

超声波辅助酶法提取蓝莓果渣花色苷的 工艺优化及降解动力学

张秀娟^{1,2,3,4,5}, 刘治廷^{1,2,3,4,5}, 杨诗涵^{1,2,3,4,5},
张金山^{1,2,3,4,5}, 陈小强^{1,2,3,4,5,6}, 张莹^{1,2,3,4,5*}

(1. 东北林业大学 森林植物生态学教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 东北林业大学 化学化工与资源利用学院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 3. 东北林业大学 林业生物制剂教育部工程中心, 黑龙江 哈尔滨 150040; 4. 黑龙江省林源活性物质生态利用重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040; 5. 东北林业大学 生物资源生态利用国家地方联合工程实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040; 6. 西藏农牧学院 资源与环境学院, 西藏 林芝 860000)

摘要: 以蓝莓果渣为原材料, 在单因素实验基础上通过响应面优化得到超声波辅助酶法提取蓝莓果渣花色苷的最佳工艺, 并通过构建降解动力学模型考察不同光照条件和温度对花色苷稳定性的影响。结果表明, 超声波辅助酶法提取蓝莓花色苷的最佳工艺参数为: 乙醇体积分数 60%、液料比 40 : 1 (mL : g, 液指提取液总体积, 料指所用原材料质量)、酶解时间 80 min。在该条件下, 花色苷得率为 (10.571±0.080) mg/g。花色苷在不同光照条件和温度下随时间变化的降解模型均符合零级动力学方程。紫外光、室内日光灯、室温避光条件对花色苷稳定性影响程度依次减弱, 4 °C 下保存花色苷损失量仅为 5.5%; 在 40~80 °C 内, 花色苷的热降解速率随着温度的升高而增加, 半衰期随着温度的升高而降低, 温度系数随温度的升高而增大, 活化能为 53.2960 kJ/mol。此外, 由热力学参数可知, 花色苷热降解为非自发反应。

关键词: 蓝莓果渣; 生物酶; 花色苷; 响应面优化; 降解动力学; 稳定性; 分离提纯技术

中图分类号: R284.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2022) 10-2069-10

Condition optimization and degradation kinetics of anthocyanins from blueberry pomace by ultrasonic-assisted enzymatic extraction

ZHANG Xiujuan^{1,2,3,4,5}, LIU Zhiting^{1,2,3,4,5}, YANG Shihan^{1,2,3,4,5},
ZHANG Jinshan^{1,2,3,4,5}, CHEN Xiaoqiang^{1,2,3,4,5,6}, ZHANG Ying^{1,2,3,4,5*}

(1. Key Laboratory of Forest Plant Ecology, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China; 2. College of Chemistry, Chemical Engineering and Resource Utilization, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China; 3. Engineering Research Center of Forest Bio-Preparation, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China; 4. Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Ecological Utilization of Forestry-Based Active Substances, Northeast Forestry University Harbin 150040, Heilongjiang, China; 5. National Engineering Laboratory for Bio-Resource Eco-Utilization, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China; 6. College of Resources and Environment, Tibet Agriculture & Animal Husbandry University, Nyingchi 860000, Tibet, China)

Abstract: The optimal extraction parameters of anthocyanins from blueberry pomace was obtained through response surface optimization based on single factor experiment, and the effects of different light conditions and temperature on the stability of anthocyanins were investigated by degradation kinetics modelling. The results showed that the optimal yield of anthocyanins (10.571±0.080) mg/g was obtained when ethanol volume fraction 60%, liquid-material ratio 40 : 1 (mL : g, liquid refers to the total volume of extraction

收稿日期: 2022-03-19; 定用日期: 2022-05-19; DOI: 10.13550/j.jxhg.20220227

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目 (LH20202C036); 西藏农牧学院林学学科创新团队建设 (藏财预指 2020-001)

作者简介: 张秀娟 (1997—), 女, 硕士生, E-mail: 1966132540@qq.com。联系人: 张莹 (1975—) 女, 副研究员, E-mail: yingzhang@nefu.edu.cn。

liquid, material refers to the quality of raw materials used), enzymatic hydrolysis time 80 min. The thermal degradation process of anthocyanins under different light conditions and temperature fitted to the zero-order kinetic equation. The influence of UV light, fluorescent lamp and dark conditions on the stability of anthocyanins gradually decreased, and the loss of anthocyanins was only 5.5% when stored at 4 °C. In the range of 40~80 °C, the thermal degradation rate of anthocyanins and the temperature coefficient increased while the half-life decreased with the rise of temperature with the activation energy 53.2960 kJ/mol. Moreover, the thermodynamic parameters suggested that the thermal degradation of anthocyanins was non-spontaneous.

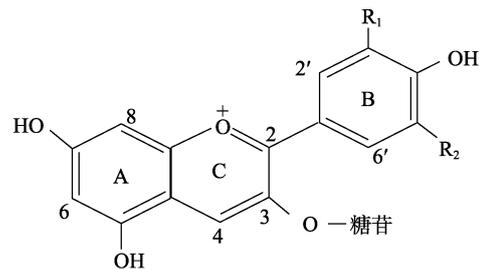
Key words: blueberry pomace; biological enzymes; anthocyanins; responsesurface optimization; degradation kinetic; stability; separation and purification technology

蓝莓为杜鹃花科植物笃斯越桔 (*Vaccinium uliginosum*) 的成熟果实, 果实呈蓝色, 富含多种营养物质, 为药食两用的功能性保健水果^[1]。具有改善视力、缓解眼睛疲劳、预防癌症、延缓皮肤衰老、抗炎、抗过敏、预防高血压、减少人体胆固醇积累、改善心血管功能等作用^[2-3]。根据国际蓝莓协会数据, 中国已成为全球最大的蓝莓种植基地, 2020 年中国蓝莓产量为 28.5 万 t, 其中 15.4 万 t 用于加工, 在加工过程中产生了大量的副产物果渣。研究表明, 蓝莓果渣中花色苷含量超过了蓝莓果实中花色苷含量的最低水平^[4], 其残留的功能性成分具有与蓝莓果实相似的功效, 且蓝莓花色苷作为天然着色剂较人工合成染料具有更高的生物活性和更低的生产成本^[5]。因此, 以蓝莓果渣为原材料, 不仅解决了环境污染问题, 而且最大限度提高了蓝莓资源经济附加值。

