

黑木耳黑色素提取工艺与来源对其 UV-Vis 光谱及抗氧化活性的影响

李玉玲, 陈佳雯, 刘昆昂, 马宏, 张根伟, 李书生

(河北省科学院生物研究所 石家庄 050000)

摘要: 黑木耳(*Auricularia heimuer*)是一种传统的药食同源真菌,富含的黑色素具有抗氧化、抗肿瘤及免疫调节等多种生物活性。为促进黑木耳资源的高效开发与利用,本研究以黑色素得率、UV-Vis 光谱特征及抗氧化活性为指标对不同提取工艺及来源获得的黑木耳黑色素进行综合分析评价。结果表明,酶解法是黑木耳子实体黑色素提取的最佳方法,采用酶解法获得的黑色素得率最高(9.49%),体外抗氧化活性最强,2.0 mg·mL⁻¹的黑色素对 DPPH、ABTS⁺和 O₂·⁻的清除率分别为 80.08%、82.87%、63.47%;从液体发酵液中提取的黑色素对 DPPH、O₂·⁻的清除率均最高,样品浓度为 2.0 mg·mL⁻¹时,清除率分别为 98.52%和 80.61%,UV-Vis 光谱与黑色素标准品相近。本研究可为黑木耳黑色素的高效提取技术优化及功能产品开发提供重要的理论依据。

关键词: 黑木耳;黑色素;提取工艺;黑色素来源;抗氧化活性

中图分类号:S646.6

文献标志码:A

文章编号:1673-2871(2025)10-178-11

Effects of extraction process and source of *Auricularia heimuer* melanin on its UV-Vis spectrum and antioxidant activity

LI Yuling, CHEN Jiawen, LIU Kun'ang, MA Hong, ZHANG Genwei, LI Shusheng

(Institute of Biology, Hebei Academy of Sciences, Shijiazhuang 050000, Hebei, China)

Abstract: *Auricularia heimuer* is a traditional edible and medicinal fungus, and its melanin exhibits diverse biological activities, including antioxidant, antitumor, and immunomodulatory properties. To promote the efficient development and utilization of *A. heimuer* resources, this study systematically evaluated melanin extracted from different sources and by various methods based on yield, UV-Vis spectral characteristics, and *in vitro* antioxidant activity. The results demonstrated that enzymatic hydrolysis was the optimal method for extracting melanin from fruiting bodies, achieving the highest yield (9.49%) and exhibiting the strongest antioxidant capacity. At a concentration of 2.0 mg·mL⁻¹, the melanin scavenged DPPH, ABTS⁺, and O₂·⁻ with efficiencies of 80.08%, 82.87%, and 63.47%, respectively. In contrast, melanin derived from liquid fermentation broth exhibited superior scavenging activity against DPPH and O₂·⁻, when the sample concentration was 2.0 mg·mL⁻¹, the scavenging rates were 98.52% and 80.61%, respectively, and displayed UV-Vis spectral features most similar to those of the standard melanin reference. These findings provide a solid theoretical foundation for optimizing the extraction of *A. heimuer* melanin and advancing its application in functional product development.

Key words: *Auricularia heimuer*; Melanin; Extraction method; Melanin source; Antioxidant activity

黑木耳(*Auricularia heimuer*)是一种传统的药食同源真菌,富含多糖、黑色素和多酚等生物活性成分,具有抗氧化、降血糖、保护心血管、抗肿瘤和提高免疫力等多种功能^[1-6]。黑木耳以“黑”出名,黑色素是其重要的功能活性成分之一。黑色素可分为天然黑色素和合成黑色素。相较于合成黑色素

制备工艺复杂且具有一定毒性的特点,天然黑色素广泛存在于动物、植物、真菌和细菌中,具有高度的安全性^[7-9]。真菌产生的黑色素是一种由吲哚或酚类化合物通过氧化聚合而成的多功能色素。不仅具备可持续生产和可生物降解的优势,还被证实能够保护有机体免受生物与非生物胁迫的影响^[8,10-12]。

收稿日期:2024-12-31;修回日期:2025-05-21

基金项目:河北省科学院高层次人才培养资助项目(2022003)

作者简介:李玉玲,女,硕士,研究方向为食用菌育种及分子机制。E-mail:liyuling031200@163.com

通信作者:刘昆昂,女,副研究员,研究方向为食用菌育种及分子机制。E-mail:liukunang@163.com

近年来,随着天然活性物质研究的不断深入,黑木耳色素的多种生物学功能逐步被揭示,其在基础研究与产业应用中的潜力已成为跨学科关注的焦点。研究表明,黑木耳色素不仅具有抗氧化、抗肿瘤和保肝等生物学活性,还因其安全、天然的特性,在食品工业中展现出“天然色素+抗氧化剂”的双重应用优势,在医学、功能食品以及化妆品领域都具有广阔的应用前景^[4,6,13-17]。

目前,黑木耳色素的提取方法多样。楚福英等^[18]采用“先酸沉后碱溶再酸沉”的工艺提取黑木耳色素,并进一步研究其对小鼠肠道菌群的影响,本研究中简称为“先酸后碱法”;Hou等^[19]则采用“先碱溶后酸沉”的方法,从黑木耳子实体中提取黑色素,并分析了其对小鼠肝功能的保护作用,本研究中简称为“先碱后酸法”。然而在提取过程中,若反应环境过酸或过碱,都会使反应过于强烈;此外,提取时间过长不仅会影响黑色素的化学结构与功能,甚至可能产生新物质^[19]。相较强酸强碱直接提取方式,酶解法可迅速破坏黑木耳细胞壁,提高黑色素的提取率,实现活性物质高效提取^[20]。基于此,本研究旨在探究不同提取工艺对黑木耳子实体中色素得率、抗氧化活性和UV-Vis光谱的影响,以筛选出得率高且活性优的高效提取方法。

此外,黑木耳色素可来源于子实体、固体发酵产物和液体发酵等途径,不同来源的黑色素在结构、生物活性、螯合金属离子及药物负载特性等方面可能存在差异^[21];若明确这些活性差异,即可根据具体应用需求进行针对性筛选与工艺优化。本研究通过对黑木耳的液体发酵液、液体发酵湿菌丝、固体发酵产物及子实体等4种不同来源的黑色素进行提取,并对其UV-Vis光谱及抗氧化活性进行综合分析,为进一步优化和完善黑木耳色素的开发与应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

黑木耳Y9为河北省科学院生物研究所食用菌研究室通过诱变获得的黑木耳菌株。

1.2 主要试剂

溶壁酶购自广东省科学院微生物研究所;黑色素标准品(M8631)购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;二甲基亚砜(D806645)、过硫酸钾(P823296)均购自上海麦克林生化科技股份有限公司;维生素C(A8100)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼

(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)(D9370)、2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS](A9590)、邻苯三酚(IP3200)均购自北京索莱宝科技有限公司;HCl购自北京化工厂有限责任公司;NaOH、无水乙醇均为分析纯,购自天津欧博凯化工有限公司;Tris-HCl(R21888)购自上海源叶生物科技有限公司。

1.3 供试培养基

液体发酵培养基^[22]:62.5 g 麦麸 60 °C水浴 5 h,煮沸 30 min,过滤得麸皮水,添加 1.6 g 酪氨酸粉末、0.1 g 硫酸铜,定容至 1 L。固体发酵培养基^[23]:62.5 g 麦麸 60 °C水浴 5 h,煮沸 30 min,过滤得麸皮水,添加 1.6 g 酪氨酸粉末、0.1 g 硫酸铜、15 g 琼脂粉,定容至 1 L。

