

# 不同处理方法对花椒籽种皮黑色素 纯化效果的比较研究

王小晶, 冯莉, 彭飞, 马琦, 李梅, 徐怀德

(西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西杨凌 712100)

**摘要:** 本文以花椒籽为原料制备花椒籽种皮黑色素粗提物 (melanin crude extract of pepper seed coat, MCEP), 并用盐酸水解法、酶解法、有机溶剂萃取法和碱溶酸沉法四种处理方法对 MCEP 进行纯化, 制得花椒籽种皮黑色素 (melanin of pepper seed coat, MP), 分别标记为 SMP、EMP、OMP 和 AMP; 通过分析其色值、紫外-可见光谱、色价、红外光谱及微观结构, 对比研究了四种处理方法对 MP 的纯化效果。结果表明, SMP 的  $L^*$ 、 $a^*$  与  $b^*$  值均显著低于 AMP、OMP 和 MCEP ( $p < 0.05$ ), 且为黑色无定型粉末, 并带有金属光泽; 四种方法制备的 MP 紫外-可见光谱均在 220 nm 有最大吸收峰, 且色价均显著高于 MCEP (151.25 U/g) ( $p < 0.05$ ), 其中 SMP 色价 (341.73 U/g) 最高; 除 AMP 外, OMP、EMP 和 SMP 的红外光谱相比于 MCEP 在 C-H 与 C-H<sub>2</sub> 处的吸收峰均明显减弱; 扫描电子显微镜结果显示, SMP 呈无规则块状, 且表面无其他物质形状结构存在。因此, 盐酸水解为本研究纯化制备 MP 的最佳处理方法。

**关键词:** 花椒籽种皮; 黑色素; 处理方法; 纯化效果; 微观结构

文章编号: 1673-9078(2019)05-236-243

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.5.033

## Comparative Study on Purification Effect of Melanin in Pepper (*Zanthoxylum bungeanum*) Seed Coat by Different Treatment Methods

WANG Xiao-jing, FENG Li, PENG Fei, MA Qi, LI Mei, XU Huai-de

(College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

**Abstract:** Pepper seeds was used as raw material to prepare crude melanin extract of pepper seed coat (MCEP) by alkali-soluble acid precipitation method, and the MCEP was purified by hydrochloric acid hydrolysis, enzymatic hydrolysis, organic solvent extraction and alkali-soluble acid precipitation method, respectively, to obtain melanins of pepper seed coat (MP), which were labeled as SMP, EMP, OMP and AMP, respectively. The purification effects of the four treatment methods on MP were analyzed by the color of the pigment, ultraviolet-visible spectroscopy, color value, Infrared spectroscopy and its microstructure. The results showed that the  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$  values of SMP were significantly lower than those of AMP, OMP and MCEP ( $p < 0.05$ ), and the SMP was black amorphous powder with metallic luster; The SMP, EMP, OMP and AMP had maximum absorption at peak 220 nm; the color values of SMP, EMP, OMP and AMP were significantly higher than the color value of MCEP (151.25 U/g) ( $p < 0.05$ ), and the SMP color value (341.73 U/g) was the highest; Except for AMP, the infrared spectroscopy of OMP, EMP and SMP were weakened or disappeared compared with the absorption peaks of MCEP in C-H and C-H<sub>2</sub> characteristic absorption band; The results of scanning electron microscope showed that SMP had a random block structure, and no other structural shapes existed. Therefore, we suggest that the hydrochloric acid hydrolysis is the best treatment method for purification and preparation of MP.

**Key words:** seed coat of pepper; melanin; purification; purification effect; microstructure

色素作为一种重要的食品添加剂, 通常采用化学合成和酶催化反应合成获得, 然而合成色素的食用不安全性限制了其大规模工业化生产<sup>[1,2]</sup>, 因此, 近年来天然色素受到了人们越来越多的关注。天然黑色素是

收稿日期: 2018-12-24

作者简介: 王小晶 (1990-), 女, 博士生, 研究方向: 农产品加工及贮藏

通讯作者: 徐怀德 (1964-), 男, 教授, 研究方向: 果品蔬菜贮藏与加工、天然产物分离

天然产物分离

存在于植物、动物及微生物中由酚类或吲哚类化合物氧化聚合而成的一类非均质高分子化合物, 结构复杂, 通常呈黑色或深棕色<sup>[3]</sup>, 具有广泛的生物活性, 如抗氧化<sup>[4,5]</sup>、抗辐射<sup>[6]</sup>、保肝<sup>[7]</sup>、抗衰老<sup>[8]</sup>和抑制细菌群体感应<sup>[9]</sup>等。因此, 在食品、化妆品与医药等工业领域具有广泛应用前景。在植物中, 黑色素主要分布在种皮、茎叶和果实等器官, 目前对于植物茎叶、果实等中含有的黑色素研究较多, 如乌饭树叶<sup>[10]</sup>、香蕉皮<sup>[11]</sup>

和黑米<sup>[12]</sup>等,而关于植物种皮中黑色素的相关研究较少。

花椒(*Zanthoxylum bungeanum* Maxim.)属芸香科花椒属植物,是我国传统的“八大调味品”之一,也是我国传统的常用中药<sup>[13]</sup>。我国是花椒产业大国,花椒籽作为花椒果皮生产的副产物,产量占花椒总产量一半以上,其年产量高达30万吨<sup>[14]</sup>。花椒籽黑色种皮占花椒籽质量的10%左右,且富含黑色素,但在花椒产地,大量的花椒籽和榨油后混有花椒籽黑种皮的饼粕常被当作燃料或肥料,甚至被当作废弃物丢掉,造成了资源的浪费,亟待开发利用。

