

毛木耳黑色素提取条件优化及体外抗氧化活性研究

刘鑫¹,袁源²,侯若琳¹,陈良韬²,吴小平³,郑明锋^{1*},傅俊生^{2*}

¹福建农林大学食品科学学院;²福建农林大学生命科学学院;³福建农林大学菌物研究中心,福州 350002

摘要:为实现毛木耳黑色素的高效提取,并对其抗氧化性进行评价。以黑色素的提取率为指标,实验采用 Box-Behnken 响应面法对超声波辅助提取毛木耳黑色素的提取条件进行优化,并对毛木耳黑色素进行红外光谱与体外化学和细胞抗氧化活性进行分析。结果表明,超声波辅助提取毛木耳黑色素的最优条件为:NaOH 浓度 0.34 mol/L,料液比 1:30,超声时间 52 min,超声功率 250 W,超声温度 70 °C;最优条件下的黑色素提取率可达 9.38% ± 0.15%。红外光谱分析结果表明,超声波组与非超声波组提取的黑色素主要吸收峰一致,官能团未发生变化。体外抗氧化实验结果表明,毛木耳黑色素对 2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸自由基 (ABTS)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基 (DPPH) 与羟基自由基具有良好清除活性,且对 H₂O₂ 诱导的 L02 细胞损伤具有明显的保护作用。本研究明确了毛木耳黑色素超声波辅助提取条件及其体外抗氧化活性,为毛木耳黑色素功能产品的开发和运用提供理论依据。

关键词:毛木耳黑色素;超声波;抗氧化;L02 细胞

中图分类号:R284.2;TR284.1

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)10-1688-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.10.004

Optimization of extraction conditions of melanin from *Auricularia polytricha* and its antioxidant activities *in vitro*

LIU Xin¹, YUAN Yuan², HOU Ruo-lin¹, CHEN Liang-tao², WU Xiao-ping³, ZHENG Ming-feng^{1*}, FU Jun-sheng^{2*}

¹College of Food Science, Fujian Agriculture And Forestry University;

²College of Life Science, Fujian Agriculture And Forestry University;

³Mycological Research Center, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

Abstract:To achieve the high extraction efficiency of *Auricularia polytricha* melanin and evaluate its antioxidant activity. The extraction yield of melanin was used as index, the Box-Behnken response surface method was used to optimize the extracting condition of melanin assisted by ultrasonic and the infrared spectrum, chemical and cellular antioxidant activities *in vitro* of *Auricularia polytricha* melanin were evaluated and analyzed. The results showed that the optimal conditions of ultrasonic-assisted melanin extraction were as follows: C_{NaOH} was 0.34 mol/L, solid-liquid ratio was 1:30, ultrasonic time was 52 mins, ultrasonic power was 250 W, ultrasonic temperature was 70 °C. The extraction yield of melanin can reach 9.38% ± 0.15% under the optimal conditions. The result of infrared spectrum showed that the main absorption peaks of melanin extracted from ultrasonic group was consistent with that extracted from non-ultrasonic group, and the functional groups did not change. The results of chemical antioxidant and cellular antioxidant experiments *in vitro* indicated that melanin in *Auricularia polytricha* had good scavenging activity on 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) (ABTS), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and hydroxyl radical, as well as had obvious protective effect on H₂O₂-induced L02 cell damage. The study confirmed the conditions of ultrasonic assisted extraction of *Auricularia polytricha* melanin and its antioxidant activities *in vitro*, which could provide the scientific basis for the development and application of functional products of *Auricularia polytricha* melanin.

Key words: *Auricularia polytricha* melanin, ultrasound, antioxidant, L02 cells

毛木耳 (*Auricularia polytricha*) 属担子菌门、伞

菌纲、木耳目、木耳科,是一种天然的食药两用真菌。其营养价值丰富,富含黑色素、多糖和蛋白质等多种活性成分^[1-3]。大量研究表明,毛木耳具有良好的抗肿瘤等功效^[4]。然而,目前关于毛木耳的研究仅集

收稿日期:2019-01-28 接受日期:2019-09-24

基金项目:国家重点研发计划(2018YFD0400200);国家自然科学基金(81503187)

*通信作者 E-mail: fujunsheng81@163.com, vanzheng@163.com

中在其蛋白质和多糖活性成分,而对其黑色素活性成分的研究却鲜有耳闻。以往研究表明,食药真菌天然黑色素具有良好抗氧化、抗菌和抗肿瘤等生物活性,对人体健康作用重要,因而在生产生活中具有巨大的应用潜力和价值^[5-7]。

黑色素是一种由酚或吡啶类化合物氧化聚合形成的非均质高分子量化合物^[8],溶于碱而不溶于水和其它有机溶剂,因此通常采用 NaOH 来提取^[9]。本文主要探究了毛木耳黑色素的超声波辅助提取条件,并对黑色素体外化学抗氧化与细胞抗氧化活性进行研究,以期为毛木耳黑色素高效提取及其产品的应用开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验原料

