

黑豆壳多酚调节面包消化特性的机理

朱水旺¹ 王 乐¹ 樊铭聪² 李 言² 钱海峰² 王 立²

(1. 糖友饱饱(杭州)健康食品有限公司, 浙江 杭州 311222; 2. 江南大学, 江苏 无锡 214122)

摘要: [目的]探究黑大豆副产物——黑豆壳多酚的功能特性及其在面包中的应用。[方法]利用超声辅助溶剂法提取黑豆壳多酚粗提物,从中分离出了游离多酚和结合多酚,并分析其对面包淀粉消化特性的调控作用。[结果]从黑豆壳多酚中得到的游离态和结合态多酚含量分别为 20.42, 9.47 mg GAE/g, 其中游离多酚对 ABTS 自由基、DPPH 自由基清除率分别达 88.85%, 80.04%。添加 0.25% 多酚可使面包芯、皮的快消化淀粉含量从 43.75% 和 40.23% 降至 31.25% 和 27.93%, 抗性淀粉升至 45.32% 和 50.59%。分子对接显示,黑豆壳多酚中绿原酸等成分与 α -葡萄糖苷酶通过氢键与疏水作用实现竞争性—非竞争性的混合抑制。[结论]黑豆壳多酚可通过抑制 α -葡萄糖苷酶活性及改变淀粉结构双重途径延缓面包消化。

关键词: 黑豆壳; 多酚; 体外消化; 淀粉消化率; α -葡萄糖苷酶抑制

Research on mechanism of polyphenols from black soybean hulls regulating digestion characteristics of bread

ZHU Shuiwang¹ WANG Le¹ FAN Mingcong² LI Yan² QIAN Haifeng² WANG Li²

(1. Tangyou Baobao (Hangzhou) Health Food Co., Ltd., Hangzhou, Zhejiang 311222, China;

2. Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] This study aimed to investigate the functional characteristics of polyphenols from black soybean hulls (a by-product of black soybean) and their application in bread. [Methods] The polyphenol extracts were obtained from black soybean hulls via ultrasonic-assisted solvent extraction, followed by the isolation of free and bound polyphenols. The regulatory effect of these polyphenols on the starch digestion characteristics of bread was further analyzed. [Results] Free and bound polyphenols were isolated from polyphenols from black soybean hulls, with contents of 20.42 mg GAE/g and 9.47 mg GAE/g, respectively. The ABTS and DPPH radical scavenging rates of free polyphenols reached 88.85% and 80.04%, respectively. The addition of 0.25% polyphenol extracts decreased the rapidly digestible starch content in bread crumb and crust from 43.75% and 40.23% to 31.25% and 27.93%, respectively, while the resistant starch content increased to 45.32% and 50.59%, respectively. Molecular docking analysis revealed that components such as chlorogenic acid in polyphenols from black soybean hulls exerted competitive and noncompetitive mixed inhibition on α -glucosidase through hydrogen bonding and hydrophobic interactions. [Conclusion] Polyphenols from black soybean hulls can retard bread digestion by inhibiting α -glucosidase activity and modifying starch structure.

Keywords: black bean hull; polyphenol; *in vitro* digestion; starch digestibility; α -glucosidase inhibition

近年来,2型糖尿病发病率持续攀升且呈现年轻化趋势,已严重威胁公共卫生与人类健康。淀粉类食物消化吸收的快慢会引起血糖波动,而调控淀粉消化速率是控制餐后血糖、预防糖尿病的关键。黑豆壳作为黑大豆加工过程中产生的副产物,富含天然活性物质,如多酚化合物、皂苷以及多糖等^[1]。多酚

基金项目: 国家食用豆产业技术体系食品加工与综合利用岗位科学家项目(编号: CARS-08-G19)

通信作者: 王立(1978—),男,江南大学教授,博士。E-mail: wangli@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2025-07-25 **改回日期:** 2025-10-19

引用格式: 朱水旺,王乐,樊铭聪,等. 黑豆壳多酚调节面包消化特性的机理[J]. 食品与机械, 2025, 41(11): 9-19.

Citation: ZHU Shuiwang, WANG Le, FAN Mingcong, et al. Research on mechanism of polyphenols from black soybean hulls regulating digestion characteristics of bread[J]. Food & Machinery, 2025, 41(11): 9-19.

类化合物具备多种生物活性,包括提升抗氧化防御、抑制脂肪堆积、调节血脂血糖代谢、促进组织修复以及减轻炎症反应等^[2]。黑豆壳多酚主要成分为花青素、黄酮醇及酚酸衍生物,可有效清除自由基并调节代谢功能^[3]。研究^[1]表明,黑豆水提物(包括黑豆壳)和花色苷可以平稳血糖、保护糖尿病导致的器官损伤。国内研究主要集中在黑豆壳多酚的提取与功能方面,但对其在食品中的应用研究较少,尤其是在改善淀粉类食品(如面包)消化特性方面。多酚可通过调控淀粉酶活性降低 GI 值,已有一些应用于健康食品中,但有关黑豆壳多酚的研究还未见报道,特别是与食品基质的作用机制更有待于探究。

研究拟围绕黑豆壳中多酚提取物的不同存在形式(游离多酚和结合多酚),以及多酚提取物对面包消化特性的影响及变化规律开展研究,探究黑豆壳主要多酚化合物对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性,并通过分子对接模拟计算技术的解析,进一步阐明其调节面包消化率的内在机制,以期实现黑豆加工副产物的资源化高值化利用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

黑豆壳:来源于陕西神木;

乙醇、乙酸乙酯、氢氧化钠、碳酸钠等:分析纯,国药化学试剂有限公司;

标准品(丁香酸、肉桂酸、对香豆酸、原儿茶酸、槲皮素、没食子酸、芦丁、绿原酸):上海源叶生物科技有限公司。

1.2 主要仪器与设备

超高效液相色谱—四极杆飞行时间质谱联用仪:ACQUITYI-Class plus+Synapt XS 型,美国沃特世公司;

高效液相色谱仪:Agilent 1260 Infinity II 型,美国安捷伦公司;

真空旋转蒸发仪:R-300 型,瑞士步琦有限公司;

质构仪:TA.XTC-18 型,上海保圣实业发展有限公司;

恒温培养箱:ZQTY-50 型,上海知楚仪器有限公司;

微孔板分光光度计:Epoch 2 型,美国伯腾仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 黑豆壳多酚的提取 根据 Zhou 等^[4]的方法对黑豆壳多酚进行提取。取 1 g 黑豆壳粉,按 $m_{\text{黑豆壳粉}}:V_{\text{乙醇}}=1:40$ (g/mL) 添加体积分数 80% 的乙醇混匀,采用功率 300 W、频率 40 kHz 的超声波辅助提取 40 min。提取液于 4 000 r/min 下离心 10 min。重复提取两次,获得上清液和残渣,上清液旋蒸后得到黑豆壳多酚粗提物。利用 10 mL 甲醇将上清液旋蒸后的黑豆壳多酚粗提物复溶,获得游离多酚甲醇溶液。取离心剩余的残渣加入 4 mol/L NaOH

溶液 20 mL,避光水解 4 h^[5],随后用 6 mol/L HCl 调节 pH 至 2.0,8 000 r/min 离心 15 min,上清液用等体积乙酸乙酯萃取 3 次,合并 3 次乙酸乙酯萃取液,将乙酸乙酯旋转蒸发完全后,用 10 mL 甲醇复溶^[6],获得结合多酚甲醇溶液。游离多酚和结合多酚甲醇溶液于 4 °C 冷藏过夜,8 000 r/min 离心 10 min,过膜后于 -80 °C 避光保存。

