

# 酶法与酸法提取的乌鸡黑色素的性能比较\*

蔡华珍, 胥孝俊

(安徽科技学院工学院, 安徽 凤阳, 233100)

**摘要** 比较了酶法和酸法提取的乌鸡黑色素的部分性能。结果表明:(1)采用酶法提取的乌鸡黑色素颗粒表面光滑,而酸法表面较粗糙;颗粒尺寸上,酸法提取的略大于酶法。(2)在抗紫外线方面,酶法优于酸法。(3)黑色素浓度小于 0.3 mg/mL 时,酶法清除自由基的效果优于酸法,但在 0.3 mg/mL 以上时,则 2 者相当。酶法与酸法黑色素均有抑制黄油氧化功能,时间越长,抑制作用越明显,酶法黑色素的抗氧化性略高于酸法,但差异不显著。(4)酶法提取的乌鸡黑色素热稳定性优于酸法,但光稳定性方面,酶法不及酸法。

**关键词** 酶法提取,酸法提取,乌鸡黑色素,性能

研究发现,乌鸡中的黑色素具有清除自由基、氧化的功能<sup>[1,2]</sup>。目前对于乌鸡黑色素的提取方法报道多为酸法,酶法研究的较少<sup>[3]</sup>。在酶法与酸法提取的乌鸡黑色素的功能性质比较方面,尚未见报道。实验以江西泰和乌鸡为研究对象,研究了 2 种方法提取的乌鸡黑色素的性能差异。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

乌鸡:江西省泰和县生物谷食品科技工业园;木瓜蛋白酶( $\geq 6\ 000\ \text{U/mg}$ ):国药集团化学试剂有限公司;风味酶(20 000 U/mg):南宁庞博生物工程有限公司;黄油:金力国际贸易公司;唾液链球菌嗜热亚种(1.1855)(*Bulgaricus streptococcus salivarius* subsp,简称 St),购于中国科学院微生物研究所。

### 1.2 主要试剂

DPPH·(购于 Sigma 公司);石油醚;酚酞;无水乙醇;无水乙醚;KOH;KI;三氯甲烷;冰乙酸;硫代硫酸钠;可溶性淀粉等,均为分析纯。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 乌鸡黑色素的提取工艺<sup>[3,4]</sup>

**酸法:**全净膛乌鸡→剔骨取肉→绞碎→浓 HCl 浸泡(12 mol/L HCl,肉酸比 1:2,40℃,12 h)→过滤→离心(10 000 r/min,5 min)→收集沉淀物→蒸馏水洗至中性→丙酮洗→石油醚(30~60℃沸程)、蒸馏水洗至 pH 中性→沉淀物冷冻干燥→黑色素。

**酶法:**全净膛乌鸡→剔骨取肉→绞碎→加热(肉水比 1:1,100℃,15 min)→木瓜蛋白酶酶解

(3.8%,pH5.5,65℃,2 h)→风味酶酶解(0.6%,pH6.0,55℃,6 h)→灭酶→过滤→离心(10 000 r/min,5 min)→收集沉淀物→乙醚、蒸馏水反复洗涤至 pH 中性→沉淀物冷冻干燥冻干→黑色素。

#### 1.3.2 乌鸡黑色素的定性分析<sup>[4]</sup>

取干燥黑色素粉末 10 mg,直接用 JES-FA200 型电子自旋共振波谱仪(日本电子公司)测定。

测定条件:微波功率 0.998 mW,微波频率 9.06 GHz,中心磁场 323.3 mT,扫描宽度 $\pm 2.5\ \text{mT}$ ,扫描时间 1.0 min,调制频率 100 kHz,调制幅度 0.3 mT。

#### 1.3.3 乌鸡黑色素的颗粒形态比较

将 2 种乌鸡黑色素粉末分别粘在碳胶带上,喷金处理,用 Sirion200 场发射扫描电子显微镜(FEI 公司)扫描照射并拍片,加速电压 5.0 kV。分辨率:3.5 nm(500 V);2.5 nm(1 kV);1.5 nm(>10 kV)。

