

陈逍遙,赵琼瑜,彭振辉,等. 乌鳖黑色素提取工艺及其结构性状[J]. 江苏农业科学,2020,48(24):182-188.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.24.036

乌鳖黑色素提取工艺及其结构性状

陈逍遙, 赵琼瑜, 彭振辉, 宋 伟

(浙江万里学院生物与环境学院,浙江宁波 315100)

摘要:以乌鳖肌肉为原料,采用“脱脂—酶解—酸解”三步法提取乌鳖黑色素,研究脱除蛋白、分离纯化乌鳖黑色素的工艺条件,通过扫描电镜对乌鳖黑色素纯化效果进行观察,并用傅里叶红外光谱仪对其结构进行分析。最佳脱脂工艺为:乙醇回流脱脂 8 次,料液比 1 g : 60 mL,脱脂率为 98.99%。脱脂后用木瓜蛋白酶进行酶解,其最佳工艺为:酶底比为 1 mg : 2 g、酶解温度 60 ℃、酶解时间 5 h、料液比 1 g : 25 mL、酶解 pH 值 5.0,蛋白质脱除率最高;酸纯化的最优工艺为:盐酸浓度 6 mol/L、料液比 1 g : 15 mL、时间 4 h、温度 100 ℃,蛋白质脱除率最高。在“脱脂—酶解—酸解”条件下总杂质脱除率高达 98.91%。通过扫描电镜可见纯化黑色素为均匀的椭圆形颗粒,颗粒表面光滑清晰,同时结合傅里叶红外光谱具有非常典型的吡咯结构,提取的乌鳖黑色素纯度高、结构完整,可用于降解和结构研究。

关键词:乌鳖;黑色素;提取工艺;脱脂工艺;酶解工艺;酸纯化工艺;结构性状

中图分类号:TS254.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)24-0182-07

清溪乌鳖(*Pelodiscus sinensis*,简称乌鳖)是从中华鳖的体色变异个体经过扩繁得到的新品种^[1],是浙江省特有地方品种,其典型形态特征是全身体色

乌黑,富含黑色素,具有很高的食用价值和药用价值^[2]。黑色素是目前所知唯一能保护生物体免受辐射伤害的天然内源性生物聚合物^[3],具有很强的生理活性,能够有效地消除自由基^[4-5],对人体具有提高机体免疫力^[6]、防止衰老^[7-8]、抑制病毒^[9]等功能,因此黑色素被广泛应用于医药、食品和保健品等领域。

目前,天然黑色素的开发研究主要集中在植物和真菌类材料,包括黑米^[10]、山杏^[11]、黑木耳^[12]、灵芝等^[13],主要采用超声波辅助提取法。动物中黑色素与蛋白质紧密相连、不易分离,要获得比较纯

收稿日期:2020-03-26

基金项目:浙江省农业(水产)新品种选育重大科技专项(编号:2016C02055-4-1);浙江省宁波市重大科技专项(编号:2017C110012);浙江省教育厅一般科研项目(编号:Y201738596)。

作者简介:陈逍遙(1999—),男,贵州铜仁人,主要从事水产动物营养品质。E-mail:927547204@qq.com。

通信作者:宋 伟,硕士,助理实验师,主要从事水产动物营养生理与健康养殖。Tel:(0574)88222991;E-mail:sw2014wl@163.com。

[11] Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *Embnet Journal*, 2011, 17(1): 10-12.

[12] Edgar R C, Haas B J, Clemente J C, et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection [J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(16): 2194-2200.

[13] Wang Q, Garrity G M, Tiedje J M, et al. Naive bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(16): 5261-5267.

[14] Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(1): 590-596.

[15] Haraszthy V I, Zambon J J, Sreenivasan P K, et al. Identification of oral bacterial species associated with halitosis[J]. *Journal of the American Dental Association*, 2007, 138(8): 1113-1120.

[16] Williams S T, Foster P G, Littlewood D. The complete mitochondrial genome of a turbinid gastropod from MiSeq Illumina sequencing

of genomic DNA and steps towards a resolved gastropod phylogeny [J]. *Gene*, 2014, 533(1): 38-47.

[17] 张亚楠,魏单平,韩瑞丽,等. 高产期不同产蛋水平蛋鸡肠道微生物群落特征[J]. *中国兽医学报*, 2017, 37(6): 1179-1185.

[18] Torok V A, Hughes R J, Mikkelsen L L, et al. Identification and characterization of potential performance-related gut microbiotas in broiler chickens across various feeding trials [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(17): 5868-5878.

[19] Lu J, Domingo J S. Turkey fecal microbial community structure and functional gene diversity revealed by 16S rRNA gene and metagenomic sequences[J]. *Journal of Microbiology*, 2008, 46(5): 469-477.

[20] Wrzosek L, Miquel S, Noordine M L, et al. Bacteroides thetaiotaomicron and Faecalibacterium prausnitzii influence the production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic epithelium of a gnotobiotic model rodent [J]. *BMC Biology*, 2013, 11(1): 61.

