

环境因素对单增李斯特菌*inlB*毒力基因表达的影响

桑 雪,朱耀磊,朱雅慧,张公亮,侯红漫*
(大连工业大学食品学院,辽宁大连116034)

摘 要:针对单增李斯特菌毒力基因*inlB*设计五对引物,从中筛选出一对特异性强的引物,利用反转录荧光定量PCR技术来考察毒力基因表达的强弱。在不同环境因素条件下培养单增李斯特菌,分别提取菌体RNA,继而合成cDNA,以管家基因16S rRNA为内参基因,利用循环阈值(Ct)的变化计算*inlB*基因的相对表达量。结果表明,毒力基因*inlB*在温度为15℃、pH为6、氯化钠浓度为1.5%~2.0%、蔗糖浓度为0.75%~1.25%时能高效表达;温度为0℃和45℃、pH为4和9、氯化钠浓度为3.5%以上以及蔗糖浓度为0%~0.25%和2.25%以上时,对毒力基因*inlB*的表达起明显的抑制作用;在pH为6的条件下,酸的种类对毒力基因*inlB*的表达影响不大。

关键词:单增李斯特菌,毒力基因*inlB*,环境因素,基因表达

Effect of environmental factors on *Listeria monocytogenes inlB* gene expression

SANG Xue, ZHU Yao-lei, ZHU Ya-hui, ZHANG Gong-liang, HOU Hong-man*

(School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China)

Abstract: Five pairs of primers were designed based on *Listeria monocytogenes* virulence genes *inlB* and a pair of well specific primers were selected for this study. The *Listeria monocytogenes* virulence factor expression was studied by real-time reverse transcriptase PCR. RNAs were extracted from *Listeria monocytogenes* culture solution under the different environmental factors conditions, and then cDNAs were synthesized respectively. The housekeeping gene 16S rRNA was used as an internal standard. The changes of the Ct value could mirror the relative expression levels of *inlB* gene. Our data suggested that *inlB* gene expression was efficient when the temperature was 15℃, pH was 6, the NaCl concentration was 1.5% to 2%, and the concentration of sucrose was 0.75% to 1.25%. When the temperature was 0℃ or 45℃, pH was 4 or 9, the NaCl concentration was more than 3.5%, and the concentration of sucrose was 0% to 0.25%, or more than 2.25%, *inlB* gene expression was suppressed. What's more, the kinds of acid had little effect on the *inlB* gene when the pH was 6.

Key words: *Listeria monocytogenes*; virulence genes *inlB*; environmental factors; gene expression

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)20-0175-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.20.028

李斯特氏菌是兼性厌氧的革兰氏阳性杆状菌^[1],其中单增李斯特菌是一种可导致食源性疾病的致病菌,广泛存在于蛋、禽、水产品、乳制品、肉、蔬菜等我们日常的食品中^[2-3]。食物较易被单增李斯特菌污染,其中乳制品及肉中的污染检出率最高。目前在世界的很多国家都发生过因该菌引起的中毒事件,感染该菌后临床表现多样化,其病的主要表现为败血症、脑膜炎和单核细胞增多,该菌的致病率远远超过其他食源性细菌^[4]。

致病的毒力基因常成簇状,扎堆形成毒力岛^[5]。

单增李斯特菌即由100个大小不一的毒力岛组成,其中单增李斯特菌的内化素岛主要参与诱导、粘附、侵袭,构成了一个基因家族系:*inlA*~*inlH*,基因家族系中*inlA*和*inlB*基因有着重要的作用,它们是最早鉴定出的与细菌侵袭相关的毒力因子,是被非吞噬细胞内化所必需,为单增李斯特菌特有,其对单增李斯特菌具有鉴别意义^[6]。毒力基因*inlB*属于内化素家族,具有受体特异性,能与肝细胞生长因子受体结合,是肝细胞、成纤维细胞、上皮细胞的介导因素等。缺失*inlB*基因的单增李斯特菌毒力株的毒力严重下降。国内

