

短梗霉黑色素的提取及其理化性质的研究

徐 磊, 王长海 *

(大连理工大学生物工程系 辽宁 大连 116024)

摘 要: 从短梗霉中提取黑色素, 并对黑色素的酸碱、热、光、耐氧化还原性以及常用食品添加剂对色素稳定性的影响进行了探讨。结果表明: 黑色素的最大吸收峰为 225nm; 碱性条件下呈黑褐色, 酸性下呈棕红或棕黄色; 除还原剂以外, 热、光、氧化剂及常用食品添加剂对其无影响, 说明该色素稳定性良好, 作为天然色素具有广阔的开发应用前景。

关键词: 出芽短梗霉; 黑色素; 提取; 理化性质

Extraction and Physico-chemical Characteristics of the Melanin Produced by *Aureobasidium pullulans*

XU Lei, WANG Chang-hai *

(Department of Bioscience and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract: The melanin was obtained from *Aureobasidium pullulans* with fermentation process. The chemical properties of

收稿日期: 2005-08-27

*通讯作者

作者简介: 徐磊(1980-), 男, 在读硕士, 主要从事微生物活性物质的研究。

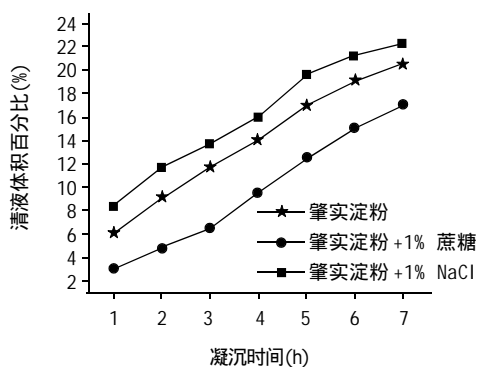


图8 介质对肇实淀粉糊凝沉的影响

Fig. 8 The effects of different media on *Euryale ferox Salisb* starch paste

3.1 肇实淀粉中直链、支链淀粉含量分别为 11.49%、88.51%, 其直支比小于玉米淀粉, 淀粉颗粒的结晶结构属于 A 型, 形状较规则, 呈多面体状, 平均粒径为 10 μm。

3.2 肇实淀粉的糊化温度为 64~76℃, 不易糊化, 耐热性能较好, 其糊化温度比玉米淀粉高而与高粱淀粉相接近。

3.3 肇实淀粉糊透明度较差, 比玉米淀粉糊透明度低很多; 肇实淀粉糊不耐冷冻, 其冻融稳定性比玉米淀粉

糊差, 不适宜用于制作冷冻食品。

3.4 肇实淀粉的溶解度与膨胀度较小, 随温度的升高而增大; 肇实淀粉比玉米淀粉的溶解度小; 在 80℃ 以下, 肇实淀粉膨胀度较小, 而在 85℃ 以上, 膨胀度迅速, 为典型的二段膨胀过程, 属于限制型膨胀淀粉。

3.5 肇实淀粉糊的凝沉性比玉米淀粉糊低; 添加 NaCl 能促进淀粉糊的凝沉, 添加蔗糖能抑制淀粉糊的凝沉。

参考文献:

- [1] 林光荣, 陈绍潘. 福建莆田茭实营养成分研究[J]. 广西热作科技, 1996, (4): 12-14.
- [2] 李彦连, 张爱良. 一种重要的水生药用维管植物—茭实[J]. 济宁师专学报, 1998, (4): 27.
- [3] 刘向农, 余碧钰. 双波长分光光度法测定银杏果仁中直链淀粉和支链淀粉[J]. 光谱实验室, 2000, (5): 506-508.
- [4] 吴雪辉, 张加明. 板栗淀粉糊特性的研究[J]. 食品与发酵工业, 2001, (6): 46-48.
- [5] F B Ahmad, P A Williams. Effect of galactomannans on the thermal and rheological properties of sago starch[J]. J Agric Food Chem, 2001, 49: 1578-1586.
- [6] Jiansheng Li, Harold Corke. Physicochemical properties of maize starches expressing dhl and sugary-2 mutants in different genetic backgrounds[J]. J Agric Food Chem, 1999, 47: 4939-4943.
- [7] 何照范. 植物淀粉及其利用[M]. 贵州: 贵州人民出版社, 1990.

