48±1.71	不透明,有絮状沉淀

3 结论

以甜叶菊叶为材料,测定了不同生长期甜叶菊中 SGs、绿原酸类、类黄酮三类有效成分的含量。分析结果表明,各种糖苷以及总糖苷含量变化幅度小;甜叶菊中绿原酸类和类黄酮总量呈现降低-升高-稳定-降低的变化趋势,于 126 d 达到最高值后趋于稳定。结合三类有效成分含量和产量因素分析,确定新疆巴州甜叶菊谱星 6 号叶采收的最佳时期为 9 月中旬~10 月初。在甜叶菊的栽培过程中,可以适当增加氮肥施量和打顶次数,以促进叶中有效成分和生物量的积累。

以澄清率和水提液中 RA、ST、RC、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 含量的保留率为考察指标,采用不同的絮凝剂对甜叶菊水提液进行澄清处理。研究结果表明,以壳聚糖盐酸盐絮凝处理的澄清液中,3 种糖苷和 6 种绿原酸类物质的保留率高,有利于后续工艺中大孔吸附树脂分别从澄清液中选择性吸附 SGs 和绿原酸

类。温度为 45 ℃、壳聚糖盐酸盐的添加量为 0.45 g/L 的絮凝条件下,水提液的澄清效果与硫酸亚铁+氢氧化钙絮凝处理的澄清效果相当。本研究为甜叶菊进一步开发和利用提供一定的理论基础。

参考文献

- [1] BARROSO M R, MARTINS N, BARROS L, et al. Assessment of the nitrogen fertilization effect on bioactive compounds of frozen fresh and dried samples of *Stevia rebaudiana* Bertoni[J]. *Food Chemistry*, 2018, 243: 208–213.
- [2] 王少甲, 尤飒飒. 甜叶菊功能性成分研究进展[J]. 食品工业科技, 2017, 38(20): 323–327. [WANG S J, YOU S S. Progress of functional components in *Stevia rebaudiana* Bertoni[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(20): 323–327.]
- [3] 刘琼, 潘芸芸, 吴卫. 甜叶菊化学成分及药理活性研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30: 1085–1091. [LIU Q, PAN Y Y, WU W. Review on chemical compositions and pharmacological activities of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Hemsl.[J]. *Natural Product Research and Development*, 2018, 30: 1085–1091.]
- [4] 徐健, 李维林. 甜菊糖药理作用及生产工艺研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(10): 207–214. [XU J, LI W L. The research progress of pharmacological effect and processing technology of stevia sugar[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2013, 39(10): 207–214.]
- [5] LEMUS-MONDACA R, VEGA-GÁLVEZ A, ZURABRAVO L, et al. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects[J]. *Food Chemistry*, 2012, 132: 1121–1132.
- [6] OLSSON K, CARLSEN S, SEMMLER A, et al. Microbial production of next-generation stevia sweeteners[J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15: 207–220.
- [7] LIN M, WANG F, ZHU Y. Modeled structure-based computational redesign of a glycosyltransferase for the synthesis of rebaudioside D from rebaudioside A[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2020, 159: 107626.
- [8] 吴则东, 马龙彪, 周艳丽, 等. 甜菊糖的生物合成、转化与糖基化[J]. 中国糖料, 2018, 40(2): 58–60. [WU Z D, MA L B, ZHOU Y L, et al. Biosynthesis, transformation and glycosylation of steviol glycosides[J]. *Sugar Crops of China*, 2018, 40(2): 58–60.]
- [9] BARROSO M, BARROS L, ÂNGELO RODRIGUES M, et al. *Stevia rebaudiana* Bertoni cultivated in Portugal: A prospective study of its antioxidant potential in different conservation conditions[J]. *Industrial Crops and Products*, 2016, 90: 49–55.
- [10] 朱文卿, 任汉书, 徐美霞, 等. 咖啡酰奎宁酸类化合物的生物学活性及提高其生物利用度技术研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(3): 321–329. [ZHU W Q, REN H S, XU M X, et al. Advances in research on biological activity and bioavailability of caffeoylquinic acids[J]. *Food Science*, 2021, 42(3): 321–329.]
- [11] 郭志龙, 马治华, 张虹, 等. 不同甜叶菊品种叶中绿原酸类成分的比较研究[J]. 广西植物, 2020, 40(5): 696–705. [GUO Z L, MA Z H, ZHANG H, et al. Variation of chlorogenic acid components in leaves of various *Stevia rebaudiana* cultivars[J]. *Guihaia*, 2020, 40(5): 696–705.]
- [12] 李云聪, 牛志平, 徐美利, 等. 甜叶菊与其他植物中绿原酸类成分对比分析[J]. 中国食品添加剂, 2021(1): 1–6. [LI Y C, NIU Z P, XU M L, et al. Comparative analysis of chlorogenic acids in stevia and other plants[J]. *China Food Additives*, 2021(1): 1–6.]
- [13] SERFATY M, IBDAH M, FISCHER R, et al. Dynamics of yield components and stevioside production in *Stevia rebaudiana* grown under different planting times, plant stands and harvest regime[J]. *Industrial Crops and Products*, 2013, 50: 731–736.
- [14] 罗庆云, 林英英, 谢越盛, 等. 甜叶菊植株体内 RA 及 STV 分布和积累动态[J]. 中国糖料, 2014(1): 13–18. [LUO Q Y, LIN Y Y, XIE Y S, et al. Distribution and accumulation of RA and STV in stevia cultivars seedling[J]. *Sugar Crops of China*, 2014(1): 13–18.]
- [15] YONEDA Y, NAKASHIMA H, MIYASAKA J, et al. Impact of blue, red, and far-red light treatments on gene expression and steviol glycoside accumulation in *Stevia rebaudiana* [J]. *Phytochemistry*, 2017, 137: 57–65.
- [16] 谢捷, 刘小景, 朱兴一, 等. 壳聚糖澄清甜叶菊水提液及其澄清机理探讨[J]. 食品科学, 2011, 32(20): 1–6. [XIE J, LIU X J, ZHU X Y, et al. Application of chitosan flocculation method in clarification of water extract from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves and flocculation mechanism analysis[J]. *Food Science*, 2011, 32(20): 1–6.]
- [17] 赵磊, 林文轩, 迟茜, 等. 甜叶菊废渣提取物抑菌活性及抑菌稳定性研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(24): 168–172. [ZHAO L, LIN W X, CHI Q, et al. Antibacterial activity and stability of *Stevia rebaudiana* waste extract[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(24): 168–172.]
- [18] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品添加剂 甜菊糖苷: GB8270-2014 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2014: 1–8. [National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. National food safety standard of steviol glycosides in food additive: GB8270-2014[S]. Beijing: China Standard Press, 2014: 1–8.]
- [19] 谢虹, 陈云, 梁建生. 甜叶菊花和叶中酚类成分分析及含量测定[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(9): 151–157. [XIE H, CHEN Y, LIANG J S. Analysis and determination of phenolic compounds in flowers and leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni[J]. *Food Research and Development*, 2021, 42(9): 151–157.]
- [20] 张虹, 张芮, 薄玉瑶, 等. 甜叶菊甜菊醇糖苷生物合成关键酶基因表达量与莱宝迪昔 A 含量的相关关系[J]. 分子植物育种, 2015, 13(8): 1802–1807. [ZHANG H, ZHANG R, BO Y Y, et al. Correlation between the transcript levels of key enzyme-encoding genes and the content of rebaudioside a in steviol glycoside biosynthesis of *Stevia rebaudiana* [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2015, 13(8): 1802–1807.]
- [21] 朱静雯, 郭书巧, 束红梅, 等. 甜菊糖苷积累与其生物合成基因表达的关系[J]. 植物遗传资源学报, 2017, 18(4): 747–753. [ZHU J W, GUO S Q, SHU H M, et al. The relationship between steviol glycosides accumulation and biosynthesis genes expression[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2017, 18(4): 747–753.]