毛木耳子实体干品购于福建省福州市大润发超市,外观呈耳状,黑色,背部有绒毛(由福建农林大学生命科学学院傅俊生副教授鉴定)。

1.2 主要药品试剂

氢氧化钠、磷酸二氢钠、柠檬酸、硫酸亚铁、水杨酸等试剂均为国产分析纯;二苯基苦味酰基苯肼(DPPH)(Sigma 公司);ABTS(Sigma 公司);四甲基噻唑蓝(MTT)(Sigma 公司);DCFH-DA 活性氧检测试剂盒(碧云天公司)等。

1.3 主要仪器设备

PS-G60 型洁康超声波机(洁康超声波设备有限公司);高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司);FE-20 型 pH 计(梅特勒托利多仪器有限公司);ST16R 型离心机(美国 Thermo 公司);CP-214 型电子天平(奥豪斯仪器有限公司);Varioskan Flash 型酶标仪(美国 Thermo 公司)等。

1.4 黑色素含量测定

通过扫描毛木耳黑色素纯品的紫外全吸收光谱,确定了毛木耳黑色素紫外的最大吸收波长在 220 nm 处(图 1),因而在此波长下检测吸光度,以氢氧化钠溶液为空白,绘制毛木耳黑色素含量标准曲线。根据公式(1)计算黑色素提取率。

$$\text{提取率}(\%) = \frac{\text{提取液中黑色素质量}}{\text{毛木耳子实体粉末质量}} \times 100\% \quad (1)$$

1.5 毛木耳黑色素提取

参照 Zou^[10]等方法,并作适当修改。将干燥的毛木耳子实体粉碎→过 80 目标准筛→精确称取毛木耳子实体 1.00 g,以料液比 1:30 加入蒸馏水,90 °C 水浴 30 min,10 000 rpm 离心 3 min,去除上清液,

重复该步骤 3 次,除去多糖和蛋白质等水溶性杂质→按一定料液比加入 NaOH 溶液→在一定的超声功率和超声温度下提取毛木耳黑色素→提取结束后,于 10 000 rpm 离心 5 min,收集上清液,用 HCl 将上清液的 pH 调节至 1.5→80 °C 水浴加 10 h→10 000 rpm 离心 3 min→收集沉淀,将沉淀依次用蒸馏水、95% 乙醇、氯仿、乙酸乙酯、石油醚和 75% 乙醇洗至溶液无色,6 000 rpm 离心去除清洗溶剂→将沉淀用 NaOH 溶解,再用 HCl 调节 pH 至 1.5 使黑色素重新沉淀→离心收集沉淀,将沉淀用 0.1 M NaOH 复溶,接着用 0.1 M HCl 调节 pH 至中性,流水透析 48 h→冷冻干燥,得干燥的毛木耳黑色素纯品。

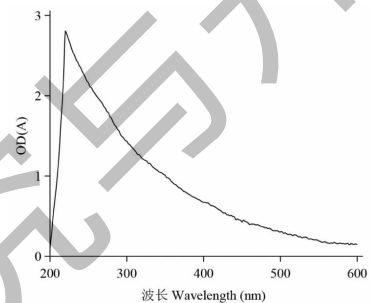


图 1 毛木耳黑色素紫外全吸收光谱图

Fig. 1 Ultraviolet full absorption spectrum *Auricularia polytricha*

1.6 超声波单因素试验

以黑色素提取率为指标,分别研究 NaOH 浓度(0.1、0.3、0.5、0.7、0.9、1.1 mol/L)、料液比(1:10、1:20、1:30、1:40、1:50、1:60 g/mL)、超声时间(10、20、30、40、50、60、70、80、90 min)、超声功率(200、250、300、350、400、450、500 W)和超声温度(20、30、40、50、60、70、80 °C)五个因素对毛木耳黑色素提取率的影响,每组实验重复 3 次。

1.7 响应面试验

依据上述单因素实验结果,采用 Desig-expert 8.0.6 软件,根据 Box-Behnken 中心组合原理进行实验设计,以优化超声波辅助提取的毛木耳黑色素的工艺参数。响应面设计表见表 1。

1.8 毛木耳黑色素红外光谱分析

将精制得黑色素粉末与 KBr 研磨混匀压片,在红外光谱仪上测定,采用 2 cm⁻¹的分辨率,扫描 60 次,扫描范围为 400~4 000 cm⁻¹。

1.9 毛木耳黑色素体外化学抗氧化活性分析

1.9.1 ABTS 自由基清除率测定

参照 Sun 等法^[11],测定毛木耳黑色素对 ABTS 自由基的清除活性,实验每组重复 3 次,取平

表1 Box-Behnken 试验因素与水平

Table 1 Factors and levels of Box-Behnken test

水平 Level	因素 Factor		
	A: NaOH 浓度 NaOH concentration (mol/L)	B: 超声时间 Ultrasonic time (min)	C: 超声功率 Ultrasonic power (W)
-1	0.1	40	200
0	0.3	50	250
1	0.5	60	300