1.3.2 黑豆壳多酚含量测定

(1) 总酚含量:根据 Kumar 等^[7]的方法修改如下:取 0.18 mL 样品液与等量 Folin 试剂混匀,静置 5 min 后加 0.72 mL 15% Na_2CO_3 溶液,摇匀后避光 1 h,测定 765 nm 处吸光度。利用没食子酸作为标准品计算样品的总酚含量($y=0.008\ 9x+0.059$, $R^2=0.999\ 5$),结果以没食子酸当量的毫克数表示(mg GAE/g)。

(2) 黄酮含量:根据 Kumar 等^[7]的方法修改如下:取 0.6 mL 样品液,加入 0.3 mL 5% NaNO_2 溶液,混合反应 6 min;加 0.3 mL 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液,反应 6 min;加 2.4 mL 4% NaOH 溶液,混匀后避光 15 min。测定 510 nm 处吸光度。采用芦丁标准液为标准品计算样品的总黄酮含量($y=0.000\ 6x+0.042\ 5$, $R^2=0.999\ 1$),结果以芦丁当量的毫克数表示(mg RT/g)。

1.3.3 黑豆壳多酚抗氧化能力测定

(1) ABTS 自由基清除能力:根据 Ilyasov 等^[8]的方法修改如下:将 7 mmol/L ABTS 溶液与 2.45 mmol/L 过硫酸钾充分混匀,避光静置 14 h。将样品液或抗坏血酸标准品与 ABTS 工作液混匀,避光反应 10 min,测定 734 nm 处吸光度,以蒸馏水代替样品调零。通过绘制抗坏血酸标准曲线($y=0.439\ 1x+9.782\ 5$, $R^2=0.999\ 4$),按式(1)计算 ABTS 自由基清除率。

$$c = \frac{A_1 - (A_2 + A_3)}{A_1} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

c ——ABTS 自由基清除率,%;

A_1 ——20 μL 磷酸缓冲液+180 μL ABTS 工作液吸光值;

A_2 ——20 μL 样品液+180 μL ABTS 工作液吸光值;

A_3 ——20 μL 样品液+180 μL 蒸馏水吸光值。

(2) DPPH 自由基清除能力:根据 Ilyasov 等^[8]的方法修改如下:取等量的样品溶液与 0.2 mmol/L DPPH 甲醇溶液混匀,避光反应 30 min,测定 510 nm 处吸光度。用甲醇作为空白参比,通过绘制抗坏血酸标准曲线($y=0.953\ 8x+1.445\ 7$, $R^2=0.999\ 0$),按式(2)计算 DPPH 自由基清除率。

$$c = \frac{A_1 - (A_2 + A_3)}{A_1} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

c ——DPPH 自由基清除率,%;

A_1 ——100 μL 甲醇+100 μL DPPH 吸光值;

A_2 ——100 μL 样品液+100 μL DPPH 吸光值;

A_3 ——100 μL 样品液+100 μL 甲醇吸光值。

1.3.4 黑豆壳多酚定性与定量分析

(1) 定性分析:利用 Waters Acquity UPLC-QTOF/MS 系统对样品进行定性分析。选用 Acquity BEH C_{18} 色谱柱 (2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μm)。流动相 A 为乙腈,流动相 B 为 0.1% 甲酸水溶液。流量 0.3 mL/min,进样体积 10 μL ,柱温 40 $^{\circ}\text{C}$ 。梯度洗脱条件:0~0.5 min, 100% B; 0.5~10.0 min, 100%~80% B; 10.0~18.0 min, 80%~0% B; 18.0~21.5 min, 0% B。质谱使用 ESI 源,采用负离子模式进行检测。

(2) 定量分析:根据 Wang 等^[9]的方法,色谱柱采用 Agilent SB- C_{18} 柱 (4.6 mm \times 250 mm)。

1.3.5 面包制备 根据潘琪峰^[10]的方法修改如下:将 200 g 高筋粉、30 g 糖、2 g 盐、黑豆壳多酚粗提物粉末(按面粉质量的 0, 0.125%, 0.250% 进行添加)混匀;倒入适量水和 2 mL 0.15% 脂肪酶溶液,低速搅拌 2 min 至无干粉;加入 20 g 黄油,搅拌 8~10 min 至面团表面光滑,且可拉出透光薄膜(无破裂)。取部分面团进行发酵、整形并烘烤。将获得的面包皮、芯密封保存,于 24 h 内检测。

1.3.6 微观结构 将冻干的面团粉和面包粉样品喷金处理。使用场发射电镜在 3 万倍放大倍数下观察样品。

1.3.7 体外消化特性研究 对面包皮与面包芯进行体外消化模拟,并计算消化曲线。

取 0.1 g 样品,加入 5 mL 0.5 mmol/L 醋酸钠缓冲液 (pH 5.2), 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 20 min (预糊化),迅速转移至 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中平衡 10 min。加入 5 mL 混合酶溶液(α -淀粉酶、淀粉转葡萄糖苷酶各 200 U/mL),置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴。在 0, 20, 40, 60, 90, 120, 180 min 时,分别取 0.1 mL 反应液,加入 0.9 mL 无水乙醇中。取 1.0 mL 混合反应液离心 (4 000 r/min, 10 min),取 0.1 mL 上清液,加入 3 mL GOPOD 试剂,在 50 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中孵育 20 min,在 510 nm 处测定吸光度,计算总淀粉含量(TS)。参照王桃^[11]的方法计算样品中快消化淀粉(RDS)、慢消化淀粉(SDS)、抗性淀粉(RS)质量分数。

1.3.8 α -葡萄糖苷酶抑制活性测定 参照 Han 等^[12]的方法并稍作修改。取 25 μL 阿波卡糖或黑豆壳多酚提取物,与 25 μL α -葡萄糖苷酶溶液(酶用量 0.2 U/mL)混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min 后加入 50 μL 2 mmol/L PNPG, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 20 min 后加入 100 μL Na_2CO_3 溶液终止反应,离心后取上清液于 405 nm 处测定吸光度。按式(3)计算 α -葡萄糖苷酶抑制率。

$$c = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_4} \right) \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

c ——抑制率,%;

A_1 ——添加酶的样品吸光度;

A_2 ——不添加酶的样品吸光度;

A_3 ——以缓冲液代替酶的阴性对照组的吸光值;

A_4 ——对照空白组的吸光度。

1.3.9 酶抑制动力学分析 参照 Gayathri 等^[13]的方法并稍作修改。取 20 μL 黑豆壳多酚提取物 (0~100 $\mu\text{g/mL}$) 和 20 μL α -葡萄糖苷酶 (0.1~0.6 U/mL) 加入 100 μL pH 6.8 磷酸盐缓冲液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 预孵育 5 min 后加入 60 μL 底物 PNPG, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 min 后,立即加入 1 mL Na_2CO_3 终止反应。在 405 nm 处测定吸光度计算 α -葡萄糖苷酶的初始反应速率,绘制初始反应速率与酶浓度的关系曲线。 α -葡萄糖苷酶添加量设置为 0.3 U/mL,以不同浓度的底物 (0.5~3.0 mmol/L) 和不同质量浓度多酚提取物 (0~100 $\mu\text{g/mL}$) 建立反应体系。通过 Lineweaver-Burk 双倒数方程拟合不同抑制剂浓度下的酶动力学曲线,判断其抑制类型。

