

黑米花青素微胶囊制备的工艺研究

娄秋艳, 孙汉巨*, 王鑫, 章萍萍, 谢玉鹏, 张曼莉, 王霄

(合肥工业大学生物与食品工程学院, 合肥 230009)

摘要: **目的** 以黑米花青素为主要原料, 开发一种能够顺利到达肠道并在肠道内缓慢释放以发挥花青素益生元功效的微胶囊。**方法** 采用锐孔法, 以包埋率为指标, 分别以壁芯比、针头孔径、海藻酸钠及 CaCl_2 浓度为因素, 采用单因素试验, 确定微胶囊的制备条件; 在此基础上, 采用四因素三水平 $L_9(3^4)$ 正交试验, 优化了该微胶囊的最佳制备工艺; 最后, 通过微胶囊在胃和肠模拟液中的释放试验, 验证该微胶囊的缓释功能。**结果** 微胶囊的最佳制备工艺: 壁芯比 3:1、针头孔径 0.45 mm、海藻酸钠 2.0%、 CaCl_2 2.0%; 该微胶囊可以在人胃模拟液中保持 4.0 h 以上, 在人肠模拟液中缓慢释放。**结论** 采用锐孔法制备的花青素微胶囊能够顺利到达肠道缓慢释放, 发挥其益生元功效。

关键词: 花青素; 缓释; 微胶囊; 益生元; 工艺研究

Study on preparation of microcapsules of anthocyanins from black rice

LOU Qiu-Yan, SUN Han-Ju*, WANG Xin, ZHANG Ping-Ping, XIE Yu-Peng,
ZHANG Man-Li, WANG Xiao

(School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

ABSTRACT: Objective To develop a kind of microcapsule of anthocyanins from black rice, which can arrive to the intestinal successfully with a sustained release and exert the prebiotic efficacy of anthocyanins. **Methods** Using the orifice method, the imbedding ratio of anthocyanins as evaluation index and the wall-core ratio, aperture of needle, sodium alginate mass fraction, and CaCl_2 concentration as factors, the conditions of making microcapsule were determined by single-factor experiments. On this basis, the preparation technology was optimized by orthogonal experiment. At last, the sustained-release function of microcapsules was verified by releasing experiment in the human stomach and intestine simulation liquid. **Results** The optimum preparation process was as follow: wall-core ratio 3:1, aperture of needle 0.45 mm, sodium alginate 2.0% and CaCl_2 2.0%. The microcapsules could maintain in the stomach simulation liquid for 4.0 h or more, and release slowly in the intestine simulation liquid. **Conclusion** The microcapsules made with the orifice method could reach the intestinal canal successfully, release slowly and exert the prebiotics efficacy of anthocyanins.

KEY WORDS: anthocyanins; sustained release; microcapsule; prebiotics; technology research

基金项目: 2015 年度合肥工业大学“秋实计划”项目、国家自然科学基金项目(31171787)

Fund: Supported by “the Autumn Plan of 2015” of Hefei University of Technology and the National Natural Science Foundation of China (31171787)

*通讯作者: 孙汉巨, 博士, 教授, 主要研究方向为农产品的综合利用。E-mail: sunhanju@163.com

*Corresponding author: SUN Han-Ju, Ph. D, Professor, School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China. E-mail: sunhanju@163.com

檬酸溶液。将两溶液按 15.45:4.55 的比例混合均匀,配制成 pH 为 6.8 的小肠模拟液^[16]。

2.5 花青素微胶囊制备的评价标准

以花青素包埋率为微胶囊化的评价指标,其中包埋率的计算如公式(1):

$$Y = \frac{C_1V_1 - C_2V_2}{C_1V_1} \times 100\% \quad (1)$$

式中: Y ——花青素包埋率(%);

C_1 ——原液花青素浓度(mg/mL);

V_1 ——原液体积(mL);

C_2 ——滤液花青素浓度(mg/mL);