近年来,花椒籽种皮黑色素(melanin of pepper seed coat, MP)的研究主要集中在提取优化<sup>[15-17]</sup>、体外生物活性<sup>[5,18]</sup>等方面,但其化学结构及组成成分目前尚不明确<sup>[19]</sup>。此外,由于黑色素难溶于水和一般有机溶剂,且具有无定型性和非均质等特性,很难利用色谱的方法对其进行纯化<sup>[20]</sup>,而获得高纯度的MP是研究其结构与性质的基础,但目前有关MP的纯化报道较少。仅张伟<sup>[19]</sup>和李荣<sup>[15]</sup>等分别采用有机溶剂萃取法和酶解法-Sevag法联用对MP进行纯化,但发现这两种方法仅能去除MP中部分杂质,均未达到理想的纯化效果。因此,为探寻一种有效的MP纯化方法,本研究对MP进行提取,并对比分析盐酸水解法、酶解法、有机溶剂萃取法和碱溶酸沉法四种处理方法对MP的纯化效果,为MP结构的进一步深入研究及MP的综合开发利用提供一定的理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料

花椒籽购自陕西韩城大红袍有限责任公司。

氢氧化钠、盐酸、磷酸氢二钠、柠檬酸、溴化钾,国药集团化学试剂有限公司;碱性蛋白酶(100000 U/g),诺维信(中国)投资有限公司;糖化酶(100000 U/mL),阿拉丁生化科技股份有限公司;其余所用试剂均为国产分析纯。

### 1.2 主要仪器设备

UV-1780紫外可见分光光度计,岛津仪器(苏州)有限公司;GL-10MD高速冷冻离心机,湖南湘仪离心机仪器有限公司;FD5-2.5E型冻干机,金西盟(北京)仪器有限公司;Vetex 70傅立叶变换红外光谱仪,德国布鲁克光学仪器公司;S-4800场发射扫描电子显微镜,日本日立;DK-98-A电热恒温水浴锅,金西盟北京仪器有限公司;柯尼卡美能达CM-5分光测色计,

日本柯尼卡美能达公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 花椒籽种皮黑色素粗提物的制备

称取一定量花椒籽,粉碎后按料液比1:3(W/V)加入石油醚进行一次脱脂,即浸泡脱脂24h后,抽滤后挥干石油醚;再进一步将其粉碎过60目筛,按上述方法进行二次脱脂,即得本试验用花椒籽脱脂粉。

准确称取一定量上述花椒籽脱脂粉,按料液比1:20(W/V)加入1.2 mol/L NaOH溶液,70℃水浴浸提2h后,6000 r/min离心15 min,用2 mol/L HCl调上清液pH至2.0,使其形成絮状沉淀析出,室温静置10 h,6000 r/min离心15 min,沉淀用蒸馏水洗涤至流出液为中性,真空冷冻干燥,得花椒籽种皮黑色素粗提物(melanin crude extract of pepper seed coat, MCEP),避光置于干燥器中备用。

#### 1.3.2 MCEP的纯化方法

##### 1.3.2.1 盐酸水解法

参照Sun<sup>[21]</sup>方法稍作修改。准确称取一定量MCEP于烧杯中,将7 mol/L HCl溶液按料液比1:30(W/V)加入,沸水浴水解2h后,收集未水解花椒籽种皮黑色素固体颗粒;沉淀依次用三氯甲烷、乙酸乙酯、无水乙醇振荡洗涤30 min,反复上述操作直至每种有机溶剂洗涤后上清液无色;再将上述得到的花椒籽种皮黑色素溶解于1 mol/L NaOH溶液中,6000 r/min离心15 min,用2 mol/L HCl调上清液pH至2.0,静置30 min,6000 r/min离心15 min,收集沉淀,如此反复碱溶酸沉处理3次后,沉淀用蒸馏水洗涤至洗脱液为中性,真空冷冻干燥,得盐酸水解法纯化制备的花椒籽种皮黑色素SMP。

##### 1.3.2.2 酶解法

准确称取1.0 g MCEP于烧杯中,按料液比1:2(W/V)溶解于磷酸缓冲液(pH 8.0)中,加入0.5 g碱性蛋白酶,60℃酶解4h后,立即冷却,调pH至4.5,再加入0.5 g糖化酶,60℃酶解4h后,灭酶(80℃,10 min)。用2 mol/L HCl调上清液pH至2.0,静置30 min,6000 r/min离心15 min,沉淀依次用三氯甲烷、乙酸乙酯、无水乙醇振荡洗涤30 min,反复上述操作直至每种有机溶剂洗涤后上清液无色;再将上述得到的花椒籽种皮黑色素溶解于1 mol/L NaOH溶液中,6000 r/min离心15 min,用2 mol/L HCl调上清液pH至2.0,静置30 min,6000 r/min离心15 min,收集沉淀,如此反复碱溶酸沉处理3次后,沉淀用蒸馏水洗涤至洗脱液为中性,真空冷冻干燥,得酶解法纯化制备的花椒籽种皮黑色素EMP。

### 1.3.2.3 有机溶剂萃取法

准确称取一定量 MCEP 于烧杯中,依次用三氯甲烷、乙酸乙酯、无水乙醇振荡洗涤 30 min (每次有机溶剂用量为 MCEP 质量的 30 倍),反复上述操作直至每种有机溶剂洗涤后上清液无色;将上述处理得到的花椒籽种皮黑色素溶解于 1 mol/L NaOH 溶液中,6000 r/min 离心 15 min,用 2 mol/L HCl 调上清液 pH 至 2.0,静置 30 min,6000 r/min 离心 15 min,收集沉淀,如此反复碱溶酸沉处理 3 次后,沉淀用蒸馏水洗涤至洗脱液为中性,真空冷冻干燥,得有机溶剂萃取法纯化制备的花椒籽种皮黑色素 OMP。

