

文章编号:1673-1689(2009)02-0229-05

Plectania YM421 胞内黑色素提取及其生物功能

叶明, 朱立, 杨柳, 李世艳

(合肥工业大学 生物与食品工程学院, 安徽 合肥 230009)

摘要: 对暗盘菌 YM421 菌株胞内黑色素的提取工艺、抗紫外线活性、抗卵磷脂氧化和抗油脂氧化进行了研究。结果表明 *Plectania* YM421 胞内黑色素最佳提取条件是 $A_3B_3C_2$, 即提取时间为 4 h, 提取温度为 90 °C, 料液质量比为 1:200; 该黑色素具有较强的抗紫外线能力, 在质量浓度为 80 mg/mL 时对卵磷脂抗氧化指数为 56%, 能显著抑制大豆油的氧化。

关键词: 暗盘菌; 黑色素; 提取; 生物功能

中图分类号: Q 939.99

文献标识码: A

Extraction Technology of Intracellular Melanin and Its Biological Function from *Plectania* YM421

YE Ming, ZHU Li, YANG Liu, LI Shi-yan

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

Abstract: In this manuscript, the extraction process of melanin from *Plectania* YM421, and the abilities of anti-ultraviolet ray irradiation, antioxidative on phosphatidylcholine and bean oil of the melanin were studied. The optimal process parameters for melanin extraction from *Plectania* YM421 was achieved: extraction times as 4 hours, extraction temperature as 90 °C and ratio of material to solution as 1:200. The melanin exhibits the strong ability of anti-ultraviolet ray irradiation, and the oxygen radical absorbance capacity of phosphatidylcholine was 56% at 80mg/mL of the melanin. Furthermore, the melanin can highly inhibit oxidative activity of bean oil.

Key words: *Plectania*, melanin, extraction, biological function

黑色素是一种结构较为复杂的多酚类聚合物,它是生物体为抵抗紫外线和电离辐射等因素的伤害逐渐进化而成的,可以被看成是生物体用来保护自己的一道屏障,能够提高生物的生存和竞争能力^[1]。黑色素不仅能作为紫外线吸收剂、抗氧化剂、自由基清除剂、阳离子螯合剂和新型天然的药物载体^[2-3],也可用来治疗某些与黑色素缺乏有关的神经系统疾病^[4]。

近年来,陆续发现合成色素对人体存在伤害,

因此越来越多的天然色素用于食品和化妆品,在国际市场上天然色素的产量正以每年 10% 的速率递增。目前,使用的天然色素主要来自植物,而这些天然色素远远不能满足实际需求。真菌色素是世界菌类资源的重要组成部分,具有极大的开发潜力,目前国际上真菌色素的研发主要集中在医药和食品着色方面。作者在国内首次对分离的一株暗盘菌属真菌黑色素进行研究,以期对盘菌黑色素的开发和应用奠定基础。

收稿日期:2008-03-26。

基金项目:安徽省自然科学基金项目(090411086)。

作者简介:叶明(1959-),男,安徽怀宁人,教授。主要从事微生物资源与应用研究。Email: yeming123@sina.com

1 材料与方法

1.1 菌株

Plectania sp YM421 菌株(采自安徽黄山),合肥工业大学微生物资源与应用研究室分离保藏。

1.2 培养基

分离与保藏培养基^[5]:PDA 培养基+0.5 g/dL 蛋白胨;发酵培养基^[6]:蔗糖 2.5 g/dL, K_2HPO_4 0.05 g/dL, $MgSO_4$ 0.03 g/dL, 味精 0.5 g/dL, 酵母膏 0.4 g/dL; pH 6.5。

1.3 实验方法

1.3.1 黑色素发酵 用内径为 6 mm 打孔器接种菌龄相同菌丝体块于装有 30 mL 发酵培养基的 100 mL 的三角瓶中, 25 °C、200 r/min 摇床培养 10 d, 发酵液过滤得菌丝体, 用蒸馏水洗涤 3 次后, 60 °C 干燥至恒重。

1.3.2 胞内色素的提取

将干燥的菌丝体进行研磨, 过 60 目筛。提取详见文献[7]。

1) 胞内色素提取参数的单因素试验

单因素试验按下列处理方法进行:

(1) 料液质量比为 1 : 200, 调节不同 pH 值, 90 °C 浸提 3 h; (2) 料液质量比为 1 : 200, 在最佳 pH 值下于不同温度浸提 3 h; (3) 以不同料液质量比, 于最佳 pH 值和温度下浸提 3 h; (4) 以最佳料液质量比, 于最佳 pH 值和温度下每隔 0.5 h 取样; 提取结束后, 5 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 稀释 4 倍后于 286 nm 处测吸光度值。

2) 胞内色素提取工艺的优化

在单因素试验的基础上, 以温度、时间和料液质量比为因素, 各取 3 个水平, 选择 $L_9(3^4)$ 正交表对提取条件进行优化。

1.4 黑色素对 *E. coli* 的光保护作用

参照文献[8]方法进行。制备菌浓度为 10^8 个/mL 的 *E. coli* 菌悬液, 分别用无菌水和 0.1 g/L 黑色素溶液稀释至 10^4 个/mL, 取 10 mL 于平皿中, 置于 20 W 紫外灯下 30 cm 处分别照射 0.5、1、2、3 min, 取 0.1 mL 涂布牛肉膏蛋白胨平板, 37 °C 培养 24 h, 计算菌落数。

1.5 黑色素抗卵磷脂氧化作用

参照文献[9]方法进行。取 5 支试管, 分别加入 0.5 mL 质量分数 10% 的蛋黄悬液, 1 mL 不同浓度的黑色素溶液, 1.5 mL 体积分数 20% 醋酸, 1.5 mL 质量分数 0.8% 硫代巴比妥酸溶液(含质量分数 1.1% 的 SDS); 振荡混匀后, 95 °C 加热 60 min。

取出冷至室温, 分别加入 5 mL 正丁醇, 振荡混匀后, 以 3 000 r/min 离心 10 min, 于 532 nm 处测定上清液的吸光度。同时测定不加黑色素溶液的吸光度。按下式计算黑色素的抗氧化指数: $A_1 = (1 - A_T/A_C) \times 100\%$ 。式中 A_C 为不含黑色素体系的吸光度, A_T 为含黑色素体系的吸光度。

1.6 黑色素抗油脂氧化作用

参照文献[10]方法进行。精确称取 0.1 g 大豆油于 50 mL 容量瓶中, 加 2.5 mL 氯仿-冰醋酸(体积比 2 : 3)溶解, 然后加入 0.25 mL 饱和碘化钾溶液, 轻轻振荡 0.5 min, 然后在暗处放置 3 min, 取出后加显色剂至刻度, 摇匀静置 5 min 后, 于 580 nm 处测吸光度。

2 结果与分析

2.1 胞内黑色素的提取

2.1.1 pH 值对胞内黑色素提取的影响 由图 1 可知, 随着 pH 的增大, 黑色素的提取量呈上升趋势, 在 pH12 时达到最大值, 表明 pH12 有利于胞内色素的溶出, 故选择 pH12 为最佳提取 pH 值。

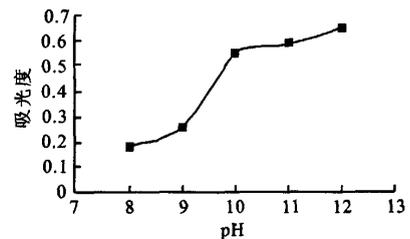


图 1 pH 对黑色素提取的影响

Fig. 1 Effect of pH on melanin extraction

2.1.2 温度对胞内黑色素提取的影响 由图 2 可知, 温度超过 60 °C 时, 色素的提取量迅速上升, 并在 90 °C 时达到最大值, 故以 90 °C 为最佳提取温度。

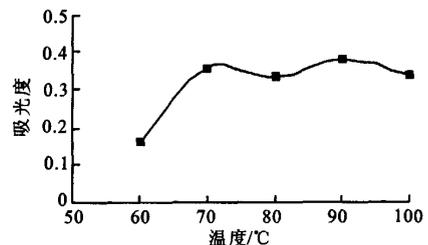


图 2 温度对黑色素提取的影响

Fig. 2 Effect of temperature on melanin extraction

2.1.3 料液质量比对黑色素提取的影响 由图 3 可知, 当料液质量比为 1 : 200 时, 黑色素的提取量达到最大值。故选择 1 : 200 作为最佳料液质量比。

