

Extraction Technology, Infrared Spectra and Antioxidant Activity of Intracellular Melanin from *Lachnum**

Ying Lu¹, Gengyi Guo¹, Lan Li¹, Kuncai Yin², Ming Ye^{1#}

¹School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei

²Ma'anshan Ankang Co. Ltd., Ma'anshan

Email: #yeming123@sina.com

Received: Aug. 30th, 2013; revised: Sep. 28th, 2013; accepted: Oct. 9th, 2013

Copyright © 2013 Ying Lu et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. In accordance of the Creative Commons Attribution License all Copyrights © 2013 are reserved for Hans and the owner of the intellectual property Ying Lu et al. All Copyright © 2013 are guarded by law and by Hans as a guardian.

Abstract: Intracellular melanins from *Lachnum* YM404 (LIM404) were obtained by the methods of alkali solution and acid isolation precipitation, ultrasonic-assisted extraction, enzyme hydrolysis, respectively. Based on the single factor experiments, Box-Behnken experiment was designed to obtain the optimum ultrasonic-assisted extraction conditions of LIM404: NaOH 1.5 mol·L⁻¹, ultrasonic power 82 W, ultrasonic temperature 75°C and ultrasonic time 33 min. Under these conditions, the yield of melanin (LIM404-b) was 12.5%, and increased 5.04%, 12.15% than that by alkali solution and acid precipitation, enzyme hydrolysis, respectively. FT-IR results showed that the structural characteristics of LIM404-b were similar to that of LIM404-a, LIM404-c. When the LIM404-b concentration was 500 mg·L⁻¹, its total antioxidant capacity was equivalent to α -tocopherol of 1.4251 mmol·mL⁻¹, and the ·OH, DPPH· and O₂⁻· scavenging rates were 64.43%, 76.05%, 68.43%, respectively, suggesting that the antioxidant activity of LIM404-b was strong.

Keywords: *Lachnum* Melanin; Extraction Technology; Yield; Structural Characteristic; Antioxidant Activity

粒毛盘菌胞内黑色素的提取工艺、红外光谱及抗氧化活性*

卢莹¹, 郭赓艺¹, 李兰¹, 殷坤才², 叶明^{1#}

¹合肥工业大学, 生物与食品工程学院, 合肥

²马鞍山市安康菌业有限公司, 马鞍山市

Email: #yeming123@sina.com

收稿日期: 2013年8月30日; 修回日期: 2013年9月28日; 录用日期: 2013年10月9日

摘要: 采用碱溶酸沉法、超声波辅助提取法以及酶解法提取粒毛盘菌 YM404 胞内黑色素(LIM404), 并在单因素实验的基础上, 运用响应面法优化获得超声波辅助法的最佳提取条件为: NaOH 浓度 1.5 mol·L⁻¹、超声功率 82 W、提取温度 75°C、提取时间 33 min, 在此条件下提取的黑色素(LIM404-b)得率最高, 为 12.50%, 较碱溶酸沉法获得的黑色素(LIM404-a)、酶解法获得的黑色素(LIM404-c)得率分别提高了 5.04%、23.76%。红外光谱显示, LIM404-b 的结构特征与 LIM404-a、LIM404-c 的基本相似。LIM404-b 浓度为 500 mg·L⁻¹ 时, 与 1.4251 mmol·mL⁻¹ α -生育酚的总抗氧化能力相当, 对·OH、DPPH·、O₂⁻· 的清除率分别为 64.43%、76.05%、68.43%, 表明 LIM404-b 具有较强的抗氧化活性。

关键词: 粒毛盘菌黑色素; 提取工艺; 得率; 结构特征; 抗氧化活性

*基金项目: 国家自然科学基金项目(31270060), 科技部中小企业技术创新项目(12C26213403307), 安徽省科研计划年度重点项目(12070303037)。

#通讯作者。

1. 引言

黑色素是通过多羟基酚氧化而成的构造不规则的类多酚聚合体^[1],存在于动物、植物以及微生物中,对温度、pH、光照等均较稳定^[2]。由于大多黑色素可溶于碱性溶液,却在酸性溶液中以沉淀形式析出,因此碱溶酸沉法是天然黑色素常用的提取方法之一^[3,4]。但由于碱溶酸沉法具有提取时间长、提取效率低,并可造成黑色素形态与结构的损伤等缺点^[5],因此近年来研究者主要采用超声波辅助提取法^[6,7]、酶解法^[8]、超临界二氧化碳萃取^[9]等方法提取天然黑色素,旨在提高黑色素的得率,获得在形态和化学结构较完整的黑色素。

