

pH 和温度对蓝莓果渣花青素抑菌保鲜应用性质的影响

翟悦¹, 赵海桃¹, 符群^{1,2*}

¹东北林业大学林学院; ²黑龙江省森林食品资源利用重点实验室, 哈尔滨 150040

摘要:本研究对蓝莓果渣花青素在不同 pH 值和温度下颜色和性能进行对比评价,旨在探究其在食品保鲜应用中的性质呈现,推进蓝莓产业中副产物果渣的多途径、高值化利用。以含量、颜色、DPPH 自由基清除率、羟基自由基清除率、总还原能力、抗脂质过氧化能力、抑菌圈直径、最低抑菌浓度和最低杀菌浓度为考察指标,研究 pH 和温度对蓝莓果渣花青素颜色和性能的影响,并以菌液电导率、蛋白质含量和碱性磷酸酶活性为指标探究其抑菌机理。结果表明,在 pH2~8 范围内,蓝莓果渣花青素呈现从深红到深紫的显著色差 ($P > 0.05$);在 -18~70 °C 的处理温度条件下,蓝莓果渣花青素的含量、抗氧化活性和抑菌活性均随处理时间延长而下降,整体颜色趋势偏向蓝绿色。蓝莓果渣花青素改变供试菌株细胞膜通透性,与菌液电导率、蛋白质含量和碱性磷酸酶活性呈现正相关,抑制供试菌株的生长。蓝莓果渣花青素在不同 pH 和温度下应用性质存在显著差异,显示出较强的体外抗氧化性及抑菌性,可应用于呈色保鲜剂开发应用。

关键词:蓝莓果渣花青素;稳定性;抗氧化活性;抑菌性能;抑菌机理

中图分类号:R284

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2023)6-1007-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2023.6.010

Effect of pH and temperature on the property of anthocyanins from blueberry pomace in antibacterial preservation applications

ZHAI Yue¹, ZHAO Hai-tao¹, FU Qun^{1,2*}

¹School of Forestry, Northeast Forestry University; ²Key Laboratory of Forest Food Resources Utilization of Heilongjiang Province, Harbin 150040, China

Abstract: In this study, the colour and properties of anthocyanins from blueberry pomace were comparatively evaluated at different pH values and temperatures, with the aim of investigating the presentation of their properties in food preservation applications and promoting the multi-path and high-value utilisation of by-product pomace in the blueberry industry. The effects of pH and temperature on the colour and properties of blueberry pomace anthocyanins were investigated using content, colour, DPPH radical scavenging, hydroxyl radical scavenging, total reducing capacity, anti-lipid peroxidation capacity, inhibition circle diameter, minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration as indicators, and the inhibition mechanism was investigated using liquid conductivity, protein content and alkaline phosphatase activity as indicators. The results showed that blueberry pomace anthocyanins showed a significant colour difference from dark red to dark purple ($P > 0.05$) in the pH range of 2-8. Under the treatment temperature of -18-70 °C, the content, antioxidant activity and antibacterial activity of blueberry pomace anthocyanins decreased with increasing treatment time, and the overall colour trend was blue-green. The anthocyanins of blueberry pomace changed the cell membrane permeability of the test strains and showed positive correlation with the conductivity, protein content and alkaline phosphatase activity of the bacterial solution, inhibiting the growth of the test strains. Blueberry pomace anthocyanins showed significant differences in application properties at different pH and temperature, showing strong *in vitro* antioxidant and antibacterial properties, which can be applied to the development of colour preservative applications.

Key words: blueberry pomace anthocyanins; stability; antioxidant activity; antibacterial properties; antibacterial mechanism

熟时果实呈深蓝色,果肉细软,多浆汁,富含多种营养物质,是一种药食两用的功能性保健水果^[1,2]。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,2021年中国蓝莓产量为47.41万吨,其中15.4万吨用于加工,在加工过程中产生了大量的副产物果渣^[3]。研究表明,蓝莓果渣中花青素含量超过了蓝莓果实中花青素含量的最低水平^[4],具备良好的资源再利用价值。目前蓝莓果渣副产物的综合利用以直接作为动物饲料、食品添加剂,以及加工为缓释型产品为主^[5,6],而蓝莓花青素作为天然着色剂与人工色素相比具有丰富的功能活性和特异的酸碱呈色性质。因此,以蓝莓果渣为原料提取花青素,不仅极大程度地变废为宝,同时有效解决蓝莓产业中节能减排问题,充分利用其应用性质开发高价值终端产品,延长蓝莓资源的产业链。

本研究以蓝莓果渣为试材,评价食品加工和保藏中不同pH和温度对蓝莓果渣花青素颜色和性能的影响,评价和分析抗氧化活性和抗菌活性,并研究抗菌抑制的机制,以期为后续开发新型具有抗氧化和抑菌活性的呈色食品保鲜膜等实践性应用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

蓝莓果渣,2022年黑龙江省农科院园艺分院提供;盐酸、水杨酸、硫酸亚铁等试剂均为分析纯;D101大孔吸附树脂(郑州和成新材料科技有限公司)。大肠埃希氏菌 Fsccl49002、金黄色葡萄球菌 CMCC(B)26003,由东北林业大学微生物实验室提供。考马斯亮蓝定量试剂盒(普利莱基因技术有限公司);碱性磷酸酶试剂盒(普利莱基因技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 蓝莓果渣花青素的提取与含量测定

蓝莓果渣低温烘干至恒重,粉碎过60目筛,按料液比1:25(g/mL)超声波辅助酸性乙醇(pH=3,体积分数为80%)提取蓝莓果渣中的花青素,30℃提取20min,重复提取2次,以D101大孔树脂纯化后冷冻干燥备用,纯化条件为:上样液质量浓度3.5g/L、上样液体积160mL,静态吸附12h,先以2倍树脂体积水洗除杂,再用60%乙醇洗脱。

采用pH示差法测定蓝莓果渣花青素的含量^[7]。取2份花青素溶液15mL,分别用pH1.0和pH4.5的缓冲溶液定容至25mL,避光静置90min,测定其在510nm和710nm的吸光度,计算其花青

素含量。

$$\text{花青素含量}(\text{mg/g}) = \frac{A \times M \times K \times 100}{\epsilon \times L} \quad (1)$$