均值。

1.9.2 DPPH 自由基清除率测定

参照 Saiga 等法^[12], 测定毛木耳黑色素对 DPPH 自由基的清除活性, 实验每组重复 3 次, 取平均值。

1.9.3 羟基自由基清除率测定

参照 Wang 等法^[13]。测定毛木耳黑色素对羟基自由基的清除活性, 实验每组重复 3 次, 取平均值。

1.10 毛木耳黑色素的体外细胞抗氧化活性分析

1.10.1 过氧化氢诱导 L02 肝细胞氧化损伤条件的确定

参照 Li 等^[14]法, 稍作修改, 建立 L02 肝细胞氧化损伤模型。取对数生长期细胞, 用 0.25% 的胰蛋白酶消化, 接种于 96 孔细胞培养板, 接种密度为 1.0×10^5 个/mL, 培养 24 h 后分组培养。分为 2 组, 空白对照组不加任何处理; 模型组用不同浓度 (25、50、100、200、400、800 $\mu\text{mol/L}$) H_2O_2 处理。于 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度培养箱培养 24 h 后, 采用 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 (MTT) 法测定细胞活力, 以半数抑制浓度 (IC_{50}) 为标准, 来确定 H_2O_2 的造模浓度^[15]。

1.10.2 毛木耳黑色素对过氧化氢诱导损伤的细胞活力影响

取对数生长期细胞, 用 0.25% 的胰蛋白酶消化, 接种于 96 孔细胞培养板, 接种密度为 1.0×10^5 个/mL, 培养 24 h 后分组培养。分为 4 组, 空白对照组不加任何处理; 模型组用 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 单独处理; 毛木耳黑色素 + H_2O_2 组用不同浓度 (1、2、4、6、8 mg/mL) 毛木耳黑色素预处理 1 h, 再与 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 共孵育; 样品对照组用 8 mg/mL 毛木耳黑色素单独处理。于 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度培养箱培养 24 h 后, 采用 MTT 法测定细胞活力。

1.10.3 毛木耳黑色素对 H_2O_2 诱导损伤的细胞形态的改善作用

取对数生长期细胞, 用 0.25% 的胰蛋白酶消化, 接种于 6 孔细胞培养板, 接种密度为 1.0×10^5 个/mL, 培养 24 h 后分组培养。分为 3 组, 空白对照组不加任何处理; 模型组用 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 单独处理; 毛木耳黑色素 + H_2O_2 组用 6 mg/mL 毛木耳黑色素预处理 1 h, 再与 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 共孵育。分别在 0、24、48 h 观察细胞形态。

1.10.4 毛木耳黑色素对 H_2O_2 诱导损伤的 L02 细胞活性氧含量的影响

取对数生长期细胞, 用 0.25% 的胰蛋白酶消化, 接种于 6 孔细胞培养板, 接种密度为 1.0×10^5 个/mL, 培养 24 h 后分组培养。分为 3 组, 空白对照组不加任何处理; 模型组用 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 单独处理; 毛木耳黑色素 + H_2O_2 组用 6 mg/mL 毛木耳黑色素预处理 1 h, 再与 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 共孵育 6 h。按照试剂盒说明书的方法, 运用原位装载探针的方法进行胞内染色, 染色 30 min, 然后用 PBS 充分清洗干净, 使用荧光显微镜观察并拍照。

1.11 统计学处理

实验数据采用 SPSS 13.0 软件分析处理。计量资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 超声波单因素试验

2.1.1 NaOH 浓度

在料液比 1:20、超声时间 30 min、超声功率 200 W、超声温度 30 $^\circ\text{C}$ 的条件下, 研究不同 NaOH 浓度 (0.1、0.3、0.5、0.7、0.9、1.1 mol/L) 对毛木耳黑色素提取率的影响。从图 2A 中可以看出, 毛木耳黑色素提取率随着 NaOH 浓度的增加呈现先升后降趋势, 当 NaOH 浓度达 0.3 mol/L 时, 黑色素提取率达到最大。因此, 在 NaOH 浓度为 0.3 mol/L 的条件下提取黑色素比较适宜。

2.1.2 料液比

在 NaOH 浓度 0.3 mol/L、超声时间 30 min、超声功率 200 W、超声温度 30 $^\circ\text{C}$ 的条件下, 研究不同料液比 (为 1:10、1:20、1:30、1:40、1:50、1:60) 对黑色素提取率的影响。从图 2B 中可以看出, 毛木耳黑色素提取率随料液比的增加呈现不断上升的趋势, 当料液比超过 1:30 后, 提取率基本保持不变, 考虑到料液比过大会造成溶剂浪费并且不利于后处

理,因此在料液比为 1:30 的条件下提取黑色素比较适宜。

2.1.3 超声时间

在 NaOH 浓度 0.3 mol/L、料液比 1:30、超声功率 200 W、超声温度 30 ℃ 的条件下,研究不同超声时间(10、20、30、40、50、60、70、80、90 min)对毛木耳黑色素提取率的影响。从图 2C 中可以看出,随着超声时间的推移,黑色素的提取率逐渐提高,当超声时间超过 50 min 时,黑色素的提取率趋于平衡。因此,在超声时间为 50 min 的条件下提取黑色素比较适宜。

2.1.4 超声功率

在 NaOH 浓度 0.3 mol/L、料液比 1:30、超声时间 50 min、超声温度 30 ℃ 的条件下,研究不同超声功率(200、250、300、350、400、450、500 W)对黑色素提取率的影响。从图 2D 中可以看出,随着超声功