粒毛盘菌是一类分布广泛的腐生性真菌,经深层发酵可产生黑色素,研究发现该黑色素具有清除自由基、抗脂质过氧化等多种生物活性^[10],具有广泛的应用前景。粒毛盘菌胞内黑色素的提取,主要采用碱溶酸沉法,但该提取方法得率较低,其它提取方法尚未见报道。本研究采用碱溶酸沉法、超声波辅助提取法以及酶解法提取粒毛盘菌 YM404 胞内黑色素(LIM404),比较三种提取工艺获得的黑色素得率,并分别对获得的黑色素进行红外光谱检测和抗氧化活性研究,以期为粒毛盘菌黑色素工业化生产提供科学依据。

2. 材料与方法

2.1. 菌株

粒毛盘菌 YM404,合肥工业大学微生物资源与应用研究室分离保藏。

2.2. 发酵培养基

麦芽糖 25 g·L⁻¹, 酵母膏 6 g·L⁻¹, 氯化铁 1 mmol·L⁻¹, L-DOPA 1.25 mmol·L⁻¹, 蒸馏水 1000 mL。

2.3. 粒毛盘菌 YM404 的发酵及菌丝体的获得

用打孔器接种直径 6 mm、菌龄一致的 YM404 菌块于各三角瓶中,26℃,160 r·min⁻¹ 恒温振荡培养 10 d。发酵液离心后收集菌丝体,60℃烘干,研碎,过 50 目筛,收集菌粉备用。

2.4. 粒毛盘菌 YM404 胞内黑色素的提取

2.4.1. 碱溶酸沉法

取 10 g YM404 菌粉,参照 Ye 等^[11]方法提取、纯

化其胞内黑色素,获得 LIM404-a。

2.4.2. 超声波辅助提取法

1) 单因素实验

取 0.1 g 菌粉,加入 20 ml NaOH 溶液,选取不同因素水平的超声波功率(0、20、40、60、80、100 W)、提取温度(20℃(室温)、40℃、50℃、60℃、70℃、80℃)、提取时间(0、20、30、40、50、60 min)以及 NaOH 溶液浓度(0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mol·L⁻¹)对超声波辅助提取 YM404 胞内黑色素进行单因素实验。反应结束后,5000 r·min⁻¹ 离心 10 min 获得上清液,测其在 520 nm 处的吸光度值,吸光度值越大表示黑色素得率越高。

2) Box-Behnken 实验

以提取功率、温度、提取时间为自变量,以提取液上清液在 520 nm 处的吸光度值为响应值,设计三因素三水平 Box-Behnken 实验,实验因素和取值见表 1。采用 Design Expert 7.5 软件对实验结果进行多元回归拟合求解,二次多项式模型

$$Y = \beta_0 + \alpha_1 A + \beta_1 B + \gamma_1 C + \alpha_1 \beta_1 AB + \alpha_1 \gamma_1 AC + \beta_1 \gamma_1 BC + \alpha_{11} A^2 + \beta_{11} B^2 + \gamma_{11} C^2$$

采用 *F* 检验对数据进行方差分析,评价二次多项式模型及其回归系数的显著性。

3) YM404 胞内黑色素的提取

取 10 g 粒毛盘菌 YM404 菌粉,采用 Box-Behnken 实验获得的最佳提取条件对其胞内黑色素进行提取,反应结束后抽滤收集滤液,其余方法同 2.4.1,获得 LIM404-b。

2.4.3. 酶解法

取 10 g 粒毛盘菌 YM404 菌粉,在 4%中性蛋白酶液,液料比为 20:1,37℃下提取 4 h,反应结束后抽滤收集滤液,其余方法同 2.4.1,获得 LIM404-c。

Table 1. Analytical factors and levels for Box-Behnken design
表 1. Box-Behnken 实验分析因素与水平

水平	因素		
	功率(W)	提取温度(°C)	提取时间(min)
-1	70	60	20
0	80	70	30
1	90	80	40

2.5. 红外光谱检测

取 2 mg LIM404-a、LIM404-b、LIM404-c 分别与 400 mg 干燥的 KBr 混匀、压片, 采用 FT-IR 6700 傅立叶变换红外光谱仪进行红外光谱分析, 扫描区间为 4000~500 cm^{-1} 。

2.6. 抗氧化活性

2.6.1. 总抗氧化能力

参考 Ye 等^[12]的方法测定的总抗氧化能力。取 0.1 mL 不同浓度(50、100、...、450、500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的黑色素溶液与 1 mL 反应试剂(含 4 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 钼酸铵、0.6 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2SO_4 以及 28 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_3PO_4)混匀, 80 $^\circ\text{C}$ 下水浴 90 min, 流水冷却至室温。于 695 nm 下测溶液的吸光度值。总抗氧化能力以当量 α -生育酚表示: $A = 0.011C + 0.0049$ ($R^2 = 0.987$), 式中 A 表示在 695 nm 下的吸光度值, C 表示 α -生育酚的当量浓度($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。