收稿日期: 2015-01-06

作者简介: 桑雪(1990-),女,硕士研究生,研究方向:食品安全与检测, E-mail: sangxue116@sina.com。

* 通讯作者: 侯红漫(1964-),女,教授,研究方向:微生物技术, E-mail: houthongman@dlpu.edu.cn。

基金项目: 辽宁省高校重大科技平台(辽教发[2011]191号);辽宁省特聘教授(辽教发[2012]145号)。

外在环境因素对致病病毒力影响方面也有了一定的研究^[7-8],本文选取的*inlB*基因,是单增李斯特菌很重要的产毒基因之一,且国内外对其研究较少,但其表达的强弱也直接影响了单增李斯特菌的毒性强弱。本文主要研究常见食品加工条件,如温度、pH、氯化钠浓度、蔗糖浓度和酸的种类对*inlB*基因表达量的影响,以期能初步了解食品加工环境因素的变化对单增李斯特菌毒力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

菌种 单增李斯特菌ATCC 19111、ATCC 19112、ATCC 19115、ATCC 15313、威氏李斯特菌CICC 21672和格氏李斯特菌CICC 21670;副溶血性弧菌、大肠杆菌、产气杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌 本实验室保存菌株;SYBR® Premix Ex Taq™、Oligo(dT)₁₅ Primer、5×M-MLV Buffer、dNTP Mixture、RNase Inhibitor、RTase M-MLV (RNase H-)等 购自宝生物工程(大连)有限公司;20×PBS缓冲溶液、RNase Free dH₂O、荧光定量PCR用引物等 购自生工生物工程(上海)股份有限公司;细菌总RNA提取试剂盒以及溶菌酶等 购自北京天根生化有限公司;胰蛋白胨、磷酸氢二钾、大豆蛋白胨、酵母膏、氯化钠、葡萄糖、醋酸、乳酸、柠檬酸、盐酸等 购自博诺试剂。

荧光定量PCR仪 美国BIO-RAD公司;高速离心机 德国Eppendorf公司;水浴锅 上海精宏实验设备有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 单增李斯特菌的培养 含0.6%酵母浸膏的胰酪胨大豆肉汤培养基(TSB-YE)[®]:胰蛋白胨1.7 g,磷酸氢二钾0.25 g,大豆蛋白胨0.3 g,酵母膏0.6 g,氯化钠0.5 g,葡萄糖0.25 g,去离子水100 mL,pH7.5。培养条件为37℃,160 r/min培养20 h。

1.2.2 引物的设计及筛选 利用NCBI与FastPCR软件相结合,要满足如下条件:21~26个碱基;前面以G/C开头(数值在45%~60%),A/T结尾;T_m=50~60且一对引物的T_m值相差不超过3℃;检测时不产生二级结构;Quality值较理想。

根据以上条件设计了五对引物,见表1,再将每对引物分别与单增李斯特菌、格氏李斯特菌、威氏李斯特菌、大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌、产气杆菌这几株细菌分别进行特异性检测,最终筛选出了一对特异性强的引物用于后续实验。

1.2.3 模板的制备

1.2.3.1 细菌RNA的提取 取适量菌液按照细菌总RNA提取试剂盒说明书步骤进行RNA提取,于-80℃条件下保存。

1.2.3.2 cDNA的合成 反应体系6 μL,包括:模板RNA (RNA定量到1 ng),Oligo(dT) Primer 1 μL,RNase free dH₂O,混匀;反应条件:70℃ 10 min;4℃ 2 min。

反应体系10 μL,包括:以上模板RNA变性溶液 6 μL,5×M-MLV Buffer 2 μL,dNTP Mixture 0.5 μL,

RNase Inhibitor 0.25 μL,RTase M-MLV (RNase H-) 0.5 μL,RNase Free dH₂O 0.75 μL,反应条件:42℃ 60 min;70℃ 15 min;4℃ 2 min;4℃保存。

1.2.4 荧光定量PCR检测反应体系及条件 25 μL扩增体系:2倍浓度的SYBR® Premix Ex Taq™ 12.5 μL;浓度为10 μmol/L的引物对各0.5 μL;Cdna模板2 μL;灭菌双蒸水9.5 μL。

