

黑果腺肋花楸花色苷的提取工艺优化及其稳定性

李雨浩¹, 张楠, 向珊珊, 张嘉颖, 吴傲, 孙爱东*

(北京林业大学生物科学与技术学院, 食品加工与安全北京市重点实验室, 北京 100083)

摘要:以黑果腺肋花楸果实作为原料, 采用单因素实验及正交法优化花色苷提取条件, 并测定在不同条件下对花色苷稳定性的影响。结果表明: 乙醇浓度 50%, 液料比 25:1 g/mL, 提取温度 55℃, 提取时间 60 min 为最佳提取条件, 此时黑果腺肋花楸花色苷提取量可达到 (4.32 ± 0.18) mg/g。当 $\text{pH} \leq 3$ 时, 花色苷呈红色且稳定性较强; 随着温度升高和光照时间增加, 花色苷极其不稳定, 溶液颜色逐渐变浅; 随着 H_2O_2 和 Na_2SO_3 浓度逐渐增加, 花色苷溶液逐渐褪色。黑果腺肋花楸花色苷在酸性条件下比较稳定, 且在加工运输保存时应尽量避免接触氧化剂和还原剂。

关键词:黑果腺肋花楸, 花色苷, 提取工艺, 稳定性

Optimization of Extraction Process and Stability of Anthocyanins from *Aronia melanocarpa*

LI Yu-hao¹, ZHANG Nan, XIANG Shan-shan, ZHANG Jia-ying, WU Ao, SUN Ai-dong*

(Key Laboratory of Food Processing and Safety, College of Biological Sciences and Biotechnology of Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: The extraction conditions of anthocyanins by single factor experiment and orthogonal method were optimized and the effect of different chemical conditions on the stability of anthocyanins of *Aronia melanocarpa* was evaluated using as raw material. The results demonstrated that, the optimum processing conditions were determined as follows: ethanol concentration 50%, liquid-solid ratio 25:1 g/mL, extraction temperature 55℃, extraction time 60 min, the extraction yield of anthocyanins reached (4.32 ± 0.18) mg/g under the best condition. Anthocyanins were red and stable under pH3. As the temperature and sunlight time increased, the anthocyanins were extremely unstable and the color gradually deepened. With the increase of concentration of H_2O_2 and Na_2SO_3 , the color of anthocyanin solution faded gradually. The anthocyanins were stable under acidic conditions and should avoid being exposed with oxidants and reducing agents during processing and transportation.

Key words: *Aronia melanocarpa*; anthocyanins; extraction; stability

中图分类号: TS255.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2019)03-0120-07

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2019.03.020

引文格式: 李雨浩, 张楠, 向珊珊, 等. 黑果腺肋花楸花色苷的提取工艺优化及其稳定性[J]. 食品工业科技, 2019, 40(3): 120-126.

黑果腺肋花楸 (*Aronia melanocarpa*) 又名不老莓, 属蔷薇科植物, 其原产地为北美的东部^[1], 是一种兼具营养价值与经济效益的独特小型浆果^[2]。果实中多酚类成分总含量高达 2.5%~3.5%^[3], 主要包含原花青素、花色苷、类黄酮等, 花色苷比例最高可达到 1% 左右^[4]。

近年来, 大量研究表明其花色苷提取物具有较强的抗氧化活性, 在抗癌、抗炎、降血糖、降血脂、防治心血管疾病等方面有很好的功效^[5-10], 引起国内外医药和食品界的重视。姚利阳等^[11]实验得出黑果花楸花色苷、总黄酮、多糖含量均高于蓝莓和蓝靛果, 含量分别为 0.352、2.636、1.764 mg/g; Kulling 等^[12]采

用氧自由基吸收能力测定法 (ORAC) 测得黑果腺肋花楸比蓝莓、黑莓、黑加仑等水果清除自由基的能力强, ORAC 值最高可达 158.2~160.2 $\mu\text{mol TE/g}$ 。目前国外对黑果腺肋花楸果实的研究主要体现在该果实中营养物质组成和鉴定^[13]、多酚类物质抗氧化性以及生物活性物质对人体代谢机理的影响^[14]等方面; 国内对黑果腺肋花楸的研究起步相对较晚, 对黑果腺肋花楸花色苷提取及稳定性系统研究较少, 国石磊等^[15]研究表明, 黑果腺肋花楸花色苷应保存在避光、低温、酸性条件下, 避免接触氧化剂、还原剂和 Cu^{2+} 、 Al^{3+} 、 Fe^{3+} 等金属离子。因此本文以溶剂种类、乙醇浓度、料液比、提取温度、提取时间为单因素, 采用正

收稿日期: 2018-05-17

作者简介: 李雨浩 (1994-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物与功能性食品, E-mail: 18614077603@163.com。

* 通讯作者: 孙爱东 (1968-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 天然产物生理活性物质的开发与利用, E-mail: adsun@bjfu.edu.cn。

交法优化黑果腺肋花楸花色苷提取条件,粗提物经 AB-8 大孔树脂纯化后,冷冻干燥制成粉末,进而测定不同 pH、温度、光照、氧化剂和还原剂对花色苷稳定性的影响。本文旨在有效提高黑果腺肋花楸花色苷粗提取率,为其稳定性研究提供理论支持,为其深加工和开发利用提供科学参考,并对其推广及功能性研究提供一定的基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

黑果腺肋花楸 产自吉林延边,-20℃冻藏备用;浓盐酸、醋酸钠、柠檬酸、无水乙醇、无水甲醇、氢氧化钠、亚硫酸钠、双氧水 均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

