

紫球藻共生真菌产物中紫红色色素的稳定性及抗氧化性研究

程文¹, 许伟², 邵荣^{1,2*}¹常州大学石油化工学院, 常州 213164; ²盐城工学院化学与生物工程学院, 盐城 224051

摘要:采用分光光度法检测紫球藻共生真菌发酵产物紫红色色素的稳定性, 考察不同条件对紫红色色素稳定性的影响, 并通过清除 ABTS 及羟基自由基的方法研究了色素的抗氧化性。结果表明: 该色素具有良好的光热稳定性, 但耐氧化性较差; 还原剂 Na₂SO₃ 对该色素具有增色作用; 该色素对大部分金属离子稳定, 但对 Cu²⁺、Fe³⁺ 敏感; pH 对色素稳定性影响较为显著; 盐类、糖类食品添加剂对该色素具有护色作用。该色素具有较强的清除 ABTS 及羟基自由基的能力, 对 ABTS 及羟基自由基的清除率分别为 99.69% 和 80.95%。

关键词:紫球藻; 共生真菌; 紫红色色素; 稳定性; 抗氧化

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.05.024

Stability and Antioxidant Activity of Amaranth Pigments Produced by Symbiotic Fungi Isolated from *Porphyridium purpureum*

CHENG Wen¹, XU Wei², SHAO Rong^{1,2*}¹School of Petrochemical Engineering, Changzhou University, Changzhou 213164, China;²School of Chemical and Biological Engineering, Yancheng Institute of Technology, Yancheng 224051, China

Abstract: The stability and antioxidant activity of amaranth pigments extracted from symbiotic fungi isolated from *Porphyridium purpureum* were investigated. The stability of the pigment was determined by the change of pigments absorbance value using spectrophotometry, and the antioxidant activity was evaluated using the method of scavenging 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) and hydroxyl free radicals. The results showed that the pigments were stable under these conditions such as heating, UV, indoor natural light, Na₂SO₃, even in the presence of NaCl, glucose, sucrose, maltose, or metal-ions (K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ and Zn²⁺). However, the pigments were bleached by H₂O₂ and even unstable under sunlight, the color of the pigments changed with pH and also changed to brown in the presence of Cu²⁺ or Fe³⁺ ions. Besides, the amaranth pigments showed good antioxidant activity, when the concentration of pigments was 12.5 mg/mL, the scavenging percentage of ABTS and hydroxyl free radicals reached 99.69% and 80.95%, respectively.

Key words: *Porphyridium purpureum*; symbiotic fungi; amaranth pigments; stability; antioxidant

与人工合成色素相比,天然色素因其无毒、安全性高、色泽自然,且具有很高的营养价值和药理功能而日益受到重视^[1]。天然色素一般来源于资源有限的动植物^[2-5]。研究表明,微生物也可作为天然色素的来源^[6-8]。微生物生长繁殖迅速,不受时间与空间的限制,可大规模生产,克服了动植物资源有限的问题^[6]。色素的稳定性是色素在应用中的一个重要指标,色素稳定性的好坏将直接影响着色物质的色泽和品质^[9]。但天然色素的稳定性差,从而影响

其应用^[10-12]。本课题组前期从紫球藻共生真菌中筛选获得一株产天然紫红色色素的菌株,该菌株通过液体发酵、提取、分离后得到紫红色色素,初步研究表明该色素具有一定的开发与利用价值。因此,本文对紫红色色素的稳定性和抗氧化性进行了研究,为该色素的进一步开发利用提供一定的依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 材料

共生真菌,从紫球藻(*Porphyridium purpureum*)中筛选获得。该菌株于2013年9月保藏于中国微生物保藏中心(北京),保藏号为8168,经鉴定为刀

收稿日期:2014-03-05 接受日期:2014-07-02

基金项目:国家自然科学基金(31101912);江苏省自然科学基金(BK20111420)