净的黑色素,就必须尽可能去除蛋白质等杂质。因此,动物来源的黑色素研究只局限在乌骨鸡等少数动物材料中。但国内外学者主要从形态特征^[1]、养殖性能^[14]、营养成分^[15]、同工酶^[16]、细胞水平和 DNA 分子水平^[17]等方面对乌鳖种质资源进行研究。有关乌鳖中黑色素的研究却鲜见报道。因此,本试验以乌鳖为研究对象,系统建立乌鳖的黑色素提取工艺,探究乌鳖的黑色素结构性状,有利于乌鳖的高附加值综合利用,对加快黑色食品的发展具有十分重要的理论意义和实用价值。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

成体乌鳖,体质量约为 500 g,购于浙江清溪鳖业股份有限公司。

主要仪器有 ME204 型电子天平,购自梅特勒-托利多公司;DS-1 高速组织捣碎机,购自上海标本模型厂;Alphal-4LSCplus 冷冻干燥机,购自德国 Christ 公司;5810 大容量低温高速台式离心机,购自德国 Eppendorf 公司;DHG9246A 型电热鼓风干燥箱,购自上海精宏实验设备有限公司;Cary100 紫外可见分光光度计,购自安捷伦科技有限公司;S-4800 型场发射扫描电镜,购自日本日立公司。

主要试剂有黑色素标准品(M2649),购自 Sigma 公司;木瓜蛋白酶,购自生工生物工程(上海)股份有限公司;无水乙醚、石油醚、无水乙醇、盐酸、氢氧化钠等,均为国药分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 乌鳖肌肉主要成分的测定 乌鳖肌肉中水分含量测定参考 GB 5009.3—2016《食品安全国家标准 食品中水分的测定》中 105℃干燥恒重法;粗蛋白含量测定参考 GB 5009.5—2016《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》自动凯氏定氮仪法;粗脂肪含量测定参考 GB 5009.6—2016《食品安全国家标准 食品中脂肪的测定》索氏抽提法;灰分含量测定参考 GB 5009.4—2016《食品安全国家标准 食品中灰分的测定》中 550℃马弗炉干法灰化法。

1.2.2 乌鳖肌肉预处理 在实验室活体宰杀后剥离肌肉,在高速组织匀浆机中打碎成肉糜,于冷冻干燥机中冻干,-20℃密封保存备用。

1.2.3 脱脂工艺的优化 (1)单因素试验。精确称取样品置于索氏提取器中,在不同溶剂(无水乙

醚、石油醚、无水乙醇)、回流次数(4、5、6、7、8、9)、料液比(1 g:50 mL、1 g:60 mL、1 g:75 mL、1 g:100 mL、1 g:150 mL)等因素下测定脱脂效果。脱脂反应结束后,滤液真空浓缩,得乌鳖油脂,滤渣置于干燥箱中以 60℃干燥至恒质量,称质量,计算脱脂率,评价各条件对乌鳖肌肉脱脂效果的影响。

$$\text{乌鳖油脂脱除率} = \frac{\text{乌鳖油脂质量(g)}}{\text{乌鳖粗脂肪含量(g)}} \times 100\%$$

(2)正交试验设计。通过单因素试验的优化,以无水乙醇为脱脂浸提试剂,选择料液比(A)、回流次数(B)作为试验因子,采用 Design-Expert 软件设计 $L_9(3^2)$ 正交试验条件,以脱脂率作为评价指标,筛选最佳脱脂工艺。

1.2.4 酶解制备黑色素的工艺优化 (1)单因素试验。精确称取一定量的脱脂样品,将其置于蛋白酶反应液中,在不同蛋白酶[木瓜蛋白酶(55℃,pH 值 5.5)、胃蛋白酶(37℃,pH 值 2.5)、胰蛋白酶(37℃,pH 值 8.0)]、料液比(1 g:10 mL、1 g:20 mL、1 g:25 mL、1 g:30 mL、1 g:40 mL)、pH 值(5.0、5.5、6.0、6.5、7.0)、温度(50、55、60、65、70、75℃)、酶底比[1 mg:4 g、1.5 mg:4 g、2 mg:4 g、3 mg:4 g、4 mg:4 g(质量比,下同)]、酶解时间(3、4、5、6、7 h)单因素下测定蛋白脱除效果。将样品置于干燥箱中以 60℃干燥至恒质量,称质量,计算蛋白质脱除率,评价各条件对乌鳖肌肉脱蛋白效果的影响。

$$\text{蛋白质脱除率} = \frac{\text{乌鳖干肉(g)} - \text{酶解残渣质量(g)}}{\text{乌鳖干肉质量(g)}} \times 100\%$$

(2)正交试验设计。以单因素试验筛选的酶解温度(C)、酶解时间(D)、料液比(E)和酶解 pH 值(F)作为试验因子,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验条件,以蛋白质脱除率为评价指标,筛选最佳工艺。