JYL-C012 九阳料理机 九阳股份有限公司;BSA224S 分析天平 SARTORIUS;RE-52AA 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂;V5800 紫外分光光度计 上海元析仪器有限公司;HL-2S 恒流泵 上海清浦沪西仪器厂;L3660D 低速离心机 上海知信试验仪器有限公司;XMTB 电热恒温水浴锅 天津市中环实验电炉有限公司;AB-8 大孔树脂 上海阿拉丁生化科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 黑果腺肋花楸花色苷样品的制备 花色苷粗提:取无霉烂、颗粒饱满的黑果腺肋花楸果实,常温解冻至浆果内外完全软化状态,去梗洗净,使用打浆机连续打浆 1 min,储藏于 4℃冰箱,待用。每次准确称取一定的黑果腺肋花楸匀浆,按一定的比例加入酸性提取溶剂,密封后放入水浴锅中在不同温度下浸提一定的时间。抽滤后在 50℃下旋转蒸发除去乙醇,粗提取液避光保存。

花色苷纯化:参考相关文献[16-17]方法并稍作修改。选用 AB-8 大孔树脂用无水乙醇浸泡 24 h,待完全溶胀后,用去离子水洗至无醇,然后用 5% HCl 溶液浸泡 12 h 后,用去离子水洗至中性;最后用 5% NaOH 溶液浸泡 12 h 后,用去离子水洗至中性;抽滤吸干树脂表面水分。采用湿法装柱,取 16 mm × 50 cm 的层析柱,装入的树脂为柱体积的 2/3,将黑果腺肋花楸花色苷粗提液以 1 mL/min 流速上柱吸附,吸附完后用 5 BV 去离子水洗去蛋白质、多糖等杂质;然后用 2.2 BV、pH2.0 的 80% 乙醇以 2.0 BV/h 流速洗脱,并采集洗脱液,蒸发收集液体中的乙醇溶剂,真空冷冻干燥机(冷阱温度-80℃)中干燥 24 h 后最终得到花色苷冻干粉,密封保存于 2 mL 试管,置于-20℃冰箱中,贮藏备用供稳定性及体外抗氧化实验测定。

1.2.2 单因素实验

1.2.2.1 溶剂种类对黑果腺肋花楸花色苷提取效果的影响 分别配制水、1% 柠檬酸、60% 乙醇、1% 柠檬酸+60% 乙醇、60% 甲醇、1% 柠檬酸+60% 甲醇六种试剂。以这六种不同的溶剂作为黑果腺肋花楸花色苷提取剂,取待测黑果腺肋花楸匀浆 6 份,每份 2.00 g,在料液比 1:20 g/mL,提取温度 25℃下浸提 60 min,以 4000 r/min 离心 10 min,分别吸取上清液

0.50 mL 进行吸光度测定。

1.2.2.2 溶剂体积分数对黑果腺肋花楸花色苷提取效果的影响 根据 1.2.2.1 结果选择最佳提取溶剂。取待测黑果腺肋花楸匀浆 5 份,每份 2.00 g,按照 1:20 g/mL 料液比分别依次加入含有 1% 柠檬酸的体积分数 20%、40%、60%、80%、100% 的乙醇,在 25℃的恒温水浴锅中浸提 60 min,以 4000 r/min 离心 10 min,分别吸取上清液 0.50 mL 进行吸光度测定。

1.2.2.3 提取时间对黑果腺肋花楸花色苷提取效果的影响 根据 1.2.2.1、1.2.2.2 结果选择最佳提取溶剂及其体积分数。取待测黑果腺肋花楸匀浆 5 份,每份 2.00 g,在料液比 1:20 g/mL,提取温度 25℃下分别浸提 30、60、90、120、150 min,以 4000 r/min 离心 10 min,分别吸取上清液 0.50 mL 进行吸光度测定。

1.2.2.4 提取温度对黑果腺肋花楸花色苷提取效果的影响 根据 1.2.2.1、1.2.2.2 结果选择最佳提取溶剂根据及其体积分数。取待测黑果腺肋花楸匀浆 5 份,每份 2.00 g,在料液比 1:20 g/mL,提取温度分别为 25、35、45、55、65℃下浸提 60 min,以 4000 r/min 离心 10 min,分别吸取上清液 0.50 mL 进行吸光度测定。

1.2.2.5 料液比对黑果腺肋花楸花色苷提取效果的影响 根据 1.2.2.1、1.2.2.2 结果选择最佳提取溶剂及其体积分数。取待测黑果腺肋花楸匀浆 5 份,每份 2.00 g,按照料液比 1:15、1:20、1:25、1:30、1:35 g/mL 分别加入含有 1% 柠檬酸的乙醇,提取温度 25℃下浸提 60 min,以 4000 r/min 离心 10 min,分别吸取上清液 0.50 mL 进行吸光度测定。

1.2.3 正交实验 根据单因素结果,以花色苷含量为指标,选择乙醇体积分数(A)、料液比(B)、提取温度(C)、提取时间(D)四个单因素进行正交优化实验,采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行四因素三水平正交试验设计,如表 1,确定黑果腺肋花楸花色苷的最佳提取工艺参数。

表 1 正交实验设计的因素水平表

Table 1 Factor level table of orthogonal experimental design

水平	因素			
	A 乙醇 体积分数 (%)	B 料液比 (g/mL)	C 提取温度 (℃)	D 提取时间 (min)
1	50	1:15	50	40
2	60	1:20	55	60
3	70	1:25	60	80