1.4 方法

黑木耳Y9于2024年1月接种,同年5-7月采摘,培养及采摘均在河北盛滨农业发展股份有限公司进行。2024年8-10月在河北省科学院生物研究所食用菌室进行黑木耳子实体黑色素不同提取工艺、体外抗氧化能力及UV-Vis扫描试验,以及黑木耳不同来源黑色素提取、体外抗氧化能力和UV-Vis扫描试验。

1.4.1 黑木耳子实体黑色素的提取方法 将采下的全部Y9鲜木耳平铺至晾晒网上,自然阳光晒干,完全随机选取干木耳400 g磨粉过80目筛备用。

先碱后酸法:根据Hou等^[19]的方法稍作调整,取20 g干燥子实体粉末,按料液比1:30添加1.5 mol·L⁻¹ NaOH,200 W超声提取1 h,9000 r·min⁻¹离心10 min取上清液;上清液添加6 mol·L⁻¹ HCl调pH至1.5,80 °C水浴10 h,9000 r·min⁻¹离心10 min取沉淀,重复离心2~3次得粗黑色素,自然风干,得粗黑色素粉末,3次重复。

先酸后碱法:根据楚福英等^[18]的方法稍作调整,取20 g干燥子实体粉末,按料液比1:20添加3 mol·L⁻¹ HCl,80 °C水浴1.5 h;浸出液添加1.5 mol·L⁻¹ NaOH调pH至12,200 W超声提取1 h,9000 r·min⁻¹离心10 min,取上清液;上清液添加6 mol·L⁻¹ HCl调pH至1.5,80 °C水浴10 h,9000 r·min⁻¹离心10 min,取沉淀,重复离心2~3次得粗黑色素,自然风干,得粗黑色素粉末,3次重复。

酶解法:根据侯若琳等^[24]的方法稍作调整,取20 g干燥子实体粉末,酶底占比1.1%,按料液比1:20添加醋酸钠缓冲溶液(pH=5),30 °C酶解

2 h, 9000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 去上清液; 沉淀按料液比 1:30 加入 1.5 mol·L⁻¹ NaOH 溶液, 超声 200 W 下提取 1 h, 9000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 收集黑色素提取液; 提取液加 6 mol·L⁻¹ HCl 调 pH 至 1.5, 80 °C 水浴 10 h, 9000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 重复离心 2~3 次得粗黑色素, 自然风干, 得粗黑色素粉末, 3 次重复。

1.4.2 黑木耳子实体黑色素清除能力的测定 DPPH 清除率的测定^[24]: 分别以不同浓度维生素 C 为阳性对照, 吸取 100 μL 0.2 mmol·L⁻¹ DPPH 无水乙醇溶液和 100 μL 待测样品(将 2.1 所得黑色素粗品稀释至 0.5、1.0、1.5、2.0 mg·mL⁻¹, 比较不同浓度样品与维生素 C(VC)的 DPPH 清除率差异, 以及 1 mg·mL⁻¹ 样品与黑色素标准品 DPPH 清除率差异, 下同)于 96 孔板, 混匀后避光室温保存 30 min, 使用酶标仪(SpectraMax Plus 384, 美谷分子仪器有限公司)于 517 nm 下测定样品吸光度(D_x)。同时, 将样品溶液和 DPPH 无水乙醇溶液分别替换为等体积二甲基亚砜, 测吸光度 D_0 和 D_{x0} , 每组 3 次重复, 计算清除率。

$$\text{DPPH 清除率}/\%=[1-(D_x-D_{x0})/D_0]\times 100。$$

ABTS⁺清除率测定^[17]: 以不同浓度维生素 C 为阳性对照, 吸取 100 μL ABTS⁺工作液(7 mmol·L⁻¹ ABTS 溶液与 2.45 mmol·L⁻¹ 过硫酸钾溶液等体积混合, 静置 16 h 用乙醇溶液稀释至其在 734 nm 处吸光度为 0.70±0.02)和 100 μL 待测样品(0.5、1.0、1.5、2.0 mg·mL⁻¹)于 96 孔板, 混匀后避光室温保存 20 min, 于 734 nm 下测定样品吸光度 D_x 。同时, 将样品溶液和 ABTS⁺工作液分别替换为等体积二甲基亚砜, 测吸光度 D_0 和 D_{x0} , 每组重复 3 次, 计算清除率。

$$\text{ABTS}^+\text{清除率}/\%=[1-(D_x-D_{x0})/D_0]\times 100。$$

O₂^{·-}清除率测定^[25]: 以不同浓度维生素 C 为阳性对照, 取 1 mL 不同浓度(ρ , 后同)(0.5、1.0、1.5、2.0 mg·mL⁻¹)待测样品, 添加 3 mL 50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲溶液(pH=8.2), 混合后 25 °C 水浴加热 20 min, 添加 25 °C 预热的 7 mmol·L⁻¹ 的邻苯三酚 0.3 mL, 迅速混匀, 25 °C 水浴 4 min, 添加 1 mL 3 mol·L⁻¹ HCl 终止反应; 以二甲基亚砜替代邻苯三酚溶液矫零, 于波长 318 nm 处测定样品吸光度, 每组 3 次重复。 D_m 为待测样品吸光值, D_b 为二甲基亚砜替代待测样品的吸光值。

$$\text{O}_2^{\cdot-}\text{清除率}/\%=(1-D_m/D_b)\times 100。$$

1.4.3 黑木耳子实体黑色素紫外-可见光光谱的测定 将黑木耳黑色素样品稀释至浓度为

1.0 mg·mL⁻¹, 使用微量分光光度计(DS-500, 屹谱仪器制造(上海)有限公司), 在 200~600 nm 进行紫外-可见光(UV-Vis)扫描, 测定黑木耳黑色素的光谱特性。

1.4.4 不同来源黑木耳黑色素的提取 液体发酵液和湿菌丝样品制备: 使用 $\Phi=5$ mm 的打孔器从活化后的菌株 Y9 上打取 10 个菌饼, 接种至装有 20 mL 液体发酵培养基的瓶内, 25 °C 黑暗静置 3 d 后转至 25 °C 180 r·min⁻¹ 摇床培养 4 d, 后转至装有 220 mL 液体发酵培养基的瓶内, 25 °C 180 r·min⁻¹ 摇培 7 d, 过滤分别获得液体发酵液和湿菌丝样品。固体发酵样品制备: 使用 $\Phi=5$ mm 的打孔器从活化后的菌株 Y9 上打取菌饼, 接种至每皿定量 20 mL 的固体培养基中心, 25 °C 黑暗培养 15 d, 获得固体发酵样品。子实体干品制备同 2.1。

液体发酵液黑色素提取^[26]: 发酵液过滤除去菌丝, 取上清液加入 6 mol·L⁻¹ HCl 调 pH 至 2, 80 °C 水浴 10 h, 9000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取沉淀, 重复离心 2~3 次得粗黑色素, 自然风干, 得粗黑色素粉末。湿菌丝黑色素提取: 取 100 g 湿菌丝, 按料液比 1:10 加入 1.5 mol·L⁻¹ NaOH, 4 °C 冷藏过夜, 9000 r·min⁻¹ 离心 10 min 去除菌丝, 取上清液加入 6 mol·L⁻¹ HCl 调 pH 至 2, 80 °C 水浴 10 h, 9000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取沉淀, 重复离心 2~3 次得粗黑色素, 自然风干, 得粗黑色素粉末。固体发酵产物黑色素提取^[23]: 将长满菌丝的培养基研磨至匀浆, 加入 1.5 mol·L⁻¹ NaOH 200 W 超声提取 1 h, 9000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液加入 6 mol·L⁻¹ HCl 调 pH 至 2, 80 °C 水浴 10 h, 9000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取沉淀, 重复离心 2~3 次得粗黑色素, 自然风干, 得粗黑色素粉末。子实体黑色素提取: 同 2.1 酶解法。以上试验均 3 次重复。

