

文章编号: 1000-5013(2009)03-0292-05

链霉菌 G-HD-4 产黑色素的提取及理化性质

郑晨娜, 方柏山, 罗菊香, 靳鸿蔚

(华侨大学 工业生物技术福建省高等学校重点实验室, 福建 泉州 362021)

摘要: 对链霉菌 G-HD-4 发酵液采用酸沉淀、碱性溶液提取、酸水解, 以及多种有机溶剂抽提等工艺手段分离、纯化出黑色素, 研究其理化性质。结果表明, 该黑色素的最大吸收峰为 246 nm, 与标准黑色素最大吸收峰相一致。在 400 nm 波长下, 其光密度值(D)随黑色素质量浓度的增加而增大; 容易被强氧化剂所氧化, 而紫外、光照、温度、有机溶剂、还原剂、各种盐, 以及金属离子对黑色素的影响较小, 氨基酸、淀粉等添加物对黑色素稳定性没有影响, 说明该黑色素稳定性良好。

关键词: 链霉菌 G-HD-4; 黑色素; 提取; 纯化; 理化性质

中图分类号: Q 939.3

文献标识码: A

许多合成黑色素对人体有一定的危害性, 有的甚至会致癌, 而天然黑色素因其食用安全性越来越受到人们的青睐^[1]。从动物或植物体内提取的黑色素, 虽然对人体没有危害性, 但是因生产过程繁琐, 生产成本高等缺点无法大规模生产。微生物所产黑色素一般是由体内的酪氨酸酶催化酪氨酸形成 L -多巴, 再经一系列氧化过程而形成, 属于氨基酸的衍生物, 具有无毒、无害、产品稳定性好的特点。而且, 产黑色素的微生物资源丰富, 生产工艺简单, 便于操作, 因此, 研究微生物发酵产生黑色素具有很大的优势^[2-4]。黑色素不仅可以作为天然的食用黑色素添加剂, 而且在化妆品、防紫外辐射、清除自由基及生物杀虫剂的光保护等方面的应用比较广泛^[5]。链霉菌是一种很重要的次生代谢物产生菌种, 有可能通过基因工程方法, 使同一菌种既能产生黑色素, 又能产生某种抗生素, 成倍地提高经济效益^[6]。据文[7-8]报道, 产黑色素的微生物多为细菌, 而放线菌产黑色素较少。对放线菌所产黑色素的稳定性研究报道较少。本文就链霉菌 G-HD-4 发酵培养、黑色素的提取及其稳定性进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 链霉菌 G-HD-4(华侨大学工业生物技术福建省高等学校重点实验室分离、筛选并保藏的菌种)。

1.1.2 培养基 (1) 高氏一号培养基^[6](1 L): 可溶性淀粉 20 g, KNO_3 1.0 g, KH_2PO_4 0.5 g, MgSO_4 0.5 g, NaCl 0.5 g, FeSO_4 0.01 g, 琼脂 15 g, $\text{pH}=7.4\sim 7.6$ 。于 121 $^\circ\text{C}$ 高压蒸汽下灭菌 20 min。(2) 种子培养基(1 L): 土豆 200 g, 胰蛋白胨 5 g, 酵母膏 3.0 g, 葡萄糖 10 g, KH_2PO_4 2.0 g, MgSO_4 0.8 g, CaCl_2 0.3 g, $\text{pH}=6.0$ 。于 115 $^\circ\text{C}$ 高压蒸汽下灭菌 30 min。(3) 基础发酵培养基(1 L): 土豆 200 g, 葡萄糖 20 g, KH_2PO_4 3.0 g, MgSO_4 1.5 g, 胰蛋白胨 5.0 g, L -酪氨酸 1.0 g, $\text{pH}=5.9$ 。于 115 $^\circ\text{C}$ 高压蒸汽下灭菌 30 min。

1.2 仪器

MP 200A 型电子天平, TU-1810PC 型紫外-可见分光光度计, 85-2 型恒温磁力搅拌器, PHS-3C 型

收稿日期: 2008-05-09

通信作者: 方柏山(1957-), 男, 教授, 主要从事合成生物学的研究。E-mail: fangbs@hqu.edu.cn.