### 1.3.2.4 碱溶酸沉法

按料液比 1:2 (W/V) 将一定量 MCEP 溶解于 1 mol/L NaOH 溶液中,6000 r/min 离心 15 min,用 2 mol/L HCl 调上清液 pH 至 2.0,静置 30 min,6000 r/min 离心 15 min,收集沉淀,如此反复碱溶酸沉处理 3 次后,沉淀用蒸馏水洗涤至洗脱液为中性,真空冷冻干燥,得碱溶酸沉法纯化制备的花椒籽种皮黑色素 AMP。

## 1.3.3 MP 的纯化效果表征

### 1.3.3.1 色值

用色差仪分别测定 MCEP、SMP、EMP、OMP 和 AMP 的色值。色差仪经标准黑板、白板校正后,对置于透明比色皿中的 MP 进行检测,其色值采用  $L^*$ 、 $a^*$  和  $b^*$  表示,其中: $L^*$  表示亮度, $a^*$  表示红绿, $b^*$  表示黄蓝, $\Delta E^*$  表示色差。

### 1.3.3.2 紫外-可见光谱

分别称取适量 MCEP、SMP、EMP、OMP 和 AMP 冻干粉,用 0.1 mol/L NaOH 溶解使其浓度均为 50 mg/L,并分别在 200~800 nm 波长范围内进行全波长扫描,空白对照为 0.1 mol/L NaOH 溶液。

### 1.3.3.3 红外光谱

采用溴化钾压片法<sup>[22]</sup>。分别将 MCEP、SMP、EMP、OMP、AMP 与溴化钾按 1:100 比例混合均匀,在玛瑙研钵中研成细粉进行压片。通过傅里叶变换红外光谱仪在室温下以空气为背景,光谱测量范围为 4000~400  $\text{cm}^{-1}$ ,光谱分辨率为 4  $\text{cm}^{-1}$ ,测定其红外吸收光谱。

### 1.3.3.4 色价<sup>[23]</sup>

分别准确称取 0.1 g MCEP、SMP、EMP、OMP 和 AMP,用磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液 (pH 8.0) 将其溶解,并定容至 100 mL 作为母液试样。再吸取 1.0 mL 母液试样用缓冲液定容至 100 mL 作为待测样,在 220 nm 波长下测定稀释后样品溶液的吸光度。色价计算公式如式 (1):

$$E_{1\text{cm}}^{1\%}(220\text{nm}) = \frac{A \times f}{m} \quad (1)$$

式中: $E_{1\text{cm}}^{1\%}(220\text{nm})$  为样品的色价 (U/g);  $A$ : 样品溶液在最大吸收波长下的吸光度;  $f$ : 样品的稀释倍数;  $m$ : 称取样品的质量 (g)。

### 1.3.3.5 扫描电子显微镜 (Scanning Electron Microscope, SEM)

分别将 MCEP、SMP、EMP、OMP 和 AMP 用导电双面胶粘在样品座上,将样品座置于离子溅射仪中,在氮气环境下用离子溅射发在样品表面喷射一层 10~20 nm 厚铂金膜,通过 S-3400N 扫描电镜对制备好的样品通过调节电镜至最适拍摄视野,分别调整放大倍数 400 和 2000 倍,观察其扫描电镜图像并拍摄记录。

## 1.4 数据处理

以上试验均重复三次,结果以平均值±标准差表示,采用 Origin 8.0 进行相关图表的绘制,采用 Minitab 16 软件进行方差分析,多重比较采用 Tukey,显著水平  $p < 0.05$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同纯化方法对 MP 色值的影响

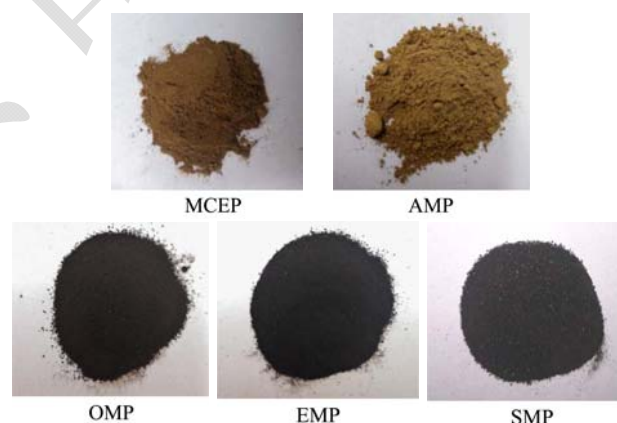


图 1 不同纯化方法制备的 MP 外观颜色

Fig.1 Appearance color of MP prepared by different purification methods

花椒籽脱脂粉经碱溶酸沉提取制备的 MCEP 得率为 9.3%,且经不同纯化方法制备的 AMP、OMP、EMP 和 SMP 得率分别为 78.2%、56.5%、43.3%、38.7%,SMP 得率最低,可能是与黑色素相互连接的蛋白质、多糖和脂质等杂质通过盐酸水解处理后,杂质去除更加彻底的原因。由表 1 可知,MCEP 分别经碱溶酸沉法、有机溶剂萃取法、酶解法以及盐酸水解法处理后,MP 颜色均逐渐加深, $\Delta E^*$  值依次增大,且差异显著 ( $p < 0.05$ )。其中 EMP 与 SMP 的  $L^*$  值均显著低于

MCEP(41.93)、AMP(41.93)和 OMP(23.39)( $p < 0.05$ ), 但 EMP 与 SMP 的  $L^*$  值差异不显著 ( $p > 0.05$ ), 且 SMP 的  $a^*$  与  $b^*$  值显著低于 EMP ( $p < 0.05$ ), 表明盐酸水解法与酶解法纯化制备的 MP 颜色更趋近于黑色, 黑色素富集更多, 纯化效果相比其余两种方法更好, 但