V_2 ——滤液体积(mL)。

2.6 花青素微胶囊制备单因素试验

2.6.1 壁芯比对花青素包埋率的影响

移取 5 份 1 mL 0.73 mg/mL 花青素溶液,分别按照壁芯比为 2:1、3:1、4:1、5:1、6:1($V:V$)与 2.0% 的海藻酸钠溶液混合均匀,得到壁芯混合溶液。再分别用针头孔径为 0.45 mm 的一次性无菌注射器将所得壁芯混合溶液逐滴滴入到 50 mL 2.0% CaCl_2 溶液中。采用循环式真空泵,在 -0.1 MPa 真空度下,抽滤,至无水滴落,获得滤液。采用可见分光光度计,在 515 nm 下测量滤液的吸光度值(OD),再根据花青素的标准曲线,计算滤液中花青素浓度,最后根据公式(1)计算花青素包埋率。

2.6.2 针头孔径对花青素包埋率的影响

移取 4 份 1 mL 0.73 mg/mL 花青素溶液,分别按照壁芯比为 3:1($V:V$)与 2.0% 的海藻酸钠溶液混合均匀,得到壁芯混合溶液。再分别用针头孔径为 0.45、0.50、0.55、0.60 mm 的一次性无菌注射器,将所得壁芯混合溶液逐滴滴入到 50 mL 2.0% CaCl_2 溶液中。然后,采用同 2.6.1 的方法,计算花青素包埋率。

2.6.3 海藻酸钠对花青素包埋率的影响

移取 4 份 1 mL 0.73 mg/mL 花青素溶液,按照壁芯比为 3:1($V:V$)分别与浓度为 1.5%、2.0%、2.5%、3.0% 的海藻酸钠溶液混合均匀,得到壁芯混合溶液。再分别用针头孔径为 0.50 mm 的一次性无菌注射器,将所得壁芯混合溶液逐滴滴入到 50 mL 2.0% CaCl_2 溶液中。然后,采用同 2.6.1 的方法,计算花青素包埋率。

2.6.4 CaCl_2 对花青素包埋率的影响

移取 5 份 1 mL 0.73 mg/mL 花青素溶液,分别按

照壁芯比为 3:1($V:V$)与 2.0% 的海藻酸钠溶液混合均匀,得到壁芯混合溶液,再用针头孔径为 0.50 mm 的一次性无菌注射器,将所得壁芯混合溶液逐滴滴入到 50 mL 浓度分别为 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5% 的 CaCl_2 溶液中。然后,采用同 2.6.1 的方法,计算花青素包埋率。

2.7 花青素微胶囊制备正交试验

在上述单因素试验的基础上,采用四因素三水平 $L_9(3^4)$ 正交试验^[17],其因素及水平分别为:壁芯比(2:1、3:1、4:1),针头孔径(0.45 mm、0.50 mm、0.55 mm),海藻酸钠(1.5%、2.0%、2.5%), CaCl_2 (1.0%、1.5%、2.0%),以花青素包埋率为指标,优化试验条件。

2.8 花青素微胶囊在胃肠模拟液中的释放试验

移取 2 份 1 mL 0.73 mg/mL 花青素溶液,在上述正交试验的最优条件下,制备花青素微胶囊,然后分别加入到 50 mL 胃模拟液和 50 mL 小肠模拟液中。然后,在水浴恒温振荡器中,在 37 °C 及 50 r/min 下反应,每 0.5 h 取样检测溶液中花青素的含量,再根据公式(2)计算花青素释放度。

$$Z = \frac{C_4V_4}{C_3V_3 \times Y} \times 100\% \quad (2)$$

式中: Z ——花青素释放度(%);

Y ——花青素包埋率(%);

C_3 ——原液花青素浓度(mg/mL);

V_3 ——原液体积(mL);

C_4 ——模拟液花青素浓度(mg/mL);

V_4 ——模拟液体积(mL)。

3 结果与分析

3.1 壁芯比对花青素包埋率的影响

壁芯比在微胶囊制备时直接影响芯材包埋率。壁芯比较小(1)时,微胶囊成型效果差,包埋率低;过高时,壁芯混合溶液过于粘稠,不易通过针孔。因此,壁芯比的选取范围为 2:1~6:1。壁芯比对包埋率的影响如图 1 所示。很显然,从 2:1 开始,包埋率随壁芯比增加快速上升,这是因为随着壁材比的增加,越来越多的花青素被包裹;在 3:1 时达到最大值(70.82%);之后,随着壁芯比增加,包埋率降低。其原因是壁芯比增加后,芯壁混合溶液粘稠度增加,不易通过针孔,微胶囊成型效果差,使更多芯材溶解到 CaCl_2 溶液,