#### 1.3.4 抗紫外线性质比较<sup>[5]</sup>

以脱脂乳为培养基活化菌种,取充分活化的菌液于已灭菌的三角瓶中,添加无菌生理盐水 V(菌液):V(无菌生理盐水)=1:9,震荡 30 min,打碎菌块,制得菌悬液,备用。

取 10 mL 菌悬液与 1 mL(2mg/mL)的黑色素水悬液于平皿( $\Phi 90\ \text{mm}$ )中充分混合,分为酸法和酶法黑色素 2 组,以 10 mL St 菌悬液+1 mL 无菌水为对照组,置于 20 W 紫外灯下方 30 cm 处照射,其间经常振摇平皿。在照射 0、2、4、6、8、10 min 后,各取出 1 mL 以 10 倍稀释法稀释,取不同稀释度的菌液 0.1 mL 进行平板涂布,然后置于 42.5℃恒温培养箱中培养 12~24 h 后菌落计数。同法,每组于照射前进行平板培养计数,比较照射前后菌落数差别,用活菌率表示。实验至少重复 3 次。

$$\text{活菌率}/\% = \frac{\text{照射后的平均菌落数}}{\text{照射 0 min 时的平均菌落数}} \times 100$$

第一作者:硕士,教授。

\* 安徽科技学院学科建设基金项目(No. YZD2004-13)

收稿日期:2006-11-09,改回日期 2007-01-29

### 1.3.5 抗自由基能力

DPPH·法<sup>[8]</sup>。将酶法与酸法提取的乌鸡黑色素分别配成黑色素— $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 溶液,黑色素浓度:0.05、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50 mg/mL。按文献[3]方法进行抗自由基能力实验。

### 1.3.6 抗氧化性能比较<sup>[6]</sup>

将酶法与酸法黑色素分别加入融化的黄油中,置于70℃烘箱中进行加速氧化试验,按GB/T5009.37—2003方法测定其过氧化值变化。

### 1.3.7 光、热处理

#### 1.3.7.1 光照处理

将酶法与酸法提取的乌鸡黑色素分别配制成浓度为0.2 mg/mL的黑色素— $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 溶液,置于光照培养箱中光照,光照度强为2 700 Lx,每12 h于560 nm下测定1次吸光值。

#### 1.3.7.2 加热处理

将0.2 mg/mL的2种黑色素— $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 溶液分别经25、50、75、100℃加热处理4 h,于560 nm下测定吸光值。

### 1.4 数据处理

数据以平均值表示。采用SAS9.0进行方差显著性分析,用Duncan新复极差法进行多重比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 酶法与酸法黑色素的鉴定

经EPR波谱仪测定,酶法与酸法提取的黑色素的波形均为稍不对称的典型单线一次微商波谱,如图1所示。

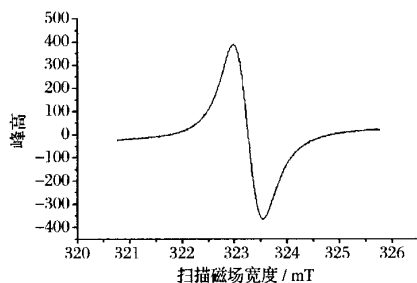


图1 乌鸡黑色素的EPR波谱图

无超精细结构, $G$ 值为2.003,线宽 $\Delta H_{pp}5.3 \sim 5.7$ ,与文献报道<sup>[4]</sup>的基本一致,表明了黑色素的信号特征,证明酶法与酸法提取物均为黑色素。

### 2.2 电镜结果比较

从图2和图3的电镜图片可以看出,乌鸡中的黑色素颗粒呈椭圆形或圆形。酶法提取的乌鸡黑色素

颗粒表面清晰光滑,酸法提取的乌鸡黑色素颗粒表面粗糙。在颗粒尺寸上(平均约为),酸法:长691.9 nm,宽389.2 nm;酶法:长662.9 nm,宽389.7 nm。由此可见,酶法黑色素颗粒略小于酸法,酸提取法对黑色素颗粒表面造成了一定的损伤。