SMP 与 EMP 在红绿与黄蓝色调方面仍存在差异<sup>[24]</sup>。此外, 通过观察 MP 粉末颜色 (图 1) 发现, 仅 SMP 带有金属光泽, 呈深黑色无定型粉末, 而其他 MP 均无金属光泽。由此可见, 盐酸水解法制备 MP 是一种有效的纯化方法。

表 1 不同纯化方法对 MP 色值的影响

Table 1 Effect of different purification methods on the color value of MP

样品	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$\Delta E^*$	颜色
MCEP	41.93±0.25 <sup>a</sup>	12.28±0.05 <sup>a</sup>	25.85±0.14 <sup>a</sup>	-	棕黄色
AMP	38.34±0.15 <sup>b</sup>	9.89±0.03 <sup>b</sup>	23.46±0.08 <sup>b</sup>	4.93±0.06 <sup>a</sup>	棕黄色
OMP	23.39±1.64 <sup>c</sup>	6.92±0.39 <sup>c</sup>	11.02±0.55 <sup>c</sup>	24.34±0.07 <sup>b</sup>	深棕色
EMP	17.67±0.22 <sup>d</sup>	5.41±0.19 <sup>d</sup>	7.42±0.25 <sup>d</sup>	31.23±0.19 <sup>c</sup>	棕黑色
SMP	16.82±0.16 <sup>d</sup>	3.04±0.16 <sup>e</sup>	4.09±0.17 <sup>e</sup>	34.49±0.16 <sup>d</sup>	黑色, 有金属光泽

注: 同列肩标不同小写字母表示差异显著 ( $p < 0.05$ )。

## 2.2 MP 的紫外-可见光谱分析

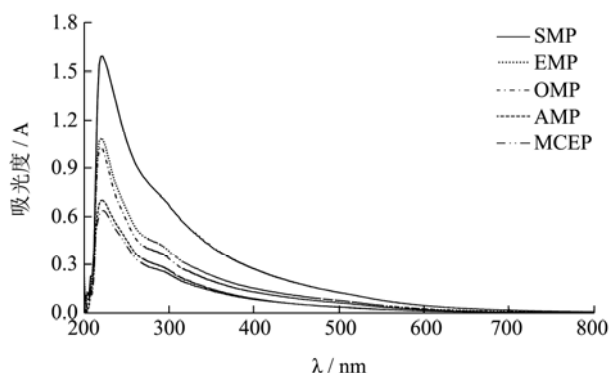


图 2 MP 的紫外-可见光谱图

Fig.2 Ultraviolet-Visible spectrum of MP

由图 2 可知, MCEP 与 AMP、OMP、EMP 和 SMP 的紫外-可见光谱均在紫外区 220 nm 处有最大吸收峰, 且从最大吸收峰位置开始, 随着波长的增加其吸光度值逐渐降低, 表明黑色素分子结构中存在较多复杂共扼结构, 这与其他有关花椒籽黑色素的紫外-可见光谱结果一致<sup>[19]</sup>, 符合典型的黑色素特征, 这进一步表明四种纯化方法均未对 MP 结构造成显著破坏。对比发现 MP 最大吸收波长与其他植物黑色素存在差异, 如黑芝麻黑色素 (228 nm)<sup>[25]</sup>、桂花种皮黑色素 (205 nm)<sup>[26]</sup>、灵芝黑色素 (212 nm)<sup>[27]</sup>, 这可能是黑色素所在溶液 pH 不同或不同来源黑色素结构存在微小差异引起的<sup>[21]</sup>。此外, 除 MCEP、AMP、OMP、EMP 外, SMP 在 260 nm 和 280 nm 处没有明显吸收峰, 表明其不含核酸、蛋白等杂质。从光密度角度来看, 在相同质量浓度条件下, MCEP、AMP、OMP、EMP 与 SMP 在 220 nm 处的吸光度依次增大, 进一步表明盐酸水解法纯化制备的 MP 富集最多, 纯度最高, 纯化效果最好, 其次是酶解法、有机溶剂萃取法和碱

溶酸沉法。

由 MP 吸光度对数值对波长作图结果 (图 3) 可知, MCEP 与 AMP、OMP、EMP 和 SMP 溶液吸光度对数值对波长作图均得一条斜率为负的直线, 且斜率依次为 -0.0084、-0.0086、-0.0085、-0.0083 和 -0.008。据报道, 不同来源的天然黑色素光密度曲线的对数函数也均具有这种负斜率值<sup>[28]</sup>, 说明四种纯化方法制备的 MP 具有典型的黑色素特征, 属天然黑色素。

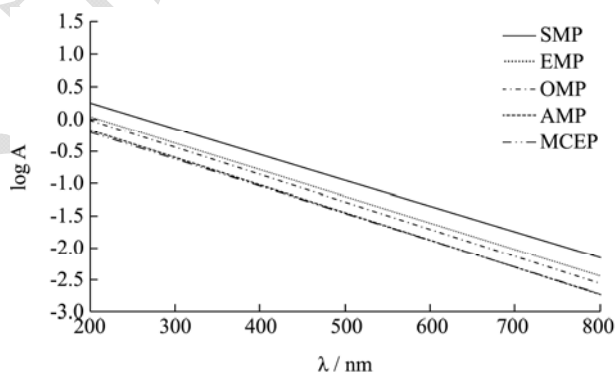


图 3 MP 的吸光度对数值对波长作图

Fig.3 A plot of the logarithm of the absorbance versus wavelength of MP

## 2.3 MP 的色价分析

由不同纯化方法制备的 MP 色价结果 (图 4) 可知, 经碱溶酸沉法、有机溶剂萃取法、酶解法以及盐酸水解法四种纯化方法制备的 MP 色价均显著高于 MCEP (151.25 U/g) ( $p < 0.05$ ), 其中 SMP 色价最高, 为 341.73 U/g, 其次是 EMP、OMP 和 AMP, 且与 MCEP 相比, 其色价值分别显著提高了 79.13%、41.78%、42.0%和 39.94% ( $p < 0.05$ ), 表明不同纯化处理均可改善 MP 纯度, 且盐酸水解法纯化效果最好, 这可能是盐酸水解作用相比其他三种纯化方法能更有