导致花青素包埋率降低。因此,微胶囊制备的最佳壁芯比为 3:1。

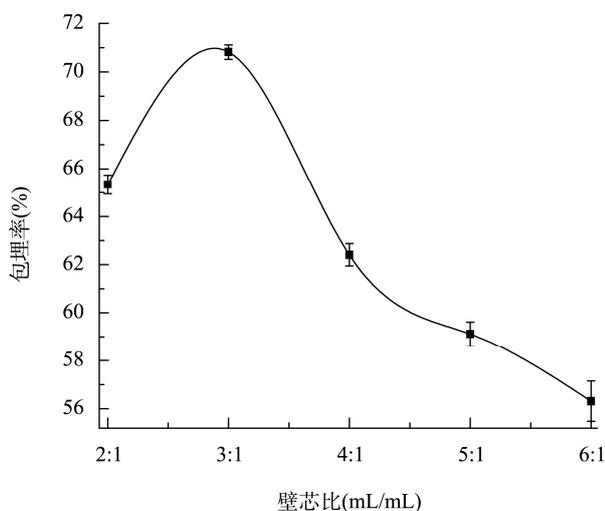


图1 壁芯比对花青素包埋率(%)的影响

Fig. 1 Effect of wall-core ratio on imbedding ratio of anthocyanins

3.2 针头孔径对花青素包埋率的影响

针头孔径对花青素包埋率的影响如图2所示。很显然,从针头孔径为0.45 mm开始,包埋率随孔径的增加而增大,在0.50 mm时,达到了最大值(85.18%)。其原因是液滴粒径随着针头孔径的增加而增大,当针头孔径超过0.50 mm时,粒径较大,微胶囊成型时间加长,导致其成型效果变差,从而使溶解在CaCl₂溶液中花青素的量增加,致使花青素包埋率降低。因此,最佳针头孔径为0.50 mm。

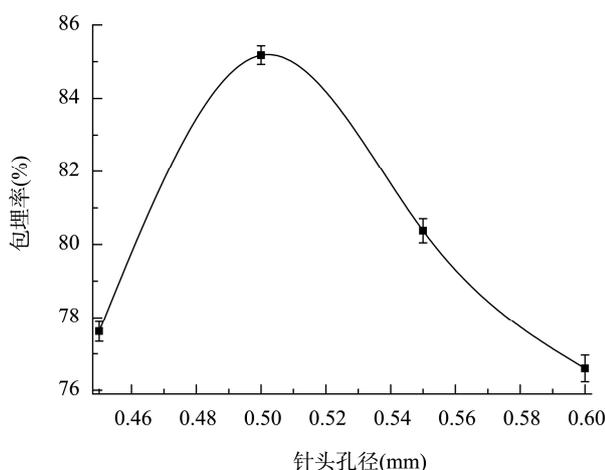


图2 针头孔径对花青素包埋率的影响

Fig. 2 Effect of aperture of needle on imbedding ratio of anthocyanins

3.3 海藻酸钠对花青素包埋率的影响

海藻酸钠浓度与花青素包埋率的关系如图3所示。很明显,包埋率先是随海藻酸钠浓度增加而升高,在2.0%时达到最高值(87.74%)。然后,随其升高而降低。海藻酸钠在微胶囊制备时,作为壁材,与固化剂反应,形成一层海藻酸钙膜,以包裹花青素。海藻酸钠浓度越大,微胶囊成型效果越好,包埋率越高,但当其超过一定值时,壁芯混合溶液就会过于粘稠,难以通过针孔,致使微胶囊成型效果差,甚至出现拖尾现象。因此,最佳海藻酸钠浓度为2.0%。