基金项目: 国家重点基础研究发展(973)计划项目(2007CB707804); 国家高技术研究发展(863)计划项目

(2006AA020103); 国家自然科学基金资助项目(30770059); 国务院侨办科研基金资助项目(07QZR07)

数字酸度计, DKZ-2 型电热恒温振荡水槽, 3K30 型超速低温冷冻离心机, DHG-9070 型电热恒温鼓风干燥箱.

1.3 试验方法

1.3.1 培养方法 (1) 菌种活化. 将保存的链霉菌 G-HD-4 接种于高氏一号培养基斜面上活化, 于 30 ℃培养 2~4 d. (2) 种子制备. 取新鲜斜面菌种 1 环, 接种于装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中. 于 150 r·min⁻¹, 30 ℃的摇瓶中培养 3 d. (3) 发酵培养. 取 1 mL 种子液, 接种于装有 50 mL 基础培养基的 250 mL 三角瓶中, 于 150 r·min⁻¹, 30 ℃的摇瓶中培养 5 d.

1.3.2 黑色素的提取与纯化 采用酸化沉淀提取黑色素的方法. 将发酵液离心, 去菌体, 上清液用 6 mol·L⁻¹ 的 HCl 调 pH 值至 2~3 左右, 静置过夜, 使其充分沉淀, 离心后得黑色素的粗提物; 粗提物用 1 mol·L⁻¹ 的 NaOH 溶液充分溶解, 离心后, 将上清液再次用 6 mol·L⁻¹ 的 HCl 调 pH 值至 2~3 左右, 静置 4 h. 离心得絮状沉淀物重悬于二次蒸馏水中, 洗涤至中性后冷冻干燥; 干粉在 6 mol·L⁻¹ 的 HCl 中酸解 4 h 后, 依次在氯仿、乙酸乙酯、乙醇等有机溶剂中进行抽提, 最后得到的固体物用二次蒸馏水清洗 3 次后, 即为纯化的黑色素.

在提取纯化过程中, 多次用 6 mol·L⁻¹ 的 HCl 处理, 以清除极易与黑色素结合在一起的多糖、蛋白质及脂类等杂质, 最后, 用二次蒸馏水洗涤至中性, 于 60 ℃烘箱烘干, 放置-20 ℃冰箱备用. 100 mL 的发酵液提取黑色素粗品 520 mg, 菌体干重为 512 mg, 回收的黑色素质量浓度为 5.2 g·L⁻¹.

1.3.3 黑色素的物理化学性质 (1) 光谱特征. 将链霉菌 G-HD-4 所产的黑色素和 Sigma 公司的标准黑色素分别配成 NaOH 稀释液(简称试验液). 在室温下以蒸馏水作为基线校正, 用 TU-1810PC 型紫外-可见分光光度计于 200~800 nm 波长范围内进行光谱扫描, 测定其最大吸收值. 将样品和标准黑色素分别配成不同质量浓度的溶液, 在 400 nm 下测定光密度值(D , 为 3 次测得的平均值, 下同略).

据文[9]报道, 黑色素溶液在可见光区 400 nm 处, 其光密度值随着黑色素质量浓度的升高而升高, 并由此可确定黑色素的质量浓度. 因此, 试验在 400 nm 处测定链霉菌所产黑色素光密度值以检测其性质. 结果发现, 黑色素溶液在质量浓度为 0~100 mg·L⁻¹ 范围内, 光密度值随质量浓度的增加而增大, 均呈线性升高, 如图 1 所示. 这一性质与 Sigma 公司合成的标准黑色素相一致. 为检测方便, 以下黑色素的理化性质均在 400 nm 下测其光密度值.