率的增大,黑色素的提取率呈现逐渐上升的趋势,当超声功率为 250 W 时,黑色素提取率达到最高。当超声功率过高,黑色素的提取率发生了下降,这可能是由于过高的超声功率,破坏了黑色素的结构,从而降低了黑色素提取率,因此在超声功率为 250 W 的条件下提取黑色素较为适宜。

2.1.5 超声温度

在 NaOH 浓度 0.3 mol/L、料液比 1:30、超声时间 50 min、超声功率 250 W 的条件下,研究超声温度对毛木耳黑色素提取率(20、30、40、50、60、70、80 ℃)的影响。从图 2E 中可以看出,黑色素的提取率随超声温度的上升而逐渐提高,当超声温度上升至 70 ℃ 后,黑色素提取率趋于平衡,温度过高可能会对黑色素的活性产生影响,且会加大能源的消耗。因此,在超声温度为 70 ℃ 的条件下提取黑色素比较适宜。

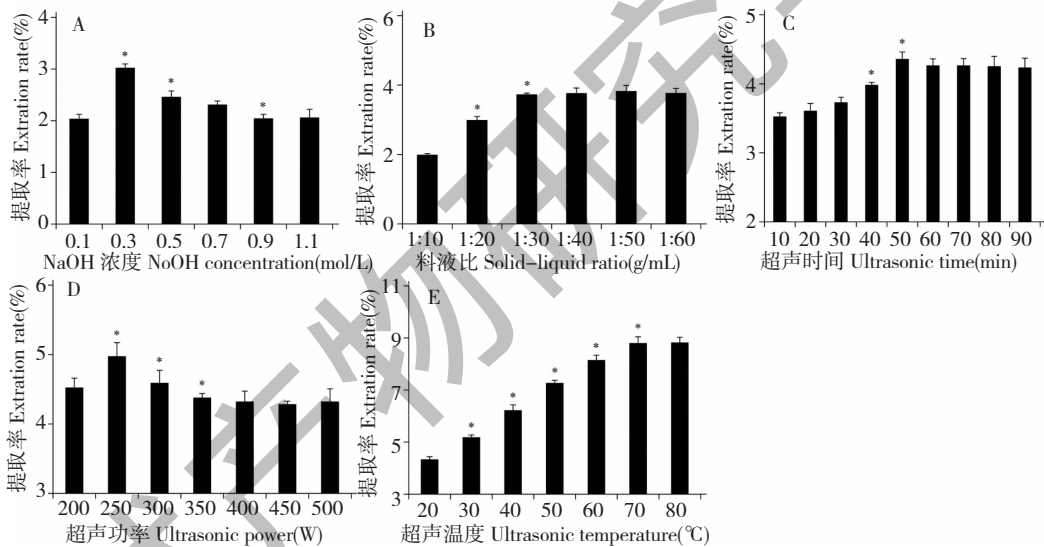


图 2 各超声单因素对毛木耳黑色素提取率的影响

Fig.2 Effect of ultrasonic single factor on extraction rate of melanin from *Auricularia polytricha*

注:与前一条件相比较,* $P < 0.05$ 。Note:Compared to the previous condition,* $P < 0.05$ 。

2.2 响应面试验设计及结果

在超声波单因素实验的基础上,根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理,选取 A (NaOH 浓度)、B(超声时间)和 C(超声功率)为自变量,以黑色素提取率(Y)为响应值,设计 3 因素 3 水平的响应面分析试验。试验设计及结果见表 2。

通过 Desig-expert 8.0.6 数据处理软件对表 2 毛木耳黑色素提取率进行响应面分析,得到 A (NaOH 浓度)、B(超声时间)、C(超声功率)3 个因

素与 Y 之间的回归方程: $Y = 9.18 + 0.19A + 0.50B + 0.42C + 0.11AB + 0.45AC + 0.13BC - 2.02A^2 - 1.08B^2 - 1.34C^2$ 。对此回归模型进行方差分析,该模型的 $P < 0.01$,说明该模型具有高度显著性。从表 3 可知,该回归方程的相关系数 $R^2 = 0.9979$,说明该模型拟合度较好,可以真实的描述各个影响因子与响应值之间的关系。同时,失拟项不显著,说明回归方程与实际情况吻合的较好,实验误差小,因此可用该回归方程较好的分析和与预测最佳提取条件。

表 2 响应面试验设计及试验结果

Table 2 Response surface design and test results

序号 No.	A:NaOH 浓度 NaOH concentration (mol/L)	B:超声时间 Ultrasonic time (min)	C:超声功率 Ultrasonic power (W)	提取率 Yield(%)
1	0	1	1	7.75
2	-1	0	1	4.92
3	0	0	0	9.10
4	1	0	1	6.87
5	1	-1	0	5.65
6	0	-1	-1	5.98
7	0	0	0	9.34
8	0	1	-1	6.68
9	0	0	0	8.93
10	1	0	-1	5.15
11	0	-1	1	6.53
12	-1	-1	0	4.92
13	-1	1	0	5.69
14	-1	0	-1	5.12
15	1	1	0	6.88
16	0	0	0	9.22
17	0	0	0	9.18