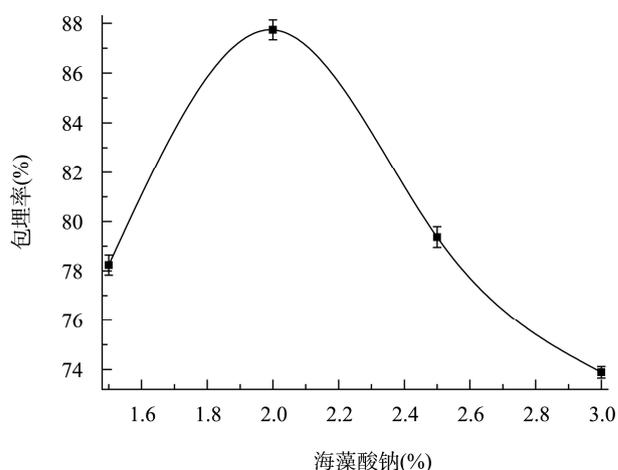


图3 海藻酸钠浓度对花青素包埋率的影响

Fig. 3 Effect of sodium alginate concentration on imbedding ratio of anthocyanins

3.4 CaCl₂对花青素包埋率的影响

CaCl₂对花青素包埋率的影响如图4所示。不难看出,花青素包埋率先是随CaCl₂浓度的增加而快速升高,在1.5%时达到最高值(95.16%);之后,随着CaCl₂浓度的增加而降低。CaCl₂在微胶囊制备过程中作为固化剂,与海藻酸钠发生反应生成圆形的海藻酸钙膜,以包裹花青素。CaCl₂浓度过高或过低,都会使海藻酸钠中的Na⁺没有适当地被Ca²⁺取代,从而导致胶囊内部结构分布不均匀,致使花青素包埋率下降。因此,最佳CaCl₂浓度为1.5%。

3.5 花青素微胶囊制备最佳工艺的确定

花青素微胶囊制备的正交试验结果如表1所示。从表1可知,影响花青素微胶囊制备的主次因素排列次序为:壁芯比 > CaCl₂ > 针头孔径 > 海藻酸钠。通过直观分析可知,4号方案花青素包埋率最高

(94.54%), 其因素水平组合为 $A_2B_1C_2D_3$, 即壁芯比 3:1、针头孔径 0.45 mm、海藻酸钠 2.0%、 $CaCl_2$ 2.0%。从极差分析结果得出最佳水平组合为 $A_2B_1C_2D_2$, 所以应对 $A_2B_1C_2D_3$ 和 $A_2B_1C_2D_2$ 进行验证试验, 最终结果分别为 94.69 和 93.12%。因此, 最佳工艺为 $A_2B_1C_2D_3$, 即: 壁芯比 3:1、针头孔径 0.45 mm、海藻酸钠 2.0%、 $CaCl_2$ 2.0%。

3.6 花青素在胃及肠模拟液中的缓释

通常情况下, 食物在胃中停留 4.0 h 左右。而在人体内, 益生菌大多存在于肠道。因此花青素微胶囊要发挥其缓慢释放和益生元功效, 必须能够在胃中保持 4.0 h, 不被溶解, 然后被运输到肠道, 在肠道内逐渐溶解, 即花青素在肠道内缓慢释放。因此, 本研究进行了花青素微胶囊在胃及肠模拟液中的释放试验。

花青素微胶囊在胃及肠模拟液中的释放试验结果如图 5 所示。很显然, 花青素在胃模拟液中的释放度, 在 4.0 h 内, 随着时间的延长升高非常缓慢, 在 3.0 h 达到最大值(5.06%)。之后, 随时间的延长而保持不变, 表明其在胃模拟液中可保持 4.0 h 以上。在肠模拟液中, 花青素释放度先随时间的延长呈直线上升趋势, 在 3.5 h 时达到最高(98.42%)。之后, 随着时间的延长, 花青素释放度基本不变, 而且此时花青素已基本释放完全。因此, 以海藻酸钠为壁材、花青素为芯材制备的微胶囊具有胃不溶性, 可以顺利到达肠道, 并且在肠道内, 随着时间的延长缓慢溶解, 达到了缓慢释放芯材的作用, 以使花青素发挥益生元的功效。