2.6.2. 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用

参照 Wang 等^[13]的方法略作修改, 0.05 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PBS (pH7.4) 2.0 mL、邻二氮菲溶液 1.5 mL (5×10^{-3} $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 混合液与不同浓度的黑色素溶液 1 mL、1.0 mL FeSO_4 溶液(7.5×10^{-3} $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)混匀, 添加 0.1% 1 mL 的双氧水, 蒸馏水稀释至 10 mL, 混匀后于 37 $^\circ\text{C}$ 恒温水浴 1 h, 紫外分光光度计测定 536 nm 时的吸光度值(A_1)。空白样以 1 mL 蒸馏水代替黑色素, 测其吸光度值为(A_0), Vc 溶液作为对照样品。 $\cdot\text{OH}$ 清除率 $= \left[\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right] \times 100\%$ 。

2.6.3. 对 DPPH \cdot 的清除作用

参照 Turkoglu 等^[14]的方法略作修改, 1 mL DPPH 无水乙醇溶液(0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)与 3 mL 不同浓度的黑色素溶液混匀, 置于黑暗环境下 30 min, 稀释, 在 517 nm 下测定混合液的吸光度值(A_1), 测定无水乙醇溶液作为空白对照的吸光度值(A_0), BHT(2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚)作为对照, DPPH \cdot 清除率 $= \left[\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right] \times 100\%$ 。

2.6.4. 对 O_2^- 的清除作用

采用邻苯三酚氧化法^[15]。1 mL 不同浓度的黑色素溶液与 3 mL pH 为 8.2 的 Tris-HCl 缓冲液混匀, 室温下静置 20 min, 加入 0.3 mL 邻苯三酚溶液(7

$\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 摇匀, 反应 4 min 后, 加入 1 mL HCl(10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)终止反应, 稀释, 在 318 nm 下测定混合液的吸光度值 A_1 , 测定蒸馏水代替反应试剂的吸光度值 (A_1')及蒸馏水代替样品溶液作为空白对照的吸光度值 (A_0), Vc 溶液作为对照样品。 O_2^- 清除率 $= \left[1 - \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \right] \times 100\%$ 。

3. 结果与分析

3.1. 超声波辅助提取 YM404 胞内黑色素

3.1.1. 单因素实验结果

1) 超声波功率对黑色素得率的影响

当提取温度为 25 $^\circ\text{C}$ 、提取时间为 10 min、NaOH 溶液浓度为 1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 不同超声波功率对胞内黑色素得率的影响如图 1 所示。在一定范围内, 随着超声波功率的增加, 溶液的吸光度值增大, 这是由于超声空化作用^[16], 在细胞表面产生较大的渗透压, 增加了溶剂进入细胞的几率。同时微射流和冲击波还会对细胞组织产生强烈的物理剪切作用, 使细胞损伤、破裂并释放出黑色素^[17]。然而, 超声功率过高时, 溶液的吸光度值减小, 这可能是由于过高的超声能量会破坏黑色素的结构, 导致得率降低。因此, 选择 80 W 为最佳超声波功率。

2) 提取温度对黑色素得率的影响

当超声波功率为 80 W、提取时间为 10 min、NaOH 溶液浓度为 1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 不同提取温度对胞内黑色素得率的影响如图 2 所示, 黑色素溶液吸光度值随着提取温度的增加先增大后略减小。提取温度为 70 $^\circ\text{C}$ 时溶液的吸光度值最大(0.124), 略高于 80 $^\circ\text{C}$ 时溶液的吸光度值, 明显高于低温时溶液的吸光度值, 表明较高的

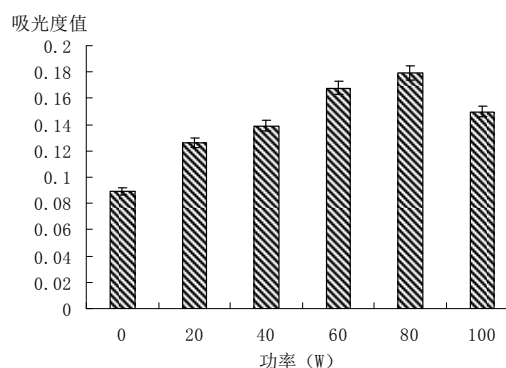


Figure 1. Effects of ultrasonic power on yield of LIM404-b
图 1. 超声波功率对黑色素得率的影响

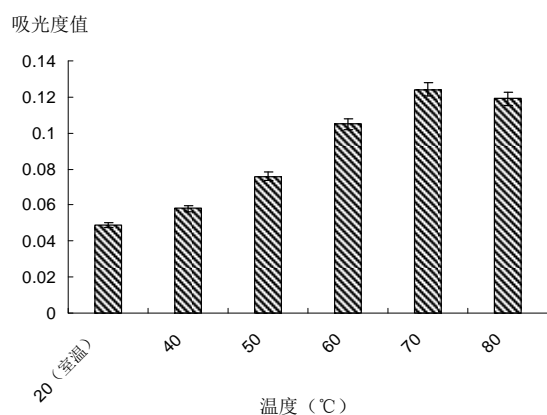


Figure 2. Effects of extraction temperature on yield of LIM404-b
图 2. 提取温度对黑色素得率的影响