melanin including thermo-stability, photo-stability, resistance to oxidant-reduction and the effect of pH value on absorption of melanin solution were examined. Furthermore, usual food additives were also investigated for the melanin stability. The test showed that the maximum absorption peak of the melanin is 225nm and the melanin becomes brown in alkaline solution and light red in the acid solution. The melanin is of stable chemical properties except the effect of reducing agent. These characteristics show that it is a good natural melanin in food industrial applications.

Key words: *Aureobasidium pullulans*; melanin; extraction; physico-chemical characteristics

中图分类号:0935

文献标识码:A

文章编号:1002-6630(2006)08-0122-04

出芽短梗霉(*Aureobasidium pullulans*)又名出芽茁霉(*Pullularia pullulans*),分类属于半知菌纲,是一种具有酵母型和菌丝形态的多形真菌,广泛存在于植物茎、叶、果实表面及花粉、树蜜中,耐高渗透压^[1]。可作为单细胞蛋白、细胞壁多糖、胞外多糖、果胶酶、色素等的生产菌株,其主要产物是短梗霉多糖,另外在多糖的分泌过程中,我们也常常发现会伴随着黑色素的产生。由于近年来对人工合成的食用色素应用和研究的结果发现:合成的色素对人体有一定的毒性,有的还可能致癌,因此天然色素的开发和利用越来越受到人们的欢迎。目前市场上红色素、黄色素比较多,天然黑色素还较为罕见。黑色素不仅可以用于天然的食用色素添加剂,在化妆品、染发剂的装饰、防紫外辐射、清除自由基以及生物杀虫剂的光保护等方面应用也比较广泛^[2]。

众多学者一直对短梗霉多糖发酵过程中的黑色素作为杂质清除,忽视了黑色素可作为一种潜在的微生物色素资源而加以开发和应用,本文就出芽短梗霉发酵所产生色素的提取及其理化性质的稳定性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

出芽短梗霉 本实验室保藏。

1.1.2 培养基与培养方法

菌种活化培养基(g/L):马铃薯 200、蔗糖 20、蛋白胨 5、琼脂 20, pH 自然,自来水 1000ml, 0.06MPa 灭菌 20min。

种子培养基(g/L):蔗糖 50、 K_2HPO_4 5.0、酵母膏 3.0、 $MgSO_4$ 0.2、 $(NH_4)_2SO_4$ 0.6、NaCl 0.1、pH 6.0, 0.06MPa, 灭菌 20min。

基础培养基(g/L):蔗糖 50、 K_2HPO_4 5.0、酵母膏 2.0、 $MgSO_4$ 0.4、 $(NH_4)_2SO_4$ 0.6、NaCl 0.1、pH 6.5, 0.06MPa, 灭菌 20min。

1.2 设备与仪器

MP200A 电子天平、UV-1800SPECTRUM 紫外可见分光光度计、85-2 恒温磁力搅拌器、PHS-3C 型数字酸

度计、HZQ-F160 恒温振荡培养箱、TGL-16C 台式离心机、DZF-6050 真空干燥箱。

1.3 方法

1.3.1 培养方法^[3]