1.3.10 分子对接 从蛋白质数据库(RCSB PDB, <https://www.rcsb.org/pdb>) 下载目标蛋白的三维结构 (PDB ID: 5Y7Z)。使用 PyMOL 2.5 软件对初始结构进行预处理。针对目标多酚类化合物,通过 PubChem 化合物数据库检索其化学结构。采用 AutoDockTools 1.5.7 软件中的 MGL Tools 模块对配体进行预处理,随后使用 AMBER 力场进行能量最小化处理,确保配体处于能量最低的稳定状态。使用 AutoDockTools 1.5.7 软件进行分子对接研究,对接完成后,通过 Discovery Studio 2021 软件对最优构象进行可视化分析。

1.3.11 数据处理 数据作图采用 Origin,使用 SPSS 对数据进行方差分析 (ANOVA) 和邓肯 (Duncan) 检验 ($P < 0.05$),所有试验进行 3 次,结果以平均值 \pm 标准偏差的形式呈现。

2 结果与分析

2.1 黑豆壳多酚的抗氧化活性与成分分析

2.1.1 黑豆壳多酚含量 黑豆壳提取物总多酚含量为 (29.89 \pm 0.09) mg GAE/g,与文献[14]的 (38.04 mg GAE/g) 接近,且高于黑豆壳子叶的 (10.60 mg GAE/g)。这可能源于黑豆壳作为植物外层组织,长期暴露于紫外、虫害等外界胁迫环境,从而诱导其合成并积累更高水平的多酚类防御性次生代谢产物。在组成结构上,黑豆壳游离多酚的没食子酸当量为 (20.42 \pm 0.19) mg GAE/g,结合多酚的没食子酸当量为 (9.47 \pm 0.13) mg GAE/g,说明游离多酚为黑豆壳多酚的主要存在形式。这一特征表明黑豆壳多酚在加工过程中可能具有更高的生物可及性。同时,加工过程未释放出的结合多酚通常在人体消化过程到达结肠进而发酵得到释放,其对抑制有害菌生长和改善肠道的菌

群组成具有积极意义。黑豆壳中总黄酮含量为 (77.95 ± 0.33) mg RT/g,与早期研究^[15]的结果 (73.50) mg RT/g)吻合,其中游离多酚的芦丁当量为 (54.17 ± 0.23) mg RT/g,结合多酚的芦丁当量为 (23.78 ± 0.18) mg RT/g。基于结构中邻苯二酚与羟基化模式带来的强金属螯合及自由基

清除活性,黑豆壳多酚有望成为一种用于提升食品抗氧化能力的新功能配料。

2.1.2 黑豆壳多酚抗氧化活性分析 将获得的黑豆壳游离、结合多酚样品对ABTS自由基、DPPH自由基清除率代入抗坏血酸标准曲线进行当量计算。结果见图1。

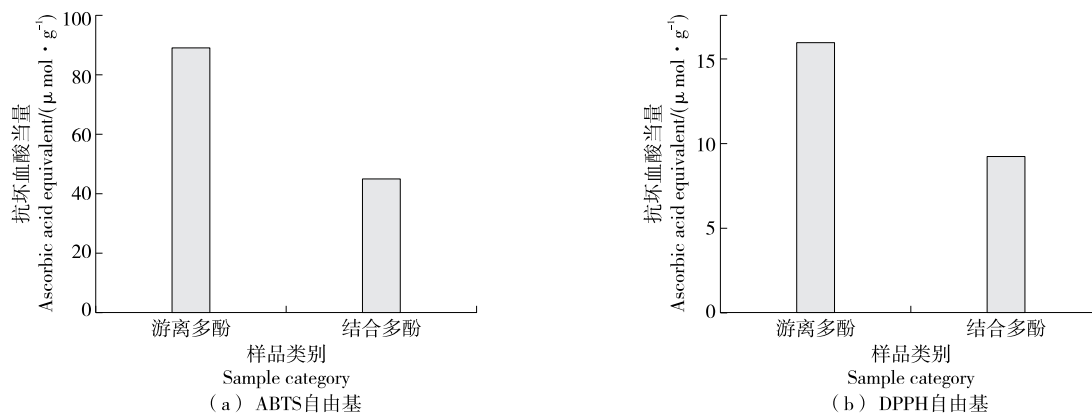


图1 黑豆壳游离多酚与结合多酚对不同自由基的清除能力

Figure 1 Different free radical scavenging capabilities of free polyphenols and bound polyphenols from black bean shells

在ABTS体系中,游离多酚质量浓度为2 mg/mL时,清除率已达到 $(88.85 \pm 0.53)\%$,ABTS自由基抗氧化能力对应抗坏血酸当量为 (89.24 ± 0.53) μmol/g;此时结合多酚的清除率为 $(49.81 \pm 1.40)\%$,对应抗坏血酸当量 (45.23 ± 1.55) μmol/g。结果显示,游离多酚的ABTS自由基抗氧化能力明显强于结合多酚,验证了多酚含量与抗氧化活性正相关的规律,并且游离态成分为主要贡献者。造成这一现象的原因可能是游离多酚通常以糖苷形式存在,呈较低聚合度,其酚羟基更易与ABTS自由基发生氢原子转移或单电子转移反应,因而表现出更强的清除能力;而结合多酚常与细胞壁多糖、蛋白质等大分子交联,空间位阻增大,反应活性受限。

在DPPH体系中,游离多酚质量浓度为10 mg/mL时清除率达到 $(80.04 \pm 0.43)\%$,DPPH自由基抗氧化能力的抗坏血酸当量为 (16.05 ± 0.17) μmol/g;结合多酚的清除率为 $(50.61 \pm 0.74)\%$,对应抗坏血酸当量 (9.29 ± 0.19) μmol/g。结果显示,游离多酚的清除率显著高于结合多酚,则对DPPH自由基的清除能力更优,这也与多酚含量测定结果相一致,可能是因为游离态多酚中,亲水性和高活性基团暴露,对DPPH自由基清除能力较强,而结合态成分因空间位阻或水溶性较低,清除能力弱于游离态,但其仍具备一定活性。值得注意的是,尽管DPPH体系中游离多酚的清除率较高,但其抗坏血酸当量值显著低于ABTS体系,这可能源于两种自由基反应机制的差异:ABTS自由基抗氧化主要在水相中反应,对亲水性成分更为敏感;而DPPH自由基在有机相中反应更强,对多

酚的疏水结构及电子给予能力具有更高选择性。

2.1.3 黑豆壳多酚主要成分鉴定与含量分析 利用Mass Lynx 4.2软件对数据进行采集和处理,可分别鉴定出黑豆壳提取物中可能存在的多酚类物质,如表1所示。

黑豆壳提取物的定性分析中鉴定出13种多酚,在游离态多酚中鉴定出11种物质,结合态多酚中鉴定出7种物质。其中丁香酸、对香豆酸、原儿茶酸、没食子酸和芦丁是在游离态和结合态中共同鉴定出来的5种物质。根据相应的标准品吸收峰面积计算标准曲线,并对游离态、结合态物质分别测量吸收峰以确定其中多酚物质含量,结果见表1。在定量测量结果中,游离态检出8种物质,结合态检出5种物质。游离态多酚以绿原酸(8.78 mg/g)和丁香酸(3.16 mg/g)为主,占游离态总量的70%以上;结合态多酚则以原儿茶酸(2.39 mg/g)和没食子酸(0.97 mg/g)为主,含量显著高于游离态。绿原酸为高极性化合物且含咖啡酰基疏水片段,使其更易被有机试剂提取为游离态^[16]。丁香酸因相对分子质量较小更易溶于有机溶剂,因此二者以游离态为主。原儿茶酸和没食子酸均具有多羟基结构(没食子酸含5个羟基,原儿茶酸含3个羟基与1个羧基),极易通过氢键或酯键与细胞壁多糖、蛋白质等大分子结合,通常需借助碱水解或高温处理才能释放^[17-18]。此外,芥子酸与咖啡酸仅存在于结合态中,说明其羧酸基团更易与植物细胞壁组分形成稳定共价连接,难以被常规提取方法解离^[19-20]。这一现象也反映出,黑豆壳中结合态酚类在常规营养评估中易被低估,但经过消化道微生物酶解后可能成为重要的酚酸来源,具备潜在的生理价值。