* 通讯作者 Tel:86-015105106336; E-mail:shaor1973@163.com

孢蜡蚧菌 (*Lecanicillium psalliotae*)^[13]。采用该菌进行液体发酵,所得发酵液产物经浓缩、提取分离后获得紫红色色素。

1.1.2 试剂

乙醇、正丁醇、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、淀粉、抗坏血酸、柠檬酸、亚硫酸钠、30% 双氧水(均为分析纯,购自江苏彤晟化学试剂有限公司);ABTS[>98% 色谱纯,购自 Sigma-aldrich(上海)贸易有限公司];邻菲罗啉(分析纯,购自上海山浦化工有限公司);其它试剂均为分析纯,并用蒸馏水配制溶液。

1.1.3 仪器

UV2310II 紫外/可见分光光度计(上海天美科学仪器有限公司);DZF-6050 真空干燥箱、DK-BD 电热恒温水槽(上海精宏实验设备公司);SHZ-III 循环水式真空泵、RE-2000B 旋转蒸发仪(上海雅荣生化设备仪器有限公司);AUY220 电子天平[岛津国际贸易(上海)有限公司];TG11-18K 离心机(太仓市华美生化仪器厂);PHS-3C 精密 pH 计(上海精密科学仪器有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 色素的提取

菌株接种在马铃薯葡萄糖液体培养基中,于 28 ℃ 静置培养 7~9 d。将发酵液抽滤,滤液旋转蒸发,浓缩至原体积的 1/5。向浓缩液中加入 3 倍体积的无水乙醇,4 ℃ 冷藏过夜,抽滤除去多糖、蛋白等不溶物;将滤液旋转蒸发至原体积的 1/10,用 2 倍体积的乙酸乙酯进行萃取,此过程重复三次,将萃取的乙酸乙酯合并,加入无水硫酸钠去除水分,过滤,将滤液真空旋转蒸发至干,于真空干燥箱中干燥备用。

1.2.2 光谱扫描

取上述样品溶于蒸馏水,以蒸馏水为对照,置于 UV2310II 紫外/可见分光光度计下,在 200~800 nm 范围内进行光谱扫描,检测最大吸收波长,测得结果为 520 nm,将其作为测定波长。

1.2.3 温度对色素稳定性的影响

将色素溶解于蒸馏水中进行稳定性研究,使对照组的吸光度在 0.4~0.7 之间。

分别取样品溶液 5 mL 置于 20、40、60、80、100 ℃ 的温度下恒温水浴处理 1~3 h,每隔 1 h 取出样品,冷却至室温,测定其在 520 nm 处的吸光度,计算色素残存率,并分析不同温度对色素稳定性的影响。

1.2.4 pH 对色素稳定性的影响

将样品溶于 pH 为 2、4、6、8、10、12 的缓冲溶液

中,室温条件下,每隔 1 h 测定其在 520 nm 处的吸光度,计算色素残存率,分析不同 pH 对色素稳定性的影响。

1.2.5 光照对色素稳定性的影响

分别取样品溶液 5 mL,置于室外日光、室内散射光、紫外光及暗室条件下处理,每隔 12 h 测定其在 520 nm 处的吸光度,计算色素残存率,分析不同光照条件对色素稳定性的影响。

1.2.6 H₂O₂ 对色素稳定性的影响

将氧化剂 H₂O₂ 分别配成终浓度为 0.10%、0.25%、0.50%、1.00% 的紫红色色素溶液,以不加 H₂O₂ 为对照(0.00%),每隔 2 h 测定其在 520 nm 处的吸光度,计算色素残存率,分析氧化剂对色素稳定性的影响。

1.2.7 Na₂SO₃ 对色素稳定性的影响

将还原剂 Na₂SO₃ 配成终浓度为 1.0、2.5、5.0、25.0、50.0 μg/mL 的色素溶液,以不加 Na₂SO₃ 为对照,每隔 2 h 测定其在 520 nm 处的吸光度,计算色素残存率,分析还原剂对色素稳定性的影响。