温度更有利于黑色素溶于萃取液中。然而, 温度过高会导致溶液中分子过于活跃, 可能造成黑色素结构的破坏。因此, 选择 70°C 为最佳提取温度。

3) 提取时间对黑色素得率的影响

当超声波功率为 80 W、提取温度为 70°C、NaOH 溶液浓度为 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 不同提取时间对超声辅助提取黑色素的影响如图 3 所示, 在一定范围内, 随着超声时间的增加, 溶液的吸光度值增大, 提取时间为 30 min 时吸光度值最大(0.115)。但当时间继续延长时, 其吸光度值缓慢下降, 这可能是由于较长时间超声处理造成了色素的部分降解^[18]。汽蚀空泡的数量随着超声时间的延长而增加, 汽蚀空泡在微生物表面附近碎裂, 可以分解细胞, 同时也会对物质的结构造成一定的破坏^[16]。因此, 选择 30 min 为最佳提取时间。

4) NaOH 溶液浓度对黑色素得率的影响

如图 4 所示, 与空白对照组相比, 以 NaOH 溶液为萃取剂, 有利于黑色素的提取, NaOH 溶液浓度为 $1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时吸光值最大。因此, 选择 $1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为最适 NaOH 溶液浓度。

单因素实验表明, 粒毛盘菌 YM404 胞内黑色素适宜的提取条件为: NaOH 浓度 $1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、超声时间 30 min、超声温度 70°C、超声功率 80 W。

3.1.2. Box-Behnken 实验结果

基于单因素实验结果, 选取超声功率(A)、温度(B)以及提取时间(C)设计三因素三水平 Box-Behnken 实验, 对每一因素选择三个水平: A(70、80、90 W), B(60°C、70°C、80°C), C(20、30、40 min)。完整的设计包括 17 种组合, 对中心点 5 次重复, 实验设计及结

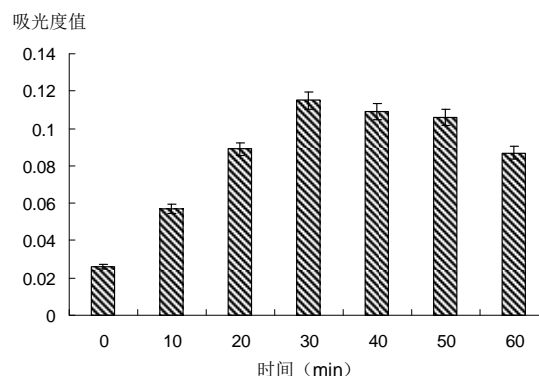


Figure 3. Effects of extraction time on yield of LIM404-b
图 3. 提取时间对黑色素得率的影响

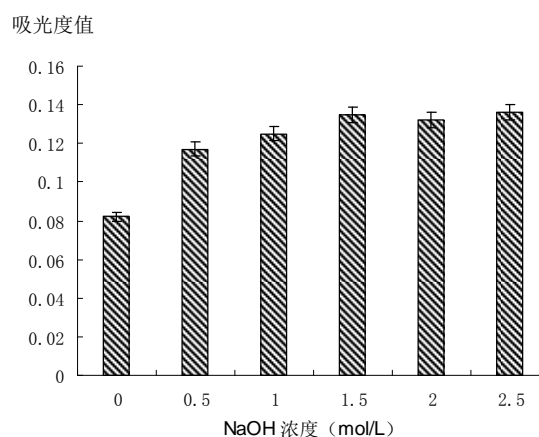


Figure 4. Effects of NaOH concentration on yield of LIM404-b
图 4. NaOH 浓度对黑色素得率的影响

果见表 2。

对所获得的实验数据使用 Design-expert 7.5 软件程序进行回归分析, 得出 YM404 胞内黑色素提取得率的回归方程如下:

$$Y = 0.21 + 0.015A + 0.018B + 0.00975C - 0.010AB + 0.015AC + 0.00425BC - 0.031A^2 - 0.015B^2 - 0.020C^2$$

对回归方程作显著性检验与方差分析, 结果如表 3 所示。由方差分析结果可知, 模型 P 值为 0.0032, 差异显著, 其决定系数 $R^2 = 0.9270$, 表明因变量与所有自变量之间的线性关系显著, 回归模型拟合良好, 能够较好的描述实验结果^[4]。功率与黑色素得率具有显著的线性效应($P < 0.5$)和极显著的二次效应($P < 0.1$), 温度与黑色素得率具有极显著的线性效应和显著的二次效应, 时间与黑色素得率的线性效应不显著, 但二次效应显著。功率与时间的交互项显著。Y

