

# 产天然色素黑木耳菌株的筛选 及其理化性质研究

孙淑静 邹峰 徐建中 苏伟灵 胡开辉

(福建农林大学 生命科学学院, 福建 福州 350002)

**摘要:**通过大量培养不同来源的92个黑木耳菌株,筛选得到1株高产红褐色色素的菌株,命名为Aua09,提取其产生的色素,并研究pH、温度、光照、氧化剂、还原剂对色素稳定性的影响。结果表明:该色素的最大吸收峰为304 nm,易溶于碱性溶液,溶于甲醇、丙酮、乙醇等有机溶剂,不溶于乙醚。酸性条件下,色素溶解度随pH降低而减小,pH值为2以下时色素基本上全部沉淀;光对色素稳定性影响不大,有较好的耐高温性能,抗氧化还原性强。

**关键词:**黑木耳;天然色素;理化性质

中图分类号:S646.6;Q815 文献标识码:A 文章编号:1000-2286(2010)01-0159-04

## A Study on Screening of *Auricularia auricular* Producing Natural Pigment and Its Physicochemical Properties

SUN Shu-jing, ZOU Feng, XU Jian-zhong, SU Wei-ling, HU Kai-hui

(College of Life Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:** The strain Aua09, which can produce pigment, was selected by large-scale cultivation of 92 strains of *Auricularia auricular* from different origins. The effects of physicochemical factors including pH, temperature, light, oxidizing agent and reductant on the extracted pigment were studied. The pigment was soluble in alkaline solution, and the maximum absorption wavelength was 304 nm in alkaline solution. The pigment is well dissolved in alkaline solution, dissolved methanol, acetone, and not dissolved in ethyl ether. In acidic solution, the pigment deposits at pH 2. Its solubility increases with pH. The pigment solution is relatively stable under the irradiations of sunlight and very stable after treated with high temperature in alkaline solution. The pigment is resistant to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NaHSO<sub>3</sub>.

**Key words:** *Auricularia auricular*; natural pigment; physicochemical properties

随着社会经济的发展和人们生活水平的提高,越来越多的人对食品中使用合成色素会不会对人体健康产生危害提出了疑问。与此同时,有研究报告也指出,几乎所有的合成色素都不能向人体提供营养物质,某些合成色素甚至会危害人体健康<sup>[1]</sup>。天然色素具备合成色素所不具有的优点:安全、无毒、色泽自然,很多天然色素中含有人体必需的营养物质和药用价值<sup>[2]</sup>,因此开发“天然、营养、多功能”的天然食用色素已势在必行。目前在我国的天然色素中,占市场主导地位的是从植物中提取的色素,从植物

收稿日期:2009-08-28 修回日期:2009-11-12

基金项目:福建省自然科学基金资助项目(2009J05046)和福建省教育厅科技项目(JA09098)

作者简介:孙淑静(1978-),女,讲师,博士,主要从事食用菌活性成分与分子生物学研究。E-mail:shjsun2004@126.com。

中提取色素,因其资源有限,原生产工艺复杂,提取率低等诸多条件的制约,发展潜力有限。而利用微生物资源生产天然色素,克服以动植物为原料生产天然色素的诸多缺点,并且易于工业化。因此,采用微生物生产天然色素将逐渐成为天然色素来源的主流<sup>[3]</sup>。

黑木耳(*Auricularia auricular*)又名木耳、细木耳、光木耳等,其营养丰富、食味鲜美,而且是药用价值较高的食用真菌,是世界公认的保健品<sup>[4]</sup>。本文正是着眼于微生物发酵的优点和黑木耳本身具有的保健功能,利用黑木耳发酵产色素,对其进行液体发酵培养,从中提取色素,同时对该色素理化性质进行研究,以期开拓食用真菌资源的利用,为天然色素的开发应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试菌株 由福建农林大学菌物研究中心提供来自不同地区的 92 个黑木耳菌株。

1.1.2 培养基 PDA 固体培养基(g/L):马铃薯 200,葡萄糖 20,琼脂 20;PDA 液体培养基(g/L):马铃薯 200,葡萄糖 20。

### 1.2 方法

1.2.1 产天然色素黑木耳菌株的筛选 将收集到的 92 株黑木耳菌株分批接种到装 100 mL PDA 液体培养基的 250 mL 三角瓶中,在 30 ℃ 200 r/min 下进行摇瓶发酵培养,观察记录发酵液的颜色变化,筛选出能够产生天然色素的菌株。