2.3 响应面优化及模型验证

通过对上述试验结果分析,可预测黑色素最优提取条件及提取率,由回归系数的显著性检验可知(表 3),模型的一次项 A 、 B 、 C 影响极显著($P < 0.01$),二次项 A^2 、 C^2 、 B^2 影响极显著($P < 0.01$),交互项 AC 影响极显著($P < 0.01$);根据一次项系数的绝对值可知,各因素对毛木耳黑色素提取率的影响主

次顺序依次为超声时间 > 超声功率 > NaOH 浓度。

根据回归分析结果绘制响应曲面,以确定 NaOH 浓度、超声功率和超声时间对毛木耳黑色素提取率的影响(图 3)。通过该模型预测的最优提取条件为:NaOH 浓度 0.34 mol/L、超声时间 52.48 min、超声功率 259.65 W,在最优提取条件下,预测的黑色素提取率可达 9.27%。

表 3 回归模型的方差分析及显著性检验

Table 3 Variance analysis and significance tests

来源 Source	平方和 Sum of square	自由度 Df	均方 Mean square	F	P
模型 Model	9	44.23	4.91	361.58	< 0.01
A	1	0.31	0.31	23.02	< 0.01
B	1	1.95	1.95	143.55	< 0.01
C	1	1.43	1.43	104.95	< 0.01
A^2	1	22.17	22.17	1 630.89	< 0.01
B^2	1	4.88	4.88	359.32	< 0.01
C^2	1	7.58	7.58	557.9	< 0.01
AB	1	0.051	0.051	3.72	0.094 9
AC	1	0.93	0.93	68.51	< 0.01

续表 3 (Continued Tab. 3)

来源 Source	平方和 Sum of square	自由度 Df	均方 Mean square	F	P
BC	1	0.068	0.068	4.97	0.061 0
失拟 Lack of fit	3	2.43E-03	8.08E-04	0.035	0.990 0
残差误差 Residual error	7	0.095	0.014	$R^2 = 0.997 9$	
纯误差 Pure error	4	9.30E-02	2.30E-02	Adj $R^2 = 0.995 1$	
合计 Total	16	44.33			

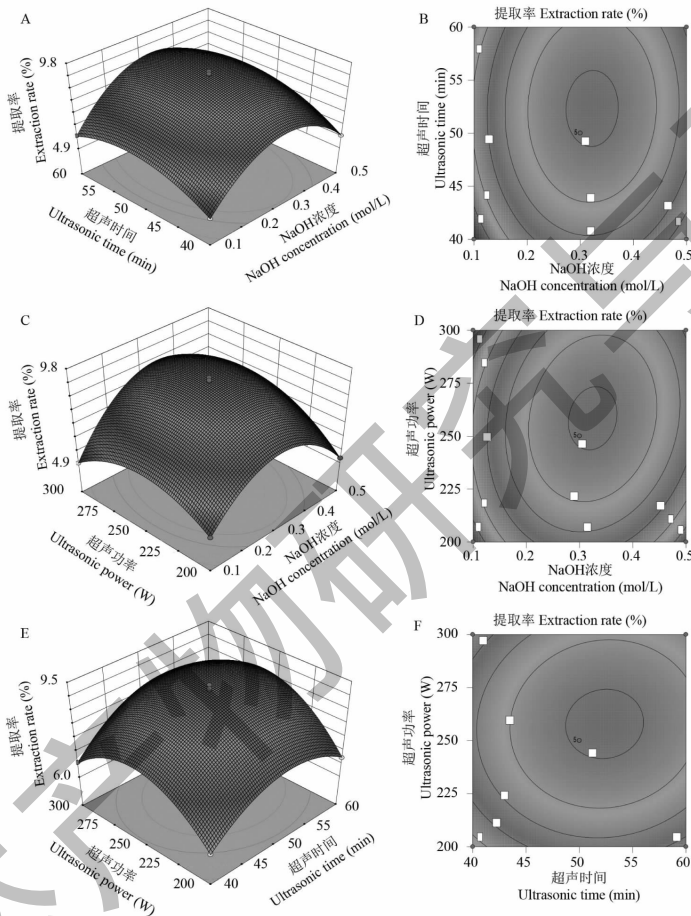


图 3 响应面法立体分析图

Fig. 3 Response surface plot

2.4 模型预测结果验证及其与非超声组黑色素提取率比较

为验证模型预测的准确性,实验对预测参数进行了验证,为便于实际试验操作,对超声功率和超声时间参数进行取整,最终实际的提取条件为 NaOH 浓度 0.34 mol/L、料液比 1:30、超声功率 250 W、超声时间 52 min、超声温度 70 ℃。在此条件下重复 3 次实验,3 次实验提取率的平均值为 $9.38\% \pm 0.15\%$ (表 4),与理论预测值的相对误差在 $\pm 0.12\%$ 内,由此可知,模型预测值和实际值之间有较

好拟合性,能较好预测和分析不同条件下毛木耳黑色素提取率变化。

为验证超声波对毛木耳黑色素提取的促进作用,在进行最优条件验证的同时,还设置了非超声组进行对比(在实验条件控制上,除不超声外,其它条件均与超声组相同)。实验结果显示,超声波提取组的提取率相比于非超声组提高了 16.09% (表 4),这与其它天然黑色素的超声提取结果变化趋势相似,表明超声波可以有效的提高黑色素提取率^[16,17]。

表4 超声波组与非超声组毛木耳黑色素提取率比较

Table 4 Comparison of *Auricularia polytricha* melanin extraction rate between ultrasonic group and non ultrasonic group

组别 Group	提取率 Yield (%)
超声波组 Ultrasonic group	9.38 ± 0.15% *
非超声波组 Non ultrasonic group	8.08 ± 0.03%

注:与非超声组相比较, * $P < 0.05$ 。

Note: Compared to non ultrasonic group * $P < 0.05$.