1.2.5 酸法纯化黑色素的工艺优化 (1)单因素试验。精确称取一定量的黑色素粗品,将其置于盐酸反应液中,在不同时间(1、6、12、24、48 h)、温度(25、60、70、80、90、100℃)、盐酸浓度(1、3、6、9、12 mol/L)、料液比(1 g:10 mL、1 g:20 mL、1 g:50 mL、1 g:100 mL、1 g:200 mL)单因素下测定黑色素纯化效果。酸纯化反应结束后,将样品置于干燥箱中以 60℃干燥至恒质量,称质量,计算杂质脱除率,评价各条件对乌鳖肌肉黑色素纯化效果的影响。

$$\text{杂质脱除率} = \frac{\text{酶解残渣质量(g)} - \text{酸化残渣质量(g)}}{\text{酶解残渣质量(g)}} \times 100\%$$

(2)正交试验设计。选择盐酸浓度(G)、时间

(H)、温度(I)和温度(J)作为试验因子,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验条件,以杂质脱除率为评价指标,对结果进行方差分析和显著性分析,筛选最佳脱除工艺。

1.2.6 乌鳖黑色素的结构性状 (1)电镜扫描。将样品均匀散布在导电胶上,置于金属载物台,用常规真空喷镀法喷金 90 s,放置于扫描电镜下观察,选取有代表性的视野进行显微拍摄。(2)傅里叶红外扫描。称取 1 mg 乌鳖黑色素样品、1 mg 乌骨鸡黑色素样品和 1 mg 黑色素标准品,将样品分别与 0.1 g 溴化钾混合,在玛瑙研钵中研成细粉,混合均匀,用红外压片机压片。测定样品在 $400 \sim 4\,000\text{ cm}^{-1}$ 范围内的红外吸收光谱。

2 结果与分析

2.1 乌鳖肌肉基本成分分析

乌鳖肌肉中测定的水分含量为 77.76%,干物

质含量为 22.24%。乌鳖肌肉干物质的营养成分如表 1 所示,粗蛋白的含量高达 77.56%,脂肪比例为 16.85%,灰分比例为 5.59%。可见,乌鳖肌肉中主要成分为蛋白质,其含有的脂肪含量也较高。因此,要对乌鳖肌肉组织进行有效的脱脂和脱蛋白工艺。

表 1 乌鳖肌肉干物质的基本营养成分

成分	粗蛋白	粗脂肪	灰分
含量(%)	77.56 ± 0.99	16.85 ± 0.90	5.59 ± 1.26

注: $n=6$ 。

2.2 脱脂工艺优化结果

2.2.1 乌鳖肉脱脂工艺优化的单因素试验 在料液比为 1 g : 75 mL、回流温度为 90 ℃、回流 8 次的初始条件下进行脱脂单因素试验,研究溶剂种类、料液比、回流次数对乌鳖肉脱脂率的影响,结果如图 1 所示,乌鳖肌肉在无水乙醇中回流 8 次、料液比为 1 g : 60 mL 时的脱脂率最高。

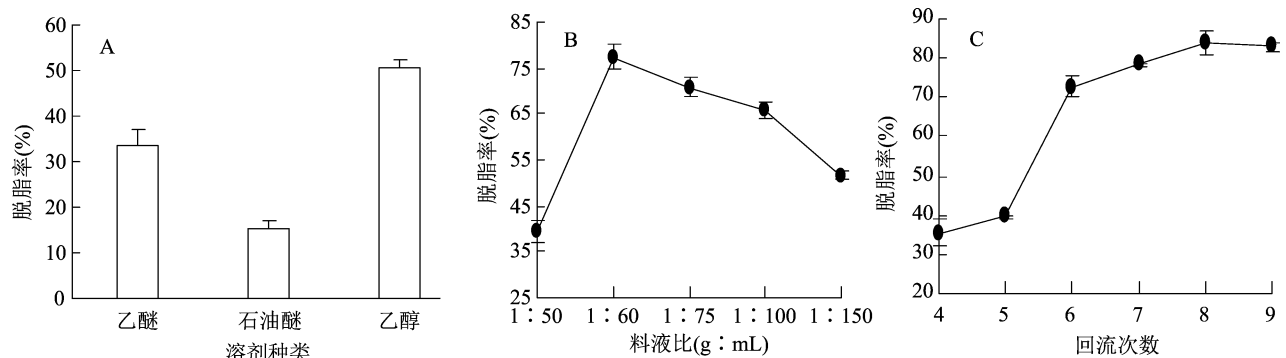


图1 试剂种类、料液比、回流次数对乌鳖肉脱脂率的影响

2.2.2 乌鳖肉脱脂工艺优化的正交试验 乌鳖肌肉乙醇脱脂的正交试验结果及方差分析如表 2、表 3 所示。根据极差 R 值大小,2 个因素的主次顺序为 B(回流次数) > A(料液比)。结合 k 值可知乌鳖肌肉脱脂率最高 (98.99%) 的条件是:料液比 1 g : 60 mL、回流次数 8 次。在 9 个试验中 8 号试验组为这一组合,因此 A_3B_2 组合为最优组合。根据方差分析结果可知,各因素在正交试验所选水平下对乌鳖肌肉脱脂率都有影响,但回流次数和料液比对其影响不显著 ($P>0.05$)。