(2) 溶解性. 取提纯的黑色素分别溶解到水、酸、碱及普通有机溶剂中, 在 25 ℃下振荡反应 1 h. 以不加黑色素的溶剂作为空白对照, 在 400 nm 下测定光密度值, 结合光密度值和溶液的颜色变化来比较黑色素在不同溶液中的溶解性. 测定各自溶解性.

(3) 热稳定性. 将试验液分别置于不同温度的恒温水浴中保温, 以 0.5 h 为时间间隔取样, 取出后快速冷却至室温, 测定光密度值.

(4) 光稳定性. 将试验液在日光、黑暗及紫外灯(样品于 15 W 紫外灯 40 cm 处)下放置, 在不同的时间取样, 测定光密度值.

(5) 酸碱稳定性. 取一定量 pH=8.0 的试验液, 分别用 HCl 和 NaOH 稀释液调节其 pH 值至 1~12. 样品室温放置 30 min, 测定光密度值并观察黑色素的色泽变化.

(6) 抗氧化性. 配制含有质量分数为 30% 的 H₂O₂ 的不同质量浓度的黑色素溶液, 室温避光放置 0, 0.5 h, 测定光密度值. 另取 0.5, 1.0, 1.5 mL 质量分数为 10% 的 NaOCl 溶液, 加入到相同稀释条件下 10 mL 黑色素溶液中, 反应 10 min 后测定光密度值.

(7) 抗还原性. 配制含不同质量浓度亚硫酸钠的黑色素溶液, 定时取样测定光密度值.

(8) 抗干扰性. 分别配制质量浓度为 0.5 g·L⁻¹ 的 CuSO₄, MgSO₄, CaCl₂, NaCl, FeCl₃, AlCl₃, ZnSO₄, KCl, NiSO₄, MnSO₄ 和 Li₂SO₄ 溶液, 取 50 μL 各金属离子溶液, 分别加到 10 mL 的黑色素溶液

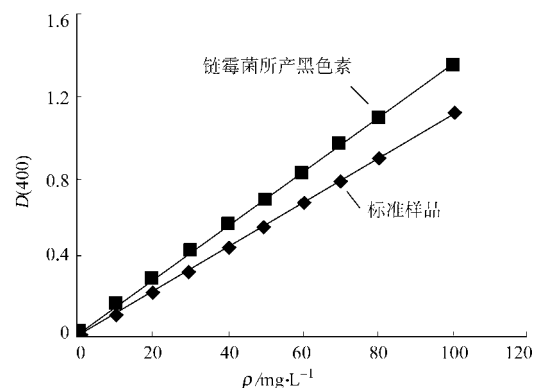


图 1 黑色素光密度值与质量浓度关系

Fig. 1 The relation on absorbance and concentration for the melanin

中,定时取样测定光密度值.分别配制含有体积分数为 2% 的蔗糖、葡萄糖、淀粉、柠檬酸、L-酪氨酸的黑色素溶液,定时取样测光密度值.

2 结果与分析

2.1 黑色素的吸收光谱

链霉菌所产黑色素与 Sigma 公司的标准黑色素的吸收光谱,如图 2 所示.由图 2 可知,两者在 246 nm 处都有一个强吸收峰,在可见光区内没有特征吸收峰,吸收值随波长的增大而减少.这与文[10]具有类似的紫外吸收光谱.

2.2 黑色素的溶解性

不同溶剂的黑色素的光密度值及颜色,如表 1 所示.由表 1 可知,该黑色素溶于碱性水溶液(如 NaOH, Na_2CO_3)中,其颜色为棕褐色,难溶于水及普通有机溶剂中(如甲苯、氯仿、乙酸乙酯、乙醇、甲醇、乙酸、石油醚、丙酮、异戊醇等),但微溶于二甲基亚砷;在 pH 值小于 3 的酸性溶液中,黑色素以不溶解性的固体沉淀物存在.这与文[5,8]报道的黑色素性质基本一致.