效去除与黑色素紧密结合的蛋白质、碳水化合物以及脂质等杂质<sup>[29]</sup>, 黑色素纯度最高而使其色价最大。此外, SMP 色价显著高于其他植物黑色素色价, 如桂花种皮黑色素色价为 60.24 U/g<sup>[3]</sup>, 阴香果皮黑色素色价为 65.21 U/g<sup>[30]</sup>, 黑芝麻黑色素色价为 326 U/g<sup>[25]</sup>。由此可见, MP 是一种具有开发应用潜力的天然黑色素资源。

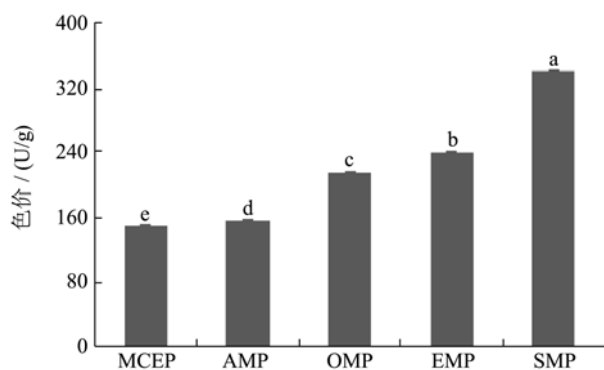


图4 不同纯化方法对MP色价的影响

Fig.4 Effect of different purification methods on the color value of MP

注: 小写字母不同表示差异显著( $p < 0.05$ )。

## 2.4 MP 的红外光谱分析

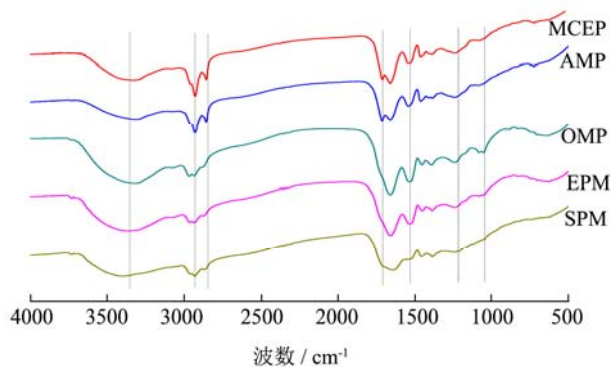


图5 MP 的红外光谱图

Fig.5 The infrared spectroscopy of MP

红外光谱通常可提供化合物官能团、化合物类别等信息, 是一种化合物结构鉴定的有效检测手段, 因此, 可用于分析不同来源黑色素的结构差异。图5显示MCEP与四种纯化方法制备的MP的红外光谱波形基本一致, 特征峰所处位置较为接近, 表明其结构具有类似的官能团。由于黑色素大分子结构的复杂性, 其红外光谱呈一系列宽而强的吸收峰, 可以看出MCEP与AMP、OMP、EMP和SMP均在3400~3200  $\text{cm}^{-1}$ 和1650~1600  $\text{cm}^{-1}$ 处具有吸收峰, 与报道的天然黑色素红外光谱特征相符<sup>[31,32]</sup>。在3400~3200  $\text{cm}^{-1}$ 处宽而强的共振吸收峰, 是由MP结构中-OH和-NH伸缩振动引起的, -OH和-NH间氢键连接可能使其吸收

峰显得宽而强; 在2920  $\text{cm}^{-1}$ 左右较小的吸收峰, 属于烷烃结构中C-H的伸缩振动; 在1650  $\text{cm}^{-1}$ 与1410  $\text{cm}^{-1}$ 附近较强的吸收峰, 是由芳香环中C=C伸缩振动和羧基外C=O伸缩振动引起的, 表明MP结构中可能存在-COOH与苯环; 此外, 在1378  $\text{cm}^{-1}$ 与1006  $\text{cm}^{-1}$ 左右的吸收峰是因C-CH<sub>3</sub>弯曲或骨架振动参与引起的; 600~700  $\text{cm}^{-1}$ 范围弱的吸收峰, 表明苯环被取代, 形成共轭体系。对比分析MCEP与不同纯化方法制备的MP发现, MCEP经盐酸水解法、酶解法和有机溶剂萃取法处理后, 在2920  $\text{cm}^{-1}$ 与2850  $\text{cm}^{-1}$ 处反映C-H和C-H<sub>2</sub>烷烃结构的吸收峰明显减弱或消失, 表明除碱溶酸沉纯化方法外, 其它三种纯化方法均能去除MCEP中的多糖、脂质等杂质。