1.2.8 金属离子对色素稳定性的影响

分别将金属离子 Na⁺、Ca²⁺、Cu²⁺、Fe²⁺、Fe³⁺、Zn²⁺、Mg²⁺、K⁺ 配成终浓度为 1.0、2.5、5.0 mmol/L 的色素溶液,并以不添加金属离子为对照,观察色素颜色变化,室温静置每隔 2 h 测定其在 520 nm 处的吸光度,计算色素残存率。

1.2.9 常用食品添加剂对色素稳定性的影响

分别将氯化钠、氯化钾、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、淀粉、抗坏血酸、柠檬酸配成浓度为 5.0 mmol/L 的色素溶液,并以不添加添加剂为对照,室温静置每隔 2 h 测定其在 520 nm 处的吸光度,计算色素残存率,分析不同食品添加剂对色素稳定性的影响。

1.2.10 色素对 ABTS 自由基的清除能力

参照 Cao 等^[14]的方法并作略微修改来测定色素对 ABTS 自由基的清除能力。将 2.45 mmol/L 的过硫酸钾加入到 7.00 mmol/L 的 ABTS 水溶液中,黑暗处理 16 h,形成稳定溶液。取适量上述溶液加水,调节溶液使其在 734 nm 处的吸光度为 0.700 ± 0.01。取不同浓度的色素提取液 150 μL,加入 3 mL 的 ABTS 溶液,室温下反应 6 min,测定 734 nm 处的吸光度,以水作对照。ABTS·清除率的计算公式如下:

$$\text{ABTS} \cdot \text{清除率}(\%) = (1 - A_1/A_0) \times 100 \quad (1)$$

A_0 是以蒸馏水代替色素的吸光度, A_1 是加色素的吸光度。

1.2.11 色素对羟基自由基的清除能力

采用邻二氮菲法对色素清除羟基自由基的能力进行测定。1.0 mL 的邻菲罗啉(2 mmol/L), 4.0 mL 磷酸盐缓冲液(pH 6.0, 0.2 mol/L), 1.0 mL 蒸馏水, 1.0 mL 的 FeSO_4 (2 mmol/L), 1.0 mL 的 H_2O_2 (2 mmol/L, 现配现用), 振荡混匀, 在 37 °C 水浴 60 min, 记作 B_b ; 以 1.0 mL 蒸馏水代替 1.0 mL H_2O_2 , 其它条件同 B_b 处理, 记作 B_c ; 以 1.0 mL 不同浓度的提取液代替 1.0 mL 蒸馏水, 其它条件同 B_b 处理, 记作 B_s 。 B_b 、 B_c 、 B_s 的吸光度在 510 nm 处测定。 $\cdot\text{OH}$ 清除率的计算公式如下:

$$\cdot\text{OH} \text{ 清除率} (\%) = (B_s - B_b) / (B_c - B_b) \times 100\% \quad (2)$$

上述所有实验均重复三次 ($n=3$), 并且标准偏差(RSD)小于 5%。

2 结果与分析

2.1 温度对色素稳定性的影响

天然色素的热稳定性是其在工业中潜在应用的重要指标。该色素在 20 ~ 100 °C 条件下吸光度值的变化如图 1 所示。由图 1 可知, 色素在 20 ~ 60 °C 条件下, 溶液吸光度随着时间的延长而略有上升; 80 ~ 100 °C 下, 溶液吸光度值随着时间的延长而降低。加热 3 h 后, 在 20、30、60、80 °C 条件下损失低于 1.0%, 在 100 °C 条件下损失率为 8.9%。由此可知, 该紫红色色素具有良好的热稳定性。