1.2.4 黑果腺肋花楸花色苷含量和色泽保存率的测定

1.2.4.1 黑果腺肋花楸花色苷含量的测定 通过 pH 示差法^[18]测定,移取黑果腺肋花楸提取液 0.5 mL,分别加入 pH1.0 和 pH4.5 的缓冲溶液 10 mL。置于 4℃冰箱平衡 60 min,稳定后用 V5800 紫外分光光度计分别在 520、700 nm 处测定花色苷溶液的吸光值,采用公式(1)计算黑果腺肋花楸提取液中花色苷含量。

$$\text{花色苷得率}(\text{mg/g}) = \frac{A \times M \times DF \times V}{\varepsilon \times L \times W} \quad \text{式(1)}$$

式中: A 为吸光度, $A = (A_{520} - A_{700}) \text{pH}1.0 - (A_{520} - A_{700}) \text{pH}4.5$; M 为矢车菊-3-葡萄糖苷分子量, 449.2; DF 为稀释因子; V 为最终提取液体积, mL; ϵ 为矢车菊-3-葡萄糖苷的消光系数, 26900; L 为光程, 1 cm; W 为原料质量, mg。

1.2.4.2 黑果腺肋花楸花色苷色泽保存率的计算 参考孙文娟^[19]论文方法, 采用公式(2)计算黑果腺肋花楸提取液中花色苷色泽保存率。

$$\text{色泽保存率}(\%) = \frac{A_1}{A_2} \times 100 \quad \text{式(2)}$$

式中: A_1 , 样品处理后吸光度值; A_2 , 样品初始吸光度值。

1.2.5 黑果腺肋花楸花色苷的稳定性测定

1.2.5.1 pH 对黑果腺肋花楸花色苷稳定性的影响 参考江澜等^[20]的方法, 稍作修改。准确量取 0.10 mg/mL 黑果腺肋花楸花色苷水溶液 11 份, 每份 10 mL, 用不同浓度氢氧化钠溶液和盐酸溶液配制 pH1~11 的溶液, 使花色苷溶液处于 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0 的环境溶液中, 摇匀后室温下避光静置 90 min, 测定 520 nm 下的溶液吸光值, 对照组为未调节 pH 的样品溶液。

1.2.5.2 光照对黑果腺肋花楸花色苷稳定性的影响 参考赵慧^[21]的方法, 稍作修改。准确量取 0.1 mg/mL 黑果腺肋花楸花色苷水溶液 6 份并分两组, 每份 10 mL, 用不同浓度氢氧化钠溶液和盐酸溶液配制 pH2~4 的溶液, 使两组置于 pH 分别为 2.0、3.0、4.0 的环境溶液中, 一组置于自然光照, 另一组避光处理。测定周期为 5 d, 每天定时取样后, 测定 520 nm 下的溶液吸光值。

1.2.5.3 温度对黑果腺肋花楸花色苷稳定性的影响 参考江澜等^[20]的方法, 稍作修改。准确量取 0.1 mg/mL 黑果腺肋花楸花色苷水溶液 6 份, 每份 15 mL, 将其置于 4、25、37、55、75、100 °C 下, 保鲜膜封口加热 3 h, 每隔 1 h 测定, 取样时迅速冷却至室温, 测定 520 nm 下的溶液吸光值。

1.2.5.4 氧化剂和还原剂对黑果腺肋花楸花色苷稳定性的影响 参考刘芳芳等^[22]的方法, 稍作修改。分别配制 Na_2SO_3 浓度为 0.5%、1%、5%、10% 的花色苷水溶液以及 H_2O_2 浓度为 5、10、20、30 mmol/L 的花色苷水溶液, 室温避光静置 2 h, 每隔 30 min 测定 520 nm 下的溶液吸光值。

1.3 数据处理

每个结果重复处理 3 次, 实验数据使用 Origin 7.5 进行整理和作图, 并采用 SPSS 19.0 软件对实验数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 黑果腺肋花楸花色苷提取的单因素实验结果

2.1.1 溶剂种类对黑果腺肋花楸花色苷提取效果的影响 由图 1 可知, 不同提取溶剂对黑果腺肋花楸花色苷提取量影响差异较大。1% 柠檬酸 + 60% 乙醇溶剂提取效果最佳, 花色苷提取量可达 3.85 mg/g; 水溶剂提取最差, 花色苷含量为 2.12 mg/g。醇提效果明显高于水提效果, 这与花色苷属于水溶性多酚

类物质, 在有机醇溶剂中的极性较强有关; 酸性溶剂的提取效果比同种非酸性溶剂的提取效果好, 这是因为花色苷在弱酸性环境中稳定, 在中性及碱性下不稳定, 结构易被破坏有关。因此选择含 1% 柠檬酸的 60% 乙醇溶液作为本试验的提取溶剂。

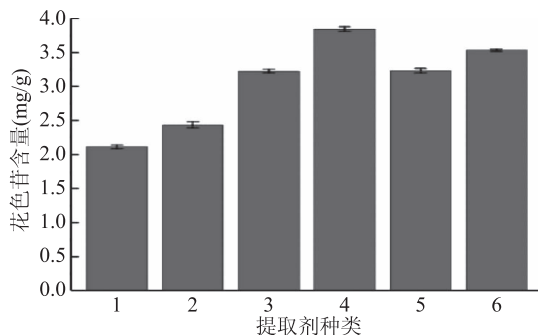


图1 溶剂种类对黑果腺肋花楸花色苷提取量的影响

Fig.1 Effects of solvent type on anthocyanin

extraction from *Aronia melanocarpa*

注: 1: 水; 2: 1% 柠檬酸; 3: 60% 乙醇;