式中: $A = (A_{510 \text{ nm}, \text{pH}1.0} - A_{710 \text{ nm}, \text{pH}1.0}) - (A_{510 \text{ nm}, \text{pH}4.5} - A_{710 \text{ nm}, \text{pH}4.5})$;M为矢车菊3-O-葡萄糖苷相对分子质量,449.21g/mol;K为溶液稀释倍数; ϵ 为矢车菊3-O-葡萄糖苷的摩尔消光系数,26900L/(mol·cm);L为比色皿光程,1cm。

1.2.2 pH对蓝莓果渣花青素颜色的影响

使用柠檬酸和磷酸二氢钠配置得到pH2.2、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0的标准溶液,分别加入1mL的蓝莓果渣花青素(浓度为1mg/mL),避光平衡60min,混合均匀后观察颜色变化,以蒸馏水和各缓冲溶液为参比液,扫描花青素溶液在不同pH下的可见吸收光谱,扫描波长设置为400~750nm,记录 A_{420} 、 A_{520} 、 A_{530} 、 A_{max} 、 A_{620} 、 A_{720} 以计算其颜色密度(colour density, CD)、颜色强度(colour intensity, CI)、降解指数(degradation index, DI)及颜色色调(colour tones, CT)^[8]。用色差仪分别测定色值的变化范围和程度,确定其在不同pH条件下的变色范围。其中,CD = $A_{\text{max}} - A_{720}$;CI = $A_{420} + A_{520} + A_{620}$;DI = A_{420} / A_{max} ;CT = A_{420} / A_{530} 。

1.2.3 温度对蓝莓果渣花青素性能的影响

1.2.3.1 温度对蓝莓果渣花青素保留率的影响

取25mL蓝莓果渣花青素(浓度为1mg/mL)溶液于烧杯中,分别在-18、4、25、30、40、50、60、70℃条件下避光3h,每隔1h取样,待溶液冷却后以蒸馏水作参比溶液,用pH示差法测定其含量,重复测定3次,求平均值,计算花青素的保留率。

$$\text{花青素保留率} = \frac{C}{C_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中, C_0 为样液初始花青素含量; C 为样液处理后花青素含量。

1.2.3.2 温度对蓝莓果渣花青素颜色的影响

取25mL蓝莓果渣花青素溶液于烧杯中,分别在-18、4、25、30、40、50、60、70℃条件下避光3h,每隔1h取样,待溶液冷却后观察颜色变化。用色差仪分别测定色值的变化程度,确定在不同温度条件下时间变化的变色范围。

1.2.3.3 温度对蓝莓果渣花青素抗氧化性能的影响

1.2.3.3.1 蓝莓果渣花青素的DPPH自由基清除能力

参照Jiao等^[9]的方法测定。取不同浓度蓝莓

果渣花青素溶液 2 mL 及 2 mL 0.2 mmol/L DPPH 溶液, 摇匀, 室温下避光静置 30 min 后在波长 517 nm 测定吸光度 A_x , 同时测定 2 mL 0.2 mmol/L DPPH 溶液与 2 mL 无水乙醇混合液吸光度 A_0 , 以及 2 mL 不同浓度蓝莓果渣花青素溶液与 2 mL 无水乙醇混合液吸光度 A_{x0} 。以 V_c 溶液做空白对照。

$$\text{DPPH 清除率} = (1 - \frac{A_x - A_{x0}}{A_0}) \times 100\% \quad (3)$$

1.2.3.3.2 蓝莓果渣花青素的羟基自由基清除能力

参考 Liu^[10] 的水杨酸法测定, 略改动。以 V_c 为阳性对照, 吸取 1 mL 9 mmol/L 的 FeSO_4 , 同时加入 1 mL 9 mmol/L 乙醇-水杨酸, 摇匀, 再加入 1 mL 蓝莓果渣花青素溶液和 1 mL 6 mmol/L H_2O_2 , 摇匀, 在 37 °C 水温中加热 30 min, 所测的吸光值为 A_1 ; 将 1 mL 蓝莓果渣花青素溶液替换为 1 mL 蒸馏水, 重复上述操作, 所测的吸光值为 A_0 ; 另一个不加 H_2O_2 , 重复上述操作, 所测的吸光值为 A_2 。

$$\text{羟基自由基清除率} = (1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}) \times 100\% \quad (4)$$

1.2.3.3.3 蓝莓果渣花青素的总还原能力

参考 Zhao 等^[11] 的普鲁士蓝还原法测定。取 1.0 mL 不同质量浓度的蓝莓果渣花青素乙醇溶液, 加入 1.0 mL 0.2 mol/LPBS 缓冲液 (pH = 6.6), 加入 1.0 mL 1 g/100 mL $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 50 °C 恒温水浴 20 min, 加入 1.0 mL 10% 三氯乙酸终止反应, 加入 2.0 mL 蒸馏水和 0.4 mL 0.1 g/100 mL FeCl_3 , 充分混匀, 静置 10 min 后测定 700 nm 处吸光度。

1.2.3.3.4 蓝莓果渣花青素的抗脂质过氧化能力

参考 Yu 等^[12] 的硫氰酸铁法测定。每隔 1 h 取 0.1 mL 的反应液, 加入 4.7 mL 体积分数 75% 乙醇与 0.1 mL 300 mg/mL NH_4SCN , 再加入 0.1 mL 0.02 mol/L 的 $\text{FeCl}_2/3.5\%$ 盐酸溶液, 室温反应 3 min, 于 500 nm 处测定吸光度。

1.2.3.4 温度对蓝莓果渣花青素抑菌活性的影响

1.2.3.4.1 抑菌圈实验

采用琼脂-孔洞扩散法 (牛津杯法)^[13], 测定不同温度下蓝莓果渣花青素对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制作用。

1.2.3.4.2 最低抑菌质量浓度和最低杀菌质量浓度的测定

采用二倍稀释法^[14]。根据试管内液体的浑浊度判定花青素对大肠杆菌及金黄色葡萄球菌的 MIC 和 MBC 值。

1.2.4 蓝莓果渣花青素抑菌机理的研究

1.2.4.1 花青素对细菌细胞膜通透性的影响

参考 Chen^[15] 的方法测定。向培养到对数期的菌液中加入 0.1 mg/mL 蓝莓果渣花青素, 培养 8 h, 每隔 1 h 取菌悬液 5 mL, 离心液体测电导率, 对照组以无菌水替代花青素。