反应参数:95℃ 30 s;95℃ 5 s,63.3℃ 25 s;72℃ 15 s;80℃ 15 s,40个循环;60~95℃建立熔解曲线。

1.2.5 环境因素对毒力基因*inlB*表达的影响 为了研究毒力基因*inlB*的表达,在不同环境因素条件下培养单增李斯特菌,每个条件作三个平行样本和一个对照样本,继而分别提取RNA,并对所有样品RNA均一化处理,合成cDNA,以管家基因16S rRNA为内参基因。方程 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 用来作为判定*inlB*表达量的依据,其中37℃、pH7.5、葡萄糖0.25%、氯化钠0.5%作为对照。本文环境因素的选择均是事先经过实验验证的在单增李斯特菌能够良好生长的条件范围内选取,利用荧光定量PCR技术分别得到每一个环境因素的循环阈值(Ct)的变化,从而计算*inlB*基因的相对表达量。

相对表达量(R.E)^[7] = $2^{-[\text{Ct}(\text{inlB}_{\text{treatment}}) - \text{Ct}(16\text{S}_{\text{treatment}})] - [\text{Ct}(\text{inlB}_{\text{control}}) - \text{Ct}(16\text{S}_{\text{control}})]}$

1.2.5.1 温度对*inlB*基因表达的影响 分别在0、5、10、15、20、25、30、37、40、45℃条件下,培养单增李斯特菌20 h,其他条件见1.2.1,继而分别提取RNA、合成cDNA,最后进行荧光定量PCR检测。

1.2.5.2 pH对*inlB*基因表达的影响 分别在pH=4、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9条件下,培养单增李斯特菌20 h,每个条件作三个平行样本,其他条件见1.2.1,继而分别提取RNA、合成cDNA,最后进行荧光定量PCR检测。

1.2.5.3 氯化钠浓度对*inlB*基因表达的影响 分别在氯化钠浓度为0.25%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4% (即加入氯化钠0.25、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4 g)条件下,培养单增李斯特菌20 h,每个条件作三个平行样本,每个条件作三个平行样本,其他条件见1.2.1,继而分别提取RNA、合成cDNA,最后进行荧光定量PCR检测。

1.2.5.4 蔗糖浓度对*inlB*基因表达的影响 分别在蔗糖浓度为0%、0.25%、0.75%、1.25%、1%、1.75%、2.25%、3%、5%、7%、9%、11%、13%、15%、17%、19%、21% (不加葡萄糖且分别加入蔗糖0、0.25、0.75、1.25、1、1.75、2.25、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21 g)条件下,培养单增李斯特菌20 h,每个条件作三个平行样本,其他条件见1.2.1,继而分别提取RNA、合成cDNA,最后进行荧光定量PCR检测。

1.2.5.5 酸的种类对*inlB*基因表达的影响 分别选取醋酸(6 mol/L)、乳酸(85%~90%)、柠檬酸(1%)和盐酸(0.1 mol/L)调节培养基pH为6,对单增李斯特菌培养20 h,每个条件作三个平行样本,其他条件见1.2.1,继而分别提取RNA、合成cDNA,最后进行荧光定量PCR检测。

表1 目的基因与对应引物序列

Table 1 Target gene and corresponding primer sequences

毒力基因	序列(5'-3')	扩增片段
<i>inlB</i> 基因	上游引物(<i>inlB</i> 1)	GTTCTTGCAGAGATGGCACG
	下游引物(<i>inlB</i> 2)	TATGCAGCATGGCTTGTAACC
	上游引物(<i>inlB</i> 3)	CGGTGGAAGTTATGCAGTCG
	下游引物(<i>inlB</i> 4)	CGCAACAACCGGTAAGATGT
	上游引物(<i>inlB</i> 5)	AGGCATCTACAAACTTCCACG
	下游引物(<i>inlB</i> 6)	CGCAACAACCGGTAAGATGT
	上游引物(<i>inlB</i> 7)	GCAGCATGGCTTGTAACCTAC
	下游引物(<i>inlB</i> 8)	CGTTGTTCTTGCAGAGATGGC
	上游引物(<i>inlB</i> 9)	GCAGCATGGCTTGTAACCTAC
	下游引物(<i>inlB</i> 10)	GTTGTTCTTGCAGAGATGGCA