目前, 蓝莓花色苷最常用的提取方式有直接提取法^[6]、微波提取法^[7]、超声提取法^[8]、生物酶解法^[9]等。MEINI 等^[10]在酶法优化葡萄渣酚类抗氧化剂的提取工艺中得到, 最适区域内酶处理提高了酚类物质的得率, 最高可达 66%, 表明生物酶解法是一种有效可行的方法。该方法依赖于酶降解或破坏细胞壁成分的能力以释放原料中的有效物质。果胶酶是催化植物细胞壁中果胶聚合物降解的一种酶^[11], 用它可降解蓝莓果皮中组成复杂的细胞壁基质, 从而释放所含的花色苷。随着绿色化学概念的发展, 超声波技术也被广泛用于植物有效成分的提取, 通过能量输入可在短时间内实现目标化合物高效率、低成本的提取^[8]。

因此, 采用超声波辅助酶法提取蓝莓果渣中的花色苷, 既利用了生物酶解温和及超声高效、受力均匀的优点, 又避免了直接提取耗时长、效率低、溶剂用量大和微波辐射不均、温度过高的缺点, 在提高花色苷得率的基础上最大程度保留了有效物质的活性, 从而可提高蓝莓用于功能性食品的收益。植物中花色苷大都是由母核结构为 2-苯基色原烯的花色素与糖以糖苷键结合而成的一类化合物^[12] (结构如下所示)。由于 pH、光照、温度、氧和酶活性

等均可影响花色苷的稳定性, 尤其是原材料在加工过程中涉及的热处理会直接影响花色苷的保留率及活性, 导致其在食品及药品中的应用受到限制^[13]。因而要最大限度减少蓝莓花色苷降解的可能。研究发现, 花色苷降解动力学会因花色苷结构差异、处理方式不同而呈现不同的降解规律^[14]。因此, 本文希望通过构建花色苷的降解动力学模型探究其在不同条件下的稳定性, 为进一步高效利用蓝莓资源提供理论依据。



花色苷元种类	R ₁	R ₂	糖苷种类
飞燕草素	OH	OH	半乳糖, 葡萄糖, 阿拉伯糖
矢车菊素	OH	H	半乳糖, 葡萄糖, 阿拉伯糖
牵牛花素	OCH ₃	OH	半乳糖, 葡萄糖, 阿拉伯糖
芍药色素	OCH ₃	H	半乳糖, 葡萄糖
锦葵色素	OCH ₃	OCH ₃	半乳糖, 葡萄糖, 阿拉伯糖

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

蓝莓果渣来源于贵州艾威德生态农业发展有限公司, 放置于-20 °C的冰箱内冷冻保存。使用前对其进行解冻并在 40 °C下的烘箱内烘干至恒重后磨成粉过 60 目筛备用; 果胶酶, 南宁庞博生物科技有限公司; 氯化钾、乙酸钠、无水乙醇, 分析纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

752 型紫外-可见分光光度计, 上海精科实业有限公司; ZF-1 紫外线分析仪, 杭州齐威仪器有限公司; H1650 离心机, 长沙湘仪离心机仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 蓝莓果渣花色苷的提取

超声辅助酶提法: 准确称取 1 g 蓝莓果渣粉末,

加入适量的水和果胶酶在 40 °C 下酶解 60 min, 再加一定量的乙醇, 调节 pH 为 3.0, 于 400 W、50 °C 下超声提取 30 min, 离心 (10000 r/min, 10 min) 后收集上清液放入 4 °C 冰箱备用。

酶提法: 采用上述同样的方法利用超声辅助酶提法过程中优化的参数提取蓝莓花色苷, 但不进行超声波处理。

1.2.2 花色苷得率的测定

参考文献[15]的方法并略加修改, 以蒸馏水为空白对照, 用 pH 示差法^[16]分别测定溶液在 510 和 700 nm 下的吸光度。用公式(1)计算花色苷的得率。

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

式中: 吸光度差 (A) 表示 pH 1.0 与 pH 4.5 条件下的花色苷在 510 nm 和 700 nm 处吸光值的差值, $A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH}1.0} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH}4.5}$; ε 为摩尔消光系数, 为 26900 L/(mol·cm); L 为光程, 为 1 cm; M_w 为主要花色苷的摩尔质量, 为 449.2 g/mol; DF 为稀释因子; V 为提取液体积, mL; m 为样品质量, g。

1.2.3 单因素实验设计

准确称取 1 g 蓝莓果渣粉末, 分别探究果胶酶添加量 (5、10、15、20、25 mg)、酶解时间 (20、40、60、80、100 min)、酶解温度 (20、30、40、50、60 °C)、超声功率 (200、300、400、500、600 W)、超声时间 (20、30、40、50、60 min)、超声温度 (20、30、40、50、60 °C)、乙醇体积分数 (40%、50%、60%、70%、80%)、液料比 [20 : 1、30 : 1、40 : 1、50 : 1、60 : 1 (mL : g)] 8 个因素对蓝莓花色苷提取得率的影响。每个水平重复 3 次取平均值。

1.2.4 Box-Behnken 实验设计

用 SPSS 26.0 软件分析单因素实验结果, 根据影响花色苷提取得率的程度大小选取酶解时间 (X_1)、乙醇体积分数 (X_2)、液料比 (X_3) 为 Box-Behnken 实验设计的 3 个自变量, 建立响应值与自变量之间的函数关系。Box-Behnken 实验设计因素与水平见表 1。

表 1 Box-Behnken 实验设计因素与水平
Table 1 Factors and levels of Box-Behnken design

水平	因素		
	X_1/min	$X_2/\%$	$X_3/(\text{mL} : \text{g})$
-1	40	40	40 : 1
0	60	50	50 : 1
+1	80	60	60 : 1

1.2.5 稳定性实验

以花色苷的保留率为指标, 研究花色苷在不同

温度、光照处理下的稳定性变化规律。花色苷保留率的计算公式如下所示。

$$\text{保留率}/\% = \frac{\rho_t}{\rho_0} \times 100 \quad (2)$$

式中: ρ_t 为 t 时刻蓝莓花色苷的质量浓度 (g/L); ρ_0 为蓝莓花色苷的初始质量浓度 (g/L)。

1.2.5.1 蓝莓花色苷的光照处理

分别取提取液 5 mL 放入 10 mL 离心管中, 然后将其放置于 365 nm 紫外光下、室内避光处、室内日光灯 (30 W) 下 7.5 d, 每隔 1.5 d 测定花色苷的保留率, 每组实验重复 3 次, 取平均值。

1.2.5.2 蓝莓花色苷的热处理

分别取提取液 5 mL 放入 EP 管中, 后依次置于 40、50、60、70、80 °C 的恒温水浴锅中避光加热 5 h, 每隔 1 h 测定花色苷的保留率, 每组实验重复 3 次, 取平均值。