4: 1% 柠檬酸 + 60% 乙醇; 5: 60% 甲醇; 6: 1% 柠檬酸 + 60% 甲醇。

2.1.2 溶剂体积分数对黑果腺肋花楸花色苷提取效果的影响 由图 2 可知, 当乙醇体积分数小于 60% 时, 花色苷提取量与乙醇体积分数成正比; 乙醇体积分数为 60% 时, 花色苷提取量最高为 3.62 mg/g, 乙醇体积分数大于 60% 时, 花色苷的提取得率逐渐降低。此趋势的原因可能与花色苷溶液与 60% 乙醇的极性更相近有关; 在乙醇体积分数较低的溶液体系中, 由于花色苷的有效溶出率受水溶性较好的物质影响很大, 从而导致提取效果较差^[25]; 但在乙醇体积分数过高的溶液体系中, 随着脂溶性物质的不断溶出, 花色苷溶解度也随之下降, 造成提取效果变差。

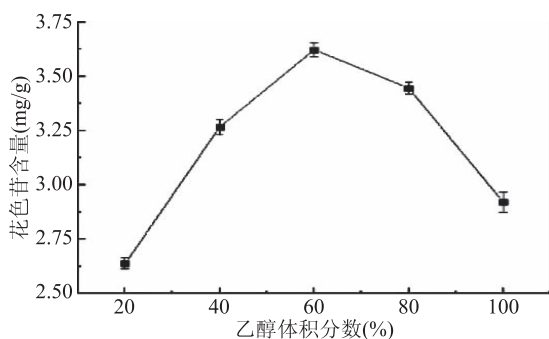


图2 乙醇体积分数对黑果腺肋花楸花色苷提取量的影响

Fig.2 Effects of ethanol volume

on anthocyanin extraction from *Aronia melanocarpa*

2.1.3 提取时间对黑果腺肋花楸花色苷提取效果的影响 由图 3 可知, 随着提取时间的增加, 黑果腺肋花楸花色苷的提取含量呈现先升后降的趋势, 在提取时间为 60 min 时达到顶峰, 此时花色苷的提取量为 3.65 mg/g。呈现此变化的原因可能是随着时间的增加, 花色苷逐渐溶出, 导致提取量增加; 而随着提取时间的持续延长, 花色苷被充分提取, 同时提取温度过高, 花色苷稳定性较低, 导致被氧化, 从而使其含量降低^[26]。

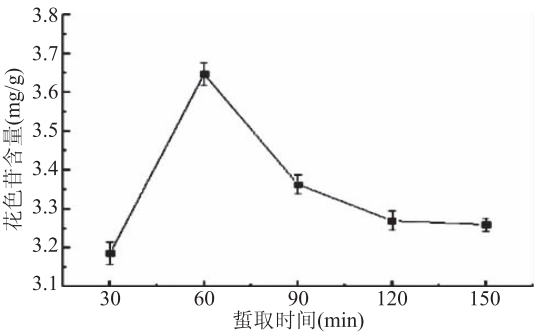


图3 提取时间对黑果腺肋花楸花色苷提取量的影响

Fig.3 Effects of extraction time

on anthocyanin extraction from *Aronia melanocarpa*

2.1.4 提取温度对黑果腺肋花楸花色苷提取效果的影响 由图4可知,一定范围的温度升高,花色苷提取量增加,55℃时达到最大值,其提取量为4.28 mg/g;温度继续上升,花色苷的提取量急剧下降。由此可见,黑果腺肋花楸花色苷的热稳定性很差,提取温度过高会破坏C位结构,导致花色苷被降解,影响提取效果^[27]。

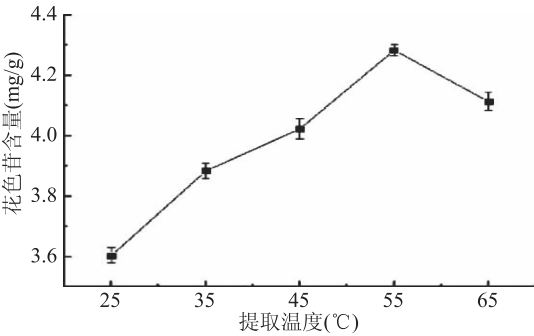


图4 提取温度对黑果腺肋花楸花色苷提取量的影响

Fig.4 Effects of extraction temperature

on anthocyanin extraction from *Aronia melanocarpa*

2.1.5 料液比对黑果腺肋花楸花色苷提取效果的影响 由图5可知,当料液比从1:15~1:20 g/mL时,花色苷提取量逐渐上升;当料液比为1:20 g/mL时达到最大,花色苷提取量为3.71 mg/g;但当料液比大于1:20 g/mL时,花色苷的含量开始下降。呈现这种先上升后下降的趋势的原因可能是当料液比较小时,花色苷在溶液中达到过饱和状态,但当料液比接