Table 2. Results and response of Box-Behnken experimental design
表 2. Box-Behnken 实验设计与响应值

Run	A	B	C	Y
	功率(W)	温度(°C)	提取时间(min)	吸光度值
1	80.00	60.00	20.00	0.143
2	80.00	80.00	40.00	0.214
3	80.00	70.00	30.00	0.213
4	80.00	60.00	40.00	0.154
5	70.00	70.00	20.00	0.156
6	80.00	70.00	30.00	0.201
7	70.00	70.00	40.00	0.145
8	90.00	70.00	20.00	0.142
9	90.00	60.00	30.00	0.187
10	90.00	80.00	30.00	0.185
11	80.00	70.00	30.00	0.215
12	70.00	80.00	30.00	0.161
13	80.00	70.00	30.00	0.216
14	90.00	70.00	40.00	0.192
15	70.00	60.00	30.00	0.122
16	80.00	70.00	30.00	0.206
17	80.00	80.00	20.00	0.186

Table 3. Estimated regression coefficients for the quadratic polynomial model and the analysis of variance for the experimental results**表 3. 二次多项式模型回归系数估计和试验结果方差分析**

	平方和	自由度	均方	F 值	Pr > F	显著性
模型	0.014	9	1.558×10^{-3}	9.88	0.0032	**
A-功率	1.861×10^{-3}	1	1.861×10^{-3}	11.80	0.0109	*
B-温度	2.450×10^{-3}	1	2.450×10^{-3}	15.54	0.0056	**
C-时间	7.605×10^{-4}	1	7.605×10^{-4}	4.83	0.0641	
AB	4.203×10^{-3}	1	4.203×10^{-4}	2.67	0.1465	
AC	9.303×10^{-4}	1	9.303×10^{-4}	5.90	0.0455	*
BC	7.225×10^{-5}	1	7.225×10^{-5}	0.46	0.5201	
A ²	4.040×10^{-3}	1	4.040×10^{-3}	25.63	0.0015	**
B ²	1.008×10^{-3}	1	1.008×10^{-3}	6.40	0.0393	*
C ²	1.765×10^{-3}	1	1.765×10^{-3}	11.20	0.0123	*
总离差	1.103×10^{-3}	7	1.576×10^{-4}			
失拟项	9.365×10^{-4}	3	3.122×10^{-4}	7.49	0.0406	*
误差	1.668×10^{-4}	4	4.170×10^{-5}			
总残差	0.015	16				

注: *代表 5%显著水平; **代表 1%显著水平。

的回归系数的检验可知,对 YM404 胞内色素提取得率影响最大的因素为温度(B),其次为功率(A),时间(C)对黑色素得率的影响最小。

利用 Design- Expert 7.5 软件分析二次回归模型,将回归方程中的任意一个因素固定在零水平,对余下的两个因素绘制响应面分析立体图(见图 5)。对回归方程进行分析得到超声辅助提取 YM404 胞内色素的最佳条件为超声功率 82.54 W、提取温度 75.34°C、提取时间 33.88 min,提取液的最大吸光度值的预测值为 0.218。以超声功率 82 W、提取温度 75°C、提取时间 33 min 的提取条件进行验证试验,获得的吸光度值为 0.216,基本吻合模型预测最大响应值,说明模型合理有效。

3.2. 三种提取工艺的黑色素得率

在超声波辅助法的最佳提取条件下, LIM404-b 得率最高,为 12.5%,较碱溶酸沉法提取获得的 LIM404-a 得率(11.9%)提高了 5.04%,较酶解法提取获得的 LIM404-c 得率(10.1%)提高了 23.76%。

3.3. 三种提取工艺获得黑色素的红外光谱分析

LIM404-a、LIM404-b 和 LIM404-c 均具有吡咯或吡啶的 N-H 伸缩振动峰(3200 cm^{-1} 附近)和 C=O 收缩振动峰(1600 cm^{-1} 附近),为真菌黑色素的特征吸收峰^[19](图 6)。在 1500 cm^{-1} 和 1400 cm^{-1} 附近具有 -NH 弯曲振动峰和 C-N 伸缩振动峰,表明其有黑色素典型的吡啶结构^[13]。此外,在 1300 cm^{-1} 处具有 C-O-C 不对称收缩振动峰,在 $900\sim 650 \text{ cm}^{-1}$ 处具有 N-H 键面外摇摆振动峰,在 $700\sim 600 \text{ cm}^{-1}$ 处具有 C-S 伸缩振动峰^[20]。三图中各特征峰位置基本一致,吸收波形及峰宽基本相似,表明三种提取方法获得的黑色素结构特征基本相似。