1.2.2 黑木耳发酵产天然色素的提取与纯化 在 250 mL 三角瓶中装入 100 mL PDA(pH 自然)培养基,每瓶接入 4 个单位菌块,在 30 ℃ 200 r/min 下摇床培养 8 d。发酵液 10 000 r/min 离心 15 min,去除菌体,取上清,用 7 mol/L HCl 调 pH 值至 2.0,摇匀,静置 2 h。将以上液体 10 000 r/min 离心 15 min,弃上清,沉淀于冷冻干燥机中干燥,所得即为色素粗提物。

将色素粗提物加 5 mL 的 7 mol/L HCl,充分混匀,沸水浴 2 h,10 000 r/min 离心 15 min。沉淀用 1 mol/L KOH 溶解,再用 7 mol/L HCl 调 pH 值至 2.0,10 000 r/min 离心 15 min,沉淀用 0.01 mol/L HCl、蒸馏水依次洗涤,10 000 r/min 离心 20 min,冷冻干燥机中干燥 24 h 后,-20 ℃ 保存。

1.2.3 色素的溶解性 (1)有机溶剂溶解性。称取 5 mg 色素提取物样品 4 份,分别放在装有 3 mL 丙酮、甲醇、乙醇、乙醚的试管内,并轻轻摇动,30 min 后观察溶解情况。

(2)水溶液溶解性。称取 5 mg 色素提取物样品 3 份,分别放在装 3 mL 蒸馏水、0.1 mol/L KOH、0.1 mol/L HCl 溶液的试管中,充分混匀,30 min 后观察色素溶解情况。再将试管置于 80 ℃ 中水浴 20 min,观察溶解情况。

1.2.4 色素的光谱特征 (1)该色素的紫外可见吸收光谱。称取色素 5 mg,用 50 μL 0.1 mol/L KOH 溶解后,加蒸馏水补足至 10 mL,用 UV-1800 型紫外可见光光度计进行光谱扫描,以蒸馏水为参照。选取扫描波长为 300~360 nm。

(2)色素的红外吸收光谱。将该色素取 2 mg,加入 200 mg KBr,干燥处理下混合研磨至粉状,压成透明薄片,400~4 000 cm 扫描。

1.2.5 色素的稳定性 (1)温度对黑木耳色素稳定性的影响。将样品液分别放入温度为 60,80,100 ℃ 的水浴锅中加热 0,1,2,3,4,5,6,7,8 h,然后在波长 304 nm 分别检测其吸光度(OD)值。

(2)光对黑木耳色素稳定性的影响。将色素样品液置于在 3 000 lx 的光照强度下分别照射 0,1,2,3,4,5 d,然后在波长 304 nm 分别检测其吸光度(OD)值。

(3)pH 值对黑木耳色素稳定性的影响。将色素溶液 pH 值分别调节到 2,4,6,8,10,12,该色素在不同 pH 值下吸光度变化。

(4)氧化剂和还原剂对黑色素稳定性的影响。分别在 5 mL 色素样品液中加入 10% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 NaHSO<sub>3</sub> 溶液 0,1,2,3,4,5 mL,用蒸馏水补足 10 mL。混合后静置 10 min,在 304 nm 处检测其吸光度(OD)值。

## 2 结果与分析

### 2.1 产天然色素黑木耳菌株的筛选结果

在培养的 92 株黑木耳中,筛选出 2 株能产生色素的菌株,其发酵液颜色发生明显变化。其中 2 株产生的色素使发酵液变为红褐色,分别是 Au. a7 和 Au. a09。其余黑木耳菌株的发酵液随着营养物质被利用,色泽变得清透,但颜色并无明显变化。比较筛选出的 2 株黑木耳,以 Au. a09 产生的颜色最深,该菌株发酵液的颜色呈红褐色,色泽光亮,发酵液经沉淀提取冷冻干燥得到粉末状色素粗产品,颜色不发生变色。且产生色素较快,约 4~6 d。故本实验采用 Au. a09 作为主要研究材料。

### 2.2 色素的溶解性

该色素易溶于碱性溶液,微溶于酸性溶液。酸性条件下,色素溶解度随 pH 降低而减小,pH=2 以下时色素基本上全部沉淀。碱性条件下,色素溶解度随着 pH 增大,溶液颜色越来越深。色素可溶于甲醇、乙醇和丙酮,但溶解性不大,溶解程度从大到小依次为:甲醇,乙醇,丙酮,不溶于乙醚。