2.3 酶法制备黑色素工艺优化结果

2.3.1 乌鳖肉蛋白质脱除工艺优化单因素试验 在酶底比 1 mg : 4 g、料液比 1 g : 10 mL、酶解时间 4 h 的初始条件下进行黑色素酶解单因素试验。蛋白酶种类、料液比、酶解 pH 值、酶解温度、酶底比、

表 2 $L_9(3^2)$ 正交试验方案及结果

试验号	A	B (次)	脱脂率 (%)
1	1(1 g : 50 mL)	1(7)	87.48
2	1	2(8)	89.79
3	1	3(9)	87.12
4	2(1 g : 60 mL)	1	83.15
5	2	2	92.46
6	2	3	82.20
7	3(1 g : 70 mL)	1	95.49
8	3	2	98.99
9	3	3	82.79
k_1	88.13	88.71	
k_2	85.94	93.75	
k_3	92.42	84.04	
R	6.48	9.71	

表 3 正交试验结果方差分析

方差来源	偏差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
A	65.320	2	32.660	1.807	0.276
B	141.495	2	70.747	3.913	0.114

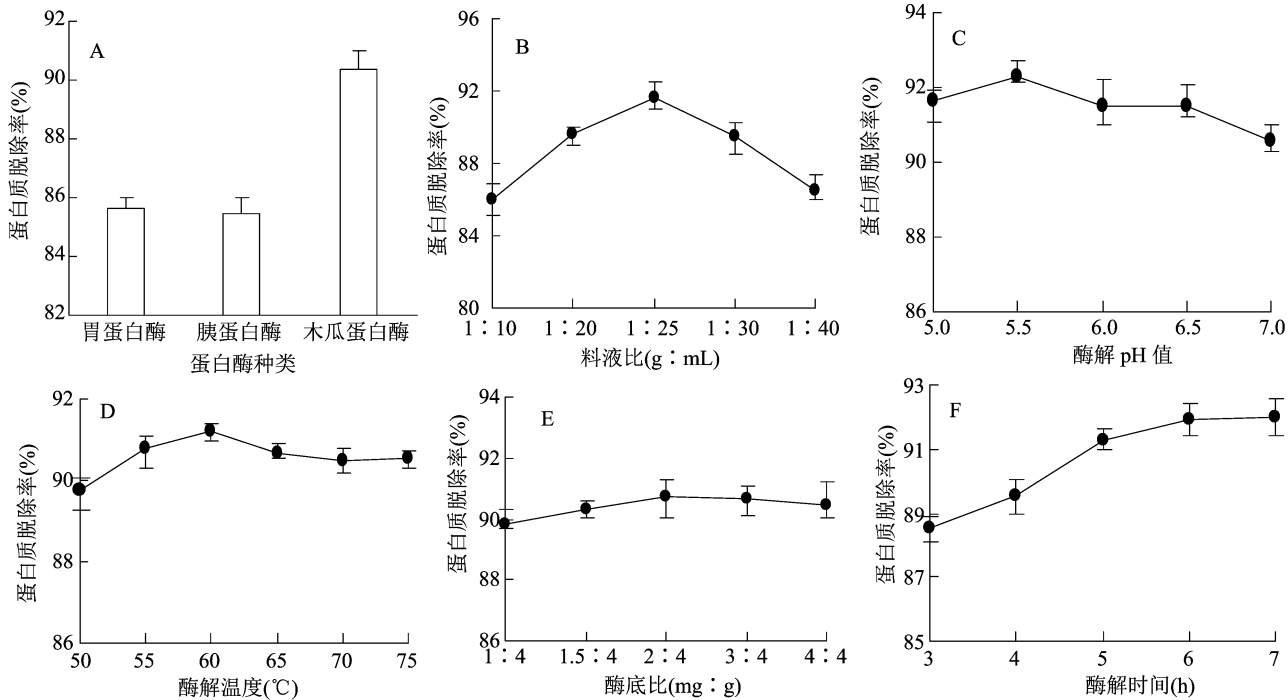


图2 蛋白酶种类、料液比、酶解 pH 值、酶解温度、酶底比和酶解时间对蛋白质去除的影响

2.3.2 蛋白质脱除工艺优化正交试验 根据单因素试验结果,选择木瓜蛋白酶和酶底比为 2 mg : 4 g 为固定条件,以酶解温度(C)、酶解时间(D)、料液比(E)、酶解 pH 值(F)为试验因子设计 L₉(3⁴)正交试验,所得结果见表 4。9 组试验结果中 6 号试验蛋白质脱除率最高,高达 95.90%,相应的水平组合为 C₂D₃E₂F₁。根据数据的极差 R 值分析结果,主次因素依次为 E(料液比) > C(酶解温度) > F(酶解 pH) > D(酶解时间)。结合 k 值进行分析可知,C₂D₁E₂F₁ 的组合较优异,该组合条件为:酶解温度 60 ℃、酶解时间 5 h、料液比 1 g : 25 mL、酶解 pH 值 5.0。在此条件下,蛋白脱除率为 95.98%。因此 C₂D₁E₂F₁ 为最优组合。方差分析结果(表 5)表明,各因素在正交试验所选水平下对乌鲈肉的蛋白脱除率都有影响,酶解温度、酶解时间、料液比和 pH 值对其影响显著(P < 0.05)。