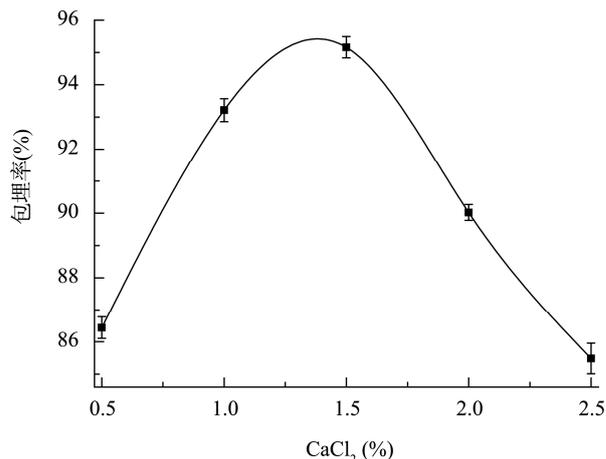


图 4 $CaCl_2$ 浓度对花青素包埋率的影响

Fig. 4 Effect of $CaCl_2$ concentration on imbedding ratio of anthocyanins

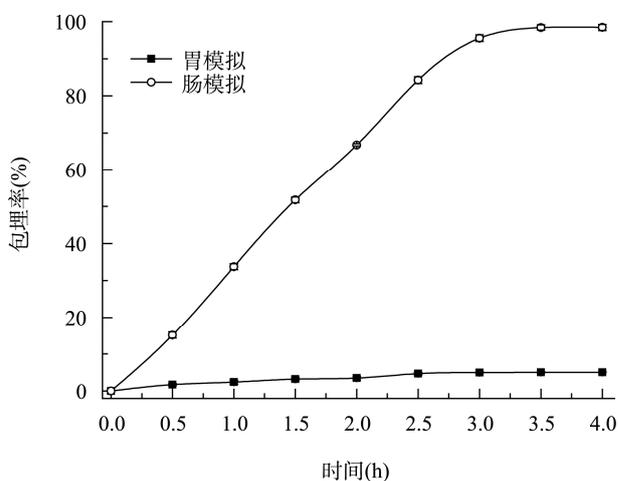


图 5 花青素微胶囊在胃及肠模拟液中的释放

Fig. 5 The releasing of anthocyanins in the stomach and intestine simulated liquid

表 1 花青素微胶囊制备正交试验结果

Table 1 Results of making microcapsule of anthocyanins

试验 序号	因素				包埋率 (%)
	A	B	C	D	
	壁芯比(mL/mL)	针头孔径 mm	海藻酸钠(%)	$CaCl_2$ (%)	
1	1(1:2)	1(0.45)	1(1.5)	1(1.0)	75.68±0.03
2	1	2(0.5)	2(2.0)	2(1.5)	87.88±0.03
3	1	3(0.55)	3(2.5)	3(2.0)	71.22±0.05
4	2(1:3)	1	2	3	94.54±0.03
5	2	2	3	1	76.72±0.04
6	2	3	1	2	83.22±0.03

续表 1

试验 序号	因素				包埋率 (%)
	A	B	C	D	
	壁芯比(mL/mL)	针头孔径 mm	海藻酸钠(%)	CaCl ₂ (%)	
7	3(1:4)	1	3	2	78.71±0.05
8	3	2	1	3	72.90±0.04
9	3	3	2	1	67.33±0.04
K ₁	234.78	248.93	231.80	219.73	
K ₂	254.48	237.50	249.75	249.81	
K ₃	218.94	221.77	226.65	238.66	
R	35.54	27.16	23.10	30.08	
因素主→次	A D B C				
最佳组合	A ₂ B ₁ C ₂ D ₂				

4 结 论

本研究通过上述单因素及正交试验,确定了黑米花青素微胶囊制备的最佳工艺,其结果为:壁芯比3:1、针头孔径0.45 mm、海藻酸钠2.0%、CaCl₂2.0%。该微胶囊,在胃及肠模拟液中,分别在3.0 h和3.5 h时,花青素释放度达到最大值(5.06%和98.42%),之后,其释放度均基本保持不变。因此,表明该微胶囊在胃模拟液中能够保持4.0 h以上,不被溶解;在小肠模拟液中随着时间的延长逐渐溶解,缓慢释放花青素,即该微胶囊能够缓慢释放,以发挥其益生元功效。