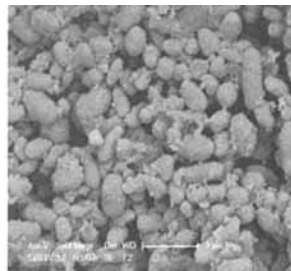


图2 酸法提取的乌鸡黑色素

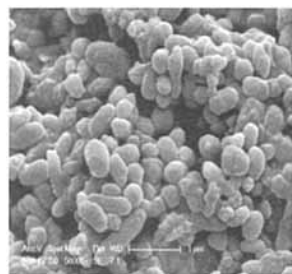


图3 酶法提取的乌鸡黑色素

阎克路等<sup>[7]</sup>在研究用蛋白酶和盐酸分离牦牛绒中的黑色素时也发现了类似的情况,分析认为,可能是酸与黑色素主要结构——吡啶环上的NH—基发生反应,使黑色素结构变得相对松弛,颗粒尺寸较大。此外,酸的水解催化作用,导致黑色素发生了一定程度的水解,使黑色素颗粒表面变粗糙;而蛋白酶分子质量大,很难渗入黑色素颗粒内部,而且由于酶的专一性,不会作用于黑色素,因此在分离过程中对黑色素造成损伤的可能性小。因而,酶法提取的黑色素颗粒较酸法的光滑且尺寸略小。

### 2.3 抗紫外线效果比较

由表1可以看出,经2 min紫外灯照射后,酶法的活菌率明显高于酸法,分别为85.9%和69.8%。随着照射时间的延长,各组活菌率均有明显的下降。但酶法与酸法活菌率之间在照射2~6 min时,酶法极显著高于酸法( $P < 0.01$ ),但8 min以后,酶法与酸法几乎没有区别。2组活菌率均极显著高于对照( $P < 0.01$ )。说明乌鸡黑色素有较强的抗紫外线功能,在抗紫外线效果上酶法要优于酸法。

表 1 酶法与酸法提取的黑色素对紫外线照射 St 活菌率(%)的影响

时间/min	0	2	4	6	8	10
酶 法	100	85.9 <sup>A</sup>	11.3 <sup>A</sup>	5.1 <sup>A</sup>	0.38 <sup>A</sup>	0.25 <sup>A</sup>
酸 法	100	69.8 <sup>B</sup>	6.8 <sup>B</sup>	3.3 <sup>B</sup>	0.35 <sup>A</sup>	0.24 <sup>A</sup>
对 照	100	1.3 <sup>C</sup>	0.1 <sup>C</sup>	0.06 <sup>C</sup>	0 <sup>B</sup>	0 <sup>B</sup>

注:同列数据后的大写字母表示  $P<0.01$ 。

2.4 抗自由基能力的比较

表 2 酸法与酶法黑色素抑制 DPPH· 的效果

浓度/mg·mL <sup>-1</sup>	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
抑制率/%						
酸	6.7	34	52.4	67.2	80.2	93.3
酶	7.2	46.2*	58.4	67.6	81.3	93.4

\* 表示酶法与酸法相比差异显著( $P<0.05$ )。

由表 2 得知,酸法与酶法提取的乌鸡黑色素均有较强的清除 DPPH· 的能力。当黑色素浓度在 0.05~0.2 mg/mL,酶法抑制率明显高于酸法;浓度在 0.1 mg/mL 时,2 者差异显著( $P<0.05$ ),浓度高于 0.3 mg/mL 后,2 者相当。这种现象是否意味着在较高浓度时,浓度成了主要影响因素,消除了酸损伤的不利影响则有待进一步研究。

2.5 酶法与酸法乌鸡黑色素在油脂抗氧化效果方面的比较

表 3 酶法与酸法黑色素的黄油过氧化值(g/g,  $\times 10^{-3}$ )