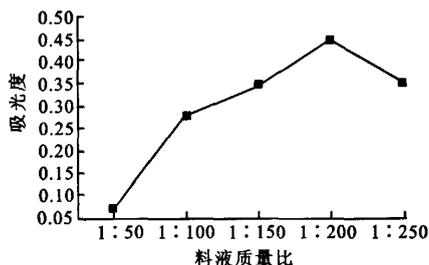


图 3 料液质量比对黑色素提取的影响

Fig. 3 Effect of pH on melanin extraction

2.1.4 时间对胞内黑色素提取的影响 由图 4 可知,时间达到 3.5 h 时,黑色素的提取量达到最大值。故选择最佳提取时间为 3.5 h。

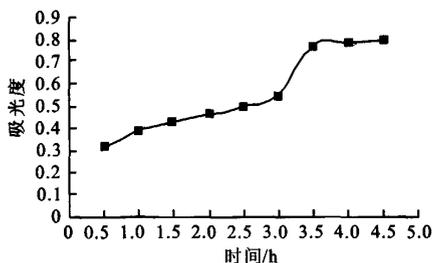


图 4 提取时间对黑色素提取的影响

Fig. 4 Effect of time on melanin extraction

2.1.5 正交试验对提取条件的优化 在单因素试验的基础上,选择 $L_9(3^4)$ 正交表对提取条件进行优化。试验方案及结果见表 1。

表 1 正交试验方案与结果

Tab. 1 Orthogonal design and results

水平	因素				吸光度
	时间 A	温度 B	料液质量比 C	空列 D	
1	1(3 h)	1(70 °C)	1(1 : 150)	1	0.223
2	1	2(80 °C)	2(1 : 200)	2	0.239
3	1	3(90 °C)	3(1 : 250)	3	0.301
4	2(3.5 h)	1	2	3	0.211
5	2	2	3	1	0.275
6	2	3	1	2	0.251
7	3(4 h)	1	3	2	0.256
8	3	2	1	3	0.246
9	3	3	2	1	0.329
k_1	0.254	0.230	0.240	0.276	
k_2	0.246	0.253	0.260	0.249	
k_3	0.277	0.294	0.277	0.253	
R	0.031	0.064	0.037	0.027	

由表 1 极差 R 值和表 2 方差分析可知,因素 B

万方数据

温度为黑色素提取的主要因素,各因素对黑色素提取产生的影响程度顺序为 $B > C > A$,可以确定最佳提取组合条件为 $A_3 B_3 C_2$ 。同时,正交试验中最大吸光度值出现在组合 $A_3 B_3 C_2$ 处,故选择最佳组合条件为 $A_3 B_3 C_2$,即提取时间为 4 h,提取温度为 90 °C,料液质量比为 1 : 200。

表 2 方差分析

Tab. 2 Results of variance analysis

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
时间	0.002	2	0.727	4.460	
温度	0.006	2	2.182	4.460	*
料液质量比	0.002	2	0.727	4.460	
空列	0.001	2	0.364	4.460	
误差	0.01	8			

2.1.6 提取次数对黑色素提取的影响 由图 5 可知,在正交试验所得最佳工艺下,随着提取次数的增加,黑色素的提取量显著下降,当提取次数达到 5 次,吸光度为 0.021,说明胞内黑色素几乎完全溶出。因此提取 4 次,利用酸碱沉淀法沉淀黑色素。4 次得到的黑色素总量(干重)为 0.015 9 g,总提取率 = (黑色素干重/菌丝体干重) × 100% = 0.015 9 / 0.099 6 = 15.96%。