## 2.5 MP 的微观结构分析

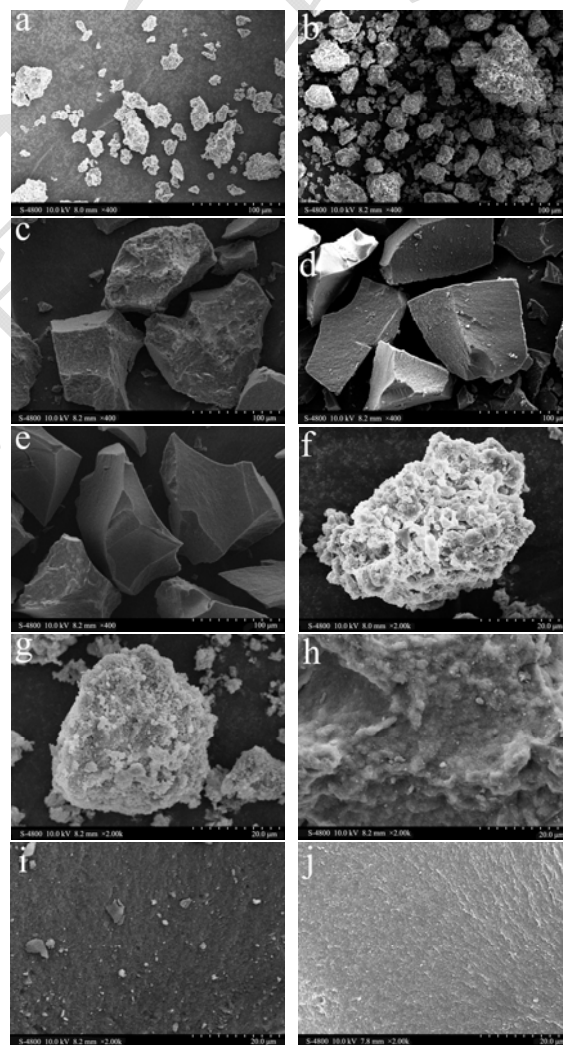


图6 MP 的扫描电子显微镜图

Fig.6 Scanning electron micrographs of MP

注: a、f: MCEP; b、g: AMP; c、h: OMP; d、i: EMP; e、j: SMP; a-e:  $\times 400$ 倍, f-j:  $\times 2000$ 倍。

为分析四种纯化方法制备的MP微观结构, 利用

扫描电镜分别对 MCEP、AMP、OMP、EMP 和 SMP 进行不同倍数的成像观察(如图 6)。比较 5 组样品的微观结构,发现不同纯化方法制备的 MP 微观形态不同。MCEP 呈分散的无规则颗粒状,表面黏连有部分球状和块状结构;AMP 呈分散的无规则颗粒状分布,而相较于 MCEP,其表面存在的球状与块状结构明显减少,但仍不平整;OMP 呈无规则块状结构,表面呈山脊状且较为致密,并存在部分空腔;EMP 呈无规则块状结构,表面致密无空洞,且黏附有少量颗粒状结构;SMP 也呈无规则块状结构,表面层次不齐,致密无空洞,且无其他形状结构存在,与报道的其他天然黑色素结构一致<sup>[33,34]</sup>。这可能是有机溶剂萃取有效去除了黑色素中的一些脂溶性成分,而对其紧密黏连的部分蛋白质、多糖等去除效果较差,故 OMP 表面结构呈现出与蛋白质微观结构类似的山脊状结构;而酶解可去除黑色素中蛋白质、碳水化合物等杂质,使黑色素呈现出致密的表面,但温和的酶解条件及酶的专一性可能对部分与黑色素紧密结合的蛋白质、脂质及碳水化合物等杂质去除不完全,使 EMP 表面结构仍存在一些颗粒状杂质;而盐酸水解能有效地去除与黑色素紧密连接的蛋白质、碳水化合物和脂质等杂质,使黑色素呈现出其致密、均一而不光滑的表面。

值得注意的是,尽管 AMP 呈现出与 MCEP 相似的颗粒状结构,但 AMP 相比 MCEP 其颗粒结构更为紧密,同时 OMP、EMP 与 SMP 也均呈现较 MCEP 与 AMP 更大的无规则块状结构,表明 MP 发生了轻微聚集;同样在 $\times 2000$ 放大倍数下观察不同处理后 MP 的微观结构,发现 MCEP 与 AMP 可呈现出完整的 MP 无规则颗粒状结构,而 OMP、EMP 与 SMP 仅呈现出 MP 某一面的局部微观形态,表明相比 MCEP 与 AMP,OMP、EMP 和 SMP 发生了明显聚集,这可能是 MCEP 经有机溶剂萃取、酶解、盐酸水解纯化处理后,纯度提高,使结构中氢键连接更加紧密,MP 聚集形成了更大的结晶体。

基于以上结果可知,相较于其他三种纯化处理方法,盐酸水解法纯化制备 MP 的纯化效果最好,这与上述色值、紫外-可见光谱、色价以及红外光谱结果一致。

### 3 结论

通过比较盐酸水解法、酶解法、有机溶剂萃取法和碱溶酸沉法四种纯化处理方法制备 MP 的纯化效果,发现四种处理方法对 MP 的纯化效果存在显著差异。SMP 的  $L^*$ 、 $a^*$  与  $b^*$  值均显著低于 AMP、OMP 和 MCEP,且为黑色无定型粉末,并带有金属光泽;

SMP、EMP、OMP 和 AMP 在 220 nm 处均有最大吸收,在 260 nm 和 280 nm 处无核酸与蛋白等杂质吸收峰,且在相同质量浓度条件下,SMP 光密度值与色价均显著高于 AMP、OMP、EMP 和 MCEP;除 AMP 外,OMP、EMP 和 SMP 的红外光谱相比于 MCEP,在 C-H 与 C-H<sub>2</sub> 特征吸收带 2920 cm<sup>-1</sup> 与 2850 cm<sup>-1</sup> 处的吸收峰均明显减弱或消失。与 MCEP、AMP、OMP 和 EMP 的 SEM 结果相比,SMP 呈无规则块状结构,表面致密无空洞,且无其他物质形状结构存在。综上所述可知,盐酸水解法相比酶解法、有机溶剂萃取法和碱溶酸沉法能更有效地去除与黑色素紧密连接的蛋白质、碳水化合物及脂质等杂质,有效纯化 MCEP。本研究结果为后期 MP 的分离鉴定及其综合开发利用提供一定的理论基础。