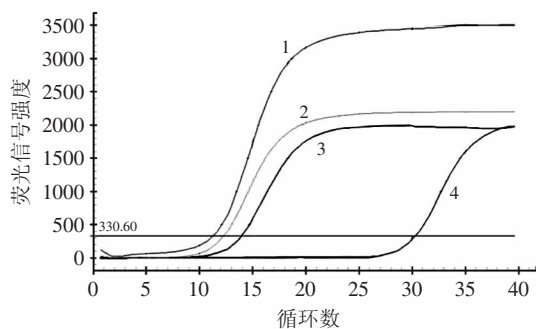
2 结果与分析

2.1 引物设计

以单增李斯特菌毒力基因*inlB*为靶基因设计了五对引物,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,所用引物序列见表1。

2.2 引物的特异性检测

用5对引物分别对单增李斯特菌ATCC 19111、ATCC 19112、ATCC 19115、ATCC 15313、威氏李斯特菌CICC 21672、格氏李斯特菌CICC 21670、副溶血性弧菌、大肠杆菌、产气杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌共11株细菌进行荧光定量PCR扩增,经过筛选,引物*inlB*1、*inlB*2特异性较强,如图1所示,只有单增李斯特菌ATCC 19111、单增李斯特菌ATCC 19112、单增李斯特菌ATCC 19115和单增李斯特菌ATCC 15313有扩增曲线,其他7株细菌没有扩增曲线,说明可以用于后续实验。

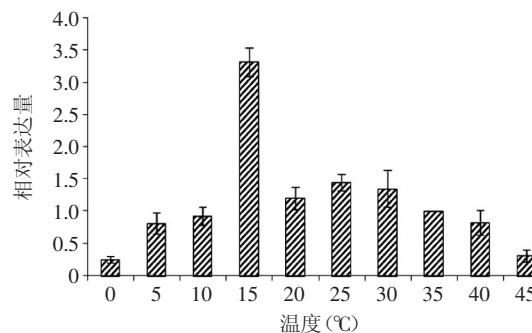
图1 引物*inlB*1、*inlB*2扩增结果Fig.1 The amplification results of primer *inlB*1 and *inlB*2

注:1为单增李斯特菌ATCC 19111,2为单增李斯特菌ATCC 19112,3为单增李斯特菌ATCC 19115,4为单增李斯特菌ATCC 15313。

2.3 温度对*inlB*基因表达的影响

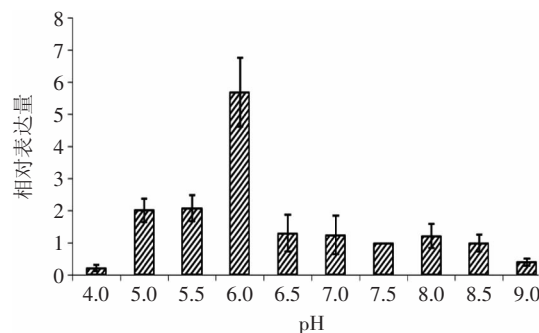
由图2可知,温度为15℃条件下的相对表达量显著高于其他不同温度条件下的相对表达量($p < 0.01$),*inlB*基因的表达较好;温度为0、45℃条件下相对表达量显著低于其他不同温度条件下的相对表达量($p < 0.05$),对*inlB*基因的表达量较低。实验结果表明,在低温条件下,*inlB*基因表达量较高,并不会影响单增

李斯特菌的产毒性能。在温度对毒力基因*inlB*表达的影响方面,Gonzalez-Serrano等^[10]也指出低温条件下毒力基因的表达量是高于28℃和37℃条件下的毒力基因表达量的,其结论与本文得到的结果是一致的。

图2 温度对*inlB*基因表达的影响Fig.2 Effect of temperature on *inlB* expression

2.4 pH对*inlB*基因表达的影响

由图3可知,pH=6条件下的相对表达量极显著高于其他pH条件下的相对表达量($p < 0.01$),*inlB*基因的表达较好;pH=4和pH=9条件下的相对表达量明显低于其他pH条件下的相对表达量($p < 0.05$),对*inlB*基因的表达起抑制作用。实验结果表明,在酸碱性较强的条件下,*inlB*基因相对表达较弱。