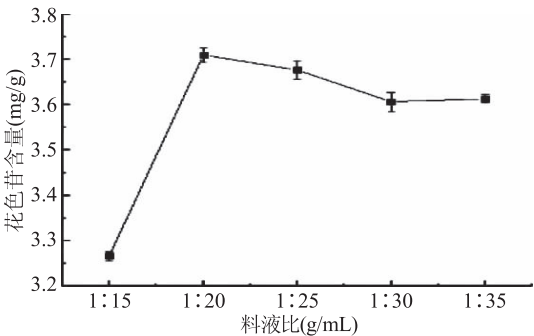


图5 料液比对黑果腺肋花楸花色苷提取量的影响

Fig.5 Effects of solid-liquid ratio

on anthocyanin extraction from *Aronia melanocarpa*

近1:20 g/mL时,原来过饱和状态下的花色苷溶液全部溶解于溶剂中;当料液比超过1:20 g/mL后,由于此时花色苷分子间的作用力减弱,稳定性降低容易被分解,导致总花色苷得率下降^[19]。

2.2 黑果腺肋花楸花色苷提取的正交实验结果

黑果腺肋花楸花色苷提取正交试验结果如表2所示,方差分析结果如表3所示。以花色苷提取量为检测指标。

表2 苷正交试验结果

Table 2 The results of orthogonal test

试验号	A	B	C	D	花色苷含量 (mg/g)
1	1	1	1	1	3.24
2	1	2	2	2	4.22
3	1	3	3	3	3.54
4	2	1	2	3	3.47
5	2	2	3	1	3.26
6	2	3	1	2	3.41
7	3	1	3	2	2.91
8	3	2	1	3	3.01
9	3	3	2	1	3.56
k ₁	3.667	3.207	3.220	3.353	
k ₂	3.380	3.497	3.750	3.513	
k ₃	3.160	3.503	3.237	3.340	
R	0.507	0.296	0.530	0.173	

表3 正交试验方差分析

Table 3 Variance analysis of orthogonal test

方差来源	偏差平方和	自由度	F比	F _{0.05}	显著性
A	0.387	2	6.911	9.000	
B	0.172	2	3.071	9.000	
C	0.504	2	9.732	9.000	*
D	0.056	2	1.000	9.000	
误差	0.06	2			

由R值分析可知,影响黑果腺肋花楸花色苷提取率的各因素主次顺序为提取温度>乙醇体积分数>料液比>提取时间,所以适当地升高温度可以促进黑果腺肋花楸花色苷溶出,但温度过高会对花色苷的结构甚至活性等都造成很大破坏。由k₁、k₂、k₃值可以确定出溶剂浸提提取黑果腺肋花楸花色苷的最佳方案为A₁B₃C₂D₂:乙醇体积分数50%,液料比25:1 g/mL,提取温度55℃,提取时间60 min,通过验证试验,按上述优选工艺平行提取3次,求得花色苷含量为(4.32±0.18) mg/g,与正交表格中A₁B₂C₂D₂花色苷提取量4.22 mg/g进行比较,表明试验所确定的A₁B₃C₂D₂为较优工艺。根据方差分析表,F_C>F_A>F_B>F_D,由此可知提取温度对花色苷提取效果的影响高于乙醇体积分数、料液比和提取时间,由F_C>F_{0.05},提取温度对花色苷提取的效果影响显著。

2.3 黑果腺肋花楸花色苷的稳定性测定结果

2.3.1 pH对黑果腺肋花楸花色苷稳定性的影

表4 pH对黑果腺肋花楸花色苷稳定性的影响

Table 4 Effects of pH on stability of anthocyanin from *Aronia melanocarpa*

pH	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	对照(CK)
颜色	亮红	深红	桃红	浅红	浅紫红	淡黄	淡黄	亮黄	亮黄	深黄	棕黄	粉红
A ₅₂₀	0.999	0.889	0.559	0.134	0.108	0.196	0.195	0.200	0.202	0.199	0.177	0.230

响 由表4可知,黑果腺肋花楸花色苷稳定性受pH影响很大,其原因是不同的pH会使花色苷化学结构发生转变。当pH≤3.0时,果汁颜色几乎为红色,其原因为在酸性环境下黑果腺肋花楸花色苷主要以红色吡喃阳离子结构存在;当pH接近7.0时,果汁颜色呈现淡黄,这是因为在中性环境中主要是存在的形式为无色查尔酮;当pH大于7.0之后,溶液逐渐形成深黄色,这是因为在碱性环境下,花色苷的主要存在形式是蓝绿色醌示结构^[19]。由此可知,当pH为1.0时,黑果腺肋花楸花色苷溶液吸光值最高,呈现亮红色,pH≥4.0时溶液颜色逐渐失去红色,因此pH≤3.0时,黑果腺肋花楸花色苷呈红色且稳定性较强,利于保存。

2.3.2 光照对黑果腺肋花楸花色苷稳定性的影响 由图6可知,不同pH黑果腺肋花楸花色苷水溶液在光照和避光条件下稳定性差异明显。避光保存5d后pH2.0花色苷水溶液吸光度值从0.895下降到0.809,说明在避光条件下,酸性环境使得花色苷稳定性较好,随着pH的升高,吸光度明显下降,说明色素逐渐开始降解褪色;第3d,pH4.0和对照组的花色苷水溶液均出现白色絮状沉淀物。光照处理5d后pH2.0花色苷水溶液吸光度值从0.895下降到0.488,吸光度值急剧下降,说明光照对花色苷的稳定性破坏较强;第3d开始,光照组所有样品开始出现白色絮状沉淀物。不同pH黑果腺肋花楸花色苷水溶液