1.3.1.1 菌种活化 将保存的出芽短梗霉菌株接种于活化培养基斜面上,于 30℃ 培养 2~4d。

1.3.1.2 种子制备 取新鲜斜面菌种 1 环,接种于种子瓶,30℃,180r/min,培养 24h。

1.3.1.3 发酵培养 取 1ml 种子液接种于发酵瓶中,30℃,180r/min,培养 5~7d。

1.3.2 色素的提取

取发酵液 100ml,加入同等体积的 NaOH(1mol/L)溶液,充分振荡,50℃ 浸提 6h 后 3000r/min 离心 10min,重复三次,收集所有上清,用 HCl 调 pH 值至 2~3 左右,静置 24h,使其充分沉淀,然后在 10000r/min 离心 20min,弃上清,得黑色素粗提物于 80℃ 真空干燥至恒重。

1.3.3 pH 测定

数字酸度计测定。

1.3.4 色素吸收光谱的测定

将色素溶于 1mol/L 的 NaOH 中,并以 1mol/L 的 NaOH 溶液作参比液,用紫外分光光度计于 200~800nm 进行光谱扫描,测定黑色素的吸收峰值。

2 结果与分析

2.1 色素的溶解性

大量实验结果表明,黑色素不溶于水、酸、多数有机溶剂,仅微溶于甲醇、二甲基亚砷等,但易溶于碱液,可以利用碱提酸沉法提取黑色素。

2.2 色素的提取纯化

按照 1.3.2 方法从短梗霉提取出黑色素的粗品。但由于黑色素极易与多糖、蛋白、木质素等结合在一起,得黑色素的粗提物往往含此类杂质较多,所以向黑色素粗提物中加 6mol/L 的浓 HCl 清除蛋白、多糖等杂质,最后蒸馏水洗至中性,于冰箱 4℃ 下保存或真空烘干,作为黑色素纯品以待备用。100ml 发酵液中提取色素纯

品约 220mg, 菌体干重约 866mg, 色素回收为 2.2g/L。

2.3 色素的吸收光谱测定

制备色素溶液, 用紫外可见分光光度计于 200 ~ 800nm 下进行光谱扫描, 得黑色素的吸收光谱, 见图 1。

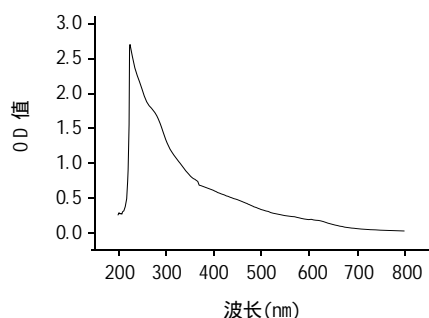


图 1 黑色素光谱图

Fig. 1 Spectrum of the melanin

图 1 可以看出, 黑色素的吸收峰值为 225nm。这与其他菌种所产黑色素有所不同, 宁华等人从酪氨酸基因工程菌提取的黑色素紫外扫描显示无特征峰^[4]; 段晓红等人从嗜麦芽假单胞菌 AT18 所产黑色素的紫外吸收峰显示在 210nm 处有一特征吸收峰^[5], 但是相同的一点是都能吸收所有波长下的光线, 在紫外和可见光区域里, 吸收值都随波长的增大而逐渐降低。

2.4 粗提物的理化性质

2.4.1 对酸碱的稳定性

黑色素在 pH 值 2 ~ 7 的范围内呈现棕红色, 当 pH > 8 时, 颜色变为深褐色。

2.4.2 热稳定性

取 20ml 色素的碱溶液分成 5 份, 分别置于不同温度下的恒温水浴中保温, 每隔 30min 取样一次, 自来水冷却后, 在 225nm 处测定吸光值 A, 观察温度对色素的影响。结果如表 1 所示。

表 1 热稳定性试验结果
Table 1 Test results of thermo-stability

时间(min)	0	30	60	90	120
50	0.925	0.991	0.874	0.908	1.030
70	0.971	1.007	0.986	1.047	1.031
100	0.511	0.532	0.633	0.638	0.831

从表 1 可以看出色素溶液在 50、70、100 °C 下色素的吸光值有升高趋势, 可能是在水浴加热过程中有水分丢失, 或在高温下引起色素的聚合, 吸光值增大。但影响不大, 表明黑色素具有很好的耐热性。