- [22] 唐桃霞,王致和,张秀华,等.不同品种(系)甜叶菊产量·光合生理和糖苷含量的相关性分析[J].*安徽农业科学*,2019,47(21):53-57. [TANG T X, WANG Z H, ZHANG X H, et al. Correlation analysis between photosynthetic physiology, glycosidic content and yield of different varieties (strains) of stevia[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2019, 47(21): 53-57.]
- [23] 孙玉明,张婷,徐晓洋,等.氮素和光照对甜菊生长、氮素吸收和甜菊糖苷相关指标的影响[J].*植物资源与环境学报*,2021,30(2):12-18,34. [SUN Y M, ZHANG T, XU X Y, et al. Effects of nitrogen and light on growth, nitrogen uptake, and steviol glycosides related indexes of *Stevia rebaudiana*[J]. *Journal of Plant Resources and Environment*, 2021, 30(2): 12-18,34.]
- [24] YANG T, ZHANG J, KE D, et al. Hydrophobic recognition allows the glycosyltransferase UGT76G1 to catalyze its substrate in two orientations[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 3214.
- [25] 周明,沈勇根,朱丽琴,等.植物黄酮化合物生物合成、积累及调控的研究进展[J].*食品研究与开发*,2016,37(18):216-221. [ZHOU M, SHEN Y G, ZHU L Q, et al. Research progress on biosynthesis, accumulation and regulation of flavonoids in plants[J]. *Food Research and Development*, 2016, 37(18): 216-221.]
- [26] TAVARINI S, PAGANO I, GUIDI L, et al. Impact of nitrogen supply on growth, steviol glycosides and photosynthesis in *Stevia rebaudiana* Bertoni[J]. *Plant Biosystems*, 2016, 150(5): 953-962.
- [27] WANG H, WANG X, YU C, et al. MYB transcription factor PdMYB118 directly interacts with bHLH transcription factor PdTT8 to regulate wound-induced anthocyanin biosynthesis in poplar[J]. *BMC Plant Biology*, 2020, 20: 173.
- [28] 王玲娜,姚佳欢,马超美.绿原酸的研究进展[J].*食品与生物技术学报*,2017,36(11):1121-1130. [WANG L N, YAO J H, MA C M. Advances in research on chlorogenic acid[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2017, 36(11): 1121-1130.]
- [29] 孙阳,黄和,胡焱.绿原酸提取纯化方法的研究进展[J].*化学试剂*,2017,39(3):257-262. [SUN Y, HUANG H, HU Y. Progress on extraction and purification of chlorogenic acid[J]. *Chemical Reagents*, 2017, 39(3): 257-262.]
- [30] 额尔敦巴雅尔,赵鹏宇,焦利卫,等.甜叶菊水提物和絮凝上清液成分差异研究[J].*食品研究与开发*,2017,38(18):143-149. [EERDUNBAYAER, ZHAO P Y, JIAO L W, et al. The study of the differences of compositions between water extract and flocculation supernatant from *Stevia rebaudiana*[J]. *Food Research and Development*, 2017, 38(18): 143-149.]
- [31] 王郑,仲米贵,黄雷,等.聚合氯化铝-壳聚糖复合絮凝剂对腐殖酸的絮凝特性研究[J].*环境工程*,2017,35(10):61-65,76. [WANG Z, ZHONG M G, HUANG L, et al. Study on flocculation characteristics of humic acid by poly aluminum chloride-chitosan composite flocculant[J]. *Environmental Engineering*, 2017, 35(10): 61-65,76.]