2.4 酸法纯化工艺优化结果

2.4.1 杂质脱除工艺优化单因素试验 酸化时间(G)、酸化温度(H)、盐酸浓度(I)和料液比(J)对乌

酶解时间因素对乌鲈肌肉蛋白脱除效果的影响如图 2 所示,木瓜蛋白酶在料液比为 1 g : 25 mL、pH 值为 5.5、温度为 60 ℃、酶底比为 2 mg : 4 g、酶解时间为 6 h 条件下可较大幅度去除蛋白质。

表 4 蛋白质脱除工艺优化 L₉(3⁴) 正交试验方案及结果

试验号	C (℃)	D (h)	E (g : mL)	F	蛋白质 脱除率(%)
1	1(55)	1(5)	1(1 : 20)	1(5.0)	94.48
2	1	2(6)	2(1 : 25)	3(6.0)	94.09
3	1	3(7)	3(1 : 30)	2(5.5)	92.44
4	2(60)	1	1	3	94.00
5	2	2	3	2	94.76
6	2	3	2	1	95.90
7	3(65)	1	2	2	95.59
8	3	2	3	1	94.28
9	3	3	1	3	93.06
k ₁	93.67	94.69	93.85	94.89	
k ₂	94.89	94.38	95.19	94.26	
k ₃	94.31	93.80	93.83	93.72	
R	1.22	0.89	1.36	1.17	

鲈黑色素粗品杂质脱除率的影响如图 3 所示,9 mol/L HCl 溶液、温度 100 ℃、料液比 1 g : 20 mL 条件下磁力搅拌 24 h,乌鲈黑色素的杂质脱除率最大。但盐酸浓度为 9 mol/L 及以上时,易爆塞、溶液

表 5 蛋白质脱除工艺优化正交试验结果方差分析

方差来源	偏差平方和	自由度	均方	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
<i>C</i>	6.67	2	3.33	33.14	0.000 1
<i>D</i>	3.72	2	1.86	18.49	0.000 1
<i>E</i>	2.99	2	1.50	14.86	0.000 2
<i>F</i>	14.52	2	7.26	72.18	0.000 1

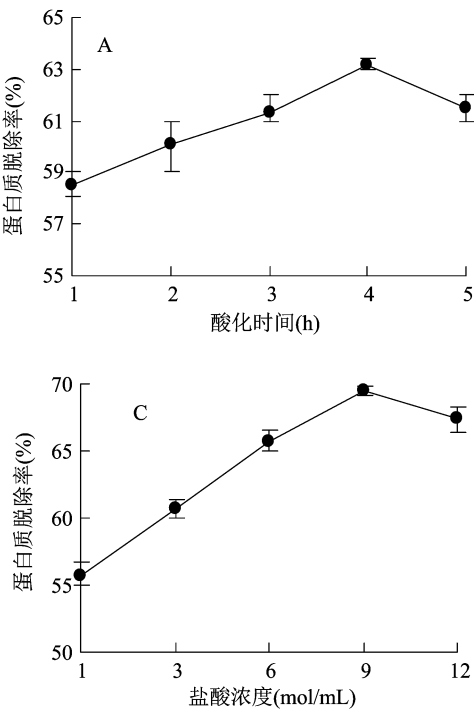


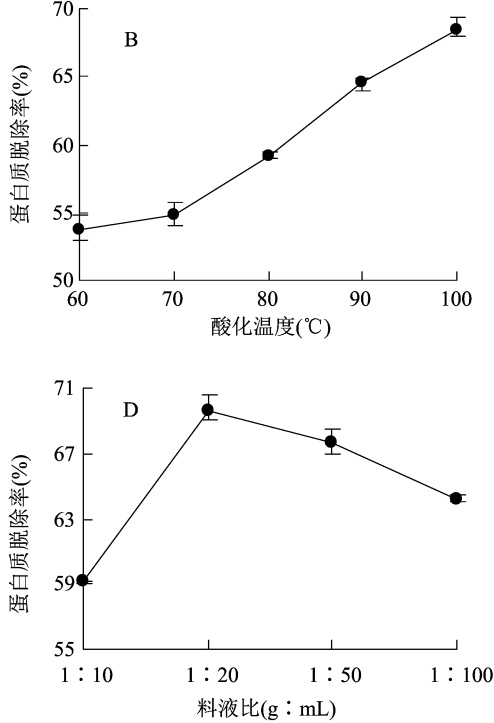
图3 酸化时间、酸化温度、盐酸浓度和料液比对乌鳖黑色素杂质脱除率的影响

表 6 杂质脱除工艺优化的 $L_9(3^4)$ 正交试验方案及结果

试验号	<i>G</i> (mol/L)	<i>H</i> (g : mL)	<i>I</i> (h)	<i>J</i> (℃)	蛋白质 脱除率(%)
1	2(6)	3(1 : 25)	1(3)	2(90)	59.13
2	2	1(1 : 15)	2(4)	3(100)	71.52
3	1(5)	3	3(5)	3	65.53
4	3(7)	2(1 : 20)	1	3	62.52
5	3	1	3	2	68.27
6	3	3	2	1(80)	64.03
7	1	2	2	2	60.18
8	2	2	3	1	58.26
9	1	1	1	1	68.12
k_1	64.61	69.30	63.26	63.47	
k_2	62.97	60.32	65.24	62.53	
k_3	64.94	62.90	64.02	66.52	
<i>R</i>	1.97	8.98	1.99	4.00	