2.4.3 光稳定性

将黑色素溶液分成两份, 1 份置于自然光下放置 4d, 每间隔一天取样, 另 1 份在紫外灯下处理 30min 和

60min, 在 225nm 处测最大吸收峰值, 结果如表 2。

表 2 光处理对黑色素稳定性的影响
Table 2 Effect of sunlight to the stability of melanin

自然光(d)					紫外光(min)		
0	1	2	3	4	0	30	60
0.834	0.883	0.899	0.907	0.932	0.826	0.845	0.846

通过表 2 看出, 光照射对黑色素影响不大, 但发现色素的吸光值随放置时间的延长而增高, 可能是在光照射下, 黑色素的聚合作用增强, 同时也说明黑色素抗紫外辐射性强。

2.4.4 耐氧化性

取 25ml 色素溶液分成 5 份, 以 30% 的 H₂O₂ 作为氧化剂, 分别向其加入 0、2、4、6、8、10ml 然后用水定容至 50ml, 室温放置 2h, 225nm 处测定 OD 值, 结果见表 3。

表 3 氧化剂对色素稳定性的影响
Table 3 Effect of oxidant on the stability of the melanin

H ₂ O ₂ (ml)	0	2	4	6	8
1h	1.967	1.952	1.957	1.978	1.985
2h	1.967	1.949	1.921	1.911	1.930

通过表 3 看出色素的耐氧化性较强, 这也与 Eric S J 等研究其他菌种黑色素的结论相一致: 真菌黑色素可抵抗高锰酸钾盐、次氯酸盐及其他氧化物的氧化作用^[6]; 说明不同菌种所产黑色素都具有抗氧化功能。

2.4.5 耐还原性

以 Na₂SO₃ 作为还原剂, 配置不同浓度的 Na₂SO₃ 色素水溶液的定时取样进在 225nm 处测 OD 值, 结果见表 4。

表 4 还原剂对色素稳定性的影响
Table 4 Effect of reducer on the stability of the melanin

时间	0	1	2	3	4
1h	0.727	0.618	0.438	0.445	0.4
2h	0.727	0.375	0.224	0	0

从表中可以看出吸光值明显降低, 黑色素溶液褪色, 单因素方差分析表明: 还原剂 Na₂SO₃ 对黑色素在实验条件下有显著性影响(p < 0.05)。

2.4.6 VC 对黑色素的影响

配制 VC 分别为 0、1%、2%、3%、4% 的黑色素溶液, 1h 后取样在 225nm 处测 OD 值。见图 5。

由图可以看出不同浓度的维生素 C 对黑色素的稳定性影响不大, 说明该色素维生素 C 有较好的耐受性。

2.4.7 苯甲酸钠对色素的影响

苯甲酸钠是食品工业中常用的防腐剂添加物。配制苯甲酸钠分别为 1 × 10⁻³、2 × 10⁻³、3 × 10⁻³、4 × 10⁻³mol/L

酚类物质对哈密瓜两种主要致病病原产生的细胞壁降解酶活性的影响

张桂芝¹, 杨世忠², 张维一¹

(1. 新疆农业大学食品科学学院, 新疆 乌鲁木齐 830052;

2. 华东理工大学化学与制药学院, 上海 200237)