1.4.5 不同来源黑木耳黑色素清除能力的测定 将液体发酵液、湿菌丝、固体发酵产物、子实体 4 种不同来源的黑木耳黑色素进行体外抗氧化能力(DPPH、ABTS⁺、O₂^{·-}清除率)的测定, 同试验方法 1.4.2。

1.4.6 不同来源黑木耳黑色素紫外-可见光光谱的测定 测定方法同 1.4.3。

1.5 数据处理与分析

采用 SPSS 26.0 软件进行数据统计, 采用单因素方差分析(one-way ANOVA)结合 Duncan 多重分析法检验不同处理间的差异显著性($P<0.05$); 采用 Excel 2021 绘制图表, 试验数据均为 3 次重复的平均值。

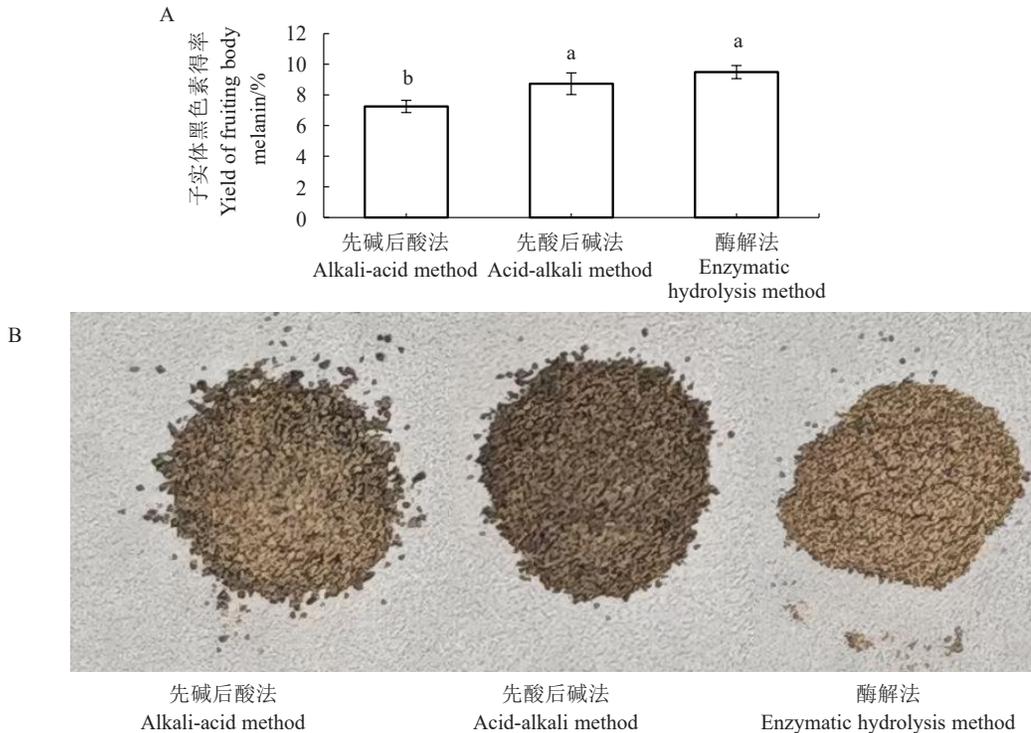
2 结果与分析

2.1 黑木耳子实体不同提取工艺黑色素得率及其生物学特性

2.1.1 黑木耳子实体不同提取工艺黑色素得率及颜色 由图 1-A 可知,使用先碱后酸法、先酸后碱法、酶解法提取黑木耳黑色素,得率分别为 7.25%、

8.73%、9.49%,由高到底依次为酶解法>先酸后碱法>先碱后酸法,其中先酸后碱法和酶解法黑色素得率均显著高于先碱后酸法,酶解法高于先酸后碱法,但差异不显著。如图 1-B 所示,不同提取工艺提取的黑色素粉末颜色有差异,先碱后酸法和酶解法呈黄棕色,先酸后碱法呈棕色。

2.1.2 黑木耳子实体不同提取工艺所得黑色素的



注:不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。下同。

Note: Different lowercase letters represent significant difference at 0.05 level. The same below.

图 1 黑木耳子实体不同提取工艺黑色素得率(A)及黑色素粉末颜色(B)

Fig. 1 *A. heimuer* fruiting body different extraction process melanin yield (A) and melanin powder color (B)

体外抗氧化能力 (1)不同提取工艺所得黑色素对 DPPH 的清除能力如图 2-A 所示。不同提取工艺所得黑色素对 DPPH 的清除率均随着黑色素样品浓度的增加而增加,当样品浓度为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时对 DPPH 的清除率均最高,先碱后酸法为 52.94%、先酸后碱法为 76.79%、酶解法为 80.08%,但均低于维生素 C,清除率由高到低依次为维生素 C>酶解法>先酸后碱法>先碱后酸法。

比较 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 黑色素样品溶液与 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 黑色素标准品溶液对 DPPH 的清除能力,如图 2-B 所示。先碱后酸法、先酸后碱法、酶解法黑色素样品溶液对 DPPH 清除率分别为 40.06%、63.80%、68.97%,均显著低于黑色素标准品溶液的清除率(97.89%)。

(2)黑木耳子实体不同提取工艺所得黑色素对 ABTS⁺的清除能力如图 3-A 所示。不同提取工艺所得黑色素对 ABTS⁺清除率均随着黑色素样品浓度的增加而增加,当黑色素样品浓度为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时清除率均最高,先碱后酸法为 75.03%、先酸后碱法为 81.20%、酶解法为 82.87%,但均低于维生素 C,清除能力由强到弱依次为维生素 C>酶解法>先酸后碱法>先碱后酸法。

比较 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 黑色素样品溶液与 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 黑色素标准品溶液对 ABTS⁺的清除能力如图 3-B 所示。先碱后酸法、先酸后碱法、酶解法黑色素样品溶液对 ABTS⁺的清除率分别为 69.23%、78.35%、80.30%,其中先酸后碱法和酶解法清除率均显著高于先碱后酸法,三者均显著低于黑色素标准品溶液

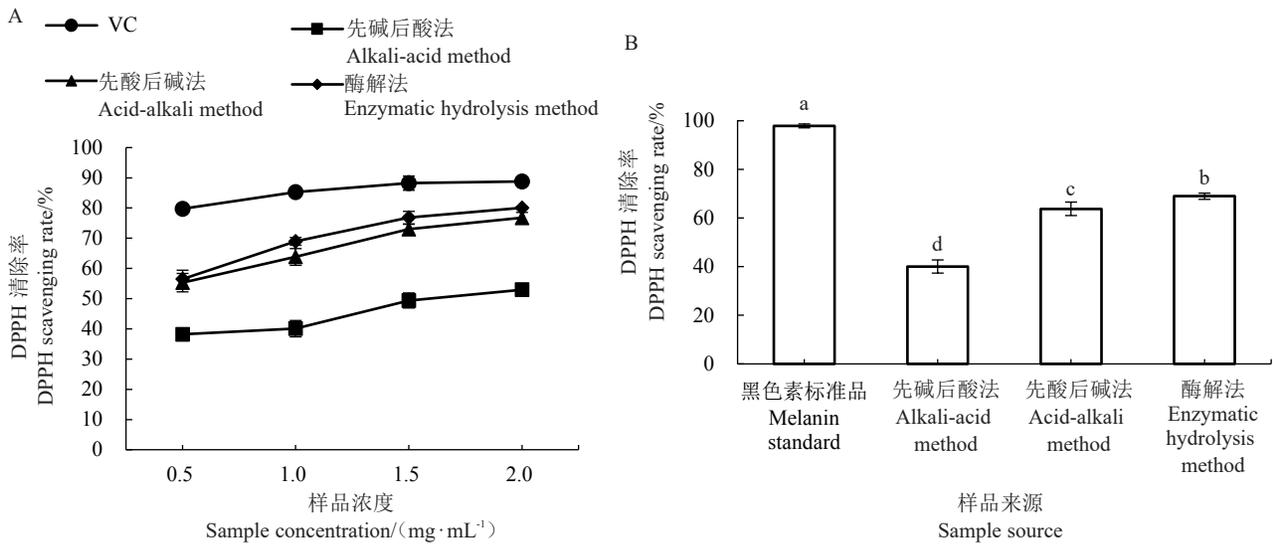


图2 黑木耳子实体不同提取工艺所得黑色素对 DPPH 的清除能力

Fig. 2 DPPH scavenging activity of melanin obtained from *A. heimuer* fruiting body different extraction process