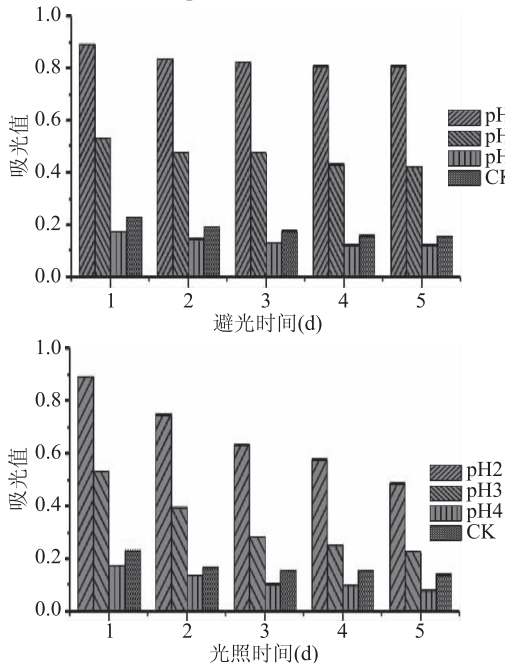


图6 光照对黑果腺肋花楸花色苷稳定性的影响

Fig.6 Effects of light on stability of anthocyanin from *Aronia melanocarpa*

的吸光值在光照条件下均比避光条件小,避光褪色慢,光照褪色快。可能是因为花色苷在光照条件下酰基脱落,导致稳定性下降。综上所述,避光环境比光照环境更利于花色苷水溶液的稳定性;酸性环境pH2.0相对其他pH条件更利于花色苷水溶液结构保持稳定。

2.3.3 温度对黑果腺肋花楸花色苷稳定性的影响

由图7可知,加热温度和时间对花色苷水溶液的稳定性影响较大。加热温度和时间升高都会导致花色苷水溶液的吸光度值降低,颜色变浅,色泽保存率减小。加热3h后,在75℃时,温度的增加对花色苷稳定性影响较弱,吸光度值从0.208下降到0.153;色泽保存率从100%下降到73.6%;100℃时,吸光度值下降到0.074,色泽保存率下降到35.6%。由此可见,黑果腺肋花楸花色苷在75℃以内,具有较强的热稳定性,随着温度的升高,其耐热性逐渐降低,这可能是在高温条件下花色苷易氧化褪色^[28]。

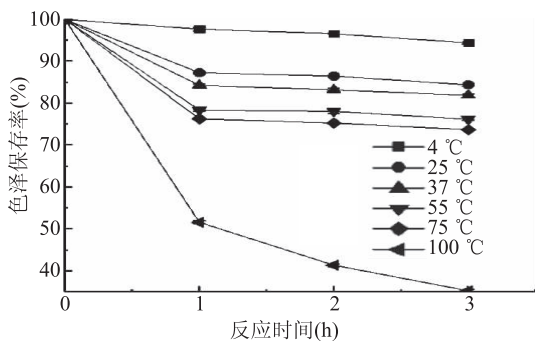


图7 温度对黑果腺肋花楸花色苷色泽保存率的影响

Fig.7 Effects of temperature on color stability of anthocyanin from *Aronia melanocarpa*

2.3.4 氧化剂和还原剂对黑果腺肋花楸花色苷稳定性的影响

由图8可知,在本文所选H₂O₂浓度范围内,添加4种不同浓度H₂O₂后,黑果腺肋花楸花色苷溶液吸光度值呈不同程度的下降趋势。添加H₂O₂后花色苷溶液吸光度值从一开始就明显低于CK组,随着H₂O₂浓度不断增大,花色苷吸光度值快速下降,当其浓度达到5%之后,花色苷的吸光度值趋于稳定;随着时间增加,不同浓度的H₂O₂花色苷溶液吸光度值总体呈现逐渐降低的趋势;色泽方面,H₂O₂浓度越大,花色苷溶液越接近无色,说明花色苷的破坏很严重。其原因可能是H₂O₂是亲核性质,花色苷的C位比较容易受到攻击,导致吡喃还阳离子被破坏,生成无色查尔酮物质,继续降解成各种无色脂类以及香豆素衍生物^[29],或者相互作用发生聚合形成沉淀。

由图9可知,在本文所选Na₂SO₃浓度范围内,添加4种不同浓度Na₂SO₃后,黑果腺肋花楸花色苷溶液吸光度值均呈不同程度的急剧下降趋势,且

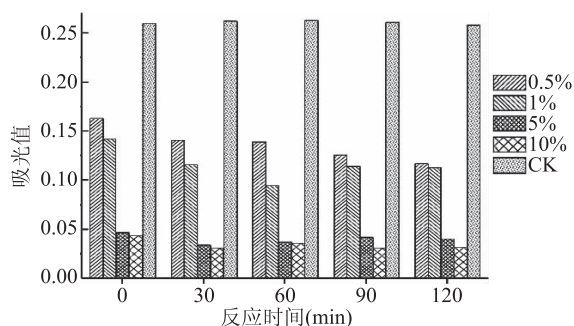


图8 氧化剂对黑果腺肋花楸花色苷稳定性的影响

Fig.8 Effects of the oxidant on stability of anthocyanin from *Aronia melanocarpa*

Na_2SO_3 浓度越大,吸光度值下降越多。不同于氧化剂对花色苷的影响,花色苷溶液的吸光值随着反应时间的增加趋于平缓,但色泽逐渐变浅。说明黑果腺肋花楸花色苷的稳定性受还原剂 Na_2SO_3 的影响也很大,且是一个快速反应的过程, Na_2SO_3 的浓度越大,花色苷的降解率就越快。其原因可能是花色苷溶液属于酸性溶液,在酸性环境下,亚硫酸根会形成亚硫酸氢根,进而亲核攻击花色苷 C 位^[30],形成无色的花色苷烟硫酸盐复合物,导致颜色变浅;还有可能是 Na_2SO_3 具有漂白作用,导致溶液颜色变浅。