表1 黑豆壳多酚提取物中主要酚类物质的定性定量分析结果[†]

Table 1 Qualitative and quantitative analysis results of main phenolic substances in polyphenol extract from black bean shells

化合物名称	保留时间/ min	[M-H](<i>m/z</i>)	主要碎片离子(<i>m/z</i>)	定性分析		定量分析/(mg·g ⁻¹)	
				游离态	结合态	游离态	结合态
咖啡酸	4.21	179.021 1	134.05, 89.04		✓		
丁香酸	4.36	197.045 6	153.02, 123.10, 121.03	✓	✓	3.16±0.05	0.28±0.01
肉桂酸	4.43	147.345 5	103.51, 92.03	✓		0.12±0.01	
对香豆酸	4.88	163.031 3	93.03, 89.04, 65.04	✓	✓	1.46±0.03	0.04±0.02
阿魏酸	5.12	193.101 1	149.05, 134.03	✓	/		
原儿茶酸	5.16	109.158 7	153.04, 109.03	✓	✓	1.97±0.08	2.39±0.06
槲皮素	5.66	301.247 9	151.43, 107.12	✓		0.38±0.00	
没食子酸	5.71	169.071 5	126.02, 97.03, 73.00	✓	✓	0.09±0.06	0.97±0.02
山柰酚	6.37	285.041 8	299.04, 271.04, 160.01	✓			
芦丁	8.47	609.021 4	300.12, 151.02	✓	✓	0.30±0.02	0.18±0.01
矢车菊素	9.01	286.118 9	285.04, 164.01, 107.10	✓			
绿原酸	14.21	353.082 1	191.03, 135.04	✓		8.78±0.12	
芥子酸	16.48	223.054 1	135.05, 93.03		✓		

[†] ✓表示检出该物质。

2.2 黑豆壳多酚对面包品质的影响

2.2.1 面包质构指标 如表2所示,随着黑豆壳多酚添加量的增加,面包高度下降,可能是因为多酚分子与面筋蛋白发生相互作用。尤其是具有邻位酚羟基结构的多酚单体可能通过氧化形成醌类中间体,与面筋蛋白中的巯基发生共价交联,或与蛋白质分子链上的疏水区、氨基酸残基形成氢键与疏水相互作用,从而部分抑制了面筋网络在发酵过程中的充分伸展,削弱了面团的持气性,导致最终产品体积收缩、结构更为密实。在力学性质方面,面包的硬度与脆度随多酚添加而显著上升,说明多酚—蛋白、多酚—淀粉之间的相互作用增强了基质的刚性。多酚作为天然交联剂,不仅促进面筋蛋白分子间形成更为致密但弹性较低的网络,也可能通过羟基与淀粉链相互作用,

干扰淀粉正常糊化与回生过程,增强结晶区连接,从而提升整体硬度和脆性。黏着性方面,0.250%添加组显著高于对照组,可能是由于多酚具有较强的水合能力,与水分子、淀粉及蛋白形成三元复合物,改变了体系内部黏附特性,增强了面包颗粒间的内聚阻力。此外,面包的弹性、内聚性与回复性均随多酚添加量增加而下降,反映出多酚添加后面筋网络连续性受损,面筋蛋白的自然延展性与恢复能力受到限制。适量多酚可增强面筋,但过量则会导致蛋白交联过度,形成局部刚性节点,破坏面筋的均一性与黏弹性响应。胶着性与咀嚼性上升进一步说明面包质构向“强韧耐嚼”方向转变,这与多酚诱导的面筋强化及淀粉凝胶结构改变密切相关,0.250%添加组表现尤为显著,说明该添加量已接近引起质构突变的临界点。

表2 面包的质构分析[†]

Table 2 Texture analysis of bread

多酚添加量/%	样品高度/mm	硬度/N	脆度/N	黏着性/(N·s)	弹性	内聚性	胶着性/N	咀嚼性/N	回复性
0.000	13.03±0.05 ^a	1.91±0.29 ^a	1.91±0.29 ^a	-0.05±0.02 ^a	0.62±0.06 ^a	0.67±0.04 ^a	1.49±0.22 ^a	0.74±0.15 ^a	0.35±0.02 ^a
0.125	12.92±0.08 ^b	2.16±0.27 ^b	2.16±0.27 ^b	-0.06±0.02 ^b	0.58±0.05 ^b	0.63±0.03 ^b	1.81±0.25 ^b	0.88±0.16 ^b	0.32±0.02 ^b
0.250	12.81±0.11 ^c	2.70±0.34 ^c	2.70±0.34 ^c	-0.07±0.03 ^c	0.53±0.04 ^c	0.60±0.02 ^b	2.26±0.27 ^c	1.08±0.19 ^c	0.28±0.02 ^c

[†] 同列小写字母不同代表差异显著($P<0.05$)。

2.2.2 微观结构 植物多酚可通过与淀粉分子的相互作用改变其结构,进而反映在微观结构中^[20-21]。通过扫描电镜对不同添加量的黑豆壳多酚面团及面包冻干粉末进行观察。如图2所示,对照组面团的面筋网络呈现连续、

有序的网状结构,面筋基质均匀包裹淀粉颗粒,形成了紧密的蛋白—淀粉复合体。当添加0.125%黑豆壳多酚时,面筋网络出现局部松散,部分淀粉颗粒表面的面筋覆盖层变薄,暴露程度轻微增加。而添加0.250%的面筋网络

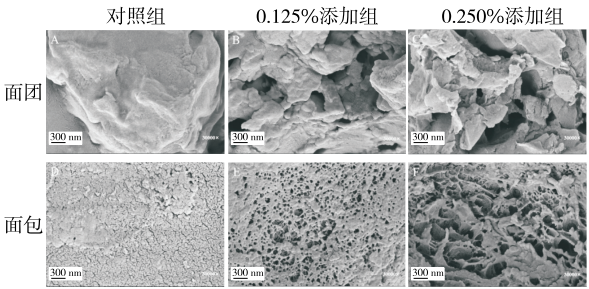


图2 面团、面包冻干粉末的电镜扫描结果
Figure 2 Electron microscope scanning results of freeze-dried powder of dough and bread

结构显著受损,面筋基质断裂成不连续的碎片,大量淀粉颗粒直接裸露于面筋间隙中。这与黑豆壳多酚富含羟基和苯环结构有关,这些结构能够通过氢键、疏水相互作用的方式与面筋蛋白相结合,导致面筋网络致密性下降。

此外,对照组面包的面筋—淀粉基质均匀分布,糊化淀粉颗粒嵌入连续的面筋网络中,界面结合紧密。添加黑豆壳多酚后,添加0.125%多酚的面包面筋网络出现局部断裂,淀粉颗粒周围的面筋基质厚度不均。而添加0.250%的则表现出更明显的结构紊乱,面筋网络碎片化严重,大量糊化淀粉颗粒从破损的面筋基质中凸出,甚至形成淀粉颗粒的团聚体。由此可知,黑豆壳多酚添加组中,淀粉颗粒的变形程度随添加量升高而加剧,尤其是0.250%添加量组,淀粉颗粒表面出现了明显的褶皱和裂痕,可能是因为多酚与淀粉分子相互作用导致其糊化特性改变。