3.4. 抗氧化活性

3.4.1. 总抗氧化能力

目前 α -生育酚作为一种抗氧化剂被广泛应用,可以通过与其他的比较来反映待测物质的抗氧化能力^[21]。如图 7 所示, LIM404-b 总抗氧化能力随其浓度的增加而增大,并呈现较好的量效关系($y = 2.8413x + 4.4367$, $R^2 = 0.9986$)。 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 LIM404-b 相当于 $1.4251 \text{ mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ α -生育酚。

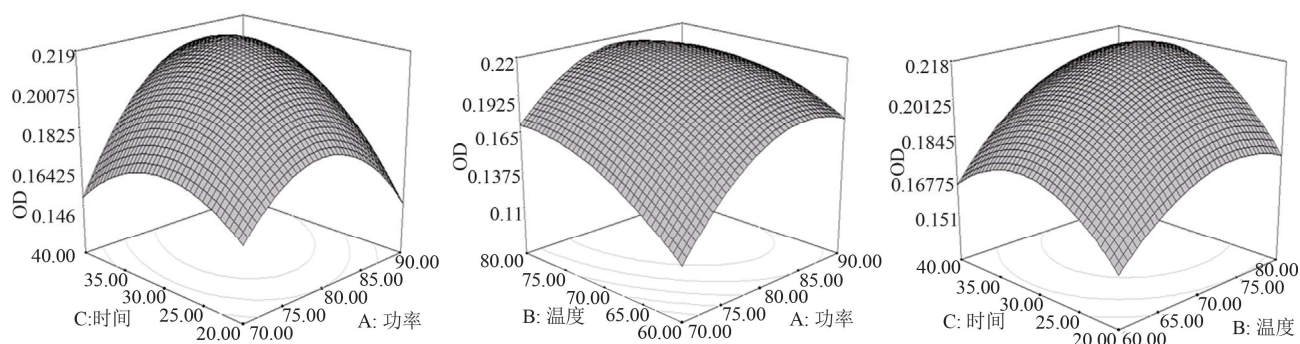


Figure 5. Response surface curve sensory score showing the interaction between ultrasonic power (A), ultrasonic temperature (B) and ultrasonic time (C)