1.2.4.2 培养液中蛋白质含量测定

参考 Chen^[15] 的方法测定。取培养到对数期的菌液, 加入花青素使其最终浓度为 0.3%, 每隔 1 h 取样, 离心取上清液, 用考马斯亮蓝法试剂盒测定细菌培养液中蛋白质含量, 对照用蒸馏水替代花青素。

1.2.4.3 培养液中碱性磷酸酶活性测定

参考 Chen^[15] 的方法测定。将 3 倍 MIC 的花青素溶液与菌液等体积混合, 37 °C 摇床培养 8 h, 每隔 1 h 取样, 离心取上清液, 用碱性磷酸酶试剂盒测定, 对照组以蒸馏水替代花青素。

1.3 数据处理

采用 Excel 2019、Origin 2022b 进行数据分析和绘图, 采用 SPSS 23.0 软件对数据进行处理。

2 结果与分析

2.1 pH 对蓝莓果渣花青素的影响

由表 1 可知, 随着 pH 值升高, 蓝莓果渣花青素溶液最大吸收波长由 515 nm 逐渐红移至 570 nm, 溶液颜色由深红转为深紫色。这与 Zhang^[16] 的研究结果相同, 产生这种现象的原因是蓝莓果渣花青素在不同 pH 溶液中的结构发生了变化, 由红色的黄烺盐阳离子形式逐渐转化为蓝色的醌型碱形式。

表 1 不同 pH 对蓝莓果渣花青素的吸收光谱及颜色的影响

Table 1 Effect of different pH on the absorption spectrum and colour of anthocyanins from blueberry pomace

pH	最大吸收波长 Maximum absorption wavelength (nm)	CD	CI	DI	CT	颜色 Colour	L^*	a^*	b^*
2.2	515	0.190 ± 0.00 ^e	0.448 ± 0.01 ^d	0.545 ± 0.00 ^a	0.136 ± 0.01 ^c	深红	89.61 ± 0.04 ^a	26.44 ± 0.06 ^c	3.85 ± 0.09 ^d
3.0	515	0.117 ± 0.01 ^f	0.359 ± 0.01 ^c	0.683 ± 0.00 ^b	0.119 ± 0.00 ^b	桃红	94.15 ± 0.02 ^b	15.14 ± 0.00 ^d	1.87 ± 0.01 ^a

续表 1 (Continued Tab. 1)

pH	最大吸收波长 Maximum absorption wavelength (nm)	CD	CI	DI	CT	颜色 Colour	L^*	a^*	b^*
4.0	515	0.071 ± 0.01 ^c	0.299 ± 0.00 ^a	0.801 ± 0.01 ^d	0.104 ± 0.01 ^a	浅红	96.79 ± 0.00 ^c	8.83 ± 0.01 ^c	1.25 ± 0.02 ^c
5.0	515	0.082 ± 0.00 ^d	0.317 ± 0.01 ^b	0.779 ± 0.01 ^c	0.110 ± 0.00 ^b	浅红	96.19 ± 0.01 ^c	9.99 ± 0.00 ^c	1.34 ± 0.01 ^c
6.0	515	0.059 ± 0.02 ^b	0.287 ± 0.00 ^a	0.922 ± 0.01 ^e	0.106 ± 0.02 ^a	浅粉	97.38 ± 0.01 ^c	6.04 ± 0.00 ^b	1.37 ± 0.00 ^c
7.0	545	0.048 ± 0.00 ^a	0.312 ± 0.03 ^b	1.086 ± 0.01 ^f	0.117 ± 0.01 ^b	浅紫	95.92 ± 0.00 ^b	0.73 ± 0.01 ^a	0.98 ± 0.03 ^b
8.0	570	0.100 ± 0.01 ^e	0.469 ± 0.03 ^d	0.969 ± 0.01 ^f	0.166 ± 0.01 ^d	深紫	89.53 ± 0.01 ^a	0.27 ± 0.02 ^a	0.07 ± 0.01 ^a

注:同列小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$)

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant differences ($P < 0.05$)

由颜色特征参数可知,随着 pH 值升高,颜色强度 CI 值先减小后增大,颜色密度 CD 值先减小后增大,降解指数 DI 值先增大后减小,颜色色调 CT 值先减小后增大,这和 Luan^[17]的研究结果相近,证明 pH 对蓝莓果渣花青素颜色和吸收光谱的影响很大。在酸性条件下,花青素颜色呈红色,CI 和 CD 值较高,中性条件主要以无色假碱或查尔酮形式存在,CI 值变小。酸性条件下,DI 值最小,说明低 pH 条件有利于蓝莓食品颜色的稳定。

2.2 温度对蓝莓果渣花青素的影响

2.2.1 温度对蓝莓果渣花青素含量的影响

由图 1 可知,随着温度增加,蓝莓果渣花青素的降解加剧,花青素保存率呈下降趋势。在-18 °C、4 °C 和室温(25 °C)条件下处理 5 h,花青素的降解程度较小,但在 60 °C 和 70 °C 条件下处理 5 h 过程中,花青素降解速度加快,加热 5 h 后,花青素保存率低至 48.51% 和 41.19%。Zhang 等^[18]研究发现,随处理温度升高,紫薯花青素含量明显降低,与本研究结果一致。说明当高于 60 °C 的温度处理蓝莓果渣花青素时,降解程度很大。花青素的降解主要是由于热处理、共价键断裂或强化氧化反应引起的氧化^[17]。因此,蓝莓产品加工过程中应尽量避免高温长时间处理。

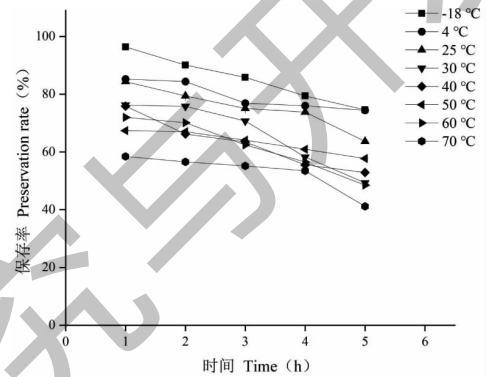


图 1 不同温度对蓝莓果渣花青素保存率的影响

Fig. 1 Effect of different temperatures of anthocyanin retention from blueberry pomace