总的来说,黑豆壳多酚的添加通过破坏面筋网络完整性、增加淀粉颗粒暴露程度,改变了面团及面包中淀粉的微观结构,这种结构的改变可能会影响面包中淀粉的消化特性。

2.2.3 体外消化曲线及淀粉消化率 对面包芯、皮的体外消化曲线和淀粉消化率进行了测定,结果如图3和表3所示。

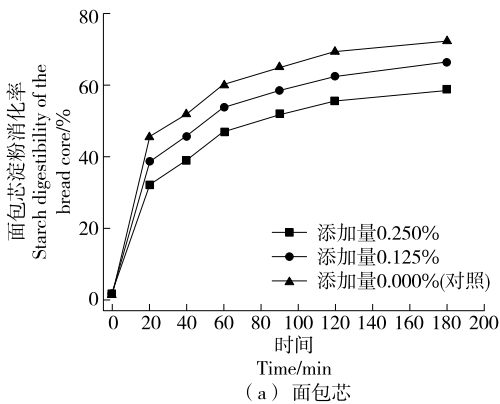


表3 不同样品体外消化特性数值[†]
Table 3 Numerical values of *in vitro* digestion characteristics of different samples %

部位	多酚添加量/%	RDS	SDS	RS
面包芯	0.000	43.75±3.25 ^a	24.03±2.14 ^a	32.22±2.22 ^d
	0.125	36.33±1.23 ^b	23.83±0.98 ^b	39.84±2.32 ^c
	0.250	31.25±1.89 ^c	23.43±1.65 ^c	45.32±2.54 ^b
面包皮	0.000	40.23±1.88 ^a	23.44±1.67 ^c	36.33±3.52 ^d
	0.125	35.55±2.34 ^b	23.24±1.57 ^c	41.21±1.84 ^c
	0.250	27.93±0.65 ^d	21.48±1.78 ^d	50.59±2.65 ^a

[†] 同列小写字母不同代表差异显著($P<0.05$)。

对于面包芯,对照组快消化淀粉含量为43.75%,随黑豆壳多酚添加量增加显著下降,可能因多酚通过氢键、疏水作用改变淀粉结构,形成紧密网状结构阻碍酶解,从而减缓消化速度^[22]。慢消化淀粉含量仅从24.03%降至23.43%,变化微小,说明处理对慢消化阶段影响有限,或因慢消化需复杂酶解过程,多酚难以改变其特性。抗性淀粉含量则升至45.32%,未被小肠吸收的淀粉进入大肠,成为肠道菌群营养源,促进有益菌生长,对肠道健康有益。对于面包皮,快消化、慢消化淀粉含量均低于对应面包芯组,抗性淀粉略高,可能因面包皮本身结构更紧密或含天然抗消化成分。添加少量黑豆壳多酚后,快消化淀粉降至35.55%,抗性淀粉升至41.21%;添加量增加时,快消化淀粉骤降至27.93%,抗性淀粉大幅增至50.59%,变化幅度远大于面包芯组。这可能归因于面包皮成分与多酚协同作用,如多酚与淀粉、酶结合降低分解效率,或包裹淀粉颗粒减缓消化。面包芯与面包皮消化特性差异可能与烘烤过程中面包皮承受的温度相对较高,而且内部面团膨胀时会挤压面包皮形成较为紧凑的网络结构有关^[23]。与对照组相比,0.250%多酚添加量组的面包芯、皮

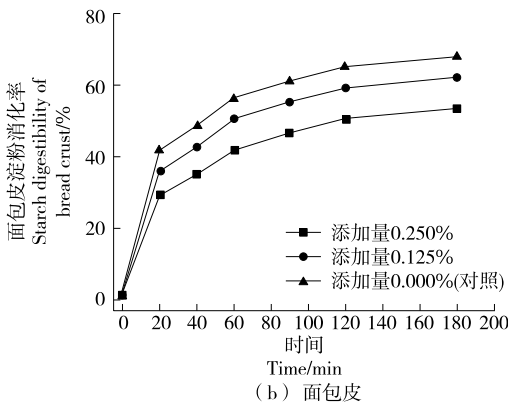


图3 面包消化特性曲线
Figure 3 Bread digestion characteristic curve

中抗性淀粉含量分别达45.32%,50.59%,为开发低GI面包提供了依据。

2.3 黑豆壳多酚的 α -葡萄糖苷酶抑制活性

2.3.1 抑制率曲线 黑豆壳多酚对 α -葡萄糖苷酶的抑制率曲线如图4所示。

由图4可知,游离与结合多酚对 α -葡萄糖苷酶的抑制率随质量浓度升高显著上升,且同等质量浓度下游离多酚抑制率更高。游离多酚 IC_{50} 为 $(205.24 \pm 2.13) \mu\text{g/mL}$,结合多酚为 $(457.28 \pm 2.91) \mu\text{g/mL}$,表明游离多酚抑制活性更强。从微观结构层面分析,游离多酚的活性基团可与 α -葡萄糖苷酶结合,干扰活性中心或阻塞底物位点。随着多酚质量浓度升高,其与酶分子发生有效碰撞的概率增大,抑制效果也随之增强。绿原酸、槲皮素等常见游离型多酚已被证实能够嵌入 α -葡萄糖苷酶的底物结合口袋,通过空间阻遏和电子效应降低酶活。

相比之下,结合多酚由于通过酯键、醚键或糖苷键与细胞壁多糖、蛋白质等大分子形成复合体,其三维结构更为复杂,暴露出活性基团的能力受到空间位阻的限制,因而难以充分接近酶的活性区域。此外,结合多酚中亲水性基团常被埋或参与交联,进一步削弱了其在水相反应体系中的溶解性与扩散能力,导致其抑制效果上升较

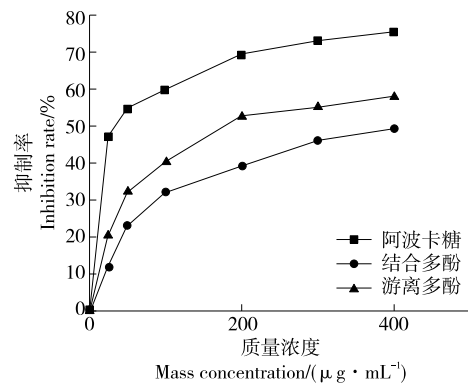


图4 α -葡萄糖苷酶抑制率变化趋势图

Figure 4 Variation trend of inhibition rate of α -glucosidase

为缓慢。例如,在 $400 \mu\text{g/mL}$ 的质量浓度下,结合多酚的抑制率仅相当于游离多酚在 $150 \mu\text{g/mL}$ 下的,反映出其在生物可及性方面与游离多酚的显著差异。

2.3.2 抑制动力学分析 游离与结合多酚对 α -葡萄糖苷酶的抑制动力学曲线如图5~图6所示。

图5(a)和图6(a)显示,不同质量浓度黑豆壳多酚(游离/结合)下, α -葡萄糖苷酶浓度 $[S]$ 与初始反应速度 V 呈现为经过原点的直线关系,且多酚添加组斜率均小于对