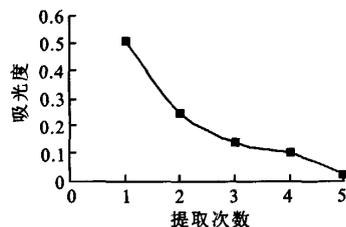


图 5 提取次数对黑色素提取的影响

Fig. 5 Effect of times on melanin extraction

2.2 黑色素的生物学功能

2.2.1 黑色素抗紫外线活性 由表 3 可知,随着紫外照射时间的延长,无菌水组 *E. coil* 存活率急剧下降,照射 1 min 后,仅有零星菌落;照射 2 min, *E. coil* 存活率为零;黑色素组菌落数随照射时间的延长也有下降,但 3 min 时,仍有 1.07×10^3 菌落出现。此外,紫外照射 8 min 后,黑色素组仍有 1.9×10^2 菌落出现。同时由表 4 可知,黑色素对 *E. coil* 的保护作用随其质量浓度的增加而增强。

2.2.2 黑色素抗卵磷脂氧化 由图 6 可知,随着黑色素质量浓度的增加其抗卵磷脂氧化活性呈上升趋势,并表现出一定的量效关系。在质量浓度为 80 mg/mL 时,抗氧化指数达到 56%。

表3 黑色素对 *E. coli* 紫外照射的保护作用Tab.3 Protection of *E. coli* against UV light by melanin

紫外照射时间/min	无菌水组菌落存活数	黑色素组菌落存活数
0	2.09×10^3	2.09×10^3
0.5	1.28×10^3	1.59×10^3
1	40	1.45×10^3
2	0	1.26×10^3
3	0	1.07×10^3

表4 不同质量浓度黑色素对 *E. coli* 紫外照射3 min的保护作用Tab.4 Protection of *E. coli* by different concentration melanin after 3 min UV light irradiation

黑色素质量浓度/(g/L)	菌落存活数
0.2	1.5×10^3
0.1	1.03×10^3
0.05	0.26×10^3
0.025	40

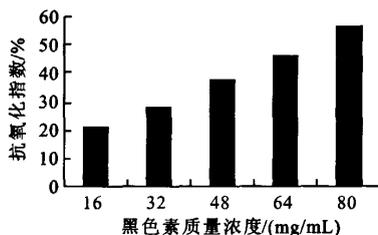


图6 黑色素抗卵磷脂氧化

Fig.6 The antioxidative activities of melanin on phosphatidylcholine

2.2.3 黑色素抗油脂氧化 由图7可知,随着时间的延长,添加黑色素的大豆油其氧化被显著抑制,并在12 h后,其抑制作用保持恒定。

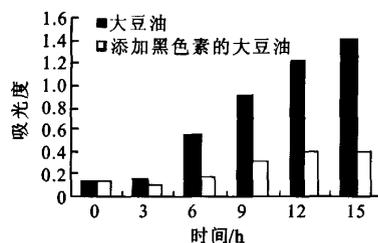


图7 黑色素抗油脂氧化

Fig.7 The antioxidative activities of melanin on bean oil

3 结语

研究中采用物理(研磨菌丝体)和化学(调pH)相结合的破胞法,其色素提取率较袁保红等^[11]的色素提取率高,说明该方法可能有利于细胞色素的溶出。同时采用热水提取 *Plectania* YM421 胞内黑色素,具有高效、操作简便、操作成本和原料处理成本低等优点。

通过活细胞计数证明了 *Plectania* YM421 胞内黑色素对 *E. coli* 具有紫外线防护作用,表明该黑色素可望作为紫外敏感物质的光保护剂。本研究结果还表明 *Plectania* YM421 黑色素能够很好地抑制卵磷脂和油脂的过氧化作用,显示该黑色素可望用于防止脂类因氧化造成的品质下降,以及抑制体内脂肪的氧化导致癌症的发生和人体的老化,在食品、化妆品、医药等行业具有较大的开发潜力与良好的市场前景。

参考文献(References):