2.2.2 温度对蓝莓果渣花青素颜色的影响

由图 2 可知,在不同温度下随着处理时间变长,蓝莓果渣花青素的 L^* 和 b^* 值逐渐增大, a^* 值逐渐减小,说明随着处理时间延长,花青素颜色逐渐变亮,并且整体颜色趋势逐渐偏向绿色和蓝色。Jun^[19]等研究发现,随着温度的升高,蓝莓果渣花青素的 L^* 、 a^* 和 b^* 值都呈降低趋势,说明蓝莓果渣花青素在高温下易降解,发生了共价键断裂或氧化反应,花青素的颜色也因此发生了明显的变化,与本试验结果一致。

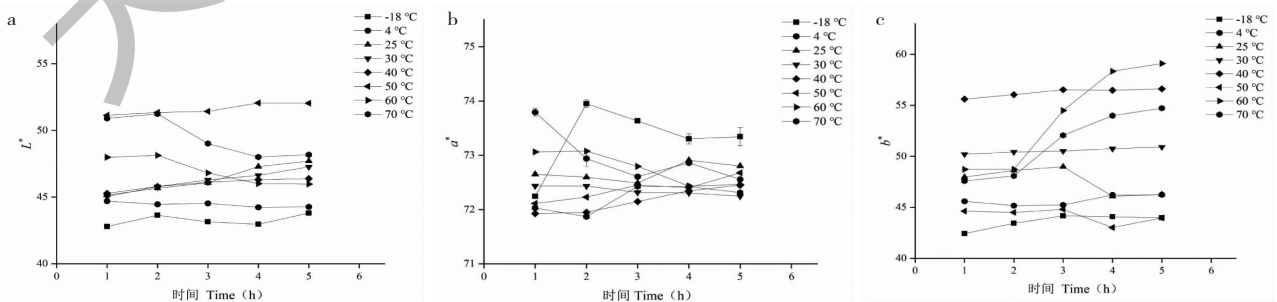


图 2 不同温度对蓝莓果渣花青素颜色的影响

Fig. 2 Effect of different temperatures on colour of anthocyanin from blueberry pomace

2.2.3 温度对蓝莓果渣花青素抗氧化性能的影响

2.2.3.1 蓝莓果渣花青素的 DPPH 自由基清除能力

DPPH· 是一种非常稳定的氮心自由基,清除 DPPH· 的能力反映了烷基自由基、羟基自由基和过氧自由基的存在,它们的作用是终止脂质过氧化链反应,通常用于评估抗氧化剂的供氢能力^[20]。如图 3 所示,随着温度升高,DPPH· 的 IC₅₀ 值呈升高趋势,-18℃ 时的 IC₅₀ 值为 0.218。Wenzig 等^[21] 采用四种不同溶剂得到蓝莓花青素提取物,清除 DPPH· 的 IC₅₀ 值为 25~988 μg/mL,本研究结果均在此范围内,并且显著低于 988 μg/mL,表明蓝莓果渣花青素具有出色的 DPPH· 清除能力。随着温度升高,DP- PH· 的 IC₅₀ 值逐渐升高,蓝莓果渣花青素对 DPPH· 的清除能力逐渐降低,说明在高温条件下,蓝莓果渣花青素发生了降解,活性有所下降,对 DPPH· 的清除能力也因此下降,这与 Lee^[22] 的研究结果一致。

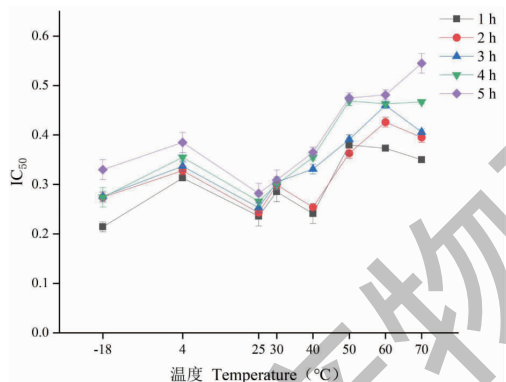
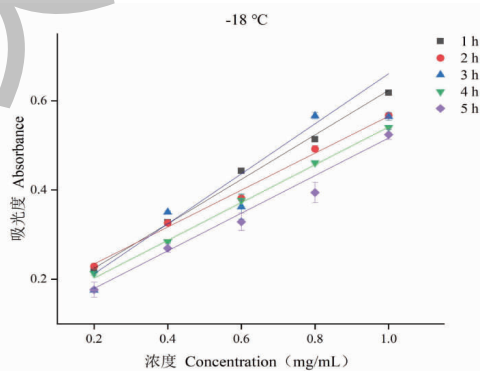


图 3 不同温度下蓝莓果渣花青素 DPPH 自由基清除能力的 IC₅₀ 值

Fig. 3 IC₅₀ values of DPPH radical scavenging capacity of anthocyanin from blueberry pomace at different temperatures

2.2.3.2 蓝莓果渣花青素的羟基自由基清除能力

·OH 可以从生物大分子(如蛋白质和核酸)中



续图 5(Continued Fig.5)

清除氧,从而降低机体的抵抗力,是一种高度反应性的氧自由基。如图 4 所示,随着温度升高,·OH 的 IC₅₀ 值总体呈升高趋势,蓝莓果渣花青素对·OH 的清除能力逐步降低,说明在高温条件下,蓝莓果渣花青素发生了降解,活性有所下降,对·OH 的清除能力也因此下降,这与 Lee^[22] 的研究结果一致。在 25℃ 条件下处理 1 h 时的 IC₅₀ 值明显小于在-18℃ 条件下处理 1 h 的 IC₅₀ 值,说明蓝莓果渣花青素在 25℃ 时对·OH 的清除能力更好。