热降解动力学模型: 采用试错法构建温度为 40~80 °C, 单次间隔为 10 °C, 处理时间为 0~5 h, 每次间隔 1 h 的降解动力学模型。其原理如下: 假设反应级数为零级、一级、二级, 则花色苷质量浓度 ρ_t 与时间 t 、花色苷质量浓度的对数 $\ln(\rho_t/\rho_0)$ 与时间 t 、花色苷浓度的倒数 $1/\rho_t$ 与时间 t 均呈线性关系, 花色苷的热降解动力学模型由相应线性回归系数的最高值决定, 其模型如公式 (3)~(5) 所示。

$$\rho_t - \rho_0 = -k_0 t \quad (3)$$

$$\ln \frac{\rho_t}{\rho_0} = -k_1 t \quad (4)$$

$$\frac{1}{\rho_t} - \frac{1}{\rho_0} = -k_2 t \quad (5)$$

式中: k_0 、 k_1 、 k_2 分别为零级、一级和二级降解速率常数 (min^{-1}); t 加热时间 (h)。

$t_{1/2}$ 为花色苷半衰期 (h), $t_{1/2}$ 根据式 (6) 计算。

$$t_{1/2} = -\ln \frac{0.5}{k} \quad (6)$$

活化能利用 Arrhenius 方程计算, 其方程如式 (7) 所示。

$$\ln k = \frac{\ln A - E_a}{R} \cdot T \quad (7)$$

式中: E_a 为活化能, kJ/mol; R 为摩尔气体常数, 8.314 J/(mol·K); T 为绝对温度, K; A 为频率因子, h^{-1} ; k 为反应速率常数, min^{-1} 。

花色苷温度系数 Q_{10} 由式 (8) 计算。

$$Q_{10} = \left(\frac{k_1'}{k_2'} \right)^{\frac{10}{T_1 - T_2}} \quad (8)$$

式中: Q_{10} 为温度系数; T_1 、 T_2 均为绝对温度, K; k_1' 、 k_2' 为 T_1 、 T_2 温度下的反应速率常数, min^{-1} 。

通过以下方程计算各温度下的焓变 ΔH (kJ/mol), 吉布斯自由能 ΔG (kJ/mol) 和熵变 ΔS [J/(mol·K)]。

$$\Delta H = E_a - RT \quad (9)$$

$$\Delta G = -RT \ln \frac{kh}{k_B T} \quad (10)$$

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad (11)$$

式中: E_a 为活化能, kJ/mol; h 为普朗克常数, 6.6262×10^{-34} J/s; k_B 为玻尔兹曼常数, 1.3806×10^{-23} J/K; T 为绝对温度, K; k 为降解速率, min^{-1} 。

1.3 数据分析

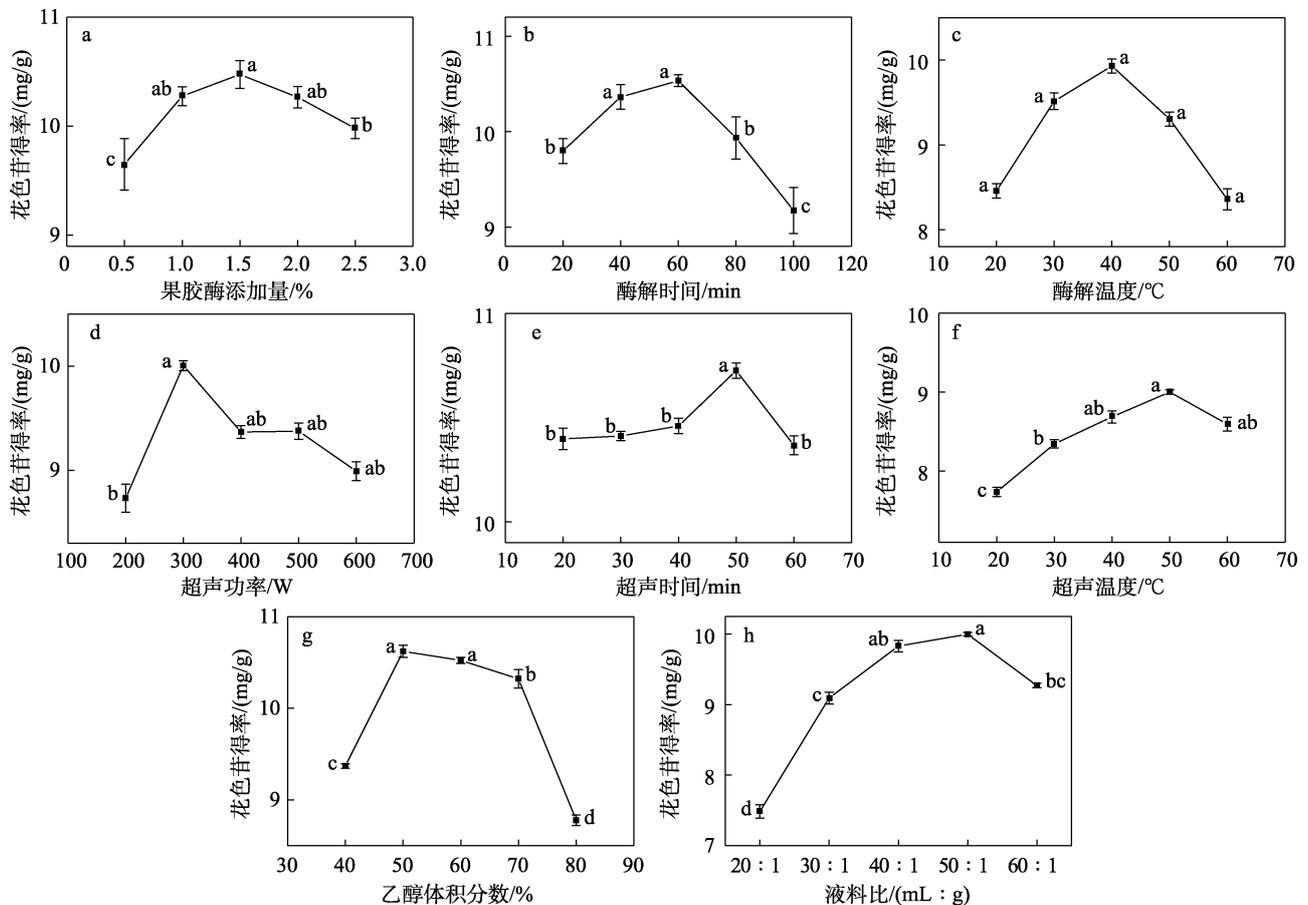
采用 SPSS 26.0 软件对单因素实验数据进行方差分析 (ANOVA), Box-Behnken 实验设计采用 Design-Expert 12.0 统计分析软件, 并用 Origin 9.0 进行绘图和数据拟合。