图3 pH对*inlB*基因表达的影响Fig.3 Effect of pH on *inlB* expression

2.5 氯化钠浓度对*inlB*基因表达的影响

由图4可知,氯化钠浓度在0%~1.5%所对应的

*inlB*基因表达量是递增的,而氯化钠浓度由1.5%~4.0%对应的*inlB*基因表达量是递减的。氯化钠浓度为1.5%和2.0%条件下的相对表达量极显著高于其他氯化钠浓度条件下的相对表达量($p < 0.01$),*inlB*基因的表达较好;氯化钠浓度为4.0%条件下的相对表达量(相对表达量为0.016034)显著低于其他氯化钠浓度条件下的相对表达量($p < 0.05$),对*inlB*基因的表达起抑制作用。实验结果表明,低盐度的条件下,能一定程度的促进*inlB*基因的表达,高盐度条件下抑制*inlB*基因的表达。

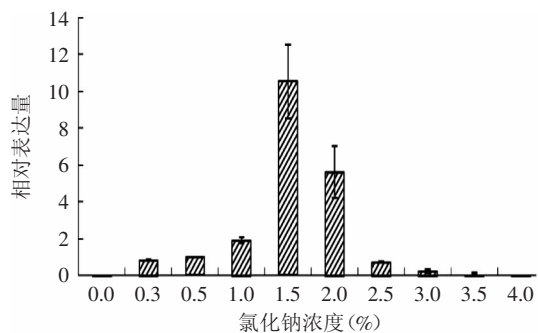


图4 氯化钠浓度对*inlB*基因表达的影响

Fig.4 Effect of NaCl concentration on *inlB* expression

2.6 蔗糖浓度对*inlB*基因表达的影响

由图5可知,蔗糖浓度为0.75%和1.25%条件下的相对表达量高于其他蔗糖浓度条件下的相对表达量,*inlB*基因的表达较好;蔗糖浓度为0%、0.25%和2.25%条件下的相对表达量低于其他蔗糖浓度条件下的相对表达量,对*inlB*基因的表达有一定的抑制。

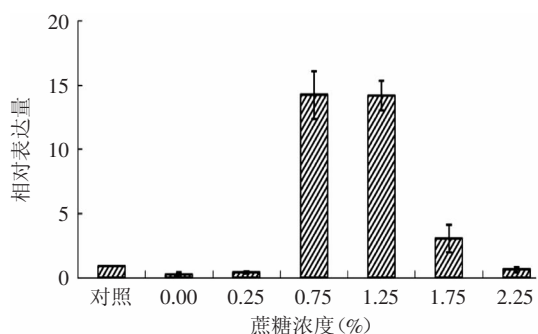


图5 蔗糖浓度(0%~2.25%)对*inlB*基因表达的影响

Fig.5 Effect of saccharose concentration (0%~2.25%) on *inlB* expression

在单增李斯特菌能够良好生长的条件范围内,选取了1%~21%的蔗糖浓度进行对*inlB*基因表达情况的研究,由图6可知,蔗糖浓度为1%条件下的相对表达量极显著高于其他蔗糖浓度条件下的相对表达量($p < 0.01$),*inlB*基因的表达较好;而蔗糖浓度为3%~21%条件下的相对表达量均较低。

实验结果表明,低蔗糖浓度条件下,能够一定程度的促进*inlB*基因的表达,高蔗糖浓度的条件下抑制*inlB*基因的表达。

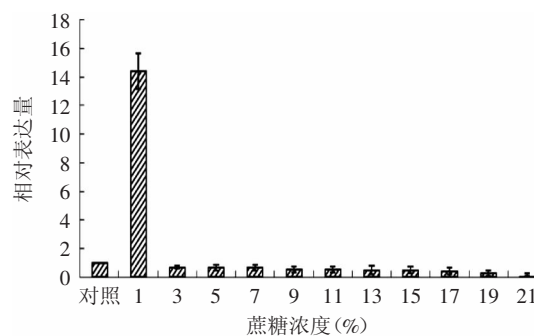


图6 蔗糖浓度(1%~21%)对*inlB*基因表达的影响

Fig.6 Effect of saccharose concentration (1%~21%) on *inlB* expression

2.7 酸对*inlB*基因表达的影响

分别选取醋酸、乳酸、柠檬酸和盐酸调节培养基pH为6,其中,乳酸、醋酸、柠檬酸为有机酸,盐酸为无机酸。由图7可知,在pH为6的条件下,酸的种类对*inlB*的表达没有显著的差异性。有关酸的种类对毒力基因表达的研究也有相关报道,Scott E Hanna等^[7]报道,选取醋酸、乳酸和盐酸调节培养基pH为5,其对毒力基因*inlA*表达没有差异性,其结论与所得结果一致。