摘 要: 本研究表明引起哈密瓜采后腐烂的两种主要致病性病原, 匍枝根霉(*Rhizopus stolonifer*)、半裸镰刀菌(*Fusarium semi tecum*) 在诱导培养基上均能产生多聚半乳糖醛酸酶(PG)、果胶甲酯酶(PME)和纤维素酶(Cellulase)。其中*Rhizopus stolonifer*所产的这两种果胶酶类多聚半乳糖醛酸酶与果胶甲酯酶的活性均比*Fusarium semi tecum* 所产的多聚半乳糖醛酸酶与果胶甲酯酶的活性高。而 *F. semi tecum*所产的纤维素酶活性比*R. stolonifer*产的酶活高。邻苯二酚、对苯二酚、对羟基苯甲酸丁酯均能明显地降低*R. stolonifer*与*F. semi tecum*产生多聚半乳糖醛酸酶, 果胶甲酯酶与纤维素酶的能力, 并且这些酚类物质对这些酶的活性也有明显的抑制作用。培养基中加入 1% 果胶或 1% 的羧甲基纤维素钠(CMC), 则均能诱导病原菌产酶, 且酶活性不同。其中果胶在诱导病原物产生多聚半乳糖醛酸酶、果胶甲酯酶方面特别显著, 果胶与 CMC 在诱导病原菌产纤维素酶方面差别不大。

关键词: 酚类物质; 细胞壁降解酶; 抑制作用; 哈密瓜

收稿日期: 2005-07-29

作者简介: 张桂芝(1973-), 女, 讲师, 博士研究生, 主要从事酚类物质的研究。

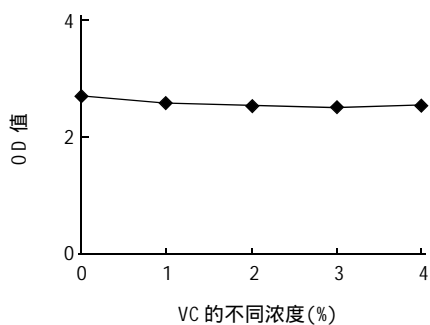


图2 VC 对色素稳定性的影响

Fig.2 Effect of VC on the stability of the melanin

的色素溶液, 1h 后取样在 225nm 处测 OD 值, 考察苯甲酸钠对色素的影响, 结果见表 6。实验证明, 此条件下防腐剂苯甲酸钠对黑色素的稳定性没有影响。

3 结 论

合成色素由于安全性问题已逐渐地受到限制, 甚至有些被禁用。天然色素越来越受到食品和化妆品行业的青睐, 在国际市场上, 天然色素的利用正以 10% 的速度增长^[7]。本实验利用发酵法制得的黑色素, 该色素具有较高的热稳定性, 不易受热分解或变色, 对

紫外、可见光照射不敏感, 并且对 H_2O_2 、VC 和苯甲酸钠有较好的耐受性, 但是还原剂 Na_2SO_3 对其影响显著, 故在应用过程中避免与还原剂的接触。另外有人发现化学合成的黑色素能清除自由基及抑制脂质过氧化^[8], 微生物所产的天然黑色素是否也有此功能, 还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Catley B J. Microbial polysaccharides and polysaccharides[M]. Academic Press, 1979. 69-84.
- [2] Alois A B, Michacl H. Wheeler. Biosynthesis and functions of fungal melanins[J]. Ann Rev Phytopathol, 1986, 24: 411-451.
- [3] 王长海, 解联合, 赵艾霞, 等. 短梗霉最佳培养条件研究[J]. 化工冶金, 1994, 15(1): 22-25.
- [4] 宁华, 王戈林, 沈萍. 酪氨酸酶基因工程菌所产黑色素的性质研究[J]. 湖北教育学院学报(自然科学版), 1999, (5): 63-66.
- [5] 段晓红, 毛歆, 彭珍荣. 固定化细胞生产黑色素的研究[J]. 武汉大学学报(自然科学版), 1997, 43: 294-253.
- [6] 李建波, 宋欣, 曲音波. 产胞外黑色素菌株的筛选[J]. 微生物学通报, 2004, 31(1): 51-54.
- [7] 张铁鹰. 天然色素及其稳定化技术[J]. 食品工业科技, 1991, (4): 27-32.
- [8] Porebska-Budny M, Sakina N, et al. Antioxidative activity of synthetic melanin. Cardioliipin liposome model[J]. Biochem Biophys Acta, 1992, 1116: 11-16.