2 结果与讨论

2.1 单因素实验

各因素对花色苷提取得率的影响见图 1。由图 1

可知, 在相应的取值范围内各因素对花色苷提取得率均呈现先上升后下降的趋势, 均有最大值。果胶酶添加量 (以蓝莓果渣质量为基准, 下同) 对花色苷得率的影响见图 1a。由图 1a 可知, 蓝莓花色苷得率在酶用量为原材料的 1.5% 时达到最大值。随后花色苷的得率随酶用量增加而逐渐下降。这是因为酶作用的底物量是有限的, 二者浓度达到了饱和状态^[17]。与聂铭等^[18]在响应面法优化果胶酶辅助提取杨梅花色苷工艺研究中的结果一致。酶解时间对花色苷得率的影响见图 1b。由图 1b 可知, 酶解时间为 100 min 时, 花色苷的得率比酶解时间 20 min 时降低 8.07%, 比酶解时间为 60 min 时降低 12.91%, 酶解时间过长会导致花色苷自身发生降解, 而其降解物质可能与酶分子结合, 降低花色苷得率^[19]。酶解温度对花色苷得率的影响见图 1c。由图 1c 可知, 花色苷得率在酶解温度为 40 °C 时达最大值。这是因为果胶酶的适宜温度范围在 15~55 °C, 而过高的温度不仅会破坏果胶酶的活性, 还会加速花色苷的降解, 导致提取得率下降^[19]。毕凯媛等^[20]在利用超声辅助果胶酶法提取红树莓花色苷的研究中得到了相似结论。



注: 字母相同为差异不显著, 字母不同为差异显著

图 1 各因素对花色苷提取得率的影响

Fig. 1 Effects of various factors on the extraction yield of anthocyanins

超声功率、时间、温度对花色苷提取得率的影响见图 1d、e、f。由图 1d~f 可知, 花色苷得率分别在超声功率 300 W、超声时间 50 min、超声温度 50 °C 时达到最大值。其原理为超声波产生的能量会引起空化效应和热量的聚集, 使有效成分在萃取溶剂中传质速率提高, 而过高的温度会破坏花色苷结构的稳定性。乙醇体积分数对花色苷得率的影响见图 1g。由图 1g 可知, 乙醇体积分数为 50% 时花色苷得率较乙醇体积分数为 40% 时提高了 11.78%, 较乙醇体积分数为 80% 时提高 17.35%。根据相似相溶原理, 溶剂对花色苷的溶解能力呈现随乙醇体积分数增加而增大的规律, 继续提高乙醇体积分数, 会使其他与溶剂极性差别较小的物质溶出, 导致花色苷得率降低^[21]。液料比对花色苷得率的影响见图 1h。由图 1h 可知, 液料比 50 : 1 (mL : g) 条件下的花色苷得率达到最大值, 且较液料比 20 : 1 (mL : g) 时提高 25.15%。这是因为随着液料比的增大, 花色苷在溶剂中不断累积, 溶液逐渐达到饱和^[22], 再增大液料比反而使花色苷含量降低, 且造成了资源的浪费。这一结果与 CHEN 等^[23]在超声波辅助提取茜草果实总花色苷中得到的趋势一致。

2.2 Box-Behnken 实验设计与分析

采用响应面优化设计三因素三水平的 Box-Behnken 设计评估变量组合, 通过二次多项式方程揭示蓝莓花色苷提取得率与提取变量之间的关系, 筛选出的因素水平编码见表 2。

表 2 Box-Behnken 实验设计与结果

Table 2 Design of experiment of Box-Behnken and results

No.	提取条件			实验结果
	X_1 /min	X_2 /%	X_3 /(mL : g)	花色苷得率/(mg/g)
1	60	50	50 : 1	8.057±0.296
2	60	40	40 : 1	7.615±0.122
3	80	40	50 : 1	7.950±0.112
4	60	50	50 : 1	8.049±0.090
5	60	50	50 : 1	7.907±0.096
6	40	50	40 : 1	8.376±0.085
7	60	60	60 : 1	9.108±0.383
8	80	50	60 : 1	8.667±0.059
9	40	60	50 : 1	9.619±0.090
10	60	60	40 : 1	9.024±0.233
11	60	50	50 : 1	8.141±0.127
12	80	60	50 : 1	9.109±0.245
13	40	40	50 : 1	9.468±0.096
14	60	40	60 : 1	9.318±0.114
15	60	50	50 : 1	8.166±0.166
16	80	50	40 : 1	9.485±0.149
17	40	50	60 : 1	11.903±0.114

采用 Design-Expert 12.0 软件对表 2 所得的实验数据进行多元回归拟合, 得到花色苷得率 (Y) 与酶解时间 (X_1)、乙醇体积分数 (X_2)、液料比 (X_3) 的二次多项回归模型方程为:

$$Y=8.064-0.5194X_1+0.3136X_2+0.5620X_3+0.2520X_1X_2-1.09X_1X_3-0.4047X_2X_3+0.9070X_1^2+0.0655X_2^2+0.6367X_3^2 \quad (12)$$

Box-Behnken 设计实验结果的方差分析如表 3 所示, 其 F 值和 p 值可用于检验回归方程各因素的显著性。模型的 F 值为 86.12, $p < 0.0001$, 差异极显著, 具有统计学意义; 失拟项 $p = 0.1276 > 0.05$, 差异不显著, 说明模型拟合状况良好。回归模型下, 一次项 (X_1 、 X_2 、 X_3)、二次项 (X_1^2 、 X_3^2)、交互项 (X_1X_3 、 X_2X_3) 对花色苷的提取得率有极显著影响 ($p < 0.01$); 交互作用项 (X_1X_2) 对花色苷提取得率有显著影响 ($p < 0.05$), 说明 3 个因素与花色苷的提取得率不是简单的一次函数关系。通过比较 3 个因素的 F 值可知^[24], 各因素对花色苷提取得率的影响排序为 $X_3 > X_1 > X_2$, 即液料比 > 酶解时间 > 乙醇体积分数。

表 3 二次多项式模型方差分析与显著性检验

Table 3 ANOVA for the fitted quadratic polynomial model and significance validation

方差来源	平方和	自由度	均方差	F 值	p 值	显著性
模型	16.64	9	1.85	86.12	<0.0001	**
X_1	2.16	1	2.16	100.52	<0.0001	**
X_2	0.7869	1	0.7869	36.65	0.0005	**
X_3	2.53	1	2.53	117.69	<0.0001	**
X_1X_2	0.2540	1	0.2540	11.83	0.0108	*
X_1X_3	4.72	1	4.72	219.84	<0.0001	**
X_2X_3	0.6553	1	0.6553	30.52	0.0009	**
X_1^2	3.46	1	3.46	161.34	<0.0001	**
X_2^2	0.0181	1	0.0181	0.8414	0.3895	
X_3^2	1.71	1	1.71	79.52	<0.0001	**
残差	0.1503	7	0.0215			
失拟项	0.1090	3	0.0363	3.52	0.1276	
纯误差	0.0413	4	0.0103			
总回归	16.79	16				
CV/%	1.66					
R^2	0.9910					
R_{adj}^2	0.9795					