### 参考文献

- [1] Galvan I, Jorge A. Dispersive Raman spectroscopy allows the identification and quantification of melanin types [J]. *Ecol Evol*, 2015, 5(7): 1425-1431
- [2] Eriksen N T. Production of phycocyanin-a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 80(1): 1-14
- [3] TAN M, GAN D, WEI L, et al. Isolation and characterization of pigment from *Cinnamomum burmannii* peel [J]. *Food Research International*, 2011, 44(7SI): 2289-2294
- [4] YAO Z Y, QI J H. Comparison of antioxidant activities of melanin fractions from Chestnut Shell [J]. *Molecules*, 2016, 21(4): 487
- [5] 董小华, 课敬璇, 申光辉, 等. 花椒籽黑色素体外抗氧化能力研究[J]. *中国油脂*, 2016, 41(8): 66-69  
DONG Xiao-hua, KE Jing-xuan, SHEN Guang-hui, et al. *In vitro* antioxidant capacity of melanin in pepper seeds [J]. *China Oils and Fats*, 2016, 41(8): 66-69
- [6] YE M, GUO G Y, LU Y, et al. Purification, structure and anti-radiation activity of melanin from *Lachnum* YM404 [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2014, 63: 170-176
- [7] SONG S, LI S, SU N, et al. Structural characterization, molecular modification and hepatoprotective effect of melanin from *Lachnum* YM226 on acute alcohol-induced liver injury in mice [J]. *Food & Function*, 2016, 7(8): 3617-3627
- [8] LU Y, YE M, SONG S, et al. Isolation, Purification, and Anti-Aging Activity of Melanin from *Lachnum singerianum* [J]. *Applied Biochemistry & Biotechnology*, 2014, 174(2):

- 762-771
- [9] ZHU H, HE C C, CHU Q H. Inhibition of quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* by pigments extracted from *Auricularia auricular* [J]. Letters in Applied Microbiology, 2011, 52(3): 269-274
- [10] 郑淑英. 乌饭树叶黑色素抗氧化性及其着色能力初步研究 [J]. 宁德师范学院学报(自然科学版), 2016, 28(2): 169-173  
ZHENG Shu-ying. Preliminary study on the antioxidant activity and coloring ability of melanin in leaves of wufan [J]. Journal of Ningde Normal University (Natural Science Edition), 2016, 28(2): 169-173
- [11] 刘晓娜, 蒋慧兰, 林广宇, 等. 香蕉皮中黑色素的提取及其对不同油脂的抗氧化作用研究 [J]. 现代食品, 2018, 8: 128-131  
LIN Xiao-na, JIANG Hui-lan, LIN Guang-yu, et al. Study on extraction of banana peel melanin and its antioxidative effects on different edible oils [J]. Modern Food, 2018, 8: 128-131
- [12] 马萍, 郭希娟, 郭增旺. 黑米黑色素微波辅助提取工艺优化 [J]. 食品与机械, 2014, 30(5): 229-231  
MA Ping, GUO Xi-juan, GUO Zeng-wang. Optimization on microwave-assisted extraction for melanin from black kernalled rice via quadratic regressive currency rotary design [J]. Food & Machinery, 2014, 30(5): 229-231
- [13] 任廷远. 花椒麻素对试验大鼠蛋白质合成与分解代谢影响的机制研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2017  
REN Ting-yuan. The effects and mechanisms of *Zanthoxylum* alkylamides on protein synthesis and catabolism in rats [D]. Chongqing: Southwest University, 2017
- [14] 杨沫, 薛媛, 任璐, 等. 不同粒度花椒籽黑种皮粉理化特性 [J]. 食品科学, 2018, 39(9): 47-52  
YANG Mo, XUE Yuan, REN Lu, et al. Physicochemical characteristics of black seed coat powders with different particle sizes of pepper (*Zanthoxylum bungeanum*) [J]. Food Science, 2018, 39(9): 47-52
- [15] 李荣, 贺学林, 徐怀德. 花椒籽黑色素提取和脱蛋白技术研究 [J]. 西北植物学报, 2008, 28(12): 2558-2563  
LI Rong, HE Xue-lin, XU Huai-de. Melanin isolation from *Zanthoxylum bungeanum* seeds and protein removal [J]. Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica, 2008, 28(12): 2558-2563
- [16] 徐文秀, 王鹏, 王晓燕. 正交法优化花椒籽黑色素提取工艺研究 [J]. 食品研究与开发, 2014, 6: 49-52  
XU Wen-xiu, WANG Peng, WANG Xiao-yan. Research on optimizing extraction method of prickly ash seed melanin by orthogonal array design tests [J]. Food Research and Development, 2014, 6: 49-52
- [17] 杨秀芳, 王改利, 马养民. 花椒籽种皮黑色素的提取纯化工艺 [J]. 贵州农业科学, 2013, 41(10): 149-153  
YANG Xiu-fang, WANG Gai-li, MA Yang-min. Extraction and purification technology for melanin in seed coat of chinese prickly ash [J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2013, 41(10): 149-153
- [18] 杨秀芳, 王改利, 马养民. 花椒籽种皮黑色素理化性质和抗氧化活性的研究 [J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2014, 35(1): 82-86  
YANG Xiu-fang, WANG Gai-li, MA Yang-min. Research on physical and chemical properties and antioxidant activity of melanin in seed coat of Chinese red pepper [J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science), 2014, 35(1): 82-86
- [19] 张伟, 吴博. 花椒籽黑色素化学结构的初步研究 [J]. 中国测试, 2017, 43(3): 49-52  
ZHANG Wei, WU Bo. Study on structure characteristics of Chinese prickly ash melanin [J]. China Measurement & Test, 2017, 43(3): 49-52
- [20] 姚增玉. 山杏种皮黑色素提取及其性质研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2007  
YAO Zeng-yu. Isolation and characterization of melanin from testae of wild apricots [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2007
- [21] SUN S, ZHANG X, SUN S, et al. Production of natural melanin by *Auricularia auricular* and study on its molecular structure [J]. Food Chemistry, 2016, 190: 801-807
- [22] XIN C, MA J, TAN C, et al. Preparation of melanin from *Catharsius molossus* L. and preliminary study on its chemical structure [J]. Journal of Bioscience & Bioengineering, 2015, 119(4): 446-454
- [23] 罗强, 杨雪果, 施宝珠, 等. 栓皮栎橡子壳色素理化性质和抗氧化活性 [J]. 食品科学, 2017, 38(11): 128-134  
LUO Qiang, YANG Xue-guo, SHI Bao-zhu, et al. Physicochemical properties and antioxidant activity of *Quercus variabilis* acorn shell pigment [J]. Food Science, 2017, 38(11): 128-134
- [24] 邹宇, 尹冬梅, 江洁, 等. 黑木耳黑色素组分分析及其抗氧化活性研究 [J]. 食品科学, 2013, 34(23): 138-141  
ZOU Yu, YIN Dong-mei, JIANG Jie, et al. Composition analysis and antioxidant activity of *Auricularia auricular* melanin [J]. Food Science, 2013, 34(23): 138-141
- [25] 康静静, 胡海威, 温文, 等. 响应面法优化黑芝麻黑色素的碱