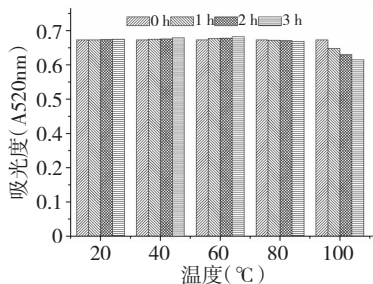


图 1 温度对紫红色色素稳定性的影响

Fig. 1 Effect of temperature on the stability of the amaranth pigments

2.3 pH 对色素稳定性的影响

图 2 显示了在不同 pH 溶液中色素吸光度的变化。由结果可知, 中性和弱酸性的条件下, 该色素表现出良好的稳定性, 色素在碱性条件下颜色由紫红色变为浅灰色, 残留率低于 50%。该研究结果为紫

红色色素在食品加工以及其他应用中提供一定的理论依据。

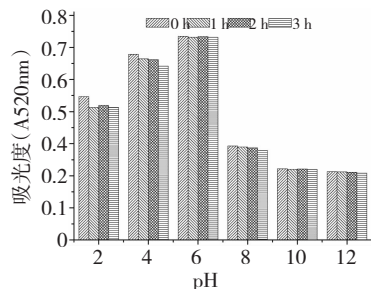


图 2 pH 对紫红色色素稳定性的影响

Fig. 2 Effect of pH on the stability of the amaranth pigments

2.4 光照对色素稳定性的影响

如图 3 所示, 考察了色素在不同光照条件下的稳定性。在室内自然光、紫外光和避光条件下色素损失较小, 96 h 后残留率均高于 85.00%; 而在室外直射光照射 24 h 后, 色素有效成分损失显著, 残留率仅为 33.60%, 96 h 后色素颜色褪去为无色。结果显示, 室内散射光、紫外光和避光对色素稳定性无明显影响, 而太阳光对色素的稳定性有显著影响。因此, 该色素在应用保存过程中应避免太阳光的直射。

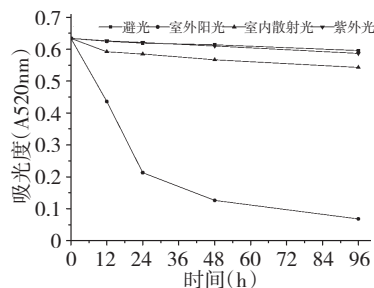


图 3 光照对紫红色色素稳定性的影响

Fig. 3 Effect of light on the stability of the amaranth pigments

2.5 H_2O_2 对色素稳定性的影响

天然色素通常可以被氧化或还原成另一种化学

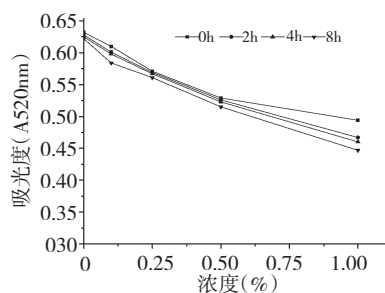


图 4 H_2O_2 对紫红色色素稳定性的影响

Fig. 4 Effect of H_2O_2 on the stability of the amaranth pigments

结构^[15]。氧化剂 H_2O_2 对紫红色色素的影响,结果如图 4 所示。随着 H_2O_2 浓度的增加,色素的残存率降低,且在 2 h 内色素有效成分明显减少,处理时间越长,色素残留量越少。结果表明,氧化剂 H_2O_2 对色素的稳定性有显著影响。

2.6 Na_2SO_3 对色素稳定性的影响

由图 5 可知,随着还原剂 Na_2SO_3 浓度、反应时间的增加,紫红色色素吸光度增加。当浓度低于 $10 \mu\text{g/mL}$ 时,增色作用明显;浓度高于 $10 \mu\text{g/mL}$ 时,增色作用趋于平缓。结果显示,还原剂 Na_2SO_3 对色