### 2.3 色素的光谱特征

2.3.1 该色素的紫外可见吸收光谱 色素碱性溶液的紫外可见吸收光谱结果如图 1。从图 1 中可以看出,该色素最大的吸收峰在 304 nm。

2.3.2 色素的红外吸收光谱 色素的红外吸收光谱扫描见图 2,从图 2 可以看到,在 3 432.68 cm<sup>-1</sup> 出现吸收峰是因为 -OH、-NH<sub>2</sub> 的伸展振动,1 651.45 cm<sup>-1</sup> 处主要是 C=C、-COO-、C=O 伸展振动引起。在上述 2 个特征峰及 2 927.93 cm<sup>-1</sup> 处的特征峰与李建波等<sup>[5]</sup>报道的黑色素红外吸收光谱所处位置较为接近。

### 2.4 色素的稳定性

2.4.1 温度对黑木耳色素稳定性的影响 该色素的热稳定性试验结果见图 3,在同一温度下,随着水浴时间的延长,色素溶液颜色无明显变化。另一方面,水浴相同时间,温度越高,色素溶液颜色加深,说明温度有助于色素的溶解。而室温下放置的色素溶液,在 8 h 内吸光度保持不变。说明该色素在碱性条件下对热比较稳定。

### 2.4.2 光对黑木耳色素稳定性的影响

光照不同照射时间对色素的影响检测结果如图 4 所示,随着光照时间的增加,色素溶液的吸光度呈现的

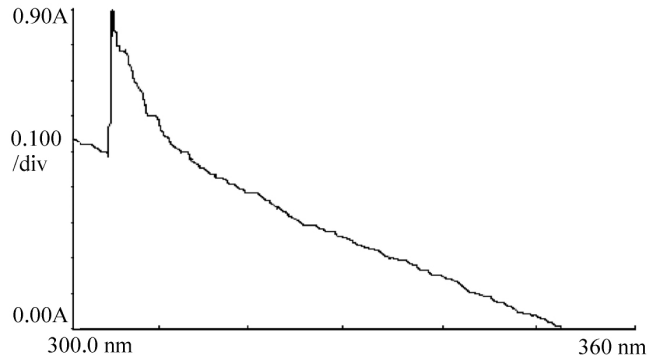


图 1 黑木耳色素溶液紫外-可见光谱

Fig. 1 Ultraviolet-visible spectrogram of the pigment

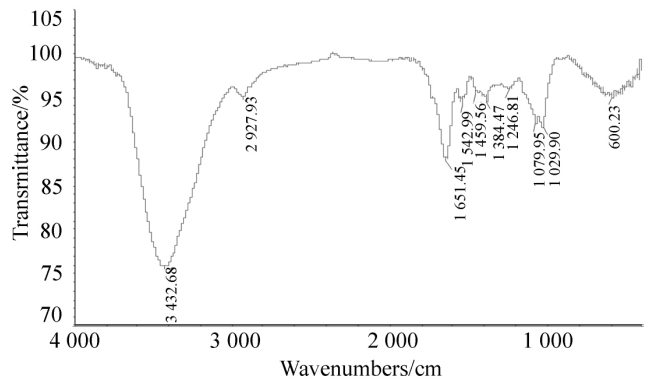


图 2 黑木耳色素红外光谱图

Fig. 2 Infrared spectra of the pigment

$$\text{波数}(\text{cm}^{-1}) = 10^4 / \text{波长}(\mu\text{m}) \quad A = \log_{10} 1/T) .$$

(In figure, wavenumbers (cm<sup>-1</sup>) = 10<sup>4</sup>/wavelength (μm), A = log<sub>10</sub> 1/T).

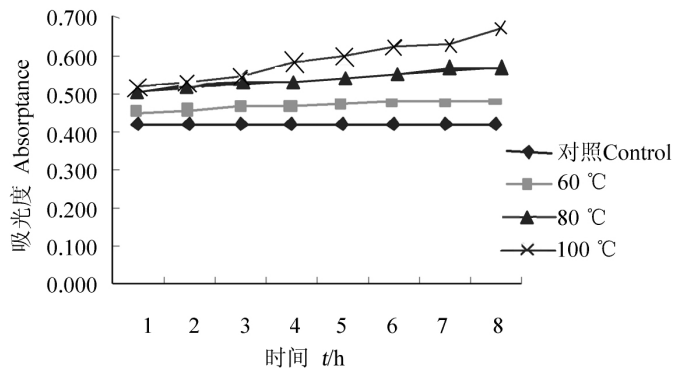


图 3 不同温度、不同处理时间对黑木耳所产色素稳定性的影响  
Fig. 3 The stability of the pigment produced by *Auricularia auricula* in different time and temperature