图 5. 超声功率(A)、超声温度(B)和超声时间(C)交互作用相应面

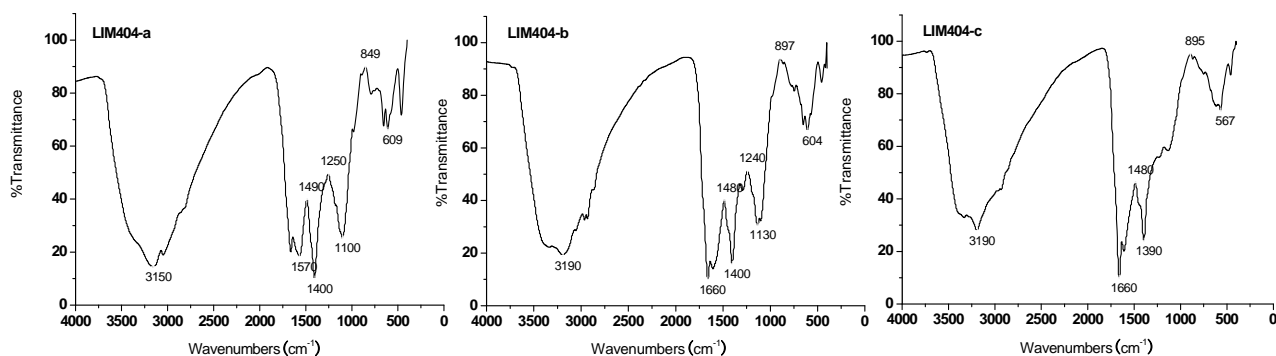


Figure 6. Infrared spectra of LIM404-a, LIM404-b and LIM404-c

图 6. LIM404-a、LIM404-b 和 LIM404-c 的红外光谱图

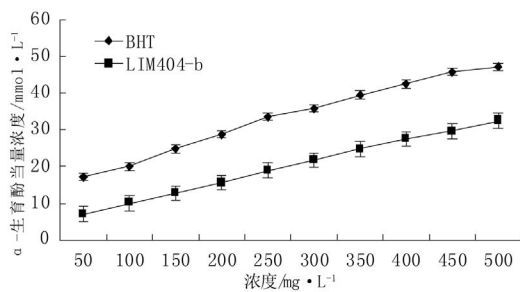


Figure 7. Total antioxidant capacity of LIM404-b
图 7. LIM404-b 的总抗氧化能力

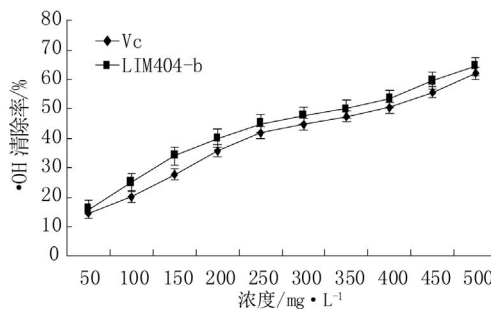


Figure 8. ·OH scavenging activity of LIM404-b
图 8. LIM404-b 对·OH 的清除能力

3.4.2. 对·OH 的清除作用

H_2O_2 在 Fe^{2+} 的作用下产生·OH, 加入抗氧化剂后, 氧化还原指示剂有颜色的变化, 根据其吸光度值的变化来检测抗氧化剂对·OH 的清除作用^[22]。LIM404-b 对·OH 的清除作用随其浓度的增大而增强(图 8), 浓度为 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, LIM404-b 对·OH 的清除率达到 64.43%, 其·OH 清除活性略高于对照组 Vc。

3.4.3. 对 DPPH· 的清除作用

DPPH· 有单电子, 在醇溶液中呈紫色, 并在 517

nm 波长处有强吸收。在 DPPH· 反应体系中加入抗氧化剂后, 抗氧化剂可与 DPPH· 单电子配对而使其吸收逐渐消失, 溶液颜色逐渐变浅, 因此在 517 nm 处检测抗氧化剂对 DPPH· 的清除效果^[23]。LIM404-b 对 DPPH· 的清除作用随其浓度的增大而增强(图 9), 并呈现良好的线性关系, 浓度为 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, LIM404-b 对 DPPH· 的清除率达到 76.05%。

3.4.4. 对 O_2^- · 的清除作用

邻苯三酚在碱性条件下能够迅速自氧化, 生成吸

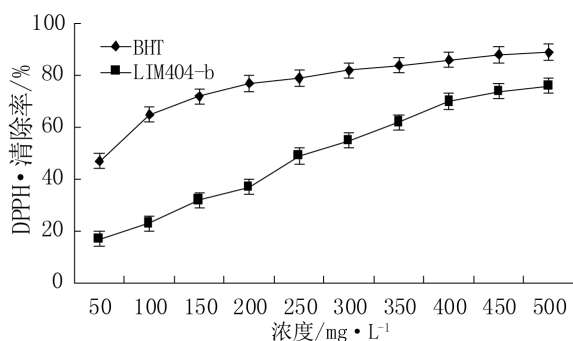


Figure 9. DPPH· scavenging activity of LIM404-b
图 9. LIM404-b 对 DPPH· 的清除能力

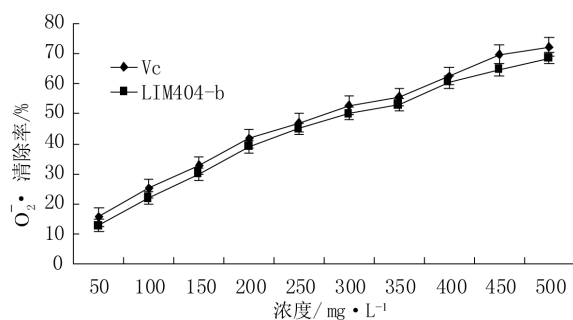


Figure 10. O₂^{·-} scavenging activity of LIM404-b.
图 10. LIM404-b 对 O₂^{·-} 的清除能力

收波长在 318 nm 附近的系列有色中间产物, 同时释放出 O₂^{·-}, 因此可通过比色法来检验物质清除 O₂^{·-} 的能力。LIM404-b 对 O₂^{·-} 的清除作用随其浓度的增大而增强, 略低于对照组 Vc(图 10), 当浓度为 500 mg·L⁻¹ 时, LIM404-b 对 O₂^{·-} 的清除率达 68.43%。

4. 结论

在单因素实验的基础上, 采用响应面法优化获得超声辅助提取法提取粒毛盘菌 YM404 胞内黑色素的最佳条件为: NaOH 浓度 1.5 mol·L⁻¹、超声功率 82 W、提取温度 75℃、提取时间 33 min; 该法获得的 LIM404-b 得率为 12.50%, 较碱溶酸沉法、酶解法分别提高了 5.04%、23.76%, 表明超声辅助提取法可提高 YM404 胞内黑色素的得率, 适合黑色素的工业化生产。红外光谱显示三种提取方法获得的黑色素结构特征基本相似。LIM404-b 浓度为 500 mg·L⁻¹ 时, 总抗氧化能力与 1.4251 mmol·mL⁻¹ α-生育酚相当, 对·OH、DPPH·、O₂^{·-} 的清除率分别为 64.43%、76.05%、68.43%, 表明粒毛盘菌黑色素具有较强的抗氧化活性, 可用于食品、医药行业中。