素具有增色作用。

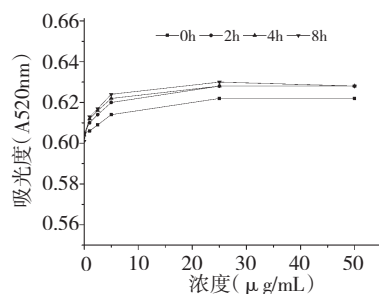


图 5 Na_2SO_3 对紫红色色素稳定性的影响

Fig. 5 Effect of Na_2SO_3 on the stability of the amaranth pigments

表 1 金属离子对紫红色色素稳定性的影响

Table 1 Effect of metal ions on the stability of the amaranth pigments

金属离子 Metal ions	离子浓度 Metal ions concentration (mmol/L)	处理前 Before processing (OD_{520})	处理后 After processing (OD_{520})	色素残存 Pigment survival (%)	颜色 color
空白组 Control	-	0.555	0.555	100	紫红 amaranth
Na +	1	0.555	0.555	100	紫红 amaranth
	2.5	0.555	0.555	100	紫红 amaranth
	5	0.555	0.556	100.18	紫红 amaranth
K +	1	0.555	0.554	>9.82	紫红 amaranth
	2.5	0.555	0.549	98.92	紫红 amaranth
	5	0.555	0.541	97.48	紫红 amaranth
Mg ²⁺	1	0.555	0.483	87.03	紫红 amaranth
	2.5	0.555	0.468	84.32	紫红 amaranth
	5	0.555	0.443	79.82	紫红 amaranth
Ca ²⁺	1	0.555	0.523	94.23	紫红 amaranth
	2.5	0.555	0.507	91.35	紫红 amaranth
	5	0.555	0.498	89.73	紫红 amaranth
Zn ²⁺	1	0.555	0.285	51.35	浅紫红 Light amaranth
	2.5	0.555	0.274	48.37	浅紫红 Light amaranth
	5	0.555	0.27	48.65	浅紫红 Light amaranth
Cu ²⁺	1	0.555	0	0	棕色 Brown
	2.5	0.555	0	0	棕色 Brown
	5	0.555	0	0	棕色 Brown
Fe ³⁺	1	0.555	0	0	棕色 Brown
	2.5	0.555	0	0	棕色 Brown
	5	0.555	0	0	棕色 Brown

2.7 金属离子对色素稳定性的影响

由表 1 可知,不同浓度的金属离子 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 对紫红色色素稳定性影响不大,而加入

Zn^{2+} 使色素颜色明显变浅, Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 使色素颜色变为棕色。由结果可知,该色素对 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 敏感,对其他多种常见金属离子稳定性良好。

2.8 常用食品添加剂对色素稳定性的影响

如图 6 所示,在溶液中分别加入氯化钠、氯化钾、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和淀粉,色素吸光度无明显变化;而加入柠檬酸或抗坏血酸后,溶液吸光度明显减小,这可能是因为加入酸性物质时溶液酸性增强,从而使色素不稳定,这与 pH 对色素的影响相一致。结果表明盐类和糖类食品添加剂对色素具有护色作用,酸性添加剂不利于色素的稳定。

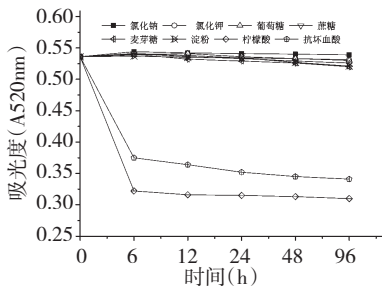


图 6 食品添加剂对紫红色素稳定性的影响

Fig. 6 Effect of food additives on the stability of the amaranth pigments

2.9 色素清除 ABTS 自由基的能力

ABTS 试验是基于抗氧化剂清除稳定的 ABTS 自由基能力的测定。如图 7 所示,随着色素浓度(0.8 ~ 12.5 mg/mL)的增加,清除 ABTS 自由基的能力增强。在浓度为 12.5 mg/mL 时,色素对 ABTS 自由基的清除率达到 99.69%。由此可知,该色素明显含有抗氧化剂,并显示了很强的清除 ABTS 自由基的能力。