注: *显著性差异, $p < 0.05$; **极显著性差异, $p < 0.01$ 。

二次回归方程决定系数 $R^2 = 0.9910$, 该值越接近于 1, 模型的拟合优度越高, 且 $R_{adj}^2 = 0.9795$, 表明预测值与实际值之间存在很好的相关性^[25]; 花色苷得率 (Y) 回归方程的变异系数 (CV) = 1.66% < 10%, 充分说明该模型用于分析响应面的变化是精确可靠的。此外, 其回归方程的信噪比为 38.1704 > 4, 说明

该模型是合理可用的。综上分析，所建模型可用于预测分析花色苷得率变化。

2.3 响应面分析与最佳提取参数的验证

根据三维响应面图可以直观地看到不同影响因素及其交互作用对响应值的影响情况，各因素交互作用对花色苷得率影响见图 2。由图 2 可知，所有响应曲面为开口向下的凸形曲面，说明 Y 存在最大值^[26]。图 2a 中，当液料比 (X_3) 为 50 : 1 (mL : g) 时，表示酶解时间 (X_1) 的曲线较陡，说明该因素对 Y 响应值有显著影响；而表示乙醇体积分数 (X_2) 的曲线较为平滑，说明该因素对 Y 响应值影响较小；但等高线形状均较为接近椭圆形，说明酶解时间 (X_1)、乙醇体积分数 (X_2) 的交互作用对响应值有显著影响^[27]。图 2b 中，当乙醇体积分数 (X_2) 为 50% 时，酶解时间 (X_1) 和液料比 (X_3) 对 Y 响应值均有显著影响；又由其等高线表现为椭圆形可知，

酶解时间 (X_1)、液料比 (X_3) 交互作用较为明显。图 2c 中，当酶解时间 (X_1) 为 60 min 时，液料比 (X_3) 对花色苷得率有显著影响，而乙醇体积分数 (X_2) 对 Y 响应值影响却不显著，由等高线表现为椭圆形可知，乙醇体积分数 (X_2)、液料比 (X_3) 交互作用对花色苷得率的影响较为显著。其中，乙醇体积分数 (X_2) 的单因素结果与响应曲面结果略有差异，可能是由于其与酶解时间 (X_1)、液料比 (X_3) 交互作用的影响所致。

根据 Design-Expert 12.0 软件优化出的最佳提取条件为：酶解时间 80 min、乙醇体积分数 60%、液料比 40 : 1 (mL : g)。花色苷得率最大预测值为 10.648 mg/g。在此条件下进行 3 次平行实验，测得花色苷的得率为 (10.571±0.080) mg/g，与预测值误差小于 1.5%，说明实验结果与模型拟合良好，响应面优化出的参数准确可靠。

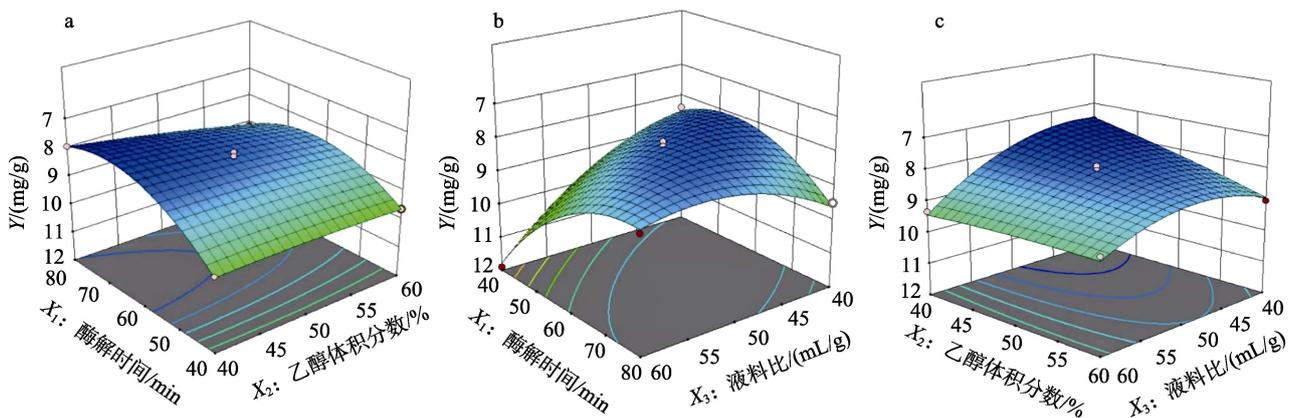


图 2 提取参数交互作用对花色苷提取得率影响的响应曲面图

Fig. 2 Response surface plots of interactions between three extraction parameters on yields of anthocyanins

2.4 与酶提法蓝莓花色苷得率的比较

由单因素实验和超声辅助酶提法的优化工艺确定酶提法的提取条件，并进行 3 次平行实验，测得花色苷的得率为 (7.482±0.048) mg/g，与超声辅助酶提法结果存在显著差异，说明超声波技术是一种提取蓝莓果渣花色苷的有效工艺^[23]。

2.5 稳定性实验分析

2.5.1 光照处理对蓝莓花色苷的影响及动力学分析

不同光照条件下花色苷保留率变化见图 3。由图 3 可知，蓝莓花色苷对 365 nm 紫外光较为敏感，7.5 d 后蓝莓花色苷损失量达到 35.67%，但在室温避光的情况下仅损失 10.09%。造成这一结果的原因可能是光照使蓝莓花色苷 2、4 位碳原子受到亲水性基团的攻击，导致其结构在 C₂ 位上水解开环生成查尔酮，查尔酮又降解生成苯甲酸及 2,4,6-三羟基苯甲醛等产物，导致花色苷损失量较大^[28]。不同光照条件下花色苷降解动力学参数见表 4。由表 4 可知， k_0 、

k_1 、 k_2 表示降解速率的大小，表 4 中降解速率与图 3 中蓝莓花色苷降解趋势符合，利用 R^2 判断反应级数可知，蓝莓花色苷在不同光照条件下降解反应均符合零级动力学反应特征 ($R^2 > 0.93$)。