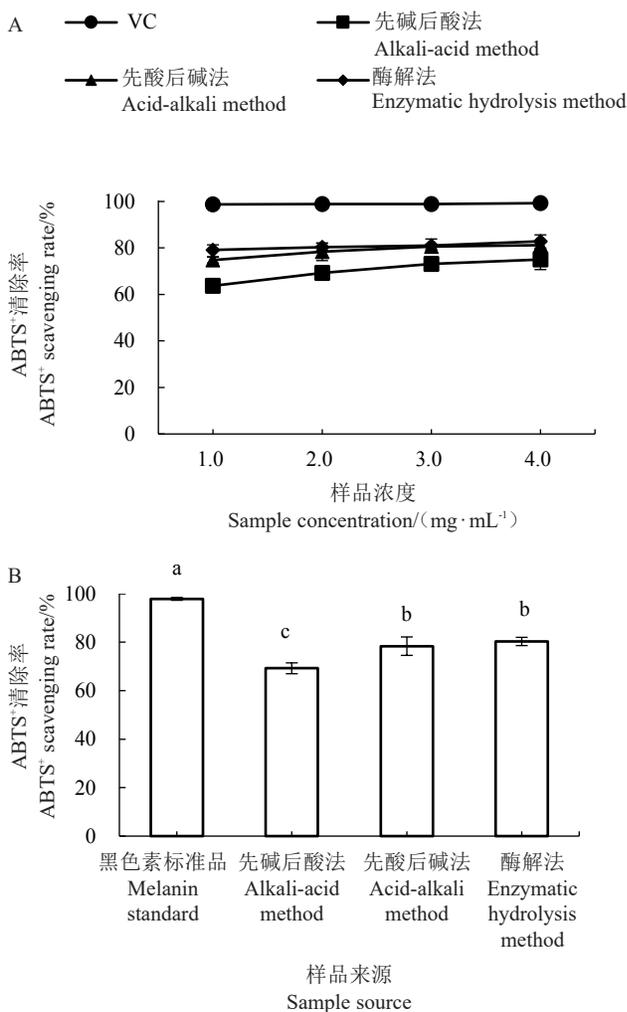


图3 黑木耳子实体不同提取工艺所得黑色素对 ABTS⁺的清除能力

Fig. 3 ABTS⁺ scavenging activity of melanin obtained from *A. heimuer* fruiting body different extraction process

的清除率(97.87%)。

(3)黑木耳子实体不同提取工艺所得黑色素对 O₂[·] 的清除能力如图 4-A 所示。不同提取工艺所得黑色素对 O₂[·] 清除率均随黑色素样品浓度增加而增加,当样品浓度为 2.0 mg·mL⁻¹ 时清除率均最高,先碱后酸法为 58.02%、先酸后碱法为 62.08%、酶解法为 63.47%,但均低于维生素 C,清除能力由强到弱依次为维生素 C>酶解法>先酸后碱法>先碱后酸法。

比较 1.0 mg·mL⁻¹ 黑色素样品溶液与 1.0 mg·mL⁻¹ 黑色素标准品溶液对 O₂[·] 的清除能力,如图 4-B 所示,先碱后酸法、先酸后碱法、酶解法黑色素样品溶液对 O₂[·] 清除率分别为 52.09%、54.15%、57.65%,均显著低于黑色素标准品溶液的清除率(79.75%)。

2.1.3 黑木耳子实体不同提取工艺所得黑色素 UV-Vis 扫描图 由图 5 可知,采用先碱后酸法、先酸后碱法、酶解法获得的黑木耳黑色素样品最大吸收峰在 238~257 nm 波长区间,与黑色素标准品一致。

2.2 不同来源黑木耳黑色素提取得率及生物学特性

2.2.1 不同来源黑木耳黑色素提取得率 分别从黑木耳液体发酵液、湿菌丝、固体发酵产物以及子实体中提取黑色素,黑色素得率见表 1。黑色素粉末如图 6 所示,液体发酵液中提取的黑色素呈黑色,湿菌丝的呈棕色,固体发酵的呈棕黑色,子实体的呈黄棕色。

2.2.2 不同来源黑木耳黑色素体外抗氧化能力 (1)不同来源黑木耳黑色素对 DPPH 的清除能力如

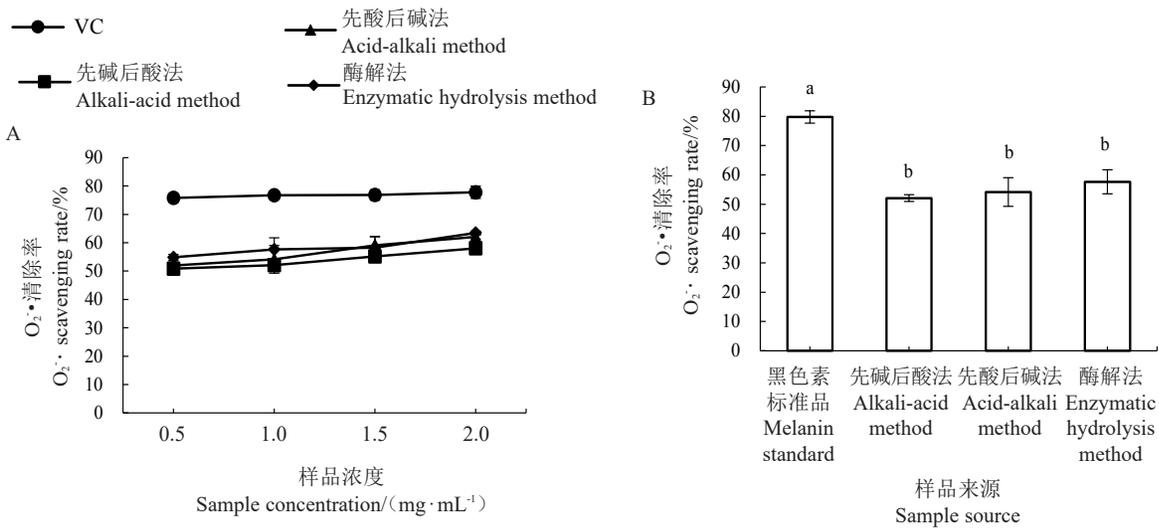


图4 黑木耳子实体不同提取工艺所得黑色素对O₂·的清除能力

Fig. 4 O₂· scavenging activity of melanin obtained from *A. heimu*er fruiting body different extraction process