参考文献 (References)

- [1] Latocha, M., Chodurek, E., Kurkiewicz, S., et al. (2000) Pyrolytic GC-MS analysis of melanin from black, gray and yellow strains of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **56**, 89-98.
- [2] Dong, C. and Yao, Y. (2012) Isolation, characterization of melanin derived from *Ophiocordyceps sinensis*, an entomogenous fungus endemic to the Tibetan Plateau. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **113**, 474-479.
- [3] 杨善岩, 李海龙, 王升贵等 (2013) 黑芝麻黑色素萃取条件的响应面优化. *浙江农业科学*, **1**, 77-80.
- [4] 李军, 张乔会, 蓝晶晶等 (2012) 响应面法对山杏核壳黑色素提取工艺的研究. *食品工业科技*, **33**, 295-299.
- [5] Liu, Y. and Simon, J.D. (2003) The effect of preparation procedures on the morphology of melanin from the ink sac of sepia officinalis. *Pigment Cell Research*, **16**, 72-80.
- [6] 董华群, 黄剑波, 董华强等 (2012) 超声波辅助提取禾雀花黑色素. *食品研究与开发*, **33**, 140-143.
- [7] 向洪平, 葛建芳, 张蓝月 (2010) 超声波辅助萃取功能性天然色素的研究与应用进展. *江苏农业科学*, **3**, 360-362.
- [8] 宋茹, 祝颖, 俞群娣 (2009) 酶解法制备的鱿鱼墨黑色素鉴定及理化性质. *浙江海洋学院学报(自然科学版)*, **28**, 95-98.
- [9] 王维维, 袁维凤, 薛宏宇等 (2012) 超临界 CO₂ 萃取黑色素条件的优化和筛选. *光谱实验室*, **29**, 2327-2329.
- [10] Ye, M., Wang, Y., Qian, M.S., et al. (2011) Preparation and properties of the melanin from *Lachnum singerianum*. *International Journal of Basic and Applied Sciences*, **11**, 51-58.
- [11] Ye, M., Chen, X., Li, G.W., et al. (2011) Structural characteristics of pheomelanin-like pigment from *lachnum singerianum*. *Advanced Materials Research*, **284-286**, 1742-1745.
- [12] Ye, M., Wang, Y., Guo, G.Y., et al. (2012) Physicochemical characteristics and antioxidant activity of arginine-modified melanin from *Lachnum YM-346*. *Food Chemistry*, **135**, 2490-2497.
- [13] Wang, H.Y., Jiang, X.L. and Mu, H.J. (2007) Structure and protective effect of exopolysaccharide from *P. Agglomerans* strain KFS-9 against UV radiation. *Microbiological Research*, **162**, 124-129.
- [14] Turkoglu, A., Duru, M.E., Nazime, M., et al. (2007) Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. *Food Chemistry*, **101**, 267-273.
- [15] Xu, Y. and Guo, Z.J. (2008) Study on antioxidant activity of extracts from *aconitum taipeicu*. *Research and Practice of Chinese Medicines*, **22**, 38-40.
- [16] Vilku, K., Mawson, R., Simons, L., et al. (2008) Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry—A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **9**, 161-169.
- [17] Patist, A. and Bates, D. (2008) Ultrasonic innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **9**, 147-154.
- [18] Tiwari, B.K., O'Donnell, C.P. and Cullen, P.J. (2009) Effect of sonication on retention of anthocyanins in blackberry juice. *Journal of Food Engineering*, **93**, 166-171.
- [19] 徐磊, 钱振明, 孙继波等 (2009) 短梗霉黑色素的分离纯化及结构的初步分析. *氨基酸和生物资源*, **31**, 9-13.
- [20] Olennikov, D.N., Agafonova, S.V., Stolbikova, A.V., et al. (2011) Melanin of *Laetiporus sulphureus* (Bull. Fr.) Murr sterile form. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **47**, 298-303.
- [21] Wang, J., Zhang, Q.B., Zhang, Z.S., et al. (2008) Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. *International Journal of Biological Macromolecules*, **42**, 127-132.
- [22] 叶明, 陈晓, 朱立等 (2010) 暗盘孢属 YM421 黑色素稳定性及其抗氧化活性. *菌物学报*, **29**, 254-260.
- [23] Kim, D.O., Lee, K.W., Lee, H.J., et al. (2002) Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 3713-3717.