添加量/mg·g <sup>-1</sup>	时间/h	0	2	4	6	8
0			1.708	1.815	1.885	2.100
0.1	酶		1.681	1.789	1.876	2.067
	酸		1.693	1.812	1.879	2.072
0.2	酶		1.634	1.763	1.872	2.047
	酸	1.532	1.650	1.783	1.873	2.060
0.3	酶		1.589	1.722	1.864	1.914
	酸		1.613	1.736	1.867	1.978
0.4	酶		1.567	1.714	1.822	1.894
	酸		1.572	1.720	1.861	1.903

由表 3 知,各浓度组中,酶法黑色素组过氧化值均略低于酸法黑色素组,但差异不显著。加黑色素的各组过氧化值均低于对照,且随着添加量增加,对过氧化过程的抑制效果也随之提高,可见,酶法与酸法黑色素均有较强的抗氧化功能,时间越长,体现越明显;酶法黑色素的抗氧化性略高于酸法。

2.6 光照和温度处理对酶法与酸法乌鸡黑色素的影响

由图 4 可知,经光照处理后,酸法黑色素液吸光值下降速率低于酶法黑色素的下降速率。光照 48h 后酸法黑色素吸光值从最初的 0.908 降到 0.751,降低了 0.157;而同期酶法黑色素液吸光值则减少了

0.432。这说明酸法提取的乌鸡黑色素光稳定性优于酶法黑色素。

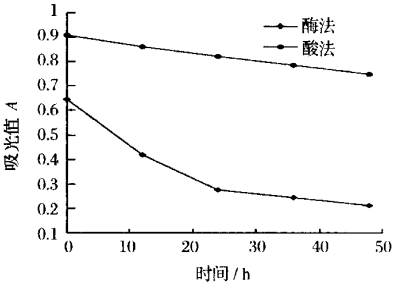


图 4 光照影响的比较

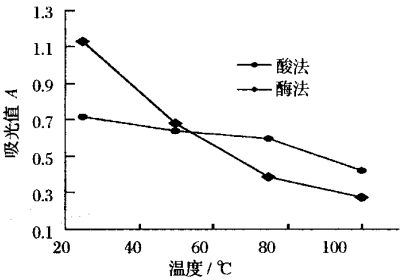


图 5 不同温度处理的影响

但热稳定性方面,酸法不及酶法。由图 5 可见,随着温度的升高,2 组吸光值均下降,但酸法乌鸡黑色素吸光值的下降速率约是酶法的 3 倍。

3 结 论

(1)酶法乌鸡黑色素颗粒表面清晰光滑,而酸法黑色素颗粒表面较粗糙、有损伤。颗粒尺寸上,酸法黑色素颗粒略大于酶法颗粒。

(2)乌鸡黑色素有很强的抗紫外线功能。在抗紫外线效果上酶法优于酸法。辐照 2 min 后,未加黑色素的活菌率只有 1.3%,加酸的活菌率是 69.8%,而加酶的活菌率达 85.7%。但酶法活菌率在照射 8 min 前均大大高于酸法,8 min 以后,酶法与酸法几乎没有区别。

(3)在抗 DPPH· 自由基方面,黑色素浓度小于 0.3 mg/mL 时,酶法的抑制率优于酸法,浓度继续升高,则 2 者抑制率相当。酶法与酸法黑色素均有抑制黄油氧化功能,时间越长,抑制作用越明显;酶法黑色素的抗氧化性略高于酸法,但差异不显著。