表 1 不同溶剂的黑色素光密度值及颜色

Tab.1 Melanin solutions' absorbency and color in different solvents

溶剂	$D(400)$	颜色	溶剂	$D(400)$	颜色	溶剂	$D(400)$	颜色
碱液(pH= 8.0)	0.200	棕褐色	甲苯	0.004	无	石油醚	0	无
二甲基亚砷	0.045	淡褐色	氯仿	0	无	丙酮	0	无
蒸馏水	0.008	无	乙醇	0	无	异戊醇	0	无
乙酸乙酯	0.007	无	乙酸	0	无	酸液(pH= 3.0)	0	无
甲醇	0.005	无						

2.3 温度对黑色素稳定性的影响

温度(θ)对黑色素稳定性的影响结果,如表 2 所示.由表 2 可知,温度在 25~ 60 $^{\circ}\text{C}$ 之间,黑色素的损失很小,光密度值几乎没有变化;在 80 $^{\circ}\text{C}$ 加热 0.5 h,其光密度值也没有什么变化.但随着时间(t)的延长,黑色素的光密度值有所减少;在 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 2 h,其光密度值仅减少了 3.02%.总体上来说,黑色素溶液随着温度的升高、时间的延长,光密度值的变化比较小,表明该黑色素对温度有较好的稳定性.

表 2 温度对黑色素稳定性的影响

Tab.2 Effect of temperature on the stability of the melanin

$\theta/^{\circ}\text{C}$	t/h					
	0	0.5	1	1.5	2	2.5
25	0.959	0.959	0.959	0.960	0.957	0.957
40	0.959	0.959	0.955	0.956	0.956	0.955
60	0.959	0.957	0.957	0.955	0.956	0.953
80	0.959	0.955	0.942	0.942	0.942	0.939
100	0.959	0.946	0.939	0.936	0.934	0.930

2.4 光对黑色素稳定性的影响

光照对黑色素稳定性的影响,如表 3 所示.由表 3 可知,黑色素溶液在日照处放置 15 d 后,其光密度值仅下降了 1.55%;而在紫外灯下照射 1 h 后,光密度值几乎不变.表明,该黑色素耐光性良好.

2.5 pH 值对黑色素稳定性的影响

表 3 光照对黑色素稳定性的影响

Tab.3 Effect of light on the stability of the melanin

t/d	0	5	10	15
日照	0.900	0.900	0.898	0.886
黑暗	0.900	0.900	0.899	0.898
t/min	0	20	40	60
紫外灯	0.971	0.979	0.969	0.972

pH 值对黑色素溶液稳定性的影响,如图 3 所示.从图 3 可看出,黑色素在不同的 pH 值下,其光密

度值有较大变化,随着 pH 值的升高,黑色素溶液的光密度值也不断升高.

由于黑色素基本不溶解于 pH 值小于 4 的水中,故当溶液的 pH 值小于 4 时,黑色素的光密度值很低且变化不大;当 pH= 4~ 5 时,随着黑色素溶解度快速增加,其光密度值也快速增大;而当 pH 大于 5 时,随着黑色素溶解度缓慢增加,其光密度值也缓慢增大,溶液颜色也逐渐加深. 如黑色素颜色在 pH= 3~ 7 呈现棕红色,在 pH= 7~ 12 为棕褐色. 黑色素的这一特性可以适用于不同的领域,如化妆品、食品工业、油漆、染料等.

2.6 氧化剂对黑色素稳定性的影响

氧化剂对黑色素稳定性的影响,如表 4,图 4 所示. 由表 4、图 4 可知,黑色素溶液随着氧化剂含量的增加,作用时间的延长,其光密度值降低,颜色明显变浅,长期放置颜色变为无色. 这表明, H₂O₂ 和 NaOCl 对该黑色素有漂白作用,同时也说明链霉菌 G- HD-4 所产的黑色素对强氧化剂不稳定.