- 提条件[J].中国食品添加剂,2014,4:92-97
- KANG Jing-jing, HU Hai-wei, WEN Wen, et al. Optimization of black pigment alkaline extraction from black sesame by response surface methodology [J]. China Food Additives, 2014, 4: 92-97
- [26] HUANG S, PAN Y, GAN D, et al. Antioxidant activities and UV-protective properties of melanin from the berry of *Cinnamomum burmannii* and *Osmanthus fragrans* [J]. Medicinal Chemistry Research, 2011, 20(4): 475-481
- [27] 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
- ZHANG Xiao-lin, CHEN Bo-wen, SUN Xiao-rui, et al. The response surface method to optimize the ultrasonic-assisted extraction of *Ganoderma lucidum* melanin [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2018, 32(3): 532-538
- [28] Selvakumar P, Rajasekar S, Periasamy K, et al. Isolation and characterization of melanin pigment from *Pleurotus cystidiosus* (telomorph of *Antromycopsis macrocarpa*) [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2008, 24(10): 2125-2131
- [29] SUN S, ZHANG X, CHEN W, et al. Production of natural edible melanin by *Auricularia auricula* and its physicochemical properties [J]. Food Chemistry, 2016, 196: 486-492
- [30] 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
- [31] 康静静.黑芝麻黑色素的分离及其结构性质的研究[D].南昌:南昌大学,2015
- KANG Jing-jing. Study of the extraction, purification, structural characteristics and physicochemical property of black pigment from semen sesami nigrum [D]. Nanchang: Nanchang University, 2015
- [32] 刘显威,刘淑集,张学勤,等.响应面法优化鱿鱼墨黑色素的制备工艺[J].海南大学学报(自然科学版),2016,34(1):25-32
- LIU Xian-wei, LIU Shu-ji, ZHANG Xue-qin, et al. Optimization of melanin preparation conditions from squid ink by response surface methodology [J]. Natural Science Journal of Hainan University (Natural Science), 2016, 34(1): 25-32
- [33] YE M, CHEN X, LI G W, et al. Structural characteristics of pheomelanin-like pigment from *Lachnum singerianum* [J]. Advanced Materials Research, 2011, 284-286: 1742-1745
- [34] Araujo M, Xavier J R, Nunes C D, et al. Marine sponge melanin: A new source of an old biopolymer [J]. Structural Chemistry, 2012, 23(1): 115-122

(上接第 136 页)

- [11] 宋健飞,刘斌,吴子健,等.冰温及冰温气调贮藏对冬枣品质的影响[J].制冷学报,2016,37(5):70-74
- SONG Jian-fei, LIU Bin, WU Zi-jian, et al. Effect of ice temperature and air controlling ice temperature (ACIT) on quality of winter jujube [J]. Journal of Refrigeration, 2016, 37(5): 70-74
- [12] Tokizawa K, Sawada S, Oka T, et al. Fan-precooling effect on heat strain while wearing protective clothin [J]. International Journal of Biometeorology, 2014, 58(9): 1919-1925
- [13] Lópezzuruëña E, Alvarez M, Gomesalves S, et al. Tolerance of brown bear spermatozoa to conditions of pre-freezing cooling rate and equilibration time [J]. Theriogenology, 2014, 81(9): 1229-1238
- [14] 杜娟,廖新福,热比古丽,等.冰水预冷对采后甜瓜品质的影响[J].新疆农业科学,2016,53(5):812-819
- DU Juan, LIAO Xin-fu, Rebiguli, et al. Effect of pre-cooling on postharvest quality of melons [J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2016, 53(5): 812-819
- [15] Hitchcock T M, Akbar M. Effect of heat extraction from a photovoltaic module by natural and forced air circulation with and without pre-cooling of air [J]. Journal of Vacuum Science & Technology B, 2014, 17(3): 1195-1199
- [16] 宋慕波,方方,陈振林,等.不同贮藏方式对马蹄贮藏品质的影响[J].食品研究与开发,2016,37(23):178-183
- SONG Mu-bo, FANG Fang, CHEN Zhen-lin, et al. Effects of different storage methods on the postharvest quality of water chestnut [J]. Food Research and Development, 2016, 37(23): 178-183
- [17] Riera F, Trong T T, Rinaldi K, et al. Precooling does not enhance the effect on performance of midcooling with ice-slush/menthol [J]. International Journal of Sports Medicine, 2016, 37(13): 1025-1031
- [18] 甄凤元,乔勇进,高春霞,等.二氧化氯气体处理对杭白菜贮藏品质的影响[J].核农学报,2017,31(7):1323-1329
- ZHEN Feng-yuan, QIAO Yong-jin, GAO Chun-xia, et al. Effect of chlorine dioxide gas on preservation of Hangzhou cabbage [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2017, 31(7): 1323-1329



现代食品科技