2.5 毛木耳黑色素红外光谱分析

黑色素在红外光谱中主要有以下主要特征吸收峰:吡啶环的 N-H 基团和 OH 基团在 3300 cm^{-1} 左右产生的吸收峰,芳环 C = C 键或 C = O 键在 1650 cm^{-1} 左右产生的吸收峰,以及芳环被取代形成共轭体系后在 $600 \sim 800\text{ cm}^{-1}$ 处所产生的弱吸收峰^[18,19]。实验结果显示(图4),超声波组与非超声组提取的毛木耳黑色素红外光谱主要特征吸收峰一致,表明超声波对毛木耳黑色素化学结构影响较小。

2.6 毛木耳黑色素体外化学抗氧化活性分析

实验进一步对毛木耳黑色素体外化学抗氧化活性进行分析。结果显示,毛木耳黑色素具有良好的化学抗氧化活性,当黑色素质量浓度达 4 mg/mL ,其

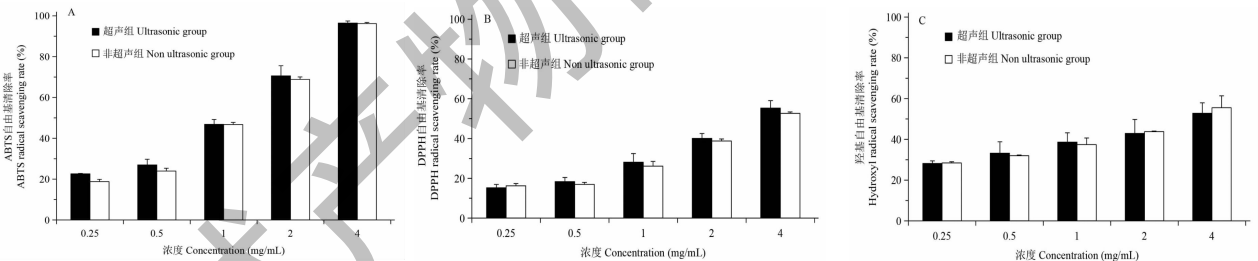


图5 超声波组与非超声组提取的毛木耳黑色素化学抗氧化活性对比

Fig. 5 Comparison of antioxidant activity of *Auricularia polytricha* melanin between ultrasonic group extraction and non ultrasonic group extraction

2.7 毛木耳黑色素体外细胞抗氧化活性分析

在确定超声波对毛木耳黑色素的化学结构和体外化学抗氧化活性影响不大后,实验进一步探究了超声波辅助提取的毛木耳黑色素对 H_2O_2 诱导的 L02 细胞损伤的保护作用,以分析毛木耳黑色素体外细胞抗氧化活性。

2.7.1 过氧化氢诱导 L02 肝细胞氧化损伤的浓度

研究首先考察了过氧化氢浓度对 L02 肝细胞损伤的影响,结果显示随着过氧化氢浓度的增加,细胞的存活率逐渐降低(图6A),当过氧化氢浓度为 $200\text{ }\mu\text{mol/L}$ 时,细胞的半数抑制浓度 (IC_{50}) 约为 50% ,

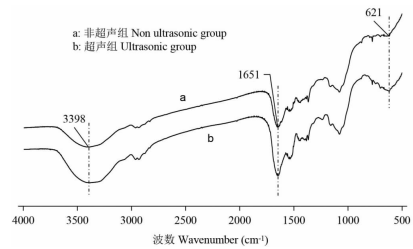


图4 超声波组与非超声组毛木耳黑色素红外光谱比较

Fig. 4 Comparison of infrared spectra of *Auricularia polytricha* melanin between ultrasonic group and non ultrasonic group

对 ABTS、DPPH 和羟基自由基的清除率分别达 $96.46\% \pm 0.98\%$ 、 $55.30\% \pm 3.74\%$ 、 $52.80\% \pm 5.12\%$ (图5),该研究结果与黑木耳黑色素的抗氧化活性相比,毛木耳黑色素对 DPPH 和羟基自由基的清除活性较黑木耳黑色素低^[7],而对 ABTS 自由基清除活性与黑木耳黑色素相近^[20]。

为探究超声波是否会对毛木耳黑色素的抗氧化活性产生影响,实验同时还对非超声组提取的黑色素化学抗氧化活性进行了研究。结果显示,超声波组与非超声组提取的黑色素清除 ABTS、DPPH 和羟基自由基的能力相近,表明超声波对毛木耳黑色素的抗氧化活性影响不大。

本研究选择造模浓度为 $200\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的过氧化氢进行后续试验。