(4)酸法提取的乌鸡黑色素光稳定性优于酶法,但热稳定性方面,酸法不及酶法的乌鸡黑色素稳定。

## 参 考 文 献

- 1 王晓通,查天发,王晓娜,等. 浅析乌鸡的药用及保健价值[J]. 上海畜牧兽医通讯,2004,26(9):61~62
- 2 李 华,邱祥聘,龙继蓉. 乌骨鸡黑色素的的研究进展[J]. 畜牧与兽医,2002,34(8):33~35
- 3 蔡华珍,陈守江,张 丽,等. 乌骨鸡中黑色素的提取及其抗氧化性研究[J]. 食品与发酵工业,2006,32(1):99~102
- 4 徐幸莲,庄 苏,陈伯祥. 乌骨鸡黑色素对延缓果蝇衰老的作用[J]. 南京农业大学学报,1999,22(2):105~108
- 5 宁 华. 黑色素对苏云金芽孢杆菌抗紫外线的作用研究[J]. 湖北教育学院学报,2000,17(5):90~92
- 6 中华人民共和国国家标准. 食用油卫生标准分析方法. GB/T5009.37-2003
- 7 阎克路. 蛋白酶和盐酸分离牦牛绒中黑色素的研究[J]. 纺织学报,2001,22(6):348~350

## Quality Comparison of Silky Fowl Melanin which Extracted in Proteinase Hydrolysis and Muriatic Acid Hydrolysis

Cai Huazhen, Xu Xiaojun

(Engineering College, Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, China)

**ABSTRACT** Part qualities of silky fowl melanin extracted by the method of proteinase hydrolysis were compared with that of the melanin which extracted by the method of muriatic acid hydrolysis. The results were as follows: (1) In comparison with the melanin particles which extracted by the proteinase hydrolysis, melanin particles which extracted by muriatic acid hydrolysis were rougher and bigger. (2) UV-resistant effect of the melanin extracting with the proteinase hydrolyzation exceeded that of the melanin extracting by the acid. (3) There was the same tendency on scavenging radical's effect as the UV-resistant effect; but when content of the melanin was above 0.3mg/mL, scavenging radical's effect of both were equal. Both the melanin extracting by the proteinase and the melanin extracting with the acid could protected butter from oxidation, and the oxidation was more obvious as time prolonged. Antioxidation of melanin extracting using the proteinase was slightly higher than that of the melanin extracting using the acid, but the difference was not striking. (4) Heat stability of the melanin extracting using the proteinase was better than that of the melanin extracting using the acid, while light stability was opposite.

**Key words** extracting using proteinase hydrolysis, extracting using muriatic acid hydrolysis, silky fowl melanin, quality

信  
息  
窗V<sub>D2</sub> 合成新工艺

麦角固醇光化学开环反应是制备 V<sub>D2</sub> 的关键步骤。传统的光化学反应生产工艺,需利用多个低功率汞灯进行长时间连续光照,在这样的光化学反应条件下会有大量副产物生成,限制了 V<sub>D2</sub> 的收率,并给产品的提纯带来极大难度,影响产品质量。另外,现有工艺中 V<sub>D2</sub> 的分离纯化技术(液相色谱或多步结晶),不仅工艺繁琐,增加生产成本,还严重影响生产规模,生产过程中所用的某些试剂也不利于环境保护。中国科学院理化技术研究所基于几十年来在光化学领域的研究积累,在成功研发出 V<sub>D3</sub> 生产新工艺的基础上(V<sub>D3</sub> 项目已成功实现成果转化,并产生了显著的经济效益)。新工艺路线以麦角固醇为起始原料,分离鉴定了所有光化学反应的主要产物,仔细进行了光化学反应动力学分析,确定了最佳反应条件,采用经济便捷的方法去除主要副产物,无需采用前面所提的液相色谱进行分离纯化,直接制备结晶,从而大大简化了生产工艺,提高了产能。该生产工艺具有产率高、生产周期短、环境友好、生产安全等特点。这些因素有效降低了 V<sub>D2</sub> 的生产成本,收率可以达到国际先进水平(30%~35%)。

产品性能: V<sub>D2</sub> 有促进小肠对钙的吸收及肾小管重吸收磷,维持及调节血浆钙、磷正常浓度,促进骨钙化及骨骼发育等作用。临床可用于防治软骨病、佝偻病等,大剂量可用于结核性皮肤病及牛皮癣。另外 V<sub>D2</sub> 在一定程度上还可以起到调节免疫力的作用。V<sub>D2</sub> 的另一个大的应用市场是饲料添加剂,在国外这方面的需求量超过了人用。