- [1] Alois A B, Michael H W. Biosynthesis and functions of fungal melanins[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 1986, 24: 411-451.
- [2] Jacobson E S, Tinnell S B. Antioxidant function of fungal melanin[J]. *J Bacteriol*, 1993, 175: 7102-7104.
- [3] Liu Y T, Sui M J, Ji D D, et al. Protection from UV irradiation by melanin of mosquitocidal activity of Bt var israeliensis [J]. *J Invertebr Pathol*, 1993, 62: 131-136.
- [4] da Silva M B, Marques A F, Nosanchuk J D, et al. Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility[J]. *Microbes And Infection*, 2006(8): 197-205.
- [5] 叶明,谭炜,陈辉,等. 粒毛盘菌培养条件及其产色素条件初步研究[J]. *食品科学*, 2007, 28(10): 329-332.
YE Ming, TAN Wei, CHEN Hui, et al. Pilot study on culture conditions of lachnum and its producing pigment conditions[J]. *Food Science*, 2007, 28(10): 329-332. (in Chinese)
- [6] 杨端云,李春远,林永成,等. 南海红树林内生真菌 *Cephalosporium* sp. 代谢产物[J]. *应用化学*, 2007, 24(2): 220-222.
YANG Duan-yun, LI Chen-yun, LIN Yong-cheng, et al. Metabolites of mangrove endophytic fungus *Cephalosporium* sp.

- from south China sea[J]. *Applied Chemistry*, 2007, 24(2): 220—222. (in Chinese)
- [7] 孙峰, 谷文英, 丁霄霖. 山药粗多糖的提取工艺[J]. *食品与生物技术学报*, 2006, 25(3): 79—84.
SUN Feng, GU Wen-ying, DING Xiao-lin. Study on the extraction technology of polysaccharide from dioscorea oppositifolia[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006, 25(3): 79—84. (in Chinese)
- [8] Geng J, Yu S B, Wan X, et al. Protective action of bacterial melanin against DNA damage in full UV spectrums by a sensitive plasmid-based noncellular system[J]. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2008: 1—5.
- [9] 潘英明, 李海云, 王恒山, 等. 桂花种子皮黑色素总酚含量的测定及其脂质抗氧化活性研究[J]. *食品研究与开发*, 2005, 26(5): 145—148.
PAN Ying-ming, LI Hai-yun, WANG Heng-shan, et al. Study on total phenolic content and lipid peroxidation inhibition activities of melanin from osmanthus fragrans' seeds[J]. *Food Research and Development*, 2005, 26(5): 145—148. (in Chinese)
- [10] 梅盛华, 张伟忠, 刘马英, 等. 碘量比色法测定食品油脂中过氧化值的研究[J]. *海峡预防医学杂志*, 2000, 6(2): 48.
MEI Sheng-hua, ZHANG Wei-zhong, LIU Ma-ying, et al. Research on methods of measuring peroxide value of fatty acids in food with iodine colorimetry[J]. *Strait Journal of Preventive Medicine*, 2000, 6(2): 48. (in Chinese)
- [11] 袁保红, 杜青平, 蔡创华, 等. 海洋细菌 *Pseudomonas* sp. 色素的提取及稳定性的研究[J]. *海洋通报*, 2005, 24(6): 92—96.
YUAN Bao-hong, DU Qing-ping, CAI Chuang-hua, et al. Study on the extraction and stability of pigments from a marine bacterium *Pseudomonas* sp. [J]. *Marine Science Bulletin*, 2005, 24(6): 92—96. (in Chinese)

(责任编辑: 秦和平, 杨萌)

《食品与生物技术学报》2009年征稿征订启事

《食品与生物技术学报》(双月刊)是教育部主管、江南大学主办的有关食品科学与工程、生物技术与发酵工程及其相关研究的专业性学术期刊,为全国中文核心期刊、中国科技核心期刊、中国期刊方阵双效期刊,目前被美国化学文摘(CA)等国内外10余家著名检索系统收录。主要刊发食品科学与工程,食品营养学,粮食、油脂及植物蛋白工程,制糖工程,农产品及水产品加工与贮藏,动物营养与饲料工程,微生物发酵,生物制药工程,环境生物技术等专业最新科研成果(新理论、新方法、新技术)的学术论文,以及反映学科前沿研究动态的高质量综述文章等,供相关领域的高等院校、科研院所、企事业单位的教学、科研等专业技术人员、专业管理人员以及有关院校师生阅读,热忱欢迎广大读者订阅。

《食品与生物技术学报》为A4(大16K)开本,144页,全年6期,每册定价15.00元,邮发代号:28—79,全国各地邮局均可订阅。

《食品与生物技术学报》编辑部