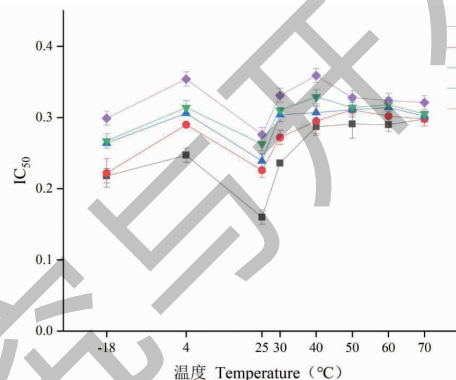
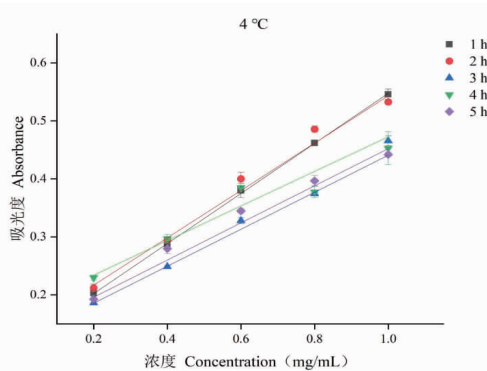


图 4 不同温度下蓝莓果渣花青素羟基自由基清除能力的 IC₅₀ 值

Fig. 4 IC₅₀ values of hydroxyl radical scavenging capacity of anthocyanin from blueberry pomace at different temperatures

2.2.3.3 蓝莓果渣花青素的总还原能力

总还原能力的测定采用普鲁士蓝还原法,溶液吸光度越大相对应的还原能力越强。由图 5 中的拟合直线可以明显看出,不同温度和处理时间条件下蓝莓果渣花青素浓度与总还原能力呈良好的线性关系。在不同温度下,总还原能力均随蓝莓果渣花青素溶液浓度的增加而增加,温度升高和时间增加均对总还原能力有降低影响。这是由于温度升高,花青素发生了异构化或氧化分解反应,导致总还原能力下降,这与 Peng 等^[23] 的研究结果相同。



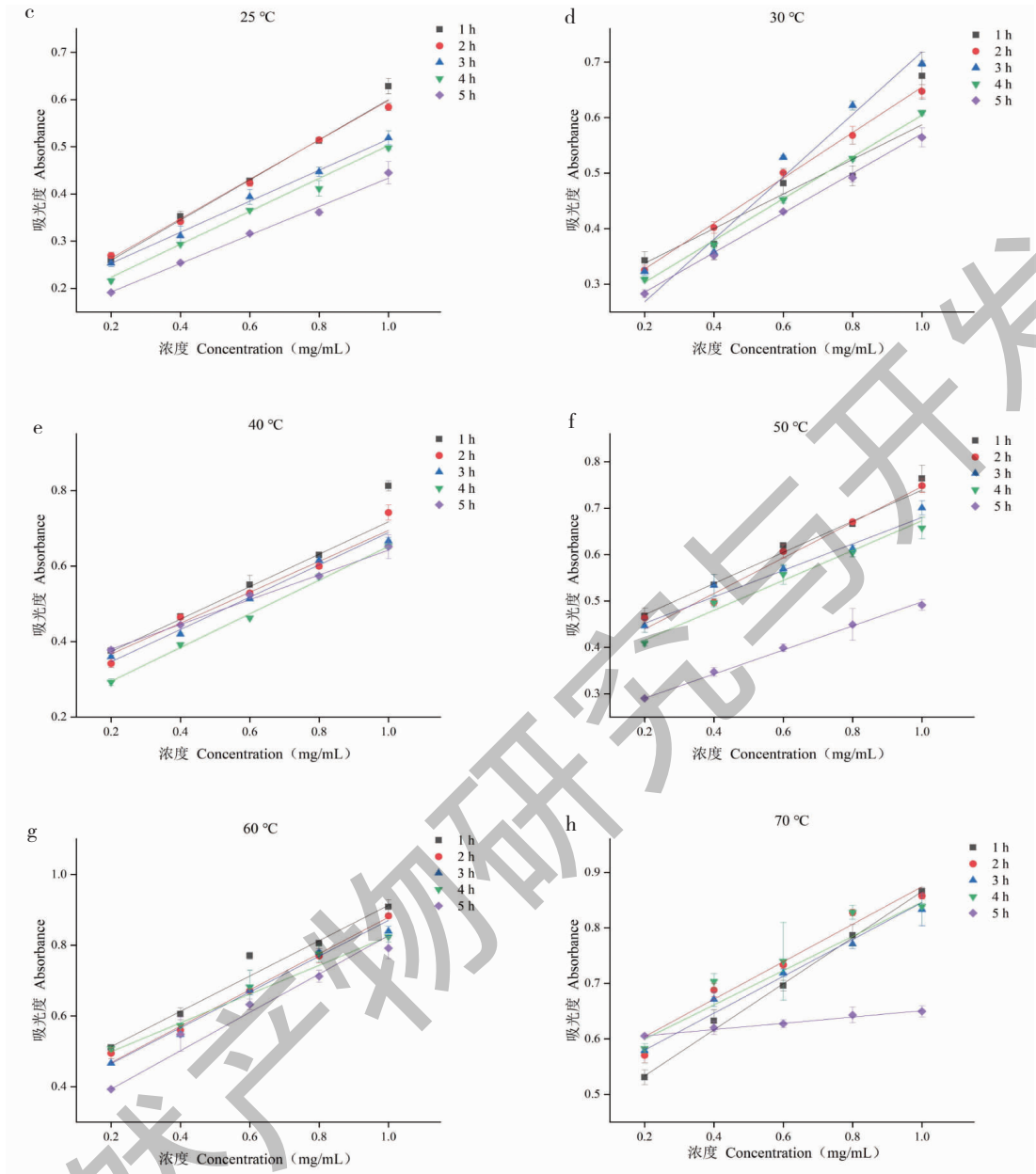


图5 不同温度对蓝莓果渣花青素总还原能力的影响

Fig.5 Effect of different temperatures on the total reduction capacity of anthocyanin from blueberry pomace

2.2.3.4 蓝莓果渣花青素的抗脂质过氧化能力

采用硫氰酸铁法测定抗脂质过氧化能力,溶液吸光度越小相对应的抗脂质过氧化能力越强。由图6中的拟合直线可以明显看出,不同温度和处理时间条件下蓝莓果渣花青素浓度与抗脂质过氧化能力呈良好的线性关系,这与 Roberto^[24]的研究结果相同。在不同温度下,抗脂质过氧化能力均随蓝莓果渣花青素溶液浓度的增加而增加,温度越高,抗脂质过氧化能力逐渐下降;处理时间越长,抗脂质过氧化能力也逐渐下降。这是由于温度升高,花青素发生了异