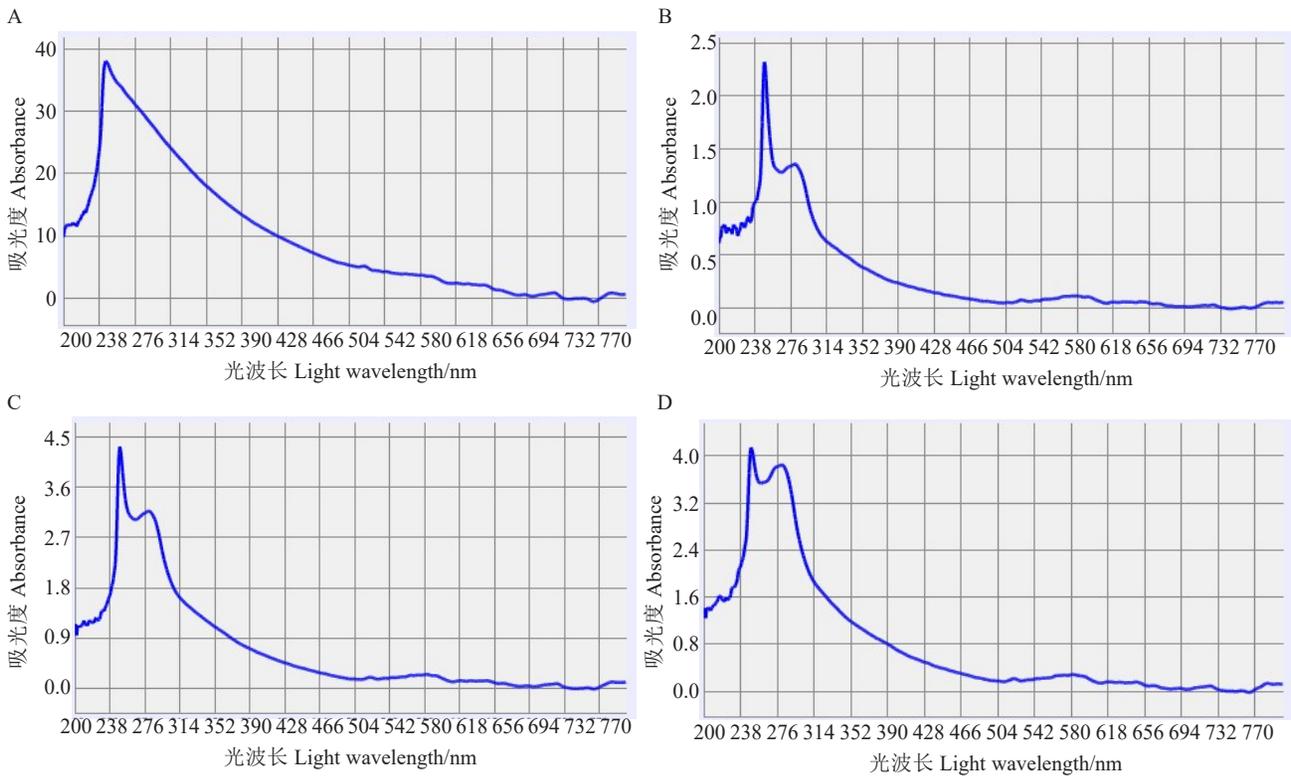


图5 黑色素标准品(A)和黑木耳子实体先碱后酸法(B)、先酸后碱法(C)、酶解法(D)所得黑色素UV-Vis图

Fig. 5 The UV-Vis spectra of melanin standard (A) and melanin obtained from *A. heimu*er fruiting body by alkali-acid method (B), acid-alkali method (C), enzymatic hydrolysis method (D)

图7-A所示。不同来源黑木耳黑色素对DPPH的清除率均随着黑色素样品浓度的增加而增加,当样品浓度为2.0 mg·mL⁻¹时清除率最高,液体发酵液为98.52%、湿菌丝89.00%、固体发酵产物为58.10%、子实体为80.08%,其中液体发酵液、湿菌丝黑色素清除率均高于维生素C(88.79%),固体发酵产物和子实体黑色素的清除率均低于维生素C,清

除能力由强到弱依次为液体发酵液>湿菌丝>维生素C>子实体>固体发酵产物。

比较1.0 mg·mL⁻¹黑色素样品溶液与1.0 mg·mL⁻¹黑色素标准品溶液对DPPH的清除能力,如图7-B所示。液体发酵液、湿菌丝、固体发酵产物、子实体黑色素样品溶液对DPPH的清除率分别为92.28%、82.49%、51.70%、68.97%,均显著低于黑色

表1 不同来源黑木耳黑色素提取得率

Table 1 Extraction rate of *A. heimuer* melanin from different sources

样品来源 Sample source	样品量 Sample size	黑色素含量 Melanin concentration/g	黑色素得率 Melanin yield/%
液体发酵液 Liquid fermentation broth	400 mL	0.68±0.06 c	0.17±0.02 c
湿菌丝 Wet mycelium	100 g	2.01±0.13 a	2.01±0.13 b
固体发酵产物 Solid fermentation products	400 mL	1.15±0.09 b	0.29±0.03 c
子实体 Fruiting body	20 g	1.90±0.09 a	9.49±0.43 a

注:不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。

Note: Different lowercase letters represent significant difference at 0.05 level.

素标准品溶液清除率(97.89%)。

(2)不同来源黑木耳黑色素对 ABTS⁺的清除能力如图 8-A 所示。不同来源黑木耳黑色素对 ABTS⁺的清除率均随着黑色素样品浓度的增加而增加,当样品浓度为 2.0 mg·mL⁻¹时清除率最高,液体发酵液为 93.18%、湿菌丝为 97.43%、固体发酵产物为 84.04%、子实体为 82.87%,但均低于维生素 C,清除能力由强到弱依次为维生素 C>湿菌丝>液体发酵液>固体发酵产物>子实体。

比较 1.0 mg·mL⁻¹ 黑色素样品溶液与 1.0 mg·mL⁻¹ 黑色素标准品溶液对 ABTS⁺的清除能力,如图 8-B 所示。液体发酵液、湿菌丝、固体发酵产物、子实体黑色素溶液对 ABTS⁺的清除率分别为 88.25%、95.40%、76.29%、80.30%,其中湿菌丝黑色素溶液与黑色素标准品溶液无显著差异,其余均显著低于黑