2.7.2 毛木耳黑色素对过氧化氢诱导损伤的细胞活力影响

结果如图6B所示。与空白组相比,样品对照组浓度为 8 mg/mL 的毛木耳黑色素对细胞活力无显著影响,表明毛木耳黑色素对细胞没有毒副作用;与模型组(仅给予 $200\text{ }\mu\text{mol/L H}_2\text{O}_2$)相比,毛木耳黑色素预处理能明显减轻 H_2O_2 导致的 L02 细胞活

力下降,并呈剂量依赖性,当毛木耳黑色素浓度达 6 mg/mL 时,L02 细胞存活率可达 $87.23\% \pm 8.72\%$ ($P < 0.05$),表明毛木耳黑色素对 H_2O_2 诱导的 L02 细胞损伤有保护作用。浓度为 8 与 6 mg/mL 的毛木耳黑色素处理组对 L02 细胞的活力影响无显著性差异,因此选择浓度为 6 mg/mL 的毛木耳黑色素进行后续试验。

2.7.3 毛木耳黑色素对 H_2O_2 诱导损伤的细胞形态的改善作用

如图 7A 所示,空白组细胞以静态粘附方式生长,呈梭形或多角形。模型组(仅给予 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2)细胞逐渐收缩,形成球形,与周围细胞分离。

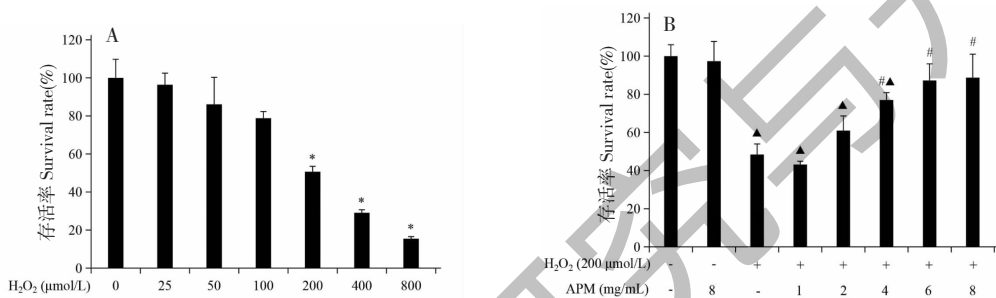


图 6 毛木耳黑色素对 H_2O_2 诱导损伤的细胞活力影响

Fig. 6 The effects of *Auricularia polytricha* melanin on H_2O_2 -induced cell viability

注:A. H_2O_2 对 L02 细胞活力的影响,与空白组相比,* $P < 0.05$;B. 木耳黑色素(APM)对 H_2O_2 诱导损伤的细胞活力影响,与空白组相比,▲ $P < 0.05$;与模型组相比,# $P < 0.05$ 。Note:A. The effect of H_2O_2 on the activity of L02 cells,compared to blank group * $P < 0.05$;B. The effects of *Auricularia polytricha* melanin on cell viability induced by H_2O_2 ,compared to blank group ▲ $P < 0.05$,compared to model group # $P < 0.05$.

3 讨论

毛木耳因其丰富的营养价值和保健功效,深受广大消费者的喜爱。黑色素作为毛木耳的主要活性成分之一,在其生物功效上发挥着重要作用,如何高效提取毛木耳黑色素对毛木耳的生产应用十分重要。超声波辅助提取法是一种利用超声波产生强烈的振动而引起细胞壁的破坏,进而提高活性物质成分提取效率的方法,其具有提取时间短、提取效率高、环境污染小和成本低的优点^[16]。因此,本实验采用超声辅助提取法提取毛木耳黑色素,并通过响应面法优化其提取工艺参数。实验结果表明,超声辅助提取法提取毛木耳色素的最佳提取工艺参数为:NaOH 浓度 0.34 mol/L,料液比 1:30,超声时间 52 min,超声功率 250 W,超声温度 70 $^{\circ}\text{C}$ 。在最优条件下,毛木耳黑色素提取率可达到 $9.38\% \pm 0.15\%$,相比于实验设置的非超声组黑色素提取率提高了 16.09%,表明超声波可有效提高毛木耳黑

与模型组相比,毛木耳黑色素能明显改善由 H_2O_2 诱导的细胞形态改变。

2.7.4 毛木耳黑色素对 H_2O_2 诱导损伤的 L02 细胞活性氧含量的影响

H_2O_2 可以诱导细胞产生活性氧(ROS),从而对细胞造成氧化损伤。从图 7B 可以看出,与空白组相比,模型组细胞内的 ROS 含量明显升高,使细胞内荧光强度明显增强,而毛木耳黑色素明显降低了由 H_2O_2 引起的细胞内 ROS 升高,进一步证实了毛木耳黑色素对 H_2O_2 诱导的 L02 细胞损伤具有保护作用。

色素提取率。

大量研究表明,过氧自由基与人类许多疾病的发生有关,如心脑血管疾病、老年痴呆等,因此寻找天然高效的抗氧化剂具有重要意义^[21]。实验进一步对超声波辅助提取的毛木耳黑色素体外化学抗氧化和细胞抗氧化活性进行分析,体外化学抗氧化实验结果表明,毛木耳黑色素具有良好的抗氧化活性,超声波辅助提取的毛木耳黑色素与非超声组提取得到的黑色素抗氧化活性相近,说明超声波不影响毛木耳色素的抗氧化活性,可以应用于毛木耳色素的高效提取。体外细胞抗氧化实验结果表明,毛木耳黑色素预处理能够明显减轻由 H_2O_2 导致的 L02 细胞活力下降及其细胞形态的改变,且降低细胞内 ROS 升高,说明毛木耳黑色素在体外对 H_2O_2 诱导的 L02 细胞损伤具有保护作用。该研究结果为毛木耳黑色素高效提取及其产品的应用开发提供科学依据。