下降趋势,原液的吸光度为 0.873,到第 5 天,吸光度就下降为 0.698,说明该色素对光相对稳定,但不适宜长期在强光下照射。

2.4.3 pH 值对黑木耳色素稳定性的影响 不同 pH 条件下对色素影响检测结果如图 5。由图 5 可看出,随着 pH 值的升高,OD 值有增高趋势,色素的颜色在 pH = 2 时由红褐色变为略带黄棕色,并有沉淀析出。这与色素溶解性的研究结果一致,水溶液酸性越强则溶解度越低,而在碱性条件下溶解度高。

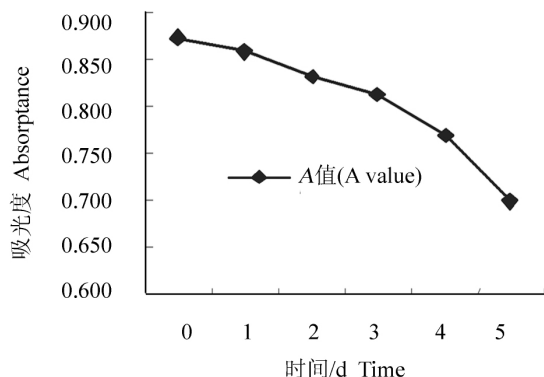


图 4 光照对黑木耳色素稳定性的影响

Fig. 4 Effects of light on the stability of the pigment produced by *Auricularia auricula*

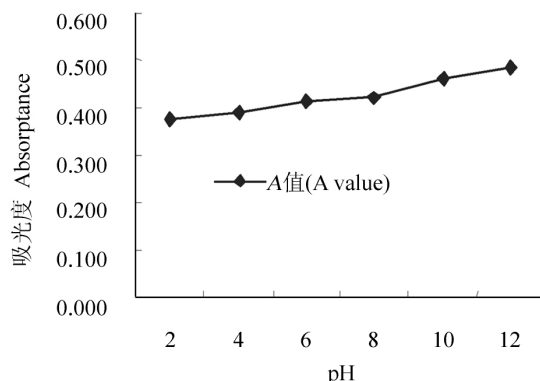


图 5 pH 值对黑木耳色素稳定性的影响

Fig. 5 Effects of pH value on the stability of the pigment produced by *Auricularia auricula*

2.4.4 氧化剂和还原剂对黑色素稳定性的影响 氧化剂和还原剂对黑色素稳定性的影响的检测结果如表 1,氧化剂 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、还原剂 NaHSO<sub>3</sub> 的加入均使色素的吸光度有所增大,并且随着氧化剂或还原剂加入的量增加,OD 值增大,说明氧化剂和还原剂可增强该色素颜色。

表 1 氧化剂和还原剂对色素稳定性的影响(304 nm)

Tab. 1 Effect of oxidizing agent and reductant on the pigment stability (304 nm)

色素液/mL	5	5	5	5	5	5
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /mL	0	1	2	3	4	5
吸光值 A Value	0.206	0.286	0.325	0.349	0.384	0.401
NaHSO <sub>3</sub> /mL	0	1	2	3	4	5
吸光值 A Value	0.168	0.172	0.184	0.208	0.266	0.328

### 3 讨论

本实验经过大量黑木耳菌株的培养,获得 1 株高产色素的菌株 Aua09,并从温度、光照、pH、氧化剂、还原剂几方面对该色素的稳定性进行了研究,结果表明该色素的热稳定性相当好,光稳定性相对较好,但不适宜长时间暴露在强光下。10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 10% NaHSO<sub>3</sub> 对色素有一定的加深作用,说明该色素的抗氧化性和耐还原性都很好,在碱性条件下色素颜色加深,说明该色素可以应用于热加工的食品中,加工和使用该色素时,无需刻意避免与氧化剂还原剂的接触。