图6 不同来源黑木耳黑色素粉末

Fig. 6 *A. heimuer* melanin powder from different sources

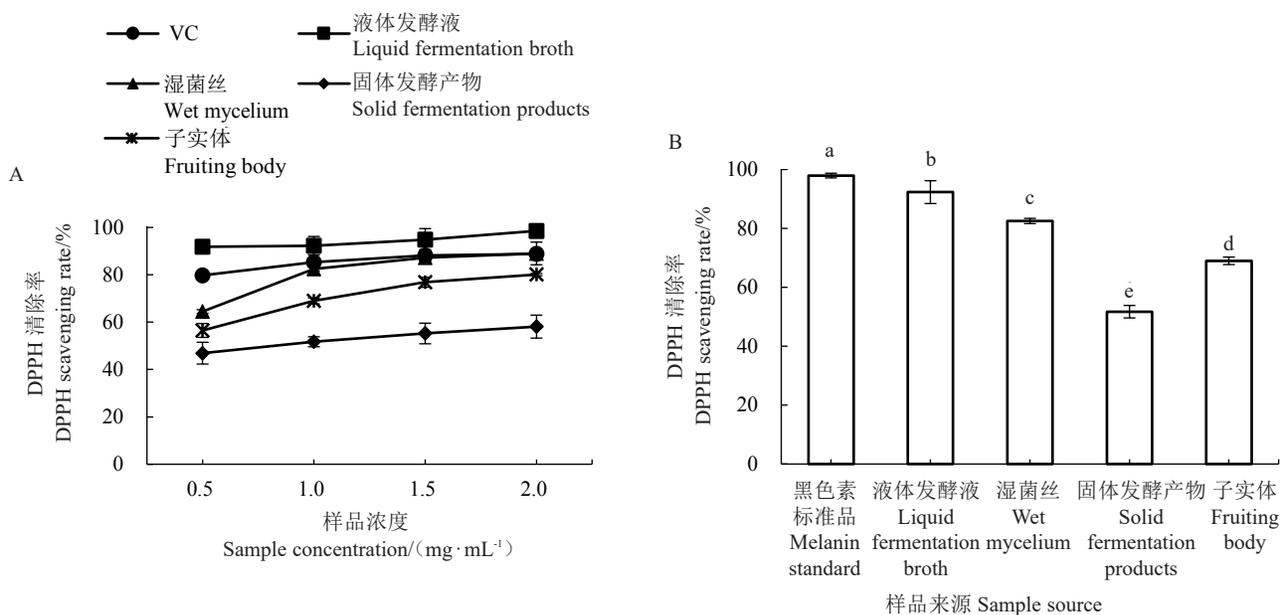


图7 不同来源黑木耳黑色素对 DPPH 的清除能力

Fig. 7 DPPH scavenging ability of *A. heimuer* melanin from different sources

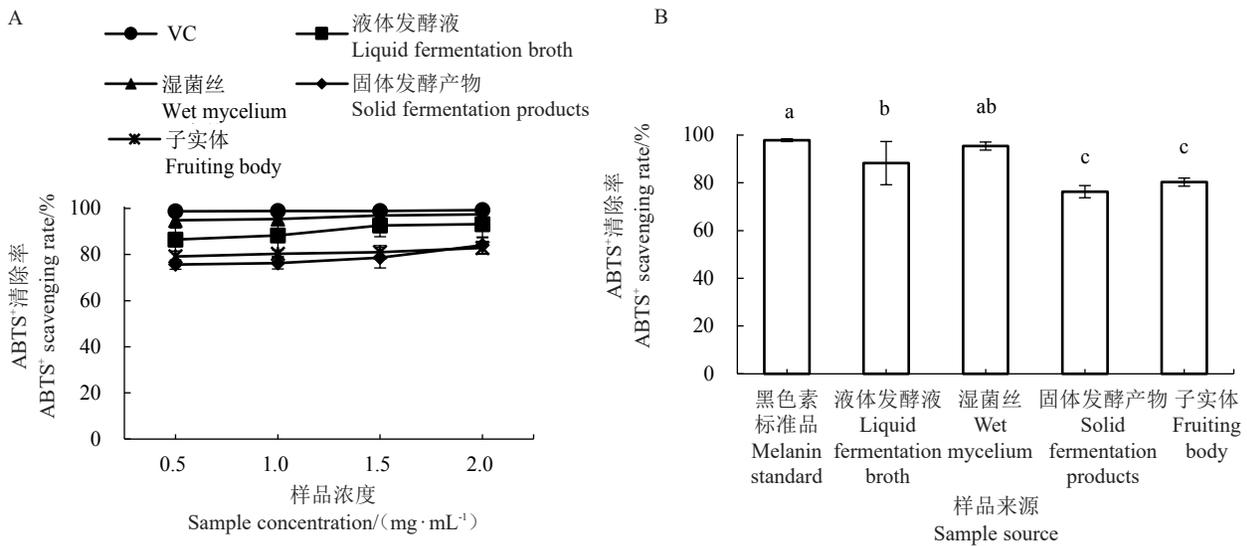


图8 不同来源黑木耳黑色素对 ABTS⁺ 的清除能力

Fig. 8 ABTS⁺ scavenging ability of *A. heimuier* melanin from different sources

色素标准品溶液清除率(97.87%)。

(3)不同来源黑木耳黑色素对 O₂[·] 的清除能力如图 9-A 所示,不同来源黑木耳黑色素对 O₂[·] 的清除率均随黑色素样品浓度增加而增加,当样品浓度为 2.0 mg·mL⁻¹ 时清除率最高,液体发酵液为 80.61%、湿菌丝为 72.44%、固体发酵产物为 70.22%、子实体为 63.47%。当样品浓度为 2.0 mg·mL⁻¹ 时液体发酵液对 O₂[·] 的清除率高于维生素 C,其他均低于维生素 C,清除能力由强到弱依次为液体发酵液>维生素 C>湿菌丝>固体发酵产物>子实体。

比较 1.0 mg·mL⁻¹ 黑色素样品溶液与 1.0 mg·mL⁻¹

黑色素标准品溶液对 O₂[·] 的清除能力,如图 9-B 所示。液体发酵液、湿菌丝、固体发酵产物、子实体 1.0 mg·mL⁻¹ 黑色素样品溶液对 O₂[·] 的清除率分别为 74.57%、55.59%、61.20%、57.65%,其中液体发酵液黑色素溶液与黑色素标准品溶液无显著差异,其他均显著低于黑色素标准品溶液清除率(79.75%)。

2.2.3 不同来源黑木耳黑色素 UV-Vis 扫描图 不同来源黑木耳黑色素 UV-Vis 扫描图如图 10 所示。黑色素标准品与不同来源黑木耳黑色素的 UV-Vis 光谱均在 238~257 nm 处有最大吸收峰,体现了光谱特性的一致性。