数据极差 *R* 值分析可知,影响脱除率的的主次因素依次为 *H*(料液比) > *J*(酸化温度) > *I*(酸化时间) >

溅出,危险性大,因此选择 6 mol/L。
2.4.2 杂质脱除工艺优化正交试验 杂质脱除工艺优化的正交试验结果如表 6 所示,方差分析见表 7,9 组中以 2 号蛋白质脱除率最高(71.52%),相应的组合为 $G_2H_1I_2J_3$,即盐酸浓度为 6 mol/L、料液比为 1 g : 15 mL、时间为 4 h、温度为 100 ℃。通过对



G(HCl 浓度)。结合 *k* 值分析结果可知, $G_3H_1I_2J_3$ 的组合更佳,经验证,该组合的蛋白质脱除率为 71.84%,与 $G_2H_1I_2J_3$ 的脱除率差异较小,同时考虑到盐酸浓度越高,其腐蚀性越强,操作时对人的危险系数大,因此最佳组合选择 $G_2H_1I_2J_3$ 。根据方差分析结果(表 7)可知,在正交试验所选水平下,各因素对黑色素粗品杂质脱除率都有显著影响($P < 0.05$)。

表 7 杂质脱除工艺优化的正交试验结果方差分析

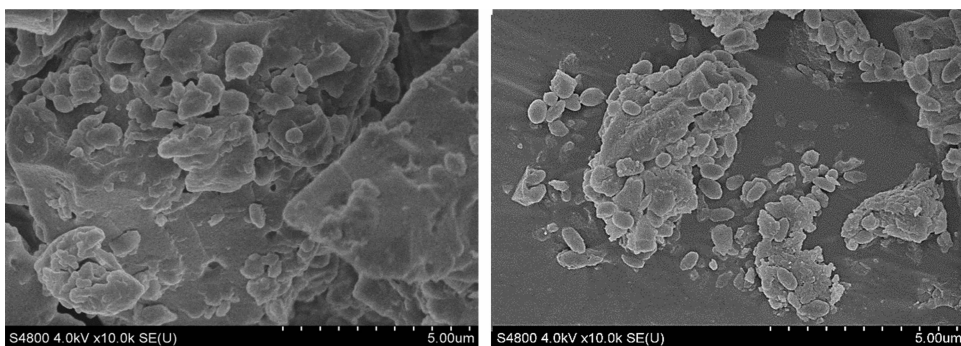
方差来源	偏差平方和	自由度	均方	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
<i>G</i>	19.734	2	9.867	137.569	0.000
<i>H</i>	383.106	2	191.553	2 670.621	0.000
<i>I</i>	18.142	2	9.071	126.471	0.000
<i>J</i>	79.220	2	39.610	552.240	0.000