构化或氧化分解反应,导致抗脂质过氧化能力下降。

2.2.4 蓝莓果渣花青素的抑菌活性

由表2可知,蓝莓果渣花青素对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均具有较好的抑菌作用,且抑菌作用随花青素的浓度上升而增强,对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度均约为0.039 g/L。另外,蓝莓果渣花青素对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的最低杀菌浓度均约为0.078 g/L,说明蓝莓果渣花青素对这两种细菌的抑制作用较为明显,且这种抑制作用在短时间内可以保持稳定。

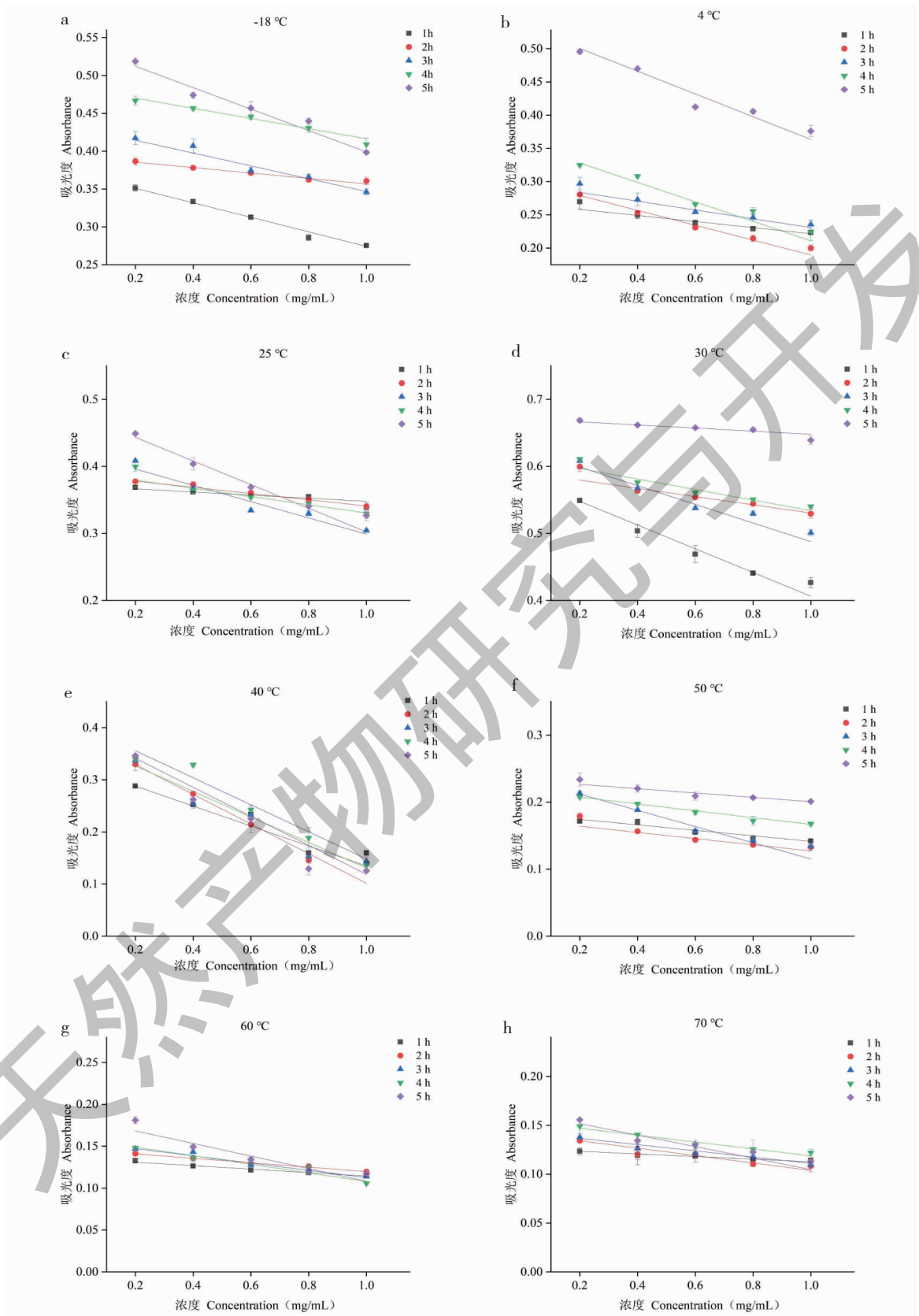


图6 不同温度对蓝莓果渣花青素抗脂质过氧化能力的影响

Fig. 6 Effect of different temperatures on the anti-lipid peroxidation capacity of anthocyanin from blueberry pomace

表2 蓝莓果渣花青素对供试菌种的最低抑菌浓度和最低杀菌浓度

Table 2 Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of anthocyanin from blueberry pomace against the test strains

菌株 Strain	MIC (g/L)	MBC (g/L)
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	0.039	0.078
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	0.039	0.078

菌株对蓝莓果渣花青素的敏感度可以根据其抑菌圈直径反映^[25,26]。结果由图7可知,蓝莓果渣花青素对各测试菌种均表现出良好的抑制作用,抑菌圈直径在13.45~23.25 mm。在测定浓度0.05~1 mg/mL范围内,抑菌效果随着蓝莓果渣花青素的浓度增大而增强,与花青素含量呈正相关;在处理温

度-18~70℃范围内,抑菌效果随温度升高而降低。当处理温度为-18℃,且花青素浓度为1 mg/mL时,大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径可达到22.9 mm和23.25 mm。由此可知,两种试验菌株对蓝莓果渣花青素都很敏感,升高温度会引起花青素的氧化降解,从而导致抑菌活性的降低。