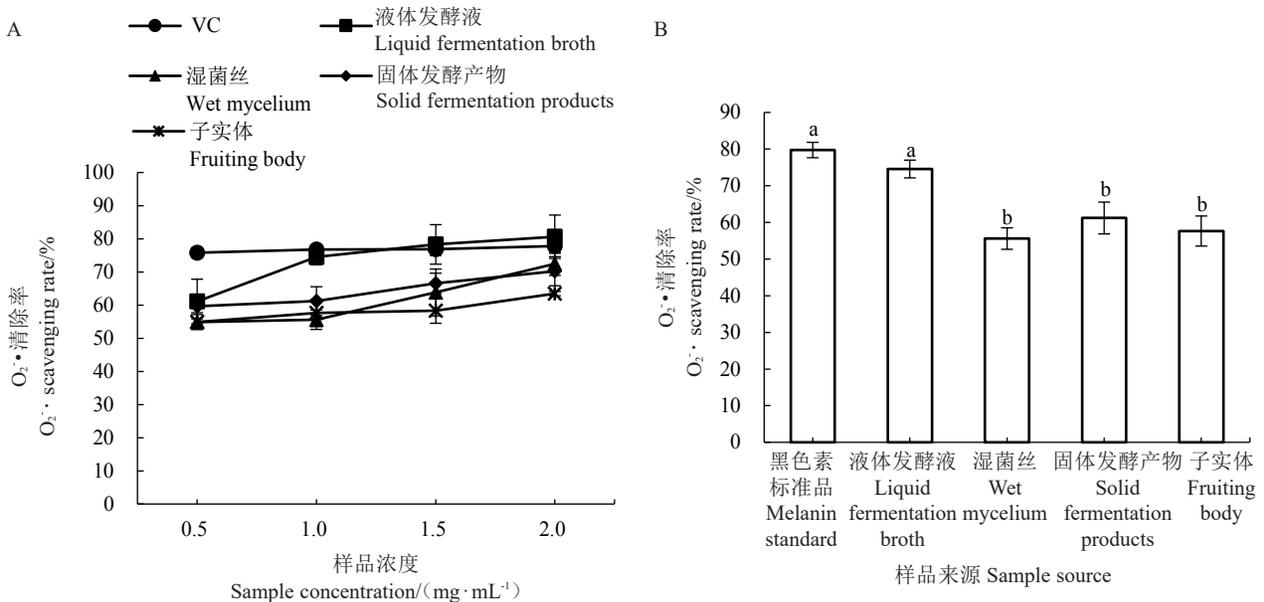


图9 不同来源黑木耳黑色素对 O₂[·] 的清除能力

Fig. 9 O₂[·] scavenging ability of *A. heimuier* melanin from different sources

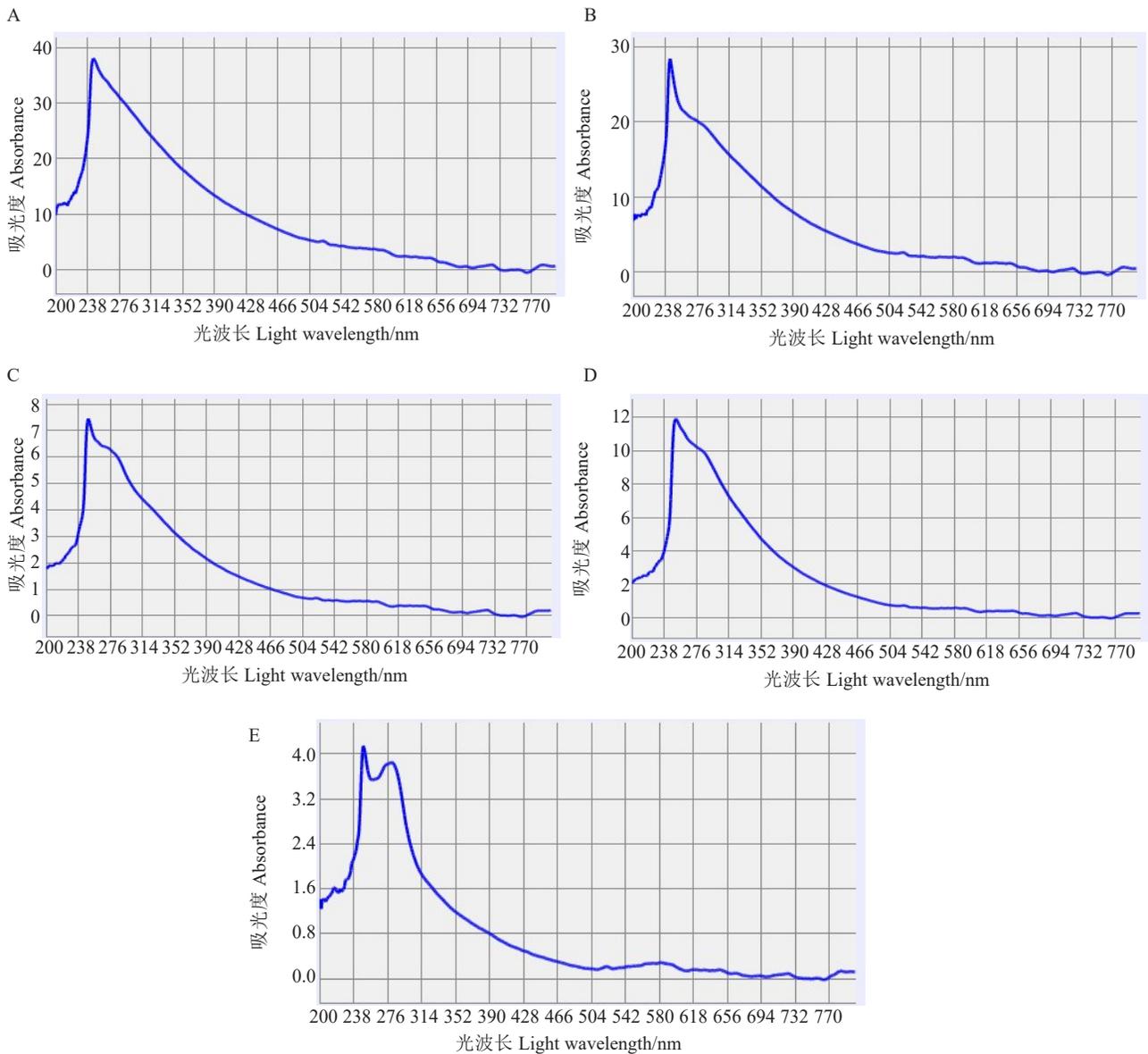


图 10 黑色素标准品(A)和液体发酵液(B)、湿菌丝(C)、固体发酵产物(D)、子实体(E)黑色素 UV-Vis 扫描图
 Fig. 10 The UV-Vis spectra of melanin standard (A) and melanin of liquid fermentation broth (B), wet mycelium (C), solid fermentation products(D), fruiting body (E)

3 讨论与结论

黑色素的制备通常基于其碱溶酸沉的特性,在酸沉过程中,酸性条件还能水解去除部分碳水化合物、脂质和蛋白质等杂质^[27]。黑木耳细胞壁成分简单,主要由几丁质(一种乙酰葡萄糖胺的多聚体)构成,此外还包含少量纤维素以及名为葡聚糖的葡萄糖多聚体^[28]。酶解法能够特异性地破坏细胞壁结构,提高活性物质的释放效率^[20]。超声辅助能极大地缩短提取时间并显著提高目标物的得率^[29]。

本研究采用超声辅助配合先碱后酸法、先酸后碱法和酶解法,从黑木耳子实体中提取黑色素,其

得率分别为 7.25%、8.73%和 9.49%,这与已有文献报道的数据相近。张艳荣等^[30]和李琦等^[31]采用超声波辅助碱溶酸沉法提取黑木耳子实体黑色素得率分别为 9.078%、9.107%;宋丹靓等^[32]采用超声波、微波联用辅助碱溶酸沉法提取黑木耳子实体黑色素,得率为 9.10%;侯若琳等^[24]利用纤维素酶-超声波协同提取黑木耳子实体黑色素,得率达 10.48%。当样品溶液浓度为 2.0 mg·mL⁻¹时,3 种提取工艺所得黑色素体外抗氧化能力分析显示,酶解法所得黑色素对 DPPH、ABTS⁺及 O₂^{·-}清除能力均最强。这表明酶解法不仅可以提高黑木耳子实体黑色素得率,还能在一定程度上增强其抗氧化能力,这与侯若琳

等^[24]和袁源等^[20]的研究结果一致。相较于依赖子实体的传统提取模式,液体发酵、固体发酵具有周期短、可控性强、不受原料采收季节限制等优势。

黑色素可分为呈黑色或棕色,含氮原子不含硫原子的真黑色素;呈棕黑色、黄棕色或棕色,含氮和硫原子的棕黑色素;呈黑色或棕色的异黑色素^[33]。李琦^[34]综合光谱特征(紫外-可见光谱、傅立叶红外光谱)与元素分析,初步证实从黑木耳子实体中获取的黑色素 MA.a 为棕黑色素。侯若琳^[35]通过采用光谱特征、元素分析、核磁共振氢谱和凝胶渗透色谱及等多种方法证明黑木耳子实体黑色素为真黑色素,同时发现纤维素酶-超声波协同提取工艺可以提高黑色素得率。Sun 等^[36]的研究表明,采用液体发酵获的黑木耳黑色素主要为真黑色素,可能伴有少量棕黑色素的混合物,酪氨酸可以促进黑色素的产生。综上,不同来源的黑木耳黑色素类型存在差异,通过发酵所获得的主要为真黑色素,而子实体中提取的黑色素则多为棕黑色素和真黑色素^[27]。

本研究分别从黑木耳液体发酵液、液体发酵菌丝、固体发酵产物及子实体4种来源提取黑色素,得率分别为0.17%、2.01%、0.29%、9.49%。所得黑色素粗品粉末分别呈黑色、棕色、棕黑色和黄棕色。进一步分析不同来源黑色素的体外抗氧化能力发现,样品浓度为0~2.0 mg·mL⁻¹时,液体发酵液黑色素对DPPH和O₂·⁻的清除率均高于其他3种来源,且对ABTS⁺的清除能力高于固体发酵培养基和子实体。综上所述,液体发酵液所得黑色素体外抗氧化能力最强,这一结果与郭燕等^[37]研究结果一致,此外其清除能力与UV-Vis光谱特性最接近黑色素标准品,可作为黑色素的优质来源。