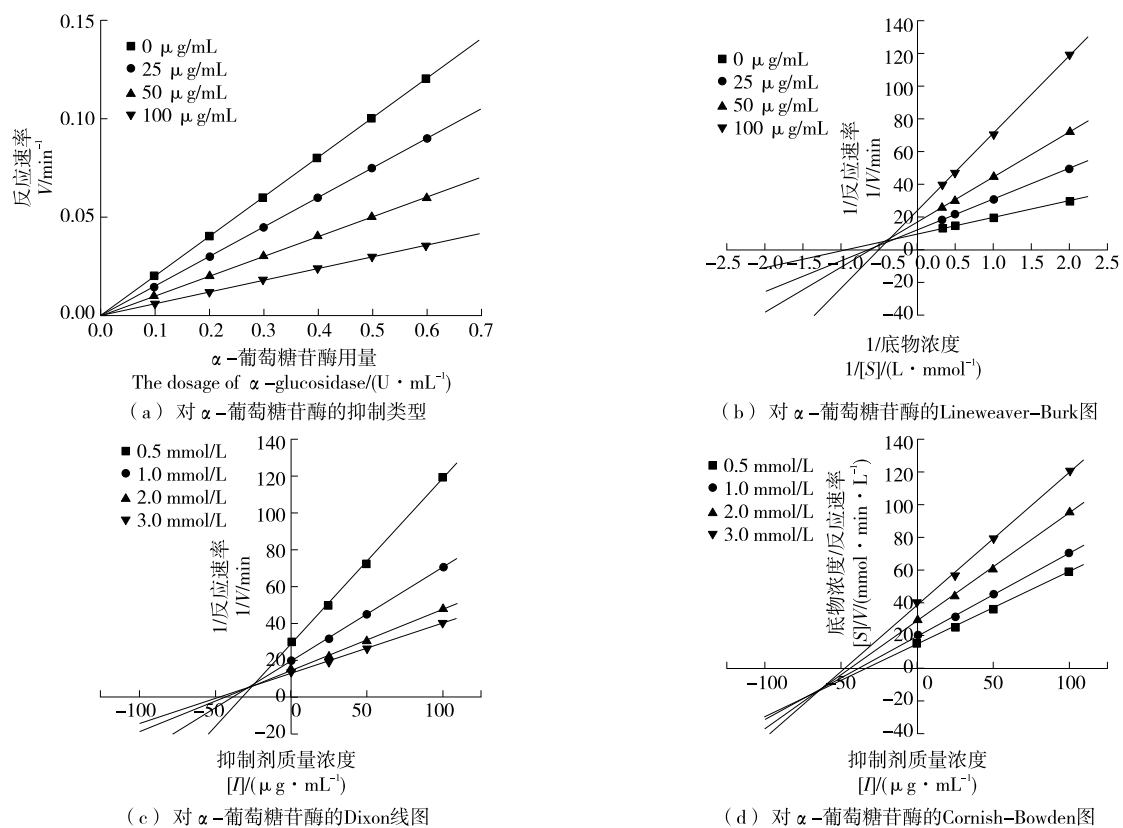
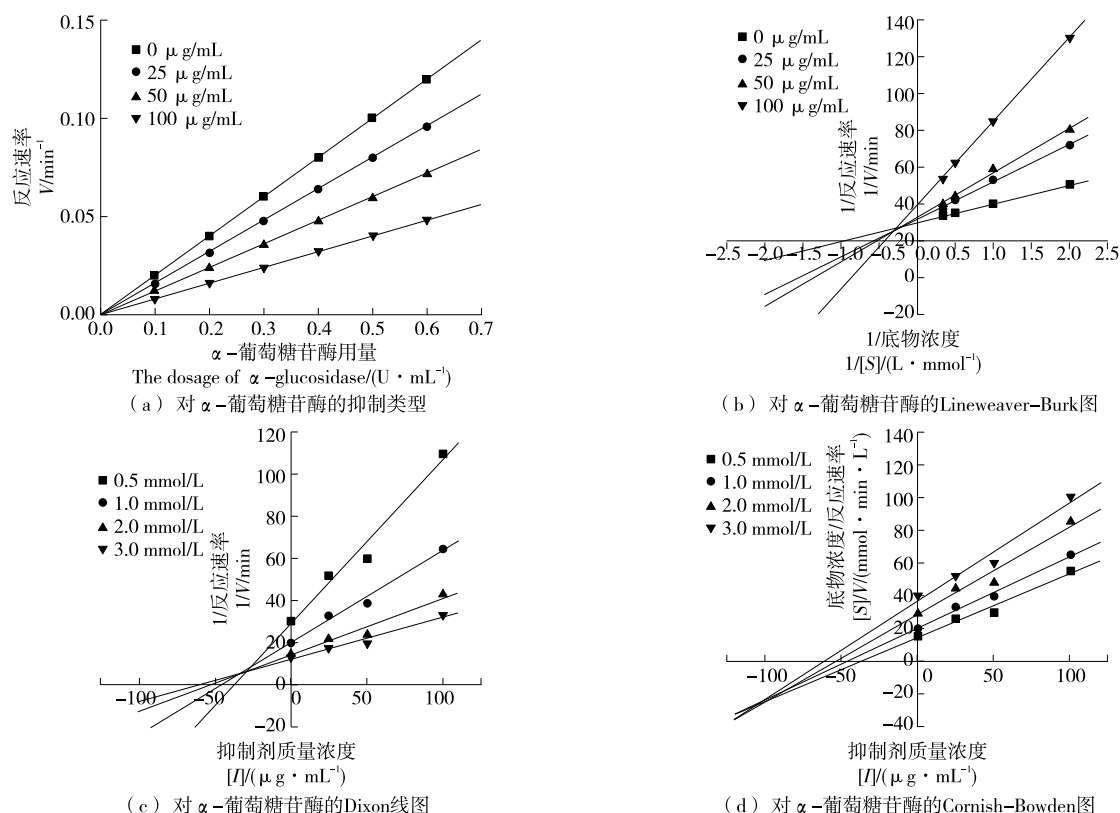


图5 黑豆壳游离多酚对 α -葡萄糖苷酶的抑制动力学曲线

Figure 5 Kinetic curve of inhibition on α -glucosidase by free polyphenols from black bean shells

图6 黑豆壳结合多酚对 α -葡萄糖苷酶的抑制动力学曲线Figure 6 Kinetic curve of inhibition on α -glucosidase by bound polyphenols from black bean shells

照组,随多酚质量浓度增加斜率递减,表明抑制作用可逆。这一现象说明黑豆壳多酚并未造成酶的永久性失活,而是通过非共价结合方式影响其催化功能。Lineweaver-Burk图(图5~图6)中,LB直线交于第二象限,说明游离和结合多酚均为竞争性与非竞争性的混合型抑制。黑豆壳多酚组既能与游离 α -葡萄糖苷酶结合,形成酶—抑制剂复合物,也能与酶—底物复合物结合,生成三元复合物,从而同时影响酶与底物的结合效率及催化转化速率。根据图5(c)和图5(d),游离多酚的 $K_i=(25.07\pm 1.33)$ mmol/L, $K'_i=(71.21\pm 2.04)$ mmol/L。 K_i 值越低表示抑制作用越强,表明黑豆壳游离多酚更倾向于占据酶的活性中心,与底物竞争结合位点,表现出更强的竞争性抑制特征;根据图6(c)和图6(d),结合多酚的 $K_i=(29.91\pm 2.72)$ mmol/L, $K'_i=(98.03\pm 2.13)$ mmol/L,表明其以竞争性抑制为主。虽然同样以竞争性抑制为主导,但其 K_i 与 K'_i 值均高于游离多酚,反映出结合多酚与酶的结合亲和力较弱,整体抑制效能较低。

2.3.3 分子对接模拟 在研究黑豆壳多酚对 α -葡萄糖苷酶抑制作用的基础上,利用分子对接模拟进一步了解抑制机制。选用黑豆壳多酚的含量占比高的前5种活性组分(绿原酸、原儿茶酸、丁香酸、没食子酸、对香豆酸)与