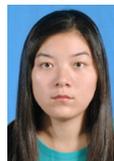
参考文献

- [1] 杨松. 药桑果实花青素提取纯化及特性研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2012.
Yang S. Extraction and purification of anthocyanin in blank mulberry (*Morus nigra* Linn) fruit and its characteristic testing [D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2012.
- [2] 石娟. 黑米中花青素的提取、纯化及其体内抗氧化活性研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2012.
Shi J. Study on separation, purification and vivo antioxidative activity of anthocyanins from black rice [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2012.
- [3] 娄秋艳, 孙汉巨, 陈晓燕, 等. 花青素果汁复合保健饮料的工艺研究[J]. 饮料工业, 2014, 17(8): 15-18.
Lou QY, Sun HJ, Chen XY, et al. Study on the formulation of composite health anthocyanin and juice drink [J]. Bev Ind, 2014, 17(8): 15-18.
- [4] 鲍晓亮. 黑米花青素的提取及特性研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2014.
Bao XL. Study on extraction and characterization of black rice anthocyanin [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2014.
- [5] 李兴元. 蓝莓花青素、多酚类物质的分离纯化与生物活性研究[D]. 天津: 天津大学, 2012.
Li XY. Investigation on separation, purification and biological activity of anthocyanins and polyphenols in blueberry [D]. Tianjin: Tianjin University, 2012.
- [6] 李瑜, 庞凌云. 食品工业微胶囊技术的研究进展[J]. 贵州农业科学, 2009, 37(11): 181-183.
Li Y, Pang LY. Research progress on microencapsulation technology in food industry [J]. Guizhou Agric Sci, 2009, 37(11): 181-183.
- [7] 王东辉, 赵裕蓉. 微胶囊的应用及研究进展[J]. 化工新型材料, 2002, 27(7): 11-14.
Wang DJ, Zhao YR. Application and recent progress of microencapsulation [J]. New Chem Materials, 2002, 27(7): 11-14.
- [8] 吴晓, 王珺, 霍乃芯. 微胶囊技术及其在食品工业中的应用[J]. 食品工程, 2011, 1: 3-6, 20.
Wu X, Wang J, Huo NX. Microencapsulation technology and its application in food industry [J]. Food Eng, 2011, 1: 3-6, 20.
- [9] 苏峻峰, 任丽, 王立新. 微胶囊技术及其最新研究进展[J]. 材料导报, 2003, (17): 141-144.
Su JF, Ren L, Wang LX. Technology and recent progress of microencapsulation [J]. Materials Rev, 2003, 17: 141-144.

- [10] 杨小兰, 袁娅, 谭玉荣, 等. 纳米微胶囊技术在功能食品中的应用研究进展[J]. 食品科学, 2013, 21(34): 359–368.
Yang XL, Yuan Y, Tan YR, *et al.* Research and applications on nanocapsule technology in functional foods [J]. Food Sci, 2013, 21(34): 359–368.
- [11] 王鑫. 蓝靛果花色苷微胶囊的制备及其稳定性的研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2009.
Wang X. Study on the preparation of anthocyanins from *Lonicera edulis turcz* microcapsules and their stability [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2009.
- [12] 丁保森, 袁武华. 锐孔法制备原花青素微胶囊工艺研究[J]. 食品与机械, 2012, 6: 214–218.
Ding BM, Yuan WH. Preparation of proanthocyanjdin microcapsules by piercing method [J]. Food Mach, 2012, 6: 214–218.
- [13] 吴克刚, 柴向华. 食品微胶囊技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2006.
Wu KG, Chai XH. Food microcapsulation [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2006.
- [14] 黄梅英. 菜籽多糖的提取、分离纯化及其对益生菌的增殖作用研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2013.
Huang MY. Study on the extraction, purification and prebiotic activity of rapeseed polysaccharides [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2013.
- [15] 张曼莉. 黑米花青素对益生菌和有害菌的体外活性研究及其分子修饰[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2015.
Zhang ML. Study on activity of probiotics and harmful bacteria in vitro and molecular modification of black rice anthocynins [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2015.
- [16] 李建武, 余瑞元, 袁明秀, 等. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 2001.
Li JW, Yu RY, Yuan MX, *et al.* Biochemistry experimental principle and method [M]. Beijing: Peking University Press, 2001.
- [17] 潘丽君, 陈锦权. 试验设计与数据处理[M]. 南京: 东南大学出版社, 2008.
Pan LJ, Chen JQ. Experimental design and data processing [M]. Nanjing: Southeast University Press, 2008.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



姜秋艳, 硕士研究生, 主要研究方向为食品工程。
E-mail: 980530898@qq.com



孙汉巨, 博士, 教授, 主要研究方向为农产品的综合利用。
E-mail: sunhanju@163.com