2.5 乌鳖黑色素结构表征的分析结果

2.5.1 乌鳖黑色素的形态分析 通过扫描电镜观察乌鳖黑色素的超显微结构(图 4),发现乌鳖酶解

粗黑色素和纯化黑色素在形态上存在差异,粗黑色素为块状,颗粒状不明显,与纯化黑色素相比具有

更多黏连性。纯化黑色素为均匀的椭圆形颗粒,颗粒表面光滑清晰。



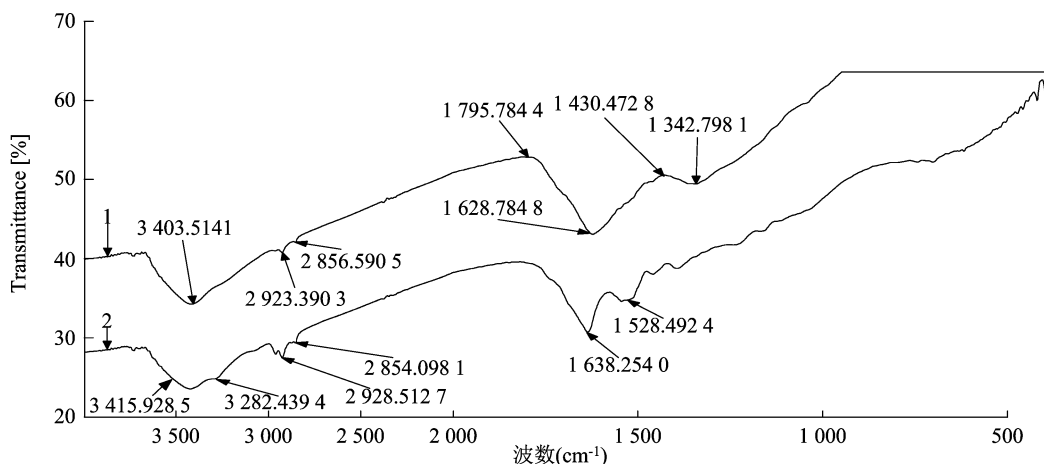
A. 粗品

B. 纯化品

图4 乌鳖黑色素酶解粗品和纯化品的扫描电镜图谱

2.5.2 乌鳖黑色素的傅里叶红外扫描分析 图5是黑色素的红外光谱图,从2种黑色素共同的吸收峰来看,在 $3\,400\text{ cm}^{-1}$ 处较强的吸收峰是由O—H和吡啶的N—H伸缩振动产生的,是黑色素的一个特征吸收峰; $2\,930\sim 2\,850\text{ cm}^{-1}$ 处附近存在相对较弱的吸收峰,推测为烷烃结构的C—H吸收区;在 $1\,600\text{ cm}^{-1}$ 处附近由因芳香环骨架振动引起的较

强的吸收峰,说明结构中吡啶环占比较大,属于黑色素典型的苯醌类结构;乌鳖黑色素在 $1\,528\text{ cm}^{-1}$ 附近的吸收峰和标准品在 $1\,380\text{ cm}^{-1}$ 附近的吸收峰由因吸收COO—的变形振动或C—C变形振动归属于苯并噻嗪环,说明乌鳖黑色素具有非常典型的吡啶结构。



1—黑色素标准品; 2—乌鳖黑色素

图5 黑色素傅里叶红外扫描图谱

3 讨论与结论

黑色素(melanin)是由吡啶或多酚类氧化聚合而成的含氮高聚物,一般呈现黑色、棕色或褐色,普遍存在于许多植物、动物以及微生物体内^[18]。传统提取动物黑色素所使用的原料主要来自乌骨鸡^[19-23]、乌骨羊^[24]等陆源性动物的皮肤、骨等组织。但由于禽流感等流行性疾病问题,陆源性黑色素的开发和利用受到很大限制。寻找新来源的黑色素是当前急须要解决的重要课题。乌鳖为浙江省特有地方品种,典型特征是腹部乌黑,富含黑色

素。但至今为止,有关乌鳖黑色素提取的研究尚未见报道。

目前,水生动物黑色素提取主要集中在泥鳅^[25]、大鲵^[26]、海参^[27]、牡蛎^[28]等动物中。张莲姬等通过盐酸水解法提取泥鳅鱼皮黑色素,提取率为2.23%^[25];杨慧等利用碱法提取大鲵皮肤黑色素,提取率达0.65%^[26];王建波等以酶水解结合碱液法提取海参黑色素,提取率最高为2.80%^[27]。从以上提取率上可以看出蛋白质脱除不彻底,杂质含量较高。为了获得纯净的动物黑色素,必须尽可能地将黑色素周围的蛋白质、脂肪等杂质去除。目

前,提取动物黑色素的方法主要包括蛋白酶提取法、盐酸提取法及酶水解结合碱液提取法等,但这些方法都存在不足,提取获得的黑色素纯度仍然不够高,不能满足研究黑色素化学结构的要求。黄宇玫等在这些方法基础上提出了“脱脂—酶解—酸解”三步法精制乌骨鸡黑色素,减少了多余蛋白质对乌骨鸡黑色素结构分析的影响^[23]。

本试验在黄宇玫等“脱脂—酶解—酸解”三步法的基础上进行优化,提取纯化乌鳖肌肉中黑色素。在最佳脱脂工艺(乙醇回流 8 次、料液比 1 g : 60 mL)、酶解工艺(木瓜蛋白酶的酶底比为 1 mg : 2 g)、酶解温度 60 ℃、酶解时间 5 h、料液比 1 g : 25 mL、酶解 pH 值 5.0)、酸解工艺(盐酸浓度 6 mol/L、料液比 3 g : 50 mL、酸解时间 4 h、酸解温度 90 ℃)的条件下获得的乌鳖杂质脱除率高达 98.91%。此外,扫描电镜下观察到的纯化黑色素为规则的椭圆形颗粒,边缘清晰平滑,表明获得的乌鳖黑色素周围无明显蛋白质附着;乌鳖黑色素和标准品黑色素傅里叶红外扫描图谱显示均具有非常典型的吡咯结构,结构完整。这些结果表明,本试验提取的乌鳖黑色素纯度高、结构完整,可为乌鳖黑色素的结构分析等进一步深入研究提供纯净的原材料。

参考文献:

- [1] 张海琪,王根连,何中央,等. 清溪乌鳖若干生物学性状与生长研究[J]. 浙江农业科学,2014,1(1):111-113.
- [2] 许晓军,张海琪,何中央. 中华鳖日本品系和清溪乌鳖线粒体 12S rRNA 基因部分序列分析[J]. 经济动物学报,2012,16(3):163-167.
- [3] Bessou - Touya S, Picardo M, Maresca V, et al. Chimeric human epidermal reconstructs to study the role of melanocytes and keratinocytes in pigmentation and photoprotection[J]. The Journal of Investigative Dermatology,1998,111(6):1103-1108.
- [4] Corsaro C, Scalia M, Blanco A R, et al. Melanins in physiological conditions protect against lipoperoxidation; a study on albino and pigmented *Xenopus*[J]. Pigment Cell Research,1995,8(5):279-282.
- [5] Mauro E D, Xu R, Soliveri G, et al. Natural melanin pigments and their interfaces with metal ions and oxides; emerging concepts and technologies[J]. MRS Communications,2017,7(2):141-151.
- [6] Lin T K, Man M Q, Abuabara K, et al. By protecting against cutaneous inflammation, epidermal pigmentation provided an additional advantage for ancestral humans[J]. Evolutionary Applications,2019,12(10):1960-1970.
- [7] Yao - Ching H, Vasyi M S, Svetlana Y M, et al. Antioxidant activity of melanins derived from tea; comparison between different oxidative states[J]. Food Chemistry,2002,78(2):233-240.
- [8] Rageh M M, El - Gebaly R H. Melanin nanoparticles; antioxidant activities and effects on γ - ray - induced DNA damage in the mouse [J]. Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis,2018,828(2):15-22.
- [9] El - Naggat N A, El - Ewasy S M. Bioproduction, characterization, anticancer and antioxidant activities of extracellular melanin pigment produced by newly isolated microbial cell factories *Streptomyces glaucescens* NEAE - H[J]. Scientific Reports,2017,7(2):1-19.
- [10] 张吉祥,赵文静,白晓杰,等. 正交试验法优化黑米黑色素的超声辅助提取工艺[J]. 食品科学,2010,31(4):39-41.
- [11] 李红姣,李巨秀,赵 忠. 响应面试验优化超声波辅助提取山杏种皮黑色素工艺及其抗氧化活性[J]. 食品科学,2016,37(18):26-33.
- [12] 张艳荣,王庆庆,刘 通,等. 木耳黑色素碱法提取工艺优化及表征[J]. 食品科学,2016,37(12):27-32.
- [13] 张小林,陈博文,孙晓瑞,等. 响应面法优化超声波辅助灵芝黑色素提取工艺[J]. 核农学报,2018,32(3):532-538.
- [14] 薛辉利,何中央,张海琪,等. 清溪乌鳖养殖性能的初步研究[J]. 中国水产,2009(6):42-43.
- [15] 张海琪,何中央,徐晓林,等. 中华乌鳖的营养成分研究[J]. 中国水产,2008,7(6):76.
- [16] 杨 弘,夏德全,吴婷婷,等. 中华鳖同工酶研究[J]. 中国水产科学,1997,4(4):55-59.
- [17] 张海琪,何中央,邵建忠. 中华鳖培育新品种群体遗传多样性的比较研究[J]. 经济动物学报,2011,15(1):39-46.
- [18] Liu Y, Simon J D. Isolation and biophysical studies of natural eumelanins; applications of imaging technologies and ultrafast spectroscopy[J]. Pigment Cell Research,2003,16(6):606-618.
- [19] 蔡华珍,张 丽. 蛋白酶法提取乌骨鸡黑色素的研究[J]. 肉类工业,2005,8(12):24-26.
- [20] 刘永忠,何满莲,吴 莉. 酸提法提取乌骨鸡黑色素的研究[J]. 安徽农业科学,2009,37(31):15256,15258.
- [21] Tu Y G, Xie M Y, Sun Y Z, et al. Structural characterization of melanin from black - bone silky fowl (*Gallus gallus domesticus* Brisson)[J]. Pigment Cell & Melanoma Research,2009,22(1):134-136.
- [22] 张恒业,李 欣,岳晓禹. 乌骨鸡黑色素的分步酶解法制备及其性能研究[J]. 食品科学,2011,32(24):55-59.
- [23] 黄宇玫,田颖刚,朱 胜. 乌骨鸡黑色素三步法提取及结构性状研究[J]. 食品工业科技,2014,35(1):249-253.
- [24] 王高富,蒋 婧,付 琳,等. 酉州乌羊皮肤黑色素含量和结构分析[J]. 黑龙江畜牧兽医(下半月),2019,5(10):35-38.
- [25] 张莲姬,崔泰花. 泥鳅鱼皮黑色素提取工艺的研究[J]. 江苏农业科学,2009,3(5):263-265.
- [26] 杨 慧,陈德经,夏冬辉,等. 大鲵皮肤色素提取工艺及抗氧化研究[J]. 天然产物研究与开发,2019,31(5):887-894.
- [27] 王建波,刘恒旭,李鑫佳,等. 海参黑色素的提取及其结构性状研究[J]. 食品科技,2019,44(4):255-260.
- [28] 于文超,何 成,武长路,等. 长牡蛎(*Crassostrea gigas*)贝壳与外套膜中黑色素的提取和鉴定[J]. 海洋与湖沼,2015,46(4):909-914.