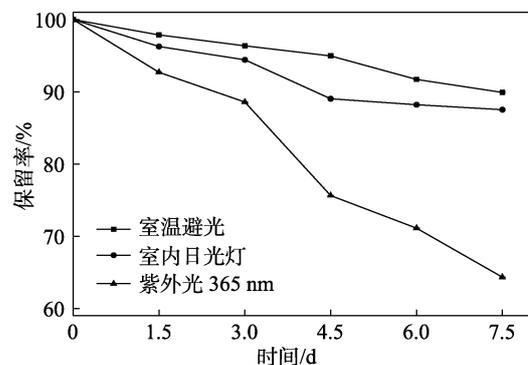


图 3 不同光照条件下放置花色苷 7.5 d 保留率的变化
Fig. 3 Changes of retention rate of anthocyanins after storing for 7.5 d at different light conditions

2.5.2 不同储存温度对蓝莓花色苷的影响及动力学分析

不同储存温度下花色苷保留率变化见图 4。由图 4 可知, 花色苷的保留率随放置时间的延长逐渐降低。

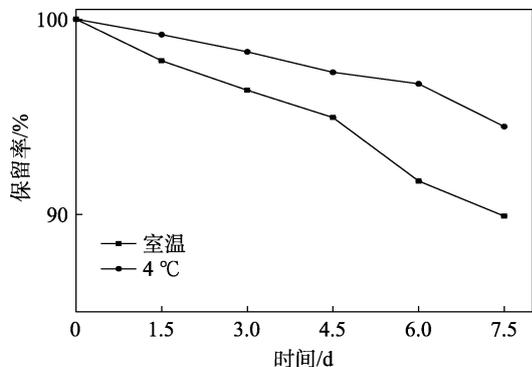


图 4 不同温度下放置花色苷 7.5 d 保留率的变化

Fig. 4 Changes of retention rate of anthocyanins after storing for 7.5 d at different temperatures

其中, 在 4 °C 条件下保存 7.5 d 后的花色苷损失量仅为 5.5%。说明温度是影响花色苷稳定性的重

要因素, 低温更有利于花色苷的保存^[29]。由表 4 中 R^2 可知, 花色苷在不同储存温度下的零级动力学降解模型拟合度最好 ($R^2 \geq 0.95$), 但通过计算半衰期以及与图 4 中花色苷降解趋势吻合程度判断可知, 蓝莓花色苷在不同储存温度下降解反应更符合一级动力学反应特征。

2.5.3 热处理对蓝莓花色苷的影响及动力学与热力学参数分析

不同加热温度下花色苷保留率随时间的变化见图 5。由图 5 可知, 花色苷的保留率随加热时间和加热温度的增加不断降低, 5 h 后, 蓝莓花色苷分别在 40~80 °C 损失了 3.81%、5.25%、7.62%、16.34%、34.72%。花色苷的热稳定性与其自身结构高度相关, 在溶液中花色苷以稳定的二苯基苯并吡喃阳离子的形式存在, 当花色苷结构发生降解时, 质子迅速流失, 发生一系列失电子和开环反应且均伴随熵的增大。因此, 当温度升高时, 平衡会向着无色的查尔酮和甲醇假碱的形式转化, 其中醌式碱和甲醇假碱在低温和酸化时可逆转为红色的稳定黄烺盐阳离子形式, 但查尔酮很难再转化^[12]。因此, 高温会破坏花色苷的结构, 加速其降解。

表 4 花色苷溶液在不同光照条件及储存温度下的动力学参数

Table 4 Kinetic parameters of anthocyanin degradation at different light conditions and temperatures

	零级		一级		二级		$t_{1/2}/d$
	k_0/min^{-1}	R^2	k_1/min^{-1}	R^2	k_2/min^{-1}	R^2	
室温避光	2×10^{-6}	0.9772	1.5×10^{-5}	0.9750	4×10^{-5}	0.9727	32.0901
室内日光灯	3×10^{-6}	0.9309	1.7×10^{-5}	0.9298	5×10^{-5}	0.9290	28.3148
紫外光 365 nm	9×10^{-6}	0.9716	4×10^{-5}	0.9758	2×10^{-4}	0.9758	12.0338
4 °C	1×10^{-6}	0.9500	5×10^{-6}	0.9470	2×10^{-5}	0.9439	96.2704

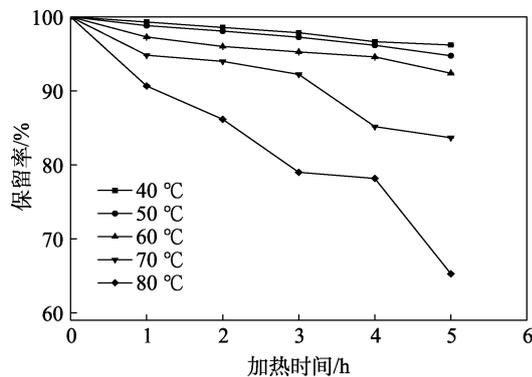


图 5 不同温度下加热 5 h 花色苷保留率的变化

Fig. 5 Changes of retention rate of anthocyanins after heating for 5 h at different temperatures

40~80 °C 加热条件下花色苷降解动力学参数见表 5。由表 5 可知, 随着温度的升高, k_0 、 k_1 、 k_2 值不断增大, 蓝莓花色苷的降解速度加快, 再由 R^2 判断反应级数可知, 在各温度下蓝莓花色苷的降解反

应符合零级动力学反应特征 ($R^2 > 0.9$)。温度越高, 花色苷降解速率 k_0 增长越快, 同时伴随着半衰期 $t_{1/2}$ 的降低, 温度系数 Q_{10} 的增大 (表示温度每升高 10 °C 花色苷降解速率增加的倍数)。反应活化能 E_a 为 53.2960 kJ/mol, 符合花色苷降解活化能区间 (35~125 kJ/mol)^[30], 且该值的大小决定了花色苷发生降解所需要的能量高低, 该值越大, 说明花色苷热稳定性越好。WU 等^[31]在声光分解混合处理下, 矢车菊素-3-葡萄糖苷 (C3G) 的降解动力学为零级, 而光解作用下, C3G 的降解动力学为一级, 说明花色苷在不同的处理方式下会呈现不同的降解动力学类型。此外, 花色苷溶液中其他化合物的存在可能会通过分子间和分子内的协同色素沉着作用影响其在 pH、热和光中的稳定性。SUI 等^[32]通过热处理已去除糖、酚酸等物质的花色苷发现, 其降解速率的加快可能是由于花色苷纯度的提高和溶液中共色素作用^[33]的降低所致。BI 等^[33]在桑椹花色苷降解动力学

研究中发现,与传统溶剂相比,低共熔溶剂(DES)下花色苷的热降解速率常数降低,半衰期延长,降解反应符合一级动力学,且DES也在提高花色苷稳

定性方面表现出更大的优势。因而,在如此复杂的评价体系下,不同的处理条件、原材料、提取方式都会影响花色苷降解动力学类型的判断。

表 5 花色苷溶液在 40~80 °C 加热条件下的动力学参数
Table 5 Kinetic parameters of anthocyanin degradation at 40~80 °C