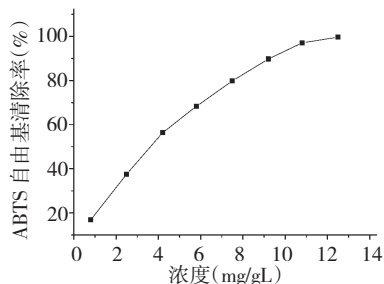


图 7 紫红色素对 ABTS 自由基的清除能力

Fig. 7 ABTS radical scavenging activity of the amaranth pigments

2.10 色素清除羟基自由基的能力

如图 8 所示,随着色素浓度(2.5 ~ 12.5 mg/mL)的增加,对羟基自由基的清除能力增强。当达到 12.5 mg/mL 时,其清除率达到 80.95%。结果显示,该色素具有一定清除羟基自由基的能力。

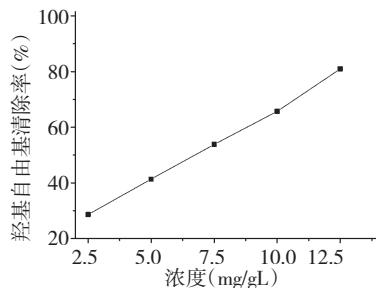


图 8 色素对羟基自由基的清除能力

Fig. 8 Hydroxyl radical scavenging activity of the amaranth pigments

3 结论

本文通过分光光度法考察了紫球藻共生真菌发酵产物中紫红色色素的稳定性,并进一步研究了该色素抗氧化能力。此色素具有一定的耐热性,可高温(80 ℃)加热,色素在中性和弱酸性条件下稳定,盐类、糖类食品添加剂以及金属离子 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 对色素稳定性无明显影响。而太阳光、氧化剂会使色素褪色, Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 使色素变色,影响其稳定性,在加工应用中应避免这些因素。同时,该色素还具有抗氧化能力,色素能显著地清除 ABTS 和羟基自由基,清除率分别达到 99.69% 和 80.95%。该紫红色色素含有多种成分,需进一步分离、鉴定;另外可对该菌产色素的条件进行优化,为该菌应用于工业生产提供依据。

参考文献

- 1 Gunasekaran S, Poorniammal R. Optimization of fermentation conditions for red pigment production from *Penicillium* sp. under submerged cultivation. *Afr J Bio-technol*, 2008, 7: 1894-1898.
- 2 Aberoumand A. A review article on edible pigments properties and sources as natural biocolorants in food stuff and food industry. *World J Dairy Food Sci*, 2011, 6: 71-78.
- 3 Buckow R, Kastell A, Terefe NS, et al. Pressure and temperature effects on degradation kinetics and storage stability of total anthocyanins in blueberry juice. *J Agric Food Chem*, 2010, 58: 10076-10084.
- 4 Murthy pushpa S, Manjunatha MR, Sulochannama G, et al. Extraction, characterization and bioactivity of coffee anthocyanins. *Eu J Biol Sci*, 2012, 4: 13-19.
- 5 Cai ZX, Wu JL, Chen L, et al. Purification and characterization of aquamarine blue pigment from the shells of abalone