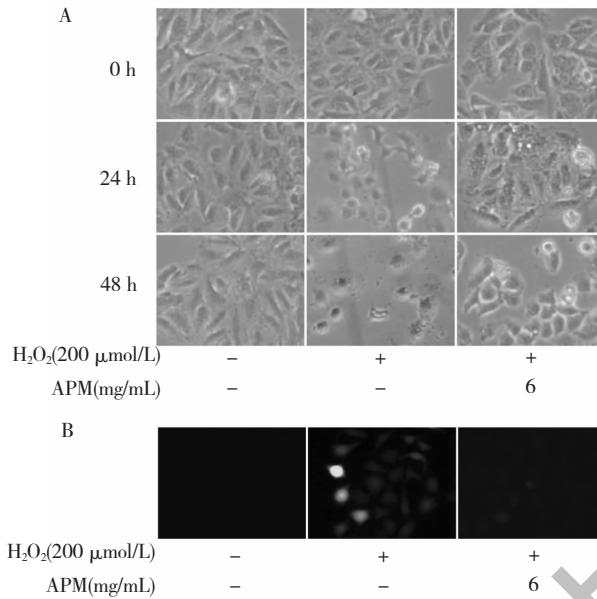


图7 毛木耳黑色素对 H₂O₂ 诱导损伤的细胞形态及其活性氧含量的影响

Fig. 7 The effects of *Auricularia polytricha* melanin on H₂O₂-induced cell morphology and the content of reactive oxygen

注:A. 毛木耳黑色素 (APM) 对 H₂O₂ 诱导损伤的细胞形态的改善作用;B. 毛木耳黑色素 (APM) 对 H₂O₂ 诱导损伤的 L02 细胞活性氧含量的影响。Note: A. The improving effect of *Auricularia polytricha* melanin on cell morphology induced by H₂O₂; B. The effects of *Auricularia polytricha* melanin on the content of reactive oxygen species in L02 cells induced by H₂O₂.

参考文献

- Zhou Y, Chen L, Fan X, et al. De novo assembly of *Auricularia polytricha* transcriptome using illumina sequencing for gene discovery and SSR marker identification [J]. PLoS One, 2014, 9: e91740.
- Zhao S, Rong CB, Zhang SM, et al. Protective effect of *Auricularia polytricha* polysaccharide on ethanol-induced liver injury [J]. Jiangsu Agr Sci (江苏农业科学), 2017, 45: 142-144.
- Zhang SM, Xu LH, Rong CB, et al. Bioactivity of *Auricularia polytricha* protein extract against hepatic injury induced by ethanol [J]. Food Sci Technol Int (食品科技), 2016, 2: 233-236.
- Chen H. Study on purification, modification and anti-tumor activity of polysaccharides from *Auricularia polytricha* [D]. Xuzhou: China University of Mining and Technology (中国矿业大学), 2016.
- Guo X, Chen S, Hu Y, et al. Preparation of water-soluble melanin from squid ink using ultrasound-assisted degradation and its anti-oxidant activity [J]. J Food Sci Tech, 2014, 51: 3680-3690.
- Elnaggar EA, Elewasy SM. Bioproduction, characterization, anticancer and antioxidant activities of extracellular melanin pigment produced by newly isolated microbial cell factories *Streptomyces glaucescens* NEAE-H [J]. Sci Rep, 2017, 7: 42129.
- Liu CY, Qi M, Lv HY, et al. The improvement of *Auricularia heimuer* melanin on acute liver injured mice [J]. Mycosystema (菌物学报), 2018, 37: 1741-1750.
- Zhang YR, Wang QQ, Liu T, et al. Alkaline extraction optimization and characterization of *Auricularia auricular* melanin [J]. Food Sci (食品科学), 2016, 37(12): 27-32.
- Li Q, Hou LH, Liu X, et al. Identification and extraction technology of melanin from *Auricularia auricular* [J]. Food Sci (食品科学), 2010, 31(16): 87-92.
- Zou Y, Hu W, Ma K, et al. Physicochemical properties and antioxidant activities of melanin and fractions from *Auricularia auricular* fruiting bodies [J]. Food Sci Biotechnology, 2015, 24: 15-21.
- Sun XQ, Zhou DQ, Wang SS, et al. Study on enhancement of antioxidant activity of tofu whey by fermentation with three species of *Lactobacillus* [J]. Food Res Dev (食品研究与开发), 2017, 38(18): 1-6.
- Ai S, Tanabe S, Nishimura T. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment [J]. J Agr Food Chem, 2003, 51: 3661.
- Wang GL, Li JK, Wu XX, et al. Extraction and purification of *Debregesia orientalis* fruit polyphenols and its antioxidant, antitumor activity [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2019, 31(1): 1-9.