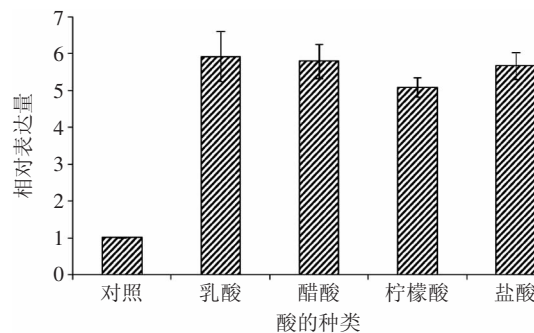


图7 酸的种类对*inlB*基因表达的影响

Fig.7 Effect of various acids on *inlB* expression

3 结论

*inlB*基因高效表达的pH为6的条件下,酸的种类对毒力基因*inlB*的表达没有明显的差异。毒力基因*inlB*在温度为15℃、pH为6、氯化钠浓度为1.5%~2.0%、蔗糖浓度为0.75%~1.25%时能高效表达;温度为0℃和45℃、pH为4和9、氯化钠浓度为3.5%以上以及蔗糖浓度为0%~0.25%和2.25%以上时,对毒力基因*inlB*的表达起明显的抑制作用;在pH为6的条件下,酸的种类对毒力基因*inlB*的表达影响不大。

参考文献

- [1] Gamble R, Muriana PM. Microplate fluorescence assay for measurement of the ability of strains of *Listeria monocytogenes* from meat and meat-processing plants to adhere to abiotic surfaces [J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(16): 5235-5244.
- [2] Englyst H N, Kingman S M, Cummings J H. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions [J]. Eur J Clin Nutr, 1992, 46(2): S33-S50.
- [3] Chan Y C, Wiedmann M. Physiology and genetics of *Listeria*

monocytogenes survival and growth at cold temperature[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2009, 49(3): 237-253.

[4] Hein I, Klein D, Lehner A, et al. Detection and quantification of the *iap* gene of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by a new real-time quantitative PCR assay[J]. Res Microbiol, 2001, 152(1): 37-46.

[5] Xiao L L, Hua L Z, Wang H. Critical issue in detecting viable *Listeria monocytogenes* cells by real-time reverse transcriptase PCR[J]. Journal of Food Protection, 2012, 75(3): 512-517.

[6] Rudol M, Scherer S. High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese[J]. Int J Food Microbiol, 2001, 63(1-2): 91-98.

[7] Scott E. Hanna, Wang H H. Assessment of Environmental Factors on *Listeria monocytogenes* Scott A *inlA* Gene Expression by Relative Quantitative Taqman Real-Time Reverse Transcriptase PCR[J]. Journal of Food Protection, 2006, 69(11): 2754-2757.

[8] 陈星. 副溶血弧菌毒力基因的表达变化研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2011.

[9] 王昊宇, 张公亮, 侯红漫. 应用SYBR Green I 溶解曲线检测食源性单增李斯特菌[J]. 食品工业科技, 2013, 34(10): 77-79.

[10] Gonzalez-Serrano C J, Santos J A, Garcia-Lopez M L, et al. Virulence makers in *Aeromonas veronii* biovar *sobria* isolates from fresh water fish and from a diarrhea case[J]. J Appl Microbiol, 2002, 93(3): 414-419.

(上接第167页)

法抗氧化反应机理的差异^[19-20], 类似结果也有报道。此外, 本研究样品并未在每种产品最佳冲泡条件下制得, 也导致其抗氧化评价的差异, 如抗氧化评价结果发现的抗氧化性较强的茶饮品昆仑雪菊、坨藏茶, 其感官评价得分较低, 所以冲泡方式的优化也是保证抗氧化活性的重要条件。杨玉琴等^[16]研究发现用不同温度的水冲泡柠檬时, 鲜柠檬中V_C含量随着温度的升高而逐渐减少, 所以宜用室温下的水冲泡新鲜柠檬, 干柠檬中V_C含量的变化先升高后降低, 最适合冲泡柠檬干的水的温度为50℃左右; 冲泡新鲜柠檬的时间不宜太长, 而冲泡干柠檬的时间应稍长。因此应当分别对茶水比、水温、以及冲泡时间进行优化实验, 每种茶以得到的最优化条件来制备茶饮产品样品再进行抗氧化测试。