α -葡萄糖苷酶的结合位点、结合能和相互作用类型进行了对接模拟,结果如图7所示,分子对接结果见表4。

结合能从高到低依次为:对香豆酸(-2.6×10^4 J/mol) $>$ 绿原酸(-2.3×10^4 J/mol) $>$ 丁香酸(-2.2×10^4 J/mol) $>$ 原儿茶酸(-2.1×10^4 J/mol) $>$ 没食子酸(-1.9×10^4 J/mol),表明抑制潜力与配体作用模式的复杂性密切相关。

对香豆酸可在 ILE A: 13、TYR A: 46、LYS A: 48、ARG A: 171位点形成氢键网络(4个氢键),这些结合位点更接近 α -葡萄糖苷酶的活性中心,与 VAL A: 7的 π -烷基作用共同发挥抑制作用,其结合能最高,抑制效果最优。绿原酸也可通过多个氢键(ASP A: 777、LYS A: 776、ILE A: 523等)阻断 α -葡萄糖苷酶的催化功能,同时 π -烷基作用(ARG A: 520、ALA A: 285)占据底物通道入口,加上碳氢键(HIS A: 645)辅助稳定构象,体现多位点共同抑制酶催化活性的机制,但可能由于距离酶活性中心较远,其抑制能力次于对香豆酸。丁香酸氢键(SER A: 47、LYS A: 48、SER A: 155)同样覆盖催化中心边缘,但碳氢键(ILE A: 156、GLY A: 157)距离活性中心较远, π - σ 作用(LYS A: 48)的贡献有限,同时疏水作用缺失导致抑制效果较弱。原儿茶酸与没食子酸的氢键靶点分散(原儿茶酸: TYR A: 46、LYS A: 48、SER A: 155、ARG A: 171)或缺乏疏水支

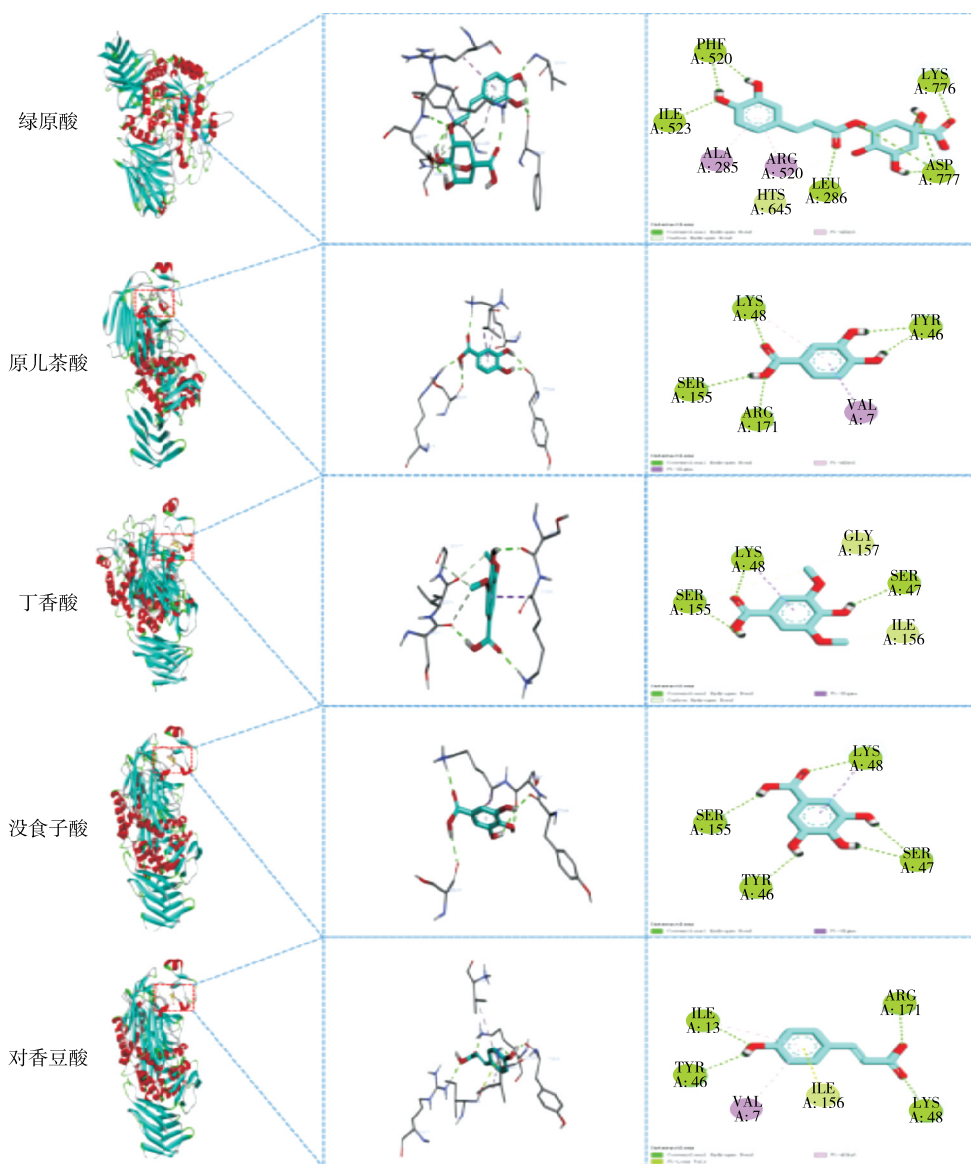


图7 α -葡萄糖苷酶与绿原酸、原儿茶酸、丁香酸、没食子酸、对香豆酸分子对接可视化结果

Figure 7 Visualization results of molecular docking of α -glucosidase with chlorogenic acid, protocatechin acid, syringic acid, gallic acid, and p-coumaric acid

撑(没食子酸仅依赖氢键和单一 π - σ 作用),抑制潜力最低。对香豆酸形成接近催化活性中心的氢键网络,绿原酸可与酶形成多种相互作用,因而二者都可实现高效抑制,结合能分别为 -2.6×10^4 , -2.3×10^4 J/mol,显著优于其他配体。丁香酸、原儿茶酸及没食子酸因作用单一或结合能较低,抑制潜力有限。前文多酚定性定量结果显示:游离态多酚中绿原酸、丁香酸、对香豆酸含量较高,结合多酚中原儿茶酸、没食子酸含量高,这也呼应了游离态多酚对 α -葡萄糖苷酶抑制作用强于结合态多酚的结果。

抑制动力学结果显示,黑豆壳多酚对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用类型为竞争性主导的混合型抑制,与分子对

接结果一致。其中,竞争性成分:对香豆酸和绿原酸通过氢键直接占据催化中心,与底物竞争结合位点,导致 K_m 升高(底物亲和力下降);非竞争性成分:绿原酸和对香豆酸通过疏水作用(VAL A:7、ALA A:285)及空间位阻阻碍底物进入活性中心,同时可能结合酶-底物复合物,降低 V_{max} 。综合分析可知,高效配体(对香豆酸、绿原酸)通过氢键与疏水作用的共同作用,实现了“竞争性占据活性中心”与“非竞争性阻断底物通道”的作用,而其他几种配体因相互作用单一或者作用力较弱难以显著影响酶功能,但也存在一定的酶活性抑制效果。这个结果揭示了黑豆壳多酚通过氢键及疏水作用与 α -葡萄糖苷酶关键残基结