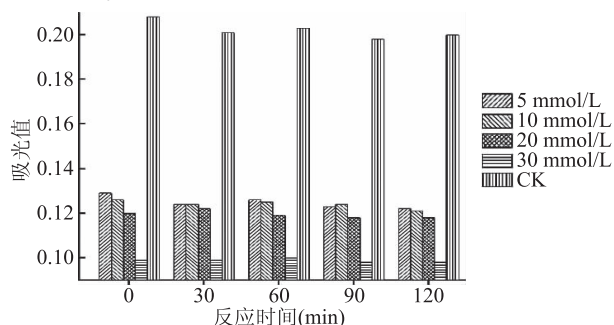


图9 还原剂对黑果腺肋花楸花色苷稳定性的影响

Fig.9 Effects of the deoxidizer on stability of anthocyanin from *Aronia melanocarpa*

3 结论

采用正交法对黑果腺肋花楸花色苷的提取条件进行优化,最佳提取条件为:乙醇体积分数 50%、液料比 25:1 g/mL、提取温度 55℃、提取时间 60 min,此条件下黑果腺肋花楸花色苷提取量可达到 (4.32 ± 0.18) mg/g。通过实验表明,当 pH 为 1.0 时,黑果腺肋花楸花色苷溶液吸光值最高,呈现亮红色, $\text{pH} \geq 4.0$ 时溶液颜色逐渐失去红色,因此黑果腺肋花楸花色苷应在酸性条件下比较稳定。

黑果腺肋花楸花色苷溶液吸光值随着温度的升高和光照时间的增加逐渐变小,避光环境比光照环境更利于花色苷水溶液保存;加工热处理温度应保持在 75℃ 内,储藏时应存放于 4℃ 冰箱。氧化剂 H_2O_2 和还原剂 Na_2SO_3 对黑果腺肋花楸花色苷溶液均会造成不同程度的破坏,在加工运输保存时应尽量避免接触此类氧化剂和还原剂。

在后续的研究中,拟采用多种方法对比提取黑果腺肋花楸花色苷;在稳定性方面拟采用多种方法

提升花色苷的稳定性,如化学方法修饰花色苷结构或采用蛋白包埋花色苷的方式提升花色苷的稳定性。

参考文献

- [1] Phillips G O. An introduction: Evolution and finalisation of the regulatory definition of dietary fibre [J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25 (2): 139-143.
- [2] 李斌,高凝轩,刘辉,等.大孔树脂纯化黑果腺肋花楸多酚的工艺优化[J].食品科学,2016,37(16):69-74.
- [3] Kokotkiewicz A, Jaremicz Z, Luczkiewicz M. Aronia plants: a review of traditional use, biological activities, and perspectives for modern medicine [J]. Journal of Medicinal Food, 2010, 13 (13): 255-269.
- [4] 李梦莎.响应面法优化超声提取黑果腺肋花楸花色苷工艺的研究[J].中国酿造,2014,33(9):129-133.
- [5] Yousuf B, Gul K, Wani A A, et al. Health benefits of anthocyanins and their encapsulation for potential use in food systems: A review [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2016, 56 (13): 2223-2230.
- [6] Stanisavljević N, Samardžić J, Janković T, et al. Antioxidant and antiproliferative activity of chokeberry juice phenolics during *in vitro*, simulated digestion in the presence of food matrix [J]. Food Chemistry, 2015, 175 (175): 516-522.
- [7] Badescu M, Badulescu O, Badescu L, et al. Effects of *Sambucus nigra* and *Aronia melanocarpa* extracts on immune system disorders within diabetes mellitus [J]. Pharmaceutical Biology, 2015, 53 (4): 533.
- [8] Jurgosiński A, Juśkiewicz J, Zduńczyk Z. Ingestion of black chokeberry fruit extract leads to intestinal and systemic changes in a rat model of prediabetes and hyperlipidemia [J]. Plant Foods for Human Nutrition, 2008, 63 (4): 176-182.
- [9] Kim B, Park Y, Wegner C J, et al. Polyphenol-rich black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) extract regulates the expression of genes critical for intestinal cholesterol flux in Caco-2 cells [J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2013, 24 (9): 1564-1570.
- [10] Nielsen I L F, Dragsted L O, Ravn-Haren G, et al. Absorption and excretion of black currant anthocyanins in humans and watanabe heritable hyperlipidemic rabbits [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2003, 51 (9): 2813-2820.
- [11] 姚利阳,张宇,张立宇,等.黑果花楸与 2 种小浆果中黄酮类物质及多糖含量比较[J].安徽农业科学,2016(1):122-124.
- [12] Kulling S, Rawel H. Chokeberry (*Aronia melanocarpa*): A review on the characteristic components and potential health effects [J]. Planta Medica, 2008, 74 (13): 1625-1634.
- [13] Ochmian I D, Grajkowski J, Milosz Smolik. Comparison of some morphological features, quality and chemical content of four cultivars of chokeberry fruits (*Aronia melanocarpa*) [J]. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj - Napoca, 2012, 40 (1): 253-260.
- [14] Ma gorzata ZielińskaPrzyjemnska, Olejnik A, Agnieszka DobrowolskaZachwieja, et al. Effects of *Aronia melanocarpa* polyphenols on oxidative metabolism and apoptosis of neutrophils

from obese and non-obese individuals [J]. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 2007, 6(3): 25-29.