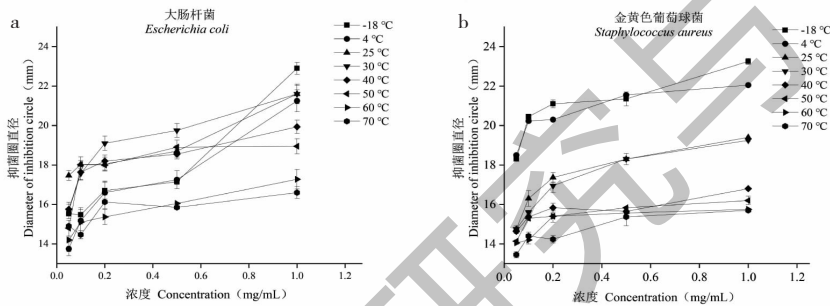


图7 蓝莓果渣花青素对供试菌种的抑制效果

Fig. 7 Inhibition results of anthocyanin from blueberry pomace against the test strains

2.3 蓝莓果渣花青素抑菌机理的研究

2.3.1 对细菌细胞膜通透性的影响

抑菌物质在破坏菌体细胞膜完整性的过程中,增加了菌体细胞膜的渗透性,导致细胞内容物流失^[27],进而使供试菌种培养液的电导率上升,因此供试菌种培养液电导率的变化能够反映细菌细胞膜通透性的变化。由图8所示,随着蓝莓果渣花青素

的长期作用,细菌细胞膜逐渐破裂,通透性发生改变,导致细胞内物质从液体中渗出,菌液电导率上升,且相同时间、相同浓度下,蓝莓果渣花青素对大肠杆菌细胞膜的破坏作用要强于对金黄色葡萄球菌细胞膜的破坏作用,这与抑菌圈实验的结果相符。

2.3.2 细菌培养液中蛋白质浓度和碱性磷酸酶活性的测定

正常情况下细菌细胞壁的微孔仅容许小于1 nm的分子通过,大分子蛋白和碱性磷酸酶不能透过细胞壁,但当细胞壁通透性发生改变,一些大分子蛋白质也能透过细胞壁分泌到胞外^[28,29]。花青素对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的作用结果如图9所示,随着作用时间的延长,细菌细胞内蛋白质和碱性磷酸酶外泄,处理5h条件下,两种菌液中的蛋白质含量分别可达517.23 μg/mL和463.07 μg/mL,碱性磷酸酶活性可达16.95 U和14.43 U。相同处理时间条件下,大肠杆菌菌液中蛋白质含量和碱性磷酸酶活性始终高于金黄色葡萄球菌,说明相同浓度的蓝莓果渣花青素溶液对大肠杆菌细胞膜的破坏作

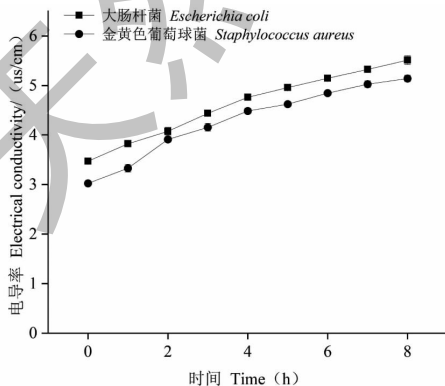


图8 蓝莓果渣花青素对供试菌种电导率的影响

Fig. 8 Effect of anthocyanins from blueberry pomace on the electrical conductivity of test strains

用要强于金黄色葡萄球菌,从而表现出更好的抑菌作用^[30]。

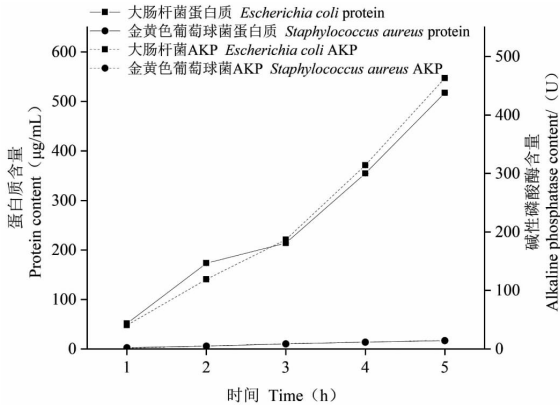


图9 蓝莓果渣花青素作用菌液中蛋白质含量和碱性磷酸酶活性

Fig. 9 Protein content and alkaline phosphatase content in blueberry pomace anthocyanin-interacting bacterial broth

3 结论与讨论

本研究以蓝莓果渣为试材,评价食品加工和保藏中不同 pH 和温度对蓝莓果渣花青素颜色和性能的影响,评价分析其抗氧化活性和抑菌活性,并探究其抑菌机理,研究表明在 pH2 ~8 范围内,蓝莓果渣花青素呈现出显著的从深红到深紫的变色范围;在-18 ~70 °C 的处理温度条件下,蓝莓果渣花青素的含量、抗氧化活性和抑菌活性均随处理时间延长而下降。蓝莓果渣花青素对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌表现出较好的抑菌效果作用机制是破坏细胞膜通透性,导致菌液中蛋白质含量和碱性磷酸酶含量的增加。

目前对蓝莓果渣花青素的研究利用主要集中在提取纯化和稳定性方面^[31],但对食源性致病菌的抑制作用及抑制机理鲜见报道,未能产生更多的利用价值。在抑菌方面,本研究仅对不同温度下蓝莓果渣花青素对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌性和机理进行了初步综合对比分析,对其安全性和食品加工应用还有待进一步探究。后续将会进行不同基质可食膜的制备和性能评价,并进行肉品保鲜的应用以及保鲜机理的研究。因此,可基于本研究结果,在蓝莓果渣花青素的开发与利用中,根据适宜的 pH 和温度来选择提取纯化和加工储藏工艺,利用其颜色和性能的变化开发新型的具有抗氧化和抑菌活性的呈色膜应用于鲜肉及其他食品的冷藏保鲜,进一步提高蓝莓果渣的利用价值,促进天然林下资源产