$\theta/^\circ\text{C}$	零级		一级		二级		$t_{1/2}/\text{h}$	$E_a/(\text{kJ}/\text{mol})$	温度范围/ $^\circ\text{C}$	Q_{10}
	k_0/min^{-1}	R^2	k_1/min^{-1}	R^2	k_2/min^{-1}	R^2				
40	3.5×10^{-5}	0.9841	1.3×10^{-4}	0.9846	5.4×10^{-4}	0.9844	88.8650	53.2960	40~60	1.4142
50	4.3×10^{-5}	0.9830	1.7×10^{-4}	0.9800	6.8×10^{-4}	0.9783	67.9556			
60	4.8×10^{-5}	0.9485	2.6×10^{-4}	0.9458	8.0×10^{-4}	0.9429	44.4325		40~80	1.7782
70	0.0001	0.9019	5.9×10^{-4}	0.9074	0.0025	0.8946	19.5804			
80	0.0003	0.9267	0.0013	0.9045	0.0062	0.8787	8.8865		60~80	2.2360

花色苷在 40~80 °C 下发生热降解的 ΔH 、 ΔG 、 ΔS 变化见表 6。 ΔH 表示降解反应发生一个过程的焓的增量,它是反应物与生成物之间的能量差,该值越小,说明花色苷的降解反应随温度的升高越容易发生^[34],且温度的高低决定了为花色苷降解提供能量的多少,低温会减缓花色苷降解产物的形成速度,从而通过延长达到降解反应所需能量的时间来减少花色苷的损失。 ΔG 表示反应体系发生过程内的自由能的变化,可用来判断花色苷的降解过程是否为自发性的反应。 ΔS 是表示反应体系混乱程度的度量,与体系中反应前后物质的量的变化值有关。较低的熵值说明反应体系中物质的量的变化值较小,此时反应物质接近于自身热力学平衡的状态,花色苷处于稳定状态,随着熵值的增高,系统的无序性增加,反应物质远离自身热力学平衡状态,花色苷发生降解反应形成的产物增多。由表 6 可知,蓝莓花色苷热降解的 $\Delta G > 0$,且在 40~80 °C 下变化不大(100.0684~106.4519 kJ/mol),这表明花色苷的降解是非自发的反应; ΔS 的绝对值在 185.6809~191.1176 J/(mol·K) 范围内,说明温度变化不会对花色苷降解的 ΔS 产生影响,且在 pH 为 3.0 的溶液中花色苷发生降解的可能性较低^[35]。

表 6 花色苷溶液在 40~80 °C 加热条件下的热力学参数
Table 6 Thermodynamic parameters of anthocyanin degradation at 40~80 °C

pH	$\theta/^\circ\text{C}$	$\Delta H/(\text{kJ}/\text{mol})$	$\Delta G/(\text{kJ}/\text{mol})$	$\Delta S/(\text{J}/\text{mol}\cdot\text{K})$
3	40	50.6937	100.0684	-187.9530
	50	50.6106	102.6295	-190.3206
	60	50.5275	104.7150	-191.1176
	70	50.4443	105.6071	-188.3892
	80	50.3612	106.4519	-185.6809

花色苷的稳定性是由其化学结构和环境因素共同决定的。目前,甲基化、糖基化和酰基化已被证

明可以增加花色苷的化学稳定性,YANG 等^[36]通过研究葡萄花色苷储存过程中的降解动力学发现,酰基的 π 堆积作用和立体阻碍在一定程度上可以防止发色团受到水的亲核攻击,使得酰基化花色苷比非酰基化花色苷的降解程度低,但酰基化可能无法保护其不受氧化降解的影响。对于花色苷的化学结构,其配基的类型、糖的种类、残留糖分的复杂性、酰基化剂的存在及溶液中共存的化合物成分都会影响花色苷结构的稳定性。因此,可以通过基团的改变提高花色苷结构的稳定性。从环境的角度出发,低 pH、低温、避光是必要的手段。此外, β -葡萄糖苷酶和多酚氧化酶在花色苷降解过程中的潜在作用也得到了证实^[37-38]。因而,可以通过抑制酶活性有效提高花色苷的稳定性,也可以将其封装在微乳剂和纳米乳剂中来克服这种低稳定性。

3 结论

通过单因素实验筛选出了对蓝莓花色苷得率有显著影响的 3 个因素,然后经过响应面优化得到了花色苷最佳提取工艺:乙醇体积分数 60%、液料比 40:1 (mL:g),酶解时间 80 min。优化条件下,花色苷得率为(10.571±0.080) mg/g,与预测值误差小于 1.5%,说明实验结果准确可靠,超声辅助酶法提取蓝莓果渣花色苷是一种高效、经济、环保的方法。

通过考察和模拟蓝莓花色苷在不同光照条件、储存温度、加热处理下保留率的变化和降解动力学模型,得出以下结论:(1)紫外光较日光灯更容易引起蓝莓花色苷的降解,室温避光条件下花色苷的损失量仅为 10.09%,有利于保持花色苷结构的稳定性;(2)低温条件更有利于花色苷的保存;(3)在 40~80 °C 范围内,蓝莓花色苷热降解均符合零级动力学模型,花色苷的降解速率和 Q_{10} 随着温度的升

高而增大, 半衰期随着温度的升高而降低, E_a 为 53.2960 kJ/mol。由热力学分析可知, 花色苷热降解为非自发反应, 说明花色苷在适宜的条件下保存可以有效防止其降解。该研究为蓝莓果渣废弃物的资源化利用提供了理论依据, 对蓝莓花色苷的不同降解动力学类型差异和稳定性给出了解释及解决方案, 对蓝莓花色苷的应用开发具有实际指导意义。

参考文献:

- [1] ZHANG C R (张昌容), LI Z (李志), HE Y F (何永福), *et al.* Research progress on functional ingredients and comprehensive utilization of blueberry pomace[J]. Food Science and Technology (食品科技), 2021, 46(6): 110-114.
- [2] STRUCK S, PLAZA M, TURNER C, *et al.* Berry pomace—A review of processing and chemical analysis of its polyphenols[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2016, 51(6): 1305-1318.
- [3] BUNEA A, RUGINĂ D, SCONȚA Z, *et al.* Anthocyanin determination in blueberry extracts from various cultivars and their antiproliferative and apoptotic properties in B16-F10 metastatic murine melanoma cells[J]. Phytochemistry, 2013, 95: 436-444.
- [4] LEI L B (雷良波), YANG H (杨浩), CHEN J L (陈军李), *et al.* Development and utilization of blueberry pomace: A review[J]. China Brewing (中国酿造), 2017, 36(10): 17-22.
- [5] LI C Y, FENG J, HUANG W Y, *et al.* Composition of polyphenols and antioxidant activity of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) in Nanjing[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(3): 523-531.
- [6] AMR A, AL-TAMIMI E. Stability of the crude extracts of *Ranunculus asiaticus* anthocyanins and their use as food colourants[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2010, 42(8): 985-991.
- [7] HERRMAN D A, BRANTSSEN J F, RAVISANKAR S, *et al.* Stability of 3-deoxyanthocyanin pigment structure relative to anthocyanins from grains under microwave assisted extraction[J]. Food Chemistry, 2020, 333: 127494.
- [8] TABARAKI R, NATEGHI A. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of natural antioxidants from rice bran using response surface methodology[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2011, 18(6): 1279-1286.
- [9] OSETE-ALCARAZA, GÓMEZ-PLAZA E, PÉREZ-PORRAS P, *et al.* Revisiting the use of pectinases in enology: A role beyond facilitating phenolic grape extraction[J]. Food Chemistry, 2022, 372: 131282.
- [10] MEINI M R, CABEZUDO I, BOSCHETTI C E, *et al.* Recovery of phenolic antioxidants from Syrah grape pomace through the optimization of an enzymatic extraction process[J]. Food Chemistry, 2019, 283: 257-264.
- [11] GARG G, SINGH A, KAUR A, *et al.* Microbial pectinases: An ecofriendly tool of nature for industries[J]. 3 Biotech, 2016, 6(1): 1-13.
- [12] LUO X L (罗晓玲), XU J H (徐嘉红), YANG W B (杨武斌), *et al.* Research progress in antioxidant function and stability of blueberry anthocyanins[J]. Science and Technology of Food Industry (食品工业科技), 2018, 39(4): 312-317.
- [13] JIANG T, MAO Y, SUI L H, *et al.* Degradation of anthocyanins and polymeric color formation during heat treatment of purple sweet potato extract at different pH[J]. Food Chemistry, 2018, 274: 460-470.
- [14] LI E H (李恩惠), JIAO X Y (娇馨瑶), WANG C G (王晨歌), *et al.* Degradation kinetics and stability of anthocyanins from blueberry[J]. Food Science (食品科学), 2018, 39(5): 1-7.
- [15] LIU Y H, SUN Y, XIE A G, *et al.* Potential of hyperspectral imaging for rapid prediction of anthocyanin content of purple-fleshed sweet potato slices during drying process[J]. Food Analytical Methods, 2017, 10(12): 3836-3846.
- [16] PENG J, WANG K, MA C, *et al.* Determination of anthocyanin and moisture content of purple sweet potatoes during drying process by their optical properties in the 400-1050 nm range[J]. Food Chemistry, 2021, 359: 129811.
- [17] ZHAO C Y (赵晨雨), LI H M (李慧敏), WANG X Y (王新媛), *et al.* Optimization of enzymatic extraction and composition analysis of anthocyanins from *Acanthopanax senticosus* dried fruit[J]. Journal of Food Safety & Quality (食品安全质量检测学报), 2021, 12(17): 7006-7013.
- [18] NIE M (聂铭), LU S M (陆胜民), WANG Y G (王阳光), *et al.* Optimization of anthocyanins extraction assisted with pectinase from red bayberry by response surface methodology[J]. Food Science and Technology (食品科技), 2021, 46(7): 194-200.
- [19] JIA H B (贾鸿冰), TIAN J Y (田继远), YU J (于娟). Effect of enzymatic hydrolysis of compound pectinase on juice yield and anthocyanin extraction from blueberry[J]. Food Science and Technology (食品科技), 2016, 41(6): 270-274.
- [20] BI K Y (毕凯媛), CUI S S (崔珊珊), GAO Y (高阳), *et al.* Ultrasonic-assisted pectinase extraction and identification of anthocyanins from *Rubusidaeus* L.[J]. Science and Technology of Food Industry (食品工业科技), 2018, 39(13): 198-205.
- [21] AKBARI S, ABDURAHMAN N H, YUNUS R M. Optimization of saponins, phenolics, and antioxidants extracted from fenugreek seeds using microwave-assisted extraction and response surface methodology as an optimizing tool[J]. Comptes Rendus Chimie, 2019, 22(11/12): 714-727.
- [22] CHEN X Q (陈小强), LIU L L (刘玲玲), SUN T T (孙彤彤), *et al.* Optimization of extraction of total phenolics and total flavonoids from *Phellodendron amurense* fruit by response surface method and their antioxidant activities[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2020, 37(2): 300-308.
- [23] CHEN X Q, LI Z H, WANG Z J, *et al.* Ultrasound-assisted extraction of total anthocyanins from *Rubia sylvatica* Nakai fruit and radical scavenging activity of the extract[J]. Industrial Crops and Products, 2020, 150: 112420.
- [24] XU B G, FENG M, TILIWA E S, *et al.* Multi-frequency power ultrasound green extraction of polyphenols from Pingyin rose: Optimization using the response surface methodology and exploration of the underlying mechanism[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 156: 113037.
- [25] JIANG H L, YANG J L, SHI Y P. Optimization of ultrasonic cell grinder extraction of anthocyanins from blueberry using response surface methodology[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2017, 34: 325-331.
- [26] LIU N (刘娜), CHEN L Z (陈灵芝), ZHANG Y (张彦), *et al.* Response surface optimization on ultrasound-assisted extraction of hemp cannabinoids and study on anti-oxidation property[J]. Modern Chemical Industry (现代化工), 2019, 39(1): 144-149.
- [27] MO Z Z (磨正遵), SHANG F F (商飞飞), PAN Z T (潘中田), *et al.* Optimization of ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from Guangxi big fruit hawthorn leaves by response surface methodology[J]. Journal of Southern Agriculture (南方农业学报), 2018, 49(5): 986-992.
- [28] SUN J X (孙建霞), ZHANG Y (张燕), HU X S (胡小松), *et al.* Structural stability and degradation mechanisms of anthocyanins[J]. Scientia Agricultura Sinica (中国农业科学), 2009, 42(3): 996-1008.
- [29] SUI X N, BARY S, ZHOU W B. Changes in the color, chemical stability and antioxidant capacity of thermally treated anthocyanin aqueous solution over storage[J]. Food Chemistry, 2016, 192: 516-524.
- [30] YANNIOTIS S, TAOUKIS P, STOFOROS N G, *et al.* Advances in food process engineering research and applications[M]. New York: Springer, 2011: 489-497.
- [31] WU X H, LIN Q W, BELWAL T, *et al.* Effect of advanced/hybrid oxidation process involving ultrasonication and ultraviolet radiation (sonophotolysis) on anthocyanin stability: Degradation kinetics and mechanism[J]. Food Chemistry, 2021, 370: 131083.