表 4 H₂O₂ 对黑色素稳定性的影响

Tab. 4 Effect of H₂O₂ on the stability of the melanin

t/ h	w(H ₂ O ₂) / %					
	0	0.1	0.4	0.8	1.2	3.0
0	0.481	0.479	0.470	0.457	0.450	0.440
0.5	0.481	0.475	0.457	0.448	0.446	0.423

2.7 还原剂对黑色素稳定性的影响

表 5 为还原剂对黑色素稳定性的影响. 由表 5 可知,在所考察的范围内,无论是增加亚硫酸钠质量浓度,还是延长时间,黑色素溶液的光密度值几乎没有变化. 该结果表明,还原剂对该黑色素没有影响.

表 5 还原剂对黑色素稳定性的影响

Tab. 5 Effect of reducer on the stability of the melanin

t/ h	$\rho(\text{Na}_2\text{SO}_3)/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$					
	0	0.05	0.1	0.2	0.4	1.0
0	0.475	0.472	0.465	0.475	0.475	0.476
24	0.476	0.470	0.467	0.474	0.471	0.474
48	0.471	0.469	0.466	0.467	0.470	0.471
96	0.484	0.475	0.471	0.470	0.480	0.470

2.8 金属离子对黑色素稳定性的影响

在食品中往往存在一些金属离子,金属离子对黑色素颜色的影响,以及是否形成沉淀决定着黑色素在食品添加剂中的适用性. 试验结果表明,当黑色素溶液与离子混合时,其光密度值并没有明显变化.

在 24 h 后, Zn²⁺, Fe³⁺, Ca²⁺ 的存在,使得黑色素溶液的光密度值有所增大;在 48 h 后,含有 Na⁺, K⁺ 的黑色素溶液的光密度值也有所升高,而含有 Mn²⁺, Ni²⁺ 的黑色素溶液的光密度值有所减少. 总的来说,48 h 后的黑色素溶液颜色变化不明显,并且这些离子均没有与黑色素产生沉淀物,这说明金属离子对黑色素稳定性没有太大影响.

2.9 添加物对黑色素稳定性的影响

葡萄糖、淀粉及各种氨基酸是食品中常见的添加剂. 试验结果表明,黑色素对各种添加剂的耐受性,除了柠檬酸外,其余的添加物均对黑色素溶液的稳定性没有影响. 这主要是因为黑色素在酸性溶液中沉淀,所以柠檬酸的添加使得溶液颜色变浅,光密度值明显降低.