现在已有许多种类的微生物被发现可以产生天然色素,倪丽姝<sup>[5]</sup>发现坚强芽孢杆菌 (*Bacillus firmus*) BFHM2002 经酪氨酸诱导可显著提高黑色素产量。赵东红等<sup>[6]</sup>用 1 株链霉菌 (*Streptomyces*) IS-1 发酵可产生蓝色的天蓝菌素。袁保红等<sup>[7]</sup>分离出 1 株海洋细菌 (*Pseudomonas sp.*) 产灵菌红素。由此可见,目前利用微生物资源生产天然色素细菌居多,在食药真菌发酵生产色素的报道较少,Yang 等<sup>[8]</sup>利用竹黄发酵产生竹红菌素,并优化了产色素的发酵条件,色素产量最高达 (196.94 ± 6.93) mg/L。本研究利用黑木耳发酵生产天然色素,原料易得,提取方法简单,生产周期短,发酵液及菌丝体含有多糖,安全无毒,具有一定的营养价值和生理功能,是值得开发和应用的天然色素。该色素外观特征呈红褐色,红外光谱扫描特征峰与李建波等<sup>[9]</sup>报道的黑色素的相近,因此对于本色素的化学结构分析、功能性质及安全性、药理作用和发酵条件我们将作进一步的研究。

(下转第 174 页)

## 参考文献:

- [1] 铁军, 白海艳. 芦荟的综合利用现状与发展趋势[J]. 中国野生植物资源 2006, 25(4): 22-24.
- [2] 张连富, 季宏武. 药食兼用资源与生物活性成分[M]. 北京: 化学工业出版社 2005: 146-147.
- [3] 戴光胜, 聂凌鸿. 芦荟功能性食品资源的开发利用[J]. 现代食品科技 2006, 9(2): 271-274.
- [4] 姚立华, 何国庆, 陈启和. 芦荟活性成分的生物学作用研究进展[J]. 科技通报 2007, 23(6): 812-815.
- [5] 蔡健. 芦荟的功能成分与保健功效[J]. 食品与药品 2006, 8(08A): 27-30.
- [6] 铁军, 白海艳, 赵芳芳. 芦荟的综合利用现状与发展趋势[J]. 中国野生植物资源 2006, 25(4): 22-24.
- [7] 鄢贵龙. 大孔树脂对葛根素吸附行为的研究[J]. 食品工业科技 2007, 28(1): 63-65.
- [8] 雍晓静, 刘钢, 张境. 应用大孔树脂分离纯化枸杞叶总黄酮的研究[J]. 宁夏大学学报: 自然科学版 2005, 26(2): 148-150.
- [9] 朱中贵, 蔡光明, 王峰, 等. 大孔树脂纯化艾叶总黄酮的研究[J]. 解放军药学学报 2009, 25(1): 10-13.
- [10] 杨武英, 上官新晨, 徐明生, 等. 聚酰胺树脂精制青钱柳黄酮的研究[J]. 天然产物研究与开发 2008, 20(2): 320-324.
- [11] 洪艳平, 上官新晨, 刘楠, 等. 枸骨叶总黄酮提取与测定[J]. 江西农业大学学报 2008, 30(3): 529-533.
- [12] 杨武英, 上官新晨, 周志娥, 等. 柑桔皮总黄酮提取工艺的研究[J]. 江西农业大学学报 2009, 31(2): 345-349.

(上接第 162 页)

## 参考文献:

- [1] 余焕玲, 杨参, 阙建全. 食品中食用天然色素的应用[J]. 广州食品科技 2001, 17(3): 63-65.
- [2] 陈纯馨, 陈忻, 吕嘉明. 竹叶叶绿素的提取及其性质研究[J]. 食品工业科技 2001, 22(5): 11-12.
- [3] 王君, 张宝善. 微生物生产天然色素的研究进展[J]. 微生物学通报 2007, 34(3): 580-583.
- [4] 曹雷, 陈红君. 黑木耳多糖的研究进展[J]. 长春师范学院学报: 自然科学版 2009, 28(2): 57-60.
- [5] 倪丽娜. 一株高产黑色素细菌的分离及鉴定[J]. 微生物学通报 2004, 31(1): 55-59.
- [6] 赵东红, 陆玲, 秦怀兰. 一种微生物发酵产蓝色素的稳定性及毒性研究[J]. 食品与发酵工业 1998, 24(5): 21-24.
- [7] 袁保红, 杜青平, 蔡创华. 海洋细菌 *Pseudomonas sp.* 色素的提取及稳定性的研究[J]. 海洋通报 2005, 24(6): 92-96.
- [8] Yang Hai long, Xiao Cai xia, Ma Wen xin et al. The production of hypocrellin colorants by submerged cultivation of the medicinal fungus *Shiraia bambusicola* [J]. Dyes and Pigments 2009, 82: 142-146.
- [9] 李建波, 宋欣, 田敏, 等. 粗糙脉孢菌产黑色素条件优化及黑色素物理特性研究[J]. 山东大学学报: 理学版 2004, 30(4): 120-123.