综合分析表明,酶解法是黑木耳子实体黑色素提取的最佳方法,兼具最高得率(9.49%)与最强体外抗氧化活性,能有效保留黑色素的功能特性;液体发酵产物可作为黑色素的优质替代来源,产物中,发酵液和菌丝均可作为提取原料。其中采用发酵液提取的黑色素不仅对DPPH、O₂·⁻的清除率最高,且UV-Vis光谱与黑色素标准品相近。本研究为黑木耳黑色素功能产品的开发和高值化利用提供了理论依据。

参考文献

- [1] 卯明娟,洪鹏,刘迪,等.黑木耳菌株活力检测及优良菌株筛选[J].中国瓜菜,2025,38(2):66-74.
- [2] WANG J Y, MA Z H, WANG C T, et al. Melanin in *Auricularia auricula*: Biosynthesis, production, physicochemical characterization, biological functions, and applications[J]. Food Science and Biotechnology, 2024, 33(8): 1751-1758.
- [3] PAK S, CHEN F, MA L J, et al. Functional perspective of black fungi (*Auricularia auricula*): Major bioactive components, health benefits and potential mechanisms[J]. Trends in Food Science and Technology, 2021, 114: 245-261.
- [4] LIN Y C, CHEN H, CAO Y J, et al. *Auricularia auricula* melanin protects against alcoholic liver injury and modulates intestinal microbiota composition in mice exposed to alcohol intake[J]. Foods, 2021, 10(10): 2436.
- [5] ISLAM T, GANESAN K, XU B J. Insights into health-promoting effects of Jew's ear (*Auricularia auricula-judae*) [J]. Trends in Food Science and Technology, 2021, 114: 552-569.
- [6] HOU R L, LIU X, WU X P, et al. Therapeutic effect of natural melanin from edible fungus *Auricularia auricula* on alcohol-induced liver damage *in vitro* and *in vivo* [J]. Food Science and Human Wellness, 2021, 10(4): 514-522.
- [7] SUTHAR M, D UFOSSÉ L, SINGH S K. The enigmatic world of fungal melanin: A comprehensive review [J]. Journal of Fungi, 2023, 9(9): 891.
- [8] CHOI K Y. Bioprocess of microbial melanin production and isolation [J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2021, 9: 765110.
- [9] YANG X T, TANG C H, ZHAN Q Y, et al. Melanin: A promising source of functional food ingredient [J]. Journal of Functional Foods, 2023, 105: 105574.
- [10] MONTEFIORI D C, ZHOU J Y. Selective antiviral activity of synthetic soluble *L*-tyrosine and *L*-dopa melanins against human immunodeficiency virus *in vitro* [J]. Antiviral Research, 1991, 15(1): 11-25.
- [11] LIU R F, MENG X F, MO C Y, et al. Melanin of fungi: From classification to application [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2022, 38(12): 228.
- [12] GAUSLAA Y, SOLHAUG K A. Fungal melanins as a sun screen for symbiotic green algae in the lichen *Lobaria pulmonaria* [J]. Oecologia, 2001, 126(4): 462-471.
- [13] CHEN Y, XU M, WANG X Y, et al. Preparation of wood ear medicinal mushroom, *Auricularia auricula-judae* (Agaricomycetes), melanin and its antioxidant properties: evaluation *in vitro* and *in vivo* [J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2021, 23(6): 89-100.
- [14] 王雨亭,王淼,李元敬,等.黑木耳黑色素对缺铁性贫血诱导溃疡性结肠炎小鼠的保护作用[J].食品科学,2023,44(17): 110-117.
- [15] MA Z H, LIU X Y, LIU Y T, et al. Studies on the biosynthetic pathways of melanin in *Auricularia auricula* [J]. Journal of Basic Microbiology, 2022, 62(7): 843-856.
- [16] HOU R L, LIU X, YAN J J, et al. Characterization of natural melanin from *Auricularia auricula* and its hepatoprotective effect on acute alcohol liver injury in mice [J]. Food and Function, 2019, 10(2): 1017-1027.
- [17] LIU X, HOU R L, WANG D T, et al. Comprehensive utilization of edible mushroom *Auricularia auricula* waste residue: Extrac-

- tion, physicochemical properties of melanin and its antioxidant activity[J]. *Food Science and Nutrition*, 2019, 7(11):3774-3783.
- [18] 楚福英,王淼,李元敬,等.黑木耳黑色素对缺铁性贫血小鼠生理指标及肠道菌群的影响[J]. *食品科学*, 2023, 44(5):128-135.
- [19] 周建良,王怀雨,童丽萍.天然黑色素的提取、改性和应用[J]. *科学通报*, 2023, 68(11):1406-1420.
- [20] 袁源,阎熠晗,吴福泉,等.复合酶提取黑木耳黑色素的工艺优化及其抗氧化活性分析[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2022, 50(6):121-130.
- [21] 任燕玲,杨柳,高莉,等.黑色素金属螯合物的研究进展及应用[J]. *材料导报*, 2020, 34(6):11145-11152.
- [22] ZOU Y, TIAN M. Fermentative production of melanin by *Auricularia auricula*[J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2016, 41(3):e12909.
- [23] 李玉玲,赵利维,高颖颖,等.外源因素对黑木耳菌株生长、黑色素产量及酪氨酸酶活性的影响[J]. *中国食用菌*, 2023, 42(3):35-41.
- [24] 侯若琳,袁源,项凯凯,等.纤维素酶-超声波协同提取黑木耳黑色素工艺及其抗氧化活性分析[J]. *菌物学报*, 2019, 38(3):414-427.
- [25] 张敏.木耳黑色素的发酵制备及其抗氧化活性[D].浙江温州:温州大学,2015.
- [26] MA Y P, ZHANG P Q, DAI X D, et al. Extraction, physicochemical properties, and antioxidant activity of natural melanin from *Auricularia auricula* fermentation[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2023, 10:1131542.
- [27] 陈雅,徐苗,王欣宜,等.黑木耳黑色素的研究综述[J]. *海南师范大学学报(自然科学版)*, 2021, 34(1):63-69.
- [28] 鲜乔,张拥军,蒋家新,等.胞壁溶解酶用于黑木耳破壁提取工艺的研究[J]. *中国食品学报*, 2012, 12(3):96-103.
- [29] LU M, YU M, SHI T Y, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of melanin and its hypoglycemic activities from *Sporisorium reilianum*[J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2020, 44(9):e14707.
- [30] 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.
- [31] 李琦,侯丽华,刘鑫,等.黑木耳黑色素鉴定及提取工艺优化[J]. *食品科学*, 2010, 31(16):87-92.
- [32] 宋丹靓敏,么宏伟,曾伟民,等.响应面法优化超声微波联用辅助提取黑木耳黑色素工艺[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(7):162-170.
- [33] 邹宇.发酵法制备黑木耳色素及其功能特性研究[D].南京:南京农业大学,2011.
- [34] 李琦.黑木耳黑色素的提取、纯化及其活性研究[D].武汉:华中农业大学,2011.
- [35] 侯若琳.黑木耳黑色素对酒精肝损伤的体内、体外药效学研究[D].福州:福建农林大学,2019.
- [36] SUN S J, ZHANG X J, SUN S W, et al. Production of natural melanin by *Auricularia auricula* and study on its molecular structure[J]. *Food Chemistry*, 2016, 190:801-807.
- [37] 郭燕,韩闯,田爽,等.3种来源黑木耳黑色素的性质及其体外抗氧化活性比较[J]. *食品研究与开发*, 2024, 45(13):63-69.