- (*Haliotisdiscus hannai* Ino). *Food Chem*, 2011, 128: 129-133.
- 6 Malik K, Tokkas J, Goyal S. Microbial pigment; A review. *Int J Microbial Res Technol*, 2012, 1: 361-365.
 - 7 Meinicke RM, Vendruscolo F, Moritz DE, et al. Potential use of glycerol as substrate for the production of red pigments by *Monascus ruberin* submerged fermentation. *Biocat Agric Biochem*, 2012, 1: 238-242.
 - 8 Daniel JD, Silvana TS, Plinho FH, et al. Production of extracellular b-glucosidase by *Monascus purpureus* on different growth substrates. *Process Biochem*, 2007, 42: 904-908.
 - 9 Tan YL(谭友莉), Ma YT(马云桐), Yan ZY(严铸云), et al. Study on the stability of red pigments produced by endophytic fungi in *coptis deltoidea* C. Y. Cheng et Hsiao. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2013, 25: 1101-1106.
 - 10 Qiu WF(邱伟芬), Wang HF(汪海峰). Stability of natural lycopene under different conditions. *J Food Sci*(食品科学), 2004, 25(2): 56-60.
 - 11 Ouyang J(欧阳杰), Zhao JL(赵佳丽), Chen XH(陈旭华). Advances in stabilization technology for natural pigments. *Food Sci Tech*(食品科技), 2006, 31: 182-184.
 - 12 Lu XH(卢雪华), Cheng J(成坚), Bai WD(白卫东). Present situation and countermeasures of the food pigment Industry in our country. *China Condiment*(中国调味品), 2010, 5(35): 35-39.
 - 13 Wu X(武侠), Liu AH(刘爱华), Cao JZ(曹君正), et al. A kind of *Lecanicillium psalliotae* strains(一种刀孢蜡蚧菌菌株). CN102417886 B, 2013-5-22.
 - 14 Cao JG, Xia X, Chen XF, et al. Characterization of flavonoids from *Dryopteris erthrosora* and evaluation of their antioxidant, anticancer and acetylcholinesterase inhibition activities. *Food Chem Toxicol*, 2013, 51: 242-250.
 - 15 Kannan P, Ganjewala D. Preliminary characterization of melanin isolated from fruits and seeds of *Nyctanthes arbortristis*. *J Sci Res*, 2009, 1: 655-661.
-
- (上接第 930 页)
- 85 Valcic S, et al. Phytochemical, morphological and biological investigations of propolis from Central Chile. *Z Naturforsch C*, 1999, 54: 406-416.
 - 86 Piccinelli AL, et al. Cuban and Brazilian red propolis; botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem*, 2011, 59: 6484-6491.
 - 87 Da Silva Frozza CO, et al. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food Chem Toxicol*, 2013, 52: 137-142.
 - 88 Sulaiman GM, et al. Chemical characterization of Iraqi propolis samples and assessing their antioxidant potentials. *Food Chem Toxicol*, 2011, 49: 2415-2421.
 - 89 Li YJ, et al. Therapeutic effects of propolis essential oil on anxiety of restraint-stressed mice. *Human Exp Toxicol*, 2012, 31: 157-165.
 - 90 Patricio E, et al. The propolis of stingless bees; terpenes from the tibia of three *Frieseomelitta* species. *J Insect Physiol*, 2002, 48: 249-254.
 - 91 Torres RNS, et al. The volatile constituents of propolis from Piaui. *Quim Nova*, 2008, 31: 479-485.
 - 92 Bankova V, et al. Seasonal variations in essential oil from Brazilian propolis. *J Essential Oil Res*, 1998, 10: 693-696.
 - 93 De Albuquerque IL, et al. Constituents of the essential oil of Brazilian green propolis from Brazil. *J Essent Oil Res*, 2008, 20: 414-415.
 - 94 De Castro Ishida VF, et al. A new type of Brazilian propolis: Prenylated benzophenones in propolis from Amazon and effects against cariogenic bacteria. *Food Chem*, 2011, 125: 966-972.
 - 95 Sheng J, et al. Antioxidant activity of ethanol and petroleum ether extracts from Brazilian propolis. *Eur Food Res Technol*, 2007, 225: 249-253.
 - 96 Marcucci MC, et al. Identification of amino acids in Brazilian propolis. *Z Naturforsch C*, 1996, 51(1-2): 11-14.
 - 97 Pereira AS, et al. Rapid screening of polar compounds in Brazilian propolis by high-temperature high-resolution gas chromatography-mass spectrometry. *J Agric Food Chem*, 2000, 48: 5226-5230.
 - 98 Mayworm MAS, et al. Does propolis contain tannins? *Evidence-based Compl Alt*, 2014, 1-4.