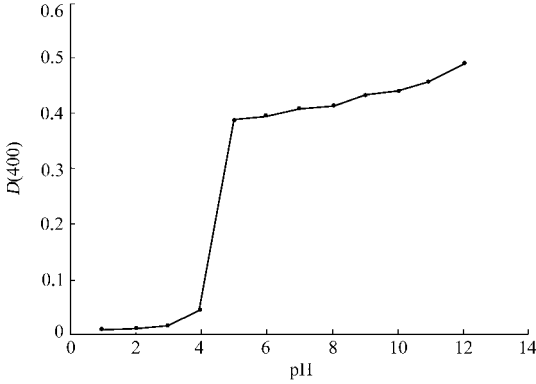


图 3 pH 值对黑色素溶液稳定性的影响

Fig. 3 Effect of pH on the stability of the melanin

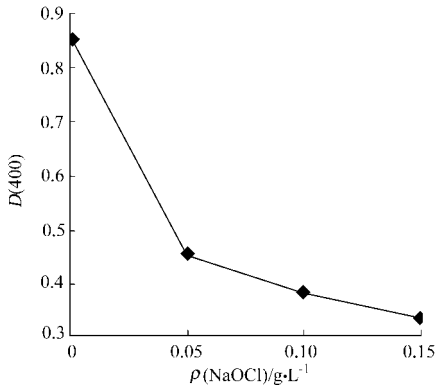


图 4 NaOCl 对黑黑色素稳定性的影响

Fig. 4 Effect of NaOCl on the stability of the melanin

3 结束语

从链霉菌 G-HD-4 发酵液分离、纯化出黑色素,在紫外可见光谱下测其最高吸收峰为 246 nm,与 Sigma 公司的黑色素峰型一致.在 400 nm 处光密度值随着黑色素浓度的增加而增大.该黑色素在 pH 值低于 4 的酸性溶液中沉淀,而溶解于碱性溶液中; H_2O_2 和 NaOCl 等强氧化剂对黑色有漂白作用,长期放置后,黑色素溶液变为无色,故在应用过程中应避免与氧化剂接触.该黑色素对热、光、还原剂、添加剂,以及各种金属离子表现出良好的稳定性.本研究利用发酵法制得的黑色素,其理化性质与其他来源的黑色素极为相似,有开发的价值.

参考文献:

- [1] WANG H S, PAN Y M, TANG X J, et al. Isolation and characterization of melanin from osmanthus fragrans' seeds [J]. LWT: Food Science and Technology, 2006, 39(5): 496-502.
- [2] AGODI A. Study of a melanic pigment of proteus mirabilis[J]. Res Microbiol, 1996, 147: 167-174.
- [3] JAMES A M. The antimicrobial properties of melanocytes, melanosomes and melanin and the evolution of black skin[J]. J Theor Biol, 2001, 211: 101-113.
- [4] NOSANCHUK J D, CASADEVALL A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis[J]. Cellular Microbiology, 2003, 5(4): 203-223.
- [5] 徐 磊, 王长海. 短梗霉黑色素的提取及其理化性质的研究[J]. 食品科学, 2006, 27(8): 122-125.
- [6] 柯冠群, 淳 泽, 万 波. 高产黑色素菌株的分离及鉴定[J]. 应用与环境生物学报, 2005, 11(6): 760-762.
- [7] 赵士毫, 马同锁, 张宏兵, 等. R362 菌株产黑色素提取及稳定性研究[J]. 食品科技, 2005(4): 51-53.
- [8] 顾敏舟, 汤建才, 黄 敏. 一株高产黑色素菌的筛选及发酵条件优化[J]. 四川师范大学学报: 自然科学版, 2006, 29(6): 735-738.
- [9] 段晓红, 毛 欲, 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(2): 249-253.
- [10] 万 霞, 耿 晶, 陈向东, 等. 5 株细菌产 L-多巴黑色素的比较研究[J]. 武汉大学学报: 理学版, 2005, 51(4): 472-476.

Extraction and Physico-Chemical Properties of the Melanin Produced by *Streptomyces* G-HD-4

ZHENG Chen-na, FANG Bai-shan,
LUO Jun-xiang, JIN Hong-wei

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Fujian Province University, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

Abstract: The melanin derived from ferment broth of *Streptomyces* G-HD-4 was isolated and purified by acid deposition, alkaline extraction, acid hydrolysis and multiplicate organic solvents extraction, and their physical and chemical properties were studied. The result shows that the maximum absorption peak of the melanin was 246 nm which agree with the typical melanin. The absorbance of the melanin increase with an increase of melanin's concentration at 400 nm. The melanin could be bleached by strong oxidants, but it had less sensitivity to ultraviolet light or room light, temperature, organic solvents, reducing agents, salts and metal ions for the melanin. Different of additions such as amino acid, starch et al, had no effect on the stability of melanin. Physical and chemical properties of the melanin revealed that the melanin from *Streptomyces* G-HD-4 had a favorable stability.

Keywords: *Streptomyces* G-HD-4; melanin; extraction; purification; physico-chemical properties

(责任编辑: 钱 筠 英文审校: 陈国华)