[15] 国石磊, 朱凤妹, 王娜, 等. 黑果腺肋花楸花色苷树脂纯化工艺及其稳定性研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2015, 27(9): 1636-1642.

[16] 周桃英, 罗登宏, 李国庆, 等. AB-8 大孔树脂纯化荷叶总黄酮的工艺研究[J]. *中国食品添加剂*, 2009(5): 113-119.

[17] 朱月, 李奋梅, 王艳丽, 等. 黑果腺肋花楸原花青素的提取及抑菌性研究[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(2): 302-306.

[18] 郑悦, 王萍. 黑果花楸花色苷提取、纯化工艺研究[J]. *北京林业大学学报*, 2016, 38(11): 118-124.

[19] 孙文娟. 紫薯花色苷提取, 脱味, 稳定性及其结构初步鉴定[D]. 无锡: 江南大学, 2015.

[20] 江澜. 紫薯花色苷的提取纯化分析及其应用[D]. 保定: 河北农业大学, 2015.

[21] 赵慧. 美国黑莓果实中花色苷的提取纯化、稳定性及抗氧化活性研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2010.

[22] 刘芳芳, 鲁亚星, 于帅, 等. 黑果腺肋花楸花青素的提取工艺及其稳定性[J]. *延边大学农学学报*, 2015, 37(3):

196-201.

[23] 陆卿卿. 蓝莓汁中花色苷稳定性及抗氧化活性的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2013.

[24] 孙希云, 刘宁, 吴朝霞, 等. 红树莓色素的纯化及成分初步鉴定[J]. *食品工业科技*, 2011, 32(2): 285-288.

[25] 李金星, 胡志和, 马立志, 等. 超声波辅助提取蓝莓果渣中花色苷的条件研究[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(20): 255-259.

[26] 邓浩, 张容鹤, 梁振益, 等. 木奶果花色苷提取纯化及其抗氧化活性研究[J]. *食品研究与开发*, 2016, 37(21): 32-36.

[27] 石光, 张春枝, 陈莉, 等. 蓝莓果实中花色苷提取工艺的研究[J]. *食品研究与开发*, 2008, 29(4): 7-10.

[28] 植中强, 李红缨, 杨海贵. 天然食用色素提取工艺与稳定性研究的状况[J]. *广州化工*, 1999(4): 18-20.

[29] 谢程程, 王勇, 宫立晶. 天然食用色素紫甘薯花青素的稳定性研究[J]. *食品工业*, 2012(6): 99-102.

[30] 刘艳杰. 紫薯花色苷的提取纯化和组分分析及稳定性研究[D]. 上海: 上海应用技术学院, 2012.

(上接第 115 页)

[15] Guan Z W, Wang S L, Li Y, et al. Kinetics of plasma membrane and mitochondrial alteration in HL-60 cells undergoing apoptosis[J]. *Journal of Hygiene Research*, 2000, 29(2): 83-86.

[16] Qi A Q, Qian K X, Shao J Z, et al. A fluorometry method to determine cell viability by double staining with fluorescein diacetate and propidium iodide [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2000, 22(1): 50-53.

[17] John A R, Sasalu C S, Peter J, et al. Properties and structure-activity studies of cyclic β -hair-pin peptidomimetics based on the cationic antimicrobial peptide protegrin I [J]. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2005, 13: 2055-2064.

[18] 杨丽莉, 吕凤霞, 别小妹, 等. 枯草芽孢杆菌抗菌脂肽对嗜水气单胞菌抑菌效果[J]. *食品科学*, 2011, 32(1): 193-198.

[19] 卢群, 丘泰球. 超声波辐照对大肠杆菌细胞膜的影响[J]. *华南理工大学学报: 自然科学版*, 2006, 34(12): 51-65.

[20] Guo Y, Ren Z H Y, Hou X. Fluorescence methods for analyzing intracellular second messenger calcium ion [J]. *Laser Journal*, 2003, 24(1): 1-5.

[21] Sergio H Marshall. Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology [J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2003, 6(3): 262-275.

[22] Yeaman M R, Yount N Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance [J]. *Pharmacological Reviews*, 2003, 55(1): 47-55.

[23] Patel PS, Huang S, Fisher S, et al. Bacillaecine, a novel inhibitor of prokaryotic protein synthesis produced by *Bacillus subtilis*: production, taxonomy, isolation, physicochemical characterization and biological activity [J]. *J Antibiotics*, 1995, 48(9): 997-1003.

[24] Stinson M, Ezraa D, Hess W M, et al. An endophytic *Gliocladium* sp. of *Eucriphia cordifolia* producing selective volatile antimicrobial compounds [J]. *Plant Science*, 2003, 165(4): 913-922.

[25] Vater J, Kablitz B, Wilde C, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68: 6210-6219.

[26] 黄华毅, 王佳琳, 马荣, 等. 枯草芽孢杆菌 STO-12 抑菌活性及其抑菌物质分析[J]. *浙江农业学报*, 2017, 29(1): 81-88.

[27] 张雯, 卞丹, 沈燕秋等. 枯草芽孢杆菌抑菌活性物质鉴定、抑菌特性及发酵条件优化[J]. *中国食品学报*, 2017, 12(12): 105-115.

一套《食品工业科技》在手， 纵观食品工业发展全貌