表 4 分子对接结果
Table 4 Molecular docking result

配体	结合能/ (J·mol ⁻¹)	作用类型			
		氢键	π-烷基作用	碳氢键	π-σ
绿原酸	-2.3×10 ⁴	LEU A:286	ALA A:285	HIS A:645	
		ILE A:523	ARG A:520		
		PHE A:535			
		ASP A:777			
		LYS A:776			
原儿茶酸	-2.1×10 ⁴	TYR A:46	LYS A:48		VAL A:7
		LYS A:48			
		SER A:155			
		ARG A:171			
丁香酸	-2.2×10 ⁴	SER A:47		ILE A:156	LYS A:48
		LYS A:48		GLY A:157	
		SER A:155			
没食子酸	-1.9×10 ⁴	TYR A:46			LYS A:48
		SER A:47			
		LYS A:48			
		SER A:155			
对香豆酸	-2.6×10 ⁴	ILE A:13	VAL A:7		
		TYR A:46			
		LYS A:48			
		ARG A:171			

合,形成稳定复合物,并以混合抑制机制改变酶构象及微环境,从而抑制底物结合并降低催化活性。

3 结论

黑豆壳游离态多酚含量(20.42 mg GAE/g)及抗氧化活性显著高于结合态的(9.47 mg GAE/g),游离态以绿原酸、丁香酸为主,结合态以原儿茶酸、没食子酸为主,游离态良好的抗氧化能力与其羟基数量及亲水性相关。添加多酚粗提物可提升面包硬度和咀嚼性,但降低了弹性和内聚性,在微观结构层面可促进淀粉团聚,形成物理屏障抑制酶解。体外消化试验证实,多酚显著降低快消化淀粉含量、提升抗性淀粉含量,同时,黑豆壳多酚对α-葡萄糖苷酶的抑制类型属于竞争性主导的混合型抑制作用。该研究揭示了黑豆壳多酚通过抑制酶活性与改变淀粉结构延缓消化的双重机制,后续将围绕黑豆壳多酚的热加工稳定性、消化过程的生物利用率和多食品体系的应用拓展等方向进行深入研究。

参考文献

[1] 徐飞,葛阳阳,刘新春,等.黑豆营养成分及生物活性的研究进展[J].中国食物与营养,2019,25(9):55-61.
XU F, GE Y Y, LIU X C, et al. Research advancement of nutritional composition and biological activity of black soybean [J]. Food and Nutrition in China, 2019, 25(9): 55-61.

[2] KOSTENKO V, AKIMOV O, GVTNIK O, et al. Modulation of redox-sensitive transcription factors with polyphenols as pathogenetically grounded approach in therapy of systemic inflammatory response[J]. Heliyon, 2023, 9(5): e15551.
[3] ADRIAN M T, DANIELA R S, OSCAR C, et al. Effect of instant controlled pressure drop (DIC) on polyphenols, flavonoids and antioxidant capacity of green lentils (*Lens culinaris*) [J]. Molecules, 2023, 28(10): 4 419.
[4] ZHOU P, LI T T, ZHAO J J, et al. Evaluation of α-glucosidase inhibitory ability: insights from free and bound polyphenols in five grain brans[J]. Food Research International, 2025, 218: 116837.
[5] 钟宜辰,彭颖,张珮珮,等.响应面优化‘不知火’柑橘果肉渣中结合酚的碱法提取工艺[J].华中农业大学学报,2020,39(2):133-140.
ZHONG Y C, PENG Y, ZHANG P P, et al. Optimization of alkaline extraction process for bound phenolics from 'dekopon' citrus pulp residue[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2020, 39(2): 133-140.
[6] ZHOU P, LI T T, ZHAO J J, et al. Grain bound polyphenols: Molecular interactions, release characteristics, and regulation mechanisms of postprandial hyperglycemia[J]. Food Research International, 2025, 208: 116291.
[7] KUMAR N, GOEL N, YADAV R. Optimized spectrophotometric methods for quantification of total phenolics

- and flavonoids in plant extracts: validation and application to herbal samples[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2020, 57(10): 3 814-3 822.
- [8] ILYASOV I R, BELOBORODOV V L, SELIVANOVA I A, et al. ABTS/PP decolorization assay of antioxidant capacity reaction pathways[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(3): 1 131.
- [9] WANG S, SUH J H, ZHENG X. Quantitative analysis of polyphenols by HPLC-DAD: method validation and application to plant extracts[J]. *Food Chemistry*, 2018, 245: 1 232-1 240.
- [10] 潘琪峰. 高含量燕麦粉的面包预拌粉研究[D]. 无锡: 江南大学, 2021: 9.
- PAN Q F. Study on the pre-mixed bread flour with a high content of oat flour[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021: 9.
- [11] 王桃. 挤压制备方便杂粮粥及其消化性研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2023: 15.
- WANG T. Preparation of instant multigrain porridge by extrusion and its digestibility[D]. Nanchang: Nanchang University, 2023: 15.
- [12] HAN L, WANG H Q, CAO J W, et al. Inhibition mechanism of α -glucosidase inhibitors screened from Tartary buckwheat and synergistic effect with acarbose[J]. *Food Chemistry*, 2023, 420: 136102.
- [13] JAGADEESAN G, MUNIYANDI K, MANOHARAN A L, et al. Understanding the bioaccessibility, α -amylase and α -glucosidase enzyme inhibition kinetics of *Allmania nodiflora* (L.) R. Br. ex Wight polyphenols during *in vitro* simulated digestion[J]. *Food Chemistry*, 2022, 372: 131294.
- [14] 彭瀚. 黑豆不同形态多酚的组成、消化特性及其抗氧化活性的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2017: 70.
- PENG H. Study on the extractable free and unextractable bound phenolic composition of black soybean, and its bioaccessability and antioxidant activities[D]. Nanchang: Nanchang University, 2017: 70.
- [15] 李娜, 杨蕾, 李菁, 等. 响应面法优化超声波辅助提取黑豆皮总黄酮工艺[J]. *广东药科大学学报*, 2021, 37(3): 25-29.
- LI N, YANG L, LI J, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of total flavonoids from *Glycine max* coat by response[J]. *Journal of Guangdong Pharmaceutical University*, 2021, 37(3): 25-29.
- [16] GUTIERREZ A S A, GUO J Y, FENG J N, et al. Inhibition of starch digestion by gallic acid and alkyl gallates[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 102: 105603.
- [17] PRABAKARAN N N, ETHIRAJ S, DUNNA N R, et al. Blending, characterization, and experimental analysis of ZnO-carboxy methyl cellulose-methyl gallic acid nanocomposites against lung cancer cells[J]. *Emergent Materials*, 2024, 7(3): 1 091-1 102.
- [18] KHAN K Y, ALI B, LI G L, et al. Distribution of nutrients, bioactive compounds, and antioxidant properties of grain-based milling fractions of *Glycine max* L[J]. *CyTA - Journal of Food*, 2024, 22(1): 2290831.
- [19] DING Y B, MOROZOVA K, ANGELI L, et al. Effect of extraction treatments on the functional properties of free and bound phenols in apple seeds[J]. *Food Bioscience*, 2023, 53: 102602.
- [20] PANDI A, KALAPPAN V M. Pharmacological and therapeutic applications of sinapic acid: an updated review[J]. *Molecular Biology Reports*, 2021, 48(4): 3 733.
- [21] OU S J L, YU J Y, ZHOU W B, et al. Effects of anthocyanins on bread microstructure, and their combined impact on starch digestibility[J]. *Food Chemistry*, 2022, 374: 131744.
- [22] ZHU J Z, ZHANG B, TAN C P, et al. Effect of *Rosa Roxburghii* juice on starch digestibility: a focus on the binding of polyphenols to amylose and porcine pancreatic α -amylase by molecular modeling[J]. *Food Hydrocolloids*, 2022, 123: 106966.
- [23] TIAN J H, OGAWA Y, SHI J, et al. The microstructure of starchy food modulates its digestibility[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2019, 59: 3 117-3 128.