本研究的结果证明苦荞茶具有一定的抗氧化性, 但其抗氧化能力在所评价的10种茶饮品中并不高, 说明作为茶饮品来利用苦荞资源, 对苦荞所含黄酮类物质的利用率是十分有限的, 这一方法还值得进一步探讨。

4 结论

在本研究的冲泡条件下, 大众消费者最易接受, 感官最优的是竹叶青。在对4个抗氧化指标的评价中, 竹叶青也表现出了较高的抗氧化性。干柠檬作为V_C含量丰富的产品, 在DPPH·清除率以及羟自由基清除率方面表现出较高活力, 被消费人群所能接受的程度也较高。综合评价, 干柠檬和竹叶青是在这样一种大众被接受程度最高且具有良好的抗氧化性的茶饮产品, 具有冲泡方便, 营养丰富, 抗氧化能力显著等特点。

参考文献

- [1] 黄建琴. 从消费趋势的变化谈21世纪茶业的发展[J]. 茶业通报, 2000, 22(4): 5-6.
- [2] 袁华芳. 黑茶化学成分及其抗氧化性的研究[D]. 大连: 辽宁师范大学, 2008: 77-78.
- [3] 潘卫仓. 茶多酚的功效及提取工艺研究进展[J]. 甘肃科技, 2011, 27(15): 57-58.
- [4] 王海燕, 戴前颖, 华再欣, 等. 皋茶保健茶的研制及体外抗

氧化活性的研究[J]. 中国农学通报, 2014, 30(24): 289-293.

[5] 龚恕, 阙斐. 绿茶不同冲饮方式的抗氧化性研究[J]. 现代农业科技, 2010(12): 322-325.

[6] 姜爱丽, 何煜波, 胡文忠, 等. 雅安藏茶的工艺特点与传承发展[J]. 食品工业科技, 2012, 33(17): 391-394.

[7] GB/T 23776—2009. 茶叶感官评审方法[J]. 北京: 中国标准出版社, 2009.

[8] 罗磊, 郭晓园. 金银花提取液抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2009, 30(21): 63-65.

[9] 岳金玖, 蒲彪, 陈安均, 等. 不同分子质量块菌多糖的体外抗氧化活性[J]. 食品科学, 2013, 34(13): 127-131.

[10] 成兰英, 梁书凤, 张治强. DPPH·法研究麦冬提取物抗氧化活性[J]. 精细化工, 2012, 29(9): 870-874.

[11] 顾林, 孙婧. 鲫鱼蛋白水解及其中性蛋白酶水解液抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2008, 29(8): 177-180.

[12] 孙晓雪, 安辛欣, 赵立艳, 等. 金针菇速溶粉的制备及体外抗氧化作用[J]. 食品工业科技, 2011, 32(6): 267-269.

[13] 晁正, 冉玉梅, 杨霞, 等. 麦麸中低聚木糖的制备及抗氧化活性研究[J]. 核农学报, 2014, 28(4): 655-661.

[14] 李春梅, 高山, 郭佳. 绿杨春绿茶的抗氧化作用[J]. 生物加工过程, 2014, 12(5): 69-73.

[15] 丁金祥, 黄昀, 李勇, 等. 茯砖茶抗氧化活性物质的提取工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(16): 12-14.

[16] 杨玉琴. 新鲜柠檬与柠檬干中V_C含量及最佳冲泡条件的探究[J]. 化学教学, 2008, 30(12): 34-35.

[17] 韦献雅, 殷丽琴, 钟成, 等. DPPH法评价抗氧化活性研究进展[J]. 食品科学, 2014, 35(9): 317-322.

[18] 段浩平, 张冬英, 龚舒静, 等. 苦荞茶黄酮类成分及茶渣营养成分研究[J]. 西南农业学报, 2014, 27(3): 1260-1263.

[19] Ou B, Huang D, Hampsch-Woodill M, et al. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(11): 3122-3130.

[20] Prior R L, Wu X., & Schaich K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(10): 4290-4302.