业链的发展,进而推动林业经济的发展。

参考文献

- Nie Q, Feng L, Hu J, et al. Effect of fermentation and sterilization on anthocyanins in blueberry [J]. J Sci Food Agric, 2017, 97:1459-1466.
- Wu Y, Zhou Q, Chen XY, et al. Comparison and screening of bioactive phenolic compounds in different blueberry cultivars; evaluation of anti-oxidation and α -glucosidase inhibition effect [J]. Food Res Int, 2017, 100:312-324.
- Zhang XJ, Liu ZT, Yang SH, et al. Process optimization and degradation kinetics of ultrasound-assisted enzymatic extraction of anthocyanin from blueberry pomace [J]. Fine Chem (精细化工), 2022, 39:2069-2077.
- Lei LB, Yang H, Chen JL, et al. Research progress on the development and utilization of blueberry pomace [J]. China Brew (中国酿造), 2017, 36:17-22.
- Zhang CR, Li Z, He YF, et al. Research progress on the main functional components and comprehensive utilization of blueberry pomace [J]. Food Sci Technol (食品科技), 2021, 46:110-114.
- Dermengiu NE, Milea SA, Burada, BP, et al. A dark purple multifunctional ingredient from blueberry pomace enhanced with lactic acid bacteria for various applications [J]. J Food Sci, 2022, 87:4725-4737.
- Wui LL, Lin Y, Wang YH, et al. Optimization of the extraction process of anthocyanin from black-fruited glandular rowan and its antioxidant activity and composition identification [J]. J Food Sci (食品科学), 2018, 39:239-246.
- Sun QY, Ren S, Lu BJ, et al. Stability study of blueberry anthocyanins [J]. Acta Nutr Sin (营养学报), 2017, 39:400-404.
- Jiao XP, Liu Y. Characterization, *in vitro* antioxidant activity and *in vivo* toxicity of sweet tea leaf polysaccharides [J]. J Food Sci (食品科学), 2020, 41:201-207.
- Liu YF. Determination of functional components and their antioxidant activity in different parts of *Yucca angustifolia* [J]. Liaoning Forest Sci Technol (辽宁林业科技), 2019, 1:6-9.
- Zhao YH, Shi SH, Zhang LG. Comparison of active ingredients and antioxidant properties of different solvent extracts from leaves of 'Ruh' prickly rose [J]. Mod Food Sci Technol (现代食品科技), 2019, 35:159-166.
- He SX, Luo Q, Xue QR, et al. Study on the content of active ingredients and antioxidant in citrus tea based on different processes [J]. Food Ind (食品工业), 2022, 43:82-86.
- Bao YH, Cao WH, Fu Q, et al. Bacteriostatic activity and thermal degradation kinetics of total alkaloids of *Phellodend-*

- dron bark [J]. Mod Food Sci Technol(现代食品科技), 2020,36:29-37.
- 14 Fan ZL,Zhang YD,Zhang H,et al. Study on the antioxidant and antibacterial activities of essential oil from red pine needles[J]. J Beijing For Univ(北京林业大学学报),2017,39:98-103.
- 15 Chen C,Xu YM,Lin BB,et al. Study on the antibacterial activity of tea polyphenols and its mechanism in Qinling green tea[J]. J Sichuan Agr Univ(四川农业大学学报),2019,37:821-827.
- 16 Zhang PP. Purification, characterization and application of anthocyanins from blueberry pomace [D]. Chuzhou: Anhui Science and Technology University(安徽科技学院),2017.
- 17 Luan LL. Extraction and stability study of anthocyanins from mulberry fruit pomace[D]. Guiyang: Guizhou University(贵州大学),2020.
- 18 Zhang HX,Bao L,Wang XL,et al. Extraction and stability evaluation of anthocyanins from purple potato[J]. Food Res Dev(食品研究与开发),2021,42:103-108.
- 19 Jun HI,Jiang SW,Oh HH,et al. Antioxidant activity and anthocyanin analysis of blueberry with different extraction conditions[J]. J Korean Soc Food Sci Nutr,2019,48:1223-1232.
- 20 Zhang KZ,Xu CY,Yu JQ,et al. Extraction, purification and antioxidant activity analysis of total flavonoids from *Artemisia annua*[J/OL]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2023,35:281-290.
- 21 Wenzig EM,Widowitz U,Kunert O,et al. Phytochemical composition and *in vitro* pharmacological activity of two rose hip (*Rosa canina* L.) preparations [J]. Phytomedicine, 2008,15:826-835.
- 22 Lee JH,Oh SK,Kim DJ,et al. Comparison of antioxidant activities by different extraction temperatures of some commercially available cultivars of rice bran in Korea[J]. Korean J Food Nutr,2013,26:1-7.
- 23 Peng J,He RJ,Xie TJ,et al. Chemical constituents from the flowers of *Bauhinia variegata* var. *candida* and its pancreatic lipase inhibitory activity[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2023,35:47-53.
- 24 Mattioli R,Francioso A,d'Erme M,et al. Anti-inflammatory activity of a polyphenolic extract from *Arabidopsis thaliana* in *in vitro* and *in vivo* models of Alzheimer's disease[J]. Int J Mol Sci,2019,20:708-708.
- 25 Zhao HT,Wu XJ,Zhong MX,et al. Study on the antibacterial activity of alkaloids in different growing parts of *Phellodendron* bark[J]. J Beijing For Univ(北京林业大学学报), 2022,44:126-134.
- 26 Fu Q,Zhang HT. Extraction of total alkaloids and bacterial inhibition of *Phellodendron* bark by semimimetic method[J]. J Beijing For Univ(北京林业大学学报),2018,40:117-123.
- 27 Zhao X,Chen L,Wu JE,et al. Elucidating antimicrobial mechanism of nisin and grape seed extract against *Listeria monocytogenes* in broth and on shrimp through NMR-based metabolomics approach[J]. Int J Food Microbiol,2020,319:108494.
- 28 Wang YN,Zheng CJ,Shao CL,et al. Preliminary study on the isolation of inhibitory compounds of the willow coral symbiotic fungus *Alternaria* sp. (WZL003) and its mechanism of action[J]. Chin J Mar Drugs(中国海洋药物),2015,34:10-16.
- 29 Zhang JS,Gao MK,Guo Y,et al. Inhibition stability of berberine and its effect on bacterial proteins[J]. J Chin Instit Food Sci Technol(中国食品学报),2021,21:81-87.
- 30 Balamayooran G,Batra S,Fessler MB,et al. Mechanisms of neutrophil accumulation in the lungs against bacteria[J]. Am J Respir Cell Mol Biol,2010,43:5-16.
- 31 Luan H,Zhou JL,Qu W,et al. Study on the purification process of macropore resin of blueberry pomace for anthocyanin[J]. China Brew(中国酿造),2021,40:138-143.